

茭白总蛋白质双向电泳技术体系的建立

罗海波^{1,2}, 陈伟³, 周静峰¹, 宋慧波¹, 郁志芳^{*2}

(1. 浙江医药高等专科学校 生物与食品系, 浙江 宁波 315100; 2. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095; 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

摘要: 为建立茭白总蛋白质双向电泳技术体系, 研究了 TCA/丙酮沉淀法和改良酚抽法两种不同总蛋白质提取方法、蛋白质上样量、pH 值范围及凝胶质量浓度等条件对 2-DE 的影响。结果表明, 改良酚抽法更适合茭白总蛋白质的提取, 采用 17 cm、pH 4~7 的胶条、1.0 mg 的蛋白质上样量、12 g/dL 的凝胶浓度、考马斯亮蓝 G-250 胶体考染法染色, 最终可获得蛋白质点较多, 背景清晰, 分辨率较高的 2-DE 图谱, 为进一步开展茭白差异蛋白质组学研究奠定了基础。

关键词: 茭白; 蛋白质组学; 双向电泳

中图分类号: Q 81 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)06—0581—05

Establishment of Two-Dimensional Electrophoresis Conditions for Proteomic Analysis of *Zizania latifolia*

LUO Hai-bo^{1,2}, CHEN Wei³, ZHOU Jing-feng¹, SONG Hui-bo¹, YU Zhi-fang^{*2}

(1. Department of Biology and Food, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. College of Food Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. College of Biological & Environmental Science, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: In order to establish the two-dimensional electrophoresis (2-DE) conditions of *Zizania latifolia*, the effects of different protein extraction methods, loading amount, pH ranges of IPG strip and gel concentration, etc. on 2-DE maps were investigated. The results showed that the modified phenol extraction protocol is more suitable for total protein extraction of *Z. latifolia* compared with TCA/acetone protocol. And a high quality 2-DE map with more protein spots, clear background and high protein point resolution was obtained using the following optimized procedure: loading 1.0mg protein sample on 17 cm IPG strip with pH 4-7, SDS-PAGE with 12 g/dL gel concentration, and finally detecting proteins with coomassie brilliant blue G250 staining. The research provides a basis for further study of the *Z. latifolia* proteomics.

Keywords: *Zizania latifolia*, proteomics, two-dimensional electrophoresis

收稿日期: 2012-11-03

基金项目: 浙江省教育厅科研基金项目(Y201226170)。

作者简介: 罗海波(1979—), 男, 湖南安乡人, 工学博士, 讲师, 主要从事果蔬采后生物学与处理技术方面的研究。

E-mail: luohaibo_1216@126.com

* 通信作者: 郁志芳(1960—), 男, 江苏启东人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事果蔬采后生物学与贮藏加工方面的研究。

E-mail: yuzhi88@yahoo.com.cn

蛋白质是基因表达的产物,直接参与生命的各种生理代谢活动,是生物细胞各种代谢和调控途径的靶分子,也是联系基因和生理代谢的重要桥梁^[1]。随着功能基因组学的兴起,蛋白质组学成为生命科学研究的重要内容,目前已广泛应用于植物生理的研究,如植物群体遗传蛋白质组、植物信号应答蛋白质组和植物组织器官蛋白质组等^[2]。双向电泳技术(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)作为蛋白质组学三大关键核心技术之一,是目前惟一能同时将上千种蛋白质分离和展示的方法,也是分析复杂组分蛋白质分辨率最高的工具^[3]。由于植物中蛋白质含量相对较低,且含有如色素、淀粉、多糖、多酚、单宁和有机酸类等大量干扰性物质,给植物蛋白质组学研究增加了困难,因而双向电泳技术在植物中的应用早期主要集中于拟南芥^[4]、水稻^[5]、小麦^[6]、玉米^[7]等传统模式作物。近年来,随着蛋白质提取技术的改进,双向电泳技术在桃^[8]、草莓^[9]、柑橘^[10]、西红柿^[11]、生菜^[12]、发菜^[13]等水果蔬菜中的应用逐渐增多,但在茭白中的应用鲜见报道。茭白属禾本科宿根性多年水生草本植物,是我国特有的水生蔬菜,其质地脆嫩、味道鲜美且营养丰富,素有“水中参”的美称^[14]。然而,茭白不耐贮藏,采后常温下3 d左右就出现组织软化及木纤维等品质劣变现象,商品价值急剧下降。研究茭白采后品质劣变过程中的蛋白质组学,对从分子层面深入揭示茭白品质劣变机制具有重要意义。作者以茭白为研究对象,拟通过对总蛋白质提取方法和双向电泳条件的优化,建立适合分离茭白蛋白质的双向电泳技术体系,为进一步开展茭白差异蛋白质组学的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 试验用茭白为5月上旬成熟的江苏地产露天茭白,采收后剥去外壳叶鞘,迅速用液氮冷冻,保存于-70℃冰箱备用。

1.1.2 试剂 苯甲基磺酰氟(PMSF)、乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)、固化pH梯度干胶条(IPG)、两性电解质(Bio-Lyte)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、丙烯酰胺(Arc)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、二甲氨基丙磺酸(CHAPS)、低熔点琼脂糖、考马斯亮蓝G-250:购自美国Bio-Rad公司;三氯乙酸(TCA)、尿素、硫脲、甘氨酸、 β -巯基乙醇(β -

Me)、十二烷基磺酸钠(SDS)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、过硫酸铵、矿物油、Tris平衡酚、四甲基乙二胺(TEMED)、牛血清蛋白(BSA):均为分析纯。

1.1.3 仪器 高速冷冻离心机:GL-20G- , 上海安亭科学仪器厂;微量高速冷冻离心机:美国FRESCO 17 Thermo 电子公司;电聚焦仪:Protean IEF System, 美国Bio-Rad公司;大型垂直电泳槽:PROTEAN II XL Cell, 美国Bio-Rad公司;凝胶成像系统:Versdoc 3000, 美国Bio-Rad公司。

1.2 蛋白质提取与含量测定

1.2.1 三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法 参照刘倩等^[15]的方法稍作修改。称取5.0 g茭白样品,用液氮研磨成粉,加入一定量的提取液(含10%TCA和0.07%DTT的丙酮溶液),-20℃沉淀过夜;4℃、13 000 g离心15 min,弃上清液;加入提取液(含0.07%DTT的丙酮溶液)于-20℃沉淀1 h,4℃、16 000 g离心15 min,弃上清液,重复用提取液悬浮沉淀3次。沉淀放入4℃冰箱中干燥后溶于1 mL水化液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4%CHAPS,1%DTT,0.5%Bio-Lyte)中,-70℃保存备用。

1.2.2 改良酚抽法 参照Zhang等^[8]的方法稍作修改。称取5.0 g茭白样品,用液氮研磨成粉,加入50 μ L、100 mmol/L PMSF原液和5~6 mL 4℃预冷2 h以上的蛋白质提取液(含有60 mmol/L Tris,1.05 mol/L蔗糖,10 mmol/L EGTA,1% Triton X-100以及1 mmol/L DTT,pH 8.3)继续研磨。匀浆液以16 000 g离心30 min。上清液中加入2.5~3倍体积的pH为7.8的Tris-饱和酚,充分摇荡,混匀,4℃静置1~2 h,16 000 g、4℃离心30 min,取上层酚相,加入至少5倍体积-20℃预冷丙酮,充分混匀,-20℃下过夜培养,沉淀蛋白质。沉淀分别用预冷的甲醇和丙酮冲洗2次,4℃下干燥后溶于1 mL水化液中,-70℃保存备用。

1.2.3 蛋白质的测定 参照Bradford^[16]的方法进行。

1.3 双向电泳

第一向采用17 cm pH 3~10或pH 4~7的bio-rad预制胶条进行水化上样(上样量分别为0.8、1.0 mg,上样体积350 μ L),参照表1设置等电聚焦程序。等电聚焦结束后将第一向胶条分别置于含2%DTT和2.5%IAA的平衡液中(6 mol/L尿素,75 mmol/L Tris-HCl,pH 8.8,20%甘油,4 g/dL SDS)各平衡15 min,然后再转移第二向垂直电泳。

表 1 17 cm 线性胶条的双向电泳等电聚焦程序

Table 1 Isoelectric focusing programme of 2-DE with 17 cm liner strips

步骤	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
状态	除盐	除盐	除盐	除盐	升压	升压	等电聚焦	保持
升压模式	线性	线性	线性	快速	线性	线性	快速	快速
温度	20 ℃	20 ℃	20 ℃	20 ℃	20 ℃	20 ℃	20 ℃	20 ℃
等电聚焦程序	100 V	200 V	500 V	1 000 V	4 000 V	8 000 V	8 000 V	500 V
	1 h	1 h	1 h	1 h	2 h	2 h	60 000 VH	任意时间

第二向 SDS-PAGE 采用的胶质量浓度为 12 g/dL, 采用恒功率进行垂直电泳, 起始用 1 W/gel 进行 100 min 后, 改为 15 W/gel 直到溴酚蓝到达胶底部, 停止电泳, 取下凝胶。

染色方法采用考马斯亮蓝 G-250 胶体考染。凝胶在 (40% 甲醇, 10% 冰醋酸, 50% 超纯水) 中固定 2 h, 用改进的胶体考染液 (0.12% G-250, 10% 磷酸, 10% 硫酸铵, 20% 甲醇) 染色过夜, 用蒸馏水冲洗凝胶两次, 加入脱色液 (10% 甲醇, 8% 冰醋酸, 82% 超纯水) 进行脱色, 直到凝胶背景清晰, 蛋白质点明显可见为止。

1.4 凝胶的图像采集与分析

脱色后的凝胶用 Versdoc 3000 凝胶成像系统采集图像, 分辨率为 300 dpi, 保存为 GSC 的图像文件, 应用 PDQuest 7.2 软件进行图像分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对蛋白质产量和 2-DE 效果的影响

试验用 TCA/丙酮沉淀法和改良酚抽法提取茭白总蛋白质, 经 Bradford 法定量分析表明, 用 TCA/丙酮沉淀法提取的蛋白质质量浓度平均值为 4.95 mg/mL, 而改良酚抽法为 19.98 mg/mL, 约为 TCA/丙酮沉淀法的 4 倍, 差异显著, 表明改良酚抽法对茭白总蛋白质提取效果明显优于 TCA/丙酮沉淀法。取 TCA/丙酮沉淀法和改良酚抽法得到的蛋白质样品, 分别以 17 cm、pH 3~10 和 pH 4~7 IPG 胶条、1.0 mg 上样量、12 g/dL SDS-PAGE 进行双向电泳分离, 0.12% 考马斯亮蓝 G-250 胶体考染法染色, 比较两种提取方法对 2-DE 效果的影响, 结果见图 1。

图 1 显示, 用 TCA/丙酮沉淀法和改良酚抽法提取的蛋白质, 所得的 2-DE 图谱蛋白质点均较清晰呈圆形, 凝胶背景干净, 分辨率较高, 横竖条纹干扰较少。经 PDQuest 7.2 软件统计分析, 在相同参数设

置条件下, TCA/丙酮沉淀法在胶面上可分辨出 93 个蛋白质点, 改良酚抽法则可检测到 657 个清晰的蛋白质点, 比 TCA/丙酮沉淀法多 564 个蛋白质点, 进一步证明了改良酚抽法对茭白总蛋白质提取效果优于 TCA/丙酮沉淀法。然而, 刘倩等^[15]采用 TCA/丙酮沉淀法提取茭白总蛋白质, 银染法染色后所得的 2-DE 图谱可检测到 1 500 个蛋白质点, 这可能与银染法的高灵敏度有关, 具体原因还有待进一步研究。

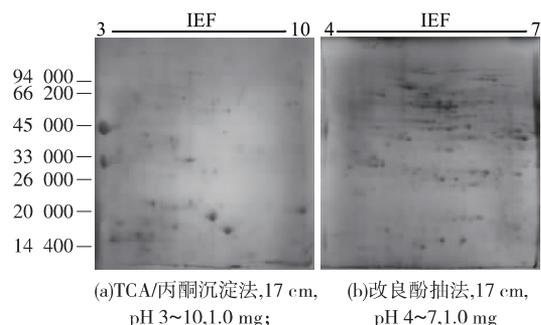


图 1 不同提取方法对茭白 2-DE 图谱的影响

Fig. 1 Effect of different protein extraction methods on 2-DE map of *Z. latifolia*

2.2 第一向等电聚焦 pH 范围对 2-DE 效果的影响

为获得最适合茭白总蛋白质分离的 IPG 胶条 pH 范围, 首先采用 17 cm、pH 3~10 的 IPG 胶条对 TCA/丙酮沉淀法提取的蛋白质进行双向电泳分析, 结果见图 1a。图 1a 显示, 茭白总蛋白质主要分布在酸性至中性区域, 而碱性端蛋白质点数量较少, 且蛋白质点存在一些重叠现象, 表明利用 pH 3~10 的胶条不能有效地将蛋白质点分开。为了达到更好的分离效果, 用 pH 4~7 的胶条对改良酚抽法提取的蛋白质样品进行试验。结果显示, 分离效果明显提高, 在 pH 3~10 胶条上没有分开的点已经完全分开, 没有明显的重叠现象, 在整个图谱上的分布较为理想, 极大地提高了 2-DE 图谱的分辨率 (图 1b)。

2.3 蛋白质上样量和 SDS-PAGE 胶质量浓度对 2-DE 效果的影响

取酚抽法得到的茭白蛋白质样品,选用 17 cm、pH 4~7 的 IPG 胶条,分别取 0.8、1.0 mg 的蛋白质样品进行双向电泳。上样量为 0.8 mg 时,2-DE 图谱上蛋白质点较少,只检测到 596 个蛋白质点,蛋白质点丰度均较弱,尤其低丰度蛋白质不能被检测到,影响了双向电泳的准确性和重复性(图 2a);上样量为 1.0 mg 时,蛋白质点数较多,检测到 657 个蛋白质点,且蛋白质点清晰,重叠现象少,图谱质量更佳(图 2b)。

此外,SDS-PAGE 分离胶浓度也是影响蛋白质分离效果的重要因素。双向电泳中,由于不同来源的蛋白质分子质量范围不同,适宜的 SDS-PAGE 凝胶质量浓度亦不同。根据多次试验分析表明,茭白总蛋白质第二向 SDS-PAGE 胶的质量浓度在 12 g/dL 最为合适,太低会导致小相对分子质量蛋白质点丢失,太高会导致蛋白质点分辨率不高,且出现部分蛋白质点重叠现象。于冯等^[17]在对秋茄叶片及刘丽娟等在对生菜叶片总蛋白质双向电泳技术体系的研究中也得到类似结果。

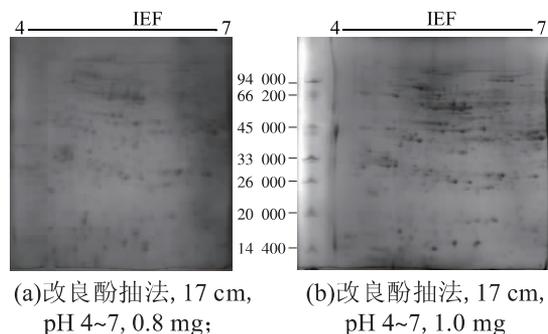


图 2 不同蛋白质上样量对茭白双向电泳图谱的影响
Fig. 2 Effect of different loading quantities on 2-DE maps of *Z. latifolia*

3 讨论

3.1 蛋白质提取方法

蛋白质样品制备是双向电泳技术体系中最关键的步骤,样品中蛋白质的种类、纯度和再溶性将直接影响双向电泳的成败。丙酮法、TCA/丙酮法和酚抽法是目前植物组织蛋白质提取常用的 3 种方法。然而,由于不同植物其组成成分各不相同,而且

含有大量干扰性物质如色素、多糖、核酸、脂类和盐类等,至今并没有哪一种方法能适用于所有植物,研究人员往往根据自己研究的实验材料探索适宜的蛋白质提取方法。Muccilli 等^[10]比较了 TCA/丙酮法和酚抽法提取柑橘果实总蛋白的效果,发现酚抽法提取得到的蛋白质纯度高,经双向电泳分析能得到分辨率较高的图谱;梁文裕等^[13]对发菜总蛋白质提取方法的研究表明,改良 TCA/丙酮法得到的蛋白质含量虽然少于酚抽法,但电泳图谱显示蛋白质分离效果较酚抽法好,蛋白质点清晰。作者比较了 TCA/丙酮法和酚抽法提取茭白总蛋白的双向电泳结果,发现利用酚抽法提取蛋白质,不仅提取效率高,而且杂质干扰少,得到的 2-DE 图谱中,蛋白质条带清晰,数量较多,适合茭白总蛋白质的提取。

3.2 上样量的选择

上样量的多少是影响 2-DE 图谱清晰度及蛋白质点多少的另一重要因素,受到 IPG 胶条长度、pH 范围、染色方法、高丰度和低丰度蛋白的分布等多种因素的制约。过低的上样量不利于一些低丰度蛋白的检测,但过高的上样量也会导致蛋白质在聚焦过程中发生沉积而不能很好地进入 IPG 胶条。甘露等对甘蓝型油菜蛋白质双向电泳体系研究表明,采用 17 cm、pH 4~7 的 IPG 胶条时,最适蛋白质上样量为 1.0 mg。本试验选用 17 cm、pH 4~7 的 IPG 胶条、考马斯亮蓝 G-250 染色,比较了 0.8、1.0 mg 两种不同上样量的双向电泳结果,发现上样量为 1.0 mg 时,得到电泳图谱中蛋白质点数较多、背景清晰。

3.3 IPG 胶条 pH 范围

IPG 胶条 pH 范围对双向电泳图谱也有重要影响。宽 pH 范围的 IPG 胶条能初步分析蛋白质的分布状况,但是等电点相近的蛋白质难以有效分离,窄 pH 范围 IPG 胶条尽管会丢失其 pH 值范围之外的蛋白质,但分辨率和灵敏度大大提高。作者首先采用 pH 3~10 的 IPG 胶条对茭白蛋白质进行分离,发现茭白蛋白质主要分布在 pH 4~7 范围,进一步选用 pH 4~7 范围的 IPG 胶条进行双向电泳分离,分辨率得到显著提高。

4 结语

通过对茭白总蛋白不同提取方法、不同 pH 梯度范围、不同蛋白质上样量的选择,探索出一套适合茭白蛋白质分析的双向电泳方法,即采用改良酚

抽法制备蛋白质干粉、17 cm、pH 4~7 的胶条、1.0 mg 的蛋白质上样量、12 g/dL 的 SDS-PAGE 凝胶浓

度,经考马斯亮蓝 G-250 胶体考染法染色后可获得分辨率高、重复性好的蛋白质 2-DE 图谱。

参考文献:

- [1] 张丽,罗海波,姜丽,等. 果实成熟衰老过程中蛋白质组学研究进展[J]. 植物生理学报,2011,47(9):861-871.
ZHANG Li,LUO Hai-bo,JI Li,et al. Advances in proteomics related to fruit ripening and senescence [J]. **Plant Physiology Journal**,2011,47(9):861-871.(in Chinese)
- [2] Takáč T,Pechan T,Šamaj J. Differential proteomics of plant development[J]. **Journal of Proteomics**,2011,74(5):577-588.
- [3] 马洪雨,王占奎,俞阗,等. 适用于黄麻根部蛋白质组学分析的双向电泳技术[J]. 西北植物学报,2010,30(1):195-202.
MA Hong-yu,WANG Zhan-kui,YU Tian,et al. Two-dimensional electrophoresis protocol for root proteomics analysis of *Orchorus olitorius*[J]. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**,2010,30(1):195-202.(in Chinese)
- [4] Mukherjee A K,Carp M J,Zuchman R,et al. Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*[J]. **Journal of Proteomics**,2010,73:709-720.
- [5] Chen X Y,Kim S T,Cho W K,et al. Proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli[J]. **Journal of Plant Physiology**,2009,166:675-685.
- [6] Irar S,Brini F,Godaya A,et al. Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (Proteome Lab PF-2D) — A wider perspective of the proteome[J]. **Journal of Proteomics**,2010,73:1707-1721.
- [7] Li K,Xu C,Zhang J. Proteome profile of maize (*Zea mays* L.) leaf tissue at the flowering stage after long-term adjustment to rice black-streaked dwarf virus infection[J]. **Gene**,2011,6:16.
- [8] Zhang L,Yu Z,Jiang L,et al. Effect of post-harvest heat treatment on proteome change of peach fruit during ripening[J]. **Journal of Proteomics**,2011,74:1135-1149.
- [9] Bianco L,Lopez L,Scalone A G,et al. Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes[J]. **Journal of Proteomics**,2009,72:586-607.
- [10] Muccilli V,Liceiardello C,Fontanini D,et al. Proteome analysis of *Citrus sinensis* L.(*Osbeck*) flesh at ripening time [J]. **Journal of Proteomics**,2009,73:134-152.
- [11] Page D,Gouble B,Valot B,et al. Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage[J]. **Planta**,2010,232:483-500.
- [12] 张侨,韩莹琰,范双喜,等. 叶用莴苣叶片蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. 中国农学通报,2010,26(13):279-283.
ZHANG Qiao,HAN Ying-yan,FAN Shuang-xi,et al. Establishment of technique of proteome two-dimensional electrophoresis of the leaf of *Lactuca sativa* L[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2010,26(13):279-283.(in Chinese)
- [13] 梁文裕,王星,焦广飞,等. 发菜蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. 西北植物学报,2009,29(8):1550-1556.
LIANG Wen-yu,WANG Xing,JIAO Guang-fei,et al. Establishment and optimization of two dimensional gel electrophoresis for proteome of nostoc flagelliforme[J]. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**,2009,29(8):1550-1556.(in Chinese)
- [14] 俞小平,陈建明. 茭白高效安全生产大全[M]. 北京:中国农业出版社,2008:1-10.
- [15] 刘倩,阮松林,俞晓平,等. 适于茭白茎部蛋白质组分析的双向电泳技术体系的建立[J]. 浙江农业学报,2010,22(3):281-286.
LIU Qian,RUAN Song-lin,YU Xiao-ping,et al. A two-dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic study of stem in *Zizania latifolia* Turcz.[J]. **Acta Agriculturae Zhejiangensis**,2010,22(3):281-286.(in Chinese)
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72:248-254.
- [17] 于冯,郑春芳,施孟如,等. 红树植物秋茄叶片双向电泳技术体系的建立及优化[J]. 热带亚热带植物学报,2011,19(6):519-523.
YU Feng,ZHENG Chun-fang,SHI Meng-ru,et al. Establishment and optimization of 2-DE technique system in leaf proteome of *Kandelia candel*[J]. **热带亚热带植物学报**,2011,19(6):519-523.(in Chinese)