

双向电泳技术研究镉诱导后牙鲆肝的 差异蛋白质组

黄清育, 朱金勇, 陈盈盈, 陈东仕, 黄河清*

(厦门大学生命科学学院 生物化学与生物技术学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用改良的 TCA 丙酮法直接提取牙鲆肝脏蛋白质组, 并采用双向凝胶电泳技术予以分离. 实验结果表明: 经氯化镉诱导后, 牙鲆肝表达出 16 个差异蛋白质 (斑点), 其中 4 个斑点上调, 2 个斑点下调, 6 个斑点消失, 新增 4 个斑点; 并且蛋白质斑点在凝胶上的分布表现出较高的重复性. 一旦这些差异蛋白质点在双向凝胶电泳图谱上实现标准指纹化后, 其图谱中的差异蛋白斑点分布规律可用于监测与评价流动水体中镉污染程度及危害性.

关键词: 镉污染; 蛋白质组; 双向电泳; 牙鲆; 污染监测

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0087-04

重金属污染是目前流动水体中最主要的污染源之一^[1-3]. 重金属具有很强的细胞毒性和致癌性, 并且这种危害性可随着水体流动而迅速蔓延. 在体内, 由于镉盐的代谢速率极慢, 因而它对人类及动物所造成的危害程度要比其它重金属更为严重^[4-5]. 监测流动水体中各类重金属的污染程度、危害性和迁移规律一直是环境科学研究领域中最具挑战性的难题之一. 目前监测水体重金属污染程度的分析方法有分光光度法、原子吸收法和电感耦合等离子体质谱法等^[6]. 这些分析技术具有快速且高灵敏度等优势, 但在连续监测数天或数星期内, 流动水体的污染源形成速率和变化规律方面却表现出劣势. 现有的生物监测技术侧重于研究各类生物有机体对重金属的富集量和表达单一蛋白质指示物的规律^[1-5]. 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是监测环境污染常用的生物标志物之一^[7-8]. 牙鲆属于海洋底栖生物, 生活在底质沉积物上, 迁移能力弱, 因而牙鲆受污染程度能较为真实地反映该区域内海洋的污染状况. 本文选用双向凝胶电泳技术, 优化分离受氯化镉污染前后牙鲆肝蛋白质组, 构建差异蛋白质组的电泳图谱, 其技术可为今后连续监测流动水体中各类重金属污染程度及危害性提供可行性分析技术.

1 材料与方 法

1.1 实验前牙鲆养殖

实验用牙鲆购于福建省东山养殖场. 在实验室驯养一周以上, 取正常牙鲆为实验对象, 实验前 72 h 停止喂食, 避免饲料中的重金属组分产生干扰, 影响测定结果的可靠性.

1.2 试 剂

pH 5~8 的载体两性电解质 Ampholine (Amersham Bioscience); 二硫苏糖醇 (DTT)、3 [(3 胆酰胺丙基) 二乙胺] 丙磺酸 (CHAPS) (Amresco 公司); 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、硫脲、Tris、甘氨酸、硝酸银、三氯乙酸 (TCA)、乙二胺四乙酸 (EDTA) (上海生工生物工程公司); SDS 分子量标准 (Fermentas 公司).

1.3 实验方法

1.3.1 牙鲆肝脏样品处理

正常牙鲆随机分为对照组和实验组. 停止喂食 3 d 后, 实验组加 CdCl_2 诱导, Cd^{2+} 终浓度为 10^{-6} mg/L, 诱导时间为 24 h 诱导后的牙鲆被迅速解剖, 剥离肝组织, 并用预冷的生理盐水洗净. 分别称取对照组和实验组牙鲆肝 0.1 g, 剪碎后加 2 mL 预冷的有机提取液 (10% TCA 丙酮), 在冰浴条件下匀浆; 匀浆液置于 -20 条件下过夜, 充分沉淀蛋白质; 随后, 匀浆液在 12 000 r/min 下, 离心 10 min, 弃上清, 收集蛋白质沉淀; 加 500 μL 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, 0.5% Ampholine, 0.002% 溴酚蓝) 溶解蛋白质沉淀, 超声震荡以促进溶解; 再次以 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 冷冻保存 (-80) 待用. 蛋白浓度采用 Bradford 法测定.

收稿日期: 2008-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40776060) 资助

* 通讯作者: hqhuang@xmu.edu.cn

1.3.2 双向凝胶电泳条件

取 0.55 g 尿素 + 200 μ L 双蒸水 + 200 μ L 10% NP-40 + 133 μ L 单体储液 ($T = 30\%$, $C = 3\%$), 待完全溶解后, 取 665 μ L 加 35 μ L 载体两性电解质 ($\text{pH } 5 \sim 8$), 混匀. 加 AP 和 TEMED 各 0.8 μ L, 混匀后迅速灌制凝胶柱 (直径 1.5 mm, 长 13 cm). 每根加 20 μ L 裂解液覆盖, 再加满阴极缓冲液, 阴极电泳缓冲液为 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液, 阳极电泳缓冲液为 0.01 mol/L 磷酸溶液. 以 200 V, 15 min; 300 V, 30 min; 400 V, 60 min 进行预电泳. 预电泳结束后, 每根柱上样 40 μ L, 再加 20 μ L 覆盖液 (裂解液稀释一倍使用) 覆盖胶条; 以 600 V 开始电泳, 电泳时间为 18 h. 等电聚焦电泳结束后, 以注射器注水吹出凝胶条, 双蒸水清洗 2 遍, 每根胶条浸于 4 mL 平衡液 (6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 50 mmol/L Tris-HCl, 2% SDS, 0.0002% 溴酚蓝, $\text{pH } 8.8$, 使用前加 DTT 至 10 mg/mL), 摇床震荡平衡 20 min. 平衡后, 双蒸水冲洗去除残留平衡液, 并转移至第二向 SDS-PAGE 凝胶 ($T = 12\%$) 顶端, 以 1% 琼脂糖封顶, 进行第二向 SDS 凝胶电泳. 以每块胶 30 mA 衡流电泳, 电泳结束后凝胶采用 Blum 法^[9]银染.

2 结果与讨论

2.1 正常牙鲆肝脏蛋白质组的双向电泳

采用有机溶剂提取动物肝脏蛋白质组的方法已较为广泛地应用于蛋白组学研究^[10]. 建立在现有有机溶剂法的基础上, 作者进行了大量的优化工作, 摸索出适合于牙鲆肝蛋白组的萃取方法, 有效地提高了蛋白质得率 (Bradford 法测定浓度可达到 10 mg/mL), 并明显改善干扰物的影响, 使凝胶层析板上的横向和纵向条纹明显减少, 提高了蛋白质斑点的分辨率.

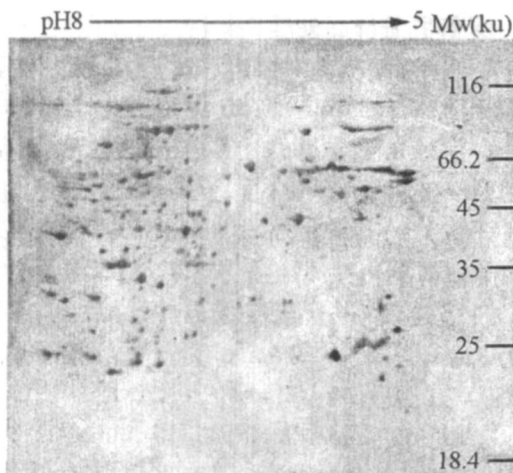


图 1 正常牙鲆肝脏蛋白质组的双向凝胶电泳图谱

Fig 1 2-DE map of proteome of the liver in *Paralichthys olivaceus* of control

图 1 是正常牙鲆肝双向凝胶电泳的蛋白质组图谱 ($\text{pH } 5 \sim 8$, $T = 12\%$, 银染). 选用 Melanie 4 软件分析, 每张凝胶电泳图谱显示出大约 900 个蛋白质斑点数, 其中较明显的斑点数目约为 500 个左右, 适合于蛋白质鉴定的斑点数目约为 300 个左右, 具有较高的重复性和稳定性特征. 图 1 中的蛋白质斑点主要分布在 $\text{pH } 5.5 \sim 7.5$ 之间, 分子量范围在 22 ~ 116 ku 之间.

2.2 经氯化镉诱导后, 牙鲆肝脏蛋白质组的双向电泳

有毒重金属均能使各种鱼类产生中毒症状, 相关的研究已有详细报道, 并发现了一些适合于监测流动海水中重金属污染程度的标记蛋白质^[11-12]. 氯化镉是一种毒性较强的无机盐, 在动物体内不仅代谢速率极慢, 而且反应较为强烈. 图 2 是经 10.0 mg/L 氯化镉诱导后, 牙鲆肝蛋白质组的双向凝胶电泳图谱. 通过 Melanie 4 软件分析和与图 1 结果比对后, 作者发现图 2 的蛋白组分布趋势和蛋白质斑点数目与图 1 相似, 但略有差别. 这一现象说明了, 经改良后的牙鲆肝蛋白质组提取与分离技术较为成熟, 可获得较高的重复性, 同时两者的差别之处很可能是由氯化镉诱导后产生的差异蛋白质. 图 2 中多数蛋白质斑点主要分布在等电点 pH 值为 5.5 ~ 7.7 之间, 分子量范围涵盖于 10 ~ 116 ku 之间, 属于常见蛋白质组的分子量范围.

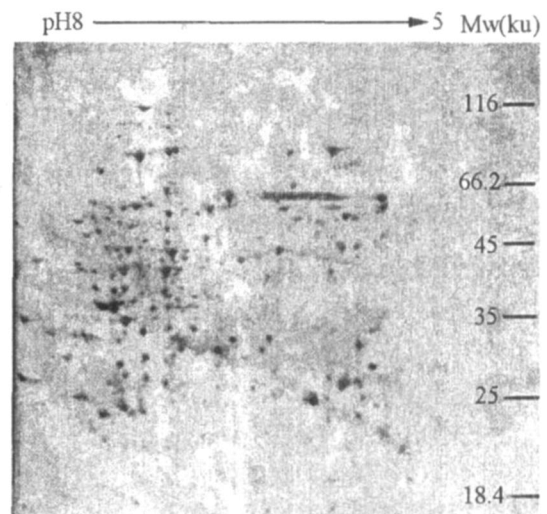


图 2 经 CdCl_2 诱导后, 牙鲆肝脏蛋白质组的双向电泳图谱

Fig 2 2-DE map of proteome of the liver in *Paralichthys olivaceus* with CdCl_2 induction

2.3 差异蛋白质组

选用 2D-PAGE 的分析软件 (Melanie 4) 比对图 1 和图 2 结果, 发现有 16 个差异蛋白质斑点. 标定在图

2上,即可获得图3结果.图3是建立在图1和图2对比的基础上,经标定后的差异蛋白质斑点的电泳图谱,其差异点的产生与提取和分离条件无关,而是镉诱导后蛋白质迁移、增加或消失的结果.16个差异蛋白质斑点的具体变化情况为:4个斑点上调(图3标号为6,9,10和13);2个斑点下调(图3标号为2和8);6个斑点消失(图3标号为1,3,4,5,11和12);4个斑点增加(图3标号为7,14,16和17).参考图3结果,选择6个较为典型的蛋白质斑点,并进行放大处理,获得图4结果.其中,A为正常牙鲆肝表达的蛋白质斑点图谱;B为经镉盐诱导后,牙鲆肝表达的蛋白质斑点图谱.对比图4结果,作者发现牙鲆在镉盐诱导下,其肝脏的生理生化特性发生明显变化,并表达差异的蛋白质组,引起蛋白质代谢系统发生紊乱,致使牙鲆产生中毒症状.

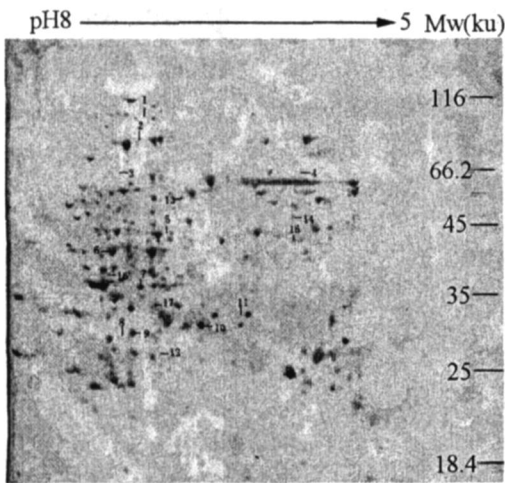


图3 经 CdCl_2 诱导后,牙鲆肝脏差异蛋白质组定位图谱
Fig.3 The location map of differential proteome of the liver in *Paralichthys olivaceus* with CdCl_2 induction

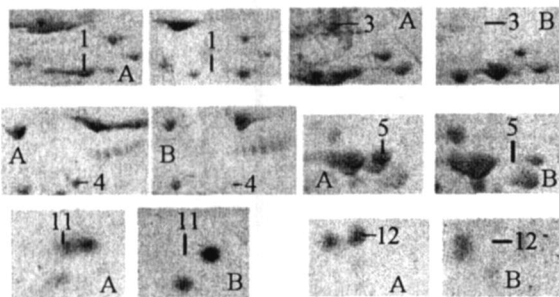


图4 经 CdCl_2 诱导后,牙鲆肝脏消失的蛋白质斑点放大
A. 对照; B. CdCl_2 诱导
Fig.4 Amplificatory map of disappeared protein spots of the liver in *Paralichthys olivaceus* with CdCl_2 induction

目前对镉盐引起动物中毒的机理尚未很清楚,其

主要原因在于镉代谢途径的复杂性.16个蛋白质斑点的差异说明了镉离子能与体内许多蛋白质、多肽和多糖等生物大分子结合,尤其能强烈地络合于各种金属蛋白质,阻断蛋白质正常代谢途径,导致机体出现镉中毒现象,并使镉离子在体内的代谢速率明显慢于其他重金属离子.

3 小 结

由于动物组织尤其是肝脏的高度异质性.对牙鲆肝脏而言,采用一般的裂解液直接提取法所获得的蛋白质样品,虽然总蛋白回收率较高,但含有许多杂质,无法获得理想的2D-PAGE图谱,影响开展蛋白质组学研究.本文所述的改良的TCA/丙酮直接提取法所获取牙鲆肝蛋白质组,不仅化学和生物干扰物组分少,而且蛋白回收率高,2D-PAGE电泳结果证明其横向与纵向条纹明显减少,能大幅度提高蛋白质的鉴定率和分辨率.

在受镉污染后,牙鲆肝脏组织表现16个差异蛋白质斑点,并有质和量的变化趋势.这种趋势是否能以整体差异蛋白质组作为监测流动水体中镉污染程度的指示物还有待于进一步研究,但毫无疑问比目前采用单一的差异蛋白质作为标志物更为可靠.

完善的蛋白质标志物组和获取具有高度重复性的双向凝胶电泳图谱将有助于为今后实施蛋白质组图谱标准化提供可行性技术,只要获取蛋白质双向凝胶电泳标准图谱就可直接评价流动水体中各类污染源的污染程度及其对海洋动物的危害性,简化现有蛋白质组技术监测流动水体污染程度过程中所需的复杂分析步骤和节省购置大型分析设备(质谱仪)的昂贵费用.

参考文献:

- [1] Bench G, Carlsen TM, Grant P G, et al Olfactory bulb uptake and determination of biotransfer factors in the californi ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) exposed to manganese and cadmium in environmental habitats [J]. Environ Sci Technol, 2001, 35: 270 - 277.
- [2] Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, et al Characteristics of trapping various organophosphorus pesticides with a ferritin reactor of shark (*Sphyrna zygaena*) liver [J]. Anal Chem, 2005, 77: 1920 - 1927.
- [3] Huang H Q, Cao TM, Lin Q M. Characteristics of trapping copper ions with scrolled ferritin reactor in the flowing seawater [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38: 2476 - 2481.
- [4] Satarug S, Baker J R, Urbenjapol S, et al A global perspective on cadmium pollution and toxicity in nonoccupationally exposed population [J]. Toxicol Lett, 2003, 137: 65 - 83.

- [5] Waalkes M P. Cadmium carcinogenesis in review [J]. *J Inorg Biochem*, 2000, 79: 241 - 244.
- [6] Polee K, Garcia-Arribas O, Calvo-Perez M, et al. Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS [J]. *J Anal At Spectrom*, 2000, 15: 1361 - 1368.
- [7] Hylland K, Sandvik M, Skare U J, et al. Biomarkers in flounder (*platichthys flesus*): an evaluation of their use in pollution monitoring [J]. *Marine Environmental Research*, 1996, 42: 223 - 227.
- [8] Rotchell J M, Clarke K R, Newton L C, et al. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel [J]. *Marine Environmental Research*, 2001, 52: 151 - 171.
- [9] Blum H, Bejer H, Goss H J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels [J]. *Electrophoresis*, 1987, 8: 93 - 99.
- [10] Traxler E, Bayer E, Stock J, et al. Towards a standardized human proteome database quantitative proteome profiling of living cells [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 1314 - 1323.
- [11] Mendze-Aimenta M, Ville-D-Hemandze J, Barroso-Moguel R, et al. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 144: 151 - 157.
- [12] Torre F R, Salibián A, Ferrari L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium [J]. *Environ Pollu*, 2000, 109: 277 - 282.

Differential Proteome of Liver in *Paralichthys olivaceus* Induced with Cadmium Revealed by Two-dimensional Gel Electrophoresis

HUANG Q ing-yu, ZHU Jin-yong, CHEN Ying-ying,
CHEN Dong-shi, HUANG He-qing*

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The liver proteome in *Paralichthys olivaceus* (PO) was directly extracted by a modified TCA/acetone method, and separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The results showed that the liver of PO expressed 16 differential proteins (protein spots) after cadmium chloride induction, 4 spots of which were up-regulated, 2 down-regulated, 6 repressed and 2 induced. In addition, we found that these differential spots and their orientation showed repeated results in the 2-DE gel. Once these spots of differential proteins in the 2D-PAGE gel were located by standard fingerprint technique, the distribution regulation of these spots in gel map could be directly used to monitor as well as evaluate the contamination level of cadmium and its critical level in halobios.

Key words: cadmium contamination; proteome; 2-DE; *Paralichthys olivaceus* contamination monitor