

学校编码: 10384

密级

学号: 22420100153596

廈門大學

博士学位论文

东风螺早期发育的生物学研究

Studies on Biology of Early Developmental Stages of

*Babylonia*

沈铭辉

指导教师: 洪万树教授 柯才焕教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2016年11月

论文答辩时间: 2016年12月

2016年12月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

( ) 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

( ) 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录

缩略词表.....	i
摘要.....	I
Abstract.....	IV
<b>第一章 绪论</b> .....	<b>1</b>
1.1 海洋腹足类研究概况.....	1
1.1.1 海洋腹足类简介.....	1
1.1.2 海洋腹足类开发利用现状.....	1
1.1.3 海洋腹足类早期生物学的研究概况.....	2
1.2 东风螺的研究概况.....	4
1.2.1 东风螺简介.....	4
1.2.2 东风螺早期发育生物学研究.....	4
1.2.3 东风螺生物学研究进展.....	5
1.2.4 东风螺的养殖繁育现状.....	6
1.3 海洋腹足类组学研究概况.....	7
1.3.1 转录组学研究方法.....	7
1.3.2 蛋白质组学研究方法.....	9
1.3.3 代谢组学研究方法.....	11
1.3.4 组学研究方法在海洋腹足类研究中的应用.....	13
1.4 研究意义.....	15
<b>第二章 五种东风螺精子的超微结构比较研究</b> .....	<b>17</b>
2.1 材料与方法.....	18
2.1.1 实验试剂与仪器.....	18
2.1.2 实验方法.....	18
2.2 结果.....	22
2.2.1 五种东风螺的精子结构.....	22
2.2.2 主成分分析.....	29

2.3 讨论.....	30
<b>第三章 方斑东风螺幼体变态的转录组学研究 .....</b>	<b>33</b>
3.1 实验方法.....	34
3.1.1 样品采集 .....	34
3.1.2 建库测序流程 .....	34
3.1.3 生物信息分析流程 .....	36
3.2 结果.....	39
3.2.1 测序数据质量评估 .....	39
3.2.2 转录本拼接 .....	42
3.2.3 基因功能注释 .....	44
3.2.4 CDS 预测 .....	56
3.2.5 SNP 和 InDel 分析.....	57
3.2.6 SSR 分析 .....	58
3.2.7 基因表达水平分析 .....	59
3.2.8 RNA-seq 整体质量评估 .....	62
3.2.9 基因差异表达分析 .....	63
3.2.10 差异基因 GO 富集分析 .....	69
3.2.11 差异基因 KEGG 富集分析 .....	74
3.3 讨论.....	79
3.3.1 测序数据质量评估 .....	79
3.3.2 转录本拼接 .....	79
3.3.3 基因功能注释 .....	80
3.3.4 基因差异表达分析 .....	81
<b>第四章 方斑东风螺幼体变态的蛋白组学研究 .....</b>	<b>84</b>
4.1 材料与方法.....	86
4.1.1 实验仪器 .....	86
4.1.2 实验方法 .....	86
4.2 结果.....	95
4.2.1 双向电泳凝胶分析 .....	95
4.2.2 蛋白质浓度测定 .....	99

4.2.3 SDS-PAGE 分析 .....	100
4.2.4 肽段 OD <sub>280</sub> 浓度测定 .....	100
4.2.5 蛋白质显著性差异分析 .....	101
4.2.6 蛋白质聚类分析 .....	103
4.2.7 GO 功能注释 .....	104
4.2.8 KEGG 通路注释 .....	107
4.3 讨论 .....	114
4.3.1 GO 功能注释 .....	114
4.3.2 KEGG 通路注释 .....	115
4.3.3 蛋白质聚类分析 .....	116
<b>第五章 方斑东风螺幼体营养的代谢组学研究 .....</b>	<b>118</b>
5.1 材料与方法 .....	119
5.1.1 实验试剂与仪器 .....	119
5.1.2 实验方法 .....	120
5.2 结果 .....	124
5.2.1 实验质量控制 .....	124
5.2.2 各组样本的典型代谢物 TIC 图谱 .....	126
5.2.3 数据分析 .....	128
5.2.4 显著性差异代谢物 .....	131
5.2.5 差异代谢物 KEGG 代谢通路分析 .....	136
5.2.6 不同营养状态对幼体代谢的影响分析 .....	140
5.3 讨论 .....	152
5.3.1 数据分析 .....	153
5.3.2 显著性差异代谢物 .....	154
5.3.3 幼体卵黄囊消失过程中体内代谢的变化 .....	155
5.3.4 饥饿对幼体代谢的影响 .....	155
5.3.5 卵黄囊消失后摄食对幼体代谢的影响 .....	156
<b>第六章 酸化暴露下方斑东风螺幼体发育的蛋白组分析 .....</b>	<b>158</b>
6.1 材料与方法 .....	159
6.1.1 实验仪器 .....	159

---

6.1.2 实验方法 .....	162
6.2 结果.....	167
6.2.1 差异蛋白鉴定结果 .....	167
6.2.2 预测蛋白质的亚细胞定位 .....	200
6.3 讨论.....	202
6.3.1 酸化对呼吸作用相关蛋白的影响 .....	203
6.3.2 酸化对贝类免疫相关蛋白的影响 .....	203
6.3.3 海洋酸化对参与生物钙化与矿化相关蛋白的影响 .....	203
6.3.4 海洋酸化对代谢的影响 .....	204
<b>第七章 总结与展望 .....</b>	<b>206</b>
7.1 总结.....	206
7.2 本文创新点.....	207
7.3 不足与展望.....	208
<b>参考文献.....</b>	<b>209</b>
<b>攻读博士期间的科研项目及科研成果 .....</b>	<b>238</b>
科研项目 .....	238
科研成果.....	238
<b>致谢.....</b>	<b>240</b>

## Contents

<b>Abbreviations</b> .....	i
<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	IV
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Research overview in marine gastropods</b> .....	1
1.1.1 Introduction of marine gastropods.....	1
1.1.2 Development and utilization of marine gastropods.....	1
1.1.3 Research overview of early biology in marine gastropods.....	2
<b>1.2 Research overview in the genus <i>Babylonia</i></b> .....	4
1.2.1 Introduction of the genus <i>Babylonia</i> .....	4
1.2.2 Biological process of early development in <i>Babylonia</i> .....	4
1.2.3 Research overview of biology in <i>Babylonia</i> .....	5
1.2.4 Breeding and artificial aquaculture of the genus <i>Babylonia</i> .....	6
<b>1.3 Omics research overview in marine gastropods</b> .....	7
1.3.1 Research methods of transcriptomics .....	7
1.3.2 Research methods of proteomics .....	9
1.3.3 Research methods of metabonomics .....	11
1.3.4 Application of omics research methods in marine gastropods .....	13
<b>1.4 Significance of this study</b> .....	15
<b>Chapter 2 Comparative Study on Ultrastructure of Sperms in Five Varieties of <i>Babylonia</i></b> .....	17
<b>2.1 Materials and methods</b> .....	18



2.1.1 Reagents and instruments .....	18
2.1.2 Methods .....	18
<b>2.2 Results .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Ultrastructure of sperms in five varieties of <i>Babylonia</i> .....	22
2.2.2 Principal component analysis .....	27
<b>2.3 Discussion .....</b>	<b>30</b>
<b>Chapter 3 Transcriptomics Study of <i>Babylonia areolata</i> Larvae</b>	
<b>during Metamorphosis Stages .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Materials and methods .....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Sample collection .....	34
3.1.2 Process of library construction and sequencing .....	34
3.1.3 Process of bioinformatic analysis .....	36
<b>3.2 Results .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Quality evaluation of sequencing data.....	39
3.2.2 Assembly of transcripts .....	42
3.2.3 Gene function annotation.....	44
3.2.4 CDS prediction .....	56
3.2.5 SNP and InDel analysis .....	57
3.2.6 SSR analysis .....	58
3.2.7 Gene expression level analysis .....	59
3.2.8 Quality evaluation of RNA-seq .....	62
3.2.9 Analysis of gene differential expression .....	63
3.2.10 GO enrichment analysis differentially expressed genes.....	69
3.2.11 KEGG enrichment analysis differentially expressed genes .....	74

<b>3.3 Discussion</b> .....	79
3.3.1 Quality evaluation of sequencing data.....	79
3.3.2 Assembly of transcripts .....	79
3.3.3 Gene function annotation.....	80
3.3.4 Analysis of gene differential expression .....	81
<b>Chapter 4 Proteomics Study of <i>Babylonia areolata</i> Larvae during Metamorphosis Stages</b> .....	84
<b>4.1 Materials and methods</b> .....	86
4.1.1 Instruments .....	86
4.1.2 Methods .....	86
<b>4.2 Results</b> .....	95
4.2.1 Two-dimensional gel electrophoresis.....	95
4.2.2 Protein concentration determination.....	99
4.2.3 SDS-PAGEanalysis .....	100
4.2.4 OD <sub>280</sub> concentration determination of peptide fragments .....	100
4.2.5 Protein significant difference analysis.....	101
4.2.6 Protein clustering analysis .....	103
4.2.7 GO fuction annotation .....	104
4.2.8 KEGG pathway annotation.....	107
<b>4.3 Discussion</b> .....	114
4.3.1 GO fuction annotation .....	114
4.3.2 KEGG pathway annotation.....	115
4.3.3 Protein clustering analysis .....	116

<b>Chapter 5 Metabonomics Study of <i>Babylonia areolata</i> Larvae in</b>	
<b>Different Nourishment States</b> .....	118
<b>5.1 Materials and methods</b> .....	119
5.1.1 Reagents and instruments .....	119
5.1.2 Methods .....	120
<b>5.2 Results</b> .....	124
5.2.1 Quality control of the experiment.....	124
5.2.2 Typical total ion chromatogram of typical metabolites.....	126
5.2.3 Data analysis.....	128
5.2.4 Differentially produced metabolites .....	131
5.2.5 KEGG metabolism pathway analysis on differentially produced metabolites .....	136
5.2.6 Impact analysis of different nourishment states to larvae metabolism.....	140
<b>5.3 Discussion</b> .....	152
5.3.1 Data analysis.....	153
5.3.2 Differentially produced metabolites .....	154
5.3.3 Metabolic changes in larvae when the yolk sacs were absorbed.....	155
5.3.4 The effect of starvation to larvae metabolism .....	155
5.3.5 The effect of feeding after the yolk sacs were absorbed to larvae metabolism.....	156
<b>Chapter 6 Proteomics Study of <i>Babylonia areolata</i> Larvae after</b>	
<b>Exposing to Acidulated Sea Water</b> .....	158
<b>6.1 Materials and methods</b> .....	159
6.1.1 Instruments .....	159

6.1.2 Methods .....	162
<b>6.2 Results .....</b>	<b>167</b>
6.2.1 Identification of differential proteins.....	167
6.2.2 Predicted subcellular localization of differential proteins.....	200
<b>6.3 Discussion.....</b>	<b>202</b>
6.3.1 The effect of acidification to protein related to respiration.....	203
6.3.2 The effect of acidification to protein related to immunity.....	203
6.3.3 The effect of acidification to protein related to bio-calcification and biomineralization .....	203
6.3.4 The effect of acidification to protein related to metabolism .....	204
<b>Chapter 7 Conclusions and Research Prospects.....</b>	<b>206</b>
7.1 Conclusions .....	206
7.2 Innovative points .....	207
7.3 Research shortage and prospects.....	208
<b>References.....</b>	<b>209</b>
<b>Science Projects and Achievements .....</b>	<b>238</b>
Science projects .....	238
Achievements .....	238
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>240</b>

## 缩略词表

## 缩略词表

## Abbreviations

缩略词	英文全称	中文全称
Abbreviation	Full Name in English	Full Name in Chinese
2D-DIGE	two-dimensional difference gel electrophoresis	双向荧光差异电泳
2D-LC	two-dimensional liquid chromatography	二维液相色谱
2DE	two-dimensional gel electrophoresis	双向凝胶电泳
AC	acrosomal complex	顶体复合体
ACa	acrosomal cap	顶体帽
AL	length of acrosome	顶体长度
AR	acrosomal rod	顶体棒
AX	axoneme	轴丝
BLAST	basic local search tool	基本局域联想搜索工具
bp	base pair	碱基对
BP	biological process	生物过程
CC	cellular component	细胞组分
cDNA	complementary deoxyribonucleid acid	互补脱氧核糖核酸
CDS	coding sequence	蛋白质编码区
COG	clusters of orthologous groups of proteins	原核生物同源蛋白簇
CP	cellular processes	细胞过程
DEG	differentially expressed gene	差异表达基因
DNA	deoxyribonucleid acid	脱氧核糖核酸
EC	endonuclear channel	精子核内沟
EIP	environmental information processing	环境信息处理
EP	end piece	精子尾鞭末段
ESI	electrospray ionization	电喷雾电离

## 缩略词表 (续)

## Abbreviations (continued)

缩略词	英文全称	中文全称
Abbreviation	Full Name in English	Full Name in Chinese
EST	expression sequence tags technology	表达序列标签技术
FDR	false discovery rate	错误发现率
FPKM	expected number of Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced	每百万 fragments 中来自某一基因每千碱基长度的 fragments 数目
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometer	气相色谱-质谱联用
GIP	genetic information processing	遗传信息处理
GO	gene ontology	基因本体
GP	glycogen particles	糖原粒
HILIC	hydrophilic interaction chromatography	亲水相互作用色谱
HL	head length	精子头部长度
HPLC	high performance liquid chromatography	高效液相色谱
iBAQ	intensity-based absolute quantification	灰度绝对定量法
IDA	information dependent acquisition	数据相关采集
IEF	isoelectric focusing	等电聚焦
InDel	insertion-deletion	缺失多态性
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	京都基因与基因组百科全书
KO	KEGG ortholog	KEGG 直系同源系统
KOG	eukaryotic ortholog groups	真核生物同源蛋白簇
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry	液相色谱-质谱联用
M	metabolism	代谢
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization	基质辅助激光解吸电离
MF	molecular function	分子功能
MP	middle piece	精子尾鞭中段

## 缩略词表 (续)

## Abbreviations (continued)

缩略词	英文全称	中文全称
Abbreviation	Full Name in English	Full Name in Chinese
MPSS	massively parallel signature sequencing	大规模平行测序技术
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
MS	mitochondrial sheath (第二章)	线粒体鞘
MS	mass spectrometry (绪论、第三章、第四章、第五章)	质谱
N	nucleus	精子细胞核
NL	length of nucleus	精子细胞核长度
NMR	nuclear magnetic resonance,	核磁共振
Nr	NCBI non-redundant protein sequences	NCBI 官方的蛋白序列数据库
Nt	NCBI nucleotide sequences	NCBI 官方的核酸序列数据库
NW	width of nucleus	精子细胞核宽度
ORF	open reading frame	开放阅读框架
OS	organismal systems	有机体系统
PC	principal component	主成分
PCA	principal component analysis	主成分分析
Pfam	protein family	蛋白结构域注释分类系统
PM	plasma membrane	质膜
PMF	peptide mass fingerprint	肽质量指纹图谱
PNF	posterior nucleus fossa	精子核后凹陷
PNFL	length of posterior nucleus fossa	精子核后凹陷长度
PNFW	width of posterior nucleus fossa	精子核后凹陷宽度
PP	principal piece (第二章)	精子尾鞭主段

## 缩略词表 (续)

## Abbreviations (continued)

缩略词	英文全称	中文全称
Abbreviation	Full Name in English	Full Name in Chinese
PP	polypropylene (第六章)	聚丙烯
Q	quadrupole	四级杆
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RNA-Seq	ribonucleic acid sequencing	核糖核酸测序技术
RPLC	reversed phase liquid chromatography	反相液相色谱
rRNA	ribosome ribonucleic acid	核糖体核糖核酸
tRNA	transfer ribonucleic acid	转运核糖核酸
SAGE	serial analysis of gene expression	基因表达序列分析
SCCM	standard cubic centimeter per minute	每分钟标准毫升
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝 胶电泳
SL	sperm length	精子测量全长
SLM	standard liter per minute	每分钟标准升
SNP	single nucleotide polymorphisms	单核苷酸多态性
SSR	simple sequence repeats	简单重复序列标记
TIC	total ion chromatogram	总离子流图
TL	tail length	尾鞭长度
TOF	time of flight	飞行时间
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography	超高效液相色谱系统



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.