

# 蛋白质组学在结核分枝杆菌研究中的应用

王一鸣 陶 晶 郭晓奎 姚玉峰\*

(上海交通大学医学院病原生物学教研室 上海 200025)

**摘 要:** 蛋白质组学是在基因组学基础上发展起来的新兴学科,其基本技术包括样品制备、蛋白质分离和蛋白质鉴定分析,其中的核心技术是双向凝胶电泳技术(2-Dimensional Electrophoresis, 2-DE)和质谱技术(Mass Spectrometry, MS)。近年来,蛋白质组学技术已应用于结核分枝杆菌的研究领域。应用蛋白质组学技术分离、鉴定、检测结核分枝杆菌致病株的全菌蛋白及分泌蛋白,分析其蛋白组成,可深入解析结核分枝杆菌的致病机理和耐药机制。通过对结核分枝杆菌致病株抗原的分析,为研制预防结核病的新疫苗拓展了空间。通过对结核分枝杆菌临床分离株的蛋白组成分分析还发现了一些有意义的结核病早期诊断标志物。蛋白质组学技术还应用于寻找新的药物靶标,在研制和筛选新的抗结核药物等方面展示了一些有价值的研究成果,为更好地开展结核病的预防、早期诊断及治疗打下了基础。

**关键词:** 蛋白质组学, 双向凝胶电泳, 质谱技术, 结核分枝杆菌

## Application of Proteomics in the Study of *Mycobacterium tuberculosis*

WANG Yi-Ming TAO Jing GUO Xiao-Kui YAO Yu-Feng\*

(Department of Medical Microbiology and Parasitology, Institutes of Medical Sciences,  
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** Proteomics is an emerging discipline developed on the basis of genomics. The fundamental techniques of proteomics include sample preparation, protein separation, protein identification and analysis, and its core techniques are two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. In recent years, proteomics has been used in researching the field of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Proteomics promotes deep understanding of the pathogenesis of MTB and resistance mechanism via isolating, identifying and analyzing the whole-cell protein and secreted proteins. The development of new vaccine against MTB has showed some promising results based on proteomics. Some powerful early diagnostic markers have been discovered via analyzing the protein composition of MTB clinical isolates. Proteomics also applies to find potential new drug targets, and it has shown many valuable research productions in developing new anti-MTB drugs. In summary, the application of proteomics has built a solid foundation for the development of prevention, early diagnosis and treatment of tuberculosis.

**Keywords:** Proteomics, 2-Dimensional Electrophoresis, Mass Spectrometry, *Mycobacterium tuberculosis*

\* 通讯作者: Tel: 86-21-63846590 转 776534; 信箱: yfyao@sjtu.edu.cn  
收稿日期: 2008-05-21; 接受日期: 2008-10-23

蛋白质组Proteome源于Protein与Genome两词的杂合,最早是由澳大利亚学者Wilkins和Williams于1994年提出的,即细胞或组织或机体在特定时间和空间上表达的所有蛋白质。蛋白质组学则以蛋白质组为研究对象,分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,了解蛋白质之间的相互作用与联系,在整体水平上研究蛋白质的组成与调控的活动规律,并由此在更深层次上获得对疾病过程、细胞生理和生化过程以及调控网络上广泛而完整的认识<sup>[1]</sup>。蛋白质组学的基本技术路线包括样品制备、蛋白质分离和蛋白质鉴定分析。双向凝胶电泳技术(2-Dimensional Electrophoresis, 2-DE)作为目前蛋白质组学研究的主要分离方法,是当前用于分析复杂组份蛋白质样品时分辨率和灵敏度最高的手段之一。蛋白质组学研究中采用的最主要鉴定方法是质谱技术(Mass Spectrometry, MS)。除此之外,肽序列标签(Peptide Sequence Tag, PST)技术、蛋白芯片(Protein Chips)技术、肽质量指纹谱(Peptide Mass Fingerprinting, PMF)技术等也是蛋白质检测与鉴定的新兴技术<sup>[2]</sup>,这些新兴的蛋白质鉴定技术灵敏度高,特异性强,是大规模鉴定蛋白质和分离鉴定低丰度蛋白质的首选方法,现在已经逐步应用于临床研究。

结核分枝杆菌是长期以来困扰人类健康主要的病原体之一,全世界每年因结核病而死亡的人数约300万,在我国居传染病死亡的首位。近年来出现的耐多药结核杆菌(MDR - TB)更是给结核病的治疗增加了巨大的困难。因此阐明结核分枝杆菌的致病机制,研究预防结核病的新疫苗,开发新的抗结核药物已刻不容缓。目前结核分枝杆菌的基因测序工作已经完成,为蛋白质组研究奠定了基础。将蛋白质组学技术应用于结核分枝杆菌的研究领域,对于阐明结核病的发病机制,制备和设计新的疫苗与药物,实现有效的预防与治疗,有着重要的价值。

## 1 结核分枝杆菌致病机理的研究

能够在整体水平上研究病原菌蛋白质谱的变化是蛋白质组研究非常明显的优势。将结核分枝杆菌的毒力株与无药的疫苗株进行比较蛋白质组学分析,若发现无药的疫苗株缺失某种或某些蛋白,则这些蛋白可能为结核分枝杆菌致病性的关键。Jungblut等采用2-DE及基体辅助激光解吸电离飞行时间质

谱(Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALD I-TOF-MS)技术,对体外培养的有毒结核分枝杆菌H37Rv和无药的疫苗菌株BCG进行比较蛋白质组学研究,分离出1800个蛋白,发现分别有16个和25个蛋白在表达丰度和位点上有差异,并做了蛋白分析归类<sup>[3,4]</sup>。在Jungblut分离出的1800个全菌蛋白中,质谱分析识别了263个蛋白,其中有接近1/3属于看家蛋白,与基因调节、生物合成、降解及新陈代谢有关,4个蛋白在翻译控制中起重要的作用,有25个蛋白被鉴定为热休克蛋白。这些蛋白被认为对结核分枝杆菌致病机理研究、疫苗候选和诊断识别有着重要的意义。Mattow等对H37Rv和BCG的分泌蛋白进行比较,发现了27种仅存在于H37Rv的特异蛋白质,其中有5种蛋白质在卡介苗中缺失,例如ESAT6。而对上述两种菌株的胞内蛋白进行相同的研究,发现了12种存在于H37Rv中的特异蛋白质,其编码ORF均在卡介苗中缺失<sup>[5]</sup>。这些蛋白可能在结核杆菌的致病机制中发挥重要作用。Ryoo等将人类单核细胞U-937分别感染结核分枝杆菌致病性K菌株(强毒株)、H37Rv(强毒株)、H37Ra(弱毒株)和BCG疫苗菌株,并对这些菌株表达的蛋白质进行了对比。通过2-D PAGE和MALD I-TOF-MS鉴定后,发现Mb1363和MT2656两个蛋白在经过吞噬作用之后的K菌株中相对大量表达。这说明Mb1363和MT2656在结核分枝杆菌致病性K菌株的致病机制中起到了某些关键作用<sup>[6]</sup>。

不同环境对结核分枝杆菌蛋白表达也有影响,研究缺氧休眠模式下的结核分枝杆菌致病菌株有助于了解其潜伏感染机制。Starck等应用2-D PAGE和MALD I-TOF对结核分枝杆菌Harlingen菌株在韦恩休眠模式下诱导的蛋白进行了蛋白质组学研究,并对比了在有氧和缺氧状态下菌株的生长情况与蛋白质表达水平。检测到在缺氧状态下,ATP消耗量降低并有50个菌体蛋白质表达发生了变化。对其中的16个蛋白质进行MALD I-TOF鉴定,发现这些蛋白质与分枝菌酸合成、氧化应激反应等有关<sup>[7]</sup>。鉴定研究这些蛋白为研究结核分枝杆菌的潜伏感染提供了一些线索。

此外,分泌蛋白在结核分枝杆菌致病机制中也起着重要作用。结核分枝杆菌的分泌蛋白被认为在与宿主细胞尤其是巨噬细胞相互作用、毒力及致病性中发挥重要的生物学作用<sup>[8]</sup>。Hiwa等对结核分枝

杆菌毒力株H37Rv的分泌蛋白滤出液进行了鉴定。应用 2-DE/MALDI I-TOF-MS技术、SDS-PAGE技术和LC-MS/MS技术, 鉴定了 257 个蛋白, 其中 62%是带有N端信号肽的分泌蛋白, 初步确定其中大部分蛋白质与原核细胞壁合成、信号转导、新陈代谢及呼吸作用相关。此外还发现了 92 个未知功能的新蛋白质。这些分泌蛋白质也均有可能在结核分枝杆菌致病机制中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。

## 2 结核分枝杆菌疫苗的研究

卡介苗是目前全世界范围内广泛应用于预防结核病的疫苗。卡介苗可有效预防新生儿及儿童粟粒性结核, 但对于成人肺结核疾病的预防效果减弱。所以, 目前急需研发一种可以预防成人肺结核疾病的新型疫苗<sup>[10]</sup>。

蛋白质组技术的发展为结核分枝杆菌新型疫苗的研究拓展了新的空间。其中亚单位疫苗的发展尤为迅速。所谓亚单位疫苗是指利用致病菌的亚单位, 尤其是抗原表位作为疫苗, 通常理想的亚单位疫苗应该由几个保护性抗原或抗原表位组成。寻找保护性抗原或表位的主要方法是利用比较蛋白质组学技术<sup>[4]</sup>, 从上清和胞内复杂的蛋白质混合物中寻找特异蛋白, 尤其是上清中的许多分泌蛋白均可以诱导强烈的免疫反应。Covert等采用 2-DE分离出结核分枝杆菌分泌蛋白 355 个、结构蛋白 299 个, 并让这些蛋白与感染了结核分枝杆菌的小鼠脾细胞进行反应。能引起T细胞免疫反应的有 37 种蛋白, 对其中 30 种进行鉴定发现, 13 种是以前已明确的抗原, 17 种是新的抗原<sup>[11]</sup>。这些抗原对研制亚单位疫苗等新型疫苗有着重要意义, 也可能是潜在的药物治疗的靶点。实验证明, 亚单位疫苗的保护效果优于卡介苗, 又克服卡介苗的不足, 将来可成为卡介苗的理想替代品。但是, 亚单位疫苗的免疫效果与其接种剂量、时间、接种方式等有关, 并且亚单位疫苗必须配以适宜的佐剂, 多次接种才能达到理想的免疫效果<sup>[12]</sup>, 这使其临床应用受到很大限制。目前, 有若干个亚单位疫苗(如Ag85A, ESAT-6)已通过小鼠和豚鼠的初步药效学评价和部分安全性评价, 并显示出对结核病有较好的保护效果<sup>[13]</sup>, 在通过进一步效力学验证和免疫毒理等安全性评价后, 有可能在近年进入临床研究。

DNA疫苗作为预防结核病的新型疫苗也有了很大进展。DNA疫苗又称核酸疫苗, 是应用编码的抗

原DNA载体直接导入机体内, 表达出蛋白质, 进而通过细胞和体液免疫反应, 产生抗体, 从而达到防治疾病的一种免疫方法。Mollenkopf等采用比较蛋白质组学技术对结核分枝杆菌H37Rv和BCG菌株的蛋白质组进行分析, 从而挑选表达不同的蛋白质基因作为候选DNA疫苗。发现有 60 多个蛋白质基因在两菌株中表达不同<sup>[14]</sup>, 在其中又鉴定了 36 个结核分枝杆菌DNA疫苗候选者, 并通过小鼠实验对这些候选疫苗的保护效力和持久性进行了测定。结果发现疫苗候选者Rv3407 作为保护性抗原保护效力突出且相对持久, 并且Rv3407 还可通过异源基础加强疫苗策略(heterologous prime-boost vaccination protocol)加强卡介苗的疫苗保护效力。这说明在将来的临床试验中, DNA疫苗应用于已接种卡介苗的个体, 可以起到表达保护性抗原和加强卡介苗保护效力的双重作用<sup>[15]</sup>。尽管DNA疫苗具有良好的发展前景, 但是其疫苗安全性问题始终是人们关注的重点。应用DNA疫苗免疫的潜在危险是, 转入宿主体内的外源基因有可能整合到宿主染色体基因组DNA上, 使宿主细胞肿瘤抑制基因失活或肿瘤基因活化, 使宿主细胞转化为癌细胞。另外, 特定结构和序列的外源DNA可刺激机体产生抗DNA抗体, 理论上可能引起自身免疫应答<sup>[16]</sup>。研究人员在努力研究免疫原性更强、安全性更高的DNA疫苗载体和抗原的同时, 还十分关注结核DNA疫苗的安全性, 并关注DNA疫苗的给药途径和免疫效果之间的关系等系列问题。因此, 在DNA疫苗进行临床应用之前, 保证其安全性是首先需要攻克的问题。

## 3 结核病早期诊断标识物的研究

结核分枝杆菌引起的结核病以肺部感染最为多见, 其普通的病原学诊断主要依靠标本涂片镜检和细菌培养, 但前者阳性率低, 后者又需历时 4~8 周, 耗时长。可见, 传统的诊断方法不适于结核病的有效、快速早期诊断。蛋白质组学技术非常适合于血液、尿液、痰液等复杂样品的分析, 利用先进的蛋白质组学技术, 可以同时分析检测上千种与结核病潜伏期感染相关的蛋白, 从而做出有效快速的早期诊断, 以便早期治疗减少疾病的传播。目前, 应用蛋白质组学技术在蛋白质或肽水平上分析导致疾病的蛋白质或肽的质和量的变化, 以期发现更多、更新的可用于疾病早期诊断的生物标识物<sup>[17]</sup>, 成为结核

病早期诊断研究的趋势。

Bahk 等对韩国的优势临床分离菌株 K 株和 H37Rv 及 CDC1551 进行比较蛋白质组学研究, 发现有 8 种蛋白质在 K 株中分泌量相对较多, 分别是: Rv0652、Rv1636、Rv2818c、Rv3369、Rv0566c、Rv3865、MT3304、Rv3160。采用大肠杆菌进行分子克隆、表达、纯化, 得到 rRv3369、rRv0566c 和 rRv3874, 通过联合酶联免疫吸附实验, 对 100 份结核病患者和 100 份健康人血清进行研究, 结果显示 rRv3369、rRv3874、rRv0566c 诊断肺结核的敏感性分别是 60%、74%、43%, 特异性分别是 96%、97%、84%。这说明 rRv3369 和 rRv3874 有望成为当地结核病早期诊断的靶点<sup>[18]</sup>。

目前, 研究结核分枝杆菌蛋白质组所用的技术多为 2-DE 和 MS。但由于 2-DE 分离方法的限制, 用此方法只有 341 个结核分枝杆菌蛋白质可以被分离鉴定<sup>[19]</sup>, 与 3924 个蛋白质编码序列相比还不到 10%。Mawuenyega 等采用自动化双向毛细管液相色谱法 (automated two-dimensional, capillary high-performance LC, 2DLC) 结合质谱技术, 对结核分枝杆菌 H37Rv 毒力株的细胞壁、细胞膜、细胞质的蛋白质组分进行全面分析鉴定, 从而鉴定并定位了 1044 个全菌蛋白质 (>25% 结核分枝杆菌蛋白质组), 并利用生物信息学方法对鉴定数据进行分析<sup>[20]</sup>。这些鉴定出的新蛋白质为寻找药物靶点及早期诊断标志物等提供了更大的资源库。

## 4 结核分枝杆菌耐药性的研究

近年来, 结核病发病率呈上升趋势, 其中一个主要原因是多重耐药结核菌株 (Multidrug-resistant TB, MDR-TB) 的出现。耐药结核菌使病程延长, 死亡危险性上升, 扩大耐药性传播的机会, 给结核病防治带来很大困难, 这已引起人们的广泛关注。采用蛋白质组学方法在细胞整体水平做动态的全局的研究, 有助于全面阐明结核分枝杆菌耐药机制, 寻找新药靶标, 对于研制和筛选新的抗结核药物具有重要的意义。

目前用于结核病治疗的一线药物有: 利福平 (rifampin)、异烟肼 (isoniazid)、链霉素 (streptomycin)、吡嗪酰胺 (pyrazinamide) 和乙胺丁醇 (ethambutol)。研究表明, 96% 的耐利福平菌株出现 *rpoB* 基因突变, 约 60% 异烟肼耐药是由于 *katG* 基因

的突变, 而在没有 *katG* 基因突变的耐药菌株中约有 10% 出现 *inhA* 基因的突变。耐链霉素与 *rpsL* 和 *rrs* 基因的突变有关, *pncA* 基因的突变与耐吡嗪酰胺有关, 大约有 69% 的乙胺丁醇耐药株有 *embB* 的改变<sup>[21]</sup>。总之, 结核杆菌的耐药机制与其药物敏感性相关的基因突变、缺失和插入有关<sup>[22]</sup>, 因为基因的改变使相关蛋白发生了变异。

乐军等应用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 技术比较了结核菌异烟肼耐药菌株和敏感菌株的全菌蛋白表达图谱, 鉴定出耐药菌株表达量显著增加 26 个蛋白质斑点, 并通过质谱分析获得了 6 个明确的肽质量指纹图谱<sup>[23]</sup>。此显著高表达的 6 个细胞壁蛋白, 分别为海藻糖磷酸酶、铁钼蛋白 A、莽草酸-5-脱氢酶、葡萄糖胺果糖-6-磷酸氨基转移酶、吡啶-3-甘油磷酸合成酶、TetR 家族转录调控因子。上述蛋白可能在耐异烟肼结核菌细胞壁的合成以及细胞壁新陈代谢中发挥重要作用。上述发现为耐异烟肼结核菌的耐药机制研究、新型抗结核药物开发和异烟肼耐药结核病诊断提供了理论帮助。

另外, 蛋白质组学技术的发展为寻找新的药物靶标开拓了广阔的前景。Argyrou 等采用亲和层析法分离纯化结核分枝杆菌 H37Rv 中对 INH-NAD(P) 加合物有高度亲和性的代谢关键酶, 发现除了已知的 InhA 和 DHFR, 还有 16 种蛋白酶对异烟肼加合物有高度亲和性, 这些蛋白酶均可能成为异烟肼药物的作用靶点, 从而为控制和根治结核病提供新的治疗途径<sup>[24]</sup>。

## 5 展望

蛋白质组研究当前还处于初级阶段, 相关技术手段还不是很完善。如双向电泳凝胶上仍只能显示细胞的部分蛋白, 因为部分蛋白要么浓度太低, 要么分子量太大或太小, 要么 pH 极高, 制约了对这些蛋白的分离和显示, 其中不排除存在有价值的功能蛋白<sup>[25]</sup>。并且, 细胞内的蛋白质种类繁多, 性质多样, 丰度差异大, 常规蛋白质组学方法不能做到分离和检测细胞中的全部蛋白质。此外, 成千上万种蛋白质之间及蛋白质与其他生物大分子间的相互作用和作用方式的复杂性同样也是蛋白质组研究所面临的问题。由于蛋白质的复杂性和识别原则的多样性, 缺乏一种高通量的识别工具仍然是蛋白质组学深入研究的瓶颈。随着对大规模蛋白质相互作用研究的重视, 发展高通量和高精度的蛋白质相互作用检测技术也被科学家所关注。国际上已建立了结核

分枝杆菌蛋白质组学跨国合作研究体系, 计划在 5 年左右的时间阐明大多数结核分枝杆菌相关蛋白的结构和功能。目前, 建立一个大规模、高通量、自动化的复杂蛋白质样品的分离和鉴定技术平台, 从而快速、准确地筛选功能蛋白质是蛋白质组学研究技术发展的目标。要实现这一目标, 要求技术上的不断改进, 并且在发展新技术的同时强调各种技术方法之间的整合和互补, 以发挥各项技术最大的潜能。基于蛋白质组学的结核病的研究, 特别是分析临床血液样品的相关蛋白质或肽的质和量精细的变化, 发现更多、更新的可用于结核病早期诊断的标识物, 将为结核病的诊断、预防和治疗提供新的思路和理论基础, 对保障人民群众的生命和健康具有重要的社会意义和经济意义。

## 参 考 文 献

- [1] 夏其昌, 曾 嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京: 科学出版社, 2004, pp.233-234.
- [2] 朱 红, 周海涛, 何春涤. 蛋白质组学及其主要技术. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(5): 318-320.
- [3] Jungblut PR, Muller EC, Mattow J, *et al.* Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. *Infect Immun*, 2001, 69(9): 5905-5907.
- [4] Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, *et al.* Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol*, 1999, 33(6): 1103-1117.
- [5] Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, *et al.* Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis*, 2003, 24(19-20): 3405-3420.
- [6] Ryoo SW, Park YK, Park SN, *et al.* Comparative proteomic analysis of virulent Korean *Mycobacterium tuberculosis* K-strain with other mycobacteria strain following infection of U-937 macrophage. *J Microbiol*, 2007, 45(3): 268-271.
- [7] Starck J, Kallenius G, Marklund BI, *et al.* Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 11): 3821-3829.
- [8] Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, *et al.* Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* blocks  $Ca^{2+}$  signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol*, 2003, 170(6): 2811-2815.
- [9] Målen H, Berven FS, Fladmark KE, *et al.* Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics*, 2007, 7(10): 1702-1718.
- [10] Kaufmann SH. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med*, 2000, 6(9): 955-960.
- [11] Covert BA, Spencer JS, Orme IM, *et al.* The application of proteomics in defining the T cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 2001, 1(4): 574-586.
- [12] Goncalves ED, Bonato VL, da Fonseca DM, *et al.* Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming. *Genet Vaccine Ther*, 2007, 5: 7.
- [13] Derrick SC, Yang AL, Morris SL. A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6-Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts BCG-induced protective immunity. *Vaccine*, 2004, 23(6): 780-788.
- [14] Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, *et al.* Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis*, 2001, 22(14): 2936-2946.
- [15] Mollenkopf HJ, Grode L, Mattow J, *et al.* Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. *Infect Immun*, 2004, 72(11): 6471-6479.
- [16] Taylor JL, Turner OC, Basaraba RJ, *et al.* Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect Immun*, 2003, 71(4): 2192-2198.
- [17] 伏建峰, 史清海, 路西春. 蛋白质组学技术及其在临床检验诊断学中的应用. 现代检验医学杂志, 2007, 22(5): 99-101.
- [18] Bahk YY, Kim SA, Kim JS, *et al.* Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics*, 2004, 4(11): 3299-3307.
- [19] Mattow J, Jungblut PR, Müller EC, *et al.* Identification of acidic, low molecular mass proteins of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Proteomics*, 2001, 1(4): 494-507.
- [20] Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(1): 396-404.
- [21] Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, *et al.* Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis*, 1998, 79(2): 111-118.
- [22] 李召东, 陈 瑜, 王明法, 等. 结核杆菌耐药的分子机制研究. 中国医药导报, 2007, 4(2): 15-17.
- [23] 乐 军, 刘丽蓉, 谢建平, 等. 异烟肼耐药和敏感结核分枝杆菌的比较蛋白质组学研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(4): 258-262.
- [24] Argyrou A, Jin L, Siconilfi-Baez L, *et al.* Proteome-wide profiling of isoniazid targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 2006, 45(47): 13947-13953.
- [25] Verrills NM. Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin Biochem Rev*, 2006, 27(2): 99-116.