

大豆种子蛋白质组样品制备方法研究

林杨杰<sup>1,2,3</sup>, 赵明<sup>1</sup>, 杨生超<sup>1</sup>, 潘映红<sup>2,3</sup>

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 中国农业科学院 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; 3. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:**以中黄 13 大豆成熟种子为材料, 采用苯酚甲醇醋酸铵法、三氯乙酸丙酮法和尿素硫脲法进行了蛋白质初提与复提, 并利用纳升级液相色谱串联质谱技术(NanoLC-MS/MS) 分析比较了尿素硫脲法初提和尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提的样品, 以及一维电泳预分离的尿素硫脲法初提样品, 旨在构建能有效提高蛋白质提取率和鉴定率的样品制备方法。结果表明: 尿素硫脲法初提结合苯酚甲醇醋酸铵法复提的蛋白得率最高, 分别达到 29. 18% 与 4. 08%; 尿素硫脲法初提与尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提样品中共鉴定到 2 246 个蛋白质组, 初提和复提样品之间差异十分明显; 每次独立制备的尿素硫脲法初提样品平均可鉴定到 1 167 个蛋白质组, 经一维电泳预分离后平均可鉴定到 1 868 个蛋白质组。研究表明, 采用适当的蛋白质样品制备和预分离方法, 能有效提高大豆种子蛋白质的提取率和鉴定率。

**关键词:**大豆种子; 蛋白质组学; 样品制备; 纳升级液相色谱串联质谱

**中图分类号:**S565. 1      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 05. 0810

A Study on Sample Preparations for Proteomics of Soybean Seeds

LIN Yang-jie<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Ming<sup>1</sup>, YANG Sheng-chao<sup>1</sup>, PAN Ying-hong<sup>2,3</sup>

(1. Institute of agriculture and biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Crop Science Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** By using pheno meth anolammonium acetate, TCA acetone or urea thiourea methods, seed proteins of soybean Zhonghuang 13 were extracted at first and second step. In order to explore the efficient methods of preparing sample for proteomics of soybean seeds. The protein extraction obtained by urea thiourea method at first step and the protein extraction obtained by pheno meth anolammonium acetate method at second step, and the first step extracted protein, which was separated further by one-dimensional electrophoresis, were analyzed with nano-LC-MS/MS respectively. The results showed that the protein yield of first and second extractions obtained by urea thiourea method and following by pheno meth anolammonium acetate method reached 29. 18% and 4. 08% respectively, and was the highest among extractions obtained by other combined methods. A total of 2 246 protein groups was identified from three replicate samples of first and second extraction, and there were significant differences between them. Average 1 167 protein groups were identified from the sample extracted by urea thiourea, and average 1 868 protein groups from the urea thiourea extracted sample which were separated further by one-dimensional electrophoresis. The results indicated that the effective sample preparation and pre-separation could enhance the yields and identification of the protein from soybean seeds.

**Keywords:** Soybean seed; Proteomics; Sample preparation; Nano LC-MS/MS

在蛋白质组学研究中, 有效的样品制备是完成后续质谱分析的重要基础。目前, 三氯乙酸(TCA) 丙酮法、苯酚甲醇醋酸铵法和尿素硫脲法已经成为制备植物蛋白质组样品的主要方法<sup>[1-3]</sup>。使用不同的制样方法能提取到不同特性的蛋白, 例如三氯乙酸丙酮法或尿素硫脲法有助于获得低丰度的大分子量蛋白质<sup>[4]</sup>。排除非蛋白质物质的干扰是制备植物蛋白质组样品需要考虑的另一问题。植物组织的蛋白质含量较低, 并且存在较多的光合色素、酚类、多糖、脂质等非蛋白质干扰成分, 从而增加了蛋白质提取难度。使用三氯乙酸丙酮法或苯酚甲醇醋酸铵法, 能够有效地降低非蛋白质物质的干扰<sup>[5-6]</sup>。

大豆(*Glycine max*) 是一种在全球范围内广泛种植的豆科植物, 其种子是人类食物及动物饲料中油脂和蛋白质的重要来源。大豆的蛋白质组学研究有助于深刻理解大豆遗传育种和栽培生产的生化基础。2010 年, 大豆 Williams 82 的全基因组测序草图完成后<sup>[7]</sup>, 大豆蛋白质组学研究得到了快速发展。但在大豆种子蛋白质组样品制备方面, 仅有早期文献简单报道过几种方法的提取效果<sup>[8-9]</sup>, 但未见制备和分析连续提取的大豆种子蛋白质组样品的报道, 也未见大豆种子蛋白质组样品直接液质分析(LC-MS/MS) 和一维电泳预分离后液质分析

收稿日期: 2016-04-12  
基金项目: 中国农业科学院科技创新工程(作物分子标记技术及其应用科研创新团队)。  
第一作者简介: 林杨杰(1992-), 男, 硕士, 主要从事蛋白质组学研究。E-mail: Lin\_YangJie@163. com。  
通讯作者: 潘映红(1962-), 男, 研究员, 主要从事蛋白质组学研究。E-mail: panyinghong@caas. cn。

(1DE-LC-MS/MS)的比较研究结果。

本研究分别采用改进的苯酚甲醇醋酸铵法、三氯乙酸丙酮法和尿素硫脲法对大豆种子蛋白质进行了初提与复提,比较了初提和复提样品的蛋白质含量,同时利用纳升级液相色谱串联质谱技术(NanoLC-MS/MS)分析比较了最佳初提和复提方法制备的样品,以及一维电泳预分离的样品,旨在构建能有效提高蛋白质提取率和鉴定率的样品制备方法,为深入开展大豆蛋白质组学研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中黄 13 成熟大豆种子,购自中国农业科学院作物科学研究所种子门市部。

主要试剂:尿素(urea)、过硫酸铵(ammonium persulfate)、甘氨酸(glycine)、四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(tris)、双丙烯酰胺(bisacrylamide)、丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(N,N-methylene bisacrylamide)为美国昂飞(Affymetrix)公司 USB 试剂产品;硫脲(thiourea)、碘乙酰胺(IAA)为美国通用电气公司(GE)产品;碳酸氢铵(ammonium bicarbonate)、二硫苏糖醇(DTT)、乙腈(ACN)为赛默飞世尔科技(Thermo Fisher)公司产品;胰蛋白酶(trypsin)为罗氏(Roche)公司产品;蛋白质标准品(Marker, P7703)为 New England Biolabs(NEB)公司产品;G-250 考马斯亮蓝、乙二胺四乙酸(EDTA)、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)为 Amresco 公司产品;苯甲基磺酰氟(PMSF)为 Sigma 公司产品;三氯乙酸(TCA)为 Wako 公司产品;甲酸(FA)为 DikmaPure 公司产品;其它化学试剂均为国产分析纯。超滤离心管(10K, VN01H02)为赛多利斯(Sartorius)公司产品。所有缓冲液均用 Milli-Q 水配制。

所用仪器包括 CSM-I 样品粉碎机(北京一轻研究所);紫外分光光度计;Image Scanner 白光扫描仪(美国通用电气公司,GE);Mini 垂直蛋白电泳仪(伯乐生命医学有限公司,Bio-rad);Q-Exactive Plus 质谱仪和 Easy-nano LC1000 液相系统(赛默飞世尔科技公司,Thermo Fisher)。

### 1.2 方法

1.2.1 样品预处理 参照 Murad 等<sup>[10]</sup>的大豆脱脂方法,具体操作步骤:取适量大豆成熟种子,放入样品粉碎机中,并倒入适量液氮研磨至细粉;称取 10 g 粉末置于 50 mL 离心管中,加入 30 mL 预冷石油醚,摇床上振荡 15 min,离心弃上清,重复 2 次,挥发除去石油醚,4℃干燥保存备用。

1.2.2 苯酚甲醇醋酸铵法 参考 Hurkman 等<sup>[11]</sup>的方法,取 50 mg 脱脂大豆种子粉末,溶于 1 mL 预冷提取液(500 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 500 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA-Na<sub>2</sub>, 700 mmol·L<sup>-1</sup> 蔗糖, 1% DTT, pH8.0)中,振荡超声 10 min,离心(14 000 g, 4℃, 20 min)取上清;加 1 mL 冷 Tris-饱和酚(pH8.0), 4℃振荡 1 h,离心(14 000 g, 4℃, 20 min),收集酚相,再加 1 mL 预冷提取液进行反萃取,搅动 1 h,离心(14 000 g, 4℃, 20 min)收集酚相;加入 4 倍体积的含 100 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵的甲醇溶液, -20℃下沉淀过夜,离心(14 000 g, 4℃, 20 min),收集沉淀;挥发除去甲醇,丙酮清洗沉淀 2 次;加入 1.2 mL 裂解液(9 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 1% CHAPS, 1% DTT)充分溶解,在室温下溶解 1 h,离心(14 000 g, 4℃, 20 min),取上清备用。3 次重复。

1.2.3 TCA 丙酮法 参考 Damerval 等<sup>[12]</sup>的方法,取 50 mg 脱脂大豆种子粉末,溶于 1.5 mL 预冷沉淀液(含 10% 三氯乙酸, 0.07% 巯基乙醇的丙酮液)中; -20℃4 h 或过夜;离心(14 000 g, 4℃, 20 min)弃上清;沉淀用 1.5 mL 预冷漂洗液(含 0.07% 巯基乙醇的丙酮)4℃振荡 1 h;离心(14 000 g, 4℃, 20 min),沉淀加入 1.5 mL 预冷溶解液(9 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 1% CHAPS, 1% DTT), 4℃摇床振荡 1 h,离心(14 000 g, 4℃, 20 min)取上清;加入 5 倍体积的漂洗液, 4℃摇床振荡 1 h,离心(14 000 g, 4℃, 20 min),收集沉淀,挥发除去丙酮后加入 1.2 mL 溶解液在室温下摇床振荡 1 h 充分溶解,离心(14 000 g, 4℃, 20 min),取上清备用。3 次重复。

1.2.4 尿素硫脲法 参考 Natarajana 等<sup>[8]</sup>与 Herman 等<sup>[13]</sup>的方法,取 50 mg 脱脂大豆种子粉末,溶于 1.5 mL 提取液(7 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 2 mol·L<sup>-1</sup> 硫脲, 4% CHAPS, 2% DTT),超声 10 min;离心(14 000 g, 4℃, 15 min),上清加入 5 倍体积冷丙酮, -20℃放置 4 h 或过夜;离心(14 000 g, 4℃, 15 min),收集沉淀,挥去丙酮后加入 1.2 mL 溶解液(9 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 1% CHAPS, 1% DTT),在室温下溶解 1 h,离心(14 000 g, 4℃, 20 min),取上清备用。3 次重复。

1.2.5 初提沉淀物复提方法 将苯酚甲醇醋酸铵法、TCA 丙酮法和尿素硫脲法初提后的沉淀分别用以上 3 种方法复提一次。3 次重复。

1.2.6 蛋白质含量测定 参照 Bradford 方法<sup>[14]</sup>进行。

1.2.7 SDS-PAGE 参照 mini-protean III cell 垂直板电泳仪说明进行电泳分离,尿素硫脲法初提和苯酚甲醇醋酸铵法复提样品上样量均为 40 μg,常规考马斯亮兰染色后,用白光扫描仪扫描。3 次重复。

1.2.8 蛋白质酶切 液体酶切参照 Li 等<sup>[15]</sup>与

Gokce 等<sup>[16]</sup>的方法完成,胶内酶切参照 Hu 等<sup>[17]</sup>的方法完成,液体酶切与胶内酶切前均超声波处理 10 min。

1.2.9 质谱分析 质谱仪 Q-Exactive Plus 配置纳升级电喷雾源和和纳升级液相色谱仪 Easy nano LC 1000。流动相为含 0.1% FA 超纯水和 ACN,液相分离时间 50 min,流速 300 nL·min<sup>-1</sup>。质谱数据采集模为数据依赖型模式 (data dependent MS/MS scan),一级母离子扫描范围 350 ~ 1700 m·z<sup>-1</sup>,分辨率 70 000,注入时间为 50 ms,自动增益控制值为 3e6,一级质谱最强的 20 个离子 (TopN = 20) 进入高能碰撞池中破碎,碰撞能量 (NCE) 为 27。二级质谱的分辨率为 17 500,二级离子注入时间为 45 ms,自动增益控制值为 1e5。

1.3 数据检索与分析

1.3.1 蛋白质搜库鉴定 利用 Proteome Discoverer 1.4 数据分析平台对质谱 RAW 文件进行分析。质谱搜索引擎设置为 SEQUEST HT,检索数据库为 Swiss-Prot 大豆数据库,肽段置信度 (Peptide confidence) 设置为 High,最大蛋白酶漏切位点为 2,肽段长度范围为 6 ~ 144 个氨基酸,母离子质量偏差为 ± 10 ppm,碎片离子质量偏差为 0.02 Da,固定修饰为半胱氨酸 (Cys) 碘乙酰胺化 (carbamidomethy/ + 57.021 Da),动态修饰为甲硫氨酸 (Met) 氧化 (oxidation/ + 15.995 Da)、谷氨酰胺 (Gln) 和天冬酰胺 (Asn) 的脱氨基 (Deamidated/ + 0.984 Da),肽段搜库假阳性率 FDR 设置为 1%。

1.3.2 LC-MS/MS 分析 取 3 次独立提取的等量尿素硫脲法初提和尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提样品,各约 100 μg,液体酶切后分别进行 3 次质谱分析,在质谱技术重复、样品提取技术重复和初提复提层次上统计鉴定到的平均和全部蛋白质组 (protein groups) 数。

1.3.3 1DE-LC-MS/MS 分析 取 2 份尿素硫脲法初提样品进行 SDS-PAGE 分离和考马斯亮蓝染色,上样量约 30 μg,依照蛋白条带分布情况切为 10 个组分,胶内酶切后分别进行 3 次质谱分析,在质谱技术重复和电泳技术重复层次上统计鉴定到的平均和全部蛋白质组数。

1.3.4 数据分析 采用 SPSS 19 统计软件进行多重比较分析。

2 结果与分析

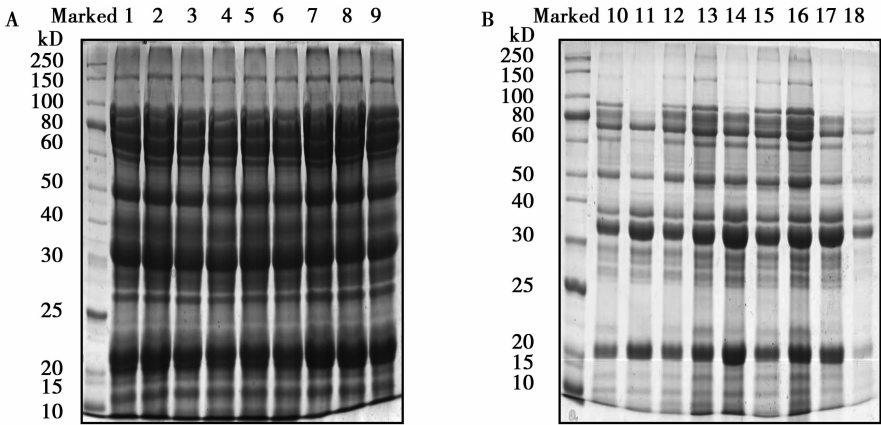
2.1 初提和复提样品的蛋白质得率及 SDS-PAGE 分析

根据蛋白标准曲线 ( $y = 0.679\ 4x - 0.002\ 6, R^2 = 0.996\ 5$ ) 计算不同方法提取蛋白量 (表 1),尿素硫脲法初提蛋白得率最高;同一种方法重复提取时,TCA 丙酮法重复提取得到的蛋白量最高;不同方法重复提取时,尿素硫脲法二次提取苯酚甲醇醋酸铵法初提后沉淀的蛋白得率最高;总体而言,尿素硫脲法初提结合苯酚甲醇醋酸铵法复提所得总蛋白得率最高。

为了进一步验证尿素硫脲法初提结合苯酚甲醇醋酸铵法复提所得总蛋白得率最高,3 种方法初提的大豆成熟种子蛋白质 SDS-PAGE 分析比较结果见图 1A。结果显示,不同方法和重复所得的初提蛋白在 SDS-PAGE 胶图上无明显差别,仅尿素硫脲法蛋白得率略高。复提样品的 SDS-PAGE 分析结果见图 1B,由图可见复提样品的差异较明显,TCA 丙酮法 - 苯酚甲醇醋酸铵法 (泳道 13) 与尿素硫脲法 - 苯酚甲醇醋酸铵法 (泳道 16) 蛋白质条带数与蛋白含量相对较高,而尿素硫脲法 - 尿素硫脲法 (泳道 18) 条带与蛋白含量相对较少。故大豆种子蛋白提取宜采用尿素硫脲法初提结合苯酚甲醇醋酸铵法复提方法。

表 1 3 种制样方法初提和复提蛋白得率

Table 1 Yield of proteins extracted by three methods at first and second step / %			
蛋白得率 Yield of different extraction methods	苯酚甲醇醋酸铵法初提 Pheno meth anolammonium acetate method at first step	TCA 丙酮法初提 TCA acetone method at first step	尿素硫脲法初提 Urea thiourea method at first step
初提 Three methods at first	21.57 ± 1.18	19.87 ± 1.04	29.18 ± 1.57
苯酚甲醇醋酸铵法复提 Pheno meth anolammonium acetate method at second step	1.77 ± 0.126	3.85 ± 0.25	4.08 ± 0.41
TCA 丙酮法复提 TCA acetone method at second step	1.35 ± 0.03	2.75 ± 0.57	1.77 ± 0.31
尿素硫脲法复提 Urea thiourea method at second step	2.35 ± 0.35	2.23 ± 0.49	0.72 ± 0.078



A:初提;B:复提;1~3:苯酚甲醇醋酸铵法;4~6:TCA 丙酮法;7~9:尿素硫脲法;10:苯酚甲醇醋酸铵法-苯酚甲醇醋酸铵法;11:苯酚甲醇醋酸铵法-TCA 丙酮法;12:苯酚甲醇醋酸铵法-尿素硫脲法;13:TCA 丙酮法-苯酚甲醇醋酸铵法;14:TCA 丙酮法-TCA 丙酮法;15:TCA 丙酮-尿素硫脲法;16:尿素硫脲法-苯酚甲醇醋酸铵法;17:尿素硫脲法-TCA 丙酮法;18:尿素硫脲法-尿素硫脲法。

A: first extraction; B: second extraction; 1-3: Pheno meth anolammonium acetate extraction; 4-6: TCA acetone extraction; 7-9: Urea thiourea extraction; 10: Pheno meth anolammonium acetate-Pheno meth anolammonium acetate extraction; 11: Pheno meth anolammonium acetate-TCA acetone extraction; 12: Pheno meth anolammonium acetate-Urea thiourea extraction; 13: TCA acetone-Pheno meth anolammonium acetate extraction; 14: TCA acetone-TCA-acetone extraction; 15: TCA acetone-Urea thiourea extraction; 16: Urea thiourea-Pheno meth anolammonium acetate extraction; 17: Urea thiourea-TCA acetone extraction; 18: Urea thiourea-Urea thiourea extraction.

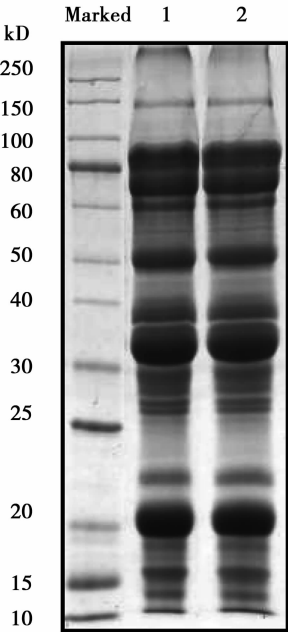
图1 初提蛋白(A)与复提蛋白(B)的 SDS-PAGE 结果

Fig.1 SDS-PAGE of proteins extracted by three methods at first step (A) and second step (B)

2.2 尿素硫脲法-苯酚甲醇醋酸铵法样品的 SDS-PAGE 及 LC-MS/MS 分析

为探究尿素硫脲法初提蛋白与尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白间差异,对尿素硫脲法-苯酚甲醇醋酸铵法样品进行 SDS-PAGE 及 LC-MS/MS 分析。大豆成熟种子的初提与复提结果表明,使用尿素硫脲法初提后,再使用苯酚甲醇醋酸铵法进行复提,尽管获得的蛋白总量最多,但尿素硫脲法初提样品与尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提样品以相同蛋白量进行 SDS-PAGE 分析,图谱无明显差异(图2)。LC-MS/MS 分析结果表明,通过比较总离子流图谱中的高强度峰分布与保留时间,可以发现同一个样品的3次质谱技术重复间具有较好的重复性,尿素硫脲法初提蛋白的3个样品提取技术重复(1~3、4~6、7~9)之间,以及苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白的3个样品提取技术重复(10~12、13~15、16~18)之间的重复性也相对较好(图3)。

尿素硫脲法-苯酚甲醇醋酸铵法样品的 LC-MS/MS 蛋白质鉴定结果见图4。结果显示,样品制备误差明显大于质谱分析误差,初提和复提样品之间的差异十分明显。在质谱技术重复(I)层面上,尿素硫脲法初提蛋白样品重复3次质谱分析,平均鉴定得到957个蛋白质组,尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白样品则平均鉴定得到989个蛋白质组。在样品提取技术重复(II)层面上,尿素硫脲法初提蛋白样品分别鉴定得到1 087,1 255 和1 160个蛋白质组,平均鉴定得到1 167个蛋白质组;尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白样品分别鉴定得到1 120,1 345 和1 114个蛋白质组,



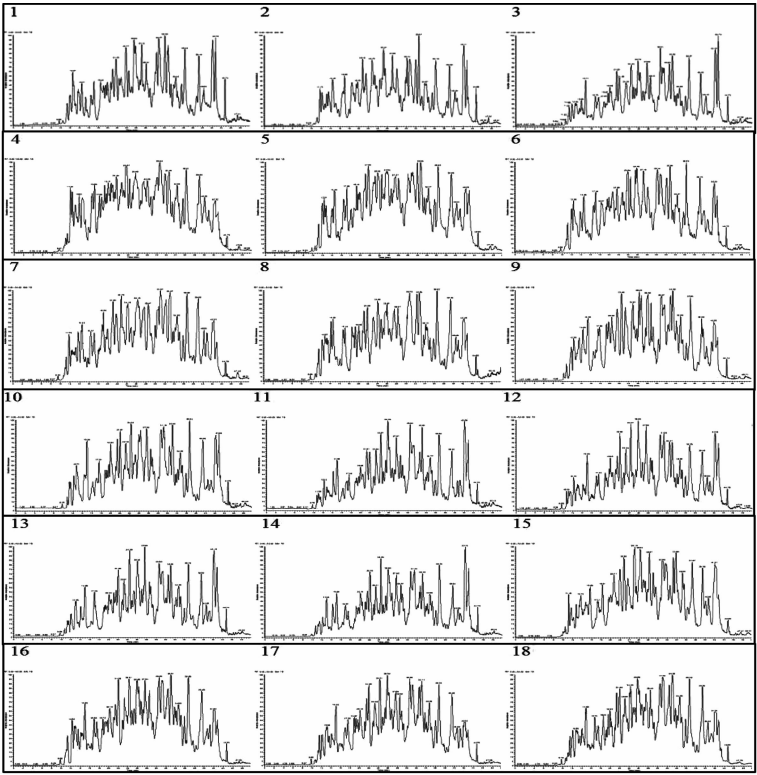
1:尿素硫脲法初提;2:苯酚甲醇醋酸铵法复提。

1: Urea thiourea extraction at first step;2: Pheno meth anolammonium acetate extraction at second step.

图2 尿素硫脲法初提蛋白与苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig.2 SDS-PAGE of proteins extracted by urea thiourea method at first step and by pheno meth anolammonium acetate method at second step

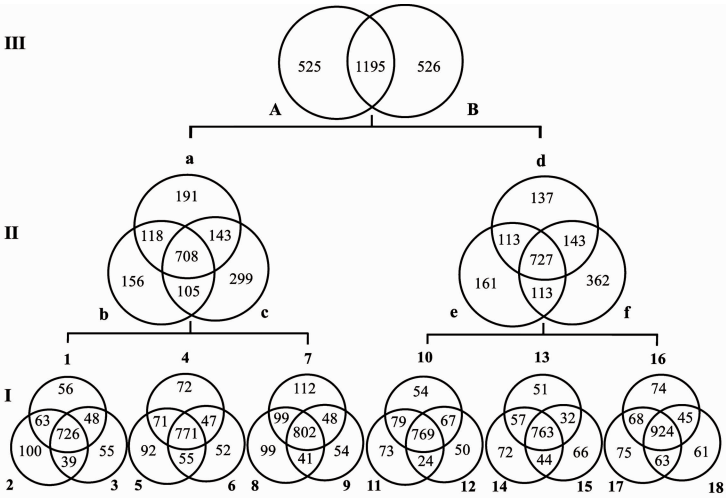
平均鉴定得到1 193个蛋白质组。在初提复提样品(III)层面上,3批尿素硫脲法初提样品总共鉴定得到1 720个蛋白质组,3批苯酚甲醇醋酸铵法复提样品总共鉴定得到1 721个蛋白质组,初提和复提样品中鉴定到的全部蛋白质组数为2 246。



1~3、4~6、7~9:尿素硫脲法样品3个提取技术重复;10~12、13~15、16~18:苯酚甲醇醋酸铵法样品3个提取技术重复。  
1-3,4-6,7-9:The repetitive sample of urea thiourea method at first step;10-12,13-15,16-18:The repetitive sample of pheno meth anolammonium acetate method at second step.

图3 尿素硫脲法-苯酚甲醇醋酸铵法样品的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatography of samples extracted by urea thiourea method at first step and by pheno meth anolammonium acetate method at second step



I:质谱技术重复;II:样品提取技术重复;III:初提复提;A:尿素硫脲法初提蛋白鉴定总结果;B:苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白鉴定总结果;a,b,c:尿素硫脲法初提蛋白样品重复;d,e,f:苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白样品重复;1~9:尿素硫脲法初提蛋白质谱上样重复;10~18:苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白质谱上样重复。

I:Repeat analysis of mass spectrum;II:Repeat analysis of extraction;III:Total analysis of two groups samples;A:Total identification results of protein groups extracted by urea thiourea method at first step; B:Total identification results of protein groups extracted by pheno meth anolammonium acetate method at second step; a,b,c: Repetitive samples of protein groups extracted by urea thiourea method at first step; d, e,f: Repetitive samples of protein groups extracted by pheno meth anolammonium acetate method at second step; 1-9:Repetitive samples of protein groups extracted by urea thiourea method at first step in analysis of mass spectrum; 10-18:Repetitive samples of protein groups extracted by pheno meth anolammonium acetate method at second step in analysis of mass spectrum.

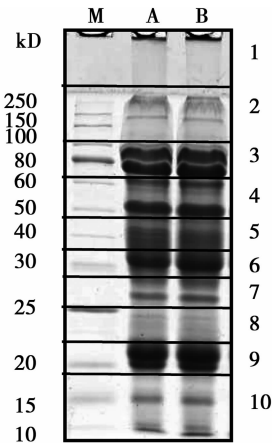
图4 尿素硫脲法-苯酚甲醇醋酸铵法样品的质谱分析结果

Fig. 4 Identification results of protein groups extracted by urea thiourea method at first step and by pheno meth anolammonium acetate method at second step

2.3 尿素硫脲法初提样品的 SDS-PAGE 分离及胶内蛋白 LC-MS/MS 分析

为了比较分析液体全蛋白酶切样品与 1DE-LC-MS/MS 样品间的差异,以尿素硫脲法初提蛋白为样品进行 1DE-LC-MS/MS 分析,两组尿素硫脲法初提样品的 SDS-PAGE 分离和分组结果见图 5,组分 1 包括累积在样品槽与浓缩胶和分离胶界面的蛋白。胶内酶切样品的总离子流图谱见图 6,结果显示 10 个组分的总离子流图存在较明显的差异。

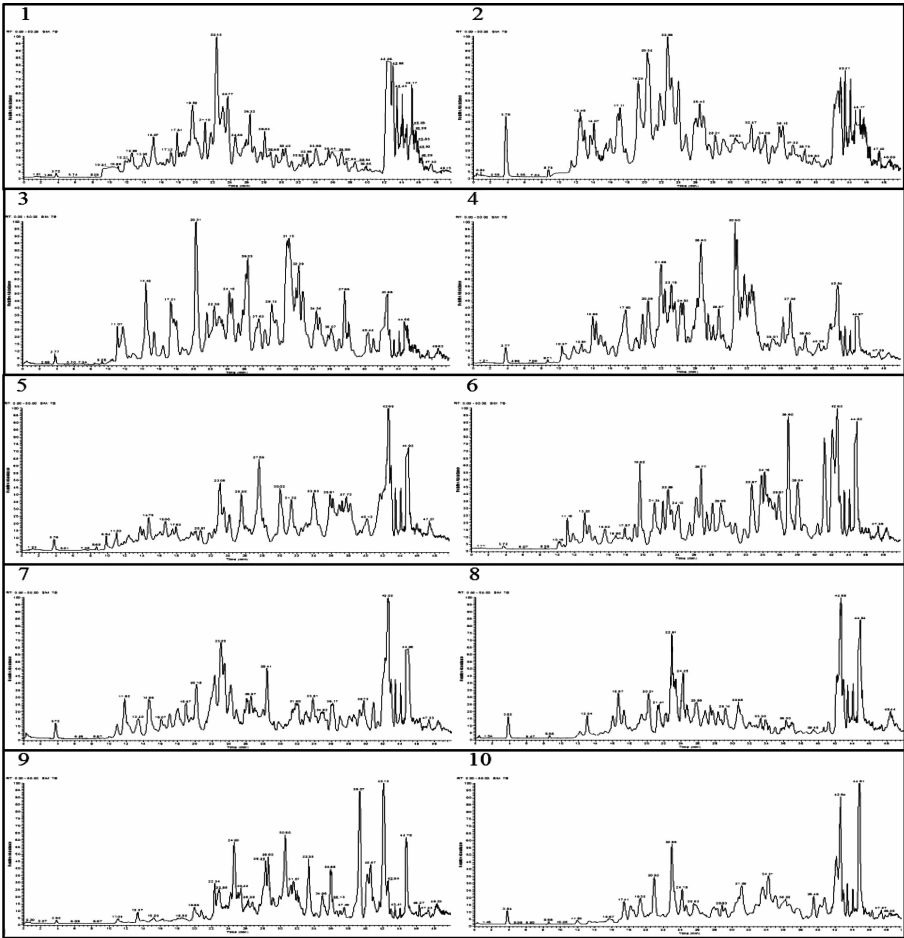
两组尿素硫脲法初提样品的 1DE-LC-MS/MS 分析结果见表 2,结果显示重复样品中鉴定到的蛋白质数相近,同时重复样品同一组分与相邻组分间共有的蛋白数相近,表明试验具有较好的重复性。在质谱技术重复层次上,两组样品分别鉴定得到 1 892和 1 843 个蛋白质组,平均鉴定得到的总蛋白组数为 1 868;明显高于 3 个独立提取样品 LC-MS/MS 平均鉴定到的蛋白质组数。



M: 蛋白质标记分子; A、B: 尿素硫脲法初提蛋白样品重复; 1 ~ 10: 酶切样品组分。

M: Protein marker; A and B: Repetitive samples extracted by urea thiourea method at first step; 1-10: Components of in-gel digestion.

图 5 尿素硫脲法初提样品的 SDS-PAGE 和分组结果  
Fig. 5 SDS-PAGE of samples extracted by urea thiourea method at first step



1 ~ 10: 10 个胶内酶切组分。  
1-10: The components of in-gel digestion.

图 6 尿素硫脲法初提样品胶内酶切总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatography of urea thiourea extracted sample which was separated further by one-dimensional electrophoresis

表 2 两组尿素硫脲法初提样品的 1DE-LC-MS/MS 分析结果

Table 2 The 1DE-LC-MS/MS results of two repetitive samples extracted by urea thiourea method at first step

	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4	A5	B5	A6	B6	A7	B7	A8	B8	A9	B9	A10	B10
A1	454																			
B1	367	443																		
A2	242	236	511																	
B2	225	222	421	470																
A3	—	—	63	64	154															
B3	—	—	56	54	103	124														
A4	—	—	—	—	41	39	257													
B4	—	—	—	—	46	45	163	236												
A5	—	—	—	—	—	—	43	42	200											
B5	—	—	—	—	—	—	40	37	157	201										
A6	—	—	—	—	—	—	—	—	45	44	258									
B6	—	—	—	—	—	—	—	—	44	42	193	228								
A7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	44	42	211							
B7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45	45	173	224						
A8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	53	50	215					
B8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49	50	164	204				
A9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	23	58			
B9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	23	47	61		
A10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29	32	158	
B10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29	32	140	202

A、B:组分样品重复 2;表中数字为条带鉴定蛋白数及相邻条带间共鉴定蛋白数;“—”表示条带分隔,不予统计;总蛋白数 = 各组分蛋白数之和—两相邻组分间共有蛋白数。

A and B: Repetitive samples extracted by urea thiourea method at first step; Numbers means that identified protein groups in bands or common proteins in adjacent bands; ‘—’ means separate bands; Total protein groups = sum of proteins groups-common proteins groups in adjacent bands.

3 讨 论

大豆种子的蛋白质组学研究有助于深刻理解大豆种子的蛋白质构成和大豆遗传育种及栽培生产的生化基础,样品制备是实现这一目标的重要基础。使用苯酚甲醇醋酸铵法、三氯乙酸丙酮法和尿素硫脲法进行的单独、重复和交叉提取,不同初提物和复提物的蛋白含量明显不同(表 1),在 SDS-PAGE 胶图上复提蛋白的差别更明显(图 1),说明不同初提和复提方法可能导致大豆种子蛋白质组制样误差。单独比较初提和复提大豆种子蛋白得率,尿素硫脲法优于其它两种方法,但初提和复提连续使用同一方法时总蛋白得率并非最高,与我们以往的研究结果类似<sup>[18]</sup>。在本研究中,尿素硫脲法初提结合苯酚甲醇醋酸铵法复提的蛋白得率最高,分别达到 29.18% 与 4.08%,与其它组合相比提取率最高,提示这一流程更适合大豆种子蛋白质组样品制备。等量的尿素硫脲法初提蛋白和尿素硫脲法初提后苯酚甲醇醋酸铵法复提蛋白在 SDS-PAGE

胶图上图谱无明显差异(图 2),但进一步的质谱分析显示初提和复提样品之间的差异十分明显(图 3 和图 4),证明使用不同方法交叉提取样品可获得更高的蛋白鉴定率。值得注意的是在提取过程中,繁琐的操作步骤与过多的丙酮清洗次数可能会导致蛋白质的损失,因此建议在蛋白提取过程中尽可能简化操作步骤与增加清洗的时间。质谱分析的总离子流图谱和蛋白鉴定结果还显示,样品制备误差明显大于质谱分析误差,但小于初提和复提样品之间的差异,说明适当增加样品制备重复有利于鉴定到更多的蛋白。1DE-LC-MS/MS 是目前蛋白质组研究中较常采用的一种技术,相比直接分析提取样品,大豆种子蛋白经一维电泳预分离后,明显提高了质谱的蛋白鉴定率(表 2)。尿素硫脲法初提蛋白的不同电泳组分(图 5)的总离子流图谱明显不同(图 6),从一个侧面显示了组分之间较大的差异。值得注意的是,组分 1 与组分 2 蛋白条带少,但鉴定蛋白数明显高于其它组分,可能原因是部分蛋白样品因形成沉淀未进入浓缩胶,或因变性不彻底等原

因形成超大复合物而滞留在分离胶顶部。组分 3、6、9 的蛋白条带染色较深,但蛋白鉴定数较少,原因可能是同一组分中高丰度蛋白干扰所致。影响蛋白质组分析的因素还包括酶切方法,以及色谱、质谱参数设置等,本试验在酶切前进行超声波处理,目的在于破坏大豆中含有的胰蛋白酶抑制因子以提高酶切效率<sup>[19]</sup>,同时使用较短的色谱分离梯度和统一的质谱参数可能减少质谱分析耗费的时间,今后进一步优化酶切和色谱质谱条件有望鉴定到更多的大豆种子蛋白。

4 结 论

尿素硫脲初提 – 苯酚甲醇醋酸铵复提法适用于大豆蛋白质组样品制备,同时,适当的制样重复和样品预分离能有效提高蛋白质的提取率和鉴定率,可为深入开展大豆蛋白质组学研究提供参考。

参考文献

[1] Hurkman W J, Tanaka C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Plant Physiology*, 1986, 81: 802-806.

[2] Brian P M, Jay J T. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: Automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(12): 1733-1744.

[3] Ján A M, Mark L J. Proteomic analysis of the testa from developing soybean seeds[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 89(26): 265-272.

[4] Savithiry S N, Hari K, Sukla M, et al. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 394(2): 259-268.

[5] Agnieszka Z, Juan D R, Juan de D A, et al. A protocol for protein extraction from lipid-rich plant tissues suitable for electrophoresis[J]. *Plant Proteomics*, 2013, 1072: 85-91.

[6] Sebastien C C, Erwin W, Kris L, 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): 2497-2507.

[7] Jeremy S, Steven B C, Jessica S, et al. Genome sequence of the palaeo-polyploid soybean[J]. *Nature*, 2010, 463: 178-183.

[8] Savithiry N, Xu C P, Thomas J C, et al. Comparison of protein

solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins [J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 342(2): 214-220.

[9] 郑蕊, 喻德跃. 适于蛋白质组研究的大豆种子蛋白双向电泳技术的改进[J]. *大豆科学*, 2005, 24(3): 166-170. (Zheng R, Yu D Y. Improvement of two-dimensional electrophoresis of bean seed protein for proteomic analysis[J]. *Soybean Science*, 2005, 24(3): 166-170. )

[10] Andre M M, Elibio L R. NanoUPLC-MS<sup>E</sup> proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database[J]. *BMC Biotechnology*, 2012, 12: 82.

[11] William J H, Charlene K T. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel [J]. *Electrophoresis*, 1986, 81(3): 802-806.

[12] Damerval C, de Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52-54.

[13] Herman E M, Helm R M, Jung R, et al. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132: 36-43.

[14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.

[15] Li R, Yu H, Xing R, et al. Application of nanoLC-MS/MS to the shotgun proteomic analysis of the nematocyst proteins from jellyfish *Stomolophus meleagris* [J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 899: 86-95.

[16] Emine G, Genna L A, Ralph A D, et al. Muddiman, increasing proteome coverage with offline RP HPLC coupled to online RP nanoLC-MS [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(9-10): 610-614.

[17] Hu M, Liu Y H, Yu K W, et al. Decreasing the amount of trypsin in in-gel digestion leads to diminished chemical noise and improved protein identifications [J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 109: 16-25.

[18] 刘伟霞, 潘映红. 适用于小麦叶片蛋白质组分析的样品制备方法 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(10): 2169-2176. (Liu W X, Pan Y H. Sample preparation methods suitable for wheat leaf proteome analysis [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(10): 2169-2176. )

[19] Chen Y M, Xu Z C, Zhang C M, et al. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing [J]. *Food Chemistry*, 2014, 154: 108-116.