

双向电泳结合质谱初步分析蛇岛蝮蛇毒蛋白质组

马 驰 刘淑清[#] 宗军卫 袁章利 孙明忠^{*}

吴玉群 李建立 孙立新 郑庆印

(大连医科大学临床医学系 大连 116044; 大连医科大学生化与分子生物学教研室 大连 116044;
大连医科大学基础医学院生物技术系 大连 116044; 辽宁蛇岛老铁山自然保护区管理处 大连 116041;
凯斯西保留地大学医学院 克利夫兰 44106 美国)

摘要: 采用荧光染料(Cy5)标记中国辽宁蛇岛蝮(*Gloydius shedaoensis shedaoensis*, GSS)蛇毒(snake venom, SV, GSS-SV)蛋白质,获得了该蛇毒的双向十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D SDS-PAGE)图谱,经DeCyder软件分析,分辨出1 000多个蛋白点,分子量范围在10~150 ku间,等电点在4~7的蛋白质点占78.8%。凝胶后染色(post-staining)采用蛋白荧光染料Deep Purple,选取的5个蛋白点经胶内酶解,产生的肽段经高效液相色谱-电喷雾串联质谱(high performance liquid chromatography/HPLC-electro-spray ionization tandem mass spectrometry/ESFMS/MS, HPLC-ESFMS/MS)进行序列测定,质谱数据经Sequest Bioworks软件分析,为蛇毒L-氨基酸氧化酶、金属蛋白酶、类凝血酶、纤溶酶原激活物和磷脂酶A₂的同源蛋白。本研究采用的荧光标记2D SDS-PAGE结合HPLC-ESFMS/MS的技术适于高通量研究蛇毒蛋白组成。

关键词: 蛇岛蝮; 蛇毒; 双向电泳; 高效液相色谱; 电喷雾质谱

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)04-70-08

Proteomic Analysis of *Gloydius shedaoensis shedaoensis* Venom by Two-dimensional Electrophoresis Combined to High Performance Liquid Chromatography-electro-spray Ionization Tandem Mass Spectrometry: a Preliminary Study

MA Chi LIU Shu-Qing[#] ZONG Jun-Wei YUAN Zhang-Li SUN Ming-Zhong^{*}
WU Yu-Qun LI Jian-Li SUN Li-Xin ZHENG Qing-Yin

(Department of Clinic Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044;

Department of Biochemistry & Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116044;

Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044;

Administrative Division of the National Snake Island and Laotieshan Mountain Natural Conservation, Dalian 116041, China;

Case Western Reserve University Medical School, Cleveland, Ohio 44106, USA)

基金项目 大连医科大学大学生科研活动资助项目,辽宁省自然科学基金项目(No. 2008S077),大连科技厅资助项目(No. 2008J22JH014)和辽宁省百千万人才工程资助项目(No. 2008921069);

***通讯作者**, E-mail: mxs288@gmail.com;

第一作者介绍 马驰,男,临床硕士连读生;研究方向:蛇毒活性物质纯化表征; E-mail: much258@gmail.com;

共同第一作者 刘淑清,女,博士,副教授;研究方向:生物化学及分子生物学; E-mail: lssqsnz@gmail.com.

收稿日期: 2009-01-16, **修回日期:** 2009-04-23

Abstract: The protein components contained in the snake venom of *Gloydius shedaoensis shedaoensis* (GSS-SV) were labeled with the fluorescent dye of Cy5. Then, the two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE) profile of GSS-SV proteome was obtained. Gel image analysis by DeCyder software resolved over 1 000 protein spots with the apparent molecular weights ranging between 10 and 150 ku on the gel. The protein spots with the pI ranging between 4 and 7 covered about 78.8 % of the overall protein spots detected by the 2D SDS-PAGE. Post-staining of the gel was performed by a high sensitive fluorescent dye, Deep Purple. Five protein spots were excised from the gel and digested by trypsin in-gel. The tryptic peptides were separated by high performance liquid chromatography (HPLC) and subsequently sequenced by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). The mass spectrometry data were searched against the NCBI database through the software of Sequest Bioworks for protein identifications. The above mentioned five gel spots were identified as the snake venom L-amino acid oxidase, metalloproteinase, thrombin-like enzyme (salmobin), plasminogen activator and phospholipase A₂, respectively. The results prove that the proteomic techniques based on two-dimensional electrophoresis, protein fluorescent labeling technique and HPLC-ESI-MS/MS can be utilized in the analysis of protein components in the snake venom complex at high throughput level.

Key words: *Gloydius shedaoensis shedaoensis*; Snake venom; Two-dimensional electrophoresis; High performance liquid chromatography; Electrospray ionization tandem mass spectrometry

蛇毒中富含酶和蛋白质,从各类蛇毒中得到的具有生物和药理活性的酶及蛋白质^[1,2]已经被广泛应用于脂质代谢、生物膜磷脂结构、脂蛋白结构与功能的研究^[3,4]、降解纤维蛋白原、溶解纤维蛋白、治疗中风和血液栓塞疾病^[5~9]、研发抗菌消炎、抗微生物^[10~12]、抗肿瘤及艾滋病活性物质^[11,13]。蛇毒组成因蛇种差异而差别较大,同种蛇毒因为产地不同也有差异^[14~19]。搞清某种蛇毒中所含蛋白种类,建立其蛋白质库,有助于推进蛇毒的理论和应用研究。

双向电泳和蛋白荧光染色技术与质谱结合的蛋白质组学研究手段,使高通量分离蛇毒蛋白质组成为现实。目前研究侧重于蛇毒比较蛋白质组学^[14~20],包括西部菱背响尾蛇(*Crotalus atrox*)^[14,19]、美洲矛头蝮(*Bothrops jararaca*)^[14,19]、加蓬咝蝰(*Bitis gabonica gabonica*)^[17]、眼镜蛇(*Naja naja atra*)^[16]和江浙蝮蛇(*Agkistrodon halys*)^[16]蛇毒的研究。蛇岛蝮(*Gloydius shedaoensis shedaoensis*, GSS)为我国特有蝮蛇种类,但蛇岛蝮蛇毒(GSS-SV)基础研究匮乏,仅有关于磷脂酶 A₂ 和类凝血酶的报道^[21,22]。本研究采用蛋白荧光染料结合 2D SDS-PAGE 获得了 GSS-SV 的双向电泳图谱,Deep Purple 凝胶后染色的个别蛋白点经 HPLC-ESI-MS/MS 分析,完

成蛋白鉴定,为 GSS-SV 高通量蛋白质组学研究奠定了一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 GSS-SV 干粉由辽宁蛇岛老铁山自然保护区管理处提供; Cy5 蛋白荧光标记染料、2D-Quant 蛋白浓度试剂盒、Deep Purple 蛋白荧光染料、尿素、硫脲、固相 pH 梯度(IPG)缓冲液、溴酚蓝、IPG 胶条(24 cm, 3~10 NL; 24 cm, 4~7)、载体两性电解质、二硫苏糖醇(DTT)、溴酚蓝、碘乙酰胺(IAA)、碳酸氢铵等购于 GE Health Care 公司; 十二烷基硫酸钠、甘氨酸、芥子酸、甲酸(99%)购于 Sigma 公司; 测序级胰蛋白酶购于 Promega 公司; HPLC 纯度水和乙腈购自美国 Brodick Johnson 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器 IPG phor 等电聚焦系统、Ettan Dalt 6 电泳系统、EttanTM 多维液相色谱系统、Typhoon 9400 激光共聚焦扫描仪、DeCyder 6.5 图像分析软件、EttanTM 自动切胶仪为 GE Health Care 产品; 纳升 C18 柱(75 μm × 15 cm)为美国 Dionex 公司产品; 电喷雾电离串联质谱仪、TurboSequest Bioworks 蛋白鉴定软件为美国 Thermo Finnigan 公司产品。

1.3 双向凝胶电泳

1.3.1 蛋白荧光标记及样品制备 采用最小标记法,按文献方法^[23,24]用 400 pmol 的 Cy5 标记 50 μ g GSS-SV 蛋白,然后将标记样品溶于新配制的二甲基甲酰胺中,在室温,暗室中反应 30 min 后,加入 10 nmol 赖氨酸,冰浴避光 10 min 终止反应。未标记的 GSS-SV 蛋白 450 μ g 与标记蛋白混合,再与等体积 2 倍缓冲液混合(2 %载体两性电解质、2 %DTT + 7 mol/L 尿素 + 2 mol/L 硫脲 + 4 % 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS) + 2 % IPG 缓冲液),然后再与 IPG 泡涨液(20 mmol/L DTT + 7 mol/L 尿素 + 2 mol/L 硫脲 + 2 % CHAPS + 1 % IPG 缓冲液)混合,使各胶上样液总体积为 450 μ l。

1.3.2 GSS-SV 的双向凝胶电泳

1.3.2.1 第一向 pH 梯度等电聚焦 电泳时温度为 20 $^{\circ}$ C,最大电流为 0.05 mA/gel。在 30 V 水化 12 h; 300 V 除盐 3 h; 300 ~ 600 V 线性升压至 1 350 V \cdot h; 600 ~ 1 000 V 线性升压至 2 400 V \cdot h; 1 000 ~ 8 000 V 线性升压至 13 500 V \cdot h; 在 8 000 V 保持聚焦,待总电压时间累积至 56 000 V \cdot h 时结束等电聚焦。

1.3.2.2 第二向 SDS-PAGE 电泳 取出胶条在 20 ml 平衡液 A (6 mol/L 尿素 + 50 mmol/L Tris-HCl + 30 % 甘油 + 2 % SDS + 1 % DTT, pH 8.0) 中平衡 15 min, 再在 20 ml 平衡液 B (用 4.5 % IAA 替换 A 中 1 % DTT) 中平衡 15 min。将胶条转入 12.5 % 分离胶面上段,进行 SDS-PAGE 分离。起始设置恒定功率 0.2 W/gel 分离 1 h; 然后 0.4 W/gel 分离 1 h; 最后以恒定功率 1.8 W/gel 分离 15 h。

1.3.2.3 图像获取及分析 采用 Typhoon 9400 激光共聚焦扫描仪获取凝胶图像, Cy5 的激发光和发射光波长分别为 633 nm 和 670 nm, 图像文件用 DeCyder 6.5 软件分析。凝胶后染色采用 Deep Purple 染色剂, 凝胶首先在 1 L 固定液 (7.5 % 乙酸 + 10 % 甲醇) 固定过夜, 接着用 750 ml 漂洗液 (2.94 g 碳酸氢钠 + 31.8 g 碳酸钠 + 750 ml 水) 震荡 30 min, 弃去液体, 然后在 500 ml Deep Purple 溶液 [Deep Purple 溶液 : 三蒸水 = 1

200 (v/v)] 中在室温、震荡和避光条件下染色 1 h, 最后倒掉染色液, 并用 0.5 L 7.5 % (v/v) 乙酸在避光、震荡条件下洗胶两次后扫描成像。

1.4 蛋白质点胶内胰蛋白酶酶解 蛋白凝胶颗粒用 25 mmol/L 碳酸氢铵、100 % 乙腈分别洗 2 次, 每次 10 min; 接着在 56 $^{\circ}$ C 用 10 mmol/L DTT 温育 45 min, 然后用 55 mmol/L IAA 室温、黑暗处浸泡胶粒 45 min; 重复用 25 mmol/L 碳酸氢铵、100 % 乙腈分别洗胶粒 2 次; 最后胶粒在 37 $^{\circ}$ C 用胰蛋白酶酶解 16 h, 以 50 % 乙腈和 0.1 % 甲酸反复提取液体 2 次^[5,8,9,23,24]。收集酶解肽段干燥浓缩, 备质谱分析用。

1.5 蛋白质的 HPLC-ESI/MS/MS 鉴定

1.5.1 HPLC-ESI/MS/MS 条件 HPLC 流动相 A: 5 % 乙腈, 94.9 % 水, 0.1 % 甲酸; 流动相 B: 95 % 乙腈, 4.9 % 水, 0.1 % 甲酸。梯度洗脱: 0 ~ 40 min, 0 ~ 80 % B; 40 ~ 45 min, 80 % ~ 95 % B; 柱流速 200 μ l/min。

nESI/MS/MS 条件: 正离子模式, m/z 范围 400 ~ 1 700。毛细管电压: 39.5 V, 源温度 200 $^{\circ}$ C, 碰撞气体为 He 气, 碰撞能量为 35 %, 锥孔电压为 4.50 kV, 喷雾流速为 200 nl/min。

1.5.2 蛋白鉴定参数设置 蛋白酶解后的肽段混合物先经 C18 柱分离, nESI/MS/MS 获得相应肽段的一级质谱和二级质谱信息。蛋白鉴定通过 TurboSequest Bioworks 软件检索 NCBInr 数据库完成。检索参数设定: Xc 值单电荷时为 1.9, 2 个电荷时为 2.5, 3 个电荷为 3.0; 蛋白检出可能性 (protein probability) 小于 10^{-3} 。肽片段质量误差为 ± 1.6 u; MS/MS 最大误差为 ± 0.8 u。

2 结 果

2.1 蛇岛蝮蛇毒的双向电泳

2.1.1 pH 3 ~ 10 的 GSS-SV 双向电泳 GSS-SV 经 pH 范围为 3 ~ 10 NL 的 24 cm 胶条等电聚焦后, 其 Cy5 标记的 12.5 % SDS-PAGE 凝胶图像见图 1。图 1A 是扫描后所得图像, 图 1B 是经 DeCyder 软件分析后的图像, 每一个被不规则圆圈标记点为软件分辨出的蛋白质胶点, 分辨出

1 270个点。其中大部分点分布在 pH 4~7 范围内,本研究同时得到了 GSS-SV 在 pH 4~7 间的

双向电泳图谱,分离效果更好。

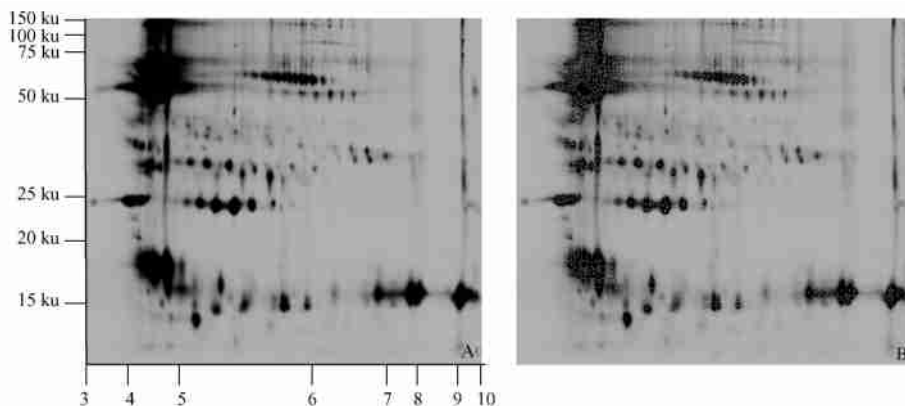


图 1 GSS-SV 的 2D SDS-PAGE (12.5%) 电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE (12.5%) electrophoresis of crude GSS-SV

A. 扫描图像; B. DeCyder 软件处理图像。

A. Scanned gel image; B. Gel image processed by DeCyder Software.

2.1.2 pH 4~7 的 GSS-SV 双向电泳 GSS-SV 经 pH 4~7 的 24 cm 胶条等电聚焦后,其 Cy5 标记的凝胶图像如图 2A 所示,DeCyder 软件可分辨出的蛋白质点有 1 001 个。

2.1.3 双向凝胶电泳的后染色 图 2B 是 GSS-SV 在 pH 4~7 间双向凝胶电泳的 Deep Purple

后染色图谱,蛋白质点的分布模式与 Cy5 显色获得的凝胶图像(图 2B)一致,说明完全可以通过前者获得的凝胶图像进行数据分析及蛋白胶点的切取。图 2B 中数字 1、2、3、4 和 5 为标记蛋白,经自动切胶仪取点后进行质谱鉴定。

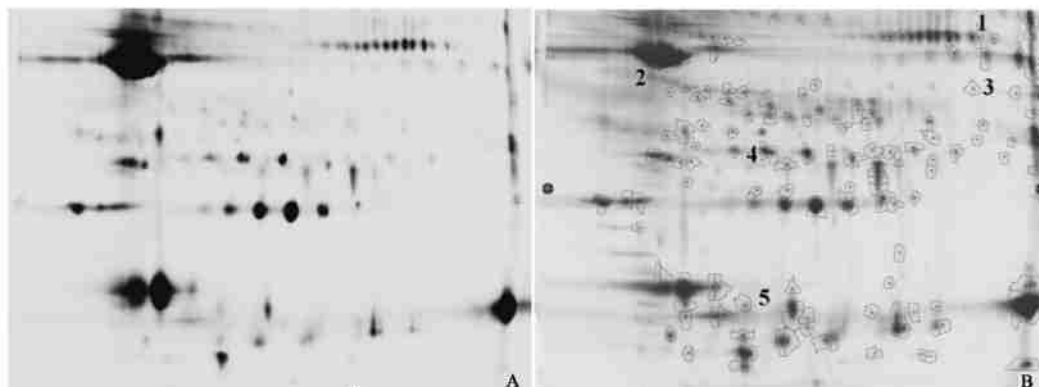


图 2 GSS-SV 的 2D SDS-PAGE (12.5%, pH 4~7) 电泳及凝胶后染色图谱

Fig. 2 Gel image and gel image acquired by post-staining for 2D SDS-PAGE (12.5%, pH 4 - 7) of GSS-SV

A. Cy5 显色图像; B. Deep Purple 显色图像。

A. Cy5 represented gel image; B. Deep Purple represented gel image.

2.2 蛋白 HPLC-ESI/MS/MS 鉴定 从 2D SDS-PAGE 上切取 5 个蛋白质点 1、2、3、4 和 5 经胶内酶解后进行 HPLC-ESI/MS/MS 分析。质

谱数据经 Bioworks 软件搜索 NCBInr 数据库分别鉴定为其他蛇毒来源的 L-氨基酸氧化酶、金属蛋白酶、类凝血酶 (salmobin)、纤溶酶原激活

物和磷脂酶 A₂。表 1 给出了这 5 个蛋白质点详细的鉴定结果,包括:同源蛋白来源(蛋白序

列号(GI#))及名称、匹配肽段的序列、肽段质量数、肽段所带电荷数和肽段检出可能性。

Reference: gi|2460031|gb|AAB71847.1| phospholipase A2 [Glyodius halys]
Database: C:\Xcalibur\database\nr_20060707.fasta
Number of Amino Acids: 124 Monoisotopic MW: 13793.1 pI: 4.85

--	--	--	--	--

Protein:

NLLQFEKMIK KMTGKEPVVS YAFYGCYCGS GGQGKPKDAT DRCCFVHDCC
YGKVTGCDPK **MDVYSFSEEN** **GDIVCGGDDP** **CKKEICECDR** AAAICFRDNL
NTYNDKKYWA FGAKNCPQEE SEAC

Protein Coverage:

Sequence	MH+	% Mass	AA	% AA
PKDATDRCCFVHDCCYVK	2060.84	14.94	36 - 53	14.52
MDVYSFSEENGDIVCGGDDPCK	2379.94	17.25	61 - 82	17.74
MDVYSFSEENGDIVCGGDDPCKK	2508.04	18.18	61 - 83	18.55
EICECDR	867.33	6.29	84 - 90	5.65
AAAICFR	751.39	5.45	91 - 97	5.65
DNLNTYNDK	1096.49	7.95	98 - 106	7.26
DNLNTYNDKK	1224.59	8.88	98 - 107	8.06
KYWAFGAK	970.51	7.04	107 - 114	6.45
YWAFGAK	842.42	6.11	108 - 114	5.65
Totals:	3713.60	26.92	33	26.61

A

Reference: gi|28948590|pdb|1M8S|A Chain A, Crystal Structures Of Cadmium-Bin
Database: C:\Xcalibur\database\nr_20060707.fasta
Number of Amino Acids: 124 Monoisotopic MW: 13933.1 pI: 4.66

--	--	--	--	--

Protein:

SILVQFETLIM KVAKSGMQW YSNYGCYCGW GGQGRPDAT DRCCFVHDCC
YGKVTGCDPK **MDVYSFSEEN** **GDIVCGGDDP** **CKKEICECDR** AAAICFRDNL
NTYNDKKYWA FGAKNCPQEE SEPC

Protein Coverage:

Sequence	MH+	% Mass	AA	% AA
PQDATDRCCFVHDCCYVK	2060.81	14.79	36 - 53	14.52
MDVYSFSEENGDIVCGGDDPCK	2379.94	17.08	61 - 82	17.74
MDVYSFSEENGDIVCGGDDPCKK	2508.04	18.00	61 - 83	18.55
EICECDR	867.33	6.23	84 - 90	5.65
AAAICFR	751.39	5.39	91 - 97	5.65
DNLNTYNDK	1096.49	7.87	98 - 106	7.26
DNLNTYNDKK	1224.59	8.79	98 - 107	8.06
KYWAFGAK	970.51	6.97	107 - 114	6.45
YWAFGAK	842.42	6.05	108 - 114	5.65
NCPQEESEPC	1135.40	8.15	115 - 124	8.06
Totals:	3713.60	26.65	33	26.61

B

图 3 蛋白质点 5 的质谱鉴定结果

Fig. 3 Protein identification result for protein spot 5

匹配肽段在 A. 中亚蝮和 B. 乌苏里蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 中的匹配; 最上边行中灰色标记部分是被分析蛋白与对比蛋白相匹配部分, 氨基酸序列中深色标记部分是上述匹配肽段的具体序列。

The distributions of matched peptides in the phospholipase A₂ from A. *Glyodius halys* and B. *Glyodius ussuriensis* snake venoms. The parts marked in grey are the matched peptides in the analyzed protein vs the matched homolog protein; The amino acid residues highlighted in deep colour are the amino acid sequences for the above matched peptides.

以蛋白质点 5 为例来说明质谱鉴定过程,其被鉴定为磷脂酶 A₂,与中亚蝮蛇毒及乌苏里蝮蛇毒来源蛋白序列号(GI#)为 2460031(图 3A)和 28948590(图 3B)的磷脂酶 A₂ 有同源性。经串联质谱鉴定得到的肽段有 DNLNTYNDKK, MDVYSFSEENGDIVCGDDPCKK 和 MDVYSFSEE-

NGDIVCGDDPCK,结果见表 1。图 3A 和图 3B 给出了质谱鉴定肽段在磷脂酶 A₂ (2460031)和 (28948590)序列中匹配情况,包括测得肽段的质量数、在同源蛋白序列中的位置、所占匹配同源蛋白的氨基酸覆盖率。

表 1 蛋白质点的鉴定结果

Table 1 Protein identification results for the selected protein spots				
样品 Sample	鉴定的肽段及序列 Peptide and Sequence	质量数 Mass (MH ⁺)	电荷数 Charges	检出几率 Probability
1	L-氨基酸氧化酶 L-amino acid oxidase			1.03 ×10 ⁻¹⁰
	VTVVYQTPAK	1 105.63	2	7.48 ×10 ⁻⁶
	RFDEIVGGM [#] DK	1 282.61	2	5.38 ×10 ⁻⁵
	HDDIFAYEK	1 137.52	2	2.34 ×10 ⁻⁶
	SAQQLYEESLGK	1 281.63	2	1.11 ×10 ⁻⁵
	NHLEEC [*] FR	1 064.51	2	3.04 ×10 ⁻³
	IYFAGEHTAEAHGWIDSTIK	2 246.09	3	1.03 ×10 ⁻¹⁰
2	金属蛋白酶 Metalloproteinase			3.11 ×10 ⁻¹⁴
	IPC [*] APEDVK	1 028.54	2	4.97 ×10 ⁻⁴
	ESMSEC [*] DPAEHC [*] TQQSSEC [*] PADVFEHK	2 995.25	3	4.46 ×10 ⁻⁴
	ITVTPNVDDILSSFAEWR	2 051.01	2	3.11 ×10 ⁻¹⁴
3	类凝血酶 Salmobin			5.49 ×10 ⁻¹¹
	LLC [*] AGILEGGIDSC [*] HR.D	1 770.92	2	9.83 ×10 ⁻⁶
	THLC [*] GGILINQEWLTAHC [*] DR	2 562.28	3	5.49 ×10 ⁻¹¹
	DSGGFLIC [*] NQQFGIVSWGR	2 148.06	2	1.05 ×10 ⁻¹⁰
4	纤溶酶原激活物 Plasminogen activator			2.01 ×10 ⁻¹³
	DKDIMLIR	1 003.56	2	4.64 ×10 ⁻³
	NFQM [#] LFGVHSK	1 323.65	2	4.08 ×10 ⁻⁴
	SHAGNTAVTC [*] PP	1 300.69	2	4.66 ×10 ⁻⁴
	NFQMLFGVHSK	1 307.66	2	8.20 ×10 ⁻⁶
	AAYPVLLAGSSILC [*] AGTQQGGK	2 150.12	2	2.01 ×10 ⁻¹³
5	磷脂酶 A ₂ Phospholipase A ₂			1.08 ×10 ⁻¹⁰
	DNLNTYNDKK	1 224.59	2	4.71 ×10 ⁻³
	M [#] DVYSFSEENGDIVC [*] GGDDPC [*] KK	2 638.14	3	1.84 ×10 ⁻⁹
	M [#] DVYSFSEENGDIVC [*] GGDDPC [*] K	2 510.04	2	1.08 ×10 ⁻¹⁰

匹配蛋白: 中亚蝮、江浙蝮蛇和短尾蝮蛇毒 L-氨基酸氧化酶; 中亚蝮蛇毒金属蛋白酶; 中亚蝮蛇毒类凝血酶; 中亚蝮蛇毒纤溶酶原激活物; 中亚蝮及乌苏里蝮蛇毒磷脂酶 A₂; * 标记氨基酸 C 被修饰,质量增加 57.25 u; # 标记氨基酸 M 被氧化,质量数增加 16.0 u。

Matched proteins for L-amino acid oxidases from the snake venoms of *Gloydus halys*, *Agkistrodon halys* and *A. blomhoffii*; for metalloproteinases from the snake venom of *G. halys*; for salmobin from the snake venom of *G. halys*; for plasminogen activator from the snake venom of *G. halys*; for phospholipase A₂ from the snake venoms of *G. halys* and *G. ussuriensis*. * Cys residue is modified by IAA with molecular mass increase of 57.25 u; # Met residue is oxidized with molecular increase of 16.0 u.

3 讨 论

双向电泳与蛋白荧光标记和蛋白质凝胶后荧光染色技术相结合的蛋白质组学技术,有效

克服了蛋白质点考马斯亮蓝与银染定量线性动态范围窄、结果不可靠、人为因素大的缺点,大大提高了实验结果的精确性和可靠性,已成功应用于动植物与人类蛋白质组及其变化的研

究^[23~28]。

蛇毒蛋白被广泛作为基础理论研究的工具酶,抗栓、抗菌消炎和抗微生物活性物质及抗肿瘤和艾滋病药物^[1~13,23]。但蛇毒组成因蛇种差异而差别较大,同种蛇毒因产地不同也有差异^[14~19],它们的生物学活性差别悬殊,因此有必要分析蛇毒中的蛋白质种类,建立其蛋白质库。蛇岛蝮为我国特有的蝮蛇种类,但蛇毒的基础及应用研究匮乏,仅有酸性磷脂酶 A₂ 和类凝血酶的报道^[21,22]。

本实验采用蛋白荧光标记 (Cy5) 技术建立了 GSS-SV 的 2D SDS-PAGE 图谱,DeCyser 分析软件分别从 pH 范围 3~10 NL 和 4~7 的胶条所产生的凝胶图像上辨别出 1 270 个和 1 001 个蛋白点,分子量范围在 10~150 ku 之间,等电点在 4~7 间的蛋白点占 78.8%。Deep Purple 蛋白荧光染料比银染线性动态范围高 3 个数量级,且该染色方法不影响后续的蛋白质质谱鉴定,本实验成功地将这一技术应用到蛇毒凝胶后染色,获得的蛋白点分布模式与 Cy5 所得图像一致,建立的方法可用于蛋白质组高通量研究。

选取的 5 个蛋白质点经 HPLC-ESI/MS/MS 分析鉴定为其他蛇毒来源的 L-氨基酸氧化酶、金属蛋白酶、类凝血酶、纤溶酶原激活物和磷脂酶 A₂。HPLC-ESI/MS/MS 是目前最常用和最准确的蛋白鉴定方法,蛋白经酶解产生的肽段经 HPLC 分离,经碰撞诱导解离由 MS/MS 模式获得碎片峰信息,获得肽段质量数的同时并完成序列分析;所得肽段序列经 Bioworks 软件检索 NCBInr 数据库,搜索同源蛋白肽段,完成蛋白鉴定^[5,8,9,23,24]。因此,HPLC-nESI/MS/MS 法可鉴定样品是什么蛋白,在蛋白完整序列未知情况下,可快速、准确、经济地获得蛋白信息,为深入研究其结构功能提供可靠依据。

本研究建立的荧光标记 2D SDS-PAGE、凝胶荧光后染色、HPLC-ESI/MS/MS 蛋白鉴定的蛋白质组学研究方法简便、快速、准确,可用于蛇毒蛋白质组的高通量研究。

参 考 文 献

[1] Metz M, Filipovsky A M, Chen C C, et al. Mast cells can

enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, 2006, **5** 786 :526 ~ 530.

- [2] Sun M Z, Ding L J, Yi Y, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of phospholipase A₂ and fibrinolytic enzyme, two enzymes obtained from Chinese *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* Venom. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, **13**: 150 ~ 155.
- [3] Yao Y, Zhou Y, Wang C. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A₂. *The EMBO Journal*, 1997, **16**(3): 651 ~ 658.
- [4] 孙明忠, 丁兰, 赵大庆等. 长白山白眉腹蛇蛇毒磷脂酶 A₂ 的纯化和表征. *生物化学和生物物理学报*, 1999, **31** (1): 104 ~ 106.
- [5] Liu S, Sun M Z, Sun C, et al. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. *Toxicon*, 2008, **52**(7): 760 ~ 768.
- [6] Hennerici M G, Kay R, Bogousslavsky J, et al. Intravenous Ancrod for acute ischaemic stroke in the European stroke treatment with Ancrod trial: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2006, **368**: 1 871 ~ 1 878.
- [7] Markland F S, Friedrichs G S, Pewitt S R, et al. Thrombolytic effects of recombinant fibrinase or APSAC in a canine model of carotid artery thrombosis. *Circulation*, 1994, **90**: 2 448 ~ 2 456.
- [8] Liu S, Sun M Z, Greenaway F T. A novel plasminogen activator from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom (ABUSV-PA): Purification and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **348**: 1 279 ~ 1 287.
- [9] Sun M Z, Liu S, Greenaway F T. Characterization of a fibrinolytic enzyme (ussurensin) from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom: Insights into the effects of Ca²⁺ on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, **1764**: 1 340 ~ 1 348.
- [10] Samy R P, Pachaiappan A, Gopalakrishnakone P, et al. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Infectious Diseases*, 2006, **6**: 100.
- [11] Mustafa L M, Foster S, Lyubimov A Y, et al. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *J Mol Biol*, 2006, **364**: 991 ~ 1 002.
- [12] Zhang H, Yang Q, Sun M, et al. Hydrogen peroxide produced by two amino acid oxidases, mediates antibacterial actions. *Journal of Microbiology*, 2004, **42**(4): 336 ~ 339.
- [13] Ohtsuka T, Shioni T, Shimoda M, et al. ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and

- correlates with cell proliferation and lymph node metastasis. *Int J Cancer*, 2006, **118**: 263 ~ 273.
- [14] Serrano S M T, Shannon J D, Wang D, *et al.* A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*, 2005, **5**: 501 ~ 510.
- [15] Tsai I, Chen Y, Wang Y. Comparative proteomics and subtyping of venom phospholipases A₂ and disintegrins of *Protobothrops pit* vipers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1702**: 111 ~ 119.
- [16] Li S, Wang J, Zhang X, *et al.* Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem J*, 2004, **384**: 119 ~ 127.
- [17] Calvete J J, Marcinkiewicz C, Sanz L. Snake venomomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. *Journal of Proteome Research*, 2007, **6**: 326 ~ 336.
- [18] Sanz L, Gibbs H L, Mackessy S P, *et al.* Venom proteomes of closely related *Sistrurus rattlesnakes* with divergent diets. *Journal of Proteome Research*, 2006, **5**(9): 2 098 ~ 2 112.
- [19] Fox J W, Ma L, Nelson K, *et al.* Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*, 2006, **47**: 700 ~ 714.
- [20] Nawarak J, Supachok S, Wu C, *et al.* Proteomics of snake venoms from elapidae and viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis*, 2003, **24**: 2 838 ~ 2 843.
- [21] Yang Q, Li M, Xu J, *et al.* Expression of glosheobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Gloydius shedaoensis*, in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(2): 101 ~ 104.
- [22] Jin Q, Yang L X, Jiao H M, *et al.* Purification, gene cloning and expression of an acidic phospholipase A₂ from *Agkistrodon shedaoensis* Zhao. *Acta Biochim Biophys Sina*, 2004, **36**(1): 27 ~ 32.
- [23] Liu S, Sun M Z, Tang J, *et al.* High-performance liquid chromatography/nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry, two-dimensional difference in-gel electrophoresis and gene microarray identification of lymphatic metastasis-associated biomarkers. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, **22**(2): 3 172 ~ 3 178.
- [24] 孙明忠, 刘淑清, 唐建武. 鼠肝癌淋巴道转移细胞模型的蛋白质组学研究. *高等学校化学学报*, 2009, **30**(3): 517 ~ 524.
- [25] Tan H T, Tan S, Lin Q, *et al.* Quantitative and temporal proteome analysis of butyrate-treated colorectal cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, 2008, **7**(6): 1 174 ~ 1 185.
- [26] Tian Q, Stepaniants S B, Mao M, *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Prot*, 2004, **3**: 960 ~ 969.
- [27] Netea-Maier R T, Hunsucker S W, Hoevenaars B M, *et al.* Discovery and validation of protein abundance differences between follicular thyroid neoplasms. *Cancer Res*, 2008, **68**(5): 1 572 ~ 1 580.
- [28] Rozanas C R, Loyland S M. Capabilities using 2-D DIGE in proteomics research: the new gold standard for 2-D gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 2008, **441**: 1 ~ 18.