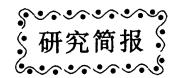


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00369



圆果种黄麻功能叶总蛋白提取方法及双向电泳体系的优化

陈富成 祁建民* 徐建堂 陈涛 陶爱芬 林培清 陈美霞 郭英
李华丽

福建农林大学 / 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福建福州 350002

摘要: 蛋白质提取方法和电泳条件是蛋白质组学研究中双向电泳的关键。本文初步建立起一套适合圆果种黄麻功能叶总蛋白双向电泳(2-DE)分析的高效提取方法及电泳条件, 在双向电泳技术中, 比较了 TCA 丙酮、Tris-base/丙酮、Tris-HCl 的蛋白提取方法, 并优化了上样量和样品制备方法。结果表明, TCA 丙酮法提取蛋白质产量高, 达 79.0 mg g⁻¹, 比 Tris-base/丙酮法和 Tris-HCl 的产量分别高出 44.2%和 114.1%。该法得到的 2-DE 图谱背景清晰, 蛋白点数最多, 约 602 个, 较其他两种方法更适合用于黄麻功能叶总蛋白双向电泳分析; 350 μg 为最佳上样量。这为黄麻蛋白质组学后续研究奠定了基础。

关键词: 黄麻功能叶; 提取方法; 蛋白质双向电泳(2-DE); 优化上样量

Optimization of Extraction Method and Two-Dimensional Electrophoresis Conditions for Proteome Analysis of Jute Functional Leaf

CHEN Fu-Cheng, QI Jian-Min*, XU Jian-Tang, CHEN Tao, TAO Ai-Fen, LIN Pei-Qing, CHEN Mei-Xia, GUO Ying, and LI Hua-Li

Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: The protein extraction methods and electrophoresis conditions are the key facts of two-dimensional electrophoresis in proteomics. In this study, in order to set up a suitable method for jute leaf total protein extraction and the optimized condition for two-dimensional electrophoresis, we compared the protein extraction methods using TCA acetone, Tris-base acetone and Tris-HCl. We also optimized the sample loading amount and sample preparation approach. The results showed that protein productivity reached 79.0 mg g⁻¹ at most by TCA acetone method, and 44.2% and 114.1% higher than by other two methods, respectively. Besides, the 2-DE image background was the clearest and the protein spots were the most reaching about 602 by TCA acetone method, which is much more suitable as extraction method for jute leaf protein two-dimensional electrophoresis. The most suitable sample loading quantity was 350 μg, which lays a foundation for further study of jute proteomics. The construction of two-dimensional electrophoresis system can be used to study the differences of protein expression on normal material and mutant of jute, and promote the application of proteomics in jute mutant.

Keywords: Jute leaf; Extraction method; Protein two-dimensional electrophoresis (2-DE); Optimizing of loading amount

黄麻(*C. capsularis* L.)、椴树科(Tiliaceae)黄麻属(Corchorus)一年生纤维作物, 是东南亚国家重要的工业原料作物, 黄麻纤维质地柔软、具有易染色、抗静电、抑菌、可降解等优良特性。为了研究黄麻不育突变体和黄麻正常材料蛋白质表达差异, 探索不育基因的分子机理, 提取其叶总蛋白及电泳是首要环节。

2-DE 技术是由意大利生物化学家 O'Farrell^[1]于 1975

年建立起来的, 该技术将等电点(isoelectric point, PI)和分子量(molecular weight, MW)两个特性结合起来分离蛋白, 具有较高的灵敏度和分辨率, 是研究蛋白质组学的核心技术^[2], 已成为从复杂体系中检测和分析蛋白质的一种强有力的生化手段^[3]。随着后基因组时代的到来, 在蛋白质组学研究中 2-DE 技术已有着举足轻重的作用, 在植物研究中也都有了广泛的应用^[4-5], 如在植物生理蛋白质组学、

本研究由国家麻类产业技术体系建设(nycytx-19-E05), 国家农业部公益性产业计划(nyhyzx07018-3)和农业部引进先进技术(948 计划)项目(2006-G-18-4)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 祁建民, E-mail: qijm863@163.com

第一作者联系方式: Tel: 0591-87644886

Received(收稿日期): 2010-07-06; Accepted(接受日期): 2010-10-03.

植物突变体蛋白质组学、植物遗传多样性蛋白质组学和植物发育蛋白质组学等方面^[6-7]。随着植物蛋白质组学研究的深入,已在水稻^[8-9]、拟南芥^[10-11]、烟草^[12]、大豆^[13]等植物中开展了该技术相关研究。目前,国内外对黄麻蛋白质组学研究却鲜见报道。

蛋白质提取和样品制备是蛋白质组学研究成功的关键^[14]。采用合适提取蛋白质方法是获得良好的 2-DE 图谱的前提条件^[15-16]。植物组织中含有多糖、酚、有机酸、脂类及其他代谢产物,这些物质会严重干扰蛋白质提取和电泳,因此在制备蛋白质样品时应尽可能的去除这些干扰物质^[17]。目前蛋白质的提取方法很多,但由于植物的生物学特征、生理生化特征不尽相同,对不同植物物种、器官,甚至同一植物不同组织的最适提取方法不同^[18-20]。因此在蛋白质组学研究 2-DE 技术分析时,应该结合不同植物物种、器官、不同时期的组织特点建立起适合自身材料的最佳提取蛋白方案。本实验探索并优化了上样量和蛋白质提取制备方法,为黄麻蛋白质组学研究奠定了坚实的工作基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

圆果黄麻 179 系福建农林大学以梅峰 2 号与闽麻 5 号杂交后代中选育出来的高产抗病优质黄麻品种。先将黄麻 179 种子播于福建农林大学麻类研究室网室。当幼苗长至第 50 天后,取其倒七功能叶在液氮里速冻后,放入 -80°C 冰箱备用。

1.2 以 TCA 丙酮法提取叶总蛋白

参照 Damerval 等^[21]的方法并有所改进。迅速称取在 -80°C 冰箱中低温保存的黄麻功能叶粉末 0.5 g,置 10 mL 灭菌离心管中,立即加入 5 mL 预冷的含 10% TCA、0.07% β -巯基乙醇(β -Me)丙酮溶液,于 -20°C 静置过夜;然后在 4°C 、 $12\ 000\times g$ 条件下离心 30 min,收集沉淀物。沉淀物中加入 5 mL 含 0.07% β -Me 的预冷丙酮溶液,在 -20°C 下至少沉淀 1 h,于 4°C 、 $12\ 000\times g$ 条件下离心 30 min;重复漂洗 3 次。最后以 5 mL 冷的 80%丙酮清洗沉淀物,在 $12\ 000\times g$ 条件下离心 20 min,把得到的白色粉末于 -20°C 挥发干,于 -80°C 下保存。

1.3 以 Tris-base/丙酮法提取叶总蛋白

参照 Rabilloud^[22]的方法略作改进。取 0.5 g 黄麻功能叶粉末,迅速加入 4.0 mL 提取缓冲液[0.04 mol L^{-1} Tris-base, 5 mol L^{-1} 尿素(urea), 2 mol L^{-1} 硫脲(thiourea), 2% W/V CHAPS, 5% W/V PVP, 2% β -Me]充分混匀后于 4°C 、 $12\ 000\times g$ 离心 40 min,取上清,加入 4 倍体积预冷含 0.07% β -Me 丙酮溶液,在 -20°C 至少静置 2 h,于 4°C 、 $12\ 000\times g$ 离心 30 min,收集沉淀物,接着用预冷含 0.07% β -Me 丙酮溶液漂洗沉淀,振荡混匀后,在 -20°C 下,静置 2 h,再于 4°C 、 $12\ 000\times g$ 离心 30 min,收集沉淀。重复漂洗 3 次。得到的样品在 -20°C 下挥发干,置 -80°C 冰箱备

用。

1.4 以 Tris-HCl 法提取叶总蛋白

参照谷瑞升等^[23]的方法操作。

1.5 蛋白裂解方式的优化及蛋白质样品的制备和定量

探讨了 2 种裂解方式:(1)在 32°C 下恒温水浴 2 h,期间振荡几次;(2)于 25°C 超声清洗器中超声处理,每次 5 min,间隔期间振荡 30 s,超声处理 40 min。

分别取上述 3 种方法制备的蛋白干粉末 70 mg,各加入 700 μL 裂解液[8 mol L^{-1} 尿素, 2 mol L^{-1} 硫脲(thiourea), 4% W/V CHAPS, 1% DTT, 1.5% V/V 的两性电解质 pH 3~10, 0.5% V/V 的两性电解质 pH 5~7],按上述两种方法裂解后,于 4°C 、 $12\ 000\times g$ 离心 20 min,上清液即为待测蛋白上样液。

参照 Bradford 法^[24]定量蛋白,在紫外分光光度计 595 nm 波长下测定色素结合物光密度 OD 值,绘制标准曲线^[25],依照标准曲线计算出样品蛋白浓度。

1.6 以聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白

参考 Laemmli^[26]的方法,先制备垂直电泳胶,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%。每个泳道蛋白上样量为 80 μg 。20 mA 电泳 16 h。电泳后胶块固定液(40% V/V 甲醇, 10% V/V 乙酸)固定 40 min 后,用三蒸水漂洗 4 次,每次 5 min,接着在染色液(0.2% W/V 考马斯亮蓝 G250, 10%硫酸铵, 10%磷酸)中染色过夜。最后用三蒸水脱色,直至背景清晰。

1.7 蛋白上样量的优化

在第一向等电点聚焦(IEF)中,设 5 个上样量梯度,分别为 150、250、350、450 和 550 μg 。根据 2-DE 凝胶图像效果优化出最佳上样量。

1.8 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)

参考王经源等^[27]的方法,第一向等电点聚焦(IEF)的胶条为 18 cm,上样量为 350 μg 。SDS-PAGE 的凝胶规格为 190 mm \times 190 mm \times 1.5 mm。分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%,在垂直电泳槽中进行电泳,用考马斯亮蓝 G250 染色。

1.9 图像分析

用 Umax Powerlook 扫描仪扫描及 Image Master 2D Platinum version 5.0 软件分析 2-DE 凝胶图像。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法蛋白的产量和蛋白点数

主要是以蛋白的产量和质量评价蛋白提取方法的优劣。蛋白的产量是进行 2-DE 分析的保障;而蛋白的质量关系到能否得到理想的 2-DE 图谱,反映了提取蛋白的纯度^[14]。从表 1 看,3 种提取方法的总蛋白的产量各不同,产量最高的为 TCA 丙酮法,达到 79.0 mg g^{-1} 鲜重,比 Tris-base/丙酮法和 Tris-HCl 法分别高出 44.2%和 114.1%。从 2-DE 图谱上的蛋白点总数看,最多的是 TCA 丙酮法,其次为 Tris-base/丙酮法,前者比后者高出 16.9%;

Tris-HCl 法最少, 前两法是其 2.73 倍和 2.34 倍。

表 1 不同提取方法蛋白的产量和 2-DE 图谱中的蛋白点数
Table 1 Protein yield and spots in 2-DE image of different extraction methods

方法 Method	蛋白产量 Protein yield (mg g ⁻¹ FW)	点数 Spot
TCA 丙酮法 TCA/actone method	79.0±1.32	602±29.0
Tris-base/丙酮法 Tris-base actone method	54.8±1.70	515±24.2
Tris-HCl 法 Tris-HCl method	36.9±1.35	220±12.6

2.2 3 种提取方法的 SDS-PAGE 带型对比

图 1 表面, TCA 丙酮法(泳道 2)和 Tris-base/丙酮法(泳道 3)都有条非常明显的条带, 分子量约为 66.0 kD, 其主要为二磷酸核酮糖羧化酶大亚基。而且这 2 种方法提取的蛋白主要是高分子量的蛋白, 分子量主要集中在 33.0~66.0 kD。而 Tris-HCl 法(泳道 1)提取的蛋白主要为低分子量的蛋白(< 35 kD)。在 66.0 kD 处也有条带, 但非常淡, 说明此分子量的蛋白量明显少。

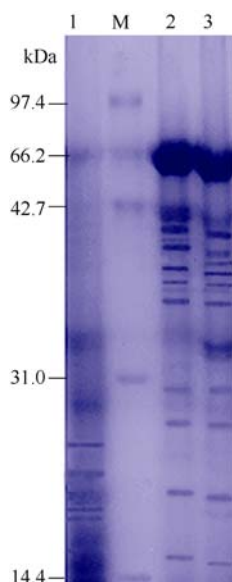


图 1 3 种提取方法的黄麻叶总蛋白的 SDS-PAGE 带型图
Fig. 1 SDS-PAGE profiles of total proteins extracted from Jute leaf using three methods

1: Tris-HCl 法; 2: TCA 丙酮法; 3: Tris-base/丙酮法; M: 蛋白 marker。
1: Tris-HCl method; 2: TCA/actone method; 3: Tris-base actone method; M: protein marker.

2.3 3 种提取方法的 2-DE 图谱

从图 2 可知, 3 种提取方法的 2-DE 图谱背景都相对清晰, 尤其是 TCA 丙酮法(1 号胶)。TCA 丙酮法在 3 种方法中是最适合作为黄麻叶总蛋白 2-DE 分析的提取方法。因为该法提取的总蛋白得到的 2-DE 图谱不仅背景清晰, 而且图谱中蛋白点数最多; 蛋白质等电点分布广(pH 4~10); 反映的蛋白信息更加全面。Tris-base/丙酮法的 2-DE 图谱(3 号胶), 虽然蛋白点数也比较多, 但有些纵条

纹。并且有些区域蛋白点未能很好分开(如 III 区), 而对应的 III 区在 TCA 丙酮法的胶上能很好地分离。这两种方法提取的蛋白都主要以高分子量蛋白为主, 都有一个高丰度、高分子量的蛋白亚基(II 区), 而 Tris-HCl 法(2 号胶)在该区未见到高分子量蛋白亚基。这些结果与图 1 中 SDS-PAGE 的带型图的结果相吻合。Tris-HCl 法(2 号胶)并不适合作为黄麻叶总蛋白的提取方法, 虽然该方法 2-DE 图谱背景清晰, 但在提取过程中很多蛋白丢失了, 特别是高分子量的蛋白, 故在 2-DE 图谱中的蛋白点非常少, 仅有 220 个蛋白点(表 1)。并且蛋白点都为低分子量的蛋白(< 35 kD), 蛋白点主要集中在 I 区内。这一结果与图 1 中 1 号泳道中的条带所示结果一致。

2.4 蛋白上样量优化

蛋白上样量直接影响到 2-DE 图谱的效果, 并且关系到实验结果的可靠性^[28]。提高上样量, 有利于低丰度蛋白的检测, 但上样量过高时, 往往会产生横纵条纹, 并且高丰度蛋白质的斑点会影响其他蛋白质点的分离和分析。图 3 中 a~e 五块胶分别表示上样量为 150、250、350、450 和 550 μ g 经考马斯亮蓝 G-250 染色后的 2-DE 图谱。五块胶中 a、b、c 三块胶的背景较 e、f 更清晰, 没有明显的纵条纹, 但 a、b 两块胶由于上样量少, 蛋白点数明显较另外 3 块胶少, 许多低丰度蛋白被丢失, 特别是在如图所示的 V 区。e、f 两块胶中, 由于上样量过大, 有些区域高丰度蛋白点将其周边蛋白点覆盖。如图示 IV 区。c 胶不论是蛋白总点数, 还是蛋白点的分离效果都是最好的, 故 350 μ g 是黄麻叶总蛋白 2-DE 分析采用考蓝时的最佳上样量。

3 讨论

3.1 关于蛋白质的提取方法

样品制备是双向电泳技术成功的关键。蛋白质的提取方法有多种, 每种方法提取的蛋白特点不同, Tris-HCl 法提取的蛋白以低分子量为主, 而 TCA 丙酮法提取的蛋白以高分子量居多。由于不同物种不同器官或组织的化学组成不同, 甚至同一植物不同组织其蛋白组成不同, 所以其最适蛋白质提取方法也不同。如许辰平等^[5]以 2-DE 分析草坪草蛋白提取方法表明, TCA 丙酮法是其叶组织提取的最佳方法, 但不是根部蛋白提取的最佳方法; 又如金艳等^[29]研究表明 TCA 丙酮法是小麦叶片总蛋白 2-DE 分析的最佳提取方法, 而曾广娟等^[4]指出最适 2-DE 分析苹果叶片总蛋白的提取方法为改良的 Tris-HCl。本研究认为, TCA 丙酮法较其他两种方法更适合作为 2-DE 分析黄麻功能叶总蛋白提取方法。所以在蛋白质组学 2-DE 分析时, 应结合自己研究的材料而探讨蛋白提取的最适方法。

3.2 关于蛋白的上样量和浓度测定

蛋白上样量直接影响 2-DE 图谱的质量和实验结果的可靠性, 降低上样量时, 可能 2-DE 图谱背景清晰, 但

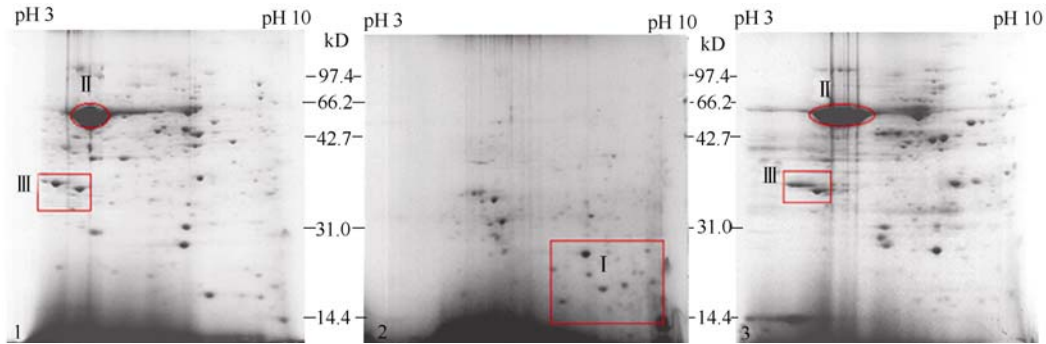


图 2 3 种方法提取黄麻叶总蛋白 2-DE 图谱效果

Fig. 2 Effectiveness of the two-dimensional gel electrophoresis images obtained from the total protein of Jute leaves following each protocol

1: TCA 丙酮法; 2: Tris-HCl 法; 3: Tris-base/丙酮法。

1: TCA/actone method; 2: Tris-HCl method; 3: Tris-base actone method.

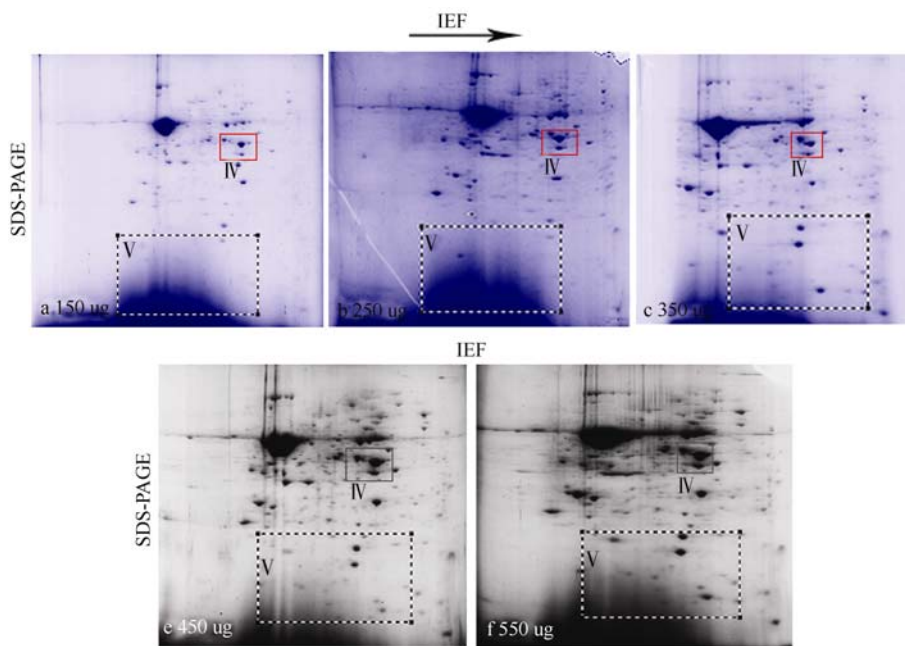


图 3 不同上样量的 2-DE 图谱对比

Fig. 3 Comparison of 2-DE images of different loading sample amounts

一些低丰度的蛋白丢失; 而提高蛋白上样量虽有利于低丰度蛋白的检测, 但往往导致高丰度蛋白斑点掩盖低丰度蛋白斑点, 且样品中含的盐离子浓度随着上样量的加大而提高, 直接影响等电聚焦效果。因此在选择上样量时应结合 2-DE 图谱和染色方法综合考虑^[28]。同时, 准确测定蛋白质浓度也是蛋白正确上样量的前提。目前蛋白浓度测定方法很多, 原理基本相似。本文采用 Bradford 法较其他测定方法不易受 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、非蛋白质复合物(如酚类)等因素的干扰, 且操作简便, 反应迅速, 灵敏度较高, 可保证蛋白浓度测定的准确性。

3.3 关于 2-DE 图谱

理想的 2-DE 图谱要求蛋白点清晰, 即相对丰度适宜, 蛋白点数量真实性高, 没有横、纵条纹。而 2-DE 图谱中横、纵条纹产生的主要原因是蛋白样品裂解不够彻底和所

含盐浓度过高、上样量过大、聚焦时间不够等^[30]。本研究发现采用超声裂解 40 min 比 $32^\circ C$ 恒温水浴裂解 2 h 的效果更加好, 同时在正常聚焦时间基础上延长半小时使 2-DE 图谱较理想, 并提高了其重复性。

References

- [1] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Biol Chem*, 1975, 250: 4007-4021
- [2] Cutler P, Bell D J, Birrell H C, Connelly J C, Connor S C, Holmes E, Mitchell B C, Monté S Y, Neville B A, Pickford R, Polley S, Schneider K, Skehel J M. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis*, 1999, 20: 3647-3658
- [3] Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electro-

- phoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1037–1053
- [4] Zeng G-J(曾广娟), Li C-M(李春敏), Zhang X-Z(张新忠), Teng Y-L(滕云龙), Dong W-X(董文轩). Efficient protein extraction method from apple leaves for apple proteomic analysis using two-dimensional electrophoresis analysis. *Chin J Chromatography* (色谱), 2009, 27(4): 484–488(in Chinese with English abstract)
- [5] Xu C P, Xu Y, Huang B R. Protein extraction for two-dimensional gel electrophoresis of proteomic profiling in turfgrass. *Crop Sci*, 2008, 48: 1608–1614
- [6] Gan L(甘露), Li D-R(李殿荣), Zang X(臧新), Fu C-H(付春华), Yu L-J(余龙江), Li M-T(栗茂腾). Construction of protein two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis system for *Brassica napus*. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(4): 612–619 (in Chinese with English abstract)
- [7] Huang-Pu H-Y(皇甫海燕), Guan C-Y(官春云), Guo B-S(郭宝顺), Zhang X-Y(张秀英). Progress in proteomics and plant proteomics research. *Crop Res* (作物研究), 2006, (5): 577–581 (in Chinese with English abstract)
- [8] Parker T, Flowers T J, Moore A L, Harpham N V. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1109–1118
- [9] Kim S T, Kim S G, Kang Y H, Wang Y, Kim J Y, Yi N, Kim J K, Rakwal R, Koh H J, Kang K Y. Proteomics analysis of rice lesion mimic mutant (sp1) reveals tightly localized probenazole induced protein (PBZ1) in cells undergoing programmed cell death. *Proteome Res*, 2008, 7: 1750–1760
- [10] Gallardo K, Job C, Groot S P C, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. Proteomics of Arabidopsis seed germination: A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol*, 2002, 129: 823–837
- [11] Jiang Y Q, Yang B, Harris N S, Deyholos M K. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *J Exp Bot*, 2007, 58: 3591–3607
- [12] Amme S, Rutten T, Melzer M, Sonsmann G, Vissers J P, Cschesler B, Mock H P. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 2005, 5: 2508–2518
- [13] Natarajan S, Xu C, Caperna T J, Garrett W M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal Biochem*, 2005, 342: 214–220
- [14] Xie C J, Wang D, Yang X Y. Protein extraction methods compatible with proteomic analysis for the cotton seedling. *Crop Sci*, 2009, 49: 395–402
- [15] Fountoulakis M. ProteOmics: current technologies and applications in neurological disorders and toxicology. *Amino Acids*, 2001, 21: 363–381
- [16] Fountoulakis M, Takacs B. Enrichment and proteomic analysis of low-abundance bacterial proteins. *Methods Enzymol*, 2002, 358: 288–306
- [17] Lei J, Lin H, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Chromatogr A*, 2004, 1023: 317–320
- [18] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 2005, 5: 2497–2507
- [19] Gorg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004, 4: 3665–3685
- [20] Shaw M M, Riederer B M. Sample preparation for twodimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 2003, 3: 1408–1417
- [21] Damerval C, Vienne D D, Zivy M, Thiellement H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52–54
- [22] Rabilloud T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998, 19: 758–760
- [23] Gu R-S(谷瑞升), Liu Q-L(刘群录), Chen X-M(陈雪梅), Jiang X-N(蒋湘宁). An improved method of 2D electrophoresis for protein analysis of woody plants. *J Beijing For Univ* (北京林业大学学报), 21(5): 7–10 (in Chinese with English abstract)
- [24] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254
- [25] Guo J-L(郭晋隆), Ye B-Y(叶冰莹), Huang Q-H(黄庆煌), Chen Y-Q(陈由强), Chen R-K(陈如凯). Improvement of extraction method and two-dimensional electrophoresis conditions for proteome study of sugar cane leaves. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2008, 5: 112–116 (in Chinese with English abstract)
- [26] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680–685
- [27] Wang J-Y(王经源), Chen S-Y(陈舒奕), Liang Y-Y(梁义元), Lin W-X(林文雄). Improvement of ISO-DALT electrophoresis system. *Fujian Agric For Univ* (福建农林大学学报), 2006, 35(2): 187–190 (in Chinese with English abstract)
- [28] Gao X(高璇), Gao Li-Y(高利艳), Yan Y-M(晏月明). Optimization of extraction method of wheat grain glutenins and two-dimensional electrophoretic analysis. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2008, 28(6): 971–976 (in Chinese with English abstract)
- [29] Jin Y(金艳), Xu H-X(许海霞), Xu Y-Y(徐圆圆), Shang X-L(尚晓丽), Cui D-Q(崔党群). Effect of different extraction protein methods on two-dimensional electrophoresis of wheat leaf protein. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2009, 29(6): 1083–1087 (in Chinese with English abstract)
- [30] Vincent D, Wheatley M D, Cramer G R. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters. *Electrophoresis*, 2006, 27: 1853–1865