

# 蛋白质组学研究在赤潮藻研究中的应用

## Application of proteomics study to red tide algae

钱方, 朱斌琳, 章军

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q 781 文献标识码: A 文章编号: 1000 3096(2006) 05-0083-04

### 1 蛋白质组学的发展

随着 DNA 序列测定技术的飞速发展, 人类基因组(Human genome)的测序工作提前完成, 人们可以在很短的时间内获得某种生物基因组的全序列。到 2004 年 7 月, 已经有 173 种病毒和原核生物基因组的工作已经完成, 其中古细菌 19 种、真细菌 154 种(蓝藻 8 种), 与此同时一些更高等生物的基因组研究也取得了日新月异的进展。在后基因组时代, 生物学的中心任务是认识基因组的功能。但是, 人类对许多基因编码的蛋白质的功能所知甚少, 许多新的技术、新的手段将被用来阐明基因的功能, 虽然利用这些手段能够同时检测到成千上万个基因的表达, 但由于基因表达水平与蛋白质水平之间并不完全相关, 人们仍然得不到完整的信息。其解决办法之一是直接研究基因的产物——蛋白质, 即某一物种、个体、器官、组织乃至细胞的基因组所表达的全部蛋白质。对应于基因组, 人们称后者为蛋白质组。由于基因功能主要是通过其表达蛋白质来实现的, 要了解基因的全部信息, 必须深入研究不同基因编码的蛋白质, 因此蛋白质组学在生命科学研究中已具有重要的地位。

蛋白质组“proteome”是由 Wilkins 于 1994 年在意大利 Siena 的一次 2-DE(two dimensional gel electrophoresis)电泳会议上首次提出的。根据 Wilkins 等的定义, “蛋白质组”一词的英文是 PROTEOME 是由 PROTEINS 和 genOME 两个词组合而成, 意思是 proteins expressed by a genome, 即基因组表达的蛋白质。蛋白质组是高度动态的<sup>[1,2]</sup>, 研究以基因组编码的所有蛋白质的组成及其变化规律, 分析不同转录条件下蛋白表达的复杂性。

蛋白质组研究的重要优势在于能够从整体水平上分析不同条件下蛋白质谱的变化。与以往蛋白质

化学的研究不同, 蛋白质组研究的对象不是单一或少数蛋白质, 它着重的是全面性和整体性, 需要获得体系内所有蛋白质组分的物理、化学及生物学参数, 如等电点、分子质量、表达量等。蛋白质组学是对蛋白质多样性的系统性研究, 目的在于细致描述结构、功能和对个体生物学系统的控制<sup>[3]</sup>。总体上, 蛋白质组学主要的研究内容为: (1) 表达蛋白质组学(expression proteomics), 研究细胞或组织中蛋白质表达的质和量的变化, 以及不同时期的表达谱的改变等。(2) 功能蛋白质组学(functional proteomics), 研究在不同生理条件下细胞中各种蛋白质之间的相互作用关系及其调控网络, 以及蛋白质的转录后修饰等。(3) 结构蛋白质组学(structure proteomics), 以阐明生物大分子的三维结构特性为目的。

目前蛋白质组研究的三大基本支撑技术为双向电泳技术、计算机图像分析与大规模数据处理技术以及物质谱技术。利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)来分离复杂的蛋白质组分, 并利用专门的计算机软件对所得的图像进行数据采集和分析。然后采用氨基酸组成分析、微量蛋白质序列分析、物质谱分析等技术将从胶上回收的蛋白质斑点进行精细的鉴定, 获得有关蛋白质性质、表达变化及翻译后加工等方面的大规模信息<sup>[4]</sup>。

蛋白质组研究的发展以双向电泳技术作为核心。其最大优势在于它可以对细胞内复杂的蛋白质组分进行整体性的定量分析, 从而可以分析当条件变化时, 一系列蛋白质而不仅仅是某一蛋白质的表达变化。例如在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 人们已经

收稿日期: 2004 05 08; 修回日期: 2004 08 08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40206018)

作者简介: 钱方(1981), 女, 河北张家口人, 硕士研究生, 研究方向: 蓝藻蛋白质组学, E-mail: maplexm@163.com; 章军, 通讯作者, E-mail: jzhang@xmu.edu.cn



研究了碳、氮、磷及硫元素限制导致的细胞内蛋白质谱变化;在对营养成分磷限制的研究中,发现当磷饥饿时有 137 个蛋白质的合成速率明显改变,其中大部分(118 个)的表现为诱导合成,其他则被抑制<sup>[5]</sup>。

计算机图像分析包括斑点检测、背景消减、斑点配比和数据库构建。常用的软件系统包括 Quest、Lips、Hermes、Gemini 等。氨基酸组分分析和肽质指纹图谱(PMF)可鉴定由 2 DE 分离的蛋白,随着质谱技术的发展,生物质谱已经成为连接蛋白质与基因的重要技术。用来分析蛋白质和多肽的质谱主要是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)和电喷雾质谱(ESI/MS)。

最近也有一些新的方法可以测定全蛋白分子量的信息。Moini 等<sup>[6]</sup>报道了毛细管电泳及电喷雾质谱对大肠杆菌(*E. coli*)核糖体蛋白的亚细胞蛋白质组学。作者指出该方法对分析较复杂的蛋白混合物(约 50 种蛋白)很有效,并且质谱的精确性足以来鉴定许多蛋白的翻译后修饰,只需要测得的基因库预测的平均分子量。

蛋白质组数据库(proteome database)是蛋白质组学研究中的重要部分,包括所有鉴定的蛋白质信息。例如,SWISS-2DPAGE 数据库是 EXPASY 分子生物学服务器的一部分,通过万维网的 URL 网址可以查询。Yeast Protein Localization database(YPLdb)是酵母蛋白定位数据库,含有由显微分析得到的酵母蛋白定位图谱信息<sup>[7,8]</sup>。

## 2 蛋白质组技术在赤潮藻研究上的应用

近年来,全球气候日渐变暖,人类赖以生存的生态环境正在受到这一气候变化的严重威胁。另外随着人口和经济的快速增长,沿海地区对自然资源掠夺式利用和沿海环境退化的危机日益加剧,一个突出的结果就是赤潮严重。赤潮已成为当今世界性的海洋灾害,正严重干扰着 30 多个沿海国家的经济发展。赤潮发生的原因尚未完全查明,之前的研究多从理化环境的变化分析,初步认为与气候、海温、盐度、营养盐 and 环境污染等多种因素有关。从 1990 年以来,我国赤潮研究开展了包括:赤潮甲藻孢囊的生理生态及生活史、赤潮微型甲藻识别新技术、赤潮种群生态动力学;赤潮生消过程、成因和机理;赤潮藻种间及藻菌相互作用;赤潮毒素及产毒、致毒机理,赤潮的生物、化学治理方法,赤潮的生态数值模拟及围隔生态系实验应用研究等<sup>[9]</sup>。

中国已报道的赤潮藻有 60~70 种<sup>[10]</sup>,以甲藻居

多,其中以裸甲藻类(*Gymnodiniales*)及多甲藻类(*Peridinales*)为多。硅藻、定鞭藻、针胞藻和蓝藻中的一些种类也是在中国常见的赤潮藻种,如中肋骨条藻(*Skeletonema costatum* (Grev) Cleve)、球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)等。

除了从宏观角度用物理化学手段进行赤潮研究外,还必须从微观角度来寻找答案,特别是从赤潮藻细胞分子水平进行研究。国内外已开始用分子生物学的手段对一些典型的赤潮藻种进行研究,比较多的研究集中在藻种的分子鉴定上,但对赤潮藻藻种的基因表达调控研究不够,比如藻种在不同阶段的基因表达情况密切影响着赤潮藻的生长和产毒情况,因为有些藻种只有在爆发时才具有毒性。另外,已知水体富营养化是赤潮生物爆发的必要条件,先前的研究主要是从理化性质的改变及环境条件的影响方面研究赤潮的,人们已研究了一些赤潮藻藻种在不同浓度的 N、P 以及温度、光照、pH 等条件下其生长的生理生态变化,但其功能基因表达调控的内在分子机理还未深入了解。

基于分子生物学技术的飞速发展,一些学者开始运用蛋白质组学的手段首先研究了集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC6803 在不同条件下的蛋白质组差异<sup>[11]</sup>。Sazuka 等<sup>[12]</sup>用双向电泳技术研究了它的全部蛋白质,并对 234 个蛋白质斑点进行 N-末端测序。Choi 等<sup>[13]</sup>对集胞藻 PCC6803 光诱导蛋白质进行了蛋白质组分析,用双向电泳分别分析光培养和暗培养条件下藻细胞中提取的可溶蛋白质;将光诱导蛋白质斑点电转移到 PVDF 膜上用 N 末端 Edman 测序,与 CyanoBase 数据库进行分析比较。他们的结果表明,8 种蛋白质与光合作用及呼吸作用有关(RbcS/L, CbbA, Gap2, AtpB, CpcB, PsbO, PsbU);细胞的过程加工涉及到 4 种蛋白质(SodB, DnaK, GroEL2, Tig);还有两种蛋白质功能未知。Simon 等<sup>[14]</sup>选用窄 pH 范围(pH 4.5~5.5)的胶,通过 MALDI 及数据库分析了聚胞藻属(*Synechocystis*)的可溶蛋白,从而奠定了研究胁迫处理时蛋白组变化的基础。总共分析了 192 种蛋白,鉴定了 105 种,其中 37 种在以前的 2DE 胶上没有看到过。Wang 等<sup>[15]</sup>通过双向电泳分离了集胞藻 PCC6803 类囊体膜的外周蛋白 200 多种,用肽质指纹质谱分析了 116 种,鉴定了来自 51 个基因的 78 种蛋白。Lindahl 等<sup>[16]</sup>介绍了一种利用蛋白质组学的方法分离含半胱氨酸的蛋白的技术。从集胞藻 PCC6803 的双向图谱中分离了大约 60 种



含半胱氨酸的不同蛋白。

Pandey 等<sup>[17]</sup>利用双向电泳研究了聚球藻(*Syrinechococcus* sp.) PCC7942 在不同光谱下蛋白质组的差异。比较分析了藻细胞在蓝光(450 nm)、红光(660 nm)和白光(400~700 nm)下的蛋白质表达图谱。在体内用 35S 荧光标记细胞后用双向电泳分析,结果显示,对黑暗适应的细胞有 8 种多肽是特有的,对蓝光有 10 种是特异的,红光诱导下有 4 种特殊蛋白质合成。这说明,在多种光源快速处理时,黑暗、蓝光和红光诱导下会合成新的多肽。

Wolfe 等<sup>[18]</sup>研究了在等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)中热休克蛋白(heat shock proteins, hsp)在逆境中的诱导。他们用 35S 标记氨基酸、双向电泳和 western blot 鉴定证实了 hsp60 是分子伴侣家族的一员,在等鞭金藻中用热激可以有效地诱导。在梯度环境温度下,用 SDS-PAGE、hsp60 抗体做 western blot 及荧光检测来定量 hsp60。等鞭金藻在盐度为 22 时不同温度下(25, 30, 35°C)诱导 1 h 后 hsp60 比 20°C 时有明显的增加,但在盐度为 34 时, hsp60 随着温度的增加却没有明显的变化。

铜盐是一种杀藻剂, Lage 等<sup>[19]</sup>用蛋白质电泳分析了铜盐毒性对闪光原甲藻(*Prorocentrum micans*)的影响。在培养基中加入 3.94  $\mu\text{mol/L}$  的铜离子使藻细胞培养 14 d 后可溶总蛋白质减少 36%, 明显抑制藻细胞生长的铜离子的最高浓度是 7.87  $\mu\text{mol/L}$ 。

Huttenlauch 等<sup>[20]</sup>报道了强壮前沟藻(*Amphidinium carterae*)膜骨架中两种不同类的骨架蛋白。运用分子生物学技术挑选多克隆和单克隆抗体用来分析甲藻中两种骨架蛋白。双向电泳图谱清晰地表明两种抗体可以识别不同的多肽。

赤潮藻藻种的蛋白质组研究还处于起步阶段,相关资料并不多。在其他藻种的研究中运用蛋白质组学的方法也有一些报道。

Hippler 等<sup>[21]</sup>利用膜蛋白质复合物的功能蛋白质组学方法研究分析了莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)类囊体的膜蛋白。数据表明捕光蛋白复合物(light harvesting complex proteins, LHCP)有 3 个跨膜域,并且鉴定了 30 多种不同的 LHCP 蛋白点。利用 2-DE 图谱鉴定了 PSI 不完善和 *crd1* 突变的种类,前者有很多 LHCI 蛋白存在而后者却没有。Rexroth 等<sup>[22]</sup>运用双向电泳及 MALDI-MS 技术研究了莱茵衣藻在改变培养条件下经洋地黄皂苷溶解的类囊体膜蛋白。在光合自养条件下,光合系统 I (PSI) 两种蛋白( $M_r = 83.2 \text{ ku}$ ,  $pI = 7.02$ ;  $M_r = 82.1 \text{ ku}$ ,  $pI = 6.53$ )都表达了,而在光混合营养时只有一种蛋白( $M_r = 82.1 \text{ ku}$ ,  $pI = 6.53$ )表达。Lemaire 等<sup>[23]</sup>用蛋白质组学的方法从莱茵衣藻中鉴定了新的硫氧还蛋白。鉴定出的 55 个靶蛋白中,29 个在较高等的

集胞藻属中已经发现过,其他的 26 个是新的靶蛋白。

在氧胁迫环境中,雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)生长快速的绿色动鞭毛可以转化为增大的红色休眠孢子。Wang 等运用双向电泳、成像分析、MALDI-TOF/PSD 质谱分析及序列数据库查询研究了氧胁迫下细胞全蛋白的表达。结果表明,氧胁迫下共鉴定 71 种蛋白以不同形式表达,多数是由于其抗氧化作用而成的。其中一小部分是已经鉴定的酶(如 GST、TRX),在胁迫下表达量提高了,而且在胁迫环境中可以持续 6 d 保持高表达量。相反,一些已鉴定的蛋白,尤其是光合作用和线粒体呼吸作用中的蛋白,在一段时间内有一个瞬时表达然后恢复正常表达水平。但是,多数已鉴定蛋白,尤其是 SOD, CAT 和过氧化物酶家族成员有一个短暂的高表达量,在之后 6 d 胁迫处理中恢复低表达量。另外,一些参与 AOS 净化途径的蛋白(如 AOX)在胁迫时有瞬间的额外表达。

### 3 存在的问题及展望

目前运用蛋白质组技术分离藻类尤其是赤潮藻特异蛋白质的研究还处于初级阶段。由于赤潮发生是多方面原因引起的,研究常见的赤潮藻种在特定环境中的蛋白质组差异,从中寻找出有价值的蛋白质分子水平上的差异,这对一些赤潮的防治和治理具有重要意义。在现有的理化性质环境因素影响的研究上结合蛋白质组等分子机制的探索,相信将会更有效地防治和治理赤潮发生。

蛋白质组技术在赤潮藻研究中的应用潜力非常巨大,但也存在一些不足。蛋白质分析技术尚无一种类似基因分析中 PCR 扩增的技术使得低丰度蛋白质得以大量扩增进行分析;同时,低丰度蛋白质通常被高丰度蛋白质掩盖而很难分离。另外,由于对极端酸性、碱性和难溶性蛋白质的分离和鉴定仍很困难,因而许多重要的有价值的蛋白质信息可能会丢失。

集胞藻 PCC6803 的基因组全序列已经完成,为其蛋白质组的研究提供了很好的背景,所以目前报道的比较多的是集胞藻 PCC6803,藻细胞的全蛋白(234 种)已经在 2DE 图谱中分离并鉴定,在网站(<http://www.kazusa.or.jp/tech/sazuka/cyano/proteome.html>)中可以查到详细资料。但关于藻类的蛋白质组数据库还很有限,随着更多藻种的基因组序列的完成,其蛋白质组研究也将得到长足发展。因此,不仅要进一步丰富和发展蛋白质组研究技术,增加其敏感性、稳定性、可重复性和特异性,还需要将基因表达技术以及生物信息学分析结合在一起,获得这些赤潮藻在不同生长阶段和不同生长环境中多种特异蛋白质的表达、功能以及相互作用等信息,从分子调控水平上阐明其爆发机理,希望能发现赤潮爆发时的标示



物,即很有可能是某(或几)种特异蛋白质或酶,那么人们就可以根据这些标示物的有无或多少来预报赤潮的发生,并可能通过抑制该标示物的产生从而抑制赤潮的发生。

## 参考文献:

- [1] Anderson N L, Matheson A D, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2000, 11:408-412.
- [2] Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. **Trends Biotechnol**, 1999, 7(3): 121-127.
- [3] Scott D, Patterson, Ruedi H. Proteomics: the first decade and beyond [J]. **Nature Genetics Supplement**, 2003, 33(3): 311-323.
- [4] Lahm H W, Langen H. Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels [J]. **Electrophoresis**, 2000, 21: 2105-2114.
- [5] Vanbogelen R A, Olson E R, Wanner B L, *et al.* Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli* [J]. **J Bacteriol**, 1996, 178(15): 4344-4366.
- [6] Moini M, Huang H. Application of capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry to subcellular proteomics of *Escherichia coli* ribosomal proteins [J]. **Electrophoresis**, 2004, 25(13): 1981-1987.
- [7] Sanchez J C, Appel R D, Hochstrasser D F. Inside SWISS 2DPAGE database [J]. **Electrophoresis**, 1995, 16: 1131-1151.
- [8] Tonella L, Walsh B J, Hochstrasser D F, *et al.* 98 *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database update [J]. **Electrophoresis**, 1998, 19: 1960-1971.
- [9] 周名江, 朱明远, 张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展 [J]. **生命科学**, 2001, 13(2): 54.
- [10] 齐雨藻. 中国藻类学研究 [M], 武汉: 武汉出版社, 2001. 152-177.
- [11] Sazuka T, Ohara O. Towards a proteome project of cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: linking 130 protein spots with their respective genes [J]. **Electrophoresis**, 1997, 18: 1252-1258.
- [12] Sazuka T, Yamaguchi M, Ohara O. Cyano2Dbase updated: linkage of 234 protein spots to corresponding genes through N-terminal microsequencing [J]. **Electrophoresis**, 1999, 20: 2160-2171.
- [13] Choi J S, Kim D S, Lee J, *et al.* Proteome analysis of light induced proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of proteins separated by 2D-PAGE using N-terminal sequencing and MALDI-TOF MS [J]. **Mol Cells**, 2000, 10(6): 705-711.
- [14] Simon W J, Hall J J, Suzuki L, *et al.* Proteomic study of the soluble proteins from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using automated matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight peptide mass fingerprinting [J]. **Proteomics**, 2002, 2: 1735-1742.
- [15] Wang Y, Sun J, Chitnis P R. Proteomic study of the peripheral proteins from thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. **Electrophoresis**, 2000, 21: 1746-1754.
- [16] Lindahl M, Francisco J. Systematic screening of reactive cysteine proteomes [J]. **Proteomics**, 2004, 4: 448-450.
- [17] Pandey R, Chauhan S, Singhal G S, *et al.* Spectral light quality affects protein profile of *Synechococcus* sp. PCC 7942: A comparative 2-Dimensional gel electrophoresis analysis [J]. **Current Microbiology**, 2000, 40: 297-301.
- [18] Wolfe M F, Olsen H E, Gasuad K A, *et al.* Induction of heat shock protein (hsp) 60 in *Isochrysis galbana* exposed to sublethal preparations of dispersant and Prudhoe Bay crude oil [J]. **Marine Environmental Research**, 1999, 47: 473-489.
- [19] Lage O M, Parente A M, Salema R. Electrophoretic analysis of polypeptides of *Prorocentrum micans* Ehrenberg exposed to toxic levels of copper [J]. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 1994, 84: 107-112.
- [20] Huttenlauch I, Peck R K, Stick R. Articulins and epiplasmins: two distinct classes of cytoskeletal proteins of the membrane skeleton in protists [J]. **Journal of Cell Science**, 1998, 111: 3367-3378.
- [21] Hippler M, Klein J, Fink A, *et al.* Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **The plant Journal**, 2001, 28: 595-606.
- [22] Rexroth J, Meyer J M W, Krause F, *et al.* Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome [J]. **Electrophoresis**, 2003, 24: 2814-2823.
- [23] Lemaire S D, Guillon B, Marechal P L, *et al.* New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Plas**, 2004, 101: 7475-7480.

(本文编辑:张培新)