

富硒酵母对斑点叉尾鲷肝脏的毒性作用及蛋白质组学的影响

熊华伟^{1#}, 简少卿^{1#}, 贾小芳², 虞舜¹,
何宝荣¹, 曾艳¹, 张丽军^{2*}, 虞鹏程^{1*}

(1. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330031;

2. 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心, 上海 201508)

摘要: 实验探讨了富硒酵母对斑点叉尾鲷肝脏的毒性作用及蛋白质组学的影响, 结果表明, 饲养 56 d 后正常组和有机硒组采用原子荧光法检测硒含量均值为 0.15 和 0.81 mg/kg。H. E 染色显示有机硒组肝细胞有明显的疏松化, 部分发生脂肪变。通过二维凝胶电泳结合 ImageMaster 软件分析, 鉴定出 8 个表达差异蛋白质点, 其中 3 个在有机硒组表达上调, 5 个在有机硒组特异表达, 经液相色谱串联质谱分析鉴定, 这些蛋白质分别是伴侣蛋白 TCP1-亚基 8、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、4SNc-Tudor 蛋白、腺苷激酶、酮糖移转酶、丙氨酰-tRNA 合成酶。富硒酵母饲料对斑点叉尾鲷肝具有明显的毒性效应, 有机硒调控 4SNc-Tudor 蛋白, 通过信号传导通道加强机体免疫。

关键词: 斑点叉尾鲷; 富硒酵母; 双向电泳; 蛋白质组学

中图分类号: S 917

文献标志码: A

硒是鱼类必需的微量元素之一, 同时也具有毒性, 适量的硒具有抗氧化、抗肿瘤、增强机体免疫、调节机体代谢和降低某些有毒元素毒性等功能^[1-3]。长期以来, 人们采用亚硒酸钠作为畜禽的主要硒源添加剂, 原因是价格便宜, 但是亚硒酸钠在使用过程中却存在许多缺点: 使用过量, 动物容易发生中毒; 对人体健康具有潜在的危害; 经肠道被动吸收, 吸收效率不高, 先被还原为硒化物, 然后转运到肝脏合成硒代蛋氨酸, 有些可被转运到肾脏通过尿液的形式排出体外, 还有一些未被吸收的硒则通过粪便排出, 造成污染环境。寻找活力高且毒性低的补硒剂成为硒研究的一项重要任务, 有机硒和纳米硒便引起了人们的关注。有机硒中的硒一般以还原态存在, 并与氨基酸结合, 其形式表现为硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸等, 以主动形式吸收, 其中有机硒中的硒代蛋氨酸, 由于蛋氨酸含有与硒同族的硫元素, 在一定条件下可以被硒元素取代而合成。目前常见的富硒物是富硒酵母, 富硒酵母是指酵母的培育过程中加入亚硒酸钠等形式的无机硒,

使酵母以有机硒的形式富集起来的微生物^[4]。亚硒酸钠作为硒源饲料添加剂的作用将逐渐被富硒酵母所取代, 虽然有机硒毒性低, 但用量不当, 同样会对机体产生毒性作用。因此, 对有机硒在饲料中作为饲料添加剂的毒性研究, 可以为有机硒饲料添加剂的研发提供一定的依据, 从而有利于有机硒在饲料应用中的推广。

目前研究通常从基因水平去研究有机硒毒性机制^[5-6], 然而, 生命活动的真正体现者是蛋白质, 采用蛋白质组学的手段进行有机硒肝毒性机制的研究将为有机硒的优化使用提供理论依据。本研究选用双向凝胶电泳技术, 构建差异蛋白质组的电泳图谱, 并用液相串联质谱技术对差异蛋白质进行质谱鉴定, 生物信息学分析筛选出可能具有有机硒肝脏毒性预警价值的标志蛋白质。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)购自江西省赣

收稿日期:2010-11-30 修回日期:2011-05-03

资助项目:江西省科技厅重大招标项目(20051A0600400);上海市自然科学基金(09ZR1426300)

#作者简介:熊华伟,简少卿为同等贡献作者

通讯作者:虞鹏程, E-mail: pcyu@ncu.edu.cn; 张丽军, E-mail: zhangliujun1221@163.com

州市水产科学研究所。固相非限制性梯度干胶条 (pH 3~10) 购自美国 GE 公司;胰酶 trypsin 购自美国 Sigma 公司;色谱纯乙腈和甲酸购自美国 Merck 公司。超速离心机购自美国 Beckman 公司,IPGphor 等电聚焦仪购自美国 GE 公司,电泳仪、垂直平板电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司,纳升级液相色谱 Ultimate 3000 购自美国戴安公司,C18 预柱(300 μm id \times 5 mm, 5 μm) 和 C18 反向柱(75 μm \times 15 cm, 3 μm , PepMapTM) 购自美国戴安公司,高容量离子阱 HCT 质谱仪购自德国 Bruker Daltonics 公司。

1.2 饲养分组

将体长为 (30 \pm 3) cm, 体质量为 (200 \pm 10) g 的健康斑点叉尾鲷分成两组并设置 3 个平行组实验, 每组 10 尾, 其中有机硒组用含硒 0.60 mg/kg 的富硒酵母饲料饲养, 建立硒过载模型; 对照组使用市售斑点叉尾鲷饲料(硒含量实测为 0.20 mg/kg) 饲养, 养殖周期为 56 d。

1.3 硒含量检测

两组斑点叉尾鲷在饲养 56 d 后, 从各组中分别随机挑选 10 尾鱼, 取其肝脏剪碎后混匀(样品量大于 1 g) 送到南昌大学分析测试中心采用原子荧光法测定硒含量。

1.4 组织病理学

将肝脏组织固定在含 4% 多聚甲醛的 PBS 中。固定后的肝脏组织块经石蜡包埋后, 切成 5 mm 厚度的石蜡切片, 采用 H. E 染色进行组织病理学检查^[7]。

1.5 肝细胞胞浆蛋白质样品提取方法

鱼肝脏在生理盐水中洗去血后剪碎, 在 Buffer 液 (250 mmol/L sucrose; 10 mmol/L HEPES; 1 mmol/L PMSF; 1 mmol/L EDTA; 用 KOH 调节 pH 至 7.5) 中匀浆 30 次, 匀浆液用 200 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清, 12 000 r/min 离心 20 min, 取沉淀, 沉淀加入等体积的 2D 裂解液 (8 mol/L Urea; 2 mol/L Thiourea; 4% CHAPS; 1% NP-40; 65 mmol/L DTT; 1 mmol/L PMSF; 1% DNAase) 进行裂解提取蛋白质, 采用 Bradford 法测定提取的样品中的蛋白质含量。

1.6 双向电泳分离和 ImageMaster 软件分析

蛋白质二维凝胶电泳方法参考文献[8]的方法, 第一向等电聚焦电泳采用 pH 3~10 非线性胶条, 电泳程序设置: 水化 10 V, 14 h; 电泳: 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 8 000 V, 30 min, 梯度; 8 000 V, 6

h, 非线性; 总功率达 51.8 kW。第二向十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 分离胶浓度为 13%。电泳完后, 剥胶, 用考马斯亮蓝染 2-DE 胶, Image scanner 扫描仪成像。所得图像用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件将电泳图谱分成 2 个类别进行找点、匹配等分析, 找出差异蛋白点。

1.7 差异蛋白质的酶解和质谱鉴定

差异蛋白点经过脱色脱水冻干后, 每管加入约 5 μL 胰酶 (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜 (16~18 h)。酶解的蛋白质经肽段萃取后, 进行分析鉴定。鉴定方法如下: 酶解后的肽段先经过 C18 预柱脱盐, 流动相流速为 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, 流动相组成为 2% ACN, 0.1% FA。然后样品以 300 nL/min 的流速经 C-18 反向柱进行分离, 色谱的梯度为 4%~48%, 梯度时间为 40 min。通过 C18 色谱柱分离的肽段由纳流喷针进入 HCT 质谱进行实时的离子化分析检测。HCT 质谱每秒钟进行 1 次一级扫描和 5 次二级扫描分析。用 DataAnalysis 3.2 软件整合肽指纹图谱和串联质谱二级图谱, 通过 Mascot 软件查询 NCBI 数据库。MS 误差: ± 1.2 u, MS/MS 误差: 0.6 u。固定修饰是半胱氨酸被修饰为脲甲基半胱氨酸 (Carbamidomethyl-Cys), 可变修饰为甲硫氨酸氧化 [Oxidation (M)], 每个肽段允许有 1 个不完全裂解位点, 物种来源选择: 其它辐鳍鱼纲 (Actinopterygii), 离子选择 (+1, +2, +3), 模式为单同位素, 置信区间为 95%, $P < 0.05$, 蛋白质得分 36 分以上结果可靠。

2 结果

2.1 硒含量比较

两组斑点叉尾鲷在饲养 56 d 后, 分别对其肝脏进行硒含量检测(南昌大学分析测试中心采用原子荧光法测定硒含量), 检测结果, 正常组肝脏硒含量值为 0.15 mg/kg ($n = 10$), 有机硒组肝脏硒含量值为 0.81 mg/kg ($n = 10$)。结果表明, 试验组斑点叉尾鲷肝脏组织的硒含量明显增多, 是正常对照组的 5 倍多。

2.2 组织病理学分析

对有机硒组和对照组斑点叉尾鲷肝脏病理切片进行 H. E 染色镜下观察, 结果表明, 有机硒组肝细胞呈弥漫疏松化(水变性), 部分肝细胞伴有气球变, 少数肝细胞脂肪变。正常组鱼肝脏组织

基本正常,仅见少数肝细胞轻度疏松化,呈灶状分布(图1)。组织病理学分析表明,试验组肝脏组织已经产生病变,产生中毒症状。

2.3 差异蛋白质组分析

通过 ImageMaster 软件分析,将有机硒组和正常组图像进行对比分析,检测到(935 ± 47)和(905 ± 5)个蛋白质点,选择2-DE 效果好、点数多的一块胶作为参考胶,进行平行组间的匹配分析,筛选出大于或等于2倍差异的蛋白质点15个。图2为肝脏蛋白质的双向电泳代表图,图中用黑色箭头标出的蛋白质点质谱鉴定的差异蛋白质点。从图2可见,蛋白斑点主要分布在等电点 pH 4~10、分子量 15~100 ku。图3为有机硒组和正常组肝脏蛋白质的双向电泳差异蛋白质8号斑点的局部放大图,该蛋白质点在有机硒组的3块胶中表达均明显上调。通过差异蛋白点比对发现,试验组斑点叉尾鲷肝脏的生理生化特性产生明显变化,通过表达差异蛋白质,导致蛋白质代谢系统紊乱,致使斑点叉尾鲷产生中毒症状。

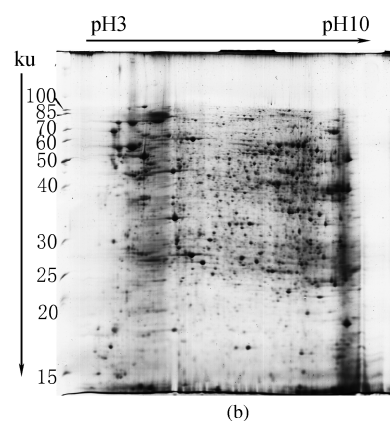
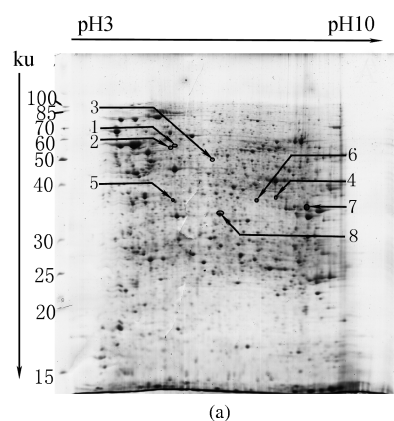


图2 有机硒组(a)和正常组(b)斑点叉尾鲷肝脏蛋白质双向凝胶电泳图谱

Fig. 2 Selenium-enriched yeast group and control group channel catfish liver protein atlas by 2-DE

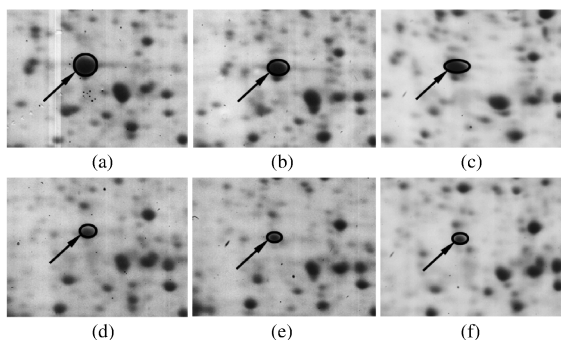


图3 差异蛋白质8号斑点局部放大图

(a),(b),(c)有机硒组;(d),(e),(f)正常组。

Fig. 3 The partial enlarged diagram of the number 8 differential protein

(a),(b),(c) represent the selenium-enriched yeast group; (d),(e),(f) represent the control group.

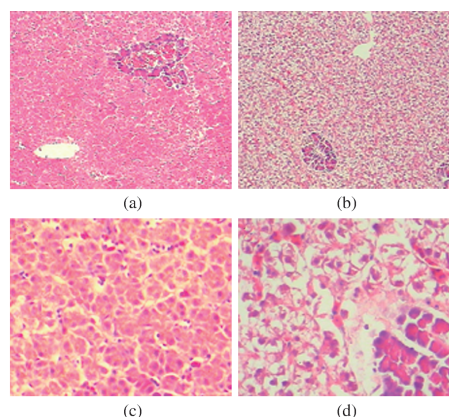


图1 斑点叉尾鲷肝脏组织病理学表现

(a) 正常组肝脏 H. E 染色 100 ×; (b) 有机硒组肝脏 H. E 染色 100 ×; (c) 正常组肝脏 H. E 染色 400 ×; (d) 有机硒组肝脏 H. E 染色 400 ×。

Fig. 1 Histopathology of channel catfish liver tissue examined by H. E staining

(a) control group liver by H. E staining (100 ×); (b) selenium-enriched yeast group liver by H. E staining (100 ×); (c) control group liver by H. E staining (400 ×); (d) selenium-enriched yeast group liver by H. E staining (400 ×).

2.4 差异蛋白质的鉴定

对15个差异蛋白质点进行质谱分析,质谱准确鉴定到8个差异蛋白质点(表1),其中3个蛋白质点在有机硒组中表达上调,5个仅在有机硒组表达。这些蛋白质的质谱检测序列覆盖率均在12%以上,均有2个以上肽段鉴定。有机硒组中上调蛋白质为伴侣蛋白含 TCPI,亚基8和甘油醛-3-磷酸脱氢酶;在有机硒组中新增蛋白质为4SNc-Tudor 蛋白、腺苷激酶、酮糖移转酶和丙氨酸-tRNA 合成酶样。结果中1号蛋白质鉴定为4SNc-Tudor 蛋白,质谱鉴定的序列覆盖率达39%(图4)。3个肽进行了二级质谱(MS/MS)分析(图4-a),其中肽段—MVTEYLNQESAK 中质谱检测

到了连续 10 个 y 离子:y2、y3、y4……y11,表明该 样如此。
肽段的鉴定非常准确。对其它蛋白质的鉴定也同

表 1 鉴定的差异蛋白质
Tab.1 The identification of differential proteins

编号 number	蛋白质序列号 protein sequence number	蛋白质名称 protein name	搜库得分 search database score	等电点 pI	分子量/ku MW	序列覆盖率/% sequence coverage scale
有机硒组特异表达的蛋白质 the specifically expressed proteins in the selenium-enriched yeast group						
1	gi 87620038	4SNc-Tudor 蛋白 4SNc-tudor domain protein	201	5.16	10.7	39
2	gi 87620038	4SNc-Tudor 蛋白 4SNc-tudor domain protein	67	5.16	10.7	14
3	gi 89266551	腺苷激酶 adenosine kinase a	217	5.6	31.0	12
4	gi 90103341	酮糖移转酶 transketolase	150	9.35	15.5	31
5	gi 89266537	丙氨酰-tRNA 合成酶样 alanyl-tRNA synthetase-like	508	4.9	27.5	57
有机硒组表达上调的蛋白质 the up regulation proteins in the selenium-enriched yeast group						
6	gi 89266459	伴侣蛋白含 TCP1 - 亚基 8 chaperonin containing TCP1 subunit 8	160	5.49	31.0	15
7	gi 27883574	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	276	9.75	17.4	39
8	gi 27883574	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	92	9.75	17.4	13

注:pI 表示蛋白质理论等电点;MW 表示蛋白质的理论分子量。
Notes:pI, predicted isoelectric; MW, predicted molecular weight.

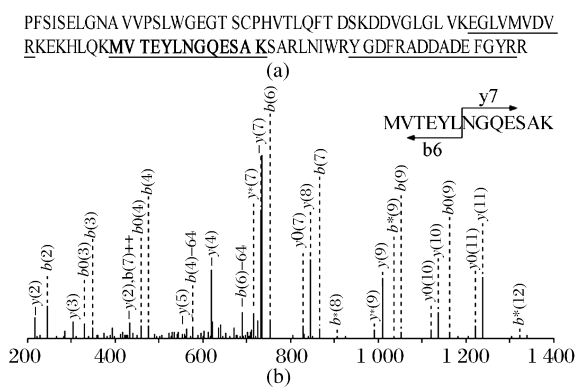


图 4 4SNc-Tudor 蛋白的质谱鉴定的序列
覆盖率 (a) 和二级质谱图 (b)

(a) 为蛋白质的序列,带下划线的序列为通过 HCT 质谱检测到的氨基酸序列。(b) 为肽段 MVTEYLNGQESAK 的酶切肽段二级质谱图,该肽段在 4SNc-Tudor 蛋白序列中的位置在 A 中以粗体表示。

Fig. 4 4SNc-Tudor domain protein sequence
coverage (a) and secondary mass spectrum
diagram (b) identification by mass spectrum

(a) is protein sequence, and the underlined sequence is detected by HCT mass spectrometer. Figure (b) is the MSMS chromatogram of MVTEYLNGQESAK peptide, which is highlighted by boldface and underline in the figure A.

3 讨论

3.1 有机硒饲料添加剂研究

关于有机硒对动物影响作用的报道结果不一致,有些研究者认为有机硒在动物生产上能起到积极作用,但用量不当同样也会引起毒性,因此在进一步全面推行有机硒之前仍需进行大量的科研工作。BELL 等^[9]以含硒饲料(1.022 mg/kg)和硒缺饲料(0.025 mg/kg)喂食平均体质量为 27 g 的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*),饲养 30 周,结果发现,缺硒饲料组 10% 虹鳟表现失调症,原因是过氧化物引起的损伤而产生传导神经异常,肝细胞产生一定的伤害。HICKS 等^[10]将硒作为饲料添加剂,发现加硒剂量为 11.4 mg/kg 连续喂食 16 周后,虹鳟体质量减轻,死亡率增加,90% 的虹鳟发生钙质沉积,用显微镜观察对肾有一定的损伤。HILTON^[11]的研究表明,饲料中添加含 13 mg/kg 硒的干饲料,则会对鱼造成慢性中毒,表现为生长迟缓、死亡率增高等症状。WANG^[12]用不同含硒浓度(0,0.02,0.06,0.2,0.4 mg/kg)和不同硒源(亚硒酸钠、硒蛋氨酸、酵母硒)去喂养平

均体质量为 1.7 g 的斑点叉尾鲟, 试验 9 周后, 通过线性分析, 结果表明不同硒源在饲料中的最适需求量分别为 0.28、0.09、0.11 mg/kg, 在最适硒需求量下饲养斑点叉尾鲟, 硒蛋氨酸组和酵母硒组的肝脏谷胱甘肽酶活力明显高于亚硒酸钠, 进一步说明有机硒比无机硒有更好的效果。

3.2 硒过载模型建立

硒在欧洲商业饲料允许添加量为 0.5 mg/kg 水平, 本试验使用含硒 0.6 mg/kg 饲料建立硒过载模型, 经过 56 d 长期毒性试验结果表明, 试验组斑点叉尾鲟肝细胞弥漫疏松化(水变性), 部分肝细胞伴有气球变, 少数肝细胞脂肪变。说明本试验中斑点叉尾鲟硒过载模型建立成功。

3.3 差异蛋白功能分析

采用蛋白质组学的方法, 检测到在富硒饲料作用后斑点叉尾鲟肝胰脏表达 8 个差异蛋白质。这些差异蛋白质根据功能来分主要是酶类, 包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶、腺苷激酶、酮糖移转酶、丙氨酰-tRNA 合成酶样; 另有伴侣蛋白类伴侣蛋白 TCPI-亚基 8; 以及转录因子蛋白类 4SNc-Tudor 蛋白。

腺苷酸激酶存在于肝脏、肾脏、酵母等, 具有嘌呤核苷酸补救作用, 通过其衍生物来合成嘌呤核苷, 对 ATP 和腺苷酸反应生成 ADP 和 AMP 的起到催化作用。伴侣蛋白含 TCPI-亚基 8 参与蛋白折叠, 与未折叠蛋白选择性非共价结合, 协助单链核苷酸或多亚基复合物形成正确三级结构。丙氨酰-tRNA 合成酶样存在于细胞质中, 具有催化丙氨酸连接到丙氨酰-tRNA 的作用。在 tRNA 的氨酰化过程中, 氨基酸首先通过连接到 AMP 而激活后, 再转移到 tRNA 3' 腺苷残基的 2' 或 3' 羟基基团。甘油醛-3-磷酸脱氢酶存在于细胞质, 参与糖酵解, 与 NAD 选择性非共价结合。

3.4 4SNc-Tudor 蛋白

4SNc-Tudor 蛋白又称 p100、SN4TDR、SND1、EBNA2 coactivator。存在于细胞核或细胞质或者两者皆有。4SNc-Tudor 蛋白在人类和许多真核生物(包括哺乳动物、鱼、果蝇繁殖酵母等)^[13] 中都存在, 该蛋白是真核细胞中不可少结构保守重要功能蛋白^[14], 其在转录调控和转录后调控过程中发挥重要作用^[15-16]。该蛋白 N 端含有 4 个葡萄糖苷核酸酶域其后接着一个 Tudor 域。目前对 4SNc-Tudor 蛋白研究较多的是河豚和斑马鱼。

徐庆刚^[17] 对河豚 SN4TDR 蛋白结构域进行 MALDI-TOF 鉴定, 发现蛋白 SN4TDR 存在 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲结构。有一个可能形成跨膜结构的片段, 并用同源建模的方法, 预测了河豚 SN4TDR 的三维结构模型。人类 SN4TDR 普遍存在人胰腺、肌肉、肝脏、肺、胎盘、脑和心脏。有机硒组中特异表达的蛋白质 4SNc-Tudor 蛋白由 95 个氨基酸组成, 具催化水解所有酯键和与核酸结合的功能。通过用 NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对本实验鉴定到的 4SNc-Tudor 蛋白与人 SND1 蛋白进行序列比对, 结果显示两者相似度序列达 77%。SND1 蛋白作为转录辅激活蛋白首次得到鉴定, 与其他转录因子(包括 EBNA-2, c-Myb, STAT6, STAT5) 相互作用调节细胞信号传导通路^[18-21]。信号传导通道是人体免疫反应的重要通道之一, 它们通过 IL-4 受体调控细胞周期而诱导了 T 细胞的增殖分化, 在许多疾病(如过敏, 哮喘, 癌症等)中有极为重要的作用。多功能转录共激活因子 SND1 蛋白是此通道中的一个非常重要的多功能蛋白。本实验中有有机硒组特异表达 4SNc-Tudor 蛋白可能与食用富硒酵母斑点叉尾鲟引起肝脏毒性相关, 诱导产生 4SNc-Tudor 蛋白, 通过信号传导通道加强机体免疫。但 4SNc-Tudor 蛋白是否为硒引起斑点叉尾鲟肝脏毒性的特异单一蛋白质仍需进一步研究来确定。

参考文献:

- [1] 王玉娥. 酵母硒对小鼠肿瘤生长和机体非特异性免疫功能的影响[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(4): 91-92.
- [2] 孙毅. 硒抗肿瘤机制的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(11): 1042-1044.
- [3] 谭玉凤. 亚硒酸钠染毒对小鼠免疫功能的影响[J]. 环境与职业医学, 2006, 23(1): 38-40.
- [4] 蒋守琴. 有机硒在动物营养上的研究与应用[J]. 饲料工业, 2005, 26(20): 43-45.
- [5] 裴小娟. 硒化合物与 EGFR/MAPK 信号传导相关性的初步研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(12): 1233-1238.
- [6] 裴小娟. 硒-甲基硒代半胱氨酸对人食管癌 EC109 细胞 Ki-67 及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J]. 汕头大学医学院学报, 2004, 17(2): 65-67.
- [7] GUI S Y. Effects and mechanisms of crude astragalosides fraction on liver fibrosis in rats[J].

- Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103 (2): 154 – 159.
- [8] ZHANG L J. Proteomic analysis of low-abundant integral plasma membrane proteins based on gels [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63 (15): 1790 – 1804.
- [9] BELL J G. Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidase activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Journal of Nutrition, 1986, 55: 305 – 311.
- [10] HICKS B D. Influence of dietary selenium on the occurrence of Nephrocalcinosis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. Journal of Fish Diseases, 1984, 7(5): 379 – 384.
- [11] HILTON J W. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Journal Nutrition, 1980, 110: 2527 – 2535.
- [12] WANG C L. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Aquaculture, 1997, 152: 223 – 234.
- [13] LI C L. Structural and functional insights into human Tudor-SN, a key component linking RNA interference and editing [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(11): 3579 – 3589.
- [14] ABE S. Structural analysis of cDNAs coding for 4SNc-Tudor domain protein from fish and their expression in yellowtail organs [J]. Marine Biotechnology (NY), 2005, 7(6): 677 – 686.
- [15] CAUDY A A. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes [J]. Nature, 2003, 425 (6956): 411 – 414.
- [16] YANG W. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2006, 13(1): 13 – 21.
- [17] 徐庆刚. 河豚 4SNc-Tudor 蛋白的鉴定及生物信息分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (3): 1163 – 1166.
- [18] TONG X. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIB, TAF40, and RPA70 but not with TATA-binding protein [J]. Journal of Virology, 2005, 69(1): 585 – 588.
- [19] LEVERSON J D. Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity [J]. Molecular Cell, 1998, 2(4): 417 – 425.
- [20] LOW S H. Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease [J]. Development Cell, 2006, 10(1): 57 – 69.
- [21] PAUKKU K. Tudor and nuclease-like domains containing protein p100 function as coactivators for signal transducer and activator of transcription 5 [J]. Molecular Endocrinology, 2006, 17 (9): 1805 – 1814.

Proteomic analysis on hepatotoxicity of selenium-enriched yeast to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) liver

XIONG Hua-wei^{1#}, JIAN Shao-qing^{1#}, JIA Xiao-fang², YU Shun¹,
HE Bao-rong¹, ZENG Yan¹, ZHANG Li-jun^{2*}, YU Peng-cheng^{1*}

(1. Life Science and Food Engineering Institute, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

2. Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China)

Abstract: To investigate the influence on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) liver toxicity and liver proteome change by the use of selenium-enriched yeast, Se-concentration in channel catfish liver was determined and the pathological change was monitored after selenium-enriched yeast feeding for 56 days. Proteins extracted from the liver of selenium-enriched yeast feeding channel catfishes and non-feeding controls were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), differentially expressed proteins between the two groups were analyzed using ImageMaster software and identified by online reversed-phase nano-flow liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry (LC-MS/MS). The average Se-concentration of liver from the non-feeding controls and the selenium-enriched yeast feeding ones were 0.15 mg/kg and 0.81 mg/kg. Significant difference was detected between these two groups ($P < 0.05$). H. E staining of pathology from channel catfish liver showed that the selenium-enriched yeast group has obvious cell loose and cell fatty degeneration. 15 differential protein were found by 2-DE separation and ImageMaster software analysis. Of them, 8 over-expressed proteins in selenium-enriched yeast were selected for MS analysis and identified successfully, including 3 u-regulated proteins and 5 uniquely expressed proteins in selenium-enriched yeast group compared with the controls. These differential proteins correspond to chaperonin TCP1 subunit 8 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 4SNC-Tudor domain protein, adenosine kinase a, transketolase and alanyl-tRNA synthetase-like *et al.* Obvious toxicity was detected in the channel catfish liver after feeding with selenium-enriched yeast. Organic selenium might strengthen immune through 4SNC-Tudor protein involved signal transmission pathway. Differential proteins identified in our work could be specific biomarkers related to toxicity of organic Se to channel catfish.

Key words: channel catfish (*Ictalurus punctatus*); selenium-enriched yeast; 2-DE; proteomic

Corresponding author: YU Peng-cheng. E-mail: pcyu@ncu.edu.cn;

ZHANG Li-jun. E-mail: zhangliujun1221@163.com

[#]XIONG Hua-wei and JIAN Shao-qing contributed equally to this work.