

# 甘蓝柱头蛋白质双向电泳体系的建立

曾 静<sup>1</sup> 陈 松<sup>1</sup> 朱利泉<sup>1\*</sup> 高启国<sup>2\*</sup> 王小佳<sup>2</sup> 杨晓红<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西南大学农学与生物技术学院, 西南大学植物生理生物化学实验室, 重庆 400716; <sup>2</sup>西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715)

**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。为建立适合甘蓝柱头总蛋白质的双向电泳体系, 本试验以甘蓝柱头为材料, 采用改良 TCA/丙酮沉淀法提取柱头总蛋白质, 通过对 IPG 胶条、上样量、聚焦程序、SDS-PAGE 胶浓度等的优化, 建立了甘蓝柱头总蛋白质双向电泳体系, 即选用长 17 cm、pH 3~10 NL 的 IPG 胶条, 上样量 150  $\mu$ g, 按照聚焦程序 I 进行等电聚焦, 第二向 SDS-PAGE 胶浓度选用 12%, 得到了分辨率高、重复性好的双向电泳图片。

**关键词:** 甘蓝柱头; 自交不亲和; 蛋白质双向电泳

中图分类号: S635.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 ( 2012 ) 12-0030-07

## Establishment of Two-dimensional Electrophoresis System of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. Stigma Protein

ZENG Jing<sup>1</sup>, CHEN Song<sup>1</sup>, ZHU Li-quan<sup>1\*</sup>, GAO Qi-guo<sup>2\*</sup>, WANG Xiao-jia<sup>2</sup>, YANG Xiao-hong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Plant Physiology and Biochemistry Laboratory, Southwest University, Chongqing 400716, China; <sup>2</sup>College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** A two-dimensional electrophoresis (2-DE) has been widely applied in proteomics research. The purpose of this study was to establish a suitable 2-DE system for proteomic analysis of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. stigma. The stigmas being harvested one day before flowering was used in the experiment. We optimized the parameters of 2-DE including extraction methods, IPG strip, sample loading, isoelectric focusing conditions and SDS-PAGE gel concentration. The optimized system included the following steps: extracting the total proteins from *Brassica oleracea* stigma by TCA/acetone precipitation, separating the proteins with length 17 cm and pH 3-10 NL IPG strips, loading proteins samples of 150  $\mu$ g followed by isoelectric focusing program I, and selecting SDS-PAGE gel concentration at 12%. The 2-D images with good repeatability and high protein spot resolution were obtained.

收稿日期: 2011-12-02; 接受日期: 2012-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 ( 30900986, 31071802 ), 重庆市自然科学基金项目 ( 2009BB1298 ), 西南大学博士基金项目 ( SWUB2008042 ), 中央高校基本科研业务费专项 ( XDK2010B010 )

作者简介: 曾静, 女, 博士研究生, 专业方向: 植物信号传导, E-mail: dream.zeng@163.com; 陈松, 男, 硕士研究生, 专业方向: 植物信号传导, E-mail: msn\_signal@hotmail.com

\* 通讯作者 ( Corresponding authors ): 朱利泉, 教授, 博士生导师, 专业方向: 细胞的化学信号传导机理及其在植物发育调控中的应用, E-mail: zhuliquan@swu.edu.cn; 高启国, 副研究员, 硕士生导师, 专业方向: 蔬菜遗传育种与生物技术, E-mail: gaoqg2004031@163.com

**Key words:** *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. stigma; Self-incompatibility; Protein two-dimensional electrophoresis

自交不亲和性 (Self-incompatibility, SI) 是显花植物识别自花和异花花粉、防止近亲繁殖、保持遗传多样性的重要机制, 同时也为研究植物胞间信号传导提供了理想的模式系统 (Wheeler et al., 2010)。甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 等芸薹属植物属于典型的孢子体型自交不亲和, 现在一般认为, 花粉落到柱头以后, *S*-位点半胱氨酸富集蛋白 (*S*-locus cysteine-rich protein, SCR) 与 *S*-位点受体激酶 (*S*-locus receptor kinase, SRK) 胞外域识别 (Takasaki et al., 2000; Shiba, et al., 2001)。当两者单倍型一致时, SCR 与 SRK 胞外域结合并引起 SRK 构象的变化, 使其释放原本结合在 SRK 激酶结构域的一类硫氧还蛋白 1/2 (Thioredoxin-like protein 1/2, ThL1/2) (Cabrillac et al., 2001) 激活 SRK 激酶活性, 使其发生自动磷酸化, 随后 SRK 与臂重复蛋白 1 (Arm repeat containing 1, ARC1) 作用并使其磷酸化 (Stone et al., 1999), 进而通过一个未知的途径继续传导来自细胞外的信号, 并最终导致自花花粉萌发受阻。综合现有研究成果, 已知信号传导因子间的表达和作用机制尚不清楚, 自交不亲和信号传导下游因子的分离和鉴定更是鲜有报道 (Isokawa et al., 2010; Ivanov et al., 2010)。

蛋白质组学分析是后基因组时代分析生物学功能的重要手段。蛋白质双向电泳 (Two-dimensional Electrophoresis, 2-DE) 技术由于能够在一张胶上同时分离几千甚至上万个蛋白质点, 从而成为了蛋白质组学研究的主要支撑技术之一, 而建立一套重复性好、分辨率高的双向电泳体系是开展蛋白质组学分析的关键。目前该技术已在拟南芥 (Santoni et al., 1994; Tanaka et al., 2005) 等模式植物以及大豆 (Martin et al., 2005; 刘怀华 等, 2010) 等非模式植物中得到广泛应用。自交不亲和信号传导是由多蛋白质因子参与的过程, 然而目前还没有利用蛋白质组学研究技术探索甘蓝柱头自交不亲和信号因子表达作用机理和分离鉴定下游未知蛋白质因子的相关报道。为此, 本试验以甘蓝柱头为材料, 采用两种改良 TCA/丙酮法提取总蛋白质, 构建适合于甘蓝柱头蛋白质双向电泳体系, 为利用该电泳体系探索甘蓝自交不亲和信号传导机理, 完善自交不亲和信号传导通路奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取西南大学十字花科研究所实验室保存的结球甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 自交系 SH, 开花前一天取其柱头,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 1.2 蛋白质的提取

蛋白质提取方法一: 参考 Sheoran 等 (2006) 的方法, 略做改进。取  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存的样品, 液氮充分研磨。加入 1 mL 预冷的含 10% 三氯醋酸 (TCA)、1% DTT 的丙酮, 充分混匀后  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  沉淀 2 h。  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $25\ 000\times g$  离心 20 min, 弃上清液。加入 1 mL 预冷的含 1% DTT 的丙酮, 充分混匀后  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 1 h。  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $25\ 000\times g$  离心 20 min, 弃上清液, 重悬沉淀于预冷的丙酮中, 充分混匀后  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 2 h。  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $25\ 000\times g$  离心 20 min; 真空干燥。按照  $20\ \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$  的比例加入样品裂解液 [ $8\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素, 4% CHAPS,  $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT、0.2% 两性电解质 ( $\text{pH}\ 3\sim 10$ ), 蛋白酶抑制剂  $10\ \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ], 室温裂解样品干粉, 振荡混匀, 每 10 min 涡旋 1 次, 1 h 后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15\ 000\times g$  离心 25 min, 取上清液, 定量, 分装后  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

蛋白质提取方法二: 参考 Zou 等 (2009) 的方法, 略做改进。取  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存的样品, 液氮充分研磨。加入 1 mL 预冷的含 10% 三氯醋酸 (TCA)、0.07%  $\beta$ -巯基乙醇的丙酮, 充分混

匀后-20℃沉淀1h。4℃、15 000×g离心25min,弃上清液。加入1mL预冷的含0.07%β-巯基乙醇的丙酮充分混匀后-20℃放置1h。4℃、15 000×g离心25min,弃上清液,重复此步骤2次。真空干燥沉淀。按照20μL·mg<sup>-1</sup>的比例加入样品裂解液〔7mol·L<sup>-1</sup>尿素,2mol·L<sup>-1</sup>硫脲,4%CHAPS,50mmol·L<sup>-1</sup>二硫苏糖醇(DTT)、0.2%两性电解质(pH3~10),蛋白酶抑制剂10μL·mL<sup>-1</sup>〕,室温裂解样品干粉,振荡混匀,每10min涡旋1次,1h后4℃、15 000×g离心25min,取上清液,定量,分装后-80℃保存备用。

### 1.3 蛋白质定量

使用上海生工生物工程技术有限公司的蛋白质定量试剂盒(SK3031),按操作说明书进行,标准蛋白质为小牛血清。

### 1.4 蛋白质双向电泳

第一向等电聚焦(Isoelectric focusing, IEF)在Bio-Rad Protean IEF Cell等电聚焦仪上完成。参照Bio-Rad公司的双向电泳系统使用说明书,等电聚焦的样品通过水化上样方式加样。吸取一定体积的样品溶液,加入IEF上样缓冲液〔7mol·L<sup>-1</sup>尿素,2mol·L<sup>-1</sup>硫脲,4%CHAPS,65mmol·L<sup>-1</sup>DTT和0.2%两性电解质(pH3~10),0.001%溴酚蓝〕补足350μL,用Milli-Q水润湿滤纸片置于聚焦槽两端电极上,将样品沿着聚焦槽的边缘从左至右线性加入样品,去除IPG预制胶条上的保护层,轻轻将IPG预制胶面朝下置于聚焦槽中的样品溶液上,20℃被动水化1h后,再用石蜡油覆盖胶面,设定等电聚焦程序进行等电聚焦。

聚焦程序:长17cm的IPG胶条程序参考Bio-Rad蛋白质双向电泳实验操作手册设定,并做了一些修改,按50V12h,100V1h,200V1h,500V1h,1000V1h,3000V1h,5000V1h,8000V1h,10000V1h,10000V80000Vhs,500V1h(聚焦程序I);长11cm的IPG胶条聚焦程序按50V12h,100V1h,200V1h,500V1h,1000V1h,3000V1h,5000V1h,8000V1h,8000V60000Vhs,500V1h(聚焦程序II)进行聚焦。

聚焦结束后马上进行两步平衡。第一步:向平衡缓冲母液〔7mol·L<sup>-1</sup>尿素,2%SDS,0.375mol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl(pH8.8),20%甘油〕中加入2%DTT(即平衡缓冲液I),置于摇床上振荡15min,倒掉平衡缓冲液I。第二步:向平衡缓冲母液中加入2.5%碘乙酰胺(即平衡缓冲液II),置于摇床振荡15min后倒掉平衡缓冲液II。

第二向SDS-PAGE电泳采用Bio-Rad PROTEAN II xi Cell电泳仪进行分离,分离胶的浓度为12%,电泳参数为75V1h,100V,直至溴酚蓝线到达凝胶底部。电泳结束后马上染色,用固定液(50%甲醇,12%乙酸,500μL·L<sup>-1</sup>甲醛)固定1.5h,接着用清洗液(50%甲醇)清洗1.5h,然后用敏化液(0.1%硫代硫酸钠)敏化90s,Milli-Q水洗涤3次,每次20s,再用染色液(0.2%硝酸银,750μL·L<sup>-1</sup>甲醛)染色30min,Milli-Q水洗涤3次,每次20s,置于显色液(60%碳酸钠,500μL·L<sup>-1</sup>甲醛,0.0008%硫代硫酸钠)中显色直至达到满意颜色,最后置于终止液(50%甲醇,12%乙酸)中终止10min。

凝胶图像采集和分析采用MICROTEK MRS-9600TFU2,分辨率300dpi,并用PDQuest 8.0.1(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)软件对图像进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同胶浓度SDS-PAGE电泳结果比较

不同胶浓度SDS-PAGE对蛋白质的分离效果不同,为了获得较好的分离效果,在进行2-DE试验之前,分别选用10%、12%、15%3种胶浓度对甘蓝柱头总蛋白质进行SDS-PAGE电泳分析。当选用10%胶浓度时,只有将20kDa以下的低分子量蛋白质跑出胶后才能使大分子量蛋白

质获得较好的分离效果 (图 1-a); 选用 12% 胶浓度时, 不仅 20 kDa 以下的低分子量蛋白质都在胶上, 而且蛋白质相对分离效果较好 (图 1-b); 选用 15% 胶浓度时, 20 kDa 以下的低分子量蛋白质都在胶上, 但蛋白质相对靠得太近, 不能得到有效分离 (图 1-c)。

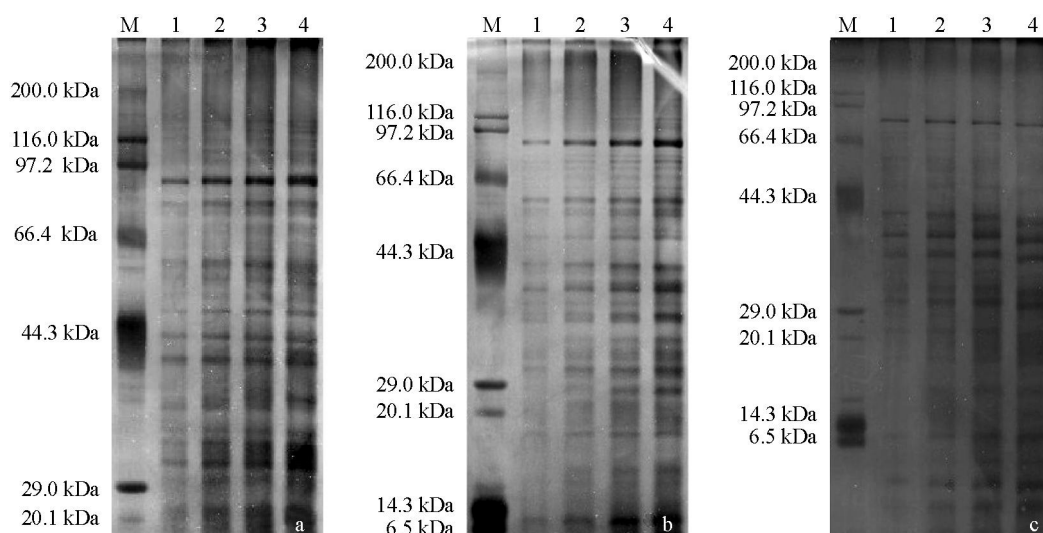


图 1 不同胶浓度 SDS-PAGE 电泳结果

a, 10% SDS-PAGE 胶浓度电泳结果; b, 12% SDS-PAGE 胶浓度电泳结果; c, 15% SDS-PAGE 胶浓度电泳结果; M, Marker; 1~4 泳道为蛋白质样品, 上样量依次为 0.5、1.0、2.0、3.0  $\mu$ L。

## 2.2 两种蛋白质提取方法所得到的 2-DE 结果比较

TCA/丙酮沉淀法是较为经典的蛋白质提取方法, 但为了得到高质量的蛋白质, 许多研究者都根据不同材料对这一方法进行了改进。本试验参考了两种 TCA/丙酮沉淀法提取甘蓝柱头总蛋白质。SDS-PAGE 电泳试验发现在上样体积一样的情况下, 第二种蛋白质提取方法得到的条带亮度要高于第一种方法, 经 Bradford 法定量也发现第二种方法得到的蛋白质浓度是第一种方法的两倍左右 (表 1)。

表 1 两种蛋白质提取方法所得到的 2-DE 结果比较

提取方法	第一次提取结果	第二次提取结果	第三次提取结果	平均提取结果 $\mu$ g $\cdot$ mL <sup>-1</sup>
第一种方法	684	645	511	613
第二种方法	1 554	1 366	1 028	1 316

不同蛋白质提取方法都会不同程度损失蛋白质。在用第一种蛋白质提取方法上样体积为第二种方法 2 倍的情况下, 第二种蛋白质提取方法获得的 2-DE 图谱经 PDQuest 8.0.1 软件分析, 得到 1 117 个蛋白质点 (图 2-b), 而利用第一种方法只得到 1 104 个蛋白质点 (图 2-a), 第二种方法获得的蛋白质点数多于第一种方法 (部分多出的蛋白质点在图 2-b B 框中用箭头表示)。此外, 从图 2 还可以看出, 第二种方法提取的部分蛋白质浓度大于第一种方法提取的蛋白质浓度 (部分浓度差异蛋白质点在图 2-b A 框中用箭头表示)。

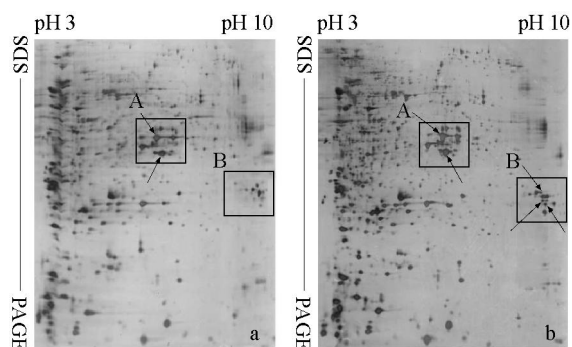


图 2 两种蛋白质提取方法 2-DE 电泳结果

a, 第一种蛋白质提取方法 2-DE 电泳结果; b, 第二种蛋白质提取方法 2-DE 电泳结果。

### 2.3 不同长度及 pH 范围 IPG 胶条 2-DE 电泳结果

为选择最适合甘蓝柱头总蛋白质分离的 IPG 胶条, 分别对长 11 cm、pH 3~10 NL, 长 11 cm、pH 4~7, 长 17 cm、pH 3~10 NL 3 种 IPG 胶条的分离效果进行比较。根据胶条的特点, 长 17 cm、pH 3~10 NL 的上样量选择 350  $\mu$ L 和聚焦程序 I; 而长 11 cm、pH 3~10 NL, 长 11 cm、pH 4~7 两种胶条上样量选择 150  $\mu$ L 和聚焦程序 II。

采用长 11 cm、pH 3~10 NL IPG 胶条的双向电泳结果显示, 甘蓝柱头总蛋白质主要分布在酸性至中性区域, 碱性端分布较少, 且蛋白质点聚集在一起, 没有得到有效分离。利用 PDQuest 8.0.1 软件对双向电泳图谱分析, 得到的蛋白质点为 1 014 个 (图 3-a)。

采用长 11 cm、pH 4~7 IPG 胶条分离所得到的蛋白质点在凝胶上分布比较均匀 (图 3-b), 分析得到蛋白质点 1 187 个。利用 pH 4~7 的胶条分离酸性至中性的蛋白质比用长 11 cm、pH 3~10 NL IPG 胶条效果要好, 表明窄 pH 梯度的 IPG 胶条极大地提高了蛋白质的分辨率, 但却丢失了碱性蛋白质。

当采用长 17 cm、pH 3~10 NL IPG 胶条时, 得到 2-DE 图谱蛋白质分离效果较长 11 cm、pH 3~10 NL IPG 胶条好, 能清晰的看到一个一个的蛋白质点, 且保留了碱性端的蛋白质 (图 4)。

以上结果表明, 甘蓝柱头总蛋白质主要是酸性及中性蛋白质, 碱性蛋白质较少。利用长 17 cm、pH 3~10 NL IPG 胶条在将酸性及中性蛋白质分离的同时, 也能分离碱性蛋白质。因此, 长 17 cm、pH 3~10 NL IPG 胶条最适合甘蓝柱头总蛋白质的分离。

### 2.4 不同聚焦功率对蛋白质双向电泳图谱的影响

等电点聚焦是最终影响 2-DE 图谱好坏的关键因素。聚焦不充分, 在 2-DE 图谱上呈现蛋白质点的横向条纹, 蛋白质分离不开; 聚焦时间较长会丢失蛋白质点, 影响结果的分析。虽然 Bio-Rad 操作手册上推荐长 17 cm IPG 胶条的总聚焦功率为 60 000 Vhs, 但实际操作表明, 即使总聚焦功率达到 70 000 Vhs 也不能使甘蓝柱头蛋白质充分的聚焦与分离; 而当总聚焦功率达到 80 000 Vhs 时蛋白质得到有效分离, 2-DE 图谱上的蛋白质点呈现圆形, 无横向拖尾, 适合于甘蓝柱头总蛋白质分离。

### 2.5 不同上样量对蛋白质电泳图谱的影响

在蛋白质双向电泳过程中, 上样量的多少也是决定 2-DE 电泳结果的主要因素, 上样量过大,

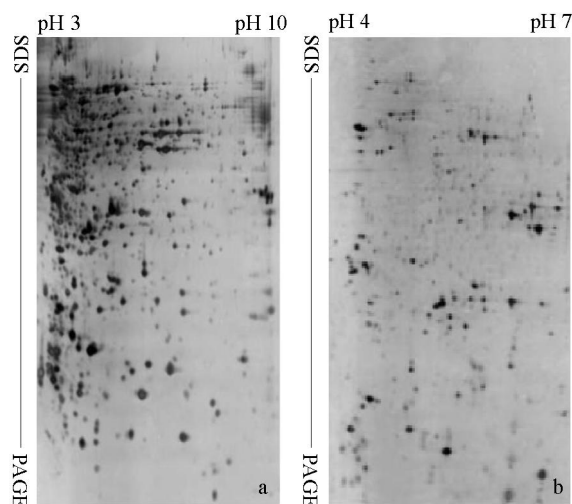


图 3 不同 IPG 胶条蛋白质 2-DE 电泳图谱

a, 长 11 cm、pH 3~10 NL IPG 胶条 2-DE 电泳结果; b, 长 11 cm、pH 4~7 IPG 胶条 2-DE 电泳结果。

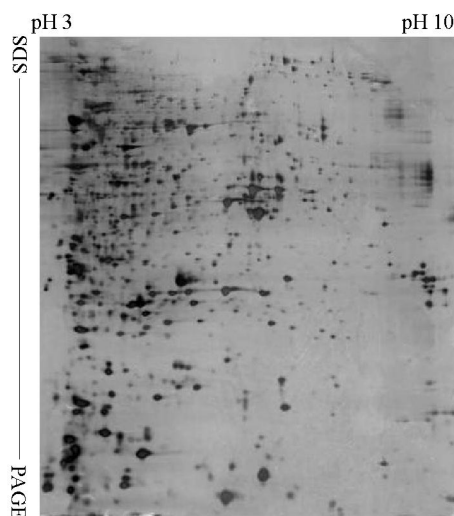


图 4 采用优化的双向电泳体系分离甘蓝柱头总蛋白质的双向电泳图谱

高丰度蛋白质质量过多, 染色后会在图谱上造成几个蛋白质点堆积在一起的现象, 蛋白质得不到有效分离。只有合适的上样量才能保证蛋白质点的有效分离, 得到较好的 2-DE 图谱。在利用银染的情况下, 当上样量为 180  $\mu\text{g}$  时, 虽然增加了酸性端低丰度蛋白质点的分辨率, 但是大部分高丰度蛋白质聚集在一起, 没有得到有效分离。当上样量为 150  $\mu\text{g}$  时, 虽然损失了部分低丰度蛋白质, 但是与 180  $\mu\text{g}$  相比较, 蛋白质点相对分离效果较好。

## 2.6 适合甘蓝柱头总蛋白质分离的双向电泳体系

通过对蛋白质提取方法、上样量、不同 pH 梯度的 IPG 胶条、等电聚焦参数的优化以及 SDS-PAGE 胶浓度的选择, 建立了一套重复性好、分辨率高的甘蓝柱头总蛋白质双向电泳体系。这几项因素的优化条件分别为: 采用第二种蛋白质提取方法, 选用长 17 cm、pH 3 ~ 10 NL 的 IPG 胶条, 150  $\mu\text{g}$  上样量, 二向 SDS-PAGE 胶浓度选用 12%, 聚焦程序 I, 银染法染色凝胶。优化双向电泳体系对甘蓝柱头蛋白质的双向电泳结果见图 4。

# 3 结论与讨论

## 3.1 不同蛋白质提取方法对双向电泳结果的影响

随着质谱技术的发展, 双向电泳技术已成为蛋白质组学和差异蛋白质分析的主要技术之一。本试验中需要对总蛋白质进行分离鉴定, 样品制备是影响 2-DE 结果好坏的关键因素之一。理想的样品制备, 应尽可能的含有较多的蛋白质种类、避免蛋白质损失与降解、保证样品最大程度溶解。相对于叶片、种子等而言, 柱头是较幼嫩的植物组织, 蛋白质含量较少。本试验采用了两种不同的改进 TCA/丙酮法提取甘蓝柱头总蛋白质。其中第一种蛋白质提取方法提取的总蛋白质量只有第二种方法的一半, 损失了大量蛋白质。此外, 从 2-DE 电泳结果来看, 第二种蛋白质提取方法得到的蛋白质点多于第一种方法, 故改进的 Zou 等 (2009) 蛋白质提取方法适用于甘蓝柱头总蛋白质的提取。

## 3.2 IPG 胶条对双向电泳结果的影响

IPG 胶条的选择需要根据样品中蛋白质的分布、目的蛋白质性质进行选择。同一样品采用不同 IPG 胶条分离, 得到的蛋白质点具有明显的差别。对于未知蛋白质分布特性的样品, 可以先选择宽范围 pH 梯度的 IPG 胶条, 再根据结果进一步调节 IPG 胶条 pH 范围及长度。本试验中, 在不清楚甘蓝柱头总蛋白质性质的情况下, 先采用了长 11 cm、pH 3 ~ 10 NL 宽范围的 IPG 胶条分离总蛋白质, 后又根据实际需要选择了长 17 cm、pH 3 ~ 10 NL 作为甘蓝柱头总蛋白质分析的 IPG 胶条。

## 3.3 双向电泳聚焦参数对双向电泳结果的影响

在蛋白质双向电泳试验中, 影响结果的另外一重要方面是等电聚焦 (IEF) 过程。等电聚焦是利用蛋白质分子等电点的不同, 在一个稳定、连续的 pH 梯度中进行蛋白质的分离。样品只有在进行充分的聚焦后才能得到较好的 2-DE 图谱, 聚焦时间过短, 2-DE 图谱会出现横向条纹, 蛋白质分离效果差; 聚焦时间过长, 会损失蛋白质点, 甚至出现烧胶的现象。

在试验过程中, 最常见的问题就是由于盐离子浓度较高而不能达到设定电压, 从而在胶图上造成横向条纹, 影响胶图质量。如果采用除盐步骤又会或多或少的损失蛋白质, 这样不利于蛋白质组学分析和低丰度新蛋白质的发现。在本试验中, 为了能达到设定的电压, 通过搭接盐桥、增加低电压步骤、延长除盐时间及采取分布升压的方式, 使蛋白质样品在等电聚焦过程中达到了预设的电压, 获得了较满意的 2-DE 图谱。另外, 在上样后先让胶条被动水化 1 h, 再加石蜡油覆盖胶条, 进行等电聚焦, 有利于胶条对样品的吸收。

## 3.4 上样量对双向电泳结果的影响

上样量大小直接影响双向电泳的分辨率和 2-DE 图谱的好坏, 上样量过低, 会损失低丰度

蛋白质;上样量过大,蛋白质分离效果较差。根据 Bio-Rad 操作说明,长 17 cm、pH 3~10 NL 的胶条若采用银染方式,蛋白质上样量不能超过 300  $\mu\text{g}$ ,不能低于 100  $\mu\text{g}$ 。但在实际操作过程中发现,上样量以 150  $\mu\text{g}$  为宜。上样量过低不能满足银染显色的要求,损失低丰度蛋白质;上样量过高蛋白质无法有效分离。

采用改进的 TCA/丙酮法提取甘蓝柱头总蛋白质,在采取增加低压除盐步骤和采取分步升压等方式下,使得在等电聚焦过程中,达到预设的高压,将甘蓝柱头蛋白质有效分离,得到重复性和分辨率都较好的双向电泳图谱,经 PDQuest 8.0.1 软件分析,有 1 117 个蛋白质点。说明所建立的体系适合于后期甘蓝柱头总蛋白质组学分析。

#### 参考文献

- 刘怀华,王莉雯,刘楠. 2010. 玉米花粉与花丝早期互作的蛋白质组学分析. 中国农业科学, 43 (24): 5000-5008.
- Cabrillac D, Cock J M, Dumas C, Gaudé T. 2001. The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat pollen. *Nature*, 410: 220-223.
- Isokawa S, Osaka M, Shirasawa A, Kikuta R, Komatsu S, Horisaki A, Niikura S, Takasa Y, Shiba H, Isogai A, Takayama S, Suzuki G, Suwabe K, Watanabe M. 2010. Novel self-incompatible lines of *Brassica rapa* L. isolated from the Japanese bulk-populations. *Genes Genet Syst*, 85: 87-96.
- Ivanov R, Fobis-Losiy I, Gaudé T. 2010. When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility. *Trends in Plant Science*, 15 (7): 387-394.
- Martin H, A Ganapathy, Joel W S, Jay J T. 2005. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiology*, 137: 1397-1419.
- Santoni V, Bellini C, Caboche M. 1994. Use of two-dimensional protein pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Planta*, 192 (4): 557-566.
- Sheoran I S, Sproule K A, Olson D J H, Ross A R S, Sawhney V K. 2006. Proteome profile and functional classification of proteins in *Arabidopsis thaliana* (Landsberg erecta) mature pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 19: 185-196.
- Shiba H, Takayama S, Iwano M, Shimamoto H, Funato M, Nakagawa T, Che F S, Suzuki G, Watanabe M, Hinata K, Isogai A. 2001. A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen *S*-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiology*, 125: 2095-2103.
- Stone S L, Amoldo M, Goring D R. 1999. A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science*, 286: 1729-1731.
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. 2000. The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 403: 913-916.
- Tanaka N, Mitsui S, Nobori H, Yanagi K, Komatsu S. 2005. Expression and function of proteins during development of the basal region in rice seedlings. *Mol Cell Proteomics*, 4 (6): 796-808.
- Wheeler M J, Franklin-Tong V E, Franklin F C H. 2001. The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytologist*, 151: 565-584.
- Zou Junjie, Song Lianfen, Zhang Wenzheng, Wang Yi, Ruan Songlin, Wu Wei-Hua. 2009. Comparative proteomic analysis of *Arabidopsis* mature pollen and germinated pollen. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51 (5): 438-455.