

吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织 在不同时期蛋白质组的表达差异

朱佳杰¹, 沈夏霜¹, 付强², 陈明¹, 周宇¹, 谭芸¹, 甘西^{1*}

(1. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021;

2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

摘要: 为研究罗非鱼感染无乳链球菌前后肝脏组织蛋白质的表达变化。本研究以吉富罗非鱼为材料, 采用双向电泳技术分析其在无乳链球菌感染胁迫下 24 h、48 ~ 144 h、12 d 与对照组(未感染)肝脏组织蛋白质组的变化, 对差异表达蛋白进行质谱分析鉴定。结果显示: 吉富罗非鱼在无乳链球菌胁迫下, 3 个实验组的蛋白质图谱与对照组相比存在显著差异, 共有 30 个蛋白质点发生显著改变, 其中 13 个表达上调, 15 个下调, 2 个蛋白质点在感染 12 d 后消失。通过 MALDI-TOF/TOF 4800 质谱分析和数据库检索对这些蛋白质进行了功能分类, 发现它们涉及到能量代谢、细胞防御与应激、消化免疫、抗氧化与排毒等许多方面。推测这些蛋白质可能在吉富罗非鱼对无乳链球菌胁迫的抗性反应中发挥了重要作用。研究结果为无乳链球菌疫苗的研制及吉富罗非鱼抗病品种选育奠定了基础。

关键词: 吉富罗非鱼; 无乳链球菌; 蛋白质组学; 双向电泳

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 是一种革兰氏阳性菌, 广泛分布在自然界中, 也是一种全球性的传染性病原菌^[1]。近年来, 随着罗非鱼养殖业发展, 不少养殖户盲目追求养殖密度, 造成罗非鱼病害频发, 其中无乳链球菌病危害最严重。2009—2013 年无乳链球菌病在我国罗非鱼主产区大面积暴发流行, 发病死亡率逐年上升^[2], 给养殖户造成了重大的经济损失, 严重影响了罗非鱼养殖业的健康持续发展^[3]。为此, 研究无乳链球菌对罗非鱼的致病机理, 实现对无乳链球菌病的有效防控, 已成为罗非鱼育种工作者的首要任务。

蛋白质组学 (proteomics) 是生命科学研究领域中的一门新兴学科^[4], 蛋白质是动物组织和细胞赖以生存的各种代谢和调控途径的主要执行者, 目前已成为后基因组时代研究生命科学最有效研究手段^[5]。双向电泳技术 (two-dimensional

electrophoresis, 2-DE) 是蛋白质组学研究中的关键技术之一^[6-7]。其原理是依据蛋白质的等电点进行第一轮的等电聚焦和依据分子量的不同进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 通过 2 次方向垂直的电泳, 将样品中的不同蛋白呈点状分离。目前蛋白质组学已在水产动物育种中开展了一系列研究, Rattanarojpong 等^[8]用黄头病毒感染凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 发现 SCP-钙结合蛋白在病毒感染对虾的免疫应答中起着重要作用, Yu 等^[9]在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 脾脏中发现了若干与免疫应答及炎症调节相关蛋白。目前国内对罗非鱼链球菌病的研究主要集中在流行病学分析^[10-11]、病理学变化^[12]、菌株分型^[2,13]、疫苗研制^[14]及抗病相关基因表达^[15]等方面, 在蛋白质组水平的研究报道甚少。本研究采用双向电泳技术研究吉富罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*) 在无乳链球菌感染胁迫过程中肝脏蛋白

收稿日期: 2013-07-24 修回日期: 2013-10-28

资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-49); 广西八桂学者建设工程专项经费; 广西区水产畜牧兽医局科研计划项目 (桂渔牧科 1204903); 广西区直属公益性科研院所基本科研业务费专项 (GXIF-2012-15)

通信作者: 甘西, E-mail: ganxicn@126.com

各个感染时期(未感染 0 h、感染 24 h、感染 48 ~ 144 h 和感染 12 d)的表达变化,以期探讨吉富罗非鱼对无乳链球菌感染的应答模式,从蛋白质水平寻找出与吉富罗非鱼抗无乳链球菌病性状相关的生物标记物,为进一步研究无乳链球菌与宿主的相互作用机制、无乳链球菌疫苗的研制及吉富罗非鱼抗病品种选育奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用吉富罗非鱼取自广西南宁国家级罗非鱼良种场的全同胞家系。选择健康无伤的吉富罗非鱼 40 尾,体质量 80.3 ~ 110.5 g,随机分为 2 组进行饲养实验,一组为无乳链球菌感染实验组,另一组为未感染对照组,暂养 10 d 后用于感染实验。无乳链球菌感染方法及剂量参照前期数据^[16]。在进行无乳链球菌感染后,前 6 d 每 24 h 取一次样,最后于感染 12 d 后再取一次样,每次取 5 个样,在冰上进行活体解剖后取肝脏组织,放入冻存管称重,液氮冻存带回实验室 -80 °C 保存备用。将随机取得的样本分为 4 组:(1)未感染组、(2)感染 24 h 组、(3)感染 48 ~ 144 h 组和(4)感染 12 d 组。无乳链球菌菌株(GD001)由广西水产科学研究院鱼病防治研究室提供。

1.2 蛋白样品的制备及定量

分别将 4 组肝脏组织用 PBS 缓冲液清洗干净后,混合剪碎,放入研钵中加入适量液氮进行研磨,直至肝脏组织被研磨至粉末状即可。快速称取 0.1 g 加入 1 mL 裂解液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% (W/V) CHAPS、1% DTT)中。待以上操作完成后,将管内的溶液震荡混匀,4 °C 放置 60 min,期间每 15 min 颠倒混匀 30 s。14 000 × g (4 °C)高速离心 60 min。取上清后用丙酮沉淀,加入适量的水化液(7 mol/L 尿素、4% (W/V) CHAPS)于 4 °C 进行溶解后,用于 Bradford 法测定蛋白质浓度,并用 Mini SDS-PAGE 凝胶检测所提取的蛋白质,将样品分装 -80 °C 保存备用。

1.3 双向电泳分离

第一向 等电聚焦(IEF) 选择 pH 4 ~ 7, 24 cm 的 IPG 胶条,在蛋白质裂解液中加入适量水化液、IPG Buffer 和 DTT,混合均匀后总上样体积达 450 μL。将上述总蛋白质样品放入标准型胶条槽中,IPG 胶条胶面朝下覆盖住样品混合液,

避免产生气泡。后在胶条上方加一层 Immobiline DryStrip 矿物油防止溶液挥发。按照如下程序进行等电聚焦:30 V 6 h、60 V 6 h、200 V 1 h、500 V 1 h、1 000 V 1 h、8 000 V 1 h、80 000 V 10 h、1 000 V 10 h。极限电流为 20 μA/gel;等电聚焦温度为恒温 20 °C。等电聚焦完成后,将取出 IPG 的胶条用滤纸蘸去胶条背面的矿物油和多余的样品,先后放入事先准备好平衡液 I(尿素 6 mol/L, SDS 2% (W/V), 1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8), 甘油 30% (V/V), 1% DTT)、平衡液 II(4% IAA 代替 1% DTT)的平衡盘中,分别平衡 13 min。让胶条的背面紧贴平衡盘,不要破坏胶面。

第二向 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 实验所用的分离胶浓度为 12.0%、厚度为 1 mm,将胶条用电泳缓冲液(3.02% Tris-HCl, 14.42% 甘氨酸, 1% SDS)润洗后转移至凝胶上方,并排尽气泡,使胶条与胶面接触完好,然后用含有溴酚蓝的琼脂糖溶液封胶面,待琼脂糖凝固即可进行 SDS-PAGE 电泳。以恒流 15 mA/gel 电泳 20 min 后,增大电流至 25 mA/gel,待溴酚蓝指示剂到达底部边缘时电泳结束。

1.4 凝胶染色、扫描及图像分析

凝胶染色采用 Yan^[17]等提供的银染方法,脱色后的凝胶用 Image Scanner 扫描仪扫描,并用 Image Master 2D Platinum 软件进行图像分析。将光密度值差异 2 倍以上视为差异蛋白点。

1.5 差异蛋白质点的酶解及质谱鉴定

切取凝胶上差异蛋白质点,对蛋白质点进行漂洗、脱色、酶解后,采用 ABI 公司的串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF 4800)进行分析。通过 Mascot 程序搜索一级和二级肽指纹图谱信息,使用数据库为 NCBI 库,当蛋白质评分大于 60 分及蛋白质评分阈值大于 95 分时结果有意义。

2 结 果

2.1 吉富罗非鱼感染无乳链球菌前后不同时期肝脏组织蛋白质表达变化

吉富罗非鱼感染无乳链球菌前后不同时期肝脏组织的蛋白质双向电泳图谱如图 1 所示,从左至右等电点递增,从下往上分子质量递增。通过对无乳链球菌感染胁迫之后不同时段的双向电泳图谱与正常对照组的比较,在 pH 4.0 ~ 7.0 的范

围内分别获取到 (573 ± 17) 、 (596 ± 10) 、 (584 ± 12) 和 (565 ± 26) 个蛋白质点。对照组与感染 24 h 组、感染 48 ~ 144 h 组和感染 12 d 组的蛋白匹配率分别为 59.35%、56.24% 和 60.11%。实验组的蛋白质点分散较为明显,蛋白质表达量有增加的趋势,主要分布在 pH 5.0 ~ 6.0 区域,表明吉富罗非鱼肝脏蛋白质种类大部分属于弱酸性蛋白。

在无乳链球菌感染胁迫后蛋白表达量发生了显著的变化,分析差异得到 30 个差异表达蛋白质斑点,其中有 13 个点蛋白质表达上调;15 个点蛋白质表达下调;2 个点蛋白质表达消失(2 号、14 号差异点在感染 12 d 时消失)。经质谱鉴定后,链球菌感染后鉴定的差异蛋白质点有一些是相互对应的,也有发生变化的点,其表达变化规律如表 1 所列。

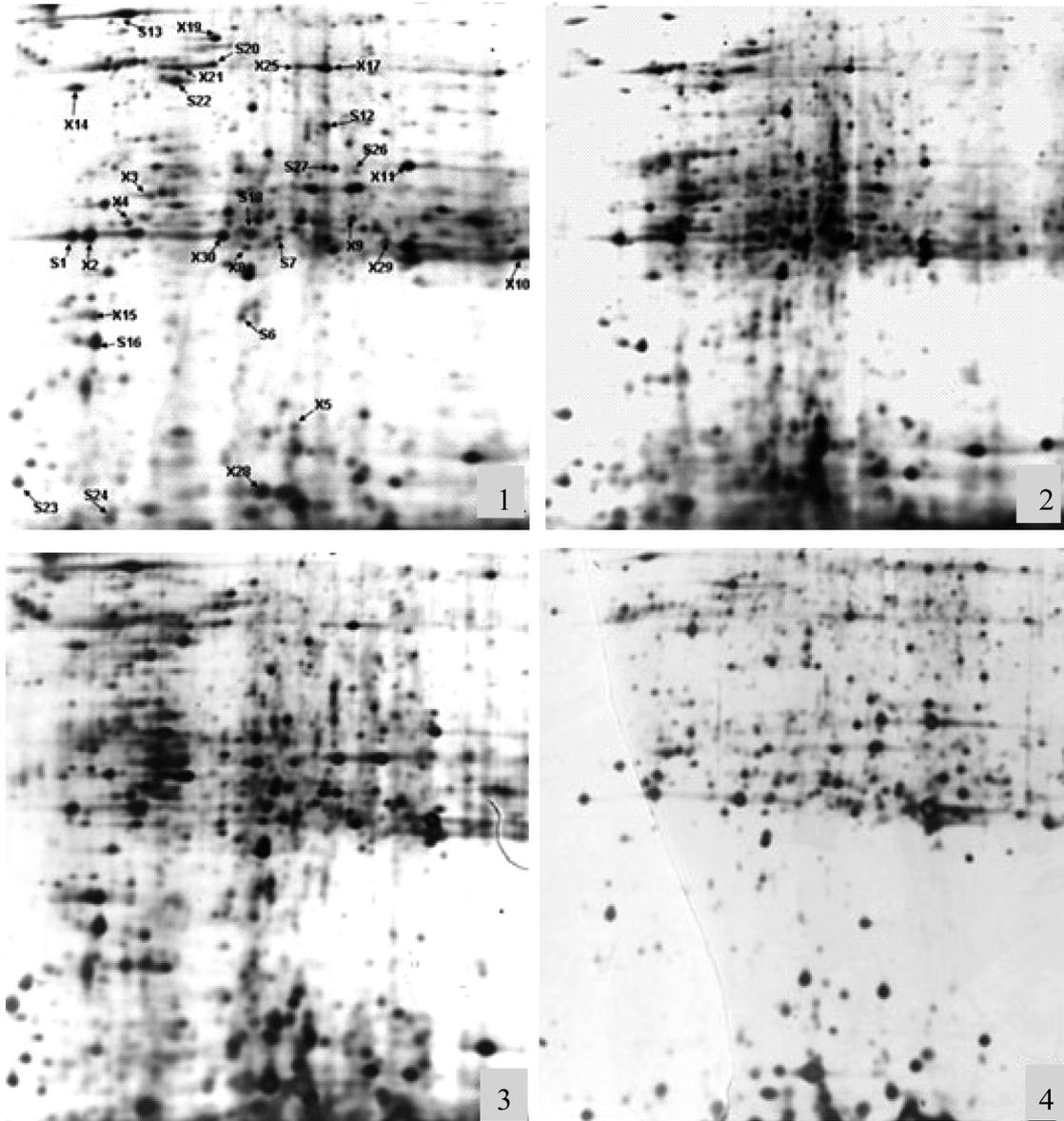


图 1 链球菌胁迫下吉富罗非鱼肝脏蛋白质组双向电泳图比较

1. 对照组,2. 感染 24 h 组,3. 感染 48 ~ 144 h 组,4. 感染 12 d 组
X 代表下调,S 代表上调

Fig. 1 2-DE images of proteins comparisons in liver of GIFT tilapia under *Streptococcus agalactiae* stress

1. control group,2. experimental group 24 h,3. experimental group 48-144 h,4. experimental group 12 d
X shows up-regulated expression and S shows down-regulated expression

2.2 对部分差异蛋白质点进行统计分析

为了消除因上样量不同对4个时期图谱比较造成的影响,本研究采用了Vol% (占总蛋白百分比)概念。同时为了排除肝脏组织蛋白质点过多对Vol%准确度的影响,从30个差异表达蛋白质点中选择S1、X2、X3、X4、X11、S12、S26、S27共8个蛋白质点进行局部放大图谱(图2)。根据各个蛋白质点的Vol%值计算每个样品表达量的变

化倍数(fold),为减少系统误差,每个样品重复3次,对数据进行统计分析。从图3中可看出,将感染后各个时期与对照组相比较,S1、X2号蛋白质点在感染24h组和感染48~144h组表达量的变化倍数呈现极显著相关($P < 0.01$);X11号蛋白质点在感染12d组表达量的变化倍数呈现极显著相关($P < 0.01$);X3、X4及S26号蛋白质点表达量的变化倍数呈现显著相关($P < 0.05$)。

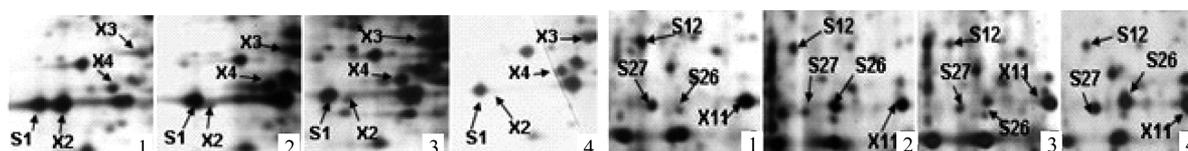


图2 8个差异表达蛋白点的局部放大图谱

1. 对照组,2. 感染24h组,3. 感染48~144h组,4. 感染12d组

Fig. 2 Eight differential expression proteins local amplified

1. control group,2. experimental group 24 h,3. experimental group 48-144 h,4. experimental group 12 d

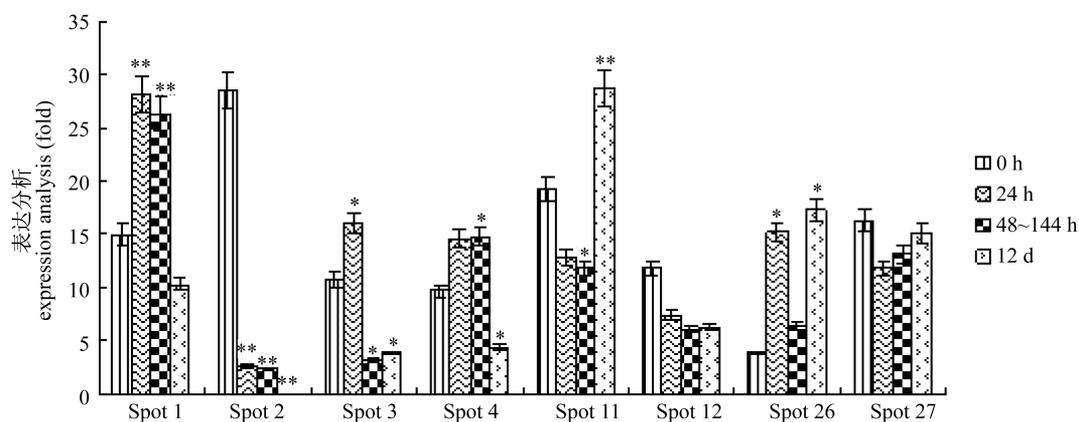


图3 肝脏双向电泳部分切割图比较

*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)

Fig. 3 Comparison of partial 2-DE maps of liver

*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)

2.3 对表达差异蛋白质点进行质谱鉴定

对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织表达显著差异的30个蛋白质点进行质谱分析,其蛋白名称和相关特性见表1。由Uniprot和Gene Ontology等数据库中查找显著差异表达的蛋白质功能。30个蛋白质经生物信息学分析结果见图4。这些蛋白点在吉富罗非鱼感染无乳链球菌的抗性反应中起到了重要的作用。

3 讨论

蛋白质作为生物体生理功能的执行者和生命

活动的直接体现者,几乎所有的生理、病理、环境因子及药剂的作用都直接依赖于蛋白质,相应的生物体内蛋白质的表达也随之发生变化,对生物体在不同的生理或病理条件下的蛋白质表达变化规律研究可揭示某些生物学现象^[18]。本研究运用双向电泳技术结合质谱鉴定分析了吉富罗非鱼感染无乳链球菌前后肝脏组织的蛋白质表达变化,发现共有30个蛋白质点表达发生了显著的改变,13个蛋白质点在无乳链球菌感染后出现不同程度上调,15个下调,2个蛋白质点在感染12d后消失。这些差异蛋白质主要与消化免疫、细胞

能量代谢、肌纤维调节及细胞骨架、细胞防御与应激及抗氧化与解毒等功能相关。研究结果有助于揭示吉富罗非鱼对无乳链球菌的应答机制,也为发现抗性生物标记物和抗病育种打下实验基础。

表 1 链球菌胁迫下吉富罗非鱼肝脏差异蛋白质质谱鉴定结果

Tab.1 Protein differences in liver of GIFT Tilapia under *Streptococcus agalactiae* stress

蛋白编号 protein no.	搜库编号 NCBI accession no.	蛋白名称及来源物种 protein name and species	分子量(ku)/ 等电点 MW(ku)/pI	蛋白得分 protein score
cellular defense and stress				
S12	gi 47085775	78 kDa glucose-regulated protein[<i>Danio rerio</i>]	71.9/5.04	262
X4	gi 27803584	heat shock protein gp96[<i>Eptatretus stoutii</i>]	90.7/4.73	164
X30	gi 148223467	heat shock protein 90 kDa beta (Grp94) , member 1 [<i>Xenopus laevis</i>]	92.5/4.77	128
X19	gi 15010550	heat shock protein gp96 precursor[<i>Homo sapiens</i>]	90.1/4.73	96
S16	gi 14714615	heat shock protein 90 ,beta (Grp94) , member 1 [<i>Mus musculus</i>]	92.4/4.74	159
myofibrillar regulatory and cytoskeletal				
S24	gi 28557136	tropomyosin4-1 [<i>Takifugu rubripes</i>]	28.6/4.65	94
X10	gi 58428938	beta-actin[<i>Siniperca chuatsi</i>]	19.7/5.30	304
S23	gi 209735706	myosin light polypeptide 6 [<i>Salmo salar</i>]	16.9/4.61	125
X17	gi 37779004	beta-actin[<i>Pagrus major</i>]	21.9/5.31	97
X25	gi 300394142	beta-actin[<i>Oncorhynchus masou rhodurus</i>]	39.9/5.29	111
energy metabolism				
S7	gi 148223359	mitochondrial ATP synthase beta subunit[<i>Xenopus laevis</i>]	56.3/5.25	108
S20	gi 46909241	ATP synthase beta subunit ,partial [<i>Encope michelini</i>]	45.8/4.96	89
X11	gi 41393119	transitional endoplasmic reticulum ATPase [<i>Danio rerio</i>]	89.4/5.14	274
X21	gi 118200319	ATP synthase beta-subunit	15.1/4.64	106
S22	gi 198285477	ATP synthase H + transporting mitochondrial F1 complex beta [<i>Salmo salar</i>]	52.9/4.87	285
X5	gi 44890712	Aldh9a1a protein [<i>Danio rerio</i>]	55.3/6.18	193
X9	gi 41056111	phosphoglucomutase-1 [<i>Danio rerio</i>]	61.1/5.74	77
digestion and immune				
S1	gi 41350549	trypsin [<i>Oreochromis niloticus</i>]	26.3/5.75	89
X2	gi 41350549	trypsin [<i>Oreochromis niloticus</i>]	26.3/5.75	89
X3	gi 999627	chain B ,refined 1.8 angstroms resolution crystal structure of porcine epsilon-trypsin	88.1/6.67	149
S6	gi 52551331	trypsin [<i>Oreochromis niloticus</i>]	22.2/5.00	97
X8	gi 23096106	NCC receptor 1 like protein [<i>Oreochromis niloticus</i>]	26.6/6.07	116
S18	gi 136429	RecName : full = trypsin ; flags : precursor trypsin	24.4/7.00	227
S27	gi 136429	RecName : full = trypsin ; flags : precursor trypsin	24.4/7.00	227
X28	gi 999627	chain B ,refined 1.8 angstroms resolution crystal structure of porcine epsilon-trypsin	88.1/6.67	338
antioxidant and detoxification				
S13	gi 193788703	protein disulfide-isomerase [<i>Danio rerio</i>]	56.6/4.55	237
X15	gi 27881963	Sb : cb825 protein [<i>Danio rerio</i>]	54.7/6.32	195
other				
X14	gi 47223959	unnamed protein product [<i>Tetraodon nigroviridis</i>]	54.7/4.74	84
S26	gi 45382019	regucalcin [<i>Gallus gallus</i>]	33.2/5.77	108
X29	gi 45382019	regucalcin [<i>Gallus gallus</i>]	33.2/5.77	97

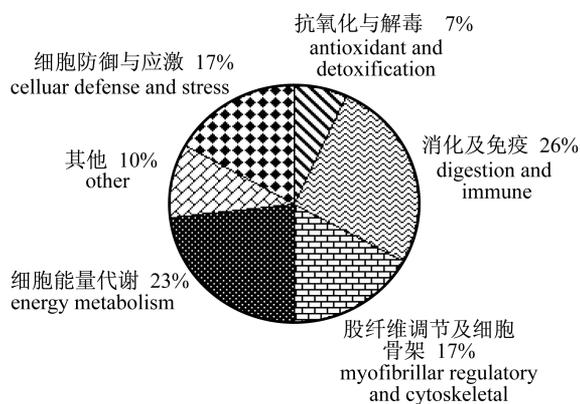


图4 吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织显著差异表达蛋白的生物学功能分类
Fig. 4 Analysis of significantly expressed proteins according to their biological process

肝脏是动物机体合成蛋白质的重要器官,对外界环境的变化非常敏感,一旦动物机体受到外界环境因素的应激,肝脏蛋白质的表达就受到一定的影响。本研究解剖感染无乳链球菌后的吉富罗非鱼,发现感染后3个时期的肝脏组织均出现明显的出血肿大,有的出现坏死灶。结合质谱鉴定结果,在感染无乳链球菌24~144 h组中发现,吉富罗非鱼肝脏组织内细胞的ATP合成酶等相关蛋白质表达变化明显,可能与能量代谢增强后减弱无乳链球菌对肝脏的感染力有关,说明肝脏在吉富罗非鱼合成及分解代谢生物学过程中的重要地位。本研究结果与Liang等^[19]研究WSSV感染南美白对虾(*Penaeus vannamei*)的结果相近。同时在这2个时期也检测到与能量代谢密切相关的醛脱氢酶及葡萄糖磷酸变位酶出现下调,与Xiong等^[20]研究斑马鱼(*Danio rerio*)感染传染性脾肾坏死病毒相一致。这可能是由于细菌侵入时,机体为了保持体内的能量供应而出现免疫的现象。

在吉富罗非鱼感染无乳链球菌后,出现较多的细胞骨架肌纤维调节蛋白表达发生变化,这些蛋白表现出较强的肌纤维特异性,并随着肌纤维的发育而变化。肌球蛋白是一个超级家族,是一种多功能肌动蛋白,为肌肉收缩提供动力;一些传统的肌球蛋白在细胞粘附、为吞噬小体的形成和发生吞噬作用时传输提供能量都具有重要意义^[21]。本研究鉴定出多个不同的蛋白质点均为肌动蛋白或其他肌动蛋白亚型。在感染时期之所以出现这样的变化,有可能是在感染初期,机体突然受到细菌的入侵而出现的肌纤维调节应答反应,在感染末期,机体已

经适应和耐受了外源细菌的入侵,这些细胞骨架蛋白就会维持肌纤维的完整、肌节排列及细胞膜等结构。推测出这些肌纤维调节蛋白在罗非鱼抗无乳链球菌的过程中发挥重要的作用,为肌肉收缩、细胞物质运输和细胞分裂等提供动力。

分子伴侣是一类重要蛋白,主要功能是促进新生蛋白的正确折叠,而且分子伴侣介导的应激反应是生命活动中重要的一部分^[22]。热休克蛋白(HSPs)也称应激反应蛋白,是一类重要的分子伴侣蛋白,具有重要的细胞功能,能维持细胞内环境动态平衡,在生物体的生长、发育、进化以及对机体生理状态的保持和病理修复中都发挥着重要的作用。本研究发现无乳链球菌感染24 h后鉴定出的内质网应激反应蛋白葡萄糖调节蛋白78(78 kDa glucose-regulated protein, GRP78)是属于热休克蛋白家族^[23]。这类蛋白在机体感染48~144 h内表达较为明显,可以推断出在感染初期和中期,机体由于受到细菌入侵而出现一系列应激反应。同时,在无乳链球菌的感染实验时发现,感染后的水温比感染前高3~5℃,但在感染12 d后水温有逐渐恢复为感染前的趋势。这也表明无乳链球菌感染后导致吉富罗非鱼肝脏新陈代谢活动加强。

在鉴定的质谱结果中,有2类蛋白质与免疫有关,分别是NCCRP-1(NCC receptor 1 like protein)受体蛋白和胰蛋白酶(trypsin)。细菌感染后,这2种蛋白质表达明显下调,推测可能在受到无乳链球菌感染后机体的免疫力下降。其中胰蛋白酶不仅在碳水化合物及蛋白质消化中起重要作用,还在免疫反应中起作用。胰蛋白酶是丝氨酸蛋白酶家族的重要成员,是动物消化蛋白质的重要酶类^[24],主要来源于鱼类的肝胰脏、肠道和幽门盲囊,在鱼类消化、生长速率和仔鱼的成活率方面都有着重要的作用^[25]。有学者提出血溶性路线是链球菌感染传播的主要途径,通过血液循环破坏肝、肾、脾等器官引发全身性出血,所以造成罗非鱼的抗病力和抗逆力下降^[26]。本研究发现这类蛋白在无乳链球菌感染后表达下调及消失,可能反应了吉富罗非鱼免疫体系的破坏,在感染WSSV的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的肝脏组织蛋白及斑节对虾(*Penaeus monodon*)胃组织蛋白质组学研究中,也有相似的研究结果^[27]。NCCRP-1受体蛋白是自然杀伤细胞

(NK)进化上的前体细胞,在鱼类中被称作非特异性细胞毒性细胞(non-specific cytotoxic cell, NCC)的受体之一,它在体内负责帮助 NCC 细胞识别各种靶细胞^[28-29]。本实验中发现 NCCRP-1 经无乳链球菌诱导后 24 h ~ 12 d 内表达下调,说明在鱼类中链球菌的诱导抑制激活 NCC 细胞这一途径。应激对鱼体免疫细胞活性的影响是相当复杂的,其详细机理还有待进一步研究。

综上所述,本研究分析了吉富罗非鱼感染无乳链球菌前后 4 个时期肝脏组织蛋白质组的表达变化,表达差异较大的主要是消化免疫蛋白、能量代谢蛋白和应激蛋白,其表达变化规律在一定程度上呈现了机体免疫反应,研究结果为进一步研究无乳链球菌与宿主的相互作用机制、无乳链球菌疫苗的研制及吉富罗非鱼抗病品种选育奠定了基础。但是,要了解各蛋白质在无乳链球菌感染过程中的作用机制,则需要对各个蛋白质进行深入功能分析和验证,下一步研究将合成免疫相关的蛋白质,并验证其生物学功能,对其所在的蛋白质调控通路做深入分析。

参考文献:

- [1] 陈贺,吴灶和,王蓓,等. 无乳链球菌灭活疫苗对罗非鱼的免疫效果[J]. 广东海洋大学学报,2012,32(6):50-56.
- [2] Chen M, Li L P, Wang R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(3-4):526-530.
- [3] 黎炯. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及重组表面免疫原性蛋白 His-Sip 的免疫效果初步研究[D]. 上海:上海海洋大学,2011.
- [4] 孙成友,李娟,刘雨田,等. 蛋白质组学技术在病毒及其感染机制研究中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2013,40(5):75-79.
- [5] 余素红. 大黄鱼免疫应答的功能蛋白质组学研究[D]. 厦门:厦门大学,2008.
- [6] Gygi S P, Corthals G L, Zhang Y, et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17):9390-9395.
- [7] Graves P R, Haystead T A J. Molecular biologist's guide to proteomics[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(1):39-63.
- [8] Rattanarojpong T, Wang H C, Lo C F, et al. Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection[J]. Proteomics, 2007, 7(20):3809-3814.
- [9] Yu S, Mu Y, Ao J, et al. Peroxiredoxin IV regulates pro-inflammatory responses in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and protects against bacterial challenge [J]. Journal Proteome Research, 2010, 9(3):1424-1436.
- [10] Nabil A E A, Inge T, Greert C, et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35-37 weeks of pregnancy [J]. BMC Infectious Diseases, 2009, 9:153.
- [11] 郭玉娟,张德锋,樊海平,等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究[J]. 水产学报, 2012,36(6):399-406.
- [12] 柴壮林,祝璟琳,杨弘,等. 不同温度下罗非鱼人工感染海豚链球菌后血液生化指标及组织病理[J]. 广东海洋大学学报,2012,32(4):34-41.
- [13] 李莉萍,王瑞,黄婷,等. 广西罗非鱼链球菌病流行菌株 PCR 鉴定和 PFGE 基因型分析[J]. 水产学报,2013,37(6):927-935.
- [14] Evans J J, Klesius P H, Shoemaker C A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration [J]. Vaccine, 2004, 22(27-28):3769-3773.
- [15] 王蓓,简纪常,鲁义善,等. 罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 转录调控因子 rovS 基因的克隆及表达研究[J]. 水产学报,2013,37(4):584-592.
- [16] 朱佳杰,李莉萍,唐瞻杨,等. 吉富罗非鱼家系构建及抗病力检测[J]. 南方水产科学,2012,8(6):22-27.
- [17] Yan J X, Wait R, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000, 21(17):3666-3672.
- [18] 姜义仁. 柞蚕微孢子虫检测及感染柞蚕中肠转录组及蛋白质组选研究[D]. 辽宁:沈阳农业大学,2012.
- [19] Liang Y, Cheng J J, Yang B, et al. The role of F₁ ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Virology Journal, 2010, 7:144.
- [20] Xiong X P, Dong C F, Xu X P, et al. Proteomic analysis of zebrafish (*Danio rerio*) infected with

- infectious spleen and kidney necrosis virus [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(4):431–440.
- [21] Knight A E, Molloy J E. Muscle, myosin and single molecules [J]. *Essays in Biochemistry*, 2000, 35: 43–59.
- [22] 王会峰. 分子伴侣及其在蛋白质折叠中的作用研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(4): 746–748.
- [23] Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(19):3702–3710.
- [24] Ruan G L, Li Y, Gao Z X, *et al.* Molecular characterization of trypsinogens and development of trypsinogen gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and topmouth culter (*Culter alburnus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(1):77–85.
- [25] 陈文波, 李卫国, 张珍, 等. 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原基因的克隆、序列分析及组织表达 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2013, 52(1):111–117.
- [26] 卓玉琛. 罗非鱼暴发性流行病组织病理的研究 [J]. *福建水产*, 2008(3):27–30.
- [27] 蒋昊. 中国明对虾在胁迫条件下肝胰脏的差异蛋白质组学研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2009.
- [28] Ishimoto Y, Savan R, Endo M, *et al.* Non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP)-1 type gene in tilapia (*Oreochromis niloticus*): its cloning and analysis [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16(2):163–172.
- [29] Cuesta A, Esteban M J, Meseguer J. Molecular characterization of the nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, 29(7):637–650.

Proteome analysis of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver in different periods after *Streptococcus agalactiae* infection

ZHU Jiajie¹, SHEN Xiashuang¹, FU Qiang², CHEN Ming¹, ZHOU Yu¹, TAN Yun¹, GAN Xi^{1*}

(1. *Guangxi Academy of Fishery Sciences, Guangxi Key Lab of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Nanning 530021, China;*

2. *College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China*)

Abstract: The protein expression of tilapia liver in different periods was studied after *Streptococcus agalactiae* infection. Two-dimensional electrophoresis was employed to analyze the proteome from liver of GIFT tilapia at 0 h, 24 h, 48–144 h and 12 days after *Streptococcus agalactiae* infection. The differential expressing proteins were identified by mass spectrometry. The results show that there were significant differences between experimental groups and control group in the proteomic map. Among the 30 differentially expressed proteins, 13 show an up-regulated expression and 15 shows down-regulated expression. Two proteins disappeared in the infection group 12 days later. The function classification of these proteins was analyzed by MALDI-TOF/TOF 4800 and mascot soft ware. They included association with energy metabolism proteins, cell defense and stress proteins, digestive immune proteins, immune and detoxification and other proteins. It is likely that they play an important role in the resistance responses to *Streptococcus agalactiae*. The discovery and identification of these proteins can offer a valuable insight into Tilapia *Streptococcus lactis* vaccine development and disease resistance breeding.

Key words: GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*); *Streptococcus agalactiae*; proteomics; two dimensional electrophoresis

Corresponding author: GAN Xi. E-mail: ganxicn@126.com