

在镉盐胁迫下用蛋白质组学技术筛选与鉴定海兔亚口腔神经节的差异蛋白质

黄琳¹, 陈东仕¹, 颜利¹, 方财王¹, 黄河清^{1,2,3}

(1. 厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术学系, 2. 海洋与环境科学学院近海海洋科学国家重点实验室, 3. 化学化工学院化学生物学系, 厦门 361005)

摘要 以蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) 的口腔神经节 (Buccal ganglion, BG) 为研究对象, 按 BG 形态对称性, 解剖成亚 BG (sub-BG, SBG), 并分为左 SBG 和右 SBG, 简称为 LSBG 和 RSBG. 用双向凝胶电泳 (2D-PAGE) 技术优化分离 LSBG 和 RSBG 全蛋白质, 并采用蛋白质组学和数据库比对技术筛选与鉴定差异蛋白质. 实验结果表明, LSBG 和 RSBG 之间的差异蛋白质主要由活性多肽的前体蛋白或降解后大片段多肽组成, 它们对维持 BG 的生理功能起着重要的作用. 在急性镉盐 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 胁迫下, NLCS 的 LSBG 和 RSBG 表达了由镉盐诱导的差异蛋白质, 并采用蛋白质组学技术分别分离、筛选和鉴定, 其主要的差异蛋白质有下调的肌球蛋白、钙结合蛋白、上调的热休克蛋白和硫氧还蛋白. 这些蛋白质可能与 BG 细胞抗镉毒性有关, 部分差异蛋白质适合于监测镉盐污染且开展毒理学研究的蛋白指示物.

关键词 海兔; 亚口腔神经节; 蛋白质组学; 镉盐; 蛋白指示物

中图分类号 O629.72; Q51 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)02-0314-06

海兔 (*Aplysia*) 是海洋中常见的雌雄同体动物^[1,2], 其中枢神经系统 (CNS) 主要由口腔神经节 (Buccal Ganglion, BG)、大脑神经节 (Cerebral Ganglion, CG) 和腹部神经节 (Abdominal Ganglion, AG) 等组成^[2], 但 NLCS 的 CNS 却缺少 AG^[3,4]. 海兔 BG 细胞直径位于 100~200 μm 之间^[5], BG 是如何行使其控制口腔及其附属器官活动; 如何调控海兔的摄食活动和海兔之间的信息交流等一直是神经科学家关注且亟待解决的问题之一. 海兔吸引素是一种由 58 个氨基酸残基组成的水溶性多肽^[6], 主要来源于海兔卵腺 (Egg cordons), 并作为海兔之间进行信息传递与交流的物质之一^[1,6]. 然而, 识别和降解吸引素的生理功能是否与海兔 BG 有关尚不清楚. Hummon 等^[7] 发现海兔 BG 中含有酸性多肽 (Acidic peptide, AP) 内切酶. 我们以 AP 为探针结合 MALDI-TOF 质谱分析技术发现海兔 CG 中含有超微量 L-L 或 L-K 多肽内切酶^[8]. 通过优化分离 NLCS 的 BG 全蛋白, 并应用肽质量指纹 (Peptide mass fingerprinting, PMF) 图谱和数据库比对技术鉴定了 96 个蛋白质^[4], 但多数蛋白质的生理功能至今尚不清楚. 本文在前期研究基础上, 将 NLCS 的 BG 进一步分为 LSBG 和 RSBG, 并用蛋白质组学技术分离与鉴定 LSBG 和 RSBG 之间差异蛋白质. 在模拟镉盐胁迫环境下, 分离筛选和鉴定 LSBG 和 RSBG 分别受镉盐诱导前后的差异蛋白质, 为后续连续监测流动海水中镉盐污染程度及其危害性提供蛋白指示物.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

REFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 超速冷冻离心机 (Beckman 公司, 美国); 真空浓缩离心机 (Labconco); Investigator HT Database 图像分析软件 (Genomic Solutions).

载体两性电解质 (Amersham 公司), pH = 5~8; 胰蛋白酶购自 Promega 公司; α -氰-4-羟肉桂酸 (HCCA) 购自美国 ICN 生物医学公司; SDS 分子量标准购自 Fermentas 公司; 二硫苏糖醇 (DTT)、超纯

收稿日期: 2008-06-02.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 40776060) 和福建省高校创新研究团队基金资助.

联系人简介: 黄河清, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事蛋白质结构与功能及生物分析化学研究. E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

尿素(urea)、过硫酸铵(APS)、硫脲、诺乃洗涤剂(Nomidet P-40, NP-40)、3[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)均购置于上海生工集团。

1.2 海兔亚口腔神经节分离

NLCS 捕获于厦门市内海浅滩区域。每只 NLCS 净重在 80 ~ 200 g 之间,采集后置于 14 °C 海水培养箱内,人工养殖数天。取 30 只 NLCS 置于 14 °C 海水中,按每只 NLCS 体重注入等体积的氯化镁溶液(28 mmol/L)于体内。待 NLCS 组织软化后,迅速在解剖镜下分离 BG,并用蒸馏水清除 BG 表面盐分和杂质。参考 BG 对称性形态结构,选用微型手术刀对 BG 进行对称性解剖,并分为亚左 BG 和亚右 BG,称为 LSBG 和 RSBG。

1.3 海兔亚口腔神经节全蛋白制备

将 LSBG 和 RSBG 分别收集于 0.5 mL 的离心管中,置于 4 °C 冰浴中,加入 300 μ L 裂解液[8 mol/L 尿素、40 mmol/L Tris、2 mol/L 硫脲、质量分数为 4% 的 CHAPS、10 mmol/L DTT 和 1 mmol/L EDTA (pH \approx 7.4)],采用超声破碎技术振荡破碎 8 ~ 10 min,收集破碎液置于 4 °C 冰箱中 24 h 以上,或确保海兔 BG 已最大量地释放细胞内含物。将 BG 内含物置于冷冻离心机内,以 100000 r/min 速度超速离心 20 min,去除离心液上层的大量脂类化合物,分离提取离心液中间层的透明澄清蛋白质样品,即为 LSBG 和 RSBG 的全蛋白提取液,供 2D-PAGE 分离。LSBG 和 RSBG 蛋白质含量测定按常规的考马斯亮蓝法分析,标准蛋白质选择纯度为 99% 的牛血清白蛋白。

1.4 急性镉盐胁迫条件下海兔亚口腔神经节制备

挑选 40 只体重为 160 ~ 200 g 的海兔,随机分成对照组和实验组,在无污染海水小池中饲养 2 d。人工配置 10 μ g/mL 的氯化镉作为污染源,构成镉盐胁迫环境且用于养殖海兔。养殖时间控制在 24 ~ 26 h 内,随后立即分离 LSBG 和 RSBG,收集且置于 -70 °C 冻存备用。按 1.3 节方法制备海兔亚口腔神经节全蛋白,海水中的氯化镉浓度用电感耦合等离子体质谱法进行监测和控制。

1.5 口腔神经节组织切片与染色

按常规组织切片技术制备海兔 BG 组织切片,然后进行脱蜡和苏木精染液染色,置于显微镜(400 放大倍数)下观察和拍摄。

1.6 双向凝胶电泳

参考文献[3,9]的 2D-PAGE 技术,优化分离海兔 LSBG 和 RSBG 全蛋白质,并用银染法进行蛋白质斑点染色。用图像扫描仪对已染色后的全蛋白质分离胶板进行透射扫描。全蛋白质斑点图谱用 Investigator HT Database 软件进行图像分析,筛选差异蛋白质。

1.7 蛋白质的原位酶解与分析

采用自制取样器,直接从分离胶上获取蛋白质斑点样品,并保存在 0.5 mL 离心管中,进行酶解。酶解和肽段提取的过程参照 Zhuo 等^[10]的方法进行。

1.8 质谱分析

将蛋白质酶解样品与 HCCA 基质(HCCA 溶于 40% 乙腈,0.1% TFA 溶液至过饱和)以 1:1 的体积比混合,取 1 μ L 混合液点滴在不锈钢 MALDI-TOF 质谱点样板上,置于空气中自然风干后进行质谱分析。质谱分析条件:高分辨率反射模式,离子源加速电压 1 为 20 kV,加速电压 2 为 18.85 kV,质谱信号单次扫描累加 10 次,测定正离子谱。采用外标法(AP 分子量 2961000)标定多肽质谱峰峰位。

1.9 数据库检索与蛋白质鉴定

参考 Zhu 等^[11]和 Zhou 等^[12]的方法进行蛋白质鉴定。在 MASCOT 检索网站(<http://www.matrix-science.com>)进行检索,利用 SWISS-PORT,MSDB 和 NCBI 等 3 个数据库对混合物肽段质量数据进行检索和蛋白质鉴定。

2 结果与讨论

2.1 海兔口腔神经节显微图

图 1(A)为 NLCS 口腔神经节的显微图谱。可以看出,BG 具有对称的形态结构,根据图示的对称

解剖线进一步分解为 LSBG 和 RSBG. 图 1(B) 为在镉盐胁迫下, NLCS 口腔神经节的显微图. 可以看出, 海兔受镉盐胁迫后, LSBG 中心区域含有相对较大面积的斑点聚合体, 说明了 LSBG 组织受急性镉盐损伤后, 造成斑点聚合体现象. 从比较正常的 BG 显微形态图[图 1(A)]可发现, 图 1(B) 中的 RSBG 组织显微形态图与图 1(A) 中的 RSBG 极为相似, 均未受到急性镉盐的创伤. 为了证实这一实验现象, 选用铅盐($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)作为急性污染源, 其污染 NLCS 时间长达 24 h, 所观察到的实验现象与图 1 极为相似. 由此看来, 海兔 BG 可进一步分为亚 BG, 其中 LSBG 和 RSBG 可能执行不同的生理功能; LSBG 易受各类重金属污染物的侵袭, 并造成器官组织受创伤现象, 而 RSBG 却具有天然的抗重金属创伤的屏障, 因此可认为 RSBG 和 LSBG 之间存在细胞结构上的差异性.



Fig. 1 Modal micrography of sub-buccal ganglion in *Aplysia* under the stress of cadmium chloride

(A) Normal buccal ganglion; (B) the buccal ganglion under the stress of cadmium chloride at $10 \mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2 RSBG 和 LSBG 之间的差异蛋白

分别制备 RSBG 和 LSBG 全蛋白样品, 其 2D-PAGE 图谱如图 2 所示. 经过 Investigator HT Database 软件统计图 2(A) 和(B) 中均含有约 300 个蛋白质斑点, 其中蛋白质斑点和亚基分子量的分布规律较为相似, 说明在 RSBG 和 LSBG 之间的多数蛋白均是同类蛋白质, 并同步执行着许多相似的生理功能. 参考图 2 结果, 并与前期有关 NLCS 的 BG 全蛋白的 2D-PAGE 图谱相比可见, 其蛋白质分布规律也存在着较高的相似性^[4]. 经统计分析发现, RSBG 和 LSBG 之间存在着 15 个差异蛋白质斑点, 其中 LSBG 有 9 个差异点, RSBG 有 6 个差异点. 选用 PMF 技术分别对这 15 个蛋白质差异点进行逐一鉴定, 获得 9 张较为理想的 PMF 谱图, 鉴定成功率约为 60% 以上; 部分蛋白质斑点匹配率不是很高, 主要是一些糖蛋白、膜蛋白、假定蛋白和酶类.

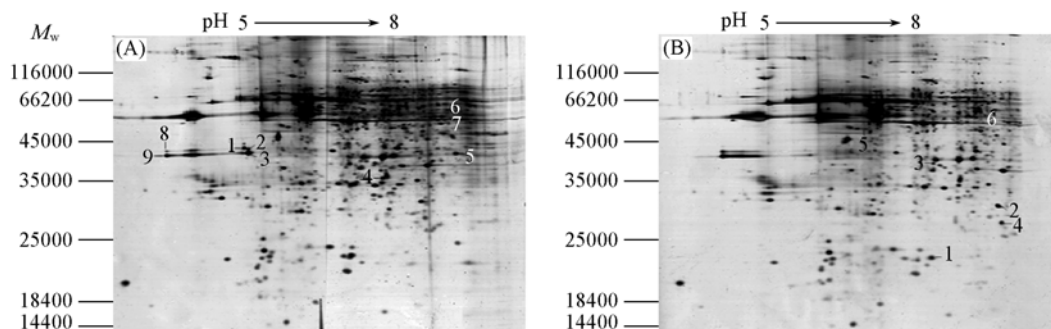


Fig. 2 2D-PAGE map of sub-buccal ganglion proteome in NLCS

(A) LSBG; (B) RSBG.

2.3 在镉盐胁迫下亚口腔神经节的差异蛋白质

图 1 结果已显示, 流动海水中的镉盐能够胁迫 NLCS, 并使亚 BG 组织发生病变, 最后由急性重金属中毒而引发死亡(48 ~ 54 h). 针对这一实验现象, 选用 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 镉盐作为污染源, 镉盐暴露时间为 24 h. 用蛋白质组学技术分离、筛选和鉴定在镉盐胁迫(暴露)前后, NLCS 口腔亚神经节的差异蛋白质. 图 3 为 NLCS 受镉盐胁迫(暴露)前后, 其 LSBG 全蛋白质的 2D-PAGE 图谱. 经过 Investigator HT Database 软件统计, 在图 3(A) 和(B) 中均含有约 300 个的蛋白质斑点. 虽然两图中所显示的斑点和蛋白质亚基分子量分布规律较为相似, 但还是存在着一定的差异蛋白. 这说明了 NLCS 受镉盐胁迫(暴露)前后, 它的 LSBG 组织或细胞结构不仅受损, 而且还表达了由镉盐诱导的应激(差异)蛋白质.

用蛋白质组分析软件对图 3(A) 和(B) 进行分析发现, 经镉盐诱导后, LSBG 和 LSBG_{Cd} 共产生了 25 个差异蛋白质, 其中包括 9 个下调蛋白和 16 个上调蛋白. 采用 PMF 技术鉴定这些差异蛋白质, 获得了

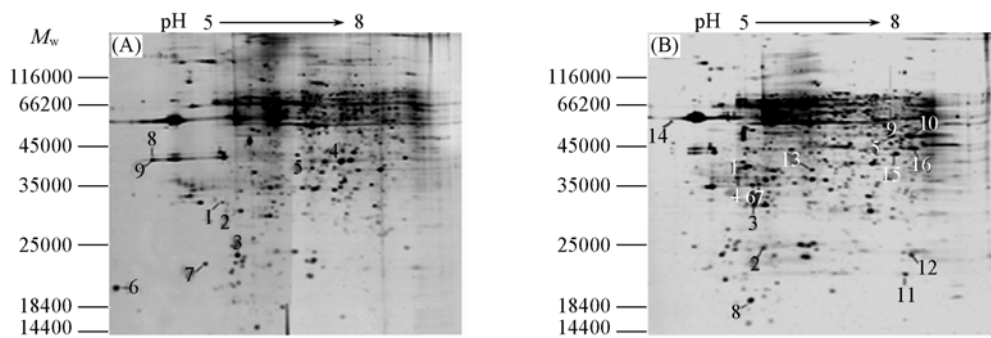


Fig. 3 2D-PAGE maps of sub-buccal ganglion proteome (LSBG) in NLCS under the stress condition of cadmium chloride at 10 µg/mL

(A) LSBG; (B) LSBG_{Cd} in the stress of cadmium chloride.

19 个鉴定结果, 鉴定成功率为 76%.

从已检索的结果可获悉, LSBG_{Cd}15 蛋白斑点匹配率较高, 检索分值为 80, 超过高匹配率 76 的分值限度, 鉴定为硫氧还原蛋白质 (Thioredoxins). 将其它一些匹配率较高 (60 分值以上) 的蛋白质鉴定为假定蛋白 (Hypothetical protein XCC4211, LSBG8)、1,5-二磷酸核酮糖-羧化酶/加氧酶的亚基 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, LSBG9)、类似 KIAA0614 蛋白 (Similar to KIAA0614 protein, partial, LSBG_{Cd}1)、甲羧基四氢叶酸水解酶 (Formyltetrahydrofolate hydrolase, LSBG_{Cd}3)、未知蛋白 (Unknown protein, LSBG_{Cd}6)、含氮还原酶 (Azoreductase, LSBG_{Cd}8) 等. 这些蛋白质来源于 LSBG 和 LSBG_{Cd} 之间的差异蛋白质, 推测均为镉盐诱导的结果, 是 NLCS 在抗镉盐毒性过程中产生的应激蛋白质, 显示出上调或下调现象, 也可能存在研究 NLCS 中枢神经系统毒理学和监测流动海水中镉盐污染程度及危害性的蛋白标志物. 为提高蛋白鉴定的可信度, 对全球各大文献信息库与数据库进行检索和比对发现, 在这 19 个差异蛋白质点中, 已有 2 个蛋白质参与由镉盐诱导神经致毒途径的报道^[13,14]. 采用 LOCtree 数据库对这 2 种差异蛋白质进行亚细胞定位, 结果见表 1.

Table 1 Differential proteins located with LOCtree database (Cd pollution) in tissue cell

Spot	Description	Previous reports (Cd response)	Reference	Subcellular localization
BGL _{Cd} 14	Heat shock protein	Heat shock protein	[13]	Cytoplasmic
BGL _{Cd} 15	Thiol-disulfide isomerase and thioredoxins	Thioredoxins	[14]	Nuclear

热休克蛋白 (Hsp) 的主要生理功能是辅助蛋白质折叠、去折叠、维持细胞蛋白质结构稳定性及防止蛋白的变性. 昆虫 *Aedes albopictus* C6/36 细胞系细胞对 Cd 的吸收、防御机制及细胞启动防御机制主要表现为诱导热激蛋白表达^[15], 从而抵抗蛋白质变性或凝集.

硫氧还原蛋白质 (Thioredoxin, Trx) 与硫氧还原酶 (Thioredoxin reductase, TrxR) 和 NADPH 一起构成硫氧还原蛋白系统 (Trx 系统), 并在调节细胞内氧化还原平衡中发挥重要作用^[16]. Trx 不仅可激活氧化还原酶的活性, 而且可发挥活性氧 (ROS) 的清除剂作用. Trx 通过巯基氧化还原调节 NFκB^[17] 和丝裂原活化激酶 (MAPK) 的活性, 并影响细胞内的分子通道. 不同金属离子对 HeLa 细胞中 Trx 的氧化作用表明镉盐对 Trx 的作用尤其明显; 随着镉盐浓度的增加, Trx 的氧化还原作用速率明显下降^[18]. 表明 Trx 对镉盐浓度呈正对应的关系, 可认为 NLCS 的 BG 中 Trx 蛋白质表达量与流动海水中的镉盐污染程度存在对应关系, 从而推测 Trx 蛋白质可作为监测流动海水镉盐污染程度的蛋白质标记物之一.

图 4 为 NLCS 受镉盐胁迫 (暴露) 前后, RSBG [图 4(A)] 和 RSBG_{Cd} [图 4(B)] 全蛋白质的 2D-PAGE 图谱. 经过 Investigator HT Database 软件统计发现, 图 4(A) 和 (B) 中含有约 300 个蛋白质斑点, 其中斑点和蛋白质亚基分子量分布规律较为相似, 但还是存在着一定量的差异蛋白. 说明 NLCS 受镉盐胁迫 (暴露) 前后, 其 RSBG 组织或细胞结构可能发生了轻微损伤, 并表达了由镉盐诱导的应激 (差异) 蛋白质.

对图 4 进行剖析同样可以发现, NLCS 经急性镉盐诱导前后, NLCS 的 RSBG 共产生 21 个差异蛋白质, 其中有 8 个下调蛋白, 13 个上调蛋白. 采用 PMF 技术对 21 个差异蛋白质进行鉴定, 共获得 15 张

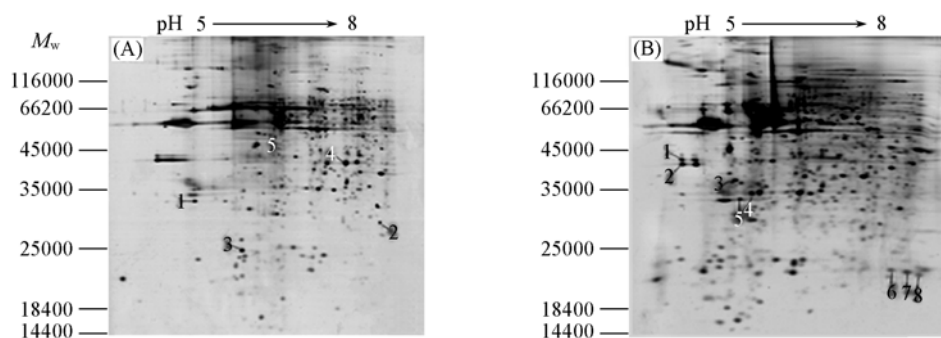


Fig. 4 2D-PAGE maps of buccal sub-ganglion(RSBG) proteome in NLCS under the stress condition of cadmium chloride at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(A) RSBG; (B) RSBG_{cd} in the stress of cadmium chloride.

PMF 谱图, 差异蛋白质鉴定成功率为 71.4%.

从检索结果中可以获悉, 差异蛋白 RSBG1 的蛋白点匹配率较高, 分值为 102, 超过高匹配率 76 的分值限度, 鉴定为肌球蛋白(Tropomyosin). 其它一些匹配率较高(60 分值以上)的蛋白质为尚未命名蛋白(Unnamed protein product, RSBG7)、类似 KIAA0614 蛋白(Similar to KIAA0614 protein, RSBG_{cd}6)、甲羧基四氢叶酸水解酶(Formyltetrahydrofolate hydrolase, RSBG_{cd}3)、未知蛋白(Unknown protein, RSBG_{cd}4)、含氮还原酶(Azoreductase, RSBG_{cd}11)、类似人血清白蛋白(Similar to human albumin, RSBG_{cd}8)和 PRO 蛋白(PRO2619, RSBG_{cd}9). 在这 15 个差异蛋白质中, RSBG 有些上调和下调蛋白与 LSBG 相同, 其中有 3 个下调蛋白, 即虾红素类型金属蛋白酶(Astacin-type metalloprotease, LSBG2, RSBG2)、假定蛋白(Hypothetical protein, LSBG4, RSBG4)、GTP 结合蛋白(Predicted GTP-binding protein, LSBG5, RSBG5); 而共同发生上调的蛋白有 5 个, 其中为假定蛋白(Hypothetical protein DDB0219224, LSBG_{cd}2, RSBG_{cd}2)、类似 KIAA0614 蛋白(Similar to KIAA0614 protein, LSBG_{cd}1, RSBG_{cd}6)、甲羧基四氢叶酸水解酶(Formyltetrahydrofolate hydrolase, LSBG_{cd}3, RSBG_{cd}3)、未知蛋白(Unknown protein, LSBG_{cd}6, RSBG_{cd}4)和含氮还原酶(Azoreductase, LSBG_{cd}8, RSBG_{cd}11), 这些蛋白可能属于 BG 中结构特性相对稳定的功能蛋白质. 为提高鉴定差异蛋白的可信度, 对这 15 个差异蛋白进行文献检索比对发现, 仅有肌球蛋白(Tropomyosin, RSBG 1)与钙结合蛋白(分子量为 16000 的 Calcium-binding protein, RSBG 3)可作为镉盐致毒机理研究的蛋白指示物^[18,19]. 把已鉴定的差异蛋白质经 LOCtree 软件归类后发现, 这些蛋白质均属于细胞质蛋白质, 说明了镉盐在 RSBG 组织细胞中也能产生毒害作用, 其发生场所主要是细胞质.

本文结果表明, BG 受镉盐污染后, 海兔的 RSBG 和 LSBG 表现出差异蛋白质(例如: 硫氧化还原蛋白、热休克蛋白、肌球蛋白以及钙结合蛋白), 从某种程度上解释了镉盐的神经致毒途径. 将部分差异蛋白质用于环境污染监测, 可拓展环境污染生物监测新技术领域中蛋白质标记物的应用; 另外, 重金属铜盐、镉盐和锌盐均能引起肝脏或肾脏中金属硫蛋白的高表达^[20], 但这一现象尚未在海兔 BG 中发现. 可见, 蛋白质组学技术是筛选与鉴定中枢神经系统中重要蛋白质的有效手段之一.^[21,22].

参 考 文 献

- [1] Huang H. Q., Lu Y. J., Lin Q. M., *et al.*. *Chin. J. Anal. Chem.* [J], 2007, **35**: 1105—1110
- [2] Kandel E. R.. *Bioscience Reports*[J], 2001, **21**: 565—611
- [3] FENG Li-Jian(冯丽剑), HUANG Lin(黄琳), ZHUO Hui-Qin(卓慧钦), *et al.*. *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学)[J], 2008, **36**: 577—582
- [4] CHEN Dong-Shi(陈东仕), HUANG He-Qing(黄河清), WU Han-Zhi(吴韩志), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(7): 1257—1261
- [5] Cummins S. F., Degan B. M., Nagle G. T.. *Peptides*[J], 2008, **29**: 152—161
- [6] Akalal D. B. G., Cummins S. F., Painter S. D., *et al.*. *Peptide*[J], 2003, **24**: 1117—1122
- [7] Hummon A. B., Huang H. Q., Khley W. P., *et al.*. *J. Neurochem.* [J], 2002, **82**: 1398—1405

- [8] LIN Qing-Mei(林庆梅), HUANG Hui-Ying(黄慧英), HUANG He-Qing(黄河清), *et al.*. Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2006, **34**: S95—S99
- [9] WANG Ya-Dong(王亚冬), WU Jin-Dao(吴金道), JIAN Zhong-Li(江中立), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(11): 2065—2072
- [10] ZHOU Hui-qin, HUANG He-qing, JIN Hong-wei, *et al.*. Chem. Res. Chinese Universities[J], 2008, **24**(1): 84—91
- [11] Zhu J. Y., Huang H. Q., Bao X. D., *et al.*. Aquatic Toxicology[J], 2006, **78**: 127—135
- [12] Zhou H. Q., Huang L., Feng L. J., *et al.*. Anal. Biochem. [J], 2008, **378**: 151—157
- [13] Lee M. S., Lee S. B., Park C. H., *et al.*. Chemosphere[J], 2006, **65**: 1074—1081
- [14] Hansen J. M., Zhang H., Jones D. P.. Free Radical Biology & Medicine[J], 2006, **40**: 138—145
- [15] Feder M. E., Hofmann G. E.. Annu. Rev. Physiol. [J], 1999, **61**: 243—282
- [16] Blazejczyk M., Wojda U., Sobczak A.. Biochim. Biophys. Acta(BBA)—Molecular Basis of Disease[J], 2006, **1762**: 66—72
- [17] Hansen J. M., Zhang H., Jones D. P.. Free Radical Biology & Medicine[J], 2006, **40**: 138—145
- [18] Silvestre F., Dierick J. F., Dumont V.. Aquatic Toxicology[J], 2006, **76**: 46—58
- [19] Miyado K., Kimura M., Taniguchi S.. Biochem. Biophys. Res. Comm. [J], 1996, **225**: 417—435
- [20] ZHAO Rui(赵锐), JI Jian-Guo(纪建国), YUAN Hong-Sheng(袁洪生), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(6): 1086—1090
- [21] DONG Lei(董雷), JIANG Ning(蒋宁), ZHOU Wen-Xia(周文霞), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(2): 274—277
- [22] YE Neng-Sheng(叶能胜), ZHANG Rong-Li(张荣利), LUO Guo-An(罗国安), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(10): 1881—1886

Differential Proteins of Sub-buccal Ganglions Selected and Identified with Proteomic Techniques in *Aplysia* Under the Stress Condition of Cadmium Chloride

HUANG Lin^{1,2}, CHEN Dong-Shi¹, YAN Li¹, FANG Cai-Wang^{1,3}, HUANG He-Qing^{1,2,3*}

(1. Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences,

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science,

3. Department of Chemical Biology, College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The buccal ganglion(BG) was symmetrically divided into two sub-BG(SBG) in *Aplysia* (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) with reference to its ganglion shape, called left SBG(LSBG) and right SBG(RSBG). The whole proteins both LSBG and RSBG were optimally separated *via* two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2D-PAGE), respectively. The differential proteins were further selected and identified by proteomic and comparison database techniques. The experimental results indicate that these differential proteins between LSBG and RSBG are identified to be the precursor proteins or the large segments of active peptides, which both proteins may play the important role in maintaining the physiological function of BG. Both LSBG and RSBG in NLCS can express the differential proteins induced with the cadmium under the stress of actual cadmium chloride at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, these proteins were effectively separated, selected and identified with proteomic techniques, indicating that these proteins were considered to be the down-regulated proteins such as ropomyosin and $M_w = 16000$ calcium-binding, and the up-regulated proteins such as heat shock protein and thioredoxin. We suggest that these proteins be tightly connected with mithridatism of cadmium in BG cells and, as protein markers in part, be suit for monitoring pollution level of cadmium and developing the research focused on toxicology.

Keywords *Aplysia*; Sub-buccal ganglion; Proteomics; Cadmium chloride; Protein marker

(Ed.: H, J, Z)