

# Framvinduskýrsla til AVS sjóðsins

vegna styrks í smáverkefni

Febrúar 2006

Heiti verkefnis

**Þróun aðferða til að meta næringarástand þorsklirfa í eldi**

Ábyrgðarmaður

Ágústa Guðmundsdóttir (kt. 020745-3209)

Prófessor, matvæla-og næringarfræðiskor HÍ

[ag@hi.is](mailto:ag@hi.is)

Aðrir umsækjendur:

Agnar Steinarsson

Sérfræðingur á Hafrannsóknastofnuninni

Hólmfríður Sveinsdóttir

Doktorsnemi hjá ÁG við HÍ

## Samantekt

Markmið þessa forverkefnis var að afla grunn upplýsinga um trypsínbúskap þorsklirfa í hefðbundnu eldi. Upplýsingarnar verða lagðar til grundvallar við mat á næringarástandi og aðgerðum er miða að bættri meltingargetu lirlfanna. Meðsent handrit að vísindagrein (Sveinsdóttir et al., 2006), sem nefnist “Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in the maturation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) eggs and embryos”, var nýlega sent til birtingar í vísindaritið Aquaculture. Í handritinu er aðdraganda og forsendum verkefnisins lýst nánar auk þess sem greint frá hluta af niðurstöðum þess. Helstu niðurstöður verkefnisins eru þær að trypsínvirkni lirlfanna er nánast engin við upphaf fæðunáms en það tímabil einkennist af hárrí dánartíðni og litlum vexti. Massagreining af próteinmengjageljum mun væntanlega leiða í ljós önnur mikilvæg prótein sem unnt verður að nota sem lífmerki (biomarkers) til að meta næringarástand þorsklirfa á frumstigum eldis.

## Upphafleg skipting verkþátta

Fyrsti verkþáttur: Öflun sýna úr hefðbundnu þorsklirfueldi fyrir annan, þriðja og fjórða verkþátt.

Annar verkþáttur: Gerð próteinlausna úr sýnum þorsklirfa, magngreiningu próteina sem og mælingum á virkni trypsína og chymotrypsína í próteinlausninni.

Þriðji verkþáttur: Greining tveggja trypsín afbrigða (trypsíns I og trypsíns Y) í próteinlausninni með SDS-PAGE rafdrætti og ónæmisþrykki (Western blot) þar sem nota átti sérhönnuð mótefni gegn trypsín afbrigðunum.

Fjórði verkþáttur: Magnbundin greining á tjáningu (mRNA) trypsín afbrigðanna tveggja með magnbundinni RT-PCR aðferð.

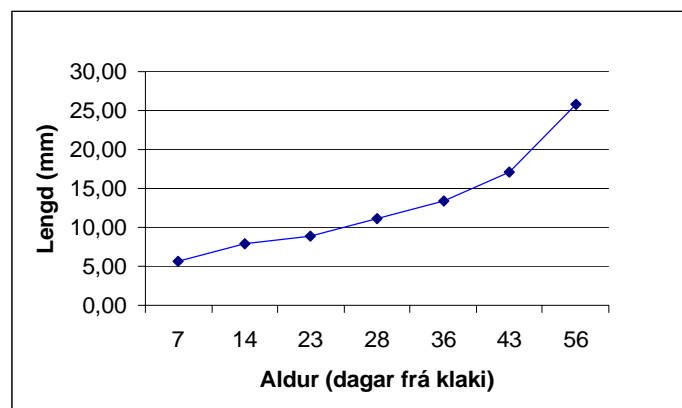
Fimmti verkþáttur: Tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna og ritun vísindagreinar.

Flestum verkþáttum er lokið að undanskilinni tölfræðilegri úrvinnslu gagna, sem nú stendur yfir. Vegna bilunar í tækjabúnaði var ákveðið að skipta út fjórða verkþætti (trypsín tjáningu með magnbundinni rtRT-PCR tækni) og nota próteinmengjagreiningu í staðinn. Hólmfríði Sveinsdóttur, doktorsnema bauðst að fara til Aberdeen í Skotlandi og vinna að próteinmengjagreiningu á sýnunum. Próteinmengjagreining er mun öflugri greining en magnbundin rtRT-PCR greining þar sem hún greinir magnbundið öll tjáð prótein á þeim tíma sem sýni er tekið, þar með talin trypsín. Aðrir kostir breytinganna við notkun próteinmengjagreiningar í stað rtRT-PCR tækninnar eru:

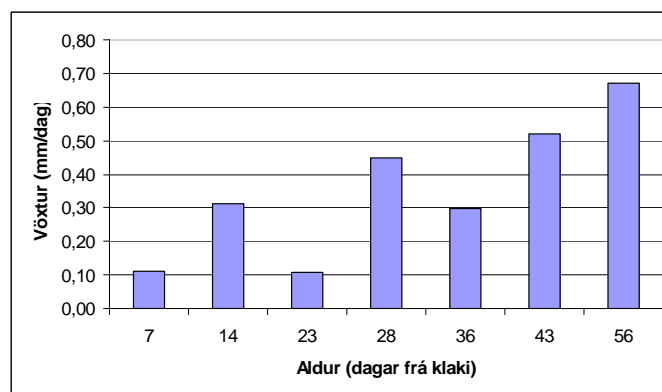
1. Dr. Phil Cash yfirmaður próteinmengjagreiningardeildarinnar við Háskólann í Aberdeen er einn fremsti sérfræðingur í heimi í próteinmengjagreiningu og því var mjög eftirsóknarvert fyrir Hólmfríði að vinna undir hans handleiðslu.
2. Próteinmengjataekni hefur lítið sem ekkert verið beitt til þessa við eldisrannsóknir á þorski og er því um mikilvægan þekkingarlegan ávinning að ræða.
3. Efling á samstarfi við erlenda háskóla og stofnanir er mjög mikilvæg fyrir íslenskt vísindasamfélag.

### Niðurstöður

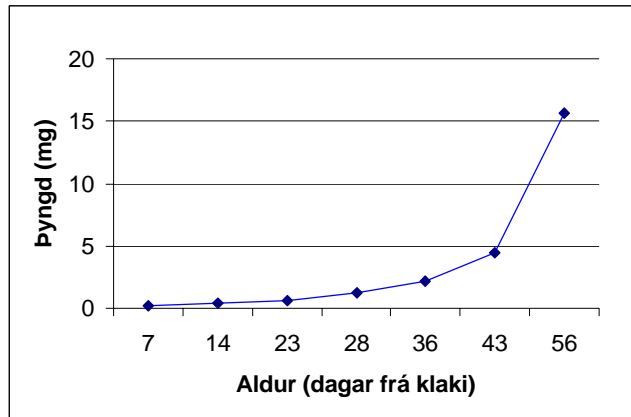
Lifun þorsklirfanna í tilrauninni var 16,4%. Lengd lirfanna jókst eftir aldri (mynd 1) en vöxtur (mm/dag) var mishraður (mynd 2). Þurrvigt lirfanna jókst hægt framanaf en í kringum 40. dag jókst hún hraðar (mynd 3).



Mynd 1 Lengd lirfa (mm)

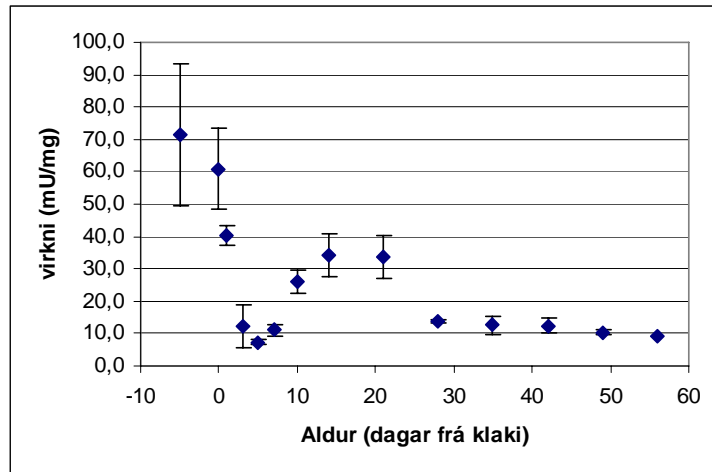


Mynd 2 Vöxtur lirfa (mm/dag)

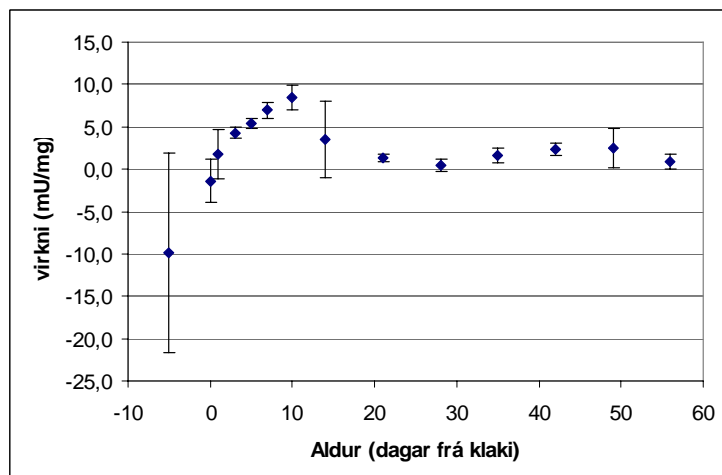


Mynd 3 Þurrvigt lirfa (mg)

Virgni trypsíns sem og chymotrypsíns í þorskhrognum og –lirfum var mæld í þrísýni. Hún reyndist breytileg eftir aldri lirfanna (mynd 4). Á þriðja til sjöunda degi eftir klak er trypsínvirknin í lágmarki en hækkar svo aftur og nær hámarki á milli 14. og 21 dags eftir klak. Á 28. degi hefur virknin minnkað niður í ca. 15 mU/mg og helst nánast stöðug út tilraunina. Chymotrypsínvirknin er mun lægri, hún er í hámarki í kringum 10. dag eftir klak, ca 8mU/mg (mynd 5) en minnkar svo aftur niður í það að vera nánast engin .

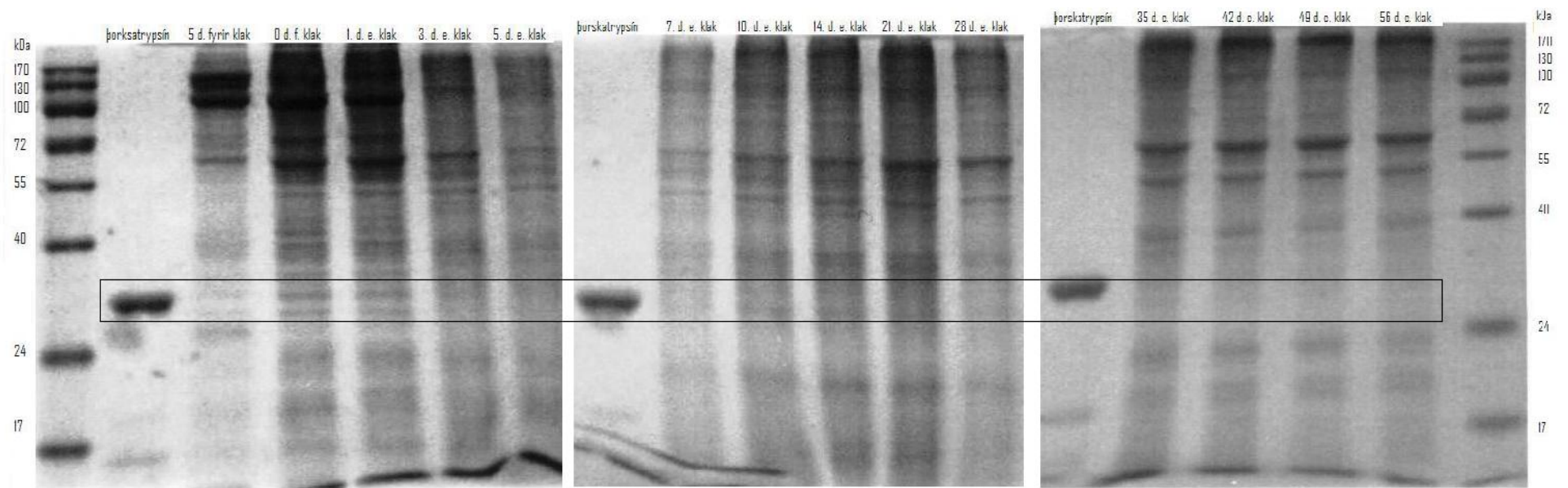


Mynd 4. Trypsínvirkni (mU/mg prótein)  $\pm$ SEM í þorsklirfufлотum.



Mynd 5. Chymotrypsínvirkni (mU/mg protein)  $\pm$ SEM í þorsklirfufлотum.

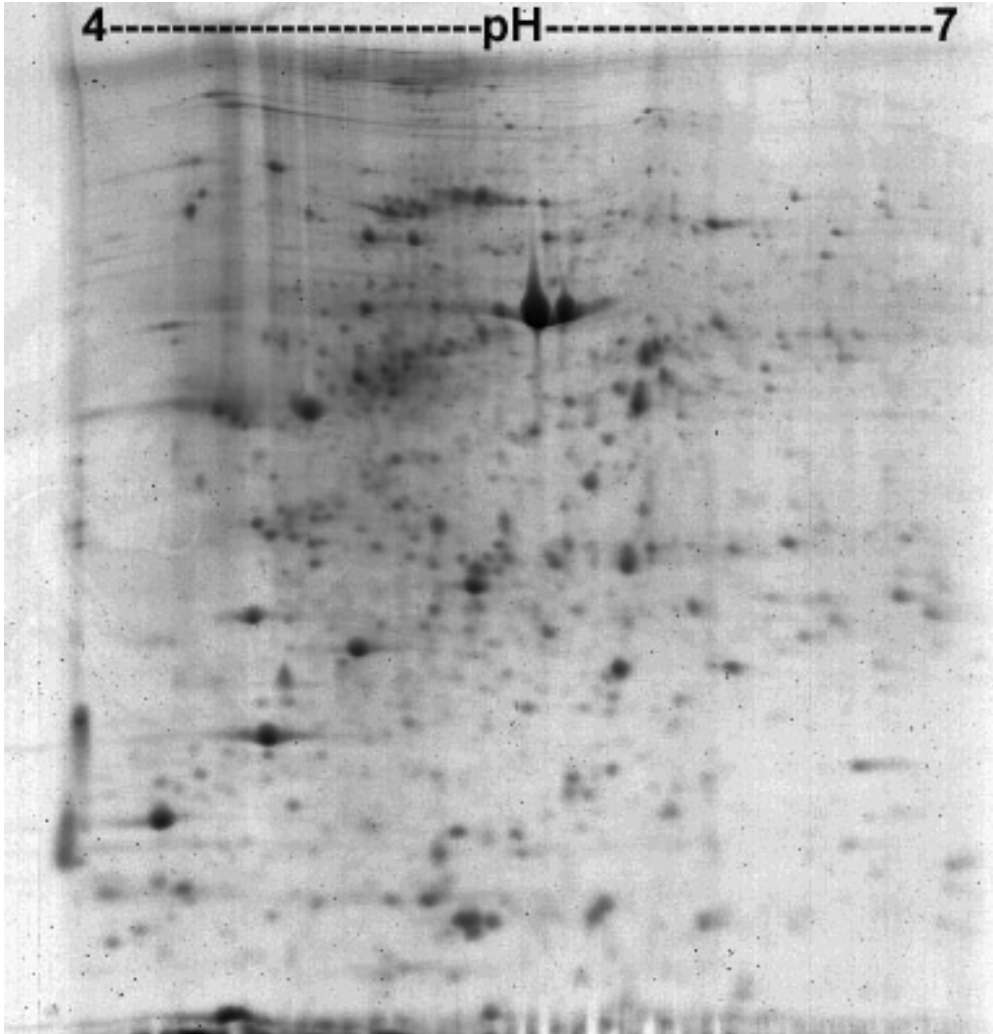
Mynd 6 sýnir SDS-PAGE rafdráttagel af floti þorsksýnanna frá degi 5 fyrir klak að degi 56 eftir klak. Í rás 1 á mynd 6a og rás 6 á mynd 6c má sjá mólmassastaðal, í rás 2 á mynd 6a, og rás 1 á myndum 6b og 6c er einangrað þorskatrypsín.



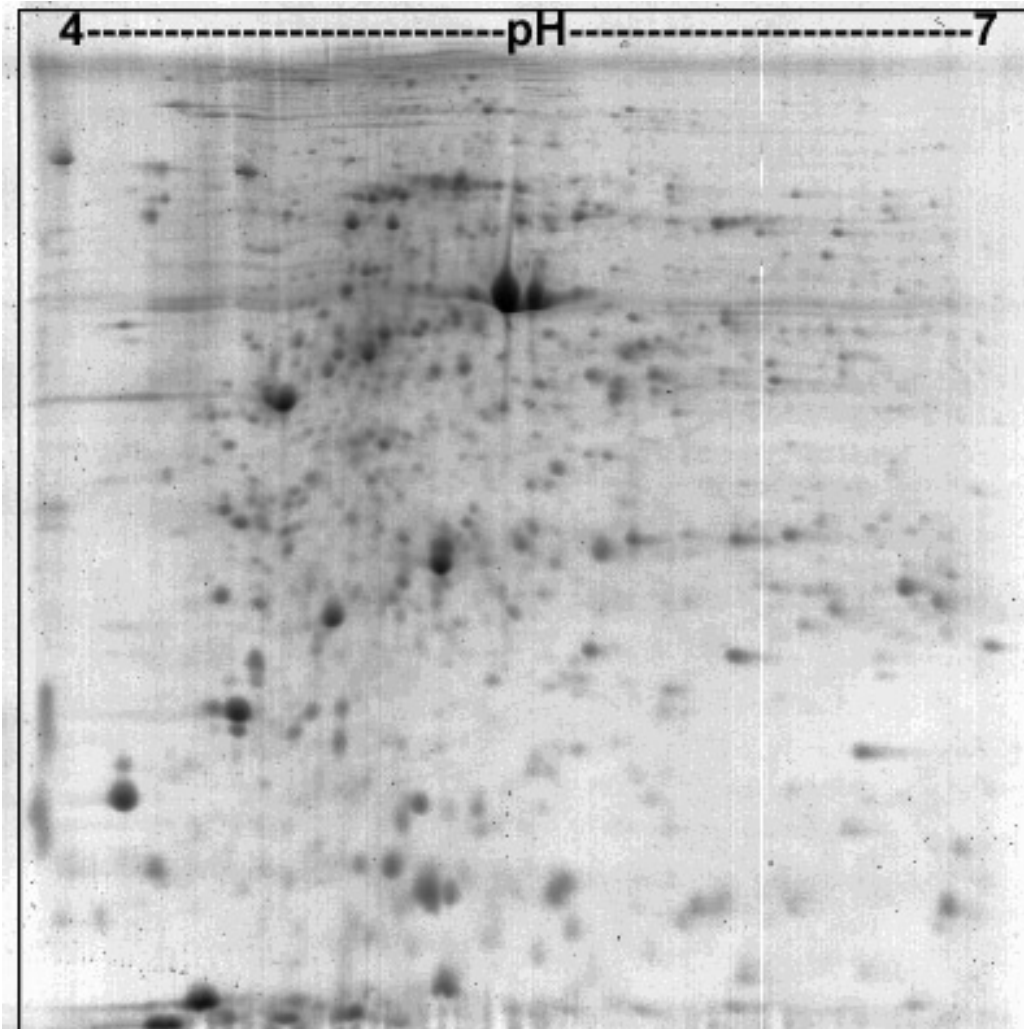
**Mynd 6 SDS-PAGE rafdráttargel af þorsklirfuflotum**

## Próteinmengjagreining

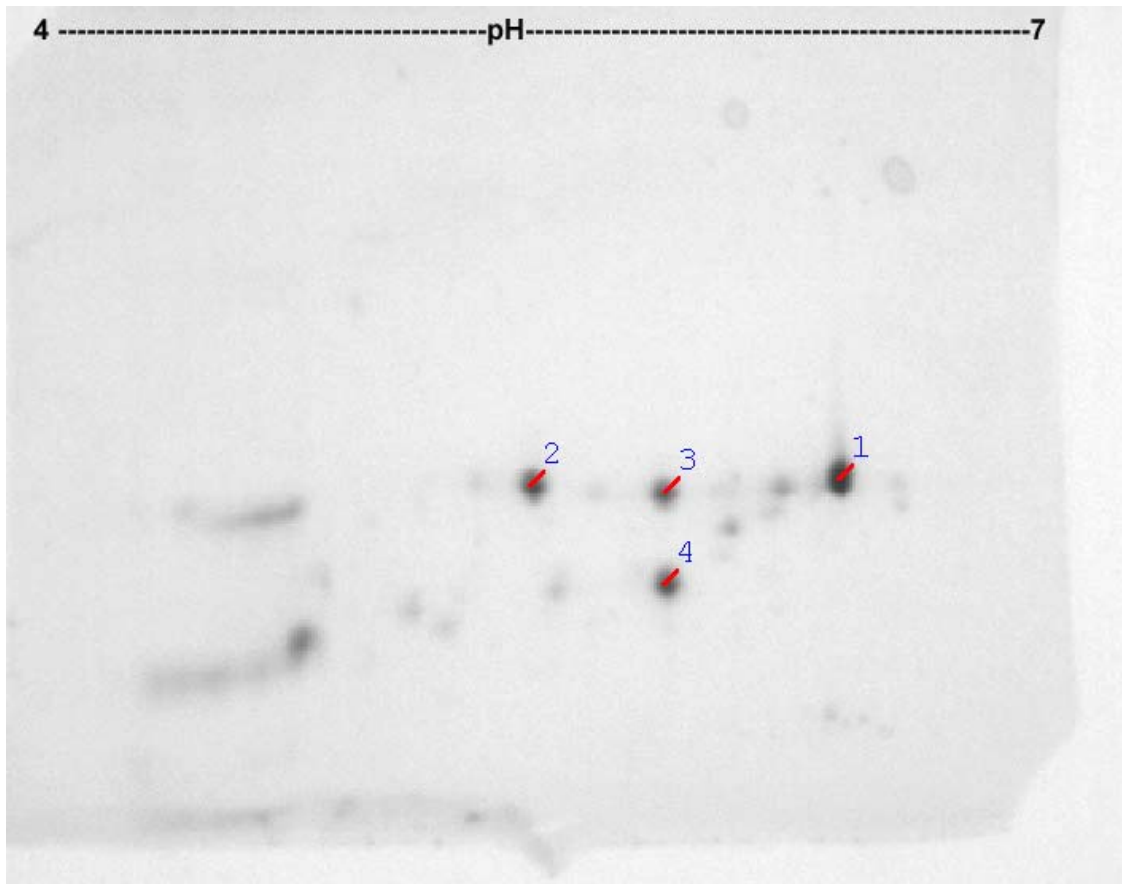
Þróun aðferða við próteinmengjagreiningu á þorsklirfum er lokið. Þróun aðferða fólst m.a. í því að finna aðferð til að leysa sem best próteinin út í lausn. Einnig þurfti að finna ræmur sem væru með rétta pH-bilið sem myndi taka yfir best yfir flest próteinin í lausninni. Einnig fólst þróun aðferða í að finna pólýacrýlamíð gel sem myndi gefa bestu upplausnina fyrir próteinin í lausninni. Þróun aðferða leiddi af sér eftirfarandi: Próteinextrakt fyrir tvívíðan rafdrátt var búið til með því að jafna lirfusýni í fjórföldu magni af í frumurofsböffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) DTT, 1% protease inhibitor cocktail), spunnið (11 500g í 10 mín) og flotið hirt. Próteinextraktið var blandað saman við bólgunarböffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) DTT), spunnið (11 500g í 5 mín) og pípetterað yfirá 11 cm IPG (immobilised pH Gradient, pH 4-7, BioRad, Hemel Hempstead, UK) ræmu. Jafnhleðslustilling próteina (fyrsta vídd) fór fram í þremur þrepum með aflíðandi (*ramped*) spennubreytingu milli þrepa (200 V í 1 mín. 3500 V í 90 mín og 3500 V í 7 klst, 2 mA og 5 W í öllum þrepum). Síðari vídd var gerð í 12% polyacrýlamíð geli (16×15 cm). Próteinin voru lituð með Colloidal Coomassie Blue G250 litun. Gelin voru skönnuð og vistuð sem bmp skjöl (myndir 6 og 7). Samanburðar gel var gert með hreinsuðu þorskatrypsíni (mynd 8). Deplarnir á samanburðargelinu voru sneiddir út úr gelinu og meltir með trypsíni án elúeringar (*in-gel trypsin digestion*). Niðurbrotsafurðirnar voru greindar með MALDI-TOF massagreini.



Mynd 6. Tvívíður prótein prófíll af þorsklirfum 6 dögum eftir klak.



Mynd 7. Tvívíður prótein prófill af þorsklirfum 24 dögum eftir klak.



Mynd 8. Tvívíður prótein prófíll af hreinsuðu þorskatrypsíni. Depill 1 og 2 sýna cod trypsinogen I (MM 25811 Da, pI 6.2) og depill 3 og 4 trypsinogen X (MM 25845 Da, pI 5.5).

### Umræða og ályktanir

Myndir 1-3 sýna hvað þorsklirfur hafa gríðarlega mikla vaxtargetu en lirfur sjávarfiska hafa mestu vaxtargetu allra hryggdýra. Eins og mynd 2 sýnir þá eru 17 mm langar lirfur að vaxa um ca. 0,5 mm á dag 43 dögum eftir klak. Hrogn og nýklaktar lirfur Atlantshafsporsks hafa tiltölulega mikla trypsinvirkni eins og sést á mynd 4. Hún minnkar þó strax eftir klak og nær lágmarki þremur vikum eftir klak. Svipað ferli sést einnig hjá öðrum sjávarfiskum, t.d. barra (Cahu og Zambonino Infante, 2001) og lúðu (Rojas Garcia og Rønnestad 2002). Þar sem trypsin virknin var mæld í heilum lirfum og lirfurnar uxu mjög hratt (sjá mynd 1-3) er sennilegt að hlutfallslegt magn trypsína hafi minnkað þar sem próteinmagn eykst í þorsklirfum eftir aldri. Í upphafi er það tiltölulega

jafnt (4-10 mg/mL) að 21. degi. Á 28. degi aftur á móti tók próteinmagn lirfanna stökk og var 25 mg/mL og jókst eftir það um 2 mg/mL á viku. Eftir að lirfurnar ná ákveðnum aldri væri sennilega betra að taka skúflangana og jafna þá út í böffer í staðinn fyrir að taka heila lirfu. Það sama má segja um chymotrypsín, þar nær virknin hámarki 10 dögum eftir klak en fellur svo niður í nánast ekki neitt og helst þannig til loka tilraunarinnar. Við jöfnun lirfanna losna próteinasa hindrar úr vöðvum og blóði og er líklegt að þeir séu að valda lítilli virkni eftir því sem lirfurnar vaxa og blóð- og vöðvamyndun eykst.

Niðurstöðurnar leiða í ljós að trypsínvirkni lirfanna er nánast engin um það leyti sem þær hefja fæðunám (u.þ.b. á 5 degi eftir klak) en það tímabil einkennist af hárrí dánartíðni og litlum vexti lirfanna (Blaxter, 1988). Mikilvægt er að meltinarením á borð við trypsín séu virk þegar forði lirfanna er uppurinn og þær algjörlega háðar utanaðkomandi fæðu. Áhugavert væri að rannsaka hvort auka mætti trypsínvirknina og þar með bæta meltingargetu lirfanna á þessu stigi, t.d. með viðbættum peptíðum eða próteinum, sem gæti verið liður í því að stuðla að bættri lifun í þorsklirfueldi.

Fjórir deplar greindust á tvívíðu rafdráttargeli (mynd 8). MALDI-TOF massagreining á deplunum leiddi í ljós tvær tegundir trypsína, cod trypsinogen I (MM 25811 Da, pI 6.2) og trypsinogen X (MM 25845 Da, pI 5.5).

Greining á tvívíðum rafdráttargeljum (myndir 6 og 7) af lirfuflotum í Phoretix 2-D Expression 2005 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) forritinu er ekki lokið. Hún mun leiða í ljós nákvæmar upplýsingar um tjáningu trypsína sem og annarra próteina í þorsklirfum annars vegar 6 dögum eftir klak og hins vegar 24 dögum eftir klak. Þar á eftir verða áhugaverð prótein sneidd út úr geli og skilgreind með MALDI-TOF massagreiningu.

## Heimildir

- Sveinsdóttir, H., Thorarensen, H. and Gudmundsdóttir, Á. (2006). "Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in the maturation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) eggs and embryos". *Aquaculture* (submitted for publication)
- Blaxter, J. H. S., 1988. Pattern and variety in development. Í: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (ritstj.). *Fish Physiology, Vol XIA*. Academic Press, San Diego, bls. 377-435.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200, 161-180.
- Rojas-García, C.R. and Rönnestad, I., 2002. Cholecystokinin and tryptic activity in the gut and body of developing Atlantic halibut larvae: evidence for participation in the regulation of protein digestion. *J Fish. Biol.*, 61, 973-986.