

技术与方法 Techniques and Methods

玉米花丝蛋白质组双向电泳条件的优化

付忠军^{1,*}, 丁冬^{1,*}, 进茜宁¹, 王长城¹, 李永亮², 汤继华^{1,**}¹河南农业大学农学院, 郑州450002; ²郑州大学生物工程系, 郑州450002

Optimization of Two-Dimensional Electrophoresis for Proteome of Maize Silk

FU Zhong-Jun^{1,*}, DING Dong^{1,*}, JIN Xi-Ning¹, WANG Chang-Cheng¹, LI Yong-Liang², TANG Ji-Hua^{1,**}¹College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China

摘要:以玉米温敏自交不亲和系‘HE97’的花丝为材料,比较了3种不同蛋白质提取方法对双向电泳结果的影响,并对其中的蛋白质上样量、等电聚焦条件及SDS-PAGE凝胶浓度进行了探索与优化。结果表明,与酚提取法和改良的酚提取法相比,采用三氯乙酸/丙酮提取法提取蛋白质操作简便,所得的双向电泳图谱蛋白质点数较多,图谱背景清晰,是一种提取玉米花丝蛋白质的有效方法。优化后的双向电泳技术体系适合于玉米花丝全蛋白质的双向电泳分析。

关键词:玉米;花丝;蛋白质提取方法;双向电泳

蛋白质组的概念最早由Wilkins和Williams在1994年提出(Swinbanks 1995),目前已成为功能基因组学的研究内容之一,双向电泳技术是最为经典的蛋白质分离技术。近年来,随着固相pH梯度胶条的出现,双向电泳可以同时展示1 000多条多肽,重复性和分辨率都有很大的提高(郭尧君 2005)。此外,随着以2-DE-MS (2-dimensional gel electrophoresis-mass spectroscopy)为核心的蛋白质组学技术的不断完善和成熟,植物蛋白质组学的研究也有了长足的进展,关于植物蛋白质组学研究的报道日益增多(Kamo等 1995; Gallardo等 2001; Shen等 2003; Song等 2007)。

由于不同组织和器官之间蛋白质和脂肪含量存在显著的差异,因此探索不同组织和器官蛋白质的最佳提取方法,优化蛋白质双向电泳技术对提高特异组织的分辨率是有意义的。玉米花丝是接受花粉所必需的器官,研究花丝的蛋白质组学差异对揭示玉米受精过程是重要的,但是迄今还没有花丝蛋白质有效提取方法的报道。本文以一个玉米温敏自交不亲和材料‘HE97’的花丝为材料,比较了不同蛋白质提取方法对花丝总蛋白的提取效果,同时在等电聚焦条件、蛋白质上样量及SDS-PAGE胶浓度的选择上也作了进一步的优化,探索出适合于玉米花丝的双向电泳技术,从而为开展玉米花丝蛋白质组学研究提供了技术支持。

材料与amp;方法

1 植株材料及取样方法

玉米(*Zea mays* L.)温敏自交不亲和材料‘HE97’由海南绿川种苗有限公司提供。在2008年春播和夏播分别将试验材料分5期播种在河南农业大学郑州科教园区,播期分别为4月19日、4月26日、5月2日、6月3日和6月10日。在花丝吐出前用新的雌穗袋将雌穗套上,当花丝完全吐出后,用0.1%焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)处理的剪刀剪取5 g花丝立即放入50 mL离心管中并放入液氮中冷冻,带回实验室于-80 °C冰箱中保存。

2 花丝总蛋白质的提取

2.1 三氯乙酸(TCA) / 丙酮法 参考Damerval等(1986)的方法,并略作改进。取2 g新鲜花丝,在液氮中迅速研磨成细粉;倒入约2 mL预冷的含10% TCA、0.07% β -巯基乙醇的丙酮溶液,混匀后转移到2 mL离心管中,在-20 °C冰箱内静置1 h后,在4 °C条件下以16 000 \times g离心10 min;倒掉上清液,用2 mL上述丙酮溶液重悬,重复以上操作2

收稿 2009-10-22 修定 2009-11-17

资助 国家“863”重大项目(2006AA10030)和教育部新世纪人才支持计划(20080010)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: tangjihua1@163.com; Tel: 0371-63558127)。

次。离心后的沉淀用 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮(含 0.07% β -巯基乙醇) 2 mL 悬浮, 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内静置 1 h 后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $16\ 000\times g$ 离心 10 min , 重复操作2次, 收集沉淀, 真空干燥。

2.2 酚提取法 参照Hurkman和Tanaka(1986)的方法并略作改进。取 2 g 新鲜花丝, 在液氮中迅速研磨成细粉; 加入 0.8 mL 苯酚(Tris缓冲液, $\text{pH } 8.0$; Sigma)和 0.8 mL SDS缓冲液(30% 蔗糖; 2% SDS; $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $\text{pH } 8.0$; $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT), 混匀后转移到 2 mL 离心管中。混合溶液在磁力搅拌器上涡旋 30 s , 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $16\ 000\times g$ 离心 5 min , 用微量移液器小心地将上层约 $400\ \mu\text{L}$ 的苯酚相转移到新的 2 mL 离心管中。向苯酚相中至少加入5倍体积的含 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵的甲醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置 30 min 。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $16\ 000\times g$ 离心 5 min , 之后用预冷的甲醇乙酸铵溶液冲洗2次, 80% 丙酮洗2次。收集沉淀, 真空干燥。

2.3 改良的酚提取法 参照Wang等(2006)文中的方法, 并略作改进。取 2 g 新鲜花丝, 在液氮中迅速研磨成细粉。倒入预冷的含 10% TCA、 0.07% β -巯基乙醇的丙酮溶液, 混匀后转移到 2 mL 离心管。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内静置 1 h , 之后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $16\ 000\times g$ 离心 5 min , 离心后的沉淀用预冷丙酮(含 0.07% β -巯基乙醇) 2 mL 重悬, 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内静置 1 h 。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $16\ 000\times g$ 离心 5 min , 收集沉淀, 真空干燥。称取 $0.05\sim 0.1\text{ g}$ 干粉悬浮于 0.8 mL 苯酚(Tris缓冲液, $\text{pH } 8.0$; Sigma)和 0.8 mL SDS缓冲液(30% 蔗糖; 2% SDS; $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $\text{pH } 8.0$; $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT)混匀后转移到 2 mL 离心管中。混合溶液在磁力搅拌器上涡旋 30 s , 苯酚相以 $16\ 000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 后被分开, 用微量移液器小心地将上层约 $400\ \mu\text{L}$ 的苯酚相转移到新的 2 mL 离心管中。向苯酚相中至少加入5倍体积的含 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵的甲醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 30 min 。之后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $16\ 000\times g$ 离心 5 min , 再用冷的甲醇乙酸铵溶液冲洗2次, 用 80% 丙酮洗2次, 收集沉淀, 真空干燥。

3 蛋白质的溶解

每毫克蛋白质干粉加入约 $20\ \mu\text{L}$ 裂解液, 成分为 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% 3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸和 $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(Lee 2008)。充分混合, 涡旋振荡 2 min , 30

$^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h , 于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $18\ 000\times g$ 离心 45 min , 取上清液分装, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

4 蛋白质样品浓度测定

蛋白质浓度测定参考Bradford(1976)文中的方法。用牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)做标准曲线, 依据标准曲线计算样品蛋白质浓度。

5 第一向等电聚焦电泳条件的优化

采用Ettan IPGhor II等电聚焦系统。主要参照Görg等(1999)文中的方法和GE公司双向电泳实验指南进行。取适量蛋白样品加裂解液至总体积为 $450\ \mu\text{L}$, 沿IPG胶条槽缓慢均匀加入, 将IPG胶条胶面朝下覆盖在样品上, 在胶面上加 2 mL 矿物油, 置于Ettan DALTsix型电泳仪上, 然后以每根胶条 $50\ \mu\text{A}$ 的极限电流和 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 聚焦温度, 设计4个等电聚焦(IEF)条件处理以优化等电聚焦条件。

条件I为 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 主动水化 50 V , 12 h ; 200 V , 1 h ; 500 V , 1 h ; $1\ 000\text{ V}$, 0.5 h ; 然后以 $10\ 000\text{ V}$ 聚焦 6 h 。条件II、III和IV的聚焦参数分别为 $10\ 000\text{ V}$ 聚焦 8 h 、 $10\ 000\text{ V}$ 聚焦 10 h 和 $10\ 000\text{ V}$ 聚焦 12 h , 其余条件同I(表1)。

第一向等电聚焦结束后, 将IPG胶条转入平衡

表1 等电聚焦参数

程序	电压 / V	程序	时间 / h	作用
S1	50	step	12	水化
S2	200	step	1	除盐
S3	500	step	1	除盐
S4	1 000	gradient	0.5	升压
S5	10 000	gradient	1.5	升压
S6 (I)	10 000	step	$10\ 000\text{ V}\cdot 6^*$	聚焦
S6 (II)	10 000	step	$10\ 000\text{ V}\cdot 8$	聚焦
S6 (III)	10 000	step	$10\ 000\text{ V}\cdot 10$	聚焦
S6 (IV)	10 000	step	$10\ 000\text{ V}\cdot 12$	聚焦
S7	500	step	12	保持

*表示电压时间积, 即电压在时间上的积分, 下同。

管中, 每根胶条加 10 mL 平衡液I [$50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $\text{pH } 8.8$; $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素; 20% 甘油; 4% SDS; 1.5 g DTT(用时现加)], 振荡平衡 15 min ; 按每根胶条 10 mL 更换平衡缓冲液II [$50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $\text{pH } 8.8$; $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素; 20% 甘油; 4% SDS; 2.5 g 碘乙酰胺(用时现加)], 振荡平衡 15 min 。

6 第二向 SDS-PAGE 电泳

分离胶浓度会影响蛋白质分离的清晰度, 先在

JY000凝胶电泳系统中保持恒流做单向电泳,用同样样品对10%、12%和15%等3个凝胶浓度进行筛选,用分离效果较好的凝胶浓度(12%)制备第二向电泳的SDS-聚丙烯酰胺凝胶。

将平衡好的IPG胶条移至1 mm厚的连续12%均匀分离胶上,并在其一端加SDS标准蛋白质分子量标准,排净气泡后用1%琼脂糖凝胶封闭,放入Ettan DALT six凝胶电泳系统进行电泳,16 °C循环水冷却,用每块胶2 W的恒功率电泳30 min,再换用每块胶8 W的恒功率电泳,直至溴酚蓝指示剂到达距胶底边约1 cm处停止。

7 凝胶染色

凝胶染色采用胶体考马斯亮蓝染色法(Candiano等2004)。电泳结束后,将凝胶立即置于固定液[40% (V/V)甲醇,10% (V/V)冰乙酸]中,固定45 min;用Millipore超纯水漂洗15 min,重复4次。洗涤完毕后置于胶体考马斯亮蓝染色液[0.12% (W/V) G-考马斯亮蓝,10% (W/V)硫酸铵,10% (V/V)磷酸,20% (V/V)甲醇]中染色过夜。用Millipore超纯水漂洗脱色,直到蛋白点清晰为止。

8 图像的扫描与分析

脱色后的凝胶使用alpha凝胶成像系统扫描获

取图像;用ImageMaster™ 2D Platinum software V5.0分析软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配及获取斑点位置坐标等。

结果与讨论

1 不同聚焦时间对双向电泳图谱的影响

等电聚焦是否充分直接影响蛋白质分离的效果。样品中的盐离子会对电泳造成干扰,当样品溶液中的盐离子浓度超过100 mmol·L⁻¹时,将严重影响等电聚焦的进行,表现为双向图谱中产生横向拖尾或造成蛋白丢失(曾维英等2007)。本文在蛋白质提取过程中,通过增加丙酮洗涤蛋白沉淀的次数来去除样品中的盐离子,同时通过在等电聚焦程序中增加低电压除盐过程,采用逐步升压的方法,使蛋白样品在等电聚焦时能顺利达到预设的聚焦高电压10 000 V,在其他条件不变的情况下,第一向IEF等电聚焦的电压设置决定了聚焦的效果。在样品制备方法、上样量、平衡时间、SDS-PAGE凝胶浓度和染色方法一致的情况下,比较了4种等电聚焦条件(I, II, III, IV)下的双向电泳图谱的效果。如图1所示,聚焦条件为100 000 V·h时,2-DE图谱上水平和垂直条纹较少,蛋白点较多、清晰,聚焦

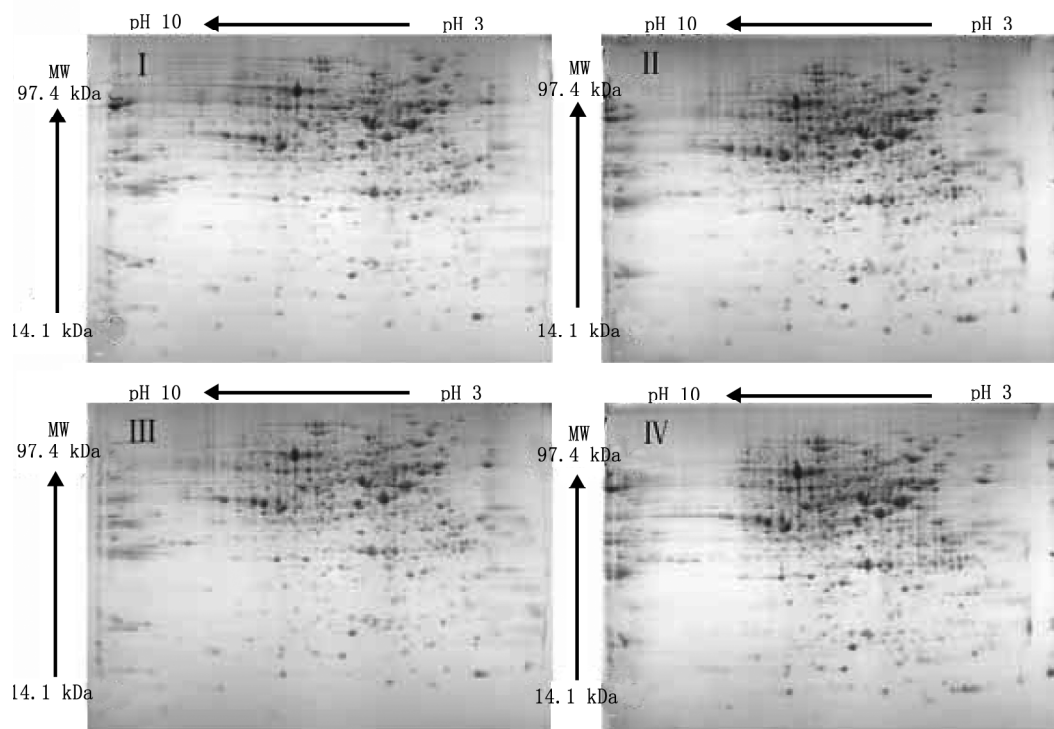


图1 等电聚焦条件对玉米花丝蛋白质双向电泳图谱的影响

效果最好。聚焦时间减少或延长,都会产生横向拖尾或条纹。

2 不同丙烯酰胺浓度对蛋白质分辨率的影响

分离胶浓度会影响蛋白质分离的清晰度,本文探讨了10%、12%和15%的分离胶对花丝蛋白质的分离效果(图2)。结果表明,分子量14 kDa以下的蛋白质在10%的分离胶中未能得到分离,且条带不够清晰。蛋白点在12%的分离胶中能充分分开,且条带清晰。15%的分离胶能够分开小分子的蛋白质,但是大分子的蛋白质有的重叠,有的不够清晰,而且蛋白前沿离溴酚蓝前沿还有一段较长的距离,说明胶浓度太大。根据以上结果认为,分离玉米花丝蛋白质的分离胶最适浓度为12%。

3 不同上样量对蛋白质分辨率的影响

选择合适的上样量对获取高质量的双向凝胶电泳图谱非常重要。过低的蛋白质上样量不利于低丰度蛋白点的检出;而过高的上样量得到的蛋白质点甚至比上样量过低时更少,这是由于聚焦过程中蛋白质浓度过高而在胶槽中沉淀,不能很好地进入IPG胶条中所致(陈蕊红等2008)。蛋白质上样量的确定,不仅与IPG胶条的长度及pH值范围有关,也与蛋白质染色方法有关。本文采用的胶体考

马斯亮蓝染色法结合了传统的考马斯亮蓝染色法和硝酸银染色法的优点,目前已得到广泛应用(徐幼平等2007;何文锦等2007)。

以三氯乙酸/丙酮法提取花丝蛋白,选用24 cm、pH 3~10 IPG胶条,分别取800、1 000和1 200 μg 蛋白样品进行双向电泳的结果(图3)显示,在上样量为800 μg 时,双向电泳图谱上蛋白点模糊,蛋白点数量少,低丰度蛋白因而不能检测到而丢失,从而影响了双向电泳的准确性和重复性(图3-a)。在上样量为1 200 μg 时,蛋白点较多,但高丰度蛋白点过大,出现饱和和重叠现象,掩盖了其余蛋白斑点,2-DE胶图谱上横条纹比较明显,影响了蛋白质点的分离与分析(图3-c)。蛋白上样量为1 000 μg 时,蛋白点清晰,无横条纹干扰,聚焦效果好,图谱质量最佳(图3-b)。

4 三种方法提取的蛋白质样品双向电泳效果比较

蛋白质样品制备是双向电泳中最关键的环节,不同样品要选择最合适的制备方法。在蛋白质样品制备过程中,应注意保持在低温环境下操作,防止蛋白质的修饰或降解。保证样品在液氮中充分研磨,通过适当增加丙酮洗涤蛋白沉淀的次数尽量多的去除杂质。

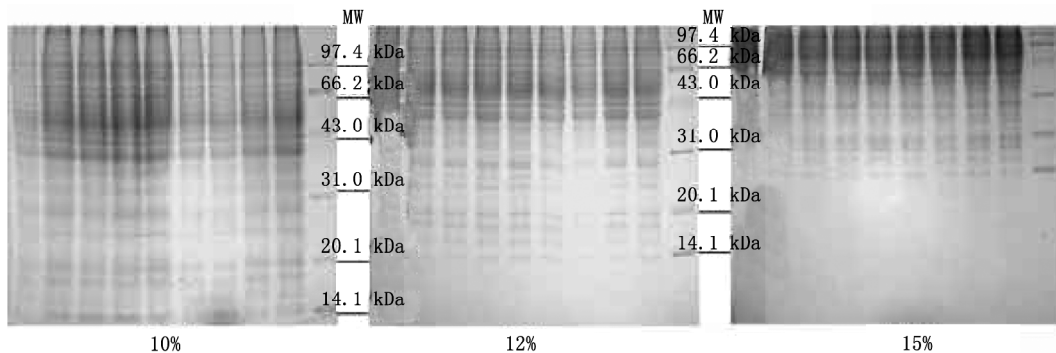


图2 不同浓度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶对玉米花丝总蛋白分离效果的影响

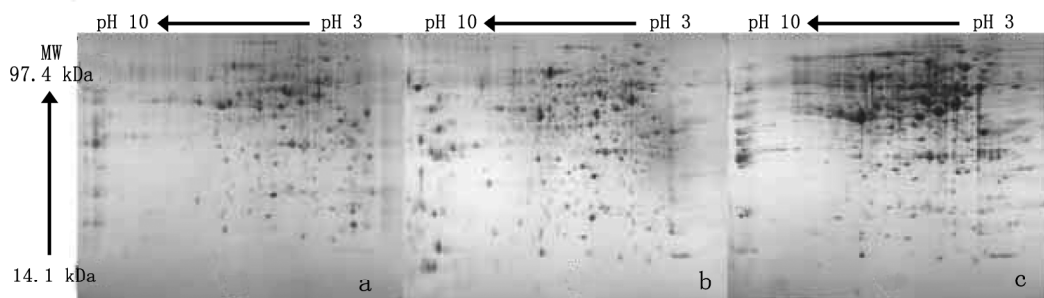


图3 凝胶浓度为12%时不同上样量的双向电泳图谱比较
上样量分别为 a: 800 μg ; b: 1 000 μg ; c: 1 200 μg 。

样品制备可分为蛋白质样品的提取、裂解液配方的选择、杂质的去除等步骤。本文通过比较前人研究结果,采用能够较大限度溶解蛋白的裂解液配方(Lee 2008),分别以酚提取法、三氯乙酸/丙酮法和改良的酚提取法提取蛋白,对使用3种提取法获得的样品进行Bradford法蛋白定量分析,蛋白质上样量为1 000 μg;分离胶为24 cm、pH 3~10 IPG胶条;12% SDS-PAGE进行双向电泳分离。胶体考马斯亮蓝染色后的结果(图4)显示,用酚提取法提取蛋白质所得的2-DE图谱(图4-b)蛋白点较模糊,分辨率低,横竖条纹干扰偏大;同时,由于样品中含有较多的盐离子等杂质,等电聚焦时电流比较

大。改良的酚提取法提取蛋白质样品所得到的2-DE图谱质量有明显改善(图4-c),而三氯乙酸/丙酮法所得到的2-DE胶图谱蛋白点分布均匀,蛋白点呈清晰的圆形,凝胶背景干净,横竖条纹干扰少(图4-a),图谱质量最佳。

用ImageMaster™ 2D Platinum software V5.0分析软件进行了点检测及统计分析,在相同的参数设置条件下,酚提取法在胶面上可分辨出621个蛋白点,改良的酚提取法可检测到697个蛋白点,三氯乙酸/丙酮法则可检测到675个清晰的蛋白点,比酚提取法多54个蛋白点,与改良的酚提取法差别不大。与其他2种方法相比,三氯乙酸/丙酮法操作

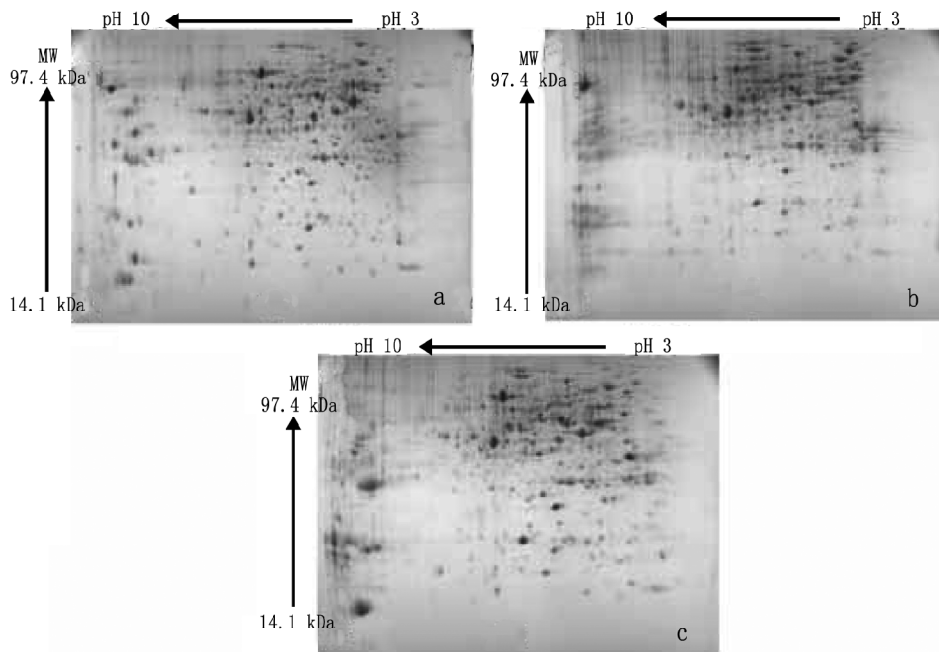


图4 不同提取方法的玉米花丝双向电泳图谱比较
a: 三氯乙酸/丙酮法; b: 酚提取法; c: 改良的酚提取法。

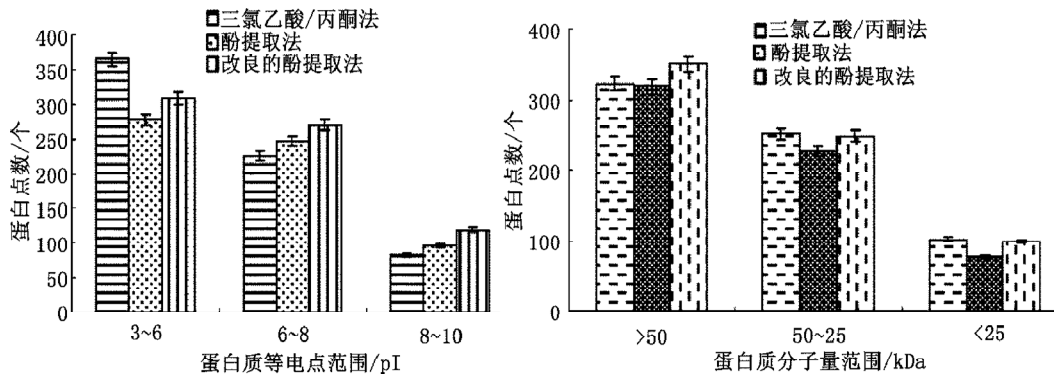


图5 三种样品制备方法提取蛋白的分子量和等电点的分布

更为简便, 在等电点3~6偏酸性区域和中低分子量范围内可检测到的蛋白点较多(图5)。

总之, 以三氯乙酸/丙酮法提取玉米花丝组织中的蛋白; IEF上样量为1 000 μg , 聚焦条件为100 000 V·h; 在浓度为12%的聚丙烯酰胺凝胶中进行SDS-PAGE, 是较适合玉米花丝蛋白质双向电泳的条件。

参考文献

- 陈蕊红, 张改生, 刘卫, 叶景秀, 牛娜(2008). 小麦花药蛋白质组双向电泳技术体系的优化. 核农学报, 22 (4): 404~409
- 郭尧君(2005). 蛋白质电泳实验技术(第二版). 北京: 科学出版社, 195~213
- 何文锦, 郭晋隆, 陈由强, 林思祖, 陈如凯(2007). 灰木相思蛋白质组双向电泳条件的优化. 西北植物学报, 27 (8): 1577~1582
- 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
- 曾维英, 杨守萍, 喻德跃, 盖钧镒(2007). 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS2A 及其保持系的花药蛋白质组比较研究. 作物学报, 33 (10): 1637~1643
- 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
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis, 25: 1327~1333
- Damerval C, Vienne DD, Zivy M, Thiellement H (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis, 7 (11): 52~54
- 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
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W (1999). Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. Electrophoresis, 20 (4-5): 712~717
- Hurkman WJ, Tanaka CK (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. Plant Physiol, 81 (3): 802~806
- Kamo M, Kawakami T, Miyatake N, Tsugita A (1995). Separation and characterization of Arabidopsis thaliana proteins by two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis, 16 (3): 423~430
- Lee K (2008). Evaluation of an effective sample prefractionation method for the proteome analysis of breast cancer tissue using narrow range two-dimensional gel electrophoresis. Biosci Biotechnol Biochem, 72 (6): 1464~1474
- Shen S, Jing Y, Kuang T (2003). Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. Proteomics, 3 (4): 527~535
- Song X, Ni Z, Yao Y Y, Xie C, Li Z, Wu H, Zhang Y, Sun Q (2007). Wheat (*Triticum aestivum* L.) root proteome and differentially expressed root proteins between hybrid and parents. Proteomics, 7 (19): 3538~3557
- Swinbanks D (1995). Government backs proteome proposal. Nature, 378: 653
- Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. Electrophoresis, 27: 2782~2786