

有关双向电泳中植物蛋白制备的研究

程霞¹, 苏源¹, 窦玉敏¹, 刘开庆¹, 邓纲^{2*}

(1. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214; 2. 云南大学 农学院, 云南 昆明 650091)

摘要:通过蛋白质组学技术研究生物体最终的执行功能是后基因组时代的重点之一。目前,双向电泳因成本低、分离效果好仍然是蛋白质组学研究的一项经典技术。为了得到高质量的双向电泳图谱,首先需制备出蛋白含量高、杂质少、稳定性好的植物样品。因此,结合植物蛋白提取的原理和方法,对蛋白制备结果影响较大的细胞破碎、预分级、杂质去除、裂解液配置以及对蛋白的溶解等几方面提出了针对性的建议。

关键词:双向电泳;蛋白质;电泳图谱;裂解液

中图分类号:Q512 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2015)06-0069-03

DOI:10.14091/j.cnki.kmxyxb.2015.06.016

Study on Plant Protein Sample Preparing in Two-dimensional Electrophoresis

CHENG Xia¹, SU Yuan¹, DOU Yu-ming¹, LIU Kai-qing¹, DENG Gang^{2*}

(1. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China;

2. College of Agricultural Science, Yunnan University, Yunnan Kunming 650091, China)

Abstract: It is one of the key focus in the post genome era that the final executive function of biology is studied through proteomics technology. At present, the two-dimensional electrophoresis is still a classic technology of proteomics research because of its low cost and good separation effect. In order to get high quality map of two-dimensional electrophoresis, it is necessary to produce good plant samples with high protein content, less impurity and good stability. Combining the principle and method of plant protein extraction, we put forward the targeted suggestions that influence the result of the protein preparation, such as cell crushing, grading, impurity removal, lysis buffer content and so on.

Key words: two-dimensional electrophoresis; protein; electrophoretogram; lysis buffer

随着当今高通量、大数据的生物信息时代的到来,生命科学领域也随之进入了高通量的后基因组时代,随之产生新的研究重点,通过蛋白质组学来研究基因的功能则为其一^[1]。蛋白质组学是指研究生物体的组织或细胞在特定时间和空间下合成的全部蛋白质及其活动、代谢规律^[2]。DNA 是主要的遗传物质,通过控制蛋白质的合成来控制生物的性状。细胞中基因表达和蛋白质的表达水平关系并不是对应的,相对于基因的稳定性,蛋白质则表现出复杂的时空性,主要原因是基因在转录后存在复杂的剪切和修饰过程^[3-4]。蛋白质的多样性决定了生命现象的复杂性。为了更好地解释基因的功能,揭示生命现象的本质,从生物蛋白质组学入手,以此研究涉及特定的

生命机理具有重要的理论和技术意义。

蛋白质组学的核心问题为样品制备、质谱鉴定及数据的检索和分析。^[5]截至目前,双向电泳仍然是蛋白质组学研究中一个主要技术手段,而其结果的可靠性,则取决于蛋白样品的制备^[6]。由于研究对象、手段和目的的不同,至今尚无通用于所有植物组织的蛋白样品制备方法。对于不同样品来源的植物组织,必须充分了解研究植物中所含蛋白的种类,植物中的非蛋白杂质成分及含量。而选择合适的提取液和裂解液是解决蛋白样品制备的核心,本文将围绕双向电泳所需样品的蛋白样品制备方法进行探讨,以期为未来的蛋白样品制备方法提供技术参考。

收稿日期:2015-10-19

基金项目:云南省教育厅资助项目(2014Y391);云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金和主任基金。

作者简介:程霞(1979—),女,河南许昌人,讲师,在读博士,主要从事植物蛋白质组学研究。

*通讯作者:邓纲(1986—),男,湖南邵阳人,讲师,博士,主要从事植物蛋白质组学研究,E-mail:gangdengplant@126.com.

1 植物细胞的破碎、预分级及蛋白的提取

为了得到蛋白,首先要对细胞进行破碎,通常使用的方法有酶解法、冷冻法和机械法.一般来说,冷冻法效率较低,酶解法则容易引入外源蛋白杂质,因此机械法较常见.目前最常用的方法为液氮研磨法,但在研磨中需注意提前预冷研钵,用液氮充分冻融组织,且快速充分的研磨成粉末,同时迅速加入蛋白沉淀剂(提取液)在低温(-20℃)下充分沉淀^[7-8].木质化程度较高的植物材料中加入石英砂则可得到较好的破碎效果^[9].

由于技术的原因,双向电泳的结果分析范围有限.为了降低样品的复杂性以及实验目的的需求(如研究低丰度蛋白),可对蛋白质样品进行分级预处理.即通过各种手段(如色谱技术、超速离心、亚细胞分级分离等),将蛋白质依据性质和在细胞中位置的不同进行分级,通过分级可以将研究性蛋白进行浓缩或去除干扰性蛋白,以此来有效去除非研究对象的干扰蛋白(如高丰度蛋白),以达到精确研究结果的目的^[10-12].未来的分级方向将直接涉及蛋白质生理特性的等电点和疏水性.

常见的植物蛋白提取方法有两种,分别是基于酚和TCA(三氯乙酸)沉淀的方法^[13].TCA沉淀法操作简单,适用于幼嫩植物体;同时TCA是一种强酸,可抑制植物中各种蛋白酶的活性,从而起到保护蛋白免于降解的目的.在实际应用中,往往使用TCA-丙酮(含15%~40%TCA)比单独的TCA或丙酮效果好,因丙酮有利于去除溶于有机溶剂的杂质,但沉淀的蛋白重新溶解则较困难^[14].酚抽提法适用于复杂植物,基于该方法可提取更多的糖蛋白,同时酚抽提法中相关试剂毒性较大,且费时费力,因此TCA-丙酮法在植物蛋白提取中较常用^[15].

2 杂质的去除

植物样品中蛋白含量较低,且含有较多的氧化酶、核酸、有机盐、无机盐以及影响后续蛋白分离和鉴定的各种次生代谢物质,同时不同植物和植物不同组织之间次生代谢物种类和含量差异较大^[16].次生代谢物主要有酚类、醛类、酮类等,这些物质在植物的生长发育过程中发挥着必不可少的重要作用,但会严重影响植物双向电泳图谱的结果.如多糖会堵塞IEF凝胶孔隙造成沉淀从而干扰聚焦,并最终

导致双向图谱中横纹的出现;脂类会同蛋白质结合成难溶的复合物;盐分会增加蛋白溶液的导电性从而会影响聚焦,如IEF聚焦时电压无法达到最大值或聚焦时间过长,并导致双向电泳背景黑暗,蛋白点分离不彻底;多酚类物质可修饰蛋白,同时降低蛋白的溶解性;核酸则会增加蛋白样品的粘度或与蛋白结合,最终导致双向图谱中横纹的出现^[17-19].

为了得到高质量的植物蛋白图谱,应尽量去除对后续实验造成干扰的各种杂质.对样品中一些难溶性的杂质,除使用传统的TCA-丙酮法外,可通过增加40000g以上的高速离心来去除;因多糖对聚焦的影响较小,目前主要通过高速离心的方法去除;核酸可利用超声波打碎,精胺和核酸结合形成复合物以及通过内切核酸酶进行高效去除^[20];盐类的去除可通过透析和液相色谱或通过20%TCA-水溶液进行清除^[21];脂类物质通过有机溶剂(丙酮等)溶解后离心去除^[22];去除酚类最有效的方法是在液氮研磨时加入不溶性的PVPP(聚乙烯吡咯烷酮),通过PVPP和酚类形成复合物后离心去除^[23].

3 裂解液的配置及对蛋白的溶解

样品制备过程中,需用裂解液对蛋白质进行溶解和提取.蛋白裂解遵循的原则是尽量多溶解蛋白的同时保持双向电泳操作中蛋白的溶解性.裂解液的成分主要包括变性剂、表面活性剂和还原剂.其作用主要有以下几个方面^[24]:将蛋白转为单一构象;防止蛋白的沉淀和修饰;破坏二硫键、离子键和氢键,阻止蛋白凝聚并充分地溶解;抑制蛋白酶活性.尿素和硫脲都是变性剂,同时使用可增加蛋白的溶解性,但在配置过程中需注意尿素纯度和配置温度的把握,若温度过高,则会导致尿素变性而修饰目的蛋白并影响电泳的重复性.表面活性剂主要有CHAPS, TritonX-100和SDS,表面活性剂的选择须与离液剂的使用密切相关,不同的样品应优化使用的类型.如使用尿素-硫脲体系时,可选择TritonX-100^[25].还原剂种类有DTT, DTE和TBP,因DTT和DTE带有负电荷,IEF时会发生流失从而导致蛋白中二硫键的重新形成;而TBP不带电荷因而有较好效果^[26].为了更好地保护蛋白免于蛋白酶的分解,裂解液中还常加入蛋白酶抑制剂,如PMSF等.

除裂解液中各成分对蛋白的溶解外,还可通过加入Tris碱、载体两性电解质等物质来提高蛋白溶解

性^[27]. Tris 碱可使溶液呈现碱性,因大部分蛋白为酸性蛋白,碱性溶液的存在可抑制蛋白酶的活性,促进二硫键的还原和烷基化,从而促进蛋白的溶解性.载体两性电解质是指相对分子质量小于 1 KD 的混合物,其可增加溶液的缓冲能力和离子强度,能防止蛋白和胶条间的疏水作用,因而可增加蛋白质的溶解性.

综上所述,为了得到较好的双向电泳分离效果,首先需要制备出高质量的蛋白样品.在样品制备过程中,我们需要把握一些基本原则,如采集样品和实验目的的一致性;尽量减少实验步骤和时间以避免蛋白的丢失,修饰和降解;尽量减少样品中杂质的含量等.

[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] WASINGER V C, CORDWELL S J, CERPA P A, et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium* [J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(1): 1090 - 1094.
- [3] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 994 - 999.
- [4] IDKER T, GALITSKI T, HOOD L. A new approach to decoding life: systems biology [J]. *Ann Rev Genom Hum Genet*, 2001, 2: 343 - 372.
- [5] 李德军, 邓治, 陈春柳, 等. 植物组织双向电泳样品制备方法研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(24): 78 - 82.
- [6] PATTERSON S D, AEBERSOD H. Proteomics: the first decade and beyond [J]. *Nature Genet*, 2003, 33: 311 - 323.
- [7] 魏天华, 应天翼. 蛋白质组学实验技术精编 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 33 - 36.
- [8] 陈晶瑜, 郭宝峰, 何付丽, 等. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(23): 97 - 100.
- [9] 金艳, 许海霞, 徐圆圆, 等. 几种不同提取方法对小麦叶片总蛋白双向电泳的影响 [J]. *麦类作物学报*, 2009(6): 1083 - 1087.
- [10] HEAZLEWOOD J L, WHELAN J, MILLAR A H. The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are FO components in the plant F1 FO ATP synthase [J]. *FEBS Lett*, 2003, 540: 201 - 205.
- [11] SHEFCHICK K, YAO X, FENSELAU C. Fractionation of cytosolic proteins on an immobilized heparin column [J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 1691 - 1698.
- [12] KLEFFMANN T, RUSSENBERGER D, ZYCHLINSKI A K V, et al. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(5): 354 - 362.
- [13] ISAACSON T, DAMASCENO C M B, SARAVANAN R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues [J]. *Nature Protocol*, 2006, 1: 769 - 774.
- [14] GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, et al. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 328 - 337.
- [15] HURKMAN W J, TANAKA C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Plant Physiol*, 1986, 81: 802 - 806.
- [16] 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.
- [17] ROSE J K C, BASHIR S, JAMES J G, et al. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools [J]. *Plant J*, 2004, 39: 715 - 733.
- [18] SARAVANAN R S, ROSE J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 2522 - 2532.
- [19] VÁLCU C M, SCHLINK K. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 1599 - 1605.
- [20] RABILLOU T, HUBERT M, TARROUX P. Procedures for two-dimensional electrophoresis analysis of nuclear proteins [J]. *J Chromatogr A*, 1986, 351(1): 77 - 89.
- [21] 阮松林, 马华升, 王世恒, 等. 植物蛋白质组学研究进展: I. 蛋白质组关键技术 [J]. *遗传*, 2006, 28(11): 1472 - 1486.
- [22] MASTRO R, HALL M. Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Anal Biochem*, 1999, 273(2): 313 - 315.
- [23] TOTH G B, PAVIA H. Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble Polyvinylpyrrolidone (PVPP) [J]. *J Chem Ecol*, 2001, 27(9): 1899 - 1910.
- [24] WESTERMEIER R, NAVEN T. Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis practical proteomics [M]. Weinheim: WILEY-VCA Verlag GmbH, 2002.
- [25] LUCHE S, SANTONI V, RABILLOU T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane proteins solubilizers in two-dimensional electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2003, 3(3): 249 - 253.
- [26] HERBERT B R, MOLLOY M P, GOOLEY A A, et al. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent [J]. *Electrophoresis*, 1998, 19: 845 - 851.
- [27] CHEN S X, HARMON A C. Advances in plant proteomics [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 5504 - 5516.