

文章编号: 1000 - 0615(2002)01 - 0042 - 05

## 采用蛋白质组学方法研究 嗜水气单胞菌的生长代谢

吴谋胜, 彭宣宪

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:**采用蛋白质组学的方法之一——二维电泳技术,对嗜水气单胞菌生长周期中各不同阶段的蛋白质组成进行了分析。结果显示,在不同生长阶段,其蛋白质组成均发生明显变化。发现了与细菌生长代谢各阶段生理活动有关的差异蛋白质,有助于深入了解嗜水气单胞菌生长周期中不同阶段的基因组表达情况。同时,还对二维电泳和普通 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行比较。结果表明,二维电泳技术是研究蛋白质组学的有效工具。

**关键词:**蛋白质组学;二维电泳;嗜水气单胞菌;生长代谢

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A

### Studying the growth metabolism of *Aeromonas hydrophila* with the methods of proteomics

WU Moursheng, PENG Xuan-xian

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Aeromonas hydrophila* is one of the important pathogenic bacteria of aquaculture. It is significant, therefore, to study the changes on functional genome in its growth cycle. Two-dimensional electrophoresis (2-D PAGE), one of the approaches for proteomics, was used to study protein composition in different phases during the cycle. The result showed that the composition was significantly changed in different phases. The discovery of different pertinent proteins in the different growth phases will contribute to find out the genome expression of *A. hydrophila* in different growth phases. In this experiment 2-D PAGE was compared with normal SDS-PAGE in the same conditions, and the result indicated that 2-D PAGE was an effective technique for proteomics study.

**Key words:** proteomics; two-dimensional electrophoresis; *Aeromonas hydrophila*; growth metabolism

细菌新陈代谢被分为迟滞期、对数生长期、稳定期和死亡期四个阶段。然而,这仅是对细菌生长现象的一种理论总结,而对导致这些变化的功能基因组变化尚不清楚。蛋白质组学是研究功能基因组的可靠方法,其中的二维电泳技术可以在一个平面上分离数以千计的蛋白质,可以在整体水平上研究生命活动的规律,是比较不同条件下同种细胞功能基因组变化的最好技术<sup>[1]</sup>。本文以水产养殖重要致病菌

收稿日期: 2001-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770585)

作者简介: 吴谋胜(1977-),男,福建泉州人,硕士,主要从事微生物蛋白质组学研究。

通讯作者: 彭宣宪(1954-),男,江西安福人,教授,博士生导师,主要从事免疫生物学和分子生物学研究。Tel: 0592-2183805, E-mail: wangpeng@jingxian.xmu.edu.cn

——嗜水气单胞菌为对象,研究细菌新陈代谢各期中蛋白质组群变化情况,旨在为控制这种病原菌提供分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 嗜水气单胞菌

嗜水气单胞菌 58209<sup>#</sup> 购自中国科学院武汉水生生物研究所鱼病研究室。

### 1.2 细菌培养、计数、收集和破碎

将嗜水气单胞菌接种于牛肉膏蛋白胨培养基,28℃ 培养 18h,作为种子菌。而后接种于上述同种培养基,接种比例 1:25(菌液:培养基),培养时间分别为 6h,12h,18h,24h,30h,42h,54h。培养结束后,取 2mL 菌液参照文献[2]的方法作平板菌落计数。其余培养液于 4 000r·min<sup>-1</sup>离心 10min,收集菌体,用 50mmol L<sup>-1</sup>,pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液洗涤 3 次,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10min,收集菌体,用同种缓冲液悬浮。用 Virsonic 475 超声细胞破碎仪(VirTis 公司产品)超声破碎。

### 1.3 电泳样品处理

在超声破碎后的菌液中加入 DNase (终浓度为 50μg·mL<sup>-1</sup>)和 RNase A(终浓度为 20μg·mL<sup>-1</sup>),37℃ 处理 30min 后,加入裂解液处理,12 000g,4℃ 离心 10min,取上清进行双向电泳。

### 1.4 二维电泳

二维电泳按文献[3]的方法进行,电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色。GDS8000pc-凝胶成像分析系统扫描,进行图象分析,打印输出照片。

### 1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(1-D PAGE)

样品按 1-D PAGE 的方法处理,其它电泳条件均与二维电泳的条件一致。脱色后用 GDS8000pc-凝胶成像分析系统扫描,进行图象分析,打印输出照片。

## 2 结果与分析

### 2.1 嗜水气单胞菌生长曲线的测定

从图 1 中可以看出嗜水气单胞菌的迟滞期比较短,6h 时为对数生长期,12h 时为稳定期,12h 以后该细菌开始进入死亡期。

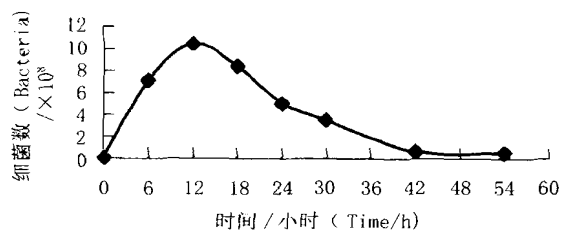


图 1 嗜水气单胞菌的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Aeromonas hydrophila*

### 2.2 二维电泳结果

#### 2.2.1 细菌生长代谢周期的二维电泳图谱

细菌经 6h,12h,18h,24h,30h,42h 和 54h 培养,其生长代谢的二维电泳图谱见图 2。

#### 2.2.2 细菌 6h 与 12h 培养物的二维电泳比较

嗜水气单胞菌 6h 与 12h 培养物的二维电泳图谱比较结果表明,6h 的二维电泳图谱比 12h 的多 1 个蛋白质点,12h 的比 6h 的多 2 个蛋白质点(图 3),提示细菌的总蛋白质组成在稳定期与对数生长期基本一致。

#### 2.2.3 细菌 12h 与 18h 培养物的二维电泳比较

嗜水气单胞菌 12h 与 18h 培养物的二维电泳图谱比较结果表明,18h 时的嗜水气单胞菌的二维电泳图谱比 12h 的多了 12 个蛋白质点(图 4),其中的 5 个蛋白质点位置比较集中(图 4 中第 3 组)。这些差异蛋白质的表达,可能与细菌从稳定期到死亡期有关。

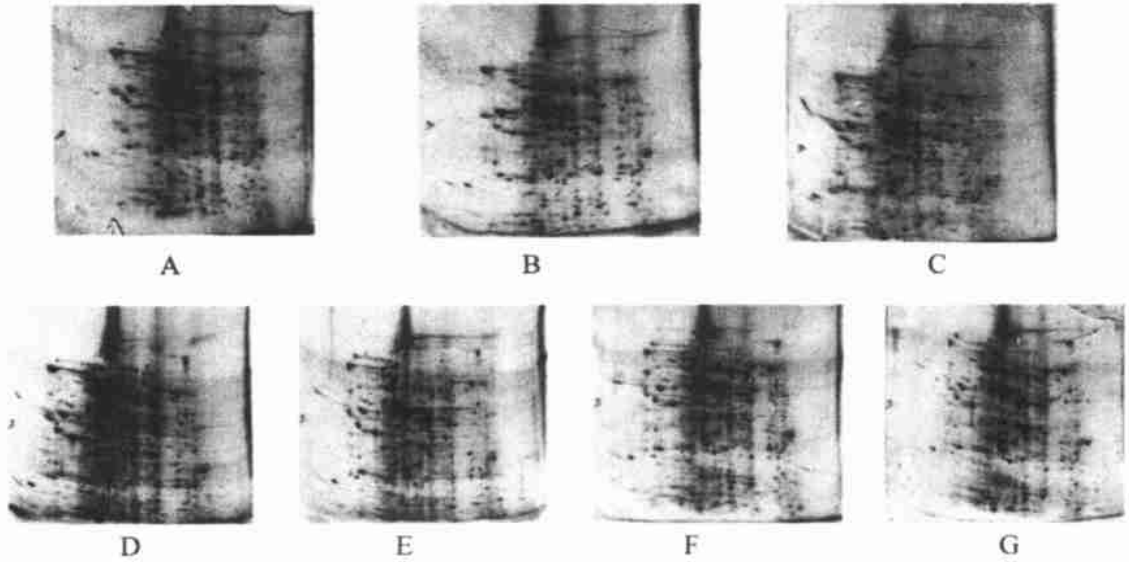


图2 嗜水气单胞菌各个生长阶段的二维电泳图谱

Fig.2 2-D PAGE of *A. hydrophila* grown at different phases  
A: 6h; B: 12h; C: 18h; D: 24h; E: 30h; F: 42h; G: 54h

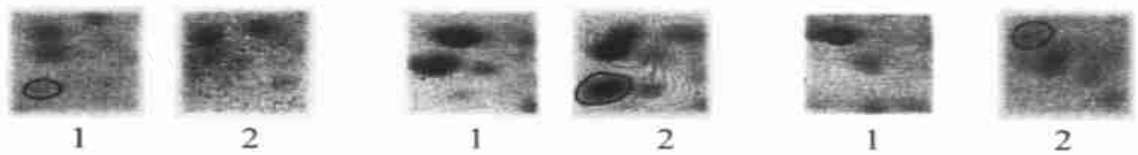


图3 嗜水气单胞菌在6h与12h时二维电泳图谱的图谱比较(记号表示差异蛋白质点,图象比例为4:1)

Fig.3 The comparison of 2-D PAGE images of *A. hydrophila* at 6h with 12h

1: 6h; 2: 12h; (The dots with marker represent for the different proteins, and the proportion is 4:1)

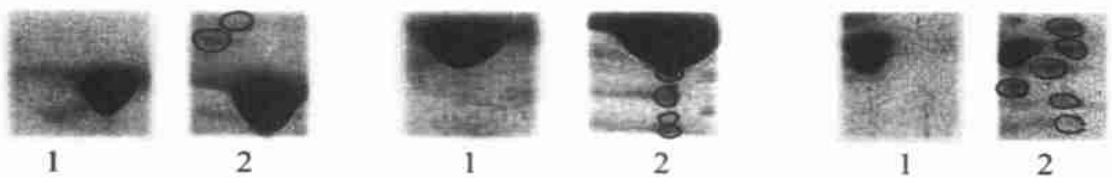


图4 嗜水气单胞菌在12h与18h时二维电泳图谱的比较(图象比例为4:1)

Fig.4 The comparison of 2-D PAGE images of *Aeromonas hydrophila* at 12h with 18h

1: 12h; 2: 18h(the proportion is 4:1)

#### 2.2.4 细菌18h与24h培养物的二维电泳比较

嗜水气单胞菌18h与24h培养物的二维电泳图谱比较结果表明,24h的二维电泳图谱比18h的多了14个蛋白质点,而少了18h时位置比较集中的5个蛋白质点。24h时活菌数迅速减少,新蛋白质点的出现可能与细菌生长的微环境急剧变化有关(图5)。

#### 2.2.5 细菌24h和30h培养物的二维电泳比较

30h时嗜水气单胞菌的二维电泳图谱与24h的并无太大的差别,它比24h的少了3个蛋白质点(图6)。这一时期的细菌生理生化性质与24h的比较接近。

### 2.2.6 细菌 30h 与 42h 培养物的二维电泳比较

嗜水气单胞菌 30h 与 42h 培养物的二维电泳图谱比较结果表明,在 42h 时,嗜水气单胞菌的二维电泳图谱比 30h 的少了 8 个蛋白质点,但出现了两个新的蛋白质点(图 7)。

### 2.2.7 细菌 42h 与 54h 培养物的二维电泳比较

嗜水气单胞菌 42h 与 54h 培养物的二维电泳图谱比较结果表明,54h 时细菌的二维电泳图谱与 42h 的二维电泳图谱并没有差别。从细菌的生长曲线来看,细菌的活菌数已趋于稳定。

### 2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 8。对其进行分析发现,以上 7 个时间段的电泳图谱并没有质的变化,即没有出现新的蛋白质条带,但从图中可以发现只有量上的变化如箭头所示。

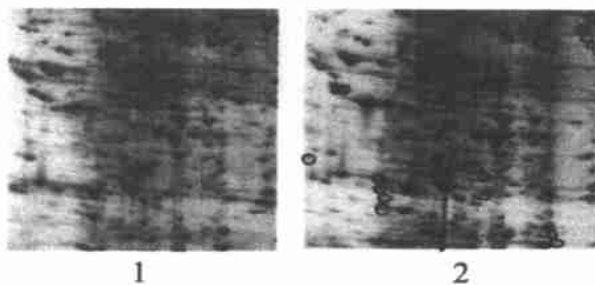


图 5 嗜水气单胞菌在 18h 与 24h 时二维电泳图谱的比较 (图象比例为 1 2.5)

Fig.5 The comparison of 2-D PAGE images of *A. hydrophila* at 18h with 24h  
1: 18h; 2: 24h (the proportion is 1 2.5)



图 6 嗜水气单胞菌在 24h 与 30h 时二维电泳图谱的比较(图象比例为 4 1)

Fig.6 The comparison of 2-D PAGE images of *A. hydrophila* at 24h with 30h  
1: 24h; 2: 30h (the proportion is 4 1)

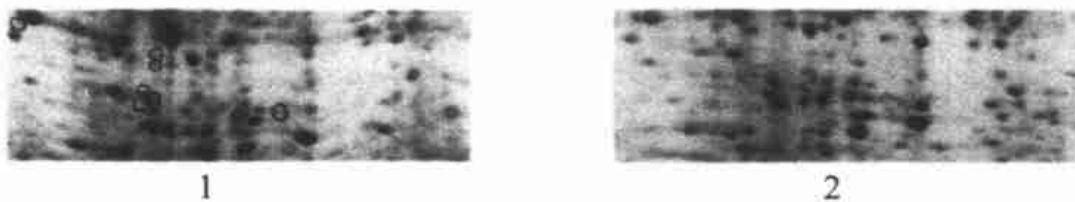


图 7 嗜水气单胞菌在 30h 与 42h 时二维电泳图谱的比较(图象比例为 1 2)

Fig.7 The comparison of 2-D PAGE images of *A. hydrophila* at 24h with 30h  
1: 30h; 2: 42h (the proportion is 1 2)

## 3 讨论

蛋白质组学是一门新兴的学科,可以在整体水平上对生命活动现象进行研究。它比基因组学更能够深入研究生命活动的规律,可以解决基因组学所不能解决的问题,如转录后修饰、基因表达的时空性等。目前,微生物蛋白质组学已得到广泛的研究,其主要集中在微生物对外界环境变化的适应性研究<sup>[4]</sup>。但对于生长周期中的微生物蛋白质组学研究则未见报道。本文采用蛋白质组学的核心技术,对嗜水气单胞菌生长过程的不同阶段进行分析。根据生长稳定期为 12h 的结果<sup>[5]</sup>,选择 6h 为一个测定点,发现该菌在生长周期的不同阶段其基因组表达发生相应变化,对这些变化进一步分析,将有利于深入了解细菌生长周期各阶段的功能基因组变化,有助于深入了解细菌在不利生长条件下所采取的保护

性机制,并对了解嗜水气单胞菌生长繁殖过程中的生理生化变化以及防治其引起的疾病具有重要意义。此外,细菌生长周期的不同阶段其蛋白质组群的明显差异可能影响细菌生理生化的结果,今后应根据研究目的选择相应时期的细菌培养液,并在分析检测结果时重视这一影响因素。

本文还比较了该菌不同生长时期的 2-D PAGE 与 1-D PAGE 图谱。从实验结果来看,2-D PAGE 能够较好显示出细菌生长周期各阶段蛋白质组群的差异,但 1-D PAGE 仅能展示出某些量的差异而不能展示出质的不同。这些结果说明,高分辨率的二维电泳技术在分析蛋白质组群变化中的重要性。

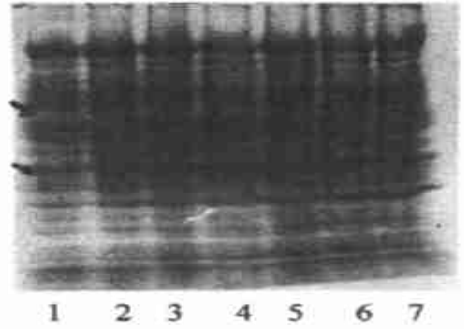


图8 嗜水气单胞菌各个生长时期的 SDS-PAGE 图谱  
(记号表示量变化的蛋白质带)

Fig. 8 The SDS-PAGE image of *A. hydrophila* in different phases

1: 6h; 2: 12h; 3: 18h; 4: 24h; 5: 30h; 6: 42h; 7: 54h

### 参考文献:

- [1] Michael J D, Kelvin H L. Proteomic analysis[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000,11:176 - 179.
- [2] Shen R, Fan X R, Li G W. Methodology in Microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999. 92 - 95. [沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 92 - 95.]
- [3] Xia Q C. Technology and Progress in research on Protein Chemistry[M]. Beijing: Science Press, 1999. 124 - 135. [夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 124 - 135.]
- [4] Michael P W, John R Y. Analysis of the microbial proteome[J]. Current Opinion in Microbiology, 2000,3:292 - 297.
- [5] Zhang C X, Wang J, Su Y Q, et al. Study on Pathogenic Biology of Bacterial Disease Occurring in *Penaeus monodon* Fabricius[A]. The Health Culture of Shrimps[M]. Beijing: China Ocean Press, 1998. 129 - 138. [张朝霞, 王军, 苏永全, 等. 斑节对虾细菌性疾病的病原学研究[A]. 虾类的健康养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 1998. 129 - 138.]

## 编委介绍

热烈祝贺《水产学报》编委会委员、中国水产科学研究院淡水渔业研究中心研究员夏德全教授于 2001 年 12 月当选为中国工程院院士。

夏德全,男,上海市人,1938 年 12 月出生,1963 年毕业于南京大学生物系,1981 - 1983 年作为访问学者在美国伊利诺斯大学遗传系进行生化和分子生物学研究,现为中国水产科学研究院淡水渔业研究中心研究员,上海水产大学名誉教授,兼职博士生导师。南京农业大学教授,博士生导师,国务院学位委员会第四届学科评议组成员。1992 年被农业部授予有突出贡献的中青年专家,同年获国务院特殊津贴,1997 年获首届中华农业科教奖,2000 年获“大北农科技基金”科技促进奖。

夏德全先生长期从事鱼类遗传育种研究,先后主持了国家“863”、国家科技攻关、国家自然科学基金等重大课题二十多项,先后获国家科技进步奖 3 项,其中二等奖 1 项,三等奖 2 项,获农业部科技进步奖 7 项,其中一等奖 2 项,二等奖 2 项,三等奖 3 项。他在国内外学术刊物上发表论文 60 多篇,多次应邀去国外讲学和参加国际学术交流,已培养了 30 多名硕士和博士研究生,为发展我国鱼类育种的理论和实践作出了重大贡献。