

刺参肠组织蛋白质双向电泳体系的建立及优化

田 焱¹ 莫海波¹ 常亚青^{1*} 湛垚垚¹ 陈百尧^{2,3} 伏光辉^{2,3} 安 建^{2,3}

(¹ 大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点开放实验室, 116023)

(² 连云港市海洋与水产科学研究所, 222044)

(³ 连云港市海珍品增养殖试验场, 222044)

摘 要 以刺参肠组织为材料, 通过蛋白质提取方法、上样前处理方法、上样量以及聚焦条件的优化, 建立了刺参肠组织蛋白质双向电泳技术体系。试验结果表明, 采用 TCA-丙酮沉淀法制备刺参肠组织蛋白质, 能够得到高纯度的蛋白质提取液。刺参样品上样前不经过处理, 等电聚焦电压 1 000V, 电流 7mA, 聚焦时间 3h, 平衡时间 30min, 最佳上样量 25 μ g, pH 4~6.5、8.5cm 的 IPG 胶条, 银染能获得较好的双向电泳图谱。通过蛋白质双向电泳体系的优化, 获得了刺参肠组织的蛋白质表达图谱, 为进一步研究刺参差异表达蛋白的筛选及蛋白质组学研究提供技术保障。

关键词 刺参 肠组织 蛋白质双向电泳

中图分类号 Q95-3; S966.9 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)05-0074-08

Establishment of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) for intestine tissue of *Apostichopus japonicus*

TIAN Yi¹ MO Hai-bo¹ CHANG Ya-qing^{1*} ZHAN Yao-yao¹
CHEN Bai-yao^{2,3} FU Guang-hui^{2,3} AN Jian^{2,3}

(¹ Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, 116023)

(² Ocean and Fishery Science Research Institute of Lianyungang City, 222044)

(³ Seafood Breeding Farm of Lianyungang City, 222044)

ABSTRACT The purpose of this research was to establish an optimized system to analyze *Apostichopus japonicus* proteomics. The protein extraction method, loading methods, sample volume and focusing condition in two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) were optimized to obtain best results. Several methods of protein preparation (TCA-acetone precipitation treatment, Tris-HCl treatment, Tris-HCl acetone treatment and pure water treatment) were applied to extract total protein from *A. japonicus* intestine. The most effective profiles with the most electrophoretic protein spots were obtained by the TCA-acetone precipitation treatment. The 2-DE electrophoretic analysis in intestine achieved an optimized map by loading without buffer solution treatment at the sample volume of 25 μ g, the pH of ampholytes ranged from 4 to 6.5. The samples were electrophoresed for 1000 V and 3 hours, and the gels were immersed in

国家自然科学基金项目(41106128)、国家“863”计划项目(2012AA10A42)和江苏省科技支撑计划(BE2012421)共同资助

* 通讯作者。E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

收稿日期: 2012-06-04; 接受日期: 2012-08-29

作者简介: 田 焱(1979-), 女, 副教授, 主要从事海洋生物学研究。E-mail: tianyi@dlou.edu.cn, Tel: (0411)84762217

2.5 ml equilibration buffer and equilibrated for 30 min. The system optimization of protein two-dimensional electrophoresis would provide supports in sea cucumber proteomics study.

KEY WORDS *Apostichopus japonicus* Intestine
Protein two-dimensional electrophoresis (2-DE)

刺参 *Apostichopus japonicus* 隶属棘皮动物门 Echinodermata、海参纲 Holothuroidea、楯手目 Aspidochirotrida、刺参属 *Apostichopus*, 是中国重要的养殖品种之一。随着刺参人工养殖规模的不断扩大, 围海养殖过度开发侵占了刺参的繁殖、生活场所(李成林等 2010)。目前养殖刺参出现抗病能力明显下降、养殖病害大面积频发、生长缓慢等问题, 严重影响了刺参养殖业的健康发展(谭杰等 2007)。因此, 开展刺参蛋白质组学的相关研究, 可以为刺参的育苗育种及繁殖研究工作奠定基础, 将有助于提高刺参养殖产业的经济效益和社会效益。

蛋白质组学是功能基因组研究的一个重要平台, 以双向电泳技术、质谱技术和生物信息学三大技术为核心, 目前在国内外都有广泛的应用(Nwugo *et al.* 2011; Torabi *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011)。双向电泳是最早的蛋白质组学研究工具, 到目前为止也是最重要的研究工具之一(贾佩峤等 2003)。目前, 建立了大菱鲆表皮(薛宝贵等 2011)、泥蚶肌肉(李太武等 2008)、大弹涂鱼肝脏(吴海庆等 2010)、青鳉(Mezhoud *et al.* 2008)、锯缘青蟹肌肉(苏静等 2005)、中国明对虾血浆蛋白(王宝杰等 2010)、草鱼肾脏蛋白(张琼宇等 2006)、海兔肝脏蛋白(李志丹等 2006)、鱼腥藻外膜蛋白(董妍玲等 2009)、中华卤虫无节幼虫总蛋白(周茜等 2008)、钉螺肝脏(彭飞等 2010)、波斯卵蛋白和性腺蛋白(Keyvanshokoh *et al.* 2008、2009)、泥鳅血清蛋白(Wu *et al.* 2004)及鲢鱼和鳊鱼肌肉组织(Tang *et al.* 2007)的双向电泳体系并开展了相关蛋白质组学研究工作。

为摸索刺参肠组织蛋白质双向电泳的最佳条件, 通过对蛋白质提取方法、上样前处理方法、上样量、等电聚焦程序的对比实验, 建立并优化了刺参肠组织双向电泳技术体系, 为开展刺参的蛋白质组学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用刺参取自大连海洋大学农业部北方海水增殖重点开放实验室, 于2012年3月选择规格均一、体重 20.36 ± 2.00 g 的刺参, 活体解剖后取肠组织存于 -80°C 备用。

1.2 实验所需试剂、仪器

尿素、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、过硫酸铵(AP)、甘氨酸、溴酚蓝、四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘油、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 G250 购自北京索莱宝科技有限公司; 载体两性电解质(pH 3~10, pH 4~6.5)、二硫苏糖醇(DTT)、低分子量蛋白质标准($12\mu\text{g}/\mu\text{l}$)等购自大连宝生物公司; 乙酸、甲醇、无水乙醇、磷酸、氢氧化钠、25%戊二醛、37%甲醛、硝酸银等购自辽宁新兴试剂有限公司; VIS-I 型可见光分析灯箱、MV-III 型单垂直板式电泳槽、OS-I 水平回旋脱色摇床、ISO-DALT 系统购自大连竞迈生物科技有限公司; 低温高速离心机、ELGA 纯水仪购自上海精密科学仪器有限公司。

1.3 肠组织蛋白样品的制备

取4份刺参肠组织解冻, 用去离子水清洗干净, 放滤纸上吸干水分, 采用以下4种不同的方法提取刺参肠组织蛋白。

1.3.1 Tris-HCl 提取法

称取0.3g刺参肠组织放入经高压灭菌的研钵中, 加入液氮充分研磨成粉末, 转移至1.5ml离心管中, 加入 $800\mu\text{l}$ Tris-HCl(50mmol/L, pH 6.8)充分混匀, 超声破碎肠组织(700W, 工作8s, 间歇4s, 10min), 4°C 、

12 000r/min离心 30min,取上清液,即为刺参肠道可溶性蛋白,−80℃保存备用。

1.3.2 去离子水提取法

称取 0.3g 刺参肠组织放入经高压灭菌的研钵中,加入液氮充分研磨成粉末,转移至 1.5ml 离心管中,加入 800 μ l 去离子水混匀,进行细胞超声破碎裂解,4℃、12 000r/min 离心 30min 后取上清液,−80℃保存备用。

1.3.3 Tris-HCl-丙酮沉淀法

取 Tris-HCl 法提取的蛋白样品 50 μ l,加入 150 μ l 的预冷丙酮,混匀后置−20℃沉降蛋白质 4h,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,弃上清液并干燥沉淀,加入样品裂解液(尿素、CHAPS、DTT),振荡器震荡 5 min,4℃、12 000r/min 离心 30 min,取上清液,−80℃保存备用。

1.3.4 TCA-丙酮沉淀法

称取 0.3g 刺参肠组织放入经高压灭菌的研钵中,加液氮充分研磨成粉末,转移至 1.5ml 离心管中,加入 3 倍体积的丙酮提取液(含 10%TCA 和 0.07%的 β -巯基乙醇)震荡混匀;−20℃沉降 4h;4℃、12 000r/min 离心 5min;弃上清液,将沉淀重悬于等体积的预冷丙酮(含 0.2%DTT)中,−20℃放置 1h;4℃、12 000r/min 离心 30min;弃上清液,冰上静置使丙酮充分挥发;在裂解液中重新溶解沉淀;4℃、12 000r/min 离心 30min,取上清液,−80℃保存。

1.4 蛋白质含量测定

采用标准蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit),用酶标仪测定蛋白质浓度。将组织蛋白质原液稀释 100 倍,考马斯亮蓝原液稀释 5 倍后,以去离子水为空白,以 0.563g/L BAS 标准蛋白作标准曲线,于波长 595nm 测定刺参肠组织蛋白质样品含量。

1.5 双向电泳

1.5.1 等电聚焦(IEF)

等电聚焦采用前处理和不处理两种方式分别进行上样。前处理组中加入等体积 2 \times 上样缓冲液(0.5mol/L Tris-HCl pH 6.8、甘油、10% SDS、 β -巯基乙醇、0.05%溴酚蓝、灭菌水)充分混匀,室温放置 1h。实验上样量分别设置为 30、25、20、15 μ g。配置等电聚焦胶条后置于等电聚焦仪进行聚焦电泳。分别采用 pH 3~10 及 4~6.5 的胶条进行聚焦电泳。等电聚焦参数设置两个对比:电压 250V 聚焦 30min,然后再用 1 000V 聚焦 3h,电流 7mA,功率 50W;电压 1 000V,电流 7mA,功率 50W,时间 3h。

1.5.2 IPG 胶条的平衡

等电聚焦后,将 IPG 胶条置于平衡液(β -巯基乙醇、1mol/L Tris-HCl pH 6.8、20% SDS、甘油、双蒸水)中分别平衡 40、30、20、15min。

1.5.3 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳采用 6%的浓缩胶和 12%的分离胶进行不连续 SDS-PAGE 垂直电泳。平衡后胶条用电泳缓冲液清洗去除多余平衡液,转移到 SDS 凝胶上,使其与 SDS 浓缩胶充分接触,避免胶条与凝胶间出现气泡,加入 1 \times 电泳缓冲液,采用垂直电泳槽(DYY-10 型电泳仪,北京六一仪器厂)电泳。以 5 mA/胶板恒流电泳 20 min 后,用 20 mA/胶板恒流电泳,直到溴酚蓝到达分离胶底部距胶边缘约 1 cm 处停止电泳。SDS-PAGE 电泳参数设置:电压 200V,电流 80mA。

1.5.4 染色

SDS-PAGE 电泳结束后,将凝胶置于染色容器内,采用硝酸银染色法及考马斯亮蓝染色法对凝胶分别进行染色。

2 结果

2.1 刺参肠组织蛋白质制备方法的比较

本研究采用了 Tris-HCl 提取法、水提取法、Tris-HCl 丙酮沉淀法和 TCA-丙酮沉淀法 4 种方法提取刺参

肠组织蛋白质,结果表明,蛋白质含量及纯度差异较大。4 种方法制备的蛋白样品经电泳检测,其结果如图 1 所示。图 1-a 为用 Tris-HCl 提取的刺参肠组织蛋白样品双向电泳图谱,图谱中蛋白质拖带现象较严重,胶面背景中含有杂质。图 1-b 为去离子水提取的刺参肠组织蛋白样品双向电泳图谱,胶面背景颜色较深。用 Tris-HCl 丙酮提取的刺参肠组织蛋白样品双向电泳图谱中,蛋白质斑点较清晰,胶面背景较干净,但蛋白质点少(图 1-c)。TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白含量和纯度都较高,且蛋白双向电泳图谱中蛋白质点较多,蛋白质斑点清晰,胶面背景干净,达到后期分析的要求(图 1-d)。

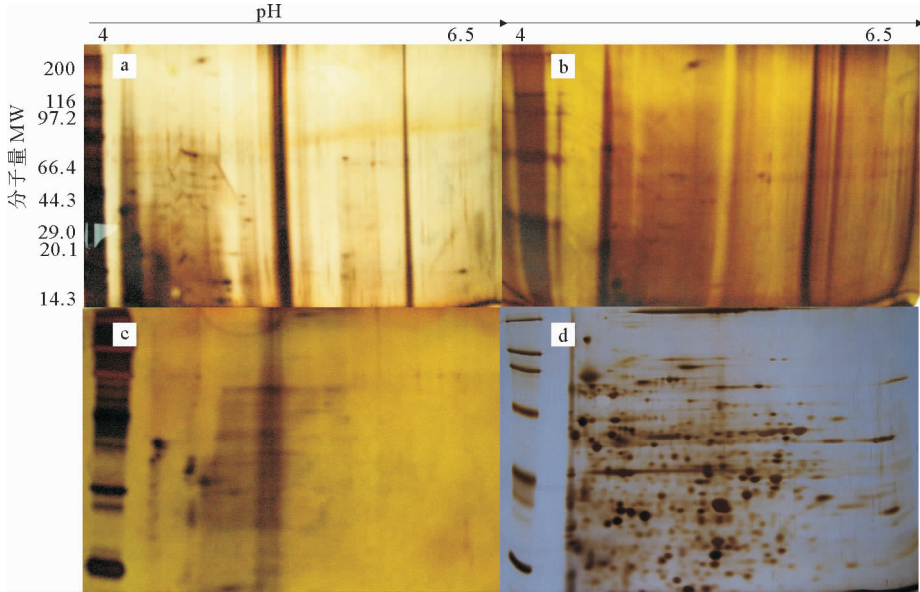


图 1 刺参肠组织不同提取方法蛋白双向电泳

Fig. 1 2-DE maps of *A. japonicus* intestine by different protein extraction methods

2.2 双向电泳条件的优化

刺参肠组织蛋白质样品经上样缓冲液处理后,蛋白质斑点减少,且蛋白质有扩散现象(图 2-a);不经上样缓冲液处理的刺参肠组织蛋白质样品,蛋白质斑点较多,聚焦较好(图 2-b)。

等电电解质不同 pH 对蛋白质分辨率的影响很大,电解质 pH 为 3~10 时,刺参肠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(图 3-a);选择电解质 pH 4~6.5 的胶条进行电泳,获得了较好的图谱(图 2-b)。实验中采用考马斯亮蓝染色,图谱分辨率明显比银染效果低,且斑点数量有所减少(图 3-b)。

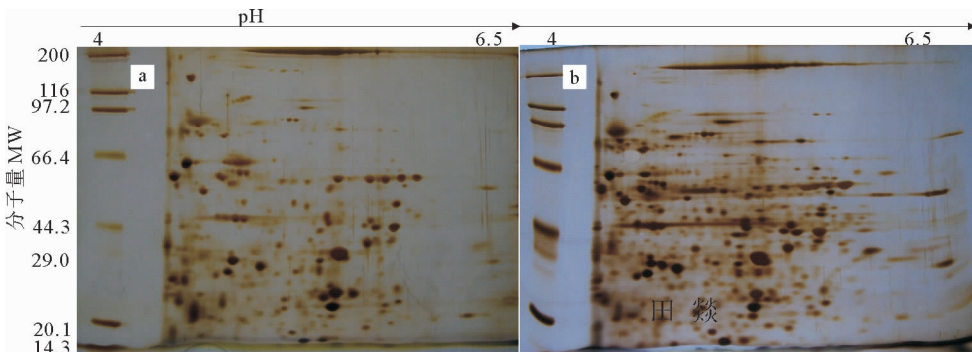


图 2 上样前不同处理方法后的双向电泳

Fig. 2 Effects of sample pretreatment on 2-DE

不同上样量对刺参肠组织蛋白质双向电泳的影响结果见图4。从图4可以看出,上样量为 $20\mu\text{g}$,得到的刺参肠组织图谱相对清晰,但蛋白质点少(图4-a);上样量 $25\mu\text{g}$,得到的刺参肠组织图谱蛋白质点较多,能更好地反映刺参肠组织的蛋白质表达情况(图4-b);随着上样量的增加,图谱的分辨率下降,斑点模糊不清。

等电聚焦条件的优化结果见图5,其中等电聚焦时电压 250V ,电泳 30min 后增大电压至 $1\,000\text{V}$,电泳 3h 后发现蛋白质点靠近胶条酸性端(图5-a);而聚焦电压为 $1\,000\text{V}$ 聚焦电泳 3h 后,能够得到蛋白质分散均匀的图谱(图5-b)。平衡时间对蛋白质双向电泳的影响见图6,其中平衡时间 20min ,蛋白质与SDS不能完整结合,得到的电泳图谱较模糊(图6-a);平衡 40min ,时间过长导致蛋白质点分辨率降低(图6-b);平衡时间 30min ,能获得分辨率较高的图谱(图6-c)。

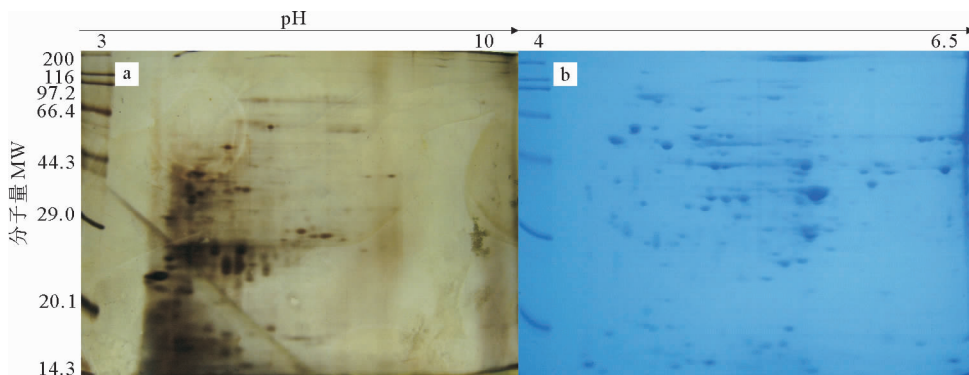


图3 不同的pH胶条范围和染色方法对双向电泳图谱的影响
Fig. 3 Effects of different pH IPG and staining method on 2-DE

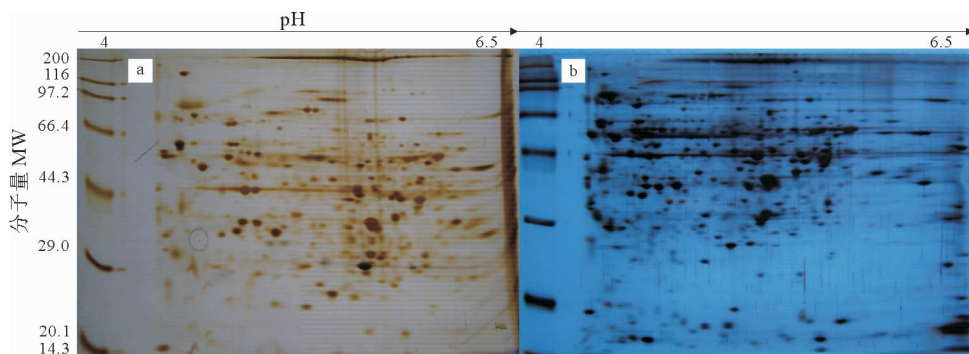


图4 不同上样量对双向电泳图谱的影响
Fig. 4 Effects of different sample volume on 2-DE

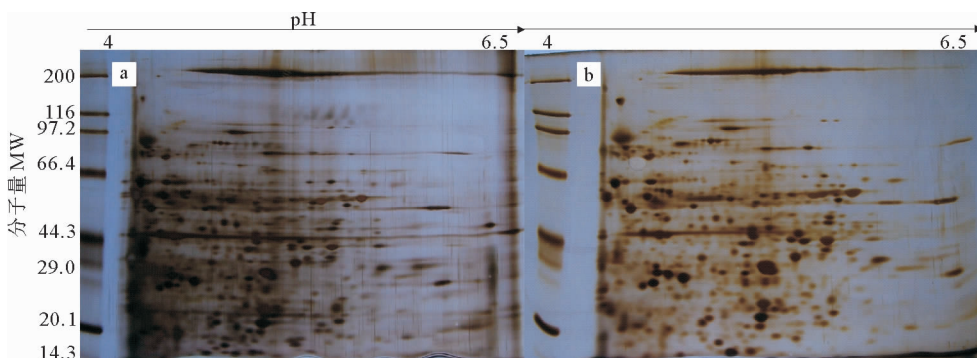


图5 不同等电聚焦程序对双向电泳图谱的影响
Fig. 5 Effects of different isoelectric focusing programs on 2-DE

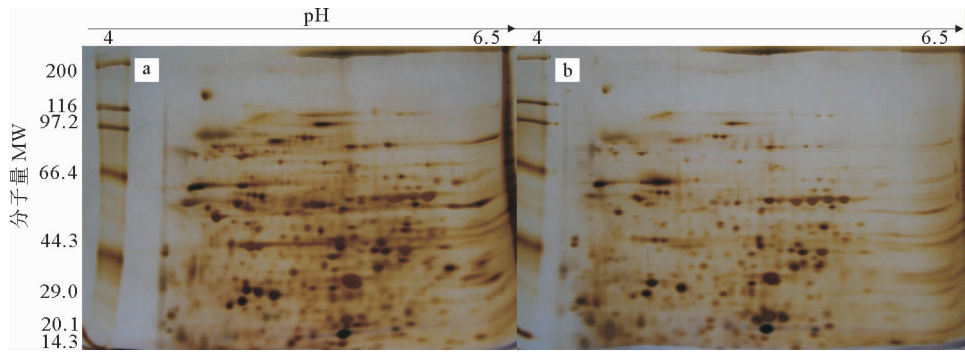


图 6 不同平衡时间对双向电泳图谱的影响

Fig. 6 Effects of different equilibrium time on 2-DE

本研究以刺参肠组织为材料,建立了刺参肠组织蛋白质双向电泳技术体系。研究表明,采用 TCA-丙酮沉淀法提取刺参肠组织蛋白质,刺参样品上样前不处理,等电聚焦电压 1 000V,电流 7mA,聚焦时间 3h 时,平衡时间 30min,最佳上样量 25 μ g,pH 4~6.5、8.5cm 的 IPG 胶条,银染能获得较好的双向电泳图谱。

3 讨论

目前关于刺参蛋白质组学方面的研究还未见报道。本研究构建并优化了刺参肠组织蛋白质组的双向电泳体系,为刺参蛋白质组学研究工作奠定基础。样品制备是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳成功与否的关键步骤(庞欢瑛等 2010;陈晶瑜等 2010)。样品制备分为蛋白质提取、杂质去除等步骤,应根据不同的实验材料选择适宜的制备方法。本研究采用 Tris-HCl 法、去离子水法、Tris-HCl 丙酮法和 TCA-丙酮沉淀法提取刺参肠组织蛋白质样品,结果表明,TCA-丙酮沉淀法获得了较理想的蛋白质二维图谱。曾广娟等(2008)在提取苹果叶片时利用 Tris-HCl 法,所得图谱背景清晰,没有横纵条纹及弥散状的蛋白质点。此方法常用于植物组织蛋白质的样品制备,在刺参肠组织中没有得到高质量的图谱。TCA 能有效地抑制蛋白酶对蛋白质的水解作用,在制样过程中保证蛋白质不被降解;丙酮溶液能除去样品中的酚类及色素等干扰物质。李志丹等(2006)利用 TCA-丙酮沉淀法对海兔肝蛋白质进行了提取优化,获得了优于其他方法的蛋白质图谱。周茜等(2008)用 TCA-丙酮沉淀法提取卤虫幼体蛋白,获得了中华卤虫初孵和孵化 24h 无节幼体较理想的蛋白表达图谱。詹悻婕等(2006)利用 TCA-丙酮沉淀法提取海兔大脑神经节蛋白质,并获得大脑神经节全蛋白质组的双向凝胶电泳图谱。薛宝贵等(2011)利用 TCA-丙酮沉淀法,获得大菱鲆表皮组织蛋白质双向电泳图谱。有研究表明,采用 TCA-丙酮沉淀法,同时加入了 β -巯基乙醇、DTT 及 CHAPS 3 种药剂(Saravanan *et al.* 2004),提取的过程中可以更好地抑制蛋白质的水解及去除干扰物质,保护蛋白质的天然状态,提取的蛋白含量高,蛋白质双向电泳图谱中蛋白质点多,蛋白质斑点清晰,胶面背景干净。在本研究中 Tris-HCl 法、去离子水法、Tris-HCl 丙酮法提取的蛋白含量太低,存在盐离子的干扰,出现较多的横纵条纹,影响结果分析;但是 TCA-丙酮沉淀法获得了较理想的蛋白质二维图谱,与上述的研究结果基本一致。

胶条的选择对双向电泳图谱具有重要的影响。田美等(2010)利用 pH 值 4~7 的非线性梯度胶条,获得了凡纳滨对虾肌肉蛋白的理想双向电泳图谱。吴海庆等(2010)研究显示,在线性宽 pH 范围的胶条(pH 3~10)尽管可以在同一块凝胶上显示样品中绝大多数的蛋白质,但大量的蛋白点都集中在胶条的中间,两端的蛋白点较少,从而造成中间蛋白的分辨率较低,pH 为 5~8 的 IPG 胶条可以大大提高分辨率和灵敏度。本研究中,在 pH 为 3~10 范围内,刺参肠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,本研究采用 pH 4~6.5 的胶条获得了较理想的蛋白质图谱。

中国对虾血浆上样量为 150 μ g,采用银染可以获得较好的分析胶图谱(王宝杰等 2011)。大黄鱼肝脏蛋

白在 17cm IPG 胶条蛋白样品的最佳上样量为 2.0mg 时获得最优凝胶图谱(李凌云等 2010)。钉螺肝脏蛋白质在 13cm 的 IPG 胶条的上样量为 100 μ g,银染时得到清晰的 2-DE 图谱(彭飞等 2010)。本研究证实,采用 pH 4~6.5、8.5cm 的 IPG 胶条,上样量为 25 μ g,银染时得到的 2-DE 图谱蛋白点多,低丰度蛋白清晰,能满足进行蛋白质组分析的要求。因此,上样量的选择,要综合考虑实验材料、蛋白质性质及种类、胶条长度、pH 范围及染色方法等因素。

许多研究结果表明,采用逐渐增压方法能达到好的聚焦效果(王宝杰等 2010;李志丹等 2006;岳亮等 2011)。目前要获得最好的图谱质量和重复性所需最佳时间是 IEF 分离达到稳态所需的时间。样品不同,等电聚焦条件也会有所差异。本实验经逐渐增压预聚焦后发现图谱中蛋白质点偏酸性端,且有降解痕迹,可能是由于刺参肠组织自溶酶受 pH 和温度的变化,使蛋白发生特异性改变(朱蓓薇等 2004;夏远景等 2009)。在 1 000V 等压聚焦条件下,得到良好的双向电泳图谱。

平衡是双向电泳的过渡阶段,对试验结果有显著影响(田美等 2009)。平衡过程可导致蛋白质丢失约 5%~25%,还会使分辨率降低,平衡 30 min,蛋白质带变宽 40%,所以平衡时间不可过长。本研究结果表明,刺参肠组织平衡 30 min 能获得较好的结果,与其他学者的研究结果相一致。王宝杰等(2010)对中国对虾血浆蛋白 IPG 胶条平衡 30 min,获得清晰的图谱。张琼宇等(2006)对草鱼肾脏蛋白 IPG 胶条平衡 30min,获得理想的蛋白质图谱。蛋白质分离后,能否被有效检测,染色过程起着关键作用。最常用的双向电泳结果检测的方法包括考马斯亮蓝染和银染两种。银染的灵敏度较高,通常含量在 0.5~5ng 的蛋白质斑点就可以被染色,比考马斯亮蓝染色法灵敏度高 100 倍,并且可检测到凝胶中的重糖基化蛋白。刺参肠组织的双向电泳结果采用银染法可以获得较好的结果,考马斯亮蓝染色法获得的蛋白质点相对较少。

蛋白质双向电泳技术是当前蛋白质组学研究中应用最广泛且具有良好灵敏度的蛋白质分离技术,本研究建立的刺参肠组织双向电泳技术体系将有助于刺参肠组织蛋白质的分离、鉴定及表达,为阐明刺参肠道在消化、再生及免疫等方面的作用及功能研究提供重要的技术支持,进一步为刺参蛋白质组学研究工作奠定重要的基础。

参 考 文 献

- 王宝杰,刘梅,蒋克勇,张国范,王雷. 2010. 中国明对虾血浆蛋白质组学研究中高丰度蛋白的超速离心去除技术. 中国水产科学, 17(4):695-700
- 王宝杰,刘梅,蒋克勇,张国范,王雷. 2011. 中国明对虾血浆蛋白质组双向电泳技术的建立与主要高丰度蛋白点的质谱鉴定. 水产学报, 35(1):50-57
- 田美,申欣,孟学平,彭永兴,程汉良. 2010. 海水养殖凡纳滨对虾肌肉组织蛋白质组学研究. 安徽农业科学, 38(2):760-762
- 田美,申欣,程汉良,孟学平. 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
- 朱蓓薇,韩冰. 2004. 海参自溶酶的分离纯化和部分性质研究. 食品与发酵工业, 30(4):132-137
- 李成林,宋爱环,胡炜,张艳萍,赵斌,李翹楚,麻丹萍. 2010. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 31(4):126-133
- 李太武,詹堃,苏秀榕. 2008. 泥蚶肉质的蛋白质组学研究. 海洋与湖沼, 39(6):678-682
- 李志丹,包晓东,黄慧英,黄河清. 2006. 优化海兔肝蛋白质组提取与分离技术. 厦门大学学报, 45(Z1):194-197
- 李凌云,冀德伟,吴海庆,陈炯,史雨红. 2010. 大黄鱼肝脏蛋白质组双向电泳技术的建立及优化. 水产科学, 29(1):27-30
- 苏静,王桂忠,刘文杰,王三英,彭宣宪. 2005. 锯缘青蟹对病原菌感染的急性反应功能蛋白质组. 厦门大学学报(自然科学版), 44(4):559-562
- 张琼宇,谢锦云,赵如榕,罗琛. 2006. 不同发育阶段草鱼肾脏蛋白质组差异的初步分析. 水生生物学报, 30(4):425-431
- 吴海庆,李凌云,叶帅东,陈炯,史雨红. 2010. 镉胁迫下大弹涂鱼肝脏蛋白质组双向电泳分析. 安全与环境学报, 10(1):1-7
- 陈晶瑜,郭宝峰,何付丽,曲春鹤,尹克鑫,杨洪达,赵长山. 2010. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较. 中国农学通报, 26(23):97-100
- 周茜,吴长功,刘凤岐,黄冰心,相建海. 2008. 中华卤虫无节幼体蛋白质组的双向凝胶电泳的分析. 海洋科学, 32(7):62-64
- 岳亮,王艺磊,张子平,冯建军,邹志华,谢芳靖,林鹏. 2011. 日本囊对虾性腺蛋白质双向电泳的样品制备方法的改进. 集美大学学报, 16(4):246-251
- 庞欢瑛,李岩,鲁义善,简纪常,吴灶和. 2010. 溶藻弧菌全菌可溶性蛋白二维图谱的建立及部分蛋白质分子的鉴定. 中国水产科学, 17(3):404-413

- 夏远景,刘志军,李 宁,陈淑花,邓记松,刘学武,李志义. 2009. 超高压处理对海参自溶酶活性影响的研究. 高压物理学报, 23(5):377-383
- 贾佩峤,黄 捷,战文斌. 2003. 双向电泳的技术原理及在水产动物病害研究上的应用展望. 海洋湖沼通报, 4:49-54
- 彭 飞,彭 玲,黄琼瑶,袁仕善,刘年猛,孙 慧,刘 铭. 2010. 钉螺肝脏表达蛋白质鉴定结果分析. 水生生物学报, 34(6):1193-1197
- 董妍玲,徐旭东. 2009. 鱼腥藻 PCC7120 外膜的纯化和外膜蛋白的鉴定. 水生生物学报, 33(5):994-997
- 曾广娟,李春敏,张新忠,腾云龙,董文轩. 2008. 苹果叶片蛋白质双向电泳样品制备方法的比较. 中国农学通报, 24(8):105-109
- 詹怿婕,陆永进,卓慧钦,凌雪萍,黄河清. 2006. 优化提取与分离海兔大脑神经节蛋白质组. 厦门大学学报, 45(Z1):198-201
- 谭 杰,孙慧玲,刘 萍,杨爱国,燕敬平,刘志鸿,周丽青. 2007. 仿刺参自然群体和养殖群体间遗传变异的微卫星标记研究. 海洋水产研究, 28(3):38-43
- 薛宝贵,黄智慧,周 洲,马爱军. 2011. 大菱鲆表皮蛋白质组双向电泳技术的建立及优化. 渔业科学进展, 32(2): 41-46
- Keyvanshokoh S, Vaziri B. 2008. Proteome analysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova. Animal Reproduction Science 109(1-4):287-297
- Keyvanshokoh S, Kalbassi MR, Hosseinkhani S, Vaziri B. 2009. Comparative proteomics analysis of male and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads. Animal Reproduction Science 111(2-4):361-368
- Mezhoud K, Bauchet AL, Chteau-Joubert S and 8 others. 2008. Proteomic and phosphoproteomic analysis of cellular responses in medaka fish (*Oryzias latipes*) following oral gavage with microcystin-LR. Toxicon 51(8):1431-1439
- Nwugo CC, Huerta AJ. 2011. The effect of silicon on the leaf proteome of rice (*Oryza sativa* L.) plants under cadmium-stress. Journal of Proteome Research 10(2):518-528
- Ong SE, Pandey A. 2001. An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics. Biomolecular Engineering 18(5):195-205
- Saravanan RS, Rose JKC. 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. Proteomics 4(9):2522-2532
- Torabi S, Wissuwa M, Heidari M and 8 others. 2009. A comparative proteome approach to decipher the mechanism of rice adaptation to phosphorous deficiency. Proteomics 9(1): 159-170
- Tang JZ, Zhang DY, Cheng J. 2007. Comparative analysis of the amino acid composition and proteomic patterns of the muscle proteins from two teleosts. *Siniperca chuatsi* L. and *Hypophthalmichthys molitrix* L.. Journal of Fisheries of China 31(3):361-368
- Wang LJ, Ren XM, Du YH and 4 others. 2011. Study on the optimization of two-dimensional electrophoresis technology system for rapeseed proteome. Agricultural Basic Science and Technology 12(5):625-629
- Wu YJ, Wang SY, Peng XX. 2004. Serum acute phaseresponse (APR)-related proteome of loach to trauma. Fish & Shellfish Immunology 16(3):381-389