



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102652831 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 05

(21) 申请号 201210135733. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 07. 11

A61K 39/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

2007903787 2007. 07. 12 AU

A61P 1/02 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200880104633. X 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

权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图 5 页

(54) 发明名称

生物膜的免疫治疗

(57) 摘要

本发明涉及一种生物膜的免疫治疗。本发明提供用于在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的组合物,该组合物包含有效地产生免疫应答的量的至少一种多肽,该多肽的氨基酸序列与对应于选自以下登录号的多肽中之一的至少 50 个氨基酸或者抗原或免疫原性部分基本相同:AAQ66654、AAQ65462、AAQ65742、AAQ66991、AAQ65561、AAQ66831、AAQ66797、AAQ66469、AAQ66587、AAQ66977、AAQ65797、AAQ65867、AAQ65868、AAQ65416、AAQ65449、AAQ66051、AAQ66377、AAQ66444、AAQ66538、AAQ67117 以及 AAQ67118。本发明还提供预防或治疗个体的牙龈卟啉单胞菌感染的方法,该方法包括向个体施用本发明的组合物。

1. 用于在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 的免疫应答的组合物,所述组合物包含有效地产生免疫应答的量的与选自下述登录号对应的多肽的至少一个抗原或免疫原性部分:AAQ66654、AAQ65462、AAQ65742、AAQ66991、AAQ65561、AAQ66831、AAQ66797、AAQ66469、AAQ66587、AAQ66977、AAQ65797、AAQ65867、AAQ65868、AAQ65416、AAQ65449、AAQ66051、AAQ66377、AAQ66444、AAQ66538、AAQ67117 以及 AAQ67118。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述部分的氨基酸序列与所述多肽之一的至少 50 个氨基酸基本相同。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述多肽对应于选自 AAQ66654、AAQ65462、AAQ66991、AAQ65561 以及 AAQ66831 的登录号的多肽。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述多肽对应于登录号 AAQ66654 的多肽。

5. 用于在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 的免疫应答的组合物,所述组合物包含有效地产生免疫应答的量的至少一种多肽,所述多肽的氨基酸序列与牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 所表达的多肽的至少 50 个氨基酸基本相同,并且所述多肽经 CELLO 程序预测是细胞外的。

6. 用于在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 的免疫应答的组合物,所述组合物包含有效地产生免疫应答的量的至少一种多肽,所述多肽的氨基酸序列经挑选与在小鼠或兔子中导致免疫应答的多肽的至少 50 个氨基酸基本相同。

7. 有效量的如权利要求 1-6 中任一项所述的组合物在制备向个体施用的用于预防、抑制或治疗所述个体的牙周疾病的药物中的用途。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的组合物在制备向个体施用的用于预防、抑制或治疗所述个体的牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 感染的药物中的用途。

9. 抗具有氨基酸序列的多肽的抗原区的抗体,所述序列与对应于下述登录号的多肽之一的至少 50 个氨基酸基本相同:AAQ66654、AAQ65462、AAQ65742、AAQ66991、AAQ65561、AAQ66831、AAQ66797、AAQ66469、AAQ66587、AAQ66977、AAQ65797、AAQ65867、AAQ65868、AAQ65416、AAQ65449、AAQ66051、AAQ66377、AAQ66444、AAQ66538、AAQ67117 以及 AAQ67118。

10. 如权利要求 9 所述的抗体,其中所述多肽对应于选自 AAQ66654、AAQ65462、AAQ66991、AAQ65561 以及 AAQ66831 的登录号的多肽。

11. 如权利要求 9 所述的抗体,其中所述多肽对应于登录号 AAQ66654 的多肽。

12. 本发明的多肽在制备用于治疗牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 感染的药物中的用途。

13. 如权利要求 12 所述的用途,其中所述多肽对应于选自下述登录号的多肽:AAQ66654、AAQ65462、AAQ65742、AAQ66991、AAQ65561、AAQ66831、AAQ66797、AAQ66469、AAQ66587、AAQ66977、AAQ65797、AAQ65867、AAQ65868、AAQ65416、AAQ65449、AAQ66051、AAQ66377、AAQ66444、AAQ66538、AAQ67117 以及 AAQ67118。

14. 如权利要求 12 所述的用途,其中所述多肽对应于选自 AAQ66654、AAQ65462、AAQ66991、AAQ65561 以及 AAQ66831 登录号的多肽。

15. 如权利要求 12 所述的用途,其中所述多肽对应于登录号 AAQ66654 的多肽。

16. 与选自下述登录号对应的多肽的至少一个抗原或免疫原性部分在制备用于治疗牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 感染的药物中的用途:AAQ66654、AAQ65462、AAQ65742、

AAQ66991、AAQ65561、AAQ66831、AAQ66797、AAQ66469、AAQ66587、AAQ66977、AAQ65797、AAQ65867、AAQ65868、AAQ65416、AAQ65449、AAQ66051、AAQ66377、AAQ66444、AAQ66538、AAQ67117 以及 AAQ67118。

17. 如权利要求 16 所述的用途,其中所述多肽对应于选自 AAQ66654、AAQ65462、AAQ66991、AAQ65561 以及 AAQ66831 登录号的多肽。

18. 如权利要求 16 所述的用途,其中所述多肽对应于登录号 AAQ66654 的多肽。

生物膜的免疫治疗

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在生物膜生长期间或在血红素限制下受到调控的多肽来调节生物膜的形成和 / 或发展。本发明涉及对可以用作抗菌疫苗或免疫治疗 / 免疫预防基础的多肽的鉴定。

[0002] 发明背景

[0003] 许多细菌治疗针对浮游状态的细菌。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 ATCC 33277 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 ATCC 33277 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, 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] 通过参照样品系统示例说明了本发明, 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 LCMALDI 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。

[0010] 因此, 在第一方面, 本发明涉及调节生物膜形成的多肽。在一种形式中, 生物膜中的微生物是细菌。在一种形式中, 细菌来自卟啉单胞菌属 (Porphyromonas)。在一实施方案中, 细菌是牙龈卟啉单胞菌并且多肽的氨基酸序列选自与表 4 所列的登录号对应的序列。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%。

[0011] 本发明还包括与登录号 AAQ65742 (版本 :0.1) 对应的多肽以及与该多肽相同至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的多肽。

[0012] 优选地, 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%。

[0013] 本发明的一方面涉及用于在个体中产生针对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的组合物, 该组合物包括有效量的本发明的第一方面的至少一种多肽或其抗原或免疫原性部分。该组合物可以任选地包括佐剂以及制药学上可接受的载体。因此, 该组合物可以含有这种多肽的抗原部分, 而不是全长多肽。通常, 该部分与对应于表 4 所列的序列的多肽至少 10 个、更通常 20 或 50 个氨基酸基本相同, 并且产生免疫应答。在一优选的形式中, 所述组合

物是疫苗。

[0014] 本发明还提供在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的组合物,该组合物包含有效地产生免疫应答的量的多肽的至少一个抗原或免疫原部分,该多肽对应于选自以下的登录号:AAQ65462、AAQ65742、AAQ66991、AAQ65561、AAQ66831、AAQ66797、AAQ66469、AAQ66587、AAQ66654、AAQ66977、AAQ65797、AAQ65867、AAQ65868、AAQ65416、AAQ65449、AAQ66051、AAQ66377、AAQ66444、AAQ66538、AAQ67117 以及 AAQ67118。

[0015] 在另一实施方案中,提供了用于在个体中产生针对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的组合物,该组合物包括有效量的至少一种多肽,该多肽对应于选自以下的登录号:AAQ65462、AAQ66991、AAQ65561 以及 AAQ66831。

[0016] 在另一实施方案中,提供了用于在个体中产生针对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的组合物,该组合物包含有效量的对应于登录号 AAQ65742 的多肽。

[0017] 在另一实施方案中,提供了用于在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的组合物,该组合物包含有效地产生免疫应答的量的至少一种多肽,该多肽的氨基酸序列与牙龈卟啉单胞菌所表达的多肽的至少 50 个氨基酸基本相同,并且该多肽被 CELLO 程序预测为是细胞外的。

[0018] 在另一实施方案中,提供了用于在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的组合物,该组合物包含有效地产生免疫应答的量的至少一种多肽,该多肽的氨基酸序列经选择,与在小鼠或兔子中导致免疫应答的多肽的至少 50 个氨基酸基本相同。

[0019] 在一实施方案中,提供了包含氨基酸序列的分离的抗原多肽,该氨基酸序列包含至少 50、60、70、80、90 或 100 个与对应于表 4 所列的登录号的一个序列的连续氨基酸序列基本相同的氨基酸。该多肽可以是纯化的或重组的。

[0020] 在另一实施方案中,提供了用于治疗牙周疾病的组合物,该组合物包含有效量的本发明的第一方面的至少一种多肽作为活性成分。

[0021] 在另一实施方案中,提供了用于治疗牙龈卟啉单胞菌感染的组合物,该组合物包含有效量的本发明的第一方面的至少一种多肽作为活性成分。

[0022] 本发明的另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如上文所述的本发明的组合物。

[0023] 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如上文所述的本发明的组合物。

[0024] 在本发明的另一方面,提供了本发明的多肽在制备用于治疗牙龈卟啉单胞菌感染的药物中的用途。

[0025] 在本发明的另一方面,提供了本发明的多肽在制备用于治疗牙周疾病的药物中的用途。

[0026] 本发明还扩展抗本发明的第一方面的多肽的抗体。优选地,该抗体特异性地针对一种对应于表 4 所列的登录号的多肽。可以利用如上文所述产生免疫应答的组合物,产生该抗体。

[0027] 在一实施方案中,提供了抗多肽的抗体,其中该多肽对应于选自以下的登录号:AAQ65462、AAQ66991、AAQ65561 以及 AAQ66831。

[0028] 在一实施方案中,提供了抗多肽的抗体,其中该多肽对应于登录号 AAQ65742。

[0029] 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,该组合物包含本发明第一方面的牙龈卟啉单胞菌多肽的拮抗剂或拮抗剂的组合以及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。该拮抗剂可以是抗体。本发明还包括拮抗剂或拮抗剂的组合在制备用于预防或治疗牙周疾病的药物中的用途。

[0030] 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调节如上文所述的生物膜的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 所列序列的多肽转录物的多核苷酸的区域互补。

[0031] 附图简述

[0032] 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,然后将切割大小相等的条带,从而进行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 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。

[0033] 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 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 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 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 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。

[0034] 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

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 发明详述

[0038] 本发明提供治疗个体的牙周疾病的方法,包括预防性治疗。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。口腔细菌在龈边缘的的积累导致称为“龈炎”的牙龈炎症。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”。牙周炎具有特定的细菌病原学，并且牙龈卟啉单胞菌被认为是主要的发病原因。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。牙齿可能逐渐地变松并不得被移除。

[0039] 利用蛋白质组策略，本发明人鉴定并定量了生物膜和浮游状态之间的 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。

[0040] 本领域的技术人员应当完全理解的是，可以改变已经鉴定为在生物膜与浮游状态之间具有丰度变化的多肽的氨基酸序列。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）。意图是与序列中所列的序列具有至少 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，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与表 4 所列的登录号有关的序列的多肽。

[0041] 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。

[0042] Gly、Ala、Val、Ile、Leu、Met；

[0043] Asp、Glu、Ser；

[0044] Asn、Gln；

[0045] Ser、Thr；

[0046] Lys、Arg、His；

[0047] Phe、Tyr、Trp、His；以及

[0048] Pro、Na - 碱性氨基酸。

[0049] 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 以及免疫学的对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), Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach (DNA 克隆：实用方法), Volumes 1-4, 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。

[0050] 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,或者该多肽或肽是可以用合成方法合成的。优选地,还从诸如抗体或凝胶基质,如用于纯化该多肽的聚丙烯酰胺的物质中分离该多肽。优选地,该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)。

[0051] 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。

[0052] 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,包括融合多肽在内。制备融合多肽的方法对本领域的技术人员是公知的。

[0053] 本文所用的“抗原性多肽”是诸如多肽、其类似物或片段的部分,其能够以足够高的亲和力结合特异性抗体,从而形成可检测的抗原抗体复合物。优选地,该抗原性多肽包含能够在宿主动物中引起体液和/或细胞免疫应答的免疫原性组分。

[0054] 在比较多肽序列时,“基本上相同”表示长度的 95% 或更高是相同的,或者任意 10 个连续的氨基酸是相同的。

[0055] 本文所用的“连续的氨基酸序列”指的是连续的一段氨基酸。

[0056] “重组多肽”是通过涉及使用重组 DNA 技术的方法制备的多肽。

[0057] “预防”牙周疾病的含有是表示抑制疾病状况的发展,但是不必是永久和完全地预防该疾病。

[0058] 在测定两个氨基酸序列是否落在指定的百分比限制内时,本领域的技术人员应当清楚需要构建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,并使比对中的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] 本发明还提供了用于在个体中产生对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的疫苗组合物,该组合物包括免疫原性有效量的本发明第一方面的至少一种多肽和制药学上可接受的载体。

[0060] 本发明的疫苗组合物优选包含抗原多肽,该抗原多肽包含能够用于赋予抗牙龈卟啉单胞菌的保护性应答的至少一种抗原。用本发明的方法治疗的个体可以选自但不限于人、绵羊、家畜 (cattle)、马、牛、猪、家禽、犬以及猫。优选地,个体是人。当在宿主中发展了抗特异性抗原多肽的细胞和/或抗体介导的应答时,在个体中即实现了针对牙龈卟啉单胞菌的免疫应答,而不论该应答是否是完全保护的。

[0061] 优选地,向个体施用疫苗组合物以诱导对牙龈卟啉单胞菌的免疫力,从而预防、抑

制或降低牙周疾病的严重性。还可以向个体施用该疫苗组合物以治疗牙周疾病,其中该牙周疾病是由,或者至少部分是由牙龈卟啉单胞菌因起的。本文所用的术语“有效量”表示足以引起抗牙龈卟啉单胞菌的免疫应答的剂量。这将根据个体和牙龈卟啉单胞菌的感染水平而变化,并最终由主治的科学家、医师或兽医决定。

[0062] 本发明的组合物包含合适的制药学上可接受的载体,例如适合向人或动物个体施用的稀释剂和/或佐剂。产生免疫应答的组合物优选包含通过鼻喷雾口服递送,或通过注射产生抗牙龈卟啉单胞菌的特异性免疫应答的合适佐剂。本发明的组合物还可以基于编码本发明的抗原多肽的重组核酸序列,其中将该核酸序列并入合适的载体并在含有该载体的合适的转化宿主中(例如,大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、COS 细胞、CHO 细胞以及 HeLa 细胞)表达。可以使用如本文所示的重组 DNA 方法制备,或者由本发明所述的氨基酸序列化学合成该组合物。另外,根据本发明,抗原多肽可以用于产生牙龈卟啉单胞菌抗血清,该抗血清用于抗牙周疾病和牙龈卟啉单胞菌所导致的感染的被动免疫。

[0063] 本领域技术人员已知的各种佐剂,通常与疫苗制剂和用于产生免疫应答的制剂联合使用。使用比单独施用疫苗抗原更少量的疫苗抗原或更少的剂量,佐剂通过调节免疫应答帮助获得更持久和更高水平的免疫力。佐剂的实例包括弗氏不完全佐剂(IFA)、佐剂 65(含有花生油、二缩甘露醇单油酸酯和单硬脂酸铝)、油乳剂、Ribi 佐剂、普卢龙尼克多元醇类(pluronic polyols)、聚胺、阿夫立定(Avridine)、Quil A、皂角苷、MPL、QS-21 以及诸如铝盐的矿物凝胶。其他实例包括水包油乳剂,如 SAF-1、SAF-0、MF59、Seppic ISA720,以及其他微粒佐剂,如 ISCOM 和 ISCOM 基质。佐剂的其他实例的广泛但详尽的名录列于 Cox and Couiter 1992 中 [In:Wong WK(ed.) Animals parasite control utilising technology(动物寄生虫控制所用的技术). Bocca Raton;CRC press et al., 1992;49-112]。除了佐剂以外,疫苗可以包含常规的制药学上可接受的载体、赋形剂、填充剂、缓冲剂或视情况而定的稀释剂。可以预防性地施用一剂或多剂含有佐剂的组合物,以预防牙周疾病,或者治疗性地治疗已经存在的牙周疾病。

[0064] 在另一优选的组合物中,将制剂与粘膜佐剂组合,并经由口服或鼻途径施用。粘膜佐剂的实例是霍乱毒素和不耐热大肠杆菌毒素、这些毒素的非毒性 B 亚基、毒性降低的这些毒素的遗传突变体。可以用于口服或经鼻递送抗原多肽的其他方法包括,通过微胶囊化将该多肽并入生物可降解的聚合物颗粒(例如,丙烯酸酯或聚酯),以促进从胃肠道或鼻腔的吸收微球体并保护蛋白不被降解。脂质体、ISCOM、水凝胶是其他潜在方法的实例,可以通过并入用于将抗原多肽递送至粘膜免疫系统的诸如 LTB、CTB 或凝集素(甘露聚糖、壳多糖和壳聚糖)的寻靶分子(targeting molecules)来进一步增强该方法。除了组合物和粘膜佐剂或递送系统以外,组合物可以包含常规的制药学上可接受的载体、赋形剂、填充剂、包衣、分散介质、抗菌和抗真菌剂、缓冲剂或的稀释剂,视情况而定。

[0065] 这个实施方案的另一个模式提供了用于防御牙龈卟啉单胞菌导致的感染的重组病毒活疫苗、重组细菌疫苗、重组减毒细菌疫苗或者失活的重组病毒疫苗。牛痘病毒是本领域中感染病毒的最著名的实例,该病毒经改造表达衍生于其他有机体的疫苗抗原。用减毒或另外处理从而自身不会导致疾病的重组牛痘活病毒免疫宿主。重组病毒在宿主内随后的复制为免疫系统的持续刺激提供了诸如抗原多肽的疫苗抗原,从而提供了长效的免疫力。

在这个语境及下文中,“疫苗”不限于产生保护性应答的组合物,而是包括产生任何免疫应答的组合物。

[0066] 其他的活疫苗载体包括:腺病毒、巨细胞病毒以及优选的痘病毒,例如,牛痘(Paoletti 和 Panicali,第 4,603,112 号美国专利)和减毒沙门氏菌(*Salmonella*)菌株(Stocker 等人,第 5,210,035 号、第 4,837,151 号和第 4,735,801 号美国专利以及 Curtis et al.,1988, *Vaccine* 6:155-160)。活疫苗是特别有利的,因为它们持续地刺激免疫系统,这基本上能够赋予长效的免疫力。当免疫应答是防御随后的牙龈卟啉单胞菌感染时,活疫苗自身可以用于抗牙龈卟啉单胞菌的保护性疫苗。特别是,活疫苗能够基于为口腔共生定居者的细菌。这种细菌可以用带有重组失活多肽的载体来转化,然后将该细菌用于在口腔中特别是在口腔粘膜上建群。一旦在口腔粘膜上建群,重组蛋白的表达将刺激粘膜相关淋巴组织产生中和抗体。例如,利用分子生物学技术,可以将编码多肽的基因在允许表达表位但是不对牛痘病毒载体的生长或复制有不利影响的位点插入牛痘病毒基因组 DNA。所得的重组病毒能够用作疫苗制剂中的免疫原。除了失活重组病毒以外,在用作免疫原前,可以用相同的方法构建失活的重组病毒疫苗制剂,而基本上不会影响表达的免疫原的免疫原性,例如,通过本领域公知的化学方法。

[0067] 作为主动免疫的替代方案,免疫可以是被动的,即包括施用含有抗本发明的多肽的抗体的纯化免疫球蛋白的免疫。

[0068] 可以将本发明的方法和组合物中所用的抗原多肽与合适的赋形剂组合,所述赋形剂,例如乳化剂、表面活性剂、稳定剂、染料、渗透增强剂、抗氧化剂、水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、硬脂酸镁以及硅酸。优选将抗原多肽配制成无菌水溶液。本发明的疫苗组合物可以用于补充目前对牙周疾病的治疗。

[0069] 本发明还提供了预防或治疗个体的牙周疾病的方法,该方法包括向个体施用本发明的疫苗组合物。还提供了抗本发明的第一方面的多肽的抗体。优选地,该抗体特异性地针对本发明的多肽。

[0070] 在本说明书中,术语“抗体”采用最广泛的含义,并具体地包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、嵌合抗体、双抗体、三抗体以及抗体片段。本发明的抗体优选能够特异性地结合上文所述的抗原多肽,而不与其他多肽的抗原交叉反应。

[0071] 本文所用的术语“特异性地结合”旨在表示通过抗体的免疫球蛋白可变区结合抗原,并且解离常数(Kd)为 $1\mu\text{M}$ 或更低,这可通过利用诸如 BIAcore™ 表面等离子体共振系统和 BIAcore™ 动力学评估软件(例如,版本 2.1)的表面等离子体共振分析测量。地,特异性结合相互作用的亲和或解离常数(Kd)优选为约 500nM-约 50pM,更优选约 500nM 或更低,更优选约 300nM 或更低,并且优选至少约 300nM-约 50pM、约 200nM-约 50pM,并且更优选至少约 100nM-约 50pM、约 75nM-约 50pM、约 10nM-约 50pM。

[0072] 已经证实,全长抗体的片段能够行使抗体的抗原结合功能。抗体的结合片段的实例包括(i) Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,包含通过铰链区的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段;(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(v) 由 VH 结构域或 VL 结构域组成的 dAb 片段;以及(vi) 分离的互补决定区(CDR)。而且,尽管 Fv 片段的两个结构域即 VL 和 VH 由分离的基因编码,但是可以利用重组方法,通过使它们成为一个蛋白链的合成连接

子将它们联合,其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子(称为单链 Fv(scFv))。也包括了其他形式的单链抗体,例如双抗体或三抗体。双抗体是二价的、双特异性抗体,其中 VH 和 VL 结构域表达于一个多肽链上,但是使用了过短而不能让相同链上的两个结构域之间配对的连接子,从而迫使该结构域与另一链上的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。

[0073] 本领域已知的各种方法还可以用于制备可以结合本发明的抗原多肽的单克隆抗体、多克隆抗体以及各种重组和合成的抗体。另外,本领域的技术人员应当熟悉能够用于增强免疫应答的各种佐剂,根据宿主的种类,该佐剂包括但不限于弗氏佐剂(完全和不完全)、诸如氢氧化铝的矿物凝胶、诸如溶血卵磷脂、普卢龙尼克多元醇类的表面活性物质、聚阴离子、肽、油乳剂、二硝基酚以及诸如卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*) (BCG) 和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*) 的潜在有用的人类佐剂。抗体和抗体片段可以通过标准技术(例如,组织培养或者使用发酵罐的无血清培养)来大量制备,以及使用诸如蛋白 A(例如,用于鼠 Mab)、蛋白 G(例如,用于大鼠 Mab) 或 MEP HYPERCEL(例如,用于 IgM 和 IgG Mab) 的亲合柱纯化。

[0074] 对于人治疗应用而言,重组的人或人源化形式的单克隆抗体是优选的实施方案。可以根据文献中的方法制备人源化的抗体(例如, Jones et al. 1986, *Nature* 321:522-25; Reichman et al. 1988 *Nature* 332:323-27; et al. 1988, *Science* 1534-36)。最近描述的用于制备人源化的单克隆抗体的“gene conversion mutagenesis(基因转化诱变)”策略也可以用于制备人源化的抗体(Carter et al. 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:4285-89)。可选地,用于产生重链区和轻链区的随机组合的重组噬菌体文库的技术也可以用于制备重组抗体(例如, Huse et al. 1989 *Science* 246:1275-81)。

[0075] 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。

[0076] 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)。

[0077] 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,该分子包含每条链中至少 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。

[0078] 所谓的 RNA 干扰或 RNAi 是已知的,并且 Hannon (2002) *Nature* 418:244-251 和 McManus&Sharp (2002) *Nature Reviews:Genetics* 3(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。

[0079] 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 Therapy* 13:225-234)。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一个硫代磷酸酯连接。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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,该整试剂盒还包括它们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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 用于生物膜与浮游研究的牙龈卟啉单胞菌的生长和收获

[0090] 利用 C-30 型 BioFlo 恒化器 (New Brunswick Scientific),使牙龈卟啉单胞菌 W50 (ATCC 53978) 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,培养物达到稳定态,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。

[0091] 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 NaH_2PO_4 、10.0mM KCl 、2.0mM 柠檬酸、1.25mM MgCl_2 、20.0mM CaCl_2 、25.0mM ZnCl_2 、50.0mM MnCl_2 、5.0mM CuCl_2 、10.0mM CoCl_2 、5.0mM H_3BO_3 、0.1mM Na_2MoO_4 、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。

[0092] 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 MgCl_2 、pH 8.0、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。

[0093] 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

[0094] 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 $\mu\text{g/mL}$ 的氯化血红素 (血红素过量) 或者 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 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 pH 8.0、150mM NaCl 、5mM MgCl_2),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。

[0095] 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

[0096] 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。

[0097] 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 pH 8.0 的 25mMTris 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。

[0098] 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。

[0099] 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 1mm^3 的方块。在 $50\text{mM NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}(1:1)$ 的溶液中脱色三次。脱色后,将该凝胶方块用 $100\%\text{ACN}$ 脱水,然后在 56°C 下,用含于 ABC 缓冲液 ($50\text{mM NH}_4\text{HCO}_3$) 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 $100\%\text{ACN}$ 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 $60\mu\text{l}$ 的溶液中,消化 20h ,该溶液含有在 H_2^{16}O 或 H_2^{18}O (H_2^{18}O , 纯度大于 97% , Marshall Isotopes) 中制备的 $2\mu\text{g}$ 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 $50\%\text{ACN}/0.1\%\text{TFA}$ 在它们各自的水 ($\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$) 中的溶液以及 $0.1\%\text{TFA}$,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 。

[0100] 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 $5\%\text{ACN}/0.1\%\text{TFA}$ 在它们各自的水 ($\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$) 中的溶液中。然后,利用高级 μL 取样模式下的 FAMOS 自动加样器,将肽溶液 ($20\mu\text{l}$) 加样至 Ultimate 纳米 LC 系统 (Nano LC system, LC Packings)。首先,以 $200\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速,将样品加样至捕获柱 ($300\mu\text{m}$ 内径 $\times 5\text{mm}$) 达 5min 。使用反向柱 (LC Packings, C18 PepMap100, $75\mu\text{m}$ i.d. $\times 15\text{cm}$, $3\mu\text{m}$, $100\text{\AA}$) 以 $300\text{nL}/\text{min}$ 的流速实现分离,用 $0-5\text{min}(0\%)$ 、 $5-10\text{min}(0-16\%)$ 、 $10-90\text{min}(16-80\%)$ 、 $90-100\text{min}(80-0\%)$ 的 ACN 梯度,在 0.1% 甲酸中洗脱。

[0101] 使用 Proteineer Fc 自动装置 fBruker 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 $0.2\mu\text{L}$ 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 (LIDT II 升级的 Ultraflex, Bruker Daltonics) 进行自动分析前,将平板用 10mM 磷酸铵和 $0.1\%\text{TFA}$ 洗涤并空气干。首先使用 25kV 的加速电压,在测量 800Da 至 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。

[0102] 使用 WarpLC 软件 (第 1.0 版) 和 LC MALDI SILE (Stable Isotope Labelling Experiment) 作业流程,选择母前体 (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。

[0103] 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。

[0104] 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 搜寻引擎 (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。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 由于一个或两个 ^{18}O 原子混合地并入肽、 ^{18}O 同位素的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:

$$[0108] \quad R = (I_1 + I_2) / I_0 \quad (1)$$

[0109] 根据下述公式计算 I_0 、 I_1 和 I_2 (27)

$$[0110] \quad I_1 = \frac{aS_2 - [aJ_2 - 2(1-a)J_4]S_0 - 2(1-a)S_4}{a^2 - (2-a-a^2)J_2 + 2(1-a)^2J_4} \quad (2)$$

$$[0111] \quad I_0 = \frac{S_0 - (1-a)I_1}{1} \quad (3)$$

$$[0112] \quad I_2 = \frac{(S_4 - J_4I_0 - J_2I_1)}{a^2} \quad (4)$$

[0113] 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 $^{16}O^{18}O$ 。

[0114] 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。

[0115] ICAT 标记的血红素限制和过量的细胞的制备和分析

[0116] 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 pH 8.3 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℃ 下,使用 2 μ l 50mM 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。

[0117] 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℃ 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 含于 0.1% TFA 的 5% 乙腈中。

[0118] 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 PepMap100, 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%)。

[0119] 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。

[0120] 使用利用 Apex 峰寻找算法的 DataAnalysis 3.2 (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 (MASCOT 2.1.02, 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。

[0121] 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 (parent 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 用于转录组学分析 (transcriptomic analysis) 的核酸的提取

[0126] 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 MatrixB 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 RNAspin 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。

[0127] 利用 Dneasy 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。

[0128] 微阵列设计、杂交和分析

[0129] 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。

[0130] 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 μ g 随机六聚体 (Invitrogen) 引发 cDNA 合成反应,由 10 μ 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。

[0131] 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 $\times$ SSPE [1 $\times$ SSPE 是 150mM NaCl、10mM NaH₂PO₄、1mM EDTA]) 达 1h。封闭后,在 H₂O 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 μ L 的杂交缓冲液中 (35% 甲酰胺、5 $\times$ SSPE、0.1%SDS、0.1mgmL⁻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 $\times$ SSC [1 $\times$ 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 $\times$ SSC (10min)、0.1 $\times$ SSC (洗涤 4 次,每次 1min) 中连续洗涤,然后快速地浸入 0.01 $\times$ SSC,然后浸入 99% 乙醇中,并利用离心干燥该芯片。

[0132] 利用 GenePix 4000B 微阵列扫描仪扫描芯片,并利用 GenePix Pro 6.0 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。

[0133] 利用 GenePix Pro 6.0 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。

[0134] 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。

[0135] 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

[0136] 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。

[0137] 除了在下文更详细地讨论的基因产物以外,某些目的基因的转录明显地被上调了,其包括 PG1874 与 PG1875 这两个基因的推断操纵子的基因,其中一个编码溶血素 A ;8 个连锁的基因 PG1634-PG1641,其中 PG1638 编码推断的硫氧还蛋白以及编码锰转运蛋白 FeoB2 的 PG1043。编码黄素氧还蛋白的 PG1858 是上调最高的基因,上调了 15.29 倍。在 152 个明显上调的基因中,约 55 个基因没有预测的功能。

[0138] 连续培养与生物膜的形成

[0139] 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 OD_{650} 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。

[0140] 使用 BSA 对 $^{16}O/^{18}O$ 定量方法的验证

[0141] 为了确定 $^{16}O/^{18}O$ 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)。

[0142] 生物膜样品和浮游样品的定量分析的实验设计

[0143] 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 $^{16}O/^{18}O$ 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。

[0144] 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 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 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)。

[0145] 浮游和成熟的生物膜牙龈卟啉单胞菌细胞的细胞外膜的蛋白质组

[0146] 基于实验方法章节所述的选择标准, 我们已经鉴定并测定了来自 1582 种肽的 116 种蛋白的相对丰度。在这些鉴定的蛋白中, 73.3% 的蛋白是通过多于 2 种特异性肽段鉴定的, 12.9% 的蛋白来自 1 种特异性肽段但是在两个生物学重复中都得到鉴定, 13.8% 的蛋白仅通过 1 种特异性肽段鉴定, Mascot 肽离子得分大于 50 (图 5)。CELLO(36) 预测 77.6% 的这些蛋白来自细胞外膜, 从而证明了这种细胞外膜富集方法的效率。通过 TIGR (www.tigr.org) 和 ORALGEN 口腔病原体序列数据库 (www.oralgen.lanl.gov) 的生物信息学分类, 预测了大比例的鉴定的蛋白参与转运, 具有蛋白水解活性或者细胞代谢功能。有趣的是, 55% 的所有鉴定的蛋白的功能是未知的。

[0147] 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 Log_{10} 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 R^2 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。

[0148] 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 (Gaussian-like) 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)。

[0149] 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。

[0150] 表现出协调调控的代谢途径的酶

[0151] 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 (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。

[0152] 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 (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)。

[0153] 有机酸终产物的分析

[0154] 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耗尽培养基中,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。

[0155] 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作为成熟的单物种生物膜的一部分生长时发生。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。

[0156] 牙龈卟啉单胞菌的连续培养

[0157] 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,使细菌在严格控制的条件下生长许多代,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)。以前的研究证明了在不同实验室的恒化器中连续培养的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 转录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,本研究中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。

[0158] ^{18}O 标记的效率

[0159] 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) 类似的凝胶中消化方法期间,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)。

[0160] 反向标记

[0161] 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。

[0162] 生物膜与浮游培养

[0163] 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的这一发现,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,特别是细胞外膜中的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。

[0164] C- 末端结构域家族

[0165] 最近证实牙龈卟啉单胞菌最近被证实具有新的蛋白家族,该家族具有高达 34 种位于细胞表面的外膜蛋白,除了具有大约 80 个残基的保守的 C- 末端结构域 (CTD) 以外,这些蛋白没有明显的序列相似性 (31、56)。牙龈卟啉单胞菌 CTD 蛋白家族包括牙龈蛋白酶 (gingipain) (RgpA [PG2024]、RgpB [PG0506]、Kgp [PG 1844])、Lys- 和 Arg- 特异性蛋白酶和粘附素,它们在细胞表面经分泌并加工,在细胞表面形成非共价复合体,并且被认为是这种细菌主要的毒力因子 (57-61)。由于牙龈蛋白酶能够降解宿主结构和防御蛋白,并且缺乏功能性 Kgp 或 RgpB 的突变体不能在鼠牙周模型中导致牙槽骨损失,因而牙龈蛋白酶与疾病发病机理直接相关 (62)。尽管这些 CTD 家族蛋白具有各种功能,CTD 家族蛋白的已知和推断的功能主要地集中于粘附和蛋白水解活性上,并且 CTD 家族蛋白还包括 CPG70 羧肽酶 (63)、PrtT 巯基蛋白酶、HagA 血细胞凝集素、格氏链球菌 (*S. gordonii*) 结合蛋白 (PG0350, (64)),其是推断的血细胞凝集素、推断的巯基还原酶、推断的纤连蛋白结合蛋白、推断的 Lys- 特异性蛋白酶 (PG0553) 和推断的冯维勒布兰德 (von Willebrand) 因子结构域蛋白等。大部分这些蛋白可能在细菌的毒力中发挥重要作用,因为它们与细胞外蛋白水解活性、聚集、血红素 / 铁的捕获和储存、生物膜形成于保持、毒力以及对氧化应激的抵抗有关。CTD 被认为在跨外膜的蛋白的分泌和其对细胞表面的附着中起作用,该作用可能经由糖基化 (56、65、66)。在本工作中,我们能够定量 9 种在两个重复中都一致地被调控的 CTD 家族蛋白 (表 2),并且除了 PG2216 和 PG1844 (Kgp) 以外,所有蛋白的丰度在生物膜状态期间都增加了。因此,这组蛋白中许多蛋白的丰度明显增加,表明它们在生物膜状态期间发挥重要的功能作用。

[0166] 牙龈卟啉单胞菌的主要细胞表面蛋白酶 RgpA、Kgp 已知主动参与肽和血红素采集,特别是来自血红蛋白和细胞表面的血红素释放的肽和血红素采集 (67、68)。在生物膜状态期间,RgpA 的丰度平均增加了 2.7 倍。HagA 的丰度在生物膜状态中也更高,HagA 含有也在 RgpA 和 Kgp 中发现的粘附素结构域,这种结构域是血细胞凝集和牙龈卟啉单胞菌的血红蛋白结合的原因 (69)。

[0167] 相比之下,发现 Kgp 在牙龈卟啉单胞菌的生物膜细胞中的丰度明显更低。这能够是由于 Kgp 丰度的下降或者可能是由于生物膜培养期间,Kgp 从牙龈卟啉单胞菌细胞表面的释放。Kgp 对牙龈卟啉单胞菌在表面暴露的 Lys 残基处水解血红蛋白是重要的,这导致肽和血红素的释放和摄取 (67、70)。Kgp 的粘附结构域与血红蛋白结合有关,并且 Genco 等人 (70) 认为 Kgp 充当血红素载体 (haemophore),其像铁载体一样,从细胞表面被释放以从环境中清除血红素。结合了血红素的 Kgp 然后被认为与 HmuR,即 TonB 连接的外膜受体结合,据报道该外膜受体对血红蛋白和血红素这两者的利用都是必需的,并且将血红素递送至细

胞 (71)。有趣的是,在包含 HmuR 的操纵子中编码的蛋白 HmuY 在生物膜培养的细胞中也更丰富。hmu 基因座含有 6 个基因 (hmuYRSTUV),并且据报道属于编码参与类似于 Iht 和 Htr 系统的血红素采集途径的蛋白的多基因簇 (72)。已证明 HmuY 对血红蛋白和血红素这两者的利用都是必需的,并且受铁的可利用性调控 (72、73)。尽管在我们的研究中没有鉴定 HmuR,但是 hmuR 和 hmuY 的操纵子特性以及其他证据表明,它们的表达受到类似的调控,并且它们一致地对血红素的利用起作用 (71、74)。因此,Kgp 丰度的减少和 HmuY 丰度的增加与其预计的作为生物膜生长中的血红素载体 (hemophore) 和血红素限制的作用是一致的 (参见下文)。

[0168] 已证明与牙龈蛋白酶加工有关的 CTD 家族蛋白酶即 CPG70 (PG0232) 的丰度在生物膜培养中也一致地更高,这可能表明了生物膜生长期间细胞表面蛋白的结构重塑中的作用 (63、75)。CTD 家族推断的硫氧还蛋白 (PG0616) 在生物膜状态中的丰度也明显地更高。PG0616 被表征为 HBP35,即具有共聚集 (coaggregation) 特性的血红素结合蛋白 (76)。特别值得注意的是,免疫反应性的 46kDa 抗原即 PG99 的丰度在生物膜细胞中平均增加了 5 倍 (表 2)。这是在本研究中观察到的蛋白丰度的最高的增加,由于 PG99 既是免疫原性的又是 CTD 家族成员,因此其最有可能位于细胞表面,这种蛋白代表了生物膜破坏剂的良好潜在靶标。

[0169] 转运蛋白

[0170] 两种推断的依赖 TonB 的受体家族蛋白 (PG1414 和 PG2008) 和推断的血红素受体蛋白 (PG1626) 的丰度也表现出明显增加。这些蛋白的确切功能是未知的,然而,对 NCBI COG 数据库的 COG 搜索获得了对与 P 功能级别的主要参与 Fe 转运的外膜受体蛋白的采样 (77)。有趣的是,我们还观察到细胞内铁储存蛋白铁蛋白 (PG1286) 丰度的增加。这些铁 / 血红素转运和储存蛋白丰度的一致增加可以是血红素 / 铁限制的标志,特别是在生物膜更深层中的血红素 / 铁限制,因为铁蛋白对牙龈卟啉单胞菌免于铁耗尽的条件是重要的 (78)。

[0171] 有可能,由于牙龈卟啉单胞菌的高蛋白水解活性、高血红蛋白和血红素结合与储存能力,血红蛋白和血红素都不会扩散远至生物膜中。也可能,经由 FeoB1 的亚铁离子的转运在位于生物膜更深层中的这种物种的铁代谢中发挥更重要作用,这还可以解释铁蛋白的增加,因为血红素作为铁的细胞表面储存的可能性不大 (45、79)。生长于血红素限制的条件下的牙龈卟啉单胞菌表现出细胞内铁的增加,这表明 PPIX 是生长限制因子,并且亚铁离子经由 FeoB1 转运蛋白积累 (45)。

[0172] IhtB (PG0669) 和推断的依赖 TonB 的受体 (PG0707) 这两者的丰度都在生物膜状态中表现出减少 (表 2)。IhtB 是血红素结合脂蛋白,认为还其作为外周外膜整合酶起作用,该酶在牙龈卟啉单胞菌摄取铁之前,将铁从血红素中移除 (80)。与许多其他蛋白的丰度的增加一致的、潜在地与血红素 / Fe 摄取有关的两种蛋白的生物膜状态期间丰度类似的减少表明,用于摄取的受体类型的转变,或者更可能地,所用基质中改变的转变。综合上文的观察,看起来在生物膜中生长的牙龈卟啉单胞菌可能是缺乏血红素的。因此,某些转运和结合蛋白更高的丰度表明,它们在生物膜状态期间是更关键的,因此可能是抗微生物药物的靶标。

[0173] 与浮游状态相比,生物膜状态期间的糖酵解酶即 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 (*S. oralis*) 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。

[0174] 生物膜形成

[0175] 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。

[0176] 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,而且还是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。

[0177] 功能未知的蛋白

[0178] 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。

[0179] 上文的结果表示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。

[0180] 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

[0181]

预期比率 1:1a)	3 次分析			平均比率 (± SD)
CCTESLVNR	0.83	0.84	0.88	0.85 ± 0.03
DLGEEHFK	0.95	1.06	0.85	0.95 ± 0.10
EACFKVEGPK	1.09	1.12	1.09	1.10 ± 0.02
ECCDKP LLEK	1.01	0.96	0.87	0.94 ± 0.07
EYEATLEECCA K	1.05	1.01	1.05	1.04 ± 0.02
LVTDLTKVHK	0.86	0.91	1.02	0.93 ± 0.08
RHPEYAVSVLLR	1.07	0.96	0.94	0.99 ± 0.07
YICDNQDTISSK	1.00	1.15	1.03	1.06 ± 0.08
平均值	0.98 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.97 ± 0.09	0.98 ± 0.08
所有肽 ID**的平均值				0.98 ± 0.12
所有肽 ID 的 CV				13.1%
	预期比率 2:1 b) (¹⁸ O/ ¹⁶ O)	预期比率 1:2 b) (¹⁸ O/ ¹⁶ 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 ± 0.33	2.30 ± 0.20	2.24 ± 0.24	
所有肽 ID***的平均值			2.22 ± 0.26	
所有肽 ID 的 CV			11.75%	
预期比率 1:5		预期比率 10:1		
	(¹⁸ O/ ¹⁶ O)		(¹⁸ O/ ¹⁶ 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 ± 0.04 (4.90 ± 0.75)		10.74 ± 2.04	
所有肽 ID 的 CV	15.26%		18.95%	

[0182] 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

[0183] 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

n=55 *n=24

[0184] 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。

[0185]

		生物学重复 1					生物学重复 2						
Tiger 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	
CTD 家族蛋白													
	蛋白酶												
PG0232	锌指肽酶, 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, 羧基氨内肽酶前体 (API)	OM/EX	1	65/23	3.33		2	62/19	3.45		2	1 (FF)	
PG1424	肽基精氨酸脱亚胺酶	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 HagA	OM	3 (15)*	59/20	2.73	0.44	3 (15)*	42/21	4.21	0.36	3	1 (FF)	
PG1844	羧基肽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 HltB	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)	
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	1 (DD)	
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	1 (FF)	

[0186]

		生物学重复 1					生物学重复 2						
Tiger 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	
PG1551	HmuY 蛋白	UN	4	75/20	2.57	0.71	4	74/20	2.78	0.21	1	1 (DD)	
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	2 (EF)	
PG2008	依赖 TonB 的受体, P90	OM	24	68/21	2.08	0.17	26	112/20	3.12	0.21	20	2 (EF)	
PG0185	RagA 蛋白	OM	58	89/21	0.42	0.02	109	126/20	0.79	0.04	24	2 (BC)	
PG0186	脂蛋白 RagB	OM	51	142/22	0.34	0.04	56	142/19	0.26	0.02	24	1 (AA)	
PG1010	ABC 转运蛋白, ATP 结合蛋白	IM	1	69/21	1.41		2	60/19	1.26		2	1 (DD)	
PG1762	蛋白膜外排膜蛋白 SecD/蛋白膜外排膜蛋白 SecE	IM	14	91/22	0.76	0.07	4	99/20	0.48	0.09	10	2 (CB)	
PG2082	POT 家族蛋白	IM	13	75/23	0.80	0.06	6	48/22	0.52	0.10	4	1 (CC)	
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	1 (DD)	
PG1286	铁蛋白	CY	5	73/22	1.50	0.04	7	124/19	2.42	0.14	3	2 (DE)	
生物膜和相关发育													
PG0159	内肽酶 PepO	PP/CY	8	122/20	0.35	0.08	3	60/19	0.18	NA ^f	3	2 (BA)	
PG0245	通用应激蛋白	CY	1	67/22	0.41		2	64/20	0.25		1	2 (BA)	
PG2132	菌毛蛋白	EX	1	31/22	1.14		2	66/20	0.85		3	2 (DC)	
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	2 (FE)	
PG0306	电子传递复合体, RnfABCDGE 型, G 亚基	PP	2	108/22	1.08		1	61/19	0.72		1	2 (DC)	
PG1084	硫氧还蛋白家族蛋白	CY	2	87/22	1.07		1	132/20	0.14		1	4 (DA)	
PG1612	甲基丙二酰基-CoA 脱羧酶, α 亚基 (mmdA)	CY	1	65/21	0.73		2	55/21	0.42		1	2 (CB)	
PG1614	富马酸还原酶, 铁-硫蛋白 (frdB)	UN	2	60/20	0.15		2	53/21	0.19		2	1 (AA)	

[0187]

		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
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**		3	NA
PG1704	硫醇: 二硫化物交换蛋白 dsbD, 推断的	IM	3	64/23	2.14		3	68/20	0.46	0.08	1	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		1	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		3	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!	3	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	1 (AA)
PG0375	核糖体蛋白 L13 (rplM)	CY	2	69/21	0.28		1	116/20	0.18		2	1 (AA)
PG0392	核糖体蛋白 L10 (rplU)	CY	2	97/21	0.33		5	68/22	0.37	0.02	3	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	4	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	11	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		2	1 (FF)
PG0694	外膜蛋白 40	OM	37	116/20	3.62	0.37	77	86/20	3.39	0.24	13	1 (FF)
PG0695	外膜蛋白 41	OM	100	110/21	2.31	0.21	53	124/19	3.18	0.20	19	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	2 (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	2 (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	2 (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	2 (AB)
脂蛋白												
PG0188	脂蛋白, 推断的	PP/EX	7	72/23	0.92	0.09	4	40/20	1.18	0.11	5	2 (CD)
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)

[0188]

		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	
	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		1	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		3	2 (EF)	
PG0217f	未命名的蛋白	OM	4	74/21	1.58	0.34	7	79/18	1.78	0.07	5	2 (DE)	
PG0218	未命名的蛋白	OM	4	61/20	2.10	0.55	11	55/20	1.59	0.17	4	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	5	2 (DF)	
PG0409	未命名的蛋白(保守的)	PP	4	82/22	2.20	0.38	2	69/19	2.28		2	1 (EE)	
PG0423	未命名的蛋白(保守的)	CY	2	90/23	3.62		1	72/21	0.68		1	4 (FB)	
PG0452	未命名的蛋白(保守的)	OM	1	53/20	0.39		3	81/20	0.40	0.11	2	1 (BB)	
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	1 (DD)	
PG0449	TPR 结构域蛋白	PP	2	68/23	1.28		1	64/18	1.19		1	1 (DD)	
PG0602	未命名的蛋白(保守的)	OM	3	63/21	0.65	0.07	1	37/21	NA**		2	NA	
PG0914	未命名的蛋白	OM	1	66/21	2.23		1	27/22	2.91		2	2 (EF)	
PG1028	TPR 结构域蛋白	PP	2	78/21	0.37		5	70/19	0.48	0.08	4	1 (BB)	
PG1035	未命名的蛋白(保守的)	OM	1	42/21	0.31		5	62/21	1.16	0.16	3	4 (AD)	
PG1304	未命名的蛋白(保守的)	OM	3	52/20	2.80	1.00	1	34/20	2.93		1	2 (EF)	
PG1356	未命名的蛋白(保守的)	CY	2	60/21	0.31		1	43/21	0.12		2	1 (AA)	
PG1382	未命名的蛋白(保守的)	OM	3	63/21	1.89	0.29	1	51/21	4.43		2	2 (EF)	
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	1 (EE)	
PG1621	未命名的蛋白(保守的)	OM	2	51/21	1.10		4	60/21	0.42	0.05	2	2 (CB)	
PG1684f	未命名的蛋白	EX/IM	1	58/22	1.25		1	73/20	0.79		1	2 (DC)	
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	2 (DC)	
PG1881	未命名的蛋白(保守的)	OM	2	49/22	0.61		4	48/19	0.82	0.16	3	1 (CC)	
PG1889f	未命名的蛋白	CY	12	99/20	0.16	0.02	8	85/20	0.25	0.03	6	1 (AA)	
PG2049	未命名的蛋白	IM/CY	3	48/21	0.63	0.06	1	27/21	0.82		1	1 (CC)	
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	1 (EE)	

[0189]

		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) c	
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)	

[0190] 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

[0191] b 最大 Mascot 肽离子得分 / 鉴定阈值

[0192] 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

[0193] d SE= 平均标准误差

[0194] e 如图 4B 所述的排名和分组

[0195] f 仅在本研究中鉴定的蛋白

[0196] ! 由于 3 肽中的一个肽未分辨 / 重叠, 未进行 SE 测量

[0197] * 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。

[0198] ** 由于未分辨 / 重叠的峰

[0199] 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。

[0200]

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-环化脱氢酶-相关蛋白 IMEC*VPNESEGR	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 IAGELLPC*VFHVSAR	33/15	1	1	2.0	-	NS	
3	PG0687	琥珀酸-半脱氢酶 AFDNGHC*SGEQSHYNEADK C*SAHAVR EYQATHNOEAVDNIC*R GVGAEDVIC*K NHGAVTC*DEAEGDR TC*NAIIAPHPR	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-羟丁酰脱氢酶 ELIIVPTTC*GIGSEVINISIAEK ILNC*QPEVYVFK LDELLGC*LLTK	35/19 41/18 35/14	12	3	2.8	0.8	1.93	8.892E-05
5	PG0690 ^b	4-羟丁酸-CoA 转移酶						3.31	0.03
6	PG0691 ^b	NHU-样蛋白						1.60	0.0002
7	PG0692	4-羟丁酸-CoA 脱氢酶 AGNYMIDLLANVC*K TASC*TOR	42/15 20/15	5	2	2.9	0.7	1.65	0.054
8	PG1067	假定的蛋白 TDISESAADVLDEPIVVC*R	64/14	2	1	2.4	-	NS	
9	PG1068	保守的假定的蛋白 MHTAAIC*GAELVK AVC*PDVHQPTGGAVGMTNDER	40/12 38/15	3	2	1.7	0.1	NS	
10	PG1075 ^b	丁酸-乙硫乙酸 CoA 转移酶						1.4	0.05
11	PG1076	酰基-CoA 脱氢酶, 短链特异性 LYC*AITAMDMITK SIQFQNTQQLADLQC*R	26/14 23/19	3	2	1.8	0.2	NS	
12	PG1078	电子传递黄素蛋白, α 亚基 VIAILC*GYK IGLTADC*TSLEIGDER	22/15 55/15	5	2	2.0	0.4	NS	
13	PG1079 ^b	烯酰-CoA						1.3	0.04
14	PG1081	乙酰胺酶		9	3	3.5	0.9	NS	

[0201]

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	PG1082	VVLNCGSSSVK AC*ELCLDYDK VEEC*PIAPLINPANK 解腺苷乙酰胺 AALVITNPLVGC*LIVK GC*SVFDIYR	42/14 29/15 42/14 52/15 43/15	5	2	4.4	1.6	NS	
16	PG1232	谷氨酸脱氢酶, NAD-特异性 C*MLDLR LRPFSTGFGAVYFVQNMCM*K	28/14 54/15	10	2	2.3	1.2	NS	
17	PG1271	鸟氨酸转氨酶 VYIVC*DGNEHGR YEDFLSAYSAVNOGHCM*HPK	42/19 32/19	3	2	0.09	-	NS	
18	PG1417	富马酸水合酶, I 类; 反氢 GQLPFC*QDTGTAILGK HGASC*PVGMQVSC*NAHR	57/15 18/16	3	2	1.0	0.2	NS	
19	PG1612	甲基丙二酰-CoA 脱氢酶, α 亚基 ENGQSVGIVANQPQVMAGC*LDSNASR C*INFGIDK	28/14 21/15	2	2	2.4	-	NS	
20	PG1614	富马酸还原酶, 铁-硫蛋白 (FrdB) MDELGFQNC*INTR APVVDIHDCK	45/13 36/15	6	2	0.25	0.1	NS	
21	PG1615	富马酸还原酶, 黄素蛋白亚基 (FrdA) LAESNAIDQC*VAQGVPEAR	29/14	1	1	0.35	-	NS	
22	PG1741	天冬氨酸脱羧酶 C*GLHEFINLPAMQPGSSIMPVK VNPVPEVAMNQCM*YK	24/14 20/15	4	2	1.0	0.2	NS	
23	PG1810	2-酮戊二酸氧化还原酶, β 亚基 IADMLAILLGTC*LVTR	54/16	3	1	2.5	0.5	NS	
24	PG1949	苹果酸脱氢酶 LTPNLC*LYDPEAVGLEGVAEIR	35/15	3	1	1.0	0.2	NS	

[0202] 1 最高得分肽的得分 / 阈值得分 (P=0.05)

[0203] 2 每种蛋白的独立肽鉴定事件的总数

[0204] 3 每种蛋白的所鉴定的单一 ICAT 标记的肽的数目

- [0205] 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）
- [0206] 5NS 没有检测到统计学显著的变化
- [0207] 6 仅在微阵列分析中鉴定的
- [0208] C* 表示 ICAT- 修饰的半胱氨酸
- [0209] 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

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	特肽肽酶, CPG70	OM	1.67	2.53	3 (DF)	AAQ65462	AAQ65462.1
PG0553	细胞外蛋白酶, 羧基胺内肽酶前体(API)	OM/EX	3.33	3.45	1 (FF)	AAQ65742	AAQ65742.1
PG2024	精氨酸特异性蛋白酶 ArgI 多聚蛋白(RgpA)	OM	1.63	3.78	3 (DE)	AAQ66991	AAQ66991.1
血红素结合							
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	依据 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	可能的的外膜相关蛋白 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

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
能量代谢							
PG2168	未命名的蛋白 (保守的)	UN	4.90	2.04	2 (FE)	AAQ67118	AAQ67118.1
富马酸还原酶, 铁-硫蛋白(frdB)							
PG1614	富马酸还原酶, 黄素蛋白亚基(frdA)	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

- [0212] *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。

- [0213] 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。

- [0214]

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
铁转运和相关的蛋白									
13	PG0644 ⁶	HtrE (Tla) TonB 连接的受体					2.05		1.54E-04
18	PG1552	HmuR		1	1	4.0	-	3.13	0.003
		MNSDELFEITYPGYTIC*R	25/15						
21	PG1019	假定的蛋白		2	1	25.0	-	2.57	0.003
		TYMIDTNSDNC*1AR	70/14						
22	PG1020 ⁶	保守的假定的蛋白: 可能的的外膜受体蛋白					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

- [0215] 1 最高得分肽的得分 / 阈值得分 (P=0.05)
- [0216] 2 每种蛋白的独立肽鉴定事件的总数
- [0217] 3 每种蛋白的所鉴定的单一 ICAT 标记的肽的数目
- [0218] 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）
- [0219] 5NS 没有检测到统计学显著的变化
- [0220] 6 仅在微阵列分析中鉴定的

- [0221] C* 表示 ICAT- 修饰的半胱氨酸
- [0222] 参考文献
- [0223] 1. Costerton, J. W. , Lewandowski, Z. , Caldwell, D. E. , Korber, D. R. , and Lappin-Scott, H. M. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745
- [0224] 2. Cvitkovitch, D. G. , Li, Y. H. , and Ellen, R. P. (2003) *J. Clin. Invest.* 112(11), 1626-1632
- [0225] 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
- [0226] 4. van Steenberg, T. J. , Kastelein, P. , Touw, J. J. , and de Graaff, J. (1982) *J. Periodontal Res.* 17(1), 41-49
- [0227] 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
- [0228] 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
- [0229] 7. Cutler, C. W. , Arnold, R. R. , and Schenkein, H. A. (1993) *J. Immunol.* 151(12), 7016-7029
- [0230] 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
- [0231] 9. Davey, M. E. (2006) *Periodontol.* 200042, 27-35
- [0232] 10. Orme, R. , Douglas, C. W. , Rimmer, S. , and Webb, M. (2006) *Proteomics* 6(15), 4269-4277
- [0233] 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
- [0234] 12. Sauer, K. , Camper, A. K. , Ehrlich, G. D. , Costerton, J. W. , and Davies, D. G. (2002) *J. Bacteriol.* 184(4), 1140-1154
- [0235] 13. Ong, S. E. , and Mann, M. (2005) *Nat. Chem. Biol.* 1(5), 252-262
- [0236] 14. Bender, M. L. , and Kemp, K. C. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 116
- [0237] 15. Schnolzer, M. , Jedrzejewski, P. , and Lehmann, W. D. (1996) *Electrophoresis* 17(5), 945-953
- [0238] 16. Yao, X. , Freas, A. , Ramirez, J. , Demirev, P. A. , and Fenselau, C. (2001) *Anal. Chem.* 73(13), 2836-2842
- [0239] 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
- [0240] 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
- [0241] 19. Zang, L. , Palmer Toy, D. , Hancock, W. S. , Sgroi, D. C. , and Karger, B.

L. (2004) *J. Proteome Res.* 3(3), 604–612

[0242] 20. Kuster, B., and Mann, M. (1999) *Anal. Chem.* 71(7), 1431–1440

[0243] 21. Takao, T., Hori, H., Okamoto, K., Harada, A., Kamachi, M., and Shimonishi, Y. (1991) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5(7), 312–315

[0244] 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

[0245] 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

[0246] 24. Chen, X., Cushman, S. W., Pannell, L. K., and Hess, S. (2005) *J. Proteome Res.* 4(2), 570–577

[0247] 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

[0248] 26. Lane, C. S., Wang, Y., Betts, R., Griffiths, W. J., and Patterson, L. H. (2007) *Mol. Cell Proteomics*

[0249] 27. Korbel, S., Schumann, M., Bittorf, T., and Krause, E. (2005) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 19(16), 2259–2271

[0250] 28. Bantscheff, M., Dumpelfeld, B., and Kuster, B. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18(8), 869–876

[0251] 29. Jia, J. Y., Lamer, S., Schumann, M., Schmidt, M. R., Krause, E., and Haucke, V. (2006) *Mol. Cell Proteomics* 5(11), 2060–2071

[0252] 30. Miyagi, M., and Rao, K. C. (2007) *Mass Spectrom. Rev* 26(1), 121–136

[0253] 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(Pt 1), 105–115

[0254] 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

[0255] 33. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) *Electrophoresis* 20(18), 3551–3567

[0256] 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

[0257] 35. Quackenbush, J. (2001) *Nat. Rev. Genet.* 2(6), 418–427

[0258] 36. Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., and Hwang, J. K. (2006) *Proteins* 64(3), 643–651

[0259] 37. Richardson, A. J., Calder, A. G., and Stewart, C. S. (1989) *Letters in Applied Microbiology* 9, 5–8

[0260] 38. O’Toole, G. A., and Kolter, R. (1998) *Mol Microbiol* 28(3), 449–461

- [0261] 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
- [0262] 40. Lopez-Ferrer, D. , Ramos-Fernandez, A. , Martinez-Bartolome, S. , Garcia-Ruiz, P. , and Vazquez, J. (2006) *Proteomics* 6 Suppl 1, S4–S11
- [0263] 41. Staes, A. , Demol, H. , Van Damme, J. , Martens, L. , Vandekerckhove, J. , and Gevaert, K. (2004) *J Proteome Res* 3(4), 786–791
- [0264] 42. Patwardhan, A. J. , Strittmatter, E. F. , Camp, D. G. , 2nd, Smith, R. D. , and Pallavicini, M. G. (2006) *Proteomics* 6(9), 2903–2915
- [0265] 43. Smalley, J. W. , Birss, A. J. , McKee, A. S. , and Marsh, P. D. (1993) *JGen Microbiol* 139(9), 2145–2150
- [0266] 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
- [0267] 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
- [0268] 46. Li, J. , Steen, H. , and Gygi, S. P. (2003) *Mol. Cell Proteomics* 2(11), 1198–1204
- [0269] 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
- [0270] 48. Hoskisson, P. A. , and Hobbs, G. (2005) *Microbiology* 151(Pt 10), 3153–3159
- [0271] 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
- [0272] 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
- [0273] 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 AmSoc Mass Spectrom* 16(8), 1221–1230
- [0274] 52. Yao, X. , Afonso, C. , and Fenselau, C. (2003) *J Proteome Res* 2(2), 147–152
- [0275] 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
- [0276] 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
- [0277] 55. Zenobi, R. , and Knochennuss, R. (1998) *Mass Spectrom. Rev.* 17(5), 337–366
- [0278] 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
- [0279] 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

- [0280] 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
- [0281] 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
- [0282] 60. Abe, N. , Kadowaki, T. , Okamoto, K. , Nakayama, K. , Ohishi, M. , and Yamamoto, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* 123(2), 305-312
- [0283] 61. Potempa, J. , Pike, R. , and Travis, J. (1995) *Infect. Immun.* 63(4), 1176-1182
- [0284] 62. Pathirana, R. D. , O'Brien-Simpson, N. M. , Brammar, G. C. , Slakeski, N. , and Reynolds, E. C. (2007) *Infect. Immun.* 75(3), 1436-1442
- [0285] 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
- [0286] 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
- [0287] 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
- [0288] 66. Nguyen, K. A. , Travis, J. , and Potempa, J. (2007) *J. Bacteriol.* 189(3), 833-843
- [0289] 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
- [0290] 68. Lewis, J. P. , Dawson, J. A. , Hannis, J. C. , Muddiman, D. , and Macrina, F. L. (1999) *J. Bacteriol.* 181(16), 4905-4913
- [0291] 69. Shi, Y. , Ratnayake, D. B. , Okamoto, K. , Abe, N. , Yamamoto, K. , and Nakayama, K. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(25), 17955-17960
- [0292] 70. Sroka, A. , Sztukowska, M. , Potempa, J. , Travis, J. , and Genco, C. A. (2001) *J. Bacteriol.* 183(19), 5609-5616
- [0293] 71. Simpson, W. , Olczak, T. , and Genco, C. A. (2000) *J. Bacteriol.* 182(20), 5737-5748
- [0294] 72. Lewis, J. P. , Plata, K. , Yu, F. , Rosato, A. , and Anaya, C. (2006) *Microbiology* 152(Pt 11), 3367-3382
- [0295] 73. Olczak, T. , Siudeja, K. , and Olczak, M. (2006) *Protein Expr. Purif.* 49(2), 299-306
- [0296] 74. Olczak, T. , Simpson, W. , Liu, X. , and Genco, C. A. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* 29(1), 119-144
- [0297] 75. Veith, P. D. , Chen, Y. Y. , and Reynolds, E. C. (2004) *Infect. Immun.* 72(6), 3655-3657
- [0298] 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
- [0299] 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
- [0300] 78. Ratnayake, D. B. , Wai, S. N. , Shi, Y. , Amako, K. , Nakayama, H. , and Nakayama, K. (2000) *Microbiology* 146 1119–1127
- [0301] 79. Smalley, J. W. , Birss, A. J. , McKee, A. S. , and Marsh, P. D. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 69(1), 63–67
- [0302] 80. Dashper, S. G. , Hendtlass, A. , Slakeski, N. , Jackson, C. , Cross, K. J. , Brownfield, L. , Hamilton, R. , Barr, I. , and Reynolds, E. C. (2000) *JBacteriol* 182(22), 6456–6462
- [0303] 81. Takahashi, N. , Sato, T. , and Yamada, T. (2000) *J. Bacteriol.* 182(17), 4704–4710
- [0304] 82. Takahashi, N. , and Sato, T. (2001) *J Dent Res* 80(5), 1425–1429
- [0305] 83. Litwin, C. M. , and Calderwood, S. B. (1993) *Clin Microbiol Rev* 6(2), 137–149
- [0306] 84. Gygi, S. P. , Rochon, Y. , Franza, B. R. , and Aebersold, R. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19(3), 1720–1730
- [0307] 85. Baughn, A. D. , and Malamy, M. H. (2003) *Microbiology* 149(Pt 6), 1551–1558
- [0308] 86. Macy, J. , Probst, I. , and Gottschalk, G. (1975) *J Bacteriol* 123(2), 436–442
- [0309] 87. Baughn, A. D. , and Malamy, M. H. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7), 4662–4667
- [0310] 88. Mayrand, D. , and McBride, B. C. (1980) *Infect Immun* 27(1), 44–50
- [0311] 89. Smith, M. A. , Mendz, G. L. , Jorgensen, M. A. , and Hazell, S. L. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* 31(9), 961–975
- [0312] 90. Kroger, A. , Geisler, V. , Lemma, E. , Theis, F. , and Lenger, R. (1992) *Archives of Microbiology* 158(5), 311–314
- [0313] 91. Shah, H. , and Williams, R. (1987) *Current Microbiology* 15, 241–246
- [0314] 92. Klein, R. A. , Linstead, D. J. , and Wheeler, M. V. (1975) *Parasitology* 71(1), 93–107
- [0315] 93. Turrens, J. F. (1989) *Biochem J* 259(2), 363–368
- [0316] 94. Mendz, G. L. , Hazell, S. L. , and Srinivasan, S. (1995) *Arch Biochem Biophys* 321(1), 153–159
- [0317] 95. Mendz, G. L. , Meek, D. J. , and Hazell, S. L. (1998) *J Membr Biol* 165(1), 65–76
- [0318] 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
- [0319] 97. Nealson, K. , and D, S. (1994) *Annual review of microbiology* 48, 311–343
- [0320] 98. Sellars, M. J. , Hall, S. J. , and Kelly, D. J. (2002) *J Bacteriol* 184(15), 4187–4196

- [0321] 99. O' Toole, G. A. , Gibbs, K. A. , Hager, P. W. , Phibbs, P. V. , Jr. , and Kolter, R. (2000) *J Bacteriol* 182(2), 425-431
- [0322] 100. Whiteley, M. , Bangera, M. G. , Bumgarner, R. E. , Parsek, M. R. , Teitzel, G. M. , Lory, S. , and Greenberg, E. P. (2001) *Nature* 413(6858), 860-864
- [0323] 101. Romeo, T. , Gong, M. , Liu, M. Y. , and Brun-Zinkernagel, A. M. (1993) *JBacteriol* 175(15), 4744-4755
- [0324] 102. Sabnis, N. A. , Yang, H. , and Romeo, T. (1995) *J Biol Chem* 270(49), 29096-29104
- [0325] 103. Mercante, J. , Suzuki, K. , Cheng, X. , Babitzke, P. , and Romeo, T. (2006) *J Biol Chem* 281(42), 31832-31842
- [0326] 104. Altier, C. , Suyemoto, M. , and Lawhon, S. D. (2000) *Infect Immun* 68(12), 6790-6797
- [0327] 105. Lawhon, S. D. , Frye, J. G. , Suyemoto, M. , Porwollik, S. , McClelland, M. , and Altier, C. (2003) *Mol Microbiol* 48(6), 1633-1645
- [0328] 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
- [0329] 107. Pancholi, V. , and Fischetti, V. A. (1992) *J. Exp. Med.* 176(2), 415-426
- [0330] 108. Taylor, J. M. , and Heinrichs, D. E. (2002) *Mol. Microbiol.* 43(6), 1603-1614
- [0331] 109. Maeda, K. , Nagata, H. , Yamamoto, Y. , Tanaka, M. , Tanaka, J. , Minamino, N. , and Shizukuishi, S. (2004) *Infect. Immun.* 72(3), 1341-1348
- [0332] 110. Gustavsson, N. , Diez, A. , and Nystrom, T. (2002) *Mol. Microbiol.* 43(1), 107-117
- [0333] 111. Kvint, K. , Nachin, L. , Diez, A. , and Nystrom, T. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* 6(2), 140-145
- [0334] 112. Kuramitsu, H. K. , Chen, W. , and Ikegami, A. (2005) *J. Periodontol.* 76(11Suppl), 2047-2051

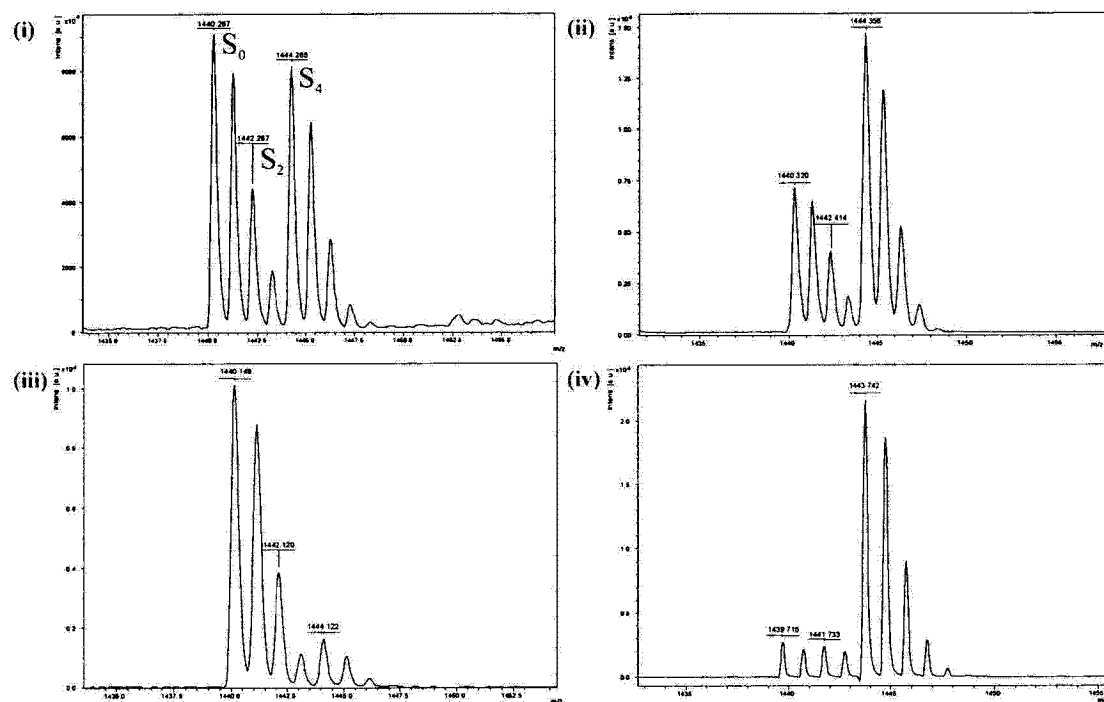
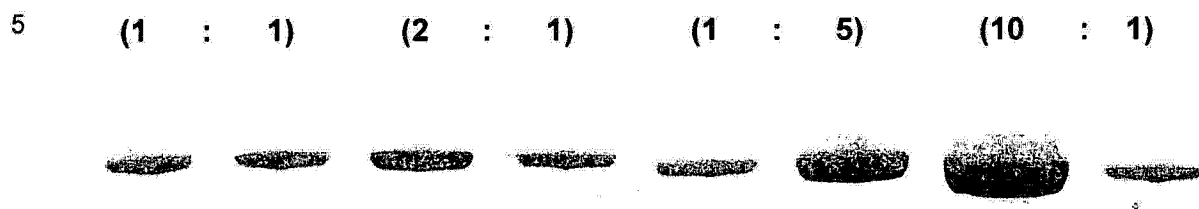
A**B**

图 1

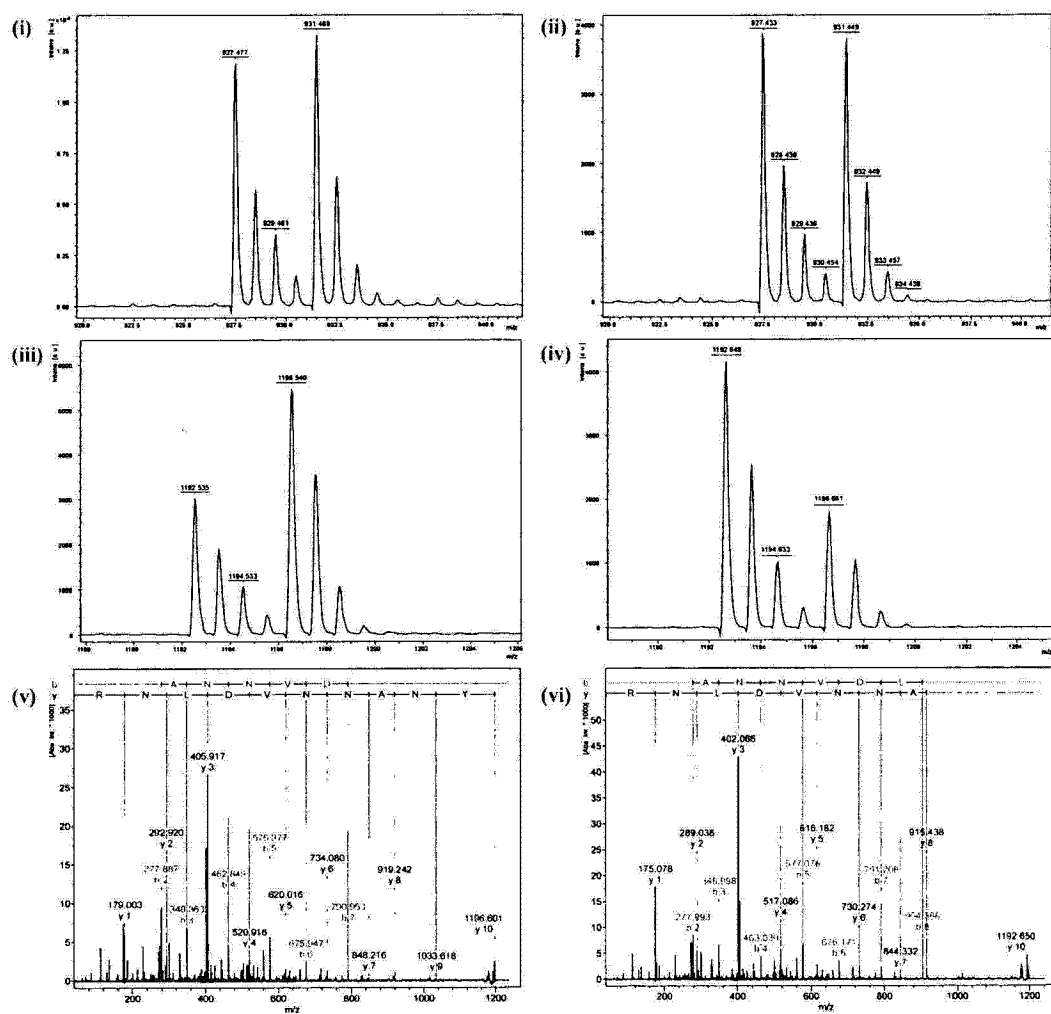


图 2

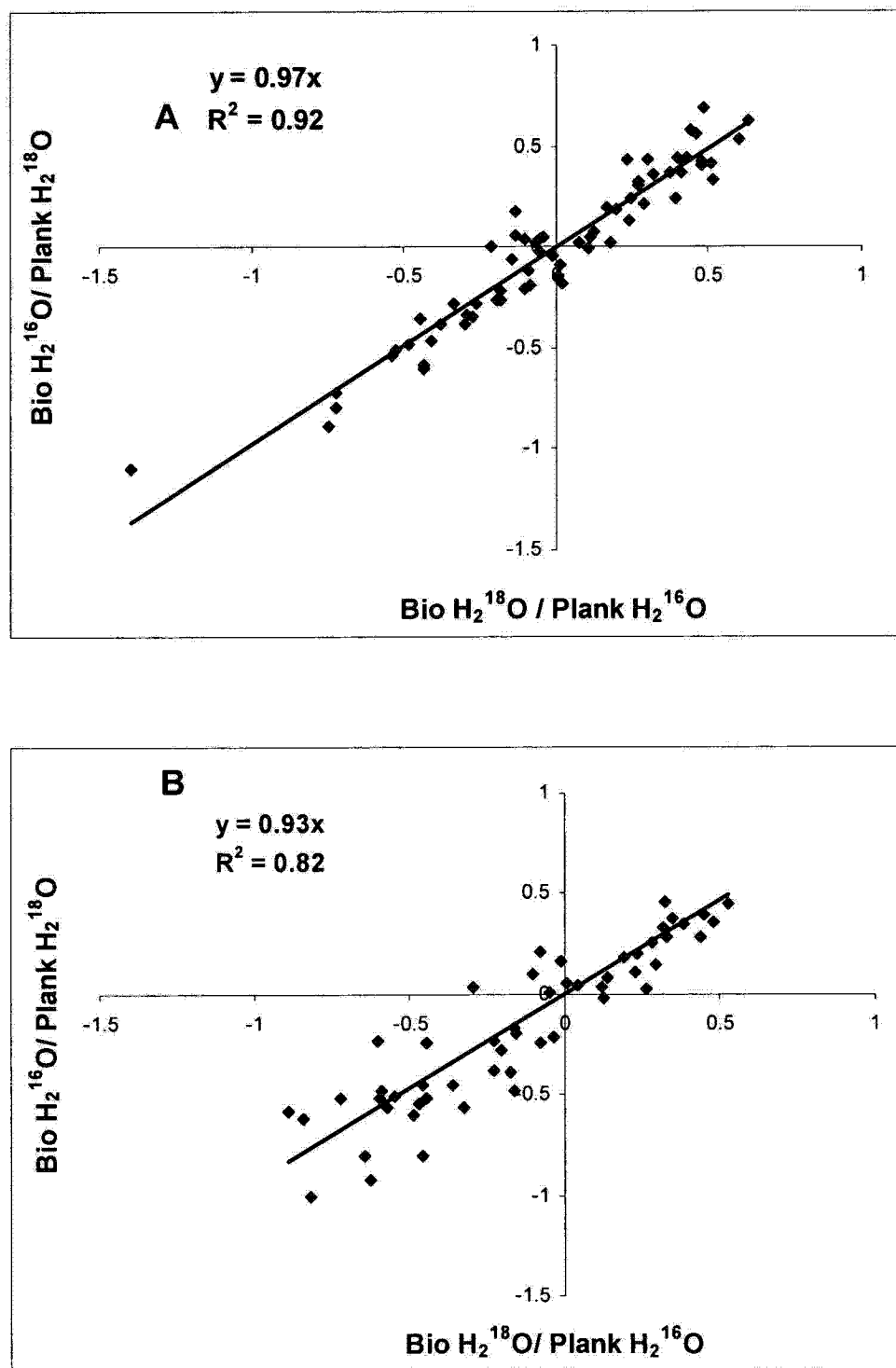


图 3

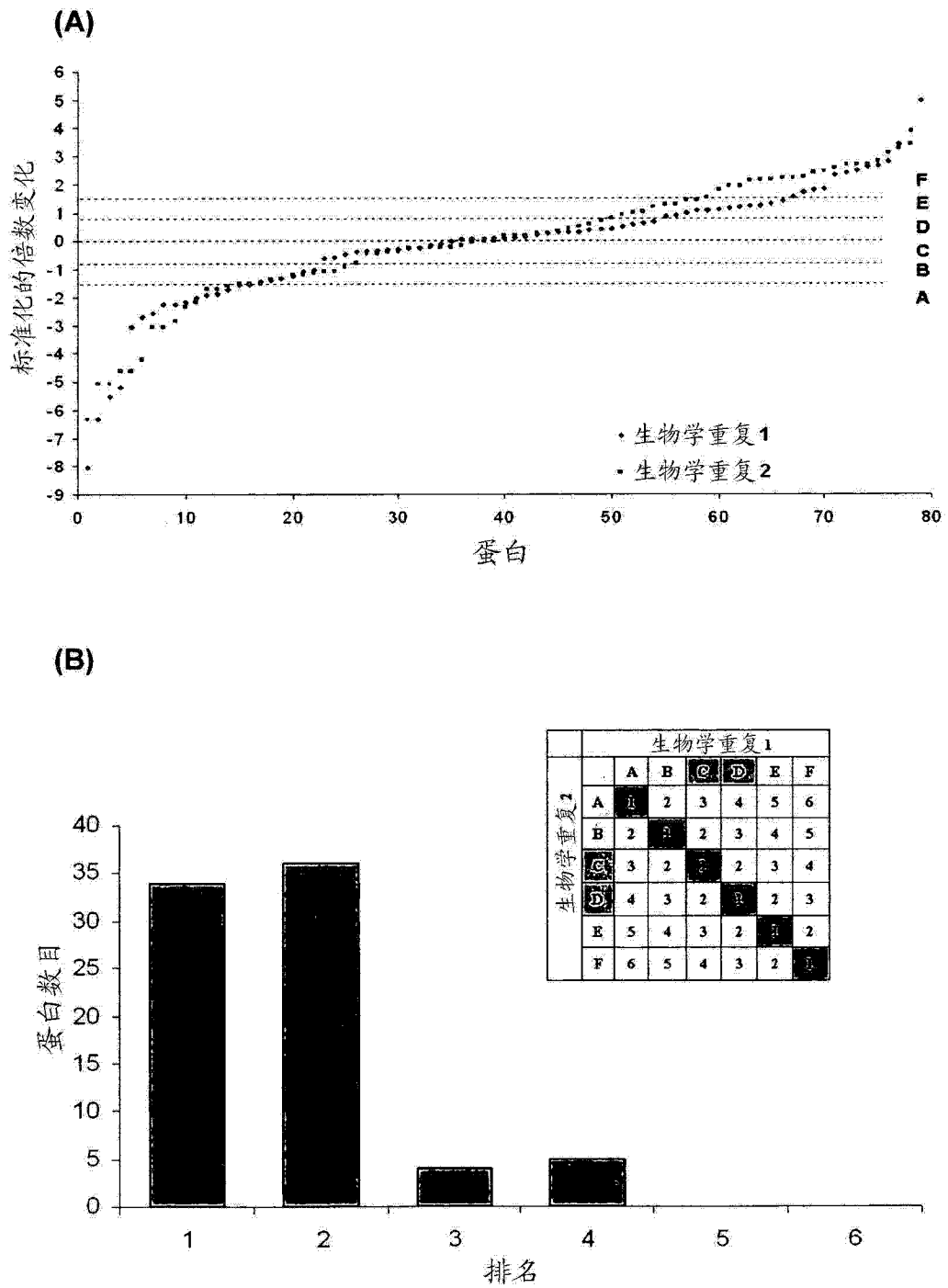


图 4

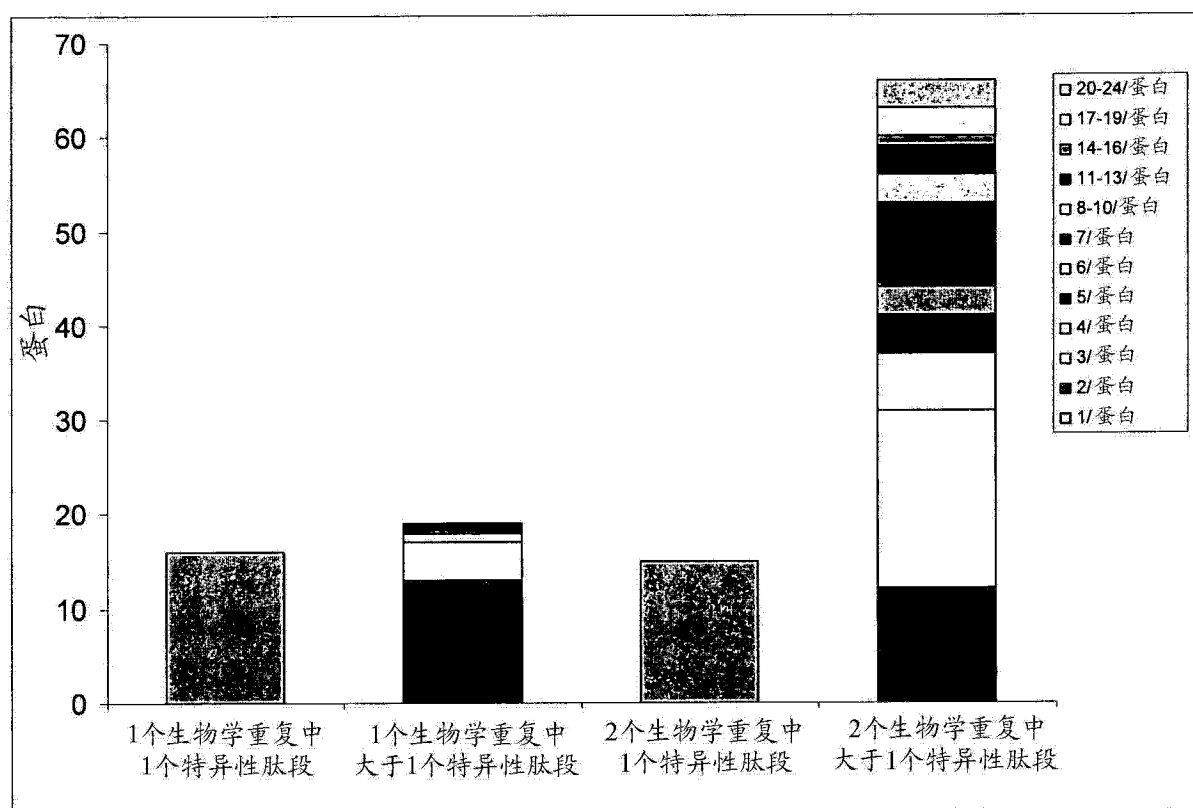


图 5