

东风螺、弯竹蛭和斑节对虾的壳基质 蛋白组学分析

张爱华¹, 卫子嫣¹, 姚宇阒², 张道锋¹, 黄建科¹, 刘 闯^{1*}

(1. 河海大学 海洋学院海洋生物技术与生物资源利用研究所, 江苏 南京 210098;

2. 江苏省沿海开发集团有限公司, 江苏 南京 210000)

摘 要:从软体动物中的腹足纲、双壳纲以及节肢动物中的甲壳纲分别选取了 3 种中国沿海常见的品种——东风螺、弯竹蛭、斑节对虾, 提取并分析它们的壳基质蛋白。利用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)技术对蛋白质组学进行分析发现特定的蛋白质具有明显的种属差异: ①N66 蛋白(一种碳酸酐酶)通常存在于弯竹蛭中, 但不存在于东风螺和斑节对虾中, 揭示 N66 蛋白质具有特异性, 在未来的物种鉴定中可能具有重要的参考意义; ②角质层蛋白 AM1199 和 CP14.6 存在于斑节对虾的表皮结构中, 在东风螺和弯竹蛭中未检测到; ③血蓝蛋白同时在 3 种动物外壳的基质蛋白中被鉴定出来, 揭示了其在不同物种的外壳形成与发育过程中的重要作用。该研究为壳基质蛋白在软体动物或节肢动物外壳中的鉴定提供了基础, 也为探索不同物种的生物矿化过程提供了重要参考。

关键词:壳基质蛋白; N66 蛋白; 角质层蛋白; 血蓝蛋白; 蛋白质组学

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1002-3682(2022)03-0258-10

doi: 10.12362/j.issn.1002-3682.20220310001

引用格式: 张爱华, 卫子嫣, 姚宇阒, 等. 东风螺、弯竹蛭和斑节对虾的壳基质蛋白组学分析[J]. 海岸工程, 2022, 41(3): 258-267. ZHANG A H, WEI Z Y, YAO Y T, et al. Shell matrix proteins analysis of *Babylonia areolates*, *Solen arcuatus* and *Penaeus monodon*[J]. Coastal Engineering, 2022, 41(3): 258-267.

碳酸钙是无脊椎动物外骨骼的主要成分, 在海洋生物中尤为常见^[1]。例如, 软体动物壳由碳酸钙和不同比例的有机成分(主要是蛋白质、酸性多糖和甲壳素)组成^[2], 这些结合起来, 赋予每种软体动物的外壳独特的物理和化学性质^[3]。尽管外壳中蛋白质的含量少于 5%, 但它们在生物矿化中起着重要作用, 这些蛋白可以控制碳酸钙晶体的成核、生长、晶型^[4], 被称为壳基质蛋白(Shell Matrix Proteins, SMPs)^[5]。

不同生物体中存在不同的壳基质蛋白表明它们可能具有不同的生物学功能^[6]。例如, 在中医中, 牡蛎壳粉常被用作药物^[7]。近年来使用扇贝壳粉进行活性研究显示, 它们具有良好的抑制病毒的能力, 扇贝壳粉能在 5 s 内灭活禽流感病毒, 在 5 s 内灭活新城鸡疫病毒, 在 30 s 内灭活鹅细小病毒^[7]。贝壳粉的生物学效应是由不同种类的 SMPs 而产生^[8], 因此, 有必要研究不同物种, 特别是不同动物门之间 SMPs 的差异, 而这种差异性也可为未来的物种鉴定和保护、资源开发利用提供辅助参考。

本文选择中国沿海 3 种不同的海洋动物作为研究对象, 分别为双壳纲的弯竹蛭、腹足纲的东风螺和甲壳纲的斑节对虾。目前这 3 种生物的壳基质蛋白均未被报道, 限制了我们对它们潜在功能的理解, 也不利于我们对其进行资源的开发利用。文章以这些具有经济价值的海洋生物为研究对象, 利用蛋白质组学的方法探索它们壳基质蛋白的差异性以及它们对碳酸钙晶体生长的影响, 为利用它们自身的壳基质蛋白特异性进行渔业方

收稿日期: 2022-03-10

资助项目: 国家重点研发项目——“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2020YFD0900705)和黄渤海滩涂生态农牧化与三产融合模式示范(2020YFD0900704); 江苏省自然科学基金项目——黄海帽贝牙齿矿化中几丁质蛋白家族的研究(BK20210363); 中央大学基础研究基金项目——帽贝牙齿的生物矿化的分子机制(B201201065)

作者简介: 张爱华(1984—), 男, 副教授, 博士, 主要从事海洋天然产物方面研究. E-mail: ahz@hhu.edu.cn

* 通信作者: 刘 闯(1988—), 男, 副教授, 博士, 主要从事海洋生物矿化方面研究. E-mail: helloliuchuang@163.com

(王佳实 编辑)

面的应用, 例如加快其生长周期, 提升其生长尺寸等奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

本文研究弯竹蛭采集于江苏省南通市, 体长约为 5 cm; 东风螺和斑节对虾均采集于南中国海, 体长分别约为 2 cm 和 13 cm。3 种实验样品的形态见图 1, 其种属树状结构见图 2。

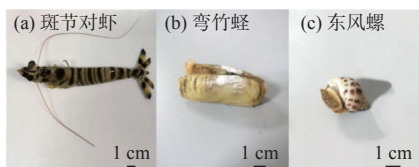


图 1 3 种海洋贝类实验样品形态

Fig. 1 Shapes of the three marine shellfish used for experimental specimens



图 2 3 种样品的种属树状图

Fig. 2 A simplified species dendrogram of the three species

弯竹蛭 (*Solen arcuatus*) 属于双壳纲竹蛭科的竹蛭属^[9], 壳小而细长, 薄且易碎, 壳体前端和后端略微向上弯曲, 后缘中部和腹部边缘都略微凹陷; 东风螺 (*Babylonia areolata*) 属于软体动物腹足纲蛾螺科东风螺属^[10], 其生活习惯为白天潜伏在沙土中, 露出水管, 吸食经过的浮游动物, 晚上借助自身分泌的黏液滑动爬行到处寻找食物, 一般分布于中国东南部沿海, 以及东南亚和日本海域; 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 属于对虾科对虾属, 是对虾属中最大的个体^[11], 与其他对虾相比, 其表面光滑、壳稍厚^[12], 由于体型、栖息地、食物和其他因素的不同, 体色也会有所不同, 斑节对虾成虾喜欢栖息在泥泞或沙质海底, 它们分布在水深约 60 m 的浅海中, 是常见的海鲜食品。

1.2 蛋白质提取与质谱分析

从壳中提取出壳基质蛋白流程为: ①为了粉碎 3 种样品的外壳, 需将外壳与肌肉组织分离, 并将分离后的外壳分别在质量分数 5% NaOH 中浸泡 24 h, 用去离子水洗涤、干燥; ②放入粉碎机中粉碎成粉, 添加 0.8 mol/L EDTA 溶液 (pH=8.0) 和 30 μ L AEBSF 试剂于装有样品粉末的烧杯中, 并将烧杯置于磁力搅拌器上搅拌 50 h; ③再将搅拌后的样品粉末溶液放置在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, 静置使固体沉淀; ④取出上清液, 转移到离心管中进行 4 000 r/min 离心 10 min; ⑤将上清液移入截流量为 3 kDa 的透析袋, 并将密封后透析袋放入含有 1 000 mL 去离子水的烧杯中, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 早晚更换烧杯中的去离子水, 用去离子水多次冲洗样品的不溶部分; ⑥将 10 mmol/L 二硫苏糖醇 ($C_4H_{10}O_2S_2$)、1% 十二烷基硫酸钠 ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) 添加到含有 0.3 mmol/L-Tris 的 HCl 溶液 (pH=8) 中并转移至离心管, 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 30 min, 每 5 min 摇动一次离心管, 使溶液与样品充分接触^[13]。

为进一步浓缩提取出壳基质蛋白, 首先需先在室温下冷却样品; 其次, 将含有蛋白质的溶液样品 4 000 r/min 离心 10 min, 置部分部分上清液于截流量为 3 kDa 透析袋中, 密封; 再次, 将透析袋放入含有 1 000 mL 去离子水的烧杯中, 4 $^{\circ}$ C 储存 2 d (每 8 h 更换 1 次水); 从次, 将透析后的可溶性和蛋白质部分转移到带有截流量为 3 kDa 半透膜的离心管中进行 4 000 r/min 离心 30 min, 用于浓缩蛋白; 最后, 浓缩后的壳基质蛋白转移至小型离心管中, 并在 -80 $^{\circ}$ C 下储存以备 SDS-PAGE 凝胶电泳检测有无蛋白质存在, 60 min 电泳后, 取出胶板, 切割电泳条带并通过 LC-MS/MS 对得到的蛋白质序列片段进行分析, 确定壳基质蛋白的种类与功能。

1.3 蛋白质鉴定与分析

根据 Liu 等^[13] 制定 LC/MS-MS 实验方法方案, 本研究使用 LTQ Orbitrap Velos 质谱仪 (赛默飞世尔, 美国)

和 Dionex U-3000 快速分离纳米 LC 系统(戴安 Thermo Scientific, 美国)进行蛋白质的肽段分离, 并通过 Uniprot 蛋白数据库对提取的壳基质蛋白进行分析。液相色谱的流动相 A、B 的参数如下: 流动相 A 中的组分为 0.1% 甲酸(CH_2O_2), 流动相 B 的组分为 0.1% 甲酸和 80% 乙腈($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$)。具体流动相参数见表 1。

表 1 流动相参数

Table 1 Flow phase parameters

时间/min	行/(nl·min ⁻¹)	流动相 A/%	流动相 B/%	时间/min	行/(nl·min ⁻¹)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	400	97	3	51.0	400	56	44
3.0	400	97	3	56.0	400	1	99
7.0	400	92	8	60.0	400	1	99
46.0	400	68	32	60.1	300	97	3

1.3.1 蛋白质提取

首先, 将已提取出的壳基质蛋白溶液, 加入 4 倍体积的丙酮裂解液中, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; 其次, 放入离心机, 17 000 r/min、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 取出沉淀, 挥干后备用; 再次, 在 1 mL 预冷的 RIPA 中加入 5 μL 磷酸酶抑制剂、1 μL 蛋白酶抑制剂和 10 μL AEBSF 混匀配制裂解液, 冰上保存数分钟; 从此, 将样品加入 200 μL 裂解液中, 冰敷后用超声破碎仪处理; 最后, 超声后 12 000 r/min、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 吸出上清液, 用 BCA 检测试剂盒进行定量。

1.3.2 蛋白质酶切

蛋白质酶切的具体步骤为: ①取定量后 50 μg 蛋白液, 加入 DTT 试剂使其终浓度为 50 mmol/L, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h; ②随后加入 IAA 试剂使其终浓度为 100 mmol/L, 室温避光反应 40 min; ③将还原烷基化后的蛋白溶液加入 10 kDa 的超滤管中, 12 000 r/min 离心 20 min, 舍弃收集管的底部溶液; ④加入 8 mol/L 尿素($\text{pH}=8.5$)100 μL , 12 000 r/min 离心 20 min, 舍弃收集管的底部溶液, 重复 2 次离心; ⑤加入 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液 100 μL , 12 000 r/min 离心 20 min, 舍弃收集管的底部溶液, 重复 3 次离心, 再次更换新收集管, 在超滤管中加入 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液(含胰蛋白酶)始终体积为 50 μL , 胰蛋白酶与蛋白的质量比为 1 : 50, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应过夜; ⑥次日先加入胰蛋白酶(胰蛋白酶与蛋白质量比 1 : 100), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 4 h, 反应后 12 000 r/min 离心 20 min, 酶解后的肽段溶液离心于收集管底部; ⑦在超滤管中加入 50 μL 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液, 12 000 r/min 再次离心 20 min, 与第⑥步得到的肽段溶液合并, 收集管底部共得到 100 μL 酶解后的样品; ⑧向多肽样品中加 100 μL 0.2%TFA 溶液, 混匀, C18 小柱用乙腈稳定后, 加入 1 mL 0.1%TFA 溶液冲洗 2 次, 把多肽样品转移到 C18 小柱, 用 500 μL 0.1%TFA 洗脱, 并用 500 μL 70% 的乙腈溶液洗脱; ⑨收集多肽样品液体, 真空干燥。

1.3.3 反相液质联用 RPLC-MS

将收集后的肽段用 20 μL 溶解液(0.1% 甲酸、5% 乙腈)溶解, 充分振荡涡旋, 13 500 r/min、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 上清转移到上样管中, 吸取 8 μL 进行质谱鉴定。

1.3.4 质谱参数

分离后的肽段直接进入 Thermo Scientific Q Exactive PLUS 质谱仪进行在线检测, 具体参数见表 2。

表 2 质谱设置参数

Table 2 Parameters set up for the Mass spectrometry

参数名称	数值	参数名称	数值
分辨率	120 000	分辨率	30 000
自动增益控制目标	400 000	自动增益控制目标	100 000
一级质谱	最大喷射时间/ms	二级质谱	最大喷射时间/ms
	50		100
	扫描范围/($\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$)		TopN
	350~1 550		20
			NCE/stepped NCE
			32

1.3.5 数据库检索

本实验运用 Maxquant Version 1.6.17.0 软件进行数据库检索, 获得 3 种样品中提取的蛋白质肽段序列信息, 具体检索参数见表 3。

表 3 Maxquant 软件鉴定参数

Table 3 Identification parameters for Maxquant software

检测参数类型	检测参数	检测参数类型	检测参数
酶	胰蛋白酶 (Trypsin)	数据库 (Database)	uniprot-taxonomy_102 312_20220220.fasta
最大缺失剪切位点/aa	3	碎片质量容限	0.03 Da
最小肽段长度/bp	6	动态修饰	Acetyl/+42.011 Da (N-Terminus) Oxidation/+15.995 Da (M)
最大肽段长度/bp	144	静态修饰	氨基甲基
前体质量容限/(mg·L ⁻¹)	15		

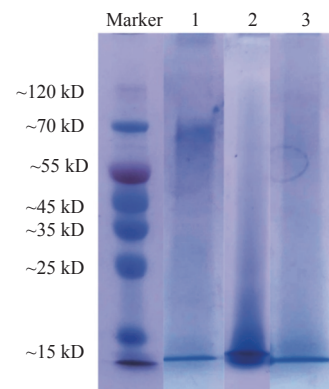
注: 空白处无内容。

1.4 碳酸钙结晶实验和扫描电镜(Scanning Electron Microscope, SEM)

使用 BCA 检测试剂盒测定蛋白质浓度后, 在含有 5 g 固体碳酸铵的干燥器中进行碳酸钙结晶实验。首先, 将 CO₂ 缓慢扩散到 6 个细胞培养皿(Nest, 无锡, 中国); 其次, 将培养皿置于密闭干燥器中室温下 10 h, 其中每个培养皿中含有 1 个滴加 180 μL 20 mmol/L CaCl₂ 和 20 μL 蛋白质的盖玻片, 蛋白质浓度梯度为 50、100 和 200 μg/mL, 在放置盖玻片时, 用去离子水替换蛋白质作为对照组; 最后, 经过 10 h 的结晶实验, 将含有碳酸钙晶体样品的盖玻片用水冲洗 2 次并风干。将风干后的含有碳酸钙晶体样品的盖玻片通过溅射法制备的纳米金薄膜后, 运用扫描电子显微镜(SEM, FEI Quanta 200, 15 kV)检查晶体的形态。

2 结果与讨论

3 种实验样品外壳基质蛋白的 SDS-PAGE 显示斑节对虾 SMPs 分子量约为 70 kDa, 而东风螺 SMPs 和弯竹蛏 SMPs 分子量分布在整个凝胶中(图 3)。LC-MS/MS 分析结果(表 4、表 5 和表 6)发现: 斑节对虾、东风螺和弯竹蛏中分别有 22、8 和 8 种 SMPs(图 4)。通过 Uniprot 蛋白数据库对 SMPs 进行分析, 将其分为不同的类别, 如生物矿化蛋白、免疫相关蛋白、胞内蛋白以及功能未知的蛋白^[5], 并通过 Venn 图分析斑节对虾、东风螺和弯竹蛏之间蛋白质的相似性和差异性(图 4)。结果表明, 3 种实验样品都含有血蓝蛋白, 同时, 在斑节对虾和东风螺中还发现一些未经鉴定的蛋白质, 这些蛋白质有待进一步分析。



注: 1 代表斑节对虾; 2 代表弯竹蛏; 3 代表东风螺。

图 3 3 个样品的蛋白胶图

Fig. 3 A SDS-PAGE picture of the three species

表 4 东风螺中提取并鉴定的壳基质蛋白种类以及质谱结果

Table 4 The SMPs extracted and identified in *Babylonia areolates* and their LC-MS/MS results

蛋白种类	蛋白编号	唯一肽段	得分
肌球蛋白重链	K1R1B3	1	216.66
含肌球蛋白运动结构域蛋白	A0A2T7Q1I2	3	213.97
非特征蛋白	A0A2T7NU61	1	25.83
含肌球蛋白_尾部_1 结构域蛋白	A0A2T7PNC2	4	22.73
B 肌动蛋白 2	B3TK83	3	18.84
血蓝蛋白	F0V3W2	4	16.78
ACTB_G1	A0A6J8EID8	1	6.96
副肌球蛋白-3	M5AJN3	2	6.86

表 5 斑节对虾中提取并鉴定的壳基质蛋白种类以及质谱结果

Table 5 The SMPs extracted and identified in *Penaeus monodon* and their LC-MS/MS results

蛋白种类	蛋白编号	唯一肽段	峰面积/(mV·min)	-10lgP
非特征蛋白 LOC113806719	XP_027213685.1	8	1.92×10 ⁹	159.95
组蛋白 H4	XP_027214496.1	19	7.26×10 ⁸	220.90
精氨酸激酶	XP_027224228.1	36	1.79×10 ⁸	271.69
非特征蛋白 LOC113806035	XP_027212936.1	8	1.60×10 ⁸	219.38
角质层蛋白 AM1199	XP_027218482.1	1	1.59×10 ⁸	69.28
角质层蛋白 CP14.6	XP_027208967.1	7	1.58×10 ⁸	249.05
40S 核糖体蛋白 S9	XP_027229688.1	3	1.58×10 ⁸	56.18
非特征蛋白 LOC113815377	XP_027223268.1	18	1.56×10 ⁸	197.15
甘油醛 3-磷酸脱氢酶	XP_027228189.1	15	1.18×10 ⁸	195.98
甘油醛 3-磷酸脱氢酶异构体 X3	XP_027237154.1	15	1.18×10 ⁸	195.98
甘油醛 3-磷酸脱氢酶异构体 X2	XP_027237147.1	15	1.18×10 ⁸	195.98
细胞壁蛋白 IFF6	XP_027233110.1	75	1.13×10 ⁸	332.56
微管蛋白 β-1 链	XP_027223912.1	2	1.05×10 ⁸	249.68
非特征蛋白 LOC113816700	XP_027224558.1	17	9.38×10 ⁷	223.93
非特征蛋白 LOC113813385	XP_027221155.1	28	8.34×10 ⁷	211.19
延伸因子 1-α 样蛋白	XP_027229150.1	8	8.25×10 ⁷	168.37
角质层蛋白 CP575	XP_027230123.1	1	8.16×10 ⁷	142.77
组蛋白 H2B	XP_027214522.1	5	7.59×10 ⁷	137.63
非特征蛋白 LOC113819636	XP_027227645.1	1	7.41×10 ⁷	73.73
非特征蛋白 LOC113819626	XP_027227634.1	1	7.41×10 ⁷	73.73
非特征蛋白 LOC113819627	XP_027227635.1	1	7.41×10 ⁷	73.73
血蓝蛋白	XP_027239062.1	31	5.28×10 ⁷	321.41

注: -10lgP 代表可信度, 结合峰面积代表肽段得分, 可信度与峰面积越高, 则肽段得分越高。一般-10lgP>100 即为高可信度。

表 6 弯竹蛭中提取并鉴定的壳基质蛋白种类以及质谱结果
Table 6 The SMPs extracted and identified in *Solen arcuatus* and their LC-MS/MS results

蛋白种类	蛋白编号	唯一肽段	得分
壳基质蛋白	A0A4P7JQR0	3	36.14
肌动蛋白	A0A649Z389	2	31.59
转录因子 IIIB 90 kDa 亚单位	A0A210Q9P0	1	30.06
N66 基质蛋白	Q9NL38	2	14.72
Pif 蛋白	U3G0C6	3	10.36
血蓝蛋白	F0V3W2	1	7.27
类泛素结构域蛋白	A0A0B7A3I5	1	6.80
含微管蛋白 C 结构域的蛋白质	A0A0B6Z0M5	1	6.80

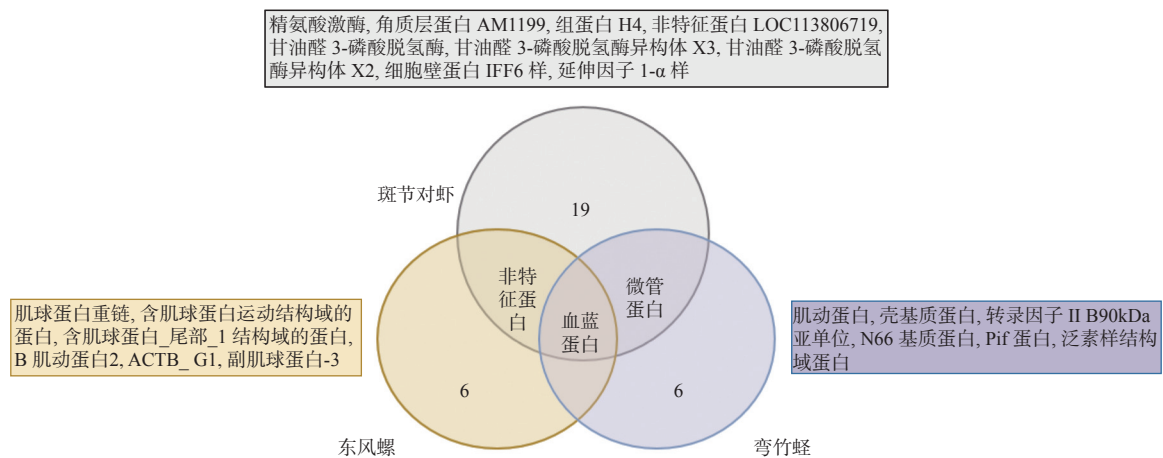


图 4 来自 3 种物种的基质蛋白种类

Fig. 4 Shell matrix proteins from the three species

2.1 3 种物种共有蛋白: 血蓝蛋白

软体动物(腹足纲和双壳纲)和节肢动物(虾、蟹)的血液中含有血蓝蛋白^[14], 是一种呼吸蛋白, 在节肢动物和软体动物的血淋巴中因含有 Cu^{2+} 而使血蓝蛋白呈现蓝色。血蓝蛋白在脱氧状态下是无色的, 在结合氧的状态下呈现出蓝色, 其主要生物学功能与体内的氧气输送有关^[15]。血蓝蛋白也是一种多功能蛋白, 与生物体内能量储存、渗透压维持和蜕皮过程的调节有关^[15], 此外, 它还具有酚氧化酶活性以及抗菌功能。小龙虾的血蓝蛋白被用于通过浸渍涂层进一步修饰几丁质支架, 从而起到增加初始细胞黏附、增强增殖和成骨分化的作用^[14]。在本文的实验中, 甲壳纲、腹足纲和双壳纲动物的样品中都检测出血蓝蛋白, 且最新研究在乌贼内贝壳中也发现了这种蛋白质^[13], 表明血蓝蛋白在生物矿化中可能起着某种重要作用。

2.2 双壳纲和甲壳纲共有蛋白: 微管蛋白

微管蛋白由 2 种密切相关的 55 kDa 蛋白质的二聚体组成, 称为 α -和 β -微管蛋白。这 2 种蛋白质的序列在真核生物界高度保守, 由相对独立的基因或小基因家族编码; α -和 β -微管蛋白聚合形成微管, 微管是真核细胞骨架的主要组成部分, 为真核细胞提供结构和形状的支撑作用^[16]。微管蛋白也存在于各种生物矿物的壳基质中^[16], 本研究在斑节对虾和弯竹蛭中发现的微管蛋白可能与其他研究中发现的微管蛋白具有相同的功能, 即可以支撑细胞的结构。但微管蛋白在生物矿化过程中的生物学功能仍有待进一步研究。

2.3 大量的未表征蛋白

地球上物种数量众多,它们体内的蛋白质种类繁多,每个序列的细微差异都会影响其生物学功能^[17]。尽管测序技术发展迅速,但仍有大量功能尚不清楚的蛋白质需要鉴定,这些蛋白质被称为未表征蛋白^[18]。因此,识别这些蛋白质的开放阅读框架是一项重要的研究任务。本文在3种物种样品的壳基质中发现了许多未经鉴定的蛋白质,尤其是在斑节对虾中,它们的生物学功能需要在未来的实验中进一步分析和研究。

2.4 双壳纲特征蛋白:N66 基质蛋白

在从弯竹蛭提取的 SMPs 中,发现了 N66 壳基质蛋白,该蛋白被 Tan 等^[19]于 2019 年首次报道具有碳酸酐酶活性,并能在体外形成多晶型的碳酸钙晶体。研究发现,与天然 N66 蛋白相比,重组 N66 蛋白具有更高的碳酸酐酶活性,并能在体外产生更大尺寸的晶体,并且可能通过糖基化和/或磷酸化调节其活性^[20]。RIVERA-PEREZ 等^[9]研究表明,N66 壳基质蛋白在软体动物外壳中扮演着钙化调节者的角色,它们可作为钙“浓缩器”,其碳酸酐酶的功能可产生碳酸盐离子,这些离子在矿化点组装成 CaCO_3 ,并且对钙棱柱层和文石珍珠层中的贝壳形成都具有重要作用^[9]。本文研究的3种物种的样品中,N66 壳基质蛋白只在弯竹蛭中被检测出来。根据文献报道^[20],N66 壳基质蛋白在翼珍珠贝和珠母贝中也有发现,同弯竹蛭一样,这3种生物均来自双壳纲。这一现象表明 N66 壳基质蛋白可能主要存在于双壳纲中,可作为特征蛋白用于未知来源贝壳的鉴定。

2.5 矿化蛋白

从东风螺、弯竹蛭和斑节对虾外壳中提取的 SMPs 中还发现了矿化蛋白,这些矿化蛋白在生物矿化过程中起到了至关重要的作用。东风螺壳 SMPs 中的一种非特征蛋白具有生物矿化作用,进一步分析其结构域发现,几丁质结合域出现在位点 25~80、92~153 和 176~225,这一蛋白的蛋白序列长度为 243 aa(图 5)。在弯竹蛭的 SMPs 中存在一段长 568 aa 的矿化蛋白,其位点 59~564 存在碳酸酐酶的合成区域。碳酸酐酶是含有金属锌的一种酶,其可以催化二氧化碳为碳酸根离子,进一步合成碳酸氢盐。经过结构域分析发现,斑节对虾 SMPs 的一种非特征蛋白可能具有类似的生物矿化作用,在一段长度为 95 aa 的序列中,其位点 20~66 出现与几丁质结合有关的结合域。另外,斑节对虾 SMPs 中还存在其他几种矿化蛋白,例如角质层蛋白 AM1199、CP14.6 和 CP575,其结构域中均存在几丁质结合位点,并且在角质层蛋白 AM1199 和 CP14.6 的结构域中,在几丁质结合位点之后还存在一段低复杂度的蛋白序列。角质层蛋白 AM1199 的低复杂度序列出现在位点 6~15,其中丙氨酸量较多,另一段低复杂度序列出现在位点 97~124,其中脯氨酸含量较多;而角质层蛋白 CP14.6 的低复杂度序列出现在位点 150~164,显示丙氨酸含量较多。

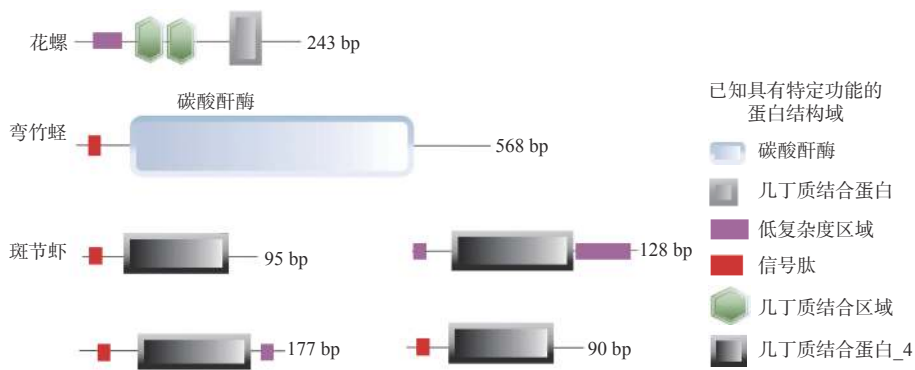


图 5 3 种物种样品 SMPs 中与矿化作用有关的蛋白

Fig. 5 Proteins related to the mineralization in the SMPs of the three species

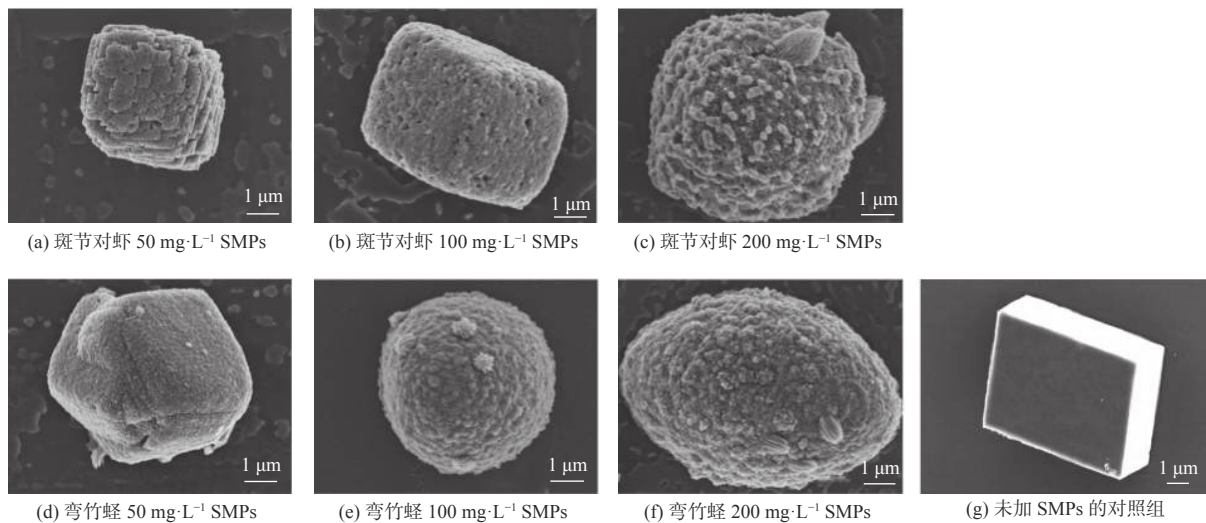
2.6 甲壳纲特征蛋白: 虾壳蛋白

从斑节对虾背壳提取的 SMPs 与东风螺、弯竹蛭的 SMPs 对比研究发现, 斑节对虾的 SMPs 种类更丰富多样, 并存在一些特有的蛋白质, 如斑节对虾 SMPs 中的精氨酸激酶, 这种蛋白质在本文所研究的软体动物中不存在, 可能在节肢动物中普遍表达, 具有一定的特异性。精氨酸激酶是一种高度保守的磷酸源激酶, 一种在无脊椎动物中发现的 ATP 磷酸转移酶, 对精氨酸残基进行磷酸化修饰, 一般含于产生尿素的动物的肝脏、肾脏、精巢中, 作为尿素循环的一个环节起作用, 该酶蛋白通常存在于具有潜在能量代谢功能的贝壳中^[21]。

在斑节对虾的 SMPs 中也发现了几种角质层蛋白, 它们通常与几丁质结合, 参与节肢动物表皮的形成。其中在 1999 年 Andersen^[22] 对蟹壳的 SMPs 的研究中发现 AM1199; Rebers 等^[23] 在蛹和成虫的表皮柔性节间区域发现角质层蛋白 CP14.6。AM1199 和 CP14.6 存在于斑节对虾的 SMPs 中, 表明斑节对虾外壳的形成涉及角质层蛋白发挥其独特的生物学功能。

2.7 壳基质蛋白对碳酸钙晶体形成的影响

扫描电镜结果(图 6)表明, 从 3 种物种样品中提取出的 SMPs 对碳酸钙结晶有重要影响, 且 SMPs 浓度越高, 结晶作用越明显, 表明提取的 SMPs 中至少含有 1 种与结晶有关的蛋白质参与了结晶的形成过程。例如, 从斑节对虾中提取的 SMPs 在其浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对碳酸钙结晶的影响不明显(图 6a); 当浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 效果开始显现(图 6b), 晶体边缘的棱角逐渐趋于圆润光滑, 晶体形态存在向球体转变的趋势; 在浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 晶体的形状发生变化, 并在晶体表面出现尖状的凸起(图 6c)。弯竹蛭的壳 SMPs 的结晶实验结果与斑节对虾的情况类似, 不同的是晶体在 SMPs 浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 6e)和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 6f)分别呈现球形和椭圆形。



注: 扫描电镜图放大倍数为 20 000 倍。

图 6 不同 SMPs 浓度对碳酸钙结晶形成影响的扫描电镜图

Fig. 6 SEM pictures showing the influence of different SMPs concentrations of on CaCO_3 crystallization formation

3 结 语

弯竹蛭、东风螺和斑节对虾的壳基质蛋白在已有的生物矿化研究中是缺少的, 本研究通过扫描电镜以及 LC-MS/MS 和生物信息学等现代技术手段对 3 种物种的壳基质蛋白进行蛋白质组学分析, 发现血蓝蛋白作

为壳基质蛋白是 3 种海洋生物所共有的。N66 蛋白可能仅存在于软体动物双壳纲中,说明不同海洋生物壳基质蛋白存在差异性。N66 蛋白质具有物种特异性,在未来的物种鉴定、水产养殖和海岸生物资源的开发中可能具有重要的参考意义。本研究结果有助于探索不同物种间壳基质蛋白的差异性和多样性,从而为沿海物种的资源利用提供一定基础。

参考文献 (References):

- [1] YARRA T, BLAXTER M, CLARK M S. A bivalve biomineralization toolbox[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(9): 4043-4055.
- [2] YARRA T, RAMESH K, BLAXTER M, et al. Transcriptomic analysis of shell repair and biomineralization in the blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(437): 1-14.
- [3] HUANG J L, LIU Y J, LIU C, et al. Heterogeneous distribution of shell matrix proteins in the pearl oyster prismatic layer[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 189: 641-648.
- [4] ARIVALAGAN J, MARIE B, SLEIGHT V A, et al. Shell matrix proteins of the clam, *Mya truncata*: roles beyond shell formation through proteomic study[J]. *Marine Genomics*, 2016, 27: 69-74.
- [5] RIVERA-PEREZ C, FLORES- SÁNCHEZ I A, OJEDA RAMÍREZ DE AREYANO J J, et al. A shell matrix protein of *Pinctada mazatlanica* produces nacre platelets in vitro[J]. *Science Report*, 2020(10): 20201.
- [6] ARIVALAGAN J, MARIE B, CHIAPPETTA G, et al. Deciphering shell proteome within different Baltic populations of mytilid mussels illustrates important local variability and potential consequences in the context of changing marine conditions[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 745: 140878.
- [7] LIU C, ZHANG R Q. Biomineral proteomics: a tool for multiple disciplinary studies[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 238: 104171.
- [8] RIVERA-PEREZ C, HERNANDEZ-SAAVEDRA N Y. Review: post-translational modifications of marine shell matrix proteins[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 256: 110641.
- [9] RIVERA-PEREZ C, OJEDA-RAMIREZ DE AREYANO J J, HERNANDEZ-SAAVEDRA N Y. Purification and functional analysis of the shell matrix protein N66 from the shell of the pearl oyster *Pteria sterna*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 235: 19-29.
- [10] KATO S, MATSUI T, GATSOGIANNIS C, et al. Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology[J]. *Biophysical Reviews*, 2018, 10(2): 191-202.
- [11] THITAMADEE S, PRACHUMWAT A, SRISALA J, et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia[J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 69-87.
- [12] LEELATANAWIT R, SITTIKANKEAW K, YOCAWIBUN P, et al. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 152(1): 66-76.
- [13] LIU C, JI X, HUANG J L, et al. Proteomics of shell matrix proteins from the cuttlefish bone reveals unique evolution for cephalopod biomineralization[J/OL]. (2021-09-01) [2022-03-10]. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00693>.
- [14] KRUPPKE B, FARACK J, WEIL S, et al. Crayfish hemocyanin on chitin bone substitute scaffolds promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2020, 108(3): 694-708.
- [15] GIANAZZA E, EBERINI I, PALAZZOLO L, et al. Hemolymph proteins: an overview across marine arthropods and molluscs[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 245: 104294.
- [16] LU Y, CHEN J J, XIAO M, et al. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site[J]. *Pharmaceutical Research*, 2012, 29(11): 2943-2971.
- [17] HAWKINS T, KIHARA D. Function prediction of uncharacterized proteins[J]. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2007, 5(1): 1-30.
- [18] EMRICH S J, BARBAZUK W B, LI L, et al. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing[J]. *Genome Research*, 2007, 17(1): 69-73.
- [19] TAN K, MA H Y, LI S K, et al. Bivalves as future source of sustainable natural omega-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *Food Chemistry*, 2020, 311: 125907.
- [20] RIVERA-PEREZ C, MAGALLANES-DOMINGUEZ C, DOMINGUEZ-BELTRAN R V, et al. Biochemical and molecular characterization of N66 from the shell of *Pinctada mazatlanica*[J]. *Peer J*, 2019, 7(4): e7212.
- [21] MOHANTY J, SAHOO S, BADHE M R, et al. Lectin-Like activity of hemocyanin in freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J].

- [Protein Journal](#), 2020, 39(4): 358-365.
- [22] ANDERSEN S O. Exoskeletal proteins from the crab, *Cancer pagurus*[J]. [Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology](#), 1999, 123: 203-211.
- [23] REBERS J E, NIU J, RIDDIFORD L M. Structure and spatial expression of the *Manduca sexta* MSCP14.6 cuticle gene[J]. [Insect Biochemistry and Molecular Biology](#), 1997, 27(3): 229-240.

Shell Matrix Proteins Analysis of *Babylonia areolates*, *Solen arcuatus* and *Penaeus monodon*

ZHANG Ai-hua¹, WEI Zi-yan¹, YAO Yu-tian², ZHANG Dao-feng¹, HUANG Jian-ke¹, LIU Chuang¹

(1. *Institute of Marine Biotechnology and Bio-resource Utilization, College of Oceanography, Hohai University, Nanjing 210098, China;*

2. Jiangsu Coast Development Group Co., Ltd., Nanjing 210000, China)

Abstract: For the study, three species commonly occurring in the coastal waters of China, i.e. *Babylonia areolates*, *Solen arcuatus* and *Penaeus monodon*, are respectively selected from the Gastropoda and Bivalvia of mollusks and the Crustacea of arthropods and their shell matrix proteins are extracted and analyzed. The proteomics analysis by using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) reveals that the given protein has significant species differences: ①protein N66 (a kind of carbonic anhydrase) occurs commonly in *Solen arcuatus*, but not in *Babylonia areolates* and *Penaeus monodon*. revealing that the protein N66 has the specificity, which may have important reference significance in species identification in the future; ②cuticle proteins AM1199 and CP14.6 are generally found in the epidermal structure of *Penaeus monodon*, and not detected in *Babylonia areolates* and *Solen arcuatus*; ③hemocyanin can be identified in the shell matrix proteins of all the three animals, revealing its important role in the shell formation and growth of different species. This study can provide a foundation for the identification of shell matrix proteins in mollusk or arthropod shells and also an important reference for exploring the biomineralization process in different species.

Key words: shell matrix proteins; protein N66; cuticle protein; hemocyanin; proteomics

Received: March 10, 2022