

葡萄叶片蛋白质双向电泳技术体系的建立

张玉洁, 张军科, 罗世杏

(西北农林科技大学 园艺学院 农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室 陕西 杨凌 712100)

摘要: 现对葡萄叶片中总蛋白质的双向电泳技术体系进行了初步探讨, 比较了不同等电聚焦程序、不同 pH 胶条以及不同 SDS-PAGE 凝胶浓度的双向电泳效果。结果表明: 葡萄叶片蛋白质使用等电聚焦程序 B, pH 范围为 4~7 的胶条和 12% 的 SDS-PAGE 凝胶可以得到较为理想的双向电泳分析结果; 采用 7 cm 胶条最大可以分离出 143 个有效蛋白质点。

关键词: 葡萄; 蛋白质组; 双向电泳

中图分类号: S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0147-05

蛋白质组(Proteome)是指基因组表达的全部蛋白质及其存在方式^[1]。蛋白质是生命的本质, 活细胞的生命状态受许多因素的影响而发生改变, 细胞内蛋白质在质或量上的变化是细胞或植物产生表型差异的直接原因。基因组和基因表达研究试图建立起细胞或植物外在表型与基因组成和表达水平的联系, 然后由于生物的基因组及其表达调控的复杂性, 基因组成和表达水平表达差异并不能代表细胞中蛋白质组的差异, 因而基因组水平或是转录水平上差异都不足以对个体之间以及个体在不同环境条件下的表型差异进行准确的描述。采用蛋白质组分析方法, 可以建立起蛋白质组和生物表型之间的直接关系, 确定在这种表型变化的过程中, 究竟有哪些蛋白质在表达、其表达量如何、以及有没有翻译后修饰等特征。近年来, 蛋白质组学研究技术和蛋白质信息学取得了长足发展并在基础研究领域被广泛采用。蛋白质组学的关键技术包括蛋白质分离技术、蛋白质测序技术和蛋白质结构和功能的生物信息学分析技术。在蛋白质组学研究中作为蛋白质分离技术之一的双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)的灵敏度和分辨率不断得到提高, 最高可达到每次双向电泳可获得 11 000 个蛋白质点的分辨率^[2], 为蛋白质组学的高通量分析奠定了方法基础。

双向电泳第一向即第一步称作等电聚焦(Isoelectric focusing, IEF), 这一步的原理是将蛋白质根据 pH 梯度

分离至各自的等电点, 通过蛋白质所带电荷的多少来分离蛋白质; 第二步是将相等等电点的蛋白质在 SDS-PAGE 凝胶上电泳分离, 分离的依据是相等等电点的蛋白质其分子量大小不同, 从而将其在与第一向垂直的方向上分离^[3]。

葡萄白粉病[*Uncinula necator* (Schw.) Burr] 是葡萄的真菌病害之一, 其分布几乎遍布全世界所有的葡萄产区^[4-5]。在我国, 尤其华北地区的河北、山东、西北地区陕西的秦岭北麓等葡萄产区受害最为严重^[6]。发掘我国葡萄抗白粉病基因资源并用来进行抗病育种是解决欧洲葡萄抗病问题的有效途径, 分离葡萄抗白粉病基因并利用转基因育种是抗病育种的最有效的方法之一。确认抗病基因的功能并分离抗病基因是抗病基因工程育种的关键步骤, 目前抗病基因资源的分离和鉴定主要采用田间调查法、PCR 和 RT-PCR 法、图位克隆等方法, 但这些方法由于获得的基因其功能很难确定, 且不能直接解释抗病的机理和原因。蛋白质组比较研究不仅可以直接查找与抗病有关的蛋白质, 易于进一步获得抗病的直接相关基因, 是确认抗病蛋白及抗病基因功能的新技术。

目前, 关于葡萄蛋白质组学研究的报道较为鲜见, 由于实验需求的不同及样品本身的特殊性, 需要通过大量试验来摸索其适宜的双向电泳条件。因此, 该研究以人工接种白粉菌的葡萄叶片为试材, 通过比较不同等电聚焦程序、不同 pH 梯度范围的 IPG 胶条和不同浓度的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳的双向电泳分离效果, 初步探索了适用于葡萄叶片蛋白质组研究的双向电泳研究技术, 以期后续研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料 材料来自西北农林科技大学园艺场的葡

第一作者简介: 张玉洁(1984), 女, 河南新乡人, 在读硕士, 现主要从事果树生物技术研究工作。

通讯作者: 张军科(1969), 男, 甘肃灵台人, 博士, 副教授, 现主要从事果树生物技术研究工作。

基金项目: 陕西省重大攻关资助项目(2006KZ05-G5)。

收稿日期: 2010-04-06

萄种资源圃。在抗病葡萄白河-35-1与佳里酿杂交F1代6-12-4植株新梢上部接种白粉菌,于接种2 d后采摘。用锡箔纸包好,放入液氮中速冻,带回实验室,放入超低温冰箱保存。

1.1.2 试剂 交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、 β -巯基乙醇、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、过硫酸铵、四甲基乙二胺、考马斯亮蓝R-250和G-250购自Amresco;尿素、硫脲、甘氨酸、3-(3-(胆酰氨基丙基)二甲氨基)丙磺酸盐(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺购自Fluka;其余试剂为国产分析纯产品,所有溶液均用双蒸水配制。pH 4~7、3~10线性7 cm IPG干胶条、载体两性电解质、矿物油、低熔点琼脂糖封胶液购自美国伯乐(Bio-Rad)公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总蛋白的制备方法 参考丁坤善等^[7]的方法,并略有改动:加入30 mL蛋白质提取液[含10%(W/V)三氯乙酸、2%(V/V) β -巯基乙醇的预冷丙酮]到50 mL的离心管中;液氮迅速研磨0.5 g样品,研磨时加入0.1 g PVPP,将样品转移至加好蛋白质提取缓冲液的离心管中, -20℃沉淀过夜,4℃,12 000 r/min离心20 min,弃上清液,沉淀加含0.2%(V/V) β -巯基乙醇的预冷丙酮并涡旋混匀, -20℃悬浮2 h,4℃12 000 r/min离心20 min,弃去上清液,用-20℃预冷丙酮先沉淀3次,操作过程中应尽量保持低温,以防蛋白质降解, -20℃挥发丙酮,自然干燥成蛋白质粉末待用。

1.2.2 蛋白的溶解与浓度测定方法 蛋白质干粉转入1.5 mL离心管中,按1 mg蛋白质干粉加入20 μ L水化上样缓冲液[7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4%(W/V)CHAPS、65 mmol/L DTT、0.2%(V/V)载体两性电解质]溶解蛋白质干粉,涡旋振荡,放入-20℃沉淀1 h。然后13 000 r/min,4℃离心30 min,上清液为所需的蛋白质溶液,少量分装, -80℃保存。用Bradford检测法制作蛋白质标准曲线^[8],然后计算出所提取的蛋白质样品浓度。定量后,按照相同蛋白质上样量进行蛋白质双向电泳。

1.2.3 等电聚焦方法 首先在聚焦盘样品槽的电极丝上搭盐桥,取含蛋白质300 μ g的样品(总体积不超过150 μ L)加入1.5 μ L 1%的溴酚蓝混匀,沿聚焦盘样品槽内壁连续均匀加入聚焦盘样品槽。将7 cm IPG线性胶条胶面朝下覆盖在样品上,放置1 h后,加1.5 mL矿物油覆盖样品和胶条,然后进行等电聚焦。第一向等电聚焦电泳结束后,将IPG胶条转入水化盘,每根胶条加2 mL平衡缓冲液I[其中含6 mol/L的尿素、2%(W/V)的SDS、0.375 mol/L pH 8.8的Tris-Cl、20%(V/V)的

甘油、2%(W/V)的DTT(现用现加)],缓慢平摇15 min。按每根胶条2 mL更换平衡缓冲液II[其中含6 mol/L的尿素、2%(W/V)的SDS、0.375 mol/L pH 8.8的Tris-Cl、20%(V/V)的甘油、2.5%(W/V)的碘乙酰胺(现用现加)],缓慢平摇15 min,中和平衡缓冲液I中过量的DTT,使等电聚焦电泳分离的蛋白质保持还原状态并固定在各自等电点位置。

1.2.4 等电聚焦程序 设A、B 2种程序处理。A处理:17℃下恒温进行,50 V主动水化14 h,250 V除盐30 min,500 V除盐30 min,4 000 V升压3 h,4 000 V下聚焦20 000 Vh,最后500 V保持,每根胶条极限电流为30 μ A。B处理:将程序A中500 V除盐时间改为1 h,4 000 V升压时间改为4 h,其余步骤相同。

1.2.5 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法 将平衡后的胶条两端各剪去约2 mm,胶面向上,置于承载第二向电泳SDS-聚丙烯酰胺凝胶的长玻璃板上,在凝胶顶部加入500 μ L低熔点琼脂糖封胶液,然后用镊子轻推胶条的塑料支撑膜,至胶条与SDS-PAGE凝胶紧密接触。在电泳槽加适量电泳缓冲液,先用80 V电压进行电泳,当样品指示剂到达凝胶界面并浓缩成一条线后,再加大电压到120 V,待指示剂到达凝胶底部边缘时停止电泳。

1.2.6 凝胶染色与结果分析 双向电泳结束后,用考马斯亮蓝R-250染色液进行染色^[9],脱色后的凝胶在Powerlook 2100XL型光密度扫描仪扫描,分辨率600 dpi(dot per inch)^[10],最后用PDQuest 8.0.1软件进行蛋白质点分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄叶片蛋白质双向电泳等电聚焦程序的优化

将处理好的葡萄6-12-4的叶片蛋白质样品加入聚焦槽中,采用pH 4~7,7 cm IPG线性干胶条,分别按程序A、B进行等电聚焦,然后使用10%的SDS-PAGE凝胶进行第二向电泳,观察了2个不同的等电聚焦程序对双向电泳图谱的影响,所得结果如图1-A、图1-B所示。经软件分析,图1-A中共得到67个蛋白质点,图1-B共得到83个蛋白质点,后者比前者多出16个蛋白质点,说明等电聚焦程序B更有利于蛋白质点的分离。

进一步对比分析程序A和程序B,程序B比程序A第二步的除盐时间多了30 min,有助于进一步去除样品中对蛋白质分离和鉴定有影响的盐离子;在进行等电聚焦时,程序B升压时间为4 h,程序A为3 h,经观察发现,程序B可以在设定时间内达到设定的聚焦电压而程序A在设定的时间内不能达到预期的聚焦电压,说明程序A升压时间不足。由此可见,程序B优于程序A的主要原因是除盐较为彻底,设定的聚焦电压持续时间较长。

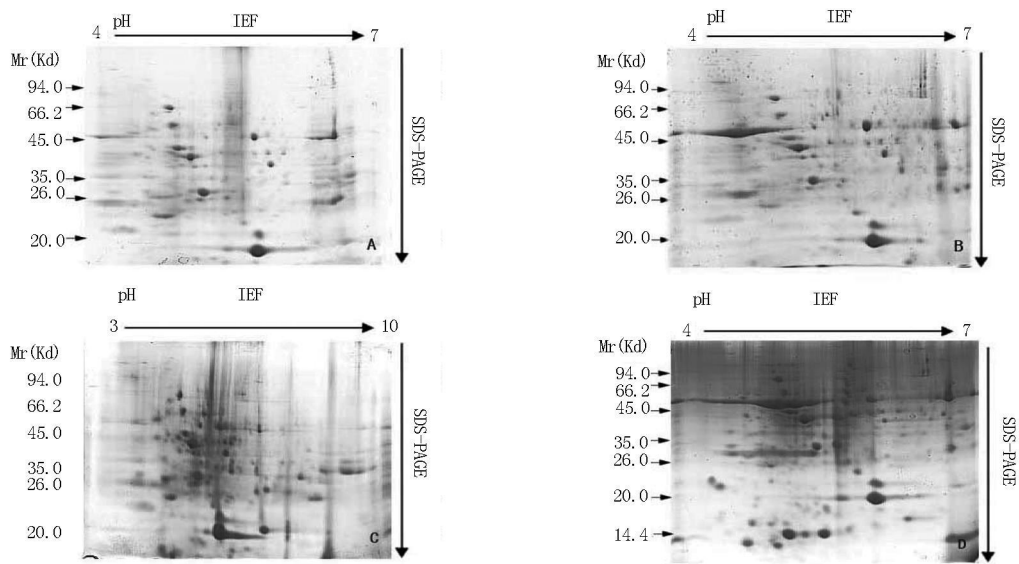


图 1 不同 2-DE 条件对葡萄叶片蛋白质的双向电泳图谱的影响

注 A. 使用程序 A, pH 4~7 10% SDS-PAGE 凝胶的双向电泳结果; B. 使用程序 B pH 4~7, 10% SDS-PAGE 凝胶的双向电泳结果; C. 使用程序 B pH 3~10, 10% SDS-PAGE 凝胶的双向电泳结果 D. 使用程序 B, pH 4~7 12% SDS-PAGE 凝胶的双向电泳结果。

2.2 2 种不同 pH 范围 IPG 胶条等电聚焦胶条对双向电泳图谱的影响

不同的样品来源、不同的蛋白质提取方法, 其蛋白质双向电泳的适宜 IEF 胶条 pH 范围不同。为了确定适合葡萄叶片蛋白质等电聚焦的适宜的 IEF 胶条 pH 范围, 研究比较了葡萄叶片蛋白质样品在不同 pH 胶条上的等电聚焦效果, 结果见图 1。图 1-C 为采用 pH 范围为 3~10 的 IPG 胶条按照程序 B 进行等电聚焦、第二向采用 10% 的 SDS-PAGE 电泳所得出的双向电泳图谱。该法检测出有效蛋白质点 98 个, 虽然点数比使用 pH 范围为 4~7 的 IPG 胶条在相同条件下所得出图谱 (图 1-B) 的蛋白质点 (83 个) 多, 但获得的蛋白质点边界不清晰, 纵向拖尾比较严重, 蛋白质点都集中在 pH 4~7 的范围内; 而图 1-B 蛋白质斑点边界清晰, 在整块胶上分布比较均匀, 分离出的各蛋白质点基本上没有拖尾和纹理。

为了进一步比较二者获得图谱的差异, 将不同 pH 胶条获得的蛋白质图片进一步放大, 结果见图 2。图 2-A 和图 2-B 分别为图 1-B 和图 1-C 中 pH 5.6~6.4 和分子量 26.0~45.0 Kd 的局部图。如图所示, 在图 2-A 中点 1 与 2、点 3 与 2 之间的横向距离要明显大于图 2-B 中的, 这有利于重叠蛋白点的分离。可见使用 pH 范围为 4~7 的胶条获得的双向电泳图谱更有利于葡萄叶片蛋白质的双向电泳分离和后续比较分析。

2.3 2 种不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶对双向电泳图谱

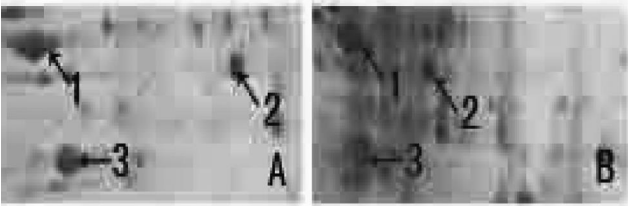


图 2 2 种 pH 范围胶条双向电泳图谱的局部放大图

注 A. 图 1-B 的局部放大图; B. 图 1-C 的局部放大图。

的影响

在双向电泳中, 不同的植物材料, 适宜的 SDS-PAGE 凝胶的浓度不同。SDS-PAGE 凝胶的浓度较低时, 大分子蛋白质点可以较好地分开, 但分子量小的蛋白质点会丢失。为了确定适合葡萄材料的 SDS-PAGE 凝胶浓度, 该研究对比了 2 个浓度的凝胶的分离效果结果见图 1。图 1-D 使用的是 12% 的 SDS-PAGE 凝胶, 分子量为 14.4 Kd 及以下区域的蛋白点获得了良好的分离, 获得了分离良好的蛋白质点 143 个, 而图 1-A、图 1-B、图 1-C 使用的都是 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 分子量为 14.4 Kd 及以下区域的蛋白点未得到分离; 与相同条件下的 10% 的凝胶双向电泳结果 (图 1-B, 83 个蛋白质点) 相比, 12% 的 SDS-PAGE 凝胶多分离出蛋白质点 60 个, 而且 12% 胶上的蛋白质点较圆润, 一些低丰度蛋白清晰可见。由此可见, 12% 的凝胶用于葡萄叶片蛋白质的双向电泳分离效果较好。

3 结论与讨论

蛋白质双向电泳是蛋白质学研究的重要技术之一,建立蛋白质双向电泳的技术体系是其应用的前提。双向电泳在农作物中的应用较多,方法体系也较为成熟,但其在葡萄蛋白质组中的应用未见报道。该研究建立了葡萄叶片蛋白质双向电泳的参数体系,使用 IEF pH 4~7 的胶条、优化的脱盐和等电聚焦时间以及采用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳均有利于获得较好的葡萄叶片蛋白质双向电泳结果。该试验通过设 2 个除盐梯度,适当延长除盐时间能增强除盐能力,减少纵向条纹的数量。程序 B 升压时间为 4 h,程序 A 为 3 h,经观察发现,程序 B 可以在设定时间内达到设定的聚焦电压而程序 A 在设定的时间内不能达到,说明程序 A 升压时间不足,程序 B 比较适合葡萄 6-12-4 的叶片蛋白质双向电泳;比较了 pH 4~7 和 pH 3~10 二种胶条的效果, pH 4~7 的胶条是适宜的选择。前人的试验中,不同的材料有的使用 pH 4~7 的效果好^[8, 19, 24],有的使用 pH 3~10 的效果好^[17, 21, 25],这可能是与材料本身蛋白质组的特性有关。分离胶浓度会影响蛋白质分离的清晰度,如果胶浓度过大,蛋白质分离即不够清晰,而且有的蛋白质点会重叠;如果胶的浓度过低,虽然蛋白质点可以较好地分开,但分子量小的蛋白质点会丢失。因此,应该寻求合适的分离胶浓度。使用 12% 的凝胶,可以使供试材料中分子量在 20.0 Kd 以下的蛋白点得到较好的分离,避免了因蛋白丢失而使结果不准确的问题。在前人的报道中,分离黄瓜离体子叶节中蛋白质的分离胶的最适浓度为 11.5%^[29];采用 7.5%~20% 的梯度凝胶时,水稻叶片蛋白点清晰易辨,且低分子量蛋白点不会丢失^[27]。可见不同的蛋白质来源双向电泳中所采用的凝胶浓度差异较大。样品制备是双向电泳技术成功的关键。植物组织中含有的色素、酚、醌、多糖等代谢产物也会对后续的蛋白质分离和鉴定有影响。该试验采用丙酮/三氯乙酸法,该方法最早用于小麦蛋白质的提取^[19],是目前提取植物蛋白使用最广泛的方法之一^[11-23]。从电泳结果看,除图 1-C 纵向拖尾比较严重外,其它各图斑点比较清晰,说明该法适用于葡萄叶片蛋白质样品的分离。目前关于葡萄蛋白质组的研究报道较少,该研究建立的葡萄总蛋白质提取和双向电泳技术的条件,为进一步的葡萄蛋白质组的研究奠定了方法基础。

参考文献

- [1] 夏其昌,曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 269-286.
- [2] Dutt M J, Lee K H. Proteomic analysis[J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(2): 176-179.

- [3] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 110-112.
- [4] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 272-287.
- [5] Rumbolz J, Gubler W D. Susceptibility of grapevine buds to infection by powdery mildew Erysiphe necator[J]. Plant Pathology, 2005, 54: 535-548.
- [6] 曹若斌. 果树病理学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1994: 165-168.
- [7] 丁坤善, 郑彩霞, 包仁艳, 等. 油松雌性不育系球果蛋白质双向电泳技术的建立[J]. 植物学通报, 2005, 22(2): 190-197.
- [8] 郇付菊, 李扬, 陈良, 等. 低温胁迫下棉花子叶蛋白质差异表达的双向电泳分析[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2008, 42(2): 262-266.
- [9] 汪家政, 范明编. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 90-92.
- [10] Damerval C, 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.
- [11] 陈蕊红, 张改生, 刘卫, 等. 小麦花药蛋白质组双向电泳技术体系的优化[J]. 核农学报, 2008, 22(4): 404-409.
- [12] 邵彩虹, 王经源, 林文雄. 苗期水稻叶片发育进程的差异蛋白质组学分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3831-3837.
- [13] 罗泽宇, 杨粤军, 刘选明. 拟南芥蛋白质组研究中双向电泳技术条件的优化[J]. 激光生物学报, 2008, 17(4): 539-543.
- [14] 王楠, 康俊梅, 杨青川, 等. 黄花苜蓿双向电泳体系的建立[J]. 中国草地学报, 2008, 30(5): 42-46.
- [15] 王世刚, 王宇, 唐咏, 等. 辣椒 CMS 型雄性不育系与保持系花期叶片蛋白质组分析[J]. 中国蔬菜, 2007(2): 13-16.
- [16] 白汝瑾, 庄天明, 刘杨, 等. 利用双向电泳技术分离盐胁迫下番茄叶片蛋白[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2007, 25(4): 363-366.
- [17] 范海延, 陈捷, 张春宇, 等. 适于黄瓜叶片蛋白质组分析的双向电泳方法最佳条件的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(3): 365-367.
- [18] 姜蕊, 胡永红, 蒋昌华, 等. 热胁迫下月季叶片蛋白双向电泳分析[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(4): 91-94.
- [19] 杨梅, 陈伟, 林思祖, 等. 杉木叶片蛋白质组的双向电泳技术优化[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(5): 438-442.
- [20] 李涛, 曾莉娟, 王健华, 等. 槟榔叶片总蛋白质提取及双向电泳条件初探[J]. 热带作物学报, 2009, 30(6): 746-750.
- [21] 郭晋隆, 叶冰莹, 黄庆煌, 等. 甘蔗叶片总蛋白提取及双向电泳条件的改进[J]. 生物技术通报, 2008(5): 112-125.
- [22] 杜保伟, 李成斌, 熊明国, 等. 桃叶片总蛋白双向电泳技术的研究[J]. 果树学报, 2009, 26(5): 752-755.
- [23] 朱志勇, 曹尚银, 徐小彪, 等. 新红星苹果花芽蛋白质提取及双向电泳的改良方法[J]. 果树学报, 2007, 24(4): 549-552.
- [24] 吴满成, 胡海涛, 余有见, 等. 牛奶子果实中蛋白质的提取和双向电泳分析方法的改良[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(7): 695-698.
- [25] 任建升, 臧新, 赵丹丹, 等. 红豆杉细胞蛋白质双向电泳样品制备方法的比较[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 11886-11888.
- [26] 李凤玉, 潘德灼, 陈伟, 等. 黄瓜子叶节的蛋白质组双向电泳条件的优化[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 963-967.
- [27] 王玉琪, 彭新湘. 适用于水稻叶片蛋白质组分析的双向电泳技术[J]. 植物生理与分子生物学报, 2006, 32(2): 252-256.

贝克桉组织培养的初步研究

张兆合¹, 逯 昀², 孙景梅^{2,3}, 侯 佳³

(1. 商丘中等专业学校, 河南 商丘 476000; 2. 商丘职业技术学院, 河南 商丘 476000 3. 西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224)

摘 要:以贝克桉(*Eucalyptus baker*)无菌苗的半木质化带未萌发腋芽的茎段为试验材料, 用不同消毒处理对贝克桉外植体进行灭菌, 并进行愈伤组织及丛生芽产生的初步研究。结果表明: 贝克桉茎段外植体洗刷干净后使用 75%乙醇溶液灭菌 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 每次 3 min; 后再用 0.1% HgCl₂ 分二步消毒, 每次处理 2 min, 每次消毒后用无菌水冲洗 3 次, 每次 3 min。这种处理方法污染率相对较低, 褐变程度最小。在改良 MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6 g/L+AC 2 g/L 的培养基上培养 1 个月后可诱导贝克桉茎段愈伤组织的生成。

关键词: 贝克桉; 灭菌方法; 褐变

中图分类号: S 792.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0151-03

桉树(*Eucalyptus*)为桃金娘科(Myrtle family)桉属, 原产澳大利亚和印度尼西亚及菲律宾几个岛屿的高大乔木。因其生长快、适应性强、用途广而被世界上百余个国家和地区广泛引种栽培, 是目前世界上最重要的木纸浆原材料之一, 也是我国南方沿海地区最主要的造林树种及发展速生丰产林的战略树种。作为当今世界上三大速生树种之一, 它的特点主要表现在: 材质坚硬, 是造纸、造船的良好材料; 繁殖容易, 速生丰产; 种类多, 抗逆性强, 较耐贫瘠。除上述特点外, 桉树的叶子可用于生产桉叶油, 树皮可用于提取树脂, 残渣培养食用菌后还可当肥料, 而花是良好的蜜源^[1]。

桉树的组培技术具有能保持母体的优良特性, 繁殖系数大, 生长期短等特点, 尤其在种源缺少的条件下能很快地满足市场需求, 因而是桉树快速繁殖的一个重要途径。但组培技术要求严格的无菌操作, 使得成本比较高, 对大面积造林不利于产出经济效益, 因此目前生产通常使用组培方法培育扦插母株作为扦插的扩大材料, 然后通过扦插繁殖生产大量苗木营造速生丰产林。桉树组培的成功, 对解决一些难以生根或无法采用扦插方法增繁无性系的树种的繁殖问题有重要借鉴作用。

但是桉树茎段的组培也存在着外植体灭菌不彻底, 易发生褐变等问题。桉树茎段接种后, 切口处易产生褐色渗出物, 使茎段周围的培养基变成棕褐色, 插入培养基里的基部褐变而失去生命力, 导致外植体死亡^[2]。

贝克桉, 作为桉树的一种, 具有桉树的主要特点, 并主要用于生产桉叶油, 所以该试验在探讨不同消毒处理

第一作者简介: 张兆合(1955-), 男, 河南商丘人, 本科, 高级讲师, 现主要从事果树栽培的教学与研究工作。E-mail: zhang3101588@126.com。
收稿日期: 2010-03-05

Study on the Conditions of 2-DE Analysis of Proteome in Grape Leaves

ZHANG Yu-jie ZHANG Jun-ke, LUO Shi-xing

(College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University; Key Lab of Northwestern Horticultural plant Germplasm Resource Application of Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: The method system of 2-dimensional electrophoresis (2-DE) of protein in grape leaves was studied, the results of 2-dimensional electrophoresis from different procedures of isoelectric focusing, different immobilized pH gradients strips and with different SDS-PAGE gel concentration were compared. The results showed that isoelectric focusing procedure B, immobilized pH gradients (IPG) strip with the linear range of pH 4~7 and 12% SDS-PAGE gel were the better choice, more than 143 protein spots were separated in one run.

Key words: grape; proteome; two-dimensional electrophoresis