

冬小麦叶片抗旱蛋白质组双向电泳技术体系的优化

王娜, 谢惠民, 王川, 王宏礼

(西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为给小麦抗旱蛋白质组学研究提供技术支撑, 以两个抗旱性不同的冬小麦品种周麦 18 和晋麦 47 三叶期幼苗为材料, 比较分析了 PEG 胁迫处理后两种不同蛋白质提取方法 TCA/丙酮法和磷酸钠缓冲液研磨法对 IEF/SDS-PAGE 双向电泳的影响, 并在 IPG 胶条 pH 范围、蛋白质上样量和 SDS-PAGE 胶浓度等方面进行了探索与优化。结果表明, 采用 TCA/丙酮法提取叶片全蛋白, 选用 17 cm、pH 4~7 的 IPG 线性胶条, 在上样量为 150 $\mu\text{g} \cdot \text{胶条}^{-1}$, 以及 12% SDS-PAGE 胶浓度下进行双向凝胶电泳, 蛋白质能够更好地被分离, 2-DE 图谱上可分辨出约 400 个蛋白点。利用该体系比较了 PEG 胁迫后两个品种双向电泳图谱的差异, 周麦 18 有 9 个蛋白点存在差异, 其中 5 个下调表达, 4 个上调表达 (3 个新诱导表达); 晋麦 47 有 5 个蛋白点存在差异, 均上调表达 (1 个新诱导表达)。

关键词: 小麦; PEG 胁迫; 蛋白提取方法; 双向电泳; 差异表达蛋白

中图分类号: S512.1⁺1; S312

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2011)03-0443-07

Winter Wheat Leaf Drought Protein and Two-dimensional Electrophoresis System Optimization

WANG Na, XIE Hui-min, WANG Chuan, WANG Hong-li

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of two different protein extraction method (TCA/acetone precipitation and sodium phosphate buffer grinding method) on two-dimensional electrophoresis technology were compared, and the pH range of IPG gel strip, the loading quantity of samples and the gel concentrations were also optimized by PEG-treated on the three leaf period of two different drought-resistant winter wheat of Jinmai 47 and Zhoumai 18. The result showed that the protein were separated obviously by taking the TCA/acetone precipitation with pH 4~7, 17 cm IPG line strip, 150 μg loading quantity and 12% concentrations of SDS-PAGE gel, and total 400 protein spots were detected on 2-DE map. Nine protein spots in Zhoumai 18 were present difference in the protein map, including five down-regulated and four up-regulated (three novel induced expression); five up-related present in Jinmai 47, including one novel induced expression.

Key words: Wheat; PEG stress; Protein extraction; Two dimensional electrophoresis; Differential expression protein

干旱等逆境胁迫会诱导植物产生应激蛋白^[1], 促使植物适应外界环境, 成为植物提高抗逆性的一个共同机制。国内外对小麦的抗旱性不仅

从形态结构、生理生化机制等方面进行了研究^[2-3], 而且已经逐步深入到 DNA、蛋白质等分子水平。小麦的抗旱性与其体内蛋白质的表达具有

* 收稿日期: 2010-09-09 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA100201)。

作者简介: 王娜 (1985-), 女, 在读硕士, 主要从事作物遗传育种理论与方法研究。E-mail: wangnana14@163.com

通讯作者: 谢惠民 (1953-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事小麦抗旱节水遗传育种研究。E-mail: huiminx@nwsuaf.edu.cn

非常密切的关系。在水分胁迫条件下,小麦细胞失水,细胞膨压减少,导致体内一些蛋白质的合成受到抑制,同时促使一些新的蛋白质合成^[4-5]。因此,对水分胁迫诱导蛋白的研究,是目前抗旱育种工作研究的热点。

利用双向凝胶电泳技术可以对生物细胞或组织全蛋白质表达进行定性或定量的综合分析,尤其是用于揭示不同条件下蛋白质表达的变化。该技术具有高通量、高灵敏度、高分辨率、重复性好等优点^[6-8],但其存在蛋白表达量少、成本高、操作过程复杂等问题,因此建立更为有效的蛋白质提取方法,高分辨地分离蛋白质一直是植物蛋白质组学研究中双向凝胶电泳技术不断改进的方向^[9]。近几年来,把植物抗旱性和双向电泳、质谱分析等先进技术结合,应用于小麦蛋白质组学的研究主要集中于小麦的叶、花药、种子、地下茎、幼芽等不同部位蛋白的双向电泳分析,以及蛋白功能的初步鉴定^[3-14],而针对某一特定环境或胁迫条件下小麦应激蛋白的产生及种类的研究鲜见报道。关于用 PEG 胁迫处理下小麦叶片抗旱蛋白的研究尚属初步阶段,而与之相关的蛋白质双向电泳技术也有待于进一步优化。本研究以两个抗旱性不同的小麦品种周麦 18 和晋麦 47 为材料,将单向 SDS-PAGE 和 2-DE 相结合,比较分析了不同蛋白质提取方法对小麦叶片总蛋白的提取效果,同时对 IPG 胶条 pH 范围、蛋白质上样量和 SDS-PAGE 胶浓度的适宜范围进行了探索与优化,以期小麦抗旱蛋白质组学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为冬小麦品种周麦 18(对干旱敏感)和晋麦 47(抗旱性强)。取三叶期幼苗室温下 PEG 胁迫处理 72 h,以不胁迫处理为对照。

1.2 实验仪器与试剂

实验采用了 PROTE AN II xi Cell 垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),PROTEAN IEF Cell 等电聚焦系统(美国 Bio-Rad 公司)、PDQuest 8.0.1 凝胶图像分析软件(美国 Bio-Rad 公司)和 UMAX PowerLook 2100XL 光密度扫描仪(台湾力捷公司)。

固相 pH 梯度线性预制 IPG 胶条(17 cm, pH 4~7 和 pH 3~10),载体两性电解质、甘油、矿物

油购自美国 Bio-Rad 公司;丙烯酰胺、N,N'-2 甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、二甲氨基丙磺酸(Chaps)、尿素、硫脲、Tris、甘氨酸、过硫酸铵(AP)、碘乙酰胺(IAA)、四甲基乙二胺(TEMED)均为 Sigma 公司产品;三氯乙酸(TCA)、丙酮、 β -巯基乙醇、牛血清白蛋白(BSA)、蛋白 Marker、低熔点琼脂糖等为 Amresco 公司产品;甲醛、无水乙醇、硫代硫酸钠、无水乙酸钠、无水碳酸钠、冰乙酸等为国产分析纯试剂;所有溶液均用 Milli-Q 制备的去离子水配制。

1.3 叶片全蛋白的提取

磷酸钠缓冲液研磨法(普通法):取小麦叶片 0.5 g,置于预冷研钵中,加入 75 mmol · L⁻¹磷酸钠缓冲液约 400 μ L (pH 7.8),冰浴迅速研磨成匀浆状。10 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清液,按 1 : 1.5 (v/v) 加入蛋白提取液(0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl, 2% SDS, 10% 甘油, 5% β -巯基乙醇, pH 8.0), 95~100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,再次离心后,吸取上清液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用^[12]。

TCA/丙酮法:即三氯乙酸/丙酮法,参照刘卫等的方法^[5,13-14],并略有改动。称取 0.5 g 小麦叶片,液氮(含少量 PVP)研磨成细粉,于 2 mL 离心管中,加入 2 mL -20 $^{\circ}$ C 预冷的提取介质[10% TCA(w/v) 和含 0.07% β -巯基乙醇的丙酮溶液(v/v)], -20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜,期间上下颠覆 2~3 次;4 $^{\circ}$ C, 20 000 g 离心 30 min 弃上清,沉淀悬浮于 2 mL -20 $^{\circ}$ C 预冷的丙酮溶液(含 0.07% β -巯基乙醇)中, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 1 h,同上离心。重复洗涤沉淀 3~4 次至蛋白为纯白色,最后沉淀真空冷冻干燥成干粉,加入蛋白质裂解缓冲液(7 mol · L⁻¹ 尿素, 2 mol · L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol · L⁻¹ DTT), 分装于 1.5 mL 的离心管中, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.4 蛋白浓度的测定

参考 Bradford 的方法^[15]测定样品。

1.5 SDS-PAGE 单向电泳检测

SDS-PAGE 电泳,浓缩胶 $T = 5\%$, $C = 2.67\%$,分离胶 $T = 10\%$, $C = 2.67\%$,加样量 15~20 μ L,两板恒流 20 mA,电泳 14~15 h,固定(甲醇:乙酸:蒸馏水=4:1:5)30 min 以上,0.20%考马斯亮蓝 R-250 染色 4~5 h,脱色液(甲醇:乙酸:蒸馏水=5:1:5)脱色 2~3 h;银染主要步骤参考文献^[9]并略有改动:①固定(无水乙醇:乙酸:双蒸水=4:1:5)至少 6 h

或固定过夜,②双蒸水洗 10 min,③敏化 30 min,④漂洗 3 次(5 min·次⁻¹),⑤银染 20 min,⑥漂洗 2 次(1 min·次⁻¹),⑦显色 3~5 min,⑧终止 10 min。Gene Genius 自动凝胶成像分析系统照相。

1.6 第一向等电聚焦电泳

采用 Protean IEF cell 等电聚焦系统(Bio-Rad),主要参照 Bio-Rad 双向电泳实验指南进行,并略有改动。根据浓度测定结果,取一定量蛋白样品加适量水化液[7 mol·L⁻¹ 尿素,2 mol·L⁻¹ 硫脲,4% CHAPS,65 mmol·L⁻¹ DTT,0.2%两性电解质 Biolyte(其中 pH 3~10 和 pH 4~6 按 1:1 的比例混合)],至总体积为 350 μL,沿 IPG 胶条槽缓慢均匀加入,将 IPG 胶条胶面朝下覆盖在样品上,样品与胶面间不能有气泡,室温泡胀约 1 h 后在胶面上覆盖 2.5 mL 矿物油,置于 PROTEAN IEF Cell 型等电聚焦电泳仪上,水化和聚焦温度在 20℃ 自动进行。

1.7 第二向 SDS-PAGE

第一向等电聚焦结束后,用超纯水冲洗 IPG 胶条背面,去掉胶条上的矿物油,并用湿滤纸轻轻擦干,将 IPG 胶条放于水化盘中并加 5 mL 胶条平衡缓冲液 I [6 mol·L⁻¹ 尿素,2% SDS,0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.8),20% 甘油,2% DTT(现加)],振荡平衡 15 min,再迅速转入 5 mL 胶条平衡缓冲液 II [6 mol·L⁻¹ 尿素,2% SDS,0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.8),20% 甘油,2.5% 碘乙酰胺(现加)]中,振荡平衡 15 min。平衡完毕后,将胶条转移到 12% SDS-PAGE 凝胶上,低熔点琼脂糖封胶后,14.5℃ 进行第二向 SDS-PAGE,待溴酚蓝移至凝胶底部时停止电泳。凝胶染色采用硝酸银染色法^[9]。

1.8 图谱分析

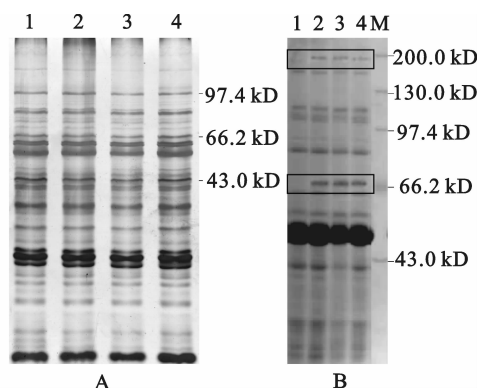
采用 UMAX Powerlook 2100XL 型光密度扫描仪对染色后的 2-DE 凝胶进行扫描,分辨率设为 600 dpi;用 PDQuest8.0.1 软件对图像进行分析,包括背景消减、斑点检测、匹配、数据分析等,并获取差异表达蛋白质点。

2 结果与分析

2.1 两种蛋白提取方法的单向 SDS-PAGE 凝胶图谱比较

用磷酸钠缓冲液研磨法提取的小麦叶片蛋白经单向 SDS-PAGE 检测后,两个材料在 PEG 胁迫

后与对照相比差异条带表达不明显(图 1A)。用 TCA/丙酮法提取蛋白后,周麦 18 在 PEG 胁迫后与对照相比在分子量 66.2 和 180 kD 处存在明显差异,其中 66.2 kD 处特异性条带与石峰等^[1]研究结果一致,180 kD 处特异性条带则是新发现条带;晋麦 47 在 PEG 胁迫处理后没有表现出明显的差异条带(图 1B)。



A:磷酸钠缓冲液研磨法;B:TCA/丙酮法;1:周麦 18(对照);2:周麦 18(PEG 处理);3:晋麦 47(对照);4:晋麦 47(PEG 处理);M:marker

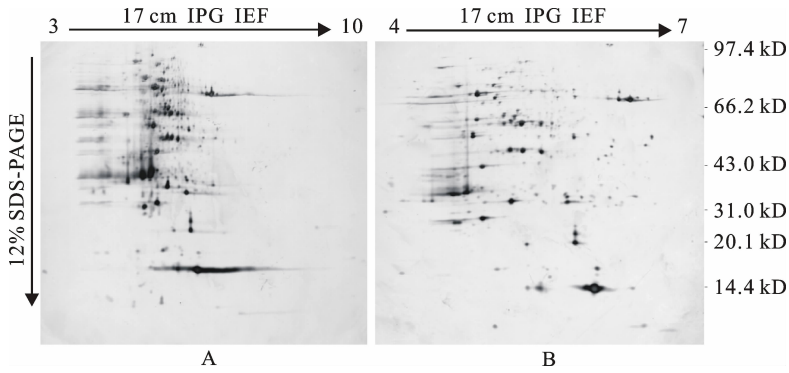
A:Sodium phosphate buffer grinding method; B. TCA/acetone precipitation method; 1: Zhoumai 18(contrast); 2: Zhoumai 18(PEG treated) 3: Jinmai 47(contrast); 4: (PEG treatment); M: marker

图 1 不同蛋白质提取方法的单向 SDS-PAGE 凝胶图谱

Fig. 1 Effect of one-way electrophoresis with two protein extratio methods

2.2 胶条 pH 范围对 2-DE 图谱的影响

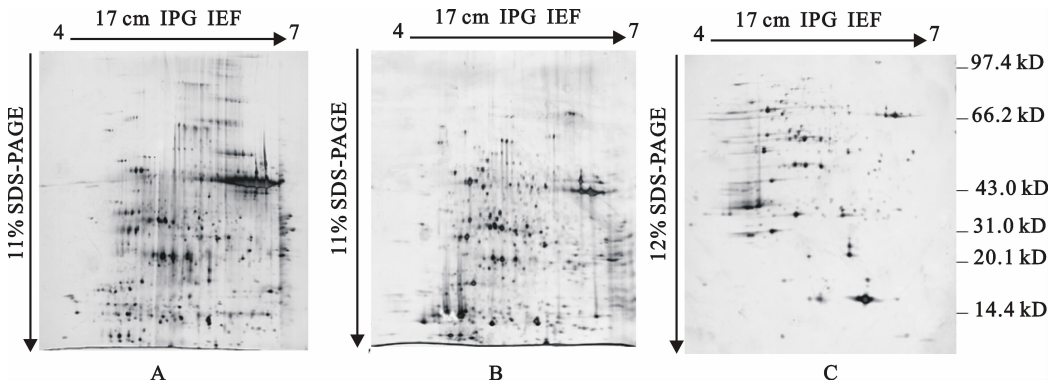
以 TCA/丙酮沉淀法提取的小麦叶片蛋白质为材料,分别采用 17 cm、pH 3~10 和 17 cm、pH 4~7 的线性 IPG 胶条,经 12% SDS-PAGE 进行蛋白质分离,凝胶采用灵敏度高的硝酸银染色法染色,获得了重复性较好的 2-DE 图谱(图 2)。用 pH 3~10 的胶条进行聚焦时,蛋白质点主要集中在 pH 4~7 范围内,高丰度蛋白质点高度聚集重叠,模糊且不易区分,低丰度蛋白质点未能充分表达,分辨率偏低,仅检测到约 200 个蛋白质点(图 2A)。而采用 pH 4~7 的胶条聚焦时,蛋白质点广泛分布在整个凝胶上,蛋白质点清晰,极显著地提高了分辨率,PDQuest8.0.1 软件检测到大约 400 个蛋白质点(图 2B)。说明采用 17 cm、pH 4~7 的线性 IPG 胶条能够更好地聚焦分离小麦叶片全蛋白。



A: 17 cm, pH 3~10; B: 17 cm, pH 4~7

图2 不同胶条 pH 范围的 2-DE 图谱比较(硝酸银染色)

Fig. 2 2-DE maps comparison different pH range of IPG gel strip (AgNO₃ staining)



A: 磷酸钠缓冲液研磨法, 11% SDS-PAGE; B 和 C: TCA/丙酮法, 11% 和 12% SDS-PAGE

A: sodium phosphate buffer grinding method, 11% SDS-PAGE; B and C: TCA/acetone precipitation, 11% and 12% SDS-PAGE

图3 不同蛋白质提取方法和 SDS-PAGE 胶浓度的 2-DE 图谱比较(17 cm, pH 4~7, 硝酸银染色)

Fig. 3 Comparison different proteins extract processes and 11% SDS-PAGE gel concentrations of 2-DE maps (17 cm, pH 4~7, silver staining)

2.3 蛋白质提取方法及 SDS-PAGE 胶浓度对 2-DE 图谱的影响

为确定合适的蛋白质样品制备方法,最大程度降低小麦叶片中高丰度蛋白对低丰度蛋白分离效果的影响,确保高、低分子量蛋白质点在 2-DE 图谱上充分均匀的表达。本研究分别用磷酸钠缓冲液研磨法和 TCA/丙酮法提取小麦叶片全蛋白质, Bradford 法蛋白定量, 以上述优化的胶条 pH 范围进行双向电泳分离, 硝酸银染色, 结果如图 3。磷酸钠缓冲液研磨法提取蛋白的 2-DE 图谱蛋白点较模糊, 分辨率低, 横竖纹干扰严重, 背景色重, 说明样品中蛋白质含干扰物质比较多(图 3A)。而 TCA/丙酮法提取蛋白的 2-DE 图谱蛋白点清晰呈圆形, 比较均匀地分布在凝胶上, 大多数蛋白质斑点呈圆形或椭圆形, 清晰可见, 分离出

的各蛋白质点基本上没有拖尾、纹理和横向扩散, 样品中杂质明显减少(图 3B)。

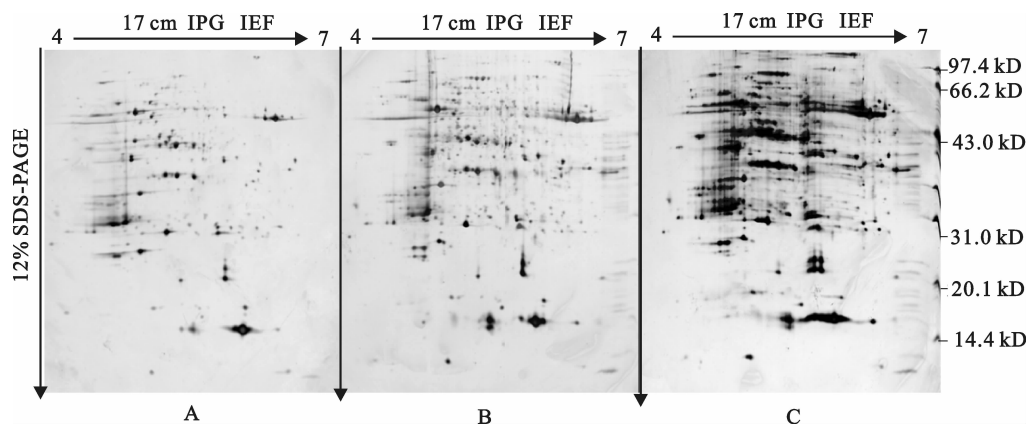
SDS-PAGE 胶浓度不同, 蛋白质分离的效果也存在差异。分别以 11% 和 12% 的 SDS-PAGE 胶浓度进行电泳, 胶浓度为 11% 时, 蛋白质点分布不均匀, 14.4 kD 以下低分子量的蛋白质未能在胶上很好地分离, 无法得以识别(图 3A 和 B); 改用 12% 胶浓度后, 高、低分子质量区域蛋白质点均较好地分离, 蛋白质点分布均匀, 获得了较好的分离图谱(图 3C)。以上比较分析表明, 采用 TCA/丙酮法和 12% 的胶浓度更适合小麦叶片全蛋白 2-DE 的分离。

2.4 上样量对 2-DE 图谱的影响

上样量对双向电泳结果也有显著影响。按上述优化条件, 分别取 140、150 和 160 μg 蛋白样品

进行双向电泳,结果如图 4。在 140 μg 上样量情况下,2-DE 图谱上蛋白点模糊不清,蛋白点非常少,低丰度蛋白模糊不清甚至不能被检测而丢失(图 4A);蛋白上样量为 150 μg 时,蛋白点清晰呈圆形,无横条纹干扰,分离均匀,低丰度蛋白数量明显增加,图谱质量最佳(图 4B)。上样量达到

160 μg 时,高丰度蛋白的斑点过大影响甚至遮盖其他蛋白点的显示,蛋白分离效果差,产生明显的横向与纵向拖尾,聚焦效果较差,影响了蛋白质点的分离与分析(图 4C)。因此,150 μg 的上样量比较适合于小麦叶片全蛋白 2-DE 分析。



A: 140 μg ; B: 150 μg ; A: 160 μg

图 4 不同上样量的 2-DE 图谱比较(17 cm, pH 4~7, 12% SDS-PAGE, 硝酸银染色)

Fig. 4 2-DE maps of different loading quantities(17 cm, pH 4~7, 12% SDS-PAGE, silver staining)

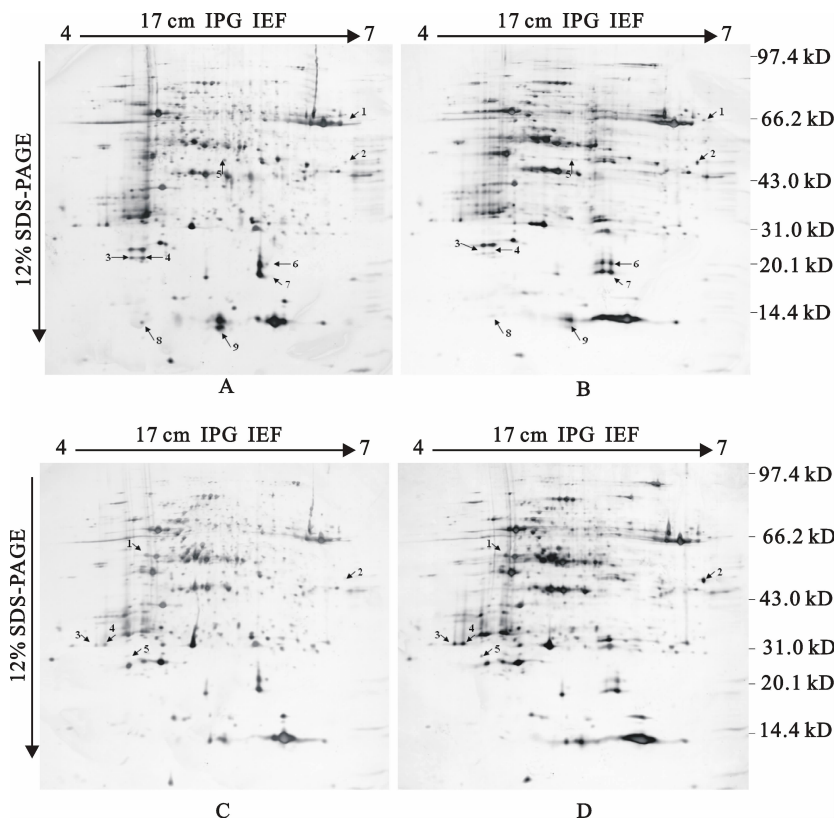


图 5 周麦 18 对照(A)与胁迫处理(B)和晋麦 47 对照(C)与胁迫处理(D) 差异表达蛋白 2-DE 图谱

Fig. 5 2-DE maps of differentially expressed protein from Zhoumai 18 contrast treatment(A)

and stress treatment (B), and Jinmai 47 contrast treatment (C) and stress treatment(D)

2.5 小麦叶片抗旱差异表达蛋白 2-DE 图谱的构建

按上述优化后的体系,分别对周麦 18 和晋麦 47 三叶期对照和 PEG 胁迫处理(72 h)的小麦叶片全蛋白进行了分离,通过严格一致的操作程序,经硝酸银染色获得了分辨率和重复性较好的双向电泳图谱(图 5)。从图 5 可以看出,蛋白点分布比较广泛,大部分蛋白质主要集中在 pI 5~6 之间。采用 PDQuest8.0.1 软件结合肉眼观察及手动调整对 2-DE 图谱进行分析可以看出,对照与 PEG 胁迫条件下 2-DE 图谱具有一定相似性,但也存在明显差异,所表达的蛋白点数有所增加,且存在一些表达量上的差异。

与对照 2-DE 图谱(图 5A、C)相比,PEG 胁迫处理后,周麦 18 存在 9 个明显的差异表达蛋白质点(图 5B),其中表达量下调的有 5 个(3、4、5、8、9),表达量上调的有 4 个,胁迫后产生的新蛋白点有 3 个(1、6、7);晋麦 47 存在 5 个明显的差异表达蛋白质点(图 5D),表达量均上调,仅蛋白质点 2 为胁迫后产生的新蛋白。

3 讨论

随着双向电泳技术的发展和完善,整个电泳体系也在不断优化与更新,而不同的材料、组织、器官在蛋白质样品的制备、电泳条件等一些细节方面还需要作相应的优化处理。本研究经过优化蛋白提取及电泳条件等得到了较好的适合小麦叶片蛋白质组学研究的 2-DE 技术体系。

3.1 样品的制备

样品制备是 2-DE 成功与否的关键步骤^[16],样品制备中蛋白提取纯度优劣更是核心。植物蛋白质中经常受到色素、酚类、醌类等次生代谢物质的污染。本研究通过在液氮中加入少量 PVP,吸附叶片组织中的色素和酚类物质,并通过增加洗涤和沉淀蛋白的次数尽可能多地去除上述杂质^[12]。试验中分别采用磷酸钠缓冲液研磨法和 TCA/丙酮法提取蛋白,在相同的蛋白质裂解液条件下,经单向和双向电泳对两种方法进行检测。磷酸钠缓冲液研磨法步骤少,操作简单,但得到的蛋白质样品颜色发黄,蛋白质浓度较高,2-DE 图谱中蛋白多,易重叠,且背景色重,说明不能有效地去除酚等可溶性杂质;TCA/丙酮法虽然步骤较多,但得到的蛋白质呈乳白色,蛋白质浓度相对

较高,2-DE 图背景色干净,能有效去除盐离子、多酚和多糖等对电泳不利的可溶性物质。说明对提取方法进行优化可显著提高电泳的分辨率。

3.2 电泳条件的优化

电泳条件包括胶条 pH 范围、上样量和 SDS-PAGE 胶浓度等方面^[17-19]。本研究首先采用 pH 3~10 的非线性胶条对小麦叶片抗旱蛋白质进行分离,发现大部分蛋白质集中在 pH 4~7 范围内,蛋白点之间紧密相连,甚至重叠在一起,模糊且不易区分;用 pH 4~7 范围的线性胶条进行双向电泳分离,大大地提高了在此区域的分辨率,增加该 pH 值范围内所检测到的蛋白数。这与陈蕊红等^[6]在小麦花药中的结论一致。

3.3 小麦叶片抗旱差异表达蛋白

本研究以优化后的双向电泳体系对 PEG 胁迫处理的两个小麦品种叶片全蛋白进行了分离,获得分辨率较高的 2-DE 图谱,并获得了 14 个差异点。这些特异性蛋白或多肽的产生,可能是水分胁迫影响一些酶的表达,导致水解酶类和某些氧化酶的活性提高,而某些参与生物合成的酶类活性减弱。此外,干旱胁迫时,蛋白质中的氨基酸残基可通过脱氨、同分异构或氧化得到修饰,一些具有此作用的酶可被胁迫上调,而其他一些渗透调节物质的合成酶在水分胁迫的条件下也可能上调。大多数上调蛋白包括超氧化物歧化酶(SOD)、激动蛋白解聚因子等^[7,20],这些蛋白质主要参与了光合作用、代谢、细胞结构及信号传导等生理生化过程^[21]。

3.4 面临的问题

虽然双向电泳技术取得了一些进展,但还存在一些局限性。许多细胞因子或功能蛋白质表达量往往很低,在提取蛋白过程中就会降解、损失,甚至丧失原有的功能,如何分离这类蛋白质,并且保持原有的特殊性有着很重要的意义。双向电泳过程耗时长,操作步骤严格且繁琐,对实验人员的经验、技巧、熟练程度要求非常高,同时还受外界环境天气的影响,无法完全自动化进行,容易产生误差,造成重复性差,不利于实现高通量分离蛋白质。双向电泳技术今后如何改进和创新,并克服目前出现的问题,向着我们所期待的方向发展还需要进一步深入探讨。

综上所述,此次试验不仅在 SDS-PAGE 胶浓度和上样量上进行了比较分析,而且最终确立了

胶条长度为 17 cm, pH 4~7 的 IPG 线性胶条, 上样量为 $150 \mu\text{g} \cdot \text{胶条}^{-1}$, 12% SDS-PAGE 胶浓度的双向电泳体系。本次实验还发现, 分子量在 180 kD 左右的蛋白与 66.2 kD 的蛋白相伴出现, 其与抗旱性的关系还有待进一步研究分析。

参考文献:

- [1] 石峰, 谢惠民, 张晓科. 冬小麦不同抗旱品种抽穗期干旱诱导蛋白差异与抗旱性的研究[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(3): 32-36.
- [2] 程思思, 乙引, 张习敏, 等. 双向电泳技术在植物应答非生物胁迫蛋白质组学研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1135-1138.
- [3] 田梦雨, 李丹丹, 戴廷波, 等. 水分胁迫下不同基因型小麦苗期的形态生理差异[J]. 应用生态学报, 2010, 21(1): 41-47.
- [4] O'Ferrell. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [5] 马俊会, 杨华瑞, 王成社, 等. PEG-6000 胁迫对小麦三叶期蛋白表达的影响[J]. 麦类作物学报, 2010, 30(5): 858-862.
- [6] 刘卫, 陈蕊红, 张改生, 等. 小麦遗传型与生理型雄性不育花药蛋白质双向电泳分析[J]. 遗传, 2008, 30(8): 1063-1069.
- [7] 陈蕊红, 张改生, 刘卫, 等. 小麦花药蛋白质组双向电泳技术体系的优化[J]. 核农学报, 2008, 22(4): 404-409.
- [8] 叶景秀, 陈蕊红, 张改生, 等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花药蛋白质组分分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 858-864.
- [9] 叶景秀, 张改生, 王书平, 等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花粉粒差异蛋白质组学研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(10): 949-957.
- [10] 王书平, 张改生, 叶景秀, 等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦生理型雄性不育小花完整叶绿体差异蛋白质的鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(9): 854-861.
- [11] 王婧, 谢惠民, 张春霞, 等. 冬小麦幼苗期水分胁迫应答蛋白遗传分析及基因初步定位[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(3): 396-400.
- [12] 吴庆丰, 王崇英, 王新宇, 等. 山藜豆叶片蛋白质双向电泳技术的建立[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1330-1336.
- [13] 金艳, 许海霞, 徐圆圆, 等. 几种不同提取方法对小麦叶片总蛋白双向电泳的影响[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(6): 1083-1087.
- [14] 王晓楠, 付连双, 李卓夫, 等. 小麦苗期地下茎蛋白质双向电泳技术体系的优化[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 66-71.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochemistry, 1976, 72(7): 248-254.
- [16] Shaw M M, Riederer B M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003, 3: 1408-1417.
- [17] 周蕴薇. 山茶叶片可溶性蛋白双向电泳技术的建立[J]. 生物技术通报, 2008(2): 127-133.
- [18] 陈丽霞, 李英慧, 任朝阳, 等. 利用双向电泳技术分离大豆矮秆突变体相关蛋白[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(3): 76-82.
- [19] 司晓敏, 李巧云. 蛋白质组技术及小麦蛋白质组研究进展[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(3): 100-105.
- [20] Ali G M, Komatsu S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5: 396-403.
- [21] He C Y, Zhang J G, Duan A G, et al. Proteins responding to drought and high-temperature stress in *Populus euramericana* cv. '74/76'[J]. Trees, 2008, 22: 803-813.