

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200426115

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

金乌贼和真蛸视神经节蛋白质组学的研究

Proteomics of Optic Ganglion from the Sepia esculenta

and the *Octopus vulgaris*

黄福生

指导教师姓名: 黄河清 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 9 月 26 日

论文答辩时间: 2007 年 10 月 31 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 陈清西 教授

评 阅 人: _____

2007 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人(签名):

年 月 日

目 录

中文摘要	1
Abstract.....	3
第一章 前言	5
一、头足类动物简介及其神经系统组成情况	5
1.1 头足类动物简介.....	5
1.2 头足类动物眼的结构.....	6
1.3 头足类动物神经系统的组成.....	7
二、蛋白质组学及其进展	8
2.1 蛋白质组学的概念.....	9
2.2 蛋白质组学研究的主要技术手段.....	10
2.3 蛋白质组学研究中的新技术.....	15
三、蛋白质组学在神经生物学研究中的应用	17
3.1 神经系统基本结构的蛋白质组学研究.....	18
3.2 蛋白质组学在神经系统疾病诊断中的应用.....	18
3.3 蛋白质组学在阐明神经系统疾病发病机制中的应用.....	19
3.4 蛋白质组学在神经系统疾病新药开发中的应用.....	21
3.5 蛋白质组学与蛋白质网络.....	22
四、甲醇中毒对神经系统的毒理研究	22
4.1 甲醇概述.....	22
4.2 甲醇对神经系统的毒理研究.....	23
4.3 人体甲醇中毒后的治疗.....	24
五、本论文的研究内容及其意义	25
第二章 材料与方法	26
一、试验材料	26
1.1 生物材料.....	26

1.2 常用试剂.....	26
1.3 仪器设备.....	26
1.4 实验试剂的配制.....	27
二、实验方法	30
2.1 实验动物处理.....	30
2.2 双向凝胶电泳样品的制备.....	30
2.3 蛋白含量的测定.....	31
2.4 第一向等电聚焦电泳.....	31
2.5 平衡及第二向 SDS-PAGE 电泳.....	31
2.6 凝胶的硝酸银染色.....	32
2.7 银染后的蛋白质的肽质量指纹鉴定.....	32
2.8 甲醇的气相色谱分离.....	34
第三章 结果与讨论	35
一、优化金乌贼视神经节蛋白质组双向凝胶电泳分离技术	35
1.1 不同样品制备方法蛋白质提取率的比较.....	35
1.2 蛋白质组双向凝胶电泳分离.....	36
1.3 双向凝胶电泳技术的改进.....	41
二、金乌贼视神经节蛋白质组学的初步研究	44
2.1 金乌贼视神经节蛋白质组学.....	44
2.2 结果与讨论.....	51
三、甲醇胁迫下真蛸视神经节的差异蛋白质组学	53
3.1 甲醇胁迫下真蛸形态及解剖学上的变化.....	54
3.2 气相色谱法检测实验组真蛸视神经节中的甲醇.....	54
3.3 甲醇胁迫下真蛸视神经节差异蛋白质组学.....	56
3.4 结果与讨论.....	60
第四章 小结	67
附录：部分蛋白质斑点的 PMF 图谱	69
缩略语表：	76

参考文献:	77
攻读硕士学位期间发表论文	85
致谢.....	86

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Chinese Abstract	1
Abstract.....	3
Chapter1 Preface	5
1. Introduction of Cephalopod and its nervous system	5
1.1 Introduction of Cephalopod	5
1.2 Structure of Cephalopod eye.....	6
1.3 nervous system of Cephalopod	7
2. Proteomics and the progress of proteomic research	8
2.1 Conception of proteomics	9
2.2 The main technologies in proteomic research.....	10
2.3 The new technologies in proteomic research.....	15
3. The use of proteomics in neuroscience	17
3.1 Proteomic research of neuron structure	18
3.2 Proteomics in the diagnosis of nervous disease	18
3.3 Proteomics in explaining the mechanism of nervous disease	19
3.4 Proteomics in developing the new drug of nervous disease.....	21
3.5 Proteomics and protein net.....	22
4. The toxicity of methanol to nervous system	22
4.1 Introduction of methanol.....	22
4.2 The toxicity of methanol	23
4.3 The therapy of methanol	24
5. Significance and content of this thesis.....	25
Chapter2 Materials and Methods	26
1. Materials	26
1.1 Life Materials.....	26

1.2 Experiment Reagents	26
1.3 Main Apparatus	26
1.4 Preparations of reagent	27
2. Methods.....	30
2.1 The treat with experiment animal	30
2.2 prepare for the sample of 2D-PAGE	30
2.3 Measure the protein concentration of sample	31
2.4 First dimension isoelectric focusing electrophoresis	31
2.5 Gel strip equilibration and second dimension SDS-PAGE	31
2.6 Gel staining	32
2.7 Identification of protein PMF after silver stain.....	32
2.8 Separation of Methanol with GC-Chromatography.....	34
Chapter3 Results and Discussion	35
1. Optimize the 2D-PAGE technology of optic ganglion from <i>Sepia esculenta</i>	35
1.1 The extracting rate of the protein using different methods.....	35
1.2 2D-PAGE separation.....	36
1.3 Optimizing of the 2D-PAGE technologies.....	41
2. The preliminary proteomic studies of the optic and cerebral ganglion from	
<i>Sepia esculenta</i>	44
2.1 Proteomics of optic ganglion	44
2.2 Discussion	51
3. Differential proteomics of optic ganglion treated with methanol from <i>Octopus</i>	
<i>vulgaris</i>	53
3.1 Morphologic and anatomic changes	54
3.2 Measure the methanol' s concentration in the optic ganglion from <i>Octopus</i>	
<i>vulgaris</i> treated with methanol.....	54
3.3 Differential proteomics	56
3.4 Discussion	60
Chapter4 Conclusion	67

Appendix: Some of the PMF maps	69
Abbreviations	76
Reference	77
Papers uttered by the auther during the study	85
Acknowledgement.....	86

厦门大学博硕士学位论文摘要库

中文摘要

金乌贼 (*Sepia esculenta*) 和真蛸 (*Octopus vulgaris*) 属于软体动物门头足类 (Cephalopoda class) 动物。头足类神经系统分化程度较高, 易于解剖分离, 适合于神经科学的研究。本论文采用双向凝胶电泳 (2D-PAGE) 技术分别分离金乌贼视神经节的全蛋白质, 并比较了 TCA/丙酮沉淀法、缓冲液法、柱层析法、裂解液法和裂解液-超速离心法分别分离和提取神经节蛋白质的优劣结果后, 确立了以裂解液-超速离心法为提取神经节蛋白质的最佳方法。此外, 还对载体两性电解质的 pH 范围、第一向等电聚焦 (IEF) 上样量、第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离胶浓度等内容进行优化, 建立了一套具有较好分辨率和重复性特点, 并适合于金乌贼和真蛸神经系统蛋白质组学研究的 2D-PAGE 分离技术。

采用优化后的 2D-PAGE 技术分离金乌贼视神经节和脑神经节蛋白质组, 并选用质量肽指纹谱 (PMF) 技术和数据库检索方法对 2D-PAGE 图谱上的蛋白质斑点进行逐一鉴定, 初步构建了金乌贼视神经节和脑神经节的分子解剖图谱。从该图谱中可看出, 脑神经节的蛋白质斑点数目明显多于视神经节的蛋白质斑点数。在鉴定蛋白质过程中, 发现在视神经和脑神经节中都有高匹配率的线粒体苹果酸脱氢酶前体 (mitochondrial malate dehydrogenase precursor, pre-MDH) 和可溶性 NSF 连接蛋白 (SNAP-type proteins)。此外, 匹配率较高还有的延长因子 G (elongation factor G)、微管蛋白 (tubulin) 和肌动蛋白 (actin) 等。

在甲醇胁迫下, 选用差异蛋白质组学研究真蛸视神经节的差异蛋白质, 并采用气相色谱法证明在真蛸视神经节中含有甲醇组分, 并计算其浓度。利用优化后的 2D-PAGE 技术, 构建真蛸视神经节经甲醇处理前后的差异蛋白质组, 发现共有 18 个蛋白质斑点出现较为明显的变化, 其中有 6 个蛋白质斑点下调, 7 个蛋白质上调, 2 个蛋白质斑点消失, 3 个蛋白质增加。采用 PMF 技术和数据库检索比对法鉴定这些差异蛋白质, 发现其中高匹配率的上调蛋白质有 β -微管蛋白 (β -tubulin)、 β -肌动蛋白 (β -actin); 其它比较有意义的差异蛋白质是上调的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、琥珀酰辅酶 A 合成酶 (Succinyl-CoA synthetase, SCS) 阿尔法亚单位, 下调蛋白假定的 ABC 转运蛋白 (putative ABC transporter: ATP binding protein), 上调

(增量)的醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase, ADH) 和长链脂酰辅酶 A 脱氢酶 (Acyl-CoA dehydrogenase long-chain specific, LACD)。作者认为微管蛋白和肌动蛋白的异常表达可能会直接导致真蛸的失明。采用 LOCtree 软件对 18 个差异蛋白质进行亚细胞定位,发现其中归属于线粒体的差异蛋白质最多,占了总差异蛋白质数量的 38.89%,说明甲醇毒性对线粒体生理功能产生极大的影响,作者推测对线粒体具有保护作用的化合物可能有助于对甲醇中毒的治疗。通过比较与分析,作者发现这些差异蛋白质之间构成一个相互影响的复杂网络,它反映了神经细胞受甲醇毒性诱导后,细胞内蛋白质结构与功能出现的异常变化现象,这将对深入了解甲醇对神经系统产生毒性的作用机制、生物体对甲醇中毒的反应和耐受机制、以及甲醇中毒的治疗提供有益的帮助。

本论文通过蛋白质组学分析技术对头足类神经系统进行了蛋白质组学研究,并构建了在甲醇胁迫下,神经节表达的差异蛋白质组。相关研究尚未有详细的研究报道,其研究意义重大。

关键字: 金乌贼; 真蛸; 神经节; 蛋白质组学; 甲醇

Abstract

Sepia esculenta and *Octopus vulgaris* are both mollusk animals belonging to class Cephalopoda. The nervous system of Cephalopoda is relatively advanced, and the ganglion of Cephalopoda is easy to anatomise and separate, making it ideal for carrying out neuroscience researches. In this paper, the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) technique was chosen to separate the total proteins of optic ganglion from *Sepia esculenta*. Five analytical approaches such as the precipitation separation of TCA/acetone, the buffer extraction, the column chromatography, the lyolysis buffer, and the lyolysis-ultracentrifugation were compared to extract and separate the protein from the optic ganglion of *Sepia esculenta* respectively. We indicated the lyolysis-ultracentrifugation was the best method for separating the proteome of optic ganglion from *Sepia esculenta*. With the optimization of other aspects such as the covering range of carrier ampholytes, the loading quantity of first dimension (IEF) and the separate gel's concentration of second dimension (SDS-PAGE), we established a stable 2D-PAGE sample preparation method, with high resolution and perfect repetition, adapting to the proteome research in the nervous system of *Sepia esculenta* and *Octopus vulgaris*.

Using the optimized method of 2D-PAGE, 2D-PAGE maps of optic and cerebral ganglion from *Sepia esculenta* were obtained. Peptide mass fingerprint (PMF) and database search were used to identify the proteins on 2D-PAGE gel, and then we established the anatomic maps of optic ganglion and cerebral ganglion of *Sepia esculenta* primarily. From the maps, we can find the protein spots of cerebral ganglion were much more than that of optic ganglion. The experiment results showed that the two high score protein, found both in optic and cerebral ganglion, were mitochondrial malate dehydrogenase precursor (pre-MDH) and SNAP-type proteins. Also, there were several protein spots with relative high score, such as elongation factor G, tubulin and actin .

We chose differential proteomics to search for the differential proteins of optic ganglion from *Octopus vulgaris* treated with methanol. Gas-chromatography (GC)

was used to prove the existence of methanol in the optic ganglion, and to calculate the concentration of that methanol. Using the optimized method of 2D-PAGE, we established the differential proteome between the methanol-induced optic ganglion and normal ganglion. Basing on the 2D-PAGE maps, we found that total significant 18 protein changed evidently, 6 were down-regulated, 7 were up-regulated, 2 were disappear and 3 were increment. All of these differential protein spots were identified by peptide mass fingerprinting (PMF) and database search. The identified results indicated that two up-regulated protein, beta-tubulin and beta-actin, were the most significant differential protein. Besides, there were five other protein which had obtained relative high score. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Succinyl-CoA synthetase (SCS) alpha subunit were up-regulate; putative ABC transporter was down-regulated; the other two, Alcohol dehydrogenase (ADH) and Acyl-CoA dehydrogenase long-chain specific (LACD) were increment. We suggested the disorders of beta-tubulin and beta-actin would result in the ablepsia of *Octopus vulgaris*. With the aid of LOCtree, the subcellular locations of differential proteins were predicted, and most of the differential proteins were mitochondrial proteins adding up to 38.89%. This showed that mitochondria had been seriously destructed by methanol toxicity and we suggested some protective compounds for mitochondria may help to cure methanol poisoning. With comparison and analysis, we found that those differential proteins composed a complex net reflecting the structural and functional disorders in the methanol-induced nerve cells. These can help us know further about the methanol's toxic mechanism to nervous system, the responses and the tolerant mechanism of the organism in methanol poisoning, and the therapy for methanol poisoning.

The proteomics research of the nervous system of Cephalopoda using proteome analytical techniques and the establishment of the methanol-induced differential proteome expressed by the ganglion cells have not yet been discribed in detail and will be of great importance for the research related.

Keywords: *Sepia esculenta*, *Octopus vulgaris*, ganglion, proteomics, methanol

第一章 前言

一、头足类动物简介及其神经系统组成情况

1.1 头足类动物简介

头足类动物是软体动物门的重要类群，广泛分布于太平洋、大西洋、印度洋和南极等海域，头足类共有 2 个亚纲 11 个目 50 个科 154 属 718 种^[1]。本论文的实验动物金乌贼 (*Sepia esculenta*, Hoyle) 属于软体动物门 (Phylum Mollusca) 头足纲 (Class Cephalopoda) 二鳃亚纲 (Subclass Dibranchia) 乌贼目 (Sepioidea)，俗称墨鱼、乌鱼；真蛸 (*Octopus vulgaris*, Cuvier) 属于二鳃亚纲八腕目 (Octopoda) 无须亚目 (Incirrata)，俗称章鱼。两者都是福建海域内常见的头足类动物。头足类身体由头部、足部、胴部 (外套膜) 组成，足的一部分特化为腕，环列于头前和口周，腕的数目有八只、十只甚至数十只，足的另一部分特化为漏斗，贴附于头部与胴体之间的腹面，为头足类喷水推进的动力结构；大多数种类的软骨组织发达，包围脑、颈、腕等区；除鹦鹉螺 (四鳃亚纲) 外不少种类内脏腹侧具有墨囊，是一种直肠盲囊，由墨腺和墨囊腔组成，遇到危险时头足类可向外喷出墨汁并乘机逃生。头足类不仅具有很高的经济价值，而且在海洋生态中占有重要的地位。头足类在海洋食物链中，是大型鱼类如金枪鱼和海洋哺乳动物如鲸鱼等的重要食饵，它位居海洋营养级金字塔的中层，具有承上启下的作用，头足类的数量变动，对各级海洋生物的数量变动有直接或间接的影响，而由此扩展的一系列营养级间的关系则更为复杂^[2]。

头足类是掠食性的食肉动物，对捕食对象几乎没有选择性，鱼类、甲壳类、软体动物、多毛类、毛颚类等，均在其捕食范围之内。其头前和口周的腕，强而有力，是其重要的捕食器官。鹦鹉螺以其头叶周围的数十只腕捕捉小蟹。乌贼的触腕平日缩于第 3 对和第 4 对腕之间的触腕囊中，摄食时能突然伸出，以触腕穗上的吸盘捉住猎物，然后以无柄腕包住送往口端；口球前端的角质颚，坚韧锋利，能咬碎食物的壳片和骨片，是重要的咀嚼器官；口球内的齿舌，有磨挫食物的功能；章鱼具有唾腺乳突，上生小齿，并在腺体分泌作用的配合下，能在贝类的壳上钻孔，然后吸食其肉。种种优异的摄食适应性，使得头足类的食谱很广，包括游泳动物、底栖动物和浮游动物等。另外，头足类具有同类残食的习性，在乌贼、章鱼和柔鱼的胃中，经常发现其同类的断腕、颚片和其他肢体。头足类不同种类

之间大小差异明显，巨型头足类如大王乌贼，最大胴长可达 5 米，最大体重可达 1 吨；而微型头足类，如玄妙微鳍乌贼，最大胴长仅为 0.018 米。大多数中型和小型头足类，如分布在北太平洋海域的柔鱼，胴长为 10~50 厘米，体重为 0.5~20 千克，寿命为 1~2 年^[3]。

头足类是重要的海洋生物药物资源。例如，从章鱼类肉的煮汁中，可提取牛磺酸，为止虚汗剂和特殊兴奋剂，用于治疗结核病、关节炎、神经病、腺质病和血液障碍等；从柔鱼类的肝脏可以提取肝油；乌贼类的墨囊主要由黑素组成，是一种很好的内科止血药，还可保护造血干细胞，有抗辐射作用，明朝李时珍所著《本草纲目》中曾有关于用乌贼的腹中墨主治心刺心痛的记述^[4]；柔鱼类和枪乌贼类的内壳，主要成分是拟蛋白，有抗肿瘤的功效；从枪乌贼和柔鱼类卵中提取卵磷脂，是天然的乳化剂和营养补品，可以降血脂，治疗脂肪肝、肝硬化等；鸚鵡螺、扁面蛸、船蛸等头足类数量稀少，但结构特异，在学术研究上有重要价值^[5]。国内外对头足类药物的研究仍然主要集中在乌贼骨和乌贼墨，尤其药理活性以及活性物质，其药用价值已拓宽至抗肿瘤、增强免疫等方面，现已有乌贼墨胶囊等产品^[6]。

头足类也是重要的海洋渔业资源之一，世界头足类渔获量于 2000 年创最高记录，达到 3,600,000 吨。我国人民历来有食海鲜的习惯，各种头足类都是人们喜爱的食品。头足类肉味鲜美，营养丰富，蛋白质含量丰富，每一百克鲜肉中含有蛋白质 15~18 克，相当一般食用贝类蛋白质含量的二至三倍，与一般海产鱼类的蛋白质含量相近，而磷的含量则比一般海产鱼类高三、四倍；此外，头足类的肉中，还含有少量的维生素 A，这是一般海产鱼类所缺乏的。头足类的干制品有墨鱼干、鱿鱼干和章鱼干等，都是重要的海味，特别是我国的鱿鱼干肉细甜嫩，在国际市场被列为优质品种^[7]。

1.2 头足类动物眼的结构

图 1-1 为头足类动物眼球结构的示意图。在结构上，头足类动物（章鱼、乌贼、鱿鱼等）的眼与脊椎动物的眼相近，这种相似性是生物界趋同进化的极佳例子。头足类的眼存在于一个软骨构成的具有支持和保护作用的眼窝中。它包含一个刚性的球形晶状体，晶状体前面具有虹膜，虹膜奇特的形状使头足类的瞳孔成狭缝状，瞳孔可以周围随光线情况张开或闭合。脊椎动物视网膜中的神经元与一

束视神经相连，视神经穿出眼球再绕回大脑，形成传递光信号的通路。由于视神经在视网膜的前方，因此穿过视网膜的那个孔不可能有感光细胞，这样就造成了视网膜上有一区域无法感光，也就是所谓的盲点。头足类的视神经在视网膜后方，不需要穿出眼球就可连接到大脑，因此头足类没有盲点的存在。像许多水生脊椎动物一样，头足类利用晶状体的前后运动来聚焦。头足类的眼能组成物体的图像，并能分辨物体形状甚至某些颜色^{[8],[9]}。

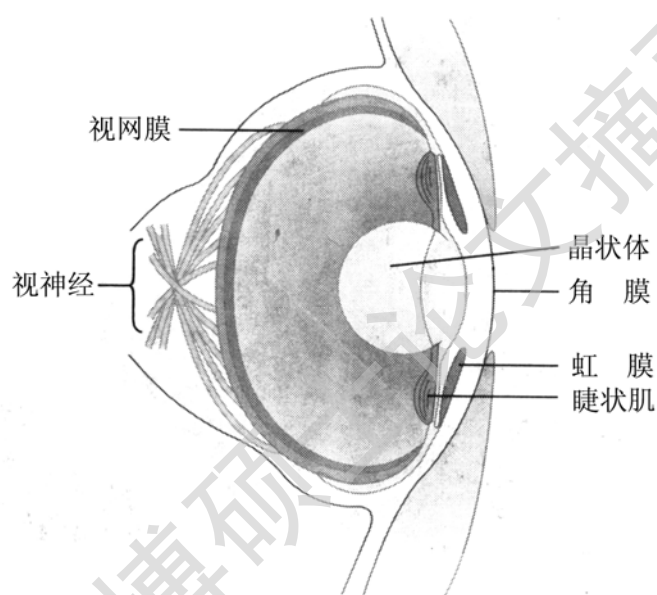


图 1-1 头足类眼球结构示意图

Fig.1-1 sketch map of Cephalopod eye

1.3 头足类动物神经系统的组成

头足类神经系统分化程度很高，中枢神经系统和周围神经系统已经形成；前者成为复杂的脑，包括脑神经、漏斗神经、腕神经、足神经等，后者包括视神经、脏神经、胃神经、外套神经等。四鳃亚纲的头足类（如鹦鹉螺）神经系统的中枢部分仅由神经索构成，周围部分的神经集中程度也较小，尚不具有星芒神经节；二鳃亚纲（如金乌贼、真蛸）神经系统的中枢和周围部分均由神经节构成。头足类的脑，是无脊椎动物中最完善者，不仅总的体积增大，而且内部结构精密专化，神经组织高度集中，由脑神经节、腕神经节、足神经节和脏神经节愈合成的脑神经块，从外表看已是一个整体。位于外套内壁背缘的外套神经，部分裸露于肌肉

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库