



适用于蛋白质双向电泳的棉花胚性 培养物蛋白质提取技术

曹景林, 朱龙付, 谭家福, 邓锋林, 李允静, 郝娟, 徐士成, 张献龙*
(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要:以陆地棉品种 Coker 201 为材料, 对与甲醇/醋酸铵丙酮沉淀结合的酚抽提法和裂解液配方进行了优化, 建立了适用于蛋白质双向电泳体系的棉花胚性培养物蛋白质样品制备技术。对胚性培养物, 通过添加 PVPP 研磨和丙酮、TCA/丙酮、甲醇/醋酸铵等有机溶剂的系列洗涤, 然后再进行酚抽提, 蛋白质质量得到显著改善, 获得的 2-DE 图谱质量高、可分辨的蛋白质点数多。比较分析 3 种裂解液对蛋白质的溶解效果发现, 在裂解液中混合采用 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素、 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲以及 4% CHAPS 是最有效的配方。

关键词:棉花; 胚性培养物; 蛋白质; 双向电泳

中图分类号: S562.035.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2009)01-0003-07

Protein Extraction from Embryogenic Cultures of Cotton for Two-dimensional Gel Electrophoresis

CAO Jing-lin, ZHU Long-fu, TAN Jia-fu, DENG Feng-lin, LI Yun-jing, HAO Juan, XU Shi-cheng, ZHANG Xian-long*

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: A new preparation protocol of protein extracts was established for 2-DE of embryogenic culture proteins of *Gossypium hirsutum*, cv. Coker 201, by optimizing a phenol extraction method combined with methanol/ammonium acetate precipitation and optimized lysis buffer. The protein extraction for 2-DE was remarkably improved by the combination of chemically and physically modified processes including polyvinylpyrrolidone (PVPP) addition, acetone cleaning and TCA/acetone washes followed by aqueous methanol/ammonium acetate and acetone lavation before phenol extraction. The protocol gave a higher protein yield and higher resolution and spot intensity in 2-DE analysis. Furthermore, three lysis buffers for 2-DE were compared on cotton embryogenic calli proteins isolation. Incorporation of chaotrope mixture ($7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ thiourea) with 4% CHAPS was found to be the most effective step.

Key words: cotton; embryogenic cultures; protein; two-dimensional gel electrophoresis

开展棉花体细胞胚胎发生的研究工作, 对于拓宽棉花种质资源和培育棉花品种具有重要意义^[1]。迄今关于棉花体细胞胚胎发生分子机制的研究仅见少量报道^[2]。近年来, 在拟南芥和其它

植物组织的研究中已经证实了蛋白质组学是研究植物发育分子机制的有力工具^[3-4], 目前已在棉花纤维发育^[5-7]、胚珠突变体^[5,8]等的研究中应用, 但在棉花体细胞胚胎发生上尚未见报道。蛋白质双

收稿日期: 2008-01-17

作者简介: 曹景林(1967-), 男, 在读博士, caojinglin660425@sohu.com; * 通讯作者, xlzhang@mail.hzau.edu.cn

基金项目: 教育部新世纪人才支持计划(NCET-04-0740)

向电泳是蛋白质组学研究中蛋白质分离的主要手段^[9]。然而,双向电泳所涉及的环节较多,尤其是棉花胚性培养物中含有大量的色素、多酚、醌、脂及其它多种次生代谢产物,用常规方法不易去除干净,对等电聚焦、SDS-PAGE 和凝胶染色的干扰较大,影响了蛋白质的分离效果^[7,10]。基于此,本文以陆地棉 Coker 201 胚性愈伤组织为材料,对蛋白质样品的制备方法进行了探讨,初步建立了以棉花胚性培养物为研究对象的蛋白质双向电泳技术体系。

1 材料和方法

1.1 供试材料及处理

陆地棉材料 Coker 201 的成熟种子经去壳消毒后,种植在 1/2MS 培养基上,于 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下暗培养 7 d 左右,获无菌苗。取无菌苗下胚轴切成 0.5 cm 左右的小段,平放于愈伤诱导培养基(MS 无机盐, B5 有机物, $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, 0.1% (W/V) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3% (W/V) glucose) 上。诱导 35 d 左右将愈伤组织转移到 2,4-D 减半的愈伤诱导培养基上继代培养。以后每 28 d 继代 1 次,直至愈伤组织发生胚分化。把胚性愈伤组织转入分化培养基(MS 无机盐(无 NH_4NO_3 而 KNO_3 加倍), B5 有机物, $2.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, $0.70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, 0.1% (W/V) Glu, 0.1% (W/V) Asn, 3% (W/V) glucose), 每 28 d 继代 1 次。愈伤的诱导和分化培养于 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度(冷光源) $135 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 每天光照 14 h 的条件下进行。所获得的胚性愈伤组织用于蛋白质的提取。

1.2 化学试剂

尿素、硫脲、十二烷基磺酸钠(SDS)均购自 Sigma 公司,二硫苏糖醇(DTT)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、IPG 缓冲液、标准蛋白质和线性 IPG 胶条(pH 3~10, 长 7 cm)均购自 Bio-Rad 公司,其余试剂为国产分析纯产品。所有溶液均用超纯水配制。

1.3 蛋白质的提取

比较了 4 种蛋白质提取方法。各方法均称取 0.1 g 胚性愈伤组织,加入 0.01 g PVPP,用液氮研磨成粉,并转入离心管中。

方法 A:参照 Ferguson 和 Turley^[6,8]的方法稍有改动。向胚性愈伤粉末中加入 0.5 mL 冷提取液($500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.65, 50

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 2% (V/V) β -巯基乙醇)和 0.5 mL Tris-HCl 饱和酚(pH 7.9)中,匀浆 1 min,然后于 4°C , $12000 \times g$ 离心 10 min。收集界面和酚相,加入 0.5 mL 冷提取液,匀浆 1 min, 4°C , $12000 \times g$ 离心 10 min,重复 3 次。收集最后 1 次萃取的界面和酚相,加入 5 倍以上体积的含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵的冷甲醇,混匀并于 -20°C 过夜。 4°C , $12000 \times g$ 离心 10 min 后将沉淀用含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵的冷甲醇洗 2 次, 80% 冷丙酮洗 2 次。 4°C 真空干燥后, -80°C 密封保存备用。

方法 B:首先采用 Yao 等^[7]的方法,将胚性愈伤粉末完全悬浮于 1 mL 冷丙酮中,匀浆 1 min 后于 4°C , $12000 \times g$ 离心 5 min。弃上清,沉淀用 1 mL 预冷丙酮再洗 1 次。将得到的沉淀冻干 30 min,然后采用方法 A 所述的酚抽提法提取蛋白。

方法 C:首先按方法 B,将胚性愈伤粉末用 1 mL 冷丙酮洗 2 次。再参照 Wang 等^[11]的方法,将沉淀重悬浮于 1 mL 含 10% TCA 的预冷丙酮中,彻底涡旋 1 min 后,于 4°C , $12000 \times g$ 离心 5 min。弃上清,将沉淀重悬浮于含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵的 80% 预冷甲醇中,充分混匀后于 4°C , $12000 \times g$ 离心 5 min。将得到的沉淀用 80% 预冷丙酮洗涤 1 次后冻干 30 min,然后采用方法 A 所述的酚抽提法提取蛋白。

方法 D:先参照 Wang 等^[10]的方法,将胚性愈伤粉末用 1 mL 冷丙酮洗 2 次后,再用 1 mL 含 10% TCA 的预冷丙酮洗 4 次,用 1 mL 10% TCA 溶液洗 2 次,用 1 mL 80% 冷丙酮洗 2 次。将得到的沉淀冻干 30 min,然后采用方法 A 所述的酚抽提法提取蛋白。

1.4 蛋白质的溶解

利用提取方法 C 所提取的蛋白质比较了 3 种有代表性的裂解液对样品的溶解效果。裂解液 A 为 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 2% (W/V) CHAPS, 0.3% (W/V) DTT, 0.5% (W/V) IPG buffer (pH 3~10)^[12]; 裂解液 B 为 $9.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 2% (W/V) CHAPS, 1% (W/V) DTT, 0.8% (W/V) IPG buffer (pH 3~10)^[13]; 裂解液 C 为 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% (W/V) CHAPS, 1% (W/V) DTT, 0.2% (W/V) IPG buffer (pH 3~10)^[7,14]。不同提取方法的 SDS-PAGE 和 2-DE 比较采用裂解液 C 溶解蛋白质。各蛋白质样品用 130 μL 裂解液溶解,室温下,反复涡旋和浸泡

1 h,使蛋白充分溶解。然后室温 $20000 \times g$,离心 20 min。收集上清,17 °C, $14000 \times g$ 再次离心 20 min。上清液即为蛋白质溶液,用于 2-DE 分析或 SDS-PAGE 分析。用改良的 Bradford 法^[15]分析蛋白浓度,以牛血清蛋白(BSA)绘制标准曲线定量蛋白。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)

采用 Laemmli 的方法^[16]在 Bio-Rad mini-Protean II 垂直板电泳槽上进行电泳。浓缩胶浓度为 4.5%,分离胶浓度为 12%,凝胶板厚为 1 mm。上样前,将蛋白质样品溶液按 1:1 (V/V) 的比例加入 $2 \times$ 上样缓冲液($125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% 甘油, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 0.1% 溴酚蓝), 37 °C 保温 6 h。每泳道上样体积 15 μL 。室温下,先恒压 50 V 电泳 1 h,然后恒压 150 V 电泳直到溴酚蓝到达分离胶底部边缘。各样品制备和 SDS-PAGE 重复 3 次。

1.6 双向电泳

选用 7 cm IPG 胶条(pH 3~10, NL), 各样品补加溴酚蓝(终浓度 0.001%)后,取 125 μL 上样。20 °C 下,将胶条水化 12 h,接着在 IPG phor 水平电泳仪(Bio-Rad, USA)中等电聚焦,程序如下: 250 V, 30 min; 500 V, 30 min; 4000 V, 3 h; 最后稳定在 4000 V 下进行直至达到 20 kVh。每根胶条限流 50 μA 。聚焦完成后,将聚焦好的胶条依次在含有 2% (W/V) DTT 和 2.5% (W/V) 碘乙酰胺的平衡液($6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 2% SDS, $375 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油)中各平衡 15 min。然后将胶条放置于垂直的 12% 的自制凝乳的顶端,加入分子质量标准蛋白,用封胶琼脂糖封固胶条后进行 SDS-PAGE 电泳。各样品制备和 2-DE 重复 3 次。

1.7 染色和图像扫描

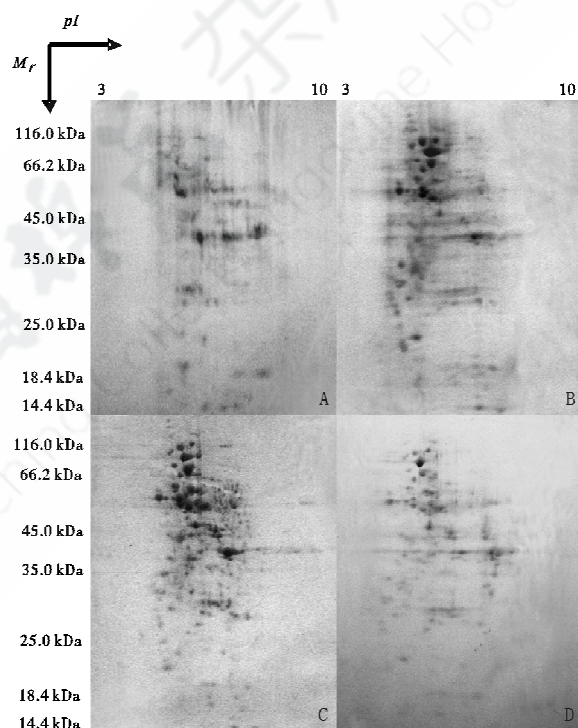
电泳结束后采用 Blue silver 法^[17]染色。用 UMAX Austra 5400 扫描凝胶。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的蛋白质的 2-DE 图谱的比较

蛋白质双向电泳和染色结果表明,利用 A 方法提取的蛋白质得到的 2-DE 图谱显示的蛋白质点很少,且有水平条纹(图 1-A)。方法 B 在对方法 A 改进后,在 2-DE 图谱中观察到的蛋白质点数比方法 A 的多,但蛋白质点总数依然偏少,而且图谱背景深,水平条纹也没有消除(图 1-B)。

方法 C 进一步改进了方法 B, 2-DE 图谱结果表明蛋白质点的数量得到显著提高,并且 2-DE 图谱无杂色背景和条纹(图 1-C)。因此,利用方法 C 提取的棉花愈伤蛋白质的纯度比方法 A 和 B 有大幅度的提高。方法 D 采用了更为复杂的步骤, 2-DE 图谱显示蛋白质点比方法 A 和 B 有所增加,而比方法 C 明显减少(图 1-D)。但基本无杂色背景,说明蛋白质纯度也较高。各方法所得蛋白质在等电聚焦过程中,方法 A 和 B 很难达到 4000 V 电压,而方法 C 和 D 则很容易达到 4000 V 电压,这也证实了方法 C 和方法 D 制备蛋白质样品纯度较好。



(A) 提取方法 A; (B) 提取方法 B; (C) 提取方法 C; (D) 提取方法 D; 将等量材料提取的蛋白质上样到 7 cm IPG 胶条(pH 3~10, NL), Blue silver 法染色。

图 1 4 种方法提取的棉花胚性培养物总蛋白质的 2-DE 图谱的比较

Fig. 1 Comparison of 2-DE patterns of embryogenic calli proteins extracted by different procedures on the basis of equal amounts of starting materials

2.2 4 种提取方法的总蛋白产量及其 SDS-PAGE 分析

各提取方法获得的蛋白质产量差异显著(表 1)。方法 A 所得蛋白质沉淀最多,但净蛋白质产量最低;方法 B 净蛋白质产量比方法 A 有所提高;方法 C 所获得的蛋白质沉淀量少,但净蛋白质产量最高;方法 D 与方法 C 的蛋白质沉淀量相

近,但净蛋白质产量明显降低,这可能与方法 D 中频繁采用 TCA 致使蛋白质不完全沉淀和再溶有关。SDS-PAGE 分析表明,方法 A 与其它 3 种方法相比,产生条带少或弱,尤其在 14.4~35.0 kDa 范围内的条带与其它方法差异明显(图 2-A);方法 B 产生的蛋白质条带略多于方法 A(图

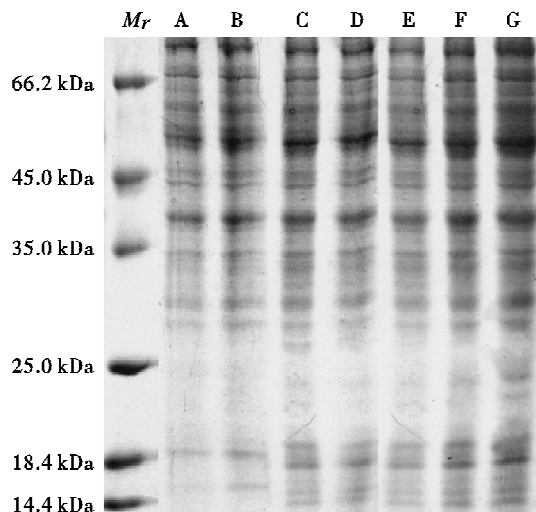
2-B);方法 C 产生了最广泛的蛋白质轮廓,蛋白质条带强而密集,尤其在 18.4~25.0 kDa 范围内有 2 条比其它方法明显的带(图 2-C);方法 D 产生的蛋白质条带比方法 C 弱而略少(图 2-D)。由此可见,蛋白质含量测定和 SDS-PAGE 分析结果与 2-DE 图谱显示出来的结果基本一致。

表 1 不同提取方法所得的棉花胚性愈伤组织蛋白质的产量和纯度

Table 1 The yields and purity of protein from cotton embryogenic calli by different extraction procedures

提取方法	愈伤组织蛋白质沉淀干重/(mg·g ⁻¹)	愈伤组织净蛋白质产量/(mg·g ⁻¹)	蛋白质纯度/%
A	4.2966±0.1146	1.8745±0.1037	43.63
B	3.9480±0.1647	2.0841±0.1745	52.79
C	3.7097±0.1659	3.1173±0.1503	84.03
D	3.5264±0.2007	2.5567±0.1946	72.50

注:数据为 3 次重复的平均值和相应的标准差。



A、B、C、D 泳道分别为提取方法 A、B、C、D 获得蛋白质的 SDS-PAGE 图谱; E、F、G 泳道分别为裂解液 A、B、C 溶解的蛋白质的 SDS-PAGE 图谱;各方法取 15 μ L 蛋白质样品溶液上样到 12% 聚丙烯酰胺凝胶上,Blue silver 法染色; M_r 为蛋白质分子质量标准。

图 2 不同提取方法和不同裂解液的棉花

胚性培养物总蛋白质的 SDS-PAGE 比较

Fig. 2 SDS-PAGE evaluation of proteins extracted from embryogenic calli of cotton with different protocols and resolved with different lysis buffer

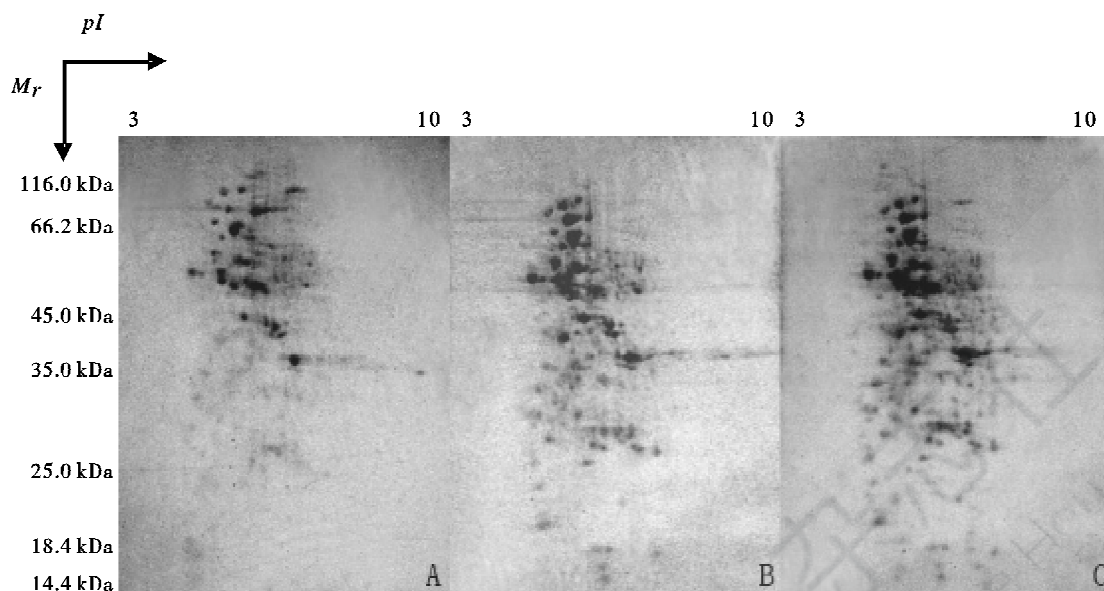
2.3 不同蛋白质裂解液的 SDS-PAGE 和 2-DE 图谱的比较

SDS-PAGE 分析和 2-DE 图谱分析表明,3 种裂解液对蛋白质样品的溶解效果差异明显(图 2、3)。裂解液 A 的 SDS-PAGE 结果显示的蛋白条带弱,尤其在 14.4~35.0 kDa 范围内的条带较少(图 2-E)。其 2-DE 图谱显示的蛋白质点数目也少,主要为分子量高于 35.0 kDa 的蛋白质,而低于 35.0 kDa 的蛋白质点较弱或不能显示(图 3-

A)。裂解液 B 对蛋白质的溶解能力比裂解液 A 有明显改善,SDS-PAGE 产生的蛋白质条带比裂解液 A 强而密集且较为广泛(图 2-F),同时 2-DE 图谱显示出的蛋白质点数目比裂解液 A 明显增多,尤其是分子量低于 35.0 kDa 的蛋白质点数目多且颜色深(图 3-B)。源于裂解液 C 的蛋白质在 SDS-PAGE 分析中产生的条带比其它两种裂解液多且强,尤其在 18.4~25.0 kDa 范围内有 2 条比其它裂解液明显的带(图 2-G),其 2-DE 图谱显示的蛋白质点也最为丰富、密集,蛋白质点数目比裂解液 A 增加约 1/3,比裂解液 B 增加约 1/5(图 3-C)。

3 结论和讨论

酚抽提法被广泛应用于含有较多干扰物质的组织材料的蛋白质抽提^[10]。但在酚抽提过程中,大多数水溶化合物如多糖、核酸等留在了水相中,多酚和脂质则能够与蛋白质共提取和共沉淀^[7]。多酚化合物的存在使 2-DE 图谱具有水平条纹,且容易异质化。胚性愈伤组织中存在的大量的油脂和蛋白质沉淀过程中引入的盐离子,也会干扰等电聚焦(IEF)。实验中发现,在样品研磨时加入 PVPP,能有效地吸附色素和多酚化合物。PVPP 的用量可根据样品的杂质含量和电泳中扩散的拖尾现象的轻重来调整,用量太少,干扰物质除不尽;反之则会造成蛋白质损失较多,一般以 10% PVPP 为宜。但只在研磨样品时加入 PVPP,而不用丙酮或甲醇洗涤样品,则所得蛋白质的量较低(表 1),2-DE 图谱的质量也很差,可以观察到的蛋白质点很少(图 1-A)。在方法 B 中样品处理增



(A)裂解液 A;(B)裂解液 B;(C)裂解液 C;将等量材料提取的蛋白质上样到 7 cm IPG 胶条(pH 3~10,NL),Blue silver 法染色。

图 3 3 种裂解液溶解的蛋白质的 2-DE 图谱比较

Fig. 3 Comparison of 2-DE patterns of proteins resolved by different lysis buffer on the basis of equal amounts of starting dry protein powder

加了冷丙酮洗涤步骤提高了蛋白质的质量,但其总体效果仍不理想。此外,针对方法 B 提取蛋白质时产量较少,利用 2% SDS 取代提取液中的 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA,以使蛋白质的溶解性能够增加,从而提高蛋白产量。但结果显示得到的 2-DE 图谱质量并没有得到改善,这一结果与 Yao 等^[7]报道的结果不同。TCA 和丙酮的结合通常用于沉淀蛋白质和双向电泳样品制备过程中去除干扰物质^[11]。在水果和蔬菜的生化分析中,甲醇溶液常用于提取酚类化合物^[18-19]。蛋白质提取方法 C 中将这些方法用于样品的预处理中,在采用 TCA/丙酮洗涤样品后接着采用含醋酸铵的甲醇溶液洗涤样品,不仅能进一步去除样品中残留的多酚、油脂和类油脂聚合物等干扰物质,而且能够压制残留的 TCA 以使 pH 值超过 7,便于随后用酚提取蛋白质。该处理使所得蛋白质的 2-DE 图谱显著地改善,显示出更多的蛋白质点(图 1-C),并且能获得较高的蛋白质产量(表 1)。为了进一步改善双向电泳的结果,我们在蛋白质提取程序中增加了蛋白质沉淀干燥前的 80% 丙酮洗涤次数,以去除样品中可能存在的油脂和蛋白质沉淀过程中引入的盐离子,但洗涤次数增多会造成蛋白质损失,一般以 2 次为宜。

蛋白质裂解液影响蛋白质样品中各种蛋白质

能否充分溶解,从而决定在 2-DE 胶上的分离效果。实验中,含高浓度尿素($9.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)配合高量 DTT(1%)的裂解液 B 对蛋白质的溶解效果比含中浓度尿素($8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的裂解液 A 得到改善,这可能是由于尿素诱导的变性暴露了蛋白质内部的不亲水残基,而 DTT 能还原二硫键以使蛋白质伸展,进而使去垢剂能够溶解蛋白质。因此,裂解液中使用高浓度的尿素配合高量还原剂 DTT,可能有利于棉花胚性愈伤组织总蛋白质的溶解。Valcu 等^[20]比较了分别含 $9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素、 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素/ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲和 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素/ $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲的 3 种裂解液,结果表明,硫脲的加入能明显改善裂解液的效果,而且硫脲加入引起的 2-DE 图谱的改善和裂解效率的提高不受去垢剂的影响。去垢剂也能很好地提高蛋白质的溶解性^[20]。目前在双向电泳技术中,两性离子去垢剂 CHAPS 是最广泛应用的去垢剂,一般以 2%~5% 浓度在 $8 \sim 9.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素溶液中使用。它结合了增溶剂和无电荷的优点,等电聚焦时能够均匀地分布于 pH 梯度^[20]。实验中裂解液 C 将裂解液 B 中的 $9.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素替换为 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素/ $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲,并将 CHAPS 的浓度在裂解液 B 的基础上加倍,同时略微降低了 IPG buffer(pH 3~10)的浓度^[14]。通过蛋白质定量和双向电泳分析表明,裂解液 C

能够更好地溶解棉花胚性愈伤组织总蛋白质,使蛋白质浓度明显提高。表明将硫脲与尿素配合使用,提高 CHAPS 的使用量,能够显著增强裂解液对蛋白质的溶解能力。

基于上述研究结果,初步建立了适用于蛋白质双向电泳体系的棉花胚性培养物总蛋白质提取技术,其基本流程如图 4 所示。

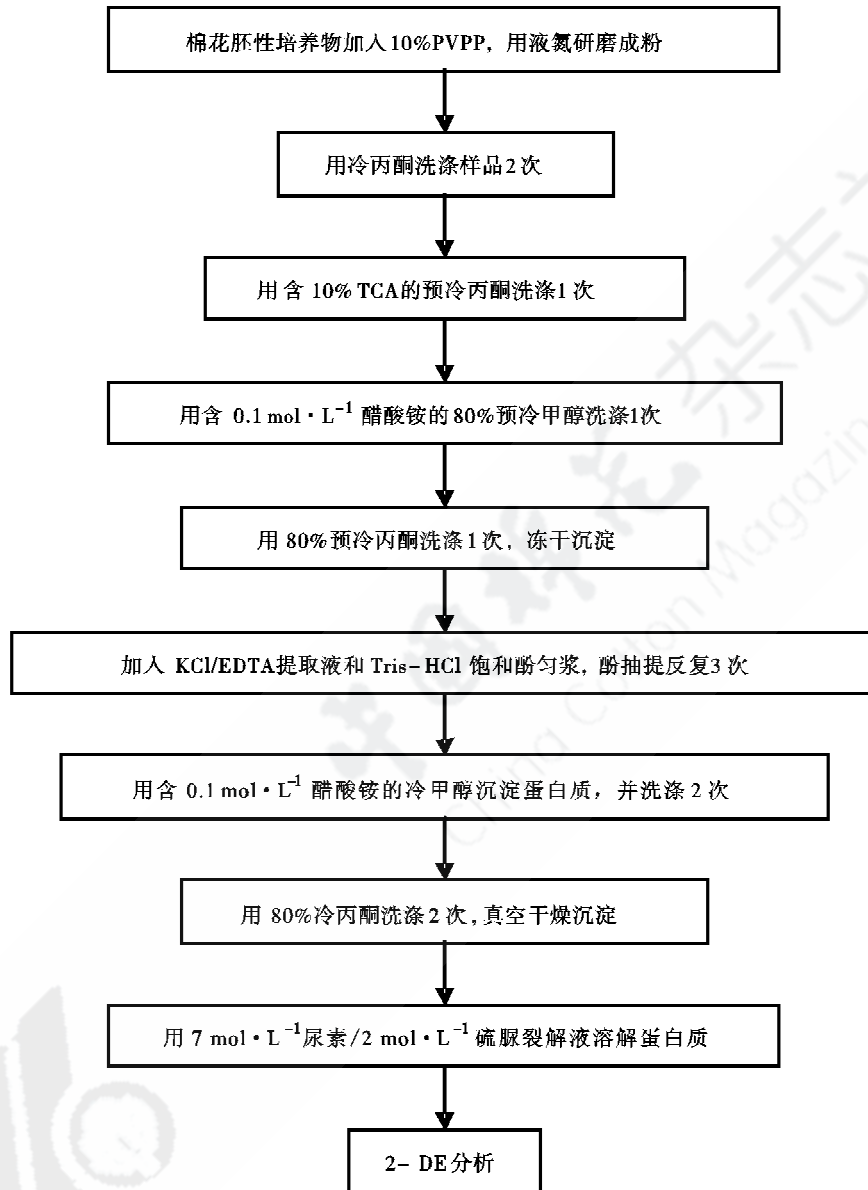


图 4 棉花胚性培养物蛋白质双向电泳样品制备流程

Fig. 4 Schematic diagram of protein sample preparation of cotton embryonic cultures for two-dimensional electrophoresis

参考文献:

- [1] 张献龙, 孙玉强, 吴家和, 等. 棉花细胞工程及新种质创造[J]. 棉花学报, 2004, 16(6): 368-373.
ZHANG Xian-long, Sun Yu-qiang, Wu Jia-he, et al. Cell engineering and new germplasm development in cotton[J]. Cotton Science, 2004, 16(6): 368-373.
- [2] 李惠英, 张献龙. 陆地棉体细胞胚胎发生过程中的 mRNA 差异显示分析[J]. 棉花学报, 2003, 15 (5): 264-268.
LI Hui-ying, Zhang Xian-long. mRNA differential display during somatic embryogenesis in upland cotton [J]. Cotton Science, 2003, 15 (5): 264-268.
- [3] ROSSIGNOL M, Peltier J B, Mock H P, et al. Plant proteome analysis: a 2004-2006 update [J]. Proteomics, 2006, 6: 5529-5548.
- [4] JORRIN J V, Maldonado A M, Castillejo M A. Plant

- proteome analysis: a 2006 update[J]. *Proteomics*, 2007, 7: 2917-2962.
- [5] 刘康, 胡凤萍, 张天真. 棉花胚珠与纤维蛋白质的两种提取方法比较研究[J]. *棉花学报*, 2005, 17(6): 323-327.
LIU Kang, Hu Feng-ping, Zhang Tian-zhen. Effect of two methods of protein extraction from cotton ovule and fiber[J]. *Cotton Science*, 2005, 17(6): 323-327.
- [6] FERGUSON D L, Turley R B. Comparison of protein profiles during cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber cell development with partial sequences of two proteins[J]. *Agricultural Food Chemistry*, 1996, 44: 4022-4027.
- [7] YAO Yuan, Yang Yi-wei, Liu Jin-yuan. An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2-DE [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27: 1-11.
- [8] TURLEY R B, Ferguson D L. Changes of ovule proteins during early fiber development in a normal and a fiberless line of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *J Plant Physiol*, 1996, 149: 695-702.
- [9] INAGAKI N, Katsuta K. Large gel two-dimensional electrophoresis: improving recovery of cellular proteome[J]. *Curr Proteomics*, 2004, 1: 35-39.
- [10] WANG Wei, Scali M, Vignani R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24: 2369-2375.
- [11] WANG Wei, Vignani R, Scali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis[J]. *Electrophoresis*, 2006, 27: 2782-2786.
- [12] JORGE I, Navarro R M, Lenz C, et al. The Holm Oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching [J]. *Proteomics*, 2005, 5: 222-234.
- [13] LEHESRANTA S J, Davies H V, Shepherd L V T, et al. Proteomic analysis of the potato tuber life cycle [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 6042-6052.
- [14] PEDRESCHI R, Vanstreels E, Carpentier S, et al. Proteomic analysis of core breakdown disorder in conference pears (*Pyrus communis* L.) [J]. *Proteomics*, 2007, 7: 2083-2099.
- [15] RAMAGLI L S, Rodríguez L V. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer[J]. *Electrophoresis*, 1985, 6: 559-563.
- [16] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [17] CANDIANO G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1327-1333.
- [18] HERTOOG M G L, Hollman P C H, Venema D P. Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in fruits and vegetables[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 1591-1598.
- [19] CROZIER A, Lean M E J, McDonald M S, et al. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 590-595.
- [20] VALCU C M, Schlink K. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 4166-4175. ●