

适用于大豆叶片蛋白质组分析的双向电泳最佳条件研究

王雪, 段玉玺, 陈立杰

(沈阳农业大学, 中国北方植物线虫研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:针对大豆叶片中蛋白含量较低, 含有大量色素、酚类、醌类等次生代谢产物干扰蛋白质双向电泳分离效果的问题, 以大豆叶片为材料, 对样品制备、蛋白质裂解液组分、等电聚焦(IEF)参数等条件进行研究。结果表明: 采用TCA/丙酮法提取大豆叶片总蛋白, 裂解缓冲液为 $9\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% CHAPS, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 0.5% Bio-Lyte, IEF等电聚焦条件为 $24\ 000\text{ Vh}$ 时, 2-DE图谱分离到的蛋白点效果最好。初步建立了一套适用于大豆叶片蛋白质组分析的双向电泳(2-DE)体系。

关键词:大豆; 叶片; 蛋白质组; 双向电泳

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)02-0325-04

A Two-Dimensional Electrophoresis Protocol Suitable for Proteomic Analysis of Soybean Leaves

WANG Xue, DUAN Yu-xi, CHEN Li-jie

(Shenyang Agricultural University, Nematology Institute of Northern China, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Proteomics is becoming a necessity in plant biology, as it is in medicine, zoology and microbiology. This study aimed at solving the problem of low content of protein in soybean leaf and the disturbance of secondary metabolites such as chromatophore, phenols and quinones to the separation of two-dimensional electrophoresis. Using leaves of soybean as material, index such as protein extraction, lysis buffer and IEF parameter were modified and improved. Results showed that, soybean leaves protein was extracted with TCA/acetone, then resolubilized in lysis buffer($9\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ thiourea, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 0.5% Bio-Lyte), Isoelectric focusing was performed at 17°C under the 24000 Vh conditions. A 2-DE (two-dimensional electrophoresis) protocol suited for the separation of proteins from soybean leaves was elementary established.

Key words: Soybean; Leaf; proteome; Two-dimensional electrophoresis

随着人类基因组计划与十余种模式生物基因组全序列测定的完成, 基因组计划的重心已逐渐由结构基因组研究转移到功能基因组研究, 生命科学随之开始了一个新的纪元“后基因组时代”, 蛋白质组研究则应运而生。蛋白质组(proteome)一词是澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams^[1]在 1994 年首次提出, 指基因组表达的全部蛋白质及其存在方式, 是基因在不同环境下表达的产物, 建立作物的蛋白质数据库对于研究它们的生长发育机理、防治病虫害及遗传育种都有重要意义。O'Farrell 等发明的等电聚焦/SDS 聚丙烯酰胺双向电泳技术作为蛋白质组研究的开门技术, 已发展成为蛋白质组学

研究的支撑技术之一^[2]。近年来, 双向电泳技术在植物研究中的应用亦有不少报道^[3-4], 但由于植物细胞中含有大量的色素、酚类和醌类等次生代谢物, 而且在植物组织中蛋白质的含量较低, 有些组分在两性电解质中的溶解性低, 这些因素严重干扰了蛋白质的双向电泳分离效果, 不能很好的显示出蛋白质的表达差异。以大豆叶片为材料, 采用 IPG 等电聚焦为第一向, 垂直 SDS-PAGE 为第二向, 对样品制备方法、蛋白质裂解液、等电聚焦电泳电压和时间等技术参数进行改进和优化, 建立了一套适合大豆叶片蛋白质组分离的双向电泳技术, 为大豆蛋白质组学的研究奠定了一定基础。

收稿日期: 2008-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671399); 农业部现代农业技术体系资助项目(413010211-1101-01031908002)。

作者简介: 王雪(1981-), 女, 博士研究生, 从事大豆对大豆胞囊线虫的抗性研究。E-mail: wangxue813@126.com。

通讯作者: 段玉玺, 教授, 博士生导师。E-mail: duanyx6407@163.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试大豆品种为辽豆 10, 由辽宁省农业科学院提供。

1.2 试剂及设备

二硫苏糖醇(DTT), 碘乙酰胺(Iodoacetamide), 两性电解质 Bio-lyte, 3-[(3-胆酰胺丙基)二乙胺]丙磺酸(CHAPS), ReadyStrip IPG Strip pH3-10, 覆盖油 IPG Cover Fluid 为 Bio-Rad 产品。硫脲为 Sigma 产品。其余试剂来自 Amresco 和上海生物工程有限公司。

等电聚焦仪、电泳仪 PowerPac 为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 总蛋白提取方法的比较 采用以下 3 种方法提取大豆叶片的总蛋白, 获取蛋白沉淀, 考察较优的提取方法。

DTT/丙酮法: 参考范海延等^[5]的方法。取 1 g 大豆叶片, 液氮冷冻研磨, 加 5 mL 含 2% DTT 的水溶液匀浆。之后 4℃ 下 10 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 弃沉淀。上清液加 4 倍体积的冷丙酮, 放置于 -20℃ 冰箱过夜。之后 4℃ 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 沉淀用 80% 丙酮溶液清洗三次(每次均放于 -20℃ 冰箱沉淀 1 h)。最后沉淀冻干, 放于 -80℃ 冰箱保存待用。

TCA/丙酮法: 参照 Xu 等^[6]的方法并略加改动。取 1 g 大豆叶片, 液氮冷冻研磨, 加入 5 mL 含 0.07% 2-巯基乙醇和 10% TCA 的冷丙酮溶液匀浆, 放置于 -20℃ 冰箱过夜, 之后 4℃ 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀用含 0.07% 2-巯基乙醇的丙酮溶液清洗 3 次(每次均放于 -20℃ 冰箱沉淀 1 h)(洗至上清液无色)。-80℃ 冷冻 2 h 以上, 沉淀冷冻干燥后蛋白粉末于 -80℃ 冰箱保存备用。

酚法: 参考 Carpentier 等^[7]的方法, 进行部分修改。取 1 g 大豆叶片, 液氮冷冻研磨成粉末, 加入 2.5 mL 提取液(0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 0.1 mol·L⁻¹ KCl, 0.7 mol·L⁻¹ 蔗糖, 0.4% 巯基乙醇, 1% DTT), 4℃ 下 10 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液加等体积的 Tris 饱和酚, 4℃ 下静置 1 h, 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集酚相。此过程反复提取 2~3 次, 最后酚相用 5 倍体积 0.1 mol·L⁻¹ 冷乙酸铵

溶液 -20℃ 沉淀过夜, 4℃ 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集沉淀, 用 0.1 mol·L⁻¹ 冷乙酸铵溶液和冷丙酮溶液各洗一次, 最后沉淀冻干, 放于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 不同裂解缓冲液比较 分别称取 10 mg 蛋白粉末, 加入 500 μl 裂解缓冲液, 涡旋混匀后, 放置于室温摇床振荡提取 3 h, 13 000 r·min⁻¹ 常温离心 30 min, 取上清, 用于蛋白含量的测定(采用 Bradford^[8]法)和电泳分析。采用如下裂解液配方:

裂解缓冲液 I: 7 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 100 mmol·L⁻¹ DTT, 0.5% Bio-Lyte (pH3-10); 裂解缓冲液 II: 8 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 100 mmol·L⁻¹ DTT, 0.5% Bio-Lyte (pH3-10); 裂解缓冲液 III: 9 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 100 mmol·L⁻¹ DTT, 0.5% Bio-Lyte (pH3-10)。

1.3.3 等电聚焦(IEF)条件的优化 设计 3 个等电聚焦(IEF)条件处理, 考察最佳 IEF 条件。

I: 17 -20℃ 被动水化 12 h, 250 V 0.5 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 4 000 V 1 h, 4 000 V, 22 000 Vh

II: 17 -20℃ 被动水化 12 h, 250 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 4 000 V 1 h, 4 000 V, 24 000 Vh

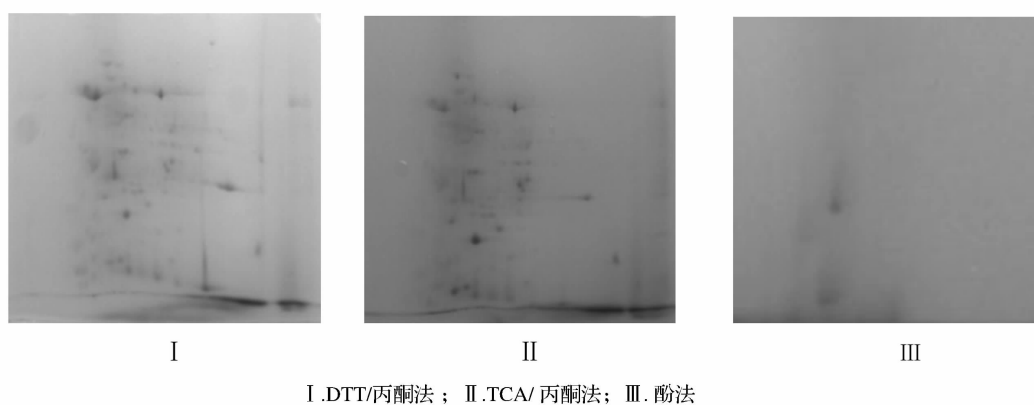
III: 17 -20℃ 被动水化 12 h, 250 V 2 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 4 000 V 3 h, 4 000 V, 24 000 Vh

1.3.4 第二向 SDS-PAGE 电泳及染色 参照郭尧君的方法^[9], 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度为 12%, 电泳参数第一步 10 mA/gel, 30 min, 20 mA/gel, 2 h。凝胶染色参考 Mooney 等^[10]胶体考染法。

2 结果与分析

2.1 大豆叶片总蛋白质提取方法的优化

大豆叶片中含有大量的色素、酚类、醌类等次生代谢物质, 这些物质的存在会严重影响第一向的等电聚焦。采用改进的 TCA/丙酮法和 DTT/丙酮法提取大豆叶片蛋白质进行双向电泳时, 经丙酮多次洗蛋白可去除这些物质, 2-DE 图谱中均能获得比较理想的蛋白点(图 1- I, II), 而利用酚法提取的蛋白损失较多, 2-DE 图谱中蛋白点很少, 由于 DTT/丙酮法获得的蛋白质干粉较少, 所以采用 TCA/丙酮法来提取大豆叶片蛋白质。



I. DTT/Actone method; II. TCA/Actone method; III. Phend method

图 1 不同提取方法对大豆叶片蛋白质 2-DE 图谱的影响

Fig. 1 The effect of different extraction methods on 2-DE map of soybean leaf protein

2.2 大豆叶片蛋白质裂解缓冲液的优化

由图 2 可知,裂解缓冲液Ⅲ的双向电泳图谱效

果最好,其他条件相同的条件下,蛋白点多而且清晰。

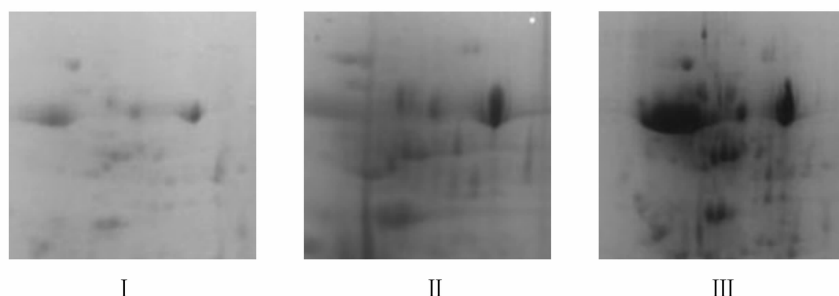


图 2 不同裂解缓冲液对大豆叶片蛋白质 2-DE 图谱的影响

Fig. 2 The effect of different rehydration buffers on 2-DE map of soybean leaves protein

2.3 最佳等电聚焦条件的优化

在双向电泳中,当聚焦时间不足或聚焦过度时,均会使 2-DE 图谱上产生明显的横条纹。由图 3 可知,聚焦条件为 24 000 Vh(处理Ⅱ,Ⅲ) 2-DE 图谱

上水平和垂直条纹较少,其中处理Ⅲ除盐聚焦效果更佳,蛋白质样品得到较好的分离、图像清晰、蛋白质斑点密集,更适合于 7cmIPG pH3-10 线性胶条进行双向电泳分离大豆叶片蛋白质。

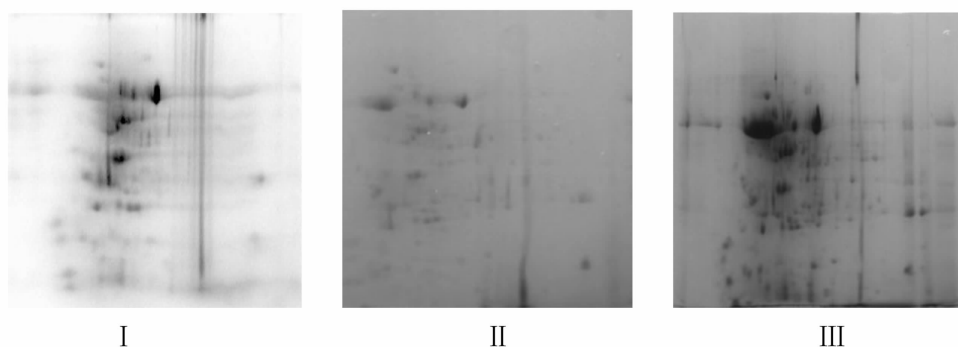


图 3 等电聚焦条件对大豆叶片蛋白质 2-DE 图谱的影响

Fig. 3 The effect of different IEF conditions on 2-DE map of soybean leaves protein

3 结论与讨论

蛋白质组学研究作为功能基因组研究的重要手段已经在各个领域学科得到了广泛的应用。目前,已经利用蛋白质组学技术研究了植物受病原菌感染诱导后的蛋白质组变化^[11]、作物对环境信号的应答^[12]、植物群体内部之间的遗传变异性^[13]等。但与原核生物、人类基因组学研究相比,关于植物蛋白质学的研究还较少。比较研究了适合于大豆叶片蛋白质组研究的双向电泳体系,认为在总蛋白的提取过程中采用 TCA/丙酮法,高速长时间离心可以有效除去植物组织中的色素、酚类、醌类等物质的影响,这样得到的蛋白样品纯度较高且蛋白干粉易于保存,是一种较为理想的方法。另外在蛋白裂解液中加入高浓度的尿素和一定量的新型两性离子去污剂 CHAPS 作为增溶剂可以很好的提高蛋白质的溶解性,而低浓度的还原剂和两性电解质又可以通过电荷之间的相互作用减少蛋白的聚合,从而增强其溶解性。使用尿素、硫脲、CHAPS、DTT、两性电解质等试剂作为裂解液配方溶解蛋白,适合于大豆叶片蛋白质的提取。在第一向的等电聚焦电泳中,温度不可超过 20℃,适当的延长除盐和聚焦时间可使不同等电点的蛋白质得到更好的分离。等电聚焦结束后最好直接进行胶条的平衡,防止蛋白的降解。总之,样品的制备是 2-DE 成功与否的关键,由于实验需求的不同及样品本身的特殊性,需要通过大量的试验来摸索其双向电泳最适合的试验条件,通过摸索建立了一套适合于大豆叶片蛋白质组学分析的双向电泳体系,以期为大豆蛋白质学领域的研究提供一套可借鉴的方法。

参考文献

- [1] Wilkins M R, Williams K L, Appel R D, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two dimensional electrophoresis and amino acid analysis[J]. *Biotechnology*, 1996, 14: 61-65.
- [2] 吴庆知, 黄开勋, 徐辉碧. 双向凝胶电泳技术进展[J]. *生物技术通讯*, 2002, 13(2): S28-31. (WU Q Z, Huang K X, XU H B. Progress in two-dimensional electrophoresis technique[J]. *Letters in Biotechnology*, 2002, 13(2): S28-31.
- [3] Gallardo K, Job C, Groot SP et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 835-848.
- [4] Agrawal GK, Yonekura M, Iwahashi Y, et al. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants part I: Technologies in proteome establishment[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 815: 109-123.
- [5] 范海延, 陈捷, 张春海, 等. 适于黄瓜叶片蛋白质组分析的双向电泳方法最佳条件的研究[J]. *沈阳农业大学学报*, 2008, 39(3): 365-367. (Fan H Y, Chen J, Zhang C Y, et al. A two-dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic analysis of cucumber leaves[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2008, 39(3): 365-367.)
- [6] Xu C P, Wesley M, Joseph Sullivan, et al. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Phytochemistry*, 2006(67): 2431-2440.
- [7] Carpentier S C, Witters E, Panis B, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis[J]. *Proteomics*, 2005, 5(10): 497-507.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [9] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999. (Guo Y J. Proteomic electrophoresis experiment technique[M]. Beijing: Science Press, 1999.)
- [10] Mooney B P, Thelen J J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag database for protein identification[J]. *Phytochemistry*, 2004, 120: 1-12.
- [11] Wang Y, Yang L, XU H, et al. Differential proteomic analysis of protein in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*[J]. *Proteomics*, 2005, 5(17): 4496-4503.
- [12] Agrawal G K, Yonekura M, Iwahashi Y, et al. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part I: Technologies in proteome establishment[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 815: 109-123.
- [13] Thiellement H, Bahrman N, Damerval C, et al. Proteomics for genetic and physiological studies in plants[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(10): 2013-2026.