



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103357014 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 23

(21) 申请号 201310179660. 6

(22) 申请日 2008. 07. 11

(30) 优先权数据

2007903788 2007. 07. 12 AU

(62) 分案原申请数据

200880104620. 2 2008. 07. 11

(71) 申请人 口腔健康澳洲私人有限公司

地址 澳大利亚维多利亚州

(72) 发明人 斯图尔特·杰弗里·达斯弗

埃里克·查尔斯·雷诺兹

保罗·大卫·维斯 洪振盛

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006. 01)

A61K 31/505 (2006. 01)

A61P 1/02 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书52页 附图13页

(54) 发明名称

生物膜治疗

(57) 摘要

本发明提供了预防、抑制或减少个体的牙龈卟啉单胞菌生物膜的方法,该方法包括向该个体施用包含多肽抑制剂的药物组合物,该多肽抑制剂减少或抑制生物膜的形成和/或生物膜的发展。本发明还提供用于预防、抑制或治疗牙周疾病或牙龈卟啉单胞菌感染的组合物。

1. 包含抑制剂的药物组合物在制备用于预防或治疗个体的源自细菌生物膜形成或与细菌生物膜形成有关的牙龈卟啉单胞菌感染的药物中的用途,其中所述抑制剂是细菌富马酸还原酶的抑制剂。

2. 包含抑制剂的药物组合物在制备用于预防或治疗个体的源自细菌生物膜形成或与细菌生物膜形成有关的牙周疾病的药物中的用途,其中所述抑制剂是细菌富马酸还原酶的抑制剂。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述细菌富马酸还原酶对应于登录号 AAQ66642.1 或 AAQ66643.1。

生物膜治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及用于预防或改变诸如那些含有牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 的生物膜的细菌生物膜的形成和 / 或发展的组合物与方法。特别是, 本发明涉及使用或抑制对生物膜生长或在血红素限制下的生长重要的多肽来调节生物膜的形成和 / 或发展。本发明还涉及用于调节生物膜的形成和 / 或发展的组合物, 该调节包括通过调控细菌的酶的调节。

[0002] 发明背景

[0003] 许多细菌治疗涉及浮游状态的细菌。然而, 细菌病理学包括生物膜状态的细菌。例如, 牙龈卟啉单胞菌被认为是慢性牙周疾病的主要病因 (causative agent)。对在牙齿表面作为多种微生物细菌生物膜的一部分而生长的牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 的异常调节的宿主免疫应答, 导致了与该疾病有关的组织损伤。细菌生物膜在自然界中普遍存在, 并且定义为互相粘附和 / 或粘附至表面或界面的基质围绕 (matrix-enclosed) 的细菌群落 (1)。这些作为成熟的生物膜粘附至表面并在表面上生长的固定细菌细胞能够幸免于包括存在抗微生物剂、剪切力以及营养缺乏在内的不利环境。

[0004] 疾病控制与预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention) 估计 65% 的人细菌感染与生物膜有关。生物膜通常通过保护细菌免受免疫系统、降低抗生素效力并将浮游细胞分散至远处以促使再感染, 使慢性感染的治疗复杂化 (2、3)。牙菌斑是细菌生物膜的典型实例, 其中高多样性的物种形成在牙齿表面生长的异源多微生物生物膜。牙齿的表面是独特的微生物生境, 因为牙齿表面是人体中唯一的坚硬、永久、不脱落的表面。与上皮细胞的脱落限制了生物膜的发展的粘膜表面相反, 这使得坚固的细菌生物膜在漫长的时间内累积。因此, 发生在浮游与生物膜状态之间的牙龈卟啉单胞菌蛋白质组的变化, 对我们理解慢性牙周疾病的发展是重要的。

[0005] 牙龈卟啉单胞菌分为两个大的菌株组, 包括 W50 和 W83 在内的菌株被描述为在动物模型中是侵入性的, 而包括 381 和 ATCC33277 在内的菌株则被描述为非侵入性的 (4、5)。Griffen 等人 (6) 发现, W83/W50 样菌株比包括 381 样菌株在内的其他牙龈卟啉单胞菌菌株与人牙周疾病更相关, 而 Cutler 等人 (7) 证明, 牙龈卟啉单胞菌的侵入性菌株比非侵入性菌株对吞噬作用更具抵抗力。测序的牙龈卟啉单胞菌 W83 菌株与模式菌株 ATCC33277 的比较表明, 菌株 33277 缺乏 7% 的基因或者是高度趋异的 (divergent), 这表明菌株之间存在明显的不同 (8)。有趣地是, 与容易形成生物膜的菌株 33277 相比, 牙龈卟啉单胞菌菌株 W50 在大部分条件下仅形成不好的生物膜 (9)。由于这个原因, 对牙龈卟啉单胞菌 W50 形成生物膜只进行了相对很少的研究。

[0006] 利用基于凝胶染色强度计算蛋白比率的 2D 凝胶电泳方法, 已进行了定量蛋白质组学研究, 以测定诸如绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 以及变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 的人细菌病原体, 从浮游至生物膜状态的蛋白质组的变化 (10-12)。替代方案是利用稳定同位素标记技术, 例如 ICAT、iTRAQ 或具有 MS 定量的重水 ($H_2^{18}O$) (13)。 $H_2^{18}O$ 标记的基础是, 在蛋白质水解期间, 已证明诸如胰蛋白酶

的内肽酶将两个 ^{18}O 原子并入所得的肽的 C- 末端 (14、15)。除了用于测定相对蛋白丰度以外 (16-19), 蛋白质组学中的 ^{18}O 标记还用于鉴定蛋白 C- 末端、鉴定酶促移除聚糖后的 N- 连接的糖基化、简化 MS/MS 的数据解释以及最近用于证实磷酸化位点 (20-23)。用于测量相对蛋白丰度的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 蛋白水解标记方法包括将一个样品在 H_2^{16}O 中消化, 并将另一样品在 H_2^{18}O 中消化。然后在通过 LC MS/MS 进行分析前, 将该消化物合并。可以通过测量 MS 模式中肽离子对 (ion pair) 的相对信号强度, 定量从 LC 柱中洗脱的肽。将两个 ^{18}O 并入胰蛋白酶消化的肽的 C- 末端, 导致 +4m/z 的质量漂移 (mass shift), 从而允许鉴定同位素对。

[0007] 由于蛋白质组的复杂性, 初步分级 (prefractionation) 步骤对于增加肽和蛋白质鉴定的数目是有利的。大部分初步分级步骤包括溶液中 (in-solution) 消化后肽水平上的 2D LC 方法 (24、25)。然而, 由于在蛋白溶液的初始脱水步骤期间潜在的样品损失, 也成功地进行了蛋白水平上的 SDS PAGE 初步分级和其后的凝胶消化中的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 标记 (26-29)。 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 蛋白水解标记是高度特异性并且多用途的方法, 但是只进行了很少的大规模验证研究 (30)。Qian 等人 (18) 进行了极好的验证研究, 他们标记了 1:1 的比率的两个相似等份的血清蛋白, 并且从 891 个肽中获得了 1.02 ± 0.23 的平均比率。Lane 等人 (26) 最近的研究还证明, 使用反向标记策略测定对照与细胞色素 P450 诱导剂处理的移植了人肿瘤的小鼠之间 17 个细胞色素 P450 蛋白相对丰度的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 方法的可行性。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明使用了某种系统, 其中以连续培养的方式使牙龈卟啉单胞菌 W50 生长, 并且在恒化器容器的垂直表面上, 随延长的时间段发展了成熟的生物膜。最终的生物膜与疾病发展条件下所见的生物膜类似, 因而允许生物膜细胞与浮游细胞之间的直接比较。在牙龈卟啉单胞菌细胞外膜 (cell envelope) 组分的 SDS-PAGE 初步分级后, 进行使用反向标记策略的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 蛋白水解标记, 然后与离线 LC MALDI TOF-MS/MS 耦合以进行鉴定与定量。在所鉴定的 116 种蛋白中, 在两个独立的连续培养研究中一致地发现了 81 种。发现具有多种功能的 47 种蛋白的丰度在生物膜细胞中一致地增加或减少, 这为生物膜控制策略提供了潜在的靶标。在这 47 种蛋白中, 本发明人选择了认为是治疗和 / 或预防牙龈卟啉单胞菌感染的特别有用的靶标的 24 种蛋白。这些蛋白列于下文的表 4 中。

[0010] 因此, 本发明提供了调节细菌形成的生物膜的分离、纯化或重组的细菌多肽。优选地, 该细菌是厌氧的。在一实施方案中, 该细菌是依赖富马酸还原酶 (Frd) 的, 例如卟啉单胞菌属 (Porphyromonas) 的那些细菌。优选的细菌是牙龈卟啉单胞菌。

[0011] 用于牙龈卟啉单胞菌的本发明的多肽的氨基酸序列选自表 4 所列的序列。本发明扩展至与该序列相同至少 80% 的序列, 优选与该序列相同 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%。

[0012] 本发明的另一方面涉及预防或治疗个体的牙龈卟啉单胞菌感染的方法, 该方法包括向该个体施用包含调节生物膜的形成的多肽的抑制剂的药物组合物, 特别是源自细菌生物膜的形成或与细菌生物膜的形成有关的牙龈卟啉单胞菌感染。还提供了预防或治疗个体的牙周疾病的方法, 该方法包括向该个体施用包含调节生物膜的形成的多肽的抑制剂的药物组合物, 特别是源自细菌生物膜的形成或与细菌生物膜的形成有关的牙周疾病。从对该多肽活性的抑制降低或抑制了生物膜的形成和 / 或发展的意义上而言, 该多肽通常对生物膜的发展是重要的或必需的。

[0013] 还提供了调节生物膜的形成的多肽的抑制剂在制备用于预防或治疗牙周疾病的药物中的用途。

[0014] 本发明的另一方面涉及用于预防或治疗牙周疾病的组合物,该组合物包含抑制剂,例如本发明第一方面的多肽的拮抗剂或拮抗剂的组合。该组合物通常还包括制药学可接受的载体。施用该组合物从而所述拮抗剂抑制感染。

[0015] 任选地,所述组合物还可以包含一种或多种抗生素,该抗生素对革兰氏阴性厌氧菌是有毒的或者抑制革兰氏阴性厌氧菌的生长。任何抑菌或杀菌抗生素可以潜在地用于本发明的组合物中。优选地,合适的抗生素包括阿莫西林、多西环素或甲硝唑。

[0016] 本发明的另一方面涉及在口腔中使用的,用于预防、抑制或治疗牙周疾病或牙龈卟啉单胞菌感染的组合物。

[0017] 本发明的另一方面涉及,在口腔中使用时,用于预防、抑制或治疗牙周疾病或牙龈卟啉单胞菌感染的组合物。

[0018] 口服组合物可以沉积在牙齿上或牙龈上,或者既沉积在牙齿上又沉积在牙龈上。

[0019] 所述多肽可以是酶。优选地,该酶与有机酸的代谢有关,更优选地,与谷氨酸/天冬氨酸的分解代谢有关。在一实施方案中,所述多肽是富马酸还原酶。

[0020] 本发明的另一方面是用于治疗牙龈卟啉单胞菌感染的组合物,该组合物包含作为活性成分、调节生物膜的形成或发展的多肽的抑制剂。

[0021] 在本发明的另一方面,提供了干扰 RNA 分子,该分子在每条链中包含至少 19 个碱基对的双链区,其中双链区中的一条链与编码上文所述多肽的多核苷酸区基本上互补。在一实施方案中,所述链的一条与编码表 4 所列序列的多肽的多核苷酸的区域互补。

[0022] 在一实施方案中,所述抑制剂是所述多肽的抑制剂。对于牙龈卟啉单胞菌,所述多肽可以是富马酸还原酶,并且该拮抗剂选自一种或多种富马酸还原酶的抑制剂。其他合适的抑制剂包括天然产物,其包括但不限于来自链霉菌 (*Streptomyces* spp.) 的紫花前胡素、verticillipyrone、paecilaminol、5-烯基-3,3(2H)-呋喃酮, nafuredin、中康酸、鱼藤酮及其天然、半合成和合成的类似物。在另一方面,本发明的抑制剂可以是合成的化合物,其包括但不限于 2-取代 4,6-二硝基酚;巯基吡啶 N-氧化物;L-092,201 (Merck Sharpe and Dohme);诸如非昔硝唑 (fexindazole)、megazol、苄硝唑、MK-436、L-634,549、米索硝唑的硝基咪唑;或者诸如阿苯达唑、坎苯达唑、甲苯达唑、奥芬达唑、帕苯达唑和噻苯达唑的苯并咪唑;或者奥克太尔或莫仑太尔。优选的抑制剂是奥克太尔、莫仑太尔或噻苯达唑。特别优选的抑制剂是奥克太尔。

[0023] 本领域的技术人员将认识到,抑制剂的选择将取决于决定该抑制剂是否适合用于临床环境的许多临床因素。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1:特定 BSA 比率的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 定量。以与实验方法中报道的生物膜样品和浮游样品相同的方式,进行已知量的 BSA 的定量,来验证方法。简而言之,将预测定量的 BSA 加入 NuPAGE 凝胶的相邻泳道中,然后进行大小相等条带的切割、正常或反向蛋白水解标记、纳米 HPLC (nanoHPLC) 以及 MALDI TOF-MS/MS。(A) BSA 胰蛋白酶肽的 MS 光谱,已知 $^{16}\text{O}:^{18}\text{O}$ 标记比率为 1:1(i)、2:1(ii)、1:5(iii) 和 10:1(iv) 的 RHPEYAVSVLLR,这显示了 ^{16}O 和 ^{18}O 标记的肽的特有的双峰同位素外膜 (S0、S2 和 S4 是同位素峰的测量强度)(B) 已知的 BSA 比率

的 SDS PAGE 凝胶,用于定量方法。

[0026] 图 2:来自牙龈卟啉单胞菌样品的典型的正向和反向 MS 和 MS/MS 光谱。(i, ii) 质谱的放大部分,其显示属于 PG2082 的正常和反向标记的肽 GNLQALVGR 的 $[M+H]^+$ 母前体离子,并且以 1:1 的比例显示典型的 4Da 质量差异,(iii, iv) 质谱,其显示属于 PG0232 的正常和反向标记的肽 YNANNVDLNR 的 $[M+H]^+$ 母前体离子,并且以 2:1 的比率显示典型的 4Da 质量差异,(v, vi) 重标记的 (+2180)YNANNVDLNR 和未标记的 YNANNVDLNR 肽的 MS/MS 光谱,其特征为所有 Y 离子的 4Da 漂移。

[0027] 图 3:正常 / 反向标记的技术重复的相关性。两个生物学重复的正常 (Bio18, Plank16) 与反向 (Plank18, Bio16) 标记的肽丰度比率的转化成 Log10 的散点图比较。已倒转了反向标记的肽的丰度比率,用于直接比较。(A) 生物学重复 1 (B) 生物学重复 2

[0028] 图 4:生物学重复的蛋白丰度的分布和相关性。(A) 在两个生物学重复中都鉴定的 81 种可定量的蛋白的标准化平均倍数变化,表现出高斯样 (Gaussian-like) 分布。还将每种蛋白的丰度比率标准化至 0 (R-1),并且将小于 1 的比率倒转并计算为 $(1-(1/R))$ (18)。通过渐增的比率 (生物膜 / 浮游) 将来自每个生物学重复的所有 81 种可定量的蛋白分类并相等地分成含有相等数目的蛋白的 6 组 (A-F)。组 C 和 D 表示未被明显调控的蛋白 (小于 3SD 从 1.0)。(B) 基于排名的蛋白的分布。插页:用于测定两个生物学重复之间的相似性的排名表。将蛋白降序排列,当两个生物学重复都落在相同的组时,1 具有最高的相似性,并且 6 具有最低的相似性。

[0029] 图 5:基于在一个或两个生物学重复中的鉴定以及所鉴定的特异性肽段 (unique peptide) 的数目,本研究中所鉴定的 116 种蛋白的细目分类。从两个生物学重复中都鉴定的蛋白 (81) 示于表 2 中。图例表示每种蛋白的所鉴定的特异性肽段的数目。

[0030] 图 6:牙龈卟啉单胞菌中谷氨酸和天冬氨酸发酵的分解代谢途径。催化每个步骤的鉴定的酶用如表 3 所示的它们的 TIGR 登录号表示。加下划线的登录号表示在另一蛋白质组分析中检测到,但是未在 ICAT 研究中检测到的酶。

[0031] 图 7:50 小时内,奥克太尔对牙龈卟啉单胞菌 W50 (A) 和 ATCC33277 (B) 的细胞生长的影响。所用的浓度是 15.625 μ M-1000 μ M。所用的阴性对照是 4 μ L DMSO。牙龈卟啉单胞菌的 MIC 和 MGT 如表 7 和表 8 所示。结果表示在不同的天数进行的两个生物学重复的平均值 (n=10)。(—DMSO、——15.625 μ M、--31.25 μ M、----62.5 μ M、-----125 μ M、-----250 μ M、---500 μ M、-----1000 μ M)

[0032] 图 8:50 小时内,莫仑太尔对牙龈卟啉单胞菌的细胞生长的影响。所用的浓度是 15.625 μ M-1000 μ M。所用的阴性对照是 4 μ L DMSO。牙龈卟啉单胞菌的 MIC 和 MGT 如表 7 所示。(—DMSO、——19.53 μ M、--39.06 μ M、----78.13 μ M、-----156.25 μ M、-----312.5 μ M、---625 μ M、-----1250 μ M、---2500 μ M、-----5000 μ M)

[0033] 图 9:50 小时内,噻苯达唑对牙龈卟啉单胞菌的细胞生长的影响。所用的浓度是 31.25 μ M-4000 μ M。所用的阴性对照是 4 μ L DMSO。牙龈卟啉单胞菌的 MIC 和 MGT 如表 7 所示。(—DMSO、——31.25 μ M、--62.5 μ M、----125 μ M、-----250 μ M、-----500 μ M、---1000 μ M、-----2000 μ M、---4000 μ M)

[0034] 图 10:奥克太尔对牙龈卟啉单胞菌菌株 33277 形成的生物膜的影响。(A) 24h 的生

物膜 (B) 48h 的生物膜。进行了生物学重复的测定, 并且误差棒表示两个生物学重复的标准偏差 ($n=12$)。

[0035] 图 11: 只用水处理并用 Baclight 染色的对照 ATCC33277 的 CLSM 图像。该图像是以 $2\mu\text{m}$ 的间隔获得的全部 z - 堆积 (z -stack) 的最大投射。比例尺 (白色) = $10\mu\text{m}$ 。

[0036] 图 12: 用 $125\mu\text{M}$ 的奥克太尔处理并用 Baclight 染色的 ATCC33277 的 CLSM 图像。该图像是以 $2\mu\text{m}$ 的间隔获得的全部 z - 堆积的最大投射。比例尺 (白色) = $10\mu\text{m}$ 。

[0037] 图 13: 用 $12.5\mu\text{M}$ 的奥克太尔处理并用 Baclight 染色的 ATCC33277 的 CLSM 图像。该图像是以 $2\mu\text{m}$ 的间隔获得的全部 z - 堆积的最大投射。比例尺 (白色) = $10\mu\text{m}$ 。

[0038] 图 14: 基于静态 24 孔测定的奥克太尔处理后的菌落形成单位。

[0039] 发明详述

[0040] 利用蛋白质组策略, 本发明人成功地鉴定并定量了生物膜状态和浮游状态之间的 116 种牙龈卟啉单胞菌细胞外膜蛋白的丰度变化, 并且通过多种肽采样 (peptide hits) 鉴定了大部分蛋白。本发明人证明了大量位于细胞表面的 C- 末端结构域家族蛋白的表达增强, 该蛋白包括 RgpA、HagA、CPG70 以及 PG99。表现出明显的丰度变化的其他蛋白包括转运相关蛋白 (HmuY 和 IhtB)、代谢酶 (FrdA 和 FrdB)、免疫原性蛋白以及许多功能仍然未知的蛋白。

[0041] 因此, 本发明提供了分离的牙龈卟啉单胞菌多肽, 该多肽的氨基酸序列选自对应于表 4 所列的登录号的序列和与对应于该登录号的序列相同至少 95% 的序列。

[0042] 优选地, 所述分离的多肽与对应于表 4 所列的登录号的任一序列的氨基酸序列相同至少 96%、97%、98%、99% 或 100%。

[0043] 术语“肽、蛋白以及多肽”在本文中互换地使用。本发明的多肽可以包括重组多肽, 如融合多肽。制备融合多肽的方法对本领域的技术人员是公知的。

[0044] 本领域的技术人员应当完全理解的是, 可以改变对应于表 4 所列的登录号的氨基酸序列。这些改变可以是氨基酸残基的缺失、插入或取代。改变的多肽可以是天然存在的 (即, 从天然来源纯化的或分离的) 或者合成的 (例如, 通过对编码 DNA 的定点诱变)。意图是与对应于表 4 所列的登录号的序列具有至少 85% 同一性, 优选至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的此类改变的多肽, 都在本发明的范围内。抗这些改变的多肽的抗体还将结合具有一个对应于表 4 所列的登录号的序列的多肽。

[0045] 尽管本领域的技术人员完全理解保守性取代的概念, 为了清楚起见, 保守性取代是下文所列的那些取代。

[0046] Gly、Ala、Val、Ile、Leu、Met ;

[0047] Asp、Glu、Ser ;

[0048] Asn、Gln ;

[0049] Ser、Thr ;

[0050] Lys、Arg、His ;

[0051] Phe、Tyr、Trp、His ; 以及

[0052] Pro、N α - 碱性氨基酸。

[0053] 除非另外指明, 否则本发明的实施将使用化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 以及免疫学的本领域技术人员公知的常规技术。在整个下述来源的文献中描述

并解释了这些技术,例如 J.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(分子克隆实践指南),John Wiley and Sons(1984)、J.Sambrook et Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册),Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989)、T.A.Brown(editor),Essential Molecular Biology:A Practical Approach(基础分子生物学:实用方法),Volumes1and2, IRL Press(1991)、D.M.Glover and B.D.Hames(editors),DNA Cloning:A Practical Approach(DNA克隆:实用方法),Volumes1-4, IRL Press(1995 and 1996)以及 F.M.Ausubel et al.(Editors),Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学最新方法),Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience(1988,包括直至目前的所有更新)。通过引用将这些原文的公开在此并入。

[0054] 本文所用的“分离的多肽”指的是从与其一起天然存在的其他蛋白质、脂类以及核酸中分离的多肽,或者多肽或肽是可以合成方法合成的。优选地,还从诸如抗体或凝胶基质,如用于纯化多肽的聚丙烯酰胺的物质中分离多肽。优选地,多肽组成纯化制剂干重的至少 10%、20%、50%、70% 以及 80%。优选地,该制剂含有足以允许蛋白测序的量的多肽(即,至少 1mg、10mg 或 100mg)。

[0055] 可以通过诸如柱层析(利用诸如离子交换基质、疏水基质等的与蛋白产品相互作用的各种基质)、使用蛋白的特异性抗体或与蛋白结合的其他配体的亲和层析的标准技术来纯化本文所述的分离的多肽。

[0056] 本文所用的“连续的氨基酸序列”指的是连续的一段氨基酸。

[0057] “重组多肽”是通过涉及使用重组 DNA 技术的方法制备的多肽。

[0058] 在测定两个氨基酸序列是否落在指定的百分比范围内时,本领域的技术人员应当清楚需要进行序列的并行比较或多重比对。在此类比较或比对中,取决于进行比对所用的算法,在定位不相同的残基时将出现差异。在本文的语境中,两个或更多个氨基酸序列之间百分比同一性或相似性的含义,应当认为是分别指使用本领域技术人员已知的任何标准算法所测定的所述序列之间的相同或相似残基的数目。例如,氨基酸序列的同一性或相似性可以利用 Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, United States of America(Devereaux et al., 1984) 的 GAP 程序来计算和/或利用该公司的 PILEUP 程序来比对。GAP 程序使用 Needleman 和 Wunsch(1970) 的算法来使相同/相似的残基的数目最大化,并使比对中序列缺口的数目和长度最小化。可选地或另外,当比较多于两个氨基酸序列时,使用 Thompson 等人(1994) 的 Clustal W 程序。

[0059] 本发明的一方面涉及预防或治疗个体的牙周疾病的方法,该方法包括向该个体施用本发明的药物组合物。

[0060] 在一种方法中,治疗了个体,包括对牙周疾病的预防性治疗。牙周疾病的范围从简单的牙龈炎症到对支持牙齿的软组织和骨头导致严重损伤的严重疾病。牙周疾病包括龈炎和牙周炎。诸如牙龈卟啉单胞菌的细菌导致称为“龈炎”牙龈的炎症。在龈炎中,牙龈变成红色、肿胀并容易出血。如果不进行治疗,龈炎能够恶化成“牙周炎”(其表示“牙齿周围的炎症”)。在牙周炎中,牙龈脱离牙齿并形成被感染的“袋”。当牙菌斑在龈线下扩散并生长时,身体的免疫系统与细菌进行斗争。如果不进行治疗,骨头、牙龈和支持牙齿的结缔组织

将遭到破坏。牙齿最后变松并不得被移除。

[0061] 本发明还提供用于预防或治疗牙周疾病的组合物,该组合物包含本发明第一方面的牙龈卟啉单胞菌多肽的拮抗剂和制药学上可接受的载体,其中该拮抗剂抑制牙龈卟啉单胞菌感染。

[0062] 可以以诸如牙粉 (dentifrice) 的适用于口腔的各种形式来制备和使用本发明的含有上文所述药物组合物的口服组合物,该形式包括牙膏、牙粉 (toothpowder) 和液体牙粉 (dentifrice)、漱口剂、片剂、口香糖、牙膏 (dental paste)、牙龈按摩膏 (gingival massage cream)、含漱片剂 (gargle tablet)、乳制品和其他食品。取决于具体口服组合物的类型和形式,本发明的口服组合物还可以包括其他公知的成分。

[0063] 在本发明的某些优选形式中,口服组合物的性质可以基本上是液态的,例如漱口剂或清洗剂。在这种制剂中,媒介物通常期望地是包括下文所述的湿润剂在内的水-醇混合物。水比醇的重量比通常是约 1:1 至约 20:1。这种类型制剂中的水-醇混合物的总量通常是制剂重量的约 70% 至约 99.9%。所述醇通常是乙醇或异丙醇。乙醇是优选的。

[0064] 本发明的这种液体和其他制剂的 pH 通常是约 5 至约 9,并且通常是约 5.0 至约 7.0。pH 可以用酸 (例如,柠檬酸或苯甲酸) 或碱 (例如,氢氧化钠) 来控制或缓冲 (用柠檬酸钠、苯甲酸钠、碳酸钠或碳酸氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等)。

[0065] 在本发明的其他期望的形式中,药物组合物的性质可以基本上是固态或膏状的,例如牙粉 (toothpowder)、牙科片剂 (dental tablet) 或牙膏 (牙膏 (dental cream)) 或凝胶牙粉。这类固态或膏状口服制剂的媒介物通常含有牙科可接受的抛光材料。

[0066] 在牙膏中,液体媒介物包含的水和湿润剂的量通常是制剂重量的约 10% 至约 80%。甘油、丙二醇、山梨醇和聚丙二醇示例了合适的湿润剂/载体。还有利的是水、甘油和山梨醇的液态混合物。在折射率是重要的考虑事项的透明凝胶中,优选地使用约 2.5%w/w 至 30%w/w 的水、0 至约 70%w/w 的甘油和约 20%w/w 至 80%w/w 的山梨醇。

[0067] 牙膏、膏和凝胶通常含有比例为约 0.1%w/w 至约 10%w/w,优选约 0.5%w/w 至约 5%w/w 的天然或合成的增稠剂或胶凝剂。合适的增稠剂是合成的锂蒙脱石,其是合成的胶体硅酸碱金属镁盐复合物粘土,例如,可商购自 Laporte Industries Limited 的 Laponite (例如,Laponite CP、Laponite SP2002、Laponite D)。Laponite D 是大约 58.00% 重量比的 SiO_2 、25.40% 重量比的 MgO 、3.05% 重量比的 Na_2O 、0.98% 重量比的 Li_2O 以及一些水分和痕量金属。Laponite D 的真实比重是 2.53,并且在水分为 8% 时,表观松密度为 1.0g/ml。

[0068] 其他合适的增稠剂包括爱尔兰藓、约塔角叉菜聚糖 (iota carrageenan)、黄蓍树胶、淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟乙基丙基纤维素、羟丁基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素 (例如,可商购的 Natrosol)、羧甲基纤维素钠和诸如细磨的 Syloid (例如,244) 的胶态二氧化硅。还可以包括增溶剂,例如,诸如丙二醇、二丙二醇和己二醇的湿润剂多羟基化合物、诸如甲基溶纤剂和乙基溶纤剂的溶纤剂、诸如橄榄油、蓖麻油和矿脂的含有的至少约 12 个直链碳的植物油和蜡以及诸如乙酸戊酯、乙酸乙酯和苯甲酸苄酯的酯。

[0069] 应当理解,常规地,口服制剂通常以贴上合适标签的包装出售或者分销。因此,一瓶口腔清洗剂 (mouth rinse) 基本上具有将其描述为口腔清洗剂或漱口剂的标签,并且具有其使用说明;牙膏、膏或凝胶通常在软管中,该软管通常是铝管、衬铅管或塑料管,或者用

于测量出内容物的其他挤、泵或加压的分配器,并且基本上具有将该内容物描述为牙膏、凝胶或牙膏的标签。

[0070] 可以在本发明的组合物中使用有机表面活性剂,以实现增加的预防作用,这有助于实现活性剂在整个口腔中的全部和完整的分散,并使得该即食组合物在外观上更可接受。优选地,该有机表面活性材料性质优选是阴离子的、非离子的或两性的,并且优选地,该有机表面活性材料不与所述活性剂相互作用。优选地将所述表面活性剂用作赋予所述组合物清洁和发泡属性的清洁材料。阴离子表面活性剂的合适实例是高级脂肪酸单甘油酯单硫酸盐的水溶性盐,如氢化的椰子油脂脂肪酸的单甘油酯单硫酸盐的钠盐,诸如月桂基硫酸钠的高级烷基硫酸盐,诸如十二烷基苯磺酸钠的烷基芳基磺酸盐,高级烷基磺基乙酸盐,1,2-二羟基丙磺酸的高级脂肪酸酯,以及诸如那些在脂肪酸、烷基或酰基中具有12至16-16个碳的低级脂肪氨基酸化合物的基本上饱和的高级脂肪酰胺等。最后描述的酰胺的实例是N-月桂酰肌氨酸和N-月桂酰肌氨酸、N-肉豆蔻酰肌氨酸或N-棕榈酰肌氨酸的钠盐、钾盐和乙醇胺盐,所述酰胺应当基本上不含肥皂或类似的高级脂肪酸材料。在本发明的口服组合物中使用这些肌氨酸盐(sarconite)化合物是特别有用的,因为除了降低牙釉质在酸溶液中的某些溶解性以外,这些材料在抑制由于碳水化合物的分解而在口腔中形成的酸中还表现出持久的明显效果。适合使用的水溶性非离子表面活性剂的实例是环氧乙烷与各种反应性含氢化合物的缩合产物,与该环氧乙烷反应的含氢化合物具有长疏水链(例如,约12至20-20个碳原子的脂肪链),其缩合产物(“ethoxamers”)含有亲水聚氧乙烯部分,例如聚(环氧乙烷)与脂肪酸、脂肪醇、脂肪酰胺、多元醇(例如,脱水山梨醇单硬脂酸酯)以及聚环氧丙烷(例如,普卢龙尼克(pluronic)材料)的缩合产物。

[0071] 表面活性剂的量按重量通常是约0.1%-5%。值得注意的是,表面活性剂可以有助于溶解本发明的活性剂,从而减少所需的助溶湿润剂的量。

[0072] 可以将各种其他材料并入本发明的口服制剂中,例如,增白剂、防腐剂、硅氧烷、叶绿素化合物和/或含氮的化合物,例如尿素、磷酸氢二铵及其混合物。将这些佐剂,当存在时,以基本上不给期望的属性和特性带来不利影响的量,并入制剂中。

[0073] 还可以使用任何合适的调味或甜味材料。合适的调味组分的实例是调味油(flavouring oils),例如,留兰香油、薄荷油、冬青油、黄樟油、丁香油、鼠尾草油、桉油、马郁兰油(oil of marjoram)、桂皮油、柠檬油和橘皮油,以及水杨酸甲酯。合适的甜味剂包括蔗糖、乳糖、麦芽糖、山梨醇、木糖醇、环己基氨基磺酸钠、紫苏亭、AMP(天冬氨酰苯丙氨酸甲酯)、糖精等。合适地,调味剂和甜味剂可以各自或共同组成制剂的约0.1%-5%以上。

[0074] 还可以将本发明的组合物并入锭剂或口香糖或其他产品中,例如,通过搅拌加入加热的香糖胶基(gum base)或涂覆香糖胶基的外层,其实例是节路顿胶(jelutong)、橡胶胶乳、聚乙酸乙烯酯树脂等,期望地与常规的增塑剂或软化剂、糖或诸如葡萄糖、山梨醇等其他增甜剂一起并入。

[0075] 在另一方面,本发明提供了成套试剂盒,其包括(a)多肽抑制剂的组合物,和(b)制药学上可接受的载体。期望的是,该试剂盒还包括在需要这种治疗的患者中使用它们抑制生物膜形成的说明书。

[0076] 旨在口服使用的组合物可以根据本领域中制备药物组合物的任何已知方法来制备,并且此类组合物可以含有选自甜味剂、调味剂、着色剂以及防腐剂的一种或多种试剂,

以提供制药学上精美和可口的制剂。片剂含有与非毒性的制药学上可接受的适合制备片剂的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是,例如,诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠的惰性稀释剂;诸如玉米淀粉或褐藻酸的成粒剂或崩解剂;诸如淀粉、明胶或金合欢的结合剂,以及诸如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石的润滑剂。片剂可以是未包衣的,或者可以通过已知的技术将它们包衣以延迟在胃肠道的分解和吸收,从而提供更长时间段的持续作用。例如,可以使用诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的延时材料。

[0077] 口服使用的制剂还可以表现为硬明胶胶囊,其中将活性成分与诸如碳酸钙、磷酸钙或高岭土(kaolin)的惰性固体稀释剂混合,或者表现为软明胶胶囊,其中将活性成分与诸如花生油、液体石蜡或橄榄油的水或油介质混合。

[0078] 水性悬浮液含有与适合制备水性悬浮液的赋形剂混合的活性材料。这种赋形剂是悬浮剂,例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯树胶;分散剂或湿润剂可以是诸如卵磷脂的天然存在的磷脂,或诸如聚氧乙烯硬脂酸酯的烯化氧与脂肪酸的缩合产物,或诸如十七烷烯氧基十六醇(heptadecaethyleneoxycetanol)的环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物,或诸如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯的环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇衍生的部分酯的缩合产物,或诸如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯的环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇酸酐衍生的部分酯的缩合产物。

[0079] 水性悬浮液也可以含有一种或多种防腐剂,例如诸如苯甲酸乙酯或苯甲酸正丙酯、对羟基苯甲酸酯的苯甲酸酯,一种或多种着色剂,一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂,例如蔗糖、糖精。

[0080] 油性悬浮液可以通过将活性组分悬浮在诸如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油的植物油,或诸如液体石蜡矿物油中来制备。油性悬浮液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以添加如上文所述的那些甜味剂和调味剂来提供美味的口服制剂。这些组合物可以通过添加诸如抗坏血酸的抗氧化剂来防腐。

[0081] 作为生物膜生长和浮游状态之间牙龈卟啉单胞菌蛋白丰度的比较揭示了这种致病菌蛋白质组的许多变化,特别是对谷氨酸/天冬氨酸分解代谢重要的富马酸还原酶的较低的丰度。在关于比较血红素限制和血红素过量的牙龈卟啉单胞菌的蛋白质组变化的另外研究中,在血红素限制中有可观察到的发酵模式的改变,这导致乙酸的产量增加并且与牙龈卟啉单胞菌的主要分解代谢途径中酶的丰度的协调变化是一致的。特别有趣的是,血红素限制和生物膜生长期间富马酸还原酶一致的较低丰度。本发明人随后证明了三种Frdr抑制剂(奥克太尔、莫仑太尔和噻苯达唑)抗牙龈卟啉单胞菌生存的作用和破坏生物膜的正常发展的亚最小抑菌浓度(subMIC)。

[0082] 如本文所用的,术语“拮抗剂”指的是抑制目的多肽的生物活性的核酸、肽、抗体、配体或其他化学实体。本领域的技术人员应当熟悉检测和选择特定蛋白的合适拮抗剂的技术,这种技术包括结合测定。

[0083] 本发明的抗体和拮抗剂有许多应用,例如,它们能够用作口腔护理产品中(牙膏和口腔清洗剂)的抗微生物的防腐剂,用于控制牙菌斑和抑制与龋齿和牙周疾病有关的病原体。本发明的抗体和拮抗剂还可以用于药物制剂中(例如,局部和全身抗感染药物)。

[0084] 本发明还提供了靶向编码本发明的第一方面的多肽的mRNA分子的干扰RNA分子。因此,本发明的第七方面提供了干扰RNA分子,该分子在每条链中都包含至少19个碱基对

的双链区,其中双链区中的一条链与编码本发明的第一方面的多肽的 mRNA 分子的区域互补或者能够在正常细胞内条件下与编码本发明的第一方面的多肽的 mRNA 分子的区域杂交。

[0085] 所谓的 RNA 干扰或 RNAi 是已知的,并且 Hannon(2002)Nature418:244-251 和 McManus & Sharp(2002)Nature Reviews:Genetics3(10):737-747 提供了关于 RNAi 的其他信息,它们的公开在此处通过引用并入。

[0086] 本发明还包括增强 siRNA 的稳定性并支持其体内用途的 siRNA 的化学修饰(参见,例如,Shen et al. (2006)Gene Therapy13:225-234)。这些修饰可以包括位于正义链寡核苷酸的 5' 和 3' 末端的反向无碱基部分,以及反义链 3' 末端的最后两个核苷酸之间的单个硫代磷酸酯键。

[0087] 优选的是,干扰 RNA 的双链区在双链区的每条链中包含至少 20、优选至少 25、最优选至少 30 个碱基对。本发明还提供了治疗个体的牙周疾病的方法,该方法包括向个体施用至少一种本发明的干扰 RNA 分子。

[0088] 在整个本说明书中,词语“包含 (comprise)”或者诸如“包含 (comprises)”或“包含 (comprising)”的变体应当理解为表示包括所宣称的元素、整数或步骤,或者元素、整数或步骤的集合,但是并不排除任何其他元素、整数或步骤,或者元素、整数或步骤的集合。

[0089] 本说明书中所述的全部公开在此处通过引用并入。本说明书所包含的文件、行为、材料、装置、文章等的任何讨论,仅用于为本发明提供语境。并不认为是承认,任何或者所有这些内容形成了部分现有技术的基础,或者是与本发明有关的技术领域的常识,尽管在本申请的每项权利要求的优先日期前,其存在于澳大利亚或其他地方。

[0090] 本领域的技术人员应当理解,在未偏离所广泛描述的本发明的精神或范围的情况下,可以对本发明进行许多变化和 / 或修饰,如具体的实施方案所示。因此,本实施方案在各个方面都认为是示例性的而非限制性的。本发明特别包括本说明书中所述的特征的所有组合。

[0091] 为了更清楚地了解本发明的特征,现在参照下文的实施例,描述本发明的优选形式。

[0092] 用于生物膜与浮游研究的牙龈卟啉单胞菌的生长和收获

[0093] 利用 C-30 型 BioFlo 恒化器 (New Brunswick Scientific),使牙龈卟啉单胞菌 W50 (ATCC53978) 以连续培养的方式生长,工作体积为 400mL。向培养容器和培养基储蓄器 (medium reservoir) 两者中连续地通入 10%CO₂ 和 90%N₂。生长温度为 37°C,并且将脑心浸液生长培养基 (brain heart infusion growth, Oxoid) 保持在 pH7.5。在所有的生长中,将氧化还原电势保持在 -300mV。稀释速率为 0.1h⁻¹,从而获得的平均每代时间 (MGT) 为 6.9h。添加无菌半胱氨酸-HCl (0.5g/L) 和氯化血红素 (5mg/L)。接种后约 10 天,培养物达到稳态,并将培养物保持另外的 30 天,直至在容器的垂直表面形成了生物膜厚层。

[0094] 在冰上或在 4°C 下进行所有的细菌细胞操作。收获时,将浮游细胞倒入干净的容器中,并用 PGA 缓冲液 (10.0mM NaH₂PO₄、10.0mM KCl、2.0mM 柠檬酸、1.25mM MgCl₂、20.0mM CaCl₂、25.0mM ZnCl₂、50.0mM MnCl₂、5.0mM CuCl₂、10.0mM CoCl₂、5.0mM H₃BO₃、0.1mM Na₂MoO₄、10mM 半胱氨酸-HCl,并在 37°C 下,用 5M NaOH 将 pH 调整至 7.5,37°C) 将生物膜温和地洗涤两次,然后将生物膜收获至 50mL 的离心管中。

[0095] 然后用 PGA 缓冲液将浮游细胞和生物膜细胞洗涤三次 (7000g), 并用洗涤缓冲液 (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM MgCl₂、pH8.0、蛋白酶抑制剂抑制剂 (Sigma)) 将两个样品再悬浮至终体积为 30mL, 并在 138Mpa 下, 3 次通过弗氏压碎器 (French Press Pressure Cell, SLM1AMINCO) 将两个样品裂解。将裂解的细胞在 2000g 下离心 30min 以除去任何未破碎的细胞。将上清液在 100000g 下进一步离心 1h 以将裂解的细胞分离成可溶和不溶 (细胞外膜) 的组分。在 100000g 下, 用洗涤缓冲液将细胞外膜组分再洗涤 3 次, 每次 20min, 以除去任何可溶的污染物。然后, 将所有样品冻存于 -80°C。

[0096] 用于血红素限制和过量研究的牙龈卟啉单胞菌的生长和收获

[0097] 利用 Bioflo 110 发酵罐/生物反应器 (New Brunswick Scientific), 使牙龈卟啉单胞菌 W50 以连续培养的方式生长, 工作体积为 400mL。生长培养基是 37g/L 的脑心浸液培养基 (Oxoid), 并补充了 5mg/mL 的无菌过滤的盐酸半胱氨酸、5.0 μg/mL 的氯化血红素 (血红素过量) 或者 0.1 μg/mL 的氯化血红素 (血红素限制)。通过向培养容器接种在相同的培养基 (血红素过量) 中生长的牙龈卟啉单胞菌的 24h 分批培养物 (100mL) 开始生长。分批培养生长 24 小时后, 打开培养基储蓄器泵并将培养基流速调整至稀释速率为 0.1h⁻¹ (平均每代时间 (MGT) 为 6.9h)。将容器的温度保持在 37°C 并将 pH 保持在 7.4±0.1。向培养物中连续地通入 95%N₂ 中的 5% 的 CO₂。在稳定态生长中收获细胞, 并用洗涤缓冲液 (50mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl、5mM MgCl₂), 在 5000g 下, 将细胞洗涤三次, 达 30min, 并在 138Mpa 下, 使细胞三次通过弗氏压碎器 (SLM, AMINCO) 将细胞分解。然后将裂解的细胞在 2000g 下离心 30min 以除去未破碎的细胞, 然后在 100000g 下超离心, 从而获得可溶 (上清液) 组分和膜组分。在冰上进行所有的分级。

[0098] ¹⁸O 蛋白水解标记的生物膜和浮游细胞外膜组分的制备和分析

[0099] 首先将细胞外膜组分再悬浮于 1mL 冰冷的含有 2%SDS 的洗涤缓冲液中, 然后进行超声处理和漩涡以促进细胞团 (pellet) 的再悬浮。再悬浮的最终步骤包括使用 29 号胰岛素针 (29-gauge-insulin needle) 帮助破碎微粒。然后将该混合物在 40000g 下离心以除去不溶颗粒, 并根据生产商的说明书使用 BCA 试剂 (Pierce) 测定上清液中蛋白的浓度。

[0100] 然后在 -20°C 下, 使用 5 体积冰冷的丙酮沉淀再悬浮的样品, 过夜, 这进一步帮助失活任何蛋白水解活性。丙酮沉淀后, 用 pH8.0 的 25mM Tris 和 1%SDS 将两个样品再悬浮至终浓度为 3mg/mL, 并用间歇的超声处理、漩涡搅拌以及使用 29 号胰岛素针进行辅助。然后进行第二 BCA 蛋白测定以使最终蛋白的量标准化。

[0101] 根据生产商的方法, 使用 MOP 运行缓冲液 (NuPAGE, Invitrogen), 进行 NuPAGE 凝胶上的凝胶电泳, 除了在向使用 MOP 作为运行缓冲液的 10 孔 10%NuPAGE 凝胶加样前, 将样品在 99°C 下煮沸 5min。将生物膜样品和浮游样品 (各 30 μg) 加样至凝胶中相邻的泳道。然后在 126V (恒定)、4°C 的条件下进行 SDS-PAGE, 至染料前沿距离凝胶的底部约 1cm。对于生物学重复, 所用的凝胶是使用 MOP 作为运行缓冲液的 4-12%NUPAGE 梯度凝胶, 以获得相似但不确切 (exact) 的分离模式, 从而克服分离成两个组分的蛋白条带的潜在变化。在考马斯亮蓝 (Coomassie brilliant blue)G-250 (31) 中过夜染色, 然后在超纯水中过夜脱色。

[0102] 使用定制的模板 (stencil) 将两个凝胶泳道分成 10 个相同大小的凝胶条带, 并且将每个部分切成约 1mm³ 的方块。在 50mMNH₄HCO₃/ACN (1:1) 的溶液中脱色三次。脱色后, 将该凝胶方块用 100%ACN 脱水, 然后在 56°C 下, 用含于 ABC 缓冲液 (50mM NH₄HCO₃) 中的 10mM 二

硫苏糖醇的溶液进行再水合/还原,达30min。在室温下避光添加55mM碘乙酰胺的ABC缓冲液的溶液达60min前,除去过量的溶液。烷化反应后,将凝胶方块在ABC缓冲液中洗涤3次,然后在100%ACN中将该凝胶方块脱水两次,达10min。使用真空离心蒸发浓缩器(speedvac)将该凝胶方块在离心下进一步干燥90min。在37°C下,在每个凝胶部分60 μ l的溶液中,消化20h,该溶液含有在H₂¹⁶O或H₂¹⁸O(H₂¹⁸O,纯度大于97%,Marshall Isotopes)中制备的2 μ g测序等级(sequence grade)的修饰的胰蛋白酶(Promega)和1/2强度的ABC缓冲液。消化后,使用50%ACN/0.1%TFA在它们各自的水(H₂¹⁶O/H₂¹⁸O)中的溶液以及0.1%TFA,在超声处理的辅助下,将肽从凝胶中提取两次,每次5min。将合并的提取物在99°C下煮沸5min以失活胰蛋白酶,然后冷冻干燥48h。

[0103] 在使用纳米HPLC和MALDI TOF-MS/MS分析进行分析前,将冷冻干燥的肽再悬浮于5%ACN/0.1%TFA在它们各自的水(H₂¹⁶O/H₂¹⁸O)中的溶液中。然后,利用高级 μ L取样模式下的FAMOS自动加样器,将肽溶液(20 μ l)加样至Ultimate纳米LC系统(Nano LC system, LC Packings)。首先,以200 μ L/min的流速,将样品加样至捕获柱(300 μ m内径 $\times$ 5mm)达5min。使用反向柱(LC Packings, C18 PepMap 100, 75 μ m i.d. $\times$ 15cm, 3 μ m, 100Å)以300nL/min的流速实现分离,用0-5min(0%)、5-10min(0-16%)、10-90min(16-80%)、90-100min(80-0%)的ACN梯度,在0.1%甲酸中洗脱。

[0104] 使用Proteineer Fc自动装置(Bruker Daltonics),以30s的时间间隔,将洗脱液直接点样至预点样的anchorchip平板(Bruker Daltonics)上。点样前,将每个点样位置用0.2 μ L的超纯水预点样,以降低与基质结晶过程期间的乙腈的浓度。在使用MALDI-TOF/TOF(LIFT II升级的Ultraflex, Bruker Daltonics)进行自动分析前,将平板用10mM磷酸铵和0.1%TFA洗涤并空气干燥。首先使用25kV的加速电压,在测量800Da-3500Da的反射方式(reflectron mode)下,进行消化物的MS分析。从8套30个激光发射产生所有MS光谱,并且每套需要包括S/N大于6的信噪比、大于3000的分辨率。对4个样品的每个组,使用预点样的内部标准品的[M+H]⁺离子(血管紧张素II、血管紧张素I、神经降压素、肾素底物和ACTH_Clip),对设备进行外部校准。使用Flexcontrol和WarpLC软件(Bruker Daltonics),在完全自动的模式下,进行MALDI-TOF/TOF的LIFT模式。在TOF1阶段,将所有离子加速至8kV,随后在LIFT室中提升至19kV,从累加的550个连续激光发射中产生MS/MS光谱。

[0105] 使用WarpLC软件(第1.0版)和LC MALDI SILE(Stable Isotope Labelling Experiment)作业流程,选择母体前体(parent precursors)。只选择了通过4Da所分离的每个重或轻对(heavy or light pair)的最丰富的峰,这提供了大于50的S/N。通过小于6次LC MALDI分级所分离的化合物被认为是相同的,因此只选择1次。

[0106] 使用Flexanalysis 2.4 Build 11(Bruker Daltonics)和Apex峰寻找算法,生成峰列表,并且S/N大于6。使用0.2m/z的宽度,用Savitzky Golay算法,使MS扫描平滑,并且使用平坦度为0.8的Median算法实现基线扣除。

[0107] 对于针对从基因组研究所(The Institute for Genomic Research)(TIGR)的网页(www.tigr.org)获得的牙龈卟啉单胞菌数据库所查询的MS/MS数据,使用MASCOT搜索引擎(MASCOT第2.1.02版, Matrix Science),实现蛋白鉴定。MASCOT搜寻参数是:电荷状态1+,以胰蛋白酶作为蛋白酶,允许一个未切割(missed cleavage),并且MS的公差为250ppm,MS/MS峰的公差为0.8m/z。固定修饰设定为半胱氨酸的脲基甲基,并且可变修饰为

C-末端 ^{18}O 标记的赖氨酸和精氨酸残基。

[0108] 使用前述的反向数据库策略 (32) 测定忽略单个肽鉴定的假阳性所要求的最小肽 MASCOT 得分。简而言之,数据库由正常方向的每个预测的牙龈卟啉单胞菌蛋白的序列以及反向序列的相同蛋白 (3880 个序列) 组成。然后用所有 MS/MS 数据集搜寻组合的数据库,以测定获得 0% 的假阳性的最低 Mascot 得分。假阳性被定义为与反向序列的阳性匹配 (粗体、红色并且高于肽阈值得分)。单个采样肽 (hits peptide) 的假阳性速率经测定为 0.5%, 并且 Mascot 肽离子得分大于阈值,且小于 25。当 Mascot 肽离子得分大于 30 时,与反向数据库没有匹配。根据 Mascot 评分算法,为了增加单个采样肽鉴定的置信度,我们使用了大于 50 的最小 Mascot 肽离子得分,其获得了比使用 30 的得分时低两个数量级的错误鉴定的概率。

[0109] 使用下述标准评价匹配的肽 i) 具有对应于小于 0.05 的 p 值的基于概率的得分的至少 2 个特异性肽段被认为是鉴定为阳性的 (要求粗体红色匹配),其中得分是 $-\log \times 10 \log(P)$, P 为观察到的匹配是随机事件的概率 (33), ii) 当在特定蛋白的鉴定中只使用了一个特异性肽段时 (重或者轻标记的肽的鉴定被认为是一个), MASCOT 肽离子得分必须大于 50, 或者在 4 个独立的实验 (2 个生物学重复和 2 个技术重复) 的超过一个的实验中鉴定了该肽。

[0110] 由于一个或两个 ^{18}O 原子混合地并入肽、 ^{18}O 同位素天然丰度的贡献以及 H_2^{18}O 纯度 ($a=0.97$), 使用下述公式以数学方式修正肽的比率 R:

$$[0111] \quad R = (I_1 + I_2) / I_0 \quad (1)$$

[0112] 根据下述公式计算 I_0 、 I_1 和 I_2 (27)

$$[0113] \quad aS_2 - [aJ_2 - 2(1-a)J_4]S_0 - 2(1-a)S_4$$

$$[0114] \quad I_1 = \frac{a^2 - (2-a-a^2)J_2 + 2(1-a)^2J_4}{a^2} \quad (2)$$

$$[0115] \quad a^2 - (2-a-a^2)J_2 + 2(1-a)^2J_4$$

$$[0116] \quad I_0 = S_0 - (1-a)I_1 \quad (3)$$

$$[0117] \quad 1$$

$$[0118] \quad I_2 = \frac{(S_4 - J_4I_0 - J_2I_1)}{a^2} \quad (4)$$

$$[0119] \quad a^2$$

[0120] 其中 S_0 、 S_2 和 S_4 分别为没有 ^{18}O 标记的肽的单同位素峰的测量强度,高于单同位素峰 2Da 的峰,和高于单同位素峰 4Da 的峰 (图 1A)。 J_0 、 J_2 和 J_4 是肽的同位素外膜的相应的理论相对强度,由 MS-Isotope (<http://prospector.ucsf.edu>) 计算。然而,当第二同位素峰 (S_1 和 S_5) 比第一同位素峰 (S_0 和 S_4) 更强时,将该比率简单地计算为 S_1 除以 S_5 。这是真实的,特别是对于大于 2000m/z 的大肽而言,其中 ^{16}O 标记的肽的第五同位素峰对 S_4 峰的贡献变得显著。通过作为实验 S_4 的百分比的实验 S_2 和理论 S_2 (J_2) 之间的差别,计算混合并入的 $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 。

[0121] 通过求相同蛋白的所有鉴定的肽的平均数来测定蛋白的丰度比率,甚至当在多于一个凝胶部分中鉴定了相同的蛋白时也是如此。将来自每个“正常”重复的数据与来自其各自“反向”重复的反比组合,从而获得每个生物学重复中每种蛋白的平均比率和标准误差。然后以与以前报道的类似的方式 (34、35) 进行两个生物学重复的标准化。简而言之,将每个生物学重复的平均比率乘以系数,从而使该比率的几何平均数等于 1。

[0122] ICAT 标记的血红素限制和过量的细胞的制备和分析

[0123] 蛋白标记和分离基于使用可切割的 ICAT 试剂 (Applied Biosystems) 的 geLC-MS/MS 方法 (Li et al., 2003)。PCT/AU2007/000890 采用了另一种蛋白质组方法, 在此将其通过引用并入。首先用 TCA (16%) 将蛋白沉淀, 然后用 6M 尿素、5mM EDTA、0.05% SDS 和 50mM pH8.3 的 Tris-HCl 将蛋白溶解。使用 BCA 蛋白试剂来测定蛋白浓度, 并将该浓度调整至 1mg/ml。在 37° C 下, 使用 2 μ 150mM 三 (2- 羧乙基) 膦酸盐将来自每个生长条件的 100 μ g 的蛋白单独还原 1h。然后, 用 ICAT_重 试剂将来自血红素限制生长条件的还原的蛋白烷基化, 并用 ICAT_轻 试剂将来自血红素过量生长条件的蛋白烷基化。然后将两个样品合并, 并在预制的 Novex10%NUPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上进行 SDS-PAGE。将该凝胶用 SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) 染色 5min, 之后用水脱色。然后从凝胶的顶部至染料的前端将该凝胶泳道切成 20 份。

[0124] 将切下的部分进一步切成 1mm³ 的方块, 在凝胶内过夜消化并按照上文的方法提取两次。将合并的上清液在减压下干燥至约 50 μ L, 然后在按照生产商的说明书 (Applied Biosystems) 加样于亲和柱上前, 将该上清液与 500 μ L 亲和加样缓冲液混合。将洗脱的肽干燥, 并在 37° C 下用纯化的 TFA 切割生物素标签 2h, 然后在减压下干燥。将干燥的样品悬浮于 35 μ L 含 0.1% TFA 的 5% 乙腈中。

[0125] 利用与 UltiMate 纳米 LC 系统 (LC Packings-Dionex) 偶联的 Esquire HCT 离子阱质谱仪进行 MS。利用 LC Packings 反相柱 (C18 PepMap 100, 75 μ m i.d. $\times$ 15cm, 3 μ m, 100 Å) 实现分离, 并利用下述乙腈梯度在 0.1% 甲酸中洗脱: 0-5min (0%)、5-10min (0%-10%)、10-100min (10%-50%)、100-120min (50%-80%)、120-130min (80%-100%)。

[0126] 将 LC 的输出直接通过界面连接至纳米喷雾离子源。在 m/z 范围为 300-1500 与离子电荷控制为 100000 的条件下, 进行 MS 采集, 并且最大积累时间为 100ms。当使用 GPF 时, 使用三个另外的 m/z 范围 (300-800、700-1200 和 1100-1500) 选择前体离子, 并重复进行每个 m/z 范围以增加所鉴定的肽的数目。从 100-3000m/z 的质量范围内获得 MS/MS 采集, 对高达 10 个的前体进行 MS/MS 采集以用于初始的完整蛋白质组分析, 并且对 3 个前体进行 MS/MS 采集以用于最大强度的多电荷离子的 ICAT 分析, 并且主动排除时间 (active exclusion time) 为 2min。

[0127] 使用利用 Apex 峰寻找算法的 DataAnalysis3.2 (Bruker Daltonics) 产生峰列表, 该算法的化合物检测阈值为 10000, 信噪比阈值为 5。为输出数据设定 +2 和 +3 的整体电荷限制。对于针对从基因组研究所 (TIGR) 的网页 (www.tigr.org) 获得的牙龈卟啉单胞菌数据库所查询 MS/MS 数据, 利用 MASCOT 搜寻引擎 (MASCOT2.1.02, Matrix Science), 实现蛋白的鉴定。利用下述标准进一步评价匹配的肽: i) 具有对应于最大 0.05 的 p 值的基于概率的 Mowse 得分的肽被认为是阳性鉴定的, 其中得分是 $-\log \times 10 \log(P)$, P 为观察到的匹配是随机事件的概率, ii) 当在特定的蛋白鉴定中只使用了一种肽, 并且 MASCOT 得分小于 30 时, 进行该光谱的人工验证。为了增加 ICAT 标记的蛋白, 特别是那些具有单个肽采集的蛋白的鉴定中的置信度, 进行了下述另外的过滤: i) ICAT 对的重和轻肽必须表现出如从它们的提取离子层析中所鉴定的接近的洗脱峰 ii) 对于具有单个特异性肽段的蛋白, 该肽必须被鉴定多于一次 (例如, 在不同的 SDS-PAGE 分级中, 或在轻和重 ICAT 这两种形式中) iii)

如果单个肽不满足 (ii) 的标准,则 MASCOT 得分必须大于等于 25,期望值小于等于 0.01,并且 MS/MS 光谱必须表现出连续系列的“b”或“y”型离子,并且考虑了强离子。假阳性的确定如上文所述。

[0128] 同位素重 ^{13}C 比轻 ^{12}C ICAT 标记的肽的比率,利用 DataAnalysis(Bruker Daltonics) 的脚本来测定,并基于单个 MS 光谱中的单同位素峰强度(信号强度和峰面积)来人工核实,进行人工核实。用于定量的母离子的最小离子数目为 2000,尽管超过 96% 的重和轻前体离子都大于 10000。在分辨率很差的光谱情况下,由母离子的重新构建的提取离子层析(extracted ion chromatograms, EIC)的面积来测定比率。计算源自单个母蛋白(partent protein)的多个肽的平均值,利用 $\alpha=0.05$ 的 Grubb 检验(Grubb's test)移除无关项。

[0129] 牙龈卟啉单胞菌蛋白的细胞定位利用 CELLO(<http://cello.life.nctu.edu.tw>(36))来预测。细胞外、外膜、内膜和胞质的预测被认为来自外膜组分。

[0130] 在无细胞培养上清液(未接种的、血红素过量和血红素限制)中的短链脂肪酸的浓度,通过基于 Richardson 等人的衍生法(37)的毛细管气相层析来测定。

[0131] 两个生物学重复之间的相关系数(r)利用来自 Microsoft Excel 的 Pearson 相关系数函数来评价。方差的系数(CV)通过用肽丰度比率除以平均值的标准偏差来计算,并且表示为百分数。

[0132] 用于转录组学分析(transcriptomic analysis)的核酸的提取

[0133] 从直接收获自恒化器的 5ml 牙龈卟啉单胞菌细胞的样品中提取 RNA。向每个样品中添加 0.2 体积的 RNA 稳定剂(含于纯乙醇的 5%v/v 的苯酚溶液)。通过离心(9000g, 5min, 25°C)使细胞成团,立即在液氮中将细胞团冷冻,并保存于 -70°C,用于后续处理。将冷冻的细胞每 1×10^{10} 个细胞悬浮于 1ml 的 TRIzol 试剂(Invitrogen)中,然后利用 Lysing Matrix B 玻璃珠(MP Biomedicals)和 Precellys 24 匀浆器(Berlin Technologies, France)将该细胞分解。按照 TRIzol 的生产商(Invitrogen)的方法,除了在 RNA 沉淀阶段添加了乙醇(终浓度为 35%)而不是异丙醇以外,通过离心除去玻璃珠,并将 RNA 组分纯化,然后将样品转移至 Illustra RNeasy Spin Mini RNA 分离试剂盒(GE Healthcare)的旋转离心柱中(spin-column)中。按照生产商的说明书纯化来自上文结合步骤的 RNA,包括柱上(on-column)的 DNA 酶处理以移除残留的 DNA。利用 Experion 自动电泳工作站(Bio-Rad)来测定 RNA 的完整性。

[0134] 利用 RNeasy 血液和组织试剂盒(Qiagen),按照生产商的说明书,从以连续培养的方式生长的牙龈卟啉单胞菌细胞中提取基因组 DNA。

[0135] 微阵列设计、杂交和分析

[0136] 微阵列芯片(microarray slide)由 Australian Genome Research Facility 印制,并由 1977 个定制设计的、用于牙龈卟啉单胞菌 W83 基因组的预测的蛋白编码区的 60mer(单元单体)寡核苷酸探针组成,该编码区包括 Los Alamos National Laboratory Oralgen 项目所预测的其他蛋白编码区在内。包括了微阵列样品库(Microarray Sample Pool, MSP)对照探针,以辅助依赖于强度的标准化。将所有探针(full complement of probes)印制至涂覆了 Corning UltraGAPS 的芯片上,每个微阵列芯片印制 3 次。

[0137] 利用用 Cy3 标记的血红素过量或血红素限制的样品将芯片杂交,该样品与用 Cy5

标记的通用基因组 DNA 参考 (GE Lifesciences) 组合。利用 Superscript plus 间接 cDNA 标记系统 (Invitrogen), 用 $5\mu\text{g}$ 随机六聚体 (Invitrogen) 引发 cDNA 合成反应, 由 $10\mu\text{g}$ 总 RNA 合成 cDNA。利用 Amersham CyDye 标记后反应染料包 (post-labelling reactive dye pack) (GE Lifesciences) 将 cDNA 用 Cy3 标记, 并利用 Invitrogen 标记系统的纯化模块将 cDNA 纯化。利用 BioPrime Plus Array CGH 间接基因组标记系统 (Invitrogen), 以类似的方法, 由 400ng DNA 合成 Cy5-dUTP 标记的基因组 cDNA。

[0138] 杂交前, 在 42°C 下, 将微阵列芯片浸入封闭溶液 (35% 甲酰胺、1%BSA、0.1%SDS、 $5\times\text{SSPE}$ [$1\times\text{SSPE}$ 是 150mM NaCl、 10mM NaH_2PO_4 、 1mM EDTA]) 达 1h。封闭后, 在 H_2O 中, 然后在 99% 乙醇中将芯片短暂地洗涤, 然后通过离心干燥。将标记的 cDNA 再悬浮于在 95°C 下变性 5min 的 $55\mu\text{L}$ 的杂交缓冲液中 (35% 甲酰胺、 $5\times\text{SSPE}$ 、0.1%SDS、 0.1mg mL^{-1} 鲑鱼精子 DNA), 然后将 cDNA 应用于芯片并用 LifterSlips (Erie Scientific) 覆盖。在 42°C 下将杂交进行 16h。杂交后, 将芯片在 0.1%SDS 加 $2\times\text{SSC}$ [$1\times\text{SSC}$ 是 150mM NaCl、 15mM 柠檬酸钠] (42°C 下达 5min, 在室温下进行所有另外的洗涤)、0.1%SDS 加 $0.1\times\text{SSC}$ (10min)、 $0.1\times\text{SSC}$ (洗涤 4 次, 每次 1min) 中连续洗涤, 然后快速地浸入 $0.01\times\text{SSC}$, 然后浸入 99% 乙醇中, 并利用离心干燥该芯片。

[0139] 利用 GenePix4000B 微阵列扫描仪扫描芯片, 并利用 GenePix Pro6.0 软件 (Molecular Devices) 分析图像。对于表示 3 个生物学重复的每次处理 (血红素限制或血红素过量), 使用 3 个芯片。

[0140] 利用 GenePix Pro6.0 软件 (Molecular Devices) 进行图像分析, 并在进一步的分析中使用“变形 (morph)”背景值作为背景估计。为了鉴定差异表达的基因, 使用 LIMMA 软件包, 截止值 (cut off) 为 $P < 0.005$ 。在阵列中, 通过经由 MSP 对照斑点拟合整体黄土曲线 (global loess curve), 并将该曲线应用于所有其他的斑点, 进行标准化。利用 Benjamini Hochberg 方法控制假发现率, 以修正多重测试。

[0141] 基因预测基于来自基因组研究所 (TIGR, www.tigr.org) 的牙龈卟啉单胞菌 W83 基因组注释。由微生物在线 (Microbesonline) 网页 (<http://microbesonline.org>) 进行操纵子预测。

[0142] 利用 DNA 微阵列分析所测定的牙龈卟啉单胞菌对血红素限制的应答

[0143] 在与蛋白质组分析所用相同的生长条件下, 对血红素限制生长对牙龈卟啉单胞菌整体基因表达的影响进行 DNA 微阵列分析。来自 3 个生物学重复的数据的分析鉴定了总共 160 个基因, 所述基因表现出血红素过量和血红素限制之间的统计学显著差异调控, 并且大部分这些基因在血红素限制的条件下表现出表达水平的增加, 只有 8 个基因被下调了。预测许多上调的基因位于操纵子中, 并且其中的大部分表现出转录物水平上的类似变化 (表 3 和 5)。转录物组数据和蛋白质组数据之间有广泛的一致性, 并且两组数据之间有显著的相关性, 其中观察到了对血红素限制的差异调控 [Spearman 相关性 0.6364, p 小于 0.05]。然而, 对于经蛋白质组分析表现出丰度差异的某些蛋白而言, 相应基因的转录物组分析没有检测到 mRNA 丰度的任何统计学显著差异。微阵列分析旨在鉴定编码如蛋白质组分析所测定的丰度变化很大的蛋白的那些基因 (表 3 和 5)。当发现来自相同基因的蛋白和转录物被血红素限制明显地调控时, 大部分蛋白和转录物表现出相同的调控方向。两个基因产物是例外, 即 CTD 家族推断的细胞表面蛋白酶 PG0026 和菌毛蛋白 (FimA) PG2132。这些蛋白

的丰度在血红素限制条件下的蛋白质组分析中下降,但是经转录组分析预测被上调。这两种蛋白都位于细胞表面,并且很有可能,它们从细胞表面释放或者被翻译后修饰,这能够将它们从在蛋白质组分析中被鉴定为上调中排除。

[0144] 牙龈卟啉单胞菌对 Frd 抑制剂的易感性

[0145] 在液体培养中进行 Frd 抑制剂对牙龈卟啉单胞菌的影响。简而言之,将 W50 培养在 200mL BHI 培养基中至 OD 为 0.6 (约 2.9×10^8 cfu/mL)。然后将细胞再悬浮于新鲜的生长培养基中至终浓度为 2.5×10^7 cfu/mL。将双羟萘酸奥克太尔 (oxantel pamonate)、柠檬酸莫仑太尔 (morantel citrate) 和噻苯达唑 (Sigma) 溶解于 DMSO 中以获得 250mM 的储存浓度。然后将 4 μ L 检测溶液与 196 μ L 细胞悬浮液混合,并转移至 96 孔平底板,然后在厌氧和 37°C 的条件下孵育,并且在 50 小时的时间段内,通过利用 iEMS 全自动定量绘图酶标仪 (microplate reader) (Labsystems OY Research Technologies Division) 测量 620nm 的光密度来进行每小时的监测。在不同抑制剂的存在下,牙龈卟啉单胞菌的平均每代时间通过用倍增时间 $[(\log_{10} N_t - \log_{10} N_0) / \log_{10} 2]$ 除以时间 $(N_t - N_0)$ 来计算,其中 N_t 和 N_0 分别是时间 t 和时间 0 时的细胞群体。

[0146] Frd 抑制剂对牙龈卟啉单胞菌生物膜的影响

[0147] 如以前所述,测定了在静态 96 孔模型中,48h 内,牙龈卟啉单胞菌生物膜的形成。简而言之,在将牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 细胞与检测物质混合,然后转移至 96 孔平底板并在 37°C 下厌氧孵育前,将牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 细胞再悬浮至最终细胞密度为 2.5×10^7 。通过用 250 μ L 超纯水将细胞洗涤两次以除去松散粘附的细胞,然后在 37°C 下干燥达 3h,进行 24h 和 48h 的生物膜质量的评价。然后将干燥的生物膜在 0.1% 结晶紫溶液中染色 15min,并用 250 μ L 超纯水洗涤两次。然后在将生物膜转移至用于测量 620nm 的光密度的新 96 孔板前,通过重复的吸液,利用 80% 乙醇和 20% 丙酮将该结晶紫染色从生物膜溶解达 2min。

[0148] 流式细胞生物膜培养和 CSLM 分析

[0149] 流式细胞中牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 的生物膜培养,类似于以前所述的培养,不过有某些修改。在厌氧培养室 (MK3 Anaerobic workstation; Don Whitley Scientific Ltd.) 中建立三通道流式细胞系统 (Stovall Life Science, USA), 并且改进是将硅泵管 (Gilson, France) 和活塞用于细菌生物膜的孵育、检测和染色。将所有的部分组装,并将 0.5% 次氯酸钠泵入系统,并保持过夜以使系统灭菌。然后在添加生长培养基前,用无菌水 (200mL) 冲刷系统。用 1mL 指数生长的稀释至 0.1 OD₆₀₀ 的牙龈卟啉单胞菌接种系统。在补充了 0.1g/L 半胱氨酸、1mg/L 氯化血红素和 1mg/L 维生素 K 的 5 $\times$ 稀释的 BHI (Oxoid) 的恒流前,将该系统孵育 1h。18h 后,将 1mL 125 μ M 或 12.5 μ M 的奥克太尔或无菌水注入系统的每个通道中,并孵育达 30min。将培养基的流动恢复另外的 10min 以洗去由于检测而未结合的细胞。然后用 BacLight 染色 (Molecular Probes) 将生物膜原位染色 (参见下文)。

[0150] 在倒转镜台的 Meta510 共焦显微镜 (Zeiss) 上进行细菌生物膜的共焦激光扫描显微术 (CLSM)。利用 63 $\times$ 的物镜以 512 $\times$ 512 的像素 (每像素 0.28 μ m), 并且每帧在 143.86 μ m(x) $\times$ 143.86 μ m(y) 对全部生物膜厚度上 (z) 每个 2 μ m 厚的水平 (xy) 光学数字 (optodigital) 剖面进行成像。为确定生物膜各处的再现性,在每个通道的 488nm 和 568nm 的波长下,从两个生物学重复的每一个的随机位置获得 5 个图像。将获得的所有图像利用

COMSTAT 软件来分析。微菌落被定义为大于 500 个像素数的细胞簇。

[0151] 被奥克太尔处理分散的细胞的生存力

[0152] 为了检测被奥克太尔处理分散的细胞的生存力,进行了如上所述的静态生物膜测定,但是有轻微的改变。简而言之,允许牙龈卟啉单胞菌(ATCC33277)在18h的孵育后,在24孔微板中形成生物膜。首先除去自由浮动的浮游细胞,并将该生物膜用PBS洗涤一次。向每孔中添加1mL125 μ M或12.5 μ M的奥克太尔或无菌水(阳性对照),并将该孔孵育达30min。仍然存活的分散的牙龈卟啉单胞菌细胞的数目,在BHI中连续稀释后,在马血琼脂板上,通过培养分析来测定。

[0153] 统计学分析

[0154] 两个生物学重复之间的相关系数(r)利用来自Microsoft Excel的Pearson相关系数函数来评价。方差的系数(CV)通过用肽丰度比率除以平均值的标准偏差来计算,表示为百分数。

[0155] 连续培养与生物膜的形成

[0156] 将牙龈卟啉单胞菌W50以连续培养的方式培养超过40天的时间段,在该过程中,培养物的细胞密度在开始的十天后保持不变,并且生物学重复1和2的OD₆₅₀分别为 2.69 ± 0.21 和 2.80 ± 0.52 。这相当于约3mg细胞干重/mL的细胞密度。在这个时间段内,在发酵罐的垂直玻璃壁上发展了牙龈卟啉单胞菌细胞的生物膜。这种生物膜收获时的厚度为约2mm。

[0157] 使用BSA对 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 定量方法的验证

[0158] 为了确定 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 定量方法的精确度和可重复性,将已知量的BSA加样至相邻的凝胶泳道,以获得1:1、1:2、1:5和10:1的比率(图1B)。在 H_2^{16}O 或 H_2^{18}O 的存在下,将条带进行凝胶内胰蛋白酶消化(in-gel tryptic digestion)、混合,然后通过LC MALDI-MS/MS进行分析。所有4个比率的单个BSA胰蛋白酶消化肽段的一套典型光谱表现出两个 ^{18}O 原子优选并入,通过BSA比率为10:1的+4Da峰的优势以及通过1:1的光谱中几乎对称的双峰,非常清楚地观察到了这种情况,这既简化了定量也简化了鉴定(图1A)。基于1:1的标记(附表),单个 ^{18}O 原子的平均并入估计小于7%。对于1:1(3次)、2:1(和1:2)、1:5和10:1的比率,所有鉴定的BSA肽的计算平均比率为 0.98 ± 0.12 、 2.22 ± 0.26 、 4.90 ± 0.75 和 10.74 ± 2.04 ,这分别表示好的动态范围、 $\pm 2\%$ –11%的高精确度以及11.75%–18.95%的低CV范围(表1)。1:1的混合物(进行三次)的可重复的精确度暗示标记偏差很低。还通过只利用在两个实验中都得以鉴定的肽,比较比率为2:1的正常和反向标记的BSA,证实了这一点。正常比率测定为 2.11 ± 0.33 ,而反向测定为 2.30 ± 0.20 (表1)。

[0159] 生物膜样品和浮游样品的定量分析的实验设计

[0160] 本研究的设计包括使用两个独立连续培养的两个生物学重复,每个重复分成从容器的壁上获得的生物膜样品和从容器的液体内容物获得的浮游样品。每个生物学重复进行了两个技术重复,尽管我们已经确定用BSA无明显标记偏差,但是我们选择使用反向标记策略,因为缺乏对复杂生物样品进行的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 标记验证研究(30)。因此,总共有4个实验,每个实验由源自 2×10 个凝胶片段的10个LC-MALDI MS/MS运行(run)组成。

[0161] 图2示出来自生物膜/浮游样品的两个正常和反向标记的肽的典型MS和MS/MS光谱,这表明了典型的反向标记方式。和用BSA数据一样,可以看出,有高水平的双 ^{18}O 并入,

对于所有的肽,平均混合并入经计算小于 15%,这证实¹⁶O/¹⁸O 蛋白水解标记方法对复杂样品也是有效的(数据未显示)。还通过 +2Da 种类的相对很少的 Mascot 采样进一步肯定了双重标记的肽的优势。重标记的肽的 MS/MS 光谱还揭示了 Y 离子中预期的 +4Da 偏移(图 2)。

[0162] 技术重复之间的相关性

[0163] 为了比较生物学数据的技术重复,将每对正常和反向标记的实验的转换成 Log₁₀ 的蛋白丰度比率互相作图(图 3)。这些点的线性回归表明,每一对是高度相关的,并且生物学重复 1 和 2 的 R² 值分别为 0.92 和 0.82。每个线性拟合的斜率也和期望值 1 接近,生物学重复 1 和 2 的斜率为 0.97 和 0.93,这分别表明技术重复之间没有标记偏差(图 3)。计算来自技术重复的蛋白丰度比率的平均值,以获得每个生物学重复的单个比率。

[0164] 生物学重复之间的相关性

[0165] 在比较两个生物学重复的平均数据前,将每个生物学重复的蛋白丰度比率标准化,以获得 1.0 的平均比率。来自两个生物学重复的标准化的蛋白丰度的作图,表现出紧密的以 0 为中心的高斯样分布(图 4A),这与其他人所述的情况类似(40、41)。两个生物学重复之间有显著的正相关性(Pearson 相关系数 $r=0.701$, $p<0.0001$),这表明能够将生物膜/浮游培养物的生长和样品的所有下游过程再现至令人满意的水平。为了确定哪些蛋白在两个生物学重复中都被一致地调控,构建了简单的排名表,其中根据蛋白的丰度比率,将它们分成 6 组(A-F),然后根据基于组的相关性,将它们排名为 1-6,并且当来自两个生物学重复的蛋白都落在相同的组时,排名为 1 的蛋白具有最高的相似性(图 4B)。利用排名表,我们能够确定,在从两个重复中所鉴定的 81 种(42%)蛋白中,有 34 种蛋白排名第一,这明显地高于随机相关性的期望值 17%(或 1/6)。大部分剩余的蛋白排名第二,因此,总共 70 种蛋白(86.4%)被认为在两个实验中都被类似地调控(排名为 1 或 2,表 2)。

[0166] 基于测量的 2:1BSA 标记实验的标准偏差(± 0.26)(表 1),当蛋白丰度变化与 1.0 的不同为标准偏差大于 3 时(大于 1.78 或者小于 0.56),认为蛋白丰度变化是生物学显著的(18、42)。利用这个标准,在两个重复中都鉴定的 81 种蛋白中,有 47 种蛋白的丰度明显地发生了变化(基于平均比率),并且其中 42 种蛋白排名为 1 或 2(表 2)。在排名为 1 和 2 的 42 种蛋白中,24 种蛋白的丰度明显地增加了,而 18 种蛋白的丰度下降了。

[0167] 表现出协调调控的代谢途径的酶

[0168] 在利用 ICAT 标记策略的血红素限制与血红素过量的研究中,鉴定了参与谷氨酸/天冬氨酸分解代谢的 20 种蛋白(表 3)。在这些蛋白中,鉴定了催化直接参与将谷氨酸代谢成丁酸的 8 个步骤中 6 个步骤的酶,并发现这些酶在血红素限制的条件下增加了 1.8-4 倍(图 6,表 3)。尽管利用 ICAT 没有检测到另外 2 种催化酶(PG0690, 4-羟丁酸 CoA-转移酶和 PG1066, 丁酸-乙酰乙酸 CoA-转移酶),但是在与表 3 中所报道的那些蛋白相当的高离子强度下,发现它们存在于另外的定性研究中(未显示),并且属于表现为受到上调的操纵子。另一方面,血红素限制对天冬氨酸分解代谢途径酶的丰度的影响是混合的,并且在氧化降解途径中催化天冬氨酸分解成草酰乙酸的酶没有发生变化,且参与将丙酮酸转换成乙酸的酶增加了 2-4.4 倍。

[0169] 经由天冬氨酸还原途径,共同催化富马酸转化成琥珀酸的两种含铁的富马酸还原酶即 FrdA(PG1615) 和 FrdB(PG1614) 的丰度,在血红素限制下培养的细胞中明显地降低了(图 6,表 3)。在操纵子中编码的这两种蛋白(Baughn et al., 2003),响应血红素限制,表

现出类似的丰度变化 (Frda L/E=0.35; FrdB L/E=0.25)。

[0170] 有机酸终产物的分析

[0171] 在生长于血红素限制下的牙龈卟啉单胞菌的已耗尽的培养基 (spent culture medium) 中, 乙酸、丁酸和丙酸的量分别是 13.09 ± 1.82 、 7.77 ± 0.40 和 0.71 ± 0.05 mmole/g 细胞干重。在生长于血红素过量下的牙龈卟啉单胞菌的已耗尽的培养基中, 乙酸、丁酸和丙酸的水平分别是 6.00 ± 0.36 、 6.51 ± 0.04 和 0.66 ± 0.07 mmole/g 细胞干重。

[0172] Frd 抑制剂对牙龈卟啉单胞菌生长的影响

[0173] 不同浓度的三种抗蠕虫剂奥克太尔、莫仑太尔和噻苯达唑在 50 小时内对牙龈卟啉单胞菌 W50 生长的影响示于图 7、8 和 9 中。如在以前报道的研究和 W50 单独的牙龈卟啉单胞菌的类似 MGT 中所见的 (43、44), DMSO 对生长的影响是可以忽略的。这三种抑制剂对牙龈卟啉单胞菌生长影响最严重的是奥克太尔 (图 7)。从生长曲线明显可见, 浓度大于 $15 \mu\text{M}$ 的奥克太尔对牙龈卟啉单胞菌的生长有正抑制。奥克太尔的最小抑菌浓度 (MIC) 如以前所述 (45) 经测定为 $112 \mu\text{M}$ 。如对奥克太尔的 subMIC 所见的, 奥克太尔渐增的浓度与较高的 MGT 还有显著的相关性 (图 7A)。莫仑太尔的杀菌效果可比较地低于奥克太尔, 并且 MIC 为约 3mM, 但是在 subMIC 下仍然表现出明显的抑制效果 (图 8)。噻苯达唑看起来对牙龈卟啉单胞菌的生长没有非常明显的抑制效果, 并且明显地要求大于 1mM 来表现轻微的生长抑制效果 (图 9)。综上所述, 不同的 Frd 抑制剂抑制效果的次序估计为奥克太尔 >> 莫仑太尔 > 噻苯达唑。

[0174] 亚最小抑菌浓度的奥克太尔对生物膜形成的影响

[0175] 将对牙龈卟啉单胞菌生长具有最严重影响的奥克太尔用于研究其对生物膜形成的影响。在生物膜检测中, 用牙龈卟啉单胞菌菌株 ATCC33277 代替 W50, 因为 W50 在大部分环境下仅形成不好的生物膜。由于奥克太尔对菌株 ATCC33277 的生长抑制效果类似于在 $125 \mu\text{M}$ 的浮游测定中对 W50 的生长抑制效果, 因此这代表了研究奥克太尔对生物膜形成的好的模型。低达 $0.1 \mu\text{M}$ 的亚最小抑菌浓度 (SubMIC) 的奥克太尔在 24h 时, 明显地减少了生物膜的质量 (图 10A), 尽管在 48h 时, 对生物膜质量具有抑制效果需要 $3.9 \mu\text{M}$ 或更高的浓度 (图 10B)。

[0176] 奥克太尔对生物膜分散的影响

[0177] 为了更仔细地研究 SubMIC 的奥克太尔对牙龈卟啉单胞菌生物膜的影响, 使用了流式细胞培养系统。当用奥克太尔处理成熟的生物膜时, 生物膜的深度和微菌落的大小有明显的减小 ($P < 0.01$), 而对照和处理样品之间的微菌落的数目没有明显变化 (图 11-13, 表 6)。

[0178] 从生物膜释放的牙龈卟啉单胞菌保持活力, 特别是用 $12.5 \mu\text{M}$ 奥克太尔处理的生物膜 (图 14)。与奥克太尔处理的细胞相比, 未处理的对照细胞看起来对分散更具有抵抗力。从生物膜回收的细胞的数目与在 CLSM 下所观察到的数目一致 (图 11-13), 并且对照样品中细胞的数目明显更多。

[0179] 上文的结果表明了蛋白丰度的变化, 该变化在浮游牙龈卟啉单胞菌粘附至固体表面并成长为成熟的单物种生物膜的一部分时发生。这是第一个利用 Gygi 小组的 geLC MS 方法 (46) 或 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 蛋白水解标记方法测定蛋白丰度变化的细菌生物膜与浮游生长的对比研究, 而到目前为止所公开的所有其他此类研究都利用了基于 2D 凝胶电泳的方法 (10-12)。

成功地利用了两个技术重复和两个生物学重复 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 反向标记方法定量和验证了蛋白丰度的变化。

[0180] 牙龈卟啉单胞菌的连续培养

[0181] 在本研究中,与分批培养的更常规的方法相反,以连续培养的方式培养牙龈卟啉单胞菌。由于诸如以下的批次之间的变化,分批培养向细菌分析中导入了大范围和程度的变量:接种体的大小和生存力、收获时细菌的准确生长阶段、培养基中可用营养物的水平以及培养基的氧化还原电势等。在连续培养中,使细菌在严格控制条件下生长许多代,该条件包括生长速率、细胞密度、营养物浓度、温度、pH 以及氧化还原电势 (44、47、48)。以前的研究证明,在不同实验室的恒化器中连续培养的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 转录物组分析的高水平的再现性 (49)。而且,在我们的研究中,生物膜细胞和浮游细胞这两者的生长都在单个发酵容器中进行,与分离培养相比,这减少了变异性。在 86.4% 已鉴定蛋白 (排名 1 和 2) 的生物学重复之间,本研究所观察到的牙龈卟啉单胞菌细胞外膜蛋白丰度的一致变化,表明连续培养系统和 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 蛋白水解标记策略适用于分析生物膜生长对牙龈卟啉单胞菌蛋白质组的影响。

[0182] ^{18}O 标记的效率

[0183] 由于 SDS-PAGE 方法提供的膜蛋白的高分辨率和可溶性,本研究所用的基本蛋白质组方法是 geLC MS 方法 (46、50)。在与其他人所述的方法 (26-29) 类似的凝胶内消化方法期间,将本方法与单个 ^{18}O 标记反应组合。有效的标记应当将两个 ^{18}O 原子并入至每个肽的 C-末端,并且应当抵抗与 ^{16}O 的反交换 (back-exchange)。在我们用 BSA 的研究中发现情况就是如此,其中单个 ^{18}O 原子的并入水平据估计小于 7%,并且发现各种 BSA 实验所获得的平均比率并未发现明显地偏好 ^{16}O (表 1),这表明与普通水的反交换不成为问题。对于生物学样品而言,也获得了类似的结果。有效的 ^{18}O 标记的关键步骤是需要完全除去天然 H_2^{16}O ,然后使用“单消化 (single-digestion)”方法,在胰蛋白酶消化前,将蛋白再溶解于 H_2^{18}O 中。尽管许多研究使用了“双消化 (double digestion)”方法 (51、52),但是该单酶切消化方法具有获得更高 ^{18}O 标记效率的优势,而在双消化方法中,某些胰蛋白酶消化的肽在初始消化后,不能将它们任何 C-末端 ^{16}O 原子交换为 ^{18}O 原子 (53)。我们还使用了凝胶内消化方法,其中如任何标准的凝胶内消化方法一样,利用有机溶剂,在初始脱水步骤期间,将蛋白保持在凝胶基质中。完全除去任何痕量的天然 H_2^{16}O 是在真空下,通过离心的冷冻干燥实现的,而蛋白仍然在凝胶基质中,以防止初始冷冻干燥步骤期间进一步吸附损失。在含有大量过量的胰蛋白酶的 H_2^{18}O 中进行再水合和凝胶内消化,该胰蛋白酶也在 H_2^{18}O 中被还原。在消化方法期间,并入了第一个 ^{18}O 原子后从凝胶中释放的胰蛋白酶消化的肽,可以进行过量的胰蛋白酶介导的第二个羰基氧交换过程。这应当促进第二个羰基氧的取代,因为释放的肽比蛋白具有更高的可溶性,从而获得更高水平的双重 ^{18}O 标记的胰蛋白酶消化的肽 (图 1 和 2; (54))。为了防止与普通水的反交换,通过煮沸使胰蛋白酶失活,这在以前就被证明是有效的 (51、54)。另外,在加样至纳米 LC 前,只将干燥、失活的混合物再悬浮并立即混合,以便将自发的交换降至最低,尽管这种自发交换已经被证实为是低的 (15、40)。

[0184] 反向标记

[0185] 在稳定的同位素标记和利用 MS 定量的情况下,在标记和离子化方法期间潜在地导入了误差。这些误差包括 MALDI 方法期间标记的潜在的不同亲和力,和重或轻标记的肽

的可能的抑制效果 (13、55)。常规技术重复包括重复相同的标记,能够导致对特定标记的未修正的偏差,或者由于污染峰而导致具体肽的随机误差的增加。我们的正常和反向标记的技术重复证明了高度的相关性,并且生物学重复 1 和 2 的散点图斜率分别为 0.97 ($R^2=0.92$) 和 0.93 ($R^2=0.82$) (图 3),这接近无标记偏差的预期比率 1.0。这些斜率还表明,该方法对于蛋白评估、凝胶加样、凝胶切割和凝胶内消化而言是可再现的。偏差的缺乏表明,诸如微阵列实验中常用的染料交换或 LOWESS 数据标准化的标准化途径 (35) 可能是不必要的。然而,当考虑轻微污染肽对 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比率的计算的影响以及需要验证变化极大的肽时,比本研究所用的细菌细胞外膜明显复杂的样品仍然要求反向标记验证。除了提供修正系统误差的评估和方法以外,反向标记设计还有助于使重和轻标记的肽这两者都易于鉴定,因为 MS/MS 采集方法只选择片段的每个重 / 轻对中最强的肽。通过这种方式,减少了错误分配的可能性。据我们所知,除了最近的 17 种细胞色素 P450 蛋白的定量 (26、30) 以外,这是在复杂生物样品中的第一个反向 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 标记的报道。

[0186] 生物膜与浮游培养

[0187] 我们已经证明了生物学重复之间强烈的正相关性 ($r=0.701, p<0.0001$),这表明了生物膜形成和发展的再现性。通过观察到 81 种可定量的蛋白中的 70 种蛋白在两个生物学重复中都表现出类似的比率这一发现,也观察到了这一情况 (表 2, 排名 1 或 2)。超过四分之三的本研究所鉴定的牙龈卟啉单胞菌蛋白是通过大于 2 个的特异性肽段鉴定的,这进一步增加了本标记方法的鉴定和定量的置信度。在从两个生物学重复都一致地鉴定的 81 种蛋白中,47 种蛋白的丰度在从浮游至生物膜状态的转变中明显地变化了。检测到的蛋白质组,特别是细胞外膜中蛋白质组的丰度百分比的变化,与对诸如绿脓假单胞菌的生物膜形成细菌的其他研究是一致的,其中超过 50% 的检测的蛋白质组在浮游和成熟生物膜生长期之间表现出明显的丰度变化 (12)。我们还观察到牙龈卟啉单胞菌的细胞外膜蛋白质组中对作为生物膜生长的各种应答。还发现以前被证明对生物膜培养做出反应而丰度发生变化的许多蛋白在我们的研究中丰度也发生了变化。明显地发现某些蛋白的丰度变化高达 5 倍 (表 2),这表明了对生物膜培养做出反应的蛋白质组的主要变化。

[0188] 代谢

[0189] 牙龈卟啉单胞菌的主要能量来源是源自氨基酸的发酵,该氨基酸是通过宿主蛋白的蛋白水解以肽的形式获得的 (47、80、81)。牙龈卟啉单胞菌的主要分解代谢途径是谷氨酸和天冬氨酸的发酵,其中谷氨酸被代谢为丁酸、丙酸和氨,而天冬氨酸被代谢为丁酸、丙酸、乙酸和氨 (图 6)。以前的报道已经表明牙龈卟啉单胞菌优先使用来自培养基的天冬氨酸 / 天冬酰胺、谷氨酸 / 谷氨酰胺、苏氨酸、丝氨酸、亮氨酸和缬氨酸 (47、81、82)。

[0190] 与谷氨酸分解代谢有关的两种牙龈卟啉单胞菌蛋白, PG1076 ($L/E=1.8$) 和 PG1078 ($L/E=2.0$) 的丰度在血红素限制期间明显地增加了。这些蛋白由排列在预测的大操纵子的 15 个基因编码。这些基因的上游是编码丰度在血红素限制期间也增加的推断蛋白和保守的推断蛋白的两个基因 (分别是 PG1067, $L/E=2.4$ 和 PG1068, $L/E=1.7$)。这个大操纵子的分析还表明,以许多铁调控基因为特征的推断的 Fur 共有序列结合区 (83),这表明这种表达可能被铁的可用性所控制。尽管我们预期操纵子中所有编码的蛋白的倍数变化是相同的,但是在所有的情况下这并不都是必需的,因为转录物水平有时不与蛋白水平关联 (84)。这可能是由于翻译后修饰或者转录物的稳定性,从而允许细胞事件的基本调控在蛋

白水平上发生,而 mRNA 的丰度无明显变化。

[0191] 由两种细胞质酶 FrdA(1615) 和 FrdB(1614) 以及跨膜的酶 FrdC(1616) 组成的异源三聚琥珀酸-醌氧化还原酶(SQOR)复合物经由天冬氨酸途径将富马酸催化转化成琥珀酸。两种细胞质富马酸还原酶, FrdA(PG1615) 和 FrdB(PG1614) 的丰度在血红素限制(分别是 3 和 4 倍)和生物膜生长(分别是 17 和 5.9 倍)中培养的细胞中明显地下降了。在操纵子中编码的这两种蛋白(85)对血红素限制(FrdA L/E=0.35;FrdBL/E=0.25)和生物膜生长(FrdA B/P=0.06;FrdB B/P=0.17)都表现出类似的丰度变化。以前在脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)中的研究表明,血红素对于细胞色素 b 依赖的 Frd 复合物的合成是必需的(86)。考虑到牙龈卟啉单胞菌不能从头合成 PPIX,因而在血红素限制生长条件下的牙龈卟啉单胞菌中观察到较低水平的 Frd 并不奇怪。脆弱拟杆菌和牙龈卟啉单胞菌这两者的生长研究表明,它们的生长要求血红素,并且这种要求能够部分地被外源琥珀酸代替(87、88)。利用生长不被血红素刺激而被添加的琥珀酸刺激的脆弱拟杆菌 Frd 缺陷突变体也证实了这个观察结果(85)。摩尔生长量研究还表明,脆弱拟杆菌 Frd 缺陷突变体具有类似于血红素限制野生型菌株的 ATP 产量。在最优生长期间,琥珀酸被转化成琥珀酰 CoA,以用于进入能量产生途径或用于必需氨基酸(赖氨酸和甲硫氨酸)的生物合成。这些研究证明了将天冬氨酸转化成琥珀酸对平衡生长的重要性。在血红素过量的条件下,被牙龈卟啉单胞菌分解代谢的一部分天冬氨酸通过富马酸还原酶(FrdA 和 FrdB)开始被还原成琥珀酸,然后通过谷氨酸途径被分解代谢而产生丁酸(图 6)。在血红素限制期间,这些富马酸还原酶丰度的降低 3-4 倍,表明较少的天冬氨酸将进入谷氨酸分解代谢途径,因此大部分分解代谢的天冬氨酸将经由氧化途径被转化成乙酸(图 6)。为了检验这个假设,我们在以连续培养方式培养的牙龈卟啉单胞菌的耗尽培养基上进行了有机酸分析。这个研究表明与在血红素过量条件下产生的乙酸水平($6.00 \pm 0.36 \text{ mmole/g}$ 细胞干重)相比,在血红素限制条件下产生了 2 倍多的乙酸($13.09 \pm 1.82 \text{ mmole/g}$ 细胞干重),而其他主要的终产物,丁酸和丙酸的水平在两种生长条件下是类似的。这与我们天冬氨酸发酵所用的途径有偏移的假设是一致的。催化丙酮酸转化成乙酸的酶(乙酸激酶 PG1081、磷酸转乙酰酶 PG1082 和丙酮酸铁氧还蛋白 PG0548)的丰度的增加也与在耗尽培养基中发现的乙酸的量的增加是一致的(表 2;图 6)。

[0192] 因此,这些结果促使我们研究通过抑制这种脆弱的代谢调控途径来控制细菌的方法。

[0193] 富马酸还原酶抑制剂对生长的影响

[0194] 我们已经证明了在牙龈卟啉单胞菌的生物膜生长期间 Frd 复合物的丰度下降 17.0 倍和 5.9 倍(分别是 FrdA 和 FrdB),这甚至大于血红素限制生长期间 FrdA 和 FrdB 下降 3 倍和 4 倍。Frd 复合物一致的较低丰度与细菌生长减少相关,该细菌生长减少既与生物膜生长条件期间和血红素限制生长条件期间两者的血红素限制有关。Smith 等人(89)以前证明,曲状杆菌(*Campylobacter* spp)的 Frd 活性在对数生长的培养物中更高,但是在进入稳定期时下降。因此,这表明 Frd 活性限制了生长速率,这使 Frd 显得重要而成为吸引人的新治疗靶标。富马酸呼吸是最广泛类型的厌氧呼吸,并且是唯一的代谢中间体,该代谢中间体已知充当电子受体,产生约 0.5ATP/电子,形成终产物琥珀酸(90)。Shah 和 William(91)报道,牙龈卟啉单胞菌从天冬氨酸产生琥珀酸,并且 Takahashi 等人(81)认为产生的琥珀

酸被转化成琥珀酰 CoA, 然后该琥珀酰 CoA 被转化成丁酸或丙酸。

[0195] 已证明通常用于治疗动物和人的蠕虫感染的抗蠕虫剂, 对幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 和空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 有抑制和杀菌效果 (89、94)。已经证实, 这些药物中的一种, 奥克太尔是幽门螺旋杆菌 (*H. pylori*) 和空肠弯曲杆菌 (*C. jejuni*) 的富马酸还原酶的抑制剂, 可能通过未知的机制作用于 Frd 复合物的亲水亚基 (94-96)。

[0196] 有趣的是, 并非所有的厌氧菌具有 Frd, 并且当 Frd 被抑制时, 具有 Frd 的某些细菌具有用于生存的替代生化途径 (97、98)。因此, 牙龈卟啉单胞菌的生存力受到 Frd 抑制剂存在的严重影响这一发现 (图 7-10) 表明, 生长绝对必须的酶和来自天冬氨酸途径的 ATP 的贡献, 在牙龈卟啉单胞菌的幸存中起关键的作用。由于人和其他动物缺乏 Frd 复合物 (92、93), 所以 Frd 抑制剂提供了抗病原体导致的疾病的靶标, 特别是那些对 Frd 有基本需求的病原体。

[0197] 富马酸还原酶抑制剂对生物膜形成的影响

[0198] 下文示出 Frd 抑制剂对牙龈卟啉单胞菌形成生物膜的能力的影响。subMIC 奥克太尔浓度下生物膜质量的减少是非常有趣的, 因为这表明存在最佳的生物膜形成所要求的最小量的 Frd 或能量。

[0199] subMIC 浓度的 Frd 抑制剂对 Frd 的部分抑制能够被转换成, 例如营养不良环境中的类似信号。例如, 在包括绿脓假单胞菌和大肠杆菌在内的许多细菌中详细地记录了碳调控的生物膜形成, 因此在营养限制的条件下, 该生物膜形成被诸如 RpoS、Crc 和 CsrA 的转录调节子所调节 (99-101)。在大肠杆菌中, *csrA* 基因编码整体调节蛋白即 CsrA (碳储存调节子), 该调节蛋白抑制某些代谢途径, 例如糖原合成和糖原异生 (101、102)。大肠杆菌中 *csrA* 的破坏导致生物膜形成增强 (101、103), 并且有趣的是, 由于 CsrA 对其他靶标的影响, 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 中 CsrA 同源物的激活导致上皮细胞侵入的增加 (104、105)。因此, 非常吸引人的推断是, 由于 Frd 活性降低引起的 ATP 水平较低, 血红素限制的牙龈卟啉单胞菌不大可能形成生物膜, 因为包括内化蛋白 (internalin) 在内的这些宿主细胞侵入蛋白被上调以促进逃入上皮细胞中, 直至营养缺乏结束。

[0200] 与浮游状态相比, 生物膜状态期间的糖酵解酶, 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的丰度更高, 这与以前从单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 和绿脓假单胞菌获得的结果是一致的 (12、106)。尽管 GAPDH 被分类为与糖酵解和糖异生有关的四聚 NAD 结合酶, 但是许多报道认为这种蛋白是多功能的, 并且当表达于革兰氏阳性菌的细胞表面时, 其看起来与纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原和转铁蛋白的结合有关 (107、108)。有趣的是, 已证实口腔链球菌 (*Streptococcus oralis*) 和牙龈卟啉单胞菌 33277 之间的共聚集, 是由牙龈卟啉单胞菌菌毛和口腔链球菌 GAPDH 之间的相互作用介导的 (109)。然而, 如果存在, GAPDH 在牙龈卟啉单胞菌的底物结合中的确切作用还不得而知。

[0201] 生物膜形成

[0202] 与生物膜细胞相比, 浮游细胞中通用应激蛋白 (universal stress protein) (UspA) 的丰度明显更高。发现各种细菌中 Usp 的产生受大量条件刺激, 例如进入稳定期、某些营养物的缺乏、氧化剂或其他刺激物 (110、111)。浮游期细胞丰度的增加与以下事实一致, 即牙龈卟啉单胞菌已经进化成作为生物膜的一部分而生长, 以及浮游期可能更有压

力。牙龈卟啉单胞菌中 UspA 的表达被认为与生物膜形成有关,因为 uspA 的失活导致由浮游细胞形成的早期生物膜变薄 (112)。在本研究中,生物膜已经建立并成熟,因此其看起来对 UspA 的需求不如自由漂浮的浮游细胞。

[0203] 发现内化蛋白家族蛋白 InlJ (PG0350) 的同源物的丰度在生物膜状态期间更高。已经证实, PG0350 对牙龈卟啉单胞菌 33277 的生物膜形成是重要的,因为基因的失活导致生物膜的形成减少 (39)。生物膜中更高水平的 PG0350 表明,这种蛋白可能不仅是初始生物膜形成必需的,而且还充当使牙龈卟啉单胞菌互相结合或与生物膜中的细胞外基质结合的粘附素。

[0204] 功能未知的蛋白

[0205] 本研究中鉴定的最大的组的蛋白是 41 种功能未知的蛋白,其包括在本研究中首次鉴定的 4 种蛋白 (表 2)。在 41 种鉴定的蛋白中,预测 37 种蛋白来自细胞外膜,并且在这一组中,17 种蛋白在生物膜和浮游细胞之间表现出明显的变化。大部分这些蛋白与有确定的名字但是功能还不明确的 GenBank 蛋白具有同源性。特别令人感兴趣的是,发现某些蛋白的丰度在生物膜状态中基本上一致地增加,所述蛋白即 PG0181、PG0613、PG1304、PG2167 和 PG2168。

[0206] 上文的结果表明应用于复杂混合物的 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 蛋白水解标记方法的大规模验证,并且首次用该方法比较细菌生物膜和浮游生长状态。发现多种具有各种功能的蛋白的丰度,在生物膜细胞中一致地增加或减少,这表明了细胞是如何适应生物膜条件的,并且还还为生物膜控制策略提供了潜在的靶标。

实施例

[0207] 为了帮助示例体现本发明的涉及治疗的方面的组合物,提供了下文的实施例。

[0208] 下文是牙膏制剂的实施例。

[0209]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
二水磷酸氢钙	50.0
甘油	20.0
羧甲基纤维素钠	1.0
十二烷基硫酸钠	1.5
月桂酰肌氨酸钠	0.5
食用香料	1.0
糖精钠	0.1
葡萄糖酸氯己定	0.01
葡聚糖酶	0.01
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.2
水	平衡

[0210] 下文是牙膏制剂的实施例。

[0211]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
二水磷酸氢钙	50.0
山梨醇	10.0
甘油	10.0
羧甲基纤维素钠	1.0
十二烷基硫酸钠	1.5
月桂酰肌氨酸钠	0.5
食用香料	1.0
糖精钠	0.1
单氟磷酸钠	0.3
葡萄糖酸氯己定	0.01
葡聚糖酶	0.01
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.2
水	平衡

[0212] 下文是牙膏制剂的实施例。

[0213]

[0214]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
二水磷酸氢钙	50.0
山梨醇	10.0
甘油	10.0
羧甲基纤维素钠	1.0
月桂酰二乙醇胺	1.0
蔗糖单月桂酸酯	2.0
食用香料	1.0
糖精钠	0.1
单氟磷酸钠	0.3
葡萄糖酸氯己定	0.01
葡聚糖酶	0.01
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.1
水	平衡

[0215] 下文是牙膏制剂的实施例。

[0216]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
山梨醇	22.0
爱尔兰藓	1.0
氢氧化钠(50%)	1.0
Gantrez	19.0
水(去离子)	2.69
单氟磷酸钠	0.76
糖精钠	0.3
焦磷酸	2.0
水合氧化铝	48.0
风味油(flavouring oil)	0.95
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.3
十二烷基硫酸钠	2.00

[0217] 下文是液体牙膏制剂的实施例。

[0218]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
聚丙烯酸钠	50.0
山梨醇	10.0
甘油	20.0
食用香料	1.0
糖精钠	0.1
单氟磷酸钠	0.3
葡萄糖酸氯己定	0.01
乙醇	3.0
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.2
亚油酸	0.05
水	平衡

[0219] 下文是漱口剂制剂的实施例。

[0220]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
乙醇	20.0
食用香料	1.0
糖精钠	0.1
单氟磷酸钠	0.3
葡萄糖酸氯己定	0.01
月桂酰二乙醇胺	0.3
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.2
水	平衡

[0221] 下文是漱口剂制剂的实施例。

[0222]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
Gantrez® S-97	2.5
甘油	10.0
风味油	0.4
单氟磷酸钠	0.05
葡萄糖酸氯己定	0.01
月桂酰二乙醇胺	0.2
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.3
水	平衡

[0223]

[0224] 下文是锭剂制剂的实施例。

[0225]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
糖	75-80
玉米糖浆	1-20
风味油	1-2
NaF	0.01-0.05
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.3
硬脂酸镁	1-5
水	平衡

[0226] 下文是牙龈按摩膏制剂的实施例。

[0227]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
白矿脂	8.0
丙二醇	4.0
十八烷醇	8.0
聚乙二醇 4000	25.0
聚乙二醇 400	37.0
蔗糖单硬脂酸酯	0.5
葡萄糖酸氯己定	0.1
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.3
水	平衡

[0228] 下文是牙周凝胶制剂的实施例。

[0229]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
普卢龙尼克 F127 (来自 BASF)	20.0
十八烷醇	8.0
双羟萘酸奥克太尔	3.0
胶态二氧化硅(例如, Aerosil® 200™)	1.0
葡萄糖酸氯己定	0.1
水	平衡

[0231] 下文是口香糖制剂的实施例。

[0232]

<u>成分</u>	<u>% w/w</u>
香糖胶基	30.0
碳酸钙	2.0
结晶山梨醇	53.0
甘油	0.5
风味油	0.1
生物膜抑制剂(双羟萘酸奥克太尔)	0.3
水	平衡

[0233] 表 1 :利用 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 蛋白水解标记预测定的 BSA 比率的定量

[0234]

预期比率 1:1a)	3 次分析			平均比率 ($\pm$ SD)	
CCTESLVNR	0.83	0.84	0.88	0.85 $\pm$ 0.03	
DLGEEHFK	0.95	1.06	0.85	0.95 $\pm$ 0.10	
EACFKVEGPK	1.09	1.12	1.09	1.10 $\pm$ 0.02	
ECCDKP LLEK	1.01	0.96	0.87	0.94 $\pm$ 0.07	
EYEATLEECCA K	1.05	1.01	1.05	1.04 $\pm$ 0.02	
LVTDLTKVHK	0.86	0.91	1.02	0.93 $\pm$ 0.08	
RHPEYAVSVLLR	1.07	0.96	0.94	0.99 $\pm$ 0.07	
YICDNQDTISSK	1.00	1.15	1.03	1.06 $\pm$ 0.08	
平均值	0.98 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.10	0.97 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.08	
所有肽 ID**的平均值				0.98 $\pm$ 0.12	
所有肽 ID 的 CV				13.1%	
	预期比率 2:1 b) ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$)	预期比率 1:2 b) ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$)			
QTALVELLK	1.92	0.44 (2.27)	2.10		
LVNELTEFAK	2.45	0.46 (2.17)	2.31		
RHPEYAVSVLLR	1.82	0.42 (2.36)	2.09		
LGEYGFQNALIVR	2.21	0.43 (2.31)	2.26		
MPCTEDYLSLILNR	2.59	0.40 (2.50)	2.55		
KVPQVSTPTLVEVSR	2.35	0.39 (2.57)	2.46		
LFTFHADICTLPDTEK	1.72	0.44 (2.27)	2.00		
RPCFSALTPDETYVPK	1.82	0.52 (1.92)	1.87		
平均值	2.11 $\pm$ 0.33	2.30 $\pm$ 0.20	2.24 $\pm$ 0.24		
所有肽 ID***的平均值			2.22 $\pm$ 0.26		
所有肽 ID 的 CV			11.75%		
预期比率 1:5		预期比率 10:1			
	($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$)		<th>($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$)</th>		($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$)
AEFVEVTK	0.232 (4.32)	AEFVEVTK	12.38		
CCTESLVNR	0.184 (5.42)	QTALVELLK	10.40		
SHCIAEVEK	0.176 (5.67)	LVNELTEFAK	14.17		
ECCDKP LLEK	0.169 (5.91)	FKDLGEEHFK	9.41		
HPEYAVSVLLR	0.218 (4.58)	HPEYAVSVLLR	11.76		
YICDNQDTISSK	0.187 (5.36)	YICDNQDTISSK	10.16		
LKECCDKP LLEK	0.252 (3.97)	RHPEYAVSVLLR	10.14		
SLHTLFGDELCK	0.183 (5.45)	SLHTLFGDELCK	7.58		
RHPEYAVSVLLR	0.201 (4.97)	EYEATLEECCA K	14.07		
VPQVSTPTLVEVSR	0.206 (4.86)	ETYGDMADCCEK	12.67		
ECCHGDLLECADDR	0.298 (3.35)	LGEYGFQNALIVR	9.36		
LFTFHADICTLPDTEK	0.210 (4.76)	VPQVSTPTLVEVSR	8.34		
		KVPQVSTPTLVEVSR	8.86		
		LFTFHADICTLPDTEK	11.08		
		RPCFSALTPDETYVPK	10.26		
平均值	0.210 $\pm$ 0.04 (4.90 $\pm$ 0.75)		10.74 $\pm$ 2.04		
所有肽 ID 的 CV	15.26%		18.95%		

[0235] a) 对于 1:1 的预期比率, 仅将在所有三个独立实验中都被鉴定的肽包括于本表格中

[0236] b) 对于 2:1 和 1:2 的预期比率, 仅将在两个实验中都被鉴定的肽包括于本表格中

[0237] **n=55***n=24

[0238] 表 2: 从两个牙龈卟啉单胞菌细胞外膜组分的生物学重复中都鉴定的 81 种蛋白的列表。丰度比率大于 1 表示蛋白在生物膜状态比浮游状态中的丰度更高。如果某种蛋白的比率偏离预测定的 BSA 比率超过 3 倍 SD (0.26) (大于 1.78 或小于 0.56), 则认为该蛋白发生了显著的改变。基于它们的平均比率, 灰色高亮的蛋白代表显著的改变。

[0239]

		生物学重复 1				生物学重复 2						
Tigr 编号	蛋白	定位	用于定量的肽的编号	Mascot 得分 b	正常比率 (B/P) c	SEd	用于定量的肽的编号	Mascot 得分	正常比率 (B/P)	SE	所有肽段	排名 (组) e
CTD 家族蛋白												
	蛋白酶											
PG0232	锌肽酶, CPG70	OM	13	71/20	1.67	0.08	26	74/21	2.53	0.08	15	3 (DF)
PG0553	细胞外蛋白酶, 赖氨酸内肽酶前体 (API)	OM/EX	1	65/23	3.33		2	62/19	3.45		2	1 (FF)
PG1424	肽基精氨酸脱羧酶	PP	9	86/22	0.49	0.05	15	89/20	3.16	0.33	10	4 (BF)
PG1837	血细胞凝集素蛋白 HgaA	OM	3 (15)*	59/20	2.73	0.44	3 (15)*	42/21	4.21	0.36	3	1 (FF)
PG1844	赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶	OM	3 (13)*	78/20	0.43	0.04	9 (24)*	77/18	0.40	0.04	10	1 (BB)
PG2024	精氨酸特异性蛋白酶 ArgI 多聚蛋白 (RgpA)	OM	3 (12)*	76/22	1.63	0.10	3 (22)*	72/20	3.78	0.61	4	3 (DE)
	血红素结合											
PG0616	硫氧还蛋白, 推断的	PP/CY	14	96/20	2.23	0.20	14	96/20	3.69	0.20	6	2 (EF)
	生物膜相关的											
PG0350	内化蛋白相关的蛋白	OM/EX	2	42/21	1.99		2	53/21	4.27		3	2 (EF)
	功能未知的蛋白											
PG1798	免疫反应性的 46 kDa 抗原 PG99	PP/EX	1	36/20	5.94		1	30/21	4.07		1	1 (FF)
PG2216	未命名的蛋白 (保守的)	OM/EX	2	36/22	0.72	NA	4	51/21	0.68	0.06	3	1 (CC)
转运												
PG0669	血红素结合蛋白 IhtB	OM	16	120/21	0.25	0.03	14	69/20	0.16	0.02	6	1 (AA)
PG0707	依赖 TonB 的受体, P92	OM	5	110/21	0.14	0.02	30	117/20	0.31	0.04	17	1 (AA)
PG0782	MotA/TolQ/ExbB 质子通道家族蛋白	IM	7	80/19	0.86	0.14	4	78/19	0.92	0.12	7	1 (CC)

[0240]

Tigr 编号	蛋白	生物学重复 1				生物学重复 2				所有特异性 数据	命名 (组) c
		定位	用于定量 的肽的编 号	Mascot 得分 b	正常比 (B/P) c	SEd	用于定量 的肽的编 号	Mascot 得分	正常比 (B/P)	SE	
PG1006	推断的依赖 TonB 的受体	OM/EX	6	59/21	1.42	0.12	9	90/20	1.50	0.11	7
PG1414	TonB 连接的外膜受体, PG47	OM	11	88/21	3.81	0.43	3	49/19	3.69	NA!	7
PG1551	HmuY 蛋白	UN	4	75/20	2.57	0.71	4	74/20	2.78	0.21	1
PG1626	可能的与外膜有关的蛋白 P58 (推断的血红素受体蛋白)	OM	41	113/21	2.37	0.22	37	122/19	3.68	0.26	17
PG2008	依赖 TonB 的受体, P90	OM	24	68/21	2.08	0.17	26	112/20	3.12	0.21	20
PG0185	RagA 蛋白	OM	58	89/21	0.42	0.02	109	126/20	0.79	0.04	24
PG0186	脂蛋白 RagB	OM	51	142/22	0.34	0.04	56	142/19	0.26	0.02	24
PG1010	ABC 转运蛋白, ATP 结合蛋白	IM	1	69/21	1.41		2	60/19	1.26		2
PG1762	蛋白质外排膜蛋白 SecD/蛋白 质外排膜蛋白 SecE	IM	14	91/22	0.76	0.07	4	99/20	0.48	0.09	10
PG2082	POT 家族蛋白	IM	13	75/23	0.80	0.06	6	48/22	0.52	0.10	4
铁/血红素储存和氧化应激应答											
PG0090	Dps 家族蛋白	CY	3	72/19	1.37	0.15	1	40/21	1.27		2
PG1286	铁蛋白	CY	5	73/22	1.50	0.04	7	124/19	2.42	0.14	3
生物膜和相关疾病											
PG0159	内肽酶 PepO	PP/CY	8	122/20	0.35	0.08	3	60/19	0.18	NA!	3
PG0245	通用应激蛋白	CY	1	67/22	0.41		2	64/20	0.25		1
PG2132	菌毛蛋白	EX	1	31/22	1.14		2	66/20	0.85		3
能量代谢											
PG0249	草酰乙酸脱羧酶, 推断的	CY	1	44/22	3.50		1	37/21	2.00		1
PG0306	电子传递复合体, Rnf/ABCDGE 型, G 亚基	PP	2	108/22	1.08		1	61/19	0.72		1
PG1084	硫氧还蛋白家族蛋白	CY	2	87/22	1.07		1	132/20	0.14		1
PG1612	甲基丙二酰基-CoA 脱羧酶, α	CY	1	65/21	0.73		2	55/21	0.42		1

[0241]

Tigr 编号	蛋白	生物学重复 1				生物学重复 2				所有特异性 数据	排名 (组) c
		定位	用于定量 的肽的编 号	Mascot 得分 b	正常比 (B/P) c	SEd	用于定量 的肽的编 号	Mascot 得分	正常比 (B/P)	SE	
PG1614	亚基 (nmtdA)										
PG1614	富马酸还原酶, 铁-硫蛋白 (frdB)	UN	2	60/20	0.15		2	53/21	0.19		1 (AA)
PG1615	富马酸还原酶, 黄素蛋白亚基 (frdA)	UN	3	58/19	0.06	NA!	1	43/20	NA**		NA
PG1704	硫醇; 二硫化物交换蛋白 dsbD, 推斯的	IM	3	64/23	2.14		3	68/20	0.46	0.08	4 (EB)
PG2181	NADH: 泛醌氧化还原酶, Na 转运, B 亚基 (nqrB)	IM	1	91/21	1.32		1	69/20	0.38		3 (DB)
PG2124	3-磷酸甘油醛脱氢酶	CY	3	105/22	3.39	0.62	2	94/19	2.45		2 (FE)
PG2157	谷氨酸环化转移酶相关蛋白	PP/EX	2	70/21	0.11		3	53/20	0.45	NA!	2 (AB)
核糖体蛋白											
PG0167	核糖体蛋白 L25	CY	4	57/20	0.27	0.05	2	50/21	0.30		3 (AA)
PG0375	核糖体蛋白 L13 (rplM)	CY	2	69/21	0.28		1	116/20	0.18		1 (AA)
PG0392	核糖体蛋白 L10 (rplJ)	CY	2	97/21	0.33		5	68/22	0.37	0.02	2 (AB)
PG0393	核糖体蛋白 L7/L12	CY	6	81/20	0.68	0.03	4	79/21	0.56	0.03	2 (CB)
功能未知的蛋白											
完整的外膜蛋白											
PG0027	可能完整的外膜蛋白 P40	OM	11	143/21	0.74	0.06	23	111/20	0.81	0.02	1 (CC)
PG0613	可能的外膜相关蛋白 P23	EX	3	55/19	4.41	0.56	1	43/20	3.24		1 (FF)
PG0694	外膜蛋白 40	OM	37	116/20	3.62	0.37	77	86/20	3.39	0.24	1 (FF)
PG0695	外膜蛋白 41	OM	100	110/21	2.31	0.21	53	124/19	3.18	0.20	2 (EF)
PG1652	可能完整的外膜蛋白 P64	OM	2	53/20	1.04		14	67/20	1.70	0.27	5 (CD)
PG1786	可能完整的外膜蛋白 P30	EX/OM	5	56/21	0.99	0.17	5	56/26	1.33	0.08	3 (CD)
PG1823	可能完整的外膜蛋白 P20	PP/OM	26	117/21	0.39	0.03	18	91/20	0.98	0.10	7 (BC)
PG2106	可能完整的外膜蛋白 P22	IM/OM	15	73/20	0.31	0.04	13	103/17	0.45	0.04	7 (AB)
脂蛋白											
PG0188	脂蛋白, 推斯的	PP/EX	7	72/23	0.92	0.09	4	40/20	1.18	0.11	5 (CD)

[0242]

		生物学重复 1					生物学重复 2						
Tigf 编号	蛋白	定位	用于定量 的肽的编号	Mascot 得分 b	正常比 (B/P) c	SEd	用于定量 的肽的编号	Mascot 得分	正常比 (D/P)	SE	所有特殊 肽段	排名 (组) c	
PG0241	脂蛋白, 推断的	OM/EX	4	93/20	0.45	0.08	2	44/20	0.16		3	2 (BA)	
PG0906	脂蛋白, 推断的	PP/CY	1	42/22	0.48		5	97/20	0.40	0.05	3	1 (BB)	
PG2173	外膜脂蛋白 Omp28	PP/OM	8	109/22	0.77	0.1	12	89/18	0.71	0.04	7	1 (CC)	

[0243]

Tigr 编号	蛋白	生物学重复 1				生物学重复 2				所有特异性肽段	排名 (组) e
		定位	用于定量的肽的编号	Mascot 得分 b	正常比率 (B/P) ^c	SEd	用于定量的肽的编号	Mascot 得分	正常比率 (B/P)	SE	
	其他蛋白										
PG0179	未命名的蛋白(保守的)	PP/EX	1	64/22	1.23		1	61/19	3.55		3 (DF)
PG0181	免疫反应性的 32 kDa 抗原 PG49	PP/OM	4	46/20	2.08	0.84	1	31/21	3.14		2 (EF)
PG0217f	未命名的蛋白	OM	4	74/21	1.58	0.34	7	79/18	1.78	0.07	2 (DE)
PG0218	未命名的蛋白	OM	4	61/20	2.10	0.55	11	55/20	1.59	0.17	2 (ED)
PG0287f	未命名的蛋白	IM/OM	3	77/21	1.32	0.06	7	53/20	1.90	0.21	2 (DE)
PG0409	未命名的蛋白(保守的)	PP	4	82/22	2.20	0.38	2	69/19	2.28		1 (EE)
PG0423	未命名的蛋白(保守的)	CY	2	90/23	3.62		1	72/21	0.68		1
PG0432	未命名的蛋白(保守的)	OM	1	53/20	0.39		3	81/20	0.40	0.11	2
PG0448	未命名的蛋白(保守的)	OM	11	74/22	1.05	0.11	10	58/20	1.44	0.08	7
PG0449	TPR 结构域蛋白	PP	2	68/23	1.28		1	64/18	1.19		1
PG0602	未命名的蛋白(保守的)	OM	3	63/21	0.65	0.07	1	37/21	NA**		2
PG0914	未命名的蛋白	OM	1	66/21	2.23		1	27/22	2.91		2
PG1028	TPR 结构域蛋白	PP	2	78/21	0.37		5	70/19	0.48	0.08	4
PG1035	未命名的蛋白(保守的)	OM	1	42/21	0.31		5	62/21	1.16	0.16	3
PG1304	未命名的蛋白(保守的)	OM	3	52/20	2.80	1.00	1	34/20	2.93		1
PG1356	未命名的蛋白(保守的)	CY	2	60/21	0.31		1	43/21	0.12		2
PG1382	未命名的蛋白(保守的)	OM	3	63/21	1.89	0.29	1	51/21	4.43		2
PG1493	未命名的蛋白(保守的)	OM	6	67/22	1.85	0.15	8	79/17	2.20	0.17	13
PG1621	未命名的蛋白(保守的)	OM	2	51/21	1.10		4	60/21	0.42	0.05	2
PG1684f	未命名的蛋白	EX/IM	1	58/22	1.25		1	73/20	0.79		1
PG1715	未命名的蛋白(保守的)	OM	4	51/20	1.10	0.04	13	71/20	0.97	0.14	3
PG1881	未命名的蛋白(保守的)	OM	2	49/22	0.61		4	48/19	0.82	0.16	3
PG1889f	未命名的蛋白	CY	12	99/20	0.16	0.02	8	85/20	0.25	0.03	6
PG2049	未命名的蛋白	IM/CY	3	48/21	0.63	0.06	1	27/21	0.82		1
PG2167	免疫反应性的 53 kDa 抗原 PG123	OM	7	64/20	2.84	0.73	4	45/20	2.26	0.06	3

[0244]

		生物学重复 1					生物学重复 2						
Tigr 编号	蛋白	定位	用于定量 的肽的编 号	Mascot 得 分 b	正常比 率 (B/P) ^c	SEd	用于定量 的肽的编 号	Mascot 得 分	正常比 率 (B/P)	SE	所有特异性 肽段	排名 (组) e	
PG2168	未命名的蛋白(保守的)	UN	3	47/21	4.90	1.97	4	74/21	2.04	0.14	4	2 (FE)	
PG2174	未命名的蛋白	OM	5	58/21	0.78	0.06	15	102/21	0.37	0.04	7	2 (CB)	

a 通过 CELLO 程序测定的定位 ;EX :细胞外, OM :外膜, IM :内膜, PP :外周胞质, CY :细胞质 ;UN :未知

- [0245] b 最大 Mascot 肽离子得分 / 鉴定阈值
- [0246] c 标准化的比率 ;B= 生物膜, P= 浮游, 标准化方法如实验方法所述
- [0247] d SE= 平均标准误差
- [0248] e 如图 4B 所述的排名和分组
- [0249] f 仅在本研究中鉴定的蛋白
- [0250] ! 由于 3 肽中的一个肽未分辨 / 重叠, 未进行 SE 测量
- [0251] * 由于在这些蛋白之间存在鉴定的肽, 比率仅源自对这些蛋白是单一的肽。括号内的值是匹配的肽的总数。
- [0252] ** 由于未分辨 / 重叠的峰
- [0253] 表 3 : 与血红素过量相比, 生长于血红素限制下的牙龈卟啉单胞菌中与谷氨酸 / 天冬氨酸分解代谢有关的基因产物的蛋白质组和转录物组分析。阴影表示预测在操纵子中编码的蛋白。

[0254]

编号	Tigr 登录号	鉴定的蛋白和肽序列	得分 ¹	N ²	n-ICAT ³	蛋白质组倍数变化 ⁴	SD (±)	转录物组倍数变化	转录物组 P-值
1	PG0329	亚胺甲基转移酶-环化脱羧酶-相关蛋白 IMEC*VPNFSGR	30/14	2	1	2.9	-	NS	
2	PG0548	丙酮酸铁氧化还原蛋白/黄素蛋白氧化还原酶家族蛋白 JAGELLPC*VFHVSAR	33/15	1	1	2.0	-	NS	
3	PG0687	琥珀酸-半醛脱氢酶 AFDNGIIC*SGEQSHYNEADK C*SAHAVR EYQATHNQFAVDNIC*R GVGAEDVIC*K NHGAYFC*DEAEGDR TC*NAIIIAHPHR	37/18 22/16 18/13 43/13 53/14 66/13	27	6	4.0	1.6	1.77	0.066
4	PG0689	依赖 NAD 的 4-羟丁酸脱氢酶 ELIIVPTTC*GTGSEVTNISIAEIK ILNC*QPEYVYPK IDELIGC*LLIK 4-羟丁酸-CoA 转移酶 NifU-样蛋白 4-羟丁酸-CoA 脱水酶 AGNYMIDILLANVC*K TASC*FQR 假定的蛋白 TDISESAADVLDPIVVC*R 保守的假定的蛋白 MITAALIC*GAEVLK AVC*PDVHQPSIGGAVGMINDER 丁酸-乙酰乙酯 CoA 转移酶 酰基-CoA 脱氢酶, 短链特异性 LYC*AETAMDMTIK SIAQFQNTQQLADIQC*R 电子传递黄素蛋白, α 亚基 VTALC*GYK TGLTADC*TSLEIGDER 烯酰-CoA 乙酸激酶	35/19 41/18 35/14 42/15 20/15 64/14 40/12 38/15 26/14 23/19 22/15 55/15	12	3	2.8	0.8	1.93	8.892E-05
5	PG0690 ⁶							3.31	0.03
6	PG0691 ⁶							1.60	0.0002
7	PG0692			5	2	2.9	0.7	1.65	0.054
8	PG1067			2	1	2.4	-	NS	
9	PG1068			3	2	1.7	0.1	NS	
10	PG1075 ⁶							1.4	0.05
11	PG1076			3	2	1.8	0.2	NS	
12	PG1078			5	2	2.0	0.4	NS	
13	PG1079 ⁶							1.3	0.04
14	PG1081			9	3	3.5	0.9	NS	

[0255]

编号	Tigr 登录号	鉴定的蛋白和肽序列	得分 ¹	N ²	n-ICAT ³	蛋白质组倍数 变化 ⁴	SD (±)	转录物组倍数变化	转录物组 P-值
15	PGI082	.VLVNC*GSSSVK	42/14	5	2	4.4	1.6	NS	
		.AC*EILGLDYDK	29/15						
		.VEEC*IPLAPIHPANLK	42/14						
		.磷酸转乙酰酶	52/15						
		.AAELVENPIYLGC*LIVK	45/15						
16	PGI232	.GC*SVEDIYR	28/14	10	2	2.3	1.2	NS	
		.谷氨酸脱氢酶, NAD-特异性	54/15						
		.C*MLDLR	42/19						
17	PGI271	.LRPESTGFAGVYFVQNMC*K	32/19	3	2	0.09	-	NS	
		.鸟氨酸转氨酶	42/19						
		.AVIIVC*DGNFHR	32/19						
18	PGI417	.YFDEL SAYSAVNQGHG*HPK	57/15	3	2	1.0	0.2	NS	
		.富马酸水合酶, I 类, 厌氧	18/16						
		.GQLPFC*QDTGTAILGK	28/14						
19	PGI612	.HGASC*PVGMGVSC*SADR	21/15	2	2	2.4	-	NS	
		.甲基丙二酰基-CoA 脱羧酶, α 亚基	28/14						
		.FNGQSVGIVANQPQVMAGC*LDSNASR	21/15						
20	PGI614	.C*TNFGIDK	45/15	6	2	0.25	0.1	NS	
		.富马酸还原酶, 铁-硫蛋白 (FrdB)	36/13						
		.MDELGFNGC*TNTR	29/14						
21	PGI615	.APVVFHDHC*R	24/14	1	1	0.35	-	NS	
		.富马酸还原酶, 黄素蛋白亚基 (FrdA)	20/15						
		.LAEVSNAIIDQC*VAQGVFFAR	54/16						
22	PGI741	.天冬氨酸裂解酶	35/15	4	2	1.0	0.2	NS	
		.C*GLHEINLPAMQPGSSIMPCK	24/14						
		.VNPVPEVMNQIC*YK	20/15						
23	PGI810	.2-酮戊二酸氧化还原酶, β 亚基	54/16	3	1	2.5	0.5	NS	
		.IADMLALLDGTG*LVTIR	35/15						
		.苹果酸脱氢酶	35/15						
24	PGI949	.LITPNLC*LYDPFAVGLGVAEIR	35/15	3	1	1.0	0.2	NS	
			35/15						
			35/15						

[0256] 1 最高得分肽的得分 / 阈值得分 (P=0.05)

[0257] 2 每种蛋白的独立肽鉴定事件的总数

- [0258] 3 每种蛋白的所鉴定的单一 ICAT 标记的肽的数目
- [0259] 4 每种倍数变化的蛋白的所有定量的肽的平均比率（血红素 - 限制 / 定量）
- [0260] 5NS 没有检测到统计学显著的变化
- [0261] 6 仅在微阵列分析中鉴定的
- [0262] C* 表示 ICAT- 修饰的半胱氨酸
- [0263] 表 4 :选作抑制生物膜形成的靶标的 24 个牙龈卟啉单胞菌多肽
- [0264]

Tigr 编号	蛋白	预测的定 位	比率(B/P) 生物学重复 1	比率(B/P) 生物学重复 2	排名 (组)	登录号*	登录号版本
CTD 家族蛋白							
PG0232	锌羧肽酶, CPG70	OM	1.67	2.53	3 (DF)	AAQ65462	AAQ65462.1
PG0553	细胞外蛋白酶, 赖氨酸内肽酶前体(API)	OM/EX	3.33	3.45	1 (FF)	AAQ65742	AAQ65742.1
PG2024	精氨酸特异性蛋白 Arg1 多聚蛋白(RgpA)	OM	1.63	3.78	3 (DE)	AAQ66991	AAQ66991.1
	血色素结合						
PG0616	硫氧还蛋白, 推断的	PP/CY	2.23	3.69	2 (EF)	AAQ65800	AAQ65800.1
	生物膜相关的						
PG0350	内化蛋白相关蛋白	OM/EX	1.99	4.27	2 (EF)	AAQ65561	AAQ65561.1
	粘附素						
PG1837	血细胞凝集素蛋白 HagA	OM	2.73	4.21	1 (FF)	AAQ66831	AAQ66831.1
	功能未知的蛋白						
PG1798	免疫反应性的 46 kDa 抗原 PG99	PP/EX	5.94	4.07	1 (FF)	AAQ66797	AAQ66797.1
转运							
PG1414	TonB 连接的外膜受体, PG47	OM	3.81	3.69	1 (FF)	AAQ66469	AAQ66469.1
PG1551	HmuY 蛋白	OM	2.57	2.78	1 (DD)	AAQ66587	AAQ66587.1
PG1626	可能的与外膜相关蛋白 P58 (推断的血红素受体蛋白)	OM	2.37	3.68	2 (EF)	AAQ66654	AAQ66654.1
PG2008	依赖 TonB 的受体, P90	OM	2.08	3.12	2 (EF)	AAQ66977	AAQ66977.1
功能未知的蛋白							
	完整的外膜蛋白						
PG0613	可能的与外膜相关蛋白 P23	EX	4.41	3.24	1 (FF)	AAQ65797	AAQ65797.1
PG0694	外膜蛋白 40	OM	3.62	3.39	1 (FF)	AAQ65867	AAQ65867.1
PG0695	外膜蛋白 41	OM	2.31	3.18	2 (EF)	AAQ65868	AAQ65868.1
	其他蛋白						
PG0181	免疫反应性 32 kDa 抗体 PG49	PP/OM	2.08	3.14	2 (EF)	AAQ65416	AAQ65416.1
PG0218	未命名的蛋白	OM	2.10	1.59	2 (ED)	AAQ65449	AAQ65449.1
PG0914	未命名的蛋白	OM	2.23	2.91	2 (EF)	AAQ66051	AAQ66051.1
PG1304	未命名的蛋白(保守的)	OM	2.80	2.93	2 (EF)	AAQ66377	AAQ66377.1
PG1382	未命名的蛋白(保守的)	OM	1.89	4.43	2 (EF)	AAQ66444	AAQ66444.1
PG1493	未命名的蛋白(保守的)	OM	1.85	2.20	1 (EE)	AAQ66538	AAQ66538.1
PG2167	免疫反应性 53 kDa 抗原 PG123	OM	2.84	2.26	1 (EE)	AAQ67117	AAQ67117.1

[0265]

Tigr 编号	蛋白	预测的定 位	比率(B/P) 生物学重复 1	比率(B/P) 生物学重复 2	排名 (组)	登录号*	登录号版本
PG2168	未命名的蛋白 (保守的) 能量代谢	UN	4.90	2.04	2 (FE)	AAQ67118	AAQ67118.1
PG1614	富马酸还原酶, 铁-硫蛋白(frdB)	UN	0.15	0.19	1(AA)	AAQ66642	AAQ66642.1
PG1615	富马酸还原酶, 黄素蛋白亚基(frdA)	UN	0.06	-	NA	AAQ66643	AAQ66643.1

[0266] * 这些登录号为本说明书中所引用的牙龈卟啉单胞菌蛋白提供了序列。与登录号对应的序列通过引用并入本文。

[0267] 表 5 :与血红素过量相比,生长于血红素限制下的牙龈卟啉单胞菌的蛋白质组和转录物组分析。阴影表示预测在操纵子中编码的蛋白。

[0268]

编号	Tigrl 登录号	鉴定的蛋白和肽序列	得分 ¹	N ²	n-ICAT ³	蛋白质组倍数变化 ⁴	SD (±)	转录物组倍数变化	转录物组 P-值
铁转运和相关的蛋白									
13	PG0644 ⁶	HnfE (Tla) TonB 连接的受体		1	1	4.0	-	2.05	1.54E-04
18	PG1552	HmuR	25/15				-	3.13	0.003
21	PG1019	MNSDELFEEITYPGYTIC*R 假定的蛋白		2	1	25.0	-	2.57	0.003
22	PG1020 ⁶	TYMIDINDSENDG*1AR 保守的假定的蛋白; 可能的外膜受体蛋白	70/14				-	3.36	3.0E-04
其他									
33	PG1874 ⁶	保守的假定的蛋白						1.52	0.05
34	PG1875 ⁶	溶血素 A						1.40	0.05

[0269] 1 最高得分肽的得分 / 阈值得分 (P=0.05)

[0270] 2 每种蛋白的独立肽鉴定事件的总数

- [0271] 3 每种蛋白的所鉴定的单一 ICAT 标记的肽的数目
- [0272] 4 每种倍数变化的蛋白的所有定量的肽的平均比率（血红素 - 限制 / 过量）
- [0273] 5NS 没有检测到统计学显著的变化
- [0274] 6 仅在微阵列分析中鉴定的
- [0275] C* 表示 ICAT- 修饰的半胱
- [0276] 表 6: 利用 3 通道流式细胞系统上的 COMSTAT 测定的添加奥克太尔对 16h 的牙龈卟啉单胞菌生物膜的影响

[0277]

	生物学重复 1	生物学重复 2	降低 %	125 μM	降低 %	对照	12.5 μM	12.5 μM	降低 % ¹
总生物量 (μm ³ /μm ²)	1.80	1.26 ^a	30.1	1.00 ^a	44.4	2.68	1.451 ^a	1.621 ^a	42.8
表面与生物体积的比率 (μm ² /μm ³)	1.50	2.04 ^a		2.27 ^b		1.86	2.331 ^a	2.541 ^a	
平均厚度 (μm)	1.16	0.70 ^a	39.7	0.43 ^a	63.2	1.80	0.911 ^a	0.891 ^a	49.9
平均微菌落 (通过像素测定, 最小值 500)	21.2	17.4		20.8		24.8	18.4	19.2	
平均微菌落面积(μm ²)	235.26	147.65 ^a	37.2	115.42 ^a	50.94	180.62	119.571 ^a	104.881 ^a	37.9

- [0278] 1 相对于对照样品, 基于两个重复的平均值的降低百分比。
- [0279] a 与对照相比 P<0. 01
- [0280] b 与对照相比 P<0. 05
- [0281] 表 7 :奥克太尔、莫仑太尔或噻苯达唑在 50h 内对牙龈卟啉单胞菌 W50 生长的影响

[0282]

	MIC	MGT h ⁻¹ (DMSO)	MGT h ⁻¹ (31.25 μM)	MGT h ⁻¹ (62.5 μM)
奥克太尔	112 μM	6.62	19.28	23.77
莫仑太尔	2800 μM	6.85	10.97	11.28
噻苯达唑	> 3 mM*	6.25	6.80	6.22

[0283] * 由于大于 3mM 的噻苯达唑的不溶性, 未能测定更高浓度的 MIC

[0284] 表 8 :奥克太尔在 50 h 内对牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277 生长的影响

[0285]

	MIC	MGT h ⁻¹ (DMSO)	MGT h ⁻¹ (31.25 μM)	MGT h ⁻¹ (62.5 μM)
奥克太尔	125 μM	6.62	10.0	24.0

[0286] 参考文献

- [0287] 1. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745
- [0288] 2. Cvitkovitch, D. G., Li, Y. H., and Ellen, R. P. (2003) *J. Clin. Invest.* 112(11), 1626-1632
- [0289] 3. Cochrane, D. M., Brown, M. R., Anwar, H., Weller, P. H., Lam, K., and Costerton, J. W. (1988) *J. Med. Microbiol.* 27(4), 255-261
- [0290] 4. van Steenberg, T. J., Kastelein, P., Touw, J. J., and de Graaff, J. (1982) *J. Periodontal Res.* 17(1), 41-49
- [0291] 5. Neiders, M. E., Chen, P. B., Suido, H., Reynolds, H. S., Zambon, J. J., Shlossman, M., and Genco, R. J. (1989) *J. Periodontal Res.* 24(3), 192-198
- [0292] 6. Griffen, A. L., Becker, M. R., Lyons, S. R., Moeschberger, M. L., and Leys, E. J. (1998) *J. Clin. Microbiol.* 36(11), 3239-3242
- [0293] 7. Cutler, C. W., Arnold, R. R., and Schenkein, H. A. (1993) *J. Immunol.* 151(12), 7016-7029
- [0294] 8. Chen, T., Hosogi, Y., Nishikawa, K., Abbey, K., Fleischmann, R. D., Walling, J., and Duncan, M. J. (2004) *J. Bacteriol.* 186(16), 5473-5479
- [0295] 9. Davey, M. E. (2006) *Periodontol.* 200042, 27-35
- [0296] 10. Orme, R., Douglas, C. W., Rimmer, S., and Webb, M. (2006) *Proteomics* 6(15), 4269-4277
- [0297] 11. Rathsam, C., Eaton, R. E., Simpson, C. L., Browne, G. V., Valova, V. A., Harty, D. W., and Jacques, N. A. (2005) *J. Proteome Res* 4(6), 2161-2173
- [0298] 12. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G. (2002) *J. Bacteriol.* 184(4), 1140-1154
- [0299] 13. Ong, S. E., and Mann, M. (2005) *Nat. Chem. Biol.* 1(5), 252-262
- [0300] 14. Bender, M. L., and Kemp, K. C. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 116
- [0301] 15. Schnolzer, M., Jedrzejewski, P., and Lehmann, W. D. (1996) *Electrophoresis* 17(5), 945-953
- [0302] 16. Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P. A., and Fenselau, C. (2001) *Anal. Chem.* 73(13), 2836-2842
- [0303] 17. Blonder, J., Hale, M. L., Chan, K. C., Yu, L. R., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Zhou, M., Popoff, M. R., Issaq, H. J., Stiles, B. G., and Veenstra, T. D. (2005) *J. Proteome Res* 4(2), 523-531
- [0304] 18. Qian, W. J., Monroe, M. E., Liu, T., Jacobs, J. M., Anderson, G. A., Shen, Y., Moore, R. J., Anderson, D. J., Zhang, R., Calvano, S. E., Lowry, S.

- F., Xiao, W., Moldawer, L. L., Davis, R. W., Tompkins, R. G., Camp, D. G., 2nd, and Smith, R. D. (2005) *Mol. Cell Proteomics* 4(5), 700–709
- [0305] 19. Zang, L., Palmer Toy, D., Hancock, W. S., Sgroi, D. C., and Karger, B. L. (2004) *J. Proteome Res.* 3(3), 604–612
- [0306] 20. Kuster, B., and Mann, M. (1999) *Anal. Chem.* 71(7), 1431–1440
- [0307] 21. Takao, T., Hori, H., Okamoto, K., Harada, A., Kamachi, M., and Shimonishi, Y. (1991) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5(7), 312–315
- [0308] 22. Shevchenko, A., Chernushevich, I., Ens, W., Standing, K. G., Thomson, B., Wilm, M., and Mann, M. (1997) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11(9), 1015–1024
- [0309] 23. Gevaert, K., Staes, A., Van Damme, J., De Groot, S., Hugelier, K., Demol, H., Martens, L., Goethals, M., and Vandekerckhove, J. (2005) *Proteomics* 5(14), 3589–3599
- [0310] 24. Chen, X., Cushman, S. W., Pannell, L. K., and Hess, S. (2005) *J. Proteome Res.* 4(2), 570–577
- [0311] 25. Stockwin, L. H., Blonder, J., Bumke, M. A., Lucas, D. A., Chan, K. C., Conrads, T. P., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Newton, D. L., and Rybak, S. M. (2006) *J. Proteome Res.* 5(11), 2996–3007
- [0312] 26. Lane, C. S., Wang, Y., Betts, R., Griffiths, W. J., and Patterson, L. H. (2007) *Mol. Cell Proteomics*
- [0313] 27. Korbelt, S., Schumann, M., Bittorf, T., and Krause, E. (2005) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 19(16), 2259–2271
- [0314] 28. Bantscheff, M., Dimpelfeld, B., and Kuster, B. (2004) *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 18(8), 869–876
- [0315] 29. Jia, J. Y., Lamer, S., Schumann, M., Schmidt, M. R., Krause, E., and Haucke, V. (2006) *Mol. Cell Proteomics* 5(11), 2060–2071
- [0316] 30. Miyagi, M., and Rao, K. C. (2007) *Mass Spectrom. Rev* 26(1), 121–136
- [0317] 31. Veith, P. D., Talbo, G. H., Slakeski, N., Dashper, S. G., Moore, C., Paolini, R. A., and Reynolds, E. C. (2002) *Biochem. J.* 363(Pt1), 105–115
- [0318] 32. Qian, W. J., Liu, T., Monroe, M. E., Strittmatter, E. F., Jacobs, J. M., Kangas, L. J., Petritis, K., Camp, D. G., 2nd, and Smith, R. D. (2005) *J. Proteome Res* 4(1), 53–62
- [0319] 33. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) *Electrophoresis* 20(18), 3551–3567
- [0320] 34. Xia, Q., Hendrickson, E. L., Zhang, Y., Wang, T., Taub, F., Moore, B. C., Porat, I., Whitman, W. B., Hackett, M., and Leigh, J. A. (2006) *Mol. Cell Proteomics* 5(5), 868–881
- [0321] 35. Quackenbush, J. (2001) *Nat. Rev. Genet.* 2(6), 418–427
- [0322] 36. Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., and Hwang, J. K. (2006) *Proteins* 64(3), 643–651

- [0323] 37. Richardson, A. J. , Calder, A. G. , and Stewart, C. S. (1989) Letters in Applied Microbiology 9, 5-8
- [0324] 38. O' Toole, G. A. , and Kolter, R. (1998) Mol Microbiol 28(3), 449-461
- [0325] 39. Capestany, C. A. , Kuboniwa, M. , Jung, I. Y. , Park, Y. , Tribble, G. D. , and Lamont, R. J. (2006) Infect. Immun. 74(5), 3002-3005
- [0326] 40. Lopez-Ferrer, D. , Ramos-Fernandez, A. , Martinez-Bartolome, S. , Garcia-Ruiz, P. , and Vazquez, J. (2006) Proteomics 6 Suppl1, S4-S11
- [0327] 41. Staes, A. , Demol, H. , Van Damme, J. , Martens, L. , Vandekerckhove, J. , and Gevaert, K. (2004) J Proteome Res 3(4), 786-791
- [0328] 42. Patwardhan, A. J. , Strittmatter, E. F. , Camp, D. G. , 2nd, Smith, R. D. , and Pallavicini, M. G. (2006) Proteomics 6(9), 2903-2915
- [0329] 43. Smalley, J. W. , Birss, A. J. , McKee, A. S. , and Marsh, P. D. (1993) J Gen Microbiol 139(9), 2145-2150
- [0330] 44. McKee, A. S. , McDermid, A. S. , Baskerville, A. , Dowsett, A. B. , Ellwood, D. C. , and Marsh, P. D. (1986) Infect. Immun. 52(2), 349-355
- [0331] 45. Dashper, S. G. , Butler, C. A. , Lissel, J. P. , Paolini, R. A. , Hoffmann, B. , Veith, P. D. , O'Brien-Simpson, N. M. , Snelgrove, S. L. , Tsiros, J. T. , and Reynolds, E. C. (2005) J. Biol. Chem. 280(30), 28095-28102
- [0332] 46. Li, J. , Steen, H. , and Gygi, S. P. (2003) Mol. Cell Proteomics 2(11), 1198-1204
- [0333] 47. Dashper, S. G. , Brownfield, L. , Slakeski, N. , Zilm, P. S. , Rogers, A. H. , and Reynolds, E. C. (2001) J. Bacteriol. 183(14), 4142-4148
- [0334] 48. Hoskisson, P. A. , and Hobbs, G. (2005) Microbiology 151(Pt10), 3153-3159
- [0335] 49. Piper, M. D. , Daran-Lapujade, P. , Bro, C. , Regenber, B. , Knudsen, S. , Nielsen, J. , and Pronk, J. T. (2002) J. Biol. Chem. 277(40), 37001-37008
- [0336] 50. Siroy, A. , Cosette, P. , Seyer, D. , Lemaitre-Guillier, C. , Vallenet, D. , Van Dorsselaer, A. , Boyer-Mariotte, S. , Jouenne, T. , and De, E. (2006) J. Proteome Res. 5(12), 3385-3398
- [0337] 51. Hood, B. L. , Lucas, D. A. , Kim, G. , Chan, K. C. , Blonder, J. , Issaq, H. J. , Veenstra, T. D. , Conrads, T. P. , Pollet, I. , and Karsan, A. (2005) J Am Soc Mass Spectrom 16(8), 1221-1230
- [0338] 52. Yao, X. , Afonso, C. , and Fenselau, C. (2003) J Proteome Res 2(2), 147-152
- [0339] 53. Eckel-Passow, J. E. , Oberg, A. L. , Therneau, T. M. , Mason, C. J. , Mahoney, D. W. , Johnson, K. L. , Olson, J. E. , and Bergen, H. R. , 3rd. (2006) Bioinformatics 22(22), 2739-2745
- [0340] 54. Storms, H. F. , van der Heijden, R. , Tjaden, U. R. , and van der Greef, J. (2006) Rapid Commun. Mass Spectrom. 20(23), 3491-3497
- [0341] 55. Zenobi, R. , and Knochenmuss, R. (1998) Mass Spectrom. Rev. 17(5), 337-366
- [0342] 56. Seers, C. A. , Slakeski, N. , Veith, P. D. , Nikolof, T. , Chen, Y. Y. , Dashper, S.

- G., and Reynolds, E. C. (2006) *J. Bacteriol.* 188(17), 6376–6386
- [0343] 57. Curtis, M. A., Kuramitsu, H. K., Lantz, M., Macrina, F. L., Nakayama, K., Potempa, J., Reynolds, E. C., and Aduse-Opoku, J. (1999) *J. Periodontal Res.* 34(8), 464–472
- [0344] 58. O'Brien-Simpson, N. M., Paolini, R. A., Hoffmann, B., Slakeski, N., Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (2001) *Infect. Immun.* 69(12), 7527–7534
- [0345] 59. O'Brien-Simpson, N. M., Veith, P. D., Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.* 4(6), 409–426
- [0346] 60. Abe, N., Kadowaki, T., Okamoto, K., Nakayama, K., Ohishi, M., and Yamamoto, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* 123(2), 305–312
- [0347] 61. Potempa, J., Pike, R., and Travis, J. (1995) *Infect. Immun.* 63(4), 1176–1182
- [0348] 62. Pathirana, R. D., O'Brien-Simpson, N. M., Brammar, G. C., Slakeski, N.,
- [0349] and Reynolds, E. C. (2007) *Infect. Immun.* 75(3), 1436–1442
- [0350] 63. Chen, Y. Y., Cross, K. J., Paolini, R. A., Fielding, J. E., Slakeski, N., and Reynolds, E. C. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(26), 23433–23440
- [0351] 64. Zhang, Y., Wang, T., Chen, W., Yilmaz, O., Park, Y., Jung, I. Y., Hackett, M., and Lamont, R. J. (2005) *Proteomics* 5(1), 198–211
- [0352] 65. Sato, K., Sakai, E., Veith, P. D., Shoji, M., Kikuchi, Y., Yukitake, H., Ohara, N., Naito, M., Okamoto, K., Reynolds, E. C., and Nakayama, K. (2005) *J. Biol. Chem.* 280(10), 8668–8677
- [0353] 66. Nguyen, K. A., Travis, J., and Potempa, J. (2007) *J. Bacteriol.* 189(3), 833–843
- [0354] 67. Dashper, S. G., Cross, K. J., Slakeski, N., Lissel, P., Aulakh, P., Moore, C., and Reynolds, E. C. (2004) *Oral Microbiol. Immunol.* 19(1), 50–56
- [0355] 68. Lewis, J. P., Dawson, J. A., Hannis, J. C., Muddiman, D., and Macrina, F. L. (1999) *J. Bacteriol.* 181(16), 4905–4913
- [0356] 69. Shi, Y., Ratnayake, D. B., Okamoto, K., Abe, N., Yamamoto, K., and Nakayama, K. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(25), 17955–17960
- [0357] 70. Sroka, A., Sztukowska, M., Potempa, J., Travis, J., and Genco, C. A. (2001) *J. Bacteriol.* 183(19), 5609–5616
- [0358] 71. Simpson, W., Olczak, T., and Genco, C. A. (2000) *J. Bacteriol.* 182(20), 5737–5748
- [0359] 72. Lewis, J. P., Plata, K., Yu, F., Rosato, A., and Anaya, C. (2006) *Microbiology* 152(Pt11), 3367–3382
- [0360] 73. Olczak, T., Siudeja, K., and Olczak, M. (2006) *Protein Expr. Purif.* 49(2), 299–306
- [0361] 74. Olczak, T., Simpson, W., Liu, X., and Genco, C. A. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* 29(1), 119–144
- [0362] 75. Veith, P. D., Chen, Y. Y., and Reynolds, E. C. (2004) *Infect. Immun.* 72(6), 3655–3657

- [0363] 76. Shibata, Y., Hiratsuka, K., Hayakawa, M., Shiroza, T., Takiguchi, H., Nagatsuka, Y., and Abiko, Y. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2), 351–356
- [0364] 77. Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S., Smirnov, S., Sverdlov, A. V., Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J., and Natale, D. A. (2003) *BMC Bioinformatics* 4, 41
- [0365] 78. Ratnayake, D. B., Wai, S. N., Shi, Y., Amako, K., Nakayama, H., and Nakayama, K. (2000) *Microbiology* 146 1119–1127
- [0366] 79. Smalley, J. W., Birss, A. J., McKee, A. S., and Marsh, P. D. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 69 (1), 63–67
- [0367] 80. Dashper, S. G., Hendtlass, A., Slakeski, N., Jackson, C., Cross, K. J., Brownfield, L., Hamilton, R., Barr, I., and Reynolds, E. C. (2000) *J Bacteriol* 182 (22), 6456–6462
- [0368] 81. Takahashi, N., Sato, T., and Yamada, T. (2000) *J. Bacteriol.* 182 (17), 4704–4710
- [0369] 82. Takahashi, N., and Sato, T. (2001) *J Dent Res* 80 (5), 1425–1429
- [0370] 83. Litwin, C. M., and Calderwood, S. B. (1993) *Clin Microbiol Rev* 6 (2), 137–149
- [0371] 84. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., and Aebersold, R. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19 (3), 1720–1730
- [0372] 85. Baughn, A. D., and Malamy, M. H. (2003) *Microbiology* 149 (Pt6), 1551–1558
- [0373] 86. Macy, J., Probst, I., and Gottschalk, G. (1975) *J Bacteriol* 123 (2), 436–442
- [0374] 87. Baughn, A. D., and Malamy, M. H. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (7), 4662–4667
- [0375] 88. Mayrand, D., and McBride, B. C. (1980) *Infect Immun* 27 (1), 44–50
- [0376] 89. Smith, M. A., Mendz, G. L., Jorgensen, M. A., and Hazell, S. L. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* 31 (9), 961–975
- [0377] 90. Kroger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F., and Lenger, R. (1992) *Archives of Microbiology* 158 (5), 311–314
- [0378] 91. Shah, H., and Williams, R. (1987) *Current Microbiology* 15, 241–246
- [0379] 92. Klein, R. A., Linstead, D. J., and Wheeler, M. V. (1975) *Parasitology* 71 (1), 93–107
- [0380] 93. Turens, J. F. (1989) *Biochem J* 259 (2), 363–368
- [0381] 94. Mendz, G. L., Hazell, S. L., and Srinivasan, S. (1995) *Arch Biochem Biophys* 321 (1), 153–159
- [0382] 95. Mendz, G. L., Meek, D. J., and Hazell, S. L. (1998) *J Membr Biol* 165 (1), 65–76
- [0383] 96. Mileni, M., MacMillan, F., Tziatzios, C., Zwicker, K., Haas, A. H., Mantele, W., Simon, J., and Lancaster, C. R. (2006) *Biochem J* 395 (1), 191–201
- [0384] 97. Nealson, K., and D, S. (1994) *Annual review of microbiology* 48, 311–343
- [0385] 98. Sellars, M. J., Hall, S. J., and Kelly, D. J. (2002) *J*

Bacteriol184(15), 4187-4196

[0386] 99. O' Toole, G. A. , Gibbs, K. A. , Hager, P. W. , Phibbs, P. V. , Jr. , and Kolter, R. (2000) J Bacteriol182(2), 425-431

[0387] 100. Whiteley, M. , Bangera, M. G. , Bumgarner, R. E. , Parsek, M. R. , Teitzel, G. M. , Lory, S. , and Greenberg, E. P. (2001) Nature413(6858), 860-864

[0388] 101. Romeo, T. , Gong, M. , Liu, M. Y. , and Brun-Zinkernagel, A. M. (1993) J Bacteriol175(15), 4744-4755

[0389] 102. Sabnis, N. A. , Yang, H. , and Romeo, T. (1995) J Biol Chem270(49), 29096-29104

[0390] 103. Mercante, J. , Suzuki, K. , Cheng, X. , Babitzke, P. , and Romeo, T. (2006) J Biol Chem281(42), 31832-31842

[0391] 104. Altier, C. , Suyemoto, M. , and Lawhon, S. D. (2000) Infect Immun68(12), 6790-6797

[0392] 105. Lawhon, S. D. , Frye, J. G. , Suyemoto, M. , Porwollik, S. , McClelland, M. , and Altier, C. (2003) Mol Microbiol48(6), 1633-1645

[0393] 106. Hefford, M. A. , D' Aoust, S. , Cyr, T. D. , Austin, J. W. , Sanders, G. , Kheradpir, E. , and Kalmokoff, M. L. (2005) Can. J. Microbiol. 51(3), 197-208

[0394] 107. Pancholi, V. , and Fischetti, V. A. (1992) J. Exp. Med. 176(2), 415-426

[0395] 108. Taylor, J. M. , and Heinrichs, D. E. (2002) Mol. Microbiol. 43(6), 1603-1614

[0396] 109. Maeda, K. , Nagata, H. , Yamamoto, Y. , Tanaka, M. , Tanaka, J. , Minamino, N. , and Shizukuishi, S. (2004) Infect. Immun. 72(3), 1341-1348

[0397] 110. Gustavsson, N. , Diez, A. , and Nystrom, T. (2002) Mol. Microbiol. 43(1), 107-117

[0398] 111. Kvint, K. , Nachin, L. , Diez, A. , and Nystrom, T. (2003) Curr. Opin. Microbiol. 6(2), 140-145

[0399] 112. Kuramitsu, H. K. , Chen, W. , and Ikegami, A. (2005) J. Periodontol. 76(11Suppl), 2047-2051

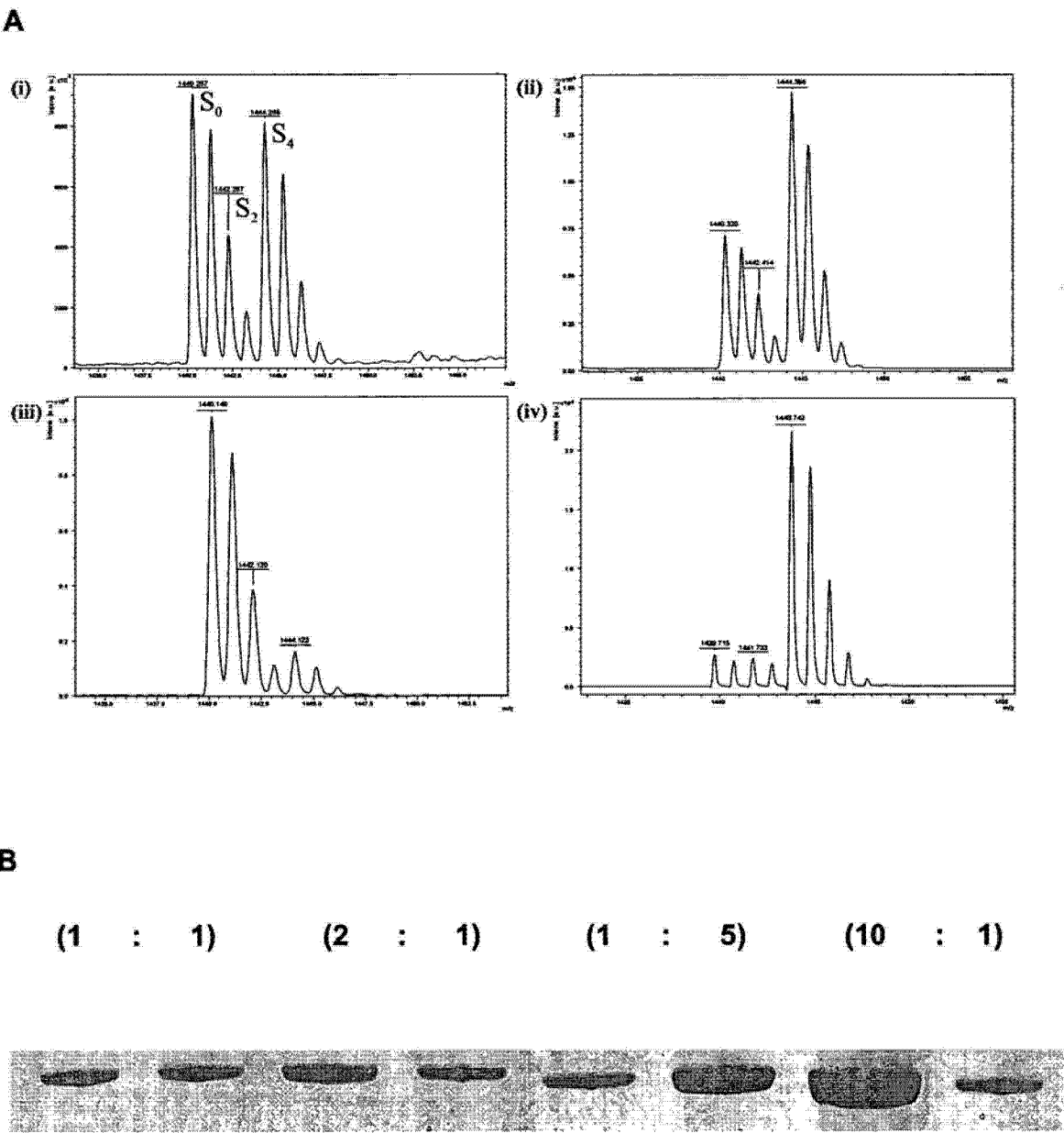


图 1

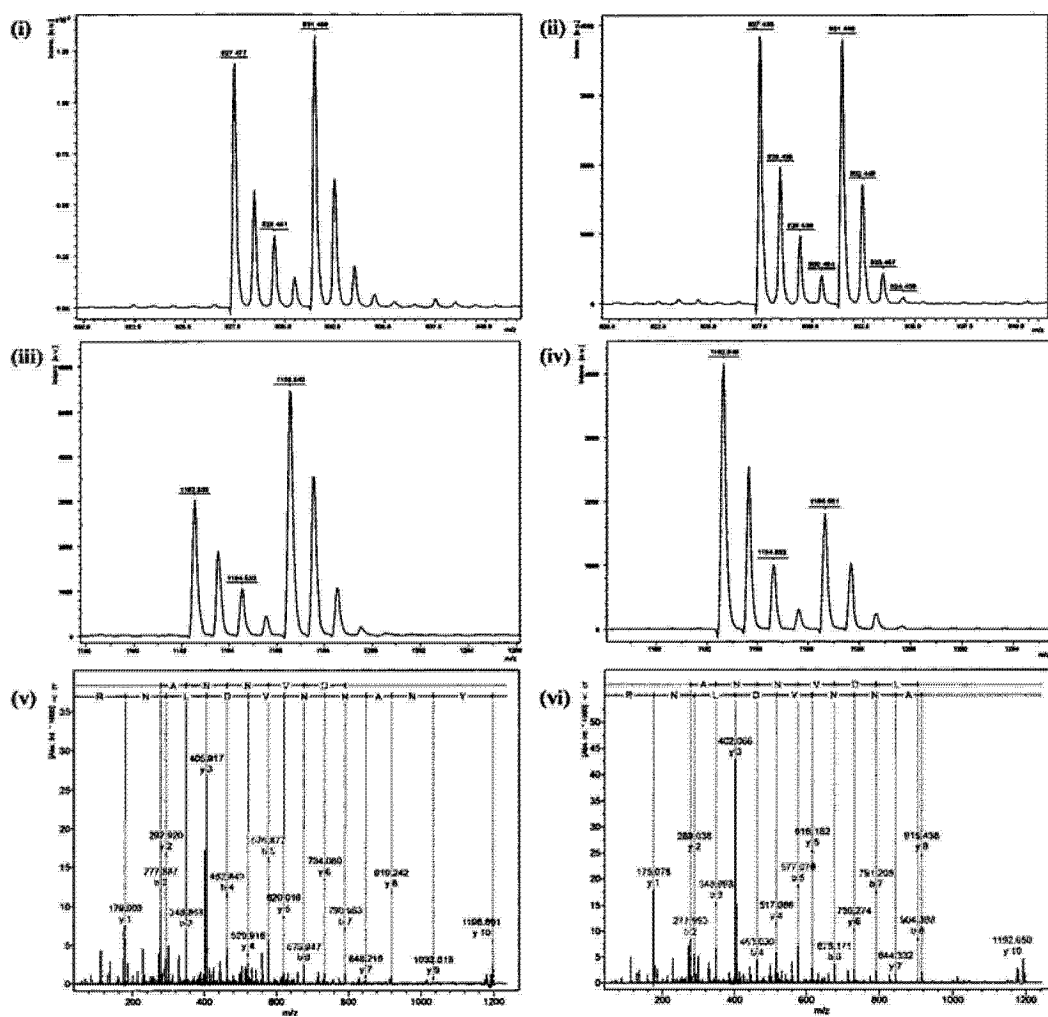


图 2

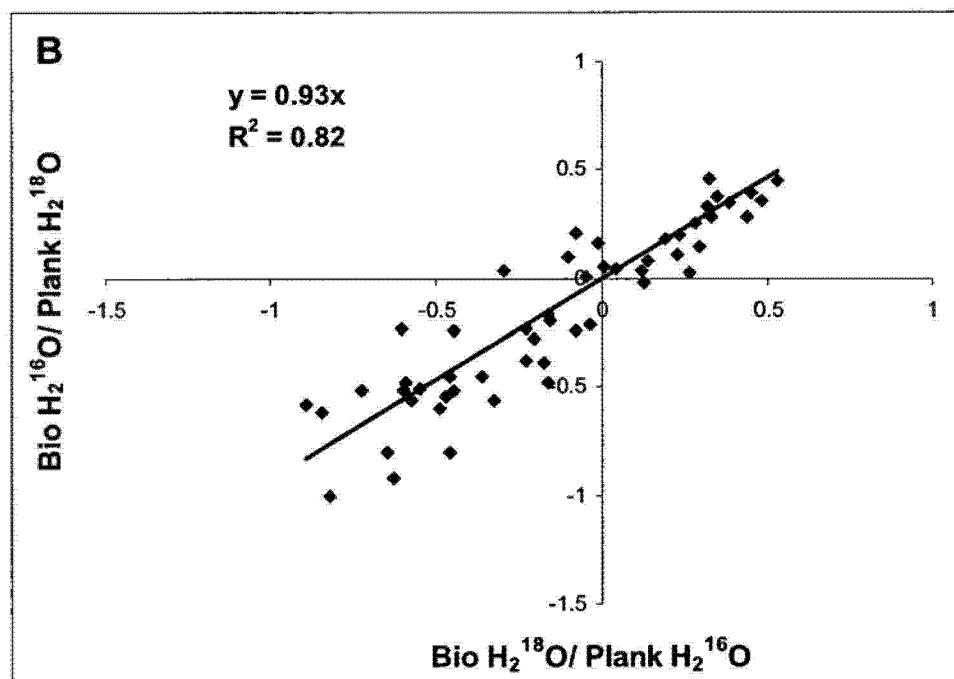
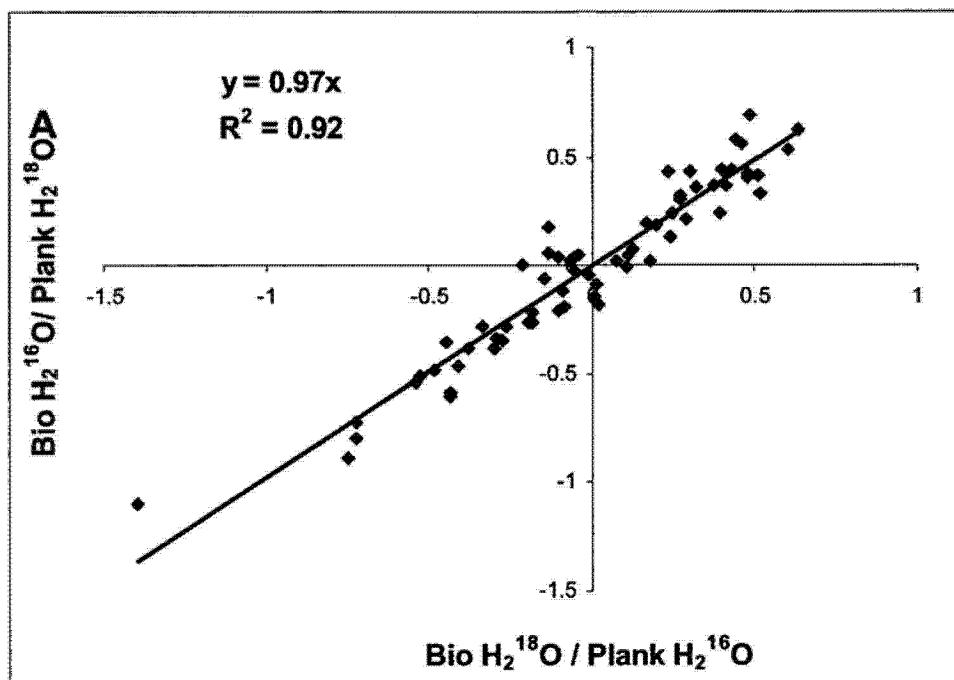


图 3

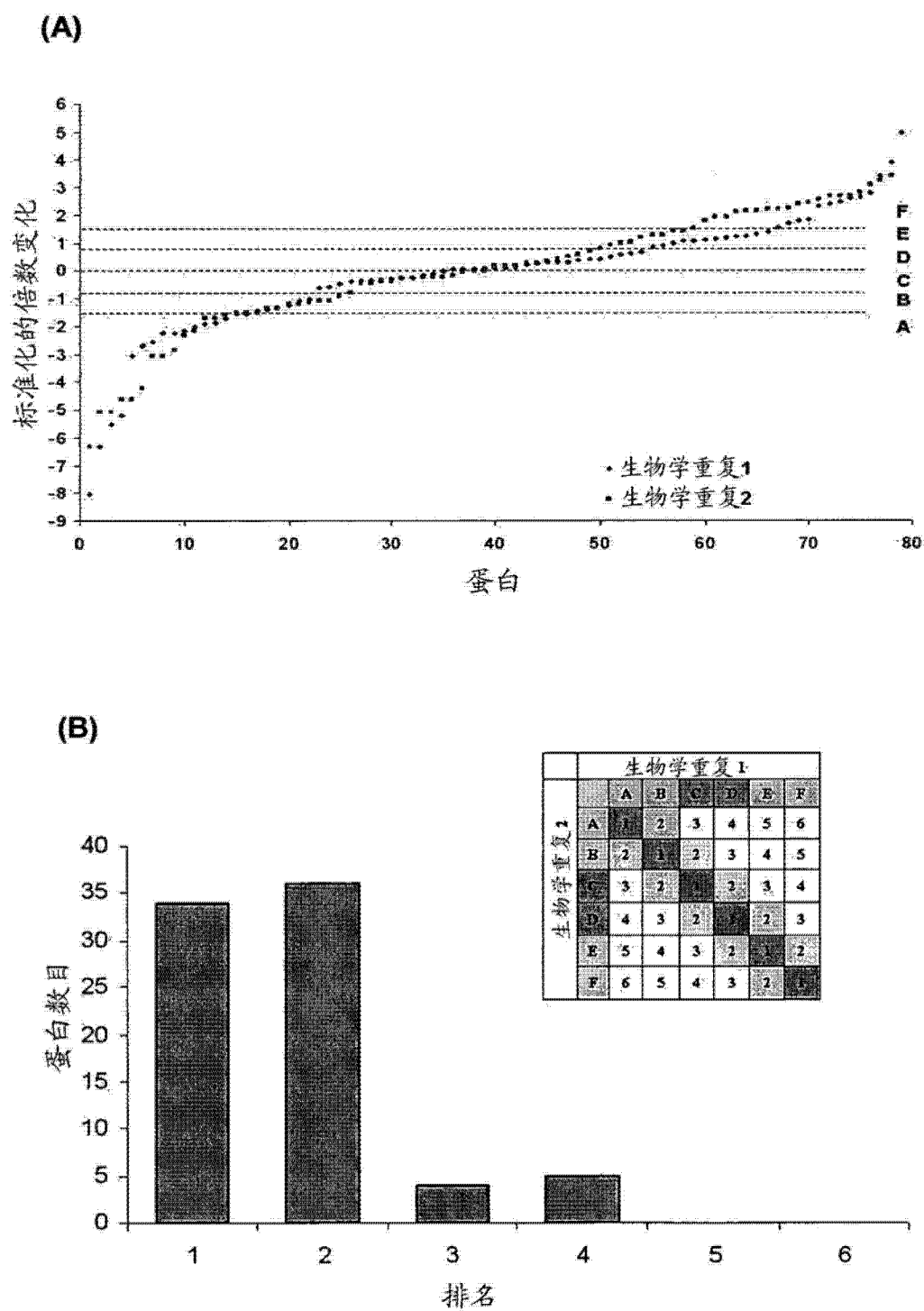


图 4

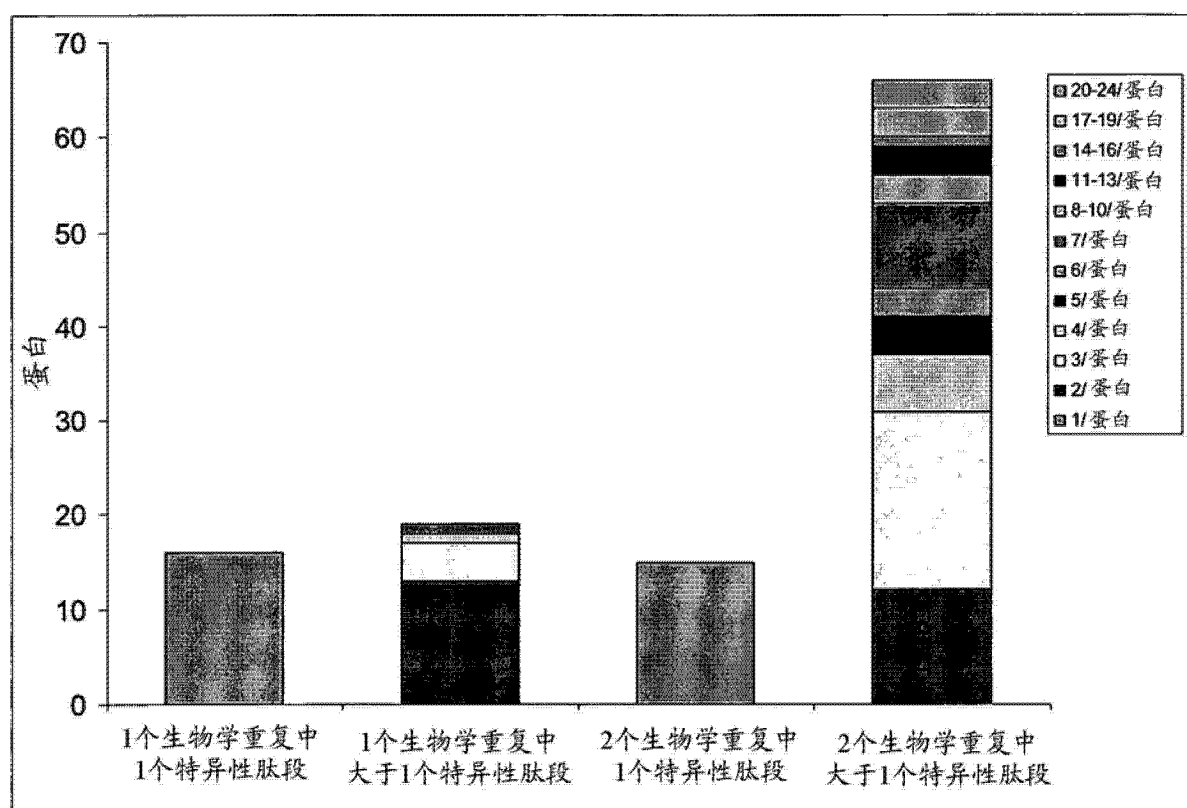


图 5

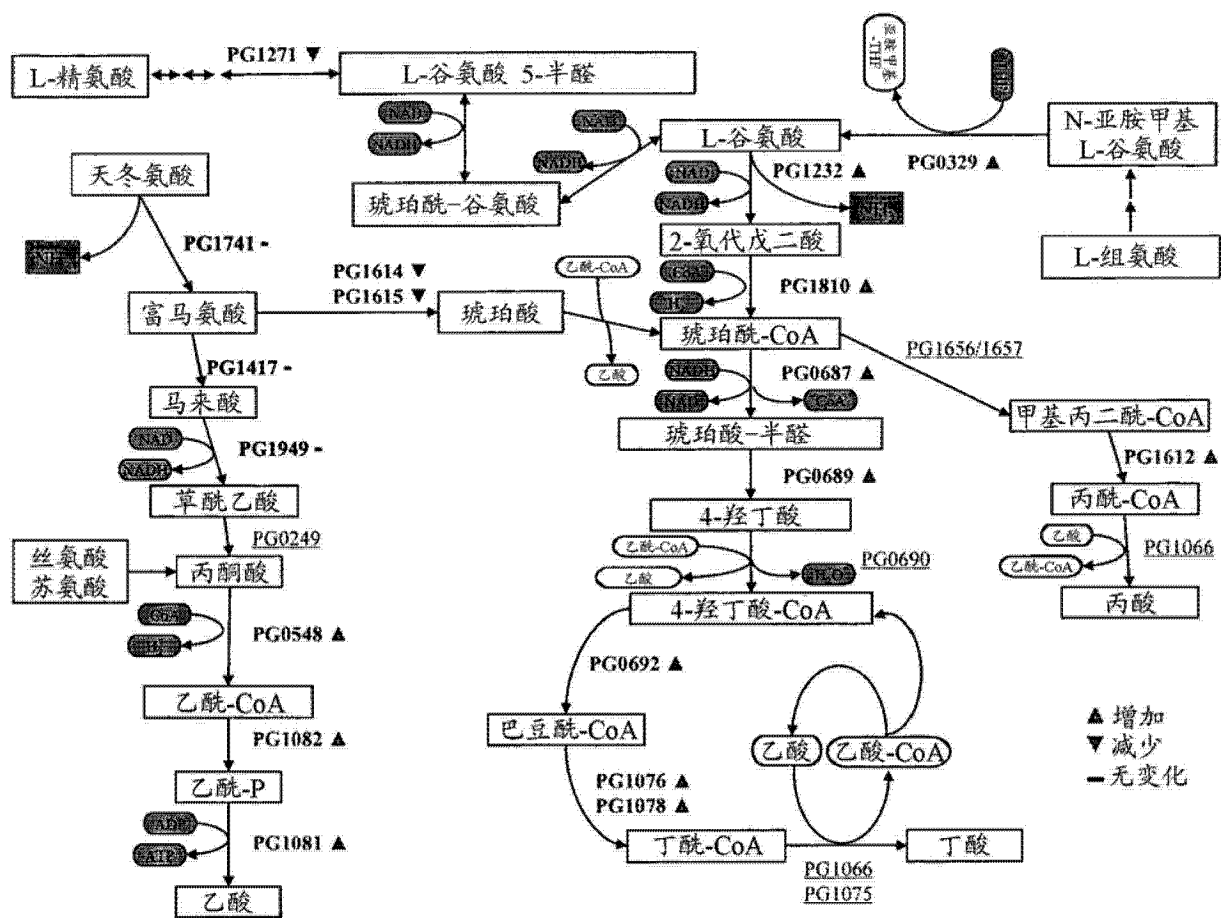


图 6

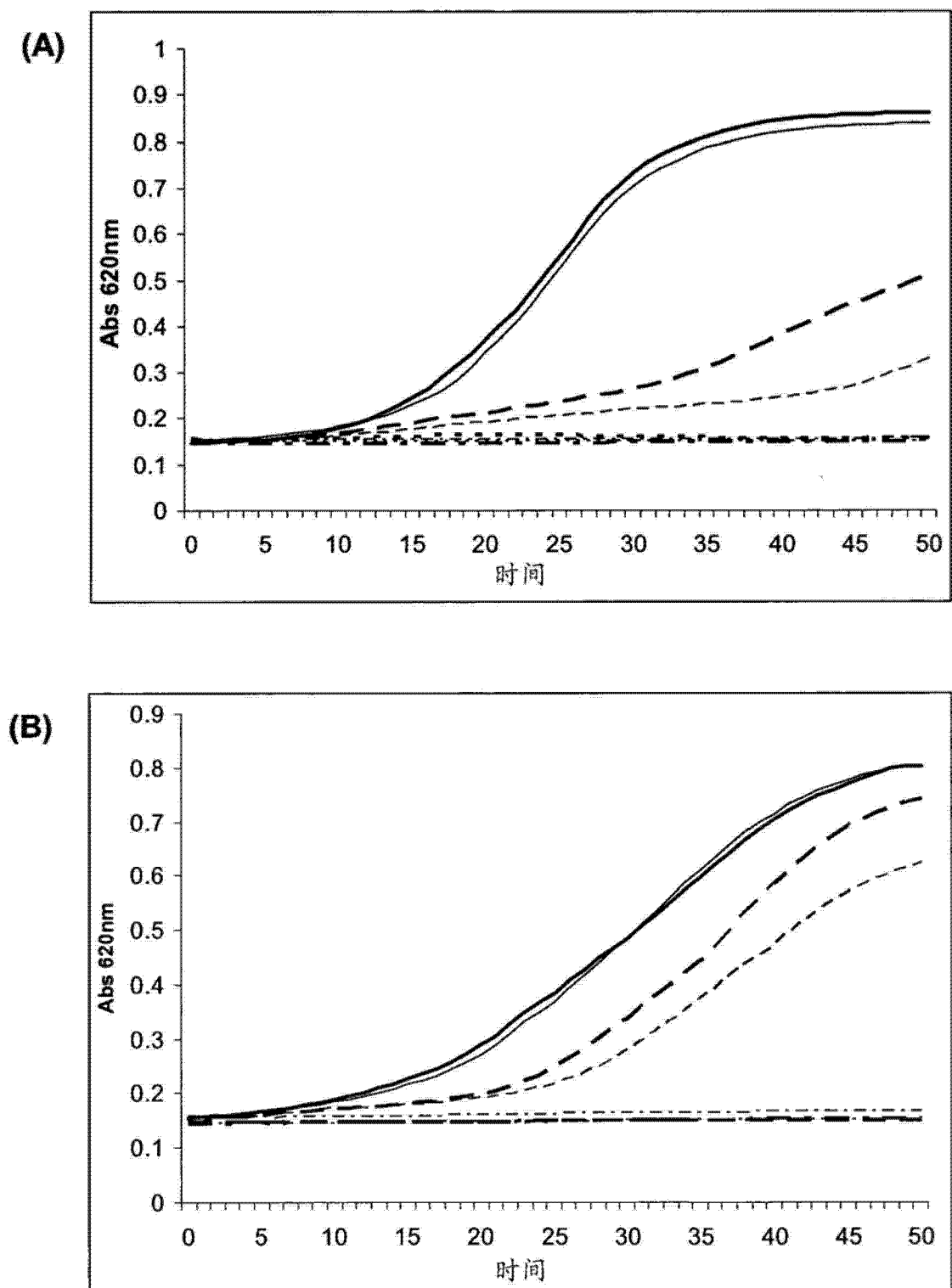


图 7

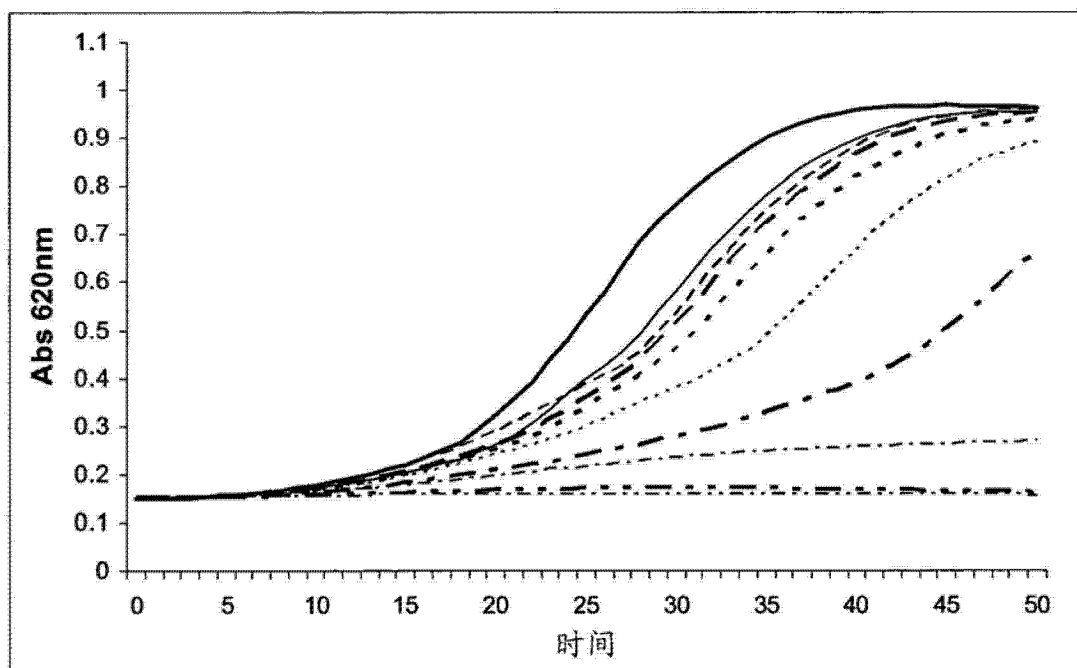


图 8

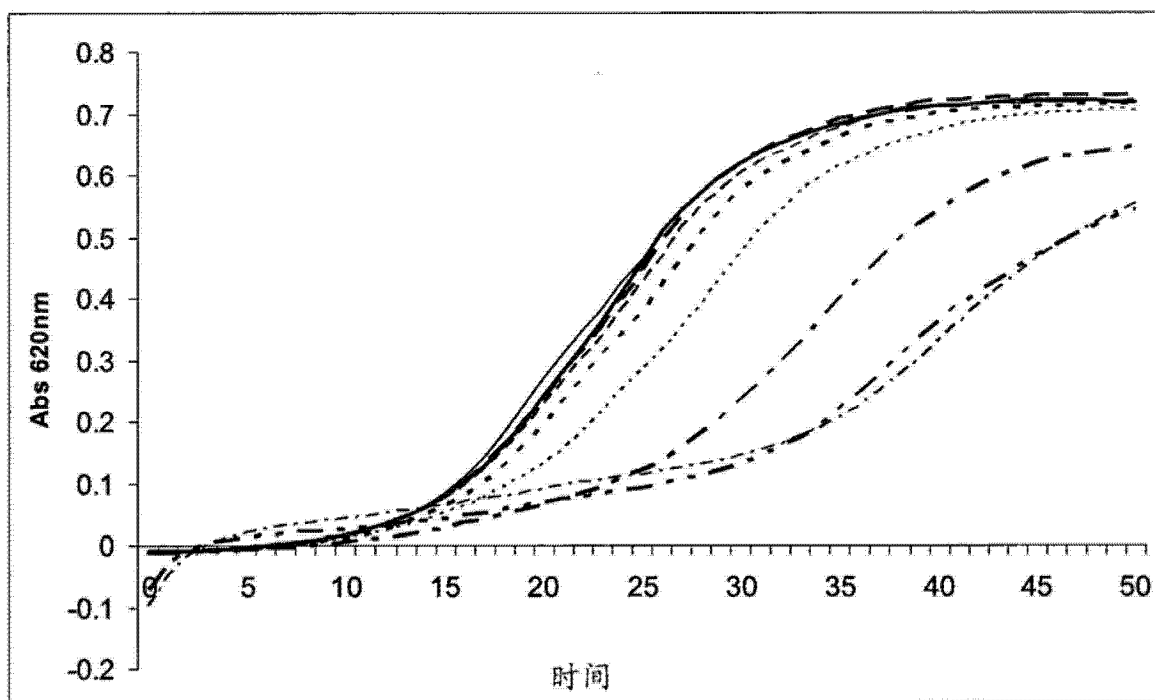


图 9

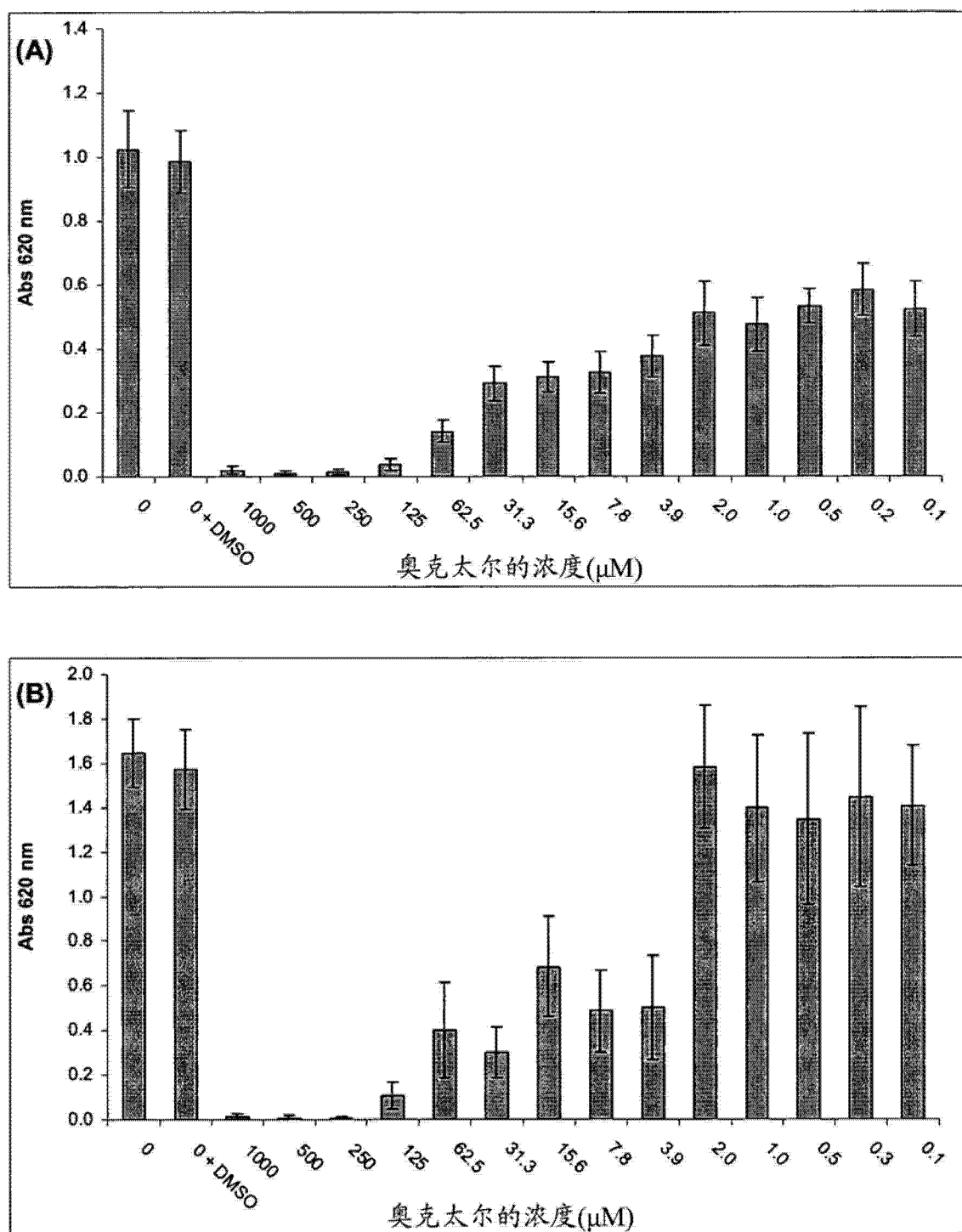


图 10

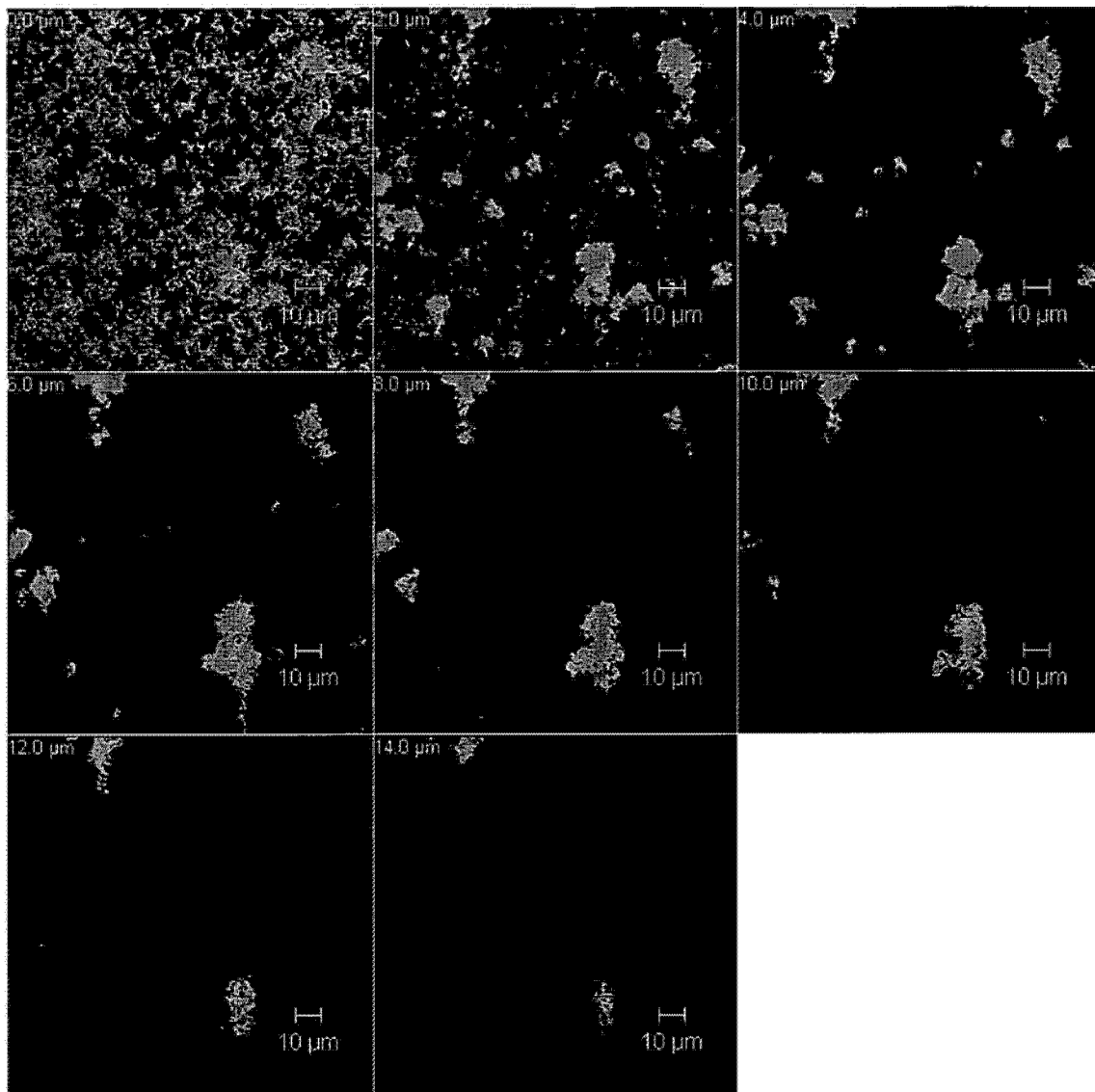


图 11

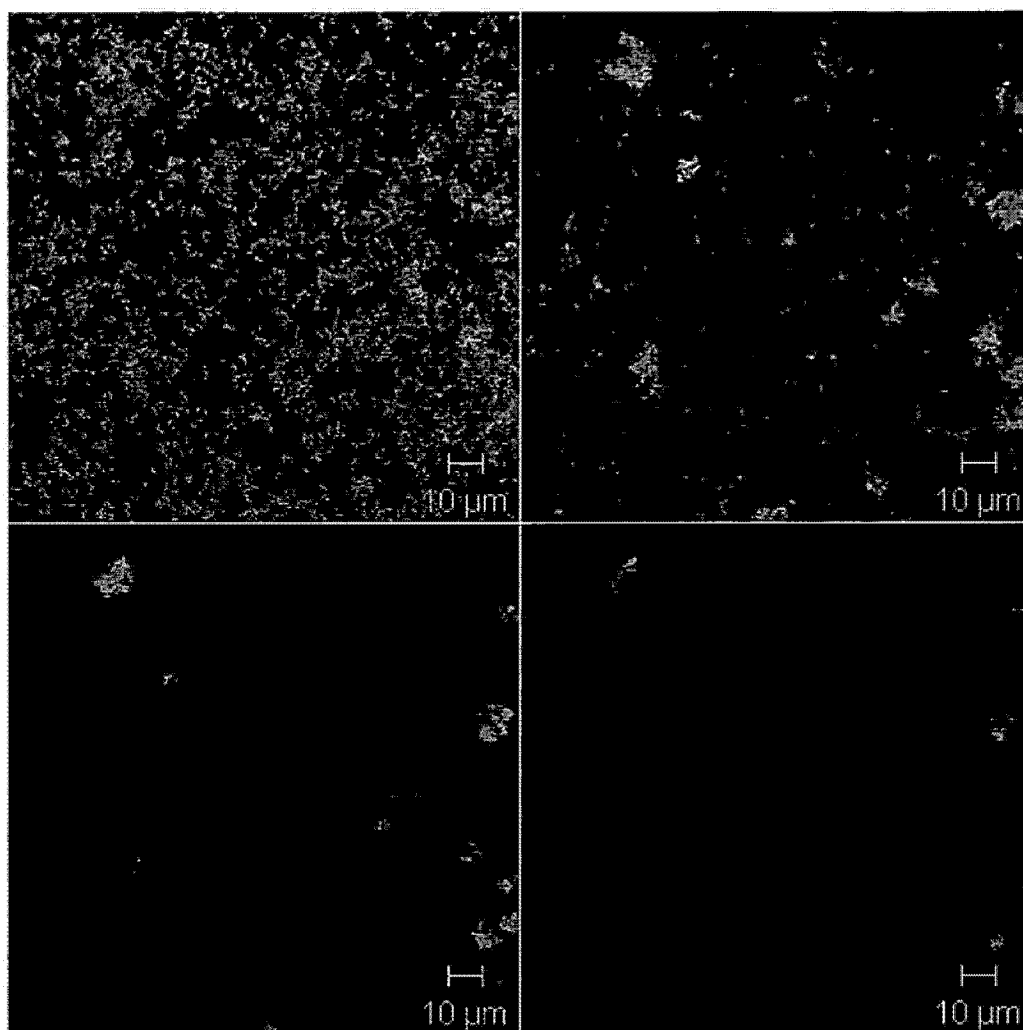


图 12

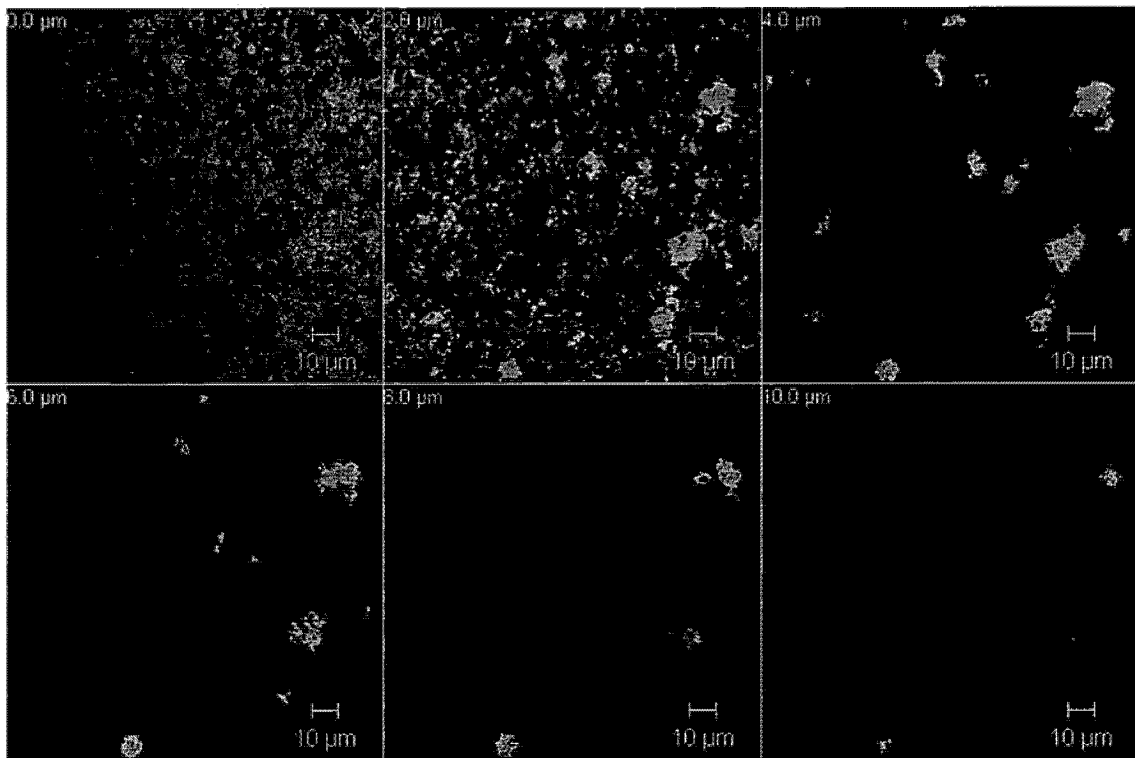


图 13

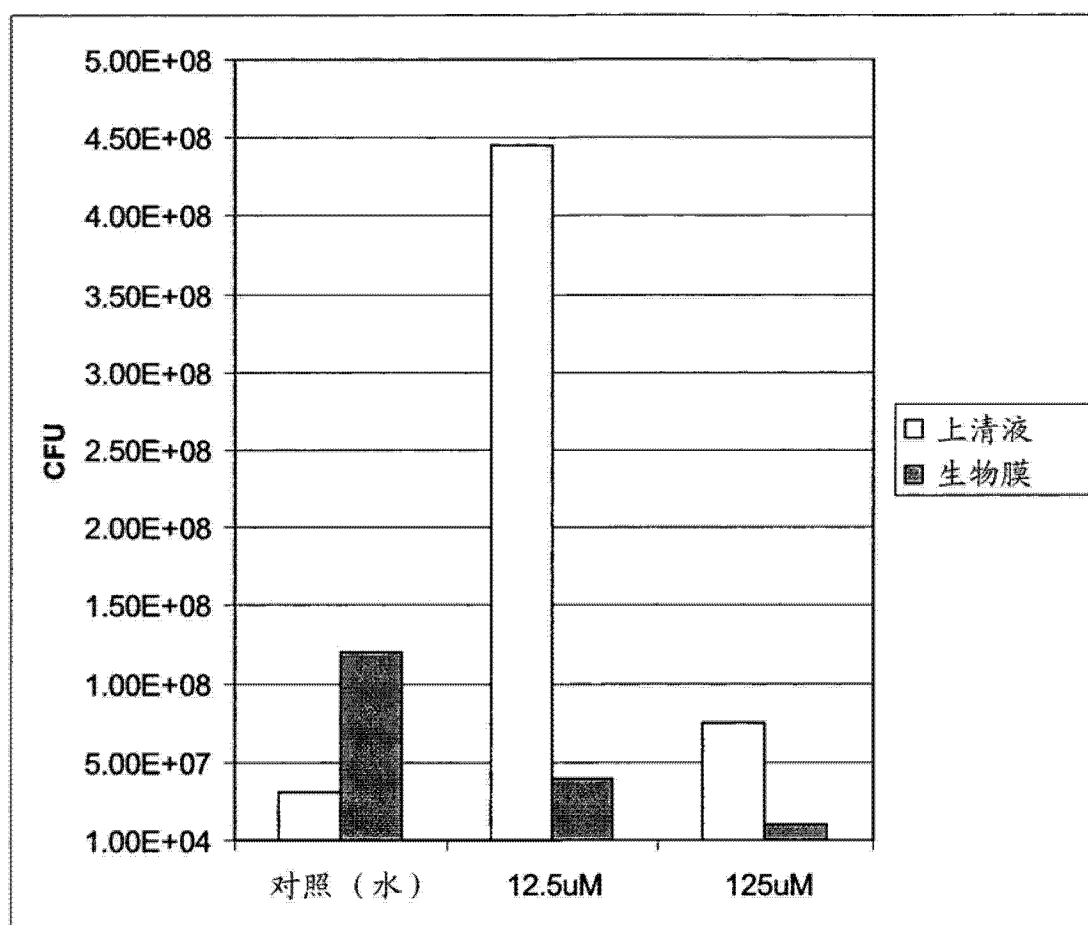


图 14