

# 不同性别光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)性腺蛋白质组差异分析\*

湛 焘 焘<sup>1,2</sup> 黄显雅<sup>1,2</sup> 沈 妍<sup>1,2</sup> 刘 伟<sup>1,2</sup> 穆琳琳<sup>1</sup>  
郝振林<sup>1,2</sup> 王轶南<sup>1,2</sup> 丁 君<sup>1,2</sup> 常亚青<sup>1,2</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部北方海水增养殖重点实验室 大连 116023)

**摘要** 采用细胞超声破碎-丙酮沉淀及除盐-50mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)复溶的方法分别提取光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)雄性、雌性性腺的可溶性全蛋白,利用载体两性电解质等电聚焦双向电泳分别在 pH 5—8 和 pH 4—6 范围内对获得的性腺组织可溶性全蛋白进行分离。通过 PDQuest8.0 图像分析软件比较分析,发现 pH 5—8 范围内,雄性光棘球海胆性腺双向电泳图谱检出的蛋白质斑点为 321 个,雌性光棘球海胆性腺检出蛋白质斑点 402 个。在 pH 4—6 范围内,雄性光棘球海胆性腺双向电泳图谱检出的蛋白质斑点数为 239 个,雌性光棘球海胆性腺检出 197 个蛋白质斑点,其中,表达呈现差异性的蛋白质斑点数为 208 个。结果提示,不同性别光棘球海胆的性腺蛋白质表达存在显著差异。

**关键词** 性别; 光棘球海胆; 双向电泳; 蛋白质组; 性腺

**中图分类号** S968

海胆因其性腺味道鲜美,营养丰富且具有一定药用价值,被誉为海产“八珍”之一。海胆性腺品质是决定海胆商品市场价格高低的重要指标。性别是影响海胆性腺品质的重要因素之一。目前,商品市场的一般观点认为雌性海胆性腺品质优于雄性海胆。童圣英等(1998)研究显示,雄性和雌性虾夷马粪海胆性腺脂肪酸组成存在较大差异。Murata 等(2002)和 Phillips 等(2009)报道了不同性别的海胆 *Hemicentrotus pulcherrimus* 和 *Evechinus chloroticus* 性腺品质间具有显著差异。常亚青等(2010)通过比较虾夷马粪海胆不同性别间性腺性状,发现对性腺产量和品质进行性别选择可达到提升性腺产量和品质的目的。但是,不同性别间海胆性腺中究竟哪些因子对性腺质量和品质具有决定性作用,国内外尚无深入研究。

自 O'Farrell(1975)首次利用双向凝胶电泳(two-

dimensional electrophoresis, 2-DE)技术分离大肠杆菌蛋白质以来,蛋白质双向电泳一直是蛋白质组学中分离复杂蛋白质所选择的核心技术,也是目前用于分离组织、细胞蛋白质的最有效的分离手段之一。在水产生物研究方面,蛋白质双向电泳技术已经广泛应用于藻类(Pineiro *et al.*, 2003; 钱方等, 2006)、甲壳类(Huang *et al.*, 2002; 秦兆宇等, 2007)、贝类(Shepard *et al.*, 2000; 李志丹等, 2006; 田美等, 2009)、鱼类(Kjaersgard *et al.*, 2006; 那宏坤等, 2008, 2009)等生物的各项研究当中。2006 年,紫球海胆 *Strongylocentrotus purpuratus* 基因组测序工作的完成(Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006),使海胆的研究得以向蛋白质组和功能基因组方向转移。Roux 等利用蛋白质双向电泳和质谱鉴定技术分离并鉴定了海胆蛋白质族中参与卵子激活以及早期发育的相关

\* 大连海洋大学人才引进启动基金, SYYJ2010002 号; 国家自然科学基金“海洋酸化对海胆浮游幼体钙化生长的影响及其机制”, 41206128 号; 国家“863”计划“高值海珍品良种培育”, 2012AA10A412 号; 辽宁省科技计划资助项目, 2007203004 号; 辽宁省“百千万人才工程”资助项目, 2008921059 号; 辽宁省“高等学校杰出青年学者成长计划”资助项目, LJQ2013079 号。湛焘焘, 讲师, E-mail: zhanyaoyao@dlou.edu.cn

通讯作者: 常亚青, 教授; E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

收稿日期: 2012-09-20, 收修改稿日期: 2012-11-21

蛋白质(Roux *et al.*, 2006, 2008; Sewell *et al.*, 2008), Dheilly 等(2009)采用双向电泳和 Western blot 技术分析发现, 海胆 185/333 基因的表达由于受到翻译后水平调控, 可产生多种病原体特异性的免疫应答蛋白。但是, 目前就不同性别海胆性腺蛋白质组的相关研究, 国内外尚未见报道。

光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)又称大连紫海胆, 是球海胆科(Strongylocentrotidae)的种类之一(常亚青等, 2004), 产于西北太平洋沿海, 在中国主要分布于辽东半岛和山东半岛的黄、渤海海域, 是我国北方沿海最主要的经济种类和重要的出口海产品种类之一。本研究旨在利用蛋白质双向电泳技术分离雄性、雌性光棘球海胆性腺可溶性全蛋白, 通过比较分析不同性别光棘球海胆性腺蛋白质表达谱的差异, 找出光棘球海胆性别间特异性表达的蛋白质, 为寻找光棘球海胆性别间决定性腺品质性状的特异性蛋白, 建立不同性别海胆性腺蛋白质组表达谱与性腺品质性状的对应关系, 提高和改良海胆性腺品质性状及制定综合海胆性腺性状选择性育种计划提供线索和参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料** 实验用健康光棘球海胆活体, 购自大连海产市场, 2 龄, 12 枚。将购买的海胆做好标记, 置冰盘上解剖, 先分别取少量性腺组织, 逐一进行显微镜直接观察确定海胆的性别后, 按标记分别收集相对应的雄性或雌性性腺组织, 短时存放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 备用。

**1.1.2 实验试剂** 超纯尿素(Urea)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、过硫酸铵(Ammol/Lonium Persulfate)、甘氨酸(Glycine)、四甲基乙二胺(Tetramethylethylenediamine, TEMED)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、Triton X-100、甘油(Glycerol)、丙烯酰胺(Acrylamide)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(N,N'-Methylene Bisacrylamide)购自北京索莱宝科技有限公司; 载体两性电解质(pH 3—10, pH 5—8, pH 4—6)为 Amersham Pharmacia 公司产品; SDS-PAGE 电泳缓冲液, 二硫苏糖醇(DTT), 相对低分子量蛋白质标准购自大连宝生物公司; 其它试剂为国产分析纯试剂。

**1.1.3 实验仪器** 高压电泳仪, 北京六一仪器厂; ISO-DALT 电泳槽及 MV 型垂直板电泳槽, 大连竞迈生物科技有限公司; Z36HK 型离心机, HERMLE Labortechnik GmbH; ELGA 超纯水仪, Purelab Ultra

Genetic, 英国; 79-2 磁力加热搅拌器, 国华公司; 低温恒温槽, 上海精密科学仪器有限公司; 微量进样器, 宁波镇海三爱仪器厂; 酶标仪, 达科为生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 光棘球海胆性腺组织可溶性全蛋白提取** 在冰盘上分别称取等重雄性和雌性光棘球海胆性腺, 分别放入匀浆器中匀浆后进一步超声破碎裂解, 工作时间 9s, 间歇 5s, 重复 20 次, 8000g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 离心 20min, 取上清, 加入 5 倍体积预冷丙酮过夜沉淀, 8000g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 离心 30min, 弃上清, 沉淀于低温冻干, 复溶于 50mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)缓冲液中, 即为相应的可溶性全蛋白。分别取少量雄性和雌性光棘球海胆性腺可溶性全蛋白溶液采用 Bradford 法测定蛋白质含量(汪家政等, 2000), 其余样品于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

**1.2.2 载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦为第一向的双向电泳** 取 50 $\mu\text{g}$  蛋白样品与等体积的 2 $\times$  样品缓冲液(汪家政等, 2000)混合, 室温放置 1h。将 0.6g 尿素, 540 $\mu\text{L}$  超纯水, 载体两性电解质混合液 30 $\mu\text{L}$  (pH 5—8 或 pH 4—6 pH 3—10 = 5 1), 200 $\mu\text{L}$  30% 丙烯酰胺溶液, 轻缓混匀后依次加入 3 $\mu\text{L}$  10%过硫酸铵和 2 $\mu\text{L}$  TEMED, 轻轻混匀, 快速吸取 80 $\mu\text{L}$  上述混合液, 从专用玻璃管(直径 1mm, 长 8cm)的一端缓慢均匀灌入, 避免产生气泡, 室温聚合。组装好 ISO-DALT 电泳槽, 使用微量进样器将处理好的样品液, 缓缓注入玻璃管上端, 使样品沉淀于胶面上, 确定上槽与玻璃管之间无渗漏, 倒入电泳缓冲液(阴极电泳缓冲液: 20mmol/L NaOH; 阳极电泳缓冲液: 10mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲液), 接通电源, 4mA 进样后, 1000V 恒压等电聚焦 3h。等电聚焦结束后, 将胶条从玻璃管中挤出, 在平衡缓冲液[5%  $\beta$ -巯基乙醇, 62.5mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 2.3% SDS, 10%甘油]中平衡 30min, 转移至梯度胶(6%浓缩胶, 12%分离胶)上端, 进行 30mA 恒流 SDS-PAGE 电泳。

**1.2.3 凝胶染色及图像分析** 电泳所得到的凝胶按照文献方法(郭尧君, 1999)进行高灵敏度的银氨染色。染色后的凝胶用超纯水清洗 3 次, 于惠普 CanoScan 图像扫描仪上进行扫描, 凝胶蛋白质斑点检测采用 PDQuest 8.0 图像分析软件完成。

## 2 结果

### 2.1 不同 pH 范围内雄性、雌性光棘球海胆性腺蛋白质 2-DE 图谱

图 1 结果显示, 雄性光棘球海胆性腺与雌性光棘

球海胆性腺蛋白质斑点分布情况大致相同, 在相对分子质量 97—20.1kDa 范围内均有分布, 经 PDQuest 图像分析软件检测, 发现, 在 pH 5—8 范围内, 雄性性腺双向电泳图谱检出的蛋白质斑点为 321 个, 雌性性腺检出 402 个蛋白质斑点, 但在此范围内, 雄性光棘球海胆性腺与雌性光棘球海胆性腺蛋白质斑点都呈现不均匀分布, 蛋白质斑点主要集中于酸性端。

由图 2 可以看出雄性光棘球海胆性腺与雌性光棘球海胆性腺蛋白质斑点分布情况大致相同, 相对

分子质量 >97kDa 几乎没有蛋白质斑点出现, 在 pH 4—6 范围内, 雄性性腺与雌性性腺蛋白质斑点都呈现均匀分布, 蛋白质斑点主要集中于在相对分子质量 97—20.1kDa 范围内。

2.2 pH 4—6 范围内, 雄性、雌性光棘球海胆性腺蛋白质 2-DE 图谱的比较分析

图 3 显示, 通过 PDQuest 图像分析软件进行斑点自动检测, 高斯模型分离重叠斑点以及图像噪声过滤以雌性光棘球海胆性腺 2-DE 图谱建立 master gel

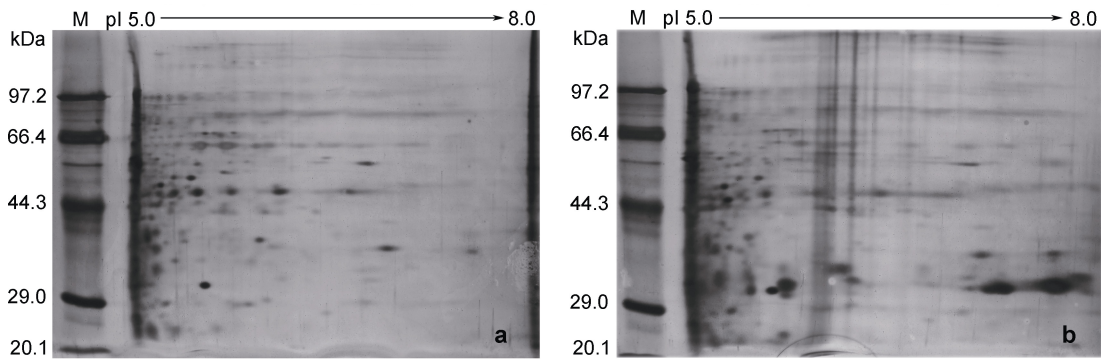


图 1 pH 5—8 不同性别光棘球海胆性腺蛋白质 2-DE 图谱

Fig.1 pH 5—8 2-DE maps of different gender *S. nudus* gonad total proteins  
a. 雄性性腺; b. 雌性性腺; M. 蛋白质标准

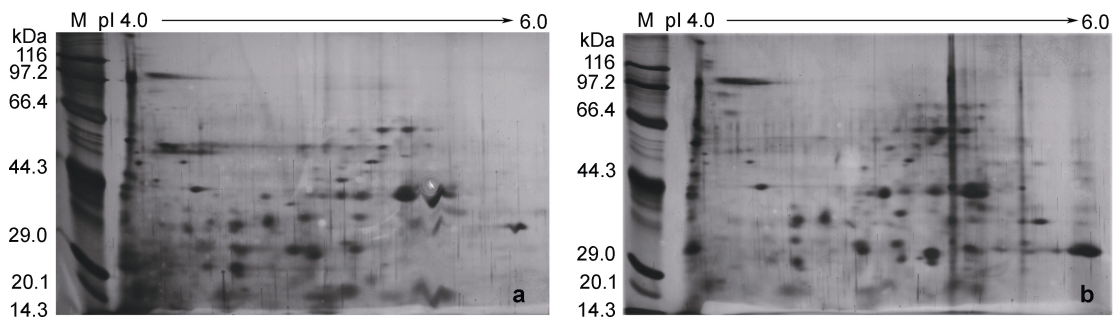


图 2 pH 4—6 不同性别光棘球海胆性腺蛋白质 2-DE 图谱

Fig.2 pH 4—6 2-DE maps of different gender *S. nudus* gonad total proteins  
a. 雄性性腺; b. 雌性性腺; M. 蛋白质标准

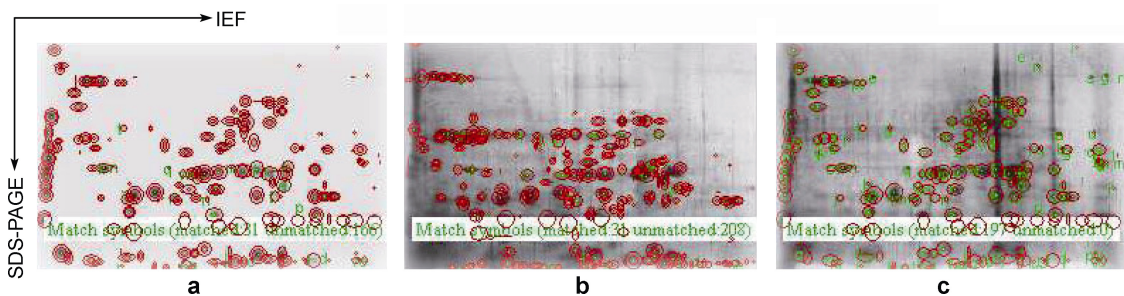


图 3 pH 4—6 雄雌光棘球海胆性腺蛋白质双向电泳 PDQuest 分析图谱

Fig.3 pH 4—6 analysis maps of different gender *S. nudus* gonad total proteins by PDQuest8.0 software  
a. 模式胶; b. 雄性性腺; c. 雌性性腺

图 3a), 以 master gel 为模型分别对雄性、雌性光棘球海胆性腺 2-DE 图谱进行消减斑点检测、匹配、量化, 获得了雄性与雌性性腺蛋白质差异表达信息(图 3b, 图 3c), 发现在 pH 4—6 范围内, 雄性性腺检出的蛋白质斑点 239 个, 雌性性腺蛋白质斑点数为 197 个, 在此范围内, 雄性光棘球海胆性腺与雌性光棘球海胆性腺相匹配的蛋白质斑点数为 31 个(图 3b, 图 3c 绿色圆圈), 差异表达的蛋白质斑点数为 208 个(图 3b 红色圆圈)。

### 3 讨论

性腺是海胆最重要的经济性状, 对海胆性腺性状的研究一直是海胆基础生物学和海胆遗传育种的重要方向。由于海胆性腺难以活体测量, 目前对海胆性腺品质分级的主要量化手段是采用 CIELAB1976 国际标准对海胆性腺颜色进行测量分级(Kelly *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2002; Shpigel *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2009), 而针对海胆性腺其它品质性状(如外观和口感)的分级方法主要是依靠人的主观感觉判断(Murata *et al.*, 2002; Pearce *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2009), 受主观因素影响较大且分级粗糙, 缺乏量化标准, 因此, 建立海胆性腺性状与其影响因子之间的对应关系, 寻找和发现海胆性腺性状特异性分子标记, 不仅可以为海胆性腺品质活体检测提供量化依据, 同时也能阐明性别影响海胆性腺品质的分子机制提供一定的理论依据。

蛋白质双向电泳技术是当前蛋白质组研究中最广泛应用且具有良好灵敏度的蛋白质分离技术, 利用双向电泳技术对光棘球海胆组织蛋白质进行分离可以获得比其它蛋白质分离技术更为全面的信息, 有助于了解光棘球海胆性腺组织蛋白质的特异性表达。

在蛋白质组研究中, 蛋白样品制备和胶条 pH 范围的选择是双向电泳技术的关键步骤, 是决定复杂蛋白质复合物能否被有效分离的关键, 可直接影响双向电泳图谱的质量以及对双向电泳图谱的图像分析。本实验采用混合取样方法以避免由于个体差异产生的蛋白表达差异, 通过细胞超声破碎方法在对光棘球海胆性腺细胞进行彻底破碎的同时也消除了细胞内的核酸污染, 再利用丙酮沉淀方法对光棘球海胆组织蛋白提取液进行除盐处理, 以提升蛋白质样品质量。一般认为, 宽范围胶条(pH 3—10, pH 3—11)可用于确定样品蛋白质的分布, 窄范围和微小范围

胶条可接受更高的上样量, 对目标蛋白进行更好的分离(Langen *et al.*, 2000)。本研究预实验发现, 在 pH 3—10 范围内, 光棘球海胆性腺组织蛋白质斑点主要集中在胶条的中部偏酸性位置, 两端的蛋白质斑点分布较少, 中部偏酸性位置的蛋白质斑点分辨率较低, 这与 Ong 等(2001)报道的生物体中大部分蛋白的等电点在 pH 4—8 之间相一致, 因此, 为了提高大多数蛋白质的分辨率, 本研究首先采用 pH 5—8 的胶条进行研究, 发现在 pH 5—8 范围内, 经 PDQuest 图像分析软件检测雄性光棘球海胆性腺双向电泳图谱检出的蛋白质斑点为 321 个, 雌性光棘球海胆性腺检出 402 个蛋白质斑点, 但在此范围内, 雄性性腺与雌性性腺蛋白质斑点呈现不均匀分布, 蛋白质斑点主要集中于酸性端, 这种不均匀分布不利于后续的图像分析, 故又选择 pH 范围相对更窄的 pH 4—6 的胶条进行研究, 发现雄性性腺与雌性性腺蛋白质斑点呈现均匀分布, 蛋白质斑点主要集中于在相对分子量 97—20.1kDa 范围内, 获得了有利于图像分析的蛋白质分辨率。

通过 PDQuest 图像分析软件进行斑点自动检测, 高斯模型分离重叠斑点以及图像噪声过滤以雌性光棘球海胆性腺 2-DE 图谱建立 master gel。以 master gel 为模型, 分别对雄性、雌性性腺 2-DE 图谱进行消减斑点检测、匹配、量化, 获得了雄性与雌性性腺蛋白质差异表达信息。在 pH 4—6 范围内, 雄性性腺检出的蛋白质斑点 239 个, 雌性性腺蛋白质斑点数为 197 个, 在此范围内, 雄性光棘球海胆性腺与雌性光棘球海胆性腺相匹配的蛋白质斑点数为 31 个, 差异表达的蛋白质斑点数为 208 个, 提示不同性别光棘球海胆性腺蛋白质表达存在显著差异。分析可能原因之一是本实验的取样时间在 5 月份, 正是雄性、雌性光棘球海胆性腺发育的高峰期, 相应的特异性蛋白质表达都处于高峰期, 所以造成雄性、雌性光棘球海胆性腺蛋白表达的差异性非常显著。

综上所述, 本研究通过蛋白质双向电泳技术及图谱分析软件, 对雄性和雌性光棘球海胆性腺可溶性全蛋白进行了分离及蛋白电泳图谱的相关比较分析, 发现雄性和雌性光棘球海胆性腺可溶性全蛋白存在显著差异, 如果进一步利用质谱鉴定技术, 对差异表达的蛋白质进行鉴定, 可为进一步寻找海胆性别与性腺品质相关蛋白因子以及进一步确定其基因奠定一定的基础。

## 参 考 文 献

- 田美, 申欣, 程汉良等, 2009. 西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系的构建. *海洋科学*, 33(11): 32—36
- 那宏坤, 黄清育, 陈盈盈, 2008. 蛋白质组学技术筛选与鉴定在甲基对硫磷胁迫下牙鲆脑组织表达的差异蛋白质. *色谱*, 26(6): 662—666
- 那宏坤, 黄清育, 黄河清, 2009. 差速离心结合蛋白质组学技术研究受镉盐胁迫后的牙鲆肝差异蛋白质. *分析化学*, 37(7): 1019—1024
- 李志丹, 包晓东, 黄慧英等, 2006. 优化海兔肝蛋白质组提取与分离技术. *厦门大学学报(自然科学版)*, 45(增刊): 194—197
- 汪家政, 范明, 2000. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 42—47, 128—129
- 秦兆宇, 刘师莲, 杨银荣等, 2007. 白斑综合征中国对虾肝胰腺蛋白质组学研究的技术探索. *山东大学学报(理学版)*, 42(7): 1—5
- 钱方, 朱斌林, 章军, 2006. 蛋白质组学研究在赤潮藻研究中的应用. *海洋科学*, 30(5): 83—86
- 郭尧君, 1999. 蛋白质电泳实验技术. 第一版. 北京: 科学出版社, 142
- 常亚青, 丁君, 宋坚等, 2004. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 219
- 常亚青, 张伟杰, 丁君等, 2010. 虾夷马粪海胆不同家系和性别间性腺性状的比较. *水产学报*, 34(7): 1080—1088
- 童圣英, 陈炜, 由学策等, 1998. 三种海胆性腺总脂的脂肪酸组成研究. *水产学报*, 22(3): 247—252
- Dheilly N M, Nair S V, Smith L C *et al*, 2009. Highly variable immune-response proteins (185/333) from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: proteomic analysis identifies diversity within and between individuals. *J Immunol*, 182(4): 2203—2212
- Huang C, Zhang X, Lin Q *et al*, 2002. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Mol Cell Proteomics*, 13(1): 223—231
- Kelly M, Owen P, Pantazis P, 2001. The commercial potential of the common sea urchin *Echinus esculentus* from the west coast of Scotland. *Hydrobiologia*, 465(1): 85—94
- Kjaersgard I V H, Norrelykke M R, Baron C P *et al*, 2006. Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage. *J Agric Food Chem*, 54: 9437—9446
- Langen H, Röder D, 2000. Separation of proteins from human embryonic kidney cells on narrow-range IPG strips. *Life Science News (Amersham Biosciences)*, 4: 1—3
- Murata Y, Yokoyama M, Unuma T *et al*, 2002. Seasonal changes of bitterness and pulcherrimine content in gonads of green sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* at Iwaki in Fukushima Prefecture. *Fisheries Science*, 68(1): 184—189
- O'Farrell P H, 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250: 4007—4021
- Ong S E, Pandey A, 2001. An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng*, 18(5): 195—205
- Pearce C, Daggett T, Robinson S, 2004. Effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 233(1—4): 337—367
- Phillips K, Bremer P, Silcock P *et al*, 2009. Effect of gender, diet and storage time on the physical properties and sensory quality of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) gonads. *Aquaculture*, 288(3—4): 205—215
- Pineiro C, Barros-Velazquez J, Vasquez J *et al*, 2003. Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products. *J Proteome Res*, 2: 127—135
- Roux M M, Radeke M J, Goel M *et al*, 2008. 2DE identification of proteins exhibiting turnover and phosphorylation dynamics during sea urchin egg activation. *Dev Biol*, 313(2): 630—647
- Roux M M, Townley I K, Raisch M *et al*, 2006. A functional genomic and proteomic perspective of sea urchin calcium signaling and egg activation. *Dev Biol*, 300(1): 416—433
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006. The genome of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314: 941—952
- Sewell M A, Eriksen S, Middleditch M J, 2008. Identification of protein components from the mature ovary of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea). *Proteomics*, 8(12): 2531—2542
- Shepard J L, Olsson B, Tedengren M *et al*, 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar Environ Res*, 50: 337—340
- Shpigel M, McBride S, Marciano S *et al*, 2005. Improving gonad colour and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 245(1—4): 101—109

## ANALYSIS OF GONAD PROTEOMES OF DIFFERENT GENDER SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS* BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

ZHAN Yao-Yao<sup>1,2</sup>, HUANG Xian-Ya<sup>1,2</sup>, SHEN Yan<sup>1,2</sup>, LIU Wei<sup>1,2</sup>, MU Lin-Lin<sup>1</sup>,  
HAO Zhen-Lin<sup>1,2</sup>, WANG Yi-Nan<sup>1,2</sup>, DING Jun<sup>1,2</sup>, CHANG Ya-Qing<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, 116023; 2. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian, 116023)

**Abstract** We extracted total proteins in male and female gonads of sea urchin *Strongylocentrotus nudus* by the method of ultrasonication-acetone sedimentate-50mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) and then separated by the carrier ampholytes two-dimensional electrophoresis in pH gradient. Results show that: (1) in pH 5-8, proteins in male and female gonads contained 321 and 402 protein spots, respectively; (2) in pH 4—6, they were 239 and 197 protein spots, respectively. Two hundred and eight unmatched protein spots were found in male and female gonad in pH 4—6 by PDQuest8.0 image analysis software, which suggests that there is a significant difference in protein expression level between male and female gonad of *S. nudus*.

**Key words** gender; *Strongylocentrotus nudus*; two-dimensional electrophoresis; proteome; gonad