

# 植物绿叶粗蛋白在 SDS-PAGE 中向负极泳动的富含苯丙氨酸的碱性蛋白的测定

梁秀文, 黄丽霞, 黄城贵, 葛晶, 陈红梅, 徐杰\*, 董宇亮, 郭晋雅, 杨净, 曾秋莲, 徐杰\*\*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631)

**摘要:** 提取菜心(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* Tsen et Lee)和生菜(*Lactuca sativa* L.)绿叶粗蛋白, 经 SDS-变性后作醋酸纤维素薄膜电泳, 证实这两种蔬菜含有分别向负极泳动和向正极泳动的蛋白。菜心绿叶粗蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 从负极电泳缓冲液中获得向负极泳动的蛋白, 其苯丙氨酸含量为 57.05%, 碱性/酸性氨基酸残基的比例为 3.04, 表明是富含苯丙氨酸的碱性蛋白。

**关键词:** 粗蛋白; 醋酸纤维素薄膜电泳; 负极泳动蛋白; SDS-PAGE; 苯丙氨酸

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)02-0126-04

## The Determination of A Phenylalanine-rich Basic Protein from Plant Green Leaves Migrated towards the Cathode in SDS-PAGE

LIANG Xiu-wen, HUANG Li-xia, HUANG Cheng-gui, GE Jing, CHEN Hong-mei, XU Jie\*, DONG Yu-liang, GUO Jin-ya, YANG Jing, ZENG Qiu-lian, XU Jie\*\*

(College of Life Sciences, South China Normal University, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** Crude proteins from green leaves of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* Tsen et Lee and *Lactuca sativa* L. were subjected to acetate cellulose membrane electrophoresis under SDS-denatured conditions. Two groups of protein were observed, one migrated towards the anode, and the other, the cathode. The cathode protein from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *utilis* was collected from cathode reservoir after SDS-PAGE, and its amino acid components were determined to have 57.0% phenylalanine, the ratio of basic/acidic amino acid residues was 3.04, indicating the protein towards cathode was a phenylalanine rich basic protein. It must be emphasized that the protein migrated towards the cathode had never been reported previously.

**Key words:** Crude protein; Acetate cellulose membrane electrophoresis; Cathode protein; SDS-PAGE; Phenylalanine

SDS-PAGE 是研究蛋白亚基组成和蛋白纯度的主要方法<sup>[1-3]</sup>。电泳时一般蛋白以 1:1.4 的比例和 SDS 结合为蛋白-SDS 胶束。由于 SDS 的负电荷远超过蛋白的电荷, 以至各种蛋白无论带何种电荷和带多少电荷, 蛋白-SDS 胶束均带负电, 蛋白电

荷对蛋白-SDS 胶束迁移率的影响可忽略<sup>[4]</sup>。但 SDS-PAGE 对含疏水性氨基酸较多的膜蛋白, 以及带电量特殊的碱性和酸性蛋白等有局限性: 如膜蛋白在 SDS-PAGE 中通常会沉淀<sup>[5]</sup>。碱性的组蛋白 F1 和 SDS 形成的胶束带负电, 也向正极泳动, 但蛋白

收稿日期: 2005-07-14 接受日期: 2005-12-19

基金项目: 广东省自然科学基金 (021105) 资助

\* 华南师范大学生命科学学院本科生

\*\* 通讯作者 Corresponding author

正电荷抵消了 SDS 部分的负电荷,其大小为 21 kD,但 SDS-PAGE 测定出为 35 kD<sup>[3]</sup>。强碱性的精蛋白在 SDS-PAGE 中会沉淀<sup>[4]</sup>或停留在分离胶处<sup>[5]</sup>,这可能是 SDS 负电荷与精蛋白的正电荷相差无几,形成的蛋白-SDS 胶束带极少或少量的净负电荷,导致溶解度降低和电泳动力不够。酸性的铁氧还蛋白的  $M_r$  只有 8 kD,但在 SDS-PAGE 中的  $R_f=0.8$ ,因此有人推测铁氧还蛋白可能不能很好地和 SDS 结合,甚至不能和 SDS 结合<sup>[6]</sup>。如果有一种碱性蛋白所带正电荷比 SDS 的负电荷还要多,或者虽然所带正电荷比 SDS 的负电荷少,但蛋白不能很好地和 SDS 结合,蛋白和 SDS 结合的比例达不到 1:1.4,正如铁氧还蛋白那样<sup>[4]</sup>,最终导致蛋白-SDS 胶束带净正电荷,在 SDS-PAGE 中就会向负极泳动。我们在提取菜心乙醇酸氧化酶同工酶的过程中,就发现了这样的一种在 SDS- 变性下向负极泳动的富含苯丙氨酸的碱性蛋白,其氨基酸组成中苯丙氨酸为 60.00%–65.62%,碱性/酸性氨基酸残基的比例为 0.89–1.46<sup>[6]</sup>。鉴于乙醇酸氧化酶同工酶是从菜心绿叶粗蛋白中提取的,类似的在 SDS- 变性下向负极泳动的蛋白也应该存在于菜心等所有植物的绿叶粗蛋白中。本文用菜心和生菜绿叶为材料,对粗蛋白中是否存在负极泳动蛋白,该蛋白占总蛋白的比例,以及该蛋白的氨基酸组成等作进一步的研究。为探讨 SDS-PAGE 的缺陷,以及为完善蛋白组学的研究提供参考。

## 1 材料和方法

**实验材料** 菜心(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* Tsen et Lee)和生菜(*Lactuca sativa* L.)均购自市场。

**仪器和试剂** L-8800 型全自动氨基酸分析仪为日立公司产品。醋酸纤维素薄膜为浙江台州路桥四青生化材料厂产品。UV-1206 紫外分光光度计是日本岛津公司产品。MIKRO 22R 冷冻离心机为德国 Hettich 公司产品。Tris 为 Roche 产品。丙烯酰胺、考马斯亮蓝 G-250、考马斯亮蓝 R-250 和 SDS 均为 Sigma 产品。N,N'-亚甲双丙烯酰胺购自 Fluka 公司。DYCZ-20B 垂直板电泳槽为北京六一厂产品。氨基黑 10B 和牛血清白蛋白均为进口分装。SDS-PAGE 所用标准蛋白购自上海丽珠东风生物

技术有限公司产品。磷酸等其他试剂均为国产分析纯产品。

**绿叶粗蛋白的制备** 选取菜心和生菜新鲜叶片,加 5 倍体积 pH8.0 的 100 mmol/L 磷酸缓冲液(PBS)于研钵中将叶片研磨至浆状。四层纱布过滤。将滤液在 4℃ 下  $4\ 000 \times g$  离心 3 min,取上清液即得叶片粗蛋白。

**绿叶粗蛋白的蛋白质含量的测定** 按 Bradford 的方法测定蛋白质含量<sup>[7]</sup>。以牛血清白蛋白为标准蛋白。

**绿叶粗蛋白的 SDS-PAGE** 按 Laemmli<sup>[2]</sup>的方法。

**绿叶粗蛋白的 SDS- 醋酸纤维素薄膜电泳** 用镊子将醋酸纤维素薄膜小心放入有 pH 8.0 的 100 mmol/L PBS 的培养皿中,浸泡 20 min,取出并夹在两层滤纸间,以吸干多余的缓冲液,平铺于实验台上(粗糙面向上)。绿叶粗蛋白按 Laemmli<sup>[2]</sup>的方法经 SDS- 变性,如蛋白质含量为 1 mg ml<sup>-1</sup>,则等体积加入 SDS- 蛋白裂解液,在 100℃ 加热 4 min 后点样在醋酸纤维素薄膜中央,并在 100 V 下电泳 40 min。电泳后经氨基黑 10B 溶液染色 10 min。最后经 10% 醋酸脱色。

**绿叶粗蛋白中在 SDS- 变性下向负极泳动的蛋白的氨基酸组成** 菜心绿叶粗蛋白经制备性 SDS-PAGE,电泳在 DYCZ-20B 垂直板电泳槽中进行,但玻璃板长度缩短为 18 cm。采用 4% 聚丙烯酰胺凝胶,胶长度仅为 2 cm。28 ml 粗蛋白(1.53 mg ml<sup>-1</sup>)经 SDS- 变性后上样,正负极的 SDS- 电泳缓冲液均为 100 ml。电泳向正极进行,电泳 2 h 后收集负极的电泳缓冲液,由此获得向负极泳动的蛋白。上 Sephadex G-50 柱层析以去除 SDS- 电泳缓冲液中的甘氨酸。经酸水解后在 L-8800 型全自动氨基酸分析仪中,采用外标定量法测定其氨基酸组成,具体操作按仪器说明书。

## 2 结果和讨论

提取菜心叶片和生菜叶片的粗蛋白。菜心叶片粗蛋白经 SDS-PAGE,电泳向正极进行,发现有多条带(图 1)。

菜心和生菜绿叶的粗蛋白经 SDS- 变性后,点样在醋酸纤维素薄膜的中央。电泳结果发现,绿叶

粗蛋白均含有在 SDS- 变性下向负极泳动和向正极泳动的蛋白, 负极 / 正极泳动蛋白的比例较低 (图 2)。因此, 尽管 SDS- 醋酸纤维素薄膜电泳的灵敏度比 SDS-PAGE 的低得多 (图 1, 2), 但图 2 的结果还是可以说明: 在 SDS- 变性下, 粗蛋白中确实含有向负极泳动的蛋白。

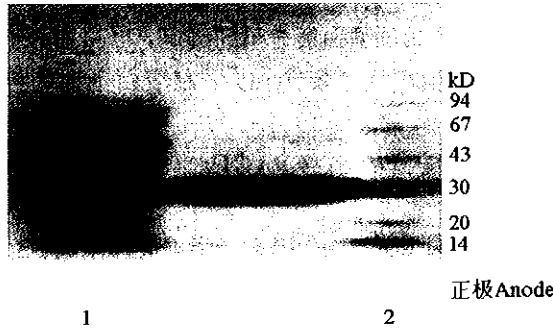


图 1 菜心绿叶粗蛋白经 SDS-PAGE 的电泳图  
Fig. 1 Electrophoretogram of crude protein from green leaves of *B. campestris* ssp. *chinensis* var. *utilis* subjected to SDS-PAGE  
1: 粗蛋白 Crude protein (14 μg); 2: Markers

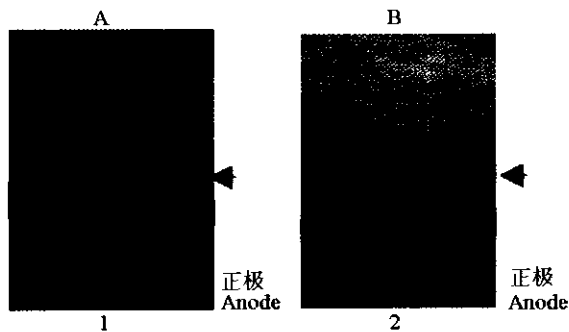


图 2 菜心(A)和生菜(B)绿叶粗蛋白经 SDS- 醋酸纤维素薄膜电泳  
Fig. 2 Crude proteins of green leaves of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *utilis* (A) and *Lactuca sativa* (B) were subjected to SDS-acetate cellulose membrane electrophoresis under SDS-denatured conditions.

电泳极性如图所示, 箭头为点样的位置 The polarity of electrophoresis was shown in figure and the arrows indicated the original of sample. 1: 粗蛋白 Crude protein (17.3 μg); 2: 粗蛋白 Crude protein (16.4 μg)

一般认为在 SDS-PAGE 中, 蛋白 -SDS 胶束均向正极泳动; 而类似的蛋白在 SDS-PAGE 中向负极泳动的现象从未见有报道<sup>[1-5]</sup>。因此, 确保该现象的可靠性是至关重要的。为此, 有必要获得向负极泳动的蛋白, 并测定其氨基酸组成, 以证实 在图 2 中向负极泳动的确实是蛋白, 而不是能和氨基黑起颜

色反应的其它物质。另外, 氨基酸组成的结果也可以帮助分析该蛋白向负极泳动的机理, 即该蛋白是否含有大量的碱性氨基酸残基。

SDS- 醋酸纤维素薄膜电泳表明, 绿叶粗蛋白中存在向负极泳动的蛋白。但从中不能获得足量的负极泳动蛋白。为此, 将绿叶粗蛋白在垂直板电泳槽经制备性 SDS-PAGE。电泳后收集负极的电泳缓冲液。上 Sephadex G-50 柱层析, 获得一个单峰(图略), 以去除 SDS- 电泳缓冲液中的甘氨酸, 由此获得向负极泳动的蛋白。其氨基酸组成中苯丙氨酸含量为 57.05%, 碱性 / 酸性氨基酸残基的比例为 3.04, 表明是富含苯丙氨酸的碱性蛋白(表 1)。这和我们之前用乙醇酸氧化酶同工酶为材料, 所获得的在 SDS-PAGE 中向负极泳动的蛋白的结果相吻合<sup>[6]</sup>。通过查对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等蛋白数据库, 未发现苯丙氨酸含量接近 60% 的蛋白。因此, 富含苯丙氨酸的碱性蛋白可能是新蛋白。

表 1 菜心绿叶粗蛋白经 SDS-PAGE 后收集负极电泳缓冲液所测定的氨基酸组成

Table 1 Amino acid contents of cathode buffer after crude protein from *B. campestris* ssp. *chinensis* var. *utilis* leaves was subjected to SDS-PAGE

氨基酸 Amino acid	含量 Content (%)
Asp	2.03
Thr	1.32
Ser	4.11
Glu	3.02
Gly	4.56
Ala	2.09
Cys	—
Val	5.19
Met	—
Ile	1.13
Leu	1.97
Tyr	2.16
Phe	57.05
Lys	10.15
His	1.01
Arg	4.21
Pro	—
Trp	—

—: Not determined

紫外吸收光谱也支持表 1 高含量苯丙氨酸的结果。牛血清白蛋白溶液在 280 nm 处有一个吸收峰,  $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$  大于 1; 以上负极泳动的蛋白溶液在 280 nm 处没有吸收峰,  $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$  小于 1(图略)。因为在蛋白对三种紫外有吸收的氨基酸中, 一般蛋白的色氨酸和酪氨酸的比例远高于苯丙氨酸, 前两者的吸收峰均在 280 nm; 而苯丙氨酸的吸收峰在 260 nm。故一般蛋白的吸收峰在 280 nm。另外, 用牛血清白蛋白为标准蛋白, 经紫外法测定以上负极泳动蛋白的浓度, 所测数据远高于考马斯亮蓝法。这也反映出其高含量苯丙氨酸的特性。

发现蛋白在 SDS-PAGE 中向负极泳动具有重要意义: 1) 一般认为蛋白 -SDS 胶束只会向正极泳动, SDS-PAGE 是目前判断蛋白纯度的主要方法。现在发现蛋白 -SDS 胶束可以向负极泳动, 即 SDS-PAGE 不能作为判断某些特殊结构蛋白的纯度的依据。2) 有许多蛋白经一些方法证实是纯的, 如 SDS-PAGE 后只有单带, 但 IEF 却含多个 pI。目前对其中的原因众说纷纭, 尚无公认的解释, 有人认为是空间构象不同所引起, 但未有确切的证据<sup>[8]</sup>。如猪生长激素经 SDS-PAGE 后只有 28 kD 带, 但 IEF 却有 6.0-7.2 等五个 pI<sup>[9]</sup>。猪生长激素可能含两种不同的亚基, 其中 28 kD 是个普通蛋白; 而另一个亚基则在 SDS-PAGE 中是向负极泳动, 因而被忽视。当然, 猪生长激素是否真的含两种亚基还有待证实。3) SDS-PAGE 是蛋白质组学研究的核心技术, 最近我国开展了人类肝脏的蛋白质组学的研究工作。而我们发现, 和绿叶粗蛋白类似, 兔子肝脏粗蛋白中也含有在 SDS-PAGE 中向负极泳动的蛋白

(待发表)。这类蛋白很容易被忽视。4) 以上负极泳动蛋白的苯丙氨酸含量很高, 具有膜蛋白的特点, 其结构和功能值得深入研究。5) 在目前所发现的 DNA 中, 有许多基因仍未知其编码何种蛋白。绿叶粗蛋白中有很多在 SDS-PAGE 中是向负极泳动, 这些蛋白必定是由基因所编码, 通过其蛋白结构与功能的研究, 有助于基因组学的研究。

### 参考文献

- [1] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 64-208.
- [2] Laemmli Y K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> [J]. Nature, 1970, 227:680-685.
- [3] 何忠效, 张树政. 电泳 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 127-161.
- [4] Williams J G, Gratzer W B. Limitation of the detergent polyacrylamide gel electrophoresis method for molecular weight determination of protein [J]. J Chromatogr, 1971, 57:121-125.
- [5] Zhao M (赵明), Sun C (孙册). The pellucida glycoprotein ZP3 binding protein of the boar spermatozoa [J]. Acta Biochem Biophys Sin(生物化学与生物物理学报), 1996, 28(2):145-152.(in Chinese)
- [6] Zeng Q L(曾秋莲), Huang M Y(黄美意), Xu J(徐杰), et al. A Phenylalanine-rich protein migrates towards the cathode in SDS-PAGE [J]. Chin J Biochem Mol Biol(中国生物化学与分子生物学报), 2006, 22(1):86-90.(in Chinese)
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem. 1976, 72:248-254.
- [8] 夏其昌, 曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004. 12-85.
- [9] Wang Y(王韵), Yu M Z(余慕贞), Shi Y X(史瀛仙). Rapid and simple preparation of porcine growth hormone [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 1991, 24(4):81-86.(in Chinese)