

技术与方法 Techniques and Methods

甘蓝型油菜温敏核不育系SP2S花蕾总蛋白质双向电泳体系的建立及应用

张菁雯, 李晓荣, 赵燕妮, 胡玉梅, 徐献锋, 于澄宇*

西北农林科技大学农学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌712100

摘要: 以甘蓝型油菜温敏核不育系SP2S及其近等基因系SP2F为材料, 分别采用TCA/丙酮法和Tris-丙酮-酚法提取花蕾总蛋白, 并优化电泳体系, 对可育和不育花蕾中的蛋白质表达进行差异分析。结果表明: TCA/丙酮法适合于花蕾总蛋白的提取, 采用10%浓度的分离胶, 上样量为450 μg , 用pH 4~7的17 cm线性胶条和改良的考马斯亮蓝染色法得到了背景清晰、蛋白点分布均匀且重复性好的电泳凝胶图谱。利用这一实验体系, 筛选出SP2S和SP2F之间大量的差异蛋白点。相比SP2F, 仅在SP2S中表达的有13个点, 上调2倍以上的点有4个, 下调2倍以上的点有9个。

关键词: 甘蓝型油菜; 温敏核不育; 花蕾; 双向电泳; 蛋白质

Establishment and Application of Two-Dimensional Electrophoresis System for Floral Bud Proteome of Temperature-Sensitive Male Sterile Line SP2S in *Brassica napus*

ZHANG Jing-Wen, LI Xiao-Rong, ZHAO Yan-Ni, HU Yu-Mei, XU Xian-Feng, YU Cheng-Yu*

College of Agronomy, State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: Using TCA/acetone and Tris-acetone-phenol methods to extract total proteins from floral buds respectively, an optimized system of two-dimensional electrophoresis (2-DE) was employed to screen differential protein expression between a temperature-sensitive male sterile line SP2S and its near isogenic line SP2F in *Brassica napus*. The results showed that clear background, well distributed protein spots and reproducible 2-DE maps could be acquired following TCA/acetone extraction, electrophoresis system including 10% SDS-PAGE, 450 μg of sample loading quantity, and 17 cm immobilized pH gradient (IPG) strip with pH 4–7, and modified staining using Coomassie Brilliant Blue. Using this optimized 2-DE system some differential protein spots between SP2S and SP2F were found. Compared with SP2F, 13 spots were specifically expressed in SP2S, 4 of them were up-regulated more than 2-fold and 9 were down-regulated more than 2-fold.

Key words: *Brassica napus*; temperature-sensitive male sterility; floral bud; two-dimensional electrophoresis; protein

随着现代分子生物学及基因组学的发展, 拟南芥、白菜、甘蓝、油菜等多种植物的基因组测序已完成, 植物育种技术从传统育种逐渐转向分子育种, 但多数生理现象的分子机制仍然悬而未决。从DNA和RNA着手的基因芯片、基因表达序列分析、高通量测序等方法所获得的信息有限, 无法解释蛋白质翻译修饰、亚细胞定位或迁移、蛋白质-蛋白质间的相互作用等。要想更深入剖析生理现象, 蛋白质组具有不可替代性(何华勤2011)。目前, 蛋白质组学在植物科学研究中的应用主要有: 植物发育不同时期蛋白质的差异、胁迫应答的蛋白质组学研究(皇甫海燕和官春云

2010; 余永芳等2011)和突变体研究(李春宏等2012)等。

甘蓝型油菜温敏细胞核不育系SP2S是我们课题组从一份欧洲油菜资源后代中发现并选育而来, 在杨凌春季表现为低温可育, 高于临界温度时彻底败育, 遗传分析表明不育性状受2~3对隐性核基因控制。雄性不育是作物杂种优势利用的主要途

收稿 2014-06-19 修定 2014-09-25

资助 教育部新世纪优秀人才项目(NECT-10-0693)和现代农业产业技术体系(ARS-13)。

* 通讯作者(E-mail: yu1009@nwsuaf.edu.cn)。

径之一,其中光、温敏雄性不育由于具有简化的制种体系和更大的杂种优势潜力成为继细胞质不育、细胞核不育、化学杀雄之后又一重要的油菜杂种优势利用途径(于澄宇2011)。郭英芬等(2012)通过对SP2S的细胞学观察,发现其败育时期和机制不同于现有报道的油菜不育系。本试验对比2种花蕾蛋白质提取方法的效果并对电泳条件进行优化,对可育与不育花蕾全蛋白经过3次重复试验,筛选蛋白质差异点。通过对温敏核不育系SP2S和可育近等基因系进行蛋白质组学分析,进一步了解温敏核不育SP2S受环境因子调控的机制。

材料与方法

1 植物材料

供试材料为大田种植的甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)温敏核不育系SP2S及其近等基因系SP2F,待气温升高、油菜转变为不育后取样,置于0℃冰盒带回,保存于-80℃冰箱。

2 蛋白质提取方法

2.1 TCA/丙酮法

参照Damerval等(1986)的TCA/丙酮沉淀法,并略有改动。取-80℃冰箱保存的花蕾,加入液氮充分研磨,所得粉末转入2.0 mL的离心管中,加入1.5 mL经-20℃预冷、含10% TCA和0.07%二硫苏糖醇(DTT)的丙酮溶液,混匀后于-20℃沉淀1 h; 4℃下13 188×g离心30 min,弃上清;沉淀悬浮于1.5 mL -20℃预冷的含0.07% DTT的丙酮溶液,-20℃沉淀1 h; 4℃下13 188×g离心30 min,弃上清;重复上述步骤3-4次,至蛋白为乳白色;室温下干燥,备用。

2.2 Tris-丙酮-酚法

参考Wang等(2006)的方法,略有改动。取-80℃冰箱保存的花蕾,加入液氮充分研磨,所得粉末转入2.0 mL的离心管中,加入1.5 mL经-20℃预冷、含10% TCA的丙酮,-20℃静置1 h; 4℃下13 188×g离心20 min,弃上清;所得沉淀用经-20℃预冷、含0.1 mol·L⁻¹乙酸钠的80%甲醇及80%丙酮各洗涤1次,4℃下13 188×g离心20 min,弃上清,沉淀于室温干燥或50℃水浴去除残余丙酮;加0.8 mL Tris-饱和酚重新悬浮,再加0.8 mL SDS缓冲液(含30%蔗糖、2% SDS、0.1 mol·L⁻¹ pH 8.0的Tris-HCl、5% β-巯基乙醇)涡旋振荡,放置5 min,4℃下

13 188×g离心20 min;移取0.2~0.4 mL上层酚相至新的离心管,加满0.1 mol·L⁻¹预冷的乙酸钠/甲醇溶液,-20℃静置1 h以上,4℃下13 188×g离心20 min;所得沉淀用预冷的100%甲醇和80%丙酮各洗涤1次,室温下干燥、备用。

3 蛋白质定量

每mg蛋白干粉中加入25 μL蛋白裂解液,蛋白裂解液含7 mol·L⁻¹尿素、2 mol·L⁻¹硫脲、4% 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)、65 mmol·L⁻¹ DTT、0.5%两性电解质、1 mmol·L⁻¹苯甲基磺酰氟(PMSF),室温放置1 h后,4℃下13 188×g离心30 min以上,至没有沉淀出现为止,取上清液,用上海生物工程股份有限公司的非干扰型蛋白质浓度测定试剂盒SK3071测浓度,按操作说明书进行,定量后分装于1.5 mL离心管中,-80℃保存备用。

4 双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)

等电聚焦采用Bio-Rad公司的17 cm线性IPG(immobilized pH gradient)胶条(pH 3~10, pH 4~7),将一定体积的蛋白质样品与水化上样缓冲液(含7 mol·L⁻¹尿素、2 mol·L⁻¹硫脲、4% CHAPS、65 mmol·L⁻¹ DTT、0.5%两性电解质、0.001%溴酚蓝)共350 μL充分混匀,加入等电聚焦盘,按Bio-Rad的蛋白质组2-DE操作手册的步骤进行,并对等电聚焦程序有所修改(表1)。第二向SDS-PAGE电泳结束后,采用改良的考马斯亮蓝染色法——Blue Silver法(Candiano等2004)进行染色。

5 凝胶图像分析

用PowerLook 2100XL扫描仪扫描凝胶图像,分辨率为300 dpi,全彩。用Bio-Rad的PDQuest 7.4.0软件分析凝胶图像。

表1 等电聚焦电泳程序

Table 1 Procedures of isoelectric focusing electrophoresis

程序	电压/V	速度	时间/h
水化	50	主动水化	15
第一步	250	线性	1
第二步	500	线性	1
第三步	1 000	快速	1
第四步	8 500	线性	5
第五步	8 500	快速	9.41
第六步	500	快速	任意时间

实验结果

1 不同分离胶浓度的选择

采用12%和10%浓度的分离胶观察胶浓度对蛋白质分离效果的影响, 结果表明在12%的分离胶中大于45 kDa、染色较深的高丰度蛋白及其附近条带未能很好分离, 整体来看条带较为密集; 而在10%的分离胶中, 蛋白条带清晰且分布均匀(图1)。因此, 在后续的2-DE中均采用10%的分离胶。

2 等电聚焦胶条的选择

将TCA/丙酮法提取的SP2F花蕾蛋白用17 cm pH 3~10的线性胶条进行2-DE, 蛋白主要集中在中

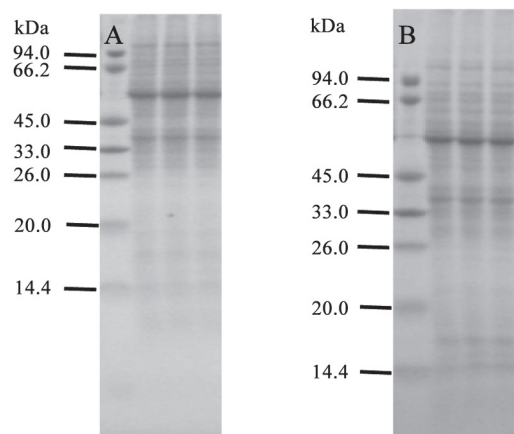


图1 不同浓度SDS-PAGE的蛋白质分离效果

Fig.1 Protein separation effect of different concentrations of SDS-PAGE

A: 12%分离胶; B: 10%分离胶。

性偏酸的区域, 并且不能很好分离(图2-B)。改用pH 4~7的线性胶条后, 虽然碱性端的纵条纹仍显示有未分离的蛋白质, 但总体分辨率明显提高, 大多数蛋白质得到分离(图2-A)。

3 两种提取方法的比较

将两种方法提取的SP2F花蕾蛋白用pH 4~7的线性胶条进行2-DE, 当上样量相同时, Tris-丙酮-酚法提取的蛋白点数明显较TCA/丙酮法的少, 酸性蛋白和低分子量蛋白均有较多的损失, 共检测到637个左右的蛋白点, TCA/丙酮法可检测到777个左右的蛋白点(图3)。因此, TCA/丙酮法可能更适合于油菜花蕾总蛋白的提取。

4 不同上样量对2-DE图谱的影响

由图4-A可见, 上样量为600 μg 时, 2-DE图谱背景模糊, 过高的上样量使高丰度蛋白附近的点模糊不清, 密集在一起, 且上样量过高, 可检测到的蛋白点数反而变少(表2)。当上样量为500 μg 时, 高丰度蛋白对其附近的蛋白依然有覆盖, 并且个别点有拖尾(图4-B)。经PDQuest软件分析和肉眼观察, 上样量为450和400 μg 时可检测到的蛋白点数相近(图4-C和D), 均高于500 μg 的上样量(表2)。由于上样量为450 μg 时蛋白点更圆, 条纹较少, 故后续2-DE均以此为上样量。

5 SP2S和SP2F花蕾蛋白质的电泳图谱比较

分别对SP2S和SP2F进行3次重复试验, 用PDQuest 7.4.0软件对2-DE图像进行剪切、斑点检测和匹配, 对图像标准化后建立重复组进行数据分析, SP2S可检测到662个蛋白点, SP2F可检测到777

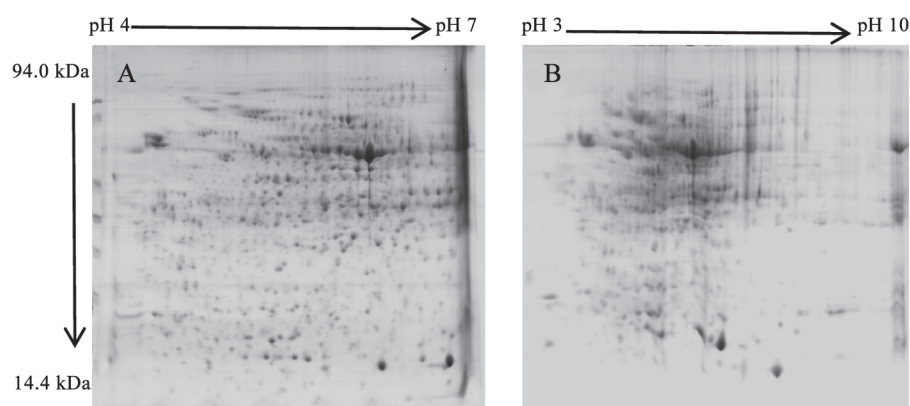


图2 不同pH范围胶条的2-DE图

Fig.2 2-DE maps of different immobilized pH gradient gels

A: pH 4~7; B: pH 3~10。

个蛋白点; 与对照SP2F相比, SP2S中具有99%统计学显著差异且符合上调2倍以上的点有4个, 下调2

倍以上的点有9个, 仅在SP2S中表达的有13个点(图5和6)。

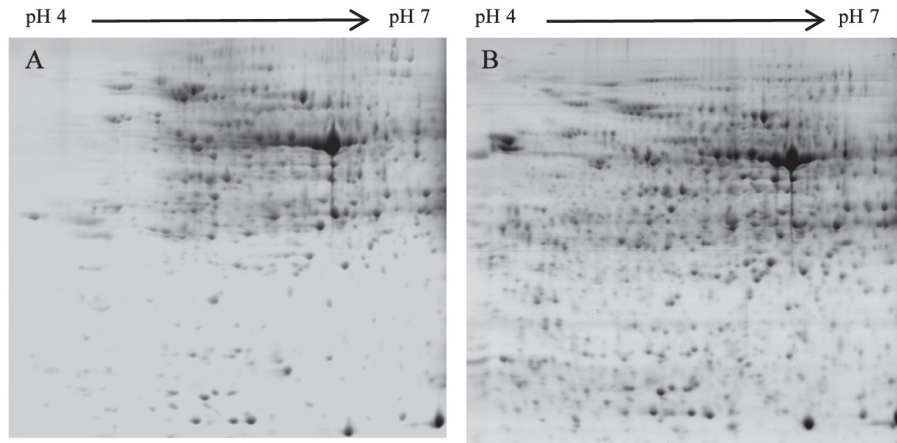


图3 不同提取方法的2-DE图

Fig.3 2-DE maps of different extraction methods

A: Tris-丙酮-酚法; B: TCA/丙酮法。

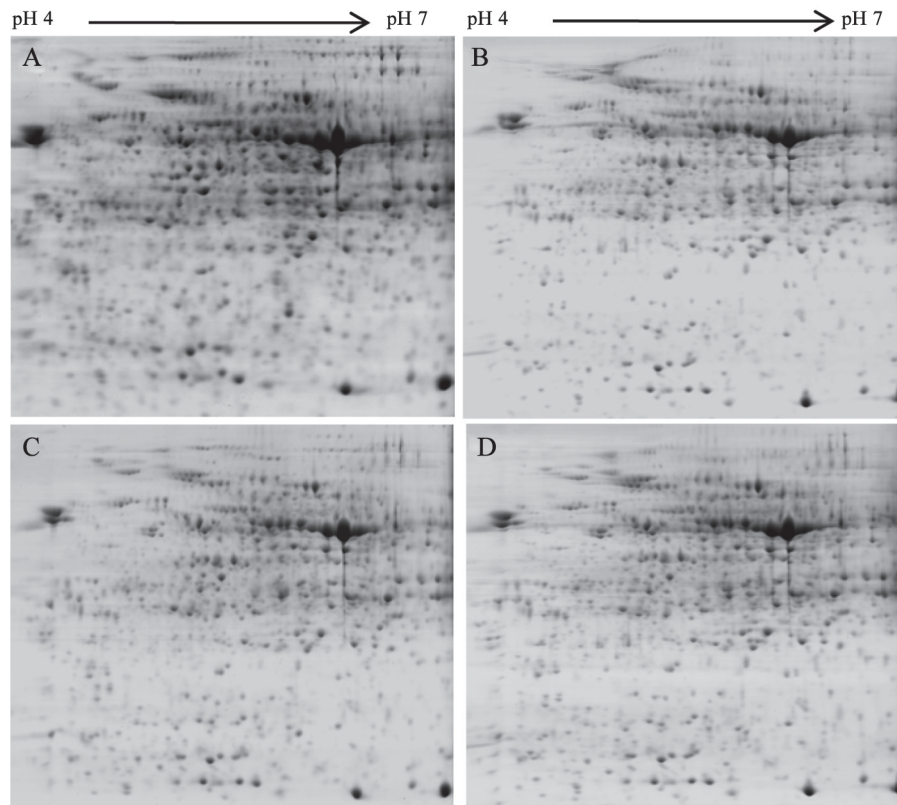


图4 不同上样量的蛋白质2-DE图谱

Fig.4 2-DE maps of different protein sample loading quantity

A: 上样量为600 µg; B: 上样量为500 µg; C: 上样量为450 µg; D: 上样量为400 µg。

表2 不同上样量的蛋白质点数

Table 2 The number of protein spots of different sample loading quantity

上样量/ μg	蛋白质点数/个
400	1 048
450	1 088
500	920
600	883

讨 论

1 蛋白提取方法的选择

蛋白样品的制备是整个蛋白质组学研究的第 一步,也是最重要的一步,样品制备的好坏直接关 系到2-DE图谱的呈现以及后续的鉴定分析。目前 已报道的关于油菜蛋白的提取方法有TCA/丙酮法 (刘海衡等2009; 甘露等2010)、Tris-HCl法(舒佳宾

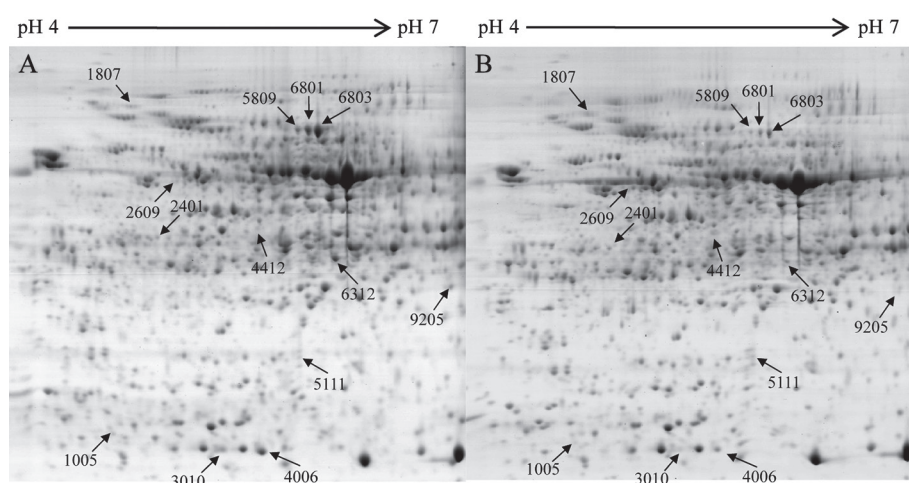


图5 SP2F (A)和SP2S (B)的蛋白点差异图谱

Fig.5 Differential protein spots of SP2F (A) and SP2S (B)

图中箭头旁数字为SSP (standard spot)编号。

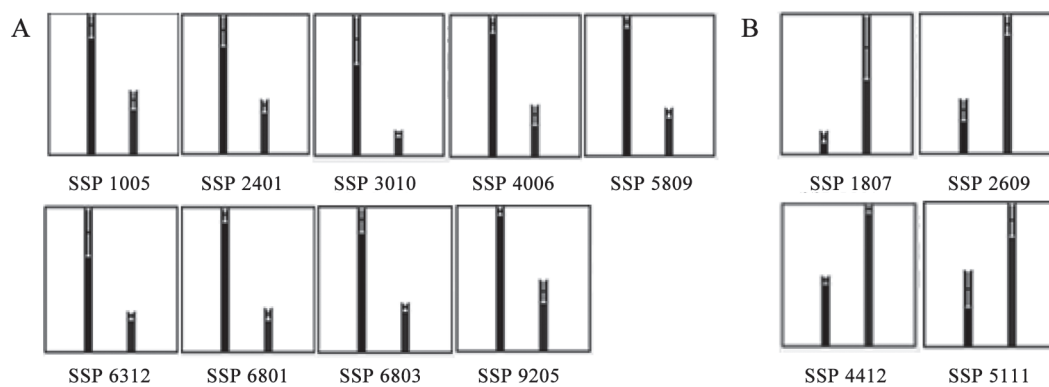


图6 差异蛋白点的量化柱状图

Fig.6 Quantization histogram of differential protein spots

A: 下调; B: 上调。SSP后的数字为SSP (standard spot)编号; 每个小图中左面柱形为SP2F, 右面为SP2S。

等2012)、改进的PEG分级法(孔芳等2010)、酚提 法及酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法(王振华等2011)。 Wang等(2006)认为, 酚提法有助于顽固组织的蛋 白提取, 但是酚法提取的步骤较多, 需多次转移,

因此蛋白总产量较低; 这与王振华等(2011)得出的 结论一致。本研究比较了Tris-丙酮-酚法和TCA/ 丙酮法, 发现TCA/丙酮法是一种相对简单的方法, 步骤少, 能提取到更多的蛋白, 并且图谱清晰, 因

此更适合甘蓝型油菜花蕾总蛋白的提取。另外,丙酮在沉淀蛋白的同时可起到纯化作用,因此等电聚焦过程中不需要除盐,还可除去植物中的多糖、脂类、色素、酚类等次生代谢物,有利于2-DE。TCA/丙酮法的缺点是不能很好解决油菜花蕾中含有的少量高丰度蛋白Rubisco的影响,这也是进行光合作用的绿色植物在2-DE中影响电泳图谱的一个主要问题,在今后的试验中可借鉴其他植物去除Rubisco的提取方法(Xi等2006;钟俐等2012)来加以解决。

2 电泳条件的优化

不同的植物、不同的组织在2-DE中对分离胶的选择也不同,本试验先比较了分离胶为10%和12%的单向SDS-PAGE,在10%的分离胶中,分子量在45.0~66.2 kDa的高丰度蛋白大亚基附近的蛋白质条带能很好分离,在后续的2-DE中采用10%浓度的分离胶均得到蛋白点清晰且分布均匀的图谱。

pH梯度胶条的选择影响差异蛋白的分离效果。采用pH 3~10的线性胶条对油菜总蛋白的分离效果不理想,从pH 3~10的2-DE图谱来看,蛋白主要集中在pH 4~8的区域,王道杰等(2008)用pH 5~8的胶条对单显性细胞核雄性不育油菜花蕾中的蛋白进行电泳,得到了一些差异蛋白点,但是用pH 5~8的胶条又会损失pH 4~5的蛋白,因此,本试验选用pH 4~7的线性胶条,蛋白得到很好的分离,分辨率大大提高,并且SP2S与SP2F之间有明显的差异点。

上样量影响2-DE图谱的质量,上样过多使得高丰度蛋白遮蔽周围的低丰度蛋白,过少又会使一些蛋白丢失,影响结果分析,因此蛋白的准确定量也很重要。我们对上样量进行梯度试验,并结合软件与人工观察,发现450 μ g为甘蓝型油菜花蕾的最佳上样量。另外,蛋白裂解液中含有高浓度的尿素等物质,李海玲等(2008)研究发现常用的Bradford法受甘油、去污剂和尿素等的影响。本试验采用上海生工的非干扰型蛋白定量试剂盒SK3071,在测浓度前对蛋白裂解液中影响蛋白浓度测定的两性去污剂、还原试剂、两性电解质、尿素等进行沉淀,有效避免了干扰物质对蛋白定量的影响。并且经改良的Blue Silver法(Candiano等2004)将染色液中的考马斯亮蓝G-250的浓度从

传统的0.1%升至0.12%,磷酸浓度从2%升至10%,灵敏度提高,接近传统的银染法。

3 SP2S和SP2F花蕾中差异蛋白质分析

本文用经过优化的2-DE对SP2S和SP2F花蕾中的差异蛋白质进行分析,发现差异点在低分子量和高分子量都有分布,并且集中在高丰度蛋白附近,而低丰度蛋白往往是调节因子、信号接受分子等一些重要的蛋白质,可见最优的提取方法与适当的上样量对于2-DE的分析是非常重要的。许志勇(2012)对甘蓝型油菜S45AB隐性细胞核雄性不育差异蛋白进行质谱分析,鉴定出的蛋白涉及碳和能量代谢、氨基酸代谢、次级代谢、脂肪酸代谢、RNA binding蛋白、蛋白质合成、蛋白质降解、蛋白质折叠、氧化还原酶、细胞壁相关蛋白、胁迫响应等,从蛋白质的功能来预测与不育相关的蛋白,进而寻找与不育有关的分子机制。本研究通过软件分析,一共找到26个差异点,对于差异点的质谱鉴定分析将在后续的试验中进行,以寻找调控甘蓝型油菜温敏不育SP2S的关键分子。

参考文献

- 甘露,李殿荣,臧新,付春华,余龙江,栗茂腾(2010). 甘蓝型油菜蛋白质双向电泳体系的建立. 作物学报, 36 (4): 612-619
- 郭英芬,葛娟,于澄宇,张国云,董军刚,董振生(2012). 新型甘蓝型油菜温敏核不育系SP2S的花药发育解剖学观察. 植物生理学报, 48 (3): 282-288
- 何华勤(2011). 简明蛋白质组学. 北京: 中国林业出版社, 3~4
- 皇甫海燕,官春云(2010). 甘蓝型油菜抗菌核病近等基因系和感病亲本蛋白差异的初步研究. 中国农业科学, 43 (10): 2000-2007
- 孔芳,蒋金金,吴磊,葛才林,王幼平(2010). 油菜叶片总蛋白质双向电泳样品制备方法的改进. 生物技术通报, (5): 93-110
- 李春宏,付三雄,戚存扣(2012). 甘蓝型油菜授粉功能缺失突变体及其野生型柱头差异蛋白研究. 中国农业科学, 45 (22): 4728-4737
- 李海玲,彭书明,李凇,张雪梅(2008). 4种常用蛋白浓度测定方法的比较. 中国生化药物杂志, 29 (4): 277-278
- 刘海衡,胡胜武,刘胜毅,黄军艳,董彩化(2009). 油菜不同器官高质量总蛋白提取方法和双向电泳体系的优化. 中国油料作物学报, 31 (4): 426-433
- 舒佳宾,文李,官春云(2012). 甘蓝型油菜叶片蛋白质双向电泳体系优化. 作物研究, 26 (4): 350-354
- 王道杰,杨翠玲,黄飞,郭嵩光(2008). 单显性细胞核雄性不育油菜花蕾表达蛋白比较研究. 西北植物学报, 28 (6): 1101-1105
- 王振华,王志方,陈水森,徐芳森,石磊(2011). 甘蓝型油菜根系可溶性蛋白的提取及双向电泳体系的优化. 华中农业大学学报, 30 (2): 219-224

- 许志勇(2012). 甘蓝型油菜S45AB隐性细胞核雄性不育蛋白质组学的研究[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学
- 于澄宇(2011). 甘蓝型油菜授粉控制系统研究现状与前景. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 39 (9): 93~99
- 余永芳, 赵丹丹, 李玉琴, 牛银银, 田保明, 臧新(2011). 磷胁迫下油菜幼苗叶片差异蛋白表达的初步分析. 河南农业科学, 40 (8): 89~91, 112
- 钟俐, 马成梅, 梁永增, 李冠(2012). 甜瓜叶片中Rubisco的去除及双向电泳体系的优化. 植物生理学报, 48 (3): 303~309
- 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 (9): 1327~1333
- Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7 (1): 52~54
- 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 (13): 2782~2786
- Xi JH, Wang X, Li SY, Zhou X, Yue L, Fan J, Hao DY (2006). Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of proteome. *Phytochemistry*, 67 (21): 2341~2348