

柱状黄杆菌强毒株和弱毒株胞外蛋白中差异蛋白的初步鉴定

刘国勇, 聂品

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要:柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 是一种世界范围的水产动物致病菌, 是中国重要养殖鱼类草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鳊 (*Siniperca chuatsi*) 等烂鳃病的病原。本研究以 1972 年从患“烂鳃病”草鱼上分离的两株冻干柱状黄杆菌 G₄ 和 G₁₈ 菌株为研究对象, 并将 G₄ 株再次分离纯化得纯化菌株, 命名为 G_{4R3}。对草鱼鱼苗浸泡攻毒结果显示, G_{4R3} 的 LD₅₀ 至少比 G₁₈ 的高 3 个数量级, 因此 G_{4R3} 为“强毒株”, G₁₈ 为“弱毒株”。利用蛋白质组学方法分析柱状黄杆菌强毒株 G_{4R3} 和弱毒株 G₁₈ 的胞外蛋白, 经过双向电泳并结合图像分析, 共发现了 34 个点是差异表达的蛋白。胶内酶解、肽质量指纹图谱和串联质谱分析后, 鉴定出其中的 7 个蛋白点, 代表滑动蛋白 K、腺苷甲硫氨酸合成酶和一种可能的膜蛋白等 3 种蛋白, 它们可能是柱状黄杆菌的毒力因子。[中国水产科学, 2007, 14 (5): 807–814]

关键词:柱状黄杆菌; 毒力因子; 胞外蛋白; 双向电泳; 质谱

中图分类号:S94

文献标识码:A

文章编号:1005–8737–(2007)05–0807–08

柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 是鱼类柱形病 (Columnaris disease, CD) 的病原菌, 可感染自然条件和养殖条件下的淡水和海水鱼类^[1], 是中国养殖草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 和鳊 (*Siniperca chuatsi*) 烂鳃病的病原^[2]。柱状黄杆菌的学名几经更改, 曾用名有柱状软骨球菌/柱状粒球粘细菌 (*Chondrococcus columnaris*)、柱状嗜纤维菌/柱状纤维黏细菌 (*Cytophaga columnaris*) 和柱状屈挠杆菌 (*Flexibacter columnaris*)^[3]。

柱状黄杆菌不同的菌株存在一定的毒力差异, 根据实验对象的死亡时间可将不同毒力的菌株区分为“强毒”和“弱毒”^[4–5]。在水温低至 15 ℃ 时柱状黄杆菌强毒株能够引起鱼类死亡, 但鱼体并不表现出明显的病状。弱毒株只在水温高于 20 ℃ 才引起鱼类发生病变, 被弱毒株感染时, 鱼类病变进程缓慢, 随着病程的发展, 鳃丝甚至部分鳃片缺损, 组织大面积损伤, 最终引起鱼类的死亡^[6]。

柱状黄杆菌强毒株和弱毒株对鱼鳃的黏附力有一定的差异, 而黏附能力是柱状黄杆菌引发疾病的前提^[7–8]。强毒株因有较厚的荚膜层而具有强的黏附能力, 其分泌的胞外产物很多是柱状黄杆菌的毒力因子^[1,7,9], 对它们进行研究有助于认识和了解

柱状黄杆菌的感染和致病机理。到目前为止, 从蛋白质学的角度研究柱状黄杆菌的毒力因子的报道尚鲜见, 只有运用基因组学的方法研究柱状黄杆菌毒力相关基因的报道^[10–11]。本研究利用比较蛋白质组学的方法, 分析柱状黄杆菌强毒株和弱毒株的胞外蛋白, 试图分析并鉴定这种病原菌的毒力因子。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养条件

本研究所用两株冻干柱状黄杆菌 G₄ 和 G₁₈ 菌株是 1972 年从患“烂鳃病”草鱼上分离的, 当时被命名为鱼害黏球菌 (*Myxococcus piscicola*), G₄ 鉴定为强毒株, G₁₈ 鉴定为弱毒株^[12]。后经 16 rDNA 作为分子标记的系统发育分析证实, 鱼害黏球菌是柱状黄杆菌的同物异名^[2]。自 1972 年后, 冻干的 G₄ 和 G₁₈ 菌株一直保存在 -20 ℃。为了恢复其毒力, 将 G₄ 菌株经过两次腹腔注射感染和一次浸泡感染草鱼。每次感染后重新分离纯化细菌, 并按照 Griffin^[13] 的方法鉴定, 最后得到的纯化的菌株命名为 G_{4R3}。G₁₈ 菌株则未经复壮。

将细菌在 25 ℃ 的 Shieh 液体培养基中缓慢摇动培养 18~36 h。原始菌液用含有 15% (体积分

收稿日期: 2007-03-01; 修订日期: 2007-05-11.

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目 ([2005]192).

作者简介: 刘国勇 (1972-), 男, 博士, 主要从事水产微生物病害和鱼类免疫学研究.

通讯作者: 聂品. E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

数)甘油的 Shieh 培养基, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 LD_{50} 的测定

健康的草鱼鱼苗来自武汉市牛山湖渔场, 体重量 $(6 \pm 0.8)\text{ g}$ 。通过浸泡攻毒, 测定 $\text{G}_{4\text{R}3}$ 和 G_{18} 的半数致死浓度 (Lethal dose 50 percent, LD_{50}), 以评价菌株 $\text{G}_{4\text{R}3}$ 和 G_{18} 的毒力。

用灭菌的配方水^[14]将柱状黄杆菌的菌液调整到所需要的浓度。在预实验的基础上, 确定了 $\text{G}_{4\text{R}3}$ 的浸泡浓度为 $1 \times 10^{3.66}\text{ CFU/mL}$ 、 $1 \times 10^{4.66}\text{ CFU/mL}$ 、 $1 \times 10^{5.66}\text{ CFU/mL}$ 、 $1 \times 10^{6.66}\text{ CFU/mL}$, G_{18} 的浸泡浓度为 $1 \times 10^{5.77}\text{ CFU/mL}$ 、 $1 \times 10^{6.77}\text{ CFU/mL}$ 、 $1 \times 10^{7.77}\text{ CFU/mL}$ 、 $1 \times 10^{8.77}\text{ CFU/mL}$, 每个浓度组 20 尾鱼苗, 在 $(20 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温下浸泡 1 h, 然后将浸泡后的鱼苗放进 20 L 的水族箱, 充气饲养, 在此期间不喂食, 水温保持在 $(20 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。对照组的鱼苗用灭菌的配方水浸泡相同的时间, 然后放入 20 L 的水族箱中, 同样条件饲养。每隔 2 h 观察 1 次, 记录鱼苗的死亡量和死亡时间以及发病症状, 连续 7 d, 并用 Reed & Muench^[15]的方法计算 LD_{50} 。

1.3 $\text{G}_{4\text{R}3}$ 和 G_{18} 菌株的生长曲线测定

将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的菌株解冻, 在 Shieh 培养基中 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至 OD_{600} 达到 0.4。然后取 2 mL 菌液加入 200 mL 新鲜 Shieh 培养基, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床继续培养, 在接种后 96 h 内, 每隔 6 h 取出少许菌液, 用梯度稀释结合平板计数的方法计算菌液的浓度。绘制细菌的生长曲线。

1.4 细菌胞外蛋白 (extracellular proteins, ECPs) 的制备

将菌株 $\text{G}_{4\text{R}3}$ 和 G_{18} 在 Shieh 培养基中 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18~36 h, 参照 Li 等的方法制备胞外蛋白^[16]。即将菌液在 $10\ 000\text{ g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min, 收集细菌。上清用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 低蛋白吸附的滤膜 (Millipore) 过滤。用 10% 三氯乙酸 (w/v) 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀滤液中的蛋白。 $15\ 000\text{ g}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min 收集沉淀的蛋白, 用 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置的丙酮两次洗涤沉淀, 室温晾干。所得到的蛋白用 5 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% [w/v] CHAPS, 2% [w/v] SB 3-10, 40 mmol/L Tris, 0.2% [w/v] Bio-Lyte 3/10 两性电解质 (Ampholyte) 溶解后, 马上使用或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用 Bio-Rad 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

配制 12% 的分离胶 (pH 8.8), 5% 的浓缩胶 (pH 6.8)。每个泳道上样 20~30 μg 的胞外蛋白, 在

Tris-glycine 缓冲液中 (pH 8.3) 进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 双向电泳

第一向等电聚焦是在 Protean IEF Cell (Bio-Rad) 上按照操作手册进行。将 ECPs 样品用水化液 (8 mol/L urea, 4% [w/v] CHAPS, 0.5% immobilized pH gradient (IPG) buffer, 65 mmol/L 二硫苏糖醇和微量的溴酚蓝稀释, 18 cm pH 3~10 非线性 pH 梯度的预制干胶条 (Amersham) 胶内水化上样。每根胶条上样 400 μg 蛋白, 上样体积 350 μL 。聚焦至功率达到 60 000 Vh 左右。聚焦完成后, 将胶条在平衡液 A (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% [v/v] 甘油, 2% [w/v] SDS, 0.01% [w/v] 溴酚蓝, 1% [w/v] DTT) 中平衡 15 min, 接着在平衡液 B (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% [v/v] 甘油, 2% [w/v] SDS, 0.01% [w/v] 溴酚蓝, 2.5% [w/v] 碘乙酰胺) 中平衡 15 min。经过 2 次平衡后, 在 Ettan Dalt Six Electrophoresis Unit (Amersham) 上进行第二向的 SDS-PAGE, 胶质量分数为 12.5%。电泳完成后, 用胶体考马斯亮蓝 G-250 进行染色。扫描得到双向电泳图谱, PDQUEST 软件 (Bio-Rad) 分析图谱, 寻找菌株 $\text{G}_{4\text{R}3}$ 和 G_{18} ECPs 的差异表达蛋白。只是在 3 次单独制备的样品之间重复性好的差异蛋白点才用作进一步的分析。

1.6 质谱分析

按照 Shevchenko 等^[17]的方法进行胶内酶解。2 μL 酶解产物上样于 MALDI-TOF 点样板, 所用的基质为 α -cyanohydroxytranscinnamic acid matrix (Sigma)。所用的质谱仪为 AutoFlex TOF-TOF LIFT Mass Spectrometer (Bruker Daltonics), 具体步骤参见操作说明。MALDI-TOF 和 MALDI-TOF/TOF 均采用反射模式, TMALDI-TOF-MS 的加速电压为 20 kV, 反射电压为 23 kV。各蛋白肽段波谱分析和数据库搜索采用 BioTools 3.0 software (Bruker)。Peptide mass fingerprint (PMF) 搜索时, 肽段质量容忍度为 100×10^{-6} , 最多允许 1 个酶切位点的遗漏; TOF-MSMS 搜索时碎片离子质量容忍度为 0.5 D, 最多允许 1 个酶切位点的遗漏。运用 Mascot (<http://www.matrixscience.com/cgi>) 搜索 NCBI 细菌数据库进行蛋白质鉴定。PMF 和 LIFT 质谱的解析采用 Mascot software (Matrix Science Ltd, London, UK)。

电喷雾-离子阱 (ESI-MS) 质谱分析方法参照

Ding 等^[18]。所用的质谱仪为 Finnigan LCQ Deca XP Plus ion-trap micro-electrospray mass spectrometer (ThermoQuest, San Jose, CA, USA), 藕联 Surveyor HPLC system (ThermoQuest) 进行在线 LC-MS 分析。MS/MS 原始数据(同时包括 *b*-离子和 *y*-离子)用 SEQUEST 软件 (University of Washington, licensed to Thermo Finnigan) 搜索 NCBI 黄杆菌属 *Flavobacterium* spp. 蛋白质数据库。蛋白鉴定的参数设置为 Xcorr (1 + ≥ 1.9 , 2 + ≥ 2.2 , 3 + ≥ 3.75) 并且 DelCn (≥ 0.1)。

2 结果与分析

2.1 G_{4R3}和 G₁₈的毒力评价

柱状黄杆菌 G_{4R3}和 G₁₈菌株对草鱼鱼苗的浸泡攻毒结果见表 1。G_{4R3}菌株对草鱼鱼苗的 LD₅₀分别为浓度为 $1 \times 10^{5.34}$, 而 G₁₈大于 $1 \times 10^{8.77}$ 。由于 G_{4R3}的 LD₅₀至少比 G₁₈的高 3 个数量级, 且 G₁₈浸泡后草鱼鱼苗的死亡时间比 G_{4R3}长, 所以菌株 G_{4R3}被定义为强毒株, 而 G₁₈被定义为弱毒株。

表 1 柱状黄杆菌 G_{4R3}和 G₁₈菌株对草鱼的浸泡感染试验
Tab.1 Immersion challenge infection of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) with *Flavobacterium columnare* strains G_{4R3} and G₁₈

菌株 G _{4R3} G _{4R3} strain			菌株 G ₁₈ G ₁₈ strain		
暴露浓度 / (CFU·mL ⁻¹)	死亡率 / %	死亡时间 / h	暴露浓度 / (CFU·mL ⁻¹)	死亡率 / %	死亡时间 / h
Exposure concentration	Mortality (n = 20)	Death time	Exposure concentration	Mortality (n = 20)	Death time
1 × 10 ^{6.66}	100	19 – 40	1 × 10 ^{8.77}	20	102 – 150
1 × 10 ^{5.66}	60	20 – 48	1 × 10 ^{7.77}	10	150
1 × 10 ^{4.66}	20	44 – 60	1 × 10 ^{6.77}	0	
1 × 10 ^{3.66}	0		1 × 10 ^{5.77}	0	

本研究运用的原始菌株为 1972 年分离和冻干保存的柱状黄杆菌强毒株 G₄和弱毒株 G₁₈^[12]。为了恢复强毒株的毒力, 将 G₄经过在草鱼体内的 3 次传代, 得到本研究所使用的强毒株 G_{4R3}。虽然没有文献报道弱毒株可以通过敏感动物的体内传代而增强毒性, 但是为了保持弱毒株的特性, G₁₈未经体内传代。

2.2 G_{4R3}和 G₁₈的 ECPs 的 SDS-PAGE

G_{4R3}和 G₁₈的菌株的生长曲线如图 1 所示。根据图 1 可确定制备胞外蛋白的适当时间。从图中可以看出, G_{4R3}菌株的生长快于 G₁₈。接种 18 h 内, G_{4R3}生长处于缓慢期, 18 ~ 30 h 处于对数期, 30 ~ 36 h 处于稳定期, 36 h 后处于衰老期。接种 24 h 内, G₁₈生长处于缓慢期, 24 ~ 36 h 处于对数期, G₁₈的稳定期很短, 36 h 后即处于稳定期和衰老期。所以分别选定 G_{4R3}的对数生长早期 20 h 和后期 26 h、G₁₈的对数生长早期 26 h 和后期 34 h 来制备胞外蛋白; 并分别进行 SDS-PAGE (图 2)。G_{4R3}和 G₁₈的 ECPs 图谱极为相似, 有 3 条主要的蛋白条带, 即分子量分别为 69 kD、54 kD 和 41 kD 的蛋白条带; 此外, 还有许多分子量在 10 ~ 200 kD 之间的蛋白条带。由于

分辨率的限制, 不能分辨出 G_{4R3}和 G₁₈菌株之间差异表达的蛋白条带。对 G_{4R3}菌株而言, 对数生长早期 20 h 和后期 26 h 的 ECPs 图谱也极为相似; 对 G₁₈而言, 对数生长早期 26 h 和后期 34 h 的 ECPs 图谱也极为相似。为了模拟体内环境, 选用对数生长后期, 即培养 26 h 的 G_{4R3}和培养 34 h 的 G₁₈来制备胞外蛋白, 进行双向电泳。

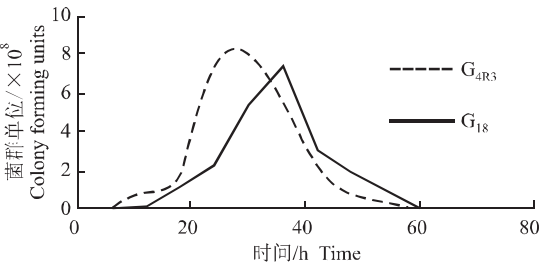


图 1 柱状黄杆菌 G_{4R3}和 G₁₈菌株的生长曲线
Fig.1 Growth curves of *Flavobacterium columnare* strains G_{4R3} and G₁₈

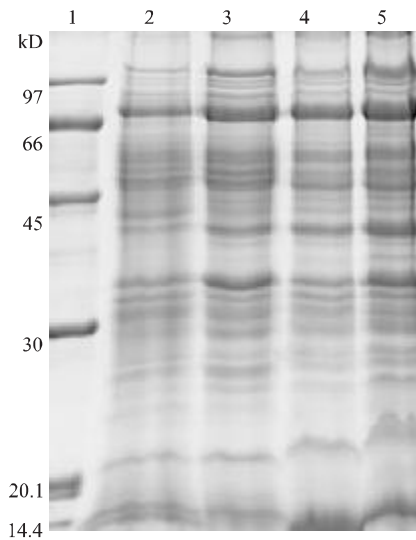


图2 柱状黄杆菌 *G*_{4R3} 和 *G*₁₈ 菌株胞外蛋白的 SDS-PAGE 图谱

1: 标准蛋白分子量; 2: *G*₁₈ 培养 28 h 后的 ECPs, 上样 20 μ g 蛋白; 3: *G*₁₈ 培养 34 h 后的 ECPs, 上样 30 μ g 蛋白; 4: *G*_{4R3} 培养 20 h 后的 ECPs, 上样 20 μ g 蛋白; 5: *G*_{4R3} 培养 26 h 后的 ECPs, 上样 30 μ g 蛋白。

Fig. 2 One-dimensional SDS-PAGE of ECPs from *Flavobacterium columnare* strains *G*_{4R3} and *G*₁₈

Lane 1: The gel was loaded with the molecular weight marker; lane 2: 20 μ g ECPs of 28 h culture of strain *G*₁₈; lane 3: 30 μ g ECPs of 34 h culture of strain *G*₁₈; lane 4: 20 μ g ECPs of 20 h culture of strain *G*_{4R3}; lane 5: 30 μ g ECPs of 26 h culture of strain *G*_{4R3}.

2.3 *G*_{4R3} 和 *G*₁₈ 菌株的 ECPs 的双向电泳

对 *G*_{4R3} 和 *G*₁₈ 菌株的 ECPs 进行了双向电泳 (2-DE; 图 3)。通过 PDQUEST 软件分析, 有 10 个蛋白点 (图 3A, w1~w10) 只在强毒株 *G*_{4R3} 中表达, 7 个蛋白点 (图 3A, w11~w17) 在强毒株 *G*_{4R3} 中表达上调 (Student's *t*-test, $P < 0.05$)。有 7 个蛋白点 (图 3B, a1~a7) 只在弱毒株 *G*₁₈ 中表达, 10 个蛋白点 (图 3B, a8~a17) 在弱毒株 *G*₁₈ 中表达上调 (Student's *t*-test, $P < 0.05$)。

2.4 MALDI-TOF MS 和 MALDI-TOF/TOF 以及 ESI-MS 鉴定差异表达的蛋白

将 34 个差异表达的蛋白点进行胶内酶解, 将酶解产物经过 MALDI-TOF MS 分析。尽管绝大多数的蛋白点都得到了很好的 PMF 图谱, 但进行数据库搜索时却没有得到鉴定结果。由于 5 个蛋白点 (w6~w9, w12) 的 PMF 图谱相似 (图 4), 且分子量相似, 只是等电点稍有差异, 所以这 5 个点中只选取了 2 个点即 w8 和 w12 做了 MALDI-TOF/TOF 分

析, 其他所有的差异蛋白点都进行了 MALDI-TOF/TOF 分析。当用 PMF 结合 MALDI-TOF MS/MS 进行数据库搜索时, 仅点 w1 和 w14 得到了鉴定。w1 经鉴定为滑动蛋白 K (GldK), 其二级质谱数据与 NCBI 细菌数据库中的约氏黄杆菌 *F. johnsoniae* GldK (accession no. AY882986) 的 3 个肽段相匹配, 总得分为 133。w14 经鉴定为腺苷甲硫氨酸合成酶, 其二级质谱数据与 NCBI 细菌数据库中的哈氏噬纤维菌 (*Cytophaga hutchinsonii*) 的 s-adenosylmethionine synthetase (accession no. ZP_00307689) 的 1 个肽段相匹配, 得分为 75。

6 个蛋白点 w2~w5, w8 和 w10 经过 ESI-MS/MS 分析, 只有点 w8 得到鉴定。当用 SEQUEST 软件对点 w8 的 LC-MS/MS 原始数据进行搜索时, 匹配最好的蛋白是约氏黄杆菌 (*F. johnsoniae*) 的一种假定的膜蛋白 (Putative membrane protein, gi 90436484)。尽管只有 1 个肽段与约氏黄杆菌 putative membrane protein 相匹配, 但是, 这个肽段被重复扫描到了 5 次, 且每次的 Xcorr values 值都大于 2.0, DelCn 大于 0.1。Pfam HMM 搜索 (<http://pfam.wustl.edu/cgi-bin/>) 显示这种 putative membrane protein 在 310 位氨基酸到 512 位氨基酸之间有一个 SusD-RagB 结构域, 其得分为 57.3。

3 讨论

细菌性病原菌的分泌蛋白在细菌的感染过程中起着非常重要的作用^[19]。细菌的胞外蛋白被直接分泌到外界环境或者直接进入宿主的体内, 在细菌的黏附、侵入和抵抗宿主的免疫反应方面起着重要的作用^[20]。本研究从处于对数生长后期的柱状黄杆菌强毒株和弱毒株的培养上清中收集胞外蛋白, 然后将这些蛋白进行了双向电泳分离, 分别采用 MALDI-TOF MS、MALDI-TOF/TOF MS 和 ESI-MS/MS 对差异表达的蛋白进行了鉴定。3 个蛋白, 即滑动蛋白 K、腺苷甲硫氨酸合成酶以及一种可能的膜蛋白被鉴定出来。

通过 PDQUEST 软件分析, 发现 *G*_{4R3} 和 *G*₁₈ 的 ECPs 共有 34 个表达有差异的蛋白点。这 34 个蛋白点都经过 MALDI-TOF MS 分析。但是, 由于还没有柱状黄杆菌的全基因组数据, 用 PMF 数据搜索 NCBI 细菌数据库, 没有阳性的鉴定结果, 尽管绝大多数的蛋白点的 PMF 图谱质量很好。这可能是因为公共数据库中关于柱状黄杆菌的蛋白和基因

序列太少了的原因。鉴于此,对这些差异表达的蛋白点做了串联质谱分析,34个差异表达蛋白点中的绝大多数都经过了MALDI-TOF/TOF分析,但只

有2个蛋白点得到了鉴定。6个蛋白点,即w2~w5,w8和w10经过ESI MS/MS分析,只有w8得到了鉴定。

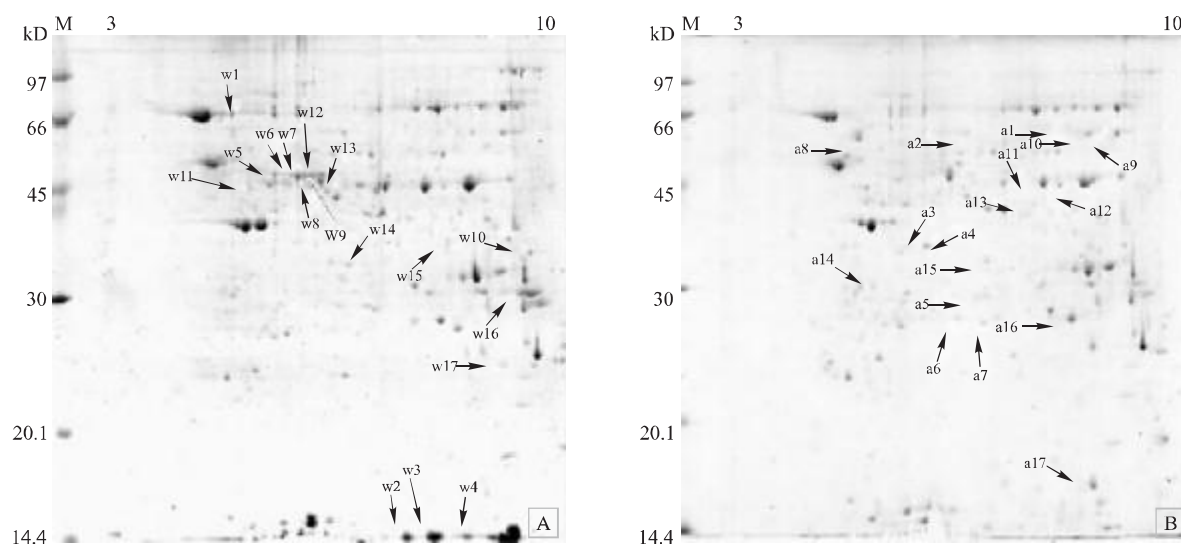


图3 柱状黄杆菌 G_{4R3} (A) 和 G_{18} (B) 菌株胞外蛋白的双向电泳图谱 (pH 3~10, 18 cm, 非线性), 胶体考马斯亮蓝 G-250 染色
注: M 为标准分子量; “↑” 示蛋白点。

Fig.3 ECPs profile of *Flavobacterium columnare* strain G_{4R3} (A) and G_{18} (B) on Colloidal Coomaassie Brilliant Blue-stained 2-DE gels with a nonlinear gradient from pH 3 to 10. M: molecular marker; “↑” shows protein point.

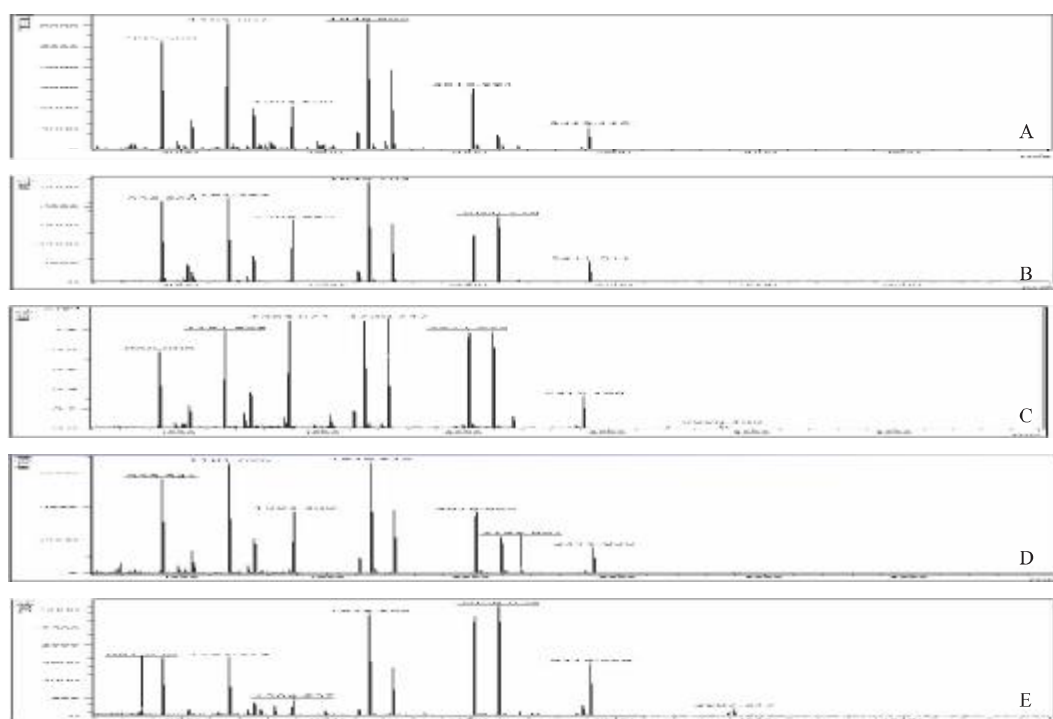


图4 一些蛋白点的肽质量指纹图谱 A, w6; B, w7; C, w8; D, w9; E, w12

Fig.4 Some peptide mass fingerprint profiles of protein spots A, w6; B, w7; C, w8; D, w9; E, w12

蛋白点 w1 被鉴定为 GldK。Braun 等^[21]发现 GldK 是与柱状黄杆菌同属的嗜冷黄杆菌的一系列滑动相关蛋白中的一员。gldK 基因插入失活会导致嗜冷黄杆菌滑动能力的完全丧失、几丁质利用能力的缺乏以及对感染野生型细菌的噬菌体的抵抗能力的缺失。尽管还不清楚 GldK 在柱状黄杆菌中的功能,但它在强毒株胞外产物中的存在,表明它可能与柱状黄杆菌的致病性有关。

蛋白点 w6~w9 和 w12 具有相似的 PMF 图谱(图 4),在 2-DE 胶上,具有相似的分子量而只是等电点稍有偏差,表明这几个点都是同一种蛋白,只是具有不同的翻译后修饰(图 3A)。点 w8 被鉴定为可能的膜蛋白,那么 w6、w7、w9 和 w12 都可以被鉴定为可能的膜蛋白。蛋白点 w6~w9 只在强毒株中表达,而不在弱毒株中表达;而蛋白点 w12 在强毒株中的表达量比弱毒株至少多 3 倍,表明这种可能的膜蛋白可能与柱状黄杆菌的致病性有关。这种蛋白的 SusD-Rag 结构域可能介导多种多糖黏附到细菌的表面,参入多糖的吸收以及降解^[22-23]。SusD-RagB 家族的成员 RagB 是牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)外膜的一种脂蛋白,具有促进许多未知配体转运的功能^[24],rag 基因座(包括 ragB)可能是一种新的毒力岛(Pathogenicity island)^[25]。通过比较强毒的和弱毒的 *P. gingivalis* 的全基因组序列发现 ragB 基因只出现在强毒株中^[26]。但是,对于柱状黄杆菌的这种可能的膜蛋白的详细的结构和功能尚有待进一步的研究。

腺苷甲硫氨酸(s-adenosylmethionine, SAM)作为包括 DNA、rRNA、tRNA 和许多蛋白质甲基化过程中甲基的供体^[27],与细胞的功能密切相关。腺苷甲硫氨酸合成酶(SAM synthetase)介导由甲硫氨酸和 ATP 合成 SAM。腺苷甲硫氨酸合成酶由 metK 基因^[28]或者 metX^[29]基因编码,metK 基因的表达对大肠杆菌 K-12 的生长是必不可少的,当 metK 的表达减少时,基因组 DNA 的甲基化减少,细胞分裂受阻^[30]。在营养缺乏时,metK 的表达是大肠杆菌 *Escherichia coli* 成活所必不可少的,而营养充足时,metX 表达则对其生长是必需的^[29]。用 PSORTb 程序(<http://www.psорт.org/psорт/>)分析显示腺苷甲硫氨酸合成酶定位于细胞质,出现在 ECPs 中,有可能是细胞自溶(Autolysis)的结果。然而,本研究在强毒株的胞外蛋白中检测到了更多的腺苷甲硫氨酸合成酶,为柱状黄杆菌中的首次报道,它是否与

毒力蛋白或基因的甲基化有关需要进一步研究。

除了 7 个鉴定的蛋白点外,本研究对强毒株中 5 个表达上调的蛋白点和 5 个只在强毒株中表达的蛋白点也进行了质谱分析,但是没有获得阳性的结果。这些蛋白点可能是新的毒力因子或者与现有数据库中的毒力相关蛋白的序列相似性太低,它们的性质以及在致病过程中的作用都有待进一步的研究。

迄今,只有关于柱状黄杆菌硫酸软骨素裂解酶(Chondroitin AC lyase)这一毒力因子的报道^[9,11]。本研究没有在强毒株和弱毒株的差异表达蛋白中检测到这种蛋白,可能是因为在 Shieh 培养基中,柱状黄杆菌 G_{4R3}产生的硫酸软骨素裂解酶与 G₁₈产生的硫酸软骨素裂解酶的量相差无几。尽管本研究鉴定出来的蛋白点较少,但鉴定出来的滑动蛋白 K、腺苷甲硫氨酸合成酶以及一种可能的膜蛋白则为研究柱状黄杆菌的毒力因子提供了可能。

参考文献:

- [1] Bader J A, Starliper C E. The genera *Flavobacterium* and *Flexibacter* [C] // *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002: 99 - 139.
- [2] 谢海侠. 柱状黄杆菌毒力相关因子的研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2005: 1 - 153.
- [3] Bernardet J-F, Segers P, Vancannet M, et al. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae and proposal of *Flavobacterium hydatidis* nom. nov. (Basonym: *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978) [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46: 128 - 148.
- [4] Bullock G L, Hsu T C, Shotts E B. Columnaris diseases of fishes. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service [J]. *Fish Disease Leaflet*, 1986, 72: 1 - 9.
- [5] Decostere A, Haesebrouck F, Devriese L A. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish [J]. *Vet Microbiol*, 1998, 62: 35 - 45.
- [6] Pacha R E, Ordal E J. Myxobacterial diseases of salmonids [C] // *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. American Fisheries Society, Special Publication No. 5, Washington: DC, 1970: 243 - 257.
- [7] Decostere A, Haesebrouck F, Charlier G, et al. The association of *Flavobacterium columnare* strains of high and low virulence with gill tissue of black mollies (*Poecilia sphenops*) [J]. *Vet Microb*, 1999a, 67: 287 - 298.
- [8] Decostere A, Haesebrouck F, Turnbull J F, et al. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence

- Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches [J]. J Fish Dis, 1999b, 22: 1 – 11.
- [9] Newton J C, Wood T M, Hartley M M. Isolation and partial characterization of extracellular proteases produced by isolates of *Flavobacterium columnare* derived from channel catfish [J]. J Aquat Anim Health, 1997, 9: 75 – 85.
- [10] Xie H X, Nie P, Sun B J. Characterization of two membrane-associated protease genes obtained from screening out-membrane protein genes of *Flavobacterium columnare* G₄ [J]. J Fish Dis, 2004, 27: 719 – 729.
- [11] Xie H X, Nie P, Chang M X, et al. Gene cloning and functional analysis of glycosaminoglycan-degrading enzyme chondroitin AC lyase from *Flavobacterium columnare* G₄ [J]. Arch Microbiol, 2005, 184: 49 – 55.
- [12] 湖北省水生生物研究所鱼病研究室. 草鱼烂鳃病的研究—I. 细菌性病原的研究 [J]. 水生生物学集刊, 1975, 5: 315 – 334.
- [13] Griffin B R. A simple procedure for the identification of *Cytophaga columnaris* [J]. J Aquat Anim Health, 1992, 4: 63 – 66.
- [14] Chowdhury M B R, Wakabayashi H. Effects of sodium, potassium, calcium and magnesium ions on the survival of *Flexibacter columnaris* in water [J]. Fish Pathology, 1988, 23: 231 – 235.
- [15] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent end points [J]. Am J Hyg, 1938, 27: 493 – 497.
- [16] Li M, Rosenshine I, Tung S L, et al. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 5 274 – 5 282.
- [17] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels [J]. Anal Chem, 1996, 68: 850 – 858.
- [18] Ding S J, Li Y, Shao X X, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials [J]. Proteomics, 2004, 4: 982 – 994.
- [19] Finlay B B, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61: 136 – 169.
- [20] Lee V T, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections [J]. Genes Dev, 2001, 15: 1 725 – 1 752.
- [21] Braun T F, Khubbar M K, Saffarini D A, et al. *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility genes identified by mariner mutagenesis [J]. J Bacteriol, 2005, 187: 6 943 – 6 952.
- [22] Cho K H, Salyers A A. Biochemical analysis of interactions between outer membrane proteins that contribute to starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron* [J]. J Bacteriol, 2001, 183: 7 224 – 7 230.
- [23] Hall L M C, Fawell S C, Shi X, et al. Sequence diversity and antigenic variation at the *rag* locus of *Porphyromonas gingivalis* [J]. Infect Immun, 2005, 73: 4 253 – 4 264.
- [24] Curtis M A, Hanley S A, Aduse-Opoku J. The *rag* locus of *Porphyromonas gingivalis*: a novel pathogenicity island [J]. J Periodontol Res, 1999, 34: 400 – 405.
- [25] Hanley S A, Aduse-Opoku J, Curtis M A. A 55-kilodalton immunodominant antigen of *Porphyromonas gingivalis* W50 has arisen via horizontal gene transfer [J]. Infect Immun, 1999, 67: 1 157 – 1 171.
- [26] Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, et al. Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis* [J]. J Bacteriol, 2004, 186: 5 473 – 5 479.
- [27] Chiang P K, Gordon R K, Tal J, et al. *s*-Adenosylmethionine and methylation [J]. FASEB J, 1996, 10: 471 – 480.
- [28] Greene R C. Biosynthesis of methionine [C] // *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington D C: American Society for Microbiology Press, 1996: 542 – 560.
- [29] Satischandran C, Taylor J C, Markham G D. Isozymes of *s*-adenosylmethionine synthetase are encoded by tandemly duplicated genes in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 1993, 9: 835 – 846.
- [30] Wei Y H, Newman E B. Studies on the role of the *metK* gene product of *Escherichia coli* K-12 [J]. Mol Microbiol, 2002, 43: 1 651 – 1 656.

Differential proteomeics of extracellular proteins between virulent and avirulent strains of *Flavobacterium columnare*

LIU Guo-yong, NIE Pin

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: *Flavobacterium columnare*, the causative agent of columnaris disease, has infected a wide range of wild, cultured and ornamental fish species in the world, and is a pathogen of gill-rot disease of several major-cultured fish species including grass carp *Ctenopharyngodon idellus* and mandarin fish *Siniperca chuatsi* in China. *F. columnare* isolates can be designated as high virulence or low virulence depending on the disease course and the mortality caused. It has been shown that the virulence of *F. columnare* is correlated with its

ability to adhere onto fish gills, and the high virulence strain has a thick capsule, whereas the capsule of the low virulence strain is much thinner. However, the information in relation to the virulence factors of *F. columnare* is rather scarce; proteomic approach has not been employed to determine virulence factors of the bacterium. In this study, a proteome analysis was carried out to compare the extracellular proteins of virulent and avirulent strains of *F. columnare* in order to identify virulence factors of the pathogen. *F. columnare* strains G_{4R3} and G₁₈ were assessed to be virulent and avirulent, respectively, by immersion challenge. Proteomic analysis by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) was applied to analyze extracellular proteins of G_{4R3} and G₁₈ at the late exponential growth phase. Thirty-four protein spots differentially expressed between the two strains were analyzed by 2-DE gels, and they were further analyzed using in-gel tryptic digestion, peptide mass fingerprinting and tandem mass spectrometry. Seven spots representing three proteins, namely GldK, *s*-adenosylmethionine synthetase and a putative membrane protein were identified, and these proteins may be considered as virulence-related factors of *F. columnare*. GldK has been reported as one of a cluster of proteins required for gliding motility of *F. johnsoniae*, in which the disruption of *gldK* gene can result in complete loss of gliding motility, deficiency in chitin utilization, and resistance to bacteriophages. Although the exact role of GldK in *F. columnare* has not been characterized, the exclusive expression of GldK in virulent strain may indicate that GldK plays an important role in the pathogenesis of *F. columnare* infection. Five differentially expressed spots were identified as a putative membrane protein. A Pfam HMM search (<http://pfam.wustl.edu/cgi-bin>) showed that the putative membrane protein had, from 310 aa to 512 aa, a SusD-RagB domain with a score of 57.3, which probably mediated the binding of a wide range of polysaccharides to the bacterial cell surface. Although the function of SusD-RagB family proteins have not yet been experimentally determined, RagB has been reported as possible lipoproteins in the outer membrane of *Porphyromonas gingivalis*, acting in concert at the surface of the bacterium to facilitate active transport of as yet unknown ligands. One spot was identified as *s*-adenosylmethionine synthetase encoded by the *metK* gene or *metX*, which mediated the synthesis of *s*-adenosylmethionine. It is reported that when *metK* expression was limited, genomic DNA methylation decreased and cell division was hampered. In *Escherichia coli*, *metK* expression is essential for growth of *E. coli* on minimal media and *metX* expression is essential for growth on rich media. In this study, the virulent *F. columnare* strain expressed much more *s*-adenosylmethionine synthetase than the avirulent strain, and its virulence may be of interest for further research. Apart from the seven identified spots, five enhanced spots and five exclusive expression spots in virulent strain could not be identified by the aforementioned approaches. These spots may be novel virulence-associated factors or proteins sharing moderate sequence similarity with identified virulence-associated factors of other species that require further characterization. Although only three virulence factors identified in this study, this report opens a path to the further analysis of virulence factors of *F. columnare*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 807–814]

Key words: *Flavobacterium columnare*; virulence factor; extracellular proteins; two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; mass spectrometry

Corresponding author: NIE Pin. E-mail: pinnie@ihb.ac.cn