

家蚕血液肽聚糖识别蛋白的鉴定和生物信息学分析

李季生^{a,b}, 毛晓霞^c, 贾漫丽^{a,b}, 李娜^{a,b}, 高玉军^{a,b}, 杨贵明^{a,b}

(承德医学院 a. 河北省高校特产蚕桑技术研发中心; b. 蚕业研究所; c. 中药研究所, 河北承德 067000)

摘 要:采用双向电泳和质谱技术分析、鉴定了家蚕血液中存在的肽聚糖识别蛋白(PGRP). 为了进一步研究该蛋白的结构和功能, 采用了生物信息学方法对其理化性质、疏水性/亲水性、信号肽、二级结构、三级结构、亚细胞定位和 GO 功能注释等进行了分析. 结果发现, 肽聚糖识别蛋白是一种分泌类蛋白, 可能具有信号肽. 其主要分子功能为肽聚糖受体, 在生物学进程中发挥的主要作用为肽聚糖代谢和先天性免疫应答.

关键词:家蚕; 血液; 肽聚糖识别蛋白; 双向电泳; 质谱; 生物信息学

中图分类号:S881.2; Q956

文献标志码:A

家蚕是我国古老的经济昆虫, 作为鳞翅目昆虫的代表和模式生物, 在研究昆虫生理学、生物学和遗传学中承担着重要的角色^[1-4].

昆虫同哺乳动物的免疫调节机制一样, 脂多糖、肽聚糖和 β -1, 3 葡聚糖是诱导昆虫免疫系统启动的诱导物, 也是昆虫体内各种识别蛋白的识别和结合的目标^[5-8]. 顾名思义, 肽聚糖识别蛋白是能识别革兰氏阳性细菌胞壁成分肽聚糖的识别分子, 它具有激活免疫细胞、吞噬细菌以及水解肽聚糖的作用^[9]. 此外, 昆虫中还至少有革兰氏阴性菌结合蛋白和 C 型凝集素两种能与革兰氏阴性菌直接结合的识别分子^[10-11]. 大多数肽聚糖识别蛋白能通过激活 Toll 或 Imd 信号传导通路^[12-16], 从而诱导针对各种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌或真菌的抗菌肽的产生^[17-18]. 日本 Ashida 领导的研究小组在家蚕血液中发现并纯化出 PRGP, 随后揭示了家蚕 PGRP-S 激活酚氧化酶原级联反应并诱导抗菌肽产生的免疫机制^[19-20], 从此开启了 PGRP 基因在果蝇、非洲按蚊等其他昆虫, 以及大鼠、小鼠等哺乳动物中相关研究. 但是此后很长一段时间, 家蚕的先天免疫系统研究进展不大, 鉴定的 PGRP 的种类也很少, 人们对家蚕先天免疫的机理也不是很清楚^[21-22]. 本实验利用双向电泳、质谱技术鉴定了家蚕血液中的肽聚糖识别蛋白, 借助生物信息学方法来分析了该蛋白的结构功能, 为进一步研究该蛋白提供了参考.

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕品种为秋丰×白玉, 采用新鲜桑叶按照常规饲养方式饲喂至五龄第 3 d. 剪尾角取血, 经液氮冷冻后放置于 -80 °C 冰箱中保存备用.

1.2 蛋白的制备

取一定量的家蚕血液, 放在冰上使其低温缓慢溶解, 然后按 1 μ L 血液加 10 μ L 裂解缓冲液(LB)的比例加入裂解缓冲液(8 M urea, 2 M thiourea, 4% (v/v) CHAPS, 2% (v/v) IPG buffer (pH 3~10)和 30 mM DTT), 25 °C 振荡混匀, 并在摇床上摇动 30 °C, 每隔 10 min 振荡混匀一次. 室温下放置 10 min, 超声波处理 30 s, 冰浴 30 s, 重复 4 次, 以使样品充分裂解. 用 4 °C 高速离心机 15 000 r·min⁻¹ 离心两次, 每次 15 min, 同

收稿日期:2014-11-27

基金项目:河北省教育厅高校科学技术研究计划(Q2012026)

作者简介:李季生(1978-), 男, 山东泰安人, 承德医学院助理研究员, 博士, 研究方向为家蚕蛋白质组学, E-mail: jshlee@163.com.

通信作者:杨贵明(1961-), 男, 承德医学院研究员, 研究方向为蚕桑综合利用, E-mail: seri999@163.com.

时吸取上清液. 蛋白定量方法采用 Bradford 法^[23], 在 595 nm 处测定标准蛋白和样品的吸光光度值, 并采用标准曲线法测定计算样品蛋白浓度. 最后, 根据所需蛋白量分装至离心管中, -20°C 下保存备用.

1.3 双向电泳和质谱鉴定

双向电泳参考 Zhou 等人的报道, 采用 Ettan IPGphor3 等电聚焦和 SDS-PAGE 垂直电泳系统 Ettan Daltsix (Amersham Biosciences). 胶条采用 pH 值为 3~10 的 24 cm 线性干胶条^[24]. 双向电泳完成后, 小心取出凝胶, 清洗后进行银染.

银染胶采用 ImageScanner 2D 扫描仪 (Amersham Bioscience) 进行扫描. 通过 Image Master 2D platinum 分析软件进行图像分析, 检测蛋白斑点, 预测其分子量和等电点.

胶内酶解方法参照 Gharahdaghi 等人的报道^[25]. 质谱鉴定采用文献[26]中的方法和参数, 质谱仪采用 ABI 公司的 4700 proteomics Analyzer. 数据库选用 NCBI nr, 搜库软件为 GPS ExploreTM software.

1.4 生物信息学分析

采用 ProtParam 在线软件对该蛋白的氨基酸序列进行理化性质分析 (<http://web.expasy.org/prot-param/>), 利用 ProtScale 中的 Hphob. / Kyte & Doolittle 在线软件进行氨基酸序列亲水性/疏水性分析 (<http://web.expasy.org/protscale/>), 利用 SignalP-4.1 对氨基酸序列进行信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM Server, v. 2.0 对氨基酸序列的跨膜结构域进行分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), PBIL 对氨基酸序列的二级结构进行分析 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html), SWISS-MODEL 在线软件进行同源建模 (<http://swissmodel.expasy.org/>). 通过 PredictProtein 对亚细胞定位、聚类分析、结合位点进行预测 (<https://www.predictprotein.org/>).

2 结果与分析

2.1 双向电泳和质谱鉴定

分析五龄第 3 d 家蚕血液双向电泳图谱, 根据肽聚糖识别蛋白的理论等电点和分子量, 在双向电泳图谱中定位. 经过胶内酶解、质谱鉴定以及 MASCOT 搜索, 发现其中该蛋白确为肽聚糖识别蛋白, 方框内为该蛋白的三维视图 (图 1). 根据表 1 鉴定结果, 该蛋白肽段匹配为 12, 序列覆盖度为 43.9, 蛋白得分为 228, 说明鉴定结果可信.

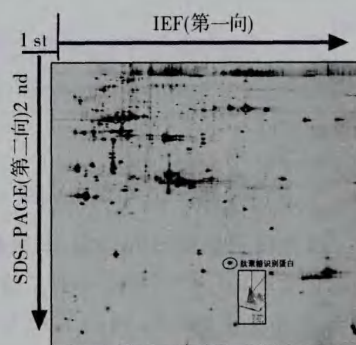


图1 肽聚糖识别蛋白的三维视图

表 1 肽聚糖识别蛋白鉴定结果

名称	登录号	实验 pI/MW	得分	置信度	肽段匹配	序列覆盖度/%
肽聚糖识别蛋白	gi112983994	7.2/19	228	100	12	43.9

2.2 肽聚糖识别蛋白的理化性质分析

采用 ProtParam 软件进行分析, 结果发现, 家蚕血液中热激关联蛋白含有 20 种基本氨基酸. 其中亮氨酸 (Leu) 含量最高, 超过 10%; 蛋氨酸 (Met) 的含量最低 (图 2). 该蛋白氨基酸数目 196 个, 分子式为 C962H1506N276O279S7, 分子量为 21626.6, 理论等电点是 6.70. 这一结果与表 1 双向电泳得出的数值有一定差异. 造成实验等电点比理论值高的原因可能是由于翻译后修饰, 比如糖基化、磷酸化、甲基化等; 造成实验分子量比理论值小的原因可能是由于基因的可变剪切或者蛋白的降解等^[27].

该蛋白 N 末端为蛋氨酸, 不稳定系数为 35.74, 被认为是一种稳定蛋白. 疏水性平均值 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.058 , 表明其为亲水性蛋白. ProtScale 分析也同样表明, 负值峰面积大于正值, 蛋白表现为亲水性 (图 3). SignalP-4.1 分析结果显示, 在 23-24 位存在剪切位点, 此处 C 值达到最高值, S 值陡峭, Y 值处于最高峰, 表明该蛋白存在信号肽 (图 4), 可能为分泌型蛋白, 这与 Mathur 等人的报道结果类似^[28]. 另外, 跨膜结构分析结果显示, 该蛋白几乎全部在膜外, 不存在跨膜区 (图 5). 从以上分析可以看出, 这些特殊的理化性质有利于肽聚糖识别蛋白识别并吞噬细菌.

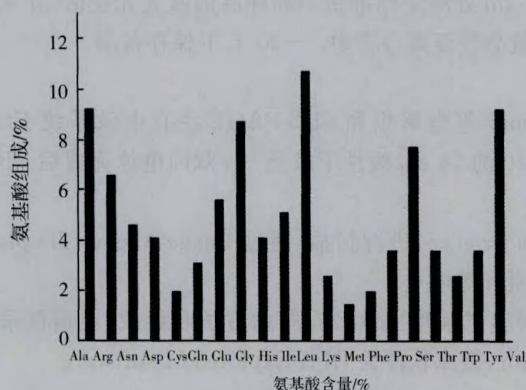


图2 肽聚糖识别蛋白的氨基酸组成分析

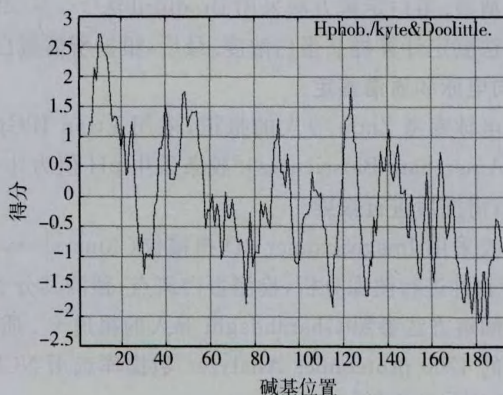


图3 肽聚糖识别蛋白的亲水性/疏水性分析

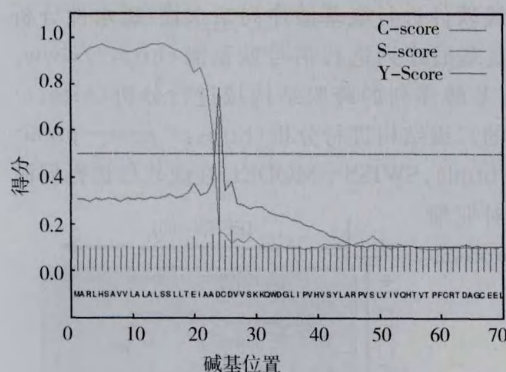


图4 SignalP-4.1预测信号肽

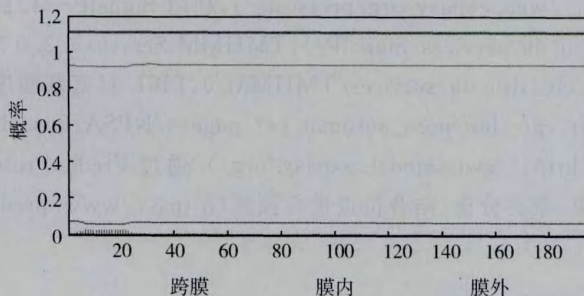


图5 TMHMM预测的跨膜结构域

2.3 肽聚糖识别蛋白的二级、三级结构预测

采用 PBIL 分析该蛋白序列二级结构,结果显示该蛋白氨基酸序列是由 46.94% α 螺旋、17.86% 延伸链和 35.20% 无规则卷曲组成(图 6)。利用 SWISS-MODEL 在线软件对该蛋白二级序列进行同源建模得到三级结构(图 7),序列一致性为 46.11%。从三级结构可以看出,家蚕肽聚糖识别蛋白的空间构象中含有 3 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠片,这与 Guan R 等人的报道一致^[29-31]。

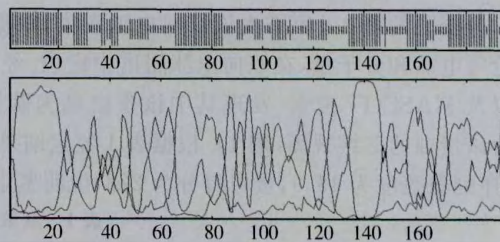


图6 肽聚糖识别蛋白的二级结构预测。



图7 肽聚糖识别蛋白的三级结构预测(不同旋转视角)

2.4 肽聚糖识别蛋白亚细胞定位、GO 功能和结合位点分析

由于家蚕肽聚糖识别蛋白为分泌类蛋白,无法通过 PredictProtein 进行亚细胞定位。GO 分析表明,肽聚糖识别蛋白在分子功能本体中可能存在 7 种功能,主要功能为肽聚糖受体活性(peptidoglycan receptor activity),在生物学进程中有 16 个 GO 分类,主要作用为肽聚糖代谢(peptidoglycan catabolic process)和先天

性免疫应答 (innate immune response). 图 8 中列出该蛋白在分子功能本体中的 GO 功能分类, 表 2 列出了它在生物学进程中的 GO 分类. 靶位点分析表明热激关联蛋白有 18 个蛋白结合位点, 5 个多核苷酸结合位点 (图 9).

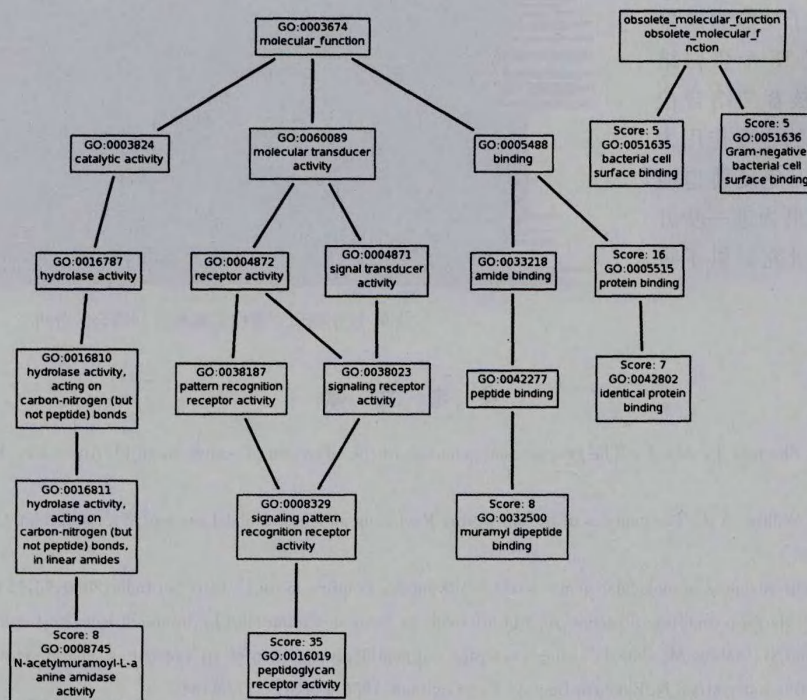


图 8 肽聚糖识别蛋白在分子功能本体中的诠释

表 2 肽聚糖识别蛋白在生物学进程本体中的诠释

序号	GO 号	GO 名称	可信度 / %
1	GO:0009253	peptidoglycan catabolic process	48
2	GO:0045087	innate immune response	46
3	GO:0032494	response to peptidoglycan	18
4	GO:0006965	positive regulation of biosynthetic process of antibacterial peptides	17
		active against Gram-positive bacteria	
5	GO:0042742	defense response to bacterium	11
6	GO:0008592	regulation of Toll signaling pathway	11
7	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	10
8	GO:0016045	detection of bacterium	9
9	GO:0031640	killing of cells of another organism	8
11	GO:0019731	antibacterial humoral response	8
12	GO:0045187	regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep	8
13	GO:0008340	determination of adult lifespan	8
14	GO:0051607	defense response to virus	8
15	GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	8
16	GO:0050832	defense response to fungus	8

3 结论

本研究通过双向电泳和质谱技术定位、鉴定了家蚕五龄第 3 d 血液中与昆虫免疫系统密切相关的的一个蛋白—肽聚糖识别蛋白. 利用生物信息学相关软件, 对该蛋白的结构性质、功能分类进行了系统的分析, 结果发现该蛋白总共含有 196 个氨基酸, 分子式为 C₉₆₂H₁₅₀₆N₂₇₆O₂₇₉S₇, 分子量为 21626. 6, 理论等电点是

6.70. 该蛋白 N 末端为蛋氨酸, 性状稳定, 可能存在信号肽, 但没有跨膜区. 氨基酸序列以 α 螺旋为主. 另外, 该蛋白是一种分泌类蛋白, 主要分子功能为肽聚糖受体, 可能存在 18 个蛋白结合位点和 5 个多核苷酸结合位点; 生物学进程中的主要作用为肽聚糖代谢和先天免疫胁迫应答. 本实验上述结果为进一步开展该蛋白的功能研究提供了重要的理论参考.

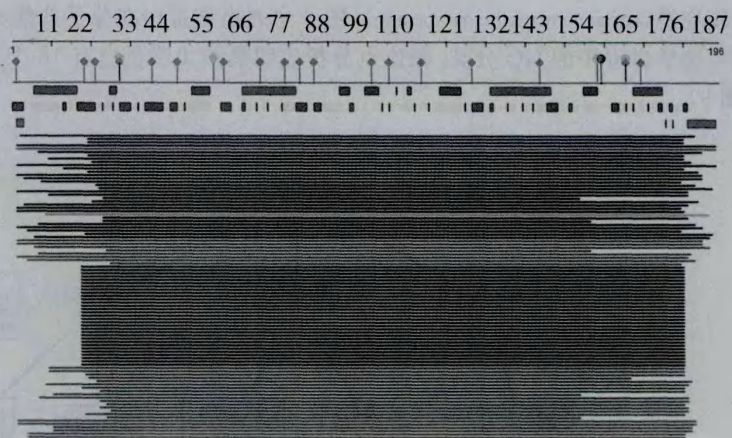


图9 肽聚糖识别蛋白氨基酸序列结合区分析

参 考 文 献

- [1] Goldsmith M R, Shimada T, Abe H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Annu. Rev. Entomol.*,2005,50:71-100.
- [2] Goldsmith M R, Wilkins A S. The genetics of the silkworm; Revisiting an ancient model system[M]. Cambridge University Press, New York,1995:21-76.
- [3] Nagaraju J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*[J]. *Curr Sci India*,2000,78:151-161.
- [4] Hakan S. Peptidoglycan recognition proteins; on and off switches for innate immunity[J]. *Immunol Rev*,2004,198(1):83-96.
- [5] Yoshida H, Ochiai M, Ashida M. Beta-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1986,141(3):1177-1184.
- [6] Samakovlis C, Asling B, Boman H G, et al. In vitro induction of cecropin genes-an immune response in a *Drosophila* blood cell line[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1992,188(3):1169-1175.
- [7] Taniai K, Furukawa S, Shono T, et al. Elicitors triggering the simultaneous gene expression of antibacterial proteins of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1996,226(3):783-790.
- [8] Iketani M, Nishimura H, Akayama K, et al. Minimum structure of peptidoglycan required for induction of antibacterial protein synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*,1999,29(1):19-24.
- [9] Werner T, Liu G, Kang D, et al. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2000,97(25):13772-13777.
- [10] Lee W J, Lee J D, Kravchenko V V, et al. Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1996,93(15):7888-7893.
- [11] Jomori T, Natori S. Molecular cloning of cDNA for lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Similarity of the protein with animal lectins and its acute phase expression[J]. *J Biol Chem*,1991,266(20):13318-13323.
- [12] Michel T, Reichhart J M, Hoffmann J A, et al. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein[J]. *Nature*,2001,414(6865):756-759.
- [13] Choe K M, Werner T, Stoven S, et al. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*[J]. *Science*,2002,296(5566):359-362.
- [14] Gottar M, Gobert V, Michel T, et al. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein[J]. *Nature*,2002,416(6881):640-644.
- [15] Bischoff V, Vignal C, Boneca I G, et al. Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria[J]. *Nat Immunol*,2004,5(11):1175-1180.
- [16] Garver L S, Wu J, Wu L P. The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2006,103(3):660-665.
- [17] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults[J]. *Cell*,1996,86(6):973-983.
- [18] Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, et al. A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control path-

- ways in the *Drosophila* host defense[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(21):9465-9469.
- [19] Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. Purification of peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* *J Biol Chem*, 1996, 271(23):13854-13860.
- [20] Park J W, Je B R, Piao S, et al. A synthetic peptidoglycan fragment as a competitive inhibitor of the melanization cascade[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(12):7747-7755.
- [21] Kang D, Liu G, Lundstrom A, et al. Peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to mammals[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(17):10078-10082.
- [22] Hashimoto K, Mega K, Matsumoto Y, et al. Three peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes encoding potential amidase from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* *Comp Biochem Physiol B Biochem*[J]. *Mol Bio*, 2007, 148(3):322-328.
- [23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(2):248-254.
- [24] Zhou Z H, Yang H J, Chen M, et al. Comparative proteomic analysis between the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry leaves and on artificial diet[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7:5103-5111.
- [25] Gharahdaghi F, Weinberg C R, Meagher D A, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(3):601-605.
- [26] Li J, Ye L, Lan T, Yu M, et al. Comparative proteomic and phosphoproteomic analysis of the silkworm (*Bombyx mori*) posterior silk gland under high temperature treatment[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39:8447-8456.
- [27] Yan S P, Zhang Q Y, Tang Z C, et al. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice[J]. *Molecular & cellular proteomics*, 2006, 5(3):484-96.
- [28] Mathur P, Murray B, Crowell T, et al. Murine peptidoglycan recognition proteins PglyrpIa and PglyrpIh are encoded in the epidermal differentiation complex and are expressed in epidermal and hematopoietic tissues[J]. *Genomics*, 2004, 83:1151-1163.
- [29] Reiser J B, Teyton L, Wilson I A. Crystal structure of the *Drosophila* peptidoglycan recognition protein (PGRP)-SA at 1.56 Å resolution[J]. *J Mol Biol*, 2004, 340:909-917.
- [30] Guan R, Malchiodi E L, Wang Q, et al. Crystal structure of the C-terminal peptidoglycan-binding domain of human peptidoglycan recognition protein-Ia[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(30):31873-31882.
- [31] Guan R, Wang Q, Sundberg E J, et al. Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein S (PGRP-S) at 1.70 Å resolution[J]. *J Mol Biol*, 2005, 347:683-691.

Identification and Bioinformatics Analysis on Peptidoglycan Recognition Protein of Silkworm Haemolymph

LI Jisheng^{a,b}, XIA Aihua^{a,b}, MAO Xiaoxia^c, JIA Manli^{a,b}, LI Na^{a,b},
GAO Yujun^{a,b}, YANG Guiming^{a,b*}

(a. Hebei Universities R&D Centre for Sericulture and Specialty Enabling Technologies;

b. Institute of Sericulture; c. Institute of Chinese Materia Medica,

Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

Abstract: Utilizing two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, peptidoglycan recognition protein (PGRP) was identified in the present study. In order to further analysis the structure and function of the protein, we employed bioinformatics methods to study its physical and chemical properties, hydrophobic/hydrophilic, signal peptide, secondary structure and tertiary structure, subcellular localization and functional annotations. Results showed that as a kind of secreted protein PGRP might have signal peptide and its molecular function was peptidoglycan receptor. In biological process ontology, it may play important role in peptidoglycan catabolic and innate immune response.

Keywords: silkworm; haemolymph; peptidoglycan recognition protein; two-dimensional electrophoresis; mass spectrometry; bioinformatics