

陆地棉花药蛋白质组分析中双向电泳技术体系的建立与优化

任燕¹, 章晓波², 吴穗洁², 唐灿明^{1*}

(1. 南京农业大学农学院, 南京 210095; 2. 国家海洋局海洋三所, 厦门 361005)

摘要:建立了适用于陆地棉花药蛋白质组研究的双向电泳技术。以陆地棉花药为材料, 采用液氮研磨的方法破碎组织, 然后用三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法和苯酚抽提结合甲醇/醋酸铵沉淀法提取蛋白质。采取载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦/SDS-PAGE 和固相 pH 梯度等电聚焦/SDS-PAGE 双向凝胶电泳, 对陆地棉花药总蛋白质进行了分离。通过对样品制备方法、等电聚焦方法、样品上样量等关键技术进行比较和优化, 发现苯酚抽提结合甲醇/醋酸铵沉淀的方法较适合陆地棉花药蛋白质的提取, 采用载体两性电解质 pH 梯度聚焦方法较 pH 梯度等电聚焦方法的效果好, 用硝酸银染色时, 上样量为 500 μg , 得到的电泳图谱分辨率高、重复性好。

关键词:蛋白质组; 双向电泳; 陆地棉; 花药

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2011)04-300-06

Development of Two-Dimensional Electrophoresis for Anther Proteome Analysis of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

REN Yan¹, ZHANG Xiao-bo², WU Sui-jie², TANG Can-ming^{1*}

(1. Agronomy College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: This study has established two-dimensional electrophoresis for anther proteomics of upland cotton. We used cotton anther as the material, using TCA/acetone precipitation and phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation, then proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis. We compared and optimized the key steps, such as sample preparation, isoelectric focusing electrophoresis and the volume of the sample. It is expected that phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation method could be one of the options for protein extraction from cotton anthers, and the isoelectric-Dalton-isoelectric focusing (ISO-DALT-IEF) is better than immobilized pH gradient-Dalton-isoelectric focusing (IPG-DALT-IEF). The high-resolution and well-reproducible patterns of proteins were observed when the silver staining is taken and 500 μg protein sample were added in electrophoresis.

Key words: proteome; two-dimensional electrophoresis; upland Cotton; anther

尽管人类基因组以及模式植物拟南芥、水稻基因组测序已经完成, 但大部分基因的功能还是未知的。目前功能基因组学研究大部分都是从 mRNA 的角度来进行, 然而蛋白质是基因功能的体现者和执行者, 在转录水平上所获取的基因表达的信息并不足以揭示该基因在细胞内的确切功能, 因此, 需要对蛋白质的表达模式和功能模式进行直接研究。在此背景下, 研究基因组编码的全蛋白质功能及其相互作用关系的蛋白质组

学(proteomics)应运而生^[1]。自 Wilkins 和 Williams 于 1994 年提出蛋白质组(proteome)的概念以来, 蛋白质组学的研究得到了空前的发展, 相关的研究技术也取得了重大突破^[2]。蛋白质分离技术、鉴定技术和支持质谱数据的蛋白质数据库是蛋白质组研究中的三大关键技术。而双向电泳自建立至今, 一直是分辨率最高、重复性最好的蛋白质分离技术。双向电泳的基本原理是根据蛋白质的等电点和分子量大小不同, 进行两次电泳将其分

收稿日期: 2009-06-09

作者简介: 任燕(1983-), 女, 硕士, ry_3038@126.com; * 通讯作者, cmtang@yahoo.cn

离^[3]。第一向是等电聚焦(Isoelectric focusing, IEF),分为载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦和固相 pH 梯度等电聚焦。第二向是 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。虽然目前双向电泳的分辨率很高,但是由于植物组织中蛋白质含量较低,而且含有很多干扰双向电泳的色素、酚类、醌类及其他次级代谢产物,获得分辨率高、重复性好的电泳图谱比较困难。因此,蛋白质样品的制备在蛋白质组研究中是非常关键的步骤。

蛋白质样品的质量会直接影响电泳的分辨率及实验结果的可靠性,因此选择适合的蛋白质提取方法尤为重要。由于蛋白质样品的类型和来源各不相同,因此必须针对不同的材料、实验室具备的实验条件及实验目的,采用不同的蛋白质提取方法。目前广泛应用于提取植物蛋白质的方法主要有两种:三氯乙酸/丙酮沉淀法和苯酚抽提法。在棉花蛋白组研究中,大多是以棉纤维及胚珠为材料^[4-5],目前国内外尚无对棉花花药和花粉蛋白质组方面的研究报道。

本研究以陆地棉花药为材料,比较植物中两种常见的蛋白质提取方法、载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦-SDS-PAGE 及固相 pH 梯度等电聚焦-SDS-PAGE、蛋白样品上样量等参数对双向电泳效果的影响,并用银染法染色,确立了适合棉花花药蛋白质组分析的双向电泳方法,为棉花雄性不育机理及花药蛋白质组学的进一步研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为陆地棉双隐性核雄性不育株及可育株,种植于南京江宁,常规栽培管理。在蕾期取不育株和可育株不同发育时期的花蕾,放入-80℃冰箱中备用。

1.2 方 法

1.2.1 蛋白质提取方法。三氯乙酸/丙酮沉淀法:参照 Imin 等^[6]的方法并加以修改。在 4℃下取下花蕾中的花药,加入 10%聚乙烯吡咯烷酮和少量石英砂,迅速研磨成粉末。加入 5 倍体积-20℃预冷的 10%三氯乙酸/丙酮溶液(含有 0.07%的 β-巯基乙醇),涡旋后于-20℃静置 2 h。4℃,15000 g

离心 15 min,弃上清液,沉淀复溶于冷丙酮中,-20℃放置 2 h 以上(或过夜)。4℃,15000 g 离心 15 min,弃上清液,用冷丙酮冲洗沉淀,15000 g 离心 10 min,重复 2~3 次,沉淀冷冻,抽干制成干粉。

苯酚抽提/甲醇醋酸铵沉淀法:按 Wei 等^[7]的方法并加以修改。将制成的干粉按照每 0.1 g 加入 2 mL 裂解液(7 mol·L⁻¹ 尿素,2 mol·L⁻¹ 硫脲,4% 3-(3-胆胺丙基)二甲氨基-1-丙磺酸(CHAPS),65 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇(DTT),2% pH 3~10 载体两性电解质,40 mM pH 8.0 Tris-HCl)溶解,重复离心 2 次后,得到的上清液即可用于上样。

1.2.2 第一向等电聚焦。(1)载体两性电解质 pH 梯度等电聚胶电泳(IEF)。将玻璃管(18 cm × 1.5 mm)一端用 Parafilm 封口膜封好,用记号笔在 13 cm 处划线标记。凝胶配置:称取 0.742 g 尿素,先后加入 270 μL 的双蒸水,270 μL 10% NP-40 溶液,176.4 μL 30% 丙烯酰胺溶液[丙烯酰胺(ACR) 28.38%,甲叉双丙烯酰胺(BIS) 1.62%],溶解后,加入 52 μL pH 3~10 的两性电解质,1.8 μL 10% AP 和 4 μL N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED),混匀后用注射器灌胶至标记处,加少量水封住,让其聚合 2 h 以上,待胶聚合完毕后,即可加样进行电泳。电极液为:上槽(负极)为 50 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液,下槽(正极)25 mmol·L⁻¹ H₃PO₄ 溶液。IEF 运行参数设定为:200 V, 30 min;300 V, 30 min;500 V, 3 h;800 V, 4 h;900 V, 2 h;1000 V, 10 h。温度保持在 20~37℃。电泳完毕后,将胶条挤到培养皿内,用双蒸水冲洗,放到平衡缓冲液[2.3%,十二烷基硫酸钠(SDS),62.5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.8),10%甘油,0.1% β-巯基乙醇,0.1% 溴酚蓝]中平衡 2 次,每次 15 min。

(2)固相 PH 梯度等电聚胶电泳(IEF)。按 Görg 等的方法进行修改^[8]。取 250 μL 不含 IPG 缓冲液的水化液(7 mol·L⁻¹ 尿素,2 mol·L⁻¹ 硫脲,2% N,N,N',N'-四甲基乙二胺(CHAPS),15 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇,加入 25 μL 样品和 1.25 μL pH 为 3~10 的固相 pH 梯度(IPG)缓冲液,充分混匀,14000 g 离心 15 min,取上清液均匀加入到持胶槽中,总上样量体积为 275 μL。取 pH 3~10,13 cm 线性 IPG 预制胶条,去掉保护膜,胶面朝下,

轻轻放入持胶槽,在胶条上层覆盖一层矿物油,盖好持胶槽盖子,置于 IPGphor 等电聚焦仪的电极板上。等电聚焦温度设定为 19℃,在 50 V 电压下水化 12 h,再经过 500 V, 2 h; 1000 V, 4 h; 8000 V, 2 h 后,在 8000 V 稳定电压下进行,一直达到 16000 V·h。等电聚焦完毕后,先将胶条放在平衡缓冲液 I (0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol·L⁻¹ 尿素, 30 % 甘油, 2 % 十二烷基硫酸钠(SDS), 终浓度为 0.002 % 的溴酚蓝, 2 % 二硫苏糖醇) 中平衡 15 min, 再在胶条平衡缓冲液 II (用 2.5 % 碘乙酰胺替代 2 % DTT, 其余组分同平衡液 I) 中平衡 15 min。

1.2.3 第二向 SDS-PAGE。胶条平衡完毕后,即可进行第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度为 12 %, 胶条上端用 1 % 琼脂糖凝胶封闭,先在 100 V 恒压下电泳 30 min,后改为 200 V 恒压电泳,溴酚蓝到达距胶底端约 2 cm 处时停止电泳。

1.2.4 银染。电泳后,取出凝胶,置于银染固定液中轻摇 20 min。用纯净水洗 2 次,每次 5 min。置于 Na₂S₂O₃ 溶液(0.2 g·L⁻¹)中轻摇 3~5 min。用纯净水漂洗 2 次后置于 AgNO₃ 溶液(2 g·L⁻¹)中轻摇 15~20 min。用纯净水漂洗 2 次后,用硫代显影液先漂洗 1 遍,再加入适量硫代显影液轻摇至显色。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对双向电泳图谱的影响

采用完全相同的双向电泳参数和方法,同时对三氯乙酸(TCA)丙酮沉淀法和苯酚抽提/甲醇醋酸铵沉淀法两种方法提取的蛋白质样品进行分离(图 1、图 2),通过 Imagemaster 5.5 软件对得到的双向电泳图谱进行分析,不同的蛋白质提取方法得到的凝胶图像上的蛋白质点数不同。通过 *t* 检验,这两种蛋白质提取方法得到的凝胶图像上的蛋白质点数有显著差异。采用三氯乙酸/丙酮沉淀法提取的蛋白质经过双向电泳得到的图谱,分子量在 18.4~116.0 kD,等电点在 3~10 的线性范围内,共检测到约 1251 个蛋白点。蛋白质点有明显覆盖现象,致使可检测到的蛋白质点数相对较低,并且明显存在横竖条纹干扰的现象,这表明样品的纯度不高,而且样品中蛋白质种类

较少。采用苯酚抽提/甲醇醋酸铵沉淀法提取的蛋白质经双向电泳得到的图谱,分子量为 18.4~116.0 kD,等电点在 3~10 的线性范围内,共检测到约 1324 个蛋白质点,蛋白质点形状规则,横竖条纹干扰少,比较清晰,有利于图谱分析。本结果表明,用苯酚抽提结合甲醇醋酸铵沉淀的方法可有效地除去色素、酚类等干扰电泳的化学物质,得到的蛋白质样品纯度高,经过多次双向电泳试验,重复性比较好。因此,苯酚抽提/甲醇醋酸铵沉淀法较三氯乙酸/丙酮沉淀法更适用于棉花花药的蛋白质提取。

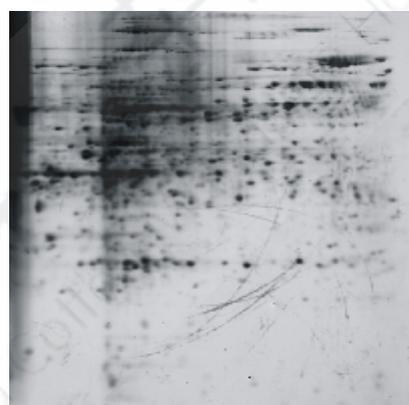


图 1 采用 TCA/丙酮沉淀法提取蛋白经双向电泳得到的图谱

Fig. 1 TCA/acetone precipitation



图 2 用苯酚抽提法提取的蛋白经双向电泳得到的图谱
Fig. 2 Phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation

2.2 载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦和固相 pH 梯度等电聚焦的比较

将苯酚抽提/甲醇醋酸铵沉淀法制得的蛋白质样品,采取载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦和固相 pH 梯度(Immobilized pH gradient, IPG)等

电聚焦的方式,对蛋白质样品进行双向电泳,上样量为 500 μg ,相同条件下经过第二向 SDS-PAGE 后,得到的电泳图谱不同(图 3,4)。结果表明,两种不同的等电聚焦方式对电泳结果有明显的影响,虽然蛋白质点的分布范围基本一致,但是蛋白质的分离效果相差很大。采用载体两性电解质 pH 梯度 IEF 的聚焦方法得到的蛋白质图谱,在分子量 18.4~116.0 kD、等电点 3~10 的线性范围内,共检测到约 1229 个蛋白点,蛋白质点清晰,聚焦完全。而采用固相 pH 梯度 IEF 的

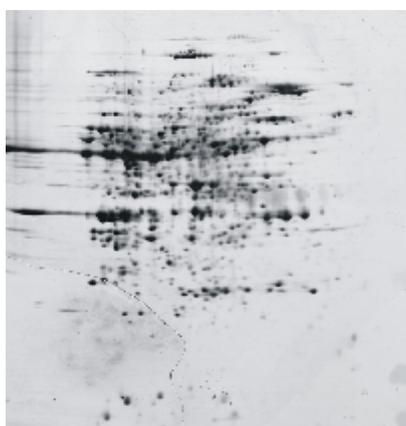


图 3 对用苯酚抽提法得到的蛋白进行分离,采用载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦,上样量为 500 μg ,凝胶用硝酸银染色

Fig. 3 ISO-DALT; phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation, silver staining method, the protein sample quantity is 500 μg

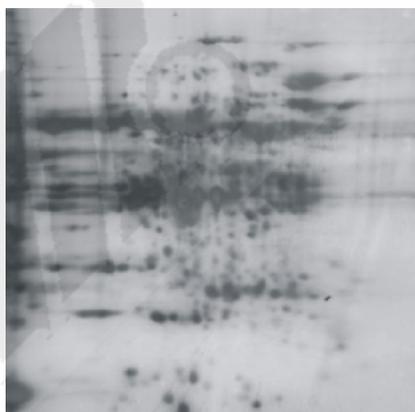


图 4 对用苯酚抽提法得到的蛋白质进行分离,采用固相 pH 梯度等电聚焦,上样量为 500 μg ,凝胶用硝酸银染色

Fig. 4 IPG-DALT; phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation, silver staining method, the protein sample quantity is 500 μg

聚焦方法得到的蛋白质图谱,在分子量 18.4~116.0 kD、等电点 3~10 的线性范围内,共检测到约 1315 个蛋白点,拖带现象非常严重,蛋白质点没有完全分离,不利于后续的图谱分析。经过多次重复试验,获得的结果相同。因此,采用载体两性电解质 pH 梯度 IEF 的聚焦方法较采用固相 pH 梯度 IEF 的聚焦方法得到的电泳图谱效果好。

2.3 上样量的选择

将苯酚抽提/甲醇醋酸铵沉淀法制得的蛋白质样品,采用载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦,对蛋白质样品进行双向电泳,得到的凝胶用硝酸银染色,比较了上样量分别为 300 μg (图 5),500 μg ,750 μg (图 6)时获得的双向电泳的图谱差异。发现上样量对双向电泳效果有明显影响。当上样量为 750 μg 时,蛋白质点会有明显的拖尾,且存在蛋白质点相互覆盖的情况,分辨率反而不高,染色背景过深(图 6)。研究还发现有时较高的蛋白质上样量(750 μg 以上)得到的蛋白质点着色却比上样量低时的着色还浅,除了染色的原因外,可能是聚焦过程中蛋白质因浓度过高而在凝胶中沉降。当上样量为 350 μg 时,则得不到足够的蛋白质点,一些丰度较低的蛋白无法检测到(图 5)。经过多次重复试验,获得的结果相同。本结果表明,采用酚提取蛋白质、载体两性电解质 pH 梯度 IEF 的聚焦方法时,硝酸银染色法的上样量以 500 μg 效果较好,分辨率高,蛋白质点无明显拖尾,重复性好(图 3)。

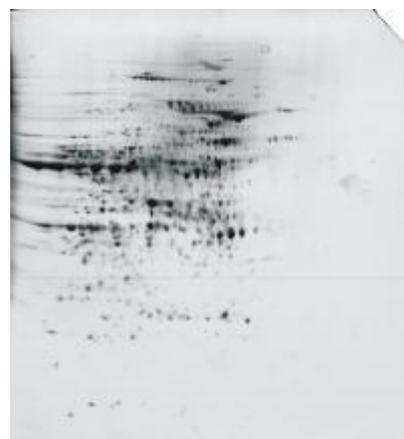


图 5 硝酸银染色法,上样量为 300 μg 时得到的双向电泳图谱

Fig. 5 Silver staining method, the protein sample quantity is 300 μg



图6 硝酸银染色法,上样量为750 μg 时得到的双向电泳图谱

Fig. 6 Silver staining method, the protein sample quantity is 750 μg

3 结论

对棉花花药进行蛋白组学分析时,苯酚抽提结合甲醇醋酸铵沉淀的方法得到的蛋白纯度高、杂质少,电泳分辨率高、蛋白点数多,更适于棉花花药蛋白质的提取,优于三氯乙酸/丙酮沉淀的方法。在棉花花药蛋白的双向电泳中,采用苯酚抽提/甲醇醋酸铵沉淀的方法,以载体两性电解质IEF为第一向等电聚焦,上样量500 μg ,并用硝酸银染色,可以得到比较理想的效果。

4 讨论

棉花样品中含有的酚类物质较多,对蛋白质样品的提取效果有很大的影响,蛋白组学分析困难较大。本实验以棉花花药为材料,将植物中两种比较常见的蛋白质提取方法进行了优化及比较研究。结果显示,采用TCA/丙酮沉淀法步骤较为简单,但是相同质量的样品最后获得的粗提物远远多于苯酚提取法,这可能是因为样品中杂质的含量过高,因而需要更多的裂解液溶解样品。但是溶液中蛋白质的含量却很少,上样时就需要增加样品的体积,从而影响双向电泳的效果,此结论与刘康等报道的结果一致^[9]。Cremer等认为三氯乙酸/丙酮沉淀法制备的蛋白沉淀不完全,而且复溶较为困难,导致蛋白点损失比较多^[10-12]。由于盐离子的影响,等电聚焦过程中还会产生没有电流的情况。采用苯酚抽提,结合甲醇/醋酸铵

沉淀的方法可以有效地去除色素、酚类等干扰双向电泳的化学物质,最后得到的蛋白质虽然少,但其所含的杂质少,且易于溶解,得到的图谱也比较清晰。

席景会等对拟南芥全细胞蛋白质样品进行的双向电泳研究也表明,TCA/丙酮沉淀法得到的蛋白质样品中,高丰度蛋白1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)含量高,电泳过程中形成一个弥散的条带区,覆盖了其周围的蛋白质点,可检测到的蛋白质点少,而采用甲醇/醋酸铵沉淀的方法能够明显减少蛋白质点相互覆盖的情况^[13]。刘伟霞等以小麦叶片为材料,采用三氯乙酸/丙酮沉淀法和酚提取/甲醇醋酸铵沉淀法提取蛋白,经SDS-PAGE分离后,条带数目、位置以及染色深浅均有较大差异。酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法得到的蛋白条带相对较多,三氯乙酸/丙酮沉淀法提取的蛋白条带相对较少^[14]。这些结果与本试验结果一致。

目前,固相pH梯度等电聚焦以其操作简便等特点逐渐取代了传统的载体两性电解质IEF,但其也存在一些缺点,上样量较大,需要的样品量多,需要使用高电压才能使蛋白质聚焦,不能分离分子量大于105 Da的蛋白质等,并且费用高昂。与固相pH梯度等电聚焦相比,载体两性电解质pH梯度等电聚焦的方法可操作性强,应用广泛,费用低。试验结果表明,采用载体两性电解质pH梯度等电聚焦得到的图谱经过t检验显示差异性不大,且分辨率也高于固相pH梯度等电聚焦。因此,第一向为载体两性电解质pH梯度等电聚焦(ISO-DALT)的双向电泳方法仍有其存在的合理性,并可以继续利用。

参考文献:

- [1] ANDERSON N L, Anderson N G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words[J]. Electrophoresis, 1998, 19(11): 1853-1861.
- [2] TYER M, Mann M. From genomics to proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 193-197.
- [3] O'FARRELL P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [4] GRAYES D A, Stewart J McD. Analysis of the protein con-

- stituency of developing cotton fibers[J]. *J Exp Bot*, 1988, 39(198): 59-69.
- [5] TURLEY R B, Ferguson D L. Changes of ovule proteins during early fiber development in a normal and a fiberless line of cotton (*Gossypium hirsutum* L)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1996, 149(6): 695-702.
- [6] IMIN N, Kerim T, Weinman J J, et al. Characterization of rice anther proteins expressed at the young microspore[J]. *Proteomics*, 2001, 1(9): 1149-1161.
- [7] WEI W, Rita V, Monica S, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis[J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(13): 2782-2786.
- [8] GÖRG A, Obermaier C, Boguth G, et al. Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(4/5):712-717.
- [9] 刘 康,胡凤萍,张天真. 棉花胚珠与纤维蛋白质的两种提取方法比较研究[J]. *棉花学报*,2005, 17(6):323-327.
LIU Kang, Hu Feng-ping, Zhang Tian-zhen. Effect of two methods of protein extraction from cotton ovule and fiber[J]. *Cotton Science*, 2005, 17(6): 323-327.
- [10] CREMER F, Van de Walle C. Method for extraction of proteins from green plant tissues for two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Analytical Biochemistry*, 1985, 147(1): 22-26.
- [11] NANDAKUMAR M P, Shen J, Raman B, et al. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis[J]. *Journal of Proteome Research*, 2003, 2(1): 89-93.
- [12] GÖRG A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1037-1053.
- [13] 席景会,殷建文,岳 琳,等. 拟南芥全细胞蛋白质样品制备及其双向电泳条件的优化[J]. *吉林大学学报:理学版*,2006, 44(6):1011-1014.
XI Jing-hui, Yin Jian-wen, Yue Lin, et al. Optimization of sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis for whole-cell proteins analysis in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Jilin University : Science Edition*, 2006, 44(6): 1011-1014.
- [14] 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 Wei-xia, Pan Ying-hong. Sample preparation methods suitable for wheat leaf proteome analysis[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(10): 2169-2176. ●