

鸭疫里默氏杆菌强、弱菌株外膜蛋白的比较蛋白质组学研究*

刘 燕 韦 强 鲍国连** 季权安
(浙江省农科院畜牧兽医研究所, 杭州 310021)

摘要 应用双向电泳及质谱技术对血清 2 型鸭疫里默氏杆菌强毒株及其体外传代 200 代(RA200)的弱毒菌株的外膜蛋白进行比较蛋白质组学研究, 借此分析鸭疫里默氏杆菌的外膜蛋白表达特点, 研究差异表达蛋白与细菌毒力的关系. 在实验中检测到血清 2 型鸭疫里默氏杆菌原代及其体外传代获得的弱毒菌株的外膜蛋白约表达 60 个蛋白质点($n=3$), 其中相差 5 倍以上 3 个. 胶内酶解和肽质量指纹图谱分析后鉴定, W1 为热休克蛋白 Hsp20 家族成员, W2、W3 为转座酶, 推测它们可能与里默氏杆菌的毒力密切相关.

关键词 鸭疫里默氏杆菌, 外膜蛋白, 双向电泳, 毒力因子
学科分类号 Q93, S85

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)感染是目前危害养鸭业的一种严重的细菌性传染病. 感染鸭出现急性或慢性败血症、纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎和脑膜炎等发生死亡外, 还可以引起干酪性输卵管炎、关节炎、结膜炎等^[1,2]. 目前已发现 21 个血清型, 各种血清型之间很少有交叉保护性. 不同血清型发病率与死亡率差异很大, 即使同一血清型 RA 毒力也不同^[3]. RA 为革兰氏阴性小杆菌, 无芽胞, 不运动^[4,5]. 国内外虽然对 RA 有一些研究^[6,7], 但是在毒力因子、致病机理、保护性抗原等方面的研究尚未充分展开. 蛋白质组学借助双向电泳高分辨率的特点, 将组织或细胞的蛋白质进行分离, 然后应用生物质谱等技术对分离蛋白质做出鉴定. 目前蛋白质组学研究主要包括两个方面: 一个方面是建立机体组织或细胞的蛋白质组 2D-PAGE 参考图谱和数据库; 另一个方面是通过比较生理和病理条件下(如疾病状态)或疾病不同发展阶段蛋白质成分在表达水平、化学修饰加工以及亚细胞定位等方面的改变情况, 从而发现和鉴定出疾病相关的蛋白质(群), 筛选出特异的生物标志物^[8], 并为进一步治疗药物的筛选提供新的平台^[9,10].

本研究对血清 2 型 RA(RA2)及该菌株传 200 代(RA200)获得的弱毒菌株的外膜蛋白(outer

membrane proteins, OMPs)进行了比较蛋白质组学研究. 主要目的是探讨鸭疫里默氏杆菌毒力相关蛋白, 为进一步了解鸭疫里默氏杆菌致病机制奠定基础.

1 材料与方法

1.1 主要材料

2 型鸭疫里默氏杆菌强毒株, 由本实验室分离、鉴定和保存. IPG 干胶条(长 24 cm, 等电点范围 3~10)载体两性电解质、IPG 缓冲液、二硫苏糖醇(DTT)、尿素、溴酚蓝、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、N, N 甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、TDMED 等均购于 Amersham Bioscience 公司.

1.2 方法

1.2.1 RA 连续传代. RA2 强毒株接种于 TSA 平板上, 37℃ 培养 24~36 h 后传代, 连续传 200 代次.

1.2.2 细菌毒力测定. 两株菌用 PBS 稀释为 1.0×10^{10} CFU/ml, 然后分别作 10 倍倍比稀释至

* 浙江省科技厅重点项目(2008C22032, 2005C12021, 2005E60014).

** 通讯联系人.

Tel: 0571-86400373, E-mail: Baogl@zaas.org

收稿日期: 2007-11-07, 接受日期: 2007-12-04

1.0×10^6 CFU/ml, 将每一稀释度腿部肌肉注射 10 天健康非免疫北京鸭, 每组 10 羽(1 ml/羽), 隔离饲养, 生理盐水作空白对照. 接种后每天观察数次, 连续观察 7 天, 记录各组雏鸭的发病、死亡情况.

1.2.3 RA 外膜蛋白的提取. 参照文献[11]进行. 简要的操作程序描述如下: 两株 RA 接种于 TSA 平板上, 37°C 培养 24 h. 以 0.01 mol/L PBS 洗下菌落, 于 4°C 、 $8\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min, 弃上清液, 重复洗至上清液透明, 将菌泥悬浮于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液中. 用超声波裂解器充分裂解菌体. $8\,000 \text{ r/min}$ 离心 20 min, 弃沉淀(除去大的细菌碎片). $100\,000 \text{ r/min}$ 4°C 离心 2 h. 将沉淀溶解于 1% 十二烷基肌氨酸钠溶液中, 37°C 作用 30 min. $100\,000 \text{ r/min}$ 4°C 离心 1 h, 最后所得到的蛋白质用 5 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 2% SB 3~10, 40 mmol/L Tris, 0.2% Bio-Lyte 3/10 两性电解质 (Ampholyte) 溶解后, 马上使用或 -80°C 保存备用.

1.2.4 蛋白质定量. 用蛋白质分析反应剂(Bio-Rad 公司)定量, 并以泡胀缓冲液进行稀释, 最终使每 $250 \mu\text{l}$ 泡胀缓冲液中含蛋白质 $100 \mu\text{g}$.

1.2.5 固相 pH 梯度双向凝胶电泳. 用 Ettan IPGphor 等电聚焦仪进行第一向等电聚焦, 主要按 IPGphor 等电聚焦系统指南进行, 在 20°C 自动进行 IPG(pH 3~10 非线性胶条)干胶条水化和等电聚焦, 上样量 $100 \mu\text{g}$, 程序设置为 30 V 12 h、 500 V 1 h、 $1\,000 \text{ V}$ 1 h、 $8\,000 \text{ V}$ 6 h、 500 Vh . 等电聚焦结束后, 将 IPG 胶条在平衡缓冲液中于摇床上振荡平衡 $15 \text{ min} \times 2$ 次, 其中第一种平衡液含 1% 二硫苏糖醇(DTT), 第二种平衡液由 2.5% 碘乙酰胺(IAA)取代. 取出平衡后的胶条, 重蒸水冲洗, 滤纸吸干多余水分, 在 Hofer SE 600 垂直电泳槽上进行 SDS-PAGE 电泳, 用厚度为 1.0 mm 、浓度 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶分离, 电泳条件先 15 mA/胶 恒流电泳 30 min, 然后加大到 30 mA/胶 , 恒流电泳至溴酚蓝前沿到达胶最底端 0.5 cm 为止. 凝胶参考按蛋白质银染试剂盒的操作手册进行硝酸银染色, 固定 1 h, 敏化 1 h, 清洗 2 h, 银染 45 min, 清洗 3 次, 每次 3 min, 显色 5 min, 终止 15 min, 获得凝胶图.

1.2.6 双向凝胶图像扫描与分析. 采用 Bio-Rad GS710 扫描仪扫描获取图像, 通过 Imaging Master 凝胶图像分析软件分析所获得的双向凝胶图谱. 用蛋白质点最多的胶为参考胶, 根据蛋白质斑点的大

小、形状、位置等参数, 软件将不同图谱中的相同斑点进行匹配, 匹配不上的斑点视为差异点. 只是在 3 次单独制备的样品之间重复性好的差异蛋白质点才用作进一步的分析.

1.2.7 质谱分析. 按基质辅助激光解吸质谱法(MALDI-TOF-MS), 测定前用胰蛋白酶水解样品, 取水解后的样品 $0.75 \mu\text{l}$ 与基质[新鲜配制 10 g/L 的 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)]等体积混合, 点于靶上, 让靶自然干燥. 最后将靶装入质谱仪, 样品用 4700 串联飞行时间质谱仪[4700 Proteomics Analyzer(TOF/TOFTM)(Applied Biosystems, USA)]进行质谱分析, 激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器, 加速电压为 20 kV , 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据. 仪器先用 myoglobin 酶解肽段进行外标校正. 基质和样品的 PMF 质量扫描范围为 $100 \sim 3\,000 \text{ u}$. 进行完 MS 后, 直接选择与对照基质的 PMF 图有差异的肽段离子进行 MS/MS 分析. 运用 Mascot(<http://www.matixscience.com/cgi>) 搜索 NCBI nr 细菌数据库进行蛋白质鉴定.

2 结 果

2.1 菌株毒力测定

200 代次菌株以 1.0×10^{10} CFU/羽及不同稀释的剂量肌肉注射北京鸭均不致动物死亡, 无发病症状, 而原代株的 LD_{50} 为 1.0×10^6 CFU.

2.2 双向凝胶电泳图谱

我们获得了重复性较好, 分辨率较高的 RA2 及 RA200 外膜蛋白的双向凝胶电泳图谱, 分别见图 1, 平均蛋白质点数分别为 (64 ± 5) 个和 (58 ± 7) 个. 这些蛋白质等电点和分子质量分布范围较广, 图中从左至右为等电点增加, 从上至下为分子质量增加. 通过 ImageMaster 软件分析 RA2 及 RA200 外膜蛋白差异表达的蛋白质点, 获得重

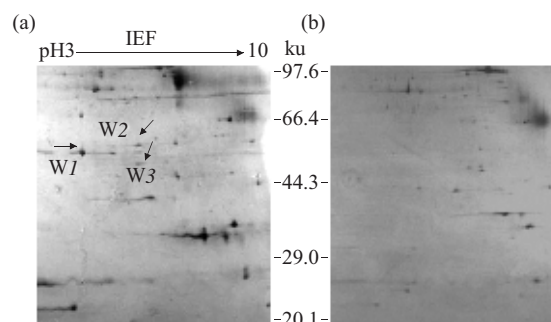


Fig. 1 OMPs profile of *Riemerella anatipestifer* strain RA2(a) and RA200(b) Silver stained 2DE gels with a nonlinear gradient from pH 3 to 10
“↑” shows different proteins.

复性好的差异表达蛋白质点数 3 个, R2 为高表达。

2.3 MALDI-TOF MS

将 3 个差异表达的蛋白质点进行胶内酶解, 将

酶解产物经过 MALDI-TOF MS 分析. 3 个蛋白质点都得到了很好的 PMF 图谱. W1 经鉴定为热休克蛋白为 Hsp20 家族成员, W2 与 W3 PMF 图谱相同, 经鉴定为转座酶(图 2)。

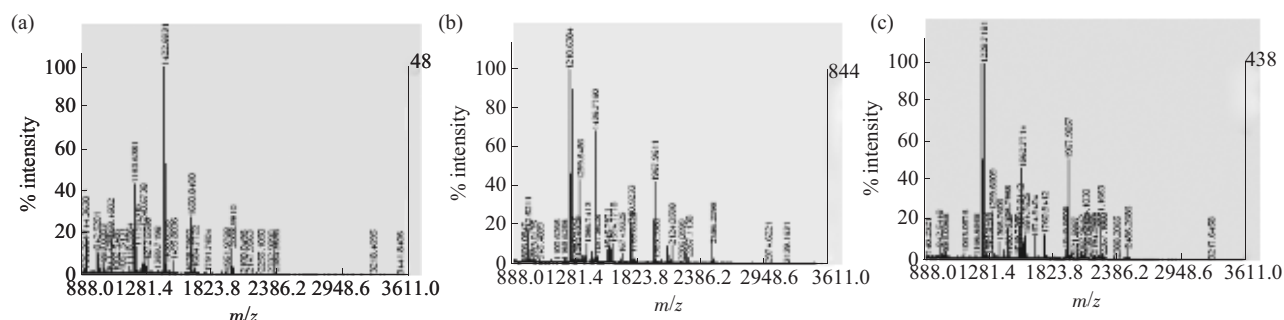


Fig. 2 Peptide mass fingerprint profiles of different protein spots

(a), (b), (c) corresponding to W1, W2, W3.

3 讨 论

外膜蛋白是革兰氏阴性菌外膜的主要结构, 占其全部组成的 1/2. 外膜蛋白在维持外膜结构, 保证物质运输等方面具有重要作用, 与细菌毒力及免疫原性密切相关^[12, 13]. 本研究将临床分离的 RA2 强毒株体外连续传代获得弱毒株, 分别提取两株的外膜蛋白, 首次应用蛋白质组学的双向电泳技术, 建立了重复性好、分辨率高的 RA2 及 RA200 外膜蛋白双向电泳图谱, 并对电泳图谱进行初步分析. 本实验制备的凝胶染色效果好、本底浅, 各点分离清晰, 无明显横向或纵向拖尾, 能满足 2-DE 专业软件分析的需要. 我们的实验结果显示 RA2 及 R200 外膜蛋白表达存在差异, 差异表达蛋白质点数差异 5 倍以上为 3 个, 3 个点在 R2 中都为高表达。

W1 经鉴定为热休克蛋白 Hsp20 家族成员. Hsp20 为低聚物, 为 α 晶体型热休克蛋白, 分子量在 12~43 ku 之间, 通常作为大的低聚物参与构成复合亚基. 该蛋白质的降低会导致膜结构构象的改变, 进一步会导致细菌的某些生物学特性发生改变。

W2、W3 经鉴定为转座酶, 转座酶 (transposase) 是催化转座因子从染色体原来的位置切离下来, 然后插入到染色体新的位置. 对革兰氏阴性菌研究发现, 转座子与细菌的毒力密切相关. 幽门螺旋杆菌感染中, 不仅有 IS605 的插入突变,

还存在其他转座子基因成分参与致病岛的分割, 其中有 45% 的基因与毒力相关^[14]. 流感嗜血杆菌侵袭必需基因有 25 条, 其中 11 条基因参与主要代谢酶的编码^[15]. 痢疾杆菌致病毒力岛均携带有可移动遗传元件, 它与侵袭性大质粒之间在进化及调控方面关系密切^[16]. 强、弱毒株转座酶表达量差异可能与二者毒力变化密切相关。

本研究通过里氏杆菌强、弱毒株的外膜蛋白比较蛋白质组学研究鉴定两个差别表达的蛋白质点, 转座酶与 Hsp20, 这两种蛋白质可能与细菌毒力有关, 具体机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- Higgins D A, Henry R R, Kounev Z V. Duck immune responses to *Riemerella anatipestifer* vaccines. Dev Comp Immunol, 2000, **24** (2~3): 153~167
- Segers P, Mannheim W, Vancanneyt M, et al. *Riemerella anatipestifer* gen. nov, comb. nov, the causative agent of septicemia anserum exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the Flavobacterium-Cytophaga rRNA homology group. Int J Syst Bacteriol, 1993, **43**(4): 768~776
- Brogden K A. *Pasteurella Anatipestifer* Infection. London: Academic Press, 1989. 115~129
- Pathanasophon P, Phuektes P, Tanticharoenyos T, et al. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Pathol, 2002, **31**(3): 267~270
- Layton H W, Sandhu T S. Protection of ducklings with a broth-grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin. Avian Dis, 1984, **28** (3): 718~726
- Weng S C, Lin W H, Chang Y F, et al. Identification of a

- virulence-associated protein homolog gene and ISRa1 in a plasmid of *Riemerella anatipestifer*. FEMS Microbiol Lett, 1999, **179** (1): 11~19
- 7 Crasta K C, Chua K L, Subramaniam S, *et al.* Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. J Bacteriol, 2002, **184**(7): 1932~1939
 - 8 Dodds R A, James I E, Rieman D, *et al.* Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption. J Bone Miner Res, 2001, **16**(10): 478~486
 - 9 Gebriel A M, Subramaniam G, Sekaran S D. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. Trop Biomed, 2006, **23** (2): 194~207
 - 10 Keenan J, Day T, Neel S, *et al.* A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. FEMS Microbiol Lett, 2000, **182**(2): 259~264
 - 11 Gebriel A M, Subramaniam G, Sekaran S D. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. Trop Biomed, 2006, **23** (2): 194~207
 - 12 Chambers G, Lawrie L, Cash P, *et al.* Proteomics: a new approach to the study of disease. J Pathol, 2000, **192**(3): 280~288
 - 13 Mullner S, Nermann T, Lottspeich F. Proteomics-a new way for drug target discovery. Arzneim It telforschung, 1998, **48**(1): 93~95
 - 14 刘炯, 许国铭, 李兆申, 等. 插入序 PUIS605 与 *cag* 致病岛分割在中国人幽门螺杆菌中的不一致性. 第二军医大学学报, 2002, **23** (2): 170~172
 - Liu J, Xu G M, Li Z S, *et al.* Acad J Sec Mil Med Univ, 2002, **23**(2): 170~172
 - 15 Salama N R, Shepherd B, Falkow S. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Hicobacter pylori*. Bacteriol, 2004, **186**(23): 7926~7935
 - 16 刘红, 杨帆, 张笑冰. 痢疾杆菌全基因组序列及基因组岛的分析. 中国工程科学, 2002, **4**(10): 40~47
 - Liu H, Yang F, Zhang X B. Engineering Science, 2002, **4**(10): 40~47

Differential Proteomics of Outer Membrane Proteins Between Virulent and Avirulent Strains of *Riemerella anatipestifer**

LIU Yan, WEI Qiang, BAO Guo-Lian**, JI Quan-An

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract In order to identify virulence factors of the pathogen, the outer membrane proteins of virulent and avirulent strains of *Riemerella anatipestifer* were compared by a proteome analysis. Three protein spots differentially expressed between the two strains were observed by 2-DE gels, and were further analyzed using in gel tryptic digestion and peptide mass fingerprinting. Three proteins were identified. W1 was Hsp20, W2 and W3 were transposon. Although the exact role of these proteins has not been characterized, the exclusive expression in virulent strain may indicate that they play an important role in the pathogenesis of *Riemerella anatipestifer* infection. Although only two virulence factors identified, it opens a path to the further analysis of virulence factors of *Riemerella anatipestifer*.

Key words *Riemerella anatipestifer*, outer membrane proteins, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, virulence factor

*This work was supported by a grant from Science and Technology Plan of Zhejiang Province (2008C22032, 2005C12021, 2005E60014).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-571-86400373, E-mail: Baogl@zaas.org

Received: November 7, 2007 Accepted: December 4, 2007