

研究报告

基于串联质谱标签法和平行反应监测技术的
氟喹诺酮耐药沙门菌蛋白质组学分析

李琳* 王磊 王文静 张瑞良 徐军 王瑞 赵霞

(安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036)

摘要:【背景】随着沙门菌对氟喹诺酮类药物的耐药性不断增强,对其耐药机理的研究显得尤为迫切和重要,蛋白质组学分析将为沙门菌的耐药机理研究提供新的靶点和方向。【目的】对鼠伤寒沙门菌诱导获得耐药性前后进行蛋白质组学分析,为深入研究沙门菌耐药机理奠定基础。【方法】用环丙沙星对鼠伤寒沙门菌 ATCC13311 进行耐药性诱导,利用串联质谱标签法(Tandem mass tag, TMT)对其耐药性进行差异蛋白的筛选和生物信息学分析,并选取 15 个差异蛋白进行平行反应监测(Parallel reaction monitoring, PRM)靶向蛋白验证。【结果】筛选出 318 个差异表达蛋白,其中上调 159 个,下调 159 个,涉及的 KEGG 通路主要包括细菌趋药性、ABC 转运蛋白、双组分系统等;PRM 定量到 13 个验证蛋白且变化趋势与 TMT 一致。【结论】通过 TMT 定量结合 PRM 靶向验证对鼠伤寒沙门菌耐药前后进行蛋白质组学分析,筛选出多个差异蛋白和代谢通路,包括外排泵相关蛋白、外膜蛋白、双组分相关蛋白及通路、细菌趋化性相关蛋白及通路等,为沙门菌氟喹诺酮类耐药机理的深入研究奠定了基础。

关键词: 沙门菌, 耐药性, 蛋白质组学, 串联质谱标签法, 平行反应监测

Fluoroquinolone resistant *Salmonella* proteomics analysis based on tandem mass tag and parallel reaction monitoring techniques

LI Lin* WANG Lei WANG Wen-Jing ZHANG Rui-Liang XU Jun

WANG Rui ZHAO Xia

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Background] As *Salmonella* resistance to fluoroquinolones has increased gradually, it is very urgent and important to study the mechanism of drug resistance. Proteomics analysis will provide new targets and directions for the study on resistance mechanism in *Salmonella*. [Objective]

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31772802); Anhui University Natural Science Key Research Project (KJ2017A132); Key Project of Outstanding Young Talent Support Program of Anhui Province (gxyqZD2016041)

*Corresponding author: E-mail: lilinah@126.com

Received: December 27, 2017; **Accepted:** April 20, 2018; **Published online** (www.cnki.net): April 24, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31772802); 安徽高校自然科学基金重点项目(KJ2017A132); 安徽省优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016041)

*通信作者: E-mail: lilinah@126.com

收稿日期: 2017-12-27; 接受日期: 2018-04-20; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-24

Proteomic analysis of *Salmonella typhimurium* was performed before and after induction, in order to lay the foundation for further studies on the mechanism in *Salmonella* resistance. [Methods] Ciprofloxacin was used to induce *Salmonella typhimurium* ATCC13311 to obtain resistance, screening and bioinformatics analysis of differential proteins were performed by using tandem mass tag (TMT). Besides, fifteen differential proteins were selected for parallel reaction monitoring (PRM) target verification. [Results] The results showed that a total of 318 differentially expressed proteins were screened, among which 159 proteins were up-regulated and 159 proteins were down-regulated. The KEGG pathways involved in these proteins mainly including bacterial chemotaxis, ABC transporters, two-component systems, etc; PRM was successfully quantitated to 13 validated proteins and the trend was consistent with TMT. [Conclusion] In this study, the proteomics analysis of *Salmonella typhimurium* parental strain and ciprofloxacin-resistant strain was conducted by TMT quantitatively combined with PRM target verification, screening out a variety of differential proteins and metabolic pathways, including efflux pump related proteins, outer membrane proteins, two-component related proteins and pathways, bacteria chemotaxis related proteins and pathways, etc. The study laid a certain foundation for further studies on the mechanism of fluoroquinolone resistance in *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella*, Drug resistance, Proteomics, Tandem mass tag, Parallel reaction monitoring

沙门菌(*Salmonella*)是重要的人畜共患病原菌,可引起伤寒、副伤寒和败血症等,严重危害养殖业和食品安全^[1]。氟喹诺酮类药物(Fluoroquinolones, FQs)是一类用于治疗沙门菌感染的常用药物,但由于其不规范使用导致了近年来 FQs 的耐药性不断增加^[2-4]。沙门菌的 FQ 耐药机制非常复杂,主要包括基因突变、产生水解酶或钝化酶、药物靶位改变、细胞膜通透性改变、主动外排功能增强和获得外源耐药基因等。目前,已有基因组学、转录组学研究沙门菌耐药性的相关报道^[5-6],而从蛋白质组学的角度研究诱导耐药沙门菌的 FQ 耐药机理尚未见报道。

高通量蛋白质组学技术的应用为研究细菌耐药性提供了有效途径。串联质谱标签(Tandem mass tag, TMT)是利用化学标签通过串联质谱对不同样品中的蛋白进行同时鉴定和定量的研究方法,已广泛应用于蛋白质组学研究^[7]。传统的蛋白质组验证手段如蛋白质免疫印迹法(Western blot)和酶联免疫吸附测定(ELISA)等由于抗体等要求,使得验证对象和数量受到了限制,而平行反应监测(Parallel reaction monitoring, PRM)是一种靶向的蛋白质组学技术,具有灵敏度高、分辨率高、可同时检测多个目的蛋白、兼具定性定量且无需抗体等优点,主要用于后期差异蛋白质的规模化验证^[8],是理想

的验证手段。本研究利用 TMT 定量蛋白质组学结合 PRM 技术验证,对鼠伤寒沙门菌 FQ 耐药性获得前后进行蛋白质组学分析,为深入研究沙门菌的 FQ 耐药机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

鼠伤寒沙门菌 ATCC13311 (标准株)由中国农业大学动物医学院兽医药理学与毒理学实验室惠赠,沙门菌环丙沙星耐药株由本实验室诱导并保存。

1.2 主要试剂和仪器

TMT 标记试剂盒,赛默飞世尔科技公司;胰蛋白酶, Promega 公司;BCA 试剂盒,碧云天生物技术有限公司;乙腈, Fisher Chemical 公司;碘代乙酰胺、二硫苏糖醇和尿素等试剂, Sigma-Aldrich 公司;环丙沙星标准品,中国食品药品检定研究院;其余常规试验试剂均为国产分析纯。

EASY-nLC 1000 超高效液相系统、Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪,赛默飞世尔科技公司。

1.3 培养基

MH 肉汤培养基(Mueller Hinton),杭州微生物试剂有限公司;LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

1.4 沙门菌环丙沙星耐药性诱导

使用浓度梯度递增法诱导耐药菌株^[9], 将鼠伤寒沙门菌标准株接种于 MH 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 菌液接种于环丙沙星(MIC 值为 0.004 mg/L)的 MH 肉汤中培养。然后, 不断以相同方式接种 ATCC13311 于药物浓度依次翻倍的 MH 肉汤中, 直至菌株可以在环丙沙星浓度为 32 mg/L 的培养基中生长。耐药菌株在空白培养基中传 5 代, 然后进行药敏实验以确定其并非适应性生长。参照 CLSI 标准对鼠伤寒沙门菌耐药株进行环丙沙星的 MIC 值测定。

1.5 TMT 定量蛋白组学方法和 PRM 靶向蛋白验证

由杭州景杰生物科技有限公司提供并完成。

1.5.1 蛋白提取和定量

分别挑取沙门菌标准株与耐药株的单菌落, 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h, 再转接于相应的 LB 培养基培养至对数前期(OD_{600} 约 0.4)。菌液于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 去上清液得菌体沉淀。再用 0.01 mol/L PBS 洗涤菌体沉淀并同上离心, 重复 2 次, 各组样品分别加入 300 μ L 裂解缓冲液(8 mol/L 尿素, 1% 蛋白酶抑制剂, 2 mmol/L EDTA), 超声裂解(功率 900 W, 超声 3 min), 4 °C、20 000 \times g 离心 10 min, 上清液转移至新的离心管, 取 5 μ L 蛋白样品, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

根据蛋白浓度测定结果, 每个样品取 30 μ g 蛋白到离心管中, 加入 5 μ L 4 \times Loading buffer, 再加入 2% SDS 使总体积为 20 μ L, 金属浴 100 °C 热变性 5 min; 依次上样 1 μ L 预染蛋白 Marker 和 20 μ L 蛋白样品, 样品相邻的空白孔上样 20 μ L 1 \times Loading buffer 封闭; 浓缩胶 80 V 电泳 20 min, 分离胶 120 V 电泳到溴酚蓝指示带到胶底端; 胶取出后于考马斯亮蓝 R250 染液中室温染色 2 h, 然后加入脱色液, 脱色至背景无色、条带清晰。

1.5.2 样品的胰酶酶解、TMT 标记蛋白及 HPLC 分级

蛋白溶液中加入二硫苏糖醇使其终浓度为

5 mmol/L, 56 °C 还原 30 min。之后加入碘代乙酰胺使其终浓度为 11 mmol/L, 室温避光孵育 15 min。最后将样品的尿素浓度稀释至低于 2 mol/L。以 1:50 的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶, 37 °C 酶解过夜。再以 1:100 的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶, 继续酶解 4 h; 胰酶酶解的肽段用 Strata X C18 (Phenomenex)除盐后真空冷冻干燥。以 0.5 mol/L TEAB 肽段用高 pH 反向 HPLC 分级, 色谱柱为 Agilent 300 Extend C18 (5 μ m 粒径, 4.6 mm 内径, 250 mm 长)。根据 TMT 试剂盒操作说明标记肽段, 标记试剂解冻后用乙腈溶解, 与肽段混合后室温孵育 2 h, 标记后的肽段混合后除盐, 真空冷冻干燥; 分级梯度为 8%–32% 乙腈, pH 9.0, 60 min 分离 60 个组分, 随后肽段合并为 5 个组分, 合并后的组分经真空冷冻干燥后进行后续操作。

1.5.3 液相色谱-质谱联用分析

肽段用液相色谱流动相 A 相(0.1% 甲酸水溶液体积比)溶解后使用 EASY-nLC 1000 超高效液相系统进行分离。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液; 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液。液相梯度设置: 0–40 min, 6%–20% B; 40–52 min, 20%–30% B; 52–56 min, 30%–80% B; 56–60 min, 80% B, 流速维持在 350 nL/min。

肽段经由超高效液相系统分离后被注入 NSI 离子源中进行电离, 然后使用 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪进行分析。离子源电压设置为 2.4 kV, 肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨的 Orbitrap 进行检测和分析。数据采集模式使用数据依赖型扫描(DDA)程序。为了提高质谱的有效利用率, 自动增益控制(AGC)设置为 5E4, 信号阈值设置为 5 000 ions/s, 最大注入时间设置为 100 ms, 串联质谱扫描的动态排除时间设置为 30 s, 避免母离子的重复扫描。

1.5.4 数据库搜索

二级质谱数据使用 MaxQuant (V1.5.2.8)进行检索。检索参数设置: 数据库为 Uniprot Salmonella typhimurium (4 743 条序列), 添加了反库以计算随

机匹配造成的假阳性率(FDR),并且在数据库中加入常见的污染库,用于消除鉴定结果中污染蛋白的影响;酶切方式设置为 Trypsin/P;漏切位点数设为2;肽段最小长度设置为7个氨基酸残基;肽段最大修饰数设为5;First search 和 Main search 的一级母离子质量误差容忍度分别设为 0.02 g/L 和 0.005 g/L,二级碎片离子的质量误差容忍度为 0.02 Da;将半胱氨酸烷基化设置为固定修饰,可变修饰为甲硫氨酸的氧化和蛋白 N 端的乙酰化;定量方法设置为 TMT-6plex,蛋白鉴定、PSM (Peptide spectrum matching)鉴定的 FDR 都设置为 1%。

1.5.5 PRM 靶向蛋白验证

提取样品蛋白,用胰酶酶解后,肽段用液相色谱流动相 A 相(0.1% 甲酸水溶液体积比)溶解后使用 EASY-nLC 1000 超高效液相系统进行分离。流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 2% 乙腈的水溶液;流动相 B 为含 1% 甲酸和 90% 乙腈的水溶液。液相梯度设置:0–38 min, 7%–25% B; 38–52 min, 23%–40% B; 52–56 min, 40%–80% B; 56–60 min, 80% B, 流速维持在 700 nL/min。

肽段经由超高效液相系统分离后被注入 NSI 离子源中进行电离,然后使用 Q Exactive™ Plus 质谱进行分析。离子源电压设置为 2.0 kV,肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨率的 Orbitrap 进行检测和分析。数据采集模式使用数据非依赖型扫描(DIA)程序,HCD 碰撞池的碎裂能量设置为 27。一级质谱自动增益控制(AGC)设置为 3E6,最大离子注入时间(Maximum IT)设置为 50 ms;二级质谱自动增益控制(AGC)设置为 1E5,最大离子注入时间(Maximum IT)设置为 100 ms,隔离窗口(Isolation window)设置为 2.0 m/z。

肽段参数:蛋白酶设置为 Trypsin[KR/P],最大漏切位点数设置为 0,肽段长度设置为 7–25 个氨基酸残基,设置半胱氨酸烷基化为固定修饰。Transition 参数:母离子电荷设置为 2、3,子离子电荷设置为 1,离子类型设置为 b、y,离子匹配的质量误差容忍度设置为 0.02 Da。

1.6 生物信息学分析

将蛋白质组学的数据进行分析处理后,以 2 倍为变化阈值(Fold change \geq 2 或 \leq 0.5), $P<0.05$ 为标准^[10]。将筛选出来的差异蛋白进行蛋白注释、蛋白质功能富集等。

2 结果与分析

2.1 药敏实验结果

药敏实验结果显示,鼠伤寒沙门菌标准株经环丙沙星诱导后,对环丙沙星的耐药值为 32 mg/L。

2.2 蛋白鉴定总览

本实验共鉴定了 2 517 个蛋白质,其中 2 265 个蛋白质具有定量信息。其中分别以变化阈值为 1.2、1.3、1.5 和 2.0, $P<0.05$ 为标准,差异蛋白数量见表 1。

2.3 蛋白注释

由图 1 可知,在上调蛋白中,参与的生物过程有刺激反应、信号处理、定位过程、运动反应等。分子功能主要表现在催化活性、信号传感器活动、转运活性等。细胞组分主要集中在细胞器、胞外区、大分子复合物、细胞膜。

由图 2 可知,在 159 个下调蛋白中,参与的生物过程有运动反应、信号处理、刺激反应、定位过程等。分子功能主要表现在核酸结合转录因子的活动、分子传感器活动、信号传感器活动、转运活性等。细胞组分主要集中在细胞器、大分子复合物、细胞膜。

表 1 差异蛋白总览

Table 1 Overview of differential proteins

比较组 Compare group	耐药株/标准株 Drug resistant strains/Standard strains	
	上调 Up regulated	下调 Down regulated
	Fold change \geq 1.2	489
Fold change \geq 1.3	413	374
Fold change \geq 1.5	305	263
Fold change \geq 2.0	159	159

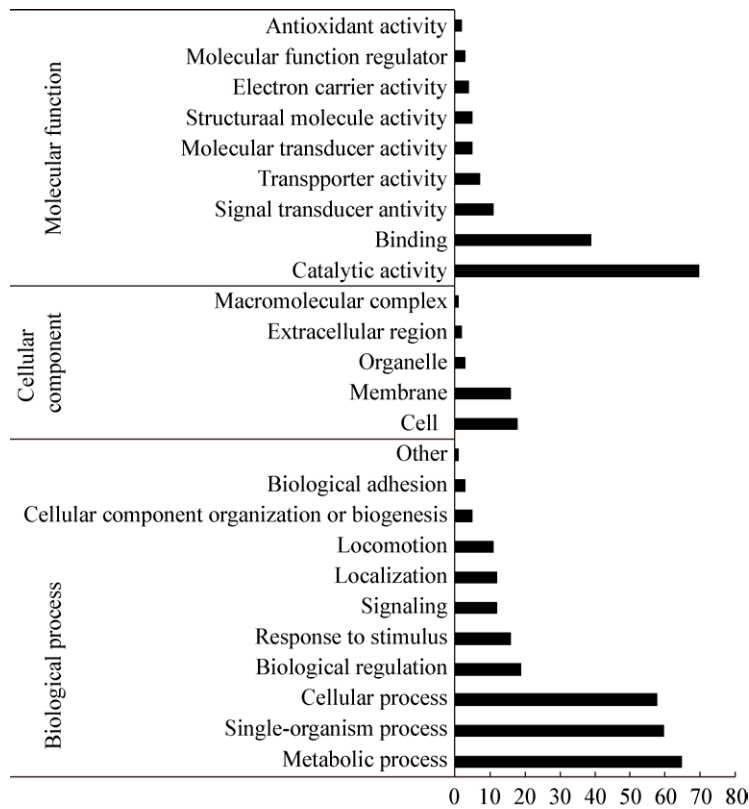


图 1 上调蛋白在 GO 二级注释中的分布情况(耐药株/标准株)

Figure 1 Distribution of up-regulated proteins in GO secondary annotation (drug resistant strains/standard strains)

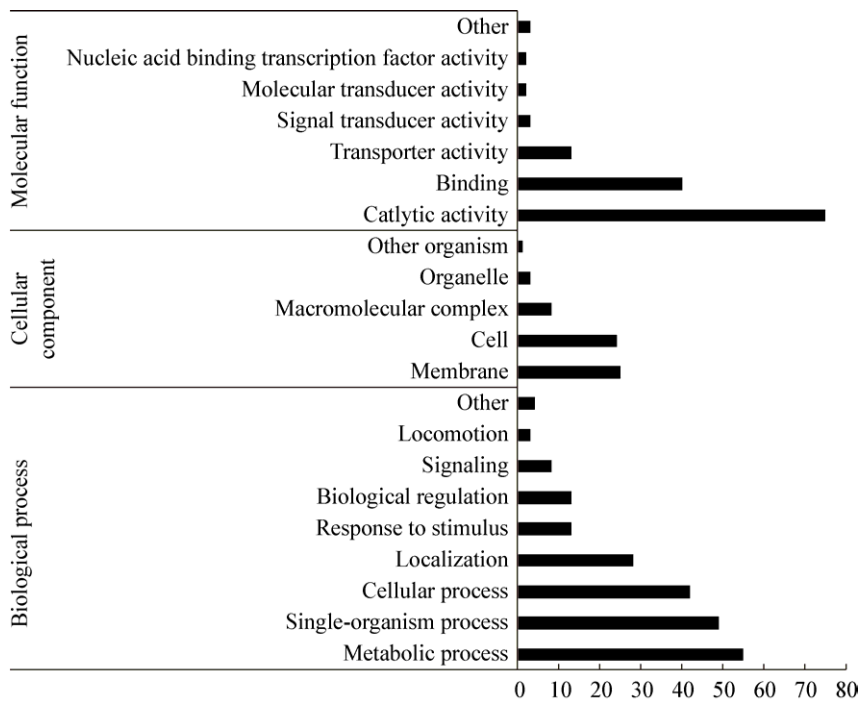


图 2 下调蛋白在 GO 二级注释中的分布情况(耐药株/标准株)

Figure 2 Distribution of down-regulated proteins in GO secondary annotation (drug resistant strains/standard strains)

2.4 差异表达蛋白的功能富集分析

对鉴定到的全体蛋白的注释以及差异表达蛋白的筛选,进行 GO、KEGG、蛋白结构域(Domain)等功能注释类型的富集分析,运用 Fisher's exact test (费希尔精确检验)得到的 p 值进行负对数($-\log_{10}$)转换,即得到转换后的值越大则此功能类型的富集越显著。

2.4.1 GO 富集

由图 3 可知,在上调蛋白参与的生物过程中,富集显著的有趋药性、运动反应、对外刺激反应、化学反应、信号转导等方面;分子功能中富集显著的有信号传感器活动;细胞组分中富集显著的有细胞突触、膜的有机组分、膜固有组分以及膜组分。

由图 4 可知,在下调蛋白参与的生物过程中,富集显著的有定位过程、转运、糖的运输及合成、丙酸的分解及代谢等方面;分子功能中富集显著的有糖的跨膜转运活性、膜孔蛋白活性等方面。

2.4.2 KEGG 通路富集

KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)是连接已知分子间相互作用的信息网络,如代谢通路、复合物、生化反应。KEGG 通路主要包括:代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程等。

由图 5 和图 6 可知,上调蛋白富集显著的 KEGG 通路有细菌趋化性、双组分系统、链霉素的生物合成、组氨酸的代谢和酮化合物糖单位的生物合成;下调蛋白富集显著的 KEGG 通路有 ABC 转

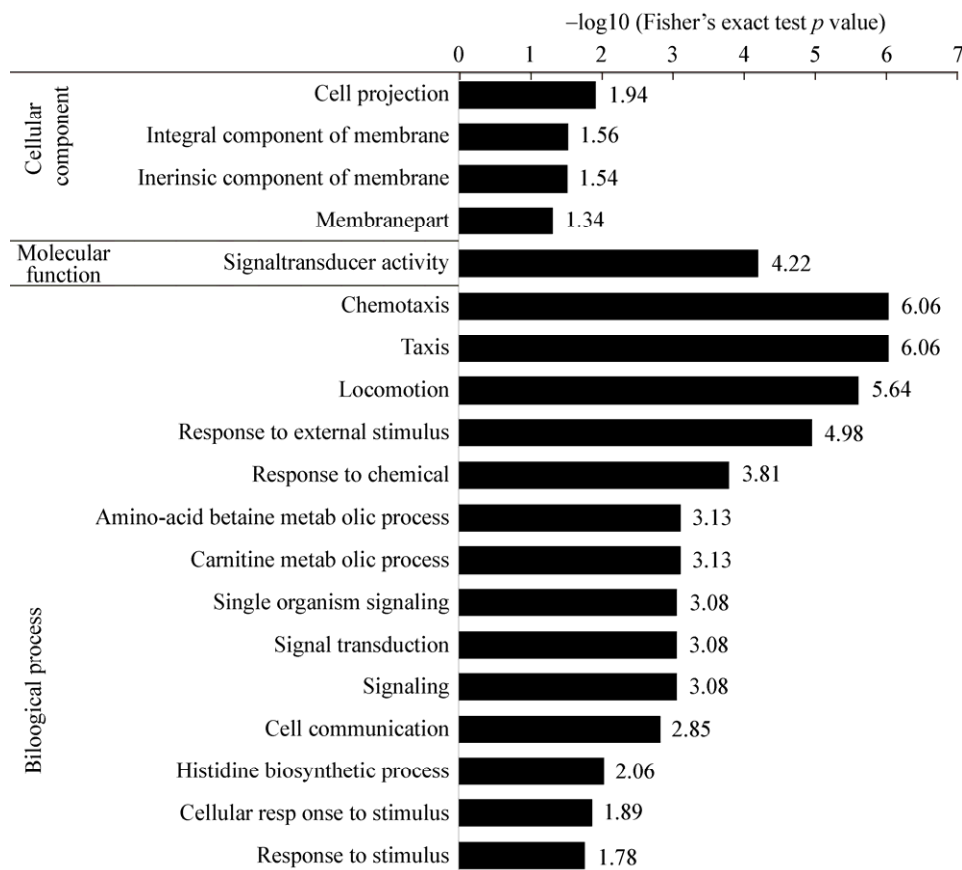


图 3 上调蛋白 GO 富集结果(耐药株/标准株)

Figure 3 Up-regulation of protein GO enrichment results (drug resistant strains/standard strains)

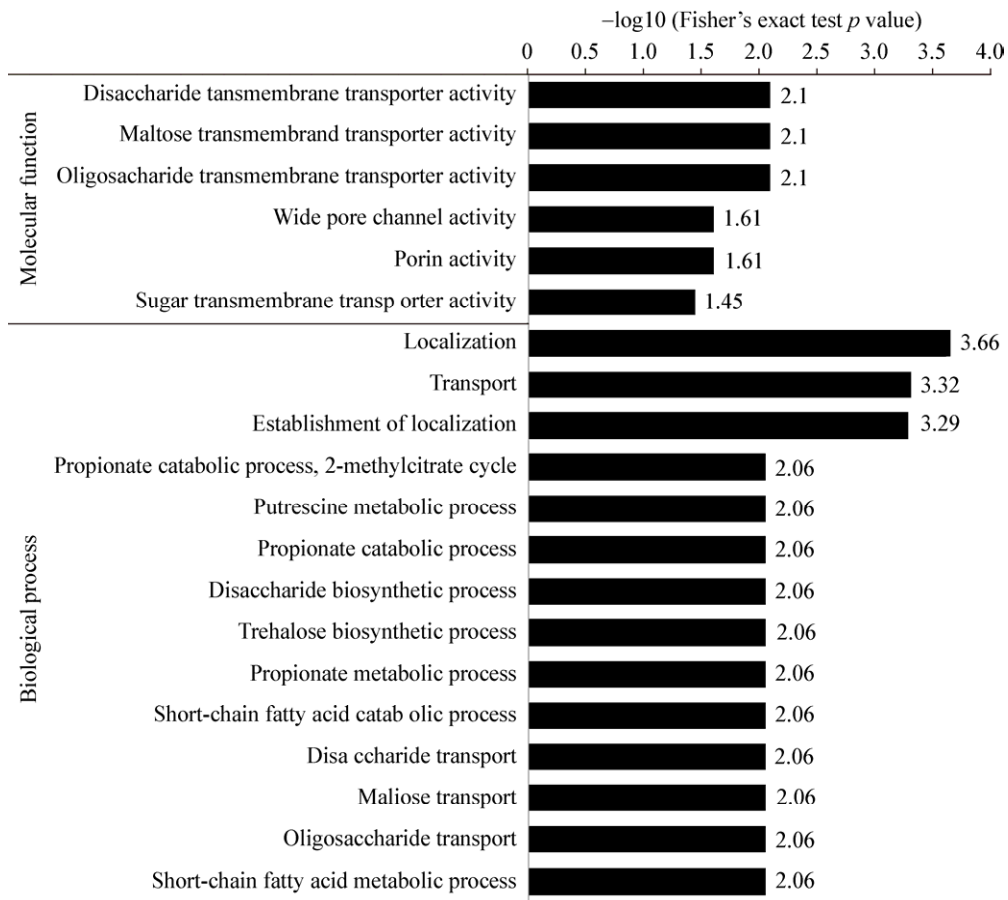


图 4 下调蛋白 GO 富集结果(耐药株/标准株)

Figure 4 Down-regulation of protein GO enrichment results (drug resistant strains/standard strains)

运系统、淀粉与蔗糖的代谢、细菌群体感应、 β -内酰胺类抗性、氨基糖与核苷酸糖代谢、阳离子抗菌肽抗性。细菌趋化性 KEGG 通路和双组分系统 KEGG 通路见图 7 和图 8 (红色表示上调蛋白, 绿色表示下调蛋白)。

2.5 PRM 验证结果

由表 2 可知, 在 15 个目的蛋白的 PRM 验证中, 受限于部分蛋白的特性及其表达丰度, 定量到了 13 个目的蛋白, PRM 验证结果与 TMT 定量结果趋势一致。

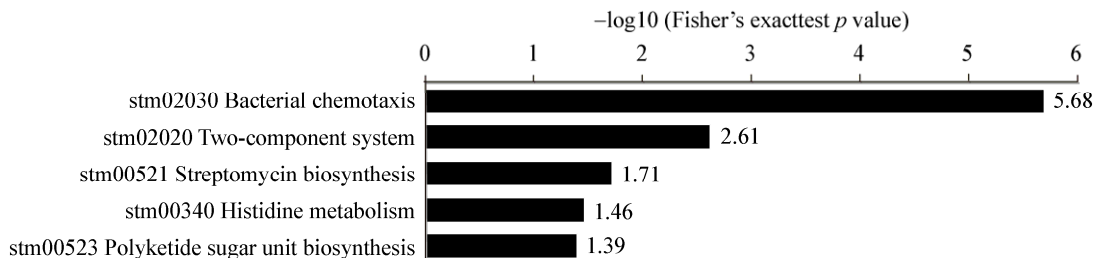


图 5 上调蛋白的 KEGG 通路富集结果(耐药株/标准株)

Figure 5 Up-regulation of protein KEGG pathway enrichment results (drug resistant strain/standard strain)

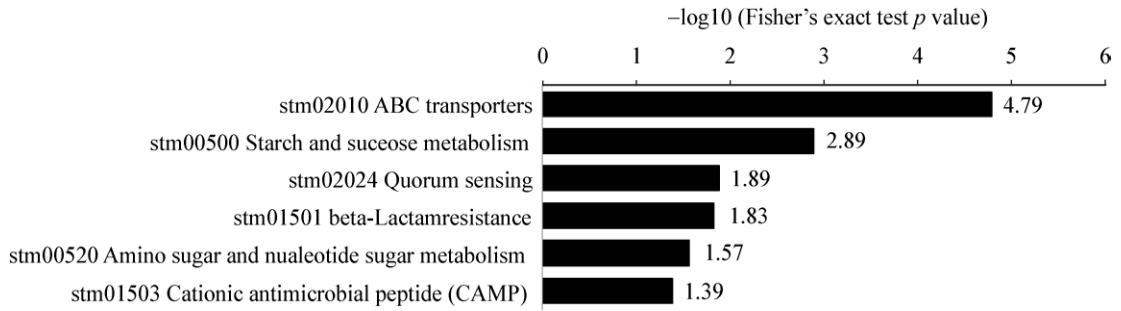


图 6 下调蛋白的 KEGG 通路富集结果(耐药株/标准株)

Figure 6 Down-regulation of protein KEGG pathway enrichment results (drug resistant strains/standard strains)

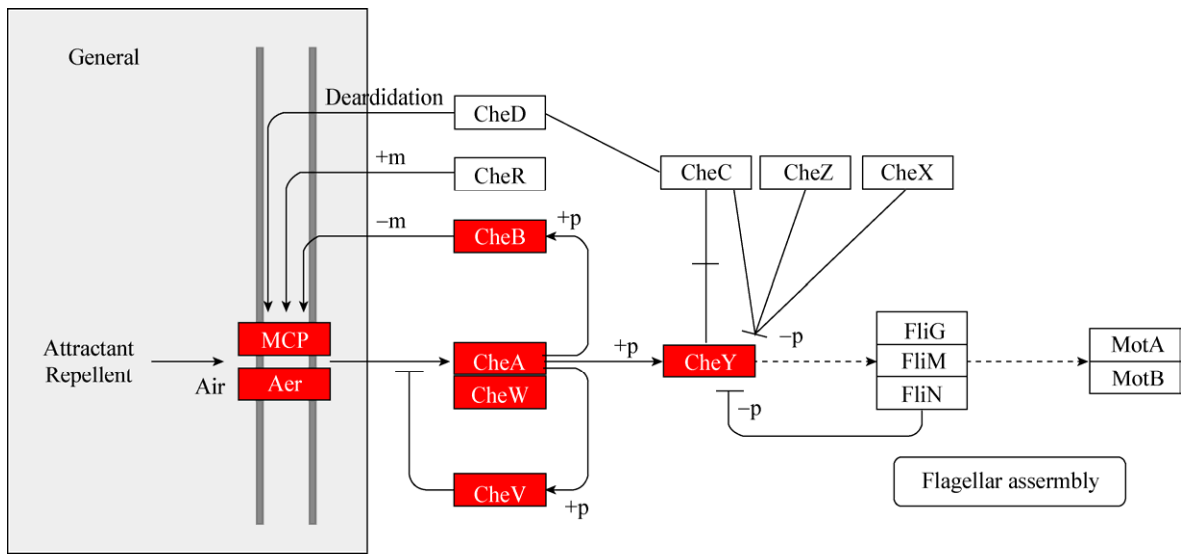


图 7 细菌趋化性 KEGG 通路

Figure 7 KEGG pathway of bacterial chemotaxis

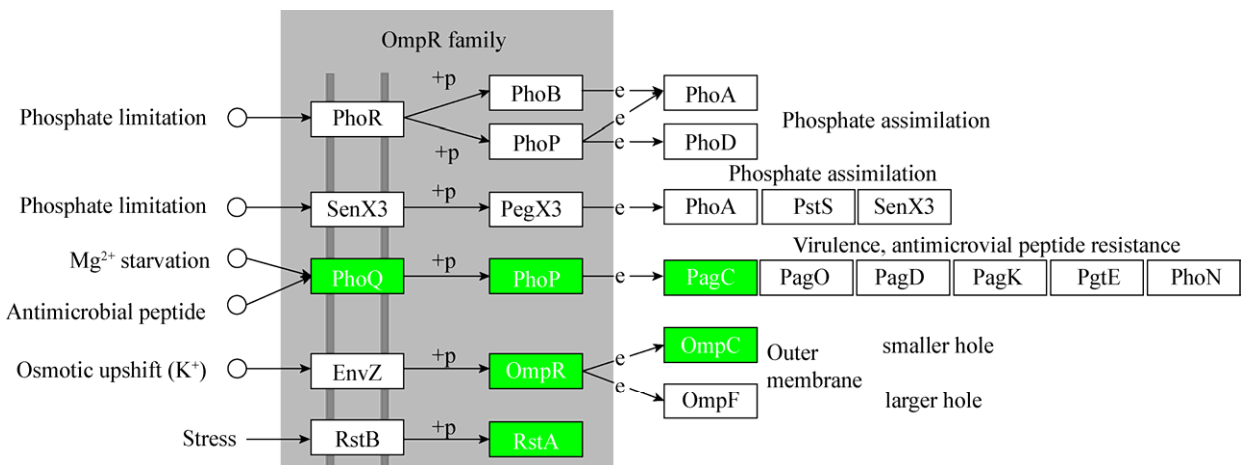


图 8 双组分系统 KEGG 通路(部分)

Figure 8 KEGG pathway of two-component system (part)

表 2 TMT 和 PRM 定量结果比较

Table 2 Comparison of TMT and PRM quantification results

蛋白名称 Protein name	蛋白编号 Protein accession No.	蛋白描述 Protein description	TMT	PRM
AcrA	A0A0D6H824	Multidrug transporter	4.319	5.057
HisJ	A0A0D6FAY9	Histidine ABC transporter substrate-binding protein HisJ	2.174	2.506
Cse4	A0A0D6IH30	CRISPR-associated protein Cse4	2.238	2.960
TolC	A0A0M2J547	Membrane protein	3.140	5.237
bepG_1	A0A0D6H9C4	Efflux pump membrane transporter	3.550	7.088
CheW	A0A0D6FN54	Chemotaxis protein CheW	11.371	40.983
OmpC	C7EXM1	Membrane protein	0.128	0.010
OmpR	A0A0J6DVR3	Osmolarity response regulator	0.398	0.319
PhoQ	A0A0W5X4D4	Sensor protein PhoQ	0.382	0.122
PhoP	A0A0J5IUL5	Transcriptional regulator	0.371	0.095
RstA	A0A0D6G7Y0	Transcriptional regulator	0.383	0.054
FliC	A0A0W5C546	Flagellin (Fragment)	10.309	INF
Hfq	A0A0B5KAT0	RNA-binding protein Hfq	7.808	INF

注: INF 表示在 PRM 实验中该蛋白只在耐药菌中被鉴定到。

Note: INF indicates that the protein was identified only in drug-resistant bacteria in PRM experiments.

3 讨论与结论

本研究利用 TMT 蛋白定量结合 PRM 靶向蛋白验证技术,对鼠伤寒沙门菌标准株和耐药株进行了蛋白质组学分析,共鉴定到 2 517 个蛋白质,其中 2 265 个具有定量信息,标记效率达到了 90%,标记效果良好,共筛选出差异蛋白 318 个(上调 159 个、下调 159 个)。结果显示,鼠伤寒沙门菌在获得 FQ 耐药性之后,差异表达蛋白显著富集在趋药性、双组分系统、ABC 转运等途径;筛选了 15 个差异显著的蛋白做 PRM 靶向蛋白验证,成功定量到 13 个差异蛋白且与 TMT 结果相符。

3.1 外排泵与沙门菌 FQ 耐药性

外排泵是细菌耐药的主要调控途径,沙门菌中 AcrAB-TolC 属于 RND 家族,是参与 FQs 耐药调控的主要外排泵,同时也是沙门菌对 FQs 产生高水平耐药的重要机制,其过量表达可以降低细菌细胞内的药物浓度^[11]。Chen 等^[12]研究表明,在环丙沙星的选择压力下,诱导菌株对环丙沙星的值可达到 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但当 AcrB 失活后突变株对环丙沙星的 MIC 值降到 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Blair 等^[13]研究表明,

当细菌存在 AcrAB-TolC 时,其他外排泵不会对细菌的多重耐药性产生显著影响。Ricci 等^[14]在体外诱导实验中表明,当鼠伤寒沙门菌缺失了 *tolC* 时,筛选不到突变株。本实验中 AcrA、TolC 等外排泵相关蛋白显著上调,说明 AcrAB-TolC 外排系统是沙门菌 FQs 耐药性的重要调控机制。

3.2 趋化性、双组分系统与沙门菌 FQ 耐药性

细菌趋化性(Chemotaxis)是指具有运动能力的细菌通过感应环境信号和调整鞭毛运动方向来达到对有利环境的趋附和对有害环境的逃离,当趋化物为药物时即为趋药性。Szurmant 等^[15]研究显示,双组分系统(Two-component system, TCS)是细菌完成趋药性的主要途径,TCS 的跨膜组氨酸激酶负责感受化学效应物刺激,而胞浆应答调节蛋白则将接受到的化学刺激转换为有效的鞭毛信号,进而产生趋化运动。TCS 是普遍存在于原核生物中的信号转导系统,它是细菌感受和应答外界信号的基础,与细菌的致病性、耐药性等有着密切关系^[16-17]。Li 等^[18]通过对嗜水气单胞菌的耐药株与标准株进行定量蛋白组实验,发现耐药株的 CheA、CheR、

CheW 等趋药性相关蛋白和 FliS、FliG 等鞭毛蛋白的表达均有显著差异。Shprung 等^[19]研究表明, PhoP/PhoQ 双组分系统的表达可调控沙门菌的耐药性。本研究中, 沙门菌在获得 FQ 耐药性之后, 趋药性相关蛋白 MCPs、CheA、CheW、CheY、CheB、CheV 以及鞭毛蛋白 FliC 均显著上调, 其 KEGG 通路显著富集, 说明沙门菌 FQ 耐药性的调控过程中, 趋药性起到重要作用。PhoP、PhoQ、RstA、BasR 等双组分系统相关蛋白表达差异显著, 其 KEGG 通路显著富集, 提示双组分系统通过自我调节及与其他系统的相互作用来调控 FQ 耐药相关蛋白的表达。

3.3 其他差异蛋白与沙门菌 FQ 耐药性

外膜蛋白(Outer membrane protein, Omp)是细菌细胞膜的重要组分, 参与药物向细胞内的转运, 当外膜蛋白异常时, 细胞膜的通透性会下降, 影响药物转运可导致耐药。本研究中, OmpC 和 OmpR 等外膜蛋白的表达显著下调, 说明外膜蛋白也参与了沙门菌 FQ 耐药性的调控。

细菌中的非编码小 RNA (Small non-coding RNA, sRNA)是一个重要的基因表达调控层次, 能够参与细菌 mRNA 的翻译和稳定性调节、RNA 的加工与修饰及蛋白质的运输等^[20]。目前已有研究表明 sRNA 能够参与细菌耐药性的调控^[21-22]。Hfq 是细菌中高度保守的六聚体蛋白质, 可以通过 sRNA 与 mRNA 的结合来调控靶基因的表达^[23-24]。Sittka 等^[25]研究表明沙门菌 sRNA 表达量变化与 *hfq* 的缺失有关。本研究显示耐药菌与敏感菌相比, Hfq 蛋白表达差异显著, 提示 Hfq-sRNA 参与沙门菌 FQ 耐药性的调控。

本研究通过 TMT 蛋白定量结合 PRM 靶向蛋白验证技术, 筛选出鼠伤寒沙门菌 FQ 耐药相关蛋白及 KEGG 通路, 主要包括外排泵相关蛋白、双组分相关蛋白、外膜蛋白及细菌趋化性、双组分系统、ABC 转运系统、细菌群体感应、 β -内酰胺类抗性通路。其中, AcrA/TolC 等外排泵相关蛋白、PhoP/Q 等双组分相关蛋白、OmpC 等外膜蛋白和

双组分系统、ABC 转运系统、细菌群体感应等通路的差异情况与以往报道的沙门菌耐药性研究相符^[13,19,26]。而本研究筛选到的 MCPs、CheA、CheW、Hfq、Cse4 等蛋白和细菌趋化性、 β -内酰胺类抗性通路在沙门菌中首次报道, 提示上述差异蛋白是沙门菌潜在的耐药性调控靶点。

Li 等^[18]发现嗜水气单胞菌在获得耐药性后 MCPs、CheA、CheW 的表达发生显著变化; Hfq 蛋白对耐药性的影响在肺炎克雷伯菌中有过报道^[27]; Sampson 等^[28]发现 CRISPR 相关蛋白 Cas9 对弗朗西斯菌的耐药性具有增强作用, 而本研究筛选的差异蛋白 MCPs、CheA、CheW、Hfq 和 CRISPR 相关蛋白 Cse4 等蛋白与沙门菌耐药性的关系为首次报道。在 KEGG 通路中, 嗜水气单胞菌标准株与耐药株的蛋白质组定量结果显示, 细菌趋化性通路差异显著^[18]; 细菌群体感应系统对细菌的生物被膜形成和革兰氏阴性菌的 RND 家族外排泵的表达具有调控作用^[29-30]; Dreier 等^[31]研究显示, 绿脓杆菌中 β -内酰胺类抗性与其外排泵表达和耐药性有关。而本研究发现细菌趋化性、 β -内酰胺类抗性通路等均有显著差异, 提示这些通路参与沙门菌对 FQ 耐药性的调控。

在后续研究中, 我们将通过编码目标蛋白基因缺失株的构建等进一步探究这些蛋白和通路对耐药性的调控作用和机制, 为深入研究沙门菌 FQ 耐药机理提供依据和研究思路。

REFERENCES

- [1] Patel S, McCormick BA. Mucosal inflammatory response to *Salmonella typhimurium* infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 311
- [2] Shi HP, Zhou XY, Wang YX, et al. Correlation of biofilm-forming ability and antimicrobial resistance of salmonella strains isolated from layers[J]. *China Poultry*, 2017, 39(2): 22-27 (in Chinese)
师红萍, 周雪雁, 王勇祥, 等. 蛋鸡沙门菌分离株生物被膜与耐药相关性研究[J]. *中国家禽*, 2017, 39(2): 22-27
- [3] Andoh LA, Dalsgaard A, Obiri-Danso K, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from poultry in Ghana[J]. *Epidemiology and Infection*, 2016, 144(15): 3288-3299
- [4] Wang Y, Yang BW, Wu Y, et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on retail raw poultry in six

- provinces and two national cities in China[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 74-80
- [5] Deekshit VK, Ballamoole KK, Rai P, et al. Draft genome sequence of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Weltevreden isolated from seafood[J]. Journal of Genomics, 2015, 3: 57-58
- [6] Li L, Dai XY, Wang Y, et al. RNA-seq-based analysis of drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected *in vivo* and *in vitro*[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175234
- [7] Duarte TT, Spencer CT. Personalized proteomics: the future of precision medicine. Proteomes, 2016, 4(4): 29
- [8] Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, et al. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics[J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2012, 11(11): 1475-1488
- [9] Feng S, Wang Y, Wang BT, et al. The establishment of the drug-resistance inducing model *in vivo* of *Salmonella enterica typhimurium* in the *Caenorhabditis elegans* and dissimilarity analysis of drug-resistance inducing *S. typhimurium in vivo* and *in vitro*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(12): 1926-1930 (in Chinese)
冯帅, 汪莹, 王彬婷, 等. 沙门菌体内耐药性诱导模型的建立和体内外诱导耐药菌基因差异分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(12): 1926-1930
- [10] Huang YL, Fu Q, Huang DL, et al. Comparative analysis of proteomics at different developmental stages of buffalo testicular seminiferous tubules by TMT-Coupled 2D LC-MS/MS[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2014, 45(8): 1265-1273 (in Chinese)
黄愉淋, 付强, 黄德伦, 等. 利用 TMT 标记结合 2D LC-MS/MS 技术分析不同时期水牛睾丸曲精细管差异蛋白质组[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(8): 1265-1273
- [11] Piddock LJV, White DG, Gensberg K, et al. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(11): 3118-3121
- [12] Chen S, Cui SH, McDermott PF, et al. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(2): 535-542
- [13] Blair JMA, Smith HE, Ricci V, et al. Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: implications for efflux and virulence inhibitor design[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(2): 424-431
- [14] Ricci V, Tzakas P, Buckley A, et al. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains are difficult to select in the absence of AcrB and TolC[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(1): 38-42
- [15] Szurmant H, Ordal GW. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(2): 301-319
- [16] Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, et al. Evolution of two-component signal transduction[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(12): 1956-1970
- [17] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction[J]. Annual Review of Biochemistry, 2000, 69(1): 183-215
- [18] Li WX, Ali F, Cai QL, et al. Quantitative proteomic analysis reveals that chemotaxis is involved in chlortetracycline resistance of *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Proteomics, 2018, 172: 143-151
- [19] Shprung T, Peleg A, Rosenfeld Y, et al. Effect of PhoP-PhoQ activation by broad repertoire of antimicrobial peptides on bacterial resistance[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(7): 4544-4551
- [20] Bojer MS, Jakobsen H, Struve C, et al. Lack of the RNA chaperone Hfq attenuates pathogenicity of several *Escherichia coli* pathotypes towards *Caenorhabditis elegans*[J]. Microbes and Infection, 2012, 14(12): 1034-1039
- [21] Ramos CG, Grilo AM, da Costa PJP, et al. MtvR is a global small noncoding regulatory RNA in *Burkholderia cenocepacia*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(16): 3514-3523
- [22] Yu J, Schneiders T. Tigecycline challenge triggers sRNA production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. BMC Microbiology, 2012, 12(1): 195
- [23] Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(8): 578-589
- [24] Nishino K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, et al. Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in *Escherichia coli*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(2): 291-296
- [25] Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, et al. Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq[J]. PLoS Genetics, 2008, 4(8): e1000163
- [26] Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters[J]. Biochimica et Biophysica Acta-proteins and Proteomics, 2009, 1794(5): 725-737
- [27] Li XR. Effect of Hfq on *Klebsiella pneumoniae* resistance and virtual screening of Hfq inhibitors[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2016 (in Chinese)
李欣然. Hfq 对肺炎克雷伯菌耐药性影响和机制初探及 Hfq 抑制剂虚拟筛选[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2016
- [28] Sampson TR, Napier BA, Schroeder MR, et al. A CRISPR *cas* system enhances envelope integrity mediating antibiotic resistance and inflammasome evasion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(30): 11163-11168
- [29] Dandekar AA, Greenberg EP. Microbiology: Plan B for quorum sensing[J]. Natural Chemical Biology, 2013, 9(5): 292-293
- [30] Pumbwe L, Skilbeck CA, Wexler HM. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*[J]. Microbial Ecology, 2008, 56(3): 412-419
- [31] Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 660