

红豆杉细胞蛋白质双向电泳样品制备方法的比较

任建升, 臧新*, 赵丹丹, 徐远玲 (郑州大学生物工程系, 河南郑州 450001)

摘要 [目的] 探索适用于红豆杉愈伤蛋白质组学研究的样品制备方法。[方法] 以红豆杉愈伤组织为材料, 分别采用三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法、Tris-HCl法和酚-甲醇/醋酸铵沉淀法提取其中的总蛋白, 通过双向电泳(2DE)检测3种方法对总蛋白的提取效果。[结果] 3种方法提取的蛋白样品2DE图谱显示的蛋白点数量均较多。TCA/丙酮沉淀法对蛋白质的提取率较高, 2DE图像清晰, 条纹少, 拖带现象轻; Tris-HCl法提取的蛋白样品2DE图谱个别区域出现较轻的云片状聚集, 并有轻微拖带现象; 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法提取蛋白样品的2DE图谱有条纹和拖带现象。[结论] TCA/丙酮沉淀法提取的蛋白质质量较高, 所得图谱背景清晰, 蛋白质信息量大。

关键词 红豆杉; 蛋白质组; 双向电泳

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-11886-03

Comparison of Protein Sample Preparation Methods from Taxus Cell for Two-dimensional Electrophoresis

REN Jian-sheng et al (Bioengineering Department of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001)

Abstract [Objective] The aim was to study protein sample preparation method that suitable for proteomics research of taxus callus. [Method] With taxus callus as the materials, its total protein was extracted by trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation, Tris-HCl and phenol-methanol/ammonium acetate precipitation methods, the extraction effects of the 3 methods on total protein were detected by two-dimensional electrophoresis (2DE). [Result] Protein spots on 2DE map of total protein extracted by 3 methods were all more. The extraction rate of (TCA)/acetone precipitation method on protein was high, and its 2DE map was clear with less fringe and light entrainment phenomena. Some regions on 2DE map of total protein extracted by Tris-HCl method appeared slight cloud and flaky aggregation with slight entrainment phenomena. 2DE map of total protein extracted by phenol-methanol/ammonium acetate precipitation method had fringe and entrainment phenomena. [Conclusion] The quality of protein extracted by (TCA)/acetone precipitation method was better, and the background of its 2DE map was clear with large-scale protein information.

Key words Taxus; Proteome; Two-dimensional electrophoresis

随着后基因组时代的到来, 蛋白质组学得到了空前的发展, 蛋白质组研究旨在揭示基因表达中真正执行生命活动的全部蛋白质的表达规律和生物功能。目前, 蛋白质组学已成为生物领域极其活跃的学科。双向电泳(Two Dimensional Electrophoresis, 2DE)是蛋白质组研究的3大关键核心技术之一(另2种是质谱技术和蛋白质组信息技术)^[1-3]。

双向电泳由于具有高分辨率和高灵敏度已成为分析复杂蛋白混合物的基本工具。该技术由O'Farrel等于1975年建立^[4]。2DE的第1向电泳是等电聚焦电泳(Iso-Electric Focusing, IEF), 第2项电泳是通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)对蛋白质进行的电泳; 自1975年以来2DE技术得到不断改进, 蛋白质双向电泳的分辨率和稳定性得到了极大提高^[5-8]。2DE电泳系统在动物和微生物研究中的应用较广泛, 但由于植物组织中含有一系列干扰因素, 双向电泳往往得不到令人满意的结果^[9]。蛋白质样品的制备是双向电泳技术的关键^[1-3]。制备植物蛋白质样品时, 增加蛋白质纯化步骤可提高电泳质量, 但可能会导致一些蛋白质选择性丢失。植物组织常用的双向电泳的总蛋白质提取方法是三氯乙酸/丙酮沉淀法^[10], 但目前尚没有对所有植物样品都适用的蛋白质样品的制备方法^[11]。红豆杉蛋白质组学研究已有报道。但红豆杉愈伤组织中蛋白含量较低, 而且富含多酚以及色素等干扰物质。研磨时酚类极易氧化, 形成大量的氧化产物, 影响电泳过程。笔者研究并改进植物蛋白质样品的制备、电泳及染色方法, 旨在探索适合红豆杉愈伤组织蛋白质的双向电泳技术。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 红豆杉愈伤细胞取自郑州大学生物工程

作者简介 任建升(1977-), 男, 河南固始人, 硕士研究生, 研究方向: 植物细胞蛋白质组学。*通讯作者, 博士, 硕士生导师。

收稿日期 2009-05-04

系组织培养实验室。主要试剂: SDS、Tris、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、TEMED、DTT、CHAPS、IPG缓冲液、碘乙酰胺等试剂为GE Healthcare产品; IPG胶条(Ready Strip™ IPGStrip, GE Healthcare); 甘油、三氯乙酸、Tris饱和酚、PVPP、醋酸铵等常用试剂均为国产分析纯; 水为Milli-Q超纯水。

1.2 方法

1.2.1 蛋白提取方法。

1.2.1.1 TCA/丙酮沉淀法参照Damerval等^[10]的方法适当改进。用液氮预冷研钵, 取材料, 液氮研磨, 准确称取2g粉末至10ml离心管中, 加5ml -20℃ 10%的TCA/丙酮(含0.07% (w/v) DTT), -20℃浸提1min, 12 000 r/min离心30min, 弃上清, 沉淀加入5ml冷丙酮(含0.07% (w/v) DTT), -20℃浸提1min, 12 000 r/min离心30min, 重复2次, 沉淀加入样品裂解液5ml (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 32 mmol/L Tris-HCl pH值6.8, 1 mmol/L PMSF, 14 mmol/L DTT, 0.2% Triton X-100), 振荡器震荡, 17℃浸提2~4h, 12 000 r/min离心15min, 上清即为蛋白质溶液。在蛋白上清液中加入5倍体积的预冷丙酮, -20℃浸提2h, 12 000 r/min离心15min, 沉淀即为纯蛋白, 用于上样或-80℃保存备用。

1.2.1.2 Tris-HCl法适当改进^[12]。取材料, 液氮研磨, 准确称取2g粉末至10ml离心管中, 加入蛋白质提取缓冲液5ml (65 mmol Tris-HCl pH值6.8, 0.5% SDS, 10%甘油, 5% β-mercaptoethanol), 样品混匀后4℃震荡浸提1h, 以充分溶解蛋白质, 12 000 r/min 4℃离心20min, 取上清800 μl, 加入8倍体积-20℃ 10%的TCA/丙酮, 混匀后-20℃沉降蛋白质3h, 12 000 r/min 4℃离心15min, 沉淀用5ml冷丙酮洗涤4次, 12 000 r/min 4℃离心15min, 沉淀室温风干后-20℃保

存备用。

1.2.1.3 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法, 参照 Wang 等^[13] 的方法。取材料, 液氮研磨, 称取 2 g 粉末至 10 ml 离心管中, 加入 5 ml 冷丙酮 (含体积分数 0.07% 的 β -巯基乙醇), 涡旋 30 s, 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 重复 1 次, 加入 -20 °C 10% 的 TCA/丙酮 5 ml 清洗 2~4 次至上清液无色, 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 用 10% 的 TCA 水溶液洗涤 1 次, 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 用 80% 冷丙酮 (含体积分数 0.07% 的 β -巯基乙醇) 洗 1 次, 室温干燥。加入 3 ml Tris 饱和酚 (pH 值 8.0) 和 3 ml 浓 SDS 缓冲液 (30% 蔗糖, 2% SDS, 0.1 mol/L Tris-HCl pH 值 8.0, 5% β -巯基乙醇), 涡旋 30 s, 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 转移上层酚相 2 ml 至另 1 只离心管中, 加入 3 倍体积 -20 °C 0.1 mol/L 的甲醇乙酸铵溶液, -20 °C 沉淀蛋白质 30 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 用 0.1 mol/L 甲醇醋酸铵溶液洗涤 2 次, 80% 冷丙酮洗涤 2 次, 然后 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 室温干燥, -20 °C 保存备用。

1.2.2 蛋白定量分析。蛋白质定量分析参照 Bradford^[14] 的方法。配制考马斯亮蓝 G-250 染色液和 BSA 标准蛋白质溶液, 在 595 nm 处测定蛋白质-色素结合物的光密度值 OD₅₉₅, 绘制标准曲线, 计算样品中蛋白质的含量。

1.2.3 双向电泳。

1.2.3.1 等电聚焦。将 pH 值 3~10 的 17 cm IPG 胶条加入 400 μ l 含 300 μ g 蛋白质的水化上样缓冲液 (7 mol/L Urea, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 0.2% Bio-Lyte, 65 mmol/L DTT, 0.001% Bromphenol Blue) 中, 在 Bio-Rad 双向电泳仪中进行电泳 (水化-除盐-除盐-升压-等电聚焦-保持)。参数设置见表 1。

表 1 等电聚焦电泳参数设置

Table 1 The parameters of isoelectric focusing electrophoresis

水化步骤 Hydratation steps	电压//V Voltage	升压模式 Voltage increase model	电泳时间//h Time	目的 Purpose
S1	50	-	12.0~16.0	主动水化
S2	250	线性	0.5	除盐
S3	1 000	快速	1.0	除盐
S4	10 000	线性	5.0	升压
S5	10 000	快速	60 000 V·h	聚焦
S6	500	快速	任意时间	保持

注: 等电聚焦电泳过程中温度保持 20 °C。

Note: The temperature maintained 20 °C in the isoelectric focusing electrophoresis.

等电聚焦结束后, 胶条依次在平衡液 I (6 mol/L Urea, 20% Glycerol, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl pH 值 8.8, 2% DTT) 和平衡液 II (6 mol/L Urea, 20% Glycerol, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl pH 值 8.8, 0.25 g Iodoacetamide) 中平衡。

1.2.3.2 第 2 向 SDS-PAGE。采用 12% 的分离胶, (凝胶厚度 1 mm), 先用 15 μ A 的低电流电泳, 样品进入分离胶后采用 30 μ A 电流电泳, 电泳完毕后染色。

1.2.3.3 染色和图像分析。用考马斯亮蓝染色, 采用 UMAX Powerlook 2100XL 进行图像扫描, 用 PDQuest7.40 (Bio-Rad) 软件对扫描图像进行分析。

2 结果与分析

2.1 TCA/丙酮法制备样品的 2DE 结果 由图 1 可知,

TCA/丙酮法提取蛋白样品的 2DE 图谱显示的蛋白质点数量较多, 蛋白提取率较高, 虽有少量蛋白丢失。图像清晰, 条纹少, 拖带现象轻, 可进行图谱分析和进一步研究。

2.2 Tris-HCl 法制备样品的 2DE 结果 由图 2 可知, Tris-HCl 法提取蛋白样品的 2DE 图谱蛋白点数量较多, 但个别区域出现较轻的云片状聚集, 有少量拖带现象, 提取步骤尚需进一步完善。

2.3 酚-甲醇/醋酸铵法制备样品的 2DE 结果 由图 3 可知, 酚-甲醇/醋酸铵法提取蛋白样品的 2DE 图谱显示的蛋白点数量较多, 但有条纹和拖带现象, 云片可能与提取过程中丙酮的洗涤次数有关。

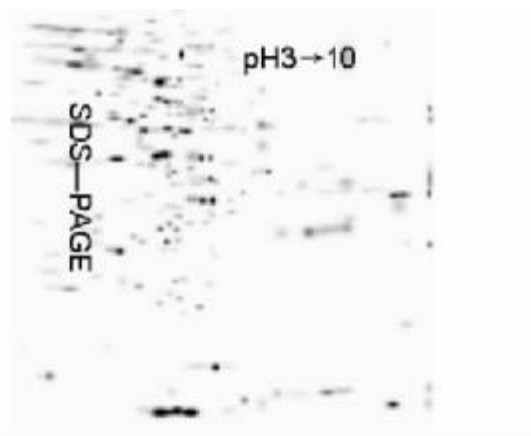


图 1 TCA/丙酮法提取蛋白质样品的 2DE 图谱

Fig. 1 2DE patterns of protein samples extracted by TCA-acetone method

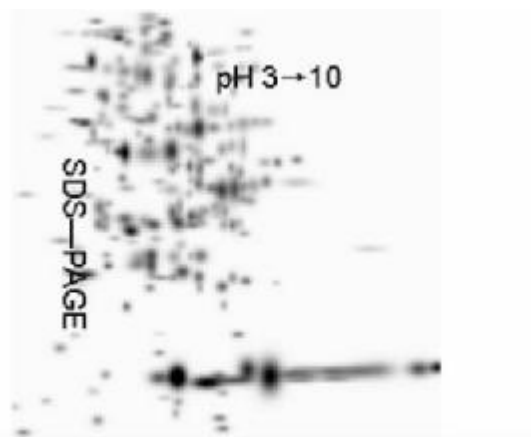


图 2 Tris-HCl 法提取蛋白质样品的 2DE 图谱

Fig. 2 2DE patterns of protein samples extracted by Tris-HCl method

3 讨论

3.1 样品制备 样品制备是双向电泳的关键环节之一^[15], 建立一套有效且重复性好的样品制备方法对双向电泳试验技术的提高和改进十分重要。要获得更多的蛋白质信息就要尽量提高蛋白质的溶解性并减少蛋白质的损失与降解。试验过程中应根据不同的试验材料选择适宜的样品制备方法。在蛋白质提取、裂解液配制、杂质去除等方面应尽量采取步骤简单的方法^[15-18]。许多学者以植物叶片, 果实及幼嫩根茎为材料, 先后提出了很多排除色素、酚、醌等干扰的植物蛋白质样品的制备方法。但有关愈伤蛋白的提取方法研究较少, 为此, 该研究在借鉴前人研究成果的基础上, 探索了

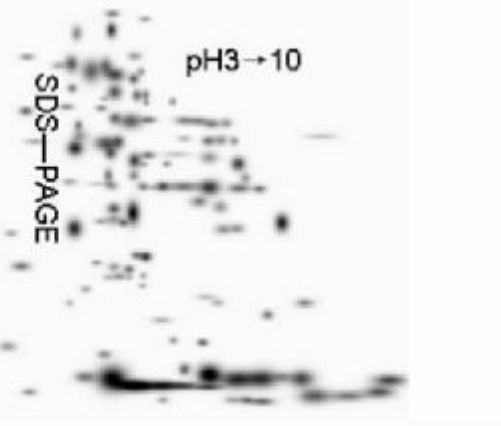


图3 酚-甲醇/醋酸铵法提取蛋白质样品的2DE图谱

Fig. 3 2DE patterns of protein samples extracted by phenol-methanol/ammonium acetate precipitation method

一套适合红豆杉愈伤组织蛋白提取及双向电泳的完整方法。

TCA/丙酮沉淀法是很有效的蛋白质沉淀方法^[10],能够消除蛋白质的瞬时水解作用和其他蛋白酶的修饰^[19]。但该方法的缺点是提取后的蛋白较难溶解,且一些小分子易丢失。

丙酮通过降低水的介电常数,破坏蛋白质胶体的水化层,使蛋白质聚集^[20],形成沉淀析出。在可溶性蛋白提取过程中,增加丙酮清洗次数可有效去除杂质。

另外,样品中盐离子浓度较高,盐离子可增加胶条的电内渗,进而干扰蛋白质聚焦,引起电压较低,双向电泳图谱出现水平方向的纹理。酚-甲醇/醋酸铵沉淀法与其他2种蛋白质提取方法相比,步骤繁琐,耗时长,且该方法溶解多糖和核酸的能力较差,因此2DE图谱上出现明显的条纹和拖带现象。

3.2 等电聚焦与 SDS-PAGE 两性电解质载体(Ampholine)是等电聚焦的关键试剂^[21]。试验结果表明,红豆杉愈伤蛋白质的等电点约为4.0~9.0(主要分布在4.5~7.5),该试验采用等电点为3~10的两性电解质,导致图谱分辨率不高。加入2种pH值范围的两性电解质载体,使其在等电点范围内重叠,可提高双向凝胶电泳图谱的分辨率。

综上所述,改进TCA/丙酮法操作程序简单,耗时短,所得图谱较理想,适用于红豆杉愈伤组织蛋白质组学研究。但丙酮洗涤过程中会有少量小分子蛋白丢失。低温浸提可提高蛋白的提取率。

(上接第11884页)

具有高度同源性,可以推测细菌的流行可能是菌株的某些质粒的流行。

前期的血清学试验鉴定出麝致病性大肠杆菌的血清型主要为O₄、O₂₆和O₁₃₉^[1],而这些菌株的质粒图谱和质粒酶切图谱相同或相似,说明血清型和质粒指纹图谱之间无明显关系,这与家养动物的报道一致^[4-5]。但是麝致病性大肠杆菌除*E. coli*-9质粒DNA的HindⅢ单酶切和BamHI单酶切有多条质粒带,其余21株菌质粒DNA的HindⅢ、EcoRI及BamHI单酶切都只有1条23 kb左右大小的质粒DNA条带,说明除*E. coli*-9具有HindⅢ和BamHI酶切位点,其余21株菌都不具有HindⅢ、EcoRI及BamHI酶切位点,这与家养动物致病性大肠杆菌的质粒酶切图谱研究结果不完全一样^[4-5],这种不同

参考文献

- [1] STAUDENMANN W, HALT P D, HOVING S, et al. Sample handling for proteome analysis [J]. Electrophoresis, 1998, 19 (6): 901-908.
- [2] SARAVANAN R S, ROSE J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. Proteomics, 2004, 4: 2522-2532.
- [3] CARPENTIER S C, WITTERS E, LAUKENS K. 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.
- [4] O'FARRELL P H. High resolution two dimensional electrophoresis of protein [J]. J Biol Chem, 1975, 250: 4007-4021.
- [5] GYGI S P, CORTHALS G L, ZHANG Y N, et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (17): 9390.
- [6] MOLLOY M P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients [J]. Anal Biochem, 2000, 280 (1): 1-10.
- [7] ZUO X, SPEICHER D W. A method for global analysis of complex proteomes using sample prefraction by solution iso-electrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis [J]. Anal Biochem, 2000, 284: 266-278.
- [8] CHEN R Z, WENG Q M, HUANG Z, et al. Analysis of resistance-related proteins in rice against brown planthopper by two-dimensional electrophoresis [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44 (4): 427-432.
- [9] 逯斌, 林兵. 一种改良的植物蛋白质双向电泳方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16 (6): 480-481.
- [10] 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 (1): 52-54.
- [11] GORG A, WEISS W, DUNN M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. Proteomics, 2004, 4: 3665-3685.
- [12] 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 等. 一种省时高效的木本植物蛋白双向电泳分析方法 [J]. 北京林业大学学报, 1999, 21 (5): 7-10.
- [13] 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: 2369-2375.
- [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] 林金科, 郑金贵, 袁明, 等. 茶树蛋白质提取及双向电泳的改良方法 [J]. 茶叶科学, 2003, 23 (1): 16-20.
- [16] WANG T, TONG Z. Specific proteins in chloroplasts of photoperiod-sensitive genic male-sterile rice [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1992, 34 (6): 426-431.
- [17] 王经源, 陈舒奕, 梁义元, 等. ISO-DALT双向电泳方法的优化与改进 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35 (2): 187-190.
- [18] 周涵韬, 林鹏. 盐胁迫下红树林植物蛋白质的比较分析 [J]. 海洋科学, 2002 (4): 5-7.
- [19] WU F S, WANG M Y. Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues [J]. Anal Biochem, 1984, 139 (1): 100-103.
- [20] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 66-68.
- [21] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.

是否由于麝致病性大肠杆菌和家养动物致病性大肠杆菌的质粒DNA序列差异造成尚需要进一步研究证明。此外,这种差异是否为导致麝致病性大肠杆菌所引起麝患病的情况与家养动物大肠杆菌病很大区别的原因之一也有待深入研究。

参考文献

- [1] 罗燕, 程建国, 李秋波, 等. 麝大肠杆菌性化脓病的病原分离鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006 (11): 81-83.
- [2] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [3] J·萨姆布鲁克, D·W·拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 2版. 金冬雁, 黎孟枫, 等. 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [4] 刘书亮, 王红宁, 陶勇, 等. 四川省规模化猪场大肠杆菌质粒DNA分析 [J]. 西南农业大学报, 2000, 13 (Z1): 69-73.
- [5] 陶勇, 王红宁, 刘书亮, 等. 四川规模化鸡场鸡致病性*E. coli*血清型、耐药性和质粒图谱的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2001, 35 (4): 9-13.