

菜青虫不同生长期相关蛋白的蛋白质组学研究

石 艳, 林祥明, 张 茜, 贺 量, 林建峰, 王 勤, 陈清西

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 以不同生长阶段的菜青虫五龄幼虫、预蛹和蛹为材料, 通过对 3 个不同生长阶段的菜青虫双向电泳图谱的比较找到 18 个差异较明显的蛋白质斑点, 并通过质谱分析技术和数据库信息检索最终鉴定出 8 个蛋白, 包括 4 个代谢相关蛋白(氧化还原酶、组氨酸乙酰转氨酶、多胺氧化酶和支酸变位酶)、3 个调控蛋白(锌指类蛋白、转座酶、与 RNA 甲基化酶有关的假想蛋白)和 1 个与结构 E-钙粘附蛋白相似的蛋白, 其余 10 个蛋白质功能皆不明确。本文的结果为进一步研究菜青虫发育相关蛋白奠定基础, 同时也为研发以这些差异蛋白为作用靶点的新型生物农药提供理论依据。

关键词: 蛋白质组学; 差异蛋白; 菜青虫; 功能

中图分类号: S 763.42

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0079-04

菜青虫是菜粉蝶 (*Pieris rapae*) 的幼虫, 又名菜白蝶, 昆虫纲鳞翅目粉蝶科, 其幼虫是菜粉蝶危害蔬菜的主要形态, 为世界性害虫。已有的研究表明菜青虫的生长、发育、蜕皮与变态由体内的一系列激素所控制, 主要包括保幼激素、蜕皮激素、促前胸腺激素、抑前胸腺神经肽、抑侧体神经肽、促咽侧体神经肽及蜕壳激素等^[1]。蛋白质组学方法与以往传统的定位于某个蛋白的研究方法不同, 它是研究其所有蛋白质及其动态变化规律的科学, 它从蛋白质水平定量、动态、整体地研究生物体, 并由此获得细胞生理和生化过程以及调控网络的相关信息, 目前已成为后基因组时代生命科学领域有效的研究手段。本文通过蛋白质组学方法对菜青虫生长发育相关蛋白进行高通量筛选, 与以往传统的定位于某个蛋白的研究方法不同, 通过此方法有可能发现新的菜青虫发育相关蛋白, 目前国内外还未见通过蛋白质组学研究方法对菜青虫蛋白质进行研究的报道。本文的研究将为建立菜青虫蛋白质组图谱和进一步阐明菜青虫重要生物学性状的形成机制及发现发育相关的功能蛋白奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

采集于漳州龙海菜地的菜青虫五龄虫、预蛹及蛹。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

丙酮沉降提取法^[2]: 液氮研磨样品(加少量石英砂)至粉末, 加至少 4 倍体积的丙酮-TCA 样品处理液, -20℃沉淀过夜后离心, 用含 0.07% β-巯基乙醇的丙酮洗涤沉淀, 放置后离心, 重复洗涤、放置、离心一次, 抽真空干燥沉淀, 30 mg 干粉加 1 mL 裂解缓冲液, 振荡 1 h, 超速离心 1 h 取上清, Bradford 法测定蛋白浓度, 分装后 -70℃冻存。

1.2.2 双向电泳

第一向采用自制等电聚焦胶条进行, 使用 pH 范围在 5~8 和 3.5~10 的两性电解质载体, 上样量 700 μg, 400 V, 12 h 后加电压到 800 V。第二向为 SDS-PAGE, 分离胶浓度 12%, 恒流 10 mA, 进入分离胶后加大到每板 20 mA。待溴酚蓝跑到离胶底边缘 1 cm 处停止电泳, Neuhoff^[3]方法染色。

1.2.3 质谱鉴定

扫描后用 melanie 4 软件分析, 对图像进行光滑处理, 背景消减, 斑点检测, 匹配等操作。以蛋白点的相对体积作为参考因素, 相差两倍的点作为差异点。参考王京兰^[4]用标准蛋白建立 PMF 鉴定凝胶电泳分离蛋白质的方法以及人肺巨细胞癌细胞蛋白和白血病细胞 HL-60 的鉴定方法^[5-8]。

将蛋白点切下, 用含 50% CH₃CN 和 50 mmol/L NH₄HCO₃ 的溶液洗胶和 100% CH₃CN 脱水后, 真空离心干燥, 加入 60~70 μL DTT, 57℃恒温水浴 1 h 去上清加入 40 μL 碘乙酰胺进行烷基化, 避光 1 h 吸出上清液, 加入 50% CH₃CN 和 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液反复吸涨, 然后加入 100% CH₃CN 脱水。再重复一次。胶粒真空离心干燥, 加入 2.5 μL 胰蛋白酶液, 0℃冰盒中放置 30 min 待酶液完全被吸

收稿日期: 2008-08-28

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2006J0078), 福建省科技计划项目(2007N0051), 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目, 国家基础科学人才培养基金项目(J0630649)资助

Email: yshi@xmu.edu.cn

收, 补充 25 mmol/L NH₄HCO₃ 5~8 μL, 37 °C 保温 6~15 h.

萃取后真空离心干燥, 加入 0.5% TFA 40% CH₃CN 溶液 2 μL 溶解, 取 1 μL 溶解液与 1 μL 饱和基质混匀. 用 MALDI-TOF-MS 进行分析, 获得肽质量指纹图谱. 通过搜索引擎 Mascot 分别在 NCBI 和 SwissProt 数据库中进行检索, 对照杂峰表对干扰峰进行去除, 查询结果以分值表示. 分值大于阈值 ($p < 0.05$) 时认为匹配结果可信, 结合不同数据库的查询结果最终确定匹配结果.

2 实验结果

2.1 菜青虫不同生长期差异蛋白

菜青虫的五龄幼虫、预蛹、蛹这 3 种蛋白样品分别进行 3 次电泳, 蛋白质的分布非常相似, 大部分分布在 pH 4~10 区间, 分子量 (M_r) 在 20~97 ku 范围内. 由于 DTT 作为蛋白还原剂使用, 使得碱性端的条纹多于酸性端. 虽然一定程度上影响了碱性端蛋白的分辨, 但就目前来说, DTT 仍然是较理想的, 也是使用最普遍的还原剂. 通过蛋白图谱分析软件分析结合人工观察, 确定了 18 个差异点. 对比 3 幅双向电泳图谱, 五龄幼虫、预蛹和蛹的电泳图谱各有 6 个差异点表达量较高. 部分差异点如图 1 所示.

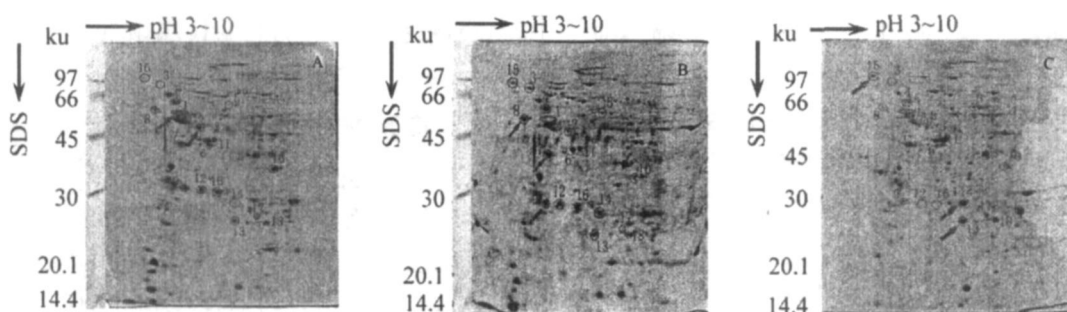


图 1 不同时期菜青虫蛋白双向电泳图谱

A. 幼虫; B. 预蛹; C. 蛹

Fig 1 The 2-DE map of different growth stages imported cabbage worm proteins

表 1 检索出的菜青虫不同生长期差异蛋白质

Tab 1 Searched differential proteins of different growth stages imported cabbage worm

Spot ID	Database ID	Protein name	Calculated pI value	mass (M_r)	Score
A1	gil108876649	zinc finger protein	9.31	36128	65
A2	gil75241569	COG4584: Transposase and inactivated derivatives	6.53	34955	62
A3	gil49250847	mgc69334 protein	5.82	15822	63
A4	gil85705952	hypothetical protein ROS217_09145	4.61	26693	63
A5	gil51971677	hypothetical protein	9.13	50958	70
A6	gil38683829	firrv-1-o1	5.41	14897	58
B7	gil6968766	putative oxidoreductase (flagellin modification)	5.83	28650	67
B8	gil67936870	conserved hypothetical protein	5.98	48322	64
B9	gil75856722	cog0454: histone acetyltransferase hpa2 and related acetyltransferases	5.33	15890	64
B10	gil83816420	hypothetical protein SRU_2516	7.70	61058	57
B11	gil165158	Ig mu-chain V-D-J precursor	8.73	14436	67
B12	gil91086093	similar to CG9277-PB isoform B	4.75	50127	54
C13	gil45439846	polyamine oxidase splice variant 11	7.6	12195	61
C14	gil16414541	lin2040	8.7	13864	62
C15	gil27802859	novel protein similar to e-cadherin (cdh1)	5.73	80268	67
C16	gil68064570	bir protein	5.21	28551	67
C17	gil84995724	hypothetical protein ta11500	5.84	67874	69
C18	gil91788261	protein of unknown function DUF1272	8.06	9015	82

考虑到样品的上样量、凝胶的染色、染色后的扫描以及对图像处理等许多因素的影响, 所得到的凝胶图谱间不可能完全一致, 即使相同表达量的蛋白在凝胶上也会有深浅的差异. 而有些差异较小的点通过肉眼观察不能准确分辨. 因此, 需结合凝胶分析软件的分析结果判断差异点. 我们目前使用的方法是通过比较两个点的相对体积 (% vol), 即该点转换成体积后的值与该图谱总的点的体积之和的比值. 相对体积相差 2 倍以上的点经重复比较确认后确定为差异点. 通过软件将点的 vol(体积)值换算成相对值 (% vol)可以更准确反映出该蛋白的表达量, 消除了因上样量、染色或扫描的不一致引起的误差. 目前的主流软件均将 % vol 作为评价蛋白差异的可靠标准. 而 % OD 则不能作为参考标准.

2.2 差异点质谱分析结果

鉴定结果以分数表示, 当分数超过阈值 ($p < 0.05$) 表示鉴定结果可信. 以下为分数超过阈值的蛋白的质谱图. 表 1 为差异蛋白鉴定结果, 其鉴定分数均超过阈值.

3 讨论

从电泳图谱可以看出, 菜青虫 3 个不同时期的细胞蛋白质组成具有部分差异, 分别对 3 个时期表达的 18 个差异蛋白点进行蛋白质数据库检索后发现, 仅有 8 个蛋白质能找到与其相关的功能, 其余 10 种功能皆不明确. 这 8 种蛋白质大致可以分为 3 类: 代谢相关蛋白、调控蛋白和信号转导相关蛋白, 结果见表 2.

代谢相关蛋白主要与氧化还原酶、组氨酸乙酰转氨酶、多胺氧化酶和支酸变位酶有关.

氧化还原酶是在生物体内广泛存在, 氧化酶催化底物脱氢并氧化生成 H_2O_2 和 H_2O , 脱氢酶催化直接

从底物上脱氢的反应^[9]. 组蛋白乙酰基转移酶催化组蛋白的乙酰化, 从而延长蛋白质在细胞内存在的时间. 近年来发现组蛋白的乙酰化在活化染色质, 使它作为转录及复制的模板中起重要作用, 它还与细胞分化和细胞癌变有关, 其分子机制尚待阐明^[10]. 多胺氧化酶参与多胺的氧化降解. 多胺是具有生理活性的含氮碱, 尽管确切生理功能迄今还不清楚, 但已有不少研究证实它们在生长发育过程中起重要作用. lin2040 蛋白与支酸变位酶有关, 而后者是生物体内 5 种支酸利用酶之一, 催化预苯酸的重排, 这是苯丙氨酸和酪氨酸进行生物合成的关键步骤^[9].

调控蛋白有 3 种, 锌指类蛋白对基因抑制或激活都起重要作用, 通过选择性的结合特异的靶结构, 调节靶基因的表达以适应生物体发育、分化、成熟等生命过程的需要. 本实验中的差异锌指蛋白有两个特殊的结构域: ssll 和 sfp1. 前者与 RNA 聚合酶[⊕]的转录起始以及核苷酸的切除修复因子有关, 后者可能作为一种转录抑制物, 调控 G2 期向 M 期的转变, 从而调节细胞分裂.

A2 是一种转座酶抑制物的衍生物, 与 DNA 的复制、重组和修复有关. 只要存在转座酶, 任何序列片段具有该酶识别的反向重复序列均可发生转移. B2 是一种假设蛋白, 可能与 RNA 甲基化酶有关. 该结构的确切功能还不十分清楚, 推测它能在翻译过程中起识别作用以及保护 mRNA 5' 端免受核酸外切酶的降解. C3 结构与 E-钙粘附蛋白相似. E-钙粘附蛋白对神经组织的构筑有重要作用, 在发育过程中通过调控钙粘附蛋白的表达数量而决定某些细胞的粘合、分离、迁移、再粘合, 从而控制这些细胞的微环境, 影响细胞的分化, 参与器官形成过程^[11].

表 2 差异蛋白分类列表

Tab 2 Classified lists of differential proteins

蛋白分类	编号	名称
代谢相关蛋白	B7	putative oxidoreductase(flagellin modification)
	B9	cog0454 histone acetyltransferase hpa2 and related acetyltransferases
	C13	polyamine oxidase splice variant 11
	C14	lin2040
调控蛋白	A1	zinc finger protein
	A2	cog4584 Transposase and inactivated derivatives
	B8	conserved hypothetical protein
信号转导相关蛋白	C15	novel protein similar to e-cadherin (cdh1)

4 展 望

目前国内外开展菜青虫蛋白质组研究时间还不长, 还需积累研究技术和相关信息为进一步推动菜青虫蛋白质组研究提供支持. 与此同时, 人类和其他模式生物已建立了完整的蛋白质数据库, 为快速分析蛋白的生物学功能提供了强有力的工具.

菜青虫在变态过程中, 成虫盘各部位的细胞迅速伸长, 并且表现出活跃的基因表达和蛋白质合成, 而针对这些分子生物学过程的抑制剂可以改变菜青虫幼虫发育和成虫的形态与生理功能, 是一种新的害虫防治途径^[12]. 今后菜青虫蛋白组学可以充分利用双向电泳、质谱分析和生物信息学最新技术, 以主要组织器官为材料, 在建立网上的蛋白质组图谱和丰富的数据库基础上, 结合最新研究成果, 阐明重要生物学性状的形成机制及相关功能基因的作用, 发现相关的功能蛋白.

参考文献:

[1] 王荫长. 昆虫生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004

[2] Salekdeh G H, Siopongco J W, Dale L J et al A proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice [J]. Field Crops Research, 2002, 76: 111- 219.

[3] Neuhoff V, Arnold N, Taube D, et al Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R250 [J]. Electrophoresis, 1988, 9

(6): 255- 262

[4] 王京兰, 蔡耘, 王杰, 等. 蛋白质组研究中肽质量指纹图制备与鉴定方法初探 [J]. 军事医学科学院院刊, 1999, 23 (1): 71- 72

[5] 王京兰, 万晶宏, 罗凌, 等. 蛋白质组研究中肽质量指纹谱鉴定方法的建立与应用 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(4): 373- 378

[6] Qian X H, Wan J H, Wang J L, et al Identification of proteins from human lung cancer isolated by two-dimensional electrophoresis by MALD-FTOF-MS and N-terminal sequencing [J]. Japanese Journal of Electrophoresis, 1999, 43: 28

[7] 钱小红, 王京兰, 蔡耘, 等. 肽质量指纹谱技术的建立及其在人肺癌细胞蛋白质组研究中的初步应用 [J]. 质谱学报, 1999, 20 (3/4): 75.

[8] Wan J H, Wang J L, Cheng H P, et al Proteomic analysis of apoptosis initiation induced by all-trans retinoic acid in human acute promyelocytic leukemia cells [J]. Electrophoresis, 2001, 22: 3026- 3037.

[9] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 等. 生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002

[10] 陈惠黎. 生物大分子的结构和功能 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999

[11] 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学 [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1998

[12] Pazos F, Stemberg M J Automated prediction of protein function and detection of functional sites from structure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(41): 14754- 14759.

Proteomics Research on Relative Proteins of Different Growth Stages Imported Cabbage Worm

SHI Yan, LI Nian-ming, ZHANG Qian, HE Liang
LI Nian-feng, WANG Qian, CHEN Qing-xi

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Proteomics research is to understand quantitatively, dynamically and wholly the organism on the protein level through which the relative informations about physiology and biochemistry of the cell and regulation can be gained. The proteins were extracted from fifth larval stage worms prepupae and pupae separated by the 2-DE and identified by PMF method. By MALD-FTOF-MS methods and database search, the results indicated that 18 differential protein spots were found and 8 of them were identified, which including metabolism relative proteins, regulating relative proteins and signal transductional relative proteins. They can lay the foundation of researching relative proteins of imported cabbage worm and help develop new bio-pesticides acting on these differential proteins in theory.

Key words proteomics, differential proteins, imported cabbage worm, function