

# 质谱蛋白组学研究中草莓雌蕊蛋白提取方法优化

裘劭人, 柴伟国, 童建新, 周历萍, 王淑珍\*

(杭州市农业科学研究院, 浙江 杭州 310024)

**摘要:**为筛选适用于质谱蛋白组学研究的草莓雌蕊蛋白提取方法,本研究通过在传统酚提法中加入氯仿提取步骤建立了一种新的酚氯仿提取方法,并对三氯乙酸/丙酮沉淀法(方法 I)、酚提法(方法 II)和酚氯仿法(方法 III)提取草莓雌蕊蛋白的3种方法的适用性进行了评估。总蛋白提取率、总蛋白鉴定通量、非共有蛋白亚细胞位置和亲疏水性分布4个方面的分析结果表明,酚氯仿法的蛋白提取效率最高,蛋白提取最全面。方法 I、方法 II、方法 III的蛋白提取率分别为 0.20%、0.12% 和 0.27%,总蛋白鉴定量分别为 5 170、5 345 和 5 697,韦恩图分析显示方法 III 交集到了方法 I 和方法 II 的大部分非共有蛋白。亚细胞定位分析显示,方法 I 和方法 III 的非共有蛋白主要分布在细胞核中,而方法 II 则主要分布在细胞质中,表明3种方法具有不同的亚细胞偏好性。亲疏水性分析显示,方法 I 亲水性蛋白比例最高但疏水性蛋白提取不足,方法 II 则亲水性蛋白提取较少,方法 III 兼顾了亲疏水性蛋白的提取。试验结果表明,3种方法中方法 III 为草莓雌蕊的最优提取方法。

**关键词:**草莓;雌蕊;蛋白组学;提取方法

中图分类号:S663.9

文献标志码:A

文章编号:1004-1524(2020)12-0000-00

## Optimization of strawberry gynoecium protein extraction method for mass spectrum-based proteomic study

QIU Jieren, CHAI Weiguo, TONG Jianxin, ZHOU Liping, WANG Shuzhen\*

(Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China)

**Abstract:** In order to screen a strawberry gynoecium protein extraction method for mass spectrum (MS)-based proteomics studies, a new method named as phenol-chloroform extraction was established by adding a chloroform extraction step to the traditional phenol extraction method, and the application on extracting strawberry gynoecium proteins of the three methods: trichloroacetic acid/acetone precipitation (method I), phenol extraction (method II) and phenol-chloroform extraction (method III) were evaluated. The analysis results of the total protein yield, sum of protein identification, subcellular location and hydrophilic-hydrophobic distribution of non-shared proteins showed that, the phenol-chloroform method is the most efficient and comprehensive for protein extraction. The protein yields of method I, method II and method III were 0.20%, 0.12% and 0.27%, respectively; and the sum of protein identified were 5 170, 5 345, and 5 697, respectively. The Venn diagram analysis showed that method III intersected most of the non-shared proteins of method I and method II. Subcellular location analysis showed that non-shared

收稿日期:2020-07-13

基金项目:杭州市农业科研自主申报项目(20191203B53);杭州市农科院科技创新基金(2020HNC21)

作者简介:裘劭人(1985—),女,浙江嵊州人,硕士,农艺师,从事植物蛋白质组和代谢组研究。E-mail: jieren\_qiu@sina.cn

\* 通信作者,王淑珍, E-mail: jxwsz163@163.com

proteins of method I and method III were mainly distributed in the nucleus, whereas those of method II were mainly distributed in the cytoplasm, indicating that the three methods had different subcellular preferences. Hydrophilic-hydrophobic analysis showed that method I had the highest proportion of hydrophilic protein but insufficient hydrophobic protein extraction, while method II had insufficient extraction of hydrophilic protein, and method III took into account the extraction of both hydrophilic and hydrophobic proteins. According to the results, method III should be the optimal protein extraction method for strawberry gynoceium.

**Key words:** strawberry; gynoceium; proteomics; extraction methods

蛋白质组学作为连接转录组学和代谢组学的桥梁,是系统生物学的重要组成部分。近年来,质谱因其高通量和高分辨率的特性成为复杂蛋白质样品分析的首选方法,基于质谱的蛋白质组学已经成为解读基因组编码信息的一项必不可少的技术<sup>[1]</sup>。由于蛋白种类的千变万化,不同组织蛋白质组成各有特点,在进行蛋白质组学实验时需要根据组织样本的特点选择合适的提取方法。如提取人树突状细胞蛋白时,纯丙酮沉淀法比三氯乙酸/丙酮沉淀法更有效,约提升了28%的蛋白鉴定量<sup>[2]</sup>。而植物细胞一般富含色素、多酚等次生代谢物,在蛋白酶解时起干扰作用,因此提取植物蛋白时需进行更繁复的纯化程序。目前常用的适用于质谱分析的植物蛋白提取方法主要为三氯乙酸/丙酮法和酚提法<sup>[3]</sup>。

草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)因其香甜的口感和丰富的营养元素而深受消费者青睐,是重要的经济作物。杂交授粉是草莓育种的常用手段,而雌蕊可授性强弱是杂交成功的重要影响因素。发育成熟的草莓雌蕊柱头表面覆有一层亲水蛋白膜,经研究报道可能与花粉识别和萌发相关,因此可采用蛋白质组学方法研究雌蕊可授性<sup>[4]</sup>。非数据依赖性采集(data-independent acquisition, DIA)质谱技术,是一种高效稳定的非标记蛋白质组研究方法<sup>[5]</sup>。本研究拟对传统蛋白提取方法进行优化并利用DIA技术评价筛选出一种适用于质谱分析的草莓雌蕊蛋白提取方法,为草莓雌蕊蛋白组学研究与应用提供技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用草莓品种为红颊(Benihoppe),于

2020年3月上旬在杭州市农业科学研究院生物技术所草莓试验基地采取。取开花第一天的草莓花,150朵混成1个重复,每种方法设3个重复。去花柄、萼片、雄蕊,取雌蕊组织称取鲜重(约0.5g)后立即置于液氮冷冻保存。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蛋白提取

雌蕊组织液氮下研磨成粉,分别采用三种方法进行蛋白提取:三氯乙酸/丙酮沉淀法(方法I)、酚提法(方法II)和酚氯仿法(方法III)。三氯乙酸/丙酮沉淀法和酚提法依照文献[6]步骤进行。酚氯仿法步骤如下:

取0.2g研磨好的粉末转移至2mL离心管,加入800 $\mu$ L 4 $^{\circ}$ C预冷的提取液(含0.7 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>蔗糖、0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>氯化钾、0.5 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris、2%巯基乙醇和50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA的水溶液,盐酸调至pH 8.0),旋涡30s混匀;再加入800 $\mu$ L 4 $^{\circ}$ C预冷的Tris饱和酚(pH 8.0)抽提,得到细胞沉淀和溶液层。溶液层又分为3层,从上至下依次为酚层、中间层和水层。吸取最上层酚层约600 $\mu$ L至新的2mL离心管,加入600 $\mu$ L提取液进行抽提,再取最上层酚层约400 $\mu$ L至10mL离心管。吸取中间层和水层至另一新的2mL离心管,加入800 $\mu$ L氯仿进行抽提。此时溶液最上层为水层,中间层含部分蛋白,最下层为氯仿。吸取最上层水层丢弃,将中间层和最下层氯仿层转移到上述的10mL离心管与酚层合并,此时离心管内溶液总体积约为1.2mL。在10mL离心管中加入6mL -20 $^{\circ}$ C预冷的0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>醋酸铵甲醇, -20 $^{\circ}$ C沉淀过夜,5000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心30min弃上清。沉淀经-20 $^{\circ}$ C预冷的甲醇清洗3次,于-70~-20 $^{\circ}$ C冻干至恒重成蛋白粉。

蛋白粉加入400 $\mu$ L裂解液(8 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>尿素,0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl,1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> PMSF(苯甲基

磺酰氟), pH 8.0), 涡旋 30 s, 置于 0 °C 冰水浴中, 以 1 000 kJ 能量、超声 3 s 间歇 5 s 的模式超声 2 min 至蛋白粉完全溶解。溶解液在 4 °C 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 取上清即为蛋白溶液。

### 1.2.2 蛋白酶解

蛋白溶液采用 Bradford 试剂盒(碧云天, 上海)定量, 取 200 μg 蛋白还原烷基化后转移至 Amicon-Ultra-15 超滤管(Merck Millipore, 美国), 按说明书除杂, 加入含 4 μg 胰酶(Promega, 美国)的 100 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH8.0) 缓冲液, 37 °C 反应 12 ~ 16 h。酶解完成后于 4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 用 200 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.0) 清洗 2 次, 即得肽段溶液。肽段溶液中加入 5% 三氟乙酸(Thermo Fisher Scientific, 美国)至终浓度为 0.1% ~ 1.0%, 以 Pierce™ C18 Tips(Thermo Fisher Scientific, 美国)除盐后冻干, 复溶于 200 μL 0.1% 甲酸水。

### 1.2.3 DIA 质谱分析

酶解后所有样本取 10 μL 肽段混合, 混合样本中加入 1 μL 10 × iRT 标准肽段溶液(Bioognosys, 瑞士), 按本课题组前期优化的二维液质联用方法建立肽段谱图数据库<sup>[7]</sup>。每个样本再各取 10 μL 分别进行反向色谱串联 DIA 质谱分析。

反向色谱分离梯度: 0 ~ 3 min, 4% ~ 7% Buffer B; 3 ~ 103 min, 7% ~ 18% Buffer B; 103 ~ 113 min, 18% ~ 35% Buffer B; 113 ~ 117 min, 35% ~ 75% Buffer B; 117 ~ 120 min, 75% Buffer B。(Buffer A, 0.1% 甲酸水溶液; Buffer B, 0.1% 甲酸乙腈溶液。)质谱设置参数: 扫描时间 120 min, 离子模式正离子, 一级质谱分辨率 70 000 at *m/z* 200, 最大注入时间 50 ms, 扫描范围 350 ~ 1300 *m/z*; 二级扫描分辨率 17 500 at *m/z* 200; 碰撞能量 27%, 分设 30 个隔离窗口, 为 350 ~ 381、381 ~ 398、398 ~ 415、415 ~ 432、432 ~ 444、444 ~ 456、456 ~ 468、468 ~ 480、480 ~ 492、492 ~ 504、504 ~ 516、516 ~ 528、528 ~ 540、540 ~ 552、552 ~ 564、564 ~ 576、576 ~ 592、592 ~ 608、608 ~ 624、624 ~ 640、640 ~ 656、656 ~ 672、672 ~ 688、688 ~ 712、712 ~ 736、736 ~ 766、766 ~ 806、806 ~ 856、856 ~ 926、926 ~ 1300 *m/z*。

### 1.2.4 数据分析

蛋白提取率通过 Microsoft Excel 2016 统计, 并利用 GraphPad Prism (v. 8.0.1) 进行两两比较单因素方差分析。质谱原始数据通过 Spectronaut Pulsar X (Biognosys, 瑞士) 进行蛋白鉴定, 通过保留时间和质量窗口的校正决定理想的提取窗口, 与谱图库进行匹配, 蛋白质定性标准: 母离子阈值 1.0% FDR, 蛋白阈值 1.0% FDR。采用 jvenn 包进行韦恩图分析蛋白交集情况<sup>[8]</sup>, 并利用 Deeploc (v. 1.0) 进行非共有蛋白的亚细胞定位预测<sup>[9]</sup>, 利用在线工具 ([http://www.bioinformatics.org/sms2/protein\\_gravy.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html)) 评估非共有蛋白的总平均亲水性 (grand average of hydropathicity, Gravy)<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

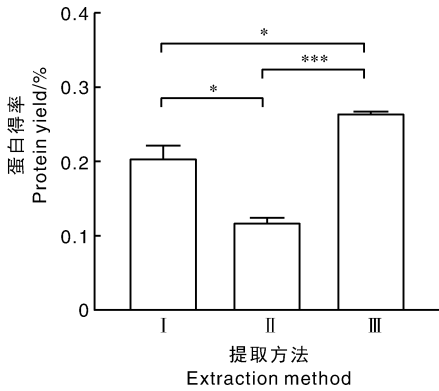
### 2.1 蛋白提取率比较

方法 I 三次重复的总蛋白提取率分别为 0.21%、0.22% 和 0.19%, 平均得率 0.20%; 方法 II 三次重复的总蛋白提取率分别为 0.11%、0.12% 和 0.12%, 平均得率 0.12%; 方法 III 三次重复的总蛋白提取率分别为 0.26%、0.27% 和 0.27%, 平均得率 0.27% (图 1)。此试验结果显示, 方法 III 的蛋白提取效率最高, 而方法 II 效率最低。

### 2.2 蛋白鉴定通量比较

三种方法提取得到的蛋白酶解后混合上机建立肽段谱图库, 共鉴定到 6 577 个蛋白, 25 895 个肽段。三种方法鉴定蛋白的韦恩图(图 2) 结果表明, 方法 I 3 次重复分别鉴定到 4 876、4 826 和 4 869 个蛋白, 总共鉴定到 5 170 个蛋白; 方法 II 3 次重复分别鉴定到 5 082、4 995 和 5 056 个蛋白, 总共鉴定到 5 345 个蛋白; 方法 III 3 次重复分别鉴定到 5 439、5 509 和 5 511 个蛋白, 总共鉴定到 5 697 个蛋白。

总鉴定蛋白的韦恩图分析显示, 4 864 个蛋白在 3 种方法中均有鉴定到, 为共有蛋白。方法 I 另外鉴定到的 306 个非共有蛋白中, 有 255 个蛋白与方法 III 有交集; 方法 II 鉴定到的 481 个非共有蛋白中, 有 421 个蛋白与方法 III 有交集; 157 个蛋白仅在方法 III 鉴定到, 35 个蛋白仅在方法 I



蛋白得率,提取蛋白量与组织鲜重的比值; I, 三氯乙酸/丙酮沉淀法; II, 酚提法; III, 酚氯仿法。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ 。下同。

Protein yield, Ratio of extracted protein amount to fresh tissue weight; I, Trichloroacetic acid/acetone precipitation method; II, Phenol extraction method; III, Phenol-chloroform method. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . The same as below.

图1 三种提取方法的蛋白得率比较

Fig. 1 Comparison of protein yields from 3 extraction methods

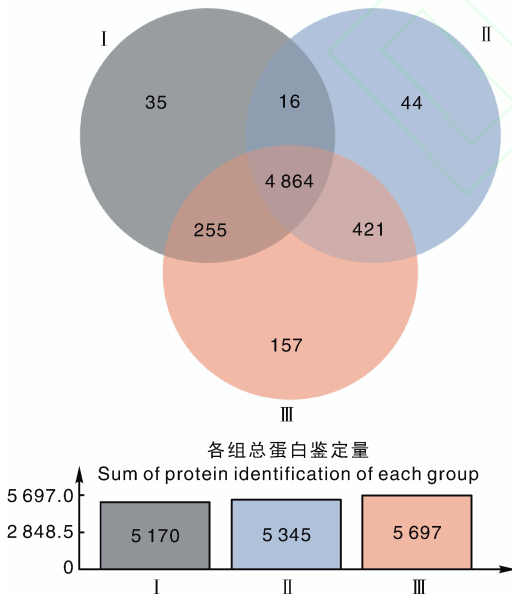


图2 三种方法鉴定蛋白的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of proteins identified by three methods

中鉴定到,44个仅在方法II中鉴定到。由此可看出,方法III提取的蛋白鉴定通量最高,并且交集到了方法I和方法II提取到的大部分非共有蛋白中,是提取最全面的方法。

## 2.3 非共有蛋白的亚细胞位置分析

方法I、II、III鉴定到的非3组共有蛋白数分别为306、481和833,按照提取方法分别对各自的非共有蛋白进行亚细胞定位预测分析,并统计各个细胞位置分布的蛋白数和占比。结果显示(表1),3种方法提取的细胞质蛋白在各自鉴定到的非共有蛋白中占比差异不大,分别为23.20%、23.91%、22.83%;而细胞核蛋白占比则变化较大。方法I提取的细胞核蛋白数量在其鉴定到的非共有蛋白中占比37.58%,与占比第二的细胞质蛋白相差约14%,这个差距在3种方法中最高;而方法II中细胞核蛋白仅占16.74%且其绝对数量在3种方法中也最低,线粒体、内质网、高尔基体、液泡、细胞膜蛋白则相比方法I有显著提升;方法III中细胞核蛋白占比最大为27.47%,但与细胞质蛋白占比相差不大。方法III提取的总蛋白数最多,分布到各亚细胞位置的绝对数量也均在3种方法中居首,大多数位置上均超过前2种方法的蛋白总和。

由此可知,3种方法对细胞蛋白的提取具有一定的位置偏好性,方法I偏好细胞核蛋白的提取;而方法II细胞核蛋白比例偏低,更偏向内质网、高尔基体等其他细胞器蛋白的提取;相对前两种方法,方法III提取的非共有蛋白较全面,在各细胞位置分布较为平衡。

## 2.4 非共有蛋白的亲疏水性分布

总平均亲水性Gravy值用以评价蛋白的亲疏水性,Gravy值为正的蛋白为疏水性蛋白,为负则是亲水性蛋白。对非共有蛋白的Gravy值进行计算,并以0.5为一个区段进行分布统计,结果显示(图3):三种方法提取到的草莓雌蕊蛋白均以亲水性蛋白为主,方法I提取的非共有蛋白中亲疏水蛋白比例分别为93.5%和6.5%,其中强亲水性蛋白(Gravy值 $< 0.5$ )有153个;方法II提取的非共有蛋白中亲疏水蛋白比例分别为74.9%和25.1%,相较方法I,亲水性蛋白比例下降明显,且强亲水性蛋白绝对量也仅为103个;而方法III中非共有蛋白亲疏水性蛋白占比分别为81.8%和18.2%,比例介于前两者之间,但各区段蛋白分布数量均高于前两者,其中强亲水性蛋白283个。

表 1 三种方法鉴定的非共有蛋白亚细胞位置分布

Table 1 Subcellular location distribution of non-shared proteins identified by three methods

位置 Location	数量 Count(占比 Percent)		
	I	II	III
细胞核 Nucleus	115(37.58%)	77(16.74%)	225(27.47%)
细胞质 Cytoplasm	71(23.20%)	110(23.91%)	187(22.83%)
质体 Plastid	26(8.50%)	55(11.96%)	81(9.89%)
线粒体 Mitochondrion	17(5.56%)	49(10.65%)	69(8.42%)
内质网 Endoplasmic reticulum	19(6.21%)	61(13.26%)	78(9.52%)
高尔基体 Golgi apparatus	5(1.63%)	28(6.09%)	39(4.76%)
液泡 Vacuole	6(1.96%)	31(6.74%)	41(5.01%)
过氧化物酶体 Peroxisome	4(1.31%)	6(1.30%)	11(1.34%)
细胞膜 Cell membrane	20(6.54%)	50(10.87%)	75(9.16%)
胞外 Extracellular	23(7.52%)	14(3.04%)	27(3.30%)

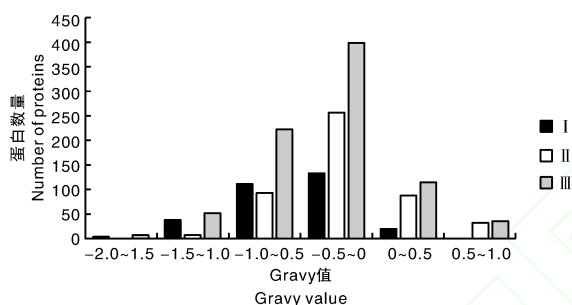


图 3 非共有蛋白 Gravy 值分布图

Fig. 3 Histogram of Gravy value distribution of non-shared proteins

### 3 讨论

三氯乙酸/丙酮沉淀法和酚提法是传统常用的植物组织蛋白提取方法,酚氯仿法则是酚提法的优化。本研究结果表明,两种传统方法中,三氯乙酸/丙酮法的总蛋白提取得率高于酚提法,约为后者的 1.67 倍,但质谱鉴定通量不及后者,这与 Jin 等<sup>[11]</sup>在棉花叶片蛋白提取上的试验结果相符;提取蛋白种类方面,三氯乙酸/丙酮法中细胞核和强亲水性蛋白的提取比例较高、疏水性蛋白提取能力较弱,而酚提法中细胞核和亲水性蛋白提取能力下降、疏水性和内质网等其他细胞器蛋白比例提升。

本研究借鉴核酸提取时去除蛋白杂质的原理,通过在传统酚提法中加入氯仿提取步骤,建立了新的酚氯仿抽提蛋白方法。在传统酚提法中,组织细胞中的蛋白首先溶入提取液水层,再经酚抽提变性溶入酚层后,用甲醇沉淀纯化并浓

缩<sup>[12]</sup>。但由于酚与水能部分互溶(常温下约 8 g 酚溶于 100 g 水),水层中仍有少量酚和强亲水性蛋白残留<sup>[13]</sup>。核酸提取时,常用酚氯仿混合物萃取含有核酸的水相,去除水相中的蛋白。氯仿在其中除了变性蛋白外,还起进一步萃取酚进入氯仿层、加速水相和酚相分离的作用<sup>[14]</sup>。酚提取后加入氯仿抽提步骤,预计将增加亲水性尤其是强亲水性蛋白的提取比例,本研究结果支持了这一预测。相比酚提法,酚氯仿法提取的亲水性蛋白比例提升了 6.9%,其中强亲水性蛋白增加 180 个,超过了三氯乙酸/丙酮沉淀法的亲水性蛋白提取容量,并同时保留了酚提法提取疏水性蛋白能力较高的特点,因此其蛋白提取得率和鉴定通量在 3 种方法中均为最高。以往的研究中注重氯仿的疏水属性,常以氯仿/甲醇组合直接抽提细胞以进行疏水性和脂溶性蛋白的提取,如 Vertommen 等<sup>[15]</sup>用氯仿/甲醇法进行了香蕉叶片膜蛋白的提取;而本研究结果显示氯仿与酚组合还可以促进亲水性蛋白的提取,弥补酚提法亲水性蛋白提取能力较弱的不足。

本研究利用 DIA 技术对 3 种方法——三氯乙酸/丙酮沉淀法、酚提法和酚氯仿法提取草莓雌蕊蛋白的适用性进行了评估。通过总蛋白提取得率、蛋白鉴定通量、非共有蛋白亚细胞位置和亲疏水性分布 4 个方面的综合评价得出,3 种方法中酚氯仿法的提取效率最高,蛋白提取最全面。酚氯仿法综合了两种传统方法的特点,提取到了两者大部分的非共有蛋白,兼顾了亲疏水性和各细胞位置蛋白的提取,其提取得率、鉴定通量、蛋白种类相比两种传统方法均有显著提升,

为最优提取方法。本研究结果为草莓雌蕊组织蛋白质组研究选择合适的蛋白提取方法提供了依据,为后续草莓雌蕊可授性机理研究奠定了技术基础。

### 参考文献 (References):

- [1] AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 198 - 207.
- [2] ZHANG Y, BOTTINELLI D, LISACEK F, et al. Optimization of human dendritic cell sample preparation for mass spectrometry-based proteomic studies [J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 484: 40 - 50.
- [3] SHEORAN I S, ROSS A R S, OLSON D J H, et al. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis[J]. *Plant Science*, 2009, 176(1): 99 - 104.
- [4] EDLUND A F, SWANSON R, PREUSS D. Pollen and *Stigma* structure and function: the role of diversity in pollination[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(Suppl): S84 - S97.
- [5] LUDWIG C, GILLET L, ROSENBERGER G, et al. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial[J]. *Molecular Systems Biology*, 2018, 14(8): e8126.
- [6] ISAACSON T, DAMASCENO C M B, SARAVANAN R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 769 - 774.
- [7] 裘劭人, 王淑珍, 柴伟国, 等. 基于二维液相色谱串联质谱定性鉴定草莓柱头蛋白的方法: CN108828126A [P]. 2018-11-16.
- [8] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15: 293.
- [9] ALMAGRO ARMENTEROS J J, SØNDERBY C K, SØNDERBY S K, et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(21): 3387 - 3395.
- [10] KYTE J, DOOLITTLE R F. a simple method for displaying the hydrophobic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105 - 132.
- [11] JIN X, ZHU L P, TAO C C, et al. An improved protein extraction method applied to cotton leaves is compatible with 2-DE and LC-MS[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 285.
- [12] WANG W, TAI F J, CHEN S N. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis[J]. *Journal of Separation Science*, 2008, 31(11): 2032 - 2039.
- [13] HILL A E, MALISOFF W M. The mutual solubility of liquids. iii. the mutual solubility of phenol and water. iv. the mutual solubility of normal butyl alcohol and water[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1926, 48(4): 918 - 927.
- [14] TAN S C, YIAP B C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 2009: 1 - 10.
- [15] VERTOMMEN A, PANIS B, SWENNEN R, et al. Evaluation of chloroform/methanol extraction to facilitate the study of membrane proteins of non-model plants[J]. *Planta*, 2010, 231(5): 1113 - 1125.

(责任编辑 张 韵)