吉林农业大学学报 2004, 26(3): 272~ 274, 279
Journal of Jilin Agricultural University

低盐压力下缢蛏血淋巴蛋白的比较蛋白质组学研究*

张 鹭[1], 陈寅山[2], 彭宣宪[3]
(1. 齐齐哈尔大学生命科学院, 齐齐哈尔 161005; 2. 福建师范大学生物工程学院, 福州 350007; 3. 厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

摘 要: 应用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳技术及图像分析技术寻找缢蛏在低盐环境压力下血淋巴内 40 kD 以下小分子蛋白质组差异, 制成肽质指纹图谱, MALDI-TOF-MS 测序, 通过数据库检索快速鉴定蛋白质或多肽。研究结果表明: 低盐压力下, 缢蛏血淋巴内有多种蛋白质发生变化, 共鉴定出包括磷脂酶 A2 (Phospholipase A2)、锌指蛋白 (Zinc Finger Protein) 等 6 种蛋白或多肽, 其功能涉及营养、基因表达及蛋白合成调控等方面, 说明其血淋巴在缢蛏的防御体系中具有关键性作用。

关键词: 缢蛏; 血淋巴; 双向电泳; 质谱; 低盐; 蛋白质
中图分类号: Q51; S985.34 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2004)03-0272-03

Comparative Proteomics of Proteins in *Sinonovacula constricta* Hemolymph under Low Salinity

ZHANG Lu[1], CHEN Yin-shan[2], PENG Xuan-xian[3]
(1. *College of Life Science, Qiqihar University, Qiqihar* 161006, *China*; 2. *College of Bioengineering, Fujian Normal University, Fuzhou* 350007, *China*; 3. *College of Life Science, Xiamen University, Xiamen* 361005, *China*)

Abstract: The differences of the whole protein(under 40 kD) expression profiles in *Sinonovacula constricta* hemolymph after shot-term treatment of low salinity are detected using two-dimensional electrophoresis and image analysis software, The peptide mass map is obtained with MALDI-TOF-MS, A novel protein or polypeptide is identified by database retrieval. Several proteins or polypeptides in *S. constricta* hemolymph change under low salinity stress, including Phospholipase A2, Zinc finger protein and so on, which are of multiple functions such as nutrition, regulatory gene expression and protein synthesis, and so on. It's obvious that hemolymph is critical in *S. constricta* defense mechanism.

Key words: *Sinonovacula constricta*; hemolymph; two-dimensional electrophoresis; MALDI-TOF-MS; low salinity; protein

缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamarck)属软体动物门、瓣鳃纲、真瓣鳃目、海螂亚目, 是我国沿海重要的经济养殖贝类, 主要生活在盐度变化较大的内湾或河口附近(1.005~ 1.020)[1]。迄今为止有许多研究曾报道过在盐度等环境压力下生物体内差异蛋白的表达[2-3], 但在环境压力下有关双壳贝类血淋巴差异蛋白表达的研究则很少发现, 尤其是对缢蛏血淋巴的相关研究尚未见报道。近年

* 基金项目: 福建省教育厅资助项目(A 类)(JA02179)
作者简介: 张 鹭(1970-), 女, 在读博士, 讲师, 研究方向: 生物制药。
收稿日期: 2003-12-28

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

来蛋白质组技术的发展为在蛋白质水平分析多种分子机理提供了便利, 已广泛用于生物医学及制药领域, 也用于生态学问题分析。本试验以缢蛏血淋巴内小分子蛋白质为研究对象, 着重探查其在低盐生态压力下的差异蛋白表达, 并进行初步鉴定, 从而推测缢蛏血淋巴的抗性机制, 为这些蛋白的进一步纯化、鉴定和克隆提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　材料

本研究所用缢蛏均购自厦门市营平农贸市场, 采自福建省龙海市蛏埕。湿重约 15 g, 体长 5~ 6 cm, 长宽比约 3∶1。

1.2　方法

1.2.1　低盐度处理方法　将灭菌海水用蒸馏水按比例稀释, 制成盐度为 3.35%、2.7%、2.1%、1.4%、0.8% 及 0.2% 的试验梯度。将暂养 1 h 的缢蛏随机分组, 每组 15 只, 处理时间分别为 0, 0.5, 1, 2, 4, 7 h, 室温。3.35% 为试验期间海水盐度, 设为对照组。

1.2.2　血淋巴样品制备　横割缢蛏闭壳肌, 用 2 mL玻璃注射器和 9 号针头从闭壳肌内抽取血淋巴, 将血淋巴置于 1 mL 无菌 EP 管内, 4 ℃静置3~ 4 h, 4 ℃离心 15 min(4 000 r/min), 取上清分装后 - 20 ℃贮存备用。

1.2.3　双向电泳试验体系　第一向等电聚焦电泳采用管状电泳形式, IEF 玻璃管尺寸为 11cm × 0.3 cm。聚焦电泳完毕后, IEF 胶条用平衡缓冲液平衡 20 min。第二向采用 Schagger[4] 等的小分子电泳系统, 凝胶尺寸为 13.5 cm × 12.5 cm, 胶厚 0.05 cm。电泳结束后, 凝胶固定 20 min, 经染色、脱色后在 Ben Q 6678- 9BM 扫描仪中成像, 所用软件为Photoshop 5.0。

1.2.4　图像及质谱分析　用 Investigator HT Analyzer Version 2.02 图像分析软件进行差异检测。差异点 PMF 样品制备后利用 ProFlex III MALDI-TOF 质谱仪进行质谱检测[5]。

1.2.5　数据库搜索　肽指纹图谱匹配使用 Peptident (www. expasy. org/ tools/ peptident. pI) 参数设置, 分别为物种来源 —后生动物(Metazoa); Mw —表观分子量 ±30%; PI—不设限制; 酶—胰酶(trypsin); 允许忽略的酶切位点 1~ 2; 修饰类型—碘乙酰化。

2　结果与分析

试验期间各组缢蛏生活状态无明显差异。取其血淋巴进行双向电泳分析, 每组重复 3 次。在其海水盐度为 0.8%, 0.5 h 的处理中出现最大可见差异点(图 1), 40 kD 以下蛋白数明显减少, 匹配率为 69.44%。各明显变化点的局部解剖图(图 2) 显示, S6 由对照胶上的 2 点变为 1 点, 大部分差异点的浓度都有所上升。其肽指纹图谱及数据库鉴定结果见表 1。

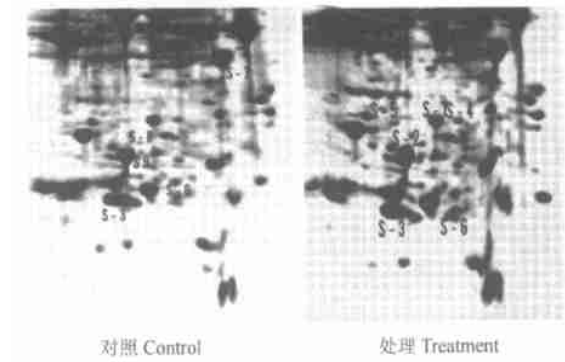

图 1　低盐短期处理(0.8%, 0.5 h) 缢蛏血淋巴双向电泳图谱

Fig. 1.　2- DE maps of S. constricta hemolymph under low salinity of 0.8%, 0.5 h

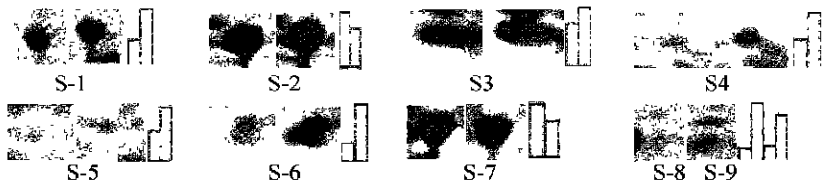

图 2　低盐短期处理(0.8%, 0.5 h) 各差异点的局部变化图

Fig. 2.　Local images of various differential proteins under low salinity of 0.8%, 0.5 h

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 低盐处理下缢蛏血淋巴2- DE图谱差异点鉴定结果

Table 1. Identification results of hemolymph 2- DE maps

点 Spot	表观分子量 Apparent Mw	序号 No.	分值 Accession score	蛋白名称 Description	物种来源 Source of species	理论分子量 Theoretical Mw	理论等电点 Theoretical PI
S1	14 800	P48650	0.50	Phospholipase A2	Echis Carinats	13 818.81	8.35
S2	11 480	Q02029	0.42	Hunchback protein (Fragment)	Euscelisplebejus	—	—
S3	7 620	P01030	0.50	C4A Anaphylatoxin	Bos taurus	8 708.12	10.09
S4	14 500	P17437	0.42	Xp2- XENLA Splice isoform2 of Skin secretory ProteinXP2 precursor	Xenopus laevis	13 499.71	8.19
S5	15 000	P00993	0.43	IBP- CarcrCheloniana	Caretta caretta	11 915.66	8.67
S7	22 400	P18720	0.38	Zinc finger protein	Xenopus laevis	—	—

3 讨 论

已有越来越多的证据表明蛋白质的合成和分解是机体抵抗环境压力的一种对策,无脊椎动物可以通过调节其血淋巴自由氨基酸及其它因子的浓度来维持血淋巴渗透压稳定。盐度调节实际上是渗透压调节。

缢蛏受低盐短期处理后,显示出了至少9种差异蛋白,经质谱分析及数据库搜索鉴定出其中6种。其功能多集中在免疫细胞活化、抗炎症反应、肌肉损伤、维持细胞内稳态、离子通道、蛋白水解、信号转导及活化以及调控蛋白质结构与功能、调控基因表达等方面。例如Phospholipase A2(S-1)具有抗炎症反应、肌肉坏死、肌肉损伤及离子通道阻断作用[6];C4A Anaphylatoxin(S-3)与C5a、C3a构成的超家族可以参与大量急、慢性炎症反应的病理过程[8];尤其Zinc Finger Protein(S7),是一种典型的DNA-binding protein。它是真核生物基因组中最丰富的蛋白质之一,通过与DNA结合可以调节真核生物的基因表达,其功能包括:DNA的识别,RNA的包装,转录活化,细胞程序性死亡的调节,蛋白质的折叠与装配,与脂质的结合等调控[10]。实验组中该蛋白的浓度呈同步下降趋势。它的发现提示我们,即使是在短期的环境压力下,也可能影响到缢蛏的DNA表达,从而使生物有可能在基因水平上产生更精确的调控机制。

多种文献都显示出Na^+/K^+ —ATPase是抗盐度压力及维持酸碱平衡的关键因子,但本次研究检测的差异蛋白中未鉴定出该酶。可能存在以下几种原因:缢蛏血淋巴中不存在Na^+/K^+ —ATPase;其含量较低,超出了双向电泳的检测限度,胶面上无法显示;血淋巴中的Na^+/K^+ —ATPase在低盐度压力下,没有发生明显的浓度变动。

总之,缢蛏能以蛋白质作为一种有效的短期适应的工具,同时合成的DNA-binding proteins作为调控蛋白,又为DNA水平的长期适应作好了准备。在低盐压力下,血淋巴内多种具有重要生理功能的蛋白质或多肽均发生变化,提示盐度可能成为缢蛏生长存活及地理分布的一个限制因子。

蛋白质组技术为我们提供了一个可靠的工具,可以对组织、体液中的蛋白质进行快速、灵敏、高通量的监测和鉴定。今后可以应用该技术对缢蛏作各种比较蛋白质组学及亚蛋白质组学的深入研究。

参考文献:

[1] 陆忠康. 简明中国水产养殖百科全书[M]. 北京:中国农业出版社,2001:806-815.

[2] Destoumieux D, Bulet P, Loew D, *et al*. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapeda)[J]. The Jouranl of Biological Chemistry, 1997, 272(45): 28398-28406.

[3] Whiteley N M, Robertson R F, Meagor J, *et al*. Protein Synthesis and Specific Dynamic Action in Crustaceans: Effects of Temperature[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2001, 128: 595-606

(下转第279页)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] 中国科学院. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 72.
[2] 王 宁. 白刺资源及开发前景[J]. 陕西林业科技, 2000, 31(1): 17-18.
[3] 王学德, 朱英国. 水稻雄性不育与可育花药的mRNA差别显示和cDNA差别片段的分析[J]. 中国科学(C辑), 1998, 28(3): 257-263.
[4] Sokolov B P, Prockop D J. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNA from differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(19): 4009-4015.
[5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
[6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
[7] 梁海永, 李会平, 郑均宝, 等. NaCl胁迫对欧洲黑杨组培植株叶片光系统II功能的影响[J]. 河北林果研究, 2000, 15(2): 101-104.
[8] 林世青, 许春辉, 张其德, 等. 叶绿素荧光动力学在植物抗性生理学、生态学和农业现代化中的应用[J]. 植物学通报, 1992, 9(1): 1-16.
[9] 张积仁. 辅酶NADH保护和修复细胞损伤的研究[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(3): 189-191.

(上接第274页)

[4] Schagger H, Von Jagow G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range From 1 to 100 kDa[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166: 368-379.
[5] Tan C, Li J, Xie Y. Preliminary Function Study of *NAG*7 Using Two-dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry[J]. Acta Biochemica et Biophysica Sinica, 2001, 33(4): 373-378.
[6] Renaud C, Fernando Z, Baltazar B, *et al*. Phospholipin. A Novel Heterodimeric Phospholipase A2 from *Pandinus imperator* Scorpion Venom[J]. FEBS Letters, 1999, 460: 447-450.
[7] Ames R S, Tometta M A, Foley J J, *et al*. Evidence that the Receptor for C4a is Distinct form the C3a Receptor[J]. Immunopharmacology, 1997, 38: 87-92.
[8] Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc Finger Proteins, new Insights into Structural and Functional Diversity[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11: 39-46.

欢迎投稿 欢迎订阅

2005年《吉林农业大学学报》

《吉林农业大学学报》是由吉林农业大学主办的综合性农业学术期刊, 国内外公开发行。本刊设有遗传育种、作物栽培、植物保护、园艺科学、动物科学、水产科学、食品科学、农业生物工程、药用植物与中药学、植物资源开发利用、农业资源与环境、农业化学、农业工程等栏目, 以研究论文、研究简报、研究快报和综述等形式集中报道以上学科所开展的基础研究、应用研究和重大开发研究所取得的最新成果。

本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊, 现被英国《国际农业与生物科学研究中心文摘》(CABI)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)、英国《动物学记录》(ZR)、联合国粮农组织国际农业科技情报系统数据库(AGRIS)、中国期刊全文数据库、《中国农业文摘》、《中国生物学文摘》等20余种国内外重要检索系统列为文献信息源期刊。

《吉林农业大学学报》现为双月刊, 大16开本, 每期120页, 定价10.00元, 全年60.00元(免收邮费)。可通过全国非邮发报刊联合发行部订阅(地址: 天津市大寺泉集北里别墅17号联合征订服务部; 邮编: 300385), 也可直接向本刊编辑部订阅(地址: 吉林省长春市新城大街2888号吉林农业大学学报编辑部, 邮编: 130118)。编辑部电话: 0431-4532914, 4531241; E-mail: jlndxb@vip.sina.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net