

柑橘叶片和果皮总蛋白质提取及双向电泳体系的建立

邓贵明^{1,2}, 曾继吾^{1,2}, 姜波¹, 钟云¹, 周碧容¹, 易干军^{1*}, 彭新湘^{2*}

(1. 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640; 2. 华南农业大学生命科学学院, 广州 540642)

摘要: 以春甜橘(*Citrus reticulata* Blanco ‘Chuntianju’)果皮和叶片为材料, 分别用 Tris-HCl、尿素/硫脲(Thi/Urea)、三氯乙酸/丙酮(TCA)和酚(Phe)等 4 种方法提取柑橘总蛋白质, 从蛋白质产量、单向 SDS-PAGE 和双向电泳等方面进行比较。结果表明, 4 种方法的分离效果存在较大差异, 不论是以柑橘叶片还是果皮为材料, 均以 TCA 法最好, 且双向电泳图谱分辨率较好, 蛋白点清晰、均匀、基本没有条纹, 且蛋白点多。这说明 TCA 法不仅能很好地去除柑橘果皮、叶片中存在的大量干扰物质, 而且还能得到稳定的蛋白点。

关键词: 柑橘; 蛋白质组; 提取; 双向电泳

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.01.004

Extraction of Total Proteins from Leaves and Peels of *Citrus reticulata* and Establishment of Two-dimensional Electrophoresis System

DENG Gui-ming^{1,2}, ZENG Ji-wu^{1,2}, JIANG Bo¹, ZHONG Yun¹, ZHOU Bi-rong¹, YI Gan-jun^{1*}, PENG Xin-xiang^{2*}

(1. Fruit Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China; 2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The total proteins in peels and leaves of *Citrus reticulata* Blanco ‘Chuntianju’ were extracted by four methods, such as Tris-HCl, Thi/Urea, trichloroacetic acid/pacetone precipitation (TCA) and phenol (Phe) extraction methods, respectively, and their effects were compared by protein production, one-way SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis (2-DE). The results showed that TCA method was the best for both leaves and peels of *C. reticulata* ‘Chuntianju’. The 2-DE map of proteins extracted by TCA method had high resolution, the protein spots were clear and uniform without stripes, and the number of protein spots were large. It suggested that the TCA method could not only remove the interfering substances in peels and leaves of *C. reticulata* ‘Chuntianju’, but also get more stable protein spots.

Key words: *Citrus reticulata*; Proteome; Extraction; Two-dimensional electrophoresis (2-DE)

1975 年 O’Farrell 建立了依据蛋白质等电点(pI)和相对分子质量(M_r)2 个基本参数来分辨蛋白质组分的双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术^[1], 该技术可以从等电点和相对分子质量两方面将数千种、甚至上万种蛋白质同时分离与

展示。而双向电泳、质谱技术与生物信息学结合成为蛋白质组学研究的三大核心技术, 能实现蛋白质的高通量分离和快速、准确鉴定, 已成为当前植物蛋白质组学的首选技术方案。随着拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)等植物全

收稿日期: 2011-03-14 接受日期: 2011-05-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BAD92B05); 国家公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-023); 广东省科技计划项目(2008A020100022; 2008A040102002; 2009B04060002; 2009B020201010)资助

* 通讯作者 Corresponding authors, emails: yiganjun@vip.163.com; xpeng@scau.edu.cn

基因组序列测定的完成和基因组学研究的深入,植物蛋白质组学研究已成为后基因组时代的研究热点^[2-3]。双向电泳技术具有较高的分辨率和灵敏度,已成为蛋白质检测和分析的一种强有力的实验手段。

要想获得比较好的 2-DE 电泳图谱,前期获得高纯度的植物总蛋白质样品是基础。样品制备是蛋白质双向电泳分析中的关键步骤之一,不同的植物材料,其样品制备方法有所不同。由于植物细胞具有较厚的细胞壁,而且植物细胞含有多种干扰物质,如蛋白酶、多糖、脂类、有机酸、色素、酚类等,影响总蛋白质的提取效果^[4-5],此外这类非蛋白质杂质也干扰等电聚焦,如电压升不到位、电流过大等。前人已对鳄梨(*Persea americana*)、香蕉(*Musa spp.*)、甜橙(*Citrus sinensis*)、苹果(*Malus domestica*)果皮的总蛋白质提取方法进行了探讨,并获得了高质量的 2-DE 图谱^[6-8];Xia 等^[9]用改良的酚抽提法从柴胡(*Bupleurum polyclomum*)的根中获得了高质量的蛋白质;采用不同方法从番茄(*Lycopersicon esculentum*)和杨树(*Populus trichocarpa*)中提取蛋白质,通过对比获得了适用于不同植物组织总蛋白的提取方法^[10-11]。

柑橘是世界上最重要的水果之一,据 FAO 统计,全球有 138 个国家栽培柑橘,每年的总产量超过 10⁸ t,约占世界水果总产量的 22%。为了开展柑橘的蛋白质组学研究,本文以广东地方特色柑橘品种——春甜橘(*Citrus reticulata* Blanco ‘Chuntianju’)

的果皮和叶片为材料,对比了 4 种不同总蛋白质提取方法的效果,以建立适用于柑橘果皮和叶片的 2-DE 体系,为柑橘的差异蛋白质组学研究工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

供试样品为采自广东省东源县东源科优质农作物品种示范场的春甜橘(*Citrus reticulata* Blanco ‘Chuntianju’)。春甜橘于 2003 年春种植,以江西红橘为砧木,管理中等。选择生长健康的树,采集新鲜柑橘叶片,先用 75% 乙醇洗涤 3 次,再用无菌水洗涤 3 次,然后直接用液氮速冻后置于 -80℃ 保存备用;果实用 75% 乙醇洗涤 3 次后,再用无菌水洗涤 3 次,然后用刀片将果皮分离迅速用液氮冷冻,放入 -80℃ 冰箱中保存备用。

17 cm pH 4~7 线性 IPG 预制胶条、IPG 缓冲液购自 Bio-Rad 公司;CHAPS、IAA、β-巯基乙醇、DTT、APS、PVPP 和 TEMED 均购自 Sigma 公司;SDS、尿素、Tris、甘氨酸、Bis、Acr 购自 MBchem;AgNO₃ 购自 BBI;其它试剂均为国产分析纯产品。

1.2 蛋白质提取方法

4 种提取方法的主要流程如图 1 所示。

Tris-HCl 提取法(方法 A) 参照 Dai 等^[12]和 Pan 等^[13]的方法。取 1 g 样品置液氮中充分研磨,加入 5 mL 预冷提取液(含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 20 mmol/L KCl, 1% (W/V) CHAPS, 0.2 %

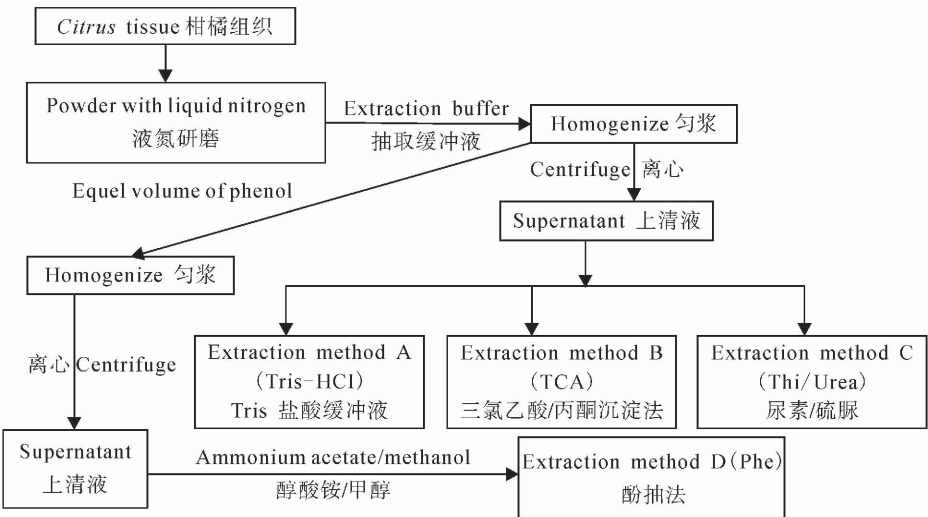


图 1 4 种蛋白提取方法的流程图
Fig. 1 Schematic outline of the four protein extraction protocols

(V/V) Bio-Lyte pH 3~10, 1% (V/V) protease inhibitor cocktail (BS384, BBI), 2% (V/V) β -巯基乙醇), 加入 100 mg PVPP。充分混匀, 冰浴 20 min; 在 4℃ 下 12000 $\times$ g 离心 15 min, 取上清液加入 3 倍体积的 10% TCA/丙酮, -20℃ 沉淀 2 h; 在 4℃ 下 12000 $\times$ g 离心 15 min, 去上清液, 加入 0.07% β -巯基乙醇丙酮, -20℃ 沉淀 2 h, 重复 2 次; 真空浓缩, 所得干粉置 -80℃ 保存待用。

三氯乙酸/丙酮沉淀(TCA)法(方法 B) 参照 Carpentier 等^[7] 和 Isaacson 等^[14] 的方法并稍加改进。预冷研钵置于冰盒中, 加入 4 mL 提取液(含 40 mmol/L Tris, 7 mmol/L 尿素, 2 mmol/L 硫脲, 4% (W/V) CHAPS, 0.2% (V/V) Bio-Lyte pH 3~10, 1% (W/V) SDS, 50 mmol/L DTT), 少许石英砂, 200 mg PVPP, 备用。1 g 样品放入瓷钵中, 加入液氮充分研磨后, 转入研钵冰浴研磨至匀浆, 倒入 10 mL 的离心管, 在 4℃ 下 12000 $\times$ g 离心 15 min。取上清液, 加入 3 倍体积预冷的 20% TCA/丙酮, 沉淀过夜。在 4℃ 下 12000 $\times$ g 离心 15 min, 去上清液, 沉淀用丙酮(含 0.07% β -巯基乙醇, -20℃ 预冷)洗涤 3 次。真空浓缩, 所得干粉置 -80℃ 保存待用。

尿素/硫脲提取(Thi/Urea)法(方法 C) 参照 Yang 等^[15] 的方法并稍加改进。预冷研钵置冰盒中, 加入 4 mL 提取液(含 40 mmol/L Tris, 5 mmol/L 尿素, 2 mmol/L 硫脲, 4% (W/V) CHAPS, 0.2% (V/V) Bio-Lyte pH 3~10, 50 mmol/L DTT), 少许石英砂, 200 mg PVPP, 备用。1 g 样品放入瓷钵中, 加入液氮充分研磨后, 转入研钵冰浴研磨至匀浆, 倒入 10 mL 的离心管, 在 4℃ 下 12000 $\times$ g 离心 15 min。取上清液, 加入 3 倍体积预冷的丙酮(含 0.07% (W/V) DTT, -20℃ 预冷), 沉淀过夜。在 4℃ 下 12000 $\times$ g 离心 15 min, 去上清液, 沉淀用丙酮(含 0.07% β -巯基乙醇, -20℃ 预冷)洗涤 3 次。真空浓缩, 所得干粉置 -80℃ 保存待用。

酚抽提 Phe 法(方法 D) 参照 Faurobert 等^[16]、Isaacson 等^[14] 和 Pan 等^[13] 的方法并稍加改进。1 g 样品置液氮中充分研磨, 装入 50 mL 离心管。加 15 mL 预冻提取液(含 0.5 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.7 mmol/L 蔗糖, 0.1 mmol/L KCl, 50 mmol/L EDTA, 2 mmol/L PMSF, 2% (V/V) β -巯基乙醇), 加入 100 mg PVPP。加入等体积的酚饱和 Tris-HCl (pH 7.5), 在 4℃ 下摇匀混合 30 min。在 4℃ 下 8000 $\times$ g 离心 30 min。收集上层液。重复 2

次, 收集酚层, 并记录酚相体积数 T。加入 5 倍体积 (5 $\times$ T) 0.1 mmol/L 的冷冻乙酸铵甲醇溶液, -20℃ 下沉淀过夜, 所得蛋白沉淀如白色雪花状。在 4℃ 下 8000 $\times$ g 离心 30 min, 去上清液。加入 2 倍体积 (2 $\times$ T) 冰甲醇润洗沉淀, 轻轻摇匀。在 4℃ 下 8000 $\times$ g 离心 10 min, 去上清液。重复 2 次以上。用预冷丙酮代替甲醇重复以上步骤 2 次以上。真空浓缩, 所得干粉置 -80℃ 保存待用。

1.3 双向电泳

蛋白质浓度的测定 蛋白质干粉加适量水化液(含 8 mmol/L 尿素, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2% Bio-Lyte, pH 3~10), 室温溶解 1 h 以上, 在 4℃ 下 12000 $\times$ g 离心 15 min, 取上清液。采用 Bradford 法^[17] 测定蛋白质浓度, 以 Bio-Rad 公司的 Bradford 法蛋白质定量试剂盒测定。

一维 SDS-PAGE 电泳 SDS-PAGE 参考 Sambrook 等^[18] 的方法。采用 12% 的分离胶, 4% 的浓缩胶。取适量样品蛋白用 Laemmli buffer (含 0.5 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% 甘油, 1% 溴酚蓝, 0.1 mmol/L DTT) 溶解, 上样量按 10 μ g (15 μ L)⁻¹ 进行, 上样前沸水中加热 3~5 min, 在 Bio-Rad 公司的 Mini-PROTEAN 3 垂直电泳槽上先用 10 mA gel⁻¹ 恒流电泳 30 min, 使蛋白电泳出浓缩胶, 再换用 20 mA gel⁻¹ 恒流电泳, 当溴酚蓝线到达凝胶边缘 1 cm 左右停止电泳。

蛋白质双向电泳 第一向等电聚焦使用 17 cm pH 4~7 的线性 IPG 胶条(Bio-Rad), 在 Bio-Rad 电泳仪上完成。上样量为 300 μ g (350 μ L)⁻¹, 水化和聚焦均在标准型胶条槽内进行, 等电聚焦程序: 50V 12 h, 250V 0.5 h, 1000V 1 h, 1000~10000V 线性上升 5 h, 10000V 80 kVh。胶条平衡 2 次, 第 1 次向平衡液(含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 6 mmol/L 尿素, 20% 甘油, 2% SDS, 0.001% 溴酚蓝)中加入 2% DTT, 第 2 次向平衡液中加入 4% 碘乙酰胺, 每次平衡 15 min。第二向 SDS-PAGE 采用 12.5% 分离胶。蛋白的显示采用银染^[7] 的方法。

1.4 2-DE 图像分析

图像扫描采用 ImageScanner labscan 扫描仪 (GE Healthcare), 软件分析采用 ImageMaster TM 2D Platinum Software (Version 6.0, GE Healthcare), 得到清晰的 Tiff 格式图像, 对比度与亮度采用软件默认值, 分辨率为 600 dpi, 再通过 ImageMaster TM

2D Platinum Software (Version 6.0, GE Healthcare) 分析软件系统,进行蛋白点的自动检测和 2-DE 凝胶的自动匹配,然后对凝胶上的蛋白点进行分析。

2 结果和分析

2.1 4 种方法的比较

按照植物蛋白质提取的 4 种方法(表 1)进行柑橘叶片和果皮的总蛋白质提取。用 4 种方法提取新鲜叶片的总蛋白质含量分别为 2.76、2.87、1.10 和

2.49 mg g⁻¹FW。方法 B 提取的柑橘叶片蛋白质含量最高,但与方法 A 的差异不显著,与方法 C、D 的达极显著差异水平,方法 C 提取的蛋白最少。用 4 种方法提取果皮的总蛋白质含量分别为 2.54、2.33、1.03 和 1.13 mg g⁻¹ FW,方法 A 提取的果皮蛋白质含量最高,方法 B 次之,两者差异不明显,但与方法 C、D 的达极显著差异水平。从蛋白质含量上看,不论是柑橘叶片还是果皮,均是方法 A 和 B 的蛋白质提取效果好于方法 C 和 D。

表 1 4 种方法提取柑橘叶片和果皮的总蛋白质含量
Table 1 Protein contents in *Citrus* leaves and peels extracted by four methods

方法 Methods	含量 Content (mg g ⁻¹ FW)	
	叶片 Leaves	果皮 Peels
Tris-HCl (A)	2.76 ± 0.047aAB	2.54 ± 0.053aA
TCA (B)	2.87 ± 0.017aA	2.33 ± 0.021aA
Thi/Urea (C)	1.10 ± 0.14cC	1.03 ± 0.35bB
Phe (D)	2.49 ± 0.16bB	1.13 ± 0.15bB

n = 3; 同列数据后不同大写和小写字母表示差异极显著(*P* < 0.01)和差异显著(*P* < 0.05)。
n = 3; Data followed different capital and small letters within column indicate significant difference at 0.01 and 0.05 levels by LSD test, respectively.

2.2 一维 SDS-PAGE 比较

用 4 种样品制备方法分别提取柑橘叶片、果皮的总蛋白质,经一维 SDS-PAGE 电泳(图 2)分离后,条带数目和分离效果有较大差异。方法 A 和方法 C 提取柑橘叶片总蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图谱背景较深,总蛋白质条带数差别不大;方法 D 的蛋白质条带最少,但背景清晰;方法 B 的电泳图谱背景色淡,条带数较多且分辨率较高,多集中在 14.3 ~ 97.2 kD 范围内,高分子量区的蛋白质条带较弱且数量少。方法 C 提取柑橘果皮总蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图谱中条带数多,但背景较深;方法 A 和方法 D 的背景比方法 C 较淡,但蛋白质条带数量少;而方法 B 的电泳图谱背景色淡,条带数多且分辨率较高,多集中在 14.3 ~ 97.2 kD 范围内,高分子量区的蛋白质条带较弱且数量少。

从柑橘叶片和果皮的蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱来看,方法 A 和方法 C 的背景较深,可能是用该抽提方法提取的蛋白样品中杂质含量高,盐离子浓度大导致的;而方法 D 的背景较浅且蛋白质条带数量少,这可能是由于尽管酚能去除植物组织中的干扰物质,尤其是多糖和核酸等,但由于其抽提步骤多,部分蛋白质可能在抽提过程中转移到水相中而导致选择性丢失;而方法 B 的背景色淡,条带数

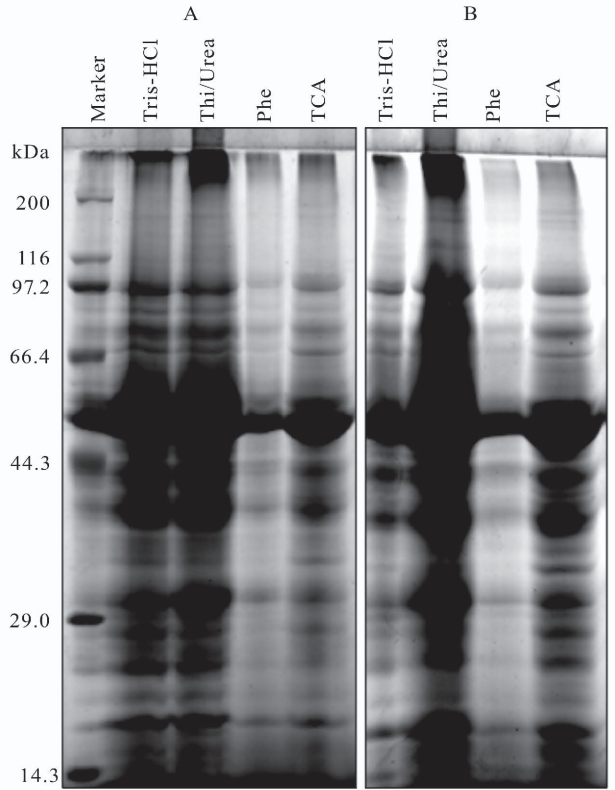


图 2 用 4 种方法提取的柑橘叶片(A)、果皮(B)蛋白的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 2 SDS-PAGE maps of proteins in *Citrus* leaves (A) and peels (B) extracted by four methods

多且分辨率较高,说明提取的蛋白质纯度较高。因而,用方法 B 提取柑橘的叶片和果皮总蛋白质的一维 SDS-PAGE 电泳分离效果好于其他 3 种方法。

2.3 双向 SDS-PAGE 比较

对 4 种方法提取的柑橘叶片、果皮蛋白质样品用 Bradford 法进行定量,2-DE 分离和银染(图 3,4)。不同蛋白质提取方法的 2-DE 图谱在质量和蛋白点数上均

存在明显差异。从表 2 可见,方法 B 提取的柑橘叶片总蛋白质在 2-DE 图谱上的蛋白点数为 1532,方法 A、C 的分别为 1304、1129,方法 D 的最少,只有 688;而 4 种方法提取的柑橘果皮总蛋白质在 2-DE 图谱上的蛋白点数分别为 1282、1292、389、616,同样是方法 B 的蛋白点数最多。因此,方法 B 在柑橘叶片和果皮总蛋白的提取中,所得蛋白点数均是最多的。

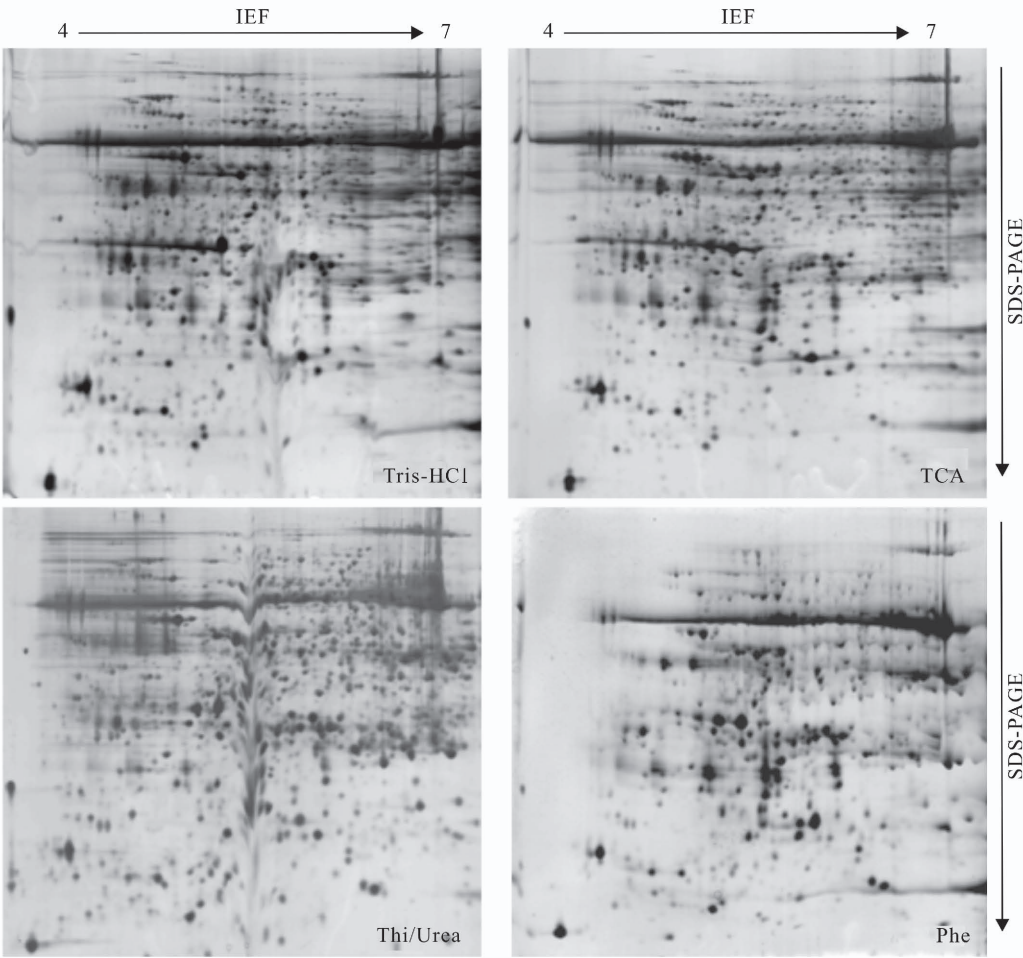


图 3 柑橘叶片总蛋白质的 2-DE 图谱
Fig. 3 2-DE maps of proteins in *Citrus* leaves

从图 3 可见,方法 D 提取柑橘叶片的总蛋白质经双向电泳后,蛋白质点明显偏少,而其它 3 种方法的蛋白点相差不大,但方法 A 和 C 的横纹和纵纹多于方法 B,且背景色较重,说明样品中蛋白质含杂质比较多,对横向及竖向干扰较大。而方法 B 所得蛋白质点分布比较清晰、均匀,明显好于其它方法。

从图 4 可见,方法 C 提取柑橘果皮的总蛋白质经双向电泳后,蛋白点最少;方法 D 的略高于方法

C 的;而方法 A 和方法 B 的蛋白点数相近,且分布均匀,说明样品中杂质含量少,大多数蛋白质斑点呈圆形或椭圆形,比较清晰,蛋白质点出现拖尾、纹理和横向扩散的现象较少。但方法 B 的 2-DE 图谱更为清晰,背景干净,基本没有条纹,蛋白质点数最多、分离效果更好。

结合蛋白产率、一维 SDS-PAGE 和 2-DE 的电泳结果,TCA/丙酮沉淀法不仅能有效去除柑橘果皮、叶片中存在的大量干扰物质,而且还能得到稳定、

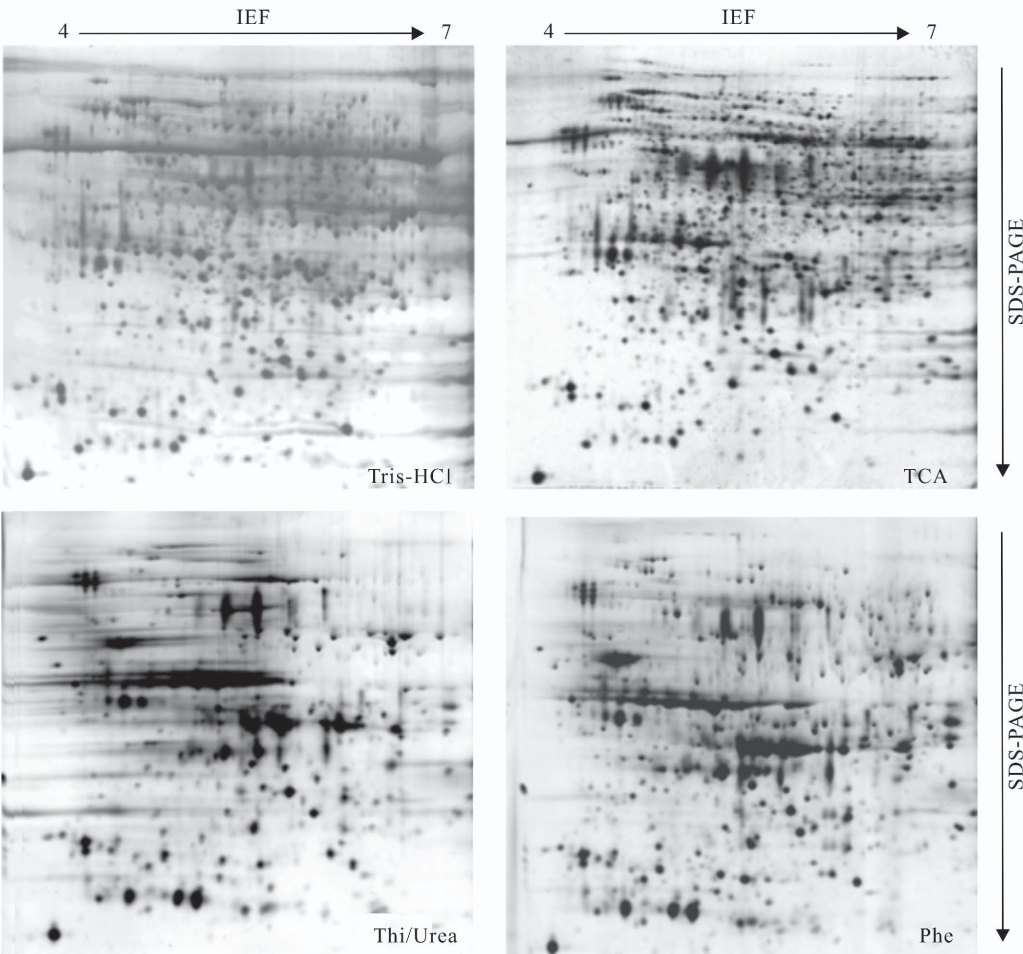


图 4 柑橘果皮总蛋白质的 2-DE 图谱
Fig. 4 2-DE maps of proteins in *Citrus* peels

表 2 4 种提取方法获得的蛋白点数

Table 2 Number of protein spots extracted by four methods

	Tris-HCl (A)	TCA (B)	Thi/Urea (C)	Phe (D)
叶片 Leaf	1304	1532	1129	688
果皮 Peel	1282	1292	389	616

高效的低丰度蛋白,所提取的蛋白质纯度高,双向电泳后蛋白质点的分离效果好。因此,TCA/丙酮沉淀法是比较适用于柑橘果皮和叶片的蛋白质提取方法。

3 讨论

样品制备是双向电泳分析中最关键的环节之一。样品制备直接影响双向电泳的分辨率、重复性和可靠性。用于植物材料总蛋白的样品制备方法有多种,如 TCA/丙酮法可使蛋白酶失活,减少蛋白质降解,同时可以去除杂质,富集碱性蛋白质,比单独使用 TCA 或丙酮法的效果好^[19]。Thi/Urea 法在

材料研磨时加入 PVPP 可有效去除样品中的酚、醌类物质。虽然尿素是较理想的蛋白增溶剂,高浓度的尿素结合硫脲可以进一步增强溶解能力,但在抽提过程中往往带入过多盐离子,影响了 2-DE 电泳结果^[20]。饱和 Phe 提取法^[21]是通过酚作为蛋白质的良好溶剂,使蛋白质和脂类溶于酚相,单宁、多酚和多糖等可溶性物质进入水相,酚相中的蛋白质可通过乙酸铵的甲醇溶液沉淀进一步纯化,但蛋白质的提取率较低。而 Tris-HCl 法在柑橘类果树总蛋白的提取效果不佳,如葡萄柚、柠檬叶片,其 2-DE 图谱条纹明显,拖尾严重^[22]。

柑橘的果皮、叶片中富含蛋白酶和其它一些干

扰物质,如单宁、多糖、果胶、酚类、油脂及色素等^[23]。本文通过比较 Tris-HCl、TCA、Thi/Urea 和 Phe 法对春甜橘果皮和叶片总蛋白的提取效果,结果表明,Thi/Urea 法用丙酮沉淀很难将这些杂质去除,2-DE 图谱上存在明显的纵向和横向条纹。Phe 法虽然可以有效去除样品中的可溶性杂质^[24],但它的蛋白质提取效率较低,样品的消耗量大,容易损失一些重要的低丰度蛋白等(图 3,4)。而 TCA 法不仅可以很好地提取春甜橘总蛋白,而且能有效地去除样品中的杂质,保证等电聚焦的顺利进行,减少 SDS-PAGE 凝胶上纵向和横向条纹,从而获得较好的 2-DE 图谱,有利于后续的蛋白质分析和研究。

参考文献

- [1] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. J Biol Chem, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [2] Jesús V J, Maldonado M A, Sira E, et al. Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge [J]. Proteomics, 2009, 9(3): 285-314.
- [3] Yu J J(喻娟娟), Dai S J(戴绍军). Research advances in plant proteomics [J]. Chin Bull Bot(植物学报), 2009, 44(4): 410-425.(in Chinese)
- [4] Cánovas F M, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, et al. Plant proteome analysis [J]. Proteomics, 2004, 4(2): 285-298.
- [5] Li X F(李肖芳), Han H P(韩和平), Wang X C(王旭初), et al. A protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis analysis of halophytes [J]. Acta Ecol Sin(生态学报), 2006, 26(6): 1848-1853.(in chinese)
- [6] Ramu S, Jocelyn K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. Proteomics, 2004, 4(9): 2522-2532.
- [7] 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.
- [8] Jun S, Braun G, Bevis E, et al. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27(15): 3144-3151.
- [9] Xie H, Pan S L, Liu S F, et al. A novel method of protein extraction from perennial *Bupleurum* root for 2-DE [J]. Electrophoresis, 2007, 28(5): 871-875.
- [10] Delaplace P, van der Wal F, Jean-Francois D, et al. Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins [J]. Proteomics, 2006, 6(24): 6494-6497.
- [11] Jorge I, Navarro R M, Lenz C, et al. Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress [J]. Proteomics, 2006, 6(Suppl. 1): 207-214.
- [12] Dai S J, Chen T T, Chong K, et al. Proteomic identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen [J]. Mol Cell Proteom, 2007, 6(2): 207-230.
- [13] Pan Z Y, Guan R, Zhu S P, et al. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28(2): 281-289.
- [14] Yang Q S, Wang Y Q, Zhang J J, et al. Identification of aluminum-responsive protein in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response [J]. Proteomics, 2007, 7(5): 737-749.
- [15] Isaacson T, Damasceno C M, Saravanan R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues [J]. Nat Protoc, 2007, 1(2): 769-774.
- [16] Faurobert M, Mihr C, Bertin N, et al. Major proteome variations associate with cherry tomato pericarp development and ripening [J]. Plant Physiol, 2007, 143(3): 1327-1346.
- [17] 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, 7(72): 248-254.
- [18] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 880-882.
- [19] Damerval C, de Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins [J]. Electrophoresis, 1986, 7(1): 52-54.
- [20] Shaw M M, Riederer B M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis [J]. Proteomics, 2003, 3(8): 1408-1417.
- [21] Audrius A Z, Andrew P B. Extraction methods for analysis of Citrus leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2005, 1078(1/2): 201-205.
- [22] Matthew I K, Paul J C. Problems associated with determining protein concentration: A comparison of techniques for protein estimations [J]. Mol Biotechnol, 2003, 23(1): 19-28.
- [23] Barraclough D, Obenland D, Laing W, et al. A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples [J]. Postharv Biol Technol, 2003, 32(2004): 175-181.
- [24] 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.