

文章编号: 1000-0615(2018)04-0596-09

DOI: 10.11964/jfc.20160810510

草金鱼感染拟态弧菌后脾脏和肠黏膜组织的 差异蛋白组学

陶丽寒, 胡丹丹, 张嘉俊, 陶会竹, 李槿年*

(安徽农业大学动物科技学院, 人兽共患病重点实验室, 安徽合肥 230036)

摘要: 为探讨鱼类感染拟态弧菌后脾脏和肠黏膜组织蛋白差异变化, 本研究以拟态弧菌 04-14分离株人工感染实验动物草金鱼, 利用双向电泳(2-DE)结合质谱技术对感染前后脾脏和肠黏膜组织的差异蛋白组学进行研究。结果显示, 感染后脾脏和肠黏膜组织中分别有11个和12个显著差异表达蛋白点, 经MALDI-TOF-MS质谱鉴定出19种显著差异表达蛋白, 其中上调表达蛋白10种, 下调表达蛋白9种, α -淀粉酶、载脂蛋白A-I、 β -肌动蛋白和过氧化物还原酶2为两种组织中共同存在的显著差异表达蛋白。GO注释分析表明, 显著差异表达蛋白分别定位于细胞外区、细胞质、线粒体和内质网, 具有结合、转运、催化、免疫、抗氧化和细胞骨架等分子功能, 参与物质与能量代谢、细胞膜转运、补体活化、应激反应、细胞与膜骨架组建、蛋白质折叠、氧化还原及铁离子运输等8个生物学过程。研究结果为进一步研究拟态弧菌的致病机制及其与宿主互作机制奠定了基础。

关键词: 草金鱼; 拟态弧菌; 脾脏; 肠黏膜组织; 差异蛋白组

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是一种严重危害水产养殖业的病原菌, 可引起养殖鱼类腹水病, 导致患病鱼类大批死亡^[1-2]。病原菌感染是细菌与宿主相互作用的过程, 当病原菌侵入机体并大量生长繁殖后, 会引起组织器官病理变化及细胞内蛋白表达发生改变, 这些变化可能暗示着细菌与宿主相互作用的本质。因此, 分析拟态弧菌感染后组织细胞中差异表达蛋白, 可为揭示该菌的分子致病机制及其与鱼体相互作用机制提供有价值的信息。

差异蛋白质组学着重于研究特定因素引起的不同样品间蛋白质组的差异, 揭示其在生理或者病理过程中的变化以及调控机制, 同时获得对某些标志性蛋白的定性和功能分析^[3]。近年来, 基于双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)结合质谱技术的差异蛋白质组学分析已逐步应用到水生动物的应激反应研究

中。如Smith等^[4]报道将虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鳃细胞由等渗变为低渗过程中, 前载脂蛋白出现显著差异表达, 推测该蛋白在鱼类渗透调节过程中起着重要作用; Larsen等^[5]比较了大西洋鳕(*Gadus morhua*)和虹鳟在苯酚胁迫下血清蛋白表达图谱, 发现大西洋鳕差异蛋白表达更敏感, 且性别表达差异小于虹鳟; Rattanarajpong等^[6]用黄头病毒(yellow head virus, YHV)感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 发现SCP-钙结合蛋白在病毒感染凡纳滨对虾的免疫应答中起着重要作用。然而, 基于蛋白组层面上的拟态弧菌感染机制的研究还未有报道。

自1991年Thune等^[7]首次报道拟态弧菌引起养殖克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)大量死亡以来, 诸多学者^[8-10]对其致病性进行了深入研究, 探明该菌的致病性是由黏附素、溶血素、肠毒素、铁载体等多种毒力因子共同作用的结果,

收稿日期: 2016-08-21 修回日期: 2017-03-30

资助项目: 国家自然科学基金(31272696, 31672698)

通信作者: 李槿年, E-mail: lijinnian2000@163.com

但其致病分子机制尚不清楚。在前期研究中以绿色荧光蛋白标记拟态弧菌示踪其在感染鱼体内的动态分布, 明确表明肠道和脾脏是拟态弧菌的主要作用靶组织^[1]。在此基础上, 本研究进一步采用双向电泳结合基质辅助激光解析电离飞行质谱技术(MALDI-TOF-MS)对拟态弧菌感染前后实验鱼脾脏与肠黏膜组织中蛋白表达变化进行检测与鉴定, 并对鉴定出的显著差异表达蛋白进行GO(Gene Ontology)注释分析, 旨在蛋白层面上为揭示拟态弧菌致病机制及其与宿主互作机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟态弧菌04-14分离株由本实验室保存; 草金鱼(*Carassius auratus*)购自合肥高新技术农业园; 乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40, NP-40)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、抑肽酶(aprotinin)、亮抑酶肽(leupeptin)和蛋白Marker均购自北京天根生化科技有限公司。3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、载体两性电解质(Bio-Lyte)、碘乙酰胺(IAM)和二硫苏糖醇(DTT)购自BIO-RAD公司; 2-D Clean-Up Kit为美国GE Healthcare公司产品。

1.2 拟态弧菌人工感染草金鱼

实验草金鱼平均体质量(100 ± 2) g, 经4%氯化钠溶液消毒后, 随机分成感染组和未感染(对照)组, 6尾/组, 分别在2个水簇箱($50 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 44 \text{ cm}$)中充气饲养, 水温(27 ± 1) °C, 每天早晚各投饵1次。暂养10 d后确认实验鱼无异常状况, 则开始人工感染实验, 即用浓度为 1×10^8 CFU/mL的拟态弧菌04-14分离株菌液通过腹腔注射感染草金鱼, 注射量为0.3 mL/尾。注射后连续7 d观察并记录草金鱼发病情况, 分别取感染组显症期和未感染组草金鱼的脾脏和肠黏膜组织置无菌EP管中, -80 °C冻存。感染组显症期草金鱼表现为张嘴呼吸、游动不平衡、鳞片部分脱落、鳍基部出血、腹部明显肿大、注射部位局部肌肉溃烂出血。剖解后发现病鱼腹腔和肠道存在积液, 肠黏膜和脾脏出血严重。

1.3 蛋白样品的制备与定量

取2 mL含蛋白酶混合抑制剂(1 mmol/L PMSF, 2 mg/L aprotinin, 5 mg/L leupeptin)的预冷NP-40细胞

裂解液分别加入200 mg液氮研磨后的脾脏和肠黏膜组织中, 冰上匀浆2 h, 12 000 r/min离心15 min后, 取上清液即为蛋白样品。随后, 分别使用P6除盐柱和2-D Clean-Up Kit除去蛋白样品中的盐分、核酸、脂类等杂质成分, 并采用SDS-PAGE分析蛋白提取效果, 核酸蛋白测定仪(NANO-DROP 2000C)测定蛋白样品中蛋白、核酸与盐离子浓度。

1.4 蛋白质双向电泳分离与图谱分析

双向电泳分离 分别取未感染组和感染组的脾脏和肠黏膜组织蛋白样品, 调整蛋白含量为1 mg, 并用400 μ L水化上样缓冲液(8 mol/L尿素、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、0.2% Bio-Lyte、0.001%溴酚蓝)加以溶解。将样品均匀加入等电聚焦槽, 用长17 cm、pH为5~8 IPG胶条覆盖在样品上, 再加入3 mL矿物油覆盖胶条。将聚焦盘放入等电聚焦仪进行等电聚焦(参数设置: 50 V 14 h、100 V 1 h、200 V 1 h、300 V 1 h、500 V 2 h、1 000 V 2 h、5 000 V 3 h、10 000 V 4 h和10 000 V、80 000 Vh)。聚焦结束后, IPG胶条经平衡缓冲液 I (6 mol/L尿素、2% SDS、pH 8.8 Tris-HCl、20%甘油、2%DTT)和平衡缓冲液 II (6 mol/L尿素、2%SDS、pH 8.8 Tris-HCl、20%甘油、2.5% IAM)平衡后于10% SDS-PAGE凝胶中进行第二向电泳, 电压设置: 90 V 30 min后转至220 V电泳至溴酚蓝到达底部边缘。各组蛋白样品按照上述程序各重复进行3次。

双向电泳图谱分析 SDS-PAGE凝胶依次经蒸馏水固定、考马斯亮蓝R250染色和脱色(水: 甲醇: 冰乙酸=9: 9: 2)后, 用Image Scanner扫描仪进行图像采集, 通过PDQuest 8.0分析软件对双向电泳图谱进行分析, 将感染前后表达量差异大于4倍的蛋白点视为显著差异表达蛋白点。

1.5 显著差异表达蛋白点的质谱鉴定与分析

切取凝胶上显著差异表达蛋白点, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行MALDI-TOF-MS质谱鉴定。所得质谱数据用Mascot 2.2软件检索NCBI数据库确定蛋白种类。检索参数: 物种分类为斑马鱼(*Danio rerio*), 最大允许胰蛋白酶漏切位点为1, 肽段质谱范围为700~4 000 u, 质谱误差设置为100 mg/kg, MS/MS误差设置为

0.6 u。进一步利用Uniprot软件对显著差异表达蛋白进行GO注释分析,统计3个ontology(细胞组成、分子功能、参与的生物学过程)中所涉及的GO条目。

2 结果

2.1 蛋白样品的制备

采用含蛋白酶抑制剂的NP-40裂解法提取脾脏和肠黏膜组织总蛋白,并用P6除盐柱和2-D

Clean-Up Kit对蛋白提取液进行除杂。2-D Clean-Up Kit除杂效果较好,虽然提取液中蛋白浓度有所降低(表1),但杂质成分明显降低,减少了对双向电泳的干扰(图1)。

2.2 感染前后脾脏和肠黏膜组织蛋白的双向电泳图谱分析

使用pH为5~8 IPG胶条,分别对拟态弧菌感染组和未感染组脾脏和肠黏膜组织总蛋白进行3次双向电泳重复。利用Image Scanner软件绘制

表1 除杂前后的蛋白样品浓度测定

Tab. 1 Concentration determination of samples before and after removing impurities

组别 group	蛋白浓度/(mg/mL) protein concentration	盐离子浓度/(mg/mL) salt ion concentration	核酸浓度/(mg/mL) nucleic acid concentration
未感染组脾脏蛋白样品除杂前 spleen protein sample in uninfected group before removing impurities	32.9	60.2	38.4
未感染组脾脏蛋白样品除杂后 spleen protein sample in uninfected group after removing impurities	20.9	16.7	19.7
感染组脾脏蛋白样品除杂前 spleen protein sample in infected group before removing impurities	22.2	52.4	37.9
感染组脾脏蛋白样品除杂后 spleen protein sample in infected group after removing impurities	17.8	14.6	11.6
未感染组肠蛋白样品除杂前 intestine protein sample in uninfected group before removing impurities	25.3	62.6	36.1
未感染组肠蛋白样品除杂后 intestine protein sample in uninfected group after removing impurities	15.5	18.9	12.3
感染组肠蛋白样品除杂前 intestine protein sample in infected group before removing impurities	19.8	50.2	28.2
感染组肠蛋白样品除杂后 intestine protein sample in infected group after removing impurities	11.3	14.4	10.7

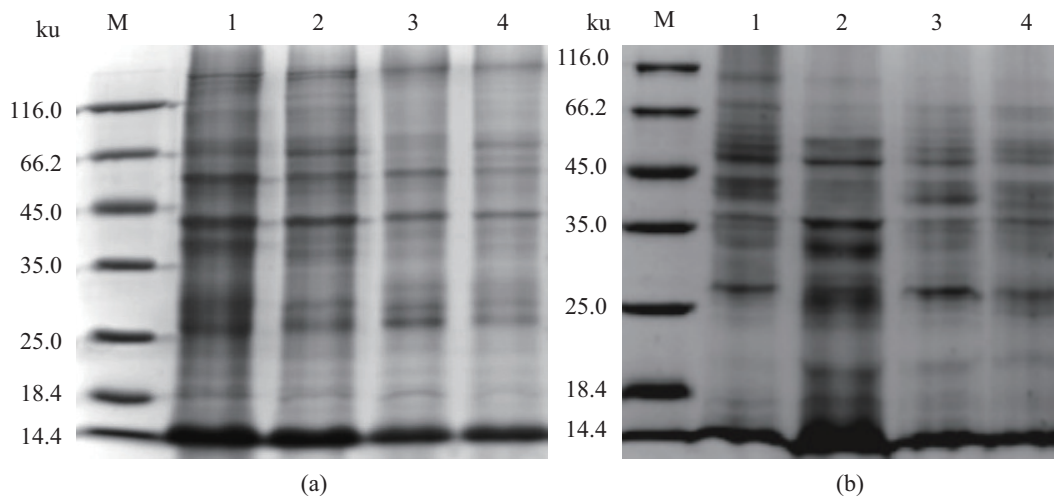


图1 除杂前后的组织总蛋白SDS-PAGE分析

(a) M. 蛋白分子量标准; 1, 3. 未感染组除杂前后脾组织总蛋白; 2, 4. 感染组除杂前后脾组织总蛋白; (b) M. 蛋白分子量标准; 1, 3. 未感染组除杂前后肠黏膜组织总蛋白; 2, 4. 感染组除杂前后肠黏膜组织总蛋白

Fig. 1 The SDS-PAGE analysis of total proteins in the tissues before and after removing impurities

(a) M. protein molecular standard; 1, 3. total spleen proteins in uninfected group before and after removing impurities; 2, 4. total spleen proteins in infected group before and after removing impurities; (b) M. protein molecular standard; 1, 3. total intestine proteins in uninfected group before and after removing impurities; 2, 4. total intestine proteins in infected group before and after removing impurities

电泳图谱, 经PDQuest 8.0软件分析, 结果发现脾脏和肠黏膜组织中均检测到300多个蛋白质点, 其中感染后脾脏组织中出现11个显著差异表达蛋白点, 其中1~6号蛋白点显著上调, 7~11号蛋白点显著下调(图2-b), 肠黏膜组织中出现12个显著差异表达蛋白点, 其中1~6号蛋白点显著上调, 7~12号蛋白点显著下调(图2-d)。

2.3 显著差异表达蛋白点的质谱鉴定与分析

对23个显著差异表达蛋白点(脾脏组织11

个, 肠黏膜组织12个)进行MOLDI-TOF-MS质谱鉴定, 成功鉴定出19种显著差异表达蛋白(表2), 其中上调表达蛋白10种, 下调表达蛋白9种, α -淀粉酶(α -amylase)、载脂蛋白A-I(apolipoprotein A-I)、 β -肌动蛋白(beta actin) 和过氧化物还原酶2(peroxide reductase 2)为感染后脾脏和肠黏膜组织共同存在显著差异表达蛋白。

对鉴定出的19种显著差异表达蛋白进行GO注释分析, 结果发现, 显著差异表达蛋白分别定位于细胞外区(52.6%)、细胞质(36.8%)、线粒

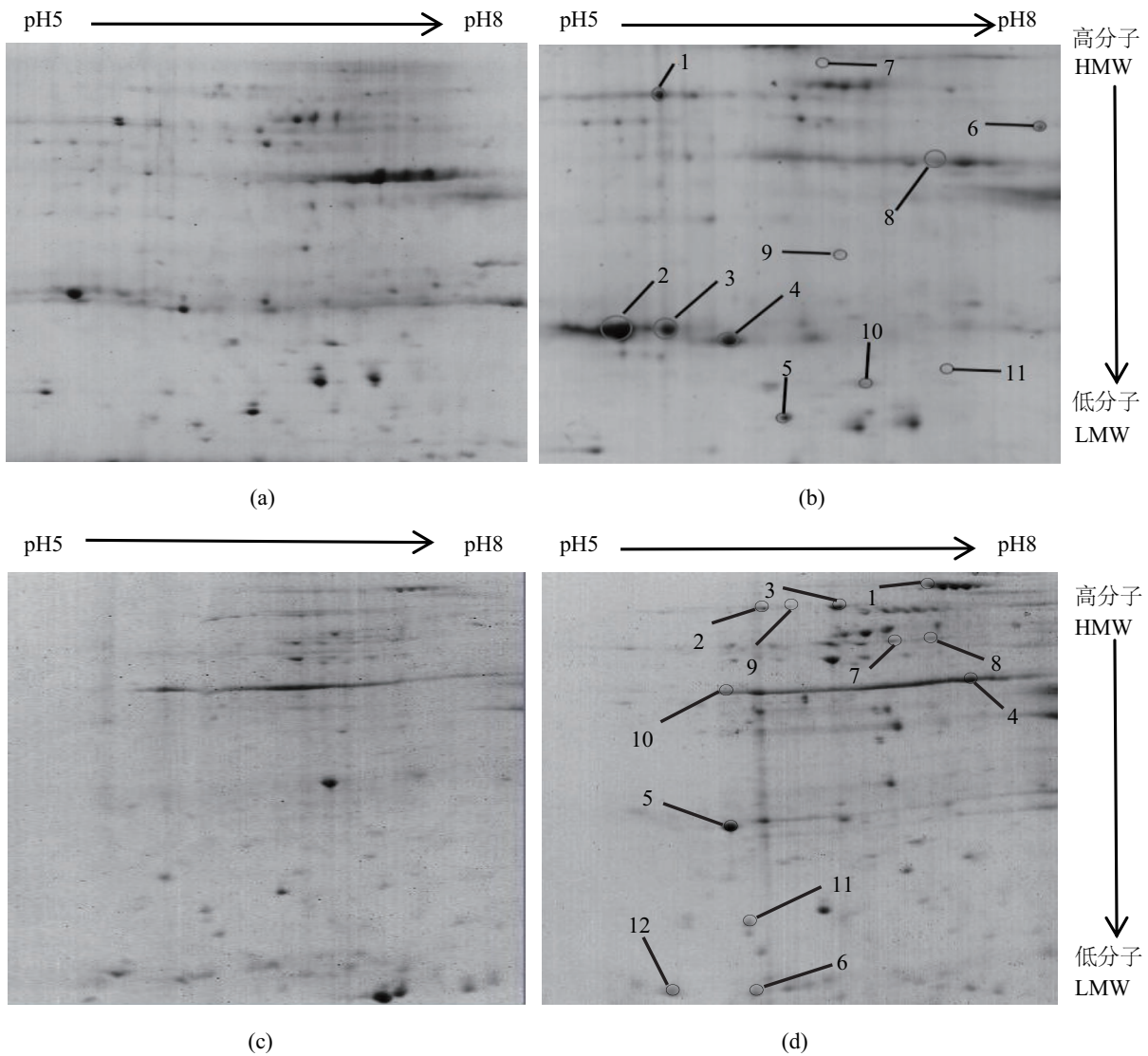


图 2 拟态弧菌感染前后草金鱼脾脏和肠黏膜组织总蛋白的双向电泳图谱

(a)、(b). 感染前后脾脏组织总蛋白; (c)、(d). 感染前后肠黏膜组织总蛋白

Fig. 2 Two-dimensional electrophoretogram of total proteins in spleen and intestine of *C. auratus* before and after infection with *V. mimicus*

(a), (b). total proteins in spleen of *C. auratus* before and after infection; (c), (d). total proteins in intestine of *C. auratus* before and after infection

表2 拟态弧菌感染后脾脏和肠黏膜组织差异表达蛋白点的质谱鉴定结果

Tab. 2 The differentially expressed protein spots in spleen and intestine after infection with *V. mimicus* in MS identification

组织 tissues	斑点序号 spot no.	蛋白序列号 protein ID	蛋白名称 protein name	分子量/(ku)/等电点 MW/pI	得分 score	表达变化 change
脾组织 spleen	1	gi 32493344	α -淀粉酶	56.8/6.4	262	上调
	2	gi 586636848	载脂蛋白A-I	30.2/5.1	79	上调
	3	gi 295314922	载脂蛋白A-IV	31.0/4.9	64	上调
	4	gi 759172426	胰蛋白酶	25.7/6.4	172	上调
	5	gi 974120900	补体C1q样蛋白	20.2/5.3	66	上调
	6	gi 640784436	ATP合成酶 β 亚基	55.1/5.1	239	上调
	7	gi 928013921	热休克蛋白70	70.4/5.5	205	下调
	8	gi 49868	β -肌动蛋白	41.7/5.3	577	下调
	9	gi 225705972	膜联蛋白V	35.0/5.5	105	下调
	10	gi 84569882	过氧化物还原酶2	21.8/5.9	385	下调
	11	gi 47085917	乳酰谷胱甘肽裂解酶	20.3/5.2	60	下调
肠组织 intestine	1	gi 66773050	肌球蛋白	228.5/5.5	373	上调
	2	gi 32527775	转铁蛋白变异体C	76.1/6.6	77	上调
	3	gi 22087586	转铁蛋白变异体A1	75.4/6.8	450	上调
	4	gi 27733675	α -肌动蛋白	42.3/5.2	549	上调
	5	gi 586636848	载脂蛋白A-I	30.2/5.1	79	上调
	6	gi 84569882	过氧化物还原酶2	21.8/5.9	385	下调
	7	gi 32493344	α -淀粉酶	56.8/6.4	262	下调
	8	gi 193788703	蛋白二硫键异构酶前体	56.6/4.5	60	下调
	9	gi 18034630	转铁蛋白变异体A	75.6/6.6	225	下调
	10	gi 49868	β -肌动蛋白	41.7/5.3	577	下调
	11	gi 441494178	铜锌超氧化物歧化酶	16.2/6.1	136	下调
	12	gi 742101868	胃调理蛋白	14.3/7.8	81	下调

体(5.3%)和内质网(5.3%)。根据这些蛋白质的分子功能不同分为免疫相关蛋白(载脂蛋白A-I、载脂蛋白A-IV、胰蛋白酶、补体C1q样蛋白、热休克蛋白70、转铁蛋白变异体C、转铁蛋白变异体A、转铁蛋白变异体A1, 占42.1%)、抗氧化相关蛋白(过氧化物还原酶2、铜锌超氧化物歧化酶、乳酰谷胱甘肽裂解酶, 占15.7%)、细胞与膜骨架蛋白(β -肌动蛋白、肌球蛋白、 α -肌动蛋白、膜联蛋白V, 占21.1%)和物质与能量代谢相关蛋白(α -淀粉酶、ATP合酶 β 亚基、蛋白二硫键异构酶前体、胃调理蛋白, 占21.1%)4类。它们参与物质

与能量代谢细胞膜转运、补体活化、应激反应、细胞骨架组建、蛋白质折叠、氧化还原及铁离子运输8个生物学过程(表3)。

3 讨论

拟态弧菌是一种人和水产动物共患肠道病原菌, 肠道和脾脏是其靶组织。本研究探明了拟态弧菌感染草金鱼后靶组织中差异表达蛋白的种类, 为揭示该菌的致病分子机制奠定了基础。

双向电泳技术由于具有操作简便、快速、高分辨率和微量分析等优点, 是蛋白质组学研

表 3 脾脏和肠黏膜组织中显著差异表达蛋白的GO注释分析

Tab. 3 GO annotation analysis of the significantly expressed proteins in spleen and intestinal mucosa tissue

差异表达蛋白 differentially expressed proteins	组织来源 tissues origin			GO注释分析 GO annotation analysis	
	spleen	intestine	cellular component	molecular function	biological process
α -淀粉酶 α -amylase	+	+	胞外区	催化活性	碳水化合物分解过程
载脂蛋白A-I apolipoprotein A-I	+	+	胞外区	转运与免疫活性	脂质转运及脂蛋白代谢过程
载脂蛋白A-IV apolipoprotein A-IV	+	-	胞外区	转运与免疫活性	脂质转运及脂蛋白代谢过程
胰蛋白酶 trypsin	+	-	胞外区	消化与免疫活性	蛋白分解过程
补体C1q样蛋白 C1q like protein	+	-	胞外区	免疫活性	补体活化过程
ATP合成酶 ATP synthase	+	-	线粒体	催化活性	ATP合成过程
热休克蛋白70 Hsp70	+	-	细胞质	结合与免疫活性	应激反应过程
β -肌动蛋白 β -actin	+	+	细胞质	细胞骨架分子	细胞骨架组建过程
膜联蛋白V annexin V	+	-	细胞质	膜构架分子	膜构架形成过程
过氧化物酶2 peroxiredoxin 2	+	+	细胞质	抗氧化活性	氧化还原过程
乳酰谷胱甘肽裂解酶 glyoxylase	+	-	胞外区	催化与抗氧化活性	谷胱甘肽合成过程
肌球蛋白 myosin	-	+	细胞质	细胞骨架分子	细胞骨架组建过程
转铁蛋白变异体C transferrin variant C	-	+	胞外区	结合与免疫活性	铁离子运输过程
转铁蛋白变异体 transferrin variant	-	+	胞外区	结合与免疫活性	铁离子运输过程
α -肌动蛋白 α -actin	-	+	细胞质	细胞骨架分子	细胞骨架组建过程
蛋白二硫键异构酶前体 protein-disulfide isomerase precursor	-	+	内质网	催化活性	蛋白质合成过程
转铁蛋白变异体A transferrin variant A	-	+	胞外区	结合与免疫活性	铁离子运输过程
铜锌超氧化物歧化酶 copper/zinc superoxide dismutase	-	+	胞外区	抗氧化活性	氧化还原过程
胃调理蛋白 gastrotropin	-	+	细胞质	转运与催化活性	脂肪酸转运过程与胆汁酸代谢过程

注: +, 阳性; -, 阴性

Notes: +, positive; -, negative

究中重要技术之一。但是, 该技术存在自动化程度低, 对分子量过大和过小的蛋白质、低丰度蛋白质、极酸或极碱和难溶的蛋白质等分离困难等缺点。蛋白样品制备的好坏直接影响蛋白分离效果。在提取的组织蛋白样品中通常含有不同量的盐分、核酸、脂类等杂质成分。高浓度盐离子在水化过程中可增加凝胶条的电导, 并引起液体流动, 导致胶条的一端膨胀而另一端变干, 最终使得两端的蛋白质无法聚焦, 造成蛋白条带拖尾或丢失; 核酸分子较大, 能与蛋白结合, 堵塞凝胶造成拖尾; 脂类能与脂蛋白结合, 降低蛋白的可溶性, 影响蛋白分离效果。为了尽可能地消除这些干扰成分

的影响, 实验同时使用美国伯乐公司生产的P6除盐柱和GE公司生产的2-D Clean-Up Kit对蛋白样品进行除杂, 结果发现, 经2-D Clean-Up Kit除杂后的蛋白样品等电聚焦电压上升正常, 2-D图谱蛋白点数目增多, 图像清晰, 说明2-D Clean-Up Kit适用于水生生物蛋白组学的研究。

本实验对感染拟态弧菌后草金鱼脾脏和肠黏膜组织中的差异表达蛋白进行了分析, 初步鉴定出4大类19种显著差异表达蛋白, 其中包括免疫相关蛋白8种、抗氧化蛋白3种、物质与能量代谢相关酶类4种和细胞骨架与膜构架相关蛋白4种。但这些蛋白仍需通过qRT-PCR和Western blot从mRNA和蛋白水平进行定量和定位验证。

在所鉴定的8种差异性免疫相关蛋白中, 载脂蛋白A-I与A-IV可通过抑制脂多糖引起的单核细胞激活而发挥抗炎作用^[12]; 补体C1q样蛋白具有活化补体作用^[13]; 胰蛋白酶是丝氨酸蛋白酶家族的重要成员, 不仅具有蛋白消化功能, 还在补体活化过程中起重要作用^[14], 这4种免疫相关蛋白的上调表达是草金鱼抗拟态弧菌感染的一种应激反应。转铁蛋白具有多态性, 经酶促糖基化后可形成不同类型变异体, 转铁蛋白及其变异体不仅参与铁的运输与代谢, 还具有免疫调节作用, 更具有抗菌或杀菌活性^[15]。本实验发现草金鱼被拟态弧菌感染后, 其脾脏与肠黏膜组织中转铁蛋白变异体C和A1表达显著上调, 而转铁蛋白变异体A表达显著下调, 推测转铁蛋白变异体在该菌感染与抗感染过程中均发挥作用。Hsp70具有分子伴侣、抗应激、调节细胞凋亡、参与机体免疫等多种生物学功能^[16]。朱佳杰等^[17]用无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)人工感染吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus* GIFT), 发现感染后24 h, 肝脏组织内Hsp70表达显著上调从而发挥抗感染作用。而本结果显示, 感染后草金鱼脾脏组织中Hsp70表达显著下调, 这可能与感染显症后期脾脏组织出血溃烂、组织内细胞合成功能受损有关。

王景^[18]报道传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)感染暗绿鲩(*Tetraodon nigroviridis*) 6 d后, 脾脏组织中过氧化物酶和过氧化氢酶表达显著上调, 发病个体自由基代谢出现紊乱。本实验得到相似结果, 感染后期草金鱼的脾脏和肠黏膜组织中过氧化物还原酶、铜锌超氧化物歧化酶和乳酰谷胱甘肽裂解酶3种抗氧化蛋白的表达均显著下调, 说明疾病的发生过程与抗氧化酶系统表达受抑制及氧自由基产生密切相关。本实验发现拟态弧菌感染草金鱼后, 脾脏组织内参与物质与能量代谢相关酶类表达量同样发生改变, 其中ATP合成酶和 α -淀粉酶的表达显著上调, 这与王士^[19]用草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)人工感染草鱼肾(*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK)细胞, 发现感染后24 h, 细胞内ATP合成酶表达显著上调结果相一致, 提示病原体侵入机体后诱导物质合成与能量代谢相关酶类表达, 加速体内物质合成与能量代谢, 以减弱病原体对组织的感染力。但是, 本研究还发现草金鱼肠黏膜

组织内 α -淀粉酶、胃调理蛋白和蛋白质二硫键异构酶前体的表达均显著下调, 其发生机制有待于进一步研究。

肌球蛋白、 α -肌动蛋白和 β -肌动蛋白均属于细胞骨架相关蛋白^[20]; 膜联蛋白V属钙离子依赖的磷脂结合蛋白, 参与细胞膜转运、膜构架形成以及调节肌动蛋白的聚合^[21]。已有研究表明当机体受到病原微生物感染时, 细胞结构受到破坏, 这时细胞与膜骨架相关蛋白表达量上调, 重建细胞骨架结构以维持细胞结构的稳定。但若能量消耗与摄取不足则可能造成 β -肌动蛋白表达量下降, 破坏细胞骨架结构的稳态性, 导致细胞出现病变^[22]。本实验结果同样证实了此观点, 拟态弧菌感染后脾脏与肠黏膜组织中肌球蛋白和 α -肌动蛋白表达量上调, 但 β -肌动蛋白及膜联蛋白V表达下调, 并伴有脾脏和肠黏膜出血和坏死现象。

参考文献:

- [1] Zhang X, Li Y W, Mo Z Q, *et al.* Outbreak of a novel disease associated with *Vibrio mimicus* infection in fresh water cultured yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 119-124.
- [2] Geng Y, Liu D, Han S, *et al.* Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 82-84.
- [3] Patterson S D, Aebersold R H. Proteomics: the first decade and beyond[J]. *Nature Genetics*, 2003, 33(3S): 311-323.
- [4] Smith R W, Wood C M, Cash P, *et al.* A polipoprotein AI could be a significant determinant of epithelial integrity in rainbow trout gill cell cultures: a study in functional proteomics[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005, 1749(1): 81-93.
- [5] Larsen B K, Bjørnstad A, Sundt R C, *et al.* Comparison of protein expression in plasma from nonylphenol and bisphenol A-exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) by use of SELDI-TOF[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78(S): S25-S33.
- [6] Rattanarojpong T, Wang H C, Lo C F, *et al.* Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection[J]. *Proteomics*, 2007, 7(20): 3809-3814.
- [7] Thune R L, Hawke J P, Siebeling R J. Vibriosis in the

- red swamp crawfish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1991, 3(3): 188-191.
- [8] Li T, Kobayashi A, Takata N, *et al.* Role of the enterotoxigenic hemolysin in pathogenicity of *Vibrio mimicus*[J]. *Journal of Health Science*, 2008, 54(6): 686-691.
- [9] Liu X Q, Gao H H, Xiao N, *et al.* Outer membrane protein U (OmpU) mediates adhesion of *Vibrio mimicus* to host cells via two novel N-terminal motifs[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119026.
- [10] Alam M, Miyoshi S, Yamamoto S, *et al.* Expression of virulence-related properties by, and intestinal adhesiveness of, *Vibrio mimicus* strains isolated from aquatic environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3871-3874.
- [11] 高会会, 侯立婷, 李耀年, 等. 拟态弧菌的绿色荧光蛋白标记及其在感染草鱼体内的动态分布[J]. *水产学报*, 2015, 39(4): 557-565.
- Gao H H, Hou L T, Li J N, *et al.* EGFP marker of *Vibrio mimicus* and its dynamic distribution in infected *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 557-565(in Chinese).
- [12] 廖雪玲, 吴满平. 载脂蛋白A-I与机体非特异性免疫系统防御功能[J]. *中国临床药理学杂志*, 2005, 14(3): 193-196.
- Liao X L, Wu M P. Apolipoprotein A-I and the non-specific immune defense function[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacy*, 2005, 14(3): 193-196(in Chinese).
- [13] 万金娟, 刘波, 戈贤平, 等. 硬骨鱼补体系统的研究进展[J]. *江西农业学报*, 2011, 23(11): 159-164.
- Wan J J, Liu B, Ge X P, *et al.* Research advances in complement system of teleost fish[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2011, 23(11): 159-164(in Chinese).
- [14] Ruan G L, Li Y, Gao Z X, *et al.* Molecular characterization of trypsinogens and development of trypsinogen gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and topmouth culter (*Culter alburnus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(1): 77-85.
- [15] 赵建辉, 韩柱, 侯小康. 转铁蛋白的研究进展[J]. *河北化工*, 2010, 33(9): 34-36.
- Zhao J H, Han Z, Hou X K. Study progress of transferrin[J]. *Hebei Chemical Industry*, 2010, 33(9): 34-36(in Chinese).
- [16] Morano K A. New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1113(1): 1-14.
- [17] 朱佳杰, 沈夏霜, 付强, 等. 吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织在不同时期蛋白质组的表达差异[J]. *水产学报*, 2013, 37(12): 1821-1828.
- Zhu J J, Shen X S, Fu Q, *et al.* Proteome analysis of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver in different periods after *Streptococcus agalactiae* infection[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(12): 1821-1828(in Chinese).
- [18] 王景. 暗绿鲩ISKNV感染模型的建立及蛋白质组分析[D]. 广州: 中山大学, 2008.
- Wang J. The infection model development of *Tetraodon nigroviridis*-ISKNV and proteome analysis[D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2008 (in Chinese).
- [19] 王士. 草鱼呼肠孤病毒混合感染及其致细胞病变效应的蛋白质组学分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Wang T. Study on the co-infection of grass carp reovirus and proteomic analysis of cytopathic effect[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [20] 周严, 胡晓燕, 王华瑾, 等. 细胞膜蛋白与细胞骨架蛋白相互作用研究进展[J]. *生物工程进展*, 2002, 22(1): 33-38, 18.
- Zhou Y, Hu X Y, Wang H J, *et al.* Interaction between membrane proteins and cytoskeletal proteins[J]. *Progress in Biotechnology*, 2002, 22(1): 33-38, 18(in Chinese).
- [21] Koopman G, Reutelingsperger C P, Kuijten G A, *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis[J]. *Blood*, 1994, 84(5): 1415-1420.
- [22] Wallar B J, Alberts A S. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton[J]. *Trends in Cell Biology*, 2003, 13(8): 435-446.

Differential proteome analysis of spleen and intestinal mucosa tissue from *Carassius auratus* infected by *Vibrio mimicus*

TAO Lihan , HU Dandan , ZHANG Jiajun , TAO Huizhu , LI Jinnian *

(Key Laboratory of Zoonoses, College of Animal Science and Technology,
Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to investigate the differentiation change of tissue proteins in fish after infection with *Vibrio mimicus*, *Carassius auratus* were artificially infected by *V. mimicus* 04-14 isolates. Differential proteome analysis in spleen and intestinal mucosa tissues before and after infection was performed by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) combined with matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry techniques (MALDI-TOF-MS). The results showed that there were 11 and 12 significantly differentially expressed proteins in spleen and intestinal mucosa tissues after infection, respectively. A total of 19 significantly differentially expressed proteins were identified by MALDI-TOF-MS, with 10 up-regulated and 9 down-regulated proteins. Amylase, apolipoprotein A-I, α -actin and peroxiredoxin 2 were the common significantly differentially proteins both in spleen and intestinal mucosa tissues. Gene Ontology (GO) annotation indicated that significant differentially expressed proteins were located in extracellular region, cytoplasm, mitochondrion and reticulum, respectively. The molecular functions of these proteins included catalytic activity, binding, transport, immune, antioxidant, cytoskeleton and membrane skeleton formation, involved in eight biological processes of substance and energy metabolism, cell membrane transport, complement activation, response to stimulus, cytoskeleton formation, protein folding, redox and iron ion transport. These results might provide a basis for further research of *V. mimicus* pathogenic mechanism and bacteria-host interactions.

Key words: *Carassius auratus*; *Vibrio mimicus*; spleen; intestinal mucosa tissue; differential proteome

Corresponding author: LI Jinnian. E-mail: lijinnian2000@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272696, 31672698)