

# 二维电泳技术在大豆子叶微粒体膜结合蛋白研究中的应用

乞永艳<sup>1</sup>, 刘富海<sup>2</sup>, Arnaud Bovy<sup>3</sup>, Jan Cordewener<sup>3</sup>, Froukje Vander Wal<sup>3</sup>

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京, 100093; 2. 北京天宝康高新技术开发有限公司, 北京, 100097;  
3. Plant Research International, P. O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands)

**摘要** 以硝酸银诱导的大豆子叶为材料, 初步探讨了二维电泳技术在分离大豆子叶微粒体膜结合蛋白中的应用, 研究了重新水化溶液的组成、加样量、等电聚焦的 total voltage hours 以及不同 pH 梯度范围 IPG(固相 pH 梯度)胶条等因素对膜蛋白的溶解和二维电泳图像的影响。结果表明对于 70×3×0.5mm IPG 胶条, 能够溶解较多蛋白质和获得高质量二维电泳图像的优化条件为: 由尿素、硫脲、三丁基膦和 C<sub>7</sub>BZO 组成的重新水化溶液(TUC<sub>7</sub>T<sub>2</sub>)、80μg 的加样量和 20000vhr 的 total voltage hour。在此优化条件下, 与宽范围 pH 梯度 IPG 胶条相比, 使用窄范围 pH 梯度胶条可以观察到更多的和质量更好的蛋白质点, 结果发现至少有 13 个点只存在于硝酸银诱导的样品中, 而不存在于对照中, 其代表的蛋白质的等电点在 4.0~8.0。

**关键词** 二维电泳; 大豆; 子叶; 微粒体膜结合蛋白

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)01-0011-05

## TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF MICROSOMAL MEMBRANE BOUND PROTEINS IN SOYBEAN COTYLEDONS

QI Yong-yan<sup>1</sup>, LIU Fu-hai<sup>2</sup>, Arnaud Bovy<sup>3</sup>, Jan Cordewener<sup>3</sup>, Froukje Vander Wal<sup>3</sup>

(1. Bee Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100093; 2. Tianbao-kang High-tech Co. Ltd., Beijing, 100097; 3. Plant Research International, P. O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, the Netherlands)

**Abstract** Soybean cotyledons induced by silver nitrate were used to investigate the work of two-dimensional electrophoresis (2DE) on the separation of microsomal membrane bound proteins. The following influencing factors on the solubilization of membrane bound proteins and 2DE images were discussed, such as the composing of rehydration solution, sample amount, focusing total voltage hours and different range of immobilized pH gradients (IPG) strips. It was shown that the samples rehydrated in solution making of urea, thiourea, tributyl phosphine and (3-(4-heptyl) phenyl 3-hydroxy propyl)(dimethylammonio propane sulfonate)(C<sub>7</sub>BZO) could be seen much better 2DE images than that of the other tested rehydration solutions. At the same time, the other running conditions for 70×3×0.5mm IPG strips were optimized as that the sample amount was 80μg and the focusing total voltage hour was around 20000. Much more clear spots were received

by the usage of narrow-range IPG strips than that of wide-range IPG strips. Thirteen distinguish spots were found only in the induced samples and not in the control samples, whose isoelectric points (pI) were 4.0~8.0.

**Key words** Two-dimensional electrophoresis; *Glycine max* (L.) Merri; Cotyledons; Microsomal membrane bound proteins

膜蛋白在细胞中的特殊位置决定了它们起着信号传导、细胞粘合、代谢物和离子运输等多种重要作用,如大豆中重要的植物抗毒素兼植物雌激素 glyceollins 的生物合成中的一些关键酶多属膜结合蛋白<sup>[1~3]</sup>。鉴于膜蛋白结构和性质的特异性,对二维电泳是否适用于膜蛋白研究的争论一直持续至今<sup>[4~6]</sup>。尽管如此,在没有找到适合膜蛋白研究的更好方法之前,二维电泳仍是目前研究膜蛋白最常用的方法。本研究就二维电泳技术在大豆子叶微粒体膜结合蛋白研究中的应用作了初步探讨,以期为大豆中相关膜蛋白的研究提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大豆种子购自荷兰 Biologisch Dynamische Zaaiteelt de Bolster 公司。硝酸银、Tris-HCl、phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)、Dowex 1-2、CHAPS、牛血清白蛋白(BSA)、硫脲、尿素、SDS、amidofobetaine-1(ASB-14)、三丁基膦(TBP)、(3-(4-heptyl) phenyl 3-hydroxy propyl)(dimethylammonio propane sulfonate)(C<sub>7</sub>BZO)等购自 Sigma 公司。二硫苏糖醇(DTT)购自 Acros Organics。“2-D Clean-up Kit”、pH3.0~10.0L Immobiline Drystrip(70×3×0.5mm)购自 Amersham Biosciences 公司。“RC DC Protein Assay”试剂盒、pH3.0~6.0L、pH5.0~8.0L 和 pH7.0~10.0L Readystrip™ IPG Strip(70×3×0.5mm)、Sypro(r) Ruby Protein stains 购自 Bio-Rad Laboratories, Inc.。碘乙酰胺(IAA)购自德国,其它试剂均为分析纯。

Buffer A:0.2M Tris-HCl(pH7.5),15%蔗糖,1mM PMSF,1mM DTT,10% Dowex1-2 (w/v)。

固定液:40%乙醇,10%甲酸,50% MilliQ  
漂洗液:10%乙醇,7.5%甲酸,82.5% MilliQ

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 植物材料的准备(参考文献<sup>[7]</sup>)

#### 1.2.2 氯化镁沉淀法提取微粒体膜蛋白

将 1.2.

1 获得的植物材料按照 1:2(w/v)的比例加入到 buffer A 中,在 0℃下充分研磨,采用氯化镁沉淀法提取大豆子叶微粒体膜蛋白<sup>[8]</sup>。

表 1 重新水化溶液的不同组成  
Table 1 Composing of dehydration solutions

| 试剂 Reagent                          | TUAT <sub>2</sub> | TUC <sub>7</sub> T <sub>2</sub> | TUCT <sub>2</sub> | TUCD  | Final Con. |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|-------|------------|
| 硫脲(T)                               | 1.52g             | 1.52g                           | 1.52g             | 1.52g | 2M         |
| 尿素(U)                               | 4.8g              | 4.8g                            | 4.8g              | 4.8g  | 8M         |
| ASB-14(A)                           | 0.1g              |                                 |                   |       |            |
| TBP(T <sub>2</sub> )<br>(200mM 储备液) | 100μL             | 100μL                           | 100μL             |       | 2mM        |
| C <sub>7</sub> BZO(C <sub>7</sub> ) |                   | 0.1g                            |                   |       |            |
| CHAPS (C)                           |                   |                                 | 0.2g              | 0.2g  | 2%         |
| DTT                                 |                   |                                 |                   | 28mg  | 20mM       |

MilliQ;补足至 10mL

1.2.3 蛋白质浓度测定 依据 Lowry 比色法遵循“RC DC Protein Assay”试剂盒使用说明进行,以 BSA 为标准。

1.2.4 二维电泳分离膜蛋白 使用“2-D Clean-Up Kit”,去除影响等电聚焦的杂质。将样品溶解在重新水化溶液中,转移到 Immobiline Drystrip Re-swelling tray 中,IPG 胶条覆盖,液体石蜡密封,室温下重新水化至少 10h。等电聚焦直到总电压达到一定数值。分别依次在含有 1%(w/v)DTT 和 2.5%IAA (w/v)的平衡缓冲液中平衡 15min。第二维电泳。在固定液中固定至少 30min。Sypro(r) Ruby Protein gel stain 染色至少 3h。在漂洗液中漂洗 30~60min。

1.2.5 扫描及图像分析 选用“fxscanner”“Quality-one”扫描胶,获得图像,用“Pdquest”软件对图像进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 去垢剂和还原剂对大豆子叶微粒体膜蛋白溶解的影响

分别使用表 1 中不同组成的重新水化溶液处理大豆子叶微粒体膜蛋白,结果表明,重新水化溶液中还原剂和去垢剂对膜蛋白溶解情况影响很大(图 1)。与 DTT 相比,TBP 是一种无离子还原剂,其无

离子特性决定了它在等电聚焦过程中不移动,从而保证了整个聚焦过程的还原状态不改变,蛋白质的疏水作用不增强,进而增加了从 IPG 上向 SDS-PAGE 的转移。因此,在二维电泳图像上可观察到较多的蛋白质点。但是,与 DTT 相比,TBP 价格较高;同时,它对光线很敏感,所有涉及它的操作都应在避光处进行。

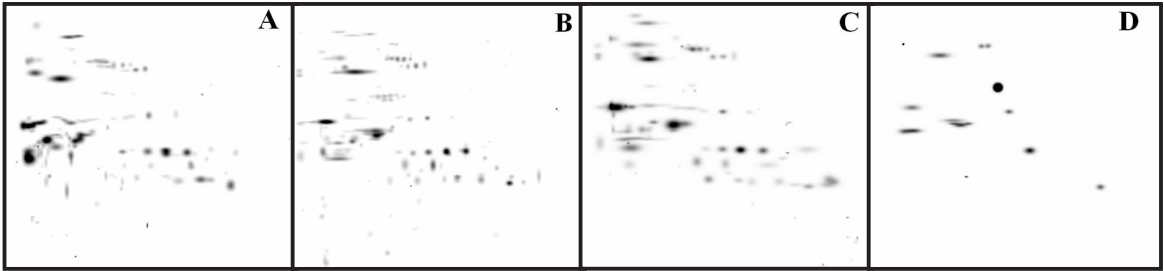
当还原剂均为 TBP 时,不同去垢剂对蛋白的溶解也不同。从分辨率高、重复性好、条纹少和溶解蛋白多等角度综合分析得到的图像,结果表明使用去垢剂 C<sub>7</sub>BZO 的效果好于 ASB-14 和 CHAPS。由于碳链长短和组成碳链烷基结构的不同,CHAPS、ASB-14 和 C<sub>7</sub>BZO 的溶解性能也稍有不同。在本研究中,C<sub>7</sub>BZO 比 CHAPS 和 ASB-14 更加适合。因此,在所试验的 4 种重新水化溶液中,由尿素、硫脲和还原剂 TBP、去垢剂 C<sub>7</sub>BZO 组成的重新水化溶液(TUC<sub>7</sub>T<sub>2</sub>)对大豆子叶微粒体膜蛋白的溶解效果最好(图 1-B)。

2.2 加样量对大豆子叶微粒体膜蛋白溶解的影响

分别试验了加样量(40μg、80μg 和 120μg)对二维电泳图像的影响,结果表明,对于 70×3×0.5 mm 的 IPG 胶条,当样品体积为 125μl 时,120μg 的加样量使得横向条纹现象比较重,同时降低了点的分辨率;40μg 的加样量使得某些低丰度蛋白很难观察到;80μg 的加样量可以观察到更多的和质量更好的蛋白质点。

2.3 等电聚焦 total voltage hours (Vhr)对大豆子叶微粒体膜蛋白溶解的影响

使选用 pH5.0~8.0 的 IPG 胶条,加样量均为 80μg,分别使最终 total Vhr 为 21867、34890 和 44046。结果表明,当聚焦的最终 total Vhr 为 34890 和 44046 时,由于聚焦过度而增加了水平方向的条纹,同时还降低了点的分辨率,影响了点的质量。在本研究条件下,对于大豆子叶微粒体膜蛋白的分离,以 21867Vhr 获得的二维电泳图像效果最好。



(生长 8d 的大豆子叶,经 0.01MAgNO<sub>3</sub> 诱导,黑暗处 25℃保温 24h;pH 梯度范围 4.0~7.0;聚焦总电压为 22560vhr;上样量为 40μg)

(8 day old cotyledons induced by 0.01M AgNO<sub>3</sub>, incubated at 25℃ in the dark for 24h, IPG strip pH range:4.0~7.0, focusing total vhr:22560vhr, protein amount: 40μg)

A: TUAT<sub>2</sub>; B:TUC<sub>7</sub>T<sub>2</sub>; C:TUCT<sub>2</sub>; D:TUCD

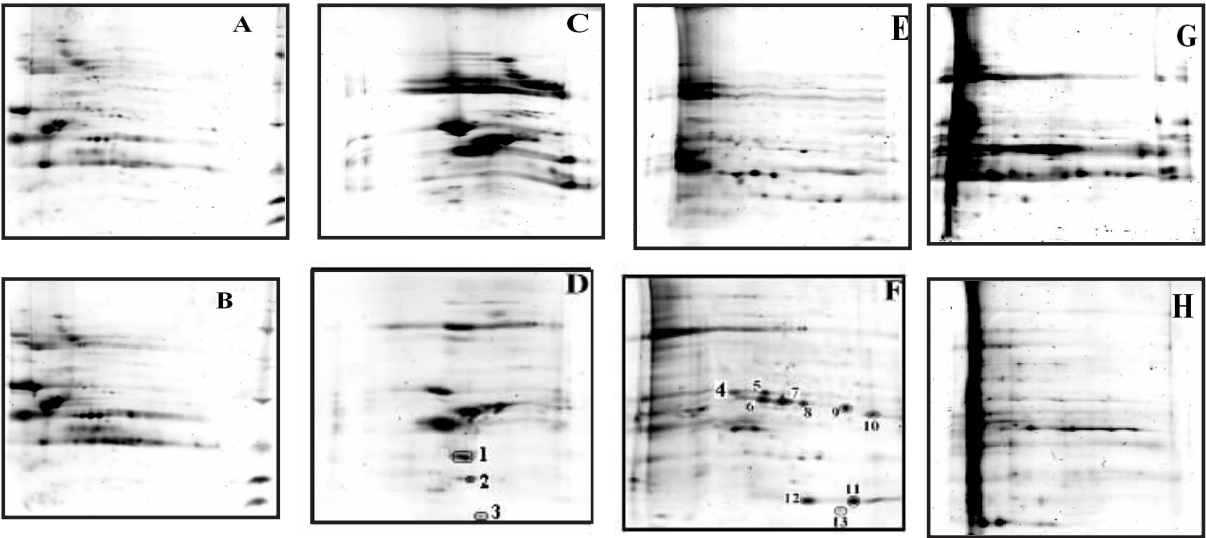
图 1 去垢剂和还原剂对大豆子叶微粒体膜蛋白溶解的影响(图中所示为经过标准化处理后的图像)

Fig. 1 Effect of detergents and reducing agents on the solubilization of microsome proteins(Normalized images were shown)

2.4 不同 pH 梯度范围 IPG 胶条对大豆子叶微粒体膜蛋白溶解的影响

在最佳条件下(以 TUC<sub>7</sub>T<sub>2</sub> 为重新水化溶液,加样量 80μg 和等电聚焦 21867Vhr),研究不同 pH 梯度范围 IPG 胶条对大豆子叶微粒体膜蛋白二维电泳图像的影响(图 2)。结果显示,使用窄范围 pH 梯度(pH4.0~6.0、pH5.0~8.0 和 pH7.0~10.0) IPG 胶条可以明显提高大豆子叶微粒体膜蛋白的分离效果。在 pH3.0~6.0 范围内,可以清晰地看到

只存在于硝酸银诱导的样品中而不存在于对照样品中 3 个点(图 2-D),在 pH5.0~8.0 范围内这样的点更多一些(图 2-F)。大豆子叶微粒体膜蛋白经二维电泳分离后,至少发现 13 个点只存在于硝酸银诱导的样品中,而不存在于对照中,表明它们所代表的蛋白质是经过硝酸银诱导之后才产生或数量增大到可测程度的,这些点所对应的蛋白质的基本性质见表 2。而使用宽范围 pH 梯度 IPG 胶条(图 2-A,图 2-B)则根本无法观察到这些差别。



A:健康子叶,IPG 胶条 pH 范围:3.0~10.0,蛋白质量:40μg;B:0.01 M 硝酸银诱导处理的子叶,IPG 胶条 pH 范围:3.0~10.0,蛋白质量:40μg;C:健康子叶,IPG 胶条 pH 范围:3.0~6.0,蛋白质量:80μg;D:0.01 M 硝酸银诱导处理的子叶,IPG 胶条 pH 范围:3.0~6.0,蛋白质量:80μg;E:健康子叶,IPG 胶条 pH 范围:5.0~8.0,蛋白质量:80μg;F:0.01 M 硝酸银诱导处理的子叶,IPG 胶条 pH 范围:5.0~8.0,蛋白质量:80μg;G:健康子叶,IPG 胶条 pH 范围:7.0~10.0,蛋白质量:80μg;H:0.01 M 硝酸银诱导处理的子叶,IPG 胶条 pH 范围:7.0~10.0,蛋白质量:80μg (所有样品均在 TUC<sub>7</sub>T<sub>2</sub> 溶液中进行重新水化,等电聚焦的 voltage hours 为 21867vhr。样品 A 和 B 中最右侧的条带为蛋白质标准品)。

A: health cotyledons, IPG strip pH range: 3.0~10.0; protein amount: 40μg; B: 0.01 M AgNO<sub>3</sub> induced cotyledons, IPG strip pH range: 3.0~10.0; protein amount: 40μg; C: health cotyledons, IPG strip pH range: 3.0~6.0; protein amount: 80μg; D: 0.01 M AgNO<sub>3</sub> induced cotyledons, IPG strip pH range: 3.0~6.0; protein amount: 80μg; E: health cotyledons, IPG strip pH range: 5.0~8.0; protein amount: 80μg; F: 0.01 M AgNO<sub>3</sub> induced cotyledons, IPG strip pH range: 5.0~8.0; protein amount: 80μg; G: health cotyledons, IPG strip pH range: 7.0~10.0; protein amount: 80μg; H: 0.01 M AgNO<sub>3</sub> induced cotyledons, IPG strip pH range: 7.0~10.0; protein amount: 80μg (All samples were rehydrated in solution TUC<sub>7</sub>T<sub>2</sub> and the focusing total voltage hours were 21867vhr. The bands on the right lane in A and B were protein markers).

图 2 对照样品和硝酸银诱导样品使用不同 pH 梯度胶条的二维电泳图像

Fig. 2 2-DE images on different pH range IPG strips for the control and AgNO<sub>3</sub> induced samples

表 2 硝酸银诱导的大豆子叶微粒体部分经过二维电泳后获得的某些点的等电点和分子量

Table 2 pI and Mw of the selected spots of microsomal fraction in AgNO<sub>3</sub> induced cotyledons according to the 2-DE images

| 点    | 等电点 | 分子量     | 点    | 等电点 | 分子量     | 点    | 等电点 | 分子量     | 点    | 等电点 | 分子量     |
|------|-----|---------|------|-----|---------|------|-----|---------|------|-----|---------|
| Spot | pI  | Mw(kDa) | Spot | pI  | Mw(kDa) | Spot | pI  | Mw(kDa) | Spot | pI  | Mw(kDa) |
| 1    | 4.6 | 19.8    | 5    | 6.4 | 39.08   | 9    | 7.4 | 31.97   | 13   | 7.2 | 8.96    |
| 2    | 4.7 | 16.5    | 6    | 6.4 | 35.35   | 10   | 7.7 | 29.90   |      |     |         |
| 3    | 4.8 | <6.5    | 7    | 6.6 | 34.18   | 11   | 6.9 | 9.91    |      |     |         |
| 4    | 6.1 | 39.08   | 8    | 6.8 | 33.06   | 12   | 7.4 | 9.91    |      |     |         |

3 讨论

虽然由尿素、硫脲、还原剂 DTT 和去垢剂 CHAPS 组成的重新水化溶液 (TUCD) 最为常用<sup>[9,10]</sup>,但是,当将之用于大豆子叶微粒体膜蛋白的溶解时,与使用还原剂 TBP 的重新水化溶液相比,在二维电泳图像上只得到很少的点。因此,“TUCD”不适合溶解大豆子叶微粒体膜蛋白。本研

究试验的 4 种重新水化溶液中,由尿素、硫脲、TBP 和 C<sub>7</sub>BZO 组成的重新水化溶液 (TUC<sub>7</sub>T<sub>2</sub>) 对大豆子叶微粒体膜蛋白的溶解效果最好。

加样量的多少和加样体积在一定程度上影响着二维电泳图像的效果和试验结果,但同时还受 IPG 胶条 pH 梯度范围、长度、染色方法、目的蛋白的性质以及等电聚焦参数等多种因素的影响<sup>[10,11]</sup>。样品过少容易引起低丰度蛋白的丢失而影响结果判断,蛋白量

过多会引起胶的变形而造成分析困难;体积过小容易引起样品在加样点的沉积而不能均匀分散于整个胶条上<sup>[12]</sup>。本研究结果表明,当使用  $70 \times 3 \times 0.5 \text{ mm}$  的 IPG 胶条时,  $80 \mu\text{g}$  ( $125 \mu\text{l}$ ) 的加样量比  $40 \mu\text{g}$  和  $120 \mu\text{g}$  可以观察到更多的和质量更好的蛋白质点。

等电聚焦情况在很大程度上决定着二维电泳图像的质量和可重复性,等电聚焦不充分将导致水平和垂直方向的条纹<sup>[12]</sup>,但聚焦时间过长也将会引起水平的条纹和蛋白质损失<sup>[9]</sup>。为确保不同试验间的一致性和聚焦过程的可重复性,通常以 total voltage hours(总 Vhr)作为标准来规定聚焦过程。达到稳定状态所需要的总 Vhr 数取决于所用胶条的 pH 范围、长度、样品量等因素,本研究条件下以 21867Vhr 获得的二维电泳图像效果最好。

使用不同 pH 梯度范围 IPG 胶条的二维电泳图像显示,在诱导样品和对照样品中,子叶微粒体膜蛋白有两个相同的趋势,即(1)不论对于宽范围 pH 梯度(pH3.0~10.0)还是窄范围 pH(pH3.0~6.0)梯度来说,在 pH4.0~6.0 范围内均表现出十分拥挤的现象,表明大部分蛋白质的等电点在 pH4.0~6.0 范围内,对照样品比诱导样品表现得更为突出,以致由于蛋白质的过分集中导致不能充分聚焦,最终产生了严重的水平方向的条纹,尤其是在分子量为 45.0~66.2Kda 范围内。针对此种情况,当研究者对此范围内的蛋白质感兴趣时,可以使用极窄 pH 范围的 IPG 胶条或减少加样量或使用更长的胶条、更大的 SDS-PAGE 使它们得到更好的分离。(2)窄范围 pH 梯度(pH5.0~8.0、pH7.0~10.0)最左侧均表现出严重的垂直方向的条纹和 Smudging 现象,这主要是由于很多蛋白质的等电点落在了所使用胶条的 pH 梯度范围之外而造成的,在 pH7.0~10.0 梯度范围内这种现象表现得更为突出。这是窄 pH 梯度使用过程中无法避免的问题,但这并不能掩盖窄 pH 梯度可以增加分离效果和可测蛋白数量的优势。

本研究结果显示了窄范围 pH 梯度 IPG 胶条在大豆子叶微粒体微粒体膜结合蛋白研究中的绝对优势,在宽范围 pH 梯度 IPG 胶条无法分辨的复杂蛋白质群中,通过窄范围 pH 梯度试验发现,至少有 13 个点只存在于硝酸银诱导的样品中,而不存在于对照中,且其代表的蛋白质的等电点在 4.0~8.0,这表明硝酸银不仅诱导了 glyceollins 的累积<sup>[13]</sup>,也有可能影响到其它的微粒体蛋白和与之相关的代谢。在进一步研究中,笔者利用四极杆一飞行时间串联质谱(Q-TOF/MS/MS)对点 1、2、和点 3 进行

了分析测定,表明点 1 为 Kunitz 胰蛋白酶抑制剂,点 2 为  $\text{SAM}^2\text{2\_SOYBN}$ ,点 3 为 Kunitz 胰蛋白酶抑制剂的 5kD 小亚基<sup>[14]</sup>。因此,本研究方法和结果,不仅为 Kunitz 胰蛋白酶抑制剂和  $\text{SAM}^2\text{2\_SOYBN}$  的进一步研究提供了有利条件,更重要的是为研究硝酸银诱导(或其它应激反应)的微粒体膜蛋白的变化提供了一定的实验基础和实践证据,并为其分离纯化提供了更为简便的可能途径,从而有利于大豆子叶微粒体诱导蛋白的制备和对之的进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Welle R., Grisebach H. Properties and solubilization of the prenyltransferase of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in soybean [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(2):479-484.
- [2] Zähringer U., Ebel J., Mulheim L. J., et al. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Dimethylallylpyrophosphate: trihydroxypterocarpan dimethylallyl transferase from elicitor-induced cotyledons [J]. *FEBS letters*, 1979, 101(1):90-92. [3] Zähringer U., Schaller E., Grisebach H. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Structure and reaction of naturally occurring and enzymatically prepared prenylated pterocarpan from elicitor-treated cotyledons and cell cultures of soybean [J]. *Zeitschrift fuer naturforschung*, 1981, 36c, 234-241.
- [4] Ames G. F. L., Nikaido K. Two dimensional gel electrophoresis of membrane proteins [J]. *Biochemistry*, 1976, 15(3):616-623.
- [5] Lehner I., Niehof M., Boriak J. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24:1795-1808.
- [6] Santoni V., Molloy M., Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21:1054-1070.
- [7] 乞永艳, Arnaud Bovy, Ric de Vos, 等. 外源茉莉酸对大豆中异戊烯黄酮 Glyceollins 及其前体 Glycinol 累积的影响 [J]. *大豆科学*, 2005, 24(4):269-273.
- [8] Diesperger H., Müller C. R., Sandermann H. Rapid isolation of a plant microsomal fraction by  $\text{Mg}^{2+}$ -precipitation [J]. *FEBS Letters*, 1974, 43(2):155-158.
- [9] Berkelman T., Stenstedt T. 2-D Electrophoresis Principles and Methods [P]. Amersham Biosciences, 1998, 80-6429-60 Edition AB.
- [10] Amersham Pharmacia Biotech Immobiline Drystrip short instruction [P]. 71-5009-57 Edition AA, 99-04, 1999.
- [11] Amersham Biosciences, Immobiline Drystrip short instruction [P]. 71-5019-33, Edition AD, 03-01, 2003.
- [12] Görg A., Obermaier C., Boguth G., et al. The current state of two dimension electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21:1037-1053.
- [13] Stössel P. Glyceollin production in soybean [J]. *Phytopath. Z.*, 1982, 105:109-119.
- [14] 乞永艳. 大豆子叶异黄酮类次生代谢物的诱导及其微粒体部分蛋白的初步研究[D]. 中国农业科学院博士学位论文, 2005 年 12 月.