

研究报告

A Letter

萝卜蛋白组分析中叶片蛋白质高效提取方法

相菲[✉], 徐良王[✉], 燕龚[✉], 义勤赖[✉], 德强[✉], 柳李旺[✉]

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京农业大学园艺学院, 南京, 210095

✉ 通讯作者: nauliulw@njau.edu.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第77篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0077

收稿日期: 2012年06月14日

接受日期: 2012年07月17日

发表日期: 2012年12月23日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012年第10卷第6期756-760页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

相菲等, 2012, 萝卜蛋白组分析中叶片蛋白质高效提取方法, 分子植物育种(online) Vol.10 No.77 pp.1559-1564 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0077)

引用格式(英文):

Xiang et al., 2012, Effective Method of Leaf Protein Extraction for Proteomic Analysis in Radish, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.77 pp.1559-1564 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0077)

摘要 以萝卜‘NAU-JLQX09’叶片为材料, 分别采用 Tris-HCl/TCA-丙酮沉淀法和改进的 PEG 分级沉淀法提取蛋白质, 通过双向凝胶电泳技术比较两种方法的效果。结果表明, 应用 Tris-HCl/TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白 2-DE 图谱可识别出 640 个蛋白点; 而改进的 PEG 分级沉淀法的蛋白组分(F₁, F₂ 以及 F₃) 2-DE 图谱可清晰识别蛋白点数目分别为 537, 170 与 852, 总蛋白点数目多且高丰度蛋白 RuBisCO 主要被沉降在 F₂ 中, F₃ 中分离到更多的低丰度蛋白点。因此, 在进行萝卜叶片蛋白质组分析时, 采用 PEG 分级沉淀法提取叶片蛋白, 可获得较高质量的 2-DE 凝胶图谱。研究结果为应用蛋白质组学解析萝卜重要性状形成分子基础提供了良好的技术支持。

关键词 萝卜; 蛋白质提取; 蛋白质组学; 双向电泳

Effective Method of Leaf Protein Extraction for Proteomic Analysis in Radish

Xiang Fei[✉], Xu Liang[✉], Wang Yan[✉], Gong Yiqin[✉], Lai Deqiang[✉], Liu Liwang[✉]

National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Genetic Improvement (East China), Ministry of Agriculture of P.R. China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, P.R. China

✉ Corresponding author, nauliulw@njau.edu.cn; ✉ Authors

Abstract In this study, two protein extraction methods, Tris-HCl/TCA-Acetone and PEG Fractionation, were compared with 2-DE using the leaves of radish line ‘NAU-JLQX09’. It was shown that with the Tris-HCl/TCA-Acetone method, the number of protein spots that could be identified by 2-DE profile was 640, while with the modified PEG Fractionation method, the number of protein spots identified in three fractions (F₁, F₂ and F₃) by 2-DE were 537, 170 and 852, respectively. Moreover, the major high-abundant proteins like ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) in leaves were successfully fractioned in F₂, indicating that a wide variety of low-abundant proteins could be detected in F₃. Therefore, it could be concluded that the 2-DE profile with the PEG Fractionation method was more effective than that with the Tris-HCl/TCA-Acetone method. These results provided an effective proteomic technical support to elucidate the molecular basis of some important agronomic traits using proteomic technique in radish.

Keywords Radish (*Raphanus sativus* L.); Leaf protein extraction; Proteomics; 2-DE

研究背景

随着进入后基因组学(Postgenomics)时代, 蛋白质组学已经逐渐成为生命科学工作的核心内容之一(Rho et al., 2008)。蛋白质组学分析主要包括高质量蛋白质的提取、分离以及成像, 蛋白的质谱鉴定和表征, 以及数据库的搜索分析等主要环节。目前蛋白质组学研究的焦点集中在发展高分辨率蛋白质的分离和快速自动的蛋白质鉴定新技术上, 但蛋白质提取和样品分离仍是其中最重要的步骤之一(Espagne et al., 2007)。

研究表明, 2-DE分离的蛋白质点大多为10⁵到10⁶个分子/细胞的高丰度拷贝数的看家蛋白(Housekeeping protein) (Paterson and Aebersold, 2003; Görög et al., 2004), 而细胞内多种具有重要调节功能的低丰度蛋白质很难被检测到(Gygi et al., 2000; Tirumalai et al., 2003)。植物的叶片中含有高丰度的能将CO₂还原成有机碳的RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶) (Gutteridge and Gatenby, 1995), 由于通常不参与基因调节, RuBisCO在一定程度上会影响

蛋白质组研究中双向电泳分析。近年来, 国内外众多学者已尝试多种蛋白提取方法, 以有效提高植物叶片蛋白质样品2-DE低丰度蛋白的检测率(Cellar et al., 2008; Peltier et al., 2004; Widjaja et al., 2009; Xi et al., 2006; 任丽萍等, 2011)。

萝卜(*Raphanus sativus* L.), 是起源于中国的一种重要十字花科根菜类蔬菜, 由于其具有较高的营养价值和较大的栽培面积, 在蔬菜作物生产与供应中占据着十分重要的地位(汪隆植和何启伟, 2005, 科学技术文献出版社, 13-18)。植物蛋白质组学研究目前主要应用于解析生长发育和生殖过程中蛋白质组的变化以及环境胁迫耐受机制, 分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平以及修饰状态。双向电泳和质谱检测是蛋白质组学研究的主要方法, 但迄今为止, 适用于萝卜叶片蛋白质高效提取的方法尚未确立。

本研究以萝卜真叶期叶片为材料, 比较改良的Tris-HCl/TCA-丙酮沉淀法和改进的PEG分级沉淀法制备蛋白质样品对2-DE分析结果的影响, 以提高蛋白质双向电泳图谱的饱和度与分辨率, 为进一步开展萝卜蛋白质组学研究提供技术支撑。

1 结果与分析

1.1 萝卜叶片总蛋白质SDS-PAGE

采用蛋白质单向电泳(SDS-PAGE)分析Tris-HCl/TCA-丙酮法提取的蛋白质以及PEG分级沉降法提取的所有沉淀组分(F₁~F₃)。从图1的凝胶图谱上可以看出, 由于分子质量的差异, 每一个泳道上的蛋白质谱带分布也存在显著差异, F₃组分的蛋白质谱带分布均匀, 许多在CK、F₁以及F₂中未分离的谱带, 在F₃上都清晰可见, 表明全细胞蛋白质被PEG有效地沉降分离。虽然组分F₃中也存在极少量的RuBisCO, 但RuBisCO (LSU以及SSU)主要存在于组分F₂以及组分F₁中。这些结果表明在萝卜叶片全细胞蛋白质中, PEG沉降法通过分步沉降, 可以有效地将蛋白进行分级分离, 并将大部分高丰度蛋白RuBisCO富集到F₁和F₂组分中, F₃组分中蛋白得到高效的分离。

1.2 两种不同提取方法对萝卜叶片2-DE凝胶图谱的影响

为了进一步分析PEG沉降法对萝卜叶片中高丰度蛋白RuBisCO的分离效果, 确定适合萝卜叶片蛋白质样品制备的方法, 将PEG分级沉降法获得的各组分

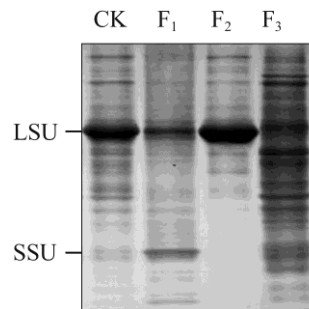


图1 Tris-HCl/TCA-丙酮法和PEG分级沉降法提取蛋白质的SDS-PAGE分析

注: 泳道F₁, F₂以及F₃代表PEG分级沉降法的各组分; CK代表对照, 为Tris-HCl/TCA-丙酮法提取的蛋白质; 左侧箭头分别代表RuBisCO大亚基(LSU)和小亚基(SSU)

Figure 1 SDS-PAGE analysis of proteins from the Tris-HCl/TCA Acetone extraction and PEG fractionation

Note: The lane F₁, F₂ and F₃ represent for the PEG fractionations and, the lane CK represents protein sample from Tris-HCl/TCA Acetone extraction serving as a control; Arrows on the left indicate the large subunit (LSU) and small subunit (SSU) of RuBisCO, respectively

蛋白与Tris-HCl/TCA-丙酮法提取的蛋白质进行双向电泳。预备试验表明, 相对于pH 3~pH 10的胶条, 蛋白点在凝胶pH 4~pH 7之间的区域内分布均匀, 蛋白质点较为清晰, 且低丰度蛋白的检测效率提高。使用pH 4~pH 7的胶条, 上样量为1 000 μg/μL, 对以上各蛋白样品进行双向电泳, 获得了重复性较好的2-DE凝胶图谱(图2)。

利用软件PDQuest 8.0进行蛋白点检测分析, 图2中, A、B、C、D 4张凝胶图谱所能检测出的蛋白点数目分别为: 640、537、170与852。Tris-HCl/TCA-丙酮法制备的蛋白质2-DE凝胶中, 椭圆标注区域有明显的横纹, 蛋白点相互重叠, 高丰度蛋白点聚集, 影响了低丰度蛋白的分离, 凝胶中蛋白质点1号经质谱鉴定与波斯菊(*Coreopsis grandiflora*)的RuBisCO大亚基(Rubisco subunit, 登录号为gi289907)同源性较高, 相当质量(Nominal Mass)为53 153, pI值为5.87。PEG分步沉降法制备的蛋白质2-DE凝胶中, 大分子量的高丰度蛋白主要沉降在图2C (F₂)中, 而图2B (F₁)中(椭圆标注区域)也有少量的高丰度蛋白点存在, 尽管PEG分级沉降法得到的各组分的蛋白点存在一定程度的重叠, 但F₁、F₂以及F₃三个组分的凝胶所能检测的蛋白点数之和显著多于Tris-HCl/TCA-丙酮法提取的蛋白, 因此, 在相等蛋白上样量条件下, 图2D (F₃)中蛋白点数目得

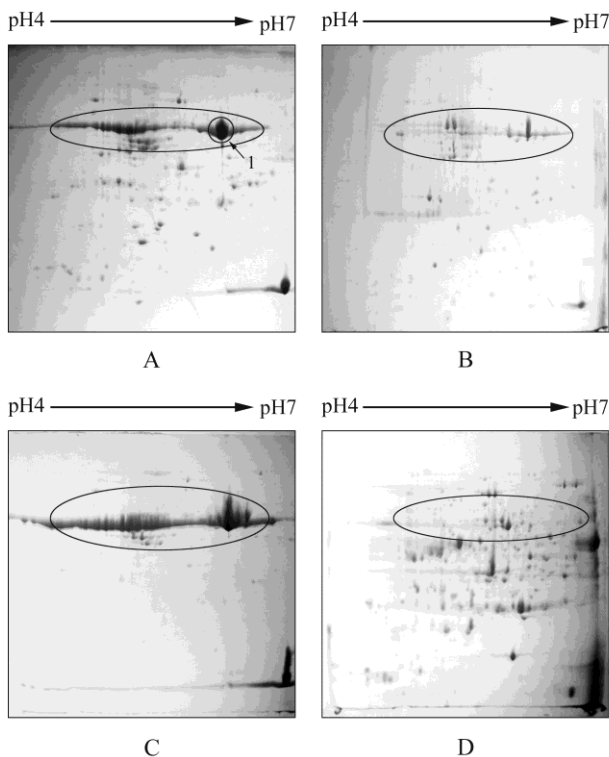


图2 Tris-HCl/TCA-丙酮法及PEG沉降法提取的萝卜叶片蛋白2-DE图谱

注: A: Tris-HCl/TCA-丙酮法; B: PEG沉降法提取组分1; C: PEG沉降法提取组分2; D: PEG沉降法提取组分3

Figure 2 2-DE profiles of proteins extracted from radish leaves using Tris-HCl/TCA-Acetone Method and PEG Fractionation

Note: A: Tris-HCl/TCA-Acetone Method; B,C,D: PEG Fractionation F₁, F₂, F₃, respectively

到大幅的提高。

在Tris-HCl/TCA-丙酮法和PEG沉降法F₃组分的蛋白凝胶电泳图谱上选取对应区域放大(图3), 观察到F₃组分蛋白点较为清晰而且密集(图3B), 图3A中检测不到的低丰度蛋白点在图3B上可以清晰地被检测到, 表明在经过PEG分级沉降之后, 低丰度蛋白的可检测率显著提高。

综合分析可以看出, 改良的PEG分级沉降法制备萝卜叶片蛋白, 可以有效地将RuBisCO沉降在F₂组分(图2C)中, F₃组分(图2D)中的低丰度蛋白分离效果显著提高, 可以鉴定出更多的低丰度蛋白。因此, 在进行萝卜叶片蛋白质组分析研究时, 与TrisHCl/TCA-丙酮法相比, Tris-HCl粗提后的PEG分级沉降法更适合分离萝卜叶片低丰度表达蛋白, 可显著提高低丰度蛋白的检测率。

2讨论

蛋白质组学的关键环节之一是蛋白质样品的

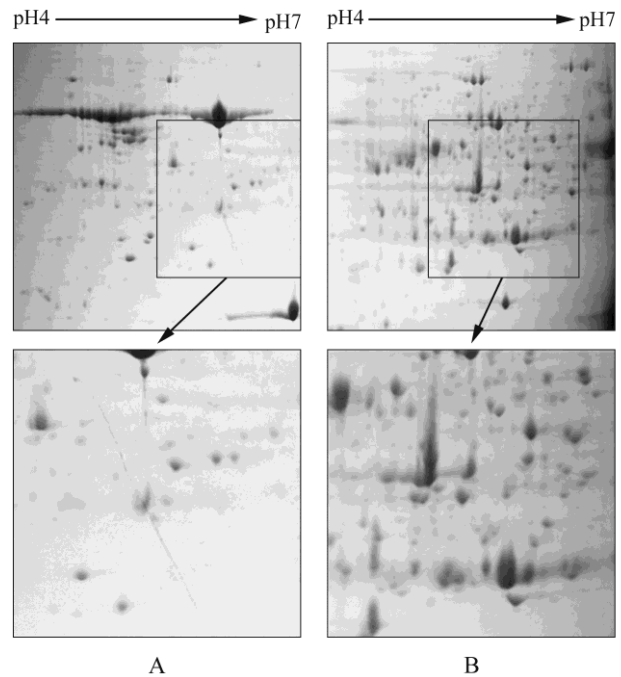


图3 Tris-HCl/TCA-丙酮法蛋白(A)与PEG沉降法组分F₃ (B)的2-DE图谱局部比较

Figure 3 Comparison of 2-DE profile of proteins extracted by Tris-HCl/TCA-Acetone method (A) and PEG Fractionation F₃ (B)

制备, 蛋白样品的质量也会直接影响双向电泳中凝胶图谱的重复性及分辨率。植物叶片中存在多种不参与基因调控的高丰度蛋白, 如RuBisCO, 但由于胶条能够承载的蛋白样品量有限, 会造成部分低丰度蛋白不能被胶条吸胀(Xi et al., 2006), 此外, 由于RuBisCO可能与植物叶片中的低丰度蛋白相结合, 也会造成部分低丰度蛋白不能被检测到(Corthals et al., 2000)。

Xi等(2006)发现采用PEG分级沉降法, 大多数的RuBisCO被沉降在16%的PEG组分中。在此基础上, 本研究将其实验步骤进行简化并采用SDSPAGE以及双向电泳技术, 比较改良的PEG分级沉降法与Tris-HCl/TCA-丙酮法对萝卜叶片蛋白质的分离效果。分析SDS-PAGE凝胶图谱, 萝卜叶片蛋白质大小亚基(LSU, SSU)主要存在于F₂和F₁组分中, 而F₃组分中蛋白质谱带明显增多, 且分布均匀。PEG沉降法通过分级沉降, 可以有效地将萝卜叶片蛋白质进行分级分离, 提取的叶片蛋白质的2-DE凝胶图谱的分析表明, 高丰度的RuBisCO被大量地沉降在F₂组分中, 少量富集于F₁组分中, 而F₃组分中几乎不含RuBisCO; 2-DE图谱上检测到的蛋白点总数之和显著多于Tris-HCl/TCA-丙酮法。综合研究结果表

明, 在相同蛋白上样量的条件下, PEG沉降法显著提高了F₁和F₃组分中低丰度蛋白质的可检测率, 能高分辨率地分离识别更多种类和数量的参与基因表达调控的蛋白质, 有利于质谱检测等后续分析工作, 为开展萝卜叶片蛋白质组学研究提供了良好的技术支持。

3材料与方法

3.1材料

材料为本实验室保存的萝卜高代自交系‘NAUJLQX09’, 种植于塑料大棚中, 常规管理, 进行蛋白提取实验时, 分别选取植株真叶期叶片。

3.2总蛋白质提取

3.2.1 Tris-HCl/TCA-丙酮法

参照谷瑞升等(1999)方法, 采用Tris-HCl粗提: 取萝卜鲜叶1 g, 用ddH₂O冲洗干净并擦干, 加入叶片质量10%的PVPP, 在液氮中研磨, 直至样品呈粉末状后, 再加入Tris-HCl提取缓冲液4 mL (100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L KCl, 50 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT), 在冰上静置1 h之后, 4℃ 12 000 rpm离心15 min; 粗提后, 取上清液, 加入预冷10% TCA/丙酮10 mL, -20℃冰箱中静置过夜, 4℃ 12 000rpm离心15 min, 所得沉淀再用10 mL左右预冷的丙酮洗涤, 在冰上静置30 min后, 4℃ 12 000 rpm离心15 min, 重复3次, 第3次用80%预冷丙酮, 沉淀置于-20℃冰箱中冷冻干燥备用。

3.2.2 PEG分级沉降法

按照PEG沉降法(Xi et al., 2006; Acquadro et al., 2009)并适当进行简化: Tris-HCl粗提步骤同3.2.1, 粗提后, 取上清液, 加入50% (w/v)PEG储备液使其终浓度达到8%, 冰浴静置30 min, 4℃ 12 000 rpm离心20 min, 沉淀为蛋白组分1 (Fraction 1, F₁)。上清液中继续加入50% (w/v) PEG储备液使其终浓度达到16%, 冰浴静置30 min, 4℃ 12 000 rpm离心20 min, 沉淀为蛋白组分2 (F₂)。上清液加入10 mL预冷10%TCA/丙酮, -20℃下静置过夜, 4℃ 12 000 rpm离心15 min, 沉淀为蛋白组分3 (F₃)。分别用预冷丙酮洗涤F₁、F₂以及F₃, 4℃ 12 000 rpm离心15 min, 重复3次, 最后一次用80%丙酮, 将F₁、F₂以及F₃沉淀-20℃下冷冻干燥备用。

3.3蛋白质样品溶解及浓度测定

将通过以上两种方法所提取的蛋白质粉末按

1:25比例加入蛋白质裂解液(7 mol/L尿素, 2 mol/L巯基乙醇, 65 mmol/L DTT, 4% CHAPS, 0.8%两性电解质Biolyte pH 3~pH 10), 涡旋1 min后, 4℃超声波助溶, 12 000 rpm离心15 min, 上清液即为蛋白质样品。Bradford (1976)法定量蛋白质样品浓度, 分装样品, 放入-80℃冰箱备用。

3.4电泳检测与图像采集

3.4.1 SDS-PAGE

在已知浓度的蛋白质样品中加入蛋白质上样缓冲液(0.062 5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10%甘油, 0.05% β-巯基乙醇, 溴酚蓝), 使其终浓度为1 μg/μL。分离胶浓度12%, 浓缩胶浓度5%, 预电泳30 min, 蛋白上样量为10 μL, 室温下电泳, 15 mA/胶, 进入分离胶后, 30 mA/胶, 至溴酚蓝到达凝胶底部停止电泳。电泳结束后银染(Blum et al., 1987)显色, 利用数码相机照相, 实验重复3次。

3.4.2双向电泳

第一向等电聚焦(IEF)参照BIORAD-PROTEAN IEF CELL (Bio-Rad, USA)等电聚焦系统指南进行。17 cm pH 4~pH 7固相IPG胶条, 每根胶条蛋白上样量为1 000 μg。50 V自动进行水化12~16 h后, 设置等电聚焦程序: 250 V, 30 min; 1 000 V, 1 h; 10 000 V, 5 h; 10 000 V, 60 000 Vh; 500 V, 保持。等电聚焦结束后, 将胶条置于平衡缓冲液 I (6 mol/L尿素, 20%甘油, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl, 2% DTT)中平衡15 min, 再置于平衡缓冲液 II (6 mol/L尿素, 20%甘油, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl, 2.5%碘乙酰胺)中平衡15 min。第二向采用Protein II (BIO-RAD)电泳槽, 平衡后的胶条放置于12%聚丙烯酰胺凝胶胶面上, 低熔点琼脂糖封胶, 开始电泳时15 mA/胶, 电泳20 min后, 30 mA/胶电泳至溴酚蓝离凝胶底部1 cm时停止电泳。考马斯亮蓝染色法(Candiano et al., 2004)染色, 凝胶扫描后图像采用PDQuest 8.0软件进行分析, 包括背景消减、蛋白点检测以及匹配等, 以获取清晰可辨的蛋白点, 实验重复3次。

3.4.3质谱鉴定与数据库检索

参照Shen等(2002)的方法进行蛋白质点的胶内酶解及肽段提取。采用ABI MALDI-TOF/TOF 4800质谱仪进行分析, 采用反射模式, 正离子谱测定获得肽指纹图谱(PMF), 用MASCOT软件(Matrix Science Ltd., London, UK)搜索NCBI和MSDB数据库。

作者贡献

相菲是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 完成论文初稿的写作; 徐良、赖德强参与实验研究和结果分析; 王燕、龚义勤参与实验设计, 试验结果分析; 柳李旺是项目构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31171956)、国家科技支撑计划课题(2012BAD02B01)、江苏省科技支撑计划(BE2010328)和江苏省农业科技自主创新资金[CX(12)2006]项目共同资助。

参考文献

- Acquadro A., Falvo S., Mila S., GiulianoAlbo A., Comino C., Moqlia A., and Lanteri S., 2009, Proteomics in globe artichoke: protein extraction and sample complexity reduction by PEG fractionation, *Electrophoresis*, 30(9): 1594-1602 <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800549> PMID:19425003
- Blum H., Beier H., and Gross H.J., 1987, Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 8(2): 93-97 <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150080203>
- Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254 [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., and Righetti P.G., 2004, Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis*, 25: 1327-1333 <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200305844> PMID:15174055
- Cellar N.A., Kuppannan K., Langhorst M.L., Ni W.T., Xu P., and Young S.A., 2008, Cross species applicability of abundant protein depletion columns for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Journal of Chromatography B*, 861(1): 29-39 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.024> PMID:18063427
- Corthals G.L., Wasinger V.C., Hochstrasser D.F., and Sanchez J.C., 2000, The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research, *Electrophoresis*, 21(6): 1104-1115 [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:6<1104::AID-ELPS1104>3.3.CO;2-3](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1104::AID-ELPS1104>3.3.CO;2-3) [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:6<1104::AID-ELPS1104>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1104::AID-ELPS1104>3.0.CO;2-C)
- Espagne C., Martinez A., Valot B., Meinel T., and Giglione C.,

- 2007, Alternative and effective proteomic analysis in *Arabidopsis*, *Proteomics*, 7(20): 3788-3799 <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200700346> PMID:17828791
- Gu R.S., Liu Q.L., Chen X.M., and Jiang X.N., 1999, Comparison and optimization of the methods on protein extraction and SDS-PAGE in woody plant, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 16(2): 171-177 (谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 蒋湘宁, 1999, 木本植物蛋白提取和SDS-PAGE分析方法的比较和优化, *植物学通报*, 16(2): 171-177)
- Gutteridge S., and Gatenby A.A., 1995, Rubisco synthesis, assembly, mechanism, and regulation, *Plant Cell*, 7(7): 809-819 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.7.7.809> <http://dx.doi.org/10.2307/3870038> PMID:12242387 PMCid:160870
- Görg A., Weiss W., and Dunn M.J., 2004, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, *Proteomics*, 4(12): 3665-3685
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y., and Aebersold R., 2000, Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97(17): 9393-9395 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.160270797> PMID:10920198
- Patlerson S.D., and Aebersold R.H., 2003, Proteomics: the first decade and beyond, *Nat. Genet.*, 33(S1): 311-323 <http://dx.doi.org/10.1038/ng1106> PMID:12610541
- Peltier J.B., Ripoll D.R., Friso G., Rudella A., Cai Y., Ytterberg J., Giacomelli L., Pillardy J., and van Wijk K.J., 2004, Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications, *J. Biol. Chem.*, 279(6): 4768-4781 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M309212200> PMID:14593120
- Ren L.P., Fan H.Y., Wang S.S., Hao Y.H., Gong Y.J., and Zhu Y.S., 2011, Improvement of cucumber leaf protein preparation method for 2-DE, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 31(8): 1706-1710 (任丽萍, 范海延, 王珊珊, 郝宇涵, 宫玉洁, 朱延姝, 2011, 黄瓜叶片蛋白质双向电泳样品分级优化, *西北植物学报*, 31(8): 1706-1710)
- Rho S., You S., Kim Y., and Hwang D., 2008, From proteomics toward systems biology: integration of different types of proteomics data into network models, *BMB Rep.*, 41(3): 184-193 <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2008.41.3.184> PMID:18377721
- Shen S.H., Matsubae M., Takao T., Tanaka N., and Komatsu S., 2002, A proteomic analysis of leaf sheaths from rice, *J. Biochem.*, 132(4): 613-620 <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003264> PMID:12359077
- Tirumalai R.S., Chan K.C., Prieto D.A., Issaq H.J., Conrads

- T.P., and Veenstra T.D., 2003, Characterization of the low molecular weight human serum proteome, *Mol. Cell Proteomics*, 2(10): 1096-1103 <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M300031-MCP200> PMID:12917320
- Widjaja I., Nauann K., Roth U., Wolf N., Mackey D., Dangel J.L., Scheel D., and Lee J., 2009, Combining subproteome enrichment and Rubisco depletion enables identification of low abundance proteins differentially regulated during plant defense, *Proteomics*, 9(1): 138-147 <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200800293> PMID:19053141
- Xi J., Wang X., Li S., Zhou X., Yue L., Fan J., and Hao D., 2006, Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome, *Phytochemistry*, 67(21): 2341-2348 <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.005> PMID:16973185