

优化灰木相思组培苗蛋白质组的提取与分离技术

何文锦^{1,2}, 郭晋隆³, 陈由强^{2,3,4}, 林思祖^{1*}, 陈如凯^{2,3}

(1. 福建农林大学林学院, 福州 350002; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108; 3. 农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福州 350002; 4. 发育与神经生物学福建省高等学校重点实验室, 福州 350108)

摘要: 针对木本植物灰木相思(*Acacia implexa* Benth.) 蛋白质分离过程中含有大量色素和酚等干扰物质的现象, 本实验优化了各步实验条件。结果表明, 在蛋白提取液中加入 10%PVP, 同时提高离心力、延长离心时间能提高可溶性蛋白得率, 第一向等电聚焦 24 cm 长的固相 pH 梯度胶条的最适蛋白上样量为 1 000 μ g, 第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶最适浓度为 12.5%。优化后的实验配置体系提高了灰木相思组培苗总蛋白双向电泳的分辨率和重复性, 建立一套适用于灰木相思组培苗蛋白质组提取与分离的方法。

关键词: 灰木相思; 组织培养; 蛋白质组; 双向电泳

中图分类号: Q946.13

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)05-0433-05

Optimized Techniques of Proteome Extraction and Separation from the *in vitro* culture of *Acacia implexa*

HE Wen-jin^{1,2}, GUO Jin-long³, CHEN You-qiang^{2,3,4}, LIN Si-zu^{1*}, CHEN Ru-kai^{2,3}

(1. Forestry college of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. College of Life sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 3. Key Laboratory of Sugarcane Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China; 4. State Key Laboratory of Developmental Biology, Fuzhou 350108, China)

Abstract: A 2-DE (two-dimensional electrophoresis) protocol for total proteins of *Acacia implexa* Benth. was described. The yield of water-soluble proteins was increased if 10% PVP was added in the protein extraction buffer, centrifugal force was increased and centrifugal time was prolonged. The optimum loading quantity of sample proteins was 1 000 μ g in isoelectric focusing. The optimum concentration of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was 12.5%. The optimized protocol markedly minimized the interference from wood pigments and other non-protein substances.

Key words: *Acacia implexa* Benth.; *in vitro* culture; Proteomics; Two-dimensional electrophoresis

自 O'Farrell 于 1975 年建立起双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 技术以来^[1], 第一向已从载体两性电解质 pH 梯度(pH gradient of carrier ampholytes) 等电聚焦发展到固相 pH 梯度 (immobilized pH gradients, IPG) 等电聚焦, 使双向电泳技术的分辨率和重复性得到大幅度提高, 成为蛋白质组学研究的三大关键核心技术之首^[2]。2-DE

技术的第一向等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)是基于蛋白质等电点不同而将其分离, 第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是基于蛋白质亚基分子量不同, 将蛋白质进一步分离, 经电荷和质量两次分离后, 可以得到蛋白质等电点和分子量的信息。近年来, 双向电泳技术在植物方面的研究也有较多报道, 但多集中在水稻、拟南芥等植物上。木

收稿日期: 2006-10-31 接受日期: 2007-04-17

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(B0510009), 福建省林业厅科技攻关项目(闽林综[2003]17 号)资助

* 通讯作者 Corresponding author

本植物中含有大量的各类次生代谢物质如单宁及酚类物质等,这类物质对电泳过程干扰很大,且用常规蛋白纯化方法不易去除干净,最终造成双向电泳图谱中背景色深、横纹、纵纹多,蛋白点不清晰。灰木相思(*Acacia implexa* Benth.)是含羞草亚科,金合欢属,热带多年生木本植物,主要分布在澳大利亚,南纬 24–36°。其材质光滑、平整,有金黄色光泽,耐腐蚀,可作为家具、高级装饰贴面板的材料,也是制造纸浆、拷胶等工业用材树种。其生物量大,耐瘠薄、对土壤有蓄水固氮作用,具良好的生态效益和经济效益,是目前较具发展前途的相思类树种之一,也是林业研究中一种优秀的种质资源。在我国南方短周期工业原料林发展、水土保持和丰富林木种质资源等方面具有重要作用和地位^[1]。建立适合于灰木相思无性系总蛋白的稳定高效的双向电泳分离技术,有利于进一步对灰木相思的抗性相关蛋白方面作深入的研究。

1 材料和方法

材料 灰木相思组培苗由福建师范大学生命科学学院植物细胞培养实验室提供。

主要试剂与设备 两性电解质 Ampholyte pH 3–10、二甲氨基丙磺酸(CHAPS)、IPG 覆盖油、IPG 预制胶条(pH 3–10 L、pH 4–7 L、pH 7–11 NL, 24 cm)等购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;尿素(Urea)、甘氨酸(Gly)、丙烯酰胺(Acr)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、过硫酸铵(AP)、碘乙酰胺(IAA)、 β -巯基乙醇(β -ME)、二硫苏糖醇(DTT)、Tris Base、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N,N-四甲基乙二胺(TEMED)均为进口试剂;其余试剂为国产分析纯产品,所有溶液均用 Millipore 纯净水配制。EttanIPG-phor 等电聚焦仪及附件、Ettan DALT six 垂直电泳系统及附件等购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。Microfuge 低温超速离心机购自美国 BECKMAN 公司。

溶液配置 蛋白提取液:含 10%三氯醋酸(TCA)、0.07% β -ME、10% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的丙酮;裂解液:7 mol/L Urea, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 40 mmol/L Trisbase, 65 mmol/L DTT;水化液:8 mol/L Urea, 2% CHAPS, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG buffer, 痕量溴酚蓝;平衡缓冲液:50 mmol/L

Tris-Cl pH 8.8, 6 mol/L Urea, 30% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝;电泳缓冲液:25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Gly, 0.1% SDS, pH 8.3;固定液:10%乙酸, 40%甲醇;胶体考马斯亮兰染液:10% 硫酸铵, 10% 磷酸, 20% 甲醇, 0.06%考马斯亮兰 G250。

总蛋白的提取 TCA-丙酮沉淀法^[4]提取灰木相思总蛋白:取组培苗 800 mg 在液氮中研磨成粉末,加入 8 ml+80 mg PVP 预冷的蛋白提取液, -20℃冰浴,沉淀 1–2 h。4℃, 30 000 $\times g$ 离心 20 min, 弃上清液。重悬沉淀于含同等浓度 β -ME 的冰丙酮中过夜。同上离心,加同体积的预冷丙酮洗沉淀二次,同上离心。取沉淀冻干,保存于 -20℃下备用。

制备蛋白溶液样品 称取干粉 30 mg 加入 450 μ l 裂解液混匀。25℃水浴,超声波裂解 30 min, 4℃, 30 000 $\times g$ 离心 20 min, 小心吸取上清液,即得蛋白溶液样品。

测量蛋白含量 根据 Ramagli 改进的 Bradford 法^[5],用牛血清蛋白做标准曲线。

第一向固相 pH 梯度等电聚焦(isoelectric focusing, IEF) 按 Görg 等^[6]的方法和 IPGphor 等电聚焦系统指南进行。根据测得的样品蛋白浓度,上样量分别为 700 μ g、1 000 μ g 与 1 300 μ g 进行筛选。选取最佳上样量 1 000 μ g 进行不同 pH 范围的 IPG 干胶条(24 cm, pH 3–10 L、pH 4–7 L、pH 7–11 NL)的蛋白等电点分离。水化和聚焦在 20℃自动进行,每胶条限流 50 μ A, IEF 参数设定见表 1。

表 1 IEF 参数设定
Table 1 Parameters of IEF

步骤 Step	电压 Voltage (V)	时间 Time (h)	总伏小时 Volt-hours (Vh)
1	30	12	360
2	200	1	200
3	500	1	500
4	1000	1	1 000
5	8000	>8	66000
总计 Total			68060

第二向垂直板 SDS-PAGE 电泳 等电聚焦结束后,迅速取出已泡胀了样品的 IPG 胶条,胶面朝上置于 15 ml 已加 1% DTT 的平衡缓冲液中,振荡平衡 20 min,倒去平衡缓冲液换成 15 ml 已加 2.5% IAA 的平衡缓冲液,振荡平衡 25 min,用干净滤纸吸去多余的平衡缓冲液。分别对 10%、12.5%、15%

三个浓度的分离胶^[9]进行筛选。电泳步骤按 Ettan DALT six 垂直电泳系统指南进行。

胶体考马斯亮兰染色 电泳后将凝胶立即放入固定液中,固定 30 min–1 h,用 Millipore 纯净水漂洗 2 次,每次 5 min,换置胶体考马斯亮兰染液^[9]染色至少 2 h,也可过夜。用 Millipore 纯净水漂洗脱色,直到蛋白点清晰为止,制成干胶保存^[7]或暂时保存于 Millipore 纯净水中。

凝胶图像分析 脱色后的双向电泳凝胶用扫描仪 ImageScanner 扫描并数字化,再用图像分析软件 ImageMaster 5.0 对数字化的图谱进行斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标。

2 结果和分析

2.1 不同 SDS-PAGE 浓度对总蛋白分离效果的影响

用浓度分别为 10%、12.5%、15%的三种凝胶对组培苗总蛋白进行分离,由于不同浓度的 SDS-PAGE 中丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺所占的比例不同,就决定了凝胶的孔径大小不同最终影响蛋白分离效果(见图 1)。在图 1a 中蛋白点不十分清晰,对碱性蛋白的分离效果不好,经检测有近 500 个点;图 1b 中蛋白点呈圆形,能分离出部分碱性蛋白,拖尾较少分离效果好,经检测有 800 个点以上;图 1c 中蛋白点损失较大,且拖尾严重,碱性蛋白几乎没有分离出,经检测只有近 300 个点。此外,第二向电泳制备的凝胶为 24 cm×26 cm×1 mm 的大面积薄型凝胶,浓度为 10%的凝胶弹性较差易大面积破裂,而浓度为 15%的凝胶脆性较大,所以也易破碎,都不利于后续实验操作。因此,对灰木相思总蛋白

进行双向电泳分离时第二向 SDS-PAGE 的浓度以 12.5%为宜。

2.2 组培苗的蛋白溶液样品上样量的选择

由于植物细胞内有许多蛋白质的表达丰度很低,提高蛋白质的上样量有利于低丰度蛋白的检出,但是上样量过大又会使样品溶液中的盐离子及其它杂质含量提高^[9],这样会直接影响到等电聚焦时蛋白质组分不能有效均匀分布在 SDS-PAGE 上,并且会出现纵向和横向拖尾。因此,适当的蛋白样品上样量对双向电泳过程和结果分析有重要影响。

各项实验条件一致,SDS-PAGE 浓度为 12.5%,蛋白上样量分别为 700 $\mu\text{g}/\text{IPG}$ 、1 000 $\mu\text{g}/\text{IPG}$ 、1 300 $\mu\text{g}/\text{IPG}$ 时同时跑胶。在图 2a 中蛋白点呈圆形,主要为酸性端蛋白,碱性端蛋白点少,低丰度蛋白检出的量也很少,检出的蛋白点约 300 个;在图 2b 中,蛋白质点呈圆形,横向与纵向拖尾少,蛋白质点分离均匀,无背景色,检出的蛋白质点增加到 800 个以上,碱性端蛋白和低丰度蛋白数量明显增加;在 2c 中由于上样量过大,使样品溶液中的杂质及离子浓度增大,在 IEF 过程中电压上升缓慢,等电聚焦效果较差,最终影响到 2-DE 图谱中蛋白点的有效分离,酸性端和碱性端蛋白点多带有横向与纵向拖尾及外形不规则的蛋白质点。

2.3 不同 pH 范围的 IPG 胶条 2-DE 图谱比较

本实验分别选用 24 cm 长 pH 3–10 L、pH 4–7 L、pH 7–11 NL 的三种胶条,上样量都为 1 000 $\mu\text{g}/\text{IPG}$ 。用 pH 3–10 L 的胶条既能分离出酸性蛋白又能分离出部分碱性蛋白,选用 pH 4–7 L 的胶条能分离出较

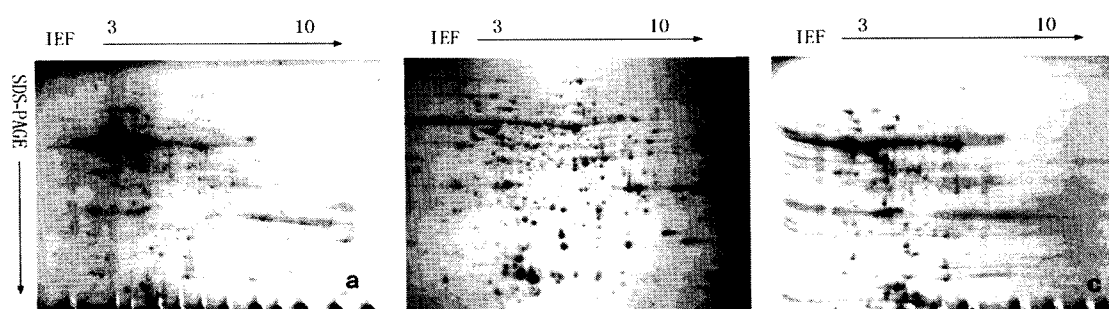


图 1 不同浓度 SDS-PAGE 灰木相思总蛋白的分离效果

Fig. 1 Separation profiles of *A. implexa* total proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with different concentrations (24 cm, 1 000 $\mu\text{g}/\text{IPG}$, Coomassie blue staining)

a. 10% SDS-PAGE; b. 12.5% SDS-PAGE; c. 15% SDS-PAGE

多的酸性蛋白及在酸性区域内低丰度的蛋白点, pH 7-11 NL 的胶条则能分离出较多的碱性蛋白。经 ImageMaster 分析在相同的酸性区域 pH 4-7 范围内, 用 pH 4-7 L 胶条可检测到 950 个点, 而用 pH 3-10 L 的胶条只能检测到 730 个点。在碱性区域内用 pH 7-11 NL 胶条可检出 170 个点, 而用 pH 3-10 L 胶条只检出了 80 个点, 所以窄 pH 范围的长距离的比宽 pH 范围短距离的胶条分离蛋白点的效果好。因此胶条 pH 范围及长度的选用要根据实验者所要研究的目的蛋白来决定。

3 讨论

样品制备是整个双向电泳的关键步骤, 样品质量的好坏直接决定了双向电泳的分辨率、重复性和蛋白质谱的结果^[10]。灰木相思树中含有大量次生代谢物质如单宁及酚类物质等, 对蛋白的提取有很大的干扰作用, 采用加入含材料鲜重 10% PVP 的

TCA- 丙酮蛋白沉淀法能有效抑制蛋白酶的活性、洗脱组织中的色素、多糖及酚类等次生物质, 保护蛋白质避免其降解。加入高浓度的 PVP 能防止酚氧化成醌, PVP 粉能与多酚结合形成一种不溶的络合物, 能有效去除酚, 另外 PVP 也有去除多糖、色素的作用, 提高蛋白纯度。

木本植物中糖很难去除, 因为经丙酮的沉淀作用, 糖与蛋白质一起沉淀下来, 所以要先去除糖, 再除色素等。采用透析法去糖, 效果虽然很好, 但操作不慎就可能使蛋白质变性。在实验过程中发现高速长时间离心, 可以把密度大的糖离至上清液的上层, 所以提高离心速度增加离心时间就可以把大部分的糖去除, 得到满意结果。由于研磨的粉末越细提取效果越好, 所以制备蛋白溶液样品过程中也需要高速离心, 这样才能得到清澈的上清液, 否则在裂解液中易出现悬浮的细小颗粒, 影响第一向电泳聚焦过程, 最终在 2-DE 图谱上产生水平条纹。本实验的蛋白质提取方法稳定而且提取总蛋白的纯度

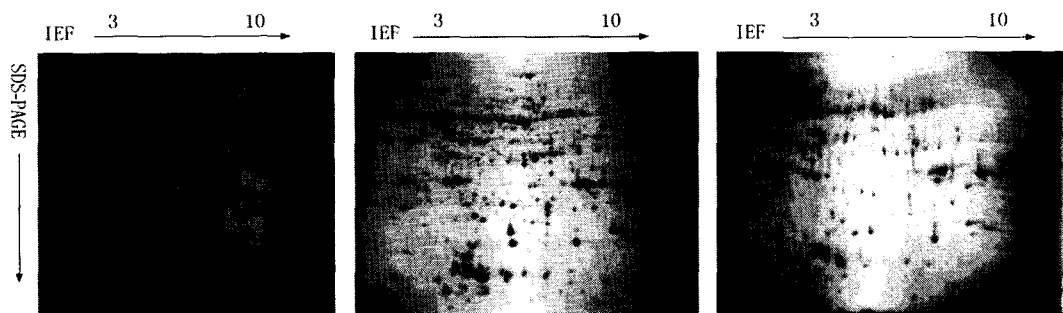


图 2 灰木相思蛋白不同上样量的 2-DE 图谱

Fig. 2 Comparison of 2-DE maps of different *A. implexa* proteins loading quantities (24 cm, Coomassie blue staining)

a. 700 µg/IPG; b. 1 000 µg/IPG; c. 1 300 µg/IPG

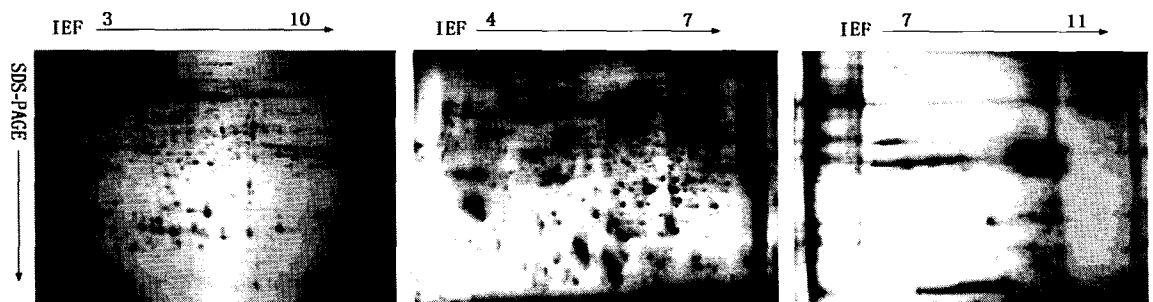


图 3 不同 pH 范围 IPG 胶条的灰木相思 2-DE 图谱

Fig. 3 2-DE maps of *A. implexa* of different IPGs (24cm, Coomassie blue staining)

a. IPG pH 3-10 L; b. IPG pH 4-7 L; c. IPG pH 7-11 NL

高,包含了细胞中大部分的可溶性蛋白。

在裂解蛋白干粉的实验过程中发现 25℃ 超声波裂解能提高裂解液中的蛋白含量,比室温静置或 29℃ 水浴裂解效果更好。由于裂解液中含有高浓度的尿素,在高于 30℃ 时易分解,产生的氰酸盐会引起氨基甲酰化,从而修饰蛋白引起蛋白电荷变化^[11],所以配置含高浓度尿素药品时要长时间搅拌直至其溶解。若温度低于 20℃,裂解液中的尿素又易结晶析出,影响蛋白溶解^[12],所以在 25℃ 条件下用超声波来助溶,而第一向 IEF 等电聚焦则控制在 20℃ 条件下进行。另外,蛋白质样品一旦溶解在含高浓度尿素的 Lysisbuffer 中,应当天使用或冷冻保存,并尽量减少反复冻融的次数^[13]。

在实验过程中发现,进行第一向 IEF 时增加设置 100 V 2 h 或 200 V 1 h,这一步有利于溶液中的杂质与离子进一步向两极移动,到 8 000 V 时电压能迅速上升。而在 1 000 V 后增加 3 000 V 1 h 或 5 000 V 1 h 完全没有必要,反而会使 2-DE 图谱效果下降。配制第二向凝胶的聚合速度与温度有很大关系,当实验温度低于 10℃ 时聚合时间明显加长,倒胶后将制胶装置平放于 28℃ 左右的温室中可在 30 min 内完成凝胶聚合。在染色结束后,可用 40℃ 左右的高纯水来脱色,可大大加快脱色速度,并且不影响染色效果。

参考文献

- [1] O'Farrel P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250:4007-4021.
- [2] Guo Y J(郭尧君). *Experimental Technique of Protein Electrophoresis* [M]. Beijing: Science Press, 1999:140-143. (in Chinese)
- [3] Wang H R(王豁然), Jiang Z P(江泽平), Yan H(阎洪). Australian trees grown in China as exotics [J]. *Trop Geog* (热带地理), 1994, 14(1):73-82. (in Chinese)
- [4] Chen W(陈伟), Huang C M(黄春梅), Lü L X(吕柳新). The improved method of two-dimensional electrophoresis of protein in recalcitrant plant litchi [J]. *J Fujian Agri Univ (Nat Sci)* (福建农业大学学报:自然科学版), 2001, 30(1):123-126. (in Chinese)
- [5] Xia Q C(夏其昌), Zeng R(曾嵘). *Chemistry of Protein and Proteomics* [M]. Beijing: Science Press, 2004:269-286. (in Chinese)
- [6] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(4-5):712-717.
- [7] Wang J Z(汪家政), Fan M(范明). *Protein Technique Manual* [M]. Beijing: Science Press, 2004:97-98. (in Chinese)
- [8] Wen L(文李), Liu G(刘盖), Zhang Z J(张再君), et al. Preliminary proteomics analysis of the total proteins of HL type cytoplasmic male sterility rice anther [J]. *Hereditas* (遗传), 2006, 28(3):311-316. (in Chinese)
- [9] Giavalisco P, Nordhoff E. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensionalelectrophoresis analysis [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(1-2):173-835.
- [10] Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. *Trend Biotechn*, 1999, 17(3):121-127.
- [11] Wang J Y(王经源), Chen S Y(陈舒奕), Liang Y Y(梁义元), et al. Improvement of ISO-DALT electrophoresis system [J]. *J Fujian Agri For Univ (Nat Sci)* (福建农林大学学报:自然科学版), 2006, 35(2):187-190. (in Chinese)
- [12] Mechin V, Consoli L. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients [J]. *Proteomics*, 2003, 13(7):1299-1302.
- [13] Li L(李蕾), Peng C Z(彭存智), Li M F(李明芳), et al. Proteomic analysis of seedless Litchi at wmbryo developmental stage [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2006, 14(4):312-317. (in Chinese)