



梅花鹿鹿茸再生干细胞蛋白质组双向电泳条件优化

董振 王权威 刘振 李春义*

中国农业科学院 特产研究所/特种动物分子生物学国家重点实验室, 长春 130000

*通讯作者, lichunyi1959@163.com

摘要 鹿茸是目前唯一可以完全再生的哺乳动物附属器官, 这种再生基于鹿茸再生干细胞。本研究以梅花鹿(*Cervus nippon*)鹿茸再生干细胞为样品, 在处理方法、染色方法、蛋白纯化和等电聚焦条件 4 个方面对蛋白质组双向电泳进行优化。结果显示, 利用 Bullet Blender 细胞组织破碎仪处理细胞优于超声波破碎; 双染法染色能够得到更多且更清晰的蛋白点; 等电聚焦总 volt-hours 在 15 000 volt-hours 时竖条纹相对较少; 通过比较 6 种不同的蛋白提取方法与纯化方法组合, 发现采用自制裂解液与双向电泳纯化试剂盒纯化相结合的方式获得的电泳图谱较好。通过综合优化后的双向电泳技术所得到的蛋白图谱中蛋白点相对较多且圆滑, 条纹现象较轻, 重复性较好, 满足后续软件分析以及数据处理的要求, 本研究为不同发育期梅花鹿鹿茸再生干细胞比较蛋白质组学研究提供了基础实验数据。

关键词 鹿茸再生干细胞, 蛋白质组, 双向电泳, 条件优化

The Optimization of Two-dimensional Electrophoresis for Antler Stem Cells in Sika Deer (*Cervus nippon*)

DONG Zhen WANG Quan-Wei LIU Zhen LI Chun-Yi*

State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Animals/Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Science, Changchun 130000, China

* Corresponding author, lichunyi1959@163.com

Abstract Deer antlers are the only known mammalian organs which can periodically regenerate from pedicles. Antler regeneration is known as a stem cell-based process and antler stem cells reside in pedicle periosteum. In this study conditions of two-dimensional electrophoresis for antler stem cells in sika deer (*Cervus nippon*) were optimized in the following four aspects including cell processing, staining, isoelectric focusing condition and protein purification. Results showed that comparing with ultrasonic, Bullet Blender had a better effect on cell breaking. It could get more and clearer protein points by combining coomassie brilliant blue staining and silver staining. When the total volt-hours of isoelectric focusing was at 15000 volt-hours, the vertical stripes were relatively lighter. By comparing six kinds of protein extraction and purification methods, the one combining the manual lysate and 2D cleanup kit would get more protein points, lighter background and clearer map. After the comprehensive optimization of two-dimensional electrophoresis, the acquired maps had more and clearer protein spots, less stripes and better reproducibility, meanwhile, they could accord with the requirements of software analysis and experimental treatments. The optimization could apply to the study of antler stem cell proteome. All these researches could provide foundation for the study of comparative proteomics in different developmental phases of antler stem cells.

Keywords Antler stem cells, Proteome, Two-dimensional electrophoresis, Condition optimization

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170950)和国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2011AA100603)

收稿日期: 2014-09-15 接受日期: 2014-09-30

蛋白质组学研究是生命科学进入后基因组时代的重要特征,其对于治疗人类疾病、寻找特效药物等有至关重要的作用。O'Farrell(1975)建立了双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis, 2-DE),该技术能同时对大量基因表达产物进行系统分析,相对于其他蛋白质组学研究方法,该技术路线成熟,对实验设备等条件要求不高,因此成为目前蛋白质组学研究的首选方法。荧光差异双向电泳(differential gel electrophoresis, DIGE)定量蛋白质组学研究技术也是在2-DE的基础上建立的(Marrouga et al., 2005)。

再生生物学特别是割处再生是近年来生命科学研究的重点领域,鹿茸是迄今为止所发现的唯一可以割处完全再生的哺乳动物附属器官,以鹿茸为模型研究哺乳动物器官再生机理具有明显优势(Li et al., 2014)。鹿茸再生是基于具有干细胞特性的角柄骨膜细胞(Li et al., 2013)。通过2-DE等研究手段证实,大量已知和未知蛋白与小分子多肽在鹿茸再生过程中起着举足轻重的作用(林冬云等, 2005; 柯李晶等, 2009; Park et al., 2004; Li et al., 2012)。为了能够全面了解鹿茸再生干细胞引发鹿茸再生过程中所涉及的分子机制并找到潜在的小分子物质,有必要对鹿茸再生干细胞蛋白进行分离鉴定。徐代勋等(2011a, b)曾对角柄骨膜组织不同发生部位的蛋白质组进行了比较分析与鉴定,但相对于细胞,骨膜组织成分复杂,不易获取与分析。因此,本研究通过优化角柄骨膜细胞2-DE过程中的样品制备、等电聚焦、SDS-PAGE电泳和染色等样品处理条件,从而排除上述骨膜组织研究的缺点,并为后续梅花鹿鹿茸再生干细胞双向电泳实验积累经验。另外,作为一种特殊的纤维细胞,目前鹿茸再生干细胞尚没有相关2-DE条件优化的研究报道,因此本研究对此类纤维细胞以及其他类相关细胞进行蛋白质组学研究具有借鉴意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

梅花鹿(*Cervus nippon*)角柄骨膜取自中国农业科学院特产研究所实验鹿场。采集骨膜,利用冰盒带回实验室进行细胞培养,培养后收获的细胞液氮保存。角柄骨膜细胞取材与培养参照Li等(2012)的方法。

1.2 试剂与仪器

尿素, 硫脲, 磷酸三丁酯(tri-butyl-phosphate, TBP), 两性电解质Bio-lyte(pH 3~10), 丙烯酰胺, 甲叉-双丙烯酰胺, IPG 干胶条(pH3~10(NL), 蛋白纯化试剂盒(2D Clean-up Kit), 全蛋白提取试剂盒(货号163-2086), 蛋白定量试剂盒(货号500-0001), 银染试剂盒(货号161-0449), 均购自Bio-Rad公司(美国); 山梨醇与蛋白酶抑制剂购自Sigma-Aldrich公司(美国); 甘油、甲醇、乙酸等购自国药集团化学试剂北京有限公司(北京), 均为分析纯试剂。

主要实验仪器有UP400S超声波细胞破碎仪(Hielscher, 德国)、高速冷冻离心机(Sigma, 美国)、Infinite® 200 PRO酶标仪(Tecan, 瑞士)、等电聚焦仪、垂直电泳仪、图象分析软件(Bio-Rad, 美国)、Power Look 2100XL-USB扫描仪(UMAX, 台湾)及Bullet Blender细胞组织破碎仪(NEXT ADVANCE, 美国)。

1.3 蛋白样品的制备与定量

弃去培养液,用山梨醇细胞清洗液清洗(李丽梅, 王秀梅, 2011),并使用胰酶消化细胞。用山梨醇细胞清洗液悬浮洗涤细胞3次,加入500 mL自制裂解液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4%CHAPS, 2 mmol/LTBP和1%蛋白酶抑制剂)。采用2种方法破碎细胞:①超声波破碎仪;②Bullet Blender细胞组织破碎仪,根据其操作指南按表1进行处理。获得的9组蛋白(超声波细胞破碎仪处理的1组, Bullet Blender细胞破碎仪处理的8组)经冰浴震荡4 h, 12 000 r/min离心30 min,取上清,用Bradford微量法对蛋白样品进行浓度测定,蛋白样品分装后-80℃冻存备用。

表1 Bullet Blender细胞破碎仪不同参数组合
Table 1 The different treatments of Bullet Blender

组别 Group	t/min	挡数 Shift
A1	1	3
A2	1	6
A3	1	9
A4	2	3
A5	2	6
A6	2	9
A7	3	3
A8	3	6

1.4 SDS-PAGE电泳与凝胶染色

将1.3中的9组蛋白分别取10 μ L进行SDS-PAGE电泳。为了检测不同凝胶染色的效果,将这9组蛋白分别在2块凝胶上进行SDS-PAGE电泳,之后对其中一块凝胶做胶体考马斯亮蓝染色(姚宏亮, 2009),另一块凝胶做银染(Bio-Rad银染试剂盒),并对采集完图像的胶体考马斯亮蓝染色凝胶做双染(即先胶体考马斯亮蓝染色后银染)。

1.5 蛋白样品的提取与纯化处理

按照1.3方法培养细胞。之后分别用自制裂解液与总蛋白提取试剂盒(Bio-Rad)重悬细胞,随后利用Bullet Blender细胞组织破碎仪破碎2种细胞重悬液并离心取上清得到蛋白溶液。每组蛋白溶液接下来都进行3种纯化处理:即对照组(不做纯化处理)、丙酮沉淀处理(赵东, 2012)与2D-cleanup纯化处理;共获得6组蛋白样品(B1~B6)(表2)。Bradford微量法测浓度后-80 $^{\circ}$ C分装保存备用。

1.6 双向凝胶电泳

1.6.1 上样

分别取等量的B1~B6组蛋白溶液,于4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心10 min,取上清加入聚焦盘槽中,胶条长度为7 cm。

1.6.2 水化

样品被动水化1 h后,将1 mL矿物油覆盖在胶条上,在50 V电压下主动水化12 h。

表2 6组蛋白样品处理方式

Table 2 Six protein samples obtained by different methods

组别 Group	样品处理方式 Methods of samples treated
B1	自制裂解液对照组 Control group of manual lysate
B2	自制裂解液裂解,丙酮沉淀 Manual lysate and acetone precipitation
B3	自制裂解液裂解,2D cleanup纯化 Manual lysate and 2D cleanup purification
B4	总蛋白提取试剂盒对照组 Control group of total protein kit
B5	总蛋白提取试剂盒裂解,丙酮沉淀 Total protein kit and acetone precipitation
B6	总蛋白提取试剂盒,2D cleanup纯化 Total protein kit and 2D cleanup purification

1.6.3 等电聚焦

等电聚焦程序为:①250 V,1 h,线性;500 V,1.5 h,快速;4 000 V,3 h,线性;4 000 V,5 000 volt-hours,快速;500 V,任意时间,快速。②250 V,1 h,线性;500 V,1.5 h,快速;4 000 V,3 h,线性;4 000 V,10 000 volt-hours,快速;500 V,任意时间,快速。③250 V,1 h,线性;500 V,1.5 h,快速;4 000 V,3 h,线性;4 000 V,15 000 volt-hours,快速;500 V,任意时间,快速。

1.6.4 平衡

将7 cm胶条于2.5 mL平衡缓冲液中(6 mol/L尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCL(pH 8.8)、20%甘油、2 mmol/L TBP)放置25 min。

1.6.5 SDS-PAGE电泳

预先制备12%的分离胶,用低熔点琼脂糖固定胶条后进行SDS-PAGE电泳,20 V低压电泳30 min,待溴酚蓝在胶条上形成一条线后,80 V电泳,至溴酚蓝到达凝胶底部结束。

1.6.6 凝胶的染色、脱色、扫描与分析

电泳结束后,按照1.4首先进行考马斯亮蓝法固定、染色并脱色,之后对其进行银染。用Umax扫描仪扫描凝胶,并用PDQuest软件对胶上的蛋白点进行分析。

2 结果与分析

2.1 细胞蛋白制备方法与染色方法的优化

好的蛋白样品是进行2-DE的重要前提条件。本研究比较了超声波破碎仪和Bullet Blender细胞组织破碎仪两种不同细胞破碎方法所获取的样品浓度。结果显示,超声细胞破碎仪得到的蛋白浓度是所有处理中最低,为575 μ g/mL;而A1(707 μ g/mL)、A2(688 μ g/mL)、A4(682 μ g/mL)与A7(704 μ g/mL)组所得到的蛋白浓度较高,均超过了680 μ g/mL,其余几组Bullet Blender细胞组织破碎仪处理的蛋白浓度介于575~680 μ g/mL之间。

将1.3获得的9组蛋白进行SDS-PAGE电泳,凝胶进行考染(图1A)、银染(图1B)与双染(图1C)。图1C显示,A1与A2条带比较清晰,尤其是70 kD以上的蛋白条带较多;超声波细胞破碎仪处理的样品在35与15 kD左右的蛋白条带不如Bullet Blend-

er细胞组织破碎仪处理的明显。综合样品的浓度可知, Bullet Blender细胞组织破碎仪A2组的处理条件适用于本实验的样品处理。比较3种染色方法, 双染法(图1C)可以得到更多及更清晰的条带, 尤其是对于分子量在40 kD以下的小分子蛋白质。

2.2 等电聚焦条件的优化

合适的等电聚焦条件可使图谱显示清晰的蛋白点, 聚焦过度会产生竖条纹。图2所示为总聚焦24 000 volt-hours的胶条(B3组蛋白样品), 可清楚

看出在中间区域出现多条蛋白析出产生的竖条纹。相应的在2-DE图谱(图3A)中该区域的蛋白聚集以及竖条纹等现象严重。而总聚焦17 000 volt-hours的2-DE图谱(图3B)在蛋白聚集和竖条纹方面相对较轻; 但当总聚焦12 000 volt-hours时, 2-DE图谱(图3C)几乎没有蛋白点出现, 表明此时聚焦不完全。由于双染法中银染易使图谱出现竖条纹, 所以最终选择总聚焦15 000 volt-hours, 即尽量做到既不因聚焦过低而导致聚焦不完全, 也不因聚焦过高而产生较多竖条纹(图3D)。

2.3 蛋白样品处理方式的优化

2.3.1 不同样品处理方式的等电聚焦参数

根据方法1.5, 获得B1~B6共6组蛋白样品。样品中的含盐量直接影响等电聚焦过程, 图4的结

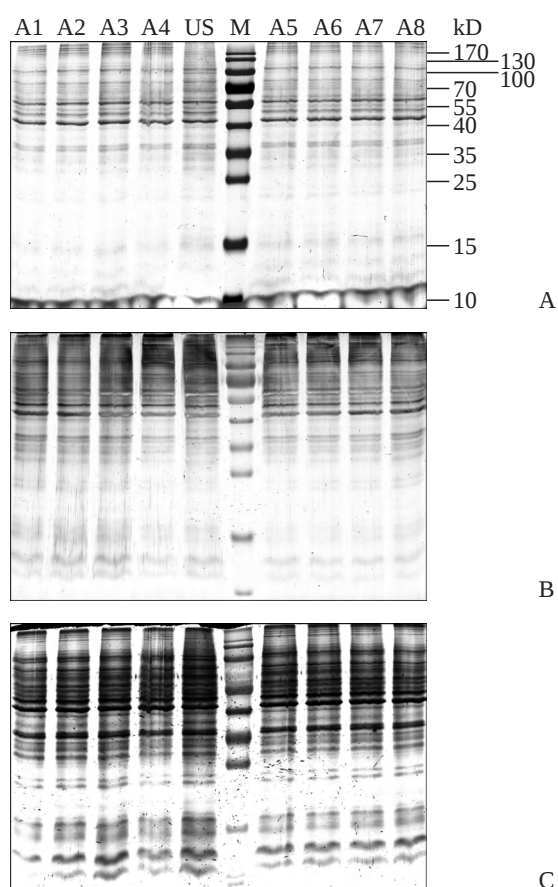


图1 染色方法的优化

Figure 1 Optimization of staining methods

A: 考马斯亮蓝染色; B: 硝酸银染色; C: 双染色法, 条带清晰, 分子量在40 kD以下的蛋白质条带较多; M: 蛋白Marker; US: 超声波细胞破碎仪处理样品; A1~A8: 按表1用Bullet Blender细胞破碎仪处理的8组样品

A: Coomassie brilliant blue staining; B: Silver staining; C: Double staining, the protein bands were clear and the map had more bands with molecular weight less than 40 kD; M: Protein marker; US: Samples treated by ultrasonic cell disruption system; A1~A8: Samples treated by Bullet Blender as Table 1



图2 总聚焦24 000 volt-hours时的7 cm胶条

Figure 2 The IPG strip (total volt-hours=24 000)

中间区域出现多条蛋白析出产生的竖条纹

Many vertical stripes produced by protein precipitate appeared in the middle area

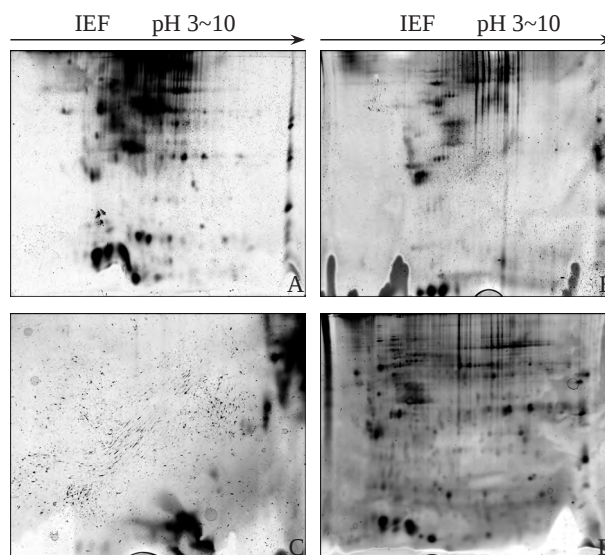


图3 等电聚焦条件的优化

Figure 3 Optimization of isoelectric focusing conditions

A~D: 总聚焦分别为24 000、17 000、12 000及15 000 volt-hours的2-DE图谱; 图D聚焦完全, 产生的竖条纹较少

A~D: 2-DE map at 24 000, 17 000, 12 000 and 15 000 volt-hours, respectively. The isoelectric focusing was complete and produced less vertical stripes in Figure 3D

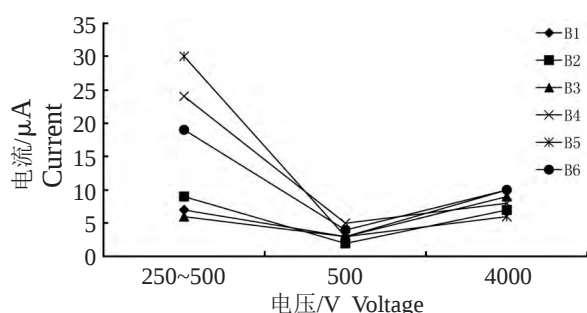


图4 不同处理样品的等电聚焦参数

Figure 4 The IEF parameters of different samples

B1~B6蛋白处理方式见表2

B1~B6 denoted as Table 2, respectively

果显示,自制裂解液处理的3组样品(B1~B3)电流值在整个等电聚焦过程中变化不大。一般情况下,在250~500 V快速升压过程中电流会达到最大值,该数值一定程度上可反映样品制备的好坏。自制裂解液处理的3组样品的电流最大值均小于总蛋白提取试剂盒处理的3组样品(B4~B6),由此可知自制裂解液处理所引入的盐量较总蛋白提取试剂盒所引入的低;随后在500 V电压阶段即等电聚焦除盐过程的最后阶段电流值会降到整个等电聚焦过程的最低点;随后在升压至4 000 V的过程中,电流会因电压的增大而略有上升,当升至4 000 V后,聚焦过程电流将不再改变。总体而言,相比总蛋白提取试剂盒处理的样品,自制裂解液处理的样品在等电聚焦每一阶段的电流值相对较低,表明自制裂解液处理的样品质量相对较高。

2.3.2 不同样品处理的双向电泳图谱双染色比较

对6组(B1~B6)不同处理方式得到的样品分别进行2-DE并采用双染法染色,获得相应的2-DE图谱(图5)。利用PDQuest软件分析中图谱的蛋白质点数。B1(图5A,蛋白质点数为304个)和B3(图5C,283个)组获得的蛋白点数量多于其他4组处理。通过丙酮沉淀处理的B2(图5B,155个)和B5组(图5E,138个)所得到的蛋白点较少、模糊且背景比较深。利用自制裂解液通过2D-cleanup纯化处理的B3组样品蛋白点比较清晰,横竖条纹相对较少。另外,由总蛋白提取试剂盒处理的样品B4~B6(图5D~F)在凝胶底部有比较明显的山峰状蓝色斑块,可能是由于试剂盒中的指示剂与染料反应所导致。而银染或多或少会造成凝胶背景深及在胶面上出现部分杂质的情况,尤其是进行双染色,这些

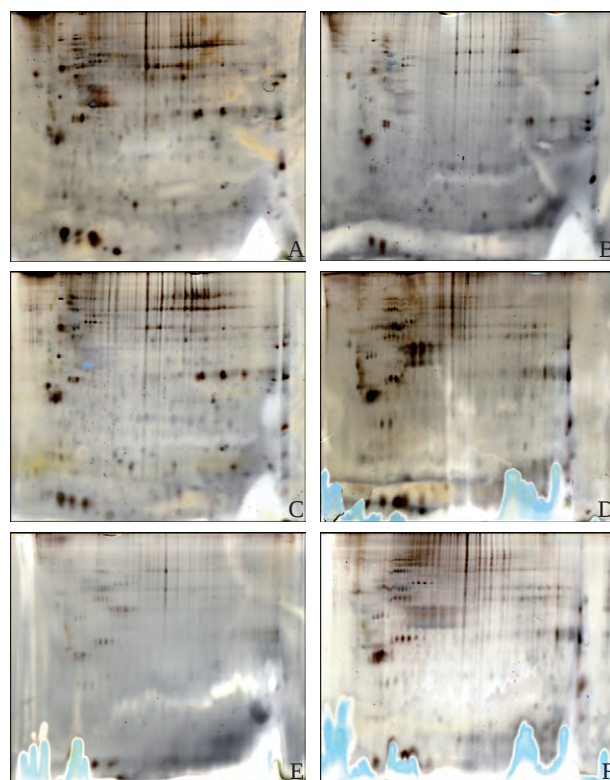


图5 不同样品处理方式的2-DE双染色图谱

Figure 5 The double staining 2-DE maps of different sample treatments

A~F: 分别为B1~B6组蛋白样品(表2); B3组样品(C)蛋白点比较清晰,横竖条纹相对较少

A~F: Protein samples of B1~B6 denoted as Table 2, respectively; The protein points were clearer and the stripes were relatively less in B3 samples (C)

情况更加明显,但由于其灵敏度高很适用于凝胶的染色,因此在操作过程中应注意尽量降低该现象。结果表明,自制裂解液与2D cleanup纯化结合的方式比较适合于本实验样品的处理。

3 讨论

鹿茸周期性再生来源于鹿茸再生干细胞。通过蛋白质组研究并利用基因工程等手段进一步探究其中相关未知蛋白的功能,对了解鹿茸的独特生物学活性及其再生特性具有重要意义,同时能够对相关蛋白质在哺乳动物器官再生中所具有的调节作用提供参考依据。目前,角柄骨膜材料昂贵,具有季节性限制,体外培养干细胞能很好地解决这一难题。本研究对鹿茸再生干细胞蛋白样品的提取以及制备等进行优化,为后续的鹿茸再生蛋白质组学分析积累基础数据,同时对其他细胞类样品的处

理也具有借鉴意义。

对于 2-DE 而言,样品的提取与制备十分关键。目前常用 PBS 去除细胞培养过程中的培养液,但易引入盐类不利于等电聚焦,实验结果证实山梨醇可较好解决上述问题。另外,一般细胞样品破碎常用超声波破碎法(王雪等, 2011),但此法的缺点是针对不同样品超声条件不好选择,易因超声过度而导致蛋白降解进而影响提取的蛋白质量。而 Bullet Blender 细胞组织破碎仪是一种比较有效的细胞破碎系统。本研究通过比较上述两种不同细胞破碎方法发现,对于鹿茸再生干细胞, Bullet Blender 细胞组织破碎法在蛋白浓度、蛋白条带数量及清晰程度方面均优于超声破碎法。

在细胞样品纯化方面,常用丙酮沉淀法(赖童飞等, 2009),但本研究发现丙酮处理的鹿茸再生干细胞样品的蛋白点数量并不多,且背景较深。可能原因是操作不当导致蛋白降解多个小片段,从而加深背景(图 5B 和 E),而这个过程不好界定如何操作最为合理,且费时,易导致蛋白变性,故不采用。Bio-Rad 公司的总蛋白提取试剂盒也是样品处理的一个常用选择,但本研究发现这种试剂盒主要存在两个问题:一是含有较多盐分,影响等电聚焦(图 4);二是其中含有一类具有指示作用的试剂会与染色剂反应,从而在凝胶底部产生严重的山峰状蓝色斑块(图 5D~F),影响后续图谱分析。

作者通过前期实验发现,等电聚焦较易出现聚焦过度,而聚焦过度的蛋白样品在胶面上会出现较多竖条纹(图 3A),银染会使得竖条纹更加明显。因此有必要通过逐渐降低等电聚焦的总 volt-hours,从而找到鹿茸再生干细胞蛋白质组最佳的电泳图谱。此外,使用劣质硫脲或裂解液含有硫脲且样品聚焦过度还可能引起“硫脲效应”。

对于染色方法,常用的是考马斯亮蓝染色,但其灵敏度不如银染(范云峰等, 2008)。对于制备胶而言,提高染色灵敏度很重要。常规银染的一个主要问题是不与质谱兼容,本实验选择了 Bio-Rad 公司的一款能与质谱兼容的银染试剂盒,将其与考马斯亮蓝染色相互结合,从而进行双染色(唐秀英等, 2010),大幅提高了染色灵敏度,且与质谱兼容(图 1)。

本实验也存在一些不足,如鹿茸再生干细胞蛋白样品聚焦条件的探索并非最佳,还存在较多竖条纹,需继续优化;双染色法条件也需继续优化,期望获得更加清晰并且背景较浅的图谱。

4 结论

为建立起优化的鹿茸再生干细胞蛋白质组双向电泳技术,本研究以鹿茸再生干细胞为样品,从细胞破碎、蛋白纯化、染色方法和等电聚焦条件等多个方面对双向电泳分离条件进行优化。结果显示,利用 Bullet Blender 细胞组织破碎仪破碎细胞优于超声波破碎;双染法染色能够得到数量更多且清晰的蛋白点;等电聚焦总 volt-hours 在 15 000 volt-hours 左右时竖条纹相对较少;通过比较 6 种蛋白提取方法与纯化方法组合发现,采用自制裂解液与双向电泳纯化试剂盒相结合的方式获得的电泳图谱较好。采用上述条件优化后的双向电泳技术所得到的蛋白图谱中蛋白点相对较多且圆滑,条纹现象较轻,重复性好,适用于后续梅花鹿鹿茸再生干细胞蛋白质组学研究。

参考文献

- 范云峰, 谢虹, 梁建生. 2008. 双向电泳中 4 种常用染色方法的灵敏度比较[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 29(4): 80-83+89. (Fan Y F, Xie H, Liang J S. 2008. Comparison of sensitivities of four protein staining methods in common use in two-dimensional electrophoresis[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 29(4): 80-83+89.)
- 柯李晶, 聂磊磊, 叶秀云, 等. 2009. 梅花鹿鹿茸中促 PC12 细胞增殖蛋白的分离和活性研究[J]. 中草药, 40(5): 715-718. (Ke L J, Nie Y L, Ye X Y, et al. 2009. Isolation and PC12 cell proliferative protein fraction from pilose antler and its activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 40(5): 715-718.)
- 林冬云, 黄晓南, 柯李晶, 等. 2005. 鹿茸中促大鼠成骨样细胞增殖活性组分的纯化与表征[J]. 中国中药杂志, 30(11): 851-855. (Lin D Y, Huang X N, Ke L J, et al. 2005. Purification and characterization of the proliferation of rat osteoblast-like cells ITMR-106 from pilose antler[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 30(11): 851-855.)
- 李丽梅, 王秀梅. 2011. HepG2 细胞蛋白质组双向电泳条件的优化与图谱的建立[J]. 内蒙古医学志, 43(5): 527-529. (Li L M, Wang X M. 2011. Establishment and optimization of two-dimensional gel electrophoresis technique for proteomics of HepG2 cells[J]. Inner Mongolia Medical Journal, 43(5): 527-529.)
- 赖童飞, 董薇, 贾银华, 等. 2009. 棉花胚珠蛋白三氯乙酸丙

- 酮法与酚抽提法的比较分析[J]. 农业生物技术学报, 17(2): 317-322. (Lai T F, Dong W, Jia Y H, et al. 2009. Evaluations of trichloroacetic acid-acetone method and phenol method for protein extraction from cotton ovule [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 17(2):317-322.)
- 唐秀英, 邵彩虹, 谢金水. 2010. 双向电泳中4种常用染色方法的比较[J]. 江西农业学报, 22(7): 100-102. (Tang X Y, Shao C H, Xie J S. 2010. Comparison of four protein staining methods in common use in two-dimensional electrophoresis[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 22(7): 100-102.)
- 王雪, 权春善, 王建华, 等. 2011. 不同细胞破碎方法对无细胞蛋白表达系统细胞抽提物活性的影响[J]. 中国生物工程杂志, 31(1): 46-50. (Wang X, Quan C S, Wang J H, et al. 2011. The influence of different cell disruption methods on the activity of the extract in cell-free protein synthesis system[J]. China Biotechnology, 31(1): 46-50.)
- 徐代勋. 2011a. 梅花鹿鹿茸角柄骨膜不同部位差异蛋白的筛选[D]. 硕士学位论文, 江苏科技大学, 导师: 李春义, pp. 18-28. (Xu D X. 2011a. Screening of differential proteins in different parts of pedicle periosteum of sika deer[D]. Thesis for M.S., Jiangsu University of Science and Technology, Supervisor: Li C Y, pp. 18-28.)
- 徐代勋, 王桂武, 赵海平, 等. 2011b. 梅花鹿角柄骨膜蛋白质组学初步研究[J]. 特产研究, (01): 5-8. (Xu D X, Wang G W, Zhao H P, et al. 2011. Proteomics study on pedicle periosteum of sika deer[J]. Special Wild Economic Animal Plant Research, (01): 5-8.)
- 姚宏亮. 2009. 胃癌和胃正常粘膜组织差异蛋白质组学和免疫组化研究[D]. 博士学位论文, 中南大学, 导师: 李永国, pp. 6-7. (Yao H L. 2009. Study on differential proteome and immunohistochemistry in adenocarcinoma and normal mucosal tissues of stomach[D]. Thesis for Ph.D., Middle and Southern University, Supervisor: Li Y G, pp. 6-7.)
- 赵东. 2012. 梅花鹿鹿茸总蛋白提取方法对双向电泳图谱的影响[J]. 中国畜牧兽医, 39(7): 25-28. (Zhao D. 2012. Methods of antler total protein extraction on the effect of map quality of two-dimensional electrophoresis in sika deer[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 39(7): 25-28.)
- Li C, Harper A, Puddick J, et al. 2012. Proteomes and signaling pathways of antler stem cells[J]. PloS ONE, 7(1): e30026.
- Li C Y, Pearson A, McMahon C. 2013. Morphogenetic mechanisms in the cyclic regeneration of hair follicles and deer antlers from stem cells[J]. BioMed Research International.
- Li C, Zhao H P, Liu Z, et al. 2014. Deer antler - A novel model for studying organ regeneration in mammals[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 56(2014): 111-122.
- Park H J, Lee D H, Park S G, et al. 2004. Proteome analysis of red deer antlers[J]. Proteomics, 4(11): 3642-3653.
- O'farrell P H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 250(10): 4007-4021.
- Marouga R, David S, Hawkins E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382(3): 669-678.

(责任编辑 李建琴)