

利用靶向蛋白质组学和可视化策略研究刺参体壁中原纤蛋白的存在

刘开梦, 石菲菲, 常耀光*, 薛长湖

中国海洋大学食品科学与工程学院
青岛 266404 changyg@ouc.edu.cn

1. 前言

海参是我国传统滋补食品。结构蛋白在微观结构与食物质量的形成中起着至关重要的作用, 课题组从刺参体壁中鉴定了472种结构蛋白, 但主要关注了胶原蛋白对微观结构的作用, 而对其他结构蛋白的研究较少。原纤蛋白是一种重要的结构蛋白, 可与胶原纤维形成网络结构, 提供长期的恢复力并确保可变胶原组织的机械稳定性。但刺参体壁中原纤蛋白的存在仍然知之甚少, 这限制了我们对原纤蛋白在刺参微结构中作用的理解。

本研究旨在利用靶向蛋白质组学和可视化策略阐明刺参中原纤蛋白的存在状态。建立基于多反应监测 (MRM) 的定量方法以检测刺参体壁原纤蛋白的含量以及主要胶原蛋白与原纤蛋白的化学计量学关系。使用生物信息学方法以及异源表达系统以获得大量重组原纤蛋白。通过动物免疫制备抗刺参原纤蛋白抗体, 以研究原纤蛋白的分布与组织构造。

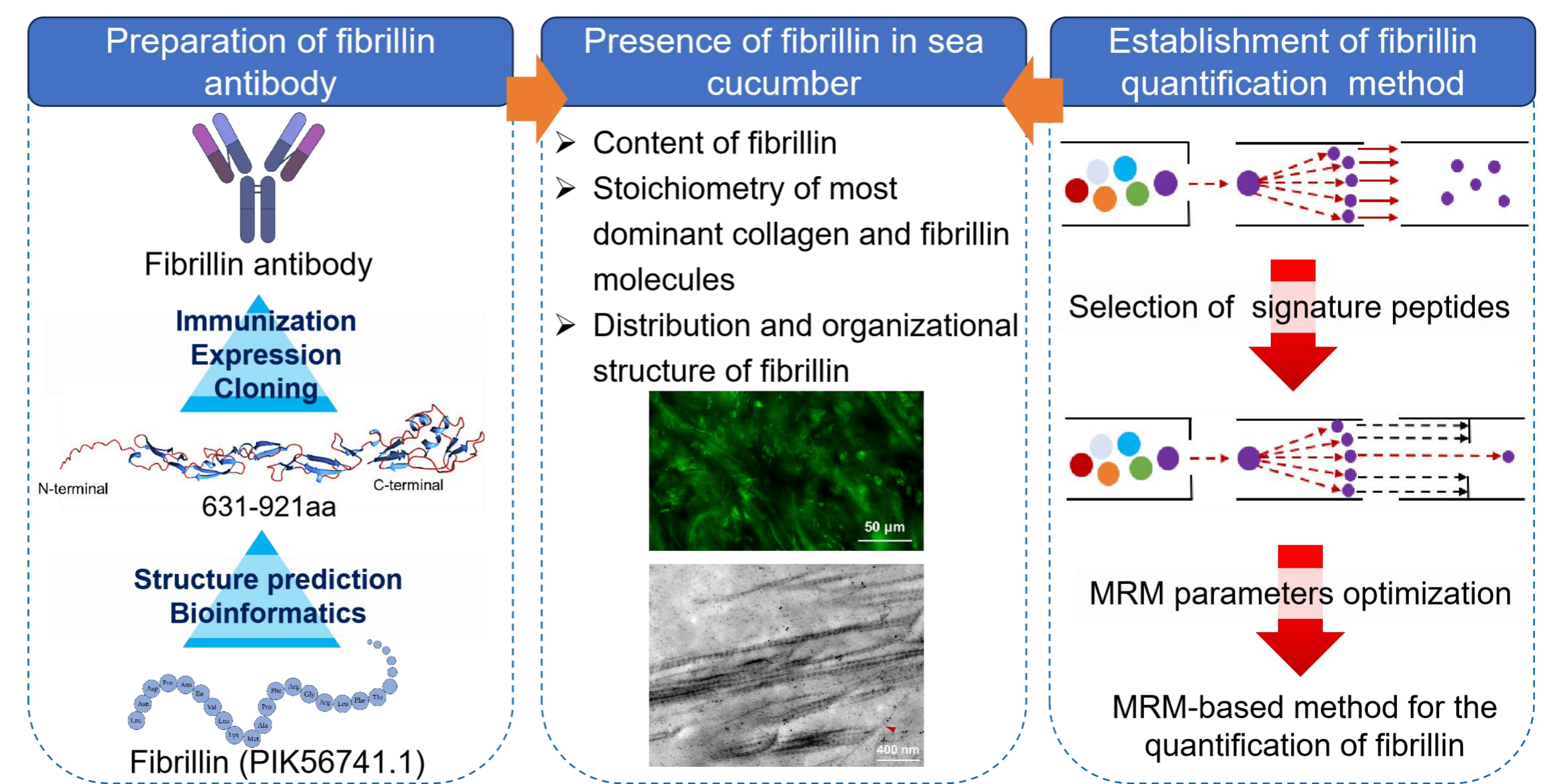


图1 技术路线

2. 结果·讨论

2.1 刺参体壁中原纤蛋白含量的测定

选择三种不同亚型的原纤蛋白并对其特征肽段进行合成。优化MRM采集参数 (表1), 并建立了线性良好的特征肽段的标准曲线 (图2)。经方法学评估 (表2), 成功建立了具有良好灵敏度和较高重复性的定量方法。使用建立的定量方法测定了三种不同亚型原纤蛋白与主要胶原蛋白的含量, 三种原纤蛋白的含量分别为0.96、2.54和0.15 $\mu\text{g/g}$ (湿基), 主要胶原蛋白与原纤蛋白的化学计量比约为250:1。使用靶向蛋白质组学策略验证了原纤蛋白分子的含量以及分子组成的异质性, 并揭示了海参纤维骨架以胶原纤维为主, 以原纤蛋白微纤维为辅。

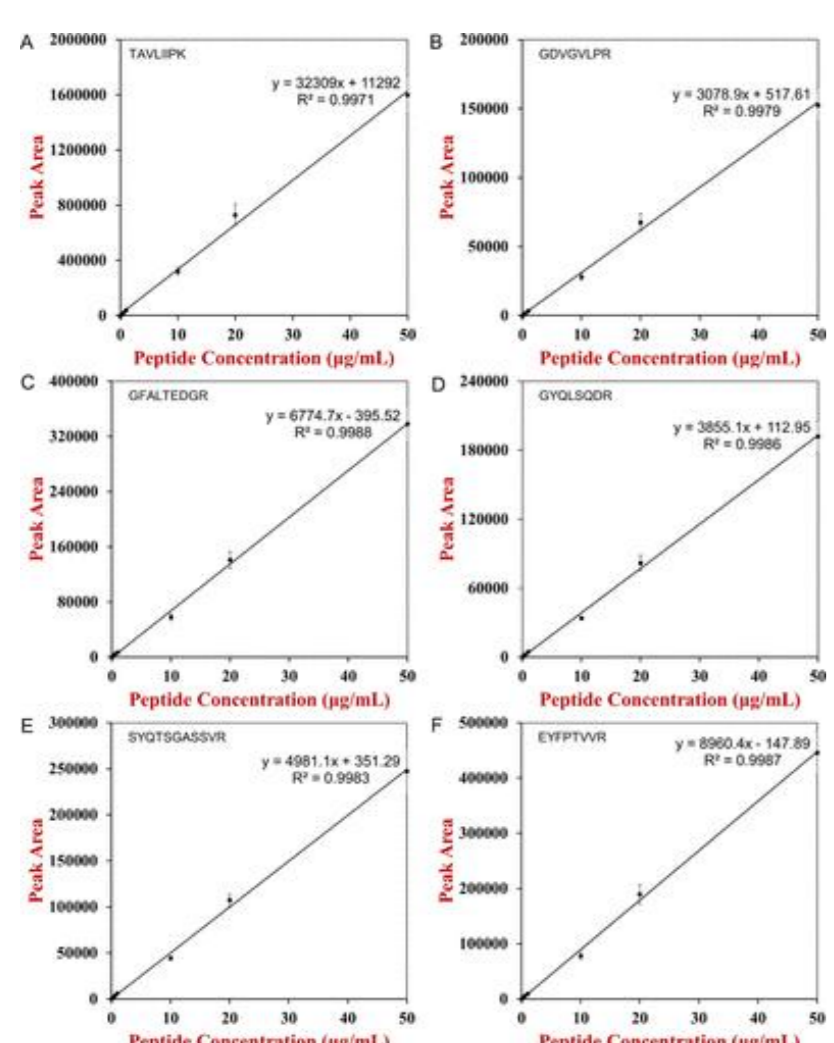


表1 MRM参数优化

Protein (ID and annotation)	Peptide	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (V)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Dwell time (ms)
PIK55242.1 (putative fibrillin-2-like isoform X1)	TAVLHPK	427.8	130	682.5 ⁺	10	50
	GDVGLPR	406.7	120	541.3 ⁺	12	50
PIK56741.1 (putative fibrillin-3, partial)	GFALTEGDR	483.2	140	690.2 ⁺	12	50
	GVQLSQDR	483.7	140	585.2 ⁺	12	50
PIK57632.1 (putative fibrillin-1, partial)	SYQTSQASSVR	571.8	160	663.3 ⁺	18	50
	EYFPTVVR	505.8	140	474.3 ⁺	20	50

表2 方法学检验

signature peptide	LOD/LOQ (ug/mL)	spiked content (ug/mL)	recovery rate (%)	RSD (%)
TAVLHPK	0.015/0.038	0.1	101.6	8.87
GDVGLPR	0.036/0.108	0.1	100.0	2.17
GFALTEGDR	0.017/0.053	0.1	97.4	0.47
GVQLSQDR	0.027/0.082	0.1	92.7	8.55
SYQTSQASSVR	0.020/0.060	0.1	99.8	1.13
EYFPTVVR	0.016/0.050	0.1	95.6	1.79
		0.1	114.9	3.70
		0.1	98.2	1.31
		0.1	93.5	2.65
		0.1	114.3	5.21
		0.1	102.0	2.22
		0.1	107.2	2.12
		0.1	98.6	3.92
		0.1	111.8	6.17
		0.1	102.1	2.12
		0.1	106.9	6.61
		0.1	115.2	4.19
		0.1	102.1	0.94
		0.1	97.4	2.07

图2 特征肽段的标准曲线

2.2 原纤蛋白的克隆、表达及抗体的制备

利用生物信息学手段, 选择原纤蛋白 (蛋白 ID: PIK56741.1, 631-921aa) 的氨基酸序列作为抗原 (图3)。将该基因片段进行异源表达, 利用亲和层析进行分离纯化, 得到电泳纯原纤蛋白 (图4)。将纯化的原纤蛋白进行动物免疫得到了效价大于1:64 000 (图5) 的抗刺参原纤蛋白抗体。

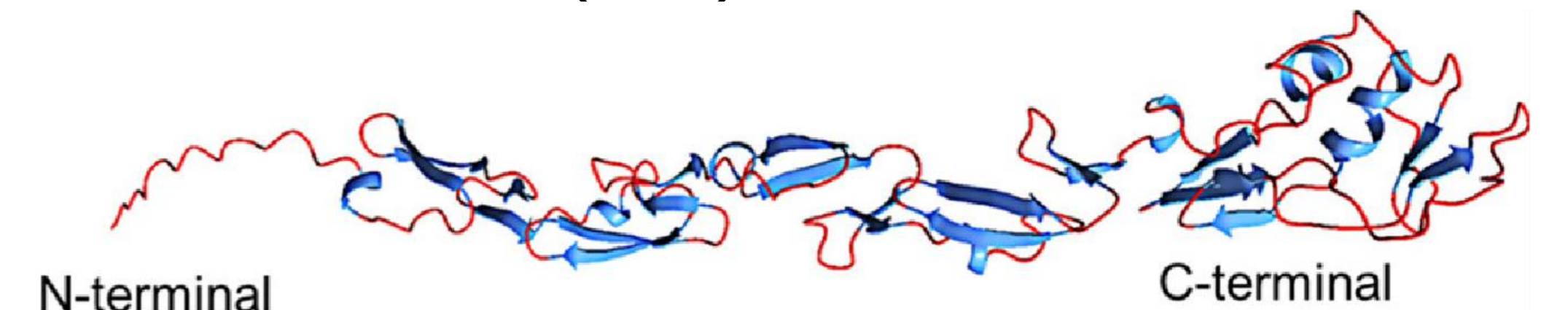


图3 原纤蛋白三维结构

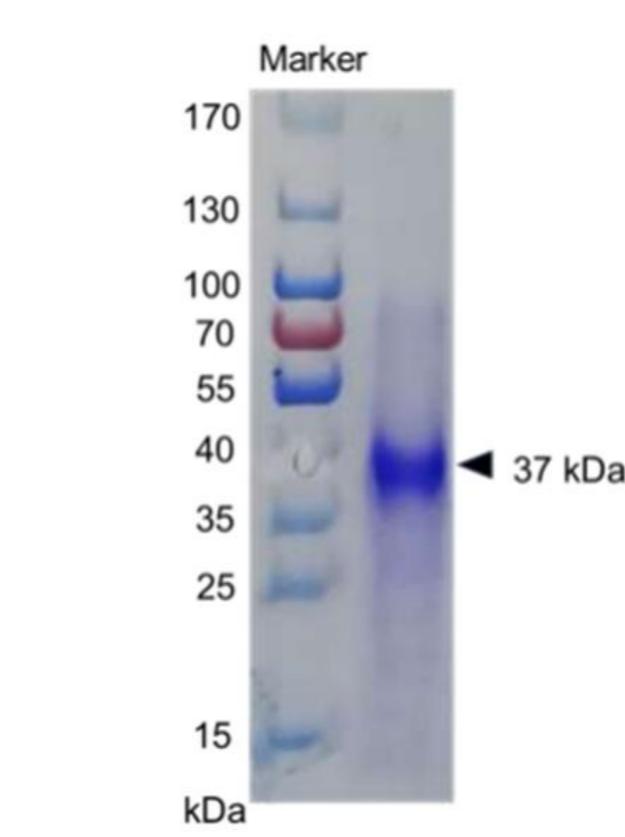


图4 SDS-PAGE分析

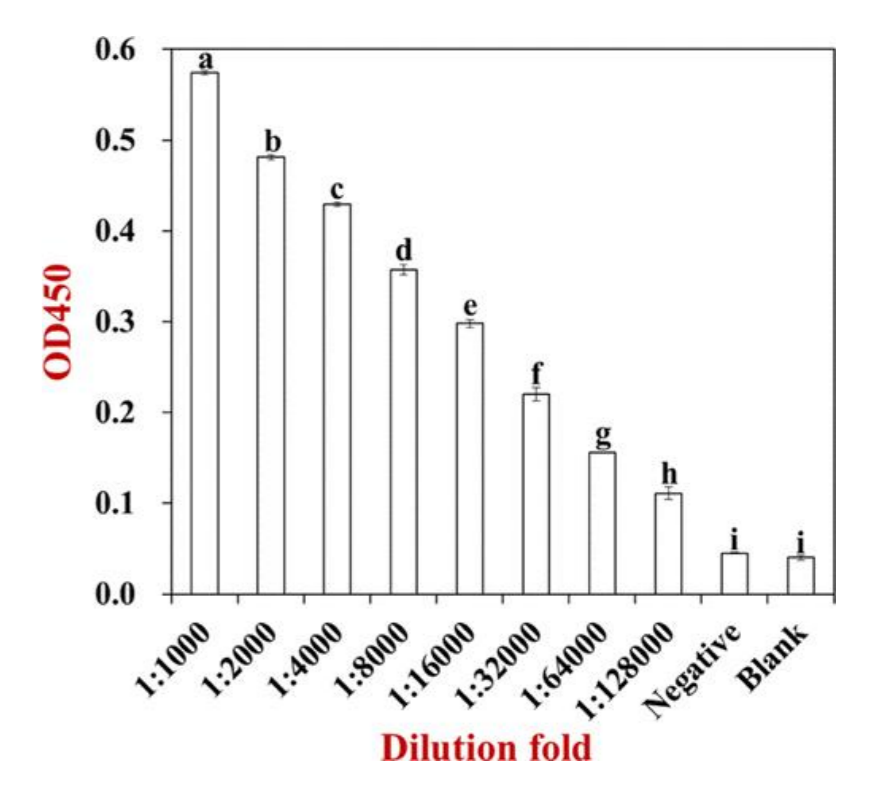


图5 抗体效价检测

2.3 刺参体壁原纤蛋白的原位可视化分析

将制备的抗刺参原纤蛋白抗体作为探针, 对刺参体壁进行免疫荧光显微镜分析, 原纤蛋白在刺参体壁中以原纤维束的形式分散存在 (图6)。进一步使用免疫电镜与透射电镜 (图7A与7B) 进行观察, 结果表明原纤蛋白微纤维部分单独存在于胶原纤维的间隙, 部分与胶原纤维进行缠绕。

刺参原纤蛋白微纤维的分布与北大西洋瓜参相似, 这意味着原纤蛋白微纤维在不同种类的海参中的分布可能是一致的。

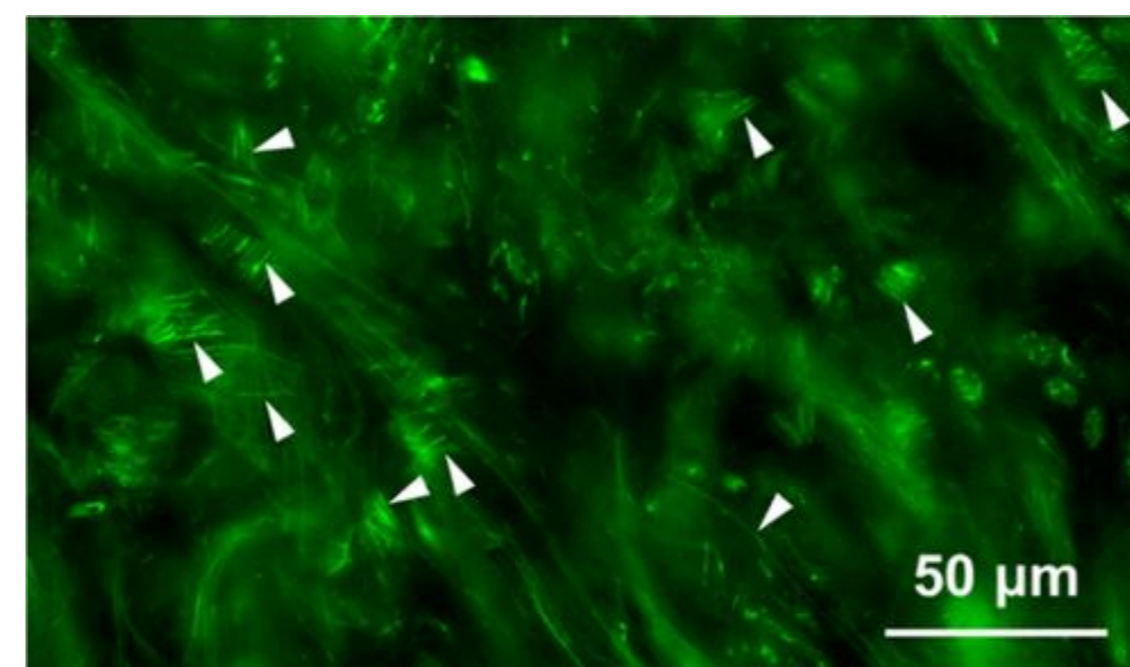


图6 免疫荧光分析

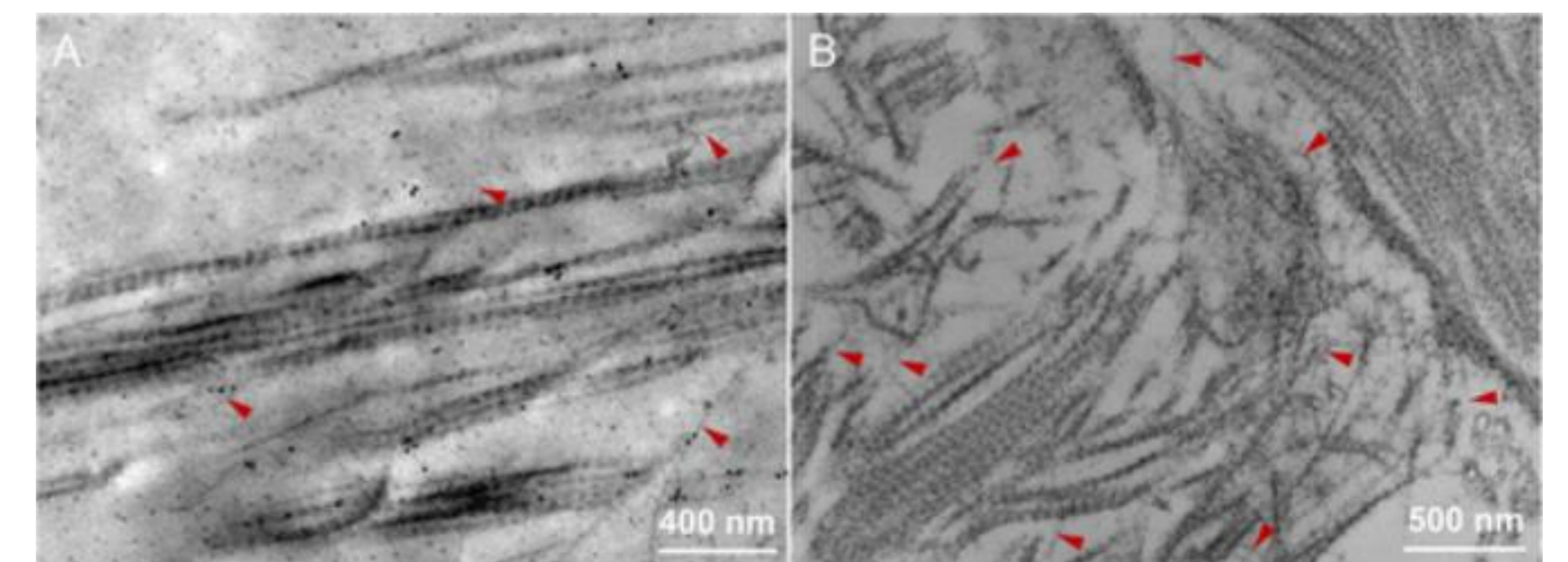


图7 免疫电镜 (A) 与透射电镜 (B) 分析

3. 总结·展望

利用靶向蛋白质组学和可视化策略首次阐明了刺参体壁中原纤蛋白的存在状态, 原纤蛋白分子组成复杂多样, 原纤蛋白微纤维主要以纤维束的形式存在并与胶原纤维共存。本研究从食品特性出发, 为海参的进一步发展提供了指导。

4. 参考文献

- Shi F.; Wang Y.; Chang Y.; Liu K.; Xue C. Food Chem. 2024, 433:137335.
 - Godwin, A. R. F.; Singh, M.; Lockhart-Cairns, M. P.; Alanazi, Y. F.; Cain, S. A.; Baldock, C. Matrix Biol. 2019, 84:17-30.
- ★ 发表论文: Liu K, Shi F, Chen G, Chang Y and Xue C, J Agr Food Chem. 2024, 72(15): 8798-8804.