

红树植物秋茄叶片双向电泳技术体系的建立及优化

于冯^{1,2}, 郑春芳², 施孟如¹, 刘伟成², 仇建标², 冀德伟², 黄丽², 陈少波^{2*}

(1. 温州医学院生命科学学院, 浙江 温州 325035; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005)

摘要: 对适用于秋茄(*Kandelia candel*)叶片蛋白质组学研究的双向电泳技术体系进行了优化。结果表明, 采用酚抽提法提取的蛋白质浓度较低, 约 $1.7 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, SDS-PAGE 电泳后几乎无条带; 而采用改良 TCA-丙酮沉淀法可显著提高提取液中蛋白质的含量, 可达 $12.4 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ 。秋茄叶片蛋白质主要分布在 pH 4~7 的范围内, 最适于采用 pH 3~10 NL 的胶条, 17 cm 胶条的最适上样量为 400 μg , 经银染后可得蛋白点约 (564 ± 34) 个。用 TCA-丙酮沉淀法提取秋茄叶片全蛋白质组, 按优化的参数进行双向电泳分离, 获得了高分辨率、高重复性的图谱, 可用于秋茄蛋白质组学研究。

关键词: 秋茄; 蛋白质; 提取; 双向电泳(2-DE); 技术优化

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)06-0519-05

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.06.005

Establishment and Optimization of 2-DE Technique System in Leaf Proteome of *Kandelia candel*

YU Feng^{1,2}, ZHENG Chun-fang², SHI Meng-ru¹, LIU Wei-cheng², QIU Jian-biao², JI De-wei², HUANG Li², CHEN Shao-bo^{2*}

(1. College of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, China)

Abstract: In order to study the proteome of *Kandelia candel* leaves, a two-dimensional electrophoresis (2-DE) system was established and optimized. Compared with the low protein content ($1.7 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) extracted by phenol (Phe), the improved trichloroacetic acid/acetone precipitation (TCA) method could obviously increase the extracting efficiency up to $12.4 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. The protein spots of *Kandelia candel* leaves mainly distributed in the range of pH 4–7. The optimal loading quantity of samples were $400 \mu\text{g gel}^{-1}$ for a 17 cm IPG strip (pH 3–10 NL), which can detect 564 ± 34 protein spots after silver staining. Therefore, the high resolution and repeatable 2-DE map could be obtained by using TCA extract method and the optimum system, which could widely use in proteome study of *Kandelia candel*.

Key words: *Kandelia candel*; Protein; Extraction; Two-dimensional electrophoresis (2-DE); Optimization

蛋白质组(Proteome)是由 Wilkins 和 Williams 于 1994 年首次提出, 并定义为“由基因组所表达的全部蛋白质”^[1]。蛋白质双向电泳(Two-dimensional

electrophoresis, 2-DE)是利用蛋白质等电点和分子量两种不同特性而进行蛋白质分离的技术, 具有较高的分辨率和灵敏度, 已成为蛋白质检测和分析的一

收稿日期: 2011-03-07

接受日期: 2011-08-17

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项经费项目(200805072; 201005012); 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室开放课题基金项目(2010F30003); 浙江省科技厅创新团队建设与人才培养项目(2009F20009); 浙江省海洋与渔业项目“高纬度红树林生态恢复关键技术应用示范”资助

作者简介: 于冯(1985~), 女, 硕士生, 研究方向为红树植物秋茄蛋白质组学的研究, email: yufengellie@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: chenshaobo@hotmail.com

种强有力的生化手段^[2]。1975 年 O'Farrell 等^[3]建立了 IEF/SDS-PAGE 双向电泳,主要用于微生物和动物细胞的全蛋白质分析。随着几种模式生物基因组测序的完成,蛋白质组学技术已经运用到甜土植物研究上,如棉花(*Gossypium hirsutum*)^[4]、小麦(*Triticum aestivum*)^[5]、水稻(*Oryza sativa*)^[6]等,而目前在红树植物中的应用研究报道甚少。

秋茄(*Kandelia candel*)为红树科(Rhizophoraceae)秋茄属植物,生长在陆地与海洋交界带的滩涂浅滩,具有极强的耐盐性。它是我国红树植物中最耐寒的种类之一,已经在中国红树林分布的最北界——温州成功越冬^[7],目前仅开展了高纬度地区引种秋茄对低温适应的生物学调查研究^[8],而对其分子遗传学和蛋白质组学等方面的研究却未见报道。

蛋白质样品制备是双向电泳的关键步骤^[2]。植物组织由于富含色素、多酚、多糖、有机酸等次生代谢物质和蛋白酶,其蛋白质样品制备一直较为困难^[9]。秋茄生长在高盐环境中,其除含有多种次生代谢物质外,还含有大量盐分,而体内存在的盐离子严重干扰了等电聚焦进行。此外,秋茄的单宁含量较高,包括水解单宁和缩合单宁,缩合单宁能与蛋白质结合形成复合物^[10-12],严重影响蛋白质的提取与分离。因此,秋茄叶片蛋白质提取较其它植物更为困难,具有其特殊性和复杂性。

本研究通过对秋茄叶片蛋白质样品制备方法、杂质的去除进行比较,对双向电泳参数、一向 IPG 胶条和最适上样量等关键步骤进行了优化,以期获得高分辨率的蛋白质双向电泳图谱,建立可靠的秋茄叶片蛋白质双向电泳技术体系,为后续秋茄差异蛋白质组学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为浙江省西门岛 2006 年从福建引种的秋茄(*Kandelia candel*)植株,2010 年 6 月采集从顶端数起第二对完全展开的叶片,装冰盒内带回实验室,放入-80℃冰箱冻存。

1.2 主要化学试剂和仪器设备

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、超纯尿素(ultraurea)、硫脲(thiourea)、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS)、四甲基乙二胺(TEMED)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、固相 pH 胶条(17 cm,

pH 4~7),Bio-lyte pH 3~10,2-DE clean-up 试剂盒等均均为 Bio-Rad 公司产品。所有溶液均用 Milli-Q 水配制。

PROTEAN IEF CELL 等点聚焦仪、PROTEAN II Xi 垂直板电泳仪及其附件,CS-800 扫描成像系统,PDQuest 7.4.0 凝胶图像分析软件均为 Bio-Rad 公司产品,UV 2800 紫外可见光分光光度计为上海尤尼柯公司产品。

1.3 蛋白质提取方法

酚抽提法 参照李肖芳等^[9]方法并加以改进。1 g 叶片置液氮中充分研磨,向研钵中加入 4 mL 提取液(含 100 mmol/L Tris, 50 mmol/L 抗坏血酸, 50 mmol/L 硼砂, 1% Triton × 100, 2% β-巯基乙醇, 1% PVPP, 9 mol/L Urea, 1 mmol/L PMSF),待其融化后继续研磨数分钟,转至离心管中,加入等体积 pH 为 8.0 的 Tris 饱和酚,涡漩,在 750 × g 下(4℃)离心 10 min。取酚层于 50 mL 离心管中,加入等体积提取液抽提,于 750 × g 下(4℃)离心 20 min;加入 5 倍体积 0.1 mol/L 乙酸铵甲醇溶液,于-20℃沉淀过夜;在 750 × g 下(4℃)离心 30 min,弃上清液;沉淀用-20℃预冷甲醇洗涤 1 次,再以-20℃含 2% β-巯基乙醇的丙酮洗涤 2 次,室温干燥,得蛋白质粉末。向蛋白质干粉中加裂解液,4℃下放置使其溶解,蛋白样品置于-80℃冰箱保存备用。

改良的 TCA-丙酮沉淀法 1 g 叶片置液氮中充分研磨,转移至 15 mL 离心管中,加入 4 倍体积 20% TCA-丙酮,于 4℃沉淀过夜,在 750 × g 下(4℃)离心 30 min,弃上清液,沉淀用丙酮(含 2% β-巯基乙醇,4℃预冷)洗涤 3 次,室温干燥后,加入 1 mL 裂解液(含 2 mol/L 硫脲, 7 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 2 mmol/L TBP, 0.2% Bio-lyte),于 4℃溶解过夜,在 750 × g 下(4℃)离心 30 min,上清液即为蛋白质溶液,蛋白样品置-80℃冰箱保存备用。

参照 Bradford 法^[13]测定叶片总蛋白质含量,用 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ 表示。

1.4 双向电泳

第一向固定 pH 梯度等电聚焦电泳 采用低电压胶内泡涨法^[2]。将 400 μg 蛋白质样品上样缓冲液(含 2 mol/L 硫脲, 7 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 2 mmol/L TBP, 0.2% Bio-lyte, 0.001% 溴酚蓝)稀释加入聚焦盘中,总上样体积为 300 μL 。

选用 17 cm pH 4~7 线性或者 pH 3~10 非线性 IPG 胶条,IPG 胶条胶面朝下放入水化液,加盖 3 mL 矿物油。水化和聚焦均在标准型胶条槽内进行,被动水化 0 V 4 h,主动水化 250 V 0.5 h,除盐 500 V 0.5 h,除盐 1000 V 1.5 h,1000~10000 V 线性上升 3 h,聚焦 10000 V 6.5 h。

IPG 胶条的平衡 等电聚焦后的 IPG 胶条依次在含 1% DTT 和 2.5% 碘乙酰胺的平衡缓冲液(含 6 mol/L 尿素,2% SDS,pH 8.8 的 50 mol/L Tris-HCl,20% 甘油)中各平衡 15 min,转移至浓度为 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的上端,琼脂糖封顶。

第二向 SDS-PAGE 电泳 以恒定电流 10 mA gel⁻¹电泳 15 min,再加大电流至 30 mA gel⁻¹,溴酚蓝指示剂到达底部边缘时电泳结束,温度控制在 15℃~20℃。

凝胶蛋白点的染色 银染参照 Yan^[14] 等的方法进行染色。

凝胶图像的采集和分析 凝胶用 GS-800 图像扫描仪投射扫描,分辨率为 63.5×63.5 microns。图像配比分析用 PDQuest 7.4.0 软件进行。

1.5 数据分析

采用 SPSS16.0 软件进行方差分析,测定数据以平均值表示。用 LSD 法对不同提取方法获得的蛋白质含量进行差异性检验($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 秋茄叶片总蛋白质含量

用两种方法提取红树植物秋茄叶片的蛋白质含量不同,用改良的 20% TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白质含量平均值为 12.4 μg μL⁻¹,是酚抽提法(1.70 μg μL⁻¹)的 7.3 倍,达显著差异($P<0.05$)。说明改良的 20% TCA-丙酮沉淀法对秋茄叶片全蛋白提取效果明显优于酚抽提法。

2.2 单向 SDS-PAGE 分析

对两种方法提取的秋茄叶片蛋白质样品分别进行单向 SDS-PAGE 分析,由图 1 可见,酚抽提法获得的蛋白质样品的 SDS-PAGE 电泳几乎检测不到条带,且背景较浅;改良的 20% TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白质样品的 SDS-PAGE 电泳的条带多而清晰,分离效果好,且污染少。这些表明,酚抽提法提取的秋茄叶片全蛋白质样品不适于电泳实验,其样品中含有较多的干扰离子,严重影响电泳结果,而

改良的 20% TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白质样品则可得较好的电泳效果。

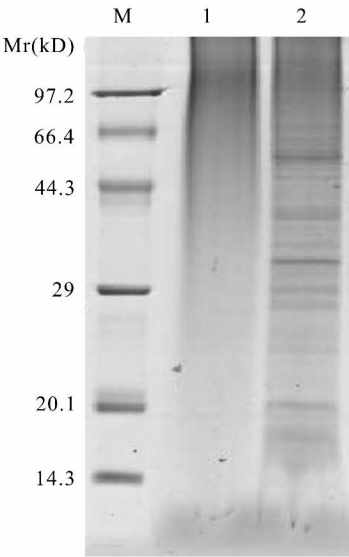


图 1 两种方法提取的蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱。M. Marker; 1. Phe 法; 2. TCA 法。

Fig. 1 SDS-PAGE maps of total proteins extracted by two methods. M. Marker; 1. Phe method; 2. TCA method.

2.3 秋茄叶片蛋白质的双向电泳

由图 2B 可看出,用改良的 20% TCA-丙酮沉淀法提取的秋茄叶片蛋白质,经双向电泳后的图谱背景模糊,有较多的横竖条纹;而将其用 clean-up 试剂盒纯化后再进行双向电泳,经银染可得到清晰的 2-DE 图谱(图 2C),蛋白质点数为(564±30)个。这表明秋茄叶片的蛋白质样品中杂质较多,需用 clean-up 试剂盒进行纯化。

从采用 pH 3~10、长 7 cm 的 IPG 线性胶条,上样量为 100 μg 时的双向电泳图谱可知(图 3),大部分蛋白质点集中于 pH 4~7 的范围内,蛋白点数较少。采用 pH 4~7、17 cm 长的 IPG 胶条,上样量为 200 μg 时,其电泳图谱有了明显改善(图 2C),秋茄叶片蛋白质能较好地分离,蛋白点数约为(436±30)个,但出现 pH 3~4 和 pH 7~10 范围内的蛋白点丢失的现象。为此,选用 pH 3~10 NL 的 IPG 胶条,并加大上样量至 400 μg(图 2A),二向胶浓度 12% 进行双向电泳,结果发现秋茄叶片的蛋白质得到了很好的分离,有蛋白点(564±34)个,且大部分蛋白点的分子量分布在 20.1~66.4 kD 范围内。因此,秋茄叶片蛋白质双向电泳应以 pH 3~10 NL 的 IPG 胶条和二向胶 12% 浓度的分离效果最佳。

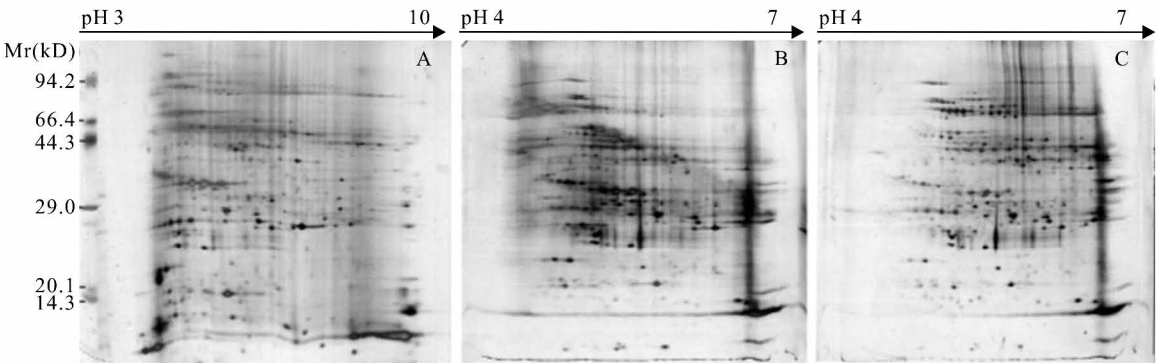


图 2 TCA-丙酮法提取的秋茄叶片蛋白的 2-DE 图谱。A. pH 3~10 NL, 17 cm 胶条; B. 纯化前, pH 4~7, 17 cm 胶条; C. 纯化后, pH 4~7, 17 cm 胶条。

Fig. 2 2-DE maps of proteins in *Kandelia candel* leaves extracted by TCA method. A. pH 3~10 NL, 17 cm IPG strip; B. Before clean-up treatment, pH 4~7, 17 cm IPG strip; C. after clean-up treatment, pH 4~7, 17 cm IPG strip.

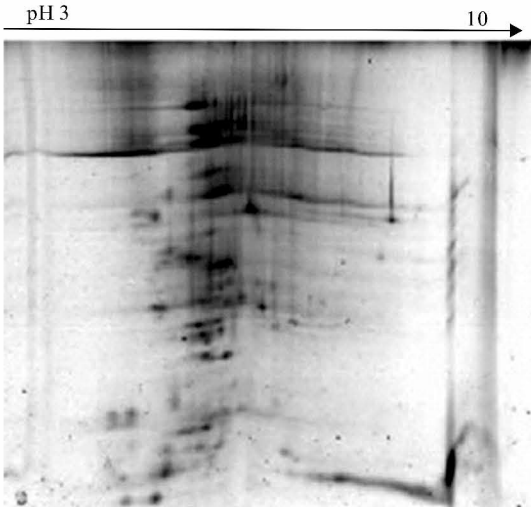


图 3 TCA-丙酮法提取的秋茄叶片蛋白的 2-DE 图谱(pH 3~10, 7 cm 胶条)

Fig. 3 2-DE map of proteins in *Kandelia candel* leaves extracted by TAC method (pH 3~10, 7 cm IPG strip)

3 讨论

酚抽提法被广泛应用于含较多干扰物的组织材料蛋白质的抽提^[15],如李肖芳等^[9]认为酚抽提法能很好地提取盐角草(*Salicornia europaea*)的蛋白质,并能有效去除样品中的盐离子。Scali^[16]等用酚抽提法提取橄榄(*Olea europaea*)叶片的蛋白质,也获得很好的效果。但本研究结果表明,酚抽提法提取的秋茄叶片蛋白质样品含量较低,而用改良的 20% TCA-丙酮沉淀法提取的秋茄叶片蛋白质明显优于酚抽提法(图 2),这可能是因为酚抽提法不能克服单宁对秋茄叶片中蛋白质的结合作用,导致蛋白质浓度过低。此外,酚抽提过程中,大多数水溶性化合

物,如多糖、核酸等留在了水相中,而多酚和脂质等化合物则与蛋白质共提取和共沉淀^[15]。改良后的 TCA-丙酮沉淀法很好地解决了这个问题,因而获得了高含量的蛋白质样品,其 SDS-PAGE 电泳图谱的条带多而清晰,其双向电泳图谱的背景清晰,蛋白质点分离较好。TCA 和丙酮的结合通常用于沉淀蛋白质和双向电泳样品制备过程中去除干扰物质^[16]。与传统方法比较,改良后的 TCA-丙酮沉淀法中 TCA 的浓度加倍,可以更好的去除盐离子,但是 TCA 在酸性条件下与蛋白质形成不溶性盐,且 TCA 可能渗入高丰度蛋白质分子内部而难以完全除去,此外若 TCA 浓度过高,也会影响高分子蛋白质的提取,且不易被丙酮彻底抽提,因此 TCA 的浓度对秋茄叶片蛋白质的提取有重要影响。本研究表明,用 20% TCA-丙酮提取秋茄叶片的蛋白质含量较高,2-DE 电泳图谱清晰。

秋茄叶片中含杂质较多,未用 clean-up 试剂盒纯化,2-DE 图谱背景模糊,有较多的横竖条纹;而经 clean-up 试剂盒纯化后,其电泳图谱背景清晰,蛋白质点分离较好(图 3B, C)。因此,提取秋茄叶片蛋白质时进行纯化是极为重要的步骤。

由图 2 和图 3A 可以看出,秋茄叶片的蛋白质 pH 大都分布在 4~7 左右,酸性端和碱性端的蛋白质分布较少。为了保证大部分蛋白质得到很好地分离且不丢失酸碱两端的少量蛋白质,本研究采用 pH 3~10 NL 的 IPG 胶条,其 pH 呈非线性分布,且 pH 4~7 的范围分布较宽,在 pH 3~4 和 7~10 范围分布较窄,这样有利于秋茄叶片蛋白质的完全分离。

电泳上样量直接影响电泳图谱上蛋白质点的

显现^[17]。过低的上样量导致一些低丰度蛋白不能显现,无法反映蛋白质组的全部信息,过高的上样量会导致聚焦过程中蛋白质在胶条槽中沉积,不能很好地进入 IPG 胶条^[18]。上样量的选择与试验材料、胶条 pH 范围、胶条长度、染色方法、高丰和低丰度蛋白的分布等情况有关。本研究采用 pH 3 ~ 10 NL,长 17 cm 的 IPG 胶条,上样量为 400 μg ,电泳后经银染得到了清晰、蛋白点数多的图谱,能满足秋茄叶片差异蛋白质组学研究的需要。

致谢 衷心感谢中国科学院华南植物园王发国博士对本论文的指导!

参考文献

- [1] Pennington S R, Wilkins M R, Hochstrasser D F, et al. Proteome analysis: From protein characterization to biological function [J]. *Trend Cell Biol*, 1997, 7(4): 168–173.
- [2] Niu Y D(牛屹东), Feng J(冯捷), Cui H(崔恒), et al. Protein Two-dimensional Electrophoresis Manual [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2006: 1–4.(in Chinese)
- [3] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250(10): 4007–4021.
- [4] Yao Y, Yang Y W, Liu J Y. An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2-DE [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(22): 4559–4569.
- [5] Damerval C, de Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7(1): 52–54.
- [6] Shen S H, Shama A, Komatsu S. Proteomics approach to identify would-response related proteins from rice leaf sheath [J]. *Proteomics*, 2003, 3(4): 527–535.
- [7] Qiu J B(仇建标), Huang L(黄丽), Chen S B(陈少波), et al. Critical tidal level for *Kandelia candel* forestation in strong tidal range area [J]. *Chin J Appl Ecol(应用生态学报)*, 2010, 21(5): 1252–1257.(in Chinese)
- [8] Chi W(池伟), Chen S B(陈少波), Qiu J B(仇建标), et al. The ecological adaptability of mangroves under low temperature stress [J]. *J Fujian For Sci Techn(福建林业科技)*, 2008, 35(4): 146–148. (in Chinese)
- [9] Li X F(李肖芳), Han H P(韩和平), Wang X C(王旭初), et al. A protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis analysis of halophytes [J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, 2006, 26(6): 1848–1853.(in Chinese)
- [10] Zheng D Z, Zheng S F, Liao B W, et al. The utilization, protection and afforestation on mangrove wetland [J]. *For Res*, 1995, 8(3): 322–328.
- [11] Hemes P J, Benner R, Cowie G L, et al. Tannin diagenesis in mangrove leaves from a tropical estuary: A novel molecular approach [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 2001, 65(18): 3109–3122.
- [12] Maie N, Behrens A, Knicker H, et al. Changes in the structure and protein binding ability of condensed tannins during decomposition of fresh needles and leaves [J]. *Soil Biol Biochem*, 2003, 35(4): 577–589.
- [13] 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(1/2): 248–254.
- [14] Yan J X, Wait R, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(17): 3666–3672.
- [15] Wang W, Scali M, Vignani R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(14): 2369–2375.
- [16] Wang W, Vignani R, Scali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(13): 2782–2786.
- [17] Wang X N(王晓楠), Fu L S(付连双), Li Z F(李卓夫), et al. Optimization of two dimensional electrophoresis system of proteins in the seedling rhizom in wheat [J]. *China Biotechn(中国生物工程杂志)*, 2008, 28(12): 66–71.(in Chinese)
- [18] Xu Y P(徐幼平), Xu Q F(徐秋芳), Cai X Z(蔡新忠). Optimization of total protein extraction from tomato leaves for two-D gel electrophoresis analysis [J]. *Acta Agri Zhejiang(浙江农业学报)*, 2007, 19(2): 71–74.(in Chinese)