

·技术与方法·

无胶筛分毛细管电泳在分析苹果发育时期转变蛋白质变化规律中的应用

田义¹, 张新忠², 张志宏³, 丛佩华^{1*}, 康国栋¹

¹中国农业科学院果树研究所, 兴城 125100; ²中国农业大学, 北京 100094; ³沈阳农业大学, 沈阳 110161

摘要 对无胶筛分毛细管电泳体系的筛分介质浓度、缓冲体系的离子强度、分离电压、进样量及温度等条件进行了优化, 最终确定最佳分离条件为7.5% Dextran, 7.5%丙三醇, 0.15 mol·L⁻¹ TB, 0.1% SDS, 分离电压23.5 kV, 进样量1.5 psix90秒, 温度25°C。应用此方法对金冠×红玉苹果杂种后代韧皮部蛋白质进行测定, 得到了多个与阶段转变相关的蛋白质, 在韧皮部50节上, 有分子量为5.0 kDa的特异蛋白质出现, 分子量为24.5 kDa的蛋白质含量在阶段转变过程中明显升高。

关键词 苹果, 无胶筛分毛细管电泳, 阶段转变, 蛋白质

田义, 张新忠, 张志宏, 丛佩华, 康国栋 (2008). 无胶筛分毛细管电泳在分析苹果发育时期转变蛋白质变化规律中的应用. *植物学通报* 25, 585–590.

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是一种新型电泳与色谱相结合的分​​离分析技术, 具有分离效率高、分析速度快和样品用量少等特点, 被广泛应用于核酸和蛋白质的分离(梁琼麟等, 2003; 金良和甘莉, 2003)。无胶筛分毛细管电泳(non-gel sieving capillary electrophoresis, NGSCE)是多种毛细管电泳分离模式中应用最为广泛的分离模式之一。常用的无胶筛分介质主要为线形均聚物, 如线形聚丙烯酰胺(LPA)、聚N,N-二甲基丙烯酰胺(PDMA)、聚氧化乙烯(PEO)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、纤维素及其衍生物等(周丹和王延梅, 2006)。Ganzler等(1992)应用10%葡聚糖(分子量为2.0×10⁶ kDa)为筛分介质, 0.06 mol·L⁻¹ MAMPD-CACO, pH 8.8 (含0.1% SDS), 以及3%(w/v) PEG 100 000、0.1 mol·L⁻¹ Tris-CHES, pH 8.8(含0.1%SDS)为条件测定蛋白质分子量并获得了满意的结果。Guttman (1996)以3% PEO为筛分介质, 0.1 mol·L⁻¹ Tris-CHES, pH 8.8(含0.1% SDS)为条件成功地测定了蛋白质的分子量。国内学者廖海明等(1999)、赵京山等(2005)和张振中等(2000)尝试使用不同的缓冲液进行了标准蛋白质分子量的测定。Nicholas等(2002)

对从菠菜叶片提取的变性Rubisco进行了检测和定量分析。汪俏梅和曾广文(1998)利用毛细管电泳法对苦瓜可溶性蛋白质进行了分析, 发现了一些与性别分化有关的特异蛋白质。鉴于添加剂在无胶筛分毛细管电泳分离DNA中效果显著, 本研究将丙三醇作为添加剂, 在较低的筛分介质浓度下取得了良好的分离效果。

1990年, Poethig (1990)在 *Science* 上发表的文章中明确提出, 将植物的个体发育划分为童期(juvenile phase)、成年营养生长期(adult vegetative phase)和生殖生长期(reproductive phase)3个发育阶段; 植株由童性(juvenility)到成年(adult)期的转变过程通常被称为阶段转变(phase change)。个体发育除时间上存在差异外, 在空间上也存在差异, 即进入成年阶段的整个树体的不同高度/节位在发育阶段上存在质的差异。张新忠和束怀瑞(2004)、田义等(2006)对植物童性及调控以及阶段转变的研究进展进行了综述。李春敏等(2005)和Zhang等(2007)通过对苹果(*Malus domestica*)实生苗叶片和韧皮部内多胺和多酚类物质的测定, 结合最低开花节位, 确定80节和120节分别为童期向成年营养生长期和成年营养生长期向生殖生长期转变的临界节位。

收稿日期: 2007-12-25; 接受日期: 2008-02-25

基金项目: 863计划(No.2006AA100108)和河北省自然科学基金(No.C2004000739)

* 通讯作者。E-mail: congph@163.com

1 材料和方法

1.1 无胶筛分毛细管电泳条件的优化路线

(1)不同筛分介质浓度的优化: 10% Dextran, 7.5% Dextran, 5% Dextran。(2)电泳温度的优化: 20°C, 25°C, 30°C。(3)分离电压的优化: 21.2 kV, 23.5 kV, 25.8 kV。(4)进样量的优化: 1.0 psix90 秒, 1.5 psix90 秒, 3.0 psix90 秒。(5)缓冲液离子强度的优化: 0.075 mol·L⁻¹, 0.1 mol·L⁻¹, 0.15 mol·L⁻¹。

1.2 苹果韧皮部蛋白质的分析

1.2.1 取样

以2年生金冠×红玉(Golden Delicious×Jonathan)杂种实生苗60株为取样材料(河北省昌黎县),分为2组(A1和A2),30株为1个重复。参照Zhang等(2007)副梢‘接力’的取样方法,自下而上5节为1个取样单位,上部枝条节位为主干节位与枝条自身节位之和,相同节位混合采样,采后放入冰盒迅速带回实验室。将材料洗净后吸干水分,取叶片和韧皮部,置液氮中速冻,然后在冷冻干燥机内冻干30小时,高速粉碎机粉碎后过60目筛,于4°C保存备用。

1.2.2 蛋白质的提取

称取100g样品,加入0.3g聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)和5mL蛋白提取液(62.5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10% 丙三醇, 5% β-巯基乙醇, 0.5% SDS, pH 8.0),充分涡旋,4°C提取1小时。然后4°C 12 000 ×g离心20分钟,取上清液,过0.45 μm滤膜。取180 μL滤液,加入20 μL的0.1%橙黄剂(orange green, OG),沸水浴10分钟,冰浴3分钟,0.5 psix30秒进样测定。电极缓冲液组成: 0.1 mol·L⁻¹ Tris-Boric acid (TB), 10% 丙三醇, 5% Dextran, 0.1% SDS(过0.45 μm滤膜)。上机检测。

1.2.3 仪器和试剂

实验所用仪器为美国Beckman公司P/ACE MDQ型毛细管电泳仪、二极管阵列检测器及32karat数据分析系统。毛细管为内径75 μm的聚丙烯酰胺涂层毛细管(中

国科学院大连化学物理研究所),管长47 cm,至检测窗口37 cm。蛋白质标样为低分子量(14.4-97.4 kDa)标准蛋白(中国科学院上海生物化学研究所监制)。Dextran为20 000T(美国Pharmacia公司)。

1.2.4 数据分析

32karat数据处理系统自动生成数据,根据迁移时间(结合特征峰)对测定结果进行判断,以便找到特异蛋白质峰。以节位为横坐标,以蛋白质的相对含量(蛋白质的峰面积与内标OG峰面积的比值)为纵坐标作图,分析蛋白质含量的变化趋势。

2 结果与分析

2.1 无胶筛分毛细管电泳条件的优化

2.1.1 筛分介质浓度的优化

蛋白质标样在不同浓度筛分介质中的电泳结果如图1所示(横坐标表示标样蛋白组分到达检测窗口的时间,纵坐标表示蛋白质组分通过检测窗口时的吸收强度,检测波长为214 nm)。

在筛分介质浓度为10% Dextran(含10%丙三醇作为添加剂)的条件下(图1A),基线不稳,蛋白质峰的峰高非常低,有的蛋白质峰没有出现。其原因之一可能是由于筛分介质浓度太大,导致进样量小,从而造成蛋白质峰小。筛分介质浓度为7.5% Dextran(含7.5%丙三醇)的条件下(图1B),基线平稳,各组分实现基线分离,分离度良好,具有较高的分离效率,在30分钟内完成了对分子量范围为14.4-97.4 kDa的蛋白质标样的分离,且标样中的杂质峰很低。筛分介质浓度为5.0% Dextran(含5.0%丙三醇)的条件下(图1C),基线平稳,分离度较小,标样中6个组分之间的距离小于8分钟,这样可能会导致将来样品中相近分子量的蛋白质不能被分离开。其它电泳条件:温度25°C,分离电压23.5 kV,进样量1.5 psix90秒。电极缓冲液的缓冲体系:0.1 mol·L⁻¹ TB, 0.1% SDS。样品为6组分的小分子量蛋白质标样。标样溶解液:62.5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10% 丙三醇, 5% β-巯基乙醇, 0.5% SDS。

2.1.2 其它电泳条件的优化

在筛分介质浓度为 7.5% Dextran(含 7.5% 丙三醇)基础上(分离电压 23.5 kV, 进样量 1.5 psi×90 秒, 电极缓冲液缓冲体系 0.1 mol·L⁻¹ TB、0.1% SDS), 对 3 个温度(20°C、25°C 和 30°C)梯度下的分离效果进行比较, 结果表明随着温度的升高, 分离时间缩短, 分离度也随之降低, 考虑到较高的温度可能会影响毛细管的使用寿命, 最

终选择 25°C。此后, 依次在前一个优化的分离条件下, 对分离电压(21.2、23.5 和 25.8 kV)、进样量(1.0 psi×90 秒、1.5 psi×90 秒、3.0 psi×90 秒)、缓冲体系(0.075 mol·L⁻¹ TB、0.10 mol·L⁻¹ TB 和 0.15 mol·L⁻¹ TB)进行优化, 结果表明随着电压的升高和缓冲体系离子强度的降低, 分离时间缩短。随着进样量的增大, 峰值变大, 但是当进样量达到 3.0 psi×90 秒时, 峰基部开始明显变宽。最后, 综合考虑基线稳定性、分离时间、峰值及毛细管寿命等因素, 认为最佳分离条件为 7.5% Dextran, 7.5% 丙三醇, 0.15 mol·L⁻¹ TB, 0.1% SDS, 23.5 kV 分离电压, 进样量为 1.5 psi×90 秒, 温度 25°C。

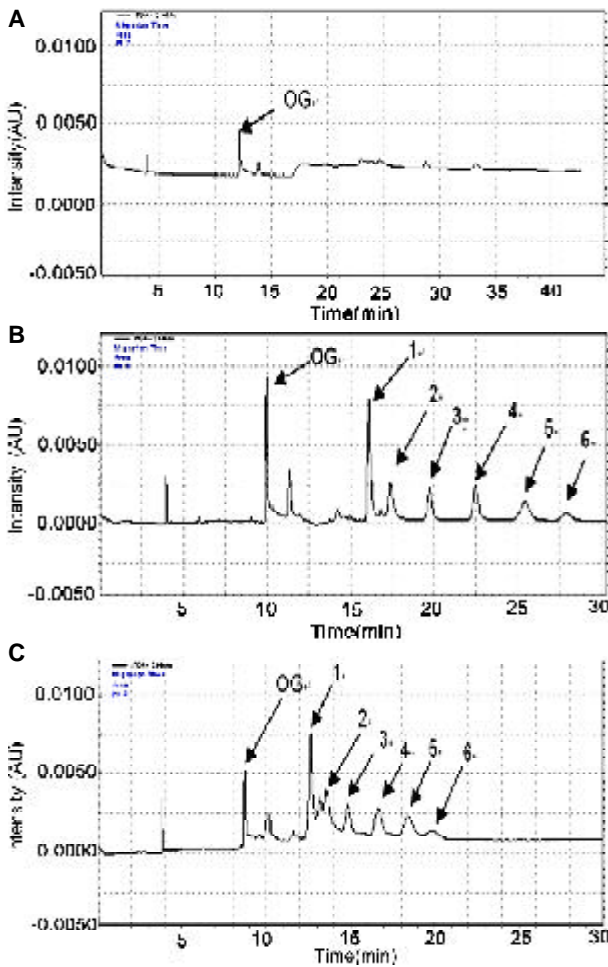


图 1 筛分介质浓度对电泳结果的影响
(A) 10% Dextran; (B) 7.5% Dextran; (C) 5% Dextran
OG: 橙黄剂; 1-6 分别代表分子量为 14.4、20.0、31.0、43.0、66.2 和 97.4 kDa 的蛋白质峰

Figure 1 Effect of different concentrations of separation matrix on electrophoresis

(A) 10% Dextran; (B) 7.5% Dextran; (C) 5% Dextran
OG: Orange green; 1-6 stand for peaks of 14.4, 20.0, 31.0, 43.0, 66.2 and 97.4 kDa proteins respectively

2.2 韧皮部蛋白质的测定

在进行样品分析之前, 用优化的电泳条件测定蛋白质标样, 制作蛋白质分子量标准曲线(图 2)。

应用优化的无胶筛分毛细管电泳条件对苹果韧皮部蛋白质进行分析, 发现有一个 5.0 kDa 蛋白质在 50 节以前缺乏, 而在 50 节以后出现(图 3)并一直存在。

对所有蛋白质峰面积进行积分, 将蛋白质峰面积与内标峰面积对比, 发现分子量为 24.5 kDa 的蛋白质随节位的升高其丰度明显增加(图 4)。在 70 节左右其含量有明显的上升, 在 120 节以上, 其含量再次明显上升。其发生规律与 Zhang 等(2007)利用多酚所测定的苹果阶段转变蛋白质的结论基本一致。据此认为 5.0 kDa 和

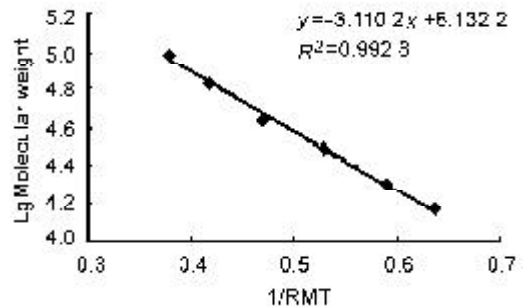


图 2 蛋白质分子量标准曲线
RMT: 相对迁移时间

Figure 2 The standard curve of protein molecular weight
RMT: Relative migration time

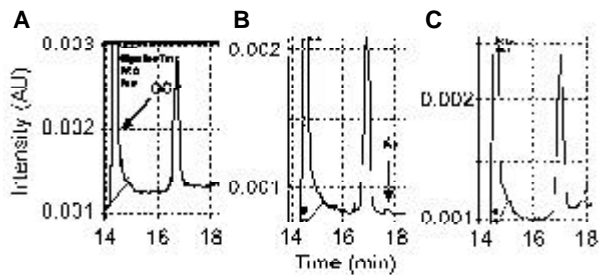


图 3 5.0 kDa 蛋白质在苹果阶段转变中的变化趋势
(A) 50 节以下未检测到该蛋白质; (B) 51-55 节该蛋白质出现; (C) 56 节以上该蛋白质含量明显增加
OG: 橙黄剂

Figure 3 The variation of a 5.0-kDa protein

(A) The protein can not be determined below the node of 50th;
(B) The protein appears from the node 51-55th; (C) The protein content increased above the node 56th
OG: Orange green

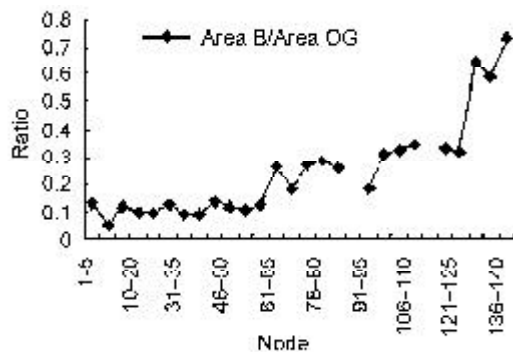


图 4 24.5 kDa 蛋白质含量在苹果阶段转变中的变化规律
Area B/Area OG: B 蛋白质峰面积与橙黄剂峰面积比值

Figure 4 The variation of the content of a 24.5-kDa protein
Area B/Area OG: The ratio of peak area between protein B and orange green

24.5 kDa 蛋白质为阶段转变相关蛋白质。利用无胶筛分毛细管电泳法进行阶段转变相关蛋白质的分析简便可行。

3 讨论

3.1 无胶筛分毛细管电泳的优点与不足

本实验对无胶筛分毛细管电泳的分离条件进行了优化并

获得了较好的应用效果。与传统的 SDS-PAGE 相比, 无胶筛分毛细管电泳显示出了极大的优越性: (1)简单, 直接可以看到结果, 省去了制胶、染色和脱色等步骤; (2)安全, 不必使用丙烯酰胺、TEMED 等有毒药品, 且药品用量少, 对环境污染小; (3)快速, 可在 30 分钟内完成对单个样品的检测并可以定量。本文通过对峰面积比值(蛋白质峰面积与内标峰面积之比)的比较, 对苹果阶段转变过程中未知蛋白质进行了半定量比较, 找到了在阶段转变过程中定量变化的蛋白质。同时, 本研究将丙三醇作为添加剂应用到蛋白质的分离中, 并且在较低的葡聚糖浓度(7.5%)条件下获得了很好的分离效果, 比 Ganzler 等(1992)和廖海明等(1999)所用浓度(10% 葡聚糖)降低了 25%。在利用无胶筛分毛细管电泳进行分离 DNA 的研究中发现, 以羟丙基甲基纤维素为筛分介质分离 DNA 时, 羟丙基甲基纤维素、硼酸和丙三醇之间形成了络合物, 从而形成了不同孔径的网络, 进而提高了分离度(周丹和王延梅, 2006)。本实验中所用的葡聚糖和羟甲基纤维素均为长链并带有多个羟基的化合物, 加入丙三醇之后分离效果得以提高的机理可能与羟甲基纤维素的机理相同, 在葡聚糖、硼酸和丙三醇之间形成络合物, 形成不同孔径的网络, 使分离度得以提高。

然而, 无胶筛分毛细管电泳在具备了以上一系列优点的同时, 也存在一些问题。首先, 仪器价格昂贵, 使毛细管电泳仪的普及受到了限制。其次, 对于没有纯品的蛋白质不能制作标准曲线, 从而难以实现定量。利用内标法虽然可对蛋白质进行半定量分析, 但由于仪器在每次进样时的进样量可能会存在差异, 加之对于峰面积无论是仪器自动积分还是手动积分都会造成不同程度的偏差, 导致非凝胶筛分毛细管电泳对于未知蛋白质的定量检测难以精确。再者, 涂层毛细管的使用寿命和成本也限制其广泛应用。随着使用次数的增加, 毛细管对于电渗流的抑制作用逐渐减弱, 管壁对蛋白质的吸附逐渐增强, 使得分离难以实现。本实验中每个样品分摊的毛细管费用在 4 元左右, 使得检测费用大幅度增加。

3.2 阶段转变蛋白质变化规律

研究苹果的阶段转变对于提高育种效率及加快育种进程

具有重要意义。本实验通过非凝胶筛分毛细管电泳法获得了 5.0 kDa 和 24.5 kDa 2 个阶段转变相关蛋白质。此前, Bon和Monteuuis (1991)在巨杉(*Sequoiadendron giganteum*)中检测到与膜相关的 16 kDa 的蛋白仅在童期和返童的组织中存在, 而在成年组织中缺乏。板栗(*Castanea mollissima*)成年区枝条组培苗中有 38 kDa 和 44 kDa 2 条特异蛋白质带, 而童期枝条的组培苗中没有发现上述蛋白质带(Amo-Marco et al., 1993)。在北美红杉(*Sequoia sempervirens*)的成年组织细胞内有 32 kDa 的并发生磷酸化作用的蛋白质, 而在童期组织的细胞中不存在(Kuo et al., 1995)。在常春藤(*Hedera nepalensis*)和橄榄(*Olea europaea*)中也发现了与阶段转变相关定性或定量变化的蛋白质(Garcia et al., 2000)。田义等(2006)对木本植物阶段转变相关蛋白质的研究进行了综述。2007 年 5 月, *Science* 杂志上发表了德国 Max Planck 植物培育研究院、英国伦敦帝国学院的 Laurent Corbesier 等和日本奈良科学技术学院的 Shojiro Tamaki 等研究的结论: 70 年来人们一直在寻找的开花素就是 *FT* 基因的蛋白产物(Corbesier et al., 2007; Tamaki et al., 2007)。随着双向电泳技术的日益完善及其与质谱兼容技术的开发, 必将进一步引导研究者将木本植物阶段转变的研究重点转向阶段转变相关的蛋白质。本文利用优化的无胶筛分毛细管电泳条件成功地找到了与苹果阶段转变相关的蛋白质, 为下一步进行双向电泳筛选阶段转变相关的特异蛋白质奠定了基础。

参考文献

- 金良, 甘莉 (2003). 毛细管电泳在蛋白质和核酸分析研究中的应用. 华中农业大学学报 **22**, 73-76.
- 李春敏, 刘国俭, 常瑞丰, 赵永波, 陈冬玫, 王广鹏, 张新忠, 束怀瑞 (2005). 苹果实生树阶段转变过程中内源多胺含量的动态变化. 河北农业科学 **9**, 1-4.
- 梁琼麟, 罗国安, 王义明 (2003). 高效毛细管电泳在核酸、蛋白质分析中的新进展. 分析化学 **31**, 1514-1519.
- 廖海明, 杨昭鹏, 徐康森 (1999). 用 SDS-填充胶毛细管电泳法测定蛋白质分子量. 药物分析杂志 **19**, 363-366.
- 田义, 张志宏, 李春敏, 张新忠 (2006). 木本植物阶段转变分子机制的研究进展. 华北农学报 **21**(S2), 15-18.
- 汪俏梅, 曾广文 (1998). 苦瓜性别分化的特异蛋白质研究. 植物学报 **40**, 241-246.
- 张新忠, 束怀瑞 (2004). 植物童性及调控的研究进展. 河北科技师范学院学报 **18**(2), 23-28.
- 张振中, 吴逸明, 蒋红丽, 吴如金 (2000). 无胶筛分毛细管电泳在蛋白质分离中的应用. 河南医科大学学报 **35**, 230-232.
- 赵京山, 温进坤, 韩梅 (2005). 无胶筛分毛细管电泳检测微量蛋白质方法的建立与评价. 河北医科大学学报 **26**, 127-128.
- 周丹, 王延梅 (2006). 添加剂在毛细管电泳分离 DNA 中的作用研究进展. 高分子通报 **10**, 76-81.
- Amo-marco JB, Vidal N, Vieitez M, Ballester A (1993). Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chestnut. *J Plant Physiol* **142**, 117-119.
- Bon MC, Monteuuis O (1991). Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. II. Biochemical arguments. *Physiol Plant* **81**, 116-120.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle L, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.
- Ganzler K, Greve KS, Cohen AS, Kanger BL, Guttman A, Cooke NC (1992). High-performance capillary electrophoresis of SDS-protein complexes using UV-transparent polymer networks. *Anal Chem* **64**, 2665-2671.
- Garcia JL, Avidan N, Troncoso A, Sarmiento R, Lavee S (2000). Possible juvenile-related proteins in olive trees tissues. *Sci Hortic* **85**, 271-284.
- Guttman A (1996). Capillary sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins. *Electrophoresis* **17**, 1333-1341.
- Kuo JJ, Huang HJ, Cheng CM, Chen LJ, Huang BL, Huang LC, Kuo TT (1995). Rejuvenation *in vitro*: modulation of protein phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. *J Plant Physiol* **146**, 333-336.
- Nicholas KUKG, Forney CF, Paulson AT (2002). A rapid capillary gel electrophoresis method for the quantitative determination of Rubisco in spinach. *Phytochem Anal* **13**, 39-44.

Poethig RS (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* **250**, 923-930.

Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**,

1033-1036.

Zhang XZ, Zhao YB, Li CM, Chen DM, Wang GP, Chang RF, Shu HR (2007). Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*). *J Plant Physiol* **164**, 574-580.

Analysis of Non-gel Sieving Capillary Electrophoresis in Protein Changes Pattern in Development Phase Shift in Apple

Yi Tian¹, Xinzhong Zhang², Zhihong Zhang³, Peihua Cong^{1*}, Guodong Kang¹

¹Research Institute of Pomology, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, China

²China Agricultural University, Beijing 100094, China; ³Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract Protein markers were used with optimal electrophoresis conditions in analysis of proteins of phase change in apple. Optimal conditions for non-gel sieving capillary electrophoresis (NGSCE) were 0.15 mol·L⁻¹ TB, 0.1% SDS, 7.5% Dextran, 7.5% glycerol, 23.5 kV separation voltage and 1.5 psix90 s injection volume. This condition for NGSCE was used to separate the phloem proteins in apple hybrid seedlings. A 5.0-kDa protein appeared above the 50th node, and the content of a 24.5-kDa protein increased sharply during phase change. The result was valuable for study of apple phase change.

Key words apple, non-gel sieving capillary electrophoresis, phase change, protein

Tian Y, Zhang XZ, Zhang ZH, Cong PH, Kang GD (2008). Analysis of non-gel sieving capillary electrophoresis in protein changes pattern in development phase shift in apple. *Chin Bull Bot* **25**, 585-590.

* Author for correspondence. E-mail: congph@163.com