

锯缘青蟹对病原菌感染的急性反应功能蛋白质组

苏 静¹, 王桂忠², 刘文杰¹, 王三英¹, 彭宣宪^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院 蛋白质组学研究中心, 2. 厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 为研究锯缘青蟹对常见重要病原菌的急性反应蛋白质组, 将锯缘青蟹随机分为四组, 分别注射生理盐水、副溶血弧菌、鳃弧菌和嗜水气单胞菌。继而提取肌肉蛋白进行双向电泳, 通过比较各组肌肉蛋白的双向电泳图谱获得三个差异表达的蛋白。对这三个差异蛋白进行肽质量指纹图谱及其生物信息分析, 鉴定为 Calnexin、无翅蛋白片断、速激肽相关肽。这些结果对研究锯缘青蟹的抗病蛋白及其机理具有重要意义。

关键词: 双向电泳; 质谱分析; 急性反应系统; 肌肉蛋白; 锯缘青蟹

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)04-0559-04

蛋白质组学是功能基因组研究的一个重要平台, 由蛋白质分离技术(如双向电泳技术)、质谱分析技术和生物信息三部分组成。其研究策略可分为表达蛋白质组学和差异蛋白质组学。差异蛋白质组学主要用于筛选和鉴定不同种类或状态下各样本之间蛋白质组的区别和变化。

几乎所有动物受到创伤和感染等外界伤害时都会启动急性反应系统(acute phase response, APR), 合成 acute phase protein (APP) 进行快速自我保护, 抵御微生物的入侵, 促进创伤的修复, 帮助机体恢复正常静息状态等。低等生物在更大程度上倚赖 APR 的保护作用。从进化的角度看, APR 机制在原始生命时代即存在, 越低等的动物对 APR 的依赖更强。无颌动物及所有的无脊椎动物缺乏 B 细胞和 T 细胞表面受体多样化所需的基因重组系统(RAG), 主要依靠天然防御系统进行自我保护。可以推断, 这类动物的 APR 系统十分强健。锯缘青蟹(*Scylla serrata*), 俗称青蟹或红蟳, 属梭子蟹科的一种大型种类, 是传统的名贵海鲜。本文以锯缘青蟹(*Scylla serrata*)为研究对象, 分别注射生理盐水、副溶血弧菌、鳃弧菌和嗜水气单胞菌, 15 min 后分别提取其肌肉蛋白, 通过双向电泳比较各组蛋白质表达的变化, 并对差异蛋白进行了基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)分析, 旨在初步探索锯缘青蟹在受到细菌感染后短时间内肌肉蛋白表达的变化, 并为以后进一步的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

锯缘青蟹购于厦门厦港农贸市场, 共 20 只。

丙烯酰胺, 双甲叉丙烯酰胺, Tris-base, SDS, 巯基乙醇, Triton X-100, DTT, Chaps, Urea, TEMED, 过硫酸氨和考马斯亮兰 R250 等购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 两性载体电解质和甘氨酸购自北京经科试剂公司; 三氟乙酸(TFA)为日本东京化成工业株式会社产品; 碘乙酰胺, 购自 Sigma 公司; 测序级胰蛋白酶购自 Promega 公司; 乙氰(CAN)为国产色谱纯; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 试验菌制备

取实验室保藏的副溶血弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)菌种, 接种于 LB 培养基中, 28℃ 振荡培养过夜。以血球计数板计数, 测得总菌数分别为 2.5×10^8 , 2.0×10^7 , 3.2×10^7 。各吸取 4 mL 菌液分装入 4 支 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 每支 1 mL 菌液。6000 RCF 离心收集菌体。0.85% 生理盐水洗涤菌体 2 次。每管用 1 mL 生理盐水悬浮菌体。

1.3 青蟹的注射感染

购回的青蟹静养 2 日后, 分为 4 组, 每组 5 只。分别注射副溶血弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌。以无菌注射器吸取菌液, 翻转青蟹使腹面朝上, 从其第三胸足基节关节膜处进针, 注射菌液 0.5 mL。对照组注射相同剂量的生理盐水。

1.4 锯缘青蟹肌肉蛋白的提取和制备

于注射后 15 min 分别取细菌注射组和对照组每

收稿日期: 2004-10-15

基金项目: 国家“863”计划(2002AA603013)

作者简介: 苏静(1978-), 男, 硕士研究生。

*通讯作者: wangpeng@xmu.edu.cn

只蟹一支螯,迅速放入冰中.取出螯中的肌肉放入离心管中,立即使用或存于 - 20 备用.称取肌肉 0.2 g,加入 0.6 mL 抽提液 (8 mol/L 脲 + 2 mol/L 硫脲 + 0.1 mol/L DTT + 2% Triton 100 + 40 mmol/L Tris + 1 mmol/L EDTA + 1 mmol/L BMSF),冰浴研磨,放入 4 冰箱过夜,约 18 h 后取出,12 000 r/min,4 离心 30 min,取上清,分装, - 20 保存.

1.5 双向电泳

双向电泳按文献 [1] 的方法进行,并稍做改进.取 pH 3~9.5 和 pH 7~10 的两性电解质按 1:4 混合后制 IEF 胶条.电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色. GDS8000pc 凝胶成像分析系统扫描,进行图像分析.

1.6 质谱样品的制备

比较双向电泳图谱,找到差异蛋白,从胶上切下,切成 1 mm³ 大小置于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,按文献 [2] 的方法处理样品.

1.7 质谱分析和数据库的查询

质谱分析和数据库的查询按照文献 [2] 的方法进行,并稍作修改,蛋白种属选择其它后生动物.

2 结果

2.1 对病原菌急性反应的双向电泳图谱

通过对副溶血弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌与注射生理盐水的对照组的肌肉蛋白双向电泳图谱进行比较,发现四组的双向电泳图谱基本一致,特别是高丰度蛋白完全相同.注射副溶血弧菌试验组与对照组之间可以发现三个十分明显的差异蛋白,分别命名为 P1, P2, P3,而注射鳃弧菌和嗜水气单胞菌试验组较对照组之间出现二个明显的差异蛋白,即 P1、P2 出现, P3 没有出现.

图 1 示对照组与注射副溶血弧菌试验组的肌肉蛋白双向电泳图谱.

2.2 对病原菌急性反应的差异点比较

为比较方便,我们将上述 2-DE 图谱中出现的差异点进行局部放大比较 (图 2).从图 2 可见, P1、P2 和 P3 均仅见于试验组,其出现是一种质的差异.

2.3 生物信息分析结果

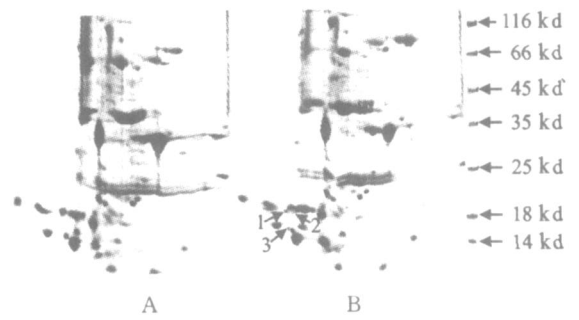


图 1 对照组与注射副溶血弧菌试验组的肌肉蛋白双向电泳图谱

A: 注射生理盐水 15 min 后的对照组; B: 注射副溶血弧菌 15 min 后的细菌注射组

Fig 1 2-D electrophoresis map of muscle proteins of *Scylla serrata* being injected with 0.85% brine or *Vibrio parahaemolyticus*

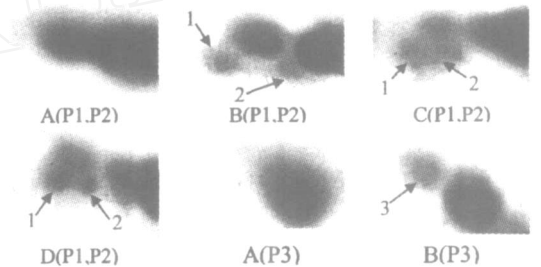


图 2 对照组与试验组肌肉蛋白双向电泳图谱差异点 (箭头表示) 放大图谱

A: 注射生理盐水 15 min 后的对照组; B: 注射副溶血弧菌 15 min 后的细菌注射组; C: 注射鳃弧菌 15 min 后的细菌注射组; D: 注射嗜水气单胞菌 15 min 后的细菌注射组

Fig 2 Zoom-in map of the proteins of variances in 2-D map of muscle protein of *Scylla serrata* being injected with 0.85% brine, *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibri oanguillanum* or *Aeromonas hydrophila*

对三个差异蛋白进行 MALD-TOF 分析,得到各自的 PMF 图谱.根据得到的肽质量指纹图谱数据,及分子量范围和其它有关参数,通过 Matrix science 网站提供的 MASCOT 软件查询与之相匹配的蛋白,搜索结果见表 1.

表 1 P1, P2, P3 在数据库搜索的结果

Tab 1 Database searching results of P1, P2, P3

编号	蛋白名称	分数	匹配肽段数目	序列覆盖率 /%	种属	等电点 /分子量
P1	Cal excitin	26	4	32	<i>Todarodes pacificus</i>	4.98/22169
P2	无翅蛋白片断	24	6	43	<i>Chaetodiopsis m eigenii</i>	9.39/22100
P3	速激肽	31	3	35	<i>Apis mellifera</i>	9.56/13485

3 讨 论

锯缘青蟹是一种名贵的食用蟹,属节肢动物门,甲壳纲,十足目,梭子蟹科的一种大型种类。迄今为止,国内外尚未见到应用蛋白质组学技术对其进行研究的有关报道。本实验采用蛋白质组技术研究了锯缘青蟹在注射生理盐水、副溶血弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌 15 min 后肌肉蛋白表达的差异。结果发现,注射副溶血弧菌 15 min 后,出现三个差异蛋白点,分别命名为 P1、P2 和 P3。表明锯缘青蟹在受到细菌感染时可产生这三个蛋白,并通过注射鳃弧菌、嗜水气单胞菌对这三个蛋白进行了追踪。结果发现 P1、P2 同样出现,表明 P1、P2 在不同细菌的刺激下都可产生, P3 没有出现。

P1 鉴定为 Calexcitin。Calexcitin 是近年来发现的一种 Ca^{2+} 结合蛋白,包含两个 EF-hands 结构,并与 GTP 结合蛋白具有同源性,可结合两个 Ca^{2+} ,并通过 GTPase 的作用与 GTP 结合。其与蛋白激酶 C 有高亲和作用。当存在 Ca^{2+} 而缺乏内在的 Ca^{2+} 钙调蛋白激酶或被蛋白激酶 C 磷酸化时, Calexcitin 可降低 K^+ 通道的平均开放时间和平均开放概率,显示出了对 K^+ 通道的直接调控作用。当将其微注射入软体动物的神经元或兔的小脑 Purkinje 细胞树突时, Calexcitin 被磷酸化后转移到了膜上,可作为 Ca^{2+} 信号分子高效增强细胞膜敏感性,增加通过膜的 Ca^{2+} 流量。Calexcitin 是被发现的第一个可结合 Ca^{2+} 的 GTP 结合蛋白,也是首个对 Ca^{2+} 敏感的肌质钙结合蛋白^[31]。Calexcitin 不仅可调控细胞膜上的离子通道,而且还参与了乌贼光感受器神经元末端突触体的多种蛋白的合成^[7]。因此,我们可以推测锯缘青蟹在受到不同细菌感染状态下,应激产生了大量 Calexcitin,一方面参与调节细胞膜上的离子通道的变化,而离子通道的变化与细胞内能量的产生紧密相关,另一方面参与多种蛋白的合成,共同抵御自身的损伤。

P2 鉴定为 Wingless 片断。Wingless 属于 Wnt 家族,是一类与胚胎发育和肿瘤形成密切相关的信号分子,是调节胚胎细胞分化的关键信号传导分子。胚胎背腹部的模式,肢的形成,神经管的模式都需要 Wingless 蛋白。Frizzled 是其在膜上的接收器。目前,已发现多种与 Wingless 信号传导相关的蛋白,并初步建立了其作用模型。当缺乏 Wingless 时, Ser/Thr 激酶 $\Delta\text{W}3$ 与肿瘤抑止蛋白 APC 协同作用于细胞质的 Amadillo,使其表达水平降低。当存在 Wingless 时, Dishevelled 通过 Frizzled 的作用被 Wingless 活化。可能存在一个激酶磷酸化 Dishevelled,且 Dishevelled 反馈抑制该激酶。Dishevelled 通过调节其酶活性拮抗 $\Delta\text{W}3$, Amadillo 不再降

低,并在细胞质和细胞核中积累,在那里 Amadillo 可能参与影响了转录因子 TCF/LEF 的活动,从而改变了基因表达^[5]。虽然,尚未见 Wingless 参与 APR 反应的报道,但其与 Wnt 属同源蛋白,而 Wnt 信号各信息分子的基因突变,发生在胚胎形成时即引起先天缺陷或发育畸形等,发生在成年体阶段即引起炎症、肿瘤等疾病。因此,我们推测锯缘青蟹在受到不同细菌感染的状态下,应激产生了大量 Wingless,作为信号分子,参与调节细胞内基因的转录,改变某些蛋白的表达,抵御自身的损伤。

P3 鉴定为速激肽相关肽。速激肽是一组具有生物学活性的多肽,它们共有保守的羧基末端序列, $-\text{Phe-X-Gly-Leu-Met-NH}_2$, 其中 X 或为一芳香族氨基酸,或为一支链脂肪族氨基酸。速激肽广泛地分布于神经系统和外周组织中,呈现出复杂的生理效应。其作用主要是参与痛觉调制、唾液分泌、胃肠活动、心血管活动、神经内分泌、呼吸及行为、造血、神经营养等活动的调节^[6]。在甲壳动物、昆虫、软体动物以及蠕虫中也发现了许多与速激肽结构序列相似的肽,它们被称为速激肽相关肽^[7]。这些肽分别由 7~19 个氨基酸残基组成, C 末端具有 $\text{FX}_1\text{GX}_2\text{Ramide}$ 结构^[8]。甲壳动物的速激肽相关肽具有多种类型,广泛分布于生物体的整个神经系统中,介导多种生物学功能。例如: EMRF-amide 相关肽可介导在多种靶组织中的多种功能,主要包括对神经肌肉接头的突触传递的调节,对神经引起的骨骼肌的收缩以及心脏、肠肌和其它内脏肌的调节^[9]。其作用可能是借助于肌醇三磷酸信号途径,引起肌质网内 Ca^{2+} 的流动进而调节肌肉的运动。虽然人们已在甲壳动物中发现了多种速激肽相关肽,并对它们的结构和功能及其两者之间的关系也有了一定的了解。但是,对于这些速激肽相关肽的具体作用途径和方式及分泌调节过程和多种肽类之间的相互协调作用还不很清楚。因此,我们只能推测锯缘青蟹在受到细菌感染的状态下,应激产生了某种速激肽相关肽,以调节肌肉细胞的生理活动。

我们采用蛋白质组技术对细菌注射组和生理盐水注射组锯缘青蟹肌肉蛋白表达的差异进行了初步研究,鉴定了三个相关蛋白,并对这三个蛋白和锯缘青蟹在受到细菌感染的状态下生理变化之间的关系进行了初步探讨。但是,由于甲壳动物的蛋白研究较少,使得 MALD FTOF/MS 的鉴定结果不够理想,查询结果的物种来源与锯缘青蟹亲缘关系较远。因此我们还需要对差异蛋白点源后衰变, MS/MS 质谱以得到蛋白质序列的详细信息。值得提出的是,迄今尚无此类相关的报道,本文为研究甲壳动物 APR 反应提供了初步实验依

据.

参考文献:

- [1] Wu Y J, Wang S Y, Peng X X. Serum acute phase response (APR)-related proteome of bach to trauma[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16: 381 - 389.
- [2] Zhang G L, Wang S Y, Peng X X, et al Applying proteomic methodologies to analyze the effect of Hexamethylene bisacetamide (HMBA) on differentiation of human gastric carcinoma BGC-823 cells[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004, 36(8): 1 613 - 1 623.
- [3] Zoltan G, Andreas J, Tapas KM, et al Calexcitin B is a new member of the sarcoplasmic calcium-binding protein family [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2001, 276(25): 22 529 - 22 536.
- [4] Maria E, Marianna C, Barry B K, et al Squid photoreceptor terminals synthesize calexcitin, a learning related protein [J]. Neuroscience Letters, 2003, 347: 21 - 24.
- [5] Magalie L, Cyrille A, Laurence D, et al Wingless capture by frizzled and frizzled2 in drosophila embryos [J]. Developmental Biology, 2001, 235: 467 - 475.
- [6] 李秀华, 赵晏. 前速激肽原的研究进展 [J]. 生理科学进展, 1999, 30(1): 78 - 80.
- [7] 褚衍亮, 姜乃澄, 王玥. 甲壳动物神经肽的结构和功能 [J]. 东海海洋, 2002, 20(1): 42 - 48.
- [8] Nassel D R. Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review [J]. Peptides, 1999, 20(1): 141 - 158.
- [9] Quigley P A, Mercier A J. Modulation of crayfish superficial extensor muscles by a FMRFamide-related neuropeptide [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1997, 118(4): 1 313 - 1 320.

Proteome in Acute Phase Response of *Scylla serrata* Being Infected with Pathogenic Bacterium

SU Jing¹, WANG Gui-zhong², LU Wen-jie¹,
WANG San-ying¹, PENG Xuan-xian^{1*}

(1. Center of Proteomics, School of Life Sciences, Xiamen Univ.,
2. Department of Oceanography, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: Innate immunity system provides the body with its first line of protection against external injury. A acute phase response (APR), as a important part of it, has been paid attention to. Proteins involved in APR are called as acute phase protein (APP). Present studies indicated that proteomics is an ideal tool to characterize APP. In the current study, APP profiles were investigated in the muscle of *Scylla serrata* against *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila* with the use of proteomic methodologies. For this purpose, *Scylla serrata* were separately injected with the three pathogenic bacteria and 0.85% brain was used as a control. Samples were prepared from the muscle at the fifteen minutes following the injections. Then the proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Three proteins with variances were achieved by comparison between the 2-DE maps. With the use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) and bioinformatics, the three variances were elementarily identified as a protein similar to calexcitin, wingless (Fragment) and tachykinin-related peptide. Calexcitin, a calcium sensor protein, can bind calcium and GTP, inhibit potassium channels, and enhance membrane excitability. Wingless belongs to Wnt family, which is a signal molecule on embryonic development and cancer. Tachykinin, a neuropeptide, plays an important role in regulation of carbohydrate metabolism, muscle contractility and pigment moving etc. Interestingly, there has been no report on the relationship between the three proteins and APR. Our results, therefore, provide valuable experimental evidences for approach to APR in a crab.

Key words: two-dimensional electrophoresis; mass spectrum analysis; APR; proteomics; *Scylla serrata*