

甘草愈伤组织蛋白质组双向电泳技术的建立

曹君迈,张 欣

(北方民族大学 生物科学与工程学院,宁夏 银川 750021)

摘 要:以来源于野生乌拉尔甘草的愈伤组织为试材,对甘草愈伤组织蛋白质的提取、SDS-PAGE 电泳、上样量、染色方法等关键步骤进行了优化,结果表明:采用改良丙酮法可提高提取液中蛋白质的含量及单向电泳图谱的分辨率;17 cm IPG 胶条上样量为 450 μg 时,采用银染法提高了双向电泳图谱的分辨率及分离效果,获得了 1 132 个蛋白点。建立了一套适用于乌拉尔甘草的愈伤组织蛋白质组分析的双向电泳方法。

关键词:甘草;愈伤组织;双向电泳;蛋白质组学

中图分类号: S567.7⁺1; Q946.1 **文献标志码:** A

Establishment and optimization of two-dimensional gel electrophoresis for proteome of *Glycyrrhiza uralensis*

CAO Jun-mai, ZHANG Xin

(College of Life Science & Engineering, Beifang University of Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Callus of *Glycyrrhiza uralensis* was used in this research for extraction of total proteins, SDS-PAGE, loading quantity and staining method, allowing optimization of the two-dimensional gel electrophoresis (2D-E) technology. The results showed that improved acetone precipitation could increase the protein contents and image resolution of gel electrophoresis. There were 1 132 protein spots identified using silver staining when the loading quantity of the sample protein was 450 μg /(17 cm IPG trip). This research developed a 2D-E method applicable for protein analysis of *Glycyrrhiza uralensis* callus.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis* callus; two-dimensional gel electrophoresis; proteomics

蛋白质组学(proteomics)是 20 世纪 90 年代中期提出的^[1],它是以基因组编码的所有蛋白质为研究对象,从细胞水平及整体水平上研究蛋白质的组成及其变化规律,从而深入认识有机体的各种生理和病理现象^[2]。其主要技术是以凝胶电泳为基础的蛋白质分离技术,以质谱为基础的蛋白质鉴定技术和生物信息分析等三大技术体系,其中双向凝胶电泳技术是目前应用最广泛的研究蛋白质组学的方法之一^[3],包括蛋白质的提取和纯化、等电聚焦电泳、SDS-2PAGE 电泳、凝胶染色及图像获取和分析等技术^[4]。近年来,双向电泳技术在愈伤组织方面的研究有水稻^[5-6]、葡萄^[7-8]、龙眼^[9]、日本落叶松^[10]、胡杨^[11]、*B. rotunda*^[12]、文香兰原球茎^[13]、雪莲^[14]等,但从研究者的实验发现不同植物提取蛋白的方法、上样量等环节均有不同,且双相电泳效果也不同,所以针对不同的植物需要建立适宜的实验体系,而关于甘草愈伤组织的双相电泳技术目前尚未见文献报道。

甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)是豆科多年生草本植物,为我国著名的大宗药材之一,同时也是国家重点保护的野生沙生经济植物。为了保护生态环境,国家大力提倡人工种植甘草。但甘草在自然栽培条件下 4~5 a 才有种子形成^[15],且种子种皮坚硬,发芽率低,造成出苗率低,对甘草生产造成了不利影响^[16]。长期以来,人们试图通过组织培养手段,解决生产上的种苗问题,而在甘草组织培养过程中出现了分化率低的关键问题^[17]。人们从植物生长调节剂及不同外植体位置效应^[18]、基因型品种^[19]、结构^[20]和生理生化^[21]等方面对甘草愈伤再分化的发生机制进行了研究,但未能深入到分子水平。为了

收稿日期:2014-05-20
基金项目:宁夏自然科学基金资助项目“甘草脱分化过程中细胞结构变化的研究”(NZ0953)
作者简介:曹君迈(1964—),女,宁夏银川市人,教授,硕士生导师,从事细胞工程和细胞生物教学与科研工作。E-mail: junmaicao@163.com.

深入研究甘草愈伤组织再分化的分子机制,从蛋白质组水平上探索其蛋白质及基因的表达差异显得尤为重要,然而甘草蛋白质的双向电泳技术研究目前鲜有报道。因此,本研究对甘草愈伤组织蛋白质双向电泳技术中的关键影响因素进行了探讨,建立了双相电泳技术,为甘草愈伤组织蛋白质组学的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

宁夏乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza Uralensis*)的叶、芽、根状茎采自北方民族大学校园内。其经度为 106°18', 纬度为 38°50', 海拔为 1100 m, 土壤为沙土。

1.2 方法

1.2.1 甘草不同来源愈伤组织的获得 甘草愈伤组织的获得采用曹君迈^[18]的方法进行培养。

1.2.2 溶液配制及保存 试剂配制参照李建科^[22]的方法进行。

1.2.3 甘草愈伤组织总蛋白质样品的提取及定量测定 甘草愈伤组织总蛋白提取方法分别为改良丙酮法(A)、裂解液(B)两种方法。其中改良丙酮法(A)提取总蛋白,参照了张立明^[23]、李建科^[22]的提取方法,但有改动:冰浴中快速去掉愈伤组织的褐化部分,取 1.0 g 左右放于研钵中,液氮研磨成粉末,加入 10 mL 冷丙酮,密封好后,重悬沉淀,放在 -20℃ 沉淀过夜;4℃ 下 15 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 弃上清,沉淀用预冷的丙酮(-20℃ 预冷)重悬,于 -20℃ 下沉淀 1 h;重复该步骤两次;4℃ 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 弃上清,沉淀中加入 6 倍体积的蛋白裂解液,其中蛋白裂解液的组成同李建科的配制方法^[22],冰上孵育 1 h,期间超声振荡 10 次,每次不超过 1 min;4℃ 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 取上清液备用。每 300 μ l 上清液加入 900 μ l 的冷丙酮, -20℃ 沉淀 1 h, 上述条件离心后,沉淀中加入 100 μ l 的蛋白裂解液,超声使其溶解,制得溶液分装在 PCR 管中或直接用于电泳。裂解液(B)提取总蛋白:参照了张立明^[23]、李建科^[22]的提取方法,但有较大改动:冰浴中快速去掉愈伤组织的褐化部分,取 0.1 g 左右的放于研钵中,液氮研磨成粉末,加入 100 μ l 的蛋白裂解液,冰上孵育 1 h,期间超声振荡 10 次,每次不超过 1 min;4℃ 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 取上清,上清液中加入 8 倍体积的冷丙酮,过夜沉淀蛋白;4℃ 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 弃上清,沉淀用预冷的丙酮(-20℃ 预冷)重悬,于 -20℃

下,沉淀 1 h;重复该步骤两次;沉淀中加入 100 μ l 的蛋白裂解液,超声使其溶解,制得溶液分装在 PCR 管中或直接用于电泳。

蛋白定量采用 Bradford 法^[24]进行测定。使用 Beckman, spectrophotometer DU800 在 595 nm 处测吸光度。以 BSA 溶液浓度(y)对吸光度(x)进行回归, 方程为: $y = 9.6536x$, $r = 0.9999^{**}$, 经检验 $P < 0.01$, 此方程可用于定量测定。

1.2.4 双向电泳 第一向—等点聚焦(IEF)电泳: 仪器 PROTEAN IEF Cell System(Bio-Rad Hercules, CA, USA);从 -20℃ 冰箱中取出水化上样液 1 管,置室温溶解,加入 5 μ l Bio-lyte(pH 3~10),混匀。取混合好的水化上样液与蛋白样品溶液以 4:1 混匀为上样液。如果蛋白样品是由冰箱中取出的,可先超声 40s/次 $\times$ 4 次,每次超声间隔冰浴冷却 20 s, 4℃ 15 000 g 离心 5 min 后再使用。从 -20℃ 冰箱中取出 IPG(线形胶条 pH 3-10, 17cm),室温溶解 10 min; 将 450 μ l 混匀的上样液(调整银染时蛋白上样量 400 μ g),徐徐加入聚焦槽中(聚焦槽两头各留出 1 cm 不加样液,但中间上样液一定要连贯,不能有气泡),小心用镊子揭去 IPG 的保护膜,胶面朝下,对准正、负极,用小镊子轻提 IPG 数次,使其与上样液充分接触,滴加矿物油覆盖;对好正、负极,盖上聚焦槽的盖子。设置聚焦程序,开始第一向电泳聚焦,其程序如下:温度设置在 18℃ 主动水化 50 V, 14 h; 500 V, 30 min, 4 次; 1 000 V, 1 h; 9 000 V, 5 h; 9 000 V ~ 60 000 V, 1 h; 500 V, 0-72 h。

平衡将胶条胶面朝上放入有 4 ml 平衡缓冲液 I 水化盘中,水平摇床上缓慢晃动 15 min;第一次平衡结束,胶条取出,用新鲜配制的 1 $\times$ 电泳缓冲液淋洗胶条背面及侧面,冲净平衡缓冲液 I,在厚滤纸上吸干多余液体,勿使胶条胶面正面接触滤纸;将胶条胶面朝上转入另一有 4 ml 的平衡缓冲液 II 水化盘中,水平摇床上缓慢晃动 15 min。将 IPG 胶条取出,用新鲜配制的 1 $\times$ 电泳缓冲液淋洗胶条,胶条胶面朝上浸入新鲜配制的 1 $\times$ 电泳缓冲液中待用,使用前在厚滤纸上吸干多余液体,勿使胶面接触滤纸。

SDS-2PAGE 电泳:使用仪器为 ROTEM II xi Cell(Bio-Rad Hercules, CA, USA)。凝胶规格为 1 mm, 配制 10% 分离胶。等凝胶聚合后,最好用塑料袋封好后放入 4℃ 冰箱聚合,使之聚合充分。将胶条上部水倾出,滤纸吸干多余水分,置于凝胶顶部,加入 1% 琼脂糖(电泳缓冲液配置,提前加热融化),用小镊子推动胶条的支持膜轻轻将其推入还未凝固的封

胶液中,使胶条与分离胶液面尽量完全贴合。20 μ l 的蛋白分子量标准加在 1 cm $\times$ 0.5 cm 滤纸条上,放置在胶条的酸性端,待封胶液彻底凝固后将凝胶转入电泳槽中,电泳槽加入电极缓冲液(25 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris, 192 mmol $\cdot$ L⁻¹ Gly, 0.1% SDS), 25 mA $\cdot$ gel⁻¹) 恒流进行电泳,电泳温度保持在 10℃,待溴酚蓝离底部 1 cm 即可停止电泳,一般电泳耗时 5~6 h。

1.2.5 染色 银染:参照郭尧君^[25]电泳结束后迅速从玻璃板上剥离凝胶,放入固定液(40% 甲醇, 10% 乙酸)固定 2 h 以上;超纯水冲洗 2 次,每次 15 min – 敏华(1 min) – 水洗(20s, 3 次)银染色(20 min) – 显色(显色时间与温度有关) – 用终止液终止。

考马斯亮蓝染色:电泳结束后迅速剥离凝胶,放入固定液中过夜,固定后置换于考马斯亮蓝染液于室温摇床摇动染色约 3~4 h 后,换脱色液脱色,直至背景无色透明,蛋白点清晰为止。

1.2.6 蛋白质表达图谱的建立及图谱分析 凝胶银染后使用透射描仪 Bio-Rad 凝胶成像系统(Pharos FX Plus Molecular Imager)进行扫描,扫描结果直接导入计算机(32 位, 300 dpi 分辨率, 全彩);借助 Progenesis SameSpots 软件分析,当两两之间的差量值大于 2 且 $P \leq 0.05$ 时,认为具有显著性差异。

2 结果和分析

2.1 不同来源愈伤组织蛋白质含量的比较

由图 1 可知,不同来源愈伤组织对蛋白质含量的影响不同,其中芽与叶来源的愈伤组织无显著差异($P > 0.05$),两者与茎来源的愈伤组织有极显著差异($P < 0.01$),说明执行不同功能的器官表现出了蛋白质差异。

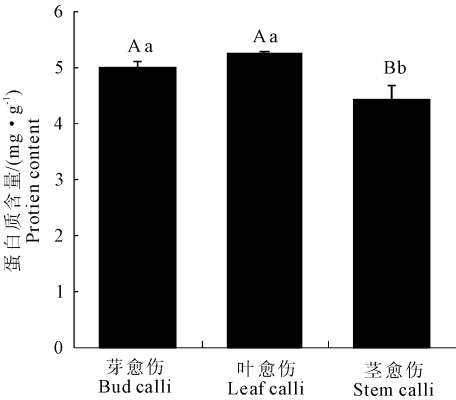


图 1 甘草不同来源愈伤组织对蛋白质含量的影响
Fig.1 Effects of different callus on the protein content in *Glycyrrhiza uralensis*

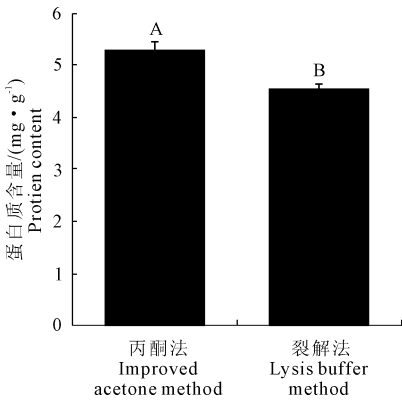


图 2 甘草总蛋白提取方法

Fig.2 Total protein extraction methods of *Glycyrrhiza uralensis* calli

2.2 总蛋白质提取方法对蛋白质含量的影响

用 1.2.3 两种方法抽提蛋白,所获得的蛋白含量如图 2。采用不同的提出方法对蛋白质的提取效果不同,由图 2 可知,改良丙酮沉淀法蛋白质的提取率极显著优于裂解液直接提取的提取率。因此,对甘草愈伤组织选用改良丙酮沉淀法提取蛋白质。

2.3 继代代数对蛋白质含量的影响

第 3 代芽来源、叶来源与茎来源愈伤组织蛋白质含量没有显著差异;第 4 代叶来源愈伤组织蛋白含量极显著高于芽来源愈伤组织蛋白含量,极显著高于茎来源愈伤组织蛋白含量($P < 0.01$);第 5 代芽来源愈伤组织蛋白含量极显著高于叶来源与茎来源的愈伤组织蛋白含量($P < 0.01$),但叶来源与茎来源愈伤组织蛋白含量之间没有显著差异;第 6 代芽来源愈伤组织的蛋白含量极显著高于叶来源及茎来源愈伤组织蛋白含量($P < 0.01$),且叶来源愈伤组织蛋白含量显著高于茎来源愈伤组织蛋白含量($P < 0.05$)(见表 1)。

同一来源的愈伤组织不同继代次数蛋白含量也有差异。第 5 代、第 6 代各来源愈伤组织蛋白含量极显著高于第 3 代、第 4 代愈伤组织蛋白含量,且第 5 代与第 6 代、第 3 代与第 4 代之间蛋白含量无显著性差异。

综上所述,芽来源与叶来源愈伤组织的蛋白含量高于茎来源愈伤组织的蛋白含量;从第 3 代到第 6 代,愈伤组织的蛋白含量逐渐增多。随着继代次数的增加,愈伤组织的稳定性越来越差,其分化程度加强,即愈伤组织的异质性增强,所以蛋白质含量随之增多。

表 1 继代代数对甘草愈伤组织蛋白质含量的影响

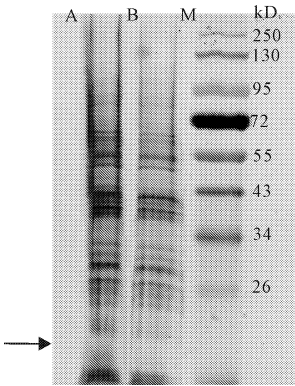
Table 1 Effects of the subculture times on *Glycyrrhiza uralensis* callus protein contents

外植体 Explant	3 代 3rd propagation	4 代 4th propagation	5 代 5th propagation	6 代 6th propagation
芽 Bud	5.37 ± 0.073	5.72 ± 0.037bB	8.35 ± 0.492aA	9.57 ± 0.333aA
叶 Leaf	5.58 ± 0.078	6.54 ± 0.006aA	7.57 ± 0.087bB	6.68 ± 0.309bB
根状茎 Rhizome	4.82 ± 0.319	5.51 ± 0.006cC	6.10 ± 0.150bB	6.15 ± 0.081cB
平均 Average	5.26 ± 0.150bB	5.92 ± 0.0.158bB	7.34 ± 0.363aA	7.67 ± 0.521aA

注:大小写字母分别表示 0.01 和 0.05 水平差异显著性,数据为三次重复的均值。
Note: The capital and lowercase letters indicated significant differences with a p-value of 0.05 and 0.01. The data was the average of three replicates.

2.4 SDS – PAGE 电泳比较

对芽愈伤组织提取蛋白进行 SDS – PAGE 电泳,其结果见图 3。电泳结果显示,芽愈伤组织的蛋白质分子量主要分布在 0 ~ 72 kD,还多了一条低分子量蛋白条带(如箭头所示),改良丙酮法提取蛋白质的条带浓,且较裂解液提取的条带清晰,这与浓度测定的结果相一致。所以改良丙酮法优于裂解液直接提取法电泳效果,因此,根据以上实验结果对愈伤组织采用改良丙酮法提取的总蛋白进行双相电泳的实验。



A. 改良丙酮沉淀法提取蛋白质; B. 裂解液直接提取蛋白质
A. SDS electrophoresis the proteins extracted by improved acetone precipitation; B. SDS electrophoresis the proteins extracted by lysis buffer

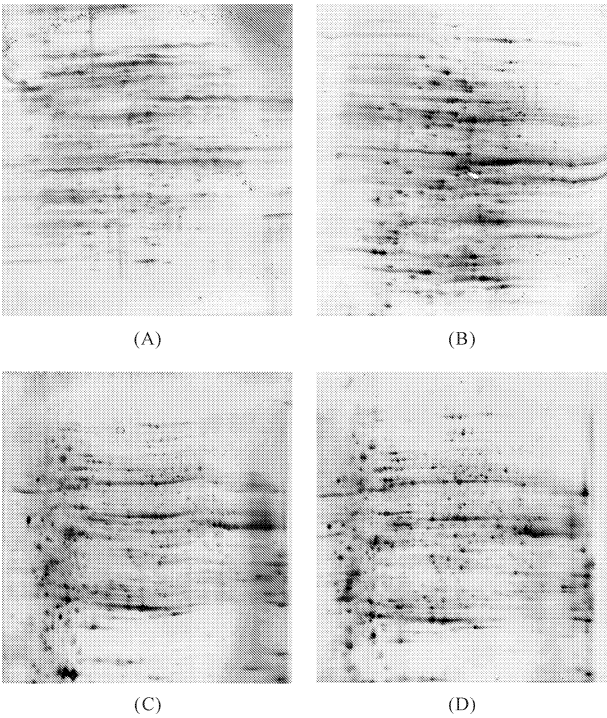
图 3 愈伤组织蛋白质 SDS 凝胶电泳图谱

Fig.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of callus protein

2.5 上样量对蛋白质双向电泳分辨率的影响

采用改良丙酮法提取的甘草芽愈伤组织蛋白质定量到 200、300、400 μg 和 450 μg 上样量,采用银染法。由图 4 看出,上样量对蛋白质双向电泳分辨率有明显影响,随着上样量的增加,蛋白点逐渐增多,上样量在 200 μg 、300 μg 时,横向及纵向的拖尾现象严重;400 μg 和 450 μg 时,没有拖尾现象且没有明显的横向及纵向的拖尾现象,图谱背景清晰,多数蛋白点呈圆形,边界清晰,一些低丰度蛋白清晰可见;400 μg 和 450 μg 时图谱的重复性好;但 450 μg 更优于 400 μg (图 4C、D)。利用 Progenesis SameSpots 分析软

件对图像进行背景消减、斑点检测。根据软件检测分别得到 919 ± 35、1009 ± 40、1101 ± 59、1132 ± 62 个蛋白点。故采用 450 μg 的上样量有利于获得高质量的电泳图谱。



A. 2D protein map using 200 μg ; B. 2D protein map using 300 μg ;
C. 2D protein map using 400 μg ; D. 2D protein map using 450 μg

图 4 不同上样量的愈伤组织蛋白质双向电泳图谱

Fig.4 Two-dimensional electrophoresis patterns of callus with different sampling amounts

2.6 染色方法对蛋白质双向电泳分辨率的影响

对甘草芽愈伤组织蛋白质采用 450 μg 的上样量进行双相电泳,对其结果进行考马斯亮蓝染色与银染色,筛选确定适合甘草源愈伤组织的最佳染色方法,以利用试验差异点的分析及质谱的进行。

从图 5 中可看出,考马斯亮蓝染色的胶图蛋白点较少,且集中在图谱的中间,靠近两端 pH 的蛋白质几乎没有,蛋白点之间较清晰;银染色的图谱蛋白点较多,大部分点较圆且能分布于各个等电点之间,

图谱背景清晰,但是图谱上显示出没有聚焦好的横条纹。综合以上考虑,甘草愈伤组织蛋白质双相电泳应选择蛋白点较多的银染色。

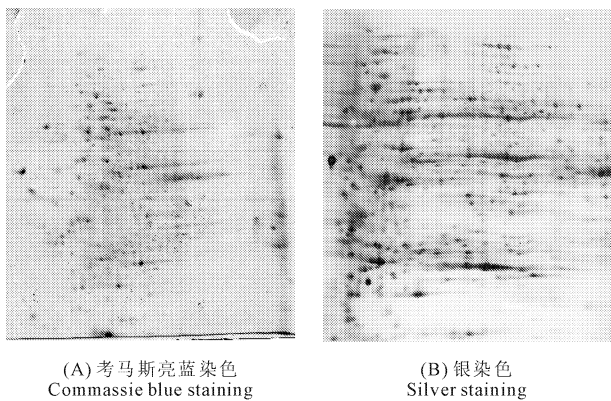


图 5 不同染色方法愈伤组织蛋白质双向电泳图谱
Fig.5 Two-dimensional electrophoresis patterns of callus protein by different staining methods

3 讨 论

蛋白质提取方法是双相电泳体系建立的关键影响因素之一。蛋白质提取方法较多,主要有 TCA/丙酮法、饱和酚、尿素法、直接提取法,等等,其中以 TCA - 丙酮沉淀法应用较多^[23,26-28]。但谷瑞升^[11]认为几种培养的本本植物细胞等利用改良丙酮沉降法优于 TCA 和丙酮法、硫酸铵沉降法;金德善^[14]对雪莲愈伤组织采用了 TCA - 丙酮沉淀法,认为酚法优于 TCA/丙酮法和尿素法;张立明^[28]等对茶树愈伤组织采用 TCA - 丙酮法,认为效果好于冷丙酮法、TCA 法、Tris - 丙酮法;而本实验对甘草愈伤组织采用的改良丙酮法提取蛋白质优于裂解液提取法,且在改良的丙酮法中未使用 TCA。尽管都采用丙酮改良法,但由于植物种类不同,提取的试剂组成和浓度不同,筛选的提取方法也不尽相同。因此,多数学者认为试剂组成及浓度不同以及离心转速和时间均会对蛋白含量产生很大影响^[30]。

谷瑞升等^[11]认为茎基愈伤组织蛋白点数明显少于长继代愈伤组织的蛋白质点数,这与我们测定的高代愈伤组织的蛋白含量显著增加的结果相一致,高代愈伤组织的异质性增高,分化程度提高,所以蛋白质含量增高,说明愈伤组织的稳定性减弱。

另外,上样量的大小对双向电泳图谱的清晰度具有较大的影响,特别是胶条长度及 pH 对上样量的大小有至关重要的影响。如用 7 cm 长非线性胶条, pH 3 ~ 10 时,茶树愈伤组织的上样量为 100 μg ^[28];用 17 cm 长的 IPG 胶条, pH 4 ~ 7 时,雪莲愈伤组织的上样量为 500 μg ^[14];日本落叶松胚性愈伤组

织采用自制的管胶,样品上样量为 600 μg ^[10];本实验用 17 cm 长的 IPG 胶条, pH 3 ~ 10 时,甘草愈伤组织的上样量为 450 μg ,与雪莲愈伤组织接近^[14]。发菜样品用 24 cm 的 IPG 胶条, pH 4 ~ 7 时,上样量为 1.5 mg^[4];灰木相思样品用 pH 3 ~ 10,长 24 cm 的 IPG 胶条时,最适蛋白上样为 1.0 mg^[31],从而说明随着胶条长度和 pH 范围的增加,上样量增加。因此,针对不同的材料、胶条长度及 pH 范围,应根据试验筛选适宜的上样量。

不同的染色方法对蛋白质染色的效果不同,理想的染色方法需要进行试验染色确定。林文芳等^[32]对不同生态型芦苇叶片、Neila Jellouli^[30]对葡萄叶和根采用银染方法,均获得了理想的双相电泳图谱。本实验对甘草愈伤组织也采用银染法,其蛋白质双向电泳图谱上蛋白点数量约 1 000 个,蛋白点清晰,图谱分辨率较好,较考染效果好。郝强等^[33]认为金心黄杨叶片总蛋白质双向电泳用考马斯亮蓝染色后的电泳图谱可完全满足蛋白质组研究的需要,而银染背景深,噪声大,不易控制,过多地依赖于操作者的技术。所以,不同植物选择何种染色方法,需通过实验筛选,能满足蛋白质组研究的需要即可。

总之,通过对甘草愈伤组织采用丙酮改良法和 17 cm, pH 3 ~ 10 的 IPG 胶条,上样量为 450 μg 时,采用银染法可获得 1 132 个蛋白点,且蛋白点清晰,图谱分辨率和重复性好。由此可建立一套适用于乌拉尔甘草的愈伤组织蛋白质组分析的双向电泳方法。

致谢:感谢中国农科院蜜蜂研究所李建科老师给予的帮助,贝益临、陈科元和张红婧参与了部分工作。

参考文献:

[1] Twyman R M. 蛋白质组学原理[M]. 王恒樑译. 北京:化学工业出版社,2007.

[2] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

[3] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. Journal of Biology Chemistry, 1975, 250(10):4007-4021.

[4] 梁文裕,王 星,焦广飞,等. 发菜蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. 西北植物学报,2009,29(8):1550-1556.

[5] Yin Lan, Tao Yong, Zhao Kang, et al. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seedderived callus differentiation[J]. Proteomics, 2007, 7(5):755-768.

[6] Cho W K, Chen Xiongyan, Chu H, et al. Proteomic analysis of the secretome of rice calli[J]. Physiologia Plantarum, 2009, 135(4):331-341.

[7] Zhao Fengxia, Chen Lihua, Perl A, et al. Proteomic changes in grape embryogenic callus in response to Agrobacterium tumefaciens-mediated

- transformation[J]. Plant Science, 2011, 181: 485-495.
- [8] 陈 思, 曾 磊, 陈尚武, 等. 蔗糖转运蛋白基因 VvSUC12 和 VvSUC27 在葡萄胚性和非胚性愈伤组织中的差异表达[J]. 生物工程学报, 2010, 26(4): 530-537.
- [9] 方智振. 龙眼体胚发生中期的蛋白质组学及 Ran 家族表达调控研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [10] 汪小雄, 卢龙斗, 李明军, 等. 日本落叶松胚性愈伤组织蛋白组分双向电泳分析[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 37(1): 116-122.
- [11] 谷瑞升, 蒋湘宁, 裴 东, 胡杨愈伤组织继代增殖和器官发生中的蛋白分子标记的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(3): 1-6.
- [12] Tan Eng Chong, Foo Gen Teck, Wong Sher Ming, et al. Optimization of two-dimensional gel electrophoresis protocols for *Boesenbergia rotunda* in vitro suspension culture[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(16): 3777-3780.
- [13] Palama T L, Menard P, Fock I, et al. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 1-18.
- [14] 金德善, 卢存福, 兰小中, 等. 雪莲愈伤组织蛋白质提取及双向电泳分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(9): 1903-1909.
- [15] 杨发林, 李克昌, 胡崇礼. 甘草种子人工繁育暨配套栽培技术研究初报[J]. 草业科学, 2004, 21(12): 90-94.
- [16] 李先恩, 赵杨景, 赵杨景, 等. 甘草种子萌发习性的研究[J]. 中药材, 1994, 17(10): 8-9.
- [17] 葛淑俊, 李广敏, 马峙英, 等. 乌拉尔甘草组培再生体系研究[J]. 草业学报, 2007, 16(6): 107-112.
- [18] 曹君迈, 李 强, 王 崇. 乌拉尔甘草胚状体的诱导及再生体系的建立[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 522-526.
- [19] 付春华, 雷 呈, 邓 慧, 等. 甘草下胚轴离体再生体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(2): 239-242.
- [20] 曹君迈, 张 欣, 刘建利, 等. 甘草不同来源愈伤组织细胞形态与线粒体变化的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(13): 121-125.
- [21] 曹君迈, 祁金涛, 刘建利, 等. 甘草不同来源愈伤组织过氧化物酶分析[J]. 干旱地区农业研究, 2010, 28(4): 123-127.
- [22] Li Jianke, Wang Ting, Zhang Zhaohui, et al. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of *Western Honeybees* (*Apis mellifera*) [J]. Journal of Agriculture Food Chemtris, 2007, 55(21): 8411-8422.
- [23] 张立明, 王云生, 高丽萍, 等. 茶树不同儿茶素含量愈伤组织的蛋白差异分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(19): 4053-4062.
- [24] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [25] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [26] 徐幼平, 徐秋芳, 蔡新忠. 适于双向电泳分析的番茄叶片总蛋白提取方法的优化[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(2): 71-74.
- [27] Saravanan R S, Jocelyn K C R. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant tissues[J]. Proteomics, 2004, 4: 2522-2532.
- [28] 范锋贵. 小麦幼苗叶片水分胁迫差异表达蛋白研究及其候选基因克隆[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [29] 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 等. 木本植物蛋白提取和 SDS-PAGE 分析方法的比较和优化[J]. 植物学通报, 1999, 16(2): 171-177.
- [30] Jellouli N, Salem A B, Chorbel A, et al. Evaluation of protein extraction methods for vitis vinifera leaf and root proteome analysis by two-dimensional electrophoresis[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(10): 933-940.
- [31] 何文锦, 郭晋隆, 陈由强, 等. 灰木相思蛋白质组双向电泳[J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1577-1582.
- [32] 林文芳, 陈林姣, 彭 浩, 等. 不同生态型芦苇叶片蛋白质双向电泳系统的筛选和优化[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(10): 1209-1214.
- [33] 郝 强, 葛秀秀, 田 宇, 等. 金心黄杨 (*Euonymus japonica* L. cv. aureo-pictus) 叶片总蛋白质提取及双向电泳技术[J]. 北京农学院学报, 2009, 24(4): 1-4, 13.