DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00612

甘蓝型油菜蛋白质双向电泳体系的建立

甘露^{1,2} 李殿荣^{1,3} 臧新⁴ 付春华^{1,2} 余龙江^{1,2} 栗茂腾^{1,2,*}

¹ 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430074; ² 分子生物物理教育部重点实验室, 湖北武汉 430074; ³ 陕西省杂交油菜研究中心, 陕西大荔 715105; ⁴ 郑州大学生物工程系, 河南郑州 450001

摘要: 选用油菜品种 08127, 采用 TCA-丙酮提取方法, pH 4~7 胶条和改进的 IEF 聚焦程序, 得到较好的蛋白质双向电泳结果, 建立了一种适合甘蓝型油菜的双向电泳体系。利用其他甘蓝型油菜品种的幼苗、叶片和茎中的蛋白检验该实验体系, 都能得到较好的蛋白质双向电泳结果。利用该实验体系比较甘蓝型油菜幼苗不同发育时期蛋白质双向电泳图, 找到二者之间的差异点, 选取部分点成功进行了质谱分析。

关键词: 甘蓝型油菜; 蛋白质; 双向电泳

Construction of Protein Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis System for *Brassica napus*

GAN Lu^{1,2}, LI Dian-Rong^{1,3}, ZANG Xin⁴, FU Chun-Hua^{1,2}, YU Long-Jiang^{1,2}, and LI Mao-Teng^{1,2,*}

¹ Institute of Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 43007, China; ² Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Wuhan 430074, China; ³ Hybrid Rapeseed Research Center of Shaanxi Province, Dali 715105, China; ⁴ Bioengineering Department of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis has been widely applied in proteomic researches. The approach can analyze dynamic changes of proteomics of biological samples under different conditions to identify specific proteins and genes. The two-dimensional gel systems for rice, *Arabidopsis*, and other species have been established. The purpose of this research was to establish a suitable system for *B. napus* to analyze proteomics. Rapeseed variety of 08127 was used in the experiment, the proteins were obtained by the trichloroacetic extraction method with pH 4–7 gel brands under the improved IEF procedure, showing a clean two-dimensional electrophoresis map. Therefore, a proper system for *B. napus* was formed. Then the system was validated by using the young seedlings, leaves and stems from other varieties, and the same results as those from variety 08127 were obtained. The proteomics profiling of seedlings in different ages of *B. napus* was analyzed by using the previous established protocol, we found 20 up-regulated and 51 down-regulated proteins with more than two times changes in 30 days old *B. napus* stems compared with in 15 days old *B. napus* stems and some of the different protein spots were successfully identified. The system established in this study is useful for *B. napus* proteomic research in the future.

Keywords: *Brassica napus*; Protein; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

蛋白质双向电泳 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE) 技术可以在一块凝胶上分辨出 1 800 多个蛋白质点^[1], 能同时分析成百上千的基因表达产物。目前, 2-DE 技术已成为蛋白质组学研究的核心和首选技术^[2-3], 利用 2-DE 技术能够比较分析生物样品在不同条件下蛋白质组的动态变化, 从而发现和鉴定出特异功能的蛋白质及基因^[4]。2-DE 技术利用的是蛋白质等电点 (isoelectric point,

PI) 和分子量 (molecule weight, MW) 两个特性, 在水平 (第一向) 和竖直 (第二向) 方向分别进行蛋白质的等点聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 进而得到蛋白质的二维分离图谱。2-DE 技术最早由 O'Farrell 等^[5]于 1975 年建立, 自 1982 年 Bjellqvist 等^[6]发明固相 pH 梯度胶 (immobilized pH gradients, IPG) 后, 消除

本研究由国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2009AA101105), 新世纪优秀人才支持计划和华中科技大学自主创新基金 (M2009059) 项目资助。

* 通讯作者 (Corresponding author): 栗茂腾, E-mail: limateng426@163.com; limateng426@mail.hust.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: ganluhust@gmail.com

Received (收稿日期): 2009-09-08; Accepted (接受日期): 2009-12-24.

了传统 IEF 的阴极漂移和重现性差等缺点^[7], 其分辨率和重复性不断改进, 成为蛋白质组学研究的主流技术。

随着植物功能基因组学研究的深入, 该技术已在拟南芥^[8-10], 水稻^[11-12]等模式植物中得到广泛应用; 对于一些非模式生物, 如大豆^[13]、烟草^[14]、番茄^[15]等, 也展开了相关研究。目前, 2-DE 技术主要集中在植物生理蛋白质组学、植物遗传多样性蛋白质组学、植物突变体蛋白质组学和植物发育蛋白质组学这 4 个方面^[16]。关于油菜蛋白质组学研究仅见少数报道, 如 Luis 等^[17]研究了低温条件下甘蓝型油菜幼苗蛋白质合成的变化, 发现低温处理下幼苗的蛋白质合成和基因的表达都发生了改变。Mihir 等^[18]对油菜雄性不育系和野生型进行了研究, 结果表明二者蛋白质表达谱呈现出明显差异。Hajduch 等^[19]研究甘蓝型油菜种子成熟过程中蛋白质的表达过程, 得到了种子成熟过程中的 794 个蛋白质表达差异点。Agrawal 等^[20]深入比较了油菜与大豆种子成熟过程中的蛋白质表达差异; Sheoran 等^[21]研究了甘蓝型油菜花粉萌发过程中蛋白质的动态表达。而国内在油菜中进行蛋白质组学方面的研究却很少。

本研究目的是找到合适的油菜蛋白质提取方法和 IEF 程序, 建立一种适合于甘蓝型油菜的双向电泳体系, 并应用该体系分析甘蓝型油菜幼苗不同发育时期蛋白质表达谱, 找到相关差异表达蛋白, 为进一步的油菜蛋白质组学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取本实验室保存的油菜品种 08127 种子, 播种于直径 10 cm 的蛭石塑料盆中, 蛭石与珍珠岩为 2:1 的配比, 每 2 d 浇一次营养液, 营养液的配方为: 2 mmol L⁻¹ KNO₃, 3 mmol L⁻¹ CaCl₂, 1 mmol L⁻¹ K₂SO₄, 0.5 mmol L⁻¹ MgSO₄, 0.4 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 0.15 mmol L⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 mmol L⁻¹ Fe-Na-EDTA, 14 mmol L⁻¹ H₃BO₃, 5 mmol L⁻¹ MnSO₄, 3 mmol L⁻¹ ZnSO₄, 0.7 mmol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.7 mmol L⁻¹ CuSO₄, 0.1 mmol L⁻¹ CoCl₂^[22]。

1.2 蛋白质的提取和定量

1.2.1 TCA/丙酮法 参照 Damerval 等^[23]方法, 略做改进。取 1 g 叶片或茎段, 双蒸水冲洗干净后加液氮研磨成粉末, 再加 10 倍体积-20℃预冷的含 10% Trichloroacetic acid (TCA, 三氯乙酸)和 0.07% Dithiothreitol (DTT, 二硫苏糖醇)的丙酮, 于-20℃

沉淀 1 h 后在 4℃ 12 000×g 条件下离心 30 min, 弃上清液; 在沉淀中加入 10 倍体积预冷的含 0.07% DTT 丙酮, 于-20℃静置 1 h 后在 4℃ 12 000×g 条件下离心 30 min, 弃上清液, 重复 3 次; 沉淀经室温风干后加入 500 μL lysis buffer (裂解液), 其中含 7 mol L⁻¹ 尿素, 2 mol L⁻¹ 硫脲, 4%CHAPS (3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲氨基基]-1-丙磺酸), 1 mmol L⁻¹ PMSF (苯甲基磺酰氟), 50 mmol L⁻¹ DTT, 0.5% Triton X-100, 0.5% Ampholine (两性电解质), 振荡混匀, 室温放置 1 h 后在 4℃ 12 000×g 条件下离心 20 min, 取上清液保存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 Tris-HCl 法 参照谷瑞升等^[24]方法, 略做改进。取 1 g 叶片或茎段, 双蒸水冲洗干净后加液氮研磨, 加入提取液 (65 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8, 0.5% SDS, 10%甘油和 5% β-巯基乙醇), 于 4℃振荡提取 1 h 后, 在 4℃ 12 000×g 条件下离心 30 min, 取上清液; 在上清液加入 10 倍体积的 10% TCA-0.07% DTT-丙酮, 在-20℃沉淀 1 h, 4℃ 12 000×g 离心 30 min, 去上清液; 沉淀加入足量的 0.07% DTT-丙酮, 涡旋混匀, 于 -20℃ 1 h; 12 000×g 离心 30 min (4℃), 去上清液, 重复 3 次此步骤; 沉淀经室温风干后用水化上样缓冲液 (7 mol L⁻¹ 尿素, 2 mol L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol L⁻¹ DTT, 0.2% ampholine, 0.001% Bromophenol blue)将其溶解, 于-80℃冰箱保存备用。

1.2.3 蛋白质定量 使用 Bio-Rad 蛋白质定量试剂盒(500-0122), 按操作说明书进行, 标准蛋白为小牛血清标准蛋白。

1.3 蛋白质双向电泳

IEF 使用 17 cm Bio-Rad IPG 干胶条, 按照 Bio-Rad 双向电泳操作手册操作, 上样量为 1 mg, 上样体积 300 μL。按定量后计算出的样品含量, 吸取一定体积的样品溶液, 加入 IEF 上样缓冲液(7 mol L⁻¹ 尿素, 2 mol L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol L⁻¹ DTT, 0.2% Ampholine, 0.001% Bromophenol blue)至 300 μL 进行等电聚焦(表 1)。等电聚焦结束后, 立即进行胶条平衡, 平衡分两步, 每次 15 min。平衡液 I 含 6 mol L⁻¹ 尿素, 2% SDS, 0.375 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8), 20% Glycerol (甘油), 2% DTT, 平衡液 II 含 6 mol L⁻¹ 尿素, 2% SDS, 0.375 mol L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 20% Glycerol, 2.5% Iodacetamide (碘化乙酰胺)。平衡结束后, 立即进行第二向电泳。使用 Bio-Rad PROTEAN II xi Cell 电泳系统, SDS-PAGE 胶浓度制

备成 10%, 采用稳流模式, 电流设定为 10 mA/gel, 45 min; 20~30 mA/gel, 6~7 h。电泳结束后, 采用 Blue Silver 法^[25]染色, 用固定液(40%甲醇, 10%乙酸)固定 1 h, 去离子水水洗 15 min, 加染液(0.12%考马斯亮蓝 G-250, 10% 硫酸铵, 10%磷酸, 20%甲醇)染色 24 h, 去离子水脱色至背景清楚。

表 1 等电点聚焦程序

Table 1 Running condition of isoelectric focusing (IEF)

步骤 Step	电压 Voltage (V)	升压模式 Voltage increase model	时间 Time (h)
S1	50	线性 Linear	14
S2	50	线性 Linear	1
S3	200	线性 Linear	1
S4	500	线性 Linear	1
S5	1000	线性 Linear	1
S6	10000	线性 Linear	5
S7	10000	快速 Accelerated	80000 Vhr
S8	500	快速 Accelerated	任意时间

1.4 凝胶扫描和图像分析

待 SDS-PAGE 凝胶脱色完全后, 用 UMAX Powerlook 2100XL 进行图像扫描, 扫描分辨率为 300 dpi, 用 PDQuest 8.01 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)软件对扫描图像进行分析。选取主胶, 手动选择原始图像上的最大点和最弱点, 选择高斯模型, 去除背景, 运行自动斑点检测, 然后手动匹配斑点, 将所有斑点标准化, 分析凝胶之间的斑点表达差异, 得出最终的报告结果。

1.5 质谱分析

取实验组与对照组凝胶上的目标差异点, 利用基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)进行质谱分析^[26]。用枪头或全自动斑点切取系统挖取差异点, 转入 1.5 mL EP 管中, 超纯水洗两次, 1:1 加入脱色液 (30 mmol L⁻¹ 亚铁氰化钾, 100 mmol L⁻¹ 硫代硫酸钠, 100 mmol L⁻¹ 碳酸氢铵, pH 8.0)脱色 20 min; 水洗两次, 加入乙腈脱水, 真空干燥, 然后加入 20 ng μ L⁻¹ 胰蛋白酶 10~20 μ L, 37℃过夜; 加入丝氨酸提取液(50%乙腈, 5%三氟乙酸) 50 μ L 提取 15 min, 重复 2 次, 真空干燥后加入 0.1%三氟乙酸溶解样品 10 μ L, 用于质谱分析。

取 2 μ L 上述提取液, 和等体积质谱上样液(10 mg mL⁻¹ α -氰基-4-羟基, 50%乙腈, 0.1%三氟乙酸)混

合, 使用 BrukerAutoflex II 进行 MALDI-TOF-MS 分析鉴定。程序设置如下: 20 kV 加速电压, 60%~65% 网格电压, 160 ns 延迟, 200/光谱的激光使蛋白点分裂为 1~4 kD 的肽段, 得到质谱表达峰图。根据肽指纹谱图, 结合 MASCOT 搜索引擎 (<http://www.matrixscience.com/>)和 NCBI 蛋白质数据库, 进行蛋白质比对鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白质提取方法和不同 pH 胶条所得到的 2-DE 结果比较

从图 1-a~b 看出, TCA-丙酮法提取的蛋白质呈现出较好的聚焦结果, 背景清晰, 蛋白质点无横纵条纹, 而 Tris-HCl 法虽然呈现出来的蛋白质点比较多, 但是杂质难以去干净, 出现较多的横纵条纹, 影响结果分析。因此, TCA-丙酮法可能更适合甘蓝型油菜蛋白质双向电泳分析。

通过分析两种不同方法提取的蛋白质在 pH 为 3~10 胶条上的 2-DE 图, 推测甘蓝型油菜总蛋白主要分布在 pH 4~7 之间。因此, 利用 pH 3~10 的胶条不能有效地将蛋白质点分开。为了得到更好的分离效果, 用 pH 4~7 的胶条对 TCA-丙酮法提取的蛋白质样品进行试验, 结果显示分离效果有了明显提高, 在 pH 3~10 胶条上没有分开的点已经完全分开(图 1-c)。经 PDquest 8.01 软件分析, 在 pH 4~7 的胶上共检测到 382 个有效蛋白质点。

2.2 不同聚焦时间对蛋白质双向电泳图谱的影响

等电点聚焦是最终影响 2-DE 胶图好坏的关键因素。聚焦不充分, 会在 2-DE 胶图上呈现蛋白质点的横向条纹, 最终影响结果的分析。虽然 Bio-Rad 的操作手册上推荐 17 cm IPG 胶条的总聚焦功率为 60 000 Vhr, 但实际操作表明, 60 000 Vhr 的总聚焦功率不能使甘蓝型油菜样品充分的聚焦。

图 2 为不同聚焦时间对甘蓝型油菜幼苗的 2-DE 胶图的影响, 可以看出, 用 17 cm IPG pH 4~7 胶条(上样量 1 mg), 当总聚焦为 70 000 Vhr 时, 蛋白质聚焦还未充分, 2-DE 胶图上的蛋白质点呈现较多的横条纹(图 2-a); 而当总聚焦为 80 000 Vhr 时, 蛋白质聚焦充分, 2-DE 胶图上的蛋白质点呈现较好的圆点, 无横向拖尾(图 2-b)。因此, 对于不同的样品, 应摸索出最适合的聚焦时间, 才能得到更好的 2-DE 图谱。将本蛋白提取方法和聚焦时间用于其他甘蓝型油菜品系的茎段和叶片的 2-DE 分析, 同样得到了较

图 1 TCA-丙酮法和 Tris-HCl 法提取的甘蓝型油菜蛋白质双向电泳图谱

Fig. 1 2-DE map of *B. napus* proteins extracted by TCA/acetone and Tris-HCl

a: TCA-丙酮法; b: Tris-HCl 法; c: TCA-丙酮法提取甘蓝型油菜的蛋白质在 17 cm pH 4~7 IPG 胶条图谱。

a: TCA/acetone extraction method; b: Tris-HCl extraction method; c: 2-DE map of *B. napus* proteins extracted by TCA/acetone and separated with 17 cm strips, pH 4~7.

好的 2-DE 结果(图 2-c, d), 这说明本实验方法具有广泛的适用性。

2.3 甘蓝型油菜幼苗发育蛋白质的双向电泳比较

分别选取生长 15 d 和 30 d 的油菜幼苗, 采用 TCA-丙酮法提取总蛋白, 按上述流程进行双向电泳分析(图 3-a, b)。使用 PDquest 8.01 软件对不同苗龄的油菜 2-DE 图谱进行表达差异分析(图 3-c, d)。结果显示, 在 15 d 苗龄和 30 d 苗龄的蛋白质 2-DE 图谱上分别检测到 329 个和 372 个蛋白质点。与 15 d 苗龄幼苗的蛋白质 2-DE 图谱比较, 30 d 苗龄幼苗的蛋白质点发生变化的一共有 181 个, 其中变化量在 1.1 倍以上的点一共有 118 个; 进一步分析, 有 71 个蛋

白点的表达量变化在 2 倍以上, 包括 20 个上升表达的点和 51 个下降表达的点, 其中, 表达量上升和下降在 5 倍以上的点分别有 5 个和 9 个。

为了判断 2-DE 上的蛋白点是否可以进行蛋白质测序分析, 把其中的部分蛋白点挖出(图 3-a'), 并送上海中科新生命生物科技有限公司利用 MALDI-TOF 方法进行质谱分析(图 3-e, e'), 3-a' 标示的蛋白质共被分成 17 个肽段, 对质谱分析所得肽段与多肽蛋白数据库中蛋白质的理论肽段进行比较, 判断出所测蛋白与已知拟南芥中的一个转运因子(PATELLIN 1)的 C.I 达到 99.44%, 证明通过本试验方法分离出的蛋白质可很好地用于质谱分析。

图 2 不同总聚焦功率对 2-DE 影响

Fig. 2 Effect of different total volt-hours on the two-dimensional gel electrophoresis

a 和 b 分别为总聚焦功率 70 000 Vhr 和 80 000 Vhr 时的电泳图; c 和 d 分别为甘蓝型油菜茎段和叶片电泳图。

a and b represent the volt-hours of 70 000 Vhr and 80 000 Vhr, respectively; c and d represent two-dimensional gel of stem and leaf from *B. napus*, respectively.

3 讨论

样品制备是双向电泳技术的第一步,也是最关键的一步,其成功与否直接决定着最终的 2-DE 结果^[27]。样品制备的失败,会导致最终实验的失败,因此,找到一种合适的样品制备技术,是进行双向电泳研究的基础^[28]。研究表明,样品中的盐分、水溶性有机物、大分子带电基团等物质均会产生不良影响,因此,样品制备原则是尽可能去除这些干扰物质。目前,在植物样品制备中,最常用的蛋白提取方法主要包括丙酮法、TCA-丙酮法、Tris-HCl 法和酚-甲醇-醋酸铵法等。TCA-丙酮法比较快捷,蛋白和丙酮可以一起沉淀下来,但是在丙酮沉淀时大量糖类也会同时沉淀下来而对电泳图谱质量造成影响;酚法虽然步骤相对比较复杂,但通过不同相选择性溶解,仍能有效去除有机物杂质。不同试验材料所含的糖类、脂肪、色素等物质可能有所不同,因此,要对蛋白提取方法进行适当的调整才能达到好的分离

效果^[29]。

样品制备的另一重要方面就是蛋白质的裂解,在蛋白质样品裂解时,应尽可能多地溶解蛋白质以及保持整个过程中蛋白质的溶解性和活性^[27]。本文所报道的 TCA-丙酮提取方法和 lysis buffer,对甘蓝型油菜样品的蛋白质提取具有较好的效果,提取后的样品的核酸和盐分等杂质含量少,聚焦过程中能顺利升压到 10 000 V 的高压,并且最终的 2-DE 图谱背景无核酸等杂质的干扰,能得到较好的 2-DE 图谱,有利于后续的分析研究。本实验室已用该方法对不同甘蓝型油菜品种以及不同的取材部位(幼苗、叶片、茎等)进行研究,均能得到较好的 2-DE 图谱,表明该方法对甘蓝型油菜的蛋白质学研究是合适的。影响双向电泳结果的另一个方面,是等电聚焦(IEF)。样品只有在高电压下得到充分的聚焦,才能保证最终得到较好的 2-DE 图谱。IEF 最常见问题就是难以升到指定电压,这主要由于样品中盐离子含量较高,因此,必需找到更合适的提取方法或经过

图 3 不同苗龄的甘蓝型油菜蛋白质双向电泳图谱

Fig. 3 2-DE map of *B. napus* at the different seedling ages

a 和 b 分别为 15 d 和 30 d 苗龄蛋白质双向电泳图谱; a'' 为 SSP 9101 蛋白点在 15 d 和 30 d 的差别; c 和 d 分别表示 a 和 b 中选定区域内蛋白质表达量的三维图谱; e 为 a' 中的标示蛋白点的质谱分析结果。

a and b represent the two-dimensional gel of *B. napus* at 15 and 30 day-old seedlings, respectively; a'' represents the difference of the SSP 9101 protein points in 15 and 30 day-old seedlings; c and d represent the 3D map of the selected part of a and b, respectively; e represents the MS/MS results of the proteins labeled in a' region.

脱盐处理。聚焦不充分主要因达不到设定电压或聚焦功率不足, 在 2-DE 胶图上会表现出蛋白质点的横条纹, 影响最终的分析。但是, 聚焦也并不是越长越好, 过量的聚焦也会导致最终胶图上横条纹的产生,

因此对于不同长度的 IPG 胶条和不同样品的上样量, 需要找到合适的聚焦程序, 才能得到较好的 2-DE 胶图。

在蛋白质双向电泳中, 平衡过程也十分关键,

其目的是促使 SDS 与蛋白质充分作用。平衡缓冲液母液包括 Tris-HCl (pH 8.8), SDS (2%), 高浓度尿素 (6 mol L^{-1}) 和甘油 (20%), 可以提高蛋白的溶解度并减少电内渗。第一部加入 DTT (1%) 是为了使蛋白去折叠, 第二步加入碘乙酰胺是为了去除多余的 DTT (银染过程中, DTT 会导致电脱尾)。平衡过程会导致蛋白质丢失 (5%~25%), 同时会使分辨率降低。但是, 如果不经平衡或是平衡不充分, 则会导致高分子量蛋白质的纹理现象, 并且等电聚焦凝胶会粘在 SDS 胶上。因此, 平衡的原则是时间要充分长 (至少 $2 \times 10 \text{ min}$) 但不能过长 (不超过 $2 \times 15 \text{ min}$)。本实验成功利用建立的 2-DE 体系, 对甘蓝型油菜幼茎的发育进行了相关研究, 比较发育 15 d 和 30 d 苗龄茎的蛋白质 2-DE 图谱, 分别监测到了 329 个和 372 个蛋白质点, 进一步经过 PDquest 8.01 的分析, 找到了 20 个表达量上升 2 倍和 51 个表达量下降 2 倍的蛋白质点, 对于相关差异点的质谱鉴定和进一步的分析, 本实验室将在后续研究中继续进行。

4 结论

TCA-丙酮法提取蛋白样品结果优于 Tris-HCl 法, 适合于甘蓝型油菜的不同组织材料 (幼苗、叶片、茎), 结合适当的聚焦程序, 能得到较好的双向电泳图谱。利用所建立的双向电泳体系找到了发育 15 d 和 30 d 苗龄茎的差异蛋白, 并选取部分点进行质谱分析, 证明本文所报道的体系可适用于甘蓝型油菜的双向电泳研究。

References

- [1] Choe L H, Lee K H. A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: The multiphor, the IPGphor and the protean IEF cell. *Electrophoresis*, 2000, 21: 993–1000
- [2] Cutler P, Bell D J, Birrell H C, Connelly J C, Connor S C, Holmes E, Mitchell B C, Monté S Y, Neville B A, Pickford R, Polley S, Schneider K, Skehel J M. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis*, 1999, 20: 3647–3658
- [3] Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1037–1053
- [4] Liang Y (梁宇), Jing Y-X (荆玉祥), Shen S-H (沈世华). Advances in plant proteomics. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2004, 28(1): 114–125 (in Chinese with English abstract)
- [5] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, 250: 4007–4021
- [6] Bjellqvist B, Ek K, Righetti P G, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 1982, 6: 317–339
- [7] Lei H-L (雷红灵), Fu M (付明), Wu Y-Y (吴永尧). Study on two-dimension electrophoresis of seed proteins of *Cardamine ensliensis*. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2008, 47(10): 1114–1116 (in Chinese with English abstract)
- [8] Gallardo K, Job C, Groot S P C, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination: A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol*, 2002, 129: 823–837
- [9] Jiang Y Q, Yang B, Harris N S, Deyholos M K. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *J Exp Bot*, 2007, 58: 3591–3607
- [10] Rutschow H, Ytterberg A J, Friso G, Nilsson R, van Wijk K J. Quantitative proteomics of a chloroplast SRP54 sorting mutant and its genetic interactions with CLPC1 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148: 156–175
- [11] Parker T, Flowers T J, Moore A L, Harpham N V. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1109–1118
- [12] Kim S T, Kim S G, Kang Y H, Wang Y, Kim J Y, Yi N, Kim J K, Rakwal R, Koh H J, Kang K Y. Proteomics analysis of rice lesion mimic mutant (sp/1) reveals tightly localized probenazole-induced protein (PBZ1) in cells undergoing programmed cell death. *J Proteome Res*, 2008, 7: 1750–1760
- [13] Natarajan S, Xu C, Caperna T J, Garrett W M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal Biochem*, 2005, 342: 214–220
- [14] Amme S, Rutten T, Melzer M, Sonnsman G, Vissers J P, Cschesler B, Mock H P. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 2005, 5: 2508–2518
- [15] Chen S B, Gollop N, Heuer B. Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: Effect of genotype and exogenous application of glycinebetaine. *J Exp Bot*, 2009, 60: 2005–2019
- [16] Huang-Pu H-Y (皇甫海燕), Guan C-Y (官春云), Guo B-S (郭宝顺), Zhang X-Y (张秀英). Progress in proteomics and plant proteomics research. *Crop Res* (作物研究), 2006, (5): 577–581 (in Chinese with English abstract)
- [17] Meza-Basso L, Alberdi M, Raynal M, Ferrero-Cadinanos M L, Delseny M. Changes in protein synthesis in rapeseed (*Brassica napus*) seedlings during a low temperature treatment. *Plant Physiol*, 1986, 82: 733–738
- [18] Mihr C, Baumgartner M, Dieterich J H, Schmitz U K, Braun H P. Proteomic approach for investigation of cytoplasmic male sterility (CMS) in Brassica. *J Plant Physiol*, 2001, 158: 787–794
- [19] Hajduch M, Casteel J E, Hurrelmeyer K E, Song Z, Agrawal G K, Thelen J J. Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*: Developmental characterization of metabolic isozymes using

- high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*, 2006, 141: 32–46
- [20] Agrawal G K, Hajduch M, Graham K, Thelen J J. In-depth investigation of the soybean seed-filling proteome and comparison with a parallel study of rapeseed. *Plant Physiol*, 2008, 148: 504–518
- [21] Sheoran I S, Pedersen E J, Ross A R, Sawhney V K. Dynamics of protein expression during pollen germination in canola (*Brassica napus*). *Planta*, 2009, 230: 779–793
- [22] Desclos M, Dubousset L, Etienne P, Caherec F L, Satoh H, Bonnefoy J, Ourry A, Avie J C. A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1830–1844
- [23] Damerval C, Vienne D D, Zivy M, Thiellement H. Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling protein. *Electrophoresis*, 1986, 7: 53–54
- [24] Gu R-S(谷瑞升), Liu Q-L(刘群录), Chen X-M(陈雪梅), Jiang X-N(蒋湘宁). An improved method of 2D electrophoresis for protein analysis of woody plants. *J Beijing For Univ* (北京林业大学学报), 1999, 21(5): 7–10 (in Chinese with English abstract)
- [25] Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G M, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti P G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1327–1333
- [26] Li X H, Wu X F, Yue W F, Liu J M, Li G L, Miao Y G. Proteomic analysis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) hemolymph during developmental stage. *J Proteome Res*, 2006, 5: 2809–2814
- [27] Ruan S-L(阮松林), Ma H-S(马华升), Wang S-H(王世恒), Xin Y(忻雅), Qian L-H(钱丽华), Tong J-X(童建新), Zhao H-P(赵杭苹), Wang J(王杰). Advances in plant proteomics: I. Key techniques of proteome. *Hereditas* (遗传), 2006, 28(11): 1472–1486 (in Chinese with English abstract)
- [28] Garfin D. Two-dimensional gel electrophoresis: An overview. *Trends Anal Chem*, 2003, 22: 263–272
- [29] Wu M-C(吴满成), Hu H-T(胡海涛), Yu Y-J(余有见), Sun N(孙娜), Yang L(杨玲). Extraction and improvement of two-dimensional electrophoresis analysis of proteins from berries of *Elaeagnus umbellata* Thunb. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2009, 45(7): 695–698 (in Chinese)