

荔枝胚蛋白质的提取方法

张以顺¹ 向旭² 黄上志¹ 傅家瑞¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广东广州 510640)

摘要:以不同体积的 Tris-HCl (0.1mol/L, pH8.8)为提取液, 结合不同含量(以胚鲜重计)的 PVP40, 对怀枝、黑叶和桂味等荔枝 (*Litchi chinensis*) 品种的胚蛋白质进行提取。结果表明, 提取液体积为胚鲜重的 5 倍(ml g⁻¹ FW), 并加入 15% 的 PVP40 时, 提取蛋白质的效果最好, 可用于荔枝胚可溶性蛋白质含量的测定; 胚乳蛋白质的提取则以等体积的提取液(内含 2% 的 PVP40)为佳。加入 10% PVP40 的胚蛋白提取液可直接进行 SDS-PAGE 电泳, 用 10 倍于蛋白质提取液体积的乙醇沉淀胚和胚乳的蛋白提取液, 可得到最佳的 SDS-PAGE 电泳效果。

关键词:荔枝; 胚蛋白质; PVP40; 电泳

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)02-0174-03

A Method for Extracting Embryo Proteins in *Litchi chinensis* Sonn.

ZHANG Yi-shun¹ XIANG Xu² HUANG Shang-zhi¹ FU Jia-rui¹

(1. Life Science College, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Pomology Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Different volumes of Tris-HCl buffer (0.1mol/L, pH 8.8) in combination with different contents of PVP40 were employed to study the embryo protein extracted from *Litchi chinensis* varieties "Huaizhi", "Guiwei" and "Heiye". It was shown that the volume of Tris-HCl buffer being 5 times the fresh weight of embryo and added with 15% PVP40 (g g⁻¹ FW) was adapted to obtain a satisfactory result. Homogenate containing 15% PVP40 (g g⁻¹ FW) could be used directly for determination of soluble protein content by Coomassie Brilliant Blue G-250 and 10% PVP40 (g g⁻¹ FW) for sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Endosperm protein could be extracted with equal volume of Tris-HCl containing 2% PVP40. Precipitation of embryo and endosperm proteins with ethanol of 10 times the volume of protein extraction gave best SDS-PAGE pattern.

Key words: *Litchi chinensis*; Embryo protein; PVP40; Electrophoresis

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 原产我国, 是南方典型的亚热带水果, 也是顽拗性植物的代表。荔枝胚的发育状况可分为正常型、败育型和部分败育型^[1], 败育型胚俗称“焦核”, 是评估荔枝品质的一个非常重要的因子。

顽拗性植物荔枝、芒果等植物材料中通常含有大量的多酚和醌类物质。多酚和醌类物质在蛋白质的提取过程中容易被氧化而使匀浆液变成褐色, 不但严重干扰提取工作的进行, 而且影响蛋白质的电

泳效果。陈伟等^[2]用含有三氯醋酸和 β-巯基乙醇的预冷丙酮在 -20℃ 下浸提荔枝胚与 PVP 的研磨粉来提取荔枝胚蛋白质, 取得较好的效果。但该方法操作程序烦琐, 三氯醋酸不仅会造成蛋白质变性, 还会改变蛋白质的电泳行为^[3]。也有学者通过在缓冲液中加入一定量的 SDS 来提取含多酚类物质的植物材料的蛋白质^[4-6], 可这种蛋白质提取液不能用较为简单的考马斯亮蓝 G-250 法测定其蛋白质含量, 也不能直接用于双向电泳分析。我们的研究目的在于建立一种简便、快速和可靠的方法, 以适用于荔枝胚和胚乳等含有多酚类物质的植物材料的蛋白质提取。提取的蛋白质匀浆液经简单沉淀后, 不仅

收稿日期: 2002-06-11 接受日期: 2002-10-18

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (980720) 资助

能直接用于含量测定,而且可直接用于单向和双向电泳的分析,促进荔枝胚败育的分子机制等深层次研究工作的开展。

1 材料和方法

1.1 植物材料

采集开花后 20 d 和 40 d 的荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 品种怀枝、黑叶及桂味幼果,置于 -20°C 低温冰箱中保存。

1.2 试验方法

液体胚乳可溶性蛋白质提取 提取液配制: Tris-HCl 0.1 mol/L, pH 8.8 (内含 2 mmol/L 二硫苏糖醇、2 mmol/L 抗坏血酸、2 mmol/L 半胱氨酸、5 mmol/L EDTA、1% 聚乙烯吡咯烷酮 PVP40、2% β -巯基乙醇)。从 -20°C 冰箱中取出开花后 20 d 的荔枝幼果,剥去珠被,将冻冰的液体胚乳与胚分离收集,等体积加入提取液, 4°C , $13\ 000 \times g$ 离心 10 min,取上清液,置 4°C 备用。

胚可溶性蛋白质提取 剥取开花后 40 d 的荔枝胚,取 1 g 分别用 5%、10%、15%、20%、25% 及 30% 的 PVP40 (g g^{-1} FW) 和 2、3、4、5 倍体积 (ml g^{-1} FW) 的 Tris-HCl 提取液在液氮中研磨提取, 4°C , $13\ 000 \times g$ 离心 15 min,取上清液,置 4°C 备用。胚的蛋白提取液与液体胚乳的蛋白提取液相同,但 PVP40 用量按胚鲜重的百分比加入,且在提取前须用少许提取液浸湿。

蛋白质纯化 在胚及胚乳蛋白粗提液中加入 10 倍体积无水乙醇,置 -20°C 下 2-3 h, 4°C , $13\ 000 \times g$ 离心 20 min,沉淀用适量提取液溶解, -20°C 条件下保存备用。

蛋白质含量测定 按 Bradford^[7] 的方法进行,用牛血清蛋白做标准曲线。

SDS-PAGE 按 Menendez^[4] 方法进行,分离胶浓度为 12%,浓缩胶为 4%,30 mA 恒流电泳,蛋白质上样量为 30 μg 。用考马斯亮蓝 R-250 对凝胶进行染色,脱色液含 7% 的冰醋酸和 10% 的乙醇。

2 结果

2.1 PVP40 对荔枝胚蛋白质提取的影响

PVP40 的主要作用在于它能与植物材料中的多酚类物质结合,以降低蛋白质提取过程中由于多酚被氧化而带来的干扰。从提取效果看,未加 PVP40 的对照蛋白质提取液,当与考马斯亮蓝作用

时,其颜色为绿色,无法测定。随着 PVP40 的加入,蛋白质含量逐渐上升,当 PVP40 用量约为胚鲜重的 15% 时,蛋白质含量最高,其后又逐渐下降(图 1)。

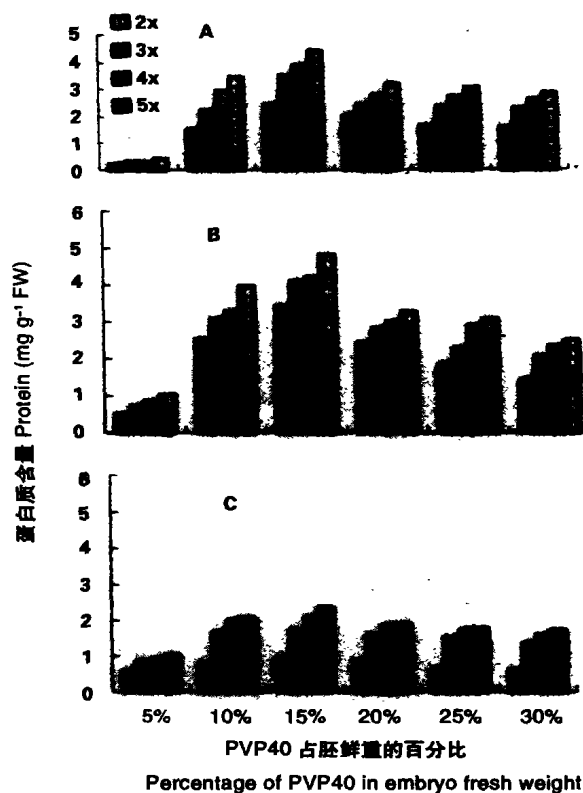


图 1 不同含量 PVP40 及不同体积的 Tris-HCl 缓冲液对荔枝胚蛋白质提取的影响

Fig. 1 Effect of different contents of PVP40 and different volumes of Tris-HCl buffer on embryo protein extraction in lychee varieties

A. 桂味 Guiwei; B. 黑叶 Heiye; C. 怀枝 Huaizhi

2x, 3x, 4x, 5x 分别表示 Tris-HCl 缓冲液体积是胚鲜重的 2、3、4、5 倍。2x, 3x, 4x and 5x represent that the volumes of Tris-HCl buffer are 2, 3, 4 and 5 times of the fresh weight of embryo, respectively.

2.2 不同体积的 Tris-HCl 缓冲液对荔枝胚蛋白质提取的影响

常用的蛋白质提取缓冲液不适用于荔枝胚蛋白质的提取。经过大量筛选,我们采用了 0.1 mol/L、pH 8.8 的 Tris-HCl 缓冲液(具体配制见方法所述)。该提取液配合 PVP40 的使用,可得到非常好的效果,而且蛋白质含量可通过比较简单的考马斯亮蓝 G-250 法进行检测。

在 PVP40 含量不变的情况下,随着 Tris-HCl 缓冲液体积的增加,荔枝胚的蛋白质含量也随之提高,当提取液体积达到胚鲜重的 5 倍 (ml g^{-1} FW) 时,蛋白质含量最高(图 1)。

2.3 PVP40 对荔枝胚及胚乳蛋白质 SDS-PAGE 的影响

提取完成后,我们分别对不同用量的 PVP40 的蛋白质提取液进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果表明,当 PVP40 的用量大于或小于胚鲜重的 10% 时,电泳效果不理想,主要表现为泳道严重偏离,相互挤压,即使提取液的蛋白质含量很高,凝胶却染不出蛋白质条带,未加 PVP40 的对照也是如此;当 PVP40 的用量为材料重量的 10% 时,胚乳和胚的蛋白质提取液进一步用 10 倍体积的乙醇沉淀,可得到最佳的 SDS-PAGE 电泳效果(图 2)。

3 讨论

荔枝胚和胚乳中含有大量的多酚及醌类物质、有机酸、糖等,成分复杂。传统的蛋白质提取缓冲液难以取得较好的分离效果,有的提取液如磷酸缓冲液根本就不能提取出任何荔枝胚蛋白质,原因在于大部分缓冲液的缓冲能力较差,荔枝胚用其匀浆,前后的 pH 值变化非常大,不利于蛋白质提取。即使本文推荐的 Tris-HCl 缓冲液,也只有配合适量 PVP40 的条件下,才能取得满意的结果,达到分离和测定的目的。

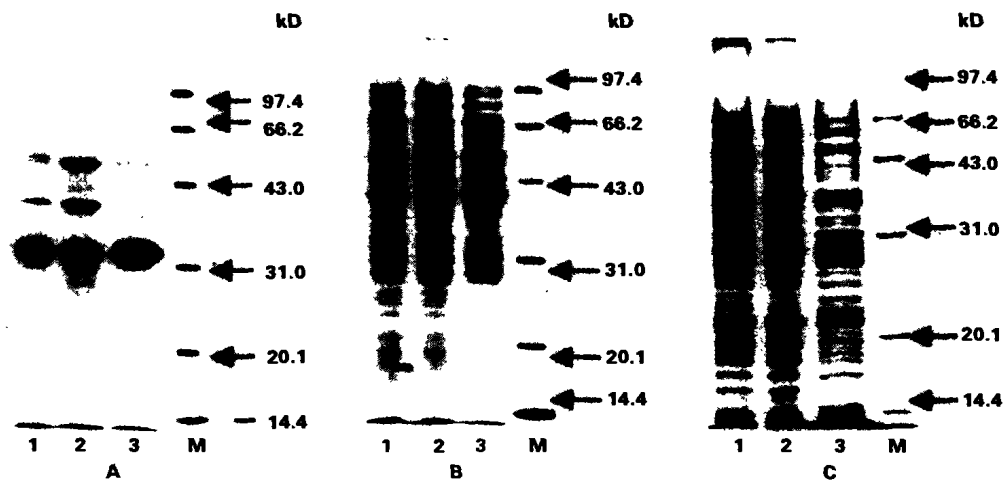


图 2 乙醇沉淀对荔枝胚及胚乳蛋白质 SDS-PAGE 的影响

Fig. 2 Effect of ethanol precipitation on SDS-PAGE of lychee embryo protein

- A. 乙醇沉淀后的胚乳蛋白质 SDS-PAGE。 SDS-PAGE of endosperm protein precipitated in ethanol
 B. 10%PVP40 提取的胚蛋白质 SDS-PAGE。 SDS-PAGE of embryo protein homogenate containing 10% PVP40.
 C. 乙醇沉淀后的胚蛋白质 SDS-PAGE。 SDS-PAGE of embryo protein precipitated in ethanol
 1. 桂味 Guiwei; 2. 黑叶 Heiye; 3. 怀枝 Huaizhi; M: Protein marker

参考文献

- [1] Lü L X (吕柳新), Yu X L (余小玲), Ye Z M (叶志明). Studies on the mechanism of embryonic development in *Litchi* [J]. *J Fujian Agri Coll* (福建农学院学报), 1989, 18(2):149-155. (in Chinese)
- [2] Chen W (陈伟), Huang C M (黄春梅), Lü L X (吕柳新). The improved method of two-dimensional electrophoresis of protein in recalcitrant plant *Litchi* [J]. *J Fujian Agri Univ* (福建农业大学学报), 2001, 30 (1):123-126. (in Chinese)
- [3] He Z X (何忠效), Zhang S Z (张树政). *Electrophoresis* [M]. Beijing: Science Press, 1999. 139-140. (in Chinese)
- [4] Menendez R A, Larsen F E, Fritts R J. Protein and isozyme electrophoresis and isoelectric focusing for characterization of apple clones [J]. *Sci Hort*, 1986, 29:211-220.
- [5] Zhou H T (周涵韬), Lin P (林鹏). Comparative study of *Avicennia marina* proteins in salt-tolerant conditions using two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Marine Sci* (海洋科学), 2002, 26 (4):5-7. (in Chinese)
- [6] Wang D X (王定祥). Changes in protein content, peroxidase and polyphenol oxidase isozyme pattern during the development of pear seeding [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1986, 12(1):40-47. (in Chinese)
- [7] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.