

HRP 标记的二抗检测 heme 结合蛋白造成假阳性问题的探讨

张亚男,张春晓,陈晓波

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018)

摘要:为了验证对辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)作为二抗标记物在检测 heme 结合蛋白时产生假阳性问题的推测,以菠菜细胞色素 b_6f 复合物(Cyt b_6f)和铁氧还蛋白-NADP⁺ 氧化还原酶(FNR)为检测对象(前者含有 heme 结合蛋白 Cyt f ,后者不含 heme 基团),采用菠菜 FNR 一抗、HRP 和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)标记的二抗,设计对比实验。结果表明,在使用 HRP 标记的二抗体系中,Cyt f 不经一抗和二抗孵育即可显色,这是明显的假阳性;而在 ALP 标记的二抗体系中,Cyt f 条带不显色,只有 FNR 条带显色。在 western blot 实验中,如果被检测蛋白为 heme 结合蛋白或者混有少量 heme 结合蛋白,应避免采用 HRP 标记的二抗,建议使用 ALP 标记的二抗或者其他二抗产品;heme 结合蛋白具有类似 HRP 的氧化还原酶活性,其本身可以和显色液反应,从而产生假阳性,干扰对实验结果的判断。

关键词:植物生物化学;蛋白免疫印迹杂交;辣根过氧化物酶;heme 结合蛋白;假阳性

中图分类号:Q503;Q554⁺.6 **文献标志码:**A

Study on the false positive problem caused by HRP-labeled secondary antibody in detecting heme binding protein

ZHANG Yanan, ZHANG Chunxiao, CHEN Xiaobo

(School of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: In order to study the false positive problem during detecting heme binding protein with horseradish peroxidase (HRP) as secondary antibody, spinach cytochrome b_6f complex (Cyt b_6f) and ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR) are used as the test material (the former contains the heme binding protein Cyt f , and the latter does not contain heme group). A comparative experiment is designed through the use of the primary antibody of spinach FNR and secondary antibodies labeled with HRP and alkaline phosphatase (ALP). The results indicate that in the HRP-labeled secondary antibody system, Cyt f could be colored even without the incubation by the primary antibody and the secondary antibody, which is a significant false positive. In the ALP-labeled secondary antibody system, the Cyt f doesn't show color, and only the FNR is colored. In western blot experiments, if the protein to be detected is a heme-binding protein or contains a small amount of heme-binding protein,

收稿日期:2018-10-23;修回日期:2018-12-28;责任编辑:王海云

基金项目:河北省自然科学基金(C2008000684)

第一作者简介:张亚男(1994—),男,山东东营人,硕士研究生,主要从事蛋白质分离、鉴定和功能方面的研究。

通信作者:陈晓波副教授。E-mail:zzschenxiaobo@163.com

张亚男,张春晓,陈晓波.HRP 标记的二抗检测 heme 结合蛋白造成假阳性问题的探讨[J].河北科技大学学报,2019,40(3):273-278.

ZHANG Yanan, ZHANG Chunxiao, CHEN Xiaobo. Study on the false positive problem caused by HRP-labeled secondary antibody in detecting heme binding protein[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(3): 273-278.

HRP-labeled secondary antibodies should be avoided and ALP-labeled secondary antibodies or other secondary antibodies should be recommended. It is speculated that the heme-binding protein has an HRP-like oxidoreductase activity, namely it can react with the color developing solution, thereby generating a false positive and interfering with the judgment of the experimental results.

Keywords: plant biochemistry; western blot; horseradish peroxidase; heme binding protein; false positive

蛋白质印迹或免疫印迹(western blot, WB)技术是利用抗原抗体杂交原理定性或定量检测蛋白质的一种手段^[1-2]。实验室常用的 WB 操作流程是通过 SDS-PAGE 将样品蛋白质分离,再将其转移到固相载体上,一般多采用 PVDF 膜、尼龙膜或 NC 膜作为固相载体,然后把固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与其对应的第一抗体(一抗)发生免疫杂交反应,特异性一抗再与和灵敏检测系统相偶联的第二抗体(二抗)反应,最终检测到能够和一抗特异结合的目的蛋白^[3]。WB 技术拥有电泳高分辨率和酶免疫测定的高敏感性及特异性,在分子生物学、生物化学、免疫遗传学等研究领域得到了非常广泛的应用^[4-5]。

WB 检测蛋白的高敏感性和特异性除了和特异性抗体有关外,还和用于检测的二级抗体的标记物有关。一般来讲,偶联到二抗上的标记物(有时也叫探针)有酶(主要包括辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)或其衍生物(APAAP, PAP))、荧光基团(FITC, Rhodamine, Texas Red, PE, Rhodamine, Dylight 等)、生物素、金颗粒等^[6]。不同 WB 类型实验需要使用不同的二抗标记物,但就一般实验室来讲,酶(主要是 HRP 和 ALP)标记的二抗的使用最为广泛,因为相对于其他标记方式,酶标记的二抗成本低廉,操作简单方便,对检测设备要求也低^[3]。HRP 的显色原理是利用其过氧化物酶的活性,催化反应需要底物过氧化氢(H_2O_2)和供氢体(DH_2)。实验中常用的供氢体有 DAB(3,3-二氨基联苯胺)、鲁米诺(luminol, 5'-氨基-2,3-二氢-1,4-咪唑二)等。这些物质大多数是没有颜色的还原性染料,可以被氧化成有颜色的氧化型的染料(D)或者通过发光来检测活性^[7-8]。ALP 的显色机理则是利用其水解酶的活性,当 ALP 处于 pH 值为 9.4 的碱性环境时,在镁离子激活下, β -甘油磷酸钠水解得到磷酸,磷酸与高浓度的钙盐结合形成无色的磷酸钙,再进一步与硝酸钴发生反应形成磷酸钴,最后经硫化胺处理形成黑色的硫化钴沉淀在酶活性的位置^[9]。HRP 和 ALP 对于二抗的敏感度相同,但由于 HRP 成本更低,并且产生的颜色比较明显,方便观察分析,因而 HRP 标记的二抗更受科研人员的青睐。

WB 实验虽然已经非常成熟了,但由于其步骤较多、涉及试剂的种类令人眼花缭乱,而检测的蛋白又各种各样,因而研究者在实验中经常会因遇到这样或那样的问题而苦恼。多数科研人员进行此项实验时要么参考某篇文献,要么沿用本实验室固有的方法,基本上是拿来就用,出了问题再找原因,对实验细节考虑不周,如二抗试剂与被检测蛋白之间的匹配问题。本研究使用铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶(FNR)的一抗、HRP 标记的二抗,检测细胞色素 b_6f (Cyt b_6f)中是否含有 FNR 时,发现在与 Cyt b_6f 的亚基 Cyt f (一种 heme 结合蛋白)几乎完全重合的位置上出现了显著的阳性条带,怀疑此条带是假阳性。为了排除疑虑,以 Cyt b_6f 和 FNR 为待检样品,使用 HRP 和 ALP 标记的 2 种二抗,设计了对比实验,最终的实验结果证实了猜测,并解释了 HRP 标记的二抗检测 heme 结合蛋白产生假阳性的原因。目前鲜有专门针对此方面的报道,相信本研究结果会给遇到类似问题的相关人员提供有益的参考和借鉴。

1 材料和方法

1.1 蛋白样品的制备

菠菜类囊体膜制备参考文献[10], Cyt b_6f 粗样品提取参照文献[11—13]。此样品混有少量的 FNR,经过一次分子筛或蔗糖密度梯度离心进一步纯化,可去除 FNR,得到纯的 Cyt b_6f 。在 Cyt b_6f 粗样品的基础上制备 FNR 样品。基本步骤如下:将-20℃的纯丙酮 800 μ L 加入至 200 μ L Cyt b_6f 粗制品(蛋白质质量浓度约为 20 mg/mL)中,混匀后于冰上静置 5 min,8 000g 离心 5 min,去除上清液,将沉淀用-20℃的纯丙酮再次悬浮处理,离心得到的沉淀悬浮于 1 mL TS(50 mmol/L Tris, pH 值为 7.5, 50 mmol/L NaCl)缓冲液中,9 000g 离心 5 min,去掉不溶物,收集上清液,转移到 10 kD 超滤管中,于 5 000g 离心浓缩至 100 μ L,即为 FNR 粗制品。

1.2 WB 实验步骤

SDS-PAGE 的制备参照文献[14],略作修改。分离胶浓度为 15% (质量分数,下同),浓缩胶浓度为 4%,将蛋白样品加入到等体积的溶液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 8.0,4 mol/L 尿素,2% SDS,5% 乙醇,2.5% 巯基乙醇)中,于 90 °C 处理 2 min,然后上样。Western blot 完整流程参照文献[15](半干式),略有修改,基本步骤如下:将凝胶玻璃板从电泳槽中取下,切去不用的部分,剪裁成和凝胶尺寸一样大小的 PVDF 固相膜,放入电转移液(240 mL H₂O,60 mL 甲醇,0.5 g H₃BO₃,1.8 mL 10% SDS)中浸泡;剪裁 12 张比凝胶尺寸略大的滤纸,放入转移缓冲液中泡透;按阴极→滤纸(6 张)→凝胶→转移膜→滤纸(6 张)→阳极的顺序放置在转膜仪上,赶压气泡;接通电源,选择恒压(CV)模式,11 V,50~60 min,电流为 70~90 mA。转膜结束,可用 0.1% 的丽春红检测转膜效果,然后用 TBST(Tris-Buffered Saline Tween-20,配置方法为将 8 g NaCl 和 2.42 g 的 Tris base 加入 800 mL 水中溶解,再加入 500~1 000 μ L 的 Tween-20,用 HCl 调节 pH 值至 7.4,加水定容至 1 L)溶液洗至无色。然后用 TBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭液于摇床上封闭 1 h,封闭完毕,用 TBST 洗膜 2 次,5 min/次。1:4 000 TBST 稀释的一抗溶液,孵育 1 h,TBST 洗膜 2 次,5 min/次;TBST 稀释 5 000 倍的二抗溶液,孵育 1 h,TBST 洗 2 次,5 min/次,然后加入显色液进行显色。

1.3 TMBZ/H₂O₂ 染色鉴定 Cyt *f* 过氧化物酶活性

TMBZ/H₂O₂ 染色鉴定过氧化物酶活性的方法参照文献[16]。染色液配制如下:将 3 份新配制的 TMBZ 甲醇溶液(6.3 mmol/L)和 7 份乙酸钠溶液(0.25 mmol/L,pH 值为 5.0)混合。将 WB 显色后的杂交膜浸没在染色液中,于 25 °C 黑暗温育 1 h 后,加入 H₂O₂ 到染色液中,使 H₂O₂ 的最终浓度达到 30 mmol/L。大约 3 min 后,结合 heme 的 Cyt *f* 的蓝色条带就会显现。

1.4 主要试剂

菠菜 FNR 一抗,购自荷兰 Agrisera 公司,从兔血清中制备;HRP 和 ALP 标记的二抗(羊抗兔),购自圣克鲁斯(上海)生物技术公司(Santa Cruz)。

2 实验结果与讨论

2.1 实验结果

Cyt *b₆f* 是植物叶绿体类囊体膜上一个重要的膜蛋白复合物,介于光系统 1 和光系统 2 之间,参与光合作用电子传递链的组成。一般认为,Cyt *b₆f* 由 4 个大亚基和 4 个小亚基组成,其中大亚基 Cyt *f* 结合一个 c-型的 heme 基团^[17]。图 1 a) 是提取的 Cyt *b₆f* 粗制品的 SDS-PAGE 图谱,分子质量从大到小依次为 Cyt *f*,Cyt *b₆*,Reisk[Fe-S]蛋白和亚基 IV,对应的相对分子质量分别为 33,23,20 和 17 kD,与文献报道一致^[12,15,18]。Cyt *f* 上面的一条浅带是 FNR,相对分子质量约为 35 kD^[15,19]。Cyt *b₆f* 粗制品经过分子筛或

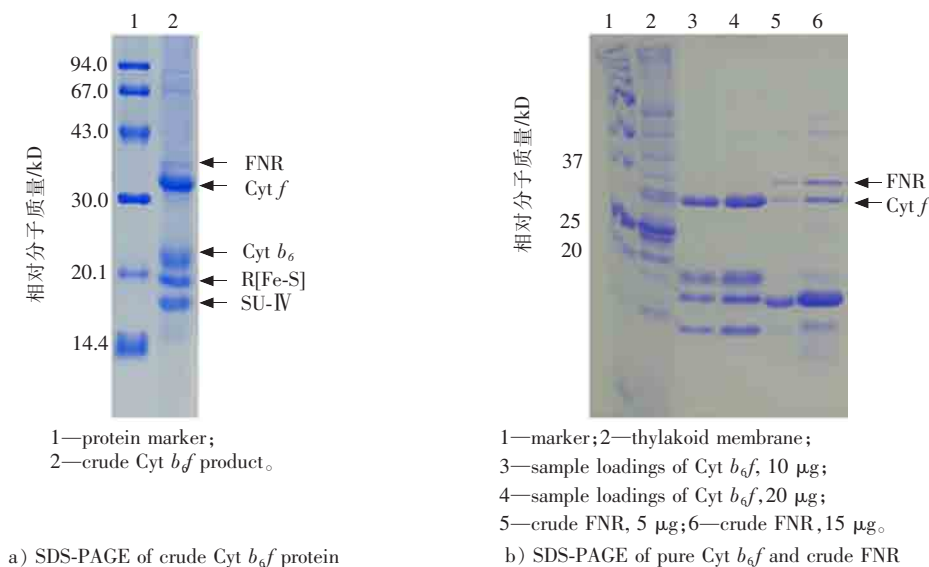
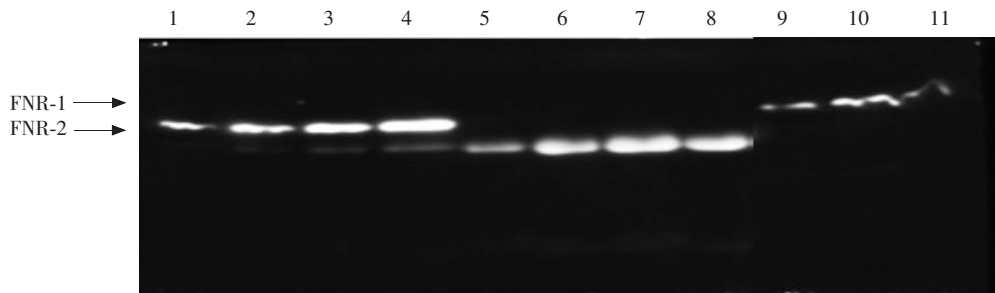


图 1 Cyt *b₆f* 和 FNR 粗制品的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE of Cyt *b₆f* and crude FNR preparations from spinach chloroplasts

蔗糖密度梯度离心之后,残留的 FNR 完全被去除,得到进一步纯化的 Cyt b_6f 样品(见图 1 b)中的 3 和 4)。以 Cyt b_6f 粗制品为基础,进行 2 次丙酮沉淀,可以有效去除 Cyt b_6 和亚基 4 等蛋白亚基,经过超滤浓缩,使 FNR 进行适当的纯化和浓缩,得到 FNR 的粗制品(见图 1 b)中的 5 和 6)。

采用菠菜 FNR 的一抗、HRP 标记的二抗,以类囊体膜、不同浓度的 FNR 样品和 Cyt b_6f 样品为检测对象,结果如图 2 所示。FNR 粗制品中,被鉴定出 FNR(记作 FNR-1),Cyt b_6f 纯制品中也被鉴定出 FNR(记作 FNR-2),但是这一位置与 Cyt f 条带几乎重合。因为这 2 个样品都是从类囊体膜中制备的,所以理论上类囊体膜中应该显示 FNR-1 和 FNR-2 两条带,但是结果类囊体膜中只显示一条 FNR 条带,并且这一条带的位置对应于 FNR-1 的位置,与粗制品中 FNR 的位置一致。当然,也可能是类囊体膜中 FNR-2 含量少于 FNR-1,所以导致类囊体膜中的 FNR-2 没有被检测出来。再者,随着 FNR 粗样品上样浓度的增加(见图 2 中的 1—4),与 Cyt f 位置重合的 FNR-2 条带也逐渐显现。依据图 1 b)的电泳图谱可知,FNR 样品中 FNR 和 Cyt f 浓度相当,一般情况下,这 2 条带亮度也应该相当。总之,上述结果使人怀疑 FNR-2 条带可能是假阳性。有文献报道,heme 结合蛋白具有和 HRP 相似的过氧化物酶的活性^[18-19]。在本实验条件下 FNR-2 显色的条带,不能排除是 Cyt f 直接和显色液反应的结果。

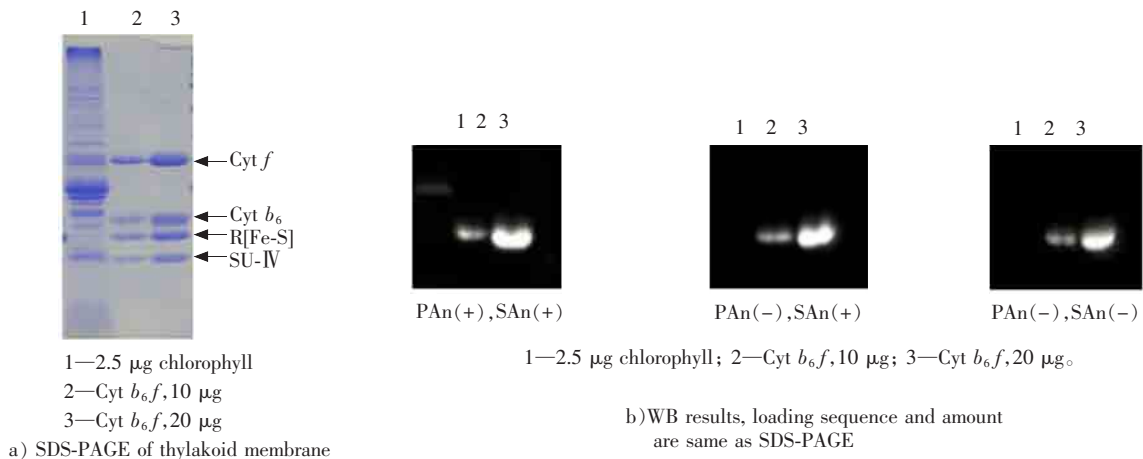


1—crude FNR,2 μg ; 2—crude FNR,5 μg ; 3—crude FNR,10 μg ; 4—crude FNR,20 μg ; 5—pure Cyt b_6f sample,2.5 μg ; 6—pure Cyt b_6f sample,5 μg ; 7—pure Cyt b_6f sample,10 μg ; 8—pure Cyt b_6f sample,15 μg ; 9—thylakoid membrane, 1.25 μg ; 10—thylakoid membrane,2.5 μg ; 11—thylakoid membrane, 5 μg 。

图 2 免疫印迹杂交(HRP 标记二抗)

Fig.2 WB results(second antibody marked by HRP)

为了验证上述想法,在对 Cyt b_6f 进行蛋白杂交实验时,设置了 2 个条件:一是不加一抗,二是同时不加一抗和二抗,研究在上述条件下,是否依然能够检测出 FNR 条带。实验结果表明,不加一抗,甚至一抗和二抗都不加,FNR-2 位置的条带都可以显色,并且随上样浓度的增加显色显著增加。显然,FNR-2 这一条带是假阳性,根据 HRP 显色的机理,产生这一假阳性的原因是经过电泳、转膜之后,Cyt f 仍然具有一定的过氧化物酶活性,自身可以直接和显色液反应。实验结果如图 3 所示。



1—2.5 μg chlorophyll
2—Cyt b_6f ,10 μg
3—Cyt b_6f ,20 μg

a) SDS-PAGE of thylakoid membrane

1—2.5 μg chlorophyll; 2—Cyt b_6f ,10 μg ; 3—Cyt b_6f ,20 μg 。

b)WB results, loading sequence and amount are same as SDS-PAGE

图 3 缺少一抗和缺少一抗、二抗条件下的 WB 实验结果

Fig.3 WB results without primary antibody, PAn(-), and without primary and secondary antibodies, PAn(-) and SAn(-)

改用 ALP 标记的二抗检测类囊体膜、FNR 粗制品和 Cyt b_6f 纯制品,见图 4。实验结果显示,对照条件下(即孵育一抗和二抗条件),类囊体膜和 FNR 粗制品中都检测到了 FNR-1,而在 Cyt b_6f 纯样品中并没有检测到 FNR-1,也没有检测到 FNR-2(见图 4 b)中的 I),而在没有孵育一抗和同时不孵育一抗和二抗的条件下,类囊体膜、FNR 粗制品均检测不出 FNR,当然 Cyt b_6f 样品中也检测不出 FNR(见图 4 b)中的 II 和 III),这一结果和预期完全相符。最后,在杂交显色之后的膜上,用 TMBZ/H₂O₂ 染色法检测了 Cyt f 的过氧化物酶活性,该方法也是利用 Cyt f 的氧化还原特性把无色的 TMBZ 氧化成了蓝色物质,因此在本实验中可以特异性检测 Cyt f 。图 4 b)(IV, V 和 VI)结果所示,分子质量略小于 FNR-1 的条带即为 Cyt f ,经比对与所谓的 FNR-2 条带完全重合。这一结果进一步证明了 FNR-2 条带为 Cyt f 所产生的假阳性条带,其产生的原因是选择了不合适的 HRP 标记的二抗。

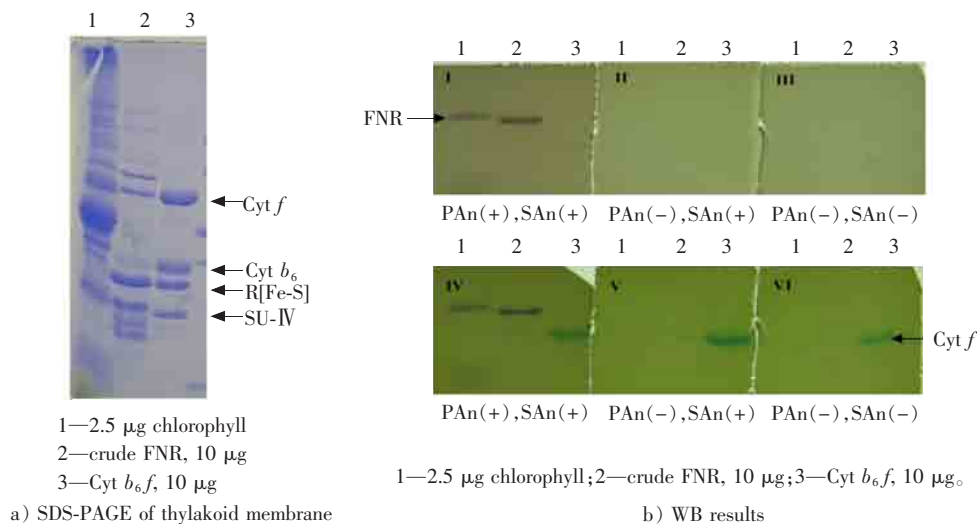


图 4 免疫印迹杂交(ALP 标记二抗)和 TMBZ/H₂O₂ 染色

Fig.4 WB results(second antibody marked by ALP)and stained with TMBZ/H₂O₂

2.2 讨论

WB 技术是目前进行蛋白质表达分析研究中应用最多的一项技术,是将传统高分辨率的 SDS-PAGE 电泳和灵敏度高、特异性强的免疫探测技术相结合,最有效地分析目的蛋白的表达,在分子生物学中发挥着重要作用^[20]。WB 的高灵敏度和二抗的标记物关系密切,特别是 HRP 标记物,其灵敏度甚至可以检测 pg 水平含量的目的蛋白,因此 HRP 标记的二抗在 WB 研究中的应用十分广泛。但是,高的灵敏度往往会产生假阳性问题,WB 中产生假阳性现象的原因多种多样。在本研究中,笔者针对 HRP 显色机理(即利用其氧化还原酶特性,使无色的底物氧化为有色的产物),探讨了 WB 实验中不恰当使用二抗标记物产生的假阳性问题。本研究中的 heme 结合蛋白 Cyt f ,其经过电泳前的变性处理、SDS-PAGE 和转膜之后,依然保留一定的过氧化物酶活性^[13,18],本身就可以和显色液反应,从而产生显著的假阳性条带,干扰对结果的判断。例如,有文献研究报道,菠菜中提取的 Cyt b_6f 粗制品中,WB 检测出现 2 条 FNR 条带,位置和本研究中的 FNR-1 和 FNR-2 相对应^[19]。根据本研究结果,这很可能是由于 HRP 标记的二抗导致实验结果出现了假阳性,令研究人员作出了错误的判断。

为了减少 WB 实验中的假阳性,某些情况下,需要考虑选择何种标记物偶联的二抗。有的研究者运用 WB 技术检测蛋白磷酸化情况时,往往推荐使用 HRP 标记的二抗,而避免使用 ALP 标记的二抗。这是因为 ALP 对磷酸酯的水解作用会使被检测的磷酸化蛋白发生变化,影响实验结果。本研究则表明,如果被检测蛋白为 heme 结合蛋白或者混有少量 heme 结合蛋白,应避免采用 HRP 标记的二抗,使用 ALP 标记的二抗或者其他二抗产品。

需要说明的是,heme 有 a, b, c 共 3 种类型,Cyt f 结合的 heme 属于 c 型,本研究没有检测结合 a 型或 b 型的蛋白是否也会产生假阳性结果。但是根据文献报道,结合 heme 基团的蛋白均会表现出一定的过氧化物酶活性^[18]。在接下来的工作中,将验证结合 a 型和 b 型 heme 的蛋白是否也会产生假阳性。另外,还需要注意的是,不仅仅是 heme 结合蛋白,其他一些类型的氧化还原酶,比如结合铜离子的氧化还原蛋白,在

SDS-PAGE 之后仍然表现出一定的氧化还原酶活性^[21]。在运用 WB 技术检测、分析这类蛋白时,如果使用 HRP 标记的二抗,很可能也会产生假阳性,影响对实验结果的判断。因此,仍需要对这类氧化还原酶进行进一步验证,以便为相关研究人员提供更有价值的参考和借鉴。

参考文献/References:

- [1] 田鲲,彭敏,陈宇,等.免疫组化、明胶酶谱、Western Blot 检测涎腺肿瘤中基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 表达的比较与评价[J].实用医院临床杂志,2010,7(5):17-21.
TIAN Kun, PENG Min, CHEN Yu, et al. Detection of the expression of MMP-2 and MMP-9 by immunohistochemistry, gelatin zymography and Western Blot analysis ins alivary gland tumors [J]. Practical Journal of Clinical Medicine, 2010, 7(5): 17-21.
- [2] NIEWIADOMSKA E, POLZIEN L, DESEL C, et al. Spatial patterns of senescence and development-dependent distribution of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(10): 1057-1068.
- [3] 张燕婉,叶珏,时那,等.蛋白质免疫印迹技术的实验研究[J].实验技术与管理,2008,25(10):35-37.
ZHANG Yanwan, YE Jue, SHI Na, et al. Experimental research on protein immunoblot assay [J]. Experimental Technology and Management, 2008, 25(10): 35-37.
- [4] 温博贵.蛋白质印迹法[J].生理科学进展,1987,18(4):328-331.
- [5] 王维,郎明林,杨学举.小麦转基因技术及转化功能基因研究进展[J].中国农学通报,2012,28(18):1-6.
WANG Wei, LANG Minglin, YANG Xueju. Advances of wheat transgenic techniques and its transferred functional genes [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(18): 1-6.
- [6] 刘奇,尹磊森,魏颖,等.蛋白质磷酸化检测方法及其原理[J].中国医药生物技术,2013,8(2):134-138.
- [7] 郭春祥,郭锡琼.介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J].上海免疫学杂志,1983,3(2):97-100.
- [8] 张维敏.普鲁士蓝纳米粒子过氧化物模拟酶及其在过氧化氢和葡萄糖检测中的应用研究[D].西安:陕西师范大学,2013.
ZHANG Weimin. Prussian Blue Nanoparticles as Peroxidase Mimetic for Colorimetric Detection of H₂O₂ and Glucose[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2013.
- [9] 陈熙,陈锦,张慧妍,等.阵列纸芯片比色法检测碱性磷酸酶[J].分析化学,2016,44(4):591-596.
CHEN Xi, CHEN Jin, ZHANG Huiyan, et al. Colorimetric detection of alkaline phosphatase on microfluidic paper-based analysis devices [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(4): 591-596.
- [10] 闫久胜.细胞色素 b₆f 蛋白复合体的结构与功能:色素的结构与功能及膜脂的作用[D].北京:中国科学院植物研究所,2000.
YAN Jiusheng. Structure and Function of Pigments and Effects of Membrane Lipids in Cytochrome b₆f Complex [D]. Beijing: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2000.
- [11] 陈晓波.细胞色素 b₆f 蛋白复合体中叶绿素 a 的性质和功能研究[D].北京:中国科学院植物研究所,2006.
CHEN Xiaobo. Characterization and Function of Chlorophyll a in Cytochrome b₆f from Spinach [D]. Beijing: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [13] CHEN X B, ZHAO X, ZHANG J P, et al. The effects of detergents DDM and β-OG on the singlet excited state lifetime of the chlorophyll a in cytochrome b₆f complex from spinach chloroplasts [J]. Science China Ser C-Life Science, 2007, 50(4): 505-510.
- [14] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of acteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [15] ZHANG H, WHITELEGGE J P, CRAMER W A. Ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b₆f Complex [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(41): 38159-38165.
- [16] THOMAS P E, RYAN D, LEVIN W. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome p-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 75(1): 168-176.
- [17] AGARWAL R, HASAN S, JONES L M, et al. Role of domain swapping in the hetero-oligomeric cytochrome b₆f lipoprotein complex [J]. Biochemistry, 2015, 54(20): 3151-3163.
- [18] CHEN X B, HOU C, LI L B, et al. The peroxidase activity of cytochrome b₆f complex from spinach chloroplasts [J]. Photosynthetica, 2010, 48(1): 3-8.
- [19] SZYMANSKA R, DLUZEWSKA J, SLESIAK I, et al. Ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase bound to cytochrome b₆f complex is active in plastoquinone reduction; Implications for cyclic electron transport [J]. Physiologia Plantarum, 2011, 141(3): 289-298.
- [20] 侯维海,王建林,旦巴,等.西藏白菜型油菜油体特征与营养品质及油体提取物的 SDS-PAGE 分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2018,46(10):68-78.
HOU Weihai, WANG Jianlin, DAN Ba, et al. Oil body characteristics, nutritional quality and SDS-PAGE analysis of oil body extracts of *Brassica campestris* form Tibet [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2018, 46(10): 68-78.
- [21] MILLER D, NICHOLAS D J D. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine/H₂O₂ staining is not specific for heme proteins separated by gel electrophoresis [J]. Analytical Biochemistry, 1984, 140(2): 577-580.