

金属蛋白质组学研究锌离子匮乏对肺炎链球菌的影响

易叔红 张留辉 孙雪松*

(暨南大学生命与健康工程研究院 广东 广州 510632)

摘要:【目的】研究锌离子缺乏对肺炎链球菌的影响,找到其适应性生长机制。【方法】以肺炎链球菌为模型,利用加锌和不加锌的培养基对细菌进行培养,收集细胞蛋白,采用双向凝胶电泳,结合金属亲和层析和质谱技术鉴定差异表达蛋白,进而通过生物信息学分析蛋白质相互关系,从中找到细菌适应锌离子匮乏条件的关键代谢通路和蛋白。【结果】测定了在限制培养条件下肺炎链球菌的最适生长浓度,建立了锌离子调控蛋白双向凝胶电泳图谱,鉴定到了96个差异表达蛋白斑点,共67个差异蛋白,其中32个表达下调,35个表达上调,锌离子调控蛋白的作用可能主要体现在糖代谢、核酸代谢、氧化还原作用、辅助蛋白质翻译、合成及折叠等方面。建立了锌结合蛋白的差异表达图谱,鉴定到了10个差异表达蛋白斑点,共7个差异蛋白,其中1个表达下调,6个表达上调。锌离子结合蛋白的作用可能主要体现在应对压力、蛋白质折叠和转运、氨基酸代谢等方面。【结论】肺炎链球菌主要通过调控碳水化合物代谢和核酸代谢等多个代谢通路来应对宿主锌金属离子匮乏的环境,从而使自身能够存活并对宿主形成感染。本研究为揭示细菌在宿主环境,特别是金属离子匮乏条件下的适应性生长机制提供理论基础。

关键词: 肺炎链球菌, 金属蛋白, 锌, 蛋白质组学

Effect of zinc depletion on *Streptococcus pneumoniae* revealed by metalloproteomics

YI Shu-Hong ZHANG Liu-Hui SUN Xue-Song*

(Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to explore the effects of zinc deficiency and the corresponding adaptive growth of *Streptococcus pneumoniae* D39. [Methods] We extracted whole proteins from *S. pneumoniae* D39 cultured with or without zinc, performed two-dimensional electrophoresis (2-DE) combined with immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and mass spectra (MS) to identify differentially expressed proteins. [Results] The 2-DE maps of whole cell proteins showed that 32 proteins were down-regulated and 35 up-regulated. These Zn²⁺ regulated

Foundation item: Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2015A030313334); Science and Technology Program of Guangzhou City (No. 201607010228)

*Corresponding author: Tel: 86-20-85226165; E-mail: tsunxs@jnu.edu.cn

Received: March 15, 2017; Accepted: June 16, 2017; Published online (www.cnki.net): June 26, 2017

基金项目: 广东省自然科学基金项目(No. 2015A030313334); 广州市科技计划项目(No. 201607010228)

*通讯作者: Tel: 86-20-85226165; E-mail: tsunxs@jnu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-15; 接受日期: 2017-06-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-06-26

proteins are mainly involved in carbohydrate metabolism, nucleotide metabolism, oxidation, proteins translation, synthesis and folding. The 2-DE maps of Zn²⁺-binding proteins by using Zn-IMAC separation exhibited 7 differentially expressed proteins, 1 down-regulated and 6 up-regulated. These Zn²⁺-binding proteins participate in the bacterial response to stress stimuli, proteins folding and amino acid metabolism. **[Conclusion]** To survive and infect the host, *S. pneumoniae* regulate many metabolic pathways mainly including carbohydrate metabolism and nucleotide metabolism under zinc deficiency. This study provides a theoretical basis for revealing the adaptive growth mechanism of bacteria in host environment with limited metal ions.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, Metalloprotein, Zinc, Proteomics

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是革兰氏阳性致病菌,能引起肺炎、中耳炎、败血症和脑膜炎等疾病^[1]。由于该细菌的强大毒力及对抗生素的抗性,这种感染的预防和治疗成为困扰国际医学界的一大难题。

肺炎链球菌对生长环境要求比较高,尤其是金属离子浓度,但是对于在感染过程中金属离子是如何改变以及金属离子是通过什么方式影响其毒力所知甚少。锌离子是金属离子中较重要的一种离子,是细菌必需的微量元素,对于细菌的生长代谢非常重要,它们通过与相应蛋白结合,尤其是与生物代谢催化剂——酶结合,共同在细菌体内发挥生物作用。锌离子对细菌的粘附力和毒力也有重要影响。在宿主中,锌离子在免疫系统中起着非常重要的角色,它是一些免疫细胞必不可少的成分之一^[2-3]。Strand 等在老鼠身上做了实验,发现如果体内缺少锌离子,将会增加其感染肺炎和导致死亡的危险^[4]。Kloosterman 等通过使用高浓度的锌离子去培养肺炎链球菌,结果发现高浓度的锌离子能够增强该菌编码毒力相关蛋白的基因表达^[5]。Manzoor 等采用转录组学阐明镍离子通过依赖锌离子的阻遏蛋白 AdcR 来直接参与 AdcR 调节子的去阻遏作用^[6]。Eijkelkamp 等通过定量的方法进行研究,结果显示在肺炎链球菌中外部锌离子竞争性抑制锰离子的吸收来应对氧化应激^[7]。Martin 等通过构建锌离子结合位点的突变株,结果发现锌离子泵出激活子 SczA 保护了肺炎链球菌免受细胞内部锌离子的毒性^[8]。

由此可见,锌离子对于肺炎链球菌的生长及对宿主的感染非常重要。但是因为锌离子代谢系统中蛋白的数量比较多而且结构复杂等因素,到目前为止,还有许多机制不是很清楚^[9],比如细菌如何从宿主环境中获取锌离子并传递给膜蛋白进而到细胞内部。本研究采用基于双向电泳的蛋白组学方法,结合本课题组建立的金属亲和层析技术^[10]鉴定肺炎链球菌在无锌环境下引起的特定蛋白质的变化,以期揭示锌离子在宿主中的调控机制,这将为基于锌蛋白的疫苗开发以及以其为靶标的抑菌剂的研发起到非常大的推动作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *S. pneumoniae* D39 菌株来源于英国国家标准菌种收藏中心(伦敦),在 37 °C、5% CO₂ 条件下,THY 培养基^[10](Todd-Hewitt broth 36.4 g/L, Yeast extract 5 g/L)中进行培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。

1.1.2 主要试剂和仪器: Todd-Hewitt broth、Yeast extract、ZnSO₄、MgCl₂、MnCl₂、CaCl₂、尿素、硫脲、3-乙胺-1-丙磺酸(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、蛋白酶抑制剂(PMSF)、咪唑、Chelex-100 等购自 Sigma 公司(USA); IPG 缓冲液、2D Clean-Up Kit 等购自 Amersham Biosciences 公司(瑞典);胰蛋白酶购自 Promega 公司(美国);固定化亚氨基二乙酸(Immobilized iminodiacetic acid, IDA) 购自 Thermo 公司(美国); Poly-prep 层析柱购自 Bio-Rad 公司(美国); SDS、Tris-base 等购自广州展晨生物公司(中国); NaCl、Na₂HPO₄·12H₂O、KH₂PO₄ 等

购自广州化学试剂厂(中国)。

ABI 4800 MALDI-TOF/TOF 串联飞行时间质谱仪, Applied Biosystems 公司(美国); IPGphor 等电聚焦仪、EttanDALT 垂直电泳槽、Image Scanner 扫描仪, GE 公司(美国); 垂直电泳仪, Bio-Rad 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养: 配制 THY 培养基, 加入 5% (质量体积比) Chelex-100 螯合并连续搅拌 8 h, 然后用双层滤纸过滤两次, 分别加入 100 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 、2 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L MnCl_2 , 得到螯合培养基, 其中一组培养基不加锌离子, 一组培养基加入最适合细菌生长的锌离子浓度, 1×10^5 Pa 高温灭菌 30 min, 备用。将肺炎链球菌 D39 分别接种到上述不加锌离子的螯合培养基及加入最适合细菌生长的锌离子浓度的螯合培养基中, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、220 r/min 下振荡培养, 分别按对应时间取出, 测定 OD_{600} 值。

1.2.2 细菌的收集和总蛋白的提取: 测定细菌生长到 OD_{600} 为 0.6 时, 将样品低温离心(4 $^\circ\text{C}$, 5 000 r/min) 20 min, 弃上清, 用预冷的无菌 PBS (1 \times PBS, pH 7.2–7.4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.830 g, KH_2PO_4 0.272 g, NaCl 8.700 g, 加水至 1 L), 低温离心(4 $^\circ\text{C}$, 5 000 r/min) 洗涤 3 次, 每次 10 min, 弃 PBS, 得到菌体。采用超声裂解提取法提取总蛋白, 裂解液为: 15 mmol/L Tris-HCl、7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% (质量体积比) CHAPS, 使用前现加 2% (体积比) IPG 缓冲液(pH 4.0–7.0)、1% (质量体积比) DTT 和 1% (质量体积比) PMSF 混合物, 冰上放置, 每隔 2 min 涡旋 10 s, 充分振荡, 放置液氮中, 10 min 后取出放入 37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱至解冻, 如此反复冻融 3 次后, 将样品超声 30 min, 加入 1% (体积比) 核酶, 冰上放置 30 min, 低温离心(4 $^\circ\text{C}$, 12 000 r/min) 10 min, 取上清即为总蛋白, Bradford 法测蛋白浓度, -80 $^\circ\text{C}$ 分装冻存。用 2D Clean-Up Kit 纯化蛋白样品^[11-12]。

1.2.3 Zn-IMAC: 金属亲和层析(IMAC)是一种有效的分离具有金属离子螯合能力的蛋白质或肽的手段, 其原理是利用 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等过渡金属离子与蛋白质表面的组氨酸或半胱氨酸配位结合, 由于蛋白质表面这些氨基酸的种类、数量、位置和空间构象不同, 因而与金属螯合物的亲和力大小不同, 从而可选择性地加以分离纯化。Zn-IMAC 是将蛋白样品先除盐, 然后用固定化亚氨基二乙酸、 ZnSO_4 和 Poly-prep 层析柱等进行一系列处理得到锌离子结合蛋白样品, 具体操作参考文献^[10]。

1.2.4 双向凝胶电泳: 加锌组和不加锌组细菌全蛋白样品以 80 μg 上样, 计算样品体积及操作步骤参照文献^[12-13]。

1.2.5 图像扫描与分析: 所有银染后的分析胶均用 Image Scanner 扫描仪同一参数扫描并保存。扫描参数为 300 dpi, 扫描后存为 TIFF 格式, 然后用 ImageMaster 2D Platinum 进行图像分析比较实验组和对照组的单向凝胶电泳图谱。将加(不加)锌离子的银染凝胶图谱用图像分析软件 ImageMaster 2D Platinum 进行比较, 选择 $P < 0.01$ 且差异近 2 倍及以上的蛋白质点作为候选差异表达蛋白质点进行后续胶内酶解以及质谱分析^[14]。

1.2.6 胶内酶解: 用刀片切下胶上目标蛋白点, 分组进行脱色、脱水和吸胀操作; 加入胰蛋白酶和覆盖液 37 $^\circ\text{C}$ 水浴酶解 16–18 h; 转移上清。超声萃取, 并将萃取液吸出与之前的上清液对应合并, 在真空干燥仪中冻干^[11,15]。

1.2.7 质谱鉴定: 冻干样品用 2 μL 样品溶解液(30% ACN, 0.1% TFA)充分溶解, 然后与基质溶解液 1:1 各 0.4 μL 点于 384 孔 AnchorChip 板上, 结晶后采用 ABI 4800 MALDI TOF/TOF 串联飞行时间质谱仪进行质谱鉴定, 然后进行 IPI 数据库搜库^[16]。

1.2.8 差异表达蛋白的功能分类和蛋白质相互作用网络图: STRING 是一个预测蛋白质-蛋白质相互作用的数据库, 主要用来收集、预测和统计大

部分类型的蛋白质-蛋白质关系。用STRING (基因/蛋白质相互作用检索工具)来绘制蛋白质相互作用网络图(<http://string-db.org>)。参数设置如下:物种:肺炎链球菌;可信度:0.40;相互作用蛋白:不超过10个。

2 结果与分析

2.1 培养基中各金属离子浓度

利用电感耦合等离子体发射光谱仪,测定配制好的 THY 培养基中各种金属离子的浓度,测得的浓度如表1所示:除了细菌生长必需的钙、镁元素外,锌离子浓度是最高的,其次是铁元素,证实了锌离子对细菌生长的重要性。

2.2 锌离子浓度对 *S. pneumoniae* D39 生长的影响

基于测定的培养基中的锌离子浓度,向经过Chelex-100 整合后的培养基中(已补加细菌生长必需的钙镁离子)加入锌离子,配制不同锌离子浓度的限制性培养基来培养细菌,每隔1 h 测量细菌生长情况。每个浓度3个重复样品,3个样品的平均值即为细菌的生长情况,绘制其生长曲线。由图1可知,当培养基中缺乏锌离子时,细菌生长受到抑制;当向培养基中补加锌离子时,细菌的生长状态得到不同程度的恢复;并且当向整合培养基中加入锌离子浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时,细菌的生长状况最好。因此,后续实验选取10 $\mu\text{mol/L}$ 锌离子作为 *S. pneumoniae* D39 的培养条件。

表1 THY 培养基中常见各金属离子浓度
Table 1 Metal ion concentrations in THY medium

金属离子 Metal ion	浓度 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)
Mg ²⁺	1 667.000
Ca ²⁺	1 055.000
Fe ³⁺	13.634
Mn ²⁺	0.519
Zn ²⁺	19.308
Cu ²⁺	0.229
Ni ²⁺	0.077

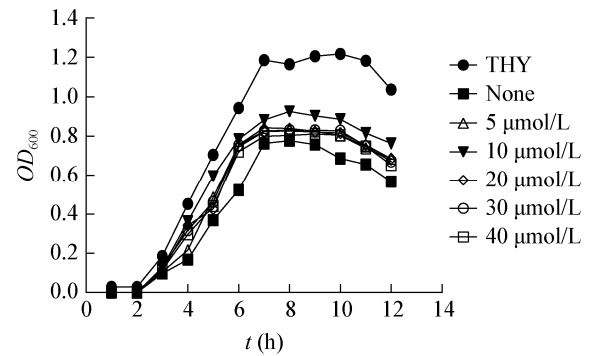


图1 Zn²⁺对 *S. pneumoniae* D39 生长的影响
Figure 1 Effect of Zn²⁺ on *S. pneumoniae* D39 growth

2.3 有无锌离子培养条件下 *S. pneumoniae* D39 的 2-DE 结果

为研究 *S. pneumoniae* D39 对缺锌环境的适应性生长机制,利用无锌和加入10 $\mu\text{mol/L}$ 锌离子的培养基分别培养 *S. pneumoniae* D39,收集对数中期的菌体,提取细菌总蛋白,进行双向凝胶电泳分离,银染显色后得到背景清晰、分辨率高的2-DE图谱(图2)。使用ImageMaster 2D Platinum软件进行图像分析。经过与有锌组相比,在无Zn²⁺培养的细菌中发现96个差异表达蛋白斑点,对应67个蛋白,其中35个表达上调,32个表达下调。

2.4 锌离子调控蛋白的功能分类

利用质谱对67个特异的差异表达蛋白进行鉴定,通过GO注释,对这些蛋白根据功能进行了分类(表2)。结果显示这些差异表达蛋白质主要参与翻译作用、乙酰化、多肽合成、核糖体合成、蛋白质折叠、蛋白水解、细菌生长周期调节蛋白、DNA复制或转录、氨基酸代谢、糖代谢、核酸代谢和氧化作用。从表2中各类的蛋白数量上看,锌离子缺失主要影响了肺炎链球菌的碳水化合物代谢,其次是核酸代谢和氧化作用。另外,发现差异倍数较大的蛋白主要集中在蛋白质翻译和折叠。这些都说明锌离子的缺失对细菌多个重要的代谢通路都有影响(图3)。

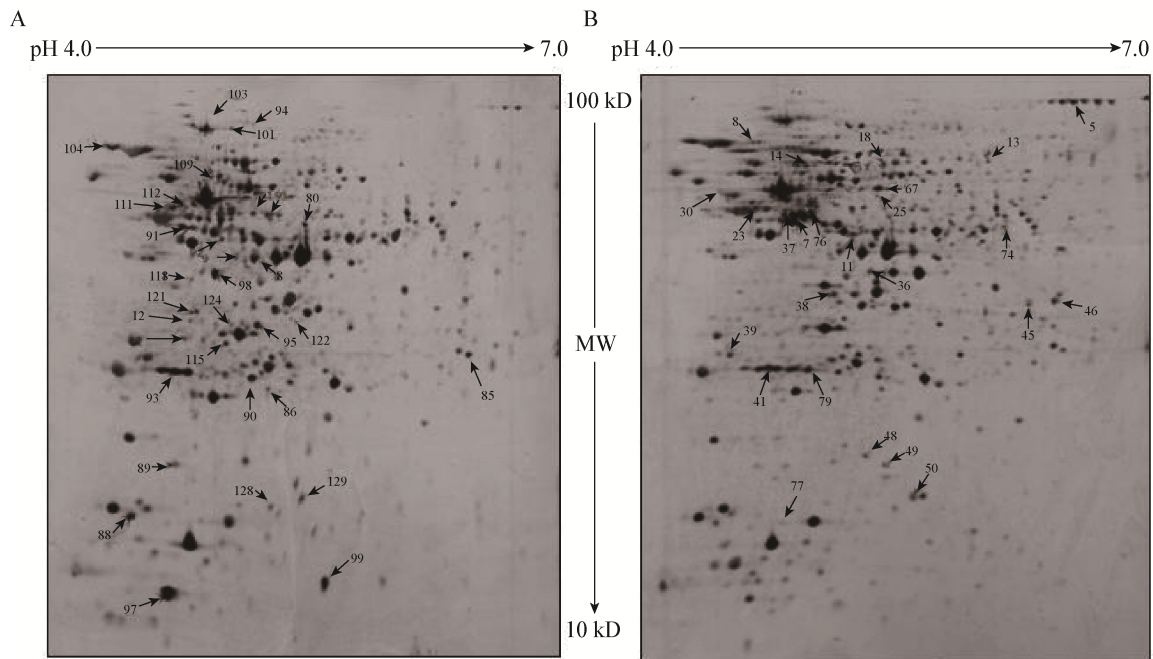


图 2 无 Zn²⁺组(A)和有 Zn²⁺组(B)培养细菌的锌调控蛋白的双向电泳图谱比较
 Figure 2 2-DE maps of Zn²⁺-regulated proteins in *S. pneumoniae* D39 cultured with (B) or without (A) Zn²⁺

表 2 *S. pneumoniae* D39 在无 Zn²⁺和有 Zn²⁺培养条件下的差异表达锌离子调控蛋白
 Table 2 Differentially expressed Zn²⁺ regulated proteins of *S. pneumoniae* D39 cultured with and without Zn²⁺

Spot No. ^{a)}	Protein Name ^{b)}	Accession No. ^{c)}	Protein MW	Protein PI	Protein score	F.D. ^{d)}
Translation						
66	Translation elongation factor Tu	gi116075932	43 943.4	4.86	256	-3.60
41	Translation elongation factor P	gi116076755	20 587.4	4.86	237	-1000 000
77	Ribosomal protein L10	gi116077226	17 468.5	5.08	346	-2.22
112B	Translation elongation factor G	gi116077328	76 782.8	4.86	229	1 000 000
38	Ribosomal protein S2	gi116077704	28 880.0	5.20	53	-1000 000
tRNA aminoacylation						
94B	Alanyl-tRNA synthetase	gi116076189	96 465.1	5.04	243	1 000 000
103B	Nucleotidyltransferase	gi116076308	85 187.1	5.11	299	1 000 000
14	GMP synthase, C-terminal domain	gi116077050	57 436.4	4.94	610	-1 000 000
18	Lysyl-tRNA synthetase	gi116077666	56 645.8	5.32	291	-1 000 000
Peptide						
20	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	gi116076748	49 397.3	5.30	95	-1 000 000
Ribosome biogenesis						
77	Ribosomal protein L10	gi116077226	17 468.5	5.08	346	-2.22
Protein folding						
8	Chaperone protein DnaK	gi116077074	64 772.3	4.63	78	-1 000 000
Proteolysis						
111B	Dipeptidase PepV	gi116076357	50 718.3	4.77	335	1 000 000

(待续)

(续表)						
121B	Methionine aminopeptidase, type I	gi116077102	31 629.5	4.90	278	1 000 000
81B	Aminopeptidase C	gi116077489	50 224.1	5.09	458	2.16
Cell cycle or regulation						
25	Transcription-repair coupling factor r	gi116076727	134 717.8	5.45	49	-1 000 000
20	UDP-N-acetylglucosaminepyrophosphorylase	gi116076748	49 397.3	5.30	95	-1 000 000
Carbohydrate metabolism						
36	L-lactate dehydrogenase	gi116076178	35 333.3	5.09	80	-1 000 000
5	Alcohol dehydrogenase, iron-containing	gi116076462	97 224.4	6.11	54	-1 000 000
20	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	gi116076748	49 397.3	5.30	95	-1 000 000
118B	UDP-glucose 4-epimerase	gi116076912	37 401.9	4.82	338	1 000 000
30	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	gi116076998	48 092.6	4.65	159	-1 000 000
95B	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	gi116077018	35 833.4	5.29	163	4.21
27	Phosphoglycerate kinase	gi116077161	41 913.0	4.92	124	-1 000 000
28	Phosphopyruvate hydratase	gi116077344	47 073.8	4.7	659	-1 000 000
97B	Thioredoxin	gi116077356	11 469.9	4.75	317	5.64
40	Triosephosphate isomerase	gi116077374	26 533.3	4.75	294	-1 000 000
110B	Pyruvate kinase	gi116077446	54 720.2	5.04	157	-4.18
123B	1-phosphofructokinase, putative	gi116077448	32 630.9	4.82	305	1 000000
104B	Conserved hypothetical protein	gi116077568	60 161.0	4.47	141	1 000 000
86B	Deoxyribose-phosphate aldolase	gi116077733	22 945.9	5.17	326	2.38
48	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase, putative	gi116077761	22 307.3	5.17	262	-1 000 000
101B	Formate acetyltransferase	gi116077764	87 766.6	5.10	617	3.85
DNA replication or transcription						
25	Transcription-repair coupling factor	gi116076727	134 717.8	5.45	49	-1 000 000
Amino acid metabolism						
14	GMP synthase, C-terminal domain	gi116077050	57 436.4	4.94	610	-1 000 000
Nucleotide metabolism						
80B	Dihydroorotase	gi116076386	45 296.2	5.29	142	2.15
79	Adenylate kinase	gi116076453	23 706.2	4.96	99	-2.12
17	Nicotinate phosphoribosyltransferase, putative	gi116076457	55 093.1	5.12	114	-1 000 000
126B	Dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit	gi116076552	28 864.6	5.00	362	1 000 000
92B	Phosphopentomutase	gi116076924	44 127.2	5.04	336	3.22
90B	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	gi116076925	25 420.9	5.14	75	2.81
124B	Aspartate carbamoyltransferase	gi116077395	34 684.5	5.1	413	1 000 000
96B	Dihydroorotate dehydrogenase, catalytic subunit	gi116077633	33 146.2	5.12	186	4.29
86B	Deoxyribose-phosphate aldolase	gi116077733	22 945.9	5.17	326	2.38
Oxidation						
91B	Oxidoreductase, pyridine nucleotide-disulfide, class I	gi116075996	47 145.6	4.83	227	3.02
82B	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	gi116076029	52 546.4	4.92	638	2.23
(待续)						

(续表)						
36	L-lactate dehydrogenase	gi116076178	35 333.3	5.09	80	-1 000 000
5	Alcohol dehydrogenase, iron-containing	gi116076462	97 224.4	6.11	54	-1 000 000
76	UDP-glucose 6-dehydrogenase, putative	gi116076609	46 584.9	5.04	84	-2.31
95B	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	gi116077018	35 833.4	5.29	163	4.21
98B	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	gi116077095	35 727.4	4.95	431	7.15
73	NADH oxidase	gi116077245	50 223.5	4.99	576	-2.47
96B	Dihydroorotate dehydrogenase, catalytic subunit	gi116077633	33 146.2	5.12	186	4.29
Other						
26	Conserved hypothetical protein	gi116075946	25 659.7	6.34	48	-1 000 000
109	FeS assembly protein SufB	gi116076250	52 643.1	4.94	260	1 000 000
122	Pyridoxine biosynthesis protein	gi116076328	31 720.4	5.23	389	1 000 000
74	Aspartate kinase	gi116076370	50 176.9	5.78	48	-2.41
88B	Non-heme iron-containing ferritin	gi116076391	19 273.8	4.59	191	2.63
75	Acetate kinase	gi116076433	43 315.3	5.09	62	-2.35
17	Nicotinate phosphoribosyltransferase, putative	gi116076457	55 093.1	5.12	114	-1 000 000
99B	Galactose-6-phosphate isomerase, LacA subunit	gi116076466	15 234.7	5.35	394	48.01
129	LemA protein	gi116076579	20 620.8	5.66	462	1 000 000
125	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	gi116076627	32 219.5	4.79	512	1 000 000
13	Metallo-beta-lactamase superfamily protein domain protein	gi116076736	61 023.9	5.67	301	-1 000 000
128	S-ribosylhomocysteine lyase (autoinducer-2 production protein luxS) (AI-2 synthesis protein)	gi116076775	17 912.1	5.31	322	1 000 000
31	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	gi116076809	41 670.7	5.11	160	-1 000 000
46	Glycosyl transferase, group 2 family protein	gi116076827	36 143.5	5.93	140	-1 000 000
115	Diaminopimelate decarboxylase	gi116076879	46 619.4	5.15	227	1 000 000
89B	Conserved hypothetical protein	gi116077084	19 803.2	4.79	330	2.66
67	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NADP-dependent	gi116077099	51 044.9	5.20	172	-3.50
85B	Phosphomethylpyrimidine kinase	gi116077129	28 304.6	5.97	479	2.33
45	Cmp-binding-factor 1	gi116077170	36 278.4	6.07	168	-1 000 000
49	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	gi116077257	20 199.4	5.26	285	-1 000 000
124	Aspartate carbamoyltransferase	gi116077395	34 684.5	5.10	413	1 000 000
127	Ribosomal subunit interface protein	gi116077494	21 086.1	5.08	452	1 000 000
50	Prevent-host-death family protein	gi116077525	9 930.0	5.14	49	-1 000 000
87B	Conserved hypothetical protein	gi116077709	37 881.6	5.10	265	2.55
102	Leucyl-tRNA synthetase	gi116077781	94 307.5	4.92	71	1 000 000
39	FeS assembly ATPase SufC	gi116077784	28 387.5	4.67	571	-1 000 000

注: ^{a)}: Spot No. 编号对应于图 2A、B 上箭头指定的蛋白质点; ^{b)}: Protein Name 来自 *S. pneumoniae* D39 数据库; ^{c)}: Accession No. 来自 *S. pneumoniae* D39 数据库; ^{d)}: F.D. 是指无 Zn^{2+} 培养的细菌全蛋白中某蛋白表达量相对有 Zn^{2+} 培养下同一个蛋白表达量的变化倍数。正值表示蛋白在无 Zn^{2+} 组中表达上调; 负值则表示蛋白在无 Zn^{2+} 组中表达下调; -1 000 000 表示仅在无 Zn^{2+} 组测得该点; 1 000 000 则表示仅在无 Zn^{2+} 组测得该点。

Note: ^{a)}: Spot No. is according to the arrows in the maps marking the position of differentially expressed proteins; ^{b)}: Protein name is according to *S. pneumoniae* D39 database; ^{c)}: Accession No. is according to *S. pneumoniae* D39 database; ^{d)}: F.D. represents change fold of proteins altered upon zinc depletion; Positive values mean up-regulated proteins in Zn^{2+} depletion condition; Negative values mean down-regulated proteins in Zn^{2+} depletion condition; -1 000 000 means proteins only detected in the condition with Zn^{2+} ; 1 000 000 means proteins only detected in Zn^{2+} depletion condition.

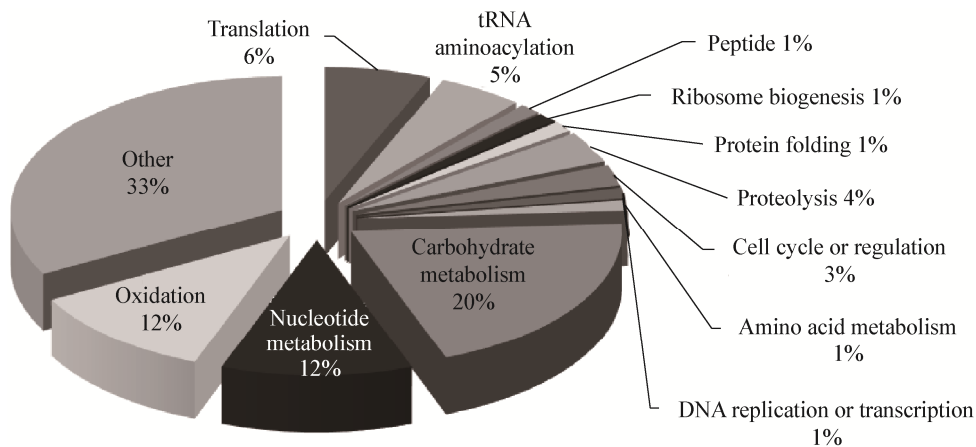


图3 差异表达锌离子调控蛋白的功能分类

Figure 3 Functional classification of differentially expressed regulated by Zn²⁺ proteins

2.5 锌离子调控蛋白的相互作用网络

登录 STRING 网站(<http://string-db.org>), 在数据库输入鉴定到的差异表达蛋白的基因名, 自动生成蛋白质相互作用图。从图 4 可得出, 锌离子调控蛋白之间的相互作用比较紧密, 图中比较核心的位置的基因所编码的都是与糖代谢相关的蛋白, 可知锌离子调控蛋白在细菌的生长代谢中起着重要作用。

2.6 有无锌离子培养条件下 *S. pneumoniae* D39 中锌离子结合蛋白的 2-DE 结果

根据以前我们建立的方法^[16], 用无锌离子和加锌离子的培养基分别培养 *S. pneumoniae* D39 提取总蛋白, 经过 Zn-IMAC 分离后, 获取锌离子结合蛋白, 因为所获蛋白数量较少, 将双向电泳的上样量降为 30 μg, 银染显色后得到两种背景清晰、分辨率高的 2-DE 图谱(图 5)。胶上显示的蛋白约为 200 个, 对于明显差异的 10 个胶点进行质谱鉴定, 共鉴定出 7 个蛋白, 6 个上调, 1 个下调。

2.7 锌离子结合蛋白的功能分类

对这些差异表达的锌离子结合蛋白进行进一步的生物信息学分析, 发现这些蛋白主要位于细胞质, 分子功能分析发现, 这些蛋白具有离子结合功能, 包括结合锌离子 (Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase) 和镁离子 (Lysyl-tRNA synthetase) (表 3 和表 4)。

3 讨论

锌(Zn)是生命代谢中重要的微量金属元素, 它是多种生物酶类的重要辅基, 如碱性磷酸酶、乙醇脱氢酶、氨基肽酶等; 它还参与了糖类、脂类、蛋白质的合成和降解等重要的新陈代谢过程。目前,

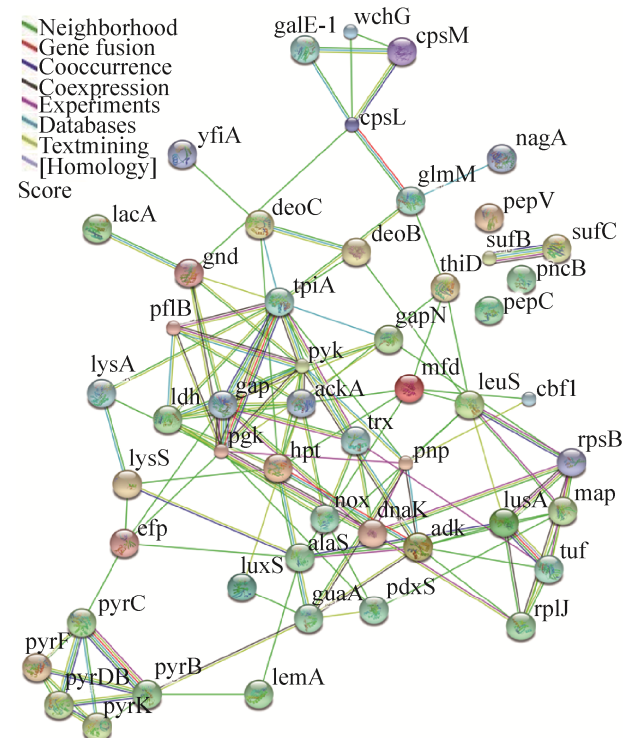


图4 差异表达锌离子调控蛋白相互作用网络

Figure 4 Protein-protein interaction network of differentially expressed regulated by Zn²⁺ proteins

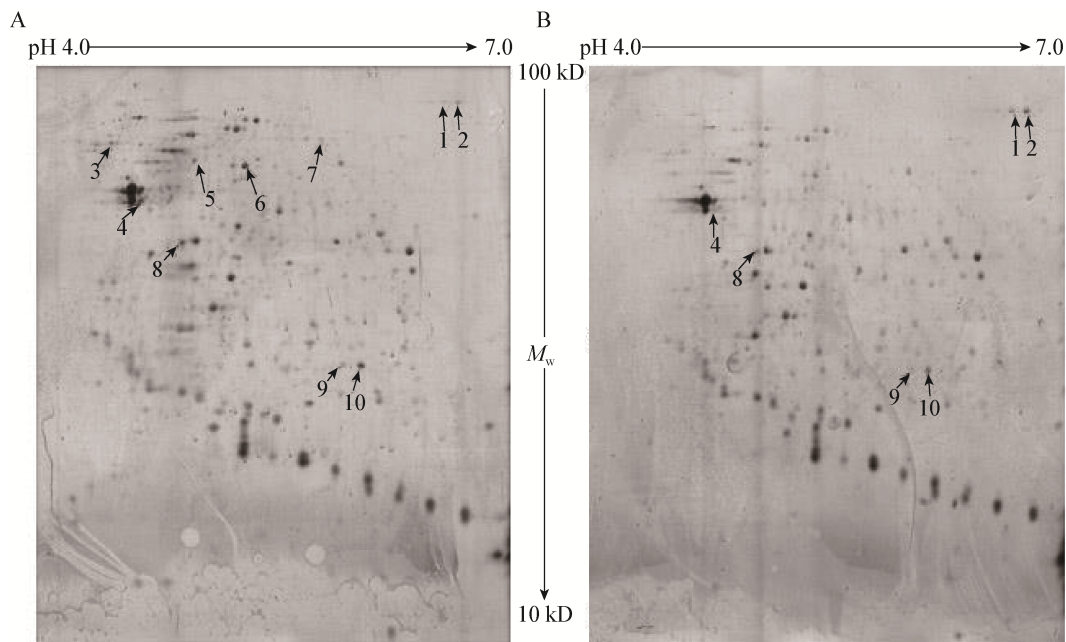


图 5 无 Zn²⁺组(A)和有 Zn²⁺组(B)培养细菌的锌结合蛋白双向电泳图谱比较

Figure 5 2-DE maps of Zn²⁺-binding proteins in *S. pneumoniae* D39 cultured with (B) or without (A) Zn²⁺

表 3 差异表达锌离子结合蛋白

Table 3 Differentially expressed Zn²⁺-binding proteins of *S. pneumoniae* D39 cultured with and without Zn²⁺

Spot No. ^{a)}	Protein Name ^{b)}	Accession No. ^{c)}	Protein M _w	Protein pI	Protein score	F.D. ^{d)}
1	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	gi116515886	97 224.4	6.11	166	-2.04
3	Trigger factor	gi116516755	47 268.8	4.43	59	1 000 000
4	Elongation factor Tu	gi116515356	43 943.4	4.86	63	2.45
5	Elongation factor Tu family protein	gi116516567	68 141.0	4.81	775	1 000 000
6	Lysyl-tRNA synthetase	gi116517090	56 645.8	5.32	415	1 000 000
7	Beta-galactosidase precursor, putative	gi116515472	246 631.6	5.81	372	1 000 000
8	Ornithine carbamoyltransferase	gi116516173	37 887.2	5.23	195	2.31

注: ^{a)}: Spot No. 编号对应于图 5A、B 上箭头指定的蛋白质点; ^{b)}: Protein Name 来自 *S. pneumoniae* D39 数据库; ^{c)}: Accession No. 来自 *S. pneumoniae* D39 数据库; ^{d)}: F.D. 是指无 Zn²⁺ 培养的细菌全蛋白经过 Zn-IMAC 分离后某蛋白表达量相对有 Zn²⁺ 培养下同一个蛋白表达量的变化倍数。正值表示蛋白在无 Zn²⁺ 组中表达上调; 负值则表示蛋白在无 Zn²⁺ 组中表达下调; 1 000 000 表示仅在无 Zn²⁺ 组测得该点。

Note: ^{a)}: Spot No. is according to the arrows in the maps marking the position of differentially expressed proteins; ^{b)}: Protein name is according to *S. pneumoniae* D39 database; ^{c)}: Accession No. is according to *S. pneumoniae* D39 database; ^{d)}: F.D. represents change fold of proteins altered upon zinc depletion; Positive values mean up-regulated proteins in Zn²⁺ depletion condition; Negative values mean down-regulated proteins in Zn²⁺ depletion condition; 1 000 000 means proteins only detected in Zn²⁺ depletion condition.

表 4 差异表达锌离子结合蛋白的功能和亚细胞结构定位

Table 4 Functional and locational classification of differentially expressed Zn²⁺-binding proteins

Protein	Function	Location
Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	Zinc ion binding	Unknown
Trigger factor	Protein transition	Unknown
Elongation factor Tu	GTP-binding	Cytoplasm
Elongation factor Tu family protein	GTP-binding	Cytoplasm
Lysyl-tRNA synthetase	Magnesium ion binding	Cytoplasm
Beta-galactosidase precursor, putative	Carbohydrate metabolic process	Cell wall or membrane
Ornithine carbamoyltransferase	Amino acid binding	Ornithine carbamoyltransferase complex

利用蛋白质组学手段来研究锌离子对肺炎链球菌锌离子调控机制的研究几乎没有。

利用蛋白质组学结合金属亲和层析技术,系统分析锌离子缺失对肺炎链球菌蛋白质表达的影响,得到了一系列不同功能类别的差异表达蛋白。GO 功能分析显示锌离子缺失对肺炎链球菌多个代谢通路中的蛋白造成影响,这些锌离子调控蛋白质中占比例最大的是碳水化合物代谢即糖代谢,其次是氧化作用和核酸代谢。我们发现在锌离子匮乏条件下,参与糖代谢的关键酶 L-lactate dehydrogenase、Phosphoglycerate kinase、Triosephosphate isomerase 等的表达大大降低。值得注意的是,蛋白相互作用的网络图表明上述几个蛋白在所鉴别的蛋白中处于中心位置(图 4)。下调表达参与糖代谢的这些蛋白中,大部分都属于酶类,在糖代谢中起着非常重要的作用,说明锌离子匮乏阻碍肺炎链球菌的糖代谢;有趣的是,锌离子缺失后导致 Aspartate carbamoyltransferase 的表达大大上调,促进氨甲酰磷酸与天冬氨酸结合形成氨甲酰天冬氨酸。氨甲酰天冬氨酸通过可逆的环化脱水作用转变成二氢乳清酸。由于蛋白 Dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit 和蛋白 Dihydroorotate dehydrogenase catalytic subunit 的表达上调,又促进催化了二氢乳清酸被氧化成乳清酸,最终促进了尿嘧啶核苷酸的合成。而蛋白 Nicotinate phosphoribosyltransferase 的表达大大下调, Adenylate kinase 的表达也下调,这将影响嘌呤核苷酸的合成。由此表明,锌离子缺失干扰了肺炎链球菌的核酸代谢。

另外,我们发现一些差异表达倍数较高的蛋白主要参与蛋白翻译和合成及正确折叠。在锌离子匮乏条件下, Translation elongation factor P 的表达急剧下降,在蛋白质合成中,它是刺激蛋白合成的第一个肽段的关键蛋白^[17-18]。同时, Translation elongation factor G 的表达大大上调,它在蛋白翻译的两个步骤中起作用,在延伸阶段时, EF-G/GTP 与 tRNA 结合到核糖体的位点 A 和

P, 然后促使 tRNA 结合到位点 P 和 E^[19]。并且, Chaperone protein DnaK 的表达急剧下降,该蛋白对折叠起着关键作用,防止蛋白在压力条件下降解^[20]。由此可知,锌离子匮乏对肺炎链球菌的蛋白翻译和正确折叠有很大影响。

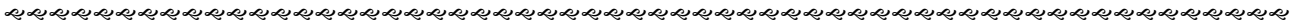
4 结论

采用双向凝胶电泳技术结合金属亲和层析和质谱技术鉴定蛋白,进而通过生物信息学分析蛋白质相互关系,探讨细菌适应锌离子匮乏条件下的关键代谢通路和蛋白。研究结果表明,锌离子缺乏主要调控糖代谢、核酸代谢和氧化还原作用等通路,并且对蛋白质翻译、合成及正确折叠等方面有较大影响。这说明肺炎链球菌为在宿主金属离子限制的条件下生存下来,系统调整多个代谢通路,以保证自身存活并对宿主形成感染。本研究为揭示细菌在宿主环境,特别是金属离子匮乏条件下的适应性生长机制提供理论基础。

参考文献

- [1] Lange V, Malmström JA, Didion J, et al. Targeted quantitative analysis of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiple reaction monitoring[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008, 7(8): 1489-1500
- [2] Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function[J]. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133(5): 1452S-1456S
- [3] Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, et al. Zinc and its role in immunity and inflammation[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2015, 14(4): 277-285
- [4] Strand TA, Briles DE, Gjessing HK, et al. Pneumococcal pulmonary infection, septicaemia and survival in young zinc-depleted mice[J]. *British Journal of Nutrition*, 2001, 86(2): 301-306
- [5] Kloosterman TG, Witwicki RM, van der Kooi-Pol MM, et al. Opposite effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-mediated expression of the virulence genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(15): 5382-5393
- [6] Manzoor I, Shafeeq S, Afzal M, et al. The Regulation of the AdcR regulon in *Streptococcus pneumoniae* depends both on Zn(2+)- and Ni(2+)-availability[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 91
- [7] Eijkelkamp BA, Morey JR, Ween MP, et al. Extracellular zinc competitively inhibits manganese uptake and compromises oxidative stress management in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89427
- [8] Martin JE, Edmonds KA, Bruce KE, et al. The zinc efflux activator SczA protects *Streptococcus pneumoniae* serotype 2

- D39 from intracellular zinc toxicity[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(4): 636-651
- [9] Sun XS, Chiu JF, He QY. Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2005, 2(5): 649-657
- [10] Sun XS, Xiao CL, Ge RG, et al. Putative copper-and zinc-binding motifs in *Streptococcus pneumoniae* identified by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2011, 11(16): 3288-3298
- [11] Nanduri B, Shah P, Ramkumar M, et al. Quantitative analysis of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 response to *in vitro* iron restriction by 2-D LC ESI MS/MS[J]. *Proteomics*, 2008, 8(10): 2104-2114
- [12] Zhang LH, Yang XY, He X, et al. Establishment and optimization of technique of two-dimensional electrophoresis for proteome of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(3): 17-21 (in Chinese)
张留辉, 阳小燕, 贺翔, 等. 肺炎链球菌蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. *江西农业学报*, 2010, 22(3): 17-21
- [13] Perrin C, González-Márquez H, Gaillard JL, et al. Reference map of soluble proteins from *Streptococcus thermophilus* by two-dimensional electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(5): 949-955
- [14] Danos O, Svinartchouk F. Dialysis-assisted two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(17): 3475-3479
- [15] Sun XS, Jia HL, Xiao CL, et al. Bacterial proteome of *Streptococcus pneumoniae* through multidimensional separations coupled with LC-MS/MS[J]. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 2011, 15(7/8): 477-482
- [16] Guo Z, Han JL, Yang XY, et al. Proteomic analysis of the copper resistance of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Metallomics*, 2015, 7(3): 448-454
- [17] Bailly M, de Crécy-Lagard V. Predicting the pathway involved in post-translational modification of Elongation factor P in a subset of bacterial species[J]. *Biology Direct*, 2010, 5: 3
- [18] Blaha G, Stanley RE, Steitz TA. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome[J]. *Science*, 2009, 325(5943): 966-970
- [19] Moazed D, Noller HF. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome[J]. *Nature*, 1989, 342(6246): 142-148
- [20] Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR. Protein quality control: triage by chaperones and proteases[J]. *Genes & Development*, 1997, 11(7): 815-823



征订启事

欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012、2013、2014、2015年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续4年获得“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选300种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助;2015年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2017年每册定价80元,全年960元,我们免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413