

## 牛布鲁氏菌不同种强毒株膜蛋白质组学差异的比较

李向阳<sup>1,2,3,4</sup>, 王学理<sup>2,3</sup>, 刘凯<sup>2</sup>, 霍晓伟<sup>2</sup>, 武迎红<sup>2</sup>, 张显华<sup>2</sup>, 张嘉保<sup>4\*</sup>

(1. 内蒙古民族大学成人教育学院, 内蒙古通辽 028043; 2. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古通辽 028043; 3. 内蒙古民族大学, 农牧交错地带农业技术开发与应用研究所, 内蒙古通辽 028043; 4. 吉林大学农学部, 吉林长春 130062)

**摘要** [目的]比较牛的不同种布鲁氏菌的菌株膜蛋白质组学的差异。[方法]采用丙酮干粉方法,提取布鲁氏菌强毒株 16M 和疫苗株 M5 的全蛋白,具有双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,用考马斯亮蓝染色、扫描获取二维电泳图谱,用 ImageMaster TM2D Platinum6.0-TOF 软件筛选出差异蛋白质酶切,准备样品进行质谱分析,通过 MALDI .0 软件在不同的肽质量指纹质谱搜索数据库,通过生物信息技术进行蛋白质识别。[结果]应用固相 pH 梯度图获得良好的重复性 2-DE 凝胶,观察布鲁氏菌强毒株 16M 和疫苗株 M5 2-DE 图谱,其蛋白质的表达模式非常相似,使用 ImageMaster TM2D4.0 软件自动识别蛋白质点,检测布鲁氏菌 16 M 蛋白的蛋白质点 856,疫苗株 M5 的蛋白质点 793。在数据库中选择有意义的蛋白质 23 种进行选择质谱鉴定。蛋白质功能的差异是由质谱鉴定得到的,涉及糖代谢、物质运输、蛋白质合成和分子伴侣等方面,有 13 种在 16M 和疫苗株 M5 的蛋白高表达。[结论]通过质谱鉴定,获得的蛋白质功能涉及糖代谢、物质运输、蛋白质合成和分子伴侣等,有 13 种在 16M 和疫苗株 M5 的蛋白高表达。

**关键词** 布鲁氏菌强毒株 16M; 疫苗株 M5; 菌体全蛋白质

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)35-13464-01

**Comparative Analysis of Brucella Virulent Strains Membrane Proteomic Differences**

LI Xiang-yang et al (Adult Education College, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028043; Faculty of Agriculture, Jilin University, Changchun, Jilin 130062)

**Abstract** [Objective] To compare membrane proteomic differences of different Brucella virulent strains of cattle. [Method] Use acetone dry powder method to extract whole proteins of Brucella virulent strain 16 M and vaccine strain M5, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to separate proteins, Kaumas Coomassie brilliant blue staining and scanning to obtain two-dimensional electrophoretogram, ImageMaster TM2D Platinum 6.0-TOF to screen different protein digestion, prepare samples for mass spectral analysis, use MALDI .0 to search and identify proteins in databases on the basis of bio-information technology. [Result] Two-dimensional gel electrophoresis shows that repeatable 2-DE gel can be obtained by using solidoid pH graduated symbols; according to 2-DE spectrum of Brucella virulent strain 16 M and vaccine strain M5, expression patterns of their proteins are similar; ImageMaster TM2D4.0 is used to identify the protein spots, that of Brucella virulent strain 16 M is 856, that of vaccine strain M5 is 793. Twenty-three significant proteins were chosen from the database for mass spectrum identification. [Conclusion] Differences of protein functions are obtained from the mass spectrum identification, 13 of them are included in 16M and M5, involving glycometabolism, material transport, protein synthesis and molecular chaperones.

**Key words** Brucella virulent strain 16M; Vaccine strain M5; Cell protein

布鲁氏杆菌病(布氏杆菌病)是一种由布鲁氏菌所引起的人兽共患传染病,普遍易感人和偶蹄动物,是一种难以治愈的慢性疾病<sup>[1]</sup>。该病会导致动物流产和不孕不育,造成巨大的经济损失和严重的公共卫生问题。布氏杆菌病在世界上 160 多个国家和地区不同程度的流行,在我国每个省几乎都存在羊、牛和猪布氏杆菌病<sup>[2]</sup>。布氏杆菌病是《中华人民共和国传染病防治法》中 37 种传染病中的乙类传染病,被列为《家畜家禽防疫条例实施细则》中二类动物疾病之首。笔者主要对布鲁氏菌不同种强毒株膜蛋白质组学差异进行比较。

**1 材料与方**

**1.1 材料** *B. melitensis* 型标准株 16M 和 *B. melitensis* 疫苗株 M5,由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所布病室保藏并提供。

**1.2 方法**

**1.2.1 布鲁氏菌的培养与变异检查。**以下操作必须在 BSL-2 级实验室操作,严格遵守实验室生物安全法规。布鲁氏菌的培养步骤为:①在 4℃ 冰箱培养 1 代牛 16M 布鲁氏菌菌株

和疫苗株 M5,均匀涂布于一次性接种的培养基上,培养箱 37℃ 48~72 h;②变异检查按照国家、国际上通用的标准,采用虎红平板凝集试验、荧光偏振测定法、I-ELISA 及试管凝集试验 4 种方法分别对血清样品进行检测<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 布鲁氏菌的提取。**采取丙酮干粉法。全菌蛋白样品制备操作①~④必须在 BSL-2 水平的实验室内操作,严格遵守实验室生物安全法规。步骤为:①接种,将 16M、M5 菌株移到 10 ml 灭菌离心管中,先加 2 ml 生理盐水,完全击败细菌,再加 7 ml 生理盐水,将全面暂停细菌,4℃,6 000 r/min,离心 10 min,弃上清;②先加 2 ml 生理盐水细菌,完全打败细菌,再加生理盐水至 7 ml,悬浮沉淀,4℃,6 000 r/min,离心 10 min,取上清液,收集细菌;③重复步骤②1 次;④加入细菌-20℃ 冰箱预冷 TCA/丙酮溶液的流体 8 ml,虽然混合,保存-20℃ 冰箱中过夜,4℃,6 000 r/min,离心 10 min,弃上清液;⑤加入沉淀,-20℃ 冰箱预冷 TCA/丙酮溶液 B 液 8 ml,沉淀,清洗,-20℃ 冰箱中静置 30 min 后,4℃,6 000 r/min,离心 10 min,放弃上清液;⑥将沉淀物-80℃ 冷冻 6 h,沉淀完全冻结;⑦冷冻沉淀物过夜后,在真空冷冻干燥机中干燥;⑧将沉淀物溶解在 2 ml 蛋白质中裂解,4℃ 溶解 2 h,超声帮助溶解(超声波治疗液晶),4℃,10 000 r/min,离心 50 min,100 L/管包装,放-80℃ 保存,供以后使用;⑨分别在 16M、M5 中测定蛋白质浓度。

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(31260608);内蒙古自治区高等学校科学技术研究重点项目(NJZZ12117);内蒙古通辽市校科技合作项目(SXZD2012131)。

**作者简介** 李向阳(1972-),男,内蒙古呼伦贝尔人,副教授,博士,从事传染病诊断及治疗。\*通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事基因诊断方面的研究。

收稿日期 2013-10-20

(下转第 13540 页)

-21.

- [16] PAULSON L D. Building rich web applications with Ajax[J]. Computer, 2005,38(10):14-17.
- [17] 张阳. 基于 AJAX 技术的 MVC 模式 WEB 应用[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2007,33(3):686-688.
- [18] 杜四清,何丕廉,杨朋润,等. 基于 WWW 的平衡施肥 WebGIS 专家系统的设计与实现[J]. 计算机工程与应用,2003(26):208-210.

- [19] GREEN D R. Cartography and the internet[J]. The Cartographic Journal, 1997,34(1):23-27.
- [20] 张明安,马友华,褚进华,等. WebGIS 技术在测土配方施肥中的应用[J]. 农业网络信息,2010(10):40-43.
- [21] 柳家友,索莉. WebGIS 的特点和发展趋势[J]. 科技信息,2009(25):20.

(上接第 13464 页)

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件对数据加以统计、分析,计量数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”的形式进行表示,采用  $t$  检验;计数资料以百分比的形式进行表示,采用卡方检验; $P < 0.05$  表示组间存在统计学差异。

## 2 结果与分析

牛布鲁氏菌强毒株 16M 与疫苗株 M5 差异蛋白质谱鉴定结果,通过选择 23 种蛋白质点,酶切位点,胰蛋白酶消化,通过质谱(MALDI-TOF-MS 鉴定,其中 20 个蛋白点的肽质量指纹(PMF 图谱),在数据库中匹配的有意义的蛋白质,被称为糖外膜蛋白结合蛋白。这些包括布鲁氏菌膜蛋白 Omp25、侵袭蛋白 B、3-酮脂酰-(酰基载体蛋白)还原酶、DPS 蛋白、转醛醇酶、ABC 胞浆蛋白糖结合蛋白、胞浆蛋白、铁结合胞质蛋白、镍和细胞质蛋白前体、分子伴侣 DnaK、乙醛、支链  $\alpha$ -酮酸还原酶三硫酸脱氢酶、二氢硫辛酰胺脱氢酶、结合 GroEL 的外膜蛋白 Omp31、细胞质环流因子、甲醛脱氢酶蛋白质等。笔者测定的蛋白质点 6 和 8。图 1、2 中横坐标是肽的质荷比

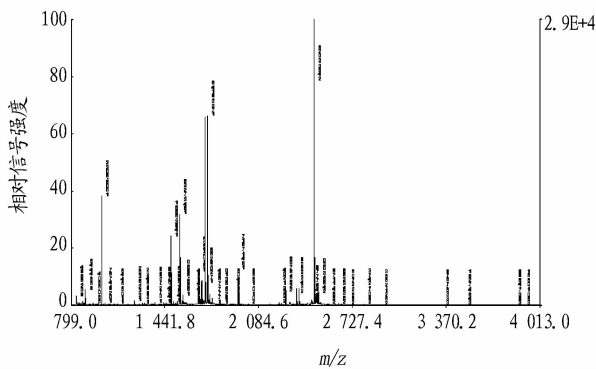


图 1 蛋白质点 6 的 PMF 图谱

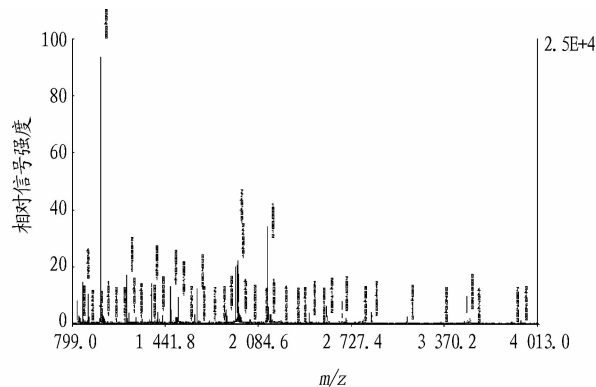


图 2 蛋白质点 20 的 PMF 图谱

( $m/z$ ),图中的单次电荷峰、肽段的质量与质量荷比值是否相等;纵坐标表示收集的肽的相对信号强度,峰越高,肽的含量越高,每个有效肽的顶部标示其相应的分子量。

## 3 讨论

在 20 世纪 70 年代后期,布鲁氏菌蛋白质组蛋白质鉴定技术得到广泛应用。通常使用 IDSDS 技术,但存在脉冲场凝胶电泳和免疫印迹布鲁氏菌蛋白,证明不同种布鲁氏菌有一个特定的蛋白质,不同菌种蛋白既有相似之处,又有差异<sup>[4]</sup>。不同类型的布鲁氏菌蛋白是探索利用 SDS 脉冲场凝胶电泳、银染法和免疫印迹方法检测相关蛋白质,包括流产布鲁氏菌、猪链球菌<sup>[5]</sup>。美国维托克·德尔维奇奥团队完整地测定了羊布鲁氏菌菌株 16M 蛋白质毒力,检测了布鲁氏菌菌株的毒性,发现这 2 种菌株在糖、脂代谢和蛋白质的合成中存在一定的差异。

低丰度蛋白质在细胞中可能有重要的监管职能,代表蛋白质组研究“烙铁头”,所以低丰度蛋白质的分离是一个挑战。目前,二维凝胶电泳技术的发展关键是如何提高二维凝胶电泳分离度、灵敏度和分辨率,精确地检测蛋白质表达。第 1 阶段是蛋白电泳,染色,具有灵敏度高和窄 pH 梯度的主要趋势是结合二维凝胶电泳分离和发展如新的荧光染色技术。这个测试是在第 1 阶段的毛细管电泳分离效果 pH 3 ~ 10 和 pH 4 ~ 7 胶条条件下进行的,发现 pH4 ~ 7 胶条能很好地分离布氏杆菌 16M 疫苗株 M5 细胞蛋白<sup>[6]</sup>。

研究表明,布鲁氏菌菌株的毒性和疫苗株 M5 的不同点(等电点不同的分子量和等电点相同的分子量之间存在差别),结果应用固相 pH 梯度双向凝胶电泳获得重复性较好的 D-2 凝胶图谱,其蛋白表达模式非常类似。这种现象可能是因为不同的蛋白质分子通过化学修饰,造成其他小分子迁移到不同等电点的位置。不同分子量的蛋白质也可能属于同一家族,但差异在分子量和等电点。通过质谱鉴定,获得 13 种在布鲁氏菌 16M 和疫苗株 M5 的高表达蛋白质。

## 参考文献

- [1] 段小宇. 布鲁氏菌分子标记疫苗株的构建及鉴别诊断方法的建立[D]. 长春:吉林大学,2007:83-88.
- [2] 农业部动物检疫所. 动物布鲁氏菌病及结核病高级专家研讨会报告汇编[G]. 2005:26-28.
- [3] 王玉飞,陈泽良,黄留玉. 布鲁氏菌胞内存活机制研究进展[J]. 微生物学通报,2007,34(6):1218-1221.
- [4] CELLI J, CHASTELLIER C, FRANCHINI D M, et al. Advances in brucellamelitensis research[J]. Exp Med, 2003, 198:545-556.
- [5] 尚德秋. 布鲁氏菌流行病学及分子生物学研究进展[J]. 中国地方病防治杂志,1997(1):22-28.
- [6] 杨海荣. 布鲁氏菌疫苗 S2、M5 个别功能基因序列分析及 AMOS 检测方法研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2007:23-24.