

白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳分析体系的建立

仪淑敏¹, 李睿智¹, 陈 杨¹, 励建荣^{1,*}, 李学鹏¹, 徐永霞¹, 李 春², 丁浩宸³, 郁晓君³

(1.渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121013;

2.渤海大学数理学院, 辽宁 锦州 121013; 3.辽宁安井食品有限公司, 辽宁 鞍山 114100)

摘 要: 以白鲢鱼为研究对象, 建立并优化其肌原纤维蛋白的双向电泳技术。结果表明, 选用固相pH值梯度预制胶条pH 4~7, 上样量120 μg , 等电聚焦程序III (50 V主动水化15 h, 250 V、2 h, 1 000 V、2.5 h及4 000 V、3 h三段式除盐, 8 000 V、2 h和10 000 V、1.5 h两段式升压, 10 000 V聚焦80 000 V \cdot h, 500 V保持10 h) 以及12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶条件下进行双向电泳, 凝胶银染后用PDQuest软件分析, 得到具有高分离度的肌原纤维蛋白双向电泳图谱, 蛋白点清晰。

关键词: 白鲢鱼; 肌原纤维蛋白; 双向电泳

Establishment of Two-Dimensional Gel Electrophoresis System for Myofibrillar Proteins of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

YI Shumin¹, LI Ruizhi¹, CHEN Yang¹, LI Jianrong^{1,*}, LI Xuepeng¹, XU Yongxia¹, LI Chun², DING Haochen³, YU Xiaojun³

(1. College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China;

2. College of Mathematics and Physics, Bohai University, Jinzhou 121013, China;

3. Liaoning Anjoy Food Co. Ltd., Anshan 114100, China)

Abstract: A two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) system for the separation of myofibrillar proteins from silver carp was established and optimized in this study. The key factors of isoelectric focusing (IEF) and the pH gradient of immobilized pH gradient (IPG) strip were selected as the main factors affecting 2-DE in this paper. We loaded 120 μg of protein onto the 17 cm pH 4–7 IPG strip, and the IEF program III was as follows: 50 V for 15 h, three-stage desalting involving 250 V for 2 h, 1 000 V for 2.5 h and 4 000 V for 3 h, 8 000 V for 2 h and 10 000 V for 1.5 h, and 10 000 V for 80 000 V \cdot h and 500 V held for 10 h. The gel concentration was 12%. The gel was stained with silver nitrate, scanned and analyzed using PDQuest software. A high-resolution 2-DE map for myofibrillar proteins from silver carp was obtained finally.

Key words: silver carp; myofibrillar protein; two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701007

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 01-0041-06

引文格式:

仪淑敏, 李睿智, 陈杨, 等. 白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳分析体系的建立[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 41-46.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701007. <http://www.spkx.net.cn>

YI Shumin, LI Ruizhi, CHEN Yang, et al. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis system for myofibrillar proteins of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Food Science, 2017, 38(1): 41-46. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701007. <http://www.spkx.net.cn>

白鲢鱼 (silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*) 又名鲢鱼, 属硬骨鱼纲, 鲤形目, 鲤科, 鲢属, 分布于我国东北部、中部、东南、南部江河中, 其抗病性较好、生长快、成本低、捕获量大^[1], 例如2014年我国的养殖

产量达到4 220 t^[2]。白鲢鱼是我国重要的经济鱼类, 营养丰富^[3], 近年来对鲢鱼的综合利用研究逐渐增多^[4-6]。其最常见的加工产品就是采用其肌原纤维蛋白生产的鱼糜^[7], 鱼糜制品的凝胶等性质与肌原纤维蛋白的变化

收稿日期: 2016-03-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31571868); 辽宁省教育厅重点实验室基础研究项目 (LZ2015002; LZ2014047); “十二五”国家科技支撑计划项目 (2015BAD17B03); 辽宁省高等学校创新团队项目 (LT2014024)

作者简介: 仪淑敏 (1980—), 女, 教授, 博士, 研究方向为水产品贮藏加工及质量安全控制。E-mail: yishumin@163.com

*通信作者: 励建荣 (1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品贮藏加工及安全控制。E-mail: lijr6491@163.com

息息相关，因此，准确有效研究白鲢鱼肌原纤维蛋白变化显得尤为重要。

蛋白质组学始于20世纪70年代双向凝胶电泳（two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE）的发展^[8-10]。蛋白质组学可用于大规模分析某一时间特定生物系统的蛋白质，蛋白质组学不仅研究蛋白质的结构和功能，还可进一步探索蛋白质的改性和交互作用，完成对某一蛋白质分子的定位和定量^[11-12]。2-DE是蛋白质组学研究的经典方法^[13-14]，是一种分析细胞、组织或其他生物样本中蛋白质表达的种类型的有力手段。

近年来，2-DE技术已被广泛用于畜禽类肌肉蛋白质的研究，为评定肉制品性状提供了新的方法和依据^[15-16]，但其在水产品方面的应用却仍处于起步阶段。肌肉蛋白质的分解是引起水产品品质变化的主要原因，为了解白鲢鱼肌原纤维蛋白中蛋白质种类和状态，客观评价其品质，本实验建立并优化了白鲢鱼肌原纤维蛋白2-DE技术，以期对白鲢鱼肉产品加工及品质鉴定提供新的方法和思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

活白鲢鱼购于辽宁省锦州市林西路水产市场，1 h内运送至实验室，立即冰水致死。

固相pH值梯度（immobilized pH gradient, IPG）预制干胶条（pH 3~10、pH 4~7、pH 5~8，17 cm）、载体两性电解质（pH 3~10、pH 5~8、pH 4~6和pH 5~7）、Tris-base、尿素、硫脲、二硫苏糖醇（dithiothreitol, DTT）、碘乙酰胺、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐（3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate, CHAPS）、聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE）所需丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfonate, SDS）、矿物油、四甲基乙二胺（N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED）、过硫酸铵、甘氨酸 美国Bio-Rad公司；甘油、溴酚蓝、琼脂糖均为国产分析纯，所有溶液均以Milli-Q超纯水系统制备的超纯水为溶剂。

1.2 仪器与设备

UV-2550型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司；MILLI-QREFERENC超纯水系统 美国密理博公司；GS-800™校正型光密度扫描仪、Protean等电聚焦电泳仪、PROTEANR II XL电泳槽 美国Bio-Rad公司；ZD-9556型水平脱色摇床 常州市凯航仪器有限公司；SORVALL Stratos冷冻高速离心机 美国Thermo公司。

1.3 方法

1.3.1 白鲢鱼肌原纤维蛋白的提取

参考周凯等^[17]的方法，取白鲢鱼脊背肉20 g，

加入100 mL 10 mmol/L Tris-HCl（pH 7.2），高速匀浆2 min，4℃、5 000 r/min离心15 min。取沉淀，加100 mL 10 mmol/L Tris-HCl（pH 7.2，含0.6 mol/L NaCl），4℃、4 500 r/min高速匀浆20 min。取上清液贮藏于4℃冰箱中备用，即为肌原纤维蛋白。用双缩脲法测定蛋白质质量浓度。

1.3.2 蛋白双向电泳

1.3.2.1 等电聚焦程序的选择和优化

根据双向电泳操作技术手册进行实验。将适量的已定量蛋白质溶液与水化上样缓冲液（含7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、0.2%载体两性电解质和0.001%溴酚蓝）充分混合，分别选用17 cm（pH 3~10、pH 4~7、pH 5~8）3种IPG预制干胶条进行等电聚焦，上样量分别选用100、120、150 μg，上样体积300 μL，本实验等电聚焦程序分别设置为I、II和III（表1）。

表1 等电聚焦程序（20℃）

Table 1 Parameter settings for isoelectric focusing (20℃)					
程序	步骤	电压/V	升压模式	持续时间	作用
I 原始	S1	50	线性	14 h	主动水化
	S2	500	线性	30 min	除盐
	S3	1 000	快速	1 h	除盐
	S4	10 000	线性	5 h	升压
	S5	10 000	快速	60 000 V·h	聚焦
	S6	500	快速	10 h	保持
II	S1	50	快速	14 h	主动水化
	S2	250	慢速	2 h	除盐
	S3	1 000	线性	3 h	除盐
	S4	4 000	快速	3 h	除盐
	S5	8 000	线性	4 h	升压
	S6	10 000	慢速	2 h	升压
	S7	10 000	快速	70 000 V·h	聚焦
	S8	500	快速	10 h	保持
III	S1	50	快速	15 h	主动水化
	S2	250	慢速	2 h	除盐
	S3	1 000	线性	2.5 h	除盐
	S4	4 000	快速	3 h	除盐
	S5	8 000	慢速	2 h	升压
	S6	10 000	慢速	1.5 h	升压
	S7	10 000	快速	80 000 V·h	聚焦
	S8	500	快速	10 h	保持

1.3.2.2 胶条平衡

等电聚焦结束后，先后分别用6 mL胶条平衡缓冲液 I（6 mol/L尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl（pH 8.8）、20%甘油和2% DTT）和缓中液 II（6 mol/L尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl（pH 8.8）、20%甘油和2.5%碘乙酰胺）进行胶条平衡，每次14 min。

1.3.2.3 第二向SDS-PAGE

将平衡完毕的胶条于1×电极缓冲液（含3 g/L Tris-base、14.4 g/L甘氨酸、1 g/L SDS）中洗去多余平衡液，

分别转移至提前制好的第二向10%、12%、15%聚丙烯酰胺分离胶上端，并加入低熔点琼脂糖封胶液（0.5%低熔点琼脂、25 mmol/L Tris-base、192 mmol/L甘氨酸、0.1% SDS和0.001%溴酚蓝），排除气泡，待其彻底凝固后，转移至垂直电泳槽中，恒压进行第二向SDS-PAGE，程序见表2。

表2 第二向SDS-PAGE程序
Table 2 Parameter settings for SDS-PAGE program

步骤	电压/V	持续时间/h	作用
S1	100	1.5	浓缩
S2	200	0.5	转移
S3	300	2.5	分离
S4	400	1.0	分离

1.3.2.4 银染、凝胶成像及分析

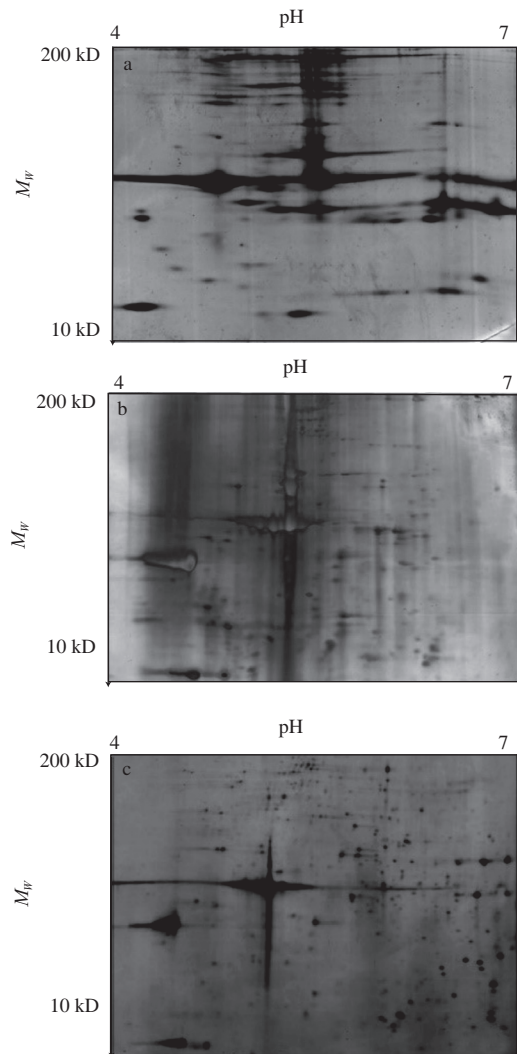
参考文献[18-20]的方法并略有修改。采用高分辨专业凝胶图像扫描系统扫描凝胶，并用PDQuest图像分析软件对图谱分析处理。

2 结果与分析

2.1 等电聚焦程序的选择和优化

在其他条件相同的情况下，分别对比3种不同的等电聚焦程序（表1）所得实验图谱（图1）。一般情况下，等电聚焦过程中除盐时间、聚焦电压和聚焦时间是主要影响因素^[21-23]，17 cm IPG胶条只有达到7 000 V以上，才能得到较好的等电聚焦效果^[18]。等电聚焦程序I实验过程中（图1a），电压未能升至预设的10 000 V，聚焦严重不彻底，纵向条纹数量极多，多数蛋白存在横向拖尾，不能分辨部分蛋白点是聚焦分离所得还是高丰度蛋白拖尾造成的残留。与程序I相较，程序II延长了除盐、升压及聚焦的时间。在实验过程中，电压能升至预设的10 000 V，但仍存在聚焦不彻底的现象，多数蛋白存在横向拖尾，大部分高分子质量蛋白略有纵向拖尾，蛋白点不够圆润（图1b）。为改善聚焦不彻底及蛋白拖尾的状况，在程序I和II的基础上改进设计了程序III（图1c）。该程序分离所得高丰度蛋白存在横向拖尾现象，个别高丰度蛋白存在纵向拖尾，但低丰度蛋白得到了较好的分离，蛋白点相对清晰，分离效果明显好于程序I和II。因此，程序III为第一向等电聚焦最佳程序。延长主动水化时间可以有效使IPG胶条充分溶胀，并有利于蛋白质样品与胶条充分接触，增加参与等电聚焦的蛋白种类和数量。适当的减少除盐和缩短升压时间有利于节省等电聚焦所消耗的时间。另外，盐类污染是导致蛋白质斑点聚焦不足的最常见原因，在双向电泳中，第一向IEF对低分子质量的离子型杂质特别敏感，样本中存在的非蛋白杂质能干扰电泳分离和随后的显影效果^[24]。因此，在等电聚焦程序II和III时，除搭建盐桥外，还适

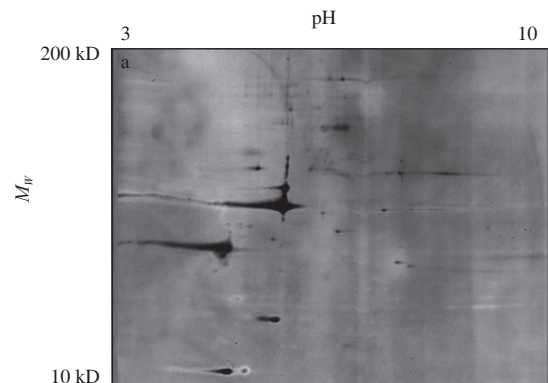
当延长了除盐时间，并设置多步升压，以除去多余的盐离子。

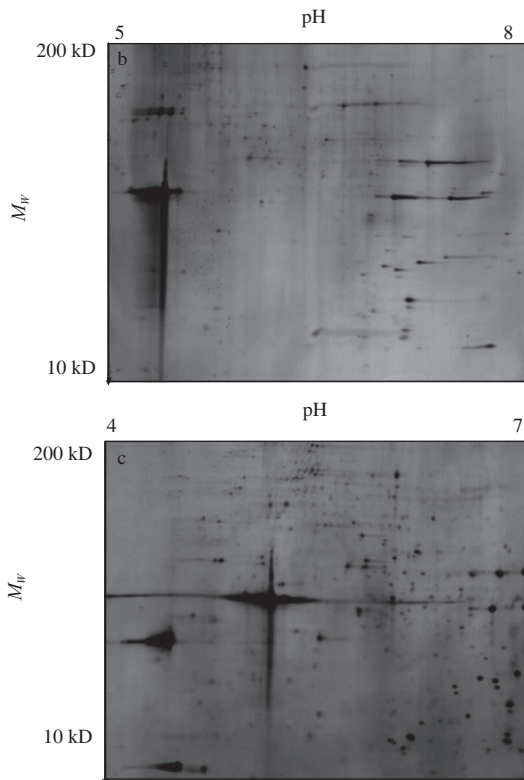


a.程序I；b.程序II；c.程序III。17 cm，pH 4~7，银染。

图1 选用不同等电聚焦程序所得白鲢鱼肌原纤维蛋白2-DE图谱
Fig. 1 2-DE maps of myofibrillar proteins from silver carp in different pH IPG strips

2.2 IPG预制干胶条pH值范围的选择





a. pH 3~10; b. pH 5~8; c. pH 4~7。17 cm, 银染。

图2 不同pH值范围IPG干胶条的白鲢鱼肌原纤维蛋白2-DE图谱

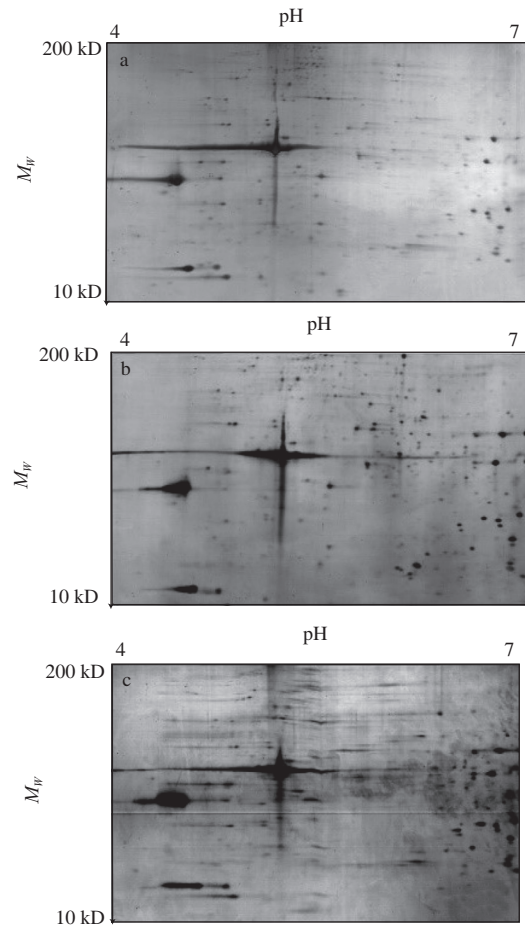
Fig. 2 2-DE maps of silver carp myofibrillar proteins from different pH IPG strips

根据不同样品所需, 恰当的选择IPG预制干胶条的pH值范围可明显改善蛋白质分离效果, 一般遵循先宽后窄、先线性后非线性的选择原则^[16,18]。由图2a可知, pH 3~10的胶条分离效果较差, 所得蛋白点数较少, 明显少于pH值范围较窄的胶条, 大多数蛋白点集中在中段, 左右两端蛋白点较少, 且伴随有部分横向拖尾现象。为了提高对大多数蛋白质的分离和分辨率, 分别选用pH 5~8和pH 4~7的IPG胶条进行进一步对比实验。结果表明, 使用pH 4~7(图2c)的IPG胶条共得到的蛋白点较多, 且分布更均匀, 蛋白分辨率和灵敏度明显提高, 这与生物中大部分蛋白的等电点在pH 4~7之间的报道相一致^[25]; 而选用pH 5~8(图2b)的IPG胶条共得到蛋白点较多, 但所得的2-DE图谱中间出现大面积空白, 蛋白点大多分布在图谱左侧及右侧。因此, pH 4~7为白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳最适宜的IPG胶条范围。不同种类的水产品及水产品的不同部位双向电泳体系所选IPG预制干胶条pH值范围不同, 但是分离效果会有所不同^[26-30]。

2.3 上样量的选择

上样量是影响蛋白2-DE图谱分辨率以及蛋白点数的另一重要因素。上样量过小, 虽然可以得到2-DE图谱较为清晰, 蛋白点分离效果较好, 水平条纹较少, 但是会造成一些低丰度蛋白的缺失, 蛋白点数量偏少, 失去一

些有意义的点; 而上样量过大, 有利于一些低丰度蛋白的检测, 但是会影响等电聚焦, 造成高丰度蛋白的不彻底分离和水平拖尾, 不利于图像的分析。本实验选择3个上样量分别为100、120、150 μg , 上样量为100 μg (图3a)时, 图谱较清晰, 蛋白点分离效果较好, 但是与其他图谱相比, 所得蛋白点数量较少, 只有342个, 且低丰度蛋白点明显缺失; 当增加至150 μg 时, 虽然得到的蛋白点清晰圆润且数量多, 蛋白点数量为1 223个, 但是多数蛋白点出现横向拖尾, 且点的光密度过大(图3c)。而上样量为120 μg 时, 所得蛋白点清晰, 分离度较好, 蛋白点数量为1 102个, 此时可以得到最佳的分离效果(图3b)。因此, 120 μg 为白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳的最佳上样量。



a. 100 μg ; b. 120 μg ; c. 150 μg 。17 cm, pH 4~7, 银染。

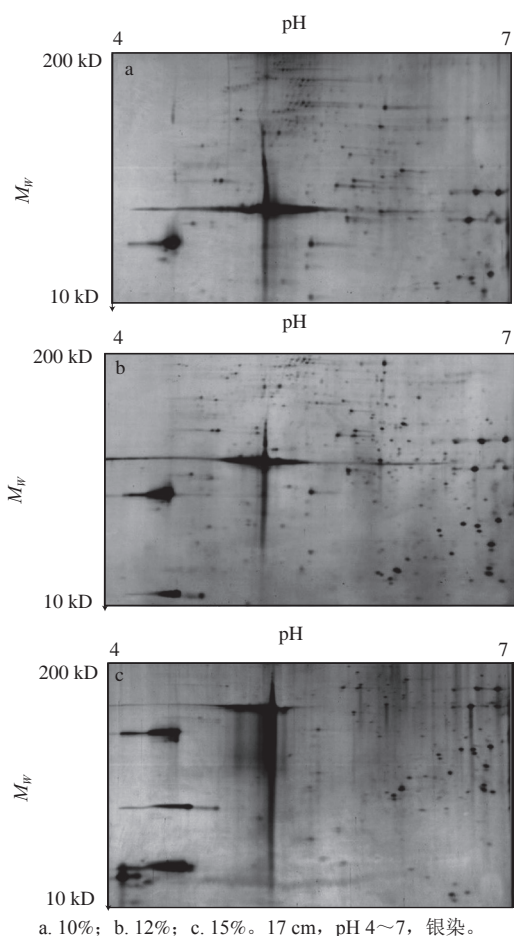
图3 不同上样量的白鲢鱼肌原纤维蛋白2-DE图谱

Fig. 3 2-DE maps of silver carp myofibrillar proteins at different loading quantities

2.4 第二向电泳胶质量分数的选择

双向电泳中第二向SDS-PAGE主要是根据蛋白质分子质量的不同进行分离, 分离胶质量分数不同, 分离范围也略有差异。为了选择适合白鲢鱼肌原纤维蛋白的SDS-PAGE胶质量分数, 得到最好的分离效果, 本实验选择

10%、12%和15% 3种质量分数分离胶进行对比。结果如图4所示, 10%的分离胶得到的2-DE图谱中蛋白点大部分位于图谱的下部, 部分蛋白点严重缺失, 可能是因为胶质量分数越低孔径越大, 小分子的蛋白跑出了胶外(图4a), 蛋白点数量为652个; 而15%的凝胶胶质量分数又过大, 导致高分子蛋白不能较好的分离, 都集中于凝胶的上部(图4c), 蛋白点数量为1 021个; 相比较而言, 12%的分离胶质量分数适中, 蛋白点的分布较为均匀(图4b), 蛋白点数量为1 102个。因此, 12%的分离胶质量分数适用于白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳。



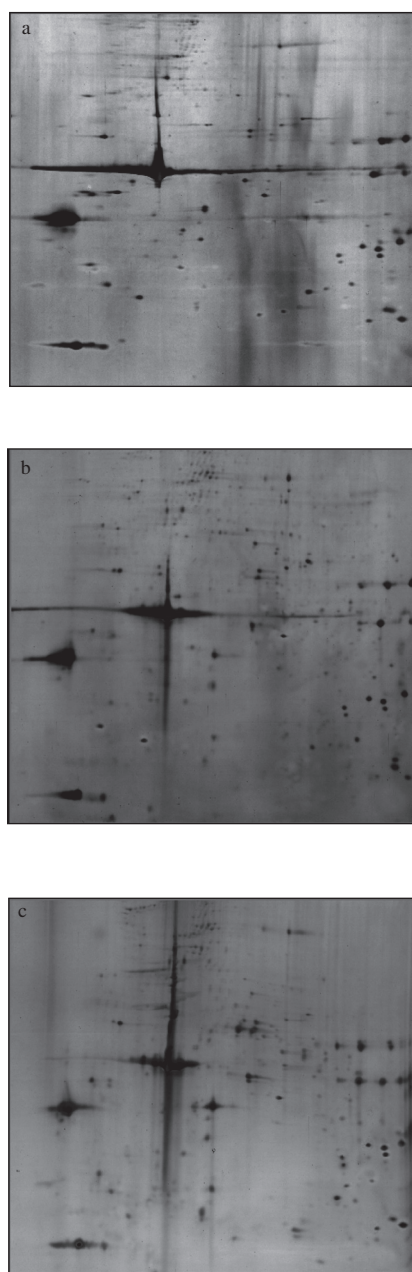
a. 10%; b. 12%; c. 15%。17 cm, pH 4~7, 银染。

图4 第二向电泳胶不同质量分数的2-DE图谱

Fig. 4 2-DE maps of SDS-PAGE gels with different concentrations

2.5 3块胶的重复性比较

2-DE图谱的重复性和稳定性是双向电泳技术存在的主要问题, 也是其自身的局限性。重复性、稳定性好的蛋白质2-DE分离技术是下一步蛋白质组学分析结果可靠性的保障。为此对同一样品、相同条件下、不同时间进行了3次双向电泳, 得到的2-DE图谱如图5所示。通过软件分析发现, 3块胶上分别检测到378、405、413个蛋白点。3张图谱中蛋白点的匹配率可达73.99%, 相关系数达0.874, 表明本研究的2-DE实验具有良好的重复性和稳定性, 可用于后续分析。



a~c分别表示同一蛋白样品的3个重复。17 cm, pH 4~7, 银染。

图5 同一蛋白样品3块胶的重复性比较

Fig. 5 Reproducibility of three 2-DE gels for the same sample

2.6 最优条件下的图谱

通过对影响2-DE图谱关键因素和实验条件的优化, 建立了白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳技术体系: 以载体两性电解质pH值梯度等电聚焦为第一向, 12%质量分数垂直SDS-PAGE为第二向, 进行双向电泳, 银染后扫描获取凝胶图像并用PDQuest软件进行分析。使用17 cm pH 4~7的IPG胶条进行主动水化上样, 上样量为120 μ g、上样体积为300 μ L时, 搭建盐桥并适当延长除盐时间, 能有效提高2-DE图谱的分辨率和重复性, 得到白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳标准图谱如图6所示。

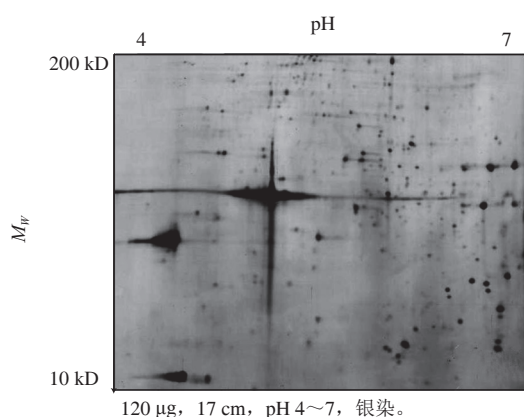


图6 白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳标准图谱

Fig. 6 Standard 2-DE map of silver carp myofibrillar proteins

3 结论

本实验建立了白鲢鱼肌原纤维蛋白的双向电泳分析体系, 选用IPG预制胶条pH 4~7、上样量120 μ g在等电聚焦程序III (50 V主动水化15 h, 250 V、2 h, 1 000 V、2.5 h及4 000 V、3 h三段式除盐, 8 000 V、2 h和10 000 V、1.5 h两段式升压, 10 000 V聚焦80 000 V·h, 500 V保持10 h) 以及12%的SDS-PAGE分离胶条件下得到的白鲢鱼肌原纤维蛋白双向电泳图谱具有高分离度, 为定性和定量研究白鲢鱼肌原纤维蛋白变化提供了依据。

参考文献:

- [1] 张彬. 低钠盐白鲢鱼糜制品的制备及其凝胶特性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012: 3.
- [2] 农业部, 渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 1.
- [3] 任丽娜. 白鲢鱼肌肉原纤维蛋白冷冻变性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 1.
- [4] 徐锦, 李明元, 黄家莉, 等. 六种商品蛋白酶对鲢鱼蛋白水解效果比较研究[J]. 中国调味品, 2012, 37(4): 53-56. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2012.04.013.
- [5] 占剑峰. 提取工艺对鲢鱼盐溶蛋白热诱导凝胶硬度的影响研究[J]. 食品科技, 2011, 36(10): 124-125.
- [6] 林琳, 陆剑峰, 翁世兵, 等. 漂洗工艺对鲢鱼鱼糜凝胶强度和色泽的影响[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(2): 8-12. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2012.02.003.
- [7] 雷雨. 猪血浆蛋白改善鲢鱼鱼糜品质及机理的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 1-5.
- [8] WILLIAMS K L. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology[J]. Electrophoresis, 1999, 20(4): 678-688. DOI:10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:4/5<678::AID-ELPS678>3.0.CO;2-R.
- [9] 李学鹏, 陈杨, 蔡路昀, 等. 蛋白质组学在水产品品质与安全研究中的应用[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 209-214. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201509039.
- [10] AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. Nature, 2003, 422: 198-207.
- [11] ORTEA I, PASCOAL A, CAÑAS B, et al. Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species: from classical methods to Foodomics[J]. Electrophoresis, 2012, 33(15): 2201-2211. DOI:10.1002/elps.201100576.
- [12] GALLARDO J M, ORTEA I, CARRERA M. Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2013, 52(52): 135-141. DOI:10.1016/j.trac.2013.05.019.
- [13] 张志燕, 马海乐, 杨艳华. 蛋白质组学及其在醋酸菌研究中的应用[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 259-264. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201605045.
- [14] 郭旭, 杨云生. 双向电泳技术在蛋白质组研究中的应用进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(5): 638-640. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2006.05.068.
- [15] 张增荣, 蒋小松, 杜华锐, 等. 蛋白质组学在畜禽肉品质研究中的应用[J]. 中国家禽, 2014, 36(8): 2-7. DOI:10.3969/j.issn.1004-6364.2014.08.002.
- [16] di LUCIA A, la GATTA B, NICASTRO A, et al. Protein modifications in cooked pork products investigated by a proteomic approach[J]. Food Chemistry, 2015, 172(1): 447-455. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.099.
- [17] 周凯, 渠宏燕, 王祺, 等. 丙烯酸氧化对大黄鱼肌肉组织和肌原纤维蛋白结构性质的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(10): 1-7. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.001.
- [18] SNEVECHENKO A, WILM M, VORM O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels[J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(5): 850-858. DOI:10.1021/ac950914h.
- [19] YAN J X, WAIT R, BERKELMAN T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2001, 21(17): 3666-3672. DOI:10.1002/1522-2683(200011)21:17<3666::AID-ELPS3666>3.0.CO;2-6.
- [20] 李学鹏. 中国对虾冷藏过程中品质评价及新鲜度指示蛋白研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012: 125-126.
- [21] 黄晓毅. 生鲜猪肉品质变化的差异蛋白质组学研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2010: 29-30.
- [22] 徐永杰. 猪肌肉组织差异蛋白质组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 29-31.
- [23] 项秀平. 虾类蛋白质的双向电泳研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2011: 37-41.
- [24] LENSTRA J A, BLOEMENDAL H. Topography of the total protein population from cultured cells upon fractionation by chemical extractions[J]. European Journal of Biochemistry, 1983, 135(3): 413-423. DOI:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07668.x.
- [25] 薛宝贵, 黄智慧, 周洲, 等. 大菱鲆表皮蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(2): 43-48. DOI:10.3969/j.issn.1000-7075.2011.02.007.
- [26] ETHUIN P, MARLARD S, DELOSIÈRE M, et al. Differentiation between fresh and frozen-thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 294-301. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.12.065.
- [27] MI H B, CHEN J X, HOU X R, et al. Proteomic analysis of mechanisms responsible for the waterless preservation of *fenneropenaeus chinensis* based on cold-forced hibernation[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2016, 25(4): 531-539. DOI:10.1080/10498850.2014.885624.
- [28] SACHIN K S, CURAM S S, SHRADDHA S, et al. Proteomic profile of zebrafish brain based on two-dimensional gel electrophoresis matrix-assisted laser desorption/ionization MS/MS analysis[J]. Zebrafish, 2010, 7: 169-177. DOI:10.1089/zeb.2010.0657.
- [29] MIRIAM H, ESTEBAN A, IRENE A, et al. Hepatic proteome analysis of atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to environmental concentrations of human pharmaceuticals[J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2015, 14(2): 371-381. DOI:10.1074/mcp.M114.045120.
- [30] LI T T, LI J R, HU W Z, et al. Protein changes in post mortem large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) monitored by SDS-PAGE and proteome analysis[J]. Food Control, 2014, 41: 49-55. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.12.031.