

基于蛋白组学技术对海参样品的研究

陈溪^{1*}, 林天野², 薛伟锋¹, 崔妍¹, 沈葆真¹, 齐欣¹, 张俊鸿³, 魏丽婧³

(1. 中华人民共和国大连海关, 大连 116600; 2. 中检(大连)测试有限公司, 大连 116600;
3. 锦州医科大学食品科学与工程学院, 锦州 121000)

摘要: 随着人们物质生活水平需要的不断提高, 具有高营养价值海珍品食用安全备受关注。海参是从属于海参纲的棘皮动物, 有研究报道, 海参与人参具有类似的药用特性, 已成为中国、日本等亚洲国家的名贵食材。蛋白质组学(proteomics)是后基因组时代的热点研究领域之一。二维凝胶电泳、高效液相色谱、毛细管电泳及其与质谱联用等已成功应用于蛋白质组分离和鉴定。目前, 采用蛋白质组学方法对海参样品的研究主要是集中在海参育苗、养殖、加工技术对海参组织结构及品质的影响, 以及病害防治方面的基础性研究, 而采用蛋白质组学对海参产地、养殖方式差异性研究, 相关报道较少。本文主要从蛋白质组学研究海参的现状及海参蛋白的提取、酶解、蛋白的鉴定及定量分析等方面进行了概述, 为海参的育苗育种、繁殖、病害的研究奠定基础。

关键词: 海参; 蛋白组学; 提取; 酶解; 定量分析

Study on sea cucumber samples based on proteomics

CHEN Xi^{1*}, LIN Tian-Ye², XUE Wei-Feng¹, CUI Yan¹, SHEN Bao-Zhen¹, QI Xin¹,
ZHANG Jun-Hong³, WEI Li-Jing³

(1. Dalian Customs District P.R., Dalian 116600, China; 2. China Inspection (Dalian) Testing Co., Ltd, Dalian 116600, China; 3. School of Food Science and Engineering of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT: With the continuous improvement of people's material living standards, the safety of sea treasures with high nutritional value has received much attention. Sea cucumber is an echinoderma belonging to *Holothuroidea*. It has been reported that sea cucumber and ginseng have similar medicinal properties and has become a valuable ingredient in Asian countries such as China and Japan. Proteomics is one of the hot research areas in the post-genome era. Two-dimensional gel electrophoresis, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and its combination with mass spectrometry have been successfully applied to proteome separation and identification. At present, the study of sea cucumber samples by proteomics is mainly focused on the effects of sea cucumber seedlings, culture and processing techniques on the structure and quality of sea cucumber, and basic research on disease control. But there were few reports about proteomics used to study the differences of sea cucumber production area and culture mode. In this paper, the current status of sea cucumber and the extraction, enzymatic hydrolysis, protein identification and quantitative analysis of sea cucumber are summarized, which lays a foundation for the research of breeding, propagation and disease of sea cucumber.

KEY WORDS: sea cucumber; proteomics; extraction; enzymolysis; quantitative analysis

基金项目: 大连市高层次人才创新支持计划(2017RQ164, 2017RQ161)。

Fund: Supported by Dalian High-Level Talents Innovation Support Plan (2017RQ164, 2017RQ161)。

*通讯作者: 陈溪, 博士, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: streamchen@126.com

*Corresponding author: CHEN Xi, Ph.D, Dalian Customs District Peoples's Republic of China, Dalian 116600, China. E-mail: streamchen@126.com

1 引言

海参(*Stichopus japonicus*)是从属于海参纲的棘皮动物,海参体壁中富含蛋白质、多糖以及生物皂苷等活性成分,还含有尼克酸、维生素 A、B₁₂、铁、锰、锌、硒等微量元素,能提高机体免疫力、延缓衰老、抗肿瘤和抗癌,具有较高的食用营养价值、药用价值和经济价值^[1]。有研究报告,海参与人参具有类似的药用特性,已成为中国、日本等亚洲国家的名贵食材^[2-5]。作为传统药食两用的海参品,海参除了具备多种营养保健功效,还具备较高的商业价值。近年来,海参养殖及加工业飞速发展,2009~2016年,中国海参产业总体呈发展趋势,其中养殖产量逐年递增,2016年产量达 20.43 万吨^[6]。海参产品的市场份额也占有了重要的地位,作为重要的经济养殖水产品,越来越受到市场的青睐。随着现代海洋渔业建设和海洋资源开发利用的不断深入,“海洋牧场”概念被提出并受到广泛关注。利用海洋资源拓展食物来源,为解决人类食品安全问题提供了新的路径。但由于海参人工养殖规模的不断扩大,海参养殖病害问题日趋严重,制约了海参产业的健康和可持续发展。目前,对海参产品的研究,主要是针对其不同的方法和技术改善加工工艺,考察其对组织结构及品质、营养价值的影响^[7-10]或是对海参的关键蛋白进行深入研究,研究其疾病机理和整治药物的直接靶位十分重要^[11,12]。

本文主要从蛋白组学研究海参的现状及海参蛋白的提取、酶解、蛋白的鉴定及定量分析等方面进行了概述,以期对海参的育苗育种、繁殖、病害的研究奠定基础。

2 海参蛋白质组学研究的意义

蛋白质组(proteome)是由澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 等于 1994 年首次提出,其概念是指在一个基因组,或一个细胞、组织表达的所有蛋白质^[13]。蛋白质组学(proteomics)源自蛋白质(protein)与基因组学(genomics)2 个词语的组合,是一个动态变化的整理,对其研究内容主要包括对蛋白质的定性鉴定、定量检测、相互作用等,是基因组 DNA 序列与基因功能之间的桥梁。

对海参蛋白质组学进行深入的研究首先需要对手参的蛋白质组进行有效地、高质量的提取、酶解、并通过高分辨质谱对其差异性进行分析。湛垚垚等^[14]将海参样品经过液氮研磨、超声、超高速冷冻离心及蛋白质组样品纯化等一系列步骤,从海参组织中获得了种类全面、浓度及纯度均较高的蛋白质组,并采用蛋白质双向电泳(2-dimensional gel electrophoresis, 2D-PAGE)、液相色谱以及蛋白质组质谱鉴定,为海参的苗种优选、养殖技术提高以及病害防控提供理论基础和实践指导,有助于解决海参种质退化、病害频发等实际生产问题,有利于提高海参产

业的经济效益和社会效益。田焱等^[12]通过 2D-PAGE 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。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。与此同时,还可以通过高分辨质谱,针对海参样品,发展高效的蛋白质样品预处理和高准确的蛋白质定量技术,实现海参中蛋白质的深度覆盖定量,基于蛋白质组学技术分析海参样品在不同加工工艺、养殖方式、不同生长时期的差异,并对其变化研究海参的营养价值和品质,从而通过蛋白质组学技术充分发掘海参的营养价值及食品安全。

3 海参蛋白前处理技术

3.1 样品制备

对于海参样品,需要先进行组织破碎,常用的破碎方法有研磨和匀浆。匀浆法是尽量将组织剪成小块或采用液氮研磨的样品,加入蛋白酶抑制剂,在冰面上进行匀浆,可采用手动匀浆或机械匀浆。匀浆完成后,过滤或离心收集匀浆液进行后续处理。总之,在破碎时应注意需要在低温情况下进行,以保证样品中的蛋白质不因温度发生变化而影响实验重复性。

3.2 蛋白提取

在组织破碎之后,细胞必须先裂解才能进行细胞器分离和蛋白提取,为避免温度对蛋白质带来的变化,表面活性剂裂解法常用于代替物理裂解法。比如 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(3-[3-(cholamidopropyl)dimethylamino]propanesulfonic acid inner salt, CHAPS)^[9,15]、聚乙二醇辛基苯基醚(polyethylene glycol octyl phenyl ether, Triton X)^[16-18]系列,具有很强的溶解蛋白能力,通常用来提取功能蛋白。另外,缓冲液组成、pH 值、盐浓度、温度等不同的蛋白质提取条件,都会直接影响到蛋白质组学的研究结果,尤其是在差异蛋白质组学研究中更为明显^[19,20]。通过研究高效的组织裂解液作为蛋白质提取和溶解体系,发展提取能力强、样品损失低的全蛋白质样品预处理新技术对手参样品中蛋白质进行提取,至关重要^[21,22]。高杨^[22]在 4 °C 条件下,对手参样品匀浆处理后,加入 Tris-HCl(含 5 mmol EDTA 和 0.5mol NaCl, pH8.0)缓冲液缓慢搅拌过夜,高速离心,冷冻干燥得到胶原粗纤维。田焱等^[12]在海参肠组织蛋白质的提取中,比较了 Tris-HCl 提取、去离子水提取、三氯乙酸(chloroacetic acid, TCA)-丙酮沉淀法,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。吴慈等^[16]在食品过敏原的检测中,比较了丙酮沉淀法与膜上原位样品预处理法(i-FASP)提取蛋白,采用 BCA 方法测定上清液

中蛋白质的浓度, 结果表明 i-FASP 法使蛋白质的提取率提高了 10 倍, 且在质谱分析时, 避免了聚合物干扰峰, 适于定量分析。因此, 样品的提取应尽可能多的获得所有的蛋白质, 以备后续的分选与鉴定。

3.3 海参蛋白的变性与酶解

二硫键在蛋白质分子的立体结构形成上起着重要作用, 为了确定蛋白质的一级结构, 首先须将二硫键打开, 使之成为线状多肽链。常用的还原剂是二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)^[16,23-26], β -巯基乙醇(β -ME)^[11,26]。但 DTT 往往无法还原包埋于蛋白质结构内部(溶剂不可及)的二硫键, 这类二硫键的还原常常需要先将蛋白质变性(高温加热或加入变性剂, 如 6 mol/L 盐酸胍、8 mol/L 尿素或 1% 十二烷基苯磺酸钠); 而加入碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)是为了巯基烷基化, 保护游离巯基再次形成二硫键; 酶解是为了将蛋白质酶解为肽段用于质谱分析。吴慈等^[16]将蛋白质提取液转移至预先润湿的超滤离心管(分子截留量为 10000)上, 离心后于膜上加入 200 μ L 100 mmol/L DTT 溶液变性, 再向膜上加入胰蛋白酶(trypsin)及 IAA, 37 $^{\circ}$ C 反应过夜, 离心得到的酶解液, 用于质谱分析。Sun 等^[24]在刺参肠道再生的磷酸和乙酰蛋白组学比较分析研究中, 海参肠经液氮冷冻研磨, 加入 8 mol/L 尿素, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L DTT 及 2% 磷酸酶抑制剂(cocktail V), 冷冻离心, 用 15% 的 TCA 沉淀蛋白, 并用冰丙酮洗剩余的沉淀物, 用缓冲液溶解; Zhang 等^[26]在 400 μ L 蛋白质提取液中加入 8 μ L 1 mol/L 的 DDT, 60 $^{\circ}$ C 30min, 冷却至室温, 加入 IAA 溶液, 避光 1 h 进行烷基化反应。将蛋白质提取液转移至预先润湿的超滤离心管上, 离心; 用 NH_4HCO_3 洗涤 2 次, 高速离心 20 min, 37 $^{\circ}$ C 下, 用 Trypsin 酶解 16 h, 消化后将样品离心 15000 r/min, 20 min, 收集于新管。所得酶解液用于 Triple TOF™ 5600 MS 分析。综上, 选择合适的表面活性剂和还原剂, 破坏所有非共价结合的蛋白质复合物和二硫键对于后续分析至关重要。

4 海参蛋白分析技术

4.1 蛋白分级

对蛋白质进行预分级有利于提高后续肽段分析的可靠性和准确性。为了更多的鉴定到蛋白质, 可采用 2D-PAGE、高低 PH 分级、SCX 分级^[27-29]等。随着分离科学的不断发展, 蛋白质组学研究中的经典分离技术如 2D-PAGE, 以及不断发展的色谱分离技术如多维毛细管液相色谱、亲和毛细管液相色谱以及整体柱技术等发挥着重要的作用, 对蛋白质进行预分级有利于提高后续肽段分析的可靠性和准确性。其中, 2D-PAGE 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, 是目前比较蛋白质组学研究的核心技术, 广泛应用于生命科学的各个领域^[27]。张鹏等^[11,30]通过对不同的蛋白提取方

法、处理方法以及不同等电聚焦程序的设置的对比试验, 建立并优化了刺参血细胞双向电泳技术体系, 并采用比较蛋白质组学的方法, 对取自辽宁省普兰店室内养殖厂腐皮综合症刺参和健康个体肠组织中差异表达蛋白进行了研究。在优化的电泳条件共检测到约 700 个蛋白质点; 表达量差异 2 倍以上的蛋白点 51 个, 最大表达差异比率为 4.32; 对其中重复性一致的 30 个差异点进行质谱鉴定, 成功鉴定了 23 个差异蛋白; 进一步扫描实验室完成的刺参转录组数据, 筛选了过氧化氢酶和泛素相关修饰子 3 的 EST 序列。为研究高温胁迫下差异蛋白的表达研究奠定了基础。田焱等^[12]以刺参肠组织为研究对象, 通过蛋白质提取、上样前处理、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, 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。尽管 2D-PAGE 具有无可比拟的分辨率, 但是依旧存在缺陷: 在二维凝胶电泳谱图上, 并不是每个蛋白斑点包含的蛋白量都足以用于蛋白质鉴定; 对于低丰度蛋白、疏水性蛋白以及一些极大蛋白和极小蛋白不能进行很好的分离; 操作复杂。毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)具有高效、快速、样品消耗少(0.1~10 nL)、易于实现自动化操作等优点, 已在蛋白质、多肽等生物大分子的分离中发挥了重要的作用。在 CE 的各种分离模式中, 毛细管等电聚焦(capillary isoelectric focusing, CIEF)不仅对样品具有较高的分辨率, 而且也有显著的富集效果。多维毛细管电泳(2D-CE)用于蛋白质和多肽的分离分析。实现了 2D-CE 的全自动化操作控制, 而且将基于整体材料的酶反应器技术引入系统中, 实现了蛋白质分离 - 在线酶解 - 肽分离 - 质谱鉴定的集成化近年来人们发展了 2D-CE 技术, 并将其广泛的用于蛋白质分离分析^[31]。

4.2 蛋白质鉴定

4.2.1 分析策略

生物体内的蛋白质种类繁多, 而且很多蛋白质还存在着复杂的翻译后修饰, 因此, 需要利用各种先进的仪器分析技术, 选择高灵敏度、高分辨率、高选择性的分离方法分析并研究生物体内蛋白质结构、功能及相互作用与动态变化。“Top-down”和“Bottom-up”(又称 Shotgun)是目前蛋白质组学研究中 2 种主要的分析策略^[31-34]。“Top-down”是先将蛋白质分离, 然后通过质谱鉴定, 直接检测获得样品的蛋白质组成信息。虽然目前质谱已经能够直接检测蛋白质分子, 且该方法在一定程度上可以降低蛋白质组学样品的复杂性, 但仍有很多技术瓶颈影响其广泛应用, 比如质谱检测蛋白质的灵敏度低于肽段等。“Bottom-up”是将混合蛋白酶解成肽段, 然后通过多维液相色谱分离多肽段, 然后经 HPLC 进行分离, 随后进行一级质谱(mass, MS)和二级质谱(MS/MS)的分析从而实现样品中蛋白质的鉴定。与蛋白质分离相比, 在肽段水平上的分离相对容易; 另外,

该方法消耗的样品量少、分离能力强、易于自动化^[35]。因此,近年来鸟枪法(Shotgun)为代表的分析技术已经成为蛋白质组学研究的主流技术之一,首先从组织或细胞等样品中提取蛋白质,并将提取的蛋白质被酶解成肽段混合物,然后肽段混合物经液相色谱分离后进入串联质谱检测,所得到的质谱数据使用 Sequest 或 Mascot 等软件结合蛋白数据库进行分析鉴定。

4.2.2 蛋白质/肽段鉴定

近年来,质谱技术的快速发展为多肽组学的研究带来了前所未有的发展机遇,目前已经有多种质谱结合的多肽富集和鉴定方法被成功应用到多肽组学的研究中,一类是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)相关的质谱技术^[36,37],主要是通过分析蛋白质酶解后肽段混合物中的特征性质量数肽段(肽指纹图谱(peptide fingerprint, PMF)),获得特征肽段的质量信息在蛋白质数据库中检索,寻找具有相似肽指纹图谱的蛋白质,初步完成蛋白质的确认;另一类是 LC-MS/MS 相关的质谱技术,如飞行时间串联质谱(Triple TOF LC-MS/MS)^[23,26]。相比较而言,前一种质谱技术更多的应用于高通量多肽组学研究中,可以对样品进行快速的扫描以进行差异分析,但缺点是不易对检测到的多肽分子进行鉴定。对于 LC-MS 相关的质谱技术,由于可以选不同种类的质量分析器,因此在多肽组学中的应用更加灵活,同时通过一维或者二维液相色谱的高效分离可以大大降低质谱分析时样品的复杂度^[34]。崔凤霞^[36]从中国产仿刺参中提取未变性胶原蛋白,对其生化性质进行了测定,确定了刺参胶原的组成类型,并利用 MALDI-TOF-TOF 质谱技术对海参胶原一级结构进行了初步研究。超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱(Q-Exactive Orbitrap MS)^[37-39]是近年来新开发出的一种具有高分辨率、灵敏度、准确度的技术,与普通质谱相比,其碎片离子扫描分析鉴别各种脂质同分异构体的超强能力。目前,该技术已成功应用于牛奶和人奶的极性脂质组分差异识别鉴定上^[40,41]。Chen 等^[18]对海参样品提取蛋白, Trypsin 消化,多肽体外标记(tandem mass tags, TMT 标记),液相色谱分离, IMAC 富集。最终采用高分辨质谱 Q-Exactive Orbitrap MS 分析。

4.3 蛋白/肽段标记及定量

质谱是很好的蛋白质鉴定工具,但不同的蛋白质或多肽在质谱中有不同的离子化效率,所以不能从质谱图中对蛋白质/肽进行精确定量分析。同位素标记技术是以稳定同位素为内标,将物理化学性质相同、质量不同的同位素掺入 2 种样品,混合后不同状态的相同蛋白质/肽因质量差异在质谱图中表现为一对峰,通过比较质谱峰的强弱,从而精确定量出蛋白质在不同状态下表达量的变化, iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation)^[23,42-45]和

TMT^[18,24,46,47]是近年来应用最广泛的差异蛋白质组学技术,它们均采用体外标记的方法,利用同位素试剂标记蛋白质酶解后产生的多肽,对两个或多个样本,在全蛋白质组层面上展开相对定量分析。其标记肽段的原理基本上是一样的,只是 iTRAQ 是 AB 公司的,他们主打仪器是 QTOF,飞行时间质谱仪, TMT 是 Thermo 的,主打的 Orbitrap 仪器,特点就是高分辨,在能够鉴定的蛋白数量上, TMT 和 iTRAQ 差别不大。基于稳定同位素标记的蛋白质组定量方法可以在不同步骤实现样品混合,可以同时实现多重标记及消除色谱-质谱联用分析过程中不稳定性带来的定量误差等优点,已成为定量蛋白质组学研究中最常用的方法^[48]。Sun 等^[24]首次进行了磷酸化和乙酰化蛋白组学的定量研究海参再生的研究。在 1169 个蛋白中鉴定出 1862 个磷酸化位点,在 712 个乙酰化位点 470 的蛋白质。张健^[42]对仿刺参样品基于 iTRAQ 标记定量技术对 AJS 多糖抗肿瘤机制进行了研究。Sun 等^[23]用相对和绝对定量的等压标记(iTRAQ)探讨海参再生过程中蛋白质含量的变化,共 4073 个鉴定蛋白中 2321 个蛋白表达差异显著。Xu 等^[43]采用了同位素标记 iTRAQ 相对定性定量法,研究蛋白质组学,最终鉴定了 3432 种蛋白质,有 127 种蛋白质有热激反应。研究结果表明热应激影响了各种生物过程中蛋白质的表达,这样的作为组织的保护和解毒,脂质和氨基酸的代谢,能量的生产和使用转录和翻译,细胞凋亡,细胞增殖。另外,二甲基化标记也是一种常用的化学标记方法,它通过比较轻重标记的样品在一级谱的峰强度/峰面积实现相对定量分析,该方法具有反应快速、反应效率高和成本低的优点。赵群等^[49,50]提出了基于二级质谱特征碎片离子定量的准等重二甲基化标记策略;蛋白质组定量覆盖率高达 99%以上;定量结果与理论值相对偏差低于 2%;动态范围达到 4 个数量级。通过一级谱可以实现蛋白质组的定量,适用于组织、细胞和体液等样品的定量分析。

5 总结

综上所述,虽然目前蛋白质组的样品处理技术得到了快速的发展,如何进一步提高样品处理的效率、选择性、重现性和自动化程度仍然是人们不断追求的目标。而针对于海参样品,研究高效的组织裂解液作为蛋白质提取和溶解体系,发展提取能力强、样品损失低的全蛋白质样品预处理技术至关重要。随着上述样品预处理技术和高分辨质谱技术的快速发展,对海参样品蛋白质定量或差异性分析,正朝向高精度与高覆盖定量分析的方向发展。未来对海参蛋白质组定量方法的研究,将以提高定量的准确度、精密密度、动态范围和定量覆盖度为中心。

参考文献

- [1] Pangestuti R, Arifin Z. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers [J]. J Trad Chin Med, 2017, 8(3): 341-351.

- [2] Aminin DL, Menchinskaya ES, Pisiagin EA, *et al.* Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides [J]. *Mar Drug*, 2015, 13(3): 1202–1223.
- [3] 张伟伟, 陆茵. 海参的抗肿瘤作用研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2010, (1): 105–108.
Zhang WW, Lu Y. Research progress on antitumor effects of sea cucumber [J]. *J Trad Chin Med Pharm*, 2010, (1): 105–108.
- [4] 张正雨. 海参肠内源酶对体壁胶原纤维流变特性及蛋白降解的作用研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2017.
Zhang ZY. Characteristics of collagenase from Intestine and its effect on collagen degradation from body wall in sea cucumber [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2017.
- [5] 秦洪. 海参(*Stichopus Japonicus*)内脏多肽和多糖提取纯化及活性研究[D]. 福建: 华侨大学, 2016.
Qin H. Study on the extraction, purification and activities of polypeptide and polysaccharide from sea cucumber (*stichopus japonicus*) viscera [D]. Fujian: Huaqiao University, 2016.
- [6] 中国报告网. 2018 年中国海参养殖行业分析报告-市场运营态势与发展前景研究 [R]. [2018-9-27]. <http://baogao.chinabaogao.com/shuichangqilei/368957368957.html>.
China Report Network. China sea cucumber aquaculture industry analysis report 2018-Market operation situation and development prospect research [R]. [2018-09-27]. <http://baogao.chinabaogao.com/shuichangqilei/368957368957.html>.
- [7] 郑明静, 周美龄, 陈妮, 等. 超高压处理对海参组织结构及品质影响的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(4): 187–210.
Zheng MJ, Zhou ML, Chen N, *et al.* Effect of ultra-high pressure treatment on tissue structure and quality of sea cucumber [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(4): 187–210.
- [8] Sevim Kose. Evaluation of seafood safety health hazards for traditional fish products: preventive measures and monitoring issues [J]. *Turk J Fish Aquat Sci*, 2010, (10): 139–160.
- [9] 王婧媛, 王联珠, 孙晓杰, 等. 海参加工工艺、营养成分及活性物质研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(11): 2749–2755.
Wang JY, Wang LZ, Sun XJ, *et al.* Research progress on processing technology, nutritive components and active substances of sea cucumber [J]. *Food Saf Qual*, 2018, 9(11): 2749–2755.
- [10] 侯志刚. 仿刺参贮藏及预煮过程的品质变化研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
Hou ZG. The research in changes of quality during storage and per-cooking about *apostichopus japonicas* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [11] 张鹏, 李成华, 李晔, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)腐皮综合症发生相关蛋白的分离与鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 1–6.
Zhang P, Li CH, Li Y, *et al.* Isolation and characterization of differential expressed proteins from skin ulceration syndrome *apostichopus japonicas* [J]. *Oceanolog Et Limnolog Sin*, 2013, 44(3): 1–6.
- [12] 田焱, 莫海波, 常亚青, 等. 刺参肠组织蛋白质双向电泳体系的建立及优化[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 74–81.
Tian Y, Mo HB, Chang YQ, *et al.* Establishment of two-dimensional gel electrophoresis(2-DE) for intestine tissue of *Apostichopus japonicas* [J]. *Progr Fish Sci*, 2013, 34(5): 74–81.
- [13] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis [J]. *Biotechnol (NY)*, 1996, (14): 61–65.
- [14] 湛焱焱, 黄显雅, 段立柱, 等. 海参组织蛋白质组的提取方法. 中国: CN,201310588498.3 [P]. 2013-11-21.
Zhan YY, Huang XY, Duan LZ, *et al.* Extraction of proteome from sea cucumber. China: CN,201310588498.3 [P]. 2013-11-21.
- [15] Zhang P, Li CH, Li Y, *et al.* Proteomic identification of differentially expressed proteins in sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes after vibrio splendidus infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, (44): 370–377.
- [16] 吴慈, 陈溪, 刘健慧, 等. 基于高分辨质谱技术的婴幼儿食品中过敏原蛋白质的高灵敏检测[J]. *色谱*, 2017, 35(10): 1037–1041.
Wu C, Chen X, Liu JH, *et al.* High-sensitive detection of multiple allergenic proteins in infant food with high-resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 35(10): 1037–1041.
- [17] Zhao Q, Fang F, Wu C, *et al.* imFASP: An integrated approach combining in-situ filter-aided sample pretreatment with microwave-assisted protein digestion for fast and efficient proteome sample preparation [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, (912): 58.
- [18] Chen MY, Zhu AJ, Kenneth BS. Comparative phosphoproteomic analysis of intestinal phosphorylated proteins in active versus aestivating sea cucumbers [J]. *J Proteom*, 2016, (135): 141–150.
- [19] Freeman WM, Hemby SE. Proteomics for protein expression profiling in neurosciences [J]. *Neurochem Res*, 2004, (29): 1065–1081.
- [20] 张倩, 石柱红, 郭秀霞, 等. 基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学技术探索淡色库蚊越冬机制[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(2): 160–168.
Zhang Q, Shi GH, Guo XX, *et al.* Study on the mechanisms underlying overwintering of *Culex pipiens pallens* using iTRAQ-based quantitative proteomic analysis [J]. *Chin J Schisto Contr*, 2019, 31(2): 160–168.
- [21] Canas B, Pineiro C, Calvo E, *et al.* Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics [J]. *J Chromatogr A*, 2007, (1153): 235–258.
- [22] 高杨. 海参体壁胶原蛋白提取、分离及理化性质的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2009.
Gao Y. Study on extraction, purification and physico-chemical property of collagen from the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2009.
- [23] Sun L, Xu DM, Xu QZ, *et al.* iTRAQ reveals proteomic changes during intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicas* [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2017, (22): 39–49.
- [24] Sun L, Lin CG, Li XN, *et al.* Comparative phospho- and acetylproteomics analysis of posttranslational modifications regulating intestine regeneration in sea cucumbers [J]. *Front Physiol*, 2018, (9): 1–22.
- [25] Matsumura T, Hasegawa M, Shigei M. Collagen fibrils of the sea-cucumber, *Stichopus japonicus*: purification and morphological study [J]. *Corm Tissue Res*, 1974, (2): 117–125.
- [26] Zhang HW, Zhang XM, Zhao X, *et al.* Discrimination of dried sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) products from different geographical origins by sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra (SWATH-MS)-based proteomic analysis and chemometric [J]. *Food Chem*, 2019, (274): 592–602.
- [27] Wang LJ, Ren XM, Du YH, *et al.* Study on the optimization of

- two-dimensional electrophoresis technology system for rapeseed proteome [J]. *Agric Basic Sci Technol*, 2011, 12(5): 625–629.
- [28] 孙秀杰, 唐君, 陈文东, 等. 基于 SCX/SAX 混合填料的集成化蛋白质组学样品前处理方法[J]. *中国科学*, 2018, 48(2): 188–194.
- Sun XJ, Tang J, Chen WD, *et al.* Integrated proteomics sample pretreatment method based on SCX/SAX mixed packing [J]. *Sci Chin*, 2018, 48(2): 188–194.
- [29] 杨开广, 张丽华, 张玉奎. 蛋白质分离和鉴定的新技术新方法研究进展[J]. *郑州轻工业学院学报(自然科学版)*, 2012, 27(5): 1–12.
- Yang KG, Zhang LH, Zhang YK. Recent advances of technique and method on the protein separation and identification in the proteomic studies [J]. *J Zhengzhou Light Ind (Nat Sci Ed)*, 2012, 27(5): 1–12.
- [30] 张鹏. 刺参高温胁迫相关蛋白的识别与鉴定研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- Zhang P. Research of the identification of related expressed proteins in thermally stressed *Apostichopus japonicas* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2014.
- [31] Yuan HM, Zhang LH, Hou CY, *et al.* Integrated platform for proteome analysis with combination of protein and peptide separation via on-line digestion [J]. *Anal Chem*, 2009, (81): 8708–8714.
- [32] 蒋小岗. 蛋白质组学样品预处理和自动化分析的技术和方法发展[D]. 北京: 中国科学院大学, 2007.
- Jiang XG. Technology and method development for sample pretreatment and automated analysis in proteome research [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2007.
- [33] 吴慈. 新型整体材料的制备及其在蛋白质组学分析中的应用[D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.
- Wu C. Preparation of novel monolithic materials and applications in proteome analysis [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2016.
- [34] 胡良海. 多维液相色谱-质谱联用技术及其应用研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2009.
- Hu LH. Development of methods and technologies in multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2009.
- [35] Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics [J]. *Chem Rev*, 2013, (113): 2343–2394.
- [36] 崔凤霞. 海参胶原蛋白生化性质及胶原肽活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- Cui FX. Study on the biochemical characterization of collagen and activity of collagen peptide extracted from the body wall of sea cucumber *stichopus. Japonicas* [D]. Qindao: Ocean University of China, 2007.
- [37] 高欢欢. 多维液相色谱串联质谱分析水稻叶片蛋白质组学的研究[D]. 浙江: 浙江工业大学, 2018.
- Gao HH. Study on the multi-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for proteomics of rice leaves [D]. Zhejiang: Zhejiang University of Technology, 2018.
- [38] Senyuva HZ, Gokmen V, Sarikaya EA. Future perspectives in Orbitrap-high-resolution mass spectrometry in food analysis: a review [J]. *Food Addit Contam A*, 2015, (32): 1568–1606.
- [39] Licklider LJ, Thoreen CC, Peng JM, *et al.* Automation of nanoscale microcapillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a vented column [J]. *Anal Chem*, 2002, (74): 3076–3083.
- [40] 周晓丽. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap Mass 技术的山羊奶、大豆奶、牛奶的脂质组分析研究[J]. *中国饲料*, 2017, (10): 33–38.
- Zhou XL. Studies on goat, soy and bovine lipids by using UPLC-Q-exactive orbitrap mass spectrometry [J]. *Chin Feed*, 2017, (10): 33–38.
- [41] Liu ZQ, Moate P, Cocks B, *et al.* Comprehensive polar lipid identification and quantification in milk by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2015, (26): 95–102.
- [42] 张健. 基于蛋白质组学等技术的仿刺参抗菌肽生成机制及生殖腺多糖、活性肽活性研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2018.
- Zhang J. The study on generation mechanism of AMP and the activity of gonad polysaccharides and polypeptides of *Apostichopus japonicas* based on proteomics and other techniques [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2018.
- [43] Xu DM, Sun LN, Liu SL, *et al.* Understanding the heat shock response in the sea cucumber *apostichopus japonicus*, using iTRAQ-based proteomics [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(150): 1–13.
- [44] Chen Z, Wang Q, Lin L, *et al.* Comparative evaluation of two isobaric labeling tags, DiART and iTRAQ [J]. *Anal Chem*, 2012, (84): 2908–2915.
- [45] Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, *et al.* Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research [J]. *Proteomics*, 2007, (7): 340–350.
- [46] Biancotto G, Bovo D, Mastroianni E, *et al.* TMT-Based proteomics profiling of bovine liver underscores protein markers of anabolic treatments [J]. *Proteom Clin Appl*, 2018, (4): 1–11.
- [47] Schvartz D, González-Ruiz V, Walter N, *et al.* Protein pathway analysis to study development-dependent effects of acute and repeated trimethyltin (TMT) treatments in 3D rat brain cell cultures [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, (60): 281–292.
- [48] Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, *et al.* Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, (389): 1017–1031.
- [49] 赵群, 张丽华, 张玉奎. 蛋白质组学技术前沿进展[J]. *应用化学*, 2018, 35(9): 977–983.
- Zhao Q, Zhang LH, Zhang YK. Recent advances in proteomics [J]. *Chin J Appl Chem*, 2018, 35(9): 977–983.
- [50] 周愿. 基于质量亏损的准等重标记定量蛋白质组学新方法研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.
- Zhou Y. Development of novel mass defect-based pseudo-isobaric labeling methods for proteome quantification [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介

陈溪, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: streamchen@126.com