

油松胚珠蛋白质提取分离技术的优化

姜春宁 郑彩霞 包仁艳

(北京林业大学生物科学与技术学院)

摘要:采用 4 种 pH 值和 2 种 SDS 浓度的 Tris-HCl 提取液、TCA/丙酮溶液对油松胚珠蛋白质进行提取。经 SDS-PAGE 电泳检测,提取液 pH 值对提取效果的影响与 SDS 浓度有关。低浓度 SDS(0.2%) 需要提高提取液的 pH 值, pH 8.8 的效果最好。SDS 浓度提高到 2%, pH 值对蛋白提取量影响不明显,电泳条带都很清晰,同时分子量为 14.4、16.1、17.1 kD 的蛋白条带明显增强。经 IEF/SDS-PAGE 凝胶电泳检测, TCA/丙酮沉淀法所得图谱效果好、干扰少、蛋白点数多;用 pH 8.8 Tris-HCl 提取液提取时,低浓度 SDS(0.2%) 比高浓度 SDS(2%) 所得图谱效果好。

关键词:油松, 胚珠蛋白, 提取分离, SDS-PAGE, IEF/SDS-PAGE

中图分类号:S791.254 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2006)04-0096-04

JIANG Chun-ning; ZHENG Cai-xia; BAO Ren-yan. **Optimization method for the extraction and separation of proteins from ovules of *Pinus tabulaeformis* Carr.** *Journal of Beijing Forestry University* (2006) 28(4) 96-99 [Ch, 16 ref.] College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

The methods of extracting proteins from ovules of *Pinus tabulaeformis* Carr. were compared and optimized in this paper. The buffers of 0.05 mol/L Tris-HCl containing two different SDS concentrations, four different pH values and a TCA/acetone solution were used. Results indicated that the effects of the pH value of the Tris-HCl buffer on SDS-PAGE were relevant to the SDS concentration and the best result occurred at pH 8.8 by using a buffer containing 0.2% SDS. While using the buffer containing 2% SDS, there were no significant differences among different pH values, and protein bands of 14.4, 16.1 and 17.1 kD were obviously strengthened. For IEF/SDS-PAGE, the TCA/acetone precipitation method was the best since the 2-D map was clearer and there were more protein spots than the others. However, among three Tris-HCl buffers, the best 2-D pattern was obtained by using a Tris-HCl buffer (pH 8.8) containing 0.2% SDS.

Key words *Pinus tabulaeformis* Carr., ovular protein, extraction and separation, SDS-PAGE, IEF/SDS-PAGE

植物生长发育过程的分子调控机制是植物发育生物学的一个重要研究课题, 紧步基因组计划之后的蛋白质组学研究为揭示发育分子调控机制提供了有效手段。油松 (*Pinus tabulaeformis* Carr.) 胚珠发育是一系列基因在时空上顺序表达的结果, 经历了包括胚珠分化、大孢子母细胞减数分裂、功能大孢子有丝分裂、游离核分裂等发育阶段的漫长过程, 是研究胚珠发育分子调控机制的理想材料。分析胚珠发育各关键时期蛋白质组的变化规律, 则是该项研究非

常重要的基础工作。

O'Farrell 等人建立的蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳双向分离技术(简称 IEF/SDS-PAGE)可分离 5 000 个不同的蛋白质组分^[1], 现已成为研究蛋白质组学研究的重要手段之一, 被广泛应用。目前大量研究表明, 影响蛋白质双向电泳分离效果的关键因子是样品制备的质量。油松组织中由于含有大量的酚类、脂类和其他一些次生代谢物, 严重制约了等电聚焦、SDS-PAGE 和凝胶染色的质量, 因此选择合适的样

收稿日期: 2005-05-26

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371144)。

第一作者: 姜春宁, 博士生。主要研究方向: 植物发育生物学。电话: 010-62391672 Email: cnjiang@126.com 地址: 100083 北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 郑彩霞, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 植物生理与发育生物学。电话: 010-62337717 Email: zhengcx@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

品制备方法对获得满意的电泳图谱至关重要. 目前植物蛋白质提取多采用 Tris-HCl 提取液及 TCA/丙酮溶液^[2-13]. 本文选择了三氯乙酸(TCA)/丙酮溶液、4种 pH 值 6.8、7.5、8.0、8.8 和 2种 SDS 浓度(0.2%、2%)的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)提取液对油松胚珠蛋白质提取效果进行比较,同时对 IEF/SDS-PAGE 的等电聚焦过程进行优化,确立了油松胚珠蛋白质提取分离的最佳方法,为下一步研究奠定了技术基础.

1 材料与方法

1.1 材料

采集北京林业大学校园内油松 2 年生球果,剥胚珠立即于 -20℃ 保存.

1.2 样品制备

1.2.1 Tris-HCl 提取法

用液氮迅速研磨胚珠后,分别称取 0.017 g 左右冻干粉放入 1.5 mL 离心管,分别加入 300 μL 含不同 SDS 浓度和 pH 值的 Tris-HCl 提取液(0.05 mol/L Tris-HCl, 10% 甘油, 5% β-巯基乙醇, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氨(PMSF)), SDS 浓度分别为 0.2% 和 2%, pH 值各为 6.8、7.5、8.0、8.8. 混匀后 4℃ 放置 30~60 min, 14 000 r 离心 20 min. 取上清, 4℃ 14 000 r 离心 5 min. 取上清, 加满预冷丙酮, -20℃ 下放置 2 h 或过夜. 4℃ 6 000 r 离心 5 min, 弃上清, 沉淀于 -20℃ 下自然干燥后加入 100 μL 样品提取液溶解蛋白, 煮沸 5 min. 4℃ 14 000 r 离心 10 min, 取上清上样.

1.2.2 TCA/丙酮沉淀法

称取 0.02 g 胚珠放入 1.5 mL 离心管, 加入 600 μL 丙酮提取液(含 10% TCA, 0.07% β-巯基乙醇的丙酮溶液), 匀浆之后再加入 900 μL 丙酮提取液. -20℃ 下沉降 1 h, 4℃ 17 800 r 离心 20 min, 弃上清. 沉淀悬浮于 -20℃ 预冷的含 0.07% β-巯基乙醇的丙酮溶液中, -20℃ 放置 2 h(或过夜). 4℃ 17 800 r 离心 15 min, 弃上清. 重复清洗两次, 每次于 -20℃ 沉降 30 min 后再离心. 沉淀在 -20℃ 下干燥(或真空抽干). 上样前加入 60 μL 裂解液(57% 尿素、2% 洗涤剂 P-40(NP-40)、5% β-巯基乙醇、1.6% 两性电解质 pH 5~8、0.4% 两性电解质 pH 3.5~10), 30℃ 温育 30 min, 20℃ 14 500 r 离心 15 min, 取上清上样.

1.2.3 蛋白质含量测定

考马斯亮蓝 G-250 染色法^[14].

1.3 蛋白质电泳

1.3.1 SDS-PAGE

采用 Bio-Rad Mini-protein II 垂直电泳槽, 分离

胶 15%, 浓缩胶 3%, 上样 30~50 μg 蛋白质. 25℃ 40 mA 跑胶.

1.3.2 IEF/SDS-PAGE

等电聚焦: 2.75 g 尿素, 100 μL NP-40, 3.98 mL 双蒸水, 于 35℃ 水浴 5 min, 溶解后加入 670 μL 凝胶贮液抽气 15 min, 加入 250 μL pH 3.5~10 两性电解质, 混匀后加入 8 μL 10% 过硫酸胺(AP)、10 μL 四甲基乙二胺(TEMED). 混匀后立即灌胶, 聚合约 2 h. 上样 50~80 μg 蛋白质. 500 V 10 min, 700 V 恒压电泳至电流为零.

取出管胶于平衡液(10% SDS, 0.05 mol/L pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液, 5% β-巯基乙醇, 10% 甘油)平衡 20 min 后, 转移到第 2 向胶板上进行 SDS-PAGE, 电泳条件同 1.3.1.

1.3.3 pH 梯度测定

聚焦结束后, 取出胶条, 顺序切成 1 cm 长小段分别放入盛有 2 mL 双蒸水的离心管, 4℃ 冰箱浸泡过夜后测定各段 pH 值.

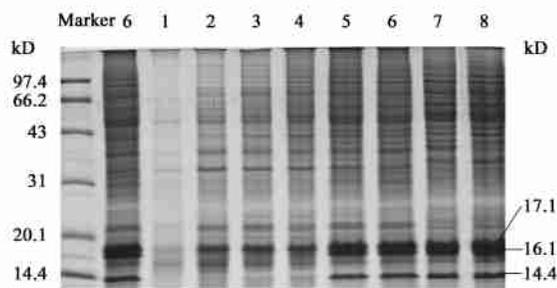
1.4 染色及脱色

胶板于染色液(0.25% 考马斯亮蓝 R-250, 45% 乙醇, 10% 冰醋酸)中染色 2 h(或过夜), 于脱色液中脱色至蛋白条带清晰.

2 结果

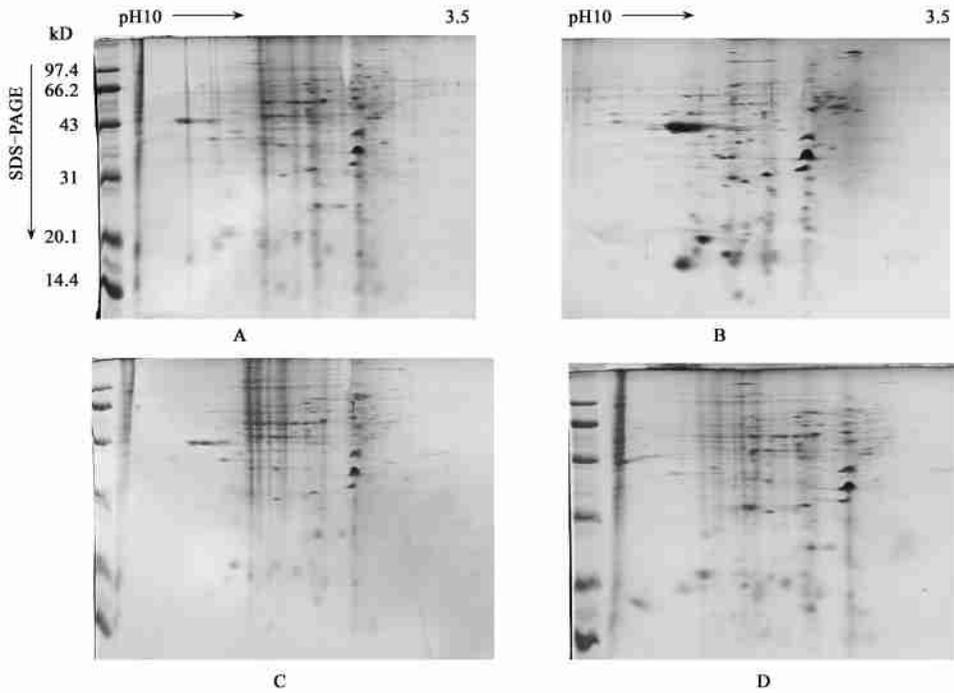
2.1 SDS-PAGE 检测结果

由图 1 可以看出: 采用 pH 6.8、0.2% SDS 的 Tris-HCl 提取液提取蛋白质, 经 SDS-PAGE 分离所得蛋白质条带少且不清晰(泳道 1), 而 pH 值为 8.8 时, 电泳条带增多且清晰(泳道 4); 采用 2% SDS 的 Tris-HCl 提取液提取蛋白质, pH 值对蛋白提取量影响不明显, 电泳条带都很清晰, 同时分子量为 14.4、16.1、17.1 kD 的蛋白条带明显增强(泳道 5~8).



泳道 1~4: 分别采用 pH 6.8、7.5、8.0、8.8 其中 SDS 浓度 0.2% 的 0.05 mol/L Tris-HCl 提取液提取蛋白 泳道 5~8: 分别采用 pH 6.8、7.5、8.0、8.8 其中 SDS 浓度 2% 的 0.05 mol/L Tris-HCl 提取液提取蛋白

图 1 胚珠可溶性蛋白质 SDS-PAGE 图谱
FIGURE 1 SDS-PAGE pattern of soluble ovular proteins



A: 采用 pH 8.8 其中 SDS 浓度为 0.2% 的 0.05 mol/L Tris-HCl 提取液提取蛋白
 B: 采用 TCA/丙酮沉淀法提取蛋白 C: 采用 pH 8.8 其中 SDS 浓度为 2% 的 0.05 mol/L Tris-HCl 提取液提取蛋白
 D: 采用 pH 6.8 其中 SDS 浓度为 2% 的 0.05 mol/L Tris-HCl 提取液提取蛋白

图 2 胚珠可溶性蛋白质及全蛋白质 IEF/SDS-PAGE 图谱

FIGURE 2 IEF/SDS-PAGE pattern of soluble(A, C, D) and total(B) ovular proteins

2.2 IEF/SDS-PAGE 检测结果

IEF/SDS-PAGE 所得 4 张图谱(图 2A, B, C, D)经 2D-Image master 软件分析分别检测到 250、284、209 和 194 个蛋白质点. 结果表明采用 TCA/丙酮沉淀法所得图谱效果好、干扰少、蛋白点数多(图 2 B), 采用 Tris-HCl 蛋白提取液提取所得图谱横纵向条纹增多, 蛋白点数明显减少; 但 SDS 浓度为 0.2% 的比 2% 的所得图谱效果好(图 2 A, C, D). 从图 2 可以看出油松胚珠蛋白质的等电点大部分在 4~7 之间, 只采用 pH 3.5~10 的两性电解质分离效果不佳, 蛋白质集中在胶板的中间, 不利于切点. 因此加入了 pH 5~8 两性电解质, 其比例为 pH 5~8: pH 3.5~10 = 4:1; 聚焦过程为 200 V 30 min, 300 V 30 min, 400 V 30 min, 600 V 6 h, 700 V 30 min, 改善了等电聚焦效果, 蛋白质点在胶面上分布均匀, 结果如图 3 所示.

3 讨论

双向凝胶电泳技术是当今蛋白质组分析研究中一个强有力的工具, 而针对双向凝胶电泳样品制备方法的探索也是蛋白质组研究的一个重要方向^[15]. 目前蛋白质的提取方法很多, 本文通过比较证明, 在进行 SDS-PAGE 电泳时, 提取液 pH 值对提取效果的影响与 SDS 浓度有关. 高浓度 SDS 条件下, 蛋白质与 SDS 能充分结合, 这样的蛋白质-SDS 复合物在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶系统中电泳迁移率便不再受

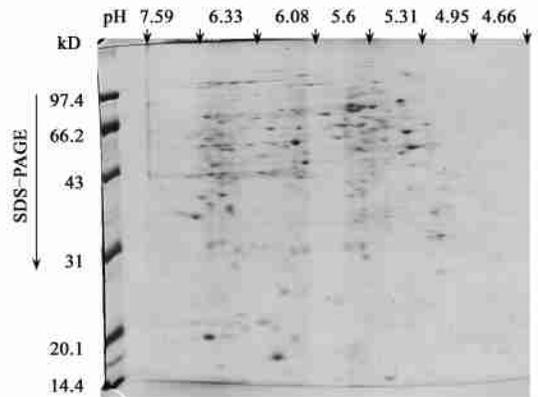


图 3 改进等电聚焦条件后的胚珠全蛋白质 IEF/SDS-PAGE 图谱

FIGURE 3 IEF/SDS-PAGE pattern of total ovular protein after improvement in IEF conditions

原有电荷和形状等因素的影响, 而主要取决于蛋白质分子量大小这一因素, 因此 SDS 浓度高提取效果好. 对于 IEF 来讲, 离子型去污剂 SDS 不利于等电聚焦, SDS 浓度过高影响其聚焦效果. 然而由于 SDS 的缓冲液可抑制蛋白质被内源性蛋白水解酶降解, 并提高了蛋白质的溶解性, 特别是膜蛋白的溶解性, 因此一般只用于样品处理的前期. 在 SDS 浓度低于 0.3% 时, 对等电聚焦不会产生太大的影响^[15].

植物材料常用 TCA/丙酮沉淀法提取蛋白质, 然后用含去污剂的裂解液来溶解沉淀. 该方法的优点是克服了在单位质量的植物组织中蛋白质提取量低的问题, 去除了植物次级代谢产物的影响, 使植物内高

活性的蛋白酶失活,避免了蛋白质被降解修饰^[15]。由于TCA/丙酮沉淀法不含SDS和Tris等盐离子,不会影响等电聚焦,因此更适合双向电泳样品的制备。

要获得质量好的图谱,等电聚焦的效果好坏影响很大。本文通过实验采用了梯度电压 200 V 30 min, 300 V 30 min, 400 V 30 min, 600 V 6 h, 700 V 30 min 进行等电聚焦,聚焦效果明显改善,蛋白质点在胶面上分布均匀,便于切点。

对于蛋白质组研究来说,2-DE 在分离蛋白质时必须具有高的重复性和分辨率。通过载体两性电解质合成的人工 pH 梯度在一定程度上限制了 2-DE 分离的重复性。因此,目前多采用固相 pH 梯度 (immobilized pH gradient, IPG) 技术解决这一问题^[16]。但由于 IPG 胶条比较昂贵,且采用 IPG-DALT 进行双向电泳步骤较繁琐费时,因此本文采用 Bio-Rad Mini-protein II 双向电泳系统进行蛋白质分析,经济省时且重复性尚可,具有一定的经济意义。

本文研究结果表明:在分离油松胚珠蛋白质时,用 SDS-PAGE 电泳,可采用含 2% SDS 的 0.05 mol/L Tris-HCl 提取液提取蛋白质;用 IEF/SDS-PAGE 电泳,采用 TCA/丙酮沉淀法最佳。对于等电聚焦采用梯度电压及延长聚焦时间,可改良分离效果,从而获得较高质量的图谱。

致谢 本研究得到北京林业大学 2003 年研究生基金项目资助,特致谢忱。

参 考 文 献

[1] 何忠效, 张树政主编. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
HE Z X, ZHANG S Z. *Electrophoresis* [M]. Beijing: Science Press, 1999.

[2] ROGERS A, ELLSWORTH D S, HUMPHRIES S W. Possible explanation of the disparity between the *in vitro* and *in vivo* measurements of Rubisco activity: A study in loblolly pine grown in elevated pCO₂ [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(360): 1 555-1 557.

[3] OOSTHUIZEN M C, STEYN B, THERON J, *et al.* Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2 770-2 780.

[4] LI M, LEUNG D W M. Protein changes associated with adventitious root formation in hypocotyls of *Pinus radiata* [J]. *Biologia Plantarum*, 2001, 44(1): 33-39.

[5] COMPERE P, JASPAR-VERSALI M F, GOFFINET G. Glycoproteins from the cuticle of the Atlantic shore crab *Carcinus maenas* (I): Electrophoresis and western-blot analysis by use of lectins [J]. *The Biological Bulletin*, 2002, 202(1): 61-73.

[6] BARNES A, BALE J, CONSTANTINIDOU C, *et al.* Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55 (402): 1 473-1 481.

[7] 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
QIAN X H, HE F C. *Proteomics: theory and methods* [M]. Beijing: Science Press, 2003.

[8] 张以顺, 向旭, 黄上志, 等. 荔枝胚蛋白质的提取方法 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(2): 174-176.
ZHANG Y S, XIANG X, HUANG S Z, *et al.* A method for extracting embryo proteins in *Lüchi chinensis* Sonn [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2003, 11(2): 174-176.

[9] 李慧玉, 董京祥, 姜静. 樟子松突变丛生枝蛋白质的双向电泳分析 [J]. 生物技术, 2004, 14(1): 35-37.
LI H Y, DONG J X, JIANG J. Analysis of multiple shoot of mutant in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* by two-dimensional electrophoresis [J]. *Biotechnology*, 2004, 14(1): 35-37.

[10] 董贵俊, 张卫东, 刘公社. 向日葵种子蛋白质的微量提取和双向电泳技术研究 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(1): 22-25.
DONG G J, ZHANG W D, LIU G S. Technical study on the protein extraction from micro-sample of sunflower seed and protein analysis with two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 2004, 26(1): 22-25.

[11] 王艇, 苏应娟, 黄超, 等. 部分裸子植物叶片总蛋白分析 [J]. 广西植物, 1999, 19(4): 367-372.
WANG T, SU Y J, HUANG C, *et al.* Analysis of leaves total protein from some gymnosperms [J]. *Guihaia*, 1999, 19(4): 367-372.

[12] 柴小清, 靳飞, 张艳萍, 等. 缺铁逆境胁迫下水稻叶蛋白质组的双向电泳分析 [J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2004, 25(3): 46-50.
CHAI X Q, JIN F, ZHANG Y P, *et al.* 2-DE analysis of differentially displayed proteins in rice young shoots under iron-deficiency stress [J]. *Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)*, 2004, 25(3): 46-50.

[13] 范国强, 蒋建平. 泡桐丛枝病与叶片蛋白质和氨基酸变化关系的研究 [J]. 林业科学研究, 1997, 10(6): 570-573.
FAN G Q, JIANG J P. Study on the relation between witches broom, protein and amino acid change in *Paulownia* leaves [J]. *Forest Research*, 1997, 10(6): 570-573.

[14] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验: 下册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
LIN J H, WEI W L, PENG X X. *Modern biological experiment (II)* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2001.

[15] 夏其昌, 曾嵘, 曹兴军, 等. 蛋白质化学与蛋白质组学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
XIA Q C, ZENG R, CAO X J, *et al.* *Chemistry of protein and proteomics* [M]. Beijing: Science Press, 2004.

[16] 钱小红, 贺福初, 万应涛, 等. 蛋白质组学: 从序列到功能 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
QIAN X H, HE F C, WAN Y T, *et al.* *Proteomics: from protein sequence to function* [M]. Beijing: Science Press, 2003.