

文章编号: 1000-0615(2016)04-0528-09

DOI: 10.11964/jfc.20150709994

## 鲫皮肤蛋白质组双向电泳与部分蛋白点的质谱鉴定

胡秀彩<sup>1</sup>, 沈晓静<sup>2</sup>, 吕爱军<sup>1,3\*</sup>, 孙敬锋<sup>1</sup>, YEONG Yiksung<sup>1</sup>,  
宋亚娇<sup>3</sup>, 李莉<sup>3</sup>, 孔祥会<sup>3</sup>

(1. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384;

2. 江苏师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116;

3. 河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007)

**摘要:** 为了建立鱼类皮肤蛋白质组双向电泳图谱及质谱鉴定, 以鲫为实验动物, 采用蛋白双向电泳(2-DE)结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)技术, 进行鲫皮肤的蛋白质组学研究。结果表明, 当上样量为800 μg, 采用18 cm、pH 3~10 IPG胶条, 等电聚焦80 000 Vh, 2-DE图谱检测为214个皮肤蛋白点, 匹配率达88%; 对其中31个蛋白点进行MS/MS鉴定为22种蛋白, 包括肌球蛋白、肌动蛋白、角蛋白、锌指蛋白585B、效应蛋白Rab15、卷曲螺旋结构域蛋白168、NCK1相关蛋白, 肌酸激酶、烯醇化酶、丙酮酸脱氢酶、腺苷酸激酶同工酶等; 进行蛋白功能聚类(GO)分析发现12种生物学过程, 主要参与代谢、细胞、有机体、免疫应答、生物调节和信号等过程。本研究首次初步揭示鲫皮肤蛋白质组及分子机制, 以为鱼类病害的预防和治疗提供科学参考。

**关键词:** 鲫; 皮肤; 蛋白质组; 双向电泳; 质谱

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

鱼类皮肤作为黏膜免疫系统的重要组成部分, 也是阻止病原微生物进入体内的第一道防线<sup>[1]</sup>。鱼类皮肤黏膜免疫系统不仅可防御宿主对病原的入侵, 而且对水产养殖疫苗应用也十分重要<sup>[2-3]</sup>。与系统免疫相比而言, 鱼类皮肤黏膜免疫系统的分子机制研究备受关注<sup>[1-3]</sup>。对哺乳动物的研究表明, 皮肤不仅具有先天免疫防御功能, 而且参与机体适应免疫的抗原识别、免疫细胞激活及皮肤免疫应答等过程<sup>[4-5]</sup>。Xu等<sup>[6]</sup>研究表明硬骨鱼皮肤相关淋巴组织(skin-associated lymphoid tissue, SALT)与哺乳动物皮肤黏膜功能类似, 在鱼类皮肤组织中存在抗体分泌细胞(antibody secreting cell, ASC)及IgM、IgT、免疫球蛋白受体(pIgR)等免疫分子<sup>[7]</sup>。近几年, 学者们相继从草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、斑点鲷(*Ictalurus punctatus*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus*

*coioides*)等鱼类的皮肤培养液中检测到特异性抗体<sup>[8-10]</sup>, 证实鱼类皮肤分泌抗体主要参与适应免疫过程并防御病原的感染。此外, 鱼类皮肤组织分泌的黏液与其他活性物质可以非特异抵御病原微生物的侵入感染<sup>[4]</sup>。Caipang等<sup>[11]</sup>对大西洋鳕(*Gadus morhua*)皮肤基因表达水平分析, 发现g型溶菌酶、金属硫蛋白、干扰素调节因子、干扰素γ、白介素1β、葡萄糖转运体、过氧化氢酶基因等主要参与抗菌活性、抗病毒应答、细胞因子、应激反应以及抗凋亡活性等。Lü等<sup>[12-13]</sup>以模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)为实验对象, 进行皮肤免疫应答的转录组学分析发现类似的先天免疫应答机制(如干扰素、凝集素、热休克蛋白和补体等)。目前, 关于鱼类皮肤相关的蛋白质组学机制仍不十分清楚<sup>[14-15]</sup>。

近年来, 随着蛋白质组学技术的发展成熟,

收稿日期: 2015-07-24 修回日期: 2015-11-11

资助项目: 国家自然科学基金(31272692); 天津市应用基础与前沿技术研究重点项目(15JCZDJC34000); 河南省高校科技创新团队支持计划(15IRTSTHN018)

通信作者: 吕爱军, E-mail: lajand@126.com

开始应用双向凝胶电泳(2-DE)、质谱(MS)技术等开展鱼类皮肤与黏液的蛋白质组学相关研究<sup>[16-18]</sup>。Rajan等<sup>[16]</sup>对大西洋鳕皮肤黏液的蛋白质组学分析,发现皮肤黏液中存在凝集素、g型溶菌酶等免疫相关蛋白。Palaksha等<sup>[17]</sup>报道牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)皮肤黏液中存在转铁蛋白, IgM水平和溶菌酶活性较高。最近, Lu等<sup>[18]</sup>首次研究报道斑马鱼皮肤免疫应答的差异蛋白质组学。目前,一般认为鱼类皮肤免疫相关蛋白在机体抗感染免疫中发挥重要作用,针对病原可能存在独立的皮肤免疫系统(fish skin immune system, FSIS)<sup>[1,4]</sup>。

尽管鱼类皮肤是黏膜免疫系统的重要组成部分,但皮肤蛋白质组学研究起步相对较晚,迄今鲜有文献报道<sup>[18]</sup>。鲫(*Carassius auratus*)为我国重要的经济型食用鱼类,养殖鲫疾病暴发流行时有发生<sup>[19]</sup>。本实验采用蛋白双向电泳(2-DE)结合基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)技术,首次进行鲫皮肤的蛋白质组学研究,有助于理解鱼类黏膜免疫应答的分子机制,以期将来为鱼类病害的预防和治疗提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鲫购自江苏省徐州市某养殖场,体质量为50~60 g,实验室饲养2周,观察确认健康后,随机选取30尾用于后续实验。

### 1.2 鲫皮肤蛋白提取

参照Lu等<sup>[18]</sup>方法进行,无菌操作取鲫背部两侧皮肤,去除肌肉组织,切皮肤块大小为2~3 mm,于液氮中研磨混合后取50~100 mg,加入0.5 mL裂解液,4 °C下裂解2 h,每30 min漩涡混匀1次,冰浴超声破碎2 min,冰浴30 min,4 °C下13 000 r/min离心30 min,在上清液中加入0.5 mL丙酮混匀,4 °C沉淀1 h,待丙酮挥发后,加入水化液溶解蛋白样品,Bradford法测定蛋白浓度,-80 °C保存。

### 1.3 蛋白水化与等电聚焦电泳

蛋白样品与水化液(7 M尿素,2 M硫脲,2% CHAPS,28 mg/10 mL DTT,0.5% IPG Buffer,痕量溴酚蓝储液)充分混合,20 °C水化12 h,18 cm

IPG胶条(GE Healthcare)上样量为400、600和800 µg,取固相pH梯度IPG干胶条进行水化,利用固相pH梯度等电聚焦仪(GE Healthcare Ettan IPGphorIII)等电聚焦电泳,程序为快速300 V 1 h,线性1000 V 1 h,线性3000 V 1 h,线性5000 V 1 h,线性8000 V 2 h,快速8000 V 1.5 h,线性10 000 V 3 h,快速10 000 V 8 h,快速500 V 10 h。

### 1.4 第二向垂直电泳

利用垂直板电泳仪(GE Healthcare Ettan DALTSix)进行,胶条平衡、灌制二向凝、胶条转移和封胶、12.5%的SDS-PAGE凝胶垂直电泳1 W/gel 1 h,15 W/gel电泳直至溴酚蓝条至凝胶底部为止,进行胶体考马斯亮蓝G250染色、脱色和图像扫描分析。

### 1.5 双向电泳图谱的重复性实验

参照Multi-strips on One Gel Method(MSOG)方法<sup>[20]</sup>,选择最适方法制备蛋白样品,采用3根7 cm pH 3~10 IPG线性胶条(GE Healthcare),上样量为60 µg,至少3次重复实验。

### 1.6 质谱分析

采用Image scanner III labscan扫描仪进行图像采集,通过ImageMaster 2D Platinum 7软件分析,确定用于质谱分析的蛋白点,切胶块大小约为1 mm<sup>3</sup>,转入EP管中,送至上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱分析。蛋白样品经5 µL 2.5~10 ng/µL测序级Trypsin (Promega)酶解,采用基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱仪(5 800 MALDI-TOF/TOF, AB SCIEX)进行质谱(MS)分析,激光源为355 nm波长的Nd:YAG激光器,加速电压为2 kV,一级质谱(MS)扫描范围为800~4000 u,选择信噪比大于50的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析。

### 1.7 蛋白数据库检索

根据MS4 700获得蛋白肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF),采用Mascot 2.2软件结合NCBI蛋白数据库进行检索,鉴定蛋白质。

## 2 结果

### 2.1 鲫皮肤蛋白双向电泳技术和图谱的建立

采用18 cm pH 3~10 IPG胶条,上样量分别为400、600和800 µg,等电聚焦80 000 Vh,进行胶

体考马斯亮蓝染色,应用Image Master Platinum软件对2-DE图谱初步分析。结果显示鲫皮肤蛋白上样量在400、600和800  $\mu\text{g}$ 时分别检测发现63、102和214个蛋白点,其中采用800  $\mu\text{g}$ 所得鲫皮肤蛋白双向电泳图谱较清晰(图1),双向电泳重复性实验图谱匹配率为88%,表明本实验建立双向电泳体系具有良好的重复性和稳定性,可用于后续蛋白质组学分析。

## 2.2 鲫皮肤蛋白质谱鉴定结果

采用MALDI-TOF/TOF-MS技术,对鲫皮肤2-DE图谱31个主要蛋白点进行MS/MS鉴定分析。结果表明在鲫皮肤中鉴定为22种蛋白,包括肌球蛋白重链(myosin heavy chain)、肌酸激酶M型(creatine kinase M-type)、角蛋白I型骨架10(keratin type I cytoskeletal 10)、烯醇化酶(enolase)、丙酮酸脱氢酶E1 $\alpha$ 亚基(pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha)、NCK1相关蛋白(nck1-associated protein)、锌指蛋白585B(zinc finger protein 585B)、卷曲螺旋结构域蛋白168(coiled-coil domain-containing protein 168)、肌动蛋白(actin)、角蛋白(keratin)、腺苷酸激酶同工酶1(adenylate kinase isoenzyme 1)和效应蛋白Rab15(rab15 effector protein)等,其中蛋白点2、3、6、7、20、21、22和23为肌球蛋白重链,蛋白点10、18为肌酸激酶M型,蛋白点11、19为角蛋白I型骨架10。鲫皮肤蛋白点质谱测序结果见表1,其中丙酮酸脱氢酶E1组件 $\alpha$ 亚基、锌指蛋白585B、卷曲螺旋结构域蛋白168的肽指纹图谱

(PMF)见图2。

进一步对所获鲫皮肤蛋白点鉴定结果进行蛋白功能聚类(GO)分析,发现12种主要的生物学过程,包括代谢过程(metabolic process)、细胞学过程(cellular process)、有机体过程(organism process)、多细胞生物过程(multicellular organismal process)、细胞组分/生物合成(cellular component organization or biogenesis)、免疫应答(immune response)、生物调节(biological regulation)、生物学过程(biological process)、发育过程(developmental process)、生殖(reproduction)、信号(signaling)和定位(localization)功能等。在鲫皮肤主要的生物学过程中,参与代谢过程最高(24.7%),其次为细胞学过程(19.5%)和有有机体过程(16.9%),其中转化转录结构域相关蛋白(TRRAP)、角蛋白I型细胞骨架(KRT10)、角蛋白II型细胞骨架(KRT6A、KRT8)为皮肤免疫应答相关蛋白(表2)。

## 3 讨论

鱼类皮肤不仅是维持鱼类体内稳态的物理屏障,而且是机体抵抗病原体入侵的有效防线之一<sup>[1,4]</sup>。因此,研究鱼类皮肤的蛋白质组学及分子调控机理,不仅有助于了解鱼类皮肤黏膜对病原体的防御机制,而且对鱼类疾病的防治具有重要意义。目前,鱼类皮肤蛋白质组学研究尚处于起步阶段<sup>[18,21]</sup>,关于鱼类皮肤免疫应答的分子机制仍不清楚。本研究首次揭示了鲫皮肤的蛋白质组学机制,以为鱼类病害的预防和治疗提供科学参考。最近,Lü等<sup>[18]</sup>以斑马鱼为实验动物模型,采用双向电泳(2-DE)结合质谱技术对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染诱导的皮肤蛋白质进行组学分析,结果表明斑马鱼皮肤免疫相关蛋白包括MHC II类DR $\alpha$ 1域、免疫球蛋白重链V区、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转录因子AP-2 $\alpha$ 、肌动蛋白和角蛋白等,这是最早的关于鱼类皮肤免疫应答蛋白质组学的研究报道。本研究表明在鲫皮肤中肌酸激酶、丙酮酸脱氢酶、锌指蛋白、肌球蛋白、肌动蛋白和角蛋白等表达丰富,而且检测到2个未知功能蛋白(蛋白点15和24),这些蛋白在鱼类皮肤中确切的生物学功能值得深入探究。Ibarz等<sup>[21]</sup>利用2-DE与LC-MS/MS等技术研究金头鲷(*Sparus aurata*)皮肤的

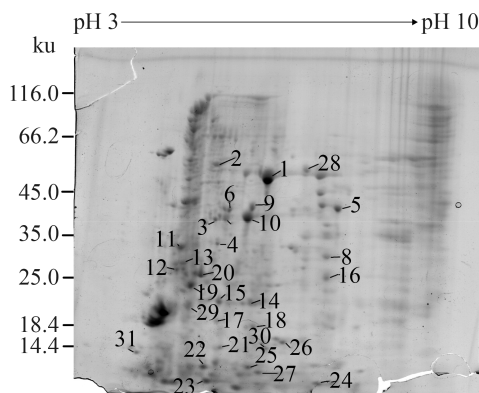


图1 鲫皮肤蛋白双向电泳图谱

蛋白胶点数字标注与表1相同

Fig. 1 *C. auratus* skin protein 2-DE electrophoresis map

Refer to protein spots indicated in Tab. 1

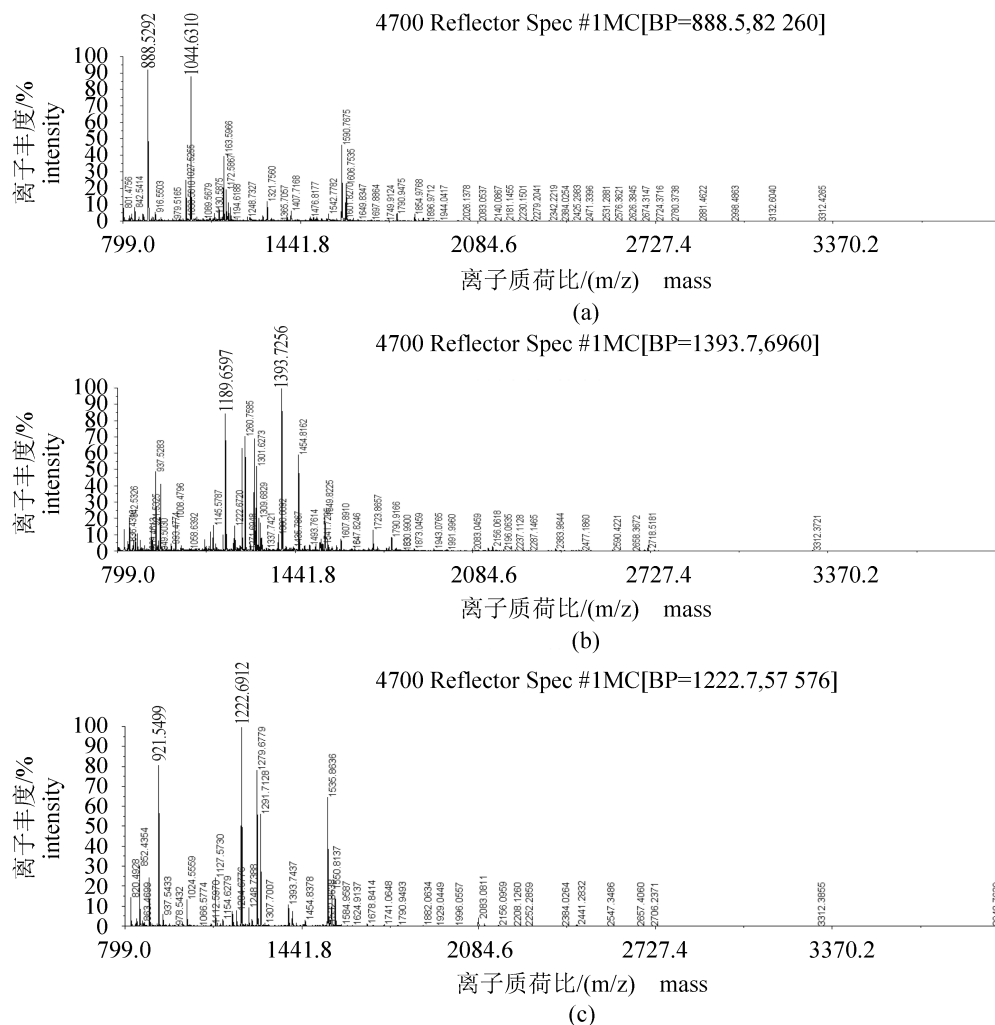


图 2 鲫鱼皮肤3个蛋白肽指纹图谱(PMF)

(a) 丙酮酸脱氢酶E1组件 $\alpha$ 亚基; (b) 锌指蛋白585B; (c) 卷曲螺旋结构域蛋白168

Fig. 2 The PMF of *C. auratus* skin three protein spots

(a) pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha; (b) zinc finger protein 585B; (c) coiled-coil domain-containing protein 168 proteins

差异蛋白质组学, 结果表明在鲫鱼皮肤再生阶段, 细胞增殖相关蛋白包括骨甘氨酸(OGN)、脂质运载蛋白2、核纤层蛋白A和转录因子等上调表达蛋白, 提示它们可能参与皮肤组织形成、再生过程, 并且雌二醇-17 $\beta$ (E2)与皮肤伤口愈合有一定关系; 而且发现角蛋白(KRT2、KRT4、KRT5、KRT13、KRT19)、肌球蛋白(MYH1、MYH2、MYH3、MYL4)、肌动蛋白(ACTB)等在金头鲷皮肤再生过程中差异表达, 这可能与硬骨鱼类皮肤组织构成有关。最近报道金头鲷皮肤黏液中含有多种细胞结构蛋白, 包括角蛋白I型和II型、肌动蛋白、微管蛋、原肌球蛋白等, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)皮肤黏液中II型角蛋白与成孔糖蛋白同源, 推测角蛋白II型糖蛋白可能

具有抗菌活性<sup>[22-23]</sup>。本研究鉴定获得鲫鱼皮肤组织结构蛋白主要有角蛋白I型细胞骨架(KRT10)、角蛋白II型细胞骨架(KRT6A、KRT8)、肌球蛋白(MYSS)、肌动蛋白(ACTM)等, 它们均参与免疫应答等生物学过程。由此推测, 一些硬骨鱼类皮肤结构蛋白, 如肌动蛋白、肌球蛋白、角蛋白等在黏膜免疫应答机制中可能起重要作用<sup>[18-21]</sup>。此外, Lü等<sup>[12-13]</sup>对斑马鱼皮肤转录组学分析, 结果表明斑马鱼皮肤免疫相关基因主要包括补体激活、急性期反应、应激防御反应和细胞凋亡等免疫应答过程, 一些基因参与了MAPK、Wnt、JAK-STAT和钙信号等免疫信号通路。以上研究不仅为解释鱼类皮肤组织的生理功能和黏膜屏障提供科学依据, 而且为进一步

表1 鲫皮肤蛋白点质谱鉴定结果

Tab.1 *C. auratus* skin proteins spots MS/MS profilings

蛋白点 spot	蛋白名称 protein name	登录号 accession no.	分子量/等电点 MW/pI	分值/覆盖率 score/coverage	肽段 peptide
1	烯醇化酶 enolase	Q27877	47421.1/6.18	190/15.198	6
2	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	420/23.222	32
3	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	197/19.171	28
4	肌动蛋白 actin	Q25381	19513.7/5.49	132/4.684	3
5	丙酮酸脱氢酶E1 $\alpha$ 亚基 pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	P29803	43646.8/8.76	102/9.024	8
6	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	368/21.426	30
7	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	96/13.65	31
8	转化转录结构域相关蛋白 transformation/transcription domain-associated protein	Q9Y4A5	441765.9/8.49	73/19.051	40
9	NCK1相关蛋白 NCK1-associated protein	B0S6R1	130082.8/6.2	63/19.085	20
10	肌酸激酶M型 creatine kinase M-type	AAC62841	43302/6.77	88/6.865	4
11	角蛋白 I 型细胞骨架10 keratin type I cytoskeletal 10	P13645	59019.8/5.13	135/4.503	10
12	角蛋白 I 型细胞骨架9 keratin type I cytoskeletal 9	P35527	62254.9/5.14	444/5.129	10
13	角蛋白 II 型细胞骨架8 keratin type II cytoskeletal 8	Q10758	53985.3/5.83	83/4.669	20
14	肌酸激酶 creatine kinase	P24722	43261.9/6.2	142/6.346	11
15	SLAIN结构域样蛋白 SLAIN motif-containing protein-like	Q5XG16	62688.3/5.77	76/13.781	17
16	锌指蛋白585B zinc finger protein 585B	Q52M93	90575.4/9.26	71/18.01	20
17	腺苷酸激酶同工酶1 adenylate kinase isoenzyme 1	P12115	21532.4/6.64	356/55.375	12
18	肌酸激酶M型 creatine kinase M-type	AAC62841	43302/6.77	117/7.108	9
19	角蛋白 I 型细胞骨架10 keratin type I cytoskeletal 10	P13645	59019.8/5.13	121/3.254	14
20	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	493/25.698	39
21	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	321/21.753	36
22	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	305/20.842	27
23	肌球蛋白重链 myosin heavy chain	Q90339	222317.6/5.57	414/19.72	36
24	卷曲螺旋结构域蛋白168 coiled-coil domain-containing protein 168	Q8NDH2	279602.5/9.35	91/37.395	45
25	组氨酸tRNA连接酶 histidine-tRNA ligase	Q61035	57909.3/5.79	64/6.804	18
26	角蛋白 II 型细胞骨架6A keratin type II cytoskeletal 6A	P02538	60293.4/8.09	72/12.323	16
27	效应蛋白Rab15 Rab15 effector protein	Q9D7T1	26293.3/6.82	78/3.531	9
28	肌球蛋白4 myosin 4	Q29RW1	223653.3/5.58	56/17.184	28
29	Daple蛋白 protein Daple	Q6VGS5	227422.9/ 5.81	60/89.461	31
30	动力蛋白重链 dynein heavy chain	Q19020	524328.5/5.9	60/88.707	49
31	黏着斑蛋白 vinculin	P18206	124292/5.5	50/1.641	23

探索皮肤的病理蛋白质组学及分子免疫机制奠定基础。

与皮肤组织的蛋白质组学研究相比, 鱼类皮

肤黏液的蛋白质组学研究相对起步较早, 目前这方面研究国外学者报道居多。Rajan等<sup>[16]</sup>采用2-DE结合液相色谱—串联质谱(LC-MS/MS)技术对

表 2 鲫皮肤蛋白质功能分类

**Tab.2 C. auratus skin protein functional classification**

功能分类 GO	蛋白比例/% ratio of protein
代谢 metabolic process	24.7
细胞学过程 cellular process	19.5
有机体过程 organism process	16.9
免疫应答 immune response	6.5
细胞组分/生物合成 cellular component or biogenesis	6.5
生物调节 biological regulation	6.5
多细胞生物过程 multicellular organismal process	5.2
发育过程 developmental process	5.2
生物学过程 biological process	3.9
生殖 reproduction	2.6
信号 signaling	1.3
定位 localization	1.3

大西洋鲑皮肤黏液的蛋白质组学分析, 发现皮肤黏液中存在凝集素(Galectin-1、MBL)、g型溶菌酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂/半胱氨酸蛋白酶抑制剂B、亲环素A、FK-506结合蛋白、蛋白酶体亚基( $\alpha$ -3和 $\alpha$ -7)和泛素等免疫相关蛋白。Rajan等<sup>[24]</sup>进一步对鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染大西洋鲑皮肤黏液的差异蛋白质组学进行分析, 结果显示其黏液中包括钙蛋白酶小亚基1、谷胱甘肽-S-转移酶 $\omega$ 1、蛋白酶体26S亚基、14 ku载脂蛋白、 $\beta$ 2-微管蛋白、冷诱导RNA结合蛋白、苹果酸脱氢酶2和II型角蛋白, 其中 $\beta$ 2-微管蛋白、冷诱导RNA结合蛋白、钙蛋白酶小亚基1、谷胱甘肽-S-转移酶 $\omega$ 1等蛋白mRNA在早期感染诱导皮肤组织中高表达; 发现一些皮肤蛋白主要参与JNK(c-Jun N-terminal kinases)信号通路与病原感染有关。研究表明, 牙鲈皮肤黏液中存在转铁蛋白(Transferrin), IgM水平、溶菌酶活性较高, 对迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)等多种鱼类病菌有较强抗菌活性<sup>[17]</sup>。杀鲑弧菌(*V. salmonicida*)对鱼类皮肤黏液具有趋向性, 其中热休克蛋白DnaK、分子伴侣GroEL和鞭毛蛋白等上调蛋白参与细菌运动性和氧化应激反应<sup>[25]</sup>。Ma等<sup>[26]</sup>对不同水温条件下大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)皮肤黏液的差异蛋白质组进行研究, 筛选出6个差异蛋白进行质谱鉴定, 结果表明凝集素和细胞角蛋白在黏液抗热胁迫

中可能是潜在的生物标志物, 当温度升高时S6酸性角蛋白I型表达量明显降低, 这为进一步研究鱼类皮肤黏液的环境胁迫机制提供参考。Valdenegro等<sup>[27]</sup>研究患阿米巴鳃病(amoebic gill disease, AGD)的大西洋鲑(*Salmo salar*)鳃和皮肤黏液的差异蛋白质组学, 发现42个皮肤黏液相关蛋白, 其中C反应蛋白、载脂蛋白1、颗粒体、组织蛋白酶和血管生成素-1等参与细胞信号转导和炎症途径, 结果表明黏液中的补体C3、前梯度蛋白-2和膜联蛋白A-1等可能是鱼类皮肤感染相关蛋白标志物。Jurado等<sup>[22]</sup>采用LC-MS/MS和2-DE-PMF-MS/MS技术首次构建金头鲷皮肤黏液蛋白质组学图谱, 通过GO聚类分析将其分为4类蛋白, 其中参与应激反应的蛋白有WAP65、热休克蛋白70、铜锌氧化物歧化酶和PRDX1、PRDX2等; 信号转导蛋白有PP2A 65 ku调节亚基、14-3-3蛋白 $\beta/\alpha$ 、酪氨酸3单加氧酶/色氨酸5单加氧酶激活蛋白、RhoGDI和PEBP1。本研究鉴定成功的鲫皮肤蛋白中, 代谢相关蛋白的比例最高, 占24.7%, 包括烯醇化酶(ENO)、丙酮酸脱氢酶E1组件 $\alpha$ 亚基(ODPAT)、肌酸激酶M型(KCRM)、肌球蛋白重链(MYSS)等代谢过程相关蛋白, 这与已报道斑马鱼皮肤与金头鲷黏液的蛋白质组学研究结果基本一致<sup>[18-22]</sup>。Sanahuja等<sup>[28]</sup>报道采用2D技术在金头鲷皮肤黏液中发现1300个蛋白点, 进一步采用LC-MS/MS方法对其中100个高丰度蛋白进行鉴定分析, 结果表明62个蛋白分属于12个GO类别, 主要涉及一些结构、代谢和保护蛋白等生物学过程, 包括热休克蛋白、转铁蛋白和血红素结合蛋白等。由此可见, 鱼类皮肤黏液的蛋白质组学以及建立黏液蛋白图谱研究, 不仅将有利于发掘更多鱼类皮肤黏液中的免疫相关蛋白, 而且有助于理解鱼类皮肤生理功能及黏膜免疫系统的分子机制。

总之, 鱼类皮肤在黏膜免疫系统中发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>, 但是关于鱼类皮肤的蛋白质组学机制仍不清楚。本研究首次对我国重要淡水养殖经济鱼类鲫皮肤的蛋白质组学分析, 结果表明可以通过蛋白质组学方法对鱼类皮肤及黏液蛋白进行鉴定研究, 采用双向电泳(2-DE)结合质谱(MS)技术共鉴定获得皮肤相关功能蛋白22个, 主要涉及代谢、细胞、有机体和免疫应答等12种生物学过程, 有助于理解鱼类皮肤免疫应答及分

子调控机制。近几年, 鱼类皮肤及其黏液的蛋白质组学研究取得较快进展, 但是相关文献的数据信息仍非常有限<sup>[16-18]</sup>。迄今为止, 在Genbank数据库中尚无鲫基因组学全序列可供参考, 因此开展鲫皮肤蛋白质组学研究工作也受到一定限制, 有待于进一步扩大研究。从目前鱼类皮肤蛋白质组学的研究情况来看, 采用不同的鱼类如大西洋鲑、金头鲷、鲫等进行皮肤或黏液蛋白质组学研究, 对获得的皮肤黏膜免疫相关蛋白鉴定结果也不完全一致<sup>[24-28]</sup>。本研究对鲫皮肤蛋白质组进行信号通路(KEGG pathway)分析, 结果发现一些鲫皮肤蛋白可能参与吞噬体、Wnt通路等免疫相关信号通路。此外, 近期本课题组通过同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)、LC-MS/MS技术等进行斑马鱼鳃的蛋白质组分析, 结果鉴定获得1338个蛋白, 主要包括细胞过程、代谢过程和生物调控相关蛋白, 揭示补体和凝血级联、致病性大肠杆菌感染以及吞噬体等信号通路参与黏膜免疫防御机制<sup>[29]</sup>。以上针对鱼类皮肤和鳃组织等的蛋白质组学结果, 不仅对今后深入研究鱼类黏膜免疫应答的分子机制奠定基础, 而且为系统地开展鱼类皮肤黏膜生理功能及蛋白质组学研究提供科学参考。

#### 参考文献:

- [1] Esteban M Á. An overview of the immunological defenses in fish skin [J]. *ISRN Immunology*, 2012, DOI: 10.5402/2012/853470.
- [2] Delamare D J, Wood D, Barnes A C. Response and function of cutaneous mucosal and serum antibodies in barramundi (*Lates calcarifer*) acclimated in seawater and freshwater [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(1): 92-101.
- [3] Dos Santos N M S, Taverne T J J, Barnes A C, *et al.* Kinetics of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) systemic and mucosal antibody secreting cell response to different antigens (*Photobacterium damsela* spp. piscicida, *Vibrio anguillarum* and DNP) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(4): 317-331.
- [4] Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, *et al.* 'Fish matters': The relevance of fish skin biology to investigative dermatology [J]. *Experimental Dermatology*, 2010, 19(4): 313-324.
- [5] Bos J D. Skin Immune System (SIS): Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology [M]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1997.
- [6] Xu Z, Parra D, Gómez D, *et al.* Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(32): 13097-13102.
- [7] Rombout J H W M, van der Tuin S J L, Yang G, *et al.* Expression of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 620-628.
- [8] Luo X C, Xie M Q, Zhu X Q, *et al.* Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(4): 427-432.
- [9] Xu D H, Klesius P H, Shelby R A. Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, immune to *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(1): 45-52.
- [10] Lü A J, Li Z Q, Zhang Q Y. Detection of cutaneous antibodies in excised skin explants from Grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) immune to *Scophthalmus maximus* rhabdovirus [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(8): 559-565.
- [11] Caipang C M, Lazado C C, Brinchmann M F, *et al.* Differential expression of immune and stress genes in the skin of Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(2): 158-162.
- [12] Lü A J, Hu X C, Wang Y, *et al.* Skin immune response in the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Aeromonas hydrophila* infection: A transcriptional profiling approach [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(2): 137-150.
- [13] Lü A J, Hu X C, Xue J, *et al.* Gene expression profiling in the skin of zebrafish infected with *Citrobacter freundii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(2): 273-283.
- [14] 吕爱军, 胡秀彩, 朱静榕, 等. 弗氏柠檬酸杆菌感染诱导斑马鱼皮肤免疫相关的基因差异表达研究[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 359-366.
- [14] Lü A J, Hu X C, Zhu J R, *et al.* Differential expression of immune-related genes from skin of zebrafish induced

- by the infection of *Citrobacter freundii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 359–366 (in Chinese).
- [15] 吕爱军, 胡秀彩, 薛军, 等. cDNA 芯片技术筛选斑马鱼皮肤免疫相关差异表达基因[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1226–1233.
- Lü A J, Hu X C, Xue J, *et al.* Differential expression of immune-related genes in the skin of zebrafish screened by cDNA microarray [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1226–1233 (in Chinese).
- [16] Rajan B, Fernandes J M O, Caipang C M A, *et al.* Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(2): 224–231.
- [17] Palaksha K J, Shin G W, Kim Y R, *et al.* Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(4): 479–488.
- [18] Lü A J, Hu X C, Wang Y, *et al.* Proteomic analysis of differential protein expression in the skin of zebrafish [*Danio rerio* (Hamilton, 1822)] infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2014, 30(1): 28–34.
- [19] 王艺, 李權年, 兰云, 等. 鲫鱼鳃中迟钝爱德华氏菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 220–221.
- Wang Y, Li J N, Lan Y, *et al.* Identification and isolation of *Edwardsiella tarda* from the gills of *Carassius auratus* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(5): 220–221 (in Chinese).
- [20] 刘志远, 励建荣, 李学鹏, 等. 中国明对虾肌肉组织蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. 水产学报, 2013, 37(2): 288–296.
- Liu Z Y, Li J R, Li X P, *et al.* Establishment of two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique in muscle proteome of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 288–296 (in Chinese).
- [21] Ibarz A, Pinto P I S, Power D M. Proteomic approach to skin regeneration in a marine teleost: Modulation by oestradiol-17 $\beta$  [J]. Marine Biotechnology, 2013, 15(6): 629–646.
- [22] Jurado J, Fuentes A C A, Guardiola F A, *et al.* Proteomic profile of the skin mucus of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Journal of Proteomics, 2015, 120: 21–34.
- [23] Molle V, Campagna S, Bessin Y, *et al.* First evidence of the pore-forming properties of a keratin from skin mucus of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, formerly *Salmo gairdneri*) [J]. Biochemical Journal, 2008, 411(1): 33–40.
- [24] Rajan B, Lokesh J, Kiron V, *et al.* Differentially expressed proteins in the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) upon natural infection with *Vibrio anguillarum* [J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9(1): 103.
- [25] Ræder I L U, Paulsen S M, Smalås A O, *et al.* Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry [J]. Microbial Pathogenesis, 2007, 42(1): 36–45.
- [26] Ma A J, Huang Z H, Wang X A. Changes in protein composition of epidermal mucus in turbot *Scophthalmus maximus* (L.) under high water temperature [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2013, 39(6): 1411–1418.
- [27] Valdenegro V V A, Crosbie P, Bridle A, *et al.* Differentially expressed proteins in gill and skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affected by amoebic gill disease [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 69–77.
- [28] Sanahuja I, Ibarz A. Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 426–435.
- [29] Lü A J, Hu X C, Wang Y, *et al.* iTRAQ analysis of gill proteins from the zebrafish (*Danio rerio*) infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1): 229–239.



## Preliminary proteomic analysis of the skin from crucian carp (*Carassius auratus*)

HU Xiucui<sup>1</sup>, SHEN Xiaojing<sup>2</sup>, LÜ Aijun<sup>1,3\*</sup>, SUN Jingfeng<sup>1</sup>, YEONG Yiksung<sup>1</sup>,  
SONG Yajiao<sup>3</sup>, LI Li<sup>3</sup>, KONG Xianghui<sup>3</sup>

(1. Tianjin Key Lab of Aqua-Ecology and Aquaculture College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China;

3. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** Fish skin plays an important role in the mucosal immune response. In order to investigate the molecular mechanisms of mucosal immune responses in fish, the Crucian carp (*Carassius auratus*) were used as an animal model for fish skin immune system (FSIS), and proteomics analysis of protein expression in the skin of *C. auratus* was performed by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS) techniques. The results showed that 214 protein spots observed on 2-DE gels shared matching profiles of about 88% protein expression spots, while the 800 µg loading dose, and 18 cm pH3-10 IPG strips were used for isoelectric focusing (IEF) to 80 000 Vh. The 31 protein spots in the skin of fish were further identified as the 22 kinds of proteins by MS/MS analysis, namely myosin heavy chain, actin, keratin, zinc finger protein 585B, Rab15 effector protein, coiled-coil domain-containing protein 168, NCK1-associated protein, and creatine kinase M-type, enolase, pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, adenylate kinase isoenzyme 1, etc. Further analysis of protein functional classification based on Gene ontology (GO) showed 12 mainly biological processes, including metabolic process, cellular process, organism process, immune response, biological regulation and signaling etc.. The three of all biological processes such as metabolic, cellular and organism accounted for 24.7%, 19.5%, and 16.9% respectively, and immune response-related proteins included transformation/transcription domain-associated protein, keratin type I cytoskeletal 10, keratin type II cytoskeletal 8, and keratin type II cytoskeletal 6A. This is the first report on proteomics analysis of expressed proteins in the skin of *C. auratus*, and this study will help to understand the molecular mechanisms of mucosal immune responses at protein level in fish.

**Key words:** *Carassius auratus*; skin; proteomics; two-dimensional electrophoresis; mass spectrum

**Corresponding author:** LÜ Aijun. E-mail: lajand@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31272692); Key Science-Technology and Application Project of Tianjin City (15JCZDJC34000); Team of Provincial Science and Technology Innovation of Henan High Education (15IRTSTHN018)