

# Asia 1 型 FMDV 感染 BHK-21 细胞差异蛋白质点 2-DE 分析

刘永杰,张克山,尚佑军,郭建宏,郑海学,田宏,卢国栋,刘湘涛\*

(中国农业科学院兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,农业部畜禽病毒学重点开放实验室,国家口蹄疫参考实验室,兰州 730046)

**摘要:** 为研究 Asia 1 型口蹄疫病毒(FMDV)感染 BHK-21 细胞后蛋白质组的变化及差异,将 FMDV 接种于培养的单层 BHK-21 细胞,同时设未接毒的 BHK-21 细胞作对照组。待细胞病变后分别提取 2 组细胞总蛋白借助 2-DE 技术及 PDQuest8.0 软件进行细胞蛋白质组二维电泳图谱差异性分析。结果显示感染组有 1 457 个可见蛋白质点,而对照组可见的蛋白质点为 1 427 个。感染组蛋白点的表达量与对照组相比,二者具有统计学差异( $P < 0.05$ )的蛋白质点 472 个,其中表达上调 251 个点,表达下调 221 个点,新合成蛋白点 30 个。结果表明 FMDV 感染 BHK-21 细胞后引起了细胞蛋白质组表达模式的改变,这种变化是病毒与细胞相互作用的结果。本研究首次利用蛋白质组学技术研究 Asia 1 型 FMDV 感染 BHK-21 细胞后蛋白质组学差异,有助于深入研究 Asia 1 型 FMDV 和 BHK-21 细胞相互作用的分子机制。

**关键词:** Asia 1 型 FMDV; BHK-21 细胞; 感染; 差异蛋白质组

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)01-0145-05

## Two-dimensional Gel Electrophoresis Analysis of Differential Protein Spots from BHK-21 Cell Infected FMDV Serotype Asia 1

LIU Yong-jie, ZHANG Ke-shan, SHANG You-jun, GUO Jian-hong, ZHENG Hai-xue, TIAN Hong, LU Guo-dong, LIU Xiang-tao\*

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** To examine the differences and changes of proteome of BHK-21 cells after infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype Asia 1, the monolayer BHK-21 cells infected with FMDV and normal cells were prepared as experimental materials. The total protein from the BHK-21 cells were isolated and used to analyze the proteome differences between the infected and the control cells by 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Results showed that there were 1 457 protein spots visible in the infected cells, and 1 427 visible protein spots in the control cells. Compared with control cells, there were significance of statistics ( $P < 0.05$ ) at 472 differential protein spots in infection cells, including 251 up-expressed protein spots, 221 down-expressed protein spots and 30 newly proteins spots. These results indicate that the expression pattern of cells are changed after infection with FMDV. It maybe results from inter-actions between viral and cellular components. This is the first time to use proteomics technologies to study the pro-

收稿日期: 2010-06-09

基金项目: “十一五”国家支撑计划课题(2006BAD06A03); 国家现代肉羊产业技术体系(ncytx-39)

作者简介: 刘永杰,男,甘肃陇南人,硕士,从事病毒蛋白质组学研究, E-mail: uge123@126.com

\* 通讯作者: 刘湘涛, E-mail: hnxiangtao@hotmail.com

teome differences after FMDV infection and this study is helpful to further research about molecular mechanisms of interactions between FMDV serotype Asia 1 and BHK-21 cells.

**Key words:** foot-and-mouth disease virus Asia 1; BHK-21 cell; infection; differential proteome

口蹄疫是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性人畜共患传染病,其临床表现为偶蹄动物口、蹄部出现水泡。口蹄疫的暴发和流行带来严重的经济损失和不良的政治影响,被 OIE 列为必须上报的动物传染病<sup>[1]</sup>。近年来,随着 FMDV 全基因组序列测定的完成,人们从基因组结构和功能水平上对口蹄疫病毒的认识越来越深刻,也取得了可喜的研究成果。然而生物体的基因组序列信息并不能预测基因产物(mRNA 或蛋白质)是否或何时被翻译、基因产物的相应含量、翻译后修饰的程度、基因剔除或过表达的影响<sup>[2]</sup>;况且蛋白质和 mRNA 之间的相关系数仅为 0.4~0.5<sup>[3]</sup>,还存在转录后复杂的加工、翻译调节以及翻译后加工等<sup>[4-5]</sup>。因此只从基因组水平上研究口蹄疫病毒与宿主细胞之间的相互作用机制有很大的局限性。口蹄疫病毒致病性是所有蛋白相互作用的结果,虽然单个基因在致病过程中的作用研究得较为深入,然而单个基因并不起决定性的作用,需要从总体蛋白质水平上研究病毒和机体的相互作用<sup>[6]</sup>。蛋白质组学技术在病毒感染研究中已成为发现致病相关蛋白、寻找早期诊断标记和揭示致病机制的有力工具<sup>[2]</sup>,从蛋白质组水平上研究口蹄疫病毒和宿主细胞相互作用机制尚未见报道。为探究 Asia 1 型 FMDV 感染 BHK-21 细胞后蛋白质组变化和差异,作者首次通过双向电泳技术结合 PDQuest 软件分析了 FMDV 感染 BHK-21 细胞后蛋白质组表达变化及差异,发现了差异蛋白质点,本文为进一步结合蛋白质组学下游技术研究 Asia 1 型 FMDV 和 BHK-21 细胞相互作用的分子机制奠定了基础、开辟了新的研究方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Asia 1 型 FMDV 由国家口蹄疫参考实验室提供。BHK-21 细胞由本室保存。胎牛血清及 MEM 细胞培养基为 Hyclone 公司产品。尿素、硫脲、CHAPS、DTT、溴酚蓝等相关试剂及 IPG 胶条(pH 3~10,非线性)、聚焦槽、电泳仪、垂直板电泳槽、GS800 扫描仪、Quantityone 图像获取软件及

PDQuest8.0 分析软件均为 Bio-rad 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞蛋白质样品的制备 FMDV 接种于培养的单层 BHK-21 细胞上将其设为感染组,同时设未接毒 BHK-21 细胞为对照组,每组做 3 次重复。病变后弃去 MEM 培养液,0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗 1 次;用细胞刮分别收集感染组和对照组细胞于 10 mL 离心管中,1 500×g 离心 10 min;弃上清,PBS 洗 3 次(室温,1 500×g,10 min),每次离心后收集沉淀。在离心管中加入 1 mL PBS 重悬细胞,用 1 mL 微量加液器移入干净的离心管中;1 500×g 离心 10 min;用 200 μL 微量加液器吸出 PBS,弃去;吸干残留的 PBS,估计样品体积,加入 2~5 倍体积裂解液[8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素,2 mol·L<sup>-1</sup> 硫脲,4% CHAPS,20 mmol·L<sup>-1</sup> Trisbase,30 mmol·L<sup>-1</sup> DTT,0.5% Bio-lyte(3-10)],混匀,液氮和常温之间反复冻融 3 次;15℃,40 000×g 离心 1 h;弃沉淀,取上清即为细胞蛋白提取物,用 Bradford 法定量后于-75℃保存备用。

1.2.2 第一向等电聚焦(IEF) 细胞蛋白质提取物(500 μg)与水化上样缓冲液[8 mol·L<sup>-1</sup> Urea,2 mol·L<sup>-1</sup> Thiourea,65 mmol·L<sup>-1</sup> DTT,4% CHAPS,65 mmol·L<sup>-1</sup> Tris,0.2% Bio-Lyte(3-10),1% (W/V) 溴酚蓝]充分混合,使总体积为 250 μL,加入到 IPG 胶条内容胀 10 h,然后将 IPG 胶条放入等电聚焦电泳仪,胶条上滴加一定量的矿物油。按以下程序完成等电聚集电泳:50 V,10 h;250 V,30 min;500 V,30 min;4 000 V,3 h;400 V,20 000 伏小时;500 V 维持(每胶条电流 50 μA)。

1.2.3 第二向 SDS-PAGE 电泳 等电聚焦完成后将 IPG 胶条在平衡缓冲液 I [0.375 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.8),6 mol·L<sup>-1</sup> Urea,20% Glycerol,2% SDS(W/V),2% DTT;Glycerol]和平衡缓冲液 II [0.375 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.8),6 mol·L<sup>-1</sup> Urea,20% Glycerol,2% SDS(W/V),2.5% Iodoacetamide;SDS 和 Iodoacetamide]中各平衡 15 min,IPG 胶条转移到 SDS-PAGE 凝胶上,用封胶液封闭。凝固后进行 SDS-PAGE(起始电压

为 80 V,待样品完全走出 IPG 胶条,溴酚蓝指示成一条线时,加大电压至 120 V),电泳至溴酚蓝前沿到达玻璃板底部停止。

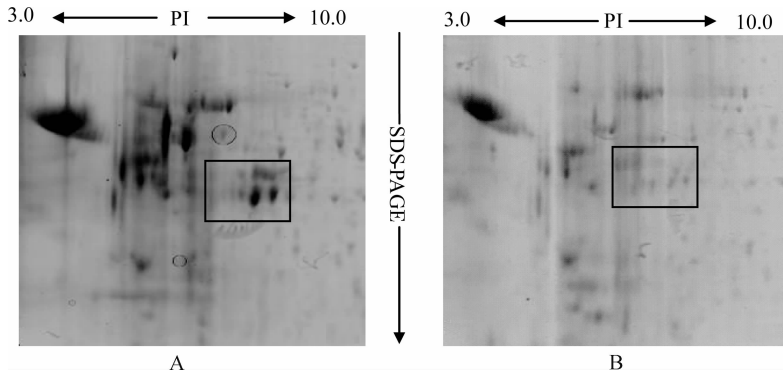
1.2.4 染色与凝胶图像分析 SDS 胶通经固定液(40%乙醇,10%乙酸)固定、考马斯亮蓝染色、过夜脱色。扫描仪获取数字化图像,用 PDQuest8.0 软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标相对分子质量和等电点校正及归一化处理,比较分析感染组与对照组蛋白表达差异情况。

## 2 结果

### 2.1 蛋白质样品的 2-DE 图谱分析

图 1 显示了感染组(图 1A)和对照组(图 1B)细

胞总蛋白质样品的双向电泳图谱。感染组和对照组分别进行了 3 次重复电泳,双向电泳凝胶经考马斯亮蓝染色,发现 3 次重复的电泳图谱基本一致,重复性较高。图 2 显示的为细胞总蛋白双向电泳的分散图(scatter plot),其样品图谱间的相关系数(correlation coefficient)为 0.162。从蛋白点的分离效果、蛋白点的数量、胶的背景及纵横条纹等几个方面,所得的双向电泳图谱可以进行点的匹配和分析。蛋白质斑点分布模式基本一致,表现为大小不等、形状和分布不规则、颜色深浅不均的斑点,>90%的蛋白点集中于 pI 4~8 范围内。对照组蛋白质点(图 1B)主要集中分布于 pI 3~7。感染组蛋白质点分布于 pI 3~9(图 1A)。



A. 感染组;B. 对照组。图 3 同

A. Infection group; B. Control group. The same in Figure 3

图 1 总蛋白质双向凝胶电泳图谱

Fig. 1 2-DE gel map of cell proteins

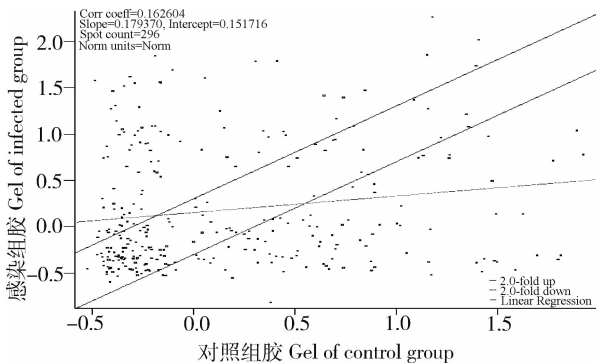


图 2 蛋白点群散点图

Fig. 2 Diagram of protein scatter spots

### 2.2 细胞蛋白质 2-DE 图谱比较

采用 Quantityone 扫描获取图像并对其进行剪

切处理,利用图像分析软件 PDQuest8.0 对 2 组细胞蛋白图谱进行比较分析。感染组可见到蛋白质点 1 457 个(图 1A),对照组双向电泳图谱上可观察到蛋白质点 1 257 个(图 1B),两者比较具有统计学差异( $P < 0.05$ ),感染后蛋白质点增加了 30 个。2 块凝胶中重复 3 次均有 2 倍表达量差异的蛋白质点可以认为是 2 组细胞系的差异表达蛋白质点。图 3 为图 1 方框区域内蛋白点图谱的三维显示,从中可观察到感染组蛋白点与对照组相比有明显的差异。以差异蛋白质点和新合成的蛋白质点作为标准,对照组细胞蛋白表达量与处理组有差异的蛋白质点 472 个,其中有 251 个蛋白点表达上调,221 个蛋白点表达下调,30 个为新合成蛋白质点。

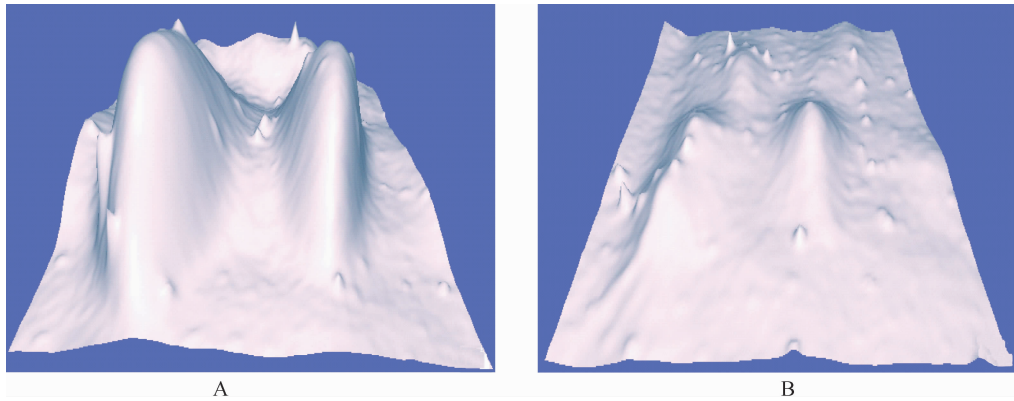


图3 差异蛋白质点三维效果图

Fig. 3 Three-dimensional viewer of differential protein spots

### 3 讨论

FMDV 为单股正链无囊膜的 RNA 病毒, 宿主范围广, 抗原结构复杂, 存在广泛的抗原变异, 根据交叉保护试验已确定的 FMDV 血清型有 7 个: SAT1、SAT2、SAT3、O、A、C 和 Asia 1 型, 各血清型间无交叉反应, 不同的血清型又具有不同的亚型, 还有为数众多的新变异株出现<sup>[7]</sup>, 给口蹄疫的防治带来了巨大困难。口蹄疫病毒成功实现对宿主细胞的入侵并在细胞内复制需要克服细胞对病毒感染产生的各种特异性和非特异性免疫抵御反应, 阻断或影响宿主细胞的正常循环机制, 利用宿主细胞的物质和能量合成病毒自身物质。相互作用的结果最终会导致宿主细胞蛋白表达模式的改变, 这种改变影响着宿主细胞的正常生理功能, 决定和反映着病毒感染致病的进程和结果<sup>[8-10]</sup>。

从蛋白质点的变化情况来看, 感染 FMDV 后, 蛋白质差异点 472 个, 其中 251 个蛋白点表达上调, 221 个蛋白点表达下调, 30 个为新合成的蛋白质点。这些差异的蛋白质可直接或间接参与病毒与细胞的相互作用。新出现的蛋白质点和表达上调的蛋白质点可能是病毒感染细胞后激活了某些信号通路, 促使一些细胞蛋白质起始表达或表达量增加, 也可能含有新合成的 FMDV 的蛋白质点。FMDV 感染细胞后可降解宿主细胞翻译起始因子 eIF4G 而关闭宿主细胞“帽子”依赖的 mRNA 翻译机制、抑制干扰素及 MHC-1 的合成从而降低机体非特异性免疫系统对 FMDV 的监视能力<sup>[11-13]</sup>, 反映出的相关蛋白质的下调表达。本试验只研究了 FMDV 感染 BHK-21 细胞后蛋白质组的变化情况, 为明确差异

表达蛋白质在病毒感染中的具体作用, 必须借助生物质谱和蛋白质芯片等技术对差异表达的蛋白质进行特征及功能的深入研究<sup>[14]</sup>。本试验为研究 FMDV 的致病机理, 提供了新思路, 开辟了新的研究方向。

### 4 结论

本试验首次借助蛋白质组学相关技术分析了 Asia 1 型 FMDV 感染 BHK-21 细胞前后细胞蛋白质组表达情况的差异。初步发现 Asia 1 型 FMDV 感染 BHK-21 细胞后导致了细胞表达模式的改变, 引起了 BHK-21 细胞内部分蛋白质的上调表达、下调表达及新蛋白质的生成。

### 参考文献:

- [1] 谢庆阁, 翟中和. 畜禽重大疫病研究进展[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1996: 1423.
- [2] HANASH S. Disease proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422: 226-232.
- [3] MANN M, JENSEN O N. Proteomic analysis of post-translational modifications[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 255-261.
- [4] MAXWELL K L, FRAPPIER L. Viral proteomics[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(2): 398-411.
- [5] PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomes[J]. *Nature*, 2004, 5(6788): 837-846.
- [6] ALFONSO P J, RIVERA B, HERNAEZ C, et al. Identification of cellular proteins modified in response to African swine fever virus infection by proteomics[J]. *Proteomics*, 2004, 4: 2037-2046.
- [7] 张显升, 刘在新, 赵启祖, 等. 口蹄疫病毒基因组 RNA

- 结构与功能研究进展[J]. 病毒学报, 2001, (4): 375-380.
- [8] 孙金福,涂长春. 病毒感染蛋白质组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(12): 1950-1954.
- [9] TSAI J M, WANG H C, LEU J H, et al. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus[J]. *J Virol*, 2004, 78(20): 11360-11370.
- [10] MADSEN E L. Epistemology of environmental microbiology[J]. *Environ Sci Technol*, 1998, 32(4): 429-439.
- [11] GRUBMAN M J, BAXT B. Foot-and-mouth disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(2): 465.
- [12] TOSH C, MITTAL M, SANYAL A, et al. Molecular phylogeny of leader proteinase gene of type A of foot-and-mouth disease virus from India [J]. *Arch Virol*, 2004, 149(3): 523-536.
- [13] KRONOVETR J, SKERN T. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: a papain-like enzyme requiring an acidic environment in the active site[J]. *FEBS Lett*, 2002, 528(1-3): 58-62.
- [14] THOMAS J J, BAKHTIAR R, SIUZDAK G. Mass spectrometry in viral proteomics[J]. *Acc Chem Res*, 2000, 3(3): 179-188.

(编辑 白永平)