

大菱鲆表皮蛋白质组双向电泳技术的建立及优化

薛宝贵^{1,2} 黄智慧^{1,2} 周 洲¹ 马爱军^{1*}

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)
(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘 要 通过对表皮蛋白质提取方法、不同裂解液配方、等点聚焦程序和上样量等条件的对比试验,建立及优化了大菱鲆表皮组织蛋白质的双向电泳体系。试验采用改良的 TCA/丙酮和超声波提取相结合的方法提取大菱鲆表皮组织的全蛋白,裂解液配方根据 Bio-Rad 公司推荐的进行调整,使用 17 cm pH 4~7 的 IPG 胶条被动水化上样,上样量为 250 μg 。等点聚焦程序采用 30 V 线性 6 h、250 V 线性 2.5 h、500 V 线性 1.5 h、1 000 V 快速 2 h、4 000 V 线性 3 h、8 000 V 快速 3 h、8 000 V 线性 1 h、500 V 24 h,凝胶银染后用 Image Master 2D Platinum 7.0 软件进行分析,最终得到较满意的双向电泳图谱,具有较高的分辨率和重复性,为大菱鲆蛋白质组学的进一步研究奠定了基础。

关键词 大菱鲆 表皮组织 蛋白质 双向电泳

中图分类号 Q953;S965.399 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0041-07

Establishment and optimization of two-dimensional gel electrophoresis for epidermal proteome of turbot *Scophthalmus maximus*

XUE Bao-gui^{1,2} HUANG Zhi-hui^{1,2} ZHOU Zhou¹ MA Ai-jun^{1*}

(¹Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)
(²College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT The two-dimensional gel electrophoresis for the epidermal proteome of *Scophthalmus maximus* was established and optimized through comparative tests by using different extraction methods, isoelectric focusing programs and sample volumes. The total proteins of the turbot epidermis were extracted by the combination of improved trichloroacetic acid(TCA)/acetone and ultrasonic extractions. The lysis buffer based on the Bio-Rad recommendations was optimized. Protein of 250 μg was loaded on the 17cm pH 4-7 immobilized pH gradients (IPG) strips. The programs for the gel isoelectric focusing were 30V linear ramp, 6h/250V linear ramp, 2.5h/500V linear ramp, 1.5h/1000V rapid, 2h/4000V linear ramp, 3h/8000V rapid, 3h/8000V linear ramp, and 1h/500V 24h. The gel was stained with silver nitrate, scanned and analyzed using the Image Master 2D Platinum 7.0 software. The two-dimensional gel electro-

现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-50)、国家支撑计划专题(2006BAD01A12012)、农业公益性行业科研专项经费项目(nyhyzx07-046)和国家 863 计划课题(2006AA100302)共同资助

* 通讯作者。E-mail: maaj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85835103

收稿日期:2010-08-24;接受日期:2010-11-02

作者简介:薛宝贵(1982-),男,硕士研究生,主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: xbg.mydream@yahoo.com.cn, Tel: 15194286863

phoresis analysis of the epidermal proteome of the turbot was successfully established with high quality map of separation under the optimization of the experimental conditions, which will be a valuable preparation for further epidermal proteomics research of *S. maximus*.

KEY WORDS Turbot *Scophthalmus maximus* Epidermis Proteome 2-DE

蛋白质组学(Proteome)由 Wilkins 和 Williams 于 1994 年首先提出,意为“基因组在某个细胞或组织中所表达的全部蛋白质及其存在方式”。蛋白质组学的研究是联系细胞基因组以及细胞行为之间很好的桥梁,现已成为生命科学各领域研究的热点。双向电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学的核心分离技术之一,最初由 O'Farrell 等于 1975 年首次建立,然后日趋完善。迄今为止,双向电泳技术在生物、医学等领域已经获得了广泛应用,并取得了一系列的硕果(Harry *et al.* 2003; Yamagiwa *et al.* 2002),但对鱼类的研究报道较少,只对大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 的肝脏(李明云等 2010)、波斯鲟 *Acipenser persicus* 的卵蛋白和性腺(Keyvanshokoo *et al.* 2008,2009)、泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus* 的血清和肌肉(詹堃等 2008; Wu *et al.* 2004)、鲢鱼 *Hypophthalmichthys molitrix* 和鳊鱼 *Siniperca chuatsi* 的肌肉(Tang *et al.* 2007)、还有青鳉 *Oryzias latipes* 的肝脏(Mezhoud *et al.* 2008)等进行过基于双向电泳技术的蛋白质组学研究。

要进行蛋白质组的双向电泳分析,首先要对双向电泳的条件进行建立及优化。但不同的研究物种、不同组织进行双向电泳时条件各不相同。作者采用大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 表皮进行双向电泳时利用大黄鱼(李明云等 2010)的双向电泳的各种优化程序不能获得好的效果。为了获得大菱鲆表皮双向电泳的最佳条件,通过对蛋白提取方法、等电聚焦程序、IPG 胶条 pH 范围等的对比实验,建立了大菱鲆表皮双向电泳基本技术,以期能为大菱鲆表皮蛋白质组学的进一步研究奠定基础,并为其他鱼类的表皮蛋白质组学研究提供参考。

大菱鲆又名多宝鱼,分类上属于硬骨鱼纲 Osleichthyes, 鲽形目 Pleuronectiformes, 鲽亚目 Pleuronectoidei, 鲆科 Bothidae, 菱鲆属 *Scophthalmus*, 为原产于欧洲的著名海水养殖特有良种,是世界市场公认的优质比目鱼类之一。自然分布于大西洋东北部,北起冰岛,南至摩洛哥附近的欧洲沿海(雷霖霖 1983)。中国水产科学研究院黄海水产研究所于 1992 年“跨洋引种”将其引入我国,创建了“温室大棚+深井海水”的开放式工厂化养殖模式(雷霖霖等 2002; 马爱军等 2002)。近年来,气候变化异常,尤其是高温或低温灾害等,给大菱鲆养殖户带来了严重的损失。当大菱鲆的外界生长条件发生改变时,体表就作为大菱鲆的第一道防御门户,通过比较不同生理、病理过程中表皮组织蛋白质组的表达差异情况,可为表皮疾病及防御功能的机理提供重要的理论依据,但尚未见到有关大菱鲆表皮双向电泳技术的报道。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用工厂化养殖大菱鲆采自烟台天源水产公司,选取规格均一、健康无伤的大菱鲆幼鱼共 12 尾,体长 11.25 ± 0.50 cm, 体重 28.65 ± 2.00 g, 将其在冰上进行活体解剖,用金属棒敲击试验鱼的头部后,迅速用解剖刀取大菱鲆无内脏侧体表的表皮组织,液氮冻存带回实验室, -80 °C 保存备用。

1.2 试剂与仪器

17cm 固相 pH 梯度(Immobilized pH gradients, IPG)胶条(pH 3~10, 4~7)、两性电解质(Bio-Lyte, pH 3~10, 4~7)、二硫苏糖醇(Dithiotherito, DTT)和 0.5% 低熔点琼脂糖封胶液等购自 Bio-Rad; CHAPS、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(Tetramethylenediamine, TEMED)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三氯醋酸、过硫酸铵、甘氨酸、尿素、硫脲、矿物油、甘油等购自 BBI 公司;低分子质量蛋白标准、磷酸、甲酸和正丁醇等购自上海生工生物工程有限公司;高速低温离心机购自 Eppendorf 公司, Ettan IPG phor III 等电聚焦系统、Ettan DAL T six 大型垂直电泳系统、扫描仪 GS-800 和 Image Master 2D Platinum 7.0 图形分析软件均购自 Bio-Rad。

1.3 实验所需液体配置

(1)裂解液:尿素 7 mol/L、硫脲 2 mol/L、4% (w/v) CHAPS、0.2% IPG buffer、40 mmol/L DTT、10 μ l/L PMSF;(2)水化液:尿素 7 mol/L、硫脲 2 mol/L、2% (w/v) CHAPS、0.5% IPG buffer、1.8 mmol/L DTT、0.002%的 1% 溴酚蓝储备溶液;(3)SDS 平衡缓冲液 I:6 mol/L 尿素、75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、29.3% 甘油、2% SDS、0.002% 溴酚蓝、1% DTT;(4)SDS 平衡缓冲液 II:6 mol/L 尿素、75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、29.3% 甘油、2% SDS、0.002% 溴酚蓝、2.5% 碘乙酰胺;(5)10 \times SDS 电泳缓冲液:250 mmol/L Tris 碱、1.92 mol/L 甘氨酸、1% SDS;(6)30% T、2.6% C 单体储液:30% 丙烯酰胺、0.8% N、N'-甲叉双丙烯酰胺、用 0.45 μ m 滤膜过滤溶液、4 $^{\circ}$ C 避光储存;(7)琼脂糖密封液:25 mmol/L Tris 碱、192 mmol/L 甘氨酸、0.1% SDS、0.5% 琼脂糖、0.002% 溴酚蓝;(8)固定液:乙醇:冰醋酸:水=5:1:4;(9)漂洗液:30% 乙醇;(10)敏化液:2.5 mmol/L 硫代硫酸钠(0.62 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);(11)银染液:0.5 g AgNO_3 溶于 200 μ l 甲醛中,用去离子水定容至 250 ml,避光保存;(12)显色液:2 ml 敏化液、125 μ l 甲醛、7.0 g Na_2CO_3 ,定容至 250 ml;(13)终止液:5% 醋酸水溶液。

1.4 蛋白样品的制备与定量

取 3 份保存的大菱鲆表皮组织,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液清洗大菱鲆表皮至发白。滤纸吸干,然后分别采取以下两种方法提取表皮组织中的蛋白质。

1.4.1 超声波提取法

准确称取样品 150 mg,放入加有液氮的陶瓷研钵(高温蒸汽灭菌处理)中,研磨成粉末状,转移至 1.5 ml 离心管中,按照比例快速加入裂解液 500 μ l。然后超声波破碎表皮组织(200 W,工作时间 5s,间歇时间 6 s,共 8 次)。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。用 Bradford 法测定表皮蛋白浓度,样品分装后-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 TCA/丙酮沉淀和超声波提取结合法

配置 10% 的 TCA/丙酮溶液(TCA:丙酮=1:10),准确称取样品 150 mg,放入加有液氮的陶瓷研钵中,研磨成粉末状。加入 500 μ l 10% 的 TCA/丙酮溶液,再加入 0.1% (w/v) 的 DTT,然后-20 $^{\circ}$ C 过夜,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 30 min,弃上清液。加入裂解液 500 μ l,震荡混匀。然后超声波破碎表皮组织(200 W,工作时间 5 s,间歇时间 6 s,共 8 次)。4 $^{\circ}$ C 静止 2~3 h,静止期间每 0.5 h 颠倒 1 次。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液;用 Bradford 法测定表皮蛋白浓度,样品分装后-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 双向电泳

1.5.1 第一向等电聚焦电泳(IEF)

17 cm pH 3~10 IPG 胶条的总上样量为 250 μ g,取大菱鲆表皮蛋白样品,按照比例与水化液混匀,总上样体积为 350 μ l,然后 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min,离心后加样至泡涨盘中。将 IPG 胶条取出室温放置 5 min,用镊子撕去 IPG 胶条表面的保护膜,胶面朝下放入泡涨盘中,加入矿物油覆盖液,被动水化 14~16 h。IEF 参数设定主要按照 Gorg(2000)描述的方法。等电聚焦程序主要设计 3 个对比,分别为等电聚焦程序 I:300 V 线性 1 h、500 V 线性 5 h、1 000 V 线性 1 h、2 500 V 线性 1 h、8 000 V 快速 3 h、8 000 V 线性 2 h、500 V 24 h;等电聚焦程序 II:250 V 线性 2.5 h、500 V 线性 1.5 h、1 000 V 快速 2 h、4 000 V 线性 3 h、8 000 V 快速 3 h、8 000 V 线性 1 h、500 V 24 h;等电聚焦程序 III:30 V 线性 6 h、250 V 线性 2.5 h、500 V 线性 1.5 h、1 000 V 快速 2 h、4 000 V 线性 3 h、8 000 V 快速 3 h、8 000 V 线性 1 h、500 V 24 h。每个 IPG 胶条的极限电流不超过 50 μ A/根;等电聚焦温度为恒温 20 $^{\circ}$ C。

1.5.2 IPG 胶条的平衡

等电聚焦后,从电泳槽中取出 IPG 胶条,用滤纸蘸去表明矿物油,胶条平衡的操作步骤以及平衡缓冲液的配制方法参照 Bio-Rad 仪器操作手册。

1.5.3 第二向十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

配制 12.5% SDS-PAGE 凝胶,将平衡后的 IPG 胶条置于凝胶的上方。注意胶条和凝胶接触的界面上不能有气泡。蛋白标准滴加在小滤纸片上,置于胶条一侧,再用琼脂糖密封液封闭胶条。待琼脂糖凝固后,将凝胶转移到电泳槽中,加入缓冲液,设置电泳运行条件:起始电压 2 W/根,1 h,待样品跑出 IPG 胶条,并在凝胶中浓缩成一条线后改到 15 W/根,3 h,温度恒温 10 ℃。

1.5.4 染色、扫描及图像分析

(1)固定:凝胶取下后,用去离子水清洗胶面,然后加入固定液振荡至少 30 min;(2)漂洗:加入新鲜漂洗液,振荡 15 min;(3)水化:加入去离子水水化 30 min;(4)敏化:用敏化液浸泡凝胶 2.5 min;(5)水洗:凝胶用去离子水洗 3 遍,每次 20 s;(6)银染:用银染液覆盖凝胶,轻微振荡 30 min。(7)水洗:重复第 5 步;(8)显色:加入新鲜配置的显色液,显色 2~5 min;(9)洗胶:迅速用去离子水漂洗凝胶 20 s;(10)终止:迅速加入终止液,终止显色反应;(11)水洗 1 次,凝胶用 GS-800 扫描仪扫描,然后凝胶图像用 Image Master 2D Platinum 7.0 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 不同蛋白提取方法对蛋白提取质量的影响

要获得高分辨率和重复性较好的双向电泳图谱,其最关键的一步便是双向电泳的第一步,即蛋白样品的制备(Pandey *et al.* 2000)。蛋白质样品的制备由于样品的结构和特性各异,因此样品的来源不同,其裂解的缓冲液组成也各不相同。为了尽可能地提高样品蛋白质的溶解度,减少对蛋白质的人为修饰,降低样品的离子强度,绝大多数样品都需要通过多次的实验才能摸索到最适宜的条件(Lilley *et al.* 2002)。本实验所用的裂解液中,DTT 是还原剂,可以破坏二硫键,使蛋白完全伸展,促进溶解;去垢剂可以溶解蛋白质变性后暴露出的疏水基团,两性离子去垢剂 CHAPS 既可以保证蛋白质仅依靠自身的电荷进行移动,同时又最大限度地降低样品的离子强度;少量 IPG buffer 的加入有助于减少蛋白质基质间的疏水相互作用,改善凝胶的电导率,从而增加表皮蛋白的溶解性;硫脲可显著增强裂解液的溶解能力以及防沉降的问题;PMSF 为蛋白酶抑制剂,可抑制多种蛋白酶活性,防止蛋白质降解,保持蛋白的完整性。

本实验采用了超声波提取法和 TCA/丙酮法与超声波法相结合的方法分别提取大菱鲆表皮蛋白,pH 4~7 的胶条用等点聚焦程序 III 进行实验。快速银染后,结果见图 1。图 1-A 表示的是用超声波法提取表皮蛋白的双向图谱,可以看到图上蛋白点很少,表明蛋白并没有很好的溶解到裂解液中,显然不能满足实验的需要。图 1-B 采用了 TCA/丙酮法和超声波提取相结合的方法,达到了比较满意的效果。由于大菱鲆表皮组织中含有部分高峰度蛋白,采用 TCA/丙酮法处理过的表皮样品,去除了大部分高丰度蛋白,从而可以使更多的低丰度蛋白显示出来。同时,与超声波破碎法相结合可以使蛋白更好地释放出来。本实验采用两种方法相结合的方法提取表皮蛋白质,突破了以往实验中仅运用一种方法所带来的弊端,可以考虑作为一种较为可靠的蛋白提取方法。

2.2 IPG 胶条 pH 范围的选择

由于生物中大部分蛋白的等电点在 pH 4~8 之间,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,从而造成中间蛋白点达不到高的分辨率(Ong *et al.* 2001)。而使用窄范围的 pH 梯度的胶条可以大大提高分辨率和灵敏度,但同时也会丢失其 pH 梯度范围之外的蛋白。选择一个合适的 pH 梯度范围的胶条对改善实验结果有着重要的作用。本实验开始使用 pH 梯度 3~10 IPG 胶条进行 2-DE,结果如图 2-A 所示。可以看出大菱鲆表皮蛋白绝大多数分布在 pH 4~7 范围之内。所以,为了提高对大多数蛋白质的分辨率,作者选择使用 pH 4~7 的胶条进行下一步的实验。如图 2-B,使用 pH 4~7 IPG 胶条可以获得大菱鲆表皮蛋白很好的双向电泳图像。

2.3 等电聚焦程序对大菱鲆表皮蛋白双向电泳图谱的影响

等电聚焦是双向电泳中的关键步骤,聚焦效果的好坏关系到蛋白分离的成败(Nagalla *et al.* 2007)。目前报道的程序也都不一样,本实验采用了 3 种不同的等电聚焦程序。由于大菱鲆是海水样品,蛋白提取液中的

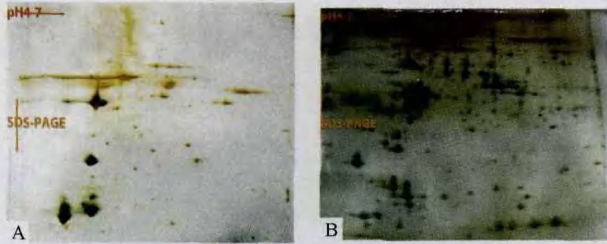


图 1 不同提取方法对大菱鲆表皮蛋白双向电泳的影响
 Fig. 1 Effects of different extraction methods on 2-DE
 A: 超声波提取法; B: TCA/丙酮法与超声波提取相结合法
 A: Ultrasonic extraction;
 B: Combination of TCA/acetone and ultrasonic extraction

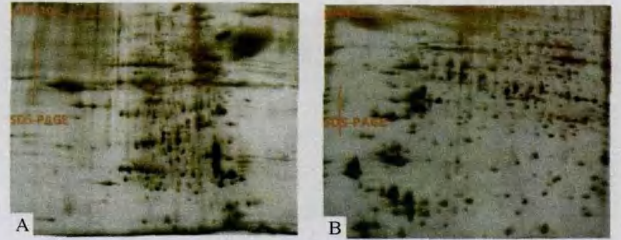


图 2 不同 pH 梯度 IPG 胶条对双向电泳的影响
 Fig. 2 Effects of different pH IPG strips on 2-DE

离子强度偏高,在聚焦过程中为了尽量除去溶液中的盐离子对聚焦的影响,等点聚焦程序 I、II、III,逐步增加了除盐的步骤及时间,同时采用了长时间缓慢升压的方法,并在胶条的两端放置盐桥,效果比较理想。等电聚焦程序 III 与 I、II 图谱中的蛋白点的横条纹相比减少。



图 3 不同等电聚焦程序对双向电泳图谱的影响(I、II、III)
 Fig. 3 Effects of different isoelectric focusing programs on 2-DE

2.4 凝胶显影时间对结果的影响

凝胶染色过程中显影时间的长短对实验结果的影响比较明显。显影时间过长会使凝胶背景很深而影响结果分析,凝胶显影时间过短(60 s)会使蛋白点显色不充分,造成蛋白点的丢失(图 4-I),只有当显影时间恰当(100 s)时才能使蛋白点充分地显示出来(图 4-II)。因此,操作中凝胶的显影时间应当恰当,不能太长或太短,否则会使凝胶的背景过深或是过浅而干扰蛋白质差异点的搜寻。

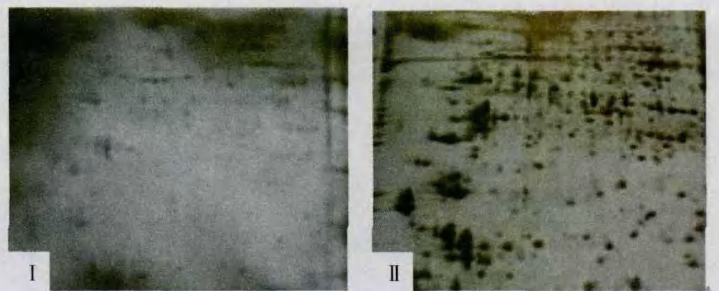


图 4 凝胶显影时间过短对双向电泳图谱的影响(I、II)
 Fig. 4 Influence of insufficient time for gel autoradiography on 2-DE

2.5 IPG 胶条转移对双向电泳图谱的影响

当蛋白质从第一向 IPG 胶条转移到第二向-十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶时,常会引起蛋白质的丢失。尤其是当 IPG 胶条放入浓缩胶上时,在胶面不平、技术不熟练等情况下,常会在 IPG 胶条引入气泡而导致蛋白点的丢失,导致双向电泳图谱失败(图 5)。张丽军等(2004)改进了胶条的转移过程:在第二向的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶上加一层薄薄的琼脂糖溶液,然后将 IPG 胶条转移上去,最后封住胶条的上面,获得了很大的成功率。

3 小结

试验通过超声波法和 TCA/丙酮相结合的方法提取大菱鲂表皮蛋白,通过双向电泳图谱鉴定提取的效果,然后利用 17 cm pH 3~10 的 IPG 胶条判断大菱鲂表皮蛋白分布的 pH 范围,最后利用 17 cm pH 4~8 的 IPG 胶条双向电泳得到试验所需要的凝胶图谱。

17 cm IPG 胶条的上样量为 250 μg ,利用 Bio-Rad 推荐的裂解液配方,采用最优的等电聚焦程序 III,设置长时间低压有效地去除盐离子,提高聚焦电压和聚焦功率都能显著改善图谱的横条纹问题。采用改进的 IPG 胶条转移方式,可以有效地避免胶条和凝胶之间的气泡。合理的凝胶显影时间使蛋白点清晰地显示出来。通过以上步骤的优化,可以得到蛋白斑点数和分辨率相对较高的双向电泳图谱,为后续开展大菱鲂表皮蛋白差异表达的研究奠定基础。



图 5 胶条转移存在气泡对双向电泳图谱的影响
Fig. 5 Influence of bubbles in strips transition on 2-DE

参 考 文 献

- 马爱军, 雷霖霖, 陈四清, 张秀梅, 陈大刚. 2002. 大菱鲂不同产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响. 海洋与湖沼, 33(1): 75~82
- 成海林, 钱小红. 2000. 蛋白质组研究的技术体系及其研究进展. 生物化学和生物物理进展, 27(6): 584~585
- 李祥云, 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): 1 003~1 111
- 李太武, 苏秀榕, 詹 堃. 2008. 泥鳅肌肉组织蛋白质双向电泳体系的建立. 台湾海峡, 27(3): 403~407
- 张丽军, 谢锦云, 张 健, 梁宋平. 2004. 2-DE 中 IPG 胶条转移到 SDS-PAGE 中的技术改进. 生命科学研究, 8(3): 225~230
- 雷霖霖. 1983. 英国养殖大菱鲂简况. 水产科技情报, 2: 26~27
- 雷霖霖, 门 强, 王印庚, 王秉新. 2002. 大菱鲂“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式. 海洋水产研究, 23(4): 1~7
- 詹 堃, 李太武, 苏秀榕. 2008. 泥鳅肌肉组织蛋白质双向电泳体系的建立. 台湾海峡, 27(3): 403~407
- Görg, A., Postel, W., and Günther, S. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21(6): 1 037~1 053
- Harry, J. K., Wilkins, M. R. Herbert, B. R. *et al.* 2003. Proteomics: capacity versus utility. Electrophoresis, 21: 1 071~1 081
- Keyvanshokoh, S., and Vaziri, B. 2008. Proteome analysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova. Animal Reproduction Science, 109(1-4): 287~297
- Keyvanshokoh, S., Kalbassi, M. R., Hosseinkhani, S. *et al.* 2009. Comparative proteomics analysis of male and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads. Animal Reproduction Science, 111(2-4): 361~368
- Klose, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik, 26(3): 231~243
- Lilley, K. S., Razaq, A., and Dupree, P. T. 2002. Two dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantization. Current Opinion in Chemical Biology, 6: 46~50
- Mezhoud, K., Bauchet, A. L., Chhateau-Joubert, S. *et al.* 2008. Proteomic and phosphoproteomic analysis of cellular responses in medaka fish (*Oryzias latipes*) following oral gavage with microcystin-LR. Toxicon, 51(8): 1 431~1 439
- Nagalla, S. R., Canick, J. A., Jacob, T. *et al.* 2007. Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers. J. Proteome Res. 6(4): 1 245~1 257
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250(10): 4 007~4 021
- Ong, S. E., and Pandey, A. 2001. An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics. Biomolecular Engineering, 18: 195~205
- Pandey, A., and Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomics. Nature, 405(6788): 837~846
- Pennington, S. R., Wilkins, M. R., Hochstrasser, D. F. *et al.* 1997. Proteome analysis: from protein characterization to biological function. Trends in Cell Biology, 7(4): 168~173
- Tang, J. Z., Zhang, D. Y., Cheng, J. *et al.* 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
- Wu, Y. J., Wang, S. Y., and Peng, X. X. 2004. Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma. Fish & Shellfish Immunology, 16(3): 381~389
- Yamagiwa, H., Sarkar, G., Charlesworth, M. C. *et al.* 2002. Two-dimensional gel electrophoresis of synovial fluid; method for detecting candidate protein markers for osteoarthritis. J. Orthop. Sci. 8: 482~490