



棉花叶片蛋白质组双向电泳技术的优化

郭忠军, 陈全家, 许春华, 王希东, 苏秀娟, 曲延英*

(新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:以棉花叶片为材料, 针对试材中含有大量色素、酚、醌等干扰物质的问题, 从蛋白提取方法、裂解液成分、上样量等方面对棉花叶片蛋白质组双向电泳技术进行优化。结果表明: 采用改良的 TCA/丙酮法提取棉花叶片总蛋白, 含有 7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、4% CHAPS、80 mmol·L⁻¹ DTT、1 mmol·L⁻¹ PMSF、0.3% 载体两性电解质的裂解缓冲液, 上样量为 600 μg, 采用 pH 4~7、24 cm 的 IPG 胶条进行双向电泳时, 2-DE 图谱的蛋白点分布均匀、清晰且重复性好。本体系为开展棉花蛋白质组学研究奠定了技术基础。

关键词: 蛋白质组; 双向电泳; 棉花; 叶片

中图分类号: S562:Q814 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2012)05-0468-05

Optimization of Two-Dimensional Electrophoresis for Cotton Leaf Proteomics

GUO Zhong-jun, CHEN Quan-jia, XU Chun-hua, WANG Xi-dong, SU Xiu-juan, QU Yan-ying*

(Agronomy College, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: Using cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves as experimental materials, the present study aimed at solving the problem of disturbance by secondary metabolites in the materials, such as chromatophores, phenols and quinones, and optimizing the protein extraction method, lysis buffer reagent, protein loading amounts and other factors. The results showed that optimal cotton leaf protein extraction was obtained by the improved TCA/acetone method, with lysis buffer containing 7 mol·L⁻¹ Urea, 2 mol·L⁻¹ Thiourea, 4% CHAPS, 80 mmol·L⁻¹ DTT, 1 mmol·L⁻¹ PMSF, and 0.3% Bio-Lyte, a protein loading amount of 600 μg, and an IPG (pH 4-7, 24 cm). Under these conditions a good protein pattern with protein spots distributed equally, of high quality and repeatability, was obtained. This system will establish a foundation for cotton proteomic research.

Key words: proteome; two-dimensional electrophoresis; cotton; leaf

蛋白质组 (Proteome) 最早是由 Wilkins 和 Williams 于 1994 年提出的^[1]。随着后基因组时代的到来, 蛋白质组学 (Proteomics) 研究越来越受到人们的关注, 逐渐成为生命科学的研究中心^[2]。双向电泳 (Two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 作为蛋白质组研究的关键技术, 是目前分辨率最高的工具之一。2-DE 经过第一向等电聚焦 (Isoelectric focusing, IEF) 和第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 可以得到大量蛋白质等电点和分子量的信息^[3]。

棉花作为一种重要的经济和油料作物, 在对其进行大量的 DNA、RNA 水平研究后, 为了更好地揭示核酸水平和蛋白质水平的关系, 对棉花开

展蛋白质组研究就显得十分迫切, 也更有意义。

1 材料和方法

1.1 材料

选用陆地棉品系 kk1543 为材料, 该材料抗旱性强, 子粒较大, 适合水培条件下研究棉花蛋白质组。培养地点为新疆农业大学农学院人工气候室。培养条件: 昼夜温度分别设为 28 °C 和 25 °C, 光照强度为 12 klx, 每天光照时间设为 10~16 h, 相对湿度为 60%~80%。两叶一心时取棉花叶片, -80 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总蛋白提取方法的比较。采用 3 种不同的

收稿日期: 2012-02-03

作者简介: 郭忠军 (1984-), 男, 硕士研究生, xndpeter@sina.com; * 通讯作者, xjyyq5322@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (30960201); 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2010211A16)

方法加以比较。方法 a: 酚抽提法, 主要参照 Carpentier 等^[4]的方法。方法 b: TCA/ 丙酮法, 参照 Shen 等^[5]的方法。方法 c: 改良的 TCA/ 丙酮沉淀法, 参照 Saravanan 等^[6]的方法, 有改动。取 1~2 g 材料, 加入适量的聚乙烯吡咯烷酮和少许石英砂, 用液氮研磨充分, 直至粉末泛白即可。转入几个 2 mL 离心管中(每管约 0.4 g), 每管中加入 1.8 mL 预冷的三氯乙酸提取液 (10% TCA, 0.07%~0.1% DTT, 0.5% β - 巯基乙醇, 1 mmol·L⁻¹ PMSF, 溶剂为冷丙酮)后, 放在 -20 °C 冰箱中冰浴 2 h 以上, 约 30 min 震荡一次。4 °C 下, 设定转速为 15 kr·min⁻¹, 离心 20 min, 弃上清, 留沉淀物。加入冷丙酮溶液 (0.07%~0.1% DTT, 0.5% β - 巯基乙醇, 1 mmol·L⁻¹ PMSF, 溶剂为冷丙酮)混匀后于 -20 °C 下静置 2~4 h, 同上离心, 弃上清液, 取沉淀物。重复洗涤 2 次, 最后取沉淀物。沉淀物干燥后, 置于 -80 °C 保存备用, 或直接进行实验。

1.2.2 蛋白裂解。蛋白裂解液配方如下。裂解缓冲液 a: 7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、4% CHAPS、80 mmol·L⁻¹ DTT、1 mmol·L⁻¹ PMSF。裂解缓冲液 b: 7 mol·L⁻¹ 尿素、4% CHAPS、80

mmol·L⁻¹ DTT、1 mmol·L⁻¹ PMSF、0.3% 载体两性电解质。裂解缓冲液 c: 7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、4% CHAPS、80 mmol·L⁻¹ DTT、1 mmol·L⁻¹ PMSF、0.3% 载体两性电解质。

1.2.3 蛋白质定量。本实验采用经典的 Bradford 法^[7]进行定量。

1.2.4 水化。向样品中加入水化缓冲液 (7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、4% CHAPS、80 mmol·L⁻¹ DTT、1 mmol·L⁻¹ PMSF、pH 4~7 的 0.3% 载体两性电解质、质量分数 0.002% 的痕量溴酚蓝)。上样量分别为 400 μ g、500 μ g、600 μ g、700 μ g, 上样总体积为 450 μ L, 以确定最佳上样量。蛋白水化液加到水化盘后, 20 °C 水化 13~15 h^[8]。

1.2.5 等电聚焦电泳(IEF)。

1.2.6 胶条平衡。等电聚焦完成后, 胶条先在平衡液 A 中平衡 15 min, 然后在平衡液 B 中平衡 15 min。平衡液 A: 含 36% 尿素, 2% SDS, 25% Tris-HCl (pH 8.8), 20% 甘油和 2% DTT (现用现加)。平衡液 B: 含 36% 尿素, 2% SDS, 25% Tris-HCl (pH 8.8), 20% 甘油和 2.5%~3% 碘代乙酰胺 (现用现加)。溶剂为双蒸馏水。

表 1 IEF 参数的设置

Table 1 Parameters of Isoelectric focusing (IEF)

步骤 Step	电压 Voltage/V	时间 Time/h	方法 Method	作用 Effect
1	100	1	step	除盐
2	200	1	step	除盐
3	500	1	step	除盐
4	1000	1	step	除盐
5	8000	2	grd	升压
6	8000	15	step	聚焦
7	500	10	step	保持

1.2.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。电泳按如下参数进行设置: 16 °C 恒温下, 60 V 低压运行 1.5 h; 250 V 高压运行约 4~6 h。电泳至溴酚蓝前沿达到胶的底部约 1~2 cm 时停止电泳。

1.2.8 剥胶与染色。染色方法参照 Yan 等^[9]的方法进行银染, 具体步骤有改进。主要改进方面有: (1) 将甲醇全部换为无水乙醇; (2) 银染时间延长至 30 min, 加遮光板; (3) 银染后, 显色前的漂洗时间调整为快速 10 s; (3) 显色时, 甲醛用量加大一倍。

1.2.9 图象的扫描和分析。染色后的胶用 Umax PowerLook 2100 XL 扫描仪扫描, 采用透射模式,

分辨率为 600 dpi。图象用 PDQuest (Version 7.10; Bio-Rad) 软件自动检测蛋白点, 人工去除错误检测的蛋白点, 加入未被检测的蛋白点。

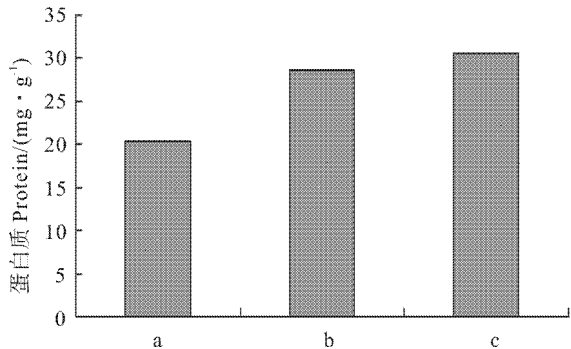
2 结果与分析

2.1 蛋白质提取方法比较

由图 1 可知不同蛋白提取方法, 蛋白得率不同。改良的 TCA/ 丙酮法蛋白得率最高, 约为 30.5 mg·g⁻¹; TCA/ 丙酮法可以达到 28.6 mg·g⁻¹; 而酚抽提法最少, 仅为 20.4 mg·g⁻¹。另外, 三种方法所提取蛋白颜色上也有区别: 只有改良的 TCA/ 丙酮法为白色, 其他两种方法的蛋白颜色

都偏黄,尤其是 TCA/ 丙酮法黄色最深。

采用酚抽提法 (图 2-A),2-DE 图谱中蛋白点



a) 酚抽提法; b) TCA/ 丙酮法; c) 改良的 TCA/ 丙酮法。

a) Phend method; b) TCA/Acetone method; c) Improved TCA/Acetone method.

图 1 不同提取方法的蛋白质得率

Fig. 1 The isolation rate of protein with different methods

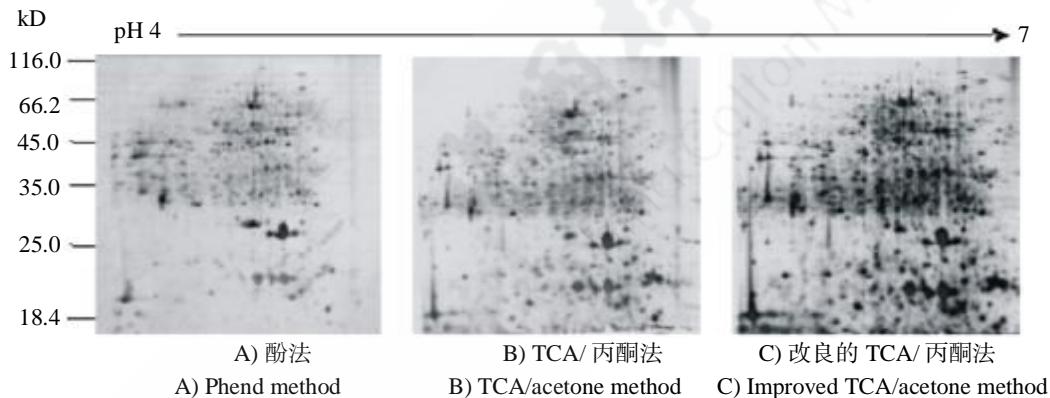


图 2 不同提取方法对棉花叶片蛋白质 2-DE 图谱的影响

Fig. 2 The effect of different extraction methods on 2-DE map of cotton leaf protein

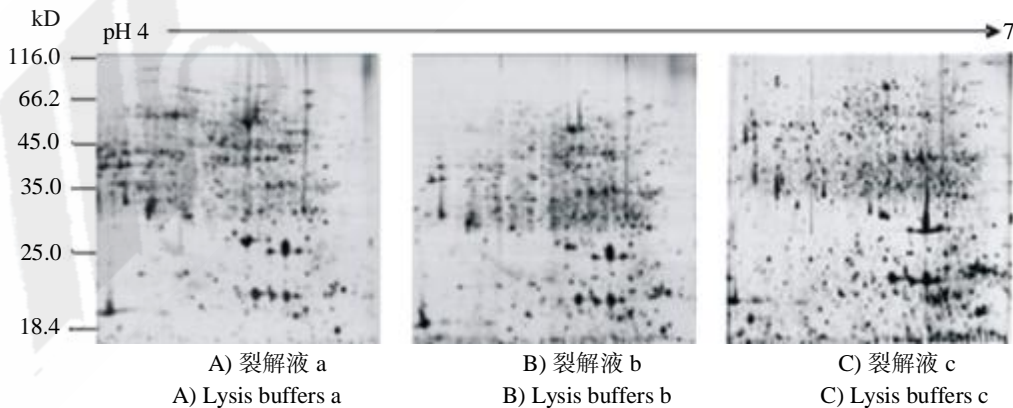


图 3 不同裂解缓冲液对棉花叶片蛋白质 2-DE 图谱的影响

Fig. 3 The effect of different lysis buffers on 2-DE map of cotton leaf protein

2.3 上样量的确定

经 PDQuest 软件分析比较,上样量为 400 μg (图 4-A)时,蛋白点数明显很少,检测到的蛋白点

最少。尤其是酸性端蛋白,图谱模糊,而且有横向和竖向的拖尾,分辨率低。采用 TCA/ 丙酮法(图 2-B),蛋白点虽有一定程度的增加但也有较多的纵向和横向拖尾、蛋白点重叠、背景色重。采用改良的 TCA/ 丙酮沉淀法(图 2-C)蛋白点较多,尤其在碱性蛋白区域。所得样品为乳白色,表明蛋白质样品所含杂质较少。图谱稳定,背景干净,说明此方法适用于提取棉花叶片蛋白。

2.2 裂解缓冲液的优化

裂解液 a 因未加两性电解质,严重影响了等电聚焦的效果,出现了大量的纵向拖尾,蛋白点较少,尤其是酸性蛋白(图 3-A)。裂解液 b 中未加入硫脲,虽然图谱较均匀,清晰,但是仍有横向条纹,图谱点也最少(图 3-B)。只有用裂解液 c(图 3-C)时,电泳图谱最清晰,蛋白点较多,而且聚集规则。所以裂解液 c 为较优选择。

主要为碱性端蛋白,酸性端蛋白点少,低丰度蛋白模糊不清甚至不能被检测而丢失。随着上样量的加大,并没有呈现背景很重的现象,而且蛋白

点也在增加;上样量达到 600 μg (图 4-C)时,蛋白点数量增幅很大,经软件分析约有 970 个点,两端极性蛋白和低丰度蛋白数量明显增加,整个凝胶图背景色浅,蛋白点边界清晰,分离均匀、圆润、横向与纵向拖尾少;但当上样量为 700 μg (图

4-D)时,蛋白点虽然有所增加,但增加不明显,在酸性端和碱性端蛋白点出现横向与纵向拖尾及外形不规则现象;高丰度蛋白质的斑点过大,低丰度蛋白被掩盖。综合考虑,最佳上样量为 600 μg 。

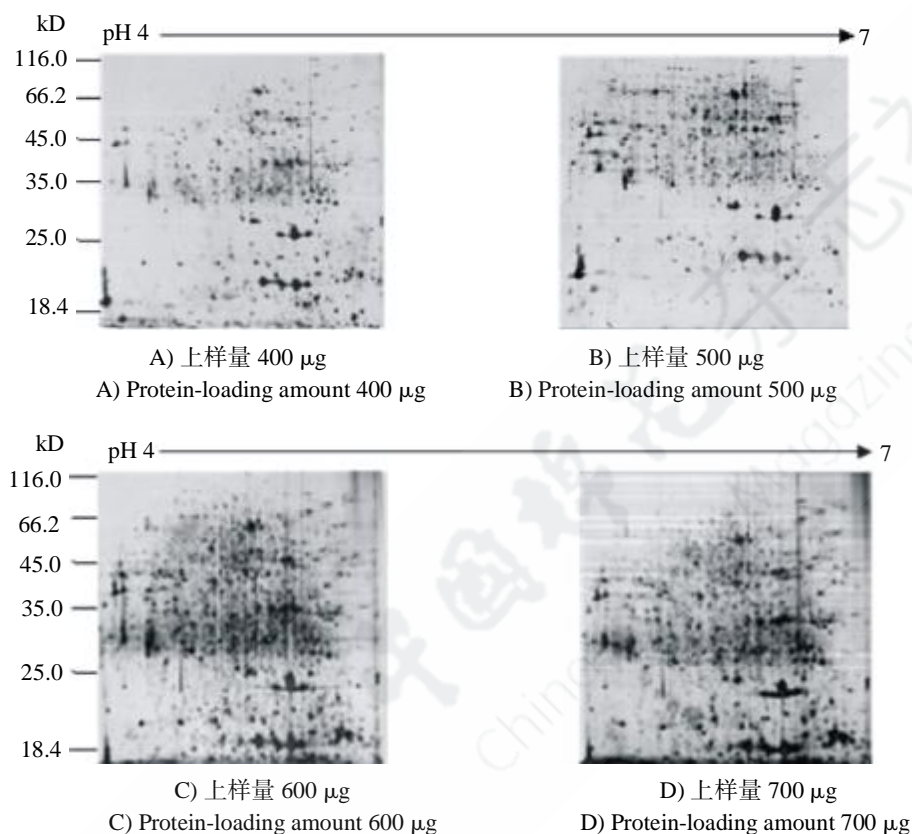


图 4 不同上样量对棉花叶片蛋白质 2-DE 图谱的影响

Fig. 4 The effect of different protein-loading amounts on 2-DE map of cotton leaf protein

3 结论与讨论

3.1 蛋白样品的纯度是决定 2-DE 图谱质量的关键

样品制备的好坏对双向电泳的成功与否起决定性作用^[10]。酚抽提法会使大多数水溶化合物与蛋白质共沉淀。这些酚等化合物的存在使 2-DE 图谱(如图 2-A)出现水平拖尾,而且蛋白得率很低。TCA-丙酮法对多糖、色素等杂质的去除效果并不好,而且还会导致一些膜蛋白和疏水性蛋白的丢失。改良的 TCA-丙酮法研磨时,在液氮中加入少量 PVP 和石英砂,可以吸附叶片中的色素、酚类和醌类物质,同时也可以保证样品的充分研磨。当叶片破碎的时候,蛋白水解酶就会被释放出来或被激活,使双向电泳结果复杂化;为

了避免这些情况的出现,样品制备应尽可能在低温下进行^[11]。本实验在 Saravanan 等方法的基础上,为了增加蛋白质的得率,我们还在提取液中加入少量的 DTT 和 PMSF。离心时,不增加离心的次数,但提高了离心力并延长了离心时间和蛋白沉淀时间,在一定程度上去除了部分多酚和醌类物质,还不影响蛋白的得率。

3.2 蛋白质的溶解率与 2-DE 图谱质量关系密切

硫脲与尿素混合使用时,能使蛋白质的三维结构打开,蛋白聚集作用得到抑制,进一步增加了蛋白质的溶解度。因此,裂解液中是否含有硫脲和尿素对蛋白质的溶解能力有很大影响,也会影响图谱质量(如图 3-B)。另外,本试验得出:4%的 CHAPS 与 2 mol·L⁻¹ 硫脲、7 mol·L⁻¹ 尿素混合

共用时对棉花叶片蛋白质的溶解最佳,这与相关文献结论相近^[12]。少量两性载体电解质的加入极大地减少了蛋白质与凝胶间的疏水作用,提高了凝胶的电导率,有利于样品向 IEF 凝胶渗透。此外,本实验裂解缓冲液中还加入了还原剂 DTT,大大增强了等电聚焦过程中蛋白质的溶解能力,从而提高了蛋白质从一维到二维的转移效率。因此,本实验采用的裂解液极大地提高了疏水蛋白的溶解能力,所得图谱质量很高。

3.3 合适的上样量对于获得高分辨率的 2-DE 图谱也极其重要

上样量过大,样品溶液中的杂质及离子含量必定增大,使电压不能很快,甚至不能上升到设定值,影响等电聚焦^[13]。上样量太大银染时也易产生“点饱和”现象,会掩盖有相似等电点/分子量的低丰度蛋白,也易产生横、纵向条纹。横条纹产生的主要原因之一就是由于上样量太大、盐离子浓度过高造成的^[14]。上样量过低,蛋白点的检测也将受到严重的影响,特别是较低丰度蛋白极有可能无法在胶上显示,进而影响电泳的准确性。

参考文献:

- [1] 王玉琪,彭新湘. 适用于水稻叶片蛋白质组分析的双向电泳技术[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(2): 252-256.
WANG Yu-qi, Peng Xin-xiang. A two-dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic study of rice leaves[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(2): 252-256.
- [2] 邵付菊,李扬,陈良,等. 低温胁迫下棉花子叶蛋白质差异表达的双向电泳分析[J]. 华中师范大学学报:自然科学版, 2008, 42(2): 262-266.
TAI Fu-ju, Li Yang, Cheng Liang, et al. Analysis of two-dimensional electrophoresis for the expressed proteins in cotton cotyledons under cold stress[J]. Journal of Huazhong Normal University: Natural Sciences, 2008, 42(2): 262-266.
- [3] YAN Shun-ping, Tang Zhang-cheng, Su Wei-ai, et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root[J]. Proteomics, 2005, 5(1): 235-244.
- [4] CARPENTIER S C, Witters E, Laukens K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis[J]. Proteomics, 2005, 5(10): 2497-2507.
- [5] SHEN S H, Jing Y X, Kuang T Y. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath[J]. Proteomics, 2003, 3(4): 527-535.
- [6] SARAVANAN R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. Proteomics, 2004, 3(4): 2522-2532.
- [7] PASQUALI C, Fialka I, Huber L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. Electrophoresis, 1997, 18(2): 2573-2581.
- [8] 黎飞,徐秋芳,臧宪朋,等. 番茄子叶总蛋白双向电泳体系的建立[J]. 园艺学报, 2010, 37(4): 661-668.
LI Fei, Xu Qiu-fang, Zang Xian-peng, et al. Establishment of two-dimensional electrophoresis system of tomato cotyledons[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(4): 661-668.
- [9] YAN J X, Waitr, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2000, 21(17): 3666-3672.
- [10] 刘丽娟,舒烈波,陈海荣,等. 适用于生菜叶片蛋白质双向电泳方法的建立及初步应用[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(10): 106-110.
LIU Li-juan, Shu Lie-bo, Chen Hai-rong, et al. Two-dimensional electrophoresis for leaf protein of lettuce (*Lactuca sativa*) and its primary application[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2009, 10(10): 106-110.
- [11] LILLEY K S, Dupree P. Plant organelle proteomics[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(2): 594-599.
- [12] RABILLOUD T, Adessi C, Giraudel A, et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3): 307-316.
- [13] GIAVALISCO P, Nordhoff E. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis[J]. Electrophoresis, 2003, 24(1): 173-835.
- [14] 范吉星,邓用川,黄惜,等. 红海榄根部总蛋白质提取方法的改进和双向电泳体系的建立[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2008, 34(5): 549-553.
FAN Ji-xing, Deng Yong-chuan, Huang Xi, et al. Improvement of protein extraction method from rhizophora stylosa root and establishment of two-dimensional electrophoresis[J]. Journal of Hunan Agriculture University: Natural Science, 2008, 34(5): 549-553.