

以蛋白質體辨別



市場上販售的魚介類常常未標明種別，倘若販售的是有毒魚介類，又不幸被消費者食用，則後果堪慮。

有毒魚種

蛋白質體的觀念首度於 1994 年在二維電泳會議中提出，

並在 1995 年闡述於學術期刊論文中。

其後蛋白質體便成為各學術會議的熱門主題，

每年有數百篇論文在著名期刊中發表。

■ 陳泰源 黃登福

每年歲末年初是大家忙著採買年貨的時節，其中南北雜貨，如魷魚絲、香魚片、蜜餞等是民眾爭相購買的應景食品。但是這些年貨大都是散裝或簡易包裝，並沒有食品衛生單位要求的法定標示，不知消費者是否注意到食用的安全性？沒有標示的食品，會令人擔憂是否貨真價實？是否有違法或過量的食品添加物，例如防腐劑、色素等？是否有不當的加工、流通過程？

由於市場上販售的魚介類多數未標明種別，而且加工後的產品也無法從外觀判斷其原料種別。倘若販售的是有毒魚介類，又不幸被消費者食用，則後果堪慮。

有報告指出，在墨爾本以每公斤 15 美元販售的鯛魚，其實只是每公斤 4 至 6 美元的廉價魚種。在佛羅里達州也有類似的情況，81 件標示是紅鯛魚的魚片檢體，僅有 30% 被鑑定是真品。至於國內，在市售香魚片的毒性調查中，發現有 11.9% 的產品含有輕微河魴毒性，衍生出消費者食用安全的疑慮。河魴是日本人相當喜愛食品，而河魴毒卻是一大困擾，因此河魴料理師傅需要通過嚴謹的廚師證照考試。但在台灣這一制度尚未周全，因此近年來曾爆發數起河魴毒中毒案例，也導致國人喪失寶貴的生命。

台灣產主要有毒和無毒河魴魚種

兔頭魴科河魴種類有十多種，其中有有毒種月尾兔頭魴（產量小於5%）和無毒種克氏兔頭魴（產量約80%）外貌相似，極易混淆，導致誤用有毒河魴魚種做為香魚片原料。背部小棘密集分布且從頭部延伸到背鰭，以及尾鰭中央明顯凹陷呈半月形，是月尾兔頭魴的典型特徵。



為杜絕業者摻假謀取不法利益，造成食用安全的顧慮，水產品的來源物種鑑定實是刻不容緩。如何有效區分有毒和無毒的河魴種類及加工產品，顯得日趨重要。以基因法或蛋白質鑑定法都能有效判定魚種，本文說明十二烷基硫酸鈉－聚丙烯醯胺膠體電泳法（sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS - PAGE）和等電點聚焦電泳法（isoelectric focusing electrophoresis, IEF）的理論和操作方法，並介紹在後基因體

時代的關鍵技術以及在魚種鑑定上的應用。

SDS-PAGE 法

基礎理論 電泳是一種提供外加電場來分離帶電粒子，依粒子大小、電荷數、形狀等不同而有不同分離程度的技術。SDS - PAGE的原理是加入一種陰離子變性劑十二烷基硫酸鈉 SDS，它會與大部分蛋白質產生疏水性作用，並以一定比例與蛋白質結合，使這些蛋白質失去本身的電荷，同時形成一形狀穩定且帶負電荷的十二烷基硫酸鈉－聚丙烯醯胺蛋白質聚合物。因此在 SDS - PAGE 中，蛋白質的移動速率僅與本身分子量的大小有關，可據以判斷蛋白質的純度及其組成次單元的分子量。

操作流程 主要分3個部分，分別是蛋白質的抽取、電泳的分析和膠片的染色。首先取魚肉溶於適當體積的水中，經均質化、離心及過濾後，其上層液就是水溶性蛋白質。把樣品與樣品緩衝液混合加熱後，取適當體積注入樣品槽中，提供一外加電場，在固定電壓或電流下開始泳動。電泳後把膠片取出以考馬斯藍或銀染色，再去掉染劑，最後以目視法或用密度分析儀計算並分析其分子量組成。



水產品來源物種的鑑定可杜絕業者摻假謀取不法利益，也可免除食用安全上的顧慮。

IEF 法

基礎理論 主要以樣品本身所帶的電荷來分離物質，與分子量大小無關，這個特性與 SDS - PAGE 不同。蛋白質是兩性物質，當淨電荷是零時，就是等電點。若外在環境酸鹼值 (pH) 與蛋白質的等電點相同時，蛋白質會停止泳動，因此可利用 pH 梯度來達到分離不同等電點蛋白質的目的。

操作流程 與 SDS - PAGE 相似，把低分子量的有機酸和鹼或電解質加入膠片配製液，使其成膠後經預對焦，即加入一外加電場，使膠片中的 pH 成梯度分布狀態，再把蛋白質注入這系統中。在外加電場驅動下，每個次單元蛋白質會停在一固定的 pH 點上，這時的 pH 就是蛋白質本身的等電點。隨著膠片上 pH 梯度不同，不同等電點的蛋白質會分布在膠片上不同位置，而達到分離的目的。

比較上述二種方法，IEF 較 SDS - PAGE 有更佳的解析度，但操作繁雜，費用也較高，SDS - PAGE 是最簡單常用的分析方法，且費用最低。

蛋白質體

蛋白質體 (proteome) 的觀念首度於 1994 年在二維電泳會議中提出，並在 1995 年闡述於學術期刊論文中。其後蛋白質體便成為各學術會議的熱門主題，每年有數百篇論文在著名期刊中發表。截至目前，美國國家醫學圖書館期刊文獻檢索系統 (PubMed) 中有關蛋白質體學的文章已近萬篇，包含回顧文章二千餘篇。

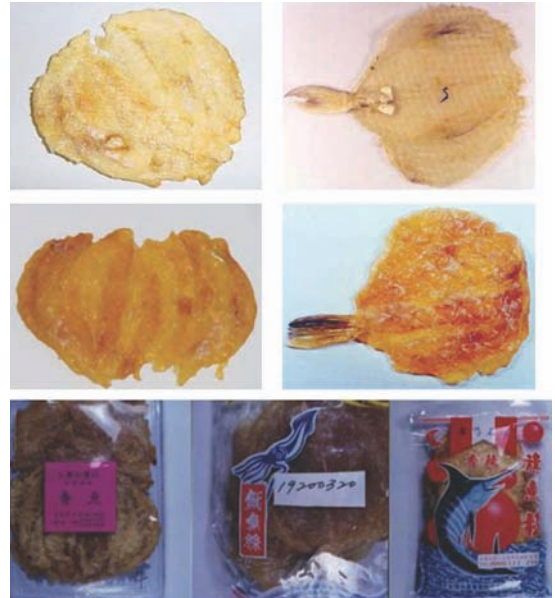
蛋白質體意指個體內所有被基因體 (genome) 表達的蛋白質，包括特定的細胞、組織、臟器等基因經轉錄及轉譯產生的全部蛋白質。蛋白質體會受成長分化、外在環境、疾病、老化等影響而變化，因此蛋白質體學是以廣泛的角度，觀察生物體面臨生理轉變或疾病反應時，整體蛋白質定性和定量的變化，以及蛋白質間交互作用等表現情形，並非針對單一蛋白質進行研究，而是探討整個蛋白質體內蛋白質的所有變化。

蛋白質體學在生物學上的應用，最常使用的是找出具有「質」與「量」改變的蛋白質。許多疾病的產生並非單純是某一種蛋白質失調所造成的，而是整個蛋白質網絡發生改變所造成的。近幾年來，已逐漸建立很多單一細胞或組織的蛋白質體資料庫。

蛋白質體學的技術涵蓋很多層面，大抵上包含 3 大部分，即純化分離技術、生物質譜儀技術，以及後續電腦程式的蛋白質資料庫和生物途徑模擬等。第一部分在純化分離技術上，一般可區分成膠體分離技術 SDS - PAGE、等電點聚焦電泳或二維電泳等，和非膠體分離技術 - 液相層析系統。

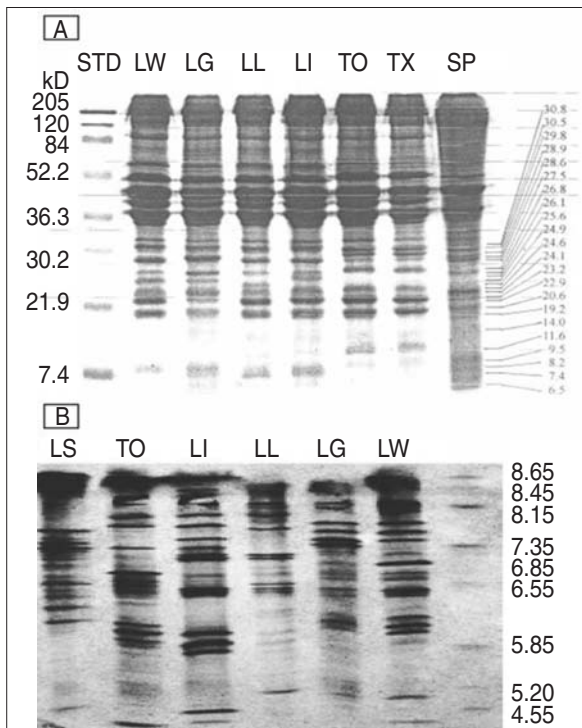
二維電泳是最被廣泛使用的方法，通常最多每個細胞可分離出 1,000 ~ 3,000 個蛋白質。另一方面，液相層析結合線上二次質譜儀系統，先以酵素使細胞中所有的蛋白質水解，再分析已水解的蛋白質片段，可解決二維電泳中的問題。

蛋白質體意指個體內所有被基因體表達的蛋白質，包括特定的細胞、組織、臟器等基因經轉錄及轉譯產生的全部蛋白質。蛋白質體學在生物學上的應用，最常使用的是找出具有「質」與「量」改變的蛋白質。



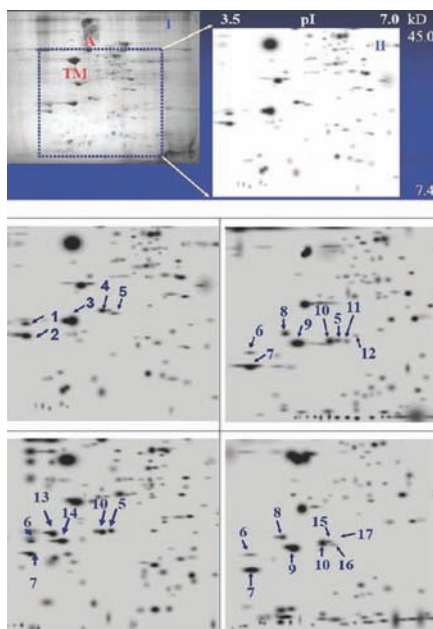
台灣市面上販售的香魚片 在台灣，香魚片常以散裝或簡易包裝型態販售，香魚片製品須留下尾鱗部分以做為初步判別的依據，再進一步以蛋白質或基因方法鑑定其來源魚種。

目前最常做為魚種鑑定的蛋白質標誌，是輕鏈肌凝蛋白和魚類主要過敏原，它們都是小分子量的蛋白質，在不同魚種中有多種次組成，且不易被魚類加工過程如酸、鹼水洗，加熱或乾燥等所破壞。因此，這二類蛋白質可用來鑑定魚類和其相關製品。



台灣產主要有毒和無毒河魨魚種的蛋白質一維電泳圖 (A) 是 SDS 膠體電泳圖譜，30 kD 以下小分子量的蛋白質可鑑別河魨魚種。(B) 是等電點聚焦電泳圖譜，不同河魨魚種的蛋白質等電點有明顯差異性。其中 LL 是指有毒種一月尾兔頭魨，TO 是指有毒種—瀧紋河魨。

台灣產主要有毒和無毒河魨魚種的蛋白質二維電泳圖 上排左邊是實驗原圖，右邊是電腦程式模擬圖，A 是指肌動蛋白，TM 是指原肌蛋白。中排及下排 4 張是電腦模擬圖，從圖中得知酸性低分子量蛋白質具有河魨種別特異性。



然而，這二項技術雖可分離高濃度的蛋白質，如持家性 (house-keeping) 和結構性蛋白質，但低濃度的蛋白質通常會被掩蔽而無法鑑定。因此，為分離更多的蛋白質與了解它們的生物功能性，在二維電泳或液相層析的分離系統之前可先進行粗劃分。例如在次細胞蛋白質體中胞器純化就是必須的分離步驟，為的是了解細胞內胞器蛋白質的分布與生物功能。

第二部分是蛋白質質譜儀技術。目前的質譜儀技術主要包含電灑—離子化法、基質輔助雷射脫附／離子化—飛行時間法及液相層析—四極棒法等。

藉由質譜儀的數據可得到肽質量指紋圖。以胰蛋白酶或其他蛋白質水解酵素得到蛋白質水解產物—肽，再用基質輔助雷射脫附／離子化—飛行時間質譜儀得到質量質譜圖，並比對儀器所附軟體資料庫的理論值與網路上蛋白質序列資料庫，便可鑑定出蛋白質身分。另外，使上述所得肽進行分子碰撞，可得到蛋白質的胺基酸序列。或由電灑離子化—四極棒／飛行時間法，即磁場型質量分析的二次質譜法，也可得到蛋白質的胺基酸序列。

第三部分是蛋白質資料庫。在後基因體時代，蛋白質分析鑑定工作不再遙不可及，主要原因是自 DNA 定序結果所推演建立的大量蛋白質序列資料庫可供查詢比對。例如進行人類、大腸桿菌或酵母菌的研究時，這些生物的 DNA 已完整定序，且得到相對應的蛋白質序列。這時相關的蛋白質身分鑑定僅需進行序列比對工作，而不用逐一地進行蛋白質定序實驗。網路資料庫中有許多參數可供使用，包含蛋白質的分子量、等電點、電荷數、胺基酸組成、肽片段分子量資料、N 端或 C 端的標籤序列等。

鑑定水產品來源物種

搜尋硬骨魚類的相關蛋白質序列資料庫可找到約 23,000 條胺基酸序列，相對地核苷酸序列卻可找到約 610,000 條。由此可知在硬骨魚類已知的核苷酸序列中，相對應的蛋白質序列僅有約 4% 被了解。直至今日，以蛋白質體鑑定水產品來源物

種或相關功能性蛋白質，仍是水產學界努力的目標。

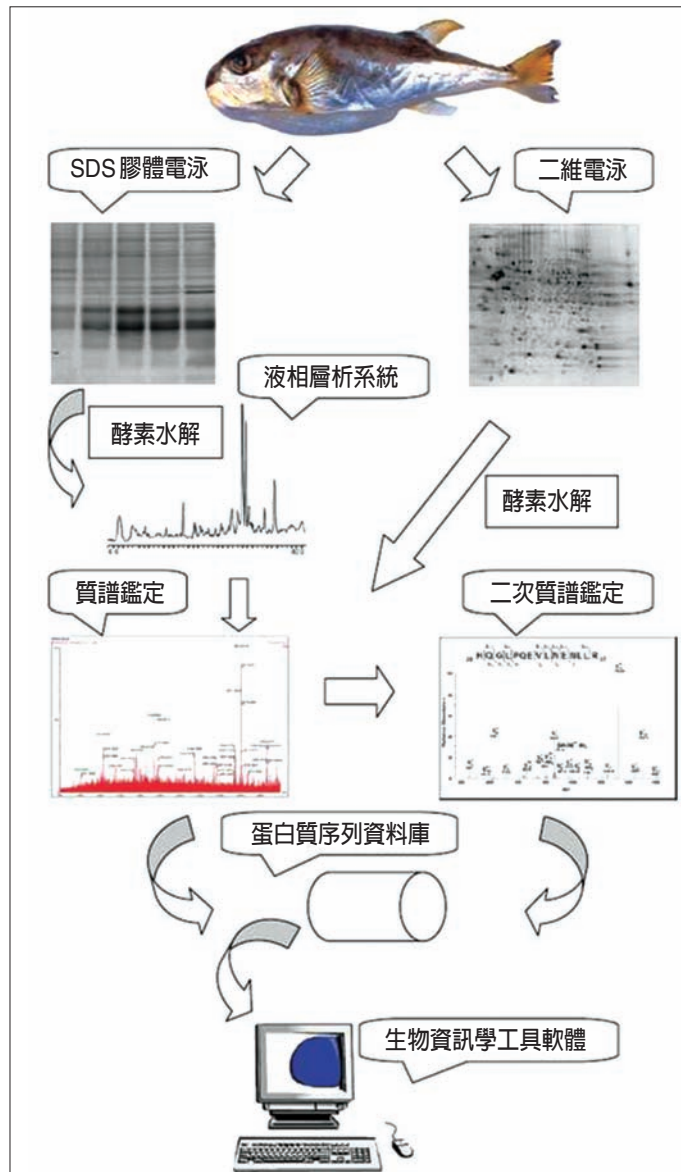
目前最常做為魚種鑑定的蛋白質標誌，是輕鏈肌凝蛋白和魚類主要過敏原，它們都是小分子量的蛋白質，在不同魚種中有多種次組成，且不易被魚類加工過程如酸、鹼水洗、加熱或乾燥等所破壞。因此，這二類蛋白質可用來鑑定魚類和其相關製品。

在國外，以蛋白質體學技術分析 parvalbumin 的次組成，被成功應用在親緣接近的鱈魚魚種鑑定上，而且也找到相對應魚種的 parvalbumin 的胺基酸序列差異性。在國內，親緣及外觀相當近似的有毒河魨魚種，也可輕易地以蛋白質體技術加以辨別。除了魚種鑑定外，蛋白質體學技術在水產品上的應用，主要有鮮度指標鑑定、死後肌肉的生化變化、加工處理的影響等。

近幾年來，蛋白質體學已應用到廣義生物學所涵蓋的各研究領域，並有卓越的貢獻，尤其在生物醫學上，例如蛋白質交互作用、胞器蛋白質體、癌症相關醫療、中草藥研發、單株抗體應用等。蛋白質體也已應用在水產品的安全性、來源鑑定、營養價值評估、鮮度指標、加工影響等研究上。

未來在水產界的蛋白質體學研究，尚有很大的發展空間，例如：高營養價值的水產蛋白質的功能性探討，以及對人體健康的完整評估；建立簡易快速的水產品鑑定技術，做為標準的檢驗操作程序；尋找水產品鮮度指標，或死後生化變化具代表意義的蛋白質標誌，以延長水產品的保鮮期限；水產品食用安全性，包含水產品病原菌、過敏性蛋白質，或其他因不當加工、流程序所引起之潛在危險因子；環境荷爾蒙等相關因子對水產生物的危害。

在國內，親緣及外觀相當近似的有毒河魨魚種，也可輕易地以蛋白質體技術加以辨別。除了魚種鑑定外，蛋白質體學技術在水產品上的應用，主要有鮮度指標鑑定、死後肌肉的生化變化、加工處理的影響等。



蛋白質體學流程圖

陳泰源

中央研究院生物化學研究所

黃登福

台灣海洋大學食品科學系