

# 一种适合油桐种仁蛋白质分离的双向电泳技术体系

占志勇, 陈益存, 韩小娇, 崔琴琴, 汪阳东\*

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

**摘要:**为奠定油桐蛋白质组学研究的基础, 针对影响油桐种仁蛋白质分离效果的几个重要因素进行单因素优化实验, 建立了油桐种仁蛋白质组分离效果良好的双向电泳技术平台。实验结果显示: 采用 TCA-丙酮结合酚抽法提取的油桐种仁蛋白质, 经裂解液( $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素,  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫脲, 4% CHAPS,  $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT, 2% IPG buffer) 裂解之后, 上样  $700 \mu\text{g}$  聚焦  $70\,000 \text{ Vh}$ , 经过 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度 15%, 恒功率 5 W, 电泳时间 8 h) 后有好的分离效果, 能满足开展后续蛋白质组学研究的实验要求。

**关键词:**油桐; 双向电泳; 蛋白质组学

中图分类号: S794.3

文献标识码: A

## An Improved System of Two-dimensional Electrophoresis for the Tung Tree Seed Protein Separation

ZHAN Zhi-yong, CHEN Yi-cun, HAN Xiao-jiao, CUI Qin-qin, WANG Yang-dong

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** In order to construct a basis for the tung trees protein research, some key factors which could impact on the results of the protein separation were studied and an improved system of two-dimensional electrophoresis were built successfully including the suitable protein extraction method (TCA-acetone combined with phenol), the solution buffer ( $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  urea,  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  thiourea, 4% CHAPS,  $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT and 2% IPG buffer), the volumes of loading protein ( $700 \mu\text{g}$ ) in IEF and the better conditions for the SDS-PAGE (15% separation gels and constant 5W for 8 h).

**Key words:** tung trees; two-dimensional electrophoresis (2-DE); proteomics

油桐(*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy-Shaw) 是原产我国的世界著名油料树种, 具有悠久的栽培、利用历史。从油桐种仁中提炼出的桐油是一种性质优良的干性油, 在工业领域用途广泛。20 世纪 70 年代至 90 年代, 我国大力发展油桐生产, 重视油桐丰产栽培技术的研究应用, 在油桐种质资源的品种分类<sup>[1-2]</sup>、优良品种选育<sup>[3-4]</sup>和繁殖<sup>[5-6]</sup>、引种<sup>[7]</sup>以及生物学性状分析<sup>[8-9]</sup>等方面开展了大量的研究。

自 20 世纪末开始, 研究人员开展了油桐的基础分子生物学研究, 如油桐叶片 DNA<sup>[10]</sup>、RNA<sup>[11]</sup> 提

取、油桐 RAPD<sup>[10]</sup> 和 ISSR-PCR 扩增体系建立<sup>[12]</sup>, 控制油桐开花启动过程的主控基因 LEAFY<sup>[13]</sup> 和油体蛋白基因的克隆和分析<sup>[14]</sup>。这些从基因方面开展的分子生物学研究能帮助了解桐油的生物合成过程, 但从基因功能的行使者——蛋白质角度研究桐油生物合成过程中蛋白质的作用模式及功能机理, 更有助于了解桐油合成时期的关键蛋白质。为此, 本研究针对影响油桐种仁蛋白质分离效果的几个重要因素进行单因素优化实验, 建立油桐种仁蛋白质分离效果良好的双向电泳技术平台, 为开展后续的

收稿日期: 2012-06-26

基金项目: 国家林业局“948”引进项目“木本油料植物油脂合成基因高通量分析技术引进”(2009-4-23)

作者简介: 占志勇(1986—), 男, 湖北蕲春人, 在读博士, 主要从事林木遗传改良研究。

\* 通讯作者: 汪阳东, 博士, 副研究员. E-mail: wyd11111@126.com

油桐蛋白质组学研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

于2011年9月份油桐果实成熟期,在浙江省金华市婺城区东方红林场油桐种源基地采取新鲜果实,用冰盒带回实验室立即剥取种仁,之后用锡箔纸包好放入液氮中浸泡5 min后,立即放入-80℃冰箱中保存备用。

### 1.2 主要仪器与试剂

主要仪器为Ettan IPGphor II等电聚焦系统(美国GE公司)、蛋白质电泳系统(美国Bio-Rad公司)、PowerLook 2100XL-USB扫描仪(UMAX公司,产地新加坡)、ImageMaster™ 2D Platinum Software 5.0图像分析软件(美国GE公司)。

17 cm IPG胶条(pH值3~10)、尿素、载体两性电解质和碘乙酰胺购自Bio-Rad公司;Acr、Bis、SDS、DTT、β-Me、PVPP、Tris、EDTA、Tris饱和酚、Triton X-100、APS和TEMED等购自上海生工公司;PMSF、CHAPS、CBB R-250和甘氨酸购自Sigma公司;其余所需的常规生化试剂均购自上海生工公司。所有溶液均用18.2 MΩ·cm<sup>-1</sup>的超纯水配制。

### 1.3 油桐种仁蛋白质提取

在预实验中,曾采用3种方法(TCA-丙酮、酚抽

法以及TCA-丙酮结合酚抽法)对油桐种仁蛋白质进行提取。经过对提取蛋白质的浓度测定以及SDS-PAGE电泳的简单分析(本文未列出)之后,最终决定采用提取效果最好的TCA-丙酮结合酚抽法作为本试验的蛋白质提取方法。

### 1.4 蛋白质裂解与定量

在备用材料加入裂解液0.5 mL,混匀后室温下静置4 h。离心,取上清作为蛋白质定量和双向电泳(2-DE)用。蛋白质定量采用Bradford<sup>[15]</sup>的方法。

### 1.5 双向电泳主要影响因素的优化

样品裂解液、等电聚焦(IEF)蛋白质上样量、等电聚焦程度(以伏小时表示)以及第二向SDS-PAGE电泳是影响蛋白质分离效果的几个重要因素。针对这些因素,采用单因素实验设计对其进行优化实验,确定分离效果稳定且良好的各因素最适条件,建立具有良好分离效果的油桐种仁蛋白质组双向电泳技术平台,供后续油桐蛋白质组学研究利用。

## 2 结果与分析

### 2.1 油桐种仁蛋白质提取效果

实验结果显示:TCA-丙酮结合酚抽法所得到的油桐种仁蛋白质有较高的浓度范围和良好的得率(表1)。运用此方法提取油桐种仁蛋白质效果好,可用于双向电泳分析。

表1 TCA-丙酮结合酚抽法提取油桐种仁蛋白质效果

方法	样品质量/g	蛋白质含量/(mg·g <sup>-1</sup> )	蛋白质浓度/(μg·μL <sup>-1</sup> )
TCA-丙酮结合酚抽法	0.5	17.513±0.326 1	6.696 2±0.236 4

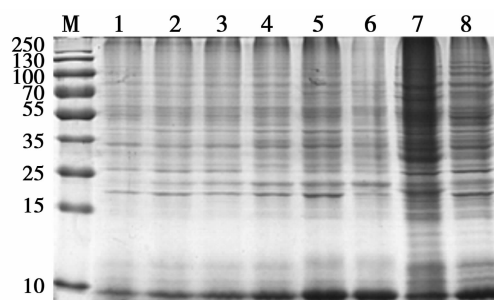
注:表中数值均是在5个数据重复的基础上计算而得,以平均值±标准误差表示。

### 2.2 双向电泳体系的优化

2.2.1 裂解液配方 本实验选取了4种pH值均为8.6的裂解液配方(表2)。根据油桐种仁蛋白质的裂解效果进行SDS-PAGE分析,结果见图1。从图1可以看出:泳道7、8中蛋白质条带均亮于前6条泳道,并且在20 kDa位置,几种裂解液的提取效果是逐渐转好的。对于油桐种仁中高分子量蛋白质(>25 kDa),几种裂解液的裂解效果依次为A≈B<C<D。

表2 裂解液配方

裂解液	配方
A	7 mol·L <sup>-1</sup> 尿素,2 mol·L <sup>-1</sup> 硫脲,2% CHAPS,65 mmol·L <sup>-1</sup> DTT <sup>[16]</sup>
B	7 mol·L <sup>-1</sup> 尿素,2 mol·L <sup>-1</sup> 硫脲,4% CHAPS,1% DTT,0.5% IPG buffer <sup>[17]</sup>
C	7 mol·L <sup>-1</sup> 尿素,2 mol·L <sup>-1</sup> 硫脲,4% CHAPS,1% DTT,2% IPG buffer <sup>[18]</sup>
D	7 mol·L <sup>-1</sup> 尿素,2 mol·L <sup>-1</sup> 硫脲,4% CHAPS,65 mmol·L <sup>-1</sup> DTT,2% IPG buffer <sup>[19]</sup>



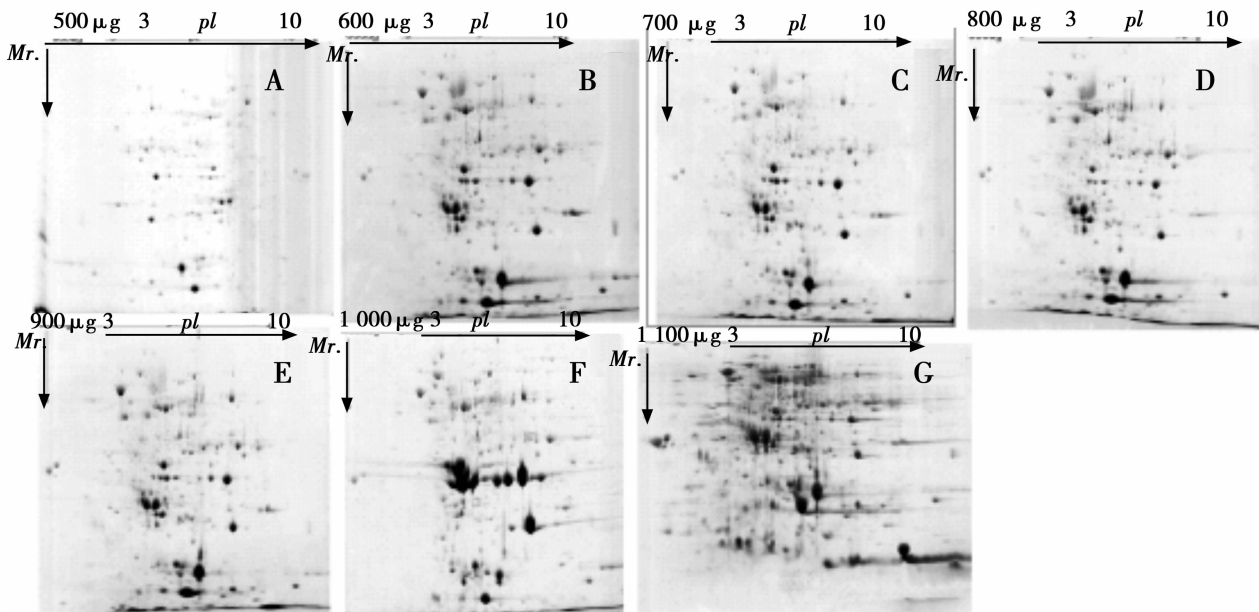
M:蛋白质Marker;泳道1和2,3和4,5和6,7和8分别代表裂解液A、B、C、D

图1 不同裂解液对油桐种仁蛋白质的SDS-PAGE电泳分析

2.2.2 等电聚焦(IEF)蛋白质上样量 以裂解液D对样品进行蛋白质溶解。定量之后,对胶条的蛋白质上样量设置从500 μg到1 100 μg的7个上样梯度,双向电泳(2-DE)结果见图2。图中有明显的蛋

蛋白质聚集沉淀,出现横向条纹,分离出的蛋白质点模糊不清,甚至图 2-G 中还有轻微的纵向条纹出现。上样量为 500  $\mu\text{g}$  时,其蛋白质点数明显偏低。当油桐种仁蛋白质的上样量控制在 600 ~ 900  $\mu\text{g}$  时(图 2-B、2-C、2-D、2-E),蛋白质分离情况较好,分离出的

蛋白质点清晰圆润。经过多次重复实验,发现蛋白质上样量在 700  $\mu\text{g}$  时,实验重复性和稳定性较好。实验最终采用的油桐种仁蛋白质上样量定为 700  $\mu\text{g}$ 。



A、B、C、D、E、F、G 分别表示上样量为 500、600、700、800、900、1 000、1 100  $\mu\text{g}$

胶条 17 cm, pH 值 3 ~ 10; CBB R250 染色。图 3 ~ 5 同。

图 2 不同 IEF 上样量的油桐种仁蛋白质双向电泳结果

2.2.3 等电聚焦程度 在合适的蛋白质上样量情况下,双向电泳(2-DE)图谱的好坏与否很大程度上决定于等电聚焦的程度,因为不管是聚焦过度还是聚焦不完全都会在 2-DE 图上造成横向条纹的出现,故需要根据胶条的长度、pH 值范围与胶条的蛋白质上样量来选择合适的聚焦时间。本实验采取 17 cm 固相胶条,等电聚焦程序如表 3 所示,以聚焦的伏小时(Y)为变量,进行不同梯度的优化实验,其结果见图 3。

表 3 17 cm 胶条等电聚焦程序

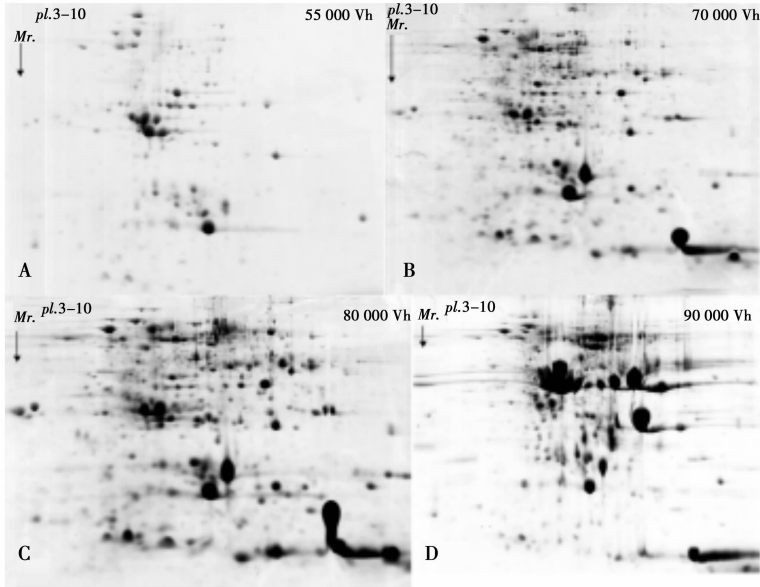
步骤	升压模式	状态	电压/V	时间/h	伏小时/Vh
1	快速	水化	50	14.0	
2	快速	除盐	500	0.5	250
3	快速	除盐	1 000	1.5	1 500
4	线性	升压	8 000	4.0	32 000
5	快速	聚焦	8 000	X	Y
6	快速	保持	500		

注:伏小时(Y) = 电压 × 聚焦电泳时间(X),在等电聚焦程序中以伏小时(Y)为主要优化因素。

在样品裂解液 D 和胶条上样量为 700  $\mu\text{g}$  的基础上,本实验采取等电聚焦 55 000、70 000、80 000、

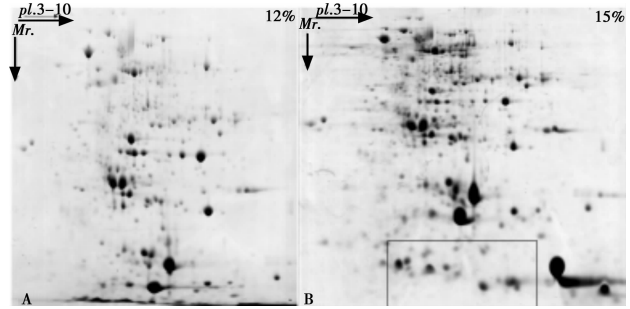
90 000 Vh 4 个梯度进行双向电泳。当等电聚焦 55 000 Vh(图 3-A)时,双向电泳(2-DE)图谱比较干净,但蛋白质点较少且模糊不清;等电聚焦 70 000 Vh(图 3-B)和 80 000 Vh(图 3-C)时,2-DE 图较为清晰;等电聚焦 80 000 Vh 时出现较为轻微的横向条纹,并且蛋白质点有轻微的漂移,发生拖尾;当等电聚焦达到 90 000 Vh(图 3-D)时,不仅出现较为严重的横向条纹,还造成蛋白质聚集沉淀。由此可知,70 000 Vh 为油桐种仁蛋白质双向电泳的最佳聚焦伏小时数。

2.2.4 SDS-PAGE 电泳 第二向 SDS-PAGE 电泳的分离胶浓度会影响蛋白质点分离的清晰度。如果分离胶浓度过高,胶内的孔径较小,造成蛋白质点分离不够清晰,并且会使分子量较为接近的蛋白质点发生重叠;如果分离胶的浓度偏低,虽然蛋白质点能被较好地分离开,清晰度较好,却会使分子量较小的蛋白质点跑出凝胶,发生丢失的情况。从预实验中可知,以恒压、恒流或者恒功率为条件进行蛋白质分离,电泳效果也会不一样。为此,本实验主要优化 SDS-PAGE 电泳的凝胶浓度、电泳运行条件和时间。



A、B、C、D 分别表示聚焦 55 000、70 000、80 000、90 000 Vh  
 图 3 不同聚焦时间的油桐种仁蛋白质双向电泳结果

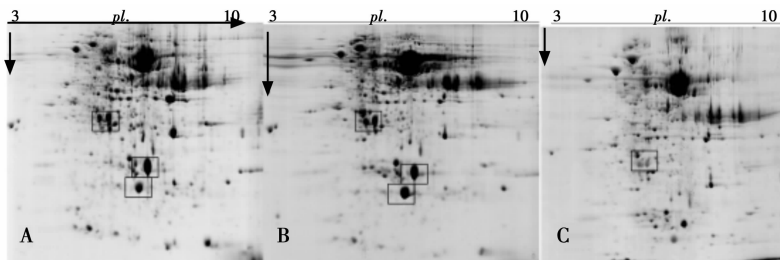
当分离胶的浓度为 12% (图 4-A) 时,很多小分子量蛋白质跑出凝胶外,被丢失;这些被丢失的蛋白点,在浓度为 15% 的分离胶上有所显示(图 4-B 中方框所示)。图 4-B 中显示的高分子量蛋白的分离效果不及图 4-A,这是由于高浓度的 PAGE 胶内的孔径较小,高分子量蛋白质通过较困难,需要的时间更久,在相同的时间内,低浓度的 PAGE 胶分离较为清晰;所以,采用高浓度的分离胶时,适当延长电泳时间,以求得蛋白质点得到充分分离。



A:分离胶浓度为 12%;B:分离胶浓度为 15%  
 图 4 不同浓度的分离胶对双向电泳的影响

采取同一批所提取的蛋白质样品,在相同的分离胶浓度下,分析 SDS-PAGE 电泳时恒流、恒压或者恒功率对蛋白质分离情况的影响(图 5)。结果发现,提取的蛋白质样品中含有较多的盐离子时,等电聚焦效果差,造成 2-DE 图上有较明显的横向条纹和蛋白聚集沉淀;恒流(图 5-A)和恒压(图 5-B)条件

下进行的 SDS-PAGE 电泳分离效果较为相似,几个关键的蛋白质点圆润度和清晰度无明显差别。从整体效果上考虑,恒功率 5 W,电泳时间 8 h 的蛋白质点分离效果较佳(图 5-C)。



A:恒流(16 mA);B:恒压(300 V);C:恒功率(5 W)  
 图 5 不同 SDS-PAGE 电泳条件对双向电泳的影响

2.3 油桐种仁蛋白质双向电泳完整体系

蛋白质双向电泳技术在蛋白质组学研究中的应

用越来越广泛,其技术也越来越成熟,目前已经成为蛋白质组学研究中的经典技术之一。针对不同的植

物材料,双向电泳的各项因素有所变化,本文对油桐种仁蛋白质双向电泳效果的几个主要因素进行优化实验后,最终确定了相应的最佳条件(表4)。根据最佳条件得到的双向电泳(2-DE)图谱(图6)蛋白质点清晰度高、稳定性较好,2-DE图上无明显的纵横向条纹,适合油桐种仁蛋白质的后续实验要求。

表4 油桐种仁蛋白质双向电泳最佳体系

因素	最佳条件
样品制备方法	TCA-丙酮结合酚抽法
裂解液配方	7 mol · L <sup>-1</sup> 尿素, 2 mol · L <sup>-1</sup> 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol · L <sup>-1</sup> DTT, 2% IPG buffer
IEF 蛋白质上样量	700 μg
等电聚焦程度	70 000 Vh
SDS-PAGE 电泳凝胶浓度	15%
SDS-PAGE 电泳运行条件	恒定功率 5 W, 电泳时间 8 h

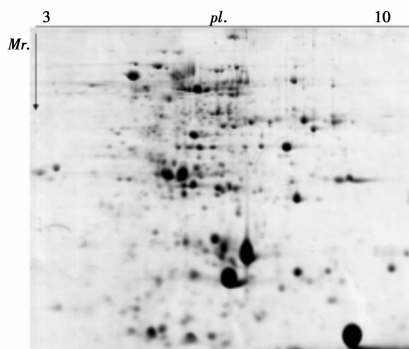


图6 油桐种仁蛋白质双向电泳结果

### 3 讨论

油桐种仁蛋白质的样品制备作为双向电泳(2-DE)流程的第一步,在整个蛋白质组学研究中起着至关重要的作用,是双向电泳分析中蛋白质点高分辨率分离的关键<sup>[20-21]</sup>。植物蛋白质提取方法多样,其中TCA-丙酮沉淀法可使蛋白酶失活、去除杂质和干扰物质,但难以使蛋白质复溶,蛋白质损失较大<sup>[22-23]</sup>;酚抽法自Hurkman等<sup>[24]</sup>1986年设计并成功提取植物膜蛋白后就被广泛应用于提取植物总蛋白,更适用于富含抑制电泳复合物的顽拗性植物组织。就蛋白提取效果而言,酚抽法要好于TCA-丙酮沉淀法<sup>[25]</sup>,但操作复杂和耗时。与油桐同属的大戟科(Euphorbiaceae)植物麻疯树(*Jatropha curca* L.),其种子含有多种蛋白质和次生代谢物质<sup>[26]</sup>,严重影响2-DE图谱的分辨率,因此,为寻找合适的油桐种仁蛋白质提取方法,本研究进行了TCA-丙酮沉淀法、酚抽法以及TCA-丙酮结合酚抽法的对比实验。结果显示TCA-丙酮结合酚抽法的效果较好,酚抽法

次之,TCA-丙酮沉淀法最次(本文未列出)。

TCA-丙酮结合酚抽法用于提取植物总蛋白,融合了TCA-丙酮沉淀法和酚抽法的优点,虽能得到较高质量的2-DE图谱<sup>[27-28]</sup>,但依然存在高丰度蛋白聚集遮掩低丰度蛋白<sup>[29]</sup>在2-DE图上显现的问题。此类难题,在植物蛋白质组分析中普遍存在。李红兵等<sup>[30]</sup>对小麦(*Triticum aestivum* L.)叶片蛋白质组经过大量去除严重影响2-DE图谱分辨率的高丰度蛋白(核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶,Rubisco酶)之后,双向电泳图谱无干扰条纹出现,清晰度高,低丰度蛋白能得到更好的显现。如何借鉴这一成功经验,使其应用在油桐种仁蛋白质2-DE分析中是下一步工作的关键。

在酚抽提过程中,植物组织中的大多数水溶性化合物(多糖、核酸等)留在了水相中,而多酚和脂质则能够与蛋白质共提取和共沉淀<sup>[31]</sup>。蛋白样品中夹杂的多酚化合物使2-DE图谱具有纵向条纹;同时油桐种仁中存在的大量油脂和在蛋白质沉淀过程中引入的盐离子,也会干扰等电聚焦(IEF)。研究证明<sup>[32]</sup>,在研磨样品时加入PVPP能有效降低多酚类物质和色素,提高2-DE图谱的分辨率,但本文中这一结论得不到体现,2-DE图谱中仍出现少量的纵向条纹,分析其原因,可能是由于所加入的PVPP量少(5%)造成的,未能彻底去除样品所含的多酚和脂质等杂质,应该将其用量增加到10%,并增加丙酮和甲醇的洗涤次数。同时,2-DE图谱上横向条纹的出现,分析其原因主要有以下几种:一是由于蛋白质上样量过高,致使高丰度蛋白聚集沉淀而引起的横向条纹;二是由于聚焦过度(90 000Vh)所造成的横向条纹;三是由于在样品制备过程中,每级抽提时引入如盐离子等杂质的量过多,增加了胶条的导电性,引起电内渗,进而干扰到蛋白质的等电聚焦,在2-DE图谱上表现出横向条纹;四是由于蛋白质样品未能完全被溶解而对等电聚焦进行干扰。

2-DE胶的染色方法也能影响蛋白质点的最终检出效果。王清<sup>[33]</sup>等对几种不同果实的2-DE图谱进行过不同染色方法的比较,发现考马斯亮蓝(CBB R-250)染色法<sup>[34]</sup>、胶体考马斯亮蓝(CBB G-250)染色法<sup>[35]</sup>对最终蛋白质点的检出无甚明显区别,但与银染法<sup>[36]</sup>有一定差距,并且这3种方法都适合果实蛋白质组研究需求,不过最终考虑到与蛋白质质谱鉴定的兼容性宜选用CBB法。故本文在油桐种仁蛋白质双向电泳流程中,采用CBB R-250法进行2-

DE 胶染色。

重复性和稳定性是自 2-DE 技术被发明以来最大的限制性因素,也是制约其广泛应用的关键因素。虽然 IPG-IEF 技术的使用极大地提高了实验结果的重复性和稳定性,但在实验操作过程中仍要注意细节问题。要确保实验结果的高重复性和高稳定性,可考虑使用同一公司生产的同一批试剂、同一操作人员和操作程序、相同分析软件、相同检测参数等来实现。本实验中,对每种处理都进行了 3 次重复,经图像分析软件检测,相同处理间的蛋白质匹配率在 72% 以上。基于上述研究结果,所建立的油桐种仁蛋白质双向电泳体系,能满足开展后续蛋白质组学研究的实验要求。

### 参考文献:

- [1] 蔡金标,丁建祖,陈必勇. 中国油桐品种、类型的分类[J]. 经济林研究,1997, 15(4): 47-50
- [2] 凌麓山,何方,方嘉兴,等. 中国油桐品种分类的研究[J]. 经济林研究,1991, 9(2): 1-8
- [3] 刘翠峰,王彦英,翟运吾,等. 油桐豫桐 1 号等 3 个优良家系的选育[J]. 经济林研究,1996, 14(1): 45-47
- [4] 吕平会,李龙山,谢复明,等. 油桐优良单株选择[J]. 经济林研究,1993, 11(2): 88-91
- [5] 龚榜初,蔡金标. 油桐育种研究的进展[J]. 经济林研究,1996, 14(1): 51-53
- [6] 刘益兴,贺赐平,李正茂,等. 不同繁殖方式对油桐树体结构及产量的影响[J]. 中南林业科技大学学报,2010, 30(5): 61-66
- [7] 隆振雄. 油桐北移引种幼苗越冬相关性状的遗传分析[J]. 西北林学院学报,1996, 11(3): 31-35
- [8] 涂炳坤,郭刚奇,徐正红,等. 油桐数量性状的主成分分析及分类[J]. 华中农业大学学报,1994, 13(3): 296-300
- [9] 夏道鸿,卢龙高. 油桐主要经济性状与产油相关分析[J]. 浙江林业科技,1992, 12(1): 32-33
- [10] 吴开云,费学谦,姚小华. 油桐 DNA 快速提取以及 RAPD 扩增的初步研究[J]. 经济林研究,1998, 16(3): 28-30
- [11] 汪阳东,李元,李鹏. 油桐桐酸合成酶基因克隆和植物表达载体构建[J]. 浙江林业科技,2007, 27(2): 1-5
- [12] 李鹏,汪阳东,陈益存,等. 油桐 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立[J]. 林业科学研究,2008, 21(2): 194-199
- [13] 李建安,孙颖,陈鸿鹏,等. 油桐 LFAFY 同源基因片段的克隆与分析[J]. 中南林业科技大学学报,2008, 28(4): 21-26
- [14] 龙红旭,谭晓风,陈洪,等. 油桐油体蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 中南林业科技大学学报,2010, 30(4): 31-38
- [15] Bradford M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254
- [16] Magni C, Scarafoni A, Herndl A, et al. Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome [J]. Phytochemistry, 2007, 68(7): 997-1007
- [17] Wang X Q, Yang P F, Zhang X F, et al. Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens* [J]. Proteomics, 2009, 9(19): 4529-4538
- [18] Han F, Chen H, Li X J, et al. A comparative proteomic analysis of rice seedlings under various high-temperature stress [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1794(11): 1625-1634
- [19] Liu H, Liu Y J, Yang M F, et al. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2009, 51(9): 850-857
- [20] Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. Trends Biotechnol, 1999, 17(3): 121-127
- [21] Rabilloud T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis: an outline [M]// Link A J. Methods molecular biology, Vol. 112: 2-D proteome analysis protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999: 9-19
- [22] Saravanan R S, Rose J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. Proteomics, 2004, 4(9): 22-32
- [23] Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H, et al. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis [J]. Electrophoresis, 2003, 24(1-2): 207-216
- [24] Hurkman W J, Tanaka C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis [J]. Plant Physiol, 1986, 81(3): 802-806
- [25] 李德军,邓治,陈春柳,等. 植物组织双向电泳样品制备方法研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(24): 78-82
- [26] Liu H, Yang Z L, Yang M F, et al. The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of *Jatropha curcas* [J]. Plant Science, 2011, 181(6): 660-666
- [27] Wang W, Vignani R, Scali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27(13): 2782-2786
- [28] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two dimensional gel electrophoresis analysis [J]. Proteomics, 2005, 5(10): 2497-2507
- [29] Shaw M M, Riederer B M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis [J]. Proteomics, 2003, 3(8): 1408-1417
- [30] 李红兵,康振生. 小麦叶片蛋白质组分析中高丰度蛋白 Rubisco 酶的快速去除方法研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2011, 39(6): 223-228
- [31] Yao Y, Yang Y W, Liu J Y. An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2-DE [J]. Electrophoresis, 2006, 27(22): 1-11
- [32] 曹景林,朱龙付,谭家福,等. 适用于蛋白质双向电泳的棉花胚性培养物蛋白质提取技术[J]. 棉花学报, 2009, 21(1): 3-9
- [33] 王清,产祝龙,秦国政,等. 果实蛋白质组学研究的实验方法[J]. 植物学报, 2009, 44(1): 107-116
- [34] Meyer T S, Lamberts B L. Use of Coomassie Brilliant Blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips [J]. Biochim Biophys Acta, 1965, 107(14): 144-145
- [35] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333
- [36] Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, et al. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview [J]. Cell Mol Bio, 1990, 40(1): 57-75