

# 蛋白质免疫印迹技术在水产品中的应用

杨明畅<sup>1,2</sup>, 马俐珍<sup>1</sup>, 李来好<sup>2,3</sup>, 杨贤庆<sup>2,3</sup>, 陈胜军<sup>2,3</sup>, 魏涯<sup>2</sup>, 王悦齐<sup>2,3</sup>,  
李春生<sup>2,3</sup>, 赵永强<sup>2,3\*</sup>

(1. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广州 510300; 3. 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 大连工业大学, 大连 116034)

**摘要:** 蛋白质免疫印迹技术作为一门新兴的方法, 在蛋白质组学研究中得到广泛应用。该技术可对待测样品中目的蛋白质进行定性和半定量分析, 为探究水产品中蛋白质组成及变化规律带来了新的途径。本文在重点介绍蛋白质免疫印迹技术原理及特点的基础上, 系统地总结了近年来该技术在水产品加工、贮藏、品质鉴别及质量安全方面的应用研究进展, 对目的蛋白质选择的局限性、水产品研究尚未覆盖、蛋白质受环境改变等问题进行了探讨, 就此展望了丰富数据库、多组学方法联合分析等发展前景, 以期蛋白质免疫印迹技术在水产品品质与质量安全相关研究和应用提供参考与借鉴。

**关键词:** 蛋白质免疫印迹技术; 水产品; 蛋白质组学; 质量与安全

## Application of western blotting in aquatic products

YANG Ming-Chang<sup>1,2</sup>, MA Li-Zhen<sup>1</sup>, LI Lai-Hao<sup>2,3</sup>, YANG Xian-Qing<sup>2,3</sup>, CHEN Sheng-Jun<sup>2,3</sup>,  
WEI Ya<sup>2,3</sup>, WANG Yue-Qi<sup>2,3</sup>, LI Chun-Sheng<sup>2,3</sup>, ZHAO Yong-Qiang<sup>2,3\*</sup>

(1. College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;  
2. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**ABSTRACT:** As a new method, western blotting technology has been widely used in protein's omics research. This technology can be used for qualitative and half quantitative analysis of the target proteins in the samples to be tested, which brings a new way to explore the composition and variation of protein in aquatic products. On the basis of introducing the principle and characteristics of protein western blotting technology, this paper systematically summarized the recent progresses of western blotting application system at actually in terms of processing, storage, quality identification and quality safety of aquatic products, discussed the limitations of the choice of destination protein, the lack of coverage of aquatic products research, and the environmental changes in protein, prospected the

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2018YFD0901006)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-46、CARS-47、CARS-50)、中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2020TD73、2021SD07)、广东省现代农业产业技术体系海水鱼产业创新项目(2019KJ143)、“扬帆计划”引进创新创业团队专项(2015YT02H109)

**Fund:** Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901006), the Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs: National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-46, CARS-47, CARS-50), the Special Scientific Research Funds for Central Nonprofit Institute (2020TD73, 2021SD07), the Modern Agricultural Industry Technology System of Guangdong-Marine Fish (2019KJ143), and the “Yang Fan” Innovative and Entrepreneurial Research Team Project (2015YT02H109)

\***通信作者:** 赵永强, 博士, 副研究员, 主要研究方向为水产品加工与质量安全。E-mail: zhaoyq@scsfri.ac.cn

\***Corresponding author:** ZHAO Yong-Qiang, Ph.D, Associate Professor, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.231, Xingangxi Road, Guangzhou 510300, China. E-mail: zhaoyq@scsfri.ac.cn

development prospect of riching database, multi-omics method joint analysis and that like, in order to provide references for the research and application of protein western blotting technology in aquatic product quality and quality safety.

**KEY WORDS:** western blotting; aquatic products; proteomics; quality and safety

## 0 引言

我国是水产品养殖、加工与出口大国, 养殖产量已连续多年位居世界水产行业首位。2019 年淡水养殖鱼类总量 2548.02 万 t、海水鱼类养殖总量 160.58 万 t, 水产品的加工与消费已成为我国食品行业的核心之一<sup>[1]</sup>。水产品种类繁多, 营养价值丰富, 主要包括鲜活水产品、冷冻水产品、鱼糜制品、调味鱼粉、鱼油和冷冻调理水产品等<sup>[2]</sup>。水产品中富含蛋白质, 约占总体的 16%~25%<sup>[3]</sup>。蛋白质不仅是营养价值的载体, 还承担着保持形态结构和改善水产品肉质特性的作用<sup>[4-5]</sup>, 蛋白质组学(proteomics)是可靠的高通量分析方法, 是基因组学与转录组学的分析补充, 最早由澳大利亚学者 WILKINS 和 WILLIAMS 共同提出和利用<sup>[6-7]</sup>。水产品中的蛋白质丰富多样, 因此应用蛋白质组学技术研究不同水产品蛋白质组成及变化规律的差异是科学发展的一大热门。

蛋白质组学技术在水产品中的应用主要集中于双向凝胶电泳(two dimensional electrophoresis, 2-DE)技术、质谱(mass spectrometry, MS)技术和生物信息学(bioinformatics)技术等方面<sup>[8]</sup>。随着对水产品中蛋白质翻译后的修饰、相对密度、相对质量及蛋白质之间的相互作用研究的深入, 蛋白质免疫印迹技术(western blotting)近年来已逐渐成为相关研究热点<sup>[9]</sup>, 该方法最早由美国科学家 SAMBROOK 提出并运用, 是蛋白质组学中分析蛋白质组成的一种新兴技术, 特点是实用性高、分析效果好, 目前广泛应用于生物化学、分子生物学、医学、遗传学等诸多领域, 已成为蛋白质定量分析检测的方法之一<sup>[10-12]</sup>。蛋白质免疫印迹技术作为蛋白质组学的一个重要组成部分, 本文简要介绍该技术的原理和特点, 并对水产品中运用该技术的相关研究进行综述, 旨在为水产品中该技术的运用提供思路。

## 1 蛋白质免疫印迹技术的工作原理和特点

### 1.1 蛋白质免疫印迹技术工作原理

蛋白质免疫印迹技术结合了十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)的高分辨率及酶联免疫技术(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)的高敏感性和特异性。在 SDS-PAGE 凝胶电泳基础上将分离的蛋白质转移到印膜上后, 先用抗目的蛋白质的一抗与转印膜上的蛋白质反应, 随后利用代标记的二抗与一抗反应, 根据不同

二抗标记物的特性检测微量蛋白质<sup>[13-14]</sup>。

### 1.2 蛋白质免疫印迹技术特点

蛋白质免疫印迹技术能够在复杂的多蛋白质样本中检测单个感兴趣的蛋白质, 归一化程度高, 免疫印迹条带的结果代表了蛋白质基因组的综合功能体现<sup>[15]</sup>。凝胶电泳操作简便、通量高、自动化程度较高, 但是耗费时间长、分辨率和可比性较低、特异性较差, 不适用于检测蛋白质多肽分子和分子量较大的蛋白质及低丰度蛋白质, 具有一定的局限性<sup>[16-17]</sup>。蛋白质免疫印迹技术的灵敏度更高、操作规范性好, 蛋白质特异性之间的鉴别效果明显, 能同时进行定性和定量的比较, 可进行微量级蛋白质的检测, 同时解决了传统蛋白质鉴别存在的溶解、聚集和靶点蛋白质与外来蛋白质共沉淀的问题, 强调了数据分析的整体有效性, 反映生物样本之间真实和有意义的差异, 适应“组-学”技术的飞速发展, 为蛋白质分析提供了更充分的需要和更大的舞台<sup>[18-19]</sup>。

## 2 蛋白质免疫印迹技术在水产品中的应用

### 2.1 水产品过敏原

水产品是人们饮食和营养获取的重要组成部分, 也是构成食物过敏的类别之一, 每年因食用鱼、虾、蟹类水产品引起过敏症状的人数逐渐增加, 且沿海地区的过敏率要高于内陆地区<sup>[20-21]</sup>。通过对水产品过敏原蛋白质的分离与纯化表达, 并与过敏性患者、实验动物的血清检测进行对比, 利用凝胶电泳和免疫印迹的测试结果确定免疫球蛋白(IgE)的结合位点, 能够有效地评估致敏性蛋白质的稳定和差异性, 优化调节水产品加工的控制点<sup>[22]</sup>。我国水产品资源丰富, 经济型水产品受到广大消费者的喜爱, 也成为了研究的热点。陈献雄等<sup>[23]</sup>将我国重要淡水鱼类的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)作为研究对象, 收集了草鱼过敏性人体的血清, 运用蛋白质免疫印迹技术确定了血清的免疫学特性, 与草鱼的致敏性蛋白质组比较发现当蛋白质相对分子质量在 20~55 ku 之间、等电点在 pH 5~9 时鱼体内有 22 个人体致敏性蛋白质, 该研究为草鱼过敏原蛋白质数据库的建设确定了反应基础和条件, 拓宽了草鱼过敏原诊断的新思路。鳊(*Siniperca chuatsi*)的肉质肥嫩、爽滑, 是人们喜爱的鱼类之一。为了丰富鳊加工产业化发展, 减少鳊过敏性蛋白质在加工中带来的影响, 李阳等<sup>[24]</sup>通过 SDS-PAGE 凝胶电泳及免疫印迹实验识别出了鳊的致敏蛋白, 与鳊过敏患者血清对比后确定了分子量为 17、34、50、60 ku 的蛋白质条带为阳性致敏蛋白, 为今后继续分离纯化阳性条带打下了基础, 同时

进一步明确了木瓜蛋白酶是降低鳕过敏蛋白质的最优水解酶。虾的过敏属性来源于螨致敏反应, GAMEZ 等<sup>[25]</sup>通过免疫印迹分析了干燥、潮湿气候生长的海虾 IgE 图谱, 证明了螨致敏来源于虾的原肌凝蛋白和泛素结合酶, 螨类-海鲜交叉反应(cross-reactivity, CR)相互抑制免疫印迹实验发现, 在潮湿气候生长的海虾致敏性高。研究人员从中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)中提取了对虾肌肉蛋白, 经腹腔注射小鼠, 运用间接 ELISA 法构建小鼠过敏源特异性(institute of cancer research, ICR)模型, 通过分离对虾蛋白与小鼠阳性免疫印迹血清进行对照, 获得 4 个关键过敏蛋白, 成功验证了对虾肌肉全蛋白的致敏效果, 并收录于蛋白质数据库中<sup>[26]</sup>。王梦梦等<sup>[27]</sup>探究了常用的抑菌方式中酸性电解水浸泡过的南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)致敏性低于茶多酚和壳聚糖, 且烹饪后效果最佳。小清蛋白(parvalbumin)作为鱼类主要过敏原, 已成为低敏性水产品鉴别的研究热点。汪宁等<sup>[28]</sup>将鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和金鲷(*Trachinotus ovatus*)、黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*)的鱼肌肉及鲑鱼丸、鲑鱼丸制品、鳗鱼(*Anguillidae*)、沙丁鱼(*Sardine*)、鲭鱼(*Mitchill*)的罐头制品作为样本进行分析, 通过免疫印迹结果发现鱼肌肉的样本中小清蛋白主要存在于白色肉的肌浆蛋白中, 红色肉的致敏性要低于白色肉, 经过漂洗加工后的鱼肉制品小清蛋白含量显著降低, 安全性增高, 漂洗越充分, 致敏性越低, 适宜更多人群食用和选择。在此研究基础上, 研究者通过对三文鱼(*Oncorhynchus*)的肌肉蛋白研究确定了在免疫印迹的条件下三文鱼水溶性总蛋白及纯化小清蛋白在分子量约为 12 ku 处具有较强的免疫反应活性且出现明显的特异杂交显色条带, 质谱检测出该蛋白为  $\beta$ -parvalbumin ( $\beta$ -PV)型, 且耐高温、性质稳定, 具有较强的免疫活性<sup>[29]</sup>, 将完整的鱼肌肉加工成鱼糜海鲜制品能够显著降低  $\beta$ -PV 含量, 免疫印迹结果进一步在阿拉斯加鲑鱼(*Alaskapillock*)加工中得到了证实<sup>[30]</sup>。运用蛋白质免疫印迹技术有助于水产品中过敏原蛋白质的表位定位与稳定性研究, 为过敏的临床诊断及预防奠定了基础, 有助于相关治疗方案的设计和防过敏性技术的创新与研发。

## 2.2 水产品加工

水产品加工的品质变化主要由肌肉组织、蛋白质含量和蛋白质组成等生物因素和环境温度决定<sup>[31]</sup>。蛋白质免疫印迹技术能够充分展现目的蛋白在加工变化中的表达差异情况, 为深入了解水产品中的蛋白质变化、机理差异分析研究和保障质量安全性、筛选最优加工方案提供参考方向<sup>[32]</sup>。

不同的加工方式增加了蛋白质分子与分子之间的聚集、展开、交联或氧化等可变性, 继而影响目的蛋白的免疫活性, 高压加工联合处理能够灭活微生物, 改善内源酶活性, 调节蛋白质表达, 满足安全和感官、营养特性的需要<sup>[33]</sup>。蟹肉的蛋白质组成已经完全测定, 且对热敏感。热处理能够借助高温引起过敏蛋白质空间构象及三级结构改变, 破坏蛋白

质空间结构, 从而达到降低致敏性或去除过敏原的效果<sup>[34]</sup>。杨焯<sup>[35]</sup>将蟹类 2 种主要的致敏性蛋白原肌球蛋白(tropomyosin, TM)和精氨酸激酶(arginine kinase, AK)利用美拉德反应进行加工处理, 免疫印迹分析显示当 TM 和 AK 分别与 L-阿拉伯糖的比例为 1:3、在 100 °C、pH 为 8.5 的条件下加热 60 min 致敏性显著降低, 微观结构证实了蛋白质内部结构发生氧化修饰, AK 二硫键破坏。程华峰等<sup>[36]</sup>探究了不同热加工方式对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) TM 的消化稳定性和致敏性影响, 根据体外模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)中消化后原肌球蛋白的免疫印迹测定的结果表明了反压蒸煮与高温高压处理对致敏性降低的效果较好, 消化率较高。余慧琳等<sup>[37]</sup>和刘光明等<sup>[38]</sup>进一步验证了运用超声波结合蒸煮的方法也可降低蟹肉的致敏性, 以期蟹类过敏原性质及脱敏方面的深入研究提供依据。蔡秋凤等<sup>[39]</sup>和 CARRERA 等<sup>[40]</sup>探究白鲢和鳕鱼在烘烤、煎炸、水煮和高压等加工方式中致敏性蛋白免疫活性, 免疫印迹验证了高压加工方式的脱敏优越性。水产品精深加工能够优化水生生物资源利用, 提高附加值。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的副产物裙边钙含量丰富, 数量庞大, 焦奎<sup>[41]</sup>利用酶解法提取栉孔扇贝裙边蛋白制备复合氨基酸螯合钙的工艺, 通过免疫印迹检测大鼠的骨通路蛋白-Wnt/ $\beta$ -Catenin 显示螯合工艺能够增加骨密度, 且安全无毒。罗文奇<sup>[42]</sup>酶解改良了鳗鱼、海参和罗非鱼肽的加工工艺, 并结合了小鼠巨噬细胞 RAW264.7 测定免疫激活活性, 免疫印迹结果揭示了肽能够激活细胞通路, 具有良好的免疫增强活性。

水产品中的蛋白质随着加工方式的变化不断丰富着功能特性, 随着研究的深入, 蛋白质免疫印迹技术可以为高品质加工提供合理的理论依据, 保证水产品质量安全发展。

## 2.3 水产品贮藏

在贮藏过程中, 冰温能够延缓水产品的肉质分解、蛋白质降解与变性。通过蛋白质免疫印迹技术有助于观察目的蛋白质的差异变化, 为进一步探究蛋白质分子机制和关键控制点的确立提供研究方向。HE 等<sup>[43]</sup>鉴别了罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)切片后冰存 0 d 和 7 d 的蛋白质变化, 蛋白质组学鉴定出了差异丰富的两种蛋白质, 葡萄糖磷酸变位酶 1 (phosphoglucosyltransferase-1, pgm1)和乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase, LDHA)免疫印迹结果进一步证实了保存 7 d 的差异蛋白质的含量低于新鲜对照组, 从而证明了鱼肉的质构与酶和厌氧条件引起的结构蛋白降解和乳酸增加有关。随着研究的深入, 作者对于罗非鱼死后冰温贮藏过程中细胞凋亡通路进行测定后发现半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3)是凋亡信号的关键分子, 参与多种凋亡信号通路, 可切割细胞骨架蛋白等多种靶蛋白, 观察其活性和免疫印迹分析了罗非鱼骨骼肌线粒体细胞色素 c (mitochondrial cytochrome c)、细胞质细胞色素 c (cytosolic cytochrome c)、线粒体蛋白组分甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和细胞质蛋白组分磷酸甘油醛脱氢酶(cytosolic protein fraction, GAPDH)贮藏 36 h 的相对变化和细胞受到死亡信号刺激后 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 和 BCL2-Associated X 的蛋白质(BCL2-Associated X, Bax)的构象变化, 得出了凋亡过程一直持续到死后 20 h, 因此, 腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP)和细胞色素 c 水平的增加是 caspase-3 激活的必要条件, 而前者部分限制了 caspase-3 的活性<sup>[44]</sup>。红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)味道鲜美、营养价值高, 食用该水产品容易引起河鲀毒素中毒, 且在冷冻运输过程中其品质会发生劣变。LEI 等<sup>[45]</sup>研究了红鳍东方鲀在 0、14 和 60 d 冷藏过程中的蛋白质组变化情况, 经过生物信息学的分析确定了影响品质的 4 个蛋白质标志物: 泛素氧化还原酶亚基(ubiquinone oxidoreductase subunit, NADH)、原胸腺素  $\alpha$  型(putative prothymosin alpha species)、桥段整合子 3 (bridging integrator 3)、Mx 族 (Mx species), 与相关研究结果对比证实了该类蛋白质与颜色变化、对冷应激性和免疫调节有关。免疫印迹结果条带通路验证了它们在贮存过程中的变化, 间接验证了它们调控红鳍东方鲀的肌肉分解、调节肉的品质机理, 为下一步改进储存和运输方式提供标志物抑制剂的研发参考。

目前关于水产品品质保存中蛋白质变化的研究主要集中在目标蛋白质活性变化、溶解性变化及蛋白质表达差异等方面。今后可采用多组学联合分析技术研究水产品肌肉蛋白质冰温贮藏中的变性情况, 为更好地抑制蛋白质冷冻变性、降低水产品品质劣变提供理论依据。

## 2.4 水产品品质鉴别

蛋白质品质控制是水产品品质的关键要素, 测定蛋白质印迹通路的变化有助于精确把握品质差异信息化的研究与发展, 提高活性效能, 为蛋白质质量归一化提供准确的研究方向<sup>[46]</sup>。

大豆蛋白营养价值高, 富含人体所需的必需氨基酸, 价格实惠, 可替代动物蛋白用于鱼糜制品中, 降低成本的同时提高了产品质量, 生产中一般添加持水性、乳化性、凝胶性好的大豆分离蛋白<sup>[47]</sup>。江韬玲<sup>[48]</sup>将 6 种市售鱼糜制品中分离出的目的蛋白大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI)免疫印迹检测后, 发现原料和制品中有重复添加的嫌疑, 含量巨大, 降低了鱼糜制品的品质, 侧面加深了消费者食用后大豆致敏的几率。高消耗  $\omega$ -3 长链多不饱和脂肪酸(high consumption of  $\omega$ -3 long chain polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是丰富的氨基酸来源, 广泛存在于海产品和植物中, ELLA 等<sup>[49]</sup>对比分析了鱼油中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexenoic acid, DHA)和植物油中亚麻酸(alpha linolenic acid, ALA)、十八碳四烯酸(stearidonic acid, SDA)对大鼠 EA.hy926 内皮细胞的抗炎效果, 免疫印迹表明 DHA 的抗炎作用好, 证实海洋衍生的多不饱和

和脂肪酸抗炎效果优于植物。大闸蟹中蕴含着丰富的蟹膏和蟹黄, 位于蟹体的卵巢部位, 其含量组成是大闸蟹分级的重要标志。研究发现蟹膏和蟹黄的含量与孕酮(progesterone)密切相关, 孕酮属于孕激素受体(progesterin receptor, PR)的一类, 调控着蟹体内的卵巢发育, 能够促进蟹黄和蟹膏的生长<sup>[50]</sup>。陈浩等<sup>[51]</sup>用三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)为参考物研究孕激素受体在发育过程中的变化, 免疫印迹和免疫组化结果证实了卵巢发育过程中滤泡细胞和生殖细胞核中始终存在孕激素受体的蛋白, 孕酮作为主要激素不仅直接参与卵黄和卵巢的生成发育, 还能结合其他内分泌激素间接调控卵巢生长。该研究能够确立目的蛋白质在生长发育过程中的作用, 为后续大闸蟹发育作用机制探究和养殖经济调控起到参考效果。虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)的生鱼片质量与保水能力(water-holding capacity, WHC)密切相关, 受到载脂蛋白 A-I-1 (apolipoprotein A-I-1)、 $\alpha$ -肌动蛋白 26 ku (alpha-actin 26 ku-fragment)的调控影响。TIZIANA 等<sup>[52]</sup>使用免疫印迹和质谱联用分析了虹鳟鱼宰前不同养殖环境条件下肌肉变化, 结果表明目的蛋白的降解和完整性受损让鱼片的品质形状发生改变, 未来可使用特定的肌肉蛋白质作为肉片品质的评价指标。

蛋白质的特异性决定了蛋白质免疫印迹的结果, 水产品中目的蛋白的丰度与分布研究是解开蛋白质功能及作用的重要一环。蛋白质免疫印迹技术的发展可以提供合理实用的表达依据, 为品质控制增添一份保障。

## 3 总结与展望

随着我国“十四五”发展规划的开启和海洋强国战略的可持续发展, 水产品品质保障和多渠道的产品运用将紧贴人们的生活。水产品作为重要的优质蛋白质来源对于保障我国粮食总体安全、实施全面营养均衡战略、保障我国“蓝色粮仓”的高品质发展、促进我国渔业的高质量发展具有重要作用。水产品由于在生长、捕捞、加工、贮存和流通过程中外环境不断变化, 所涉及到的蛋白质变化机理错综复杂, 因此蛋白质相互之间的关系还有待于进一步研究。

水产品种类丰富, 来源广泛, 蛋白质丰富多变, 目标蛋白选择的局限性依然是困扰蛋白质免疫印迹技术方法的一大难题, 因此, 扩充蛋白质数据库的完整性势在必行, 应提升水产品目标蛋白在大范围样品检测中的丰度分析与数据对比, 建立不同时期蛋白质表达的相关性分析网络。此外, 将蛋白质免疫印迹技术测定的目的蛋白与基因组学、转录组学、代谢组学联合分析也是检测定量标准的一个发展趋势。未来, 可利用蛋白质免疫印迹技术进一步探究水产品与人体、动植物体、生态环境之间的关系, 为水产品蛋白质的机理研究及蛋白的高效利用、提高食品营养品质等方面提供技术支撑。

## 参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.

- Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas. China Fishery Statistics Yearbook 2020 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020.
- [2] 叶元土. 水产食品产业链发展关键问题的思考与发展机遇[J]. 饲料工业, 2021, 42(6): 1-8.
- YE YT. Analysis of development opportunities and core elements of aquatic food industry chain [J]. Feed Ind, 2021, 42(6): 1-8.
- [3] 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.
- LI TT. Studies on bio-preservation techniques and protein indicators of freshness in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) during refrigerated storage [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2013.
- [4] 黄卉, 熊雅雯, 李来好, 等. 鱼肉热煮过程中质构保持技术研究进展[J]. 南方水产科学, 2021, 17(3): 122-128.
- HUANG H, XIONG YW, LI LH, *et al.* Research progress on texture preservation technology of fish meat during hot boiling [J]. South China Fish Sci, 2021, 17(3): 122-128.
- [5] XIONG YL, GUO A. Animal and plant protein oxidation: Chemical and functional property significance [J]. Foods, 2021, 10(1). <https://doi.org/10.3390/foods10010040>
- [6] 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]. Nat Biotechnol, 1996, 14(1): 61-65.
- [7] 杜照奎, 徐慧君, 柯世省. 蛋白质 SDS-PAGE 电泳实验常见问题及改进措施[J]. 山东化工, 2019, 48(16): 135-136.
- DU ZK, XU HJ, KE SX. Common problems and improvements of SDS-PAGE electrophoresis for protein [J]. Shandong Chem Ind, 2019, 48(16): 135-136.
- [8] 赵永强, 李娜, 李来好, 等. 水产品质量与安全控制的蛋白质组学研究[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(3): 344-350.
- ZHAO YQ, LI N, LI LH, *et al.* Application of proteomics in regulation of aquatic products quality and safety [J]. J Dalian Ocean Univ, 2016, 31(3): 344-350.
- [9] TOWBIN S, GORDON H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications [J]. Proc National Acad Sci, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [10] GREEN M, SAMBROOK J. Molecular cloning: A laboratory manual [C]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [11] 姜斌. 蛋白质免疫印迹分析法实验条件的研究[J]. 实验技术管理, 2008, 25(5): 53-55.
- JIANG B. The research on experimental condition of the western blotting [J]. Exp Technol Manage, 2008, 25(5): 53-55.
- [12] 刘倩, 江世贵, 邱丽华, 等. 斑节对虾 Toll9 受体基因免疫功能的研究与表达分析[J]. 南方水产科学, 2017, 13(5): 63-71.
- LIU Q, JIANG SG, QIU LH, *et al.* Immune function and expression of Toll9 receptor gene from *Penaeus monodon* [J]. South China Fish Sci, 2017, 13(5): 63-71.
- [13] ALEXANDER SH, RICHARDS AL, BAILEY DJ, *et al.* The one hour yeast proteome [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(1): 339-347.
- [14] 章燕, 冯智田, 窦志勇, 等. 基于免疫学的微生物快速检测技术研究与应用现状[J]. 中国卫生监督杂志, 2020, 27(3): 253-256.
- ZHANG Y, FENG ZT, DOU ZY, *et al.* Research and application of rapid detection technology of microorganism based on immunology [J]. Chin J Health Inspect, 2020, 27(3): 253-256.
- [15] JANES K. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting [J]. Sci Signal, 2015, 37(18): 1-12.
- [16] 李欣, 赵玉红, 石建党, 等. 蛋白质免疫印迹技术在本科实验教学中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2020, 39(2): 195-198.
- LI X, ZHAO YH, SHI JD, *et al.* Application of western blotting technology in the undergraduate experimental teaching [J]. Res Explor Lab, 2020, 39(2): 195-198.
- [17] 张现峰, 杜学忠. 蛋白表面分子印迹技术[J]. 化学进展, 2016, 28(1): 149-162.
- ZHANG XF, DU XZ. Protein surface imprinting technology [J]. Prog Chem, 2016, 28(1): 149-162.
- [18] DANLEL L, SARA B. Food allergy: Etiology, allergens and analytical strategies [C]. Reference Module in Food Sciences, 2021.
- [19] PILLAI L, SCHUTZ AR, HARFORD J. A systematic approach to quantitative western blot analysis [J]. Anal Biochem, 2020, 593: 1-16.
- [20] 张永霞, 杨阳, 蔡秋风, 等. 水产食物过敏原及其抗原表位的研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2015, 5(5): 1-8.
- ZHANG YX, YANG Y, CAI QF, *et al.* The research of seafood allergens and its epitopes [J]. Chin Fish Qual Stand, 2015, 5(5): 1-8.
- [21] 王雅清, 倪皓洁, 李华韬, 等. 食物过敏原检测技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 264-269, 270.
- WANG YQ, NI HJ, LI HT, *et al.* Research advance in detection technology for food allergen [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(13): 264-269, 270.
- [22] BURES AW, TANG M, SICHERS C, *et al.* ICO: Food allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(4): 906-920.
- [23] 陈献雄, 邹玉兰, 刘志刚. 草鱼过敏原蛋白质的分离及其免疫学特性初步鉴定[J]. 南昌大学学报(医学版), 2018, 58(1): 32-35.
- CHEN XX, WU YL, LIU ZG. Separation and immunological identification of allergenic proteins in *Ctenopharyngodon idellus* [J]. J Nanchang Univ (Med Sci Ed), 2018, 58(1): 32-35.
- [24] 李阳, 刘楚怡, 薛文通. 鳕鱼致敏蛋白的识别及酶法水解的脱敏分析[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 299-303.
- LI Y, LIU CY, XUE WT. Identification of IgE-binding protein from mandarin fish and antigenicity reduced by proteinases hydrolysis [J]. Food Sci, 2012, 37(2): 299-303.
- [25] GAMEZ C, PAZ M, MANUEL B, *et al.* New shrimp IgE-binding proteins involved in immitte-seafood cross-reactivity [J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58: 1915-1925.
- [26] 傅玲琳, 梁亚云, 赵淑淑, 等. 中国对虾蛋白致敏小鼠模型构建及主要过敏原的双向电泳联合质谱鉴定[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 172-181.
- FU LL, LIANG YY, ZHAO SS, *et al.* Establishment of shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) protein-sensitized mouse model and identification of major allergens by 2-delectrophoresis combined mass spectrometry [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2017, 17(12): 172-181.
- [27] 王梦梦, 王学丽, 李娅茹, 等. 抑菌和烹饪处理对南美白对虾主要过敏原原肌球蛋白免疫活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(4): 41-47.
- WANG MM, WANG XL, LI YR, *et al.* Effect of bacteriostasis and cooking treatments on the immunological activity of major allergen tropomyosin in *Litopenaeus vannamei* [J]. J Food Sci Biotechnol, 2020, 39(4): 41-47.
- [28] 汪宁, 王锡昌, 蔡秋风, 等. 鱼类肌肉中过敏蛋白的检测与分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(2): 141-145.
- WANG N, WANG XC, CAI QF, *et al.* Detection and analysis of parvalbumin in fish muscle [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci Ed), 2008, 47(2): 141-145.
- [29] 马涛, 王一侠, 金振涛, 等. 三文鱼过敏原小清蛋白分离纯化及免疫结构鉴定[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(4): 1-5.
- WANG T, WANG YX, JIN ZT, *et al.* Purification and allergenicity identification of salmon parvalbumin [J]. Food Res Dev, 2017, 38(4): 1-5.

- [30] RAQUEL T, HELENA M, JAIVER B, *et al.* Fish muscle processing into seafood products reduces  $\beta$ -parvalbumin allergenicity [J]. *Food Chem*, 2021, 364: 1–7.
- [31] 孙承锋, 相悦, 李来好, 等. 鱼类贮藏过程中蛋白质相关品质变化机制的研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2019, 9(5): 8–16.  
SUN CF, XIANG Y, LI LH, *et al.* Research progress on the mechanism of protein related quality changes in fish during storage and transportation [J]. *Chin Fish Qual Stand*, 2019, 9(5): 8–16.
- [32] PICARD B, LEFERRE F, LEBRET B. Meat and fish flesh quality improvement with proteomic applications [J]. *Anim Front*, 2012, (2): 18–25.
- [33] MARCO C. High pressure processing of meat, meat products and seafood [J]. *Food Eng Rev*, 2010, (2): 256–273.
- [34] 费丹霞, 徐赞美, 肖宇, 等. 水产品过敏原消减技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(8): 1764–1768.  
FEI DX, XU ZM, XIAO Y, *et al.* Research progress of allergen reduction techniques in aquatic products [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(8): 1764–1768.
- [35] 杨煌. 美拉德反应影响拟穴青蟹主要过敏原致敏性的机理研究[D]. 厦门: 集美大学, 2019.  
YANG H. The mechanism study on the influence by Maillard reaction of the allergenicity of major allergens from *Scylla paramamosain* [D]. Xiamen: Jimei University, 2019.
- [36] 程华峰, 王福田, 朱亚军, 等. 不同热加工处理方式对中华绒螯蟹原肌球蛋白的消化稳定性和致敏性的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(22): 8303–8311.  
CHEN HF, WANG FT, ZHU YJ, *et al.* Effects of different thermal processing methods on digestibility and allergenicity of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* tropomyosin [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(22): 8303–8311.
- [37] 余慧琳, 曹敏杰, 蔡秋凤, 等. 不同加工处理对蟹类过敏原的影响[C]. *中国食品科学技术学会第七届年会论文摘要集*, 2010.  
YU HL, CAO MJ, CAI QF, *et al.* The influence of different processing methods on the crab allergen [C]. *Abstracts of Food Summit in China 7th Meeting of CIFST*, 2010.
- [38] 刘光明, 余惠琳, 黄秀秀, 等. 加工处理方式对蟹类原肌球蛋白的消化稳定性和过敏原性的影响[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(4): 14–22.  
LIU GM, YU HL, HUANG XX, *et al.* Effects of processing methods on digestibility and allergenicity of crab tropomyosin [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2011, 11(4): 14–22.
- [39] 蔡秋凤, 郭城, 刘光明, 等. 不同加工方式对鱼类主要过敏原免疫活性的影响[C]. *中国食品科学技术学会第八届年会暨第六届东西方食品业高层论坛论文摘要集*, 2011.  
CAI QF, GUO C, LIU GM, *et al.* Effects of different processing methods on the immunoreactivity of fish major allergen [C]. *Abstracts of Food Summit in China 2011 & 8th Annual Meeting of CIFST*, 2011.
- [40] CARRERA M, FIDALGO L, SARAIVA J, *et al.* Effects of high-pressure treatment on the muscle proteome of hake by bottom-up proteomics [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 4559–4570.
- [41] 焦奎. 以扇贝加工废弃物为原料的复合氨基酸螯合钙制备工艺及其功能评价[D]. 青岛: 青岛大学, 2019.  
JIAO K. Preparation technology and function evaluation of complex amino acid calcium chelate from scallop processing waste [D]. Qingdao: Qingdao University, 2019.
- [42] 罗文奇. 三种水生生物活性肽的制备分离与促免疫活性研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2019.  
LUO WQ. Preparation and isolation of three kinds of aquatic bioactive peptides and study on their immunogenic activities [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2019.
- [43] HE YF, HUANG H, LI LH, *et al.* Label-free proteomics of tilapia fillets and their relationship with meat texture during post-mortem storage [J]. *Food Anal Methods*, 2018, 11: 3023–3033.
- [44] HE YF, HUANG H, LI LH, *et al.* Changes in apoptosis factors and activation of caspase-3 in tilapia muscle during storage [J]. *Int J Food Prop*, 2018, 21(1): 1800–1810.
- [45] LEI M, LI YZ, WANG XL, *et al.* Protein biomarkers associated with frozen Japanese puffer fish (*Takifugu rubripes*) quality traits [J]. *Food Chem*, 2020, 327: 1–8.
- [46] 李芳, 吴晓娟, 王伟. 蛋白质氧化影响机体营养状况的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(3): 384–391.  
LI F, WU XJ, WU W. Recent advances on the effect of protein oxidation on the nutritional status of the body [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21(3): 384–391.
- [47] 刘紫薇, 朱明明, 王凤新, 等. 高温湿热处理对大豆分离蛋白的结构及其功能特性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(15): 157–164.  
LIU ZW, ZHU MM, WANG FX, *et al.* Effect of high temperature hydrothermal treatment on the structure and functional properties of soybean protein isolate [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(15): 157–164.
- [48] 江韬玲. 鱼糜制品中大豆蛋白的检测[D]. 厦门: 集美大学, 2014.  
JIANG TL. Detection of soybean proteins in surimi products [D]. Xiamen: Jimei University, 2014.
- [49] ELLA B, ELIZABETH M, PHILIP C. Comparing effects of polyunsaturated fatty acids derived from marine and plant sources on endothelial cell inflammation [C]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2020.
- [50] 宋萍, 叶海辉, 王桂忠, 等. 拟穴青蟹视神经节孕酮受体的免疫识别[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2010, 49(2): 282–285.  
SONG P, YE HH, WANG GZ, *et al.* Immunological recognition of progesterone receptor in optic ganglia of the mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *J Xiamen Univ (Nat Sci Ed)*, 2010, 49(2): 282–285.
- [51] 陈浩, 吴旭干, 刘智俊, 等. 三疣梭子蟹卵巢发育期间孕酮受体的免疫识别与分布[J]. *水产学报*, 2013, 37(8): 1173–1181.  
CHEN H, WU XG, LIU ZJ, *et al.* Immunorecognition and distribution of progesterone receptor in the swimming crab *Portunus trituberculatus* during ovarian development [J]. *J Fish China*, 2013, 37(8): 1173–1181.
- [52] TIZIANA B, GIULIA C, SOFIE B, *et al.* Identification of target muscle-proteins using western blotting and high-resolution mass spectrometry as early quality indicators of nutrient supply practices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Eur Food Res Technol*, 2019, (245): 401–410.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

## 作者简介



杨明畅, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工与质量安全。

E-mail: 841551330@qq.com



赵永强, 博士, 副研究员, 主要研究方向为水产品加工与质量安全。

E-mail: zhaoyq@scsfri.ac.cn