

蛋白质组学技术筛选与鉴定在甲基对硫磷胁迫下 牙鲆脑组织表达的差异蛋白质*

那宏坤¹, 黄清育¹, 陈盈盈¹, 黄河清^{1,2,3,4}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;
3. 固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005; 4. 化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以甲基对硫磷 (MP) 为有机磷农药污染源, 采用蛋白质组学技术分离及鉴定在甲基对硫磷胁迫下, 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 脑组织表达的差异蛋白质, 从中筛选出潜在的适合于监测甲基对硫磷污染程度的蛋白指示物。实验结果表明: 在甲基对硫磷胁迫下, 牙鲆脑组织表达出 17 个差异蛋白质, 经肽质量指纹 (PMF) 图谱技术鉴定后, 发现其中部分差异蛋白质为热休克蛋白、细胞色素 P450 和谷胱甘肽 S 转移酶, 均是受甲基对硫磷胁迫有关的蛋白质。

关键词: 蛋白质组学; 双向电泳; 甲基对硫磷; 蛋白指示物; 牙鲆脑

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2008)06-0662-05 栏目类别: 研究论文

Differential proteins revealed with proteomics in the brain tissue of *Paralichthys olivaceus* under the stress of methyl parathion

NA Hongkun¹, HUANG Qingyu¹, CHEN Yingying¹, HUANG Heqing^{1,2,3,4}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen 361005, China; 3. State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, Xiamen 361005, China; 4. Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen 361005, China)

Abstract The proteins from the brain tissue of the fish *Paralichthys olivaceus* (PO) were separated by the optimized two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). Approximately 650 protein spots in each gel were detected from the brain sample when applying 200 mg protein to a 2D-PAGE gel in the pH range of 3.0–10.0. The differential proteins from the PO brain were separated and identified by proteomic technologies and they were further selected as the potential protein markers to monitor the contamination levels of methyl parathion (MP). Compared with the control group, 17 differential proteins were obtained from the PO brain under the stress of MP at 3 mg/L. Among these spots, fourteen were up-regulated and three were down-regulated. Then these differential proteins were further identified by peptide mass fingerprint (PMF) and database search. The results showed that heat shock protein 70, glutathione S-transferase and cytochrome P450 were significantly found in those differential proteins. These proteins might have strong potential for monitoring the contamination levels of MP and searching for the toxicological mechanism, as well as to evaluate the degree of risk of human fatalities under the condition of MP pollution. The results indicated that the application of the multiple biomarkers has the advantages over that of the single biomarker for monitoring the levels of MP contamination in the flowing seawater.

Key words proteomics; two-dimensional electrophoresis; methyl parathion; protein marker; *Paralichthys olivaceus* brain

收稿日期: 2008-07-09

第一作者: 那宏坤, 硕士. E-mail: nahongkun1@163.com

通讯联系人: 黄河清, 教授, 博士生导师, 研究方向为蛋白质结构与功能. E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 04776060) 和福建省高校创新团队资金资助。

* 本文的英文电子版由 Elsevier 出版社在 ScienceDirect 上出版 (<http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722059>).

众所周知, 农药在防治农作物病虫害过程中起着极其重要的作用。至今已有 150~160 种有机磷农药成为商品化产品, 如甲基对硫磷和甲胺磷等。通常, 农药使用量中只有 1% 左右到达目标害虫, 而 99% 的农药通过附在作物叶面上或通过降雨流入地表水和地下水, 污染着环境^[1]。如何科学合理地揭示流动水体中含有的中、低和微毒量有机磷农药对人类及水生动物的危害性, 如何连续监测流动水体中农药产生的亚慢性^[2]、慢性中毒^[3-4]的危害性一直是目前国内外环境保护机构、环境污染生物监测等领域所面临的亟待解决的挑战性问题之一。

目前有机磷农药的分析方法可分为化学法和生物法。化学法可分为化学发光法^[5]、色谱法^[6]、质谱法和毛细管电泳技术^[7]等。多数分析技术均具备快速而灵敏的特点, 但需定期取样, 且只能反映瞬时的、局部的有机磷农药的污染状况, 难以反映联合毒物之间的复杂作用(如协同、拮抗作用等)所造成的生态毒性效应^[8], 难以实现连续监测有机磷农药的污染程度和合理地评价不同种类的农药对水生动物和人类所产生的危害性^[9]。目前, 一些常用的生物检测法如生物传感器^[10]和酶分析法^[11]等, 多侧重于研究指示生物个体和种群数量的变化以及生物的生理指标变化趋势, 检测指标较单一。而蛋白质组学技术应用于环境科学研究领域还处于起步阶段, 相关的报道不多。

本研究以甲基对硫磷为人工模拟有机磷污染源, 以牙鲈脑组织为研究材料, 利用蛋白质组学及相关分析技术, 高效分离及鉴定在甲基对硫磷胁迫下牙鲈脑组织表达的差异蛋白质, 从中筛选出对监测甲基对硫磷污染具有潜在价值的蛋白标记物, 为建立监测有机磷农药污染程度及危害性的生物分析技术奠定良好的研究基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

双向电泳仪(北京六一仪器厂); Reflex型基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)仪(Bruker公司, 德国); 真空浓缩离心机(Labconco公司, 美国); 各类高速、超速冷冻离心机(贝克曼公司, 美国); 载体两性电解质 pH 3~10(Amersham, 瑞典); 胰蛋白酶(trypsin) # V5111 (Promega公司, 美国); 基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(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)等试剂, 分析纯(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.2 实验材料与样品制备

实验所需的实验鱼牙鲈均购于厦门人工养殖场, 实验室饲养一周, 实验前 72 h 开始停止喂食。随机选择牙鲈 6 只, 并随机分为实验组和对照组。实验组牙鲈置于人工模拟构建的甲基对硫磷(3 mg/L)污染环境中, 饲养 96 h, 对照组牙鲈置于正常海水中饲养。选用剪断脊椎处死方式处理牙鲈, 并迅速解剖, 获取脑组织, 用预冷的 0.067 mol/L (pH 7.2)磷酸缓冲液直接冲洗, 用滤纸吸干多余液体并保存在 -80 °C 低温冰箱内以备双向凝胶电泳使用。整个取样过程应在 7 min 内完成。

1.3 试剂配制

样品裂解液: 7 mol/L 尿素 + 40 g/L 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS) + 2 mol/L 硫脲 + 60 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT) + 10 mmol/L Tris + 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA) + 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF) + 0.5% (体积分数) 载体两性电解质 + 少量溴酚蓝, 于 -20 °C 保存待用。

平衡液: 50 mmol/L Tris-HCl + 6 mol/L 尿素 + 30% (体积分数) 甘油 + 20 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS) (pH 8.8), 将该储备液于 -20 °C 保存。使用前每 10 mL 平衡储备液加 100 mg DTT。

SDS 分离胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl + 4 g/L SDS 的水溶液 (pH 8.8)。

等点聚焦胶条配方: 0.55 g 尿素 + 200 μ L 双蒸水 + 200 μ L 10% (体积分数) 乙基苯基聚乙二醇(NP-40) + 133 μ L 单体储备液(291 g/L 丙烯酰胺 + 9 g/L 甲叉丙烯酰胺), 待完全溶解后, 加入 25 μ L 载体两性电解质, 混匀; 然后加入 100 g/L 过硫酸铵溶液和 N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)各 0.8 μ L, 混匀后迅速灌入专用玻璃管, 形成胶柱(直径 1.5 mm, 长 15 cm), 并立即在柱顶小心加入约 1 cm 双蒸水隔绝空气。

SDS 均一胶配方: 33 mL 单体储备液 + 22.5 mL SDS 分离胶缓冲液 + 34.5 mL 双蒸水 + 250 μ L 100 g/L 过硫酸铵溶液 + 50 μ L TEMED, 混匀后灌成平板胶。

银染溶液及保存液: 参见文献[12]。

1.4 牙鲈脑全蛋白的提取

取牙鲈脑组织 0.5 g 加入 2.5 mL 样品裂解液, 于 4 °C 溶解 12 h 后, 在 4 °C, 130 000 r/min 条件下离心 35 min, 取上清液, 即为双向电泳的样品液。

1.5 双向凝胶电泳分离条件

等电聚焦电泳 按“等点聚焦胶条配方”制成柱状胶条。在上样之前, 先加 15 μ L 的样品裂解液

进行预电泳,其过程按照以下步骤进行: 1) 200 V, 15 m i_r; 2) 300 V, 30 m i_r; 3) 400 V, 60 m i_r。预电泳结束后,将柱中的裂解液抽出,换上样品液,进行电泳: 1) 400 V, 4 h; 2) 600 V, 18 h。

胶条平衡 等点聚焦电泳完毕后,将胶条取出,放入平衡液中,平衡 15 m i_n后,将胶条转移至 SDS 凝胶上。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 将凝胶液灌入预先准备好的玻璃板中,制成 200 mm × 200 mm × 0.7 mm 的 SDS-PAGE 凝胶板。将平衡后的胶条转移到 SDS 凝胶上,并在胶条上覆盖一层加有溴酚蓝的 0.5% 琼脂糖,在凝胶左上端加蛋白标志物,相对分子质量分别为 18 400, 25 000, 35 000, 45 000, 66 200, 116 000。在 140 V 的恒定电压下进行 SDS 凝胶电泳。待溴酚蓝前沿到达凝胶底端时,停止电泳。

1.6 银染和图像分析

参照文献 [12] 采用银染法进行蛋白质染色。染色后,利用图像扫描仪对 SDS-PAGE 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差异斑点分析与统计。

1.7 差异蛋白质鉴定

选用常规肽质量指纹图谱 (PMF) 和数据库比对技术直接鉴定差异蛋白质^[12],检索条件为:物种限定为 Animal, PMF 图谱中的肽片段的相对分子质量为 600~ 3 000,其中胰蛋白酶自切峰和角蛋白酶解峰等杂峰用 Rubbish peak killer 软件去除。肽片段的相对分子质量最大允许误差为 0.5% (±500 ppm),离子类型选择单同位素 [M + H]⁺,酶解漏切位点 1/2 个,被选择的片段峰信号均应较强,为基线

宽度的 1 倍以上。

2 结果与讨论

2.1 双向电泳分离牙鲈脑组织的蛋白质组

图 1 是在甲基对硫磷胁迫下,牙鲈脑组织全蛋白质组的双向凝胶电泳图谱。从图 1 可以看出,蛋白质斑点主要集中在 pH 4.5~ 9.0。多数蛋白质斑点的相对分子质量在 25 000~ 100 000。经 Melanie 4 Trial 软件对凝胶电泳图谱进行分析与统计,图中约有 650 个蛋白质斑点,分辨率较高,适合于开展后续的差异蛋白质的筛选与鉴定。

2.2 差异蛋白质的筛选

选用蛋白质分析软件 Melanie 4 Trial 对图 1-a, b 两张电泳图中的蛋白点进行分析比较,由于蛋白质斑点面积与蛋白质的量成正相关,因此可以通过蛋白质斑点面积大小的变化来鉴定该蛋白质是增加还是减少。根据两图的蛋白质斑点面积差异共筛选出 17 个差异蛋白点。与对照组相比较,其中上调蛋白质 14 个,图中的蛋白质斑点号码分别是 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17; 下调蛋白质 3 个,斑点号码分别是 1, 7, 10。

2.3 差异蛋白质的鉴定

采用 PMF 鉴定这些差异蛋白质^[12],通过 Matrix science 网站提供的 MASCOT 软件查询与之相匹配的蛋白质结果见表 1。表 1 中,spot 为蛋白质斑点号,Access 为蛋白质在检索数据库中的输入号,Score 为鉴定蛋白质的检索匹配分数,SC 为肽段覆盖率,Taxonomy 为物种,M_r 和 pI 分别为该蛋白质的相对分子质量和等电点,Description 为对所鉴定的蛋白质种类的描述。

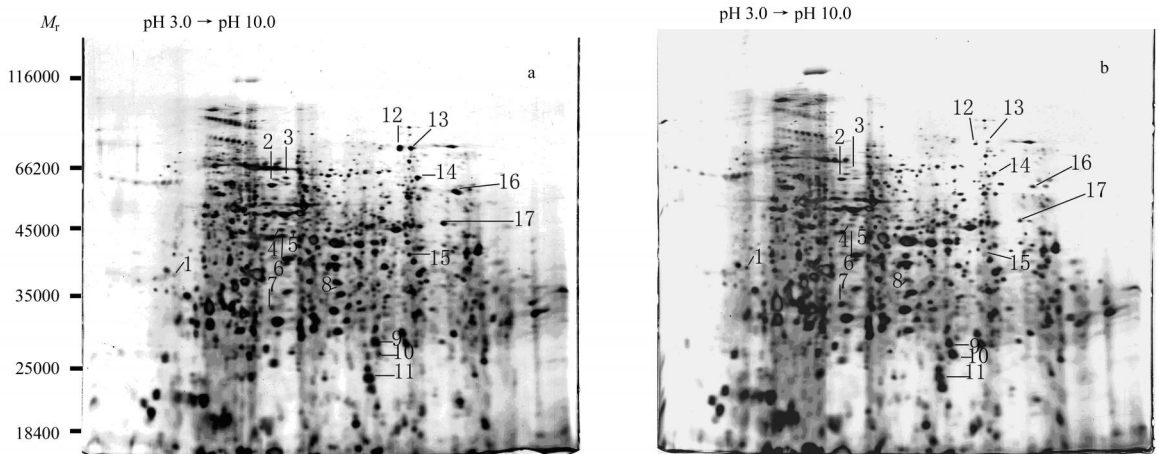


图 1 牙鲈脑组织全蛋白双向电泳图
Fig 1 2-DE maps of brain proteins from *Paralichthys olivaceus*
 a experimental group (treated with 3 mg/L MP); b control group
 For spots, see Table 1.

表 1 差异蛋白质的质谱鉴定结果
Table 1 MS identification of differential proteins

Spot	Access	Score	S C/%	Taxonomy	M _r	pI	Description
1	AAH80655	41	16	homo sapiens	48402	9.54	BC080655 N D
2	Q8MWP5_OSTED	73	20	native oyster	66479	5.48	cytoplasmic heat shock protein 70 (fragment)
3	Q53HM1_HUMAN	43	14	human	61562	6.93	uridine cytidine kinase
4	A22631	73	22	rat	58222	8.81	cytochrome P450 3A1
5	Q2H88 ICTPU	41	21	channel catfish	33313	6.01	enolase 1 alpha (fragment)
6	AAH36569	62	19	homo sapiens	71357	5.81	contactin 1
7	Q5QEJ3_RANPI	34	26	northern leopard frog	31736	8.20	DAZ-like protein
8	O15985_PATYE	44	14	ezo giant scallop	37672	5.25	troponin T
9	Q9MZB0_SHEEP	73	33	sheep	26226	6.64	alpha-tubulin 1 (fragment)
10	S06570	74	54	African clawed frog	20257	9.11	finger protein (clone XkGF42-1)
11	Q2K18_BOVIN	51	30	bovine	27174	6.83	similar to glutathione-S-transferase
12	CBS_HUMAN	68	25	human	61044	6.22	cystathionine beta-synthase (EC 4.2.1.22) (serine sulfhydryase)
13	Q9IA83_PAROL	81	21	Japanese flounder	76579	6.06	transferrin
14	Q8TDF3_HUMAN	75	25	human	47496	8.48	43 000 acetylcholine receptor associated protein
15	Q4RQ87_TETNG	36	22	green puffer	56045	6.90	chromosome 17 SCAF15006
16	Q7TST7_MOUSE	52	20	mouse	46798	4.69	protein kinase C-zeta 2
17	Q80WW4_MOUSE	44	23	mouse	39087	5.90	sepinb9c protein

The "Spot" represents the marked numbers of proteins; the "Access" represents the access numbers of proteins in database; the "Score" represents the protein matching scores of database search; the "SC" represents the sequence coverage of proteins; the "M_r" represents the relative molecular mass of proteins; the "pI" represents the isoelectric point of proteins; and the "Description" represents the descriptions of identified proteins.

在牙鲆脑组织中 17 个差异蛋白质的检索结果中发现了 6 种与甲基对硫磷毒害作用相关的蛋白质,且蛋白质的匹配率较为理想(匹配分数 > 50),其他检索结果或是匹配分数太低或是尚未检索到这些蛋白质与甲基对硫磷相关的研究报道。这 6 种蛋白质的主要生理功能如下。

图 1 中蛋白质斑点 2 的检索结果为 cytoplasmic 热休克蛋白 (HSP) 70 即 HSP70。在甲基对硫磷胁迫下,其在牙鲆脑组织内的表达量明显升高。HSP 是生物在污染环境重要的防御机制,并成为污染环境首选的蛋白标志物之一。Varo 等^[13]通过二级食物链研究发现,含有有机磷的饵料丰年虫能使伊比利亚秘鱈的 HSP70 表达量明显增加,从而提出 HSP70 可以作为有机磷胁迫下鱼体内的蛋白标记物的观点。

谷胱甘肽 S 转移酶 (GST, 图 1 中蛋白质斑点 11) 和 HSP70 类似,随着环境中甲基对硫磷的增加,牙鲆脑组织内的表达量随之递增,属于上调蛋白质。GST 是催化谷胱甘肽与亲电子的外源物结合的二聚体酶,为氧化还原反应的重要酶之一,在人群中呈多态性分布,具有解毒功能,在保护细胞免受细胞毒素和致癌因子的损害方面发挥重要的作用。由于它在解毒过程中的特殊作用,已被作为鉴定包括有机磷中毒在内的多种机体毒理和病理状态的重要生物标记酶之一^[14]。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, 图 1 中蛋白质斑点 4) 是一种氧化酶,可催化多种有机磷的氧化

降解^[15]。Ricciardi 等^[16]研究发现,有机磷进入斑马鱼体内,可以诱导细胞色素 P450 的产生。有机磷在体内氧化降解与细胞色素 P450 密切相关。目前,以 P450 酶系作为有机磷毒性的生物标志物已广泛应用于毒理学研究中,所以可作为甲基对硫磷污染检测的一项指标。从图 1 中可发现,在甲基对硫磷胁迫下,牙鲆脑组织中的细胞色素 P450 3A1 也随之增加。

图 1 中蛋白质斑点 14 被鉴定为乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) 结合蛋白,属于上调蛋白质。有机磷酸酯类杀虫剂除了抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 外,还可抑制 AChR。通常将 AChR 分为两类:蕈毒碱型 mAChR 和烟碱型 nAChR。研究发现,有机磷杀虫剂乐果可以增强肌细胞膜上的 nAChR 的表达,它可通过结合到非竞争性位点改变该受体的构型或是直接阻断 nAChR 通道而抑制其功能;此外,还发现乐果可以快速诱导基因 c-fos 的表达,而 c-fos 又可能作为一种转导因子增强 nAChR 的表达^[17]。上述内容表明有机磷农药能刺激乙酰胆碱受体的表达。乙酰胆碱受体结合蛋白与乙酰胆碱受体应该具有一定的协同作用,推测乙酰胆碱受体结合蛋白的增加与甲基对硫磷的刺激有关,所以具有作为监测甲基对硫磷污染程度的新蛋白质指标物之一的可能。

图 1 中蛋白质斑点 16 的鉴定结果为蛋白激酶 C (PKC) 家族成员,属于上调蛋白质。蛋白激酶 C 能诱导激活成纤维细胞生长因子,减少放射性损伤

后内皮细胞的凋亡。Tanigaki等^[18]发现 PKC 抑制剂 H-7能诱导急性肺损伤。王万铁等^[19]研究发现 PKC 的 mRNA与反映肺组织受损程度较敏感的指标即肺组织湿干重比(W/D)和肺损伤组织学定量评价指标(IQA)呈显著负相关,PKC同功酶在肺损伤过程中起细胞保护作用。我们认为甲基对硫磷刺激组织细胞自我保护功能,导致 PKC产生高表达现象,使细胞损伤得以修复,因而组织细胞内的 PKC表达量的高低可能与细胞受甲基对硫磷损伤的程度有关。

微管蛋白的异常表达与某些恶性生物学行为(如白血病、肿瘤等)及细胞病理生理过程密切相关^[20],并在许多疾病中均有过量表达的现象^[21],它的变化可以反应细胞的健康状况。在甲基对硫磷胁迫下,α微管蛋白(图1中蛋白质斑点9)表达量增加,反映出细胞健康状况受到甲基对硫磷的影响。

3 结论

选用蛋白质组学技术能同时筛选与鉴定出6种以上的差异蛋白质,且具有监测甲基对硫磷污染程度及危害性的潜在应用价值,其生物监测效益和可信度比单一指标更为可靠,同时能进行危害性程度评价,其研究有重要的意义,所建立的分析技术可为有机磷污染生物监测提供新颖的分析技术,弥补现有的化学分析法和单一生物指标监测的缺陷。

参考文献:

[1] Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, et al. Anal Chem, 2005, 77: 1920
 [2] Possanai F P, Fortunato J J, Feier G, et al. Environ Toxicol Pharmaco, 2007, 23: 198
 [3] Hirthe G, Fisher T C, Crane M, et al. Chemosphere, 2001,

44: 583
 [4] Varo I, Amat F, Navarro J C. Aquatic Toxicology, 2008, 88: 53
 [5] Liu X Y, Li A F, Chen M, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (刘晓宇, 李爱芳, 陈明, 等. 分析化学), 2007, 35(12): 1809
 [6] Wang J F, Luan L, Wang Z Q, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王金芳, 栾鸾, 王正全, 等. 分析化学), 2007, 35(10): 1430
 [7] Chen X M, Hu B Z, Liu H S, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (陈笑梅, 胡贝贞, 刘海山, 等. 分析化学), 2007, 35(1): 106
 [8] Li X J, Huang L H, Xu Y J. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李晓静, 黄丽涵, 徐远金. 分析化学), 2007, 35(10): 1487
 [9] Sun J C, Lynn B C. J Am Soc Mass Spectrom, 2007, 18: 698
 [10] Yang G M, White I M, Fan X D. Sens Actuators B Chem, 2008, 133: 105
 [11] Kavitha P, Rao J V. Environ Toxicol Pharmaco, 2008, 26: 192
 [12] Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, et al. Aquat Toxicol, 2006, 78: 127
 [13] Varo I, Serrano R, Piñach E. Arch Environ Contam Toxicol, 2002, 42: 229
 [14] Miyamoto T, Mikawa T. J Pestic Sci, 2005, 30: 31
 [15] Buatti F M, D'Annello A, Volpe M T, et al. Drug Metab Dispos, 2005, 33: 295
 [16] Ricciardi F, Binelli A, Provini A. Ecotoxicol Environ Saf, 2006, 63: 406
 [17] Wu Y J, Leng X F. Acta Entomologica Sinica (伍一军, 冷欣夫. 昆虫学报), 2003, 46(3): 382
 [18] Tanigaki T, Suzuki Y, Hemer D. Crit Care Med, 1994, 22: 1167
 [19] Wang W T, Lin L N, Tu J W, et al. Chinese Journal of Pathophysiology (王万铁, 林丽娜, 涂军伟, 等. 中国病理生理杂志), 2005, 21(3): 545
 [20] Rao J Y. Front Biosci, 2002, 7: el
 [21] Cadrin M, Martinoli M G. Biochem Cell Biol, 1995, 73: 627