

大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 和其保持系的不同器官蛋白质组比较

曾维英^{1,2}, 杨守萍¹, 盖钧镒¹, 喻德跃¹

(¹南京农业大学大豆研究所, 国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095; ²广西农业科学院玉米研究所, 广西南宁 530227)

摘要:质核互作雄性不育在杂种优势利用中起着重要作用, 探讨质核互作雄性不育发生的机理具有重要的理论和实践意义。本研究开展大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的不同器官蛋白质组比较分析。以大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 和其保持系 NJCMS1B 的种子、叶片和花药为材料, 采用双向凝胶电泳技术对其蛋白质进行分离, 考马斯亮蓝染色, 获得重复性好的蛋白质双向电泳图谱, 利用 PDQuest 软件处理分析, 寻找差异表达蛋白。结果发现不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的种子 2-DE 图谱间存在 7 个差异表达蛋白点, 其中 3 个在 NJCMS1A 中表达而在 NJCMS1B 中缺失, 3 个在 NJCMS1A 中缺失而在 NJCMS1B 中表达, 1 个在 NJCMS1A 中表达量明显增强; 苗期叶片 2-DE 图谱间基本一致, 没有差异表达蛋白点; 单核小孢子期花药 2-DE 图谱间有 9 个差异表达蛋白点, 其中 3 个在 NJCMS1A 中表达而在 NJCMS1B 中缺失, 6 个在 NJCMS1A 中缺失而在 NJCMS1B 中表达; 二胞花粉期花药 2-DE 图谱间有 24 个差异表达蛋白点, 其中 10 个在 NJCMS1A 中表达而在 NJCMS1B 中缺失, 12 个在 NJCMS1A 中缺失而在 NJCMS1B 中表达, 2 个在 NJCMS1B 中表达量明显增强。两系花药间存在较多差异表达蛋白点, 种子间仅有少量差异表达蛋白点, 而苗期叶片间几乎没有差异表达蛋白点, 说明不育基因表达具有时空性和器官特异性, 与育性有关的蛋白主要在花药中表达。

关键词:大豆; 质核互作雄性不育; 不同器官; 蛋白质组; 双向凝胶电泳

Comparative Proteome Analysis of Different Organs between Cytoplasmic-nuclear Male-sterile Line NJCMS1A and Its Maintainer in Soybeans

ZENG Wei-ying^{1,2}, YANG Shou-ping¹, GAI Jun-yi¹, and Yu De-yue¹

(¹Nanjing Agricultural University, Soybean Research Institute, National Center for Soybean Improvement, National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, Jiangsu; ²Maize Research Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530227, Guangxi, China)

Abstract: Cytoplasmic-nuclear male sterility plays an important role in the production of hybrid seeds. The knowledge of the mechanism of the cytoplasmic-nuclear male-sterility is essential to hybrid seed production. The present paper was aimed at the comparative proteome analysis of different organs between the cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybeans. The materials were the seeds, young leaves and anthers from the male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) technique was used to separate the protein spots and the gels were stained with Coomassie Blue G-250. The obtained 2-DE maps were pretty consistent among replications. The difference between the protein maps of NJCMS1A and those of NJCMS1B was analyzed with the PDQuest image software. Seven protein spots were found differentially expressed between NJCMS1A and NJCMS1B seeds. Among these, 3 protein spots were present in the seed protein map of NJCMS1A but absent in that of NJCMS1B, and 3 protein spots present in that of NJCMS1B but absent in that of NJCMS1A, another protein spot was up-regulated significantly in the map of NJCMS1A in comparison with that of NJCMS1B. Nine protein spots were found differentially expressed between NJCMS1A and NJCMS1B anthers at uninucleate microspore stage. Among them, 3 protein spots were present in the anther protein map of NJCMS1A but absent in that of NJCMS1B, and 6 protein spots present in that of NJCMS1B but absent in that of NJCMS1A.

收稿日期 (Received): 2007-09-03; 接受日期 (Accepted): 2007-11-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2002CB111304, 2004CB7206, 2006CB101708); 国家自然科学基金项目 (30490250, 30671314); 国家高技术研究发展计划项目 (2002AA211052, 2006AA100104); 长江学者和创新团队发展计划资助项目 (PCSIRT)

作者简介: 曾维英 (1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传育种。

通讯作者 (Corresponding author): 杨守萍, 副教授, 博士。Tel: 025-84396463; E-mail: spyang@njau.edu.cn

喻德跃, 教授, 博士。Tel: 025-84396410; E-mail: dyyu@njau.edu.cn

MS1A. Twenty-four protein spots were found differentially expressed between NJCMS1A and NJCMS1B anthers at binucleate pollen stage. Among them, 10 protein spots were present in the anther protein map of NJCMS1A but absent in that of NJCMS1B, and 12 protein spots present in that of NJCMS1B but absent in that of NJCMS1A, another two protein spots were up-regulated significantly in the map of NJCMS1B in comparison with that of NJCMS1A. No protein spot was found differentially expressed between NJCMS1A and NJCMS1B leaves. The above results showed that there were lots of difference between the 2-DE maps of anthers of NJCMS1A and those of NJCMS1B, a little difference between the 2-DE maps of seeds of NJCMS1A and those of NJCMS1B, but no difference between the 2-DE maps of leaves of NJCMS1A and those of NJCMS1B. It was inferred that the expression of the male sterile genes was spacially and periodically, and the anther was the major organ in which the protein related to the male sterility was expressed.

Key words: Soybean; Cytoplasmic-nuclear male-sterility; Different organs; Proteome; Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

蛋白质组 (Proteome) 一词源于蛋白质 (Protein) 和基因组 (Genome), 蛋白质组学是从整体水平研究细胞、组织、器官及有机体 (微生物) 内的蛋白质表达变化。双向凝胶电泳技术具有高分辨率、高重复性和微量制备等性能, 已经成为蛋白质检测和分析的一种强有力的生化手段, 是目前蛋白质组学研究的主要分离方法, 蛋白质首先根据其等电点在 pH 梯度胶中等电聚焦, 然后按照分子量大小在 SDS-PAGE 中进行第二向分离。应用雄性不育系开发作物杂种优势和进行轮回选择、回交等育种研究可以省掉繁杂的人工去雄手续。大豆为自花授粉植物, 其雄性不育系可以在轮回选择和杂种优势等方面得到广泛的应用, 目前最有希望用于杂种大豆生产的还是质核互作雄性不育“三系”。至今为止, 已从遗传学、细胞学、分子生物学等方面对大豆质核互作雄性不育开展了相关研究 (盖钧镒等, 1999; Ding et al., 2002; 凡军民, 2003; Yang et al., 2007), 但还没有蛋白质表达研究的有关报道。本试验利用双向凝胶电泳技术对大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 和其保持系 NJCMS1B 的种子、叶片和花药蛋白质组进行比较分析, 以期找到差异表达蛋白, 为进一步了解大豆质核互作雄性不育发生的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

NJCMS1A 是以两个栽培大豆杂交组合 (N8855 × N2899) F₁ 为母本, N2899 为轮回亲本连续回交多代, 得到的质核互作雄性不育系, N2899 (NJCMS1B) 为其保持系 (盖钧镒等, 1999; Ding et al., 2002), 2005 年和 2006 年夏种植在南京农业大学国家大豆改良中心江浦试验站, 采用花药散粉性、花粉发芽率和成熟期植株育性表现 3 种指标确定不育株 (凡军

民, 2003; Yang et al., 2007)。取苗期嫩叶, 存储于 -80℃ 冰箱中备用; 大豆小孢子通常在开花前一天的半夜或开花日的凌晨发育为成熟二胞花粉 (盖钧镒, 2006), 于开花前一天和开花日的清晨, 根据花蕾外部形态结合细胞学检查, 摘取单核小孢子期和二胞花粉期花蕾, 存储在 -80℃ 冰箱中备用; 种子为成熟干种子。

1.2 方法

参照 Gallardo 等 (2001)、郑蕊和喻德跃 (2005)、徐晓燕等 (2006) 的方法, 并加以改进。

1.2.1 蛋白样品制备 种子蛋白样品制备: 取约 200 mg 种子, 去种皮, 加 10% PVP 和少量石英砂, 于液氮中碾磨, 在低温条件下, 采用 TCA-丙酮沉淀法制得蛋白干粉。每毫克蛋白干粉加入 10 μL 蛋白质裂解缓冲液 (7 mol L⁻¹ 尿素、2 mol L⁻¹ 硫脲、4% CHAPS、65 mmol L⁻¹ DTT、2% Bio-Lyte pH 3 ~ 10、0.1% 蛋白酶抑制剂) 溶解。4℃ 搅拌抽提 2 h, 冰浴超声波 3 min, 4℃, 15 000 r min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 即蛋白质样品溶液, 1.5 mL 离心管分装, -80℃ 储存备用。参照 Bradford (1976) 测定样品中蛋白质浓度, 标准蛋白为牛血清白蛋白 (BSA)。叶片蛋白样品制备: 临用时从 -80℃ 冰箱中取出冻存的叶片, 采用 TCA-丙酮沉淀法制得蛋白干粉, 具体步骤同上。花药蛋白样品制备: 临用时从 -80℃ 冰箱中取出冻存的花蕾, 在冰浴上挑取花药, 采用 TCA-丙酮沉淀法制得蛋白干粉, 具体步骤同上。

1.2.2 双向凝胶电泳 (2-DE) 每个样品用水化液 (7 mol L⁻¹ 尿素、2 mol L⁻¹ 硫脲、4% CHAPS、65 mmol L⁻¹ DTT、2% Bio-Lyte pH 3 ~ 10) 稀释混匀, 4℃, 15 000 r min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液上样。17 cm pH 3 ~ 10 线性 IPG 预制胶条考染蛋白质上样量为 1 mg, 总上样体积为 340 μL, 17 cm pH 4 ~ 7 线性 IPG

预制胶条考染蛋白质上样量为 1.5 mg, 总上样体积为 350 μL , 7 cm pH 4~7 线性 IPG 预制胶条考染蛋白质上样量为 200 μg , 总上样体积为 120 μL 。等电聚焦在 BIO-RAD 公司的 IPGphor 电泳仪上进行, 水化和聚焦在 19 $^{\circ}\text{C}$ 自动进行, 17 cm 线性 IPG 胶条在 50 V 电压下水化 13 h 后, 经过 200 V 0.5 h、500 V 0.5 h、1 000 V 1 h、2 000 V 1 h、8 000 V 5 h 后, 在 8 000 V 稳定电压下进行 25 000 Vhr; 7 cm 线性 IPG 胶条在 50 V 电压下水化 13 h 后, 经过 250 V 1 h、500 V 1 h、4 000 V 1 h 后, 在 4 000 V 稳定电压下进行 25 000 Vhr。聚焦完毕后, 胶条先在胶条平衡缓冲液 I (0.375 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8.8, 6 mol L^{-1} 尿素, 30% 甘油, 5% SDS, 2% DTT) 中平衡 15 min, 再在胶条平衡缓冲液 II (2.5% 碘乙酰胺替代 2% DTT, 其余组分同胶条平衡缓冲液 I) 中平衡 15 min, 然后进行第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度分别为 10% 和 12%。

1.2.3 考马斯亮蓝染色 双蒸水洗, 12% TCA 固定 2 h, 双蒸水洗 3 次, 每次 15 min。20% 甲醇, 1.6% 磷酸, 8% 硫酸铵和 0.08% 考马斯亮蓝 G-250 染色 16~24 h, 双蒸水漂洗脱色。

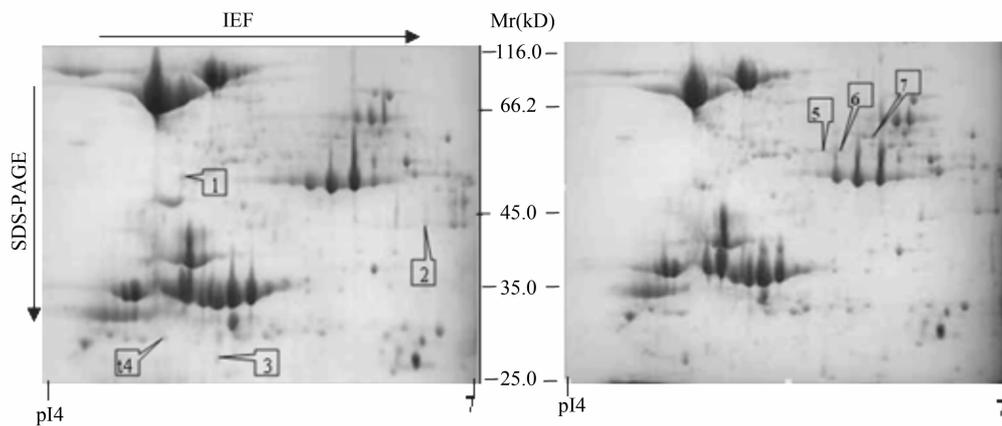
1.2.4 图谱分析 用 BIO-RAD 公司的 Versea-doc 3 000 凝胶成像系统对凝胶电泳图谱进行扫描, 并用 PDQuest 软件进行图像处理分析, 包括背景消减、斑

点检测、匹配、分子量和等电点分析等, 获取差异表达蛋白点。

2 结果与分析

2.1 不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的种子蛋白质组比较分析

取不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的成熟干种子, 提取蛋白, 先用 pH3~10 线性 IPG 胶条, 12% 分离胶进行分离, 通过严格一致的操作程序, 得到重复性好的种子 2-DE 图谱, 用 PDQuest 软件处理分析, 于分子量 18.4~116.0 kD、等电点 3~10 范围内, 检测到约 350 个蛋白点, 蛋白点主要集中在 pI 4~7 范围内, 有些蛋白点相互覆盖。再采用 pH 4~7 线性 IPG 胶条, 10% 分离胶进行双向电泳, 得到重复性好的 2-DE 图谱(如图 1), 于分子量 25.0~116.0 kD、等电点 4~7 范围内, 检测到约 312 个蛋白点。NJCMS1A 和 NJCMS1B 的种子 2-DE 图谱十分接近, 仅有少量差异蛋白点存在, 具体表现为: 两系种子间有 7 个差异表达蛋白点, 其中 3 个(图 1, Spot2~4) 在 NJCMS1A 中表达而在 NJCMS1B 中缺失, 3 个(图 1, Spot5~7) 在 NJCMS1A 中缺失而在 NJCMS1B 中表达, 1 个(图 1, Spot1) 在 NJCMS1A 中表达量明显增强(2.5 倍以上), 差异表达蛋白点的分子量和等电点列在表 1 中。



a: NJCMS1A; b: NJCMS1B

图 1 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的种子 2-DE 图谱

Fig. 1 2-DE maps of seed of male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B

2.2 不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的叶片蛋白质组比较分析

通过严格一致的程序操作, 得到重复性好的苗期叶片 2-DE 图谱(如图 2)。用 PDQuest 软件处理分析,

于分子量 18.4~116.0 kD、等电点 4~7 线性范围内, 检测到约 226 个蛋白点, 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的叶片 2-DE 图谱基本一致, 蛋白质的斑点数、相对分子量和等电点都类似, 基本没有差异。

表 1 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的种子中差异表达蛋白点

Table 1 The differential protein spots of seed of male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B

编号 Code	分子量 Mr(kD)	等电点 pI	不育系 1A	保持系 1B	编号 Code	分子量 Mr(kD)	等电点 pI	不育系 1A	保持系 1B
1	55.7	5.24	↑	↓	5	61.1	6.11	-	+
2	48.6	6.64	+	-	6	58.5	5.94	-	+
3	34.0	5.14	+	-	7	58.6	5.85	-	+
4	31.8	5.06	+	-					

编号与图 1 中的蛋白质点代号相同;“1A”代表 NJCMS1A,“1B”代表 NJCMS1B;“+”表示蛋白出现,“-”表示蛋白缺失,“↑”表示表达量增加,“↓”表示表达量下降。

The code is the same as that in Fig. 1 “1A” represents NJCMS1A, “1B” represents NJCMS1B. “+” indicates that the protein spot is present, “-” indicates that the protein spot is absent. “↑” indicates that the protein spot is up-regulated, “↓” indicates that the protein spot is down-regulated.

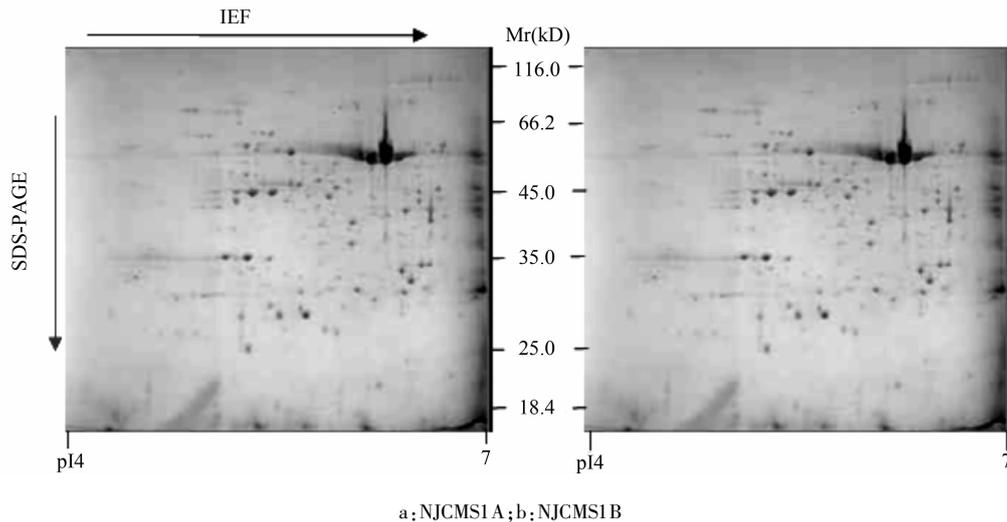


图 2 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的苗期叶片 2-DE 图谱

Fig. 2 2-DE maps of leaf of male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B

2.3 不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的花药蛋白质组比较分析

通过严格一致的程序操作,得到重复性好的花药 2-DE 图谱(如图 3、4)。用 PDQuest 软件处理分

析,于分子量 18.4 ~ 116.0 kD、等电点 4 ~ 7 线性范围内,在不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的单核小孢子期花药 2-DE 图谱上检测到约 193 个蛋白点,在二胞花粉期花药 2-DE 图谱上检测到约 214 个

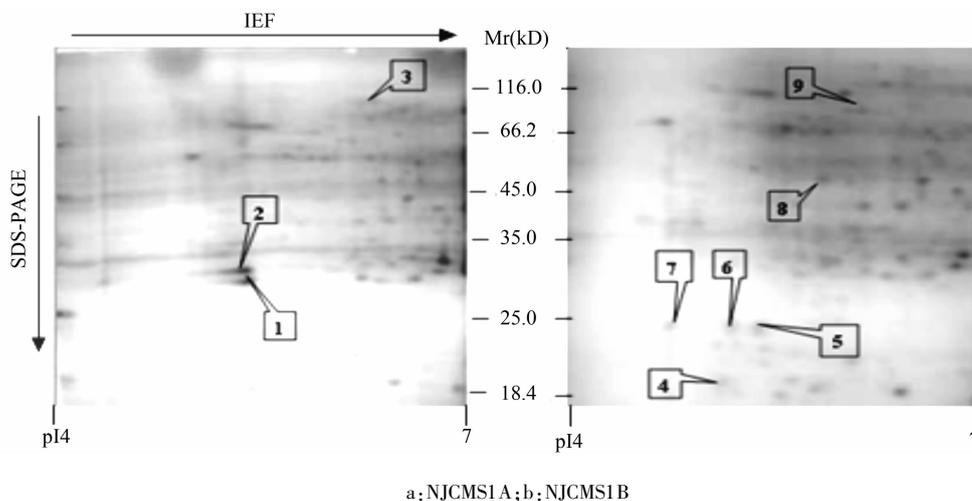


图 3 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的单核小孢子期花药 2-DE 图谱

Fig. 3 2-DE maps of anther at uninucleate microspore stage of male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B

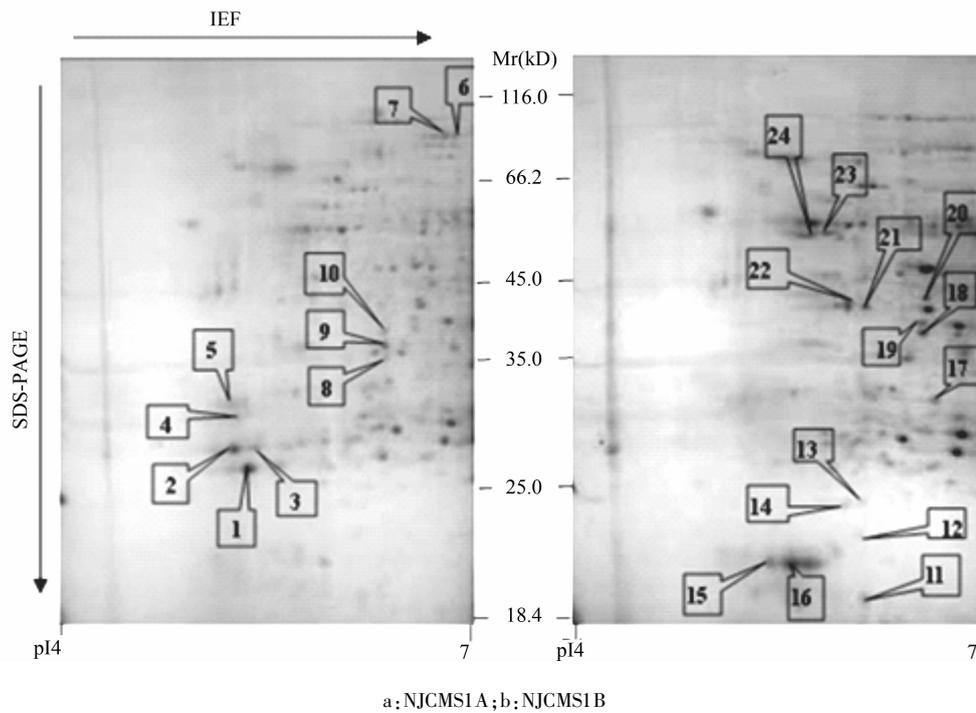


图4 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的二胞花粉期花药 2-DE 图谱

Fig. 4 2-DE maps of anther at binucleate pollen stage of male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B

蛋白点。NJCMS1A 与 NJCMS1B 的单核小孢子期花药间有 9 个差异表达蛋白点,其中 3 个(图 3, Spot1~3)在 NJCMS1A 中表达而在 NJCMS1B 中缺失,6 个(图 3, Spot4~9)在 NJCMS1A 中缺失而在 NJCMS1B 中表达,差异表达蛋白点的分子量和等电点列在表 2 中;NJCMS1A 与 NJCMS1B 的二胞花粉期花药间有 24 个差异表达蛋白点,其中 10 个(图 4, Spot1~10)在 NJCMS1A 中表达而在 NJCMS1B 中缺失,12 个(图 4, Spot11~17, 20~24)在 NJCMS1A 中缺失而在 NJCMS1B 中表达,2 个(图 4, Spot18~19)

在 NJCMS1B 中表达量明显增强(2.5 倍以上),差异表达蛋白点的分子量和等电点列在表 3 中。从图 3、4 可以看出,不育系 NJCMS1A 的单核小孢子期和二胞花粉期花药蛋白图谱之间存在较大差异,同时保持系 NJCMS1B 的两个图谱之间也有较大差异,基因的时序表达调控决定不同的发育时期表达不同的基因,蛋白质的差异相应的体现了基因表达的变化,所以不同时期的蛋白质图谱差异较大(魏磊等, 2002)。

表 2 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的单核小孢子期花药中差异表达蛋白点

Table 2 The differential protein spots of anther at uninucleate microspore stage of male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B

编号 Code	分子量 Mr(kD)	等电点 pI	不育系 1A	保持系 1B	编号 Code	分子量 Mr(kD)	等电点 pI	不育系 1A	保持系 1B
1	28.6	5.15	+	-	6	23.3	5.15	-	+
2	30.4	5.14	+	-	7	22.2	4.72	-	+
3	105.0	6.23	+	-	8	35.9	5.44	-	+
4	19.1	5.08	-	+	9	79.8	5.97	-	+
5	23.0	5.34	-	+					

编号与图 3 中的蛋白质点代号相同;“1A”代表 NJCMS1A,“1B”代表 NJCMS1B,“+”表示蛋白出现,“-”表示蛋白缺失。

The code is the same as that in Fig. 3. “1A” represents NJCMS1A, “1B” represents NJCMS1B. “+” indicates that the protein spot is present, “-” indicates that the protein spot is absent.

表 3 不育系 NJCMS1A 和保持系 NJCMS1B 的二胞花粉期花药中差异表达蛋白点

Table 3 The differential protein spots of anther at binucleate pollen stage of male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B

编号 Code	分子量 Mr(kD)	等电点 pI	不育系 1A	保持系 1B	编号 Code	分子量 Mr(kD)	等电点 pI	不育系 1A	保持系 1B
1	26.9	5.36	+	-	13	25.2	6.16	-	+
2	28.2	5.25	+	-	14	24.9	6.05	-	+
3	28.3	5.41	+	-	15	20.7	5.48	-	+
4	30.4	5.28	+	-	16	20.7	5.64	-	+
5	31.4	5.23	+	-	17	32.3	32.3	-	+
6	86.4	6.90	+	-	18	39.0	6.54	↓	↑
7	83.7	6.82	+	-	19	40.3	6.53	↓	↑
8	35.5	6.35	+	-	20	44.1	6.56	-	+
9	36.6	6.33	+	-	21	42.1	6.17	-	+
10	38.4	6.33	+	-	22	42.3	6.03	-	+
11	19.5	6.23	-	+	23	54.7	5.86	-	+
12	23.1	6.17	-	+	24	54.2	5.75	-	+

编号与图 4 中的蛋白质点代号相同;“1A”代表 NJCMS1A,“1B”代表 NJCMS1B;“+”表示蛋白出现,“-”表示蛋白缺失,“↑”表示表达量增加,“↓”表示表达量下降。

The code is the same as that in Fig. 4. “1A” represents NJCMS1A, “1B” represents NJCMS1B. “+” indicates that the protein spot is present, “-” indicates that the protein spot is absent, “↑” indicates that the protein spot is up-regulated, “↓” indicates that the protein spot is down-regulated.

3 讨论

研究表明质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的花药间存在较多差异表达蛋白点,种子间仅有少量差异表达蛋白点,而苗期叶片间基本没有差异表达蛋白点,说明不育基因表达具有时空性和器官特异性,与育性有关的蛋白主要在花药中表达。类似现象在小麦、水稻等作物上也有发现,门淑珍和刘博林(2001)研究表明小麦显性核雄性不育材料后代不育株与可育株之间胚乳和叶片的蛋白质组成没有明显差异,而减数分裂期花药的蛋白质组成有明显差异,说明 Ms2 的表达具有较强的器官特异性;藤晓月和陈雪晖(1996)对 T 型小麦两系不同发育时期(苗期、开花期、种子)的可溶性蛋白组分进行比较研究,与保持系相比不育系在花药和种子中均有特异蛋白存在,在苗期叶片中则未发现,这表明雄性不育基因的表达具有明显的时空性;邵锦震和顾勇(2006)研究发现水稻保持系武金 4B 孕穗期剑叶蛋白样本经 2-DE 分离后,蛋白质斑点数、相对分子量和等电点类似于不育系武金 4A,似无明显区别;魏磊等(2002)研究表明不育系紫稻 A 与其保持系紫稻 B 的叶片蛋白图谱之间在三叶期和分蘖期时差异均不明显;文李等(2006)对红莲型细胞质雄性不育水稻的不育系(YTA)和保持系(YTB)的单核期花粉总蛋白质进行蛋白质组分析,

发现差异表达蛋白质点数为 85。

另外本研究还发现不育系 NJCMS1A 的不同发育时期的花药蛋白图谱之间存在较大差异,不育系 NJCMS1A 与保持系 NJCMS1B 的花药蛋白图谱在二胞花粉期时的差异较单核小孢子期要大,这与细胞学研究结果相一致,凡军民(2003)研究发现 NJCMS1A 的小孢子大量败育主要发生在二胞花粉期,不育系 NJCMS1A 与保持系 NJCMS1B 的细胞学差异也在二胞花粉期达到最大,这可能是基因的时序表达调控的结果。

4 结论

开展大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的不同器官蛋白质组比较分析。获得重复性好的蛋白质双向电泳(2-DE)图谱,利用 PDQuest 软件处理分析,发现不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的种子 2-DE 图谱间存在 7 个差异表达蛋白点,苗期叶片 2-DE 图谱间基本没有差异表达蛋白点,单核小孢子期花药 2-DE 图谱间有 9 个差异表达蛋白点,二胞花粉期花药 2-DE 图谱间有 24 个差异表达蛋白点。两系花药间存在较多差异表达蛋白点,种子间仅有少量差异表达蛋白点,而苗期叶片间基本没有差异表达蛋白点,说明不育基因表达具有时空性和器官特异性,与育性有关的蛋白主要在花药中表达。

References

- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1):248-254
- Ding D R, Gai J Y, Cui Z L, and Qiu J X. 2002. Development of a cytoplasmic-nuclear male-sterile line of soybean. *Euphytica*, 124:85-91
- Fan J M. 2003. Studies on cyto-morphological and cyto-chemical features of cytoplasmic-nuclear male-sterile lines of soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill]. Thesis for M S, Agronomy College of Nanjing Agricultural University, Supervisor: Yang S P (凡军民. 2003. 大豆质核互作雄性不育系的细胞形态学和细胞化学特征的研究. 硕士学位论文, 南京农业大学农学院, 导师: 杨守萍)
- Gai J Y, ed. 2006. *Crop breeding (Species)*, 2nd edn. China Agriculture Press, China, Beijing, pp. 223 (盖钧镒, 著. 2006. 作物育种学各论. 中国农业出版社, 中国, 北京, pp. 223)
- Gai J Y, Ding D R, Cui Z L, and Qiu J X. 1999. Development and performance of the cytoplasmic nuclear male sterile line NJCMS1A of soybean. *Scientia Agricultura Sinica*, 32(5):23-27 (盖钧镒, 丁德荣, 崔章林, 邱家驹. 1999. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 的选育及其特性. *中国农业科学*, 32(5):23-27)
- Gallardo K, Job C, Groot S P C, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, and Job D. 2001. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, 126:835-848
- Men S Z, and Liu B L. 2001. Studies on protein composition of different organs of wheat plant under control of a male sterile gene (MS2). *Acta Agronomica Sinica*, 27(1):117-122 (门淑珍, 刘博林. 2001. 小麦显性雄性核不育材料后代不育株与可育株不同器官的蛋白质比较研究. *作物学报*, 27(1):117-122)
- Shao J Z, and Gu Y. 2006. Analysis of flag leaf proteins of cross rice by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Hubei Normal University (Natural Science)*, 26(1):1-5 (邵锦震, 顾勇. 2006. 水稻剑叶蛋白质的双向电泳分析. *湖北师范学院学报(自然科学版)*, 26(1):1-5)
- Teng X Y, and Chen X H. 1996. Comparative studies on the constitution of protein between t-type cytoplasmic male sterile wheat and its maintainer. *Acta Agronomica Sinica*, 22(3):264-270 (滕晓月, 陈雪晖. 1996. 小麦 T 型细胞质雄性不育系和保持系蛋白质的比较研究. *作物学报*, 22(3):264-270)
- Wei L, Ding Y, Hu Y J, and Yu J H. 2002. Analysis of leaf proteins of zidao male-sterile line by 2D-PAGE. *Acta Genetica Sinica*, 29(8):696-699 (魏磊, 丁毅, 胡耀军, 余金洪. 2002. 紫稻细胞质雄性不育系叶片全蛋白双向电泳分析. *遗传学报*, 29(8):696-699)
- Wen L, Liu G, Zhang Z J, Tao J, Tao J, Wan C X, Li S Q, and Zhu Y G. 2006. Preliminary proteomics analysis of the total proteins of HL type cytoplasmic male sterility rice anther. *Hereditas*, 28(3):311-316 (文李, 刘盖, 张再君, 陶钧, 万翠香, 李绍清, 朱英国. 2006. 红莲型水稻细胞质雄性不育花药蛋白质组学初步分析. *遗传*, 28(3):311-316)
- Xu X Y, Zheng R, Li C M, Gai J Y, and Yu D Y. 2006. Differential proteomic analysis of seed germination in soybean. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 33(11):1106-1112 (徐晓燕, 郑蕊, 李春梅, 盖钧镒, 喻德跃. 2006. 大豆种子萌发过程中的差异蛋白质组研究. *生物化学与生物物理进展*, 33(11):1106-1112)
- Yang S P, Duan M P, Meng Q C, Qiu J, Fan J M, Zhao T J, Yu D Y, and Gai J Y. 2007. Inheritance and gene tagging of male fertility restoration of cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A in soybean. *Plant Breeding*, 126:302-305
- Zheng R, and Yu D Y. 2005. Improvement of two-dimensional electrophoresis of soybean seed protein for proteome analysis. *Soybean Science*, 24(3):166-170 (郑蕊, 喻德跃. 2005. 适于蛋白质组研究的大豆种子蛋白双向电泳技术的改进. *大豆科学*, 24(3):166-170)