

Próteinmengjagreining á þorsklirfum (*Gadus morhua*) meðhöndluðum með peptíðum og bætibakteríum.

Hólmfríður Sveinsdóttir og Ágústa Guðmundsdóttir. Raunvísindastofnun Háskólans. holmfrs@hi.is

Inngangur: Markmið verkefnisins er að skapa nýja þekkingu á áhrifum peptíða og bætibaktería (probiotic bacteria) á tjáningu trypsína sem og annarra próteina í þorsklirfum (*Gadus morhua*) með hjálp próteinmengjagreiningar (proteomics). Rannsóknir á lifrum sjávarfiska hafa sýnt að fyrstu dagarnir eftir upphaf fæðunáms einkennast af hárrí dánartíðni og hægum vexti. Ástæðuna má m.a. rekja til lélegrar meltingargetu liffanna en hún er háð magni og virkni trypsína. Í verkefninu var leitast við að bæta meltingargetu liffanna með peptíðum og bætibakteríum.

Efniviður og aðferðir: Lirfueldið var framkvæmt í tilraunaeldisstöð Hafrannsóknarstofnunarinnar að Stað í Grindavík. Nýklöktum kviðpokalirfum var skipt upp í þrjá hópa: C-hópur (viðmiðunarsýni), P-hópur og B-hópur. Í hverjum hópi voru 7500 liffur í 150 l. liffusílóum. Hjá P-hópi voru sett 5 g af fiskpeptíðum út í eldissjóinn daglega fram að degi 8 eftir klak (e.k.). Hjá B-hópi voru sett 6 g af bætibakteríublöndu (REMUS frá Avecom, Belgía) út í eldissjóinn annan hvern dag fram að lokum tilraunarinnar (24. degi e.k.). Einnig fékk B-hópur hjóldýr einu sinni á dag (*Brachinous plicatilis*), sem áður voru böðuð upp úr bætibakteríublöndunni (12 g bætibakteríublanda/1 l hjóldýr). Lirfuhóparnir voru fóðraðir þrisvar sinnum á dag með hjóldýrum (1 l hjóldýr/lirfuhóp) og tvisvar á dag með þörungum (2,5 ml/lirfuhóp). Hitastigið var 9 °C, væg loftun, vatnsrennsli 750 ml/mín, og ljósstyrkur 300 lux 24 klst. á dag. Í lok tilraunarinnar var lifun og meðalþurrvgigt lifra í hverjum hópi ákvörðuð. Sýni voru tekin á degi 6 e.k. úr P-hópi og á degi 24 e.k. úr B-hópi til próteinmengjagreininga. Próteinextrakt fyrir tvívíðan rafdrátt var búið til með því að jafna liffusýni í fjórföldu magni af í frumurofsböffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) DTT, 1% protease inhibitor cocktail), spunnið og flotið hirt. Próteinextraktið var blandað saman við bólgunarböffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) DTT) og pípetterað yfirá IPG (immobilised pH Gradient) ræmu (pH 4-7). Jafnhleðslustilling próteina (fyrsta vídd) fór fram í þremur þrepum með aflíðandi spennubreytingu milli þrepa. Síðari vídd var gerð í 12% polyacrýlamíð geli (16×15 cm). Próteinin voru lituð með Colloidal Coomassie Blue G250 litun. Gelin voru skönnuð og myndirnar greindar með Phoretix 2D forritinu, þar sem trypsíndeplar voru staðsettir m.t.t. samanburðargels af hreinsuðu þorskatrypsíni. Deplar á samanburðargeli voru sneiddir út úr gelinu, meltir með trypsíni og peptíðin greind með MALDI-TOF massagreiningu.

Niðurstöður og ályktun: Lifun hjá B-hópnum var 23,9%, P-hópnum 12,5% og hjá C-hópnum 2,2%. Meðalþurrvgigtin var $0,74 \pm 0,06$ mg hjá B-hópnum, $0,62 \pm 0,04$ mg hjá P-hópnum og $0,82 \pm 0,09$ mg hjá C-hópnum. Meðhöndlun með bætibakteríum sem og peptíðum jók lifun liffanna samanborið við C hóp á meðan hún hafði neikvæð áhrif á vöxt þeirra. Fjórir próteindeplar greindust á geli af einangruðu þorskatrypsíni. MALDI-TOF massagreining leiddi í ljós tvær tegundir trypsína, cod trypsinogen I (MM 25811 Da, pI 6.2) og trypsinogen X (MM 25845 Da, pI 5.5). Trypsíndeplarnir hafa allir verið staðsettir á geljum af extrakti þorsklirfuhópanna. Nákvæmari greining í Phoretix 2D forritinu á geljunum er ekki lokið en hún mun leiða í ljós hvort munur sé á tjáningu trypsína sem og annarra próteina milli meðhöndlananna.