

葡萄种子蛋白质双向电泳体系的建立

王瑞璞¹, 崔 蕾¹, 张小莹², 王 茜², 张朝红², 李 琰¹

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:为了进行葡萄种子蛋白质组学的研究,以葡萄种子为试材,通过对比粗蛋白质不同溶解方法、IPG 胶条、上样量、等电聚焦参数以及不同 SDS-PAGE 分离胶浓度对双向电泳效果的影响,建立了适合葡萄种子的双向电泳体系。结果表明:TCA-丙酮提取蛋白质经酚抽提后蛋白质溶解快、杂质少、浓度高,筛选获得 17 cm pH 5~8 的 IPG 胶条,上样量 600 μ g,第一向的聚焦步骤达到 80 000 Vh 以及 11% 的 SDS-PAGE 分离胶的双向电泳参数,蛋白质分离效果好。所建立的双向电泳体系,适用于不同葡萄品种的种子蛋白质分离。

关键词:葡萄;种子;蛋白质组学;双向电泳

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0086-06

20 世纪末至 21 世纪初,大量物种基因组测序完成,研究者越来越关注基因表达和功能。1994 年,WILKINS 教授将蛋白质组的概念进一步延伸成为蛋白质组学,一时间蛋白质组学成为了后基因时代的研究热点^[1]。蛋白质组学是对一个基因组、一个细胞或者是一个生物体产生的所有蛋白质的结构和功能的系统性研究,主要研究领域涉及蛋白质在生物体内的表达水平,在细胞中的定位,翻译后修饰,蛋白质之间的互作以及行使功能的时间与空间。一个组织甚至是一个细胞,在某一个特定的时间点所含的蛋白质都是非常复杂而且多样的。由于化学性质的复杂性和多变性,一项技术只能解决蛋白质组学的一个小分支。虽然一些技术如色谱法、离子检测系统自动化、生物信息学等一直在进步,蛋白质组学的应用范围在不断扩大^[2]。但是目前在一个单独的试验里,仍不可能研究整个蛋白质组学。这就要求学者们必须根据所要解决的问题,严谨巧妙的设计试验。

葡萄(*Vitis vinifera* L)是一种重要的栽培植物,是近年我国发展最快的果树之一^[3]。双向电泳技术是蛋白质组学的重要研究技术,国内外已有将双向电泳技术应用于葡萄蛋白质组学的研究,但主要集中于叶片、果皮和果肉^[4-5],而与繁殖直接相关的种子的研究尚鲜见报道。由于葡萄种子中含有大量的酚类、多糖等次级代

谢物,对蛋白质的提取以及双向电泳造成干扰^[6]。影响双向电泳的因素也有很多,该研究参考前人在葡萄上的研究经验,提取种子蛋白质并进行双向电泳效果不理想,不适宜的双向电泳体系会造成双向图谱横纹、竖纹、拖尾以及点数的减少。至目前为止,没有一种双向体系用于所有的植物组织,为了借助双向电泳技术寻找葡萄种子发育过程中的差异蛋白质,该研究通过对比不同的蛋白质获取方法,不同规格的 IPG 胶条,不同的上样量,不同的等电聚焦以及不同的分离胶浓度所获得的蛋白质图谱,建立了一套适合葡萄种子蛋白质的双向电泳体系,为研究葡萄种子发育或败育机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自西北农林科技大学葡萄种质资源圃,在黑比诺葡萄(*V. vinifera* cv. Pinot Noir)和无核白葡萄(*V. vinifera* cv. Thompson Seedless)盛花期开始套袋,于盛花期后 10、20、30、40 d 采取发育正常的幼果,于冰上剥离种子,放入 2.0 mL 的离心管中,液氮速冻,等量混合,在-80℃储存备用。

IPG 胶条、载体两性电解质 bio-lyte 和 CHAPS 购自美国 Bio-Rad 公司,丙烯酰胺、SDS、NN-甲叉双丙烯酰胺、TEMED、APS、DTT、PMSF、 β -巯基乙醇为进口分装。矿物油、低熔点琼脂糖、尿素、碘乙酰胺、硫脲、考马斯亮蓝 G-250、PVPP 等试剂购自 MP 公司,甘氨酸、三氯乙酸、Tris-饱和酚、丙酮以及其它试剂均为分析纯,配试剂所用水均为 MilliQ 水。

1.2 试验方法

1.2.1 TCA-丙酮沉淀法提取葡萄种子蛋白质 参照焦竹青等^[6]的方法,略有改动。取 0.2 g 样品和 0.02 g

第一作者简介:王瑞璞(1989-),女,河南郑州人,硕士,研究方向为植物发育生物学。E-mail:wrp52565@126.com.

责任作者:李琰(1971-),女,河南洛阳人,博士,副教授,研究方向为植物学和药用植物开发利用。E-mail:ly2659@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31372023);国家现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目(CARS-30-yz-7)。

收稿日期:2015-06-01

PVPP,加入液氮迅速研磨后,分装到 2.0 mL 离心管中。加满 -20°C 预冷的提取液 TCA-丙酮(内含 0.07% DTT,0.07% β -ME,1 mmol/L PMSF),充分涡旋后放置 -20°C 过夜。 4°C 12 000 r/min 离心 1 h,弃上清。先用 -20°C 预冷的丙酮(内含 0.07% β -ME,1 mmol/L PMSF),洗涤沉淀 2 次,再用 -20°C 预冷的 80%的丙酮洗涤至沉淀发白,将沉淀干燥至粉末状, -80°C 保存备用。

1.2.2 双向电泳(two-dimensional electrophoresis,2-DE)

试验选用 3 种规格的 IPG 胶条,7 cm pH 4~7、17 cm pH 3~10 以及 17 cm pH 5~8 的胶条。7 cm 上样体积为 150 μL ,17 cm 上样体积为 300 μL 。为了获得最佳上样量,试验设计了上样梯度,上样量分别为 400、600、800 μg 。按照 Bio-rad 蛋白质组 2-DE 的操作手册进行电泳,进行等电聚焦时该试验采用了手册中的标准聚焦参数 60 000 Vh 和 80 000 Vh 进行对比。第二向 SDS-PAGE 凝胶电泳时设置了 3 个浓度的分离胶,分别为 12%、11% 和 10%。电泳结束之后,参照陈蕊红等^[7]的胶体染色法进行染色。重复 3 次之后,用 U-Max 扫描仪扫描。

1.3 项目测定

蛋白质样品的溶解及浓度测定。每 100 mg 粉末加入 500 μL 的裂解液(7 mmol/L 尿素,2 mmol/L 硫脲,4% (W/V)CHAPS,65 mmol/L DTT,0.1% (V/V) 载体两性电解质),分别放置于 4°C 4 h、 4°C 8 h、 26°C 0.5 h 和 26°C 2 h 溶解后,离心取上清,用 Bradford 法测定蛋白质浓度。由于 TCA-丙酮法所得蛋白质较难溶解,在 4 种条件下所获得的蛋白质浓度不高,差异不明显,又采用涡旋、超声以及涡旋-超声的方法进行促溶。为了提高蛋白质溶解性,在上述的粉末中,以 1:1 的比例加入 Tris-饱和酚和 SDS buffer(0.1 mol/L Tris-HCl,2% SDS,50 mmol/L EDTA,30% 的蔗糖,5% β -ME,pH 8.0),充分混匀,冰浴 2 h 后,离心取酚相,在其中加入 -20°C 预

冷的 80%的甲醇(内含 0.1 mol/L 醋酸铵),在 -20°C 条件下沉淀过夜,收集沉淀弃上清,沉淀即为提取的蛋白质,再将蛋白质用 -20°C 预冷的丙酮清洗数次。沉淀干燥后也以上述比例加入裂解液,浓度测定方法同上。

1.4 数据分析

采用 Bio-Rad 的 PDQuest 8.0 软件对差异蛋白质点进行

2 结果与分析

2.1 不同溶解方法对蛋白质浓度及双向电泳图谱的影响

TCA-丙酮沉淀法是双向电泳中经典的蛋白质提取方法,相对来说比较快速便捷。由于样品富含次级代谢物质较多,使用 TCA-丙酮法获得的蛋白质难溶解,经涡旋后获得浓度较超声高一些,经涡旋加超声处理后获得的浓度相对最高,但是浓度对于上样要求来说仍旧较低。用酚抽提之后,得到的蛋白质易溶解,在相同条件下获得的浓度比其它几种方式都高。蛋白质在 4°C 下的溶解性较差,在 26°C 水浴溶解效率高;溶解时间越长浓度越高,但是考虑到蛋白质酶水解作用在 26°C 下不能溶解时间过长(图 1)。将 TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白质和酚抽提后溶解的蛋白质进行双向电泳(图 2),图谱显

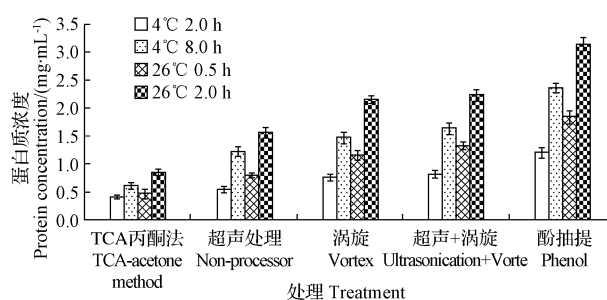
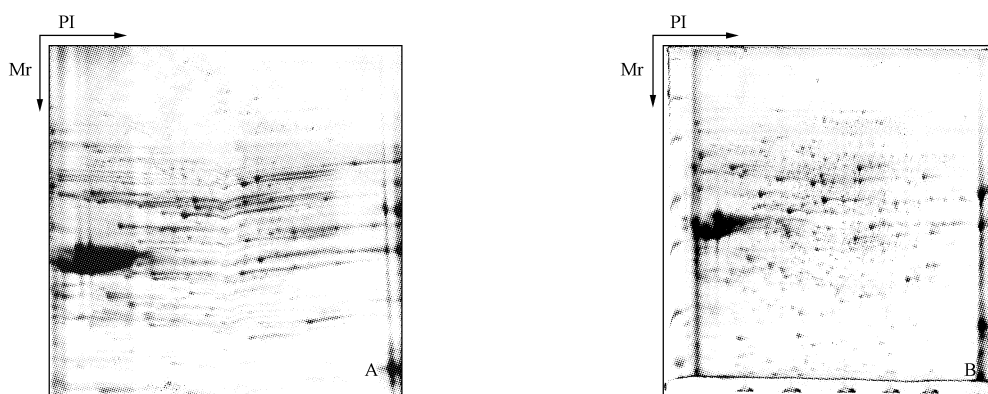


图 1 采用不同溶解方式所获得的蛋白质浓度

Fig.1 The concentrations of soluble protein obtained by using different methods



注:A. TCA-丙酮法,17 cm,pH 5~8 胶条;B. TCA-丙酮/酚法,17 cm,pH 5~8 胶条。

Note:A. TCA-acetone method,17 cm,pH 5~8 strip;B. TCA-acetone/phenol method,17 cm,pH 5~8 strip.

图 2 采用不同蛋白质溶解方法所获得的葡萄种子的双向电泳图谱

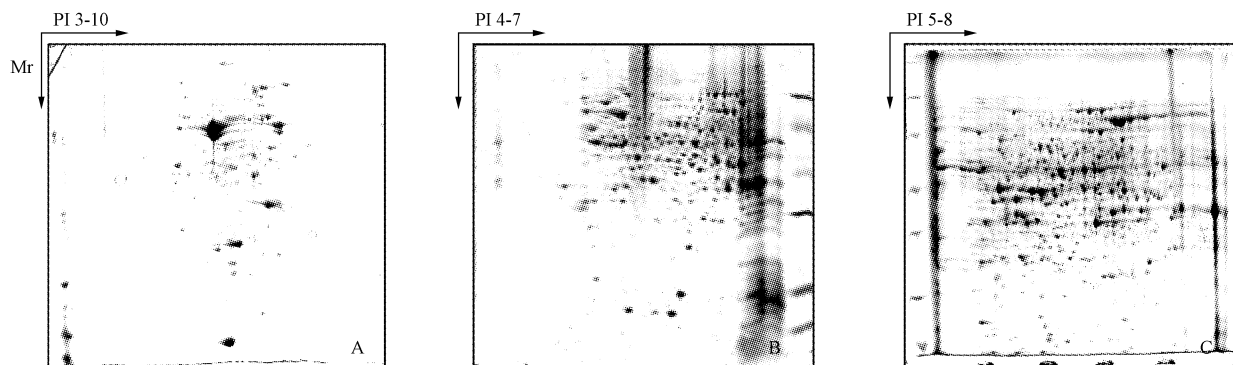
Fig.2 The 2-DE profiles of grape seeds proteins obtained from different extraction methods

示使用 TCA-丙酮法提取后干扰物较多,导致横向拖尾,背景较深。相对而言,用酚抽提之后,蛋白质拖尾现象明显减少,背景清晰,蛋白质点聚焦的比较好,更有利于之后的分析。经过 PDQuest 8.0 软件分析,用 TCA-丙酮法提取的蛋白质双向图谱中获得了 802 个蛋白质点,而使用酚抽提之后获得了 1 127 个蛋白质点。

2.2 不同 IPG 胶条对双向电泳结果的影响

使用 pH 3~10 的 IPG 胶条能分离出广范围的蛋白

质,但是相对而言蛋白质比较密集,葡萄种子蛋白质大多集中中间部分,又采用 pH 4~7 和 pH 5~8 的 IPG 胶条进行分离。结果表明,使用 pH 4~7 的胶条时,在酸性端蛋白质少,而碱性端蛋白质聚集,无法很好的分离。使用 pH 5~8 的胶条,能使大部分的蛋白质都分开。图谱还表明,由于蛋白质点比较多,17 cm 的胶条可以让蛋白质点横向分离的更好,相对 7 cm 的胶条更合适,方便后续的分析研究(图 3)。



注:A. 17 cm, pH 3~10; B. 7 cm, pH 4~7; C. 17 cm, pH 5~8。

Note: A. 17 cm, pH 3-10; B. 7 cm, pH 4-7; C. 17 cm, pH 5-8.

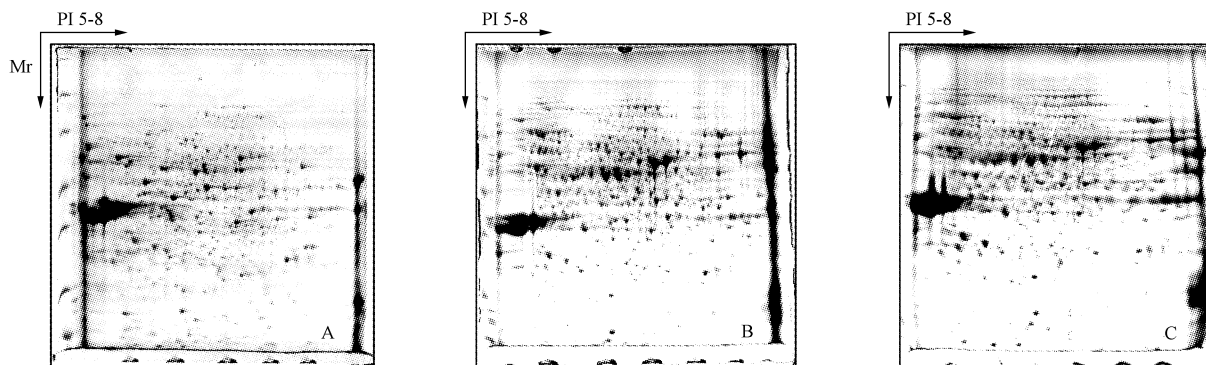
图 3 采用不同 pH 值范围以及不同长度的 IPG 胶条分离葡萄种子蛋白质的双向电泳图谱

Fig. 3 The 2-DE profiles of grape seeds proteins obtained using different pH range IPG strips and different lengths

2.3 不同上样量对双向电泳结果的影响

如图 4 所示,400 μg 上样量过少,得到的蛋白质点较少。800 μg 的上样量略多,致使蛋白质不易分开,高

丰度蛋白质量大,不利用后续分析。600 μg 的上样量比较合适,能获得较多的蛋白质点,也利于后续分析。



注:A. 400 μg ; B. 600 μg ; C. 800 μg 。

Note: A. 400 μg ; B. 600 μg ; C. 800 μg .

图 4 不同上样量对双向电泳图谱的影响

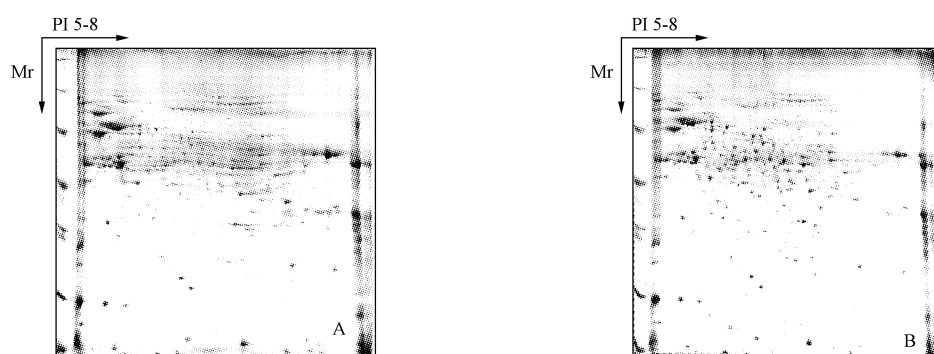
Fig. 4 The 2-DE profiles of grape seeds proteins obtained with different loading samples

2.4 不同等电聚焦参数对双向电泳结果的影响

在 Bio-Rad 手册中第一向聚焦步骤的参数为 60 000 Vh,但是在试验操作中,由于样品的不同,聚焦参数需要根据实际情况进行调整。由图 5 可知,聚焦到 60 000 Vh 等电聚焦不完全,无法满足样品的需求;聚焦到 80 000 Vh 时,横纹明显减少,蛋白质点增多而且蛋白质点聚焦的比较好。

2.5 不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶对双向电泳结果的影响

双向电泳的第二向用聚丙烯酰胺凝胶将不同分子量的蛋白质进行再次分离,不同浓度凝胶分离效果有明显差异(图 6),12% 的分离胶大分子不易分开,而 10% 的分离胶有部分小分子丢失。而且 11% 的分离胶在分离大分子时效果与 10% 的差别不大,所以浓度为 11% 的分离胶比较合适。

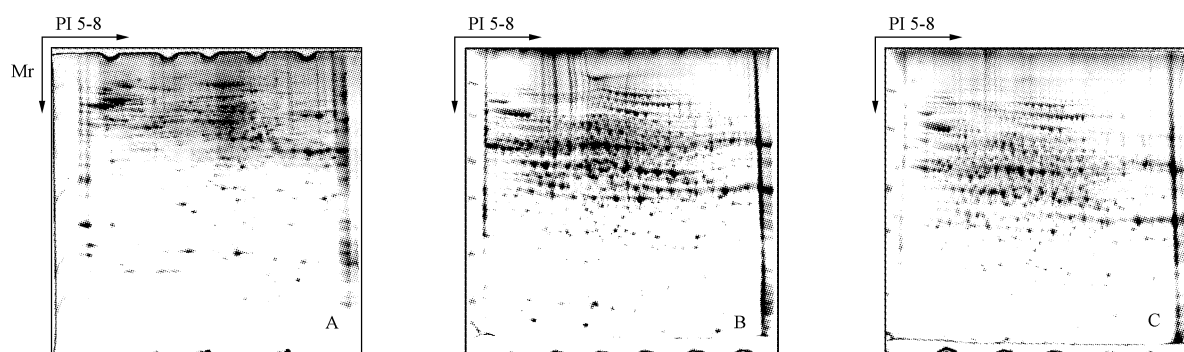


注:A. S4 60 000 Vh;B. S4 80 000 Vh。

Note:A. S4 60 000 Vh;B. S4 80 000 Vh.

图5 不同聚焦参数对双向电泳图谱的影响

Fig. 5 The 2-DE profiles of grape seeds proteins obtained using different I soelectric focusing procedures



注:A. 12%;B. 11%;C. 10%。

Note:A. 12%;B. 11%;C. 10%.

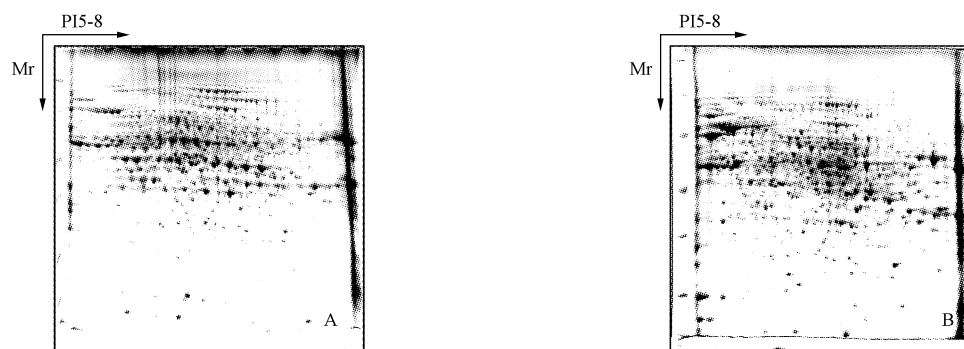
图6 不同浓度的SDS-PAGE凝胶对双向电泳图谱的影响

Fig. 6 The 2-DE profiles of grape seeds proteins obtained using different SDS-PAGE gels

2.6 葡萄品种“黑比诺”和“无核白”种子蛋白质的双向电泳图谱

采用TCA-丙酮/酚抽提法提取“黑比诺”和“无核白”种子蛋白质,双向体系如下17 cm pH 5~8的IPG胶条,上样600 μ g,电聚焦到80 000 Vh以及11%的SDS-

凝胶。“无核白”品种种子蛋白质得到很好的分离,证明该体系适用于无核品种的葡萄幼种子。将使用PDQuest 8.0软件分析之后获得的差异蛋白质点进行质谱测序,分析数据并对其进行功能注释,发现70%的差异蛋白质参与细胞过程。



注:A:“黑比诺”;B:“无核白”。

Note:A: ‘Pinot Noir’;B: ‘Thompson Seedless’.

图7 “黑比诺”种子和“无核白”种子蛋白质双向电泳图谱

Fig. 7 The 2-DE profiles of different periods of ‘Pinot Noir’ and ‘Thompson Seedless’ grapes seeds proteins

3 讨论与结论

双向电泳技术在蛋白质组学的研究中广泛使用,只有建立一套适合的双向电泳体系才能有效的进行蛋白质组学的研究。双向电泳上样量大,pH 值梯度稳定,可以得到整个蛋白质组的信息^[8],但是缺点是操作比较繁琐,影响因素特别多^[9-10]。

蛋白质提取及样品制备是双向电泳中的关键步骤,TCA-丙酮法是提取蛋白质经典方法,但是此法适合提取植物幼嫩组织的蛋白质,不适用于复杂样品^[11]。用酚抽提之后,样品中杂质减少,可以防止堵塞分离胶胶孔,使蛋白质得到更好的分离,而且蛋白质比较容易溶解。但是用酚抽提过程中,样品需求量较大^[12],建议提取样品 ≥ 1 g 时使用 10 mL 离心管。马斌等^[13]在比较 TCA-丙酮法和酚法提取蛋白质时,也认为后者优于前者。

用不同 pH 值范围的 IPG 胶条进行蛋白质分离时得到的效果完全不同,合适的 pH 值是双向电泳的关键因素。焦竹青等^[6]认为 pH 4~7 的胶条比较适用于分离山葡萄花序蛋白质组,GIRIBALDI 等^[4]和 SARRY 等^[14]认为 pH 3~10 非线性的胶条适用于葡萄果肉蛋白质组的分离。在试验中发现 pH 4~7 的胶条碱性端蛋白质分离效果不佳,pH 3~10 的胶条所获得的蛋白质点较少,无法大范围的分离蛋白质该研究首次使用 pH 5~8 的 IPG 胶条分离葡萄种子蛋白质。由于葡萄种子蛋白质材料比较难获得,600 μ g 的上样量可以满足分析需求。不同的植物材料需要不同的 SDS-PAGE 凝胶进行分离,低浓度的分离胶可以很好的分开大分子蛋白质,但是容易丢失小分子蛋白质。而高浓度的分离胶分不开大分子蛋白质,而且适合的分离胶浓度对图谱分析和收集蛋白质点是非常重要的。11%的分离胶使蛋白质点清晰易辨,且又不丢失小分子量的蛋白质点。

在该试验过程中,课题组发现裂解液中尿素的质量对 IEF(等点聚焦)的影响很大。劣质尿素容易导致电压升不上去,聚焦不完全,甚至还有结晶析出的现象。优质尿素可以使蛋白质点聚焦的很好,裂解效果也很好。优质尿素颗粒均匀外观光泽半透明。劣质尿素杂质过多,推荐使用进口原装尿素。聚焦不完全时蛋白质点会出现拖尾现象,而且会损失一些蛋白质点,所以 S4 要选

用 80 000 Vh 的聚焦参数。在等电聚焦过程中,如果电压升不上去,可以采用搭盐桥以及缓慢升压的方法。试验过程中发现,不同 pH 值范围的 IPG 胶条,同时进行等电聚焦时对其结果影响不大。测定蛋白质浓度时,若使用酶标仪进行测定,最好使用同一种酶标板,2 种不同品牌的酶标板测量结果可以相差约 0.5 mg/mL。

该研究获得的适合于葡萄种子双向电泳体系如下:TCA-丙酮/酚法提蛋白质,pH 5~8 的 IPG 胶条,上样量为 600 μ g,等电聚焦到 80 000 Vh,11%的 SDS-PAGE 分离胶,可以很好的分离葡萄种子的蛋白质。

参考文献

- [1] PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomics [J]. *Nature*, 2000, 405(6788): 837-846.
- [2] GUARNIERI M T. Comparative proteomics lends insight into genotype-specific pathogenicity [J]. *Proteomics*, 2013, 13(17): 2544-2545.
- [3] 陶然, 王晨, 房经贵, 等. 我国葡萄育种研究概况 [J]. *江西农业学报*, 2012, 24(6): 24-30.
- [4] GIRIBALDI M, PERUGINI I, SAUVAGE F X, et al. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF [J]. *Proteomics*, 2007, 7(17): 3154-3170.
- [5] VINCENT D, WHEATLEY M D, CRAMER G R. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(9): 1853-1865.
- [6] 焦竹青, 许培磊, 王振兴, 等. 山葡萄花序蛋白质双向电泳技术体系的建立 [J]. *果树学报*, 2012, 29(5): 945-951.
- [7] 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.
- [8] 巩红飞, 柳军玺, 邸多隆. 蛋白质组学研究中的分离分析技术及其研究进展 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2014, 36(2): 12-17.
- [9] GAO M X, LI N, ZHANG J, et al. The study of three extraction methods for pre-separation and enrichment; application to the complex proteome separation in rat liver [J]. *Separation and Purification Technology*, 2006, 52(1): 170-176.
- [10] GORG A, WEISS W, DUNN M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics*, 2005(3): 826-827.
- [11] 李德军, 邓治, 陈春柳, 等. 植物组织双向电泳样品制备方法研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(24): 78-82.
- [12] 刘伟霞, 潘映红. 适用于小麦叶片蛋白质组分析的样品制备方法 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(10): 2169-2176.
- [13] 马斌, 孙骏威, 余初浪, 等. 枇杷叶片和果实总蛋白质提取及双向电泳的优化方法 [J]. *果树学报*, 2011, 28(2): 358-362.
- [14] SARRY J E, SOMMERER N, SAUVAGE F X, et al. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp [J]. *Proteomics*, 2004, 4(1): 201-215.

Establishment of Two-dimensional Electrophoresis System of Grape Seed

WANG Ruipu¹, CUI Lei¹, ZHANG Xiaoying², WANG Qian², ZHANG Chaohong², LI Yan¹

(1. College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forest University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forest University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking the grape seeds as material, in order to establish a two-dimensional electrophoresis (2-DE) system for proteomic analysis of grape seed, we compared the parameters including different protein extraction methods, the pH value

菊芋组织培养及继代苗遗传稳定性的 SSR 分析

杨世鹏, 赵孟良, 孙雪梅, 陶丽婷, 李莉

(青海大学 农林科学院, 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要:以“青芋 2 号”茎段为试验材料, 考察了不同培养基对菊芋愈伤组织诱导、丛生芽诱导及生根培养的影响, 并利用已优化的 SSR-PCR 反应体系对不同继代次数的菊芋试管苗进行遗传稳定性分析。结果表明:适宜菊芋离体增殖的培养基植物生长激素调节物质配比为 MS+1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, 适合菊芋生根培养基最佳配比为 1/2MS+0.1 mg/L IBA。从继代 8 次的组培苗中分析其遗传的变化, 在检测出的 50 个条带中, 个体之间未发生变异, 生物学性状上亦未发现明显差异。试验表明在多次继代培养过程后, 菊芋的遗传物质未发生明显变化, 为今后菊芋快繁及离体保存等提供了技术参考。

关键词:菊芋; 组织培养; SSR-PCR; 遗传稳定性

中图分类号:S 632.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0091-04

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)属菊科向日葵属多年生草本植物, 俗名洋姜、鬼子姜, 抗旱、抗寒、耐贫瘠, 是一种抗逆性极好的植物^[1]。目前, 菊芋大规模工业化生产对苗木繁殖的要求越来越高, 而菊芋的繁殖主要还是依靠块茎自然繁殖, 在引种、繁殖及生产过程中容易造成菊芋病害的积累, 导致菊芋产量、品质下降和种性退化等问题^[2]。在植物组织培养过程中, 植物体细胞易发生无性系变异, 其发生的途径有其遗传学基础, 可从形态学、细胞学、生物化学和分子生物学等多个方面对其进行综合检测和鉴定^[3]。保持原有品种的优良特性和遗传稳定性是避免组培生产损失的关键^[4]。

SSR(Simple Sequence Repeat 简单重复序列)是近

几年来发展迅速的分子标记技术, 具有重复性好、多态性高等优点。目前已有国内外学者利用分子标记技术对多种材料如桉树^[5]、越橘^[6]、木薯^[7]等进行了体细胞无性系变异的研究报道。该试验以菊芋茎段为试验材料, 对菊芋的组织培养技术进行研究。并通过 SSR 分子标记技术对菊芋继代苗进行检测, 进一步验证了组培苗的遗传稳定性, 对菊芋的种质资源保存及研究有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料“青芋 2 号”菊芋为青海省农林科学院菊芋研发中心自主选育审定品种, 取块茎打破休眠之后, 栽种于栽培土与蛭石 1:1 配比的花盆内, 待植株长至约 20~30 cm 时取其地上茎段部分作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 菊芋外植体的选取与消毒 将“青芋 2 号”地上部分用清水洗净之后, 除去叶片, 然后将茎段剪成约 1~2 cm 无根节间的茎段, 在自来水下反复冲洗后, 放置于超净工作台上, 75%乙醇浸泡 20 s, 无菌水冲洗 2 次, 然

第一作者简介:杨世鹏(1990-), 男, 青海湟源人, 硕士研究生, 研究方向为菊芋生理及分子。E-mail:200806773@qq.com.

责任作者:李莉(1959-), 女, 江苏丰县人, 本科, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为蔬菜栽培与生理。E-mail:yyslili@163.com.

基金项目:青海省科技厅资助项目(2012-H-809)。

收稿日期:2015-05-28

gradient of IPG strip, sample loading, isoelectric focusing conditions and different SDS-PAGE separation gel. The results showed that the protein was dissolved quickly, more pure and in high concentration after extracting by TCA-acetone/phenol method. The system with 17 cm pH 5-8 IPG strips, loading 600 μ g samples, focusing to 80 000 Vh and separating by 11% SDS-PAGE gel showed good two-dimensional electrophoresis maps. The system was also suitable for different grape seed protein.

Keywords: grape; seed; proteomics; Two-dimensional electrophoresis (2-DE)