

# 金乌贼脑和视神经节蛋白质组比较分析

黄福生<sup>1</sup>, 陈海滨<sup>1</sup>, 黄琳<sup>1</sup>, 黄河清<sup>1,2,3</sup>

(1 厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术学系, 2 近海海洋环境科学国家重点实验室, 海洋与环境学院, 3 化学化工学院化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

**摘要** 采用双向凝胶电泳 (2D-PAGE) 技术优化分离金乌贼的脑及视神经节全蛋白质, 并选用肽质量指纹谱 (Peptide mass fingerprinting, PMF) 技术和数据库检索方法对 2D-PAGE 图谱上的部分蛋白质斑点进行鉴定, 初步构建了金乌贼视神经节 (Optic ganglion of *Sepia esculenta*, SEOG) 和脑神经节 (Cerebral ganglion of *Sepia esculenta*, SECG) 部分分子解剖图谱. 用 Melanie 4 Trial 软件分析脑神经节和视神经节蛋白质斑点总数量分别为 682 和 594 个, 其中 SECG 蛋白质斑点数量明显多于 SEOG. 在脑神经节和视神经节中均发现了线粒体苹果酸脱氢酶前体 (Mitochondrial malate dehydrogenase precursor, pre-MDH) 及可溶性 NSF 连接蛋白 (SNAP-type proteins). 此外, 延长因子 (Elongation factor G)、微管蛋白 (Tubulin) 和肌动蛋白 (Actin) 等蛋白质也具有高匹配率. 已鉴定的蛋白质, 多数归属于假定蛋白和结构蛋白类.

**关键词** 金乌贼; 脑神经节; 视神经节; 蛋白质组学; 鉴定

中图分类号 O629.72.Q51

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)10-1980-07

金乌贼 (*Sepia esculenta*, Hoyle) 属软体动物门 (Phylum Mollusca) 头足纲 (Class Cephalopoda) 二鳃亚纲 (Subclass Dibranchia) 乌贼目 (Sepidilea), 俗称墨鱼或乌鱼. 头足类是重要的海洋生物药物资源, 具有大神经节特点, 其神经系统分化程度较高, 易于解剖分离, 适于开展神经科学研究. Hodgkin 和 Huxley<sup>[1]</sup> 在研究乌贼巨大轴突细胞膜上的离子传导过程中发现, 离子可穿梭于神经细胞之间, 并伴随着传递信息的作用, 这一重大发现使他们获得了 1963 年诺贝尔生理学医学奖. 目前, 对头足类药物的研究仍主要集中在对乌贼骨和乌贼墨的研究上, 尤其集中在药理活性以及抗肿瘤药物方面. 头足类动物眼球的视网膜与脊椎动物的不同之处, 在于没有盲点区域. 章鱼和乌贼在光线极弱的海底环境下仍有较好的视觉, 这与其特殊感光系统有关<sup>[2,3]</sup>. 金乌贼的视神经节 (Optic ganglion of *Sepia esculenta*, SEOG) 总体积明显大于脑神经节 (Cerebral ganglion of *Sepia esculenta*, SECG), 体现出大神经节在金乌贼中枢神经系统中的重要地位. 海兔 (*Aplysia*) 中枢神经系统与金乌贼、章鱼极为相似, 具有独立的神经节系统, 并有简单和易分离等特点<sup>[4]</sup>, 但其运动速度却明显慢于金乌贼和章鱼, 其机理尚不清楚. 寻找和比较金乌贼的脑和视神经节全蛋白质组的异同点, 将有助于了解金乌贼、章鱼和海兔运动速度快慢、反应灵敏性和高视觉效果的原因. 蛋白质组学及相关分析技术是揭示这些软体动物神经系统关键蛋白质和差异蛋白质组学的最佳分析技术之一<sup>[4-6]</sup>, 但尚未见详细的报道<sup>[4]</sup>. 至今, 比较蛋白质组学技术一直是筛选差异蛋白质或指示蛋白质的最佳分离与分析技术之一<sup>[7,8]</sup>. 本文采用双向凝胶电泳技术 (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE) 优化分离金乌贼视神经节及脑神经节的全蛋白质组, 并选用 PMF (Peptide mass fingerprinting) 和数据库比对技术鉴定部分蛋白质, 比较两者间的同类蛋白质, 为揭示金乌贼视神经节及脑神经节执行不同生理功能与研究信号传导途径提供科学依据.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

CP-3800 型气相色谱仪 (美国 Varian 公司); REFLEX<sup>TM</sup> II 型基质辅助激光解析离子化飞行时间质

收稿日期: 2009-06-23

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 04776060) 和福建省高校创新团队资金资助.

联系人简介: 黄河清, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事蛋白质结构与功能及蛋白质组学研究. E-mail: hquang@xmu.edu.cn

谱仪(德国 Bruker公司); SCP55H 超速冷冻离心机(日本 Hitachi公司); FREEZONE18型真空旋转蒸发仪(Labconco公司). 载体两性电解质(Amersham公司), pH 3.0~10.0 胰蛋白酶(Promega公司); 基质  $\alpha$ -氰-4-羟肉桂酸(HCCA)及芥子酸(SA, 美国 ICN 生物医学公司); 碘乙酰胺(Sigma公司); 丙稀酰胺、甲叉丙稀酰胺及三羟甲基氨基甲烷(Tris)等试剂均购自上海生工公司.

## 1.2 实验材料

金乌贼捕获于厦门近海海域, 实验前在 20 °C 左右的海水中放养 4 d. 用解剖针在解剖盘上固定金乌贼, 将其迅速解剖后取出其视神经节和脑神经节, 小心去除神经节外部结缔组织, 用预冷双蒸水冲洗, 滤纸吸干多余液体, 在 -80 °C 超低温冰箱中保存备用.

## 1.3 样品制备和蛋白质提取

优化提取金乌贼脑神经节和视神经节全蛋白. 具体实验步骤如下: (1) 将 0.1 g 样品置于 1.5 mL 离心管中, 加入 500  $\mu$ L 裂解液, 戳碎神经节样品. 将破碎样品置于 -20 °C 冰箱中, 速冻成固体; (2) 取出速冻样品于冰上融化, 并重复冻融 2 次之后置于 4 °C 冰箱中过夜. 将样品离心 15 min (4 °C, 12000 r/min), 取其上清液作为裂解样品; (3) 将裂解样品再次超速离心 35 min (0 °C, 100000g). 收集离心管中部的澄清液层的混合蛋白样品, 备用.

## 1.4 蛋白质分离、染色和图像分析

采用 2D-PAGE 技术分离金乌贼脑神经节和视神经节全蛋白. 第一向 (EF-PAGE, pH 5.0~8.0): 每管上样量为 80  $\mu$ g (取 10  $\mu$ L 样品, 用 20  $\mu$ L 裂解液稀释, 静置 30 min 后离心并上样). 电泳程序为: 200 V, 20 min; 300 V, 40 min; 400 V, 20 h. 第二向 (SDS-PAGE, 浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 12%): 以每板 20 mA 恒流电泳至溴酚蓝前沿距胶部下缘 5 mm 时结束电泳<sup>[4]</sup>. 采用银染法染色蛋白质. 选用 GDS 8000pc 型凝胶成像扫描分析系统扫描 SDS-PAGE 蛋白质凝胶层析板, 获取 2D-PAGE 图谱, 并用 Melanie 4.0 双向凝胶电泳图谱分析软件统计蛋白质斑点总数目.

## 1.5 质谱分析与蛋白质鉴定

将乙腈、水及三氟乙酸按 3:7:0.01 (体积比) 配制成溶液. 将基质 DBH 和芥子酸 (SA) 按 1:1 (质量比) 进行预混合. 随后, 将混合基质加入到溶解液中, 直到所配置的基质溶液处于饱和状态为止, 静止溶解 60 min. 取上清基质溶液与待测蛋白质样品按 1:1 (体积比) 均匀混合, 供质谱分析. 质谱分析基本条件: MALDI-TOF 质谱仪的离子解吸电离源为脉冲氮激光 (337 nm), 选用高分辨率反射分析模型, 加速电压控制在 20 kV. 平均每次测定样品的激光脉冲在 120 次左右. 采用外标法标定多肽质谱峰的峰位. 选择鉴定蛋白质斑点的基本要求如下: (1) 待鉴定的蛋白质均为取自 3 块 SDS-PAGE 分离胶板 (不同批次实验) 上的同一斑点的蛋白质, 并组成混合样品, 确保所有待鉴定的蛋白质均属于高重复性且适合进行鉴定的蛋白样品; (2) 对于同一神经节的蛋白质, 如果其表达随时间、空间和其它条件变化产生明显差异, 则不作为候选鉴定的蛋白质. (3) 只鉴定重复性高且分辨率高的部分蛋白质, 对重复性较差的蛋白质不作为候选鉴定的蛋白质, 以提高对已鉴定蛋白质的可信度.

质谱数据检索和蛋白质鉴定参考陈东仕<sup>[6]</sup>和冯丽剑<sup>[9]</sup>等描述的分析方法.

## 1.6 肽质量指纹图谱的分析和数据库检索

数据库查询: 利用 MASCOT 网站提供的检索工具查询. 查询条件如下: 肽质量指纹图中的肽片段质量为 600~3000, 肽片段分子质量最大允许误差为  $\pm 0.2$  Da, 离子类型选择单同位素分子量  $[M+H]^+$ , 酶解漏切位点 1/2 个, 被选择的片段峰信号均应较强, 为基线宽度的 1 倍以上. 在 SWISS-PORT 和 NCBM 数据库中检索 {具体参数设置如下: Taxonomy= all entries; enzyme= trypsin; missed cleavages= 1/2; Peptide tolerance=  $\pm 0.2$  Da /  $\pm 0.5$  Da; fixed modifications= carbamidomethyl (C); variable modifications= oxidation (M); mass values=  $[M+H]^+$ , Monoisotopic}.

# 2 结果与讨论

## 2.1 金乌贼视神经节蛋白质组分离与鉴定

2.1.1 金乌贼视神经节蛋白质组分离 类似海兔中枢神经系统 (Center neural system, CNS) 的特性,

金乌贼 CNS 也含有丰富的脂类物质, 它对蛋白质提取、溶解以及选用 2D-PAGE 技术分离 CNS 全蛋白质时均会产生明显干扰<sup>[4,6]</sup>. 当采用常规丙酮沉淀法去除 SEOG 中大量的脂类时, 由于 SEOG 中总蛋白含量偏少, 去脂过程将造成部分蛋白质损失, 不适合进行 SEOG 蛋白质组提取<sup>[4,6,9]</sup>. 而采用裂解液直接破碎 SEOG 组织的方法, 并同时选用超速离心技术去除脂类物质, 则能有效地提取 SEOG 蛋白质组, 减少 SEOG 蛋白质丢失现象, 是一种有效提取 SEOG 蛋白质组且适合于 2D-PAGE 分离的有效方法, 优于作者前期已建立的微柱层析法及直接裂解法等<sup>[4]</sup>. 此外, 还对样品上样量和载体两性电解质的 pH 范围进行了优化, 结果表明, SEOG 蛋白质组提取液上样量为 80~220 μg 时最佳; 采用载体两性电解质的 pH 范围为 5.0~8.0 比 pH 3.0~9.0 和 pH 4.0~6.0 更有利于 SEOG 蛋白质的分离, 结果见图 1.

从图 1 可以看出, 在凝胶层析板的中间区域, 蛋白质斑点数目相对集中, 表明中性蛋白质种类较多; 而左侧蛋白质斑点的数目少于右侧, 表明弱酸性蛋白质种类少于弱碱性蛋白质, 这些蛋白质斑点分布趋势不同于海兔口腔神经节 (Buccal ganglion BG)<sup>[4,6]</sup>, 但右侧条纹数目偏多, 不利于进行蛋白质鉴定. 通过进一步分析可知, 图 1 所显示的蛋白质分子量由分离胶上端到下端逐步减少, 多数蛋白质亚基分子量位于 25000 和 70000 之间, 超过该范围的蛋白质种类较少. 此外, 图 1 中所显示的各种蛋白质斑点之间的染色深浅和相对面积均存在着差异性较大的特点, 其结果直接反映出 SEOG 蛋白质组由相对含量差异较大的蛋白亚基组成, SEOG 蛋白质组的组成与含量呈复杂化特点.

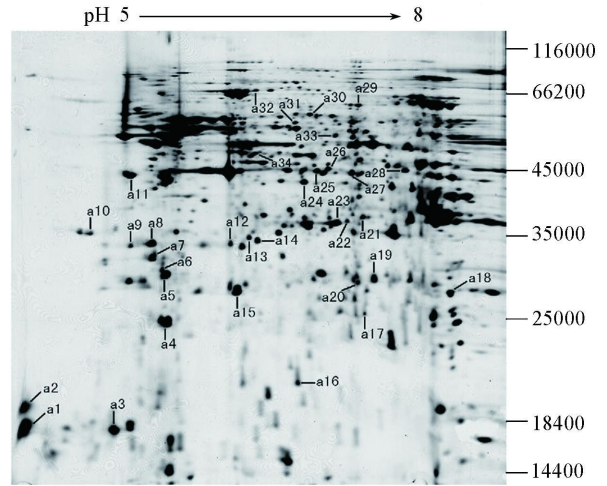


Fig 1 2D-PAGE map of optic ganglion proteome in *Sepia esculenta*

2.1.2 金乌贼视神经节蛋白质组鉴定 PMF 技术已成为蛋白质组学研究中常用的蛋白质鉴定技术之一<sup>[7,8]</sup>. 选用 Investigator HT Database 软件对图 1 进行图谱分析, 可检测到约 594 个的蛋白质斑点数目, 收集其中高重复性的 34 个斑点进行肽质量指纹图谱比较分析, 共获得 34 个鉴定结果, 蛋白质鉴定率为 100%. 由于蛋白胶内酶解的操作步骤复杂, 难以回收全部的酶解肽段, 一些疏水性较强或过长的肽段均可能丢失, 导致覆盖率仅在 20%~50% 之间. 尽管如此, 蛋白质具有很强的序列专一性, 酶解后产生的肽混合物质量数仍具有特征性, 适合于通过肽质量图谱分析, 并结合 2D-PAGE 分离胶板上显示蛋白质所对应的等电点和分子量等理化信息, 对蛋白质进行综合性鉴定和评价. 经过数据库检索, 除去了分值比较低的鉴定结果, 最终鉴定了 SEOG 蛋白质组中高重复性的 34 个蛋白质和多肽, 鉴定结果如表 1 所示. 由表 1 可见, 上述 34 种已鉴定的蛋白质分数均高于 50, 显示出较高的鉴定率和可信度.

Table 1 PMF identification of optic ganglion proteins in *Sepia esculenta*

Spots No	Accession	Score	Rate of sequence covering(%)	Taxonomy	M <sub>w</sub>	pI	Description
a1	gil58001715	51	36	<i>Glucobacter oxydans</i> 621H	19602	5.52	Adenine phosphoribosyltransferase
a2	gil53750955	51	30	<i>Legionella pneumophila</i> str. Paris	21839	5.34	Hypothetical protein
a3	gil46576268	66	12	<i>Helicobacter hepaticus</i>	77315	5.18	Elongation factor G
a4	gil33575717	56	21	<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	25070	6.15	Lipoprotein releasing system ATP-binding protein
a5	gil78101120	55	15	<i>Gallus gallus</i> chicken	31249	5.84	Chain A, Vinculin head (0-258)
a6	gil73997835	60	24	<i>Canis familiaris</i>	19265	6.15	Predicted similar to expressed in non-metastatic cells 1 protein(NM 23A)
a7	gil15140001	67	32	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	28378	5.96	Putative transcriptional regulator protein
a8	gil77386718	65	32	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	29510	5.98	Probable 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase

Continued

Spots No	Accession	Score	Rate of sequence covering(%)	Taxonomy	M <sub>w</sub>	pI	Description
a9	gil46909247	56	23	Lestes congen er	36665	4.91	ATP synthase β subunit
a10	gil55241074	57	32	Anopheles gamb iae str. PEST	36007	6.21	ENSANGP00000011349
a11	gil51977864	55	13	Bacillus cereus E33L	41727	5.48	Probable cysteine desulfurase
a12	gil747850	87	24	Loligo pealei	33704	5.13	SNAP-type protein
a13	gil59712906	59	20	Vibrio fischeri ES114	33781	6.02	Hydrogen peroxide-inducible genes activator
a14	gil20720	51	26	Pisum sativum	28773	6.14	Ferritin-precursor
a15	gil89072703	55	20	Photobacterium sp. SKA34	47309	5.43	Histidyl-tRNA synthetase
a16	gil7620673	60	25	Colinus cristatus	26356	5.46	Gag polyprotein
a17	gil38230910	77	33	Human immunodeficiency virus 1	29394	9.62	Envelope glycoprotein
a18	gil132597	68	26	Phytolacca americana	29410	8.86	Antiviral protein S(PAP-S) (Ribosome-inactivating protein)
a19	gil78494574	53	29	Rhodospseudomonas pakistris BSB18	26184	9.21	ABC transporter related
a20	gil2983903	51	14	Aquifex aeolicus VF5	35103	7.03	Hypothetical protein aq_1526
a21	gil303135351	16	50	Sepia officinalis	24668	6.03	Mitochondrial malate dehydrogenase precursor
a22	gil119478494	60	40	Marine γ proteobacterium HTCC2143	26515	7.79	Hypothetical protein GP2143_11434
a23	gil68139849	68	27	Ferroplasma acidimanus Fer1	39384	6.71	Aspartate/glutamate/uridylyltransferase
a24	gil67934062	59	20	Solibacter usitatus E11n6076	39875	6.31	Metallophosphoesterase
a25	gil6460147	62	31	Deinococcus radiodurans R1	42842	6.64	Hypothetical protein DR_2334
a26	gil50932051	51	18	Oryza sativa(Japonica cultivar-group)	45073	6.52	Putative isovaleryl-CoA dehydrogenase
a27	gil73984956	50	13	Canis familiaris	45958	6.69	Predicted similar to Histone deacetylase 11 (HD11)
a28	gil63849799	50	17	Maize yellow stripe virus	45141	6.86	Hypothetical protein
a29	Q3RJU8_RALME	53	23	Rastonia metallurans( Strain CH 34)	41167	6.56	Glycosyltransferase, family 19( EC 2.4.1.182)
a30	gil84358069	56	13	Burkholderia dobsa AUO158	53570	6.68	COG1236 Predicted exonuclease of the β-lactamase fold
a31	gil37679621	58	21	Vibrio vulnificus YJ016	44047	4.82	Hypothetical protein VV1437
a32	gil91785306	60	13	Burkholderia xenovorans LB400	76327	6.33	Putative molybdopterin oxidoreductase
a33	gil22295362	55	18	Thermosynchooccus elongatus BP-1	52474	6.42	tlr1637
a34	gil214832	51	22	Xenopus laevis	48817	6.40	Thyroid hormone receptor protein

2.2 金乌贼脑神经节蛋白质组分离与鉴定

2.2.1 金乌贼脑神经节蛋白质组分离 头足类的“脑”是无脊椎动物中最复杂的器官。金乌贼脑神经节位于它的两个眼球中间，周围由软骨包围，通过神经连索与各神经节相连。在视神经节蛋白质组分离的基础上，选用 2D-PAGE 技术对 SECG 蛋白质组进行了优化分离，结果如图 2 所示。从图 2 中可以直观地看出，在凝胶层析板的中间区域，蛋白质斑点数目相对集中，表明中性蛋白质种类较多；而右侧蛋白质斑点的数目多于左侧，表明弱酸性蛋白质种类少于弱碱性蛋白质，但右侧条纹数目偏多，不利于进行蛋白质鉴定。图 2 还显示，蛋白质分子量由分离胶的上端到下端逐步减少，多数蛋白质亚基分子量位于 20000 和 116000 之间，超过该范围的蛋白质种类较少。此外，图 2 中所显示的各种蛋白质斑点之间的染色深浅和相对面积均具有较大差异性，表明 SECG 蛋白质组由相对蛋白质含量差异较大的蛋白亚基组成，SECG(图 2)和 SEOG(图 1)蛋白质组的组成与分布均现呈复杂化特征。

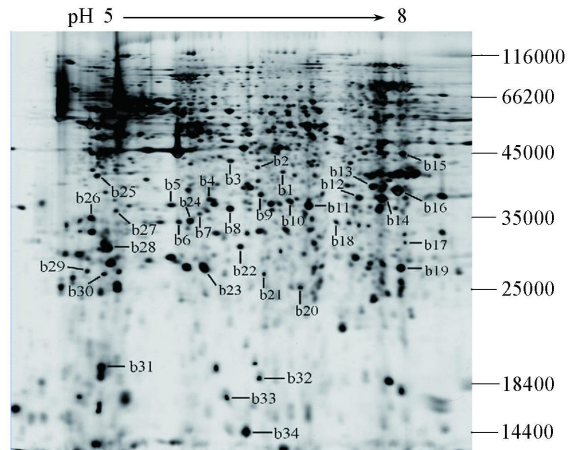


Fig 2 2D-PAGE map of cerebral ganglion proteome in Sepia esculenta

2.2.2 金乌贼脑神经节蛋白质组鉴定 选用 InvestigatorHT Database软件对图 2进行图谱分析,可检测到约 682个蛋白质斑点,选择其中具有高重复性特点的 34个蛋白质斑点进行肽质量指纹图谱分析,获得 34个鉴定结果,鉴定率 100%。比较图 1结果可直观地看出,选取图谱上比较清晰的蛋白质斑点进行 PMF 鉴定和数据库检索,将检索分数大于 50的 PMF 鉴定结果列于表 2

Table 2 PMF identification of cerebral ganglion proteins in *Sepia esculenta*

Spots No	Accession	Score	Rate of sequence covering(%)	Taxonomy	$M_w$	pI	Description
b1	gi186355958	54	30	Rhizobium etli CFN 42	39441	6.56	Hypothetical protein RHE_CH00301
b2	gi137651156	78	19	Octopus vulgaris	44010	5.54	$\beta$ -Tubulin
b3	gi1120556345	51	16	Marinobacter aquaeolei VT8	41778	6.69	Cytochrome c oxidase subunit 1
b4	gi121667237	57	21	Myxine glutinosa	36164	7.70	$\alpha$ -Tubulin 2
b5	gi119857397	54	32	Pseudomonas putida W 619	26653	7.41	Succinate dehydrogenase and fumarate reductase iron-sulfur protein
b6	gi1747850	96	24	Loligo pealei	33704	5.13	SNAP-type protein
b7	gi167463184	51	27	Entamoeba histolytica HM-I MSS	27653	5.56	Conserved hypothetical protein
b8	gi115372192	55	22	Stigmatella aurantia DW 4/3-1	38273	5.71	Aminomethyltransferase, putative
b9	gi183767600	54	26	Aspergillus oryzae	34971	5.88	Unnamed protein product
b10	gi147569251	54	16	Bacillus cereus G9241	33594	7.17	Phosphoesterase
b11	gi156963973	52	12	Bacillus clausii KSM-K 16	48442	6.11	Zn-dependent protease
b12	gi1108880344	63	25	Aedes aegypti	53927	7.03	Conserved hypothetical protein
b13	gi194311037	57	14	Raistrickia metalidians CH 34	49381	8.88	HFK protein
b14	gi130313535	90	51	Sepia officinalis	24668	6.03	Mitochondrial malate dehydrogenase precursor
b15	gi156807484	51	11	Streptococcus pyogenes M 49 591	48950	9.19	COG2113 ABC-type proline/glycine betaine transport systems
b16	gi1134282227	62	30	Burkholderia pseudomallei 305	33885	9.24	Putative ribose ABC transporter periplasmic ribose-binding protein
b17	gi1124515944	52	16	Leptospirillum sp. Group II UBA	38506	8.42	Putative glycosyltransferase
b18	gi189143139	50	33	Pseudochrobactrum saccharolyticum	32416	8.52	Recombinase A
b19	gi148255909	62	29	Homo sapiens	21160	9.97	Basic helix-loop-helix transcription factor 15
b20	gi189211055	68	20	Halobacterium salinarum R1	34797	6.56	Magnesium chelatase, Chl subunit
b21	gi1124506165	51	19	Plasmodium falciparum 3D7	31800	7.03	CDK-activating kinase assembly factor, putative
b22	gi16650826	57	19	Homo sapiens	30084	6.97	PRO2044
b23	gi13182898	81	30	Saccobossus kowalevskii	42198	5.30	Actin-2
b24	gi146906674	58	24	Listeria monocytogenes str 4b F2365	23476	6.32	Hypothetical protein LMO2365_0456
b25	gi133318287	64	16	Tigriopus japonicus	41991	5.30	$\beta$ -Actin
b26	gi113932634	61	28	Caulobacter sp. K31	45665	6.13	Conserved hypothetical protein
b27	gi191212070	54	21	Escherichia coli UT189	41592	6.12	FIRd-NAD(+) reductase
b28	gi1124268267	52	21	Methylbium petrophilum PM 1	33849	6.26	Hypothetical protein Mpe_A3083
b29	gi166045475	72	24	Pseudomonas syringae pv. syringae B728a	40571	6.04	Twine-arginine translocation pathway signal
b30	gi1145507578	60	26	Paramecium tetraurelia	25633	7.77	Hypothetical protein
b31	gi167466968	59	28	Entamoeba histolytica HM-I MSS	24094	5.20	Rab family GTPase
b32	gi11245596	60	51	Human immunodeficiency virus type 1	10208	6.34	Envelope glycoprotein, V1-V2 region
b33	gi1114639858	62	35	Pan troglodytes	17339	9.20	Hypothetical protein
b34	gi1148286636	56	39	Helianthus tuberosus	19072	5.50	NBS-LRR resistance-like protein RGC710

从蛋白质鉴定与匹配率分析可知,在上述 34种蛋白和多肽中,有 4种蛋白质匹配率较高(得分超过 76 见表 2),30种蛋白质匹配率较为理想(得分在 50和 76之间),表明表 2中已鉴定的蛋白质均具有较高的可信度,其中有 SNAP亚型蛋白(SNAP-type protein)、Mitochondrial malate dehydrogenase precursor(线粒体苹果酸脱氢酶前体)、肌动蛋白(Actin-2)和微管蛋白( $\beta$ -Tubulin)。

### 2.3 金乌贼脑和视神经节的蛋白质比较分析

比较图 1和图 2结果可以发现,脑神经节图谱上的蛋白质斑点数相对较多,蛋白质斑点分布更加均匀。用 Melanie 4 Trial软件分析图 1和图 2凝胶电泳图可获悉,图 1的蛋白质总斑点数为 594 而图 2的蛋白点总数为 682 表明脑神经节中含有的蛋白质种类及数量比视神经节多,且表现出较多差异蛋

白质特点, 推测这些差异蛋白质与脑神经节具有执行复杂生理功能有关。

对比表 1 和表 2 结果可见, 共有 68 个检索数据中匹配分数达到显著水平以上 (得分大于 80), 其中与头足类相关的蛋白质斑点共有 4 个: a12(SNAP-type protein, score 87)、a21(Mitochondrial malate dehydrogenase precursor, score 116)、b6(SNAP-type protein, score 96) 和 b14(Mitochondrial malate dehydrogenase precursor, score 90), 其中 a12 与 b6 及 a21 与 b14 是同一类型的蛋白质。

a21 及 b14(Mitochondrial malate dehydrogenase precursor): 从 SEOG 和 SECG 的蛋白质组 (图 1 和图 2) 中均鉴定出与乌贼属 (*Sepia*) 相关的高匹配率蛋白质, 其中为线粒体苹果酸脱氢酶前体 (Mitochondrial malate dehydrogenase precursor, pre-MDH), 相对应的蛋白质斑点为图 1(a21) 和图 2(b14), 定位于细胞浆。苹果酸脱氢酶 (MDH) 是一种高酶活性的同工酶形式, 主要分布于线粒体、过氧化物体、叶绿体、乙醛酸体及细胞浆内。在信号肽的前体蛋白 (pre-MDH) 进入相应细胞器官的过程中, 目标肽段被切除, 随后组装生成包含两个相同亚单位的全酶。已证实, MDH 活性的异常与急性心肌梗塞、病毒性肝炎、恶性肿瘤、创伤性休克、胰腺癌、肾脏疾病和类风湿关节炎等的疾病有关<sup>[10-12]</sup>, 它是适合于作为临床疾病诊断的重要标志性蛋白质之一。

a12 及 b6(SNAP-type protein): 另外一个与头足类相关的高匹配蛋白质是枪乌贼属 (*Loligo*) 的 SNAP-type protein, 它对应的蛋白质斑点位于 a12 和 b6 之间, 定位于细胞浆内, 故 SNAP-type protein 为可溶性 NSF 连接蛋白 (Soluble NSF-attachment proteins, SNAPs), 具有恢复细胞内囊泡转运的能力。SNAPs 已被证实在不同组织和细胞内的多种细胞融合作用中都发挥着重大作用<sup>[13]</sup>, 例如, SNAPs 介导的蛋白质之间的相互作用是神经递质释放所必需的<sup>[14]</sup>, 因而对 SNAPs 的研究也成为中枢神经系统病理学的热点课题之一<sup>[15, 16]</sup>。

从表 1 和表 2 中还检索到匹配分数相对较高的蛋白有 a3 延长因子 G (Elongation factor G, score 66)、a17 包膜糖蛋白 (Envelope glycoprotein, score 77)、b2 微管蛋白 ( $\beta$ -Tubulin, score 78)、b23 肌动蛋白 (Actin-2, score 81) 和一些假定蛋白等, 其中延长因子 (EF) 是肽链延长时所需要的蛋白因子, EF-G 主要存在于原核生物中, 有转位酶活性, 可结合并水解 1 分子 GTP, 促进 mRNA-肽酰-tRNA 由 A 位前移到 P 位, 同时促进卸载 tRNA 释放。包膜糖蛋白、微管蛋白和肌动蛋白都是与结构相关的蛋白。

从表 1 和表 2 中可以看出, 在已鉴定的 68 个酶蛋白类中, 其中假定蛋白和结构蛋白等占绝大多数, 它与头足类相关的高匹配率蛋白质仅有 2 种, 而且表 1 和表 2 大部分蛋白质斑点得分并不是很高, 基本上介于 50~60 之间。在现有各大数据库中, 有关头足类神经系统功能的蛋白质数据和信息相对较少, 例如, 在 NCBI 蛋白质数据库中以 *Sepia* 为关键字检索对象, 只得到 461 个相关条目。所以采用 PMF 技术鉴定头足类蛋白质难以获得较为理想的检索结果。虽然涉及头足类神经系统蛋白质的结构与功能方面的研究甚少, 但通过初步构建的金乌贼视神经节及脑神经节分子解剖图谱, 仍然可以在研究神经系统方面提供一些重要信息, 尤其为后续研究关键蛋白质<sup>[17, 18]</sup>的结构与功能奠定了良好的基础, 并提供了可行的分析技术<sup>[19, 20]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Hodgkin A. L., Huxley A. E. Journal of Physiology [J], 1952, 117: 500-544
- [2] Jagger W. S., Sands P. J. Vision Research [J], 1999, 39: 2841-2852
- [3] Peter Boyle, Paul Rodhouse. Cephalopods: Ecology and Fisheries [M], HongKong: Blackwell Publishing Company, 2005: 103-111
- [4] HUANG Lin (黄琳), CHEN Dong-Shi (陈东仕), YAN Li (颜利), et al. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2009, 30(2): 314-319
- [5] LI Shan-Yu (李善玉), FAN Jia (范佳), XI Jing-Hui (席景会), et al. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2007, 28(9): 1696-1700
- [6] CHEN Dong-Shi (陈东仕), HUANG He-Qing (黄河清), WU Han-Zhi (吴韩志), et al. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2006, 27(7): 1257-1261
- [7] LI Ying (李莹), WANG Yi (王毅), QU Hai-Bin (瞿海斌), et al. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2008, 29(3): 515-518
- [8] ZHAO Si-Hai (赵四海), XUN Meng (寻萌), CHU Yong-Lie (楚壅烈), et al. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报)



- [ J]. 2008 **29**(11): 2174—2177
- [ 9] FENG Li-Jian(冯丽剑), HUANG Lin(黄琳), ZHUO Hui-Qin(卓慧钦), *et al.* Chin J Anal Chem. (分析化学) [ J], 2008 **36**(5): 577—582
- [ 10] Severo Ochoa Methods in Enzymology [ J], 1995 **63**: 735—739
- [ 11] Christine Gietl Michael Lehnerer Ole Olsen *et al.* Plant Molecular Biology [ J], 1990 **14**: 1019—1030
- [ 12] Gietl C., Hock B. Current Topics in Biological and Medical Research [ J], 1987 **16**: 175—192
- [ 13] Benjamin J N., Hugh R. P. Molecular Cell Research [ J], 1998 **1404**(1): 9—31
- [ 14] Debelb W. M., Dresbach T., Whiteheart S W., *et al.* Nature [ J], 1995 **373**(6515): 626—630
- [ 15] Douglas O. C., Irene C. G., James E. R., *et al.* Cell [ J], 1990 **61**(4): 709—721
- [ 16] Gudrun Stenbeck. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology [ J], 1998 **30**(5): 573—577
- [ 17] LN Qing-Mei(林庆梅), HUANG Hui-Ying(黄慧英), HUANG He-Qing(黄河清), *et al.* Chin J Anal Chem. (分析化学) [ J], 2006 **34**: S95—S99
- [ 18] HUANG He-Qing(黄河清), LU Yong-Jin(陆永进), LN Qing-Mei(林庆梅), *et al.* Chin J Anal Chem. (分析化学) [ J], 2007 **35**(8): 1105—1110
- [ 19] ZHUO Hui-Qin(卓慧钦), HUANG Lin(黄琳), FENG Li-Jian(冯丽剑), *et al.* Analytical Biochemistry [ J], 2008 **378**: 151—157
- [ 20] Humm A. B., Huang H. Q., Khley W. P., *et al.* Journal of Neurochemistry [ J], 2002 **82**: 1398—1405

## Comparison Analysis of Proteome of Both Cerebral and Optic Ganglions in *Sepia esculenta*

HUANG Fu-Sheng<sup>1</sup>, CHEN Hai-Bin<sup>1</sup>, HUANG Lin<sup>1</sup>, HUANG He-Qing<sup>1, 2, 3\*</sup>

(1. Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science,

3. Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry & Chemical Engineering

Xiamen University, Xiamen 361005 China)

**Abstract** *Sepia esculenta* vests in a cephalopoda animal in mollusca. The differentiation of neural system show not only relative higher level in *Cephalopoda animal*, but also is easily to separate for studying in the neural sciences. Here, proteomes of both cerebral and optic ganglions in *Sepia esculenta* were effectively separated by a improved approach of 2D-PAGE. In addition, we used both peptide mass fingerprinting (PMF) and database search to identify protein spots in part in 2D-PAGE gel for establishing maps of molecular anatomy of cerebral and optic ganglions primarily in *Sepia esculenta*. We used a software of Melanie 4 Trial to analyze those ganglions, indicating approximately 682 and 594 protein spots in cerebral and optic ganglions, respectively, which the spot numbers in front more than that in later. Moreover, the same proteins such as mitochondrial malate dehydrogenase precursor, pre-MDH, SNAP-type proteins can be found by both ganglions. In addition, these spots such as elongation factor G, tubulin, and actin shows high match rate, but most protein identified in the gel are hypothetical and structural proteins.

**Keywords** *Sepia esculenta*; Cerebral ganglion; Optic ganglion; Proteomics; Identification

(Ed: A, G)