

# 基于荧光标记的大黄鱼氧化肌肉蛋白质双向电泳技术的建立

李学鹏<sup>1</sup>, 周明言<sup>1</sup>, 渠宏雁<sup>1</sup>, 王金厢<sup>1</sup>, 朱文慧<sup>1</sup>, 徐永霞<sup>1</sup>, 仪淑敏<sup>1</sup>, 林洪<sup>2</sup>, 励建荣<sup>1,\*</sup>

(1.渤海大学食品科学与工程学院, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013;

2.中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

**摘 要:** 在确定大黄鱼肌肉蛋白质双向电泳分离的基础上, 采用荧光素-5-氨基硫脲 (fluorescein-5-thiosemicarbazide, FTSC) 对氧化的大黄鱼肌肉蛋白质进行荧光标记和参数优化, 进而建立氧化肌肉蛋白质的双向电泳技术体系。结果显示, 氧化肌肉蛋白质较佳的双向电泳程序为: 蛋白样品采用液氮研磨和裂解液III (含 8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% 3-(3-(胆酰胺丙基)二甲氨基)丙磺酸内盐 (CHAPS)、65 mmol/L 二巯苏糖醇 (DTT) 和 0.2% 载体两性电解质) 制备; 采用 FTSC 溶液 40 °C 恒温水浴 3 h, 对氧化蛋白质进行荧光标记, 并采用乙醇-乙酸乙酯混合溶液进行洗脱; 标记后的蛋白样品采用 pH 5~8 的固定化 pH 梯度 (IPG) 预制胶条上样后, 采用等电聚焦程序 C (50 V 主动水化 14 h, 500 V、2 h, 1 000 V、1.5 h 及 4 000 V、1 h 三段式除盐, 6 000 V、0.5 h 和 10 000 V、1 h 两段式升压, 10 000 V 聚焦 80 000 vhr, 最后 500 V 保持 10 h) 进行第 1 向分离, 再采用 12% 的聚丙烯酰胺分离胶进行第 2 向分离; 最后所得凝胶经直接荧光扫描和银染后扫描分别得到氧化肌肉蛋白质的荧光图谱和肌肉全蛋白电泳图谱。由该程序获得的双向电泳图谱具有分离度好、蛋白点清晰、分布均匀等优点, 为利用双向电泳和蛋白质组学技术分离鉴定氧化蛋白质种类、进而阐明蛋白质氧化机制提供理论依据。

**关键词:** 双向电泳; 大黄鱼; 氧化肌肉蛋白质; 荧光素-5-氨基硫脲; 荧光标记

## Establishment of Two-Dimensional Gel Electrophoresis Based on Fluorescence Labeling for Oxidized Muscle Proteins of Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*)

LI Xuepeng<sup>1</sup>, ZHOU Mingyan<sup>1</sup>, QU Hongyan<sup>1</sup>, WANG Jinxiang<sup>1</sup>, ZHU Wenhui<sup>1</sup>, XU Yongxia<sup>1</sup>, YI Shumin<sup>1</sup>, LIN Hong<sup>2</sup>, LI Jianrong<sup>1,\*</sup>

(1. National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, China;

2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to optimize the processing parameter for fluorescence labeling of oxidized muscle proteins from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) with fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC), and further to establish a two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) system for oxidized muscle proteins. The results showed that the optimized electrophoresis process was as follow. The protein sample was prepared by liquid nitrogen milling and using a lysis buffer containing 8 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT and 0.2% carrier ampholyte, and then the oxidized protein was labeled with FTSC (20 mmol/L in DMSO) for 3 h at 40 °C in the dark, and washed five times with ethanol/ethyl acetate (1:1). The sample was loaded onto immobilized pH gradient (IPG) gel strip (pH 5–8), and separated by isoelectric focusing (active rehydration for 14 h at 50 V; desalting for 2 h at 500 V, 1.5 h at 1 000 V and 1 h at 4 000 V; voltage for 0.5 h at 6 000 V at first and then for 1 h at 10 000 V; focusing for 80 000 vhr at 10 000 V; finally balancing for 10 h at 500 V). After isoelectric focusing, the IPG strip was transferred and the proteins were separated by 12% SDS-PAGE. Finally, 2-DE maps for the oxidized and whole muscle proteins with high resolution and even distribution were obtained by direct scanning using a fluorescence image scanner and scanning after silver staining. This study would provide a foundation

收稿日期: 2016-06-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31301569); 国家自然科学基金面上项目 (31571868); 中国博士后科学基金面上资助项目 (2015M582143); “十二五”国家科技支撑计划项目 (2015BAD17B03); 辽宁省教育厅重点实验室基础研究项目 (LZ2014047)

作者简介: 李学鹏 (1982—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为水产品贮藏加工。E-mail: xuepengli8234@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与食品安全。E-mail: lijianrong6491@163.com

for the separation and identification of oxidized muscle proteins, and further for the clarification of protein oxidation mechanism by two-dimensional gel electrophoresis and proteomics technology.

**Key words:** two-dimensional electrophoresis; large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*); oxidized muscle proteins; fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC); fluorescence labeling

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706005

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 06-0027-09

引文格式:

李学鹏, 周明言, 渠宏雁, 等. 基于荧光标记的大黄鱼氧化肌肉蛋白质双向电泳技术的建立[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 27-35. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706005. <http://www.spkx.net.cn>

LI Xuepeng, ZHOU Mingyan, QU Hongyan, et al. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis based on fluorescence labeling for oxidized muscle proteins of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Food Science, 2017, 38(6): 27-35. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706005. <http://www.spkx.net.cn>

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 属石首鱼科黄鱼属, 为暖温性近海中下层群性洄游鱼类, 是我国最重要的海水养殖鱼类之一, 出口量在我国网箱养殖鱼类中位列第一<sup>[1-2]</sup>。然而, 由于大黄鱼自身高蛋白、高脂肪、高水分的特点, 死后品质变化快、易腐败变质, 造成了严重的经济损失。因此, 深层次探究解析大黄鱼品质变化机制, 以针对性地提出控制措施, 显得尤为重要。蛋白质氧化是目前食品化学领域中研究热点之一, 研究发现, 蛋白质氧化是影响食品品质的重要因素, 不仅可以降低肉类食品品质, 如嫩度、多汁性、风味和色泽, 还会影响其功能性, 如凝胶性、乳化性<sup>[3]</sup>。但目前对鱼肉中蛋白质氧化机制方面的研究仍比较欠缺, 已有研究多集中在对不同氧化程度及样品间的对比分析等方面, 对具体哪些蛋白质参与氧化反应仍知之甚少, 导致对鱼肉蛋白质氧化机制的认识还不够全面<sup>[4]</sup>。双向电泳技术和蛋白质组学可以对样品中蛋白质进行分离和鉴定, 有助于筛选出氧化蛋白质的种类, 为蛋白质氧化机制的解析奠定基础。

近年来, 以双向电泳分离、质谱鉴定和生物信息学三大技术为核心的蛋白质组学技术成为研究生物蛋白质最直接和有效的方法<sup>[5-9]</sup>。蛋白质组是指由基因组编码的全部蛋白质, 是在蛋白水平上大规模研究基因表达的产物, 由澳大利亚学者威尔金斯和威廉姆斯提出。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, 其不仅研究蛋白质的机构和功能, 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<sup>[10-11]</sup>。目前, 双向电泳和蛋白质组学技术已被广泛用于畜禽和水产类肌肉蛋白质的研究, 为评定肌肉品质和品质变化机制提供了新的方法和依据<sup>[9,12-17]</sup>, 但普通双向电泳无法对氧化和非氧化蛋白进行区分, 能够分离、筛选氧化蛋白质的双向电泳技术仍鲜见报道。蛋白质氧化后形成的羰基可以与荧光素发生特异性结合, 进而可采用荧光标记结合双向电泳对生物样品中的氧化

蛋白质进行筛选和鉴定, 为系统研究鱼肉蛋白质氧化机制提供了一条新的途径<sup>[12]</sup>。鉴于此, 本研究建立并优化了基于荧光标记的大黄鱼氧化肌肉蛋白质双向电泳技术体系, 以期为大黄鱼肌肉中氧化蛋白质的分离鉴定和蛋白质氧化机制的研究提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

体长约40 cm的鲜活大黄鱼, 购自浙江省杭州市水产市场, 鲜活运至实验室, 立即用冰水致死, 真空包装后置于-80 °C冰箱冻藏备用。

固定化pH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) dimethylammonio)propanesulfonate, CHAPS)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、矿物油、四甲基乙二胺 (tetramethylethylenediamine, TEMED)、过硫酸铵、甘氨酸 美国Bio-Rad公司; 荧光素-5-氨基硫脲 (fluorescein-5-thiosemicarbazide, FTSC) 美国Sigma公司; 甘油、溴酚蓝、考马斯亮蓝G-250、琼脂糖、二甲基甲酰胺 (dimethylformamide, DMF)、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 等试剂均为国产分析纯; 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; 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 IEF等电聚焦电泳仪、ChemiDoc™ XRS+凝胶成像仪、Protean 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；Legend Micro21R台式微量离心机美国Thermo公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 肌肉蛋白质的提取及裂解液配方选择

取大黄鱼背部肌肉组织200 mg,置于预冷的陶瓷研钵中,液氮研磨0.5 h至组织呈粉末状,分装至1.5 mL微量离心管中(每管50 mg),加入500  $\mu$ L不同配方的裂解液(表1)振荡混匀并冰浴裂解3 h。裂解完毕后,将离心管取出,于4  $^{\circ}$ C、13 200  $\times$ g离心1 h,去除上层漂浮脂肪层及底部杂质沉淀,所得清液即为大黄鱼肌肉全蛋白提取液。采用Bradford法测定蛋白质质量浓度,分装后于-20  $^{\circ}$ C冻藏备用。

表1 大黄鱼肌肉蛋白质裂解液配方  
Table 1 Lysis buffers for muscle proteins of *P. crocea*

裂解液	尿素/ (mol/L)	硫脲/ (mol/L)	CHAPS/%	DTT/ (mmol/L)	Tris-base/ (mmol/L)	PMSF/ ( $\mu$ mol/L)	载体两性 电解质/%
I <sup>[4]</sup>	7	2	2	25	0	0	0.5
II	7	2	2	25	40	0	0.5
III	8	2	4	65	40	0	0.2
IV	8	2	4	65	40	200	0.2

#### 1.3.2 双向电泳的建立

##### 1.3.2.1 等电聚焦程序的选择和优化

表2 等电聚焦程序(20  $^{\circ}$ C)  
Table 2 Parameters of isoelectric focusing program (20  $^{\circ}$ C)

程序	步骤	电压/V	升压模式	持续时间	作用
A	S1	50	线性	12 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	3 h	升压
	S5	10 000	快速	80 000 vhr	聚焦
	S6	500	快速	10 h	保持
B	S1	50	线性	12 h	主动水化
	S2	500	线性	1 h	除盐
	S3	1 000	快速	1 h	除盐
	S4	6 000	快速	2 h	升压
	S5	8 000	线性	1 h	升压
	S6	8 000	快速	80 000 vhr	聚焦
	S7	500	快速	10 h	保持
C	S1	50	线性	14 h	主动水化
	S2	500	线性	2 h	除盐
	S3	1 000	快速	1.5 h	除盐
	S4	4000	快速	1 h	除盐
	S5	6 000	快速	0.5 h	升压
	S6	10 000	线性	1 h	升压
	S7	10 000	快速	80 000 vhr	聚焦
	S8	500	快速	10 h	保持

根据Bio-Rad公司双向电泳操作技术手册进行实验。

将已定量的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,选用17 cm IPG预制干胶条进行等电聚焦,上样量100  $\mu$ g,上样体积300  $\mu$ L,等电聚焦程序分别设置为A、B和C(表2)。

##### 1.3.2.2 胶条平衡

等电聚焦结束后,分别用6 mL胶条平衡缓冲液1(6 mol/L尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)、20%甘油和2% DTT)和2(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2向SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

将平衡完毕的胶条于1 $\times$ 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,转移至提前制好的第2向12%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2向SDS-PAGE,程序见表3。

表3 第2向SDS-PAGE程序  
Table 3 Parameters of 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、凝胶成像与分析

参考Shevchenko<sup>[18]</sup>、Yan<sup>[19]</sup>等及李学鹏<sup>[20]</sup>的方法并略有修改,具体步骤见表4。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。

表4 双向电泳银染步骤  
Table 4 Silver staining protocol in 2-DE

步骤	试剂	总体积/mL	时间/min
固定	10%冰乙酸+40%乙醇	500	120
敏化	30%乙醇+6.8%乙酸钠+0.2%硫代硫酸钠	500	30
水洗	超纯水	3 $\times$ 500	3 $\times$ 5
银染	0.25%硝酸银	500	20
水洗	超纯水	2 $\times$ 500	2
显色	2%碳酸钠+0.08%甲醛	500	<10
终止	10% EDTA-Na <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	500	10
水洗	超纯水	3 $\times$ 500	3 $\times$ 5



### 1.3.3 氧化肌肉蛋白质荧光标记方法的建立与优化

采用芬顿体系<sup>[21]</sup>（芬顿反应液含0.1 mmol/L  $\text{FeCl}_3$ 、0.1 mmol/L 抗坏血酸和10 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ ）对大黄鱼肌肉进行选择体外模拟氧化，蛋白氧化程度采用二硝基苯腙（dinitrophenylhydrazine, DNPH）法测定羰基值来表示，经检测，氧化后蛋白羰基值为16.59 nmol/mg。氧化后按照上述步骤制备蛋白样品并进行荧光标记和双向电泳实验，向1 mL大黄鱼氧化肌肉蛋白样品中加入50  $\mu\text{L}$  20 mmol/L的FTSC溶液，恒温水浴后加入等体积20%三氯乙酸（trichloroacetic acid, TCA）溶液，13 200 $\times$ g离心40 min，弃上清液，加入1 mL洗液，振荡2 min，13 200 $\times$ g离心20 min，重复清洗5次以除去残留的FTSC，加入1 mL裂解液冰浴裂解2 h，Bradford法测定蛋白质质量浓度，备用。

#### 1.3.3.1 孵化时间和温度对荧光标记的影响

向1 mL大黄鱼蛋白样品中加入50  $\mu\text{L}$  20 mmol/L的FTSC溶液（以DMSO为溶剂），37  $^{\circ}\text{C}$ 和40  $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别水浴孵化2.5、3 h和4 h后进行SDS-PAGE，采用ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+凝胶扫描成像系统结合520 nm带通滤光片扫描凝胶图像，观察标记时间对荧光标记效果的影响。

#### 1.3.3.2 荧光素溶剂对荧光标记的影响

向1 mL大黄鱼蛋白样品中加入50  $\mu\text{L}$  20 mmol/L的FTSC溶液（分别以水、DMF和DMSO为溶剂），在40  $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴3 h后进行双向电泳，观察溶剂对荧光标记效果的影响。

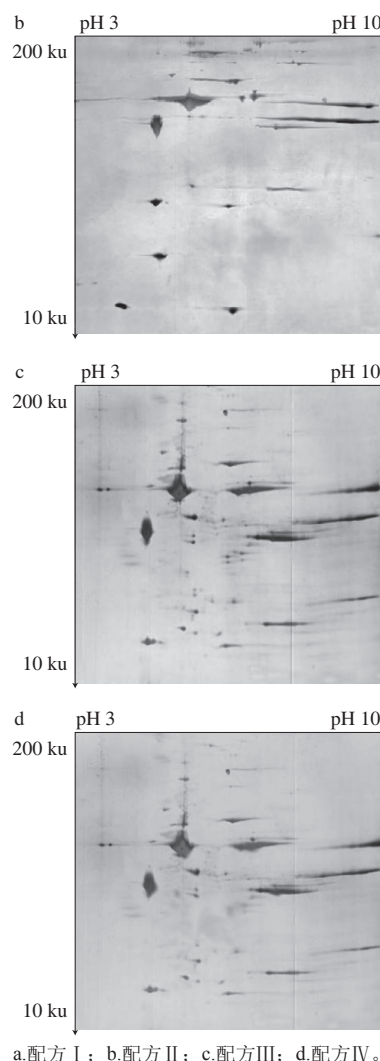
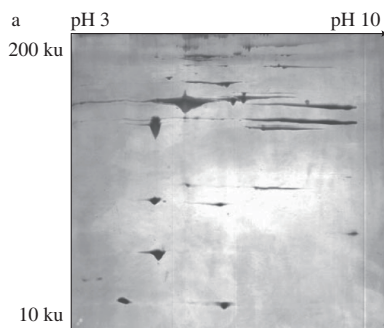
#### 1.3.3.3 残留荧光素清洗方法的影响

分别选择水、无水乙醇和乙醇-乙酸乙酯（1:1， $V/V$ ）混合液作为洗液清洗添加TCA所得沉淀，对凝胶图像进行分析，比较采用不同洗液对多余荧光素的洗涤效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 大黄鱼肌肉蛋白双向电泳的建立与优化

#### 2.1.1 裂解液配方的选择和优化



a.配方 I；b.配方 II；c.配方 III；d.配方 IV。

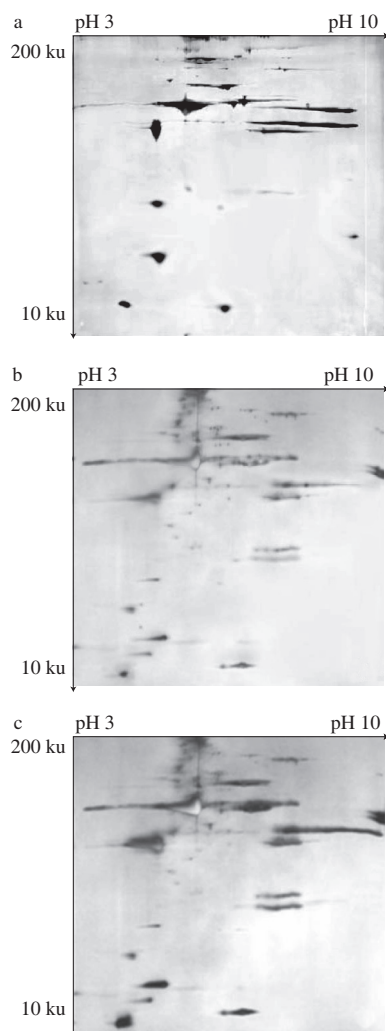
图1 不同裂解液配方提取的大黄鱼肌肉蛋白双向电泳图谱 (pH 3~10)

Fig. 1 2-DE images of large yellow croaker muscle proteins extracted by different lysis buffers

不同蛋白样品由于来源的不同，种类和含量都有较大差异，为了得到最佳的蛋白溶解和抽提效果，在最大程度上保存蛋白质，尤其是小分子蛋白，本研究对所用蛋白质裂解液配方进行了优化。与配方 I（图1a）相比，配方 II（图1b）增加了Tris-base，不仅可以起到稳定裂解液pH值的作用，也可以抑制样品中蛋白质的降解，因此所得凝胶图像背景更清晰，且蛋白点聚焦更彻底。而与前两个配方相比较，配方 III（图1c）和 IV（图1d）尿素含量较高，所得蛋白点的数量显著增加（图1a所得蛋白点220个，图1b所得蛋白点276个），这是因为尿素是一种中性促溶剂，通过破坏氨基酸残基间的非共价键和离子键使蛋白质变性，使许多种蛋白溶解并展开，进而使离子基团都暴露在溶液中<sup>[21-23]</sup>。此外，硫脲也被发现能提高蛋白质溶解度，尤其是膜蛋白的溶解度<sup>[24-26]</sup>，它和尿素配合使用时，可以有效地提高疏水性蛋白的溶

解度<sup>[23]</sup>。另外, 配方III和IV中增加的两性去污剂CHAPS可以更好地确保蛋白样品的完全溶解、防止通过疏水作用而使蛋白质集聚<sup>[27]</sup>。但配方IV中额外添加的蛋白酶抑制剂PMSF并未在抑制蛋白降解方面起到明显作用, 与此相反, 添加蛋白酶抑制剂的样品所得凝胶图像背景更模糊, 可能是因为PMSF影响了银染效果。综上, 配方III的蛋白图谱获得了较多的蛋白点数, 且分布较均匀, 背景较整洁, 图谱整体较为清晰, 因此, 裂解液III为提取大黄鱼肌肉蛋白的优选配方。

### 2.1.2 上样量的选择



a. 上样量90 µg; b. 上样量100 µg; c. 上样量120 µg。

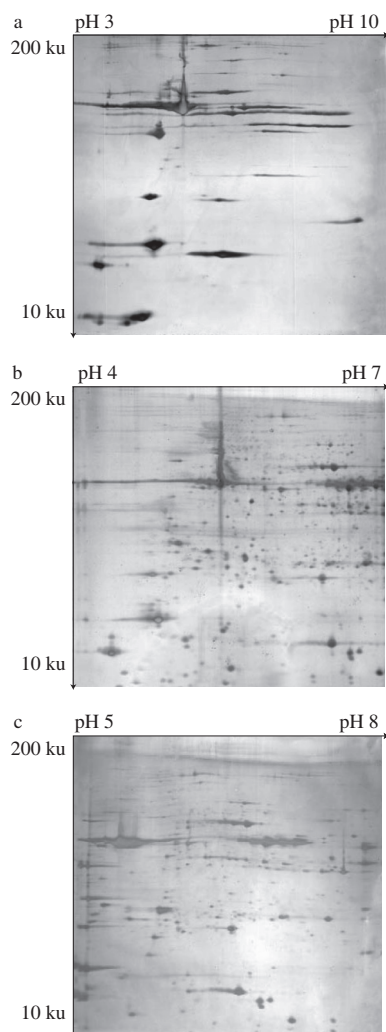
图2 不同上样量所得大黄鱼肌肉蛋白双向电泳图谱 (pH 3~10)

Fig. 2 2-DE images of large yellow croaker muscle proteins at different loading quantities

上样量过小, 可能会造成一些低丰度蛋白损失, 而上样量过高, 则会影响等电聚焦, 易造成水平拖尾和高丰度蛋白分离不彻底<sup>[28]</sup>。为获得较多且清晰的蛋白点数, 提高大黄鱼双向电泳图谱质量, 本实验分别选择90、100、120 µg作为上样量, 银染显色, 所得双向电泳

图谱如图2所示。由图2a可知, 上样量90 µg时所得蛋白图谱背景清洁, 蛋白点清晰, 得到了较好的分离效果, 但与图2b相较, 却存在低丰度蛋白点缺失的问题, 仅得到不到300个蛋白点, 而上样量100 µg时 (图2b) 所得蛋白图谱蛋白点数量可达400个以上, 且所得蛋白点清晰, 分离度较好。当上样量增加至120 µg (图2c), 虽然蛋白点数量较多, 但是所得电泳图谱却出现严重的横向拖尾现象, 部分高丰度蛋白未能得到有效分离, 出现了交叉和重叠, 与上样量100 µg所得电泳图相比, 上样量120 µg时所得电泳图谱分离度和分辨率都较差。因此, 100 µg为大黄鱼肌肉蛋白双向电泳的优选上样量。

### 2.1.3 IPG预制干胶条pH值范围的选择



a. pH 3~10; b. pH 4~7; c. pH 5~8。

图3 不同pH值范围IPG干胶条的大黄鱼肌肉蛋白双向电泳图谱

Fig. 3 2-DE images of large yellow croaker muscle proteins from IPG strips with different pH ranges

根据不同样品所需, 恰当选择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<sup>[29-31]</sup>。pH 3~10 (图3a)

的胶条分离效果较差, 所得蛋白点数仅为249个, 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, 且伴有严重的横向拖尾现象。为了提高对大多数蛋白质的分离和分辨, 分别选用pH 4~7和pH 5~8的IPG胶条进行进一步对比实验。结果表明, 使用pH 5~8 (图3c) 的IPG胶条共得到蛋白点658个, 且分布更均匀, 蛋白分辨率和灵敏度明显提高, 而选用pH 4~7 (图3b) 的IPG胶条共得到蛋白点550个, 所得的双向电泳图谱左侧出现大面积空白, 蛋白点大多分布在图谱中段及右侧。因此, pH 5~8为大黄鱼肌肉蛋白双向电泳最适宜的IPG胶条范围, 这与王任等<sup>[33]</sup>的研究结果较为一致。

#### 2.1.4 等电聚焦程序的选择与优化

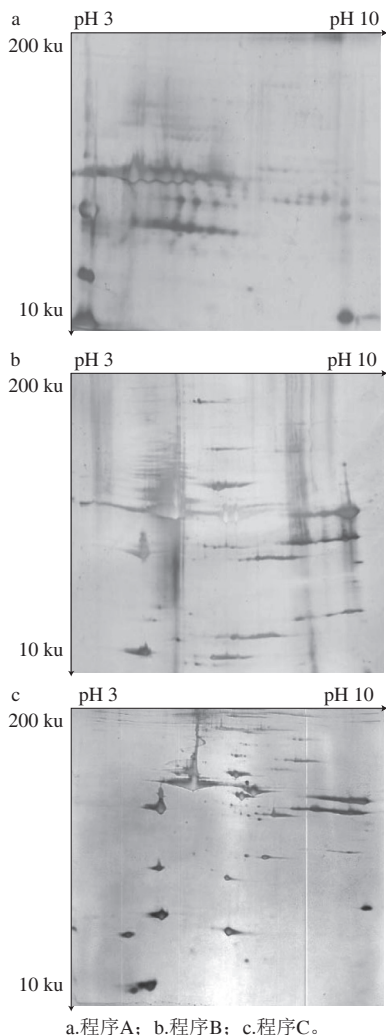


图4 选用不同等电聚焦程序所得大黄鱼肌肉蛋白双向电泳图谱 (pH 3~10)

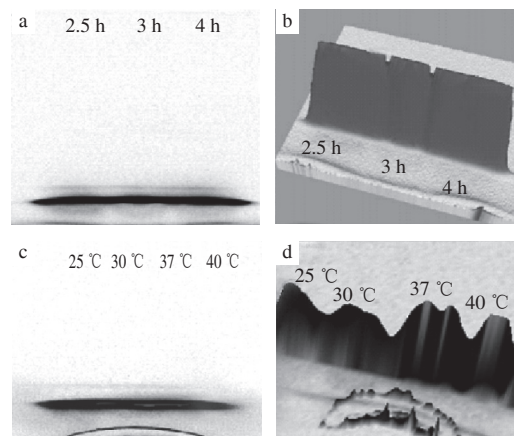
Fig. 4 2-DE images of large yellow croaker muscle proteins from different isoelectric focusings

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2) 所得实验图谱 (图4)。一般情

况下, 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<sup>[18]</sup>。等电聚焦程序A实验过程中 (图4a), 电压未能升至预设的10 000 V, 聚焦不彻底, 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A相较, 程序B延长了主动水化、除盐及聚焦的时间, 并鉴于程序A未能达到预设电压10 000 V, 因此将聚焦电压降至8 000 V。在实验过程中 (图4b), 电压能升至预设的8 000 V, 但仍存在聚焦不彻底的现象, 多数蛋白存在横向拖尾, 部分高分子质量蛋白略有纵向拖尾, 蛋白点不够圆润。为改善聚焦不彻底及蛋白拖尾的状况, 在程序A和B的基础上改进设计了程序C, 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A和B, 因此, 程序C为第1向等电聚焦最佳程序。延长主动水化时间可以有效的使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。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1向等电聚焦电泳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类杂质能干扰电泳分离<sup>[28]</sup>。因此, 在等电聚焦时, 除搭建盐桥外, 还应适当延长除盐时间, 并设置多步升压, 以除去多余的盐离子。

## 2.2 FTSC荧光标记技术的建立和优化

### 2.2.1 标记反应时间和温度的影响



a. 不同处理时间; b. 3D视图-不同处理时间;  
c. 不同处理温度; d. 3D视图-不同处理温度。

图5 不同时间和温度处理的大黄鱼肌肉蛋白荧光SDS-PAGE图谱  
Fig. 5 SDS-PAGE of fluorescence-labeled large yellow croaker muscle proteins at different treatment temperatures and times

由图5a和图5b可知, 其他条件一致, 荧光标记恒温水浴2.5、3 h和4 h时, 荧光强度无明显差别, 三维图 (5b) 显示峰高一致, 说明水浴时间对FTSC的标记效果无明显影响, 因此, 选择3 h为水浴时间。由图5c可知,



不同水浴温度处理的FTSC的标记效果无明显差别,但3D图(图5d)结果表明,37℃和40℃处理的样品峰高明显高于25℃和30℃处理的样品,说明温度越高FTSC特异性标记蛋白羰基的效果越好。比较37℃样品和40℃样品,后者的峰高更平缓,标记效果更稳定,因此,40℃为荧光标记最适宜的水浴温度。综上,40℃恒温水浴3 h FTSC标记更稳定。

### 2.2.2 FTSC溶剂的影响

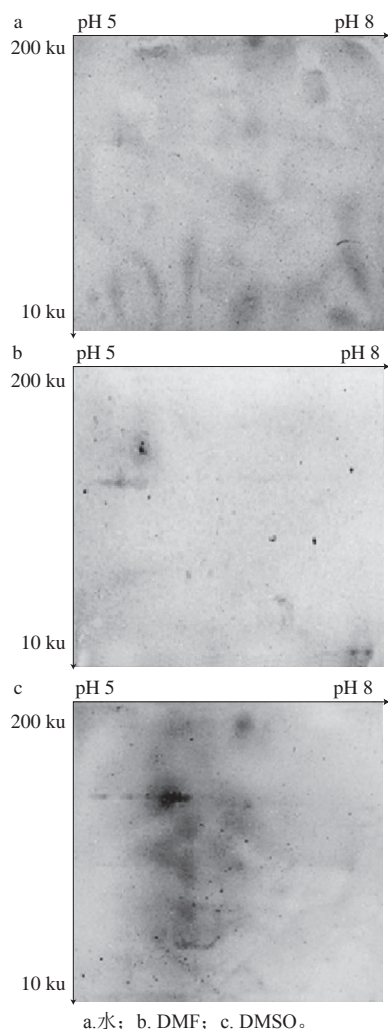


图6 不同溶剂的大黄鱼肌肉蛋白荧光图谱

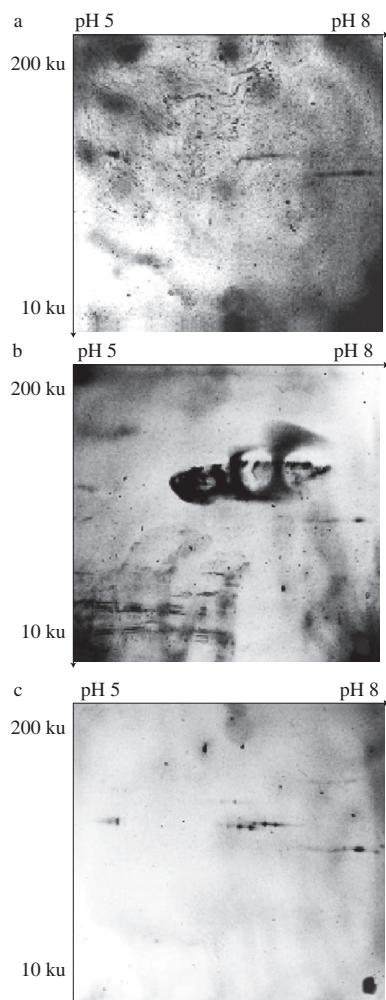
Fig. 6 2-DE images of fluorescence-labeled large yellow croaker muscle proteins in different solvents

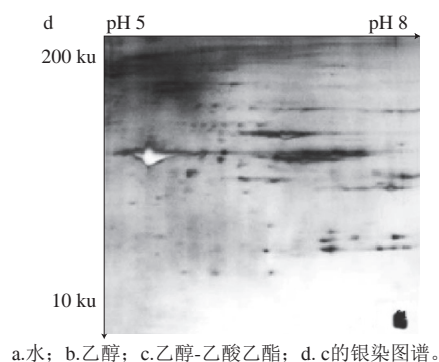
同一荧光体在不同的溶剂中,其荧光光谱的位置和强度可能有着显著的变化<sup>[33]</sup>。在溶液中溶质和溶剂分子之间存在着静电相互作用,而溶质分子的基态和激发态有着不同的电子分布,因而具有不同的偶极矩、极化率,导致基态和激发态两者与溶剂分子的相互作用程度不同,这对荧光的光谱和强度有很大的影响<sup>[34]</sup>。用分别以水、DMF和DMSO为溶剂配制的FTSC溶液对大黄鱼肌肉蛋白进行特异性标记,采用ChemiDoc™ XRS+凝

胶扫描成像系统结合520 nm带通滤光片观察所得荧光标记凝胶图像。以水为溶剂所得荧光图谱(图6a)背景模糊,几乎观察不到被荧光标记的蛋白质;而以DMF为溶剂所得荧光图谱(图6b)蛋白点杂乱,无法排除噪点的干扰,凝胶下沿有较大面积黑色区域,说明以DMF为溶剂标记的蛋白样品中有较多游离的FTSC分子残留,干扰了荧光标记结果;以DMSO为溶剂所得荧光图谱获得了清晰的荧光标记的蛋白点,虽然存在背景模糊的现象,但未对蛋白点造成干扰。因此,以DMSO为溶剂配制的FTSC溶液具有较好的荧光标记效果。

### 2.2.3 残留荧光素洗液的影响

为充分去除未能与蛋白质羰基特异性结合的游离荧光素,排除噪点对荧光图谱的干扰,分别用水、乙醇和乙醇-乙酸乙酯(1:1, V/V)对TCA沉淀所得蛋白进行5次反复清洗。由图7可知,以水和乙醇清洗的蛋白所得电泳图谱存在不规则的曲线、条纹及不均匀的黑色色团,对蛋白点造成极大干扰,而与前两者相较,以乙醇-乙酸乙酯混合溶液为洗液所得图谱蛋白点清晰,没有条纹干扰,得到了良好的荧光标记效果。综上所述,乙醇-乙酸乙酯(1:1, V/V)混合溶液对游离荧光素的去除效果最佳。





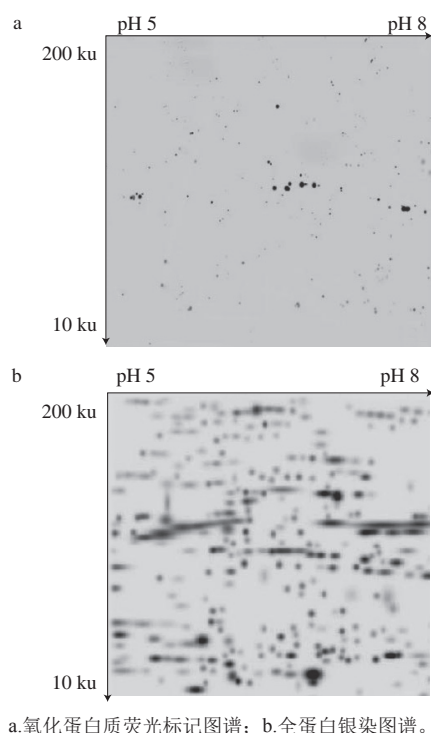
a.水; b.乙醇; c.乙醇-乙酸乙酯; d. c.的银染图谱。

图7 不同洗液处理的大黄鱼肌肉蛋白荧光图谱

Fig. 7 2-DE images of fluorescence-labeled large yellow croaker muscle proteins with different washing solutions

### 2.3 大黄鱼肌肉蛋白标准双向电泳图谱

通过以上影响双向电泳分离效果因素和环节的优化,在较优条件下得到大黄鱼肌肉氧化蛋白质和全蛋白的双向电泳图谱,结果如图8所示。可以看出,蛋白点的分离度和分辨率均较佳,可以满足后续差异蛋白点的挖掘和鉴定等研究的需要。



a.氧化蛋白质荧光标记图谱; b.全蛋白银染图谱。

图8 大黄鱼肌肉蛋白标准双向电泳图谱

Fig. 8 Standard 2-DE images of yellow croaker muscle proteins

## 3 结论

本研究成功建立了基于荧光标记的大黄鱼肌肉中氧化蛋白质的双向电泳技术,关键环节为:蛋白样品采用液氮研磨和裂解液III制备;采用FTSC溶液对氧化蛋白

质进行荧光标记,并采用乙醇-乙酸乙酯混合溶液进行洗脱;标记后的蛋白样品采用pH 5~8的IPG预制胶条上样后,采用等电聚焦程序C进行第1向分离,再采用12%的聚丙烯酰胺分离胶进行第2向分离;最后所得凝胶经直接荧光扫描和银染后扫描分别得到氧化肌肉蛋白质的荧光图谱和肌肉全蛋白电泳图谱。采用该方法获得的双向电泳图谱具有分辨率高、分离度好、分布均匀等优点,为后续定性研究特异性标记的氧化蛋白质、阐明蛋白质氧化机制奠定了技术基础。

### 参考文献:

- [1] LI T T, HU W Z, LI J R, et al. Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Food Control, 2012, 25(1): 101-106. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.10.029.
- [2] ZHENG W B, LIU G Z, AO J Q, et al. Expression analysis of immune-relevant genes in the spleen of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 21(4): 414-430. DOI:10.1016/j.fsi.2006.01.006.
- [3] ZHANG W, XIAO S, AHN D U. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(11): 1191-1201. DOI:10.1080/10408398.2011.577540.
- [4] PAZOS M, MAESTRE R, GALLARDO J M, et al. Proteomic evaluation of myofibrillar carbonylation in chilled fish mince and its inhibition by catechin[J]. Food Chemistry, 2013, 136(1): 64-72. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.07.109.
- [5] WILLIAMS K L. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology[J]. Electrophoresis, 1999, 20(4/5): 678-688. DOI:10.1002/9783527613489.ch10.
- [6] 李婷婷. 大黄鱼生物保鲜技术及新鲜度指示蛋白研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.
- [7] 胡敏, 徐凌飞, 张军科, 等. 梨叶片总蛋白提取及双向电泳体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(1): 197-209. DOI:10.1390/S.20111216.1116.006.
- [8] BENDIXEN E. The use of proteomics in meat science[J]. Meat Science, 2005, 71(1): 138-149. DOI:10.1016/j.meatsci.2005.03.013.
- [9] 朱雅卿, 韩剑众, 王彦波. 猪骨骼肌双向电泳样品制备及等电聚焦方法研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(3): 99-104. DOI:10.16429/j.1009-7848.2009.03.018.
- [10] 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: 135-141. DOI:10.1016/j.trac.2013.05.019.
- [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] 李学鹏, 励建荣, 李婷婷, 等. 冷杀菌技术在水产品贮藏与加工中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(6): 173-179. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2011.06.051.
- [13] 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:10.16372/j.issn.1004-6364.2014.08.002.
- [14] 芦方茹, 马云, 徐永杰, 等. 基于双向电泳技术的家畜蛋白质组学研究进展[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(1): 1-4. DOI:10.3969/j.issn.1673-1182.2014.01.001.



- [15] CARVALHO M E, GASPARIN G, POLETI M D, et al. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed[J]. *Meat Science*, 2014, 96(3): 1318-1324. DOI:10.1016/j.meatsci.2013.11.014.
- [16] LUCCIA A D, GATTA B I, NICASTRO A, et al. Protein modifications in cooked pork products investigated by a proteomic approach[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 447-455. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.099.
- [17] MONTOWSKA M, POSPIECH E. Species-specific expression of various proteins in meat tissue: proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1461-1469. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.09.072.
- [18] SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyamide gels[J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68: 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*, 2000, 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, 2011.
- [21] XIONG Y L, PARK D, OOIZUMI T. Variation in the cross-linking pattern of porcine myofibrillar protein exposed to three oxidative environments[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57: 153-159. DOI:10.1021/jf8024453.
- [22] RABELOUD T. Solubilization of proteins for electrophoretic analysis[J]. *Electrophoresis*, 1996, 17(5): 813-829. DOI:10.1002/elps.1150170503.
- [23] RABELOUD T, ADESSI C, GIRAUDEL A, et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(3/4): 307-316. DOI:10.1002/elps.1150180303.
- [24] KIM M R, KIM C W. Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 849(1): 203-210. DOI:10.1016/j.jchromb.2006.11.046.
- [25] MOLLOY M P, HERBERT B R, WAISH B J, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(5): 837-844. DOI:10.1002/elps.1150190539.
- [26] MUSANTE L, CANDIANO G, GHIGGERI G M, et al. Resolution of fibronectin and other uncharacterized proteins by two-dimensional polyacrylamide electrophoresis with thiourea[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, 705(2): 351-356. DOI:10.1016/S0378-4347(97)00545-8.
- [27] RABELOUD T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(5): 758-760. DOI:10.1002/elps.1150190526.
- [28] PASQUALI C, FIALKA I, HUBER L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(4): 2573-2581. DOI:10.1002/elps.1150181413.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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): 41-46. DOI:10.3969/j.issn.1000-7075.2011.02.007.
- [33] 王任, 王彦波, 李婷婷, 等. 大黄鱼肌肉组织双向凝胶电泳方法的建立[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(11): 154-159. DOI:10.16429/j.1009-7848.2012.11.031.
- [34] 陈向明. 新荧光试剂的开发及在高效液相色谱中的应用[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2006.
- [35] 杨文生. BODIPY类和过渡金属配合物类发光体系的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2013.