

羊布鲁氏菌的分泌蛋白质组分析

王玉飞^{1**} 曲 勍^{1,2**} 乔 凤^{1,2} 钟志军¹ 杜昕颖¹ 汪舟佳¹ 陈泽良¹ 黄留玉^{1*}

(1. 军事医学科学院疾病预防控制所 北京 100071)

(2. 吉林大学公共卫生学院 人畜共患病教育部重点实验室 吉林 长春 130021)

摘 要: 分泌蛋白是指那些分泌到细胞外的蛋白质。布鲁氏菌的分泌蛋白可能介导了病原与宿主之间的相互作用, 在布鲁氏菌的毒力方面发挥一定的作用, 但是研究方法的局限性限制了分泌蛋白的研究。本文报道了利用蛋白质组的方法来寻找羊布鲁氏菌的分泌蛋白。首先用 TCA-丙酮法提取布鲁氏菌培养上清中的分泌蛋白, 双向电泳进行分离, 然后用质谱来鉴定这些蛋白, 最终鉴定到 40 种蛋白。通过生物信息学分析, 发现这些蛋白主要是 ABC 转运系统的底物结合蛋白、外膜蛋白和热休克蛋白。这些蛋白的识别不仅有助于对布鲁氏菌致病机制的理解, 而且也可作为布鲁氏菌病的疫苗研制提供靶标蛋白。

关键词: 布鲁氏菌, 分泌蛋白, 双向电泳, 质谱

Proteome Analysis of Secreted Proteins of *Brucella melitensis*

WANG Yu-Fei^{1**} QU Qing^{1,2**} QIAO Feng^{1,2} ZHONG Zhi-Jun¹ DU Xin-Ying¹
WANG Zhou-Jia¹ CHEN Ze-Liang¹ HUANG Liu-Yu^{1*}

(1. Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

(2. School of Public Health, Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

Abstract: Secreted proteins (the secretome) of the *Brucella* may mediate important pathogen-host interactions, but such proteins are technically difficult to analyze. In the present study, we describe an approach to identify *Brucella melitensis* secreted proteins by using proteome analysis. TCA-acetone was used to recovery extracellular proteins from the culture of *Brucella melitensis*, and two-dimensional gel electrophoresis followed by mass spectrometry for protein resolution and identification. At last, 40 proteins were identified. These proteins included substrate-binding proteins of ABC transporters, outer membrane proteins and heat shock proteins. The identification of these secreted proteins provides important clues for the understanding of the molecular mechanism of *Brucella* and interesting candidates for the vaccine to treat or prevent *Brucella* infections.

Keywords: *Brucella*, Secreted protein, Two-dimension electrophoresis (2-DE), Mass spectrometry

布鲁氏菌病(Brucellosis, 简称布病)是由布鲁氏菌引起的一类动物源性疾病, 是重要的人兽共患传

染病, 在世界各地都有广泛流行, 尤其是发展中国家。布鲁氏菌(*Brucella*)可感染人类、多种家畜和野

基金项目: 国家“十一五”重大专项子课题(No. 2008ZX1004-015); 国家 863 计划项目(No. 2007AA02Z412)

* 通讯作者: Tel: 86-10-66948301; 信箱: huangly@nic.bmi.ac.cn

**同为第一作者

收稿日期: 2009-03-19; 接受日期: 2009-05-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

生动物, 病人主要症状为慢性关节炎及神经损伤, 病畜主要表现为流产和不育。1985年WHO布病专家委员会把布鲁氏菌属分为6个菌种: 牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)、羊种布鲁氏菌(*B. melitensis*)、猪种布鲁氏菌(*B. suis*)、沙林鼠种布鲁氏菌(*B. neotomae*)、绵羊附睾种布鲁氏菌(*B. ovis*)和犬种布鲁氏菌(*B. canis*)。我国布病的流行总体上系以羊种布鲁氏菌为主的混合感染。布鲁氏菌是一种胞内寄生菌, 胞内生存和复制是布鲁氏菌的主要毒力特征。布鲁氏菌主要是通过改变吞噬体的成熟过程来避免吞噬体与溶酶体的融合, 从而使得细菌可以抵达其胞内复制部位内质网, 开始大量复制^[1]。然而, 此过程的调控机制至今尚未阐明。

不同功能的蛋白质通过相应的分选信号与严格的运输途径, 准确地定位到相应的细胞器中, 或被分泌到细胞外发挥功能, 其中分泌到细胞外的蛋白质称为分泌性蛋白质, 简称分泌性蛋白或分泌蛋白(Secreted protein)。对于病原菌来说, 许多胞外蛋白是毒素、粘附素和决定毒力的酶。对于胞内寄生菌来说, 分泌蛋白尤为重要, 因为这些蛋白可直接与宿主细胞发生作用。分泌性蛋白通过内分泌、旁分泌、自分泌等途径发挥作用, 全面系统的研究分泌性蛋白不仅有助于全面认识、分析和解释各种生理和病理现象, 而且也为药物等的开发提供更多的选择。分泌性蛋白是目前生物学界研究的热点和难点, 其研究策略也是极具挑战性的研究领域。其主要的研究策略有: 生物信息学研究; 信号肽捕获系统; 蛋白质组学研究。其中每种方法均有其优缺点。生物信息学方法主要是通过遗传算法以及生物信息学软件对基因产物的注解来预测、筛选出分泌性蛋白质, 但得到的结果需要生物学实验来验证。信号肽捕获系统是一种基于蛋白质在细胞内的表达定位而设计的十分有效的功能性基因克隆系统, 但其操作复杂、工作量大、实验条件要求高, 而且还面临着使用酵母系统易引起较高的假阳性和假阴性, 使用哺乳动物细胞系统操作繁琐等问题, 所以不适合大规模的筛选寻找分泌蛋白。蛋白质组学技术的兴起和发展, 使我们可以同时获得几千种蛋白质, 为整体水平上研究分泌性蛋白提供了捷径。细菌全基因组测序工作的完成使得蛋白质组的方法可以用于分泌蛋白的寻找。首先通过双向电泳分析细菌培

养物上清中的分泌蛋白, 然后利用质谱来鉴定这些蛋白。目前这种方法已用于幽门螺杆菌、无乳链球菌、爱德华菌等。本文报道了利用蛋白质组的方法寻找羊布鲁氏菌的分泌蛋白, 不仅有助于理解布鲁氏菌的致病机制, 而且也可为布病的疫苗研制提供靶标蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 羊布鲁氏菌 *B. melitensis* 55009 购自中国药品生物制品鉴定所。

1.1.2 主要试剂: 尿素、硫脲, 购自Sigma公司。IPG干胶条和IPG缓冲液、干胶条覆盖液(矿物油)、二硫苏糖醇(DTT)、Tris、溴酚蓝、考马斯亮蓝 G-250、蛋白定量试剂盒, 购自Amersham pharmacia公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺, 购自BBI公司。过硫酸铵、TEMED、CHAPS、甘氨酸、SDS、RNase A, 购自AMRESCO公司。碘乙酰胺、三氟乙酸(TFA), 购自ACROS公司。蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor cocktail tablets)、测序级胰蛋白酶, 购自Roche公司。磷酸、丙酮为国产分析纯; 甘油、三氯乙酸(TCA)为国产优级纯; 乙腈为一级色谱纯。吸头与离心管, AxyGen公司; 大豆胰蛋白胨琼脂(TSA)和大豆胰蛋白胨肉汤(TSB)购自生物梅里埃公司, 用于布鲁氏菌的培养。

1.1.3 主要仪器: Sigma 3K-12 台式高速冷冻离心机; Sonics VC 750 型超声仪; Amersham Pharmacia 公司 IPGphor 水平电泳仪、EttanTM DALT Six 垂直电泳仪、ImageScanner 扫描仪、ImageMaster 2D Platinum 双向电泳凝胶图像分析软件; Bruker 公司 REFLEXTMIII 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪。

1.2 方法

1.2.1 分泌蛋白的提取: 从TSA平板上挑取新鲜羊布鲁氏菌单菌落到含5 mL TSB培养基的试管中, 37°C, 200 r/min 培养48 h, 1%转接至含100 mL TSB的500 mL三角瓶中, 37°C, 200 r/min, 培养至对数生长中期($OD_{600}=1.0$); 在细菌培养液中加入300 μ L蛋白酶抑制剂, 混匀, 4°C、5000 r/min离心10 min, 收集上清; 将所有上清通过0.22 μ m的低蛋白结合的过滤器过滤除菌, 并将过滤后的上清分装至每管22.5 mL (50 mL离心管); 每管加入1/6体积100% TCA溶液

(三氟乙酸, 20 g 加水至 20 mL), 充分混匀, 冰浴 1 h, 其间每 10 min 取出振荡 20 s; 4°C、10500 r/min 离心 20 min, 收集沉淀, 弃上清; 用-20°C 预冷的丙酮清洗沉淀, 同上离心, 弃上清; 用递减量的预冷丙酮再清洗 3 次沉淀, 充分将 TCA 溶于丙酮中洗掉(残余的 TCA 会影响等电聚焦的结果), 最后将含蛋白的丙酮溶液合并转入 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管, 4°C、12500 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 蛋白沉淀在室温放置 1 h 以充分晾干(也可以采取抽真空离心 15 min 的方法使蛋白干燥); 用 400 μ L 样品溶解液(7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT)充分溶解蛋白, 在室温放置 30 min, 间或振荡溶解; 15°C、26000 r/min 离心 30 min 去除不溶物, 收集上清。用蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度, 按每管 800 μ g 分装, 直接上样或-70°C 保存备用。

1.2.2 双向电泳: 第一向电泳为等电聚焦电泳。取出冻存细胞蛋白样品, 加入 1.75 μ L IPG Buffer 以及水化液(7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 0.4% DTT, 痕量溴酚兰)至终体积 350 μ L, 充分混匀; 20°C, 电流不超过 50 μ A/strip, 水化 1 h, 30 V 10 h, 500 V 30 min, 2000 V 30 min, 5000 V 30 min, 8000 V 至压积超过 80000 Vh; 电泳后将胶条分别在含 1% DTT 的平衡缓冲液(50 mM Tris-Cl, pH 8.8, 6 mol/L Urea, 30%甘油, 2% SDS, 痕量溴酚兰)和含 2.5% 碘乙酰胺的平衡缓冲液中平衡 15 min。第二向电泳为 SDS-PAGE 电泳。采用恒流方式电泳, 15°C 循环水冷却, 先 20 mA/gel 电泳 45 min 使蛋白进入 SDS-PAGE 胶, 然后将电流加大至 30 mA/gel; 当溴酚蓝刚刚迁移出凝胶底部时终止电泳。电泳结束前配置胶体考马斯亮蓝 G-250 染色液(0.1% G-250, 34%无水甲醇, 17%硫酸铵, 3%磷酸), 将凝胶与玻璃板剥离后, 浸泡在染色液中缓慢摇动, 染色过夜。第二天更换脱色液。缓慢摇动脱色至背景清晰后进行图像扫描。

1.2.3 图像扫描与分析: 扫描参数选择: 透射扫描, 光学分辨率为 400 dpi, 对比度与亮度采用软件自动默认值。凝胶扫描后用保鲜膜包裹, 4°C 保存备用。

1.2.4 胶内酶切和质谱分析: 将保存的凝胶置于明亮的灯光下, 用剪过的吸头(孔径约 1.5 mm)戳取蛋白点, 50%乙腈, 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液脱色; 20 mmol/L 碳酸氢铵的牛胰蛋白酶(浓度为

10 ng/ μ L), 置于 37°C 恒温箱消化。用 2 μ L 0.5% TFA 溶液溶解后即可用于质谱分析。将 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -CCA)溶于含 0.1%三氟乙酸的 50%乙腈溶液中, 制成饱和溶液后离心, 取 1 μ L 上清与 1 μ L 肽段萃取液混合, 取 1 μ L 点在 Score384 靶上, 送入离子源中进行检测。反射检测方式, 飞行管长度 3 m; 氮激光器: 波长 337 nm; 加速电压 20 kV; 反射电压为 23 kV。

1.2.5 数据库查询: 登陆互联网(<http://www.matrix-science.com>), 用 Mascot 程序在相应数据库中对 MALDI-TOF 质谱检测得到的肽质量指纹图谱进行检索, 数据库选 NCBI nr, 种属选 Proteobacteria。检索参数选择如下: 氨基酸固定修饰方式选择 Carbamidomethyl(C) 修饰、可能修饰方式选择 Oxidation(M) 修饰; 可接受的肽段分子量误差为 0.3 D (可适当调整)。最后将肽质量指纹图谱数据通过浏览对应的文本文件或复制全部数值递交给 Mascot 数据框进行检索。为使鉴定结果更可靠, 每一个查询要求至少有 5 个肽段匹配, 且其在整个蛋白质序列中的覆盖率不低于 15%; 对小于 20 kD 的蛋白质, 则要求至少有 3 个肽段匹配和不低于 20% 的覆盖率。

1.2.6 代谢通路分析: 从 www.kegg.com 网站下载羊布鲁氏菌(*B. melitensis*)所涉及的代谢通路图, 分析所鉴定的蛋白质在各个通路中的分布, 了解羊布鲁氏菌在代谢通路使用上的特点。

2 结果

2.1 实验室培养条件下羊布鲁氏菌的分泌蛋白双向电泳图谱

提取 TSB 培养条件下的羊布鲁氏菌的分泌蛋白, 不同批次培养重复 3 次, 每次提取的蛋白样品同时进行双向电泳, 重复 3 次, 不同批次实验之间的凝胶蛋白点匹配率达 60%以上。为了解羊布鲁氏菌分泌蛋白的分布范围, 我们在预实验中首先采用 pH 3~10 的 IPG 胶条进行一向分离, 结果发现大部分蛋白都位于 pH 4~7 之间。因此, 我们选用了 pH 4~7、18 cm 的 IGP 胶条进行一向分离, 用 12.5% SDS-PAGE 进行二向电泳。电泳结果如图 1, 图上的点为成功鉴定出来的蛋白点。

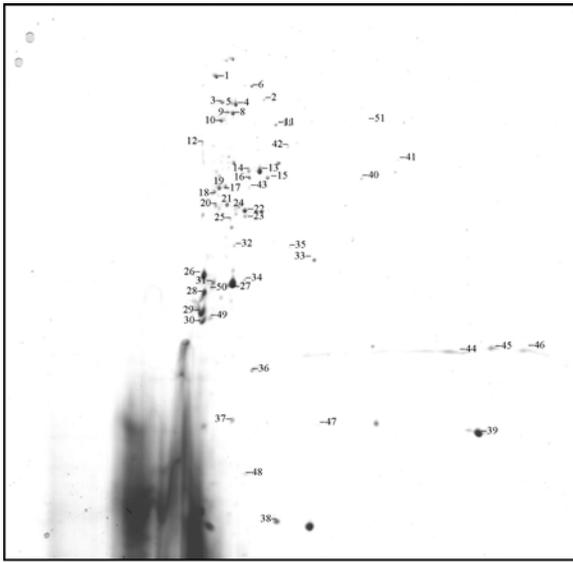


图1 实验室培养条件下的羊布鲁氏菌分泌蛋白图谱
Fig. 1 Protein compositions of secreted proteins of laboratory-grown *B. melitensis*

2.2 蛋白的质谱分析结果及相关信息

将凝胶扫描成 TIF 格式图, 使用 Image Master™ 2D Platinum 5.0 软件分别对分泌蛋白电泳图谱进行点的检测。分泌蛋白胶图上可分辨出 95 个蛋白点, 对这些蛋白点进行取点、胶内酶切和质谱分析, 并通过 MASCOT 软件与相应数据库检索对蛋白质点进行鉴定。最终鉴定到 51 个蛋白质点, 代表 40 种蛋白。所有鉴定蛋白质点在凝胶上分布情况见图 1, 这些蛋白的质谱检索结果见表 1。利用网上相关的分析工具对这些蛋白的功能类型、胞内定位和代谢通路等信息进行进一步分析, 结果汇总于表 2。通过生物信息学分析发现, 分泌蛋白主要是参与氨基酸转运和代谢(10/40)、翻译后修饰以及蛋白折叠(7/40)、无机离子转运和代谢(6/40)的。而且, 当用 KEGG 分析这些蛋白参与的代谢通路时, 发现近 1/2 的蛋白(17/40)均是 ABC 转运系统元件中的底物结合蛋白, 参与物质转运。

3 讨论

布鲁氏菌是一种兼性胞内寄生菌, 其分泌蛋白在感染过程中可介导病原与宿主细胞之间的相互作用, 对于理解布鲁氏菌的致病机制具有十分重要的意义。Mari'a Ine's Marchesini 等曾通过 N 端捕获筛选系统来识别牛布鲁氏菌的分泌蛋白, 但由于使用技术的限制, 得到的分泌蛋白很少^[2]。2002 年羊布鲁氏菌 *Brucella melitensis* 16M 全基因组测序工作完

成, 这使得蛋白质组的方法可以用于布鲁氏菌的研究。同年, Mary Ann Wagner 等对实验室培养条件下的羊布鲁氏菌的全菌蛋白进行了分离鉴定, 并建立了羊布鲁氏菌全菌蛋白的参考图谱^[3]。2006 年, JP Connolly 等人对实验室培养条件下的牛布鲁氏菌的外膜蛋白进行了分离鉴定, 并进行了外膜蛋白的免疫蛋白质组研究^[4]。但是, 迄今尚未见有布鲁氏菌分泌蛋白组的相关研究报道。本研究中, 我们首次报道了利用蛋白质组的方法来寻找羊布鲁氏菌的分泌蛋白, 从图 1 中可以看出, 布鲁氏菌的分泌蛋白点不多, 而且大多丰度较低。用质谱对胶图上的蛋白点进行鉴定, 共得到 40 种蛋白。通过生物信息学分析, 我们发现这些蛋白主要是 ABC 转运系统的底物结合蛋白、外膜蛋白和一些热休克蛋白。

由于细菌易于裂解, 从而导致大量蛋白的非特异释放, 这使得从细胞培养物上清中分离的分泌蛋白中经常会有菌体蛋白的污染, 因此不能断定鉴定到的蛋白就是分泌蛋白。这也使得分泌蛋白的鉴定结果很难解释^[5]。有些人通过检测一些胞质特有的高丰度蛋白是否在分泌蛋白中出现来判定分泌蛋白是否有菌体蛋白的污染。但是不同的蛋白稳定性也可导致一些蛋白仅在上清中出现, 而且大部分非特异释放的蛋白可能会被降解, 仅有一小部分蛋白可被 TCA 沉淀回复。因此, 即使上清中没有那些胞质特有蛋白, 也不能得出上清中没有菌体蛋白污染的结论^[5,6]。在我们得到的鉴定结果中, 有些蛋白预测的细胞定位为胞质和周质, 有可能是分泌蛋白提取过程中细菌的自裂解导致的, 也有可能这些蛋白的胞外定位是人为原因, 或者是一些特殊的还未被识别的分泌途径。因此, 我们的研究结果只是给出了羊布鲁氏菌中可能是分泌蛋白的靶标, 它们的确切功能还有待于进一步的研究证实。

热休克蛋白的主要作用是辅助毒力因子的折叠和正确定位、降解异常表达的蛋白, 它们在布鲁氏菌的胞内生存中发挥重要的作用。在这些鉴定到的热休克蛋白中, 除了 DnaK, 其余蛋白(HtrA、Tf、GroEL、GroES、SOD、DsbA 和肽基脯氨酰顺反异构酶 A)均有相关分泌蛋白的报道。Mari'a Ine's Marchesini 等通过 N 端捕获筛选系统来识别牛布鲁氏菌的分泌蛋白时, 发现了 Tf 和肽基脯氨酰顺反异构酶 A^[2]。Dirk Bumann 等在 *H. pylori* 的分泌蛋白中发现了 HtrA 和 DsbA^[5]。Anne Vanet 等在 *H. pylori*

表1 羊布鲁氏菌分泌蛋白的质谱检索结果
Table 1 Database searching results of identified secreted proteins of *B. melitensis*

蛋白点 Spot No.	NCBI GI 号 NCBI GI	位点号 Locus	基因名 Gene	序列覆盖率 Sequence coverage	匹配肽段数目 Number of matched peptide	理论分子量 Theoretical mass (kD)	理论等电点 Theoretical pI
1	gi 17988285	BMEI2002	<i>dnaK</i>	0.41	21	68.7	4.80
2	gi 17987613	BMEI1330	–	0.27	12	53.5	5.81
3	gi 17987352	BMEI1069	<i>Tig</i>	0.33	15	54.4	4.94
4	gi 17989393	BMEI1048	<i>groEL</i>	0.48	29	57.4	5.04
5	gi 17989393	BMEI1048	<i>groEL</i>	0.48	29	57.4	5.04
6	gi 17988198	BMEI1915	–	0.26	13	63.6	5.19
7	gi 17988198	BMEI1915	–	0.26	13	63.6	5.19
8	gi 17989079	BMEI0734	<i>oppA</i>	0.45	21	56.2	5.13
9	gi 17989079	BMEI0734	<i>oppA</i>	0.45	21	56.2	5.13
10	gi 17989080	BMEI0735	<i>oppA</i>	0.42	28	58.9	4.97
11	gi 17988832	BMEI0487	<i>ddpA</i>	0.43	20	58.2	5.44
12	gi 17987290	BMEI1007	<i>omp25b</i>	0.39	8	25.2	4.72
13	gi 17987038	BMEI0755	<i>tuf</i>	0.41	14	42.6	5.29
14	gi 17987038	BMEI0755	<i>tuf</i>	0.41	14	42.6	5.29
15	gi 17988970	BMEI0625	–	0.30	15	48.3	5.51
16	gi 17988970	BMEI0625	–	0.30	15	48.3	5.51
17	gi 17986547	BMEI0263	<i>livK</i>	0.27	9	39.8	5.21
18	gi 17989465	BMEI1120	<i>afuA</i>	0.55	14	39.0	4.88
19	gi 17988935	BMEI0590	<i>ugpB</i>	0.53	21	43.1	4.97
20	gi 17986694	BMEI0411	–	0.49	18	40.9	4.96
21	gi 17988929	BMEI0584	<i>afuA</i>	0.31	7	36.3	5.20
22	gi 17986956	BMEI0673	–	0.49	17	37.1	5.31
23	gi 17989328	BMEI0983	<i>RbsB</i>	0.49	20	36	5.37
24	gi 17988213	BMEI1930	–	0.29	8	37.9	5.29
25	gi 17986299	BMEI0015	–	0.29	10	32.2	5.00
26	gi 17987290	BMEI1007	<i>omp25b</i>	0.39	8	25.2	4.72
27	gi 17989189	BMEI0844	<i>omp31</i>	0.47	10	23.2	5.21
28	gi 17988112	BMEI1829	<i>omp25c</i>	0.42	8	24.6	4.79
29	gi 17987290	BMEI1007	<i>omp25b</i>	0.39	8	25.2	4.72
30	gi 17988112	BMEI1829	<i>omp25c</i>	0.42	8	24.6	4.79
31	gi 17988780	BMEI0435	<i>xyIF</i>	0.58	12	31	5.60
32	gi 17987494	BMEI1211	–	0.48	16	37.1	5.30
33	gi 17987079	BMEI0796	–	0.60	15	34.3	6.92
34	gi 17988895	BMEI0550	–	0.63	18	31.8	5.57
35	gi 17988952	BMEI0607	<i>fatB</i>	0.29	5	31.2	5.36
36	gi 17987723	BMEI1440	<i>dsbA</i>	0.45	9	23.8	6.43
37	gi 17984032	BMEI1980	–	0.47	7	19.9	5.43
38	gi 17989392	BMEI1047	<i>groES</i>	0.47	5	10.4	5.41
39	gi 17988926	BMEI0581	<i>sod</i>	0.62	8	18.3	6.24
40	gi 17988124	BMEI1841	<i>sbp</i>	0.40	11	36.1	5.47
41	gi 17989047	BMEI0702	–	0.35	10	40	5.58
42	gi 17986498	BMEI0214	<i>tsp</i>	0.35	13	47	5.69
43	gi 17988689	BMEI0344	<i>livK</i>	0.30	15	43.1	5.31
44	gi 17987532	BMEI1249	<i>omp25</i>	0.41	9	23.2	8.58
45	gi 17987532	BMEI1249	<i>omp25</i>	0.41	9	23.2	8.58
46	gi 17987532	BMEI1249	<i>omp25</i>	0.41	9	23.2	8.58
47	gi 17987171	BMEI0888	–	0.35	6	19.1	6.08
48	gi 17987256	BMEI0973	–	0.66	9	16.6	5.74
49	gi 17986825	BMEI0542	–	0.49	11	30	4.83
50	gi 17986825	BMEI0542	–	0.49	11	30	4.83
51	gi 17989204	BMEI0859	<i>ddpA</i>	0.28	12	54.6	5.71

表2 羊布鲁氏菌分泌蛋白的生物信息学分析结果
Table 2 The related information of identified secreted proteins of *B. melitensis*

蛋白点 Spot No.	位点号 Locus	定位 ^a Location	信号肽 ^b Signal peptide	跨膜片段数 Number of transmembrane helices	COG ^c	代谢通路 ^d Metabolic pathway	蛋白功能描述 Protein description
1	BMEI2002	C	N	—	O		Molecular chaperone DnaK
2	BMEI1330	U	Y	3	O		Protease DO
3	BMEI1069	C	N	—	O		Trigger factor
4	BMEII1048	C	N	—	O		Chaperonin GroEL
5	BMEII1048	C	N	—	O		Chaperonin GroEL
6	BMEI1915	C	N	—	J		30S ribosomal protein S1
7	BMEI1915	C	N	—	J		30S ribosomal protein S1
8	BMEII0734	P	N	—	E	bme02010	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor
9	BMEII0734	P	N	—	E	bme02010	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor
10	BMEII0735	P	Y	—	E	bme02010	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor
11	BMEII0487	P	Y	1	E	bme02010	Nickel-binding periplasmic protein precursor
12	BMEI1007	OM	Y	—	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
13	BMEI0755	C	N	—	J		Elongation factor Tu
14	BMEI0755	C	N	—	J		Elongation factor Tu
15	BMEII0625	P	Y	1	G	bme02010	Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein
16	BMEII0625	P	Y	1	G	bme02010	Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein
17	BMEI0263	P	Y	1	E	bme02010	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor
18	BMEIII120	U	Y	—	P	bme02010	Iron(iii)-binding periplasmic protein precursor
19	BMEII0590	U	N	—	G		Sugar-binding protein
20	BMEI0411	P	Y	1	E	bme02010	Putrescine-binding periplasmic protein
21	BMEII0584	P	Y	—	P	bme02010	Iron(iii)-binding periplasmic protein precursor
22	BMEI0673	P	Y	—	P	bme02010	Thiosulfate-binding protein precursor
23	BMEII0983	P	Y	—	G		D-galactose-binding periplasmic protein precursor
24	BMEI1930	P	Y	1	E	bme02010	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor
25	BMEI0015	U	Y	—	R		ABC transporter substrate-binding protein
26	BMEI1007	OM	Y	—	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
27	BMEII0844	OM	N	—	M		31 KD outer-membrane immunogenic protein
28	BMEI1829	OM	Y	1	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
29	BMEI1007	OM	Y	—	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
30	BMEI1829	OM	Y	1	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
31	BMEII0435	P	N	—	G	bme02010	D-ribose-binding periplasmic protein precursor
32	BMEI1211	P	Y	1	ET	bme02010	General L-amino acid-binding periplasmic protein aapj precursor
33	BMEI0796	U	Y	2	R		31 KD outer-membrane immunogenic protein
34	BMEII0550	P	Y	1	E	bme02010	Glycine betaine/L-proline-binding protein prox
35	BMEII0607	P	Y	—	P	bme02010	Ferric anguibactin-binding protein
36	BMEI1440	U	Y	—	O		Thiol:disulfide interchange protein dsba
37	BMEI1980	U	N	—	P		DNA protection during starvation conditions
38	BMEII1047	C	N	—	O		Co-chaperonin GroES
39	BMEII0581	P	Y	—	—		Superoxide dismutase (Cu-Zn)
40	BMEI1841	P	N	—	P	bme02010	Sulfate-binding protein precursor
41	BMEII0702	U	Y	1	R		ABC transporter periplasmic binding protein

续表

蛋白点 Spot No.	位点号 Locus	定位 ^a Location	信号肽 ^b Signal peptide	跨膜片段数 Number of transmembrane helices	COG ^c	代谢通路 ^d Metabolic pathway	蛋白功能描述 Protein description
42	BMEI0214	U	Y	1	M		Tail-specific protease
43	BMEI0344	U	Y	-	E	bme02010	Branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
44	BMEI1249	OM	Y	1	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
45	BMEI1249	OM	Y	1	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
46	BMEI1249	OM	Y	1	M		25 KD outer-membrane immunogenic protein
47	BMEI0888	P	N	-	O		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
48	BMEI0973	U	N	-	S		Hypothetical protein BMEI0973
49	BMEI0542	U	Y	-	-		Hypothetical protein BMEI0542
50	BMEI0542	U	Y	-	-		Hypothetical protein BMEI0542
51	BMEI0859	P	N	-	E	bme02010	Oligopeptide-binding protein APPA precursor

注: a: 细胞定位依据PSORTb V 2.0 软件计算结果(<http://www.psort.org/>); b: 蛋白是否含有信号肽根据Signal P 3.0 软件的计算结果(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), “Y”代表有信号肽, “N”代表无信号肽; c: 每个单字母均代表一种特定的功能分类, 其对应关系可以在COG网站查询(<http://www.ncbi.nlm.gov/COG/>); d: 代谢通路根据KEGG的查询结果(<http://www.kegg.com/>); “bme02010”代表该蛋白参与ABC transporters.

Note: a: Protein cellular location was annotated by PSORTb V 2.0 (<http://www.psort.org/>); b: As determined by Signal P 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), “Y” means yes, “N” means no; c: Abbreviation of cellular role categories of theoretical (<http://www.ncbi.nlm.gov/COG/>); d: As determined by KEGG (<http://www.kegg.com/>); “bme02010” means the protein is involving in ABC transporters.

的分泌蛋白中发现了 SOD 以及 GroES 和 GroEL 的同源物 HspA 和 HspB^[6]。这些蛋白除了 HtrA、DsbA 和 SOD, 其它均缺乏分泌序列而且都定位于胞质中。因此这些蛋白的胞外定位可能是人为原因, 或者是一些特殊的还未被识别的分泌途径。Masahisa Watarai 等在牛布鲁氏菌的培养物上清中发现 GroEL, 认为 GroEL 可分泌到胞外, 而且这种分泌与 IV 型分泌系统(T4SS)相关, 因此推测 GroEL 可能是 T4SS 的效应子蛋白^[7]。虽然已确定 GroEL 位于胞质, 但一些病原菌的表面可以表达 GroEL, 通常这与分子伴侣在粘附时发挥的作用有关^[8]。Hsp 分子伴侣是大多数病原菌的主要抗原, 它们在细菌感染过程中或者压力刺激作用下的表达会发生上调。细菌与宿主的相互作用是一种压力刺激, 可能会导致 GroEL 在膜上的重排。

布鲁氏菌的外膜蛋白最早于 20 世纪 80 年代早期被发现, 当时认为是一种潜在的免疫性和保护性抗原。本研究中一共鉴定到 5 个外膜蛋白, 分别是 Omp25(点 44, 45, 46)、Omp25b(点 12, 26, 29)、Omp25c(点 28, 30)和 Omp31(点 27, 33)。Omp25 蛋白是 OmpA 家族一个重要的外膜蛋白, 在维持细菌外膜结构稳定性中发挥重要作用。此外, 已有研究

结果表明 Omp25 与布鲁氏菌的毒力有关, 在抑制 TNF- α 的分泌中也起着重要作用。Rose-Anne Boigegrain 等在分析布鲁氏菌受到酸刺激分泌的蛋白质时发现, Omp25 也被分泌到了细胞外, 提示其除了维持细胞膜结构外, 还可作为分泌蛋白发挥其它作用^[9]。Omp31 是布鲁氏菌的另一个免疫保护性抗原, 常用于布鲁氏菌的鉴定。除了维持布鲁氏菌外膜的完整性外, Omp31 还是一种潜在的血色素利用蛋白, 与布鲁氏菌对铁的摄取有关^[10]。

本研究还鉴定到 17 个 ABC 转运系统的底物结合蛋白(Substrate-binding proteins, SBPs), 对应于 19 个蛋白点: 周质寡肽结合蛋白前体(点 8, 9, 10)、镍结合周质蛋白前体(点 11)、3-磷酸甘油周质结合蛋白前体(点 15, 16)、亮氨酸-异亮氨酸-缬氨酸-苏氨酸和丙氨酸结合蛋白前体(点 17, 24)、铁周质结合蛋白前体(点 18, 21)、腐胺结合周质蛋白(点 20)、硫酸盐结合蛋白前体(点 22)、D-核糖结合周质蛋白前体(点 31)、L-氨基酸周质结合蛋白前体(点 32)、 β -氨基乙酸/L-脯氨酸结合蛋白(点 34)、铁结合蛋白(点 35)、硫结合蛋白前体(点 40)、周质氨基酸结合蛋白(点 43)和寡肽结合蛋白前体(点 51)。其中 3-磷酸甘油周质结合蛋白前体已被证实是分泌蛋白, 其它未见相关

报道。ABC 转运系统元件, 几乎存在于所有的真核和原核生物中, 可利用 ATP 水解的能量将可溶性物质进行跨膜转运。ABC 转运系统包括一到两个跨膜 5~6 次的跨膜蛋白; 一到两个位于膜的胞质面的膜 ATP 结合蛋白, 可通过单一的跨膜螺旋锚定到膜上; 一个高亲和力的胞质外可溶性底物结合蛋白(见图 2)。跨膜蛋白可形成可溶的特异通道, ATP 结合蛋白给系统提供能量。SBPs 在革兰氏阴性菌中常位于细胞周质, 其主要功能是向膜另一侧的 ATP 结合蛋白传输信号, 随之的 ATP 结合和水解可导致转运小孔开放, 伴随着底物从 SBPs 的释放。SBPs 与底物的可溶性结合可以诱导 SBPs 发生构象的变化, 从而有利于其与跨膜的化学感应物或转运蛋白的结合。此外, 还有证据表明细菌的 SBPs 在蛋白折叠以及保护周质抵抗压力方面发挥作用。我们鉴定到的 SBPs 涉及核糖、氨基酸、胺、碳、硫、寡肽、铁以及铁复合物的转运(见图 2)。

总之, 本研究利用蛋白质组学对羊布鲁氏菌的分泌蛋白进行了全面的分析, 共得到了 40 个候选蛋白, 这些蛋白有可能介导了病原-宿主之间的相互作用。在这些候选的分泌蛋白中, Omp25、HtrA、Tf、GroEL、GroES、SOD、DsbA、肽基脯氨酰顺反异构酶 A 和 3-磷酸甘油周质结合蛋白前体这 9 个分泌蛋白以前有相关的文献报道, 而其余 31 个蛋白则是首次提出可能是分泌蛋白, 它们的确切功能还有待于进一步的研究证实。这些蛋白的识别不仅有助于对布鲁氏菌致病机制的理解, 而且也可为布病的疫苗研制提供靶标蛋白。

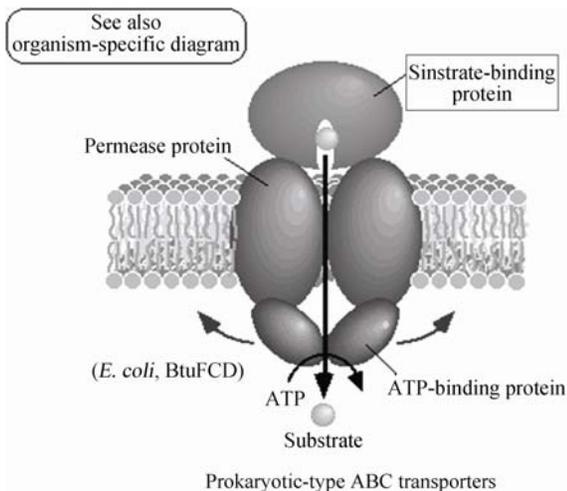


图 2 ABC 转运系统元件来自 www.kegg.com
Fig. 2 ABC transporters(As determined by www.kegg.com)

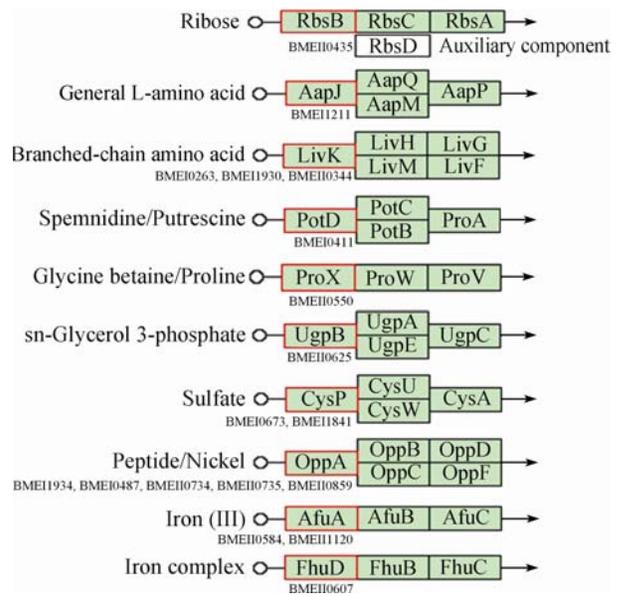


图 3 鉴定出来的 SBP
Fig. 3 The identified SBP

参 考 文 献

- [1] Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, 2002, **90**: 281-297.
- [2] Marchesini MI, Ugalde JE, Czibener C, et al. N-terminal-capturing screening system for the isolation of *Brucella abortus* genes encoding surface exposed and secreted proteins. *Microb Pathog*, 2004, **37**: 95-105.
- [3] Wagner MA, M Eschenbrenner, Troy AH, et al. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: Identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics*, 2002, **2**: 1047-1060.
- [4] Connolly JP, Comerchi D, Alefantis TG, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics*, 2006, **6**: 3767-3780.
- [5] Bumann D, Aksu S, Wendland M, et al. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 2002, **70**: 3396-3403.
- [6] Vanet A, Labigne A. Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. *Infect Immun*, 1998, **66**: 1023-1027.
- [7] Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, et al. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J Exp Med*, 2003, **198**: 5-17.
- [8] Garduno RA, Garduno E, Hoffman PS. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun*, 1998, **66**: 4602-4610.
- [9] Boigegrain RA, Salhi I, Alvarez-Martinez MT, et al. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect Immun*, 2004, **72**: 5693-5703.
- [10] Delpino MV, Cassataro J, Fossati CA, et al. *Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes Infect*, 2006, **8**: 1203-1208.