

文章编号: 1000-0615(2019)05-1271-17

DOI: 10.11964/jfc.20180511293

大弹涂鱼皮肤黏液的抑菌活性和蛋白质组学

刘宏汉¹, 姜雨婷¹, 范美华¹, 王日昕², 廖智^{1*}

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 海洋生物蛋白质工程研究室, 浙江舟山 316022;

2. 宁波大学海洋学院, 鱼类健康与进化研究室, 浙江宁波 315211)

摘要: 皮肤黏液是鱼类免疫防御的第一道防线。大弹涂鱼皮肤黏液对其免疫防御、渗透压维持以及适应水陆生活等方面具有重要意义。为深入了解大弹涂鱼皮肤黏液的蛋白质分子组成, 对其皮肤黏液开展了抑菌活性分析和蛋白质组学分析。通过电刺激法收集大弹涂鱼皮肤黏液, 采用打孔法比较了皮肤黏液和血清的抑菌活性差异; 进一步利用鳃弧菌对大弹涂鱼进行诱导, 采用生长曲线抑制法分析和比较了诱导前后皮肤黏液的抑菌活性差异。利用Shotgun质谱技术, 结合大弹涂鱼皮肤转录组数据库, 对大弹涂鱼皮肤黏液开展了蛋白质组学分析; 进一步利用String软件对所鉴定的蛋白质开展了蛋白质相互作用预测。大弹涂鱼皮肤黏液具有广谱抑菌活性, 鳃弧菌诱导后的大弹涂鱼皮肤黏液与诱导前相比, 对部分革兰氏阴性菌的抑菌活性明显上升, 但对其他菌株的抑菌活性差异不明显。从大弹涂鱼皮肤黏液中共鉴定各类蛋白质分子97种, 基本分子组成与其他硬骨鱼类皮肤黏液蛋白相似, 但也有少数蛋白如泛素蛋白、胸腺素蛋白等未在其他鱼类皮肤黏液中报道。此外, 其他鱼类中所鉴定到的部分蛋白如热休克蛋白、抗菌肽等在大弹涂鱼皮肤黏液中未能鉴定到。大弹涂鱼皮肤黏液中已鉴定的蛋白多数具有与免疫功能相关的结构域, 且存在一个以肌动蛋白为核心的相互作用网络。大弹涂鱼皮肤黏液具有明显的广谱抑菌活性, 其蛋白质组成与其他鱼类皮肤黏液具有一定的相似性。本研究为深入了解大弹涂鱼皮肤黏液的分子多样性及功能机制奠定了基础。

关键词: 大弹涂鱼; 皮肤黏液; 蛋白质组学; 免疫; 抑菌活性

中图分类号: Q 71; S 942

文献标志码: A

皮肤是鱼类用以保护机体的一道重要屏障。由于鱼类生存于水环境, 与陆生生物相比, 其皮肤组织面临来自微生物侵袭的风险更高, 各种物理化学因素的影响更大, 因此, 鱼类皮肤通过分泌黏液, 与表皮细胞一起构成黏膜免疫系统, 成为抵御微生物侵袭的第一道防线^[1-3]。鱼类皮肤黏液主要成分为蛋白质^[4-7]。在功能方面, 皮肤黏液不仅参与鱼类免疫防御^[4], 其所含的糖蛋白、溶菌酶、补体蛋白、凝集素、黄素酶、蛋白水解酶、抗菌肽以及免疫球蛋白等众多免疫成分可作为免疫相关分子的储存库^[8]; 鱼类皮肤黏液还参与了鱼类的呼吸、渗透调节、繁殖、运

动、排泄和信息交流等生物学功能^[9]。因此, 鱼类皮肤黏液的相关研究在鱼类学研究中占据着重要地位。

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、弹涂鱼科(Periophthalmidae)、大弹涂鱼属(*Boleophthalmus*)。与其他硬骨鱼类相比, 大弹涂鱼的一个重要特点在于其三分之一的生命可生活于滩涂这样的陆地环境, 生物学特性介于鱼类和两栖类之间。为此, 对于大弹涂鱼皮肤黏液的研究不仅有助于了解大弹涂鱼的特殊生活习性的适应机制, 也有助于了解鱼类在进化过程中, 其

收稿日期: 2018-05-22 修回日期: 2018-09-30

资助项目: 国家自然科学基金(31472279); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2017R411010)

通信作者: 廖智, E-mail: liaozhi@zjou.edu.cn

皮肤黏液的分子组成变化机制。

为深入了解大弹涂鱼皮肤黏液的分子组成,通过电刺激法收集大弹涂鱼皮肤黏液,研究并比较了其和血清的抑菌活性差异以及鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)诱导对其皮肤黏液的抑菌活性的影响。在此基础上,皮肤黏液经脱盐、还原烷基化和酶解后,采取蛋白质组学策略,结合大弹涂鱼皮肤转录组数据,研究其蛋白质分子组成特点。从中鉴定各类蛋白质分子共计97种,并对上述蛋白质分子开展了序列分析和相互作用预测。本研究为了解大弹涂鱼皮肤黏液中的蛋白质分子多样性特征以及大弹涂鱼皮肤黏液的功能机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验对象

成年野生大弹涂鱼采集于浙江宁波镇海澥浦沿海滩涂,体长12~14 cm。大弹涂鱼在装有经过滤除菌海水的恒温(25 °C)水箱中静养24 h,之后选取健康、活泼、表皮无损伤的个体进行实验。采用电刺激法收集大弹涂鱼皮肤黏液^[10]。将大弹涂鱼个体置于盐度为18的经过滤除菌的海水中,经10 V电压,刺激次数10次(电刺激10 s,间隔10 s)后收集含有大弹涂鱼皮肤黏液的海水,经离心(12 000 r/min, 20 min, 4 °C)后,上清液采用透析袋(Viskase MD44, MWCO: 1 ku, 美国)进行透析脱盐,冷冻干燥后,保存于-20 °C备用。

1.2 大弹涂鱼皮肤黏液的抑菌活性分析

采用打孔法研究大弹涂鱼皮肤黏液及血清样品对14种微生物的抑制作用。其中大弹涂鱼皮肤黏液样品为脱盐冻干后的粉末,将大弹涂鱼经低温麻醉后,以灭菌注射器收集其血液,为防止血液凝固,加入红细胞保存液(阿氏液, $V_{\text{血液}}:V_{\text{阿氏液}}=1:4$)经低速离心(1 000 r/min, 15 min, 4 °C)去除血细胞后获得血清。抑菌实验所用菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC),5种革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*);7种革兰氏阴性菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、副溶血性弧

菌(*V. parahaemolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、鳗弧菌、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*);2种真菌:白色念珠菌(*Monilia albican*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)。将微生物涂布于LB固体培养基上,以打孔器在平板上打孔,在孔内加入浓度为1 mg/mL大弹涂鱼皮肤黏液样品,另设大弹涂鱼血清浓度为1 mg/mL对照组;阴性对照组为纯水;上述样品加样量均为10 μL。平板于37 °C条件下培养12 h后观察抑菌圈并测量其直径。蛋白浓度定量采用福林酚蛋白浓度测定试剂盒[C505031, 生工生物工程(上海)股份有限公司],按试剂盒操作说明进行,标准品为牛血清白蛋白。

采取生长曲线抑制法^[11]分析大弹涂鱼经鳗弧菌注射诱导后其皮肤黏液的抑菌活性变化。鳗弧菌诱导参照已有文献^[12]进行。鳗弧菌溶于生理盐水(10^6 CFU/mL),经腹腔注射(100 μL/尾)诱导24 h的大弹涂鱼经电刺激法收集其皮肤黏液,经冷冻干燥后进行蛋白质定量。抑菌活性测试菌株同上。测试菌株溶于LB培养基中(OD_{600} 值为0.01),取80 μL菌液置于96孔板中,加入20 μL样品溶液(蛋白浓度调节为1 mg/mL);对照组为80 μL菌液加20 μL纯水,在37 °C培养箱中培养8 h后,测量其 OD_{600} 。去除本底值后,根据样品组与对照组的 OD_{600} 比值判断抑菌效果,抑制率高代表抑菌活性强。

1.3 大弹涂鱼皮肤黏液蛋白质组学分析

大弹涂鱼皮肤黏液样品的还原烷基化、胰蛋白酶酶解、Shotgun质谱分析参照已有文献^[13]。将大弹涂鱼皮肤黏液样品溶解于50 mmol/L碳酸氢铵溶液,加入二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)至终浓度为10 mmol/L,于57 °C条件下还原1 h,再加入碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM)溶液至终浓度为20 mmol/L,在室温、黑暗条件下进行烷基化反应45 min。反应结束后,按1:50比例加入胰蛋白酶(proteomics grade, Sigma),37 °C条件下孵育12 h。酶解完成后,样品溶液经离心(12 000 r/min, 20 min, 4 °C)取上清液冷冻干燥后,复溶于4%的乙腈溶液(0.1% 三氟乙酸)进行质谱分析,质谱仪为QSTAR-Elite (Applied Biosystems, 美国)。

酶解后的样品溶液首先经高效液相色谱系统(20AD HPLC system, Shimadzu, 日本)进行分离;分离柱为分析型Zorbax 300SB-C₁₈反相色谱柱(0.1 mm×150 mm, 5 μm, 300 Å, 加拿大);洗

脱液分别为含0.1%甲酸的5%乙腈溶液(A液)和95%乙腈(B液);洗脱梯度为90 min内B液的比例由5%上升到35%,流速为0.3 mL/min。质谱数据的采集由软件Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems, 美国)完成;一级质谱扫描范围 m/z 350~1 500;分辨率分别为60 000(全扫描)和2 000(MS/MS扫描);强度最大的8个峰(m/z 100~2 000)经动态排除法收集后进行序列分析。

采用MSCOT 2.1软件进行蛋白质鉴定。数据库采用大弹涂鱼皮肤转录组unigene数据集(大弹涂鱼基因组数据目前尚未开放下载),共计119 848条unigene序列^[4]。上述unigene数据经MSCOT 2.1软件转化为6种可能的蛋白质翻译格式所推导的氨基酸序列,构成自定义本地数据库。二级质谱数据用以检索该蛋白质序列数据库;质谱质量容差分别设定为 5×10^{-5} mg/L(一级质谱)和0.2 u(二级质谱);固定修饰设定为乙酰化,可变修饰设定为氧化;蛋白质得分在60分以上且最佳离子得分(ion score)在40分以上为可信鉴定结果。

对获得的鉴定结果,利用Lasergene v7.1软件中的EditSeq模块进行开放阅读框(open reading frame, ORF)分析。ORF推导氨基酸序列与MS/MS质谱图的肽段序列信息进行相互验证,以判断推导ORF区域以及MS/MS数据的可信度。利用SignalP 4.1在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽分析;序列同源检索在NCBI数据库中以BLAST工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线进行;结构域分析用SMART工具软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线预测;采用ProtParam在线工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质分子的基本理化性质。采用String在线软件(版本v9.05)(<https://string-db.org/>)进行蛋白质相互作用分析。

1.4 数据分析

实验数据采用Excel 2013进行整理,采用SPSS 22.0软件进行统计学分析及显著性差异分析, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果

2.1 大弹涂鱼皮肤黏液的提取及抑菌活性

大弹涂鱼在过滤除菌海水中经电刺激后,收集含皮肤黏液的海水,经透析脱盐后冻干。蛋

白浓度定量分析表明,其皮肤黏液冻干粉中蛋白质浓度为20.9%。采取打孔法检测大弹涂鱼皮肤黏液和血清对14种微生物的抑制作用。大弹涂鱼皮肤黏液样品在1 mg/mL蛋白浓度下对所检测的14种菌均可观察到明显的抑菌圈(表1)。而相同蛋白浓度下,大弹涂鱼血清仅对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌产生抑制作用,对其他12种微生物均无明显抑制活性(表1)。进一步采取生长曲线抑制法比较了大弹涂鱼经鳗弧菌诱导后,其皮肤黏液抑菌活性差异,结果显示,大弹涂鱼皮肤黏液样品在1 mg/mL浓度下对14种测试菌的抑制率均在80%以上(图1)。经鳗弧菌诱导24 h后,与未诱导组相比,大弹涂鱼皮肤黏液样品对多数所测试菌株的抑制率差异不明显(图1),但对部分革兰氏阴性菌,如大肠杆菌、绿脓杆菌和哈氏弧菌的抑制率有显著升高($P < 0.05$, $n=3$),而对巨大芽孢杆菌的抑制率则有极显著下降($P < 0.01$, $n=3$)。

2.2 大弹涂鱼皮肤黏液质谱鉴定

对大弹涂鱼皮肤黏液样品经脱盐、还原烷基化以及胰蛋白酶酶解后,开展Shotgun质谱分析,通过所获得的二级质谱数据搜索大弹涂鱼皮肤转录组数据库,共获得97种有效蛋白,对所鉴定的蛋白匹配的unigene进行开放阅读框分析,对开放阅读框编码的蛋白质序列开展了序列同源性搜索、结构域预测和信号肽预测(附表1)。

所鉴定的97种蛋白质经过BLAST分析,有94种蛋白可搜索到同源序列,其余3种蛋白未能检索到。在所鉴定的蛋白中,结构蛋白数量最多,包括角蛋白、肌动蛋白、肌动蛋白结合蛋白、肌球蛋白、细胞骨架蛋白、纤维蛋白和胶原蛋白等,共计30种;其次为酶类蛋白,包括乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、磷酸酶、转移酶等共计15种;此外,还鉴定到免疫相关蛋白(免疫球蛋白、凝集素等),转运相关蛋白(载脂蛋白、转铁蛋白、血红蛋白亚基等),钙离子结合蛋白(钙调蛋白、钙黏蛋白和钙网蛋白等)以及黏蛋白、泛素蛋白、TBT结合蛋白、白蛋白等(附表1)。

所鉴定的蛋白中有61种蛋白的同源序列来源于大弹涂鱼,其他蛋白的同源序列多来源于其他鱼类,其中4种来自美丽硬骨舌鱼(*Scleropages formosus*),3种来自黑点青鳉(*Oryzias melastigma*),3种来自大黄鱼(*Larimichthys crocea*),2种

表1 大弹涂鱼皮肤黏液样品及血清样品
对14种菌的抑菌圈直径

Tab. 1 Zone diameter of 14 microorganisms inhibited
by *B. pectinirostris* skin mucus and serum
samples at protein concentration of 1 mg/mL mm

菌种 microorganisms	皮肤黏液抑菌圈 mucus	血清抑菌圈 serum
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	5.73±0.41**	4.90±0.82**
巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	4.17±0.05**	-
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	4.57±0.09**	4.63±0.42**
苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	5.13±0.26**	-
藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	4.63±0.29**	-
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	5.73±0.56**	-
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	5.10±0.29**	-
荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	4.80±0.22**	-
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	5.77±0.21**	-
哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	4.53±0.12**	-
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	5.03±0.12**	-
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	4.13±0.05**	-
白色念珠菌 <i>M. albican</i>	4.17±0.25**	-
黑曲霉 <i>A. niger</i>	4.27±0.76**	-

注: ** $P < 0.01$; - 无抑菌活性

Notes: ** $P < 0.01$; - no antibacterial activity

来自贝氏隆头鱼(*Labrus bergylta*)等。此外,也有少数蛋白在序列同源性搜索时,所匹配的同源蛋白来自非鱼类物种,包括哺乳类、甲壳类等(附表1)。

所鉴定的蛋白中,有89种蛋白可预测到序列中有结构域(附表1);13种蛋白可预测到信号肽序列,其中包括胶原蛋白、免疫球蛋白、凝集素、钙网蛋白、钙黏蛋白、载脂蛋白以及巨球蛋白等(附表1),表明上述蛋白属于分泌蛋白。

将大弹涂鱼皮肤黏液中鉴定的97种蛋白及其推导的氨基酸序列提交至<https://string-db.org/>,以斑马鱼(*Dania rario*)为物种模板,利用String软件开展蛋白质相互作用网络分析,结果显示,共有56种蛋白获得鉴定,其中有40种存在于以肌动蛋白为核心的相互作用网络中,另有16种蛋白

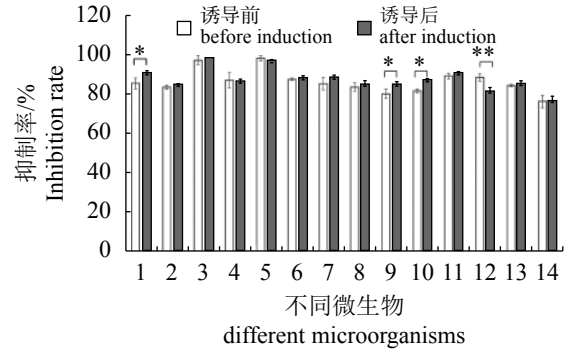


图1 生长曲线抑制法检测鳃弧菌诱导前后大弹涂鱼
皮肤黏液样品对14种菌的抑制率

1.大肠杆菌, 2.副溶血性弧菌, 3.枯草芽孢杆菌, 4.金黄色葡萄球菌, 5.藤黄微球菌, 6.溶藻弧菌, 7.苏云金芽孢杆菌, 8.鳃弧菌, 9.铜绿假单胞菌, 10.哈氏弧菌, 11.荧光假单胞菌, 12.巨大芽孢杆菌, 13.白色念珠菌, 14.黑曲霉; “*”代表 $P < 0.05$, “**”代表 $P < 0.01$; $n = 3$

Fig. 1 The inhibition rate of skin mucus from *B. pectinirostris* before and after *V. anguillarum* induction

1. *E. coli*, 2. *V. parahaemolyticus*, 3. *B. subtilis*, 4. *S. aureus*, 5. *M. luteus*, 6. *V. alginolyticus*, 7. *B. thuringiensis*, 8. *V. anguillarum*, 9. *P. aeruginosa*, 10. *V. harveyi*, 11. *P. fluorescens*, 12. *B. megaterium*, 13. *M. albican*, 14. *A. niger*; “*” $P < 0.05$, “**” $P < 0.01$; $n = 3$

位于网络之外(图2, 表2)。

3 讨论

皮肤是鱼类的第一道免疫防线。有研究显示,鱼类皮肤黏液的免疫相关蛋白(如溶菌酶、碱性磷酸酶、酯酶、蛋白酶、抗蛋白酶、过氧化物酶和抗菌因子)的活性通常高于血清^[15-16],表明黏膜免疫以及皮肤黏液对鱼类生存具有重要性。鱼类皮肤黏液的分子组成复杂,而蛋白质是鱼类皮肤黏液中最重要分子。目前,对于鱼类皮肤黏液的蛋白质组学研究尚不多见,以“Proteomic-fish-skin-mucus”作为关键词,在美国国立医学图书馆数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Proteomic+fish+skin+mucus>)中检索到的相关文献仅18篇,主要集中在鲷、鲈、鲑、鲤等少数几个鱼类物种。

由于大弹涂鱼在自然状态下皮肤黏液分泌量极少,因此,采用电刺激法促使大弹涂鱼分泌更多的黏液以开展研究。电刺激法在两栖类皮肤黏液研究中已被证明是一种无损伤的刺激手段^[10],但在鱼类皮肤黏液的研究中尚不多见。通过低强度电刺激,可观察到大弹涂鱼皮肤表面黏液分泌量明显增加。收集大弹涂鱼皮肤黏液,采

表 2 String分析结果中蛋白质全名和缩写对应表

Tab. 2 The full names and the corresponding abbreviations of identified proteins in String analysis

缩写 abbreviations	全称(长度/aa) full name (length)	缩写 abbreviations	全称(长度/aa) full name (length)
pgam1a	磷酸甘油酸变位酶 phosphoglycerate mutase 1a (254)	ATP5B	ATP合成酶 ATP synthase (529)
ptmaa	前胸腺素 prothymosin (105)	uba52	泛素A-52残基核糖体蛋白融合产物 ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (128)
ldhba	乳酸脱氢酶 lactate dehydrogenase Ba (334)	ENSDARG00000042535	肌动蛋白 actin, alpha (377)
fgb	纤维蛋白原 fibrinogen (485)	calr	钙网蛋白 calreticulin (418)
msna	moesin a (579)	sod1	超氧化物歧化酶 superoxide dismutase 1(154)
impa1	肌醇-单磷酸酶 inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 (282)	txn	硫氧蛋白 thioredoxin (107)
ENSDARG00000015050	钙调蛋白 calmodulin 2a (149)	tagln	transgelin (199)
fabp11a	脂肪酸结合蛋白 fatty acid binding protein 11a (134)	flna	细丝蛋白 filamin A, alpha (2614)
cahz	碳酸酐酶 carbonic anhydrase (260)	a2ml	α -2巨球蛋白 alpha-2-macroglobulin-like (1442)
cf12l	cofilin 1 (165)	fa56g11	si-dkey-46g23.5 (1453)
eef2b	真核翻译延伸因子 eukaryotic translation elongation factor 2b (858)	cdh1	钙粘蛋白 cadherin 1(864)
flncb	细丝蛋白 filamin C (2 743)	ptx3a	pentraxin 3(447)
tfa	transferrin-a (675)	gpx4a	谷胱甘肽过氧化物酶 glutathione peroxidase 4a (112)
ywhaba	酪氨酸3-单加氧酶/色氨酸5-单加氧酶活化蛋白 tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein (244)	ubb	泛素 ubiquitin C (533)
pvalb3	小白蛋白 parvalbumin 3 (109)	krt15	角蛋白 keratin 15 (460)
ptgdsb	前列腺素D2合成酶 bprostaglandin D2 synthase b (184)	TMSB15A	胸腺素 thymosin beta 15a (44)
cot1l	coactosin-like 1(142)	zgc:173994	zgc-173994 (219)
fabp3	脂肪酸结合蛋白 fatty acid binding protein 3(133)	rbp4	视黄醇结合蛋白 retinol binding protein 4(192)
LOC573769	si-ch211-161h7.6 (100)	zgc:92066	zgc-92066(226)
mpx	骨髓特异性过氧化物酶 myeloid-specific peroxidase (893)	ENSDARG00000089124	血红蛋白 hemoglobin alpha embryonic-1 (143)
ndrg1a	n-myc downstream regulated gene 1a (392)	blvrb	胆绿素还原酶 biliverdin reductase B (NADPH) (260)
efhd2	EF-hand domain family (233)	rps27a	核糖体蛋白 ribosomal protein S27a (172)
enpp2	外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (850)	pfn1	profilin 1 (141)
actb1	肌动蛋白 actin, beta 1(375)	apoa1b	载脂蛋白 A-Iapolipoprotein A-I (257)
actc1b	肌动蛋白 actin, alpha (377)	myl12.2	肌球蛋白 myosin, light chain 12 (172)
apoa2	载脂蛋白 A-IIapolipoprotein A-II (141)	colla2	胶原蛋白, I型, α 2 collagen, type I, alpha 2 (1352)

· 续表2 ·

缩写 abbreviations	全称(长度/aa) full name (length)	缩写 abbreviations	全称(长度/aa) full name (length)
pycard	PYD and CARD domain containing (203)	actb2	肌动蛋白 actin, beta 2(375)
tpi1b	磷酸丙糖异构酶 triosephosphate isomerase 1b (248)	ighv6-1	免疫球蛋白 immunoglobulin heavy variable 6-1 (114)

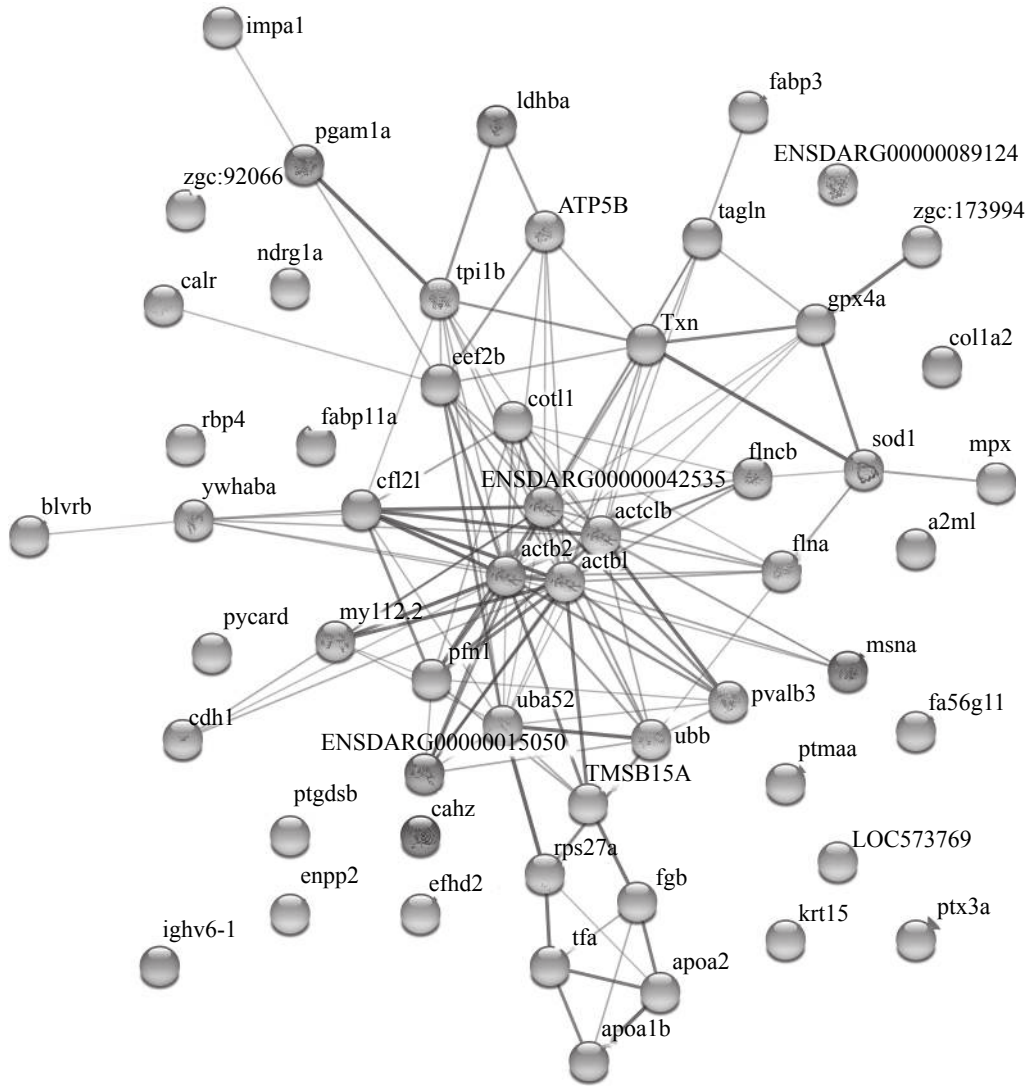


图 2 利用String软件(v9.05)分析的大弹涂鱼皮肤黏液蛋白质的相互作用网络图

粗线条代表强的相互作用，细线条代表弱的相互作用

Fig. 2 Confidence view of protein-protein interaction network of identified proteins created by String v9.05

Thick lines represent strong interactions, thin lines represent weak interactions

取Shotgun质谱策略结合转录组数据库搜索，对其进行了蛋白质组学分析，总计鉴定出97种蛋白质分子，可将其分为结构性蛋白、酶类蛋白、免疫相关蛋白、转运相关蛋白、钙离子结合蛋白和其他蛋白等6大类。

大弹涂鱼皮肤黏液蛋白质分子中，结构性蛋白占据了多数(30.9%)，其中主要是角蛋白和

肌动蛋白的不同变体，此外还包括纤维蛋白、细胞骨架蛋白、胶原蛋白等。类似的结果在其他鱼类的皮肤黏液蛋白质组成研究中已有报道。例如，金头鲷(*Sparus aurata*)皮肤黏液的蛋白质组学分析中，所鉴定的蛋白中有44%为结构性蛋白^[17]；而在对挪威舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)皮肤黏液的蛋白质组学研究中，有25.2%的蛋白为

结构性蛋白^[18]。结构性蛋白在鱼类皮肤黏液中的存在被认为是一种较为普遍的现象,其中,角蛋白和肌动蛋白均被认为与免疫相关,例如,在变形虫感染后的大西洋鲑(*Salmo salar*)的皮肤黏液中,角蛋白的表达量明显上调^[19];在鳃弧菌感染后的大西洋鳕(*Gadus morhua*)皮肤黏液蛋白质组学研究中得出同样的结论^[20]。此外,Molle等^[21]发现虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)皮肤黏液中的角蛋白可通过穿孔机制杀灭病原微生物,这表明角蛋白可能直接参与了鱼类皮肤黏液的免疫防御功能。而肌动蛋白同样在不同鱼类皮肤黏液中均有发现,且在鱼类遭受感染或者胁迫刺激后,其表达量出现明显变化^[17, 22-23]。此外,在昆虫的肌动蛋白研究中发现,肌动蛋白可以通过结合在病原微生物表面直接杀灭微生物,或者通过激活宿主吞噬细胞完成对微生物的吞噬作用^[24],推测肌动蛋白在鱼类皮肤黏液中可能具有类似的功能。

酶类蛋白在大弹涂鱼皮肤黏液中种类较多,包括乳酸脱氢酶、碳酸酐酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、磷酸酶、转移酶等。其中超氧化物歧化酶和过氧化物酶被认为是参与应激反应的重要酶类,在多种鱼类皮肤黏液中被鉴定出^[18, 25-26]。其中,大弹涂鱼皮肤黏液中鉴定的超氧化物歧化酶(c39279_g1_i1)理论分子量为15.9 ku,与金头鲷和舌齿鲈皮肤黏液中鉴定的超氧化物歧化酶的分子量接近,理论等电点也相近(pI为6左右);超氧化物歧化酶已被证实与免疫相关^[27-28],因此,大弹涂鱼皮肤黏液中的超氧化物歧化酶可能也参与了皮肤黏液的免疫功能。此外,大弹涂鱼皮肤黏液中鉴定到2种过氧化物酶,分别为c63909_g1_i1和c54456_g1_i1,后者序列中含信号肽序列。此前已报道在鱼类脾和肾中,过氧化物酶在免疫诱导后其表达量上升^[29];此外,过氧化物酶还被证明与炎症反应有关^[30]。

大弹涂鱼皮肤黏液中还鉴定到部分直接与免疫有关的分子,包括凝集素(c38038_g1_i1)、免疫球蛋白(c55569_g1_i2和c34104_g1_i1)等,其中在鱼类皮肤黏液中已报道至少5种类型的凝集素^[31-32]。凝集素作为免疫活性物质,具有分子识别和激活吞噬细胞等功能,因而在鱼类皮肤黏液中具有极为重要的作用^[31]。大弹涂鱼中鉴定到的凝集素分子序列中含信号肽和正五聚蛋白(PTX pentraxin)结构域,是一种典型的正五聚蛋白。正

五聚蛋白被认为在鱼类感染和炎症反应中是一种急性时相蛋白^[32],已在斑鳐(*Raja kenoeji*)和圆鳍鱼(*Cyclopterus lumpus*)皮肤黏液中鉴定出^[30, 32-33]。免疫球蛋白在鱼类皮肤黏液中的存在早有报道^[34-35],但并非一种普遍现象,例如,在对金头鲷和圆鳍鱼的皮肤黏液研究中就未鉴定到免疫球蛋白的存在^[17, 34],但考虑到上述研究中采用的是二维双向电泳结合蛋白质质谱鉴定技术,而本研究采用的Shotgun质谱技术不同于上述研究,因此,不排除因技术的灵敏度不同而导致。目前,已知鱼类皮肤黏液中的免疫球蛋白主要为IgT^[36],其分子结构由4条重链和4条轻链组成,其中重链分子量为70~80 ku,轻链分子量为20~30 ku^[37-38]。大弹涂鱼皮肤黏液中鉴定到2种免疫球蛋白c55569_g1_i2和c34104_g1_i1,其前体蛋白分子量分别为66和27 ku,推测c55569_g1_i2为免疫球蛋白重链,而c34104_g1_i1为免疫球蛋白轻链。此外,这2种蛋白均具有信号肽序列,表明这2种蛋白均为分泌型蛋白。鱼类皮肤黏液中的免疫球蛋白在结构和功能方面与血清中的免疫球蛋白存在差异,被认为是鱼类皮肤黏膜免疫体系的重要组成部分^[37-39],已有报道证明,鱼类皮肤黏液中免疫球蛋白能够吞噬细菌以及寄生虫等微生物,以防止其进一步感染上皮细胞^[40]。

从大弹涂鱼皮肤黏液中还鉴定到与物质转运有关的蛋白,包括载脂蛋白、转铁蛋白和血红蛋白等,其中载脂蛋白在鱼类皮肤黏液中普遍存在^[41],在鱼类遭受细菌感染后,其表达量会明显上升^[20, 22];此外,有研究表明鱼类皮肤黏液中的载脂蛋白在体外可裂解细菌并具有较强的杀菌作用^[42]。从大弹涂鱼皮肤黏液中鉴定到1种含载脂蛋白结构域的蛋白和4种含脂质运输结构域的蛋白,其中2种具有信号肽序列(c54454_g6_i1和c14526_g1_i1),而已报道的其他鱼类皮肤黏液中的载脂蛋白多为胞内蛋白^[41],这表明大弹涂鱼皮肤黏液中的载脂蛋白可能具有较为特殊的结构与功能。此外,在大弹涂鱼皮肤黏液中还鉴定到3种铁离子结合蛋白,包括血红素结合蛋白(c62810_g1_i1)和2种转铁蛋白(c47931_g1_i3和c20630_g1_i1),铁离子结合蛋白在其他鱼类皮肤黏液中被广泛鉴定到^[18, 22-23],并被认为可以通过结合铁离子而抑制细菌的生长,从而达到免疫防御的作用^[23]。

此外,大弹涂鱼皮肤黏液中还含有钙离子

结合蛋白, 包括3种钙调蛋白(c35670_g1_i1、c35670_g2_i1和c46827_g1_i1), 1种含EF手(EF-hand)结构域的蛋白(c57025_g5_i1)、1种钙网蛋白(c46982_g1_i1)和1种钙黏蛋白(c56178_g1_i1)。其中钙调蛋白在鱼类皮肤黏液中的存在早有报道^[43], 且在鱼类皮肤黏液中广泛存在。该蛋白不仅与鱼类皮肤黏液渗透压维持以及抗低温有关^[44], 还与鱼类的应激反应和免疫有相关^[45]。而钙网蛋白则可以通过与微生物的结合诱导激活宿主吞噬细胞的吞噬作用, 因此, 钙网蛋白对鱼类皮肤黏液的免疫防御同样起到了重要作用^[46-47]。

大弹涂鱼皮肤黏液中还鉴定到其他蛋白, 包括黏蛋白(c57849_g1_i1)、14-3-3蛋白(c23513_g1_i2)、泛素蛋白(c58032_g1_i1、c51162_g1_i1和c76039_g1_i1)、胸腺素(c35418_g2_i1、c36334_g2_i1和c62622_g1_i1)和延伸因子(c20684_g1_i1、c20195_g2_i1和c51081_g12_i1)等。上述蛋白中, 黏蛋白是鱼类皮肤黏液中鉴定到的分子量最大(100 ku以上)的蛋白质, 该蛋白携带大量寡糖链, 通过分子交联并结合水分子, 在鱼类体表形成一层湿滑的表层^[1, 48]; 14-3-3蛋白在鱼类皮肤黏液中也广泛发现^[41], 被认为是一种信号转导相关蛋白^[49], 尽管目前关于14-3-3蛋白在鱼类皮肤黏液中的作用尚不明确, 但已有报道发现, 该蛋白在斑马鱼的细胞吞噬以及抵御微生物方面发挥着重要作用^[50], 因此, 可以推测14-3-3蛋白在大弹涂鱼皮肤黏液中可能通过介导信号转导来激活皮肤表皮细胞的免疫防御功能。此外, 如泛素蛋白、胸腺素等, 则是首次在鱼类皮肤黏液中被发现, 关于这些蛋白在鱼类皮肤黏液中的作用, 目前尚无相关报道。

通过对上述蛋白展开相互作用分析, 发现有相互作用的蛋白中以肌动蛋白为核心, 其外围有肌球蛋白(myosin, myl)、丝切蛋白(cofilin, cfl)、细丝蛋白(filamin, flna)、泛素蛋白(ubiquitin, ubb)和小清蛋白(parvalbumin, pvalb)等, 而在上述蛋白外围, 还存在延伸因子(translation elongation factor, eef)、纤维蛋白原(fibrinogen, fgb)、转铁蛋白(transferrin, trf)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和载脂蛋白(apolipoprotein, apo)等。可见, 大弹涂鱼皮肤黏液中, 结构性蛋白、酶类蛋白等可能通过相互作用形成网络并因此介导了大弹涂鱼皮肤黏液的各种功能。

在本研究中, 部分在其他鱼类皮肤黏液中鉴定到的蛋白, 如热休克蛋白^[22]、组蛋白^[17]、抗菌肽^[51]等, 在大弹涂鱼皮肤黏液中未得到鉴定, 尽管上述蛋白在大弹涂鱼转录组数据库中均存在^[14], 但可能因为在皮肤黏液中含量极低而未能检测到, 因此, 尚不能排除上述蛋白在大弹涂鱼皮肤黏液中的存在。同时, 大弹涂鱼皮肤黏液具有广谱的、较强的抑菌活性。在对14种微生物的抑菌圈实验中, 大弹涂鱼皮肤黏液样品均表现出明显的抑菌圈, 而大弹涂鱼血清样品在相同蛋白浓度下, 仅对2种菌表现出抑菌活性, 表明大弹涂鱼皮肤黏液相较于血清具有更广谱的抑菌效果, 因此在鱼类免疫中具有重要意义。尽管本研究在大弹涂鱼皮肤黏液中未能鉴定到抗菌肽分子, 但从鉴定结果分析, 大弹涂鱼皮肤黏液中的角蛋白、载脂蛋白、凝集素、转铁蛋白等均有可能发挥了直接抑菌的活性。从鳃弧菌诱导结果分析, 鳃弧菌诱导对大弹涂鱼皮肤黏液的抑菌活性有一定影响, 特别是皮肤黏液对部分革兰氏阴性菌的抑制活性有所增强, 但总体影响不大。

综上所述, 大弹涂鱼作为一种在水生和陆生环境均能生存的特殊鱼类, 其皮肤黏液蛋白质组学研究具有重要意义。从所鉴定的97种大弹涂鱼皮肤黏液蛋白质分子分析, 多数与免疫防御有关, 部分与渗透压维持、信号转导、新陈代谢、物质转运等有关。上述研究为后续深入开展大弹涂鱼皮肤黏液的免疫防御机制及其他功能机制分析奠定了基础。

感谢复旦大学周新文博士协助shotgun质谱分析。

参考文献:

- [1] Shephard K L. Functions for fish mucus[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1994, 4(4): 401-429.
- [2] Ingram G A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection-a review[J]. *Journal of Fish Biology*, 1980, 16(1): 23-60.
- [3] Nigam A K, Kumari U, Mittal S, *et al.* Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(5): 1245-1256.
- [4] Esteban M Á. An overview of the immunological defen-

- ses in fish skin[J]. *ISRN Immunology*, 2012, 2012: 853470.
- [5] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 827-839.
- [6] Verdugo P. Goblet cells secretion and mucogenesis[J]. *Annual Review of Physiology*, 1990, 52: 157-176.
- [7] Strous G J, Dekker J. Mucin-type glycoproteins[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 27(1-2): 57-92.
- [8] Alexander J B, Ingram G A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2: 249-279.
- [9] Ensign L M, Schneider C, Suk J S, *et al.* Mucus penetrating nanoparticles: biophysical tool and method of drug and gene delivery[J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(28): 3887-3894.
- [10] Tyler M J, Stone D J M, Bowie J H. A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 1992, 28(4): 199-200.
- [11] 张东玲, 关瑞章, 黄文树, 等. pH和色谱柱对日本鳗鲡肝脏抗菌肽分离纯化效果的影响及抗菌活性检测[J]. *水产学报*, 2013, 37(4): 614-621.
- Zhang D L, Guan R Z, Huang W S, *et al.* Effects of pH and chromatographic column on isolation, purification of antibacterial peptide from Japanese eel liver, and determination of antibacterial activity[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 614-621(in Chinese).
- [12] 严林飞, 安昕, 包苗苗, 等. 大黄鱼过氧化氢酶基因的克隆及其对鳃弧菌感染的响应[J]. *水产学报*, 2017, 41(5): 641-648.
- Yan L F, An X, Bao M M, *et al.* Expression of catalase in *Larimichthys crocea* after infection of *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 641-648(in Chinese).
- [13] Liao Z, Bao L F, Fan M H, *et al.* In-depth proteomic analysis of nacre, prism, and myostracum of *Mytilus shell*[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 122: 26-40.
- [14] 张毓霞, 石戈, 王日昕, 等. 大弹涂鱼皮肤转录组测序及抗菌肽基因分析[J]. *生命科学研究*, 2018, 22(1): 26-35.
- Zhang Y X, Shi G, Wang R X, *et al.* Transcriptome of *Boleophthalmus pectinirostris* skin and analysis of anti-microbial peptide related unigenes[J]. *Life Science Research*, 2018, 22(1): 26-35(in Chinese).
- [15] Guardiola F A, Cuesta A, Arizcun M, *et al.* Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(2): 545-551.
- [16] Subramanian S, Mackinnon S L, Ross N W. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(3): 256-263.
- [17] Cordero H, Morcillo P, Cuesta A, *et al.* Differential proteome profile of skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after probiotic intake and/or overcrowding stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 132: 41-50.
- [18] Cordero H, Brinchmann M F, Cuesta A, *et al.* Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Proteomics*, 2015, 15(23-24): 4007-4020.
- [19] Valdenegro-Vega V A, Crosbie P, Bridle A, *et al.* Differentially expressed proteins in gill and skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affected by amoebic gill disease[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 69-77.
- [20] Rajan B, Lokesh J, Kiron V, *et al.* Differentially expressed proteins in the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) upon natural infection with *Vibrio anguillarum*[J]. *BMC Veterinary Research*, 2013, 9: 103.
- [21] Molle V, Campagna S, Bessin Y, *et al.* First evidence of the pore-forming properties of a keratin from skin mucus of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, formerly *Salmo gairdneri*)[J]. *Biochemical Journal*, 2008, 411(1): 33-40.
- [22] Provan F, Jensen L B, Uleberg K E, *et al.* Proteomic analysis of epidermal mucus from sea lice-infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(3): 311-321.
- [23] Easy R H, Ross N W. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2009, 4(3): 159-167.
- [24] Sandiford S L, Dong Y M, Pike A, *et al.* Cytoplasmic actin is an extracellular insect immune factor which is

- secreted upon immune challenge and mediates phagocytosis and direct killing of bacteria, and is a *Plasmodium* Antagonist[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(2): e1004631.
- [25] Jurado J, Fuentes-Almagro C A, Guardiola F A, *et al.* Proteomic profile of the skin mucus of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 120: 21-34.
- [26] Chong K, Joshi S, Jin L T, *et al.* Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior[J]. *Proteomics*, 2006, 6(7): 2251-2258.
- [27] Terrazzano G, Rubino V, Damiano S, *et al.* T cell activation induces CuZn superoxide dismutase (SOD)-1 intracellular re-localization, production and secretion[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2014, 1843(2): 265-274.
- [28] Gongora M C, Lob H E, Landmesser U, *et al.* Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: a potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome[J]. *American Journal of Pathology*, 2008, 173(4): 915-926.
- [29] Long W, Guo H Y, Zhang N, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of a peroxiredoxin 1 cDNA from golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51(2): 261-270.
- [30] Riddell J R, Wang X Y, Minderman H, *et al.* Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 184(2): 1022-1030.
- [31] Suzuki Y, Tasumi S, Tsutsui S, *et al.* Molecular diversity of skin mucus lectins in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 723-730.
- [32] Tsutsui S, Yamaguchi M, Hirasawa A, *et al.* Common skate (*Raja kenoei*) secretes pentraxin into the cutaneous secretion: the first skin mucus lectin in cartilaginous fish[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2009, 146(2): 295-306.
- [33] Du Clos T W. Pentraxins: Structure, function, and role in inflammation[J]. *ISRN Inflammation*, 2013, 2013: 379040.
- [34] Patel D M, Brinchmann M F. Skin mucus proteins of lump sucker (*Cyclopterus lumpus*)[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2017, 9: 217-225.
- [35] Rombout J H W M, Taverne N, van de Kamp M, *et al.* Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1993, 17(4): 309-317.
- [36] Zhang Y A, Salinas I, Li J, *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(9): 827-835.
- [37] Coscia M R, Simoniello P, Giacomelli S, *et al.* Investigation of immunoglobulins in skin of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 206-214.
- [38] Sheng X Z, Xu G J, Tang X Q, *et al.* Monoclonal antibodies recognizing mucus immunoglobulin and surface immunoglobulin-positive cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, 145(1-2): 143-150.
- [39] Guardiola F A, Cuesta A, Abellán E, *et al.* Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 24-31.
- [40] Xu Z, Parra D, Gómez D, *et al.* Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(32): 13097-13102.
- [41] Brinchmann M F. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies[J]. *Molecular Biosystems*, 2016, 12(7): 2056-2063.
- [42] Johnston L D, Brown G, Gauthier D, *et al.* Apolipoprotein A-I from striped bass (*Morone saxatilis*) demonstrates antibacterial activity *in vitro*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 151(2): 167-175.
- [43] Flik G, van Rijs J H, Wendelaar Bonga S E. Evidence for the presence of calmodulin in fish mucus[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1984, 138(3): 651-654.
- [44] Yang N, Peng C L, Cheng D, *et al.* The over-expression of calmodulin from Antarctic notothenioid fish increases cold tolerance in tobacco[J]. *Gene*, 2013, 521(1): 32-37.
- [45] Li S, Jia Z R, Li X J, *et al.* Calmodulin is a stress and immune response gene in Chinese mitten crab *Eriocheir*

- sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 120-128.
- [46] Micallef G, Cash P, Fernandes J M O, *et al.* Dietary yeast cell wall extract alters the proteome of the skin mucous barrier in atlantic salmon (*Salmo salar*): increased abundance and expression of a calreticulin-like protein[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169075.
- [47] Wang G H, Jiang Z J, He S W, *et al.* Two novel calreticulin-related molecules with microbial binding and phagocytosis enhancing capacity in the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 72: 174-180.
- [48] Issa S M A, Schulz B L, Packer N H, *et al.* Analysis of mucosal mucins separated by SDS-urea agarose polyacrylamide composite gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(24): 3554-3563.
- [49] Kltz D, Chakravarty D, Adilakshmi T. A novel 14-3-3 gene is osmoregulated in gill epithelium of the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(17): 2975-2985.
- [50] Ulvila J, Vanha-Aho L M, Kleino A, *et al.* Cofilin regulator 14-3-3 ζ is an evolutionarily conserved protein required for phagocytosis and microbial resistance[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2011, 89(5): 649-659.
- [51] Rakers S, Niklasson L, Steinhagen D, *et al.* Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: perspectives for investigative dermatology[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133(5): 1140-1149.

Antimicrobial activity and proteomic analysis of *Boleophthalmus pectinirostris* skin mucus

LIU Honghan¹, JIANG Yuting¹, FAN Meihua¹, WANG Rixin², LIAO Zhi^{1*}

(1. Laboratory of Marine Biology Protein Engineering, Marine Science and Technology College,
Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Laboratory of Fish Health and Evolution, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Fish skin mucus serves as the first line of defense against pathogens and external stressors. The mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* inhabit intertidal mudflats containing abundant and diverse microbial population, thus, the skin together with the mucus of *B. pectinirostris* are very important for the immune defense, osmotic pressure maintenance and adaptation to amphibian life. For exploring the proteomic profile of the skin mucus and understanding the molecular mechanism of *B. pectinirostris* adaptation to amphibious environments, the antibacterial activity was determined by agar diffusion plate method for the mucus and the serum samples. In addition, a growth curve inhibition method was used to compare the antibacterial activities of *B. pectinirostris* mucus before and after vibrio induction. Furthermore, the proteomic profile of natural *B. pectinirostris* mucus was identified by Shotgun mass spectrometry technology combining with skin transcriptome searching. The interaction network analysis of the identified proteins from mucus was performed by String software. Skin mucus was collected from *B. pectinirostris* after electrical stimulation. The mucus of *B. pectinirostris* showed a broad spectrum of antimicrobial activity more than serum of the same species, indicating that the mucus has a stronger antimicrobial activity than the serum. After vibrio induction, the antibacterial activity of mucus was slightly stronger for some gram-negative bacteria than that of un-induced mucus. A total of 97 proteins were identified from natural mucus of *B. pectinirostris* with a similar results from studies of other fish species, including actins, keratins, apolipoproteins, transferrins, calmodulins, ubiquitins, pentraxins, and various enzymes. However, some proteins, such as ubiquitin-like proteins and thymosin, were identified first from fish mucus. The identified proteins can be clustered into structural proteins, enzymes, material transport related proteins, immune proteins, and other proteins. Most of these proteins are known to be involved in immune and/or stress responses. Protein interaction analysis showed strong interactions among the identified proteins, such as actin, myosin, cofilin, filamin, apolipoprotein, transferrin, calmodulin, and superoxide dismutase. The proteomic profile established in this study could not only provide knowledge on the routes involved in mucosal innate immunity, but also put forward a non-invasive technique based on locating immune markers with a potential use for prevention and/or diagnosis of fish diseases.

Key words: *Boleophthalmus pectinirostris*; skin mucus; proteomics; immunology; antimicrobial activity

Corresponding author: LIAO Zhi. E-mail: liaozhi@zjou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472279); Innovation Plan of Science and Technology and Project of Planting Talent for College Students of Zhejiang Province (2017R411010)

附表 1 大弹涂鱼皮肤黏液的蛋白质组学鉴定结果
Tab. 1 The proteomic profile of skin mucus of *B. pectinirostris*

单一基因 unigene	分数 score	匹配肽段 matched peptides	同源蛋白名称/编号 homologous protein name/GenBank ID	物种 species	E-value	结构域(编号)及信号肽 domain (ID) and signal peptide
c14526_g1_i1	1 557	13	apolipoprotein A-IV/XP_020782485.1	<i>B. pectinirostris</i>	6.00E-140	Apolipoprotein (PF01442); MKYVALALALLAIGCQA
c47931_g1_i3	1 432	11	Serotransferrin-like/XP_020777739.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Transferrin (PF00405); TR_FER (SM0000094)
c32660_g2_i1	998	4	Parvalbumin beta-like/XP_020794485.1	<i>B. pectinirostris</i>	6.00E-49	EFh (SM000054)(2个)
c45830_g1_i1	910	17	Alpha-2-macroglobulin-like protein-1/XP_020782559.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	A2M_N (PF01835); A2M_N_2 (SM001359); A2M (SM001360); Thiol-ester_cl (PF10569); A2M_comp (PF07678); MGHPIQMRTWVLFVTLGCSYLGQA
c32660_g1_i1	736	3	parvalbumin alpha/XP_020780087.1	<i>B. pectinirostris</i>	1.00E-46	EFh (SM000054)(2个)
c48644_g1_i1	617	4	keratin, type II cytoskeletal cochlear-like isoform XI/XP_020777976.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Keratin_2_head; Filament (SM001391)
c69975_g1_i1	576	6	14 ku apolipoprotein/AEA51133.1	<i>O. melastigma</i>	4.00E-13	—
c48635_g1_i1	545	4	cystatin-B-like/XP_024135419.1	<i>O. melastigma</i>	4.00E-17	Cystatin (PF00031)
c50936_g2_i1	528	5	actin, cytoplasmic 1/XP_020773086.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	ACTIN (SM000268)
c50936_g1_i1	528	5	actin, cytoplasmic 1 isoform XI/XP_020782947.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	ACTIN (SM000268)
c35099_g1_i1	528	1	keratin, type II cytoskeletal 8-like/XP_020772862.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-146	Filament (SM001391)
c72150_g1_i1	508	3	lipocalin-like/XP_020781291.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Lipocalin (PF00061)
c37506_g1_i1	410	2	myelin P2 protein-like/XP_020788114.1	<i>B. pectinirostris</i>	6E-77	Lipocalin (PF00061)
c30996_g1_i1	386	2	thioredoxin-like/XP_020793422.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-70	DIMI (PF02966)
c39279_g1_i1	360	2	superoxide dismutase [Cu-Zn]/XP_020778489.1	<i>B. pectinirostris</i>	4.00E-92	Sod_Cu (PF00080)
c23263_g1_i1	348	3	hemoglobin subunit alpha-1-like/XP_020787301.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-97	Globin (PF00042)
c43876_g1_i1	341	2	Actin/KH49510.1	<i>T. suis</i>	0	ACTIN (SM000268)
c63242_g1_i1	304	1	Actin/AEK78850.1	<i>O. nigriventris</i>	3.00E-51	Actin (PF00022)
c24163_g1_i1	300	3	Keratin, type I cytoskeletal 13-like isoform X2/XP_020797615.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-133	Filament (SM001391)

· 续附表1 ·

单一基因 unigene	分数 score	匹配肽段 matched peptides	同源蛋白名称/编号 homologous protein name/GenBank ID	物种 species	E-值 E-value	结构域(编号)及信号肽 domain (ID) and signal peptide
c56814_g2_i1	256	2	Keratin, type I cytoskeletal 13-like/XP_022607861.1	<i>S. dumerilii</i>	1.00E-75	Filament (SM001391)
c57532_g2_i2	252	6	Alpha-2-macroglobulin-like/XP_020506621.1	<i>L. bergilta</i>	0	A2M_N_2(SM001359); A2M (SM001360); Thiol-ester_cl (PF10569); A2M_comp (PF076780)
c42862_g1_i1	226	5	Calmodulin/ELW71144.1	<i>T. chinensis</i>	2.00E-102	EFh (SM000054)(4个)
c46827_g1_i1	226	5	Calmodulin/ELW71144.1	<i>T. chinensis</i>	8.00E-104	
c70762_g1_i1	226	2	—	—	—	—
c31596_g1_i2	207	4	Fibrinogen beta chain/XP_020780547.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Fib_alpha (SM001212); FBG (SM000186)
c51112_g1_i2	201	5	Keratin, type I cytoskeletal 13-like/XP_020797591.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Filament (SM001391)
c55569_g1_i2	183	3	Immunoglobulin mu heavy chain precursor/ACM24795.1	<i>L. crocea</i>		IGv (SM000406); IGc1(SM000407)(2个); IG_like (SM000410); MDYRTALVFFVYWTGVFA
c54454_g6_i1	167	2	Retinol-binding protein 4/XP_020792333.1	<i>B. pectinirostris</i>	5.00E-146	Lipocalin (PF00061); MLQYVVALCLVAVSWA
c54456_g1_i1	167	2	Eosinophil peroxidase-like/XP_020780830.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	An_peroxidase (PF03098); MLFSVLFALCLCLPVYL
c34104_g1_i1	167	4	Immunoglobulin kappa light chain-like/XP_020443720.1	<i>M. albus</i>	1.00E-103	IGv (SM000406); IGc1 (SM000407); MTTQATYGLLTNNMTLVCVLMWTVLCCCFESRG
c42219_g1_i1	166	3	Inositol monophosphatase 1-like/XP_020786419.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Inositol_P (PF00459)
c36334_g2_i1	166	1	Thymosin beta-a-like/KPP68867.1	<i>S. formosus</i>	4.00E-09	THY (SM000152)
c36781_g1_i1	162	1	alpha 2 actin/CAF89867.1	<i>B. taurus</i>	4.00E-81	Actin (PF00022)
c47043_g2_i1	159	2	collagen alpha-1(I) chain-like/XP_020773987.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	VWC (SM000214); Collagen (PF01391)(5个); COLFI (SM000038); MFSFVDIRIALLSAAVLLARG
c56178_g1_i1	152	3	B-cadherin-like/XP_020792303.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Cadherin_pro (SM001055); CA (SM000112)(5个); Cadherin_C (PF01049); MGTATFAVLGALLLVLTSSLVSS
c76039_g1_i1	145	2	ubiquitin-40S ribosomal protein S27a/NP_956796.1	<i>D. rerio</i>	3.00E-111	—
c58032_g1_i1	145	2	ubiquitin/NP_001117666.1	<i>O. mykiss</i>	4.00E-89	UBQ (SM000213); Ribosomal_L40e (SM001377)
c51162_g1_i1	145	2	polyubiquitin/AAO66467.1	<i>C. dromedarius</i>	6.00E-54	Ubiquitin (PF00240); UBQ (SM000213)
c36056_g2_i1	142	2	BLTX302/AI197690.1	<i>N. pilipes</i>	1.00E-51	Actin (PF00022)

·续附表1·

单一基因 unigene	分数 score	匹配肽段 matched peptides	同源蛋白名称/编号 homologous protein name/GenBank ID	物种 species	E-值 E-value	结构域(编号)及信号肽 domain (ID) and signal peptide
c58637_g1_i1	142	2	alpha actin/AO25758.1	<i>I. punctatus</i>	1.00E-42	Actin (PF00022)
c20268_g1_i1	142	2	actin/KPP71390.1	<i>S. formosus</i>	1.00E-55	Actin (PF00022)
c47150_g1_i1	137	1	ectonucleotide pyrophosphatase/XP_020776347.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	SO (SM000201)(2个); Phosphodiesterase (PF01663); NUC (SM000477); MLRGIPVLLLLWAAADLNRA
c35670_g1_i1	134	2	Calmodulin/KKF31114.1	<i>L. crocea</i>	4.00E-13	EF-hand_1 (PF00036)
c43322_g1_i1	132	1	TBT-binding protein/AEA51045.1	<i>O. melastigma</i>	9.00E-12	—
c67492_g1_i1	129	2	fatty acid-binding protein, heart-like/XP_020788128.1	<i>B. pectinirostris</i>	4.00E-77	Lipopalin (PF00061)
c50596_g1_i3	119	1	glutathione S-transferase 3-like/XP_020777134.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-80	GST_N (PF02798)
c47043_g1_i2	118	2	collagen alpha-2(I) chain isoform X2/XP_023133230.1	<i>A. ocellaris</i>	0	Collagen (PF01391)(5个); COLFI (SM000038); MLSFVDTRLLLLAVTSYLATC
c35670_g2_i1	116	2	Calmodulin/ELW71144.1	<i>T. chinensis</i>	6.00E-43	EFH (SM000054)(2个)
c42986_g1_i1	115	2	alpha-cardiac actin/AAA37166.1	<i>M. musculus</i>	1.00E-38	Actin (PF00022)
c24792_g1_i1	110	2	hemoglobin subunit alpha-2-like/XP_020779749.1	<i>B. pectinirostris</i>	4.00E-100	Globin (PF00042)
c21240_g1_i1	107	1	alpha actin/AO25758.1	<i>I. punctatus</i>	2.00E-32	Actin (PF00022)
c23513_g1_i2	103	2	14-3-3 protein theta/XP_020774968.1	<i>B. pectinirostris</i>	1.00E-157	14_3_3 domain (SM000101)
c56814_g1_i1	101	3	keratin, type I cytoskeletal 13-like/XP_020796540.1	<i>B. pectinirostris</i>	1.00E-168	Filament (SM001391)
c63909_g1_i1	100	1	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase/XP_020795695.1	<i>B. pectinirostris</i>	7.00E-46	—
c54038_g1_i1	98	2	L-lactate dehydrogenase A chain/XP_020790852.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Ldh_1_N (PF00056); Ldh_1_C (PF02866)
c44612_g1_i2	96	1	keratin, type I cytoskeletal 18-like isoform X2/XP_020778110.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Filament (SM001391)
c3412_g1_i1	96	1	keratin, type I cytoskeletal 18-like/XP_020796889.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Filament (SM001391)
c46982_g1_i1	96	2	calreticulin-like isoform X1/XP_020784760.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Calreticulin (PF00262); Calreticulin (PF00262); MQIFTVAVVFAVCSVHA
c64043_g1_i1	92	1	—	—	—	—
c62622_g1_i1	89	2	thymosin beta-4 isoform X1/XP_020317005.1	<i>O. kisutch</i>	3.00E-13	THY (SM000152)

·续附表1·

单一基因 unigene	分数 score	匹配肽段 matched peptides	同源蛋白名称/编号 homologous protein name/GenBank ID	物种 species	E-值 E-value	结构域(编号)及信号肽 domain (ID) and signal peptide
c47435_g1_i1	88	1	L-lactate dehydrogenase B chain/XP_020793955.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Ldh_1_N (PF000056);Ldh_1_C (PF02866)
c35418_g2_i1	88	1	prothymosin alpha-like/XP_003435633.1	<i>C. lupus</i>	0.44	Prothymosin (PF03247)
c55122_g2_i2	88	2	murinoglobulin-2/XP_020483078.1	<i>L. bergylta</i>	8.00E-40	A2M_recep (SM001361)
c55271_g1_i2	87	1	carbonic anhydrase-like/XP_020781667.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Carb_anhydrase (SM001057)
c57849_g1_i1	86	2	mucin-5AC-like/XP_020792129.1	<i>B. pectinirostris</i>	8.00E-21	internal repeat
c38038_g1_i1	86	1	pentraxin-related protein PTX3/XP_020793363.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	PTX (SM000159); MSHCSLARSLHVLSLCLIALARA
c57025_g5_i1	84	2	EF-hand domain-containing protein D2-like/XP_020787368.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-124	EFH (SM000054)
c50249_g1_i1	83	1	apoptosis-associated speck-like protein/XP_020781703.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-124	PYRIN (SM001289); CARD (PF00619)
c20630_g1_i1	83	1	ferritin/XP_020794460.1	<i>B. pectinirostris</i>	4.00E-118	Ferritin (PF00210)
c55441_g2_i1	83	1	myosin regulatory light polypeptide 9-like/KPP79972.1	<i>S. formosus</i>	1.00E-109	EFH (SM000054)(3个)
c41582_g1_i2	83	1	Myosin regulatory light polypeptide 9/KKF30943.1	<i>L. crocea</i>	8.00E-109	EFH (SM000054)(3个)
c57976_g1_i1	83	1	myosin regulatory light polypeptide 9-like/KPP79972.1	<i>S. formosus</i>	4.00E-105	EFH (SM000054)(3个)
c37686_g1_i1	83	3	coactosin-like protein/XP_020790544.1	<i>B. pectinirostris</i>	6.00E-90	ADF (SM000102)
c56599_g7_i1	82	1	filamin-B/XP_020777732.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	IG_FLMN (SM000557)(11个)
c37395_g1_i1	82	2	cofilin-1-like/XP_020777021.1	<i>B. pectinirostris</i>	1.00E-10	ADF (SM000102)
c43322_g2_i1	81	2	—	—	—	—; MFAAFGLLLCLVLSQS
c6049_g1_i1	81	2	glutathione S-transferase Mu 3-like/XP_020785437.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-153	GST_N (PF02798); GST_C_3
c71961_g1_i1	83	2	protein S100-G-like/XP_020795401.1	<i>B. pectinirostris</i>	9.00E-55	S_100(PF01023); EF-hand_1 (PF00036)
c75270_g1_i1	82	1	Actin-like/BAF06817.1	<i>O. sativa</i>	4.00E-41	Actin (PF00022)
c36056_g2_i1	82	1	actin 5c/AMK48590.1	<i>R. ferrugineus</i>	3.00E-52	Actin (PF00022)
c51112_g1_i4	92	1	keratin, type I cytoskeletal 13-like/XP_020797591.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Filament (SM001391)

· 续附表1 ·

单一基因 unigene	分数 score	匹配肽段 matched peptides	同源蛋白名称/编号 homologous protein name/GenBank ID	物种 species	E-值 E-value	结构域(编号)及信号肽 domain (ID) and signal peptide
c39507_g1_i1	84	1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial/XP_020772775.1	<i>B. pectinirostris</i>	0E+00	ATP-synt_ab_N (PF02874);AAA (SM000382);ATP-synt_ab_C (PF00306)
c6020_g1_i1	67	1	transgelin-like/XP_020789192.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-146	CH (SM000033);Calponin (PF00402)
c43675_g1_i4	61	1	protein NDRG1-like isoform X2/XP_020788533.1	<i>B. pectinirostris</i>	6.00E-25	—
c43675_g1_i2	61	1	protein NDRG1-like isoform X2/XP_020788533.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Ndr (PF03096)
c55083_g4_i1	73	1	flavin reductase (NADPH)/XP_020794303.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-152	NmrA (PF05368)
c51081_g12_i1	67	1	elongation factor Tu/WP_076142809.1	<i>S. enterica</i>	0	GTP_EFTU;GTP_EFTU_D2(PF03144);GTP_EFTU_D3(PF03143)
c53503_g2_i1	94	3	phosphoglycerate mutase 1/XP_020784920.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	PGAM (SM000855)
c43675_g1_i1	85	1	protein NDRG1-like isoform X1/XP_020788532.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	Ndr (PF03096)
c46230_g1_i1	81	3	moesin/XP_020789144.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	B41(SM000295);FERM_C (SM001196);ERM (PF00769)
c55307_g9_i1	74	3	filamin-A-like isoform X1/XP_020788102.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	IG_FLMN (SM000557)(17个)
c47931_g1_i2	63	2	Serotransferrin-like/XP_020777739.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	TR_FER (SM000094)(2个)
c39106_g1_i1	62	1	triosephosphate isomerase/XP_020783592.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	TIM (PF00121)
c20684_g1_i1	62	1	elongation factor 2-like/XP_020795676.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	MMR_HSR1(PF01926); GTP_EFTU_D2(PF03144); EFG_II (PF14492);EFG_IV (SM000889);EFG_C (SM000838)
c20195_g2_i1	62	1	elongation factor 2/XP_020777225.1	<i>B. pectinirostris</i>	0	MMR_HSR1(PF01926)
c62810_g1_i1	61	2	hemopexin-like/XP_020772849.1	<i>B. pectinirostris</i>	2.00E-24	Hemopexin (PF000045)