

东方蜜蜂微孢子虫 30 kD 蛋白的 LC-MS/MS 质谱鉴定及分析*

何超¹, 王瑞生², 何强¹, 许金山¹, 周泽扬^{1,3}

(1. 重庆师范大学 生命科学学院 资源动物与病原微生物实验室, 重庆 401331;

2. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 3. 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716)

摘要:在微孢子虫(Microsporidia)侵染宿主的过程中,与侵染相关的蛋白主要分布在 30 kD 左右。本研究分别采用煮沸法、不同浓度碱处理发芽法提取东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)蛋白并通过 SDS-PAGE 电泳进行比较,发现 0.1 mol/L KHCO₃、K₂CO₃ 混合液(pH 值为 10.7)发芽法提取出的蛋白条带更丰富。回收 30 kD 左右蛋白进行 LC-MS/MS 质谱测定并检索蜜蜂微孢子虫全基因组预测蛋白数据库,共鉴定获得的 269 个预测蛋白,匹配 COG 数据库后进行了蛋白功能分类。结果表明 30 kD 蛋白主要包括翻译转录蛋白、核糖体结构蛋白、修饰蛋白、转化蛋白及分子伴侣等。从中还鉴定到与侵染相关的 7 种潜在孢壁蛋白(Spore wall protein,SWP)和 3 种极管蛋白(Polar tube protein,PTP),并对之进行蛋白基因的序列分析,进而发现注释到的 PTP1、PTP2 和家蚕微孢子虫的 PTP1、PTP2 具有明显的共线性,其中 SWP12 的变异度相对较小;结合多重序列比对结果,表明 SWP12 在东方蜜蜂微孢子虫中是一类较保守的孢壁蛋白。本研究对于蜜蜂微孢子虫蛋白的提取方法比较和侵染相关的后选靶标蛋白的确定具有重要的参考意义。

关键词:东方蜜蜂微孢子虫;LC-MS/MS 质谱;孢壁蛋白;极管蛋白

中图分类号:Q959.115;O657.63;Q51

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2014)05-0035-07

微孢子虫(Microsporidia)可以感染几乎所有的昆虫、鱼类等动物,甚至人类^[1]。在发现微孢子虫后的 150 多年的历史中,已经发现报道的微孢子虫多达 150 多个属、1 300 多个种^[2],其中一部分能对经济昆虫造成大的危害和严重的经济损失,因此微孢子虫是许多生物进出口检验检疫的重要病原物之一。蜜蜂微孢子虫感染蜜蜂主要通过感染蜜蜂中肠并经过工蜂间相互互饲等方式诱导爆发大面积病害,给蜜蜂产业化及其副产品生产带来毁灭性打击,是蜜蜂主要的病原微生物之一。1996 年 Fries 等人^[3]基于光学显微镜和超微结构特征以及在核糖体小亚基 RNA 编码区的核苷酸序列,在中华蜜蜂(*Apis cerana*)体内鉴定到一种蜜蜂微孢子虫并将之分支为东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)。近年来,有研究发现东方蜜蜂微孢子虫对蜜蜂更具危害性:蜜蜂感染该病原体后中肠组织受到破坏,工蜂寿命缩短,采集能力下降,进而引发细菌病和病毒病的继发感染,导致群势下降,甚至可跨群感染^[4]。欧洲一些国家及美国发现蜜蜂微孢子虫是导致蜜蜂出现衰竭失调(Colony collapse disorder, CCD)现象的主要病原体之一^[5-7],染病蜜蜂蜂群出现明显的下降趋势。

蜜蜂微孢子虫在侵染蜜蜂中肠时,它的蛋白与蜜蜂中肠围食膜的接触最为直接^[8]。Moore 等人^[9]于 1993 年对 7 种微孢子虫总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,条带分布在 25~30 kD。2007 年吴正理等人^[10]采用不同方法对家蚕微孢子虫蛋白进行提取分析,主带分布于 25~35 kD 之间,通过质谱分析发现孢壁蛋白(Spore wall protein,SWP)位于其中,而 SWP 是一种与侵染有直接关联的蛋白^[11-14]。目前对蜜蜂微孢子虫功能蛋白鉴定的相关研究鲜少报道。本研究拟对东方蜜蜂微孢子虫 30 kD 蛋白进行分离提取,进行 LC-MS/MS 质谱分析并对 SWP 的组成及一些极管蛋白(Polar tube protein,PTP)的序列结构进行初步分析,期望能为解析蜜蜂微孢子虫 SWP 在感染宿主细胞中的作用提供有益的参考。

* 收稿日期:2014-04-15 修回日期:2014-05-08 网络出版时间:2014-9-17 22:37

资助项目:重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ110611);重庆市发改委项目(No. 20091537)

作者简介:何超,男,研究方向为动物学,E-mail:406429529@qq.com;通讯作者:许金山,xujinshan2008@cqnu.edu.cn

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140917.2237.007.html

1 材料与方法

1.1 材料

实验用东方蜜蜂微孢子虫采自重庆市酉阳县,并经意蜂工蜂扩繁提纯。材料的分离纯化步骤为:取感染了东方蜜蜂微孢子虫的意蜂,剪下蜜蜂腹部并收集,加入适量 ddH₂O 研磨,4 层纱布过滤,收集滤液。滤液采用 500 r/min 离心 10 min 后取上清;上清 3 000 r/min 离心 10 min 后取沉淀,沉淀用 ddH₂O。粗提液经 Percoll 密度梯度离心(25%、50%、75%、100%的 Percoll 溶液各 850 μ L,13 000 g 离心 30 min),底层沉淀即为纯化孢子,如发现有杂质可用 ddH₂O 悬浮,10 000 r/min 离心 10 min,重复几次,再次 Percoll 密度梯度离心,收集底层沉淀。

1.2 试剂

2 \times 样品缓冲液的配制:蔗糖 10 g,SDS 2.3 g,Tris 0.756 g, β -巯基乙醇 5 mL,加 ddH₂O 溶解后定容至 50 mL。3 \times 上样缓冲液的配制:0.3 mol/L Tris-HCl(pH 值为 6.8),6% SDS,24% 甘油,12% β -巯基乙醇,0.15% 溴酚蓝(BPB)。

1.3 东方蜜蜂微孢子虫蛋白的提取方法

1.3.1 煮沸法 参照文献[15]的方法。取 1 管孢子(密度为 1×10^9 个/管),10 000 r/min 离心 5 min,弃上清;依次加入 100 μ L 2 \times 样品缓冲液,100 μ L 3 \times 上样缓冲液,混匀后煮沸 5 min,13 000g,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清。

1.3.2 发芽法 参照文献[16-18]的方法取 3 管孢子(密度为 1×10^9 个/管),10 000 r/min 离心 5 min,弃上清;分别用不同浓度碱液 100 μ L 悬浮,在摇床 27 $^{\circ}$ C 下摇 1 h,13 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,收集沉淀。沉淀中加入 100 μ L 2 \times 样品缓冲液,100 μ L 3 \times 上样缓冲液,混匀后,煮沸 5 min,13 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清。所用碱液分别为:0.1 mol/L KOH、0.05 mol/L KOH、0.01 mol/L KOH、0.1 mol/L KHCO₃ 与 K₂CO₃ 的混合液(pH 值为 10.7)。

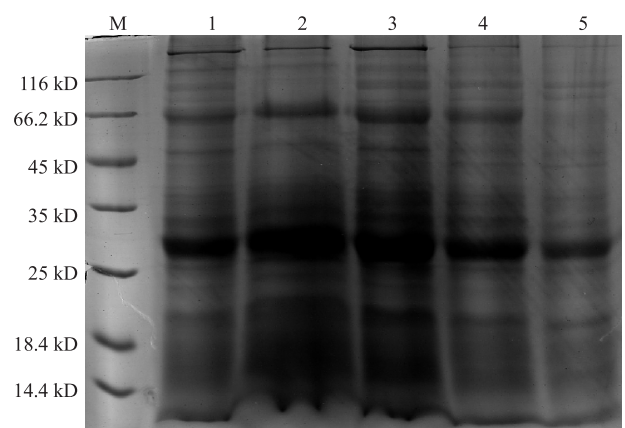
2 结果

2.1 两种方法处理后的蛋白的 SDS-PAGE 结果分析

两种方法处理的孢子蛋白样品用 15% 分离胶、6% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色检测。由图 1 可见,由煮沸法提取的蛋白条带丰富,在约 20、30、60 kD 处有 3 条主带,其中约 30 kD 处条带浓度最高。孢子经不同碱液处理提取的蛋白的差异比较大。0.1 mol/L KHCO₃、K₂CO₃ 混合液提取的蛋白条带最为丰富,在约 20、30、60 kD 处有 3 条主带,其中约 30 kD 处条带浓度最高,与煮沸法的主带位置相同;0.01 mol/L KOH 处理的蛋白条数与浓度较 0.1 mol/L KHCO₃、K₂CO₃ 混合液提取的蛋白条数和浓度基本一致;0.05 mol/L KOH 处理的蛋白条数与前两者相比基本一致,浓度有所减少;而 0.1 mol/L KOH 处理的蛋白只有 20、30 kD 处有两条主带且浓度较低。

2.3 LC-MS/MS 质谱鉴定以及蛋白功能分类

选取图 1 中 2 泳道 30 kD 条带,将条带切割回收后送交北京华大蛋白质研发中心有限公司进行液质联用(LC-MS)离子阱电喷雾(HCT)质谱分析。得到的短肽序列用 Mascot 软件匹配到东方蜜蜂微孢子虫的全基因组蛋白数据库。研究中共检索到 269 个蛋白基因,并对这些基因进行 COG 功能分类。COG 分类结果显示,翻译转录蛋白、核糖体结构蛋白含量最多占到 25.54%,修饰蛋白、转化蛋白及分子伴侣含量次之占 22.83%(封二彩图 2)。值得一提的是,在鉴定结果中包括了与孢子侵染相关的 7 个 SWP 和 3 个 PTP,具体质谱结果见表 1。



注:M. 蛋白质低分子量 marker;1. 煮沸法提取的蛋白;2. 0.1 mol/L KHCO₃、K₂CO₃ 混合液(pH 值为 10.7)处理后提取的蛋白;3. 0.01 mol/L KOH 处理后提取的蛋白;4. 0.05 mol/L KOH 处理后提取的蛋白;5. 0.1 mol/L KOH 处理后提取的蛋白。

图 1 不同方法处理的蜜蜂微孢子虫的蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of *N. ceranae* proteins extracted by different methods

表 1 蜜蜂微孢子虫 30 kD SWP 和 PTP 的 LC-MS/MS 肽段的匹配结果

Tab. 1 LC-MS/MS analysis of 30 kD SWPs and PTPs of *N. ceranae*

基因编号	肽段编号	观测分子量	实验测定值	数据库理论值	缺失酶切位点	分值	排序	肽段
ACOL010000 10_28743_2	49	429.751 0	857.487 5	857.485 8	0	54	1	R. VGLEALEK. A
	118	463.735 8	925.457 1	925.454 5	0	25	1	R. FEELFNK. S
	1 401	651.330 3	1 300.646 0	1 300.645 2	0	75	1	K. VLEYNVDFFR. V
	2 289	715.378 4	1 428.742 3	1 428.740 1	1	70	1	K. KVLEYNVDFFR. V
	3 646	815.366 9	1 628.719 2	1 628.714 0	1	21	1	R. EECERFEELFNK. S
	3 950	831.893 8	1 661.773 0	1 661.768 5	0	90	1	K. HVNFPPEEYIETER. K
	4 917	597.631 0	1 789.871 1	1 789.863 5	1	52	1	K. HVNFPPEEYIETERK. Y
	5 295	917.945 6	1 833.876 7	1 833.867 9	0	78	1	K. VGSSIASLMNYEHGGNAK. K
	5 433	925.940 4	1 849.866 2	1 849.862 8	0	80	1	K. VGSSIASLMNYEHGGNAK. K
	8 317	1 212.582 4	2 423.150 2	2 423.146 1	0	116	1	K. SCVQALSAMNDFLGDDGVQGVLK. K
	8 380	1 220.579 6	2 439.144 6	2 439.141 0	0	123	1	K. SCVQALSAMNDFLGDDGVQGVLK. K
	8 784	1 276.634 2	2 551.253 8	2 551.241 1	1	100	1	K. SCVQALSAMNDFLGDDGVQGVLKK. V
	8 849	1 284.631 8	2 567.249 1	2 567.236 0	1	62	1	K. SCVQALSAMNDFLGDDGVQGVLKK. V
	11 851	1 134.532 2	4 534.099 8	4 534.094 4	0	50	1	K. LYQGLSHSSVSNLNFLDNHDFEAMSIICSNFADEDNDK. L
	11 852	1 512.375 7	4 534.105 3	4 534.094 4	0	64	1	K. LYQGLSHSSVSNLNFLDNHDFEAMSIICSNFADEDNDK. L
ACOL010000 32_19542_15	2	359.189 9	716.365 3	716.364 6	0	44	1	K. FFFTR. Y
	150	475.241 6	948.468 7	948.466 5	0	72	1	R. FNDGLIDR. M
	181	487.755 0	973.495 5	973.494 3	0	35	1	R. VTAFVMYK. I
	274	518.795 0	1 035.575 4	1 035.571 3	0	33	1	R. LYSNGTLIR. I
	478	566.309 4	1 130.604 3	1 130.598 5	0	46	1	R. AFFNLVQHR. L
	973	623.290 3	1 244.566 0	1 244.564 2	0	15	1	R. DPCITIGPCGR. N
	15 2 093	467.895 8	1 400.665 4	1 400.665 3	1	42	1	R. RDPCITIGPCGR. N
	2 614	737.859 4	1 473.704 3	1 473.700 1	0	60	1	R. DVYLNCSIWDHR. V
	4 445	872.862 1	1 743.709 6	1 743.708 6	0	97	1	R. YVFECYGEIEER. L
	6 380	1 017.989 4	2 033.964 3	2 033.959 0	0	79	1	R. YVFDYMNILASLPSNCK. I
7 645	1 141.043 8	2 280.073 1	2 280.067 4	0	78	1	R. NDGFLLPFTFDCITGFFNR. E	
10 686	1 648.352 3	3 294.690 0	3 294.684 6	0	124	1	K. LNICFSGIPSADFLIDPVSIELNLYER. T	
ACOL010000 02_58817_30	15	390.716 0	779.417 4	779.417 7	0	29	1	K. TLDYIR. C
	54	431.204 9	860.395 2	860.396 3	0	26	2	R. CHFELR. R
	90	453.250 1	904.485 6	904.484 1	0	15	1	R. IQCIPFK. V
	179	487.271 7	972.528 8	972.524 0	0	27	1	K. EDIINTIR. F
	221	504.236 6	1 006.458 7	1 006.457 6	0	66	1	K. CDAEMILR. I
	249	512.234 0	1 022.453 3	1 022.452 5	0	63	1	K. CDAEMILR. I
	302	525.778 6	1 049.542 7	1 049.539 3	0	44	1	K. EIYEDLLR. R
	653	589.827 9	1 177.641 2	1 177.634 2	1	56	1	R. KEIYEDLLR. R
	778	603.829 0	1 205.643 4	1 205.640 4	1	27	1	K. EIYEDLLRR. Y
	827	607.860 6	1 213.706 6	1 213.703 0	1	55	1	K. LKEDIINTIR. F
	998	624.828 0	1 247.641 4	1 247.636 6	1	54	1	K. IKCDAEMILR. I
	1 138	632.824 8	1 263.635 1	1 263.631 5	1	42	1	K. IKCDAEMILR. I
	1 430	652.310 8	1 302.607 1	1 302.606 0	0	59	1	R. IIDCNLNGCPK. E
	1 658	666.289 3	1 330.563 9	1 330.564 6	0	32	1	K. HSDGTCMPADLK. N
	1 840	682.376 4	1 362.738 2	1 362.732 9	0	67	1	R. GLLMINNIANYK. K
	1 947	690.372 6	1 378.730 6	1 378.727 8	0	78	1	R. GLLMINNIANYK. K
	2 749	746.424 1	1 490.833 7	1 490.827 9	1	80	1	R. GLLMINNIANYKK. L
	2 858	754.422 2	1 506.829 8	1 506.822 8	1	61	1	R. GLLMINNIANYKK. L
	3 080	772.877 1	1 543.739 7	1 543.735 4	0	53	1	R. LHCNDPFNFKPR. C
	3 282	789.414 3	1 576.813 9	1 576.810 6	1	50	1	R. IQCIPFKVPSTCK. V
5 989	973.987 0	1 945.959 4	1 945.957 4	0	117	1	K. EYALFTASALHNTSFFK. Y	
8 130	1 189.064 7	2 376.114 8	2 376.106 5	0	90	1	R. RPMTFAGMMDALNTVSWGTYK. H	
8 194	798.374 1	2 392.100 4	2 392.101 4	0	85	1	R. RPMTFAGMMDALNTVSWGTYK. H	
9 789	983.487 8	2 947.441 7	2 947.435 4	0	76	1	R. RPCIETTICIFDIVAADNVKPEAIR. I	

续表 1

基因编号	肽段编号	观测分子量	实验测定值	数据库理论值	缺失酶切位点	分值	排序	肽段
	269	518.310 1	1 034.605 6	1 034.601 2	0	23	1	R. FLSTVDIHK. T
	502	569.354 1	1 136.693 6	1 136.691 7	1	29	1	R. KIGLSIHELK. G
	993	624.795 7	1 247.576 9	1 247.575 1	0	60	1	K. NELCCAIVNR. A
	1 150	633.788 6	1 265.562 6	1 265.559 8	0	27	1	R. IPDQDCDYIK. A
	1 768	676.338 4	1 350.662 3	1 350.660 2	0	42	1	R. GNCIQDLYQIK. V
	1 883	685.845 6	1 369.676 6	1 369.673 4	0	33	1	K. VCEPPVCAITPK. V
ACOL010000	1 925	688.842 2	1 375.669 9	1 375.670 0	1	81	1	R. KNELCCAIVNR. A
56_15755_13	3 616	814.417 9	1 626.821 1	1 626.810 9	1	28	1	K. EKVCEPPVCAITPK. V
	6 285	1 007.474 6	2 012.934 7	2 012.921 5	0	75	1	K. TGSTTSNEYTLSSEYFVK. N
	7 783	1 149.085 0	2 296.155 4	2 296.148 8	0	75	1	K. VQTQFENGPFGLTPIGEHTK. G
	8 802	1 279.661 5	2 557.308 4	2 557.309 8	0	91	0	R. LVIESNDNQFSLMSLVAPNEIK. N
	10 630	1 642.815 3	3 283.616 1	3 283.597 2	0	29	1	K. GFCINFFPEDELIVIVYEASDNGIRPGAR. L
	10 785	1 689.391 7	3 376.768 9	3 376.755 5	0	88	1	K. NNVAIHETVDPLTGFVNFSIQIFIPGSATDGK. I
	11 158	1 200.925 1	3 599.753 3	3 599.740 2	0	49	1	K. NNTDITVNGYPLRPVCTPCNTEIWFHQVVR. Y
	736	598.799 0	1 195.583 5	1 195.579 5	0	55	1	R. EVYMEVIEGK. I
ACOL010000	2 288	715.371 4	1 428.728 2	1 428.724 9	0	57	1	K. IALPNDFSPNDVK. L
05_36805_17	3 636	814.898 9	1 627.783 3	1 627.777 0	0	17	1	K. ILVVGEFADYDYPQ. -
	3 900	829.892 6	1 657.770 6	1 657.765 8	0	104	1	K. LQVETDGFVFCDK. E
	8 344	1215.564 7	2 429.114 8	2 429.105 7	1	89	1	K. LQVETDGFVFCDEKQPSDSK. V
	1 591	661.308 5	1 320.602 5	1 320.598 6	0	47	1	K. ASPYETFTYSR. L
	1 668	666.816 6	1 331.618 7	1 331.618 0	0	23	1	K. ASNFFTNMGTVK. A
ACOL010000	2 765	748.381 7	1 494.748 9	1 494.746 7	0	64	1	R. LSQWFGTSQNISK. I
28_19963_4	2 787	750.350 0	1 498.685 5	1 498.683 4	0	28	1	K. QNVDAIMHAATSNO. -
	5 219	912.996 5	1 823.978 5	1 823.966 9	0	66	1	K. IVSSFYEILNNLVEGK. K
	6 241	1 003.509 6	2 005.004 7	2 005.000 4	1	57	1	K. NIDEKDIVEAFSDGVNLK. L
	597	580.776 3	1 159.537 9	1 159.535 7	0	41	1	K. DSEPLDDTLR. C
	676	592.297 4	1 182.580 2	1 182.576 8	0	90	1	K. YAVESIESASK. S
	1 483	654.361 2	1 306.707 9	1 306.706 7	0	68	1	R. YGVQMVTLTLLQR. Y
	2 691	743.423 5	1 484.832 5	1 484.835 1	0	60	1	R. TIGVLWQGIELTR. I
	4 230	853.915 9	1 705.817 2	1 705.813 4	0	87	1	K. FVGDCIGSEPGVVGWK. N
	4 352	863.979 0	1 725.943 4	1 725.941 4	0	47	1	K. TDNTFHIALNVHLQK. Y
ACOL010001	5 851	961.503 5	1 920.992 4	1 920.986 6	0	81	1	K. SSIMEAITGIPNLYLDGK. F
22_9917_5	6 288	672.006 8	2 012.998 5	2 012.991 5	0	50	1	K. NQALVQVIHAIPDNSHEE. -
	7 464	1 125.107 7	2 248.200 8	2 248.195 0	0	99	1	K. ESILSYIGTIVNEINSDLIR. Y
	8 563	832.102 6	2 493.286 0	2 493.282 5	1	73	1	K. SSIMEAITGIPNLYLDGKFPK. V
	8 893	860.731 4	2 579.172 3	2 579.157 3	0	33	1	K. DVYQDNMGLHLFVWTCQDNK. D
	10 470	1 052.593 0	3 154.757 2	3 154.731 1	1	73	1	K. LNMILPPKESILSYIGTIVNEINSDLIR. Y
	10 690	825.148 2	3 296.563 9	3 296.563 5	1	22	1	K. DVYQDNMGLHLFVWTCQDNKDFLTIK. I
	11 350	939.668 3	3 754.644 2	3 754.643 5	0	29	1	R. EATSTDDFVNHNSTSGNDIYEDEYGLFPEYALTK. K
	31	409.268 8	816.523 0	816.522 2	0	40	1	K. IVFIGLR. T
	265	517.764 8	1 033.515 1	1 033.511 4	0	24	1	R. ELLSDCIK. Q
	929	618.798 4	1 235.582 2	1 235.581 6	0	39	1	R. TVSNASQECLK. N
ACOL010001	4 940	897.458 5	1 792.902 4	1 792.900 2	0	116	1	K. GQQQQHAAINAAVQAMK. M
97_6868_11	6 680	1 045.511 6	2 089.008 6	2 089.008 5	0	87	1	K. KPYCICPGINDAISQPTR. E
	7 350	1 109.560 7	2 217.106 8	2 217.103 4	1	84	1	K. KPYCICPGINDAISQPTR. E
	8 000	1 174.099 1	2 346.183 7	2 346.178 4	0	88	1	K. VVTDYPFVVVFNEYGEAIASK. T
	9 573	955.119 3	2 862.336 0	2 862.330 1	0	121	1	K. QECSGNGIITNILSNATVDVSNDEGEGAK. S

续表 1

基因编号	肽段编号	观测分子量	实验测定值	数据库理论值	缺失酶切位点	分值	排序	肽段
	137	467.767 5	933.520 4	933.517 1	0	34	1	R. IPDSVIYK. M
	3 674	816.929 3	1 631.844 0	1 631.836 6	1	34	1	K. STGISREEDLPSTK. T
	3 694	818.937 1	1 635.859 7	1 635.854 1	1	52	1	K. ALGMEKEDYINLIK. R
	3 878	828.384 3	1 654.754 0	1 654.747 5	0	75	1	R. FVSPTNGFTNEEDAK. K
	4 539	878.979 2	1 755.943 8	1 755.936 6	1	59	1	R. KAAADLIDETQIINNK. I
	5 374	920.499 0	1 838.983 5	1 838.973 8	0	96	1	K. VIPNDASEININNSVIK. F
	6 332	1 013.014 2	2 024.013 9	2 024.0076	0	88	1	R. NPGPNPLTSGQVFPNQTR. A
ACOL010000	7 772	765.373 2	2 293.097 9	2 293.097 5	1	62	1	R. HTAEVFNNTLEYVNTTEEKR. H
03_44937_42	8 335	1 214.108 5	2 426.202 5	2 426.196 5	0	124	1	K. QVSSNDISTSNLINYIFNSISK. V
	8 351	811.075 1	2 430.203 4	2 430.191 4	0	58	1	K. QLQNDGVLTEPFASDLIDAQEK. S
	8 389	1 222.624 4	2 443.234 2	2 443.223 1	0	98	1	K. QVSSNDISTSNLINYIFNSISK. V
	8 918	647.308 0	2 585.203 1	2 585.195 5	1	61	1	K. MNEYNSDPNKKPTEILDITDFSK. S
	8 971	868.072 5	2 601.195 7	2 601.190 4	1	52	1	K. MNEYNSDPNKKPTEILDITDFSK. S
	9 020	873.741 4	2 618.202 3	2 618.195 2	1	44	1	K. AAANIANNPETKDDVMQELDNSMK. I
	9 410	926.479 6	2 776.416 8	2 776.406 5	0	85	1	K. SPLTGLTQDQVEQILANTPHTSAPMK. Y
	11 558	1 011.245 4	4 040.952 3	4 040.959 0	0	24	1	R. ASFNTNNPAGNAFGSPSPGINLPNQRPRAGAGANAPNTPQR. R
ACOL010001	4 236	854.375 0	1 706.735 4	1 706.735 2	0	90	1	K. GGNCDVQSNIECLNK. M
97_6868_10								

注:加粗字体表示测序中氨基酸可能被氧化。

2.4 孢壁及极管蛋白的定序列结构特征分析

通过 COG 数据库功能注释分类,共鉴定到 7 个 SWP 和 3 个 PTP;采用 Smart 软件,对 7 种 SWP 结构域进行分析(表 2)。结果发现 SWP12 有重复序列,SWP25 和 SWP7 有信号肽,SWPN 和假定 SWP9 有跨膜域。对鉴定到的 3 种 SWP 和 4 种假设 SWP 同家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)、柞蚕微孢子虫(*Nosema antheraea*)、西方蜜蜂微孢子虫(*Nosema apis*)的相应同源蛋白进行遗传距离分析,结果发现这 4 种微孢子虫中的 7 种 SWP 序列变异度各不相同,其中注释为假设 SWP 的变异度最大(图 3)。SWP12 的变异度相对较小,结合多重序列比对结果,表明 SWP12 在微孢子虫中是一类较保守的 SWP(封二彩图 4)。对注释到 PTP1 和 PTP2 与家蚕微孢子虫相应蛋白进行共线性分析,结果表明存在明显的共线性,而临近基因则没有对应关系(封二彩图 5)。

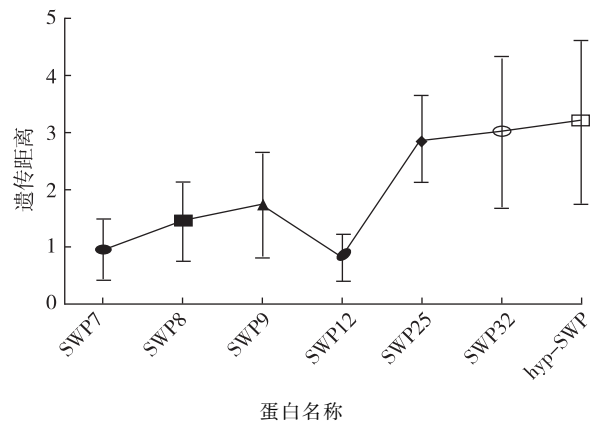


图 3 东方蜜蜂微孢子虫 7 种孢壁蛋白的遗传距离分析
Fig. 3 The average distance of each family of spore wall proteins in seven *Nosema* species

表 2 东方蜜蜂微孢子虫 30 kD SWP 和 PTP 的注释结果

Tab. 2 The characteristic of putative genes encoding 30 kD SWPs and PTPs of *N. ceranae*

基因编号	注释	分子量/Da	总得分	覆盖度/%	信号肽	跨膜域	GenBank 登陆号
ACOL01000010_28743_2	SWP12_NOSBO	29 024	2 218	51	—	—	gi 257096789 sp B3STP6.1
ACOL01000032_19542_15	SWP32_NOSBO	42 959	856	40	—	—	gi 259511817 sp B3STN7.1
ACOL01000002_58817_30	SWP25_NOSBO	32 847	6 174	61	+	—	gi 259511814 sp B3STN6.1
ACOL01000056_15755_13	假定 SWP	56 349	1 468	44	—	+	gi 157382914 gb ABV48892.1
ACOL01000005_36805_17	SWP 8	22 223	585	34	—	—	gi 343409347 gb AEM23899.1
ACOL01000028_19963_4	假定 SWP 9	45 201	219	24	—	+	gi 484855975 gb EOB13793.1
ACOL01000122_9917_5	假定 SWP 7	32 882	1 513	76	+	—	gi 484855883 gb EOB13707.1
ACOL01000197_6868_11	PTP 2	31 529	3 648	40	+	—	gi 340764467 gb AEK69415.1
ACOL01000003_44937_42	PTP 3	157 686	1 052	24	+	—	gi 484857316 gb EOB15062.1
ACOL01000197_6868_10	PTP 1	49 073	90	3	—	—	gi 484852837 gb EOB11666.1

注:“+”、“—”分别表示存在和不存在该结构。

3 分析与讨论

本研究对煮沸法、碱溶法提取的蛋白浓度与丰度进行了对比,不同浓度 KOH 处理后提取的蛋白浓度与丰度差距明显,高浓度 KOH(0.1 mol/L)处理只有 2 条主带,分别在约 20、30 kD 处,和吴正理等人^[19]对家蚕微孢子虫蛋白提取结果相似。0.05 和 0.01 mol/L KOH 处理后蛋白条带明显增多且浓度均有提高,有 3 条主带,比 0.1 mol/L KOH 处理多出 1 条在 66.2 kD 处的主带。煮沸法提取的蛋白与 0.01 mol/L KOH 提取的蛋白量相近,在 66.2、30、20 kD 处也有 3 条很明显的条带。

在家蚕微孢子虫中有报道 SWP5 和 PTP 的互作^[20],本研究对 30 kD 处蛋白的质谱分析鉴定的结果中也包括了 PTP,这是否预示在蜜蜂中 SWP 和 PTP 也存在互作? 值得一提的是,PTP3 的完整分子量大小为 130 kD 左右,而本研究在 30 kD 大小的蛋白条带中即鉴定获得了 PTP3。这一特征与侯健革等人^[21]的研究结果相似,他们通过双向电泳技术比较家蚕微孢子虫与桑尺蠖(*Phthonandria atrilineata* Butler)来源微孢子虫的蛋白质组差异,将发现的 13 个差异蛋白质点进行质谱鉴定,其中有 1 个大小约 40 kD 的差异蛋白点被注释为家蚕微孢子虫 PTP3。因此本研究推测蜜蜂微孢子虫 PTP3 蛋白在碱处理后应发生肽键断裂从而形成相对较小的片段。

致谢:感谢重庆市酉阳县清泉养蜂专业合作社樊贵宜先生对蜜蜂微孢子虫的采集工作提供帮助。

参考文献:

- [1] Wittner M. Historic perspective on the Microsporidia: expanding horizons[M]//Wittner M, Weiss L M. The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington D. C. :ASM, 1999:1-6.
- [2] Keeling P J, Fast N M. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites[J]. Annual Reviews in Microbiology, 2002, 56(1): 93-116.
- [3] Fries I, Feng F, da Silva A, et al. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae)[J]. European Journal of Protistology, 1996, 32(3): 356-365.
- [4] 秦浩然, 李继莲, 和绍禹, 等. Calcofluor White M2R 与 SytoxGreen 双重染色法鉴别蜜蜂微孢子虫[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(5): 1392-1396.
- [5] Qin H R, Li J L, He S Y, et al. Detection and identification of *Nosema ceranae* by dual fluorescent staining with calcofluor white M2R and sytox green[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(5): 1392-1396.
- [6] Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(10): 2659-2669.
- [7] Chen Y, Evans J D. Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States[J]. American Bee Journal, 2007, 147(12): 1027-1028.
- [8] Chen Y, Evans J D, Smith I B, et al. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 97(2): 186-188.
- [9] Dussaubat C, Sagastume S, Gómez-Moracho T, et al. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2): 670-678.
- [10] Moore C B, Brooks W M. An evaluation of SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis for the determination of intragenetic relationships of vairimorpha isolates[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1993, 62(3): 285-288.
- [11] 吴正理, 李艳红, 宋元达. 微孢子虫蛋白质及其与宿主互作的研究进展[J]. 蚕业科学, 2009, 35(4): 921-928.
- [12] Wu Z L, Li Y H, Song Y D. Advances in the research of Microsporidian proteins and their interactions with host cells[J]. Science of Sericulture, 2009, 35(4): 921-928.
- [13] Xu Y, Takvorian P, Cali A, et al. Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi* [J]. Infection and Immunity, 2006, 74(1): 239-247.
- [14] Enriquez F J, Wagner G, Fragoso M, et al. Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on Microsporidian development in vitro[J]. Parasitology, 1998, 117(06): 515-520.
- [15] 崔红娟, 周泽扬, 万永继, 等. 家蚕微孢子虫表面抗原蛋白对家蚕致病性的影响[J]. 蚕业科学, 1999, 25(4): 261-262.
- [16] Cui H J, Zhou Z Y, Wan Y J, et al. *Nosema bombycis* surface antigen protein impact on the pathogenicity of *B. mori*[J]. Science of Sericulture, 1999, 25(4): 261-262.
- [17] Southern T R, Jolly C E, Lester M E, et al. EnP1, a Microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(8): 1354-1362.
- [18] 黄少康, 鲁兴萌, 汪方炜, 等. 两种微孢子虫孢子表面蛋白及对家蚕侵染性的比较研究[J]. 蚕业科学, 2004, 30(2): 157-163.

- Huang S K, Lu X M, Wang F W, et al. Comparative study of two surface proteins of *Nosema* spores and infection of silkworm[J]. Science of Sericulture, 2004, 30(2): 157-163.
- [16] 王爱荣, 刘向国. 柞蚕微孢子虫孢子人工发芽的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(4): 281-284.
- Wang A R, Liu X G. A Study on artificial induction of *Nosema pernyi* spores[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2002, 33(4): 281-284.
- [17] 高永珍, 戴祝英. 家蚕病原性微孢子虫的蛋白质化学性质的研究[J]. 蚕业科学, 1999, 25(2): 82-91.
- Gao Y Z, Liu X G. Studies on spore wall protein chemical properties of Microsporidias pathogenic to silkworm, *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 1999, 25(2): 82-91.
- [18] 郭锡杰, 黄可威. 家蚕病原性微孢子虫孢子表面蛋白的选择性分离与总蛋白比较分析[J]. 蚕业科学, 1995, 21(4): 238-242.
- Guo X J, Huang K W. Selective separation of exospore protein and comparative analysis of total spore proteins of Microsporidias pathogenic to silkworm *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 1995, 21(4): 238-242.
- [19] 吴正理, 谭小辉, 潘国庆, 等. 家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 孢壁蛋白提取方法的优化研究[J]. 蚕业科学, 2007, 33(1): 62-66.
- Wu Z L, Tan X H, PAN G Q, et al. Optimization of *Nosema bombycis* spore wall protein extraction[J]. Science of Sericulture, 2007, 33(1): 62-66.
- [20] Li Z, Pan G, Li T, et al. SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic Microsporidian *Nosema bombycis* [J]. Eukaryotic cell, 2012, 11(2): 229-237.
- [21] 侯建革, 沈中元, 唐旭东, 等. 家蚕微孢子虫与桑尺蠖来源微孢子虫的蛋白组学分析[J]. 蚕业科学, 2013, 39(3): 537-542.
- Hou J G, Shen Z Y, Tang S D, et al. Proteomic analysis of *Nosema bombycis* and Microsporidian from *Phthonandria atrilineata* Butler[J]. Science of Sericulture, 2013, 39(3): 537-542.

Animal Sciences

The LC-MS/MS Identification of 30 kD Protein in Microsporidia *Nosema ceranae*

HE Chao¹, WANG Ruisheng², HE Qiang¹, XU Jinshan¹, ZHOU Zeyang^{1,3}

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460;

3. State Key Laboratory of Genome Biology, Chongqing 400716, China)

Abstract: Proteins involved in the cell invasion of Microsporidia were mainly presented as a molecular mass of approximately 30 kD. In this study, we have compared the effect of extraction of total spore proteins from *Nosema ceranae* by two methods of unitizing boiling and alkali-germination, which show that the latter with solution consist of 0.1 mol/L KHCO₃ and K₂CO₃ (pH=10.7) were preferred to be recommended rather than the former method. After that, protein bands with proximately 30 kD were recovered to conduct liquid chromatography and mass spectrometry. By Mascot online searching for protein-coding genes database of *N. ceranae*, 269 potential proteins were characterized and classified as translation and transcription proteins, ribosomal structural proteins, modified proteins, transforming proteins and molecular chaperones, etc. Among them, seven spore wall proteins and three polar tube proteins, which were considered to be the key factor during the cell invasion of Microsporidia, have also been identified. Further data analysis of polar tube proteins show that PTP1 and PTP2 gene from *N. ceranae* share the common syntenic character with that from other *Nosema* species. In addition, sequence divergence of spore wall proteins revealed that the SWP12 gene is more conserved than other six spore wall genes in *Nosema* species. Our studies offer the source to study the function of targeted proteins in *N. ceranae* that may take a role in affecting the host *Apis mellifera*.

Key words: *Nosema ceranae*; LC-MS/MS; polar tube protein; spore wall protein

(责任编辑 方 兴)