

陈财珍, 许翠娅, 杨芳, 等. 石油烃对中肋骨条藻污染胁迫下蛋白质组学研究[J]. 渔业研究, xxxx, xx(x): 1–11.
Chen C Z, Xu C Y, Yang F, et al. Proteomics of *Skeletonema costatum* under contaminated stress by petroleum hydrocarbons[J]. Journal of Fisheries Research, xxxx, xx(x): 1–11.



石油烃对中肋骨条藻污染胁迫下 蛋白质组学研究

陈财珍¹, 许翠娅¹, 杨芳¹, 陈宇锋¹, 许贻斌¹,
郑盛华¹, 江良荣², 罗冬莲^{1*}

(1. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013;
2. 厦门大学, 福建 厦门 361005)

摘要: 【目的】研究石油烃对中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 污染胁迫条件下的蛋白质组的变化。【方法】本研究运用同重同位素相对与绝对定量 (iTRAQ) 试验, 通过反相液质联用 (RPLC-MS) 技术, 分析石油烃的慢性毒性处理与急性毒性处理导致中肋骨条藻蛋白质组差异性变化。【结果】与对照组相比, 慢性毒性处理组和急性毒性处理组分别鉴定了 112 个和 169 个显著差异表达蛋白质 (DEPs), 有 40 个交集 DEPs, 且其中有 20 个蛋白质的亚细胞结构定位均定位到叶绿体; 上调 DEPs 有 5 个共同的显著富集 ($P<0.05$) GO 条目, 分别是碳水化合物衍生物代谢过程、碳水化合物衍生物的生物合成过程、无机二磷酸酶活性、谷氨酰胺-果糖-6-磷酸转氨酶 (异构化) 活性、碳水化合物衍生结合, 没有共同显著富集通路; 下调 DEPs 有三磷酸腺苷水解耦合质子运输、质子转运型三磷酸腺苷酶, V1 结构域 2 个共同的显著富集 ($P<0.05$) GO 条目, 有导管酸分泌通路、抗生素的生物合成通路 2 条共同显著富集 ($P<0.05$) 通路; 与毒性响应相关的蛋白热休克蛋白 (蛋白 ID: 220971590) 在 2 种毒性处理后均显著上调 ($P<0.05$)。【结论】石油烃对中肋骨条藻污染胁迫条件下的 DEPs 与石油烃的污染胁迫响应机制有关, 为石油烃的致毒机理在分子水平上的研究奠定基础。

关键词: 石油烃; 中肋骨条藻; 污染胁迫; 蛋白质组学; 差异表达蛋白

中图分类号: S917.4; Q519 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096–9848 (xxxx) 00–0001–11

石油是海洋污染中常见的一种污染物, 尤其是石油衍生的烃类是污染水环境的重要因素之一, 每年通过各种途径进入海洋环境中的原油超过 500×10^4 t^[1-2]。原油作为有机化合物的一个复杂混合物, 由长链烃和短链烃组成, 而原油水溶液 (Water-accommodated fraction, WAF) 中则含有具有较差可溶性但是能够长时间存在于水环境中的一种长链烃^[3]。通常认为, WAF 是石油直接危害海洋生物

的主要形式之一, 并且它的分散程度和组分性质在一定程度上与毒性有着密不可分的联系^[4]。有文献报道指出, 芳香烃类化合物作为石油中具有较强毒性的一种物质, 包括茈、茈萘、萘、菲以及萘等^[5]。研究发现, 石油组分中的多环芳烃虽然分子量较小, 但对海洋生物危害最大^[6]。石油烃对水生生态具有显著的毒性效应, 主要表现在对海洋生物的危害、影响海洋微藻的光合作用和破坏海洋生态平衡

收稿日期: 2024-12-23

修回日期: 2025-02-11

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2018YFC1406306); 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2021R10130010)

第一作者: 陈财珍, 女, 副研究员, 硕士, 研究方向为渔业与生态环境。E-mail: 37251687@qq.com

通信作者: 罗冬莲, 教授级高工, 研究方向为海洋与渔业生态环境。E-mail: 295807046@qq.com

©《渔业研究》编辑部。本文为使用 CC BY-NC-ND 4.0 许可协议的开放获取作品。

© Editorial Office of Journal of Fisheries Research. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license.

等方面：石油烃中的多环芳烃类化合物易在生物体内富集，不仅能使鱼、虾、贝类海产品变味，严重时还能产生毒性效应，给海洋生态环境和渔业资源带来严重危害；石油烃对海洋微藻的光合作用有显著影响，包括降低叶绿素 *a* 含量、影响各项叶绿素荧光参数和降低羧化酶活性等；石油污染形成的油膜会阻碍水体的复氧作用，这些影响直接关系到海洋微藻的生长和繁殖，进而影响整个海洋生态系统的平衡^[7]。

中肋骨条藻属于中心硅藻纲 (Coscinodiscophyceae)、骨条藻科 (Skeletonema costatum)，是常见的浮游植物种类，为广温广盐的典型代表，其对毒物敏感、易获得、个体小、繁殖快，在较短时间可得到化合物对中肋骨条藻许多世代及种群水平的影响评价，是一种很好的测试生物^[8]。

蛋白质组学 (Proteomics) 主要是指在外界环境条件下的细胞、组织、器官、个体以及物种等在特定时刻表达出的全套蛋白质，对各蛋白质的变化进行定量分析，能够动态监测细胞、菌体的生物调控和复杂代谢功能，从而在蛋白质水平上获得细胞代谢过程的整体认识^[9]。随着新的环境污染物的发现和污染物质分析的痕量化、复杂化、多样化，蛋白质组学技术让环境科学研究者们在依靠传统分子生物学技术发现对于低浓度、低胁迫、多应激反应机制诱导的标志物的研究的基础上，有了更进一步从遗传信息的表达水平和代谢通路水平上了解污染胁迫机理的机会^[10]。因此，本研究利用双向凝胶电泳技术、质谱分析、稳定同位素标记技术和生物信息学分析等蛋白质组学技术，研究石油烃污染胁迫下中肋骨条藻的响应蛋白，为其致毒机理在分子水平上的研究奠定基础，为评估石油烃对海洋环境的风险和预警提供基础数据和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

中肋骨条藻由厦门大学环境与生态学院提供；0#柴油：厦门市东渡加油站提供；培养基：f/2 培养液；海水取自厦门市前埔附近海域；正己烷为色谱纯：美国 Tedia 公司；油标准 GBW CE1080913 (1 000 mg/L)：国家海洋环境监测中心；蛋白质标准品：分子量为 10 000~250 000 Da，Fermentas 公司；乙腈、甲酸：美国 Tedia 公司；1×PBS 缓冲液、三氯乙酸酞丙酮、乙二胺四乙酸、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl)、SDS、四甲基乙二胺、

丙烯酰胺、TEAB、二巯基苏糖醇 (DTT)、苯甲基磺酰氟化物、过硫酸铵：Sigma-Aldrich 公司；Reagent-8Plex Multiplex Kit：Biosystems；其他均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计：美国 Varian 公司；振荡器：德国 Wiggens 公司；恒温光照培养箱：上海精宏实验设备有限公司；全自动高压灭菌锅：致微 (厦门) 仪器有限公司；生物显微镜 Leica DM 4500B：德国 Leica 公司；四位机械式手动金属计数器：美国百赛施 (BYXAS)；5804R 离心机：Eppendorf 公司；Milli-Q 纯水机：Millipore 公司；超声细胞破碎仪：索尼公司；电泳仪：BIO-RAD 公司；酶联免疫仪：BIO-RAD 公司；高效液相色谱：SHIMADZU 公司；超高效液相色谱：AB SCIEX 公司；质谱：AB SCIEX 公司；扫描仪：UMAX 公司。

1.3 方法

1.3.1 石油烃水溶组分 (WAF) 母液的制备

在 500 mL 分液漏斗中加入过滤灭菌的海水和 0#柴油，体积比为 9 : 1，用振荡器以 230 r/min 振荡 8 h，然后静置 12 h 分层，分离下层水相即为实验用 WAF 母液，需要注意的是，在制备期间，要处于避光状态，同时在 4 °C 条件下保存 WAF 母液，并依据 GB 17378.4—2007《海洋监测规范第 4 部分：海水分析》中石油类的测定方法测定其浓度。

1.3.2 急性毒性处理与慢性毒性处理^[11]

中肋骨条藻培养在恒温光照培养箱中，采用 f/2 营养液配方，培养条件为温度 (20±2) °C，明暗周期为 12 h·12 h，光源为白色日光灯，强度约为 4 000 lx。藻液初始藻细胞密度为 2.2×10⁵ cells·mL⁻¹。

急性毒性处理时间一般控制在 96 h 以内，但根据周永欣的藻类急性毒性试验方法^[11]可知，如果藻类仍有明显生长，试验时间可延长至 7 d，因此，在本实验室条件下急性毒性处理是持续在石油烃浓度为 3.0 mg/L 的培养液中培养 6 d。慢性毒性处理是持续在石油烃浓度为 3.0 mg/L 的培养液中培养 3 个月。具体为在 500 mL 具塞玻璃三角瓶中，分别加入不同体积的 WAF 母液和 f/2 培养液，石油烃浓度为 3.0 mg/L，总体积为 300 mL。其中对照组只加入过滤海水和 f/2 培养液，对照组除了没有加入 WAF 母液外，其他实验和检测过程与处理组一样。对照组设置 2 个平行组，急性毒性处理组和慢性毒性处理组设置 3 个平行。

收集新鲜藻液至 100 mL 离心管中，8 000 r/min，

4 °C 条件下离心 5 min, 弃上清液, 收集沉淀, 沉淀按 1 : 1 (W : V) 溶解于 1×PBS 缓冲液中, 置于 -70 °C 冰箱保存, 用于差异蛋白分析。

1.3.3 蛋白提取

使用 FASP (Filter-aided sample preparation) [12] 酶解方法进行酶解; 将酶解好的肽段冻干。用 SDS-PAGE 电泳鉴定提取的蛋白。

1.3.4 同重同位素相对与绝对定量 (Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 试验

将冻干的肽段用 30 μL 0.5M TEAB 进行溶解, 取出 iTRAQ® Reagent-8Plex Multiplex Kit, 每组样品对应 1 个分子量。将标记试剂离心, 分别加入 70 μL 异丙醇, 震荡混匀后高速离心, 然后加入到各自对应酶解液中, 充分混匀离心, 室温静置反应 2 h。

1.3.5 一维高 pH 反相分离和反相液质联用 RPLC-MS 分析肽的检测

1) 一维高 pH 反相分离

A 相: 20 mM 甲酸铵, pH10; B 相: 20 mM 甲酸铵, 100%ACN, pH10; 紫外检测波长: 214 nm/280 nm; 流速: 200 μL/min; 根据峰型和时间共收取 12 个梯度, 真空离心浓缩后, 用 50 μL RP-LC A 相 (5%ACN, 0.1% 甲酸) 溶解, 进行第二维分析。

2) 反相液质联用 RPLC-MS

富集柱: 自制 C18, 5 μm, ID100 μm, 20 mm Length; 分离柱: 自制 C18, 3 μm, ID75 μm, 120 mm Length; 色谱条件: 色谱分离时间: 90 min; A: 5% ACN, 0.1% 甲酸; B: 95% ACN, 0.1% 甲酸; 流速: 300 nL/min; 质谱鉴定: MS 扫描范围 (m/z) 350~1 250, 累积时间 0.25 s, MS/MS 扫描范围 (m/z) 100~1 500, 扫描模式: HS 高灵敏度模式, 累积时间 0.1 s, IDA 采集模式, 1 个 MS1 图谱选择 20 个最强的母离子进行串联扫描。

1.3.6 数据处理

质谱产生的原始数据 wiff 和 scan 文件通过 MS data converter V1.3 (AB Sciex) 转化为 mgf 文件, 然后导入 mascot 2.5.1 进行搜索, 将 mascot 生产的 dat 文件导入到 Scaffold_4.3.2 进行定量分析。

1.3.7 数据库搜索和生物信息学分析

利用 MASCOT2.5 引擎 (Matrix Science 公司) 对从质谱获得的原始数据进行搜索, 搜索对象为美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的硅藻门 (Bacillariophyta) 数据库。使用 Blast 2 Go 程序从 UniProt-

GO 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/GO/>) 获得蛋白质组的 GO 注释, 并使用 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 进行通路分析。GO 和 KEGG 的富集分析根据 Fisher's exact test 进行, 显著性水平 P 为 0.05。

2 结果与分析

2.1 差异表达蛋白 (DEPs) 数据分析

将提取的蛋白通过 iTRAQ 试验, RPLC-MS 分析, 标准生物信息分析, 本研究共检测到 1 723 个蛋白, 有定量信息的蛋白个数为 1 682 个。以差异倍数变化超过 1.2 倍作为显著上调, 小于 0.833 倍作为显著下调的变化标准, 所有差异表达蛋白汇总数据见图 1, 组 2 (慢性毒性处理组, 下同) 与组 1 (对照组, 下同) 间的差异蛋白 112 个, 其中表达量上调 49 个、表达量下调 63 个; 组 3 (急性毒性处理组, 下同) 与组 1 间的差异蛋白 169 个, 其中表达量上调 81 个、表达量下调 88 个。从图 2 中可知, 组 2 和组 3 有 40 个共同的差异蛋白, 组 2 特有的差异蛋白 72, 组 3 特有的差异蛋白 129 个, 对 40 个共有差异蛋白进行亚细胞结构定位分析, 结果见表 1, 从表 1 可以看出, 半数交集差异蛋白定位到了叶绿体, 叶绿体为重要的光合作用细胞器, 因此可以推测毒性处理后对中肋骨条藻的光合作用有很大的影响。

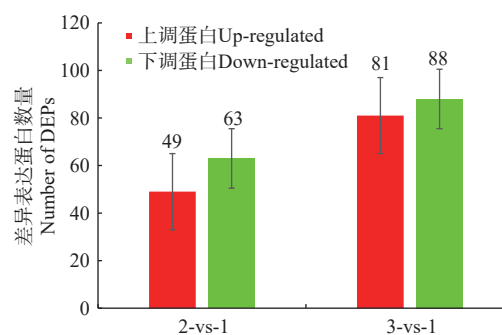


图 1 差异表达蛋白

Fig. 1 Differentially expressed proteins

注: 1 为对照组; 2 为慢性毒性处理组; 3 为急性毒性处理组, 图 2 同此。

Notes: 1 is the control group; 2 is the chronic toxicity group; 3 is the acute toxicity group. It's the same as figure 2.

2.2 急慢性毒性的差异表达蛋白 GO 富集分析

对不同处理组的上下调差异表达蛋白分别进行 GO 富集分析, 通过图 3 和图 4 可以看出, 急性毒性处理组比慢性毒性处理组发生了更多的功能变化, 尤其是上调蛋白引起的功能变化。

2 种毒性处理的各自上调差异蛋白均显著富集在碳水化合物衍生物代谢过程、碳水化合物衍生物的生物合成过程、无机二磷酸酶活性、谷氨酰胺-果糖-6-磷酸转氨酶（异构化）活性和碳水化合物衍生结合这 5 个 GO Term，此外各组差异蛋白均有 2 个和 13 个的特异的 GO Term；2 种毒性处理的各自下调差异蛋白引起的功能变化差异比较大，差异蛋白富集的共同 GO Term 只有三磷酸腺苷水解耦合质子运输、质子转运型三磷酸腺苷酶 V1 结构域。

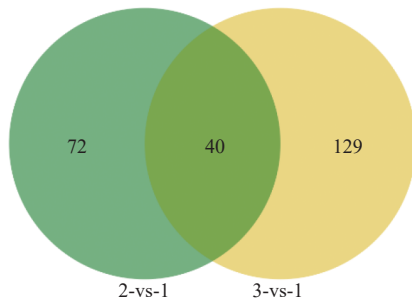


图 2 差异表达蛋白韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of DEPs

表 1 交集蛋白信息

Tab. 1 Intersectional protein information

蛋白质 ID Protein ID	蛋白质描述 Protein description	细胞器定位 Subcellular Localization
220969155	N-乙酰精氨酸氨基转移酶 O-N-acetylornithine aminotransferase	叶绿体 Chloroplast
220971590	热休克蛋白, 部分 Heat shock protein, partial	叶绿体 Chloroplast
220971055	ATP 硫酸化酶, 部分) ATP sulfurylase, partial	膜细胞 Plasma membrane
220975005	预测蛋白 Predicted protein	细胞质 Cytoplasm
220972490	尿素酶辅助蛋白, 部分 Urease accessory protein, partial	叶绿体 Chloroplast
397644174	假设蛋白 THAOC_01966 Hypothetical protein THAOC_01966	细胞质 Cytoplasm
397633232	假设蛋白 THAOC_07713 Hypothetical protein THAOC_07713	叶绿体 Chloroplast
209586331	双功能天冬氨酸酰胺酶/超氨基酸脱氢酶 Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase	叶绿体 Chloroplast
220977366	预测蛋白, 部分 Predicted protein, partial	膜细胞 Plasma membrane
589908236	磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 2 Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	叶绿体 Chloroplast
217409931	预测蛋白, 部分 Predicted protein, partial	叶绿体 Chloroplast
397614943	假设蛋白 THAOC_16250 Hypothetical protein THAOC_16250	叶绿体 Chloroplast
397628896	假设蛋白 THAOC_09683, 部分 Hypothetical protein THAOC_09683, partial	叶绿体 Chloroplast

续表 1

蛋白质 ID Protein ID	蛋白质描述 Protein description	细胞器定位 Subcellular Localization
397622430	假设蛋白 THAOC_12378 Hypothetical protein THAOC_12378	细胞核 Nucleus
397611251	(假设蛋白 THAOC_18299) Hypothetical protein THAOC_18299	叶绿体 Chloroplast
397618148	假设蛋白 THAOC_14457, 部分 Hypothetical protein THAOC_14457, partial	叶绿体 Chloroplast
220974844	磷酸葡萄糖变位酶 Phosphoglucomutase	细胞质 Cytoplasm
217403429	预测蛋白 Predicted protein	叶绿体 Chloroplast
397586188	假设蛋白 THAOC_27014 Hypothetical protein THAOC_27014	细胞质 Cytoplasm
15485656	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶, 部分 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, partial	细胞质 Cytoplasm
209585725	预测蛋白 Predicted protein	叶绿体 Chloroplast
220975207	液泡 ATP 酶 Vacuolar ATPase	细胞质 Cytoplasm
220976997	并甘醇 5-磷酸酶 Inositol 5-phosphatase	叶绿体 Chloroplast
220975699	真核翻译起始因子 5A Eucaryotic translation initiation factor 5A	细胞骨架 Cytoskeleton
397574738	假设蛋白 THAOC_31776 Hypothetical protein THAOC_31776	膜细胞 Plasma membrane
220977596	亮氨酸-tRNA 合成酶 Isoleucine-tRNA synthetase	叶绿体 Chloroplast
220977553	假设蛋白 THAPSDRAFT_1456 Hypothetical protein THAPSDRAFT_1456	叶绿体 Chloroplast
220975807	甘氨酸脱羧酶 P 蛋白 Glycine decarboxylase P-protein	线粒体 Mitochondria
397583401	假设蛋白 THAOC_28078 Hypothetical protein THAOC_28078	叶绿体 Chloroplast
371572698	镁原卟啉 IX 螯合酶, 叶绿体 Mg-protoporphyrin IX chelatase (chloroplast)	叶绿体 Chloroplast
217407740	预测蛋白 Predicted protein	叶绿体 Chloroplast
209583522	预测蛋白 Predicted protein	叶绿体 Chloroplast
220976251	假设蛋白 THAPSDRAFT_268160 Hypothetical protein THAPSDRAFT_268160	内质网 Endoplasmic reticulum
397647372	假设蛋白 THAOC_00477, 部分 Hypothetical protein THAOC_00477, partial	细胞核 Nucleus
220975173	预测蛋白 Predicted protein	膜细胞 Plasma membrane
283568992	光系统 II CP47 叶绿素伴蛋白 Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein	膜细胞 Plasma membrane
220974496	预测蛋白 Predicted protein	膜细胞 Plasma membrane
397627145	假设蛋白 THAOC_10458 Hypothetical protein THAOC_10458	细胞质 Cytoplasm
220978311	U5 小核糖核蛋白, U5 snRNP U5 small nuclear ribonucleoprotein, U5 snRNP	细胞核 Nucleus
220970433	假设蛋白 THAPSDRAFT_264181, 部分	细胞质

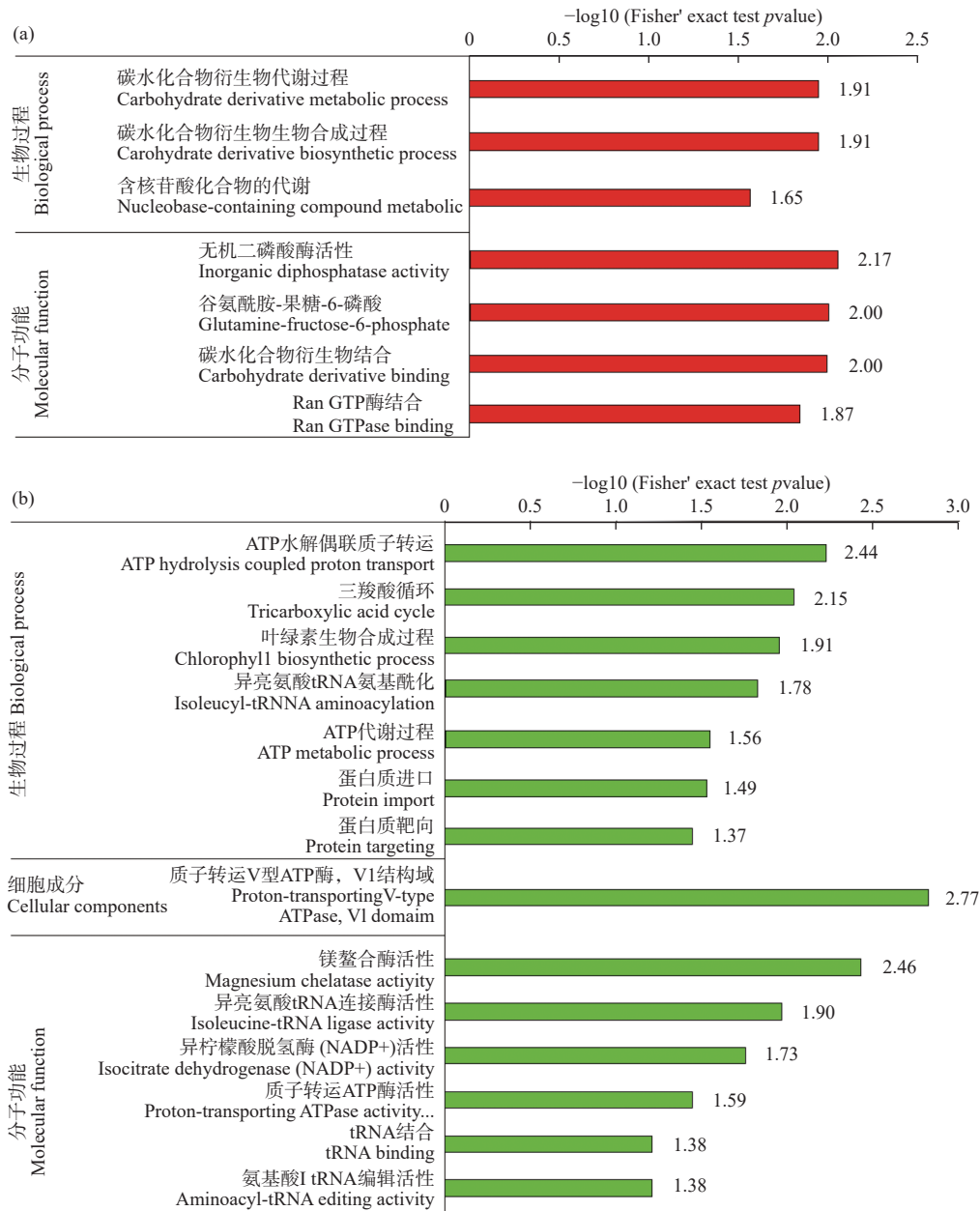


图 3 慢性毒性处理组 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of the chronic toxicity treatment groups

注：上调蛋白 (A) 和下调蛋白 (B) 的 GO 富集分析。横轴数值为显著 P 值 ($P < 0.05$) 的负对数转换，图 4~图 6 同此。

Notes: GO enrichment analysis of up-regulated proteins (A) and down-regulated proteins (B). The horizontal axis value is negative log transformed with significant p -value ($P < 0.05$). It's the same as figure 4-figure 6.

2.3 急慢性毒性的差异表达蛋白 KEGG pathway 富集分析

对不同处理组的上下调差异表达蛋白分别进行 KEGG 富集分析 (图 5、图 6)，从 2 种毒性处理引起的通路变化结果来看，上调的差异蛋白相关的通路都较少，并且没有共同显著变化的通路，慢性毒性响应相关的有 2 条分别为氨基糖和核苷酸糖代

谢通路和内质网蛋白加工通路，急性毒性响应相关的有 4 条分别为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路、噬菌体-酵母、内吞作用、真核生物核糖体合成。而下调蛋白所富集的通路相对较多并且导管酸分泌通路、抗生素的生物合成通路这 2 条通路在 2 种毒性处理的下调蛋白中都显著富集，其余慢、急性毒性处理都各自有 12 条和 9 条显著富集的通路。

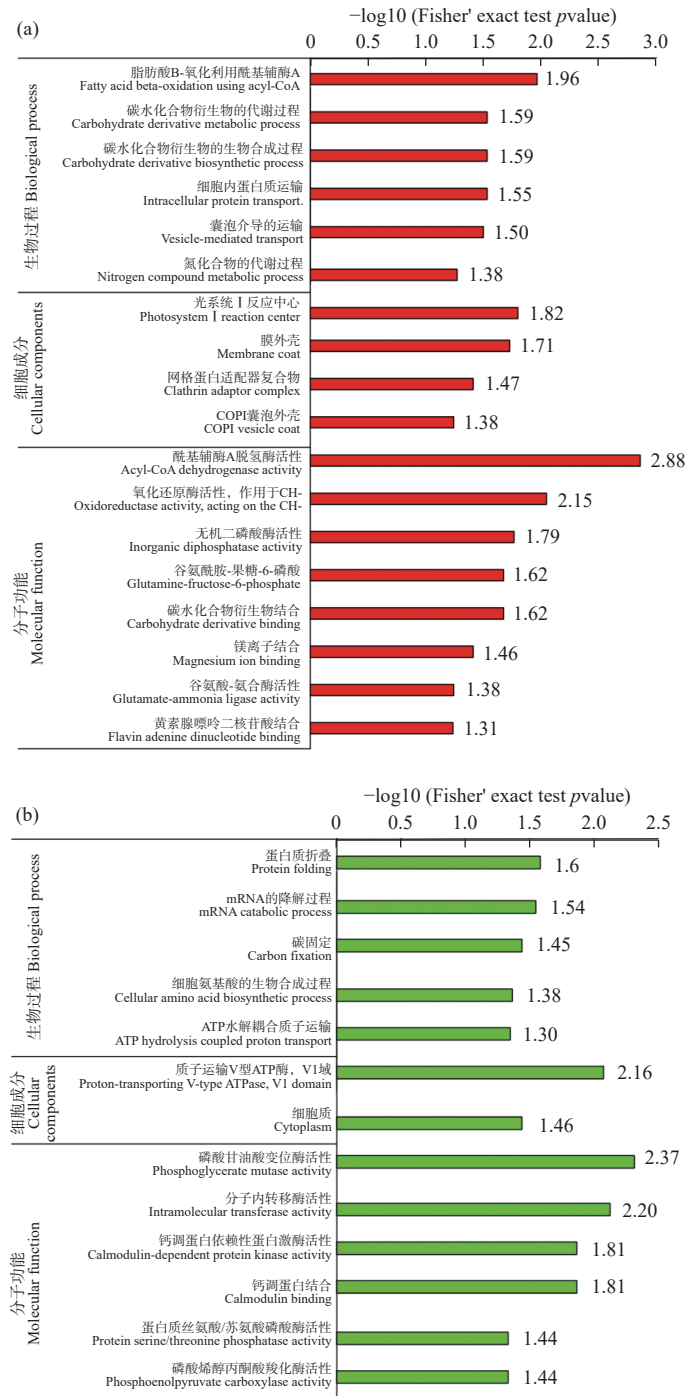


图 4 急性毒性处理组 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis in the acute toxicity treatment groups

2.4 石油烃污染胁迫响应相关的差异表达蛋白

已知毒性响应相关蛋白有如超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、抗血酸过氧化物酶、热休克蛋白和细胞色素 P450 酶等, 其参与抗逆环境胁迫等功能^[13-16]。与对照组相比, 分析发现一共有 38 个与过氧化物酶、热应激蛋白和细胞色素相关的蛋白, 其中有 4 个蛋白在毒性处理后出现差异表

达, 分别为细胞色素 P450 (18479135)、热休克蛋白 70 (908309951)、热休克蛋白 (220971590) 和假设蛋白 THAOC_16293 (397614868)。4 个差异表达蛋白结果见表 2, 慢性毒性处理组中热休克蛋白 (220971590) 和假设蛋白 THAOC_16293 (397614868) 有显著上调 ($P < 0.05$) 的趋势; 急性毒性处理组中热休克蛋白 70 (908309951)、热

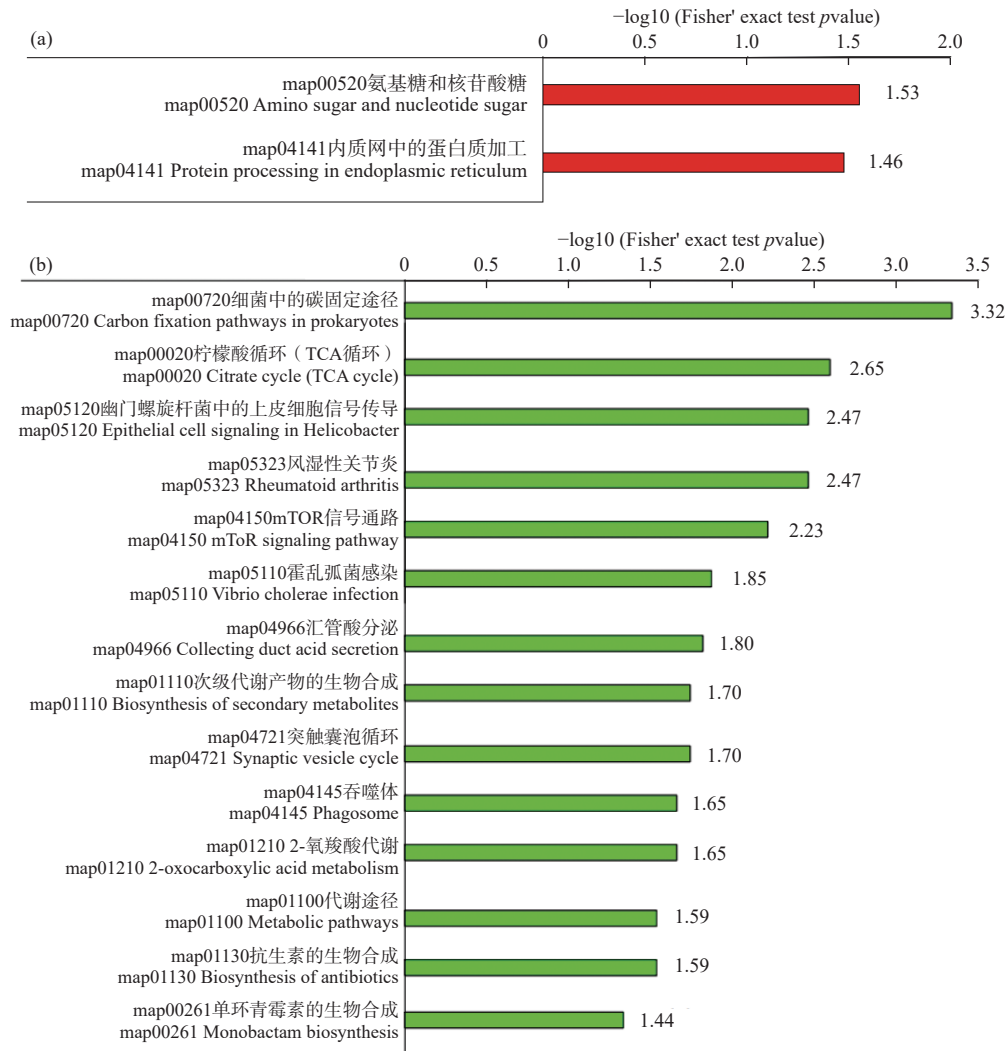


图 5 慢性毒性处理组 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis in the chronic toxic treatment groups

休克蛋白 (220971590) 有显著上调的趋势。因此, 推测这些蛋白可能与中肋骨条藻对石油烃的污染胁迫响应机制有关。

3 讨论

石油烃类污染物可直接影响浮游植物的生理代谢过程, 尤其是在浓度较高的石油烃作用下, 可提高大部分浮游植物的呼吸速率, 降低光合速率, 从而更好地适应胁迫环境^[17]。Becarelli 等^[18]指出, 润滑油可明显抑制杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 和三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 等光合作用。一般来说, 通过研究石油烃急性毒性对藻类的损伤, 可以将短期内毒性物质对藻类胁迫作用的位点充分反映出来, 若石油进入水体, 则会对物种产生长期的作用^[19]。

通常, 石油烃对藻类的毒性作用包括对细胞的生长抑制、叶绿素含量的降低以及对氮循环过程的影响^[20-21]。在石油烃胁迫下, 藻类通过吸收与同化硝酸盐氮, 释放亚硝酸氮和氨氮来维持细胞的正常生长, 这表明海洋藻类在石油烃胁迫下的氮循环过程处于稳态^[22]。本研究发现, 在石油烃胁迫下, 中肋骨条藻的半数交集差异蛋白定位到了叶绿体, 叶绿体为重要的光合作用细胞器, 说明毒性处理后对中肋骨条藻光合作用的影响较大, 并且在石油烃的环境胁迫下, 中肋骨条藻通过提高光合途径中的有机物质转化和光能吸收、物质循环代谢以及积累能量等关键支路的基因表达量来使自身的生命活动得以维持。通过 GO 和 KEGG 富集分析, 显著富集到的共同通路主要是碳水化合物的合成和代谢通路, 进一步说明了石油烃对中肋骨条藻生长和代谢

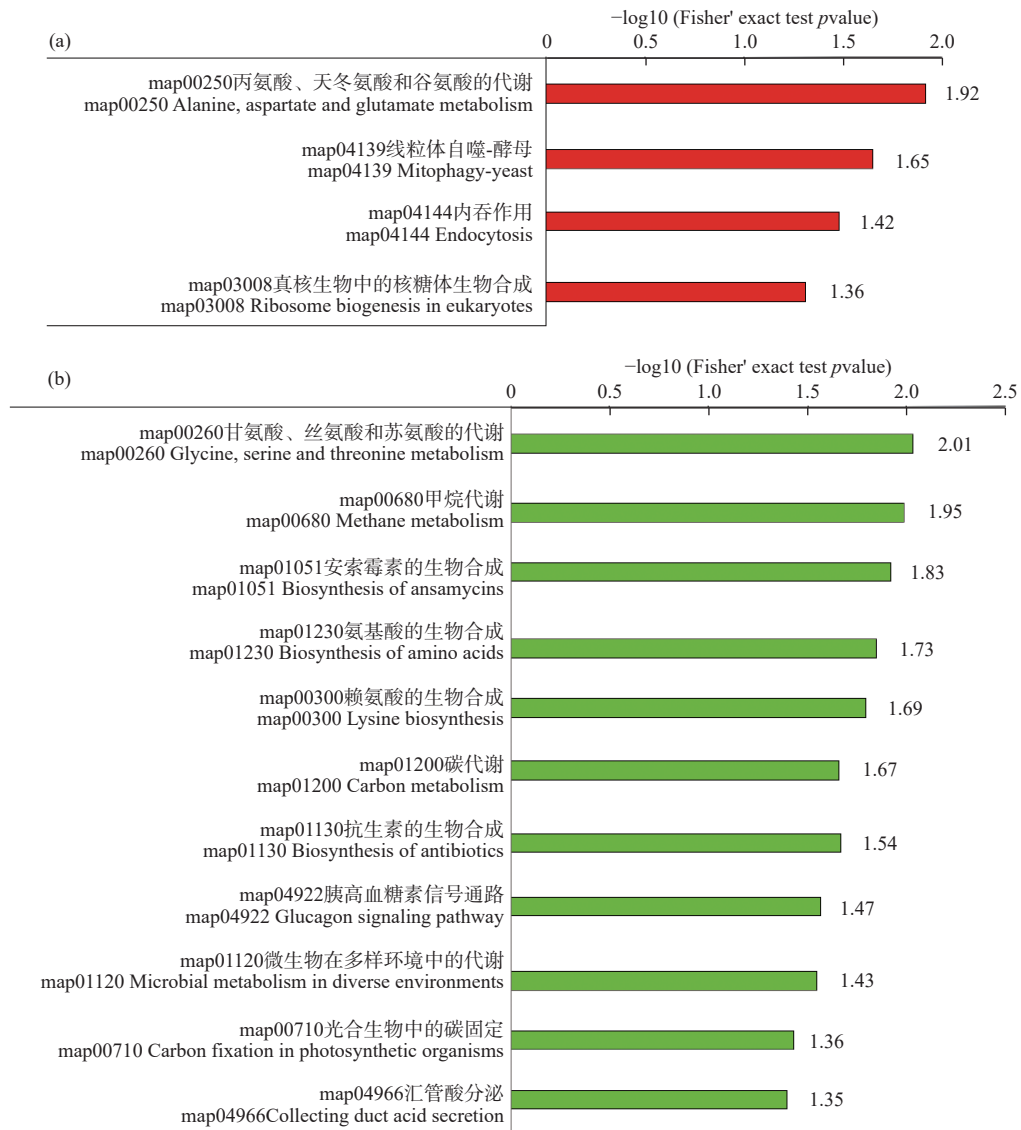


图 6 急性毒性处理组 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis in the acute toxicity treatment groups

表 2 石油烃污染胁迫响应相关的差异表达蛋白

Tab. 2 DEPs associated with the stress response from petroleum hydrocarbon pollution

蛋白质序列号 Protein accession	蛋白质描述 Protein description	2/1 比率 2/1 Ratio	2/1 P 值 2/1 P value	3/1 比率 3/1 Ratio	3/1 P 值 3/1 P value
18479135	细胞色素 P450 Cytochrome P450	0.199 7	0.012 2	0.455 2	0.061 2
908309951	热休克蛋白 70 (叶绿体) Heat shock protein 70 (chloroplast)	1.18	0.762	2.148 2	0.010 6
220971590	热休克蛋白, 部分 Heat shock protein, partial	1.668 8	0.009 92	1.401 5	0.026 6
397614868	假设蛋白 THAOC_16293 Hypothetical protein THAOC_16293	1.427 1	0.017	1.037	0.68

注: 第一列为蛋白 ID; 第二列为蛋白描述; 第三、四列为慢性毒性处理组与对照的差异倍数和 P value; 第五、六列为急性毒性处理组与对照组的差异倍数和 P value。

Notes: The first column is the protein ID; The second column is the protein description; The third and fourth columns are the fold difference and P value between the chronic toxicity treatment group and the control; The fifth and sixth columns are the multiple difference and P value between the acute toxicity treatment group and the control group.

的影响。热休克蛋白 (Heat shock protein, Hsp) 作为高度保守的一个蛋白质家族, 也是一个分子伴侣, 其生理作用以辅助蛋白折叠与去折叠为主, 可以使细胞蛋白维持稳定, 避免蛋白凝聚和变性。在 Hsp 家族中, 热休克蛋白 70 (Hsp70) 是一个比较重要的成员, 有研究报道指出, Hsp70 作为有效的一种分子标志物, 在环境污染早期预警中应用广泛^[23]。本次研究显示, 在毒性处理后, 热休克蛋白表达水平上调, 与慢性毒性处理相比, 急性毒性处理后, 发生了更多的功能变化, 尤其是上调蛋白引起的功能变化, 分析原因是热休克蛋白位于细胞质内, 钙活化核苷酸酶 1、ABC 转运子以及转录调节因子均位于线粒体内, 细胞核存在肌球蛋白, 提示石油烃作用于中肋骨条藻中的线粒体、细胞核以及细胞质, 且对应激蛋白的差异化表达起到诱导作用, 而 Hsp70 对石油烃胁迫具有应激保护作用^[24]。这一过程体现了生物体对应激反应的适应性调整, 以及 Hsp 在保护细胞免受环境压力损害中的重要作用。

综上所述, 石油烃通过其毒性作用影响中肋骨条藻的生长和代谢, 而中肋骨条藻则通过上调热休克蛋白的表达来应对这种胁迫, 保护自身免受损伤。本研究不仅为石油烃的致毒机理在分子水平上的研究奠定基础, 也为未来开发更有效的海洋污染防治策略提供了重要的理论依据。

参考文献 (References):

- [1] Wang Q W, Zhang H, Zhu P X, *et al.* Balancing energy security and marine pollution prevention legal challenges of utilizing nuclear power for decarbonizing maritime transportation in the Arctic region[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2024, 31(28): 40445 – 40461.
- [2] 肖洁, 张瑛妮, 张天闻. 海洋污染事故中裂解碳九主要成分的监测分析方法 [J]. *渔业研究*, 2020, 42 (2): 138 – 145.
Xiao J, Zhang D N, Zhang T W. Analysis methods for detecting cracking C₉ in sudden marine pollution accidents[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2020, 42(2): 138 – 145.
- [3] Nesterov O, Addad Y, Bilal S, *et al.* A numerical assessment of the dispersion of dissolved pollutants in the Arabian Gulf associated with the Barakah nuclear power plant[J]. *Ocean Modelling*, 2023, 186: 102274.
- [4] Barari M, Ramezani M, Lashkarbolooki M, *et al.* Influence of alkyl chain length of imidazolium-based ionic liquid on the crude oil-aqueous solution IFT under different ionic strengths[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2022, 556: 113404.
- [5] Lashkarbolooki M, Ayatollahi S. Evaluation of effect of temperature and pressure on the dynamic interfacial tension of crude oil/aqueous solutions containing chloride anion through experimental and modelling approaches [J]. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2018, 96(6): 1396 – 1402.
- [6] 王昭申, 胡玉星. 土壤中总石油烃 (C₁₀-C₄₀) 检测过程中影响结果因素探讨 [J]. *干旱环境监测*, 2023, 37 (4): 145 – 148.
Wang Z S, Hu Y X. Discussion on the influencing factors of total petroleum hydrocarbons (C₁₀-C₄₀) detection in soil[J]. *Arid Environmental Monitoring*, 2023, 37(4): 145 – 148.
- [7] Pedelacq M E, Venturini N, Bicego M C, *et al.* Petroleum hydrocarbon ecological risk and changes induced on macrobenthic communities of a microtidal estuary in South America[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2024, 207: 116916.
- [8] Guo Q, Yu X F, Zhang K S, *et al.* Atomically dispersed Co-Mn dual sites anchored in photoresponsive carbon nitride mediated peroxy monosulfate activation for elimination of petroleum hydrocarbon in water[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2024, 343: 123581.
- [9] Wang Y Q, Qiu Y J, Chen S J, *et al.* Discovery of characteristic proteins linked to textural changes in fermented golden pompano (*Trachinotus ovatus*) based on a label-free proteomics strategy[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2024, 127: 105931.
- [10] Wang P, Guo Y, Li S P, *et al.* Comparative proteomics reveal the humoral immune rejection of pearl oyster *Pinctada fucata* to xenograft from *Pinctada maxima*[J]. *Aquaculture*, 2024, 582: 740515.
- [11] 中华人民共和国农业部. 渔药毒性试验方法 第 1 部分: 外用渔药急性毒性试验: SC/T 1087.1—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Method of toxicity test of fishery drugs part 1: acute toxicity test of external fishery drugs: SC/T 1087.1—2006[S]. Beijing: Standards Press of China,

- 2006.
- [12] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1989: 175 – 176.
Zhou Y X, Zhang Z X. Toxicity test methods for Aquatic Organisms[M]. Beijing: Agriculture Press, 1989: 175 – 176.
- [13] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 359 – 362.
- [14] 张丽, 蒋风华, 曹为, 等. 四溴双酚 A (TBBPA) 对中肋骨条藻的毒性效应研究 [J]. 生态毒理学报, 2014, 9 (6): 1219 – 1225.
Zhang L, Jiang F H, Cao W, *et al.* Toxic effects of tetrabromobisphenol A(TBBPA) on *Skeletonema costatum*[J]. Chinese Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(6): 1219 – 1225.
- [15] 马双慧, 白洁, 孙鹏飞, 等. 一株溶藻菌 *Zobellella* sp. B307 对太平洋亚历山大藻的溶藻特性及作用机制研究 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2024, 54 (5): 66 – 73.
Ma S H, Bai J, Sun P F, *et al.* The algicidal characteristics and mechanism of an algicidal bacterium *Zobellella* sp. B307 on *Alexanderium pacificum*[J]. Journal of Ocean University of China (Natural Science Edition), 2024, 54(5): 66 – 73.
- [16] 吴子宜, 赖文杰, 邹振江, 等. 四指马鲛热休克蛋白 70 基因 (*HSP70*) 表达分析 [J]. 海南热带海洋学院学报, 2024, 31 (2): 6 – 15.
Wu Z Y, Lai W J, Zou Z J, *et al.* Expression analysis of heat shock protein 70 (*HSP70*) gene in *Eleutheronema tetradactylum*[J]. Journal of Hainan University of Tropical Oceanography, 2024, 31(2): 6 – 15.
- [17] 李飞, 苏甜甜, 苏康杰, 等. 螺旋藻和红球藻对斑马鱼生长性能、抗氧化酶、磷酸酶和热休克蛋白的影响 [J]. 浙江农业学报, 2024, 36 (7): 1511 – 1518.
Li F, Su T T, Su K J, *et al.* Effects of *Spirulina platensis* and *Haematococcus pluvialis* on the growth performance, antioxidant enzymes, phosphatase, and heat shock protein of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2024, 36(7): 1511 – 1518.
- [18] Hemmer M J, Barron M G, Greene R M. Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil (LSC), and chemically dispersed LSC to two aquatic test species[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(10): 2244 – 2252.
- [19] Becarelli S, Bernabei G, Siracusa G, *et al.* Bio-based decontamination and detoxification of total petroleum hydrocarbon-contaminated dredged sediments: perspectives to produce constructed technosols in the frame of the circular economy[J]. Water, 2023, 15(23): 4106.
- [20] 王江涛, 赵卫红, 李雪莲, 等. 石油烃和营养盐的复合污染对海洋浮游植物的影响 I . 石油烃对海洋浮游植物吸收营养盐的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2013, 44 (1): 43 – 48.
Wang J T, Zhao W H, Li X L, *et al.* Effects of combined pollution of petroleum hydrocarbons and nutrient salts on Marine phytoplankton I . Effects of petroleum hydrocarbons on nutrient uptake by Marine phytoplankton[J]. Oceanology and Limnology, 2013, 44(1): 43 – 48.
- [21] 高祥, 石晓勇, 韩秀荣, 等. 石油烃类污染物对中肋骨条藻和微型原甲藻的毒性效应研究 [J]. 海洋环境科学, 2017, 36 (6): 918 – 923.
Gao X, Shi X Y, Han X R, *et al.* Toxicity of petroleum hydrocarbon pollutants on *Skeletonema Costatum* and *Prorocentrum Minimum*[J]. Marine Environmental Science, 2017, 36(6): 918 – 923.
- [22] Ezenweani R S, Kadiri M O. Evaluating the productivity and bioremediation potential of two tropical marine algae in petroleum hydrocarbon polluted tropical marine water[J]. International Journal of Phytoremediation, 2024, 26(7): 1099 – 1116.
- [23] Laneve G, Bruno M, Mukherjee A, *et al.* Remote sensing detection of algal blooms in a lake impacted by petroleum hydrocarbons[J]. Remote Sensing, 2021, 14(1): 121.
- [24] Tominaga H, Coury D A, Amano H, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA encoding a heat shock protein 70 from a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta)[J]. Ecotoxicology, 2010, 19(3): 577 – 588.

Proteomics of *Skeletonema costatum* under contaminated stress by petroleum hydrocarbons

CHEN Caizhen¹, XU Cuiya¹, YANG Fang¹, CHEN Yufeng¹, XU Yibin¹, ZHENG Shenghua¹, JIANG Liangrong², LUO Donglian^{1*}

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-Value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China;

2. Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Objective] To investigate the changes in the proteome of *Skeletonema costatum* under pollution stress caused by petroleum hydrocarbons. [Methods] This study employed Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) in combination with Reverse-Phase Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (RPLC-MS) to analyze the differential proteomic changes in *Skeletonema costatum* resulting from chronic and acute toxicity treatments with petroleum hydrocarbons. [Results] Compared with the control group, 112 and 169 differentially expressed proteins (DEPs) were identified in the chronic and acute toxicity treatment groups, respectively. There were 40 overlapping DEPs between the two groups, with 20 of these proteins localized to the chloroplasts. The upregulated DEPs shared five common significantly enriched ($P < 0.05$) Gene Ontology (GO) terms: carbohydrate derivative metabolic process, carbohydrate derivative biosynthetic process, inorganic diphosphatase activity, glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerization) activity, and carbohydrate derivative binding. However, no common significantly enriched pathways were found. The downregulated DEPs shared two common significantly enriched ($P < 0.05$) GO terms: ATP hydrolysis coupled to proton transport and proton-translocating ATPase, V1 domain. Additionally, two common significantly enriched ($P < 0.05$) pathways were identified: ductal acid secretion pathway and antibiotic biosynthesis pathway. The heat shock protein (protein ID: 220971590), which is related to toxicity response, was significantly upregulated ($P < 0.05$) after both chronic and acute toxicity treatments. [Conclusion] The DEPs identified in *Skeletonema costatum* under petroleum hydrocarbon pollution stress are related to the stress response mechanisms of petroleum hydrocarbons. This study lays the foundation for understanding the toxicological mechanisms of petroleum hydrocarbons at the molecular level.

Key words: petroleum hydrocarbon; *Skeletonema costatum*; pollution stress; proteomics; differentially expressed protein