

文冠果枝条韧皮部蛋白质双向电泳体系的建立

刘昭军¹, 张 胜¹, 赵 忠^{1,2*}, 张博勇^{1,2}, 宗建伟¹

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 西部环境与生态教育部重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:以文冠果当年生硬枝韧皮部为材料,通过 TCA/丙酮法提取总蛋白,研究了不同的蛋白质裂解液组成对双向电泳的影响,并在胶条选择、蛋白质上样量和等电聚焦时间等方面进行了优化。结果表明, TCA/丙酮提取法适用于提取文冠果韧皮部组织总蛋白,得到的图谱背景低,蛋白质点清晰;样品溶解于含有尿素和硫脲的蛋白质裂解液 II 中,可显著地提高蛋白质的溶解性,获得的总蛋白溶液浓度远大于裂解液 I 提取的总蛋白溶液浓度。在适宜的时间范围用超声波破碎仪处理蛋白质粉溶液有助于大幅度提高裂解液中蛋白质的浓度。等电聚焦条件宜根据样品特性选择, 80 000 Vh 能够使得文冠果韧皮部蛋白质双向凝胶碱性端的横条纹大大减少。

关键词:文冠果;韧皮部;蛋白质提取方法;蛋白质裂解液;双向电泳技术

中图分类号:S 718.43

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2012)03-0055-07

Optimization of Two-dimensional Gel Electrophoresis for Proteome from the Phloem of *Xanthoceras sorbifolia*

LIU Zhao-jun¹, ZHANG Sheng¹, ZHAO Zhong^{1,2*}, ZHANG Bo-yong^{1,2}, ZONG Jian-wei¹

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Ministry of Education Key Laboratory of Environment and Ecology in Western China, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: TCA/Acetone was used for extracting total protein from the phloem of *Xanthoceras sorbifolia*. The effects of different lysis buffers on two-dimensional electrophoresis (2-DE) gels were compared, loading quantity of sample were primarily selected, types of strips and the time for isoelectric focusing were also optimized for the analysis of 2-DE system on the phloem. The results showed that TCA/Aceton is suitable for extracting total protein from the phloem. This method made low background and clearly protein spot on gels. Lysis buffer II significantly increased the protein solubility; this buffer dissolved higher amounts of total protein than lysis buffer I. Proper ultrasonic treatment in appropriate condition will significantly increase the concentration of protein solution. Isoelectric focusing conditions should be selected according to the sample characteristics, 80 000 Vh was enough for isoelectric focusing in order to reduce horizontal lines on alkaline side.

Key words: *Xanthoceras sorbifolia*; phloem; protein extraction method; protein lysis buffer; two-dimensional electrophoresis

聚丙烯酰胺凝胶双向电泳最先由 P. H. O' FARRELL^[1]提出。它作为最经典的蛋白质分离技术,经过 30 多 a 的不断改进,已成为蛋白质组学研究中的重要手段^[2],并不断在各领域取得进展^[3-5]。

目前,以拟南芥、水稻等模式植物为材料进行的蛋白质组学研究众多^[6-9],已成为植物发育生物学中的一个重要领域。文冠果是我国北方地区重要的生物能源树种^[10]。前人研究表明,文冠果存在“千花一果”的

收稿日期:2012-01-05 修回日期:2012-03-19

基金项目:国家自然科学基金(30671673);国家林业局林业科学技术推广项目([2011]36)。

作者简介:刘昭军,男,在读硕士,主要研究方向:蛋白质组学研究。E-mail:ljdeyouxiang@sina.com

* 通讯作者:赵忠,男,博士,教授,主要研究方向:森林培育理论与技术。E-mail:zhaozh@nwsuaf.edu.cn

现象,即花序繁华但结实率非常低(约 2%)^[11-12],这使得其实生苗的繁殖存在很大困难;文冠果自交授粉的果实无法发育成熟,只有杂交授粉的果实能够最终发育为成熟果实^[13],致使母株的优良性状无法通过种子得到保持,通过种子繁育其良种是不现实的。而文冠果属扦插难生根树种^[14-15],目前缺乏对文冠果扦插生根调控机理的研究,使得其快速育苗技术难有突破,成为制约其优良品系繁殖的瓶颈。本研究旨在通过蛋白质双向电泳技术,提取并分离文冠果插穗在不定根形成过程中的关键性蛋白质,从而探索制约文冠果不定根形成的生理生化机制,建立适用于文冠果韧皮部的双向电泳技术体系,为开展文冠果不定根形成机理的蛋白质组学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试文冠果枝条采自西北农林科技大学校园,于 2005 年种植。2011 年 7 月 25 日 09:00 时用修枝剪采集当年生硬枝。采后立即带回实验室,超纯水冲洗后,以干净的滤纸吸去多余水分,用洁净的手术刀刮去树皮取韧皮部,放置于预冷的研钵中研磨,研磨前加入适量酸洗后的石英砂及 20% 交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)^[16]。

1.2 仪器和试剂

PROTEAN IEF cell 等电聚焦系统(美国 Bio-Rad 公司),PROTEAN II xi Cell 垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),PowerLook 2100XL 扫描仪(美国 UMAX 公司);pH 3~10 及 pH 4~7 线性 17 cm IPG 干胶条购自 Bio-Rad 公司;pH 3~10、pH 4~6 及 pH 5~7 两性电解质购自 Pharmacia 公司;三氯乙酸(TCA)购自 Sigma 公司;交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)购自索莱宝公司;丙烯酰胺、N,N'-2 甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、低熔点琼脂糖、溴酚蓝、CHAPS、尿素、硫脲、Tris、甘氨酸、过硫酸铵(AP)、碘乙酰胺、硝酸银、TEMED 均为 Ameriso 公司进口分装试剂。其他试剂为国产分析纯。

1.3 总蛋白的提取

采用 TCA/丙酮法提取文冠果当年生硬枝韧皮部总蛋白:蛋白质提取参照 Damerval 等的方法^[17],略有改动。取新鲜刮取的文冠果韧皮部 2 g,加入 20% 的 PVPP 和适量酸洗过的石英砂,在液氮中迅速研磨成细粉。研磨好的细粉转移至离心管中,加入 20 mL 提前于 -20℃ 预冷的提取介质(10% TCA 和 0.07% β -巯基乙醇丙酮溶液),-20℃ 沉淀

2 h(或过夜);4℃,13 000 g 离心 30 min,弃上清,沉淀悬浮于 20 mL 提前于 -20℃ 预冷的丙酮溶液(含 0.07% β -巯基乙醇)中,-20℃ 沉淀 2 h,同上离心。重复洗涤沉淀 2~3 次至蛋白为纯白色,最后沉淀置于通风橱中常温下干燥。丙酮挥发完后分别加入裂解液 I 和裂解液 II。均于 27℃ 摇床中助溶 1 h,期间用漩涡振荡器振荡数次。

蛋白质裂解液 I:9 mol·L⁻¹ 尿素,4 % (W/V) CHAPS,65 mmol·L⁻¹ DTT,0.5 % (V/V) 载体两性电解质。蛋白质裂解液 II:7 mol·L⁻¹ 尿素,2 mol·L⁻¹ 硫脲,4 % (W/V) CHAPS,65 mmol·L⁻¹ DTT,0.5 % (V/V) 载体两性电解质。

分别采用蛋白质裂解液 I 和蛋白质裂解液 II 裂解 TCA/丙酮法提取的蛋白质粗粉。经标准曲线测定浓度之后,用超声波处理裂解效果好的裂解液 II 溶解的蛋白质。由于一定条件下,使用超声波破碎仪处理蛋白质溶液有助于提高蛋白质的溶解效果,故参考徐超^[18]等的研究,将超声波破碎频率设定为 30%,每超声 1 s 间歇 3 s,分别处理蛋白质溶液 12、24 min。

1.4 蛋白质浓度测定

参考 M. M. BRADFORD^[19] 的方法。用天根 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定样品蛋白质浓度,在 595 nm 处测定吸光度值。在 Excel 工作表中,以蛋白含量(μ g)为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标绘制标准曲线,依据标准曲线计算样品蛋白质浓度。

1.5 第一向等电聚焦电泳

采用 Protean IEF cell 等电聚焦系统(Bio-Rad)。主要参照伯乐双向电泳实验指南进行,取适量蛋白样品加水化上样缓冲液至总体积为 350 μ L,沿 IPG 胶条槽边缘缓慢均匀加入,将 IPG 胶条胶面朝下覆盖在样品上(注意避免产生气泡),在胶面上加 3 mL 矿物油,置于 Protean IEF Cell 型电泳仪上,20℃ 恒温下进行,以 50 V 低电压泡胀 14 h 后,按 250 V 进行 30 min,500 V 进行 1 h,1 000 V 进行 1 h,10 000 V 进行 5 h,最后稳压在 10 000 V 进行等电聚焦,总电压时间积为 80 000 Vh 时结束电泳。第一向等电聚焦结束后,将 IPG 胶条放于 5 mL 胶条平衡缓冲液 I [6 mol·L⁻¹ 尿素,2% (W/V) SDS,0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCL (pH 8.8),20% (V/V) 甘油,2% (W/V) DTT(现加)] 中振荡平衡 15 min,再转入 5 mL 胶条平衡缓冲液 II [6 mol·L⁻¹ 尿素,2% (W/V) SDS,0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCL (pH 8.8),20% (V/V) 甘油,2.5% (W/V) 碘乙酰胺(现加)] 中振荡平衡 15 min。

1.6 第二向 SDS-PAGE 电泳

使用 PROTE AN II xi Cell (Bio-Rad) 垂直电泳系统。平衡完毕后将胶条转移到 SDS-PAGE 凝胶上,用低熔点琼脂糖封胶后电泳,待溴酚蓝移至凝胶底部时停止电泳。电泳结束后,用硝酸银染色法染色^[20],将凝胶置于固定液[40%(V/V)乙醇,10%(V/V)冰乙酸]中固定 2 h;用超纯水迅速漂洗 1~2 次后置于敏化液中敏化 30 min[11.274%(W/V)三水合乙酸钠,0.314%(W/V)五水合硫代硫酸钠,0.05%戊二醛(现加)];用超纯水漂洗 3 次,每次 10 min;硝酸银染色[0.025%(W/V)硝酸银,0.04%甲醛(现加)]30 min;超纯水快速水洗 2 次;碳酸钠溶液[2.5%(W/V)碳酸钠,0.02%甲醛(现加)]中显色,直到蛋白点清晰为止。

1.7 图像扫描与分析

终止染色后的凝胶在 Powerlook 2100XL 型光密度扫描仪(Bio-Rad)上扫描照相,分辨率为 400 dpi。试验重复 3 次。用 PDQuest7.4 软件(Bio-Rad)对图像进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同裂解液及超声波处理对蛋白溶液浓度的影响

使用天根 Bradford 蛋白质定量试剂盒进行蛋白质定量,得到的标准曲线为 $Y = 0.0084X + 1.183$, $R^2 = 0.9971$,结果如图 1 所示。所得标准曲线相关系数较高,可以用于后续试验中总蛋白含量的测定。

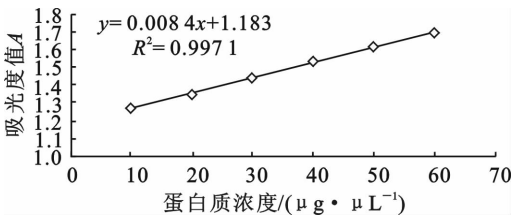


图 1 蛋白质浓度测定标准曲线

Fig.1 Standard curve of protein concentration

从图 1 可看出,以蛋白质裂解液 II 溶解的蛋白质浓度几乎是裂解液 I 所得浓度的 2 倍。故超声处理对象为裂解液 II 裂解所得的蛋白质溶液。由表 1 可知,短时间的超声波处理并未显著提高蛋白质浓度,但随着时间的提高,蛋白质浓度得到了较大的增长,24 min 处理的蛋白质浓度在 12 min 处理所得蛋白质浓度的基础上提高了 20% 以上。这可能是由于短时间的超声波处理不足以破碎大部分植物细胞壁,从而无法提高蛋白质溶液的浓度。以上比较分析表明,采用 TCA/丙酮法提取文冠果枝条韧皮部

组织中的蛋白,用蛋白质裂解液 II 溶解,辅以 30% 破碎功率的超声波,在超声 1 s 间歇 3 s 的条件下处理 24 min,可获较高浓度的文冠果韧皮部蛋白质溶液。

表 1 不同裂解液和超声波处理对文冠果韧皮部总蛋白浓度的影响

Table 1 Effects of different lysis buffers and ultrasonic treatments on the protein concentrations of the phloem

样品号	裂解方式	蛋白质浓度 (μg · μL ⁻¹)
1	裂解液 I	0.871
2	裂解液 II	1.382
3	裂解液 II 结合超声波处理 12 min	1.410
4	裂解液 II 结合超声波处理 24 min	1.723

2.2 IPG 胶条及等电聚焦时间的选择

以 pH 3~10 的 17 cm IPG 线性胶条分离文冠果韧皮部总蛋白(图 2)。图 2A 显示,文冠果韧皮部的蛋白质主要集中在 pH 4~7 的范围内。在 pH 4~7 窄范围的胶条上蛋白质得到了很好的展现(图 2B)。经 PDQuest 7.4 和人工查验,可识别(716±15)个蛋白质点。

参照伯乐(Bio-rad)蛋白组学技术实验指南及 N. MUTHREICH 和 P. MARGARIA 等的报道^[21-22],对 17 cm 的 IPG 胶条采用表 2 中 IEF 程序 I 的等点聚焦时间。从图 3A 可以看出,蛋白质在碱性端出现长短不等的横条纹。这是由于聚焦不完全,使得部分蛋白质在第二向电泳时在凝胶上产生了横向拖带。为此,在控制其他条件的情况下,将等点聚焦时间延长到 8 h(10 000 V · h⁻¹),使上样蛋白质得到充分的聚焦,程序如表 2 IEF 程序 II 所示。由图 3B 可看出,在原来基础上增加等点聚焦时间后,凝胶碱性端的横条纹几乎消失,而且整张图片的蛋白质点更圆润,分离效果更好。

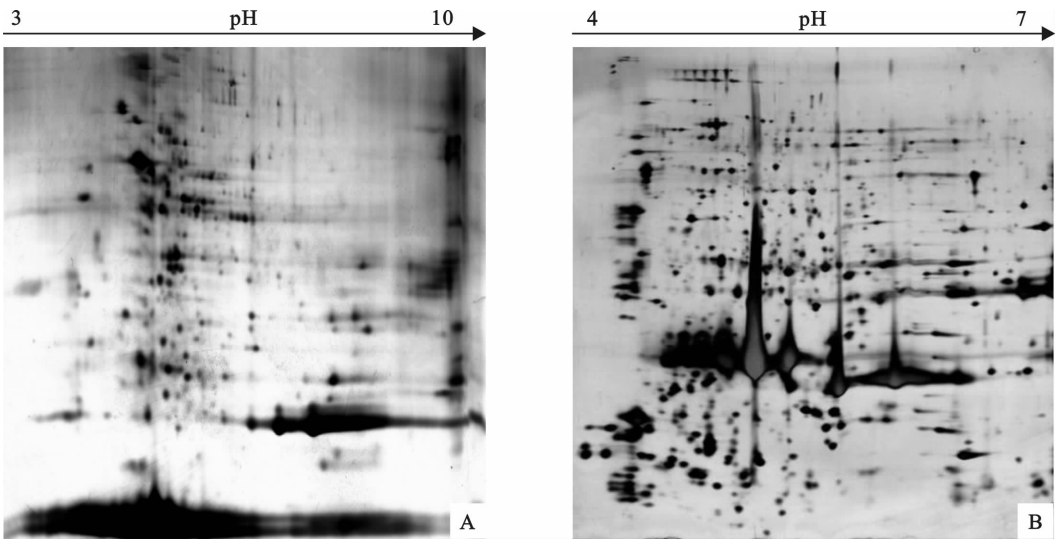
2.3 不同上样量对 2-DE 图谱的影响

以 TCA/丙酮法提取文冠果韧皮部总蛋白,裂解液 II 裂解蛋白,选用 17 cm、pH 4~7 IPG 胶条,分别取 120、180 μg 和 240 μg 蛋白样品进行双向电泳,结果图 4 中的 3D 立体模型经过位置旋转调整,以方便展示更多的蛋白质峰。图 4A 显示,在上样量为 120 μg 时,双向电泳图谱上蛋白点模糊不清,低丰度蛋白因不能被检测而丢失,影响了双向电泳的准确性和重复性。3D 模型显示由于上样量太低使得部分蛋白质峰值过小甚至被高丰度蛋白质掩盖从而可能导致后续结果不准确。图 4C 显示,在上样量为 240 μg 时,蛋白点数基本没有增加,但由于高丰度蛋白点过大,出现饱和重叠现象,掩盖了其周围的蛋白斑点,影响不同蛋白质点之间的分离。3D

模型显示,240 μg 的上样量使得等电点和分子量均相近的蛋白质融合为一个峰,这将极大地干扰后续质谱鉴定,导致质谱签定失败。同时,过高的上样量使得凝胶在碱性端出现了横条纹,影响后续取点。图 4B 显示,蛋白上样量为 180 μg 时,蛋白点清晰,无横条纹干扰,聚焦效果好,图谱质量最佳。3D 模型显示,180 μg 的上样量能够很好得展示蛋白质点,各峰之间相对独立,少有干扰,有利于后续的质谱鉴定。

表 2 2 种不同等电聚焦程序的设置
Table 2 Two different isoelectric focusing procedure

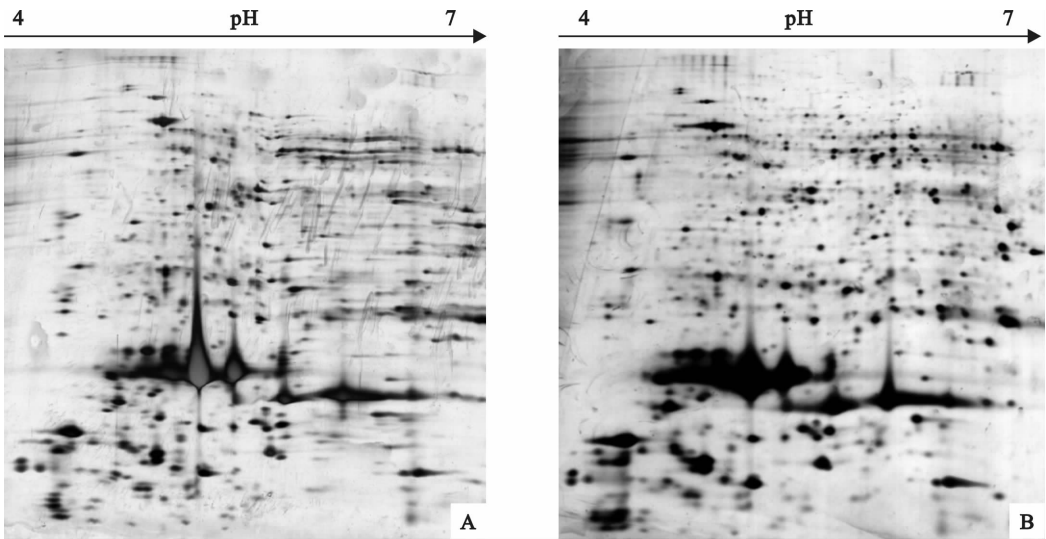
步骤	升压方式	IEF 程序 I		IEF 程序 II	
		电压/V	时间/h	电压/V	时间/h
S1	被动水化	50	14	50	14
S2	线性	250	0.5	250	0.5
S3	快速	1 000	1	1 000	1
S4	线性	10 000	5	10 000	5
S5	快速	10 000	6	10 000	8
S6	快速	500	任意	500	任意



注:胶条分别为 pH 3—10(A) 及 pH 4—7(B)。蛋白质由 TCA/丙酮法提取,上样量 180 μg ,体系 350 μL ,12%凝胶,银染。

图 2 不同线性 IPG 胶条对双向图谱的影响

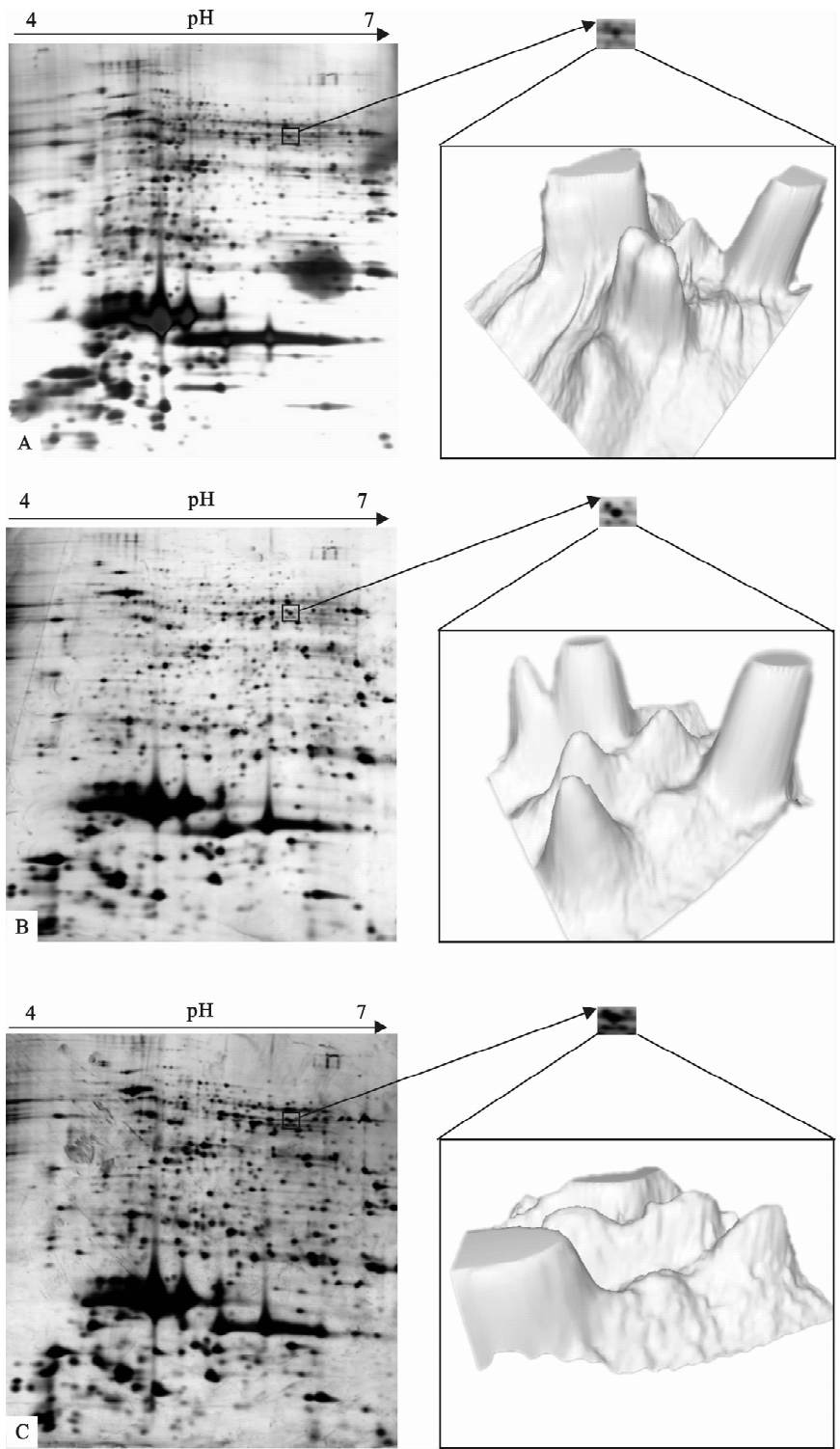
Fig. 2 2-DE maps by using linear IPG strip with pH 3—10(A) and pH 4—7(B) for IEF, followed by the electrophoresis of 12% SDS-PAGE and silver stained



等电聚焦时间为 60 000 Vh
等电聚焦时间为 80 000 Vh

图 3 不同等电聚焦时间对双向凝胶图谱的影响(胶浓度 12%,银染)

Fig. 3 2-DE patterns of the protein sample by using different isoelectric focusing Vh followed by the electrophoresis of 12% SDS-PAGE and silver stained



注: A:上样量 120 μg ; B:上样量 180 μg ; C:上样量 240 μg 。
图 4 12%胶浓度及银染条件下,不同上样量对双向电泳图谱质量的影响
Fig. 4 Effect of sample volume on two-dimensional electrophoresis

3 结论与讨论

高质量的 2-DE 图谱是对蛋白质进行质谱分析的决定性条件。在双向电泳凝胶图谱上尽可能多地展现所研究组织的蛋白质,有利于全面了解蛋白质间的相互作用关系,而凝胶上蛋白质分离的效果直接影响质谱鉴定的结果。因此,针对某一研究材料

进行细致的双向电泳条件优化是非常必要的。植物样品中次生代谢产物较多,而枝条韧皮部中大量纤维素的存在还使得蛋白质含量相对较少,这都增加了研究的难度。本研究以 TCA/丙酮法提取蛋白,经双向电泳分析,所得的 2-DE 胶图谱蛋白点圆润清晰,凝胶背景几乎无云状干扰,无横竖条纹,表明 TCA/丙酮法适合于文冠果韧皮部蛋白的

提取。由于植物组织双向电泳经常受色素、酚类、醌类等次生代谢物质的干扰,可通过在研磨的过程中加入适量 PVPP 用于吸附文冠果韧皮部组织中的次生代谢产物。另外,加入酸洗过的石英砂也可保证样品在液氮中的充分研磨。在蛋白质提取过程中要适时加入液氮再研磨,维持低温环境,可以有效避免造成蛋白质的降解与修饰。

样品制备是双向电泳成功的关键。操作中除了需要尽可能地避免蛋白质的损失与降解,还应当使研磨后的蛋白质粗提物处于最大程度的溶解状态,以保证第二向能够展现更多的蛋白质,因此,选择适宜的蛋白质裂解方法尤其重要。裂解液中硫脲的使用可提高一些疏水性蛋白质的溶解性能,特别是膜蛋白的溶解性,但由于其不溶于水的特性,在使用时需与高浓度的尿素联用。本研究通过蛋白质定量,发现硫脲和尿素联用,可大大增加蛋白质的溶解性,效果远好于单独使用尿素,表现在 2 种裂解液提取的蛋白质的浓度相差几乎为 2 倍。在本试验中,pH 4~6 和 pH 5~7 2 种两性电解质按 1:1 比例加入,使蛋白质在 pH 4~7 等电点范围内重叠,增加了蛋白质的溶解性,使得蛋白质点更分散更丰富,提高了双向凝胶电泳图谱的分辨率。超声处理能够较好地促进蛋白溶解,但必须通过预试验筛选适宜的超声处理的强度和持续时间。如果强度过小且超声时间短,达不到充分裂解蛋白质的目的;而强度过大持续时间过长,则可能会导致蛋白质降解。为防止蛋白质降解,应将盛样品的离心管放在冰盒中后再超声处理,而且两次处理之间必须有合适的低温静置时间,防止超声处理产热过高而导致蛋白质降解。

采用窄范围的 IPG 胶条对样品蛋白进行分离,可以提高蛋白质在第二向的分辨率,从而提高凝胶上所检测到的蛋白质点数^[23-24],但必然会造成不在该 pH 值范围内的蛋白质的损失。本研究首先采用 17 cm、pH 3~10 的线性胶条对文冠果当年生硬枝韧皮部蛋白质进行分离,发现大部分蛋白质集中在 pH 4~7 的范围内,再改用 pH 4~7 范围的线性胶条进行双向电泳分离,大幅度提高了此区域蛋白质的分辨率,同时,也使得尽量多的蛋白质得到了展现。

适宜的上样量在双向电泳中是非常重要的,合理应用能够使双向凝胶尽量在蛋白质点数量的增加和凝胶图片质量的保证之间取得平衡,从而直接影响了图谱的质量和结果的可靠性。而蛋白质上样量,不仅与 IPG 胶条的长度、pH 值范围有关,同时也与蛋白质染色方法有关。本研究采用硝酸银染色法染色,其检测灵敏度高,上样量小,弥补了植物韧

皮部蛋白质含量稀少的缺陷,同时稍做改动又能与质谱兼容^[25]。在选用 17 cm、pH 4~7 IPG 胶条,采用该种蛋白质染色方法后,通过分析比较,在蛋白质上样量为 180 μg 时,就能获得很好的 2-DE 图谱效果,胶背景干净,少有横、纵条纹,得到的蛋白质点圆润。另外,通过观察凝胶 3 D 模型中蛋白质峰值的分布也有利于更加直观、细致地分析蛋白质点的分离情况,效果优于二维观察。

参考文献:

[1] O'FARRELL P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. Journal of Biological Chemistry, 1975,250(10):4007-4021.

[2] TYER M, MANN M. From genomics to proteomics[J]. Nature, 2003,422(6928):193-197.

[3] LA FUENTE M D, BORRAJO A, BERM DEZ J, et al. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds[J]. Journal of Proteomics, 2011, 262-267.

[4] SARA R, MARIA G EI, SIROOS M, et al. The influence of temperature on plant development in a vernalization-requiring winter wheat: A 2-DE based proteomic investigation[J]. Journal of Proteomics, 2011, 643-659.

[5] SHAN X Y, WANG J X, CHUA L L, et al. The role of *Arabidopsis* rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence [J]. Plant Physiology, 2011, 155(2):751-764.

[6] SEMANEA B, JOKED, ANNC, et al. Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(4): 247-254.

[7] WIENKOOP S, BAGINSKY S, WECKWERTH W. *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research[J]. Journal of Proteomics, 2010, 37(11): 2239-2248.

[8] AGRAWA G K, RAKWAL L. Rice proteomics: a move toward expanded proteome coverage to comparative and functional proteomics uncovers the mysteries of rice and plant biology[J]. Proteomics, 2011, 11(9): 1630-1649.

[9] HWANG H, CHO M H, HAHN B S, et al. Proteomic identification of rhythmic proteins in rice seedlings[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1814(4): 470-479.

[10] 李云. 我国林业生物质能源林基地建设问题的思考与前瞻 [J]. 林业资源管理, 2008(3):12-15, 20.

LI Y. Thoughts and prospect on forestry biological energy base development in China[J]. Forest Resources Management, 2008(3): 12-15, 20. (in Chinese)

[11] 马利苹, 王力华, 阴黎明, 等. 乌丹地区文冠果生物学特性及物候观测[J]. 应用生态学报, 2008, 19(12): 2583-2587.

MA L P, WANG L H, YIN L M, et al. Biology and phenology of *Xanthoceras sorbifolia* in Wudan area[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(12): 2583-2587. (in Chinese)

[12] 高述民, 马凯, 杜希华, 等. 文冠果(*Xanthoceras sorbifolia*)研究进展[J]. 植物学通报, 2002, 19(3): 296-301.

GAO S M, MA K, DU X H, et al. Advances in research on *Xanthoceras sorbifolia* [J]. Chinese Bulletin of Botany,

2002,19(3):296-301. (in Chinese)

[13] 周庆源,傅德志. 文冠果生殖生物学的初步研究[J]. 林业科学,2010,46(1):158-162.
ZHOU Q Y, FU D Z. Preliminary studies on the reproductive biology of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2010, 46(1): 158-162. (in Chinese).

[14] 王涛. 绿色植物生长调节剂应用技术论文集(第 4 集) [C]. 北京:北京科学技术出版社,2001:21-24.

[15] 牟洪香,侯新村. 文冠果的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007, 35(3):703-705.
MOU H X, HOU X C. Advances in research on *Xanthoceras sorbifolia* Bunge[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2007,35(3):703-705. (in Chinese)

[16] ISAACSON T, DAMASCENO C MB, SARAVANAN R S, *et al.* Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues[J]. Nature Protocols, 2006,1(2): 769-774.

[17] DAMERVAL C, VIENNE D D, ZIVY M, *et al.* Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seeding proteins [J]. Electrophoresis, 1986, 7(1):52-54.

[18] 徐超,吴小芹,林司曦,等. 马尾松根部蛋白双向电泳分离体系的构建[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2011,35(1): 15-18.
XU C, WU X Q, LIN S X, *et al.* Establishment of two-dimensional gel electrophoresis system for analyzing the root protein of *Pinus massoniana*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2011,35(1):15-18. (in Chinese)

[19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal. Biochem. , 1976 (72):248-254.

[20] WESTERMEIER R, NAVEN T. Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis [M]. Weinheim: WILEYVCH Verlag GmbH, 2002.

[21] MUTHREICH N, SCHÜTZENMEISTER A, SCHÜTZ W, *et al.* Regulation of the maize (*Zea mays* L.) embryo proteome by RTCS which controls seminal root initiation[J]. European Journal of Cell Biology, 2010,89(2-3): 242-249.

[22] MARGARIA P, PALMANO S. Response of the *Vitis vinifera* L. cv. ‘Nebbiolo’ proteome to ‘Flavescence dorée’ phytoplasma infection[J]. Proteomics, 2011,11(2): 212-224.

[23] GÈRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, *et al.* Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures[J]. Electrophoresis,1999,20(4-5):712-717.

[24] GÖRG A, POSTEL W, GÜNTHER S, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000(21): 1037-1053.

[25] SINHA P, POLAND J, SCHNOLZER M, *et al.* A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis[J]. Proteomics, 2001(1): 835-840.

(上接第 47 页)

[11] 刘秀英,熊建立,林辉. 基于高光谱特征参数的樟树叶绿素含量的估算模型研究[J]. 广东农业科学, 2011(5): 1-4.
LIU X Y, XIONG J L, LIN H, *et al.* Study on modeling chlorophyll content of camphor by characteristic variables of hyperspectra [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011 (5): 1-4. (in Chinese)

[12] 刘璇,林辉,臧卓,等. 杉木叶绿素 a 含量与高光谱数据相关性分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(5): 72-76.
LIU X, LIN H, ZANG Z, *et al.* Study on correlation between chlorophyll-l a and hyperspectral data of *Cunninghamia lanceolata* [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2010, 30(5): 72-76. (in Chinese)

[13] 张连蓬,柳钦火,王德高,等. 高光谱遥感植被指数的普适性分析[J]. 测绘通报, 2010(9): 1-4.
ZHANG L P, LIU Q H, WANG D G, *et al.* The universal analysis of vegetation indices for hyperspectral remote sensing data [J]. Bulletin of Surveying and Mapping, 2010(9): 1-4. (in Chinese)

[14] 赵世杰,史国安,董新纯,等. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业科学技术出版社. 2002:56-57.

[15] 苏金明,傅荣华,周建斌,等. 统计软件 spss 系列-应用实战篇[M]. 北京:电子工业出版社,2002:281-285.