

临床型乳房炎与正常奶牛血浆的差异蛋白质组研究

杨永新^{1,2}, 赵兴绪¹, 张勇¹, 陶金忠¹

(¹甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; ²安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 合肥 230031)

摘要: 【目的】检测和分析临床型乳房炎与正常奶牛血浆中差异表达的蛋白质。【方法】用二维凝胶电泳分离血浆蛋白, 凝胶用硝酸银染色和考马斯亮蓝染色, PDQuest 7.4 软件自动检测分析差异表达蛋白斑点并经高效液相色谱串联离子阱质谱鉴定。【结果】凝胶图谱分析后得到 3 个差异蛋白斑点, 鉴定为 2 种蛋白质(结合珠蛋白前体和乳球蛋白)。结合珠蛋白前体在临床型乳房炎奶牛血浆中表达量增加, 可作为乳房炎诊断标记分子; 而乳球蛋白的表达量下调。【结论】临床型乳房炎与正常奶牛的血浆中蛋白质的表达存在差异, 对差异表达蛋白质的研究有利于探索机体的生理病理状态, 可为疾病的诊断和治疗提供全面的信息。

关键词: 奶牛; 临床型乳房炎; 血浆; 差异表达蛋白质

Comparative Proteomics Analysis of Plasma Between Healthy Dairy Cows and Clinical Mastitic Cows

YANG Yong-xin^{1,2}, ZHAO Xing-xu¹, ZHANG Yong¹, TAO Jin-zhong¹

(¹College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070; ²Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract: 【Objective】Differential proteomic expressions in plasma from healthy dairy cows and clinical mastitic cows was investigated. 【Method】The current research presents the protein changes using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) after stained with silver nitrate and colloidal coomassie blue, differential expression proteins were detected by PDQuest 7.4 software and subjected to ion trap mass spectrometer equipped with a Surveyor HPLC system, and differential spots of protein were identified. 【Result】Three protein spots were identified to be two proteins differentially expressed. Overall, haptoglobin precursor was up-regulated in cows infected with clinical mastitis, could serve as a mastitis-associated diagnostic marker. Protein SCGB 2A1 (secretoglobulin, family 2A, member 1) was down-regulated. 【Conclusion】There was a significant difference at protein level in plasma from healthy dairy cows and clinical mastitic cows. Differential proteome expression analysis may be useful to clarify the mechanisms involved in pathophysiology, and to further study the related proteins and the molecular markers of clinical mastitis.

Key words: Dairy cows; Clinical mastitis; Plasma; Differential proteomic expression

0 引言

【研究意义】血液可通过循环系统与全身各个组织、器官密切联系, 而当机体各组织或器官发生病变时, 可直接或间接地引起血液成分的变化。特别是血浆中存在的近万种蛋白质, 参与了机体的凝血、免疫、小分子物质的运输等一系列生理或病理过程。血浆蛋白质表达模式的变化可充分反映机体的生理病理状

态, 从而为疾病的诊断、治疗提供全面的信息。【前人研究进展】随着 2002 年人类血浆蛋白质组计划的实施, 以其为重心的血浆蛋白质组研究在多种物种得到广泛开展, 并在人类多种疾病如乳腺癌、卵巢癌的早期诊断分子和药物治疗靶标的筛选方面奠定了基础^[1,2]。且已有研究用二维凝胶电泳(2-DE)结合质谱技术对正常奶牛、亚临床型乳房炎和临床型乳房炎奶牛乳清蛋白质组进行了研究^[3,4], 以及采用 2-DE 技术

收稿日期: 2007-05-25; 接受日期: 2008-01-18

基金项目: 科技部国际合作重点项目计划(2005DFA30720)

作者简介: 杨永新(1978-), 男, 甘肃岷县人, 博士研究生, 研究方向为动物生殖生理。E-mail: yangyongxin66@yahoo.com.cn。通讯作者赵兴绪(1962-), 甘肃漳县人, 教授, 研究方向为临床兽医学。Tel: 0931-7632482; E-mail: zhaoux@gsau.edu.cn

建立了健康荷斯坦奶牛血浆的 2-D 图谱, 并用质谱对凝胶中的蛋白斑点进行了鉴定^[5]。【本研究切入点】但是尚缺乏临床型乳房炎奶牛血浆蛋白质组的研究, 于是, 本试验通过 2-DE 分离了正常和临床型乳房炎奶牛的血浆蛋白, 并结合高效液相色谱串联离子阱质谱对差异表达蛋白斑点进行鉴定。【拟解决的关键问题】以筛选乳房炎诊断生物标记分子, 并为探讨乳房炎的发病机制和治疗提供一些新的参考资料。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

17 cm pH3~10 NL 梯度胶条 (Cat. No.163-2009) 为 Bio-Rad (CA, USA) 公司产品; IPG Buffer pH 3~10 和 2-D Quant Kit (Cat. No. 80-6483-56) 为 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) 公司产品; CHAPS、硝酸银、硫代硫酸钠、碳酸钠、甲醛、二硫苏糖醇、矿物油、甘氨酸和低熔点琼脂糖为 Amresco (Solon, Oh, USA) 公司产品; Tris、TEMED、丙烯酰胺、甲叉双丙稀酰胺、过硫酸胺、硫尿、碘乙酰胺、尿素、十二烷基硫酸钠、乙氰 (色谱纯)、甲酸、考马斯亮蓝 G-250 和甘油为 Sigma (St.Louis, MO, USA) 公司产品; 测序级胰蛋白酶为 Promega (Madison, WI, USA) 公司产品; 其余药品均为国产分析纯试剂。

主要设备有 PROTEAN IEF Cell 和 PROTEAN II xi 系统及 PDQuest 7.4 图像分析软件 (Bio-Rad 公司), Milli-Q 超纯水系统 (Millipore 公司), MICRO 17TR 高速低温离心机 (Hanil 公司), 离子阱质谱仪 LCQ DecaXP plus (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) 和 U2800 紫外可见分光光度计 (Hitachi 公司)。

1.2 试验材料

选取健康奶牛 12 头和临床型乳房炎奶牛 12 头, 其中, 临床型乳房炎奶牛以乳腺组织出现红肿、热痛以及乳汁凝块等症状为判定依据, 健康奶牛以 4 个乳区乳样的 LMT 试验进行判定。牛颈静脉采血, 以 0.5%EDTA 抗凝。将采集的血样冰浴保存, 及时带回实验室。

1.3 血浆蛋白质样品制备

抗凝血样 $3\ 000\times g$ 离心 20 min, 收集上层血浆, 等体积混合各头份的血浆即为全血浆蛋白质样品。取部分血浆样品用 2-D Quant Kit 测定浓度, 然后分装, -75°C 保存。

1.4 2-DE

第一向等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 电泳:

采用胶内溶胀法, 将血浆蛋白质样品 $3\sim 5\ \mu\text{l}$ 和 10%SDS、2.3%DTT 混合在 95°C 孵育 5 min^[6], 然后与上样缓冲液 ($7\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫尿, 4% CHAPS, $65\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 0.5% IPG buffer, 0.001% 溴酚蓝) $400\ \mu\text{l}$ 均匀混合, 室温放置 1 h 后, $10\ 000\times g$ 离心 10 min, 吸取上清均匀加入聚焦盘中。将聚焦盘置于 PROTEAN IEF Cell 电泳仪中进行等电聚焦, 程序设置以及第二向 SDS-PAGE 电泳如杨永新等^[7]所述。

1.5 凝胶染色和图像分析

凝胶采用硝酸银染色方法如 Mortz 等所述^[8], 制备型凝胶用考马斯亮蓝方法染色方法。图谱用 PDQuest7.4 分析软件进行背景消减、斑点检测、自动匹配。所有数据的统计分析使用 SPSS 11.0 和 Excel 2003 软件。

1.6 蛋白质酶解

凝胶图谱经 PDQuest7.4 分析软件处理, 标记差异表达的蛋白斑点。将塑料枪头 ($1\ 000\ \mu\text{l}$) 尖端切去, 使其直径约 2 mm, 分离选取的蛋白斑点并置于离心管中。采用优化后的胶内酶切: $400\ \mu\text{l}$ 去离子水清洗胶粒 30 min, 重复 3 次, 再用 $400\ \mu\text{l}$ 50%乙氰-50% 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液冲洗胶粒 30 min, 然后加入 $400\ \mu\text{l}$ 50%乙氰-50% 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵脱色 (过夜), $100\ \mu\text{l}$ 纯乙氰脱水、干燥; 加 $10\ \mu\text{l}$ $20\ \text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 测序级胰蛋白酶, 37°C 酶解过夜; 吸出酶解液, 加 $10\ \mu\text{l}$ 50% 乙氰/2%甲酸, 超声 30 min, 上清合并到酶解液; 重复一次。

1.7 离子阱质谱检测

微量离子阱串联质谱仪 LCQ Deca Xp plus 系统 (Thermo Finnigan), 利用 Surveyor HPLC 液相系统 (Thermo) 上样前, 将色谱柱 BioBasic-18、 $150\times 0.18\text{mm}$ (Thermo) 用流动相 A (Milli-QH₂O+0.1%甲酸) 平衡, 流动相 B (乙氰+0.1%甲酸) 120 min 线性梯度洗脱; 样品进样量为 $20\ \mu\text{l}$, 流速 $120\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$; 质谱全扫描范围: $m/z\ 400\sim 2\ 000$, MS/MS 数据依赖扫描 5 次。数据采集在正离子模式下运行, 喷雾电压 3.2 kV, 温度 160°C 。采用数据依赖模式, 3 个信号最强的肽段被选择用于二级质谱分析, 5 min 内, 质量相同的肽段将不再被选择用于二级质谱分析。

2 结果与分析

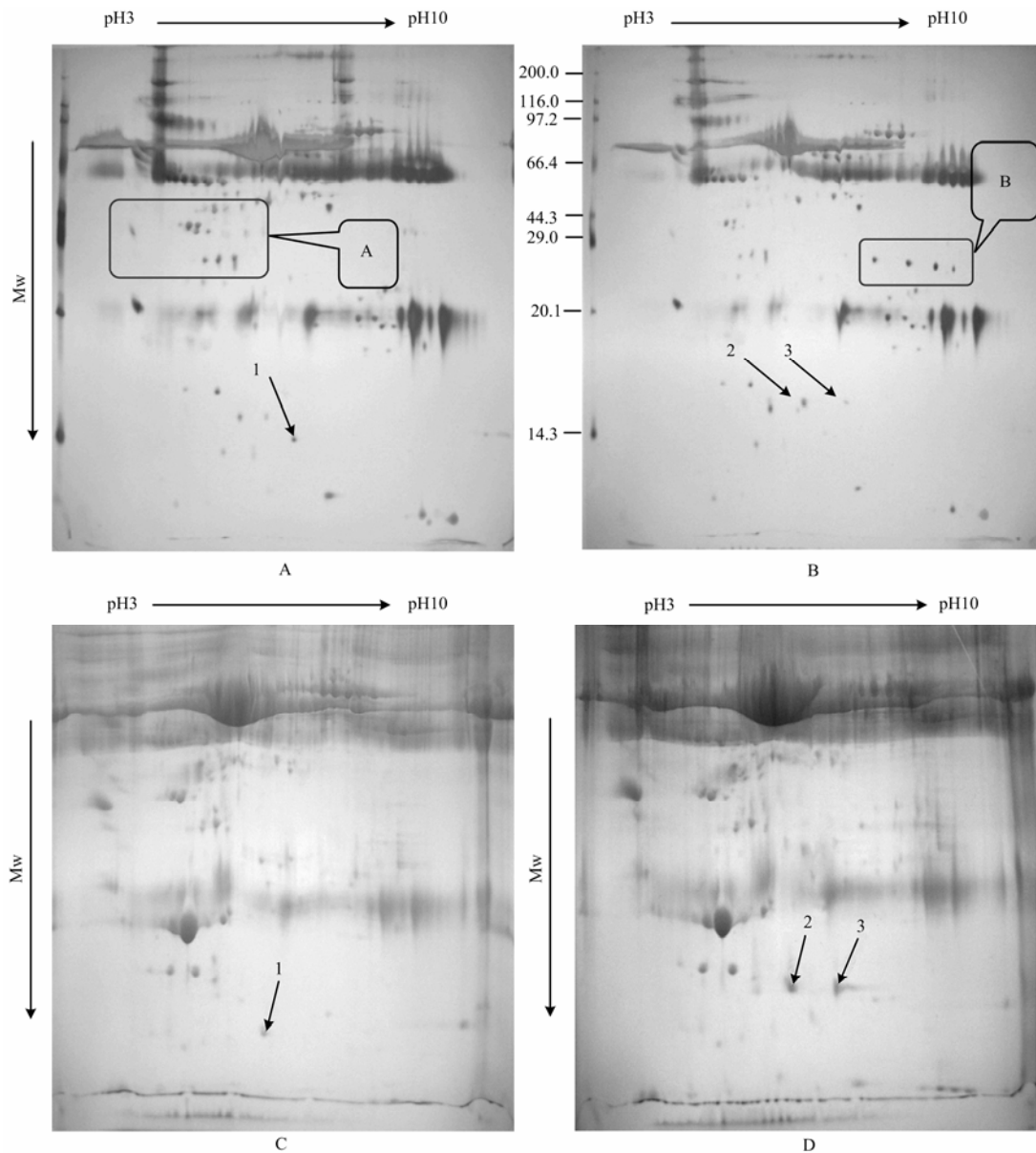
2.1 血浆全蛋白质的差异表达检测

试验重复 3 次, 将硝酸银染色获得的健康奶牛和临床型乳房炎奶牛的血浆蛋白凝胶图谱用 PDQuest7.4

软件系统自动检测匹配。以蛋白表达谱上“斑点染色强度和面积三倍量的变化”为标准进行差异分析,检测差异表达的蛋白斑点。然后,在制备型凝胶图谱上寻找对应的蛋白斑点。由凝胶图谱(图1)的匹配可以发现,银染的健康奶牛血浆图谱中A区域与临床型乳房炎奶牛B区域存在明显的差别,然而这两个区域

的蛋白斑点在制备型的凝胶图谱中却无明显差异;仅有3个蛋白斑点(斑点1、2和3)在银染和考染中均呈差异表达,即斑点1在临床型乳房炎奶牛血浆中表达量下调,斑点2和3在临床型乳房炎奶牛血浆中表达量增加。

2.2 血浆差异表达蛋白质的鉴定



1、2和3为质谱鉴定的差异表达蛋白斑点。A和B为硝酸银染色的凝胶图谱,C和D为凝胶考马斯亮蓝染色的图谱,A和C为正常奶牛血浆蛋白凝胶图谱;B和D为临床型乳房炎奶牛血浆蛋白凝胶图谱

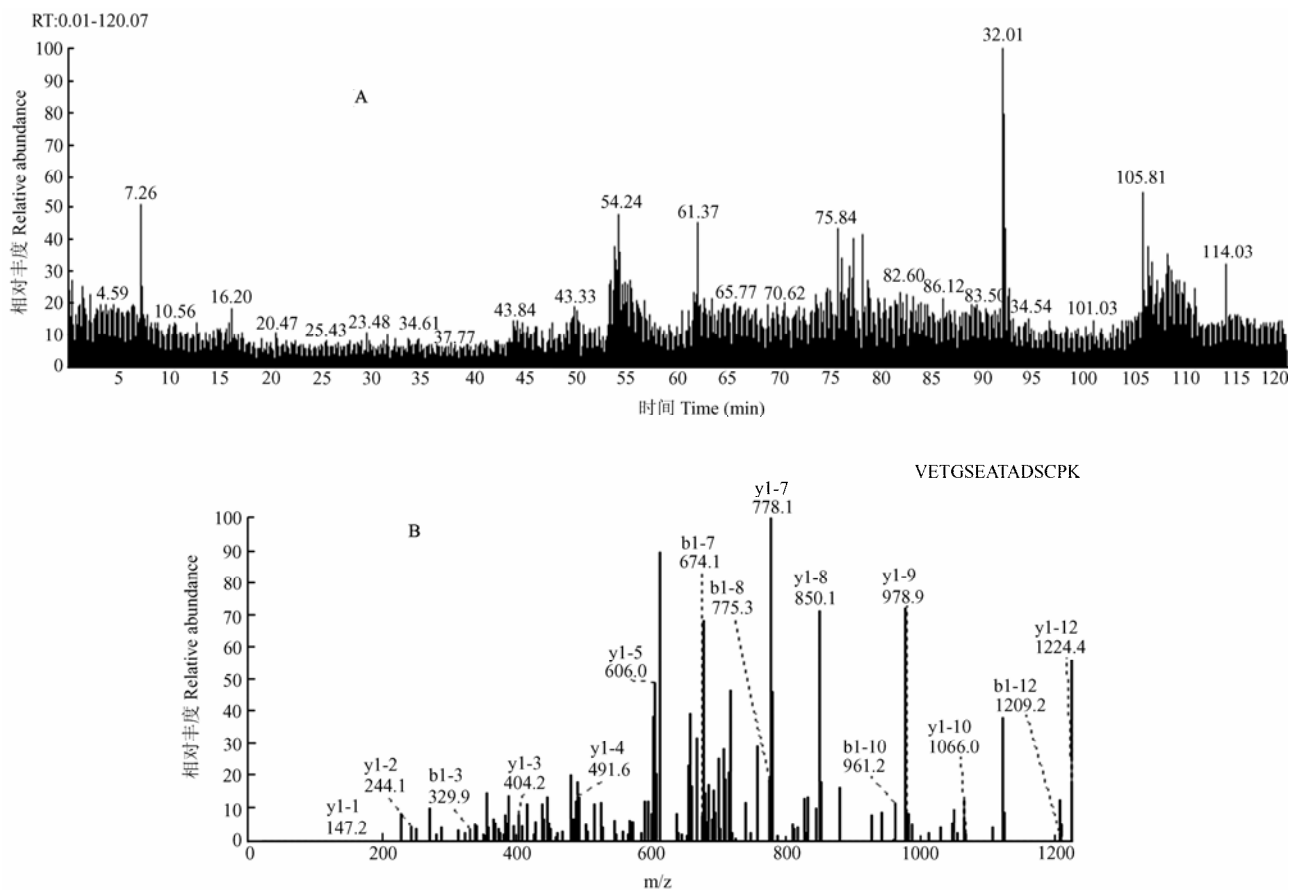
Differential expression spots of protein 1, 2 and 3 identified by MS/MS. A and B stained proteins was by silver nitrate. C and D stained proteins was by colloidal Coomassie blue. A and C showed 2-DE maps of healthy dairy cows. B and D showed 2-DE maps of clinical mastitic cows

图1 健康奶牛和临床型乳房炎奶牛血浆蛋白

Fig. 1 2-DE maps of plasma protein from healthy dairy cows and clinical mastitic cows

将血浆蛋白的差异表达斑点运用高效液相色谱串联离子阱质谱分析, 用整合在质谱仪上的 Bioworks 软件中的检索软件 SEQUEST 搜索 NCBI 蛋白质数据库, 这 3 个蛋白斑点可搜索到相应的结果, 对应

于 2 种蛋白质, 如表所示。其中图 2 表示蛋白斑点 3 的质谱扫描图, 以及前体离子质荷比为 726.62 的串联质谱模式图, 据此可检测到的肽片段是 VETGSEATADSCP K。



A 总离子流图, x 轴代表分析的时间, y 轴代表能够检测到的离子流。B 前体离子质荷比为 726.62 的串联质谱图, b 和 y 离子是肽片段的 N-末端和 C-末端, 据此可检测到的肽片段为 VETGSEATADSCP K

A Total ion current of spot 3 using mass spectrum analysis. The x axis represents the retention time of the analysis, and the y axis represents ion current detected. B MS/MS analysis of the double-charged peptide ions with a m/z ratio of 726.62. b and y designate the N- and C-terminal fragments of the peptide produced by breakage at the peptide bond in LCQ, respectively. VETGSEATADSCP K is the detected peptide fragment

图 2 蛋白斑点 3 的 LC-MS/MS 分析

Fig. 2 LC-MS/MS profile analysis of protein spot 3

表 LC-MS/MS 鉴定血浆蛋白中差异表达的蛋白斑点

Table Differentially expressed protein spots in plasma protein identified by LC-MS/MS

蛋白斑点 Protein spot	蛋白质名称 Protein name	蛋白质登记号 Accession	理论等电点;分子质量 pI; Mw	检测肽段 Peptide sequence detected	覆盖率 Coverage (%)
临床型乳房炎奶牛血浆中的下调蛋白 Down regulated proteins in cows infected with clinical mastitis					
1	分泌球蛋白 2A 家族成员 1 Secretoglobin, family 2A, member 1	AAH62218	5.48; 10884.8	TINSDISIPEYK ELLQEFIDSDAAAEAMGK	31.58
临床型乳房炎奶牛血浆中的上调蛋白 Up regulated proteins in cows infected with clinical mastitis					
2	结合珠蛋白前体 Haptoglobin precursor	HPBO	4.64; 4681.2	VETGSEATADSCP K	31.11
3	结合珠蛋白前体 Haptoglobin precursor	HPBO	4.64; 4681.2	VETGSEATADSCP K	31.11

2.3 差异表达蛋白质分析

由鉴定结果可知, 蛋白斑点 2 和 3 为结合珠蛋白前体, 这两个蛋白斑点表达于临床型乳房炎奶牛血浆中, 具有几乎相同的分子质量, 但等电点却有差异。然而, 成熟的结合珠蛋白是由来源相同的 α 和 β 链组成的异二聚体, 是血浆糖蛋白。因此, 这可能是结合珠蛋白前体翻译后修饰的产物。于是, 运用生物信息学工具中的翻译后修饰预测软件 NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 和 NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 对结合珠蛋白前体的糖基化 O-和 N-连接的位点进行预测, 由于该蛋白缺乏信号肽尚未能得到糖基化位点的预测结果, 但却存在潜在 O-糖基化基序。此外, 也有可能是结合珠蛋白前体突变的结果。

分泌球蛋白 2A 家族成员 1 (Secretoglobin, family 2A, member 1), 又称为乳腺球蛋白 2 (Mammaglobin 2)、Lipophilin-C、(泪液球蛋白) lacryglobin。它能够与雄激素和类固醇结合, 并具有转录调节类固醇激素的作用。

3 讨论

3.1 染色方法对差异蛋白斑点的影响分析

银染是目前差异蛋白质组分析中最常用的显色方法, 一般认为其灵敏度是 1~10 ng, 对某些种类的蛋白质染色效果差, 并影响其后的质谱分析; 而凝胶考马斯亮蓝 G-250 的灵敏度可达 8~50 ng, 且与下游的蛋白鉴定质谱技术有很好的兼容性^[9]。本试验中, 正常奶牛和临床型乳房炎奶牛血浆银染 2-D 凝胶中区域 A 和 B 中的蛋白斑点虽有明显的差异, 但在考马斯亮蓝染色的凝胶中却无明显差异。这可能是加大蛋白上样量后蛋白质未能得到很好的分离, 也可能是蛋白质对银染和考染的染色灵敏度存在差异。

3.2 结合珠蛋白前体

结合珠蛋白具有宿主防御作用和抗菌活性, 可与血红素形成复合体能够预防、阻止铁的损失。通过蛋白质组技术对肝细胞癌、严重急性呼吸道综合征和卵巢癌等的研究表明, 结合珠蛋白表达量上调, 并认为是一个有用的诊断分子^[2,10,11]。然而, 使用 2D 差显凝胶电泳技术结合 MALDI-TOF/TOF 对乳腺癌血清的研究表明, 结合珠蛋白的表达量却下调^[1]。笔者的研究表明, 结合珠蛋白前体在临床型乳房炎奶牛血浆中表达量上调, 与临床型乳房炎奶牛或诱导的急性和慢性乳房炎奶牛的血浆中结合珠蛋白的浓度增加^[12-14],

为急性期蛋白的结论相一致。这可能是结合珠蛋白在病原菌侵入奶牛乳腺的免疫应答中发挥着极其重要的作用, 可作为奶牛乳房炎的诊断标记分子。

3.3 乳腺球蛋白

现有研究表明, 乳腺球蛋白可作为检测乳腺癌淋巴结转移的 mRNA 标记分子^[15], 其蛋白表达水平在乳腺癌病人的乳腺组织中增加, 并依赖于肿瘤发展阶段^[16], 可作为乳腺癌血清检测的生物标记分子^[17]。然而, 也有研究表明, 乳腺球蛋白在正常组织和前列腺肿瘤组织中均有表达, 其 mRNA 表达水平在药物治疗后的前列腺和卵巢癌细胞系与野生型细胞系间并不显著^[18]。本研究结果表明, 正常奶牛血浆中可检测到差异表达的乳腺球蛋白, 这可能是该蛋白在奶牛血浆中有其它未知的功能, 对此尚需更多的研究。

4 结论

本研究对临床型乳房炎奶牛和正常奶牛的血浆蛋白采用二维凝胶电泳结合高效液相色谱串联离子阱质谱的方法进行差异蛋白质组学研究。二维凝胶图谱经软件自动分析、检测得到 3 个差异表达蛋白斑点, 质谱鉴定为 2 种蛋白, 其中结合珠蛋白前体在临床型乳房炎奶牛血浆中表达量上调, 是一个急性期蛋白, 可作为奶牛乳房炎的诊断标记分子, 差异蛋白质组的研究有利于探索了机体生理病理的分子机理, 并为疾病的诊断和治疗能够提供全面的信息。

References

- [1] Huang H L, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, Falkensammer G, Griesmacher A, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck C W, Stecher G, Bonn G K, Huber L A. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis*, 2006, 27(8): 1641-1650.
- [2] Ahmed N, Oliva K T, Barker G, Hoffmann P, Reeve S, Smith I A, Quinn M A, Rice G E. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. *Proteomics*, 2005, 5(17): 4625-4636.
- [3] Baeker R, Haebel S, Schlatterer K, Schlatterer B. Lipocalin-type prostaglandin D synthase in milk: a new biomarker for bovine mastitis. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 2002, 67(1): 75-88.
- [4] Hogarth C J, Fitzpatrick J L, Nolan A M, Young F J, Pitt A, Eckersall P D. Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis.

- Proteomics*, 2004, 4(7): 2094-2100.
- [5] Talamo F, D'Ambrosio C, Arena S, Del Vecchio P, Ledda L, Zehender G, Ferrara L, Scaloni A. Proteins from bovine tissues and biological fluids: defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics*, 2003, 3(4): 440-460.
- [6] Steel L F, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer S H, Evans A A, London W T, Dwek R, Block T M. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 2003, 3(5): 601-609.
- [7] 杨永新, 陶金忠, 张 勇, 曹随忠, 赵兴绪. 奶牛乳腺组织蛋白质样品的制备及 2-DE 图谱分析. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(8): 846-850.
- Yang Y X, Tao J Z, Zhang Y, Cao S Z, Zhao X X. Preparation of protein samples from mammary tissues and its 2-DE analysis. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(8): 846-850. (in Chinese)
- [8] Mortz E, Krogh T N, Vorum H, Görg A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, 2001, 1(11): 1359-1363.
- [9] Simpson R J. 蛋白质与蛋白质组学实验指南(影印版). 北京: 科学出版社, 2003: 190.
- Simpson R J. *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, 2003: 190. (in Chinese)
- [10] Ang I L, Poon T C, Lai P B, Chan A T, Ngai S M, Hui A Y, Johnson P J, Sung J J. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(10): 2691-2700.
- [11] Wan J, Sun W, Li X, Ying W, Dai J, Kuai X, Wei H, Gao X, Zhu Y, Jiang Y, Qian X, He F. Inflammation inhibitors were remarkably up-regulated in plasma of severe acute respiratory syndrome patients at progressive phase. *Proteomics*, 2006, 6(9): 2886-2894.
- [12] Eckersall P D, Young F J, McComb C, Hogarth C J, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan A M, Fitzpatrick J L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Record*, 2001, 148(2): 35-41.
- [13] Eckersall P D, Young F J, Nolan A M, Knight C H, McComb C, Waterston M M, Hogarth C J, Scott E M, Fitzpatrick J L. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(5): 1488-1501.
- [14] Gronlund U, Hulten C, Eckersall P D, Hogarth C, Persson W K. Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Research*, 2003, 70(4): 379-386.
- [15] Ooka M, Sakita I, Fujiwara Y, Tamaki Y, Yamamoto H, Aihara T, Miyazaki M, Kadota M, Masuda N, Sugita Y, Iwao K, Monden M. Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients. *Oncology Reports*, 2000, 7(3): 561-566.
- [16] Bernstein J L, Godbold J H, Raptis G, Watson M A, Levinson B, Aaronson S A, Fleming T P. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11(18): 6528-6535.
- [17] Watson M A, Dintzis S, Darrow C M, Voss L E, DiPersio J, Jensen R, Fleming T P. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Research*, 1999, 59(13): 3028-3031.
- [18] Tucker J M, Lipatova Z, Beljanski V, Townsend D M, Tew K D. Evaluation of lipophilins as determinants of tumor cell response to estramustine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Fast Forward*, 2005, 315(3): 1158-1162.

(责任编辑 林鉴非)