

野生鲤鱼耳石中蛋白质的提取与表征

任冬妮 李卓 高永华 冯庆玲

(清华大学材料科学与工程系 新型陶瓷与精细工艺国家重点实验室, 北京 100084)

摘要:通过对北京密云水库的野生鲤鱼的微耳石和星耳石中的蛋白质进行提取,分别得到了 3 种基质蛋白。根据其提取过程中溶解性的不同,分为水可溶蛋白(WSP)、酸可溶蛋白(ASP)和酸不可溶蛋白(AIP)。通过高效液相色谱、X 射线衍射、红外光谱分析和氨基酸成分分析等方法分别对 3 种基质蛋白进行了表征,发现微耳石和星耳石中 3 种基质蛋白特征存在差异,并初步推断蛋白质特征的差别与碳酸钙晶体在微耳石和星耳石中的不同晶型有关。

关键词:微耳石;星耳石;基质蛋白;提取;表征

中图分类号: P578.6⁺1; P575

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2009)06-0593-06

Extraction and characterization of protein from otoliths of wild carp

REN Dong-ni, LI Zhuo, GAO Yong-hua and FENG Qing-ling

(State Key Laboratory of New Ceramics and Fine Processing, Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The proteins in lapillus and asteriscus of wild carp from the Miyun Reservoir in Beijing were extracted. According to the difference in solubility, the proteins can be classified into three groups, namely, water soluble protein(WSP), acid soluble protein(ASP) and acid insoluble protein(AIP). Using high performance liquid chromatography(HPLC), X-ray diffraction(XRD) and Fourier transformation infrared spectra(FTIR), the authors characterized the sorted proteins from different otoliths. It is found that the three types of proteins in lapillus and asteriscus have different characteristics, and such differences may be responsible for different kinds of crystalline state in calcium carbonate.

Key words: lapillus; asteriscus; matrix protein; extraction; characterization

鱼耳石是一种典型的天然生物矿物,它是位于鱼类耳囊中以矿物质沉积为主的功能性结构体,在生物学上主要起声音接收器和平衡定向的作用。组成鱼耳石的主要无机成分是碳酸钙,约占 96%,其余为 3% 的有机基质和 1% 的微量元素。尽管所占分数很小,有机基质在碳酸钙生物矿化过程中所起的作用是至关重要的,不仅起着结构框架的作用,更重要的是控制着无机矿物的形核、生长以及矿物结构的堆积方式(崔福斋等, 2004)。

国际上积极开展了对鱼耳石生物矿化的研究(Murayama *et al.*, 2000; Dauphin and Dufour, 2003; Beier *et al.*, 2004; Emi and Philippe, 2005),国内有关鱼耳石的研究主要集中在形态学、矿物学和微量元素特征等方面(杨良锋等, 2006; 曹焯等, 2006, 2008; 李胜荣等, 2007; 罗军燕等, 2008;

高永华等, 2008; 张晓霞等, 2009),但是专门针对鱼耳石蛋白成分的研究国际上开展的还不多,尚没有对耳石蛋白的组分和分类形成统一的认识。耳石中的有机基质主要由蛋白质和糖类物质组成,蛋白质对碳酸钙在生物体内的矿化有重要作用。

鱼耳石有 3 对,分别为矢耳石、星耳石和微耳石。这 3 对耳石中的碳酸钙矿物的存在形式和蛋白质成分都有差别,那么不同晶型矿物中所含的蛋白质有何差异? 球文石在鱼耳石中的稳定存在是否与其中的蛋白有关? 蛋白的差异是否是导致文石/球文石转化的原因? 针对这些问题,本文利用水和弱酸对耳石中的有机质进行提取,按照有机基质在水和 pH=4 的醋酸中的溶解性将其分为水可溶蛋白(water-soluble protein, WSP)、酸可溶蛋白(acid-soluble protein, ASP)和酸不可溶

收稿日期: 2009-08-28; 修订日期: 2009-09-13

基金项目: 国家重点基础研究发展“973”计划(2007CB815604); 国家自然科学基金资助项目(50672052, 50672044)

作者简介: 任冬妮(1985-),女,汉族,博士生,研究方向:生物矿化, E-mail: rdn08@mails.tsinghua.edu.cn; 通讯作者: 冯庆玲,教授,研究方向:生物材料, E-mail: biomater@mail.tsinghua.edu.cn。

蛋白(acid-insoluble protein, AIP),并对提取的有机基质进行了表征。

1 样品与实验

1.1 基质蛋白的提取

实验用鲤鱼来自北京市密云水库,鲤鱼为3~4年生,体长45~50 cm,体厚10~12 cm。鱼头解剖,取出星耳石及微耳石,因矢耳石质量过小难以满足蛋白质提取需要,舍弃。耳石清洗后于酒精中浸泡10 h,晾干。将耳石样品在玛瑙研钵中精细研磨,过筛使粉体颗粒小于50 μm 。去离子水清洗两次,离心,烘干待用。

水可溶蛋白的提取:将10 g耳石粉末分散在20 mL Milli-Q水中,在室温下持续搅拌20 h。将混合物在4℃,3 500 r/min的转速下离心20 min,分离出上清液,沉淀的粉体留做继续提取酸可溶蛋白使用。选用0.22 μm 的滤纸将上清液抽滤,过滤掉残余的固体颗粒。过滤好的液体放入-20℃冰箱中预冷,待液体冰冻后,放入冷冻干燥机,直至得到水可溶蛋白粉末。

酸可溶蛋白的提取:用Milli-Q水清洗沉淀,并在4℃,3 500 r/min的转速下离心10 min,重复两次,称量剩余的粉末质量约为8.28 g。配置82.8 mL pH为4.0的醋酸溶液,每次少量的逐次向醋酸溶液中加入粉末,一边加入粉末一边用玻璃棒快速搅拌,使粉末在醋酸溶液中尽量分散。将混合物在

磁力搅拌机上持续搅拌10 h,在4℃,3 500 r/min的转速下离心20 min,分离出上清液。重复离心及分离上清液数次以确保将酸不可溶蛋白分离开。将液体注入8 000 kDa的透析袋中进行透析(透析袋分子量不宜选择过小以免发生透析袋爆裂),每两天换水一次,共换水4次。将透析袋中内容物倒入烧瓶,置于冰箱中预冷后进行冷冻干燥,可得到酸可溶蛋白粉末。

酸不可溶蛋白的提取:将上一步中的沉淀物用pH值为2.0的醋酸溶液清洗以彻底除去可能残留的碳酸钙晶体,再用Milli-Q水清洗后在4℃,3 500 r/min的转速下离心10 min,重复水清洗3~5次,每次丢弃上清液,将沉淀预冷后冷冻干燥,即可得到酸不可溶蛋白粉末。

1.2 基质蛋白的表征方法

在法国奥尔良大学采用Shimadzu 10AVP Japan高效液相色谱仪(HPLC)对蛋白进行分离及成分鉴定,选用GEA-2546-C1805色谱柱,蛋白粉末均溶解在Milli-Q水中48 h以上,离心并过滤,蛋白浓度约1 mg/mL, pH值为7.8的0.2 M的Tris-HCl缓冲溶液,流动相为从0到0.5 M的NaCl线性梯度溶液,流速1 mL/min。

在清华大学采用Rigaku公司的TTR-III型X射线衍射仪进行蛋白结构分析, 2θ 最小步距0.002°, 2θ 角度范围0~80°。于清华大学分析测试中心,采用Spectrum GX傅立叶红外拉曼光谱仪,其分辨率为0.3 cm^{-1} ,测试范围为IR 4 000~400 cm^{-1} 。

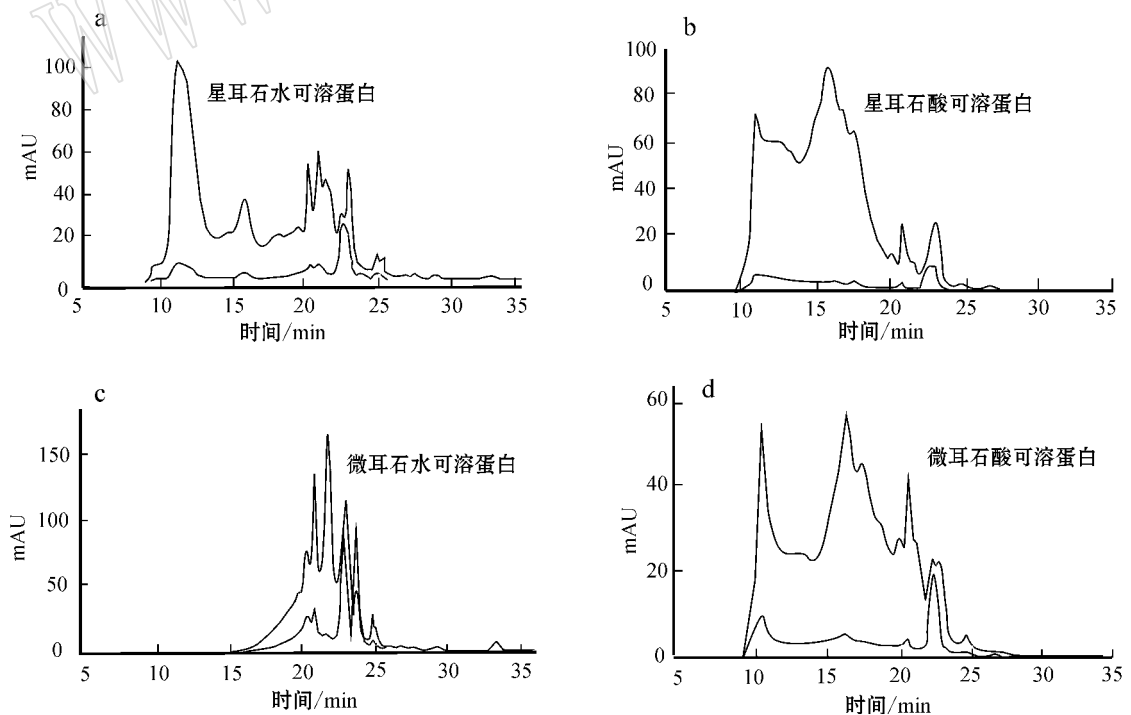


图1 鲤鱼耳石4种蛋白的HPLC结果

Fig. 1 HPLC results of 4 soluble proteins of carp otoliths

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱分析

由于酸不溶蛋白无法引入,因此仅对星耳石和微耳石的水可溶蛋白和酸可溶蛋白进行了高效液相色谱分析,图 1 是这 4 种可溶蛋白的 HPLC 结果。从图 1 可以看出,微耳石和星耳石的水可溶蛋白有较大的差异,其中图 1a 星耳石的水可溶蛋白峰出现的较早,说明其中含有的蛋白分子量较大,各分子量组间隔较大,区分度较好,而图 1c 微耳石水可溶蛋白

峰出现较晚且较为集中,说明微耳石中所含蛋白分子量偏小,但各组分区分度依然很好。图 1b 与图 1d 中各峰位及曲线形状基本一致,两种蛋白中各组分分子量接近,且二者难于区分,这说明两种酸可溶蛋白有极大的相似性。酸可溶蛋白的相似性也出现在其他种类动物的生物矿物中,如平胸鸟类的蛋壳(Mann *et al.*, 2006)。

2.2 X 射线衍射分析

由于星耳石中未提取到酸不可溶蛋白,因此本实验利用 XRD 衍射方法对从耳石中提取到的 5 种蛋白进行了分析,结果如图 2 所示。排除玻璃衬底的干扰,可以发现微耳石的酸

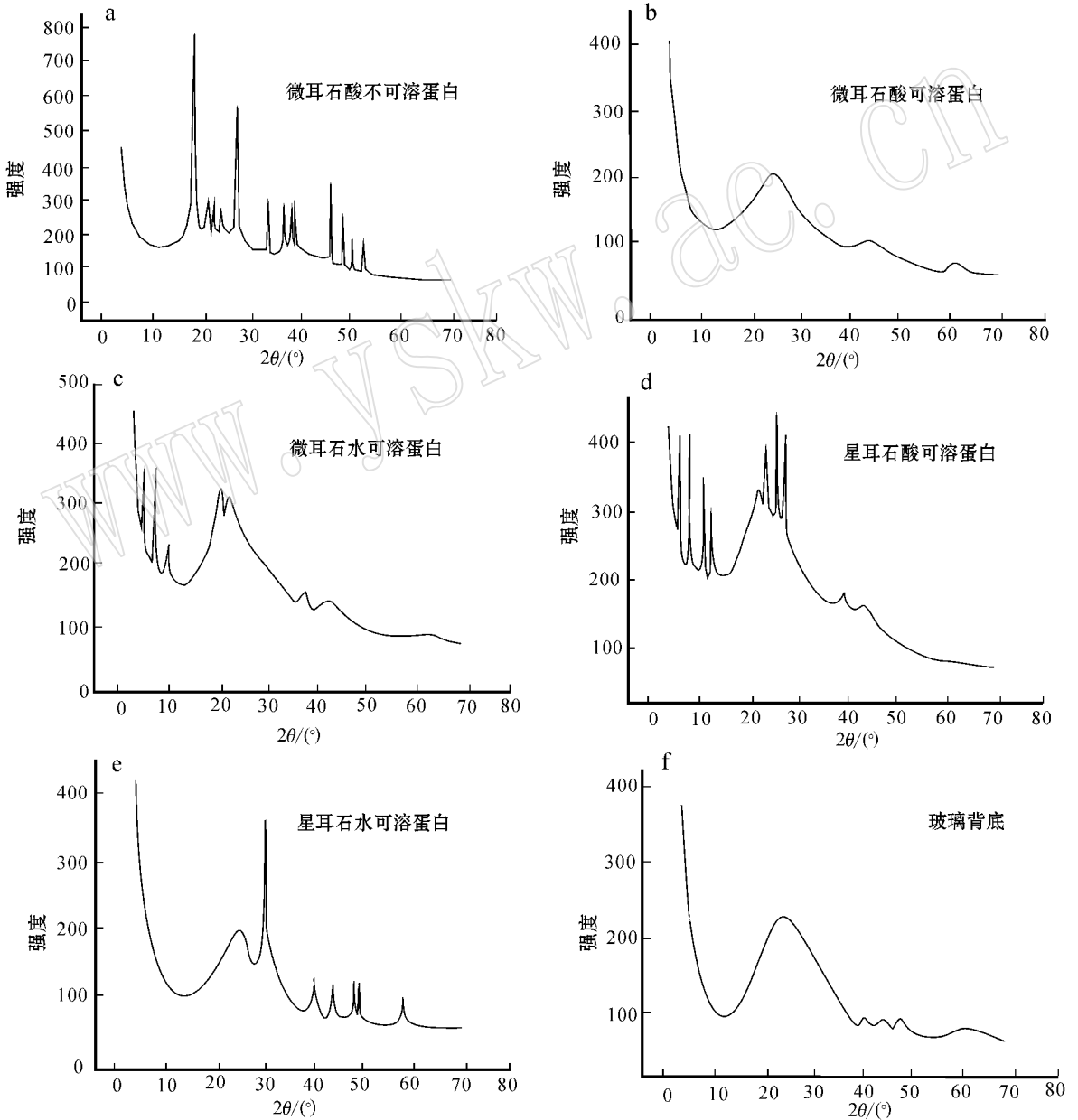


图 2 鲤鱼耳石蛋白的 XRD 图谱

Fig. 2 XRD atlas of proteins of carp otoliths

不可溶蛋白(图 2a)有很强烈的结晶现象发生,其衍射峰强且尖锐,说明这种蛋白较容易形成长程有序的结构,根据晶体衍射分析方法计算可以得出,出现在 17° 的最强峰对应的 d 值为 0.522 nm 。Pauling 等(1951)对 α -角蛋白进行了 X 射线衍射分析,从衍射图中看到有 $0.5 \sim 0.55 \text{ nm}$ 的重复单位,故推测蛋白质分子中有重复性结构,并认为这种重复性结构为 α 螺旋。 α 螺旋中每 3.6 个氨基酸残基上升一圈,相当于 0.54 nm ,与本文的 d 值基本吻合,说明微耳石不可溶蛋白中应存在相当比例的 α 螺旋结构。对比图 2b 与图 2d 可以发现,虽然两种酸可溶蛋白在 HPLC 的结果显示中具有几乎相同的

分子量成分,但是它们却有着不同的结构,其中微耳石的酸可溶蛋白几乎不具备晶体的特点。图 2c 为微耳石水可溶蛋白,其中出现的 9° 、 23° 峰为 β 折叠的特征峰,说明微耳石水溶蛋白中含有较多的 β 折叠结构。图 2e 中星耳石水可溶蛋白中 29° 峰在文献中还未见报道,对其鉴定还需要配合其他蛋白质分析手段。

2.3 红外光谱分析

图 3 为从星耳石和微耳石中提取到的蛋白经过冷冻干燥后的红外光谱分析谱图,可用于分析蛋白的酰胺谱带。

出现在 3420 cm^{-1} 附近的酰胺 A 为吸附水的峰,在所有 5

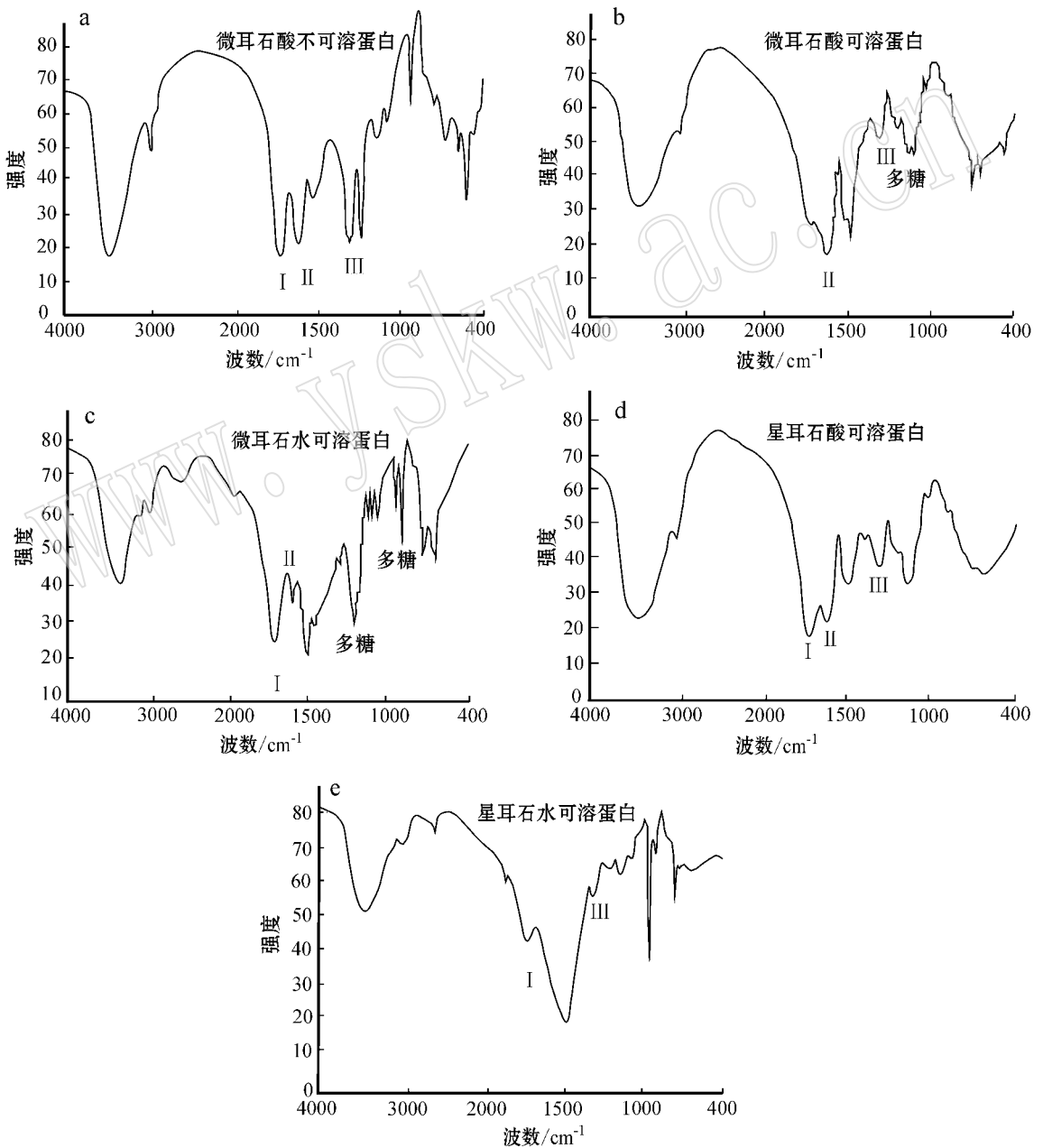


图 3 鲤鱼耳石蛋白红外图谱

Fig. 3 FTIR spectrum of proteins of carp otoliths

种蛋白中均有出现。图 3a 为微耳石的酸不可溶蛋白红外谱图,其中的酰胺 I、II、III 带均较为明显。图 3b 为微耳石的酸可溶蛋白红外谱图,其中酰胺 I 峰退化为小肩状,而在 $1000 \sim 1150 \text{ cm}^{-1}$ 的区域出现了多糖的吸收峰。图 3c 为微耳石的水可溶蛋白红外谱图,其中酰胺 III 未出现,多糖蛋白在微耳石水溶蛋白中大量的出现。星耳石的酸可溶蛋白中构象包括 α 螺旋(酰胺 I 的 1658 cm^{-1} 峰)、无规卷曲(酰胺 II 的 1549 cm^{-1} 峰)和 β 折叠(酰胺 III 的 1242 cm^{-1} 峰)(Dauphin and Dufour, 2003)(图 3d)。星耳石的水可溶蛋白中构象包括酰胺 I 的 1663 cm^{-1} 峰为 β 螺旋结构,酰胺 III 的 1245 cm^{-1} 峰为 β 折叠(图 3e)。

2.4 氨基酸成分分析

在中科院生物物理所,利用氨基酸自动分析仪对从星耳石和微耳石中提取到的水可溶蛋白和酸可溶蛋白进行了氨基酸成分分析,各蛋白中氨基酸成分见表 1。实验没有检测到色氨酸(tryptophane)与半胱氨酸(cysteine)的存在。氨基酸的成分未能表现出不同蛋白之间的明显差别。然而,球文石中 Glx 的含量较高,这种 Glx 含量较高的现象在无定型碳酸钙所含的酸性大分子中也存在(Aizenberg *et al.*, 1996)。球文石是碳酸钙 3 种非水合晶体中最易溶的,笔者推测 Glx 的浓度与碳酸钙晶型的溶解度有关。Glx 是谷氨酸/谷氨酰胺的统称,是二十种常见氨基酸之一,是一种酸性氨基酸,其 R 基

表 1 鲤鱼耳石中蛋白质的氨基酸成分分析

$w_B/\%$

Table 1 Analysis of amino acid constituents carp otoliths

	星耳石		微耳石	
	水可溶蛋白	酸可溶蛋白	水可溶蛋白	酸可溶蛋白
Asx(天冬氨酸/天冬酰胺)	20.7	23.8	18.8	20.9
Thr(苏氨酸)	8.6	8.8	8.9	9.2
Ser(丝氨酸)	15.2	14.3	13.7	12.5
Glx(谷氨酸/谷氨酰胺)	18.8	19.1	14.3	15.5
Pro(脯氨酸)	5.4	4.7	5.1	4.9
Gly(甘氨酸)	8.3	7.1	10.2	10.3
Ala(丙氨酸)	5.7	4.6	5.7	5.5
Val(缬氨酸)	2.9	2.1	3.5	3.7
Met(甲硫氨酸)	4.5	5.2	7.0	7.5
Ile(异亮氨酸)	0.8	0.8	2.1	1.3
Leu(亮氨酸)	1.6	1.1	1.6	1.2
Tyr(酪氨酸)	0.8	2.1	1.6	1.9
Phe(苯丙氨酸)	2.1	1.7	1.8	1.7
Lys(赖氨酸)	2.2	2.4	2.9	2.1
His(组氨酸)	1.1	0.8	1.8	1.1
Arg(精氨酸)	1.4	1.3	1.0	0.8

中含有一个羧基 -COOH,球文石的形成过程中的作用机理可能包括酸性基团、羧基的化学作用。

生物矿化过程是一个细胞调制的过程,它的奇特之处在于其过程是一个天然存在的高度控制过程,受生物机体内在机制调制,可以实现从分子水平到介观水平上对晶体形状、大小、结构、位相和排列的精确控制和组装,从而形成复杂的分级结构(Addadi and Weiner, 2001),具备特殊的性能。

在碳酸钙的 3 种晶体中,方解石是热力学最稳定的,而球文石是最不稳定的,但在星耳石中碳酸钙却可以以球文石形式稳定存在。有关球文石生物矿物的有机基质分析,所见文献还较少,Rasmussen 和 Korsgaard(2004)在研究耳石蛋白时发现,球文石部分的可溶蛋白要比文石部分的可溶蛋白多。本次分析也证实,文石晶体为主的微耳石和球文石晶体为主的星耳石的水可溶蛋白的差异较大。说明水可溶蛋白在控制球文石的生成方面很可能发挥了一定的作用。

在本次试验中没有在星耳石中发现酸不可溶蛋白,酸不

可溶蛋白被认为在生物矿化的过程中起着结构框架的作用。星耳石蛋白提取过程中酸不可溶蛋白的缺失是实验条件和操作所限?还是星耳石中确实不存在酸不可溶蛋白?这是不是导致星耳石中碳酸钙以球文石这种热力学最不稳定的形式存在的一个重要原因,还有待后续的实验加以验证。

3 结论

(1) 从微耳石中提取了 3 种蛋白(水可溶蛋白、酸可溶蛋白、酸不可溶蛋白),星耳石中提取了两种蛋白(水可溶蛋白、酸可溶蛋白)。

(2) 微耳石中酸不可溶蛋白极易结晶形成有序结构,其中含有较多的 α 螺旋。

(3) 两种酸可溶蛋白成分的组成及分子量分布均较为相似,但结构上存在着不同,这种差异可以实现控制碳酸钙晶型的作用。

(4) 星耳石水可溶蛋白分子量分布范围较宽, 微耳石水可溶蛋白分子量较为集中, 两者中蛋白的区分度均较好, 水可溶蛋白起着控制碳酸钙晶型及形貌的重要作用。

References

- Addadi L and Weiner S. 2001. Biomineralization-Crystals, asymmetry and life [J]. *Nature*, 411(6 839): 753~755.
- Aizenberg J, Lambert G, Addadi L, *et al.* 1996. Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates [J]. *Adv. Mater.*, 8: 222~226.
- Beier M, Anken R H and Rahmann H. 2004. Calcium-tracers disclose the site of biomineralization in inner ear otoliths of fish [J]. *Adv. Spa. Res.*, 33: 1 401~1 405.
- Cao Ye, Li Shengrong, Yang Liangfeng, *et al.* 2006. Thermoluminescence characteristics of otoliths of wild carps (cyprinoid) in the Baiyangdian Lake and the Miyun Reservoir [J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 25(5): 449~454 (in Chinese with English abstract).
- Cao Ye, Li Shengrong, Yang Liangfeng, *et al.* 2008. Micro-chemical characteristics of carp otoliths and their typomorphic significance in the evaluation of water quality in lakes and reservoirs——as exemplified by the Baiyangdian lake, Hebei Province and the Miyun Reservoir, Beijing [J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 28(4): 407~412 (in Chinese with English abstract).
- Cui Fuzhai and Feng Qingling. 2004. *Biomaterials Science* [M]. Beijing: Tsinghua Press. (in Chinese with English abstract).
- Dauphin Y and Dufour E. 2003. Composition and properties of the soluble organic matrix of the otolith of a marine fish: *Gadus morhua* Linne, 1758 (Teleostei, Gadidae) [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 134: 551~561.
- Emi Murayama and Philippe Herbomel. 2005. Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory macula [J]. *Mech Dev.*, 122: 791~803.
- Gao Yonghua, Li Shengrong, Ren Dongni, *et al.* 2008. An overview of focuses of research on otolith element characteristics and general testing methods [J]. *Earth Science Frontiers*, 15(6): 11~17 (in Chinese with English abstract).
- Li Shengrong, Shen Junfeng, Luo Junyan, *et al.* 2007. The genetic mineralogical attribute of fish otoliths: environmental typomorphism and some new investigation methods [J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 27(z): 241~248 (in Chinese with English abstract).
- Luo Junyan, Li Shengrong and Shen Junfeng. 2008. The influential factors of strontium and barium enrichment in otolith and their response to the environment [J]. *Earth Science Frontiers*, 15(6): 18~24 (in Chinese with English abstract).
- Mann K, Macek B and Olsen J V. 2006. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer [J]. *Proteomics*, 6: 3 801~3 810.
- Murayamae, Okuno A, Ohira T, *et al.* 2000. Molecular cloning and expression of an otolith matrix protein cDNA from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 126: 511~520.
- Pauling L, Corey R B and Branson H R. 1951. Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains [J]. *Proc Nat. Acad. Sc. U. S. A.*, 37: 205~211.
- Rasmussen T H and Korsgaard B. 2004. Estrogenic octylphenol affects seminal fluid production and its biochemical composition of eelpout (*Zoarces viviparus*) [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 139(1~3): 1~10.
- Yang Liangfeng, Li Shengrong, Luo Junyan, *et al.* 2006. Microchemical characteristics of carp otoliths from two different water environments and their indication significance for environmental changes [J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 25(6): 511~517 (in Chinese with English abstract).
- Zhang Xiaoxia, Ye Zhenjiang, Wang Yingjun, *et al.* 2008. Study on otolith morphology of chelidonicthys spinosus in the Qingdao Coastal waters [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 39(4): 622~626 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 曹 焯, 李胜荣, 杨良锋, 等. 2006. 白洋淀和密云水库野生鲤鱼耳石热释光特征研究 [J]. *岩石矿物学杂志*, 25(5): 449~454.
- 曹 焯, 李胜荣, 杨良锋, 等. 2008. 鱼耳石微化学特征在湖泊水质评价中的标型意义——以河北白洋淀和北京密云水库野生鲤鱼为例 [J]. *矿物学报*, 28(4): 407~412.
- 崔福斋, 冯庆玲. 2004. *生物材料学* [M]. 北京: 清华大学出版社.
- 高永华, 李胜荣, 任冬妮, 等. 2008. 鱼耳石元素研究热点及常用测试分析方法综述 [J]. *地学前缘*, 15(6): 11~17.
- 李胜荣, 申俊峰, 罗军燕, 等. 2007. 鱼耳石的成因矿物学属性: 环境标型及其研究新方法 [J]. *矿物学报*, 27(z): 241~248.
- 罗军燕, 李胜荣, 申俊峰. 2008. 鱼耳石中锶和钡富集的影响因素及其环境响应 [J]. *地学前缘*, 15(6): 18~24.
- 杨良锋, 李胜荣, 罗军燕, 等. 2006. 不同水域鲤鱼耳石微化学特征及其环境指示意义 [J]. *岩石矿物学杂志*, 25(6): 511~517.
- 张晓霞, 叶振江, 王英俊, 等. 2009. 青岛海域小眼绿鳍鱼耳石形态的初步研究 [J]. *中国海洋大学学报*, 39(4): 622~626.