差速离心结合蛋白质组学技术研究受镉盐胁迫后的牙鲆肝差异蛋白质

那宏坤[1] 黄清育[1] 黄河清*[1,2,3]

(厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术学系[1], 近海海洋环境科学国家重点实验室[2], 化学化工学院固体表面物理化学国家重点实验室和化学生物学福建省重点实验室[3], 厦门 361005)

摘 要 人工构建镉盐污染源,选用差速离心结合双向凝胶电泳 (2D-PAGE)法,高效提取、分离和筛选牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*, PO)受镉盐胁迫后的肝脏全蛋白和差异蛋白质。实验结果表明: 选用直接裂解法提取牙鲆肝 (PO liver POL)全蛋白质且用 2D-PAGE分离, 可获得约 800个蛋白斑点,其中镉盐诱导了 11个差异蛋白斑点。以相对离心力为 1000× g, 12000× g和 100000 × g的差速离心法,分别制备了 3种沉淀蛋白和 1种胞浆蛋白,称为 POL组分ⅳ、POL组分Ⅶ、POL组分Ⅷ和 POL组分Ⅸ(胞浆蛋白),蛋白斑点数目分别为 380、550、500和 850个,总计 2280个,明显高于直接裂解法。比较分析法发现,差速离心结合 2D-PAGE分离技术可获得牙鲆肝脏受镉盐胁迫后表达的 54个差异蛋白质,并适合于用肽质量指纹 (peptide mass fingerprint, PMF)图谱技术鉴定。本实验所建立的差速离心结合蛋白质组学技术可高效提取、分离和鉴定组织全蛋白或差异蛋白,并能有效地筛选出蛋白指示物。

关键词 牙鲆肝, 蛋白质组学, 差速离心, 镉污染, 蛋白指示物

1 引 言

建立高效提取与分离动植物及微生物组织细胞中的全蛋白,且可鉴定蛋白质的方法,是目前开展蛋白质组学研究所面临的技术难题之一[1,2]。双向凝胶电泳 (2D-PAGE)和双向液相色谱分离 (2D-LC)技术是目前开展蛋白质组学研究的常用分离技术,但前者易受细胞组织内干扰物影响,例如核酸、多糖和脂类物质[3]; 而后者在分离过程中,易丢失部分蛋白质, 难获取全蛋白[4]。目前, 组织细胞全蛋白的常用破碎技术有丙酮沉淀法、裂解法、冻溶法和酶解法等[1~4]。针对生物材料来源不同,优化提取组织细胞全蛋白和减少内外干扰物是开展蛋白质组学必须克服的难题。至今, 相关的研究已有大量且详细的研究报道[5,6], 但尚未建立一套较为成熟、重复性高和广谱性好的细胞组织全蛋白质提取方法。环境蛋白质组学是目前环境毒理学中最有挑战性和前瞻性的领域之一, 相关的研究仅仅处于起步阶段。环境蛋白质组学能同时筛选与鉴定出由各类重金属和有机污染物, 在单一和联合胁迫效应环境中所诱导的多种蛋白指示物[7,8], 为揭示复杂的毒理机理和评价危害性提供实验证据[1,2,9]。

本实验以牙鲆肝脏组织为材料, 选用差速离心和双向凝胶电泳非在线联用技术, 高效提取和优化分离受镉盐胁迫前后的牙鲆肝脏全蛋白,为后续选用蛋白质组学技术筛选及鉴定监测镉污染程度及危害性的蛋白质标志物提供可信度较高的结果。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

双向电泳仪 (北京六一仪器厂); REFLEX型 MALDI-TOF质谱仪 (德国 Bruker公司); 各类冷冻离心机 (贝克曼公司)。载体两性电解质 (Amersham 公司), pH 3~ 10, 胰蛋白酶 (Promega公司); 基质 α-氰-4-羟肉桂酸 (美国 ICN生物医学公司); 碘乙酰胺 (Sigma公司); 丙稀酰胺、甲叉丙稀酰胺等试剂均购自上海生物工程技术有限公司; 匀浆缓冲液: 0.25 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L PMSF (pH = 7.4); 样品裂解液: 7 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 2 mol/L 硫脲, 60 mmol/L DTT,

2008-12-14收稿; 2009-03-13接受
本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 40776060) 和福建省高校创新研究团队基金资助
* E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 0.5% 载体两性电解质, 0.0002% 溴酚兰。分装, -20 ℃保存待用; 双向电泳和银染方法中所需试剂均参考文献[1, 10]。

实验所需的牙鲆均购于厦门人工养殖场。使用前, 牙鲆需在实验室驯养一周。实验前 72 h开始停止喂食, 防止饲料中微量重金属影响牙鲆的正常代谢。随机选择牙鲆 10只, 并随机分为实验组和对照组。实验组牙鲆置于人工模拟构建的 $CdCl_2$(10 mg/L)的污染环境中, 继续饲养 72 h。对照组牙鲆置于在人工海水中继续饲养。实验前, 选用剪断脊椎处死方式处理牙鲆, 并迅速解剖, 获取牙鲆肝脏, 用预冷的磷酸盐缓冲液直接冲洗, 并保存在 -80 ℃以备使用。

2.2 差速离心提取牙鲆肝脏蛋白质

取实验组(受镉盐胁迫)5条牙鲆的肝脏(POL)各 20 g 混合后共 100 g, 对照组的 POL取法同上。加入等体积匀浆缓冲液, 在冰浴条件下研磨制成匀浆。随后, 以 400×g的相对离心力离心 10 min, 去除未磨碎的组织和细胞, 收集上清液 iv, 备用。选用下列差速离心技术, 分步收集蛋白沉淀物, 并选用 2D-PAGE进行有效分离, 具体实验步骤(始终维持在 4 ℃环境下): (1) 1000×g沉淀分离: 以 1000×g的相对离心力离心上清液 iv 10 min, 收集沉淀蛋白和上清液㈦。该沉淀物主要是细胞核, 用匀浆缓冲液洗涤两次, 最后收集沉淀样品备用(-20 ℃保存, 下同); (2) 12000×g沉淀的分离: 以 12000×g的相对离心力离心上清液㈦ 30 min, 收集沉淀蛋白和上清液 ㈣ 选用匀浆缓冲液洗涤该沉淀蛋白两次, 最后收集沉淀样品备用; (3) 100000×g沉淀的分离: 以 100000×g的相对离心力离心上清液 ㈣ 30 min, 收集沉淀蛋白质和上清液 ㈤。上清液 ㈤中多数蛋白是胞浆蛋白, 收集样品, 冻干备用; (4) 上述所有收集的蛋白组分分别充分溶解于裂解液中, 并选用 100000×g的相对离心力离心蛋白样品 10 min, 分别收集上清液, 称为 POL蛋白组分 iv(1000×g沉淀蛋白)、POL蛋白组分 ㈦(12000×g沉淀蛋白)、POL蛋白组分 ㈣(100000×g沉淀蛋白)和 POL蛋白组分 ㈤(胞浆蛋白), 并用于双向电泳分离。

2.3 双向凝胶电泳分离条件

2.3.1 等电聚焦电泳 在上样之前, 参考文献[10]先进行预电泳。预电泳结束后, 换上样品液, 在用 Bradford法测定样品液的总蛋白浓度后, 以 150 μg总蛋白上样, 然后进行等电聚焦电泳。

2.3.2 凝胶电泳 按照 SDS均一胶的配方配置 11% 胶浓度的凝胶。将平衡后的胶条转移到 SDS凝胶上, 并在胶条上覆盖一层含有溴酚兰的 0.5% 琼脂糖, 在 140 V 的恒定电压下进行电泳。待溴酚兰前沿到达凝胶底端时, 停止电泳。

2.4 银染、图像分析及蛋白鉴定

参照文献[10]的银染方法进行蛋白质染色。染色后, 利用扫描仪对 SDS凝胶板进行透射扫描。选用 Melanie 4 Trial软件进行凝胶电泳图谱中的蛋白质总数和差异斑点分析与统计。用 REFLEX 型 MALDI-TOF质谱仪获得各蛋白的肽质量指纹图, 采用反射模式、正离子谱测定。激光波长为 337 nm, 质谱信号单次扫描累加 200次, 用 BRUKER 肽混合物作外标。选用常规 PMF和数据库比对技术直接鉴定差异蛋白质[11]。数据库选择 MSDB, 检索基本条件参照文献[10]。

3 结果与讨论

3.1 直接裂解法 **POL**全蛋白分离

图 1是牙鲆受金属镉胁迫后, 采取直接裂解法提取 POL全蛋白质的 2D-PAGE图谱。从图 1可看出, 实验组和对照组的蛋白质斑点分布趋势基本一致, 具有较好的重现性。

采用 Melanie 4 Trial软件进行蛋白质斑点数目统计与分析, 对照组和实验组 2D-PAGE图谱中的蛋白质斑点数目约为 800个, 其中多数蛋白质斑点的 pI范围集中在 4.5~9.0之间, 蛋白质亚

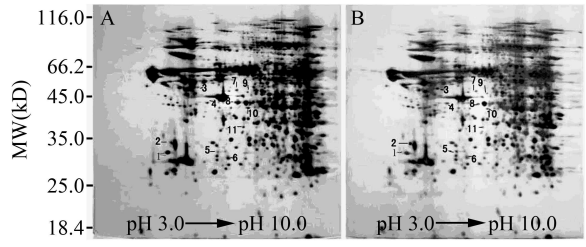

图 1 直接裂解法提取的牙鲆肝脏全蛋白双向电泳图

Fig. 1 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) map of *Paralichtys olivaceus* (POL) proteome extracted with direct lysis

A. 实验组(experimental group): 10 mg/L镉盐处理(treated with 10 mg/L $CdCl_2$); B. 对照组(control group)。

© 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基的分子量在 25~ 100 kD之间, 具有较高的分辨率, 适合于后续蛋白质鉴定。

通过比对分析, 可获得 11个差异蛋白质斑点, 其中高表达蛋白 2个 (A6和 A11); 上调蛋白 6个 (A1、A4、A7、A8、A9和 A10); 下调蛋白 3个 (A2、A3和 A5)。这些差异蛋白斑点均与受镉盐诱导有关, 推测是牙鲆肝脏产生的应激蛋白质。

3 2 优化建立差速离心法分离 **POL** 全蛋白质技术

肝脏是动物代谢的重要场所之一, 具有各类复杂代谢途径和含有丰富的蛋白质。借鉴文献 [12], 选用 2D-PAGE分离法可获得约近千个鼠肝脏全蛋白斑点数的实验结果。

本实验选用直接裂解法提取 POL全蛋白, 但只获取约 800个蛋白斑点的 2D-PAGE图谱。显然, 图 1中的全蛋白质斑点数偏少, 不太适合进一步深入开展 POL蛋白质组学研究, 尤其不适合研究镉盐毒理学和筛选连续监测流动水体镉污染程度的蛋白指示物。在系列比对实验基础上, 建立了差速离心法高效提取牙鲆肝脏全蛋白技术, 具体实验步骤见图 2。图 2显示了选用差速离心法使牙鲆肝脏中不同沉降系数的蛋白质得到粗分离, 减少高丰度蛋白的干扰和提高低丰度蛋白富集的效果, 有助于开展牙鲆肝脏全蛋白组学研究和筛选差异蛋白质。

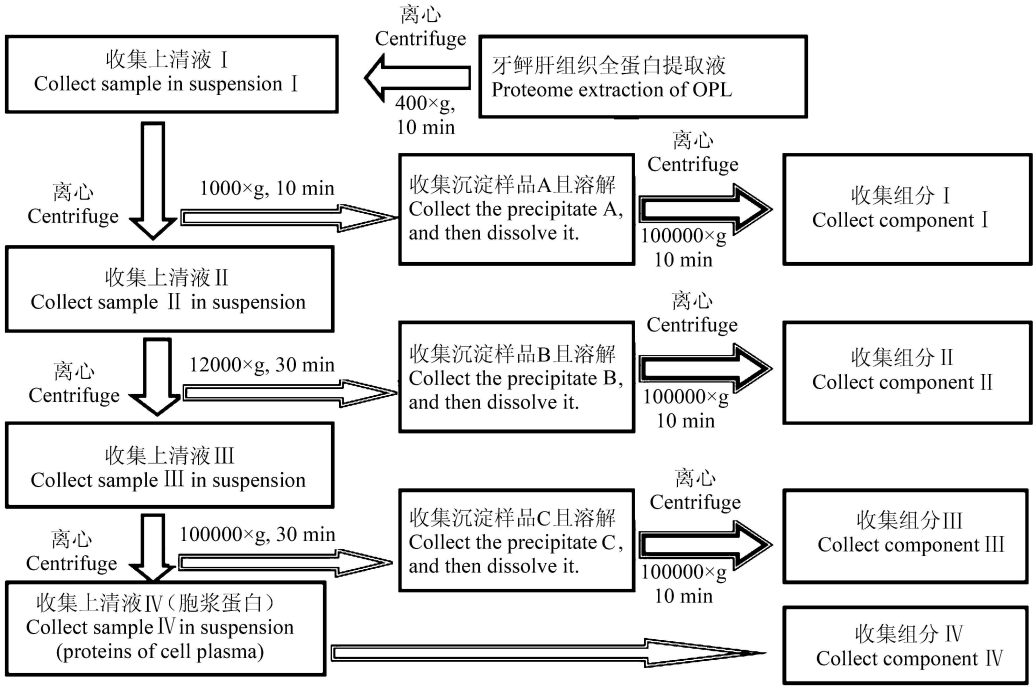

图 2　差速离心法分离牙鲆肝全蛋白主要实验步骤示意图

Fig 2　Experimental map of proteome extraction by different centrifugation in POL

目前, 常用于动物肝脏全蛋白质提取技术且适合于开展蛋白质组学研究方法有 TCA/丙酮酸沉淀法、缓冲液法、裂解法及“鸟枪”蛋白质组分析法[13, 14]等。但这些方法获取肝脏全蛋白种类大都低于 1500种, 明显少于本实验建立的差速离心提取技术。

3 3 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 iv的差异蛋白

图 3是在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 iv全蛋白和差异蛋白图谱。采用 Melanie 4 Trial软件对图解中的蛋白质斑点数目进行统计与分析, 可在亚细胞组分 iv中获得约 380个蛋白质斑点。比较图 3A (实验组)和图 3B (对照组), 可获得 11个差异蛋白斑点。其中 A1、A2、A3、A4、A6、A7和 A8为上调蛋白, 而 A5、A9、A10和 A11为下调蛋白。

3 4 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分㊦的差异蛋白

图 4是在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分㊦全蛋白和差异蛋白的 2D-PAGE图谱。经统计与分析后, 发现亚细胞组分㊦中获得约 550个蛋白斑点。

比较图 4A (实验组)和图 4B(对照组)蛋白斑点分布和差异特性, 可获得 13个差异蛋白斑点, 其中

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的 A1和 A4斑点为上调蛋白; A2、A3、A6、A7、A8、A9、A11和 A12斑点为下调蛋白; A5、A10和 A13为高表达蛋白 (high expression proteins)。

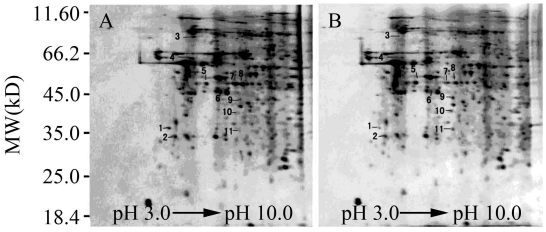

图 3 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 iv全蛋白的 2D-PAGE图谱

Fig 3 2D-PAGE map of proteome in component iv of POL under stress of cadmium chloride

A. 实验组 (experimental group): 10 mg/L 镉盐处理 (treated with 10 mg/L $CdCl_2$); B. 对照组 (control group)。

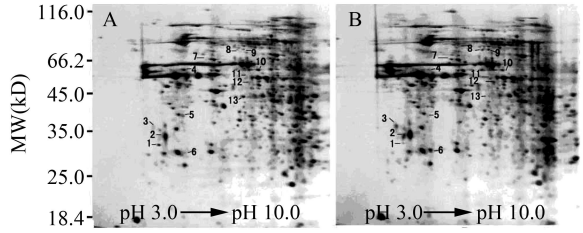

图 4 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 ㊅全蛋白的 2D-PAGE图谱

Fig 4 2D-PAGE map of proteome in component ㊅ of POL under stress of cadmium chloride

A. 实验组 (experimental group): 10 mg/L 镉盐处理 (treated with 10 mg/L $CdCl_2$); B. 对照组(control group)。

3.5 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 ㊃的差异蛋白

图 5是在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 ㊃的全蛋白和差异蛋白质的 2D-PAGE图谱。经分析与统计, 可获悉图 5显示出约 500个蛋白斑点。比对图 5A和图 5B结果, 可进一步获悉两图之间约有 14个差异蛋白斑点。其中的 A10、A11和 A14斑点为上调蛋白; A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A12和 A13斑点为下调蛋白。

3.6 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 ㊄的差异蛋白

通常认为, 细胞破碎液经 100000× g的相对离心力离心后所获得的蛋白上清液视为细胞的胞浆蛋白。根据 3.2节所描述的实验步骤和离心率可获悉, 牙鲆肝脏组分 ㊄属于胞浆蛋白质。在镉盐胁迫下, 所获得牙鲆肝脏组分 ㊄的差异蛋白质, 视为金属镉胁迫牙鲆肝脏表达的差异胞浆蛋白。从图 6中可看出牙鲆肝脏组分 ㊄含有约 850个蛋白斑点, 其胞浆蛋白质种类明显高于其它牙鲆肝脏组分的蛋白质种类, 说明了牙鲆肝脏含有丰富的胞浆蛋白质。比较图 6A和图 6B中的差异蛋白斑点分布情况和规律可获悉, 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏表达了 16种差异蛋白, 其差异蛋白总数目多于其它 POL组分。其中高表达的蛋白质为 A1、A2、A4和 A9; 上调蛋白为 A5、A6、A7、A10、A11和 A14; 下调蛋白为 A3、A8、A12、A13、A15和 A16。

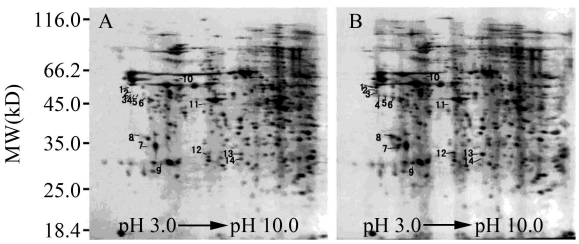

图 5 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组分 ㊃全蛋白的 2D-PAGE图谱

Fig 5 2D-PAGE map of proteome in component ㊃ of POL under stress of cadmium chloride

A. 实验组 (experimental group): 10 mg/L 镉盐处理 (treated with 10 mg/L $CdCl_2$); B. 对照组 (control group)。

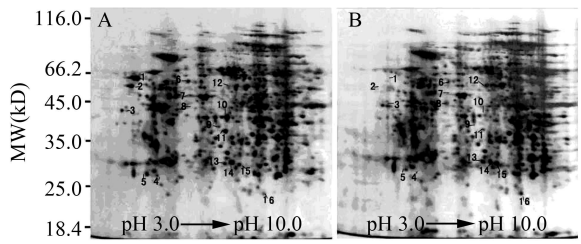

图 6 在镉盐胁迫下, 牙鲆肝脏组 ㊄全蛋白的 2D-PAGE图谱

Fig 6 2D-PAGE map of proteome in component ㊄ of POL under stress of cadmium chloride

A. 实验组 (experimental group): 10 mg/L 镉盐处理 (treated with 10 mg/L $CdCl_2$); B. 对照组(control group)。

进一步选用肽质量指纹 (PMF)图谱和数据库比对技术对上述 54个差异蛋白进行鉴定。结果发现, 有 3种同类差异蛋白, 即共有 51个不同的差异蛋白。在鉴定结果中发现了一些文献[15, 16]中已报道的与镉盐胁迫有关的蛋白 (见表 1)。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　牙鲆肝脏中表达的与镉盐胁迫有关的差异蛋白的质谱鉴定
Table 1　MS identification of differential proteins in POL concerned with stress of cadmium chloride

蛋白点 Spot	输入号 Access	分数 Score	覆盖率 SC (%)	物种 Taxonomy	分子量/等电点 Mr/pI	蛋白描述 Description
Fig 3-A6	Q80YQ4_MOUSE	66	25	小鼠 Mouse	65552/5.66	锌指蛋白 238 Zinc finger protein 238
Fig 3-A7	ZN500_HUMAN	60	27	人类 Human	54553/6.84	锌指蛋白 500 Zinc finger protein 500
Fig 4-A4	Q9DD57_CHIRA	133	30	银鱼 Ocellated icefish	50174/4.74	β-微管蛋白 β-Tubulin
Fig 4-A7	Q178T8_AEDAE	60	23	蚊子 Yellow fever mosquito	58699/8.55	细胞色素 P450 Cytochrome P450
Fig 4-A8	Q90ZF4_FUNHE	82	21	鳉鱼 Killifish	68752/5.43	V型 ATP酶亚基 A V-ATPase subunit A
Fig 6-A1	Q510T0_XENTR	57	19	热带爪蛙 Western clawed frog	57845/6.35	过氧化氢酶 Catalase
Fig 6-A6	Q6P3L3_BRARE	63	15%	斑马鱼 Danio rerio	72117/5.04	70 kD热休克蛋白 5 Heat shock 70 kD protein 5
Fig 6-A7	JC1246	74	17%	果蝇 Fruit fly	42072/5.29	肌动蛋白 Actin

总结图 3~6中所显示的蛋白斑点数目可获悉, 选用差速离心法分离牙鲆肝脏的全蛋白种类约2280个, 明显高于直接裂解法 (800个蛋白斑点)的结果。虽然选用不同离心力分离 POL亚细胞蛋白组分之间含有同一类蛋白, 但只发现存在少量同类蛋白质, 说明了选用差速离心法所获取的 POL全蛋白中只含有少量的同类蛋白质, 推测所获得的蛋白种类应高于 2000种, 适合于开展 POL蛋白质组学研究。在镉盐胁迫下, 同样也获取 54种差异蛋白, 其中只有 3种同类差异蛋白, 即镉盐胁迫牙鲆肝脏表达了 51种差异蛋白, 这也适合于筛选潜在的可用于研究金属镉毒理学和监测流动水体重金属污染的蛋白质指示物。显然, 差速离心结合双向电泳技术显著提高了牙鲆肝全蛋白的分离效率和差异蛋白的检出率。

由于动物组织、细胞及卵等中蛋白质种类间存在丰度差异[17], 现有的全蛋白提取与分离技术不易通过单一的 2D-PAGE方法同时显示高低丰度不同的蛋白质。而本实验所建立的差速离心技术结合蛋白质组学技术, 不仅降低蛋白之间产生沉淀现象, 而且还使许多低丰度蛋白得以富集和鉴定, 从中获取更多的蛋白种类。在蛋白的分离效率上明显高于现有的全蛋白提取与分离技术, 如直接裂解法, 适合开展蛋白质组学研究和筛选与鉴定差异蛋白质组学。前人研究已发现, 热激蛋白质 70S (HSP70)和过氧化氢酶均可作为监测金属镉污染或氧化损伤的指示蛋白[15,16]。从表 1所鉴定的差异蛋白质种类中也含有这两种蛋白。此外, V型 ATP酶和细胞骨架相关蛋白 (例如: Bete微管蛋白和 actin)等均与镉代谢和受镉抑制表达有关。这说明, 选用蛋白质组学及相关分析技术可筛选并鉴定许多潜在的适合作为蛋白质指示物且可用于开展镉毒理学机理、污染程度的关键指示蛋白质[18~20]。

References

1　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(4): 433~438
2　Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, Lin Q M, Cai Z W. *Aquat. Toxicol.*, **2006**, 78(2): 127~135
3　Feng Li-Jian(冯丽剑), Huang Lin(黄 琳), Zhou Hui-Qin(卓慧钦), Huang He-Qing(黄河清). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(5): 557~582
4　Zeng X H, Huang H Q, Chen D S, Jin H W, Huang H Y. *Intern. J. Mass Spectro.*, **2007**, 261: 108~114
5　Li Na(李 娜), Yang Peng-Yuan(杨芃原). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(4): 449~453
6　Gazzana G, Borlak J. *J. Proteome Res.*, **2007**, 6(8): 3143~3151
7　Ahsan N, Lee S H, Lee D G, Lee H, Lee S W, Bahk J D, Lee B H. *C. R. Biologies*, **2007**, 330(10): 735~746
8　Silvestre F, Dierick J F, Dumont V, Dieu M, Raes M, Devos P. *Aquat. Toxicol.*, **2006**, 76(1): 46~58
9　Rustichelli C, Visioli G, Kostecka D, Vurro E, Sanitadi T L, Marmiroli N. *Evniro. Pollu.*, **2008**, 156(3): 1121~1127
10　Na Hong-Kun(那宏坤), Huang Qing-Yu(黄清育), Chen Ying-Ying(陈盈盈), Huang He-Qing(黄河清). *Chinese Journal Chromatography* (色 谱), **2008**, 26(6): 662~664

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

11 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(6): 791~796
12 Gao M X, Li N, Zhang J, Yang P Y, Zhang X M. *Sep. Purif. Technol.*, **2006**, 52: 170~176
13 Zhang J, Xu X Q, Gao M X, Yang P Y, Zhang X M. *Proteomics*, **2007**, 7: 500~512
14 Xue Xiao-Fang(薛晓芳), Wu Song-Feng(吴松峰), Zhu Yun-Ping(朱云平), He Fu-Chu(贺福初). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2007**, 35(1): 19~24
15 Radlowska M, Pempkowiak J. *Environ. Intern.*, **2002**, 27: 605~608
16 Frank V, Eva V, James F D, Dirk I. *Plant Science*, **2001**, 161: 405~414
17 Huang He-Qing(黄河清), Lu Yong-Jin(陆永进), Lin Qing-Mei(林庆梅), Zhuo Hui-Qin(卓慧钦), Huang Hui-Ying(黄慧英). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2007**, 35(8): 1105~1110
18 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. Chinese Universties*(高等学校化学学报), **2009**, 30: 314~319
19 Ling X P, Zhu J Y, Huang L, Huang H Q. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2009**, 27: 212~218
20 Chen Hai-Bin(陈海滨), Huang Lin(黄 琳), Huang Qing-Yu(黄清育), Zhu Feng(朱 峰), Ling Xue-Ping(凌雪萍), Huang He-Qing(黄河清). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(6): 801~805

Differential Proteins of Liver Revealed with a Combined Technology of both Differential Centrifugation and Proteomics in *Paralichthys Olivaceus* Under Stress of Cadmium Salt

NA Hong-Kun[1], HUANG Qing-Yu[1], HUANG He-Qing*[1,2,3]

[1] *(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)*

[2] *(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen 361005)*

[3] *(The Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province and State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface Collage of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)*

Abstract Both total proteome and differential proteins were effectively extracted, separated and selected by a combined approach of both differential centrifugation and 2D-PAGE in liver of *Paralichtys olivaceus* (POL) under the stress of cadmium chloride as an artificial pollution source. Approximately 800 spots for extraction of whole protein separated with 2D-PAGE were obtained by direct lysis in the POL. In addition, approximately 11 differential proteins in POL were also obtained under the stress of cadmium chloride. The differential centrifugal were used to prepare three sedimentation and a plasmolysis proteins, called POL component ⅳ, POL component ㈦, POL component ㈣ and POL component ㈤(plasmolysis protein), respectively. Total protein spots for each gel were calculated to have 380, 550, 500, and 850, respectively, approximately 2280 spots in sum, while total spots are much higher than those by direct lysis approach. Using the comparison method, approximately 54 differential proteins in POL were obtained by a combined technology of both differential and two dimensional polyacylamide gel electrophoresis(2D-PAGE) methods under the stress of cadmium chloride. In addition, these differential proteins can be further identified by peptide mass fingerprint (PMF). Here, these combined techniques can be effectively used to extract, separate and identify the whole proteins and the differential proteins including protein markers in the biological tissue.

Keywords *Paralichthys olivaceus* liver; proteomics; differential centrifugation; cadmium contamination; protein marker

(Received 14 December 2008; accepted 13 March 2009)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net