

米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白质组 及其对温度变化的响应研究*

王 坤¹ 王 沛¹ 张 浩¹ 张树峰¹ 王大志^{1, 2①}

(1. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361102; 2. 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)近年在我国福建、浙江和广东沿海经常形成赤潮,其赤潮不仅影响到海洋生态系统的稳定,也严重威胁到水产养殖以及人类生命健康安全。本论文以米氏凯伦藻为研究对象,建立了米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白质荧光标记技术和细胞膜蛋白质提取方法,运用荧光差异凝胶电泳技术(2-D DIGE)对膜蛋白质进行了分析,并研究了米氏凯伦藻的膜蛋白质组及其对环境温度变动的响应。实验共鉴定到 44 个细胞表面膜蛋白,其中有效注释 27 个,主要为转运蛋白、HSP70 蛋白家族和捕光蛋白等。米氏凯伦藻在 20°C 条件下的细胞生长和光合作用要明显好于 16°C 和 12°C,但 16°C 和 12°C 条件下的差别不大,表明低温限制了米氏凯伦藻的生长。当米氏凯伦藻从 12°C 快速转移至 16°C 和 20°C 时,藻细胞密度和光合作用效率短时间迅速降低,但细胞很快即适应温度变化。细胞膜上的转运蛋白和光合作用蛋白在其适应温度变化中起着重要作用。

关键词 米氏凯伦藻; 温度; 膜蛋白质; 蛋白质组; 差异荧光凝胶电泳技术

中图分类号 Q946; Q948.885.3; X55 **doi:** 10.11693/hyhz20180700189

米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi* Hansen)是一种单细胞浮游植物,属于裸甲藻目,可以产生鱼毒素和溶血性毒素,近年来常在我国近岸尤其是浙江、福建和广东沿海形成藻华,给渔业养殖造成了巨大的损失。米氏凯伦藻没有细胞壁,其细胞膜直接和外界环境相接触,因此细胞表面的膜蛋白可能在营养盐的跨膜转运、细胞通讯、信号应答和能量传递等方面起着非常重要作用(Musil *et al.*, 1990; Snyders *et al.*, 1999; Hicke *et al.*, 2003),对调控细胞的基本生理功能甚至藻华的形成可能有重要作用,但目前这方面的研究非常缺乏,一定程度上也限制了我们对米氏凯伦藻藻华形成机制的认识。

细胞表面膜蛋白质的研究一直是生命科学领域的重点。目前国内外已建立了多种研究方法,直接对细胞表面的膜蛋白进行标记是一种常用的方法。早期

的研究是对整个细胞表面膜蛋白进行生物素化(Palenik *et al.*, 1995)和矢量标记(Bertomeu *et al.*, 2003),但是这样的处理方法会导致膜蛋白溶解度降低,只能鉴定到少数蛋白质。近来有学者利用荧光染料在体内和体外标记无细胞壁的人类细胞株系(Mayrhofer *et al.*, 2006)和细菌表面膜蛋白(Anaya *et al.*, 2007)。通过直接标记人类单核细胞表面膜蛋白的方法,推测出单核细胞的活性和氧化压力受病毒影响,但不影响病毒感染的动力学(Kadiu *et al.*, 2009)。Li 等(2012)也将荧光染料标记方法应用于藻亚历山大藻细胞表面蛋白研究,通过直接标记,鉴定到 38 个细胞表面蛋白。这些研究表明,荧光染料可直接用于标记细胞表面蛋白,开展细胞表面膜蛋白研究。

研究表明,东海海域的藻华演替与温度具有很好的相关性(张传松, 2008)。我国闽浙沿海的米氏凯

*国家重点研发计划资助项目, 2017YFC1404300 号。王 坤, 硕士, E-mail: xmu12223@163.com; 同等贡献第一作者: 王 沛, 硕士研究生, E-mail: 982729976@qq.com

通信作者: 王大志, 教授, 博士生导师, E-mail: dzwang@xmu.edu.cn

收稿日期: 2018-07-30, 收修改稿日期: 2018-11-05

海藻藻华通常发生在每年的 5、6 月份, 此时海水温度升高迅速, 因此推测米氏凯伦藻藻华暴发与海水升温存在一定的关联性。沈鑫绿等(2014)发现在东海海水温度较常年高时, 米氏凯伦藻藻华暴发几率会增大; 而当东海海区海水温度较常年下降时, 东海原甲藻赤潮暴发几率会增大。因此, 研究米氏凯伦藻对环境温度变化的响应对可能有助于揭示其藻华形成机制。

本文利用荧光染料标记技术, 建立了米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白标记、分离和鉴定方法, 并且比较了不同温度培养条件下米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白表达的差异, 探讨了这些膜蛋白在米氏凯伦藻适应环境温度变化时的作用。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

本实验所用米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)由厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室海洋藻类收集中心(CCMA)所提供, 编号 CCM-083, 于 2012 年分离于中国福建苏澳海区(25°37'N, 119°42'E)。藻细胞培养在 K 培养基中(Keller *et al.*, 1987), 培养条件为: 海水盐度 30, 光照强度 100 μ E/(m²·s), 温度(20 \pm 1) $^{\circ}$ C, 光暗周期为 14h:10h。培养用海水采自厦门湾, 使用前用 0.22 μ m 滤膜过滤后灭菌。温度实验设置五组(12 $^{\circ}$ C, 16 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C, 12 $^{\circ}$ C \rightarrow 16 $^{\circ}$ C, 12 $^{\circ}$ C \rightarrow 20 $^{\circ}$ C), 每组 6 个平行, 变温组在第五天变温, 藻细胞在实验前经过相应温度驯化。

1.2 生长参数测定

每天在固定时间(光照周期第 8 小时左右)采集细胞计数样 1mL 加入鲁格试剂后在光学显微镜下进行细胞计数, 计算各培养液中的细胞密度。另取 5mL 藻液, 在相应培养温度下暗处理 5—10min 后读取 F_v/F_m 值, 测定 PSII 最大光化学量子产量。

1.3 细胞样品收集及处理

各组的藻液在指数期时通过离心(1000g, 5min)收集藻细胞。细胞表面膜蛋白质标记所用的染料为 Amersham[™] CyDye DIGE Fluors (mimimal dyes) 荧光染料, 通过蛋白质分子上的赖氨酸残基与染料 N-hydroxy-sulfosuccinimide (NHS) 的酯基团共价结合, 如图 1 所示。

将收集的藻细胞用 1mL 磷酸盐缓冲溶液 PBS (0.02mol/L phosphate, 0.45mol/L NaCl, pH 7.5) 洗涤, 加入 Hank's 平衡缓冲溶液 HBSS (5.33mmol/L KCl,

413.79mmol/L NaCl, 1.26mmol/L CaCl₂, 4.17mmol/L NaHCO₃, 0.407mmol/L MgSO₄, 0.493mmol/L MgCl₂, 0.338mmol/L Na₂HPO₄, 5.56mmol/L D-Glucose, 0.441mmol/L KH₂PO₄) 后于 4 $^{\circ}$ C, 800g 离心 5min, 沉淀重悬于 200 μ L HBSS (含 1mol/L urea, pH 8.5) 缓冲溶液中, 加入 600pmol 的 cy5 染料(温度实验标记方案如表 1 所示), 于 4 $^{\circ}$ C 暗处孵育 20min 进行标记处理。反应完后加入 20 μ L 10mmol/L 的 lysine, 4 $^{\circ}$ C 暗处反应 10min 后 4 $^{\circ}$ C, 800g 离心去上清液。用 500 μ L HBSS (pH 7.4, 盐度 30) 的缓冲液洗涤 2 次, 4 $^{\circ}$ C, 800g 离心 5min 去上清液后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

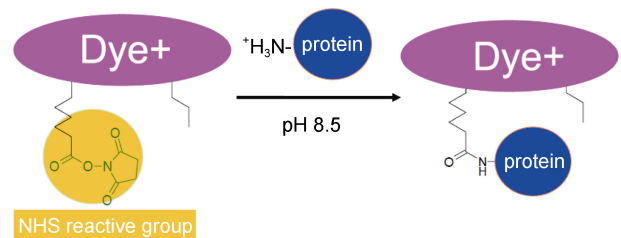


图 1 2-D DIGE 标记细胞表面蛋白质原理(李成, 2011)
Fig.1 Schematic diagram of protein labeling for a cell surface membrane

表 1 2D-DIGE 实验设计
Tab.1 The 2D-DIGE experimental design

gel	cy2	cy5
1	内标	16 $^{\circ}$ C
2	内标	20 $^{\circ}$ C
3	内标	12 $^{\circ}$ C \rightarrow 20 $^{\circ}$ C
4	内标	12 $^{\circ}$ C
5	内标	12 $^{\circ}$ C \rightarrow 16 $^{\circ}$ C
6	内标	12 $^{\circ}$ C \rightarrow 16 $^{\circ}$ C
7	内标	12 $^{\circ}$ C
8	内标	12 $^{\circ}$ C \rightarrow 20 $^{\circ}$ C

1.4 蛋白质提取与定量

将标记的藻细胞样品通过 trizol 提取法提取大部分蛋白, 然后结合顺序提取法提取膜蛋白。第一步向样品中加入 trizol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 按照之前报道的方法进行提取(Wang *et al.*, 2013); 第二步参照 Molloy 等人的方法进行提取(Molloy *et al.*, 1998), 并向得到的上清液中加入 20% TCA/丙酮(W/V), 震荡充分混匀后放置于 -20 $^{\circ}$ C 过夜。4 $^{\circ}$ C, 20000g 离心 30min 后向沉淀中加入 1mL 含有 20mm DTT 的 100%丙酮, 4 $^{\circ}$ C 静止 30min, 相同条件下离心, 取沉淀并重复此步骤 3 次。向沉淀中加入适量重溶胀液使蛋白溶解。提取的蛋白使用 GE

healthcare[™]公司的 2-D quant kit 试剂盒进行蛋白定量, 在 480nm 吸收波长下用酶标仪测定 BSA 标准和样品的吸光值, 绘制 BSA 浓度标准曲线, 以标准曲线计算每个样品的蛋白浓度。

1.5 蛋白质分离与鉴定

使用 2-D DIGE 方法对标记的细胞表面膜蛋白进行分离, 双向电泳的等点聚焦条件如表 2 所示。蛋白样品溶液分别加入 1% DTT 和 0.5% IPG buffer, 用重溶液(RB)补齐至 450 μ L, 混匀后 15000g 离心 20min

取上清液。使用 pH 4—7 的 IPG 胶条, 按照表 2 设置的等电聚焦程序进行蛋白质一向分离。等电聚焦结束之后立即将胶条在平衡液 (6mol/L urea, 50mmol/L Tris, pH 8.8, 30% V/V glycerol, 2% SDS, a trace of bromophenol blue, 1% DTT)和平衡液 (6mol/L urea, 50mmol/L Tris, pH 8.8, 30% V/V glycerol, 2% SDS, a trace of bromophenol blue, 2.5%碘乙酰胺)各平衡 17min, 之后进行第二向 SDS-PAGE 电泳, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%。

表 2 24cm IPG 预制胶条(pH 4—7)等电聚焦程序

Tab.2 The procedure of the IEF for 24cm IPG strip

步骤	电压	时间(h)/ 伏.小时(V.h)	升压类型	温度(°C)	电流(μ A)
1	100	6h	step	20	<75
2	500	30min	grad	20	<75
3	1000	30min	grad	20	<75
4	2000	1h	grad	20	<75
5	10000	1h	grad	20	<75
6	10000	60kVh	step	20	<75
合计			20h/78kVh		

使用 typHoon 9500 荧光扫描仪对得到的胶图进行扫描, 参数设为扫描滤光片波长为 633nm, 发射波长为 670nm。温度实验部分中 cy2 内参样品参数设为扫描滤光片波长为 488nm, 发射波长为 520nm。扫描的图像用 decyder[™] 2D 7.2 软件进行分析, 利用 decyder 7.2 软件中的 differential in-gel analysis (DIA) 模块对胶内蛋白点进行识别检测, 同时以 cy2 内参样品的荧光强度对胶内另一个蛋白荧光点进行归一化分析。设置参数为: 点数为 2500, 最大容量小于 30000。对不同温度条件下蛋白质数据进行 *t*-test 和 ANOVA 方差分析, 找出相互之间差异表达的蛋白质点并生成差异列表。蛋白质丰度差异值大于 1.5 倍并且统计学 *P* 值小于 0.5 认为是可信的, 后进行下一步的酶解和质谱鉴定。将凝胶保存在 3%乙酸之中, 4°C 保存以备后续挖点鉴定。

1.6 蛋白质酶解与分析

根据荧光扫描结果, 切下荧光对应的蛋白质点胶粒, 脱色后加入适量酶液(10ng/ μ L, 用 10mmol/L 的碳酸氢铵溶解胰蛋白酶)覆盖胶粒, 然后置于 4°C 下 30min 使胶粒充分溶胀。加入 10mmol/L 碳酸氢铵覆盖胶粒, 50°C 空气中放置 2h。酶解完的肽段样品采用 AB SCIEX 5800 MALDI TOF/TOF[™] MS 质谱仪进行鉴定分析。同时使用 Sequenzym peptide 标准试剂

盒(AB SCIEX)对质谱仪进行校准, AB SCIEX 自带的 TOF/TOF[™] series explorer[™] 软件做一级质谱同时自动选择母离子进行二级质谱。一级模式设定: 激光脉冲频率为 400Hz; 并进行 1000 次激光打击形成一级图谱; 质荷比扫描范围选择 850—4000Da; 信噪比 (S/N)为 10; 其局部的噪音窗口宽度的质荷比为 250, 最小半峰宽为 2.9bins。二级模式之下: 激光脉冲频率为 1000Hz; 进行 2000 次激光打击, 并累积成图。每一个分析的蛋白点选择 15 个一级质谱的谱峰 S/N 大于 50 的母离子进行 MS/MS 串联二级质谱分析。MALDI TOF/TOF 质谱鉴定的结果采用 GPS Explorer 3.5 软件包以及 MASCOT 2.2 数据库搜索软件对蛋白质谱一级、二级质谱结果进行联合搜库(Wang *et al*, 2011)。将鉴定到的蛋白质用 iProClass 数据库和 Toulza 等(2010)报道的结果进行 GO 功能注释。

2 结果

2.1 细胞表面膜蛋白标记及鉴定

米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白经过荧光染料 cy5 标记后用 trizol 提取法结合顺序提取法提取, 蛋白质双向凝胶电泳分离结果如图 2 所示。通过软件分析对比, 共检测到 44 个蛋白质荧光点, 它们可能是细胞表面蛋白。

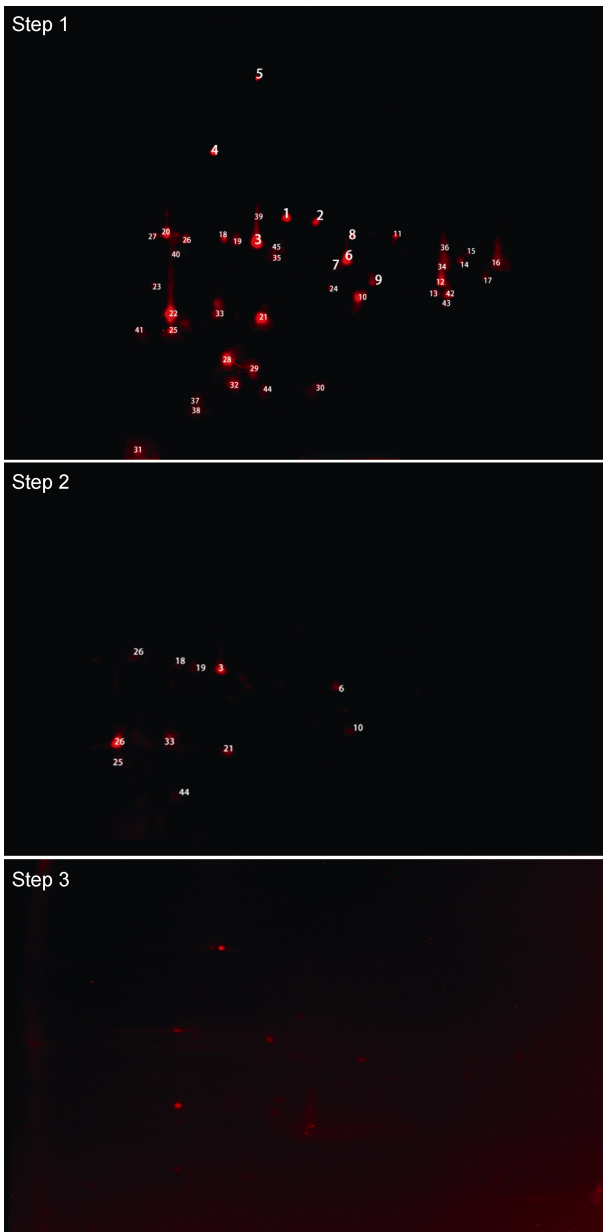


图 2 米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白三步提取法的双向凝胶电泳荧光图

Fig.2 The 2-D map of cell surface membrane proteins extracted using sequential extraction

将 44 个荧光蛋白质点酶解后用 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定到 27 个可信蛋白, 其中在甲藻纲蛋白质数据库中鉴定到 11 个可信蛋白(表 3); 通过 *de novo* 结合 MS-blast 鉴定到 16 个可信蛋白(表 4), 其他 17 个蛋白质点未能被鉴定。在所鉴定的蛋白质中存在蛋白异构体, 在胶图上的分子量和等电点存在差异, 但都被鉴定为同一类蛋白, 这可能是同一个蛋白家族的异构体或只是同一个基因表达产物的不同修饰体(Hockin *et al.*, 2012)。

对鉴定到的 27 个蛋白质进行 GO 功能注释分类,

结果如图 3 所示。其中膜蛋白共 9 个占 33%, 叶绿体的类囊体蛋白 7 个占 26%, 未得到分类的蛋白质 7 个占 26%, 其他少数蛋白质被注释到胞内蛋白。

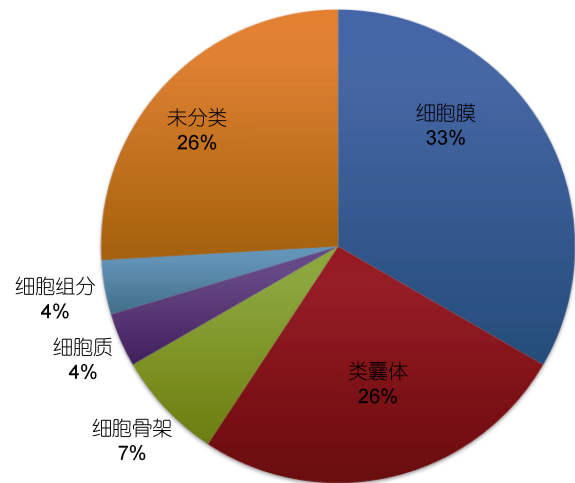


图 3 基于细胞成份组成的 GO 注释分类

Fig.3 The GO classifications of the annotated proteins

2.2 温度实验结果

米氏凯伦藻在 20°C、16°C 和 12°C 三个温度条件下经过 4 个月的温度驯化后生长情况如图 4 所示。20°C 条件下米氏凯伦藻始终处于较快生长状态, 在 16°C、12°C 条件下米氏凯伦藻生长缓慢。在第 4 天将 12°C 条件下的米氏凯伦藻分别转移到 20°C 和 16°C 条件下, 转到 20°C 条件下的藻细胞密度出现了短暂降低的现象, 之后细胞进入快速生长状态, 而转到 16°C 条件下的藻细胞生长较缓慢。

五个温度梯度条件下米氏凯伦藻的最大光化学量子产量(F_v/F_m)如图 5。20°C 条件下最大。当第 4 天变温时, 在第 5 天 12°C→20°C, 12°C→16°C 两组的 F_v/F_m 降低, 特别是在 12°C→20°C 组, 之后迅速恢复正常。

对五种温度处理条件下的米氏凯伦藻表面蛋白进行 2D-DIGE 分离, 并用 Decyder 7.0 软件对各组样品间差异蛋白进行识别分析。两两温度之间差异表达的蛋白满足统计学意义且蛋白丰度变化大于 1.5 倍的蛋白共有 6 个, 如图 6 和表 5 所示。

用 AB SCIEX 5800 MALDI-TOF/TOFTM MS 质谱对 6 个差异表达蛋白质进行鉴定, 均为可信的蛋白且其表达变化如表 6 所示。注释到 4 个可信蛋白。其中 2 个蛋白质(点 135, 点 165)注释为 transport, 1 个蛋白质(点 158)注释为 cellular protein modification process, 1 个蛋白质(点 292)被注释到 generation of precursor metabolites and energy。另外两个蛋白未得到有效注释。

表 3 在 NCBI 甲藻蛋白数据库中鉴定到的 11 个蛋白质
Tab.3 The proteins identified in the NCBI nr database

胶点	蛋白名称	物种	NCBI 登录号	理论分子量 (Da)	理论等电点 pI	匹配肽段数	蛋白质得分	得分置信度 (%)	总离子得分	总离子置信度 (%)
4	3; short=pep	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i>	297385107	44544.5	4.78	5	60	99.345	44	99.906
5	bip /heat shock protein 70	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20198944	74439.3	5.15	18	558	100	485	100
7	light-harvesting protein	<i>Symbiodinium</i> sp. c3	306430545	66010.2	7.6	3	78	99.989	72	100
8	light-harvesting protein	<i>Symbiodinium</i> sp. c3	306430563	54070.4	7.74	4	53	96.866	44	99.916
9	chloroplast light harvesting complex protein	<i>Heterocapsa triquetra</i>	58613555	26741.7	6.17	3	57	98.534	46	99.939
11	putative chloroplast light harvesting protein	<i>Lepidodinium chlorophorum</i>	338746086	20253.2	5.8	3	59	99.137	46	99.952
16	chloroplast light harvesting protein isoform 12	<i>Karlodinium veneficum</i>	77024193	42318.4	5.4	4	100	100	89	100
20	chloroplast light harvesting protein isoform 8	<i>Karlodinium veneficum</i>	77024185	42628.5	5.27	5	96	100	82	100
25	chloroplast light harvesting protein isoform 5-like protein	<i>Karlodinium veneficum</i>	157093103	18701.6	9.25	3	52	95.257	42	99.836
41	chlorophyll a/b-binding protein isoform 4 /actin-related protein - arp5p	<i>Karlodinium veneficum</i>	255965856	24033.4	5.85	4	60	99.248	43	99.881
44	photosystem ii d2 apoprotein (chloroplast)	<i>karenia mikimotoi</i>	422034799	16031.8	4.8	4	94	100	70	100

表 4 *de novo* 测序及 *ms-blast* 鉴定的 16 个可信蛋白质
Tab.4 The proteins identified by *de novo* sequencing and MS blast

胶点	蛋白名称	物种	登录号	总高分片段数	匹配肽段数	匹配肽段且高分片段数>62	两个独立肽段且高分片段数>104	三个独立肽段且高分片段数>134
1	membrane protein	<i>Prevotella sp. oral taxon 317</i>	496523478	64	1	1		
2	hypothetical protein dappudraft_302881	<i>Daphnia pulex</i>	321470999	159	4			
6	hypothetical protein, conserved	<i>Toxoplasma Gondii me49</i>	237837237	207	4	1	y	y
10	light-harvesting protein, partial	<i>Symbiodinium sp. c3</i>	306430557	173	3	1	y	y
14	hypothetical protein	<i>Oribacterium sp. oral</i>	496506261	67	1	1		
15	efflux transporter, rnd family, mfp subunit	<i>Bradyrhizobium sp. dfci-1</i>	540135867	149	2	2	y	
17	nodulation receptor kinase	<i>Mellilotus albus</i>	21698802	95	2	1		
19	ABC transporter substrate-binding protein	<i>Streptomyces himastatinicus</i>	497403020	71	1	1		
27	membrane protein	<i>Achromobacter piechaudii</i>	493248717	129	3	1		
28	predicted: keratin, type ii cuticular hb2	<i>Equus caballus</i>	194212013	171	3			y
30	protein hum-10	<i>Caenorhabditis elegans</i>	392925914	110	2	1	y	
32	ABC transporter substrate-binding protein	<i>Subdoligranulum sp.</i>	496683461	105	2	1	y	
33	traf3-interacting protein 1	<i>Myotis brandtii</i>	521024389	147	3			y
35	light harvesting protein	<i>Emiliana huxleyi ccmp1516</i>	551555397	254	5	1	y	y
38	hypothetical protein trividraft_138892	<i>Trichoderma virens gy29-8</i>	358387764	68	1	1		
39	rhodanese-like domain-containing protein	<i>Colletotrichum graminicola m1.001</i>	310795854	100	2	1		

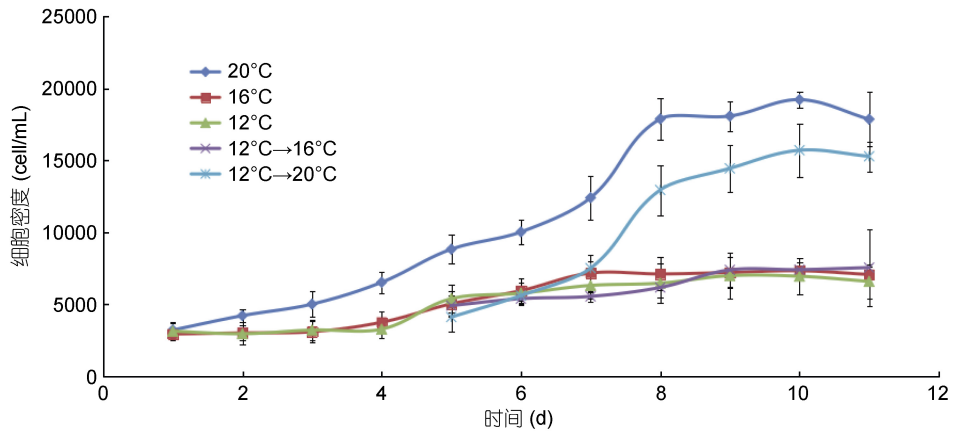


图 4 米氏凯伦藻在不同温度梯度条件下的生长曲线
Fig.4 Growth curves of *K. mikimotoi* at different growth temperatures

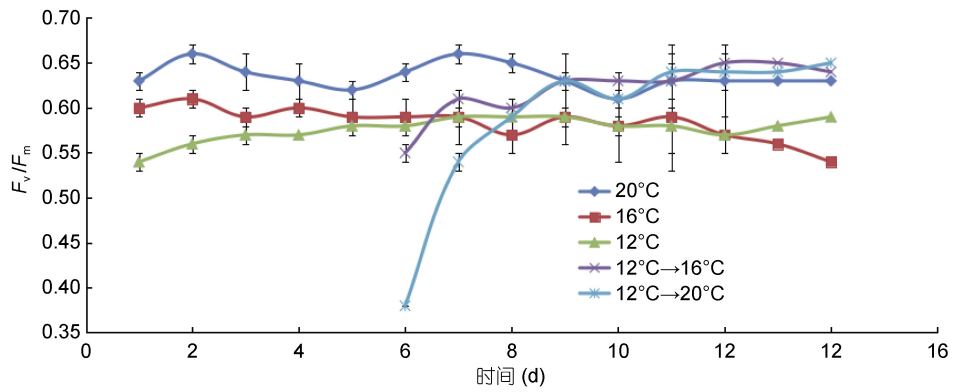


图 5 米氏凯伦藻 5 个温度梯度下 F_v/F_m 变化
Fig.5 Variations of F_v/F_m of *K. mikimotoi* at different growth temperatures

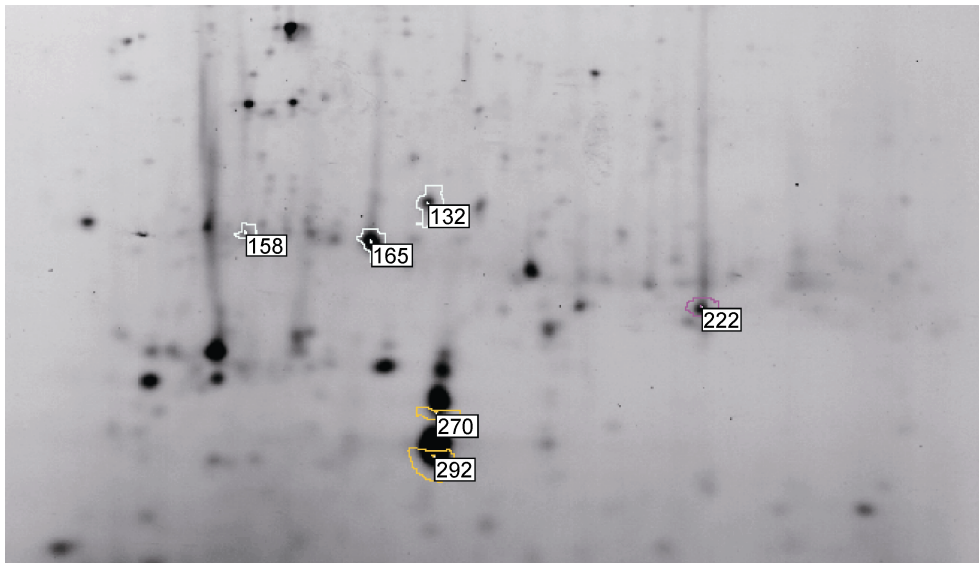


图 6 米氏凯伦藻细胞表面蛋白质组凝胶电泳图
Fig.6 The 2D map of differential expression membrane proteins of *K. mikimotoi*

表 5 差异表达蛋白统计
Tab.5 Overview of differentially expressed proteins

温度对比方案*	上调蛋白个数	下调蛋白个数
12°C/20°C	2	0
16°C/20°C	1	0
12°C/16°C	0	0
12°C→20°C/20°C	1	2
12°C→16°C/16°C	1	4
12°C→16°C/12°C	1	3
12°C→20°C/12°C	1	4
12°C→16°C/12°C→20°C	0	0

注: *温度对比方案以“/”后为参照基准

表 6 差异表达蛋白
Tab.6 Differentially expressed proteins

胶点	NCBI ^b	蛋白名称
132	496523478	TonB-linked outer membrane protein
158	77024185	L-cystine transport system permease protein TcyB
165	505821775	Photosystem II D2 apoprotein (Fragment)
222	519111539	Hypothetical protein
270	548247975	Hypothetical protein
292	422034799	Chloroplast light harvesting protein isoform 8

3 讨论

3.1 米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白

用 2D-DIGE 染料标记细胞表面膜蛋白技术已经被应用于研究人类细胞(Mayrhofer *et al*, 2006; Kadiu *et al*, 2009)、浮游藻类(Li *et al*, 2012)以及细菌(Anaya *et al*, 2007)等。这种方法克服了以往生物素和同位素标记方法(Palenik *et al*, 1995)导致的膜蛋白疏水性增加和影响后续蛋白质鉴定等问题, 在生命科学研究领域具有较好的应用前景。

本文运用蛋白质荧光标记技术、顺序提取法和凝胶电泳分离技术对米氏凯伦藻细胞表面膜蛋白质进行了研究。从凝胶电泳的荧光图可以看出, 三步提取方法中第一步用 trizol 试剂能将细胞内大部分蛋白提取出来, 说明大部分是未被荧光染料标记的胞内蛋白。实验中所得到胶图的荧光点只有几十个, 根据基因组开放阅读框预测的膜蛋白可以占到其整个基于

组的 20%—30% (Wallin *et al*, 1998), 而胶图上的荧光点只有几十个, 这可能是这些膜蛋白丰度较低且被胞内高丰度蛋白掩盖(Mitra *et al*, 2007), 因而即使基于高灵敏度的荧光染料标记蛋白法也很难被检测到(Marouga *et al*, 2005)。第二步及第三步的荧光点和第一步的荧光点基本上重合, 表明第一步包含了后续两步的大部分膜蛋白。在上样量相同的情况下, 第二、三两步凝胶电泳所得到的荧光点很少, 可能是由于膜蛋白比较难溶, 用基于凝胶的方法分离, 在第一向等电聚焦时不能完全溶解, 导致蛋白质的丢失(Luche *et al*, 2003)。

对已鉴定到的蛋白进行细胞成分 GO 注释, 发现了与底物转运有关的 ABC transporter substrate-binding protein。ABC 转运蛋白作为细胞膜蛋白非常重要的组成成分, 其蛋白质超家族是目前已知的从原核生物到人类最古老的蛋白家族之一(Verrier *et al*, 2008), 在大肠杆菌中 ABC 转运蛋白占整个基因组的 5%(Higgins *et al*, 2004)。所有 ABC 转运蛋白都含有非常保守的跨膜结构域和 ATP 结合结构域, 具有执行物质运输、胁迫响应和细胞间通讯等多种功能(Rea, 2007)。本研究还鉴定到了藻细胞表面 heat shock protein 70 (HSP70)分子伴侣蛋白。Li 等(2012)在利用 2D-DIGE 荧光染料标记链状亚历山大藻细胞表面膜蛋白时, 同样鉴定到 HSP70c 和 HSP70 两个热休克蛋白。研究表明, HSP70 可以存在于细胞表面(Kornilovs *et al*, 2002; Jang *et al*, 2003; Shin *et al*, 2003)。在氧化胁迫和热休克情况下, 细胞中的 HSP70 可以稳定溶酶体膜结构的稳定性, 阻止溶酶体的裂解(Nylandsted *et al*, 2004), 通过阻止细胞色素 c 和组织蛋白酶的释放去控制细胞凋亡过程(Bivik *et al*, 2007)。然而 HSP70 可能并非通过典型的分泌途径到达细胞膜表面(李成, 2011), 而具体是如何转移到细胞膜上未知。efflux transporter, RND family, MFP subunit 是跨膜结构的协同转运蛋白超家族(MFS transporter)以及相关的 nodulation receptor kinase、MFS transporter 这类蛋白质是通过膜内外底物浓度不同来转运的次级蛋白转运超家族(Maloney, 1990, 1992; Holmes *et al*, 2012)。研究中还鉴定到两个 membrane protein, 这可能是由于利用 *de novo* 从头测序结合 MS-blast 同源搜索只是鉴定到符合膜蛋白结构的部分肽段, 具体是何种蛋白质还不能确定。这些结果表明米氏凯伦藻的细胞膜具有较强的物质转运能力和抗逆能力。

本研究中,除了鉴定到与表面膜相关的蛋白质以外,还鉴定到一些在叶绿体类囊体上参与光合作用的捕光蛋白的不同亚基。一般认为捕光蛋白存在细胞内,然而在本研究中被大量鉴定,这可能一方面是它占类囊体膜上叶绿素总量的40%—60%,另一方面在利用荧光染料进行细胞表面标记时,由于米氏凯伦藻特殊的形态结构,叶绿体与细胞膜紧密接触以及鞭毛与细胞膜相连导致捕光蛋白和细胞骨架蛋白被荧光染料标记。米氏凯伦藻的捕光蛋白存在跨膜特性并锚定在类囊体上,用来捕捉更多的光能用于光合作用或其他生理功能,这可能是米氏凯伦藻对光利用的一种特殊机制。同时鉴定到组成光合系统的 photosystem d2 apoprotein 和 chlorophyll *a/b*-binding protein isoform 4 /actin-related protein - arp5p, d2 蛋白质具有5个跨膜区域,这两个蛋白被荧光染料标记上的原因尚不清楚。

此外,本研究中还鉴定到 protein hum-10、Traf3-interacting protein 1 和 Rhodanese-like domain-containing protein 以及一些假想蛋白质,它们的功能尚不明确,这些蛋白质可能是目前未知的细胞表面膜蛋白质,有待后续继续深入研究。

3.2 米氏凯伦藻对温度变化的响应

米氏凯伦藻在 20°C、16°C 和 12°C 三个温度经长期驯化后,20°C 条件下第2天细胞即进入快速生长期,而 16°C 和 12°C 条件下细胞生长缓慢。在第4天进行快速变温后,12°C→20°C 和 12°C→16°C 两组的米氏凯伦藻细胞密度短期迅速减少,PSII 最大光化学量子产量(F_v/F_m)也迅速降低,这可能与短时间内温度骤变导致米氏凯伦藻细胞生理不适有关,这与现场海水温度逐渐升高(郭伟其等,2005)的情况有所不同。但随后两组变温的细胞逐渐恢复并适应新的温度环境,表明米氏凯伦藻对于温度变化的适应能力较强。因此我们猜想:在环境温度缓慢升高时,米氏凯伦藻生长速率较慢而无法竞争过硅藻等其他藻类,不利于其形成藻华;但当环境温度快速升高时,米氏凯伦藻较其他藻类适应性更快,可以率先占据营养盐等资源,从而有利于其藻华的形成。

通过比较 20°C、16°C 和 12°C 三个温度梯度以及 12°C→20°C, 12°C→16°C 膜蛋白质组的变化,发现了6个蛋白质的表达发生显著变化。在 16°C 和 12°C 之间,膜蛋白质组水平上两者之间没有显著差异。这可能是由于 12°C 和 16°C 与米氏凯伦藻最适生

长温度范围 20—24°C 相差较远,低温抑制了细胞活力,导致两者的差异较小。

TonB-linked outer membrane protein (点 132)是一种重要的质子驱动膜转运蛋白,主要参与环境中铁(Lundrigan *et al.*, 1986; Pressler *et al.*, 1988; Koedding *et al.*, 2004)以及维生素 B₁₂ (Heller *et al.*, 1985)等底物的跨膜转运,在细胞各种底物的转运方面起着重要作用,当米氏凯伦藻的培养温度从 12°C 转运到 16°C 和 20°C 时,细胞内 TonB-linked outer membrane protein 的表达下调,说明在低温条件下细胞可能需要更多转运载体,维持基本的物质需要。L-cystine transport system permease protein tcyb (点 158)被定位在细胞质膜上的多跨膜的转运胱氨酸的膜蛋白,属于 ABC transporter permease,它广泛分布在细胞膜上,通过水解 ATP 释放能量从而将底物从膜低浓度一侧转运到高浓度一侧(Liu *et al.*, 1999)。在 12°C 和 16°C 低温培养条件下该蛋白显著高表达,可能是补偿由于温度降低而导致蛋白质活性降低的影响(Varkey *et al.*, 2015),同时也可保持细胞内正常的物质代谢以及提高胞内渗透压抵御低温。此外,还鉴定到类囊体上的光捕捉蛋白质(点 292)和 photosystem

d2 apoprotein (点 165),这可能是是在利用荧光进行细胞表面标记时,由于米氏凯伦藻较为特殊的细胞形态结构,即叶绿体与细胞膜紧密接触有关。光捕捉蛋白质在培养温度 16°C 与 12°C 之间没有变化,在 20°C 条件下表达上调,而 photosystem d2 apoprotein 与之相反,这表明低温胁迫导致细胞基本代谢功能的转变(Cui *et al.*, 2005),同时也表明米氏凯伦藻光系统对低温较为敏感,细胞通过调整光系统和光系统之间的电子转移平衡以避免细胞受损;而当温度升高时,米氏凯伦藻需要较多的捕光蛋白以获取更多能量维持细胞的快速增长。由于米氏凯伦藻基因和蛋白质数据库的不完善以及关于膜蛋白信息的缺乏,未能得到 hypothetical protein (点 222 和 270)的具体功能信息。

4 结论

本文建立了基于荧光染料的细胞表面膜蛋白标记方法,为甲藻细胞表面膜蛋白研究提供了技术支撑。米氏凯伦藻表面膜蛋白主要为转运蛋白、HSP70 家族蛋白和光合作用相关蛋白等,这表明米氏凯伦藻具有较强的物质转运能力、光合作用能力和抗胁迫能力,这些膜蛋白可能在米氏凯伦藻适应环境变动

方面具有重要作用。

低温会抑制米氏凯伦藻细胞的生长, 但迅速升温可刺激细胞生长, 并且米氏凯伦藻可快速适应温度的变化, 这可能是米氏凯伦藻藻华形成的一个重要原因。注释到的 4 个与环境温度变化相关的细胞表面膜蛋白主要为转运和捕光蛋白, 表明物质转运和光合作用对于米氏凯伦藻响应环境的温度变化有着重要作用。

目前由于米氏凯伦藻基因组数据库的缺乏以及膜蛋白提取方法方面面临的挑战, 本文仅鉴定到数量极少的膜蛋白, 后续应加强米氏凯伦藻基因组和转录组的研究, 完善膜蛋白提取方法, 以获得更多的膜蛋白信息, 提升我们对米氏凯伦藻基本生命活动规律以及赤潮形成机制的认识。

参 考 文 献

- 李 成, 2011. 海洋甲藻蛋白质组学研究: 以亚历山大藻为例. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 36—96
- 沈益绿, 2014. 东海原甲藻和米氏凯伦藻种间竞争对海水温度变化的响应机制. 上海: 华东师范大学博士学位论文, 102—113
- 张传松, 2008. 长江口及邻近海域赤潮生消过程特征及其营养盐效应分析. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 96—125
- 郭伟其, 沙 伟, 沈红梅等, 2005. 东海沿岸海水表层温度的变化特征及变化趋势. 海洋学报, 27(5): 1—8
- Anaya C C, Church N, Lewis J P, 2007. Detection and identification of bacterial cell surface proteins by fluorescent labeling. *Proteomics*, 7(2): 215—219
- Bertomeu T, Hastings J W, Morse D, 2003. Vectorial labeling of dinoflagellate cell surface proteins. *Journal of Phycology*, 39(6): 1254—1260
- Bivik C, Rosdahl I, Öllinger K, 2007. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis*, 28(3): 537—544
- Cui S X, Huang F, Wang J *et al*, 2005. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5(12): 3162—3172
- Dančik V, Addona T A, Clauser K R *et al*, 1999. *De novo* peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *Journal of Computational Biology*, 6(3—4): 327—342
- Heller K, Kadner R J, 1985. Nucleotide sequence of the gene for the vitamin B₁₂ receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 161(3): 904—908
- Hicke L, Dunn R, 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1): 141—172
- Higgins C F, Linton K J, 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10): 918—926
- Hockin N L, Mock T, Mulholland F *et al*, 2012. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiology*, 158(1): 299—312
- Holmes A R, Keniya M V, Ivnitski-Steele I *et al*, 2012. The monoamine oxidase A inhibitor clorgyline is a broad-spectrum inhibitor of fungal ABC and MFS transporter efflux pump activities which reverses the azole resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3): 1508—1515
- Jang J H, Hanash S, 2003. Profiling of the cell surface proteome. *Proteomics*, 3(10): 1947—1954
- Kadiu I, Wang T, Schlautman J D *et al*, 2009. HIV-1 transforms the monocyte plasma membrane proteome. *Cellular Immunology*, 258(1): 44—58
- Keller M D, Selvin R C, Claus W *et al*, 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology*, 23(4): 633—638
- Koedding J, Howard P, Kaufmann L *et al*, 2004. Dimerization of TonB is not essential for its binding to the outer membrane siderophore receptor FhuA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11): 9978—9986
- Kornilovs'ka I, Nilsson I, Utt M *et al*, 2002. Immunogenic proteins of *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter bilis* and *Helicobacter hepaticus* identified by two - dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteomics*, 2(6): 775—783
- Li C, Wang D Z, Dong H P *et al*, 2012. Proteomics of a toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* DH01: detection and identification of cell surface proteins using fluorescent labeling. *Chinese Science Bulletin*, 57(25): 3320—3327
- Liu P Q, Liu C E, Ames G F L, 1999. Modulation of ATPase activity by physical disengagement of the ATP-binding domains of an ABC transporter, the histidine permease. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26): 18310—18318
- Luche S, Santoni V, Rabilloud T, 2003. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two - dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 3(3): 249—253
- Lundrigan M D, Kadner R J, 1986. Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that

- interact with TonB. *Journal of Biological Chemistry*, 261(23): 10797—10801
- Maloney P C, 1990. Microbes and membrane biology. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1—2): 91—102
- Maloney P C, 1992. The molecular and cell biology of anion transport by bacteria. *BioEssays*, 14(11): 757—762
- Marouga R, David S, Hawkins E, 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(3): 669—678
- Mayrhofer C, Krieger S, Allmaier G *et al*, 2006. DIGE compatible labelling of surface proteins on vital cells *in vitro* and *in vivo*. *Proteomics*, 6(2): 579—585
- Mitra S K, Gantt J A, Ruby J F *et al*, 2007. Clouse and Michael B. Goshe. Membrane proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* using alternative solubilization techniques. *Journal of Proteome Research*, 6(5): 1933—1950
- Molloy M P, Herbert B R, Walsh B J *et al*, 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two - dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(5): 837—844
- Musil L S, Cunningham B A, Edelman G M *et al*, 1990. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *The Journal of Cell Biology*, 111(5): 2077—2088
- Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A *et al*, 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(4): 425—435
- Palenik B, Koke J A, 1995. Characterization of a nitrogen-regulated protein identified by cell surface biotinylation of a marine phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9): 3311—3315
- Pressler U, Staudenmaier H, Zimmermann L *et al*, 1988. Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170(6): 2716—2724
- Rea P A, 2007. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 347—375
- Shin B K, Wang H, Yim A M *et al*, 2003. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9): 7607—7616
- Snyders S, Kohorn B D, 1999. TAKs, thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14): 9137—9140
- Toulza E, Shin M S, Blanc G *et al*, 2010. Gene expression in proliferating cells of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13): 4521—4529
- Varkey D, Mazard S, Ostrowski M *et al*, 2015. Effects of low temperature on tropical and temperate isolates of marine *Synechococcus*. *The ISME Journal*, 10(5): 1252—1263
- Verrier P J, Bird D, Burla B *et al*, 2008. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, 13(4): 151—159
- Wallin E, von Heijne G, 1998. Genome - wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science*, 7(4): 1029—1038
- Wang D Z, Li C, Xie Z X *et al*, 2011. Homology-driven proteomics of dinoflagellates with unsequenced genomes using MALDI-TOF/TOF and automated *De novo* sequencing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 471020
- Wang D Z, Zhang Y J, Zhang S F *et al*, 2013. Quantitative proteomic analysis of cell cycle of the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* (Dinophyceae). *PLoS One*, 8(5): e63659

THE CELL SURFACE PROTEOME OF *KARENIA MIKIMOTOI* AND ITS RESPONSE TO TEMPERATURE CHANGE

WANG Kun¹, WANG Pei¹, ZHANG Hao¹, ZHANG Shu-Feng¹, WANG Da-Zhi^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract *Karenia mikimotoi* is a toxic harmful algal bloom species distributed in the temperate and tropical coastal waters, and it can produce hemolytic toxin and fish toxin. In recent years, it often causes blooms in the coastal areas of Fujian, Zhejiang, and Guangdong provinces of China, resulting in the destabilization of the marine ecosystem and serious harms to local aquaculture and human health or even life. In this paper, fluorescence labeling and sequential extraction of cell membrane proteins from *K. mikimotoi* were established. Cell surface membrane proteins were analyzed using fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE), and the response of membrane proteome of *K. mikimotoi* to a changing environmental temperature was studied. In total, 44 cell surface membrane proteins were identified, of which 27 were annotated effectively, including mainly transporters, HSP70 protein family, and light harvesting protein. Cell growth and photosynthesis of *K. mikimotoi* grown in 20°C were better than those in 16°C and 12°C but no difference was found between 16°C and 12°C, indicating that a low temperature could limit the cell growth of *K. mikimotoi*. When ambient temperature of *K. mikimotoi* cells boosted rapidly from 12°C to 16°C or 20°C, cell density and photosynthesis efficiency decreased quickly but the cells could rapidly adapt to the temperature change. Therefore, we believe that the transport and photosynthetic proteins of a cell membrane play an important role in the cells' adaptation to a quick ambient temperature change.

Key words *Karenia mikimotoi*; temperature; membrane proteins; proteome; difference fluorescence gel electrophoresis