

# 富含多糖的芜菁根皮中磷酸化蛋白的Pro-Q Diamond/SYPRO荧光染料分析技术和质谱鉴定方法

闫海芳<sup>1</sup>, 安春鹏<sup>1</sup>, 河鳍实之<sup>2</sup>, 李玉花<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>东京大学大学院农学生命研究科, 日本东京 113-8650

## Analysis Technique and Mass Spectrometry Method of Phosphoproteome in Swollen Hypocotyls of Turnip (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa* 'Tsuda') Rich in Polysaccharides by Pro-Q Diamond/SYPRO Fluorescence Stain

YAN Hai-Fang<sup>1</sup>, AN Chun-Peng<sup>1</sup>, KAWABATA Saneyuki<sup>2</sup>, LI Yu-Hua<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; <sup>2</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

**摘要:**介绍了利用 Pro-Q Diamond/SYPRO 荧光染料分析磷酸化蛋白在芜菁根皮中的表达。比较了酚法、SDS 法、Tris-HCl 法、TCA-丙酮法、裂解液直接裂解法和改良的酚 2 h 沉淀法所提取芜菁根皮中总蛋白的浓度和纯度。最后用改良酚法提取了芜菁的总蛋白, 双相电泳分离后, 用 Pro-Q Diamond/SYPRO 荧光染料染色对磷酸化蛋白进行染色分析, 并对磷酸化蛋白点做了质谱鉴定。

**关键词:** Pro-Q Diamond/SYPRO; 芜菁; 磷酸化蛋白; 质谱鉴定

蛋白质磷酸化(protein phosphorylation)修饰是常见的一种蛋白翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)方式。随着蛋白质组学技术的不断发展, 磷酸化蛋白质组学已成为蛋白质组学研究的一个重要课题。分离高质量的磷酸化蛋白对这些研究是非常重要的。许多植物, 例如芜菁的根皮中, 含有大量的多糖和次级产物, 蛋白质提取的难度远远高于其他组织(闫海芳 2003)。而且磷酸化蛋白质在细胞内丰度低、磷酸基团很容易在分离过程中丢失, 对分离方法要求高。为此, 本文以富含多糖和次生代谢产物的芜菁根皮为材料, 针对目前常用的蛋白提取方法——酚法、SDS 法、Tris-HCl 法、三氯乙酸(TCA)-丙酮法和裂解液直接裂解法(Chitted 和 Peng 2007; Sheoran 等 2009)进行了比较, 并对酚法做了改进和优化。同时采用磷酸化蛋白特异染料 Pro-Q Diamond 和总蛋白染料 SYPRO 两种荧光染料染色, 分析磷酸化蛋白和总蛋白的表达情况, 同时对磷酸化蛋白作了随机质谱鉴定。本文从蛋白提取方法的优化到磷酸化蛋白的分析鉴定, 建立了一套较为有效的分析富含多糖的芜菁根皮中磷酸化蛋白的分析方法。

## 材料与方法

### 1 材料

以温室中生长至2个月的‘津田’芜菁(*Brassica rapa* L. subsp. *rapa* 'Tsuda')膨大根的根皮为试验材料, 放在液氮中速冻后置于-80℃超低温冰箱中贮存待用。

### 2 方法

#### 2.1 总蛋白的提取

**2.1.1 提取液** 文中采用的酚法、SDS 法、Tris-HCl 法、TCA-丙酮法、裂解液直接裂解法和改良的酚 2 h 沉淀法(Chitted 和 Peng 2007; Sheoran 等 2009)均按照参考文献进行的。(1)酚法提取液为 0.9 mol·L<sup>-1</sup> 蔗糖、0.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、0.05 mol·L<sup>-1</sup> EDTA、0.1 mol·L<sup>-1</sup> KCl, 2% β-巯基乙醇现用现加; (2) SDS 法提取液为 1.175 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.8)、5% SDS、15% 甘油、0.03 mol·L<sup>-1</sup> DTT; (3) Tris-HCl 法的提取液为 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.8)、5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、20 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、100

收稿 2009-03-10 修定 2009-05-05

资助 国家自然科学基金重点项目(30730078)。

\* 通讯作者(E-mail: lyhshen@126.com; Tel: 0451-82191783)。

mmol·L<sup>-1</sup> KCl、2 mmol·L<sup>-1</sup> 苯甲基磺酰氟(PMSF); (4) TCA-丙酮法的提取液为10% TCA和1% DTT的丙酮(使用前-20℃预冷); (5)裂解液直接裂解法的裂解液为含有7 mol·L<sup>-1</sup> 尿素、2 mol·L<sup>-1</sup> 硫脲、4% 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、1% DTT、2%两性电解质(ampholyte, pH 3~8)。

**2.1.2 提取方法** 从低温冰箱中取出芜菁根皮,加入液氮后研磨成粉,取0.15 g粉末分别加入到提取液中。酚法的操作过程如下:0.15 g粉末加入到700 μL提取液中,迅速混匀,加入等体积的饱和酚,温和混匀10 min;4℃下以2 500×g离心10 min,吸取上层酚相;剩余液体重新用700 μL饱和酚抽提,再吸取酚相,合并两次提取的酚相于10 mL管中,加入5倍体积的沉淀液(含0.1 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵和2% β-巯基乙醇的甲醇溶液),-70℃过夜沉淀或者沉淀2 h(改良酚法);10 000×g离心30 min,沉淀分别用预冷的沉淀液和70%乙醇洗3次,洗沉淀时要充分悬浮沉淀;所得沉淀在冷冻真空干燥仪中干燥成粉末备用。SDS法:0.15 g粉末加入到700 μL提取液中,温和混匀20 min,转入10 mL管中,加入4倍体积的-20℃预冷过的丙酮,混匀,于-20℃下沉淀2 h;4℃下以15 000×g离心20 min后,弃去上清液;以于-20℃预冷80%丙酮洗沉淀至无色;离心后弃去上清液,沉淀在冷冻真空干燥仪中干燥成粉末备用。Tris-HCl法:0.15 g粉末加入到700 μL提取液中,温和混匀20 min,4℃下放置30 min,15 000×g离心20 min,吸取上清液于10 mL管中;沉淀重新抽提1次,合并2次上清液;加入5倍体积-20℃下预冷过的丙酮,混匀,-20℃下沉淀2 h;4℃下以15 000×g离心20 min,弃去上清液;以-20℃下预冷过的80%丙酮洗沉淀3次,沉淀在冷冻干燥仪中干燥至粉末备用。TCA-丙酮法:0.15 g粉末加入700 μL提取液,混匀,-20℃下放置2 h;4℃下以15 000×g离心20 min,沉淀用含1% DTT、-20℃下预冷过的80%丙酮洗至无色;冷冻真空干燥仪中冷冻干燥沉淀至粉末备用。裂解液直接裂解法:0.15 g粉末加入500 μL裂解液,温和混匀,室温溶解2 h;4℃下以15 000×g离心20 min,取上清于新管中备用。

**2.1.3 蛋白裂解方法** 以上各法提取的蛋白,用100 μL裂解液(同直接裂解法)室温溶解沉淀,15℃下

以15 000×g离心20 min,去除未溶解部分,-40℃下保存备用。以Bradford法(汪家政和范明2000)测定蛋白浓度,试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

**2.2 双相电泳** 双相电泳的第一向等电聚焦电泳采用Amersham Biosciences生产的24 cm胶条,pH 3~11,上样量为600 μg,上样体积为450 μL。用Amersham Biosciences生产的Ettan IPGphor进行第一向的等点聚焦。30 V溶胀12 h,然后分别调节电压为200 V 1 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,8 000 V梯度上升30 min,8 000 V 4 h。聚焦结束后用12.0%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行第二向分离,于240 V电泳5~7 h。电泳参数参考Amersham Biosciences提供的双向电泳参数。电源用Electrophoresis Power Supply EPS601。

**2.3 Pro-Q Diamond和SYPRO荧光染色** Pro-Q Diamond染色(Steinberg等2003;Bio-Rad公司提供的手册):电泳结束后,凝胶置于聚丙烯塑料盒中,固定液(40%甲醇和10%冰乙酸)固定3 h,1 h后更换新的固定液,这样固定效果会更好。凝胶用Milli-Q去离子水洗3次,每次20 min,水洗后加入500 mL Pro-Q Diamond,摇床上震荡,染色1 h,回收染色液,以脱色液(25%乙腈和50 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸钠,pH 4.0)洗3次,每次30 min,后用Milli-Q去离子水洗3次,每次10 min,之后即可用Typhoon 9400荧光扫描仪采集图像。

SYPRO荧光染色(Steinberg等2003;Bio-Rad公司提供的手册):Pro-Q Diamond染色后的凝胶,扫描后用Milli-Q去离子水洗1次后,加入500 mL SYPRO荧光染色液,染色3 h,回收染色液,凝胶用10%甲醇和7%冰乙酸洗1 h,有助于去除非特异的点,Milli-Q去离子水洗后即可用于采集图像。

**2.4 质谱鉴定** 采用GE公司的Spot Picker工作站自动随机挖取3个Pro-Q Diamond染色后的磷酸化蛋白质点,将挖取的蛋白点置于0.5 mL的离心管中,编号。质谱样品处理参照AB公司提供的手册。

## 实验结果

### 1 总蛋白检测

用6种方法提取的总蛋白质,进行SDS-PAGE电泳检测和浓度测定的结果(图1、表1)。采用SYPRO荧光染料进行染色,结果表明,等量的材料

和提取液, 酚法得率最高, SDS法和Tris-HCl法次之, TCA-丙酮法和裂解液直接裂解法最差。将相同体积蛋白溶解液(10  $\mu\text{L}$ )进行SDS-PAGE电泳的结果(图1)显示, 酚法样品的条带较SDS法和Tris-HCl法多, 而TCA-丙酮法和裂解液直接裂解法的样品则无条带。酚法样品的条带虽然多, 但是很多条带不清晰, 而在改进的酚法样品中条带很清晰, 得率未受到明显影响。

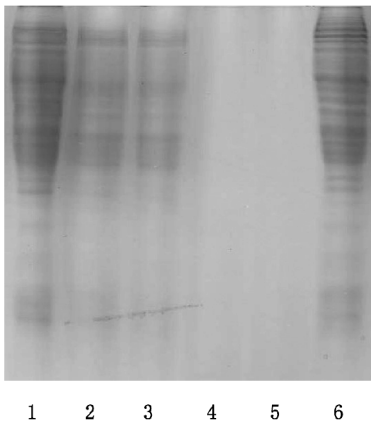


图1 6种不同提取方法所得芜菁根皮总蛋白的SDS-PAGE图谱比较

上样量为10  $\mu\text{L}$ 。1: 酚法; 2: SDS法; 3: Tris-HCl法; 4: TCA-丙酮法; 5: 裂解液直接裂解法; 6: 改进的酚法。

表1 6种不同提取方法所得芜菁根皮总蛋白的浓度和得率

提取方法	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	蛋白得率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
酚法	1.62	1 080
SDS法	1.16	773
Tris-HCl法	1.08	720
TCA-丙酮法	0.26	173
直接裂解法	0.24	160
改良的酚法	1.59	1 060

直接裂解法显示浓度为测定浓度 $\times 5$ 。

## 2 Pro-Q Diamond 染色和 SYPRO 荧光染色双向电泳结果

采用改进的酚法提取芜菁根皮的总蛋白质, 并进行双向电泳, 用Molecular Probe公司生产的专门用于磷酸化蛋白染色的荧光染料Pro-Q Diamond染色的结果见图2-a。染色结果用Amersham Biosciences公司的Image-master软件分析, 在参数设定为Smooth=3、Mini area=17、Saliency=200条件下, 经软件自动检测蛋白点后, 人工去除错误的蛋白点, 并增加未被检测的点后, 出现了181个磷酸化蛋白点, 这些点集中分布在酸性端, 而且分子量也比较集中。凝胶用Pro-Q Diamond染色后, 再用SYPRO对总蛋白进行染色分析的结果见图2-b。染色结果的分析软件和条件与Pro-Q Diamond

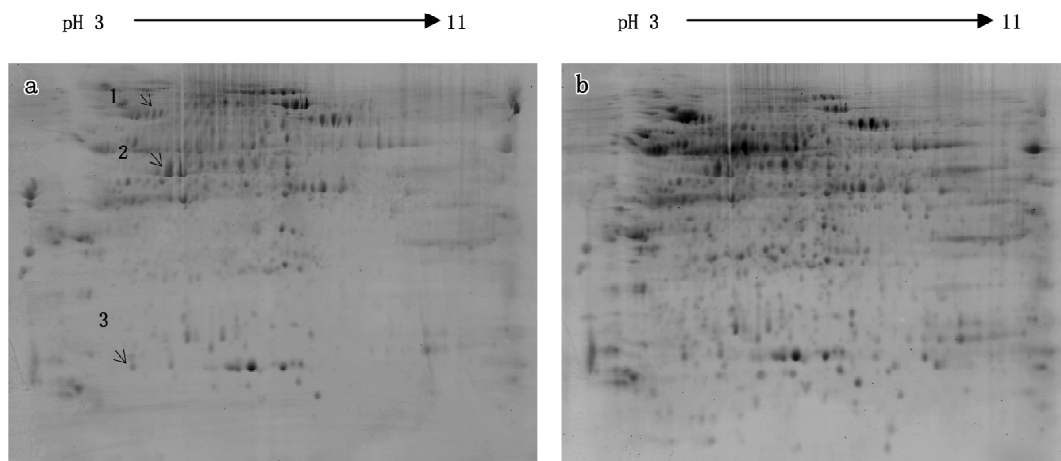


图2 芜菁根皮总蛋白 SDS-PAGE 图谱

以IPG (pH 3~11) 24 cm的胶条为第一向和12.0% SDS-PAGE为第二向分离总蛋白。a为Pro-Q Diamond染色的总磷酸化蛋白结果。至少检测到181个蛋白点, 1、2、3分别为随机抽取3个点进行质谱分析磷酸化蛋白。b为继Pro-Q Diamond染色后, 用SYPRO进行2次染色的结果, 至少检测到642个点。利用Amersham Biosciences公司的Image-master软件, 分析条件为Smooth=3, Mini area=17, Saliency=200。

染色的相同。在此条件下,检测到642个蛋白点。这些点分布于整个胶上,无论是高pH还是较低的分子量都检测到蛋白点。这一结果表明用改良后的酚法提取的蛋白完全可以满足分析磷酸化和总蛋白的需要。

### 3 质谱鉴定

从Pro-Q Diamond染色的磷酸化蛋白中,随机挖取3个点,质谱进一步分析的结果表明,这3个

蛋白分别为热激蛋白81-3 (heat shock protein 81-3)、液泡ATP酶亚基B (vacuolar ATP synthase subunit B)和受翻译调节的肿瘤蛋白同系物 (translationally-controlled tumor protein homolog) (表2)。它们在水稻和橄榄型油菜磷酸化蛋白研究中都有过报道,是被磷酸化修饰的蛋白。说明这种改良的酚法可以分离到高质量的蛋白质,而且Pro-Q Diamond染色后的磷酸化蛋白也可以满足质谱鉴定

表2 磷酸化蛋白质的谱分

磷酸化蛋白名称	分子量/kDa	等电点	肽段数量	可信度得分
热激蛋白81-3 (heat shock protein 81-3)	80.2869	4.95	8	100
液泡ATP酶亚基B (vacuolar ATP synthase subunit B)	54.1876	4.98	8	100
受翻译调节的肿瘤蛋白同系物(translationally-controlled tumor protein homolog)	19.1414	4.63	6	100

肽段数量: 质谱分析与已知蛋白氨基酸序列吻合的肽段数量; 可信度得分: 蛋白鉴定结果的准确度。

的需要。

## 讨 论

高质量磷酸化蛋白的获得,对于磷酸化蛋白质组学的研究是非常必要的。但是提取过程中很多步骤会影响蛋白的质量,例如样品的研磨是否完全、迅速,是否能充分利用变性剂、表面活性剂、两性电解质、还原剂等成分实现蛋白的有效溶解(徐幼平等2007),而且还要考虑提取时间,时间过长则已释放的蛋白酶还有可能会产生活性而降解蛋白质。这些都是能否获得高质量蛋白质的关键性步骤。

其次,还根据植物材料的不同来选取不同的提取方法。TCA-丙酮法是目前最常用的蛋白提取法。而本文中的茺菁根皮富含多糖等次生代谢产物,用酚法比较适合,但长时间的沉淀,对沉淀蛋白的质量有一定的影响,因此缩短沉淀时间对提高蛋白的纯度有利。与水稻、黄瓜不同,普通的酚法就可以分离到高质量的蛋白(Chitted和Peng 2007; 李凤玉等2008)。对番茄叶片来说,则TCA-丙酮法最适合(徐幼平等2007)。因此,在提取植物蛋白之前了解所研究材料的特点是必要的。

目前研究磷酸化蛋白的主要方法有:固相金属亲和色谱分离和纯化磷酸化蛋白(Muszynska等1986);免疫沉淀选择性分离磷酸化蛋白(Conrades和Veenstra 2005);磷酸肽疏水性不同通过高效液

相色谱分离(车发云等2000)等。但是因为磷酸化蛋白质在细胞内丰度较低,磷酸化蛋白质的磷酸基团很容易在分离过程中丢失。这些都给磷酸化蛋白质的研究带来一定的困难。提取总蛋白后直接电泳以后以Pro-Q Diamond染料染色可以减少操作步骤和磷酸化蛋白的丢失。而且SYPRO染料还可以在Pro-Q Diamond染色后的胶上重新对总蛋白进行染色,这对同一块胶上分析磷酸化蛋白和总蛋白很方便。

磷酸化蛋白由于磷酸基团的修饰作用,主要集中在酸性端,我们的染色结果也有这样的特点。这种在酸性端集中分布的情况与水稻根中的磷酸化蛋白分布相似,无论是高盐胁迫与否的条件下,也是大部分集中在酸性端(Chitted和Peng 2007)。至于图2-a和b所检测到的蛋白点,磷酸化蛋白数量和总蛋白数都是数量上磷酸化蛋白占总蛋白点的28.2% (181/642),比一般植物材料中的5%~10%高出很多,这可能与植物材料的部位特异性有一定的关系(Agrawal和Thelen 2006)。而且检测到的蛋白点偏少,这可能与上样量和所用胶条的pH范围都有关系。我们认为,对此,可以根据磷酸化蛋白分布的特点,选择pH范围较窄的胶条(pH 4~7)加以克服,可得到较好的分离效果,蛋白点也多。这说明该染色方法对研究磷酸化蛋白和总蛋白非常适合。

总之,这种提取蛋白的改良酚法,还可以减少糖类次生代谢产物的污染,提高蛋白的纯度,而

且可以减少提取的时间,一般在4 h内就可以完成。

### 参考文献

- 车发云, 邵晓霞, 夏其昌(2000). 高效液相色谱-电喷雾四极杆离子阱质谱鉴定蛋白质磷酸化位点. 中国科学C辑, 30 (4): 421~427
- 李凤玉, 潘德灼, 陈伟(2008). 黄瓜子叶节的蛋白质组双向电泳条件的优化. 植物生理学通讯, 44 (5): 963~967
- 汪家政, 范明主编(2000). 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 42~46
- 徐幼平, 徐秋芳, 蔡新忠(2007). 适于双向电泳分析的番茄叶片总蛋白提取方法的优化. 浙江农业学报, 19 (2): 71~74
- 闫海芳(2003). 光环境影响花青素合成途径中相关基因的表达机制(硕士论文). 哈尔滨: 东北林业大学, 14~21
- Agrawal GK, Thelen JJ (2006). Large scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape. *Mol Cell Proteomics*, 5 (11): 2044~2059
- Chitted RB, Peng Z (2007). Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) root. *J Proteome Res*, 6 (5): 1718~1727
- Conrades TP, Veenstra TD (2005). An enriched look at tyrosine phosphorylation. *Nat Biotechnol*, 23: 36~37
- Muszynska G, Andersson L, Porath J (1986). Selective adsorption of phosphoproteins gel-immobilized ferric chelate. *Biochemistry*, 25 (22): 6850~6853
- Sheoran IS, Ross ARS, Olson DJH, Sawhney VK (2009). Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Sci*, 176 (1): 99~144
- Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP, Patton WF (2003). Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics*, 3 (7): 1128~1144