

鱼源嗜水气单胞菌全菌蛋白双向电泳与质谱鉴定

吕爱军^{1*}, 胡秀彩¹, 孙敬锋¹, YEONG Yiksung¹, 石洪玥¹,
李莉², 孔祥会²

(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. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 为建立鱼源嗜水气单胞菌全菌蛋白图谱并进行质谱分析, 利用双向电泳(2-DE)结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)技术对嗜水气单胞菌的蛋白质组学进行鉴定研究。结果显示, 嗜水气单胞菌28 °C培养12 h、三氯醋酸(TCA)/丙酮沉淀法提取全菌蛋白、等电聚焦20 000 Vh的2-DE图谱匹配率达81%; 采用18 cm、pH 3-10 IPG胶条进行2-DE分析获得146个蛋白点, 随机选取部分蛋白点进行肽质量指纹图谱(PMF)分析, 共鉴定23个蛋白点包括膜脂蛋白、分子伴侣、30S核糖体蛋白S1、延伸因子、细胞色素C等, 其中发现烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、二氢硫辛酰胺脱氢酶、精氨酸脱亚氨酶、ATP合酶 α 亚基、脱氧核糖核酸聚合酶亚基 α 、氨基甲酸激酶、腺苷酸激酶、尿苷磷酸化酶、硝基还原酶、肽酰脯氨酰异构酶共计11个代谢相关蛋白酶; 基于分子功能进行蛋白分类(GO)分析, 发现主要为结合(17.1%)、催化(14.3%)和转移酶(11.4%)等生物学过程。建立鱼源嗜水气单胞菌全菌蛋白图谱与部分蛋白鉴定, 有助于理解嗜水气单胞菌的蛋白质组学及其分子机制。

关键词: 嗜水气单胞菌; 斑马鱼; 蛋白质组; 双向电泳; 质谱

中图分类号: Q 939.91; S 917

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种革兰氏阴性菌, 普遍存在于淡水、污水、淤泥和土壤中, 一般认为它是一种条件致病菌^[1]。致病性嗜水气单胞菌是一种典型的“人-畜-鱼”共患病原菌, 可引起虾和淡水鱼类暴发性出血病、蛙和鳖等多种水产动物发病, 往往给水产养殖业造成巨大的经济损失, 还能引发人体肠胃炎和败血症, 严重威胁人类健康^[2-3]。因此, 嗜水气单胞菌一直受到人类医学、兽医学及水生动物医学工作者的极大关注^[1-3]。

近年来, 蛋白质组学技术的快速发展为深入研究水产动物病原菌及其引起的疾病提供了重要手段。因此, 关于嗜水气单胞菌的蛋白质组学研究, 在国内外备受关注^[4-8]。目前针对鱼源

嗜水气单胞菌的全菌蛋白图谱建立及其蛋白鉴定研究, 已有报道的数据信息仍非常有限。吴谋胜等^[4]采用双向电泳技术检测嗜水气单胞菌菌体蛋白, 结果表明培养24 h图谱蛋白点最多。王三英等^[5]从嗜水气单胞菌2-DE图谱中随机选取部分蛋白点进行质谱分析鉴定, 在NCBI数据库中检索发现12个细菌蛋白。陈川等^[6]研究表明嗜水气单胞菌的乙酸-乙酰辅酶A转移酶亚基、ABC转运蛋白和核糖体小亚基蛋白与四环素耐药机制有关。Das等^[7]对12株嗜水气单胞菌全菌蛋白SDS-PAGE图谱比较分析, 发现蛋白分子量范围多在19.5~86.2 ku之间。Yu等^[8]构建嗜水气单胞菌AH-1菌株的胞外蛋白(ECPs)图谱, 采用质谱鉴定获得溶血素、丝氨酸蛋白酶、甘油酸酯胆固醇

收稿日期: 2015-12-22 修回日期: 2016-01-25

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

酰基转移酶和金属蛋白酶等。因此,本研究利用双向电泳(2-DE)结合质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)技术进行鱼源嗜水气单胞菌Zf-1菌株蛋白质组学实验,旨在建立嗜水气单胞菌全菌蛋白图谱与部分蛋白鉴定,不仅有助于理解嗜水气单胞菌的蛋白质组学,而且对该菌分子致病机理、疫苗研制及其引起的鱼病防治提供科学参考。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和培养基

嗜水气单胞菌Zf-1菌株分离自患病斑马鱼(*Danio rerio*),由本实验室保藏。胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 全菌蛋白提取

细菌蛋白裂解提取法参照Yu等^[8]方法。将Zf-1菌株接种于TSB液体培养基中,于28℃ 200 r/min振荡培养12 h,取4 mL菌液12 000 r/min离心2 min,收集菌体。收集的菌体中加入裂解液[8 M尿素(或7 M尿素),2 M硫脲],4% CHAPS(m/V),1% DTT(m/V),45 mg/L PMSF,2% IPG buffer(V/V)],混匀,4℃裂解2 h,30 min振荡混匀一次;加入2 μL(20 U/mL)核酸酶,4℃放置15 min;4℃ 15 000×g离心1 h,取上清,-80℃保存。

三氯醋酸(TCA)/丙酮沉淀法参照Imbert等^[9]方法。收集的菌体中加入70 μL无菌水混匀,于95℃水浴5 min,加入9倍体积预冷的10% TCA-丙酮提取液(含0.07% β-巯基乙醇),充分混匀,-20℃过夜;漩涡振荡混匀后,4℃ 15 000×g离心30 min,去上清;沉淀重悬于含0.07% β-巯基乙醇的预冷丙酮溶液中,-20℃放置1 h;4℃ 15 000×g离心30 min,去上清液;用适量水化液溶解沉淀,4℃ 15 000×g离心30 min,取上清液,Bradford法测定蛋白浓度。

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℃水化12 h,pH3-10 IPG胶条(GE Healthcare),上样量为60(7 cm),400和600 μg(18 cm),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5000 V 4 h、10 000 V 5 h(或8 h)和快速500 V 10 h。

1.4 第二向垂直电泳

利用Ettan DALTsix大型垂直板电泳系统(GE Healthcare,美国)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

采用7 cm pH 3~10 IPG线性胶条(GE Healthcare,美国),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 mm³,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(5800 MALDI-TOF/TOF,AB SCIEX,美国)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 不同方法提取的嗜水气单胞菌全菌蛋白浓度

嗜水气单胞菌Zf-1菌株在TSB肉汤培养基28℃培养12 h,分别采用8 M尿素、7 M尿素/2 M硫脲裂解液法、三氯醋酸(TCA)/丙酮沉淀法提

取全菌蛋白,结果表明TCA/丙酮法提取蛋白浓度为2445.86 $\mu\text{g/mL}$,所得全菌蛋白浓度最高,2-DE图谱蛋白点清晰且数量较多,蛋白点染色深;7 M尿素/2 M硫脲提取法为1333.53 $\mu\text{g/mL}$,所得图谱蛋白点颜色较浅,无横条纹出现;8 M尿素提取法为649.61 $\mu\text{g/mL}$,蛋白浓度低,所得图谱蛋白点清晰圆润,蛋白点数量偏少。

2.2 嗜水气单胞菌双向电泳图谱的建立及条件优化

为验证双向电泳体系的重复性,采用TCA/丙酮沉淀法制备嗜水气单胞菌蛋白样品,采用7 cm pH3-10 IPG胶条,上样量为60 μg ,进行等电聚焦20 000 Vh进行2-DE电泳考染图谱检测蛋白点为(59 \pm 5)个,且主要高丰度蛋白点匹配良好,图谱匹配率达81%,表明本实验建立的双向电泳体系重复性较好,可用于后续蛋白质组学分析。

为确定不同等电聚焦时间(5 h、8 h)、上样量(400 μg 、600 μg)对嗜水气单胞菌双向电泳图谱的影响,采用TCA/丙酮沉淀法制备嗜水气单胞菌蛋白样品,18 cm pH3-10 IPG胶条,上样量为400 μg ,2-DE结果显示等电聚焦5 h检测蛋白点数为162个,可见明显的横条纹,蛋白点之间没有清晰分开,说明聚焦时间短,聚焦不完全;上样量为400 μg 、等电聚焦8 h的图谱检测蛋白点数为146个,而且蛋白点清晰,多为圆形,蛋白点之间无粘连横条纹,聚焦完全,并且低丰度蛋白染色效果较好(图1)。与400 μg 蛋白相比,上样量600 μg 检测到217个蛋白点,蛋白点数量增多,但高丰度蛋白点存在较多横条纹,覆盖了

部分低丰度蛋白点。

2.3 嗜水气单胞菌蛋白质谱鉴定结果

利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)技术,从嗜水气单胞菌2-DE图谱中随机选取部分蛋白点进行肽质量指纹图谱(PMF)分析(图2),结果显示,嗜水气单胞菌鉴定获得23个蛋白点(表1),包括分子伴侣GroEL(molecular chaperones GroEL)、细胞色素C(cytochrome C)、延伸因子P(elongation factor P)、膜脂蛋白(membrane lipoprotein)等蛋白;其中发现烯醇化酶(enolase)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase)、ATP合酶 α 亚基(ATP F0F1 synthase subunit alpha)、精氨酸脱亚氨酶(arginine deiminase)、脱氧核糖核酸聚合酶亚基 α (DNA-directed RNA polymerase subunit alpha)、氨基甲酸激酶(carbamate kinase)、腺苷酸激酶(adenylate kinase)、尿苷磷酸化酶(uridine phosphorylase)、硝基还原酶(nitroreductase)、肽酰脯氨酰异构酶(peptidylprolyl isomerase)11个代谢相关蛋白酶。进行蛋白质功能分类(GO)分析结果显示主要有17.1%结合活性、14.3%催化活性、11.4%转移酶活性、11.4%氧化还原酶活性、8.6%水解酶活性和2.9%结构分子活性等功能。

3 讨论

3.1 嗜水气单胞菌蛋白双向电泳图谱技术的建立与优化

近年来,针对鱼源嗜水气单胞菌的全菌蛋白图谱建立及其蛋白鉴定研究仍相对薄弱^[4-8]。本研究对嗜水气单胞菌蛋白样品提取方法、等电聚焦时间和上样量3个主要影响因素,进行嗜水气单胞菌全菌蛋白双向电泳体系的条件优化和图谱建立。研究表明蛋白样品质量对于双向电泳实验非常重要,裂解液法制备的蛋白样品中糖类、核酸类等杂质含量较高;TCA/丙酮沉淀法是在酸性条件下提取蛋白质,抑制蛋白酶活性,通过蛋白沉淀和重溶去除样品中盐离子和脂质等杂质,可以起到纯化蛋白作用^[9-11]。本研究采用TCA/丙酮沉淀法提取的细菌蛋白浓度最高,从双向电泳图谱可以看出,样品溶液盐离

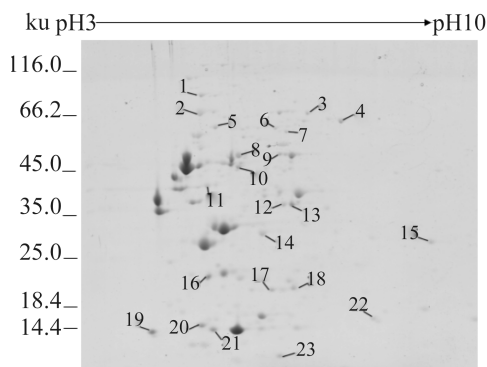


图1 嗜水气单胞菌双向电泳图谱

Fig. 1 2-D electrophoresis map and protein spots of *Aeromonas hydrophila*

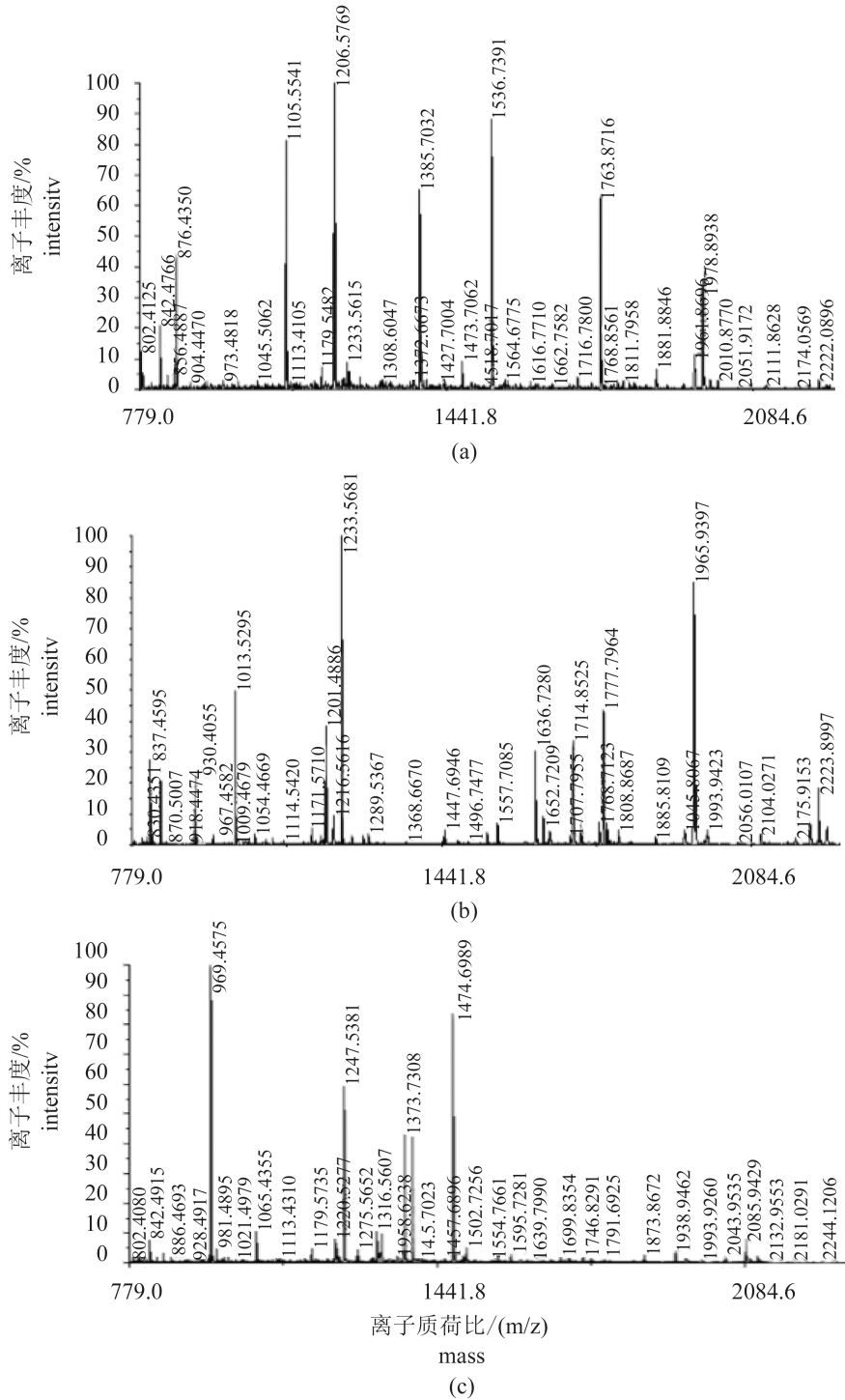


图 2 嗜水气单胞菌3个蛋白肽指纹图谱

(a)二氢硫辛酰胺脱氢酶; (b)延伸因子-Tu; (c)膜脂蛋白

Fig. 2 The PMF of *Aeromonas hydrophila* 3 protein spots

(a) dihydroliipoamide dehydrogenase; (b) elongation factor Tu; (c) membrane lipoprotein

子等杂质含量少, 蛋白点数量较多, 图谱分辨率较高。进一步优化双向电泳体系, 采用400 μg上样量, 聚焦时间8 h所得嗜水气单胞菌全菌

蛋白双向电泳图谱蛋白点数量较多, 且图谱背景较清晰、分辨率较高, 建立的双向电泳体系重复性较好, 可用于后续蛋白质组学分析。

表1 嗜水气单胞菌蛋白质谱鉴定结果

Tab. 1 Protein identification of *A. hydrophila* by PMF analysis

胶点 spots	蛋白名称 protein names	登录号 accession No.	分子量/等电点 MW/pI	分值/覆盖率 score/coverage	肽段数目/段 peptide count	分子功能 molecular function
1	30S核糖体蛋白S1 30S ribosomal protein S1	gi 615569690	61432.8/4.92	783/25.514	18	核酸结合, RNA结合, 核糖体结构组成
2	分子伴侣 molecular chaperone GroEL	gi 615568615	57258.7/4.87	968/25.963	22	核酸结合, ATP结合, 未折叠蛋白结合
3	细胞色素C cytochrome C	gi 663466873	57459.5/6.64	923/28.956	17	金属离子结合
4	寡肽ABC转运蛋白寡肽结合蛋白 oligopeptide ABC transporter periplasmic oligopeptide-binding protein	gi 507522278	59632.3/6.36	817/46.021	24	蛋白结合
5	未知蛋白 Hypothetical protein	gi 657062266	77947.4/5.1	1380/51.895	26	NA
6	ATP合酶 α 亚基 ATP F0F1 synthase subunit alpha	gi 663470278	55324.1/5.71	1110/38.43	23	核酸结合, ATP结合, 水解酶活性, 作用于酸酐, 催化物质跨膜运动, 质子转运ATP合成酶活性, 旋转机制
7	二氢硫辛酰胺脱氢酶 dihydroliipoamide dehydrogenase	gi 651304959	50561.5/5.78	835/31.991	17	二氢硫辛酰胺脱氢酶活性, 氧化还原酶活性, 作为NAD(P)受体作用于硫组供体, 结合黄素腺嘌呤核苷酸
8	烯醇化酶 enolase	gi 663469524	45748.5/5.24	1050/22.109	14	镁离子结合, 磷酸丙酮酸活性, 裂解酶活性
9	精氨酸脱亚氨酶 arginine deiminase	gi 615571917	45956.9/5.93	894/45.734	19	水解酶活性, 作用于淀粉碳-氮键, 精氨酸脱亚氨酶活性
10	延伸因子 elongation factor Tu	gi 663470024	43525.3/5.24	1020/61.507	20	核酸结合, 翻译延伸因子活性, GTP结合活性
11	脱氧核糖核酸聚合酶 α 亚基 α DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	gi 604187519	36344.1/4.93	787/60.108	13	DNA结合, 脱氧核糖核酸聚合酶活性, 转移酶活性, 核苷酸转移酶活性, 蛋白二聚作用
12	亚精胺/腐胺ABC转运蛋白的底物结合蛋白 spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	gi 657062493	40291.7/6.04	125/5.962	13	氧化还原酶活性, 金属离子结合, 铁硫簇蛋白结合
13	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 657059535	35341.1/5.9	631/45.13	16	氧化还原酶活性, 作用于供体乙醛或氧代基团, NADP/NAD结合
14	氨基甲酸激酶 carbamate kinase	gi 615571916	32815.3/5.54	764/55.051	10	激酶活性, 转移酶活性
15	膜脂蛋白 membrane lipoprotein	gi 507519737	35086/8.26	500/44.426	14	蛋白转运活性
16	延伸因子 elongation factor P	gi 663466967	21226.6/4.88	298/10.16	7	翻译延伸因子活性
17	腺苷酸激酶 adenylate kinase	gi 663468346	23155.1/5.62	831/52.465	13	核苷酸结合, 腺苷酸激酶活性, ATP结合, 激酶活性, 转移酶活性, 含碱基复合物激酶活性
18	尿苷磷酸化酶 uridine phosphorylase	gi 615569338	27011.8/5.88	1060/53.265	12	尿苷磷酸化酶活性, 催化活性, 转移酶活性"
19	未知蛋白 hypothetical protein V429_20050	gi 615571469	23261.1/4.51	427/46.972	8	NA
20	无机焦磷酸酶 inorganic pyrophosphatase	gi 615571382	19676/4.88	656/43.817	9	镁离子结合, 无机二磷酸酶活性, 水解酶活性
21	自转运蛋白 autotransporter	gi 615568893	22528/6.11	491/33.542	10	运输蛋白
22	硝基还原酶 nitroreductase	gi 615571101	22574.7/7.07	584/35.339	10	氧化还原酶活性
23	肽酰脯氨酰异构酶 peptidylprolyl isomerase	gi 663467416	18135.9/5.64	458/39.936	7	异构酶活性, 金属离子结合

3.2 嗜水气单胞菌的蛋白质组学分析

本研究采用2-DE-MS/MS技术成功建立了嗜水气单胞菌Zf-1菌株全菌蛋白的蛋白质图谱, 并且对嗜水气单胞菌蛋白进行了肽质量指纹图谱

(PMF)初步分析, 最终鉴定发现23个细菌蛋白分子, 结果有助于理解嗜水气单胞菌的蛋白质组学及其分子致病机理。进一步对蛋白质功能分类(GO)分析表明, 主要有17.1%结合活性、

14.3%催化活性、11.4%转移酶活性、11.4%氧化还原酶活性、8.6%水解酶活性和2.9%结构分子活性等功能。值得关注的是,在本研究中随机选取了鱼源嗜水气单胞菌的部分蛋白点进行质谱鉴定,可获得蛋白数据信息十分有限。因此,今后应该选取一定分子量的蛋白进行质谱分析,同时对嗜水气单胞菌蛋白功能数据进行整理分析和归类,以期初步阐明不同种类蛋白的生物学意义,为进一步探讨发掘嗜水气单胞菌致病性相关蛋白、疫苗相关蛋白等提供科学依据。

研究表明,分子伴侣GroEL属于热休克蛋白家族(Hsp60),具有多种生物学功能^[12-14]。Ræder等^[12]研究鳃弧菌(*Vibrio salmonicida*)对鱼类皮肤黏液免疫的蛋白质组学,发现GroEL被显著诱导表达;鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)热休克蛋白66 ku显示与肠道黏液细胞结合^[13],推断黏液中可能含有调控该蛋白的相关因子。研究表明在一些细菌中GroEL被认为是一种毒力因子,可能涉及细菌病原在宿主中的生存状况,在霍乱弧菌(*V. cholerae*)中GroEL和DnaK同源物在宿主免疫应答系统中是主要抗原^[14];嗜水气单胞菌的免疫原性也可能与GroEL有关^[4]。本研究经质谱鉴定,所得鱼源嗜水气单胞菌分子伴侣GroEL分子量为57 ku, pI 4.87,通过蛋白质功能聚类分析发现,GroEL与T细胞介导免疫反应有关,还参与MyD88依赖性Toll受体信号途径。由此推测GroEL可能与嗜水气单胞菌毒力有关,可能是嗜水气单胞菌致病性相关潜在的分子标志物。

核糖体蛋白(ribosomal protein)是核糖体的主要结构成分,拥有多种类型的亚基,主要结合RNA和核酸,并参与蛋白质翻译过程。在本研究中鉴定获得1个鱼源嗜水气单胞菌30S核糖体蛋白S1分子。Juan等^[15]提取金头鲷(*Sparus aurata*)皮肤黏液表面细菌蛋白,研究鉴定表皮微生物群落的30S核糖体蛋白S5、S3、S10和50S核糖体L20、L5、L1等亚基。有研究表明,一些16S rRNA位点是四环素结合的主要位点,揭示核糖体蛋白可能与菌株耐药性有关,其作用机理可能通过核糖体蛋白指导16S rRNA正确折叠,从而降低四环素与16S rRNA结合^[6]。由此可见,嗜水气单胞菌的耐药机制也可能与核糖体蛋白有关。

延伸因子Tu(EF-Tu)是参与细菌翻译过程的重

要蛋白之一,与细胞周期有关。研究表明细菌EF-Tu分子能干扰宿主细胞的信号传递,诱导宿主免疫应答过程^[17];作为细菌感染宿主细胞免疫应答过程中的抗原,与细菌的致病性有关^[18-19]。本研究通过质谱鉴定嗜水气单胞菌全菌蛋白质组,其中蛋白点10鉴定为延伸因子EF-Tu。已有报道耐药嗜水气单胞菌菌株EF-Tu具有调控功能,其耐药机制可能是EF-Tu直接参与基因表达调控,调节细菌转运蛋白的运作^[4]。近期在金头鲷皮肤黏液表面的菌群蛋白中鉴定到EF-Tu,患沙眼衣原体的病人血清中也检测到EF抗体,推测EF-Tu可能作为病原体感染的生物标志物,可用于新型疫苗的研制^[14-16]。以上研究表明,延伸因子Tu可能与嗜水气单胞菌的耐药性及致病性有关,但在致病机制中的确切功能有待进一步研究。

此外,本研究鉴定发现鱼源嗜水气单胞菌11个代谢相关蛋白酶,为今后深入研究嗜水气单胞菌的代谢生长等奠定基础。其中,二氢硫辛酰胺脱氢酶(DLD)属于黄素蛋白氧化还原酶家族,是构成丙酮酸脱氢酶复合体的组件^[20]。研究显示,二氢硫辛酰胺脱氢酶可能与细菌的致病性相关,表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)抗血清能识别该蛋白^[21]。张静^[22]利用HEp-2细胞研究二氢硫辛酰胺脱氢酶融合蛋白介导猪链球菌的粘附特性,结果表明二氢硫辛酰胺脱氢酶融合蛋白与细菌粘附作用有关。细菌侵入宿主细胞,首先要粘附在宿主表面,由此推测该蛋白在嗜水气单胞菌的粘附过程中起重要作用。

值得注意的是,本研究还鉴定到2个未知功能蛋白(蛋白点5、蛋白点11)。对嗜水气单胞菌可溶性蛋白和外膜蛋白的免疫原性蛋白进行Western Blot分析,结果表明hypothetical protein可能与嗜水气单胞菌的免疫原性有关^[14]。寡肽ABC转运周质寡肽结合蛋白(oligopeptide ABC transporter periplasmic oligopeptide-binding protein)和亚精胺/腐胺ABC转运底物结合蛋白(Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein)的生物学功能未知,对这2种蛋白在嗜水气单胞菌生理或致病性方面的作用,有待进一步研究。

关于嗜水气单胞菌全菌蛋白的2-DE-MS/MS鉴定,目前鲜有文献报道^[8, 23]。本研究建立鱼源嗜水气单胞菌蛋白质指纹图谱,不仅对嗜水气单胞菌菌株之间的比较蛋白质组学和功

能蛋白质组研究奠定基础,而且为阐明嗜水气单胞菌的分子致病机理、疫苗研制及其引起的鱼病防治提供科学参考。

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it [J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282-288 (in Chinese).
- [2] 李雪, 胡秀彩, 兰云, 等. 嗜水气单胞菌粘附素和外膜蛋白A基因克隆与结构预测[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(1): 29-35.
Li X, Hu X C, Lan Y, et al. Cloning and structure prediction of adhesion gene and outer membrane protein A gene from *Aeromonas hydrophila* [J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(1): 29-35 (in Chinese).
- [3] 时云朵, 任燕, 张德锋, 等. 山萘萜碱提高嗜水气单胞菌灭活疫苗浸泡免疫鲫的效果[J]. 水产学报, 2015, 39(5): 720-727.
Shi Y D, Ren Y, Zhang D F, et al. Anisodamine increases efficacy of *Aeromonas hydrophila* inactivated vaccine in gibel carp *Carassius auratus gibelio* by immersion immunization [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(5): 720-727 (in Chinese).
- [4] 吴谋胜, 彭宣宪. 采用蛋白质组学方法研究嗜水气单胞菌的生长代谢[J]. 水产学报, 2002, 26(1): 42-46.
Wu M S, Peng X X. Studying the growth metabolism of *Aeromonas hydrophila* with the methods of proteomics [J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(1): 42-46 (in Chinese).
- [5] 王三英, 吴谋胜, 陈晋安, 等. 嗜水气单胞菌蛋白质组分子解剖图谱的初步建立[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(2): 139-143.
Wang S Y, Wu M S, Chen J A, et al. Primary establishment of proteome map to *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2003, 42(2): 139-143(in Chinese).
- [6] 陈川, 王三英, 彭宣宪. 嗜水气单胞菌耐四环素的蛋白质组学初步研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(3): 396-398.
Chen C, Wang S Y, Peng X X. Analysis of tetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* by proteome techniques[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(3): 396-398 (in Chinese).
- [7] Das B K, Samal S K, Samantaray B R, et al. Protein fingerprinting profiles in different strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fresh water fish [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21: 587-591.
- [8] Yu H B, Kaur R, Lim S, et al. Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1 [J]. Proteomics, 2007, 7(3): 436-449.
- [9] Imbert M, Gancel F. Effect of different temperature downshifts on protein synthesis by *Aeromonas hydrophila* [J]. Current Microbiology, 2004, 49: 79-83.
- [10] 宋春花, 郗园林, 张梅喜, 等. 志贺菌全菌蛋白质双向电泳技术的建立[J]. 郑州大学学报(医学版), 2007, 42(2): 316-318.
Song C H, Xi Y L, Zhang M X, et al. Establishment of two-dmensional proteome map of *Shigella flexneri* [J]. Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences), 2007, 42(2): 316-318(in Chinese).
- [11] 庞欢瑛, 李岩, 鲁义善, 等. 溶藻弧菌全菌可溶性蛋白质二维图谱的建立及部分蛋白分子的鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 404-413.
Pang H Y, Li Y, Lu Y S, et al. Proteome reference map for total soluble proteins of *Vibrio alginolyticus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 404-413 (in Chinese).
- [12] Ræder I L, Paulsen S M, Smalås AO, 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.
- [13] Ensgraber M, Loos M. A 66-Kd heat shock protein of *Salmonella typhimurium* responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus [J]. Infection and Immunity, 1992, 60(8): 3072-3078.
- [14] Sanchez-Campillo M, Bini L, Comanducci M, et al. Identification of immunoreaction proteins of *Chlamydia trachomatis* by western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera [J]. Electrophoresis, 1999, 20(11): 2269-2279.
- [15] Juan J, Fuentes-Almagro 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.

- [16] Brown G A, Wellings S R. Electron microscopy of the skin of the teleost, *Hippoglossoides elassodon* [J]. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1970, 103(2): 149–169.
- [17] Silverman J M, Reiner N E. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes [J]. *Cell Microbiology*, 2011, 13(1): 1–9.
- [18] Junior D S G, Araujo F A, Almeida N F, *et al.* Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* [J]. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, 105(7): 843–849.
- [19] Nieves W, Heang J, Asakrah S, *et al.* Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization [J]. *PloS One*, 2010, 5(12): e14361
- [20] Moran J F, Su Z H, Sarath G, *et al.* Molecular cloning, functional characterization, and subcellular localization of soybean nodile dihydrolipoamide reductase [J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(1): 300–313.
- [21] Sellman B R, Howell A P, Kelly-Boyd C, *et al.* Identification of immunogenic and serum binding proteins of *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(10): 6591–6600.
- [22] 张静. 猪链球菌二氢硫辛酰胺脱氢酶的生物学功能初探及串联蛋白的免疫保护评价[D]. 上海:上海交通大学, 2012.
- Zhang J. Adhesive function of putative dihydrolipoamide dehydrogenase of *Streptococcus suis* and protective vaccination with recombinant trivalent protein gapdh-mrp-hm6 in swine[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2012 (in Chinese).
- [23] Thompson K D, Diab A, Ardó L, *et al.* Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(1): 60–69.

Construction of two-dimensional (2-D) polyacrylamide gel electrophoresis and characterization of whole-cell proteins produced by the *Aeromonas hydrophila* from fish

LÜ Aijun^{1*}, HU Xiucui¹, SUN Jingfeng¹, YEONG Yiksung¹, SHI Hongyue¹, LI Li², KONG Xianghui²
(1. Tianjin Key Lab of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;
2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In order to investigate the whole-cell proteomics and two-dimensional (2-D) gel maps of *Aeromonas hydrophila* isolated from the fish in this study, the proteomics analysis of *A. hydrophila* strain Zf-1 was performed using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS) techniques. *A. hydrophila* strain was prepared by shaking culture at 28 °C for 12 h, and the proteins of whole cell were extracted by using trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation method. The results showed that 146 protein spots were observed in 2-DE gels performed with 18 cm pH3-10 IPG strips, and it shared matching profiles of about 81% protein expression spots while the 60 µg loading dose, and 7 cm pH3-10 IPG strips were used for isoelectric focusing (IEF) to 20 000 Vh. A total of 23 protein spots were further identified by the peptide mass fingerprinting (PMF) analysis, including Membrane lipoprotein, Molecular chaperones, 30S ribosomal protein S1, Elongation factor, Cytochrome C, etc; Furthermore, 11 enzymes of metabolism related proteins were found to be ATP F0F1 synthase subunit alpha, Dihydrolipoamide dehydrogenase, Enolase, Arginine deiminase, DNA-directed RNA polymerase subunit alpha, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Carbamate kinase, Adenylate kinase, Uridine phosphorylase, Nitroreductase, and Peptidylprolyl isomerase. Analysis of protein functional classification with Gene Ontology (GO) of *A. hydrophila* based on molecular function showed that binding (17.1%), catalytic activity (14.3%), and transferase activity (11.4%) were responsible for the main biological functions. In conclusion, the proteomics analysis and 2-D map were constructed for *A. hydrophila* strain Zf-1 from the fish in this study, and the results will help to understanding the pathogenic mechanism and treatment of diseases caused by *A. hydrophila* from fish.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; zebrafish; 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 (15JCZDJC34000); Team of Provincial Science and Technology Innovation of Henan Higher Education (15IRTSTHN018)