

# 泥蚶(*Tegillarca granosa*)肉质的蛋白组学研究\*

李太武 詹堃 苏秀榕

(“应用海洋生物技术”教育部重点实验室 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

**提要** 采用双向电泳技术,对广东阳江和浙江乐清两地的泥蚶肌肉全蛋白进行了研究,并利用质谱和软件对差异蛋白进行了分析。研究表明,阳江和乐清两地样品平均检测到的蛋白点数分别为  $674 \pm 25$  和  $746 \pm 34$  个,平均匹配率为 78.6%。差异表达蛋白质点数为 26 个,其中 3 个点仅在阳江泥蚶中表达,5 个点仅在乐清泥蚶中表达;6 个点在阳江泥蚶中为高表达,12 个点在阳江泥蚶中为低表达。选择其中 6 个具有代表性的蛋白点进行肽指纹图谱分析。结果显示,乐清泥蚶中高表达的 4 个蛋白确定为肌动蛋白、PRKA 激酶锚定蛋白 9、烯醇化酶。这些物质与泥蚶的肉质特性有一定关联。乐清地区出产的泥蚶在营养、肉质和鲜美度方面均优于阳江地区的泥蚶。

**关键词** 泥蚶,双向电泳,肽指纹图谱,品质  
**中图分类号** Q346

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)俗称血蚶、宁蚶、花蚶、粒蚶,属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、列齿目(Taxodonta)、蚶科(Arcidae)动物,主要分布于西太平洋、印度洋和大西洋海域,在中国、韩国、泰国、菲律宾、马来西亚等地均有分布。在我国仅分布在山东半岛以南沿海(李太武等,2004)。近年来,随着泥蚶育苗技术的进一步成熟,其养殖业也得到长足发展,已成为我国浙江、福建、广东等地的主要经济养殖贝类(曹华等,2006)。泥蚶作为水产业主导经济养殖贝类产品之一,味道鲜美、营养价值高,深受人们的喜爱,市场需求量很大,经济价值高。早期研究主要集中于泥蚶育苗、增殖技术以及致病机理和防治措施等方面,而相关的基础研究直至 20 世纪末才逐步展开(潘沙芳等,2006;苏秀榕等,2005;曾庆国等,2008)。泥蚶含有多种蛋白质和维生素 B<sub>12</sub>,是滋补佳品;蚶壳可做药用,有消血块、化痰之功效。据《本草经疏》记载:蚶,味甘,性温,无毒;有补血、健胃功效;主治血虚痿痹,胃痛,消化不良,下痢脓血等,亦用于滋补强壮,病后体虚。我国不同海区泥蚶的肉质有所差异(詹堃等,2007),为了研究泥蚶肉质变化的生物学机制,作者选择了

业内公认品质最好的浙江乐清、原种产地广东阳江的泥蚶,采用双向电泳技术,寻找差异表达蛋白并进行测序分析,对了解两地泥蚶品质差异具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

广东阳江新鲜泥蚶采集于 2007 年 4 月 16 日,浙江乐清新鲜泥蚶采集于 2007 年 5 月 2 日。电泳所有试剂均为 Bio-Rad 公司随仪器所带。

### 1.2 方 法

**1.2.1 泥蚶肌肉总蛋白的提取** 用 4℃ 预冷 PBS 缓冲液清洗干净新鲜的泥蚶肌肉,滤纸吸干后称量,以 1:5 的比例加入适量的裂解液(8mol/L 尿素、1.5mol/L Thioruea、4% CHAPS、10mmol/L Tris、2mmol/L TBP、0.2% Bio-Lyte 3/10 两性电解质、0.0002% 溴酚兰、1mmol/L PMSF、1mmol/L EDTA),冰浴下匀浆至无可见组织块,静置 5—10h 之后,4℃、30000 g 离心 30min,小心避开上层漂浮的脂质层,取上清,使用 Bio-Rad 公司的 2-DE 纯化试剂盒,用考马斯亮蓝法定蛋白,确保浓度约为 5g/L,分装后置 -80℃ 保存待用。

\* 国家自然科学基金资助项目,30771665 号;长江学者和创新团队发展计划资助项目,2007—2009;浙江省重点社会发展资助项目,2005C23083 号。李太武,教授,博导,E-mail: litaiwu@nbn.edu.cn

收稿日期:2007-10-25,收修改稿日期:2007-12-19

**1.2.2 电泳** 采用 17cm、pH 4—7 的线性胶条, 被动的水化上样, 上样量为 0.75mg, 等电聚焦参照文献(Yoichi *et al*, 2002)进行, SDS-PAGE 第二向电泳的条件为 S1 : 130V、30min, S2 : 250V、3h ; 考马斯亮兰 G-250 染色, 脱色后扫描, 利用 Bio-Rad 公司的 PDquest7.4 数据分析。

### 1.2.3 肽指纹图谱分析

(1) 质谱样品制备 使用 PDQuest 7.4 软件对结果进行分析, 选择差异蛋白, 从胶上切下, 切成  $1\text{mm}^3$  大小, 置于 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 按 Caulin 等(2000)的方法处理样品。

(2) 质谱分析(MALDI-TOF-MS) 质谱样品使用德国 BRUKER 公司的 ReFlex<sup>TM</sup> III MALDI-TOF 质谱仪进行分析, 采用反射模式, 离子源加速电压 1 为 20kV, 加速电压 2 为 23kV。N<sub>2</sub> 激光波长 337nm, 脉冲 3ns, 离子延迟 2000ns, 真空度  $1.4 \times 10^{-3}$  Torr, 用标准 Marker 峰作为外标校正质谱峰, 正离子谱测定, 获得肽质量指纹图谱。

(3) 数据库检索 获得的混合物肽片段质量数据通过 PSI 系统 MS-FIT 搜索引擎检索, 数据库 NCBIInr.6.26.2007, 肽片段质量范围 800—4000, 半胱氨酸为尿甲基半胱氨酸(carbamidomethyl-Cys), 最大允许肽质量误差为 0.5, 每个肽允许有 1 个不完全裂解位点, 蛋白质的相对分子质量范围为 1000—100000, 等电点 pI = 3—10。

## 2 结果

### 2.1 两地泥蚶肌肉组织蛋白双向电泳

泥蚶肌肉蛋白的等电点和分子量分布范围较广,

但绝大多数集中于 pH 值 4—7、分子量 14—114kD 区域。经软件分析可知, 阳江和乐清两地样品平均检测到的蛋白点数分别为  $674 \pm 25$  和  $746 \pm 34$  个, 平均匹配率为 78.6%。见图 1、图 2。

### 2.2 差异蛋白点的分析和检测

差异表达蛋白质点筛选的标准: 将电泳图进行灰度扫描后, 筛选出在每次重复实验中都出现的、仅在阳江泥蚶中表达或仅在乐清泥蚶中表达的差异表达蛋白质点, 以及两者间表达量相差 5 倍以上的差异表达蛋白质点。通过软件分析, 获得差异表达蛋白质点数为 26 个, 其中 3 个点仅在阳江泥蚶中表达, 5 个点仅在乐清泥蚶中表达, 6 个点在阳江泥蚶中为高表达(表达量高于乐清泥蚶的 5 倍以上), 12 个点在阳江泥蚶中为低表达(表达量低于乐清泥蚶的 5 倍以上)。在这些差异点中, 剔除掉表达丰度过高、过低以及难以进行扣点操作的蛋白点后, 选择其中 6 个具有代表性的点进行蛋白的肽指纹图谱分析(MALDI-TOF-MS)。图 2 为这些点的放大图谱, 其中 P1、P3、P5、P6 为乐清泥蚶高表达点, P2 为阳江泥蚶高表达点, P4 仅在乐清泥蚶中表达。

### 2.3 质谱检测

经质谱检测, 得到了这 6 个蛋白点的 PMF 图谱以及相关数据, 通过 Matrix science 网站提供的 MASCOT 软件查询与之匹配的蛋白, 并结合相应蛋白质点的表观等电点、分子量、匹配肽段的多少以及氨基酸序列的覆盖率进行蛋白质鉴定, 结果的数据见表 1。由搜索结果可知, 这 6 个蛋白分别是肌动蛋白片段(Actin 1)、未命名蛋白 KRAB(Unnamed protein product)、肌动蛋白(Actin)、假设蛋白 LOC768032

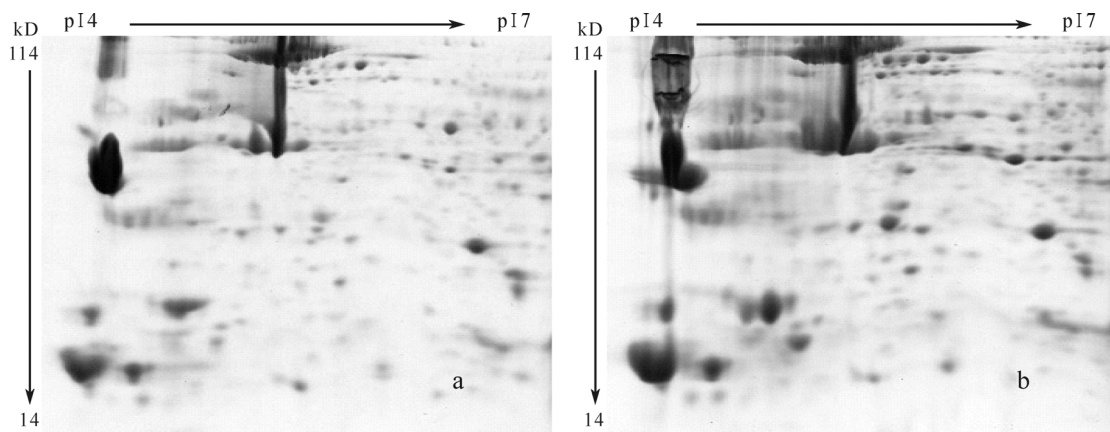


图 1 阳江和乐清两地泥蚶肌肉蛋白的双向电泳图谱

Fig.1 2-D gel electrophoresis images of muscle proteins of *T. granosa* from Yangjiang and Yueqing  
a. 阳江; b. 乐清

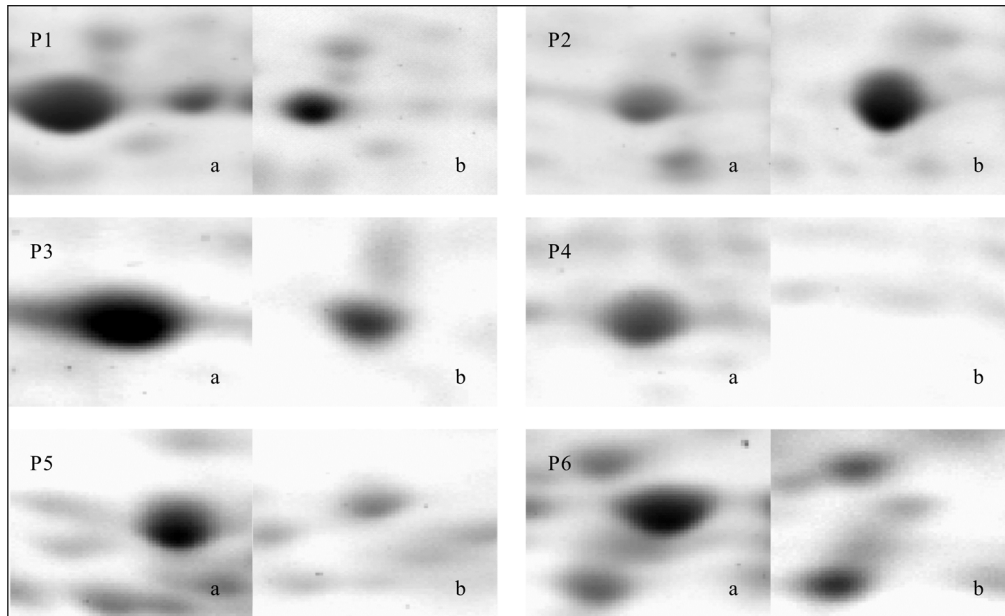


图 2 阳江和乐清两地泥蚶肌肉蛋白的双向电泳图谱差异点放大图谱

Fig.2 Enlarged portion at the variance point on 2-D gel electrophoresis image of muscle proteins of *T. granosa* from two locations  
 P1 : a. 乐清, b. 阳江; P2 : a. 阳江, b. 乐清; P3 : a. 乐清, b. 阳江;  
 P4 : a. 阳江, b. 乐清; P5 : a. 乐清, b. 阳江; P6 : a. 乐清, b. 阳江

表 1 P1—P6 在数据库中的搜索结果  
 Tab.1 Database search results on P1—P6

蛋白	编号	总得分	序列覆盖率	蛋白名称	种属来源
P1	gi 3046400	75	35%	Actin 1	<i>Zebrafish</i> sp.
P2	gi 74187820	81	23%	Unnamed protein product (KRAB)	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
P3	gi 86307562	148	37%	Actin	<i>Mus musculus</i>
P4	gi 116004401	81	28%	hypothetical protein LOC7 68032	<i>Bos taurus</i>
P5	gi 125661048	86	26%	A kinase (PRKA) anchor protein 9	<i>Xenopus laevis</i>
P6	gi 53830714	78	24%	Enolase	<i>Oncometopia nigricans</i>

(hypothetical protein LOC768032)、PRKA 激酶锚定蛋白 9 [A kinase (PRKA) anchor protein 9]以及烯醇化酶 (enolase)。

### 3 讨论

#### 3.1 双向电泳的高分辨率和可重复性

保持双向电泳良好的重复性的首要问题就是两个不同地区泥蚶的取样和肌肉组织的取材。由于浙江和广东地区的水温、盐度、饵料等都存在明显的差异,取样的时间必须保证这两个地区的泥蚶样本既处在同一发育阶段,又处在营养积累的最佳时期。同时,由于个体差异以及其他偶然因素和系统误差的影响,传统的蛋白质学方法对同一样本能达到的最佳匹配率在 85%左右(Hanash, 2003; Walgren *et al.*, 2004)。系

统误差在目前的技术水平条件下是不可避免的,因此作者要做的就是尽量消除个体差异带来的影响。在肌肉组织样品的取材时采用标本混合策略,即同一地区的样品取材需将至少大于 20 例随机个体的肌肉组织等量混合后再进入提取步骤。

裂解液中高浓度的尿素可以造成强变性条件(但如果再提高浓度,尿素就容易析出,影响蛋白的溶解),过量的去污剂也可以减少脂类的污染,两性电解质可以提高蛋白的溶解度,同时有利于等电聚焦。使用广谱的蛋白酶抑制剂、选择被动的水化上样、较长时间的缓慢升压模式等均可达到高分辨率和可重复性。

#### 3.2 差异蛋白质

6 个最主要的差异蛋白点的肽指纹图谱分析显示

了检测的效果良好, 蛋白的检出率达到了 100%。稍显遗憾的是, 比对之后最相近的蛋白序列来源物种除了 P1 为水生的斑马鱼之外, 其他都来自于陆生动物, 这主要是由于海洋生物蛋白质库的严重缺乏而导致。但参考 Pan 等(2006)对于质谱检测可靠性评价的方法, 综合比对得分和序列覆盖率等数据表明, 这些比对结果都是相当可信的。

经肽指纹图谱分析, P1、P3 均为 Actin 1, 也就是肌动蛋白的片段; 这两个点在乐清泥蚶肌肉组织中均为高表达。肌动蛋白是贝类肌肉中的肌原纤维蛋白的重要组成部分, 是重要的结构蛋白之一, 它在细肌丝中与肌球蛋白双螺旋并行存在, 可影响并调控肌动球蛋白之间的相互作用。此外肌动蛋白还跟贝类的肉质及口感有紧密联系, 肌动蛋白和肌球蛋白形成的肌动球蛋白(actomyosin, AM), 其所形成的热诱导凝胶对肉制品的组织结构及保水、保油性有显著影响。Phatcharat 等(2006)研究了鲷(*Priacanthus tayenus*)肌动球蛋白的凝胶特性; Binsi 等(2006)研究了贻贝肌动蛋白的生化和功能特性; Sasaki 等(2001)对肌球蛋白与肌动蛋白相互作用进行研究认为: 肌球蛋白与肌动蛋白相互结构作用主要依赖 ATP 起作用; Soottawat 等(2007)发现焦磷酸盐能使对虾肌动球蛋白分解成肌动蛋白和肌球蛋白; Bentil(1998)研究了肌动球蛋白运动模型; Lorena 等(2006)研究了不同软体动物肌原纤维蛋白生化和功能特性, 发现该类蛋白具有酶活、减小粘度、乳化等作用, 其中肌动球蛋白降低粘度、乳化作用较强。潘沙芳等(2006)曾对几个主要泥蚶产区出产的泥蚶肌动蛋白进行了提取分析, 结果发现肌动蛋白含量为乐清 > 湛江 > 福建 = 荣成 > 韩国, 作者的实验也印证了此结果。

P6 蛋白点在乐清泥蚶肌肉组织为高表达, 鉴定为 Enolase, 即烯醇化酶。烯醇化酶又称 2-磷酸-D-甘油酸水解酶, 它催化磷酸甘油向磷酸烯醇式丙酮酸的转化, 是糖酵解过程的限速酶, 一般认为该酶是一个古老的、保守的、功能单一的蛋白。烯醇化酶既可催化糖酵解过程中 2-磷酸-D-甘油酸(PGA)向磷酸-烯醇式丙酮酸(PEP)的转化, 又可在糖原合成过程中催化逆向反应, 即作为磷酸丙酮酸水合酶, 使 PEP 向 PGA 转化, 因此烯醇化酶在细胞能量代谢过程中起重要的作用(Bolten *et al*, 2008)。

P5 蛋白点在乐清泥蚶肌肉组织也为高表达, 经鉴定, 确定为 A kinase (PRKA) anchor protein 9, 即 PRKA 激酶锚定蛋白 9。PRKA 激酶是蛋白激酶庞大

家族中的一个成员。Chardot 等(1994)研究表明, PRKA 激酶能对蛋白进行磷酸化修饰, 是很有潜力和前途的食品蛋白改性的工具。磷酸化改性后的蛋白中, 由于引进了大量的磷酸根基团而增加了蛋白质体系的电负性, 提高了蛋白质分子之间的静电斥力, 使之在食品体系中更易分散, 相互排斥, 因而提高了溶解度和聚结稳定性。

P2 蛋白点在阳江泥蚶肌肉组织为高表达, 被鉴定为一种尚未命名的蛋白 KRAB(Unnamed protein product), 关于它的功能研究尚不多见, 被认为可能与锌指蛋白(Zinc finger protein)的代谢相关。

P4 蛋白点只在乐清泥蚶中出现, 被鉴定为假设蛋白 LOC768032(hypothetical protein LOC768032), 假设蛋白是一类经发现后尚未进行功能特性研究的蛋白。LOC768032 的功能推测与细胞运动和代谢相关。

## 参 考 文 献

- 苏秀榕, 吕振明, 李太武等, 2005. 泥蚶个体发育过程中同工酶基因表达与调控的研究. 海洋与湖沼, 36(1): 81—87
- 李太武, 吕振明, 林志华等, 2004. 泥蚶同工酶谱在不同组织的差异研究. 海洋学报, 26(4): 125—132
- 詹 堃, 李太武, 苏秀榕, 2007. 阳江乐清两地泥蚶肌肉组织营养成分研究. 水产科学, 26(12): 665—667
- 曹 华, 蒋建斌, 曹红军, 2006. 泥蚶人工育苗及滩涂养成技术研究. 齐鲁渔业, 23(6): 1—3
- 曾庆国, 林志华, 尤仲杰, 2008. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)GT 微卫星位点的筛选和性质鉴定. 海洋与湖沼, 39(2): 174—177
- 潘沙芳, 李太武, 苏秀榕, 2006. 用多元分析法研究泥蚶氨基酸地区差异. 海洋与湖沼, 37(6): 536—540
- Bentil D E, 1998. Distribution of attachment events relative to actin binding sites as evidenced in a bidirectional actomyosin interaction model. Bulletin of Mathematical Biology, 60(5): 973—995
- Binsi P K, Shamasundar B A, Dileep A O, 2006. Some physico-chemical, functional and rheological properties of actomyosin from green mussel (*Perna viridis*). Food Research International, 39(9): 992—1001
- Bolten K E, Marsh A E, Reed S M *et al*, 2008. *Sarcocystis neurona*: molecular characterization of enolase domain I region and a comparison to other protozoa. Experimental Parasitology, 120(1): 108—112
- Caulin C, Ware C F, Magin T M, 2000. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. J Cell Biol, 149: 17—22
- Chardot T, Meunier J C, 1994. Purification and principal properties of the casein kinase II purified from the yeast *Yarrowia lipolytica*. International Journal of Biochemistry, 26(8):

- 1017—1024
- Hanash S, 2003. Disease proteomics. *Nature*, 422: 226—232
- Lorena A Mignino, María E, 2006. Physico-chemical and functional properties of myofibrillar proteins from different species of molluscs. *LWT-Food Science and Technology*, 39(1): 35—42
- Pan J Y, Cheng Y Y, 2006. Identification and analysis of absorbed and metabolic components in rat plasma after oral administration of Shuangdan granule by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(5): 565—572
- Phatcharat S, Benjakul S T, Visessanguan W, 2006. Effects of washing with oxidising agents on the gel-forming ability and physicochemical properties of surimi produced from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 9(3): 431—439
- Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, 2001. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(2): 292—297
- Soottawat B, Visessanguan W, Kijroongrojan K, 2007. Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *Food Chemistry*, 103(4): 1199—1207
- Walgren J L, Thompson D C, 2004. Application of proteomic technologies in the drug development process. *Toxicol Lett*, 149: 377—385
- Yoichi S, Naomi M, Shindo H *et al*, 2002. Purification of lactic acid dehydrogenase from crude bovine heart extract by pH-peak focusing counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 776(2): 183—189

## THE PROTEOMICS OF *TEGILLARCA GRANOSA* LINNAEUS

LI Tai-Wu, ZHAN Kun, SU Xiu-Rong

(Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211)

**Abstract** Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) of proteins in muscle tissue of *Tegillarca granosa*, sampled in Yangjiang of Guangdong Province and Yueqing of Zhejiang Province, was studied. The results show that the total amount of protein in two granosa was  $674 \pm 25$  and  $746 \pm 34$ , respectively, the average matching rate was 78.6%. Analysis with software recognized 26 different proteins, of which 3 appeared in Yangjiang, and 5 in Yueqing, exclusively; 6 were higher expressed in Yangjiang, and 12 were in Yueqing. Afterwards, 6 typical proteins (P1—P6) were chosen to run a MALDI-TOF-MS, and were recognized as actin 1, unnamed protein product (KRAB), actin, hypothetical protein LOC768032, a kinase (PRKA) anchor protein 9, and enolase, respectively. Among them, 4 proteins (P1, P3, P5, P6) with high expression in Yueqing sample were confirmed closely related to meat quality of the mollusc. Specifically, P1 and P3 proteins can influence the gelatin characteristic in heating, and decide the meat quality, physical appearance, and yield in a certain degree; P5 protein can alter protein in phosphoric acidification, and enhance protein solubility and stability; P6 protein plays a key role in regulating the glucose metabolism in mollusc; while the function of P2 and P4 protein remains unclear due to less available information. In overall, this study in proteome shows that the food quality of Yueqing was better than that of Yangjiang.

**Key words** *Tegillarca granosa*, Two-dimensional gel electrophoresis, Peptide fingerprint, Quality