

适于蛋白质组研究的大豆种子蛋白双向电泳技术的改进^{*}

郑蕊^{1,2} 喻德跃^{1**}

(1. 南京农业大学大豆研究所, 国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095;
2. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘要 以大豆种子为材料, 通过对样品制备、电泳条件以及染色方法等关键步骤进行改进, 在大豆种子蛋白分析研究中获得了质量较高的双向电泳图谱, 为大豆种子蛋白质组研究提供一较好的实验方法。

关键词 大豆; 种子蛋白; 双向电泳; 蛋白质组

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)03-0166-05

随着众多生物基因组测序的完成, 生命科学研究已经进入以获知基因功能为目标的后基因组时代。在获得了基因的全部序列信息后, 须进一步明了相关基因的功能。由于基因功能的主要体现者是蛋白质, 而蛋白质的修饰加工、转运定位、立体结构形成、蛋白质互作、蛋白质核酸互作等, 都不能在基因序列水平上直接获知, 为此, 1994年, Wilkins等^[1]提出了蛋白质组(Proteome)的概念。蛋白质组指的是“由一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部相应的蛋白质”。蛋白质组是以蛋白质为研究对象, 从蛋白质整体水平阐明基因的功能, 阐明生命现象的本质和规律。

开展蛋白质组研究的关键是尽可能完全地获得一个基因组在一个生物体或一个组织器官的特定时期表达的蛋白质的种类和数量。双向电泳(2-DE)是分离组织和器官蛋白质的首选技术, 其原理是将等电聚焦(IEF)和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结合起来, 依据蛋白质不同的等电点和相对分子量分离生物体中复杂的蛋白组分, 具有较高的分辨率和灵敏度。双向电泳技术早期主要应用于细菌、动物组织和细胞全蛋白组分的研究, 近年来, 双向电泳技术在植物中的应用亦有不少报道^[2-4], 但由于植物细胞中含有大量的酚类和醌类等次生代谢物质, 种子中又含有大量的糖类等大

分子物质, 因而对电泳过程干扰较大, 且用常规蛋白纯化方法不易达到纯化目的, 从而影响蛋白质的分离效果。2-DE实验周期长、步骤多, 如样品处理^[5]、上样方式^[6]、等电聚焦和染色^[7]等各个环节均影响2-DE的分离效果。对于不同来源、不同组织的样品, 都需要摸索其适宜的实验条件。因此, 针对具体样品2-DE实验条件的优化是蛋白质组分析的先决条件。

随着大豆功能基因组研究的深入, 大豆蛋白质组研究也日益得到重视。本研究以大豆为材料, 对传统的样品制备、电泳及染色等方法进行了一些改进和优化, 初步确定了适合大豆种子蛋白2-DE的样品提取方法、电泳条件和蛋白点检测方法, 为大豆蛋白质组研究提供一较好的实验方法。

1 材料

1.1 大豆材料

大豆 N2899 种子, 由南京农业大学国家大豆改良中心种质资源研究室提供。

1.2 试剂及设备

尿素, 甘氨酸, 三氨基甲烷(Tris), 碘乙酰胺,

* 收稿日期: 2005-04-11

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项和教育部跨世纪优秀人才基金。

作者简介: 郑蕊(1972-), 女, 在读硕士, 讲师, 研究方向植物生物技术。

** 通讯作者: E-mail: dyu@njau.edu.cn.

低熔点琼脂糖,十二烷基磺酸钠(SDS),丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,四甲基乙二胺(TEMED),过硫酸胺(AP),碘乙酰胺、IPG 预制胶条,两性电解质,矿物油等均为 Bio-Rad 公司产品;二硫代苏糖醇(DTT),牛血清白蛋白(Albumin Bovine)为 AM-RESO 分装,蛋白酶抑制剂(protease inhibitor cocktail)为 Sigma 产品;乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂),考马斯亮兰 G-250、考马斯亮兰 R-250、苯酚、蔗糖、硫酸胺、三氯乙酸(TCA)和甘油等试剂为国产分析纯。

等电聚焦电泳仪 Protean IEF cell, VersaDoc 3000 凝胶成像系统, PDQuest 图像分析软件均为 Bio-Rad 公司产品;垂直板电泳仪 Ettan DALT-twelve 为 Amersham Pharmacia Biosciences 公司产品,超速离心机为美国 Beckman 公司产品, Vcx600 超声破碎仪为美国天美公司产品。

2 方法

2.1 样品制备及蛋白质浓度测定

2.1.1 三氯乙酸-丙酮法

蛋白样品的提取在低温下操作,方法参照 Gallardo 等^[2]并做了改进。大豆种子一粒(约 200mg)去皮,加入 20mg PVP,于液氮中磨成粉末,转入 10ml 离心管中,加入 3ml 冷 10% TCA-丙酮溶液,内含 0.07% 的 β -巯基乙醇, -20℃ 沉淀 1h, 4℃ 15,000rpm 离心 15min,沉淀悬浮于 3ml 冷丙酮中(内含 0.07% 的 β -巯基乙醇), -20℃ 放置 2 小时或过夜,期间间歇振荡, 4℃, 15,000rpm, 离心 20min, 去丙酮,该步重复 3-4 次,直到有机相呈无色为止。将沉淀冷冻干燥成粉,即制得丙酮粉。

每 mg 丙酮粉加入 10ul 的蛋白质裂解缓冲液(9M 脲、4% CHAPS、1% ampholyte (pH3-10), 0.1% protease inhibitor cocktail)溶解。4℃ 搅拌 10min 后加入 14mM 的 DTT,搅拌 20min 后,冰浴超声波处理 3min, 4℃, 35,000g 离心 20min (重复 1 次),取上清液,即得蛋白样品。分装, -20℃ 冻存。

2.1.2 苯酚法

蛋白样品的提取参照 Mooney 等^[3]并做了改进。大豆种子 1g,去皮,液氮研磨成粉末,加入 15ml 提取液(50% 苯酚, 0.45M 蔗糖, 5mM EDTA, 3% DTT 或 β -巯基乙醇, 50mM Tris-HCL (pH8.8), 在冰浴上不停的匀浆,直至匀浆液达到室温后,转移到带螺旋盖的管子中, 4℃, 间歇涡旋 30min;超声波

处理 3min 后 4℃, 8000g, 离心 20min; 去上层酚相后,加入 5 倍体积的冰浴的 0.1M 的乙酸胺(甲醇配制),混匀, -20℃, 放置至少 1h; 4℃, 8000g, 离心 15min 沉淀蛋白;弃去上清,沉淀用 0.1M 的乙酸胺(甲醇配制)洗两次,再用 80% 冷丙酮洗两次,最后用 70% 乙醇洗一次,沉淀存贮于 -20℃ 或冷冻干燥后,再用溶胀液悬浮后直接用于等电聚焦电泳(IEF)。

Bradford 法^[8]测定样品中蛋白质浓度,标准蛋白为牛血清蛋白(BSA)。

2.2 双向电泳

2.2.1 第一向等电聚焦电泳(IEF)

样品用上样缓冲液(8M 尿素, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 2% 载体两性电解质,痕量溴酚兰)稀释,每根 17 cm pH 3-10 线性 IPG 预制胶条,考染蛋白质上样量为 1mg,总上样体积为 350 μ l;银染蛋白质上样量为 150 μ g,总上样体积为 300 μ l。聚焦温度 19℃,聚焦电压小时数 50000 Vhs。

2.2.2 平衡

聚焦完毕后,胶条先在平衡液 I (0.375M Tris-HCl pH 8.8, 6M 尿素, 20% 甘油, 2% SDS, 2% DTT) 中于摇床平衡 15 min, 再在平衡液 II (2.5% 碘乙酰胺替换 2% DTT,其余组分同于平衡液 I) 中平衡 15 min。

2.3 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

平衡好的 IPG 预制胶条转移到 SDS-PAGE 凝胶上,用低熔点琼脂糖封胶液(0.5% 低熔点琼脂糖, 25 mM Tris, 198 mM 甘氨酸, 0.1% SDS, 痕量溴酚兰)封闭,待封胶液凝固后进行第二向垂直电泳。5w/gel 恒功率 45 min 后, 15w/gel 恒功率直到溴酚蓝前沿到达距玻璃板底部 1cm 处,结束电泳。

2.4 染色

凝胶染色参考 Mooney 等胶体考染法^[3]并做了改进。12% 三氯乙酸(TCA)固定 2hs 后, ddH₂O 水洗 3 次,每次 15min, 20% 甲醇, 1.6% 磷酸, 8% 硫酸胺和 0.08% 考马斯亮蓝-G250 染色 16-24hs, ddH₂O 漂洗脱色。

3 结果与讨论

3.1 样品制备

样品制备是 2-DE 电泳成功的基础。本研究分别采用改进的三氯乙酸-丙酮法和苯酚法提取大

豆种子蛋白,其考染的电泳图谱如图1所示。结果发现苯酚法提取的蛋白样品2-DE图谱背景重,有水平和垂直拖尾现象(图1,A)。这是由于酚提取法尽管可以除去样品中大量的酚类、醌类和色素等次生代谢物质,但是对大豆种子中含有的糖类核酸等大分子物质,不易去除,从而影响了2-DE图谱的质量。

应用传统的三氯乙酸-丙酮法提取蛋白时,经丙酮的作用糖与蛋白质一起沉淀,大量的糖类会影响电泳图谱的质量,所以要先去除糖类,再除色素脂类等物质。尽管采用透析法去糖效果很好,但透析

程序复杂并耗时长,也易引起蛋白质变性^[9]。在实验中发现高速长时间离心作用,可以把密度大的糖分离至上清液的上层,因为选取增加离心速度延长离心时间的方法,可以去除大部分糖。然后再用丙酮多次洗蛋白,去除色素、酚类醌类等物质。样品中核酸的存在同样会影响电泳图谱的质量,加入核酸酶会使核酸降解,可是同时又引入了外源蛋白,本实验在样品裂解时结合物理超声波破碎可有效降解核酸。经改进后的方法提取的蛋白样品电泳图背景清晰,分辨率高(图1,B)。经多次实验比较,重复性好。

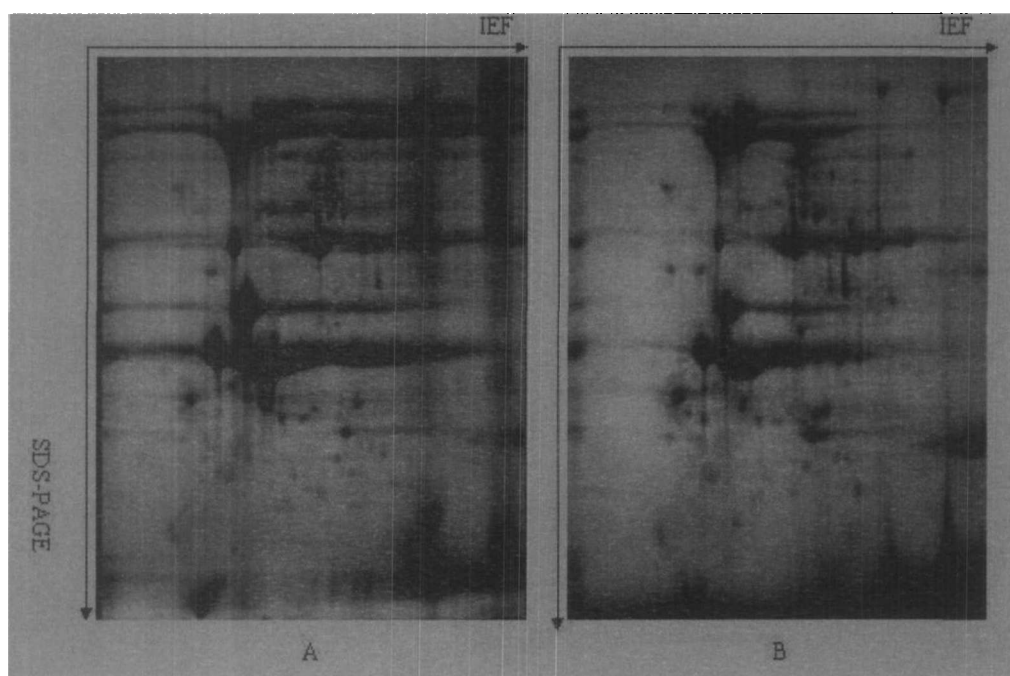


图1 大豆种子贮藏蛋白2D电泳图谱(不同提取法)

Fig. 1 2-DE maps of soybean seed storage proteins (with different extraction methods)

A: 苯酚提取法, B: 三氯乙酸-丙酮提取法, 考马斯亮兰 R-250 染色, A、B 上样量均为 1mg

A: Proteins extracted with phenol B: Proteins extracted with Trichloroacetic acid (TCA)-acetone, Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB-R250) staining, 1mg total proteins loaded on both A and B

此外,应注意干燥后的蛋白质样品在等电聚焦前要溶解在样品裂解缓冲液中,因其中含有高浓度的尿素,遇热后分解产生氰酸盐而引起蛋白质氨基甲酰化,这会影响后继的质谱鉴定。因此,溶解后的蛋白质样品尽量不要加热,如须加热也不宜超过 37℃。另外,蛋白质样品一旦溶解在含尿素的裂解液中,最好当天使用,如果冷冻保存,应分装冻存以减少反复冻融对蛋白的损耗。

3.2 第一向等电聚焦(IEF)和第二向 SDS-PAGE 电泳

等电聚焦时要注意环境温度,防止尿素析出。

本实验采用 Bio-Rad 公司等电聚焦电泳仪 Protean IEF cell 进行等电聚焦,温度设为 19℃。胶条的重泡胀和等电聚焦在同一容器中进行,采用样品直接加入重泡胀液,避免了使用样品杯上样在胶面某一点造成蛋白质沉淀^[10]。对于 17cm 的胶条样品溶液上样总体积为 350-450μl 为好,过多的样品液不能被胶条充分吸收,影响电泳正常进行。溶胀一小时后再加覆盖油。样品再水化采用被动溶胀方式 14h,不需预电泳,直接等电聚焦,总聚焦达到 50000Vhs 时,聚焦效果比较好。等电聚焦结束后胶条需要平衡,平衡的目的是使 SDS 与蛋白分子作

用^[11]。但是平衡时操作应小心,每次对胶条的处理都要保证不碰胶面,避免蛋白的损耗;需严格控制两次平衡时间,过长或过短都会引起蛋白点的水平或垂直拖尾。平衡后的胶条与 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的良好接触是减少蛋白丢失的一个重要环节。为了使胶条与 SDS 凝胶紧密接触,先于凝缩胶面上滴含有

溴酚蓝低熔点琼脂糖,再将平衡后的胶条置于其上,注意清除胶面与胶条之间的气泡,然后用琼脂糖封胶,等琼脂糖凝固后进行第二向电泳。实验结果证明,这样的操作可减少因胶条和凝胶之间接触不紧密引起蛋白质的不完全转移。

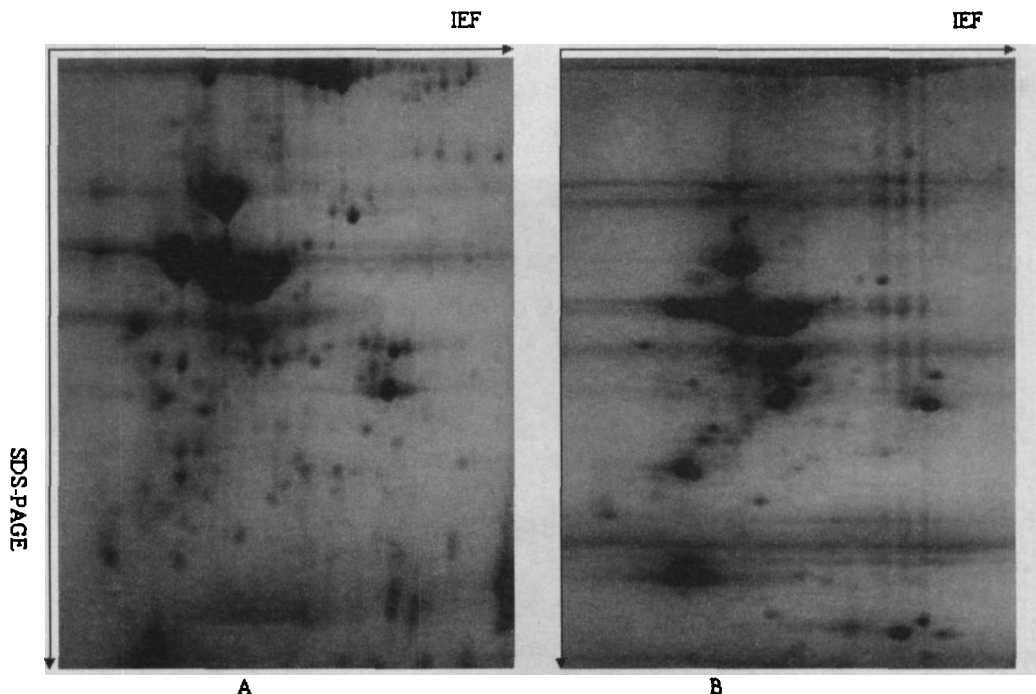


图 2 大豆种子贮藏蛋白 2D 电泳图谱(不同染色法)

Fig. 2 2-DE maps of soybean seed storage proteins (with different staining methods)

A,考马斯蓝 G-250 染色,B,考马斯蓝 R-250 染色蛋白样品为改良后的三氯乙酸-丙酮法提取,A,B 上样量均为 1mg
A: Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB-G250) staining. B: Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB-R250) staining Proteins extracted with improved methods of Trichloroacetic acid (TCA)-acetone 1mg total proteins loaded on both A and B

3.3 染色

双向电泳图谱蛋白质的检测是通过染色反应实现的。目前常用的染色方法有考马斯亮兰、银染和荧光染色法。银染法尽管灵敏度高,但步骤繁多、耗时长,需要严格把握时间,并且稳定性和重复性较差^[12]。而且银染过程中加入的甲醛会引起蛋白质修饰,影响后继的质谱鉴定。荧光染色灵敏度也很高,但是试剂昂贵,并需要专门的仪器设备。考马斯亮兰 R-250 染色法易操作,可是灵敏度低,样品中许多低丰度蛋白检测不到(图 2,B)。我们用改进的胶体考马斯亮兰 G-250 染色,操作简单易掌握,比考马斯亮兰 R-250 染色检测灵敏度高,而且避免了传统的考马斯亮兰 R-250 染色中冰醋酸的使用,纯水脱色即可得到背景清晰的图谱(图 2,A)。

研究表明,应用本研究的改良技术可检测到大豆种子蛋白质斑点 300 个左右,而用传统的方法仅

检测到 240 个左右蛋白质点。该改良方法适用于大豆种子蛋白的双向电泳分析,并在大豆种子发育蛋白组研究中取得较满意的结果(包括质谱分析将另文发表),因此,可以将本研究建立的 2-DE 技术应用于大豆种子蛋白质组的研究。

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 Gallardo K, Job C, Groot SP et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming[J]. Plant Physiology, 2001, 126, 835-848.
- 3 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 identifica-

- tion[J]. *Phytochemistry*, 2004, 120, 1—12.
- 4 Watson B S, Asirvatham V S, Wang L J et al. Mapping the Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*)[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131, 1104—1123.
 - 5 兰彦, 钱小红, 王阔, 等. 蛋白质组分析中蛋白质分步提取方法的建立[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(3), 415—418.
 - 6 Sanchez J C, Rouge V, Pisteur M et al. Improved and simplified in-gel sample application using reawelling of dry immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18, 324—327.
 - 7 郭亮君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18(1), 32—37.
 - 8 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248—254.
 - 9 朱宏, 张中恒, 王同昌. 小麦叶片蛋白质双向电泳的改良方法[J]. *东北林业大学学报*, 2004, 32(4) 68—69.
 - 10 Rabilloud T H, Ualette C, Lawrence J J. Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension[J]. *Electrophoresis*, 1994, 15, 1522—1558.
 - 11 Holloway P J, Arunel P H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of plant proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 1988, 172, 8—15.
 - 12 孙崇荣, 李育庆, 汪景长, 等. 水稻种子蛋白质组分的双向电泳分析[J]. *作物学报*, 1987, 13(1), 63—68.

IMPROVEMENT OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF BEAN SEED PROTEIN FOR PROTEOME ANALYSIS

Zheng Rui^{1,2} Yu Deyue^{1*}

(1. *Nanjing Agricultural University, Soybean Research Institute, National Center for Soybean Improvement, and National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021*)

Abstract Using soybean seed as experimental material, maps of two-dimensional electrophoresis with high quality were obtained through improving the key procedures, such as sample preparation, electrophoresis conditions and staining methods. This improved 2-DE technique will be served as a basis for further investigation of soybean seed proteome.

Key words Soybean; Seed protein; Two dimensional electrophoresis(2-DE); Proteome

欢迎订阅 2006 年《北方园艺》

《北方园艺》期刊是由黑龙江省农科院主管, 黑龙江省园艺学会、黑龙江省农科院园艺分院共同主办的以科学研究与技术普及相结合的大型综合性农业技术期刊, 是我国园艺科技类核心期刊。本刊坚持以汇集园艺科技最新的技术成果为责任、荟萃园艺科技最好的佳篇新作为义务、传播园艺科技最快的致富信息为宗旨, 以知识性、先进性、实用性为办刊特色。本刊内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。主要栏目: 专题综述、设施园艺、栽培技术(菜园、果园、瓜园)、试验研究、园林花卉、贮藏保鲜、植物保护、生物技术、食用菌类、经验之谈、农资信息等。信息涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究的新技术、新品种、新经验。

本刊为双月刊, 单月 5 日出版, 大 16 开本, 80 页内文, 平订, 彩四封及内插彩页印刷, 每期 6.00 元, 全年 36.00 元。全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 14—150, 或直接向编辑部汇款订阅, 竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校师生, 各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅, 订阅者请在汇款单附言栏内写清订购份数、收件人姓名及详细地址, 邮编。

地址: 哈尔滨市动力区哈平路义发源 电话(传真): 0451—86674276

邮编: 150069 联系人: 贾丹萍