

# 应用蛋白质组学的方法分析缺铁培养对 化脓性链球菌 MGAS5005 的影响

吕洁 余光创 孙正华 王南杰 朱颖 王红翠 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】研究铁缺失对化脓性链球菌的影响, 并寻找摄铁系统中的关键蛋白。【方法】以化脓链球菌为模型, 利用含 Fe 和不含 Fe 的培养基对细菌进行培养, 收集全细胞蛋白进行双向电泳, 定量软件分析电泳图谱, 质谱鉴定差异蛋白, 进而通过生物信息学分析蛋白上下游关系, 从中找到关键蛋白。【结果】鉴定出 20 个差异蛋白, 并用 Cytoscape 软件对差异蛋白相互关系网络进行节点分析找到其中 5 个瓶颈分子。【结论】在培养基中的  $\text{Fe}^{3+}$  缺乏时, 细菌的生物合成和含氮化合物、生物大分子等重要代谢受到很大影响, 这为进一步阐明细菌铁代谢机制奠定了基础。

**关键词:** 化脓性链球菌, 金属蛋白, 铁, 蛋白质组学

## Proteomic analysis of effects of iron depletion on *Streptococcus pyogenes* MGAS5005

LÜ Jie YU Guang-Chuang SUN Zheng-Hua WANG Nan-Jie  
ZHU Ying WANG Hong-Cui SUN Xue-Song\*

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

**Abstract:** [Objective] Analyze the effects of iron deficiency on *Streptococcus pyogenes*, and find the key proteins in the iron acquisition systems. [Methods] *Streptococcus pyogenes* was cultured in THY medium with or without iron. Total proteins were extracted for the 2DE-gel analysis. The altered proteins upon iron depletion were identified by mass spectrometry. Fur-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000373); 广东省自然科学基金项目(No. 10451063201005247); 暨南大学  
创新与培育项目(No. 21611201)

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

收稿日期: 2011-11-17; 接受日期: 2012-02-22

ther bioinformatics analyzed the relationship between key differentially expressed proteins. **[Results]** The 20 altered protein were identified. With Cytoscape analysis of the betweenness of these proteins, 5 bottleneck proteins were detected. **[Conclusion]** The results showed that iron depletion affect the cellular biosynthetic processes, the metabolic process of compound containing nitrogen and the macromolecular metabolic process etc. This study laid a foundation for further studying the mechanisms of the iron metabolism in bacteria.

**Keywords:** *Streptococcus pyogenes*, Metalloprotein, Iron, Proteomics

病原微生物引起的感染性疾病一直是人类健康的大敌, 由于病原微生物的快速变异性、抗药性、新的微生物种类的出现等, 感染性疾病仍然是全球范围内主要的疾病之一<sup>[1]</sup>。其中, 链球菌主要引起人类的化脓性炎症、猩红热、新生儿败血症、细菌性心内膜炎等感染, 甚至引起毒性休克<sup>[2]</sup>。

铁是细菌生长的必须金属元素<sup>[3]</sup>。在化脓性链球菌的长期研究中证明了铁离子是细菌生长繁殖中以及对宿主侵袭过程中至关重要的微量元素<sup>[4]</sup>。很多重要的酶、参与生物代谢过程的蛋白质都与铁离子密切相关。尤其在近十年的研究中, 肯定了致病菌必须具备从宿主体内掠夺足够的铁离子才能保证其生长和繁殖能力<sup>[5]</sup>, 因此细菌拥有一套对铁离子具有高度亲和力的摄取系统: MtsABC、HtsABC 和 FtsABCD<sup>[6-8]</sup>。若丧失铁离子的掠夺能力, 它将被宿主体内的免疫系统消灭或因缺乏营养死亡<sup>[9]</sup>。目前缺铁环境对细菌的基因/蛋白质表达改变的研究较少, Nanduri 等利用非标记定量方法研究了铁离子限制引起肺炎链球菌蛋白组学的改变<sup>[10]</sup>。本文利用基于双向电泳技术的蛋白质组学方法鉴定化脓性链球菌在缺铁环境引起的特定蛋白质的变化, 以期揭示细菌的铁转运通路及其在宿主中适应性生长的分子机制奠定基础, 从而更深入地开展对基于铁蛋白的疫苗开发及以其为靶向的抑菌剂的研发工作。这将对细菌引发感染的预防和治疗起到推动作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 化脓性链球菌 MGAS5005, 购自英国国家典型菌种保藏中心(National Collection of Type Culture, NCTC)。

**1.1.2 无菌金属盐溶液:**  $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$  (均由 Sigma 公司生产) 分别配制成 0.05 mol/L、0.10 mol/L、1.00 mol/L 溶液。定容后使用 Millipore 一次性过滤器过滤除菌, 4 °C 保存备用。

**1.1.3 培养基:** 普通 THY 培养基为含 0.5% 的酵母浸出液(由 OXOID 公司生产)的 Todd-Hewitt broth 培养基。去离子限制性 THY 培养基为用 5% (W/V) 的 Chelex-100 resin 螯合处理 8 h 的 THY 培养基。

**1.1.4 试剂:** Chelex-100 resin、G-250 染色液购自 Bio-Rad 公司; 尿素、硫脲、CHAPS、二硫苏糖醇(DDT)、碘乙酰胺(IAA)、蛋白酶抑制剂(PMSF)等购自 Sigma 公司; 固相 pH 梯度干胶条(pH 4-7, 13 cm)、2D Clean up Kit 等购自 GE 公司; 丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺、SDS、Tris-base 购自广州展晨生物公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基中各金属离子浓度测定:** 使用电感耦合等离子体发射光谱仪 Optima 2000 (Perkin Elmer) 测定普通 THY 培养基与去离子限制性 THY 培养基中各金属的浓度。

**1.2.2 MGAS5005 菌株培养基中最适合  $\text{Fe}^{3+}$  浓度的测定:** 在去离子的限制性培养基中补加

100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ 、2 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 培养体系中的终浓度<sup>[10]</sup>,及一系列  $\text{Fe}^{3+}$ 浓度(0  $\mu\text{mol/L}$ 、25  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、200  $\mu\text{mol/L}$ 、1.6 mmol/L),于 24 孔板中培养,每个浓度平行 3 个孔。2 mL 菌液/孔,接种量 1%,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养。从培养开始后第 2 小时开始到第 13 小时,每小时测定一次  $OD_{600}$  值。绘制生长曲线。

**1.2.3 细菌的培养与收集:**设定 3 组平行实验,每组分为含 Fe 组和不含 Fe 组,每组均补加  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ,其中含 Fe 组加  $\text{Fe}^{3+}$ 量为 1.2.2 所得结果。接种前,离心去除菌种中的培养基,用  $\text{ddH}_2\text{O}$  清洗 2 次后重新悬浮后接种培养, $OD_{600}$  值 0.8 时收菌。离心去上清。

**1.2.4 细菌全蛋白的提取与纯化:**采用反复冻融和超声裂解法提取细菌全蛋白<sup>[10]</sup>。全蛋白提取操作参照文献[10]方法。测定蛋白浓度后,-80  $^{\circ}\text{C}$  分装冻存。2D Clean-Up Kit 纯化样品。

**1.2.5 双向电泳:**含 Fe 组和不含 Fe 组细菌全蛋白样品以 100  $\mu\text{g}$  上样,计算样品体积<sup>[11]</sup>,操作步骤参照文献[11]。

**1.2.6 图像分析:**将银染得到的双向电泳分析胶用 Image Scanner 扫描仪在同一参数下扫描并保存。ImageMaster 2D Platinum 比较实验组和对照组的双向电泳图谱,只有  $P < 0.01$  且差异在近 2 及以上的蛋白点作为候选差异表达蛋白质进行胶内酶解和质谱分析<sup>[12]</sup>。

**1.2.7 胶内酶解:**根据图像分析结果,挖取对应的蛋白质银染点,分组进行脱色,脱水和吸胀处理;加入胰蛋白酶液和覆盖液 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。实验所用试剂配制参照文献[10]。

**1.2.8 质谱鉴定:**对选取的差异表达蛋白点进行胶内酶解。冻干后的蛋白质样品用 2  $\mu\text{L}$  含有 0.1% TFA 的 30%乙腈充分溶解,取 0.8  $\mu\text{L}$  样品点于

384 孔 AnchorChip 板上,取 0.4  $\mu\text{L}$  5 g/L CHCA 基质溶解液点于样品上,风干结晶后进行质谱鉴定。

采用美国 ABI 4800 MALDI-TOF/TOF 串联飞行时间质谱仪(Applied Biosystems, Foster City, CA)进行肽指纹图谱(PMF)鉴定。质谱操作采用正离子反射模式,外标校正进行检测。每个样品质谱信号累计扫描 600-800 次,扫描范围为 800-4 000 D,得到鉴定蛋白的肽指纹图谱。从一级质谱的肽质量指纹图谱中选择信噪比(S/N)大于 50 的 5 个得分最高的前体离子做 MS/MS 分析,质谱信号累计扫描 900-1 200 次,得到其序列信息,对一级质谱鉴定的蛋白质进行进一步确认。通过 GPS Explorer 软件(V3.6, Applied Biosystems)得到 MS 和 MS/MS 的数据,然后用 MASCOT (V2.1, Matrix Science, London, U.K)搜索引擎对本地数据库中的化脓性链球菌 MGAS5005 进行检索,鉴定蛋白质。

**1.2.9 生物信息分析:**使用 STRING 数据库(版本号 9.0 网址 <http://string-db.org>)分析差异蛋白质之间相互作用。该数据库收录了经过验证的蛋白质相互作用和预测的相互关系,预测的相互关系包括保守的基因组邻近关系(Conserved genomic neighborhood)、基因融合事件(Gene fusion)、跨基因组的基因共现(Co-occurrence of genes across genomes),本文将得到的差异蛋白通过数据库检索,得到了蛋白质相互作用关系。

分析时所设置的参数如下:物种:化脓性链球菌 MGAS5005;可信度:0.40;相互作用蛋白:不超过 10 个;在数据库输入编码蛋白的基因名,自动生成蛋白质相互作用图<sup>[13]</sup>。

通过 Cytoscape 软件(版本号 2.8 网址 <http://www.cytoscape.org>)进行可视化和后续的分析,进一步找到其中的关键蛋白。该软件源自于系统生物学,是一个开放性的可视和分析的网络

软件。软件的核心部分提供了网络显示、布局、查询等方面的基本功能。将生物分子交互网络与高通量基因表达数据和其他的分子状态信息整合在一起。其核心是网络，其中的节点(Node)是基因、蛋白质或者分子，其连接是这些生物结构之间的相互作用。

2 结果与分析

2.1 普通 THY 与去离子限制性 THY 中各金属离子浓度测定结果

如表 1 所示，通过对 THY 培养基进行 8 h 的螯合处理，Ca<sup>2+</sup>由 2 104.0 μmol/L 减少到 227.5 μmol/L，螯合效率为 89.2%、Fe<sup>3+</sup>由 226.1 μmol/L 减少到 1.7 μmol/L，螯合效率为 99.2%、Mg<sup>2+</sup>由

3 485.0 μmol/L 减少到 712.5 μmol/L，螯合效率为 79.6%。其去离子的效率较高，残余金属离子在以后实验中对结果干扰较小。

2.2 最适合 Fe<sup>3+</sup>浓度的测定结果

根据不同培养时间点对应的 OD<sub>600</sub> 值，绘制不同 Fe<sup>3+</sup>浓度下细菌的生长曲线。从图 1 看出，当 Fe<sup>3+</sup>浓度在 25–50 μmol/L 之间最接近普通培养基下的生长状态；而 Fe<sup>3+</sup>为 0 μmol/L 时，虽然培养基中补加了 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>，生长仍然受到了限制，生长速度变慢；在培养基中补加 200 μmol/L、1.6 mmol/L 的高浓度 Fe<sup>3+</sup>时也抑制了细菌的正常生长。从以上实验结果得出，细菌在 50 μmol/L 的 Fe<sup>3+</sup>浓度的去离子限制性 THY 培养基中的生长状态与普通 THY 培养基最接近，为最适合的 Fe<sup>3+</sup>浓度。

表 1 普通 THY 与去离子限制性 THY 中各金属离子浓度						
Table 1 Metal ion concentrations in normal and Chelex100-chelated THY medium						
金属离子 Metal ion	Ca <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
普通 THY Normal THY (μmol/L)	2 104.0	226.1	3 485.0	0.5	0.5	46.7
去离子 THY Chelex100-chelated THY (μmol/L)	227.5	1.7	712.5	0.0	0.0	0.8

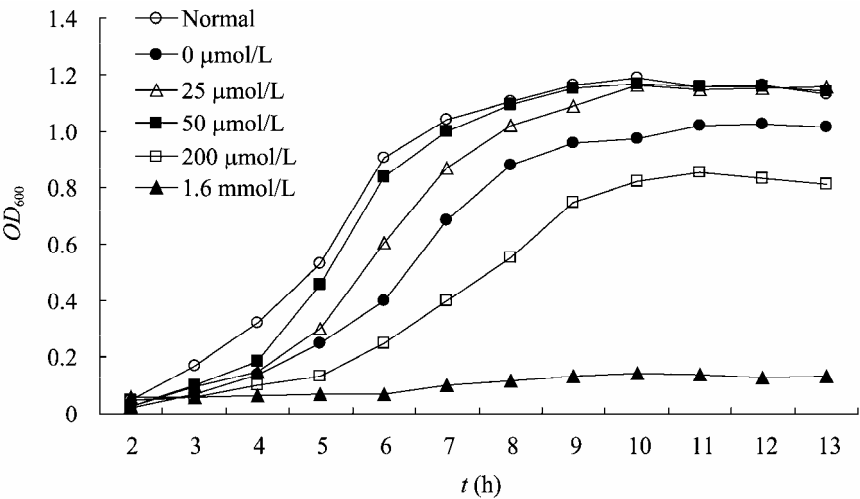


图 1 Fe<sup>3+</sup>对化脓链球菌生长的影响  
Fig. 1 Effect of iron on *S. pyogenes* MGAS5005 growth

2.3 双向电泳图谱

如图 2 所示, 将含 Fe 和不含 Fe 培养下得到的细菌全蛋白进行双向电泳并银染, 得到清晰度高、质量较好的双向电泳银染图谱, 经 3 次重复实验, 使用 Image Master 2D Platinum 6.0 进行图像分析, 得到 1 047±52 个蛋白质点。经不含 Fe 组和含 Fe 组图谱对比, 从中筛选到 34 个差异点, 其中有 28 个在含铁培养的情况下上调, 仅有 5 个相对下调。

2.4 质谱鉴定结果

按照差异表达蛋白胶内酶解实验方法, 通过质谱对这 34 个差异点进行检测, 去冗余后共鉴定出 20 个蛋白, 其中有 18 个在含铁的培养情况下上调, 有 2 个相对下调。实验结果见表 2。

利用生物信息学方法将鉴定得到的差异蛋白进行 GO 功能分类<sup>[2]</sup>, 从分类情况来看, 这些蛋白主要参与生物合成和代谢两大类, 而代谢涉及了蛋白代谢、有机酸代谢、含氮化合物代谢、大分子代谢和酮类物质代谢的功能方面。实验结果见表 3。

通过 STRING 数据库获得细菌在含 Fe 和不含 Fe 的培养基下得到的全蛋白的差异蛋白的相互作用关系, 通过 Cytoscape 对相互作用网络进行展示, 详见图 3。根据该图显示的结果, 由于铁的缺失引起的差异表达蛋白之间存在着较为紧密的相互作用, 存在网络中央的为一些高丰度的外分泌蛋白、核糖体蛋白、代谢合成相关的重要酶类等。

基于这个网络, 再进行瓶颈分子(Bottleneck moleculars)分析, 度量网络节点的介数(Betweenness), 介数是网络拓扑结构最重要的指标之一, 度量非冗余最短路径通过特定节点的数目。高介数节点控制着网络中大部分的信息流, 这些节点被定义为瓶颈分子。瓶颈分子控制着网络节点间的信息交流, 如果瓶颈分子受到阻滞, 将导致信号转导系统失效<sup>[14]</sup>。经过分析, 本文得到网络中的 5 个瓶颈蛋白(Elongation factor Tu、30S ribosomal protein S1、30S ribosomal protein S2、Phosphoglycerate kinase 和 Triosephosphate isomerase), 详见图 4。

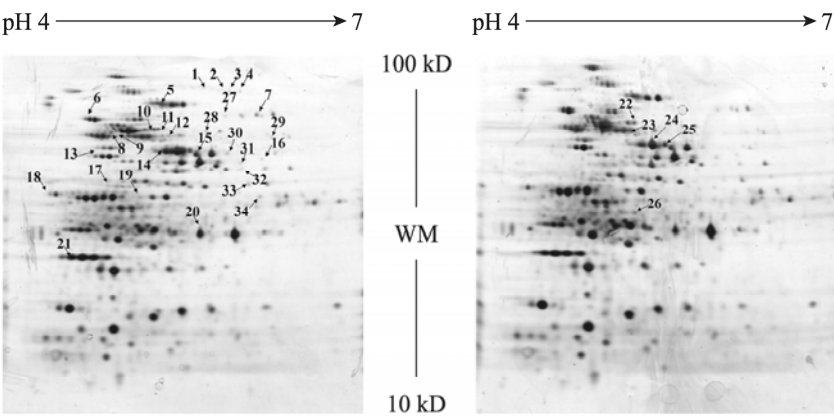


图 2 不含 Fe 组和含 Fe 组样品的双向图谱比较

Fig. 2 The 2-DE maps of *S. pyogenes* MGAS5005 cultured with or without Fe<sup>3+</sup>

注: A、B 分别代表含 Fe 组和不含 Fe 组。  
Note: A: Cultured in THY medium with Fe<sup>3+</sup>; B: Cultured in THY medium without Fe<sup>3+</sup>.

表 2 MGAS5005 细菌在不含 Fe 和含 Fe 条件下培养所得总蛋白差异鉴定结果  
Table 2 Summary of differentially expressed proteins of *S. pyogenes* MGAS5005 with and without Fe<sup>3+</sup> culture

Spot No. <sup>a)</sup>	Protein Name <sup>b)</sup>	Accession No. <sup>c)</sup>	Gene name	Protein MW	Protein PI	Protein Score	F.D. <sup>d)</sup>
1	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	gi 71910936	<i>nrdE.2</i>	81 300.8	5.35	47	△
2.3.4	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	gi 71910507	<i>clpL</i>	77 300.1	5.58	56	△
5	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	gi 71910799	<i>glmS</i>	65 523.6	5.10	105	+2.174 12
6	Chaperonin groel	gi 71911574	<i>groEL</i>	57 060.0	4.75	264	△
7	Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	gi 71911670	<i>guaB</i>	52 774.2	5.65	163	+2.281 31
8	30S ribosomal protein S1	gi 71910528	<i>rpsA</i>	43 822.9	4.90	453	△
9	Elongation factor Tu	gi 71910321	<i>tuf</i>	43 828.4	4.91	249	△
10.11.22	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate	gi 71910932	<i>gapN</i>	50 337.4	5.06	101	△
12	Glutamine synthetase	gi 71911409	<i>glnA</i>	50 408.2	5.21	92	△
13	Phosphoglycerate kinase	gi 71911412	<i>pgk</i>	42 104.0	4.82	214	△
14.24.25	Ornithine carbamoyltransferase	gi 71911086	<i>arcB</i>	37 873.2	5.19	350	+1.947 27
15	3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	gi 71911302	<i>fabF</i>	43 623.9	5.38	324	+2.126 54
16	Phenylalanyl-trna synthetase subunit alpha	gi 71910400	<i>pheS</i>	39 153.9	5.65	113	△
17	Molecular chaperone dnaK	gi 71911311	<i>dnaK</i>	64 880.2	4.62	50	△
18	Putative manganese-dependent inorganic	gi 71910133	<i>ppaC</i>	33 596.0	4.47	103	△
19	30S ribosomal protein S2	gi 71911593	<i>rpsB</i>	28 382.8	5.11	62	△
20	3-Ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	gi 71911303	<i>fabG</i>	25 913.4	5.52	52	+2.377 22
21	Triosephosphate isomerase	gi 71910322	<i>tpiA</i>	26 601.3	4.57	127	+1.962 32
23	Arginine deiminase	gi 71911088	<i>arcA</i>	46 267.8	4.99	455	-4.136 10
26	50S ribosomal protein L3	gi 71909858	<i>rplC</i>	22 412.1	10.13	54	-2.035 94

注: <sup>a)</sup>: Spot No. 编号对应于图 2 上箭头指定的蛋白质点, 不同的 Spot No. 鉴定为同一蛋白质的可能是磷酸化等翻译后修饰等原因造成; <sup>b)</sup>: Protein name 来自 *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 数据库; <sup>c)</sup>: Accession No. 来自 *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 数据库; <sup>d)</sup>: F.D. 是指含 Fe 培养的细菌全蛋白中某蛋白表达量相对不含 Fe 培养下同一个蛋白表达量的倍数; △: 仅在含 Fe 组测得该点.

Note: <sup>a)</sup>: Spot No is according to the arrows in the maps marking the positions of differentially expressed proteins. Spots with different No. have been identified as the same protein probably due to phosphorylation or other post-translational modifications; <sup>b)</sup>: Protein name is according to *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 database; <sup>c)</sup>: Accession No. is according to *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 database; <sup>d)</sup>: F.D. represents fold of proteins altered upon iron repletion; △: The proteins are only detected in Fe<sup>3+</sup> replete condition.

表 3 差异蛋白功能分类数据表  
Table 3 Functional classification of differentially expressed proteins

Function <sup>a)</sup>	Count <sup>b)</sup>	Gene name	Protein name <sup>c)</sup>	Spot No. <sup>d)</sup>
Cellular biosynthetic process	10	<i>nrdE.2</i>	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	1
		<i>guaB</i>	Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	7
		<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	8
		<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	12
		<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	15
		<i>pheS</i>	Phenylalanyl-trna synthetase subunit alpha	16
		<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	19
		<i>fabG</i>	3-Ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	20
		<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomerase	21
		<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	26
Cellular nitrogen compound metabolic process	8	<i>nrdE.2</i>	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	1
		<i>glmS</i>	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	5
		<i>guaB</i>	Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	7
		<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	12
		<i>pheS</i>	Phenylalanyl-trna synthetase subunit alpha	16
		<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomerase	21
		<i>arcA</i>	Arginine deiminase	23
		<i>arcB</i>	Ornithine carbamoyltransferase	14.24.25
Cellular ketone metabolic process	7	<i>glmS</i>	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	5
		<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	12
		<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	15
		<i>pheS</i>	Phenylalanyl-trna synthetase subunit alpha	16
		<i>fabG</i>	3-Ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	20
		<i>arcA</i>	Arginine deiminase	23
		<i>arcB</i>	Ornithine carbamoyltransferase	14.24.25
Cellular macromolecule metabolic process	7	<i>nrdE.2</i>	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	1
		<i>groEL</i>	Chaperonin groel	6
		<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	8
		<i>pheS</i>	Phenylalanyl-trna synthetase subunit alpha	16
		<i>dnaK</i>	Molecular chaperone dnak	17
		<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	19
		<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	26
Organic acid metabolic process	7	<i>glmS</i>	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	5
		<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	12
		<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	15
		<i>pheS</i>	Phenylalanyl-trna synthetase subunit alpha	16

(待续)

(续表 3)

Protein metabolic process	6	<i>fabG</i>	3-Ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	20
		<i>arcA</i>	Arginine deiminase	23
		<i>arcB</i>	Ornithine carbamoyltransferase	14.24.25
		<i>groEL</i>	Chaperonin groel	6
		<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	8
		<i>pheS</i>	Phenylalanyl-trna synthetase subunit alpha	16
Unknown	3	<i>dnaK</i>	Molecular chaperone dnak	17
		<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	19
		<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	26
		<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	2.3.4
		<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	9
		<i>ppaC</i>	Putative manganese-dependent inorganic	18
Other	2	<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase	13
		<i>gapN</i>	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate	10.11.22

注: <sup>a)</sup>: Function 指蛋白质 GO 功能分类; <sup>b)</sup>: Count 代表蛋白质数量; <sup>c)</sup>: Protein name 来自 *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 数据库; <sup>d)</sup>: Spot No. 编号对应于图 2 上箭头指定的蛋白质点。

Note: <sup>a)</sup>: Function represents GO functional groups; <sup>b)</sup>: Count represents protein number; <sup>c)</sup>: Protein name is according to *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 database; <sup>d)</sup>: Spot No. is according to the arrows in the maps marking the positions of differentially expressed proteins.

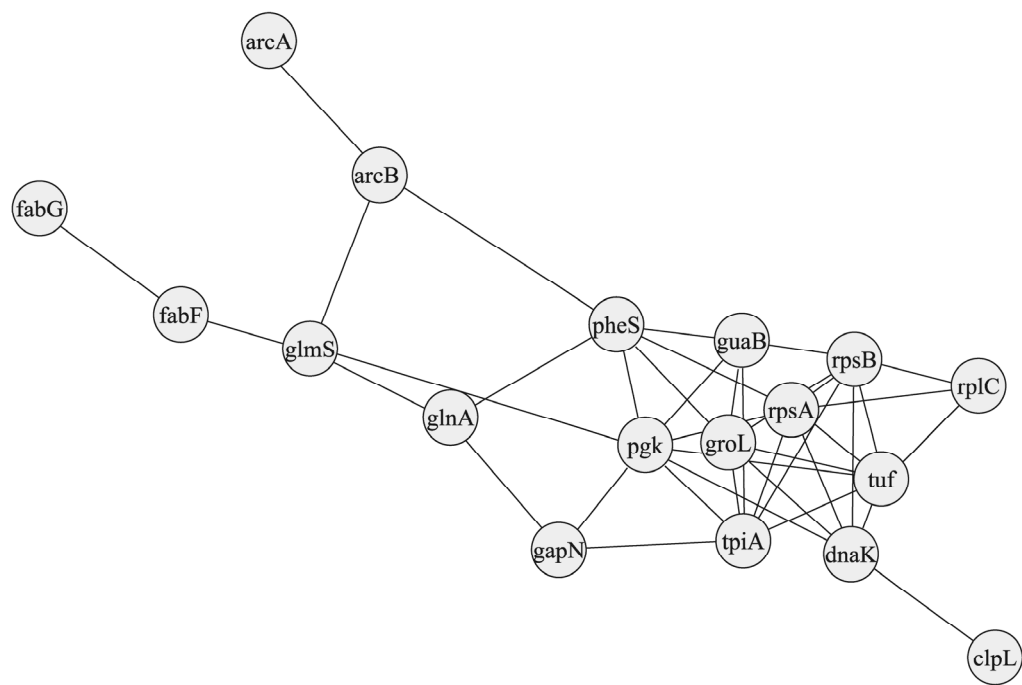


图 3 差异蛋白相互关系图

Fig. 3 The protein-protein interaction network of the identified differential proteins in *S. pyogenes* MGAS5005



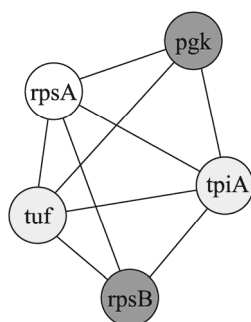


图 4 差异蛋白中关键蛋白相互关系图

Fig. 4 The interaction network of bottleneck proteins

### 3 讨论

本文将蛋白质组学技术运用于缺铁环境下对化脓性链球菌的影响研究中。包括双向电泳技术、质谱技术和生物信息学技术的联合使用。双向电泳技术已经被广泛应用于分离特定条件培养下的特定种类细胞内的几百至几千种蛋白质<sup>[15-16]</sup>。同时与质谱技术联合,可以获得包括蛋白名称、等电点、分子量以及存储号等信息<sup>[17]</sup>。通过以上所得并结合生物信息学技术可以对目标蛋白进行深入的研究和分析。本文使用 Cytoscape 软件对采集的差异蛋白进行数据分析并绘制网络图。软件的核心部分提供了网络显示、布局、查询等方面的基本功能,用于大规模蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-DNA 和遗传交互作用的分析<sup>[18-19]</sup>,展示分析结果更直观准确。

螯合剂被应用在目前的金属蛋白组学研究中, Chelex-100 resin 已经被广泛的用于螯合的实验处理,对高价金属离子有很高的亲合力和螯合作用<sup>[20]</sup>。本文中其螯合效率达到 90%。在去离子限制性培养基中,细菌仍然可以生长,说明它会应激使用其他金属离子,从而形成一定的代偿效应<sup>[21]</sup>。在含 Fe 和不含 Fe 两组培养中发现,不补加 Fe<sup>3+</sup>组细菌活力较差,生长比加 Fe<sup>3+</sup>组迟滞,裂解收集的细菌全蛋白浓度较低。

Nanduri 等对利用螯合处理的方法肺炎链球

菌(*Streptococcus pneumoniae* TIGR4)做了研究。使用基于 2-D LC ESI MS/MS 的非标记定量技术联合 Pathway Studio 软件对肺炎链球菌缺铁培养诱发的蛋白质表达差异作了分析,找到缺铁环境下对细菌铁转运、DNA 合成、修复以及翻译等造成的影响。所用的技术和方法是成熟的,对鉴定出的有表达改变的蛋白质之间的相互作用和通路的生物信息学分析也是当前在相关研究中被广泛选用的技术,预测性结果对后续研究有启迪和引导作用。

本文中利用类似的处理方法研究了铁离子对化脓性链球菌的影响。与之不同的是,本研究采用的是基于双向电泳技术的蛋白质组学定量方法,这种技术的优势是可以观察到某些蛋白不同形式的异构体或者修饰形式的变化。我们发现铁离子的缺失对化脓链球菌生物合成起到了很重要的作用。在不含铁的情况下,测定到 Elongation factor Tu 蛋白的表达量有相对下调,它在肺炎链球菌中缺铁环境下同样发生下调。它是一种高丰度的具有高度保守性的菌细胞内的蛋白质,在蛋白质生物合成的延伸过程中起到了关键性的作用<sup>[22]</sup>。近年来,EF-Tu 却是作为一种新发现的病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)分子而受到高度重视<sup>[23]</sup>,它在对宿主的侵袭过程中能被宿主细胞特异性地识别进而引发宿主的免疫反应。30S ribosomal protein S1 和 30S ribosomal protein S2 的表达量也急剧下调,在生物合成中,30S ribosomal protein S1 和 30S ribosomal protein S2 能协同作用<sup>[24]</sup>,与 30S 核糖体亚基结合从而影响后续蛋白表达和合成。在代谢的调节中,发现不含 Fe 培养的全蛋白中 Phosphoglycerate kinase (磷酸甘油酸激酶)表达有急剧下调,这是细菌糖代谢的关键蛋白,参与糖酵解的关键酶,也是细菌得以生存的必须酶,该酶的缺乏可导致代谢等功能的紊乱。同时, Trio-

sephosphate isomerase (磷酸丙糖异构酶)的表达也出现相应下调,该酶表达的缺失致使细菌其他的代谢功能也受到很大影响<sup>[25]</sup>。在细菌的抗氧化作用中, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate 的表达也有明显的变化,在部分已经证实的细菌中 NADPH 参与了将  $\text{Fe}^{3+}$  转化为  $\text{Fe}^{2+}$  的作用<sup>[3]</sup>。

总体而言,当培养环境中的含 Fe 量充足时,与细菌生物合成相关的蛋白质、代谢中相关调控的各种酶表达量也都相对上调,这说明 Fe 是调控细胞各种代谢途径的重要因素。

## 参 考 文 献

- [1] Cole JN, Henningham A, Gillen CM, et al. Human pathogenic streptococcal proteomics and vaccine development[J]. *Proteomics-Clinical Applications*, 2008, 2(3): 387-410.
- [2] Lange V, Malmstrom JA, Didion J, et al. Targeted quantitative analysis of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiple reaction monitoring[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2008, 7(8): 1489-1500.
- [3] Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 881-941.
- [4] Janulczyk R, Pallon J, Björck L. Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* ABC transporter with multiple specificity for metal cations[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(3): 596-606.
- [5] Holden MTG, Heather Z, Paillot R, et al. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(3): e1000346.
- [6] Brown JS, Holden DW. Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens[J]. *Microbes and Infection*, 2002, 4(11): 1149-1156.
- [7] Seeger MA, van Veen HW. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(5): 725-737.
- [8] Tong Y, Guo ML. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 481(1): 1-15.
- [9] Sun XS, Baker HM, Ge RG, et al. Crystal structure and metal binding properties of the lipoprotein MtsA, responsible for iron transport in *Streptococcus pyogenes*[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(26): 6184-6190.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Danos O, Svinartchouk F. Dialysis-assisted two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(17): 3475-3479.
- [13] Ge F, Lu XP, Zeng HL, et al. Proteomic and functional analyses reveal a dual molecular mechanism underlying arsenic-induced apoptosis in human multiple myeloma cells[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(6): 3006-3019.
- [14] Yu GC, Xiao CL, Lu CH, et al. Phosphoproteome profile of human lung cancer cell line A549[J]. *Molecular Biosystems*, 2011, 7(2): 472-479.
- [15] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1037-1053.
- [16] Fey SJ, Larsen PM. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5(1): 26-33.
- [17] Marcellin E, Gruber CW, Archer C, et al. Proteome analysis of the hyaluronic acid-producing bacterium, *Streptococcus zooepidemicus*[J]. *Proteome Science*, 2009, 7(1): 13.
- [18] Lepp Z, Huang CF, Okada T. Finding key members in compound libraries by analyzing networks of molecules assembled by structural similarity[J].

- Journal of Chemical Information and Modeling, 2009, 49(11): 2429–2443.
- [19] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Research, 2003, 13(11): 2498–2504.
- [20] Costin A, Bystrom B, Rovner E, et al. Effect of chelating ion exchange resin (Chelex 100) on impedance and evoked potentials[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1974, 30(2): 159–161.
- [21] Jakubovics NS, Jenkinson HF. Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria[J]. Microbiology, 2001, 147(7): 1709–1718.
- [22] Severin A, Nickbarg E, Wooters J, et al. Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(5): 1514–1522.
- [23] Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, et al. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants[J]. The Plant Cell, 2004, 16(12): 3496–3507.
- [24] Schwedler-Breitenreuter G, Lotti M, Stöffler-Meilicke M, et al. Localization of ribosomal protein S2 on the surface of the 30S subunit from *Escherichia coli*, using monoclonal antibodies[J]. The EMBO Journal, 1985, 4(8): 2109–2112.
- [25] Solem C, Koebmann B, Jensen PR. Control analysis of the role of triosephosphate isomerase in glucose metabolism in *Lactococcus lactis*[J]. IET Systems Biology, 2008, 2(2): 64–72.

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名课讲堂”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!