

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)低温胁迫 耐受性能与体表蛋白组学研究*

黄智慧¹ 商晓梅¹ 薛宝贵¹ 马爱军¹ 王新安¹
杨志² 曲江波² 王宝义³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 青岛市海水鱼类种子工程
与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 烟台市开发区天源水产有限公司 烟台 264003;
3. 兴城龙运井盐水水产养殖有限责任公司 兴城 125100)

提要 采用急性低温胁迫实验方法,通过对实验鱼的死亡率、死亡历时、摄食量以及呼吸频率等耐寒指标进行比较分析,并由此分析结果判断幼鱼的低温临界温度为 0℃,在此温度基础上,利用双向电泳技术,对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼进行体表蛋白水平上的耐受机理研究。根据低温胁迫组和常温对照组机体表皮蛋白组图谱差异进行比较分析。结果表明,低温胁迫后蛋白发生了显著变化。从中挑选四个差异蛋白点进行肽指纹图谱(MALDI-TOF-MS)分析,采用 PMF 技术和 MASCOT、NCBI 网站提供的检索工具进行鉴定,结果显示,低温胁迫组大菱鲂表皮 MLC 和 Mimecan 前体蛋白表达显著上调,而 type 角蛋白表达显著下调。大菱鲂对低温胁迫是一个复杂的网络反应,涉及很多蛋白质的参与,这些低温响应蛋白在大菱鲂对低温胁迫的抗性反应中起到重要的作用。

关键词 大菱鲂;低温胁迫;耐受性能;体表蛋白;双向电泳系统

中图分类号 Q953

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)属于鲽形目、鲽科、菱鲽属,原产于欧洲,自然分布于大西洋东侧欧洲沿岸以及黑海和地中海沿岸(雷霖霖,2003)。1992年由黄海水产研究所引进,以其特有的耐低温、高生长速度、抗病害能力强等优良品质逐渐成为黄、渤海沿岸三省一市等北方沿海工厂化养殖业的主导品种之一。近年来,气候变化异常,尤其是2009—2010年的低温冰冻灾害,在辽东沿海(如葫芦岛地区的养殖场),由于抽提的海水温度长时间的低温,给大菱鲂养殖户带来了严重的损失。因此,对大菱鲂开展耐寒机理研究,在积极应对低温对大菱鲂的伤害以及大菱鲂抗逆选育工作等方面,都极为重要。

关于鱼类对环境温度适应及其调控机理方面的研究较多。南极鱼抗冻蛋白的发现为人们深入动物抗

冷性研究和培育耐冻动物物种提供了新的探究方向和依据(Sicheri *et al*, 1995);梁利群等(1997)采用分子标记技术获得了6个与鲤鱼耐寒性状相关的分子标记,由此得出鱼类的耐寒性状为数量性状,受微效多基因控制;罗非鱼耐寒品系的选育工作也取得了很大的进展(林勇等,2010;卢其西等,2011);通过蛋白组学技术对大黄鱼耐寒机制的研究也为该领域提供了可靠的基础数据和依据(李凌云等,2010)。以上研究表明,温度的变化会加强鱼类应激反应的水平,通过调节自身的生理活动和新陈代谢来适应温度的变化(徐镇等,2006)。

目前对大菱鲂耐低温机理性研究较少,尤其是低温胁迫对体表皮影响的研究,国内外文献均尚未有所涉及。体表皮是动物与外界直接接触的部位,

* 现代农业产业技术体系建设专项资金, CARS-50-G01 号。黄智慧, 博士研究生, E-mail: zhihui0710@yahoo.com.cn

通讯作者: 马爱军, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-01-12, 收修改稿日期: 2011-10-19

鱼类生活在水中, 受水环境改变的影响最大, 尤其对温度的变化最敏感、最直接。因此, 本实验选择大菱鲆幼鱼体表皮作为研究对象, 在蛋白水平上进行耐温机制的深入探究, 以期寻找与低温胁迫相关的抗逆蛋白, 为鱼类的抗寒研究提供基础资料; 同时, 开展低温胁迫实验, 对大菱鲆耐寒性能初步评估, 为大菱鲆低温选育工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大菱鲆幼鱼低温耐受性能研究

1.1.1 实验鱼 实验用大菱鲆均来自本实验室在烟台天源水产有限公司构建的大菱鲆选育家系。选取 180 尾幼鱼, 规格均一、健康无伤, 体长(10.25±0.34)cm, 体重(25.4±1.50)g。将实验鱼挑出后放入实验鱼缸内暂养。

1.1.2 低温胁迫实验设计 待实验鱼暂养 7d, 饥饿 3d 后, 开始实验, 实验期间正常投喂。根据预实验结果, 选取 6℃、3℃、0℃、-3℃、-6℃五个低温梯度, 每个温度梯度设计三个平行实验。采取急性降温的办法, 将实验鱼从养殖温度直接转入实验温度条件, 每个温度梯度放置实验鱼各 30 尾, 常温对照组 30 尾。温度控制方法: 采用泡沫箱长×宽×高为 80×80×80cm, 首先将新鲜的海水放在泡沫箱中待水冷却到指定的温度, 然后放入实验鱼低温胁迫, 每隔 3h 通过加冰水保持泡沫箱内水体的温度在设定温度 0.3 个上下幅度之内。实验期间投喂干颗粒饵料, 粒径为 2mm, 每天投喂 2 次, 并且每天保持早晚换水各 1 次, 换水前新水先降温至实验温度。待实验鱼充分适应水体环境 12h 后, 进行连续观测。记录 6℃、3℃、0℃、-3℃、-6℃五个低温梯度下实验鱼 48h 内的摄食总量、体色变化、呼吸频率以及死亡时间等生命表征情况。静止呼吸频率测定方法为: 幼鱼静止时, 以每 1min 鳃盖或口张开的次数为 1 次呼吸, 每隔 15min 记录 1 次, 每个实验组每次记录 5 尾鱼, 3 次记录取平均值。

1.1.3 数据处理与统计分析 利用 SPSS 16.0 软件对实验鱼首尾死亡历时(第一尾死亡个体的低温持续时间); 实验结束时末尾死亡历时(最后一尾死亡个体的低温持续时间); 死亡历时时域(首尾死亡至最后死亡历时的范围); 死亡率、摄食量及静止呼吸频率进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 并采用多重比较法进行分析处理, 差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

1.2 低温胁迫体表蛋白组学研究

1.2.1 实验鱼 从家系中选取规格均一、健康无伤的幼鱼 60 尾, 体长(10.25±0.34)cm, 体重在(25.4±1.50)g。将实验鱼挑出后放入实验鱼缸内暂养 7d。

1.2.2 低温胁迫实验设计与取样 根据低温性能评估, 确定 0℃为临界点, 并作为本实验的低温胁迫温度。实验鱼暂养 10d 后, 随机挑取 30 尾实验鱼直接放入预先调至 0℃的实验缸内; 剩余 30 尾作为对照组, 在正常水温条件的实验缸中, 每个实验组设有三个平行组。低温胁迫试验保温方法参照文中 1.1.2 章节所述。并且每天保持早晚换水各 1 次, 换水前新水先降温至 0℃。低温胁迫 72h 后从存活鱼中随机选取 9 尾实验鱼作为低温胁迫组, 同时随机挑取 9 尾暂养实验鱼作为对照组。将实验鱼在冰上进行活体解剖, 即: 用金属棒敲击试验鱼的头部后, 迅速用解剖刀取表皮组织, 液氮冻存带回实验室, -80℃保存备用。

1.2.3 蛋白样品的制备与定量 准确称取样品 150mg, 放入加有液氮的陶瓷研钵中, 研磨成粉末状。加入 500μl 10%的 TCA/丙酮溶液, 再加入 0.1% (W/V)的 DTT, -20℃过夜, 4℃ 12000r/min 离心 30min, 弃上清液。加入 500μl 裂解液[尿素 7mol/L, 硫脲 2mol/L, 4% (W/V) CHAPS, 0.2% IPG buffer, 40mmol/L DTT, 10μl/L PMSF], 震荡混匀。超声波破碎表皮组织, 4℃静止 2—3h, 静止期间每 30min 颠倒 1 次, 4℃ 12000r/min 离心 30min, 收集上清液。分别将低温胁迫组和常温对照组的各 9 个平行样混合为相同的 3 个待测样, 可以减少个体差异造成的误差(Weinkauff *et al.*, 2006), 用 Bradford 法测定表皮蛋白浓度, 样品分装后-80℃保存备用。

1.2.4 双向电泳 17cm pH 4—7 IPG 胶条的总上样量为 250μg, 取大菱鲆表皮蛋白样品, 按照比例与水化液混匀, 总上样体积为 350μl, 4℃ 12000r/min 离心 5min, 离心后加样至泡涨盘中。将 IPG 胶条取出室温被动水化 14—16h。等电聚焦程序主要设计 3 个对比, 等电聚焦程序: 30V 线性 6h / 250V 线性 2.5h / 500V 线性 1.5h / 1000V 快速 2h / 4000V 线性 3h / 8000V 快速 3h / 8000V 线性 1h / 500V 24h。每个 IPG 胶条的极限电流不超过 50μA/根; 等电聚焦温度为恒温 20℃。等电聚焦、胶条平衡、SDS-PAGE 电泳的操作步骤和平衡缓冲液的配制方法等参照 GE 仪器操作手册(GE Healthcare)。

1.2.5 染色、扫描及图像分析 染色完毕后, 用凝胶图像扫描仪 ImageScanner 采集图像(GE Health-

care)。使用 Imagemaster 2D Platinum 6.0 对双向凝胶电泳图谱进行分析, 分析内容包括图像密度校正、找点、背景扣除、设置参比胶及图谱间的点匹配、标准化和差异点筛选, 对其中表达差异比较大蛋白点进行肽质指纹图谱鉴定。

1.2.6 质谱鉴定 切割差异蛋白质点置于 1.5ml 离心管中, 低温送至上海博苑生物科技有限公司进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析, 得到的肽质量指纹图谱(Peptide Mass Fingerprinting, PMF)检索蛋白质公共数据库, 最终鉴定蛋白质。

2 结果与分析

2.1 大菱鲂幼鱼低温耐受性能分析

2.1.1 不同低温胁迫条件下幼鱼死亡率分析

表 1 可以得出, 随着温度的不断降低, 在实验期内, 死亡历时时域由无限大缩短至 1.33—7.5h, 从而说明持续低温胁迫水平越低, 耐受低温持续的历时越短, 大菱鲂幼鱼存活机率越小, 当超出其耐受温度最低限时, 几乎全部死亡。

2.1.2 不同低温温度下生理状态分析 由表 2 可以看出, 低温对大菱鲂幼鱼的摄食及生命表征都有一定的影响, 随着温度的降低, 摄食行为逐渐减弱, 到 0℃不再进食; 0℃后体色开始加深, 呼吸变得急促, 到-3℃时, 大口呼吸, 呼吸频率逐渐减慢; -3℃低温对幼鱼游泳行为有直接影响, 身体失去平衡。通过以上死亡率以及摄食、呼吸频率等生命表征判断大菱鲂幼鱼临界最低致死温度为 0℃。

2.2 低温胁迫下大菱鲂表皮蛋白组学分析

2.2.1 实验重复性比较

表 1 不同低温条件下大菱鲂幼鱼死亡历时、死亡历时域及死亡率
Tab.1 Duration, lasting time domain of death and mortality for *S. maximus* under different low temperature stress

持续温度(℃)	重复组	死亡历时(h)		死亡历时域(h)		死亡率(%)
		首尾历时	末尾历时	历时域	平均历时域	
6	1	—	—	—	—	0 ^a
	2	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	
3	1	—	—	—	—	0.67 ^a
	2	144.0	—	144.0—	—	
	3	—	—	—	—	
0	1	47.5	142.0	47.5—142.0	49.5—143.17	67.81 ^b
	2	52.0	143.5	52.0—143.5	—	
	3	49.0	144.0	49.0—144.0	—	
-3	1	18.0	70.0	18.0—70.0	17.5—70.0	100.00 ^c
	2	15.5	69.5	15.5—69.5	—	
	3	19.0	70.5	19.0—70.5	—	
-6	1	1.0	6.5	1.0—6.5	1.33—7.5	100.00 ^c
	2	1.5	8.0	1.5—8.0	—	
	3	1.5	8.0	1.5—8.0	—	

注: 上标字母不同者表示差异显著($P < 0.05$), 相同者表示组间差异不显著($P > 0.05$)

表 2 不同低温条件下大菱鲂幼鱼行为变化

Tab.2 The change of behavior for *S. maximus* under different low temperature stress

温度(℃)	每尾摄食总量(g)	体色变深尾数	静止呼吸频率(次/min)	出现死亡时间(h)
13.8(常温)	4.256±0.322	0 ^a	54.533±1.625 ^a	—
6	2.303±0.268	0 ^a	52.566±2.150 ^a	—
3	1.250±0.504	0.333±0.377 ^a	52.400±2.066 ^a	144.0
0	0	3.671±0.637 ^b	66.766±2.138 ^b	47.5
-3	0 ^c	6.450±0.552 ^c	35.033±2.635 ^c	15.5
-6	0 ^c	8.590±0.721 ^d	21.266±2.059 ^d	1.0

注: 每栏中上标字母不同者表示差异显著($P < 0.05$), 相同者表示组间差异不显著($P > 0.05$)

进行双向电泳实验。以正常温度下表皮蛋白 2D 图谱为例, 蛋白质斑点匹配率平均为 90.3%。同一蛋白质的等电点(pI)、相对分子量(M)和蛋白质表达量(Volume)在三张图谱中的相对标准差分别为 11.36 ± 4.05 , 8.78 ± 4.10 , 10.76 ± 5.31 , 说明具有较好的重复性。

2.2.2 低温胁迫下大菱鲆表皮蛋白双向电泳图谱分析 低温胁迫下大菱鲆表皮蛋白双向电泳图谱见图 1。经 PDQuest 软件分析, 低温胁迫组大菱鲆蛋白点共(375±20)个, 正常组共(389±26)个, 图谱蛋白点的匹配率在 85%以上, 可用作进一步分析。对比分析 2-DE 图谱, 大菱鲆表皮蛋白斑点主要分布于 pH 4.0—7.0 之间, 这表明表皮蛋白种类主要属于中性或弱酸性蛋白, 其中多数蛋白质分子量位于 20—100kDa。共有 19 个蛋白点在低温胁迫后, 表达量发生显著变化。其中, 表达下调 50%以上的蛋白点有 4 个蛋白点, 分别是 2、8、9、17 号蛋白点, 上调的比例(RF)在 0.28—0.48 范围内; 表达上调 2 倍以上的蛋白点有 8 个, 分别是 1、5、10、11、13、15、16、18、19 号蛋白点, 下调的比例(IF)在 2.01—6.60 之间; 消失点有 2 个, 分别是 4、14 号蛋白点; 新增点有 6 个, 分别是 3、6、7、12 号蛋白点。

2.2.3 低温胁迫下大菱鲆表皮差异蛋白点质谱分析及数据库搜寻比对 从 19 个显著差异蛋白点中挑选出 4 个蛋白点分别进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析。图 2 是 4 个蛋白点的对比差异的放大图片。其中, 11 号蛋白点为低温胁迫后上调比例 3.60, 17 号蛋白点低温胁迫后下调比例(IF)是 0.28, 18 号和 19 号蛋白点上调的比例分别是 2.46 和 3.12。经质谱检测, 采用 PMF 技术和 MASCOT、

NCBI 网站提供的检索工具进行鉴定, 结果见表 3。11 和 17 号蛋白点分别鉴定为肌球蛋白轻链(myosin light

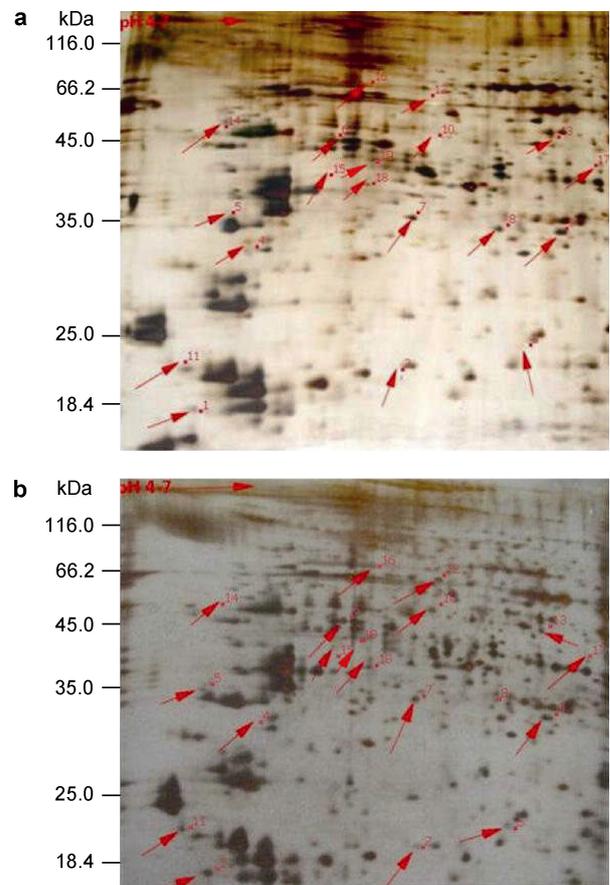


图 1 大菱鲆表皮蛋白质组双向电泳凝胶图谱

Fig.1 Two-dimensional electrophoresis profiles of epidermis proteome of *S. maximus*
a. 对照组; b. 低温 0°C 胁迫组

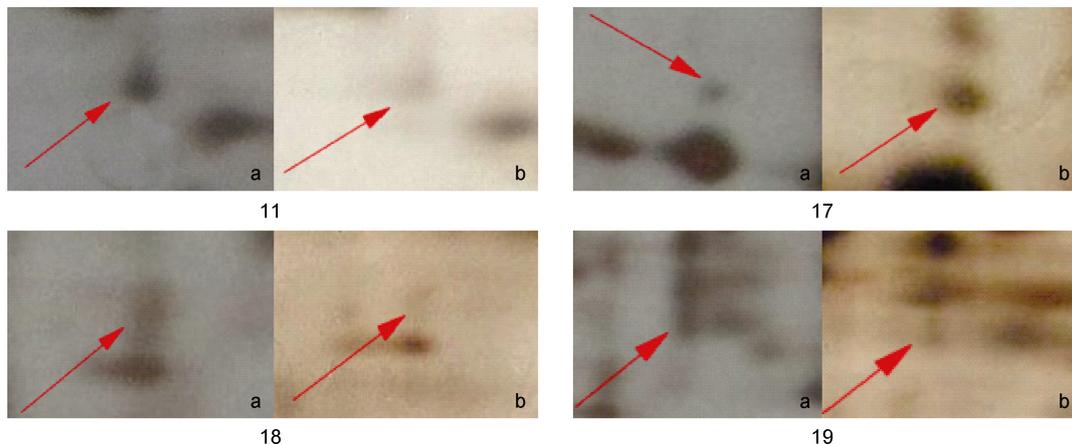


图 2 差异蛋白点表达比较

Fig.2 The image of different protein spots
a: 低温 0°C 胁迫后表达蛋白点; b: 对照组蛋白点

表 3 低温胁迫下大菱鲂表皮差异蛋白点表达
Tab.3 Protein differences in epidermis proteome of *S. maximus* after low temperature stress

斑点序号	特定序列代码	分数	序列覆盖率	分类法	分子量/等电点 Mr(Da)/pI	描述
N11	gi 7678742	470	44%	Cypselurus agoos	16732/4.45	Myosin light chain 3
N17	gi 386854	54	2%	Homo sapiens	52928/5.331	Type keratin subunit protein
N18	gi 229366384	79	7%	Anoplopoma fimbria	30302/6.60	Mimecan precursor
N19	gi 229366384	95	7%	Anoplopoma fimbria	30302/6.60	Mimecan precursor

chain, MLC), type 角蛋白, 18 和 19 号蛋白点都是 Mimecan 前体蛋白。

3 讨论

近年来, 有关鱼类对环境温度的胁迫机理的研究开展较多(Davies *et al.*, 1982; Sicheri *et al.*, 1995; 梁利群等, 1997; 林勇等, 2010; 徐镇等, 2006)。这些研究结果表明: 环境温度的变化会加强鱼类应激反应水平, 诱导鱼类一系列生理基础的变化, 诱导依赖温度调控的相关功能基因, 在最大的温度允许范围内激活和启动该功能基因最大量表达途径, 从而适应环境的变化(卢其西等, 2011); 但如果超出其忍受能力, 将会导致鱼体发育畸形、疾病发生甚至死亡。因此, 研究鱼类的温度胁迫效应及其生理学机制, 对疾病控制以及耐温选育都具有至关重要的作用。

3.1 低温胁迫对大菱鲂幼鱼生命表征影响

本文通过低温胁迫实验, 对大菱鲂幼鱼的死亡率、死亡历时、摄食量以及呼吸频率等耐低温性能进行分析比较, 结果表明: 在不同持续低温胁迫下, 大菱鲂幼鱼首尾死亡历时和末尾死亡历时均随着温度的降低而缩短; 随着时间的延长, 摄食量逐渐减少, 呼吸频率逐渐减弱, 并且判断幼鱼的低温临界温度(非损伤性的)为 0℃。达到此温度前, 鱼体可以通过调节自身的生理活动来适应环境温度的变化; 但超过此温度后, 其温度超出了耐受范围, 自我调节能力无法满足机体需要, 则会导致生命活动失调甚至死亡。这一结论与之前对大黄鱼和吉富罗非鱼的低温胁迫研究结果基本一致(李凌云等, 2010; 马旦梅等, 2010), 同时确定了大菱鲂幼鱼最低耐受温度条件, 这对建立大菱鲂低温预警机制、减少养殖风险、预防低温病害都具有重要意义。

3.2 低温胁迫蛋白组学研究

众所周知, 低温胁迫是鱼类抗寒机理研究的一

个重要途径, 目前国内外从组织生化、分子生物学、蛋白组学等多重方向对其展开了不同程度的探究(Haymet *et al.*, 2001; 梁友光, 2005¹⁾; 冀德伟等, 2009; 李凌云等, 2010)。本文以低温养殖实验的结论为依据, 同时开展低温胁迫机理性研究。目前, 利用双向电泳技术鉴定胁迫诱导下蛋白含量的变化已经成为一种认识和研究生物体忍耐环境胁迫能力的有效途径(冯德芹等, 2006), 而且越来越多的证据表明蛋白质的合成和分解是机体抵抗环境应激的一种对策(Whiteley *et al.*, 2001; Lovett *et al.*, 2001)。因此本实验采用此策略, 期望通过对低温胁迫条件下蛋白变化比较, 发现与低温相关的关键蛋白, 从而更加快捷、准确、有效地了解胁迫机制及生物对环境的适应机制。

本实验结果表明: 常温参照组与低温实验组的表皮蛋白图谱通过软件分析, 发现 19 个蛋白点的表达量发生了显著变化, 主要表现在蛋白图谱斑点的增减以及染色的深浅, 提示出低温胁迫下组织蛋白成分发生了质(蛋白点的缺失、增加以及位置改变等)和量(蛋白质点的深浅)的变化。作者选取了 4 个有显著差异的蛋白点(11, 17, 18, 19)进行质谱分析, 均获得了有效信息, 其中 11 和 17 号蛋白点分别鉴定为肌球蛋白轻链、type 角蛋白, 18 和 19 号蛋白点都是 Mimecan 前体蛋白, 这些蛋白可能与大菱鲂的抗冷机制有关。

细胞角蛋白(cytokeratin, CK)是中间纤维家族的重要成员之一, 主要表达于上皮细胞中, 有较高程度的组织特异性和分化特异性。目前国内外学者已开始认为细胞角蛋白与上皮细胞在进行正常新陈代谢过程中发生凋亡现象相关, 如 Caulin 等(2000)发现 CK18/8 可以通过增强表皮细胞抵抗肿瘤坏死因子诱导的凋亡, 并提出上皮细胞在凋亡过程中, 细胞角蛋白发生着特异降解, 陈丹英等(2002)也提出伴随着细胞凋亡过程的开始, 角蛋白可能主要以解聚为单分

1) 梁友光, 2005. 长吻鮠越冬的生理生化适应. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 119

子而非降解为片段的形式被消化。根据本实验鉴定得到的细胞角蛋白的变化特征, 作者推测, 随着温度的降低, 上皮细胞的再生能力减弱, 角蛋白由于不断发生解聚或被其它基团修饰, 在图谱中出现下调变化, 这种改变对表皮的细胞骨架造成损伤, 破坏了表皮细胞的正常生理功能, 使体表的抵抗能力降低, 机体处于危险状态。这在李明云等(2010)对低温胁迫下大黄鱼的肝脏蛋白质组进行的双向电泳分析研究中得到的结论有所体现。细胞角蛋白的表达含量的特殊变化现象及其自身与细胞凋亡相关的特性, 使其具有成为耐温指示蛋白的潜质, 对其功能性验证将在今后的工作中深入探讨。

在本实验中检测出的另一蛋白——肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC), 在鱼体中起着重要的调节功能。肌球蛋白是肌肉主要构成蛋白质之一, 是一种分子发动机, 通过 ATP 的水解导致自身构型的变化从而在肌动蛋白丝上移动, 为肌肉收缩提供能量。研究证明, 鱼类肌球蛋白 ATP 酶的活性是通过基因表达来调节的, 从而应对水体温度的变化(Heap *et al.*, 1985; Goldspink, 1998), 其中 MLC 通过磷酸化及去磷酸化调控平滑肌的舒缩(Johnston *et al.*, 1975)。在本实验中急性低温胁迫打破了大菱鲂机体稳态的平衡, 大菱鲂通过释放更多的 ATP 能量来满足机体对低温环境下的需要, 作者认为鱼体通过提高 MLC 表达含量, 从而满足 ATP 酶活性的需要, 而在蛋白图谱上表现出该蛋白点表达量的骤然上调。本试验结果与李明云等(2010)对低温胁迫下大黄鱼的肝脏研究结果基本一致。

Mimecan 属于亮氨酸富集蛋白家族(small leucine-rich proteoglycan, SLRP)成员。目前研究表明 mimecan 可能在细胞的应激性反应、生长调节、凋亡等方面发挥重要作用(Tasbeva *et al.*, 2001; Tasbeva, 2002)。而在本研究中, 低温胁迫后 mimecan 蛋白上调表达, 可能是由于大菱鲂受到冷刺激后所产生的反应, 但其应激机制还需要今后进一步深入探究。

3.3 小结

本文通过对大菱鲂幼鱼耐低温力研究分析, 确定其致死临界温度, 在此温度基础上, 开展了蛋白水平上的耐受机理研究, 为避免胁迫导致的伤害, 提高大菱鲂耐温性能提供新的思路。根据以上讨论分析推

测: 随着低温胁迫时间的延长, 低温会加速细胞的凋亡, 打破鱼体内环境的动态平衡, 当这种变化超过大菱鲂的机体调节能力时, 就会引起大菱鲂的各种生理反应, 甚至死亡; 而对于组织的蛋白成分, 其自身在胁迫环境下会发生结构修饰, 如蛋白质的氧化、磷酸化、以及糖基化等, 而变化后的蛋白质容易成为水解酶的底物, 原有活性蛋白可能降解, 产生多个碎片, 因此在图谱中便产生了蛋白点增多或减少甚至消失的现象(黄智慧, 2010)¹⁾。通过双向电泳技术及质谱分析技术发现的与低温相关的蛋白, 是否可以作为一种指示信号? 它们的功能机制又如何? 等等, 这些都是今后需要更深入探讨和验证的工作。

参 考 文 献

- 马旦梅, 程光平, 喻海燕, 2010. 吉富罗非鱼对低温持续胁迫的死亡反应. 广西农业科学, 41(7): 726—728
- 卢其西, 林 勇, 宾石玉等, 2011. 罗非鱼 6 个家系的低温耐寒测定分析. 广西师范大学学报: 自然科学版, 29(2): 104—109
- 冯德芹, 郭尧君, 2006. 双向电泳在畜牧业和渔业中的最新应用. 现代科学仪器, 5: 31—35
- 李明云, 冀德伟, 吴海庆等, 2010. 低温胁迫下大黄鱼肝脏蛋白质组双向电泳分析. 农业生物技术学报, 18(2): 323—328
- 陈丹英, 高云飞, 2002. PK15 细胞凋亡过程中角蛋白中间纤维的变化. 动物学报, 48(1): 58—63
- 林 勇, 唐瞻杨, 唐章生等, 2010. 罗非鱼 5 个不同品系低温致死的研究. 水产科技情报, 37(5): 222—225
- 徐 镇, 江锦坡, 陈寅儿, 2006. 不同品系大黄鱼致死低温的研究. 宁波大学学报(理工版), 19(4): 462—464
- 梁利群, 孙效文, 1997. 鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析. 中国水产科学, 4(3): 89—91
- 雷霖霖, 2003. 大菱鲂养殖技术. 上海: 上海科学技术出版社, 8—9
- 冀德伟, 李明云, 王天柱等, 2009. 不同低温胁迫时间对大黄鱼血清生化指标的影响. 水产科学, 28(1): 1—4
- Caulin C, Ware C F, Magin T M *et al.*, 2000. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. The Journal of Cell Biology, 149(1): 17—22
- Davies P L, Roach A H, Hew C L, 1982. DNA sequence coding for an antifreeze protein precursor from winter flounder. Proc Natl Acad Sci USA, 79: 335—339
- Goldspink G, 1998. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. Comp Biochem Physiol, 120B: 5—15

1) 黄智慧, 2010. 高温逆境下大菱鲂体表生理生化特性研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 44—45

- Haymet A D J, Ward L G, Harding M M, 2001. Hydrophobic analogues of the winter founder 'antifreeze' protein. *Federation of European Biochemical Societies*, 491(2001): 285—288
- Heap S P, Watt P W, Goldspink G, 1985. Consequences of thermal change on the myofibrillar ATPase of five freshwater teleosts. *J Fish Biol*, 26: 733—738
- Lovett D L, Verzi M P, Clifford P D *et al*, 2001. Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)*, 128: 299—2306
- Sicheri F, Yang D S C, 1995. Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature*, 375: 427—431
- Tasbeva E S, 2002. Analysis of the promoter region of human mimecan gene. *Biochim Biophys Acta*, 1575(1—3): 123—129
- Tasbeva E S, Maki C G, Conrad A H *et al*, 2001. Transcriptional activation of bovine mimecan by p53 through an intronic DNA-binding site. *Biochim Biophys Acta*, 1517(3): 333—328
- Weinkauff M, Hiddemann W, Dreyling M, 2006. Sample pooling in 2-D gel electrophoresis: a new approach to reduce non-specific expression background. *Electrophoresis*, 27: 4555—4558
- Whiteley N M, Robertson R F, Meagor J *et al*, 2001. Protein synthesis and specific dynamic action in crustaceans: effects of temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)*, 128: 595—606

THE RESISTANCE ABILITY AND EPIDERMIS PROTEOMICS ANALYSIS OF TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* UNDER LOW TEMPERATURE STRESS

HUANG Zhi-Hui¹, SHANG Xiao-Mei¹, XUE Bao-Gui¹, MA Ai-Jun¹, WANG Xin-An¹,
YANG Zhi², QU Jiang-Bo², WANG Bao-Yi³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao, 266071; 2. Yantai Tianyuan Aquatic Limited Corporation, Yantai, 264003; 3. Xingcheng Longyun Aquatic Limited Corporation, Xingcheng, 125100)

Abstract In order to assess the cold hardy capacity in the turbot (*Scophthalmus maximus*), this paper carried out the experiment of acute low temperature stress. In the condition of indoor artificial cooling, analyzed the resistant index by calculated the mortality, death time, food intake and breathing rate at static. And determine the critical temperature for juvenile is 0°C. Based on the temperature, we carried out the research about the tolerance mechanism in protein level by the technique of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The epidermis proteome of were analyzed through after acute low temperature stress at 0°C, and then, analyzed by ImageMaster 2D Software. The result showed that significant changes in the expression between the normal temperature sample and the low stress sample. And 4 points of proteins were picked out to analyze through MALDI-TOF-MS, and then searched in database. The result demonstrated that the expressions of myosin light chain (MLC) and Mimecan precursor have up-regulated remarkably, however, type II keratin subunit protein down-regulated remarkably. It concluded that the responses of turbot to low temperature stress were considerable complex, including involvements of many proteins. And all those proteins played great roles in responses to low temperature stress for turbot. When the dynamic equilibrium in vivo environment of *S. maximus* was broken by low temperature stress, various physiological reactions would be induced and even death if the changes were out of control.

Key words Turbot *Scophthalmus maximus*; Low temperature stress; Resistant index; Epidermis proteins; Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)