

技术与方法 **Techniques and Method****建立和优化双向电泳分析柱花草根系蛋白谱的方法**陈志坚<sup>1</sup>, 严炜<sup>1,2</sup>, 孙丽莉<sup>1,2</sup>, 刘国道<sup>2</sup>, 廖红<sup>1</sup>, 田江<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>华南农业大学根系生物学研究中心, 广州 510642; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 571737

**摘要:** 本研究以柱花草根系为材料, 比较了不同蛋白质提取方法和蛋白上样量等因素对双向电泳方法分析根系蛋白图谱的影响。结果表明, 在苯酚法提取蛋白中, 加入  $0.7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 和 20% 乙醇, 并在蛋白沉淀过程中加入 1/10 倍体积  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 能够有效去除组织样品中的非蛋白成分, 结合使用 pH 4~7 范围的 IPG 胶条, 1 mg 根系蛋白可以在双向电泳图谱上分辨出较多蛋白点, 图谱背景清晰, 该体系适合柱花草根系蛋白质的双向电泳分析。

**关键词:** 双向电泳; 蛋白提取; 柱花草

**Establishment and Optimization of Two Dimensional Electrophoresis System for Analyzing Protein Profiles in Stylo Roots**CHEN Zhi-Jian<sup>1</sup>, YAN Wei<sup>1,2</sup>, SUN Li-Li<sup>1,2</sup>, LIU Guo-Dao<sup>2</sup>, LIAO Hong<sup>1</sup>, TIAN Jiang<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Root Biology Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Crops Genetic Resource, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Danzhou, Hainan 571737, China

**Abstract:** In the study, effects of different methods of protein extraction and loading on analyzing protein profiles of stylo roots were investigated using the two-dimensional electrophoresis (2-DE). The results showed that 2-DE could be optimized by using the modified phenol extraction buffer containing  $0.7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl and 20% ethanol, the precipitation buffer containing 1/10 volume  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl. Totally, 500 protein spots could be well resolved and detected in the gels when 1 mg protein of roots was separated using pH 4~7 IPG strip. All the results suggested that the method was suitable for the study of 2-DE of stylo roots.

**Key words:** 2-DE; protein extraction; stylo

双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学研究的核心技术, 已广泛应用于研究蛋白表达模式、蛋白互作、亚细胞定位、蛋白修饰等蛋白功能与调控方面(Patterson和Aebersold 2003)。植物组织中含有诸多非蛋白成分, 如多糖、酚类物质、色素、脂类、单宁以及其他次级代谢物等, 这些成分会干扰双向电泳图谱中蛋白的分离, 导致双向电泳得不到满意的结果(Shaw 和 Riederer 2003; Hille 等 2001)。蛋白质提取过程中植物组织样品中的非蛋白成分的去除是双向电泳技术的关键步骤, 是影响双向电泳质量与后续研究工作的重要因素。非蛋白成分的种类和数量因不同植物种类、不同器官和不同生长发育阶段而异, 蛋白提取方法必须针对提取材料的特性进行优化(Gorg 等 2004; Shaw 和 Riederer 2003)。近年来, 已报道许多适用于不同植物样品的蛋白提取方法,

如 Tris-HCl 提取法、苯酚提取法和 TCA 丙酮提取法等, 已被广泛应用于水稻(Yin 等 2007; Yan 等 2006; Salekdeh 等 2002)、玉米(Li 等 2007; Sauer 等 2006)、大豆(Xu 等 2008)、大麦(Witzel 等 2007)等蛋白质组学研究中, 但是由于蛋白质丰度、分子量、电荷、转录后修饰以及与其他分子相结合等, 没有适合于任何植物和组织蛋白提取的专一方法(Chen 和 Harmon 2006)。

柱花草具有品质好、耐旱、耐酸性瘦土的特点, 广泛用于水土保持、提高土壤肥力等(Liu 等 1997)。同时, 柱花草含有大量的粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、木质素、糖类和矿物盐等, 是优良的热带豆科牧草, 具有良好的营养价值和饲用价值

收稿 2010-10-18 修定 2010-11-24

资助 国家自然科学基金专项基金项目(309420047)。

\* 通讯作者(E-mail: jtian@scau.edu.cn; Tel: 020-85280156)。

(周汉林等 2006; 白昌军和刘国道 2002)。由于柱花草含有大量的非蛋白成分, 迄今还未见对柱花草根系蛋白有效提取方法及蛋白质双向电泳条件试验的相关报道。本文以柱花草‘TPRC2001-1’根系为材料, 比较了不同蛋白质提取方法对根系蛋白提取效果的影响, 并对苯酚提取法进行改良, 同时在蛋白质上样量等方面也作了进一步的优化, 探索适合于柱花草根系蛋白的双向电泳技术, 从而为开展豆科牧草蛋白质组学研究提供参考。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

供试柱花草(*Stylosanthes guianensis* L.)品种为‘TPRC2001-1’。种子去种皮经 10% NaClO 消毒后, 播入石英砂中, 在 25 °C 暗室催芽, 发芽后搬入温室进行培养。培养温度为 28 °C/25 °C (昼/夜), 湿度 75%, 光照强度 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。待第 1 片叶完全展开时, 选取生长一致的幼苗, 移栽至 14 L 塑料盆中进行营养液栽培。营养液为 1/2 Hoagland 溶液 (Liao 等 2006), 每 7 d 更换 1 次营养液, 每 2 d 用 KOH 或  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调节 pH 值至 5.8。待生长一个月后收获柱花草根系, -80 °C 超低温冰箱保存备用。

### 2 根系蛋白质的提取

#### 2.1 Tris-HCl 提取法

参考 Rabilloud (1998) 的方法并略作改进。取 3 g 根系组织样品, 用 12 mL 提取液(0.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.3, 2% NP-40, 20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 1% PVPP)研磨, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 15 min, 取上清, 加入 4 倍体积分含 10% TCA 的丙酮溶液, 混匀, -20 °C 静置 1 h 后, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 1 h, 弃上清, 用预冷的丙酮溶液重悬, -20 °C 静置 1 h 后, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 1 h, 收集沉淀, 真空干燥, -80 °C 超低温冰箱保存备用。

#### 2.2 苯酚提取法

参照 Hurkman 和 Tanaka (1986) 方法并略作改进。3 g 根系组织样品, 加入 8.0 mL 提取缓冲液(50% 苯酚, 0.45 mol·L<sup>-1</sup> 蔗糖, 25 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 250 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.8, 2 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 2% PVPP)研磨, 混匀, 在 4 °C 下 5 000×g 离

心 10 min, 吸取上层苯酚溶液, 加入 5 倍体积预冷的甲醇(含 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵和 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 混匀, -20 °C 静置 2 h 后, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用预冷的甲醇(含 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵)冲洗 2 次, 然后用 80% 丙酮洗 2 次, 最后用 70% 酒精洗 1 次, 收集沉淀, 真空干燥, -80 °C 超低温冰箱保存备用。

### 2.3 改良苯酚提取法

参照 Hurkman 和 Tanaka (1986) 方法并作改进。3 g 根系组织样品, 加入 8.0 mL 提取缓冲液(50% 苯酚, 0.45 mol·L<sup>-1</sup> 蔗糖, 25 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 250 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.8, 2 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 2% PVPP, 0.3~1.4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10%~40% 乙醇)研磨, 混匀, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 15 min, 吸取上层苯酚溶液, 加入 1/10 倍体积 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 加入 5 倍体积预冷的甲醇(含 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵和 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 混匀, -20 °C 静置 2 h 后, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用预冷的甲醇(含 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵)冲洗 2 次, 然后用 80% 丙酮洗 2 次, 最后用 70% 酒精洗 1 次, 收集沉淀, 真空干燥, -80 °C 超低温冰箱保存备用。

### 3 蛋白质样品溶解及浓度测定

蛋白质样品加入 600 mL 裂解液(7 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 2 mol·L<sup>-1</sup> 硫脲, 4% CHAPS, 80 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, 1% IPG 缓冲液)充分混合, 涡旋振荡 15 min, 在 4 °C 下 10 000×g 离心 15 min, 上清即为蛋白质样品液。采用蛋白定量试剂盒(2-D Quant-Kit, GE-Healthcare)对蛋白质样品进行浓度测定, 制备牛血清蛋白(BSA)标准曲线, 测定样品吸光度值, 计算样品蛋白质浓度。

### 4 双向电泳

向胶条槽中加入 430  $\mu\text{L}$  蛋白样品液, 放入 IPG 胶条(24 cm)后滴加覆盖油, 盖上胶条槽盖子, 置于 IPGphor 上(GE-Healthcare), 等电聚焦(IEF)程序为 25 °C, 50  $\mu\text{A}\cdot\text{胶}^{-1}$ , 电压和时间参数为: 30 V (快速 12 h)→ 50 V (快速 2 h)→ 100 V (线性 2 h)→ 200 V (线性 2 h)→ 500 V (线性 2 h)→ 1000 V (线性 2 h)→ 8 000 V (线性 4 h)→ 8 000 V (快速 90 000 V·h)→ 500 V (快速 10 h)。

将聚焦完成的 IPG 胶条进行平衡。胶条平衡

分两步进行: 第一步用含有 1% DTT 的平衡液[平衡液: 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.8), 6 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 30% (V/V) 甘油, 2% (W/V) SDS, 微量溴酚蓝]平衡 15 min; 第二步用含有 2.5% 碘乙酰胺的平衡液平衡 15 min。

平衡好的 IPG 胶条移至凝胶上端, 放入 Ettan DALTsix 电泳仪(GE-Healthcare)进行电泳, 10 mA·胶<sup>-1</sup> 电泳 1 h 后, 40 mA·胶<sup>-1</sup> 电泳至结束。

### 5 凝胶染色和扫描

电泳结束后, 去离子水冲洗凝胶, 用固定液 [40% (V/V) 无水乙醇, 10% (V/V) 冰乙酸] 固定 1 h 以上后, 用考马斯亮蓝 G-250 染色液 [0.08% (W/V) 考马斯亮蓝 G-250, 25% (V/V) 甲醇, 1% (V/V) 磷酸] 染色过夜, 然后用去离子水冲洗数次, 直到凝胶背景清晰为止, 用 EPSON 1640XL 型扫描仪进行扫描。

## 实验结果

### 1 不同提取方法对蛋白含量及 2-DE 图谱蛋白点数目影响

从表 1 可以看出, 不同提取方法得到的蛋白含量差异不明显, 约为 1 mg 蛋白每克鲜重, 但在 2-DE 图谱中所显示出来的蛋白点数目各不一样。采

表 1 不同蛋白提取方法的蛋白含量及蛋白点数目

Table 1 Protein yield and total number of spots using different protein extraction methods

方法	蛋白含量/mg·g <sup>-1</sup> (FW)	蛋白点数目/个
Tris-HCl 提取法	1.02±0.08 <sup>a</sup>	30
苯酚提取法	0.99±0.04 <sup>a</sup>	70
改良苯酚提取法	1.00±0.03 <sup>a</sup>	500

表中同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

用 PD-Quest 7.0 (Bio-Rad) 软件进行点检测及统计分析, 在相同的参数设置条件下, 改良的苯酚提取法在胶面上蛋白点数目最多, 可分辨出 500 个蛋白点, 分别是 Tris-HCl 提取法和苯酚提取法 16.7 和 7.1 倍, 差异显著。

### 2 Tris-HCl 及苯酚提取法对 2-DE 图谱效果的影响

从图 1 可以看出, 用 Tris-HCl 提取法提取蛋白质所得的 2-DE 图谱(图 1-A、B)蛋白点模糊, 分辨率低, 横竖条纹干扰严重, 凝胶背景较深; 用苯酚提取法提取蛋白质所得的 2-DE 图谱(图 1-C、D)蛋白点较 Tris-HCl 提取法所得多, 分离效果较好, 分辨率有所提高, 蛋白点主要集中在等电点 4~7 范围内(图 1-D), 但蛋白点数目偏少, 不利于后续研究分析。

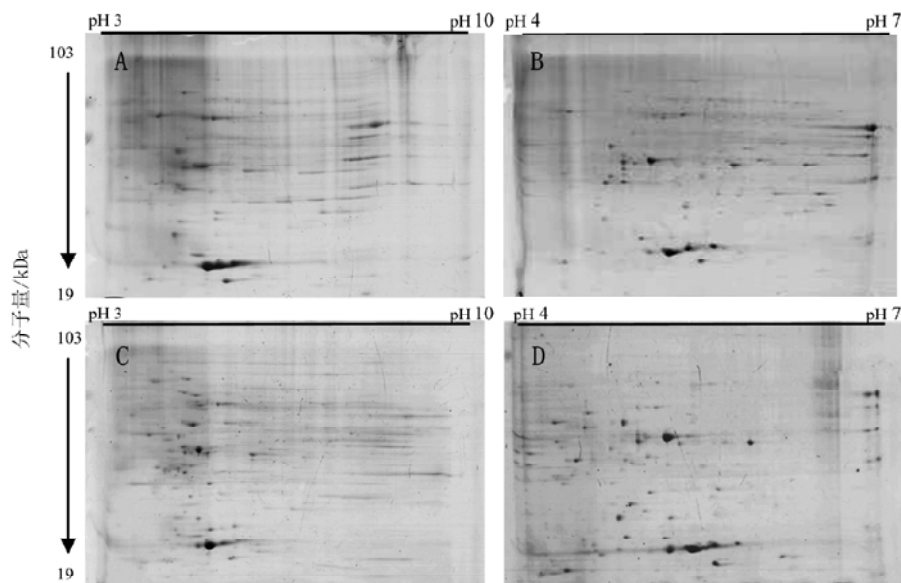


图 1 Tris-HCl 和苯酚提取法的柱花草根系 2-DE 图谱比较

Fig.1 Comparison of 2-DE protein patterns in roots of stylo using Tris-HCl and phenol extraction methods

A: Tris-HCl 提取法(胶条 pH 3~10); B: Tris-HCl 提取法(胶条 pH 4~7); C: 苯酚提取法(胶条 pH 3~10); D: 苯酚提取法(胶条 pH 4~7); 蛋白质上样量均为 800 μg。

### 3 改良苯酚提取法对2-DE图谱效果的影响

本研究在苯酚提取法基础上作进一步改良,比较了在提取液中分别加入不同浓度的NaCl和乙醇,并在蛋白沉淀过程中加入1/10倍体积5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl对2-DE图谱的影响。结果表明,低浓度NaCl(0.3 mol·L<sup>-1</sup>)和乙醇(10%)不能很好地去除样品中的非蛋白成分,蛋白点模糊,仍有横竖条纹干扰(图2-A);高浓度NaCl(1.4 mol·L<sup>-1</sup>)和乙醇(40%)会增加样

品中盐离子浓度,而盐离子浓度过高会直接影响等电聚焦时电压的上升,从而影响聚焦效果,导致2-DE图谱蛋白点分辨率低,横条纹干扰严重(图2-C);在提取液中加入0.7 mol·L<sup>-1</sup> NaCl和20%乙醇提取蛋白质样品所得的2-DE图谱质量最好(图2-B),蛋白点分布均匀清晰,在高中低分子量范围内均可检测到较多的蛋白点,凝胶背景干净,相比Tris-HCl和苯酚提取法所得图谱效果(图1)有明显改善,表明该

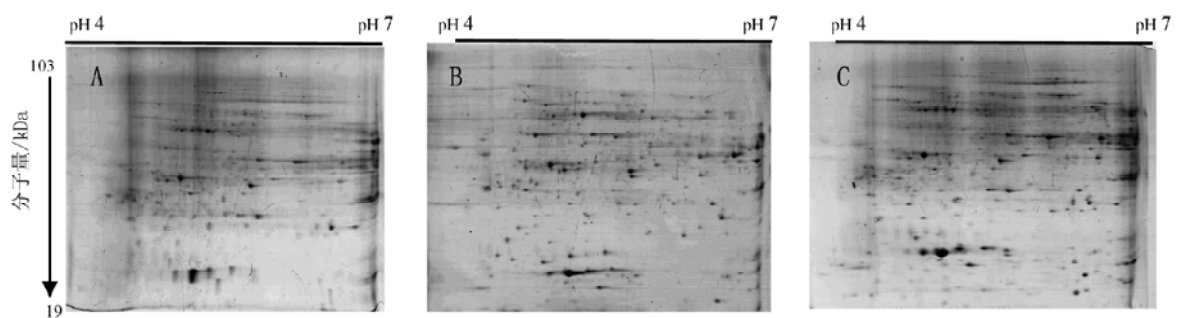


图2 改良苯酚提取法的2-DE图谱比较

Fig.2 Comparison of 2-DE protein patterns using modified phenol extraction methods

A: 0.3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10% 乙醇; B: 0.7 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 20% 乙醇; C: 1.4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 40% 乙醇; 蛋白质上样量均为 800 μg。

方法适合柱花草根系蛋白提取。

### 4 蛋白质上样量对2-DE图谱效果的影响

从图3可以看出,当蛋白质上样量为800 μg时,图谱蛋白点数量较少,不利于检出低丰度的蛋白点(图3-A);当上样量为1200 μg,蛋白点增多,

但高丰度蛋白点过大,掩盖了其余蛋白点,且图谱上横竖条纹比较明显(图3-C);当上样量为1000 μg时,蛋白点呈清晰的圆形且分离均匀,低丰度蛋白数量也明显增加,无横竖条纹干扰,图谱质量最佳(图3-B)。

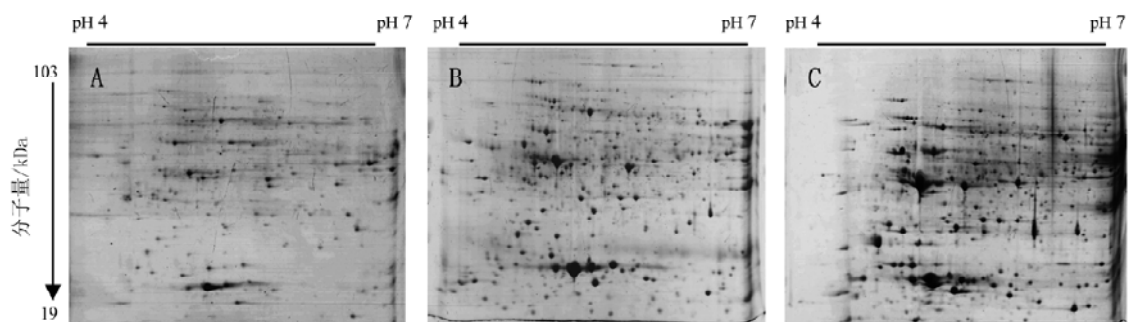


图3 不同蛋白质上样量的2-DE图谱比较

Fig.3 Comparison of 2-DE protein patterns using different protein loading quantity

A: 蛋白质上样量为 800 μg; B: 蛋白质上样量为 1 000 μg; C: 蛋白质上样量为 1 200 μg。

## 讨 论

植物根系组织中含有大量非蛋白成分(Xie 等

2007; Tsugita 和 Kamo 1999),这些成分在蛋白质提取过程中难以去除,并能够和蛋白质一起被提取出

来, 对蛋白点迁移和分离有重要的影响(Shaw 和 Riederer 2003; Hille 等 2001)。

蛋白质样品制备是双向电泳中关键的环节, 不同样品要选择最合适的制备方法。本研究用 Tris-HCl 提取法所得的 2-DE 图谱不理想(图 1-A、B), 这可能由于该方法在提取过程中不能有效去除根系组织中的非蛋白成分, 使蛋白等电聚焦(IEF)不充分。这与 Xie 等(2007)结果相似, 认为 Tris-HCl 提取法不适合含有大量非蛋白成分的多年生柴胡根系蛋白的提取。因此, 该蛋白提取法不适合柱花草根系蛋白的提取。

苯酚提取法能够有效去除组织样品中含有的干扰成分(Nagai 等 2008; Bona 等 2007; Carpentier 等 2005)。在本研究中, 相对 Tris-HCl 提取法, 苯酚提取法所得的 2-DE 图谱效果较好(图 1-C、D), 蛋白点主要集中在等电点 4~7 范围内, 但蛋白点数目偏少, 这可能由于柱花草根系中含有大量的干扰物质, 这些干扰物质在提取过程中不能完全被去除, 影响蛋白点的迁移和分离。

在核酸研究中, 植物 DNA 和 RNA 提取也受多糖、酚类、单宁等次级代谢物的影响, 目前, 已建立起许多有效去除这些物质的 DNA 和 RNA 提取方法。已有研究报道表明, 加入终浓度 0.7~5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 10%~30% 乙醇能够有效去除这些干扰物质, 从而获得高质量的 DNA 或 RNA (Cheng 等 2003; Lewinsohn 等 1994; Chang 等 1993; Fang 等 1992; Tesniere 和 Vayda 1991)。在上述研究基础上, 本研究对苯酚提取法作进一步改良, 比较了在蛋白提取液中加入不同浓度 NaCl 和乙醇, 并在蛋白沉淀过程中加入 1/10 倍体积 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 对蛋白图谱的影响。结果表明, 在提取液中加入终浓度为 0.7 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 20% 乙醇提取蛋白质样品所得 2-DE 图谱效果最佳(图 2-B)。NaCl 和乙醇能够充分去除柱花草根系组织中的非蛋白成分, 可能是由于 NaCl 和乙醇在初始提取时就能使多糖和酚类等物质沉淀, 减少这些物质对后续步骤的污染。

植物体内大部分蛋白质的表达丰度很低, 提高样品上样量会有利于低丰度蛋白的检出, 但上样量过高又会引起高丰度蛋白点掩盖低丰度蛋白点

(Giavalisco 等 2003)。本研究表明当蛋白上样量为 1 mg 时, 2-DE 图谱质量最佳(图 3-B)。

总之, 运用改良的苯酚提取法, 结合使用 pH 4~7 IPG 胶条以及蛋白上样量为 1 mg 的体系适用于柱花草根系蛋白双向电泳研究, 同时, 该体系也可能适用于富含干扰成分的非模式植物组织蛋白的提取。

### 参考文献

- 白昌军, 刘国道(2002). 热研 5 号柱花草营养价值动态评价. 热带农业科学, 22 (2): 11~23
- 周汉林, 李琼, 唐军, 朱志伟(2006). 海南不同地区几种热带牧草的营养价值评定. 草业科学, 23 (9): 41~44
- Bona E, Marsano F, Cavaletto M, Berta G (2007). Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. *Proteomics*, 7: 1121~1130
- 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
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993). A simple efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep*, 11: 113~116
- Chen S, Harmon AC (2006). Advances in plant proteomics. *Proteomics*, 6: 5504~5516
- Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM, Deng XX (2003). An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. *Plant Mol Biol Rep*, 21: 177a~177g
- Fang G, Hammar S, Grumet R (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 13: 52~54, 56
- Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H, Gobom J, Klose J (2003). Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. *Electrophoresis*, 24: 207~216
- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ (2004). Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4: 3665~3685
- 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
- Hurkman WJ, Tanaka CK (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*, 81: 802~806
- Lewinsohn E, Steele CL, Croteau R (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Mol Biol Rep*, 12: 20~25
- Li K, Xu C, Zhang K, Yang A, Zhang J (2007). Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics*, 7:

- 1501~1512
- Liao H, Wan HY, Shaff J, Wang XR, Yan XL, Kochian LV (2006). Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to Al tolerance: exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiol*, 72: 19~23
- Liu GD, Phaikaew C, Stur WW (1997). Status of *Stylosanthes* development in other countries. II. *Stylosanthes* development and utilization in China and south-east Asia. *Tropic Grasslands*, 31: 460~466
- Nagai K, Yotsukura N, Lkegami H, Kimura H, Morimoto K (2008). Protein extraction for 2-DE from the lamina of *Ecklonia kurome* (laminariales): recalcitrant tissue containing high levels of viscous polysaccharides. *Electrophoresis*, 29: 672~681
- Patterson SD, Aebersold RH (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet*, 33: 311~323
- Rabilloud T (1998). Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 19: 758~760
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002). A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Res*, 76: 199~219
- Sauer M, Jakob A, Nordheim A, Hochholdinger 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
- Tesniere C, Vayda ME (1991). Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Mol Biol Rep*, 9: 242~251
- Tsugita A, Kamo M (1999). 2-D Electrophoresis of plant proteins. *Methods Mol Biol*, 112: 95~97
- Witzel K, Surabhi GK, Jyothsnakumari G, Sudhakar C, Matros A, Mock P (2007). Quantitative proteome analysis of barley seeds using ruthenium (II)-tris-(bathophenanthroline-disulphonate) staining. *J Proteome Res*, 6: 1325~1333
- Xie H, Pan S, Liu S, Ye K, Huo K (2007). A novel method of protein extraction from perennial *Bupleurum* root for 2-DE. *Electrophoresis*, 28: 871~875
- Xu C, 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
- Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol Cell Proteomics*, 5: 484~496
- Yin L, Tao Y, Zhao K, Shao J, Li X, Liu G, Liu S, Zhu L (2007). Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed derived callus differentiation. *Proteomics*, 7: 755~768