

Rapport 37/2015 • Utgitt august 2015

Proteomanalyse: To-dimensjonal gelelektroforese av Nordsjøsild i forhold til modningstid

Flemming Jessen (DTU Food – National Food Institute, Denmark) & Torstein Skåra





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sundalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-327-5 (trykt) ISBN: 978-82-8296-328-2 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Proteomanalyse: To-dimensjonal gelelektroforese av Nordsjøsil i forhold til modningstid	<i>Rapportnr.:</i> 37/2015
	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Flemming Jessen (DTU Food – National Food Institute, Denmark) & Torstein Skåra	<i>Dato:</i> 24. august 2015
<i>Avdeling:</i> Prosessteknologi	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 11
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF#901033
<i>Stikkord:</i> Sild, matjes, nedbrytning, modning, 2D-gel	<i>Prosjektnr.:</i> 11065
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Forsøksresultater fra tidligere FHF-prosjekter på matjessild har vist at salte- og modningsprosessene er reproducerbare. Det er dog stadig en utfordring å kunne måle enzymaktivitet og modningsgrad, som er to parametre som har vist seg å henge tett sammen. Analysene som er gjennomført i forsøkene, i forbindelse med produksjonen, er imidlertid tidkrevende og omstendelige og derfor dårlig egnet til industrielle formål. Det er derfor et industrielt behov for en enklere metode.</p> <p>Denne rapporten bygger på arbeidet som er beskrevet i tidligere rapporter. Den beskriver identifikasjonen av mulige modnings-indikator-proteiner, og tar utgangspunkt i de forsøk med filetering av delvis modnet matjessild, som ble gjennomført i 2014.</p>	
<i>English summary/recommendation:</i> <p>Results from previous experiments with salting and ripening of North Sea herring have shown reproducible results. A challenge remains with respect to measuring enzyme activity and degree of ripening; two parameters that appear to be closely related. The analyses carried out in the previous experiments have been elaborate and time consuming, and not well suited for process monitoring in industry.</p> <p>This report describes the identification of potential protein markers for ripening, based on trials carried out in 2014.</p>	

Innhold

1	Introduktion	1
2	Mål	1
3	Materiale og metoder	2
3.1	Proteomanalyse.....	2
3.1.1	Prøvemateriale og prøve oparbejdelse	2
3.1.2	Proteinbestemmelse	2
3.1.3	To-dimensional gelelektroforese (2DE).....	2
3.1.4	Massespektroskopi (MS) til identifikation af proteiner	3
4	Resultater og diskussion	4
4.1	Sammenligning af proteinprofiler	4
4.2	Identifikation af proteinpletter	5
5	Konklusion	8
6	Perspektivering	9
7	Referencer	11

1 Introduktion

Forsøgsresultater fra tidligere FHF-projekter på matjessild (Skåra *et al.*, 2013; 2014a; 2014b) viste at saltnings og modningsprocesserne er reproducerbare. Det er dog stadig en udfordring at kunne måle enzymaktivitet og modningsgrad, som er to parametre der har vist sig at hænge tæt sammen. Analyserne som er gennemført i forsøgene, i forbindelse med produktionen, er imidlertid tidskrævende og omstændelige og derfor dårligt egnede til industrielle formål. Der er således et industrielt behov for en simplere metode.

Dette notat bygger på arbejdet som er beskrevet i de tidligere rapporter, og tager udgangspunkt i de forsøg med filetering af delvist modnede matjessild, som blev gennemført i 2014.

Ved produktion af matjessild i dag, vurderes råvaren nøje og procesparametre og modningsforløbet overvåges kontinuert af kyndige personer med lang produktionserfaring. Resultaterne fra de tidligere forsøg har indikeret at der sker en række proteinændringer, som "unik" karakteriserer den færdigt modnede matjessild. Hvis disse proteinændringer kan gøres detekterbare på en let måde, vil man råde over et simpelt værktøj, som kan bidrage til at forbedre proceskontrollen gennem en reduktion af behovet for subjektive vurderinger og erfaringsmæssige kundskaber. Metoden vil desuden kunne bidrage til opnåelse af en mere ensartet produktkvalitet og en bedre processtyring.

2 Mål

Med udgangspunkt i projektets problemstillinger søgte vi svar på yderligere spørgsmål med henblik på en mulig lageoptimering. En optimeret lage er defineret som en lage, hvor den biomolekylære sammensætning (herunder enzymerne) er således, at produktet efter modning kommer til at ligne den traditionelle matjessild. For at opnå det, er det nødvendigt at kende de processer som er vigtige for matjes modningen.

Et væsentligt spørgsmål er derfor: Hvilke proteinforandringer sker der i fileten under modningsprocessen?

3 Materiale og metoder

For at klarlægge de proteinforandringer der sker i fileten under modningsprocessen har vi valgt at udføre proteomanalyser (2D-gelanalyser), som fortæller noget om hvordan muskelproteinerne er blevet påvirket under matjes fremstillingen. For at nå et skridt videre, i forhold til tidligere forsøg, har vi udvalgt et antal proteiner, som er blevet analyseret yderligere i et forsøg på at identificere dem ved hjælp af massespektroskopi (MS). Herved nærmer vi os ikke kun en større forståelse af modningsprocesserne, men også muligheden for udvikling af en simpel metode til måling af modningsgrad.

3.1 Proteomanalyse

Resultatet af en proteomanalyse består af en proteinprofil, som viser en prøves forskellige proteiner adskilt efter ladning og størrelse. For en given prøve udgør en sådan proteinprofil en slags fingeraftryk, som kan sammenlignes mellem forskellige prøver og benyttes til at undersøge, hvilke processer der under forskellige modninger er forskellige og hvilke som ligner hinanden.

3.1.1 Prøvemateriale og prøve oparbejdelse

Prøverne blev produceret ud fra Nordsøild, som blev leveret til Egersund Seafood, den 15. juni 2014. Råvaren blev brugt til en kommerciel matjesproduktion. Hovedkappede sild (500 kg) blev lagt i saltlage (300 kg, 13 % salt, 5 °C). Der blev gennemført 4 prøveudtag: A: råvare (8 fileter), B: 3 timer i lage inden filetering (8 fileter), C: 6 timer i lage inden filetering (8 fileter) og D: 9 timer i lage inden filetering (8 fileter). Umiddelbart efter vakuumpakning blev prøverne frosset ned ved -30 °C, og derefter lagret ved -80 °C. DTU Food modtog prøverne fra Nofima, Stavanger den 30. september 2014. De blev opbevaret ved -80°C indtil analyse. Efter optøning blev der udtaget muskelstykker lige under rygfinnen og muskelstykkerne blev lagret i prøverør ved -80 °C indtil analyse.

Fra de frosne muskelstykker blev der udskåret og afvejet 200 mg muskel som omgående blev homogeniseret (Polytron PT 1200, KINEMATICA) i 2 ml buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ved 0 °C. Der blev homogeniseret 3 gange 30 s med 30 s pause mellem homogeniseringerne.

Homogenatet blev centrifugeret med 11.200 g i 20 min ved 3 °C hvorefter supernatanten blev taget fra og frosset (-80 °C) indtil analyse.

3.1.2 Proteinbestemmelse

Prøvernes proteinindhold blev bestemt ved Lowry metoden (Lowry *et al.*, 1951) i en udgave modificeret af Peterson (1977) og efter TCA fældning som beskrevet af Kaplan & Pedersen (1989).

3.1.3 To-dimensional gelelektroforese (2DE)

På baggrund af prøvernes proteinkoncentrationer blev der fældet (TCA) en proteinmængde så der kunne benyttes 1000 µg protein til elektroforesen. Det fældede protein blev opløst i 8 M urea, 2 M thiourea, 50 mM DTT, 1,5 % CHAPS, 2 % Pharmalyt 3–10, og 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) og påsat en Immobiline Drystrips gel (GE Healthcare, 18 cm, pl 4-7) til elektroforetisk adskillelse af proteinerne i

første dimension (1D). Efter denne elektroforese blev 1D-gelen ekvibreret i 2 x 20 min i 6 M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8,8) 30 % (w/v) glycerol og 2 % SDS med henholdsvis 1 % (w/v) DTT, og 4,5 % iodoacetamide. 1D-gelen blev herefter lagt ovenpå en SDS-polyacrylamidgel (12 %) og proteinerne blev nu elektroforetisk adskilt i anden dimensions (2D).

Efter elektroforesen blev proteinerne fixeret og farvet med colloid Coomassie Brilliant Blue (Rabilloud & Charmont, 2000). 2D-gelen blev herefter fotograferet (CCD kamera) og billederne blev analyseret ved hjælp af programmet Progenesis SameSpots (version 4.5, Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)

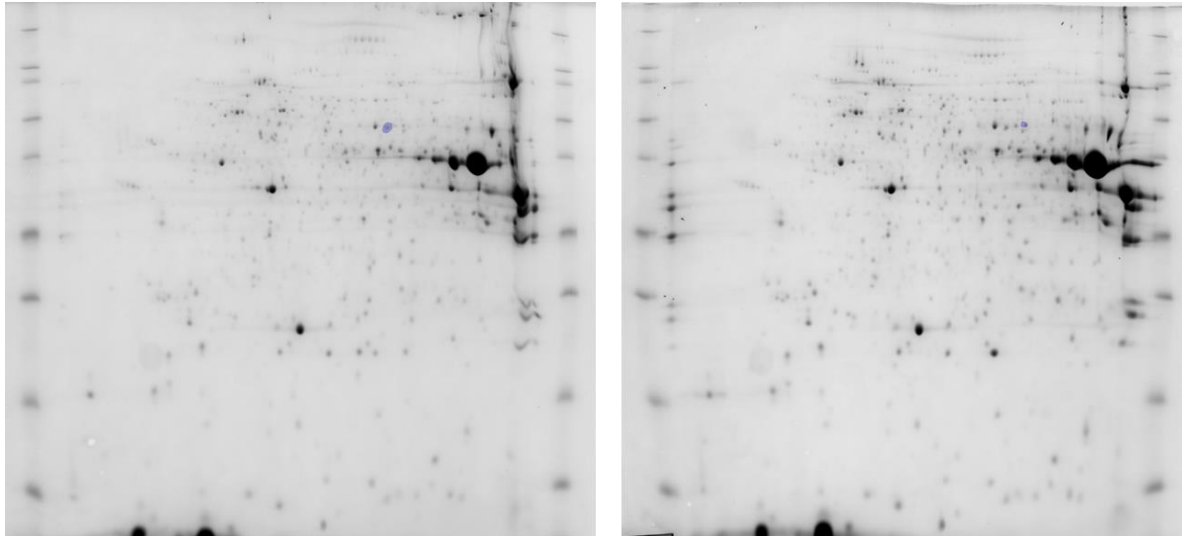
En mere detaljeret beskrivelse af den benyttede 2DE procedure findes i Wulff *et al.* (2012).

3.1.4 Massespektroskopi (MS) til identifikation af proteiner

Proteinpletter blev skåret ud af gelerne, fordøjet med trypsin og påsat et såkaldt MALDI-target. Masse/ladnings ratioer blev derefter målt med et Ultraflex II massespektrometer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). De fremkomne MS og MS/MS masselister benyttes derefter til MASCOT-MS/MS ion-søgninger i databaser. En mere detaljeret beskrivelse findes i Wulff *et al.* (2012).

4 Resultater og diskussion

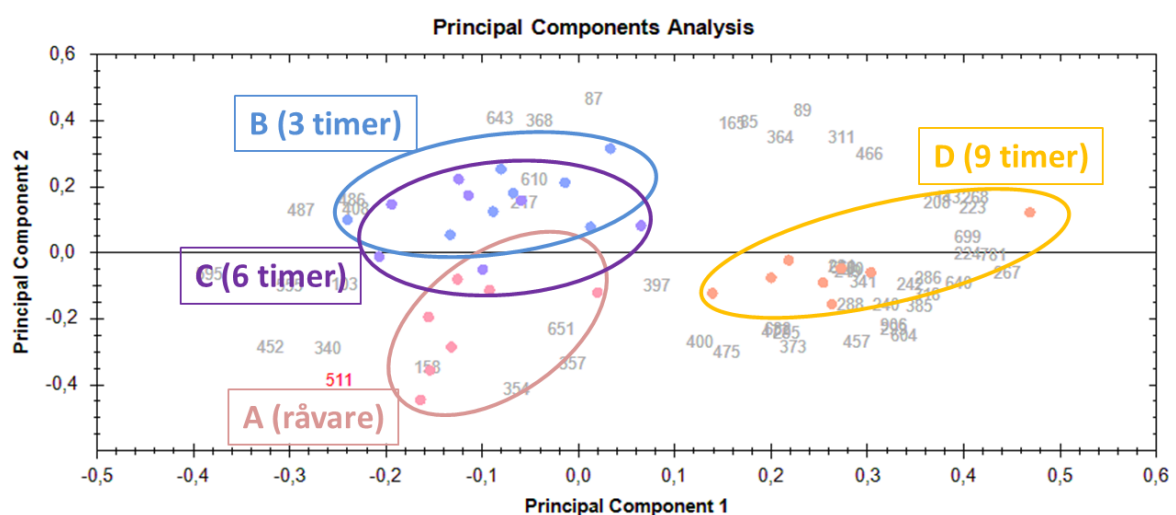
Med henblik på at finde proteinforandringer der sker i sildemusklens under modningsprocessen blev proteomanalysen (2D-gelelektroforese) anvendt på 8 fisk fra hver af koderne, altså i alt 32 fisk. Der ses eksempler på færdige 2D-geler i figur 1.



Figur 1 Eksempler på 2D-geler af prøve fra henholdsvis råvare (venstre gel) og 9 timer i lage (højre gel).

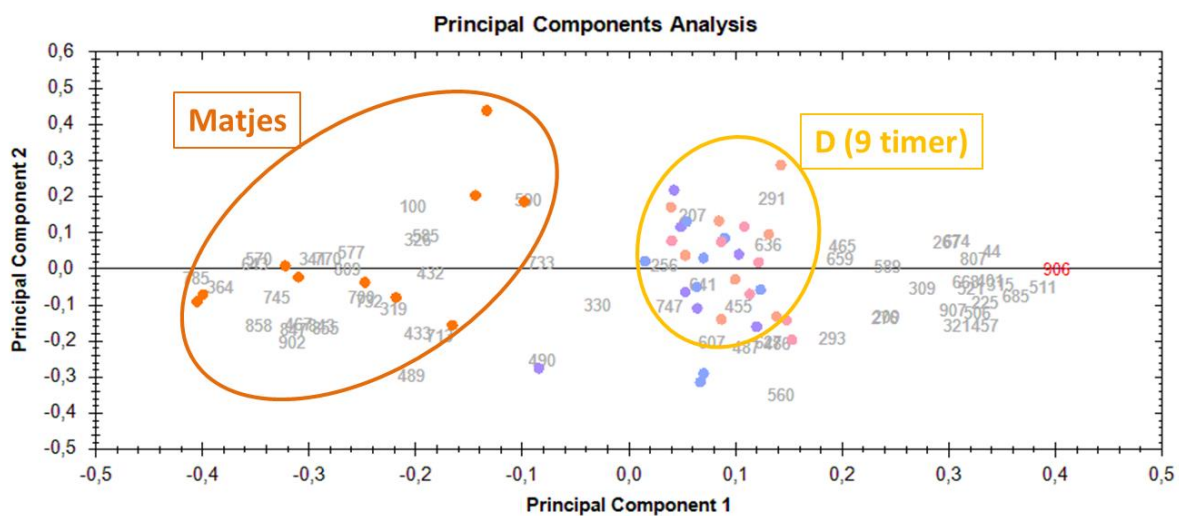
4.1 Sammenligning af proteinprofiler

Proteinprofilerne fra de 32 2D-geler blev sammenlignet ved hjælp af billedanalyse. I figur 2 ses resultatet af en principal komponent analyse (PCA), som viser hvilke prøver der ligner hinanden i forhold til proteinpletter. Det ses tydeligt at prøverne fra 3 og 6 timer i lage ikke er meget forskellige fra råvaren, mens prøverne fra 9 timer i lage er forskellige fra alle de øvrige koder.



Figur 2 Principal komponent analyser af 2D-gel data. Placeringen i plottet af de enkelte sildeprøver er angivet med massivt farvede symboler, mens de diffuse grå tal angiver proteinpletterne (55 pletter) fra 2D-gelerne som er signifikante ($p < 0,05$) i en ANOVA der sammenligner koderne.

Selvom det således ser ud til at 9 timers modning fører til store ændringer i filetens proteiner, så er de proteinforskelle, der er mellem kode D (9 timer) og de øvrige grupper meget små i forhold til de ændringer der sker i proteinerne under den traditionelle matjes modning. Det ses tydeligt af figur 3, som er et plot baseret på de proteiner som ændredes under den traditionelle matjes modning (se tidligere rapport). Her ligger kode D sammen med koderne A, B og C, mens matjes koden ligger helt for sig selv til venstre i plottet. De 9 timers modning er derfor ikke tilstrækkeligt, men kun et skridt på vejen til den modne matjes. I stedet for at fortsætte arbejdet med de proteiner som ændredes ved 9 timers modning, blev det derfor besluttet at fokusere på de proteiner, som ændres under den traditionelle matjes modning. Det drejer sig om de proteiner der blev fundet i forsøget fra 2012 (Skåra *et al.*, 2013), blandt hvilke der kan findes et mindre antal som samlet (i en matematisk model) vil kunne benyttes til bestemmelse af en slags modningsgrad og dermed besvare spørgsmålet: Er modningsgraden for en matjes nået? Vi forsøger derfor at få disse proteiner identificeret.



Figur 3 PCA af 2D-gel data fra koderne A, B, C, D og den traditionelle matjes fra forsøg i 2012. Der er medtaget proteinpletter (64 pletter) som er højsignifikante ($p < 0,01$) i en ANOVA som sammenligner matjes med råvare (2012).

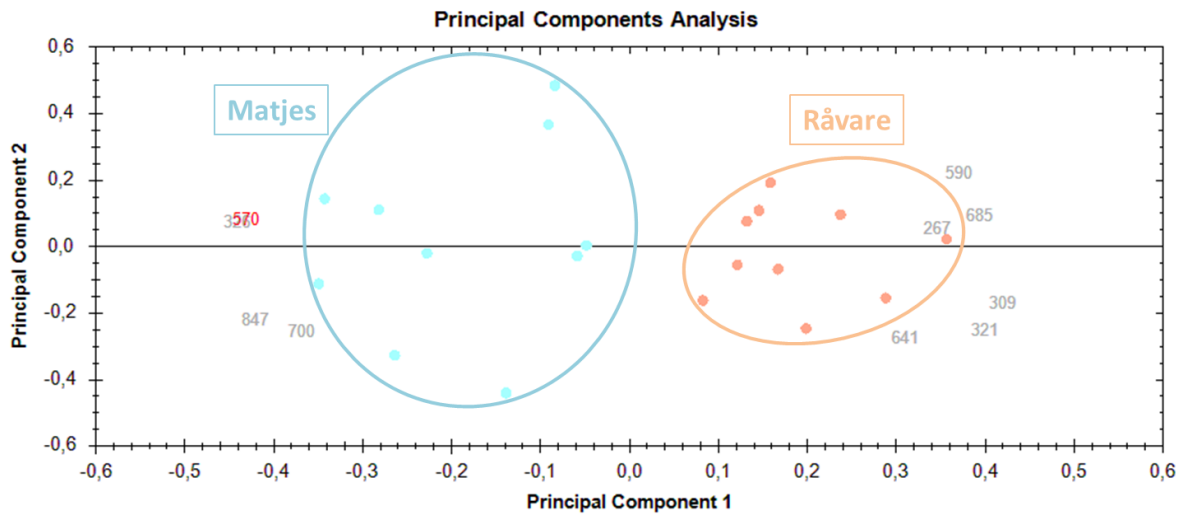
4.2 Identifikation af proteinpletter

Ud af de 64 proteiner, hvis mængde ændrede sig højsignifikante ($p < 0,01$) under den traditionelle matjes modning blev 56 videre analyseret og heraf er indtil videre 10 proteiner blevet identificeret (se Tabel 1). At der ikke blev identificeret flere proteiner her i første omgang, skyldes dels at det er komplicerede analyser og specielt at databasesøgningerne udgør en barriere når det drejer sig om proteiner fra arter (her sild) som ikke er stærkt repræsenteret i proteindatabaserne. Det er dog et problem som kan overvindes, men det kræver at en større del af de enkelte proteiner analyseres videre med MS/MS inden der søges i databaserne.

Tabell 1 Identifikation af proteiner fra pletter i gelerne.

Gel-plet nummer	Proteinnavn	Proteinmængden i matjes i forhold til i råvaren
9	calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1-B-like	↑
12	tropomyosin alpha-1 chain	↑
22	caspase-8-like protein	↓
26	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	↑
31	electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	↓
33	ubiquitin-conjugating enzyme E2 R2	↓
47	myotubularin-related protein 6, partial	↓
51	T-complex protein 1 subunit epsilon	↓
52	alpha-actinin	↓
53	Echs1 protein, partial	↑

Nogle af de identificerede proteiner (#: 9, 12 og 52) relaterer direkte til muskelstrukturer (aktin-filamenter) og -funktioner (regulering af cytoskelettets organisering), som vides at være væsentlige for konsistensen af musklen. Derudover kunne proteinerne #22, #26 og #51 tænkes at have betydning for kvalitet da disse proteiner er involveret i processer som har indflydelse på hvordan andre proteiner foldes og nedbrydes. De øvrige proteiner kan ikke umiddelbart tilskrives en årsagssammenhæng med kvalitets parametre, men de vil absolut kunne benyttes som markører i forbindelse med udviklingen af en kommende metode til måling af modningsgrad. Som det fremgår af Tabel 1 så stiger mængden af 4 af proteinerne (#: 9, 12, 26 og 53) under matjesmodningen, mens de resterende 6 proteiner falder i mængde. Det betyder, at disse 10 proteiner ville kunne benyttes til måling af om en sild er rå eller om den har nået matjes-modningsgraden. Det kan ses i figur 4, hvor en PCA af netop disse 10 proteiner tydeligt grupperer prøverne som henholdsvis matjes og råvare. Der kan dog laves en bedre (stærkere) bestemmelse, hvis der benyttes en anden sammensætning af proteiner (12 stk, hvoraf 2 er blandt de identificerede).



Figur 4 PCA af 2D-gel data omfattende den traditionelle matjes og råvaren fra forsøg i 2012. Der er udelukkende medtaget de 10 identificerede proteinpletter.

5 Konklusion

Alle analyserede prøver fra forsøget 2014 med de delvist modnede sild havde proteinbilleder, som var meget forskellige fra de "kommercielle" matjessild, der blev analyseret tidligere (2012). Det kan således konkluderes at 9 timer i lagen ikke giver en tilstrækkelig modningsgrad af silden. Dette stemmer godt overens med markedsundersøgelser, som indikerer at ingen af fileterne fra 2014-forsøget opfattes som "tilstrækkeligt" modnede (Skåra, personlig kommunikation).

Proteomanalysen udgøre et stærkt værktøj til undersøgelse af hvordan musklen påvirkes under matjes modningsprocessen, og der kan på den baggrund laves matematiske modeller som ved måling af en række proteiner vil kunne bestemme modningsgraden af en sildemuskel. Et væsentligt resultat af denne undersøgelse er at nogle af de proteiner, som forandres under matjes modningen, er blevet identificeret, og dette kan danne grundlag for udvikling/etablering af en hurtig metode til måling af modningsgrad under matjes produktionen.

6 Perspektivering

Ved hjælp af 2D-gelanalysen har vi fundet en række proteiner, hvoraf nogle allerede er identificeret, som karakteriserer matjes modningsprocessen. Et antal af disse proteiner kan benyttes i forbindelse med etableringen af en hurtig-analyse, som vil kunne anvendes til at kontrollere og optimere modningsprocessen i relation til de variable parametre som har betydning for processen (tid, temperatur, lagesammensætning osv.). Et sådant matjes-modning assay skulle ved analyse af homogeniseret sildemuskel måle et antal udvalgte proteinmarkører på en hurtig måde, og resultaterne kan via en matematisk model være et mål for "modningsgraden" af silden.

Det centrale princip i et matjes-modnings assay vil være anvendelse af antistoffer som er rettet mod de udvalgte proteiner. Antistofferne vil kunne benyttes i forbindelse med forskellige analysetyper. ELISA vil være et særdeles godt og robust bud på et assay, som vil kunne benyttes "at line" til rimelig hurtig analyse (1-2 timer) af et stort antal indsamlede prøver. En anden "at line" mulighed er at udvikle en art "sticks", som der benyttes til pH-måling eller graviditets-tests. Sådanne "sticks" vil potentielt kunne måle modningsgraden på få minutter efter at en prøve er homogeniseret. Endelig er der mulighed for en "micro-fluid-version", som består af et mindre pumpe/slange system hvori analysen med antistofferne kan foretages på nogle få mikrolitter. Systemet kan enten virke "at-line" hvor der analyseres fra et homogenat, som i analysetyperne ovenfor, eller som et "on-line" system hvor der stikkes en nål ind i musklen for at trække nogle få mikrolitter ud og analysere på disse. Analysetiden for et sådant system vil kunne være ½-2 minutter.

En farbarvej frem til en færdig og funktionsdygtig hurtig-analyse vil omfatte følgende trin:

- 1) En verificering af at de udvalgte proteinmarkører virkelig kan måle modningsgrad.
- 2) Da der kun er kørt proteomanalyse (2D-geler) på traditionelt modnede matjes en gang (gruppen fra 2012), vil det være vigtigt at få kørt 2D-geler af prøver fra yderligere 2-3 matjesproduktioner, således at der i det videre arbejde benyttes proteinmarkører som vil være gyldige.
- 3) De verificerede proteinmarkører skal have analyseret deres aminosyresekvens inden der kan laves antistoffer mod dem.
- 4) For at lave antistoffer som er helt specifikke for de enkelte proteinmarkører er det nødvendigt at kende aminosyresekvensen af den ene ende (c-terminalen) af proteinerne, da mange af proteinerne er dele af større proteiner som er blevet klippet i stykker under processen. Det skyldes at antistofferne gerne skulle kunne genkende det itu-klippede protein og ikke forveksle det med det intakte protein som ikke har nogen værdi som markør for modningen.
- 5) Få produceret antistoffer som er helt specifikke mod de ønskede proteiner.
- 6) Da mange antistoffer let kan kryds reagere med andre proteiner, skal hvert antistof testes for om det binder specifikt til det ønskede protein. Det gøres ved hjælp af Western Blotting af 2D-geler.
- 7) En etablering af ELISA metode til måling af proteinmarkørerne.
- 8) Dette trin kan som nævnt ovenfor udgøre den endelige analyse, men dette trin 4 er derudover nødvendigt uafhængigt af hvilken anden af de tidligere nævnte analysetyper der efterfølgende ønskes etableret.
- 9) (Eventuelt). Udvikling af en hurtigere metode end traditionel ELISA. Det kunne som nævnt være:
 - a) En art "sticks" til måling i homogeniseret muskel
 - b) Et "micro-fluid-system" til måling i homogeniseret muskel

- c) Et "micro-fluid-system" til "on-line" måling på sildefileterne ved indstikning af en nål. Dette kræver en forudgående udvikling/etablering af system til udtrækning af væske fra musklen via nål.

7 Referencer

- Kaplan, R.S. & P.L. Pedersen (1989). Sensitive protein assay in presence of high-levels of lipid. *Methods in Enzymology*, **172**, pp. 393–399.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem AD*, **193**.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry AD*, **83**.
- Rabilloud, T. & S. Charmont (2000). Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In Thierry Rabilloud (ed.). *Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 107–126.
- Skåra, T., M. Carlehög, J. Skaret, A. Gildberg, F. Jessen, H.H. Nielsen & T. Løvdal (2013). Alternativ produksjon av Matjessild. Del 1: Nordsjøsil. Pages 1–39. Nofima.
- Skåra, T., R. Skåra, M. Carlehög, P. Lea, A. Gildberg, F. Jessen & H.H. Nielsen (2014a). Alternativ produksjon av matjessild. Prosessutvikling og oppskalering. Page 39. Nofima.
- Skåra, T., S.K. Stormo, M. Carlehög, P. Lea, A. Gildberg, F. Jessen & H.H. Nielsen (2014b). Alternativ produksjon av Matjessild. Del 2: NVG sild. Pages 1–28. Nofima.
- Wulff, T., A. Jokumsen, P. Hojrup & F. Jessen (2012). Time-dependent changes in protein expression in rainbow trout muscle following hypoxia. *Journal of Proteomics*, **75**, pp. 2342–2351.

