

应用双向电泳分析 2 株不同毒力的副猪嗜血杆菌蛋白质表达的差异

王晨燕^{1,2#}, 王隆柏^{1#}, 车勇良¹, 吴学敏¹, 陈如敬¹, 邵良平², 周伦江^{1*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福州 350013;

2. 福建农林大学动物科学学院, 福州 350002)

摘要: 副猪嗜血杆菌是猪常见细菌性疾病的病原之一, 临床表现为多发性纤维索性浆膜炎、关节炎和脑膜炎。运用蛋白质组学技术对不同毒力的副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*) 进行比较研究, 明确差异蛋白质信息, 对揭示其致病机制具有重要意义。本试验通过应用建立的双向电泳方法对选取同为 4 型的 2 株不同 *H. parasuis* 临床分离株 (菌株 A 和菌株 B) 进行蛋白质组学研究, 二者相互比较, 共鉴定出 10 个差异表达蛋白质, 其中菌株 A 有 3 个蛋白质表达量为增加, 分别是谷氨酰 tRNA 合成酶、半胱氨酸合成酶和假设蛋白; 菌株 B 有 7 个蛋白质表达量为增加, 包括 Yae T 蛋白 (omp85)、CTP 合酶、天冬氨酰 tRNA 合成酶 (有 3 个)、尿苷激酶、SecB 蛋白。差异蛋白质的功能主要集中在蛋白质合成、氨基酸合成和嘧啶合成。研究结果进一步丰富了 *H. parasuis* 的毒力因子和致病机制的相关信息, 也为今后开展 *H. parasuis* 免疫蛋白质组学研究奠定了基础。

关键词: 副猪嗜血杆菌; 双向电泳; 差异蛋白质

中图分类号: S854.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)03-0503-06

Differential Analysis of Expressed Proteins between Different Virulent *Haemophilus parasuis* by Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

WANG Chen-yan^{1,2#}, WANG Long-bai^{1#}, CHE Yong-liang¹, WU Xue-min¹, CHEN Ru-jing¹,
SHAO Liang-ping², ZHOU Lun-jiang^{1*}

(1. Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

2. College of Animal Science, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Haemophilus parasuis* was one of the common bacterial disease pathogen of pigs, clinically characterized by fibrinous polyserositis, fibrinous arthritis and meningitis. It had importance significance that the expressed proteins of different virulent *H. parasuis* strains were profiled by the comparative proteomic approach to reveal the mechanism of pathogenesis. We chose 2 different virulent stains, stain A and stain B, of *H. parasuis* serotype 4 for comparative analysis, 10 differently expressed proteins were analyzed and identified by 2-DE and MALDI-TOF-MS. In all proteins differentially expressed, 3 protein spots were upregulated in strain A, they were glutamyl-tRNA synthetase, cysteine synthase and hypothetical protein, and 7 protein spots were upregulated in strain B included YaeT protein (omp85), CTP synthetase, aspartyl-tRNA synthetase (3 spots), uridylate kinase, protein-export chaperone SecB and so on. The function of expressed pro-

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 2013 年福建省农业科学院创新团队项目; 福建省现代农业生猪产业技术体系建设 (2014-2016)

作者简介: 王晨燕 (1988-), 女, 硕士生, 主要从事临床兽医学研究, E-mail: 329177624@qq.com; 王隆柏 (1977-), 男, 福建宁化人, 副研究员, 主要从事分子生物学与免疫学研究, E-mail: wanglongbai@163.com。二人共为第一作者

* 通信作者: 周伦江 (1973-), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物病毒学与分子生物学研究, E-mail: lunjiang@163.com

teins mainly consisted of protein biosynthesis, amino-acid biosynthesis and pyrimidine biosynthesis. These results further enrich the information of virulence factors and pathogenic mechanisms of the *H. parasuis* strains, and also lay a foundation for study of immune proteomic.

Key words: *Haemophilus parasuis*; 2-DE; expressed protein

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪 Glässer 病的病原体, 临床表现为多发性纤维素性浆膜炎、关节炎和脑膜炎^[1-3]。作为一种猪常见的上呼吸道定植菌, 当机体受到应激或感染时易发此病。近几年, 随着生猪养殖业的不断发展, 饲养密度的加大, 猪群疫病日益复杂, 尤其是猪群感染了猪繁殖与呼吸综合征病毒等免疫抑制性疾病后, *H. parasuis* 的发病情况也呈现递增趋势, 并成为导致猪群发生细菌性疾病的主要病原之一, 给中国养猪业带来重大的经济损失^[4]。

目前, 双向电泳技术作为蛋白质组学研究的三大核心技术之一, 是分析复杂样品中蛋白质的分辨率最高的工具, 且蛋白质组学在生命科学研究领域已得到广泛应用。如 D. N. Chakravarti 等^[5] 通过蛋白质组学技术鉴定出有价值的流感嗜血杆菌的外膜蛋白 p6, 该蛋白质可作为流感嗜血杆菌的候选疫苗蛋白质之一。G. G. Tomazella 等^[6] 利用现有的蛋白质数据库信息对多重耐药的大肠杆菌进行蛋白质鉴定和分析, 结果鉴定出 1 596 个蛋白质。本试验通过应用建立的双向电泳方法成功地对 2 株血清 4 型不同毒力的 *H. parasuis* 临床分离株进行蛋白质组学比较分析, 并明确了差异蛋白质的功能, 为进一步揭示 *H. parasuis* 的毒力因子及致病机制提供了相关信息, 也为今后顺利开展 *H. parasuis* 的免疫蛋白质组学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

副猪嗜血杆菌血清 4 型临床分离株 (菌株 A 毒力强于菌株 B), 由本科室于 2012 年在福建南平、长乐养猪场分离鉴定并进行保存。

1.2 主要设备

Ettan IPGphor II 等电聚焦系统, 标准胶条槽 (24 cm), EPS 3501 XL 电源, Ettan DALT six 大型垂直电泳系统, MultiTemp(tm) III 恒温循环水浴, Image Scanner III 扫描仪均购自 GE 公司; DYY-6C 型电泳仪购自北京六一仪器厂; 双向电泳凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0, 伯乐凝胶成像系统均购自

Bio-RAD 公司。

1.3 主要试剂

Immobiline DryStrip 干胶条, 载体两性电解质 IPG buffer (pH4~7), Tris-base, 硫脲, CHAPS, 二硫苏糖醇 DTT, 碘乙酰胺, DeStreak reagent, 2D-clean up 试剂盒, 覆盖油均购自 GE Healthcare 公司; 尿素, 溴酚蓝, TEMED, 过硫酸铵均购自 Sigma 公司; 甘油、SDS、硫代硫酸钠、NAD、考马斯亮蓝 R250、低熔点琼脂糖为 Amresco 公司进口产品; 蛋白质 Marker 购自博士德公司。TSA 培养基、TSB 培养基购自 BD 公司; 脱纤维马全血购自郑州益康生物工程有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青材料有限公司, 使用前 56 °C 灭活 30 min。

1.4 样品制备

将 *H. parasuis* 血清型临床分离株接种于 TSB 营养肉汤中, 180 r·min⁻¹, 37 °C 摇床培养至对数期; 将菌液分装于 50 mL 管中, 3 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 取沉淀; 用 4 °C PBS 重悬细菌 3 次, 3 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 5 min, 取沉淀; 冰浴条件准备, 加入已溶解的蛋白酶抑制剂的裂解液; 在 4 °C 冰浴条件下进行超声破碎 (2 次 30 个脉冲; 间隔 4 s; 脉冲持续 0.3 s; 20 kHz 同质音, 功率输出, 60 W, 至液体澄清为止); 破碎后菌液分装至 2 mL 离心管中, 17 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 1 h; 小心收集上清液, 每份以 100 μL 进行分装并冻存于 -80 °C; BCA 法测定蛋白质浓度。

1.5 SDS-PAGE 制备及电泳

配制 12% 的分离胶和 5% 浓缩胶; 样品加热溶解后按比例加入 Loading buffer, 开始电压设置 80 V 浓缩约 30 min 左右, 待样品进入分离胶后设置 100 V 至染料移动到距硅胶框底边 1.5 cm, 停止电泳, 关闭电源; 电泳结束后, 考马斯亮蓝 R250 染料染色 15 min, 脱色。

1.6 双向电泳

使用 2 根 24 cm 胶条, 采取主动水化上样, 上样量为 500 μg, 经 2-D clean up 试剂盒处理后, 用水化液 (7 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 2% CHAPS, 40 mmol·L⁻¹ DTT, 0.5% pH 4~7 IPG Buffer,

0.002% 溴酚蓝) 补至体积 450 μL , 将其加入水化盘中, IPG 胶条胶面朝下放入水化盘中, 并加入适量覆盖油。一向等电聚焦设置: 30 V 12 h, 100 V 2 h, 200 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 3 h, 2 000 V 2 h, 8 000 V 3 h, 8 000 V 60 000 V h, 500 V 10 h。一向等电聚焦结束后, 使用 10 mL 平衡液 I (6 mol \cdot L⁻¹ 尿素, 75 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 29.3% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝, 10 mg \cdot mL⁻¹ DTT) 轻摇平衡 15 min, 而后使用 10 mL 平衡液 II (6 mol \cdot L⁻¹ 尿素, 75 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 29.3% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝, 40 mg \cdot mL⁻¹ 碘乙酰胺) 轻摇平衡 15 min。然后在 Ettan Dalt Six 上进行双向垂直电泳, 分离胶浓度为 12.5%^[7]。最后采用银染法染色^[8]。

1.7 凝胶图像分析

使用 ImageScanner III 扫描仪对凝胶进行拍照, 再用双向电泳凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 进行分析。

1.8 胶点蛋白质鉴定

挑选出 23 个蛋白质点, 送深圳华大基因公司进行蛋白质鉴定。本项目使用数据库: Haemophilus-1210(17141seqs), 本项目使用的 Mascot 版本为 Mascot 2.3.02。根据一级、二级谱图信息与数据库进行比对和搜索。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 图谱

H. parasuis 经 SDS-PAGE 显示 (图 1), 在 SDS-PAGE 电泳图谱上条带主要分布在 25~100 ku, 主要条带的相对分子质量大致为 100、85、78、58、48、38 和 27 ku。其中相对分子质量 38、48、58 ku 的蛋白质为高丰度蛋白质。

2.2 双向电泳结果

2.2.1 副猪嗜血杆菌的银染图谱 2 株 *H. parasuis* 分离株, 上样量为 500 μg , 采用银染法显色, 结果如图 2 所示。通过双向电泳凝胶图像分析软件 PDQuest 8.0 对图谱进行分析得出菌株 A 共有 1 105 个蛋白质点, 菌株 B 共有 1 085 个蛋白质点。2 张电泳图谱中大部分的蛋白质点位于 25~100 ku, 相对分子质量小于 10 ku 的蛋白质很少, 其中高丰度的蛋白质点在 38~58 ku, 与一维电泳结果一致。以菌株 A 为对照, 挖取相差 3 倍以上的 23 个差异蛋白质点送去鉴定。

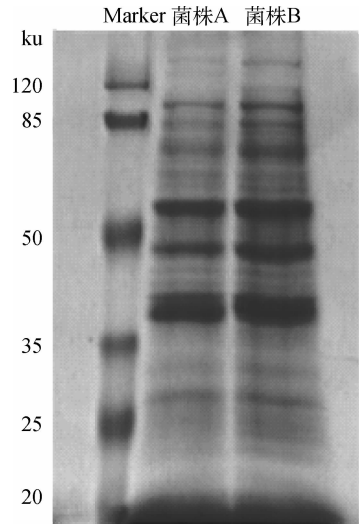


图 1 副猪嗜血杆菌的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of *Haemophilus parasuis*

2.2.2 副猪嗜血杆菌菌株的鉴定结果 统计每个胶点的鉴定情况, 最后确定 23 个胶点蛋白质中, 鉴定到的蛋白质点有 10 个 (图 2, 编号 1~10), 其中菌株 A 为 3 个, 菌株 B 为 7 个, 鉴定成功率为 43.48%。利用二级质谱技术分析, 将获得的差异蛋白质在 SwissP. sprot 在线数据库中检索, 获得这些蛋白质的功能, 具体鉴定结果如表 1。

3 讨论

根据血清型分型方法 *H. parasuis* 可分为 15 种血清型, 但仍有 30% 以上未能分型。目前, 细菌的血清型已普遍作为毒力的标志, 不同的血清型其毒力和致病力都存在差异。本试验首先通过建立和优化 *H. parasuis* 双向电泳方法, 确定了样品处理技术、上样量以及聚焦时间, 再选用 2 株血清 4 型的不同毒力 *H. parasuis* 菌株, 通过比较蛋白质组学技术研究发现同为血清 4 型的 *H. parasuis* 之间存在部分蛋白质差异表达, 提示这些差异蛋白质可能对菌株的毒力造成了影响。

曹会敏等^[9] 运用双向电泳方法对 *H. parasuis* 的毒力和非毒力菌株进行比较蛋白质组学研究, 结果鉴定出 42 个差异蛋白质。B. Zhang 等^[10] 对 *H. parasuis* 血清 4 型菌株 SC096 野毒株和 ompP5 缺失株进行比较分析, 发现缺失株中 ompP5 蛋白的不表达影响了 *H. parasuis* 的总蛋白质表达, 可能会导致新表型的出现。本研究通过优化后的 *H. parasuis* 双向电泳方法, 对 2 株同一血清型不同毒力

表 1 2D 胶点蛋白质 MS+MS/MS 质谱鉴定结果
Table 1 MS+MS/MS results of protein spots in 2-DE gel

| 编号 Spot No. | 蛋白质名称 Protein name | 蛋白质 ID 号 Protein ID | 蛋白质相对分子质量/kDa Protein mass (kDa) | 等电点 Isoelectric point | 分值 Score | 细胞定位 Cellular location | 功能 Function |
|----------------|---|------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------|---------------------------|--|
| 1 | 谷氨酰 tRNA 合成酶 Glutamyl-tRNA synthetase | gi 544683655 | 53.28 | 5.60 | 134/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与蛋白质合成 Protein biosynthesis |
| 2 | 半胱氨酸合成酶 Cysteine synthase | gi 498485421 | 33.67 | 6.81 | 98.4/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与氨基酸合成 Amino-acid biosynthesis |
| 3 | 假设蛋白 Hypothetical protein | gi 507173859 | 22.31 | 4.92 | 156/55 | 细胞质 Cytoplasm | 未知 Unknown |
| 4 | Yae T 蛋白 Outer membrane assembly complex, Yae T protein | gi 544682089 | 90.23 | 6.56 | 123/55 | 细胞外膜 Outer membrane | 外膜蛋白组成部分 Cell outer membrane assembly, protein insertion into membrane |
| 5 | CTP 合酶 CTP synthetase | gi 254813972 | 60.27 | 6.13 | 82.6/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与嘧啶合成 Pyrimidine biosynthesis |
| 6 | 天冬氨酰 tRNA 合成酶 Aspartyl-tRNA synthetase | gi 544679466 | 66.59 | 5.05 | 64.8/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与蛋白质合成 Protein biosynthesis |
| 7 | 天冬氨酰 tRNA 合成酶 Aspartyl-tRNA synthetase | gi 544685451 | 66.63 | 4.99 | 56.6/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与蛋白质合成 Protein biosynthesis |
| 8 | 尿苷激酶 Uridylate kinase | gi 513128237 | 25.75 | 6.52 | 65.2/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与嘧啶合成 Pyrimidine biosynthesis |
| 9 | SecB 蛋白 Protein-export chaperone | gi 529269918 | 19.21 | 4.03 | 67.6/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与蛋白质运输 Protein transport |
| 10 | 天冬氨酰 tRNA 合成酶 Aspartyl-tRNA synthetase | gi 544685451 | 66.63 | 4.99 | 58.7/55 | 细胞质 Cytoplasm | 参与蛋白质合成 Protein biosynthesis |

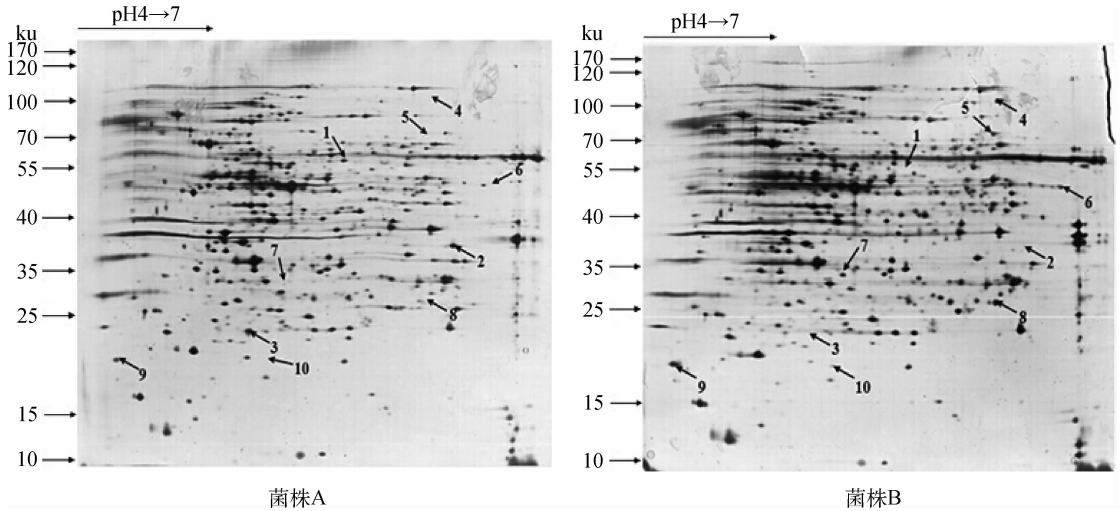


图 2 副猪嗜血杆菌菌株 A、B 的银染图谱

Fig. 2 The silver stain map of *Haemophilus parasuis* strain A and strain B

的菌株 A 和菌株 B 进行蛋白质鉴定,结果鉴定出 10 个差异表达蛋白质,通过数据检索,明确了差异蛋白质的功能。菌株 A 的 3 个上调蛋白质为谷氨酰 tRNA 合成酶、半胱氨酸合成酶和假设蛋白;菌株 B 的 7 个上调蛋白质为天冬氨酰 tRNA 合成酶(3 个)、尿苷激酶、Yae T 蛋白(omp85)、SecB 蛋白、CTP 合酶。蛋白质点 6、7 和 10 鉴定结果为同一蛋白质,都是天冬氨酰 tRNA 合成酶,可能是由于 mRNA 翻译后修饰或是其组成亚基,因此在同一块胶上会显现出多个蛋白质点。

通过将差异蛋白质进行功能分类^[11],其中比例最大的是转录和翻译的酶类,蛋白质合成的忠实性是保证遗传物质稳定的前提条件,特异性氨酰-tRNA 的形成依赖于氨酰-tRNA 合成酶(AARS),且有研究发现 AARS 是一类多功能蛋白质,通过 AARS 之间或者与其他蛋白质形成高度有序的复合物参与到多种重要的生理过程^[12-13]。Yae T 蛋白(omp85)是细菌膜上的成分之一,在蛋白质鉴定结果中表达上调。通过研究发现在细菌膜上存在一类 YaeT 复合物,它参与折叠了外膜蛋白,在大肠杆菌中这类复合物的组成部分包括 Yae T 蛋白和其他三个脂蛋白(YfgL、NlpB 和 YfiO),但具体功能还在研究中^[14]。SecB 蛋白为酸性蛋白,目前只在革兰阴性菌中发现,它作为分泌到细胞膜外蛋白的识别分子,可能具有维持前体蛋白非折叠形式和转运前体蛋白至细胞质内膜侧的双重功能。SecB 蛋白表达量上调可能与 *H. parasuis* 分泌蛋白运输有关^[15]。差异蛋白质功能的明确,为进一步揭示 *H.*

parasuis 的毒力因子及致病机制提供了相关信息。

参考文献(References):

- [1] OLVERA A, CERDÀ-CUÉLLAR M, ARAGON V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing[J]. *Microbiology*, 2006, 152(12): 3683-3690.
- [2] BIGAS A, GARRIDO M E, BADIOLA I, et al. Colonization capacity and serum bactericidal activity of *Haemophilus parasuis* thy mutants[J]. *Int Microbiol*, 2006, 9(4): 297-301.
- [3] ARAGON V, CERDÀ-CUÉLLAR M, FRAILE L, et al. Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 142(3-4): 387-393.
- [4] OLIVEIRA S, PIJOAN C. *Haemophilus parasuis*: new trends in diagnosis, epidemiology and control[J]. *Vet Microbiol*, 2004, 99(1): 1-12.
- [5] CHAKRAVARTI D N, FISKE M J, FLETCHER L D, et al. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates[J]. *Vaccine*, 2000, 19(6): 601-612.
- [6] TOMAZELLA G G, RISBERG K, MYLVAGANAM H, et al. Proteomic analysis of a multi-resistant clinical *Escherichia coli* isolate of unknown genomic background[J]. *J Proteomics*, 2012, 75(6): 1830-1837.
- [7] 张爱玲, 王兴龙, 王英超, 等. 2 型猪链球菌分泌组双向电泳样品制备方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(10): 776-779.

- provement of preparation method of *Streptococcus suis* type 2 secretome sample for two dimensional electrophoresis[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31(10):776-779. (in Chinese)
- [8] 王隆柏,王晨燕,吴学敏,等.高致病性繁殖与呼吸综合征病毒蛋白质组双向电泳方法的建立及优化[J].*中国预防兽医学报*,2012,34(5):365-369.
WANG L B, WANG C Y, WU X M, et al. Establishment and optimization of two-dimensional electrophoresis for proteome of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(5):365-369. (in Chinese)
- [9] 曹会敏,李军星,袁秀芳,等.副猪嗜血杆菌毒力与非毒力菌株菌体蛋白的比较蛋白质组学分析[J].*农业生物技术学报*,2013,21(7):870-878.
CAO H M, LI J X, YUAN X F, et al. Comparative proteome analysis of cytosolic proteins between virulent and avirulent *Haemophilus parasuis*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2013, 21(7): 870-878. (in Chinese)
- [10] ZHANG B, XU C, ZHOU S, et al. Comparative proteomic analysis of a *Haemophilus parasuis* SC096 mutant deficient in the outer membrane protein P5 [J]. *Microb Pathog*, 2012, 52(2):117-124.
- [11] BEVAN M, BANCROFT I, BENT E, et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 485-488.
- [12] HAUSMANN C D, IBBA M. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(4):705-721.
- [13] HAN J M, KIM J Y, KIM S. Molecular network and functional implications of macromolecular tRNA synthetase complex[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303(4):985-993.
- [14] MALINVERNI J C, WERNER J, KIM S, et al. YfiO stabilizes the Yae T complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 61(1):151-164.
- [15] 葛高翔,林其谁.大肠杆菌周质和外膜蛋白的定位[J].*生物化学与生物物理进展*,2000,27(6):597-601.
GE G X, LIN Q S. Targeting of Periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli* [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, 27(6): 597-601. (in Chinese)

(编辑 白永平)