

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2023.01.001

蛋白质组学技术在动物科学中的研究进展

李蕾蕾¹, 黄增文^{2*}, 顾亚玲¹, 张娟¹, 冯小芳¹, 王中成²

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 西昌学院动物科学学院, 四川 西昌 615000)

摘要:蛋白质组学在后基因组时代以其独特的角度和重要的作用已成为生命科学领域研究的热点内容。动物科学作为生命科学的一个重要分支,其相关研究对人类的生活有着重要意义。为了系统地了解 and 展望蛋白质组学技术在动物科学中的研究进展,综述了蛋白质组学的概念及其相关技术,归纳和评析了近年来蛋白质组学在动物繁殖、营养、遗传育种和疾病防治方面的研究现状。

关键词:蛋白质组学; 生命科学; 动物科学; 蛋白质鉴定; 畜牧业应用

中图分类号:Q51 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2023)01-0001-05

Advances in Proteomics Technology in Animal Science

LI Leilei¹, HUANG Zengwen^{2*}, GU Yaling¹, ZHANG Juan¹,
FENG Xiaofang¹, WANG Zhongcheng²

(1. Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China;

2. College of Animal Science, Xichang University, Xichang, Sichuan 615000, China)

Abstract: Proteomics has become a hot topic in life sciences with its unique perspective and important role in the post-genomic era. As an important branch of life sciences, the research of animal science bears great significance on human life. The application of proteomics in animal science has become widespread. This paper expounds the concept of proteomics and its related technologies, and summarizes and reviews the current status of proteomics research in animal reproduction, nutrition, genetic breeding and disease control in recent years. It aims to provide a theoretical basis for research and production practice in the field of animal science in terms of the protein level.

Keywords: proteomics; life sciences; animal science; protein identification; animal husbandry applications

0 引言

蛋白质作为生物体的重要组成部分,是生命活动的主要载体,也是生命现象复杂多变的主要原因。蛋白质水平由基因表达决定,但生物体往往只表达基因组的部分序列,同时表达的水平 and 程度也与生物体所处外部环境和内部状态密切相关。基因表达水平的高低并不意味着机体内相应蛋白质活性的高低,而且对于蛋白质复杂的翻译后修饰过程从基因水平也不能给予有效解释,但这些修饰过程却对蛋白质功能的发挥起着至关重要的作用^[1]。因此,只有将机体内所有蛋白质看作一个整体开展蛋白质组学研究,才有可能认识生命活动的基本规

律^[2]。随着人类生活质量的不断提高,人们对于动物产品的需求已经从追求数量转变为要求其品质,而动物产品品质的提高则主要取决于动物生产技术的不断创新和研发技术的科学发展。近年来蛋白质组学技术不仅为动物繁殖、营养、遗传育种和疾病诊断与防控方面的研究做出了重要贡献,也为动物生产实践向着更高水平发展奠定了理论基础。

1 蛋白质组学概况

蛋白质组的概念是由 Wilkins 和 Williams 在 1994 年首次提出,指基因组表达的所有相应蛋白质的集合,即细胞、组织或机体全部蛋白质的存在及其活动方式^[3]。而以蛋白质组为研究对象的蛋白质

收稿日期:2022-09-27

基金项目:西昌学院博士科研启动基金(YBZ202211)。

作者简介:李蕾蕾(1998—),男,宁夏吴忠人,硕士研究生,主要研究方向:动物遗传育种与繁殖。*通信作者:黄增文(1984—),男,四川达州人,副教授,博士,主要研究方向:畜禽分子育种。

组学,就是研究这些蛋白质组成及其变化规律的一门科学,主要内容涉及多个方面,如蛋白质鉴定和定量、蛋白质间的相互作用、翻译后修饰和功能分析等^[4]。同时蛋白质组学的出现补充了基因组学和转录组学的不足,提供了从蛋白质水平上大规模直接研究基因功能的方法。通过分析特定蛋白质的结构和功能,广泛应用于鉴定和定量细胞、组织或生物体中的蛋白质^[5]。如今在动物科学领域已开展

了众多蛋白质组学的相关研究,这些研究成果为该领域在蛋白质水平上的深入研究做出了重大贡献,也促进了动物科学研究的发展。

2 蛋白质组学分析流程

常规的蛋白质组学分析流程如图 1 所示,通常包括样品制备、蛋白分离、蛋白鉴定和数据分析^[6]。

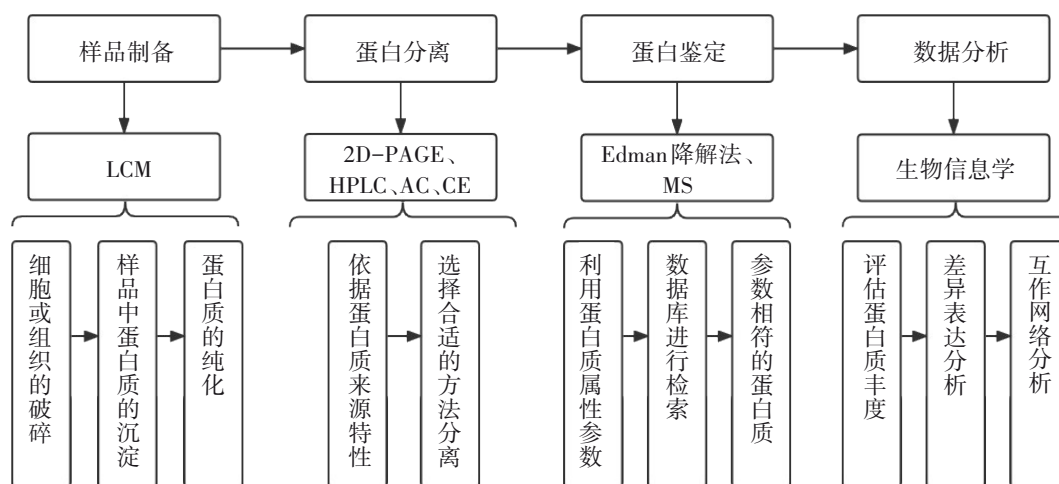


图 1 蛋白质组学分析流程

2.1 蛋白质样品制备

蛋白质样品的制备是蛋白质组学研究的第一步,样品质量直接影响后续实验的研究结果。样品制备的步骤首先是细胞或组织的破碎,其次是沉淀样品溶液中的蛋白质并去除杂质,最后是样品中蛋白质的纯化。激光捕获显微切割(LCM)是蛋白质组学样品制备的常用技术,其原理是用乙烯乙酸盐聚合物覆盖在被选择细胞上,然后用红外激光照射使膜与组织结合,便可将靶细胞从切片分离^[7]。在制备过程中应尽可能采取成熟、简单的方法以减少蛋白质丢失,制备好的样品应低温保存,防止蛋白质变性。

2.2 蛋白质分离技术

现在,蛋白质的分离、提取技术越来越趋向于综合应用,但蛋白本身所具有的各种特性都可直接影响具体分离手段的选择。因此,根据蛋白质来源及特性选择合适的分离方法至关重要^[8]。常用的蛋白质分离技术包括双向凝胶电泳(2D-PAGE)、高效液相色谱(HPLC)、亲和层析(AC)、毛细管电泳(CE)等^[9-10]。表 1 总结了各种蛋白质分离技术的原理及其特点。

2.3 蛋白质鉴定技术

蛋白质鉴定的原理是利用蛋白质相对分子质量、等电点、氨基酸组成等属性参数,在已有蛋白质数据库中检索与参数相符的蛋白质。过去二十年,在全球范围内产生的大量蛋白质组数据已上传到公共数据存储库。例如,ProteomeXchange 是蛋白质组学数据存储库的全球联盟,该联盟包括几个成员存储库,例如欧洲的 PRIDE、美国的 MassIVE 和日本的 JPOST^[16]。这些数据库的数据是公开的,可根据需要选择合适的数据库进行相应蛋白质参数的检索。常用的蛋白质鉴定技术包括 Edman 降解法测序和生物质谱(MS)。

Edman 降解法^[17]的基本原理是异硫氰酸苯酯(PITC)在温和条件下与含有自由氨基的多肽或蛋白质发生偶联反应生成苯氨基硫甲酰衍生物,该衍生物经过环化从肽链上断裂下来,然后转变为 PTH-氨基酸。该氨基酸在紫外光下有强吸收,通过色谱鉴定,便可以得到蛋白质或多肽端的序列信息。该方法的优点是前期反应副产物少,结果准确度高。但存在灵敏度低、测序速度慢、费用高等缺点。

MS 是通过测定样品的质荷比(m/z)来进行成

表 1 蛋白质分离技术

技术名称	原理	优点	缺点
2D-PAGE ^[11]	根据蛋白质的等电点和相对分子质量的差异进行分离	高通量、重复性好、敏感度高	不适用低拷贝蛋白、极酸或极碱蛋白、难溶蛋白, 对操作者的专业技术要求较高
HPLC ^[12-13]	通过固定相吸附流动相中的蛋白质, 将与固定相吸附能力不同的蛋白质分离	自动化程度高、适用性、能灵活更改流动相、易于大量制备	易出现假阳性, 样品前处理要求较高
AC ^[14]	具有特殊结构的蛋白质分子可以与吸附剂亲和和吸附滞留分离	过程简单快速、分辨率高	只适用于具有配基的蛋白质分子
CE ^[15]	根据蛋白质各组分在电渗流作用下迁移速度不同分离	分离选择的广泛正交性、样品体积分要求低	制备能力较差, 样品组成影响分离重现性

分和结构分析的, 是蛋白质鉴定主要技术。MS 允许通过多种方法分析蛋白质和肽, 例如电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 或基质辅助激光解吸电离质谱 (MALDI-MS)^[18]。这些方法可依据蛋白质或肽的质量将其识别为完整的分子, 或者通过酶消化时产生的肽指纹图谱鉴定蛋白质。串联质谱 (MS / MS) 允许蛋白质和肽的片段化以确定蛋白质 (自上而下的蛋白质组学) 和肽 (自下而上的蛋白质组学) 的氨基酸序列。此外, 串联质谱还允许鉴定蛋白质和肽的翻译后修饰^[19]。因其高敏感度、高准确性、高通量和自动化鉴定等优点, 目前已成为蛋白质组学研究中最重要支柱技术^[20], 但存在无法准确区分某些氨基酸 (如亮氨酸和异亮氨酸) 的缺点。

2.4 数据分析

在蛋白质组学研究中主要借助生物信息学进行数据的分析。生物信息学是应用信息科学的方法和技术, 研究生物过程中信息的存贮、内涵和传递, 分析生物体细胞、组织、器官的生理、病理过程中的各种生物信息^[21]。鉴定后的样品只能知道其中含有哪些蛋白质, 并不清楚这些蛋白质的属性、空间构象、功能等信息, 借助生物信息学知识可以解决这些问题。生物信息学工具从原始 MS 数据中提取准确的信息, 用来进行蛋白质鉴定和定量。可以使用计算程序搜索大型蛋白质数据库或 MS 光谱文库, 将所得光谱匹配至相应的肽。在蛋白质鉴定之后, 通常进行定量以评估样品内的蛋白质丰度, 然后进行差异表达和互作网络分析以得出生物系统中蛋白之间的功能联系^[22]。因此, 蛋白质组学数据分析就是应用生物信息学对鉴定的蛋白质的结构、功能及互作进行的进一步分析。

3 蛋白质组学与其他组学的联系

一般而言, 组学技术包括基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学。每一种组学研究的侧重点不同, 分别解释不同层面的生物学现象^[23]。在组学发展中, 基因组学和转录组学揭示了生命现象的底层因子, 预示可能发生什么; 蛋白组学揭示了生命现象的表层因子, 提醒即将发生什么; 而代谢组学揭示了生命现象的最终结果, 体现正在发生什么^[24]。各组学之间的联系依照中心法则, DNA (基因组学) 转录为 mRNA (转录组学), 接着翻译为蛋白质 (蛋白质组学), 这些蛋白质可催化产生或作用于代谢产物 (代谢组学)。由此可见, 各组学研究目的不同, 但却紧密联系, 如图 2 所示。同时这种紧密联系为多组学联合分析提供了思路, 将不同组学结果进行整合, 可从因到果, 由表入内地深层次挖掘生命现象的本质^[25]。

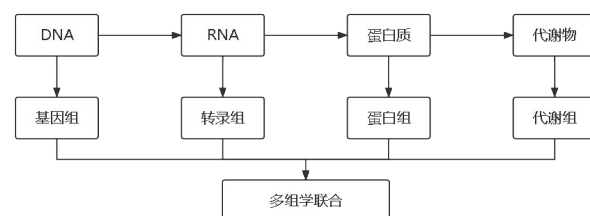


图 2 蛋白质组学与其他组学的联系

4 蛋白质组学技术在动物科学中的应用

4.1 动物繁殖方向的研究

蛋白质组学在动物精子蛋白研究中发挥了重要作用。可寻找潜在蛋白标志物用于评估精液质量和估计精子受精能力。Bastan 等^[26]利用蛋白质组学

分析 proAKAP4 蛋白在牛冷冻精液中的表达,结果显示其有可能成为冷冻精液质量评价的生物标志物蛋白。动物精浆胞外囊泡(SPEVs)可调节精子的运动和获能。Luo 等^[27]运用蛋白质印迹法检测出 7 种细胞外囊泡(EVs)的标记蛋白,GO 功能富集分析表明,鸡 SPEV 蛋白主要富集于能量供应和转运蛋白条目中,推测有 4 个 IFT 家族蛋白在精子组成和功能中起重要作用。卵巢静止是由于奶牛繁殖功能衰退引起的产后疾病,会影响奶牛卵巢周期和正常排卵。赵畅等^[28]利用同位素标记相对和绝对定量(ITRAQ)技术探究奶牛出现卵巢静止后血清中蛋白的变化,发现 14 个差异蛋白与卵巢静止密切相关。这些差异蛋白可以作为奶牛产后发生卵巢静止的蛋白标志物。随着技术发展,胚胎移植作为一种辅助繁殖技术已经在畜牧业中得到广泛应用。Kusama 等^[29]研究妊娠第 7 天奶牛子宫冲洗液中的蛋白质和外泌体 miRNAs,并用 ITRAQ 技术分析得出,外泌体中的蛋白质和 miRNA 成分网络可能对胚胎发育和已经妊娠的子宫微环境有贡献。由此可见,蛋白质组学在动物繁殖中主要用于鉴定相关蛋白标志物以及探究动物生殖细胞性能的作用机制。通过对动物繁殖性能相关蛋白质进行分析,可阐明动物繁殖的相关机制,从而为动物繁殖性能的提高提供指导。

4.2 动物营养方向的研究

众所周知,瘤胃功能对反刍动物消化过程具有重要意义。因瘤胃有着巨大的内表面积和大量微生物区系,所以对反刍动物机体免疫应答和健康也有重要作用。范海啸^[30]基于蛋白质组学研究热应激对奶牛瘤胃功能的影响,得出热应激通过加强瘤胃三羧酸循环和丙酮酸代谢为机体提供能量,同时加强氨排放以维持氮稳定。Lopes 等^[31]探究育肥牛肝脏蛋白质组的变化,发现肉牛肥育阶段补充瘤胃保护的维生素 B 和含羟基的微量矿物质可以改变与电子传输链和其他氧化还原途径相关的蛋白质丰度,促进活性氧产生。研究表明,驴乳具有极高营养价值,同时因其营养成分接近母乳,所以备受研究者关注^[32]。Zhang 等^[33]使用非标记蛋白质组学方法对驴乳(哺乳期 4~5 个月)和人乳(哺乳期 6~8 个月)之间差异表达的乳脂球膜(MFGM)蛋白进行了定量,发现差异表达蛋白 293 个,扩展了我们对驴乳和人乳不同生物学功能的认识。因此,在动物营养研究中,蛋白质组学技术可用于研究动物组织或细胞中的蛋白质在各种营养物质影响下的表达变化,也可以研究与机体代谢相关酶的表达情况。另外,

该技术可揭示动物生长发育规律和营养物质的分子调节机制,为动物生产提供帮助。

4.3 动物遗传育种方向的研究

牦牛是一种能够生活在高寒、高海拔地区的特殊畜种,对我国高原地区牧民的生活具有重要意义。贾银海等^[34]为探究牦牛机体适应高原寒冷气候的机制,应用 TMT 蛋白组学技术对牦牛抗冷蛋白进行筛选。得到了包括 CIRP 和 HSP70 等 144 个与牦牛抗寒性有关的差异蛋白,为高原牦牛种质资源的开发做出贡献。随着生活质量提高,人们对牛肉品质的要求也越来越高。López-Pedrouso 等^[35]为寻找与牛肉嫩度相关的蛋白标志物,采用定量蛋白质组学方法发现了 43 种蛋白质,并得出糖异生、糖酵解和柠檬酸循环是影响皮埃蒙特牛肉嫩度的关键途径。一直以来,制约养羊业发展的主要因素是绵羊的繁殖性能。如果能够提高绵羊产羔数,对养羊业发展必将起到极大的推动作用。张壮彪^[36]利用转录组学和蛋白质组学联合的方法探究小尾寒羊下丘脑影响产羔数的分子机制。发现 LGALS3、ASPA 和 TTR 可能是影响无 FecB 基因突变小尾寒羊产羔数差异的候选基因,为揭示绵羊多羔分子机制以及培育高繁殖力绵羊新品种提供了依据。因此,在动物遗传育种研究中,利用蛋白质组学对畜禽优势性状进行探究,可鉴定出与该品种优势性状相关的蛋白质,从而深入研究该性状形成的机制。蛋白质组学从分子水平为动物新品种选育和优良品种的保种工作奠定了基础。

4.4 动物疾病诊断与防控方向的研究

犬利什曼病是一种人畜共患病,具有高度传染性,对人类和犬的健康都是巨大的威胁。Franco-Martínez 等^[37]对同一组犬感染利什曼原虫前后的血清蛋白质组进行了分析,发现 74 个蛋白包括脂联素-锡、转铁蛋白和免疫球蛋白在感染的不同阶段表现出不同调节,这些蛋白可作为犬利什曼病早期诊断或疾病进展的潜在血清生物标志物。牛支原体肺炎是一种具有高度传染性的呼吸道疾病,感染会使牛的健康遭到严重威胁。李海利等^[38]采用 ITRAQ 差异蛋白质组学策略,对牛支原体临床分离菌株(HN12)和标准菌株(PG45)进行差异蛋白质筛选,发现了多种免疫原性蛋白质。乳腺炎是影响奶牛生产最为严重的疾病,对奶牛业造成了极大经济影响。Turk 等^[39]利用定量蛋白质组学方法发现奶牛乳汁和血清蛋白质丰度的改变可揭示乳腺炎发展过程,为乳腺炎诊断新方法开发提供了有价值的工具。由于蛋白质是机体生命功能的执行者,是机

体生理和病理状态发生变化的重要标志,所以运用蛋白质组学技术对动物体内发生变化的蛋白质进行研究,对疾病及时诊断及防控有重要作用。

5 总结与展望

尽管蛋白质组学在动物科学研究中已被广泛应用,但是不难发现蛋白质组学研究还处于初级阶段,缺乏深入研究以及研究结果并不完全可靠。与基因组学和转录组学相比,蛋白质组学研究的数量相对较少,同时,生物机体内各种机制及蛋白质

功能的发挥均相当复杂(如所鉴定蛋白质为什么及如何与它们在正常或患病条件下分泌的程度相关),一定程度上限制了蛋白质组学对研究问题及意义的解释。要想解决这些问题就需要蛋白质组学与其他现代生物学研究方法相结合,如与基因组学、转录组学、代谢组学、微生物组学、表观遗传学等联合开展多组学分析。相信随着相关的新技术、新方法和新思路的不断提出和发展,一定会使蛋白质组学的研究更加准确、精细和深入,同时在动物科学领域中的应用也必将更加广泛。

参考文献:

- [1] 李潇影,胡良海.人参蛋白质组学研究进展[J].上海中医药大学学报,2021,35(1):146-152.
- [2] ADHIKARI S, NICE E C, DEUTSCH E W, et al. A high-stringency blueprint of the human proteome[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):5301.
- [3] BANKS R E, DUNN M J, HOCHSTRASSER D F, et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities[J]. Lancet, 2000, 356(9243):1749-1756.
- [4] AL-AMRANI S, AL-JABRI Z, AL-ZAABI A, et al. Proteomics: concepts and applications in human medicine[J]. World J Biol Chem, 2021, 12(5):57-69.
- [5] ASLAM B, BASIT M, NISAR M A, et al. Proteomics: technologies and their applications[J]. Journal of Chromatographic Science, 2017, 55(2):182-196.
- [6] 吴琼,隋欣桐,田瑞军.高通量蛋白质组学分析研究进展[J].色谱,2021,39(2):112-117.
- [7] CHANG C C, CHONG H T, TASHIRO A. Laser capture microdissection of single neurons with morphological visualization using fluorescent proteins fused to transmembrane proteins[J]. eNeuro, 2021, 8(5):ENEURO.0275-20.2021.
- [8] 杨文盛,张军东,刘璐,等.不同来源蛋白质提取分离技术的研究进展[J].中国药学杂志,2020,55(11):861-866.
- [9] ISLAM K M, TAM S Y, LAW H. Advances in high throughput proteomics profiling in establishing potential biomarkers for gastrointestinal cancer[J]. Cells, 2022, 11(6):973.
- [10] AGREGAN R, ECHEGARAY N, LOPEZ-PEDROUSO M, et al. Proteomic advances in cereal and vegetable crops[J]. Molecules, 2021, 26(16):4924.
- [11] NOMURA F, TSUCHIDA S, MURATA S, et al. Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection[J]. Clin Proteomics, 2020, 17:14.
- [12] SEO M H, KIM D W, KIM Y S, et al. Pentoxifylline-induced protein expression change in RAW 264.7 cells as determined by immunoprecipitation-based high performance liquid chromatography[J]. PLoS One, 2022, 17(3):e261797.
- [13] AMPONSAH S K, BOADU J A, DWAMENA D K, et al. Bioanalysis of aminoglycosides using high-performance liquid chromatography[J]. ADMET DMPK, 2022, 10(1):27-62.
- [14] GOUMENOU A, DELAUNAY N, PICHON V. Recent advances in lectin-based affinity sorbents for protein glycosylation studies[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021(8):746822.
- [15] GUZMAN N A, GUZMAN D E. Immunoaffinity capillary electrophoresis in the era of proteoforms, liquid biopsy and preventive medicine: a potential impact in the diagnosis and monitoring of disease progression[J]. Biomolecules, 2021, 11(10):1443.
- [16] DEUTSCH E W, CSORDAS A, SUN Z, et al. The proteomexchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1):D1100-D1106.
- [17] 陈厚凯,郝瑞,田瑞军.蛋白质测序技术进展[J].科学通报,2021,66(25):3309-3317.
- [18] NEAGU A N, JAYATHIRTA M, BAXTER E, et al. Applications of tandem mass spectrometry (MS/MS) in protein analysis for biomedical research[J]. Molecules, 2022, 27(8):2411.
- [19] MACKLIN A, KHAN S, KISLINGER T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research[J]. Clin Proteomics, 2020, 17:17.