

不同花纹文蛤(*Meretrix meretrix*)的外套膜蛋白质的双向电泳研究*

苏秀榕¹ 金春华¹ 李春艳¹ 李 晔¹ 张春丹¹ 李太武^{1,2}

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

摘要 采用双向电泳技术,对浙江乐清无花纹和有花纹文蛤外套膜的全蛋白进行了研究,并利用质谱和软件对差异蛋白进行了分析。经PDQuest软件分析,在pH 4—7,分子量14.3—200kD之间,无花纹文蛤样品中检测到 682 ± 24 个蛋白质点,有花纹样品检测到 600 ± 35 个蛋白质点,平均匹配率为84.5%。研究结果显示,两种文蛤共有256个点存在差异表达,这些差异点可能与贝壳的颜色和花纹形成有关。其中98个点为无花纹文蛤特有,57个点为有花纹文蛤特有,另有101个点在表达量上存在两倍以上差异。在无花纹贝壳中发现分子量为42kD左右,等电点为6.4左右,与库蚊的肌动蛋白(分子量为41.7kD,等电点为5.3)匹配率较高;分子量为29kD,等电点为5.6,与飞鱿的肌动蛋白(分子量为29kD,等电点为5.25)匹配率较高的两个蛋白质。在有花纹文蛤中发现了分子量为27kD左右,等电点为4.8,与丽文蛤属的肌浆钙结合蛋白(分子量为20.8kD,等电点为4.98)匹配率较高。

关键词 文蛤, 贝壳花纹, 外套膜蛋白, 双向电泳

中图分类号 S968.3

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、异齿亚纲(Heterodonta)、帘蛤目(Veneroida)、帘蛤科(Veneridae)、文蛤属(*Meretrix*),是我国沿海常见的一种重要经济贝类。我国已记载的种类有文蛤、丽文蛤(*Meretrix lusoria* Rumphius)、斧文蛤(*Meretrix lamarckii* Deshayes)、中国文蛤(*Meretrix petechialis* Lamarck)、帘文蛤(*Meretrix lyrata* Sowerby)和台湾文蛤(*Meretrix formosana* Sowerby)等6种。目前常见的有文蛤、丽文蛤和斧文蛤,其中文蛤是海水增养殖优良品种,也是我国大宗出口的鲜活水产品之一(杜晓东等,2004)。文蛤在我国沿海均有分布,南至广西北海,北到辽宁各地,是我国海水养殖的重要经济贝类之一。文蛤贝壳的颜色和花纹,随着地理分布不同发生着规律性的变化。由北至南,文蛤贝壳颜色从灰色、黄色到褐色、红褐色逐渐变得光泽艳丽;而贝壳花纹却刚好相

反,从条带纹、致密的波浪纹到不规则纹、稀疏的点状纹,贝壳花纹从浓密到没有。而在同一个地区,文蛤贝壳的颜色和花纹也在一定范围内变化(李太武等,2006a, b; 张安国等,2006)。近年来由于国际贸易的发展,文蛤的需求量逐年上升,促进了各地文蛤养殖事业的发展。同时,养殖的无序性造成了对野生资源的过度开发,不同地区的随意引种也使文蛤的遗传多样性受到了严重的威胁。目前,文蛤的基础研究主要集中在形态学、细胞学、生理生化(陈大鹏等,2004; 潘宝平等,2006)、养殖学和病理学(程量等,1997)方面均取得了一定的成绩,但对其蛋白质组学方面的研究还见报道。本文采用蛋白质组学的研究技术,对浙江地区有花纹和无花纹文蛤的外套膜进行了双向电泳的比较,找出差异蛋白点,分析特异蛋白对贝壳花纹和颜色形成的影响,为研究以文蛤贝壳花纹为遗传标记,选育优良品种的工作提供理论支持,也为关于

* 国家高技术研究发展计划(863计划),2002AA626020号;长江学者和创新团队发展计划资助项目,2007—2009;宁波市科技局项目,2004C0163号。苏秀榕,教授,E-mail:suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期:2008-11-27,收修改稿日期:2009-01-12

文蛤的基因组学研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用文蛤(*Meretrix meretrix*)取于浙江温州乐清湾,活体运至实验室,在海水中养殖。电泳所有试剂均为 Bio-rad 公司随仪器所带。

1.2 方法

1.2.1 文蛤外套膜总蛋白的提取 用 4 预冷 PBS 缓冲液清洗干净新鲜的文蛤外套膜,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, 以及 1mmol/L EDTA), 冰浴下匀浆至无可见组织块,静置 5—10h 之后, 4 、 30000g 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(钱宝珍, 2005)。

1.2.2 样品浓度 无花纹样品终浓度为 1.69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 有花纹样品终浓度为 3.61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。两种样品的上样量为 270 μg 。

1.2.3 电泳 采用 7cm、pH 3—11 的线性胶条, 被动水化上样, 上样量为 230 μg , 等电聚焦采用文献进行, SDS-PAGE 第二向电泳的条件为 S1 : 130V, 30min; S2 : 250V, 3h, 考马斯亮蓝 G-250 染色, 脱色后扫描, 利用 Bio-Rad 公司的 PDquest7.4 数据分析(李太武等, 2008)。

1.2.4 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, 从胶上切成 1mm³ 大小置于 1.5ml 的离心管中, 加入缓冲液的方法处理样品(Helena *et al*, 2005)。

(2) 质谱分析 质谱样品使用德国 BRUKER 公司的 ReFlexTM 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。N₂ 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(潘晓宁等,

1999)。

(3) 数据库检索 获得的肽片段质量数据通过 PSI 系统 MS-FIT 搜索引擎检索数据 NCBI, 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 1000—100000, 等电点 pI 3—10 (Robert *et al*, 2007)。

2 结果与讨论

2.1 双向电泳结果

无花纹和有花纹文蛤外套膜的双向电泳图谱是在相同的实验条件下完成的, 并经过三次以上的重复实验, 实验结果稳定。经 PDQuest 软件分析, 在 pH 4—7, 分子量 14.3—200kD 之间, 无花纹文蛤样品中检测到 682 \pm 24 个蛋白质点, 有花纹样品检测到 600 \pm 35 个蛋白质点, 平均匹配率为 84.5%(Hobson *et al*, 2007)。

2.2 差异蛋白质点的选取

以相同点的量值差异在两倍以上即认为表达量存在差异, 对图 1a 和图 1b 进行差异分析, 发现共有 256 个点存在差异表达, 这些差异点可能与贝壳的颜色和花纹形成有关。其中 98 个点为无花纹文蛤特有, 57 个点为有花纹文蛤特有, 另有 101 个点在表达量上存在两倍以上差异。为了明确差异蛋白的功能, 推测其与花纹形成机制之间的关系, 本文对部分差异蛋白质点进行了质谱鉴定。为保证样点在不同凝胶上存

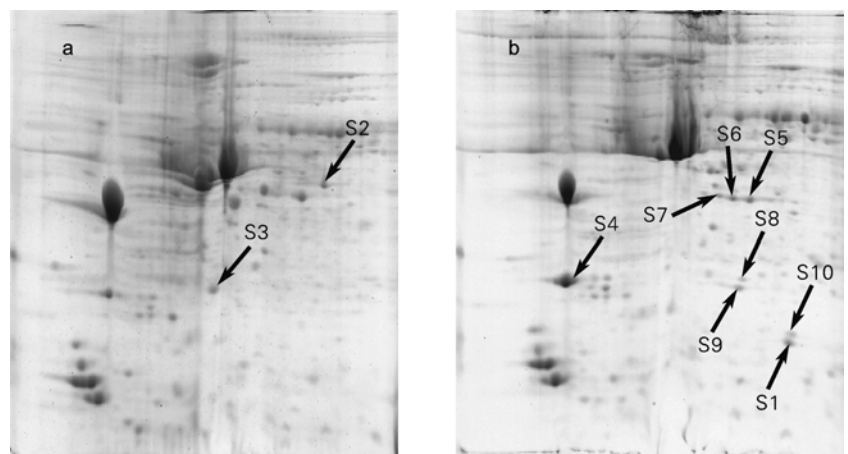


图 1 不同花纹文蛤双向电泳图谱

Fig.1 Two-dimensional gel electrophoresis of the mantle of different-pattern *M. meretrix*

a. 无花纹文蛤; b. 花纹文蛤

在显著差异, 选取了高丰度蛋白。在两块凝胶上共切取了 10 个点 S1—S10 进行质谱鉴定, 图 1a 中 S2 和 S3 是在无花纹样品表达上调点, 图 1b 中 S1 和 S4—S10 是在有花纹文蛤样品表达量上调点(Hutchinson *et al.*, 2008)。

2.3 质谱鉴定

将获得的完整的肽指纹图谱进行数据库检索, 筛选最合适匹配。研究结果发现 S2 的分子量为 42kD 左右, 等电点为 6.4 左右, 与库蚊(*Culex pipiens pipiens*)

的肌动蛋白(分子量为 41.7kD, 等电点为 5.3)匹配率较高; S3 的分子量为 29kD, 等电点为 5.6, 与飞鱿(*Thysanoteuthis rhombus*)的肌动蛋白(分子量为 29kD, 等电点为 5.25)匹配率较高; S4 的分子量为 27kD 左右, 等电点为 4.8, 与丽文蛤(*Meretrix lusoria*)的肌浆钙结合蛋白(分子量为 20.8kD, 等电点为 4.98)匹配率较高, 具体鉴定结果见表 1。其它蛋白点在数据库中没有找到评分在 75 以上的匹配蛋白, 为未知蛋白(Xu *et al.*, 2006)。

表 1 文蛤肽指纹图谱鉴定结果

Tab.1 The result of peptide mass fingerprinting of *M. meretrix*

序号	数据库序列号	蛋白名称	种属	分子量	等电点 pI
S2	gi/68270850	actin	<i>Culex pipiens pipiens</i>	41782.5	5.30
S3	gi/8895921	actin	<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	28989.7	5.25
S4	gi/2988366	sarcoplasmic calcium-binding protein	<i>Meretrix lusoria</i>	20795.3	4.98

3 讨论

3.1 肌动蛋白

经过质谱鉴定发现, S2 和 S3 都是肌动蛋白, 均在无花纹样品中表达。肌动蛋白是真核细胞中最丰富的蛋白质, 在肌细胞中, 肌动蛋白占总蛋白的 10%, 即使在非肌细胞中, 肌动蛋白也占细胞总蛋白的 1%—5%。肌动蛋白是微丝的结构蛋白, 它构成细胞骨架, 与全部细胞运动如肌肉收缩、变形运动、胞质分裂等有关。肌动蛋白能促进 ATP 酶活性。肌动蛋白还参与了细胞核内肌动蛋白形成和功能的调节, 包括肌动蛋白单体与聚合形式的转换、染色质结构调整、基因转录调控、mRNA 加工和运输等许多重要生理功能。据 Kim 等(2006)报道, 库蚊的肌动蛋白有增强活力和抗寒作用。在无花纹文蛤外套膜中表达量上调的这两种蛋白质可能与花纹色素产生的抑制作用有关, 具体机制还需要进一步研究。

3.2 肌浆钙结合蛋白

S4 是肌浆钙结合蛋白, 它在有花纹的文蛤外套膜表达量上调。肌浆钙结合蛋白通过与 Ca^{2+} 的结合和分离, 使蛋白的构型发生变化, 对酶或细胞的机能进行调控。还能通过与 Ca^{2+} 结合使游离的离子浓度降低, 具有贮藏 Ca^{2+} 的功能, 参与细胞间 Ca^{2+} 的运输和贮藏, 也可能与花纹色素的促进分泌有关。

3.3 其它蛋白

进行鉴定的 10 个蛋白点, 在质谱仪上均能得到清晰图谱, 但有些蛋白在检索中却没有对应的名字,

可能有以下几方面的原因: 一是软体动物蛋白质方面的研究很少, 数据库中存在的信息少, 没有相关的实验数据, 所以蛋白序列匹配值低。二是由于制样方法还不完善, 实验方法还有待改进, 蛋白点不是单一蛋白, 而是混合蛋白, 样品蛋白质来源属于数据库中不存在蛋白质的质谱数据。三是蛋白的修饰造成的, 或者是结果中随机出现的峰过多, 产生不能鉴定出肽段的峰, 例如在文蛤中大量存在的糖蛋白质的质谱峰, 而糖蛋白一般只裂解糖链, 导致有糖基存在的肽段, 其质谱结果中大部分是糖链断裂的结果, 因此只能识别该质谱结果来源于糖蛋白质, 但无法获得该肽段序列的任何信息。四是 Mascot 软件自身的问题, 有些肽段产生的特定质谱峰图在 Mascot 软件很难解析(席景会等, 2006)。

参 考 文 献

- 杜晓东, 邓岳文, 叶富良, 2004. 广东和广西地区野生文蛤的遗传多样性. 中国水产科学, 11(1): 41—47
- 李太武, 苏秀榕, 季延滨等, 2006a. 不同发育阶段文蛤同工酶基因的表达研究. 海洋学报, 28(5): 162—166
- 李太武, 张安国, 苏秀榕等, 2006b. 不同花纹文蛤(*Meretrix meretrix*)的 ITS2 分析. 海洋与湖沼, 37(2): 132—137
- 李太武, 詹堃, 苏秀榕, 2008. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)肉质的蛋白组学研究. 海洋与湖沼, 39(6): 678—682
- 张安国, 李太武, 苏秀榕等, 2006. 不同地理种群文蛤的营养成分研究. 水产科学, 25(2): 79—81
- 陈大鹏, 沈怀舜, 丁亚军等, 2004. 文蛤地理种群 ISSR 分子标记的初步研究. 南京师范大学学报(自然科学版), 27(3): 74—77

- 钱宝珍, 2005. 浙江省6种短沟蜆足肌全蛋白 SDS-PAGE 图谱的比较研究. 中国血吸虫病防治杂志, 17(1): 49—51
- 席景会, 殷建文, 岳琳等, 2006. 拟南芥全细胞蛋白质样品制备及其双向电泳条件的优化. 吉林大学学报(理学版), 44(6): 1011—1014
- 程量, 王康乐, 1997. 文蛤形态学及其亚显微结构的研究. 动物学研究, 18(4): 351—357
- 潘宝平, 吴琪, 张素萍等, 2006. 文蛤属(*Meretrix*)16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析. 海洋与湖沼, 37(4): 342—347
- 潘晓宁, 赵晖, 胡美浩, 1999. 一种 SDS-PAGE 与 MALD-TOF-MS 质谱联用的方法. 生物化学与生物物理进展, 26(4): 17—21
- Helena I, Zamani L L, Edlund P O *et al*, 2005. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 828(1—2): 9—13
- Hobson D J, Rupa P, Diaz G J *et al*, 2007. Proteomic analysis of ovomucoid hypersensitivity in mice by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). Food and Chemical Toxicology, 45: 2372—2380
- Hutchinson D O, Jongbloed B, 2008. Two-dimensional gel electrophoresis in inclusion body myositis. Journal of Clinical Neuroscience, 15: 440—444
- Kim M, Robich R M, Rinehart J P, 2006. Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. Insect Physiol, 52(11—12): 1226—1233
- Robert N W, Andrzej K W, Anna G K, 2007. Proteomic analysis of *Chelidonium majus milky* sap using two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. Phytochemistry, 68: 1612—1622
- Xu C P, Garrett W M, Sullivan J P *et al*, 2006. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Phytochemistry, 67: 2431—2440

PROTEOMIC ANALYSIS OF *MERETRIX MERETRIX* OF DIFFERENT PATTERNS

SU Xiu-Rong¹, JIN Chun-Hua¹, LI Chun-Yan¹, LI Ye¹, ZHANG Chun-Dan¹, LI Tai-Wu^{1,2}

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211;

2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract Using two-dimensional gel electrophoresis, the protein of whole mantle of patterned and non-patterned *Meretrix meretrix*, from Yueqing, Zhejiang, East China, was studied in mass spectrometry. With software PDQuest, in pH 4—7 and molecular weight between 14.3—200kD, 682±24 protein spots were detected in the non-pattern clams, and for patterns ones, being 600±35. The average matching rate was 84.5%. Different expressions were shown in 256 spots, being probably related to the shell pattern formation, among them 98 were from non-patterned clams, and 57 from the patterned. In addition, expression of over twice as much difference was revealed in 101 spots. Two proteins of high rate were found. One was about 42kD in the patterned clams with isoelectric point at about 6.4, matching *Culex* actin (molecular weight 41.7kD, isoelectric point of 5.3); another was 29kD with isoelectric point 5.6 matching flying squid actin protein (molecular weight of 29kD, isoelectric point of 5.25). For the non-patterned clams, a 27kD molecular weighted one was found with isoelectric point of 4.8, matching well sarcoplasmic calcium-binding protein (molecular weight 20.8kD, isoelectric point of 4.98) in genus *Meretrix lusoria*.

Key words *Meretrix meretrix*, Shell pattern, Mantle protein, Two-dimensional gel electrophoresis