

大豆叶片蛋白质双向电泳技术的改良

顾宪鹏, 罗秋兰, 高继国, 李文滨

(东北农业大学 大豆研究所, 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以大豆叶片为材料, 比较分析了3种蛋白质的提取方法, 讨论了等电聚焦时间和染色方法等关键因素对双向电泳的影响, 同时选择不同的IPG胶条, 设定了第1向等电聚焦和第2向SDS-PAGE电泳的电泳程序及参数。结果表明: 采用TCA-丙酮沉淀法提取蛋白质, 选择pH 4~7(17 cm) IPG胶条, 适当延长和改变等电聚焦的第2步和第3步的时间和参数, 并且用考马斯亮蓝和银染复合染色法对12%的凝胶进行染色, 能够获得清晰蛋白点的双向电泳图谱, 说明优化出的双向电泳技术更加适合于大豆叶片总蛋白质分离。

关键词: 蛋白质提取; SDS-PAGE; 双向电泳; 蛋白质组学

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0663-05

Improvement of Two-dimension Electrophoresis for Soybean Leaves Total Protein

GU Xian-peng, LUO Qiu-lan, GAO Ji-guo, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: To improve the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) technology for separating leaf proteins in soybean, we compared three soybean leaf protein isolation methods, discussed the influence of isoelectric focusing time and staining, chose the different IPG strips to set the electrophoresis program and parameters of the first isoelectric focusing and the second sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). When chose the TCA-acetone precipitation method to extract protein, selected pH 4-7 (17 cm) IPG strips, prolonged the isoelectric focusing time of the second and the third step, modified the isoelectric focusing parameters, and combined the coomassie brilliant blue staining and silver staining for 12% gelatin, we obtained clear soybean protein 2D-PAGE map. Results suggest the optimized method is suitable for separating total protein in soybean leaf.

Key words: Protein extraction; SDS-PAGE; Two-dimension electrophoresis; proteomics

自从1994年Wilkins和Williams提出了蛋白质组的概念, 蛋白质组、蛋白质组学及相关技术的研究已经取得了重大进展。双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是能同时对上千种蛋白质进行分离的高分辨率方法。目前仍是蛋白质组学分析的基本工具^[1]。2-DE是通过2次方向互相垂直的电泳, 将样品中的蛋白质按等电点(isoelectric point, pI)和分子质量(molecular weight, M_r)的不同呈点状分离^[2]。双向电泳步骤繁琐, 影响因素较多, 其中样品的制备极为关键^[3,4]。植物组织因含有较多次生代谢产物(如色素等), 也会严重影响电泳结果^[5-6]。

大豆为典型的短日照植物^[7], 其生长发育对光周期反应非常敏感。生物体在不同生态条件下蛋白质合成的数量和类型是截然不同的, 生物体细胞在某

一时刻特征性的生命活动基础都是由这些动态变化的蛋白质构成的^[8], 运用双向电泳技术可以清楚了解大豆光周期反应过程中蛋白质的动态变化^[9]。该研究采取不同光周期处理的大豆叶片, 比较了3种蛋白质提取方法的差异, 对不同pH值和长度胶条进行了选择, 同时优化了等电聚焦电泳的时间、电泳程序的参数以及凝胶染色的方法, 从而获得了分辨率高、重复性好的大豆叶片总蛋白质双向电泳图谱。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试大豆材料为光敏感型晚熟品种东农42, 将其培养于光照培养箱中, 在昼温24~26℃, 夜温21~23℃, 250 μmol·m⁻²·s⁻¹白光, 长日照(LD)(16

收稿日期: 2011-04-02

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(30971810)。

第一作者简介: 顾宪鹏(1987-), 男, 在读硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: guxianpeng99@sina.com。

通讯作者: 李文滨(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

h 光 8 h 暗) 条件下生长;待第 1 片三出复叶展开后(大约出苗后 10 d 左右),进行短日照(SD)(8 h 光 16 h 暗)光周期处理,分别在处理后第 1、8、15、22 天的黑暗/光照交替时,同时对 LD 和 SD 的第 1 片三出复叶进行取材, -80℃ 保存,用于蛋白质提取。

1.2 主要试剂

pH 3.0 ~ 10.0, pH 4.0 ~ 7.0 线性 17 cm 和 pH 3.0 ~ 10.0 线性 11 cm 的 IPG 预制胶条、两性电解质,矿物油购自美国 Bio-Rad 公司;胰蛋白酶(trypsin)购自美国 Promega 公司;尿素、硫脲、碳酸氢铵、十二烷基磺酸钠(SDS)、碘乙酰胺(IAA)、二巯代苏糖醇(DTT)购自美国 Sigma 公司;烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三氨基甲烷(Tris)、牛血清白蛋白(BSA)、过硫酸胺(AP)、甘氨酸、CHAPS、 β -巯基乙醇、Trizol 购自美国 Amersco 公司;丙酮、氯乙酸(TCA)、低熔点琼脂糖、甘油、甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 G-250、硫酸铵、甲醇、无水乙醇、三氯甲烷、异戊醇、冰乙酸和甲酸均为国产分析纯。

1.3 仪器设备

低温冷冻离心机、台式高速低温离心机(德国 Beckman 公司);Protean IEF System 水平电泳系统、PowerPacTM HV 垂直板电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);Powerlook 2100XL 扫描仪(美国 UMAX 公司);UNI TRAP UT-1000 真空离心机(日本 EYELA 公司)。

1.4 叶片总蛋白的提取

1.4.1 TCA-丙酮法提取叶片总蛋白 将处理后的大豆叶片材料 1 g 液氮研磨至细粉状,加入 15 mL 预冷提取缓冲液 I(含 10% 三氯乙酸,0.07% β -巯基乙醇的冷丙酮),充分振荡混匀, -20℃ 放置沉淀 1 h, 4℃, 15 000 r · min⁻¹ 离心 45 min, 弃上清,加 1 mL 提取缓冲液 II(含 0.07% β -巯基乙醇的事先预冷的丙酮),充分振荡混匀, 4℃, 15 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 弃去上清液。 -20℃ 干燥, 沉淀按 20 μ L · mg⁻¹ 比例加入样品裂解液(表 1), 35℃ 水浴 1 h, 4℃, 15 000 r · min⁻¹ 离心 45 min, 取上清, 加入 5 倍提取缓冲液 II, 振荡混匀, 4℃, 15 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清液, 放置挥发丙酮 5 ~ 8 min, 在沉淀中加 20 μ L 去离子水, -80℃ 保存备用。

1.4.2 直接提取法 取大豆叶片 300 mg 液氮研磨至细粉状,加入 30 mg 水不溶性 PVP 用于色素吸附,悬浮于 900 μ L 的蛋白质提取液(50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8、10% 甘油、0.5% SDS、5% β -巯基

乙醇)中, 4℃ 浸提 60 min, 4℃, 13 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, 分装, 直接用于电泳或 -80℃ 冻存。

1.4.3 丙酮沉淀法 在方法 1.4.2 的上清液中加入 3 倍体积的含 0.07% β -巯基乙醇的预冷的丙酮, 混匀, -20℃ 沉淀蛋白质 1.5 h, 4℃, 15 300 r · min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 80%、100% 预冷的丙酮各洗 1 次, -20℃ 放置, 待丙酮完全挥发后收集蛋白质干粉, 小量分装, 冻存于 -80℃。

表 1 样品裂解液

Table 1 Solution of sample extraction

药品名称	浓度	用量
Drug name	Concentration	Dosage
尿素	7 mol · L ⁻¹	4.2 g
硫脲	2 mol · L ⁻¹	1.52 g
CHAPS	4%	0.4 g
DTT	65 mmol · L ⁻¹	0.098 g(现用现加)
Bio-Lyte(pH 3 ~ 10)	1% (w/v)	50 μ L(40%, 现用现加)
MilliQ 水		定容至 10 mL

1.4.4 蛋白质浓度的测定 参照 Bradford 法^[10]进行蛋白质定量。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)

按 Giovanni 等的方法^[11]进行 SDS-聚丙烯酰胺电泳。

1.6 双向凝胶电泳(2-DE)

等电聚焦电泳,将 IPG 胶条加入 300 μ L 含 300 μ g 蛋白质的水化上样缓冲液(7 mol · L⁻¹ Urea, 2 mol · L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 0.2% Bio-Lyte, 65 mol · L⁻¹ DTT, 0.001% Bromphenol Blue)中,在 Bio-Rad 双向电泳仪中进行电泳,电泳步骤为水化、除盐、升压、等电聚焦、保持。

等电聚焦完毕后在平衡液中平衡,平衡分为 2 步,第 1 步为取 6 mL 平衡缓冲液母液(6 mol · L⁻¹ 尿素, 2% SDS, 0.375 mol · L⁻¹ pH 8.8 Tris-HCl, 20% 甘油),加入 0.125 g DTT, 平衡 15 min。第 2 步为采用取 6 mL 平衡缓冲液母液,加入 0.15 g 的丙烯酰胺,再平衡 15 min。平衡完毕后,采用 12% SDS-PAGE 胶先用 10 mA 低电流电泳,样品进入分离胶后用 20 mA 电泳。

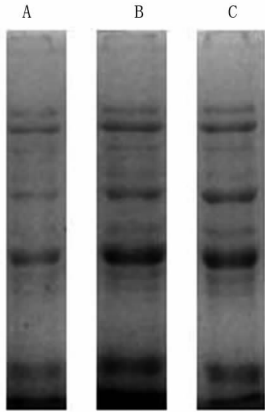
电泳结束后采用考马斯亮蓝染色和银染联合使用的染色法^[12]。胶板取下后立即置于考马斯亮蓝染色液(0.12% 考马斯亮蓝 G-250 + 10% 硫酸铵 + 10% 磷酸 + 20% 甲醇)中固定和染色,然后放入脱色液中脱色至几乎无底色为止,再进行银染的敏化处理,最后进行染色、显色和终止处理,每一步骤完成后都要用去离子水进行漂洗。用 UMAX Powerlook 2100XL 扫描仪 300dpi 分辨率采集图像,最后

用 PDQuest8.0.1 图像分析软件分析处理图像。

2 结果与分析

2.1 蛋白质不同提取方法的提取效果

分别对直接提取法、丙酮沉淀法和 TCA-丙酮沉淀法提取的大豆叶片总蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 1。直接提取法的 SDS-PAGE 电泳图



A. 直接提取法;B. 丙酮沉淀法;C. TCA-丙酮沉淀法
A. Direct extraction;B. Acet precipitation;
C. TCA-acet precipitation

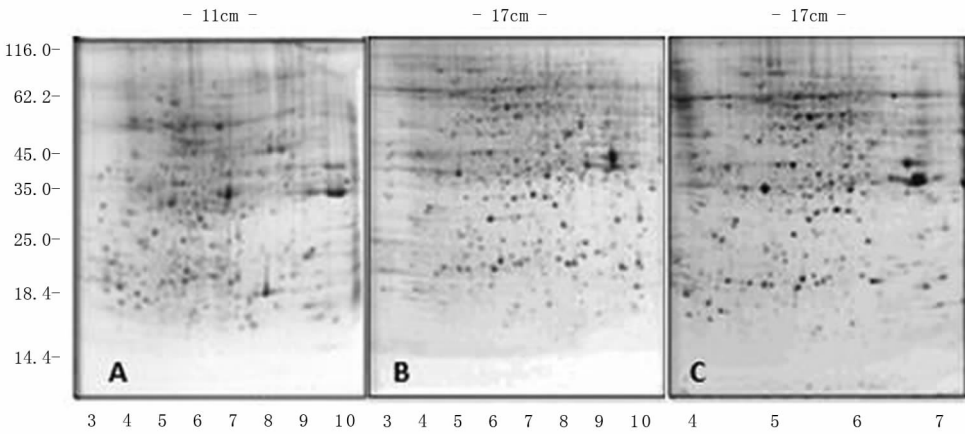
图 1 不同提取方法提取的蛋白质的 SDS-PAGE 电泳

Fig.1 SDS-PAGE of the proteins extracted by different methods

谱中蛋白质条带较少且不清晰,说明样品中盐离子浓度较高或目标蛋白质有所降解从而影响了 SDS-PAGE 电泳的效果;而丙酮沉淀法和 TCA-丙酮沉淀法的电泳图谱中蛋白质条带较多并且清晰,但丙酮沉淀法相对技术程序复杂,因此,TCA-丙酮沉淀法更适合用于提取大豆叶片蛋白质。

2.3 不同 pH 范围及不同长度 IPG 胶条的等电聚焦效果

分别使用 pH 3 ~ 10(11 cm)、pH 3 ~ 10(17 cm)和 pH 4 ~ 7(17 cm)3 种规格的胶条进行双向电泳,目的是检测等电聚焦时蛋白质是否能够有效的分离,从而得到差异的蛋白位点。从图 2 的电泳结果可以看出,在 pH 5 ~ 7 范围内有大量的叶片蛋白质点出现,而在 pH 3 ~ 5 和 pH 9 ~ 10 范围内只有少数蛋白质点出现。图 2A 和 2B 为具有 pH 范围相同、胶条长度不同的蛋白质分离效果图,图 2B 和 2C 为长度相同、pH 范围不同的胶条的蛋白质分离效果图,通过三者的比较可以看出,与使用 pH 范围大、长度较短的胶条相比,使用 pH 值范围小、长度较长的胶条进行叶片蛋白质双向电泳能够提高蛋白质分离的分辨率,解决蛋白质点密集、难以分开、不能得到有效蛋白位点的问题。



A. IPG 胶条 pH 3 ~ 10(11 cm);B. IPG 胶条 pH 3 ~ 10(17 cm);C. IPG 胶条 pH 4 ~ 7(17 cm)。
A IPG strips pH 3-10(11 cm);B IPG strips pH 3-10(17 cm);C. IPG strips pH 4-7(17 cm)。

图 2 大豆叶片总蛋白质不同 pH 值和胶条长度的双向电泳图谱

Fig.2 2-DE map of soybean leaf proteins with different pH values and IPG length

2.4 不同参数对等电聚焦电泳的影响

等电聚焦程序中,第 2 步和第 3 步的设定电压分别为 1 000 V 和 8 000 V,为了能达到等电聚焦时设定电压,当用 11 cm 胶条进行电泳时第 2 步和第 3 步设定时间分别为 1 h 和 1.5 h,用 17 cm 胶条时相应设定的时间为 1 h 和 4 h,而在对大豆叶片总蛋白质进行实验时各步骤在所设定时间内不能达到所

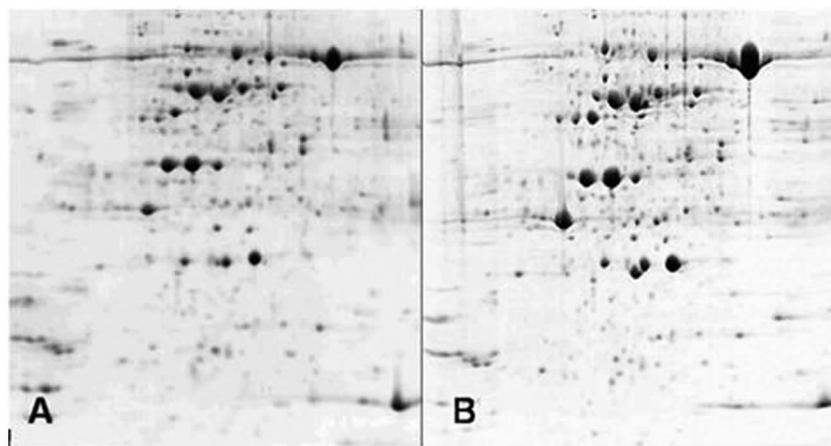
设电压值。等电聚焦过程中,蛋白质是否能够充分到达等电点位置与当时电压高低有关,电压达不到会直接影响等电聚焦的效果,因此试验经过多次对时间改动的尝试和比较,确定用 11 cm 胶条时的第 2 步和第 3 步设定时间应延长到 2 h 和 3 h,用 17 cm 胶条时的第 2 步和第 3 步设定时间应延长到 2 h 和 5 h,适当延长低电压的电泳时间,最终使电压可以

达到预设的 8 000 V, 确保蛋白质在 8 000 V 的电压下有充分的时间进行电泳, 在实际操作中 11 cm 胶条等电聚焦的总伏小时 (Vhr) 需要达到 3 000 Vhr 以上, 17 cm 胶条需要达到 4 000 Vhr 上。

2.5 考马斯亮蓝和银染联合使用的效果

凝胶采用了考马斯亮蓝和银染复合染色法, 复合染色法的染色效果要好于单独的考马斯亮蓝或银染

染色法。图 3A 为考马斯亮蓝染色效果, 所得到的凝胶有十分明亮的背景, 清晰的蛋白质点。图 3B 为考马斯亮蓝染色后的银染效果, 凝胶背景较暗, 由于染色较深蛋白质密集区的蛋白质点之间边界会不太清晰, 但银染能显示出考马斯亮蓝染色不具备的一些低丰度的蛋白质点。因此, 为了能够得到更多蛋白质点的信息, 可以将 2 种染色方法联合起来用。



A. 考马斯亮蓝染色结果; B. 考马斯亮蓝染色后的银染结果。

A. The result of dyeing with coomassie brilliant blue;

B. The result of dyeing with silver after coomassie brilliant blue.

图 3 双向电泳后考马斯亮蓝染色和银染效果的比较

Fig. 3 Comparison of dyeing with coomassie brilliant blue and silver in 2-DE

3 讨论

3.1 蛋白质样品制备是双向电泳的关键步骤

蛋白质提取是双向电泳的第 1 步, 提取效果的好坏直接影响蛋白质的分离及最后结果的可靠性。因此提高样品蛋白质的溶解性并降低蛋白质的损耗和降解, 才能获得更多的蛋白质信息^[12]。样品中盐份含量过高会导致电泳的内渗升高, 从而导致等电聚焦时电压不能达到预设值而直接影响等电聚焦效果。样品制备分为蛋白质的提取、裂解液配方的选择、杂质的去除等步骤, 样品制备方法要根据不同试验材料进行选择^[13]。试验中增加样品的处理步骤一定程度上可以提高样品纯度, 但蛋白质样品制备步骤太过于复杂, 得到样品的双向电泳结果的重复性就不好, 蛋白质种类也会变少。因此, 为获得理想样品应尽量采用步骤简单的样品制备方法。TCA-丙酮沉淀法是植物蛋白样品制备最常用方法之一, 能够有效地除去样品中的盐离子和其它杂质分子, 利于双向电泳电压的上升^[14]。该试验中的 TCA-丙酮沉淀法具有操作步骤简单, 蛋白质提取效率高的特点, 更适合于双向电泳中对大豆叶片总

蛋白的提取。

3.2 等电聚焦的时间是电泳体系的一个重要参数

理论上讲, 要获得最好的图谱质量和重复性所需最佳时间是 IEF 分离达到稳定态所需的时间。聚焦时间太短, 会导致水平和垂直条纹的出现^[15]。过度聚焦虽然不会导致蛋白质向阴极漂移, 但会因为活性水转运而导致过多水在 IPG 胶表面渗出 (电渗) 而造成蛋白图谱变性, 在胶条碱性端产生水平条纹以及蛋白丢失。不同的 pH 范围和 IPG 胶条长度所需的聚焦时间不同, 在该试验中出现蛋白聚焦不完全, 产生横向条纹的现象, 当把聚焦时间从 8 000 V 的 6 h 增加到 8 h 后, 则聚焦效果出现明显改善。该试验中将双向电泳的第 2 步和第 3 步的设定电泳时间做了一定的调整, 因为不同的蛋白样品中所含有的盐份都有不同, 并且所需要的升压时间也不相同^[15]。

3.3 凝胶染色方法的选择

该试验采用的是 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 具有较大的分离范围, 非常适合大豆叶片总蛋白的分离。用银染和考马斯亮蓝染色效果都较好, 能检测到的蛋白质数目也很相近。相关文献表明由于考马斯

亮蓝染色所要用到的蛋白质质量为 450 μg ,蛋白质的聚集效果也较差,得到图像不清晰,部分蛋白质会相互叠加^[16]。该实验采用考马斯亮蓝和银染复合染色的方法,在银染时,蛋白质点的颜色出现由浅变深的变化过程,颜色的深浅可作为银染程度的重要依据。考马斯亮蓝染色能显示出丰度较高或蛋白质密集区的蛋白质,而再进行银染时,这些丰度较高或蛋白质密集区的大部分蛋白质点会混成一片,但一些丰度低的蛋白质点会显示出来。因此,在分析蛋白质图谱时,可以将 2 种染色方法结合,合理利用二者的优点,可以获得更多的蛋白质信息。

4 结 论

采用直接提取法、丙酮沉淀法和 TCA-丙酮沉淀法提取大豆叶片蛋白质并且分别对 3 种方法提取的蛋白质进行了 SDS-PAGE 电泳,结果 TCA-丙酮沉淀法更适合用于提取大豆叶片蛋白质。同时分别使用了 pH 3 ~ 10 (11 cm)、pH 3 ~ 10 (17 cm) 和 pH 4 ~ 7 (17 cm) 3 种规格的胶条进行了双向电泳,结果显示使用 pH 值范围小的长胶条进行叶片蛋白质双向电泳能够更好提高蛋白质分离的分辨率。在凝胶方面,采用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶适合大豆叶片总蛋白的分离。在染色方法的选择上,采用的银染和考马斯亮蓝复合染色法得到了较好的染色效果,获得了大量的蛋白质信息。

参考文献

- [1] 季之娟,薛庆中. 植物蛋白质组学研究进展[J]. 生命科学, 2004,16(4):241-246. (Ji Z J, Xue Q Z. The research advance on plant protein tissue[J]. Life Sciences, 2004, 16(4): 241-246.)
- [2] Görg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. Proteomics, 2004, 4 (1): 3665-3685.
- [3] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250 (10): 4007-4021.
- [4] 徐幼平,徐秋芳,蔡新忠,等. 适于双向电泳分析的番茄叶片总蛋白提取方法的优化[J]. 浙江农业大学学报,2007,19(2): 71-74. (Xu Y P, Xu Q F, Cai X Z, et al. Optimization of two-dimension electrophoresis of leaf proteins of tomato[J]. Acta Agriculture University Zhejiangensis, 2007, 19(2): 71-74.)
- [5] 吴庆丰,王崇英,王新宇,等. 山黧豆叶片蛋白质双向电泳技术的建立[J]. 西北植物学报,2006,26(7):1330-1336. (Wu Q F, Wang C Y, Wang X Y, et al. Establishment of Two-dimension elec-
- trophoresis of leaf proteins of *Lathyrus sativus* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(7): 1300-1336.)
- [6] 魏琳,陈由强,叶冰莹,等. 卷柏总蛋白质提取方法及双向电泳条件的建立[J]. 生物技术通讯,2006,17(1):46-48. (Wei L, Chen Y Q, et al. Establishment of two-dimension electrophoresis of total proteins of selaginella[J]. Bulletin of Biotechnology, 2006, 17 (1): 46-48.)
- [7] 郑蕊,喻德跃. 适于蛋白质组研究的大豆种子双向电泳技术的改进[J]. 大豆科学,2005,24(3):166-170. (Zhen Y, Yu D Y. Establishment of two-dimension electrophoresis of seeds proteins of soybean[J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 166-170.)
- [8] Agrawal G K, Hasidic M, Graham K, et al. In-depth investigation of soybean seedfilling proteome and comparison with a parallel study of rape seed[J]. Plant Physiology, 2008, 148(3): 504-518.
- [9] Xu C, Garrett W M, Sullivan J, et al. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Phytochemistry, 2006, 67(2): 2431-2440.
- [10] Pasquali C, Fialka I, Huber L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. Electrophoresis, 1997, 18 (2): 2573-2581.
- [11] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(4): 1327-1333.
- [12] 刘丽娟,舒烈波,陈海荣,等. 适用于生菜叶片蛋白质双向电泳方法的建立及初步应用[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1): 106-110 (Liu L J, Shu L B, Chen H R, et al. Two-dimensional electrophoresis for leaf protein of lettuce (*Lactuca sativa*) and its primary application[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2009, 10 (1): 106-110.)
- [13] 王玉琪,彭新湘. 适用于水稻叶片蛋白质组分析的双向电泳技术[J]. 植物生理与分子生物学学报,2006,32(2):252-256. (Wang Y Y, Peng X X. Establishment of two-dimension electrophoresis of leaf proteins of rice[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(2): 252-256.)
- [14] 余初浪,严顺平,孙卫宁,等. 适用于水稻根、叶、悬浮细胞总蛋白分析的高分辨率双向电泳方法[J]. 中国水稻科学,2006,20 (5):549-552. (Yu C L, Yan S P, Sun W N, et al. High-resolution two-dimensional electrophoresis for total proteins in rice roots, leaves and suspension cells [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2006, 20(5): 549-552.)
- [15] Jorge I, Navarro R M, Lenz C, et al. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching[J]. Proteomics, 2005, 5(1): 222-234.
- [16] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimension electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1057.