

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 027

耐辐射菌 *Micrococcus luteus* SC1204 总蛋白双向电泳体系的建立

邓鸷远^{1,2}, 杨 阳¹, 高 鹏³, 温文婷¹, 马福林¹, 孙 群¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 宜宾学院生物研究所, 宜宾 644007;
3. 四川省原子能研究院, 成都 610066)

摘 要: 以耐辐射藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* SC1204 为研究对象, 建立总蛋白双向电泳体系. 结果表明, 采用液氮研磨-酚/超高速离心法提取总蛋白, 裂解液 II (8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、60 mmol/L DTT、4% CHAPS、40 mmol/L Tris、1% pH 3~10 NL IPG buffer、0.002% BPB) 溶解蛋白, 使用 24 cm、pH 4~7 的 IPG 胶条, 上样量 250 μg 及等电聚焦 7 h (56000 Vh), 可获得满意分辨率的双向电泳图谱, 适用于后续的质谱及差异蛋白质组分析.

关键词: 耐辐射菌; 藤黄微球菌; 蛋白质提取; 双向电泳

中图分类号: Q51 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2016)02-0413-06

Optimization of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) system for proteomics analysis of a radiation-resistant bacterium *Micrococcus luteus* SC1204

DENG Wu-Yuan^{1,2}, YANG Yang¹, GAO Peng³, WEN Wen-Ting¹, MA Fu-Lin¹, SUN Qun¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;
2. Institute of Biology, Yibin University, Yibin 644007, China;
3. Sichuan Institute of Atomic Energy, Chengdu 610066, China)

Abstract: The total proteins extracted from a radiation-resistant bacterium *Micrococcus luteus* SC1204 were separated by immobilized pH gradient-based two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), and Image Master 2D Platinum 5.0 was applied to analyse 2-DE images after silver staining. The 2-DE was optimized by comparative tests on the important factors including extraction methods, lysis buffer components, pH range 3~10 of IPG strips, sample volume, and isoelectric focusing time. The results showed that the resolution of 2-DE profiles was significantly improved by liquid nitrogen grinding-phenol / ultracentrifugation in lysis buffer II for sample preparation, pH 4~7 (24 cm) IPG gel strips, the sample loading at 250 μg , and prolonged isoelectric focusing time (56000 Vh). This work provided a technical basis for the further study on differential proteomics in *M. luteus* SC1204.

Key words: radiation-resistance bacterium; *Micrococcus luteus*; protein extraction; two-dimensional gel electrophoresis

收稿日期: 2014-05-23

基金项目: 国家科技支撑计划(2014BAA03B00)

作者简介: 邓鸷远(1978-), 女, 四川开江人, 高级实验师, 博士研究生, 研究方向为资源微生物学. E-mail: dengwuyuan78@163.com

通讯作者: 孙群. E-mail: qunsun@scu.edu.cn

1 引言

蛋白质组学能从细胞整体水平上研究蛋白质组成及其调控规律,可用于研究细胞在特定条件下蛋白质的表达情况^[1]。双向电泳(2-DE)是蛋白质组学研究中最有效的技术之一,如广泛用于耐辐射微生物的抗逆性研究。Bhakti Basu 等^[2]利用双向技术联用质谱分析,在耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans* R1)总蛋白中发现了 28 个辐射诱导的显著差异表达蛋白,它们分别属于 DNA 修复、氧化应激反应、蛋白质翻译和折叠等相关蛋白;Mahnaz Yazdani 等^[3]在一株巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium* WHO)蛋白质组的双向分析中,获得了 45 个辐射诱导蛋白,这些诱导蛋白也与 DNA 重组、修复、蛋白翻译等有关。这些报道的研究对象主要是一些辐射抗性极强的微生物(能耐受 15 kGy 以上 γ 辐射),而抗辐射能力相对较弱,但数量较多的耐辐射菌却少有提及。与非耐辐射菌相比,后者具有一定的辐射抗性,推测它们与如 *Deinococcus radiodurans* 等这些极端耐辐射菌有着抗辐射机制的差异性。

藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)为革兰氏阳性菌,广泛分布于空气、水、土壤和动植物体表^[4],属条件致病菌,可引起人体败血症、脓肿^[5]等疾病。国内外已有学者对该菌的快速检测^[6]及其引起相关疾病进行了研究,但对具有辐射抗性的藤黄微球菌的研究却鲜见报道。本实验室在一辐照室钴源装置周围的环境表面分离到一株具有较强耐辐射能力的黄色非芽胞细菌,在剂量为 8.0 kGy 的 γ 射线辐射后依然具有存活能力,经 16S rDNA 分子鉴定为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* SC1204),其 GeneBank 登录号为 KF938934。

本研究拟对 *M. luteus* SC1204 双向电泳样品制备方法、裂解液配方、蛋白上样量、IPG 胶条 pH 值范围、等电聚焦时间进行优化,以期为该菌建立可靠的蛋白质组双向电泳技术体系,为 *M. luteus* SC1204 在辐射压力下细胞表达的蛋白质组分析奠定基础,以阐明这类细胞在辐射应激反应过程中功能蛋白的变化,进一步探讨其抗辐射的分子机制。

2 材料与方法

2.1 材料

耐辐射藤黄微球菌 *M. luteus* SC1204,由本

实验室在一辐照室钴源装置周围的环境表面分离得到。

2.2 方法

2.2.1 全菌蛋白提取方法的优化 超声破碎-TCA/丙酮法 采用改良后的 Zhang LF et al^[7]方法。取适量细菌培养物,离心收集细胞,用 PBS 缓冲液清洗 3 次,加入 600 μ L 缓冲液,冰上超声至液体澄清。16000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,弃沉淀。加入预冷的 10% TCA 丙酮溶液, -20 $^{\circ}$ C 过夜。4 $^{\circ}$ C 离心,收集沉淀,用丙酮和 80% 丙酮各清洗两次后于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻干燥。加入 300 μ L 裂解液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 60 mmol/L DTT, 2% pH 3~10 NL IPG Buffer, 0.002% BPB),超声助溶 2 min,温育 1 h, 16000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,取上清, -40 $^{\circ}$ C 保存。

液氮研磨-TCA/丙酮法 按乌日娜等^[8]方法(略有改动):液氮研磨菌体细胞,取粉末 50 mg,加入适量 TCA/丙酮溶液, -20 $^{\circ}$ C 过夜。后续步骤同超声破碎-TCA/丙酮法。

液氮研磨-酚法 参照张小果等^[9]的方法(略有改动),取液氮研磨的菌体粉末 50 mg,加入 1.5 mL 缓冲液(含 10% TCA, 0.07% β 巯基乙醇的丙酮溶液),混匀, -20 $^{\circ}$ C 过夜。16000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,弃上清,加入预冷的丙酮(含 0.07% β 巯基乙醇),混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 2 h,离心,弃上清。用丙酮和 80% 丙酮各洗涤 2 次后, -20 $^{\circ}$ C 冷冻干燥。加入 0.9 mL 缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0、30% 蔗糖、10 mmol/L EDTA、4% SDS、2% β 巯基乙醇),冰上超声 5 min。加入 0.7 mL Tris 饱和酚,室温放置 30 min,期间振荡 3~5 次。16000 g,离心 20 min,收集上层相,加入适量甲醇(含 0.1 mol/L 乙酸铵), -20 $^{\circ}$ C 静置 2 h 以上, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,弃上清。沉淀用 -20 $^{\circ}$ C 预冷的甲醇、丙酮和 80% 丙酮各洗涤 2 次,挥发掉残留丙酮后加入 800 μ L 裂解液,混匀,温育 1 h。16000 g, 4 $^{\circ}$ C,离心 30 min,取上清, -40 $^{\circ}$ C 保存。

液氮研磨-酚/超高速离心法 提取方法同液氮研磨-酚法,只是最后一次离心速度由 16000 g 上升至 50000 g。

2.2.2 裂解液配方的确定 本研究采用了两种裂解液,裂解液 I: 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、60 mmol/L DTT、4% CHAPS、1% pH 3~10 NL IPG buffer、0.002% BPB;裂解液配方 II 与 I 相比,增加了尿素的浓度至 8 mol/L,同时添加了 40

mmol/L Tris.

2.2.3 双向电泳 以上样品在使用前, 均用 Bradford 法^[10]测定蛋白含量. 取 250~300 μg 蛋白上样, 采用 pH 3~10 非线性(24 cm) 和 pH 4~7 的非线性(24 cm) IPG 胶条, 按照表 1 的等电聚焦程序进行第一向等电聚焦. 聚焦之后, 将胶条

表 1 等电聚焦程序参数设置

Tab. 1 Setting of IEF parameters

步骤 Step	电压(V) Volaget	升压模式 Volaget increase model	持续时间(h) Time
S1	0		6
S2	30	step	6
S3	100	step	1
S4	500	step	1
S5	1000	grad	1
S6	5000	grad	1
S7	8000	grad	1
S8	8000	step	6 或 7

分别在平衡缓冲液 I 和 II 中平衡 15 min, 然后将胶条转移至 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上, 开始第二向垂直电泳. 循环水浴温度为 15 $^{\circ}\text{C}$, 设置程序为起始功率 1 W/胶, 电泳 45 min 之后, 15 W/胶, 待溴酚蓝指示剂到达凝胶底部时停止电泳.

2.2.4 凝胶染色 采用银染法, 将电泳结束后的 SDS-PAGE 胶用固定液固定过夜后, 超纯水漂洗 2 \times 5 min, 敏化 1 min, 漂洗 2 \times 20 s, 0.1% Ag-NO_3 避光染色 10 min, 漂洗, 显色 1~3 min, 加入终止液振摇 10 min, 漂洗 10 min.

2.2.5 图像扫描与分析 采用扫描仪 Image Scanner 扫描凝胶图像, 分辨率为 600 dpi. 并用 Image Master2D Platinum 分析 2-DE 胶图.

设计不同的双向电泳体系(表 2), 以建立和优化 *M. luteus* SC1204 总蛋白的最佳双向电泳体系.

表 2 *M. luteus* SC1204 总蛋白的 7 个双向电泳体系

Tab. 2 Seven systems of two-dimensional electrophoresis of total proteins from *M. luteus* SC1204

体系编号 System	蛋白提取方法 Protein extraction	裂解液配方 Lysis buffer	上样量(μg) Loading quantities	胶条 pH 梯度 pH gradients of IPG strip	等电聚焦时间(h) IFE time
1	液氮研磨-TCA/丙酮法	I	300	3~10	6
2	液氮研磨-TCA/丙酮法	I	300	4~7	6
3	液氮研磨-酚法	I	300	4~7	6
4	液氮研磨-酚/超高速离心法	I	300	4~7	6
5	液氮研磨-酚/超高速离心法	I	250	4~7	6
6	液氮研磨-酚/超高速离心法	II	250	4~7	6
7	液氮研磨-酚/超高速离心法	II	250	4~7	7

3 结果与分析

3.1 不同蛋白提取方法的效果比较

分析比较了几种蛋白提取方法, 超声破碎法提取的蛋白得率极低, 其浓度仅有 1.42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 因此未进行后续的电泳实验. 而采用液氮研磨的后 3 种方法所得的蛋白样品含量相对较高, 在细胞湿重和加入裂解液体积的比例均相同的前提下, 所得蛋白的浓度分别为 5.18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、4.72 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 4.38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 双向电泳结果显示, 液氮研磨-TCA/丙酮法图谱(图 1a)中横纹较多, 蛋白点较模糊, 蛋白斑点数为 388 个; 液氮研磨-酚法的图谱(图 1b)与图 1a 相比, 蛋白点分离度明显提高, 蛋白点数为 463; 液氮研磨-酚/超高速离心法的蛋白分离效果(图 1c)更好, 蛋白点数最多, 达 502,

因此该法最适合耐辐射藤黄微球菌 *M. luteus* SC1204 的双向电泳样品制备.

3.2 裂解液配方对 2-DE 图谱的影响

从图 2 可以看出, 在其它实验条件都相同的情况下, 裂解液 II (图 2b) 的蛋白质图谱较裂解液 I (图 2a) 分辨率更高, 几乎没有横纹, 蛋白点数目明显更多, 且分布均匀分散. 因此在后续的实验中使用配方 II 的裂解液来制备蛋白样品.

3.3 IPG 胶条 pH 值对 2-DE 图谱的影响

如图所示, 使用 pH 3~10(图 3a) 的胶条所得电泳图谱中蛋白点大都集中分布在酸性端, 碱性端蛋白点数较少, 这也说明所提取出来的蛋白质的等电点几乎都分布于 pH 3~10 之间, 因此为了提高对大多数蛋白质的分辨率, 改用了 pH 4~7 的 IPG 胶条. 结果发现, 使用 pH 4~7 的胶条(图

3b)所得电泳图谱中大部分蛋白点靠中间区域分布,蛋白质的分离度有所提高.因此后续实验中

均采用 pH 4~7 的 IPG 胶条.

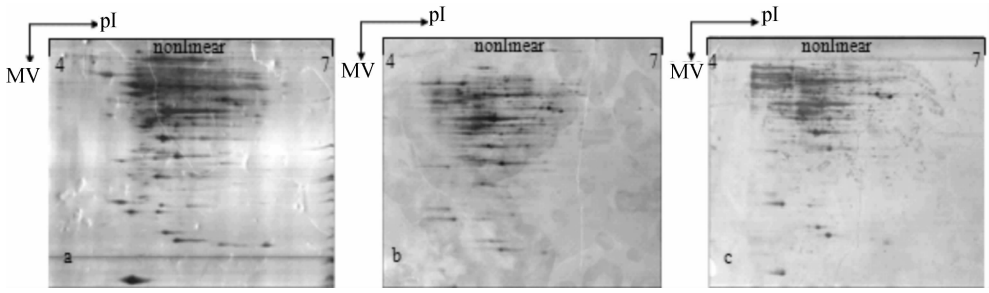


图 1 *M. luteus* SC1204 经不同制备方法获得的总蛋白 2-DE 图谱

a: 液氮研磨-TCA/丙酮法, 体系 2; b: 液氮研磨-酚法, 体系 3; c: 液氮研磨-酚/超高速离心法, 体系 4

Fig. 1 The 2-DE of total proteins from *M. luteus* SC1204 extracted by different sample preparations a: liquid nitrogen grinding-TCA/acetone method, System 2; b: liquid nitrogen grinding-phenol method, System 3; c: liquid nitrogen grinding-phenol/ultracentrifugation method, System 4

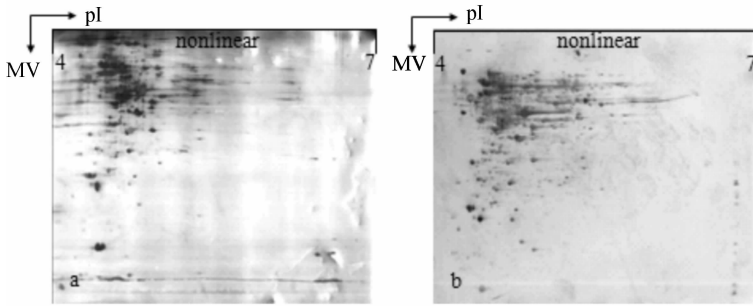


图 2 不同裂解液配方的 *M. luteus* SC1204 总蛋白 2-DE 图谱

a: 裂解液 I, 体系 5; b: 裂解液 II, 体系 6

Fig. 2 The 2-DE of total proteins from *M. luteus* SC1204 extracted by different lysis buffer a: lysis buffer I, System 5; b: lysis buffer II, System 6

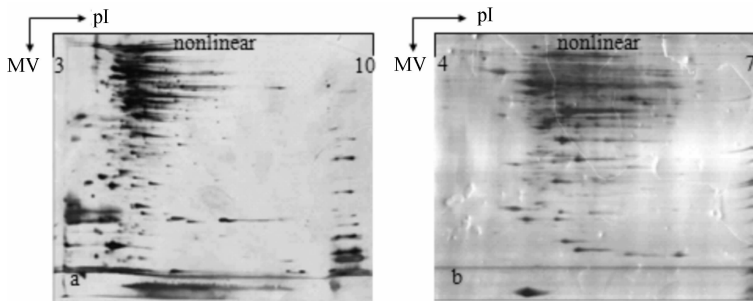


图 3 不同胶条 pH 范围的 *M. luteus* SC1204 总蛋白 2-DE 图谱

a: pH 3~10, 体系 1; b: pH 4~7, 体系 2

Fig. 3 The 2-DE of *M. luteus* SC1204 total proteins from different pH strips a: pH 3~10, System 1; b: pH 4~7, System 2

3.4 样品上样量对 2-DE 图谱的影响

2-DE 图谱显示, 上样量为 250 μg 的电泳图谱(图 4b)较 300 μg (图 4a)更清晰, 横条纹明显减少. 因此后续实验中选择上样量 250 μg 较好.

3.5 等电聚焦时间对 2-DE 图谱的影响

结果表明, 聚焦 7 h 的电泳图谱(图 5b)较聚

焦 6 h 的电泳图谱(图 5a)分辨率高, 图谱分析, 等电聚焦 6 h 的电泳图谱的蛋白斑点数为 591 个, 而聚焦 7 h 的电泳图谱的蛋白斑点数增加到了 672 个, 蛋白分离效果明显好于聚焦 6 h.

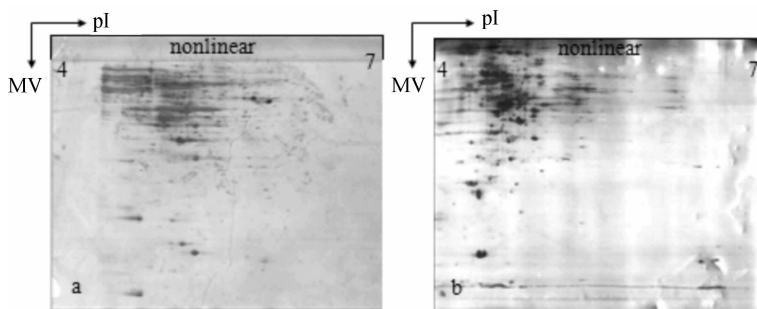


图 4 不同上样量的 *M. luteus* SC1204 总蛋白 2-DE 图谱

a: 300 μg , 体系 4; b: 250 μg , 体系 5

Fig. 4 The 2-DE of *M. luteus* SC1204 total proteins at different loading quantities

a: 300 μg , System 4; b: 250 μg , System 5

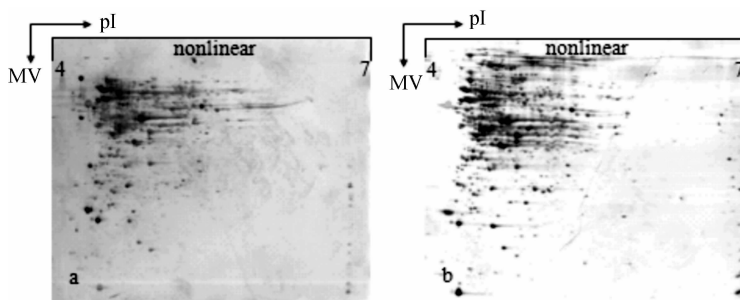


图 5 不同等电聚焦时间的 *M. luteus* SC1204 总蛋白 2-DE 图谱

a: 6 h, 体系 6; b: 7 h, 体系 7

Fig. 5 The 2-DE of *M. luteus* SC1204 total proteins at different IEF time

a: 6 h, System 6; b: 7 h, System 7

4 讨论

4.1 蛋白质样品的制备

蛋白质提取需要有效破碎细胞, 释放细胞内容物. 藤黄微球菌为革兰氏阳性菌, 具有较坚韧的细胞壁, 采用超声破碎细胞, 耗时过长, 蛋白易降解. 而液氮研磨不仅破碎细胞效果好, 还可大量制备蛋白样品, 且低温可防止蛋白降解^[8].

蛋白样品中的盐离子等杂质会影响等电聚焦的进行, 在双向图谱中造成横向拖尾或蛋白丢失^[11]. 本实验采用酚法提取耐辐射细菌 *M. luteus* SC1204 总蛋白, 获得的 2-DE 图谱较清晰, 蛋白点较多. 推测其原因是酚法通过不同相选择性溶解, 能有效去除有机物杂质和盐离子等, 酚还能使蛋白水解酶失活而防止蛋白降解^[12]. 同时, 由于酚的脂溶性, 还有利于膜蛋白的提取^[9], 而有些膜蛋白往往与耐辐射菌细胞的辐射抗性有关^[13,14]. 超高速离心也是去除蛋白中杂质的有效手段. 本研究加大提取过程中的最后一次离心速度至 50000g, 使 2-DE 图谱效果得到了进一步改善.

2-DE 样品的制备不但要求尽量减少蛋白的降解与损失, 还应使其最大程度地被溶解, 从而在电泳图谱上呈现更多的蛋白^[15]. 裂解液中硫脲与高浓度尿素的联用、两性去垢剂 CHAPS 均可提高蛋白质的溶解性能, 特别是膜蛋白的溶解性^[11,16], 但若按 4% CHAPS 与 2 mol/L 硫脲和 8 mol/L 尿素混合时, 蛋白溶解性会更佳^[16,17]; Tris 不仅有助于膜蛋白的聚焦^[18], 而且还能抑制蛋白降解, 因此裂解液 II 的图谱较 I 更为清晰, 且蛋白点数更多.

4.2 双向电泳

研究表明, 使用窄范围 pH 梯度胶条会检测到更多的蛋白点, 尤其是低丰度蛋白. Robert Wildgruber 等^[19]利用 pH 4~5, 4.5~5.5, 5~6 和 6~9 等窄范围 pH 胶条分离出 2286 个酵母蛋白质点, 而用 pH 3~10 的胶条只鉴定出 755 个蛋白质点. 本实验先采用了 pH 3~10 的非线性胶条对 *M. luteus* SC1204 的总蛋白进行分离, 发现大部分蛋白质集中在酸性端, 之后改用 pH 4~7 非线性胶条进行双向电泳, 提高了在该 pH 范围的

蛋白分辨率, 蛋白点增加了 10.01%。

双向电泳的分辨率还与上样量的多少有关。在本实验中, 上样量为 300 μg 时, 横纹相对较多, 且因高丰度蛋白点过大掩盖了其周围的蛋白点, 而且等电点和分子量相近的蛋白相互重叠和融合为一个点, 从而影响不同蛋白点之间的分离, 这将有碍于后续的质谱鉴定。比较而言, 上样量为 250 μg 的图谱更清晰, 蛋白点更多而分散。

聚焦情况的好坏也会影响电泳结果。聚焦不完全会造成蛋白水平和垂直方向的拖尾; 但过度聚焦会因为活性水转运而导致过多水在 IPG 胶表面渗出(电渗), 引起蛋白图谱变形, 以及在胶条碱性端产生水平条纹和蛋白质的丢失^[20]。本实验中的体系 7 适当延长了聚焦时间以确保聚焦完全, 获得了较清晰的电泳图谱。

通过以上步骤的优化, 采用液氮研磨—酚/超高速离心法提取 *M. luteus* SC1204 总蛋白, 在裂解液中合理提高尿素浓度, 添加 40 mM Tris, 24 cm pH 4~7 IPG 胶条, 上样量为 250 μg 和适当延长聚焦时间能获得较高质量的 2-DE 图谱, 适合于后续蛋白质组学分析。

参考文献:

- [1] Van Wijk K J. Challenges and prospects of plant proteomics[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 501.
- [2] Basu B, Apte S K. Gammaradiation-induced proteome of *Deinococcus radiodurans* primarily targets DNA repair and oxidative stress alleviation[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 11(1): 1.
- [3] Yazdani M, Naderi-Manesh H. Comparative proteomics analysis of a novel γ -radiation-resistant bacterium wild-type *Bacillus megaterium* strain WHO DQ973298 recovering from 5 kGy γ -irradiation[J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2012, 10(2): 87.
- [4] 程波财, 姜淑英, 汪孟娟, 等. 藤黄微球菌降解真菌毒素玉米赤霉烯酮的研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2010, 22(5): 389.
- [5] 柯水源, 林湛, 戴湘春, 等. 藤黄微球菌致败血症 7 例及脓肿 1 例[J]. *广东医学院学报*, 2001, 19(4): 281.
- [6] 陈宇明, 程天印, 王小君, 等. 藤黄微球菌 PCR 检测方法的建立[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2007, 1: 47.
- [7] Zhang L F, Yang H M, Cui S X, *et al.* Proteomic analysis of plasma membranes of cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 in response to high pH stress [J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(6): 2892.
- [8] 乌日娜, 张和平, 孟和, 等. 干酪乳杆菌蛋白质双向电泳条件优化及图谱建立[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(5): 598.
- [9] 张小果, 乔桂荣, 李翠云, 等. 旱柳根系蛋白质双向电泳体系的建立[J]. *浙江农林大学学报*, 2011, 28(4): 653.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976(72): 248.
- [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.
- [12] 李红兵, 康振生. 适于小麦叶片蛋白质组分析的样品提取方法研究[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(3): 632.
- [13] Tian B, Wang H, Ma X Q, *et al.* Proteomic analysis of membrane proteins from a radioresistant and moderate thermophilic bacterium *Deinococcus geothermalis* [J]. *Molecular Biosystems*, 2010, 6(10): 2068.
- [14] Rajpurohit Y S, Misra H S. Characterization of a DNA damage-inducible membrane protein kinase from *Deinococcus radiodurans* and its role in bacterial radioresistance and DNA strand break repair [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6): 1470.
- [15] 刘昭军, 张胜, 赵忠, 等. 文冠果枝条韧皮部蛋白质双向电泳体系的建立[J]. *西北林学院学报*, 2012, 27(3): 55.
- [16] Molly M P, Herbert B R, Walsh B J, *et al.* Extraction of membrane protein by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19: 837.
- [17] Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, *et al.* Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 307.
- [18] 夏金兰, 欧阳叙东, 张成桂, 等. 大肠杆菌外膜蛋白的分离及其双向电泳图谱的建立[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(2): 201.
- [19] Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, *et al.* Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 2610.
- [20] 阮松林, 童建新, 赵杭苹. 双向电泳技术研究进展[J]. *杭州农业科技*, 2006, (5): 2.