

郭长明, 袁 橙, 朱善元, 等. 应用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术筛选无乳链球菌鱼源株与牛源株差异表达蛋白[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 868-873.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.022

## 应用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术筛选无乳链球菌鱼源株与牛源株差异表达蛋白

郭长明<sup>1</sup>, 袁 橙<sup>1</sup>, 朱善元<sup>1</sup>, 刘广锦<sup>2</sup>, 陆承平<sup>2</sup>, 刘永杰<sup>2</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300; 2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为揭示不同宿主来源无乳链球菌致病机制, 提取无乳链球菌鱼源株 GD201008-001 和牛源株 ATCC13813 的全菌蛋白质, 经 iTRAQ 试剂标记后进行质谱鉴定, 质谱数据用软件 Mascot2.2 和 ProteomeDiscoverer1.4 进行查库 (UniProt 数据库) 鉴定及定量分析, 并利用 blast2go 软件对差异蛋白质进行 GO (gene ontology) 功能注释。共鉴定出在鱼源株 GD201008-001 和牛源株 ATCC13813 中差异表达的蛋白质 17 个 ( $P < 0.05$ ), 其中在 ATCC13813 中上调表达的蛋白质 3 个 (比值  $> 1.500$ ), 下调表达的蛋白质 14 个 (比值  $< 0.667$ )。GO 分析预测结果表明这些蛋白质主要参与 15 个生物学功能, 涉及代谢过程、细胞成分、结合、催化活性、结构分子活性等。其中 *cpsIVK* 在牛源株 ATCC13813 中下调最显著, 其功能为荚膜生物合成蛋白质, 与无乳链球菌荚膜合成相关。进一步验证发现, 鱼源株 GD201008-001 抵抗小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬的能力显著高于 *cpsIVK* 下调的牛源株 ATCC13813 ( $P < 0.01$ ), 提示 *cpsIVK* 可能在鱼源无乳链球菌逃避宿主免疫细胞吞噬过程中发挥功能。

**关键词:** 无乳链球菌; 鱼源株; 牛源株; iTRAQ; *cpsIVK* 基因; 蛋白质组学

**中图分类号:** S941.42      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0868-06

## Quantitative identification of differential proteins in *Streptococcus agalactiae* piscine strain and bovine strain using iTRAQ

GUO Chang-ming<sup>1</sup>, YUAN Cheng<sup>1</sup>, ZHU Shan-yuan<sup>1</sup>, LIU Guang-jin<sup>2</sup>, LU Cheng-ping<sup>2</sup>, LIU Yong-jie<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Provincial Veterinary Bio-pharmaceutical High-tech Key Laboratory, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To identify differentially expressed proteins in *Streptococcus agalactiae* (*S. galactiae*) piscine strain (GD201008-001) and bovine strain (ATCC13813) by iTRAQ, and provide new clues for exploring the pathogenic mechanism of *S. galactiae* strains isolated from different hosts, cellular proteins were extracted from cultures of *S. galactiae*

GD201008-001 and ATCC13813, and labeled with isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). Differentially expressed proteins were identified with LC-MS/MS. The mass spectrometry data was analyzed by Mascot2.2 and Proteome Discoverer1.4 and subjected to biological information analysis by blast2go. A total of 17 differentially expressed proteins were revealed in GD201008-001 and ATCC13813 ( $P < 0.05$ ), among which 3 proteins were up-regulated (ratio  $> 1.5$ ) and 14 were down-regulated (ratio  $< 0.667$ ) in ATCC13813. These

收稿日期: 2017-01-22

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31502085); 江苏省自然科学基金青年科学基金项目 (BK20140703); 中央高校基本科研基金项目 (KJQN201618); 江苏农牧科技职业学院科研项目 (NSF201503)

**作者简介:** 郭长明 (1984-), 男, 山东临朐人, 博士, 讲师, 主要从事预防兽医学 (病原微生物和寄生虫分子免疫方向) 研究。  
(E-mail) gcmscience@126.com

**通讯作者:** 刘永杰, (E-mail) liuyongjie@njau.edu.cn

proteins are involved in 15 biological functions including metabolic process, cell composition, binding, catalytic activity, and hypothetical proteins. The most down-regulated protein *cpsIVK* encoding capsule biosynthesis protein was related to *S. agalactiae* capsular synthesis. Further experiments showed that the antiphagocytosis of GD201008-001 resisting murine macrophages RAW264.7 was significantly higher than ATCC13813 ( $P < 0.01$ ) in which *cpsIVK* was down-regulated, suggesting that *cpsIVK* may play a role in the resistance to host immune cell phagocytosis of *S. galactiae* piscine strain.

**Key words:** *Streptococcus galactiae*; piscine strain; bovine strain; iTRAQ; *cpsIVK* gene; proteomics

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*), 亦称 B 群链球菌 (Group B streptococci, GBS), 是自然界中广泛存在的一种革兰氏阳性菌。无乳链球菌可寄生于反刍动物的乳腺中, 导致牛奶的质量和产量下降<sup>[1]</sup>。近年来, 世界多个国家报道了鱼类无乳链球菌病的爆发流行, 感染鱼类包括海鱼和淡水鱼, 造成多种鱼类死亡, 罗非鱼等温水性鱼类感染尤其严重<sup>[2-3]</sup>。中国南方地区近年也爆发了罗非鱼无乳链球菌病, 给罗非鱼养殖业造成巨大经济损失<sup>[4]</sup>, 且目前尚无有效防控手段。

目前无乳链球菌相关研究侧重于牛源株与人源株, 对鱼源无乳链球菌的致病机制研究较少。因无乳链球菌宿主范围广泛, 存在异种宿主之间交叉传播的可能性, 因此, 相同血清型且不同宿主来源的无乳链球菌蛋白表达谱是否存在差异, 差异表达蛋白中是否存在新的毒力因子等问题都还需要进一步的研究和探讨。同位素标记相对和绝对定量 (Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术是 2004 年由美国 ABI (应用生物系统公司) 开发的一种同位素标记的蛋白质组学定量技术<sup>[5]</sup>。该技术可同时对 2~8 个样品进行相对定量研究, 具有很好的精确性和重复性, 是目前在比较蛋白质组学上应用效果较好的标记技术之一<sup>[6]</sup>。本研究通过 iTRAQ 技术筛选无乳链球菌不同宿主来源株差异表达蛋白, 以期获得新的毒力因子, 为阐明无乳链球菌的致病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和细胞系

无乳链球菌鱼源株 GD201008-001 分离自广东省某罗非鱼养殖场患病罗非鱼, 由南京农业大学刘广锦博士分离; 无乳链球菌牛源株 ATCC13813 购自 ATCC (美国模式培养物集存库), 血清型为 Ia 型。小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 购自美国 ATCC 细胞库, 由江苏农牧科技职业学院江苏省兽用生物制

药高技术研究重点实验室保存。细胞培养条件为: DMEM 完全培养基, 15% FBS, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 使用 0.25% 胰酶消化传代。

### 1.2 主要仪器和试剂

Q-Exactive 质谱仪、Easy nLC1000 纳升级液相色谱仪为 Thermo 公司产品, AKTA Purifier 100 纯化仪、600V 电泳仪为 GE 公司产品, 低温高速离心机、真空离心浓缩仪为 Eppendorf 公司产品, 可见紫外分光光度计为尤尼柯公司产品。十二烷基硫酸钠 (SDS)、尿素、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、二硫苏糖醇 (DTT)、吡啶乙酸 (IAA) 均购自 Bio-rad 公司, iTRAQ Reagent-8plex Multiplex Kit、溶解缓冲液购自 AB SCIEX 公司, 胎牛血清 (FBS)、杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) 培养基、0.25% 胰酶购自 Gibco 公司, C18 除盐柱购自 Sigma 公司。5×上样缓冲液: 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 500 mmol/L DTT, 250 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8; SDT 缓冲液: 4% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, pH 7.6; UA 缓冲液: 8 mol/L 尿素, 150 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0。

### 1.3 无乳链球菌蛋白质制备

1.3.1 制备方法 将无乳链球菌鱼源株 GD201008-001、牛源株 ATCC13813 菌株活化后, 在 THB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至对数期。离心取沉淀, PBS 洗涤 3 次, 菌体沉淀中加入 500 μl STD buffer (4% SDS, 1 mmol/L DTT, 150 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 匀浆, 沸水浴 5 min。超声波破碎 (80 W, 超声 10 s, 间歇 15 s, 共 10 次), 沸水浴 5 min, 离心取上清, BCA 法进行蛋白质定量。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳 取 20 μg 蛋白质样品加入 1/5 体积的 5×上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 14 000 g 离心 10 min, 取上清, 进行 12.5% SDS-PAGE 电泳。电泳条件: 14 mA 恒流, 电泳时间 90 min。考马斯亮蓝染色。

### 1.4 蛋白质酶解和肽段定量

各取 200 μg 蛋白质样品, 按照 Wiśniewski 等<sup>[7]</sup>

的方法进行酶解和肽段定量。

### 1.5 肽段标记及 SCX 分级

两组样品肽段分别取 80  $\mu\text{g}$ , 按照 AB 公司试剂盒 iTRAQ Reagent-8plex MultiplexKit 说明书进行标记。将标记后的所有肽段混合, 进行 SCX 预分级。SCX 分级后, 收集洗脱肽段样品约 36 份。根据 SCX 色谱图合并成 6 份肽段样品, 冻干后用  $\text{C}_{18}$  除盐柱脱盐。

### 1.6 质谱分析

将每份脱盐肽段样品用纳升流速 HPLC 液相系统 Easy nLC 进行分离。缓冲液 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 缓冲液 B 为 0.1% 甲酸乙腈水溶液 (乙腈为 84%)。色谱柱以 95% 的缓冲液 A 平衡。样品由自动进样器上样到上样柱 Thermo scientific EASYcolumn (2 cm $\times$  100  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ - $\text{C}_{18}$ ), 再经分析柱 Thermo scientific EASY column (75  $\mu\text{m}$  $\times$ 100 mm, 3  $\mu\text{m}$ - $\text{C}_{18}$ ) 分离, 流速为 300 nl/min。相关液相梯度如下: 0~55 min, B 液线性梯度从 0% 到 40%; 55~58 min, 缓冲液 B 线性梯度从 40% 到 100%; 58~60 min, 缓冲液 B 维持在 100%。

每份样品经毛细管高效液相色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪 (Thermo 公司) 进行质谱分析。分析

时长: 60 min, 检测方式: 正离子; 母离子扫描范围: 300~1 800 m/z, 一级质谱分辨率: 在质荷比 200 时为 70 000, 自动增益目标值: 3e6, 一级最大注入时间: 10 ms, 扫描范围数: 1, 动态排除时间: 40.0 s。多肽和多肽碎片的质量电荷比按照下列方法采集: 每次全扫描后采集 10 个碎片图谱, 二级碎裂模式: 高能碰撞解离, 隔离窗口: 2 m/z, 二级质谱分辨率: 在质荷比 200 时为 17 500, 扫描叠加数: 1, 二级最大注入时间: 60 ms, 归一化的碰撞能量: 30 eV, 最小填充比: 0.1%。

### 1.7 质谱数据分析

质谱分析的原始数据为 RAW 文件, 用软件 Mascot2.2 和 ProteomeDiscoverer1.4 (thermo) 进行查库鉴定及定量分析。所用数据库为 uniprot\_Streptococcus\_agalactiae\_55498\_20160527.fasta 蛋白质库, 查库软件为 Mascot 2.2。查库时将 RAW 文件通过 Proteome Discoverer 提交至 Mascot 服务器, 选择已经建立好的数据库, 然后进行数据库搜索。相关参数见表 1。结果过滤参数为 Peptide  $FDR \leq 0.01$ <sup>[8]</sup>。采用 Proteome Discoverer1.4 软件对肽段报告离子峰强度值进行定量分析, 分析参数见表 2。

表 1 Mascot 搜索参数

Table 1 Search parameters of Mascot

项目	数值
Type of search	MS/MS Ion search
Enzyme	Trypsin
Mass Values	Monoisotopic
Max Missed Cleavages	2
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C), iTRAQ8plex (N-term), iTRAQ8plex (K)
Variable modifications	Oxidation (M)
Peptide Mass Tolerance	$\pm 2.0 \times 10^{-5}$
Fragment Mass Tolerance	0.1
Protein Mass	Unrestricted
Database	uniprot_Streptococcus_agalactiae_55498_20160527.fasta
Database pattern	decoy

表 2 Proteome Discoverer1.4 定量分析参数

Table 2 Quantitative analysis parameters of Proteome Discoverer1.4

项目	数值
Protein Quantification	Use Only Unique Peptides
Experimental Bias	Normalize On Protein Median

### 1.8 生物信息学分析

采用 blast2go (<https://www.blast2go.com/>) 软件进行蛋白质的 GO (gene ontology) 功能注释。差异表达蛋白质的 GO 富集分析: 以不同菌株差异蛋白质为“test”, 以本试验鉴定到的全部蛋白质为“reference”, 利用超几何概率分布计算相应的  $P$  值, 选择 GO 层次 2 进行汇总。分别对细胞组分 (Cellular

component)、分子功能(Molecular function)和生物过程(Biological process)进行分析。

1.9 巨噬细胞对无乳链球菌的吞噬试验

吞噬试验按照 Lun 等<sup>[9]</sup>的方法,并作改进。在 24 孔细胞培养板内将 RAW264.7 培养至单层(每孔约  $4\times 10^5$  个细胞)后使用。用 PBS 将孔内细胞洗 3 遍,对数期细菌用 PBS 洗涤 3 次后以感染比(MOI) 10:1 加入细胞孔,室温 800 g 离心 10 min。将细胞板置于细胞培养箱培养 1 h 后,每孔用 PBS 洗 5 遍,加入含有青霉素 G 的 DMEM(终浓度 100 μg/ml)1 ml 继续培养 1 h 杀死胞外细菌。用灭菌水裂解细胞,进行平板计数。

2 结果

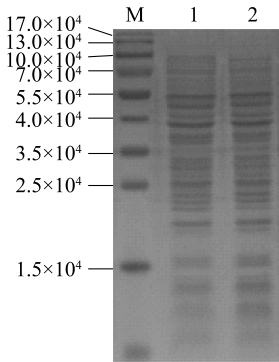
2.1 无乳链球菌鱼源株与牛源株菌体蛋白质的差异性

取无乳链球菌鱼源株 GD201008-001 和牛源株 ATCC13813 菌体蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳,结果(图 1)显示两样品蛋白质条带、定量一致性较好,表明两组样品蛋白质差异性较小。

2.2 无乳链球菌鱼源株与牛源株差异表达蛋白

将牛源株 ATCC13813 和鱼源株 GD201008-001 的总蛋白质,分别用 2 种标记物标记,ATCC13813 的标记物为 119、121,GD201008-001 的标记物为 113、

114。通过质谱分析,得到 4 组数据。蛋白质定量分析时,以 119、121 标记物通道平均值为内参,进行比较。各组蛋白质的 iTRAQ 比值均采取各通道标记与内参的比值<sup>[10]</sup>。以无乳链球菌牛源株 ATCC13813 和鱼源株 GD201008-001 表达蛋白量的比值(ATCC13813/GD201008-001)  $>1.50$  或  $<0.667$ 、且  $P<0.05$  的蛋白质作为表达差异蛋白质,共发现 17 个差异表达蛋白质。同鱼源株 GD201008-001 相比较,牛源株 ATCC13813 中上调表达蛋白质 4 个(表 3),其中 3 个蛋白质功能已知,1 个功能未知。



M:Marker;1:牛源株 ATCC13813;2:鱼源株 GD201008-001。

图 1 无乳链球菌菌体蛋白质 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of the cellular proteins extracted from *Streptococcus agalactiae*

表 3 无乳链球菌牛源株 ATCC13813 较鱼源株 GD201008-001 上调表达的蛋白质

Table 3 Up-regulated proteins in *S. galactiae* bovine strain ATCC13813 compared to piscine strain GD201008-001

登录号	基因名称	蛋白质描述	蛋白量比率 (ATCC13813/GD201008-001)
V6Z241	SAG0136_07225	胞壁质水解酶调节因子	1.64
AOA0E1EKD2	EN72_00810	未知蛋白	1.63
V6Z372	SAG0136_05645	2-硝基丙烷双加氧酶	1.57
V6Z2R4	SAG0136_07205	果糖-二磷酸醛缩酶	1.52

与鱼源株 GD201008-001 相比较,牛源株 ATCC13813 中下调表达蛋白质 13 个(表 4)。其中,未知功能蛋白质 2 个。下调最显著的是 *cpsIVK* 编码的荚膜生物合成蛋白,蛋白量比率为 0.17。

2.3 无乳链球菌鱼源株与牛源株差异表达蛋白质的功能

采用 Blast2go 软件对筛选到的差异表达蛋白质主要功能类别进行 GO 功能富集分析,结果(图 2)表明这些差异蛋白质的生物学功能覆盖范围较为广泛,主要涉及代谢过程、细胞成分、结

合、催化活性和结构分子活性等 15 个生物学功能。

2.4 无乳链球菌鱼源株与牛源株的小鼠巨噬细胞吞噬率比较

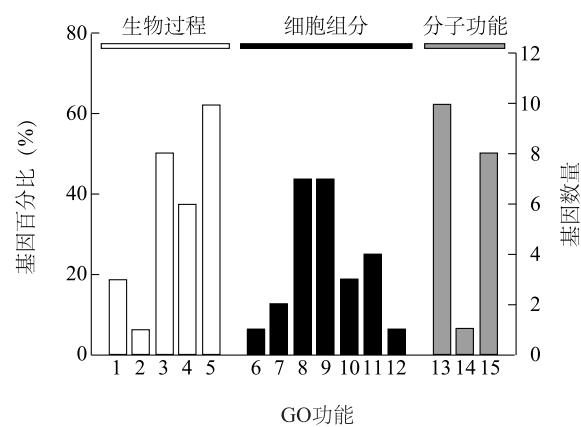
在 MOI=10 时,巨噬细胞与无乳链球菌互作 1 h,计算吞噬率。结果(图 3)表明,无乳链球菌鱼源株 GD201008-001 和牛源株 ATCC13813 被巨噬细胞吞噬的吞噬率分别为 11.92% 和 29.00%,差异极显著( $P<0.01$ )。说明鱼源株 GD201008-001 抵抗吞噬的能力显著高于牛源株 ATCC13813。



表 4 无乳链球菌牛源株 ATCC13813 较鱼源株 GD201008-001 下调表达的蛋白质

Table 4 Down-regulated proteins in *S. galactiae* bovine strain ATCC13813 compared to piscine strain GD201008-001

登录号	基因名称	蛋白质描述	蛋白量比率 (ATCC13813/GD201008-001)
Q93TI4	<i>epsIVK</i>	荚膜生物合成蛋白	0.17
A0A0E1ELH0	EN72_03115	阻遏蛋白	0.31
V6Z546	<i>ftsY</i>	信号识别粒子受体 FtsY	0.35
A0A0H1V9B0	WA04_04180	噬菌体门户蛋白	0.40
A0A0H1TT93	<i>rpmD</i>	50S 核糖体蛋白 L30	0.41
V6Z0Q3	SAG0136_04125	5-甲酰四氢叶酸环连接酶	0.43
A0A0E1EI36	EN72_07250	未知蛋白质	0.43
D0UXZ3	<i>tuf</i>	延伸因子	0.45
A0A0H1UC24	WA34_02045	青霉素结合蛋白	0.47
A0A0H1LU35	<i>paaH</i>	3-羟基丁酰-辅酶 A 脱氢酶	0.51
S9B419	SAG0023_00665	未知蛋白质	0.52
V6Z0M3	SAG0136_03875	ABC 转运蛋白酶	0.58
A0A0H1U031	WA34_11780	DegV 家族 EDD 结构域蛋白	0.66



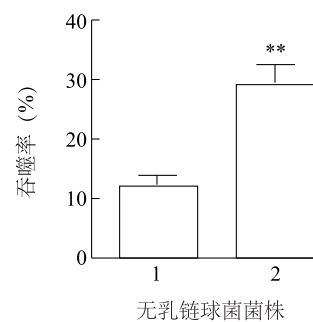
1:定位;2:细胞组分定位或合成;3:细胞过程;4:单生物过程;5:代谢过程;6:细胞器部分;7:大分子复合物;8:细胞部分;9:细胞;10:膜的一部分;11:膜;12:细胞器;13:结合;14:结构分子活性;15:催化活性。

图 2 无乳链球菌牛源株 ATCC13813 与鱼源株 GD201008-001 差异表达蛋白质 GO 功能注释图

Fig.2 Gene ontology analysis of differentially expressed proteins of *S. galactiae* bovine strain ATCC13813 and piscine strain GD201008-001

3 讨论

无乳链球菌作为一种人、兽、鱼共同感染的病原菌,给人类身体健康及养殖业造成严重威胁,对于无乳链球菌致病机制的探索也逐渐成为研究的热点。不同宿主来源的无乳链球菌蛋白质表达谱存在何种差异,差异表达蛋白质中是否存在与其致病机制相关的毒力因子,都需深入研究。病原微生物的致病



1:GD201008-001;2:ATCC13813. \*\* 表示菌株间差异极显著。

图 3 无乳链球菌牛源株 ATCC13813 和鱼源株 GD201008-001 的吞噬率

Fig.3 The phagocytosis rate of *S. galactiae* bovine strain ATCC13813 and piscine strain GD201008-001

作用是病原与宿主相互作用的复杂过程,涉及多种蛋白质分子,因此,应用比较蛋白质组学技术,整体、动态、定量地分析病原微生物差异表达的蛋白质,对于阐明病原微生物的致病机制具有至关重要的作用。iTRAQ 技术可以高通量地处理复杂样本,并且重复性好,可以同时进行定性、定量分析,在微生物比较蛋白质组学领域中得到广泛应用<sup>[11]</sup>。

本研究通过 iTRAQ 技术结合质谱分析技术,在体外培养条件下,以表达蛋白质量的比值筛选表达差异蛋白,共筛选到无乳链球菌牛源株 ATCC13813 和鱼源株 GD201008-001 差异表达蛋白质 17 个,其中已知功能蛋白质 14 个,未知功能蛋白质 3 个。通过对差异表达蛋白质主要功能类别的 GO 功能富集分析,发现差异蛋白质共涉及 15 个生物学功能。差异蛋白质表达比值

最大的为 *cpsIVK* 编码的荚膜生物合成蛋白,在鱼源株 GD201008-001 中表达量显著上调。无乳链球菌周被富含唾液酸的荚膜多糖(Capsular polysaccharide, CPS)。CPS 经过唾液酸修饰后,宿主免疫系统就会发生识别错误,将无乳链球菌当作自身成分。因此,荚膜可以帮助无乳链球菌逃避中性白细胞、巨噬细胞等吞噬细胞的免疫清除作用<sup>[12]</sup>。本研究比较了小鼠巨噬细胞 RAW264.7 对无乳链球菌牛源株 ATCC13813 和鱼源株 GD201008-001 的吞噬率,发现 *cpsIVK* 编码的荚膜生物合成蛋白表达量显著升高的鱼源株 GD201008-001 被巨噬细胞吞噬的效率显著低于 ATCC13813。我们推测, *cpsIVK* 编码的无乳链球菌荚膜生物合成蛋白表达量可能影响荚膜多糖的合成,继而导致细菌被巨噬细胞吞噬效率的差异。筛选到的另外一个在 GD201008-001 中上调表达的蛋白质是青霉素结合蛋白,其功能通常是参与肽聚糖生物合成,同时,青霉素结合蛋白是  $\beta$ -酰胺类抗生素的作用靶点<sup>[13-15]</sup>。有研究结果表明,无乳链球菌青霉素结合蛋白缺失株在新生大鼠的肺脏中更容易被清除,缺失株对于中性粒细胞和肺泡巨噬细胞的杀伤作用也更为敏感<sup>[16-17]</sup>。笔者在前期研究中也发现,相对于鱼源株 GD201008-001,青霉素结合蛋白表达量显著下调的牛源株 ATCC13813 更容易被小鼠巨噬细胞 RAW264.7 清除<sup>[18]</sup>,青霉素结合蛋白表达量的多少是否在此过程中发挥了关键作用仍需继续验证。其他差异表达蛋白质,特别是未鉴定蛋白质在不同宿主来源的无乳链球菌致病机制中所起的作用,同样需要进一步研究。

综上所述,本研究使用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术分析了无乳链球菌鱼源株与牛源株差异表达的蛋白质,对于揭示不同宿主来源的无乳链球菌毒力差异及致病机理提供了新的线索。

## 参考文献:

- [1] KEEFE G P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review[J]. Canadian Veterinary Journal La Revue Veterinaire Canadienne, 1997, 38(7):429.
- [2] SUANYUK N, KONG F, KO D, et al. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae*, in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus*, in Thailand-Relationship to human isolates[J]. Aquaculture, 2008, 284(1-4):35-40.
- [3] 刘 溪,敖秋桅,谭 芸,等. 无乳链球菌感染吉富罗非鱼后体内病原菌的动态分布[J]. 南方农业学报, 2015, 46(9): 1715-1719.
- [4] 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(3):399-406.
- [5] ROSS P L, HUANG Y N, MARCHESE J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(12):1154-1169.
- [6] WU W W, WANG G, BAEK S J, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(3):651-658.
- [7] WISNIEWSKI J, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nature Methods, 2009, 6(5):359-362.
- [8] SANDBERG A, LINDELL G, KÄLLSTRÖM B N, et al. Tumor proteomics by multivariate analysis on individual pathway data for characterization of vulvar cancer phenotypes[J]. Molecular & Cellular Proteomics Mcp, 2012, 11(7): 3929-3936.
- [9] LUN S, WILLSON P J. Expression of green fluorescent protein and its application in pathogenesis studies of serotype 2 *Streptococcus suis*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3):401-412.
- [10] UNWIN R D, GRIFFITHS J R, WHETTON A D. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS[J]. Nature Protocols, 2010, 5(9):1574-1582.
- [11] 袁建丰,李林林,孙敏华,等. iTRAQ 标记技术及其在微生物比较蛋白质组学中的研究进展[J].中国预防兽医学报, 2013, 35(10):859-862.
- [12] DORAN K, NIZET V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy[J]. Molecular Microbiology, 2004, 54(1):23-31.
- [13] SPRATT B G, CROMIE K D. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria[J]. Clinical Infectious Diseases, 1988, 10(4): 699.
- [14] GEORGOPAPADAKOU N H, LIU F Y. Penicillin-binding proteins in bacteria[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1980, 18(1):148-157.
- [15] ZAPUN A, CONTRERASMARTEL C, VERNET T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance[J]. Fems Microbiology Reviews, 2008, 32(2):361-385.
- [16] JONES A L, NEEDHAM R H, CLANCY A, et al. Penicillin-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*: a novel mechanism for evasion of immune clearance[J]. Molecular Microbiology, 2003, 47(1):247-256.
- [17] JONES A L, MERTZ R H, CARL D J, et al. A streptococcal penicillin-binding protein is critical for resisting innate airway defenses in the neonatal lung[J]. Journal of Immunology, 2007, 179(5): 3196-3202.
- [18] 郭长明. 鱼源无乳链球菌感染小鼠巨噬细胞差异转录基因的筛选及功能研究[D]. 南京:南京农业大学, 2014.

(责任编辑:张震林)