

表 6 IBA 浓度与当年高生长多重比较

激素浓度	N	显著性检验	
		1	2
30 mg ·L <sup>-1</sup>	30	4.110 0	
20 mg ·L <sup>-1</sup>	30	4.706 7	4.706 7
10 mg ·L <sup>-1</sup>	30		4.983 3
P 值		0.096	0.437

表 7 NAA 不同浓度、不同浸泡时间与当年高生长统计

不同浓度	时间 / h	平均当年高 / cm	成活率 / %
30 mg ·L <sup>-1</sup>	1	4.50	99
	2	4.00	97.1
	3	4.70	92.5
40 mg ·L <sup>-1</sup>	1	3.75	99.0
	2	4.80	94.8
	3	4.70	90.4
50 mg ·L <sup>-1</sup>	1	4.15	97.1
	2	4.25	96.9
	3	2.80	91.3

### 2.3 NAA 对东北红豆杉插穗生根的影响

NAA 不同浓度、不同浸泡时间与当年高生长的影响结果见表 7。NAA 不同浓度、不同浸泡时间及其交互作用对当年高生长的影响多因子方差分析表明, F 值为 1.066, 其概率为 0.395 > 0.05, 差异不显著性, 说明 NAA 不同浓度、不同浸泡时间对红豆杉苗木的影响不显著。

## 3 结论

插穗经 ABT 1 号生根粉 50 ~ 100 mg ·L<sup>-1</sup> 水溶液浸泡 0.5 h, 或用 IBA 10 ~ 20 mg ·L<sup>-1</sup> 水溶液浸泡 0.5 ~ 1.0 h, 有利于生根和提高成活率, 促进扦插苗的生长。

### 参考文献

- [1] 周以良. 黑龙江省树木志[M]. 哈尔滨: 黑龙江省科学技术出版社, 1986: 6.
- [2] 柏广新. 中国东北红豆杉研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 9.
- [3] 崔万成. 东北红豆杉人工栽培技术的研究[J]. 中国林副特产, 2003(2): 8-11.
- [4] 王新成, 郑秀财. 东北红豆杉薄膜封闭扦插造林试验[J]. 林业科技, 2000(4): 6-7.
- [5] 王挺良. 南方红豆杉人工林栽培和生长的研究[J]. 林业科技通讯, 2001(6): 9-11.
- [6] 李成东. 我国红豆杉的栽培研究[J]. 时珍国药研究, 1997(6): 550-551.
- [7] 谢志远. 曼地亚红豆杉的引种栽培和速生刺激剂的研究[J]. 中草药, 1999(2): 143.
- [8] 张宗勤. 红豆杉种子发育及幼苗生长动态[J]. 植物资源与环境, 1998(2): 12-15.

编辑: 琳莉

# 甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 叶片蛋白提取方法的比较

李然红<sup>1</sup>, 于丽杰<sup>2</sup>, 王晶晶<sup>1</sup>, 李晓东<sup>1</sup>

(1. 牡丹江师范学院生物系, 牡丹江 157012; 2. 哈尔滨师范大学, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘 要:** 分别用直接提取法、丙酮沉淀法和丙酮三氯乙酸结合沉淀法提取甘蓝叶片蛋白, SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果表明, 丙酮沉淀法较适合甘蓝叶片蛋白质的提取. 本文对影响 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的关键步骤进行了探讨, 对凝胶的不同染色方法进行了比较, 确立了一套适用于甘蓝叶片蛋白提取、定量、凝胶制备、电泳、染色以及脱色的方法. 采用改良后的丙酮沉淀法提取的甘蓝叶片蛋白 SDS - PAGE 电泳结果显示, 其条带清晰, 数量多, 分辨率高.

**关键词:** 甘蓝; 蛋白提取; SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[中图分类号] S630.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1003 - 6180(2009)02 - 0043 - 03

SDS - PAGE (十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳) 是分析生物体蛋白质常用的方法, 又是蛋白质双向电泳的重要组成部分<sup>[1]</sup>, 可得到较好的 SDS - PAGE 图谱, 是进行蛋白质分析的关键. 影响 SDS - PAGE 分析结果的因素是多方面的, 其中蛋白的提取和纯化、凝胶制备、蛋白定量

以及电泳后凝胶染色和脱色均是重要环节<sup>[2]</sup>. 不同植物具有不同的特点, 要得到较好的电泳图谱, 需要进行实验. 目前对十字花科芸苔属植物(包括油菜、大白菜、甘蓝等)的转基因研究涉及到增产<sup>[3]</sup>、抗虫<sup>[4]</sup>、制药<sup>[5]</sup>等诸多方面, 如何从植物体中提取到高质量的蛋白, 对转基因植物的下游检

收稿日期: 2008-12-09

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014)

测具有关键作用。

本试验以甘蓝为例,对其叶片蛋白提取、定量、凝胶制备、电泳、染色以及脱色等方法进行了比较研究和改良,获得了一套适用于甘蓝叶片蛋白提取、定量、凝胶制备、电泳、染色以及脱色的方法,为其他十字花科芸苔属植物叶片蛋白的提取及 SDS - PAGE 提供了一定的理论和实践基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

以中甘 11 号甘蓝为材料,种子为中国农科院蔬菜花卉研究所生产的商用种子,取播种后 15 d 苗龄的甘蓝叶片,每 1.5 mL Eppendorf 管放入 0.1 g 甘蓝叶片,液氮研磨后, - 80 保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白质的提取

**直接提取法** 取出实验材料,每 Eppendorf 管加入蛋白提取液(pH8 150 mmol/L Tris-HCl, 25%甘油,2%PVP40)350 μL,于冰上静置 3~4 小时,4℃,12 000 rpm 离心 20 min,取上清液电泳。

**丙酮沉淀法** 取出实验材料,每 Eppendorf 管加入蛋白提取液(50 mmol/L Tris pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 抗坏血酸,1%PVP40,0.1%β-巯基乙醇)350 μL,4℃放置 1 h 充分溶解蛋白。4℃,12 000 rpm 离心 20 min,取上清液加入 1 mL 100%丙酮(含 1%β-巯基乙醇)混匀,-20℃沉降过夜。4℃,10 000 rpm 离心 10 min,弃上清液,加入 300 μL 80%丙酮(含 1%β-巯基乙醇),旋涡振荡清洗沉淀 3 次,最后一次清洗液不倒出,-20℃放置过夜。4℃,10 000 rpm 离心 10 min,弃上清液后于 -20℃干燥挥发丙酮,制得蛋白干粉。

**丙酮和 TCA(三氯乙酸)结合沉淀法** 基本步骤同丙酮沉淀法,第二次离心后弃上清液,加入 150 μL 蛋白提取液,旋涡振荡充分溶解后,加入 300 μL 10%TCA 混匀,-20℃沉降 30 min。

#### 1.2.2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用 Laemmli(1970)法。丙酮沉淀法及丙酮和三氯乙酸结合沉淀法获得的蛋白干粉,以 20 μL 1 mg 的比例加入蛋白上样液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 10%甘油,5%β-巯基乙醇)。溶解后离心,取上清液加入 0.2 倍体积的上样液(10%SDS,微量溴芬蓝),煮沸 5 min 后离心,取上清液上样电泳。

#### 1.2.3 蛋白含量的测定

参见 Bradford(1976)方法。

#### 1.2.4 凝胶的染色

**考马斯亮蓝染色法** 将凝胶放入培养皿中,

加入 5 倍体积的考马斯亮蓝染色液,室温染色 4 h 以上,用蒸馏水冲洗凝胶洗去浮色。然后将凝胶浸泡在脱色液中,平缓摇动脱色 3~4 h。

**硝酸银染色法** 固定:将凝胶放入培养皿中,加入固定液(5:1:4 = V<sub>乙醇</sub>:V<sub>冰乙酸</sub>:V<sub>水</sub>),固定 3 h 以上,可过夜。

再固定:用去离子水漂洗,加入固定液(10%戊二醛),固定 30 min。

漂洗:用去离子水漂洗 3 次,每次 10 min,再用去离子水漂洗 3 次,每次 30 min。

银染:废弃最后一批洗涤用水,将凝胶置于新配的 150 mL 银染液(150 mL 银染液含 2.0 mL 氨水,31.5 mL 0.36%NaOH,6 mL 19.4%的硝酸银)中,染色 12~15 min。

漂洗:用去离子水漂洗 3 次,5 min/次。

显色:加入显色液(含 0.005%的三氯乙酸和 0.019%的甲醛溶液),室温,平缓摇动,显色至黄褐的蛋白带达所需对比度。

终止:用 4%的冰乙酸终止显色反应。

## 2 结果与分析

实验结果表明,直接提取法操作简单,提取的蛋白量大,但蛋白条带模糊弥散,色素和杂质含量多。丙酮沉淀法与丙酮三氯乙酸结合沉淀法获得的蛋白质在蛋白质条带数量和条带的清晰程度上并没有明显差别,丙酮和三氯乙酸结合沉淀法的操作繁琐,蛋白质损失量大并且制得的干粉很难被溶解,它的优势可能会在双向凝胶电泳中体现出来<sup>[6]</sup>。而在分离蛋白质、测定蛋白质亚基的分子量、Western 杂交等方面,丙酮沉淀法由于具有操作比较简单,蛋白质损失量小的优势,足可以达到实验目的。

表 1 不同方法提取的蛋白含量

蛋白提取方法	蛋白含量 (μg·g <sup>-1</sup> )	蛋白电泳结果 杂质干扰	操作繁简
直接提取法	466	多	简单
丙酮沉淀法	180	少	较简单
丙酮-TCA 沉淀法	70	少	复杂

目前对 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色常采用考马斯亮蓝、硝酸银染色、铜染色<sup>[7]</sup>等方法。本实验采用了考马斯亮蓝染色和硝酸银染色两种常用染色方法。考马斯亮蓝染色法是最初使用的蛋白质染色方法,20 世纪 80 年代产生的银染色方法的检测灵敏度是考马斯亮蓝的 100 倍。考马斯亮蓝染色法操作简单,但染色效果较差,硝酸银染色操作复杂,但染色效果较好,能够检测出低表达

的蛋白质,也有人利用考马斯亮蓝-银染复合染色<sup>[8]</sup>方法得到较好的分辨率.可根据实验目的选择适合的染色方法.本实验通过将丙酮沉淀法及丙酮三氯乙酸结合沉淀法方法制得的蛋白质样品溶液稀释十倍后进行硝酸银染色,效果较好.

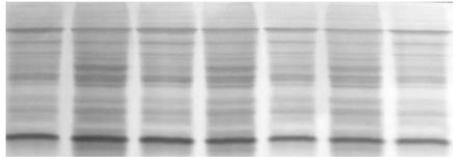


图 1 硝酸银染色结果

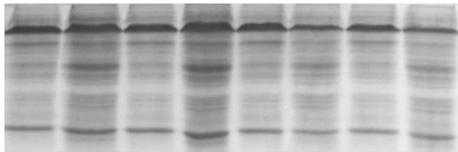


图 2 考马斯亮蓝染色结果

### 3 讨论

制备分离胶时,为使凝胶充分聚合,在凝胶聚合之前要加入封闭液隔绝空气.本实验分别以水和异丁醇为封闭液,发现以水封闭很容易与凝胶相溶,即使小心加入也会稀释胶顶 2~4 mm 凝胶的浓度,使凝胶孔径不匀,影响分离效果.采用异丁醇封闭时,不搅动分离胶的界面平缓加入是非常重要的,其效果远好于以水封闭.根据 SDS-PAGE 的原理,用 SDS 和还原剂来处理蛋白质,蛋白质分子能否解聚并与 SDS 充分结合是关键,本实验采取两步处理,先用上样液旋涡振荡充分溶解并解聚蛋白,离心除去不溶物,然后加 0.2 倍体积的上样液,加热使蛋白质亚基与 SDS 充分结合,再次离心除去不溶物后上样,达到了较好的分离效果.实验中出现蛋白条带歪斜的现象,在加入电极缓冲液后,尽量排除凝胶底部两玻璃板之间的气泡会起到一定的作用.

#### 参考文献

- [1] Bio é r g é i q u e C e l l u l a i r e , e t a l . T w o - d i m e n s i o n a l g e l e l e c t r o p h o r e s i s i n p r o t e o m i c s : O l d , o l d f a s i o n e d , b u t i t s t i l l c l i m b s u p t h e m o u n t a i n s [ J ] . P r o t e o m i c s , 2 0 0 2 , 2 : 3 - 1 0 .
- [2] 舒群芳,赵路,李文彬,等.植物蛋白质电泳分析的方法学研究及技术改进[J].植物学通报,1998,15(6):73-78.
- [3] 沈革志,陆桂华. TA29-barnase 基因转化甘蓝产生雄性不育植株[J].植物生理学报,2001,27:43-48.
- [4] 毛慧珠,郭培福.抗虫转基因甘蓝及其后代研究[J].中国科学(C辑),1996,26:39-347.
- [5] 李大力,王丹,杨树林,等.水蛭肽基因的克隆及其转化甘蓝[J].生物技术,2002,12:226-232.
- [6] 朱宏,张中恒,王同昌,等.小麦叶片蛋白质双向电泳的改良[J].东北林业大学学报,2004,32(4):68-69.
- [7] 肖浩文,朱平,张爱铃,等.三种染色方法用于检测聚丙烯酰胺凝胶中蛋白质的三种方法[J].解放军广州医高专学报,1998,21(2):119-120.
- [8] 朱友林,王建,余潮.植物蛋白质双向电泳及其考马斯亮蓝-银染复合染色法[J].南昌大学学报:理科版,1999,23(2):101-104.

编辑:琳莉

## 北方药用植物资源的开发与利用

李平顺<sup>1</sup>,洪光<sup>2</sup>

(1. 林口县林业局中山阳林场,黑龙江 林口 157600;2. 黑龙江省林口县莲花林业站,黑龙江 林口 157600)

**摘要:**北药是我国中草药资源的重要组成部分,极具发展潜力.本文分析了我国北药资源开发和利用的现状,提出了合理化建议,旨在为今后北药开发与利用提供参考.

**关键词:**北药;开发;利用;建议

[中图分类号]S38

[文献标识码]A

[文章编号]1003-6180(2009)02-0045-02

我国北方药用植物资源丰富,其资源的开发和利用受到重视.由于受经济利益的趋动,个别地区对资源进行了掠夺式的采收,使一些药用植物丧失了适宜的生态环境,减弱了资源的再生能力,致使许多药用植物趋于衰退或濒临灭绝.因此,对北方珍稀濒危药用植物资源的保护和利用,是 21 世纪药用植物资源开发和利用的重大课题.

### 1 北药的开发和保护

药用资源开发与保护是一个大课题,要从就地保存、迁地保存和种质库保存等方面进行综合性保护.种质资源的消失,是不可能再创造的,因此筹建药用植物的基因库和种子库是根本措施,是 21 世纪北药资源开发和利用的方向.

收稿日期:2009-03-16