技术与方法 Techniques and Methods

牛奶子果实中蛋白质的提取和双向电泳分析方法的改良

吴满成, 胡海涛, 余有见, 孙娜, 杨玲*
浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004

Extraction and Improvement of Two-Dimensional Electrophoresis Analysis of Proteins from Berries of *Elaeagnus umbellate* Thunb.

WU Man-Cheng, HU Hai-Tao, YU You-Jian, SUN Na, YANG Ling*
College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China

提要: 比较2种提取牛奶子果实中总蛋白的方法以及用SDS-PAGE分析的结果表明, 用酚法提取蛋白时, 适当延长第2次平衡时间, 并及时更换平衡缓冲液Ⅱ, 可获得高分辨率的总蛋白图谱。这种改良了的方法解决了牛奶子果实中富含的色素和多酚等化合物对双向电泳(2-DE)的干扰问题, 重复性好, 适用于果实中蛋白的2-DE分析和尔后的技术操作。

关键词: 牛奶子; 果实; 蛋白质; 双向电泳

蛋白组学是后基因组时代主要研究领域之一。由于双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)所具备的对蛋白质混合物的高度平行分析能力, 使之与质谱技术和生物信息学成为蛋白组学研究中的三大核心技术(廖翔等2003), 已广泛应用于生物学研究领域的各个方面。

牛奶子是胡颓子科胡颓子属植物, 起源于我国, 分布广泛, 具有较高的食用、药用、观赏和生态学价值。其果实中富含人体所必须的多种氨基酸、矿质元素、维生素、脂肪酸和类黄酮等物质, 尤其是番茄红素的含量高出番茄的5~18倍, 很可能成为工厂化生产番茄红素的原料(Fordham等2003)。国外正对牛奶子进行广泛的研究和应用试验, 而我国对此种多功能的植物资源还未引起足够重视。有关牛奶子果实中蛋白质组学的研究尚未见报道。牛奶子果肉富含糖类、色素和酚类等次生代谢产物(倪穗等2007), 给其果实中蛋白质组学2-DE研究增加了难度。本文比较了三氯乙酸和酚2种提取方法在牛奶子果实中总蛋白产量和SDS-PAGE分辨率的差异, 并研究了平衡时间和方式对2-DE图谱的影响, 以期建立适合于牛奶子果实中蛋白组学研究的方法。

材料与方法

1 实验材料

以牛奶子(*Elaeagnus umbellate* Thunb.)硬核期的果实为材料。样品采自杭州临安的野生牛奶子植株, 液氮中速冻后置于−70 ℃中保存。

2 总蛋白的提取和定量测定

三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)法提取蛋白参照Gallardo等(2001)的方法并做了改进。取约1 g牛奶子果实弃核后用液氮研磨成粉, 称重后加入25 mL −20 ℃预冷的TCA提取液(10% TCA、0.07% DTT)混匀, 于−20 ℃中放置2 h, 于4 ℃下以35 000×*g*离心15 min, 取沉淀。加入10 mL −20 ℃预冷的洗涤液(0.07% DTT的丙酮), 混匀后于−20 ℃下放置2 h后, 4 ℃下以35 000×*g*离心15 min。沉淀重复洗涤2次。

酚法中的蛋白提取参照Mooney和Thelen (2004)文中的方法并稍做改进。按1 g研磨粉比2.5 mL的比例加入pH 8.8的Tris饱和酚提取液(0.1 mol·L^{-1} pH 8.8的Tris-HCl、10 mmol·L^{-1} EDTA、200 mmol·L^{-1} KCl、2% DTT、0.9 mol·L^{-1}蔗糖), 混匀后于4 ℃下放置30 min, 4 ℃下以15 000×*g*离心5 min, 弃上层溶液。向剩余酚相中加入等体积的提取液, 重复2次, 然后向剩余酚相加入20 mL的−20 ℃含0.1 mol·L^{-1}醋酸铵的丙酮溶液, 于−20 ℃下放置至少1 h, 并于4 ℃下以20 000×*g*离心20

收稿 2009-03-18 修定 2009-06-08
资助 浙江省科技计划(2008C24G2030004)和浙江省自然科学基金(Y306441)。
* 通讯作者(E-mail: yangl@zjnu.cn; Tel: 0579-82282396)。

min, 取沉淀。分别以−20 ℃预冷的0.1 mol·L^{-1}醋酸铵的丙酮溶液、0.07% DTT的丙酮、70%乙醇各洗涤一次。

用Bradford (1976)法测定样品中的蛋白浓度, 标准蛋白为牛血清蛋白。

3 等电聚焦与平衡

参照Sarry等(2004)文中的方法设置等电聚焦程序, 每根pH 4~7线性7 cm胶条限制电流30 mA, 17 cm胶条限制电流50 mA。等电聚焦约28 h后进行2次平衡, 第1次加入平衡缓冲液I (6 mol·L^{-1}尿素、2% SDS、0.375 mol·L^{-1} pH 8.8的Tris-HCl、20%甘油和2% DTT)平衡12 min; 按以下2种方法迅速转入第2次平衡。第1种方法加入平衡缓冲液II (6 mol·L^{-1}尿素、2% SDS、0.375 mol·L^{-1} pH 8.8的Tris-HCl、20%甘油和2.5%碘乙酰胺)平衡12 min; 第2种方法为加入平衡缓冲液II平衡4 min, 迅速倒掉后再加入平衡缓冲液II平衡12 min。

4 SDS-PAGE和染色

配制12%的分离胶, 按以下参数进行电泳: 17 ℃恒温下, 起始用低电(5 mA·17 cm胶$^{-1}$), 待样品完全走出IPG胶条浓缩成一条线后, 再加大电流至20~30 mA·17 cm胶$^{-1}$, 待溴酚蓝指示剂到达底部边缘时停止电泳。银染采用Yan等(2000)文中的方法。

5 凝胶扫描和图像分析

胶用UMAX Power Look 2100XL (Maxium Tech, 中国台北)扫描仪扫描, 采用透射模式, 分辨率为600 dpi。图像用PD-Quest 2-DE 8.0.1软件分析。

实验结果

1 两种提取方法的蛋白得率及其图谱效果的比较

采用TCA法和酚法提取的牛奶子果实中总蛋白产率分别为(1.62±0.15) mg·g^{-1}和(1.27±0.09) mg·g^{-1}。酚法和TCA法提取的蛋白样品, 以相同的上样量同时采用17 cm胶条进行等电聚焦电泳和SDS-PAGE后获得的图谱中, 酚法的蛋白点较多, 且胶面背景清晰无明显的条纹与斑点(图1-a); TCA法的蛋白点较少, 大分子端蛋白点有明显的拖尾现象(图1-b)。采用标准化方法于Local regression模式下以Floating Ball 47背景抽提, Median 3×3噪声过滤类型, 用PD-Quest 2-DE 8.0.1软件分析的结果表明, 酚法(图1-a)共检测出符合高斯模型的有效点1 036个, 而TCA法(图1-b)仅检测出653个有效点。将这些点按分子质量和等电点区间分析时, 发现在不同的分子质量与等电点区间, 酚法获得的蛋白点数均多于TCA法(图2)。

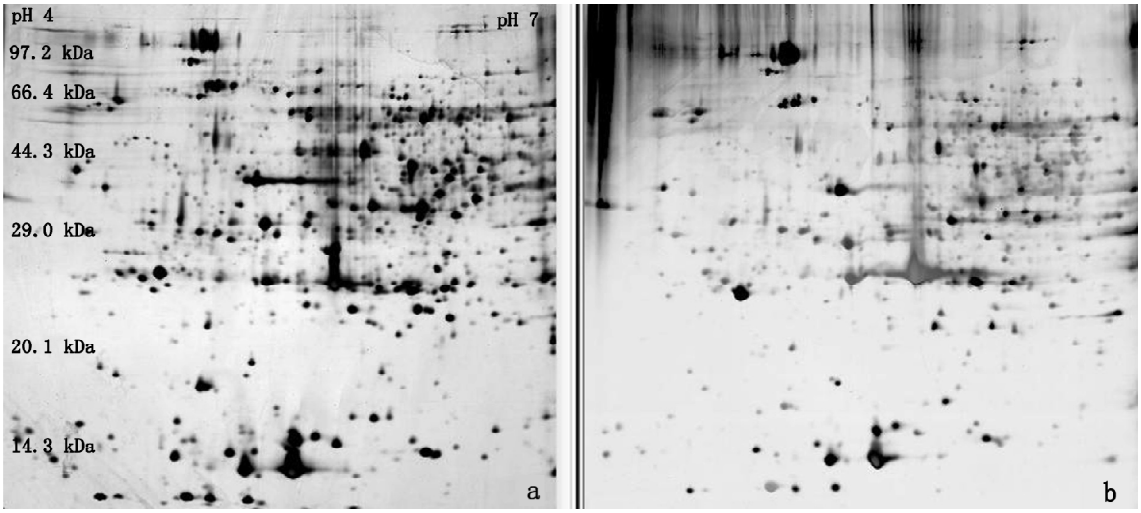


图1 酚法(a)和TCA法(b)提取蛋白的2-DE图谱比较

2 不同平衡时间对2-DE图谱的影响

采用酚法提取的蛋白样品, 上样量取200 μg, 用17 cm胶条进行等电聚焦电泳, 图3-a为胶条等电聚焦后经平衡缓冲液I还原12 min后, 再按第1种方法进行2次平衡, 其胶面背景模糊, 且条纹较多。图3-b为胶条等电聚焦后经平衡缓冲液I还原

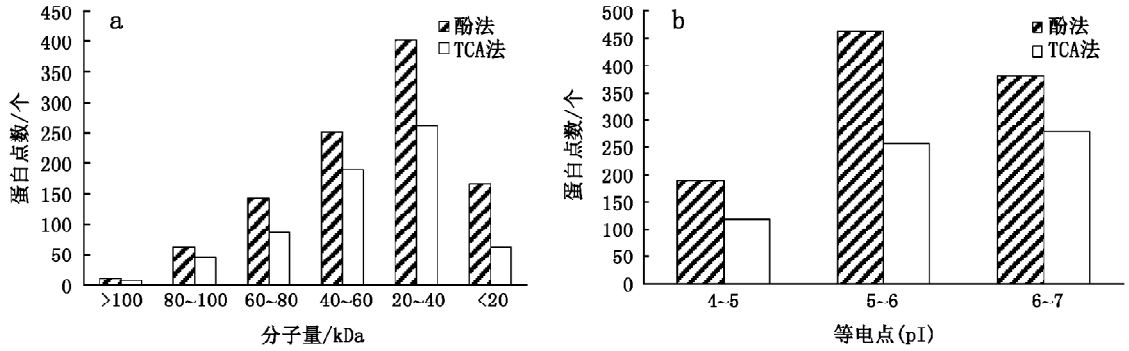


图2 不同分子量与等电点区域内蛋白点数的比较

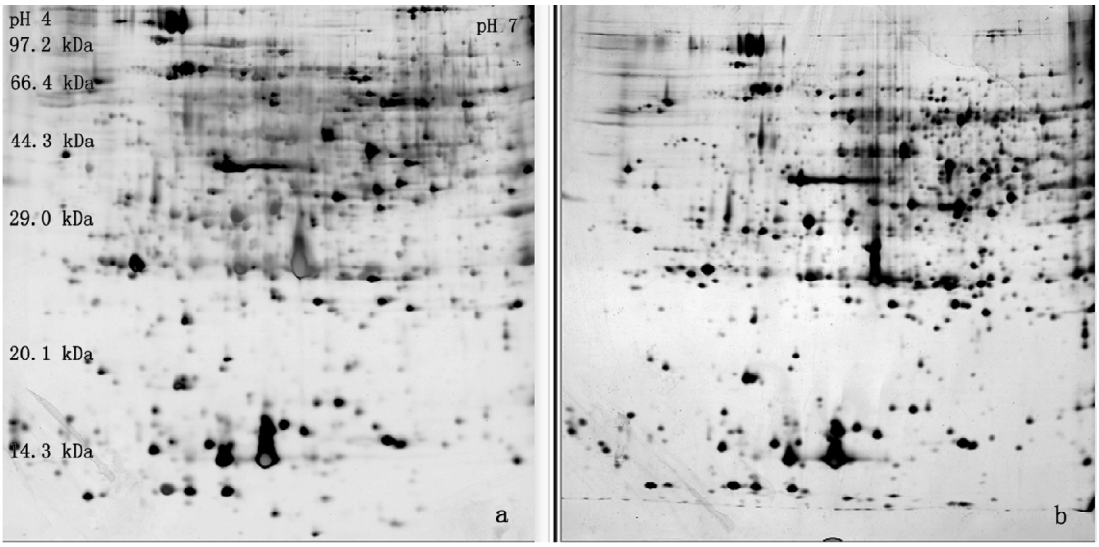


图3 第1种2次平衡方法(a)和第2种2次平衡方法(b)的2-DE图谱比较

12 min后, 再按第2种方法进行2次平衡, 其胶面背景清晰无条纹。第1种平衡方法共检测出符合高斯模型的有效点890个, 第2种方法的有效蛋白点为1 036个。

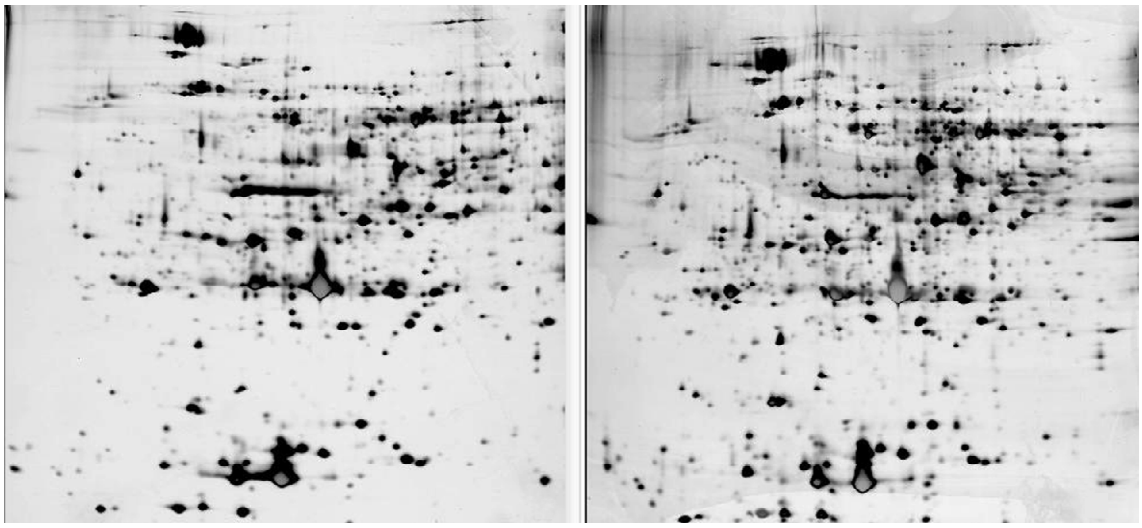
讨 论

蛋白提取是2-DE中关键的一步(Blackstock和Weir 1999), 其质量直接影响电泳的分辨率和重复性。TCA法和酚法均为常用的蛋白提取方法, 前者快捷, 能有效使蛋白与丙酮一起沉淀下来, 从而达到去除一些干扰物质纯化蛋白的目的, 然而丙酮沉淀蛋白时会有大量糖类一起沉淀下来而严重影响电泳图谱的质量; 酚法虽然步骤较为复杂, 耗时较多, 但此法的不同相选择性溶解, 能有效的去除有机物杂质, 从而达到很好地分离蛋白的目的。相同的上样量经过多次重复实验比较, 这两种方法对牛奶子果实中蛋白的提取效果不同, 酚法的2-DE图谱中获得的蛋白点数显著多于TCA法的蛋白点数, 且表达更为丰富, 背景也更清晰(图1)。这可能是由于牛奶子果肉富含的糖类、脂肪、色素和酚类等次生代谢物质与蛋白结合或者包裹在蛋白周围, 这就加大了蛋白质自身的质量, 同时也改变了蛋白等电点, 以致大部分蛋白聚集在胶面的大分子端并形成大量的条纹, 造成蛋白点数减少, 并影响胶面背景的清晰度。酚法可很好的去除干扰2-DE分离的糖类、色素和酚类等物质, 因此获得的蛋白样品纯度较高, 再溶性好(张艳萍等2004)。因此, 我们认为酚法更适用于牛奶子果实蛋白质组2-DE分析研究。

平衡的目的是促进SDS与蛋白质充分作用(Holloway和Arunel 1988), 是第二向SDS-PAGE之前的重要一步。在其它条件一致的情况下, 平衡是

否充分在很大程度上会影响图谱的质量。第1种方法的平衡时间较短, 没有及时更换平衡缓冲液II, 会造成残留DTT影响SDS与蛋白质结合的效果。DTT在平衡过程中起还原剂作用, 在蛋白质与SDS充分作用的同时, 平衡缓冲液II中的碘乙酰胺会烷基化自由的DTT, 以致第2次平衡不完全, 结果在SDS-PAGE胶上产生条纹的假象(王一鸣等2007)(图3-a)。而第2种方法的第2次平衡时间被延长, 并及时更换平衡缓冲液II, 起润洗胶条的作用, 可很好的去除残留的DTT对第2次平衡的影响, 所以与第1种方法相比其背景更加清晰(图3-b)。

总之, 采用酚法提取蛋白, 再适度的延长平衡时间后SDS与蛋白分子可充分结合, 因此获得较多蛋白点和高分辨率的2-DE图谱。本文建立的体系适用于果实中的蛋白组学分析, 此体系的试验结果重复性较好(图4)。



第1次重复　　第2次重复

图4 改良的酚法2次重复结果的比较

参考文献

廖翔, 应天翼, 黄留玉, 黄培堂(2003). 蛋白质组学研究中的双向电泳技术. 生物技术通讯, 14: 522~524

倪穗, 李纪元, 李辛雷, 范正琪, 田敏, 鲁仪增(2007). 牛奶子果实性状及营养成分的产地与株间变异研究. 林业科学研究, 20: 404~407

王一鸣, 花宝光, 王有年, 梦海玲(2007). 桃果实蛋白质双向电泳影响因素的研究. 园艺学报, 34 (6): 1579~1584

张艳萍, 靳飞, 柴小青, 卫功宏, 印莉萍(2004). 缺铁逆境胁迫下水稻叶片蛋白的双向电泳及其蛋白质组图谱分析. 生物信息学报, 2 (3): 6~11

Blackstock WP, Weir MP (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol, 17 (3): 121~127

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254

Fordham IM, Zimmerman RH, Black BL, Clevidence BM, Wiley ER (2003). Autumn olive: a potential alternative crop. Acta Hort, 626: 429~431

Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D (2001). Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. Plant Physiol, 126: 835~848

Holloway PJ, Arunel PH (1988). High-resolution two-dimensional electrophoresis of plant proteins. Anal Biochem, 172: 8~15

Mooney BP, Thelen JJ (2004). High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag database for protein identification. Phytochemistry, 120: 1~12

Sarry JE, Sommerer N, Sauvage FX, Bergoin A, Rossignol M, Albagnac G, Romieu C (2004). Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. Proteomics, 4: 201~215

Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. Electrophoresis, 21: 3666~3672