

低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺蛋白质表达及脂肪酸组成的变化

孔祥会^{1,2} 王桂忠¹ 王克坚¹ 李少菁¹

(1. 厦门大学海洋学系, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005; 2. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

摘要:锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 在不同低温下经3周驯化后, 采用双向电泳 (Two division electrophoresis, 2D-E) 和气相色谱 (Gas chromatography, GC) 分别对肝胰腺中蛋白质表达和脂肪酸组成变化进行研究, 结果发现 5℃ 驯化组与 27℃ 组相比, 肝胰腺中共有 22 种蛋白的变化, 其中 5℃ 驯化组有 15 种蛋白在 27℃ 组没有检出, 而 27℃ 组有 7 种蛋白在 5℃ 驯化组没有发现; 10℃ 驯化组与 27℃ 组相比, 共有 18 种蛋白变化, 10℃ 驯化组有 14 种蛋白在 27℃ 组没有检出, 27℃ 组有 4 种蛋白在 10℃ 驯化组没有出现; 锯缘青蟹 15℃ 驯化组与 27℃ 组相比, 肝胰腺中有 6 种蛋白质有变化, 其中驯化组分离出 5 种在 27℃ 组没有检出的蛋白质, 27℃ 组分离出 1 种在驯化组没有出现的蛋白质。27℃ 组没有检出, 仅在驯化组中出现的蛋白质中, 经 Imagemaster2D Elite 软件分析后发现 5℃ 和 10℃ 驯化组有 14 种蛋白质在图谱上是匹配的 (即是同样的), 15℃ 驯化组表达的 5 种蛋白与 5℃ 驯化组和 10℃ 驯化组表达的蛋白不匹配。低温驯化 3 周后锯缘青蟹肝胰腺中饱和脂肪酸 \sum SFA 在 5℃ 和 10℃ 驯化组显著低于 27℃ 组 ($P < 0.05$), 而 \sum UFA 在 5℃ 和 10℃ 驯化组显著高于 27℃ 组 ($P < 0.05$), 相应地 5℃ 和 10℃ 驯化组饱和指数 \sum SFA/ \sum UFA 也显著低于 27℃ 组 ($P < 0.05$), 其主要是 \sum PUFA- ω 6 低温驯化下显著升高 ($P < 0.01$) 所致。结论表明锯缘青蟹不同低温驯化下, 肝胰腺细胞中蛋白质表达是一种动态变化模式。驯化温度越低, 差异蛋白变化越大。低温驯化下脂肪酸饱和指数降低, 主要是维持低温下肝胰腺正常的生理功能。

关键词: 差异蛋白; 脂肪酸; 肝胰腺; 低温驯化; 锯缘青蟹

中图分类号: Q594

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)05-0524-09

生物体生活的环境条件改变时, 其组织细胞中蛋白质表达发生相应的变化, 既有蛋白质表达量的消长, 又有蛋白种类的变化, 以此适应外界环境的变化。通过双向电泳以确定环境变化时蛋白质的表达变化, 是研究生物体环境适应性调控的重要方法^[1]。水生动物中关于蛋白质的研究报道, 目前大多集中于酶活性^[2], 等位酶^[3], 可溶性蛋白含量^[4]及组分^[5]的变化, 对于环境低温驯化下蛋白质表达变化很少进行更细的分离和研究。

肝胰腺是甲壳动物脂类代谢的中心, 其组织中脂肪酸组成可以反应机体的营养水平。也可以反应机体摄食状况, 健康水平及环境改变时机体的生理生化调节。锯缘青蟹^[6,7], 中华绒螯蟹^[8]和虾类^[9]等甲壳动物中关于脂肪酸组成的相关研究已有报道, 但大多集中于营养, 生殖和发育等方面, 而低温

驯化对其脂肪酸组成变化的研究相对较少。

锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 是生活在河口海区的一种重要经济甲壳动物, 其生活的环境温度经常发生变化, 研究其温度变化时组织中蛋白质的表达及脂肪酸组成的变化, 对于探讨其低温环境适应有重要意义。本研究对锯缘青蟹进行低温驯化 3 周后, 通过研究其肝胰腺中蛋白质表达及脂肪酸组成的变化, 以此来探讨低温驯化下锯缘青蟹的低温适应机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 采用来自福建诏安国家“863”青蟹育苗基地同一批亲蟹繁殖的, 在同一池培育的雄性幼蟹用于实验。选择体色鲜艳, 无病无伤, 规格整齐的 60 只幼蟹, 随机分为 4 组。各组幼蟹低温驯养前, 个体基本情况见表 1。

收稿日期: 2005-04-11; 修订日期: 2005-05-20

基金项目: 国家“863”重大专项 (2002AA603013) 资助

作者简介: 孔祥会 (1968—), 男, 博士, 副教授, 主要从事水生动物环境适应与分子进化研究. E-mail: xhkong@henannu.edu.cn

通讯作者: 王桂忠, E-mail: gzwang@jingxian.xmu.edu.cn

表 1 低温驯化青蟹幼蟹分组基本情况

Tab.1 Grouping status of *S. serrata* juveniles for low temperature acclimation

	驯化组 (Acclimation group)			27℃
	5℃	10℃	15℃	
头胸甲宽(cm)Carapace width	3.06 ± 0.27	2.88 ± 0.24	2.95 ± 0.24	2.86 ± 0.18
头胸甲长(cm)Carapace length	2.16 ± 0.21	2.09 ± 0.18	2.13 ± 0.18	2.08 ± 0.17
体重(g)Body weight	5.04 ± 1.18	4.60 ± 1.13	4.69 ± 1.07	4.53 ± 0.49

1.2 低温驯化 幼蟹单只饲养,养殖容器为体积 2L 的半透明圆柱状塑料皿;控温装置为大容积光照生物培养箱;光周期为:12L:12D,养殖用水为沙滤海水,经充氧曝气 24h 和充分沉淀后使用。盐度为 25。每 3d 换水 1 次。投饵以幼蟹专用配合饲料和菲律宾杂色蛤仔。在适应、降温和驯化期间管理条件一致。

幼蟹适应 1 周后进行降温。降温速度 1℃/12 h,降至设定温度后恒温,开始计算驯化时间。实验组驯化期间水温分别为 5 ± 1.5℃,10 ± 1.5℃和 15 ± 1.5℃,正常饲养组为自然水温(27 ± 2.5℃)。驯化期间定期换水,海水温度降至设定温度后迅速换水。每天早中晚定期观察,并做好记录。

1.3 2D-E 电泳和分析 解剖锯缘青蟹,迅速取出肝胰腺,电子天平称取 0.2g 混合样品(每组 10 只蟹,每只蟹取 0.02g,本实验取混合样品主要目的是为了忽视个体间差异,以观察驯化组群体间蛋白表达总体差异),按质量体积之比 1:5(g:ml)加入预冷的 10% TCA(溶于丙酮,内含 0.1% DTT)。冰浴上匀浆, -20℃ 冰箱过夜,使蛋白质充分变性。采用 Eppendorf 5810R (Made in Germany) 低温离心机离心, 4℃, 20,000r/min 离心 50min,然后弃上清,每管加入 1mL 0.1% DTT 的丙酮液悬浮蛋白沉淀,超声波处理 2min,振荡器上振荡 5min,然后 4℃, 20,000r/min 离心 50min,然后再重复洗涤 1 次(不需超声),然后真空冷冻干燥沉淀。每管加入 0.8mL 裂解液(7.5mol/L urea, 2mol/L thiourea, 4% CHAPS, 40 mmol/L Trisbase, 40mmol/L DTT, 2% IPG buffer (pH3-10), 充分混匀。4℃下裂解 2h。4℃, 20,000r/min 离心 50min,取上清分装于 1.5mL 的离心管中,存于 -80℃ 冰箱备用。按照 Bradford 方法进行蛋白定量^[10]。

IEF (Isoelectrophoresis focusing) 使用 Immobiline™ pH3-10 线性 IPG 预制干胶条(购自 Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 在 IPGphor 电泳仪 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 上完成。取样品和溶胀液(8mol/L urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer, 0.002% 溴

酚蓝), 溶液中加少许 DTT。13cm 胶条上样量为 150μg 蛋白;溶胀液总体积为 250μL。然后加覆盖液 2mL, 进行溶胀和 IEF。

本实验采用低电压溶胀, IPGphor 胶条经低电压溶胀后可自动进行 IEF。20℃ 每个 IPG 胶条最大电流 0.05mA。基准液(50mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 6mol/L urea, 30% glycerol, 2% SDS)。加入 0.01g/mL DTT 即为平衡液 I; 加入 0.04g/mL IAA, 即为平衡液 II。每次平衡 15min。

SDS-PAGE 使用自制 SDS 凝胶(160mm × 180mm × 1.5mm, T = 10%, C = 2.6%) 在 SE600 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 进行恒流电泳 (Step 1: 10mA per gel, 15min; Step 2: 20mA per gel, 5.5h)。蛋白 Marker (Fermentas com.)。AA/BA 贮液 (T = 30.8%, C = 2.6%), 分离胶缓冲液贮液 (1.5mol/L Tris-HCl, pH8.8); 电极缓冲液 (25mmol/L Tris, 192mmol/L Glycine, 0.1% SDS, pH8.3)。采用银染对蛋白点进行定量和定性。

在 Image Scanner 扫描仪 (UMAX Power 1100) 上用 Labscan3.01 扫描软件进行扫描, 然后使用 Imagemaster 2D Elite 分析软件进行分析。比较分析时, 对于模糊不清的点不计, 仅是比较差异表达明显的点。

蛋白质的分子量计算是以已知分子量的一组蛋白质作为标准, 利用 Imagemaster 2D Elite 分析软件进行计算, 从而确定图中各蛋白点的分子量; 同理根据胶条的已知 pH 值梯度进行计算, 从而确定图中各蛋白质的等电点。相对蛋白含量以蛋白点光密度体积 (Norm. Vol.) 占总体积的百分比 (%) 计算。为了研究方便, 人为地把蛋白分为高含量蛋白 (protein contents ≥ 0.50%); 中含量蛋白 (0.50% > protein content ≥ 0.10%); 低含量蛋白 (0.10% > protein content ≥ 0.05%); 微量蛋白 (protein content < 0.05%)。

1.4 脂肪酸组成测定 脂肪酸测定标准系列购于美国 Fluka 公司, 包括 C14:0, C16:1 ω7, C 16:0, C18:2 ω6, C18:1 ω9, C18:3 ω3, C18:0, C19:0, C20:4 ω6, C20:5 ω3, C20:1 ω9, C20:3 ω3, C20:0, C22:6 ω3, C22:1 ω9, C22:0, C24:1 ω9, C24:0, C26:0, 其中 C19:0 作为内标^[5]。正

己烷,甲醇为国产色谱纯,其他试剂为国产分析纯。

样品预处理及脂肪酸测定参见 Kong(2004)方法^[11]。

1.5 统计分析 采用 EXCEL 2000 统计分析软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和独立性 t 检验。

2 结果

2.1 低温驯化锯缘青蟹肝胰腺蛋白质表达的变化

锯缘青蟹低温驯化下肝胰腺中蛋白质表达发生了较大的变化(表2—表5;图1)。5℃驯化组肝胰腺中

表 2 5℃驯化组锯缘青蟹肝胰腺蛋白质表达的变化

Tab.2 Changes of specific proteins in hepatopancreas of *S. serrata* under 5℃ acclimation

5℃				27℃			
蛋白点编号 Protein code	蛋白含量 Protein content	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight	蛋白点编号 Protein code	蛋白含量 Protein content	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight
2	0.21	6.45	84.77	82(a)	1.20	5.85	27.40
3	0.59	6.57	83.84	137(a, b)	1.27	4.25	20.73
4	0.56	6.70	83.61	157(a)	2.79	5.46	18.90
39	0.33	7.16	43.07	158(a)	0.73	7.22	18.88
44	0.84	7.10	41.85	161(a)	3.01	4.99	18.81
57	0.56	6.87	40.18	163(a, b)	2.58	4.75	18.75
60	0.73	5.81	40.08	171(a, b)	4.72	4.20	18.09
61	0.98	5.98	39.91				
87	2.18	6.55	37.26				
108	1.05	7.84	33.03				
120	3.75	6.86	29.92				
130	0.79	6.07	26.62				
141	1.77	6.46	24.24				
146	0.85	7.84	23.33				
199	1.04	7.37	16.29				

注:蛋白点编号指用 ImageMaster 2D Elite 软件对凝胶图像分析时对检测到的蛋白点的编号;蛋白含量指相对蛋白含量(每个点进行 Normalization 后,每个点体积占所有点总体积的百分比%);5℃组与 27℃组各蛋白指两图谱比较而言,27℃组蛋白点编号一列中 a, b 和 c 分别表示与 5℃, 10℃ 和 15℃ 驯化组相比检出的差异蛋白。此注解适用于本文中表 2, 表 3, 表 4。

表 3 10℃驯化组锯缘青蟹肝胰腺蛋白质表达的变化

Tab.3 Changes of specific proteins in hepatopancreas of *S. serrata* under 10℃ acclimation

10℃				27℃			
蛋白点编号 Protein code	蛋白含量 Protein content	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight	蛋白点编号 Protein code	蛋白含量 Protein content	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight
2	0.17	6.77	88.09	137(a, b)	1.27	4.25	20.73
3	0.19	6.64	87.60	163(a, b)	2.58	4.75	18.75
18	0.33	7.25	44.20	171(a, b)	4.72	4.20	18.09
23	0.58	7.21	42.80	189(b)	1.59	3.80	14.65
33	0.47	6.97	40.61				
35	0.53	5.89	40.35				
36	0.86	6.06	40.13				
56	2.07	6.64	37.53				
72	0.22	7.94	34.67				
81	3.21	6.97	31.52				
96	1.58	6.17	27.78				
106	2.76	6.59	25.91				
108	0.60	7.95	25.54				
157	0.35	5.48	19.06				

表 4 15℃驯化组锯缘青蟹肝胰腺蛋白质表达的变化

Tab.4 Changes of specific proteins in hepatopancreas of *S. serrata* under 15℃ acclimation

15℃				27℃			
蛋白点编号 Protein code	蛋白含量 Protein content	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight	蛋白点编号 Protein code	蛋白含量 Protein content	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight
81	0.65	6.16	23.51	135(c)	0.61	6.43	21.16
104	0.33	6.62	20.80				
150	0.89	8.69	17.61				
152	1.96	9.07	17.52				
160	1.54	5.39	15.97				

表 5 不同低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺差异蛋白的匹配

Tab.5 Matches of specific difference proteins in hepatopancreas of *S. serrata* under different low temperature acclimation

驯化温度 Acclimation temperature			27℃
5℃	10℃	15℃	
2		81	82(a)
3m	3m	104	135(c)
4m	2m	150	157(a)
39m	18m	152	158(a)
44m	23m	160	161(a)
57m	33m		163(a,b)
60m	35m		137(a,b)
61m	36m		171(a,b)
87m	56m		189(b)
108m	72m		
120m	81m		
130m	96m		
141m	106m		
146m	108m		
199m	171m		

注:表内数字表示蛋白点编号,数字后 m 表示匹配(matches),同一行中标有 m 的各蛋白点为匹配蛋白。

蛋白质表达与 27℃组相比,共有 22 种蛋白质的变化,其中 5℃驯化组有 15 种蛋白质在 27℃组没有出现,而 27℃组有 7 种蛋白质在 5℃驯化组没有检出。肝胰腺表达的差异性蛋白大多属于高含

量或中含量蛋白;驯化组差异蛋白质等电点大多为中性或偏酸性,而 27℃组大多为酸性,没有检出碱性差异蛋白;5℃驯化组差异蛋白质分子量为 16.29—84.77;27℃组为 18.09—27.40。

10℃驯化组与 27℃组相比,共有 18 种差异蛋白质的变化,其中驯化组 14 种,27℃组有 4 种,即 10℃驯化组表达了 14 种 27℃组没有表达的蛋白质,27℃组检出了 4 种蛋白,在 10℃驯化组没有表达。10℃驯化组肝胰腺中表达的差异蛋白等电点大多为中性或偏酸性,其分子量为 19.06—88.09;27℃组表达的差异蛋白质等电点为酸性,分子量较低,为 14.65—20.73。锯缘青蟹 15℃驯化组与 27℃组相比,肝胰腺中共有 6 种蛋白质表达的变化,其中驯化组 5 种,27℃组 1 种,即 15℃驯化组表达了 5 种蛋白质 27℃组没有表达,27℃组也检出 1 种 15℃组没有表达的蛋白。相对蛋白含量为高含量蛋白或中含量蛋白。15℃驯化组肝胰腺中差异蛋白质等电点在 5.39—9.07 之间,分子量较低,在 15.97—23.51 之间;27℃组等电点为 6.43,分子量为 21.16。

不同低温驯化组锯缘青蟹肝胰腺中表达的而 27℃组没有检出的蛋白匹配见表 5(蛋白匹配指不同样品做出的 2-DE 电泳图谱在比较蛋白点差异时,由于电泳胶的变形,分析软件会用几何学测度计算得出不同胶上属于同一种的蛋白点,即为蛋白匹配)。5℃和 10℃驯化组肝胰腺中有 14 种蛋白质是匹配的(匹配的蛋白即为同一种蛋白)。15℃驯化组表达的 5 个差异蛋白点与 5℃和 10℃驯化组不匹配,即 15℃驯化表达的 5 种差异蛋白质与 5℃和 10℃驯化下表达的蛋白不一样。

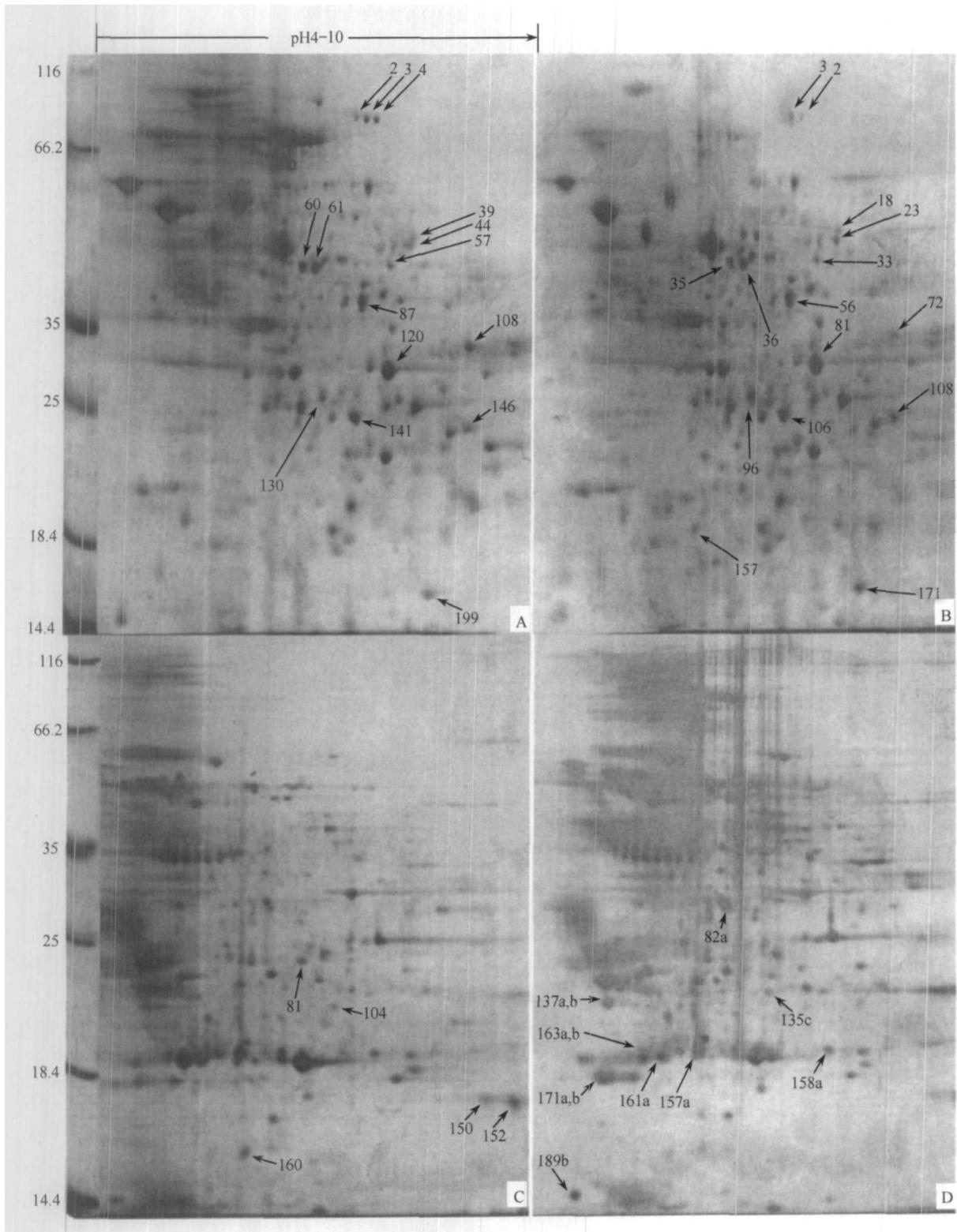


图1 锯缘青蟹肝胰腺2D-E电泳图

Fig. 1 2D-E maps of proteins in hepatopancreas of *S. serrata* under different temperature acclimation

图注:图左外侧表示蛋白质 Marker 分子量,单位为 kD,图中 pH 范围仅显示 4→9(实验中所用固相化胶条的 pH 为 3→10) 图 A,B,C 和 D 分别表示 5℃,10℃,15℃ 驯化组和 27℃ 组,图中差异蛋白以箭头标出,箭头一端所标数字为 ImageMaster 2D Elite 软件分析时对应蛋白点的编号.图 A,B 和 C 中箭头注明的蛋白点表示与 27℃ 组肝胰腺 2D-E 比较的差异蛋白;图 D 中数字后 a,b 和 c 分别表示与 5℃,10℃ 和 15℃ 驯化组的差异蛋白

2.2 低温驯化锯缘青蟹肝胰腺脂肪酸组成的变化

低温驯化 3 周后青蟹肝胰腺中脂肪酸组成见表 6。脂肪酸以 C16:0、C18:2、C18:1、C20:5 和 C22:6 为主。其中 C16:0 随驯化温度降低而降低, 5℃ 驯化组最低, 与 27℃ 组之间具有显著性差异 ($P < 0.05$); C16:1、C18:0、C18:1、C20:4 和 C22:6 在低温驯化组与 27℃ 组间差异不显著 ($P > 0.05$); C20:5 在 5℃ 驯化组显著高于 27℃ 组 ($P < 0.05$)。∑SFA 在 5℃ 和 10℃ 驯化组显著低于 27℃ 组 ($P < 0.05$), 而 ∑UFA 在 5℃ 和 10℃ 驯化组显著高于

27℃ 组 ($P < 0.05$), 相应地 5℃ 和 10℃ 驯化组 ∑SFA/∑UFA 也显著低于 27℃ 组 ($P < 0.05$)。∑MUFA 和 ∑PUFA-ω3 低温驯化组与 27℃ 组之间没有显著差异 ($P > 0.05$), 而 ∑PUFA-ω6 低温驯化下显著高于 27℃ 组 ($P < 0.01$), ω6/ω3 低温驯化下升高, 但仅 15℃ 驯化组与 27℃ 组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), EPA + DHA 在低温驯化组与 27℃ 组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但 EPA/DHA 在 15℃ 驯化组显著低于 27℃ 组 ($P < 0.05$), 而在 5℃ 驯化组显著升高 ($P < 0.01$)。

表 6 低温驯化锯缘青蟹肝胰腺中脂肪酸组成的变化(相对比例, %)($M \pm SD$)($n = 3$)

Tab. 6 Changes of the fatty acid composition in hepatopancreas of *S. serrata* under low temperature acclimation(relative proportion, %)
(Means \pm Standard deviation)($n = 3$)

脂肪酸 Fatty Acid	驯化温度 Acclimation temperature			27℃
	5℃	10℃	15℃	
C14:0	1.84 \pm 0.42	1.27 \pm 0.61	1.95 \pm 0.64	2.02 \pm 0.89
C16:1ω7	4.41 \pm 0.82	3.40 \pm 0.92	3.95 \pm 1.36	2.99 \pm 0.45
C16:0	14.42 \pm 2.36*	15.14 \pm 1.92	17.45 \pm 2.12	20.46 \pm 2.86
C18:2ω6	7.96 \pm 1.49	10.91 \pm 0.99*	12.61 \pm 1.01**	7.32 \pm 1.00
C18:1ω9	30.89 \pm 3.99	25.69 \pm 2.95	26.86 \pm 2.54	25.07 \pm 2.16
C18:3ω3	2.46 \pm 0.76	6.23 \pm 0.92	3.53 \pm 0.60	4.67 \pm 1.25
C18:0	5.28 \pm 0.97	5.40 \pm 1.16	4.92 \pm 1.10	6.63 \pm 1.59
C20:4ω6	4.13 \pm 1.19	3.42 \pm 0.44	2.47 \pm 0.98	2.62 \pm 0.64
C20:5ω3	8.11 \pm 1.33*	5.82 \pm 1.51	4.95 \pm 0.97	5.34 \pm 0.93
C20:1ω9	1.00 \pm 0.55**	4.51 \pm 0.92	1.54 \pm 0.37**	4.96 \pm 0.58
C20:3ω3	1.52 \pm 0.81	1.20 \pm 0.58	1.22 \pm 0.54	1.20 \pm 0.65
C20:0	1.53 \pm 0.69	1.47 \pm 0.61	1.68 \pm 0.62	1.82 \pm 0.74
C22:6ω3	10.80 \pm 1.98	10.84 \pm 2.45	13.10 \pm 2.22	11.55 \pm 2.51
C22:1ω3	1.85 \pm 0.80	1.57 \pm 0.60	1.07 \pm 0.24	1.30 \pm 0.64
C22:0	1.09 \pm 0.52	0.87 \pm 0.21	0.95 \pm 0.22	0.83 \pm 0.30
C24:1	1.00 \pm 0.23	0.57 \pm 0.10	0.64 \pm 0.33	0.39 \pm 0.34
C24:0	0.61 \pm 0.36	0.58 \pm 0.24	0.61 \pm 0.21	0.43 \pm 0.15
C26:0	1.11 \pm 0.22	1.12 \pm 0.50	0.48 \pm 0.17	0.39 \pm 0.18
∑SFA	25.88 \pm 2.89*	25.85 \pm 2.61*	28.05 \pm 4.68	32.58 \pm 0.82
∑MUFA	39.15 \pm 3.51	35.74 \pm 0.58	34.06 \pm 2.76	34.71 \pm 2.47
∑PUFA-ω6	12.09 \pm 0.49**	14.33 \pm 1.06**	15.09 \pm 0.32**	9.94 \pm 0.53
∑PUFA-ω3	22.89 \pm 2.17	24.08 \pm 2.46	22.80 \pm 2.15	22.77 \pm 2.91
∑UFA	74.12 \pm 2.88*	74.15 \pm 2.60*	71.95 \pm 4.68	67.42 \pm 0.82
∑SFA/∑UFA	0.35 \pm 0.05*	0.35 \pm 0.05*	0.39 \pm 0.09	0.48 \pm 0.02
ω6/ω3	0.53 \pm 0.07	0.60 \pm 0.08	0.67 \pm 0.06*	0.44 \pm 0.07
EPA + DHA	18.91 \pm 3.25	16.65 \pm 3.89	18.05 \pm 3.19	16.89 \pm 3.37
EPA/DHA	0.75 \pm 0.06**	0.53 \pm 0.06	0.38 \pm 0.01*	0.47 \pm 0.04

注: ∑SFA 表示饱和脂肪酸之和; ∑MUFA 表示单不饱和脂肪酸之和; ∑PUFA 表示多不饱和脂肪酸之和; ∑UFA 表示不饱和脂肪酸之和。与 27℃ 组之间统计分析时, “**” 表示具有极显著性差异 ($P < 0.01$); “*” 表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 低温驯化锯缘青蟹肝胰腺蛋白质表达的变化

生物体组织细胞中蛋白质的表达及二级结构的折叠与环境具有密切相关性^[12,13],虽然特定环境下的蛋白质表达可以从 mRNA 的表达差异有所显示,但不能够准确反应细胞内蛋白质表达和数量的变化^[14]。为了全面理解生物体变化的调控,就需要对细胞所有蛋白质的表达变化进行研究,而蛋白质的许多信息可以从 2D-E 电泳中加以确定,因此确定某一生物特定组织中特异蛋白质表达对于研究环境驯化适应机制具有重要意义。

低温驯化锯缘青蟹肝胰腺中差异蛋白质的变化与 27℃ 组相比,5℃ 驯化组共有 22 种差异蛋白质的变化(驯化组 15 种,27℃ 组 7 种);而 10℃ 驯化组共有 18 种差异蛋白质的变化(驯化组 14 种,27℃ 组 4 种);15℃ 驯化组共有 6 种差异蛋白质的变化(驯化组 5 种,27℃ 组 1 种),表明驯化温度越低,差异蛋白质变化越大。从匹配情况来看,5℃ 和 10℃ 驯化组肝胰腺中表达的差异蛋白有 14 种匹配,15℃ 驯化组表达的 5 种差异蛋白与 5℃ 和 10℃ 表达的差异蛋白不匹配,表明 5℃ 和 10℃ 驯化组蛋白质表达的变化与 15℃ 驯化组之间存在较大差异。

低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺中蛋白质的表达随环境低温的变化而发生相应的变化,处在蛋白质数量和种类不断变化的动态过程中。环境温度降低时,蛋白质表达变化是机体为了适应环境变化在蛋白质水平上进行的调控,这种差异蛋白质一般是代谢酶的同工酶,应激蛋白,信号调控蛋白等功能性蛋白,其作用是对体内生理生化代谢水平进行调节,以与外界环境的变化相适应。从实验结果来看,当驯化温度较低时,肝胰腺差异蛋白质较多,这可能是肝胰腺在机体生理代谢上具有重要的作用,多种蛋白质表达以适应低温环境,从而致使低温驯化下蛋白质种类及数量发生较大变化;另一方面也有蛋白质的分解以满足环境变化时机体的生理代谢和能量需求。温度变化时水生动物器官组织中蛋白质的表达变化报道较少,本实验结果难以进行相关的比较和讨论,但 Gilles 对中华绒螯蟹盐度应激鳃中蛋白质表达进行研究,发现当环境盐度较高时,血清蛋白的总数量明显降低^[15],从而推测当环境温度变化时也会发生蛋白质表达的变化。

本研究中有兴趣的一个现象是 5℃ 和 10℃ 驯化组青蟹肝胰腺中差异蛋白质的表达基本一致,但 15℃ 驯化组表达的差异蛋白质与 5℃ 和 10℃ 驯化组

不同。由此来看 5℃ 和 10℃ 驯化组与 15℃ 驯化组比较,差异蛋白质的表达相差较大,表明 15℃ 驯化下锯缘青蟹采用的低温适应调控模式与 5℃ 和 10℃ 可能有所差异。

2D-E 是分离蛋白质的一种有效方法^[16],近几年也不断得到完善和提高,其研究目的是分离所有蛋白,然而一个典型细胞中总蛋白 90% 的含量是由总蛋白点的 10% 组成^[17,18],即使采用最大上样量和较长的电泳分离时间,微量蛋白也难以检测到^[19,20],有时许多个基因产物迁移至凝胶上同一位置,这样给蛋白质定量和分析带来困难^[19]。说明该研究方法具有一定的局限性,还需要在今后的研究中加以提高和完善。本实验中采用宽 pH 值(3—10)范围的固相化 pH 梯度(IPG)胶条仅是为了观察组织中蛋白点的分布概况和确定比较明显的蛋白点差异,对于更精确的研究还需要采用窄 pH 范围的 IPG 胶条以增大检测灵敏度,所以对于差异功能蛋白的精确研究和特征判定还需要作更深入的 2D-E 研究和质谱分析。

3.2 低温驯化锯缘青蟹脂肪酸组成的变化

低温驯化后,锯缘青蟹肝胰腺组织中脂肪酸饱和指数 $\Sigma SFA/\Sigma UFA$ 在低温驯化下降低。这与以前对冷驯化的岸蟹^[21]组织中饱和脂肪酸含量降低的报道一致。 $\Sigma PUFA-\omega 6$ 低温驯化下显著升高,因而 $\omega 6/\omega 3$ 低温驯化下升高。这也说明低温驯化下长链多不饱和脂肪酸增加^[21]。低温驯化下 C16:0 随驯化温度的降低而降低,C16:0 的降低一方面是组织在低温下降低饱和脂肪酸的含量;另一方面是 C16:0 氧化分解为机体提供能量。青蟹在低温驯化下短链脂肪酸下降,长链脂肪酸增加,这主要是生物内部转化和链加长作用的结果^[22]。因为低温驯化下的幼蟹基本不摄食,10℃ 青蟹处于静止状态,不运动,5℃ 青蟹基本处于麻木状态,没有任何反应。所以脂肪酸组成的变化主要限于体内的分解和转化,无外源性脂肪酸的补充。低温驯化下肝胰腺 $\Sigma SFA/\Sigma UFA$ 显著降低,这可能是为增加低温下生物膜的流动性而增加组织中不饱和脂肪酸的含量。

当外界环境温度降低时,锯缘青蟹生理代谢,生化组成及特定功能蛋白表达的变化均会发生相互协同调节,以此来与外界环境相适应。本实验中仅对不同低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺中差异蛋白质的变化,脂肪酸组成进行了研究,而对于低温驯化过程中脂肪酸代谢调节,功能蛋白表达的基因调控还有待深入的研究。

参考文献:

- [1] Lilley K S, Razzaq A, Dupree P. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation[J]. *Current Opinion of Chemistry and Biology*, 2001, 6: 46—50
- [2] Kong X H, Wang G Z, Li S J, et al. Comparative study on the activities of four ATPases in different organs and tissues of mud crab, *Scylla serrata*[J]. *Journal of xiamen university (Nature science)*. 2004, 43(1): 98—101[孔祥会, 王桂忠, 李少菁, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中 4 种类型 ATPase 活性比较研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(1): 98—101]
- [3] Li Z B, Li S J, Wang G Z, et al. Biochemical genetic analysis of allozymes of mud crab, *Scylla serrata*[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2004, 12(2): 61—64[黎中宝, 李少菁, 王桂忠等. 锯缘青蟹等位酶的生化遗传研究. 中国生态农业学报, 2004, 12(2): 61—64]
- [4] Weng Y Z, Li S J, Wang G Z. Effect of starvation on the biochemical composition of *Scylla serrata* larvae. *Journal of Xianmen University (Natural Science)*, 2004, 41(1): 84—88[翁幼竹, 李少菁, 王桂忠. 饥饿对锯缘青蟹幼体生化组成的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(1): 84—88]
- [5] Yang S T, Gui J F. Comparison of sperm proteins between males from gynogenetic and gonochoristic crucian carp. *Acta Zoologica Sinica* 2001, 47(1): 79—84[杨书婷, 桂建芳. 雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫精子蛋白组分的比较研究. 动物学报, 2001, 47(1): 79—84]
- [6] Li S J, Lin S J, Liu L D, et al. Studies on lipid classes & fatty acid compositions during ovarian development of mud crab, *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. *Journal of xiamen university (Nature science)*, 1994, 33 (Sup.): 109—115[李少菁, 林淑君, 刘理东, 王桂忠. 锯缘青蟹卵巢发育过程中不同器官组织脂类和脂肪酸组成. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 33(Sup.): 109—115]
- [7] Cheng Y X, Li S J, Wang G Z, et al. Changes in lipid class and fatty acid compositions in the ovaries and hepatopancreas of the mud crab *Scylla serrata* during the vitellogenesis of the second ovarian maturation [J]. *Acta oceanologica sinica*, 2001, 23(3): 66—77[成永旭, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹卵黄发生期卵巢和肝胰腺脂类的变化[J]. 海洋学报, 2001, 23(3): 66—77]
- [8] Ying X P, Luo Y Y, Zhang Y P. A comparative study on the composition of amino acid and fatty acid in fertilized eggs and lost eggs of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 2004, 28(4): 402—408[应雪萍, 罗媛媛, 张永普. 中华绒螯蟹受精卵、流产卵氨基酸及脂肪酸组成的比较研究, 水生生物学报, 2004, 28(4): 402—408]
- [9] Guo Z F, Kang X J, Lin Z Q, et al. Variation of fatty acids composition in *macrobrachium nipponese* during ovary development[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2004, 3(4): 433—436[郭志峰, 康现江, 蒯智强等. 日本沼虾卵巢发育过程中脂肪酸变化的研究, 分析化学, 2004, 3(4): 433—436]
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding[J]. *Annals of Biochemistry*, 1976, 72: 248—254
- [11] Kong X H. Physiological and biochemical mechanism of low temperature effects on *Scylla serrata* [D]. Thesis for doctor of science. Xiamen university, 2004, 55—97[孔祥会. 锯缘青蟹低温效应生理生化机制研究. 博士学位论文, 厦门大学, 2004, 55—97]
- [12] Macdonald J R, Johnson W C. Environmental features are important in determining protein secondary structure [J]. *Protein Science*, 2001, 10: 1172—1177
- [13] Bond P J, Sansom M S P. Membrane Protein Dynamics versus Environment: Simulations of OmpA in a Micelle and in a Bilayer [J]. *Journal of Molecule Biology*, 2003, 329: 1035—1053
- [14] Gabor Miklos G L, Maleszka R. Protein functions and biological contexts [J]. *Proteomics*, 2001, 1: 169—178
- [15] Gilles R. Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1977, 56(A): 109—114
- [16] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1037—1053
- [17] Gabor Miklos G L, Maleszka R. Protein functions and biological contexts [J]. *Proteomics*, 2001, 1: 169—178
- [18] Zuo Z, Echan L, Hembach P, et al. Towards global analysis of mammalian proteomes using sample pre-fractionation prior to narrow pH range two dimensional gels and using one-dimensional gels for insoluble large proteins [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22: 1603—1615
- [19] Gygi S P, Corthals G L, Zhang Y, et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology [J]. *Proceeding of Natural Academic Science in USA*, 2000, 97: 9390—9395
- [20] Gygi S P, Rist B, Aebersold R. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis [J]. *Current Opinion of Biotechnology*, 2000, 11: 396—401
- [21] Pazos A J, Sanchez J L, Roman G, et al. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2003, 134B: 367—380
- [22] Zhu B K, Cao W X. Fatty acid composition and their changes during early life stage of silver carp *hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 2002, 26(2): 130—135[朱邦科, 曹文宣. 鲢早期发育阶段鱼体脂肪酸组成变化. 水生生物学报, 2002, 26(2): 130—135]

CHANGES OF PROTEIN EXPRESSION AND FATTY ACID COMPOSITION IN HEPATOPANCREAS OF *SCYLLA SERRATA* UNDER LOW TEMPERATURE ACCLIMATION

KONG Xiang-Hui^{1,2}, WANG Gui-Zhong¹, WANG Ke-Jian¹ and LI Shao-Jing¹

(1. Department of oceanography, State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University,

Xiamen 361005, China; 2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007)

Abstract: Mud crab, *Scylla serrata*, is an economic crustacean living in estuarine waters. Studies on mechanism of low temperature adaptation are important for low temperature breeding, as well as crab aquaculture. Two-division electrophoresis, including isoelectrophoresis focusing (IEF) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), was important method for proteins division in proteomes, which was used to determine expression of specific proteins in hepatopancreas of *Scylla serrata* under low temperature acclimation. In addition, gas chromatography was used to determine fatty acid composition in different low temperature acclimation groups.

Scylla serrata, were enforced to experience 3 weeks acclimation under different low temperature, hepatopancreas of whom was taken out from each crab respectively. Hepatopancreas from ten crabs of each group was mixed to perform experiment. The experiment results showed that there were 22 difference proteins in hepatopancreas between 5°C acclimation group and 27°C group. 15 proteins were expressed in 5°C acclimation group and without in 27°C group, there were 7 proteins in 27°C group and without in 5°C acclimation group. there were 18 difference proteins between 10°C acclimation group and 27°C group, namely that, 14 specific proteins were expressed in 10°C acclimation group, and 4 in 27°C group; there were 6 specific difference proteins between 15°C acclimation group and 27°C group, 5 specific proteins were expressed in 15°C acclimation group and without in 27°C group, one protein appeared in 27°C group and without in 15°C acclimation group. For matches of difference proteins in different acclimation groups, 14 proteins were matched in 5°C and 10°C group, while specific difference proteins in 15°C group were not matched with 5°C and 10°C at all. these results indicated that specific proteins expressed in 5°C and 10°C were almost corresponding, while those expressed in 15°C group is resmble with 27°C group. It is obvious that difference proteins between acclimation group and 27°C group increased with acclimation temperature decrease.

After acclimation of 3 weeks, the sum of the saturated fatty acids (\sum SFA) in hepatopancreas in 5°C and 10°C acclimation groups were significantly lower than that in 27°C group ($P < 0.05$), while the sum of the unsaturated fatty acids (\sum UFA) in 5°C and 10°C acclimation groups were significantly higher than that in 27°C group ($P < 0.05$), thus \sum SFA/ \sum UFA in 5°C and 10°C acclimation group were significantly lower than that in 27°C group ($P < 0.05$), which was due to the significant increase of \sum PUFA- ω 6 ($P < 0.01$) under low temperature acclimation.

During the process of low temperature acclimation, changes in protein expression are dynamic. The lower acclimation temperature it is, the more specific difference proteins are expressed, the saturated index of fatty acid (\sum SFA/ \sum UFA) decreases under low temperature acclimation. Changes of protein expression and fatty acid composition in low temperature are used to adapt to environmental changes and to maintain the physiological function of the hepatopancreas.

Key words: Difference proteins; Fatty acid; Hepatopancreas; Low temperature acclimation; *Scylla serrata*