

# 耐异烟肼和链霉素的结核分枝杆菌临床分离株与敏感株差异蛋白表达研究

何秀云 朱传智 逢宇 黄香玉 蒋丽气 赵雁林 庄玉辉

**【摘要】 目的** 鉴定结核分枝杆菌对异烟肼和链霉素耐药相关的潜在蛋白。**方法** 以药物敏感株(01105)和标准株 H37Rv 为对照,核素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)结合 Nano 液相色谱-串联质谱分析仪(LC-MS-MS)技术和生物信息学,鉴定并相对定量结核分枝杆菌对异烟肼与链霉素耐药的临床分离株 02166 菌株蛋白。**结果** 02166 菌株分别与 01105 菌株和 H37Rv 菌株比较差异表达蛋白为 153 个和 130 个,02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较差异表达蛋白均为 86 个(共同差异表达蛋白)。差异表达蛋白理论相对分子质量和等电点分布广泛,相对分子质量从 7.63~326.22,等电点从 3.74~12.48,其主要参与中间代谢、呼吸作用和脂类代谢。共同差异表达蛋白:9 个核糖体蛋白(Rv0056、Rv0651、Rv0652、Rv0701、Rv0719、Rv1630、Rv2785c、Rv2909c 和 Rv3458c)在 02166 菌株中表达下调;5 个蛋白(Rv0234c、Rv2466c、Rv2626c、Rv2986c 和 Rv3118)在 02166 菌株中呈显著差异表达,其中琥珀酸半醛脱氢酶(Rv0234c)和假定未知蛋白(Rv2466c)在 02166 菌株中表达上调倍数>1.2,DNA 结合蛋白 HU 同系物 hupB(Rv2986c)、假定未知蛋白(Rv2626c 和 Rv3118)在 02166 菌株中表达下调倍数<0.5。**结论** iTRAQ 发现了耐异烟肼和链霉素的结核分枝杆菌临床分离株差异表达蛋白,为进一步探讨结核分枝杆菌异烟肼或链霉素耐药机制奠定了基础。

**【关键词】** 分枝杆菌; 结核; 异烟肼; 链霉素; 蛋白质组学

**Quantitative proteomic analyses of isoniazid- and streptomycin-resistant and sensitive clinical isolates and H37Rv of *Mycobacterium tuberculosis*** HE Xiu-yun\*, ZHU Chuan-zhi, PANG Yu, HUANG Xiang-yu, JIANG Li-qi, ZHAO Yan-lin, ZHUANG Yu-hui. \* Beijing Key Lab of Transplantation and Immune Regulation, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: HE Xiu-yun, Email: xwhe@sohu.com; ZHAO Yan-lin, Email: zhaoyanlin@chinatb.org

**【Abstract】 Objective** To identify the proteins differentially expressed in isoniazid- and streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate (INH/S<sup>r</sup> isolate) compared with drug-sensitive clinical isolate (INH/S<sup>s</sup> isolate) and H37Rv. **Methods** Whole cellular proteins were extracted from the INH/S<sup>r</sup> isolate 02166, the INH/S<sup>s</sup> isolate 01105 and H37Rv of *M. tuberculosis*, respectively. The proteins were digested with trypsin. The peptides were labeled, separated and identified by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) combined with Nano LC-MS-MS technology. The bioinformatics were used to identify and quantify the proteins. **Results** One hundred and fifty three and 130 proteins were found differential expression in 02166 strain compared with 01105 strain and H37Rv, respectively, including 86 proteins in 02166 strain compared with both 01105 strain and H37Rv. The theoretical molecular weight and isoelectric point of differentially expressed proteins ranged from 7.63 to 326.22 and from 3.74 to 12.48, respectively. Differentially expressed proteins were mainly associated with intermediary metabolism, respiration, and lipid metabolism. Nine ribosomal proteins (Rv0056, Rv0651, Rv0652, Rv0701, Rv0719, Rv1630, Rv2785c, Rv2909c and Rv3458c) were commonly down-regulated in 02166 strain compared with both 01105 and H37Rv. Succinate-semialdehyde dehydrogenase (Rv0234c) and putative uncharacterized protein (Rv2466c) were common up-regulation (the ratios>1.2), and probable DNA-binding protein HU homolog hupB (Rv2986c) and putative uncharacterized protein (Rv2626c and Rv3118) were down-regulation (the ratios<0.5) in 02166 strain compared with both 01105 strain and H37Rv. **Conclusion** Differentially expressed proteins were identified in INH/S<sup>r</sup> isolate compared with INH/S<sup>s</sup> isolate and H37Rv using iTRAQ. Further study will focus on the above proteins playing role in INH or S resistance.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Isoniazid; Streptomycin; Proteomics

基金项目:“十一五”国家重大科技专项(2008ZX10003-009)

作者单位:100091 北京,解放军第三〇九医院 器官移植与免疫调节北京市重点实验室(何秀云、朱传智、黄香玉、蒋丽气、庄玉辉);中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心 国家结核病参比实验室(逢宇、赵雁林)

通信作者:何秀云,Email: xwhe@sohu.com; 赵雁林,Email: zhaoyanlin@chinatb.org

目前,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)H37Rv 全基因组序列已知,但许多蛋白质功能仍不清楚。Mtb 耐药机制、致病机制研究还有待于揭示更多 Mtb 蛋白功能。虽然,目前治疗结核病依然采用利福平(RFP)、异烟肼(INH)、链霉素(S)和吡嗪酰胺(PZA)的联合化疗,但 RFP、INH 和 S 耐药现象严重。研究发现 INH 耐药的分子诊断标识有 *katG*, *inhA*, *kasA*, *oxyR-ahpC* 间隔区突变,但仍有高达 40% 的耐 INH 菌株不能检测到上述基因突变<sup>[1]</sup>。编码核糖体 S12 蛋白的 *rpsL* 基因突变(K43R, K88Q)是 S 耐药的主要分子标识,其次是编码 16S rRNA 的 *rrs* 基因突变(530 茎环和 915 位核苷酸)<sup>[2]</sup>。但仍有约 30% S 耐药结核分枝杆菌未检测到 *rpsL* 或 *rrs* 基因突变,推测结核分枝杆菌 S 耐药还存在其他机制<sup>[3]</sup>。

宿主免疫功能和感染的 Mtb 毒力强弱决定了机体感染 Mtb 的结果。不同 Mtb 临床分离株和不同分枝杆菌的差异可从基因水平进行解释,已发现增强胞内生长基因(enhanced intracellular survival, *eis*)、增强胞内生长速率的基因(*in vivo* growth, *ivg*),增强侵入位点(mycobacterial enhanced entry locus, *mel2*)与 Mtb 毒力有关<sup>[4-5]</sup>。但基因表达与否与所处的环境有关,单从基因水平无法解释菌株在不同培养条件下差异表达蛋白<sup>[6]</sup>。

寻找与结核分枝杆菌 INH 和 S 耐药相关的新蛋白,以进一步解析结核分枝杆菌 INH 和 S 耐药机制是以后研究工作的重点内容之一。蛋白质组学可全面了解某组织、细胞器、甚至某生物的整体蛋白,其在疾病诊断标识、疾病机制研究等方面已发挥重要作用。基于经典双向凝胶电泳的蛋白质组学存在低分辨率和低敏感度,以及无法对不溶性蛋白质、高分子量蛋白质、极酸性蛋白质和极碱性蛋白质进行分析的缺点。而定量蛋白质组学能全面定量分析差异表达蛋白,为大范围鉴定蛋白及其复合物提供了有效的途径<sup>[7]</sup>。核素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术是美国 Applied Biosystems 公司研发的一种新的体外多肽标记技术,该技术定量准确性高,联用液相色谱分离弥补了凝胶分离在蛋白质疏水性,相对分子质量和等电点方面的限制<sup>[10]</sup>;该技术不仅可以对任何类型的蛋白质进行鉴定,并可同时对 8 个样品进行定量,从而缩小了不同样品不同批次间的试验误差,有较好的重复性<sup>[8]</sup>。本研究采用 iTRAQ 技术分析耐 INH 和 S 的 Mtb 临床分离株 02166、INH 和 S 敏感株 01105 和 H37Rv 的菌体蛋白,通过 Mascot

搜索及生物信息学对蛋白定量分析,旨在寻找与结核分枝杆菌 INH 和(或)S 耐药相关的新蛋白。

## 材料和方法

### 一、菌株

Mtb 临床分离株 02166 和 01105 由国家疾病预防控制中心国家结核病参比实验室从临床分离、鉴定(毒力、耐药性和基因型)和保存。02166 菌株和 01105 菌株均为北京基因型、毒力高于 H37Rv。02166 菌株对 INH 和 S 耐药、对 RFP、EMB、Km、Ofx 敏感,01105 菌株对上述抗结核药均敏感。02166 菌株、01105 菌株及 H37Rv 抽提菌体蛋白的菌体由国家结核病参比实验室提供。菌体经钴 60 照射灭活,保存于-80℃备用。

### 二、主要试剂和仪器

iTRAQ-8plex 标试剂盒购自 ABI 公司;胰蛋白酶(trypsin)、三乙基碳酸氢铵(triethylammonium bicarbonate, TEAB)购自 Sigma 公司;Bradford 定量试剂盒购自美国伯乐 Bio-Rad 公司;三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、羟乙基哌嗪乙硫磺酸{2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, HEPES}、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐{3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonium]-1-propanesulfonate, CHAPS}、苯甲基磺酰氟化物(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙腈、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM)等试剂均为进口分装试剂,磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、氯化钾(KCl)、丙酮、甲酸等为国产分析纯。低温超高压连续细胞破碎机 JN3000 为广州聚能生物科技有限公司产品;超声波细胞粉碎仪 JY92-II 为宁波新芝生物科技股份有限公司产品;半制备型高压液相色谱(high pressure liquid chromatography, HPLC)系统为日本岛津产品, Luna 5u SCX 100A 色谱柱(250×4.60 mm, 5 μm)为美国菲罗门公司(Phenomenex)产品;Nano-LC MicroTOF-Q II 为美国 Bruker 公司产品;C18 反相色谱柱(100×0.075 mm, 5 μm)为美国 Agilent 产品。

### 三、菌体蛋白 iTRAQ 分析

#### (一)菌体蛋白提取

灭活的 Mtb 经 1×PBS(pH 7.4)洗涤 30 min, 4℃、8000×g 离心 30 min, 弃上清。30 ml 裂解液[Tris-Cl 20 mmol/L, pH 8.5; 1 mmol/L 乙二醇四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 1 mmol/L

PMSF]充分悬浮沉淀,低温超高压连续细胞破碎机将菌细胞破碎、功率不超过 1500 W,1 次循环后将菌液再重新进样,4 次循环破菌,溶液总体积不超过 50 ml。4 ℃、20 000×g 离心 30 min,取 20 ml 上清加入 5 ml 50% TCA/丙酮(100 ml 丙酮溶解 50 g TCA),冰水浴 2 h,4 ℃、20 000×g 离心 30 min。−20 ℃预冷丙酮洗涤沉淀 3 次,每次洗涤均 4 ℃、20 000×g 离心 30 min;沉淀自然晾干,即为制备好的 Mtb 全菌体蛋白样品,冻存于−80 ℃备用。

## (二)菌体蛋白复溶及定量

取部分制备好的 Mtb 全菌体蛋白样品沉淀于 1.5 ml 离心管,加入复溶缓冲液(8 mol/L 尿素,4% CHAPS,30 mmol/L HEPES,pH 调至 8.0~8.3),加入 PMSF 至终浓度 1 mmol/L、EDTA 至终浓度 2 mmol/L,混匀并冰上放置 5 min。加入 DTT 至终浓度 10 mmol/L,超声(超声波发射 2 s、间歇 3 s、功率 240 W)5 min 助溶,15 ℃、20 000×g 离心 25 min。取上清,加入 DTT 至终浓度 10 mmol/L,56 ℃恒温水浴 1 h,迅速加入 IAM 至终浓度 55~100 mmol/L,暗室室温静置 1 h。加入 4 倍于样品溶液体积的预冷丙酮,−20 ℃沉淀至少 3 h。4 ℃、20 000×g 离心 20 min,弃上清。300 μl 50% TEAB、0.1% SDS 溶液复溶沉淀,超声(超声波发射 2 s、间歇 3 s、功率 240 W)3 min 助溶。Bradford 试剂盒测定蛋白质含量。

## (三)蛋白质酶解

每个样品取 100 μg 蛋白,含 0.1% SDS 的 50% TEAB 补齐体积至 3 个样品为相同体积。每 100 μg 蛋白质样品加入 3.3 μg 胰蛋白酶,37 ℃水浴 24 h;补加 1 μg 胰蛋白酶,37 ℃水浴 12 h。酶解样品真空冷冻干燥,30 μl 含 0.1% SDS 的 50% TEAB 复溶肽段。取 1 μl 复溶肽段经 ZipTip® Pipette Tips 脱盐,1 μl 基质洗脱的蛋白样品直接上样基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)检测肽质量指纹图谱以评价胰蛋白酶消化效果。

## (四)标记肽段

将 iTRAQ-8plex 标记试剂盒中的标记试剂(113、115 和 121)平衡至室温,每管标记试剂中加入 70 μl 异丙醇,颠倒混匀后加入到对应的酶解肽段样品中,113 标记临床分离株 01105、115 标记临床分离株 02166、121 标记 H37Rv。混匀、稍离心后,室温静置 2 h。

## (五)半制备型 HPLC 分离肽段

A 液(25%乙腈,10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,磷酸调

pH 值至 3.0,孔径 0.22 μm 有机膜过滤)平衡系统,10~20 min;标记的样品用 A 液稀释 10 倍,全部上样,流速 1 ml/min。洗脱梯度:0%~5% B 液(25%乙腈,2 mol/L KCl,10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,磷酸调 pH 值至 3.0,孔径 0.22 μm 有机膜过滤),1 min;5%~30% B 液,20 min;30%~50% B 液,5 min;50% B 液,5 min;50%~100% B 液,5 min;分部收集样品。收集样品用 C18 反相色谱柱除盐,低温抽干、0.1%甲酸复溶肽段用于 Nano LC 分离。

## (六)Nano LC 分离及质谱鉴定

HPLC 分离并脱盐的 0.1%甲酸复溶肽段上样。流动相 A 液:H<sub>2</sub>O,0.1%甲酸;B 液:乙腈,0.1%甲酸。洗脱梯度为:0%~5% B 液,0~10 min;5%~45% B 液,10~80 min;45%~80% B 液,80~85 min;80% B 液,85~100 min;80%~5% B 液,100~105 min;5% B 液,105~120 min。流速 0.0003 ml/min。Nano LC 分离的样品直接注入 MicroTOF-Q II 质谱仪,一级质谱(mass spectrometry,MS)扫描质荷比(m/z)范围为 300~2000。每个一级质谱图自动选择 3 个最强母离子进行串联扫描,MS-MS 扫描 m/z 范围为 200~3000,每组样品质谱鉴定 3 次重复。MicroTOF-Q II 质谱仪检测参数:离子源(ESI,正离子扫描),扫描范围(Auto MS<sup>2</sup>,m/z 50~2000),Set capillary(1400 V),干燥热源(150 ℃),碰撞池(500.0 VPP),传输时间(150 μs),前脉冲存储时间(2.0 μs),校准方法(自动调谐优化电压,外标法校准质量数)。

## (七)生物信息学分析

质谱扫描完毕,得到质谱信号图。质谱数据分析软件 DataAnalysis 4.0(美国 Bruker 公司)打开质谱信号图,打开 baf 数据,自动分析标峰得到 mgf 文件。合并 mgf 文件。将合并后的 mgf 文件进行 Mascot 检索(SwissProt 下载的 Mtb 数据库为搜索数据库进行本地搜索)。Mascot 检索参数:酶(enzyme):胰蛋白酶(trypsin);数据库(database):swissprot-rat;肽段电荷 peptide charge:+,++,+++;仪器(instrument):ESI-QUAD-TOF;固定修饰(fixed modification):脲甲基化 carba-midomethyl(C);可变修饰(variable modification):Gln>pyro-Glu(N-term Q),氧化反应 oxidation(M),iTRAQ-8plex(K),iTRAQ-8plex(N-term)和 iTRAQ-8plex(Y);肽质量值误差范围(peptide tol):0.1 u (monoisotopic);MS-MS 碎片离子的质量值误差范围(MS-MS tol):0.1 u;最大错配(max missed cleavages):1。筛选:P<0.05。差异表达蛋白质定量以 Mascot 搜库结

果为基础,以 m/z 113 和 m/z 121 为对照组,依据 Mascot 的加权方式,根据一组肽段核素报告基团的相对含量的比例进行定量,02166 菌株分别与 01105 菌株和 H37Rv 的直接比值显示相对定量结果,根据不同肽段鉴定次数进行统计学分析,从而判定相对定量结果的统计学意义( $P<0.05$ )<sup>[9]</sup>(DataAnalysis 4.0 软件直接给出统计结果, $P<0.05$  或  $P>0.05$ )。若蛋白质标记的报告基团信息丢失,则该蛋白无定量信息。

结 果

一、菌体蛋白鉴定及相对定量

02166 菌株与 01105 菌株比较有 153 个差异表达蛋白,其中,表达上调蛋白 12 个(3 个蛋白上调倍数 $>1.2$ );表达下调蛋白 141 个(104 个蛋白下调倍数 $<0.8$ )。02166 菌株与 H37Rv 菌株比较有 129 个差异表达蛋白,表达上调蛋白 33 个(20 个蛋白上调倍数 $>1.2$ );表达下调蛋白 96 个(67 个蛋白下调倍数 $<0.8$ )。

01105 菌株与 H37Rv 菌株比较差异表达蛋白有 130 个,表达上调蛋白 113 个(74 个蛋白上调倍数 $>1.2$ );下调表达蛋白 27 个(11 个蛋白下调倍数 $<0.8$ )。

02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较共同差异表达蛋白有 86 个,共同表达下调 69 个(其中 Rv3118、Rv2626c 和 Rv2986c 表达下调倍数 $<0.5$ ),共同表达上调 6 个(Rv0234c 和 Rv2466c 表达上调倍数 $>1.2$ ),11 个蛋白表达下调或上调不一致

(表 1)。67 个蛋白在 02166 菌株与 01105 菌株比较中差异表达,却在 02166 菌株与 H37Rv 比较中无差异表达;43 个蛋白在 02166 菌株与 H37Rv 比较中差异表达,却在 02166 菌株与 01105 菌株比较中无差异表达。

二、差异表达蛋白相对分子质量和等电点分布

02166 菌株与 01105 菌株或 H37Rv 比较无冗余的差异表达蛋白共 196 个,其理论相对分子质量和等电点分布广泛,相对分子质量范围为 7.63~326.22;等电点范围为 3.74~12.48。83.4% 差异表达蛋白相对分子质量小于 60,77.4% 差异表达蛋白等电点小于 7(图 1A,B)。

三、差异表达蛋白功能分析

根据巴斯德研究所功能分类树(<http://genolist.pasteur.fr/tuberculist>)对差异表达蛋白进行功能分类,差异表达蛋白主要参与脂类代谢(1)、中间代谢和呼吸(7)和保守假定蛋白(10);两组差异表达蛋白均无属于稳定 RNAs(4)、插入序列和噬菌体(5)、PE/PPE 家族蛋白(6)、未知功能蛋白(8)(图 2)。

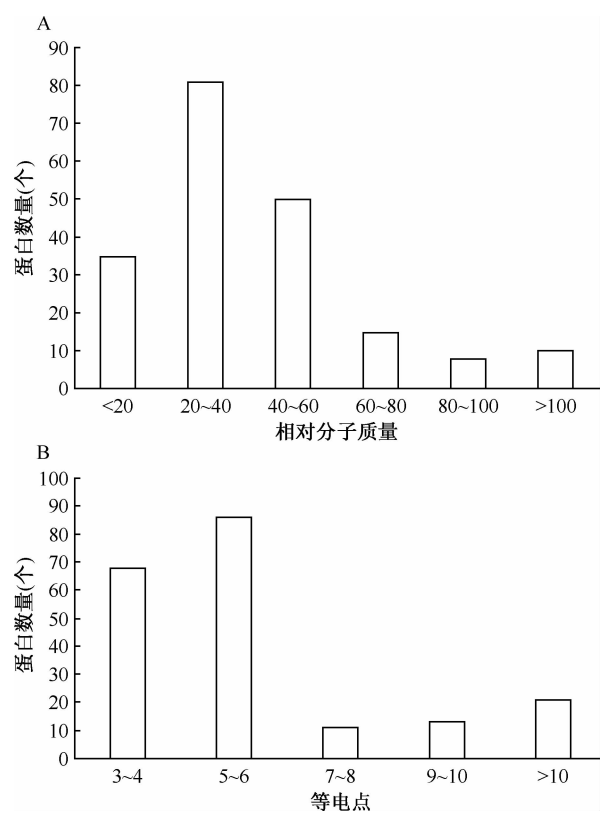
四、核糖体蛋白和参与脂类代谢蛋白

9 个核糖体蛋白在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均下调表达,其中 Rv0056、Rv0651、Rv0652、Rv0701 和 Rv0719 为 50S 核糖体蛋白,Rv2785c、Rv2909c 和 Rv3458c 为 30S 核糖体蛋白,Rv1630 为可能的核糖体蛋白 S1。Rv0641(50S 核糖体蛋白)和 Rv0707(30S 核糖体蛋白)仅在 02166 菌株与 01105 菌株比较中下调表达,Rv2442c 和 Rv3456c

表 1 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较表达上调或下调不一致的蛋白

蛋白 Rv 序号	蛋白描述	不同肽段数量 (条)	功能 分类 <sup>a</sup>	比值 <sup>b</sup>	
				02166 菌株/01105 菌株	02166 菌株/H37Rv
Rv0958	镁螯合酶	4	7	0.70	1.60
Rv1833c	卤代烷脱卤酶	14	7	0.71	1.33
Rv0860	脂肪酸氧化蛋白(FadB)	68	1	0.81	1.02
Rv0831c	假定未知蛋白 <sup>c</sup> (BCG_0884c)	29	10	0.79	1.11
Rv1876	细菌铁蛋白	16	7	0.81	1.00
Rv0577	27 kDa 抗原(Cfp30B)	12	10	0.84	1.18
Rv0106	假定未知蛋白(BCG_0139)	15	10	0.86	1.90
Rv3001c	乙酮醇酸还原异构酶	32	7	0.89	1.10
Rv0859	酰基辅酶 A 硫解酶(fadA)	4	1	0.91	1.06
Rv3846	超氧化物歧化酶	37	0	0.93	1.15
Rv3389c	MaoC 家族蛋白(片段)	13	7	0.95	1.36

注 <sup>a</sup>:<http://genolist.pasteur.fr/tuberculist>; <sup>b</sup>:02166 菌株蛋白与 01105 菌株或 H37Rv 相应蛋白表达差异倍数的 log2 值; <sup>c</sup>: putative uncharacterized protein



A: 差异蛋白相对分子质量分布;B: 差异蛋白等电点分布  
图 1 差异表达蛋白分子质量和等电点分布

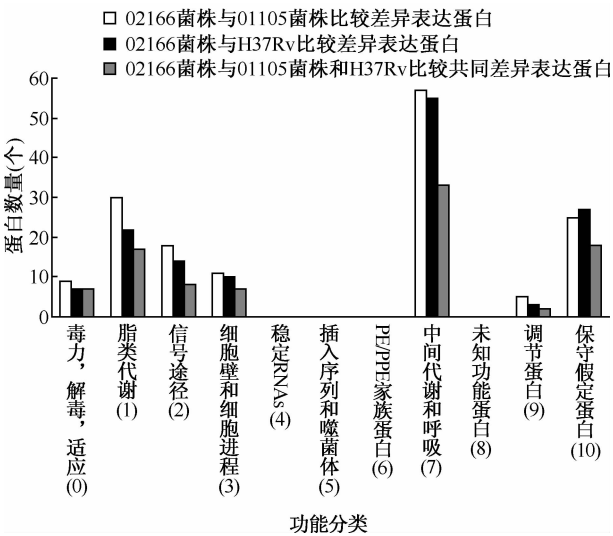


图 2 差异表达蛋白功能分类

(50S 核糖体蛋白) 仅在 02166 菌株与 H37Rv 比较中分别下调和上调表达。

34 个脂类代谢(1)蛋白在 INH 耐药菌株中差异表达: Rv3804c、Rv3140、Rv2245、Rv0824c、Rv1925、Rv3130c、Rv3801c、Rv1094、Rv2941 和 Rv3800c 在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均下调表达; Rv0154c、Rv0222、Rv0242c、Rv0503c、Rv1070c、Rv1492、Rv2187、Rv2247、Rv2831 和 Rv3274c 在

02166 菌株与 01105 菌株比较中下调表达, Rv0873 和 Rv1181 在 02166 菌株与 01105 菌株比较中上调表达; Rv0231、Rv1074c、Rv1483、Rv2244、Rv2246、Rv2524c、Rv2940c、Rv3720 和 Rv3774 在 02166 菌株与 H37Rv 比较中下调表达, 而 Rv1543、Rv1544 和 Rv3061c 在 02166 菌株与 H37Rv 比较中上调表达。

讨 论

研究表明 iTRAQ 技术可用于鉴定大分子、极酸、极碱蛋白, 不仅可以弥补双向电泳不足, 而且 iTRAQ 定量鉴定的蛋白数量多于经典双向凝胶电泳<sup>[10]</sup>。本研究采用 iTRAQ 技术有效地定量鉴定了耐 INH 和 S Mtb 临床分离株 02166、药物敏感临床分离株 01105 和标准株 H37Rv 之间的差异蛋白, 02166 菌株菌体蛋白与 01105 菌株和 H37Rv 比较共同差异表达蛋白有 86 个, 且差异表达蛋白的相对分子质量和等电点分布范围广泛。

*katG* ( Rv1908c )、*aphC* ( Rv2428 )、*kasA* ( Rv2245 )和 *inhA*(Rv1484)基因突变与部分耐 INH 的 Mtb 临床分离株相关<sup>[11-12]</sup>。Rv2245 和 Rv1484 参与脂肪酸合成, Rv1908c 和 Rv2428 参与解毒作用。本研究发现, Rv1908c 和 Rv2245 在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均下调表达, Rv2428 只在 02166 菌株与 H37Rv 比较中下调表达, Rv1484 在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均未出现差异表达。药物 S 主要与细菌核糖体 30S 亚基单位结合, 抑制蛋白合成。研究表明, *rpsL* 和 *rrs* 基因突变与 S 耐药相关<sup>[13]</sup>, *rpsL* 编码 30S 核糖体蛋白 S12 (Rv0682)。本研究未鉴定到 Rv0682, 但发现 9 个核糖体蛋白在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均下调表达, 其中 Rv0056、Rv0651、Rv0652、Rv0701 和 Rv0719 为 50S 核糖体蛋白, Rv2785c、Rv2909c 和 Rv3458c 为 30S 核糖体蛋白, Rv1630 为可能的核糖体蛋白 S1。生物信息学分析发现 Rv0056、Rv0652、Rv0701、Rv1630 和 Rv2785c 在 Mtb 中均为药物/化合物优先作用靶点 (<http://tdrtargets.org/>)。但这 5 个核糖体蛋白在 02166 菌株中下调表达与 Mtb S 耐药的关系, 有待进一步试验验证。

基于双向电泳的蛋白质组学的研究鉴定到 5 个蛋白 (Rv1446c、Rv3028c、Rv0491、Rv2971 和 Rv2145c) 在 INH 耐药 Mtb 中上调表达<sup>[14]</sup>。S 耐药株上调表达 Rv0350、Rv0440、Rv1240、Rv3075c、Rv2971、Rv3028c、Rv2145c、Rv2031c 和 Rv0569, 进一步采用 silico docking 分析表明只有 Rv0350、Rv0440 和 Rv2971

与 S 呈现有意义的相互作用<sup>[15]</sup>。因此, Rv2971、Rv3028c 和 Rv2145c 在 S 耐药株和 INH 耐药株中均上调表达。本研究发现 Rv0440、Rv2145c 和 Rv3028c 在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均下调表达, Rv0350 和 Rv2971、Rv1240 分别在 02166 菌株与 01105 菌株比较中上调和下调表达、Rv3075 和 Rv2031 在 02166 菌株与 H37Rv 比较中下调表达, Rv0491、Rv0569 和 Rv1446c 在本研究中未鉴定到。这种不同蛋白质组学方法发现不同差异表达蛋白的现象较常见<sup>[16]</sup>。

综上所述, 定量蛋白质组学能有效鉴定到差异表达蛋白。Rv0234c、Rv2466c、Rv3118、Rv2626c 和 Rv2986c 在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均差异表达(下调倍数<0.5 或上调倍数>1.2), 9 个核糖体蛋白在 02166 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较中均下调表达。这些蛋白与 INH 和 S 耐药关系还未见报道, 因此, 值得进一步探讨这些蛋白与 Mtb INH、S 耐药的关系, 为进一步研究结核分枝杆菌 INH、S 耐药机制提供新靶点。

参 考 文 献

[1] Espasa M, González-Martin J, Alcaide F, et al. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(6): 860-865.

[2] Ulger M, Aslan G, Emekdaş G, et al. Investigation of *rpsL* and *rrs* gene region mutations in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Mikrobiyol Bul, 2009, 43(1):115-120.

[3] Nhu NT, Lan NT, Phuong NT, et al. Association of streptomycin resistance mutations with level of drug resistance and *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Int J Tuberc Lung Dis, 2012, 16(4):527-531.

[4] Zhang M, Gong J, Lin Y, et al. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. Infect Immun, 1998, 66(2):794-799.

[5] Janagama HK, Hassounah HA, Cirillo SL, et al. Random inducible controlled expression (RICE) for identification of mycobacterial virulence genes. Tuberculosis (Edinb), 2011, 91 Suppl 1:S66-68.

[6] Florczyk MA, McCue LA, Stack RF, et al. Identification and characterization of mycobacterial proteins differentially expressed under standing and shaking culture conditions, including Rv2623 from a novel class of putative ATP-binding proteins. Infect Immun, 2001, 69(9):5777-5785.

[7] Kumar SG, Venugopal AK, Mahadevan A, et al. Quantitative proteomics for identifying biomarkers for tuberculous meningitis. Clin Proteomics, 2012, 9(1):12.

[8] Wu WW, Wang G, Baek SJ, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. J Proteome Res, 2006, 5(3):651-658.

[9] Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. Nat Chem Biol, 2005, 1(5):252-262.

[10] Shui W, Gilmore SA, Sheu L, et al. Quantitative proteomic profiling of host-pathogen interactions: the macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* lipids. J Proteome Res, 2009, 8(1):282-289.

[11] Soudani A, Hadjfredj S, Zribi M, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of tunisian isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Microbiol, 2011, 49(3):413-417.

[12] Yao C, Zhu T, Li Y, et al. Detection of *rpoB*, *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11):1639-1643.

[13] Tudó G, Rey E, Borrell S, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(11): 2341-2346.

[14] Jiang X, Zhang W, Gao F, et al. Comparison of the proteome of isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Microb Drug Resist, 2006, 12(4): 231-238.

[15] Sharma P, Kumar B, Gupta Y, et al. Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Proteome Sci, 2010, 8:59.

[16] Mehaffy C, Hess A, Prenni JE, et al. Descriptive proteomic analysis shows protein variability between closely related clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Proteomics, 2010, 10(10):1966-1984.

(收稿日期:2012-11-28)  
(本文编辑:张晓进)

《中国防痨杂志》协办单位名单

(名单顺序按照协议签署时间排列)

1. 北京金之路医药科技有限公司
2. 北京结核病控制研究所
3. 山东省胸科医院
4. 武汉市结核病防治所
5. 沈阳双鼎制药有限公司

(本刊编辑部)