

温度对嗜水气单胞菌蛋白质表达的影响*

吴谋胜 王三英 彭宣宪

(厦门大学生命科学学院,细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 361005)

关键词 嗜水气单胞菌,蛋白质组学,二维电泳

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 广泛存在于水体中,是水产养殖的重要致病菌。在导致水产养殖业重大经济损失的同时,该菌还可以引起人类急性胃肠炎、败血症等疾病,是颇受关注的一种新人畜共患菌。采用现代生物学技术对其进行深入研究具有重要意义。

热休克应答最早是在真核生物研究中发现的热诱导基因表达现象,现认为普遍存在于从细菌到高等真核生物的整个生物界。目前,研究热休克应答及其基因表达调控的变化主要集中在真核生物领域,而采用蛋白质组学的方法对细菌热休克应答进行研究则少有报道。

蛋白质组学是一门新兴的前沿学科。这一概念是在1995年才提出来的,其产生主要基于人类基因组计划取得的突破性进展。因为随着对基因组研究的深入,人们认识到单纯从基因组信息并不可能完全揭示生命的奥秘。基因的功能必须由其功能的体现者——蛋白质来执行,并且是以组群的方式来完成。由此,蛋白质组学应运而生。其研究技术主要是二维电泳技术和物质谱技术,即先用二维电泳技术对蛋白质进行分离以发现相关变化的蛋白质组群,然后再用物质谱技术对差异蛋白质进行鉴定。本实验采用二维电泳技术对嗜水气单胞菌热休克应答过程中的蛋白表达变化进行研究。

1 材料与方 法

1.1 嗜水气单胞菌

购自中国科学院武汉水生生物研究所菌种站。

1.2 细菌培养及菌体收集

将嗜水气单胞菌接种于牛肉膏蛋白胨培养基,25℃培养24h后,分别于25,32,37,42℃再培养30min,8190 r/min,4℃离心10min,收集菌体;再用生理盐水洗涤菌体3次,8190 r/min,4℃离心10min,收集菌体,称重。

1.3 细菌破碎

取上述各组菌体按1:4的比例(菌重:溶液体积)加入pH7.0,0.01 mol/L的Tris-HCl缓冲液,悬浮菌体后用Visonic 475超声细胞破碎仪(VirTis公司产品)超声破碎。

1.4 电泳样品处理

于超声破碎后的菌液中加入DNase I(终浓度为50 mg/L)和RNase A(终浓度为20 mg/L),37℃处理30min后,加入裂解液处理,11583 r/min,4℃离心10min,取上清进行二维电泳。

1.5 二维电泳

二维电泳按文献[2]进行,电泳结束后用考马斯亮蓝R250染色。GDS 8000pc-凝胶成像分析系统扫描,打印输出照片。

1.6 差异蛋白温度变化的动力学分析

二维电泳凝胶经BioRad凝胶成像系统成像后,用其提供的软件对差异蛋白进行光密度测定,并对温度进行作图。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌可溶性蛋白质的二维电泳分析

采用二维电泳技术,对在25,32,37,42℃条件下培养的嗜水气单胞菌破碎后的可溶性总蛋白进行分析,其电泳结果见图1。从图1可见,所得到的嗜水气单胞菌可溶性蛋白质二维电泳图谱的结果比较理想,各蛋白点之间区分得比较清楚,因而可以进行蛋白质表达的差异分析。

* 国家自然科学基金资助项目39770585号(淡水鱼类血清免疫复合物的免疫生物学)和IFS基金资助项目A/2338-2。

第一作者:吴谋胜,出生于1977年,硕士研究生。E-mail: Wangpeng@jingxian.xmn.edu.cn

收稿日期:2000-11-20;修回日期:2001-03-01

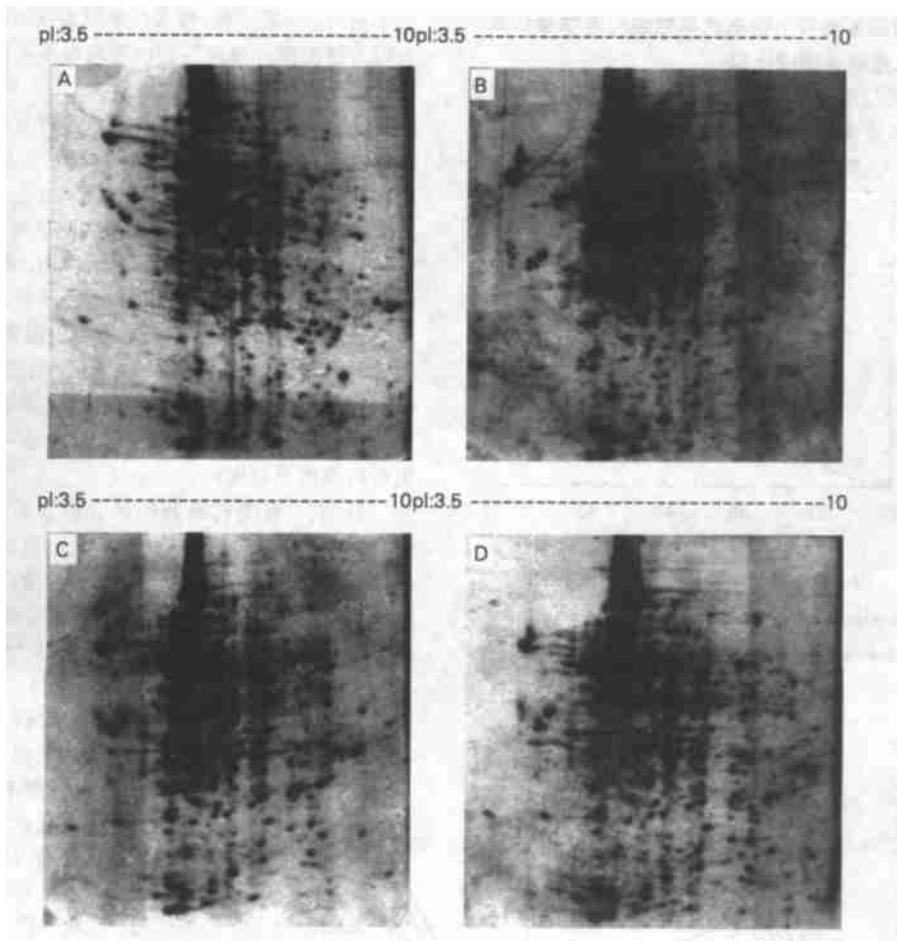


图 1 嗜水气单胞菌可溶性总蛋白的二维电泳分析

A. 25 °C, B. 32 °C, C. 37 °C, D. 42 °C

Fig.1 Analysis of totally soluble proteins of *Aeromonas hydrophila* with two dimensional electrophoresis

A. 25 °C, B. 32 °C, C. 37 °C, D. 42 °C

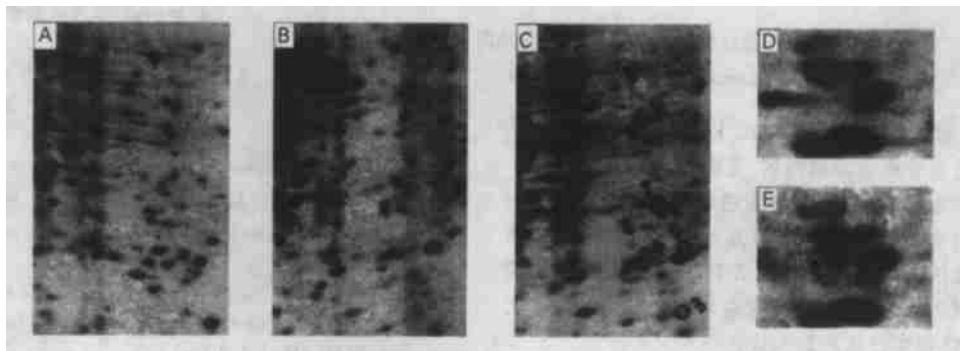


图 2 不同温度诱导的差异蛋白的二维电泳图谱比较(差异蛋白质用 O 表示)

A. 25 °C, B. 32 °C, C. 37 °C, D. 37 °C, E. 42 °C

Fig.2 The comparison of proteins of *Aeromonas hydrophila* with two dimensional electrophoresis at different temperatures .

A. 25 °C, B. 32 °C, C. 37 °C, D. 37 °C, E. 42 °C

2.2 不同温度诱导下嗜水气单胞菌可溶性蛋白质的二维电泳图谱比较

对 4 张二维电泳图谱的分析比较发现,随着温度升高蛋白点逐渐增加,32 ℃较 25 ℃多了 2 个蛋白点,37 ℃较 32 ℃多了 7 个蛋白点,42 ℃较 37 ℃多了 1 个

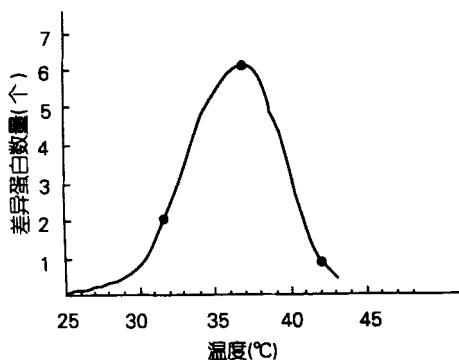


图 3 差异蛋白数量与温度的关系

Fig.3 The relationship between amounts of new proteins and temperature

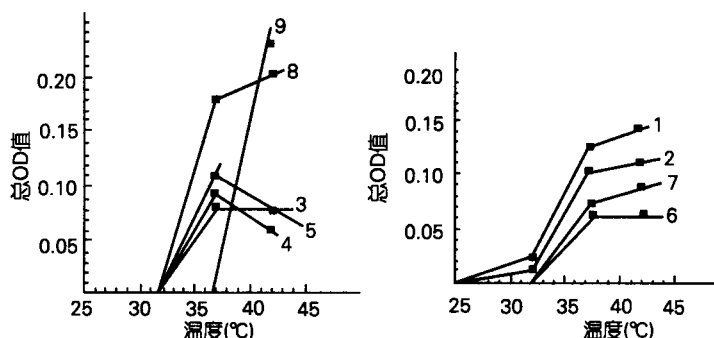


图 4 差异蛋白动力学变化图(蛋白点标号见图 2)

Fig.4 The kinetic analysis of new proteins

蛋白点(差异蛋白用圆圈表示,以下皆同),且这些差异蛋白主要分布在偏碱性区,见图 2。

2.3 不同诱导温度与差异蛋白表达的关系

蛋白数量与诱导温度的关系及差异蛋白点光密度值变化情况见图 3 和图 4。从中可见,新蛋白增加的最适区域为 32~37 ℃,且这些差异蛋白的表达量大部分在 37 ℃均已达到最大值。

3 讨论

采用二维电泳技术,对重要水产病原菌——嗜水气单胞菌的热休克应答过程中的蛋白表达变化进

行了研究。结果发现,嗜水气单胞菌具有热休克反应,表现为随温度升高应答蛋白逐渐增多的现象,这些蛋白可能与该菌的热休克反应有关,深入研究这些蛋白的功能有助于了解该菌对热调节的有关分子基础。同时还发现,嗜水气单胞菌对热休克应答有一个最佳反应区,这个区域位于 32 ℃和 37 ℃之间。当温度低于 32 ℃或高于 37 ℃时,其反应强度明显减弱,这可能是细菌最适生长温度的分子解释。因而,采用蛋白质组学的方法有助于阐明该菌对热适应的有关机理。孙建和等采用 SDS-PAGE 技术研究发现,温度对嗜水气单胞菌外膜蛋白的表达量具有明显影响,但并未有新条带的增加^[1]。这些结果说明,二维电泳是一项具有高度敏感性的分析技术,特别重要的是还可以从蛋白质组群的角度进行探讨。

目前,有关病原菌热休克应答的蛋白质组学的研究虽未见报道,但已有一篇关于固氮菌(*Bradyrhizobium japonicum*)热休克应答的文献^[3],且蛋白质组学的研究在发育生物学、病理学等方面已受到高度重视^[4,5]。作者在研究过程中亦认为,蛋白质组学

是在蛋白质整体水平上对生命活动规律进行研究的良好方法。采用生物质谱分析,可以对嗜水气单胞菌在不同热休克温度间的差异蛋白进行鉴定,确定与热休克应答有关的基因,再通过基因改造,使其成为温度敏感株疫苗,这对水产养殖业具有重要意义。

参考文献

- 1 孙建和,严亚贤,陈怀育等. 温度对嗜水气单胞菌外膜蛋白表达的影响,中国兽医学报,1999, 19(6): 555~558
- 2 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京:科学出版社, 1997. 124~135

- 3 Munchbach M., Dainese P., Staudenmann W. et al.. Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum*, *Euro. J. Biochem.*, 1999, 263: 39~48
- 4 Kanaya S., Ujiie Y., Hasegawa K. et al.. Proteome analysis of *Oncorhynchus* species during embryogenesis *Electrophoresis*, 2000, 21(9): 1907~1913
- 5 Edgar P. F., Schonberger S. J., Dean B. et al.. A comparative proteome analysis of hippocampal tissue from schizophrenic and Alzheimer's disease individuals, *Molecular Psychiatry*, 1999, 4(2): 173~178

EFFECT OF TEMPERATURE ON PROTEIN EXPRESSION OF *Aeromonas hydrophila*

WU Mou-sheng WANG Sai-ying PENG Xian-xian

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, 361005)

Received: Nov., 20, 2000

Key Words: *Aeromonas hydrophila*, Proteomics, Two dimensional electrophoresis

Abstract

Aeromonas hydrophila is one of the importantly pathogenic bacteria of aquaculture and causes great loss. In this experiment we characterized the response of *Aeromonas hydrophila* to heat shock by proteomics and found the significant change on its proteome with the rising of temperature. There were 2 novel proteins in the image at 32 °C compared with the image at 25 °C, 7 novel proteins at 37 °C compared with 32 °C and 1 novel protein at 42 °C compared with 37 °C. These novel proteins were mainly appeared at the alkaline zone. The results can elucidate the molecular mechanism that *Aeromonas hydrophila* is accord with changes of temperature in some extent. The further study to these proteins will contribute to invent a new temperature-sensitive bacterial vaccine.

(本文编辑:刘珊珊)