

技术与方法 Techniques and Methods

黄瓜子叶节的蛋白质组双向电泳条件的优化

李凤玉^{1,*}, 潘德灼¹, 陈伟²¹福建师范大学生命科学学院, 福州 350108; ²福建农林大学生命科学学院, 福州 350002Optimization of Two-dimensional Electrophoresis for Proteome of *Cucumis sativus* L. Cotyledonary NodeLI Feng-Yu^{1,*}, PAN De-Zhuo¹, CHEN Wei²¹College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; ²College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

摘要: 对黄瓜离体子叶节的蛋白质双向电泳的条件进行优化的结果表明: 黄瓜子叶节蛋白质主要分布在pH 4~7范围, 用酚抽提法制备蛋白质干粉, 第一向等电聚焦固相 pH 梯度胶条(24 cm)的最适蛋白上样量为 1 200 µg, 第二向 SDS-PAGE 采用 11.5% 的分离胶, 可以得到 1 100 多个蛋白点。

关键词: 黄瓜子叶节; 蛋白质组; 双向电泳

蛋白质双向电泳(2-DE)技术是由 O'Farrell (1975)创立的, 是差异蛋白质组学研究的重要技术, 也是蛋白质检测和质谱分析一类等后续工作前的关键性一步。近年来, 双向电泳技术广泛应用于植物学的研究, 在蛋白质水平上探讨水稻(Shen 等 2003)、小麦(范宝莉等 2004)和荔枝(陈伟等 2001)等植物的生长发育机制。由于双向电泳涉及的环节较多、植物材料的多样性以及植物组织中存在干扰电泳的代谢产物, 因此, 双向电泳条件往往对电泳结果影响较大。杉木(杨梅等 2007)、白桦树(宋学东等 2006)和山豆(吴庆丰等 2006)的蛋白质双向电泳技术已有所报道。

黄瓜是研究植物成花和性别表达机理的常用材料(陈惠明等 2005; 庞基良等 1999; 徐纪明和向太和 2007)。近年来, 已有人将双向电泳技术用于黄瓜蛋白质差异的研究(范海延等 2007; 屈中华等 2007), 但是技术尚不够成熟。本文从总蛋白抽提方法、第一向等电聚焦 pH 范围、蛋白质上样量以及 SDS-PAGE 分离胶浓度等方面进行了探讨, 为植物蛋白质组学研究提供实验技术参考。

材料与amp;方法

1 材料

材料为本实验室组织培养的黄瓜(*Cucumis sativus* L.)幼苗离体子叶节。黄瓜品种‘早丰 1 号’

种子购自大连园艺北方种业研发中心。

2 试剂和仪器

固相 pH 梯度(IPG)胶条、IPG 缓冲液、两性电解质(ampholyte)、丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、二硫苏糖醇(DTT)、尿素、硫脲、二甲氨基丙磺酸(CHAPS)、β-巯基乙醇(β-Me)、过硫酸铵(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、碘乙酰胺(IAA)、牛血清白蛋白(BSA)、Tris-饱和酚 pH 8.0, 以上均为进口试剂。所有溶液均用双蒸水(dd H₂O)配制。

IPGphor 等电聚焦仪和 Ettan DALT six 垂直电泳仪(Amersham Pharmacia Biotech 公司), 高速冷冻离心机(BECKMAN 公司)。

3 蛋白质样品的提取和制备

采用三氯乙酸(TCA)-丙酮法和酚抽提法(刘康等 2005)制备黄瓜离体子叶节的蛋白质干粉。取 20~30 mg 蛋白质干粉, 加入 15 倍体积的裂解液[7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、4% (W/V) CHAPS、2% (V/V) 两性电解质和 65 mmol·L⁻¹ DTT]混合均匀后, 置于 35 °C 恒温水浴中 2.5 h, 于常温下, 以 20 000×g 离心 5 min, 取上清液。以 Bradford (1976)的方法

收稿 2008-06-04 修定 2008-09-18

资助 福建省自然科学基金(B0510007)和福建省科技厅项目(K04025)。

* 通讯作者(E-mail: fylf@fjnu.edu.cn; Tel: 13067253699)。

测定样品中蛋白质含量,以牛血清蛋白为标准蛋白。

4 双向电泳

向胶条槽中加入 450 μL 含样品的水化液[7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲、2% (W/V) CHAPS、0.5% (V/V) IPG 缓冲液、18 mmol·L⁻¹ DTT 和痕量溴酚蓝],放入胶条后滴加覆盖油,盖上胶条槽盖子,置于 IPGphor 上,等电聚焦(IEF)条件为 20^o, 50 $\mu\text{A}\cdot\text{胶}^{-1}$, 电压和时间参数为: 30 V (12 h) 200 V (1 h) 500 V (1 h) 1 000 V (1 h) 1 000~8 000 V (0.5 h) 8 000 V (5 h) 1 000 V (2 h)。

等电聚焦后,迅速取出 IPG 胶条,分别于平衡液 I 和平衡液 II [平衡液: 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8)、6 mol·L⁻¹ 尿素、30% (V/V) 甘油、2% (W/V) SDS、痕量溴酚蓝。第 1 次平衡每 10 mL 平衡液加入 100 mg DTT 即平衡液 I, 第 2 次平衡每 10 mL 平衡液加入 250 mg IAA 即平衡液 II] 中平衡 15 min 后取出的胶条用滤纸小心吸去残余平衡液,再用电极缓冲液[0.025 mol·L⁻¹ Tris、0.192 mol·L⁻¹ 甘氨酸、0.1% (W/V) SDS, pH 8.3] 润洗 1 s, 并转移至第二向 SDS-PAGE 胶上。

平衡好的 IPG 胶条移至分离胶上端,放入 Ettan DALT six 电泳仪进行电泳,先 10 mA·胶⁻¹ 电泳 30 min, 后用 30 mA·胶⁻¹ 电泳,示踪的溴酚蓝行至凝胶底部边缘时停止电泳。

5 考马斯亮蓝染色

电泳结束后,凝胶用蒸馏水冲洗后并用染色液 [0.03% (W/V) 考马斯亮蓝 R-250、50% (V/V) 甲醇、10% (V/V) 乙酸] 染色 2 h 后,进行脱色处理直

至背景变浅和蛋白点清晰可见,脱色后的凝胶用蒸馏水冲洗 3 次后用 Image Scanner 扫描仪扫描。

结果与讨论

1 蛋白质干粉制备方法的比较

双向电泳中等电聚焦胶条合宜的 pH 与清晰可辨的双向电泳图的获得关系极大,有利于蛋白质差异的比较(Görg 等 2000)。本文中黄瓜离体子叶节的大部分蛋白质分布在 pH 4~7 范围内的酸性一端。因此认为,分离黄瓜离体子叶节应选择 pH 4~7 的 IPG 胶条。

蛋白质干粉制备是双向电泳的关键步骤,它的好坏直接决定着双向电泳的分辨率、重复性和蛋白质谱的清晰度(Bodzon-Kulakowska 等 2007; Giavalisco 等 2003)。在蛋白质提取过程中,如何去除影响蛋白质可溶性和双向电泳重复性的物质(如核酸、脂类和多糖等生物大分子以及盐类小分子)很重要(郭尧君 2005)。大分子物质会阻塞凝胶孔径;盐浓度过高会降低等电聚焦的电压,甚至损坏 IPG 胶条。另外,植物材料蛋白质含量也很重要,而且植物组织中含有的色素、酚、醌、多糖等代谢产物也会对后续的蛋白质分离和鉴定有影响(Bodzon-Kulakowska 等 2007)。因此,蛋白质提取方法是获取差异蛋白的关键。本文比较两种蛋白质干粉的制备方法,即 TCA-丙酮法(图 1-a)和酚抽提法(图 1-b),上样量为 1 200 μg , 12% 分离胶。

图 1 结果经 Image Master 2D 软件分析得出, TCA-丙酮法提取的蛋白质干粉经双向电泳后得到的蛋白点约有 450 个,而酚抽提的蛋白点约有 840

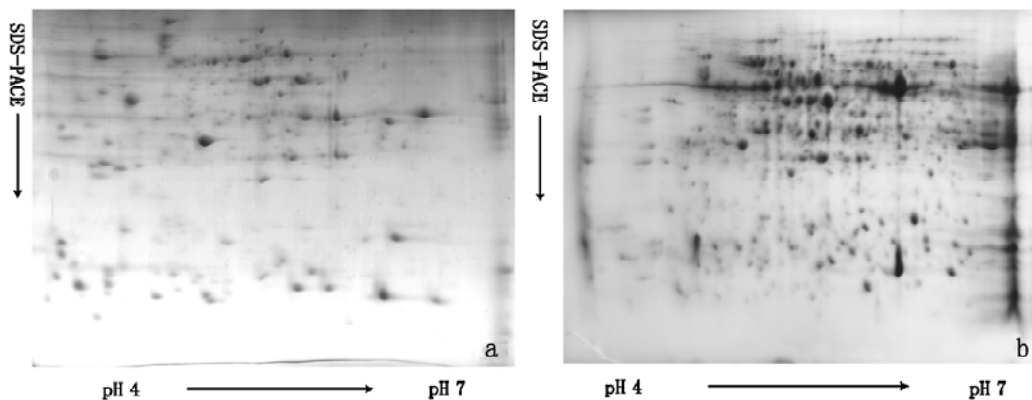


图 1 不同蛋白质干粉制备方法双向电泳图谱的比较

a: TCA-丙酮法; b: 酚抽提法。

个, 比 TCA-丙酮法多近 400 点, 且各点的分离比较清晰, 能满足双向电泳分析的需要。因此认为, 酚抽提法更适合黄瓜离体子叶节中总蛋白质的提取。

但 TCA-丙酮法虽然能有效地抑制蛋白酶的活性, 避免蛋白质降解, 可本文采用的黄瓜离体子叶节中含有较多的多糖(如细胞壁中的果胶和纤维素)等代谢产物, 会随着离心而沉淀下来, 以致蛋白质干粉中的各类杂质增多, 对双向电泳会有不良效果。酚抽提法是先将于液氮下研磨呈粉末的组织材料溶解在蛋白质提取液中, 这样以酚抽提蛋白质后, 再在蛋白质溶液中加入蛋白质沉淀剂, 离心得到蛋白质沉淀物。所以认为, 酚抽提法得到的蛋白质干粉中的杂质少, 可较好地避免多糖等物质的干扰。

2 样品溶液蛋白上样量的比较

双向电泳的第一向 IEF 聚焦效果的好坏直接影响蛋白质分离的好坏。在 IEF 过程中, 样品溶液中不能有太多的离子, 否则聚焦时电压升得很慢甚至升不到所设定的电压, 从而影响聚焦的效果(郭尧君 2005)。一般来说, 植物细胞内大部分蛋白质的

表达丰度很低, 所以提高样品的上样量会有利于低丰度蛋白的检出, 但上样量过高又会引起高丰度蛋白的斑点掩盖低丰度蛋白斑点, 而且样品中含有盐离子, 上样量越大盐离子也越多, 盐离子浓度会直接影响等电聚焦时电压的上升, 从而影响聚焦效果(Giavalisco 等 2003)。本文从样品制备方法、第一向 IEF 等电聚焦的电压设置、平衡时间、SDS-PAGE 凝胶浓度和染色方法的灵敏度等综合考虑, 比较上样量为 1 000、1 200 和 1 400 μg 蛋白的结果表明, 上样量为 1 000 μg 的蛋白质呈圆形, 检出的蛋白点约有 620 个, 低丰度蛋白检出的量很少(图 2-a); 上样量为 1 200 μg , 蛋白点呈圆形, 横向与纵向拖尾较少, 蛋白点分离均匀, 检出的蛋白点增加到了 1 100 多个, 低丰度蛋白数量也明显增加(图 2-b); 上样量为 1 400 μg , 由于上样量过大, 使样品溶液中的杂质及离子含量增大, 在 IEF 过程中电压上升缓慢, 等电聚焦效果较差(图 2-c)。据此认为, 最佳的上样量为 1 200 μg 。

3 SDS-PAGE 分离胶浓度的比较

分离胶浓度会影响蛋白质分离的清晰度, 如果

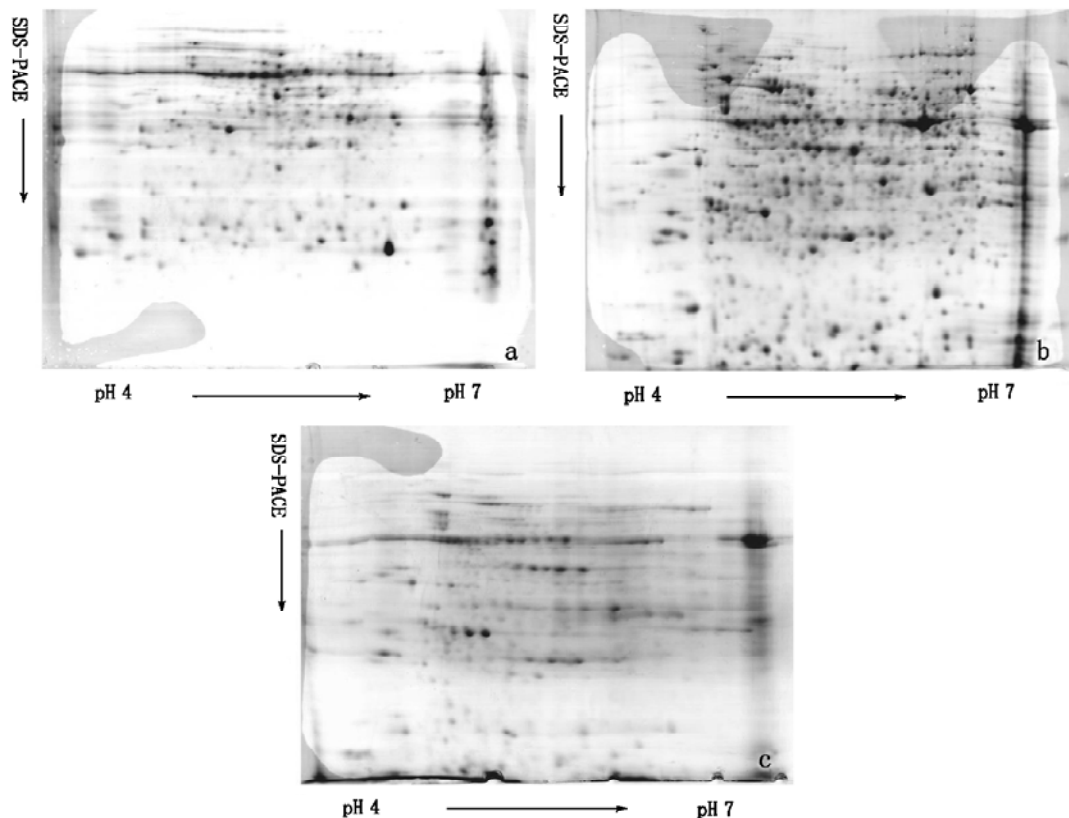


图2 不同上样量的蛋白质双向电泳图谱比较

a: 上样量为 1 000 μg ; b: 上样量为 1 200 μg ; c: 上样量为 1 400 μg 。

胶浓度过大, 蛋白质分离即不够清晰, 而且有的蛋白质点会重叠; 如果胶的浓度过低, 虽然蛋白质点可以较好地分开, 但分子量小的蛋白质点会丢失。因此, 应该寻求相对最适的分离胶浓度。本文探讨 11.0%、11.5%、12.0%、12.5% 的分离胶对黄瓜蛋白质的分离效果表明, 11.0% 的分离胶有部分蛋白点丢失, 且蛋白点不够清晰(图 3-a)。11.5% 的分离胶蛋白点能充分分开, 且蛋白点清晰(图 3-b)。12.0% 的分离胶能够使小分子的蛋白点分开, 但是大分子的蛋白点有的重叠, 有的不够清晰, 而且蛋

白前沿离溴酚蓝还有一段距离, 说明胶的浓度还可以减小(图 3-c)。蛋白点在 12.5% 的分离胶上分离得不很清楚, 离溴酚蓝前沿还有一段较长的距离(图 3-d), 说明胶浓度太大。综合以上结果认为, 分离黄瓜离体子叶节中蛋白质的分离胶的最适浓度为 11.5%。

总之, 黄瓜离体子叶节蛋白质双向电泳用 pH 4~7 的 IPG 线性胶条得到的分离效果较好, 用酚抽提法制备黄瓜离体子叶节蛋白质干粉好, 第一向等电聚焦最适上样量为 1 200 μg , 第二向 SDS-PAGE

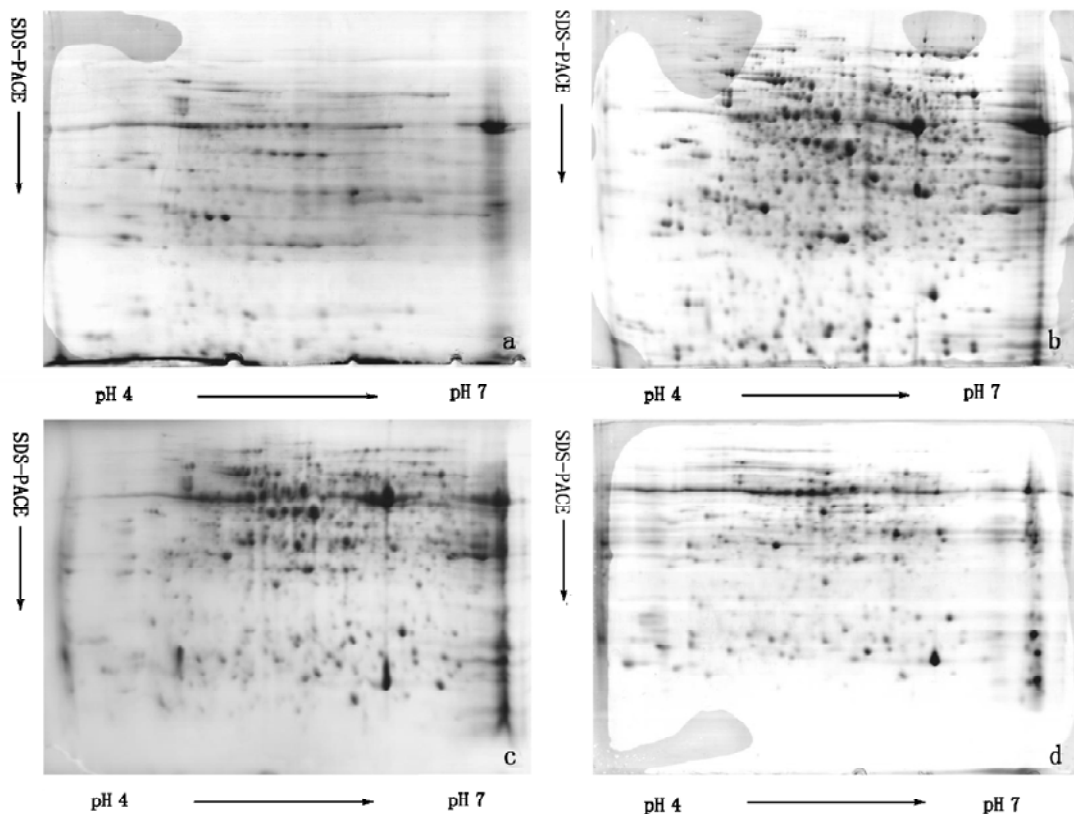


图3 不同分离胶浓度双向电泳图谱的比较

a: 11% 分离胶; b: 11.5% 分离胶; c: 12% 分离胶; d: 12.5% 分离胶。

用 11.5% 的分离胶, 是黄瓜离体子叶节中蛋白质双向电泳的较佳方案, 图谱中蛋白点有 1 100 多个, 图像清晰, 蛋白点的拖尾现象明显减少。

参考文献

- 陈惠明, 卢向阳, 刘晓虹, 易克, 许亮, 田云, 许勇(2005). 两个新发现的黄瓜性别决定基因遗传规律的研究. 园艺学报, 32 (5): 895~898
- 陈伟, 吕柳新, 黄春梅, 周洁, 梁文裕(2001). '乌叶' 荔枝胚胎发育过程特异蛋白的变化. 园艺学报, 28 (6): 504~508

- 范宝莉, 王振英, 陈宏, 彭永康(2004). 小麦 T 型细胞质雄性不育系、保持系蛋白质双向电泳比较研究. 实验生物学报, 37 (1): 45~49
- 范海延, 陈捷, 吕春茂, 张春宇, 孙权(2007). 黄瓜杂交二代抗黄瓜白粉病的蛋白质组学初步分析. 园艺学报, 34 (2): 349~354
- 郭尧君(2005). 蛋白质电泳实验技术. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 215~224
- 刘康, 胡凤萍, 张天真(2005). 棉花胚珠与纤维蛋白质的两种提取方法比较研究. 棉花学报, 17 (6): 323~327
- 庞基良, 张和珠, 梁海曼(1999). 黄瓜去顶苗花决定临界期的研究. 植物生理学报, 25 (1): 93~97

- 屈中华, 薛春生, 刘力行, 陈捷(2007). 生物型种衣剂诱导后黄瓜叶片蛋白质组学初步研究. 安徽农业科学, 35 (21): 6487~6489
- 宋学东, 李慧玉, 姜静, 梁艳(2006). 白桦花芽蛋白质双向电泳技术的建立. 生物技术通讯, 17 (6): 901~903
- 吴庆丰, 王崇英, 王新宇, 李志孝, 王亚馥(2006). 山豆叶片蛋白质双向电泳技术的建立. 西北植物学报, 26 (7): 1330~1336
- 徐纪明, 向太和(2007). 三种模式植物性别决定的研究进展. 亚热带植物科学, 36 (2): 68~72
- 杨梅, 陈伟, 林思祖, 曹光球(2007). 杉木叶片蛋白质组的双向电泳技术优化. 热带亚热带植物学报, 15 (5): 438~442
- Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, Jarzebinska J, Silberring J (2007). Methods for samples preparation in proteomic research. J Chromatog B, 849: 1~31
- 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
- Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H, Gobom J, Klose J (2003). Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. Electrophoresis, 24: 207~216
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21: 1037~1053
- O'Farrell PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem, 250 (10): 4007~4021
- Shen S, Sharma A, Komatsu S (2003). Characterization of proteins responsive to gibberellin in the leaf-sheath of rice (*Oryza sativa* L.) seedling using proteome analysis. Biol Pharm Bull, 26 (2): 129~136