

蛋白质组学技术筛选与鉴定镉诱导下 褐云玛瑙螺肝脏的差异蛋白质

陈海滨¹ 黄琳¹ 黄清育¹ 凌雪萍^{1,3} 朱锋¹ 黄河清^{*1,2,3}

(厦门大学生命科学院生物化学与生物技术学系¹; 海洋与环境科学学院近海海洋科学
国家重点实验室²; 化学化工学院化学生物学系³, 厦门 361005)

摘要 比较丙酮/TCA沉淀法和直接裂解法,优化提取与分离褐云玛瑙螺 (*Achatina fulica*, AF)肝脏全蛋白。采用丙酮/TCA沉淀法,可获得约 600个蛋白质斑点。用 0.5 mg/L CdCl₂ 溶液浸泡后的去梗小白菜喂养 AF,并作为镉盐诱导 AF肝脏表达应激蛋白质的实验材料。采用蛋白质组学技术筛选出由镉盐诱导 AF肝脏表达的 14个差异蛋白质斑点,并用肽质量指纹图谱技术 (peptide mass fingerprinting, PMF)和数据库比对法初步鉴定出 7种差异蛋白质,其中部分为热激蛋白 (heat shock protein)、甲基转移酶 (Methyltransferase)、三磷酸腺苷结合盒子转运体 (ABC transporter)、钼酸盐转运子亚基 (molybdate transporter subunit)和磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase)。差异蛋白质均参与镉盐代谢,并适合作为监测土壤或食物中镉污染程度及危害性的指示蛋白质。

关键词 镉盐,差异蛋白质,蛋白质组学,污染监测,肝脏

1 引言

金属镉是重要的化学工业原料,可通过空气、水源、食物、果蔬等途径直接侵袭人体且长期积累,产生镉中毒现象^[1]。近几十年来,科学家已对金属镉产生的危害性和毒理学进行了大量的研究^[1~4]。由于金属镉易直接络合或插入动植物及微生物细胞内的许多蛋白质,并使之丧失生物学功能,毒性机理与途径十分复杂^[2~4]。关于镉盐毒理学途径与机理的研究,尤其是镉代谢途径的研究,是环境科学、重金属毒理学和生物医学研究的热点课题^[5~7]。

在动物器官中,最易受镉盐污染的是肝脏和肾脏^[8]。据报道,老鼠受金属镉污染后,其肝脏内的镉含量高于肾脏 3倍^[9]。在镉盐胁迫下,动物肝脏中的金属硫蛋白 (metallothionein, MT)表达量异常增加^[10,11],并可作为生物监测的标志物之一^[12]。牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*, PO)受金属镉 (10 mg/L)胁迫后,其脑组织表达了 24种差异蛋白质,其中转铁蛋白表达量与污染源中的镉含量的增加成负对应线性关系,认为转铁蛋白表达递减率可作为监测环境中金属镉污染程度的生物标志物^[5]。文献 [13]报道了采用蛋白质组学技术筛选与鉴定了中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*, ES)受金属镉急性和慢性污染后,蟹前腮分别表达 6和 31种应激蛋白质。蛋白质组学技术是筛选与鉴定动物器官受有毒金属污染前后所表达的应激蛋白质的最佳分析技术之一,所获得的实验结果能更加科学地揭示金属镉在体内呈现的复杂代谢过程与途径。

褐云玛瑙螺 (*Achatina fulica*, AF)隶属于软体动物门 (Mollusca)腹足纲 (Gastropoda)肺螺目 (Fulmonata)柄眼亚目 (Stylommatopoda)玛瑙螺科 (Achatinidae)。由于 AF食性杂而量多,不善于长途迁移,其器官内的重金属含量与分布能较为客观地反映出 AF居住区域内的重金属污染程度。因而采用蛋白质组学技术筛选与鉴定 AF受金属镉污染前后的肝脏差异蛋白质,不仅适合于作为监测金属镉污染程度的生物标志物,同时也较为科学地反映出某区域内金属镉污染程度及危害性,并能从蛋白质途径揭示金属镉毒理学机理。本实验以 AF为研究材料,采用蛋白质组学技术筛选与鉴定 AF受金属污染前后的差异蛋白质,其研究在监测土壤镉毒性和食品安全领域具有重要的科学意义和潜在的应用价值。

2008-08-12收稿;2009-01-06接受

本文系国家自然科学基金项目 (No. 40776060)和福建省高校创新研究团队基金资助

* E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

2 实验方法

2.1 仪器和试剂

REFLEX 型 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司); DYCZ-26 型多用途电泳仪 (北京六一仪器厂); 真空旋转蒸发仪 (Labconco 公司)。

载体两性电解质 pH 3 ~ 10 和 pH 5 ~ 8 (Amersham 公司); #V5111 胰蛋白酶 (Trypsin, Promega 公司); 基质 羧-4 羟肉桂酸 (HCCA, 美国 ICN 生物医学公司); 碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 等均为分析纯 (上海生工生物工程技术有限公司)。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 样品制备

2.2.1 褐云玛瑙螺的饲养 在实验室内驯养一周的 AF 停止喂食 72 h 后, 随机分为对照组和实验组。实验组选用 0.5 mg/L CdCl₂ 浸泡去梗小白菜叶, 浸泡时间为 2 h, 随后喂食实验组 AF, 对 AF 进行急性中毒处理。选用未经 CdCl₂ 浸泡的去梗小白菜叶喂食对照组 AF。喂食 2 d 后, 迅速解剖 AF, 取肝脏组织, 在 -80 °C 保存备用。

2.2.2 实验肝脏组织的提取 分别称取对照组和实验组的 AF 肝脏组织 40 mg, 置于 2 mL 离心管中; 加入 2.0 mL 10% 丙酮-TCA 溶液沉淀 4 h, 在 4 °C 下, 以 12000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。用 -20 °C 冷丙酮清洗沉淀 3~4 次, 去除 TCA。已收集的 AF 肝脏样品置于 4 °C 冰箱内风干, 按体积比 1:8 加入裂解液 (7 mol/L 尿素; 4% CHAPS; 2 mol/L 硫脲; 60 mmol/L DTT; 10 mmol/L Tris; 1 mmol/L EDTA; 1 mmol/L PMSF; 0.5% CA), 在 4 °C 下放置 2~4 h, 待沉淀绝大部分溶解后, 收集样品置于 -80 °C 冰箱内, 保存备用。

2.3 双向凝胶电泳

将 0.825 g 尿素、300 μL 蒸馏水、300 μL 10% NP-40 和 200 μL 单体储液混匀, 待完全溶解后, 取 35 μL 载体两性电解质 (pH 5~8), 混匀; 加 10% 过硫酸铵溶液和四甲基乙二胺各 0.8 μL, 混匀后用 6# 长针头迅速注入专用玻璃管, 形成胶柱 (直径 1.5 mm, 长 14.5 cm), 并立即在柱顶小心加入长约 1 cm 的水隔绝空气。制备好的胶柱应在 12 h 内使用。在上样前, 先加 15 μL 样品裂解液进行预电泳, 其过程按照以下步骤进行: 200 V, 15 min; 300 V, 30 min; 400 V, 60 min。预电泳结束后, 将柱中的裂解液抽出, 换上样品液, 每管上样量为 80 μg, 进行电泳: 400 V, 4 h; 600 V, 18 h^[6]。

聚焦结束后, 将胶条取出, 放入 4 mL 平衡液中, 平衡 15 min 后, 将胶条转移至 SDS 凝胶上, 并在胶条上覆盖一层加有溴酚蓝的 1.0% 琼脂糖, 在 25 mA 的恒定电流下进行 SDS 凝胶电泳, 当前沿指示剂距离底端 1 cm 时停止电泳^[14]。

2.4 全蛋白质染色与图像分析

参考文献 [5] 的方法, 对 2D-PAGE 凝胶中的蛋白质进行银染。2D-PAGE 凝胶层析板中的蛋白质斑点采用 GDS 8000pc 凝胶成像分析系统进行扫描, 所获得图谱和蛋白质斑点数目均由 Melanie 4.0 双向电泳图谱分析软件分析与统计。

2.5 蛋白质的原位酶解

用干净的解剖刀将感兴趣的蛋白质点从胶上切下, 保存在 0.5 mL 离心管中, 进行酶解。将肽段提取液置于旋转蒸发器内干燥, 加入 2.5 μL 0.5% (V/V) TEA 溶液溶解肽段, 采用文献 [15, 16] 的方法, 以 MALDI-TOF 质谱分析进行多肽质量指纹图谱的分析与比较。

3 结果与讨论

3.1 优化褐云玛瑙螺肝组织蛋白质组的分离

优化样品提取, 其目的是为了 提高获取全蛋白质的效果, 这是开展蛋白质组学研究的关键步骤。分别选用了丙酮/TCA 沉淀法和直接裂解法提取 AF 肝脏全蛋白质, 并进行了比较分析。实验结果表明: 全蛋白质经双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (2D-PAGE) 分离后, 选用丙酮/TCA 沉淀法制备的 AF 肝脏全蛋白质, 其全蛋白质斑点均有较高的分辨率, 分布趋势较为均匀, 即无论酸性蛋白或碱性蛋白、高丰度蛋白或

低丰度蛋白都得到较好的分离,重复性也较好,但蛋白质总斑点数目略少些。实验进一步表明,虽然采用直接裂解法制备 AF 肝脏全蛋白质的斑点数目相对较多,但斑点分布不均匀,不易区分,直接影响到后续的蛋白质鉴定。本实验采用丙酮/TCA 沉淀法较适合于开展 AF 肝脏蛋白质组学研究。经比较分析,选择 pH 5.0~8.0 范围的载体两性电解质是 AF 肝脏全蛋白质最佳等电点分离区域,它不仅能有效分离 AF 全蛋白质,而且也适合于开展 AF 肝脏蛋白质组学研究。

3.2 AF 肝脏全蛋白质电泳图谱

图 1 是 AF 肝脏全蛋白质的 2D-PAGE 图谱。从图 1 可见,蛋白质斑点较均匀地分散在凝胶层析板 pH 5.0~8.0 范围内,这意味着采用丙酮/TCA 沉淀提取法能有效地提取 AF 肝脏中弱酸性、弱碱性和中性蛋白质,并展现出较高的分辨率。这一现象不同于蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) 口腔神经节^[17]、O 脑组织^[18]和鲤鱼 (*Danio rerio*, DR) 脑组织的全蛋白质^[14]分布规律。此外,图 1 中绝大多数蛋白质分子量位于 20~90 kDa 之间。采用 Melanie 4.0 双向凝胶电泳图谱分析软件统计图 1 中蛋白质斑点数目约为 600 个。

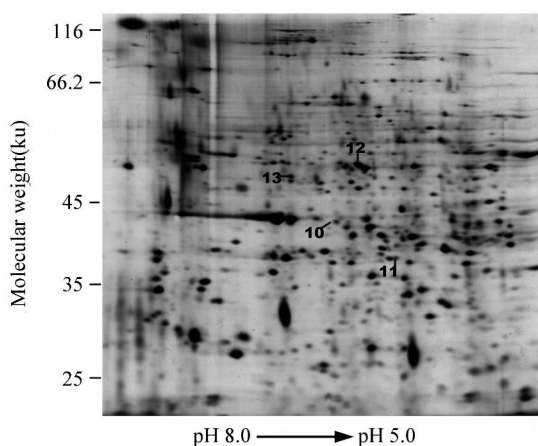


图 1 褐云玛瑙螺肝脏双向凝胶电泳图谱 (对照组, pH 5.0~8.0)

Fig 1 Two-dimensional electrophoresis map of complete proteins from liver of *Achatina fulica* (AF) (control sample, pH 5.0~8.0)

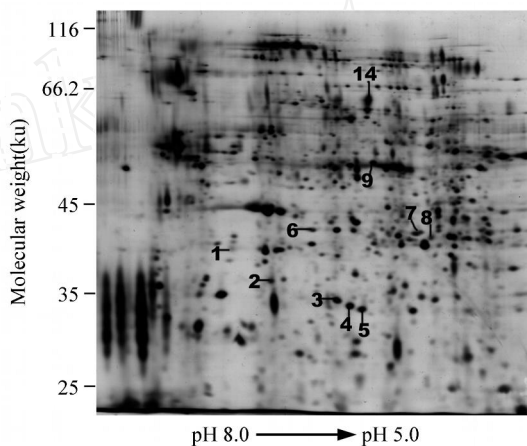


图 2 经 0.5 mg/L CdCl₂ 诱导后,褐云玛瑙螺肝脏全蛋白质的双向凝胶电泳图谱 (实验组, pH 5.0~8.0)

Fig 2 2D-PAGE map of complete proteins from liver of AF exposed to 0.5 mg/L CdCl₂ (experimental sample, pH 5.0~8.0)

图 2 是经 0.5 mg/L CdCl₂ 诱导后,AF 肝脏全蛋白质的 2D-PAGE 图谱 (实验组, pH 5.0~8.0)。采用 Melanie 4.0 双向凝胶电泳图谱分析软件统计图 2 中蛋白质斑点数目约为 600 个。比较图 1 与图 2 可见,虽然 AF 已经受到镉盐急性创伤,但其肝脏全蛋白质斑点数目分布规律和分子量大小与图 1 显示的结果很相似,只存在着少量差异蛋白质斑点。如图 1 标识号码为 10~13 和图 2 标识号码为 1~9 及 14 的蛋白质斑点。推测这些差异蛋白质斑点与 AF 肝脏受急性镉盐中毒创伤后所反映的应激蛋白质有关。

3.3 比较与分析差异蛋白质斑点变化趋势

采用 Melanie 4.0 双向凝胶电泳图谱分析软件比较图 1 和图 2 的差异蛋白质斑点可发现,对照组和实验组之间至少存在 14 个差异蛋白质。图 3 是 AF 经镉盐诱导前后,其肝脏表达的差异蛋白质斑点局部放大图,其中有 3 个斑点 (3、4 和 5) 显示出上调现象,2 个斑点 (11 和 12) 显示出下调现象,7 个斑点 (1、2、6、7、8、9 和 14) 显示出增加现象,2 个斑点 (10 和 13) 显示出缺失现象。

3.4 差异蛋白质鉴定

采用 EMF 和 MASCOT 网站提供的检索工具,对图 3 所显示的差异蛋白质进行逐一鉴定与分析。检索基本条件^[5]为:EMF 图谱中的肽片段质量为 600~3000 Da 之间,肽片段分子质量最大允许误差为 ± 0.2 Da,离子类型选择单同位素分子量 $[M + H]^+$,酶解的漏切位点为 1/2 个。对 14 个差异蛋白质斑点进行鉴定,其检索与比对结果见表 1。其中 7 个蛋白质斑点获得有意义检索结果,得分均 >50 分,具有一定的可信度。

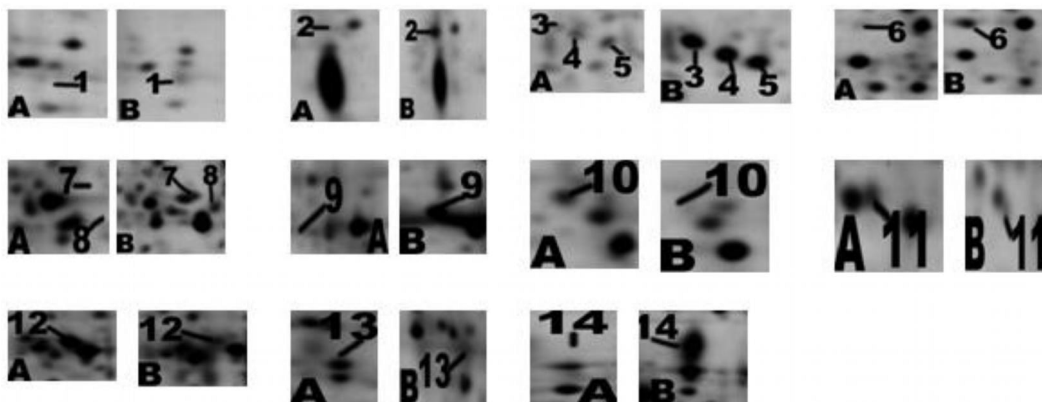


图 3 AF经镉盐诱导前后,其肝脏表达的差异蛋白质斑点局部放大图

Fig 3 Differential protein spots of liver both AF and AF induced with CdCl₂

A. 对照组 (control group); B. 0.5 mg/L 镉盐处理的实验组 (experimental sample with 0.5 mg/L CdCl₂)。

表 1 中的 7 个差异蛋白质经 2D-MS 技术鉴定后,初步认定为热激蛋白 (heat shock protein, HSP)、甲基转移酶 (methyltransferase)、三磷酸腺苷结合子转运体 (ABC transporter)、钼酸盐转运子亚基 (molybdate transporter subunit)、磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase) 等。HSP 是细胞在高温、重金属离子或疾病等应激原胁迫下所生成的一组蛋白质,是环境中的胁迫因子促使特定基因表达的产物,它在生物体内分发挥着重要功能,能提高细胞的耐热性,发挥分子伴侣的作用。在有胁迫因子存在的环境中,生物体内的 HSP 都能被诱导合成,以保护细胞免受损伤。HSP 已成为生物在污染环境中重要的防御机制,并成为镉盐污染生物监测的首选蛋白标志物之一^[5]。目前,尚未有报道显示甲基转移酶与镉盐胁迫有关,推测其有作为监测镉盐污染新型蛋白质标志物的可能。三磷酸腺苷结合子转运体是一组跨膜蛋白,它能与 ATP 结合在胞膜和内质网上的过氧化物酶体和线粒体上,并起着介导氨基酸、脂质、脂多糖、多肽等作用。磷酸甘油酸变位酶有催化 3 磷酸甘油酸重排生成 2 磷酸甘油酸的作用,是糖酵解的经典途径。在镉盐诱导下,AF 肝脏细胞中出现了磷酸甘油酸变位酶下调现象,这说明了镉盐可能使 AF 肝细胞中糖酵解途径受阻。

表 1 镉盐诱导前后 AF 肝脏表达的差异蛋白质鉴定结果

Table 1 Differential protein identification from livers both AF and AF induced with CdCl₂

斑点编号 Spot No	特定序列代码 Access	分子量 Mass(Mr)	分数标准 Score	描述 Description
1	gi 88854346	16045	70	Heat shock protein
2	gi 145645623	25258	53	Methyltransferase type 12
6	gi 86356147	56392	50	Probable sugar adenosinetriphosphate (ATP) binding cassette (ABC) transporter ATP-binding protein
9	gi 119575505	44313	64	Septin peptidase inhibitor CladeB (ovalbumin), member 6, isoform clinical research associate (CRA)
10	gi 45358079	32111	83	Molybdate transporter
11	gi 118734691	28189	63	ABC transporter related
12	gi 89099459	23047	66	Phosphoglycerate mutase

根据各差异蛋白质的生理功能与作用,可归纳为保护作用 (热激蛋白的上调)、解毒、修复 (丝氨酸相关酶调整) 和损伤 (磷酸甘油酸变位酶的下调、钼酸盐转运子的缺失) 等应激作用,其毒理学机理复杂。正因如此,这些差异蛋白质不仅可作为镉盐污染的生物监测物^[17,18],而且还为揭示镉盐毒理机制提供新途径。其研究在生物监测食物链和土壤中镉污染程度及危害性方面具有重要意义。

References

- 1 Fernandez A, Singh A, Jaffe R. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54: 1681 ~ 1691
- 2 Buico A, Cassino C, Dondero F, Vergani L, OSELLA D. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, 102: 921 ~ 927
- 3 Wolff N A, Lee W K, Abouhamed M, Thevenod F. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 230: 78 ~ 85

- 4 Huang H Q, Cao T M, Lin Q M. *Environmental Science & Technology*, **2004**, 38: 2476 ~ 2481
- 5 Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, Lin Q M, Cai Z W. *Aquatic Toxicology*, **2006**, 78: 127 ~ 135
- 6 Borges L P, Brando R, Godoi B, Nogueira C W, Zeni G. *Chemico-Biological Interactions*, **2008**, 171: 15 ~ 25
- 7 Nordberg G F, Jin T, Hong F, Zhang A, Buccger J P, Bernard A. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2005**, 206: 191 ~ 197
- 8 Min K S, Uede H, Tanaka K. *Toxicology Letters*, **2008**, 176: 85 ~ 92
- 9 Lahaye V, Bustamante P, Law R J. *Marine Environmental Research*, **2007**, 64: 247 ~ 266
- 10 Kannan K, Augusta T, Perrotta E, Thomas N J, Tannabe S. *Chemosphere*, **2006**, 65: 2169 ~ 2167
- 11 Erk M, Muysen B T A, Ghekiere A, Janssen C R. *Marine Environmental Research*, **2008**, 65: 437 ~ 444
- 12 Ahsan N, Lee S H, Lee D G, Lee H, Lee S W, Bahk J D, Lee B H. *C. R. Biologies*, **2008**, 330: 735 ~ 746
- 13 Silvertre F, Dierick J, Dumont V, Dieu M, Raes M, Devos P. *Aquatic Toxicology*, **2006**, 76: 46 ~ 58
- 14 Bao Xiao-Dong(包晓东), Huang Lin(黄琳), Huang He-Qing(黄河清), Cai Zong-Wei(蔡宗苇). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(3): 433 ~ 438
- 15 Zhou Xin-Wen(周新文), Zhang Ling(张玲). *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), **2005**, 21(6): 831 ~ 839
- 16 Zhuo Hui-Qin(卓慧钦), Jin Hong-Wei(金宏伟), Huang He-Qing(黄河清), Huang Hui-Ying(黄慧英), Cai Zong-Wei(蔡宗苇). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(5): 791 ~ 796
- 17 Huang Lin(黄琳), Chen Dong-Shi(陈东仕), Yan Li(颜利), Fang Cai-Wang(方财王), Huang He-Qing(黄河清). *Chem. J. Chin. Universities* (高等学校化学学报), **2009**, 30: 314 ~ 319
- 18 Ling X P, Zhu J Y, Huang L, Huang H Q. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2009**, 27: 212 ~ 218

Selection and Identification of Differential Proteins of Liver with Proteomics Techniques in *Achatina Fulica* Under Induction of Cadmium

CHEN Hai-Bin¹, HUANG Lin¹, HUANG Qing-Yu¹, LI NG Xue-Ping^{1,3},

ZHU Feng¹, HUANG He-Qing^{*1,2,3}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences; ²State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, ³The Key Lab of Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract In comparison with direct lysis, the precipitation analysis of acetone/trichloroacetic acid was selected to optimize and separate whole proteins from the liver tissue of *Achatina fulica* (AF). By this method, approximately 600 protein spots in gel were obtained. Using a cabbage exposed by 0.05 mg/L CdCl₂ as AF food, the liver was selected to reveal the stress proteins in the AF exposed to acute cadmium toxicity. Fourteen of differential protein spots in AF liver were obtained by proteomics, and then seven of these spots were further identified by both peptide mass fingerprint (PMF) and database search, which indicated that these proteins in part were identified to be heat shock protein, methyltransferase, adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporter, molybdate transporter subunit, and phosphoglycerate mutase. The results suggest that these significant proteins can be connected with metabolism pathway of cadmium, and with biomarkers for monitoring the contamination level of the cadmium and evaluating the crisis level both food and soil.

Keywords Cadmium, differential proteins, proteomics, contamination monitoring, liver

(Received 12 August 2008; accepted 6 January 2009)