

3株水产动物病原弧菌主要分泌性蛋白的 鉴定及其分泌性序列的分析

刘 笋^{1,2}, 王秀华¹, 黄 健^{1*}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要:从3株水产动物病原菌鳃弧菌 MN、鳃弧菌 3101、费氏弧菌培养液中分别获取了分泌性蛋白,进行 SDS-PAGE,对表达量较高的5条蛋白区带进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定表明,它们分别是鳃弧菌 MN 金属蛋白酶(empA-MN)、鳃弧菌 3101 金属蛋白酶(empA-3101)、锌金属蛋白酶(zinc empA)、费氏弧菌 VFMJ11_1094 蛋白(VFMJ11_1094)和费氏弧菌 ES114 的外膜蛋白(OMP)。根据所鉴定的序列设计引物,分别从鳃弧菌 MN、鳃弧菌 3101 和费氏弧菌中扩增出相应基因,克隆后测定 emp-MN、empA-3101、zinc empA、VFMJ11-1094 和 OMP 相应基因的序列,经在线软件 SignalP 3.0 分析,确定 emp-MN、empA-3101、zinc empA、VFMJ11-1094 和 OMP 均存在不同的分泌性信号肽序列 angMN-35、ang3101-35、ang3101-25、vf-38 和 vf-23,通过在线软件 PSORT 分析表明,所有信号肽均定位在细胞的周质空间或细胞外膜上。

关键词:水产动物病原菌;分泌性蛋白;MALDI-TOF/TOF 质谱分析;分泌性序列;细胞定位
中图分类号: Q 785; S 947 **文献标志码:** A

细菌性疾病是水产养殖中最常见的病害之一,其中,鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)等被认为是重要的病原菌^[1-2]。费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)对鱼类养殖的危害相对小一些,但常常和其他病原联合致病,NOVOA 等^[3]在西班牙加利西亚省的1次连续5年的流行病学调查发现,从外观正常以及患病的大菱鲆中都可以分离到费氏弧菌,经常与由寄生虫、病毒、粘细菌引起的混合感染症状有关。实验证明,水产动物病原菌的胞外产物中具有多种酶活性,其中分泌性蛋白(明胶酶或酪蛋白酶)的活性对病原菌的致病性具有重要作用。目前已经发现,鳃弧菌、溶藻胶弧菌(*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)等多种鱼、虾类病原菌均可产生具有强烈致病作用的分泌性胞外蛋白^[4-8]。

分泌性蛋白参与众多的生理过程,包括细菌

外壁的生物发育及能量的产生、有害物质的清理和脱毒、信号转导等过程^[9-11]。利用分泌性蛋白的特征,进行鱼虾类疫苗抗原的表达与分泌,可能为疫苗的导入提供有效途径。对未知的分泌性蛋白的研究,多采用质谱(mass spectrometry)鉴定的方法进行详细生物信息的获取。质谱是指带电原子、分子或分子碎片按质荷比(或质量)的大小顺序排列的图谱^[12]。现代质谱仪可将蛋白分子离子化并通过适当的电场、磁场将它们按空间位置、时间先后或者轨道稳定与否实现质荷比分离(精度可达0.1 u),通过与数据库比对便可知晓该蛋白质分子种类。肽和蛋白质的质谱序列测定的优点是最低的耗样量和高速率,因此在近年来得到了越来越多的关注,成为极具潜力的新手段,对高速发展的分子生物学的研究及生物奥秘的探索具有非常重要的意义^[13-14]。

本研究从水产动物病原菌分泌的胞外产物

收稿日期:2011-03-09

修回日期:2011-06-30

资助项目:公益性行业科研专项经费项目;国家虾现代产业技术体系(nycytx-46)

通讯作者:黄 健,E-mail:huangjie@ysfri.ac.cn

中,通过质谱分析鉴定蛋白的序列,并进行分泌性序列的筛选及生物信息学分析,以便为分泌性载体的构建提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

鳗弧菌 MN, 编号 04061701, 2004 年 4 月分离自山东莱州; 鳗弧菌 3101, 编号 04103101, 2004 年 10 月分离自山东莱州; 费氏弧菌, 编号 050616A, 2005 年 6 月分离自山东昌邑; 所有菌株均为本实验室分离鉴定, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。使用前采用平板划线的方法进行活化。

1.2 细菌培养及分泌性蛋白的制备

挑取各株细菌菌株的单菌落至 10 mL 液体 2216E 培养基 (0.1% 酵母提取物, 0.5% 蛋白胨, 0.001% FePO_4) 中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 振荡培养 24 h。培养物于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 再分别用 0.45 和 0.20 μm 滤膜过滤。然后将滤液用截流 10 ku 的超滤管 (MILLIPORE) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心超滤 30 min。使液体由 10 mL 浓缩到 1 mL。浓缩滤液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用 Bradford 法^[15] 及电泳扫描法, 测定波长为 595 nm 时不同浓度的标准蛋白

的光密度值, 绘制标准曲线, 计算总蛋白含量。

1.3 分泌性蛋白 SDS-PAGE

根据测得的蛋白浓度, 取 10 μL 分泌性蛋白浓缩物进行 SDS-PAGE, 采用 5% 浓缩胶, 15% 分离胶, Tris-甘氨酸-SDS 缓冲液 (250 mmol/L 甘氨酸, 25 mmol/L Tris, 0.1% SDS, pH 8.3), 120 V 电泳约 2.5 h。

1.4 主要分泌性蛋白区带的质谱分析

分泌性蛋白经 SDS-PAGE 后, 从凝胶上切下表达量相对较高的蛋白条带, 送上海博苑科技有限公司进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析, 通过 MATRIX SCIENCE 数据库在线比对鉴定。

1.5 基因克隆及序列测定

根据质谱分析鉴定出的鳗弧菌 MN 的金属蛋白酶、鳗弧菌 3101 的金属蛋白酶、锌金属蛋白酶、费氏弧菌 VFMJ11_1094 蛋白和费氏弧菌 ES114 的外膜蛋白序列, 采用 Primer premier 5.0, 设计了 4 对引物 P1、P2、P3 和 P4, 其中, 鳗弧菌 MN 和鳗弧菌 3101 的金属蛋白酶基因使用同一对引物 P1 进行扩增, P2 用于扩增鳗弧菌 3101 的 zinc empA 基因, P3 用于扩增费氏弧菌的 VFMJ11_1094 基因, P4 用于扩增费氏弧菌的 OMP 基因。所有引物送交上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 设计的引物序列
Tab. 1 The sequences of primers

引物 primer	代号 code	序列 sequence	目的片段长度/bp fragment length
P1	P1-F	TCA GCG GAT GCT AAT AAT AAC TC	1 947
	P1-R	CTA TCG TTG AAT ACC CTC CTA CAT	
P2	P2-F	CTA AAC CCG TTT GAA TTA AGC T	2 200
	P2-R	GTA AGA TGC CCA ACC GAA GA	
P3	P3-F	TCT AAG AAA AGG CAG TGG AC	1 251
	P3-R	GAT GAT GGT GGT GAT GAA TG	
P4	P4-F	TGT GAG TTT TCC ATT TAG ACT	837
	P4-R	ACG AAG AAA GTG ATG AAC G	

分别提取鳗弧菌 MN, 鳗弧菌 3101, 费氏弧菌的基因组 DNA, 作为 PCR 反应的模板。采用紫外分光光度法和琼脂糖电泳法测定模板 DNA 的浓度后, 按照常规方法进行 PCR 反应。25 μL 反应体系包含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl_2 , dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 0.025 mmol/L; 正向和反向引物浓度各 40 pmol; Ex Taq DNA 聚合酶 (天根) 1.25 U, 按以下程序进行 PCR 扩增: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变

性, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s、退火 (退火温度分别为 $53.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 个循环、 $53.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 个循环、 $50.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 个循环、 $48.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 个循环) 40 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 s 的循环; 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, PCR 结束后, 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶回收试剂盒 (ZYMO) 回收 PCR 产物。

将回收的 PCR 扩增片段与 pGM-T 载体 (天根) 进行连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞 (天根), 涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的

LB 琼脂平板上,待菌落长出后,挑取白色菌落进行 PCR 筛选出重组菌。将重组菌接种于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,提取重组质粒,送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.6 分泌性信号肽序列的生物信息学分析

对所测定的序列用信号肽预测软件 SignalP 3.0^[16] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),选择革兰氏阴性细菌的方法,进行在线信号肽预测。进一步对信号肽分泌序列用细胞定位分析预测软件 PSORT^[17-18] (<http://psort.hgc.jp/form.html>)选择革兰氏阴性细菌的方法,进行在线细胞定位分析。

2 结果

2.1 获取的 3 种海水细菌胞外蛋白的 SDS-PAGE

将获取的 3 种海水细菌的胞外蛋白经超滤浓缩后进行 SDS-PAGE(图 1),结果表明,在这 3 种海水细菌的胞外产物中,每种菌都有很多蛋白条带,但是表达量不同。经图像分析软件 Gel-pro 分析发现(表 2),表达量相对比较高的有鳃弧菌

MN 的 35 ku 蛋白;鳃弧菌 3101 的 35、25 ku 蛋白;费氏弧菌的 38、23 ku 蛋白。

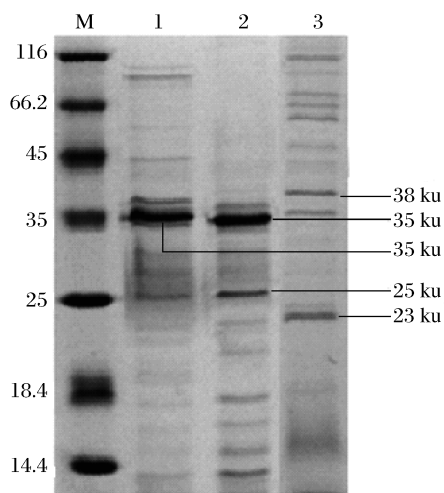


图 1 3 株海水细菌胞外蛋白的 SDS-PAGE

M. 蛋白质分子量标准(MBI);1. 鳃弧菌 MN;2. 鳃弧菌 3101;3. 费氏弧菌。

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of three kinds of aquacultural bacteria extracellular products

M. Protein molecular weight standards(MBI); 1. *V. anguillarum* MN; 2. *V. anguillarum* 3101;3. *V. fischeri*.

表 2 蛋白含量分析
Tab. 2 Protein amount analysis

行标 rows	泳道 M lane M		泳道 1 lane 1		泳道 2 lane 2		泳道 3 lane 3	
	分子量 molecular weight	含量 amount	分子量 molecular weight	含量 amount	分子量 molecular weight	含量 amount	分子量 molecular weight	含量 amount
r1	116	8.326 1					116	5.022 0
r2	66	8.373 3					68	3.792 3
r3							67	3.841 4
r4							65	4.741 4
r5	45	13.925 0						
r6	35	7.154 6					38	6.250 7
r7			35	55.863 0	35	49.893 0	35	4.796 4
r8	25	19.479 0						
r9			25	5.451 0	25	4.031 6		
r10							23	8.912 9
r11	18	12.905 0						
r12					17	2.767 9		
r13	14	18.873 0						
r14					13	3.423 4		
区带总量 sum		89.037 0		61.314 0		60.116 0		37.357 0
泳道总量 in lane		100		100		100		100

2.2 主要分泌性蛋白的质谱分析

将胞外产物的 SDS-PAGE 中表达量相对较高的蛋白带胶条切下,送上海博苑生物科技有限公司进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定。

鳗弧菌 MN 的 35 ku 蛋白条带的鉴定结果为毒力相关金属蛋白酶(virulence metalloprotease)。其肽指纹图谱中有 10 条序列与毒力相关金属蛋白酶相匹配,蛋白序列覆盖率约为 18% (表 3,图 2)。

表 3 鳗弧菌 MN 的 35 ku 蛋白质谱分析中基本信息和匹配的肽段序列
Tab.3 The basic information and match peptide sequences in Mass Spectrometry analysis of the 35 ku protein of *V. anguillarum* MN

肽段 开始 start	肽段 结束 end	实际 测量值 observed	实验 测定值 Mr(expt)	数据库 理论值 Mr(calc)	肽段序列 sequence
213	229	1 919.934 6	1 918.927 3	1 918.949 5	K. TGFYQYTD F PGLVINK. V
271	287	1 837.869 5	1836.862 2	1836.879 5	K. AINGAYSPLNDAHYFGK. V
288	294	901.436 0	900.428 8	900.441 5	K. VVFDMYK. D
295	309	1 854.868 4	1 853.861 1	1 853.880 4	K. DWMNTTPLTFQLTMR. V
295	309	1 870.863 4	1 869.856 1	1 869.875 4	K. DWMNTTPLTFQLTMR. V
386	398	1 408.697 8	1 407.690 5	1 407.703 5	K. GSVDWVVGSDIFK. S
405	411	884.405 3	833.398 0	883.407 6	R. YFDQPSK. D
405	414	1 212.552 5	1 211.545 2	1 211.557 1	R. SFDQPSKDGR. S
415	437	2 628.215 3	2 627.208 0	2 627.215 3	R. SIDHASQYYNGLNVHYSSGVFNR. A
438	445	955.514 4	954.507 1	954.517 4	R. AYYLLANK. A

Top Score:733 for gi_1169522, virulence metalloprotease[*Listonella anguillarum*(*V. anguillarum*)]

```

1 MKKVQRQMKW LFLAASISAA LPVSAARMVQ VDDPSLLEQA LSMQARSIVP
51 TQNGFQVVKS VILPNGEVKV RYQQMYHGLP VFNTSVVATQ TEKGIGQVYG
101 MLAQQIDSDV VSTSPQVEQK QAVSIALTHY QQQNPSLISA DLVTENERAQ
151 LMRLDENQM AQMVYLVDFV VATNEPARPF FFIDANSQDV LQTWEGLNHA
201 EATGTGPGGN QKTGFYQYGT DFPGLVINKV GNICSMNSA VRTVDMKHAT
251 SGGSTFSYSC TDASNYNDYK AINGAYSPLN DAHYFGKVVV DMYKDWMTT
301 PLTFQLTMRV HYDSNYENAF WNGSSMTFGD GQNTFYELVD INVSAREVSH
351 GFTEQNSGLV YQNMSGGINE AFSDIAGEAA EYMRGSVDW VVGSDIFKSS
401 GGLRYFDQPS RDGRSIDHAS QYYNGLNVHY SSGVFNRAYY LLANKANWSV
451 RRGFEVFTVA NQLYWTANST FDQGGCGVAR AAQDLGYNEA DVVDVFNQVG
501 VNASCQVVPV TENVLEKGP VIGLQGTSS EAFYFTFVAS STSAKVSLSL
551 GSGDADLYVK AGSEPTSSW DCRPYKSGNN EQCTISATPG TTYHVMLRGY
601 SNYSGVTLRL D

```

图 2 毒力相关金属蛋白酶序列

[virulence metalloprotease, gi_1169522, *Listonella anguillarum*(*V. anguillarum*)], 下划线部分是鳗弧菌 MN 的 35 ku 蛋白质谱鉴定出的肽段。

Fig.2 The protein sequences of metalloprotease

[virulence metalloprotease, gi_1169522, *Listonella anguillarum*(*V. anguillarum*)], the underlined parts are the identified protein peptides of Mass Spectrometry analysis of the 35 ku protein of *V. anguillarum* MN.

鳗弧菌 3101 的 35 ku 蛋白条带的鉴定结果为毒力相关金属蛋白酶。其肽指纹图谱中有 10 条序列与毒力相关金属蛋白酶相匹配,蛋白序列覆盖率约为 16% (表 4,图 3)。

鳗弧菌 3101 的 25 ku 蛋白条带的鉴定结果为锌金属蛋白酶(zinc metalloprotease)。其肽指纹图谱中有 2 条序列与毒力相关金属蛋白酶相匹

配,蛋白序列覆盖率约为 4% (表 5,图 4)。

费氏弧菌的 38 ku 蛋白条带的鉴定结果为 VFMJ11_1094 蛋白(hypothetical protein VFMJ11_1094)。其肽指纹图谱中有 10 条序列与 VFMJ11_1094 蛋白相匹配,蛋白序列覆盖率约为 40% (表 6,图 5)。

费氏弧菌的 23 ku 蛋白条带的鉴定结果为费

氏弧菌 ES114 的外膜蛋白 (outer membrane protein [*Vibrio fischeri* ES114])。其肽指纹图谱 中有 4 条序列与 VFMJ11_1094 蛋白相匹配, 蛋白序列覆盖率约为 19% (表 7, 图 6)。

表 4 鳗弧菌 3101 35 ku 蛋白质谱分析中基本信息和匹配的肽段序列
Tab. 4 The basic information and match peptide sequences in Mass Spectrometry analysis of the 35 ku protein of *V. anguillarum* 3101

肽段 开始 start	肽段 结束 end	实际 测量值 observed	实验 测定值 Mr(expt)	数据库 理论值 Mr(calc)	肽段序列 sequence
213	229	1 919. 915 2	1 918. 907 9	1 918. 946 5	K. TGFYQYTDFFPGLVINK. V
288	294	901. 434 7	900. 427 4	900. 441 5	K. VVFDMYK. D
295	309	1 854. 852 2	1 853. 844 9	1 853. 880 4	K. DWMNTTPLTFQLTMR. V
295	309	1 870. 847 0	1 869. 839 7	1 869. 875 4	K. DWMNTTPLTFQLTMR. V
386	398	1 408. 683 6	1 407. 676 3	1 407. 703 5	K. GSVDWVVGSDIFK. S
405	411	884. 397 2	833. 389 9	883. 407 6	R. YFDQPSK. D
405	414	1 212. 544 9	1 211. 537 6	1 211. 557 1	R. SFDQPSKDGR. S
415	437	2 628. 190 9	2 627. 183 6	2 627. 215 3	R. SIDHASQYYNGLNVHYSSGVFNR. A
438	445	955. 506 3	954. 499 1	954. 517 4	R. AYYLLANK. A
481	489	979. 465 3	978. 458 0	978. 477 0	K. AAODLGYNK. A

Top Score:686 for gi 1169522, virulence metalloprotease[*Listonella anguillarum*(*V. anguillarum*)]

```

1 MKKVQRQMKW LFLAASISAA LPVSAAKMVQ VDDPSLLEQA LSMQARSIVP
51 TQNGFQVVKV VTLPNGKVKV RYQQMYHGLP VFNTSVVATQ TEKGIGQVYG
101 MLAQQIDSDV VSTSPQVEQK QAVSIALTHY QQQNPSLISA DLVTENERAQ
151 LMVRLDENQM AQMVYLVDFV VATNEPARPF FFIDANSGDV LQIWEGLNHA
201 EATGTGPGGN QRTGFIYQYGT DFPGLVINKV GNICSMMSA VKITVDMKHAT
251 SGGSTFSYSC TDASNYNDYK AINGAYSPLN DAHYFGKVVV DMYKDWMTT
301 PLTFQLTMRV HYDSNYENAF WNGSSMTFGD GQNTFFYPLVD INVSAHEVSH
351 GFTEQNSGLV YQNMSSGINE AFSDIAGEAA EFMKGSVDW VVGSDIFKSS
401 GGLRYFDQPS RDGRSIDHAS QYYNGLNVHY SSGVFNRAYY LLANKANWSV
451 RKGFEVFTVA NQLYWTANST FDQGGCGVAK AAQDLGYNKA DVVDAFNQVG
501 VNASCVVVPP TENVLEKQKP VIGLQGTSS EAFYFTFTVAS STSAKVSISL
551 GSGDADLYVK AGSKPTTSSW DCRPYKSGNN EQCTISATPG TTYHVMLKGY
601 SNYSGVTLRL D

```

图 3 毒力相关金属蛋白酶序列

(virulence metalloprotease, gi 1169522, *Listonella anguillarum*[*V. anguillarum*]), 下划线部分是鳗弧菌 3101 35 ku 蛋白质谱鉴定出的肽段。

Fig. 3 The protein sequences of metalloprotease

(virulence metalloprotease, gi 1169522, *Listonella anguillarum*[*V. anguillarum*]), the underlined parts are the identified protein peptides of Mass Spectrometry analysis of the 35 ku protein of *V. anguillarum* 3101.

表 5 鳗弧菌 3101 25 ku 蛋白质谱分析中基本信息和匹配的肽段序
Tab. 5 The basic information and match peptide sequences in Mass Spectrometry analysis of the 25 ku protein of *V. anguillarum* 3101

肽段 开始 start	肽段 结束 end	实际 测量值 observed	实验 测定值 Mr(expt)	数据库 理论值 Mr(calc)	肽段序列 sequence
230	242	1 385. 592 5	1 384. 585 2	1 384. 596 3	K. TGTCTMNNNAVK. T
386	398	1 408. 674 4	1 407. 667 1	1 407. 703 5	R. GSVDWVVGSDIFK. S

Top Score:131 for gi 262164412, zinc metalloprotease[*V. mimicus* VM223]

```

1 MKQIQRPLNW LILAGAATGF PLYAAQMVTI DDVSIWEQAL AQQQYSVWPA
51 ASGFKAVNTV QLPNGKVKVR YQQLYNGVPV YGTVVVATES KKGISQVYGQ
101 MAQQLEADLS TVAPDIESKQ AIALAVSHFG QQNAIDTAQT LPIENENAQL
151 LVRLDENQQA QLVYLVDFV ASETPARPFY FINAATGEVL EQWDGINHAV
201 ATGTGPGGNQ KIGRYEYGSN GLPGFSIDKT GTTCTMNSA VRIVNLNGGT
251 TGSTAFNYAC NDSINYNYSVK TVNGAYSPLN DAHVFGEVVF DMYQQWLNTS
301 PLTFQLTMRV HYGSNYENAF WDGRAMTFGD GNTRFYPLVD INVSAHEVSH
351 GFTEQNSGLV YKDMSSGINE AYSDIAGEAA EFFMRGSVDW VVGSDFKSA
401 GGLRYFDQPS RDGRSIDHAS QYYSMDVHH SSGVFNRAYY LLANKAGWNV
451 RKGFEVFAVA NQLYWTIPNST FDQGACGVVK AAQDLSYNTA DVVAAFNTVG
501 VNAACGTPP TNNVLEKGGP ITGLTGASNG EDFYFTVAA SGSVVVSTSG
551 GTGDVDLYVE AGSKPTTTSW DCRPYRPGNA EQCTISALAG TTYHVMLRGY
601 SNYSGVTLISL N

```

图4 锌金属蛋白酶序列

(zinc metalloprotease, gi 262164412, [*V. mimicus* VM223]), 下划线部分是鳗弧菌 3101 25 ku 蛋白质谱鉴定出的肽段。

Fig. 4 The protein sequences of zinc metalloprotease

(zinc metalloprotease, gi 262164412, [*V. mimicus* VM223]), the underlined parts are the identified protein peptides of Mass Spectrometry analysis of the 25 ku protein of *V. anguillarum* 3101.

表6 费氏弧菌 38 ku 蛋白质谱分析中基本信息和匹配的肽段序列

Tab. 6 The basic information and match peptide sequences in Mass Spectrometry analysis of the 38 ku protein of *V. fischeri*

肽段 开始 start	肽段 结束 end	实际 测量值 observed	实验 测定值 Mr(expt)	数据库 理论值 Mr(calc)	肽段序列 sequence
29	40	1 481.607 2	1 480.599 9	1 480.611 5	R. NEDMFAFDPMHK. D
29	40	1 497.590 8	1 496.583 5	1 496.606 4	R. NEDMFAFDPMHK. D
41	60	2 009.888 4	2 008.881 1	2 008.901 5	K. DQFSVSGSVGVGGYYDTGSK. A
61	77	1 975.927 7	1 974.920 4	1 974.947 6	K. AFYDDWATGLTLAVNYR. N
81	100	2 340.054 2	2 339.046 9	2 339.087 9	R. IVGYFETDMLNYYTDSSETK. S
191	212	2 478.160 4	2 477.153 1	2 447.186 3	K. GVNGYVVGIEQEIFNVYAGYETR. D
213	226	1 575.694 6	1 574.687 3	1 574.710 1	R. DSDYDVYTVTGNVK. L
281	298	2 025.912 2	2 024.904 9	2 024.940 1	K. TDTDYSYVNAAMTLAK. N
299	307	1 050.459 0	1 049.451 7	1 049.463 4	K. NMDMGIDVR. Q
299	307	1 066.453 2	1 065.445 9	1 065.453 3	K. NMDMGIDVR. Q

Top Score :855 for gi 197335314, hypothetical protein VFMJ11_1094[*V. fischeri* MJ11]

```

1 MKKILLALAI ASISASAFV DTSSQNSRNE DMFAFDEMHK DQFSVSGSVG
51 VGGYYDTGSK AFYDDWATGL TLAVNYRN IVGYFETDLM LNYYTDSSETK
101 SIPNGSGPAT DVDKAWLGFDTGFGIASFGW ENDTALDAID GAGDSTYEFG
151 ASAGDASDAF NVVKFQGAIN GFAYAVSYFE TGDDHAKADK GVNGYVVGIEQ
201 EIFNVYAGYE TRSDYDVYTV VTGNVKGEL ELGANFWIEE TDTKLLDKTN
251 TGYVVSAGYA VSEDLLAAG YAGNTEEIGK TDTDYSYVNV AAMYT LAKNM
301 DMGIDVRQDL DAGGADEETY VFAAGYFFF

```

图5 VFMJ11_1094 蛋白序列

(hypothetical protein VFMJ11_1094, gi 197335214, hypothetical protein VFMJ11_1094[*V. fischeri* MJ11]), 下划线部分是费氏弧菌 38 ku 蛋白质谱鉴定出的肽段。

Fig. 5 The protein sequences of hypothetical protein VFMJ11_1094

(hypothetical protein VFMJ11_1094, gi 197335214, hypothetical protein VFMJ11_1094[*V. fischeri* MJ11]), the underlined parts are the identified protein peptides of Mass Spectrometry analysis of the 38 ku protein of *V. fischeri*.

表 7 费氏弧菌 23 ku 蛋白质谱分析中基本信息 and 匹配的肽段序列
 Tab.7 The basic information and match peptide sequences in Mass Spectrometry
 analysis of the 23 ku protein of *V. fischeri*

肽段 开始 start	肽段 结束 end	实际 测量值 observed	实验 测定值 Mr(expt)	数据库 理论值 Mr(calc)	肽段序列 sequence
57	65	1 119.464 7	1 118.457 4	1 118.496 8	K. FMGGYQFNR. I
66	75	1 163.620 1	1 162.612 8	1 162.659 8	R. IVAVELQYTK.
76	87	1 328.610 1	1 327.602 8	1 327.652 1	K. YGDINVNHPTAK. A
156	163	8 34.447 6	833.440 4	833.475 9	K. ALSGLAFR. V

Top Score:256 for gi 172087689, outer membrane protein[*V. fischeri* ES114]

```

1 MKKIALLLVL FSAFSNANDN ISGFYLGAGL GATTFDDGGA FDYTGASINA
51 DDSTLKFFMGG YQFNRIVAVE LQYTRYGDIN VNHPTAKAAG FKGIDIESTS
101 ISLAANLGYT FDSGWRPFGI VGLGSLESST NVLGHSLSEN NTSFHYGVGV
151 EYAPKALSGL AFRVAYEGDM FIEENVYQDY GYYSYSDDYA MNIGTFYAGA
201 TYKF

```

图 6 费氏弧菌 ES114 的外膜蛋白

(outer membrane protein, gi 172087689, outer membrane protein[*V. fischeri* ES114]), 下划线部分是费氏弧菌 23 ku 蛋白质谱鉴定出的肽段。

Fig. 6 The protein sequences of outer membrane protein

(outer membrane protein, gi 172087689, outer membrane protein[*V. fischeri* ES114]), the underlined parts are the identified protein peptides of Mass Spectrometry analysis of the 23 ku protein of *V. fischeri*.

2.3 PCR 扩增的结果

根据质谱鉴定的结果,其中鳗弧菌 MN 和鳗弧菌 3101 的 35 ku 蛋白鉴定结果均为毒力相关金属蛋白酶,故设计引物的时候使用同一对引物进行扩增反应。设计引物时,将各蛋白的开放阅读框包含在扩增片段的内部,预测 PCR 所扩增的基因片段大小分别为 1 947,1 947,2 200,1 251,837 bp。PCR 结果(图 7 ~ 图 11)表明,各基因扩增的结果都比较好,可进行大量扩增,PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示,扩增出的片段大小与预测大小一致。

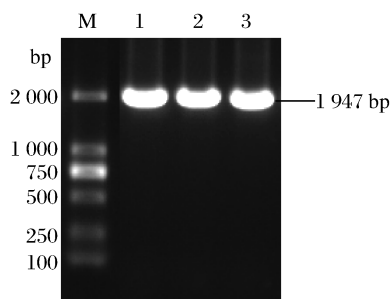


图 7 PCR 扩增鳗弧菌 MN empA 蛋白

Fig.7 Amplified *V. anguillarum* MN empA

M. DLZ2000 DNA marker. 1 -3; PCR products. The same as the following.

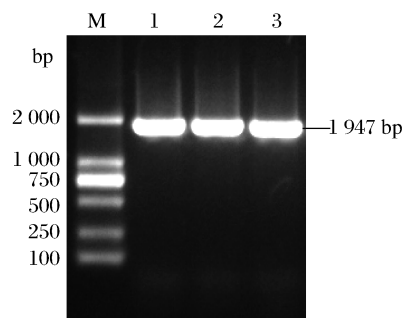


图 8 PCR 扩增鳗弧菌 3101 empA 蛋白

Fig.8 Amplified *V. anguillarum* 3101 empA

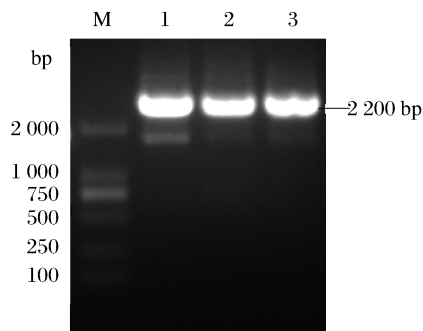


图 9 PCR 扩增鳗弧菌 3101 锌金属蛋白酶

Fig.9 Amplified zinc metalloprotease of *V. anguillarum* 3101

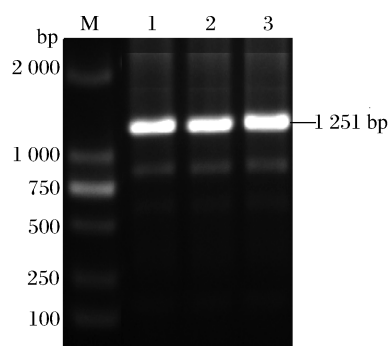


图10 PCR扩增费氏弧菌 VFMJ11_1094 蛋白
Fig. 10 Amplified hypothetical protein of *V. fischeri*

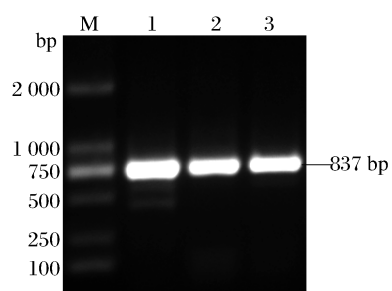


图11 PCR扩增费氏弧菌 ES114 的外膜蛋白
Fig. 11 Amplified outer membrane protein VFMJ11_1094 of *V. fischeri* ES114

2.4 重组载体的筛选与测序

将PCR筛选阳性克隆,少量抽提重组质粒,

重组质粒经酶切后进一步证明是阳性后,将阳性的重组质粒进行测序,测序结果表明所有开放阅读框的碱基与目的序列完全相同,证实克隆到T载体上的外源DNA片段分别为鳗弧菌MN的金属蛋白酶、鳗弧菌3101的金属蛋白酶、锌金属蛋白酶、费氏弧菌VFMJ11_1094蛋白和费氏弧菌ES114的外膜蛋白基因,可对测序的蛋白序列进行下一步的分析。

2.5 鉴定的蛋白序列分泌序列的分析筛选

对质谱分析中鉴定的蛋白序列用在线信号肽预测软件SignalP 3.0对全部的氨基酸序列进行预测信号肽,软件分析发现,质谱鉴定出的5种蛋白的氨基酸序列都带有明显的信号肽序列。按照其蛋白的来源,将这5条分泌序列分别命名为angMN-35、ang3101-25、ang3101-25、vf-38、vf-23。其中,信号肽的氨基酸长度都为15~40,且都位于分泌性序列的N端(表8)。

2.6 分泌序列在细胞中的定位分析

对分析筛选出的分泌序列进行细胞定位的分析,用在线细胞定位分析预测软件PSORT,进行蛋白位置的分析预测。分析发现,来源于革兰氏阴性菌的分泌性序列angMN-35、ang3101-35、ang3101-25、vf-38、vf-23都是定位在周质空间或细胞外膜上(表9)。

表8 3株菌的主要分泌性蛋白的分泌序列

Tab. 8 Major secreted protein sequences of three kinds of aquacultural bacteria

菌株 strain	蛋白/ku protein	信号肽序列 signal peptide sequence
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i> MN	35	<u>MKKVQRQMKW</u> LFLAASISAA LPVSAAKMVQ VDDPSLLEQA LSMQA
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i> 3101	35	<u>MKKVQRQMKW</u> LFLAASISAA LPVSAAKMVQ VDDPSLLEQA LSMQA
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i> 3101	25	<u>MKQIQRPLNW</u> LILAGAATGF PLYAAQMVTI DDVSIVEQAL AQQQY
费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>	38	<u>MKKTLALAI</u> ASISASAFV DTSSQNSRNE DMFAFDPMHK DQFSV
费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>	23	<u>MKKIALLLVL</u> FSAFSNANDN ISGFYLGAGL GATTFDDGGA FDYTG

注:表中显示N端前45个氨基酸,信号肽为带有下划线的氨基酸序列。

Notes: N-terminal signal peptide of 45 amino acids and their signal regionals (underlined part of the amino acid sequence).

表9 分析筛选出的5个分泌序列的细胞定位分析结果

Tab. 9 Cellular localization of the 5 selected secretory sequences

菌株 source strain	蛋白 protein	信号肽 signal peptide	细胞定位 predicted subcellular location	得分 reliability score
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i> MN	angMN-35	+	outer membrane/periplasmic space	0.922/0.137
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i> 3101	ang3101-35	+	outer membrane/periplasmic space	0.922/0.137
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i> 3101	ang3101-25	+	outer membrane/periplasmic space	0.924/0.155
费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>	vf-38	+	outer membrane/periplasmic space	0.936/0.294
费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>	vf-23	+	outer membrane/periplasmic space	0.949/0.433

3 讨论

对 3 种水产动物病原菌主要分泌性蛋白进行获取纯化后,分别得到了表达量相对较高的鳃弧菌 MN 的 35 ku 蛋白,鳃弧菌 3101 的 35、25 ku 蛋白,费氏弧菌的 38、23 ku 蛋白,质谱鉴定的结果分别为鳃弧菌的金属蛋白酶,鳃弧菌的金属蛋白酶、锌金属蛋白酶,费氏弧菌的 VFMJ11_1094 蛋白,费氏弧菌 ES114 的外膜蛋白。其中,鳃弧菌 3101 的 25 ku 蛋白的鉴定结果中,蛋白序列覆盖率虽然只有 4%,但是鉴定的结果是 2 个独立的肽段,所以鉴定结果可靠。根据质谱鉴定的蛋白的序列设计引物,分别用鳃弧菌 MN、鳃弧菌 3101 和费氏弧菌的基因组 DNA 做模板,扩增了 empA-MN、empA-3101、zinc empA、VFMJ11-1094 和 OMP 基因并对克隆的基因片段进行了测序。

本实验中分析筛选出了 5 条分泌性序列,利用 SignalP3.0 分析这 5 个序列发现,这些基因都带有明显的信号肽序列,说明不管是革兰氏阳性细菌还是阴性细菌,其分泌性蛋白的转运大都依赖于信号肽的存在^[19-20]。利用 PSORT 软件分析其在细胞中的定位不同,也符合理论的推论:革兰氏阴性菌中有细胞周质和外膜的存在,分泌蛋白定位在细胞周质、外膜上或是分泌到细胞外。

分泌性蛋白是目前水产动物病害防治研究的热点和难点^[21],也是极具挑战性的研究领域。全面系统的研究分泌性蛋白不仅有助于全面认识、分析和解释各种生理和病理现象,而且也为新药的开发提供更多的选择。运用 DNA 重组技术在细菌等微生物中分泌具有某些有应用前景的生物活性物质已经在免疫和生物技术等领域得到了广泛的应用。而应用分泌性序列构建具有高量表达的分泌性载体也就具有了重要的意义。

对于分泌性序列的筛选,大多数研究采用基因工程捕获的策略进行^[22-23],这种方法工作量很大且假阳性率较高。本实验从高表达的分泌性蛋白的获取入手,经过质谱鉴定、分泌序列的筛选分析及细胞定位分析后,筛选出了可用于目的菌株分泌性载体构建的分泌性序列,这对于分泌性表达载体所需的信号肽序列的筛选,是一种快速高效的方法,也为应用分泌性序列构建具有高量表达的分泌性载体提供了可靠的理论和方法依据。

参考文献:

- [1] 郑国兴,沈亚林,李何. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究[J]. 水产学报,1990,14(1):1-7.
- [2] 徐海圣,舒妙安,占秀安,等. 养殖河蟹弧菌病原菌分离鉴定及其胞外产物的致病性[J]. 水产学报,2002,26(4):357-360.
- [3] NOVOA B, FIGUERAS A, PUENTES C F, *et al.* Characterization of birnavirus isolated from disease turbot cultured in Spain [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 1993, 15:163-169.
- [4] 陈师勇,莫照兰,张振冬,等. 鳃弧菌胞外产物中致病因子的分离纯化及性质研究[J]. 高技术通讯, 2002(8):96-100.
- [5] 黄志坚,何建国. 溶藻弧菌外膜蛋白(Va-OMP)的免疫原性及免疫保护性[J]. 水产学报,2006,30(4):538-543.
- [6] 李星云,丁文超,陈炯,等. 溶藻弧菌外膜蛋白 OmpK 基因表达和间接 ELISA 检测方法的初步建立[J]. 水产学报,2010,30(10):1559-1565.
- [7] 杨嘉龙,周丽,邢婧,等. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析[J]. 中国水产科学,2007,14(6):981-989.
- [8] 董传甫,林天龙,俞伏松,等. 创伤弧菌 FJ03-X2 胞外产物对欧洲鳗鲡的致病性和免疫原性分析[J]. 华中农业大学学报,2006,25(1):71-75.
- [9] 葛圣雷,陈主初,肖志强,等. 分泌性蛋白的研究策略[J]. 生命的化学,2005,25(6):476-477.
- [10] 孙强,韩骅. 分泌蛋白特异性基因缺陷的设计与验证[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(4):328-333.
- [11] ZHANG W W, SUN L. Cloning, characterization and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9):2825-2831.
- [12] GURUSAHAI K M, WILLIAM H M. Developments in mass spectrometry for the analysis of complex protein mixtures [J]. *Briefings In Functional Genomics and Proteomics*, 2006, 5(2):98-111.
- [13] SHAMA P M, BRIAN D H, ANDREW S G, *et al.* Improved method for the analysis of membrane proteins by mass spectrometry [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 30:89-94.
- [14] ANNE C G, RUEDI A, BRIAN R. Advances in protein complex analysis using mass spectrometry [J]. *Journal of Physiology*, 2005, 563(1):11-21.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉萨尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京:科学出版社,2002.

- [16] JANNICK D B, HENRIK N, GUNNAR V H, *et al.* Improved prediction of signal peptides-SignalP 3.0 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340 (4): 783 - 795.
- [17] 孙强, 王冀姝, 李荣, 等. *suc2* 信号肽捕获系统的建立[J]. *遗传学报*, 2001, 28(4): 379 - 384.
- [18] 孙强, 王冀姝, 陈萍, 等. *suc2* 基因的克隆及在酵母基因组中的定位突变[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(12): 1447 - 1450.
- [19] ROBINSON C, BOLHUIS A. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2: 350.
- [20] MORI H, HO K. The Sec protein-translocation pathway [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9: 494.
- [21] LEE K K, CHEN Y L, LIU P C. Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease [J]. *Blood Cell Molecules and Diseases*, 1999, 25 (13): 180 - 192.
- [22] 张奉学, 于传信. 信号肽捕获——一种筛选分泌性和膜性蛋白的工具 [J]. *热带医学杂志*, 2004, 4(4): 498 - 500.
- [23] WILLIAM C S, B. ANNA A, ALEXANDRAI L J. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reporter is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice [J]. *Genes & Development*, 1992, 6: 903 - 918.

Mass spectrometry identification of secreted proteins from 3 aquatic bacterial isolates of animal origin and analysis of their secretive sequences

LIU Sun^{1,2}, WANG Xiu-hua¹, HUANG Jie^{1*}

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The secreted proteins of *Vibrio anguillarum* MN, *V. anguillarum* 3101 and *Vibrio fischeri* which were isolated and conserved by our laboratory, were extracted. The components of secreted proteins were separated by SDS-PAGE. The 5 high expressed protein bands in the SDS-PAGE were identified by mass spectrometry MALDI-TOF/TOF as the metalloprotease of *V. anguillarum* MN, the metalloprotease of *V. anguillarum* 3101, the zinc metalloproteinase of *V. anguillarum* 3101, the hypothetical protein VFMJ11_1094 and outer membrane protein of *V. fischeri* ES114. After downloading the sequences of above proteins from NCBI database, PCR primers were designed and specific DNA bands were amplified, cloned and sequence analysed. 5 signal peptides were given by using the online software SignalP 3.0, namely angMN-35, ang3101-35, ang3101-25, vf-38 and vf-23. The cellular localization of the secreted sequences were analyzed by PSORT. And we found that all the signal peptides located in the outer membrane or periplasmic space of the cell. The results may be useful for construction of a secreted vector.

Key words: aquatic bacteria; secreted proteins; MALDI-TOF/TOF mass spectrometry; secretive sequences; cell localization

Corresponding author: HUANG Jie. E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn