

适用于甜玉米叶片蛋白质组分析的双向电泳技术

王 猛, 李云锋, 王振中

(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用改良的 TCA/丙酮法提取叶片总蛋白,建立了一套适用于甜玉米叶片的蛋白质组学研究方法,并对蛋白溶解液、蛋白上样量、第一向 IEF 等电聚焦时间等条件进行了优化.用改进的蛋白溶解液提取叶片总蛋白,明显减轻了离子干扰造成的蛋白点横拖;500 μg 蛋白上样量的检出蛋白点最丰富,可达 750 个以上;延长 8 000 V 等电聚焦至 30 000 Vh 可获得良好的蛋白点分离效果;采用优化条件后的双向电泳参数,结果重复性较高,检出蛋白点的线性回归相关系数可达 0.93 以上.

关键词:甜玉米;蛋白质组;双向电泳

中图分类号:Q946.1

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2012)03-0421-03

A Two-Dimensional Electrophoresis Protocol Suitable for Proteomics Study of Sweet Corn Leaves

WANG Meng, LI Yun-feng, WANG Zhen-zhong

(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A two-dimensional electrophoresis protocol suitable for the separation of proteins from sweet corn leaves was established by using improved TCA/acetone method for total proteins extraction. Two-dimensional electrophoresis conditions such as lysis buffer, protein loading quantities, isoelectric focusing time were modified and improved. The use of modified lysis buffer can lighten the protein horizontal drag; the maximum number of spots were larger than 750, acquired at 500 μg protein loading quantities; the best total isoelectric focusing time was 50 000 Vh; the linear regression correlation coefficient of spots was greater than 0.93, which showed high experiment repeatability.

Key words: sweet corn; proteomics; two-dimensional electrophoresis

近年来,我国甜玉米产业迅速发展,截至 2009 年种植面积已达 27.24 万 hm^2 ,产量 350.76 万 t,在创造丰富的经济效益和社会效益的同时,我国甜玉米还存在种质资源匮乏,抗逆能力不足,易受病虫害侵扰等问题^[1-3].蛋白质组学研究对改良作物遗传性状和指导抗逆抗病育种具有重要意义^[4-7],可为解决我国甜玉米目前存在的诸多困扰提供新的解决思路.本研究以“三叶一心期”甜玉米叶片为材料,对总蛋白的提取、蛋白上样量、第一向 IEF 等电聚焦等进行改进,提出了一套适用于甜玉米叶片蛋白质组研究的双向电泳方法.

1 材料与方法

1.1 材料

供试甜玉米品种为丰甜 1 号,购自广东省农业科学院蔬菜研究所.

1.2 方法

1.2.1 叶片总蛋白的提取 参考何瑞锋等^[8]、李冠军等^[9]方法并作适当改进,取“三叶一心”期玉米第 2 片叶 0.5 g(去除主脉),加入 0.05 g 交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP),于液氮中研磨均匀,加入 15 mL 100 g/L 的 TCA/丙酮(含 φ 为 0.07% β -巯基乙醇),冰

收稿日期:2011-08-21

作者简介:王 猛(1986—),男,硕士;通信作者:王振中(1956—),男,教授,博士, E-mail: zzwang@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技厅产业化推进项目(2007A020400002)

上继续研磨 5 min,并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 12 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮(含 φ 为 0.07% β -巯基乙醇)悬浮沉淀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min,并重复 6 次直至沉淀无色,冷冻真空干燥沉淀并称质量.以 2 种不同的蛋白溶解液溶解蛋白干粉,按每 1 mg 蛋白加入 20 μL 蛋白溶解液 1(尿素 7 mol/L, 硫脲 2 mol/L, Tris 40 mmol/L, DTT 10 mmol/L, CHAPS 40 g/L, PMSF 1 mmol/L, pH 3 ~ 10, φ 为 1% 的 NL IPG Buffer) 或蛋白溶解液 2(Tris 20 mmol/L, 其他同溶解液 1) 超声波震荡使蛋白溶解, 12 000 r/min 离心 30 min, 上清即为蛋白提取液, 以 Bio-Rad Quick Start Bradford 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后分装保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下.

1.2.2 第一向固相梯度等电聚焦电泳(IEF) 将提取的蛋白用蛋白溶解液 3(尿素 7 mol/L, 硫脲 2 mol/L, DTT 10 mmol/L, CHAPS 40 g/L, PMSF 1 mmol/L, pH 3 ~ 10, φ 为 1% 的 NL IPG Buffer) 稀释至体积 350 μL , 蛋白质量分别为 400、450 和 500 μg , Tris 浓度 5 mmol/L 以下, 采用 GE 18 cm pH3 ~ 10NL IPG 胶条, 水化上样 12 h, 将胶条置于 GE IPGphor III 聚焦盘, 表面覆盖矿物油, 进行第一向固相梯度等电聚焦电泳(IEF), IEF 参数为: 20 V 恒压 2 h; 100 V 恒压 2 h; 1 000 V 线性升压 8 h; 8 000 V 线性升压 13 500 Vh; 8 000 V 等电聚焦 13 000 Vh 或 30 000 Vh; 500 V 恒压 6 h; 温度均为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IEF 结束后, 将胶条转移至平衡盘, 加入平衡液 1(尿素 6 mol/L, pH 8.8 Tris-HCl 75 mmol/L, 甘油 φ 为 29.3%, SDS 20 g/L, DTT 65 mmol/L), 平衡 20 min, 转移至 5 mL 平衡液 2(碘乙酰胺 135 mmol/L, 其他同平衡液 1), 平衡 20 min.

1.2.3 第二向 SDS-PAGE 将平衡后的 IPG 胶条转移至第二向 120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶顶部, 覆盖琼脂糖封胶液. GE Ruby 垂直电泳槽系统中按 8 mA, 30 min; 16 mA, 5 ~ 6 h 进行第 2 向电泳, 直至溴酚蓝指示带迁移出凝胶底部.

1.2.4 凝胶的固定、染色和分析 固定液(φ 为 10% 的乙酸)固定 2 h 以上, 胶体考染液(1.2 g/L 考马斯亮蓝 G-250, 100 g/L 硫酸铵, φ 为 10% 的磷酸, φ 为 20% 的甲醇)染色过夜, 超纯水脱色至背景干净、蛋白点清晰. 以 UMAX 2100 扫描仪扫描凝胶, Bio-Rad PDQuest 8.0 软件分析图像.

2 结果与分析

2.1 不同的蛋白溶解液对提取蛋白的影响

由图 1 可知, 2 种蛋白溶解液提取的玉米叶片总

蛋白在 pH3 ~ 10 范围内都有蛋白点分布. 在 500 μg 蛋白上样量、8 000 V 等电聚焦 30 000 Vh 条件下, 经 PDQuest 8.0 软件分析, 蛋白溶解液 1 提取样品检出蛋白点数目比蛋白溶解液 2 提取样品检出蛋白点数目平均少 14 个, 这可能由于蛋白溶解液 1 提取蛋白在双向电泳过程中出现了明显横向拖尾从而导致 PDQuest 8.0 软件不能准确判断被联接的蛋白点. 因此在蛋白溶解液中引入 Tris 的浓度在 20 mmol/L 时适用于甜玉米叶片蛋白质组的提取.

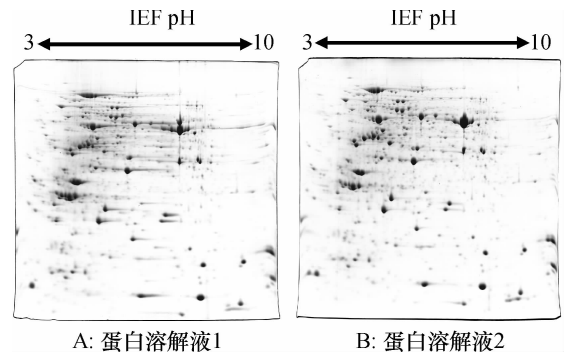


图 1 不同蛋白溶解液提取蛋白双向电泳对比图

Fig. 1 Comparison of extraction effects by different types of lysis buffer on 2-D gel

2.2 不同蛋白上样量对蛋白点数目影响

本研究设计 400、450 和 500 μg 3 个蛋白上样量, 双向电泳结果如图 2. 由 PDQuest 8.0 软件分析可知, 400 μg 蛋白上样量其双向图谱蛋白点最少, 500 μg 蛋白上样量蛋白点最多, 有 750 个以上.

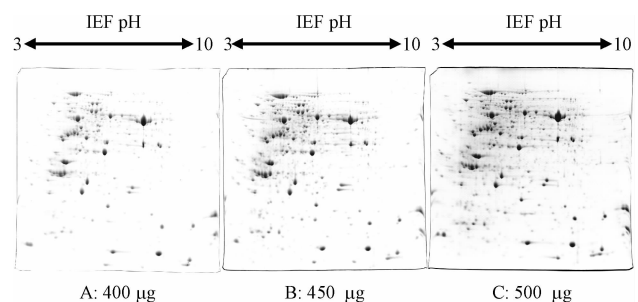


图 2 不同蛋白上样量双向电泳对比图

Fig. 2 Comparison of different protein loading quantities on 2-D gel

2.3 不同聚焦时间对双向电泳结果的影响

将 8 000 V 恒压步骤设定为 13 000 Vh 或 30 000 Vh, 不同聚焦效果如图 3. 由图 3 可知, 图谱中许多蛋白点在较低的总聚焦时间下出现了横向拖尾现象, 而采用 8 000 V 聚焦 30 000 Vh 后, 蛋白点更为清晰.

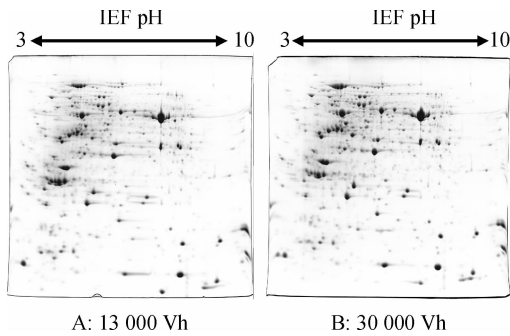


图3 不同聚焦时间双向电泳对比图

Fig. 3 Comparison of different lengths of isoelectric focusing time on 2-D gel

2.4 双向图谱的重复性

双向电泳试验重复9次以上,将图谱随机分为随机重复组1和随机重复组2,分别将2组中所有出现的蛋白点的模型设为横坐标和纵坐标,以PDQuest 8.0软件进行线性回归分析,结果见图4。由图4可知,所有蛋白点的模型线性回归系数达0.93,试验结果达到了高度重复。

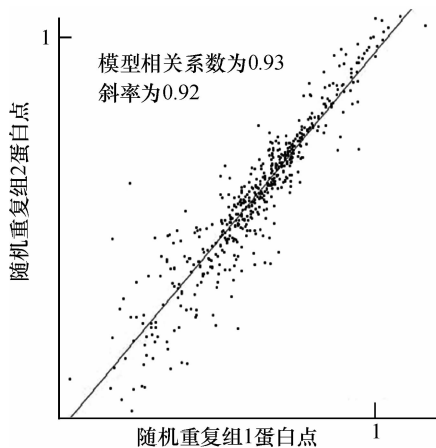


图4 双向图谱蛋白点线性回归分析

Fig. 4 Linear regression analysis of protein spots

3 讨论与结论

TCA/丙酮法是目前植物组织最常用的蛋白质组提取方法^[10-11],在沉淀蛋白的同时,PVPP可有效吸附植物组织中的酚类等干扰物质^[8,12]。Tris的引入可有效提高碱性范围内蛋白的溶解度,但引入离子成分后会影 响第一向结果,应在等电聚焦前将Tris浓度稀释至小于5 mmol/L。非线性pH梯度胶条等电点两端密集中间稀疏,植物蛋白质的等电点大多偏酸性。因此本试验采用GE公司非线性pH梯度胶条(pH 3~10),以获得更好的蛋白质分离效果。按照胶条说明书,针对此型号胶条的蛋白上样量最高为500 μg,增加上样量有利于低丰度蛋白的检测,但上样量

过高会使IPG胶条对蛋白过吸附,造成IPG胶条分辨能力下降,高丰度蛋白影响其他蛋白点的分析和拖尾现象加重等情况出现;而较低上样量虽然有利于双向图谱分析,但有可能出现低丰度蛋白检测不到的情况。聚焦时间直接影响双向电泳图谱质量,是试验成败的关键因素,经过摸索,发现8 000 V等电聚焦30 000 Vh可达到良好的蛋白点分离效果,若一味增加聚焦时间则可能有过聚焦现象出现。双向电泳试验必须保证较高重复性,以保证结果分析的准确性。

参考文献:

- [1] 姚文华,韩学莉,汪燕芬,等.我国甜玉米育种研究现状与发展对策[J].中国农业科技导报,2011,13(2):1-8.
- [2] 潘艺,张禄祥,万忠,等.2009年广东甜玉米产业发展现状分析[J].广东农业科学,2010,37(3):236-238.
- [3] 潘艺,万忠,尹艳,等.2010年广东甜玉米产业发展现状分析[J].广东农业科学,2011,38(3):16-17.
- [4] 阮松林,马华升,王世恒,等.植物蛋白质组学研究进展:II:蛋白质组技术在植物生物学研究中的应用[J].遗传,2006,28(12):1633-1648.
- [5] GOTTLIEB L D, DE VIENNE D. Assessment of pleiotropic effects of a gene substitution in pea by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Genetics, 1988, 119(3):705-710.
- [6] DAMERVAL C, LE GUILLOUX M. Characterization of novel proteins affected by the O₂ mutation and expressed during maize endosperm development[J]. Mol Gen Genet, 1998, 257(3):354-361.
- [7] WILKINS M R, SANCHEZ J C, WILLIAMS K L. Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects[J]. Electrophoresis, 1996, 17(5):830-838.
- [8] 何瑞锋,丁毅,张剑锋,等.植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化III[J].遗传,2000,22(5):319-321.
- [9] 李冠军,付凤玲.玉米叶片总蛋白提取和双向电泳技术的改进[J].玉米科学,2006,14(6):100-103.
- [10] GRANIER F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1988, 9(11):712-718.
- [11] KATHRYN S L, AZAM R, PAUL D. Two-dimensional gel electrophoresis: Recent advances in sample preparation, detection and quantitation[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 6(1):46-50.
- [12] CÁNOVAS F M, GAUDOT E D, RECORBET G, et al. Plant proteome analysis[J]. Proteomics, 2004, 4(2):285-298.