

不同提取液对巴西橡胶树橡胶粒子蛋白质提取和分离的影响

代龙军, 黎瑜, 聂智毅, 康桂娟, 段翠芳, 曾日中*

中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 海南儋州571737

摘要: 橡胶粒子是巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)乳管细胞内进行橡胶生物合成的亚细胞结构; 对橡胶粒子的蛋白质组学研究, 可为揭示天然橡胶生物合成机理提供线索。采用5种提取液分别提取橡胶粒子蛋白, 并对橡胶粒子蛋白进行SDS-PAGE和16-BAC/SDS-PAGE电泳分离及MALDI TOF/TOF串联质谱分析, 证明不同提取液抽提的橡胶粒子蛋白具有不同组成, 发现分子量较高的橡胶延伸因子家族蛋白更难从橡胶粒子上被洗脱和提取。通过检索橡胶树转录组数据库, 鉴定了3个新的橡胶粒子蛋白, 即醌氧化还原酶、含蓖麻毒素B链凝集素结构域蛋白及枯萎/脱水相关蛋白。本研究建立的橡胶粒子蛋白质提取和分离方法, 为进一步鉴定低丰度和具有重要功能的橡胶粒子蛋白提供了参照体系。

关键词: 巴西橡胶树; 橡胶粒子; 蛋白质; 提取液

Effects of Different Solutions on Extraction and Separation of Rubber Particle Proteins of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

DAI Long-Jun, LI Yu, NIE Zhi-Yi, KANG Gui-Juan, DUAN Cui-Fang, ZENG Ri-Zhong*

State Key Laboratory Incubation Base, Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Rubber particles are organelles responsible for the biosynthesis of natural rubber in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Proteomics investigations into rubber particles may provide clues for elucidating the mechanisms of natural rubber biosynthesis. In this study total proteins extracted from rubber particles using five different buffers were subjected to SDS-PAGE and 16-BAC/SDS-PAGE analysis, respectively, and then analyzed by MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry. The data demonstrated that rubber particle proteins extracted with different buffers had different components, and proteins with higher molecular weight in the rubber elongation factor family were not easily extracted from the rubber particles. Three novel rubber particle proteins, quinone oxidoreductase, protein containing ricin B chain lectin domain, and senescence/dehydration-related protein, were identified through searching a transcriptome database of *H. brasiliensis*. Our study establishes a reference system which is helpful to identify novel rubber particle proteins with low-abundance and important biological functions.

Key words: *Hevea brasiliensis*; rubber particle; protein; extraction buffer

尽管世界上存在约2 500种产胶植物, 但是工业用途天然橡胶几乎都来自巴西橡胶树(Mooibroek和Cornish 2000; Cornish 2001)。巴西橡胶树韧皮部的乳管细胞生产胶乳; 胶乳中主要包含橡胶粒子、C-乳清、黄色体、Frey-Wyssling粒子等成分。橡胶粒子是乳管细胞中数量最多的细胞器, 占胶乳总体积30%~40%、占胶乳干重90% (Jacob等1993)。橡胶粒子是巴西橡胶树进行橡胶生物合成与储存的细胞器, 具有半单位膜结构(Cornish等1999), 橡胶生物合成发生于橡胶粒子表面, 膜结合的橡胶转移酶或酶复合体催化异戊二烯焦磷酸多

聚化为天然橡胶(Archer等1963; McMullen和McSweeney 1966; Cornish 2001)。然而, 橡胶转移酶及其蛋白质辅助因子至今未能确认, 天然橡胶多聚化机理及天然橡胶分子量决定机制尚不清楚。

为了寻找与橡胶转移酶及其辅助蛋白质因子, 我们开展了针对橡胶粒子的蛋白质组学研究, 如

收稿 2013-06-04 修定 2013-08-13

资助 国家自然科学基金(31270713)、中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(1630022013014)和海南省自然科学基金(312028)。

* 通讯作者(E-mail: hnzrz@aliyun.com; Tel: 0898-23300776)。

橡胶粒子蛋白质表达谱研究(段翠芳等2006; 代龙军等2012; Dai等2013)及大小橡胶粒子差异表达蛋白质组学研究(Xiang等2012; 项秋兰等2012)。我们发现洗涤过的橡胶粒子仍存在许多来自其他亚细胞结构和C-乳清的蛋白质(代龙军等2012)。采用不同提取液抽提的橡胶粒子蛋白质, 所获得的SDS-PAGE图谱存在较大差异(Cornish等1993; Dennis和Light 1989; Wititsuwannakul等2004; Wang等2010; 吴坤鑫等2008), 反映出所提取的橡胶粒子蛋白质具有不同的组成。

本文采用提取能力不同的提取液抽提橡胶粒子蛋白质, 并进行电泳分离和质谱鉴定, 一方面可以区别与橡胶粒子结合紧密程度不一的蛋白质, 为分析蛋白质的功能及亚细胞定位提供线索; 另一方面, 依靠不同提取液对特定蛋白质的偏好, 相对地富集某些丰度较低的蛋白质, 有利于这些蛋白质的电泳分离和新蛋白质的鉴定。

材料与amp;方法

1 化学试剂与溶液

1.1 化学试剂

16-BAC (benzyltrimethyl-*n*-hexadecylammonium chloride)为Sigma Aldrich公司产品。Bradford蛋白质浓度测定试剂盒为碧云天生物技术研究所产品。蛋白分子量标准为Fermentas公司产品。Tris碱、甘氨酸为BIO BASIC INC产品。尿素、硫脲、咪唑、Triton X-100 (以下简称TX-100)、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸 {3-[3-(cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate, CHAPS}、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、DTT、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵(APS)、溴酚兰、考马斯亮兰(CBB) R-250为Amresco公司产品。蛋白酶抑制剂混合物(cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets)购自Roche Applied Science。琼脂糖为BIO WEST公司产品。三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)及其他试剂为国产分析纯。

1.2 溶液

各种溶液按以下方法配制。橡胶粒子洗涤缓冲液: 10 mmol·L⁻¹ Tris, 250 mmol·L⁻¹蔗糖, 用HCl调节pH至7.0。Na₂CO₃提取液: 100 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃ (Fujiki等1982a, b; Braun等2009)。基本提取液: 50

mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹咪唑, 2 mmol·L⁻¹ 6-氨基己酸, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 用HCl调节pH至7.0 [该配方参考Wittig等(2006)文献, Wittig等在该配方的基础上分别加入TX-100、digtonin (洋地黄皂甙)、dodecylmaltoside (十二烷基麦芽糖苷)等温和去垢剂组成提取液以提取线粒体中的蛋白质复合体。本文采用的3种提取液亦以该配方为基础, 加入TX-100、CHAPS、SDS等去垢剂, 为方便陈述将该配方提取液称为“基本提取液”。向基本提取液按 W/V 分别加入去垢剂, 获得1% TX-100、1% CHAPS和1% SDS提取液。取蛋白酶抑制剂混合物片剂1片, 溶于1 mL含7 mol·L⁻¹脲和2 mol·L⁻¹硫脲的溶液中, 配成10倍储液。

2 实验方法

2.1 橡胶粒子制备方法

实验用胶乳采集自正常割胶的巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)无性系‘热研7-33-97’, 割龄为3年。将胶乳收集到冰浴中的离心管内, 带回实验室。4 °C 16 000 r·min⁻¹离心(离心力为30 996×g, Beckman Avanti-J25离心机, JA-25.50定角转子) 1 h, 挖取上层橡胶粒子(中层为C-乳清液相组分, 下层为黄色体为主的固相组分)。转移橡胶粒子层至盛有5倍体积预冷(4 °C)橡胶粒子洗涤缓冲液的烧杯, 搅拌成均匀悬液, 4 °C 16 000 r·min⁻¹离心10 min收集橡胶粒子层; 共洗涤3次。

2.2 蛋白质提取方法

2.2.1 用提取液从橡胶粒子抽提蛋白质 取用上述各种提取液, 按提取液:橡胶粒子湿重=5:1混合, 置于冰水浴中磁力搅拌30 min, 使蛋白质从橡胶粒子溶解入提取液中。转移提取液/橡胶粒子混合物到离心管, 4 °C 16 000 r·min⁻¹下离心1 h, 用12号穿刺针穿透乳酪状固相上层(含破碎的橡胶粒子成分, 如橡胶烃等), 用注射器抽取液相的下层清液。将抽取的含蛋白质提取液于4 °C 32 000 r·min⁻¹下离心(离心力87 793×g) 45 min (Beckman Optima L-100XP离心机, 41Ti水平转子), 用注射器移除上层漂浮的残余颗粒成分, 得到澄清的含蛋白质的提取液。

2.2.2 超滤浓缩法制备蛋白质样品 2种不含去垢剂提取液(Na₂CO₃提取液和基本提取液)抽提的蛋白质采用本法进行浓缩与溶液替换。将上述澄清的含蛋白质提取液分别装入分子截留量

(molecular weight cut off, MWCO)为10 kDa的超滤管(Millipore)中以3 000×g离心力浓缩至原体积的1/30 (由15 mL浓缩至0.5 mL), 然后加入含6 mol·L⁻¹脲和2 mol·L⁻¹硫脲的溶液至15 mL, 再次离心浓缩至0.5 mL, 加入蛋白酶抑制剂混合物储液(最终体积的1/10), 于-20 °C保存。

使用这2种提取液从相同重量的橡胶粒子所提取的蛋白质浓度过低, 不适合使用TCA/丙酮沉淀法进行浓缩和溶液替换, 因而使用超滤管直接进行浓缩及溶液替换。

2.2.3 TCA/丙酮沉淀法制备蛋白质样品 3种含去垢剂提取液抽提的橡胶粒子蛋白质采用本法浓缩。向澄清的含蛋白质提取液加入4倍体积分含10% TCA、90%丙酮和0.2% DTT的溶液于-20 °C下沉淀过夜。室温下, 14 000 r·min⁻¹离心10 min收集蛋白质沉淀。以含0.2% DTT的预冷丙酮洗涤蛋白质沉淀3次。最后将蛋白质沉淀溶解于含7 mol·L⁻¹脲和2 mol·L⁻¹硫脲的溶液中, 加入蛋白酶抑制剂混合物储液(最终体积的1/10), 于-20 °C保存。

2.3 蛋白质定量

依照试剂盒说明书配制标准样品与绘制标准曲线。将待测样品作适当稀释, 使浓度在标准曲线的线性范围内。使用普通分光光度计进行吸光值测定, 检测波长595 nm。

2.4 SDS-PAGE

方法参见Simpson (2003)文献, 采用20 cm×20 cm玻璃板、1.0 mm封边垫条、宽度为10 mm·孔⁻¹的样品梳制作凝胶。基本提取液抽提的蛋白质上样量为50 μg·泳道⁻¹ (基本提取液所提取的蛋白质种类较少, 且不存在个别蛋白质丰度过高的情况, 采用较小上样量进行SDS-PAGE电泳足以清晰显示有关蛋白质条带), 其他样品上样量为150 μg·泳道⁻¹。

2.5 16-BAC/SDS-PAGE双向电泳

具体实验过程参见Nothwang和Schindler (2009)文献。第一向16-BAC-PAGE分离胶浓度为10%, 上样量为300 μg·泳道⁻¹; 第二向SDS-PAGE采用12%凝胶进行。平衡缓冲液依照Braun等(2009)文献配制, 其组成为50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8, 1.5 mol·L⁻¹尿素, 30% (V/V)甘油, 2% (W/V) SDS。

1% SDS提取液所抽提的蛋白质经过TCA/丙酮沉淀及丙酮洗涤后仍然存在少量SDS, SDS将干扰蛋白质的16-BAC-PAGE分离, 因此对1% SDS提

取液所抽提的蛋白质未进行16-BAC/SDS-PAGE双向电泳。TX-100提取液所抽提的蛋白质其SDS-PAGE条带几乎完全被CHAPS提取液及Na₂CO₃提取液的条带所包含, 因此未对TX-100提取液所提取的蛋白质进行16-BAC/SDS-PAGE双向电泳。

2.6 蛋白质鉴定方法

依据我们先前的方法(代龙军等2012)进行蛋白质条带/点胶块脱色、胶内蛋白质胰蛋白酶水解、MALDI TOF/TOF串联质谱分析、使用获得的质谱数据对NCBI植物蛋白质数据库进行检索。不能通过检索NCBI植物蛋白质数据库获得鉴定的蛋白质条带/点, 则使用转录组数据库作为目标数据库进行检索。

使用获得的质谱数据对转录组数据库进行检索, 方法如下: 依照Rahman等(2013)文献提供的登录号范围从NCBI下载所有巴西橡胶树转录组组装序列(transcriptome shotgun assembly, TSA); 将TSA数据用GPS Explorer (V3.6)软件导入生成本地TSA数据库; 使用该软件所带的MASCOT (V2.1)搜索引擎以质谱数据检索本地TSA数据库。从检索结果中选取最高得分所对应的基因登录号, 将该基因登录号代表的核酸序列在NCBI网站进行tBLASTx比对, 获得同源基因信息, 据此推测基因功能, 实现蛋白质注释。若使用tBLASTx比对不能返回有意义的结果, 则先将TSA进行翻译, 获得氨基酸序列, 再以氨基酸序列在NCBI网站进行BLASTp比对, 通过BLASTp同源蛋白搜索实现蛋白质功能注释。

实验结果

因为质谱鉴定结果中有较多的REF家族蛋白质, 为了便于陈述, 先对该家族蛋白质的分类做简要说明。橡胶粒子中丰度最高的蛋白质被命名为橡胶延伸因子(rubber elongation factor, REF) (Dennis等1989)。在小橡胶粒子中也发现一个与REF同源的高丰度蛋白质, 命名为小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, SRPP) (Oh等1999)。REF和SRPP分别对应于本文中的gi|21689593和gi|14423933。陆续在橡胶树与其他物种发现了更多的REF同源蛋白质, 这些蛋白质形成了一个蛋白超家族, 称REF超家族。依照系统进化分析结果, 按氨基酸序列相似程度可将橡胶树REF家族蛋白

质分为二个亚家族: REF亚家族(包括REF及REF异构体)和SRPP亚家族(包括SRPP及SRPP异构体)(代龙军等2012)。下文提及具体的REF家族蛋白时将同时列出亚家族缩写与gi登录号。

1 5种不同提取液抽提的橡胶粒子蛋白质的SDS-PAGE结果

不同提取液所抽提橡胶粒子蛋白质的SDS-PAGE结果如图1所示,部分条带的蛋白质质谱鉴定结果已在图中标示,便于后文分析。

从图1可见,使用不同提取能力的提取液抽提的橡胶粒子蛋白质的组成有明显差异。首先,含去垢剂的3个提取液(泳道3、4、5)提取能力由弱到强为TX-100<CHAPS<SDS,均可有效提取与橡胶粒子紧密结合的REF (gi|21689593);不包含去垢剂的提取液提取能力较弱,其中基本提取液提取能力又弱于Na₂CO₃提取液。

其次,结合质谱鉴定结果分析可知,REF家族蛋白质与橡胶粒子结合的紧密程度存在差异,在同一亚家族中分子量较大的蛋白质与橡胶粒子结合更紧密。REF亚家族蛋白质与橡胶粒子结合紧密程度: REF (gi|21689593, 14.7 kDa)<REF (gi|38122474, 19.6 kDa)<HbREF2 (23.6 kDa)。使用提取能力较弱的基本提取液及Na₂CO₃提取液时REF (gi|21689593)可被少量抽提,而使用含去垢剂提取液抽提时REF (gi|21689593)被提取的量则显著升高;使用温和去垢剂1% TX-100提取液抽提时REF (gi|38122474)可被少量抽提;使用提取能力更强的1% CHAPS或1% SDS提取液抽提时,REF (gi|38122474)和HbREF2 (gi|387080194)在SDS-PAGE中出现较粗条带。SRPP亚家族蛋白质与橡胶粒子结合紧密程度: SRPP (gi|14423933, 22.3 kDa)<SRPP (gi|37622210, 25.7 kDa)。SRPP (gi|14423933)可被较弱的基本提取液抽提,SRPP (gi|37622210)则需要含Na₂CO₃提取液或含去垢剂提取液才能被提取。

第三,Na₂CO₃提取液抽提的不同种类蛋白质的丰度比较平均,而其他提取液抽提的蛋白质集中于一定分子量范围,个别蛋白质具有极高的丰度。如基本提取液抽提蛋白质主要集中于13~35 kDa, TX-100提取液抽提的蛋白质除REF (gi|21689593)外主要集中于24~52 kDa, CHAPS提取液抽提的蛋白质除REF (gi|21689593)外主要集中于19~38 kDa。

最后,从Na₂CO₃提取液抽提的蛋白质中鉴定了更多种类的蛋白质,基本提取液所抽提的蛋白质包含的蛋白质种类最少。含Na₂CO₃提取液最早由Fujiki等(1982a, b)用于洗涤内质网膜以去除可溶性蛋白质及外周蛋白,后来该溶液成为膜蛋白质组学研究中的洗涤膜结构的常用溶液。从图1可见,尽管Na₂CO₃提取液提取能力弱于SDS提取液,但Na₂CO₃提取液所提取的蛋白质种类的数量接近SDS提取液所提取蛋白质种类的数量。Na₂CO₃提取液不仅能提取非橡胶粒子自身的蛋白质,也能提取橡胶粒子自身的蛋白质REF (gi|21689593)和SRPP (gi|14423933和gi|37622210);这一现象说明洗涤过的橡胶粒子仍然存在大量与之结合不够紧密的蛋白质,也说明橡胶粒子的半单位膜结构比单位膜结构要脆弱。

2 橡胶粒子蛋白质的16-BAC/SDS-PAGE电泳分离及质谱鉴定结果

我们发现16-BAC/SDS-PAGE是适合分离橡

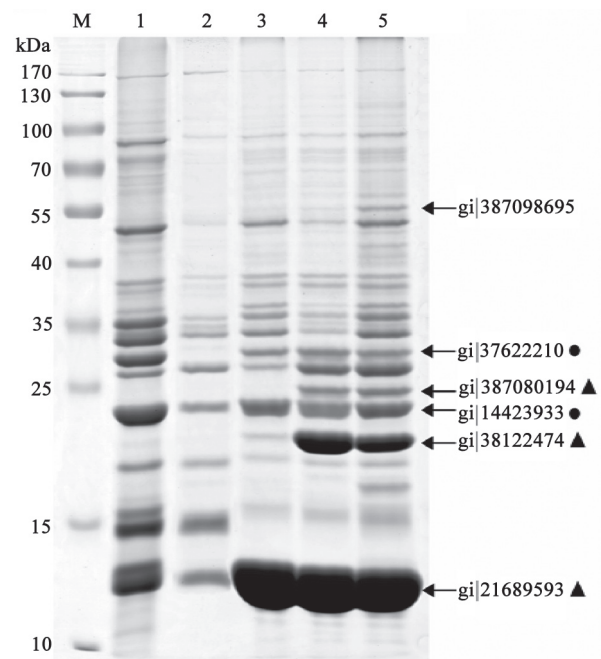


图1 不同方法提取橡胶粒子蛋白质的SDS-PAGE
Fig.1 SDS-PAGE profiles of rubber particle proteins extracted with different buffers

M: 蛋白质分子量标准; 1: Na₂CO₃提取液; 2: 基本提取液; 3: 1% TX-100提取液; 4: 1% CHAPS提取液; 5: 1% SDS提取液。
▲表示REF亚家族蛋白质, ●表示SRPP亚家族蛋白质。其中gi|387080194和gi|387098695为TSA登录号,对应的蛋白质分别为HbREF2和枯萎/脱水相关蛋白。

胶粒子蛋白质的电泳技术(代龙军等2012), 本文仍采用这一电泳技术, 以较高丰度的蛋白质为主要研究对象。

对各种提取液抽提的蛋白质进行电泳分离后, 分别切取SDS-PAGE泳道的蛋白质条带与16-BAC/SDS-PAGE双向电泳的蛋白质点进行质谱鉴定; 依据质谱鉴定结果获得蛋白质条带与蛋白质点的对应关系, 相对应的蛋白质条带/蛋白质点/质谱鉴定结果以相同数字表示。

2.1 含 Na_2CO_3 提取液抽提的橡胶粒子蛋白质

如图2所示, 使用该提取液抽提的蛋白质中, 有些因分子量大小相近不易被SDS-PAGE有效分离, 而在16-BAC/SDS-PAGE双向电泳中得到了较好分离, 如1与2, 3与4, 9与10。

与我们先前的16-BAC/SDS-PAGE分离及质谱鉴定结果(代龙军等2012)相比, 从 Na_2CO_3 提取液抽提的蛋白质中新鉴定了4个蛋白质(表1): 类ASR蛋白1 (ABA-, stress-, and ripening-induced like proteins, 脱落酸、胁迫、成熟诱导蛋白) (2号)、ADP核糖基化因子(3号)、蛋白质延伸因子1 α 亚基(13号)和笼形蛋白重链(15号); 但是也有数个原来鉴定的蛋白质此次未能鉴定, 如柠檬酸结合蛋白、Ras相关蛋白等。造成这种差异的原因可能是:

Na_2CO_3 提取液提取能力弱, 偏向于提取与橡胶粒子松散结合的蛋白质, 同时忽略那些与橡胶粒子结合较紧密的蛋白质; 而我们先前使用的提取液含4% CHAPS、1% NP40、 $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲、 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲(代龙军等2012), 提取能力过强, 导致所抽提蛋白质中REF (gi|21689593)等与橡胶粒子紧密结合的蛋白质含量显著增加, 同时其他与橡胶粒子松散结合的蛋白质相对含量下降。

采用检索转录组数据库的方法, 鉴定了新蛋白质: 醌氧化还原酶(12号)及含蓖麻毒素B链凝集素结构域蛋白(5号) (表2)。醌氧化还原酶涉及醌/半醌的相互转换及NAD(P)H/NAD(P)的相互转换, 参与抗氧化反应(Ross等2000), 因此可能与橡胶树死皮病成因有关。含蓖麻毒素B链凝集素结构域蛋白可能作为一种凝集素参与胶乳凝固或其他的识别反应。Wititsuwannakul等(2008)已经分离鉴定了一个导致橡胶粒子凝聚和胶乳凝固的17 kDa凝集素样蛋白质。

蛋白质条带/蛋白质点依照分子量由小到大的顺序切取并编号, 表1中的蛋白质的理论分子量也基本按照从小到大的顺序排列。但有2个蛋白质的理论分子量与电泳分离的结果不相吻合: 类ASR蛋白1及SRPP (gi|37622210)均是表观分子量

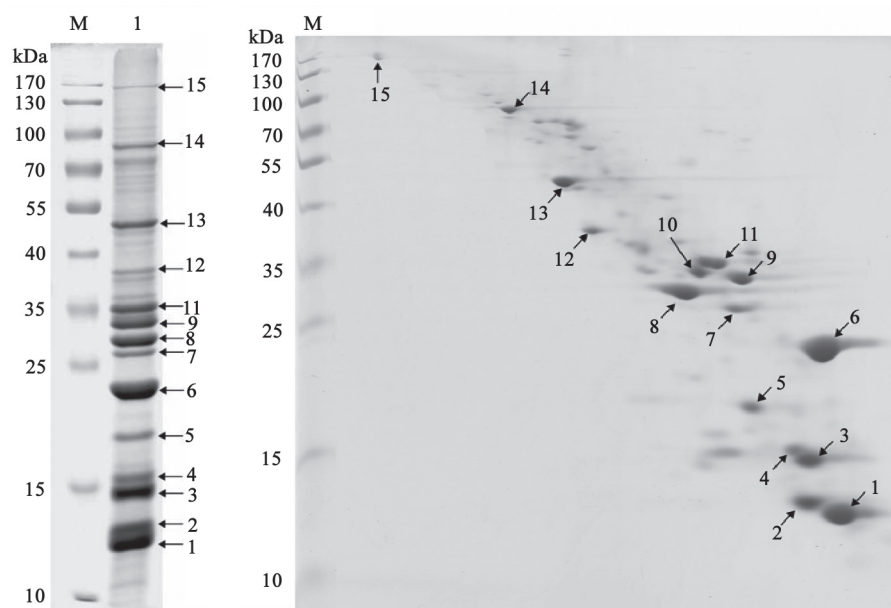


图2 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 提取液抽提橡胶粒子蛋白质的SDS-PAGE及16-BAC/SDS-PAGE对比

Fig.2 SDS-PAGE and 16-BAC/SDS-PAGE of rubber particle proteins extracted with a buffer including $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3

左图为SDS-PAGE结果, 右图为16-BAC/SDS-PAGE结果。图3、4同此。

表1 Na₂CO₃提取液抽提并通过检索NCBI植物蛋白质数据库鉴定的蛋白质Table 1 Proteins extracted with a buffer including Na₂CO₃ and identified by searching against the NCBI viridiplantae protein database

编号	蛋白质名称	NCBI登录号	分子量/kDa	等电点	覆盖率/%	肽段数	蛋白质得分
1	REF (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 21689593	14.7	5.04	92	23	810
2	类ASR蛋白1 (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 37901078	12.1	8.52	52	12	508
3	ADP核糖基化因子(<i>Echinacea angustifolia</i>)	gi 133908607	15.6	5.78	34	6	96
4	亲环素(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 167599641	18.2	9.14	34	6	142
6	SRPP (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 14423933	22.3	4.80	89	24	586
7	壳多糖酶(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 3451147	33.7	8.72	50	19	458
8	SRPP (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 37622210	25.7	8.99	68	17	294
9	β -1,3-葡聚糖苷酶(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 10946499	35.2	9.46	63	28	882
11	β -1,3-葡聚糖苷酶(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 261824816	35.3	9.59	75	14	1 010
13	蛋白质延伸因子1 α 亚基(<i>Malus \times domestica</i>)	gi 4138179	49.5	9.15	30	16	138
14	磷脂酶D α 亚基(<i>Citrus sinensis</i>)	gi 169160465	91.0	5.60	25	26	324
15	笼形蛋白重链(<i>Ricinus communis</i>)	gi 255574808	193.1	5.30	24	48	190

分子量数值中有下划线表示该数值的理论分子量与电泳分离显示的表现分子量不相吻合。

表2 Na₂CO₃提取液抽提并通过检索TSA数据库鉴定的蛋白质Table 2 Proteins extracted with a buffer including Na₂CO₃ and identified by searching against the TSA database

编号	TSA登录号	TSA得分	ORF编码氨基酸残基		同源基因登录号	同源基因名称
			数量	分子量/kDa		
5	gi 387086993	570	183	20.6	gi 313586568*	假定蛋白19 mRNA完整编码序列(<i>H. brasiliensis</i>)
10	gi 387076146	331	314	35.9	gi 255544036	膜联蛋白(<i>Ricinus communis</i>)**
12	gi 387073250	640	329	34.5	gi 255589976	醌氧化还原酶(<i>Ricinus communis</i>)

*: gi|313586568翻译得到的蛋白质为gi|313586569 (假定蛋白19), 在NCBI的保守区数据库(conserved domain database, CDD)中的分类为RicinB_lectin_2 [pfam14200], Ricin-type beta-trefoil lectin domain-like。为表述方便, 将该蛋白质简称为“含蓖麻毒素B链凝集素结构域蛋白”。**: 膜联蛋白的英文名称为annexin。表4同此。

大于理论分子量, 提示这2个蛋白质可能存在糖基化修饰, 在今后的研究中将对此予以验证。

2.2 基本提取液抽提的橡胶粒子蛋白质

基本提取液抽提的橡胶粒子蛋白质经16-BAC/SDS-PAGE双向电泳分离得到11个显著的蛋白质点(图3)。

基本提取液是5种提取液中最弱的一种, 因为采用相同步骤提取与浓缩, 基本提取液所提取的蛋白质不仅包含的条带少, 浓度也低(Na₂CO₃提取液所抽提蛋白质浓度约4.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 而基本提取液所抽提的蛋白质浓度约为1.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 提取能力的强弱, 可能与提取液的极性或pH有关, 如Na₂CO₃提取液呈碱性(约pH 11.5), 而基本提取液pH为7.0。支持基本提取液提取能力最弱的一个例证是SRPP (gi|37622210), 图1显示SRPP (gi|37622210)可被另外4种提取液抽提, 但不能被基本提取液抽提。

基本提取液所提取的蛋白质主要包括壳多糖

酶、 β -1,3-葡聚糖苷酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶等3种典型的非橡胶粒子自身的水溶性蛋白质, 即“污染”蛋白质。其中壳多糖酶、 β -1,3-葡聚糖苷酶(含多个异构体)是在黄色体中高丰度存在的蛋白质(Subroto等1996); 所鉴定的3种甘油醛-3-磷酸脱氢酶(表3中编号9~11)在C乳清中以较高丰度存在。采用基本提取液抽提的蛋白质中甘油醛-3-磷酸脱氢酶含量较高, 在16-BAC/SDS-PAGE图谱中呈现明显蛋白质点; 而采用Na₂CO₃提取液抽提蛋白质中甘油醛-3-磷酸脱氢酶的相对含量较低, 在16-BAC/SDS-PAGE图谱中未能形成蛋白质点。除上述蛋白质外, 16-BAC/SDS-PAGE双向电泳图谱中有2个显著的REF家族蛋白质点, 即REF (gi|21689593)和SRPP (gi|14423933), 分别为1号和5号斑点。

2.3 含1% CHAPS提取液抽提的橡胶粒子蛋白质

1% CHAPS提取液提取的蛋白质经16-BAC/

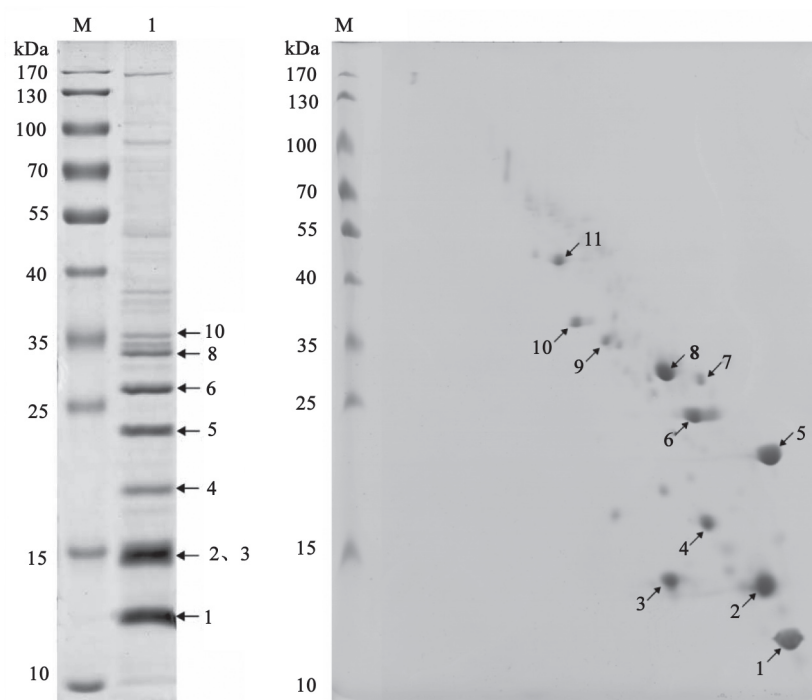


图3 基本提取液抽提橡胶粒子蛋白质的SDS-PAGE及16-BAC/SDS-PAGE对比

Fig.3 SDS-PAGE and 16-BAC/SDS-PAGE of rubber particle proteins extracted with a basal buffer

表3 基本提取液抽提并通过检索NCBI蛋白质数据库鉴定的蛋白质

Table 3 Proteins extracted with a basal buffer and identified by searching against the NCBI viridiplantae protein database

编号	蛋白质名称	NCBI登录号	分子量/ kDa	等电点	覆盖率/%	肽段数	蛋白质 得分
1	REF (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 21689593	14.7	5.04	81	19	348
2	ADP核糖基化因子(<i>Echinacea angustifolia</i>)	gi 133908607	15.6	5.78	26	5	155
3	亲环素(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 167599641	18.2	9.14	34	18	142
5	SRPP (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 14423933	22.3	4.80	89	25	879
6	壳多糖酶(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 3451147	33.7	8.72	45	17	334
8	β -1,3-葡聚糖苷酶(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 10946499	35.2	9.46	78	32	1 040
9	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(<i>Cladopus doianus</i>)	gi 300174962	36.4	6.61	49	18	411
10	非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶(<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)	gi 1842115	53.1	7.10	27	21	501
11	NADP依赖甘油醛-3-磷酸脱氢酶(<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)	gi 2494076	53.1	7.10	29	24	506

SDS-PAGE双向电泳分离得到7个显著的蛋白质点(图4),除6号点为壳多糖酶之外其余6个均属于REF家族,如表5、6所示。

REF亚家族蛋白质REF(gi|38122474)(2号点)和REF(gi|37901161)(3号点)分子量均为19.6 kDa(图4),有数个氨基酸不同(图5),等电点分别为5.06和5.43(表5);在第一向16-BAC-PAGE电泳时,REF(gi|37901161)比REF(gi|38122474)泳动略慢,经双向电泳两个蛋白质得以分离。16-BAC-PAGE和SDS-PAGE都是依据蛋白质分子量大小进行分离,

但相同蛋白质采用这两种电泳方法分离时迁移率不同,这种差异使得两种电泳技术组合为双向电泳后获得更高的分辨力。我们先前采用不同于本文的提取液配方抽提橡胶粒子蛋白质并进行16-BAC/SDS-PAGE及质谱分析(代龙军等2012),仅鉴定了浓度较高的REF(gi|38122474),未能鉴定同样分子量大小的REF(gi|37901161),提示不同提取液对特定的蛋白质存在偏好。

与5号点(图4)匹配的TSA序列为gi|387080194(表6),其核酸序列包含完整的ORF。该蛋白质在

表4 基本提取液抽提并通过检索TSA数据库鉴定的蛋白质

Table 4 Proteins extracted with a basal buffer and identified by searching against the TSA database

编号	TSA登录号	TSA得分	ORF编码氨基酸残基		同源基因登录号	同源基因名称
			数量	分子量/kDa		
4	gi 387086993	618	183	20.6	gi 313586568	假定蛋白19 mRNA完整编码序列(<i>H. brasiliensis</i>)
7	gi 387076146	516	314	35.9	gi 255544036	膜联蛋白(<i>Ricinus communis</i>)

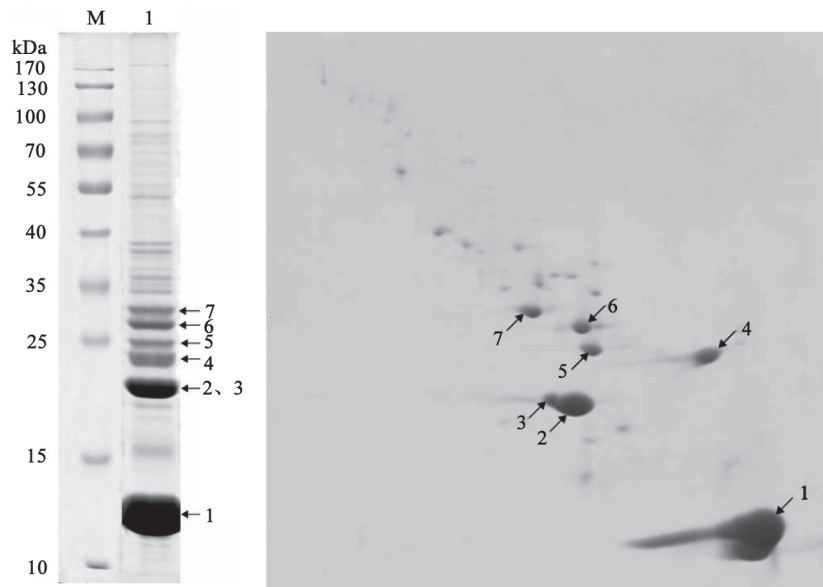


图4 1% CHAPS提取液抽提橡胶粒子蛋白质的SDS-PAGE及16-BAC/SDS-PAGE对比

Fig.4 SDS-PAGE and 16-BAC/SDS-PAGE of rubber particle proteins extracted with a buffer including 1% CHAPS

表5 CHAPS提取液抽提并通过检索NCBI蛋白质数据库鉴定的蛋白质

Table 5 Proteins extracted with a buffer including CHAPS and identified by searching against the NCBI viridiplantae protein database

编号	蛋白质名称	NCBI登录号	分子量/kDa	等电点	覆盖率%	肽段数	蛋白质得分
1	REF (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 21689593	14.7	5.04	91	22	827
2	REF (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 38122474	19.6	5.06	44	19	575
3	类REF胁迫相关蛋白1 (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 37901161	19.6	5.43	65	21	841
4	SRPP (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 14423933	22.3	4.80	89	24	378
6	壳多糖酶(<i>H. brasiliensis</i>)	gi 3451147	33.7	8.72	28	7	128
7	SRPP (<i>H. brasiliensis</i>)	gi 37622210	25.7	8.99	77	17	281

表6 CHAPS提取液抽提并通过检索TSA数据库鉴定的蛋白质

Table 6 Proteins extracted with a buffer including CHAPS and identified by searching against the TSA database

编号	TSA登录号	TSA得分	ORF编码氨基酸残基		同源基因登录号	同源基因名称	备注
			数量	分子量/kDa			
5	gi 387080194	596	222	23.6	-	-	该蛋白质已命名为HbREF2 (代龙军等2012)

此前的研究中已鉴定[代龙军等(2012)的HbREF2及Dai等(2013)中的Unigene 40343]。

2.4 含1% SDS提取液抽提的橡胶粒子蛋白质

切取SDS提取液蛋白质SDS-PAGE泳道的特

gi 38122474	MAEGEEEVNIQEEANKGEENPQEEANIQEEETNKGEENIQEEANIQEEANKKEEESLKYL	58
gi 37901161	MAEGEEEVNIQEEANKGEENPQEEANIQEEETNKGEENIQEEANIQEEANKKEEESLKYL	58
gi 38122474	DFVQAATYARASFSKLYLFAKDKSGPFKPGVNTVESRFSVVRFVYNKEQPVPNKVL	116
gi 37901161	DFVQAATYARASFSKLYLFAKDKSGPFKPGVNTVESRFSVVRFVYNKEQPVPNKVL	116
gi 38122474	KFADRRVDAYVTVLDRIVPPIVKRASIQAYSVAPGAAAVASYLPLHTKRLSKVLYGD	174
gi 37901161	KFADRRVDAYVTVLDRIVPPIVKRASIQAYSVAPGAAAVASYLPLHTKRLSKVLYGD	174

图5 REF (gi|38122474)和REF (gi|37901161)的氨基酸序列比对

Fig.5 Alignment of amino acid sequences of REF (gi|38122474) and REF (gi|37901161)

有条带(图1中以其TSA登录号标注)进行质谱分析,检索从NCBI下载的TSA数据库,与之匹配的TSA序列为gi|387098695,该TSA序列的ORF区5'端完整,3'端不完整,翻译得到该蛋白质N端202个氨基酸残基序列,以此序列在NCBI网站进行BLASTp检索(注:因直接用tBLASTx工具对该TSA序列检索时未能返回有意义的检索结果),发现与之同源的蛋白质为枯萎/脱水相关蛋白[gi|198400319, senescence/dehydration-related protein (*Camellia sinensis*)]。枯萎/脱水蛋白质可能与橡胶树所受到伤害胁迫相关,因为橡胶树树皮破损而排出胶乳会导致大量水分丢失。

另外,以转录组数据库为目标数据库,对我们原来未能鉴定的几个蛋白质点(代龙军等2012)的质谱数据重新进行检索,使这些蛋白质得到鉴定:原文的17号点鉴定为醌氧化还原酶(同表2的12号);原文的18号点鉴定为33.9 kDa的含蓖麻毒素B凝集结构域蛋白[TSA代码gi|387077282, ORF编码296AA,与本文鉴定的gi|387086993(图2、表2中的5号,图3、表4中的4号)同源];原文的20号点鉴定为细胞色素P450蛋白质(TSA代码gi|387065339, ORF编码500AA),在本文则未能鉴定。这些蛋白质及本文的3个新发现的蛋白质获得鉴定,得益于Rahman等(2013)在基因组与转录研究中取得的最新进展。

讨 论

Na₂CO₃提取液可抽提橡胶粒子自身蛋白质,包括2种SRPP异构体和少量REF (gi|21689593),而对于单位膜结构,该提取液仅能去除内质网膜及细胞质膜的外周蛋白。这反映了橡胶粒子的半单位膜结构与内质网膜、细胞质膜等单位膜结构的

不同。被提取的蛋白质REF (gi|21689593)及SRPP (gi|14423933)结构上也不同于常见的膜蛋白,它们没有典型的跨膜结构域(Dennis等1989; Oh等1999)。

基本提取液提取能力较弱,除了提取一些来自黄色体和C乳清的可溶性蛋白质,也能提取少量橡胶粒子自身的高丰度蛋白质REF (gi|21689593)及SRPP (gi|14423933)。

本文选取3种提取能力逐渐增强的去垢剂:TX-100(非离子去垢剂)、CHAPS(两性离子去垢剂)、SDS(阴离子去垢剂)加入基本提取液以提取橡胶粒子蛋白质。未使用含阳离子去垢剂如16-BAC和CTAB(cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵)的提取液,因为阳离子将中和橡胶粒子表面的负电荷,迅速导致橡胶粒子凝聚,已凝聚橡胶粒子中的蛋白质将不易提取。相对于不含去垢剂提取液,加入去垢剂显著提高了所抽提蛋白质中REF (gi|21689593)的相对含量。REF (gi|38122474)和HbREF2需在提取液中包含较强的去垢剂如CHAPS或SDS才能有效抽提。

橡胶粒子不能耐受高强度的反复洗涤(代龙军等2012),因此无法获得“纯净”的橡胶粒子。采用相同的洗涤过程,但采用提取能力不同的提取液,分层次地提取橡胶粒子蛋白质,可以分析各种蛋白质与橡胶粒子结合的紧密程度,为分析蛋白质的功能及亚细胞定位提供线索;依靠不同提取液对特定蛋白质的偏好,相对地富集某些丰度较低的蛋白质,有利于这些蛋白质的电泳分离和新蛋白质的鉴定。

总之,我们发现不同提取液抽提的橡胶粒子蛋白质具有不同组成;随着分子量增加,REF和SRPP亚家族蛋白质与橡胶粒子结合力增强。采用

橡胶粒子蛋白质质谱分析数据检索转录组数据库, 鉴定了3个新蛋白质: 醌氧化还原酶、含蓖麻毒素B链凝集素结构域蛋白及枯萎/脱水相关蛋白质。获得了不同提取液抽提的橡胶粒子中丰度较高的蛋白质的16-BAC/SDS-PAGE图谱及质谱鉴定结果, 为将来进一步鉴定低丰度的、具有重要功能的橡胶粒子蛋白质建立了参照体系。

参考文献

- 代龙军, 项秋兰, 黎瑜, 聂智毅, 康桂娟, 段翠芳, 曾日中(2012). 巴西橡胶树橡胶粒子蛋白质的16-BAC/SDS-PAGE双向电泳及质谱分析. 中国农业科学, 45 (11): 2328~2338
- 段翠芳, 聂智毅, 曾日中(2006). 橡胶粒子膜蛋白双向电泳体系的建立和质谱初步分析. 热带作物学报, 27 (3): 22~29
- 吴坤鑫, 王震, 姚茂平, 陈雄庭, 陈守才(2008). 橡胶树不同品系橡胶粒子蛋白的比较研究. 安徽农业科学, (36): 15785~15787, 15803
- 项秋兰, 代龙军, 黎瑜, 聂智毅, 康桂娟, 段翠芳, 曾日中(2012). 橡胶树大小橡胶粒子的差速离心分离及其差异表达蛋白质的研究. 中国农学通报, 28 (4): 18~23
- Archer BL, Audley BG, Cockbain EG, McSweeney GP (1963). The biosynthesis of rubber. Incorporation of mevalonate and isopentenyl pyrophosphate into rubber by *Hevea brasiliensis*-latex fractions. *Biochem J*, 89 (3): 565~574
- Braun RJ, Kinkl N, Zischka H, Ueffing M (2009). 16-BAC/SDS-PAGE analysis of membrane proteins of yeast mitochondria purified by free flow electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 528: 83~107
- Cornish K (2001). Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species. *Nat Prod Rep*, 18 (2): 182~189
- Cornish K, Siler D, Grosjen O-K, Goodman N (1993). Fundamental similarities in rubber particle architecture and function in three evolutionarily divergent plant species. *J Nat Rubb Res*, 8 (4): 275~285
- Cornish K, Wood DF, Windle JJ (1999). Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane. *Planta*, 210: 85~96
- Dai LJ, Kang GJ, Li Y, Nie ZY, Duan CF, Zeng RZ (2013). In-depth proteome analysis of the rubber particle of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol Biol*, 82 (1-2): 155~168
- Dennis MS, Henzel WJ, Bell J, Kohr W, Light DR (1989). Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in *Hevea* latex. *J Biol Chem*, 264 (31): 18618~18626
- Dennis MS, Light DR (1989). Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. *J Biol Chem*, 264 (31): 18608~18617
- Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL, Lazarow PB (1982a). Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol*, 93 (1): 103~110
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982b). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 93 (1): 97~102
- Jacob JL, d'Auzac J, Prevot JC (1993). The composition of natural latex from *Hevea brasiliensis*. *Clin Rev Allergy*, 11 (3): 325~337
- McMullen AI, McSweeney GP (1966). The biosynthesis of rubber: incorporation of isopentenyl pyrophosphate into purified rubber particles by a soluble latex-serum enzyme. *Biochem J*, 101 (1): 42~47
- Mooibroek H, Cornish K (2000). Alternative sources of natural rubber. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53 (4): 355~365
- Nothwang HG, Schindler J (2009). Two-dimensional separation of membrane proteins by 16-BAC-SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*, 528: 269~277
- Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J, Chow KS, Yeang HY, Wagner B, Breiteneder H, Han KH (1999). Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem*, 274 (24): 17132~17138
- Rahman AYA, Usharraj AO, Misra BB, Thottathil GP, Jayasekaran K, Feng Y, Hou S, Ong SY, Ng FL, Lee LS et al (2013). Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *BMC genomics*, 14: 75
- Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact*, 129: 77~97
- Simpson RJ (2003). SDS-PAGE of proteins. In: Simpson RJ (ed). *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 52~62
- Subroto T, Koningsveld GAV, Schreuder HA, Soedjanaatmadja UMS, Beintema JJ (1996). Chitinase and beta-1,3-glucanase in the luteoid-body fraction of *Hevea* latex. *Phytochemistry*, 43 (1): 29~37
- Wang XC, Shi MJ, Lu XL, Ma RF, Wu CG, Guo AP, Peng M, Tian WM (2010). A method for protein extraction from different subcellular fractions of laticifer latex in *Hevea brasiliensis* compatible with 2-DE and MS. *Proteome Sci*, 8: 35
- Wititsuwannakul D, Rattanapittayaporn A, Koyama T, Wititsuwannakul R (2004). Involvement of *Hevea* latex organelle membrane proteins in the rubber biosynthesis activity and regulatory function. *Macromol Biosci*, 4 (3): 314~323
- Wititsuwannakul R, Pasitkul P, Kanokwiroon K, Wititsuwannakul D (2008). A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochemistry*, 69 (2): 339~347
- Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc*, 1 (1): 418~428
- Xiang QL, Xia KC, Dai LJ, Kang GJ, Li Y, Nie ZY, Duan CF, Zeng RZ (2012). Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasiliensis* using 2D-DIGE. *Plant Physiol Biochem*, 60: 207~213