

基于DIA蛋白质组学解析菲律宾蛤仔壳色分化的多通路协同调控机制

吴思润¹, 梁誉腾¹, 吴牧雨¹, 马雪娇¹, 高志鹰², 霍忠明², 刘洋²

¹大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连

²辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连

收稿日期: 2026年2月5日; 录用日期: 2026年2月26日; 发布日期: 2026年3月9日

摘要

为揭示菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)同一壳体黑白壳区域色泽分化的分子机制, 本研究采用数据非依赖采集(DIA)蛋白质组学技术, 对黑壳(B组)与白壳(W组)区域对应的外套膜组织进行差异蛋白筛选及功能解析。通过主成分分析(PCA)验证样本重复性, 结合P值(<0.05)与差异倍数($FC \geq 1.5$ 或 $\leq 1/1.5$)筛选显著差异蛋白, 同步开展GO功能富集与KEGG通路富集分析。结果显示, 共筛选获得1500个显著差异表达蛋白, 其中下调蛋白数量(1117个)约为上调蛋白(383个)的2.9倍, 提示蛋白表达抑制在壳色分化中占主导。KEGG富集分析发现, 差异蛋白显著富集于溶酶体、SNARE、Spliceosome三条核心通路: 溶酶体通路中CTSL、CTSS蛋白下调抑制壳基质更新; SNARE通路Syntaxin、SNAP-25等蛋白下调阻碍囊泡运输与色素分泌; Spliceosome通路SF3B/U2复合体、PRPF/SF蛋白下调影响转录后RNA加工效率。三条通路与能量代谢通路协同作用, 形成“能量代谢-物质分泌-转录后加工”的调控网络, 共同介导蛤仔壳色差异。本研究从蛋白质组层面揭示了蛤仔壳色分化的多通路协同调控机制, 填补了贝类壳色形成中RNA加工层面调控的研究空白, 为蛤仔壳色性状的分子育种提供理论依据。

关键词

菲律宾蛤仔, DIA蛋白质组学, 壳色分化, 溶酶体通路, 分子机制

Multi-Pathway Coordinated Regulatory Mechanisms Underlying Shell Color Differentiation in *Ruditapes philippinarum* Revealed by DIA-Based Proteomics

Sirun Wu¹, Yuteng Liang¹, Muyu Wu¹, Xuejiao Ma¹, Zhiying Gao², Zhongming Huo², Yang Liu²

文章引用: 吴思润, 梁誉腾, 吴牧雨, 马雪娇, 高志鹰, 霍忠明, 刘洋. 基于 DIA 蛋白质组学解析菲律宾蛤仔壳色分化的多通路协同调控机制[J]. 水产研究, 2026, 13(1): 67-81. DOI: 10.12677/ojfr.2026.131009

Abstract

To elucidate the molecular mechanisms underlying color differentiation between black and white shell regions within the same shell of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), this study employed data-independent acquisition (DIA) proteomics to identify and functionally characterize differentially expressed proteins in mantle tissues corresponding to black (B group) and white (W group) shell areas. Sample reproducibility was validated by principal component analysis (PCA). Significantly differentially expressed proteins were screened using a P value (<0.05) combined with fold-change criteria ($FC \geq 1.5$ or $\leq 1/1.5$), followed by Gene Ontology (GO) functional enrichment and KEGG pathway enrichment analyses. The results identified a total of 1,500 significantly differentially expressed proteins were identified, among which downregulated proteins (1117) were approximately 2.9 times more abundant than upregulated proteins (383), indicating that suppression of protein expression plays a dominant role in shell color differentiation. KEGG enrichment analysis revealed that these proteins were significantly enriched in three core pathways: lysosome, SNARE, and spliceosome. In the lysosome pathway, downregulation of CTSL and CTSS inhibited shell matrix turnover; in the SNARE pathway, reduced expression of proteins such as syntaxin and SNAP-25 impeded vesicle transport and pigment secretion; and in the spliceosome pathway, downregulation of the SF3B/U2 complex and PRPF/SF proteins affected the efficiency of post-transcriptional RNA processing. These three pathways act synergistically with energy metabolism pathways to form an integrated regulatory network of “energy metabolism - material secretion - post-transcriptional processing”, collectively mediating shell color differences in the Manila clam. At the proteomic level, this study reveals a multi-pathway coordinated regulatory mechanism underlying shell color differentiation, fills a knowledge gap regarding RNA-processing-level regulation in molluscan shell coloration, and provides a theoretical basis for molecular breeding of shell color traits in clams.

Keywords

Ruditapes philippinarum, DIA Proteomics, Shell Color Differentiation, Lysosome Pathway, Molecular Mechanism

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

贝类外壳作为其适应外界环境的核心防护屏障，不仅能够有效抵御物理冲击、化学侵蚀及生物捕食等多重外界胁迫，其独特的形态结构与色泽表型更成为物种分类鉴定、生态适应性评估及经济性状筛选的重要指标[1]。壳色表型的形成是一个复杂的多通路协同调控过程，不仅依赖于特定色素组分的种类与含量，更与壳体生物矿化的完整进程深度耦合，涵盖无机相碳酸钙晶体的沉积模式、有机基质的精准调控，以及色素分子的合成、转运与靶向沉积等关键环节[2]。已有研究证实，贝类壳色的表型差异并非由单一色素分子主导，而是壳基质蛋白、糖类组分、能量代谢网络及信号通路调控等多因素共同作用的结

果, 形成了复杂的分子调控网络[3]。

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*), 简称蛤仔, 作为我国沿海滩涂养殖产业中的支柱性经济贝类, 在黄渤海、东海及南海沿岸均有广泛分布, 具有生长速率快、适应能力强、养殖效益显著等优势。该物种外壳普遍呈现黑白相间、界限清晰的典型色泽特征, 且同一壳体不同颜色区域的遗传背景一致, 为解析贝类壳色形成的分子机制提供了理想的天然研究模型[4]。目前, 学界针对蛤仔的研究多聚焦于生长性能调控、环境胁迫响应(如盐度、温度、重金属胁迫)及群体遗传多样性等领域, 积累了较为丰富的基础数据, 而针对同一壳体不同颜色区域的分子水平差异, 尤其是蛋白层面的系统性比较研究仍较为匮乏, 制约了对其壳色调控机制的深入解析[5]。

贝类壳体的化学组成以碳酸钙晶体为主, 辅以少量有机基质(占比通常不足 5%), 尽管有机基质含量较低, 但其作为矿化过程的“分子模板”, 在碳酸钙晶体的成核、生长取向调控、矿化速率调节以及色素分子的锚定与结合中发挥着不可替代的关键作用[6]。其中, 壳基质蛋白、糖胺聚糖及糖蛋白等生物大分子可通过提供特异性结合位点, 调控色素分子在壳体中的分布模式与富集程度, 进而影响壳色表型[7]。此外, 色素的合成与沉积过程高度依赖细胞代谢状态的调控, 尤其是能量代谢通路的支撑: 线粒体氧化磷酸化通路作为细胞能量代谢的核心, 为壳基质蛋白的合成、转运及色素分子的沉积过程提供能量支撑; 而 mTOR 信号通路则通过精准感知细胞能量状态与营养水平, 对壳体形成相关基因的表达及蛋白合成过程进行动态调控[8] [9]。

随着高通量组学技术的飞速发展, 定量蛋白质组学已成为解析贝类壳体形成及色素调控分子机制的核心技术手段。相较于转录组学仅能反映基因转录水平的差异, 蛋白质组学可直接对应功能分子的表达丰度、修饰状态及相互作用关系, 更贴合壳形成这一动态生理过程的研究需求, 能够精准鉴定参与壳体结构构建、色素代谢及矿化调控的结构蛋白、功能酶类及代谢调控蛋白[10]。目前, 在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)、马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)等贝类中, 已有多种与壳体矿化、色素沉积及基质合成相关的功能蛋白被成功鉴定, 为揭示贝类壳色形成的分子基础提供了重要参考[11] [12]。然而, 针对同一贝类壳体不同颜色区域的蛋白组学系统比较研究仍较为有限, 尚未明确调控同一壳体色泽分化的核心蛋白及分子通路, 文蛤(*Meretrix meretrix*)中相关研究虽有涉及, 但针对蛤仔的专项研究仍存在空白[13]。

因此, 本研究以蛤仔同一壳体的黑色与白色区域为研究对象, 采用 DIA (Data independent acquisition) 定量蛋白质组学技术, 系统比较不同壳色区域的蛋白表达谱差异。通过 GO 和 KEGG 通路富集分析, 重点聚焦氧化磷酸化、溶酶体代谢、细胞外基质相互作用及糖胺聚糖生物合成等与壳体矿化及色素沉积密切相关的代谢通路, 旨在阐明蛤仔壳色表型差异的核心分子调控机制, 筛选调控壳色形成的关键功能蛋白。本研究结果不仅能够丰富贝类壳色形成分子机制的理论体系, 深化对贝类矿化与色素代谢协同调控机制的理解, 同时也可对蛤仔优良壳色性状的定向分子育种、养殖品系改良及种质资源创新提供重要的理论支撑与技术参考[14]。

2. 材料与方法

2.1. 样品采集与处理

实验用蛤仔采自辽宁省葫芦岛市兴城海区, 健康状况良好, 平均壳长为 3.0 ± 0.5 cm, 选取 200 枚蛤仔, 放置于 50 L 容积的平底养殖槽中, 20°C 充氧海水中暂养两周, 待蛤仔适应环境、生理状态稳定后, 适应养殖环境后开始实验。暂养期间每 12 h 更换一次海水, 并投喂小球藻饵料。实验所用海水来自大连市黑石礁海区, 海水盐度为 31 ± 1.0 , pH 值为 8.15 ± 0.10 , 温度为 $18^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 经沉淀、砂滤后贮存备用。

挑选 5 只健康的蛤仔记做组织解剖取样, 用解剖工具解剖, 取黑壳(B)与白壳(W)对应区域外套膜组

织(图 1), 利用液氮对样本进行速冻, 随后储存于 -80°C 超低温冰箱, 用于样品制备。



Figure 1. Sampling diagram
图 1. 取样示意图

2.2. 样品制备

2.2.1. 蛋白质提取

取蛤仔壳体黑色、白色区域外套膜组织样品各 50~100 mg, 迅速置于预冷的研钵中, 加入适量液氮充分研磨至均匀粉末状, 期间持续补充液氮以维持低温环境, 防止蛋白质降解。将研磨后的样品粉末快速转移至 1.5 mL 无菌 EP 管中, 按照料液比 1:5~1:10 (m/v) 加入预冷的 SDT 裂解液(含 4% SDS、100 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L DTT, pH 7.6), 涡旋振荡 30 s 使样品与裂解液充分混匀。

将 EP 管置于沸水浴锅中, 恒温沸水浴 3 min, 使蛋白质充分变性并终止内源性蛋白酶活性, 取出后立即置于冰浴中冷却至室温。随后采用超声波破碎仪进行超声处理, 设定参数为: 功率 200~300 W, 脉冲模式(超声 3 s, 间隔 5 s), 全程冰浴条件下超声 2 min, 进一步破碎细胞结构, 促进蛋白质充分释放, 避免超声产热导致蛋白质变性。

超声处理后, 将 EP 管放入高速冷冻离心机, 于 4°C 、16,000 g 条件下离心 20 min, 离心前确保样品管平衡以避免离心失衡。离心结束后, 用无菌枪头缓慢吸取上清液至新的预冷 EP 管中, 避免吸入底部沉淀(细胞碎片、杂质及未裂解组织); 若上清液仍存在浑浊, 可重复离心一次以提高样品纯度。

采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定上清液中蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准品绘制标准曲线, 根据标准曲线计算各样品的蛋白质浓度, 确保蛋白质浓度满足后续实验需求(一般控制在 $1\sim 5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$)。取适量蛋白样品, 加入 $5\times$ 上样缓冲液, 沸水浴 5 min 进行变性处理, 通过 12% SDS-PAGE 凝胶电泳验证蛋白质提取完整性及纯度, 电泳结束后经考马斯亮蓝 R-250 染色、脱色, 观察蛋白条带清晰度与分布情况, 合格样品置于 -80°C 冰箱中保存备用, 用于后续定量蛋白质组学分析。

2.2.2. 蛋白质酶解

每例样品取适量蛋白分别进行 FASP 酶解, 步骤如下: 每例样品中分别加 DTT 至 100 mM, 沸水浴 5 min, 冷却至室温。加入 200 μL UA buffer (8M Urea, 150 mM Tris-HCl, pH 8.0)混匀, 转入 10 KD 超滤离心管, 离心 12,000 g 15 min。加入 200 μL UA buffer 离心 12,000 g 15 min, 弃滤液。加入 100 μL IAA (50 mM IAA in UA), 600 rpm 振荡 1 min, 避光室温 30 min, 离心 12,000 g 10 min。加入 100 μL UA buffer, 离心 12,000 g 10 min 重复 2 次。加入 100 μL NH_4HCO_3 buffer, 离心 14,000 g 10 min 重复 2 次。加入 40 μL Trypsin buffer (6 μg Trypsin in 40 μL NH_4HCO_3 buffer), 600 rpm 振荡 1 min, 37°C 16~18 h。换新收集

管, 离心 12,000 g 10 min, 收集滤液, 酶解后的肽段使用 C18 Cartridge 脱盐, 真空冻干。脱盐后的肽段干燥后用 0.1% FA 复溶, 并对肽段浓度进行测定, 以备 LC-MS 分析。

2.3. DIA 质谱数据分析

2.3.1. DIA 质谱数据采集

每例样品取适量肽段, 使用 Vanquish Neo UHPLC system, operated Neo UHPLC 色谱系统(Thermo Scientific)进行色谱分离。缓冲液: A 液为 0.1%甲酸水溶液, B 液为 0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为 80%)。色谱柱以 96%的 A 液平衡。样品首先进入捕集柱(Trap Column, PepMap Neo 5 μm C18, 300 μm \times 5 mm, Thermo Scientific)进行脱盐与富集, 随后转移到分析柱($\mu\text{PAC}^{\text{TM}}$ Neo High-Throughput 色谱柱, Thermo Scientific)进行梯度分离。液相梯度设置如下: 0 min~0.1 min, B 液线性梯度从 4%~6%; 0.1 min~1.2 min, B 液线性梯度从 6%~12%; 1.2 min~3 min, B 液线性梯度从 12%~22.5%; 3 min~5 min, B 液线性梯度从 22.5%~45%; 5 min~5.2 min, B 液线性梯度从 45%~99%; 5.2 min~6 min, B 液维持在 99%。肽段分离后用 Orbitrap Astral 质谱仪(Thermo Scientific)进行 DIA (数据非依赖采集)质谱分析[15]。分析时长为 6 min, 电喷雾电压 2.2 kV, 检测模式: 正离子, 母离子扫描范围: 380~980 m/z, 一级质谱分辨率: 240,000, AGC target: 500%, 一级 Maximum IT: 3 ms。二级质谱分辨率: 80,000, AGC target: 500%, 二级 Maximum IT: 3 ms, RF-lens: 40%, MS2 Activation Type: HCD, Isolation window: 2 Th, Normalized collision energy: 25%, cycle time: 0.6 [15] [16]。

2.3.2. DIA 质谱数据检索

通过软件 DIA-NN 合并所有质谱数据, 完成 DIA 质谱数据的数据库检索及蛋白 DIA 定量分析[17]。数据库为 NCBI-Ruditapes philippinarum [129788]-78947-251118.fasta, 来源于网址 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/129788> [18]。

2.4. 数据分析及生物信息学分析

2.4.1. 蛋白质筛选

为了保证后续生信与统计学分析的有效性、准确性, 根据通用的原则, 我们首先筛选样本实验数据, 确保鉴定的蛋白对应的样品组别中至少保留 50%以上无空值数据, 然后对剩余的空值进行数据填充, 然后进行统计分析, 其中符合表达差异倍数大于 1.5 倍(上下调)且 P-value 小于 0.05 筛选标准的蛋白质视为显著性差异表达蛋白质。

2.4.2. 质量控制与主成分分析(PCA)

为保障质谱数据及后续分析结果的可靠性, 采用统计学方法对数据进行系统性质量控制(QC), 核心流程如下: 实验通过高质量精度、高分辨率质谱仪采集数据, 控制肽段质量误差阈值为 ± 10 ppm; 采集完成后用 Proteome Discoverer 软件搜库, 设定 Peptide FDR ≤ 0.01 、Protein FDR ≤ 0.01 以过滤假阳性结果, 确保定量准确性[19]。

同时统计鉴定肽段数、蛋白质数及肽段覆盖率。稳定性评估采用双重方式: 计算样本间蛋白质表达量相关系数及相对标准偏差(RSD)分析重现性, 同时通过主成分分析(PCA)进一步验证, 利用 R 软件对质控后数据进行 PCA 降维。经上述流程筛选后的高质量数据, 用于后续蛋白质表达差异及通路富集分析。

2.4.3. 差异蛋白筛选

蛋白质显著性差异分析以 P 值(P.value)结合差异倍数(FC, Fold Change)作为筛选标准。设定筛选阈值为 P.value < 0.05 , 且 FC ≥ 1.5 或 FC $\leq 1/1.5$, 据此筛选获得显著差异蛋白[20]。

2.4.4. 富集分析

筛选获得的显著差异蛋白,采用 R 软件进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析,探究差异蛋白的生物学功能及参与的核心代谢通路。

GO 功能富集分析将差异蛋白归类至分子功能(MF)、细胞组分(CC)及生物过程(BP)三个维度,采用 FDR 校正法控制假阳性,设定 $FDR < 0.05$ 为阈值,筛选具有统计学意义的显著富集 GO 条目[21]。

KEGG 通路富集分析以物种特异性数据库为参考,定位差异蛋白参与的信号通路及代谢途径,同样采用 FDR 校正,以 $FDR < 0.05$ 为标准,筛选显著富集的通路,结合通路功能注释,挖掘与蛤仔壳色形成相关的核心通路[22]。

3. 结果

3.1. 蛋白质鉴定结果

DIA 蛋白质定性定量结果数据统计,将项目中每个样品独立进行样品制备,蛋白质酶解后分别上机进行 DIA 质谱检测。所得的 DIA 原始质谱文件,导入 DIA-NN 进行 DIA 分析,使用 $Qvalue \leq 0.01$ 为筛选参数,本次实验最终得到的蛋白和肽段统计信息见表 1。

Table 1. DIA protein identification results summary

表 1. DIA 蛋白质鉴定结果统计

样品组别	样品名	蛋白组数目	唯一性肽段
B	B1	8067	45,656
	B2	8289	46,366
	B3	8508	48,723
	B4	8094	45,700
	B5	8258	46,929
	B-Total	9564	58,345
W	W1	8698	48,283
	W2	8744	49,806
	W3	8635	48,909
	W4	8665	49,525
	W5	8568	47,612
	W-Total	9726	59,291
Total		9876	60,677

3.2. 蛋白质组数据质量

为评估蛋白质组数据的整体质量及鉴定特征,本研究对肽段长度分布、蛋白对应的 unique 肽段数量、蛋白分子量与等电点分布及蛋白覆盖度进行了统计分析(图 2(a)~(d)),结果显示所获数据质量优良,可满足后续分析需求。其中,肽段长度分布结果表明,大多数鉴定肽段长度集中在 8~16 个氨基酸之间,峰值位于 10~12 个氨基酸(图 2(a)),符合胰蛋白酶酶切及 LC-MS/MS 分析的典型肽段长度特征,提示酶切效率良好且质谱检测稳定,而较长肽段(>20 aa)数量较少,进一步印证了样品处理与数据采集过程的可靠性;蛋白分子量与等电点统计结果显示,鉴定蛋白分子量主要集中在 10~100 kDa 范围内,等电点以 pI 5~9 区间为主且分布广泛(图 2(b)),蛋白对应的 unique 肽段数量分布显示,大部分蛋白由 1~3 条 unique 肽段支

持鉴定,且 2 条及以上 unique 肽段鉴定的蛋白占比较高(图 2(c)),既表明蛋白鉴定结果可信度高,也反映样品中同时存在高丰度与一定数量的低丰度蛋白,为后续差异蛋白分析奠定了良好基础;符合贝类组织蛋白质的一般理化特征,说明鉴定蛋白覆盖多种理化性质与功能类型,无明显偏向性;蛋白覆盖度分析则显示,约 38%的蛋白覆盖度处于 10%~30%区间,11%的蛋白覆盖度达 30%~50%,另有少量蛋白覆盖度超过 50% (图 2(d)),虽部分蛋白覆盖度偏低,但整体分布合理,契合复杂生物样品蛋白质组分析的常见特征,体现了数据良好的深度与可靠性。

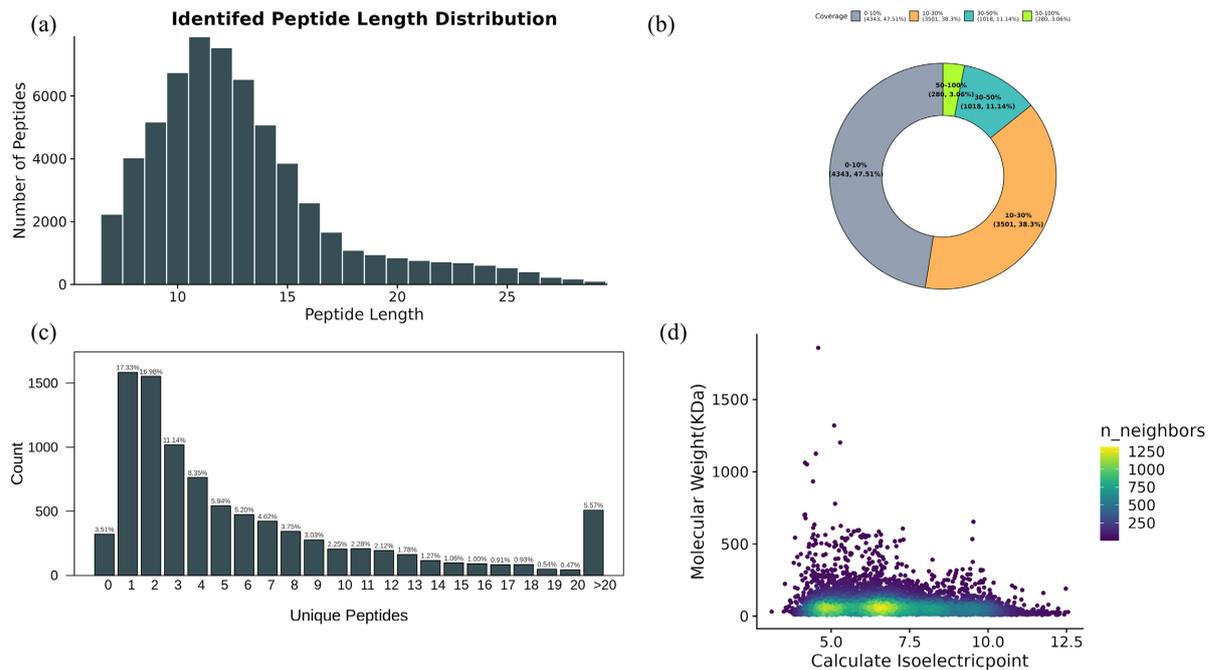


Figure 2. Quality assessment and identification feature distribution of proteomic data (a) Peptide length distribution; (b) Protein molecular weight versus isoelectric point distribution; (c) Unique peptide count distribution; (d) Protein coverage distribution

图 2. 蛋白质组学数据质量评估与鉴定特征分布分析(a) 肽段长度分布图; (b) 蛋白分子量与等电点分布图; (c) unique 肽段数量分布图; (d) 蛋白覆盖度分布图

基于蛋白质表达谱数据的主成分分析(PCA)结果如图 3 所示,清晰揭示了 B 组与 W 组样本间的整体蛋白质表达差异及组内重复性特征。第一主成分(PC1)可解释 26.10%的总变异,是区分两组样本的核心维度;第二主成分(PC2)解释了 14.26%的总变异,主要反映组内样本的离散程度。从 PCA 二维得分图的空间分布特征来看,两组样本呈现显著的组间分离与良好的组内聚集特性: B 组样本(蓝色)集中分布于 PC1 轴负值区域, W 组样本(红色)则聚集于 PC1 轴正值区域,两组置信椭圆在 PC1 方向上无重叠,表明 B 组与 W 组在蛋白质表达谱上存在明确的系统性差异;而各组内样本在二维空间中聚集度较高,其中 B 组样本分布更为紧凑,提示组内生物学重复一致性优良,实验数据稳定性可靠。

3.3. 差异表达蛋白质分析

蛤仔黑壳区域(B 组)与白壳区域(W 组)对应的外套膜组织蛋白质组数据进行差异表达分析,结合火山图可视化呈现(图 4),共筛选获得 1500 个显著差异表达蛋白。从火山图可见,差异蛋白沿表达倍数轴呈明显不对称分布,其中 383 个为显著上调蛋白(红色散点),此类蛋白在黑壳区域对应外套膜组织中的表达水平显著高于白壳区域;1117 个为显著下调蛋白(蓝色散点),对应蛋白在黑壳区域外套膜组织中的表达

水平显著低于白壳区域。量化分析显示，显著下调蛋白数量约为上调蛋白的 2.9 倍，提示同一蛤仔不同壳色区域外套膜组织的蛋白表达调控网络中，蛋白表达抑制现象较表达激活现象更为普遍，这一表达差异特征可能是驱动其壳体黑白区域色泽分化的重要分子基础。

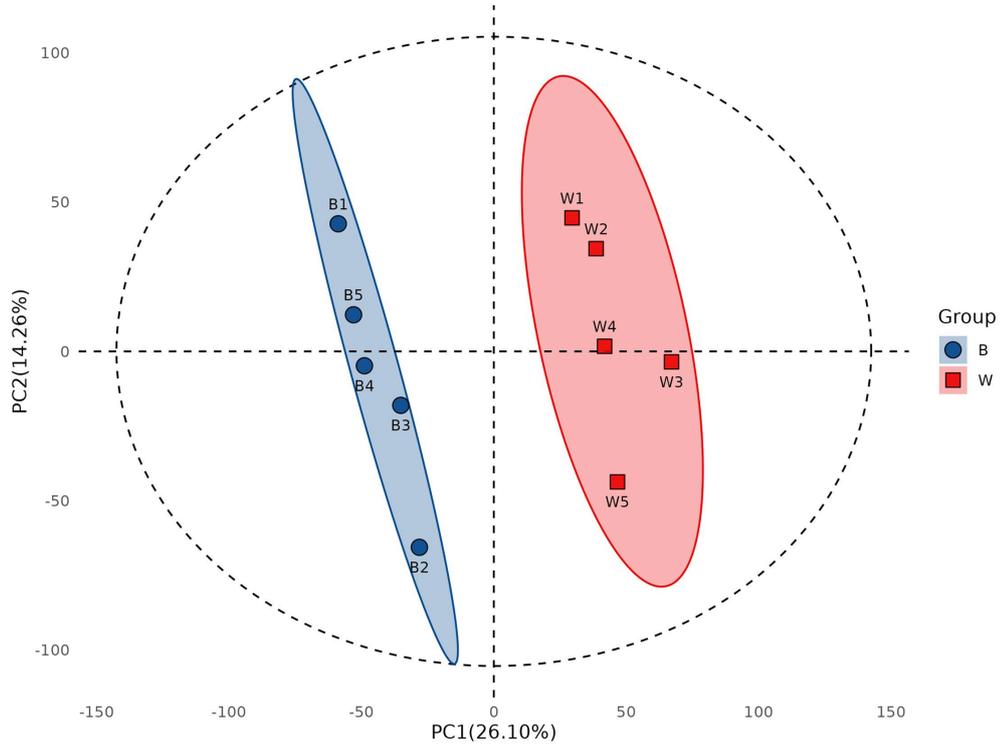


Figure 3. Principal component analysis (PCA) reveals global protein expression differences and intra-group reproducibility between mantle samples of black shell (B) and white shell (W)

图 3. 主成分分析(PCA)揭示黑壳(B)与白壳(W)外套膜样本间整体蛋白质表达差异及组内重复性特征

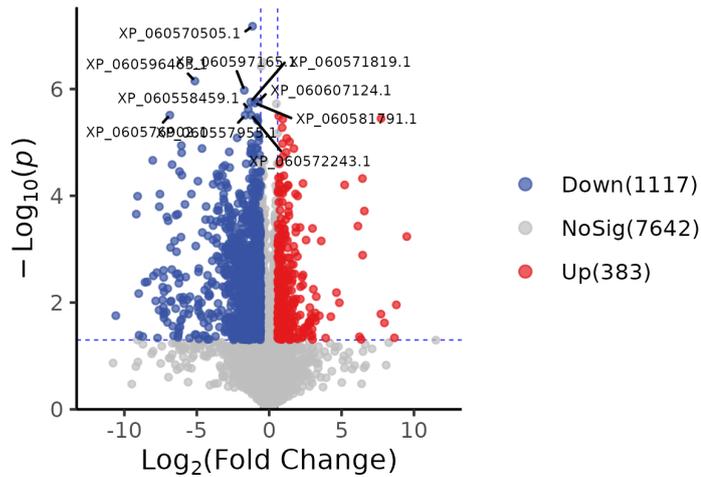


Figure 4. Volcano plot of differentially expressed proteins between the B and W groups. Compared with the white shell (W), 1117 proteins were significantly downregulated (blue) and 383 proteins were significantly upregulated (red) in the black shell (B) samples, while 7642 proteins showed no significant change (gray)

图 4. B vs. W 比较组差异表达蛋白火山图。图中显示，与白壳(W)相比，黑壳(B)样本中 1117 个蛋白显著下调(蓝色)，383 个蛋白显著上调(红色)，另有 7642 个蛋白未发生显著变化(灰色)

3.4. 功能富集分析

3.4.1. GO 功能富集分析

蛤仔同一壳体黑壳区域(B组)与白壳区域(W组)外套膜组织的显著差异蛋白进行GO功能富集分析,结果显示两组在生物过程、分子功能及细胞组分三大维度均存在明显功能分化,差异蛋白功能覆盖广泛,为解析壳色分化的分子机制提供了重要线索(图5)。在生物过程(Biological Process, BP)层面,差异蛋白主要富集于代谢过程(metabolic process)、细胞过程(cellular process)、定位过程(localization)及发育过程(developmental process)等核心生理活动,同时在运动过程(locomotion)、多细胞个体过程(multicellular organismal process)、稳态过程(homeostatic process)中也有显著富集,且涉及生物过程的正向与负向调控(positive/negative regulation of biological process)、对刺激的反应(response to stimulus)、解毒过程(detoxification)及免疫系统过程(immune system process)等调控与防御相关条目,提示壳色差异的形成可能与外套膜组织的代谢调控、环境响应及生理稳态维持密切相关。在分子功能(Molecular Function, MF)层面,差异蛋白以结合活性(binding activity)和催化活性(catalytic activity)为核心富集类型,同时涵盖转运蛋白活性(transporter activity)、ATP依赖性活性(ATP-dependent activity)、电子传递活性(electron transfer activity)及抗氧化活性(antioxidant activity)等能量代谢与物质转运相关活性,此外还涉及细胞骨架马达活性(cytoskeletal motor activity)、分子伴侣蛋白折叠活性(protein folding chaperone activity),以及转录调控活性(transcription regulator activity)、翻译调控活性(translation regulator activity),表明差异蛋白通过多样的分子功能参与壳色形成相关的物质合成、能量供给及基因表达调控。在细胞组分(Cellular Component, CC)层面,差异蛋白主要定位于细胞结构实体(cellular anatomical entity)及蛋白质复合体(protein-containing complex),提示这些差异蛋白多通过形成功能复合体或作用于特定细胞结构,发挥其参与壳色调控的生物学功能。总体而言,GO富集结果表明,黑白壳区域差异蛋白在细胞功能执行、代谢活动调控及结构组成等方面呈现广泛的功能分布特征,其功能多样性可能是驱动蛤仔壳体黑白区域色泽分化的重要分子基础。

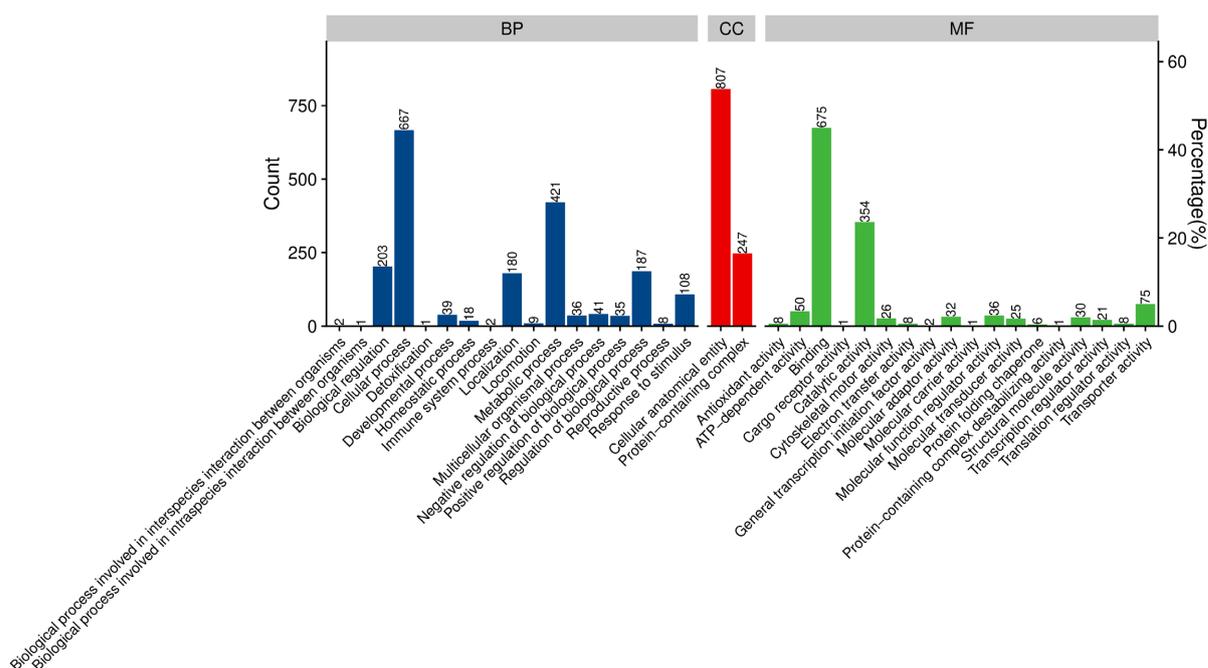


Figure 5. GO annotation enrichment map of differentially expressed genes

图5. 差异表达蛋白质GO注释富集图

3.4.2. KEGG 功能富集分析

蛤仔外套膜组织的显著差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示差异蛋白广泛参与多个代谢通路、信号通路及生理过程, 为揭示壳色分化的分子调控网络提供了关键依据(图 6)。其中, 能量代谢与物质转运降解相关通路尤为突出, 包括氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)、嘌呤代谢(Purine metabolism)、谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)、糖胺聚糖降解(Glycosaminoglycan degradation)及其他聚糖降解(Other glycan degradation), 提示能量供给效率与物质代谢差异可能是驱动壳色分化的重要因素; 细胞转运与加工相关通路涵盖囊泡运输中 SNARE 相互作用(SNARE interactions in vesicular transport)、内吞作用(Endocytosis)、吞噬体(Phagosome)、溶酶体(Lysosome)及内质网蛋白加工(Protein processing in endoplasmic reticulum), 反映两组外套膜组织在蛋白转运、降解及加工修饰方面存在显著差异, 可能影响壳基质蛋白的合成与沉积。信号调控及合成相关通路包括 mTOR 信号通路(mTOR signaling pathway)、细胞外基质受体相互作用(ECM-receptor interaction)、糖胺聚糖生物合成 - 硫酸软骨素/硫酸皮肤素(Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate/dermatan sulfate)、鞘糖脂生物合成 - 神经节苷脂系列(Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series), 这些通路直接参与壳形成相关的信号传导与生物大分子合成, 可能通过调控壳基质组成影响壳色表型。此外, 差异蛋白还富集于核糖体(Ribosome)、剪接体(Spliceosome)、泛素介导的蛋白水解(Ubiquitin mediated proteolysis)、mRNA 监视通路(mRNA surveillance pathway)等基因表达与蛋白调控通路, 以及药物代谢 - 细胞色素 P450 (Drug metabolism - cytochrome P450)、药物代谢 - 其他酶(Drug metabolism - other enzymes)等解毒代谢通路, 表明壳色差异的形成是多通路协同调控的结果, 涉及能量供给、物质合成、信号传导及代谢调控等多个层面的复杂相互作用。

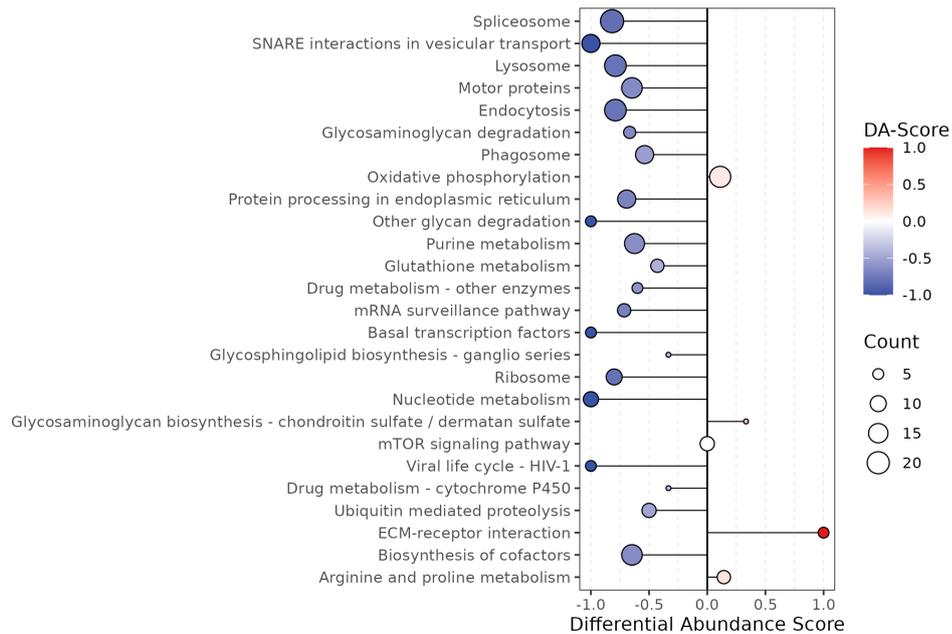


Figure 6. KEGG annotation enrichment map of differentially expressed genes

图 6. 差异表达蛋白质 KEGG 注释富集图

4. 讨论

4.1. 溶酶体通路关键差异蛋白对蛤仔壳色形成的调控

溶酶体(Lysosome)通路中显著富集的关键差异蛋白主要为 CTSL (组织蛋白酶 L, cathepsin L)与 CTSS

(组织蛋白酶 S, cathepsin S), 二者均隶属于半胱氨酸蛋白酶家族(Cathepsins)蛋白。这类蛋白在细胞内蛋白降解、基质更新及膜性结构重塑过程中发挥核心调控作用[23][24]。溶酶体系统不仅参与细胞内物质的降解与循环再利用, 其功能状态还与贝类壳基质的代谢平衡密切相关, 而壳基质蛋白的动态调控正是壳色形成的重要环节[25]。在本研究蛋白质组学分析中, 黑壳区域相较于白壳区域, CTSL 蛋白显著下调(表达倍数 $FC = -4.20$), CTSS 蛋白亦呈现一定程度下调($FC = -1.51$), 提示两组外套膜组织中溶酶体通路活性整体减弱。结合生物矿化速率差异推测, 溶酶体通路活性减弱可能导致壳基质蛋白的降解速率降低, 进而影响壳体矿化进程: 白壳区域外套膜组织中溶酶体通路活性相对较高, 壳基质蛋白更新周转加快, 支撑壳体快速矿化, 快速形成的壳体无机相结构可能掩盖了色素分子, 使得白壳表型得以呈现; 而黑壳区域溶酶体通路活性受抑, 壳基质蛋白降解减缓, 导致壳体矿化速率下降, 矿化过程中色素分子未被快速形成的壳体结构掩盖, 得以在壳体中稳定沉积, 进而通过影响壳体结构完整性及色素显现效率, 参与壳色表型分化。

已有研究证实, CTSL 蛋白在多种生物的生物矿化过程中具有重要作用。例如, 在马氏珠母贝(*P. fucata*)中, CTSL 蛋白的高表达水平与壳体外层有机基质的重塑及碳酸钙晶体生长密切相关[26], 其酶活性的动态调控可直接影响矿化过程中壳基质蛋白的加工修饰与更新周转。类似地, CTSS 蛋白也被证实参与贝类壳体形成过程中有机基质的降解及重构, 是壳基质代谢网络的关键功能蛋白[27]。据此推测, 蛤仔壳色形成过程中, 溶酶体通路相关 Cathepsin 家族蛋白(CTSL, CTSS)的表达下调, 可能导致壳基质蛋白更新周转减缓, 进而影响色素结合位点的形成效率或有机相结构的透明度, 最终造成黑白壳区域的色泽差异。

此外, CTSL 蛋白与能量代谢通路存在潜在调控关联。研究发现, CTSL 蛋白的表达及酶活性在氧化应激条件下易受线粒体代谢状态的调控[28], 而在贝类中, 线粒体介导的能量代谢过程与壳体矿化及壳基质合成密切相关, 可为蛋白合成、色素沉积提供能量支撑[29]。因此, 本研究中 CTSL 蛋白的显著下调, 不仅反映了壳基质降解通路的功能抑制, 还可能与能量代谢水平的改变协同作用, 共同影响壳色形成的动态平衡过程。

4.2. SNARE 通路核心差异蛋白对蛤仔壳色形成的调控

SNARE (可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)通路中多种核心蛋白均呈现显著下调趋势, 包括 Syntaxin 蛋白(K08513, 表达倍数 $FC = -4.10$)、SNAP-25 类蛋白(K08490, $FC = -2.24$)及 VAMP 蛋白(K08495, $FC = -1.85$)。这些蛋白分别对应 Qa-SNARE、Qb/Qc-SNARE 与 R-SNARE 家族成员, 是介导细胞内囊泡与靶膜融合的核心功能元件[30][31]。它们在囊泡运输与膜融合过程中, 通过组装形成四螺旋复合体实现膜间距缩短及脂质双层融合, 这一过程是维持细胞分泌功能及胞外基质转运的关键环节, 直接影响生物大分子的靶向运输效率[32]。因此, SNARE 通路核心蛋白的系统性下调, 提示蛤仔黑白壳区域外套膜组织间的囊泡运输与蛋白分泌活动可能受到显著抑制。

在贝类壳体形成过程中, 囊泡介导的分泌系统承担着核心转运功能, 负责将壳基质蛋白、糖类物质及色素分子精准运输至壳形成前缘的外套膜外侧, 为壳体矿化及色素沉积提供物质基础[25]。已有研究证实, 外套膜细胞可通过高效的 SNARE 复合体介导分泌过程, 调控壳基质的沉积模式及有机和无机界面结构的构建[27]。结合矿化速率差异分析, 白壳区域 SNARE 通路活性相对较高, 囊泡运输与蛋白分泌效率较强, 可快速转运壳基质组分至矿化位点, 支撑壳体快速矿化, 快速形成的无机矿化结构可掩盖色素分子, 呈现白壳表型; 而黑壳区域 SNARE 通路功能受抑, 色素分子及壳基质组分的胞外排泌效率显著下降, 导致壳体矿化速率减慢, 色素分子无需被快速矿化的壳体结构掩盖, 得以在壳体中正常显现, 进

而驱动壳色表型差异的形成[33]。尤其是 Syntaxin 蛋白的显著下调(FC = -4.10), 意味着 Qa-SNARE 介导的膜融合过程受到强烈抑制, 可能造成色素囊泡在细胞内滞留或外排延迟、矿化速率进一步降低, 同时可能造成色素囊泡在细胞内短暂滞留后缓慢释放, 使色素分子能够稳定沉积于矿化较慢的壳体结构中, 直接影响黑色素等关键色素的沉积位置与浓度分布, 最终参与黑白壳色的分化调控。

SNARE 蛋白复合体的功能发挥与能量代谢、膜系统状态密切相关。研究表明, SNARE 蛋白复合体的组装与解离过程依赖 ATP 能量供给及 Ca^{2+} 信号通路调控, 其活性状态受细胞能量代谢水平的直接影响[34]。而在贝类中, 壳体形成过程伴随高度活跃的能量代谢活动, 线粒体氧化磷酸化通路与膜运输过程存在紧密的耦合关系, 可为囊泡运输、蛋白分泌提供充足能量[29]。因此, 本研究中观察到的 SNARE 通路核心蛋白系统性下调, 可能与能量代谢水平降低及溶酶体通路受抑形成协同作用, 共同反映出黑壳区域外套膜细胞分泌功能与物质转运活性的整体减弱, 这一变化或许是蛤仔黑白壳区域在代谢活动与壳基质沉积方面呈现差异的重要分子基础。

4.3. Spliceosome 通路差异蛋白对蛤仔壳色形成的转录后调控作用

剪接体(Spliceosome)通路中富集的差异蛋白几乎全部呈现下调趋势, 且这些蛋白主要集中于剪接体的核心结构及催化模块, 包括 SF3B/U2 复合体(K11097, 表达倍数 FC = -2.51)、PRPF/SF 蛋白(K12858, FC = -2.80)、SF3A 复合体(K12870, FC = -1.60)等。上述蛋白均为剪接体装配、剪接位点识别及催化反应的关键功能因子, 共同构成 mRNA 前体剪接的核心分子基础, 直接调控转录后 RNA 加工的效率与精度[35][36]。因此, 这类蛋白的系统性下调, 提示蛤仔黑、白壳区域外套膜组织在转录后 RNA 加工及成熟水平上存在稳定的功能性差异, 该差异或为壳色表型分化过程中的伴随现象。

真核生物的 mRNA 剪接是基因表达转录后调控的核心环节, 剪接体通过精准识别内含子边界序列, 完成内含子去除与外显子拼接, 最终生成具有功能活性的成熟 mRNA, 为后续蛋白翻译提供模板[37]。这一动态过程中, U1、U2、U4/U6、U5 等小核核糖核蛋白复合体(snRNPs)及其关联蛋白共同组装形成剪接体功能系统[38]。其中, SF3B 复合体(由 SF3B1-6 蛋白组成)作为 U2 snRNP 的核心组分, 可特异性识别 RNA 分支点序列, 对剪接位点的精确定位至关重要, 直接影响 mRNA 剪接的准确性[39]。本研究中 SF3B 复合体的下调, 可能导致 mRNA 剪接精度降低, 引发错剪或可变剪接事件增多, 进而改变关键壳基质蛋白的翻译产物丰度或结构, 间接参与壳色表型分化。

已有研究表明, 剪接调控机制与贝类壳形成过程密切相关。在太平洋牡蛎(*C. gigas*)与马氏珠母贝(*P. fucata*)中, 其转录组研究发现剪接体组分在外套膜与壳形成区显著富集, 提示外套膜细胞可通过活跃的 RNA 剪接机制, 为壳形成所需的大量功能蛋白合成提供保障[25][27]。结合本研究结果推测, 蛤仔黑白壳区域 Spliceosome 通路核心蛋白的系统性下调, 可能导致外套膜细胞的 mRNA 剪接效率下降, 进而降低下游与壳基质形成、色素沉积相关蛋白的翻译效率, 最终驱动壳色差异的形成。

此外, 剪接体蛋白的活性状态与细胞能量代谢、信号转导通路存在紧密调控关联。已有研究证实, mTOR 信号通路及氧化磷酸化通路的活性变化, 可通过调节 SF3B1、PRPF 等剪接体核心蛋白的磷酸化水平, 影响剪接体的组装效率与功能发挥[40][41]。结合本研究中能量代谢通路相关蛋白的同步下调, 推测蛤仔不同壳色区域可能存在“能量代谢、剪接体功能、蛋白翻译”的协同调控模式: 能量代谢水平受限使得剪接体复合体装配效率下降导致功能性 mRNA 生成不足进而对壳色相关功能蛋白合成产生抑制效应, 最终在蛋白质组水平上驱动黑白壳区域的表型分化。

Spliceosome 通路核心蛋白的系统性下调提示, 蛤仔壳色表型的形成不仅受代谢活动与色素沉积的直接调控, 还受到转录后 RNA 加工能力差异的深层影响。该结果从 RNA 加工调控视角, 为解析贝类壳色形成的复杂分子网络提供了新的研究方向, 也进一步印证了壳色分化是多通路、多层次协同调控的结果。

5. 结论

本研究通过对蛤仔黑白壳区域外套膜组织的 DIA 蛋白质组学分析,发现 1500 个显著差异表达蛋白,其中下调蛋白数量远超上调蛋白,表明蛋白表达抑制是壳色分化的主导趋势。差异蛋白主要富集于溶酶体、SNARE 和剪接体三条通路,它们分别通过影响基质蛋白降解、色素分泌和 RNA 剪接来调控壳色形成。本研究揭示了剪接体通路在贝类壳色形成中的重要作用,并完善了其与能量代谢的耦合调控网络,为蛤仔壳色育种提供了重要靶点和理论依据。

基金项目

山东省重点研发计划(农业良种工程)(2023LZGCQY001); 国家贝类产业技术体系专项(CARS-49); 辽宁省科技重大专项(种质创新工程)(2024JH1/11700010); 辽宁省渔业补贴专项(2024, 2025); 辽宁省科技厅, 辽宁省科技计划联合计划(技术攻关计划项目)(2024JH2/102600078)。

参考文献

- [1] Marin, F., Luquet, G., Marie, B. and Medakovic, D. (2008) Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. In: *Current Topics in Developmental Biology*, Elsevier, 209-276. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(07\)80006-8](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(07)80006-8)
- [2] Addadi, L. and Weiner, S. (2014) Biomineralization: Mineral Formation by Organisms. *Annual Review of Biochemistry*, **83**, 439-466.
- [3] Sun, X., Liu, Z., Zhou, L., Wu, B., Dong, Y. and Yang, A. (2016) Integration of Next Generation Sequencing and EPR Analysis to Uncover Molecular Mechanism Underlying Shell Color Variation in Scallops. *PLOS ONE*, **11**, e0161876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161876>
- [4] Song, X., Li, L., Zhang, G. and Guo, X. (2020) Transcriptomic and Proteomic Insights into Shell Color Formation in the Clam *Ruditapes philippinarum*. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 17421.
- [5] Chen, J., Huang, J., Zeng, Q., Xu, L. and Zhang, C. (2021) Comparative Transcriptome Analysis Reveals Potential Genes Involved in Shell Color Formation in *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture Research*, **52**, 1135-1148.
- [6] Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., *et al.* (2009) An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation. *Science*, **325**, 1388-1390. <https://doi.org/10.1126/science.1173793>
- [7] Mann, K. and Jackson, D.J. (2014) Characterization of Mollusc Shell Matrix Proteins by Quantitative Proteomics. *Proteomics*, **14**, 2545-2556.
- [8] Zhang, C., Xie, L. and Zhang, R. (2020) Energy Metabolism and Shell Formation in Mollusks: Molecular Insights and Applications. *Frontiers in Physiology*, **11**, Article 1040.
- [9] Pu, J., Li, C., Chen, J., Li, Y. and Zhang, G. (2021) mTOR Signaling Pathway Regulates Shell Biomineralization in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Frontiers in Marine Science*, **8**, Article 674229.
- [10] Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L. and Zhang, L. (2019) Lysosomal Activity and Shell Matrix Remodeling in Mollusk Biomineralization. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 5751.
- [11] Kinoshita, S., Wang, N., Inoue, H. and Maeyama, K. (2021) Proteomic Analysis of Shell Matrix Proteins from the Japanese Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology*, **23**, 381-393.
- [12] Liu, X., He, M., Huang, H. and Zhang, L. (2018) Identification of Shell Matrix Proteins Related to Shell Color in the Scallop *Chlamys nobilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **25**, 12-21.
- [13] Wang, X., Li, Y., Guo, H., Chen, J. and Li, C. (2022) Quantitative Proteomic Analysis Reveals Key Proteins Involved in Shell Color Differentiation in *Meretrix meretrix*. *Journal of Proteomics*, **260**, Article 104549.
- [14] Li, Y., Song, X., Chen, J., and Zhang, C. (2024) Proteomic Insights into Shell Pigmentation Mechanisms in Bivalves. *Marine Biotechnology*, **26**, 99-113.
- [15] Cox, J. and Mann, M. (2008) MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized p.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification. *Nature Biotechnology*, **26**, 1367-1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- [16] Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V. and Mann, M. (2011) Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *Journal of Proteome Research*, **10**, 1794-1805.

- <https://doi.org/10.1021/pr101065j>
- [17] Parker, S.J., Rost, H., Rosenberger, G., Collins, B.C., Malmström, L., Amodei, D., *et al.* (2015) Identification of a Set of Conserved Eukaryotic Internal Retention Time Standards for Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, **14**, 2800-2813. <https://doi.org/10.1074/mcp.o114.042267>
- [18] Martinez-Val, A., Bekker-Jensen, D.B., Hogrebe, A. and Olsen, J.V. (2021) Data Processing and Analysis for Dia-Based Phosphoproteomics Using Spectronaut. In: *Methods in Molecular Biology*, Springer, 95-107. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1641-3_6
- [19] Vaudel, M., Burkhart, J.M., Sickmann, A., Martens, L. and Zahedi, R.P. (2011) Peptide Identification Quality Control. *Proteomics*, **11**, 2105-2114. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000704>
- [20] Rozanova, S., Uszkoreit, J., Schork, K., Serschnitzki, B., Eisenacher, M., Tönges, L., *et al.* (2023) Quality Control—A Stepchild in Quantitative Proteomics: A Case Study for the Human CSF Proteome. *Biomolecules*, **13**, Article 491. <https://doi.org/10.3390/biom13030491>
- [21] Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., *et al.* (2000) Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, **25**, 25-29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- [22] Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. and Tanabe, M. (2012) KEGG for Integration and Interpretation of Large-Scale Molecular Data Sets. *Nucleic Acids Research*, **40**, D109-D114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
- [23] Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., *et al.* (2012) Cysteine Cathepsins: From Structure, Function and Regulation to New Frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta—Proteins and Proteomics*, **1824**, 68-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
- [24] Reiser, J., Adair, B. and Reinheckel, T. (2010) Specialized Roles for Cysteine Cathepsins in Health and Disease. *Journal of Clinical Investigation*, **120**, 3421-3431. <https://doi.org/10.1172/jci42918>
- [25] Ding, J., Wen, Q., Huo, Z., Nie, H., Qin, Y. and Yan, X. (2021) Identification of Shell-Color-Related MicroRNAs in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Using High-Throughput Sequencing of Small RNA Transcriptomes. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 8044. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86727-9>
- [26] Liu, J., Yang, D., Liu, S., Li, S., Xu, G., Zheng, G., *et al.* (2015) Microarray: A Global Analysis of Biomineralization-Related Gene Expression Profiles during Larval Development in the Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *BMC Genomics*, **16**, Article No. 325. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1524-2>
- [27] Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Belliard, C., Piquemal, D., *et al.* (2012) Different Secretory Repertoires Control the Biomineralization Processes of Prism and Nacre Deposition of the Pearl Oyster Shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 20986-20991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210552109>
- [28] Droga-Mazovec, G., Bojič, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., *et al.* (2008) Cysteine Cathepsins Trigger Caspase-Dependent Cell Death through Cleavage of Bid and Antiapoptotic Bcl-2 Homologues. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 19140-19150. <https://doi.org/10.1074/jbc.m802513200>
- [29] Ivanina, A.V., Falfushynska, H.I., Beniash, E., Piontkivska, H. and Sokolova, I.M. (2017) Biomineralization-Related Specialization of Hemocytes and Mantle Tissues of the Pacific Oysters *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, **220**, 3209-3221. <https://doi.org/10.1242/jeb.160861>
- [30] Jahn, R. and Scheller, R.H. (2006) SNAREs—Engines for Membrane Fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 631-643. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- [31] Südhof, T.C. and Rothman, J.E. (2009) Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science*, **323**, 474-477. <https://doi.org/10.1126/science.1161748>
- [32] Hong, W. (2005) Snares and Traffic. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, **1744**, 120-144. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.03.014>
- [33] Fang, D., Xu, G., Hu, Y., Pan, C., Xie, L. and Zhang, R. (2011) Identification of Novel Genes Involved in Shell Formation in the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology*, **13**, 624-632.
- [34] Rizo, J. and Xu, J. (2015) The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annual Review of Biophysics*, **44**, 339-367. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034057>
- [35] Wahl, M.C., Will, C.L. and Lührmann, R. (2009) The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*, **136**, 701-718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- [36] Will, C.L. and Lührmann, R. (2010) Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**, a003707. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- [37] Matera, A.G. and Wang, Z. (2014) A Day in the Life of the Spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**, 108-121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- [38] Papasaïkas, P. and Valcárcel, J. (2016) The Spliceosome: The Ultimate RNA Chaperone and Sculptor. *Trends in*

-
- Biochemical Sciences*, **41**, 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.11.003>
- [39] Cretu, C., Schmitzová, J., Ponce-Salvatierra, A., Dybkov, O., De Laurentiis, E.I., Sharma, K., *et al.* (2016) Molecular Architecture of SF3b and Structural Consequences of Its Cancer-Related Mutations. *Molecular Cell*, **64**, 307-319. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.036>
- [40] Lee, S.C. and Abdel-Wahab, O. (2016) Therapeutic Targeting of Splicing in Cancer. *Nature Medicine*, **22**, 976-986. <https://doi.org/10.1038/nm.4165>
- [41] Chen, W. and Moore, M.J. (2015) Spliceosomes. *Current Biology*, **25**, R181-R183. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.059>