

技术与方法 Techniques and Methods

甜瓜叶片中Rubisco的去除及双向电泳体系的优化

钟俐, 马成梅, 梁永增, 李冠*

新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐830046

摘要: 为降低Rubisco的干扰, 建立适合于甜瓜叶片蛋白质的双向电泳技术, 本文比较了不同全蛋白提取方法和上样量对双向电泳的影响。结果表明, Mg/NP-40/PEG3350/TCA/丙酮提取法可去除样品中绝大多数的Rubisco, 使低丰度蛋白得以检测, 适合后续分析。以该法提取的蛋白, 采用600、800、1 000和1 200 μg 四种上样量进行双向电泳, 上样量为1 000 μg 的样品用pH 3~10的IPG胶条, 在2-DE胶上分辨出质量好、数量多的蛋白质点(562个)。因此, Mg/NP-40/PEG3350/TCA/丙酮法是适合甜瓜叶片蛋白质提取的方法, 1 000 μg 是最适上样量。

关键词: 甜瓜; Rubisco; 蛋白质提取; 双向电泳; 上样量

Depletion of Rubisco from *Cucumis melon* Leaf and Optimization of Two-Dimensional Electrophoresis for Proteome

ZHONG Li, MA Cheng-Mei, LIANG Yong-Zeng, LI Guan*

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

Abstract: This research compared the effects of different methods of protein extraction of *Cucumis melon* leaves and different loading amounts on 2-DE profile. The results indicated that Mg/NP-40/PEG3350/TCA/acetone precipitation was a suitable method for subsequent analysis attributed to reducing the interference of Rubisco. There were 562 proteins could be well resolved and detected in the gels when 1 000 μg protein of leaves was loading with pH 3~10 IPG strips. All the results showed that Mg/NP-40/PEG3350 TCA/acetone precipitation was much more suitable for protein extraction and 1 000 μg was the optimum loading amount of *Cucumis melon* leaves.

Key words: *Cucumis melo* L.; Rubisco; protein extraction; two-dimensional electrophoresis (2-DE); loading quantity of sample

蛋白质双向电泳技术(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是研究差异蛋白质组学的重要技术(O' Faneli 1975)。该技术为在蛋白质水平上研究和比较不同生理条件下生物体的蛋白质表达提供了很好的平台。双向电泳技术与质谱技术的结合, 能迅速地鉴定蛋白质及其蛋白表达量的变化信息, 重复性好, 可信度高。这项技术自创立以来, 在植物蛋白组学研究中得到了广泛应用。研究者运用蛋白质组学的相关技术和方法对分离到的相关蛋白质进行了大量的鉴定工作, 发现了许多与病害胁迫密切相关的蛋白质。玉米(李冠军和付凤玲2006; Sauer等2006)、黄瓜(李凤玉等2008)、大豆(Xu等2008)、水稻(Kim等2011)等植物的蛋白质双向电泳技术已有所报道。此外, 蛋白质组学技术还用于分析非生物因子胁迫下植物的蛋白响应过程, 如低温(Patton等2007)、高温

(He和Huang 2007)、干旱(Iria等2010)、盐害(霍晨敏等2004)等。

在植物蛋白质组双向电泳过程中, 某个组织中如果存在一种或几种超高丰度的蛋白, 不仅会掩盖一些低丰度蛋白的显示(Herman等2003), 还可能在电泳过程中影响相邻蛋白的泳动(Cho等2008)。甜瓜为葫芦科(Cucurbitaceae)甜瓜属(*Cucumis*)一年生草本植物。其叶片中Rubisco (1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)含量很高, 约占总蛋白含量的40%~50%, 对双向电泳造成较大干扰。为

收稿 2011-12-12 修定 2012-01-20

资助 国家自然科学基金(31060148)、新疆维吾尔自治区自然科学基金(2011211A013)和新疆维吾尔自治区高技术研究发展项目(201111120)。

* 通讯作者(E-mail: guanli@xju.edu.cn; Tel: 0991-8581106)。

了深入研究甜瓜抗病的分子机制,从蛋白质组水平上探索其蛋白质及基因的表达差异很有必要,然而甜瓜蛋白质的双向电泳技术研究目前未见报道。本研究以甜瓜幼苗叶片为材料,对双向电泳结果影响最大的全蛋白质的提取、Rubisco的去除和上样量进行了优化,不仅为甜瓜叶片蛋白组学研究提供科学依据,也为其他以Rubisco含量丰富的绿色组织为材料的植物蛋白质的双向电泳技术提供参考资料。

材料与方法

1 实验材料

供试品种为新疆甜瓜(*Cucumis melo* L.)主栽品种伽师瓜(*Cucurbitaceae melo* var. *saccharinus* Naud)。将甜瓜种子浸种催芽后,播种于蛭石:珍珠岩按3:1配制的基质的营养钵中,在光照培养箱内培养,培养条件为温度(25±2)℃、光照强度为2 500 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照周期为14 h·d⁻¹,每周浇一次Hoagload培养液,待幼苗长至四叶一心时,选取生长一致的甜瓜叶片,进行全蛋白的提取。

2 试剂和仪器

硫脲、碘乙酰胺(IAA)、载体两性电解质IPG-buffer、pH 3~10的干胶条、矿物油购于美国GE公司;尿素、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸铵(AP)、TEMED、Tris-base为Sigma公司产品;考马斯亮蓝G-250、牛血清白蛋白(BSA)为Amresco公司产品;甲醇、磷酸、冰乙酸、甘油、TCA等试剂均为国产分析纯。溶液的配制及稀释均为超纯水。

试验中用到的仪器如下,GE HealthCare公司的IPGphor 3聚焦仪和二向电泳系统Ettan DALT six、Bio-Rad Mini-3垂直电泳槽、Heraeus高速低温离心机、Labtech UV1000紫外分光光度计、Microtec scanwizard蛋白扫描分析仪和Image master 7.0 Demo凝胶分析软件。

3 蛋白质干粉的制备

3.1 TCA/丙酮法

参考王海云等(2010)的方法,略作改进。取3.0 g甜瓜叶片液氮充分研磨后,加入25 mL预冷的10% TCA/丙酮溶液(w/v),-20℃静置过夜;次日,4℃,10 000×g离心30 min,弃上清;沉淀震荡悬浮于预冷的丙酮溶液中;静置1 h,4℃,9 500×g离心15

min,弃上清,重复2次;沉淀用90%的冰浴丙酮溶液(w/v)悬浮,静置1 h,4℃,9 500×g离心15 min,弃上清,沉淀低温冷冻干燥,得蛋白质干粉,置于-70℃冰箱保存备用。

3.2 Tris-饱和酚法

参考Carpentier等(2005)、Coumans等(2009)的方法,略作改进。取3.0 g甜瓜叶片于液氮中研磨至细粉状,悬浮于缓冲液[含50%苯酚、250 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.6)、450 mmol·L⁻¹ 蔗糖、50 mmol·L⁻¹ EDTA、2 mmol·L⁻¹ PMSF、2 mmol·L⁻¹ DTT和100 mmol·L⁻¹ KCl]中,摇匀。静置15 min,4℃,10 000×g离心30 min,收集酚相。加入3倍体积0.1 mol·L⁻¹乙酸铵-甲醇溶液,混匀,-20℃过夜,4℃,12 000×g离心20 min,沉淀用3倍体积0.1 mol·L⁻¹乙酸铵-甲醇溶液洗涤2次,-20℃预冷的90%丙酮溶液洗2次,沉淀于4℃冷冻干燥。蛋白质干粉-70℃保存

3.3 磷酸缓冲液直接提取法

取1.0 g新鲜的甜瓜幼叶,加少量(约10%)的水不溶性PVP,迅速用液氮研磨成粉状,倒进装有预冷的磷酸缓冲液(pH 7.0)的离心管中,混匀,冰浴15 min,12 000×g离心15 min,取上清用于蛋白电泳分析或-70℃保存。

3.4 Mg/NP-40/PEG3350/TCA/丙酮提取法

参考Kim等(2001)的方法,略作修改。取3.0 g甜瓜叶片,液氮充分研磨后加入预冷的10 mL Mg/NP-40溶液[含0.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8)、2% (v/v) NP-40、1% (w/v) PVPP、20 mmol·L⁻¹ MgCl₂和2% (v/v) β-巯基乙醇],4℃提取2 h,10 000×g离心20 min;上清液中加入PEG3350,使其终浓度为15%;混匀,冰上孵育30 min,10 000×g离心20 min,其中上清中加入预冷的10% TCA/丙酮溶液,-20℃沉淀过夜;7 500×g离心15 min,沉淀用预冷的丙酮[含0.07% (v/v) β-巯基乙醇]悬浮,-20℃沉淀30 min;8 000×g离心15 min,重复3次,直至上清无色,用90%丙酮[含0.07% (v/v) β-巯基乙醇]重新悬浮,8 000×g离心20 min,沉淀冷冻干燥后置于-70℃冰箱保存备用。15% PEG3350分级沉淀中加入2 mL裂解液35℃水浴裂解2 h,10 000×g离心20 min,上清中加入预冷的10% TCA/丙酮,-20℃沉淀过夜;6 000×g离心15 min,沉淀用预冷的90%丙酮溶液

[含0.07% (v/v) β -巯基乙醇]悬浮, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀30 min; $8\ 500\times g$ 离心15 min, 弃上清; 沉淀冷冻干燥。

4 蛋白质的裂解及含量测定

将15% PEG3350上清与沉淀中分别提取到的蛋白质干粉以1:25 (m/v)加入裂解液[含7 mol·L⁻¹尿素、2 mol·L⁻¹硫脲、4% CHAPS、0.5% (v/v) IPG缓冲液(pH 3~10)、100 mmol·L⁻¹ DTT和痕量溴酚蓝], $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴2 h, 每隔0.5 h振荡混匀1次, 使样品充分裂解, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\ 000\times g$ 离心5 min, 取上清, 用Bradford法测定蛋白质含量, 标准蛋白为BSA。已知蛋白含量的裂解液直接用于上样或 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

5 样品的1-DE分析

采用非变性SDS-PAGE法, 电极缓冲液含0.1% SDS, 0.384 mol·L⁻¹的甘氨酸和0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3); 化合聚合法制胶, 12.5%分离胶, 3%浓缩胶, 浓缩胶电压为80 V, 分离胶电压为130 V。浓度为1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品每孔上样10 μL 或20 μL , 电泳至溴酚蓝标志至凝胶前沿为止。用含40% (v/v) 甲醇和10% (v/v) 醋酸的固定液固定15 min, 蒸馏水漂洗3次, 每次15 min, 考马斯亮蓝染液染色1.5 h, 蒸馏水脱色至背景无色。实验重复3次, Microtec scanwizard扫描仪扫描照相。

6 样品的2-DE分析

第一向等电聚焦(IEF)采用18 cm, pH 3~10的IPG胶条。分别吸取含600、800、1 000和1 200 μg 蛋白的样品溶液, 补足裂解液至350 μL , 移至水化盘中, 将胶条胶面朝下放入样品水化液中, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下跑胶过夜。次日, 取出胶条, 胶面朝上置于聚焦盘上, 覆盖矿物油, 置于IPGphor 3上, 聚焦条件为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mA·胶⁻¹, 电压和时间参数为: 500 V (Step 3 h)→1 000 V (Grad 1 h)→2 000 V (Grad 1 h)→4 000 V (Grad 1 h)→10 000 V (Grad 1 h)→10 000 V (Step 5 h)→500 V (Grad 1 h)→500 V (Step 10 h)。

第二向采用胶浓度为12.5%的SDS-PAGE, 等电聚焦结束后, 迅速取出IPG胶条, 分别于10 mL含100 mg DTT的平衡液I和10 mL含250 mg碘乙酰胺的平衡液II [平衡液中含50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8)、6 mol·L⁻¹尿素、30% (v/v)甘油、2% (w/v) SDS及痕量溴酚蓝]中平衡15 min, 取出胶条, 用滤纸小心吸去残余平衡液, 再用电极缓冲液[0.025 mol·L⁻¹ Tris、0.192 mol·L⁻¹甘氨酸、0.1% (w/v)

SDS, pH 8.3)]润洗1 s, 并转移至第二向SDS-PAGE胶上, 放入Ettan DALT six电泳体系进行电泳, 先10 mA·胶⁻¹, 电泳2 h, 之后改用30 mA·胶⁻¹电泳, 溴酚蓝前沿至凝胶底部边缘时停止电泳。胶体考马斯亮蓝染色法染色。每处理重复做3块胶, Microtec scanwizard蛋白扫描分析仪扫描凝胶图像; Image Master 7.0软件分析凝胶图像。

实验结果

1 甜瓜叶片全蛋白质最佳提取方法

蛋白质样品的制备决定了双向电泳的分辨率、重复性和图谱的清晰度。蛋白质提取过程中, 要去除影响蛋白质可溶性和双向电泳重复性的物质(如核酸、脂类和多糖、盐类小分子)及高丰度蛋白。本文比较了4种甜瓜叶片蛋白质干粉的制备方法, 结果表明: 以TCA/丙酮法提取的蛋白质样品中不能有效去除Rubisco, 其大亚基(large subunit of Rubisco, LSR)和小亚基(small subunit of Rubisco, SSR)在1-DE胶(图1, 泳道1)上可见含量丰富, 尤

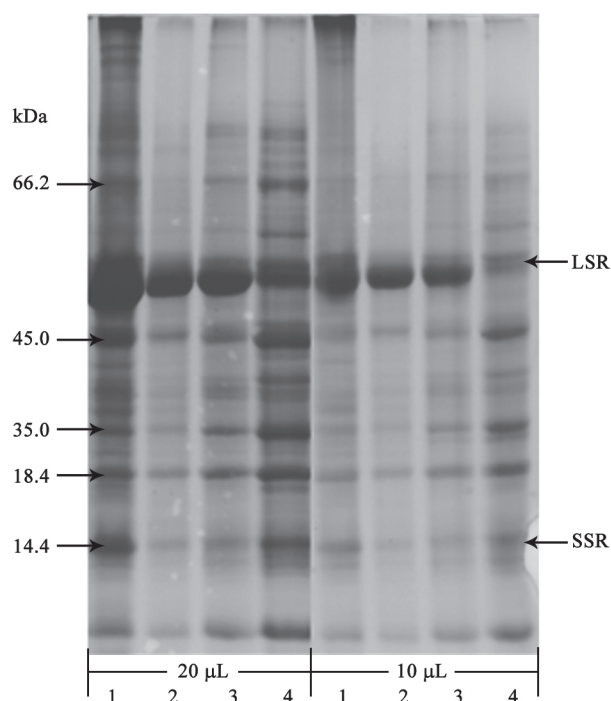


图1 甜瓜叶片4种提取方法的1-DE分析
Fig.1 1-DE analysis of melon leaf proteins extracted with 4 methods

泳道1: TCA/丙酮法; 泳道2: Tris-饱和酚法; 泳道3: 磷酸缓冲液法; 泳道4: NP-40/PEG3350/TCA/丙酮法。

以大亚基为多。双向电泳后得到的蛋白点约有238个(图3-A), 分析蛋白质点数不多的原因是由于在上样量一定的条件下, 含量过高的Rubisco使低丰度蛋白在2-DE胶上未充分显现; 用Tris-饱和酚法提取的蛋白质所得1-DE图谱条带少, 不能有效去除Rubisco的大亚基(图1, 泳道2), 2-DE电泳图谱的蛋白点也较少, 且有明显的拖尾现象(图3-B); 磷酸缓冲液提取法步骤简单, 成本低, 但蛋白提取率偏低, 1-DE图谱蛋白条带少(图1, 泳道3), 双向电泳等电聚焦时电压上升波动大, 2-DE图谱纵横条纹多, 干扰大, 蛋白形状不规则且蛋白质点少(图3-C), 提取效果差。而采用Mg/NP-40/PEG3350预处理, 然后用TCA/丙酮沉淀法提取的甜瓜叶片蛋白质经1-DE (图1, 泳道4)和2-DE (图2; 图3-D)可知: 包括Rubisco的大小亚基在内的3种高丰度蛋白及极少量的其他蛋白质分布于PEG3350的沉淀中, 绝大多数蛋白质分布于PEG3350的上清液中, 因此采用Mg/NP-40/PEG3350预处理法使得中低丰度蛋

白得以检测, 经2-DE检测到蛋白质点约549个。

选择pH范围合适的IPG胶条对双向电泳的结

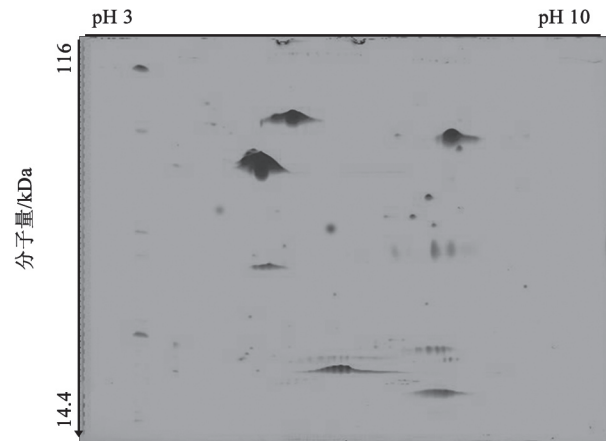


图2 PEG3350分级提取时在沉淀中提取到的甜瓜叶片蛋白质的2-DE图谱

Fig.2 2-DE analysis of melon leaf proteins fractionated in the precipitation of PEG3350
pH 3~10, 18 cm胶条, 上样量为1 000 μ g。

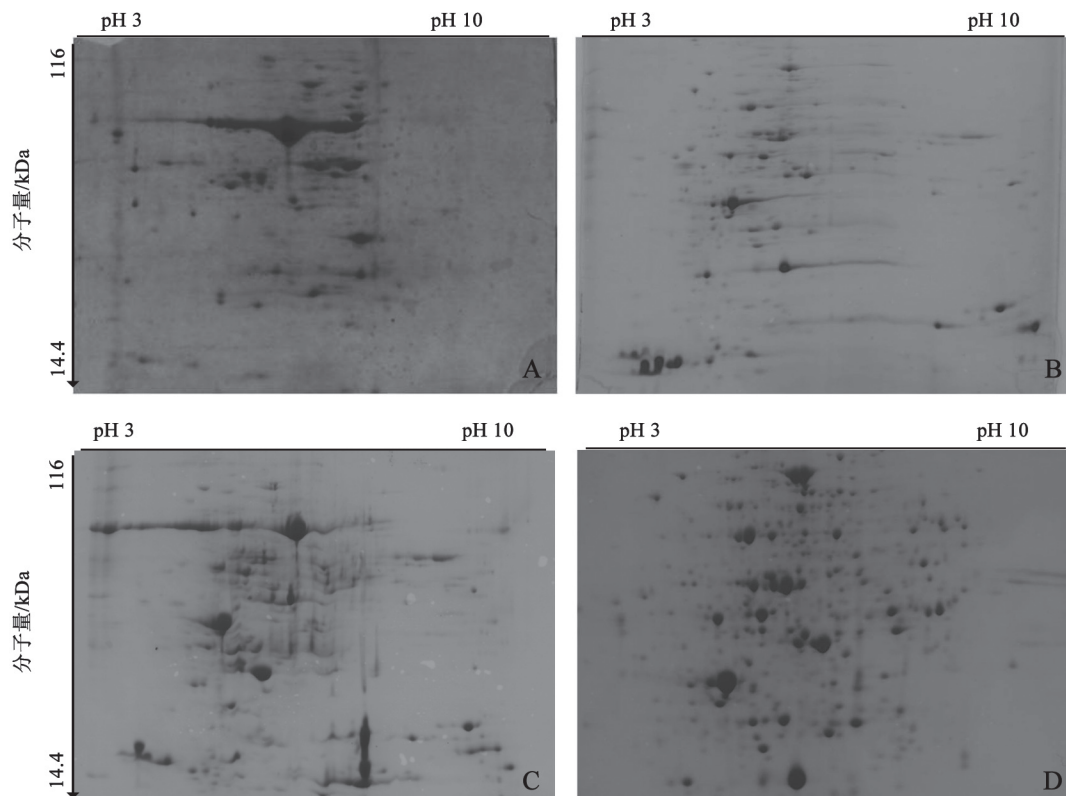


图3 甜瓜叶片蛋白质不同提取方法的2-DE图谱分析

Fig.3 2-DE analysis of melon leaf proteins extracted with 4 methods

A: TCA丙酮法; B: Tris-饱和酚法; C: 磷酸缓冲液法; D: Mg/NP-40/PEG3350/TCA/丙酮法。pH 3~10, 18 cm胶条, 上样量均为1 000 μ g。

果影响较大。本研究中甜瓜叶片中的大部分蛋白质分布在pH 3~10范围内。因此, 可以选择pH 3~10, 18 cm的IPG胶条。

2 甜瓜叶片2-DE蛋白质上样量的确定

图4显示, 上样量对双向电泳图谱分辨率有明显的影响: 当甜瓜叶片蛋白质的上样量为600 μg 时, 蛋白质点虽然无拖尾现象, 但2-DE图谱上只检出了约100个蛋白质点, 低丰度蛋白数量很少(图4-A), 上样量为800 μg 蛋白检出率与上样量为600 μg 的2-DE结果没有明显区别(图4-B), 当蛋白质上样量为1 000 μg 时, 蛋白质点数量多(562个), 形态好, 呈圆点型, 边界清晰且在胶面上分布均匀, 几乎无纵向与横向拖尾, 检出的低丰度蛋白质的数量明显增加(图4-C), 有利于后续的鉴定分析; 而当蛋白质上样量增加到1 200 μg 时, 蛋白质点数虽有一定增多, 但是由于样品中蛋白含量、杂质及盐离子浓度的增加, IEF过程中电压上升缓慢, 部分高

丰度蛋白在电泳过程中影响其周围的蛋白质, 使得一些分子量或等电点相近的蛋白质无法有效分开(图4-D)。因此, 甜瓜叶片蛋白质上样量为1 000 μg 时, 双向电泳图谱效果较好, 过高或过低的上样量不利于获得高质量的双向电泳图谱。

讨 论

蛋白质是生命活动的执行者, 因此可以从细胞或个体中蛋白质变化的角度解释或阐明生命活动的基本规律。大多数组织中的大部分蛋白都能通过2-DE技术得以分离, 除非是含量极低的调节蛋白或信号分子蛋白(Gorg等2004)。蛋白组学的限制因子之一是缺乏有效的方法使含量很少的基因产物得以显示, 究其原因主要在于较低的样品承载量, 虽然现在有了商品化的IPG胶条, 也只是在一定程度上缓解了这个问题。样品的提取是2-DE的关键步骤, 蛋白与非蛋白成分的种类与数

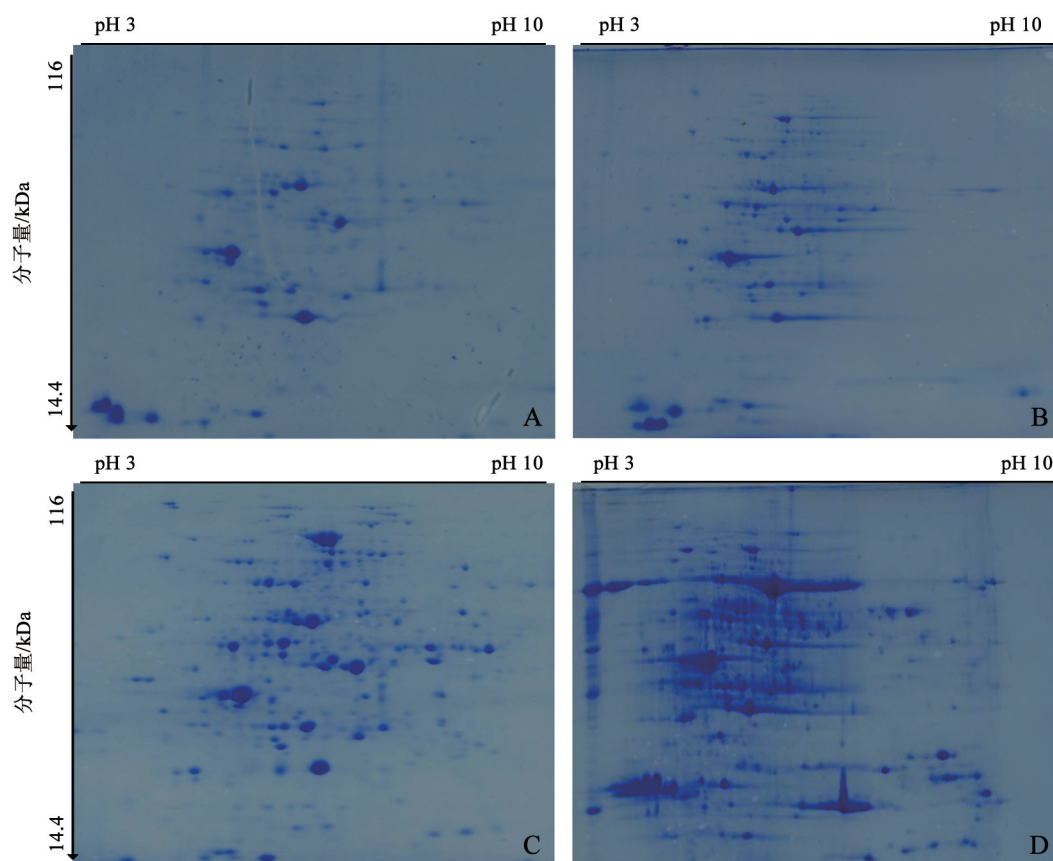


图4 甜瓜叶片蛋白质2-DE上样量分析

Fig.4 2-DE analysis with different proteins loading quantity

蛋白质上样量如下, A: 600 μg ; B: 800 μg ; C: 1 000 μg ; D: 1 200 μg . pH 3~10, 18 cm胶条。

量因材料来源的不同而有很大区别(Hille等2001; Shaw和 Riederer 2003), 因此全蛋白的提取方法也必须针对材料的特性加以选择和优化。目前应用于双向电泳的植物全蛋白质提取方法主要有: TCA/丙酮沉淀法、Tris-饱和酚法、Trizol沉淀法、Tris-丙酮-酚法、尿素-硫脲提取法等等, 不论采用何种方法, 最根本的目的是去除样品中的非蛋白组分, 获得高纯度、无干扰杂质和尽可能多的蛋白质(Xie等2007)。

Tris-饱和酚缓冲液提取时蛋白组分在酚相, 核酸在水相, 使蛋白与核酸得以分离, 该法的优点是能将蛋白水解最小化, 利于膜蛋白的提取, 去除2-DE过程中干扰IEF的非蛋白组分; 缺点是提取过程复杂, 步骤多, 导致蛋白样品在制备过程中容易损失, 所得蛋白量少, 不利于后续分析; 用Tris-饱和酚法以绿色植物为材料提取蛋白样品时, Rubisco大亚基含量高, 样品溶解不充分。TCA/丙酮法比Tris-饱和酚法步骤简单, 能很好地抑制蛋白酶的活性, 其缺点和Tris-饱和酚法一样, 提取效率低, 不能有效去除Rubisco, 在IEF上样缓冲液中的溶解性差。Rubisco大量存在于植物细胞的叶绿体中(Feller等2008), 对低丰度表达蛋白具有明显的掩盖效应, 而某些低丰度蛋白往往具有重要功能。Kim等(2001)通过实验证明具有调控功能的信号转导因子, 如Gα、水稻ADP糖基化因子(ADP-ribosylation factor, ARF)、GTP连接蛋白等低丰度蛋白均在15% PEG4000的上清液中, 14-3-3蛋白则分布于20% PEG4000的沉淀中。Kim等(2001)还发现在2-DE之前用PEG4000分级提取还有一个优点: 即相同质量的样品的蛋白点数量是TCA/丙酮法所得样品中蛋白点数量的2.7倍, 即PEG法有助于富集低丰度蛋白。本试验采取Mg/NP-40预分离法可以提高蛋白质的溶解性, 然后用15%的PEG3350分级沉淀, 使甜瓜叶片中大部分的Rubisco留在沉淀中, 而样品中其他蛋白, 尤其是低丰度蛋白主要处于上清液中, 然后用TCA/丙酮沉淀, 制得的蛋白质样品取得了较好的2-DE效果, 在后续研究中, 我们用该体系对接种白粉病前后的甜瓜叶片进行了蛋白组学分析, 经质谱分析筛选到多个与甜瓜抗病性相关的差异蛋白, 进一步的分析鉴定及功能验证实验还在进行中。因此本试验建立的甜瓜叶片

蛋白质双向电泳体系能够满足后续试验中筛选与甜瓜抗病性相关的信号转导因子及病程相关蛋白的需要。

参考文献

- 霍晨敏, 赵宝存, 葛荣朝, 沈银柱, 黄占景(2004). 小麦耐盐突变体盐胁迫下的蛋白质组分析. 遗传学报, 31 (2): 1408~1414
- 李凤玉, 潘德灼, 陈伟(2008). 黄瓜子叶节的蛋白质组双向电泳条件的优化. 植物生理学通讯, 44 (5): 963~967
- 李冠军, 付凤玲(2006). 玉米叶片总蛋白提取和双向电泳技术的改进. 玉米科学, 14 (6): 100~103
- 王海云, 丁义, 符真珠, 何松林(2010). 不同提取方法及上样量对牡丹试管苗茎基部蛋白双向电泳的影响. 基因组学与应用生物学, 29 (1): 91~96
- Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, (5): 2497~2507
- Cho JH, Hwang H, Cho MH, Kwon YK, Jeon JS, Bhoo SH, Hahn TR (2008). The effect of DTT in protein preparations for proteomic analysis: removal of a highly abundant plant enzyme, ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Biol*, 51: 297~301
- Coumans JV, Poljak A, Raftery MJ, Backhouse D, Pereg-Gerk L (2009). Analysis of cotton (*Gossypium hirsutum*) root proteomes during a compatible interaction with the black root rot fungus *Thielaviopsis basicola*. *Proteomics*, 9 (2): 335~349
- Feller U, Anders I, Mae T (2008). Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J Exp Bot*, 59: 1615~1624
- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4: 3665~3885
- He Y, Huang B (2007). Protein changes during heat stress in three kentucky bluegrass cultivars differing in heat tolerance. *Corp Sci*, 47: 2513~2520
- Herman EM, Helm RM, Jung R, Kinney AJ (2003). Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol*, 132: 36~43
- Hille JM, Freed AL, Watzig H (2001). Possibilities to improve automation, speed and precision of proteome analysis: a comparison of two-dimensional electrophoresis and alternatives. *Electrophoresis*, 22: 4035~4052
- Iria S, Brini F, Goday A, Masmoudi K, Pages M (2010). Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (ProteomeLab PF-2D) – A wider perspective of the proteome. *J Proteomics*, 73: 1707~1721
- Kim SG, Wang YM, Wu J, Kang KY, Kim ST (2011). Physiological and proteomic analysis of young rice leaves grown under nitrogen-starvation conditions. *Plant Biotechnol Rep*, 5: 309~315
- Kim ST, Cho KS, Jang YS, Kang KY (2001). Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, 22: 2103~2109
- O' Faneli PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250: 4007~4021

- Patton AJ, Cunningham SM, Volenec JJ, Reicher ZJ (2007). Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses: I. Role of proteins. *Crop Sci*, 47: 2162~2169
- Sauer M, Jakob A, Nordheim A, Hochholodinger F (2006). Proteomic analysis of shoot borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Proteomics*, 6: 2530~2541
- Shaw MM, Riederer BM (2003). Sample preparation for two dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 3: 1408~1417
- Xie H, Pan SL, Liu SF, Ye K, Huo KK (2007). A novel method of protein extraction from perennial *Bupleurum* root for 2-DE. *Electrophoresis*, 28: 871~875
- Xu CP, Sullivan JH, Garrett WM, Caperna TJ, Natarajan S (2008). Impact of solar ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. *Phytochemistry*, 69: 38~48