

# 低温选择大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的 肝脏蛋白质组双向电泳分析\*

李明云<sup>1</sup> 吴玉珍<sup>1</sup> 冀德伟<sup>1</sup> 吴海庆<sup>1</sup> 陈 炯<sup>1</sup> 史雨红<sup>1</sup>  
罗海忠<sup>2</sup> 柳敏海<sup>2</sup> 傅荣兵<sup>2</sup>

(1. 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波大学 宁波 315211;  
2. 浙江省舟山市水产研究所 舟山 316000)

**摘要** 采用双向电泳技术,对低温选择组与对照组大黄鱼进行肝脏蛋白质组双向电泳分析。结果表明,低温选择组肝脏蛋白点  $1673 \pm 47$  个,对照组  $1651 \pm 43$  个,共有 19 个蛋白点经低温选择后,表达量显著变化。从中挑选 3 个差异蛋白点进行肽指纹图谱(MALDI-TOF-MS)或串联质谱(LC-MS-MS)分析,然后 MS-BLAST 数据库搜寻。低温选择组大黄鱼肝脏 MHC 和 CFL2 蛋白表达显著上调,而 2-Cys Prxs 蛋白表达显著下调。说明低温选育组大黄鱼机体抗细胞凋亡能力明显增强,预示低温选择后留下的大黄鱼在低温环境中生存能力更强。

**关键词** 大黄鱼,低温选育,肝脏,双向电泳  
**中图分类号** S965.322; Q523

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)隶属于鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Pseudosciaena*),是我国沿海重要的网箱养殖经济鱼类。而近年来,我国东部海区冬季常受寒潮侵袭,特别是 2008 年初南方地区罕见的冰冻雨雪灾害天气,加上养殖大黄鱼种质退化等原因,浙江沿海网箱养殖大黄鱼损失惨重。因此,加快大黄鱼抗低温品系的选育和抗寒机理的研究迫在眉睫,对此,本课题组于 2007 年 1 月在浙江省舟山市水产研究所基地进行了大黄鱼低温选择工作。低温选择的方法采用室内水泥池中加冰降温,从 920 尾岱衢族大黄鱼中选择出 225 尾能耐受 5.5℃ 低温的大黄鱼,然后将耐低温的大黄鱼饲养于海区养殖网箱中,作为年底实验用鱼和明年催产亲鱼。

关于鱼类抗寒机理的研究,主要集中于对极地鱼类抗冻蛋白类型、抗冻活性以及作用机制等方面的分析(Davies *et al.*, 1990; Devires, 1986; Jia *et al.*, 1996),而基于双向电泳技术的抗寒机理研究尚未见报道。本

文对低温选择组及对照组大黄鱼进行肝脏蛋白质组差异表达分析,以期能从差异蛋白质组学角度对低温选择的大黄鱼进行评价,为鱼类的抗寒研究提供基础资料,并为子代大黄鱼的低温选育工作提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

实验用鱼是 2007 年 1 月低温选择出来并饲养至 12 月的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)。选取规格均一、健康无伤的低温选择组及对照组大黄鱼各 8 尾,体重 350.7—413.5g,体长 30.0—33.5cm,取样时海水温度为 10.0℃。从低温选择后至采样的 11 个月内,两组大黄鱼的喂养和水环境条件是相同的。实验鱼断尾放血,解剖取肝脏,样品液氮冻存带回实验室,转存于 -70℃ 超低温冰箱中备用。

### 1.2 试剂与仪器

二硫苏糖醇(DTT)、17cm pH 5—8 IPG 干胶条、pI 5—8 两性电解质和 0.5% 低熔点琼脂糖封胶液等购

\* 国家高技术研究发展计划(863)项目,2006AA10A405 号;浙江省重大项目,2006C12005 号;宁波市重大项目,2008C10022 号;长江学者和创新团队发展计划项目,IRT0734 号。李明云,教授,博士生导师,E-mail: limingyun@nbip.net

收稿日期:2009-09-25,收修改稿日期:2009-11-23

自 Bio-Rad (美国); 过硫酸铵(APS)、亮肽素、抑肽素、矿物油和碘乙酰胺等购自 AMRESKO (美国); 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、Tris、十二烷基磺酸钠(SDS)、四甲基二乙胺(TEMED)、硫酸铵、尿素、硫脲、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘油、三氯醋酸、甘氨酸和考马斯亮蓝 G-250 等购自 BBI (加拿大); 磷酸、甲醇和正丁醇等购自上海生工(中国); 等电聚焦仪、垂直电泳系统、扫描仪 GS-800 和 PDQuest 分析软件等购自 Bio-Rad (美国)。

### 1.3 蛋白样品的制备与定量

将同组大黄鱼肝脏混合剪碎, 再液氮研磨至粉末状, 快速称取 0.2g 加入 1ml 裂解液中[尿素 7mol/L, 硫脲 2mol/L, CHAPS 4% (W/V), Tris 40mmol/L, 用前每 ml 现加 DTT 0.01g, 磷酸三丁酯(TBP) 10 $\mu$ l, 两性电解质 5 $\mu$ l, PMSF 10 $\mu$ l, 乙二胺四乙酸(EDTA) 2 $\mu$ l, 亮肽素 10 $\mu$ l, 抑肽素 10 $\mu$ l], 震荡混匀, 于 4 $^{\circ}$ C 裂解 2—3 h, 期间每半小时颠倒混匀 1 次。12000r/min 离心 30min, 取上清液, 再 15000r/min 离心 60min, 取上清即为蛋白样品。Bradford 法测定蛋白浓度, 蛋白样品分装后 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 双向电泳

17cm pH 5—8 IPG 胶条的上样总体积 400 $\mu$ l, 总上样量 2.0mg。等电聚焦程序为: 50V 主动水化 14h, 250V 线性除盐 1h, 500V 线性除盐 1h, 1000V 线性除盐 2h, 9000V 线性升压 8h, 9000V 快速聚焦 80000V-hr, 500V 保持。等电聚焦、胶条平衡、SDS-PAGE 电泳的操作步骤和平衡缓冲液的配制方法等参照 Bio-Rad 仪器操作手册。

### 1.5 凝胶染色、扫描及图像分析

凝胶染色方法在 GE 双向电泳仪器操作手册基础上改进而来。20%的三氯醋酸固定 1h, 染色液(20%甲醇, 8%硫酸铵、16%磷酸、0.08%考马斯亮蓝 G-250)染色过夜, 用去离子水漂洗 3—4 次, 每次 0.5h。脱色后的凝胶用 GS-800 扫描仪扫描, 并用 PDQuest 图像分析软件对扫描图谱处理分析。双向电泳实验过程重复 3 次, 以保证实验结果的稳定性。

### 1.6 质谱鉴定

切割差异蛋白质点置于 1.5ml 离心管中, 低温送至上海中科新生命生物科技有限公司进行基质辅助激光解析电离

飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)或液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析, 得到的肽质量指纹图谱(Peptide Mass Fingerprinting, PMF)检索蛋白质公共数据库, 最终鉴定蛋白质。

## 2 结果

### 2.1 低温选择大黄鱼肝脏蛋白双向电泳图像分析

低温选择及对照组大黄鱼肝脏蛋白双向电泳图谱见图 1。经 PDQuest 软件分析, 对照组大黄鱼蛋白点 1651 $\pm$ 43 个, 低温选择组 1673 $\pm$ 47 个。图谱蛋白质点匹配率达到 90%以上, 表明可用作进一步分析。对比分析 2-DE 图谱, 大黄鱼肝脏蛋白质分子量集中在 15—100kDa、等电点 5—8 的区域。共有 19 个蛋白点在低温胁迫后, 表达量发生显著变化。其中, 表达上调 2 倍以上的蛋白点 5 个(1、6、9、11 和 18 号点), 上调的比率(*IF*)在 2.59—5.24 范围内; 表达下调 50%以上的蛋白点 6 个(3、4、7、12、17 和 19 号点), 下调的比率(*RF*)0.09—0.27; 新增点 5 个(8、10、13、14 和 16 号点); 消失点 3 个(2、5 和 15 号点)。

### 2.2 低温选择大黄鱼肝脏差异蛋白点质谱分析及数据库搜寻比对

从 19 个显著差异蛋白点中挑选 3 个蛋白点进行 MALDI-TOF-MS (17、18 号点)或 LC-MS/MS (14 号点)分析, 图 2 为 3 个蛋白点的对比差异放大图, 其中 17 号蛋白在低温选择后表达量下调比率(*RF*)为 0.27, 18 号蛋白表达上调比率(*IF*)为 3.86, 而 14 号点为低温选择后新增点。经质谱检测, 数据库搜寻比对, 结果见表 1。14、17 和 18 号蛋白分别鉴定为肌球蛋白重

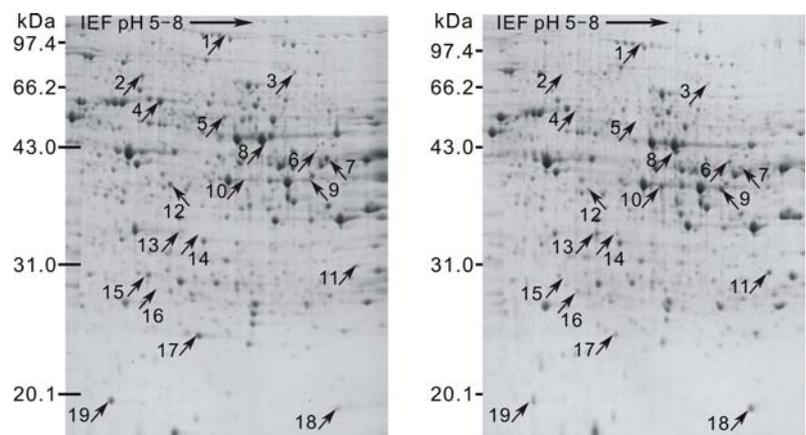


图 1 大黄鱼肝脏蛋白质组双向电泳图谱

Fig.1 Two-dimensional electrophoresis of the liver proteome of *P. crocea*  
左: 对照组; 右: 低温选择组

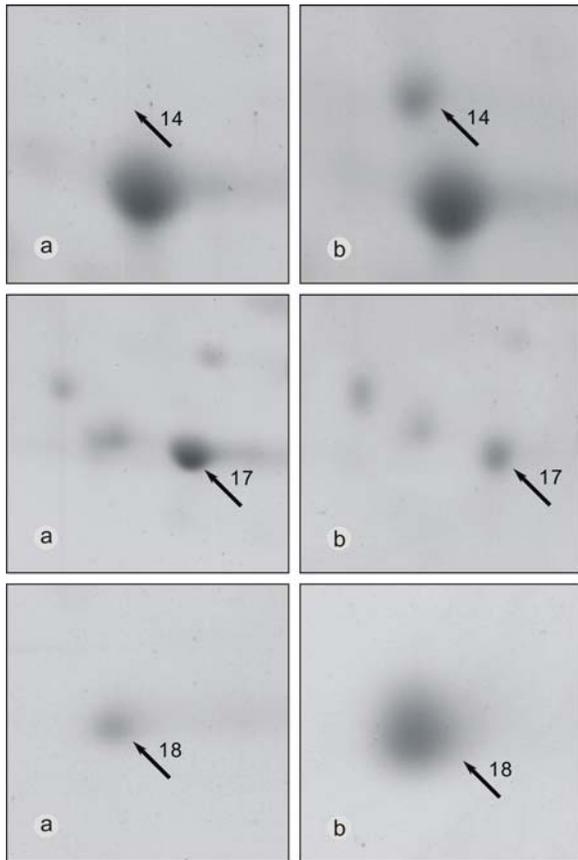


图 2 差异蛋白点切割图

Fig.2 The images showing differential expression of proteins  
a: 对照组蛋白点; b: 低温选育后表达差异蛋白点

链(myosin heavy chain, MHC)、2-cys peroxiredoxins (2-Cys Prxs)和 Cofilin 2(CFL2)。

### 3 讨论

肌球蛋白(myosin)于 1864 年在研究骨骼肌收缩时发现并命名(Knight *et al*, 2000), myosin 由 2 条长肽链[肌球蛋白重链(MHC)]和 4 条短肽链[肌球蛋白轻链(MLC)]组成(Pette *et al*, 2000), 每一 myosin 头部含有一个 ATP 和肌动蛋白结合位点, 直接与肌肉的运动和能量供应相关。研究证实, 鱼类 MHC 基因的表达直接受约于水环境因子的变化和运动功能的

差异, 即随着水温变化和鱼游泳功能的需要, 鱼类 MHC 基因的表达显示出对这些变化因子的适应和调节(Weaver *et al*, 2001), 是通过改变对 ATP 酶的活性而调节对气候温度变化的适应的(Bryson-Richardson *et al*, 2005; Tao *et al*, 2004)。在低温环境中, 实验鱼需要更多的能量供应以适应低温环境和满足运动功能的需要, 而低温选择的大黄鱼 MHC 表达显著上调, 推测可能是低温选择大黄鱼对低温环境的机体调节适应能力增强的结果。

2-Cys Prxs 是抗氧化酶家族中的一个亚类, 因为 Cys Prx 在 52 位和 172 位上分别有一个高度保守的半胱氨酸残基而得名。2-Cys Prxs 在细胞内主要起抗氧化损伤; 调节过氧化氢( $H_2O_2$ )介导的信号转导; 参与细胞的增殖、分化与凋亡和增强 NK 细胞的活性等作用(Nonn *et al*, 2003; Lee *et al*, 2003; 章波等, 2003; Dierick *et al*, 2003; Crowley-Weber *et al*, 2002)。作者推测, 对照组大黄鱼在 10.0 低温下, 肝细胞就开始出现坏死凋亡, 而经过 5.5 低温选择的大黄鱼对低温的耐受力增强, 抗细胞凋亡能力增强, 从而表现为 2-Cys Prxs 的表达显著下调。

CFL2 是低分子量的肌动蛋白结合蛋白, 作为 Cofilin 家族的新成员, 其精细的蛋白结构还不是很清楚, 但 CFL2 无论是全序列还是功能区域, 都是高度保守的, 因而推测其蛋白结构类似于 Cofilin 家族的其他成员(Pope *et al*, 2004)。Thirion 等(2001)在机械诱导的鼠肌肉损伤模型中, 急性肌肉损伤 1 天后, CFL2 急剧减少; 陈浩明等(1999)发现, 热激或 DMSO 处理能够引起动植物细胞的凋亡, 并推测 CFL2 参与了细胞的凋亡过程。因此, 作者认为, 在低温选择后 CFL2 表达量上调, 可能选育后的大黄鱼个体对低温的抵抗能力明显增强, 机体被胁迫损伤的程度降低, 细胞凋亡也相对减少的结果, 这与 17 号蛋白点表达的推测结论是一致的。

在 10.0 低温环境中, 经低温选择过的大黄鱼机体抗细胞凋亡能力明显增强, 也就预示选择后大黄鱼在低温环境中生存能力更强。这从蛋白角度印证了

表 1 低温选择大黄鱼肝脏差异蛋白点表达

Tab.1 Identification of proteins differentially expressed in the liver of *P. crocea* after low temperature breeding

蛋白点序号	分子量(kDa)/ 等电点	序列覆盖率(%) / 得分	数据库登录号/物种	相似蛋白
14	39.2 / 6.3	—	<i>Morone saxatilis</i>	MHC
17	23.9 / 6.3	34 / 109	gi 61404506/ <i>Thunnus maccoyii</i>	2-Cys Prxs
18	16.3 / 7.4	20 / 90	gi 48462724/ <i>Fundulus heteroclitus</i>	CFL2

通过低温选择来选育耐低温品系大黄鱼的工作方向是正确的, 为今后逐代选育工作提供了方法与经验。

### 参 考 文 献

- 陈浩明, 颜长辉, 姜晓芳等, 1999. 热激诱导烟草悬浮细胞的凋亡. 科学通报, 44(2): 196—200
- 章 波, 粟永萍, 刘晓宏等, 2003. 小鼠小肠上皮细胞经射线照射后蛋白质组差异分析. 中华放射医学与防护杂志, 23(4): 234—237
- Bryson-Richardson R J, Daggett D F, Cortes F *et al*, 2005. Myosin heavy chain expression in zebrafish and slow muscle composition. *Dev Dyn*, 233: 1018—1022
- Crowley-Weber C L, Payne C M, Gleason-Guzman M *et al*, 2002. Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate. *Carcinogenesis*, 23(12): 2063—2080
- Davies P L, Hew C L, 1990. Biochemistry of fish antifreeze proteins. *The FASEB Journal*, 4(8): 2460—2468
- Devires A L, 1986. Antifreeze glycopeptides and peptides: interaction with ice and water. *Methods Enzymol*, 127: 293—303
- Dierick J F, Wenders F, Chainiaux F *et al*, 2003. Retrovirally mediated overexpression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB. *Biogerontology*, 4(3): 125—131
- Jia Z C, Deluca C, Chao H *et al*, 1996. Structural basis for the binding of a globular antifreeze protein to ice. *Nature*, 384: 285—288
- Knight A E, Molloy J E, 2000. Muscle, myosin and single molecules. *Essays Biochem*, 35: 43—59
- Lee T H, Kim S U, Yu S L *et al*, 2003. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood*, 101(12): 5033—5038
- Nonn L, Berggren M, Powis G, 2003. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res*, 1: 682—689
- Pette D, Staron R S, 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*, 50(6): 500—509
- Pope B J, Zierler-Gould K M, Kuhne R *et al*, 2004. Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J Biol Chem*, 279(6): 4840—4848
- Tao Y, Kobayashi M, Liang C S *et al*, 2004. Temperature-dependent expression patterns of grass carp fast skeletal myosin heavy chain genes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 139: 649—656
- Thirion C, Stucka R, Mendel B *et al*, 2001. Characterization of human muscle type cofilin (CFL2) in normal and regenerating muscle. *Eur J Biochem*, 268(12): 3473—3482
- Weaver F E, Stauffer K A, Coughlin D J, 2001. Myosin heavy chain expression in the red, white, and ventricular muscle of juvenile stages of rainbow trout. *J Exp Zool*, 290: 751—758

## 2-DE ANALYSIS OF LIVER OF *PSEUDOSCIAENA CROCEA* AFTER LOW TEMPERATURE BREEDING

LI Ming-Yun<sup>1</sup>, WU Yu-Zhen<sup>1</sup>, JI De-Wei<sup>1</sup>, WU Hai-Qing<sup>1</sup>, CHEN Jiong<sup>1</sup>, SHI Yu-Hong<sup>1</sup>,  
LUO Hai-Zhong<sup>2</sup>, LIU Min-Hai<sup>2</sup>, FU Rong-Bing<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211;  
2. Fisheries Institute of Zhoushan of Zhejiang Province, Zhoushan, 316000)

**Abstract** We used 2-DE to compare the liver proteomes of *Pseudosciaena crocea* with or without low-temperature breeding, and found similar number of proteins expressed in the low-temperature breeding group (1673±47) and the control group (1651±43). The expressions of 19 proteins were significantly altered after low temperature breeding. Three proteins (MHC, CFL2 and 2-Cys Prxs) were identified by MALDI-TOF-MS/LC-MS-MS and MS-BLAST searching. The expressions of MHC and CFL2 protein were up-regulated remarkably, whereas the expression of 2-Cys Prxs was down-regulated remarkably, suggesting the anti-apoptosis ability of the low-temperature breeding group is strengthened.

**Key words** *Pseudosciaena crocea*, Low temperature breeding, Liver, Two-dimentionlal gel electrophoresis (2-DE)