

有关植物双向电泳体系建立中几个问题的探讨

程霞¹, 窦玉敏¹, 唐萍², 苏源¹, 邓纲^{3*}

(1. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214; 2. 云南农业大学 植保学院, 云南 昆明 650201;
3. 云南大学 农学院, 云南 昆明 650091)

摘要:双向电泳技术是目前最常用的能够从植物组织中分离出上千种蛋白的技术. 因此, 需对蛋白样品制备过程、等电聚焦、第二相电泳、染色等进行分析探讨, 结果表明, 样品制备需根据样品的成分选择不同的裂解液成分(如: CHAPS, Triton X-100 和 DTT 等); 胶条越长要求上样量越大(考染上样量约为银染上样的 5 倍), 等电聚焦电压越大, 聚焦过程也越长; SDS-PAGE 胶体积分数为 10%~15%, 常用 12%; 第二相电泳需选择恒定电流, 且先以 10 mA/胶, 跑 0.5~1.0 h, 再以大电流 30 mA/胶至第二相电泳完成.

关键词:双向电泳; 蛋白质; 电泳图谱; 等电聚焦; 聚丙烯酰胺凝胶

中图分类号: S718 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639(2015)03-0069-03

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2015.03.016

Several Issues about Setting up Plant Two-dimensional Electrophoresis(2-DE) System

CHENG Xia¹, DOU Yu-ming¹, TANG Ping², SU Yuan¹, DENG Gang^{3*}

(1. Life Science and Technology Department, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China;
2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China;
3. College of Agricultural Science, Yunnan University, Yunnan Kunming 650091, China)

Abstract: 2-DE is the most commonly used technology to separate hundreds of proteins from the plant tissues. We analyzed and studied the processes of sample preparation, IFE, second-phase electrophoresis, gel-staining. The result showed that the sample preparation due to different elements (CHAPS, Triton X-100, DTT etc) should be selected according to different pyrolysis liquid elements. Longer of gel requires more loading amount of sample (5 times loading amount of sample in G250-staining more than silver-staining). Higher isoelectric focusing voltage the longer is the process of focusing. The volume fraction of SDS-PAGE is 10%—15%, commonly used 12%. polyacrylamide gel. The second -phase electrophoresis should select constant current and firstly 10 mA/gel should be set to run 0.5—1.0 h then 30 mA/gel till second-phase electrophoresis was finished.

Key words: two-dimensional electrophoresis; protein; electrophoretogram; isoelectric focusing; polyacrylamide gel

基因组学是分子生物学的核心,但随着技术的迅速发展,基因组学的研究出现了各种瓶颈,主要体现在细胞中 mRNA 水平与蛋白质表达水平不一致^[1-2]. 2003 年人类基因组测序的完成,生命科学进入了后基因组时代,即功能基因组的研究. 蛋白质是生命活动的执行者和生命现象的体现者. 蛋白质组学是以细胞中存在的全部蛋白质及其活动规律为研究对象,逻辑上是研究生命过程的第二步,是后

基因组时代的核心内容^[3]. 蛋白组学起源于 1975 年,但由于技术的原因,直到 20 世纪 90 年代,蛋白分离和鉴定技术取得突破后才迅速开展起来. 近年来有关蛋白组学的文章逐年增多,但主要集中在人类和微生物方面,植物蛋白组学发展相对较晚,但发展也较迅速^[4].

虽然有关蛋白组学的研究技术发展很快,出现了如 iTRAQ, DIGE, ICAT, SILAC 等高通量方法,并

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 云南省教育厅资助项目(2014Y391).

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,主要从事植物蛋白组学研究, E-mail: gangdengplant@126.com.

很快应用到各种研究中. 但采用双向电泳技术则其费用较低, 同时在研究蛋白质的修饰, 发现蛋白质组学同工酶或异构酶以及食品分析方面有较强的优势, 至今仍然是蛋白质组学研究中最经典的技术, 发挥着不可替代的作用^[5]. 为了更好地掌握双向电泳技术, 本文结合自身在植物双向电泳操作过程中遇到的一些问题进行了以下探讨.

1 蛋白质的提取

蛋白质提取和制备的质量是蛋白组学研究成功的基础. 植物组织中蛋白的含量相对较低且含有大量非蛋白干扰蛋白的提取和后续的分离, 如多糖、核酸和脂类以及各种次生代谢物酚等^[6-8]. 最好的提取方法是在尽可能多地保留样品中蛋白质的同时必须有效去除其中的杂质才能获得高质量的分析结果. 常见的植物蛋白质提取方法有基于酚或者 TCA(三氯乙酸)的方法. 有研究^[9-11]显示, 基于 TCA 的方法适用于幼小植物, TCA 除了能沉淀蛋白质外还能有效地去除各种杂质. 而基于酚的方法适用于复杂的植物, 特别是含较多可溶性糖的植物组织, 另外, 基于酚的方法步骤较繁琐, 所以基于 TCA 的方法被广泛应用在植物蛋白的提取中.

在蛋白的提取过程中, 为了避免因植物组织内的蛋白酶而导致蛋白的丢失和降解, 整个操作过程中要保持低温快速, 在尽可能去除杂质的同时减少操作的时间. 基于 TCA 的方法除了沉淀蛋白外, 还需要合适的裂解液重新溶解和提取蛋白, 所以摸索裂解液的配方也是很重要的. 裂解液一般包括变性剂(离液剂)、表面活性剂、还原剂等. 目的是通过破坏蛋白质的二级、三级结构和蛋白质的离子键、氢键以及还原蛋白的二硫键达到蛋白去折叠, 最终使蛋白、特别是疏水性蛋白更好的充分溶解. 有资料显示, 裂解液使用尿素—硫脲体系时, 应加入 Triton X-100, 而单独使用尿素时则应加入 CHAPS^[12], 另外为了避免蛋白的氨甲酰化, 尿素溶液加热温度不能超过 37℃, 使用前最好分装使用并储存于 -20℃ 冰箱. 而在还原剂使用方面, TBP 较 DTT 和 DTE 有更好的效果^[13-14]. 还有资料^[15]显示, 加入适量的两性电解质和 Tris, 可以增加裂解液的离子浓度和溶液的碱性, 从而增强蛋白的溶解.

2 双向电泳中参数的优化

双向电泳参数包括蛋白上样量/胶条, IPG 胶条 pH 范围、长度, IEF 聚焦程序, 聚丙烯酰胺凝胶体积分数等. 为了获得背景清晰的双向电泳图谱以满足后续的分析研究, 正式试验前要对以上参数进行摸索优化. 一般来说, 增加蛋白上样量可以提高低丰度蛋白的分辨率, 从而有利于蛋白点的检测以及提高电泳结果的准确性. 但上样量过大则易使蛋白质在 IEF 聚焦时沉淀, 导致横向或纵向的条纹和拖尾, 从而对电泳结果产生影响. 另外, 蛋白的上样量受样品种类、胶条长度及其 pH 范围以及凝胶的染色方法等的影响^[16]. 胶条越长, 上样量越大; 考染蛋白上样量要大于银染, 一般为银染上样量的 5~10 倍.

有关 IPG 胶条 pH 范围、长度也会对蛋白质图谱结果产生影响. 一般来说, 短胶条上样量小, 成本低, 适用于成分简单的样品; 长胶条分辨率高, 上样量大, 适用于分析复杂样品, 同时利于切取蛋白点用于质谱分析. 同时宽 pH 范围胶条可以得到更多的蛋白点, 而窄胶条则能提高蛋白的分辨率. 在实际操作中, 先使用宽 pH 胶条观察蛋白的分布情况, 然后进一步确定窄胶条的使用范围. 如果样品中蛋白 pH 范围与实际使用胶条范围相差较大, 则会造成部分蛋白点重叠, 影响结果的进一步分析^[17]. 在 IPG 胶条的选择过程中, 实际还有一个 IPG 缓冲液的使用问题, 一般来说, 胶条的 pH 范围和 IPG 缓冲液存在一一对应关系, 但是实际操作中, 宽 pH 范围 IPG 缓冲液也可以用于窄 pH 范围的胶条, 反之则不行.

一次 IEF 等电聚焦电泳, 要经历一系列的电压过程, 主要包括低压除盐、梯度升压、高压聚焦、低压维持 4 个阶段. 样品、胶条长度、pH 范围、上样量都会影响聚焦程序的设定, 具体试验条件需要摸索. 一般来说, 胶条越长、pH 范围越窄、上样量越大, 需要的聚焦时间就越长. 聚焦时间不足则容易造成高相对分子质量蛋白质聚焦不完全, 点不圆, 蛋白点聚集等. 在聚焦过程中, 有时会出现聚焦电压上不去的现象, 这可能与前面蛋白的提取质量有关, 可能是蛋白中盐离子的质量浓度过高所致(需改进蛋白样品制备方法), 所以在设置聚焦程序时最大电流一般设为 0.05 mA/胶条, 以免

烧胶. 另外在等电聚焦中发现不同样品或者不同 pH 范围的胶条最好不要同时做等电聚焦, 因为会导致某些样品的不完全聚焦^[18].

对植物蛋白来说, SDS-PAGE 凝胶使用浓度 (体积分数, 下同) 一般在 10% ~ 15% 之间, 具体体积分数要进行摸索. SDS-PAGE 是按照蛋白质的相对分子质量大小进行蛋白分离的, 低体积分数的凝胶适用于高相对分子质量蛋白的分离, 高体积分数则适于分离低相对分子质量蛋白^[19]. 为了得到更多的蛋白点, 使蛋白均匀地分布于凝胶中, 选择适合样品的凝胶体积分数非常重要. 一般首先用 12% 的凝胶观察蛋白相对分子质量的分布, 然后再增加或降低凝胶体积分数, 从而达到最好的效果. 另外双向电泳第二相 SDS-PAGE 不需要制备浓缩胶, 因为经过 IEF 等电聚焦过程, 已经将蛋白聚集在一条线上了, 从一相到二相的转移就是从凝胶到凝胶的转移, 能很好地进行蛋白分离^[20].

3 植物双向电泳图谱常见问题分析

植物双向电泳中最常见的问题就是蛋白图谱中横向和竖向条纹的出现. 横纹的出现主要与样品制备和一相等电聚焦有关, 样品制备体现在杂质去除不彻底, 如离子浓度或多糖含量过高, 蛋白溶解性差或溶解不彻底; 等电聚焦则体现在聚焦时间过长或过短、上样量过大、样品体积分数过高、水化不正确、起始电压过高等. 竖纹的出现主要是在二相中产生的, 如一相和二相之间的平衡不充分、蛋白发生氧化、试剂质量差或溶液配错等问题上^[18]. 实际操作中具体问题需具体分析.

双向电泳过程中, 聚焦结束的时会发现胶条两端靠近电极的地方出现了烧焦的现象, 这可能是由于样品中离子浓度过高导致, 对后续的实验一般无太大影响. 还有二相 SDS-PAGE 电泳, 大多选用恒定电流, 特别是对于宽 pH 胶条, 选用恒定电流 (相对恒定电压) 能得到更好的分辨率, 因恒流能更好地控制胶条产热. 实际操作中, 首先用 10 mA/胶条的恒定电流跑 30 min, 然后转换成 30 mA/胶条至电泳结束, 这样做是为了减少高相对分子质量蛋白的丢失.

综上所述, 双向电泳虽然在蛋白灵敏度、分离能

力、高通量方面相对较弱, 但在某些方面却有不可替代的地位. 可以说目前并没有一种明确的最好的蛋白质组方法, 因为不同的方式所得到的差异蛋白有较大差别, 其结果可以互为补充, 定量和定性结果的可靠性与实验室技术水平密切相关. 所以在双向电泳这条道路上, 我们可以通过把握一些关键步骤得到更好的双向电泳图谱.

[参考文献]

- [1] 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: 994 - 999.
- [2] IDEKER T, GALITSKI T, HOOD L. A new approach to decoding life: systems biology[J]. *Ann Rev Genom Hum Genet*, 2001, 2: 343 - 372.
- [3] 林秀琴, 袁坤, 王真辉, 等. 植物响应逆境胁迫的比较蛋白质组学研究进展[J]. *热带农业科学*, 2009, 29 (2): 52 - 57.
- [4] 曾嵘, 夏其昌. 蛋白质组学研究进展与趋势[J]. *中国科学院院刊*, 2002 (3): 167 - 169.
- [5] PATTERSON S D, AEBERSOLD H. Proteomics: the first decade and beyond[J]. *Nature Genet*, 2003, 33: 311 - 323.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] VAICU C M, SCHLINK K. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis[J]. *Proteomics*, 2006, 6: 1599 - 1605.
- [9] ISAACSON T, DAMASCENO C M B, SAAVANAN R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues[J]. *Natue Protocols*, 2006, 1: 769 - 774.
- [10] WANG W, MONICA S, VIGNANIL V, 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.
- [11] SAAVANAN 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.

(下转第 86 页)

- [3] 张萍, 刘升, 胡松勤, 等. 支撑喉镜显微手术与非显微手术治疗声带息肉疗效观察[J]. 中国实用医药杂志, 2008, 3(25): 68-69.
- [4] 赵俐, 刘英杰. 支撑式喉镜下双侧声带息肉的显微手术[J]. 内蒙古医学院学报, 2003, 25(3): 197-197.
- [5] 丁锋. 声带息肉 246 例治疗体会[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(27): 3461-3462.
- [6] 郑明秀, 王正强, 吴平, 等. 电视喉动态镜对声带粘膜波的观察[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1998, 12(3): 143-144.
- [7] PRADES J M, DUMOLLARD J M, DUBAND S, et al. Lamina propria of the human vocal fold: histomorphometric study of collagen fibers[J]. Surg Radiol Anat, 2010, 32(4): 377-382.
- [8] 宗志云. 对声门暴露困难的声带息肉患者采用支撑喉镜结合纤维喉镜进行治疗的效果分析[J]. 当代医药论丛, 2014, 12(16): 219-220.
- [9] 陶春蕾. 电子纤维喉镜下治疗声带息肉 265 例临床效果观察[J]. 泰山医学院学报, 2014, 35(10): 1032-1034.
- [10] 许培阳, 吴志云, 王永胜. 三种全麻方法用于显微支撑喉镜下喉手术的临床观察[J]. 临床军医杂志, 2014, 42(3): 260-262.
- [11] 郑明秀, 王正强, 朱嘉卫, 等. 267 例声带息肉不同术式选择和应用[J]. 云南医药, 1999, 20(4): 269-270.
- [12] 蔡红武, 唐安洲, 徐志文, 等. 喉 CO₂ 激光手术后声带粘连原因分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 24(4): 147-148.
- [13] 连军胜, 黄顺德, 张世能, 等. 低温等离子消融处理 52 例广基型声带息肉疗效观察[J]. 中外医疗, 2013(28): 41-43.
- [14] 叶方. 纤维喉镜与显微支撑喉镜加电动喉刨削器切除声带息肉的效果比较[J]. 中国实用医刊, 2014, 41(20): 104-105.
- [15] 汪审清, 凌玲, 鲁裕玉. 喉动态镜声带小结区粘膜波表现及意义[J]. 中国内镜杂志, 1999, 5(5): 3-3.
- [16] 黄兆挑. 耳鼻咽喉科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 116.

(上接第 71 页)

- [12] LUCHE S, SANTONI V, RABILLOUD T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane proteins solubilizes in two-dimensional electrophoresis [J]. Proteomics, 2003, 3: 249-253.
- [13] RIGHETTI P G, TUDOR G, GIANAZZA E. Effect of 2-mercaptoethanol on pH gradients in isoelectric focusing [J]. J Biochem Biophys Meth, 1982, 6: 219-227.
- [14] HERBET B R, MOLLY M P, GOLLEY A A, et al. Improved solubility in two-dimensional electrophoresis using tributylphosphine as reducing agent [J]. Electrophoresis, 1998, 19: 845-851.
- [15] VANDAH L B B, CHRISTIANSEN G, BIRKELUND S. Preparation of bacterial samples for 2-D PAGE [M]// WALKER J M. The Proteomics Protocols Handbook. New Jersey: Humana Press, 2005: 19-26.
- [16] 黎飞, 徐秋芳, 臧宪朋, 等. 番茄子叶总蛋白双向电泳体系的建立[J]. 园艺学报, 2010(4): 661-668.
- [17] 陈伟, 黄榕辉, 林小敏, 等. 秋茄根系蛋白质组的双向电泳技术优化[J]. 福建农业学报, 2012(8): 863-868.
- [18] 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.
- [19] 唐芸芸. 基于移动反应界面的聚丙烯酰胺凝胶电泳及其应用研究[D]. 上海: 上海交通大学 2013.
- [20] 阮松林, 童建新, 赵杭苹. 双向电泳技术研究进展[J]. 杭州农业科技, 2006(5): 2-5.

