

小麦根蛋白提取与双向电泳方法的优化与应用

郭广芳, 董坤, 高利艳, 王顺利, 王轲, 晏月明

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要:为了建立一套适合小麦根蛋白质组分析的双向电泳系统(2-DE), 得到更加清晰的电泳图谱, 本研究以小麦幼苗根系为材料, 对根蛋白的提取方法、上样量等进行了优化。研究发现, 上样量为 1200 μ g 时, Trizol 抽提法提取的蛋白能够获得图像清晰、分辨率高、重复性好的双向电泳图谱, 基本满足小麦根系蛋白质组学的分析和研究。

关键词:小麦根系; 蛋白质组; 双向电泳; Trizol 抽提法

Optimization and Application on Two-Dimensional Electrophoresis for Wheat Root Proteomic Study

GUO Guang-fang, DONG Kun, GAO Li-yan, WANG Shun-li, WANG Ke, YAN Yue-ming

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract: To develop an efficient and high resolution 2-DE procedure for wheat root proteomic analysis, the method of wheat root protein extraction and sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis(2-DE) were optimized by using the roots of wheat cultivars Jing-411 and Chinese Spring at two leaves stage. Separation results of wheat root protein by using the optimized method showed that better resolution of the electrophoresis patterns could be achieved. In particular, the protein samples extracted from Trizol reagent appeared to be better for two-dimensional gel electrophoresis separation, which could be used as an important tool for the studies on the wheat root proteome.

Key words: Wheat root; Proteome; Two-dimensional electrophoresis(2-DE); Trizol extraction

小麦是世界上广泛种植的主要粮食作物之一, 全球每年需求量大约为 6 亿 t, 并且逐年增加, 但是由于环境恶化、耕地减少等不利因素严重制约着小麦产量的增加^[1]。因此, 改善小麦自身抗逆性成为提高小麦产量和品质的重要途径。小麦根系直接与土壤环境相接触, 吸收水分和矿物质营养, 在不同环境和不同的发育时期蛋白质组会发生明显的变化^[2]。近年来利用双向电泳和质谱等蛋白质组学方法对小麦幼苗根系蛋白质组的研究逐渐成为热点^[3-5]。

转录水平上提供的信息并不能完全确定基因的功能, 蛋白质才是生命现象的直接体现者和生理功能的最终执行者。蛋白质组最早由 Wilkins 和 Williams 提出, 2-DE 技术作为蛋白质组学研究的关

键技术, 能够将数千种蛋白同时分离和展示, 具有信息量大、分辨率高等特点^[6]。蛋白质提取在 2-DE 技术中至关重要, 但是小麦根部含有很多的次生代谢产物, 使电泳图像的分辨率低和重复性差。因此, 改进蛋白提取方法, 使小麦根蛋白在 2-DE 图谱上得到理想的分离, 获得高分辨率、高灵敏度和高重复性的 2-DE 图谱是开展小麦根蛋白质组学研究的首要条件。

本文优化了小麦根蛋白的提取过程, 摸索了理想的蛋白上样量, 从而提高了双向电泳图谱的分辨率, 有利于今后对小麦根系蛋白质组学的分析和研究。

收稿日期: 2009-03-09

修回日期: 2009-10-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30830072); 国家“973”计划项目(2009CB118303)

作者简介: 郭广芳, 在读硕士, 主要从事小麦蛋白质组鉴定分析。E-mail: guo Guangfang1@163.com

通讯作者: 晏月明, 博导, 主要从事小麦分子遗传与蛋白质组学研究。E-mail: yanym@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

选取2个小麦品种京-411和中国春,在25℃下黑暗催芽,然后将发芽一致的种子在1×Hoagland营养液中培养,昼温/夜温=26℃/20℃,光周期白天/黑夜=16h/8h。2叶1心期时收取根系,-80℃保存备用。

Trizol溶液(Invitrogen)、硫脲、尿素、Tris、DTT、TritonX-110、4-乙烯吡啶、CHAPS等购自Amresco公司,β-巯基乙醇、溴酚蓝、碘乙酰胺购自Sigma公司,2D Quant Kit、IPG-buffer(pH4~7)、Ettan IPGphor等电聚焦系统、pH4~7 IPG胶条(18cm)、Image Master 2D Platinum分析软件为(GEHC)产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 小麦根蛋白的样品制备

1.2.1 酚提取法 参照陈蕊红等^[7]的方法,并略有改动。取1mg小麦幼苗根系,液氮研磨充分后加入1ml提取液(蔗糖250.6mmol/L, Tris-HCl 20mmol/L, EDTA 10mmol/L, PMSF 1mmol/L, 1mmol/L DTT和400mmol/L Triton X-100)研磨15min,离心取上清,加入三氯乙酸(TCA)使其终浓度为10%,-20℃沉淀过夜。沉淀用预冷的丙酮(含0.2% DTT)洗4次,蛋白干粉于-80℃储存。

1.2.2 Trizol抽提法 参照Kirkland等^[8]的方法,并改进优化。取1mg小麦幼苗根系,液氮研磨充分后加入5ml Trizol溶液(Invitrogen),超声波处理后加入1ml氯仿,剧烈震荡15min,室内静置5min。13000rpm,4℃,离心15min,弃上层水相,加入600~1000μl 95%乙醇,振荡混匀,离心取上清。上清液中加入4倍体积的异丙醇沉淀2~3h,离心后沉淀用5ml含0.3mol/L盐酸胍的95%乙醇溶液洗3次。室温放置20min,然后再用95%乙醇清洗2次,7000rpm,4℃,离心10min。最后真空干燥10min,-80℃冰箱内保存备用。

1.3 蛋白定量

将300μl裂解液(7mol/L Urea,2mol/L Thiourea,4% CHAPS,40mmol/L Tris-base)加入到2mg蛋白干粉中裂解5h,用2D Quant蛋白定量试剂盒测蛋白浓度。

1.4 2-DE

等电聚焦(IEF):蛋白浓度测定后,吸取一定体积的蛋白溶液,加入IPG buffer(pH4~7)使终浓度为0.5%,然后用水化液补齐至350μl。采用Ettan

IPGphor等电聚焦系统,等电聚焦参数为:主动水化,30V,12h;300V,1h;500V,1h;1000V,1h;3000V,1h;8000V聚焦9h。

胶条平衡:等电聚焦后,将胶条置于5ml平衡液I(50mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),6mmol/L 尿素,30%甘油,2% SDS,0.002% [w/v] 溴酚蓝,1% DTT)中平衡15min,然后在5ml平衡液II(50mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),6mmol/L 尿素,30%甘油,2% SDS,0.002% [w/v] 溴酚蓝,4% IAA)中平衡15min,最后在电极缓冲液中平衡2~3min。

SDS-PAGE:胶条转移到12.5%的SDS-PAGE胶上进行低温(15℃)电泳,12mA/gel 预电泳40min,20mA/gel 至电泳结束。

1.5 图像扫描分析

凝胶经考马斯亮蓝染色后,用ImageScanner labscan,300dpi扫描,用Image Master 2D Platinum Software(Version 5.0,GE Healthcare)分析。

2 结果与分析

通过对小麦根蛋白的提取步骤和上样量等关键步骤进行优化,建立了适合2-DE分析的小麦根蛋白质组的样品制备方法和电泳条件。

2.1 蛋白提取方法和上样量对2-DE图谱的影响

小麦根系蛋白主要集中于酸性端,为了使根蛋白得到较好的分离,试验采用了pH4~7的IPG胶条。上样量对于获得高分辨率的2-DE图谱至关重要,直接影响着2-DE图谱的重复性,过多过少都会影响试验结果的可靠性。

图1为小麦酚抽提法提取的京-411根蛋白2-DE图谱,上样量为800μg时(图1-A),蛋白点数目较少,可观测到206±8个蛋白点,很多低丰度蛋白难以检测,但当上样量增加至1200μg时(图1-B),可观测到384±20个蛋白点,且碱性端蛋白点的数目明显增多,图像清晰无拖尾现象;但是酸性端的蛋白点分离较差,出现了严重的横条纹,且背景颜色很深,致使蛋白点难以通过软件观测。

图2为Trizol抽提法提取的京-411根蛋白的2-DE图谱,当上样量为800μg时(图2-A),可测得222±13个蛋白点,当上样量增至1200μg时(图2-B),可得649±6个蛋白点,比前者增加了427±19个。

此外,Trizol抽提法还明显改善了酸性端蛋白的分离效果,没有出现横条纹和拖尾,而且背景颜色均匀。

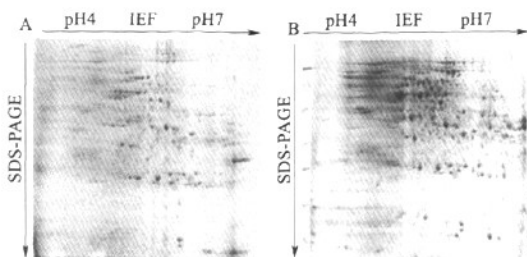


图1 苯酚抽提法提取的京-411根蛋白的双向电泳分析
Fig 1 The two-dimensional electrophoresis analysis of Jing-411 root proteins extracted by method of phenol extraction

A: 上样量 800 µg; B: 上样量 1200 µg
A: 800 µg Protein sample; B: 1200 µg Protein sample

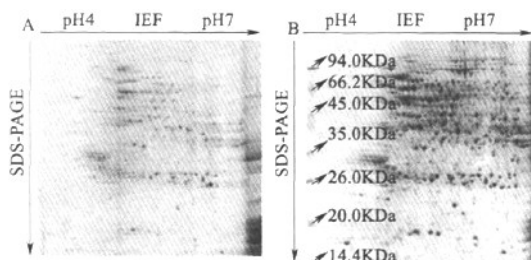


图2 Trizol抽提法提取的京-411根蛋白的双向电泳分析
Fig.2 The two-dimensional electrophoresis analysis of Jing-411 root proteins extracted by method of Trizol

A: 上样量 800 µg; B: 上样量 1200 µg
A: 800 µg Protein sample; B: 1200 µg Protein sample

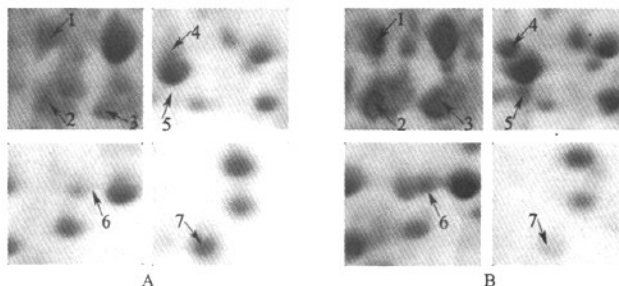


图3 酚抽提法 2-DE 图谱的放大图 (A) 及 Trizol 抽提法 2-DE 图谱的放大图 (B)

Fig.3 The enlarged boxed regions A, B are 2-DE maps from phenol and Trizol extraction methods

箭头所示为酚抽提法和 Trizol 抽提法之间部分差异蛋白点。下同

Arrows with numeric annotation indicate some changed protein spots. The same as below

验对不同盐浓度处理的中国春幼苗根系进行蛋白提取,在上样量为 1200 µg 时,也同样得到了高分辨率的小麦幼苗根系蛋白 2-DE 图谱,用软件对各个处理的 2-DE 图谱进行了观测和分析。

图 4-A 为对照组,分析共得约 422 个蛋白点,图 4-B 为 1.5% NaCl 处理组,共找到约 442 个蛋白点,与对照组相比,增加了 20 个;图 4-C 为 2.5% NaCl

双向电泳中,样品中盐离子浓度、DTT 用量以及各种环境因素等诸多因素都极易影响其重复性,但是重复性又是双向电泳甚至是整个蛋白质组学技术研究中最重要的环节。本试验进行了 3 次重复,所得的双向电泳图谱上蛋白点的数目变化幅度不大,显示了很好的重复性。

2.2 Trizol 抽提法与酚抽提法差异蛋白点的比较

不同的化学试剂与蛋白质的亲和力不同,因此不同的提取方法所得的 2-DE 图谱上蛋白点的数量、种类和丰度都会有所不同。用 Image Master 2D Platinum Software (Version 5.0, GE Healthcare) 在相同参数的情况下对 Trizol 抽提法与酚抽提法所得的双向电泳的图谱进行分析,共得 321 ± 24 个,其中 81 ± 6 个是表达量发生显著变化的差异点。图 3 放大了图 2 中部分差异点,对于蛋白点 1、2、3、4, Trizol 抽提法所得蛋白点的表达量相对较大,分别是酚抽提法的 2.11、2.67、4.93、3.16 倍,蛋白点 5、6 在酚抽提法中没有,而在 Trizol 抽提法中较为清楚,但是有些蛋白种类 Trizol 抽提法提取的量较低,例如蛋白点 7 在酚抽提法中较多,其表达量是 Trizol 抽提法中的约 2.77 倍。比较发现, Trizol 抽提法提取的蛋白种类较多。

2.3 Trizol 抽提法的应用

为了验证 Trizol 抽提法制备蛋白的效果,本试

处理组,共找到约 506 个蛋白点,与图 4-B 相比,增加了 64 个,图 4-D 为 3.5% NaCl 处理组,共找到约 449 个蛋白点,与图 4-C 相比,蛋白点减少了 57 个。试验证明,随着盐浓度的增加,蛋白点的数目先增加后减少,而且蛋白点数目差异显著。图 5 是将图 4 中虚线框内放大,图像显示背景颜色均匀,高丰度蛋白点清晰规则,无拖尾现象,有些蛋白点在体积变化

上差异显著,例如蛋白点 10、12、13 的体积随着盐浓度的增加明显下降,蛋白点 11、14 的体积明显增大,其中蛋白点 15 是经过盐处理后新出现的,在 2.5% NaCl 处理组中不清楚,但在 3.5% NaCl 处理组中较清晰。

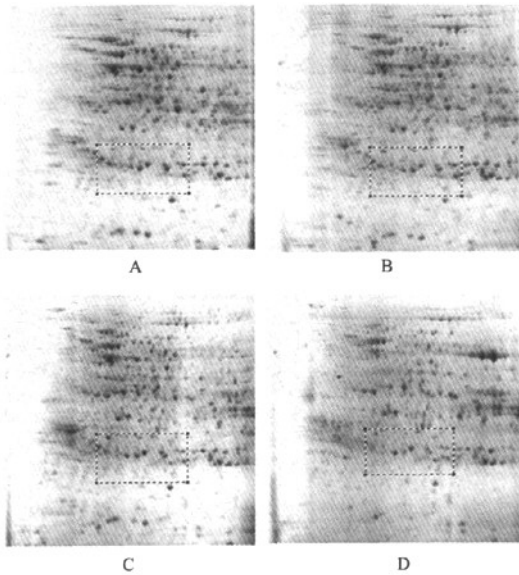


图 4 不同盐浓度处理后中国春根蛋白的双向电泳分析
 Fig.4 The two-dimensional electrophoresis analysis of Chinese Spring root proteins after different concentration of salt stress

A:对照 Control;B:1.5% NaCl;C:2.5% NaCl;D:3.5% NaCl

因此采用 Trizol 抽提法对小麦幼苗的根系进行蛋白提取,上样量为 1200 μ g 时能够得到理想的 2-DE 图谱,蛋白点形状规则、分辨率高、稳定性好且重复性较高,可以满足小麦根系蛋白组学分析的要求。

3 讨论

3.1 蛋白质样品制备

蛋白提取是 2-DE 中关键的环节,直接影响电泳的分辨率、可靠性和重复性^[9]。植物根系蛋白提取和电泳分离效果受到众多物质的影响,如酚类、醌类、色素以及其他次生代谢产物^[10]。本试验优化了小麦根系蛋白质组的提取过程和电泳条件,得到了较理想的 2-DE 图谱。

不同的提取液和沉淀剂对蛋白质溶解性和吸附力不同,所得的蛋白种类、丰度以及盐离子浓度都有很大的差异。试验表明,苯酚抽提法中的 TCA 沉淀和 Trizol 抽提法中的异丙醇沉淀在电泳图谱上有很大的差异,包括蛋白质的种类、丰度以及背景度。图 1-B 中展示的 Trizol 抽提法蛋白电泳图谱较为理想。TCA 沉淀虽然可以抑制蛋白酶的活性,避免蛋白质的降解,但这种方法导致所制备的蛋白干粉难以完全溶解,从而损失一些膜蛋白和疏水性蛋白^[11],例如蛋白点 5、6、15。同时,TCA 是强酸性物质,样品中 TCA 去除不完全,将会造成样品缓冲液的 pH 值过低,导致等电聚焦过程不理想而出现严重的横向拖尾。Trizol 抽提法中用异丙醇沉淀,然后用含

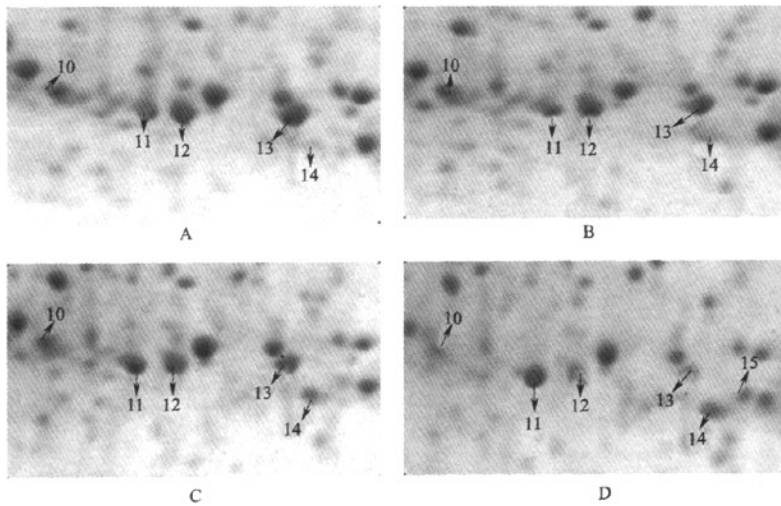


图 5 图 4 中虚线区域的放大图

Fig.5 The enlarged boxed regions A-D are shown equivalent regions from Fig.4

0.3mmol/L 盐酸胍的95%乙醇溶液清洗,能够有效的去除蛋白中的干扰物质。从图4中可以看出,用该方法提取的蛋白质稳定性好,重复性高,双向电泳图谱清晰,基本上没有横条纹和拖尾等现象。

3.2 上样量的选择

适当的上样量直接影响2-DE图谱的可靠性^[12-13]。上样量过大,在重泡胀期和等电聚焦时蛋白质容易发生沉淀,影响聚焦效果,并且丰度较大的蛋白斑点相对较大,易于掩盖一些分子量差异不大的低丰度蛋白点,横条纹和拖尾较为严重;如果上样量过低,低丰度蛋白在胶上难以显现,不利于分析和研究根系在生长发育中或胁迫后蛋白质表达的上调和下调。本试验选用了800 μ g和1200 μ g两种上样量进行对比,酚法提取的根蛋白上样量为1200 μ g时比上样量为800 μ g时多293个蛋白点;Trizol抽提法提取的蛋白样品上样量为1200 μ g时比上样量为800 μ g时多480个蛋白点,可以看出Trizol抽提法较酚抽提法相比更为理想。当上样量增至1200 μ g时,蛋白点的数目大大增加,有利于研究和分析低丰度蛋白的变化。

3.3 电泳条件的改进

除了蛋白样品纯度之外,盐离子也是影响双向电泳的重要因素。盐离子可以使IPG胶条中溶液的电导率增大,并引起电内渗^[7]。样品溶液中盐离子的浓度超过100mmol/L时将会严重影响等电聚焦的进行,造成横向拖尾和蛋白点丢失^[14]。小麦根组织中含有较多的盐离子,尤其是受到高盐胁迫后蛋白样品中盐离子浓度更大,故试验中采用蛋白样品多次洗涤、增加等电聚焦IEF中低电压除盐时间以及加盐桥于电极两端进行数次除盐等方法,使蛋白样品在等电聚焦时能够顺利达到预设的聚焦高电压。此外,还原剂DTT可以增加蛋白质的溶解性,但其为碱性物质,浓度过高会影响pH梯度,致使电压上升困难;浓度过低则会在碱性pH下去质子化,等电聚焦时会损耗DTT,导致二硫键复原,蛋白质沉

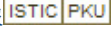
淀^[7]。现在很多试验中采用了三丁基磷酸(TBP)替代DTT,因为TBP的还原效果远高于DTT,而且不带电荷,不在等电聚焦中发生移动。本试验是否采用TBP代替DTT还需要进一步的探索。

本试验认为Trizol法可以很好的提取小麦幼苗根系的蛋白质,并能有效的去除样品中的盐离子,获得高分辨率的双向电泳图谱,为从蛋白质水平上了解小麦根系的生理活动和调节机制奠定基础。

参考文献

- [1] Donnelly B E, Madden R D, Ayoubi P, et al. The wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf proteome[J]. *Proteomics*, 2005, 5: 1624-1633
- [2] 阮松林, 董建新, 赵抗草. 植物响应逆境胁迫蛋白质组学研究进展[J]. *杭州农业科技*, 2007(2): 15-18
- [3] Song X, Ni Z F, Yao Y Y, et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) root proteome and differentially expressed root proteins between hybrid and parents[J]. *Proteomics*, 2007, 7: 3538-3557
- [4] Wang M C, Peng Z Y, Li C L, et al. Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum* / *Thinopyrum ponticum* [J]. *Proteomics*, 2008, 8: 1470-1489
- [5] Cheng Y W, Qi Y C, Zhu Q, et al. New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress[J]. *Proteomics*, 2009, 9: 3100-3114
- [6] 李圣青, 赵峰, 戚好文, 等. 肺组织灌注前后双向电泳的比较[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2006, 27(2): 203
- [7] 陈蕊红, 张改生, 刘卫, 等. 小麦花药蛋白质组双向电泳技术体系的优化[J]. *核农学报*, 2008, 22(4): 404-409
- [8] Kirkland P A, Busby J, Stevens S, et al. Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins[J]. *Anal Biochem*, 2006, 351: 254-259
- [9] 邵付菊, 李扬, 陈良, 等. 低温胁迫下棉花子叶蛋白质差异表达的双向电泳分析[J]. *华中师范大学学报*, 2008, 42(2): 262-266
- [10] Canovas F M, Dumas-Caudot E, Recorbet G, et al. Plant proteome analysis [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 285-298
- [11] 罗泽宇, 杨粤军, 刘选明. 拟南芥蛋白质组研究中双向电泳技术条件的优化[J]. *激光生物学报*, 2008, 17(4): 539-543
- [12] 杨君, 杨云强, 杨水平, 等. 箭毒木种子蛋白质样品制备及双向电泳改良方法[J]. *云南植物研究*, 2009, 31(4): 357-362
- [13] 刘丽娟, 舒烈波, 陈海荣, 等. 适用于生菜叶蛋白质双向电泳方法的建立及初步应用[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(1): 106-110
- [14] Gorge A, Weiss W, Dunn M J, et al. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics*, 2004, 4(12): 3665-3685

小麦根蛋白提取与双向电泳方法的优化与应用

作者: 郭广芳, 董坤, 高利艳, 王顺利, 王轲, 晏月明, GUO Guang-fang, DONG Kun, GAO Li-yan, WANG Shun-li, WANG Ke, YAN Yue-ming
作者单位: 首都师范大学生命科学学院, 北京, 100048
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2010, 11(2)
被引用次数: 1次

参考文献(14条)

1. Kirkland P A; Busby J; Stevens S [Trisol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophitic proteins](#) [外文期刊] 2006(2)
2. 陈蕊红; 张改生; 刘卫 [小麦花药蛋白质组双向电泳技术体系的优化](#) [期刊论文] - [核农学报](#) 2008(04)
3. 李圣青; 赵峰; 戚好文 [肺组织灌注前后双向电泳的比较](#) [期刊论文] - [西安交通大学学报\(医学版\)](#) 2006(02)
4. Song X; Ni Z F; Yao Y Y [Wheat \(Triticum aestivum L.\) root proteome and differentially expressed root proteins between hybrid and parents](#) 2007
5. 阮松林; 童建新; 赵杭莘 [植物响应逆境胁迫蛋白质组学研究进展](#) 2007(02)
6. Donnelly B E; MacIlden R D; Ayoubi P [The wheat \(Triticum aestivum L.\) leaf proteome](#) [外文期刊] 2005(6)
7. 郁付菊; 李扬; 陈良 [低温胁迫下棉花子叶蛋白质差异表达的双向电泳分析](#) [期刊论文] - [华中师范大学学报](#) 2008(02)
8. Gorge A; Weiss W; Dunn M J [Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics](#) [外文期刊] 2004(12)
9. 刘丽娟; 舒烈波; 陈海荣 [适用于生菜叶蛋白质双向电泳方法的建立及初步应用](#) [期刊论文] - [植物遗传资源学报](#) 2009(01)
10. 杨君; 杨云强; 杨永平 [箭毒木种子蛋白质样品制备及双向电泳改良方法](#) [期刊论文] - [云南植物研究](#) 2009(04)
11. 罗泽宇; 杨粤军; 刘选明 [拟南芥蛋白质组研究中双向电泳技术条件的优化](#) [期刊论文] - [激光生物学报](#) 2008(04)
12. Canovas F M; Dumas-Gaudot E; Recorbet G [Plant proteome analysis](#) [外文期刊] 2004(2)
13. Chang Y W; Qi Y C; Zhu Q [New changes in the plasmamembrane-associated pntome of rice roots under salt stress](#) 2009
14. Wang M C; Peng Z Y; Li C L [Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum](#) [外文期刊] 2008(7)

引证文献(2条)

1. 丁艳. 葛才林. 王泽港. 杜庆才 [Cd²⁺和1, 2, 4-三氯苯污染胁迫下小麦叶片蛋白质的双向电泳分析](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2010(35)
2. 丁艳. 葛才林. 王泽港. 杜庆才 [Cd²⁺和1, 2, 4-三氯苯污染胁迫下小麦叶片蛋白质的双向电泳分析](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2010(35)