

野生大豆叶片蛋白质组双向电泳技术体系的优化研究

张宁¹, 孙晓丽², 端木慧子¹, 于洋¹, 纪巍¹, 朱延明¹

(1. 东北农业大学 生命科学学院/农业生物功能基因重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为给野生大豆蛋白质组学分析提供技术支撑,以耐盐碱野生大豆叶片为材料,对 Tris-饱和酚法、Tris-HCl 法和 TCA-丙酮法 3 种蛋白质提取方法进行了比较,并对蛋白上样量、等电聚焦参数及凝胶浓度进行了优化。结果表明:使用 Tris-饱和酚法提取蛋白质,上样量为 2 000 μg ,等电聚焦 90 000 V \cdot h,凝胶浓度为 10% 时,可获得背景清晰、蛋白点数较多、重复性较好的蛋白双向电泳图谱。

关键词:野生大豆;叶片;蛋白质提取;双向电泳;蛋白质组学

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0874

Optimization of Two-dimensional Electrophoresis Technology System for *Glycine soja* Leaves Proteome

ZHANG Ning¹, SUN Xiao-li², DUANMU Hui-zi¹, YU Yang¹, JI Wei¹, ZHU Yan-ming¹

(1. College of Life Science/Key Laboratory of Agricultural Biological Functional Genes, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, China; 2. Agronomy College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: To facilitate the proteomic analysis of wild soybean leaves, in this study, we established a suitable protocol for leaf protein extraction and two-dimensional electrophoresis. We extracted the total proteins of *Glycine soja* leaves through Tris-phenol method, Tris-HCl method and TCA-acetone method, compared the protein quantity and yield, and found that proteins extracted by Tris-phenol method displayed the highest concentration and best quality. We also compared the 2-DE images obtained by using different protein loading amounts, isoelectric focusing (IEF) parameters, and gel concentrations. Our results identified a suitable protocol for 2-DE analysis, using the Tris-phenol method for protein extraction, 2 000 μg protein loading amount, 90 000 V \cdot h IEF condition, 10% gel concentration. Under this condition, we obtained good 2-DE images with much clearer background, more protein spots, and better reproducibility. Taken together, in this study, we established a suitable system for 2-DE analysis of wild soybean leaf proteins, which will lay a foundation for the following *Glycine soja* leaf proteomic research.

Keywords: *Glycine soja*; Leaves; Protein extraction; Two-dimensional electrophoresis; Proteomics

蛋白质双向电泳技术(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是研究差异蛋白质组学的重要技术,在蛋白组学研究中具有不可替代的作用^[1-2]。该技术利用蛋白质的等电点和分子量两种特性对蛋白质进行分离,是获得细胞、组织或器官等蛋白表达图谱的主要手段^[3-5]。由于其简便、快速、直观等优点,双向电泳技术已被广泛应用于各种生物样品的蛋白表达谱构建及差异蛋白筛选^[6-8]。但由于所分析样品的多样性,迄今仍没有一种方法能适用于各种生物样品的蛋白质制备和分离。因此根据不同生物样品的特点,建立其特定的蛋白质样品制备技术和双向电泳体系十分必要^[9-11]。

野生大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆的野生近缘

种,具有优异的耐盐碱、抗寒、抗病害能力,是我国宝贵的野生资源财富^[12]。目前对野生大豆的研究主要集中在其对逆境胁迫的生理响应、基因克隆和功能分析等方面^[13-16],对其蛋白质组学研究还未见报道。蛋白质是植物生理活动的直接执行者,因此,通过双向电泳技术构建野生大豆在逆境胁迫下的蛋白表达谱,筛选差异表达蛋白对研究其耐逆机制具有重要的作用。

本研究以野生大豆叶片为材料,比较了 3 种不同的植物蛋白质提取方法,优化了蛋白上样量,等电聚焦参数和凝胶浓度,最终建立了一种适用于野生大豆叶片蛋白组的双向电泳体系,为野生大豆蛋白质组的后续研究奠定了基础。

收稿日期:2014-12-08

基金项目:国家自然科学基金(31171578);国家转基因重大专项(2011ZX08004);黑龙江省高校科技创新团队建设计划(2011TD055)。

第一作者简介:张宁(1989-),女,硕士,主要从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail:zhang_ning1989@163.com。

通讯作者:朱延明(1955-),男,教授,博导,主要从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail:ymzhu2001@neau.edu.cn。

1 材料与方 法

1.1 材 料

采用葛瑛等^[12]于吉林白城市盐碱地(E122°15'53",N45°07'31",海拔152 m)采集的野生大豆材料G07256。选取籽粒饱满、大小一致的野生大豆种子放入三角瓶中,倒入质量分数为98%浓硫酸,用玻璃棒搅拌10 min,倒出浓硫酸,立即用大量清水冲洗至中性;将种子放于湿润滤纸上,暗处保湿培养2 d,诱导种子萌发;将萌发后的幼苗(约3 cm)转移至1/4 Hoagland 营养液^[9]中培养,置于飞利浦农用钠灯下培养,光照强度为30 000 lux,光照/黑暗周期为16 h/8 h,湿度为60%,温度28/24℃。取长势一致的21 d的野生大豆幼苗三出复叶,液氮速冻,储于-80℃冰箱备用。

1.2 叶片总蛋白提取

1.2.1 TCA-丙酮沉淀法 参照 Damerval 等^[17]的方法稍作改进。称取1.0 g 野大豆叶片,在液氮中充分研磨成粉末,悬于40 mL 提取缓冲液(40 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH7.6, 1 mmol·L⁻¹ DTT)中,继续研磨至溶液匀浆,转移至50 mL 离心管中;涡旋震荡,超声破碎15 s,冰浴30 s,重复3次;4℃,25 000 g 离心10 min,吸取上清至干净的50 mL 离心管中,弃去沉淀;加入400 μL 100% TCA,涡旋震荡5 s 混匀,冰上静置15 min;4℃,15 000 g 离心10 min,弃上清;用5 mL 冰预冷的丙酮重悬沉淀,4℃,25 000 g 离心5 min,重复2次;用80%丙酮重悬沉淀,4℃,25 000 g 离心5 min,弃上清,干燥沉淀,存于-80℃待用。

1.2.2 Tris-饱和酚法 参照 Wang 等^[18]的方法。称取1.0 g 野大豆叶片,加液氮研磨成粉末,将粉末悬浮于10 mL 蛋白提取液中(0.9 mol·L⁻¹蔗糖,0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl,0.01 mol·L⁻¹ EDTA,0.4% (v/v) β-ME,pH 8.8),加入10 mL 饱和酚震荡匀浆;4℃,15 000 g 离心10 min,转移上清至干净的离心管中,沉淀加入5 mL 蛋白提取液和5 mL 饱和酚再次离心,收集上清;向两次收集的上清液中加入5倍体积的-20℃预冷的0.1 mol·L⁻¹乙酸铵甲醇,-20℃沉淀过夜;4℃,15 000 g 离心15 min,弃上清;依次加入10 mL 预冷的乙酸铵甲醇溶液2次,80%丙酮2次,70%乙醇1次清洗沉淀,每次离心后使沉淀重悬,-20℃静置15 min;室温风干沉淀获得蛋白干粉样品,-80℃保存。

1.2.3 Tris-HCl 法 称取1.0 g 野大豆叶片,加液氮研磨成粉末,将粉末重悬于5 mL 蛋白提取液(50

mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH7.5, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA,5% (v/v) Triton X-100,1% (w/v) proteinase inhibitor cocktail)中,振荡30 s,冰浴30 s至完全溶解;4℃,20 000 g 离心20 min,取上清,分装于-80℃保存或直接用于蛋白电泳。

1.3 蛋白裂解与定量

将TCA-丙酮沉淀法和Tris-饱和酚法获得的蛋白干粉加入裂解液(7 mol·L⁻¹尿素,2 mol·L⁻¹硫脲,4% (w/v) CHAPS,2% (v/v) pharmalyte pH3~10,0.04 mol·L⁻¹ DTT,4% (w/v) proteinase inhibitor cocktail),4℃震荡混匀30 min,低温超声15 min,直至干粉溶解;4℃,20 000 g 离心20 min,取上清,直接用于双向电泳或保存于-80℃待用。

使用GE公司的2-D Quant 试剂盒对叶片的总蛋白进行定量。根据表1用2 mg·mL⁻¹ BSA(试剂盒提供的标准液)配置标准曲线管,另取检测管加入2 μL 待检测样品;向标准曲线管及检测管中加入500 μL 沉淀剂(precipitant),震荡并室温孵育2~3 min;加入500 μL 共沉淀剂(co-precipitant),快速混匀;10 000 g 离心5 min 沉淀蛋白质,弃上清;再次离心,吸出剩余液体(至管中无可见液体);每管加100 μL 铜溶液,400 μL 蒸馏水,短暂震荡使沉淀重悬;每管加1 mL 工作显色液(color reagent A: color reagent B = 100:1),室温孵育20 min;以水做对照,在480 nm 下读取标准液和检测液的吸光值;以蛋白含量为横轴,吸光值为纵轴制备BSA标准曲线,并从标准曲线中查出检测管中蛋白质含量。其中,纯蛋白质量=蛋白浓度×蛋白质样品体积;纯蛋白得率=纯蛋白质量/鲜重质量×100%。

表1 BSA 标准曲线的制备

Table 1 The preparation of standard curves of BSA

编号 No.	1	2	3	4	5	6
BSA 标准液体积 Volume of BSA /μL	0	5	10	15	20	25
蛋白含量 Content of protein /μg	0	10	20	30	40	50

1.4 蛋白质电泳

1.4.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 参照 Laemmli^[19]的方法,使用5%的浓缩胶及12%的分离胶进行蛋白分离,60 V 恒压进行浓缩,90 V 恒压至溴酚蓝跑出凝胶。

1.4.2 双向电泳

(1) 第一向等点聚焦电泳(IEF):采用 Et-

tanIPGphor 等电聚焦系统,参照 Dai 等^[20]的方法进行第一向等电聚焦电泳。采用 24 cm pH 4~7 线性 IPG 预制胶条,为探索最佳上样量,本实验设计 4 种不同质量梯度,分别取 1 200,1 600,2 000 和 3 000 μg 野生大豆叶片蛋白样品裂解液,加入水化液 [8 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,2% (w/v) CHAPS,0.3% (w/v) DTT,0.8% (v/v) IPG buffer pH 4~7,0.01% (w/v) 溴酚蓝] 至总体积为 450 μL 。参照 GE Healthcare 24 cm IPG 双向电泳操作手册进行 IPG-IEF,采取 2 种等电聚焦条件(表 2)对本步骤进行优化,等电聚焦在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下进行,每根胶条的极限电流为 50 μA 。

表 2 不同 IEF 程序

Table 2 Different procedures of IEF

步骤 Steps	I		II	
	电压 Voltage/V	时间 Time/h	电压 Voltage/V	时间 Time/h
1	30	8	30	8
2	50	4	100	0.5
3	100	1	300	0.5
4	300	1	1000	1
5	500	1	8000	3
6	1000	1	8000	8
7	8000	12		

(2) IPG 胶条的平衡:第一向等电聚焦结束后,将胶条分别先后置于平衡缓冲液 I [0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.8,6 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,30% (v/v) 甘油,2% (w/v) SDS,0.01% (w/v) 溴酚蓝,1% (w/v) DTT] 和缓冲液 II [0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.8,6 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,30% (v/v) 甘油,2% (w/v) SDS,0.01% (w/v) 溴酚蓝,4% (w/v) IAA] 中,于水平摇床上各平衡 15 min;其间用 SDS 电泳缓冲液 [25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris,192 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸,0.1% (w/v) SDS] 平衡 3 次,每次 60 s。

(3) 第二向 SDS-PAGE 电泳:将平衡好的 IPG

胶条转移至 10% 及 12.5% SDS-PAGE 凝胶上,用 0.5% (w/v) 琼脂糖封胶液 [0.5% (w/v) 琼脂糖,25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris,192 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸,0.1% (w/v) SDS,0.01% (w/v) 溴酚蓝] 封闭。封胶液凝固后即可进行第二向垂直电泳,预电泳每张胶 3.5 W 恒功率,待跑出一条直线后改用每张胶 17.5 W 恒功率至溴酚蓝前沿到达凝胶底部时结束。

1.4.3 染色 参照倪瑞涓等^[21]方法进行染色,将凝胶放入固定液 [40% (v/v) 无水乙醇,10% (v/v) 乙酸] 固定 30 min;将缩小的凝胶转移至 10% (v/v) 乙酸中放大 20 min;将凝胶转移至 90~100 $^{\circ}\text{C}$ 的 R-350 染液 (722 mg R-350 溶于 1 600 mL 冰乙酸中) 中 10 min;用 10% (v/v) 乙酸脱色过夜,其间换液,至凝胶背景清晰。

1.4.4 凝胶扫描和图像分析 使用 Imagescan (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 扫描凝胶,并用软件 PDquest 8.0 (Bio-rad) 对图像进行分析。

2 结果与分析

2.1 野生大豆叶片蛋白质提取方法的确定

合适的提取方法能最大限度的保留样品蛋白的多样性。本实验中使用 TCA-丙酮沉淀法、Tris-饱和酚法和 Tris-HCl 法分别提取野生大豆叶片蛋白(表 3)。通过蛋白浓度及纯蛋白得率分析表明,3 种提取方法中 Tris-饱和酚法获得的蛋白浓度最高 18.52 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,分别是 TCA-丙酮沉淀法 (6.36 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 和 Tris-HCl 法 (8.78 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 的 2.9 和 2.1 倍;纯蛋白得率最高的也是 Tris-饱和酚法 (1.151%),是 TCA-丙酮沉淀法 (0.317%) 和 Tris-HCl 法 (0.898%) 的 3.6 倍和 1.3 倍。因此,Tris-饱和酚法更有利于充分利用野生大豆叶片材料并能保留大部分蛋白,减少蛋白损失,能满足下一步等电聚焦时对上样量的需求。

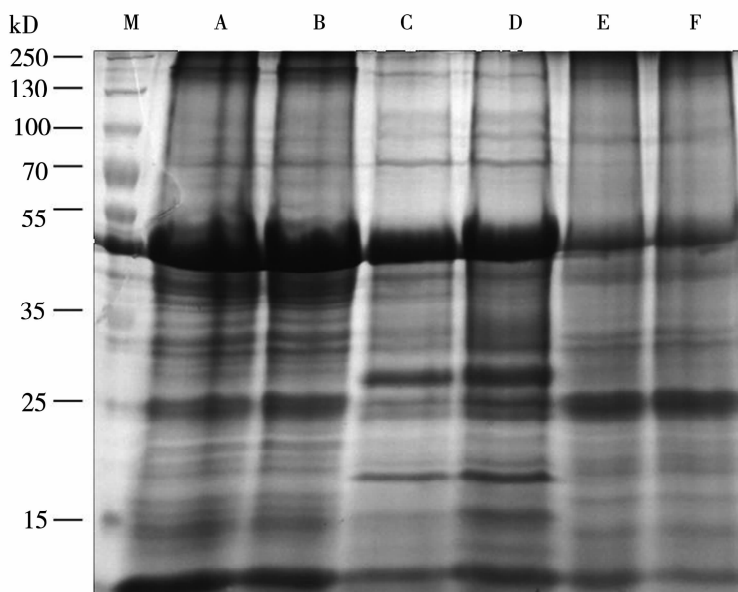
表 3 不同方法提取的野生大豆叶片总蛋白效率比较

Table 3 Comparison of the total proteins extracted from *Glycine soja* leaves by different methods

提取方法 Method	蛋白浓度 Protein concentration / $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	样品鲜重 Fresh weight / g	纯蛋白质量 Protein weight / mg	纯蛋白得率 Protein yield / %
TCA-丙酮沉淀法 TCA-acetone method	6.36	1.0	3.17	0.317
Tris-饱和酚法 Tris-phenol method	18.52	1.0	11.51	1.151
Tris-HCl 法 Tris-HCl method	8.78	1.0	8.98	0.898

对 3 种方法所提蛋白进行 SDS-PAGE 垂直电泳分析(图 1),发现 Tris-HCl 法(泳道 E、F)提取蛋白的条带最少且浅,说明此方法所获得的蛋白量较少,不适合蛋白双向电泳;而 Tris-饱和酚法(泳道 A、B)提取的蛋白条带最多,清晰、均匀地分布于 15 ~ 50 kD,泳道背景较清晰,说明此方法获得的蛋白

不仅浓度高,蛋白含量分布均匀,且杂质少。结果表明,在 3 种提取方法中,Tris-饱和酚法要优于 TCA-丙酮法和 Tris-HCl 法。因此,本实验采用 Tris-饱和酚法提取野大豆叶片总蛋白,用于进行后续的双向电泳分析。



M: 标准分子量蛋白质; A-B: Tris-饱和酚法; C-D: TCA-丙酮沉淀法; E-F: Tris-HCl 法。

M: Protein marker; A-B: Tris-phenol method; C-D: TCA-acetone method; E-F: Tris-HCl method.

图 1 不同方法提取的野生大豆叶片总蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE profiles of total proteins extracted from *Glycine soja* leaves using different methods

2.2 蛋白质双向电泳体系的优化

2.2.1 2-DE 蛋白上样量的确定 如图 2 所示,分析发现,上样量为 1 200 μg 时(图 2A),蛋白点之间分离较好,但点数太少,低丰度蛋白基本不可见;当上样量增加到 1 600 μg 时(图 2B),蛋白点数明显增加,能显示部分低丰度蛋白;2 000 μg 上样量时(图 2C),可清晰显示大部分低丰度蛋白,凝胶背景较干净,且分布比较均匀,无扩散现象;但将上样量增加到 3 000 μg 时(图 2D),高丰度蛋白浓度过高,严重掩盖了周围的低丰度蛋白,且横纵条纹明显。因此,针对本实验中 24 cm, pH4 ~ 7 的线性 IPG 胶条,2 000 μg 是最佳上样量。

2.2.2 双向电泳条件的优化 双向电泳的条件是能否获得理想蛋白质表达谱的决定性因素。我们首先参照 Dai^[20] 等方法,使用等电聚焦条件一(30 V, 8 h \rightarrow 50 V, 4 h \rightarrow 100 V, 1 h \rightarrow 300 V, 1 h \rightarrow 500 V, 1 h \rightarrow 1 000 V, 1 h \rightarrow 8 000 V, 12 h)进行第一向等电聚焦电泳(IPG-IEF),并使用 12% 的凝胶进

行第二向电泳(SDS-PAGE)。如图 3A 所示,所得到的图谱横纹较多,点与点之间分离效果较差;且蛋白点多数聚集于凝胶中上部,大量蛋白点聚集重叠而得不到很好的分离(图 3A)。

针对上述问题,我们缩短了水化时间,并减小了凝胶浓度,使用等电聚焦条件二(30 V, 8 h \rightarrow 100 V, 0.5 h \rightarrow 300 V, 0.5 h \rightarrow 1 000 V, 1 h \rightarrow 8 000 V, 3 h \rightarrow 8 000 V, 8 h)进行 IPG-IEF,使用 10% 的凝胶进行了第二向电泳(图 3B)。结果显示,优化后所得到的电泳图谱横纹明显减少,蛋白点圆润,没有弥散;虽然损失了分子量小于 15 kD 的蛋白点,但对于凝胶中部的蛋白点起到了良好的分离效果,蛋白点重叠现象大量减少,均匀的分布于整个凝胶之间,更适合下一步对凝胶图像的分析 and 胶内酶解实验的操作。因此,在本实验中对于 24 cm, pH4 ~ 7 的线性 IPG 胶条,上样量为 2 000 μg 时运用优化后的双向电泳条件比较合适。

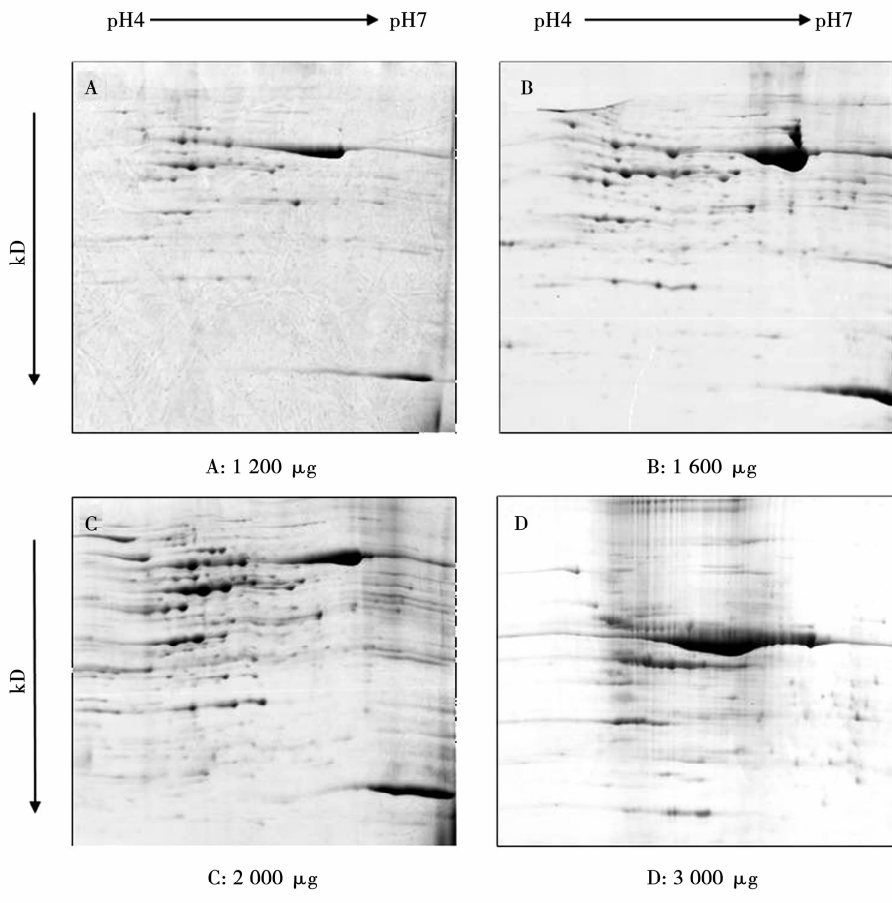
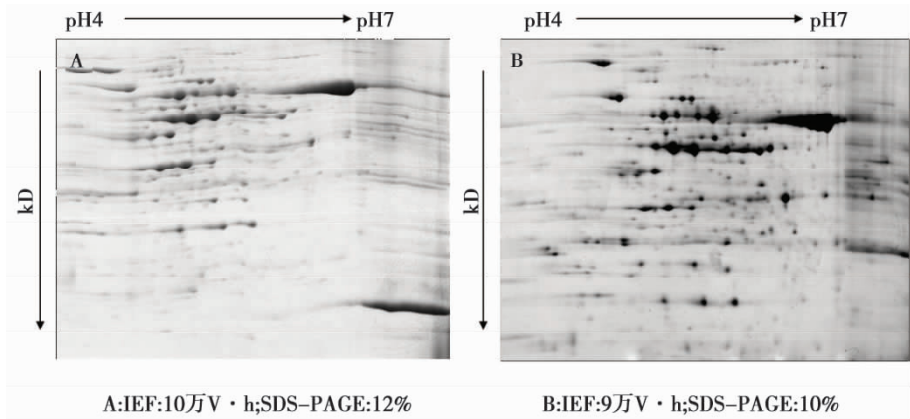


图2 不同上样量的野生大豆蛋白双向电泳图谱

Fig. 2 2-DE gels of the *Glycine soja* proteins with different loading quantities



A: IEF: 条件1; SDS-PAGE: 12%; B: IEF: 条件2; SDS-PAGE: 10%。

A: IEF: condition 1; SDS-PAGE: 12%; B: IEF: condition 2; SDS-PAGE: 10%.

图3 不同双向电泳条件下的双向蛋白质电泳图谱

Fig. 3 2-DE gel of different methods

3 结论与讨论

蛋白质提取是双向电泳的第一个也是最重要的步骤。合适的蛋白质提取方法是建立重复性好, 分辨率高的双向电泳体系的基础。植物组织(特别是绿色叶片)中含有的色素、多酚、多糖、醌及其它次生代谢产物会干扰电泳及分辨效果。很多科研

工作者对不同植物组织的蛋白提取方法进行了探讨和优化, 包括小麦^[8]、水稻^[20]、秋茄^[22]、烟草^[23]、桃^[24]等。此外, 顾宪鹏^[10]和王雪^[11]等对大豆叶片的蛋白质提取方法进行了对比, 认为 TCA-丙酮法适合大豆叶片的提取。但本研究中我们发现, 针对野生大豆叶片, 此法所提取的蛋白浓度较低, 在 SDS-PAGE 垂直电泳中条带较少且不清晰, 可能野生大

豆叶片与栽培大豆叶片的结构存在一定差异。李春奇等^[25]研究显示,与栽培大豆相比,野生大豆的叶片中叶肉细胞层数较多,且含有多细胞的腺毛。本研究发现 Tris-饱和酚法更适用于提取野生大豆叶片蛋白质。酚是蛋白质的良好溶剂,在样品制备过程中,蛋白质和脂类溶于酚相,盐、核酸、多酚和多糖等可溶性物质进入水相,从而得以分离。酚层中的蛋白质通过乙酸钠的甲醇溶液沉淀得以进一步纯化。乙酸钠在甲醇、丙酮等有机溶剂中有较好的溶解度,因而可以在后面的沉淀洗涤(乙醇)过程中除去,避免重新引入离子。Tris-饱和酚法虽然步骤繁琐费时,但能有效去除多糖和多酚,最大限度地消除了杂质对蛋白提取的影响,适用于杂质含量较高的植物样品的提取^[26]。

上样量的选择是获得高质量 2-DE 图谱的因素之一,合适的上样量能显示尽可能多的蛋白点,且背景干净,无横竖条纹。本研究通过对比 4 种不同的上样量的电泳图谱,确定了采用 Tris-饱和酚法提取的野生大豆叶片蛋白质进行 2-DE 分析时,最佳上样量为 2 000 μg 。上样量的大小主要取决于胶条的长度,pH 范围以及染色方法等因素^[27]。一般情况下,植物细胞内大部分蛋白质表达丰度很低,所以适当的提高蛋白上样量有助于低丰度蛋白的检测,但上样量过高可导致高丰度的蛋白点掩盖低丰度的蛋白点;且样品中含有盐离子,上样量过大导致盐离子浓度增加,将直接导致等电聚焦时电压的上升,产生横纵向条纹,影响等电聚焦效果^[28]。研究表明不同的样品、胶条长度和 pH 范围及蛋白定量方法,均能导致最佳上样量的差异^[22,29-30],因此需要根据自身实验的特点设计最佳上样量,以得到最好的结果。

双向电泳的条件是直接影响双向电泳图谱的重要因素,多数研究都通过调整聚焦时间来优化 IEF 条件^[31-32]。本研究中,我们发现即使聚焦时间充足仍然有横条纹,推测可能是由于低电压水化时间过长,导致两性电解质消耗殆尽而使蛋白聚集,聚焦不充分而产生横条纹。因此,我们缩短了升压时间,结果表明调整后的程序很好的减少了大部分横条纹。本实验为当传统优化方法无法得到预期结果时提供了解决问题的新思路。

综上所述,本研究对蛋白提取方法、蛋白上样量、聚焦条件和凝胶浓度进行了比较和优化,建立一套适用于野生大豆叶片总蛋白质组分析的双向电泳方法,即采用 Tris-饱和酚法提取野生大豆叶

片总蛋白,蛋白上样量为 2 000 μg ,等电聚焦 90 000 V·h,凝胶浓度为 10% 时,所得图谱具有较高的分辨率和重复性,对进一步研究野生大豆蛋白质组具有重要意义。

参考文献

- [1] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [2] 刘春,麻浩,刘健晖,等. 大豆蛋白质组学研究进展[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 0712-0716. (Liu C, Ma H, Liu J H, et al. Advances in Soybean Proteomics[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 0712-0716.)
- [3] Sobhanian H, Razavizadeh R, Nanjo Y, et al. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress[J]. Proteome Science, 2010, 19: 1-15.
- [4] Uhrig R G, Moorhead G B. Plant proteomics: Current status and future prospects[J]. Journal of Proteomics, 2013, 88: 34-36.
- [5] Zhu W, Zhang E, Li H, et al. Comparative proteomics analysis of developing peanut aerial and subterranean pods identifies pod swelling related proteins[J]. Journal of Proteomics, 2013, 91: 172-187.
- [6] Debez A, Braun H P, Pich A, et al. Proteomic and physiological responses of the halophyte *Cakile maritima* to moderate salinity at the germinative and vegetative stages[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(18): 5667-5694.
- [7] Huerta-Ocampo J A, Osuna-Castro J A, Lino-Lopez G J, et al. Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(7): 2160-2169.
- [8] Kang G, Li G, Ma H, et al. Proteomic analysis on the leaves of *TaBTF3* gene virus-induced silenced wheat plants may reveal its regulatory mechanism[J]. Journal of Proteomics, 2013, 83: 130-143.
- [9] 郑天慧,宋波,姜自芹,等. 大豆花瓣蛋白双向电泳分析技术体系的优化[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2010, 26(6): 75-80. (Zheng T H, Song B, Jiang Z Q, et al. Optimization of Two-Dimensional Gel Electrophoresis for Proteome of Soybean (*Glycine Max* L. Merrill) Floret[J]. Natural Sciences Journal of Harbin Normal University, 2010, 26(6): 75-80.)
- [10] 顾宪鹏,罗秋兰,高继国,等. 大豆叶片蛋白质双向电泳技术的改良[J]. 大豆科学, 2011, 30(4): 663-667. (Gu X P, Luo Q L, Gao J G, et al. Improvement of two-dimension electrophoresis for soybean leaves total protein[J]. Soybean Science, 2011, 30(4): 663-667.)
- [11] 王雪,段玉玺,陈立杰. 适用于大豆叶片蛋白质组分析的双向电泳最佳条件研究[J]. 大豆科学, 2009, 28(2): 325-328. (Wang X, Duan Y X, Chen L J. A two-dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic analysis of soybean leaves[J]. Soybean Science, 2009, 28(2): 325-328.)

- [12] 葛瑛, 朱延明, 吕德康, 等. 野生大豆碱胁迫反应的研究[J]. 草业科学, 2009, 26(2): 47-52. (Ge Y, Zhu Y M, Lyu D K, et al. Research on responses of wild soybean to alkaline stress[J]. Pratacultural Science, 2009, 26(2): 47-52.)
- [13] 郑世英, 萧蓓蕾, 金桂芳. NaCl 胁迫对野生大豆和栽培大豆叶绿素及光合特性的影响[J]. 大豆科学, 2013, 32(4): 486-489. (Zheng S Y, Xiao B L, Jin G F. Effect of NaCl stress on chlorophyll content and photosynthetic characteristics of *Glycine soja* and *Glycine max*[J]. Soybean Science, 2013, 32(4): 486-489.)
- [14] 纪展波, 蒲伟凤, 李桂兰, 等. 野生大豆、半野生大豆和栽培大豆对苗期干旱胁迫的生理反应[J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 598-604. (Ji Z B, Pu W F, Li G L, et al. Physiological reaction of *Glycine soja*, *Glycine gracilis* and *Glycine max* to drought stress in seedling stage[J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 598-604.)
- [15] 朱延明, 杨欣兴, 孙晓丽, 等. 野生大豆新基因 GsDabb1 的克隆及其同源表达拟南芥的耐逆性分析[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(4): 1-7. (Zhu Y M, Yang X X, Sun X L, et al. Molecular characterization of *GsDabb1*, a Dabb homolog from *Glycine soja*, and its heterologous expression to improve drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(4): 1-7.)
- [16] 王臻昱, 才华, 柏锡, 等. 野生大豆 GsGST19 基因的克隆及其转基因苜蓿的耐盐碱性分析[J]. 作物学报, 2013, 38(6): 971-979. (Wang Z Y, Cai H, Bai X, et al. Isolation of *GsGST19* from *Glycine soja* and Analysis of Saline-Alkaline Tolerance for Transgenic *Medicago sativa*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 38(6): 971-979.)
- [17] Damerval C, De Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins[J]. Electrophoresis, 1986, 7(1): 52-54.
- [18] Xiaonan W, Heng Z, Lei S, et al. Desiccation Tolerance Mechanism in Resurrection Fern-Ally *Selaginella tamariscina* Revealed by Physiological and Proteomic Analysis[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9: 6561-6577.
- [19] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [20] Dai S, Li L, Chen T, et al. Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth[J]. Proteomics, 2006, 6(8): 2504-2529.
- [21] 倪瑞涓, 曹洪祥, 杨传平, 等. 一种聚丙烯酰胺凝胶的快速染色方法-热考染法[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2008, 25(3): 393-395. (Ni H J, Cao H X, Yang C P, et al. Strain measurement in flexibility material using fiber Bragg gratings[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University. 2008, 25(3): 393-395.)
- [22] 陈伟, 黄榕辉, 林小敏, 等. 秋茄根系蛋白质组的双向电泳技术的优化[J]. 福建农业学报, 2012, 27(8): 863-868. (Chen W, Huang R H, Lin X M, et al. Optimization of two-dimensional polyaneyleamide gel electrophoresis for proteome of *Kandelia candel* roots[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27(8): 863-868.)
- [23] 尤垂淮, 唐莉娜, 王海斌, 等. 烟草叶片蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. 中国烟草学报, 2012, 18(5): 96-102. (You C H, Tang L N, Wang H B, et al. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis of proteins from tobacco leaves[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2012, 18(5): 96-102.)
- [24] 张丽, 姜丽, 石韵, 等. 桃果实总蛋白质双向电泳优化体系的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(3): 250-257. (Zhang L, Jiang L, Shi Y, et al. Optimization of two-dimensional electrophoresis conditions for proteome analysis of peach fruit[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(3): 250-257.)
- [25] 李春奇, 高致明. 野生大豆的解剖学研究[J]. 河南农业大学学报, 1994, 28(1): 29-36. (Li C Q, Gao Z M. Anatomical study on wild soybean (*Glycine soja*)[J]. Acta Agriculturae Universitatis Henanensis, 1994, 28(1): 29-36.)
- [26] 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.
- [27] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053.
- [28] Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H, et al. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis[J]. Electrophoresis, 2003, 24(1-2): 207-216.
- [29] 张小果, 乔桂荣, 李翠云, 等. 旱柳根系蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28(4): 653-661. (Zhang X G, Qiao G R, Li C Y, et al. A two-dimensional electrophoresis system of *Salix matsudana* root proteomics[J]. Journal of Zhejiang Agriculture and Forestry University. 2011, 28(4): 653-661.)
- [30] 王丽娟, 任学敏, 杜艳慧, 等. 菜籽蛋白质组双向电泳技术体系的优化研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(17): 10179-10181. (Wang L J, Ren X M, Du Y H, et al. Optimization of two-dimensional electrophoresis technology system for rapeseed proteome[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(17): 10179-10181.)
- [31] 占志勇, 陈益存, 韩小娇, 等. 一种适合油桐种仁蛋白质分离的双向电泳技术体系[J]. 林业科学研究, 2012, 25(6): 745-750. (Zhan Z Y, Chen Y C, Han X J, et al. An Improved System of Two-dimensional Electrophoresis for the Tung Tree Seed Protein Separation[J]. Forest Research, 2012, 25(6): 745-750.)
- [32] 裴玉贺, 白建芬, 郭新梅, 等. 玉米叶片蛋白质双向电泳方法的优化[J]. 农学学报, 2013, 3(01): 1-5. (Pei Y H, Bai J F, Guo X M, et al. Optimization on two-dimensional electrophoresis method of maize leaf proteins[J]. Journal of Agriculture, 2013, 3(01): 1-5.)