

## 应用iTRAQ定量蛋白质组学技术筛选无乳链球菌 鱼源株与人源株差异表达蛋白

郭长明<sup>1</sup>, 袁 橙<sup>1</sup>, 武彩红<sup>1</sup>, 朱善元<sup>1</sup>,  
刘广锦<sup>2</sup>, 陆承平<sup>2</sup>, 刘永杰<sup>2\*</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 以斑马鱼和巨噬细胞作为体内、外感染模型, 比较无乳链球菌鱼源株GD201008-001与人源株A909的致病性差异, 利用iTRAQ技术和质谱分析技术进行差异表达蛋白鉴定, 以为揭示无乳链球菌不同宿主来源株致病机制提供新思路。实验通过测定菌株GD201008-001、A909的斑马鱼半数致死量和巨噬细胞吞噬率, 比较二者致病性差异; 提取全菌蛋白, 经iTRAQ试剂标记后进行质谱鉴定, 质谱数据用软件Mascot 2.2和Proteome Discoverer 1.4进行查库(UniProt数据库)鉴定及定量分析, 并对差异蛋白进行GO功能注释和KEGG通路分析。结果显示, GD201008-001毒力显著高于A909; 通过iTRAQ分析两株菌差异表达蛋白, 发现差异蛋白涉及的生物学功能较为广泛, 在鉴定出的368个差异表达蛋白中, GD201008-001中上调表达蛋白193个(比值>1.5), 下调表达蛋白175个(比值<0.667)。生物信息学分析预测这些蛋白主要涉及26个生物学功能, 14个通路, 推测ClpX、GlmS和CpsIVK可能在两株菌致病性差异中发挥重要作用。本研究为阐明无乳链球菌不同宿主来源株致病性差异奠定了基础。

**关键词:** 无乳链球菌; 鱼源株; 人源株; iTRAQ; 蛋白质组学

**中图分类号:** Q 938.8; S 917.1

**文献标志码:** A

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*), 亦称B族链球菌(group B Streptococci, GBS), 宿主感染范围广泛。无乳链球菌是人类新生儿肺炎、脑膜炎<sup>[1]</sup>、奶牛乳腺炎<sup>[2]</sup>、鱼类脑膜脑炎<sup>[3]</sup>的主要病原菌之一。该菌可以感染多种鱼类, 罗非鱼感染尤其严重<sup>[4]</sup>, 2009年以来, 我国南方罗非鱼养殖区发生严重的鱼源无乳链球菌感染, 患病鱼死亡率高, 造成了严重经济损失<sup>[5]</sup>。

I a、I b血清型的人源无乳链球菌能引起鱼类感染发病, 可致尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等鱼类败血症和脑膜炎<sup>[6]</sup>。海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)与

无乳链球菌同属, 也是罗非鱼链球菌病的主要病原之一, 海豚链球菌亦可感染人<sup>[7]</sup>。因此, 推测罗非鱼源无乳链球菌可能对人类具有致病性。刘广锦等<sup>[8]</sup>从我国广东罗非鱼养殖场患病鱼体内分离到多株无乳链球菌, 并对其中一株强毒株GD201008-001进行了全基因组测序和比较基因组学分析, 结果证明, 罗非鱼源无乳链球菌GD201008-001(ZQ0910), 与从北美新生患儿体内分离到的无乳链球菌A909血清型相同, 且在基因组序列、基因元件上最为相似, 进化关系也较近。研究结果同Rosinski等<sup>[9]</sup>的结论一致, 因此可以推测某些无乳链球菌鱼源株可能与人源株

收稿日期: 2017-01-15 修回日期: 2017-06-08

资助项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31502085); 江苏省自然科学基金青年科学基金(BK20140703); 中央高校基本科研基金(KJQN201618); 江苏农牧科技职业学院科研项目(NSF201503)

通信作者: 刘永杰, E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

源于同一祖先,有感染人类的潜在可能,迫切需要开展深入研究。相同血清型且不同宿主来源的无乳链球菌蛋白表达谱存在何种差异,差异表达蛋白中是否存在新的毒力因子,均需进一步探讨。同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术是2004年由美国ABI(应用生物系统公司)开发的一种同位素标记的蛋白质组学定量技术<sup>[10]</sup>。该技术可同时对2~8个样品进行相对定量研究,具有很好的精确性和重复性,在比较蛋白质组学研究中已经得到了很好的应用<sup>[11]</sup>。本研究首先通过斑马鱼模型和巨噬细胞模型比较无乳链球菌鱼源株与人源株的致病性差异,然后利用iTRAQ技术筛选两株菌差异表达蛋白,以期获得可能的新的毒力因子,为阐明无乳链球菌的致病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、细胞和实验动物

无乳链球菌鱼源株GD201008-001分离自广东某罗非鱼养殖场患病罗非鱼脑内,由南京农业大学刘广锦博士分离;人源株A909购自ATCC,血清型均为I a型。小鼠单核巨噬细胞RAW264.7购自ATCC,由本实验室保存。细胞培养条件为10% FBS DMEM完全培养基,37 °C,5%CO<sub>2</sub>,0.25%胰酶消化传代。实验动物选用AB纯系80日龄的斑马鱼(Danio rerio),由中国水产科学院珠江水产研究所提供,斑马鱼按照Neely等<sup>[12]</sup>的方法饲养,实验期间,水温为(26±1)°C。

### 1.2 主要仪器和试剂

Easy nLC1000纳升级液相色谱仪、Q-Exact-ive质谱仪(Thermo Finnigan);低温高速离心机、真空离心浓缩仪(Eppendorf);AKTA Purifier 100纯化仪、600 V电泳仪(GE Healthcare);可见紫外分光光度计(尤尼柯);Urea、SDS、Trisbase、IAA、DTT(Bio-Rad);iTRAQ Reagent-8plex Multiplex Kit、Dissolution buffer(AB SCIEX);C18 Cartridge(Sigma);THB培养基(BD);DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶(Gibco);SDT buffer(4%SDS,100 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L DTT,pH7.6);5×上样缓冲液(10%SDS,0.5%溴酚蓝,50%甘油),UA buffer(8 mol/L Urea,150 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)。

### 1.3 两株无乳链球菌对斑马鱼的LD<sub>50</sub>测定

购买AB纯系80日龄斑马鱼,观察饲养一周,待确认斑马鱼健康无死亡后,选取个体大小相当的斑马鱼进行试验,15尾/组,分开饲养。将无乳链球菌在37 °C振荡培养至对数生长期,用无菌PBS洗涤菌体3次后,用无菌PBS进行倍比稀释,将GD201008-001与A909分别配制8个不同稀释度的活菌液,同时进行平板计数。攻毒组斑马鱼腹腔注射菌液20 μL/尾。对照组斑马鱼腹腔注射无菌PBS 20 μL/尾。接种后每天定时观察,记录死亡斑马鱼数量,连续观察7 d。按Bliss法<sup>[13]</sup>计算LD<sub>50</sub>。

### 1.4 巨噬细胞对无乳链球菌的吞噬

吞噬试验在Hoe N P等<sup>[14]</sup>的方法上进行了一些改进:将无乳链球菌在37 °C振荡培养至对数生长期,用杜伯科磷酸缓冲盐溶液(DPBS)洗涤三次,将菌液浓度调整至1.25×10<sup>8</sup> CFU/mL,取1 mL用5.0 μg/mL FITC(Sigma)标记20 min,DPBS洗去未结合的标记物。将标记好的无乳链球菌重悬在1 mL DMEM营养液中,加入1×10<sup>6</sup>个RAW264.7细胞与无乳链球菌37 °C共孵育60 min。用等体积台盼蓝淬灭细胞外结合菌体的荧光,用流式细胞仪计数吞噬了FITC标记菌体的细胞数,每个样品计数10 000个事件,然后计算巨噬细胞的吞噬率。

### 1.5 蛋白样品制备

**制备方法** 将活化后的GD201008-001、A909,37 °C振荡培养至对数生长期。离心取沉淀,PBS洗涤3次后加入500 μL STD buffer,匀浆后沸水浴5 min。超声破碎(80 W,超声10 s,间歇15 s,共10次),沸水浴5 min,离心取上清,BCA法定量蛋白质。取20 μg进行SDS PAGE电泳检测。

**SDS-PAGE电泳** 将20 μg蛋白质样品5:1(V/V)加入5×上样缓冲液,沸水浴5 min,14 000×g离心10 min,取上清,进行12.5% SDS-PAGE电泳。电泳条件为恒流14 mA,电泳时间90 min。考马斯亮蓝染色。

### 1.6 酶解、肽段定量、肽段标记及SCX分级

各取200 μg样品,按照Wisniewski等<sup>[15]</sup>的方法进行酶解、肽段定量。两组样品肽段分别取80 μg,按照AB公司iTRAQ试剂盒说明书进行标记。将标记后的所有肽段混合,进行SCX预分级。SCX分级后,收集洗脱肽段样品约36份,根

据SCX色谱图合并成6份,冻干后C<sub>18</sub>除盐柱(Sigma)脱盐。

### 1.7 质谱分析

每份上述脱盐肽段样品采用纳升流速HPLC液相系统Easy nLC进行分离。缓冲液A液为0.1%甲酸水溶液, B液为0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为84%)。色谱柱以95%的A液平衡。样品由自动进样器上样到上样柱Thermo scientific EASY column (2 cm×100 μm, 5 μm-C18),再经分析柱Thermo scientific EASY column (75 μm×100 mm, 3 μm-C18)分离,流速为300 nL/min。

每份样品经毛细管高效液相色谱分离后用Q-Exactive质谱仪进行质谱分析。质谱分析参数如下:分析时长为60 min;检测方式为正离子;母离子扫描范围为300~1800 m/z;一级质谱分辨率在质荷比200时为70 000;自动增益目标值:3e6;一级最大注入时间为10 ms;扫描范围数为1;动态排除时间为40.0 s。多肽和多肽的碎片的

质量电荷比按照下列方法采集:每次全扫描后采集10个碎片图谱,二级碎裂模式为高能碰撞解离;隔离窗口为2 m/z;二级质谱分辨率为在质荷比200时为17 500;扫描叠加数为1;二级最大注入时间为60 ms;归一化的碰撞能量为30 eV;最小填充比为0.1%。

### 1.8 质谱数据分析

质谱分析原始数据为RAW文件,用软件Mascot 2.2和Proteome Discoverer1.4(Thermo)进行查库鉴定及定量分析。

本次使用数据库为uniprot\_Streptococcus\_agalactiae\_55498\_20160527.fasta蛋白质库(收录序列55 498条,下载于20160527)。

查库使用Mascot软件版本为Mascot 2.2。查库时将RAW文件通过Proteome Discoverer提交至Mascot服务器,选择已经建立好的数据库,然后进行数据库搜索。相关参数如下表:

表1 Mascot搜索参数

Tab. 1 Search parameters of Mascot

参数名 item	参数值 value
搜库方式 type of search	二级离子搜库 MS/MS Ion search
酶 enzyme	胰蛋白酶 Trypsin
质量值 mass values	单同位素 monoisotopic
漏切位点数 max missed cleavages	2
固定修饰 fixed modifications	半胱氨酸脲甲基化修饰(半胱氨酸) carbamidomethyl (C), iTRAQ8标(N端) iTRAQ8plex (N-term), iTRAQ8标(赖氨酸) iTRAQ8plex (K)
可变修饰 variable modifications	氧化(蛋氨酸) oxidation (M)
肽段质量误差 peptide mass tolerance	±20×10 <sup>-6</sup>
碎片质量误差 fragment mass tolerance	0.1u
蛋白质质量 protein mass	不限定 unrestricted
数据库 database	无乳链球菌蛋白数据 uniprot_Streptococcus_agalactiae_55498_20160527.fasta
数据库模式 database pattern	正反库 decoy

结果过滤参数为错误发生概率(Peptide FDR)≤0.01<sup>[16]</sup>。

采用Proteome Discoverer 1.4软件对肽段报告离子峰强度值进行定量分析(表2)。

### 1.9 生物信息学分析

蛋白的GO (gene ontology)功能注释和KEGG pathway分析分别采用blast2go软件(<http://www>。

表2 Proteome Discoverer 1.4定量分析参数

Tab. 2 Quantitative analysis parameters of Proteome Discoverer 1.4

参数名 item	参数值 value
蛋白定量 protein quantification	只使用唯一肽段定量 use only unique Peptides
实验校正 experimental bias	蛋白中位数归一化 normalize on protein Median

blast2go.com/)和kaas软件(<http://www.genome.jp/tools/kaas/>)进行分析,以不同菌株差异蛋白为test,以本次实验鉴定到的全部蛋白为reference,利用超几何概率分布计算各相应的 $P$ 值。其中,GO分析选择层次2进行汇总,分别对细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物过程(biological process)进行分析。

## 2 结果

### 2.1 两株无乳链球菌对斑马鱼的LD<sub>50</sub>

GD201008-001对斑马鱼的LD<sub>50</sub>为 $4.46 \times 10^2$  CFU,而A909对斑马鱼的LD<sub>50</sub>为 $2.86 \times 10^7$  CFU,鱼源株对斑马鱼的毒力显著高于人源株(表3)。

表3 无乳链球菌对斑马鱼模型LD<sub>50</sub>的测定

Tab. 3 LD<sub>50</sub> of *S. agalactiae* isolates in zebrafish infection model

攻毒剂量 dose of challenge CFU/(0.02 mL)	死亡数/总数 number of death/total		
	GD201008-001	A909	PBS
$5 \times 10^8$		13/15	0/15
$1 \times 10^8$		10/15	0/15
$5 \times 10^7$		9/15	0/15
$1 \times 10^7$		7/15	0/15
$5 \times 10^6$		4/15	0/15
$1 \times 10^6$		1/15	0/15
$5 \times 10^5$		0/15	0/15
$1 \times 10^5$		0/15	0/15
$5 \times 10^4$	15/15		0/15
$1 \times 10^4$	15/15		0/15
$5 \times 10^3$	13/15		0/15
$1 \times 10^3$	8/15		0/15
$5 \times 10^2$	6/15		0/15
$1 \times 10^2$	5/15		0/15
$5 \times 10^1$	2/15		0/15
$1 \times 10^1$	1/15		0/15
LD <sub>50</sub>	$4.46 \times 10^2$	$2.86 \times 10^7$	

### 2.2 两株无乳链球菌的小鼠巨噬细胞吞噬率比较

小鼠巨噬细胞GD201008-001、A909的

RAW264.7吞噬率分别为24.08%与58.34%(图1),鱼源株的吞噬率显著低于人源株( $P < 0.01$ ),结果表明,鱼源株GD201008-001抵抗吞噬的能力显著高于人源株A909。

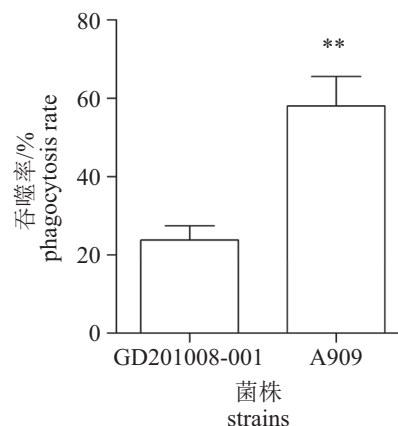


图1 两株无乳链球菌的吞噬率

\*\*代表菌株间差异极显著( $P < 0.01$ )

Fig. 1 The phagocytosis rate of two *S. agalactiae* strains

\*\* $P < 0.01$  indicate significant difference between the two strains

### 2.3 全菌体蛋白SDS-PAGE

分别取20  $\mu$ g菌体蛋白样品,进行SDS-PAGE电泳分离后,各组蛋白质条带较为均一,两组样品电泳条带无较明显差异,表明两组样品间蛋白提取差异性较小,样品定量一致性较好(图2)。

### 2.4 差异蛋白筛选结果

将抽提的GD201008-001和A909的总蛋白,分别采用3种标记物标记作为重复,GD201008-001标记物为113、114、115,A909标记物为116、117、118。通过质谱分析,一共得到6组数据。蛋白定量分析时,以116、117、118通道平均值为内参,进行比较。各组蛋白质的iTRAQ比值均采取各通道标签与内参的比值<sup>[17]</sup>,本研究选择GD201008-001和A909表达蛋白量的比值比(GD201008-001/A909) $> 1.5$ 或 $< 0.667$ ,且 $P < 0.05$ 的蛋白作为表达差异蛋白,共筛选到差异表达蛋白368个。同A909相比,在GD201008-001中上调表达蛋白193个,下调表达蛋白175个,表4和表5分别列出了蛋白表达上调和下调比例排名前10的蛋白及功能注释。上调比例最显著的是Clp蛋白酶ClpX,比值为15.773,下调比例最显著的是苏氨酸-tRNA连接酶,比值为0.084。

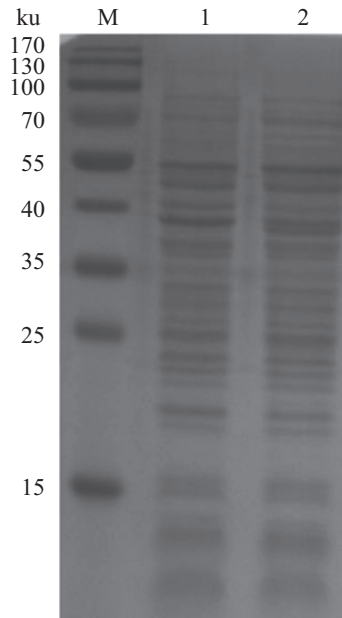


图2 菌体蛋白SDS-PAGE图谱

M. 蛋白分子量标准; 1. GD201008-001; 2. A909

Fig. 2 SDS-PAGE of the cellular proteins extracted from GD201008-001 and A909

M. Marker; 1. GD201008-001; 2. A909

## 2.5 GO分析结果

采用blast2go软件对筛选到的差异表达蛋白进行GO功能富集分析, 差异蛋白的生物学功能覆盖范围较为广泛, 共涉及到26个生物学功能(图3)。差异蛋白在生物过程分析中主要涉及代谢过程、细胞过程、单一的生物过程等; 在细胞组分分析中主要涉细胞成分、细胞、膜成分

等; 在分子功能分析中主要涉及催化活性、结合、转运活性。

## 2.6 KEGG pathway分析结果

使用Kaas软件对筛选到的差异表达蛋白进行KEGG通路分析, 差异表达蛋白涉及14个通路, 主要集中在代谢通路, 前3位通路分别是代谢通路、次生代谢生物合成通路、氨基糖和核苷酸糖代谢通路(图4)。

## 3 讨论

人、兽、鱼均可感染无乳链球菌, 给人类身体健康及养殖业造成严重威胁。目前, 国内外对无乳链球菌的研究多侧重于人源株的致病机理, 而对鱼源株的致病机制研究较少。近年来, 罗非鱼无乳链球菌病在世界范围内多个国家暴发流行<sup>[18]</sup>, 因此也急需开展对鱼源无乳链球菌致病机理的研究。通过检测两株无乳链球菌对斑马鱼模型的LD<sub>50</sub>, 发现两株菌感染斑马鱼后出现相同的发病症状, 病鱼腹部红肿, 游泳打转, 但鱼源株GD201008-001对斑马鱼的毒力显著高于人源株A909。通过RAW264.7吞噬无乳链球菌实验证明, GD201008-001抵抗巨噬细胞吞噬的能力显著高于A909。因此, 我们认为, GD201008-001的致病性强于A909, 其致病性差异的分子基础尚需深入研究。

Evans等<sup>[18]</sup>研究发现, 从新生儿脑膜炎病例分离的血清型为I a型的无乳链球菌对尼罗罗非

表4 GD201008-001较A909表达上调比例前10的蛋白

Tab. 4 Top 10 up-regulated proteins in GD201008-001 compared to A909

登录号 accession	基因名称 gene name	蛋白描述 protein description	比值 ratio of GD201008-001/A909
A0A0H1VL50	<i>clpX</i>	Clp蛋白酶 ClpX Clp protease ClpX	15.773
A0A0H1ZJA4	<i>ribH</i>	6,7-二甲基-8-核糖醇基二氧四氢蝶呤合成酶 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	15.098
Q93TI4	<i>cpsIVK</i>	荚膜生物合成蛋白 capsular biosynthesis protein	5.850
E7S7B3		未知蛋白 uncharacterized protein	5.650
A0A0H1VH34		腺苷酸琥珀酸合成酶 adenylosuccinate synthetase	5.470
Q8DZC6	<i>rpiA</i>	核糖-5-磷酸异构酶 ribose-5-phosphate isomerase A	4.644
A0A0H1V7F3	<i>glmS</i>	果糖-6-磷酸谷氨酰胺转氨酶 glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	4.432
Q8DZ20	<i>rplJ</i>	50S核糖体蛋白L10 50S ribosomal protein L10	4.401
E7S2F8		未知蛋白 uncharacterized protein	4.321
A0A0H1V1U2		二羟丙酮激酶 dihydroxyacetone kinase	4.051

表5 GD201008-001较A909表达下调比例前10的蛋白

Tab.5 Top 10 down-regulated proteins in GD201008-001 compared to A909

登录号 gaccession	基因名称 gene name	蛋白描述 gprotein description	比值 ratio of GD201008-001/A909
Q8E0L9	<i>thrS</i>	苏氨酸-tRNA连接酶 Threonine-tRNA ligase	0.084
Q3K3V3	<i>rplR</i>	50S核糖体蛋白L18 50S ribosomal protein L18	0.167
A0A0E1EF17	<i>tkt</i>	转酮醇酶 Transketolase	0.177
A0A075N859	<i>livG</i>	B支链氨基酸ABC转运蛋白ATP结合蛋白 branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	0.196
R4ZB74	<i>acoA</i>	羟基丁酮脱氢酶 Acetoin dehydrogenase	0.203
A0A0H1TQL3	-	核苷酸结合蛋白 Nucleotide-binding protein	0.205
A0A075MXS7	<i>rbgA</i>	核糖体合成三磷酸鸟苷酶 A Ribosome biogenesis GTPase A	0.209
A0A0H1UDF4	<i>rpoC</i>	DNA指导的RNA聚合酶β亚基 DNA-directed RNA polymerase subunit beta	0.215
A0A0H1TH19	-	未知蛋白 uncharacterized protein	0.228
Q8DXX0	-	未知蛋白 uncharacterized protein	0.229

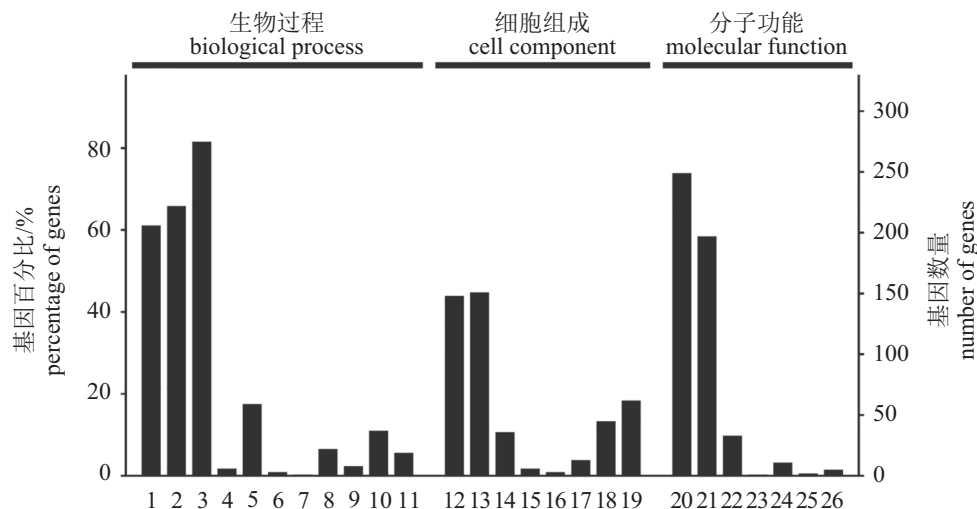


图3 GD201008-001与A909差异表达蛋白GO注释图

1. 单生物过程; 2. 细胞过程; 3. 代谢过程; 4. 进化过程; 5. 定位; 6. 多生物过程; 7. 免疫系统过程; 8. 细胞组份定位或合成; 9. 信号传导; 10. 生物调节; 11. 应激反应; 12. 细胞部分; 13. 细胞; 14. 大分子复合物; 15. 胞外区域; 16. 细胞器部分; 17. 细胞器; 18. 膜的一部分; 19. 膜; 20. 催化活性; 21. 结合; 22. 转运蛋白活性; 23. 抗氧化活性; 24. 结构分子活性; 25. 分子转导活性; 26. 核酸结合的转录因子活性

Fig.3 Gene ontology analysis of differentially expressed proteins of GD201008-001 and A909

1. single-organism process; 2. cellular process; 3. metabolic process; 4. developmental process; 5. localization; 6. multi-organism process; 7. immune system process; 8. cellular component organization or biogenesis; 9. signaling; 10. biological regulation; 11. response to stimulus; 12. cell part; 13. cell; 14. macromolecular complex; 15. extracellular region; 16. organelle part; 17. organelle; 18. membrane part; 19. membrane; 20. catalytic activity; 21. binding; 22. transporter activity; 23. antioxidant activity; 24. structural molecule activity; 25. molecular transducer activity; 26. nucleic acid binding transcription factor activity

鱼具有致病性,推测可能是因为基因的变异,导致了上述无乳链球菌跨宿主传播现象。关于鱼源无乳链球菌是否能够感染人,目前尚无定

论,但是已证实,与无乳链球菌同属的海豚链球菌鱼源株可感染人<sup>[7]</sup>,所以推测鱼源株存在感染人类的潜在可能。罗非鱼源无乳链球菌 GD2-

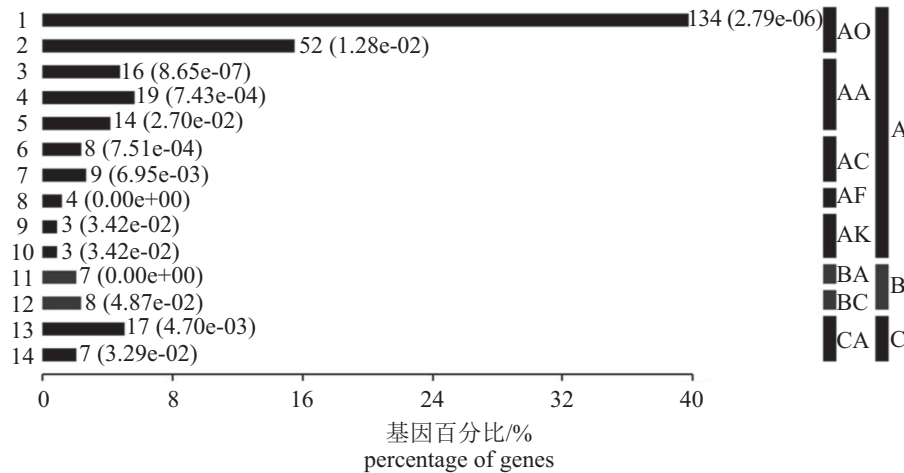


图4 GD201008-001与A909差异表达蛋白KEGG通路分析注释图

A. 代谢; B. 遗传信息处理; C. 环境信息处理; A0. 全面和概观图谱; AA. 碳水化合物代谢; AC. 活性脂质代谢; AF. 其它氨基酸代谢; AK. 外来物质的降解和代谢; BA. 转录; BC. 折叠、整理和降解; CA. 膜运输; 1. 代谢途径; 2. 合成次生代谢产物; 3. 半乳糖代谢; 4. 氨基糖和核苷酸糖代谢; 5. 糖酵解/糖异生; 6. 甘油磷脂代谢; 7. 甘油脂代谢; 8. 谷胱甘肽代谢; 9. 萘降解; 10. 氯代烷和氯代烯烃的降解; 11. RNA聚合酶; 12. 蛋白输出; 13. 磷酸转移酶系统; 14. 细菌分泌系统

Fig. 4 KEGG pathway analysis of differentially expressed proteins of GD201008-001 and A909

A. metabolism; B. genetic information processing; C. environmental information processing; A0. global and overview maps; AA. carbohydrate metabolism; AC. lipid metabolism; AF. metabolism of other amino acids; AK. xenobiotics biodegradation and metabolism; BA. transcription; BC. folding, sorting, and degradation; CA. membrane transport; 1. metabolic pathways; 2. biosynthesis secondary metabolites; 3. galactose metabolism; 4. amino sugar and nucleotide sugar metabolism; 5. glycolysis/Gluconeogenesis; 6. glycerophospholipid metabolism; 7. glycerolipid metabolism; 8. glutathione metabolism; 9. naphthalene degradation; 10. chloroalkane and chloroalkene degradation; 11. rNA polymerase; 12. protein export; 13. phosphotransferase system; 14. bacterial secretion system

01008-001与人源株A909血清型相同,通过全基因组测序和比较基因组学分析证明,二者在基因组序列、基因元件上最为相似,进化关系也较近<sup>[8]</sup>,但二者蛋白表达谱差异如何尚不明确。iTRAQ技术可以高通量地处理复杂样本,并且重复性好,可以同时定性、定量分析,在微生物比较蛋白组学领域中得到了广泛的应用<sup>[19]</sup>。因此,本研究利用iTRAQ定量蛋白组学技术分析了鱼源株与人源株差异表达蛋白。在体外培养条件下,共筛选到GD201008-001和人A909差异表达蛋白368个,在GD201008-001中193个蛋白上调表达,175个蛋白下调表达。上调比例最显著的是Clp蛋白酶ClpX,比值为15.77。ClpX是热休克蛋白Hsp100蛋白家族的成员之一,细菌侵入机体后,面临环境压力的应激,因此热休克蛋白对于修复应激造成的损伤至关重要。同时,ClpX是ClpXP丝氨酸蛋白酶的ATP酶亚基,是结核分枝杆菌致病所需的因子<sup>[20-21]</sup>。结核分枝杆菌的ClpX蛋白研究中发现大肠杆菌中过量表达结核分枝杆菌的ClpX能够延长宿主菌的对数生长期,增加宿主对外界氧化压力的抵抗<sup>[22]</sup>。ClpX对

于金黄色葡萄球菌在压力环境下的生长非常重要,ClpX蛋白能够帮助细菌抵抗宿主巨噬细胞所产生氧化压力,ClpX突变菌株在小鼠体内的毒力显著减弱<sup>[23]</sup>。另外一个上调蛋白果糖-6-磷酸谷氨酰胺转氨酶,编码基因是*glmS*。沙门氏菌敲除*glmS*后,会影响其生长代谢和细胞膜的完整性,同时缺失株对疏水性抗生素的敏感性显著升高,在细胞模型培养实验中数量显著减少<sup>[24]</sup>。在本研究中,ClpX、GlmS在GD201008-001中表达比例显著上调,GD201008-001对斑马鱼模型的LD<sub>50</sub>也显著低于A909,推测ClpX、GlmS可能在GD201008-001与A909致病性差异中起到一定作用。在差异蛋白中,*cpsIVK*编码的荚膜生物合成蛋白在GD201008-001中也显著上调表达。众所周知,无乳链球菌周被富含唾液酸的荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)。CPS经过唾液酸修饰后,宿主免疫系统就会发生识别错误,认为无乳链球菌并非非己成份。因此,荚膜可以帮助无乳链球菌逃避中性白细胞、巨噬细胞等吞噬细胞的免疫清除作用<sup>[24]</sup>。本研究以小鼠巨噬细胞RAW264.7为细胞模型,比较了GD201008-001和

A909的吞噬率,结果表明,荚膜生物合成蛋白表达量显著升高的GD201008-001被巨噬细胞吞噬的效率显著低于A909。我们推测,无乳链球菌荚膜生物合成蛋白表达量可能影响了荚膜多糖的合成,继而导致GD201008-001抵抗巨噬细胞吞噬的能力增强,利于细菌的免疫逃避。其他差异表达蛋白,特别是未鉴定蛋白和下调表达蛋白,在不同宿主来源的无乳链球菌致病机制中所起的作用,尚需继续研究。虽然在体外培养条件下,不同宿主来源的无乳链球菌差异表达蛋白会对细菌的致病性差异造成影响,但是也不能忽略细菌感染宿主后,特异性上调表达的某些蛋白在致病机制中所起的作用。

通过对差异表达蛋白主要功能类别进行GO功能富集分析,结果发现,差异蛋白共涉及26个生物学功能。KEGG通路分析显示,两株菌差异表达蛋白涉及14个通路,且主要集中在代谢通路。无乳链球菌鱼源株与人源株在天然宿主体内所处的环境差异较大,可能会导致代谢过程的明显差异。在体外培养过程中,两株菌差异蛋白主要涉及代谢途径,也可能是与两株菌适应不同宿主密切相关的,具体功能尚需进一步验证。生物信息学分析结果表明,GD201008-001和A909差异表达蛋白发挥的功能比较广泛,参与了众多通路的调节。

综上所述,本实验通过iTRAQ定量蛋白质组学技术分析了无乳链球菌鱼源株与人源株差异表达的蛋白,对于揭示不同宿主来源的无乳链球菌毒力差异及致病机理提供了新的线索。

#### 参考文献:

- [1] Mhalu F S. Infection with *Streptococcus agalactiae* in a London hospital[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1976, 29(4): 309-312.
- [2] Schalm O W, Casselberry N H. Treatment of *Streptococcus agalactiae* infections with intramammary infusions of penicillin[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1946, 109(837): 470-477.
- [3] Vandamme P, Devriese L A, Pot B, et al. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic group B, type Ib *Streptococcus*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(1): 81-85.
- [4] Bowater R O, Forbes-Faulkner J, Anderson I G, et al. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(3): 173-186.
- [5] Li L P, Wang R, Liang W W, et al. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3-4): 719-724.
- [6] Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish[J]. *Veterinary Microbiology*, 1995, 43(1): 33-40.
- [7] Lau S K P, Woo P C Y, Tse H, et al. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(3): 1004-1009.
- [8] Liu G J, Zhang W, Lu C P. Comparative genomics analysis of *Streptococcus agalactiae* reveals that isolates from cultured tilapia in China are closely related to the human strain A909[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 775.
- [9] Rosinski-Chupin I, Sauvage E, Mairey B, et al. Reductive evolution in *Streptococcus agalactiae* and the emergence of a host adapted lineage[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 252.
- [10] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [11] Wu W W, Wang G H, Baek S J, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cI-CAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(3): 651-658.
- [12] Neely M N, Pfeifer J D, Caparon M. *Streptococcus-zebrafish* model of bacterial pathogenesis[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(7): 3904-3914.
- [13] Rosiello A P, Essigmann J M, Wogan G N. Rapid and accurate determination of the median lethal dose (LD50) and its error with a small computer[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1977, 3(5-6): 797-809.
- [14] Hoe N P, Ireland R M, Deleo F R, et al. Insight into the molecular basis of pathogen abundance: Group A *Streptococcus* inhibitor of complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(11): 7646-7651.



- [15] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [16] Sandberg A, Lindell G, Källström B N, *et al.* Tumor proteomics by multivariate analysis on individual pathway data for characterization of vulvar cancer phenotypes[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(7): M112.016998.
- [17] Unwin R D, Griffiths J R, Whetton A D. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(9): 1574-1582.
- [18] Evans J J, Klesius P H, Pasnik D J, *et al.* Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(5): 774-776.
- [19] 袁建丰, 李林林, 孙敏华, 等. iTRAQ标记技术及其在微生物比较蛋白质组学中的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(10): 859-862.
- Yuan J F, Li L L, Sun M H, *et al.* Research progress of iTRAQ technology and its application in comparative proteomics[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(10): 859-862(in Chinese).
- [20] Knipfer N, Seth A, Roudiak S G, *et al.* Species variation in ATP-dependent protein degradation: protease profiles differ between mycobacteria and protease functions differ between *Mycobacterium smegmatis* and *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1999, 231(1-2): 95-104.
- [21] Butler S M, Festa R A, Pearce M J, *et al.* Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(3): 553-562.
- [22] 王琳, 谢建平. 细菌ClpX蛋白酶的结构和功能[J]. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1281-1287.
- Wang L, Xie J P. Bacterial ClpX protease structure and function—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(10): 1281-1287(in Chinese).
- [23] Frees D, Qazi S N A, Hill P J, *et al.* Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(6): 1565-1578.
- [24] Doran K S, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: No longer in its infancy[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(1): 23-31.

## Quantitative proteomic analysis of differential proteins in *Streptococcus agalactiae* piscine strain and human strain using iTRAQ

GUO Changming<sup>1</sup>, YUAN Cheng<sup>1</sup>, WU Caihong<sup>1</sup>, ZHU Shanyuan<sup>1</sup>,  
LIU Guangjin<sup>2</sup>, LU Chengping<sup>2</sup>, LIU Yongjie<sup>2\*</sup>

(1. Jiangsu Provincial Veterinary Bio-pharmaceutical High-tech Key Laboratory,  
Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Zebrafish and macrophages were used as *in vivo* and *in vitro* infection models to evaluate the pathogenic characteristics of *Streptococcus agalactiae* piscine strain (GD201008-001) and human strain (A909). iTRAQ and LC-MS/MS technology was used to identify differentially expressed proteins in GD201008-001 and A909, and provide new clues for exploring the pathogenic mechanism of *S. galactiae* strains isolated from different hosts. The pathogenic characteristics of GD201008-001 and A909 were evaluated by analyzing LD<sub>50</sub> to zebrafish and phagocytosis of macrophages. Cellular proteins were extracted from cultures of GD201008-001 and A909, and labelled with iTRAQ reagent. Differentially expressed proteins were identified with LC-MS/MS. The mass spectrometry data was analyzed by Mascot2.2 and Proteome Discoverer1.4, and then subjected to biological information analysis of GO (gene ontology) and KEGG pathway. The result of pathogenicity difference analysis indicated that the virulence of GD201008-001 was higher than that of A909. Differentially expressed proteins were identified in *S. galactiae* piscine strain compared with human strain. A total of 368 differentially expressed proteins were revealed ( $P < 0.05$ ), among which 193 proteins were up-regulated (ratio > 1.5) and 175 proteins were down-regulated (ratio < 0.667) in GD201008-001. Bioinformatics analysis predicted that these proteins are mainly involved in 26 biological functions and 14 pathways. It is speculated that ClpX, GlmS and CpsIVK may play an important role in the pathogenicity of GD201008-001 and A909. These results may shed light on the pathogenic mechanism of *S. galactiae* strains isolated from different hosts.

**Key words:** *Streptococcus agalactiae*; piscine strain; human strain; iTRAQ; proteomics

**Corresponding author:** LIU Yongjie. E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

**Funding projects:** Youth Foundation of the National Natural Science Foundation of China (31502085); Youth Foundation of Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20140703); Fundamental Research Funds for the Central Universities (KJQN201618); Research Project of Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College (NSF201503)