

# 荔枝果皮总蛋白质提取及双向电泳体系的建立

李开拓, 郭志雄, 潘东明\*, 钟凤林, 潘腾飞

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

**摘要:** 用 TCA-丙酮、丙酮和酚 3 种方法提取荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)果皮的总蛋白质, 比较了蛋白产量、单向 SDS-PAGE 和双向电泳等方面的差异, 并对双向电泳体系进行探索。结果表明: 酚抽提法最佳, 提取的总蛋白得率最高, 蛋白在单向 SDS-PAGE 中形成条带数目最多, 最清晰; 经双向电泳分离用银染显色, 可检测约 870 个蛋白点, 图谱分辨率较好, 蛋白点清晰, 主要分布在 pH 4~8, 分子量约为 15.0~85.0 kD, 可有效解析荔枝果皮的蛋白质组。

**关键词:** 荔枝; 果皮; 蛋白质组; 提取; 双向电泳

中图分类号: Q94-336

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)01-0069-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.01.010

## Extraction of Total Protein from Litchi Pericarp and Establishment of Two-dimensional Electrophoresis

LI Kai-tuo, GUO Zhi-xiong, PAN Dong-ming\*, ZHONG Feng-lin, PAN Teng-fei

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The total protein was extracted from *Litchi chinensis* pericarp by using three methods, such as trichloroacetic acid (TCA)-acetone, acetone and phenol. The results showed that the total protein yield was the highest by phenol extraction method, and protein bands were the most and clear in one dimensional SDS-PAGE. About 870 clear protein spots were detected by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and silver staining with isoelectric points at pH 4~8, and relative molecular weight of protein ranged from 15.0 to 85.0 kD.

**Key words:** *Litchi chinensis* Sonn.; Pericarp; Proteome; Extraction; 2-DE

近年来,双向电泳(2-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术在小麦(*Triticum aestivum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等的研究日益增多,已成为植物学中基因功能和育种研究的主要途径,被广泛应用于基础研究、医学、农业等各个领域,而其在果树蛋白质组学研究的报道较少。荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)为无患子科荔枝属植物,原产于中国南部,是我国著名的亚热带果树,也是顽拗性植物的代表。其果皮由子房壁发育而来,果肉由假种皮发育而成,果皮与果肉的细胞之间联系不紧密,分属两个相对独立的系统,但果皮与果实着色、采后保鲜和裂果等的关系密切。对荔枝果皮

的研究主要集中在生理生化及基因组学方面,对蛋白质组学的研究尚未见报道。荔枝果皮中存在大量的酚类物质(总酚可高达 45 mg g<sup>-1</sup>)<sup>[1]</sup>、多糖、各种色素及较高活性的氧化酶等,极易褐变,且木质化程度很高<sup>[2]</sup>,要提取荔枝果皮中高质量的总蛋白质难度较大,有必要对荔枝果皮的蛋白质提取方法和双向电泳条件进行比较优化。本文用 TCA-丙酮法、丙酮法和酚抽提法提取荔枝果皮的总蛋白质,并用单向 SDS-PAGE 和双向电泳进行比较分析,以选择最佳的提取方法和优化双向电泳体系,为荔枝的蛋白质组学的研究奠定基础。

收稿日期: 2010-04-01

接受日期: 2010-06-30

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD07B01)资助

作者简介: 李开拓,男,在读博士生,主要研究方向是果树分子生物学, email: lkt1215@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, email: pdm666@126.com

# 1 材料和方法

## 1.1 材料和试剂

荔枝品种下番枝 (*Lüchi chinensis* Sonn. 'Xiafanzhi') 于 2009 年 6~7 月采自福清市龙山街道荔枝园。果实采后置于冰盒中带回实验室剥皮,液氮处理后贮于  $-40^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。幼果期的果实在 6 月 29 日采样,果皮绿色;成熟期果实在 7 月 23 日取样,果皮为红色。

裂解液(IEF buffer)含 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% (m/v) Chaps, 2% (v/v) pharmalyte, 60 mmol/L DTT; 提取液 I 含 65 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 0.5% SDS, 10% 甘油, 5%  $\beta$ -巯基乙醇; 提取液 II 含 0.7 mol/L 蔗糖, 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.1 mol/L KCl, 2%  $\beta$ -巯基乙醇; 水化液含 8 mol/L 尿素, 2% (m/v) Chaps, 1% (v/v) IPG 缓冲液, 40 mmol/L DTT, 2% 溴酚蓝; 平衡液含 6 mol/L 尿素, 75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 30% (v/v) 甘油, 2% (m/v) SDS, 2% 溴酚蓝, 第一次平衡时加 DTT 为平衡液 I, 第二次平衡时加碘乙酰胺为平衡液 II; 考马斯亮蓝染色液含 1% (m/v) R-250, 45% (v/v) 甲醇, 10% (v/v) 冰乙酸。其它溶液参照 GE 公司说明书。

## 1.2 果皮总蛋白的提取

**TCA-丙酮法** 参考 Damerval 等<sup>[3]</sup>方法稍加改进。3 g 荔枝果皮用液氮(加 20% PVPP)研磨成粉,加入 15 mL 10% TCA/0.07% 2-ME/冷丙酮,置  $-20^{\circ}\text{C}$  2 h 后,在  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000 \times g$  离心 10 min,重复两次。沉淀用 15 mL 0.07% 2-ME/80% 冷丙酮洗 2 次,  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000 \times g$  离心 10 min,晾干,分成两份,一份加入 10  $\mu\text{L}$  SDS buffer  $\mu\text{g}^{-1}$  干粉,另一份加入 10  $\mu\text{L}$  裂解液  $\mu\text{g}^{-1}$  干粉,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 2 h,室温  $15000 \times g$  离心 10 min,取上清,SDS Buffer 提取的蛋白质进行 SDS-PAGE,裂解液提取的蛋白质进行双向电泳(下同)。

**丙酮法** 参考谷瑞升等<sup>[4]</sup>方法稍加改进。3 g 果皮液氮(加 20% PVPP)研磨成粉,加 5 倍体积的 0.07% 2-ME/冷丙酮,振荡涡旋,  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000 \times g$  离心 10 min,重复两次。挥发干丙酮,加 3 倍体积的蛋白提取液 I,充分振荡混匀,于  $4^{\circ}\text{C}$  放置 1 h,每隔 10 min 振荡 1 次。  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000 \times g$  离心 20 min,去沉淀。上清液分成两份,分别加 5 倍体积的 0.07% 2-ME/冷丙酮,  $-20^{\circ}\text{C}$  沉降蛋白 1 h,  $15000 \times g$

离心 10 min,沉淀用 0.07% 2-ME/80% 冷丙酮洗 2 次,晾干,一份加 200  $\mu\text{L}$  SDS buffer,另一份加 200  $\mu\text{L}$  裂解液,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 2 h,室温  $15000 \times g$  离心 10 min,取上清,分别进行 SDS-PAGE 或双向电泳。

**酚抽提法** 参考 Saravanan 等<sup>[5]</sup>方法稍加改进。3 g 果皮液氮(加 20% PVPP)研磨成粉,加 5 倍体积的 0.07% 2-ME/冷丙酮,振荡涡旋,  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000 \times g$  离心 10 min,重复两次。抽干丙酮,再用液氮研磨成更细粉末,加入 7.5 mL 提取液 II,涡旋,充分混匀,  $4^{\circ}\text{C}$  放置 30 min(每隔 10 min 振荡 1 次),加等体积的 Tris 饱和酚(pH 7.8),涡旋振荡,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 30 min(每隔 10 min 振荡 1 次),  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000 \times g$  离心 10 min,转移上层酚相,加等体积提取液 II 重复抽两次,涡旋充分混匀,  $4^{\circ}\text{C}$  下  $15000 \times g$  离心 10 min。上层酚相分成两份,分别加 5 倍体积 0.1 mol/L 醋酸氨甲醇溶液,  $-20^{\circ}\text{C}$  下至少放置 4 h 或过夜,于  $4^{\circ}\text{C}$   $15000 \times g$  离心 15 min,沉淀用 5 mL 0.1 mol/L 醋酸氨甲醇溶液洗 3 次,80% 冷丙酮洗 2 次,晾干,一份加入 200  $\mu\text{L}$  SDS buffer,另一份加入 200  $\mu\text{L}$  裂解液,  $37^{\circ}\text{C}$  温浴 2 h,室温  $15000 \times g$  离心 10 min,取上清,分别进行 SDS-PAGE 或双向电泳。

## 1.3 蛋白质含量测定

参照 Bradford 法<sup>[6]</sup>测定总蛋白质含量,用  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW 表示。

## 1.4 双向电泳

第一向等电聚焦采用 IPG phor III 等电聚焦系统,IPG 干胶条为 18 cm, pH 3~10, pH 4~7, 水化液与样品终体积为 350  $\mu\text{L}$ 。电泳参数设定为  $20^{\circ}\text{C}$ 、50  $\mu\text{A trip}^{-1}$ 、30 V(12 h)、100 V(1 h)、500 V(1 h)、1000 V(1 h)、2000 V(1 h)、4000 V(1 h)、8000 V(5 h)。

第二向 SDS-PAGE 垂直板电泳将聚焦好的 IPG 胶条用平衡液 I (100 mg 10 mL<sup>-1</sup> DTT) 和平衡液 II (250 mg 10 mL<sup>-1</sup> 碘乙酰胺) 分别平衡 15 min。使用 DALT-Six 系统,进行 SDS-PAGE 电泳:  $16^{\circ}\text{C}$ , 12 W/板电泳到溴酚蓝前沿跑至离胶底部 0.5~1.0 cm 处停止。

## 1.5 凝胶染色及图像分析

考马斯亮蓝染色参照 Amersham pharmacia 蛋白质电泳技术手册。

银染方法: 40% 甲醇、10% 乙酸固定胶 1 h, 30% 甲醇洗胶  $2 \times 20$  min, 水洗 20 min。0.02% 硫代

硫酸钠增敏 1 min。水洗 3 × 20 s。冷的 0.2% 硝酸银、0.02% 冷甲醛在 4℃ 染色 20 min。水洗 3 × 20 s。0.05% 甲醛, 3% 碳酸钠显色。观察颜色变化, 显色液变黄时更换显色液, 当染色完全时, 5% 乙酸终止显色。

染色后凝胶使用 Imagescanner II (GE Healthcare Life Sciences) 系统进行扫描, 并用 Image Master™ 2D Platinum software (Amersham Bioscience, Sweden) 分析软件进行分析。

### 1.6 数据分析

各试验进行 3 次重复, 最后结果以平均值 ± 标准误差表示。

## 2 结果和分析

### 2.1 荔枝果皮总蛋白质含量和单向 SDS-PAGE 分析

3 种方法提取的荔枝果皮蛋白质含量不同, 以酚抽提法得到的蛋白质含量最高, IEF buffer 和 SDS buffer 溶解的蛋白得率分别为  $652.2 \pm 25.5 \text{ mg g}^{-1} \text{FW}$  和  $594.5 \pm 19.4 \text{ mg g}^{-1} \text{FW}$ , 约为 TCA-丙酮法 ( $424.2 \pm 15 \text{ mg g}^{-1} \text{FW}$ 、 $369.4 \pm 15.1 \text{ mg g}^{-1} \text{FW}$ ) 和 丙酮法 ( $430 \pm 7 \text{ mg g}^{-1} \text{FW}$ 、 $385.6 \pm 12.6 \text{ mg g}^{-1} \text{FW}$ ) 提取的 1.5 倍, 且以 IEF buffer 溶解的蛋白得率均略高于 SDS buffer。将提取的蛋白(上样量为 40 μg)进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 用考马斯亮蓝染色, 从图 1 可见, 酚抽提法得到的蛋白电泳后条带数量最多, 最清晰, 分离效果很好, 说明该方法提取的蛋白质量好, 污染少; TCA-丙酮法得到的蛋白电泳后没有出现明显条带或只有微弱条带, 且背景模糊, 说明含有较多

的杂质; 丙酮法提取的蛋白电泳后背景较浅, 几乎检测不到条带, 这可能是提取过程中蛋白质降解, 大部分蛋白质富集在泳道底部, 还可能是提取液中有较多的非蛋白物质, 与考马斯亮蓝反应, 导致蛋白定量发生偏差, 这些非蛋白物质也使得电泳后泳道点样孔最亮。因此, 从单向 SDS-PAGE 可看出, 酚抽提法比其它两种方法提取的蛋白效果好。

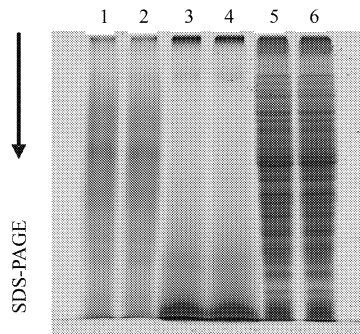


图 1 不同方法提取蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of proteins extracted by different methods  
1,2. TCA-丙酮法 TCA-acetone method; 3,4. 丙酮法 Acetone extraction method; 5,6. 酚抽提法 Phenol extraction method.

### 2.2 双向电泳的比较

3 种方法提取的荔枝果皮总蛋白质, 用 18 cm、pH 3 ~ 10 IPG 胶条, 上样量 200 μg、12.5% SDS-PAGE 进行双向电泳分离, 胶体用考马斯亮蓝染色和银染。

图 2A 显示, 用 TCA-丙酮法提取的蛋白质, 所得的 2-DE 考染图谱几乎检测不到蛋白点, 只有零星几个。对考染后的胶进行脱色再银染表明(图 2B), 同样只有检测到很少的蛋白点, 且在酸性端出现竖纹, 说明用 TCA-丙酮法提取的总蛋白质含有较多的杂质, 不适于荔枝果皮总蛋白质的分离。

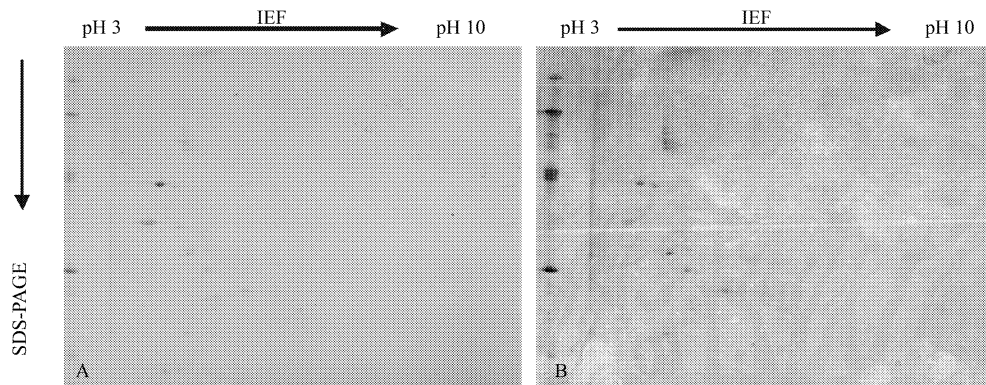


图 2 TCA-丙酮法提取蛋白的 2-DE 结果

Fig. 2 2-DE of protein using TCA-acetone extraction method

A. 考染 Coomassie staining; B. 考染 + 银染 Coomassie + Silver staining

从图 3 可见,丙酮法提取的蛋白经 2-DE,考染的只在酸性端有微弱的蛋白斑点,再银染可见蛋白点主要集中在酸性区,中性到碱性区只检测到少数低分子量蛋白点,大分子量蛋白点几乎全部丢失,

且酸性区有较深的背景纹。由此可见,丙酮法提取的蛋白质比 TCA-丙酮法的效果较好,且银染的灵敏度比考染高。

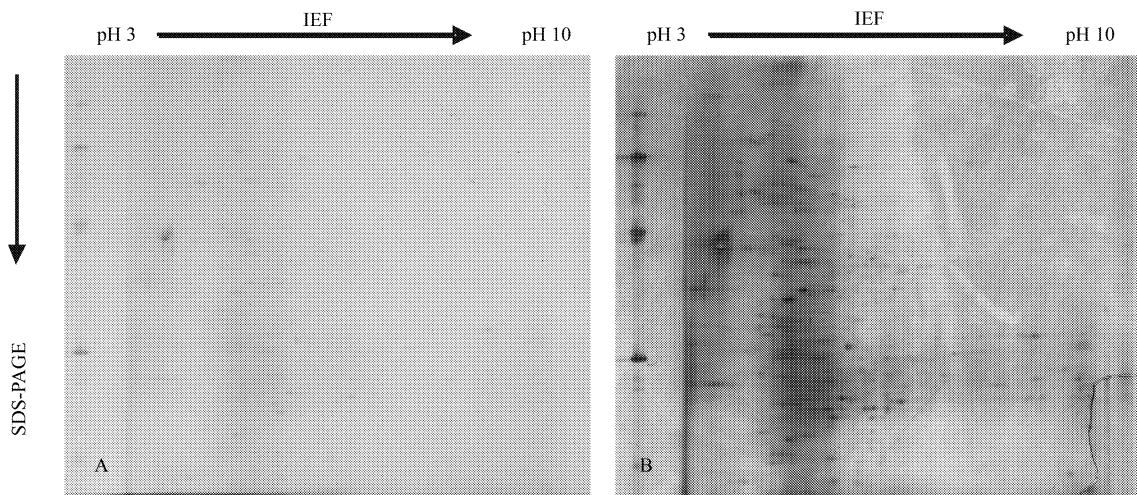


图 3 丙酮法提取蛋白的 2-DE 结果

Fig. 3 2-DE of protein using acetone extraction method

A. 考染 Coomassie staining; B. 考染 + 银染 Coomassie + Silver staining

酚抽提法提取的蛋白经双向电泳后得到有效分离(图 4),考染和银染后经 ImageMaster2D 软件分析,分别有蛋白点  $430 \pm 38$  和  $873 \pm 52$  个。大多数蛋白点呈圆形,蛋白点基本上没有拖尾、纹理和

横向扩散,胶体背景清晰,比较均匀地分布在凝胶上。从图 4B 可知,荔枝果皮蛋白质的等电点约为  $\text{pH } 3 \sim 10$ ,主要分布在  $\text{pH } 4 \sim 8$ ,相对分子量约为  $10.0 \sim 100.0 \text{ kD}$ ,主要分布在  $15.0 \sim 85.0 \text{ kD}$ 。

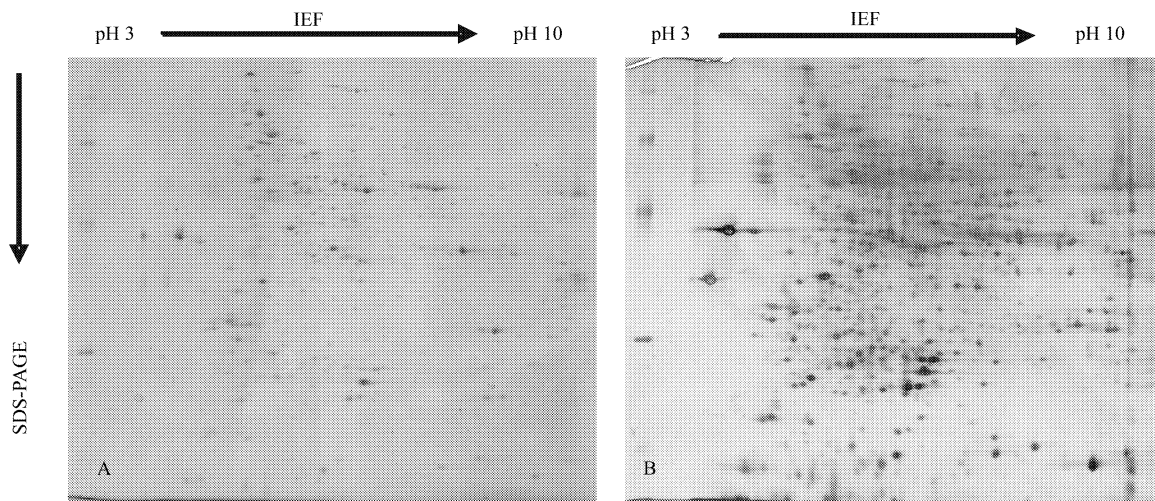


图 4 酚抽提法提取蛋白的 2-DE 结果

Fig. 4 2-DE of protein using phenol extraction method

A. 考染 Coomassie staining; B. 考染 + 银染 Coomassie + Silver staining

可见,常规的 TCA-丙酮法和丙酮法不能有效地提取和分离荔枝果皮的总蛋白质,而酚抽提法能很好地去除荔枝果皮中的多酚、多糖、色素及其它次生代谢物质,得到高质量、高纯度的总蛋白质。

### 2.3 IPG 胶条 pH 选择

从图 4B 可以看出,IPG 胶条  $\text{pH}$  为  $3 \sim 10$  时,在  $\text{pH } 4 \sim 6$  间的大分子量蛋白质的等电点非常接近,排列过于紧密甚至重叠在一起,不利于后期图

像分析和特异蛋白点的切取。为此选择更窄 pH 范围的 IPG 胶条,如图 5A 采用 18 cm、pH 4~7 的 IPG 胶条,上样量为 200  $\mu\text{g}$ ,双向电泳图谱经银染后,部分在 pH 3~10 的 IPG 胶条上不能清楚分离的蛋白质得到了有效分离。由于荔枝果皮蛋白质等电点主要集中在 pH 4~8 之间,在胶条长度不变的情况下,以 pH 4~7 的 IPG 胶条分离的效果最佳。

## 2.4 果皮不同发育阶段蛋白质双向电泳图谱的比较

在获得高分辨率的荔枝果皮蛋白质双向电泳

图谱后,对荔枝果皮不同发育阶段的蛋白质经双向电泳(图 5),并用 ImageMaster2D 软件进行分析。结果表明,荔枝果皮的蛋白质点由幼果期的 825 个下降到成熟期的 778 个,随着果实的成熟,蛋白质的种类逐渐减少,同时在表达量上也存在很大差异。可见,采用 18 cm、pH 4~7 的 IPG 胶条,上样量为 200  $\mu\text{g}$ ,双向电泳经银染后可以有效分离荔枝果皮的差异蛋白点,可进一步对其生长发育过程进行差异蛋白质组学研究。

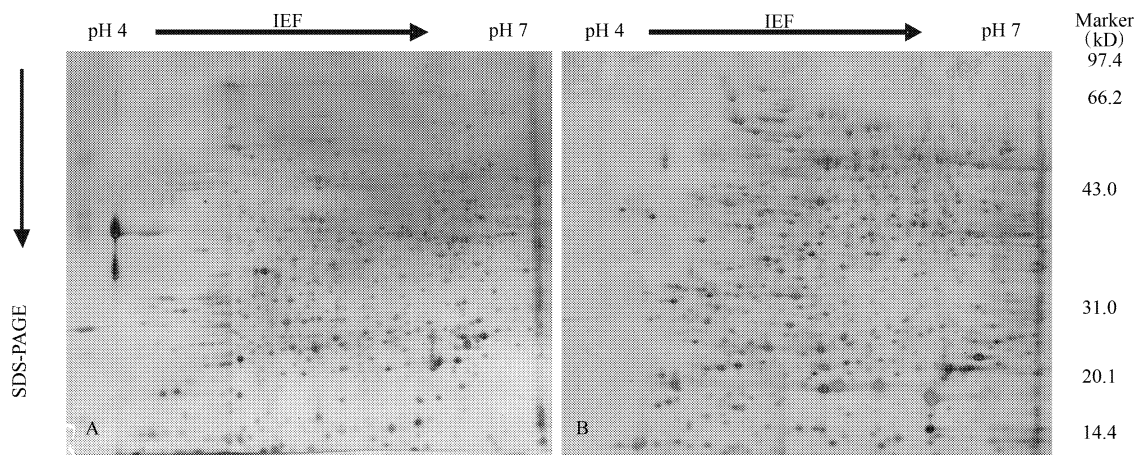


图5 荔枝果皮不同发育阶段蛋白质双向电泳图谱比较(银染)

Fig. 5 2-DE of proteins at different development stages in litchi pericarp (silver staining)

A. 成熟期 Mature stage; B. 幼果期 Young fruit stage

## 3 讨论

### 3.1 样品制备

制备高质量的蛋白质样品是双向电泳成功的最关键步骤之一。在提取蛋白质的过程中,把细胞中的非蛋白物质也沉淀或溶解下来,从而影响蛋白质的质量<sup>[7]</sup>。植物组织中含有大量以各种形式存在的可溶性非蛋白干扰物质,一般比种子或幼苗中的含量高很多,主要包括多酚、萜类和有机酸等,干扰双向电泳的效果<sup>[8]</sup>。通常在蛋白质提取前或提取后除去这些非蛋白干扰物质。荔枝果皮中存在大量的酚类、多糖、各种色素及较高活性的氧化酶等干扰物质,如果把研磨的荔枝果皮直接溶解在提取缓冲液中,提取的缓冲液呈黑褐色,沉淀的蛋白呈褐色,很难再做进一步处理。因此,荔枝果皮应先去除非蛋白干扰物质再进行蛋白质提取。

通常先用有机溶剂(如丙酮)浸洗植物组织以除去非蛋白干扰物质。我们在提取过程中,加入 20% PVPP 与荔枝果皮共同研磨以防止果皮褐变,再加入冷丙酮浸洗 3 次,这样可除去大部分色素及

部分非蛋白物质。在一定程度上,材料研磨粗细程度也会影响非蛋白物质的清除及蛋白质的提取<sup>[9]</sup>。由于荔枝果皮木质化程度很高,细胞不易破碎。因此,材料用液氮研磨,经丙酮 3 次浸洗、晾干后,加入液氮进行第二次研磨,使颗粒更细,有利于后面非蛋白物质的去除及蛋白质的提取。在酚抽提法中有两个明显的改良,一个是经过酚抽提后再加入等体积的提取缓冲液抽提两次,可以除去更多的非蛋白物质,从而提高样品蛋白质的纯度。另一个是采用 0.1 mol/L 醋酸铵甲醇溶液沉淀蛋白质,而不是用常规的 TCA 沉淀,由于 TCA 是强酸性物质,样品沉淀时间过长会分解部分蛋白质,且如果样品中 TCA 去除不完全,会造成缓冲液 pH 值过低,从而导致第一向 IEF 聚焦过程失败,蛋白质分布在固相胶条的酸性端,而不能在整个胶条中均匀分布<sup>[10]</sup>,TCA-丙酮法中只检测到少数几个酸性端蛋白点,有可能是样品在 TCA 溶液中沉淀过长,且样品去除不完全。

### 3.2 单向 SDS-PAGE 的应用

3 种方法提取的荔枝果皮总蛋白质进行单向 SDS-PAGE 和双向电泳,结果表明,单向 SDS-PAGE 和双向电泳的分离效果一致。由于做双向电泳的胶条和药品都比较贵,而且费时,因此,在摸索一种材料的双向电泳体系时,可先进行单向 SDS-PAGE 检测,这样可以节省大量的人力、财力和物力。

### 3.3 染色

双向电泳凝胶染色最常用的方法是考马斯亮蓝和硝酸银染色两种。考马斯亮蓝染色方法简便,染色线性范围宽,染色后不影响质谱鉴定,有利于观察电泳初步结果,但灵敏度低(图 3A,图 4A),不能检测到低丰度蛋白质,检测限为 0.2~0.5  $\mu\text{g}$ 。银染操作步骤复杂,且因银染的氧化而不能做质谱鉴定,但灵敏度高(图 3B,图 4B),检测限为 0.1 ng,有利于蛋白质电泳图谱信息的分析处理<sup>[11-12]</sup>。本试验通过银染获得了灵敏度高和背景低的电泳图谱,并利用图像分析软件对电泳图谱做进一步分析。

采用 3 种不同方法对提取的荔枝果皮总蛋白质进行双向电泳,结果表明,酚抽提法适于荔枝果皮蛋白质的提取,可以有效的去除非蛋白干扰物质,蛋白质含量高、质量好。单向 SDS-PAGE 和双向电泳都得到较好的分离,条带多且清晰,蛋白点数量多,呈圆形,基本上没有拖尾、纹理和横向扩散,比较均匀地分布在凝胶上。

### 参考文献

- [1] Lin Z F(林植芳), Li S S(李双顺), Zhang D L(张东林). The changes of oxidation and peroxidation in postharvest litchi fruit [J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 1988, 30: 382-387.(in Chinese)
- [2] Yang Z Y(杨转英), Hu G B(胡桂兵), Wang H C(王惠聪), et al. Total RNA extraction and mRNA differential display analysis of litchi pericarps at different coloring stages [J]. *J Fruit Sci*(果树学报), 2008, 25(2): 281-285.(in Chinese)
- [3] Damerval C, De Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7(1): 52-54.
- [4] Gu R S(谷瑞升), Liu Q L(刘群录), Chen X M(陈雪梅), et al. An improved method of 2D electrophoresis for protein analysis of woody plants [J]. *J Beijing For Univ*(北京林业大学学报), 1999, 21(5): 7-10.(in Chinese)
- [5] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. *Proteom Clin Appl*, 2004, 4 (9): 2522-2532.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [7] Boguth G, Harder A, Scheibe B, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1037-1053.
- [8] Granier F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1988, 9(11): 712-718.
- [9] Wang W, Scali M, Vignani R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24 (14): 2369-2375.
- [10] Wen L(文李), Liu G(刘盖), Wang K(王坤), et al. Improvement of two-dimensional gel electrophoresis of total proteins from rice anthers [J]. *J Mol Cell Biol*(分子细胞生物学报), 2006, 39(5): 473-476.(in Chinese)
- [11] Zhu Z Y(朱志勇), Cao S Y(曹尚银), Xu X B(徐小彪), et al. Improvement of isolation and method of two-dimensional electrophoresis of protein from apple plant [J]. *J Fruit Sci*(果树学报), 2007, 24(4): 549-552.(in Chinese)
- [12] Ma Z C(马增春), Gao Y(高月), Lü J P(吕俊萍), et al. Comparison of three protein detect methods in two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2004, 4: 551-556.(in Chinese)