

太平洋牡蛎幼体附着变态差异蛋白质组研究

杨丙晔^{1,2}, 濮菲², 陈仲巍¹

(1. 厦门医学院厦门市医用海洋天然产物与细胞工程重点实验室 福建 厦门 361023;

2. 厦门大学海洋与地球学院 福建 厦门 361102)

摘要: 太平洋牡蛎(*Crassostrea angulata*) 是中国主要的海洋养殖经济物种之一, 具有重要的经济价值和商业价值, 附着变态是牡蛎幼体从受精卵发育到成体所需的重要阶段, 其分子机制的研究对牡蛎养殖育苗具有重要的指导意义. 本研究利用双向电泳技术分离筛选牡蛎幼体附着变态过程中的差异表达的蛋白, 进一步利用质谱技术鉴定幼体附着变态过程中发育相关的关键蛋白, 共筛选出 128 个差异蛋白, 鉴定并注释了 39 种蛋白. 通过对差异表达蛋白功能分析, 筛选获得了与纤毛组建相关的筑丝蛋白和与稳定钙离子胞内浓度相关的钙网蛋白, 为揭示牡蛎幼体面盘组织及纤毛的退化消失和钙离子有效诱导幼体附着变态的机制提供分子数据. 同时还获得了调节脂肪酸 β -氧化、三羧酸循环和糖酵解重要生理功能的关键酶蛋白: 乙酰辅酶 A 脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和 3-磷酸甘油醛脱氢酶, 以及调节无脊椎动物机体能量存储和释放的酶蛋白: 精氨酸激酶和 ATP 合成酶, 进一步阐明了牡蛎幼体在附着变态过程中能量调节的分子机制.

关键词: 海洋生物学; 牡蛎; 幼体; 附着变态; 蛋白质组

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 03. 009

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2018)03-0372-08

太平洋牡蛎(*Crassostrea angulata*) 是中国主要的海洋养殖经济物种之一, 具有重要的经济价值和商业价值. 附着变态是牡蛎幼体从受精卵发育到成体所需的重要阶段, 其成败直接决定育苗的成活率, 所以研究幼体附着变态对牡蛎养殖育苗具有重要的指导意义. 蛋白质组学的研究已经越来越受到人们的关注, 它是解析细胞或器官在生长发育过程中各种生理机制的一种非常有效的研究方法^[1-3], 可以比较细胞在不同生理或病理条件下蛋白表达的异同, 对相关蛋白质进行分类和鉴定. 更重要的是蛋白质组学的研究可以分析蛋白的功能以及蛋白之间的相互作用.

随着质谱技术的不断提高, 蛋白质组学技术在水产领域得到广泛应用, Tay 等(2006) 通过对斑马鱼(*Danio rerio*) 胚胎蛋白质组进行分析, 获得了多个与细胞代谢、细胞骨架、蛋白降解相关的功能蛋白^[4]. Nomura 等(2009) 通过对玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*) 受精卵、胚胎和幼体的蛋白质组比较分析,

揭示了海鞘胚胎发育过程中卵黄蛋白原大量的翻译后修饰和降解, 以及胚胎和幼体发育过程中基因表达和细胞分化的模式^[5]. 利用蛋白质组技术对喂食过镉的僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*) 性腺进行分析, 发现了 11 个差异表达的蛋白, 可以作为检验牡蛎食品是否镉污染的标志蛋白^[6]. Cao 等(2009) 通过对包那米虫感染的欧洲平牡蛎(*Ostrea edulis*) 血淋巴进行蛋白质组比较分析, 阐述了牡蛎对抗包那米虫病的分子基础^[7]. 蛋白质组学技术对重要水产经济物种幼体附着变态的研究应用也越来越多, Lopez 等(2005) 对贻贝(*Mytilus galloprovincialis*) 附着变态时期幼体进行蛋白质组学分析, 获得了贻贝幼体 6 个特异表达的蛋白^[8]. Thiyagarajan 等(2008) 通过对重要污损生物纹藤壶(*Balanus amphitrite*) 幼体进行蛋白质组分析, 发现了 9 个介虫时期特异表达的蛋白^[9], 之后其团队继续对草苔虫(*Bugula neritina*)、才女虫(*Pseudopolydora vexillosa*)、华美盘管虫(*Hydroides elegans*) 进行了附着变态的蛋白质

收稿日期: 2017-11-14

基金项目: 福建省教育厅福建省中青年骨干教师教育科研资助项目(JA15811); 厦门市科技局科技计划资助项目(3502Z20154078); 厦门医学院自然科学类科研计划资助项目(Z2014-08)

作者简介: 杨丙晔(1982—), 男, 博士, 讲师; E-mail: yby@xmmc.edu.cn

组学的研究^[10-13]. 本研究利用双向电泳和质谱技术对太平洋牡蛎幼体附着变态过程中差异表达的蛋白进行比较分析.

1 材料与方法

1.1 样品采集

太平洋牡蛎亲贝来自于古雷养殖场,亲贝取回后获取牡蛎精子和卵子人工授精. 在水泥池中盐度为 22、水温为 28℃ 条件下培养,幼体发育到 D 形时期密度约为 15 个/mm³. 幼体主要喂养的藻为等鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*) 和小球藻(*Chlorella vulgaris*). 幼体在进入眼点幼体 3 d 后,每天都取幼体样品,每次 3 个平行样,直到幼体开始大面积附着,获取的幼体样品液氮冻存待用. 在幼体发育到开始附着时,在幼体的培养池中加入洗刷干净的波纹板,都是第一天放入,24 h 后取出,直到牡蛎幼体开始大面积附着的那天,取出波纹板,将波纹板上附着的牡蛎幼体用刷子轻轻刷在过滤的海水中,收集幼体,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值为 7.2)清洗 3 次,液氮速冻,超低温冰箱保存待用.

1.2 幼体总蛋白提取

每管 100 mg 幼体中加入 1 cm³ TRIzol 试剂,在冰上匀浆机匀浆打碎,每次 30 s,间隙停止 10 s,匀浆破碎 5 min;加入 200 mm³ 氯仿后振荡 15 s,室温下放置 5 min;12 000 r/min 4℃ 离心 15 min,去掉浅黄色中层和无色上层溶液;加入 300 mm³ 乙醇后振荡混匀,2 000 r/min 4℃ 离心 5 min;将上清转移至新的离心管中,加入 1.5 cm³ 异丙醇,振荡混匀,室温下至少放置 20 min,若一个离心管装不下,可平均分成两管后,分别加入 750 mm³ 异丙醇;14 000 r/min 4℃ 离心 10 min,弃上清,取沉淀;上述沉淀中加入 1 cm³ 体积分数为 95% 的乙醇,振荡重悬浮沉淀后 14 000 r/min 4℃ 离心 10 min,弃上清,取沉淀;沉淀在超净台中干燥后,重新溶解于 50 ~ 100 mm³ 蛋白裂解液中,加入量视沉淀量而定,溶解好的蛋白 -80℃ 保存待用. 提取的总蛋白利用 Bradford 的蛋白浓度测定试剂盒来测定所提取总蛋白浓度.

1.3 幼体总 RNA 的提取以及 cDNA 第一条链的合成

总蛋白提取的过程中,第一次高速离心后将分层的最上层上清转移到新的离心管中,接下来的步骤按照 invitrogen trizol 试剂盒说明书提取幼体总 RNA.

使用 TaKaRa 反转录试剂盒,按照说明书以提取的幼体总 RNA 为模板,合成 cDNA 第一条链. 合

成的模板 -20℃ 保存待用.

1.4 双向电泳

第一向等电聚焦:所取蛋白量为 100 mg. 仪器设定参数,仪器运行参数:50V,13h;100V,2h;200V,2h;500V,1h;1 000V,2h;4 000V,2h;8 000V,15 000VHrs;8 000V,35 000VHrs. 第一向跑完后,将胶条取出正面向上加入到胶条盘中,加入事先配好的还原液浸泡 17 min,用 SDS 电泳缓冲液冲洗 3 次,再用烷化液避光摇动浸泡 17 min,最后用 TGS 缓冲液清洗 2 遍. 第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳:所用凝胶浓度为 12%. 电泳参数为:20 mA/板,30 min;40 mA/板运行至溴酚蓝条带距离底端 1 cm 左右,一般设定时间为 5 h;之后 100V 保护电压.

1.5 银染

将事先配制好的固定液加入到塑料盒中,将胶板从电泳装置中取出打开胶板,将胶转移到与胶条对应的塑料盒中,在水瓶摇床上轻轻摇动 2 h 或过夜,然后用体积分数为 50% 的无水乙醇清洗 30 min;然后加入敏化液敏化 3 min;超纯水清洗 3 次,每次 5 min;再加入银染液,每块胶 200 cm³,超纯水快速冲洗 2 次;加入显色液,摇动显色直至蛋白点清晰的出现;超纯水快速冲洗一下,加入终止液,终止 15 min;最后用超纯水冲洗一次,将溶液换成体积分数为 1% 的冰醋酸溶液. 用凝胶扫描仪扫描保存图像(全彩、透射模式,300 dpi 分辨率)以备后面分析.

1.6 差异蛋白分析及质谱鉴定

使用 ImageMaster 双向电泳图谱分析软件分析图谱,比较胶图中各点的蛋白含量占总蛋白含量占比的差异. 将相对含量差异超过 1.5 倍以上的标记为差异点. 从胶上切下含差异蛋白点的胶粒,放入 1.5 cm³ 的离心管中,加入 200 mm³ 超纯水漩涡振荡 2 次,每次 5s;去掉超纯水,加入 1:1 混合的 300 mmol/dm³ 铁氰化钾和 100 mmol/dm³ 的硫代硫酸钠溶液,振荡 5 ~ 10 s,看到胶粒变为浅黄色或白色,立即加入 1 cm³ 的超纯水终止反应,再用超纯水清洗 2 次;用 50 mmol/dm³ 的碳酸氢铵溶液清洗 1 次,然后换成 1:1 混合的乙腈和碳酸氢铵溶液,清洗 2 次;100% 的乙腈,洗 2 次. 超净台中胶粒干燥. 在离心管中加入 5 mm³ 的胰蛋白酶溶液,冰上孵育 30 min,移液枪吸掉多余的酶解液,37℃ 酶解过夜. 酶解结束后,加入 50.0 mm³ 蛋白溶解液,室温放置 1 h,短暂离心后吸取上清液,每次 0.5 mm³ 上样到质谱的点样板上,干燥后,重复上样 3 次. 上样板送入仪器,进行蛋白点质谱测定.

2 结果与讨论

2.1 蛋白差异点的筛选和质谱鉴定

双向电泳扫描图如图 1 所示,整个胶图上大约有 1 300 多个比较清晰的蛋白点,蛋白的分子量主要集中在 20 ~ 70 kDa,蛋白 pI 值主要集中在 4 ~ 8 的范围内.

利用 ImageMaster 软件筛选出两个时期幼体的蛋白表达差异在 1.5 倍以上的有 128 个,差异点在 2 倍以上的有 66 个,将 66 个蛋白差异点通过酶解质谱鉴定,注释出 39 种蛋白名称.其中 8 种蛋白表达升高,31 种表达降低.39 种蛋白质的具体名称以及功能分类如表 1 所示.

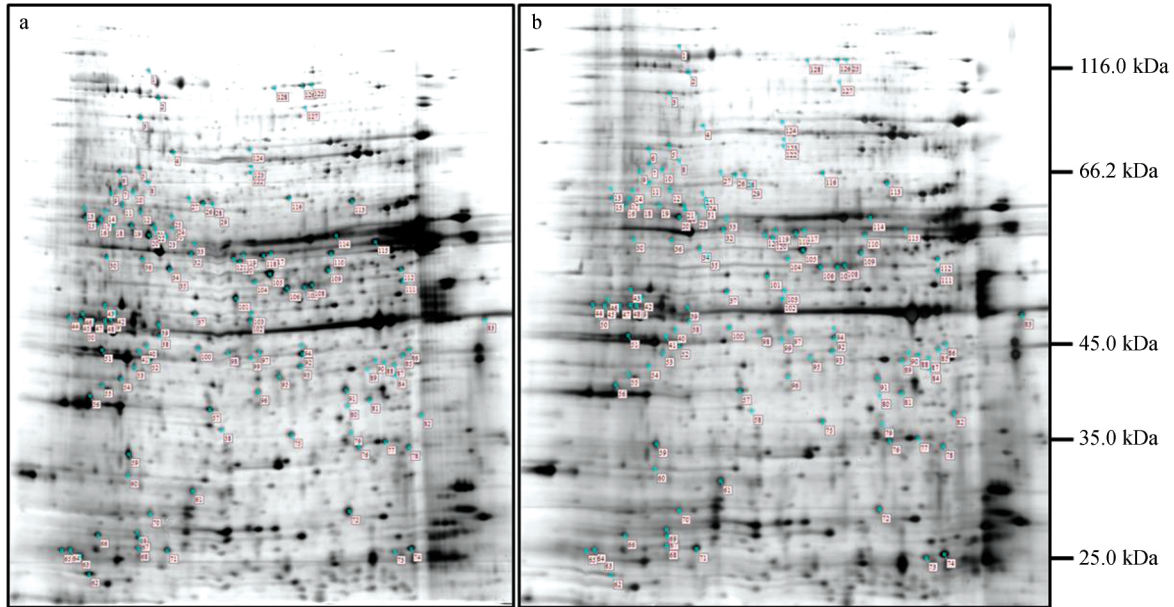


图 1 牡蛎幼体附着变态过程中全蛋白双向凝胶电泳图谱

Fig. 1 2-DE map of the total proteome during the Pacific oyster larval settlement and metamorphosis
a. 变态前幼体; b. 变态幼体

表 1 牡蛎幼体两个不同时期的差异蛋白质谱鉴定结果

Tab. 1 Summary of the differentially expressed proteins in two development stages of the Pacific oyster, identified by MALDI-TOF/TOF

功能分类	蛋白点编号	蛋白名称	蛋白功能
细胞骨架部分	15	β-微管蛋白	微管
	33	微管蛋白 α-3 链	细胞骨架、微管
	44	β-肌动蛋白	细胞质、细胞骨架
	72	肌肉组织肌动蛋白	细胞质、细胞骨架
	92	肌动蛋白 2	细胞质、细胞骨架
	95	肌动蛋白	细胞质、细胞骨架
	115	β-微管蛋白 1	微管
	122	β-微管蛋白 2	微管
	110	筑丝蛋白 A1	微管
生理调节部分	127	穹窿体主蛋白	核蛋白
	9	脂酰辅酶 A 脱氢酶	脂肪代谢
	13	过氧化氢酶	氧化还原酶

续表 1

功能分类	蛋白点编号	蛋白名称	蛋白功能
	20	谷氨酰胺合成酶	氨基酸代谢
	22	past-1 蛋白	钙离子绑定
	24	丙酰辅酶 a 羧化酶	连接酶
	38	异柠檬酸脱氢酶 1	氧化还原酶
	39	异柠檬酸脱氢酶	氧化还原酶
	42	鸟氨酸氨基转移酶	氨基转移酶
	50	天门冬氨酸氨基转移酶	氨基酸代谢
	52	精氨酸激酶	转移酶
	56	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	氧化还原酶
	70	过氧化物还原酶	抗氧化活性
	73	Rho-GDI 相关蛋白	激活 GTP 酶
	76	丙酮酸脱氢酶 E1 β 亚基	激活 GTP 酶
	81	蛋白磷酸酯酶 2A	基因表达
	83	内质网钙结合蛋白	钙离子绑定
	98	谷氨酰胺合成酶	三磷酸腺苷绑定
	101	腺苷高半胱氨酸水解酶	水解酶
	108	GDP 解离抑制因子	GDP 解离抑制因子活性
	121	丙酮酸脱氢酶	氧化还原酶
细胞增殖部分	32	三磷酸腺苷合成酶	氢离子跨膜转运活性
	59	蛋白激酶 C 受体	发育蛋白
蛋白修饰因子部分	12	细胞色素氧化酶 6A 亚基	蛋白折叠
	18	细胞色素氧化酶腺	分子伴侣
	19	苷酸环化酶关联蛋白	腺叶酸环化酶绑定
	26	复合蛋白 1 α 亚基	分子伴侣
	27	复合蛋白 1 β 亚基	分子伴侣

2.2 蛋白差异点 mRNA 水平的表达验证

依据牡蛎幼体转录组文库或太平洋牡蛎上传的基因组和转录组数据获得 10 个蛋白质点的 cDNA 序列,依据序列设计定量引物(表 2)利用 qRT-PCR 技术验证 10 种蛋白质在两个幼体不同发育时期的

mRNA 表达变化,结果如图 2 所示.其中有 9 个蛋白质的 mRNA 表达变化与双向的蛋白表达变化一致,有一个蛋白质的 mRNA 表达变化与双向的蛋白表达变化是相反的.

表 2 10 个基因表达荧光定量检测引物序列
Tab. 2 qRT-PCR primers sequences of ten genes

蛋白名称	引物编号	引物序列(5'-3')
天门冬氨酸氨基转移酶	CAA-F	AAGCCGCATGTTAATAGAGC
	CAA-R	TTGGCATCCTTATTGGCACA
筑丝蛋白	TK-F	AACATCAGGCAATGGAAGA
	TK-R	AGTCAGACACTCAATGGCTACA

续表 2

蛋白名称	引物编号	引物序列(5'-3')
Rho-GDI 相关蛋白	RGRP-F	TGATCCACGCAATGTTATAGTTTC
	RGRP-R	CGGTATTGGCTCCCTCTTT
精氨酸激酶	AK-F	CCGAGGGATATGAGGTGTTTC
	AK-R	TTTAGAGCGGCAATGGTTTT
谷氨酰胺合成酶	GS-F	TGAGGGCTCTAACTCTGACA
	GS-R	ATTCCTGCTCTATTCCAAAC
三磷酸腺苷合成酶	ATPS-F	CTGCCTTTCAGTCTGTTGT
	ATPS-R	CTTGAGAATGCCCGTGTAG
过氧化氢酶	CATA-F	CTGATCGAGGTCGGGAAGA
	CATA-R	CGGTGGGTGTCGGAGTAAG
腺苷高半胱氨酸水解酶	AP-F	ATGGTCCATTCAAACCTGA
	AP-R	AAACAAACATCTGCCTTCA
异柠檬酸脱氢酶	ID-F	GTCTACCAGCAAGGCTACAA
	ID-R	ATAGTCTTACACGCCACACA
腺苷酸环化酶关联蛋白	ACAP-F	GCCAGTGTTTGAATCCAGG
	ACAP-R	CGGAACTTTACCCATCACCT

2.3 讨论

牡蛎幼体在附着变态时期存在较多激烈的形态学变化^[14]，例如面盘的消失、嘴和足的消亡，还有鳃丝和唇瓣的快速生长，这些形态学上的变化都需要大量能量的消耗，在牡蛎附着变态后整体的干重会明显降低。已有学者研究发现，在变态过程中所消耗的能量最大可以达到牡蛎本身所储存总能量的 64.5%。对牡蛎附着变态提供能量贡献最多的是蛋白质，占总能量的 69.3%，其次是脂肪和糖类，分别为 24.3% 和 6.4%^[15]。

精氨酸激酶是一种磷酸原激酶，主要存在于无脊椎动物体内，是调节无脊椎动物能量代谢的关键酶，它通过催化精氨酸和腺苷三磷酸(ATP)之间的可逆性反应，将能量存储于磷酸精氨酸的高能磷酸键中，或将磷酸精氨酸分解产生 ATP^[16]。精氨酸激酶对调节无脊椎动物体内的能量代谢、储存和利用起着重要的作用^[17-19]。精氨酸激酶在太平洋牡蛎幼体附着变态过程中蛋白表达水平变化较大，这与幼体在此时期大量能量消耗的调节相一致。ATP 是能量的载体分子^[20]，在线粒体中，ATP 合成酶是生物体能量代谢最为关键的酶，参与 ATP 的合成和水解。实验结果显示 ATP 合成酶在附着变态前表达量比较高，预示着在此时期有合成比较多的 ATP，储存

能量为变态时期能量的消耗做准备。

脂肪酸可以通过 β-氧化分解成乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环从而产生大量的 ATP 为生物体提供能量。乙酰辅酶 A 脱氢酶是 β-氧化过程中的关键酶，通过分析牡蛎附着变态过程中差异蛋白质点发现，乙酰辅酶 A 脱氢酶在附着变态过程中大量表达，从而导致牡蛎幼体在附着变态过程中脂肪被大量消耗。三羧酸循环是需氧生物体内普遍存在的代谢途径，是三大营养物质：蛋白质、脂肪和糖类的最终代谢通路，异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环第一步脱羧氧化的关键酶，同时也是限速酶，异柠檬酸脱氢酶表达量的升高说明了三羧酸循环的加快，从而导致营养物质被消耗同时释放大量能量。3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)是糖酵解过程中的一个关键酶，它表达量的升高意味着糖酵解加速，从而导致牡蛎幼体在附着变态时期糖类被大量分解。综合以上研究结果表明太平洋牡蛎幼体在附着变态过程中通过调节脂肪酸 β-氧化、糖酵解和三羧酸循环重要生理过程中的关键酶，消耗蛋白质、脂肪和糖类以提供所需的大量能量。

筑丝蛋白是一类纤毛或鞭毛轴丝中的与微管相关的蛋白质，是组建纤毛和鞭毛结构的一类重要蛋白质。牡蛎幼体在附着变态前具有面盘组织，在面盘

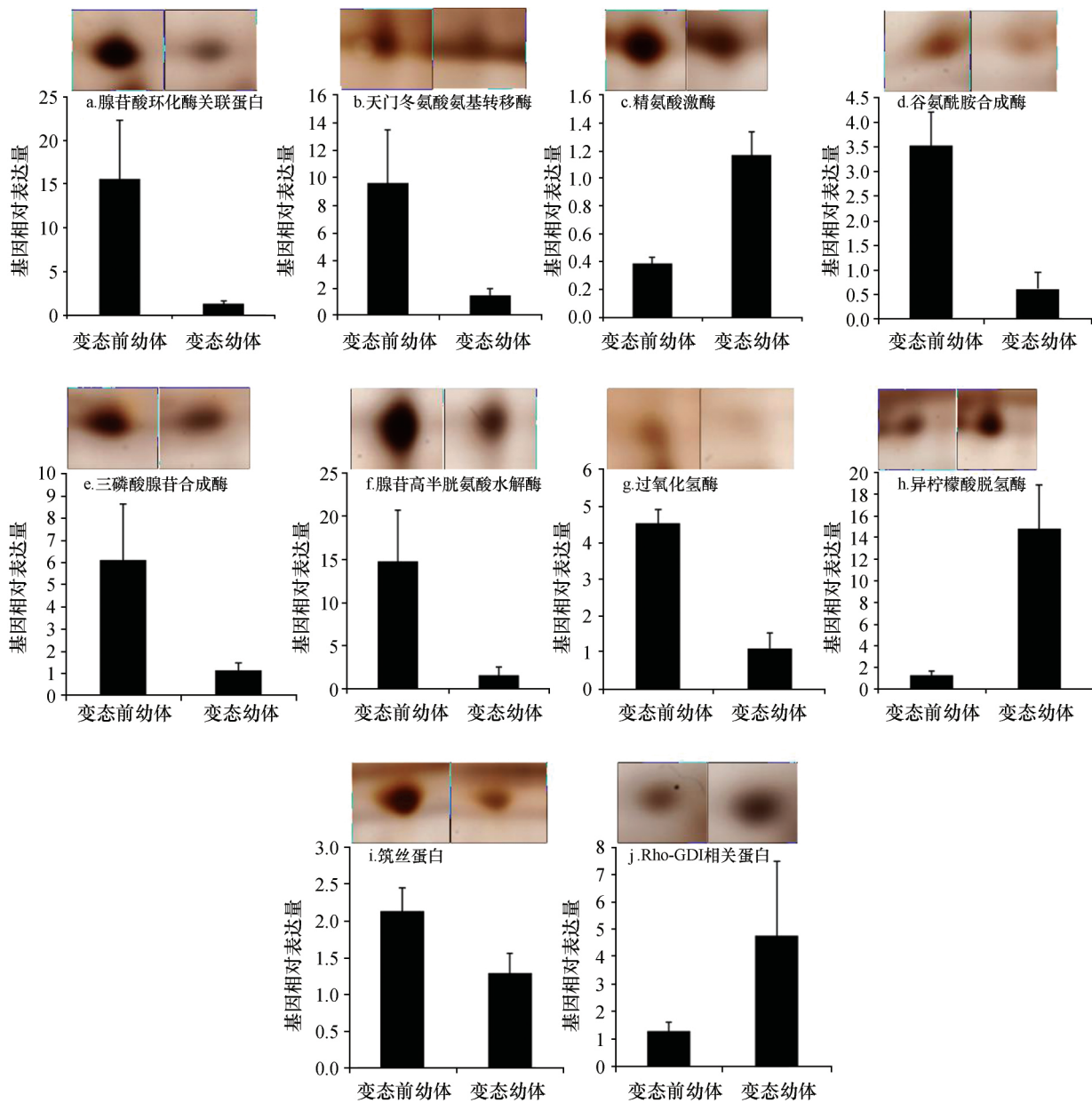


图2 10种蛋白基因水平的表达变化

Fig. 2 mRNA expression pattern of ten proteins

组织上有大量纤毛的存在,通过面盘纤毛的摆动牡蛎幼体可以在海水中游动,但到了附着变态过程中,面盘连同纤毛会一起退化或消失.蛋白质组分析表明筑丝蛋白在牡蛎幼体附着变态前表达量比较高,到变态过程中表达量明显降低,这可能与牡蛎幼体在附着变态过程中面盘组织纤毛的退化消失有着密切联系.钙网蛋白是一类多功能的蛋白质分子,参与多种重要的细胞生物学过程^[21-25],是内质网中可以结合钙离子的保守蛋白,具有维持胞内钙离子稳定的作用,而稳定的胞内钙离子浓度对细胞生理功能发挥至关重要.钙离子对牡蛎幼体附着变态有着很好的诱导效果^[26],说明钙离子对牡蛎幼体的附着变

态有着重要的作用,钙网蛋白在附着变态时期升高进而导致某些细胞内的钙离子浓度升高,从而为后续重要生理功能的发挥奠定基础.

本研究利用双向电泳和质谱技术,对太平洋牡蛎幼体附着前及变态过程中的蛋白质组进行比较分析,筛选获得牡蛎幼体在附着变态过程中调节脂肪酸 β -氧化、三羧酸循环和糖酵解重要生理功能的关键酶蛋白:乙酰辅酶A脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和3-磷酸甘油醛脱氢酶,以及调节无脊椎动物机体能量存储和释放的酶蛋白:精氨酸激酶和ATP合成酶,进一步阐明了牡蛎幼体在附着变态过程中能量调节的分子机制.另外还筛选获得与纤毛组建相关

的筑丝蛋白和与稳定钙离子胞内浓度相关的钙网蛋白,为揭示牡蛎幼体面盘组织及纤毛的退化消失和钙离子有效诱导幼体附着变态的分子机制提供数据支持。

3 结论

牡蛎幼体通过调节脂肪酸 β -氧化、三羧酸循环和糖酵解三大重要生理功能的关键酶蛋白:乙酰辅酶A脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和3-磷酸甘油醛脱氢酶的表达变化来调节自身物质与能量的转化,进而

利用无脊椎动物机体能量调节酶蛋白:精氨酸激酶和ATP合成酶的变化,从而控制能量的存储和释放,最终满足幼体在附着变态过程中大量能量的需求。牡蛎幼体通过控制结构组成蛋白筑丝蛋白的表达变化,从而调节纤毛的生长与消失。幼体通过控制细胞内的钙网蛋白的变化,从而调节细胞中钙离子的浓度,进而调节幼体在附着变态过程中与钙离子相关的重要生理功能。

参考文献:

- [1] COX B, KISLINGER T, WIGLE D A, et al. Integrated proteomic and transcriptomic profiling of mouse lung development and Nmyc target genes [J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3: 109-123.
- [2] MURALIDHARAN S, THOMPSON E, RAFTOS D, et al. Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters [J]. *Proteomics* 2012, 12: 906-921.
- [3] WANG H, ZHANG H, WONG Y H, et al. Rapid transcriptome and proteome profiling of a non-model marine invertebrate, *Bugula neritina* [J]. *Proteomics*, 2010, 10 (16): 2972-2981.
- [4] TAY T L, LIN Q, SEOW T K, et al. Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebra fish, *Danio rerio* [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 3176-3188.
- [5] NOMURA M, NAKAJIMA A, INABA K. Proteomic profiles of embryonic development in the ascidian *Ciona intestinalis* [J]. *Developmental Biology*, 2009, 325: 468-481.
- [6] ZHU B, GAO K S, WANG K J, et al. Gonad differential proteins revealed with proteomics in oyster (*Saccostrea cucullata*) using algae as food contaminated with cadmium [J]. *Chemosphere*, 2012, 87: 397-403.
- [7] CAO A, FUENTES J, COMESAÑA P, et al. A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis [J]. *Aquaculture*, 2009, 295(3/4): 149-156.
- [8] LÓPEZ J L, ABALDE S L, FUENTES J. Proteomic approach to probe for larvae proteins of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(4): 396-404.
- [9] THIYAGARAJAN V, QIAN P Y. Proteomic analysis of larvae during development, attachment, and metamorphosis in the fouling barnacle, *Balanus amphitrite* [J]. *Proteomics*, 2008, 8(15): 3164-3172.
- [10] THIYAGARAJAN V, WONG T, QIAN P Y. 2D gel-based proteome and phosphoproteome analysis during larvae metamorphosis in two major marine biofouling invertebrates [J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(6): 2708-2719.
- [11] ZHANG H, WONG Y H, WANG H, et al. Quantitative proteomics identify molecular targets that are crucial in larvae settlement and metamorphosis of *Bugula neritina* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(1): 349-360.
- [12] CHANDRAMOULI K H, MOK F S, WANG H, et al. Phosphoproteome analysis during larval development and metamorphosis in the spionid polychaete *Pseudopolydora vexillosa* [J]. *BMC Developmental Biology*, 2011, 11: 31-45.
- [13] ZHANG Y, SUN J, XIAO K, et al. 2D gel-based multiplexed proteomic analysis during larvae development and metamorphosis of the biofouling polychaete tubeworm *Hydroides elegans* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(9): 4851-4860.
- [14] KALYANSUNDARAM M. Larval development of the edible oyster *Crassostrea medrasensis* (preston) [J]. *Mahasagar*, 1992, 25: 51-54.
- [15] VIDELA J A, CHAPARRO O R, THOMPSON R J. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early juvenile development of the oyster *Ostrea chilensis* [J]. *Marine Biology*, 1998, 132: 635-640.
- [16] ELLINGTON W R. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1989, 143: 177-194.
- [17] WYSS M, MAUGHAN D, WALLIMANN T. Re-evaluation of the structure and physiological function of guanidino kinases in fruitfly (*Drosophila*), sea urchin (*Psammechinus miliaris*), and man [J]. *Biochemical Journal*, 1995, 309: 255-261.
- [18] NEWSHOLME E A, BEIS I, LEECH A R, et al. The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle [J]. *Biochemical Journal*, 1978, 172: 533-537.
- [19] ELLINGTON W R. Evolution and physiological roles of phosphagen systems [J]. *Annual Review Physiology*, 2001, 63: 289-

325.

- [20] 韩贻仁. 分子细胞生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 71-75.
- [21] KRAUSE K H, MICHALAK M. Calreticulin[J]. Cell, 1997, 88: 439-443.
- [22] EGGLETON P, REID K B, KISHORE U, et al. Clinical relevance of calreticulin in systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 1997, 6: 564-571.
- [23] MICHALAK M, BURNS K, ANDRIN C, et al. Endoplasmic reticulum form of calreticulin modulates glucocorticoid-sensitive gene expression[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 29 436-29 445.
- [24] SONTHEIMER R D, NGUYEN T Q, CHENG S T, et al. The unveiling of calreticulin-A clinically relevant tour of modern cell biology[J]. Journal of Investigative Medicine, 1995, 43: 362-370.
- [25] BURNS K, DUGGAN B, ATKINSON E A, et al. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor[J]. Nature, 1994, 367: 476-480.
- [26] 祁剑飞, 曾志南, 宁岳, 等. 几种阳离子对福建牡蛎幼虫附着和变态的影响[J]. 福建水产, 2013, 35: 27-31.

Study on differentially expressed proteins related to larval settlement and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

YANG Bing-ye^{1, 2}, PU Fei², CHEN Zhong-wei¹

(1. Xiamen Key Laboratory of Marine Medicinal Natural Products and Cell Engineering, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China; 2. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is an economically important mariculture species in China, settlement and metamorphosis is an essential process for the larval development of the species. The study of molecular mechanism on larval settlement and metamorphosis is helpful for the oyster growing and seeding. In our studies 128 proteins in different expression were screened and 39 proteins identified during the settlement and metamorphosis with two-dimension gel electrophoresis and mass-spectrometric technique, respectively. The function analysis of the different expressed proteins screened and resulted fibroin related to the formation of cilia and the calcium net proteins related to stabilize the intracellular concentration of calcium ions. These provide the molecular data that reveals the degeneration and disappearance of the veliger tissue and cilia of the oyster larvae and the mechanism of calcium ion to effectively induce the attachment and metamorphosis of the larvae. In the meanwhile, we obtained three key protein enzymes as acetyl coenzyme A dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and 3-phosphate glyceraldehyde dehydrogenase, which respectively regulate the important physiological functions of fatty acid β -oxidation, tricarboxylic acid cycle and glycolysis, and two other enzymes, arginine kinase and ATP synthetase that regulate the energy storage and release in the invertebrate. These observations furtherly clarify the molecular mechanism of energy regulation in oyster larvae during the settlement and metamorphosis.

Key words: marine biology; oyster; larvae; settlement and metamorphosis; proteome

DOI: 10.3969/J. ISSN.2095-4972.2018.03.009

(责任编辑: 方建勇)