

## 双向电泳联用质谱技术研究棉苗 对细极链格孢菌蛋白激发子诱导的应答

张志刚<sup>1,2,3</sup>, 邱德文<sup>3\*</sup>, 官春云<sup>2</sup>, 杨秀芬<sup>3</sup>, 肖立一<sup>1</sup>, 杨晓萍<sup>1</sup>

(1. 湖南省棉花科学研究所, 常德 415101; 2. 湖南农业大学, 长沙 410128;

3. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100081)

**摘要:**采用双向电泳和质谱技术分析了对棉苗诱导的全蛋白质组, 建立二者间的差异表达图谱, 并对差异蛋白进行了鉴定及分析归类。结果表明, 蛋白质分子质量在 10~100 kD 之间、等电点 3~10 范围内, 每块胶分离到约 600 个蛋白质点。得到了大约 53 个差异蛋白点, 其中有 31 个为上调蛋白, 22 个为下调蛋白。对 PEAT 诱导后表达量明显增加的 7 个上调蛋白点用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)进行肽质量指纹谱的分析, 并通过检索不同的数据库进行蛋白质鉴定与功能预测, 获得了 4 个蛋白的肽质量指纹图谱, 经数据库检索鉴定分析, GH-1、GH-3、GH-6 推测为核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶基因家簇, GH-7 推测为 S-腺苷-L-蛋氨酸合成酶。

**关键词:**双向电泳; 蛋白激发子; MALDI-TOF-MS; 棉花

中图分类号: S562.035.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2008)06-0425-06

## Analysis of the Inducing Responsiveness in Cotton Against Protein Elicitor from *Alternaria tenuissima* Using Two-dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry

ZHANG Zhi-gang<sup>1,2,3</sup>, QIU De-wen<sup>3\*</sup>, GUAN Chun-yun<sup>2</sup>, YANG Xiu-fen<sup>3</sup>, XIAO Li-yi<sup>1</sup>, YANG Xiao-ping<sup>1</sup>

(1. Hu'nan Cotton Research Institute, Changde, Hu'nan, 415101 China; 2. Hu'nan Agriculture University, Changsha 410128; 3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Proteins extracted from the cotton seedling induced by protein elicitor from *Alternaria tenuissima* were separated by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) and Mass Spectrometry. Reference maps were obtained with a good reproducibility. After analyzing with 2-DE software, approximately 600 proteins per 2-DE gel were isolated with molecular weights ranging from 10 kD to 100 kD and PI ranging from 3 to 10. About 53 spots expressed differently, with 31 at a higher level and 22 at a lower level. Seven stronger expressed proteins of high levels observed in a secondary PEAT gel were excised and identified using peptide mass fingerprinting and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Four identified proteins and their putative functions were presented. Three of them, spot no. 1, 3, 6 were identified as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, and spot no. Seven was identified as S-adenosyl-L-methionine synthetase.

**Key words:** PETA; 2-DE; MALDI-TOF-MS; cotton

收稿日期: 2007-04-20 作者简介: 张志刚(1976-), 男, 博士, zhangzhig@126.com; \* 通讯作者

基金项目: 国家 973 重点基础研究发展计划(No. 2003CB114204), 国家 863 重点基础研究发展计划(2003AA241130)

自 Eden 公司利用 *Ewinia amylovora* 中提取的 Harpin 蛋白激发子成功开发出 Messenger<sup>[1]</sup> 并用于多种病虫害的防治以来,激发子已成为抗病性研究的热点问题。国内外已有多人从多种病原菌中分离纯化出蛋白激发子,如从 *Phytophthora* spp. 和 *Pythium* spp. 中提取的 Elicitin<sup>[2]</sup>, 从 *P. boehmeriae* 中提取的 PB90<sup>[3]</sup> 等。Kanoh 等和 Schaffrath 等分别用稻瘟菌来源的糖蛋白激发子处理水稻叶片,发现可诱导叶片不同抗性反应的发生<sup>[4-5]</sup>。国内报告从稻瘟病菌细胞壁及培养滤液中获得的抽提物处理水稻,对水稻苯丙烷类途径酶类和绿原酸具有诱导作用<sup>[6]</sup>。相对而言,从真菌获得的纯化激发子与植物相互作用方面的研究很少,本研究室首次从葡萄孢菌(*Botrytis*)、细极链格孢菌(*Alternaria*)、黄曲霉菌(*Asporgillus*)等多种真菌中分离出的一类新型蛋白质,具有诱导植物抗性、提高植物免疫力的功能。不同来源的蛋白激发子在理化性质上略有差异,但生物活性相似或接近。本研究使用的细极链格孢菌蛋白激发子是从真菌细极链格孢菌中提取的蛋白激发子(protein elicitor from *Alternaria tenuissima*, PEAT)。核酸和氨基酸序列分析表明,PEAT 完全不同于过敏蛋白和隐地蛋白,专利号为 ZL011286660<sup>[7-9]</sup>。目前 PEAT 处理棉株后诱导机体蛋白应答的系统性研究还未见报导。

蛋白组学技术以双向电泳技术和质谱技术为核心,能把细胞或组织内的蛋白质进行最大限度的分离并进行鉴定,目前在国内外都有广泛的应用<sup>[10-11]</sup>。因此,本试验利用蛋白质双向电泳和 MALDI-TOF 质谱分析两种方法,主要是针对蛋白的提取,蛋白溶解液及等电聚焦条件进行了探索。并在此基础上对 PEAT 诱导条件下的棉叶全细胞蛋白质进行了双向电泳分析,以此研究 PEAT 作用前后蛋白质表达谱的变化,探讨 PEAT 对棉株诱导的应答系统,寻找与 PEAT 密切相关的差异表达蛋白质和基因,明确 PEAT 与受体棉花相互作用的分子基础及其信号转导途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试品种与材料

供试品种为转基因抗虫杂交棉湘杂棉 3 号; PEAT 粗提蛋白液的浓度为  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中,使用前配成  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.2 样品的处理

用  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PEAT 粗提蛋白液浸泡的棉花种子为处理组,用清水浸泡的棉花种子为对照组,处理 6 h;催芽 2 d 后,播种于营养钵中,每钵 2 株,以灭菌的草炭蛭石混合土为培养介质(草炭:蛭石=2:1),温度控制在  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,相对湿度控制在 70%~75% 之间。至棉花生长到子叶平展,再用  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PEAT1 粗提蛋白液喷雾处理组一次。同时用清水喷雾对照组一次,7 d 后,分别采集叶片,迅速置于液氮中,在  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.3 叶片全蛋白的制备

采用三氯乙酸/丙酮沉淀法提取并做如下修改<sup>[12-13]</sup>:取叶片 0.5 g 加 20 mg PVP 于液氮中研磨成粉末,将粉末悬浮于水化上样缓冲液中, $-20^\circ\text{C}$  沉淀过夜;室温溶解 15 min, $15^\circ\text{C}$  下  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 60 min,取上清,通过 Bradford 法测定总蛋白浓度,然后调整浓度一致,用于上样或  $-20^\circ\text{C}$  保存。

### 1.4 双向电泳

采用 Amersham Science 公司的等电聚焦仪 IPGphor,将电泳参数适当调整后进行棉叶蛋白质 2-DE。使用 13 cm 长度的 IPG 胶条,胶条 pH 范围为 3~9.5,采用胶内泡涨的方法等电聚焦、凝胶平衡、垂直 SDS 电泳。凝胶按常规考马斯亮蓝方法染色、脱色<sup>[14-15]</sup>。

### 1.5 图像获取分析

对原始图像进行一系列的加工和扫描之后,所得图谱借助图像分析软件 ImageMaster<sup>TM</sup> 2DPlatinum 进行蛋白点的检定、匹配和编辑,数据分析和输出。

### 1.6 质谱与生物信息学分析

将凝胶上的蛋白质差异点切下,送北京市农林科学院蛋白质工程实验室采用基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)进行肽质量指纹图谱分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花双向电泳技术体系建立

2.1.1 全蛋白提取方法的改进。采用三氯乙酸/丙酮沉淀法提取蛋白质。最初采用丙酮沉淀蛋白质的次数为 2 次且沉淀不过夜,但结果不太理想,有时会影响等电聚焦电泳,所以将丙酮沉淀蛋白质的次数增加为 3 次,并用冷丙酮再洗沉淀且第一次沉淀过夜,取得了较好的结果。试验还对

BIO-RAD Proteome Works™ System 中的水化上样缓冲液的配方进行了筛选,发现水化上样缓冲液 I (8 mol 尿素,4% CHAPS, DTT 65 mmol · L<sup>-1</sup>, 0.2%两性电解质)得到的蛋白浓度较高,且在进行第一向电泳时也可以达到高压聚焦的目的。同时,在本实验过程中发现高速长时间离心(15000 r · min<sup>-1</sup> 离心 1 h),可以把密度大的糖离至上清液的上层,所以选取提高离心速度增加离心时间的方法,并重复步骤 2 次,就可以把大部分的糖去除,得到满意结果。此外,制样时的离心温度也很关键。有文献报道离心温度为 4℃,但是在实验中发现 4℃离心后管壁有许多尿素结晶析出,因此,本实验将离心温度提高到 10~15℃,不再出现结晶。

**2.1.2 双向电泳条件的改进。**在第一向等电聚焦电泳中采用 pH 3~10,13 cm 胶条进行电泳。上样采用的是主动溶胀方法。研究发现,上样量过大或过小都影响聚焦效果,上样量过大或浓度过高,产生横向干扰;上样量过小,则点模糊不清甚至消失,从而影响到电泳结果分析的准确性,最后上样量确定为 280 μL。在聚焦过程中发现,当聚焦时间不够时,蛋白质没有完全聚焦,双向电泳图谱呈现水平条带状,蛋白质不能被分离成单个点;而过长时间的聚焦,蛋白质点产生水平拖尾和部分蛋白质点丢失,因此,本实验选用分步升压最后达到 8000 V 高压的聚焦方法。其中 S<sub>1</sub> 的水化时间最好为 15 h, S<sub>2</sub> 的除盐过程改为 3 h, S<sub>3</sub> 的除盐过程为 1 h; S<sub>4</sub> 的升压过程为 6 h 30 min, S<sub>5</sub> 的聚焦过程为 0.6 h,结果表明试验效果较好。

试验还对胶条平衡时间进行了探索。研究发现,聚焦时间太短,会导致水平和垂直条纹的出现,蛋白点分辨率低。过度聚焦会因为活性水转运而导致过多的水在 IPG 胶表面渗出而造成蛋白图谱变性,在胶条碱性端产生水平条纹以及蛋白丢失。最后定在第一步平衡时间为 20 min,第二步平衡时间为 15 min,经过第二向电泳,结果显示,蛋白质点的拖尾现象有明显改善,且蛋白损失也不是很严重。

在 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳中采用了低电流稳流电泳。且采用均一胶进行电泳。而将电泳步骤分为两步,第一步 15 mA 进行约 45 min,然后改为 35 mA 进行电泳,整个电泳时间约 6 h。

通过对双向电泳技术体系的摸索改进,获得了适用于棉花叶片蛋白质分析的一套技术体系。

采用三氯乙酸/冷丙酮(-20℃)沉淀法提取蛋白质。提取液为含 10%三氯乙酸和含 0.2% DTT 和 0.05%β-巯基乙醇的预冷丙酮。试验将冷丙酮沉淀的次数增至 3 次,采用 10~15℃下 15000 r · min<sup>-1</sup>离心 1 h。pH 3~10 的 13 cm IPG 胶条上样量为 280 μL,电泳过程为分步升压,其中 S<sub>1</sub> 的水化时间最好为 15 h, S<sub>2</sub> 的除盐过程改为 3 h, S<sub>3</sub> 的除盐过程为 1 h; S<sub>4</sub> 的升压过程为 6 h 30 min, S<sub>5</sub> 的聚焦过程为 0.6 h,最后聚焦总电压达到 8000 V 左右。平衡时间改进为第一步为 20 min、第二步为 15 min 的平衡程序。第二向 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳的最佳参数设置为稳流 15 mA 进行电泳 45 min,待样品完全跑出胶条,指示剂浓缩成一条线后,加大电流至 35 mA 直至电泳结束。

## 2.2 2-DE 图谱特征

诱导处理与对照同一样品在相同的条件下,双向凝胶电泳重复 3 次,经软件分析发现,同一样品的双向电泳图谱有很好的重复性,其总蛋白质的分布模式非常相似,保证 PEAT1 诱导处理的棉苗与正常棉苗蛋白质组成分析结果的可靠性。

处理的双向凝胶电泳图谱与对照的双向凝胶电泳图谱(图 1)。凝胶均为 13 cm×13 cm PAGE 胶,两块胶在同一电泳槽中同时电泳。结果发现,蛋白质分子质量在 10~100 kD 之间,等电点分布在 3~9 之间,酸性端蛋白质点的分布多于碱性端的分布。

## 2.3 软件输出结果

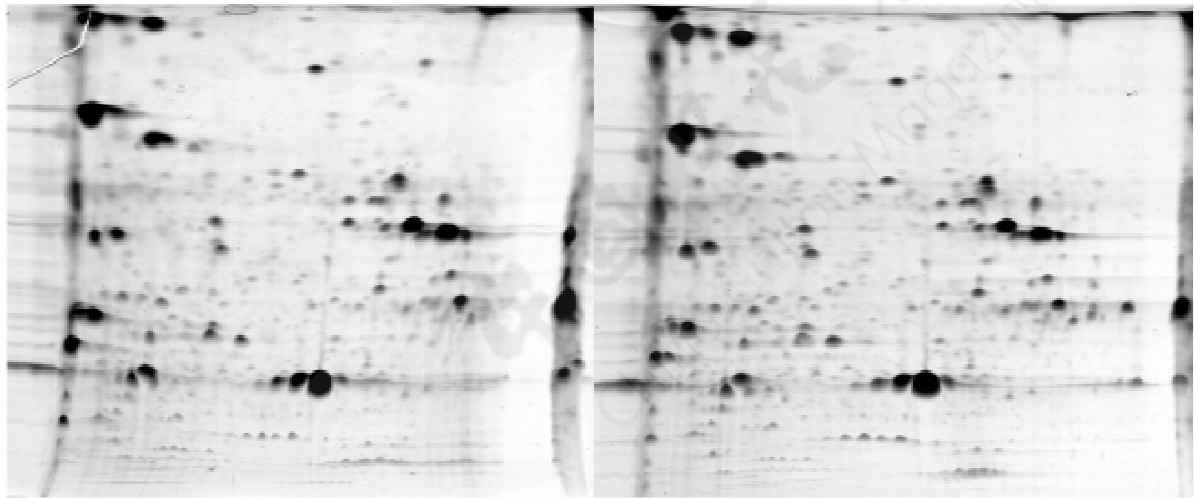
按照 ImageMaster™ 2DPlatinum 软件的操作说明,从中选取匹配率较高的 2 组双向电泳图谱进行分析。首先通过调整 Saliency、Smooth、Min Area 等一系列参数来检测并显示 2 组蛋白质表达谱中的所有蛋白质点。在相同条件下,识别的蛋白点数分别如下:CK-22 确定为(652±20)个,CK-11 确定为(585±25)个,t-11 确定为(614±28)个,t-33 确定为(578±30)个。而植物组织中实际的蛋白点要远多于这些,这主要与样品制备方法和胶的染色方法有关。蛋白质的种类很多,任何一种方法也不可能将所有的蛋白质全部提取出来。我们选择三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法是因为它能去除脂类、核酸、多糖等大分子,更重要的是它能有效去除样品制备过程中产生的盐及其它带电离子,它们都影响等电聚焦的效果,从而影响聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离。而考马斯

亮兰染色和银染色是蛋白质电泳凝胶两种最主要的染色方法。银染约比考马斯亮兰染色的灵敏度高出 100 倍,但在应用中显色太快,稳定性和重复性均不如考马斯亮兰染色。本实验选用考马斯亮兰染色(G250)获得了较好的双向电泳图谱。

凝胶上的蛋白点被检定之后,需要建立一个参照凝胶,再进行凝胶之间的比对。匹配组中包括一系列要进行质量和数量比较的凝胶,单一凝胶上独立的点能与参照凝胶上相应的点进行比较,每组中分别选择其中一块作为参照胶,进行匹配。对照组中选择 CK-22 图谱作为参照胶;诱导组中选择 t-33 图谱作为参照胶;两者匹配后再以对照组作为参照胶。其匹配结果通过搜索来自两张胶的 %Vol 之间的线性依赖关系分别得到了三

张散点图(图 2)。其结果为:对照组的匹配率为 82.78%,相关系数为 0.921;处理组的匹配率为 85.30%,相关系数为 0.950;而 2 组的匹配率为 77.61%,相关系数为 0.913。

通过 %Vol 之间的差异找到不同胶之间的蛋白表达水平的变化情况(上调蛋白还是下调蛋白)。通过软件分析,再结合肉眼观察设定 %Vol 域值为 2 所发现对照与处理图像中存在不少差异点,本试验大约得到了 53 个差异蛋白点,这些点可能就是有意义的功能蛋白质,也有可能是由于人为因素与软件分析造成的假差异蛋白点。其中有 31 个为上调蛋白,22 个为下调蛋白。最后,再经过目测与软件分析对比,选定了 7 个差异非常显著的上调蛋白点用于质谱分析。



处理

对照

图 1 处理组与对照组的 2-DE 图谱(处理为 CK-22,处理为 t-33)

Fig. 1 2-DE gel of the treatment and CK(the treatment: t-33; CK-22)

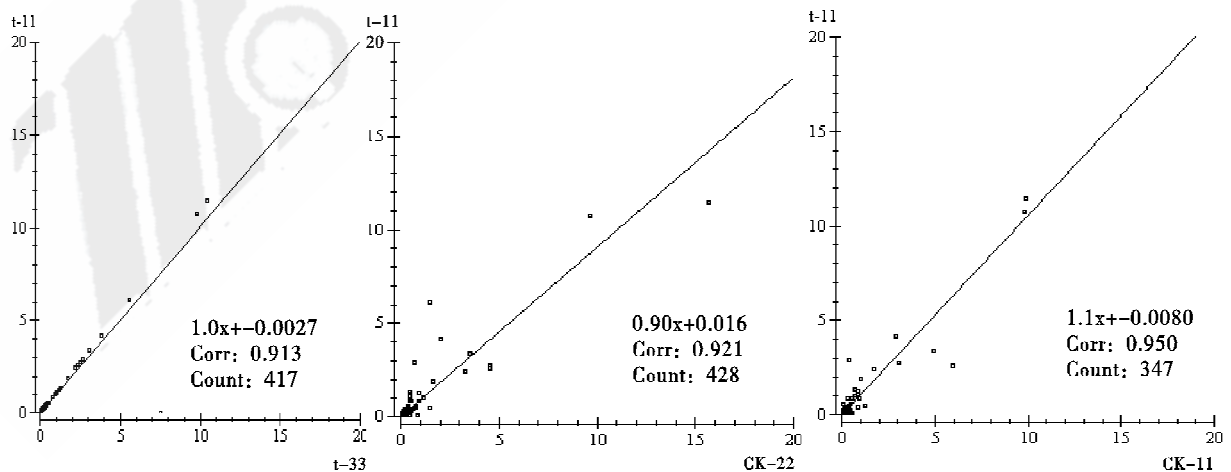


图 2 蛋白质的散点图(%Vol)

Fig. 2 Scatters plot of protein

## 2.4 差异表达蛋白质的 MALDI-TOF 质谱分析与鉴定

对 7 个差异蛋白质点进行 MALDI-TOF/MS 分析,获得了 4 个蛋白的肽质量指纹图谱。编号为 2、3、5 的蛋白质点可能由于丰度太低,或者由于样品制备过程中某些不可知因素没有检测到有

效峰或峰值数过底而未能得到肽质量指纹图谱。将所得的肽质量指纹图谱数据提交至 Mascot 网站,选用 MSDB、NCBI 和 SwissPort 数据库进行比对,得到差异蛋白的序列信息。共有 4 个蛋白质得到鉴定(表 1)。

表 1 MALDI-TOF-MS 鉴定棉苗经 PEAT1 诱导产生差异表达的蛋白质

Table 1 MALDI-TOF-MS identification of proteins with altered expression in cotton after PEAT1 treatment

蛋白点编号	基因登记号	同源基因编码的片段	得分	mass/z
GH-1	gi 22003612	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	55	49916
GH-2				
GH-3	gi 1352821	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplast precursor (RuBisCO small subunit)	87	20251
GH-4				
GH-5				
GH-6	gi 132167	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor (RuBisCO activase) (RA).	91	45011
GH-7	gi 13540318	S-adenosyl-L-methionine synthetase	2037	43109

## 3 结论与讨论

3.1 建立了一套适合棉花蛋白质双向电泳的技术体系,为今后深入研究棉花抗病机理提供了技术基础。

3.2 通过双向凝胶电泳软件分析,试验大约得到了 53 个差异蛋白点,其中有 31 个为上调蛋白,22 个为下调蛋白。选定了 7 个差异非常显著的上调蛋白点用于质谱分析,获得了 4 个蛋白的肽质量指纹图谱,经数据库检索鉴定分析,GH-1、GH-3、GH-6 推测为核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶基因簇,GH-7 推测为 S-腺苷-L-蛋氨酸合成酶。

GH-1、GH-3、GH-6 推测为 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphosphate carboxylase/oxygenase,简称 RubisCO)基因簇,其中,GH-1 推测该基因的大亚基,GH-3 推测为该基因的小亚基,GH-6 推测为该基因。而 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶是光合碳同化作用的关键酶,总共有 16 个亚基,其中 8 个大亚基含有催化位点,8 个小亚基是全酶活性所必需的。Rubisco 的大亚基由叶绿体基因编码,而小亚基则由核基因编码,在细胞质的游离核糖体上合成后被运送到叶绿体基质中。该酶催化光合作用的 CO<sub>2</sub> 固定的第一步反应,使 CO<sub>2</sub> 和二磷酸核酮糖(RuBP)转变成两个分子的 3-磷酸甘油酸;同时也催化光呼吸过程的第一步反应,即催化 O<sub>2</sub> 和 RuBP 产生一分子磷酸甘油酸和一分子磷酸乙醇

酸。因此,该酶是调节光合和光呼吸从而决定净光合的一个关键酶。此外,RubisCO 是植物可溶性蛋白中含量最高的蛋白质,占 50% 左右,它是植物体内的一种重要的储藏蛋白。因此,Rubisco 表达量的增加可以增强棉株的光合速率与外界光合作用有效辐射。分析其原因,PEAT 诱导刺激 Rubisco,可能是促进叶绿体基粒的形成,改善光合机构的自身运转平衡状况,延长了叶片的光合功能期,使光合速率维持在一个较高的水平。GH-7 推测为 S-腺苷-L-蛋氨酸合成酶。腺苷蛋氨酸(S-adenosyl-L-methionine,简称 SAME 或 Adomet),即 S-腺苷-L-蛋氨酸,又名腺苷甲硫氨酸,它是甲硫氨酸(Methionine, Met)的活性形式。在动植物体内广泛存在,它是由底物 L-甲硫氨酸和 ATP 经 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-Adenosyl-L-Methionine Synthetase,)酶促合成的,是一种生理活性物质。它作为甲基供体(转甲基作用)和生理性巯基化合物(如半胱氨酸、牛磺酸、谷胱甘肽和辅酶 A)的前体(转硫作用),参与体内重要的生化反应。

3.3 ImageMaster™ 2DPlatinum 软件要求将 2 组电泳图谱匹配比较,从成百上千个蛋白质点中找出表达有差异(包括有无差异和多少差异)的蛋白质来。尽管实验过程中尽可能地保证条件一致和操作同步,实验误差仍在所难免。同样的蛋白质点在不同的凝胶上位置很可能有稍许偏差,染色过程中一些因素还会导致出现伪蛋白点(非蛋

白质着色),软件对此一律识别为差异蛋白质。上述这些问题都需要手动添加,删除或分割。并且手工匹配也需要大量时间和精力,而且会导致错误匹配发生。因此,双向电泳软件分析的自动化程度还要提高,应向智能化方向发展。

#### 参考文献:

- [1] WEI Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*[J]. *Science*, 1992, 257(5066):85-88.
- [2] RICCI P, Bonnet P, Huet J C. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco[J]. *J Eur Biochem*, 1989, 183:555-563.
- [3] WANG Y C, Hu D W, Zhang Z G. Purification and immunocytolocalization of a novel *Phytophthora boehmeriae* protein inducing the hypersensitive response and systemic acquired resistance in tobacco and Chinese cabbage[J]. *Physiol & Mol Plant Pathol*, 2003, 63: 223-232.
- [4] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method after the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-252.
- [5] KANO H, Hega M, Sekizawa Y. Transmembrane signaling operated at rice blade cells stimulated by blast fungus elicitors I. Operation of the phospholipase C system [J]. *Pesticide Sci*, 1993, 18: 299-308.
- [6] BI Y M, Ouyang G C. Induction effects of elicitor from *Pyricularia oryzae* on enzymes of phenylpropane pathway and chlorogenic acid[J]. *Plant Physiol Commun*, 29(3):10-20.
- [7] 张志刚, 杨晓萍, 赵瑞元, 等. 交链孢菌蛋白激发子对棉子萌发及幼苗生长的影响[J]. *中国棉花*, 2007, 34(5):24-25.
- [8] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质: 中国, CN1344727A[P]. 2002.
- [9] 张志刚, 邱德文, 杨秀芬, 等. 细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉苗基因表达差减文库的构建及 EST 分析[J]. *棉花学报*, 2007, 19(4):248-254.
- [10] OFARRELL P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(10):4007-4020.
- [11] OFARRELL P Z, Goodman H M, O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins[J]. *Cell*, 1977, 12: 1133-1142.
- [12] 王雪, 马俊, 张桂寅, 等. 黄萎病菌胁迫条件下棉花叶片的蛋白质组分析[J]. *棉花学报*, 2007, 19(4): 273-278.
- [13] 贺力强. 双向电泳及其在水稻(*Oryza sativa* L.) 细胞质雄性不育相关蛋白质研究中的应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2001.
- [14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999:142.
- [15] 何瑞锋, 丁毅, 张剑锋, 等. 植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化[J]. *遗传*, 2000, 22(5): 319-321. ●