

大黄鱼血清抗病功能蛋白分析

吴志鹏*, 王三英**

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用蛋白质组学技术筛选大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)血清中的抗病功能蛋白, 通过对比两组抗病能力差异大的大黄鱼血清的双向电泳图谱, 得到了 21 个显著的差异点, 并用质谱获得上述差异点肽质量指纹图谱. 进一步检索发现 10 号差异点是诱导型一氧化氮合成酶(iNOS), 其催化产物 NO 可结合病原体的特定靶点, 协助大黄鱼体内的免疫系统共同抵御病原体入侵, 显著提高了大黄鱼的抗病能力, 所以 iNOS 与大黄鱼抵抗病原体入侵密切相关.

关键词: 蛋白质组学技术; 血清; 抗病功能蛋白; 诱导型一氧化氮合成酶

中图分类号: Q 31

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)01-0121-04

目前对鱼类如何抵御病原体的机制所知甚少, 蛋白质作为生物体内功能直接执行者, 无疑是与抗病相关的主要分子. 已有的研究表明, 在疾病发生过程或机体康复过程中, 血清中与产生疾病或抗病相关蛋白的种类和数量会发生相应变化. 这些变化可通过蛋白质组学技术进行检测. 如练惠辉等^[1]对比分析了胆管癌病人和正常健康对照组血清蛋白的双向电泳图谱, 找到了 8 种差异蛋白与胆管癌密切相关. 冯钜涛等^[2]采用双向电泳-质谱技术从血清样品中筛选出 7 种蛋白与肝癌相关. 本文选择抗病能力差异大的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)血清做进一步分析, 利用蛋白质组学的高通量和高分辨力对大黄鱼的抗病机制做初步的分析.

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

尿素(urea), 曲拉通(Triton X-100), 丙烯酰胺(Acrylamide), 双丙烯酰胺(Bis-acrylamide), 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 十二烷基磺酸钠(SDS), N-三羟甲基甘氨酸(tricine), 以上试剂购自上海生工生物工程有限公司; 胰酶(Trypsin)为美国 Promega 公司产品; PowerPac 3000 电泳仪购自 BIO-RAD 公司; Reflex III MALDI-TOF 质谱仪为 Bruker 产品.

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 福建省科技计划项目(2007N0052)

* 现在莆田学院医学院工作

** 通信作者: wangpeng@xmu.edu.cn

1.2 分组及血清样品处理

对照组和实验组大黄鱼各 20 尾, 因大黄鱼在室内难以饲养, 我们选择在海面废弃的鱼排进行分组处理. 对照组没有进行三联疫苗免疫保护, 直接用 3 种混合活菌腹腔注射攻击, 实验组进行三联疫苗免疫保护后用 3 种混合活菌腹腔注射攻击. 收集实验组经攻毒一周后存活的 17 尾大黄鱼血清混合备用, 收集对照组经攻毒一周内濒临死亡的 19 尾大黄鱼血清混合备用. 血清处理方法是取各组 5 μ L 混合血清, 按质量比 1:5 加冷丙酮沉淀 3 h 后离心收集沉淀, 沉淀用裂解液 [(9.0 mol/L 尿素, 4% (体积分数) β -巯基乙醇, 1% (质量分数) Triton X-100, Tris 40 mmol/L, 0.125% (质量分数) SDS, 1% (体积分数) 两性电解质] 搅拌裂解, 溶解后每管取 20 μ L 直接上样.

1.3 双向电泳

第一向等电聚焦电泳, 预电泳 200 V, 15 min; 300 V, 30 min; 400 V, 60 min. 正式电泳 400 V, 18 h. 第二向为 SDS-PAGE, 条件与常规的 SDS-PAGE 凝胶一样, 分离胶 12% (质量分数), 浓缩胶 5% (质量分数). 调电压至 80 V 进行电泳, 当溴酚兰至分离胶时调电压至 120 V 继续电泳. 电泳结束后染色扫描, 输出照片.

1.4 差异点肽质量指纹(PMF)图谱分析

比较对照组和实验组血清双向电泳图谱, 找出差异点. 差异点使用 ReFlexTM III MALDI-TOF 质谱仪进行分析, 反射模式, 离子源加速电压 1 为 20 kV, 加速电压 2 为 23 kV, N₂ 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 2 000 ns, 真空度 1.867×10^{-5} Pa, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 并用标准 Maker 峰

作为外标校正质谱峰,正离子谱测定,获得各点的 PMF 图谱.

1.5 数据库查询

肽指纹图谱匹配通过网站 <http://www.expasy.org/tools/peptident.html> 进行查询. 查询条件: PMF 图谱中的肽片段分子质量控制在 800~3 500 u, 表观分子质量的误差范围为 30%, 表观 pI 值 2, 肽片段分子质量最大容许误差范围为 $\pm 10^{-4}$, 每个肽允许有 1 个不完全裂解位点(血清样品部分差异点允许有 2 个不完全裂解位点), 物种来源选择 other vertebrata, 数据库为 Swiss-Prot and TrEMBL, 离子选择 $[M+H]^+$ 和 monoisotopic, 最少匹配肽片段数规定为 4(血清样品部分差异点最少匹配肽片段数规定为 3), 半胱氨酸为碘乙酰胺处理.

2 结果

2.1 对照组和实验组血清双向凝胶电泳 (2-DE) 图谱比较

对照组和实验组血清样品 2-DE 图谱如图 1 所示. 实验组与对照组图谱总体模式一致, 具有可比性. 对两张图谱进行比较, 找到 21 个变化明显的点. 图 2 为局部各点的比较图. 图 1 和图 2 箭头所示为差异点. 其中在实验组表达而在对照组没有表达的点编号为 10, 12, 14, 15, 17, 19 号; 在实验组表达量上调的点是 11, 13, 16, 18, 20, 21 号; 在实验组表达量下调的点是

2, 3, 5, 6, 8 号; 在实验组没有表达而在对照组有表达的点编号为 1, 4, 7, 9 号.

2.2 差异点 PMF 图谱

对上述的 21 个差异点进行肽指纹图谱的分析, 除第 17 号差异点没打出质谱峰, 其余 20 个差异点都有相应的肽指纹图谱.

2.3 差异点 PMF 图谱数据库搜索结果

利用 PepIdent 软件将肽指纹图谱信息对 Swiss-Prot and TrEMBL 数据库进行搜索, 结果如表 1 所示.

3 讨论

血清是生物体内最重要的体液, 它的一些指标可直接反映生物的生理病理状态. 目前, 通过蛋白质组学方法在血清样品中寻找疾病相关蛋白被证实是可行的^[3]. 比较大黄鱼对照组和实验组血清样品的 2-DE 图谱, 共找到 21 个变化明显且重复性好的差异点. 其中在实验组表达而在对照组没有表达的点编号为 10, 12, 14, 15, 17, 19 号; 在实验组表达量上调的点是 11, 13, 16, 18, 20, 21 号; 在实验组表达量下调的点是 2, 3, 5, 6, 8 号; 在实验组没有表达而在对照组有表达的点编号为 1, 4, 7, 9 号. 进一步对血清差异点 PMF 图谱数据库搜索显示, 编号为 10 号的差异点是诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS, EC 1. 14. 13. 39). 已有的文献表明 iNOS 与鱼类抵抗病原体入侵紧密相关^[4].

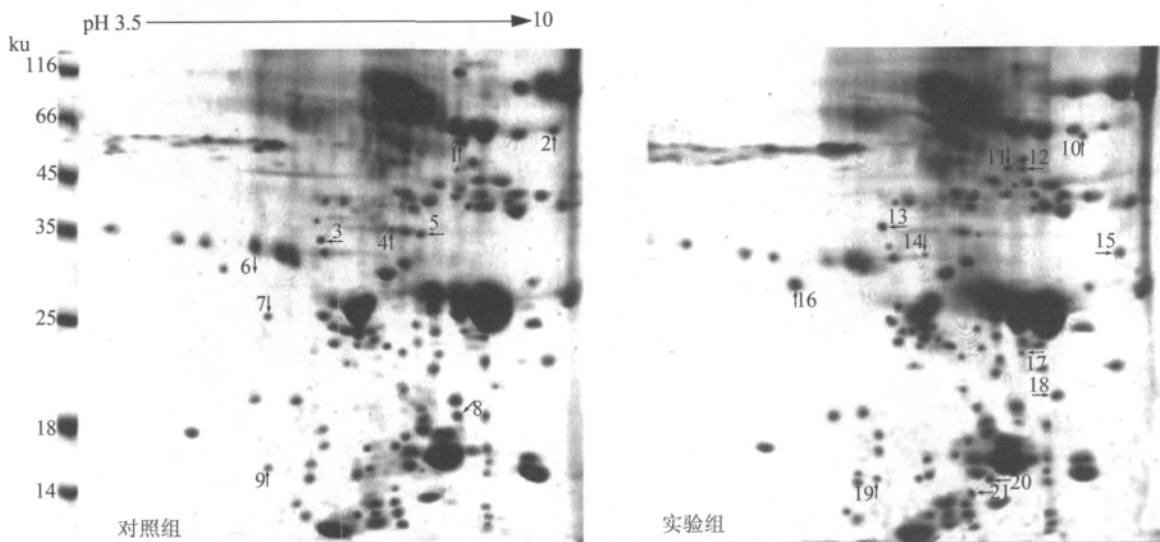


图 1 血清 2-DE 图谱比较
Fig. 1 Comparison of 2-DE maps of serum

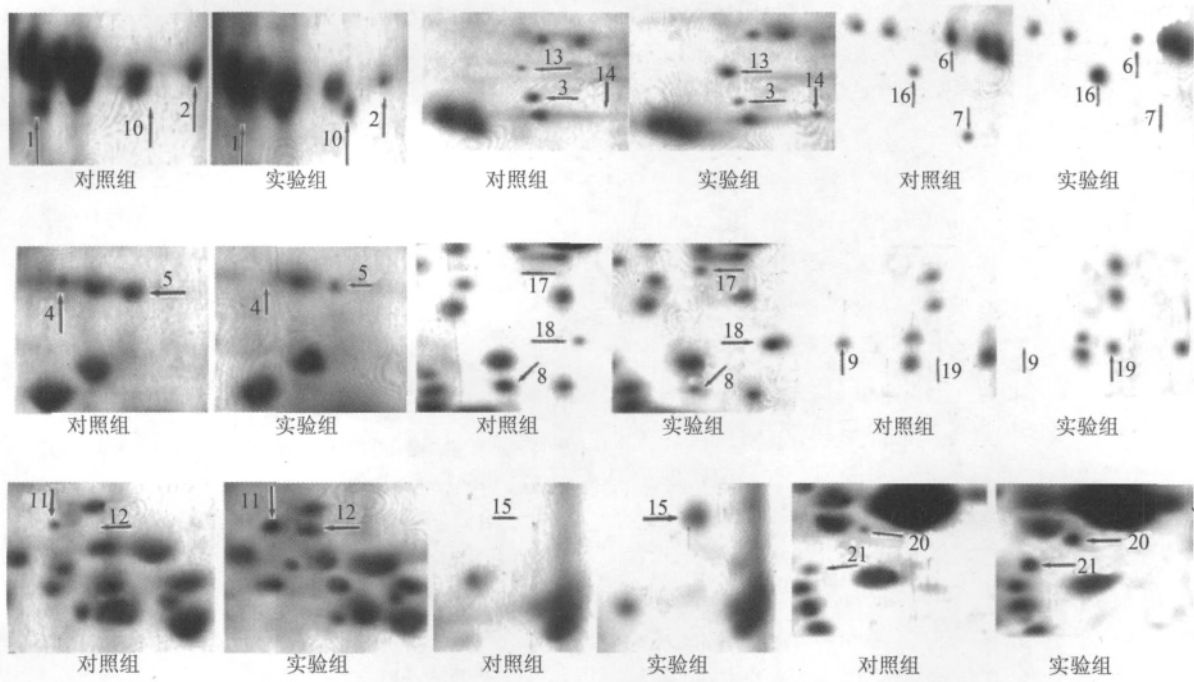


图 2 血清 2-DE 图谱切割图比较

Fig. 2 Comparison of partial 2-DE maps of serum

表 1 血清差异点 PMF 图谱数据库搜索结果

Tab. 1 Searching results of the PMF of serum different spots

差异点编号	匹配肽数量	数据库中编号	描述	等电点	分子量/u	覆盖率/%
1	4	P09108	太平洋电鳐突触上 43 ku 受体相关蛋白	7.22	46321.42	14.8
2	6	Q7SXB0	斑马鱼上某种蛋白	8.66	55210.46	23.0
3	6	Q90XF9	磷酸丙糖异构酶 (EC 5.3.1.1)	4.98	26924.49	41.9
4	3	Q7ZW35	斑马鱼上某种蛋白	5.64	37135.58	20.7
5	4	Q9IAV0	鸟氨酸转氨甲酰酶	7.17	40399.56	21.3
6	4	Q9W6K4	斑马鱼上 LIM 蛋白			25.0
7	6	Q7SXL6	斑马鱼上某种蛋白	5.77	34894.64	38.1
8	4	Q91117	条纹鲈 FKIF9 片段			40.0
9	4	O42189	磷脂酶 A2 BA1	5.00	14058.83	58.9
10	6	Q92091	虹鲟鱼上诱导型一氧化氮合成酶			13.2
11	4	O93348	虹鲟鱼上某种蛋白	7.02	40001.60	17.5
12	4	Q7ZZ96	斑马鱼上异常免疫类型受体	6.80	36029.64	20.1
13	3	Q90WD9	3 磷酸甘油醛脱氢酶	6.36	36005.20	19.4
14	4	Q7ZV18	类似突触融合蛋白 4A	5.83	33919.94	23.2
15	4	Q7ZZ42	斑马鱼上组织因子抑制物	8.54	31892.27	16.1
16	4	Q9W644	日本鳗鱼上增殖细胞核抗原	4.41	28600.65	28.1
18	4	P28022	鲤鱼上 Gamma-M3	7.65	20818.51	30.6
19	4	P01140	眼镜蛇上神经生长因子	5.76	13022.54	15.5
20	4	Q90ZJ6	青鲟上 B2 微球蛋白	6.95	13187.00	34.5
21	5	P28103	细尾长尾鲨上 Wnt-5a 蛋白片段			24.1

目前已知生物体内的一氧化氮合成酶(NOS)有3种不同形式:nNOS(neuronal NOS),eNOS(endothelial NOS)和iNOS(inducible NOS).前两者需较高的Ca²⁺浓度下才有活性,是Ca²⁺依赖的酶.iNOS则是不依赖Ca²⁺的酶,它需要一些刺激下才能表达出来,故称为诱导型的iNOS^[5].Siedlar等^[6]通过实验表明在体外癌细胞可以直接刺激单核细胞产生iNOS.在生物体内,iNOS催化产生的NO在心血管系统中可以使血管舒张.Eddy等^[7]利用L-硝基精氨酸甲酯和L-单甲基精氨酸(L-arginine的相似物)竞争iNOS,抑制NO的产生,结果使幼小的大麻哈鱼血管收缩,而加入正常底物L-arginine后,NO产量增加,大麻哈鱼血管舒张.iNOS另一个重要的功能是它催化产生的NO在抵御病原体 and 肿瘤中发挥重要作用,通过NO结合病原体或肿瘤的特定靶点,抑制病原体入侵及肿瘤DNA合成,从而起到杀菌和抑制肿瘤的作用.研究表明iNOS在抵御病原体和肿瘤过程中,可以协同生物体内的免疫系统共同抵御外源入侵和保持机体稳定.Gross等^[8]用猪布鲁氏杆菌(*Brucella suis*)感染老鼠的巨噬细胞,研究iNOS杀菌活性和表达的变化.他们认为iNOS通过催化产生NO是作为一种补助的防御功能在宿主抵抗外源侵害中发挥作用.

在本实验中,实验组的大黄鱼攻毒后免疫保护率达88.9%.我们推测,除了疫苗起主要保护作用外,大黄鱼体内诱导产生的iNOS也起到重要的抵御病原菌作用,iNOS催化产生的NO具有杀菌功能,NO协同大黄鱼的免疫系统共同抵御病原菌的入侵,从而使大黄鱼表现出较强的抗病能力.相反,对照组的大黄鱼在攻毒后既没有疫苗的保护作用,也缺少iNOS的协同防御作用,在病原菌入侵时,大黄鱼抗病能力不足,容易被病原菌侵害致死.当然,对于鱼类如何抵御病原体

侵害,其抗病机制要比我们推测复杂,特别是对其抵抗病害的分子机制,需要我们进一步去探索.

参考文献:

- [1] 练惠辉,韩鹏,邱乒乓,等.胆管癌患者与健康志愿者血清样品蛋白质表达差异分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2009,25(4):352-357.
- [2] 冯钜涛,刘银坤,MOHAMAD RADWAN ALMOFTI,等.双向电泳-质谱技术筛选肝癌血清标记物[J].生物化学与生物物理进展,2005,32(7):673-677.
- [3] Anderson N L, Anderson N G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words[J]. Electrophoresis, 1998, 19(11): 1853-1861.
- [4] Schoor W P, Plumb J A. Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. Dis. Aquat [J]. Organisms, 1994, 19: 153-155.
- [5] Laing K J, Hardie L J, Aartsen W, et al. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1999(23): 71-85.
- [6] Siedlar M, Mytar B, Krzeszowiak A, et al. Demonstration of iNOS-mRNA and iNOS in human monocytes stimulated with cancer cells *in vitro* [J]. Journal of Leukocyte Biology, 1999, 65(5): 597-604.
- [7] Eddy E B, Tibbs P. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and a substrate, L-arginine, on the cardiac function of juvenile salmonid fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, 135(2): 137-144.
- [8] Gross A, Spiesser S, Terraza B R, et al. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages [J]. Infect Immun, 1998, 66(4): 1309-1316.

Analysis of the Antidisease Protein in *Pseudosciaena crocea* Serum

WU Zhi-peng*, WANG San-ying**

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The control group and experimental group, between which there were marked difference in the protection rate, were analyzed by using proteomic technology in order to find out antidisease protein in serum sample of *Pseudosciaena crocea*. 21 different spots in serum sample were found through comparing the 2-DE gel maps of control group with experimental group. These different spots were analyzed by PMF (peptide mass fingerprint) through MALDI-TOF-MS. One of the spots was iNOS (inducible nitric oxide synthase, EC 1.14.13.39). As one of the iNOS's catalytic products, NO bonded with the specific target of pathogens. It assisted the immune system of *Pseudosciaena crocea* to resist the invasion of pathogens. NO significantly improved the *Pseudosciaena crocea*'s disease resistance. So iNOS may be an important role in antidisease mechanism of *Pseudosciaena crocea*.

Key words: proteomic technology; serum; antidisease protein; iNOS