

Próteinmengjagreining á þorsklirfum (*Gadus morhua*) meðhöndluðum með fiskipeptíðum.



Hólfríður Sveinsdóttir¹, Agnar Steinarsson² og Ágústa Guðmundsdóttir¹.

¹Raunvísindastofnun Háskólans, Vatnsmýrarvegi 16, IS-101 Reykjavík.

²Hafrannsóknarstofnunin, Staður, IS-240 Grindavík



HAFRANNSÓKNASTOFNUNIN

INNGANGUR

Rannsóknir á lifrum sjávarfiska hafa sýnt að fyrstu dagarnir eftir upphaf fæðunáms einkennast af hárrí dánartíðni og litlum vexti (1). Ástæðuna má m.a. rekja til lélegrar meltingargetu lifranna en hún er háð magni og virkni trypsína (2). Því hefur stór hluti rannsókna á lifrum sjávarfiska beinst að því að auka lifun lifra í eldi með m.a. mismunandi frumfóðrun. Markmið verkefnisins er að skapa nýja þekkingu á áhrifum "jákvæðra" umhverfisþátta eins og peptíða á trypsín tjáningu sem og almenna próteintjáningu þorsklirfa (*Gadus morhua*) með hjálp próteinmengjagreiningar (proteome analysis).

AÐFERÐIR

Lirfueldið var framkvæmt í tilraunaeldistöð Hafrannsóknastofnunarinnar að Stað í Grindavík. Nýklöktum kviðpokalirfum var skipt upp í 2 hópa (7500 lifur/150 l síló). C- og P-hópur. Lirfuhóparnir voru fóðraðir 3svar með hjóldýrum (*Brachinous plicatilis*) og 2svar með þörungum daglega.

Meðhöndlun:

C-hópur: Engin meðhöndlun, viðmiðunarhópur.

P-hópur: 5 g próteinmelta (Ufsaprótein frá Prímex, Siglufirði) út í eldissjóinn daglega fyrstu 8 daga eftir klak (d.e.k.).

Í lok tilraunarinnar (24 d.e.k.) var lifun og meðalþurrvgit lifranna ákvörðuð. Sýni til próteinmengjagreininga fyrir P- hóp voru tekin á 6 d.e.k.

Próteinmengjagreining:

Lirfusýni (pooled sample) var jafnað í fjórföldu magni af frumurofsböffer, spunnid og flotið hirt (próteinextrakt). Próteinextrakti var blandað saman við bólgunarböffer og pípetterað yfirá pH stillta ræmu (pH 4-7). Jafnhleðslustilling próteina (fyrsta vídd) fór fram í þremur þrepum með aflíðandi spennubreytingu milli þrepa. Síðari vídd var gerð í 12% pólyacrýlamíð geli (16x15 cm) og rafdreigið í 100 Vklst., síðan við 200 V í 1300 Vklst. Próteinin voru lituð með Colloidal Coomassie Blue G250 litun. Gelin voru skönnuð og myndirnar greindar með Phoretix 2D tölvuforritinu. Depilmagn var staðlað m.t.t. heildarpróteinmagns á geli (*normal volume*) og samanburður á depilmagni einstakra prótína milli gelja framkvæmdur m.t.t. þess. Marktækni í próteintjáningu var metin með *student's t-test* ($n = 4$; $P \leq 0.05$). Fjórir próteindeklar af 2D (*two-dimensional*) geli af einangruðu þorskatrypsíni voru sneiddir út úr geli og greindir með MALDI-TOF massagreiningu.

NIÐURSTÖÐUR

Líffræðilegar rannsóknir

Tafla 1. Lifun (%) og þurrvgit (mg) \pm SEM þorsklirfa 24 d.e.k.

	Lifun (%)	Þurrvgit (mg) \pm SEM
C-hópur 24 d.e.k.	2.2	0.82 \pm 0.09
P-hópur 24 d.e.k.	12.5	0.62 \pm 0.04

Próteinmengjagreining

Tafla 2. Fjöldi próteindepla á 2D geljum ($n = 4$) \pm SEM.

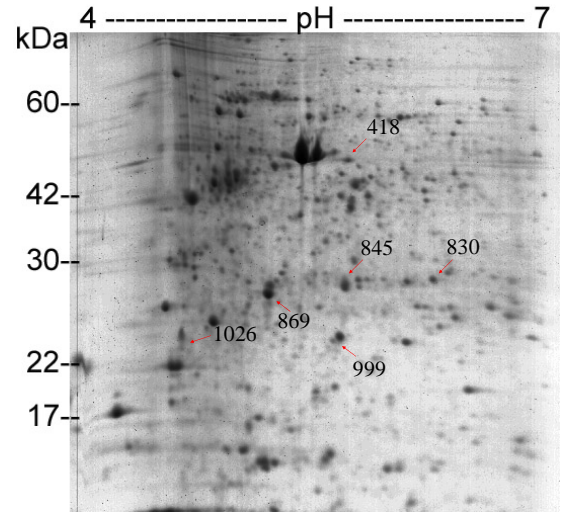
	Fjöldi próteindepla \pm SEM.
C-hópur 6 d.e.k.	422 \pm 6.21
P-hópur 6 d.e.k.	449.75 \pm 24.78

Student's t-test ($n=4$) leiddi í ljós að 17 próteindeklar voru tjáðir marktækt ($P \leq 0.05$) í minna magni og 36 próteindeklar í meira magni í meðhöndluðum lifrum (P-hóp) samanborið við viðmiðunarhóp (C-hóp). Þrjár próteindeklar voru tjáðir í meira en þrefalt meira magni í P-hóp og 3 próteindeklar voru tjáðir í meira en þrefalt minna magni samanborið við C-hóp.

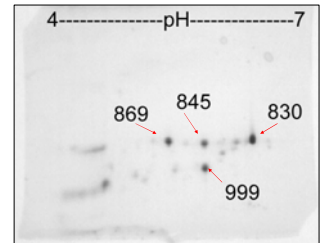
Heimildir:

- 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.
- Rojas-García, C.R. og 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.

Mynd 1. 2D próteinprófill af þorsklirfu-extrakti úr P-hóp (6 d.e.k.)

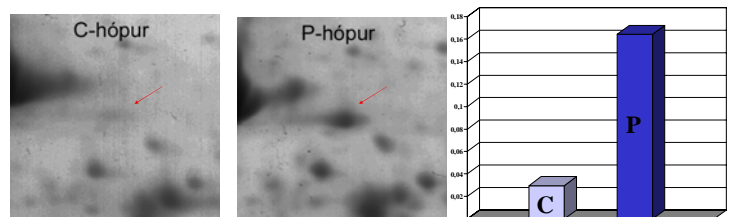


Mynd 2. 2D próteinprófill af einangruðu þorskatrypsíni. Niðurstöður úr MALDI TOF massagreiningu voru eftirfarandi: 830 og 999: Trypsinogen 1 (MM 25811 Da; pI 6.2). 869 og 845: Trypsinogen X (MM 25845 Da; pI 5.5).

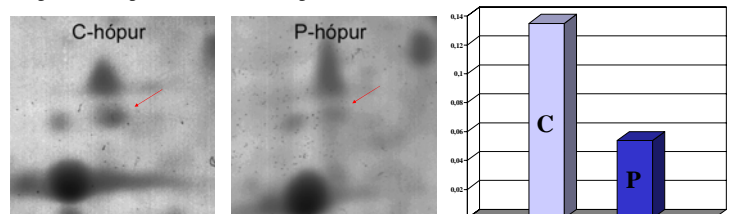


Tafla 3. Magn (*normal volume*) trypsíndepla á 2D geljum ($n = 4$) \pm SEM.

Próteindeplanr.	C-hópur	P-hópur	Áhrif á tjáningu
830	0.246 \pm 0.019	0.319 \pm 0.024	Jákvæð
845	0.943 \pm 0.124	0.858 \pm 0.055	Neikvæð
869	1.717 \pm 0.160	1.606 \pm 0.161	Neikvæð
999	0.905 \pm 0.086	0.745 \pm 0.050	Neikvæð



Mynd 3. Próteindepill 418 í C-hóp og P-hóp. Stöplariðið sýnir meðalmagn ($n = 4$) próteinsdepilsins í hvorum hópi.



Mynd 4. Próteindepill 1026 í C-hóp og P-hóp. Stöplariðið sýnir meðalmagn ($n = 4$) próteinsdepilsins í hvorum hópi.

UMRÆÐA

Meðhöndlun lifra með próteinmeltu fyrstu 8 d.e.k. eykur lifun þeirra en ekki vöxt sem skýra má með því að meiri lifun eykur samkeppni um fæðu. Meðhöndlunin hafði jákvæð áhrif á tjáningu trypsíns 1 (depill 830) sem mest er af í einangruðu þorskatrypsíni (sjá mynd 2) en aðrir trypsíndeklar voru í minna magni í meðhöndluðum lifrum. Í framhaldinu verða áhugaverðir próteindeklar þ.á.m. 418 og 1026 sneiddir út úr 2D geli og greindir í MALDI-TOF massagreini. Upplýsingarnar sem fást úr verkefninu verða nýttar við leit að lífmerkjum til að meta meltingargetu lifra í eldi. Einnig verður unnt að leggja þessar upplýsingar til grundvallar við þróun á fóðri.

Verkefnið var styrkt af Rannís og Rannsóknasjóði Háskóla Íslands