

基于 2-DE 结合质谱研究围产期奶牛 血浆蛋白表达的变化

杨永新^{1,2}, 王加启^{1*}, 卜登攀¹, 张乐颖¹, 李珊珊¹, 张春林¹, 周凌云¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 合肥 230031)

摘要: 本试验旨在揭示奶牛围产期免疫功能下降的机理。采用二维凝胶电泳方法建立了分娩前第 21 天、分娩后第 1 天和 21 天血浆蛋白表达图谱, SYPRO ruby 染色后, ImageMaster 2D platinum 6.0 软件匹配检测差异表达蛋白点, 液相色谱串联质谱鉴定。结果表明: 与分娩前第 21 天和分娩后第 21 天相比, 分娩后第 1 天血浆中转甲状腺素蛋白表达量下调、而结合珠蛋白和 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白表达量上调; 与分娩前第 21 天和分娩后第 1 天相比, 分娩后第 21 天载脂蛋白 A1 表达量增加, 这些表达变化的蛋白涉及急性期应答反应及运输和代谢等生物学功能。结果提示奶牛分娩后急性期蛋白表达量的增加可能与免疫功能下降相关。

关键词: 围产期; 血浆; 二维凝胶电泳; 质谱

中图分类号: S857.22; Q51

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)02-0188-05

Changes of Plasma Proteins in Transition Dairy Cows Based on 2-DE Combination with Mass Spectrometry

YANG Yong-xin^{1,2}, WANG Jia-qi^{1*}, BU Deng-pan¹, ZHANG Le-ying¹, LI Shan-shan¹,
ZHANG Chun-lin¹, ZHOU Ling-yun¹

(1. *State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*; 2. *Institute of Animal Science, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China*)

Abstract: The mechanism of immune system suppression was investigated in transition dairy cows. Changes of plasma proteins on the 21 d before calving, on the 1 d and 21 d after calving were separated by two-dimensional electrophoresis providing a platform for parallel analysis. After visualization proteins with SYPRO ruby, differentially expressed proteins were analyzed by ImageMaster 2D Platinum 6.0 software, and identified by HPLC equipped with ion trap mass spectrometer. The result showed that transthyretin was down-regulated on the 1 d after calving, while haptoglobin and alpha-1 acid glycoprotein were up-regulation, with a much larger and more abrupt variation at parturition, comparative with the 21 d prepartum and postpartum; the expression abundance of apolipoprotein A- I increased on the 21 d postpartum compared to prepartum and at parturition. These proteins were involved in acute-phase response, transport and metabolism. The findings may provide valuable information for the exploring of the decreased immune function during the transition dairy cows.

Key words: transition; plasma; two-dimensional electrophoresis; mass spectrometry

收稿日期: 2009-07-31

基金项目: 国家自然科学基金(30871837); 动物营养学国家重点实验室开放课题(2004DA125184F0802)

作者简介: 杨永新(1978-), 男, 甘肃岷县人, 博士后, 主要从事牛奶蛋白组质及活性蛋白研究, E-mail: yangyongxin66@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 王加启, Tel: 010-62890458, E-mail: wang-jia-qi@263.net

围产期是奶牛泌乳周期、乃至一生中最为关键的时期,包括妊娠后期和泌乳早期的一段时间。这一时期,奶牛因分娩和泌乳等一系列生理过程,引起免疫防御功能下降,易发生子宫内膜炎和乳房炎等疾病^[1],因此会给奶牛养殖业带来巨大的经济损失。

为了阐明奶牛围产期免疫功能下降的机制,许多学者从体液免疫和细胞免疫两方面展开研究,结果发现奶牛分娩后外周血嗜中性粒细胞表达的黏附分子和受体(CD44 和 L-选择素等)的下降削弱了其迁移能力以及对炎症调节因子的应答能力,从而降低了其吞噬功能^[2-4];之后,对分娩前第 28 天和产后奶牛的嗜中性粒细胞采用蛋白质组学技术进行了分析,结果发现了 40 多个差异表达蛋白,包括具有抗菌活性的牛骨髓抗菌肽-28、导管素抗菌肽,参与花生四烯酸代谢和传递通路的花生四烯酸 12 脂氧合酶等^[5]。而以蛋白质组学方法对妊娠期和产后奶牛的血清蛋白的研究发现,结合珠蛋白和 α -酸性糖蛋白在分娩后表达量增加^[6]。由此表明,围产期奶牛免疫功能的下降与生物功能的执行者——蛋白质的表达变化相关。

鉴于蛋白质组学技术能够整体全面的分析蛋白质的表达变化,本试验将采用二维凝胶电泳(2-DE)分离荷斯坦奶牛分娩前 21 天、分娩后第 1 和 21 天血浆蛋白,用 SYPRO ruby 染色,液相色谱串联离子阱质谱的方法鉴定血浆差异表达蛋白,为揭示围产期奶牛免疫功能下降的机制提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

2008 年 12 月至 2009 年 2 月在北京市大兴区奶牛养殖基地选择 23 头体质量(500 ± 40) kg 相近的初产中国荷斯坦奶牛。依据人工输精时间,在预产期前第 21 天、分娩后第 1 和 21 天以真空 EDTA 抗凝采血管(BD VacutainerTM)采集奶牛尾静脉血,于 4 °C 3 000 g 离心 15 min,分离血浆,分装于 1.5 mL 离心管中,−20 °C 保存。并于分娩后第 7、14 和 21 天采集奶样,4 °C 保存,用 Fossomatic 5000 体细胞仪(Foss 公司,丹麦)检测牛奶中体细胞数。试验奶牛采用散栏饲养,全混合日粮方式饲喂,奶牛分娩前日饲喂 1 次,分娩后日饲喂 3 次、挤奶 3 次,自由饮水。

1.2 方法

1.2.1 蛋白样品制备和 2-DE 取约 5 μ L(300

μ g)蛋白样品与 10 μ L 10% SDS/2.3% 二硫苏糖醇于 95 °C 水浴中孵育 5 min,自然冷却后与 350 μ L 水化上样缓冲液(8 mol · L⁻¹ 尿素,4% CHAPS,2.5 mmol · L⁻¹ TBP,0.5% 固相化 pH 梯度胶条缓冲液)混合,周期性的涡旋 5 min,离心吸取清液均匀加入聚焦盘。将固相化 pH 梯度胶条(17 cm pH 4~7)置入聚焦盘的相应聚焦槽内,然后置于电泳仪(protein IEF CELL, BIO-RAD, USA)中进行等电聚焦;聚焦结束后,胶条依次用含 2.0% 二硫苏糖醇和 2.5% 碘乙酰胺平衡缓冲液(6 mol · L⁻¹ 尿素,2% SDS,20% 甘油,0.375 mol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8)还原和烷基化蛋白。最后将胶条置于 12% 的 SDS-PAGE 凝胶上,低熔点琼脂糖溶液密封胶条,垂直板凝胶电泳仪(Ettan DALT Six electrophoresis unit, GE Healthcare, USA)电泳,循环水浴温度为 12 °C,起始功率为 1 W 电泳 40 min,2 W 电泳 30 min,然后加大功率至 46 W,待溴酚蓝指示剂到底部时停止电泳。

1.2.2 图像采集和分析 将凝胶用固定液(40% 甲醇,10% 乙酸)固定 3 h,MillQ 水清洗 3 次,每次 10 min,加入 SYPRO ruby 染色液振荡染色过夜,10% 甲醇/7% 乙酸冲洗 30 min,去离子水漂洗后用 Fluro-chem(Alphfa Innotech, USA)采集图像。ImageMaster 2D platinum 6.0(GE Healthcare, USA)软件进行背景消减、斑点检测和自动匹配等过程,并对检测的差异表达蛋白点用手工方法校正。考马斯亮蓝染色的凝胶用于差异蛋白点的分离鉴定。

1.2.3 蛋白酶解 手工切割差异蛋白点胶粒移至 1.5 mL 离心管中,胶粒用 200 μ L MillQ 水清洗 30 min;然后用 200 μ L 50% 乙氰溶液清洗 2 次,每次 30 min;再用 200 μ L 50% 乙氰和 50 mmol · L⁻¹ 碳酸氢铵溶液漂洗 30 min,重复 1 次,脱色过夜,100 μ L 乙氰脱水干燥;干燥凝胶颗粒加 10 μ L 20 ng · μ L⁻¹ 测序级胰蛋白酶,37 °C 酶解过夜;提取酶解液,加 10 μ L 50% 乙氰/2% 甲酸,超声 30 min,上清合并到酶解液;重复 1 次。

1.2.4 串联质谱鉴定 混合肽质量采用液相色谱串联离子阱质谱(LCQ Deca Xp plus, Thermo Finnigan, USA)系统分析。进样前色谱柱 BioBasic-18(Surveyor, Thermo, USA)用流动相 A(0.1% 甲酸水溶液)平衡,流动相 B(0.1% 甲酸乙氰溶液)120 min 线性梯度洗脱。进样量 20 μ L,流速 120

$\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。正离子模式检测,全扫描范围是 m/z 400—2 000,MS/MS 数据依赖扫描 5 次。用整合在质谱仪上的检索软件 SEQUEST 搜索 NCBI 非冗余蛋白质数据库(2009 年 2 月 22 日),检索结果用 Single threshold 参数筛选, $\Delta \text{CN} \geq 0.1$; Xcorr 值是 $+1 \geq 1.9$, $+2 \geq 2.2$, $+3 \geq 3.75$ 。

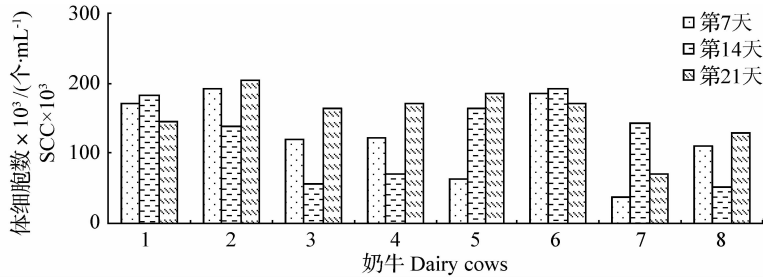


图 1 8 头试验牛分娩后乳中体细胞数检测结果

Fig. 1 The results of somatic cell count in milk of 8 dairy cows after calving

2.2 差异蛋白分析和鉴定

将 7 头健康奶牛分娩前第 21 天、分娩后第 1 天和 21 天的血浆分别等体积混合,然后将混合血浆和 1 头奶牛 3 个时间点的血浆蛋白采用 2-DE 分离。图 2 为 SYPRO ruby 染色的分娩前第 21 天、分娩后第 1 天和 21 天的血浆蛋白图谱。软件自动匹配,以蛋白表达量 2 倍或 2 倍以上变化为检测标准。检测结果发现,与分娩前第 21 天相比,分娩后第 1 天有两个蛋白点表达量升高,且这 2 个蛋白点(蛋白点 1 和 2)在分娩后第 21 天表达量降低;与分娩前第 21 天相比,分娩后第 1 天有 1 个蛋白点(蛋白点 3)表达量下调,至产后第 21 天时表达

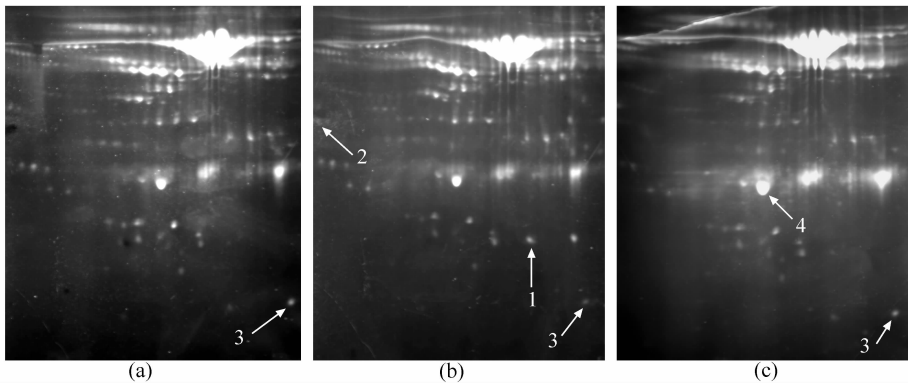
2 结果与分析

2.1 牛奶中体细胞数检测结果

依据分娩后第 7、14 和 21 天牛奶中体细胞数检测结果,选择体细胞数小于 200×10^3 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的 8 头临床健康奶牛用于进一步的试验分析(图 1)。

量增加;此外,还存在 1 个蛋白点(蛋白点 4)在分娩前第 21 天和分娩后第 1 天无差异,而在分娩后第 21 天表达量增加(图 3)。

差异表达的蛋白点质谱鉴定结果如表 1 所示。结合珠蛋白和 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白在分娩后第 1 天表达量急剧增加,它们都是主要由肝脏合成的糖蛋白,且为急性期反应蛋白。分娩后表达量降低的转甲状腺素蛋白也是由肝脏合成,主要存在于血浆中,参与体内甲状腺素的运输和维生素 A 的代谢。分娩后表达量上调的载脂蛋白 A1 主要由肝脏合成,是高密度脂蛋白胆固醇的主要结构蛋白,在脂蛋白代谢中具有重要的生理功能。



(a) 表示预产期前第 21 天血浆蛋白凝胶图谱;(b) 表示分娩后第 1 天血浆蛋白凝胶图谱;(c) 表示分娩后第 21 天血浆蛋白凝胶图谱;1. 结合珠蛋白;2. $\alpha 1$ 酸性糖蛋白;3. 转甲状腺素蛋白;4. 载脂蛋白 A1

(a) Show 2-DE maps of plasma 21 d prior to calving; (b) Show 2-DE maps of plasma protein at 1 d postpartum; (c) Show 2-DE maps of plasma protein at 21 d postpartum; 1. Haptoglobin; 2. Alpha-1 acid glycoprotein; 3. Transferrin; 4. Apolipoprotein A-I

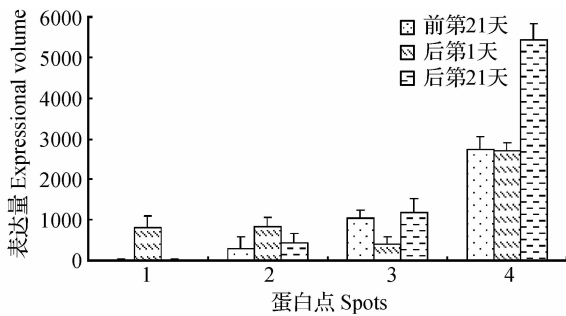
图 2 围产期奶牛血浆蛋白表达图谱

Fig. 2 Analysis of expression protein patterns of plasma from transition dairy cows

表 1 血浆中差异蛋白点的液相色谱串联离子阱质谱鉴定结果

Table 1 Identification of differential expression plasma proteins by LC-MS/MS

蛋白点 Spot	蛋白质 Protein name	登录号 Accession no.	分子质量 Molecular weight	等电点 Isoelectric point	鉴定氨基酸序列 Sequence	覆盖率/% Coverage
1	结合珠蛋白 Haptoglobin	gi:94966763	44 859.08	7.83	APEIANSHVEYSVR; IENGYVEYLVR; LHAGNGVYTFNNK; LPECEAVCGK- PK; TCGDGVYTFNSK; YQCKPYTLR	20.2
2	α 1 酸性糖蛋白 alpha-1 acid glycoprotein	gi:94966811	23 182.5	5.62	DACGPLEKQHEEER; KEFLDVIK; VESDREHFVDLLLSK; WFYIGSAFR; AIQAAFFYLEPR; EYQTIEDK	37.13
3	转甲状腺素蛋白 Transthyretin	gi:27806789	15 726.98	5.90	GSPAANVGVK; FVEGLYKVELDTK; TSESGELHGLTTEDKFVE; GLYK; HY- TIAALLSPYSYSTTAL; VSSPK	46.26
4	载脂蛋白 A1 Apolipoprotein A-I	gi:75832056	28 432.8	5.57	VSILAAIDEASKK; VQELQD- KLSPLAQELR; WHEEVEIYR; DYVA- QFEASALGK; LEALKEGGSLAEY- HAK; QKVQELQDKLSPLAQELR	33.08



1. 结合珠蛋白; 2. α 1 酸性糖蛋白; 3. 转甲状腺素蛋白; 4. 载脂蛋白 A1

1. Haptoglobin; 2. Alpha-1 acid glycoprotein; 3. Transthyretin; 4. Apolipoprotein A-I

图 3 凝胶电泳图谱中 4 个差异蛋白点的表达量

Fig. 3 The expressional volume changes of 4 differentially expressed spots from gel maps

3 讨论

围产期奶牛因分娩、泌乳以及日粮营养的变化,造成机体免疫防御功能下降,导致奶牛分娩后子宫内膜炎、乳房炎等传染性疾病发生率增加。为了从血浆蛋白水平揭示机体免疫功能下降机制,本试验采用二维凝胶电泳结合质谱的方法对围产期奶牛血浆蛋白的变化进行了分析。

结果表明,分娩前后奶牛血浆中转甲状腺素蛋白、载脂蛋白 A1、结合珠蛋白和 α 1 酸性糖蛋白表达发生变化,它们都主要由肝脏合成。转甲状腺素蛋白主要存在于血浆中,参与体内甲状腺素的运输和维生素 A 的代谢。Pösö 等研究表明,干奶期血浆中转甲状腺素蛋白浓度高于泌乳期,此后的研究也发

现,分娩后奶牛血浆中转甲状腺素蛋白的含量下降,同时还伴有血浆视黄醇水平的下降,且产后血浆维生素 A 的下降与奶牛乳房炎发病率的增加相关^[7-8]。我们的试验结果也表明,分娩后奶牛血浆中转甲状腺素蛋白的表达量下降,可能增加了分娩后奶牛对疾病的易感性。

结合珠蛋白的主要功能是与游离血红蛋白结合成稳定的复合物,转运到肝脏后被单核巨噬细胞系统降解;结合珠蛋白和 α 1 酸性糖蛋白属急性期反应蛋白,在组织损伤或炎症时表达量增加。有研究以肝功能的指示剂——血浆对氧磷酶为分类标准,发现奶牛分娩后不论对氧磷酶浓度的高低都伴有结合珠蛋白表达量的急剧增加,但结合珠蛋白的表达量稍有差异,表明急性期蛋白——结合珠蛋白的表达量与炎症严重程度相关^[9-10]。通过 ELISA 方法和放射免疫扩散法分别对分娩前 1 周至产后 3 周血浆中结合珠蛋白和 α 1 酸性糖蛋白的检测表明,它们在分娩后表达量增加,此后又下降,并发现肠胃外投 L-胱氨酸盐对急性期蛋白的表达量具有调节作用^[11]。Cairolì 等采用蛋白质组学方法对分娩前后血清的检测结果表明,结合珠蛋白和 α 1 酸性糖蛋白在分娩后表达量也上调^[6]。这可能是,分娩时母体对胎儿的特异性免疫耐受遭到破坏,使一些促炎症细胞因子产生,从而导致肝脏合成的结合珠蛋白和 α 1 酸性糖蛋白等急性期蛋白表达量增加。然而,对自然发生和试验诱导乳房炎奶牛外周血和乳中结合珠蛋白的检测表明,发生炎症反应时结合珠蛋白的表达量也增加,可能是肝脏表达的这些蛋白与机体免疫防御功能有关^[12-13]。

此外, Loor 等对围产期奶牛肝脏基因表达变化的研究表明, 具有转运功能的胰岛素样生长因子结合蛋白 3、抗氧化功能的谷胱甘肽硫转移酶 M5 和维持葡萄糖动态平衡的 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 基因在分娩前第 65 天至分娩后第 14 天降低 3 倍, 围产期肝脏基因的表达变化可能是为了适应奶牛分娩、泌乳所致的生理代谢变化^[14]。但是, Janovick-Guretzky 等对围产期、日粮补饲以及疾病条件下牛肝脏 β -肌动蛋白、核糖体蛋白 S9 等管家基因 mRNA 的检测发现, 它们的表达量受机体生理状态、日粮类型和采食量等的影响^[15]。由此表明, 奶牛围产期生理变化机理的阐明需要综合考虑各方面的影响因素。

4 结 论

奶牛分娩后主要由肝脏合成的转甲状腺素蛋白表达量下降, 而结合珠蛋白和 α 1 酸性糖蛋白等急性期蛋白的表达量增加。这可能是临近分娩时肝脏对生理代谢变化的应答能力发生变化, 造成肝脏合成蛋白的模式改变, 合成和分泌的蛋白优先用于分娩、泌乳导致的代谢变化的应答。因而, 降低围产期奶牛急性期应答将有利于改善奶牛的生产性能和繁殖性能。

参考文献:

- [1] HAMMON D S, EVJEN I M, DHIMAN T R, et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 113(1-2):21-29.
- [2] KEHRLI M E, Jr. NONNECKE B J, ROTH J A. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period[J]. *Am J Vet Res*, 1989, 50(2):207-214.
- [3] HARP J A, WATERS T E, GOFF J P. Adhesion molecule and homing receptor expression on blood and milk polymorphonuclear leukocytes during the periparturient period of dairy cattle[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 104(1-2):99-103.
- [4] MONFARDINI E, PAAPE M J, WANG Y, et al. Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition [J]. *Vet Res*, 2002, 33(3):271-281.
- [5] LIPPOLIS J D, PETERSON-BURCH B D, REINHARDT T A. Differential expression analysis of proteins from neutrophils in the periparturient period and neutrophils from dexamethasone-treated dairy cows [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 111(3-4):149-164.
- [6] CAIROLI F, BATTOCCHIO M, VERONESI M C, et al. Serum protein pattern during cow pregnancy: Acute-phase proteins increase in the peripartum period[J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(8):1617-1625.
- [7] PÖSÖ A R, LINDBERG L A. Plasma protein synthesis and serum amino acids in dry and lactating dairy cows[J]. *Zentralbl Veterinarmed A*, 1994, 41(1):72-75.
- [8] REZAMAND P, HOAGLAND T A, MOYES K M, et al. Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey dairy cows with or without subclinical mastitis [J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(11):5097-5107.
- [9] BIONAZ M, TREVISI E, CALAMARI L, et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(4):1740-1750.
- [10] BERTONI G, TREVISI E, HAN X, et al. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91(9):3300-3310.
- [11] JAFARI A, EMMANUEL D G V, CHRISTOPHERSON R J, et al. Parenteral administration of glutamine modulates acute phase response in postparturient dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89(12):4660-4668.
- [12] ECKERSALL P D, YOUNG F J, McCOMB C, et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis[J]. *Veterinary Record*, 2001, 148(2):35-41.
- [13] ECKERSALL P D, YOUNG F J, NOLAN A M, et al. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis[J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89(5):1488-1501.
- [14] LOOR J J, DANN H M, EVERTS R E, et al. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function [J]. *Physiol Genomics*, 2005, 23(2):217-226.
- [15] JANOVICK-GURETZKY N A, DANN H M, CARLSON D B, et al. Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment[J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(5):2246-2252.