

研究报告

Research Report

藨草种子破眠蛋白质双向电泳体系的建立

斯日古楞¹ 王明玖^{2*}

1 内蒙古民族大学农学院, 通辽, 028000; 2 内蒙古农业大学草原与资源环境学院, 呼和浩特, 010018

*通讯作者, wangmj_0540@163.com

摘要 为了建立一套适合于藨草种子破眠蛋白质双向电泳的技术体系, 以内蒙古民族大学农学院选育的“通选一号”藨草种子为试验材料, 对其蛋白质提取方法、分离技术等进行了探讨。结果表明: 采用三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA/A 法)提取种子蛋白, 结合使用 pH4~7 的 18 cm IPG 胶条, 200 μg 的上样量, 12% SDS-PAGE 胶, 硝酸银法染色, 可得到清晰、丰富的蛋白质点。

关键词 藨草, 种子破眠蛋白质, 双向电泳

Establishment of Two-Dimensional Electrophoresis System for Seed Dormancy Protein in *Phalaris arundinacea* L.

Siriguleng¹ Wang Mingjiu^{2*}

1 College of Agronomy Inner Mongolia University of Nationalities, Tongliao, 028000; 2 College of Grassland, Resources and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, 010018

* Corresponding author, wangmj_0540@163.com

Abstract To develop a suitable system for two-dimensional electrophoresis (2-DE) of *Phalaris arundinacea* seed dormancy protein, we were using the “Tong Xuan 1 Hao” *Phalaris arundinacea* which was selected by the College of Agronomy, Inner Mongolia University for Nationalities as materials, discussed the protein extraction method and separation technology. Results showed that the samples prepared by TCA/acetone precipitation method, combined with the use of 18 cm IPG strip of pH=4~7, 200 μg loading quantity of protein, 12% SDS-PAGE gel and silver nitrate staining method, can get clear and rich protein spots.

Keywords *Phalaris arundinacea* L., Seed dormancy protein, Two-dimensional electrophoresis

双向电泳(2-DE)的思路最早在 20 世纪 60 年代被提出, 随后, 多位科学家相继对双向凝胶电泳做进一步的优化, 建立了高分辨率的双向电泳。双向电泳进行的第一向电泳是在不同 pH 梯度 IPG 胶条内进行等点聚焦, 第二向电泳是在 SDS-PAGE 凝胶上根据蛋白质分子量的大小进行分离。极高的分辨率和灵敏度是双向电泳技术在组织或细胞内各种蛋白的显示和分析中得以利用的关键。在 2-DE 技术中蛋白质的提取和

电泳体系优化是其成功与否的关键。该技术在玉米(董婧等, 2016; 杨彦芳等, 2015)、水稻(郭佳林等, 2015; 叶景秀, 2015)、大豆(刘卫国等, 2016; 张宁等, 2015)等作物上的应用较为广泛, 但在牧草当中利用的报道较少。

藨草(*Phalaris arundinacea* L.)是禾本科早熟禾亚科(Pooideae)藨草属(*Phalaris* L.)多年生冷季型牧草, 具有产草量高、抗盐碱性强等特点(聂微微等, 2010; 骆秀梅和张永亮, 2011; 王学愿和张永亮, 2013)。藨草种子具有休眠性, 在一定程度上影响了生产上的利用。然而种子是植物繁殖后代的重要方式, 从结构和生理上已经做好了传播的准备, 贮藏了足够的养分以供幼苗长成自养体。而种子蛋白质不仅在其形成、发育、萌发甚至成苗的过程中扮演着非常重要的角色, 还参与各种代谢和调控的途径(徐恒恒等, 2014), 为新植株的生长提供了不可或缺的条件。因此, 探究藨草种子蛋白在休眠与萌发过程中的相互作用, 可使其种子休眠机理机制的研究成为可能。但是藨草种子中含有大量的淀粉及脂肪类物质, 所以得到纯化程度高、分离效果好的蛋白质要依赖于适宜的蛋白质提取方法和双向电泳技术。笔者通过对 GA_3 引发的藨草种子破眠蛋白质的提取及双向电泳体系的建立, 为日后研究其作用机理及功能奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 蛋白质的提取及定量

通过 TCA/丙酮沉淀法, 在凝胶上得到了背景清晰、较集中的蛋白质点。蛋白质双向电泳体系建立过程中最基础、最关键的步骤之一是制备纯度、溶解度较高的蛋白质。样品制备的关键点是有效去除干扰成分, 尽可能减少蛋白质的降解和丢失, 以获得更高的分辨率。TCA/丙酮沉淀法是较常用的蛋白质提取方法。其中, TCA 在酸性条件下使蛋白质变性、聚集沉淀。依据库伦定律, 蛋白质溶液中加入丙酮后, 溶液的介电常数下降, 从而造成蛋白质之间静电作用力增强的同时蛋白质与丙酮对水的争夺可直接导致水化层的破坏, 从而引起蛋白质的沉降。

蛋白质定量采用 Brandford 法, 得到标准曲线的方程式为: $y=6.2283x-0.0461$ ($R^2=0.9969$)(图 1), 根据蛋白质定量结果确定样品的上样量: 0.07 m 胶需用 5×10^{-5} g 总蛋白, 加入 DTT 终浓度 0.5 mol/L, 0.8% IPG buffer, 用水化液补充体积至 0.000 125 L。0.18 m 胶需用 2×10^{-4} g 总蛋白总体积 0.000 350 L。

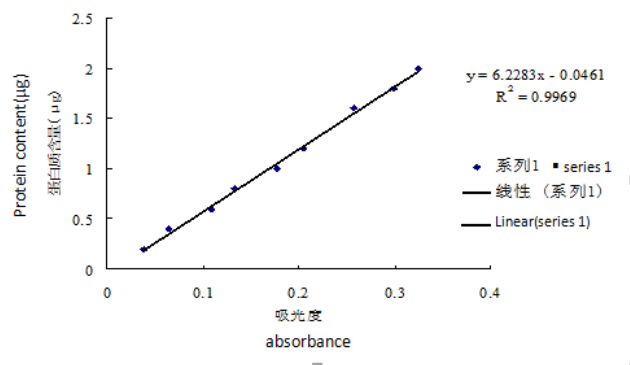


图 1 蛋白质定量标准曲线

Figure 1 The protein quantitative standard curve

1.2 IPG 胶条的选择

pH=4~7, 0.18 m IPG 胶条(图 2A)与 pH=3~10, 0.07 cm 胶条(图 2B)相比较, 在前者上得到了背景噪音小、清晰度高、横纹少、蛋白质点呈规则的圆形的分辨率较高的蛋白质图谱。本试验选用 0.07 m 的 pH3~10 IPG 胶条做为藜草种子破眠蛋白质双向电泳的载体, 并对凝胶图谱进行分析, 统计蛋白质点的分离情况和数目。在 0.07 m 的凝胶上蛋白质点大多分布在 pH4~7 的范围之内, 但是点之间有重叠的现象(图 2A)。因此, 采用 pH4~7、胶条长度为 0.18 m 的 IPG 胶条进行双向电泳体系的优化。通过 Image Master 2D platinum 5.0 软件分析得出, 可见的蛋白质点从 7 cm 的 94 个点增加到 18 cm 的 987 点, 分辨率增加了 10 倍。采用 pH4~7、长度为 18 cm 的 IPG 胶条进行双向电泳后蛋白质得到了有效的分离(图 2B)。可以看出随着 IPG 胶条长度的增加和 pH 梯度的变窄, 提高了藜草种子蛋白质 2D 电泳图谱的分辨率。分析其原因可能是由于胶条长度不够, 使得高丰度的蛋白对低丰度的蛋白有粘聚作用, 或是虽然胶条的 pH 梯度变窄, 但是胶条变得相对长的时候其不同等电点的蛋白质间距变大, 原来等电点相近的蛋白质点就能分离开来。

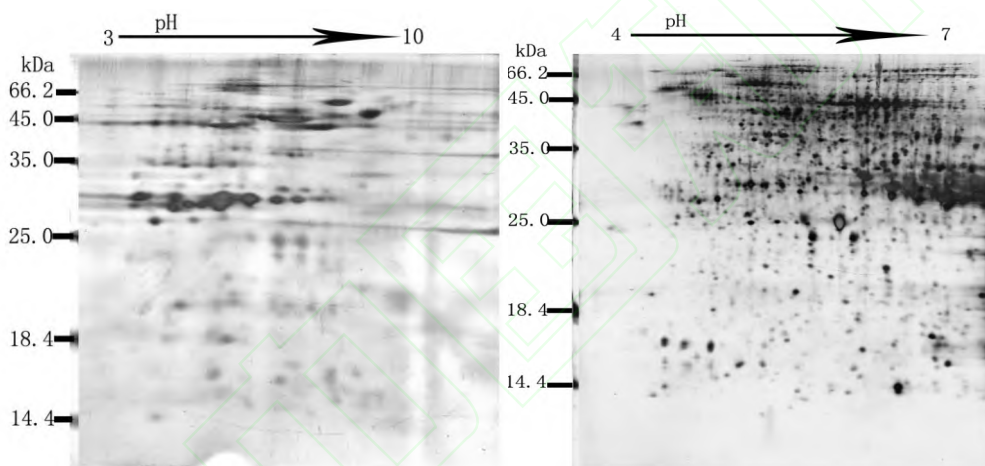


图 2A IPG 胶条 2-DE 电泳

注: A: pH 3~10; B: pH 4~7

Figure 2 2-DE electrophoresis from IPG

Note: pH 3~10; pH 4~7

1.3 藜草种子双向电泳的建立

将制备得到的蛋白样品进行第一向以等电点分离的电泳和第二向以蛋白质分子量大小进行电泳的试验后得到蛋白质点较多、分离较均匀的凝胶图谱(图 2B)。第一向等电点聚焦运行程序中胶条的聚焦时间以 9 h 为宜, 过长时间的聚焦会导致蛋白质的弥散, 而过短的时间会造成聚焦不完全, 影响双向电泳的整体效果。制备 SDS-PAGE 凝胶时, 灌胶结束后需用 Milli-Q 水封面以免造成胶面的不平整。在银染致敏过程中去掉戊二醛进行染色, 也得到了理想的凝胶图谱。

2 讨论

2.1 蛋白质的提取方法

蛋白质样品提取是进行蛋白质双向电泳最基础且关键的步骤之一。目前有许多蛋白质样品的制备方法。有效的、具有可重复性的样品制备方法是双向凝胶电泳(2-DE)成功的关键。一般来说,有效的蛋白质制备方法应具备以下4点要求:(1)在合适盐浓度下,可重复地溶解所有的蛋白质且要避免溶解度低的蛋白质在等电聚焦时沉淀析出。(2)防止蛋白质的降解及化学修饰。(3)要排除核酸、多糖、脂类等的干扰。(4)获得的目标蛋白应在可探测的范围之内,需要去除高丰度蛋白和不相关蛋白(穆雪,2011)。最常用的植物蛋白质制备方法有TCA/丙酮沉淀法、饱和酚法和Trizol沉淀法(陈晶瑜等,2010)。

三氯乙酸/丙酮法沉淀蛋白质主要基于以下几个方面的作用:在酸性条件下三氯乙酸不仅能与蛋白质形成不溶性盐,且作为蛋白质变性剂使蛋白质构象发生改变,暴露出较多的疏水性基团,使之聚集沉淀(孙杰,2009)。而丙酮沉淀蛋白质时,必须在0~4℃低温下进行且蛋白质被丙酮沉淀后,应立即分离,否则蛋白质会变性。因此运用此方法提取蛋白质首先需要研磨彻底,其次保持低温沉淀,完成之后,务必要超声助溶。本研究利用三氯乙酸附加冷丙酮方法,提取种子总蛋白过程中加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP),可明显减少藜草种子中非蛋白物质对总蛋白纯度的影响。在沉淀过程中增加10%冷丙酮洗涤,同时在离心时加大转速,可有效去除总蛋白样品中的盐分,减少双向电泳图谱中横竖条纹干扰的现象。沉淀洗涤后将混合物进行裂解,将裂解物在冰浴超声波中进行破碎,使其在低温条件下充分破碎,得到纯度较高、数量较多的蛋白质样品。

2.2 不同 pH 梯度和长度的 IPG 胶条对双向电泳的影响

双向电泳技术具备的极高分辨率和灵敏度使同时显示多种蛋白成为可能,但有些问题是该技术无法解决的,如对低丰度蛋白的检测、极酸和极碱性蛋白的分离、高分子质量区蛋白的分离、膜蛋白的提取与有效分离和胶上蛋白高通量的鉴定技术等。这些问题成为蛋白质组研究的一个瓶颈,近年来一些针对蛋白质提取、染色、检测等步骤的新技术致力于改善这些状况,其中,提高2-DE的分辨率和可重复性成为专家学者们一直关注的焦点。提高分辨率能确保蛋白质最大程度的分离,高重复性有利于凝胶间的对比。目前,提高双向电泳的分辨率的主要措施有使用商品化、范围窄的IPG干胶条,减少凝胶厚度,增大凝胶面积等(李倩等,2009)。本试验所选用的pH=4~7,0.18 m长的IPG胶条分离效果较pH=3~10,0.07 m长的IPG胶条好,且可检测的蛋白点较多。

2.3 蛋白质上样量和聚焦时间对双向电泳的影响

选择合适的蛋白质上样量是获得高质量双向电泳图谱的关键。过低上样量不利于检测低丰度蛋白点,过高则得到的蛋白点甚至比过低上样量时得到的蛋白点更少,因为等电聚焦时蛋白质浓度过高会在胶槽中

沉淀，不能很好地进入胶条中。上样量增加，在一定程度上有利于低丰度蛋白质显现，而过高时，高丰度蛋白斑点过大，影响其他蛋白点的分离。而且，蛋白样品溶液过多则不能被胶条吸收，影响电泳的效果(董婧等, 2016)。因此，应根据蛋白质提取的目的、方法和胶条的长度，pH 值范围等确定合适的蛋白质上样量。在进行双向电泳过程中第一相的等电聚焦与第二相的 SDS-PAGE 凝胶分离是否合理、完全，均可影响到蛋白点在凝胶上的分布效果(王振华等, 2011; 尹稳等, 2014)。双向电泳过程中聚焦能否达到平衡直接影响蛋白质的分离及分析结果，因此蛋白质的等电平衡显得尤为重要。在聚焦过程中电泳槽内的温度不能超过 20℃，超过此温度会引起尿素的降解，影响蛋白质的等电点，从而产生等电聚焦不良的效果。好的等电聚焦后蛋白质点应该成规则的圆形、清晰度高和数量多等特点。本试验采用三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA/A 法)提取种子蛋白，结合使用 pH4~7 的 18 cm IPG 胶条，上样量为 2 mg，SDS-PAGE 分离凝胶浓度为 12%，等电聚焦时间为 9 h，用硝酸银法染色，可得到横纹少、清晰度高、分辨率较高的蛋白质图谱，初步建立了一套适用于藜草种子蛋白质组分析的双向电泳技术体系。

3 材料与amp;方法

3.1 材料

“通选一号”藜草种子，由内蒙古民族大学农学院提供。

3.2 化学试剂

尿素、Tris-base、蛋白 Marker、甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝、丙烯酰胺、低熔点琼脂糖、N'N'N'N'-四甲基乙烯二胺(TEMED)、十二烷基磺酸钠(SDS)、固相 PH 梯度 IPG 干胶条、IPG buffer、牛血清蛋白、二巯素糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAM)、CHAPS、乙二胺四乙酸(EDTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、甘氨酸、矿物油、考马斯亮蓝染料 G250、过硫酸胺。所有溶液均用 Milli-Q 制备的纯水配制。

3.3 主要仪器及设备

Bio-Rad 电泳系统、布鲁克 Ultraflex、UMAX Powerlook 2100XL-USB 扫描仪、IKA 振荡器、Protein II xi Cell 电泳槽、恒温加热块、Eppendorf centrifuge 5417R 型离心机、电热恒温水浴锅(长安科学仪器)、研钵、液氮罐、电子天平、各型微量移液器及离心管。

3.4 试验材料的准备

取“通选一号”藜草种子 2 g，在室温条件下用 0.4 g/L GA₃ 浸种 24 h 后备用。

3.5 蛋白质样品制备

3.5.1 三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA/A 法)

将器皿进行灭菌处理，取制好的蛋白质样品放入预冷的研钵中，加入 10% 的交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)后，在液氮中迅速研磨种子。将磨细后的种子粉末放入离心管中，加入含有 10% TCA 的预冷丙酮，于振

荡器上混匀后置-20℃冰箱沉淀 2 h。

3.5.2 样品的纯化

15℃, 21 000 rpm, 离心 30 min 后取沉淀, 在沉淀中加入预冷的纯丙酮进行清洗后将离心管放入-20℃冰箱沉淀 30 min。清洗 2~3 次。

3.5.3 样品的裂解

加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L PMSF, 2×10^{-6} mol/L EDTA, 1×10^{-5} mol/L DTT 的裂解液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 2×10^{-5} mol/L Tris-HCL, 调 pH 至 8.8)至 0.000 5 L。

3.5.4 样品的超声波处理

将裂解的混合液冰浴超声(开启 2 s, 终止 3 s, 功率为 180W)破碎 5 min。后 15℃, 21 000 rpm, 离心 30 min, 收集上清液, -80℃保存备用。

3.6 蛋白质的定量上样

使用 Bradford 法对蛋白进行定量, 具体程序参照《生物化学实验技术与实施教程》并加以改进(钱国英, 2009)。取 10 支 5 mL 干净的 Eppendorf 取样。将 Eppendorf 管盖子盖紧后将溶液纵向倒转混合, 放置室温 2 min 后在 595 nm 下比色, 记录各管的光密度值(OD_{595}), 并绘制标准曲线。

3.7 蛋白质样品的双向电泳

3.7.1 水化上样

制备的蛋白质样品需要经过水化处理。水化液成分: 7 mol/L 尿素、2% CHAPS、0.5% DDT、0.8% IPG Buffer、适量溴酚蓝指示剂。从冰箱中取出-20℃冷冻保存的 pH=3~7, 长度分别为 0.07 m 和 0.18 m 的 IPG 胶条在室温放置 10 min, 平衡胶条的温度。0.07 m 胶条加 5×10^{-5} g 蛋白样品补充终体积至 0.000 125 L。0.18 m 胶需用 0.000 2g 总蛋白总体积 0.000 35 L, 加入到 Eppendorf 管中, 在 10℃下 21 000 rpm 离心 10 min, 充分混匀。加样时样品需要沿着胶条槽的边缘从左到右连贯快速加入, 防止产生气泡。而胶条槽上下端各留出 0.01 m, 不需要加样。

3.7.2 第一向等点聚焦(IEF)

把样品加入到聚焦盘中后, 用镊子撕下 IPG 胶条上的保护层后将胶条的正负极对应聚焦盘的正负极, IPG 胶条胶面朝下, 置于聚焦盘中的样品溶液上, 确保胶条与样品溶液和电极紧密接触。然后缓慢地在每根胶条上加入适量矿物油, 防止胶条水化过程中液体的蒸发, 形成结晶。盖上聚焦盘的盖子, 将聚焦盘的正、负极对好 PROTEIN IEF 仪器的正、负级, 水平置于仪器上, 开始运行等电聚焦程序, 各具体参数见表 1。

表 1 等点聚焦运行参数

Table 1 The parameter of isoelectric focusing

步骤 Step	电压 Voltage (V)	时间 Time (h)	处理 Treatment	说明 Explanation
1	30	12	快速 Fast	水化 Hydration
2	200	2	快速 Fast	除盐 Demineralization
3	500	2	线性 Linear	聚焦 Focusing
4	1 000	2	线性 Linear	聚焦 Focusing
5	8 000	3	线性 Linear	聚焦 Focusing
6	8 000	65000Vh	快速 Fast	保持 Maintaining

注: 水化和聚焦时 PROTEIN IEF 内恒温 20℃, 最大电流设置每条 IPG 胶条 50 μ A

Note: During hydration and focusing, PROTEIN IEF has a constant temperature of 20 $^{\circ}$ C and a maximum current of 50 μ A for each IPG strip

3.7.3 IPG 胶条平衡

用移液枪吸取适量胶条平衡液, 融化后平分到 2 个平衡管中, 一管加入胶条平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl, 20%甘油, 使用时加 1% DTT), 另一个管中加入胶条平衡液 II (6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl, 20%甘油, 使用时加 2.5%碘乙酰胺使用时加 2.5%碘代乙酰胺), 充分溶解。待等电聚焦完成后用镊子夹出胶条, 胶面朝上放在湿润的滤纸上。另外一张湿润的滤纸覆盖在胶面上, 轻轻吸去上面的甘油。用镊子夹起胶条的一端, 先放进装有平衡液 I 的平衡管中, 在低速摇床上放置 15 min。后将胶条转入平衡液 II 中, 同样在低速摇床上放置 15 min。

3.7.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

组装灌胶磨具, 配置 T=12.0%的 SDS 凝胶, 灌胶后用 Milli-Q 水封面, 保持胶面平整, 聚合 30 min。待凝胶凝固后, 倒去分离胶表面的 Milli-Q 水。将已平衡好的 IPG 胶条放置在 SDS-PAGE 凝胶玻璃板胶面上, 用镊子轻轻压紧, 胶条与胶面之间不能产生气泡, 胶条一端加入标准蛋白, 用 0.5%低熔点琼脂糖固定胶条。将凝胶玻璃板装入 Protein II xi cell 垂直电泳槽中, 设置系统运行参数(表 1), 开始电泳。待溴酚蓝指示剂迁移到离胶底 1 cm 时停止电泳。电泳结束后把胶移到染色盒中进行染色。

3.8 蛋白质点的获取与分析

3.8.1 凝胶染色

蛋白质分析胶采用硝酸银染色法。染色步骤: 固定 \rightarrow 漂洗 \rightarrow 致敏 \rightarrow 漂洗 \rightarrow 银染 \rightarrow 漂洗 \rightarrow 显色 \rightarrow 终止。试剂与作用时间见(表 2)。

表 2 凝胶染色试剂及时间

Table 2 Gel staining reagents and time

染色步骤	试剂配制	作用时间	处理次数
Staining procedure	Reagent preparation	Acting time	Treating times
固定	100 mL 乙醇, 25 mL 冰醋酸, 加水定容至 250 mL		
Fixation	100 mL ethanol, 25 mL glacial acetic acid, dilute with water to 250 mL	30 min	1
漂洗	Milli-Q 水		
Rinse	Milli-Q water	30 min	1~2
致敏	30%乙醇, 乙酸钠 17 g, 三水乙酸钠 28.2 g, 硫代硫酸钠 0.5 g, 加水到终体积 250 mL		
Sensitization	30% ethanol, 17 g sodium acetate, 28.2 g sodium trihydrate, 0.5 g sodium thiosulfate, dilute with water to 250 mL	30 min	1
漂洗	Milli-Q 水		
Rinse	Milli-Q water	10 min	3
银染	0.625 g AgNO ₃ , 0.000 1 L 37%甲醛, 加水到终体积 250 mL		
Silver staining	0.625 g AgNO ₃ , 0.000 1 L 37% methanol, dilute with water to 250 mL	20 min	1
漂洗	Milli-Q 水		
Rinse	Milli-Q water	1 min	2
显色	6.25 g Na ₂ CO ₃ , 0.000 05 L 37%甲醛, 加水到终体积 250 mL		
Color rendering	6.25 g Na ₂ CO ₃ , 0.000 05 L 37% methanol, dilute with water to 250 mL	2 min	1
终止	1 g 甘氨酸, 加水到终体积 250 mL		
Termination	1 g glycine, dilute with water to 250 mL	10 min	1

3.8.2 胶片扫描

用 UMAX Powerlook 2100XL-USB 扫描染色后的胶片获得图像, TIF 格式保存。

3.8.3 图像分析

采用 ImageMaster 2D platinum 5.0 软件进行胶图的分析, 在进行分析之前需对凝胶进行消除噪音, 消减背景等操作, 以免影响对点的检测。之后需要对点进行归一化处理, 以便于对不同胶上的同一蛋白质点进行客观的相对定量。后将扫描的胶图导入分析软件中, 对其进行定量分析, 选取 3 倍以上差异点。

作者贡献

斯日古楞是本实验的执行人, 参与论文的设计, 材料的收集, 实验的实施到后期数据的整理与分析, 论文初稿的撰写。王明玖为实验设计提供思路, 修改论文并最终定稿。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家重点研发计划课题“科尔沁沙质草甸草地退化治理技术与模式”(2016YFC0500605)和内

蒙古民族大学博士科研启动基金(BS351)共同资助。

参考文献

- Chen J.Y., Guo B.F., He F.L., Qu C.H., Yin K.X., Yang H.D., and Zhao C.S., 2010, The comparison of protein extraction methods of plant for two-dimensional electrophoresis, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 26(23): 97-100 (陈晶瑜, 郭宝峰, 何付丽, 曲春鹤, 尹克鑫, 杨洪达, 赵长山, 2010, 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较, *中国农学通报*, 26(23): 97-100)
- Dong Q., Lu X.P., Lv E.S., Xue C.L., and Li J.W., 2016, Two dimensional electrophoresis of optimization and extraction of proteome research of maize, *Huabei Nongxue Bao (Acta Agriculturae Boreall Sinica)*, 31(4): 13-18 (董婧, 逯晓萍, 吕二锁, 薛春雷, 李俊伟, 2016, 玉米蛋白质组研究中双向电泳技术条件的优化, *华北农学报*, 31(4): 13-18)
- Guo J.L., Li Z., Zhang G.S., Wang S.P., Song Q.L., Li Y., Ma S.C., Niu N., and Wang J.W., 2015, Optimization of two-dimensional electrophoresis system for the study of multi-ovary character in wheat, *Zhongguo Shengwuhuaxue Yu Fenzishengwuxue Bao (Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology)*, 31(9): 999-1007 (郭佳林, 李政, 张改生, 王书平, 宋齐鲁, 李影, 马守才, 牛娜, 王军卫, 2015, 多子房小麦蛋白质双向电泳体系的建立及优化, *中国生物化学与分子生物学报*, 31(9): 999-1007)
- Li Q., Yu Z., Jiang F., and Peng Y.K., 2009, The Application of two-dimensional electrophoresis technology in proteomics, *Shiyanshi Xue (Laboratory Science)*, (2): 81-83 (李倩, 于振, 江帆, 彭永康, 2009, 双向电泳技术在蛋白质组学中的应用, *实验室学*, (2): 81-83)
- Liu W.G., Zou J.L., Yang C.Y., Luo L., Jiang T., and Yang W.Y., 2016, Optimization of proteomic method of two-dimensional electrophoresis for soybean stem, *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Oil Crop Sciences)*, 38(2): 230-236 (刘卫国, 邹俊林, 杨晨雨, 罗玲, 蒋涛, 杨文钰, 2016, 大豆茎秆蛋白质双向电泳技术体系优化, *中国油料作物学报*, 38(2): 230-236)
- Luo X.M., and Zhang Y.L., 2011, Effects of complex salt stress on the seeding growth of two reed Canarygrass, *Neimenggu Minzudaxue Xuebao (Journal of Inner Mongolia University for Nationalities) (Natural Science Edition)*, 26(5): 538-540 (骆秀梅, 张永亮, 2011, 复盐胁迫对2种藜草苗期生长的影响, *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 26(5): 538-540)
- Mu X., 2011, The Study of two-dimensional electrophoresis of Jinhua ham, Thesis for M.S., Food Science and Engineering Institute, Zhejiang Gongshang University, Supervisor: Han J.Z., pp.10-11 (穆雪, 2011, 金华火腿蛋白质的双向电泳研究, 硕士学位论文, 浙江工商大学食品科学与工程学院, 导师: 韩剑众, pp.10-11)
- Nie W.W., Zhang Y.L., and Ren X.Z., 2010, Effect saline-alkali stress on physiological characteristics of *Phalaris arundinacea*, *Neimenggu Minzudaxue Xuebao (Journal of Inner Mongolia University for Nationalities) (Natural Science Edition)*, 25(2): 176-177 (聂微微, 张永亮, 任秀珍, 2010, 盐碱胁迫对藜草幼苗生理特性的影响, *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*,

25(2): 176-177)

- Qian G.Y., 2009, Biochemistry experiment technology and implementation course, Zhejiang University Press, Hangzhou, China, pp.108-109 (钱国英, 2009, 生物化学实验技术与实施教程, 浙江大学出版社, 中国, 杭州, pp.108-109)
- Sun J., 2009, Study on the mechanism of dormancy and proteomics of dormancy-breaking buffalograss seeds, Dissertation for Ph.D., College of Ecology and Environment, Inner Mongolia Agriculture University, Supervisor: Yun J.F., pp.56-57 (孙杰, 2009, 野牛草种子休眠机理及破眠蛋白质组学研究, 博士学位论文, 内蒙古农业大学生态环境学院, 导师: 云锦凤, pp.56-57)
- Wang X.Y., and Zhang Y.L., 2013, Physiological and growth response of *Phalaris arundinacea* seedling to salt stress, Neimenggu Minzudaxue Xuebao (Journal of Inner Mongolia University for Nationalities) (Natural Science Edition), 28(6): 670-673 (王学愿, 张永亮, 2013, 藜草幼苗对盐胁迫的生理与生长响应, 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 28(6): 670-673)
- Wang Z.H., Wang F.Z., and Chen S.S., 2011, Comparison of protein extraction methods from *Brassica napus* roots and optimization of two-dimensional electrophoresis, Huazhong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Huazhong Agricultural University), 30(20): 219-224 (王振华, 王志方, 陈水森, 2011, 甘蓝型油菜根系可溶性蛋白的提取及双向电泳体系的优化, 华中农业大学学报, 30(20): 219-224)
- Xu H.H., Li N., Liu S.J., Wang W.Q., Wang W.P., Zhang H., Cheng H.Y., and Song S.Q., 2014, Research progress in seed germination and its control, Zuowuxue Bao (Acta Agronomica Sinica), 40(7): 1141-1156 (徐恒恒, 黎妮, 刘树君, 王伟青, 王伟平, 张红, 程红焱, 宋松泉, 2014, 种子萌发及其调控的研究进展, 作物学报, 40(7): 1141-1156)
- Yang Y.F., Li N.N., Zhao Y.F., and Hu X.L., 2015, Extraction and establishment of two-dimensional electrophoresis system for chloroplast proteins of maize, Hebei Nongye Kexue (Journal of Henan Agricultural Sciences), 44(6): 24-28 (杨彦芳, 李娜娜, 赵飞云, 胡秀丽, 2015, 玉米叶绿体蛋白质提取及其双向电泳体系建立, 河北农业科学, 44(6): 24-28)
- Ye J.X., 2015, Optimization of two-dimensional electrophoresis system for grain protein in spring wheat, Jiangsu Nongye Xuebao (Jiangsu Journal of Agricultural Sciences), 31(5): 957-961 (叶景秀, 2015, 小麦籽粒蛋白质双向电泳体系的优化, 江苏农业学报, 31(5): 957-961)
- Yin W., Fu X., and Li P., 2014, Application research progress of proteomics, Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin), (1): 32-38 (尹稳, 伏旭, 李平, 2014, 蛋白质组学的应用研究进展, 生物技术通报, (1): 32-38)
- Zhang N., Sun X.L., Duanmu H.Z., Yu Y., Ji W., and Zhu Y.M., 2015, Optimization of two-dimensional electrophoresis technology system for *Glycine soja* leaves proteome, Dadou Kexue (Soybean Science), 34(5): 875-880 (张宁, 孙晓丽, 端木慧子, 于洋, 纪巍, 朱延明, 2015, 野生大豆叶片蛋白质组双向电泳技术体系的优化研究, 大豆科学, 34(5): 875-880)