曹莹莹, 郭晓蕊, 李怀玉. 肌球蛋白的提取纯化及羟自由基氧化对其氧化位点的研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(11): 137−148. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060012
CAO Yingying, GUO Xiaorui, LI Huaiyu. Extraction and Purification of Myosin and the Effects of Hydroxyl Radical Oxidation on Its Oxidation Sites[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(11): 137−148. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060012

· 研究与探讨 ·

肌球蛋白的提取纯化及羟自由基氧化对其氧化位点的研究

曹莹莹*, 郭晓蕊, 李怀玉
（兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050）

摘　要: 本研究通过沉淀离心法提取新鲜羊肉中肌球蛋白，经柱层析法纯化后，用硫酸铵盐析法与超滤离心法进行浓缩。结果表明：优化后的蛋白提取工艺更高效，离子交换柱中肌球蛋白的最佳上样量为 20 mg；硫酸铵盐析的最优饱和度是 50%。通过设置 H_2O_2 浓度梯度（0、0.5、1、5、10、20 mmol/L）构建羟自由基氧化体系，对肌球蛋白进行不同程度的氧化处理，进而探究羟自由基氧化对肌球蛋白结构和氧化位点的作用机制。研究表明，随着 H_2O_2 浓度的增加，在 20 mmol/L H_2O_2 处理条件下，肌球蛋白的羰基含量相较于对照组（0 mmol/L）增加了 2.376 倍、总巯基含量降低了 37.02%、游离巯基含量降低了 53.24%、离子键含量降低了 50.98%、氢键含量降低了 50.85%，但二硫键含量呈现先升后降趋势，当 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L 时达到峰值，是对照组含量的 2.28 倍。全自动氨基酸分析仪测得 Cys、Tyr、Phe 和 His 这四种氨基酸容易氧化，且难易顺序为 Cys>Tyr>His>Phe。LC-MS/MS 检测显示在轻度氧化时，其主要攻击的是 SH1-SH2 周围的蛋白。在 20 mmol/L H_2O_2 重度氧化时，肌球蛋白发生了大量的聚集，这些聚集主要发生在肌球蛋白的头部螺旋区以及 1502~1783 区。

关键词: 肌球蛋白, 柱层析纯化, 结构特性, 氨基酸分析, 氧化位点
中图分类号: TS251.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)11−0137−12
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060012
本文网刊:

Extraction and Purification of Myosin and the Effects of Hydroxyl Radical Oxidation on Its Oxidation Sites

CAO Yingying*, GUO Xiaorui, LI Huaiyu
（College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China）

Abstract: In this study, myosin was extracted from fresh mutton using precipitation centrifugation, purified via column chromatography, and concentrated through ammonium sulfate salting-out combined with ultrafiltration centrifugation. The results demonstrated that the improved protein extraction method was more efficient. The optimal loading amount of myosin onto the ion-exchange column was determined to be 20 mg, and the optimal saturation level for ammonium sulfate salting-out stood at 50%. To explore the impacts of hydroxyl radical oxidation on the structure and oxidation sites of myosin, a hydroxyl radical oxidation system was established by regulating the concentration of H_2O_2 (0, 0.5, 1, 5, 10, and 20 mmol/L), which enabled myosin to undergo oxidation to varying degrees. Research findings indicated that with the increase of H_2O_2 concentration, the carbonyl content of myosin increased by 2.376 times, while the contents of total sulfhydryl, free sulfhydryl, ionic bond and hydrogen bond decreased by 37.02%, 53.24%, 50.98% and 50.85%, respectively, upon treatment with 20 mmol/L H_2O_2 compared to the control group (0 mmol/L). In contrast, the disulfide bond content exhibited a tendency of first increasing and then decreasing. It reached its maximum value when the H_2O_2 concentration was 10 mmol/L, which was 2.28 times that of the control group. Measurements using a fully automatic amino acid analyzer revealed that four amino acids, namely Cys, Tyr, Phe, and His, were susceptible to oxidation, with the order of their suscep-

收稿日期: 2025−06−05
基金项目: 甘肃省科技专员专项（26CXGA054）; 国家自然科学基金资助项目（32260553）; 甘肃省科技重大专项（26ZDNG001）。
作者简介/通信作者*: 曹莹莹（1981−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 肉制品加工与质量控制, E-mail: cy_0533@126.com。

tibility being Cys>Tyr>His>Phe. LC-MS/MS detection showed that under mild oxidation conditions, hydroxyl radicals mainly attacked the proteins around the SH1-SH2 region. When subjected to severe oxidation at an H_2O_2 concentration of 20 mmol/L, a large amount of myosin aggregated, and these aggregations primarily occurred in the head helical region and the 1502~1783 region of myosin.

Key words: myosin; column chromatography purification; structural properties; amino acid analysis; oxidation site

肌肉蛋白质按溶解性分为肌原纤维蛋白、肌浆蛋白和结缔组织蛋白，肌原纤维蛋白占肌肉总蛋白 50%~60%，其核心成分肌球蛋白占肌原纤维蛋白 50%~55%（约为肌肉总蛋白的 1/3）[1−2]。肌肉蛋白是肉类的重要组分，对肉品品质和加工特性起着关键作用[3]。在众多肌肉蛋白中，肌球蛋白占据核心地位，它不仅是肌肉收缩的主要功能蛋白，还在很大程度上影响着肉的质地、保水性以及凝胶特性等[4−5]。深入了解肌球蛋白的性质并对其进行有效调控，对于提升肉品质量、开发高附加值肉产品具有至关重要的意义。

肌球蛋白的纯化是开展其相关研究的基础。通过有效的纯化方法，可以从复杂的肌肉组织体系中分离出高纯度的肌球蛋白，从而排除其他杂质蛋白和成分的干扰，准确地研究肌球蛋白自身的结构与功能之间的关系[6−7]。目前，虽然已经有多种肌球蛋白纯化方法被报道，但不同方法在纯化效率、纯度以及对蛋白结构完整性的保持等方面存在差异。因此，不断优化和改进肌球蛋白的纯化工艺，获取高质量的肌球蛋白样品，仍然是该领域研究的重点之一。

此外，肌球蛋白的氧化稳定性直接影响肉品品质。在肉类的加工和贮藏阶段，肌球蛋白易受到各种氧化应激的影响，发生氧化反应。氧化会导致肌球蛋白的结构改变[8]，如二级结构的变化、氨基酸残基的修饰以及蛋白质交联等[9−10]，进而影响其功能特性。例如，氧化可能降低肌球蛋白的溶解性，破坏其凝胶形成能力，导致肉的保水性下降、质地变硬，严重影响肉品的口感和消费者接受度[11−12]。此外，氧化还可能引发肌球蛋白的风味变化[13]，产生不愉快的气味和味道，降低肉品的感官品质。同时，肌球蛋白的氧化还与肉品的营养价值密切相关。过度氧化可能导致蛋白质营养价值降低，甚至产生一些潜在的有害物质，可能对人体健康造成威胁[14−15]。因此，研究肌球蛋白的氧化稳定性，揭示其氧化机制，并寻找有效的抗氧化策略来延缓或抑制肌球蛋白的氧化，对于保障肉品的品质、延长货架期以及提高肉品的营养价值都具有深远的现实意义。

本研究旨在优化肌球蛋白的纯化方法，获得高纯度且结构完整的肌球蛋白样品，并研究肌球蛋白的氧化机理。通过探讨不同程度氧化对肌球蛋白的影响，揭示其氧化规律和机制，为制定针对性的抗氧化调控措施提供理论支撑，最终为改善肉品品质、推动肉类产业的可持续发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜里脊肉　购自甘肃省兰州理工大学附近的菜市场；DE-52 纤维素　土锋生物科技有限公司；其他化学试剂均为国产分析纯。

CJJ 78-1 磁力搅拌器　上海梅香仪器有限公司；DE-52 离子交换柱　上海士锋生物科技有限公司；3 kDa 超滤离心管　德国 Merck Millipore 公司；XH-C 漩涡混匀器　江苏省金坛市医疗仪器厂；52N 紫外分光光度计　上海仪电分析仪器有限公司；JIDI-16R 台式冷冻离心机　广州吉迪仪器有限公司；AD300L-H 数显匀浆机　上海昂尼仪器仪表有限公司；Mini-PROTEANT Tetra Cell 垂直电泳系统、TripleTOF™ 5600+系统-液质联用仪　美国 Bio-Rad 公司；FD-A10N-50 冻干机　冠森生物科技有限公司；L-8900 全自动氨基酸分析仪　日本日立公司；ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 色谱柱　美国 Agilent Technologies 公司；ChromXP C_{18} 分析柱　美国 Eksigent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肌球蛋白的提取　基于朱宏星等[16] 的研究并稍作修改。将刚宰杀的羊肉放入冰箱中冷却，去掉筋膜及多余的脂肪切碎后与预冷提取液 A（0.5 mol/L KCl、0.1 mol/L KH_2PO_4、0.05 mol/L K_2HPO_4、0.0005 mol/L EDTA-2Na、0.004 mol/L 焦磷酸钠，pH6.5）按 1∶3（v/v）混合，冰浴匀浆（5000 r/min，5 s）后超声 10 min，10000×g、10 min 离心取上清液。再加 10 倍预冷水，4 ℃ 静置 4 h 后 8000×g、10 min 离心得沉淀。沉淀用提取液 B（0.3 mol/L KCl，0.02 mol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4，pH7.0）复溶搅拌 20 min，10000×g、20 min 离心取上清。通过水相稀释诱导沉淀（10 倍体积超纯水，过夜），低温离心（8000×g，10 min）获得粗品。粗品用透析液（0.6 mol/L KCl，0.02 mol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4，pH7.5）复溶后，用 10 kDa 膜透析 24 h，10000×g、20 min 离心获终产物。方法改进后将切碎肉样经绞肉机充分绞碎，去除超声步骤，均质时间延长至 1 min，提取液 B 复溶搅拌时间缩短至 1 min，稀释上清液后只需静置 4 h，并降低离心转速与时间，其余步骤与改进前方法一致，获得改进后的肌球蛋白终产物。

1.2.2 肌球蛋白的纯化　本研究基于赵利拉[17] 的方法，采用 DE-52 纤维素层析法优化肌球蛋白纯化工艺，主要流程包括样品与填料预处理、装柱、加样、洗脱、收集及浓缩，具体步骤如下。

1.2.2.1 样品预处理　粗蛋白液经透析平衡（20 mmol/L Tris-HCl，160 mmol/L KCl，pH8.2）后，30 倍体积稀释，于 4 ℃、5000×g 离心 5 min，收集上

清液冷藏备用。根据双缩脲法测定蛋白浓度（y=0.0426x−0.0008，R^2=0.9999）为 0.1 mg/mL。

1.2.2.2　填料预处理　100 g DE-52 纤维素用蒸馏水浸泡后，进行酸碱循环处理（0.5 mol/L HCl/NaOH 各 1 h），去离子水洗至中性，以上操作重复三次后 4 ℃保存。

1.2.2.3　装柱　将预处理填料搅拌均匀后静置 2 h，垂直装柱避免气泡，装填至距柱顶 5 cm 处停止，维持液面高于填料层 3 cm。设备需放置在 4 ℃下冷却过夜，以 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液（含 0.16 mol/L KCl，pH8.2）、1.5 mL/min 的流速平衡填料柱，至 280 nm 处吸光值稳定。

1.2.2.4　加样与洗脱　将样品以 1.0 mL/min 流速向平衡后的 DE-52 离子交换柱连续上样 300 mL 肌球蛋白溶液，按 50 min/管分段收集流出液，监测 280 nm 处吸光度，稳定后停止加样，根据公式计算得出最佳载量。在 3 个洗脱瓶中分别装入 0.16、0.3、1.5 mol/L KCl 的 Tris-HCl 缓冲液（pH8.2），以 1.0 mL/min 的速度依次进行洗脱至 280 nm 处的吸光值稳定，除去未吸附蛋白，合并各管中高浓度肌球蛋白进行浓缩。

$$\text{载量(mg)} = \text{上样体积(mL)} \times \text{蛋白样品浓度(mg/mL)} \quad \text{式（1）}$$

1.2.2.5　浓缩与盐析　采用分段盐析法确定最佳饱和度：将收集液按每管 20 mL 分装，分别添加不同质量硫酸铵至饱和度 20%、30%、40%、50%、60%、70%，磁力搅拌混匀后 4 ℃静置 1 h，经 10000×g 离心 10 min 收集沉淀，用 0.02 mol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4 缓冲液（含 0.6 mol/L KCl，pH7.0）复溶，测定蛋白浓度确定最佳饱和度。向收集液中加入硫酸铵至最佳饱和度，4 ℃、10000×g 离心 10 min 收集沉淀，复溶透析后，使用 3 kDa 超滤离心管于 4 ℃、4000×g 离心浓缩至目标浓度。

1.2.3　肌球蛋白纯度检测　通过 SDS-PAGE 检测提取所得肌球蛋白的纯度。选取 12% 的分离胶浓度和 5% 的浓缩胶浓度[18]。将肌球蛋白浓度调整至 2 mg/mL。取 1.5 mL 离心管，向其中加入 160 μL 肌球蛋白溶液和 40 μL 的蛋白上样缓冲液（含 SDS、DTT、Tris-HCl、甘油和指示剂的混合溶液），在漩涡混匀器上混合均匀（30 s），将离心管置于沸水中加热 5 min，将其冷却至室温后离心（4 ℃，10000×g、5 min）。在电泳槽中倒入 0.25 mol/L Tris-Gly 电泳缓冲液（含 0.1% SDS，pH8.3），Marker 和样品的上样体积分别为 5、10 μL。调节开始电压为 70 V，进入分离胶之后电压加大至 120 V，当样品跑至距胶底部 1 cm 左右处停止跑胶。恒温振荡器中染色（含 0.125% R250，10% 冰乙酸，25% 乙醇）2 h，脱色（含 10% 冰乙酸，25% 乙醇）至出现清晰蛋白条带，拍照保存图像。

1.2.4　肌球蛋白氧化处理　参照 ZHANG 等[19] 方法略作修改。将肌球蛋白用磷酸盐缓冲液（50 mmol/L KH_2PO_4、50 mmol/L K_2HPO_4、0.6 mol/L KCl，pH6.5）配制成 20 mg/mL 溶液，与等体积氧化体系（含 0.1 mmol/L $FeCl_3$、1 mmol/L $C_6H_8O_6$ 及 0、0.5、1、5、10、20 mmol/L H_2O_2）混合，4 ℃避光反应 24 h，加入 1 mmol/L EDTA 终止。随后，用低浓度磷酸盐缓冲液（20 mmol/L KH_2PO_4、20 mmol/L K_2HPO_4，pH6.5）将体系 KCl 浓度稀释至 0.1 mol/L，经 8000×g 离心（4 ℃，5 min）收集沉淀，重复洗涤两次。沉淀物用磷酸盐缓冲盐水（Phosphate Buffered Saline，PBS）缓冲液（20 mmol/L KH_2PO_4、20 mmol/L K_2HPO_4、0.6 mol/L KCl，pH7）溶解，4 ℃保存备用。

1.2.5　羰基含量的测定　参照 CHEN 等[20] 方法并稍作修改。肌球蛋白经 PBS 缓冲液稀释至 5 mg/mL，取 6 支试管各加 0.8 mL 不同氧化程度的该溶液。接着加入 1600 μL 含 0.002 g/mL 二硝基苯肼的 2 mol/L HCl 溶液，反应 30 min；加 800 μL 0.4 g/mL 三氯乙酸，混匀后低温离心（8000×g，5 min）弃上清。用乙醇-乙酸乙酯（1∶1）混合液洗涤沉淀，加 3 mL 磷酸盐缓冲液（20 mmol/L KH_2PO_4、20 mmol/L K_2HPO_4、6 mol/L 盐酸胍，pH6.5）溶解沉淀，室温暗处静置 12 h。以 2 mol/L HCl 溶液为对照，于 370 nm 处测吸光度，依据摩尔消光系数（22000 L/(mol·cm)），按公式（2）计算羰基含量。

$$\text{羰基含量(nmol/mg)} = \frac{A}{22000 \times C} \times 10^6 \quad \text{式（2）}$$

式中：A，样品在 370 nm 处的吸光度；C，蛋白样品的浓度，mg/mL。

1.2.6　总巯基含量的测定　参照 BU 等[21] 的方法并作调整。将肌球蛋白样品用 PBS 缓冲液稀释至 5 mg/mL。取 6 支试管，分别加入 1 mL 不同氧化程度的肌球蛋白溶液，再用 9 mL 磷酸盐缓冲液（20 mmol/L KH_2PO_4、20 mmol/L K_2HPO_4、6 mol/L 尿素、0.6 mol/L KCl、10 mmol/L EDTA-2Na，pH7.0）稀释。取 3 mL 稀释液于试管中，加入 0.4 mL 0.1% DTNB，40 ℃避光水浴 30 min。冷却至室温后，于 412 nm 波长处测定吸光度。巯基含量根据摩尔消光系数（13600 L/(mol·cm)）按公式（3）计算。

$$\text{巯基含量(nmol/mg)} = \frac{A \times 10^5}{136 \times C} \quad \text{式（3）}$$

式中：A，样品在 412 nm 处的吸光度；C，蛋白样品的浓度，mg/mL。

1.2.7　游离巯基和二硫键含量的测定　基于 ZHOU 等[22] 的实验方法稍作调整。用 PBS 缓冲液将肌球蛋白稀释为 1 mg/mL 溶液，准确量取肌球蛋白质溶液 1.0 mL，加入 5.0 mL 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液与 0.4 mL DTNB 溶液，40 ℃避光水浴 30 min，冷却后于 412 nm 测定吸光度，以 Tris-HCl 溶液作空白对照。

$$游离巯基含量(\mu mol/g) = 73.53A_{412}\frac{D}{C} \quad 式（4）$$

式中：A_{412}，412 nm 处的吸光度；D，稀释倍数；C，肌球蛋白浓度，mg/mL。

$$二硫键含量(\mu mol/g) = \frac{总巯基含量 - 游离巯基含量}{2} \quad 式（5）$$

1.2.8 离子键和氢键含量的测定 以杜艳[23]的方法为基础稍作改进。冻干保存不同氧化程度的肌球蛋白，取氧化度相同的蛋白试样（每组 0.1 g）3 组，分别为 A、B、C。A 组加入 5 mL 0.15 mol/L NaCl 溶液（SA），B 组加入 6 mL 0.6 mol/L NaCl 溶液（SB），C 组加入含 0.15 mol/L 尿素和 0.5 mol/L NaCl 的混合溶液（SC）。振荡混匀后，4 ℃ 静置 30 min，经 4800×g 离心 10 min（4 ℃）取上清液，用对应溶剂稀释后测定蛋白含量。离子键含量由 SB 与 SA 溶液蛋白含量差值计算，氢键含量通过 SC 与 SB 溶液的蛋白含量差值确定。

1.2.9 氨基酸组成 参照 GB/T 5009.124-2016，使用全自动氨基酸分析仪测定 0、0.5、5、20 mmol/L 不同浓度 H_2O_2 处理的肌球蛋白中 17 种氨基酸（Asp、Thr、Ser、Glu、Gly、Ala、Cys、Val、Met、Ile、Leu、Tyr、Phe、Lys、His、Arg、Pro）的浓度。

1.2.10 氧化位点的鉴定

1.2.10.1 胰蛋白酶水解 用胰蛋白酶（1 mg/mL）水解肌球蛋白，以酶∶蛋白=1∶100（m/m）在 37 ℃ 恒温水浴中进行，分别水解 0、1、2、3、4 h，90 ℃ 加热 5 min 终止酶解，选出最适酶解时间。

1.2.10.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis，SDS-PAGE） 参考 SHEN 等[18]的方法。以最适酶解时间为基础对不同氧化程度的肌球蛋白水解液进行 SDS-PAGE 分析，配制 5% 浓缩胶和 12% 分离胶。将蛋白浓度调整为 2 mg/mL，取 160 μL 样品与 40 μL 含 DTT 的上样缓冲液混合，涡旋 30 s 后沸水浴 5 min，冷却至室温后 4 ℃、10000×g 离心 5 min。电泳槽加入 0.25 mol/L Tris-Gly 缓冲液（含 0.1% SDS，pH8.3），Marker 蛋白和样品上样量分别为 5 μL 和 10 μL。调节初始电压 75 V，样品进入分离胶后调至 120 V，至胶底部停止电泳。加入染色液（含 0.125% R250，25% 乙醇，10% 冰乙酸）振荡染色 6 h，再用脱色液（含 25% 乙醇，10% 冰乙酸）脱色，每 2 h 更换一次脱色液至条带清晰，拍照记录。

1.2.10.3 质谱样品制备 从 SDS-PAGE 凝胶上切取条带进行胶内酶解。将凝胶切片置于 1.5 mL 离心管，用 500 μL 超纯水振荡清洗 5 min，重复 2 次；随后用 400 μL 脱色液（100 mmol/L NH_4HCO_3，30% 乙腈）冲洗至透明，冻干备用。4 ℃ 下用 5 μL 10 ng/μL 猪胰蛋白酶预消化 1 h，促进凝胶充分吸收酶液。再加入 25 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲液，37 ℃ 酶解 24 h 后吸取酶解液于新试管。原管中加入 20 μL 60% 乙腈/0.1% 三氟乙酸混合液，600 W 超声 30 min，合并两次溶液后冻干备用。

1.2.10.4 质谱分析 参照蒋文馨[24]的方法取冻干样品溶解，溶解好的蛋白质（含 0.1% 甲酸、2% 乙腈与 98% 水）进样后，先经 C_{18} 柱（5 μm，50 mm×4.6 mm）以 5 nL/min 流速处理，再以 300 nL/min 流速在 100 min 内洗脱至 C_{18} 分析柱（75 μm×150 mm），流动相由 A 相（3% 二甲基亚砜、97% 水、0.1% 甲酸）和 B 相（3% 二甲基亚砜、97% 乙腈、0.1% 甲酸）组成，洗脱梯度设置为：0~5 min 保持 95% A 相、5% B 相；5~100 min B 相由 5% 升高至 95%（A 相由 95% 下降至 5%）。经液相色谱-串联质谱（Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，LC-MS/MS）分析后，所得数据通过美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）数据库进行蛋白质鉴定与氨基酸序列比对。

1.3 数据处理

实验各处理均设置 3 次重复，数据以平均值±标准差呈现。使用 Origin 2021 进行数据处理与分析，借助 SPSS 27.0 软件，采用单因素方差分析（ANOVA），并通过 Duncan 多重比较法开展显著性检验（P<0.05），质谱图解析及数据处理由 peakview 2.0 软件完成，绵羊肌球蛋白氨基酸序列来源于 NCBI 蛋白数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）。

2 结果与分析

2.1 肌球蛋白的纯化

2.1.1 肌球蛋白载量测定 由图 1 所示，当肌球蛋白上样量超过 200 mL 时，吸光度趋于稳定，表明填料吸附已经达到饱和，经计算确定该层析体系最佳载量为 20 mg。

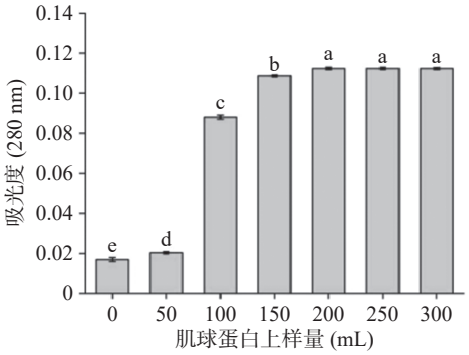


图 1 DE-52 离子交换柱中肌球蛋白的载量变化

Fig.1 Changes of myosin loading in DE-52 ion exchange column

注：不同小写字母表示差异显著（P<0.05）；图 3、图 5~图 8 同。

2.1.2 肌球蛋白的洗脱曲线分析 采用 DE-52 纤维素层析法对蛋白质进行纯化。以洗脱液的体积作为横坐标，在 280 nm 处的吸光度作为纵坐标，绘制

出肌球蛋白的洗脱曲线。观察图 2 可知，分别用含 0.3 mol/L KCl、1.5 mol/L KCl 的 Tirs-HCl（0.02 mol/L）溶液洗脱时，洗脱出一个高峰（峰 A），一个低峰（峰 B），并且峰 A 中所含的肌球蛋白含量明显高于峰 B，所以肌球蛋白主要在低盐条件下洗脱（峰 A），可能是结合条件未优化或蛋白特性导致的。合并峰 A 中肌球蛋白高的各管样品可初步富集目标蛋白。

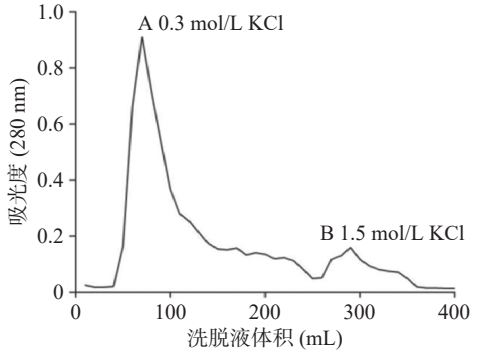


图 2　肌球蛋白洗脱曲线

Fig.2　Elution curve of myosin

2.1.3　硫酸铵盐析饱和度的优化　基于离心分离技术探究肌球蛋白硫酸铵盐析的最优饱和度条件[25]。根据图 3 可知，硫酸铵在 20%~70% 饱和度范围内，复溶液的蛋白质浓度呈现先上升后平稳的变化趋势；当硫酸铵饱和度在 20%~50% 区间时，复溶液蛋白质浓度呈显著递增趋势（P<0.05）；而当饱和度超过 50% 后，蛋白质浓度变化不显著（P>0.05），该结果表明 50% 硫酸铵饱和度就能实现肌球蛋白的高效沉淀。综合考虑高盐浓度对后续实验步骤可能产生的干扰因素，最终确定 50% 为硫酸铵盐析纯化肌球蛋白的最适饱和度。

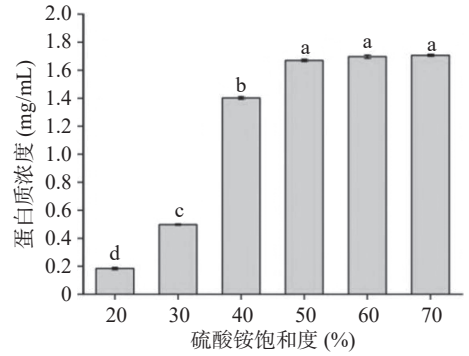


图 3　硫酸铵饱和度对肌球蛋白浓度的影响

Fig.3　Effect of ammonium sulfate saturation on myosin concentration

2.1.4　肌球蛋白纯度检测　图 4 展示了羊肉肌球蛋白提取纯化过程的电泳图谱。结果显示，样品 1~3 均呈现出特征性条带：1 条分子量为 250 kDa 的肌球蛋白重链，以及 3 条分子量分别为 22.5、17.0 和 13.5 kDa 的轻链。其中样品 1 存在 4 条分子量介于 25~50 kDa 的杂蛋白条带，样品 2 则含有 2 条分子量在 30~40 kDa 的杂蛋白条带。对比样品 1 与样品 2，后者的肌球蛋白亚基条带颜色加深，杂蛋白数量明显减少，这表明改良朱宏星等[16] 的提取方法后，肌球蛋白纯度显著提升。进一步观察发现，样品 3 中肌球蛋白亚基条带颜色更深，且未检测到杂蛋白条带，说明经纯化处理后的肌球蛋白纯度最高。

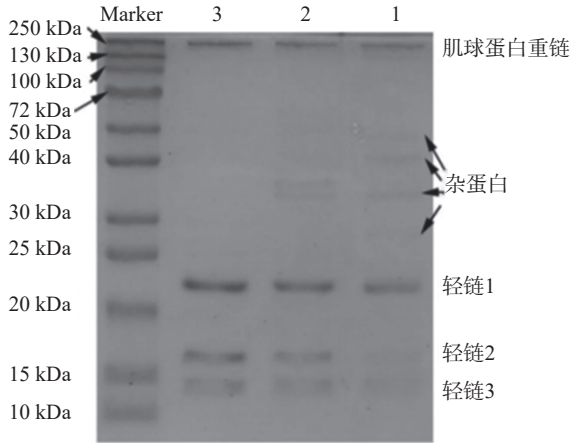


图 4　肌球蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.4　SDS-PAGE profile of myosin

注：1 改进前的肌球蛋白；2 改进后的肌球蛋白；3 纯化肌球蛋白。

2.2　不同氧化程度对羊肉肌球蛋白羰基含量的影响

肉品储藏时，蛋白质的羰基化修饰是其氧化反应的关键环节，也因此被视作蛋白质氧化过程中最核心的步骤[26]。由图 5 可知，随 H_2O_2 浓度升高，肉品中羰基含量呈现显著上升趋势。对照组羰基含量为 1.982 nmol/mg，处于较低水平；随着浓度增至 5、10、20 mmol/L，羰基含量大幅攀升，分别是 3.244、4.292、4.711 nmol/mg。其中 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L 时，羰基含量与对照组差异显著（P<0.05），是对照组的 2.165 倍，当 H_2O_2 浓度为 20 mmol/L 时，羰基含量是对照组的 2.376 倍，增长幅度变缓。由此猜测，当 H_2O_2 浓度超过 10 mmol/L 时，蛋白质可能已接近完全氧化状态。这一现象可能与羟自由基攻击肌球蛋白中的特定氨基酸残基并促使其转化为羰基衍生物，进而导致羰基数量增加有关。已有研究表明，活性氧可对蛋白质的肽键或侧链基团发起攻击，使其发生氧化并形成羰基衍生物[27−28]。

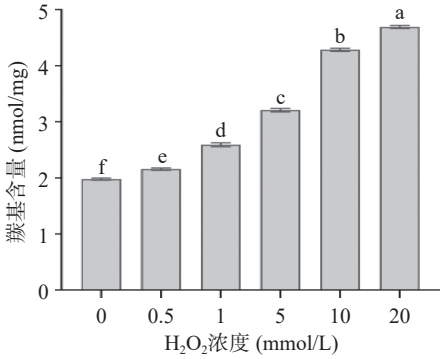


图 5　羟自由基氧化对羊肉肌球蛋白中羰基含量的影响

Fig.5　Effect of hydroxyl radical oxidation on carbonyl content in mutton myosin

2.3 不同氧化程度对羊肉肌球蛋白巯基含量的影响

巯基含量减少是蛋白质氧化的典型特征之一[29]。如图 6 所示，当 H_2O_2 浓度从 5 mmol/L 提升至 20 mmol/L 时，样品中巯基浓度呈现显著下降趋势(P<0.05)。与对照组的巯基含量为 49.53 nmol/mg 相比，当处理组 H_2O_2 浓度为 5、10、20 mmol/L 时，测得巯基含量分别为 42.25、39.69 和 31.19 nmol/mg，其中最高浓度组的巯基损失率达 37.02%，表明蛋白质氧化损伤程度与处理强度呈正相关，这与 CAO 等[30] 结果相同，即高浓度 H_2O_2 会引发氨基酸侧链修饰，进而导致游离氨和总巯基的流失。巯基含量下降可能源于·OH 氧化诱导，致使肌球蛋白构象改变暴露内部巯基，并夺取半胱氨酸等含硫氨基酸的活性氢原子[31]。

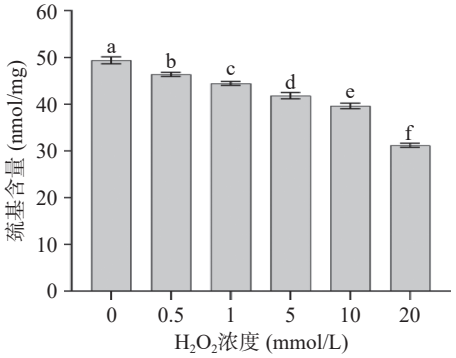


图 6 羟自由基氧化对羊肉肌球蛋白中巯基含量的影响

Fig.6 Effect of hydroxyl radical oxidation on the content of sulfydryl group in myosin of mutton

2.4 不同氧化程度对羊肉肌球蛋白游离巯基和二硫键含量的影响

巯基作为维持蛋白质高级结构和功能特性的关键化学基团，在凝胶网络形成过程中通过二硫键交换作用调控分子间交联强度，直接影响蛋白质的功能表达[32]。如图 7A 所示，随着 H_2O_2 浓度增加，游离巯基含量呈递减显著趋势(P<0.05)。对照组中游离巯基含量为 40.93 μmol/g，当 H_2O_2 浓度为 0.5、1、5、10、20 mmol/L 时，游离巯基含量依次是 37.06、34.44、29.76、20.34、18.73 μmol/g。这与胡婷[33] 研究氧化对牦牛肉蛋白质结构影响的结果保持一致，可能是由于巯基对氧化反应更敏感，H_2O_2 可以促进部分自由巯基的氧化，使巯基含量减少。当 H_2O_2 浓度达到 10 mmol/L 和 20 mmol/L 时，游离巯基含量显著下降，推测此时肌球蛋白接近完全氧化状态，故此游离巯基急剧减少，这一结果与前文当 H_2O_2 浓度超 10 mmol/L 时蛋白近乎全氧化的推断一致。

由图 7B 可知，二硫键含量随 H_2O_2 浓度增加呈现先升后降态势。对照组(0 mmol/L H_2O_2)二硫键含量为 4.221 μmol/g，当 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L 时，二硫键含量达到最大值 9.627 μmol/g。二硫键含量的增加可能是肌球蛋白经过 H_2O_2 氧化后巯基转化而成的，这与 XIAO 等[34] 发现导致鳄鱼尾部和躯干

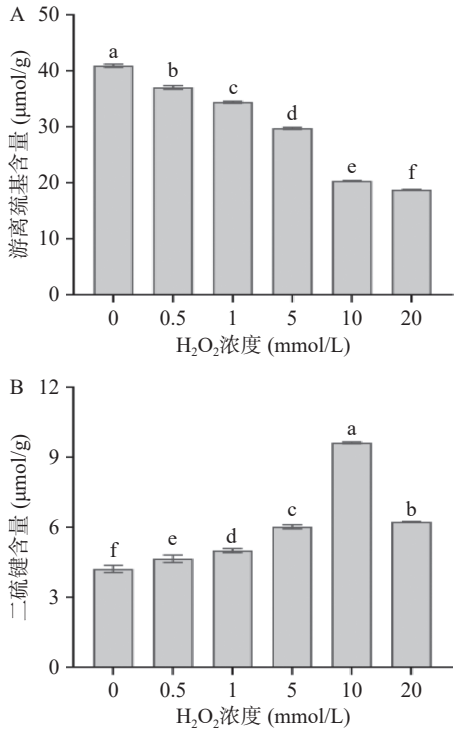


图 7 羟自由基氧化对肌球蛋白游离巯基(A)和二硫键(B)含量的影响

Fig.7 Effects of hydroxyl radical oxidation on free mercaptan (A) and disulfide bond (B) content of myosin

中游离巯基含量降低的原因相同，DONG 等[35] 也提出了此观点。H_2O_2 浓度达到顶峰可能是在该浓度下肌球蛋白已完全氧化，此时巯基-二硫键动态平衡体系被打破，巯基几乎全部转化为二硫键，但在 H_2O_2 浓度为 20 mmol/L 时，二硫键含量下降可能是部分二硫键经超氧化作用转化为亚磺酸、磺酸等稳定氧化终产物，这类不可逆转化过程造成二硫键的损耗[36]。

2.5 不同氧化程度对羊肉肌球蛋白离子键和氢键含量的影响

离子键和氢键是驱动蛋白质交联聚集的关键作用力，其中氢键在麦谷蛋白与麦醇溶蛋白构建面筋网状结构中起重要作用[37]。由图 8 可知，随 H_2O_2 浓度的逐渐升高，氢键和离子键含量不断减少，对照组的离子键和氢键含量分别为 5.93 mg/mL 和 15.93 mg/mL，当 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L 时，离子键和氢键含量分别为 3.217 mg/mL 和 8.372 mg/mL，当 H_2O_2 浓度为 20 mmol/L 时，离子键和氢键含量下降至 2.907 mg/mL 和 7.829 mg/mL。氢键、离子键通过影响蛋白质结构的稳定性，从而影响蛋白质的溶解度，其含量的减少会导致蛋白质的溶解度下降，邹敏等[38] 研究表明，冷藏可致使α-螺旋氢键断裂，破坏面筋蛋白二级结构，促使疏水基团外露，降低蛋白质溶解度，此结论也与赵康程等[37] 发现热处理通过改变谷物及豆类蛋白的二级结构，影响基团空间位置进而导致部分离子键和氢键断裂，使蛋白质溶解性降低的结论相似。

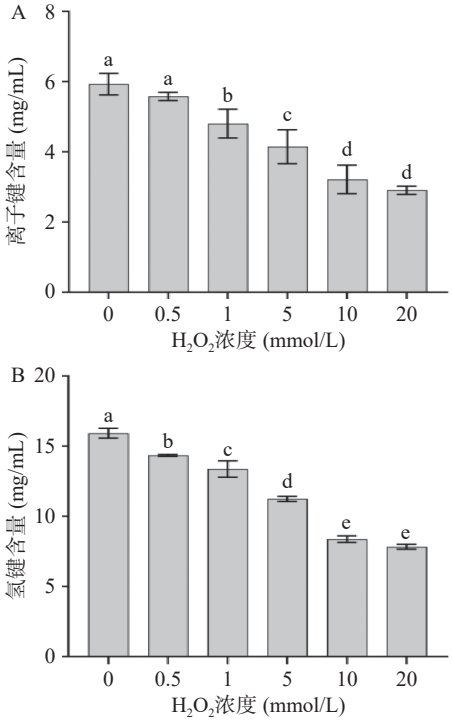


图 8　羟自由基氧化后肌球蛋白离子键含量(A)和氢键含量(B)的变化

Fig.8　Changes of the content of ion bonds (A) and hydrogen bonds (B) in myosin after hydroxyl radical oxidation

2.6　氨基酸分析

选取 0 mmol/L(对照组)、0.5 mmol/L(轻度氧化)、5 mmol/L(中度氧化)、20 mmol/L(极端氧化) 4 个具有代表性的浓度节点，分析不同 H_2O_2 氧化程度对蛋白质氨基酸组成的影响。由表 1 可知，随着氧化浓度升高，总氨基酸含量显著降低(P<0.05)。其中对照组(0 mmol/L)与 0.5 mmol/L H_2O_2 处理组蛋白质氨基酸组成无显著差异(P>0.05)，而当浓度升至 5 mmol/L 和 20 mmol/L 时，氨基酸含量显著低于对照组(P<0.05)。由表 1 可知，当 H_2O_2 浓度为 0、0.5、5 和 20 mmol/L 时，氨基酸总量分别为 330.64、323.03、279.7 和 212.34 mg/100 mL，这与实验设定的蛋白浓度(3 mg/mL)计算结果相近。

根据表 1 可知，随着 H_2O_2 浓度升高，氨基酸含量呈下降趋势，其中 Cys、Tyr、Phe 和 His 的含量下降较为显著(P<0.05)，且以 Cys 的变化最为突出，当 H_2O_2 氧化浓度达到 20 mmol/L 时，其含量较对照组减少 75.97%。结合上述结果，可推测羟自由基对这四种氨基酸的氧化作用较强。基于氨基酸含量变化，推测其被氧化的难易顺序为 Cys>Tyr>His>Phe，这一结果与 FRANCO 等[39] 和 CATALDO 等[40] 关于臭氧选择性氧化芳烃类氨基酸和半胱氨酸的结论有所区别，可能是由于臭氧在水溶液中产生的自由基对其他氨基酸也发生了氧化作用。此外，不同研究得出的氨基酸氧化顺序存在差异：MURPHY 等[41] 研究的氨基酸氧化顺序 Met>His>Trp>Tyr；而庄坤等[42] 研究发现氨基酸的氧化难易顺序为：Ser>Cys>Met>Tyr>Phe，他们还猜想氧化顺序可能与氨基酸在不同蛋白中的空间位置相关。郑淋[43] 发现，二肽中 Tyr 和 Trp 因空间位置差异，导致不同二肽对氧化剂的敏感性存在区别。

2.7　氧化肌球蛋白酶解产物 SDS-PAGE 分析

肌球蛋白酶解产物 SDS-PAGE 如图 9 所示。随着胰蛋白酶酶解时间延长，肌球蛋白的重链与轻链逐步分解。酶解 4 h 后，肌球蛋白重链完全消失，标

表 1　H_2O_2 氧化肌球蛋白氨基酸组成

Table 1　Amino acid composition of oxidized myosin by H_2O_2

氨基酸	含量(mg/100 mL)				相对0 s减少量(%)		
	0 mmol/L	0.5 mmol/L	5 mmol/L	20 mmol/L	0.5 mmol/L	5 mmol/L	20 mmol/L
Asp	20.23±0.1^a	19.75±0.13^b	17.36±0.16^c	14.15±0.14^d	2.36	14.19	30.02
Gln	61.40±1.12^a	61.00±0.76^a	54.13±0.31^b	41.93±0.33^c	1.72	12.80	32.45
Ser	13.28±0.16^a	12.92±0.1^a	11.12±0.46^b	8.42±0.36^c	2.71	16.26	36.63
Gly	10.58±0.39^a	10.31±0.39^a	8.93±0.23^b	6.58±0.29^c	2.60	15.63	37.78
His	6.67±0.12^a	6.49±0.12^a	5.63±0.24^b	3.89±0.17^c	2.35	15.60	41.70
Arg	28.05±0.29^a	27.37±0.29^b	23.96±0.15^c	18.02±0.22^d	2.43	14.60	35.76
Thr	17.82±0.21^a	17.34±0.21^b	14.93±0.21^c	10.91±0.21^d	2.70	16.23	38.80
Ala	19.77±0.41^a	19.23±0.41^a	16.53±0.28^b	12.56±0.32^c	2.73	16.37	36.45
Pro	11.19±0.15^a	10.92±0.15^a	9.56±0.36^b	7.63±0.31^c	2.44	14.63	31.87
Cys	0.60±0.09^a	0.57±0.09^a	0.40±0.05^b	0.15±0.08^c	5.59	33.56	75.97
Tyr	11.62±0.36^a	11.27±0.36^a	9.18±0.22^b	6.70±0.2^c	3.00	21.03	42.33
Val	13.95±0.37^a	13.60±0.37^a	11.87±0.43^b	8.85±0.27^c	2.48	14.90	36.54
Met	8.15±0.19^a	7.84±0.19^a	6.30±0.22^b	4.99±0.29^c	3.78	22.68	38.79
Ile	16.21±0.45^a	15.76±0.45^a	13.51±0.37^b	10.12±0.39^c	2.78	16.69	37.59
Leu	32.94±0.36^a	32.05±0.36^b	27.61±0.28^c	20.99±0.31^d	2.70	16.17	36.28
Phe	13.81±0.28^a	13.39±0.28^a	11.25±0.31^b	8.23±0.35^c	2.85	18.57	40.44
Lys	44.36±0.32^a	43.21±0.32^b	37.44±0.22^c	28.23±0.32^d	2.60	15.59	36.37
总和	330.64±5.04^a	323.03±4.98^a	279.7±4.50^b	212.34±4.51^c	2.49	15.58	35.91

注：不同小写字母表示不同 H_2O_2 浓度处理组间差异显著(P<0.05)。

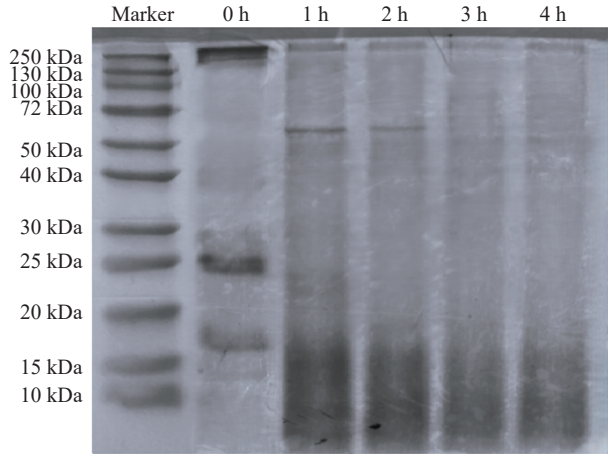


图 9 肌球蛋白酶解产物 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.9 SDS-PAGE electrophoretic result of myosin protease hydrolysate

志着酶解反应充分完成。基于此，本研究选取 4 h 作为酶解时间，在此条件下探究不同氧化程度肌球蛋白的氧化位点。

不同氧化程度下肌球蛋白酶解液电泳图如图 10 所示。在 0~10 kDa 区间内，条带颜色随 H_2O_2 浓度增加呈现先加深后变浅趋势，当 H_2O_2 浓度为 1 mmol/L 时，条带颜色最深，表明此时蛋白质经酶解后产生的小片段数量最多，可能是由于轻度氧化促使蛋白质结构展开，暴露出更多活性位点，该区域小片段含量的变化可反映肌球蛋白酶解程度的差异。此外，当 H_2O_2 氧化浓度为 20 mmol/L 时，在 50~72 kDa 区间出现一条新条带。为进一步分析肌球蛋白肽链的氧化状态，根据电泳结果，选取 0~10 kDa 范围内 0、1 和 20 mmol/L 浓度下的电泳条带，以及 50~72 kDa 范围内 20 mmol/L 浓度下的电泳条带，进行凝胶酶解处理后，使用 LC-MS/MS 进行检测分析。

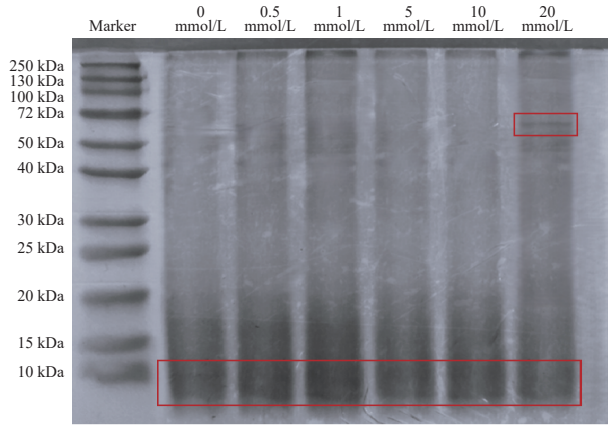


图 10 不同氧化程度肌球蛋白酶解液电泳结果

Fig.10 Electrophoresis result of myoglobin protease hydrolysate with different oxidation degree

注：泳道上方“Marker”为蛋白质分子量标准品，上方红色方框为 20 mmol/L H_2O_2(50~72 kDa)新生条带区域，下方红色方框为 0~10 kDa 低分子量肽段分布区域。

2.8 氧化肌球蛋白酶解产物质谱分析

2.8.1 总离子流图(Total Ion Current Chromatogram, TIC)分析 质谱样品的总离子流图如图 11 所示，从图中可以看出 0 mmol/L H_2O_2(0~10 kDa)、1 mmol/L H_2O_2(0~10 kDa)和 20 mmol/L H_2O_2(0~10 kDa)的 TIC 图谱整体峰形走势基本一致，而 20 mmol/L H_2O_2(50~72 kDa)样品，无论是峰的数量、位置，还是整体的峰形轮廓，都与前三者存在差异，这表明前三者样品之间的主要碎片组成相似。

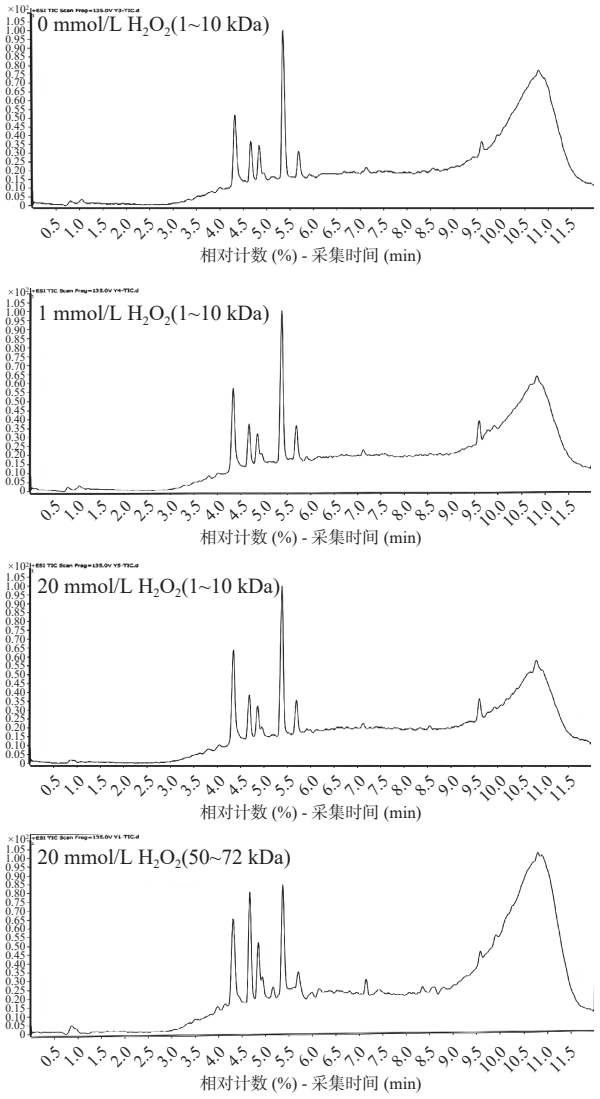


图 11 羟自由基氧化肌球蛋白酶解产物的 TIC 结果

Fig.11 TIC results of myoglobin protease hydrolysis products oxidized by hydroxyl radical

2.8.2 基峰离子流图(Base Peak Ion Current Chromatogram, BPC)分析 质谱样品的基峰图如图 12 所示，在 0~20 mmol/L H_2O_2 处理范围内，低分子量区(0~10 kDa)的蛋白质碎片谱呈现高度保守性，其基峰模式未发生显著改变。然而，在高分子量区(50~72 kDa)，20 mmol/L 处理组于质荷比(m/z)约为 680~750 的区域出现特征性峰型变化。表明不同氧化程度肌球蛋白(0~10 kDa)样品之间的主要碎片相同，这与上文的 TIC 结果相符。

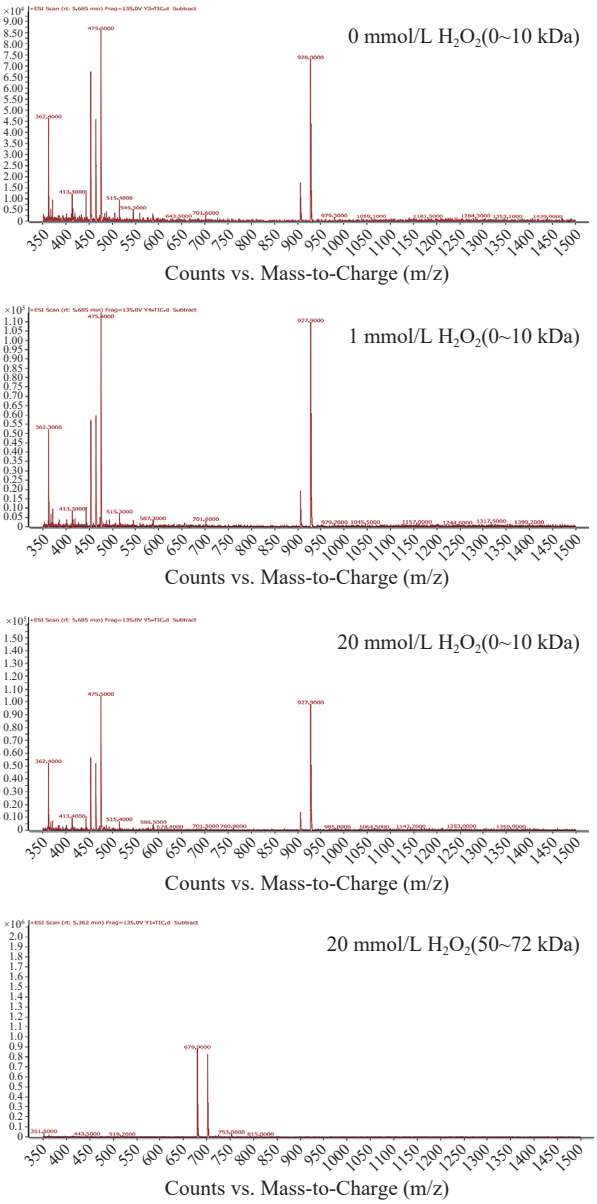


图 12　羟自由基氧化肌球蛋白酶解产物的 BPC 结果

Fig.12　BPC results of hydroxyl radical oxidation of myoglobin protease hydrolysis products

2.8.3　氧化肌球蛋白酶解产物(0~10 kDa)的肽段数量分布及来源　氧化肌球蛋白酶解产物(0~10 kDa)的肽段数量及来源如表 2 所示。检测出的肽段主要来源于绵羊肌球蛋白 1、肌球蛋白 2 和肌球蛋白 3，其中肌球蛋白 3 的肽段数量最多。随着 H_2O_2 氧化浓度升高，三种肌球蛋白肽段的变化趋势一致：在 0~10 kDa 区间内，20 mmol/L H_2O_2 浓度下样品的肽段数量少于 0 mmol/L 和 1 mmol/L 浓度组。H_2O_2 浓度增加过程中，样品在产生新肽段的同时伴随部分肽段消失，表明蛋白质结构同时经历展开与折叠的动态变化[44]。

表 2　氧化肌球蛋白酶解产物(0~10 kDa)的肽段数量及来源

Table 2　Number and source of peptides of oxidized myosin protease hydrolysate (0~10 kDa)

肽段来源	蛋白匹配信息	0 mmol/L	1 mmol/L	20 mmol/L
肌球蛋白1	XP_004012755.2	24	27	16
肌球蛋白2	XP_027830685.1	41	50	22
肌球蛋白3	XP_027830682.1	109	112	78

在此基础上，本实验通过对比不同 H_2O_2 浓度氧化后酶解肽段的氨基酸序列，筛选不同氧化下蛋白结构发生变化的关键位点。在 0~10 kDa 范围内，1 mmol/L H_2O_2 浓度样品相较于 0 mmol/L H_2O_2 组新增的肽段、20 mmol/L 组相较于 1 mmol/L 组新增的肽段及其在重链中的分布如图 13 所示。结果显示，肌球蛋白经 H_2O_2 处理后，新生成的多肽主要分布于 SH1 和 SH2 区域(以红色圆圈标注)。其中，SH1 和 SH2 分别对应序列号为 707 和 697 的半胱氨酸[24]。已有研究显示，SH1 可调控 ATPase 活性[45−46]，其具备高活性、易被氧化的特点，推测原因是邻近的精氨酸(707 位)促使巯基易于释放 H^+[47]。据此推测，新生成多肽富集于 SH1-SH2 周围，可能是由于 SH1-SH2 位点易被氧化，进而引发邻近蛋白质结构改变并暴露新的酶解位点。这表明，在 H_2O_2 轻度氧化条件下，蛋白质的主要氧化位点集中于 SH1-SH2 周边区域。

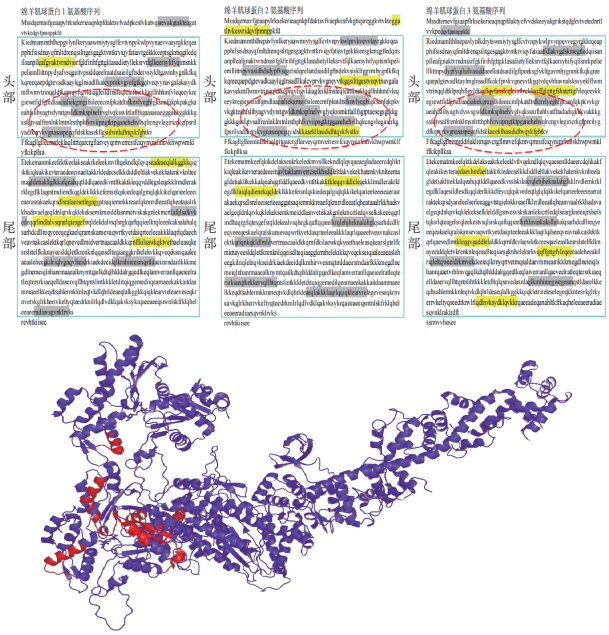


图 13　氧化肌球蛋白酶解产物(0~10 kDa)在肌球蛋白序列中的分布

Fig.13　Distribution of oxidized protease hydrolysates (0~10 kDa) in myosin sequence

注：灰色为 1 mmol/L H_2O_2 氧化样品相对 0 mmol/L H_2O_2 氧化样品新增加的肽段，黄色为 20 mmol/L H_2O_2 氧化样品相对于 1 mmol/L H_2O_2 样品新增加的肽段，红色为肌球蛋白空间模型(PDB ID: 5H53)新生成多肽的空间位置分布，红色圆圈为分布在肌球蛋白头部 SH1 和 SH2 区域的新增肽段。

2.8.4　氧化肌球蛋白酶解产物(50~72 kDa)在氨基酸序列上的分布　20 mmol/L H_2O_2 氧化蛋白酶解样品在肌球蛋白重链中的分布如图 14 所示。SDS-PAGE 分析(图 10)可知，仅在 20 mmol/L H_2O_2 组出现分子量在 50~72 kDa 的高分子量特征条带，推测该条带

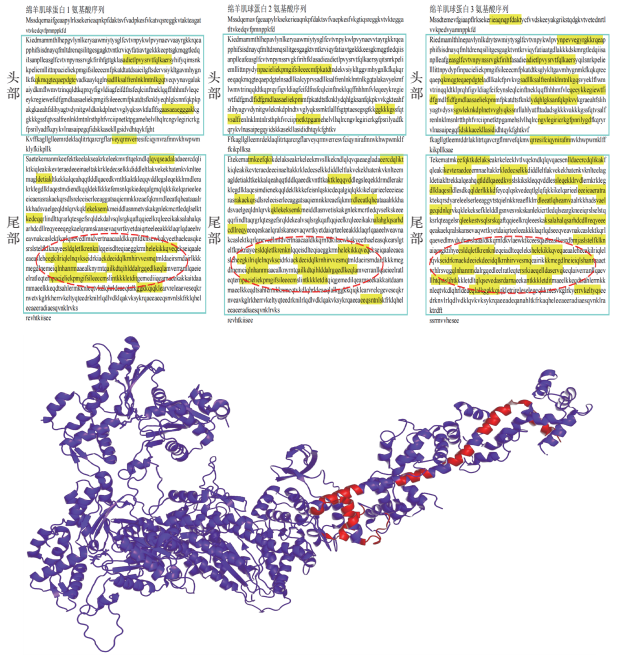


图 14 氧化肌球蛋白酶解样品(50~72 kDa)在肌球蛋白重链中的分布

Fig.14 Distribution of oxidized proteolytic hydrolysis samples (50~72 kDa) in myosin heavy chain

注:红色为肌球蛋白空间模型(PDB ID: 5H53)酶解产物的空间位置分布,黄色为 20 mmol/L H_2O_2(50~72 kDa)聚集肽段在氨基酸序列上的分布,红色圆圈为分布在肌球蛋白尾部氨基酸序号 1502~1783 范围内的聚集肽段。

是蛋白质经重度氧化发生交联聚集后形成的。由于聚集体的酶解位点被包裹,无法被蛋白酶水解,因此其分子量较大。由图 14 可知,所有黄色标注的聚集体中,绵羊肌球蛋白 3 的数量显著高于肌球蛋白 1 和 2,这可能与肌球蛋白 3 的丰度较高有关。在三种肌球蛋白尾部的氨基酸序号 1502~1783 范围内(以红色圆圈标注)均检测到肽段分布。此外,绵羊肌球蛋白 3 头部的 SH1 螺旋区及其尾部 1502~1783 区域有大量肽段聚集,而肌球蛋白 1 和 2 头部的 SH1 螺旋区仅有少量肽段聚集,尾部 1502~1783 区域则存在肽段聚集。肌球蛋白 3 检测到较多肽段聚集,推测可能与其含量较高且更易被氧化有关。值得注意的是,三种肌球蛋白尾部的 1502~1783 区域均出现肽段聚集,这可能是过度氧化导致该区域肽段发生折叠聚集,或该区域肽段在过度氧化后更易形成聚集体。DAI 等[48] 的研究证实,过度氧化时肌球蛋白尾部更易发生聚集,支持上述推测。

3 结论

本研究采用沉淀离心法初步提取肌球蛋白,柱层析法纯化肌球蛋白,层析柱最佳上样量为 20 mg,硫酸铵盐析的最优饱和度是 50% 以及超滤离心法浓缩肌球蛋白。随着 H_2O_2 浓度的增大,肌球蛋白总巯基、游离巯基及离子键、氢键含量均下降,而二硫键呈先上升后下降趋势,在 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L 时到达峰值,为初始含量的 2.28 倍。羟自由基对半胱氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸及组氨酸的氧化作用较强,且氧化难易程度的顺序为 Cys>Tyr>His>Phe。H_2O_2 氧化浓度较低时,产生的羟自由基先攻击肌球蛋白头部 SH1-SH2 附近的区域,使其蛋白质结构展开;当 H_2O_2 浓度过高时,会使得肌球蛋白尾部 1502~1783 区域和少量头部螺旋区域的肽段形成聚集体。

通过优化肌球蛋白提取纯化工艺和研究其氧化位点特征,在提升蛋白产量与稳定性的同时,揭示了氧化对肌球蛋白的构效影响,但尚未阐明氨基酸序列特征与氧化位点选择性的内在关联机制,后期研究可针对被氧化蛋白的氨基酸序列进行分析,研究其与氧化位点之间的关系,为后续肌球蛋白的研究提供理论基础和数据支撑。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 张颖颖, 康超娣, 张明悦, 等. 蛋白质组学在肉类真实性鉴别中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(5): 286−294. [ZHANG Yingying, KANG Chaodi, ZHANG Mingyue, et al. Progress in the application of proteomics in meat product authentication[J]. Food Science, 2022, 43(5): 286−294.]

[2] 魏娜. 羟自由基和过氧自由基氧化对鸭肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2021. [WEI Na. Effects of of hydroxyl radical and peroxy radical oxidation on the structure and gel properties of duck myofibrillar protein[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.]

[3] 杨宗韫. 类 PSE 鸡胸肉肌球蛋白水溶液分散性及油-水界面功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2021. [YANG Zongyun. Water solution dispersibility and oil/water interfacial properties of PSE-like chicken breast myosin[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021.]

[4] 郭欣. 多酚对高白鲑肌球蛋白氧化及凝胶特性的影响[D]. 石河子: 石河子大学, 2024. [GUO Xin. The effect of polyphenols on the oxidation and gel properties of myosin in *Coregonus peled*[D]. Shihezi: Shihezi University, 2024.]

[5] 杨玲, 王兆丰, 王静, 等. 体外氧化对牦牛肉肌原纤维蛋白凝胶保水性的影响[J]. 食品科技, 2021, 46(12): 123−129. [YANG Ling, WANG Zhaofeng, WANG Jing, et al. Effect of *in vitro* oxidation on the water retention of myofibrillar proteins gel from yak meat[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(12): 123−129.]

[6] 高宏敏, 宋尚新, 刘安凤, 等. Ⅰ/Ⅱ型肌球蛋白亚型的提取及纯化方法[J]. 保鲜与加工, 2024, 24(10): 58−66. [GAO Hongmin, SONG Shangxin, LIU Anfeng, et al. Methods for extraction and purification of type Ⅰ/Ⅱ myosin subtypes[J]. Storage and Process, 2024, 24(10): 58−66.]

[7] 王珊, 刘瑶, 刘柯欣, 等. 南极磷虾原肌球蛋白纯化鉴定、理化特性及模拟表位肽预测[J]. 食品科学, 2022, 43(24): 117−128. [WANG Shan, LIU Yao, LIU Kexin, et al. Purification, physicochemical properties, and mimotope peptide prediction of tropomyosin from Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. Food Science, 2022, 43(24): 117−128.]

[8] RAMADHAN A H, YU D W, JIANG Q X, et al. *In vitro* susceptibility of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) to oxidized

myosin on structural change of protein secondary structure associated with reactive oxygen species（ROS）treatment[J]. Food Bioscience, 2024, 60: 104319.
[9] SHEN Mingjuan, YANG Xi, WANG Zhenxing, et al. The impact of AAPH-induced oxidation on the functional and structural properties, and proteomics of arachin[J]. Molecules, 2023, 28(17): 6277.
[10] 黄琳琳, 张一敏, 朱立贤, 等. 蛋白质氧化和翻译后修饰对肉品质的影响及机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 241−247. [HUANG Linlin, ZHANG Yimin, ZHU Lixian, et al. Advances in research of the effects and mechanisms of protein oxidationand post-translational modification on meat quality[J]. Food Science, 2021, 42(9): 241−247.]
[11] ZHANG Dong, LI Hongjun, WANG Zefu, et al. Effects of *in vitro* oxidation on myofibrillar protein charge, aggregation, and structural characteristics[J]. Food Chemistry, 2020, 332: 127396.
[12] NYAISABA B M, LIU X X, ZHU S C, et al. Effect of hydroxyl-radical on the biochemical properties and structure of myofibrillar protein from Alaska pollock（*Theragra chalcogramma*）[J]. LWT, 2019, 106: 15−21.
[13] 刘昊天, 殷小钰, 汪海棠, 等. 基于蛋白氧化行为的肉及肉制品品质提升及劣变机制研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 230−237. [LIU Haotian, YIN Xiaoyu, WANG Haitang, et al. Quality improvement and deterioration of meat and meat products based on the protein oxidation: A review of recent research[J]. Food Science, 2020, 41(21): 230−237.]
[14] HELLWIG M. Analysis of protein oxidation in food and feed products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(46): 12870−12885.
[15] 马文慧. 基于氧化调控肌原纤维蛋白凝胶性能及其体外酶解机制的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2023. [MA Wenhui. Study on gel properties and *in vitro* enzymatic hydrolysis mechanisms of myofibrillar proteins based on oxidation regulation[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2023.]
[16] 朱宏星, 王道营, 徐为民, 等. 肌红蛋白血红素辅基氧化修饰对肌球蛋白结构性质的影响[J]. 肉类研究, 2020, 34(11): 1−8. [ZHU Hongxing, WANG Daoying, XU Weimin, et al. Influence of oxidative modification of hemin prosthetic group of myoglobin on the structure and properties of myosin[J]. Meat Research, 2020, 34(11): 1−8.]
[17] 赵利拉. 不同氧化程度对羊肉肌球蛋白理化性质及凝胶特性影响的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2024. [ZHAO Lila. The study of effect of different oxidation degree on physicochemical properties and gel properties of mutton myosin[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2024.]
[18] SHEN H, STEPHEN E J, ZHAO M M, et al. Effect of oxidation on the gel properties of porcine myofibrillar proteins and their binding abilities with selected flavour compounds[J]. Food Chemistry, 2020, 329: 127032.
[19] ZHANG D, LI H J, EMARA A M, et al. Effect of *in vitro* oxidation on the water retention mechanism of myofibrillar proteins gel from pork muscles[J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126226.
[20] CHEN Mingyue, PAN Qingmei, WU Binbin, et al. Effect of fenugreek（*Trigonella foenum-graecum* L.）seed extracts on the structure of myofibrillar protein oxidation in duck meat[J]. Foods, 2023, 12(24): 4482.
[21] BU Xinrong, WANG Huihui, WANG Yujiao, et al. Effects of iron-catalyzed oxidation and methemoglobin oxidation systems on endogenous enzyme activity and myofibrillar protein degradation in yak meat[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134647.
[22] ZHOU Y, ZHAO D, FOSTER T J, et al. Konjac glucomannan-induced changes in thiol/disulphide exchange and gluten conformation upon dough mixing[J]. Food Chemistry, 2014, 143: 163−169.
[23] 杜艳. 青稞蛋白-多酚相互作用机制及复合物应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023. [DU Yan. The interaction mechanism of highland barley proteins-polyphenols and the application of its complexes[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.]
[24] 蒋文馨. 臭氧氧化对白鲢肌球蛋白结构的影响及氧化位点的鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. [JIANG Wenxin. Effect of ozone induced oxidation on the structure of sliver carps myosin and identification of oxidized sites[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.]
[25] 傅玲琳, 富舒洁, 王彦波, 等. 凡纳对虾原肌球蛋白硫酸铵沉淀分离纯化方法的优化[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 187−192. [FU Linglin, FU Shujie, WANG Yanbo, et al. Optimization of purification by ammonium sulfate precipitation of the major allergen tropomyosin from shrimp（*Litopenaeus vannamei*）[J]. Food Science, 2017, 38(18): 187−192.]
[26] BERGONZO C, ARYAL B, RAO V A. Divalent ions as mediators of carbonylation in cardiac myosin binding protein C[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2023, 124: 108576.
[27] CAO Jinxuan, ZHOU Changyu, WANG Ying, et al. The effect of oxidation on the structure of G-actin and its binding ability with aroma compounds in carp grass skeletal muscle[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 346−353.
[28] MÁRQUEZ-LÁZARO J P, MORA L, MÉNDEZ-CUADRO D, et al. *In vitro* oxidation promoted by sarafloxacin antibiotic residues on myosin and chicken meat proteins[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 111: 104622.
[29] 马思丽, 杨波, 李亚蕾, 等. 羟自由基氧化对牛肌原纤维蛋白结构与乳化性能的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(6): 8−16. [MA Sili, YANG Bo, LI Yalei, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on the structure and emulsifying properties of beef myofibrillar protein[J]. Food Science, 2022, 43(6): 8−16.]
[30] CAO Yungang, MA Wenhui, WANG Jiankang, et al. Influence of sodium pyrophosphate on the physicochemical and gelling properties of myofibrillar proteins under hydroxyl radical-induced oxidative stress[J]. Food & Function, 2020, 11(3): 1996−2004.
[31] 张萌, 马思丽, 李亚蕾, 等. 贮藏期间蛋白质氧化对牛肉品质的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 327−336. [ZHANG Meng, MA Sili, LI Yalei, et al. Effect of protein oxidation on beef quality during storage[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 327−336.]
[32] DENG Xiaorong, LEI Yongdong, LIU Juan, et al. Effect of oxidation on the structural and functional properties of myofibrillar in *Coregonus peled*[J]. International Food Research Journal, 2021, 28(5): 960−968.
[33] 胡婷. 氧化对牦牛肉持水性及蛋白质结构的影响研究[D]. 成都: 西南民族大学, 2023. [HU Ting. Effects of oxidation on water retention and protein structure of yak beef[D]. Chengdu: Southwest University for Nationalities, 2023.]
[34] XIAO Hongmei, WU Yingfeng, LIU Jia, et al. Potential mechanism of different gelation properties of white and red muscle fibre from crocodile（*Crocodylus siamensis*）meat: Study of myofibrillar protein[J]. LWT, 2021, 143: 111045.
[35] DONG Ming, XU Yujuan, ZHANG Yumei, et al. Physicochemical and structural properties of myofibrillar proteins isolated from pale, soft, exudative（PSE）-like chicken breast meat: Effects of

pulsed electric field (PEF)[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 59: 102277.
[36] 尤翔宇. 过氧自由基和丙二醛氧化对米糠蛋白结构、功能性质和消化性质的影响[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019. [YOU Xiangyu. Effects of oxidative modification on structure functional properties and digestibility of rice bran protein by peroxyl radicals and malondialdehyde[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2019.]
[37] 赵康程, 李森, 谭斌, 等. 不同加工方式对谷物及豆类蛋白结构、功能特性的影响研究进展[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(10): 198−206. [ZHAO Kangcheng, LI Sen, TAN Bin, et al. Research progress on influences of different processing methods on structural and functional characteristics of grain from legume and proteins[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2024, 39(10): 198−206.]
[38] 邹敏, 杨润强, 顾振新, 等. 冻藏对面团中面筋蛋白分子结构及功能特性影响的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 347−352. [ZOU Min, YANG Runqiang, GU Zhenxin, et al. Research progess in the effect of frozen storage on molecular structure and functional properties of gluten proteins in dough[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(19): 347−352.]
[39] FRANCO C, OTTORINO O. On the action of ozone on phospholipids, a model compound of the external envelope of pericapsidic viruses like coronavirus[J]. Ozone: Science and Engineering, 2020, 42(6): 478−491.
[40] CATALDO F, PUTZ M V, URSINI O, et al. On the action of ozone on single-wall carbon nanohorns (SWCNH)[J]. Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures, 2015, 23(12): 1095−1102.
[41] MURPHY R C, OKUNO T, JOHNSON C A, et al. Determination of double bond positions in polyunsaturated fatty acids using the photochemical paternò-Büchi reaction with acetone and tandem mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(16): 8545−8553.
[42] 庄坤, 丁文平, 刘成龙. 臭氧处理对糯米中氨基酸组成的影响[J]. 食品科技, 2016, 41(5): 146−150. [ZHUANG Kun, DING Wenping, LIU Chenglong. Effect of ozone treatment on the amino acid composition of glutinous rice[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(5): 146−150.]
[43] 郑淋. 抗氧化肽的构效关系及定向制备的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015. [ZHENG Lin. Structure-activity relationship and directional preparation of antioxidant peptide[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015.]
[44] YIN Yantao, XING Lujuan, ZHANG Wangang. Moderate protein oxidation improves bovine myofibril digestibility by releasing peptides in the S2 region of myosin: A peptidomics perspective [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(5): 2514−2522.
[45] JOHNSON A, NASKAR A, NESMELOV Y E. Quantifying the reversibility of ATP hydrolysis in rabbit skeletal myosin subfragment 1 using a luciferase assay[J]. BMC Methods, 2024, 1: 14.
[46] ARABI M, HOSSAIN M M, ROOT D D. BPS2025-Anti-myosin subfragment-2 peptides elevate myosin ATPase activity[J]. Biophysical Journal, 2025, 124(3): 298a−299a.
[47] 石彤, 解钰, 张昊, 等. 精氨酸对微波场下低盐鲟鱼肌原纤维蛋白预凝胶化的影响[J]. 食品科学, 2025, 46(7): 51−60. [SHI Tong, XIE Yu, ZHANG Hao, et al. Effect of arginine on microwave-induced pre-gelation of sturgeon myofibrillar protein under low salt condition[J]. Food Science, 2025, 46(7): 51−60.]
[48] DAI Hongjie, CHEN Xueke, PENG Lin, et al. The mechanism of improved myosin gel properties by low dose rosmarinic acid addition during gel formation[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105869.