



## 研究报告

## 高盐环境下鼠伤寒沙门氏菌差异糖蛋白富集及组学分析

陈香云 杜旭东 郑小煜 周大炜\*

南开大学泰达生物技术研究院 天津 300450

**摘要:**【背景】沙门氏菌是一种革兰阴性肠道病原菌，主要依靠 III 型分泌系统(type III secretion systems, T3SSs)来产生与致病性相关的效应蛋白。其中沙门氏菌致病岛(*Salmonella* pathogenicity island, SPI)区域是关键基因区域。高盐浓度条件可以诱导 SPI-1 上效应蛋白的表达。【目的】探究在高盐浓度条件下鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)糖蛋白的差异表达情况，寻找有意义的效应糖蛋白。【方法】将鼠伤寒沙门氏菌在普通培养基和高盐培养基中培养，收集菌体并超声裂解，提取蛋白后，用胍偶联法富集糖蛋白并用胰酶酶解，通过二甲基标记定量及 LC/MS 定量蛋白质组学方法进行糖蛋白的定量，用 Thermo Proteome Discoverer 2.2 软件对标记蛋白进行定性及定量分析。【结果】质谱结果显示，高盐环境中，沙门氏菌有 19 个糖蛋白的表达发生显著改变，其中，上调蛋白 10 个，最为显著的是 *ompC* 基因编码的外膜孔蛋白；下调表达糖蛋白 9 个，最为显著的是 *yjgF* 基因编码的翻译起始抑制因子。【结论】根据定量蛋白质组学分析，沙门氏菌在高盐环境下有多种重要糖蛋白的表达水平发生显著改变，这一结果对研究沙门氏菌 SPI-1 产生的效应糖蛋白表达情况以及寻找沙门氏菌致病机制有重要意义。

关键词：鼠伤寒沙门氏菌，沙门氏菌致病岛 1，液质联用质谱仪，差异糖蛋白质组学

## Enrichment and omics analysis of differential glycoproteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under high salinity environment

CHEN Xiang-Yun DU Xu-Dong ZHENG Xiao-Yu ZHOU Da-Wei\*

TEDA Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Nankai University, Tianjin 300450, China

**Abstract:** [Background] *Salmonella* is a kind of Gram-negative intestinal pathogen that relies primarily on type III secretion systems (T3SSs) to produce pathogenicity-associated effector proteins. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI) is a key genetic region. The conditions of high-salt can induce the expression of effector proteins on SPI-1. [Objective] In order to explore the differential expression of glycoprotein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under high-salt concentration, and to find meaningful effector glycoprotein. [Methods] *Salmonella enterica* serovar Typhimurium was cultured in common medium and high-salt medium, and then the cells were collected. The glycoproteins were

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81772149); Tianjin Natural Science Foundation (18JCZDJC32400)

\*Corresponding author: Tel: 86-22-66229544; E-mail: dawei Zhou@nankai.edu.cn

Received: 15-11-2019; Accepted: 07-07-2020; Published online: 24-09-2020

基金项目：国家自然科学基金(81772149)；天津市自然科学基金重点资助项目(18JCZDJC32400)

\*通信作者：Tel: 022-66229544; E-mail: dawei Zhou@nankai.edu.cn

收稿日期：2019-11-15；接受日期：2020-07-07；网络首发日期：2020-09-24

enriched by hydrazine coupling method after ultrasonication and protein extraction. After the enzymatic hydrolysis, the glycoproteins were quantified by dimethyl-labeled quantitative method, and the labeled proteins were qualitatively and quantitatively analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry. [Results] Mass spectrometry results showed that the expression of 19 glycoproteins in *Salmonella* significantly changed in the high salt environment. Among these, 10 glycoproteins were up-regulated, the most notably one was the outer membrane porin encoded by *ompC*. Nine glycoproteins were down-regulated, the most notably one was translation initiation inhibitor encoded by *yjgF*. [Conclusion] The expression levels of many important glycoproteins in *Salmonella* have significant changes at high-salt environments. This study has important significance in investigating the expression of effector glycoprotein produced by *Salmonella* SPI-1 and searching the pathogenic mechanism of *Salmonella*.

**Keywords:** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, SPI-1, LC/MS, Differential glycoproteomics

沙门氏菌是革兰氏阴性细菌,属肠杆菌科,是兼性病原菌,可感染各种动物导致局部肠道感染和多种严重全身性疾病等不同疾病<sup>[1-2]</sup>。鼠伤寒沙门氏菌是当今研究最多的一种细菌病原体之一,其需要将毒力因子通过 III 型分泌系统(type III secretion systems, T3SSs)传递到宿主细胞中以完成感染。沙门氏菌致病岛(*Salmonella* pathogenicity island, SPI)是这个过程中的关键基因组区域,其中沙门氏菌 SPI-1 编码的相关效应蛋白主要促进其侵入宿主的肠道上皮细胞,从而导致肠胃炎,这些效应蛋白即为沙门氏菌发病机制中的中心环节<sup>[3]</sup>,而高渗透压环境可以诱导沙门氏菌 SPI-1 的相关蛋白表达<sup>[4]</sup>。

很多具有重要生理功能以及生物学意义的蛋白质,尤其是糖蛋白的表达丰度非常低,所以对于糖蛋白的研究比较困难。胍化学富集法基于共价连接的原理,特异性地将糖蛋白/糖肽/糖链从复杂的生物体系中分离出来,因此,与其他基于物理吸附的富集方法相比特异性较强,而基于质谱(mass spectrometry, MS)的蛋白质组学已经发展成为一种高灵敏度的定量工具。

本研究以普通 LB 培养基作为对照,用高盐诱导培养基培养沙门氏菌,诱导其产生与 SPI-1 功能相关的蛋白,使用胍化学法<sup>[5]</sup>分别富集糖蛋白,对捕获的糖蛋白酶解后进行同位素二甲基标记,做差异糖蛋白的定性及定量分析<sup>[6]</sup>。分析鼠伤寒沙门氏菌在高盐诱导环境中糖蛋白的差异表达情况,寻找

其与致病性相关的糖蛋白,为探索鼠伤寒沙门氏菌致病机理研究提供新思路和新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验采用的菌种为鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) ATCC 14028,保存于南开大学泰达生物技术研究院。

LB 培养基(g/L):蛋白胍 10.0,酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。高盐诱导培养基在 LB 培养基中额外加入 0.3 mol/L NaCl 即可。

胍酰树脂(hydrazinyl resin)、乙腈(CAN、色谱级)、甲酸(FA、色谱级)、C18-SEP 小柱、质谱用比色法肽段定量试剂盒和 C18 毛细管液相分析柱(Acclaim PepMap™ RSLC), Thermo Fisher Scientific 公司;碘代乙酰胺(iodoacetamide, IAA)和 10 K 超滤管, Waters 公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, Bio-Rad 公司。

超声破碎仪、Q Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱仪和 EASY-nLC 1200 液相仪, Thermo Fisher Scientific 公司;真空离心浓缩仪, Eppendorf 公司;多功能酶标仪, Molecular Devices 公司。

### 1.2 细菌培养及全蛋白提取

分别用 200 mL 高盐诱导培养基及普通 LB 培养基培养细菌至  $OD_{600}$  约为 0.9,  $5\ 000\times g$  离心 5 min 收集菌体,并用 PBS 清洗 2 次。加入 5 mL 细菌裂解液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.5%

SDS, 40 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L PMSF)重悬菌体。超声破碎(振幅 45%, 2 s/2 s, 7 min)。6 000×g 离心 10 min 后取上清, 加入核酸酶于冰盒上反应 15 min。用 10 K 超滤管除盐并用偶联缓冲液(100 mmol/L NaAc, 150 mmol/L NaCl, pH 5.5)置换 Buffer。

### 1.3 胍化学法富集糖蛋白

将除盐之后的蛋白溶液稀释至 1 g/L, 向溶液中加入现配的 NaIO<sub>4</sub> 溶液至终浓度为 15 mmol/L, 避光氧化 1 h 后用 10 K 超滤管去除未反应的 NaIO<sub>4</sub>。取 100 μL 酰肼树脂悬液(固形物 50%)于 1.5 mL 离心管中, 3 000×g 离心 30 s 去除原始树脂保存液, 用去离子水、偶联缓冲液分别清洗树脂 2 次。将 NaIO<sub>4</sub> 氧化后的蛋白溶液加入酰肼树脂中, 室温下轻摇反应过夜。再依次用 1 mol/L NaCl、纯甲醇、50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 分别清洗树脂 2 次, 除去未偶联蛋白。

### 1.4 胍酰树脂上偶联糖蛋白酶解

向胍酰树脂中加入含 50 mmol/L DTT 的 10% TEAB 缓冲液, 56 °C 孵育 45 min, 再加入含 100 mmol/L IAA 的 10% TEAB 缓冲液, 避光孵育 30 min, 加入 10% TEAB 缓冲液清洗并重悬树脂。按 1:25 (质量比)比例加入胰蛋白酶, 37 °C 酶解过夜。3 000×g 离心 30 s 除去树脂, 上清在 90 °C 孵育 10 min 终止酶解。4 °C、12 000×g 离心 30 min, 取上清作为定量样品, 旋干保存。

将胍酰树脂用 PNGase F 酶解释放 N-糖肽, 10 000×g 离心 30 min, 收集上清中的 PNGase F 酶解肽段, 用 FA 溶液调节 pH 至 3.0–4.0 后用 Sep-pak

C18 柱除盐, 作为定性样品, 旋干保存。

### 1.5 二甲基标记肽段及脱盐

将定量样品溶于 10% TEAB 缓冲液中, 稀释肽段浓度至 250 mg/L, 取 200 μL 肽段溶液, 加入 4% CH<sub>2</sub>O 和 0.6 mol/L NaBH<sub>3</sub>CN 各 8 μL 混匀, 于通风橱内室温反应 1 h。后向样品中依次加入 32 μL 1%氨水和 16 μL 5% FA 溶液终止反应。同时按表 1 进行同一样品的反标记。

标记后, 将普通 LB 培养基样品与高盐诱导培养基样品等比例混合。加入 FA 调节 pH 至 3.0–4.0 后用 Sep-pak C18 柱除盐, 旋干保存。

### 1.6 LC/MS 分析

将旋干的定性样品和标记后的定量样品分别用 100 μL 0.1% FA 溶液溶解, 用于质谱检测。质谱采用液相色谱-四极杆静电场轨道阱组合式质谱仪, 液相型号为 EASY-nLC1200, 使用 C18 毛细管柱(Acclaim PepMap<sup>TM</sup> RSLC, 75×25 cm, 2 μm, 100 Å)作为液相柱, A 液为 0.1% FA 水溶液, B 液为含 0.1% FA 的 80%乙腈溶液。数据采集使用数据依赖模式(data dependent acquisition, DDA), 质谱分辨率为 70 000, 扫描范围为 300–1 700 Da 的全扫描。上样体积 4 μL (200–500 ng), 用 Thermo Proteome Discoverer 2.2 软件进行定性及定量分析。设置固定修饰为半胱氨酸残基+57.021 Da, 可变修饰甲硫氨酸残基+15.995 Da、N 末端乙酰化+42.001 Da。在定量样品中, 发生在肽段 N-端和赖氨酸上的二甲基修饰的轻、重标分子质量分别为+28.031 Da 和+32.056 Da<sup>[6-7]</sup>。

表 1 定量样品标记表

Table 1 The labeling table of quantitative samples

标记组 Mark groups	样品组 Sample groups	4% CH <sub>2</sub> O (μL)	4% CD <sub>2</sub> O (μL)	0.6 mol/L NaBH <sub>3</sub> CN (μL)	
正标 Mark	200 μL 普通 LB 培养基样品	200 μL LB medium sample	8	—	8
	200 μL 高盐诱导培养基样品	200 μL high salt medium sample	—	8	8
反标 Anti-mark	200 μL 普通 LB 培养基样品	200 μL LB medium sample	—	8	8
	200 μL 高盐诱导培养基样品	200 μL high salt medium sample	8	—	8

注: —: 不添加对应试剂。

Note: —: No corresponding reagent added.

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) ATCC 14028 全蛋白数据库来源于 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)。

### 1.7 qRT-PCR 测定

使用 QuantStudio 5 实时 PCR 系统对 10 个编码基因的 mRNA 表达水平进行 qRT-PCR。收集普通 LB 培养基与高盐 LB 培养基中处于对数生长期的菌体。5 000×g 离心 5 min 沉淀细菌, 然后使用 RNeasy Mini 试剂盒提取总 RNA 样品。使用 ND-2000 分光光度计对纯化的 RNA 进行定量。使用 PrimeScript RT 试剂盒合成 cDNA。16S rRNA 基因作为内参基因, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对各基因的相对表达量进行计算。

qRT-PCR 反应体系: 2×SYBR Premix *ExTaq* 10 μL, 正、反向引物(5 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 1 μL, Nuclease-free water 7 μL。

qRT-PCR 反应条件: 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 57.5 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 5 s, 55 °C 60 s, 95 °C 1 s, 1 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 差异糖蛋白定量分析

基于稳定同位素标记的二甲基标记定量方法, 所需样品少且样品损失少、适用范围广、价格便宜, 非常适宜定量蛋白质组学的研究。这是一种基于多肽母离子定量的方法, 结果是在多肽的 N-端和赖氨酸残基上加上 2 个甲基, 导致多肽的分子量发生变化, 甲醛(CH<sub>2</sub>O)和氘代甲醛(CD<sub>2</sub>O)作为稳定同

位素标记物, 可以标记产生不同的分子量变化, 分别标记实验组和对照组样品, 即可实现二者相同的多肽片段产生 4.025 Da 的质量差(图 1), 因此可以进行精确的蛋白质定量, 可用于研究同一蛋白在不同实验处理环境下的差异蛋白质组学。

将标记后的样品进行液质联用分析, 并用 Thermo Proteome Discoverer 2.2 进行定性及定量蛋白质组学分析。该研究做 3 个实验重复, 均进行非糖肽的二甲基正反标记的定量分析以及糖肽的定性分析。在每一次定量实验中, 被正反标记都标记上的蛋白认为是可信蛋白(表 2)。本研究认为可信蛋白表达水平变化超过 1.5 倍的蛋白(差异倍数>1.5 或<0.66)为高盐诱导的差异表达蛋白<sup>[6]</sup>(图 2)。3 个定量实验重复中至少有 2 组重复鉴定到的差异蛋白, 推测是可信的差异蛋白<sup>[8]</sup>, 共有 49 个, 对其进行 KEGG 功能分析, 结果显示被定量的糖蛋白主要是代谢通路相关蛋白(21.51%)、核糖体相关蛋白(12.90%)、次生代谢产物的生物合成相关蛋白(12.90%)、不同环境中的微生物代谢相关蛋白(7.53%)等(图 3)。推测在 3 组定量实验中均鉴定到的差异蛋白是可信度最高的差异蛋白, 共有 30 个(图 4)。

### 2.2 差异糖蛋白定性与定量整合分析

仅对胍酰树脂富集的糖蛋白进行定量分析的准确度及灵敏度不高。对于仅有一个糖基化位点的糖蛋白, 不同样品的标记效率会影响同位素标记定量的准确性, 而对含多个糖基化位点的蛋白质, 其

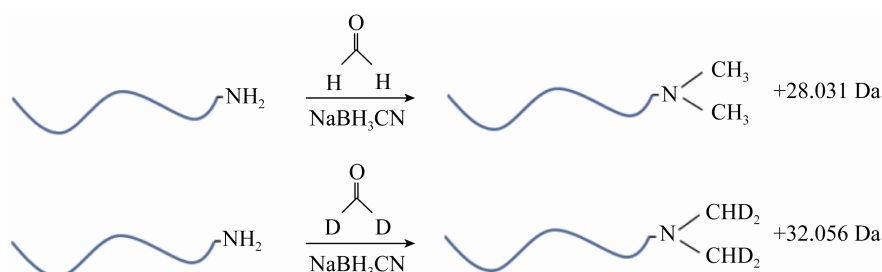


图 1 不同形式的甲醛对多肽的标记结果

Figure 1 The labeling results of polypeptides by different forms of CH<sub>2</sub>O

表 2 蛋白质定量及差异表达结果

Table 2 The results of the protein identification and differential expression

实验 Experiments	标记组 Mark groups	蛋白数目 Number of proteins	可信蛋白数目 Number of credible proteins	差异表达蛋白数目 Number of differentially expressed proteins
实验重复一 Experiment I	正标样品 Mark	341	303	82
	反标样品 Anti-mark	373		
实验重复二 Experiment II	正标样品 Mark	372	322	100
	反标样品 Anti-mark	366		
实验重复三 Experiment III	正标样品 Mark	358	287	71
	反标样品 Anti-mark	346		

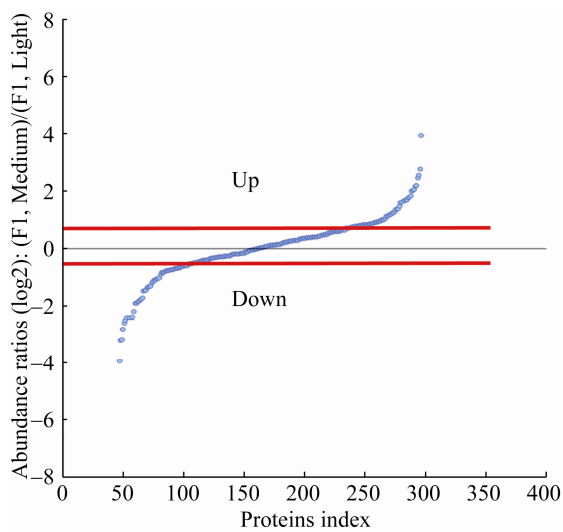


图 2 蛋白质差异表达示意图

Figure 2 The schematic diagram of differentially expressed proteins

不同糖基化位点的不同占有率也会影响标记的准确性。鉴于此,我们对胰酶酶解后胍酰树脂富集到的糖肽进行定性质谱鉴定,用以校正定量实验结果(图 5)。最终 3 组定性分析中均鉴定到的糖蛋白数目为 23 个(图 4)。

将一维定性与三维定量结果进行整合分析。认为定性及定量结果中均被鉴定到的糖蛋白为准确定量的糖蛋白,符合条件的糖蛋白共有 19 个(图 4),其功能如表 3 所示。其中,高盐诱导组中上调表达糖蛋白 10 个,上调最为显著的是 *ompC* 基因编码的外膜孔蛋白,上调倍数为 5.835 倍;下调表达糖蛋白 9 个,下调最为显著的是 *yjgF* 基因

编码的翻译起始抑制因子,差异倍数为原来的 0.193 倍(表 3)。

### 2.3 qRT-PCR 测定差异糖蛋白基因表达结果

根据鼠伤寒沙门氏菌在高盐环境下糖蛋白差异表达的情况,对 10 个编码基因的 mRNA 表达水平进行 qRT-PCR 测定。与普通 LB 培养基相比,高盐环境诱导下的鼠伤寒沙门氏菌中 *ompC* 的相对表达水平变化最大,是对照的 6.76 倍,显著上调的基因表达水平由高到低依次是 *ompC*、*nirB*、*pyrG*、*infB*、*lpp*、*nuoA*,分别是对照的 1.54、1.81、1.88、2.79、3.10、6.76 倍,*yeaG*、*pflB* 基因的表达水平显著下降,分别是对照组的 0.24、0.87 倍,而 *ssb*、*ptsI* 在 mRNA 水平和蛋白质水平表达量不一致(图 6)。

### 3 讨论

由沙门氏菌 SPI-1 编码的 III 型分泌系统效应因子主要用于介导沙门氏菌对宿主细胞的入侵<sup>[9]</sup>,而 SPI-2 编码的效应因子主要与促进细胞内存活和复制相关<sup>[10-11]</sup>。有研究表明,沙门氏菌在不同环境胁迫下会利用大量基因和蛋白进行多层次调控来执行防御和修复功能,其蛋白质表达谱会有所改变<sup>[12]</sup>。当沙门氏菌在高渗透压的培养基中生长时,*invA* 等效应子的转录水平会显著提升<sup>[13]</sup>;当今高渗透压和氧气限制已广泛用于体外诱导沙门氏菌致病岛 1 (SPI-1)基因的表达<sup>[4]</sup>,这是在小肠中 SPI-1 T3SS 引发细胞入侵的条件<sup>[14-15]</sup>。

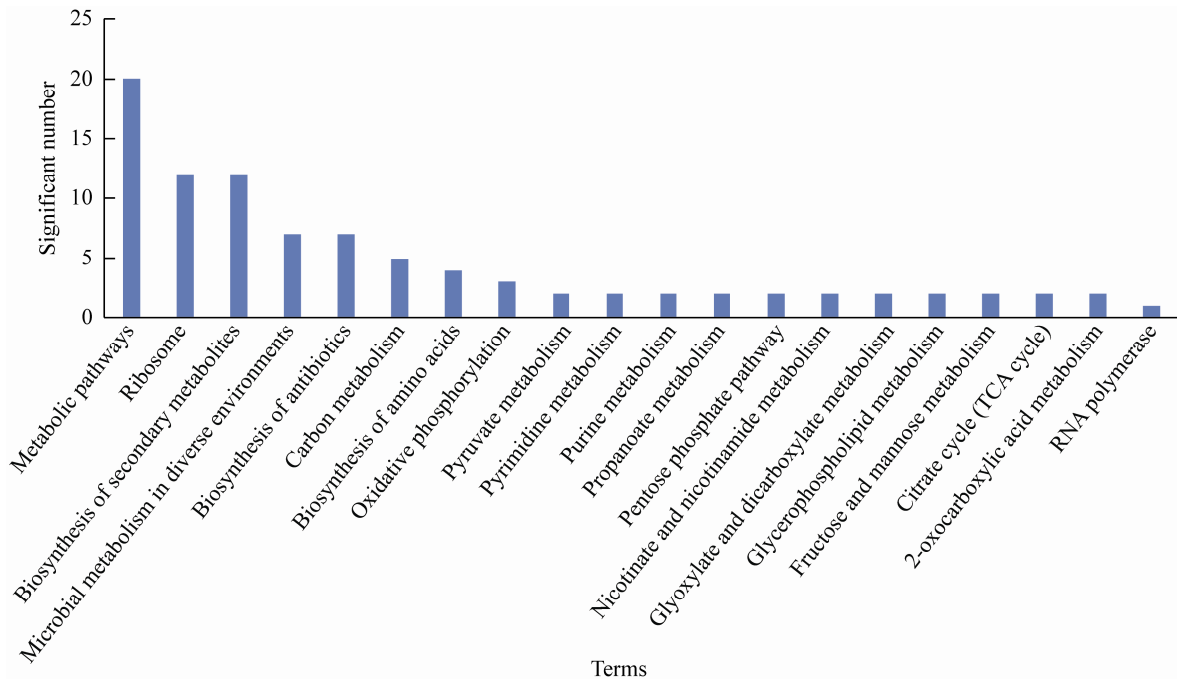


图3 可信的差异蛋白功能分布

Figure 3 The function distribution of the credible differential proteins

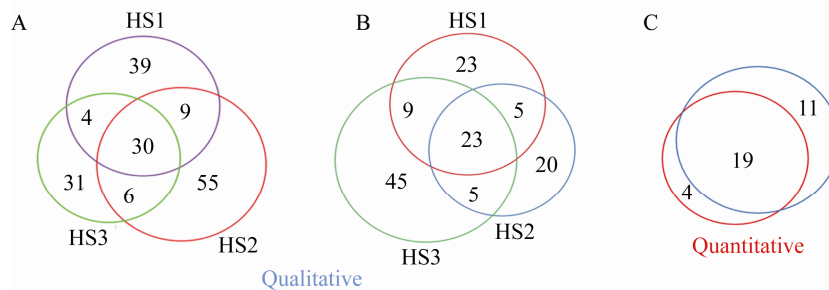


图4 一维定性及三维定量分析差异蛋白图示

Figure 4 The differential proteins of qualitative and quantitative analysis

注：A：三维定量分析结果；B：一维定性分析结果；C：一维定性与三维定量分析结果重叠图示。

Note: A: The results of quantitative analysis; B: The results of qualitative analysis; C: The overlap of qualitative and quantitative results.

已有研究显示，糖蛋白在病原菌的蛋白可溶性、黏附及侵袭、抗原变异、蛋白组装、保护性免疫等过程中发挥重要作用<sup>[16-18]</sup>。在病原菌的致病机制研究中，对糖蛋白的深入研究意义重大。本研究运用胍化学法对鼠伤寒沙门氏菌糖蛋白进行富集，预测了鼠伤寒沙门氏菌在高盐胁迫下糖蛋白水平的表达变化。本研究的质谱定量结果显示：高盐环

境中鼠伤寒沙门氏菌共有 19 个糖蛋白的表达发生显著改变，被定量的差异糖蛋白主要是代谢通路相关蛋白、次生代谢产物的生物合成相关蛋白、嘧啶代谢、不同环境中的微生物代谢相关蛋白等。

作为遗传的基本单位，基因会经过转录与翻译成为蛋白质，从而起到生理功能。即蛋白质的表达情况被基因转录调控决定。对此，为了进一步了解

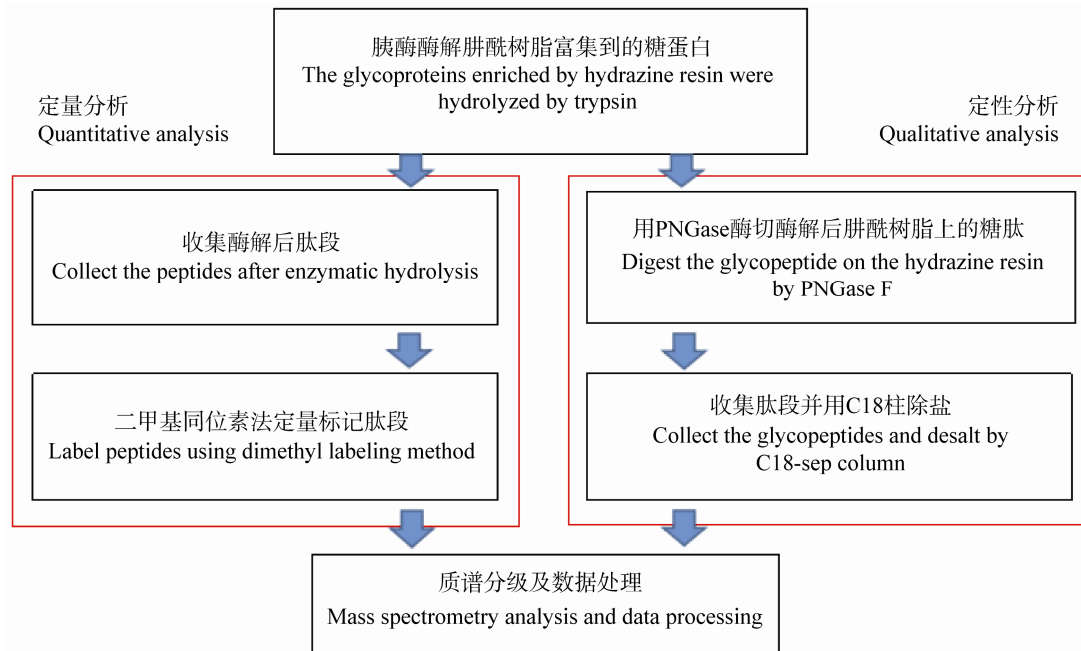


图 5 基于胍化学法富集糖蛋白的定性定量流程示意图

Figure 5 The process diagram of qualitative and quantitative glycoproteomics based hydrazide chemistry

表 3 可信度最高的蛋白功能及差异倍数表

Table 3 The functions and differential expression multiples of the most credible proteins

蛋白编号 UniProt ID	基因名称 Gene name	表达差异倍数 Differential expressed multiples	主要功能 Major functions
A0A0F6BAY1	<i>yjgF</i>	0.193	Putative translation initiation inhibitor
A0A0F6AZU0	<i>wraB</i>	0.236	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)
A0A0F6B0L0	<i>yeaG</i>	0.238	Putative serine protein kinase
A0A0F6BAA1	<i>ssb</i>	0.286	Single-stranded DNA-binding protein
A0A0F6B3F3	<i>cpsG</i>	0.305	Phosphomannomutase
A0A0F6B9R7	<i>glpK</i>	0.377	Glycerol kinase
A0A0F6B9U1	<i>katG</i>	0.491	Catalase-peroxidase
A0A0F6B3T5	<i>yeiP</i>	0.496	Elongation factor P-like protein
A0A0F6AZB9	<i>pflB</i>	0.510	Pyruvate formate lyase I
A0A0F6B771	<i>infB</i>	1.680	Translation initiation factor IF-2
A0A0F6A WW5	<i>gcd</i>	2.171	Glucose dehydrogenase
A0A0F6B624	<i>pyrG</i>	2.180	CTP synthase
A0A0F6BBB5	<i>deoD</i>	2.265	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type
A0A0F6B4I1	<i>ptsI</i>	2.281	Phosphoenolpyruvate-protein; phosphotransferase
A0A0F6B585	<i>pssA</i>	2.522	Phosphatidylserine synthase
A0A0F6B467	<i>nuoA</i>	3.390	NADH-quinone oxidoreductase subunit A
A0A0F6B0X1	<i>lpp</i>	4.382	Murein lipoprotein
A0A0F6B7S5	<i>nirB</i>	4.777	Nitrite reductase large subunit
A0A0F6B3Z7	<i>ompC</i>	5.835	Outer membrane porin protein C



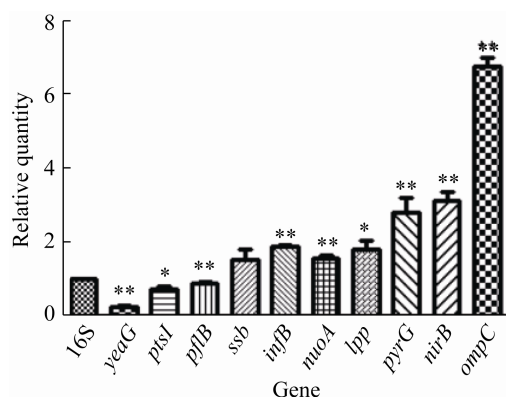


图6 高盐环境下10个基因表达水平的相对变化量  
Figure 6 Relative changes in the expression levels of 10 genes under high salt environment

注: \*\*: 在  $P < 0.01$  的水平上有差异; \*: 在  $P < 0.05$  的水平上有差异。

Note: \*\*: The difference at the level of  $P < 0.01$ ; \*: The difference at the level of  $P < 0.05$ .

菌体的应激机制, 需要对差异蛋白质基因 mRNA 的表达情况进行分析, 但差异蛋白编码基因的转录水平和翻译水平是否一致仍不确定。本研究根据质谱鉴定结果对 10 个差异糖蛋白相应编码基因在 mRNA 水平的表达情况进行探究, 为进一步揭示鼠伤寒沙门氏菌应答高盐胁迫的分子机制研究奠定基础。qRT-PCR 结果显示: 高盐环境诱导下鼠伤寒沙门氏菌 *nuoA*、*lpp*、*infB*、*pyrG*、*nirB*、*ompC* 的基因表达水平显著上调, *yeaG*、*pflB* 基因的表达水平显著下降, 均与蛋白表达趋势一致; 而 *ssb*、*ptsI* 在 mRNA 的变化水平和本研究质谱定量预测的蛋白质水平表达量不一致。这种蛋白与编码基因表达水平不一致的主要原因可能为: (1) 环境胁迫对基因会产生短时间的应激作用, 待菌体对环境适应后, 基因的调节行为才会在蛋白质水平呈现; (2) 基因转录、翻译成蛋白质的过程包含着众多复杂的生化反应, 存在基因转录后调控的情况; (3) 在蛋白质样品的提取中, 蛋白质会被人为操作改变, 从而影响蛋白质的定量结果。

本研究中, 质谱定量预测出高盐环境下上调倍数最大的糖蛋白是 *ompC* 基因编码的外膜孔蛋白, 其作用主要是作为效应因子分泌到细菌体外的通

道, III 型分泌系统产生的效应因子需要通过外膜孔蛋白组成的通道分泌到菌体外部, 实现入侵宿主细胞的功能<sup>[19]</sup>, 同时对外膜孔蛋白的表达调控可实现细胞通透性的改变, 帮助细菌适应不同的环境; 而 *nirB* 会编码产生亚硝酸还原酶大亚基, 参与将亚硝酸盐还原为铵盐的过程, 有利于消除细胞呼吸中亚硝酸盐的积累, 并再生  $\text{NAD}^+$ , 其功能可能是在侵染过程中加快电子传递链的运作, 产生更多的能量。在本研究中还发现了由 *nuoA* 基因编码产生的 NADH-氧化还原酶亚基, 此基因与上述亚硝酸还原酶大亚基均有相同的上调行为, 可能在侵染过程中相互配合完成能量供应的任务<sup>[20-21]</sup>。此外, 磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是细胞膜的重要组成部分, 并且参与了许多细胞生物学进程<sup>[22-23]</sup>, 在鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌等革兰氏阴性菌中, *pssA* 编码的 PS 合酶和核糖体具有十分紧密的联系, 并有研究表明大肠杆菌中的 PS 合酶可在催化过程中与脂质底物结合, 实现与膜表面相互作用的外周膜蛋白作用<sup>[24]</sup>。另外, *ptsI* 编码的磷酸烯醇丙酮酸蛋白磷酸转移酶在高盐诱导环境中的表达水平有所上升, 此蛋白在碳水化合物转运系统中催化糖底物磷酸化并促进后者在细胞膜上的转运, 而碳水化合物作为细菌中许多重要代谢途径的基本组成部分, 可直接或间接调控感染过程。相关研究结果显示, 鼠伤寒沙门氏菌 *ptsI* 基因缺失会影响葡萄糖和甘油的摄取, 最终导致其在小鼠结肠炎模型下毒性减弱<sup>[25]</sup>。*lpp* 编码的鼠李素脂蛋白通过将外膜与鼠李素连接而有助于维持外膜结构, 从而使外膜可以履行其对环境的生理功能, 对细菌的毒性有贡献<sup>[26]</sup>。

#### 4 结论

综上所述, 本研究使用基于质谱的定性及定量蛋白质组学方法, 对鼠伤寒沙门氏菌在高盐诱导培养基与常规 LB 培养基中的糖蛋白差异表达情况进行预测分析, 寻找到一些鼠伤寒沙门氏菌在高渗透压环境中表达水平可能显著改变的糖蛋白, 这些蛋白在沙门氏菌生存及感染过程中可能



存在重要的生物学意义。本研究为揭示鼠伤寒沙门氏菌的致病机理和治疗沙门氏菌相关疾病提供了一个方向, 但后续还需要更多生物学实验来进一步验证, 并深入研究具体蛋白的生物学功能。

## REFERENCES

- [1] Schaer BLD, Aceto H, Rankin SC. Outbreak of salmonellosis caused by *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC in a large animal veterinary teaching hospital[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2010, 24(5): 1138-1146
- [2] Min Y, Schifferli DM. Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 4: 419
- [3] Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages[J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(2): 145-156
- [4] Galán JE, Curtiss III R. Expression of *Salmonella* Typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling[J]. *Infection and Immunity*, 1990, 58(6): 1879-1885
- [5] Stöckmann H, O'Flaherty R, Adamczyk B, et al. Automated, high-throughput serum glycoprofiling platform[J]. *Integrative Biology*, 2015, 7(9): 1026-1032
- [6] Cheng S, Wang L, Liu Q, et al. Identification of a novel *Salmonella* type III effector by quantitative secretome profiling[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017, 16(12): 2219-2228
- [7] Hu ZY, Sun Z, Zhang Y, et al. Glycoproteome quantification of human lung cancer cells exposed to amorphous silica nanoparticles[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2012, 70(19): 2059-2065 (in Chinese)  
胡争艳, 孙珍, 张轶, 等. 纳米二氧化硅影响人肺癌细胞的定量糖蛋白质组学研究[J]. *化学学报*, 2012, 70(19): 2059-2065
- [8] Qi LL, Hu M, Fu JQ, et al. Quantitative proteomic analysis of host epithelial cells infected by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Proteomics*, 2017, 17(13/14): 1700092
- [9] Vergnes A, Viala JPM, Ouadah-Tsabet R, et al. The iron-sulfur cluster sensor IscR is a negative regulator of Spi1 type III secretion system in *Salmonella enterica*[J]. *Cellular Microbiology*, 2017, 19(4): e12680
- [10] Wood MW, Jones MA, Watson PR. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(3): 883-891
- [11] Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. *Salmonella* SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences[J]. *Cell Host & Microbe*, 2017, 22(2): 217-231
- [12] Higashide W, Dai SP, Hombs VP, et al. Involvement of SipA in modulating actin dynamics during *Salmonella* invasion into cultured epithelial cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2002, 4(6): 357-365
- [13] Cardenal-Muñoz E, Ramos-Morales F. Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector SteA[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26930
- [14] Lostroh CP, Lee CA. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system[J]. *Microbes and Infection*, 2001, 3(14/15): 1281-1291
- [15] Altier C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion[J]. *The Journal of Microbiology*, 2005, 43: 85-92
- [16] Wolfert MA, Boons GJ. Adaptive immune activation: glycosylation does matter[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(12): 776-784
- [17] Li JF, Metruccio MME, Evans DJ, et al. Mucosal fluid glycoprotein DMBT1 suppresses twitching motility and virulence of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(5): e1006392
- [18] Li YH, Li RY, Yu H, et al. *Enterococcus faecalis*  $\alpha$ 1-2-mannosidase (EfMan-I): an efficient catalyst for glycoprotein N-glycan modification[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(3): 439-451
- [19] Toobak H, Rasooli I, Talei D, et al. Immune response variations to *Salmonella enterica* serovar Typhi recombinant porin proteins in mice[J]. *Biologicals*, 2013, 41(4): 224-230
- [20] Claas K, Weber S, Downs DM. Lesions in the *nuo* operon, encoding NADH dehydrogenase complex I, prevent PurF-independent thiamine synthesis and reduce flux through the oxidative pentose phosphate pathway in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(1): 228-232
- [21] Virzintiene E, Trane M, Hägerhäll C. Revised transmembrane orientation of the NADH: quinone oxidoreductase subunit NuoA[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(20): 3277-3283
- [22] Chen YL, Montedonico AE, Kauffman S, et al. Phosphatidylserine synthase and phosphatidylserine decarboxylase are essential for cell wall integrity and virulence in *Candida albicans*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(5): 1112-1132
- [23] Tani M, Kuge O. Involvement of complex sphingolipids and phosphatidylserine in endosomal trafficking in yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 86(5): 1262-1280
- [24] Louie K, Chen YC, Dowhan W. Substrate-induced membrane association of phosphatidylserine synthase from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986, 165(3): 805-812
- [25] Zhi Y, Lin SM, Jang AY, et al. Effective mucosal live attenuated *Salmonella* vaccine by deleting phosphotransferase system component genes *ptsI* and *csrJ*[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 57(1): 64-73
- [26] Fadl AA, Sha J, Klimpel GR, et al. Murein lipoprotein is a critical outer membrane component involved in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium systemic infection[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(2): 1081-1096