

蛋白组学技术的发展及在水生态毒理学中的应用

梁雪芳^{1,*}, 查金苗^{1,*}, 程钢^{2,#}, 王子健¹

1. 中国科学院生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中南民族大学生命科学学院 国家民委生物技术重点实验室, 武汉 430074

摘要: 作为后基因组时代重要的研究工具, 蛋白组学技术的发展对水生态毒理学研究产生了巨大的促进作用。对近年来应用于水生态毒理学研究中的蛋白组学技术的发展历程和应用现状进行了全面的阐述。从蛋白提取、蛋白分离和鉴定、蛋白定量等方面对蛋白组学研究技术的发展进行了系统的介绍, 重点介绍和比较了蛋白分离和鉴定技术中的基于胶的技术和非胶技术。在简介蛋白组学技术发展的基础上, 以蛋白的识别和定量, 特定功能蛋白的研究, 蛋白相互作用研究这 3 个蛋白组学的研究方向为切入点, 详细阐述了各类技术在水生态毒理学研究中的应用, 如蛋白组学在阐明各种污染物对水生生物的毒性作用机制方面的应用, 以及在水体污染状况的监测和评价方面的应用等。最后, 指出了目前蛋白组学研究的不足, 并有针对性地提出了水生态毒理学研究中蛋白组学的发展方向。

关键词: 蛋白组学; 蛋白分离与鉴定; 蛋白定量; 水生态毒理学

文章编号: 1673-5897(2012)1-010-15

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Development and Application of Proteomic Technologies in Aquatic Toxicology

Liang Xuefang¹, Zha Jinmiao^{1,*}, Cheng Gang^{2,#}, Wang Zijian¹

1. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. Key Laboratory for Biotechnology of National Commission for Nationalities, College of Life Science, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Received 21 July 2011

accepted 22 August 2011

Abstract: Proteomic technologies, the important tools in post-genome era, have greatly promoted the development of aquatic toxicology. This review was dedicated to the recent development and application of proteomic technologies in aquatic toxicology. The development of proteomic research methods were fully introduced in terms of protein extraction, separation, identification and quantification, which especially focused on the introduction and comparison of gel-based and gel-free proteomic techniques as the main two protein separation and identification methods. The application of proteomic technologies in aquatic toxicology were summarized in details from the perspectives of identification and quantification of proteins, functional modifications of proteins, and protein-protein interactions, such as studies on toxicological mechanism of water pollutants, and the monitoring and evaluation of water pollution. Finally, problems of present proteomic research were pointed out and suggestions were accordingly given for future proteomic studies in aquatic toxicology.

收稿日期: 2011-07-21 **录用日期:** 2011-08-22

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No. 21007086); 国家高技术研究发展计划项目(No. 2010AA065105)

作者简介: 梁雪芳(1987-), 女, 硕士生, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: lxfzm@163.com;

* **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: jmzha@rcees.ac.cn; # **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: cheng_gang28@yahoo.com.cn

Keywords: proteomics; separation and identification of proteins; protein quantification; aquatic toxicology

“蛋白质组(proteome) ”的概念由澳大利亚科学家 Wilkins 于 1994 年提出,可定义为 1 个基因组、1 种生物或者 1 种细胞(或组织) 所表达的全部蛋白质,而蛋白组学技术是后基因组时代重要的研究工具^[1]。由于蛋白质是生命体功能的执行者和体现者,因此,蛋白质组研究可以很好地弥补基因组研究中基因表达时空差异的缺陷,直接指向影响表型的蛋白质。近年来,基因组学(genomics)、蛋白组学(proteomics) 和代谢组学(metabolomics) 共同组成的组学技术(omics technology) 极大地促进了生物学和医学的发展,并且已在水生态毒理学中得到了广泛应用。基于组学技术的发展,水生态毒理学研究也逐渐从个体、组织等水平上的研究,发展到了对分子机制的研究。蛋白组学技术的建立和应用,为新生生物标记物(biomarker) 的发现^[2],生态毒理学研究^[3]、生态风险评价^[4]、生物监测和生物修复效果评价^[5]等提供了有力的工具。目前蛋白组学在水生态毒理学研究中的应用相对于生物学、医学等领域尚处于起步阶段,随着近年来组学技术的发展,蛋白组学在水生态毒理学中的应用日益广泛,特别是在针对水生无脊椎动物和水生脊椎动物研究中的应用显著增加^[6]。本文全面阐述了蛋白组学技术在水生态毒理学研究中的研究方法和应用现状,并展望了蛋白组学技术在水生态毒理学中的发展方向。

1 蛋白组学研究技术的发展

目前,蛋白组学在水生态毒理学中的研究策略和方法通常分为蛋白提取、蛋白分离和分析及质谱鉴定。

1.1 蛋白提取

蛋白提取是蛋白组学技术操作中的第 1 个环节,蛋白提取的效果直接影响蛋白组学实验的成败,因此在蛋白组学提出和发展的过程中,学者们在蛋白提取的优化尤其是植物蛋白的提取方面做了大量的工作^[7-9]。相对于植物细胞来说,动物细胞没有细胞壁和植物色素等因素的干扰,更容易提取。根据研究目的的不同,蛋白提取可分为整个生物体、特定组织、细胞或者亚细胞。目前,对于胚胎和幼体主要采用整体蛋白提取,对于水生脊椎动物大多是肝脏组织的蛋白提取,对水生无脊椎动物主要集中在鳃和消化腺的蛋白提取,而在细胞和亚细胞水平上的蛋白提取的研究工作相对较少。目前对于水生动

物组织总蛋白的提取主要有 2 种方法,第 1 种采取研磨破碎后用裂解液溶解的方法,提取过程中的杂质通过离心或者 TCA(三氯乙酸) /丙酮法去除,其优点是简单方便,缺点是提取后的蛋白样品相对复杂,有可能会影响分离的效果;第 2 种是采用分步提取法富集某类蛋白,优点是提取后的蛋白样品相对简单,容易分离和富集,缺点是操作相对复杂。基于对研究结果的稳定性和可靠性的考虑,目前大部分研究均采用了分步提取法。例如 Apraiz 等^[8]和 Amelina 等^[9]用分步提取法完成了贻贝(*Mytilus edulis*) 消化腺的蛋白提取,利用所获得的特征蛋白表征了水体污染。分步提取法可以大大降低蛋白组分析的复杂性,并且具有明确的针对性,可以更有效地发现生物标记物和评价不同种类的毒性。

1.2 蛋白分离与鉴定

蛋白组学中蛋白分离鉴定技术主要包括: 基于胶(gel-based) 的技术和非胶(gel-free) 技术。

1.2.1 基于胶的技术

基于胶的蛋白组学技术主要是双向电泳(two dimensional electrophoresis, 2-DE) 分离和质谱鉴定,操作步骤包括蛋白样品的制备、蛋白分离、蛋白染色、图像分析和质谱鉴定。双向电泳是 1975 年由 O' Farrell^[10]提出的,其原理是将蛋白质在第一向等电聚焦中按照等电点不同进行分离,在第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳中按照分子量的不同进行二次分离。目前常用的等电聚焦技术是固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG) 聚焦,其优点为固定的 pH 梯度更稳定,可显著提高等电聚焦分离的分辨率^[11]。双向电泳能用于蛋白组学的研究主要依赖于质谱技术的发展,20 世纪 90 年代中期质谱技术的引入使蛋白鉴定产生了质的飞跃,蛋白质的检测由传统的 Edman 降解法转向了根据肽质量指纹(peptide mass fingerprint) 和肽序列分析推断蛋白质的高通量的质谱检测技术^[12]。电喷雾电离(electrospray ionization, ESI) 技术和基质辅助激光解离(matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) 技术的出现促使质谱应用于蛋白组学的研究并得以迅速发展^[13]。目前,在水生态毒理研究中应用最为广泛的是 MALDI-TOF 和 MALDI-TOF-TOF。飞行时间质谱(time-of-flight, TOF) 是根据离子在真空管中的飞行时间来推导质荷比(m/z),常与 MALDI 构成 MAL-

DI-TOF 平台^[5],广泛用于 2-DE 的蛋白斑点鉴定的中下游。IPGs、2-DE 和质谱共同组成了当前基于胶的蛋白组学的主流技术^[6]。双向电泳具有成熟完善的理论基础,对于全蛋白质分析有很高的分辨率^[3],是水生态毒理研究中应用最为广泛的蛋白组学分离技术。随着蛋白染色技术^[7]、质谱技术^[5]以及生物信息学技术^[8-20]的发展,双向电泳技术也得到了长足的发展。尽管如此,双向电泳技术仍然存在以下缺点:(1)难以得到低丰度蛋白、疏水性蛋白(如膜蛋白)和一些极端蛋白;(2)容易产生蛋白的共迁移现象;(3)自动化程度低,耗时耗力,效率较低,重复性差^[21]。

差异凝胶电泳(differential in gel electrophoresis, DIGE)是在 2-DE 基础上发展出的一种较新的基于胶的蛋白分离和定量方法^[22],DIGE 使用 Cy2、Cy3 和 Cy5 荧光染料标记蛋白质,优点在于可实现多个样品在 1 张胶上的同时分离,差异蛋白更加直观,重复性高,工作量少,分辨率更高。2-DE 传统的染色方法,如考马斯亮蓝染色和银染,其最低检测限分别为 1 ng^[23]和 0.5 ng^[24],而使用荧光染料染色的 DIGE 法的最低检测限可达 0.015 ng^[25],显著提高了蛋白点的检测范围。同时,DIGE 引入了内标的概念,每个蛋白点都有各自的内标,根据荧光强度进行蛋白点与其内标之间的校准,极大地提高了结果的准确性、可靠性和重复性。迄今,DIGE 已广泛用于模式生物、组织蛋白组、亚细胞蛋白组和体液的蛋白质组研究^[26]。

1.2.2 非胶技术

目前非胶技术的主流是多维色谱-质谱(LCⁿ-MS)技术,该技术包括多维色谱分离和质谱鉴定。所有一维色谱(反相色谱、离子交换色谱、分子排阻色谱和亲和色谱等)都可以用于 LCⁿ-MS。LCⁿ-MS 技术可以增加峰容量和动态范围,从而能够对复杂蛋白样品进行分析和定量,比一维色谱-质谱的分离能力更强^[27]。二维色谱通常由第一向色谱(X(X代表某一维色谱)和其正交色谱构成,第二维多是反相色谱,以便于与后续质谱兼容。LC²-MS 技术中使用最广泛的是强阳离子交换色谱(strong-cation-exchange chromatography, SCX)和反相色谱(reverse-phase liquid chromatography, RPLC)构成的二维色谱与串联质谱的组合。Link 等^[28]对传统的 SCX/RPLC 进行了改进,首次利用这种技术分析复杂的蛋白样品,证明了二维色谱-质谱技术在分离蛋白样品上的优势。Yates 研究小组^[29-31]在 SCX/RPLC/

MS/MS 技术的基础上,建立了多维蛋白鉴定技术(multidimensional protein identification technology, MudPIT)用乙酸铵代替氯化钾和磷酸钾,在样品进入 MS/MS 时免去了脱盐的步骤,使得分离效果大大改善,且能够分离 2-DE 难以检测的低丰度蛋白,与该法形成互补。经过对色谱条件的不断优化,对不同分离手段联用的探索以及质谱技术的不断发展,MudPIT 不仅可进行生物样品的全蛋白分析,而且可应用于蛋白定位、蛋白的相互作用、蛋白的翻译后修饰以及蛋白定量^[31]。基于二维色谱难以有效分离的低丰度蛋白,为进一步增加峰容量,发展了高维色谱(LCⁿ-MS, $n > 2$)。早在 1995 年 Moore 和 Jorgenson^[32]对三维色谱进行了描述,他们使用分子排阻色谱/反相色谱/毛细管区带电泳(SEC/RPLC/CZE)组成的系统分离卵清蛋白,并且对系统的峰容量进行了估算,认为 3 维系统远比 2 维系统的峰容量高。近年来,高维色谱在医学领域的应用逐渐增加,尤其是在血浆中癌症生物标志物的研究中发挥了巨大的推动作用,高维色谱可以有效地检测复杂血清蛋白样品中的低丰度蛋白($< 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),因此,可以实现对血液中特异的癌症蛋白标志物的分析^[33-34]。虽然高维色谱可以大幅增加峰容量,检测浓度很低的蛋白,但同时也会引起分析过程中样品稀释和温度控制的问题^[31]。

1.3 蛋白定量

目前基于非胶技术的蛋白定量技术主要包括 2 大类:稳定同位素标签(stable isotope labeling)法和非标签(label-free)法。

1.3.1 稳定同位素标签法

常用的稳定同位素标签法有同位素编码亲和标签法(isotope coded affinity tag, ICAT)、细胞培养同位素标记法(stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)和同位素标签相对绝对定量技术(isotope tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)。ICAT 是最早发展起来的定量蛋白组学技术,它的原理是利用与半胱氨酸发生特异性反应的化学试剂标记蛋白质侧链,不同样品分别由“轻”标签和“重”标签标记,经蛋白酶解后混合,由多维色谱进行分离,并进行标签富集和 MS/MS 鉴定,对于不同样品,肽段混合后性质相同,因此有差异的是同位素标记后的肽段的质量,据此可进行蛋白的定量^[35]。ICAT 产生后,蛋白定量技术的研发大量开展,人们对以半胱氨酸为靶向的 ICAT 技术不断地进行改进,并且发展了针对其他位点的亲和标签技术,如对赖氨酸

残基、丝氨酸和苏氨酸残基特异性标记的标签法^[64]。SILAC 是对 ICAT 技术的改进,其原理是在进行体外细胞培养时,用稳定同位素标记氨基酸,与 ICAT 不同的是它不进行肽段富集步骤,样品的复杂性不减少,而且几乎所有的肽段被标记,被鉴定蛋白的氨基酸序列覆盖范围增加。ICAT 和 SILAC 技术都是利用标记后肽段质量的差异进行蛋白的相对定量,但是这 2 类方法中的标签试剂只有 2 种,无法对很多复杂的状态进行比较,如几种不同实验条件下的结果比较,以及与时间相关的实验结果的比较等。此外,这些方法增加了 MS 的复杂性,而且对于以半胱氨酸为靶向的 ICAT 技术来说,标签富集阶段很多与翻译后修饰相关的肽段都会丢失,因此限制了对蛋白翻译后修饰的分析。为了克服以上方法的不足, Ross 等^[67] 发展了 iTRAQ 技术,该技术是用含有 4 种不同同位素组合(即报告基团, m/z 分别为 114、115、116 和 117) 的同重试剂,特异性标记氨基和赖氨酸侧链,标记后产生质量相同的肽段,经液相色谱不被分离,而经碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID) 后释放出不同的报告基团,由质谱进行鉴定和相对/绝对定量。Wu 等^[68] 对 DIGE、ICAT 和 iTRAQ 等技术进行了比较,指出 iTRAQ 灵敏度最高,可见 iTRAQ 技术优势明显。目前, iTRAQ 的同重试剂组合已增加到 8 种元素^[69], 并且建立了方法的质量控制体系^[69]。

1.3.2 非标签法

非标签法是利用蛋白丰度与峰面积或 MS/MS 质谱数的相关性来定量的一种方法,不需要昂贵的同位素试剂和专业的分析软件,而且不受标签试剂的限制,克服了标签法中一次实验只能分析少数几个样品的缺点,同时克服了 1 种标签法并没有普适性的限制。已有大量实验表明,非标签法定量的准确性比基于胶的定量方法更高,而且它的动态范围高于标签法,具有良好的发展前景^[69]。

2 蛋白组学在水生态毒理学研究中的应用

随着蛋白组学的发展,蛋白组学技术已应用于水生态毒理学的研究中。研究多以贻贝等无脊椎动物和鱼类为主体(表 1),从蛋白组学角度研究水体污染物在生物体内的毒性作用机制。在样品获得方式上,主要是实验室暴露实验,野外采样较为有限;从蛋白组学技术的研究方向上,主要是差异蛋白的分析鉴定、蛋白定量和功能研究。

2.1 蛋白组学技术在水生态毒理学中的研究方向

蛋白组学技术在水生态毒理学中的应用主要包括:蛋白的识别和定量、特定功能蛋白的研究和蛋白相互作用研究^[80]。

蛋白的识别和定量是目前蛋白组学技术在水生态毒理学研究中应用最多的内容,主要是对水生生物体、组织、细胞和亚细胞中全蛋白的分离、鉴定和分析,从而建立 1 个蛋白组图谱(protein profile) 或差异蛋白组集合,以表征水体污染状况或根据水体污染物对生物体的影响而评价污染物的毒性。Lucitt 等^[82] 利用 2D LC-ESI-MS/MS 和 DIGE-MALDI-TOF/TOF 2 种技术分离鉴定了斑马鱼受精后 72 h 和 120 h 的全蛋白,分别分离鉴定蛋白共 1 457(72 hpf) 和 1 184(120 hpf) 个,建立了斑马鱼胚胎发育的蛋白表达图谱,同时比较 2 个时间点的差异蛋白发现了与生长发育过程中蛋白合成相关的蛋白,发现参与能量代谢的蛋白和翻译相关蛋白在 72 hpf 阶段的表达量远高于 120 hpf 阶段,该研究可以为水生态毒理中环境污染物对斑马鱼胚胎的毒性研究提供有力的数据支持。Li 等^[79] 研究了斑马鱼胚胎暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MC-LR(微囊藻毒素) 时蛋白表达差异,发现 75 个蛋白差异显著,并鉴定了其中 40 个差异蛋白,这些蛋白主要与氧化应激、能量代谢和细胞骨架等相关。

特定功能蛋白的研究,主要是对蛋白的翻译后修饰进行研究。在水生态毒理研究中,一些学者对蛋白的羰基化(carbonylation)^[83-85]、谷胱甘肽化(glutathionylation)^[84]、泛素化(ubiquitination)^[85] 和磷酸化(phosphorylation)^[50-51,69] 等现象进行了对应蛋白的分离与分析。Mezhoud 等^[50-51] 利用 2-DE-ESI/MALDI-TOF 技术研究了 MC-LR 对青鳉肝脏蛋白的磷酸化作用,发现若干与细胞骨架、信号转导和细胞凋亡等相关的蛋白在 MC-LR 暴露下显著上调或下调。

蛋白相互作用研究是对蛋白组中在功能上具有相互作用的蛋白进行分离、鉴定和分析。常用的方法主要有免疫共沉淀、酵母双杂交和荧光能量共振转移等,近年来又发展了 Vera 标签法和邻近接合反应等新的蛋白相互作用的研究方法^[86]。这些方法为了解和阐明水生生物暴露于环境污染物时机体内变化和适应机制提供了丰富的技术方法和手段,水生态毒理中常用 western blot 免疫印迹法验证蛋白组学研究中鉴定的蛋白。

表1 蛋白质组学在水生态毒理研究中的应用

Table 1 Application of proteomic technologies in aquatic toxicology research

受试生物组织	暴露污染物 ^a	方法	结果 ^b	文献 ^c
蛤(<i>Chamaelea gallina</i>) 整体	多氯联苯、铜、 三丁基锡、砷	2-DE-MALDI-TOF MS; 2-DE-ESI MS/MS	↑ 原肌球蛋白(tropomyosin) ↑ 肌球蛋白轻链(light chain of myosin) ↑ ↓ 肌动蛋白(actin)	[42]
贻贝(<i>Mytilus edulis</i>) 鳃	原油、原油和 烷基酚的混合物、 多环芳烃混合物	2-DE-MALDI-TOF MS; 2-DE-LC/MS/MS	↓ 肌动蛋白(actin) ↓ 果糖磷酸氢盐醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase) ↓ 苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase) ↑ 重金属结合蛋白(heavy metal binding protein)	[43]
贻贝(<i>Mytilus edulis</i>) 消化腺细胞过氧 化物酶体蛋白	DAP、PBDE-47、BPA	DIGE-MALDI-TOF MS; DIGE-ESI-MS/MS	↓ 羟羧酸氧化酶 1(hydroxyacid oxidase 1) ↓ 微管蛋白(tubulin) ↓ 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase) ↑ 过氧化氢酶(catalase)	[9]
摇蚊(<i>Chironomus ripari-</i> <i>us</i>) 幼虫	镉	2-DE-MALDI-TOF MS	↓ S 腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine decarboxylase) ↑ 转氨酶(aminotransferase) → O-甲基转移酶(O-methyltransferase)	[44]
中华绒螯蟹(<i>Eriocheir</i> <i>sinensis</i>) 鳃	镉	2-DE-nESI-Q-TOF MS/MS	↑ ↓ 谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase) ↓ 微管蛋白 α (α -tubulin) ↓ 钙结合蛋白 23(calcium-binding protein 23) ↑ 蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase)	[45]
褐牙鲈(<i>Paralichthys</i> <i>olivaceus</i>) 脑	镉	2-DE-MALDI-TOF MS	↑ 肌酸激酶(creatine kinase) ↑ 转录调节因子(transcriptional regulator) ↓ 脱氢酶(dehydrogenase) ↓ 转铁蛋白(transferrin)	[46]
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>) 肝	TBBPA	DIGE-MALDI-TOF MS/MS	↑ 热休克蛋白 70 家族成员 HSPA5(heat shock protein 70 kDa protein 5) ↑ 伴侣蛋白 GP96(chaperone protein GP96) ↓ 肌动蛋白 β (β -actin) ↓ 甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶(betaine homocysteine methyltransferase)	[47]
非洲爪蟾(<i>Xenopus</i> <i>laevis</i>) 蝌蚪	多氯联苯 Aroclor 1254	DIGE-LC-ESI-MS/MS	↑ 醛脱氢酶 7A1(aldehyde dehydrogenase 7A1) ↑ 脯氨酸 4 羟化酶 β (prolyl 4-hydroxylase β) ↓ 肌动蛋白 α 1(actin α 1) ↓ 原肌球蛋白 1 α 链(tropomyosin-1 α chain)	[48]
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>) 肝	溴阻燃剂 混合物(BFRs)	2-DE-MALDI-TOF MS	↑ 过氧化还原酶(peroxiredoxin 6) (δ) ↑ α 烯醇酶(alpha-enolase 1) (η) ↓ 转酮醇酶(transketolase) (η) ↓ 铁离子调节蛋白 1(iron regulatory protein 1) (η)	[49]
青鳉(<i>Oryzias latipes</i>) 肝	MC-LR	2-DE-ESI-qTOF	↑ 甲基转移酶(methyltransferase) ↑ 四跨膜蛋白(transmembrane 4) ↑ 载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1) ↑ 铁蛋白(ferritin)	[50]
青鳉(<i>Oryzias latipes</i>) 肝	MC-LR	2-DE-MALDI-TOF/ ESI-qTOF	↑ 酸性核糖体磷蛋白 PO(acidic ribosomal phosphoprotein PO) ↑ 苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase) ↑ 烯醇酶(enolase)	[51]

续表 1

受试生物组织	暴露污染物 ^a	方 法	结 果 ^b	文 献 ^c
稀有鮡鲫 (Gobiocypris rarus) 肝	PFOA	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding protein) (♂) ↑ 过氧化还原酶 (peroxiredoxin) (♂) ↑ 蛋氨酸亚砷还原酶 B (methionine sulfoxide reductase B) (♀) ↓ 谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase 1) (♂) ↓ ATP 合酶 (ATP synthase) (♂) ↓ 钙调素 (regucalcin) (♀) ↓ 苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase) (♀)	[52]
鲶鱼 (Ictalurus punctatus) 肾脏	爱德华氏菌 (E. ictaluri)	2-DE-MALDI-TOF MS/MS	→ 热休克蛋白 90-β (heat shock protein 90-beta) (暴露 2 h 后) → 类果糖二磷酸酶 (fructose-1,6-bisphosphatase-like protein) (暴露 2 h 后) → 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (暴露 6 h 后) → ATP 合酶 β 亚基 (ATP synthase beta subunit) (暴露 6 h 后)	[53]
蛤 (Ruditapes decussates) 鳃 (G)、消化腺 (D)	镉	2-DE-LC/ESI/MS/MS	↑ 肌动蛋白 (actin) (G) ↑ GDP 解离抑制蛋白 (Rab GDP dissociation inhibitor alpha) (G) ↓ 闭壳肌肌动蛋白 (actin adductor muscle) (D)	[54]
黑头呆鱼 (Pimephales promelas) 肝	群勃龙 (17β-trenbolone)、 氟他胺 (flutamide)	2D-LC-MS/MS (iTRAQ)	↑ 二磷酸果糖酶 (aldolase b, fructose-bisphosphate) ↑ 血红蛋白 α 链 (hemoglobin alpha chain) ↓ 甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶 (betaine homocysteine methyltransferase) ↓ 磷酸丙糖异构酶 1b (triosephosphate isomerase 1b)	[55]
白鲸 (Huso huso) 脑	甲基汞	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 热休克蛋白 70-2 (stress protein HSP70-2) ↑ 角蛋白 8 (keratin 8) ↓ 牛科动物晶体结构蛋白 A 链 (chain A, crystal structure of bovine brain)	[56]
斑马鱼 (Danio rerio) 肝细胞	HBCD (H)、 TBBPA (T)	2-DE-MALDI-TOF/LC-FT-ICR	↑ 醛脱氢酶 2b (aldehyde dehydrogenase 2b) (H) ↓ 真核生物翻译延长因子 2 (eucaryotic translation elongation factor 2) (H) ↑ 转酮醇酶 (transketolase) (T) ↓ 热休克蛋白 70 家族成员 HSPA8 (HSP 70 protein 8) (T) ↑ 转醛醇酶 (transaldolase 1) (H + T) ↓ 热休克蛋白 70 家族成员 HSP 70 9B (HSP 70 9B protein) (H + T)	[57]
褐牙鲈 (Paralichthys olivaceus) 鳃	镉	2-DE-MALDI-TOF-MS	↑ 磺基转移酶家族 (sulfotransferase family) ↓ ATP 结合盒转运蛋白 (ABC transporter ATP-binding protein) ↓ 角蛋白 10 (keratin 10)	[58]
河豚 (Takifugu rubripes) 心肌	氟化钠	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase) ↑ 染色体结构维持相关蛋白 4 (SMC4, protein) ↑ 丝裂原活化蛋白激酶 10 (mitogen-activated protein kinase 10)	[59]
青鳉 (Oryzias latipes) 肝脏	MC-LR	2-DE-LC-MS/MS	↑ 蛋白质二硫键异构酶 A4 (protein disulfide isomerase A4) ↑ 热休克蛋白 70 家族成员 HSPA5 (heat shock protein 70 kDa protein 5) ↓ ATP 合酶线粒体 d 亚基 (ATP synthase mitochondrial d subunit)	[60]
大嘴鲈鱼 (Micropterus salmoides) 肝	氯化镉、菲、 毒杀芬 (toxaphene)、 ATZ、PCB 126	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↓ 蛋白激酶 C 受体 (receptor of activated protein kinase C) ↓ 球蛋白轻链 (myosin light chain alkali) ↑ 磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase) ↓ 醛缩酶 B (fructose bisphosphate aldolase B)	[61]

续表 1

受试生物组织	暴露污染物 ^a	方 法	结 果 ^b	文 献 ^c
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>) 胚胎	PFOS	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 过氧化还原酶 2(peroxiredoxin 2) ↑ 视黄醇结合蛋白 4(retinol binding protein 4) ↓ 核苷二磷酸激酶 Z2(NDPK-Z2) ↓ 晶状体蛋白 gamma MX(crystallin, gamma MX)	[62]
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>) 肝	MC-LR	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 膜联蛋白 4(annexin 4) ↑ 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase) ↓ 丙酮酸激酶(pyruvate kinase) ↓ 2-羟烷基辅酶 A 裂合酶 1(2-hydroxyacyl-CoA lyase 1)	[63]
大西洋鳕鱼(<i>Gadus morhua</i>) 脑	甲基汞	2-DE-MALDI-TOF MS/MS	↑ 吡哆醛激酶(pyridoxal kinase) ↑ G 蛋白(G protein) ↑ 蛋白磷酸酶 1(protein phosphatase 1)	[64]
褐藻(<i>Scytosiphon gracilis</i>)	铜	2-DE-LC/MS/MS	↑ 过氧化还原酶(chloroplast peroxiredoxin) ↑ 磷酸甘露糖酶(cytosolic phosphomannomutase) ↑ 3-磷酸甘油醛脱氢酶(cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	[65]
稀有鮡鲫(<i>Gobiocypris rarus</i>) 肝	PCP	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↓ 线粒体 ATP 合酶(mitochondrial ATP synthase) ↑ 果糖二磷酸酶(fructose-1,6-bisphosphatase) ↓ ↑ 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase) ↓ ↑ 脂肪酸结合蛋白(liver-basic fatty acid binding protein)	[66]
河豚(<i>Takifugu rubripes</i>) 肝	氟化钠	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 蛋白质二硫键异构酶 ER-60(protein disulfide isomerase ER-60) ↓ 细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)	[67]
黑头呆鱼(<i>Pimephales promelas</i>) 端脑	EE2	2D-LC-MS/MS(iTRAQ)	↓ ATP 合酶(ATP synthase) ↓ 乳酸脱氢酶 B4 (lactate dehydrogenase B4) ↑ 微管体结合蛋白(microtubule-associated protein tau) ↑ 星形细胞磷蛋白(astrocytic phosphoprotein)	[68]
苔藓虫(<i>Bugula neritina</i>) 幼虫	丁烯酸内酯	2-DE-MALDI-TOF-MS	↑ 线粒体肽酶(mitochondrial peptidase) ↑ 热休克蛋白 70(HSP70) ↓ 网钙蛋白(reticulocalbin)	[69]
中吻鲟(<i>Acipenser medirostris</i> , GS) 和高首鲟(<i>Acipenser transmontanus</i> , WS) 幼鱼	硒	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 含缬氨酸蛋白(valosin containing protein) (GS) ↑ 肌酸激酶(creatine kinase) (GS) ↑ 40S 核糖体蛋白(40S ribosomal protein Sa) (WS) ↑ ↓ 蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase) (WS)	[70]
金头鲷(<i>Sparus aurata</i>) 肝	伊佛霉素(ivermectin)	DIGE-MALDI/LC-MS/MS	↓ 载脂蛋白 A1(apolipoprotein A-I) ↓ β 球蛋白(beta-globin) ↓ ATP 合酶 β 亚基(ATP synthase subunit beta)	[71]
鲍鱼(<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>) 肝、胰腺	DAP、BPA	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ β 微管蛋白(β-tubulin) ↑ 热休克蛋白 70(HSP 70) ↑ 硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase) ↓ 醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase)	[72]
黄鳊鲷(<i>Sparus latus</i>) 肝	MP	2-DE-MALDI-TOF/TOF-MS	↑ 过氧化还原酶 2(peroxiredoxin 2) ↑ 二硫键异构酶 A3 前体(disulfide-isomerase A3 precursor) ↑ 细胞质肌动蛋白 1(actin cytoplasmic 1) ↓ 苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase)	[73]
杜父鱼(<i>Cottus gobio</i>) 肝、鳃	镉	DIGE-LC-MS/MS	↑ 葡萄糖磷酸变位酶 1(phosphoglucomutase 1) ↑ 组织蛋白酶 B(cathepsin B) ↓ 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating) ↓ 磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase)	[74]

续表 1

受试生物组织	暴露污染物 ^a	方 法	结 果 ^b	文 献 ^c
扇贝 (<i>Patinopecten yes-soensis</i>) 肾	铜	2-DE-MALDI-TOF MS/MS	↑ 莽草酸激酶(shikimate kinase) ↑ 转录调节因子(transcriptional regulators) ↓ DNA 指导的 RNA 聚合酶 α 链(DNA-directed RNA polymerase alpha chain)	[75]
片脚类 (<i>Hyalella azteca</i>) 整体	ATZ、DEA	2-DE-MALDI-TOF MS/MS	↑ 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (♂) ↑ 血蓝蛋白亚基 1(hemocyanin subunit 1) (♂) ↓ 乙醇脱氢酶 VI (alcohol dehydrogenase class VI) (♀) ↓ 肌酸激酶同工酶 b(creatine kinase isoform b) (♀)	[76]
青鳉(<i>Oryzias latipes</i>) 肝、脑	汞	2-DE-MALDI-TOF /TOF-MS	↑ 核纤层蛋白 B(lamin type B) ↑ 蛋白酶体 α1 亚基(proteasome alpha 1, subunit) ↓ 丙酮酸脱氢酶 E1 组分 α1 亚基(pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial)	[77]
青鳉(<i>Oryzias latipes</i>) 肝	MC-LR	iTRAQ	↑ 乙酰辅酶 A 结合蛋白(Acyl-CoA binding protein) ↑ 球蛋白 α 成体(globin α adult) ↓ 延胡索酰乙酰乙酸水解酶(FAH)	[78]
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>) 胚胎	MC-LR	2-DE-MALDI-TOF /TOF-MS	↑ 热休克蛋白 70 家族成员 HSPA9(heat shock 70 kDa protein 9) ↑ 蛋白磷酸酶 2a,催化亚基 α(protein phosphatase 2a, catalytic subunit, α) ↓ α 微管蛋白(α-tubulin)	[78]
双壳类 (<i>Mytilus galloprovincialis</i> , M) 和 柱孢藻(<i>Cylindrocapsa</i>) (<i>Corbicula fluminea</i> , <i>spermopsis raciborskii</i>) 毒素	毒素	2-DE-MALDI-TOF MS/MS	↓ 肌动蛋白(actin) (C,G) ↑ ATP 合酶 β 亚基(ATP synthase subunit beta) (C,D) ↓ 微管蛋白 α 链(tubulin alpha chain) (M,G) ↑ β 肌动蛋白(β-actin) (M,D)	[80]

鳃(G)、消化腺(D)
a 缩写释义: ATZ, atrazine,阿特拉津; BPA, bisphenol-A, 双酚 A; DAP, diallyl phthalate, 邻苯二甲酸二烯丙酯; DEA, desethylatrazine, 去乙基阿特拉津; E2, 17β-estradiol, 17β 雌二醇; EE2, 17α-ethinylestradiol, 17α 乙炔雌二醇; HBCD, hexabromocyclododecane, 六溴环十二烷; MC-LR, MC-leucine-arginine, 微囊藻毒素-亮氨酸-精氨酸; MP, methyl parathion, 甲基对硫磷; PBDE-47, polybrominated diphenyl ethers-47, 多溴联苯醚 47; PCB 126, polychlorinated biphenyl-126, 多氯联苯; PCP, pentachlorophenol, 五氯苯酚; PFOA, perfluorooctanoic acid, 全氟辛酸; PFOS, perfluorooctane sulfonate, 全氟辛基磺酸; TBBPA, tetrabromobisphenol-A, 四溴双酚 A。
b 仅列出部分具有显著差异的蛋白, ↑ 表示与空白相比蛋白上调, ↓ 表示与空白相比蛋白下调, ↓ ↑ 表示与空白相比不同的暴露条件下蛋白上调或下调, → 表示暴露后新出现的蛋白。
缩写释义: ABC, ATP-binding cassette, ATP 结合盒; ATP, adenosine triphosphate, 三磷酸腺苷; FAH, fumarylacetoacetate hydrolase, 延胡索酰乙酰乙酸水解酶; GDP, guanosine diphosphate, 二磷酸鸟苷; HSP, heat shock protein, 热休克蛋白; NDPK, nucleoside diphosphate kinase, 核苷二磷酸激酶; SMC-4, structural maintenance of chromosomes protein 4, 染色体结构维持相关蛋白 4。
c 按照发表时间顺序排列。

2.2 毒性作用机制研究与水体污染评价

在水生态毒理中, 蛋白组研究主要应用于毒性作用机制研究。在研究水体污染物的毒性作用机制时, 主要是利用蛋白组学技术探究水生动物在污染物暴露前后的蛋白表达差异, 重点是分离和鉴定差异蛋白并分析这些蛋白的功能, 推断其对相关代谢通路的影响。Wang 等^[63] 在研究 MC-LR 对斑马鱼肝脏的毒性时, 发现大量与蛋白消化有关的蛋白和超氧化物歧化酶发生了变化, 由此证明 MC-LR 会引起斑马鱼蛋白水解和抗氧化作用的异常。Martyniuk 等^[55, 68] 用 iTRAQ 技术研究了性激素对黑头呆鱼

(*Pimephales promelas*) 肝脏和脑组织的影响, 分别得到了药物作用下 45 个和 77 个差异蛋白的相对定量数据, 并对其所在通路进行了分析, 结果表明这些蛋白参与细胞代谢和氧化应激等功能, 从而在机制上阐述了这些药物对水生生物的细胞增殖、分化等产生的影响。目前, 所开展的蛋白组研究的暴露周期均比较短, 大部分为短期或中长期, 选择的暴露阶段多为胚胎或成体, 成长阶段暴露实验的开展很少^[8]。然而, 对于环境毒理学研究, 长期暴露实验具有更大的实际意义, 而且在鱼类发育的不同阶段, 其蛋白质的表达情况自身就存在差异, 因此在一段成长期内选

择多个时间点进行蛋白组学研究十分必要。此外,同种动物的不同性别的蛋白表达也可能存在差异,对于此类背景值的蛋白组研究也十分重要。

另一方面,蛋白组学已用于监测和评价水体污染状况(表2)。早在2000年Knigge等^[90]首次利用表面加强激光解析电离时间飞行质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术分析了挪威卡莫伊岛附近水体中贻贝(*Mytilus edulis*)的蛋白组表达情况,成功得到不同采样点贻贝的蛋白表达图谱,评价和监测了当地水域中重金属和多环芳烃的污染状

况,随着蛋白组学技术的更新,2-DE-MALDI-TOF-MS技术得以应用,在北京高碑店河和西班牙多明戈(Domingo Rubio)河口分别利用金鱼和欧洲青蟹(*Carcinus maenas*),通过差异蛋白分析,获得了新的生物标记物,评价了水体的污染状况^[88,93]。虽然,野外实验能够更加真实地反映当地的污染状况对水生生物的影响,但由于采样等方面的困难,迄今为止开展的工作尚十分有限,因此蛋白组学技术在特定水域的水体和沉积物污染现状的评估方面的应用仍有很大的发展空间。

表2 野外采样实验研究的相关信息

Table 2 Information of field experiments in proteome research

实验动物	生理性状	采样地点	组 织	方 法	结 果 ^a	文 献
美国螯虾(<i>Procambarus clarkii</i>)	成年个体	美国多南那(Doñana)自然公园及其周边的8个采样点,受农药污染	鳃	2-DE	35个显著的蛋白差异点	[87]
欧洲青蟹(<i>Carcinus maenas</i>)	雄性	西班牙多明戈(Domingo Rubio)河口,受硫铁矿和金属等工业排放以及农药污染	鳃	2-DE-MALDI-TOF-MS	↑ 激活转录因子7(ATF7, cAMP-dependent transcription factor) ↓ ABC转运子G蛋白家族(ABC transporter G family protein) ↓ 醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase)	[88]
蛤(<i>Scrobicularia plana</i>)	体长 5.45 cm	西班牙瓜达尔基维尔河口(Guadalquivir estuary) 3个采样点,受重金属污染	鳃	2-DE-MALDI-TOF-MS	↑ 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT) ↑ 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	[89]
贻贝(<i>Mytilus edulis</i>)		挪威卡莫伊岛附近,受重金属和多环芳烃污染	消化腺	SELDI-TOF MS	受重金属污染采样点,16个差异质谱峰;受多环芳烃污染采样点,19个差异质谱峰	[90]
贻贝(<i>Mytilus edulis</i>)	体长5 cm	瑞典哥德堡海港(Göteborg harbor),受多环芳烃污染	消化腺	LC/2-DE-ESI-MS/MS	↑ 组织蛋白酶B(cathepsin B) ↑ 谷胱甘肽S转移酶(glutathione-S-transferase) ↓ 类聚束蛋白(fascin-like protein) ↓ 醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase)	[91]
小嘴鲈鱼(<i>Micropogonias dolomieu</i>)	成鱼,雌雄混合	美国谢南多亚河(Shenandoah River),受持久性有机物和重金属污染	前肾	2-DE-MALDI-TOF-MS	↓ V型ATP酶β亚基(V-type ATPase β subunit) ↓ 磷酸丙糖异构酶B(triosephosphate isomerase B) ↓ ATP合酶β亚基(mitochondrial ATP synthase β-subunit)	[92]
虹鳟(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	幼鱼,雌雄混合	瑞典哥德堡嘉宝污水处理厂,含有多环芳烃和家用化学品类	肝	2-DE-FT-ICR MS	↓ 甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase) ↓ 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase) ↑ 线粒体ATP合酶α亚基(mitochondrial ATP synthase alpha-subunit) ↑ 羰基还原酶/20β-羟基类固醇脱氢酶(carbonyl reductase/20β-hydroxysteroid dehydrogenase)	[93]

续表 2

实验动物	生理性状	采样地点	组 织	方 法	结 果 ^a	文 献
金鱼 (<i>Carassius auratus</i>)	成鱼,雄性	北京高碑店河,接纳污水处理厂排放物和火力发电厂排放的冷却剂废水	肝脏	2-DE-MALDI-TOF	↑ 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase)	[93]
					↑ ↓ 脂肪酸结合蛋白 (liver basic fatty acid-binding protein)	
					↑ ↓ 铁蛋白 H3 (ferritin H3)	

a 仅列出部分具有显著差异的蛋白, ↑ 表示与空白相比蛋白上调, ↓ 表示与空白相比蛋白下调, ↑ ↓ 表示与空白相比不同的暴露条件下蛋白上调或下调。

缩写释义: ABC, ATP – binding cassette, ATP 结合盒; ATF, activating transcription factor, 激活转录因子; ATP, adenosine triphosphate, 三磷酸腺苷; cAMP, cyclic adenosine monophosphate, 环腺苷酸; HGPRT, hypoxanthine – guanine phosphoribosyltransferase, 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶。

此外,蛋白质组学技术在针对摇蚊(*Chironomus riparius*)^[4]、藻类(*Scytosiphon gracilis*)^[63] 和水生微生物(*Geobacter metallireducens*)^[64] 等不同物种的研究中也有部分应用,可见蛋白质组学在水生态毒理学中的应用正在不断加强。

3 展 望

(1) 由于分步提取法可以富集低丰度蛋白,有目的地分离某类蛋白,因此,随着蛋白质组学在水生态毒理学中应用的不断发展,功能蛋白以及蛋白相互作用的研究将需要更明确的细胞定位,利用分步提取法进行亚细胞提取可为此类研究提供有效的手段。

(2) 目前蛋白质组学在生态毒理学研究中的研究方法上多集中于基于胶的技术,非胶技术的应用较少,今后可在已有研究的基础上应用非胶技术分析低丰度蛋白,进行蛋白定量以及翻译后修饰、蛋白相互作用等方面的研究。

(3) 蛋白质组学在水生态毒理中的应用主要是剂量效应、时间效应和水生动物蛋白表达之间关系的研究,而在进行此类研究时,往往忽略了对研究对象生物学背景的蛋白质组学研究,如不同发育阶段、性别对于蛋白表达的影响,而这些因素本身也影响着蛋白的表达,因此,建立模式生物不同发育阶段的蛋白表达图谱也十分重要。

(4) 目前所开展的研究大部分为急性短期暴露实验,而更接近环境中真实情况的长期暴露实验尚需大量开展。

(5) 对于差异蛋白的分析研究目前大多仅进行了有限的功能分类,而对这些蛋白所在的具体通路尚未开展全面分析,对于机制的研究还存在很大的局限性,因此,建立差异蛋白所在通路以及分析上下游蛋白之间的关系将成为今后研究的重点。

(6) 相对于模式生物而言,非模式生物的基因组和蛋白质序列数据库十分有限,已成为当前非模式生物蛋白质组学研究的主要困难之一,因此,丰富非模式生物基因组和蛋白质序列数据库在非模式生物的蛋白质组学研究中意义重大。

(7) 目前蛋白质组学在水生态毒理研究中的应用还处于初级阶段,蛋白表达图谱的研究开展较多,关于蛋白质结构和蛋白相互作用等方面的研究仍有待于进一步深入,随着蛋白质组学技术的发展以及水生态毒理学研究的深入,蛋白组学的应用将更加丰富。

术语表

- AF, affinity chromatography; 亲和色谱
- 2-DE, two dimensional electrophoresis; 双向电泳
- DIGE, differential in gel electrophoresis; 差异凝胶电泳
- 2D-LC-MS, two dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry; 二维液相色谱-质谱联用
- ESI, electrospray ionization; 电喷雾电离
- FT-ICR, Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry; 傅里叶变换-离子回旋共振质谱
- ICAT, isotope coded affinity tag; 同位素编码亲和标签
- iTRAQ, isotope tags for relative and absolute quantitation; 同位素标签相对绝对定量
- LC, liquid chromatography; 液相色谱
- LCⁿ, multidimensional liquid chromatography; 多维液相色谱
- LC-MS, liquid chromatography coupled to mass spectrometry; 液相色谱-质谱联用
- LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; 液相质谱-串联质谱联用
- LCⁿ-MS, multidimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry; 多维液相色谱-质谱联用
- MALDI, matrix assisted laser desorption ionization; 基质辅助激光解析电离
- MS, mass spectrometry; 质谱

MS/MS, tandem mass spectrometry; 串联质谱

MudPIT, multidimensional protein identification technology; 多维蛋白鉴定技术

m/z, mass to charge ratio; 质荷比

RP, reverse phase chromatography; 反相色谱

SCX, strong cation-exchange chromatography; 强阳离子交换色谱

SEC, size exclusion chromatography; 分子排阻色谱

SELDI-TOF-MS, surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; 表面加强激光解析电离时间飞行质谱

SILAC, stable isotope labeling with amino acids in cell culture; 细胞培养同位素标记

TOF, time-of-flight; 飞行时间

通讯作者简介: 查金苗 (1975—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究兴趣包括水生模型生物体系的构建和发展、水环境生物毒性测试方法、环境内分泌干扰物的筛选技术研究、环境污染物对水生生物分子毒理机制和水生态系统完整性评估方法等, 在国内外学术刊物上发表高水平论文 50 余篇, SCI 论文 30 余篇。

程钢 (1975—), 男, 博士, 主要从事生化和分子生物学研究, 已发表 SCI 论文 7 篇, 中文核心论文 12 篇。

参考文献:

- [1] 贺福初. 蛋白质组 (proteome) 研究——后基因组时代的主力军 [J]. 科学通报, 1999, 44(2): 113–122
- [2] van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 13(2): 57–149
- [3] Merrick B A, Tomer K B. Toxicoproteomics: A parallel approach to identifying biomarkers [J]. Environmental Health Perspectives, 2003, 111(11): a578–a579
- [4] Boverhof D R, Zacharewski T R. Toxicogenomics in risk assessment: Applications and needs [J]. Toxicological Sciences, 2006, 89(2): 352–360
- [5] Stenuit B, Eysers L, Schuler L, et al. Emerging high-throughput approaches to analyze bioremediation of sites contaminated with hazardous and/or recalcitrant wastes [J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(6): 561–575
- [6] Sanchez B C, Ralston-Hooper K, Sepúlveda M S. Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(2): 274–282
- [7] Wang W, Tai F, Chen S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis [J]. Journal of Separation Science, 2008, 31(11): 2032–2039
- [8] Wang W, Viqani R, Scali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27(13): 2782–2786
- [9] Apraiz I, Mi J, Cristobal S. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*) [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2006, 5(7): 1274–1285
- [10] Amelina H, Apraiz I, Sun W, et al. Proteomics-based method for the assessment of marine pollution using liquid chromatography coupled with two-dimensional electrophoresis [J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(6): 2094–2104
- [11] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007–4021
- [12] Ly L, Wasinger V C. Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: Tools for the complex proteome [J]. Proteomics, 2011, 11(4): 513–534
- [13] Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future [J]. Journal of Proteomics, 2010, 73(11): 2064–2077
- [14] 刘建军, 庄志雄, 邓平建, 等. 质谱技术在蛋白质组研究中的应用 [J]. 卫生研究, 2003, 32(3): 257–260
- Liu J J, Zhuang Z X, Deng P J, et al. Application of mass spectrometry in the proteome research [J]. Journal of Hygiene Research, 2003, 32(3): 257–260 (in Chinese)
- [15] Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis [J]. Science, 2006, 312(5771): 212–217
- [16] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037–1053
- [17] Miller I, Crawford J, Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: Which, when, why [J]. Proteomics, 2006, 6(20): 5385–5408
- [18] Monsinjon T, Andersen O K, Le Boulenger F, et al. Data processing and classification analysis of proteomic changes: A case study of oil pollution in the mussel, *Mytilus edulis* [J]. Proteome Science, 2006, 4(1): 17
- [19] Dowsey A W, Dunn M J, Yang G Z. Automated image alignment for 2D gel electrophoresis in a high-throughput proteomics pipeline [J]. Bioinformatics, 2008, 24(7): 950–957
- [20] Dowsey A W, Morris J S, Gutstein H G, et al. Informatics and statistics for analyzing 2-D gel electrophoresis images [J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 604: 239–255
- [21] Roe M R, Griffin T J. Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: Tools for studying biological response of proteins and proteomes [J]. Proteomics, 2006, 6(17): 4678–4687

- [22] Ünlü M, Morgan M E, Minden J S. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(11): 2071 – 2077
- [23] Neuhoﬀ V, Arold N, Taube D, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250 [J]. *Electrophoresis*, 1988, 9(6): 255 – 262
- [24] Blum H, Beier H, Gross H J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels [J]. *Electrophoresis*, 1987, 8(2): 93 – 99
- [25] Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(3): 669 – 678
- [26] Minden J S, Dowd S R, Meyer H E, et al. Difference gel electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(S1): S156 – S161
- [27] Horvatovich P, Hoekman B, Govorukhina N, et al. Multidimensional chromatography coupled to mass spectrometry in analysing complex proteomics samples [J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(10): 1421 – 1437
- [28] Link A J, Eng J, Schieltz D M, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(7): 676 – 682
- [29] Wolters D A, Washburn M P, Yates J R 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(23): 5683 – 5690
- [30] Washburn M P, Wolters D, Yates J R 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(3): 242 – 247
- [31] Fournier M L, Gilmore J M, Martin-Brown S A, et al. Multidimensional separations-based shotgun proteomics [J]. *Chemical Review*, 2007, 107(8): 3654 – 3686
- [32] Moore A W, Jorgenson J W. Comprehensive three-dimensional separation of peptides using size exclusion chromatography/reversed phase liquid chromatography/optically gated capillary zone electrophoresis [J]. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(19): 3456 – 3463
- [33] Hoffman S A, Joo W A, Echan L A, et al. Higher dimensional (Hi-D) separation strategies dramatically improve the potential for cancer biomarker detection in serum and plasma [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 849(1 – 2): 43 – 52
- [34] Sandra K, Moshir M, Dhondt F, et al. Highly efficient peptide separations in proteomics: Part 2: Bi- and multidimensional liquid-based separation techniques [J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877(11 – 12): 1019 – 1039
- [35] Gyil S P, Rist B, Gerber S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 994 – 999
- [36] Leitner A, Lindner W. Current chemical tagging strategies for proteome analysis by mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 813(1–2): 1 – 26
- [37] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(12): 1154 – 1169
- [38] Wu W W, Wang G, Baek S J, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, iCAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF [J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(3): 651 – 658
- [39] Pichler P, Köcher T, Holzmann J, et al. Peptide labeling with isobaric tags yields higher identification rates using iTRAQ 4-plex compared to TMT 6-plex and iTRAQ 8-plex on LTQ Orbitrap [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(15): 6549 – 6558
- [40] Burkhardt J M, Vaudel M, Zahedi R P, et al. iTRAQ protein quantification: A quality controlled workflow [J]. *Proteomics*, 2011, 11(6): 1125 – 1134
- [41] Neilson K A, Ali N A, Muralidharan S, et al. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry [J]. *Proteomics*, 2011, 11(4): 535 – 553
- [42] Rodríguez-Ortega M J, Grøsvik B E, Rodríguez-Ariza A, et al. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants [J]. *Proteomics*, 2003, 3(8): 1535 – 1543
- [43] Manduzio H, Cosette P, Gricourt L, et al. Proteome modifications of blue mussel (*Mytilus edulis* L.) gills as an effect of water pollution [J]. *Proteomics*, 2005, 5(18): 4958 – 4963
- [44] Lee S E, Yoo D, Son J, et al. Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae [J]. *Proteomics*, 2006, 6(3): 945 – 957
- [45] Silvestre F, Dierick J F, Dumont V, et al. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(1): 46 – 58
- [46] Zhu J Y, Huang H Q, Bao Q M, et al. Acute toxicity profile of cadmium revealed by proteomics in brain tissue of *Paralichthys olivaceus*: Potential role of transferrin in cadmium toxicity [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78(2): 127 – 135
- [47] De Wit M, Keil D, Remmerie N, et al. Molecular targets of TBBPA in zebrafish analysed through integration

- of genomic and proteomic approaches [J]. *Chemosphere*, 2008, 74(1): 96–105
- [48] Gillardin V, Silvestre F, Dieu M, et al. Protein expression profiling in the African clawed frog *Xenopus laevis* tadpoles exposed to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, 8(4): 596–611
- [49] Kling P, Norman A, Andersson P L, et al. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(2): 319–327
- [50] Mezhoud K, Bauchet A L, Château-Joubert S, et al. Proteomic and phosphoproteomic analysis of cellular responses in medaka fish (*Oryzias latipes*) following oral gavage with microcystin-LR [J]. *Toxicon*, 2008, 51(8): 1431–1439
- [51] Mezhoud K, Praseuth D, Puiseux-Dao S, et al. Global quantitative analysis of protein expression and phosphorylation status in the liver of the medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to microcystin-LR: I. Balneation study [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86(2): 166–175
- [52] Wei Y, Chan L L, Wang D, et al. Proteomic analysis of hepatic protein profiles in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to perfluorooctanoic acid [J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(4): 1729–1739
- [53] Booth N J, Bilodeau-Bourgeois A L. Proteomic analysis of head kidney tissue from high and low susceptibility families of channel catfish following challenge with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(1): 193–196
- [54] Chora S, Starita-Geribaldi M, Guignonis J, et al. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(4): 300–308
- [55] Martyniuk C J, Alvarez S, McClung S, et al. Quantitative proteomic profiles of androgen receptor signaling in the liver of fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(5): 2186–2200
- [56] Keyvanshokoh S, Vaziri B, Gharaei A, et al. Proteome modifications of juvenile beluga (*Huso huso*) brain as an effect of dietary methylmercury [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2009, 4(4): 243–248
- [57] Kling P, Förlin L. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(7): 1985–1993
- [58] Ling X P, Zhu J Y, Huang L, et al. Proteomic changes in response to acute cadmium toxicity in gill tissue of *Paralichthys olivaceus* [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2009, 27(2): 212–218
- [59] Lu J, Xu Q, Zheng J, et al. Comparative proteomics analysis of cardiac muscle samples from pufferfish *Takifugu rubripes* exposed to excessive fluoride: Initial molecular response to fluorosis [J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2009, 19(6-7): 468–475
- [60] Malécot M, Mezhoud K, Marie A, et al. Proteomic study of the effects of microcystin-LR on organelle and membrane proteins in medaka fish liver [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(2): 153–161
- [61] Sanchez B C, Ralston-Hooper K J, Kowalski K A, et al. Liver proteome response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to several environmental contaminants: Potential insights into biomarker development [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 95(1): 52–59
- [62] Shi X, Yeung L W Y, Lan P K S, et al. Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate [J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 110(2): 334–340
- [63] Wang M, Chan L L, Si M Z, et al. Proteomic analysis of hepatic tissue of zebrafish (*Danio rerio*) experimentally exposed to chronic microcystin-LR [J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 113(1): 60–69
- [64] Berg K, Puntervoll P, Valdersnes S, et al. Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 100(1): 51–65
- [65] Contreras L, Moenne A, Gaillard F, et al. Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96(2): 85–89
- [66] Fang Y, Gao X, Zha J, et al. Identification of differential hepatic proteins in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to pentachlorophenol (PCP) by proteomic analysis [J]. *Toxicology Letters*, 2010, 199(1): 69–79
- [67] Lu J, Zheng J, Liu H, et al. Proteomics analysis of liver samples from puffer fish *Takifugu rubripes* exposed to excessive fluoride: An insight into molecular response to fluorosis [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2010, 24(1): 21–28
- [68] Martyniuk C J, Kroll K J, Doperalski N J, et al. Environmentally relevant exposure to 17 α -ethinylestradiol affects the telencephalic proteome of male fathead minnows [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 98(4): 344–353
- [69] Qian P Y, Wong Y H, Zhang Y. Changes in the proteome and phosphoproteome expression in the bryozoan *Bugula*

- neritina larvae in response to the antifouling agent butenolide [1]. *Proteomics*, 2010, 10(19): 3435–3446
- [70] Silvestre F, Linares-Casenave J, Doroshov S I, et al. A proteomic analysis of green and white sturgeon larvae exposed to heat stress and selenium [1]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(16): 3176–3188
- [71] Varó I, Rigos G, Navarro J C, et al. Effect of ivermectin on the liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*: A proteomic approach [1]. *Chemosphere*, 2010, 80(5): 570–577
- [72] Zhou J, Cai Z, Lei L, et al. A proteomics based approach to assessing the toxicity of bisphenol A and diallyl phthalate to the abalone (*Haliotis diversicolor* *super-texta*) [1]. *Chemosphere*, 2010, 79(5): 595–604
- [73] Chen H, Huang H. Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in *Sparus latus* liver [1]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 800–806
- [74] Dorts J, Kestemont P, Dieu M, et al. Proteomic response to sublethal cadmium exposure in a sentinel fish species, *Cottus gobio* [1]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(2): 470–478
- [75] Huang X, Fang C W, Guo Y W, et al. Differential protein expression of kidney tissue in the scallop *Patinopecten yessoensis* under acute cadmium stress [1]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(5): 1232–1237
- [76] Ralston-Hooper K J, Sanchez B C, Adamec J, et al. Proteomics in aquatic amphipods: Can it be used to determine mechanisms of toxicity and interspecies responses after exposure to atrazine? [1]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(5): 1197–1203
- [77] Wang M, Wang Y, Wang J, et al. Proteome profiles in medaka (*Oryzias melastigma*) liver and brain experimentally exposed to acute inorganic mercury [1]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 103(3-4): 129–139
- [78] Malécot M, Marie A, Puiseux S, et al. iTRAQ-based proteomic study of the effects of microcystin-LR on medaka fish liver [1]. *Proteomics*, 2011, 11(10): 2071–2078
- [79] Li G, Chen J, Xie P, et al. Protein expression profiling in the zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to the microcystin-LR [1]. *Proteomics*, 2011, 11(10): 2003–2018
- [80] Puerto M, Campos A, Prieto A, et al. Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells [1]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 109–116
- [81] Wetmore B A, Merrick B A. Toxicoproteomics: Proteomics applied to toxicology and pathology [1]. *Toxicologic Pathology*, 2004, 32(6): 619–642
- [82] Lucitt M B, Price T S, Pizarro A, et al. Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development [1]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008, 7(5): 981–994
- [83] McDonagh B, Sheehan D. Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: Carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress [1]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(4): 325–333
- [84] McDonagh B, Tyther R, Sheehan D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and western blotting: Actin as a target for oxidative stress [1]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 73(3): 315–326
- [85] Chora S, McDonagh B, Sheehan D, et al. Ubiquitination and carbonylation as markers of oxidative-stress in *Ruditapes decussatus* [1]. *Marine Environmental Research*, 2008, 66(1): 95–97
- [86] Mocanu M M, Váradi T, Szöllösi J, et al. Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA) [1]. *Proteomics*, 2011, 11(10): 2063–2070
- [87] Vioque-Fernández A, Alves de Almeida E, López-Barea J. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches [1]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(5): 1784–1797
- [88] Montes Nieto R, García-Barrera T, Gómez-Ariza J, et al. Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Carcinus maenas* [1]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(2): 401–408
- [89] Romero-Ruiz A, Carrascal M, Alhama J, et al. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain) [1]. *Proteomics*, 2006, 6(S1): S245–S255
- [90] Knigge T, Monsinjon T, Andersen O K. Surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry approach to biomarker discovery in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals under field conditions [1]. *Proteomics*, 2004, 4(9): 2722–2727
- [91] Ripley J, Iwanowicz L, Blazer V, et al. Utilization of protein expression profiles as indicators of environmental impairment of smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) from the Shenandoah River, Virginia, USA [1]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(8): 1756–1767
- [92] Albertsson E, Kling P, Gunnarsson L, et al. Proteomic analyses indicate induction of hepatic carbonyl reductase/20 β -hydroxysteroid dehydrogenase B in rainbow trout exposed to sewage effluent [1]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 68(1): 33–39

- [3] Wang J, Wei Y, Wang D, et al. Proteomic study of the effects of complex environmental stresses in the livers of goldfish (*Carassius auratus*) that inhabit Gaobeidian Lake in Beijing, China [J]. *Ecotoxicology*, 2007, 17 (3) : 213 – 220
- [4] Ahrendt A J, Tollaksen S L, Lindberg C, et al. Steady state protein levels in *Geobacter metallireducens* grown with iron (III) citrate or nitrate as terminal electron acceptor [J]. *Proteomics*, 2007, 7(22) : 4148 – 4157
- ◆