

叶景秀. 小麦籽粒蛋白质双向电泳体系的优化[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 957-961.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.002

小麦籽粒蛋白质双向电泳体系的优化

叶景秀

(青海省农林科学院, 青海 西宁 810016)

摘要: 为建立一套适合于小麦籽粒蛋白质双向电泳的技术体系,以青海省农林科学院自育春小麦品种青春38籽粒为材料,对比了2种在植物组织中常用的蛋白质提取方法,对双向电泳过程中胶条pH值、蛋白质上样量和分离胶浓度等方面进行了优化。结果表明:与用酚提取法相比采用TCA/丙酮沉淀法提取的蛋白质所得的双向电泳图谱质量较好,蛋白质经裂解后在17 cm、pH 5~8的IPG胶条、上样量380 μ g和分离胶浓度12%的条件下得到了清晰、蛋白质点丰富的双向电泳图谱。

关键词: 小麦; 籽粒蛋白质; 双向电泳

中图分类号: S512.1⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)05-0957-05

Optimization of two-dimensional electrophoresis system for grain protein in spring wheat

YE Jing-xiu

(Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Xining 810016, China)

Abstract: To develop a system for two-dimensional electrophoresis(2-DE) of grain protein extracted from spring wheat, two protein extraction methods commonly used for plant tissues were compared. The pH range, the loading quantity of sample and the gel concentrations were optimized in the 2-DE system for the grains from Qingchun 38. The samples prepared by TCA/acetone precipitation yielded better quality 2-DE map than by phenol extraction method. The condition of 17-cm IPG with pH 5-8, 380 μ g loading quantity of protein and 12% SDS-PAGE gel gave rich protein spots in the 2-DE map.

Key words: wheat; grain protein; two-dimensional electrophoresis

小麦籽粒灌浆对产量及品质至关重要。前人的工作主要集中在生理生化水平的研究上,例如分析不同因素对灌浆特性的影响^[1-3],淀粉的积累规律^[4],各种酶的变化规律等^[5]。然而,籽粒的灌浆是一个复杂的生理生化过程,仅从生理生化水平无法深层次地揭示其机制。

目前,随着植物蛋白质组学研究技术的日渐成熟,植物蛋白质数据库的不断更新,蛋白质组学技术在水稻^[6]、小麦^[7]、拟南芥^[8]、大豆^[9]、烟草^[10]等作物中的研究报道日益增多。以植物蛋白质的提取、双向电泳分离、质谱鉴定等先进技术相结合,应用于小麦蛋白质组学的研究主要集中于小麦的根、叶片、花药、花粉等组织器官蛋白质的双向电泳分析及相关蛋白质功能的初步鉴定,然而,由于受籽粒中多糖等物质的影响,较难提取籽粒总蛋白质,影响了蛋白质组学技术在籽粒中的应用。在前人已发表的关于籽粒蛋白质组学研究的文献中,对不同作物所采取的蛋白质提取方法各不相同。王慧娜等^[11]在不同

收稿日期:2015-06-16

基金项目:青海省农林科学院创新基金重大专项项目(2014-NKY-203);青海省(应用)基础研究计划项目(2013-Z-721)

作者简介:叶景秀(1979-),女,山东临沂人,硕士,助理研究员,现主要从事蛋白质组学和小麦育种方面的研究工作。(E-mail)sdyejingxiu@163.com

方法提取的小麦籽粒蛋白质双向电泳凝胶分离效果的分析比较一文中只介绍了提取方法对双向电泳分离效果的影响,而影响双向电泳效果的因素不仅仅是蛋白质样品的制备还包括蛋白质上样量、分离胶浓度、合适的胶条 pH 值等。因此,本研究对 2 种常用的植物组织蛋白质提取方法进行比较,并对双向电泳过程中胶条 pH 值、蛋白质上样量和分离胶浓度等方面进行优化,以期探索出一套适合于小麦籽粒蛋白质双向电泳的技术体系,为今后开展小麦籽粒蛋白质组学研究提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

小麦青春 38 为青海省农林科学院自育品种,2013 年种植于青海省农林科学院试验地,按常规技术栽培管理,乳熟期和蜡熟期分别取穗中部籽粒,以液氮速冻,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 仪器和试剂

PROTEAN IEF Cell 等电聚焦系统、PROTEAN II xi Cell 垂直电泳系统、PDQuest 8.0.1 凝胶图像分析软件均为美国 Bio-Rad 公司产品,UMAX PowerLook 2100XL 光密度扫描仪为台湾力捷公司产品,pH 4~7 和 pH 5~8 线性 IPG 胶条、两性电解质等为 Bio-Rad 公司产品,苯甲基磺酰氟(PMSF)、 β -巯基乙醇(β -ME)、二甲氨基丙磺酸(Chaps)、丙烯酰胺(Acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(Bis-acrylamide)、四甲基乙二胺(TEMED)、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸铵、碘乙酰胺、尿素为 Sigma 和 Thermo 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 籽粒总蛋白质的提取 TCA(三氯乙酸)/丙酮沉淀法:小麦籽粒加液氮研磨成粉末,参照陈蕊红等^[12]的 TCA 丙酮法提取总蛋白质,略有改动。用 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷蛋白质提取液(8% TCA,0.07% β -ME,1 mmol/L PMSF)沉淀蛋白质,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜,期间振荡多次,4 $^{\circ}\text{C}$,14 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀用预冷丙酮溶液(含 0.07% β -ME、1 mmol/L PMSF)洗涤, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 30 min,重复 4~5 次,直至蛋白质沉淀物为纯白色,将沉淀真空冷冻成干粉, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。酚提取法:小麦籽粒加液氮研磨成细粉,转移至离心管加适量提取液(0.1 mol/L Tris-

HCl,pH8.0,1% DTT,0.9 mol/L 蔗糖,1 mmol/L PMSF),搅匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 g 离心 20 min,在上清液中加入等体积的 Tris 饱和酚(pH 8.0),充分振荡混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 000 g,5 min),收集酚相,加入 3 倍体积预冷的甲醇溶液(含 0.1 mol/L 醋酸铵),混匀后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,4 $^{\circ}\text{C}$ 、18 000 g 离心 30 min,弃上清收集沉淀,沉淀用 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮溶液(含 0.1% DTT)洗涤,离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、18 000 g,30 min),重复洗涤过程 2~3 次,直至蛋白质沉淀物为纯白色,将沉淀真空冷冻成干粉, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3.2 蛋白质的裂解与定量 将蛋白质干粉溶解于水化液(8 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% Chaps,65 mmol/L DTT,0.5% 载体两性电解质),32 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,振荡充分混匀后用液氮冷却,此过程重复 2 次,于 20 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 000 r/min 离心 15 min,吸取上清备用。蛋白质浓度测定参考考马斯亮蓝 Bradford 法。

1.3.3 蛋白质双向电泳(2D-PAGE) 主要按 IPG-phor 等电聚焦系统指南进行。取适量蛋白质样品与水化液(加入痕量 0.001% 溴酚蓝)充分混合至 380 μl ,沿 PROTEIN IEF Cell 型电泳仪(BIO-RAD)聚焦槽内连续加入,将 17 cm IPG 胶条胶面朝下覆盖在样品上,被动吸收 1 h 后,加 3 ml 矿物油覆盖胶条,置于 IPG 等电聚焦仪的电极板上,在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下主动水化 15 h 使胶条充分吸胀,吸收样品,然后以每根 50 μA 的极限电流按表 1 程序进行第 1 向等电聚焦电泳。等电聚焦结束后,胶条分别在平衡缓冲液 I(6 mol/L 尿素,2% SDS,0.375 mol/L Tris-HCl,20% 甘油,使用时加 2% DTT)和平衡缓冲液 II(6 mol/L 尿素,2% SDS,0.375 mol/L Tris-HCl,20% 甘油,使用时加 2.5% 碘乙酰胺)中平衡 15 min。第 2 向 SDS-PAGE 用 12% 和 13% 分离胶。凝胶染色采用硝酸银染色法,其过程依次是:超纯水洗 2 次,每次 2 min,固定液[10% 冰乙酸(体积比)+40% 无水乙醇(体积比)]固定 2.5 h,超纯水快速冲洗 2 次,敏化液[30% 甲醇(体积比)+0.2% 硫代硫酸钠(质量体积比)+6.8% 乙酸钠(质量体积比)]中 30 min,超纯水水洗 3 次,每次 5 min,硝酸银[0.25% 硝酸银(质量体积比)]染色 20 min,快速漂洗 2 次,显影液[2.5% 无水碳酸钠(质量体积比)+0.04% 甲醛(质量体积比)]显影后加终止液[10% 冰醋酸(体积比)]终止反应。

表 1 等电聚焦电泳程序

Table 1 Procedures of isoelectric focusing electrophoresis

程序	电压(V)	升压方式	时间(h)
第 1 步	250	线性	1.5
第 2 步	500	线性	1.0
第 3 步	1 000	快速	1.0
第 4 步	8 000	线性	4.0
第 5 步	8 000	快速	
第 6 步	500	快速	任意

1.3.4 图谱扫描与分析 用 UMAX PowerLook 2100XL 型光密度扫描仪透射扫描染色后的双向电泳凝胶获取图像,分辨率设为 600 dpi,在 PDQuest 2DE 8.0.1 分析软件(美国 Bio-Rad 公司)的辅助下,定义蛋白质点的大小、强弱,检测和统计蛋白质点数目。

1.3.5 统计分析 用 Microsoft Office Excel 2010 对 3 次重复的 2-DE 图谱上蛋白质点数目进行统计分析。

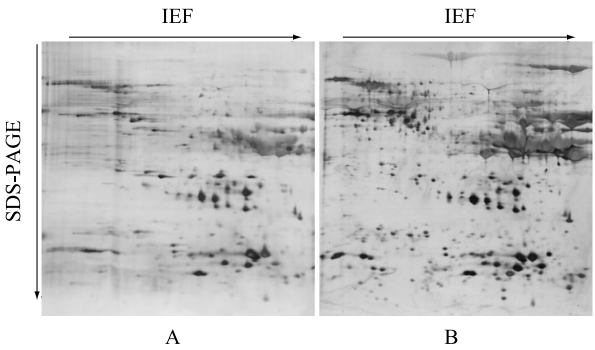
2 结果

2.1 不同提取方法对蛋白质双向电泳图谱质量的影响

分别用 TCA 丙酮沉淀法和酚提取法提取小麦籽粒总蛋白质,用蛋白质裂解液裂解蛋白质,用考马斯亮蓝 Bradford 法进行蛋白质定量,以 17 cm、pH5~8 IPG 胶条进行双向电泳分离,硝酸银染色。结果(图 1)显示,用酚提取法提取的蛋白质双向电泳图谱酸性端蛋白质点较模糊,分辨率低,横竖纹干扰严重,碱性端效果稍好,但是检测到的蛋白质点数目偏少;而 TCA 丙酮沉淀法提取的蛋白质双向电泳凝胶图谱蛋白质点分布均匀,蛋白质点清晰且更丰富,凝胶背景干净,横竖条纹干扰少。用 PDQuest 软件统计分析结果显示,在相同的参数条件下,酚提取法可分辨出约 260 个蛋白质点,TCA 丙酮沉淀法则可检测到约 490 个清晰的蛋白质点,比酚提取法多 230 个蛋白质点。说明采用 TCA 丙酮沉淀法提取的小麦籽粒蛋白质双向电泳分离效果较好。

2.2 不同 pH 值 IPG 胶条对双向电泳图谱的影响

用等电点 pH 值 4~7 的 IPG 胶条进行的籽粒蛋白质电泳分离结果表明,蛋白质大多集中在碱性端,pH 4~5 范围内蛋白质点很少;等电点 pH 5~8

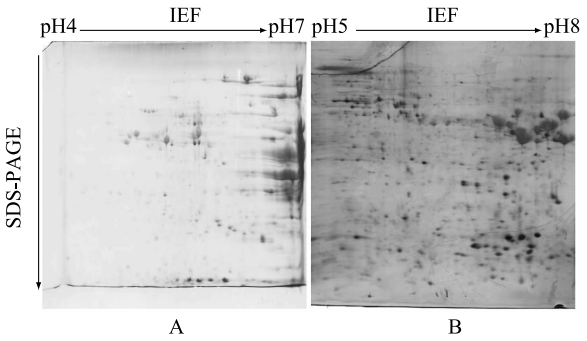


A:酚提取法;B:TCA 丙酮沉淀法。

图 1 不同方法提取的蛋白质双向电泳图谱比较

Fig. 1 Comparison of 2-DE maps of proteins extracted by two methods

IPG 胶条的电泳分离结果表明:蛋白质点分布较均匀,能更好地满足研究分析的需求(图 2)。



A:等电点 pH4~7 的 IPG 胶条;B:等电点 pH5~8 的 IPG 胶条。

图 2 不同 pH 值 IPG 胶条的双向电泳图谱比较

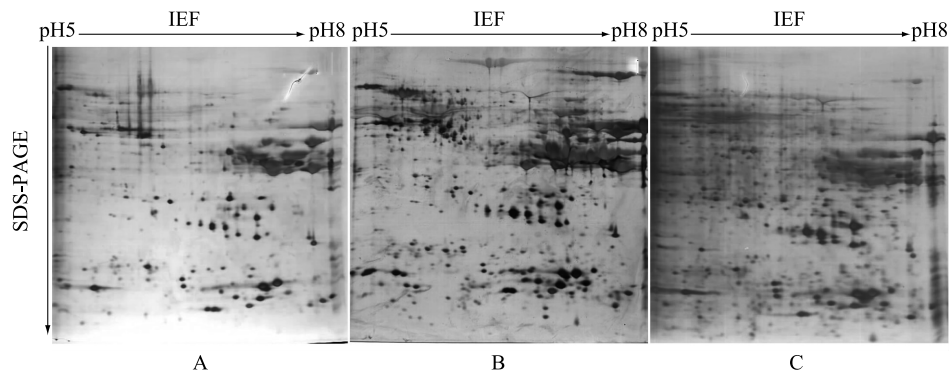
Fig. 2 2-DE maps of protein in the systems with different pH ranges of IPG

2.3 上样量及 SDS-PAGE 胶浓度对双向电泳图谱的影响

为了更好地分离蛋白质,进一步比较分析了双向电泳中不同蛋白质上样量和 SDS-PAGE 胶浓度。选用 17 cm、pH 5~8 IPG 胶条,分别取 300 μg、380 μg 和 450 μg 蛋白质样品进行双向电泳,结果见图 3。在上样量为 300 μg 时,双向电泳图谱上蛋白质点模糊不清,低丰度蛋白质因不能被检测而丢失,影响了双向电泳的准确性和重复性,经软件分析检出 304 个蛋白质点;在上样量为 450 μg 时,蛋白质点数目多,但高丰度蛋白质点过大,出现饱和和重叠现象,掩盖了其他蛋白质点,而且图谱上横条纹比较明显,

影响了蛋白质点的分离与分析,经软件分析检出 570 个蛋白质点;上样量为 380 μg 时,蛋白质点清

晰,无横条纹干扰,聚焦效果好,图谱质量最佳,经软件分析检出 516 个蛋白质点。

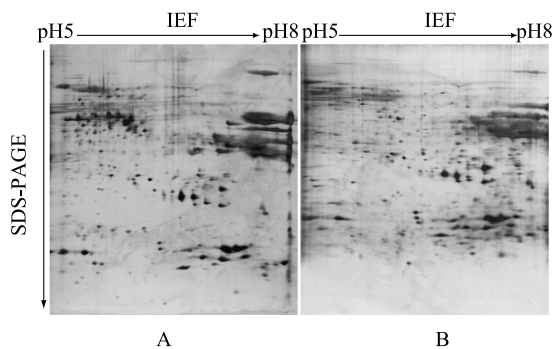


A: 上样量 300 μg ; B: 上样量 380 μg ; C: 上样量 450 μg 。

图 3 不同蛋白质上样量的双向电泳图谱比较

Fig. 3 2-DE maps of different loading quantities of proteins

在选用 17 cm pH5 ~ 8 胶条、上样量 380 μg 的基础上,分别以 12% 和 13% 的 SDS-PAGE 胶浓度对小麦籽粒蛋白质进行电泳分析。分离胶浓度为 13% 时,高分子量蛋白质分离不充分,蛋白质挤压叠加,遮盖了某些蛋白质点在图谱上的表达,从而降低了分辨率;分离胶浓度为 12% 时,蛋白质分离较好,蛋白质点清晰圆润,获得较好的分离图谱(图 4)。



A: 12% 分离胶; B: 13% 分离胶。

图 4 不同分离胶浓度的双向电泳图谱比较

Fig. 4 2-DE maps of protein in the systems with different gel concentrations

2.4 双向电泳图谱的重复性分析

蛋白质双向电泳图谱的重复性,是后续蛋白质组学分析结果可靠性的基本保障。为分析本研究建立的小麦籽粒蛋白质双向电泳体系的重复性,在上述优化条件的基础上,采用严格一致的操作程序,并

精确控制电泳温度与电流电压,进行了 3 次双向电泳重复试验。经软件分析发现,3 张图谱分别检测到 490、512、531 个蛋白质点。选取其中 1 张凝胶图谱作为参考胶,其余图谱与其进行蛋白质点匹配分析,平均匹配率达到 96%。蛋白质点位置在 IPG-IEF 方向偏移为 (1.79 ± 0.36) mm,在 SDS-PAGE 方向偏移为 (1.65 ± 0.41) mm。说明所建立的双向电泳体系重复性和稳定性均较高。

3 讨论

蛋白质组学是后基因组时代生命科学研究的一个重要领域,蛋白质组学研究的重要性使其相关技术得到突飞猛进的发展^[13]。其中,双向电泳作为分离分析蛋白质的重要手段,在蛋白质组研究中发挥着关键作用。因此,对双向电泳条件进行优化显得尤为重要。

样品制备是双向电泳的第一步,采用不同方法提取的蛋白质电泳效果不同。增广娟等^[14]比较了苹果叶片蛋白质的不同提取方法,结果表明改良的 Tris-HCl 提取法的蛋白质点最多,双向电泳效果最好。陈蕊红等^[12]比较分析了不同小麦花药蛋白质提取方法,发现 TCA 丙酮法提取效果较好。石海波等^[15]对玉米籽粒蛋白质不同提取方法的研究结果表明,可溶性蛋白质提取法获得的蛋白质纯度高、浓度适中、双向电泳蛋白质点最丰富,最适合双向电泳研究。李奇松等^[16]对比了 3 种不同的蛋白质提取

方法,结果表明可溶性蛋白质提取法最适用于籽粒蛋白质组学的研究。本试验对比分析了用途较为广泛的 TCA 丙酮沉淀法和酚提取法,结果表明 TCA 丙酮沉淀法比较适用于双向电泳图谱分析,这与王慧娜等^[11]的研究结果有分歧,推测可能与提取过程中所用的试剂配方不同有关。

双向电泳体系中电泳条件包括胶条 pH 值、上样量和 SDS-PAGE 分离胶浓度等方面^[17]。理想的 IPG 胶条,既要覆盖样品中全部蛋白质的等电点,又不能因等电点相对集中导致大量蛋白质点聚集在一起。本研究根据前期对小麦叶片蛋白质双向电泳分离试验的经验,首先采用了等电点 pH 值 4~7 的 IPG 胶条对小麦籽粒蛋白质进行分离,发现大部分蛋白质集中在碱性端,蛋白质点之间紧密相连,甚至重叠在一起,模糊且不易区分,改用等电点 pH 5~8 的 IPG 胶条后,籽粒蛋白质分辨率显著提高,分离效果较好,检测到的蛋白质点数多。

合适的上样量和分离胶浓度在双向电泳中是非常重要的。过大的上样量和分离胶浓度,容易导致蛋白质大量聚集,遮盖部分蛋白质点的表达,无法反映蛋白质组的全部信息;上样量和分离胶浓度过低会导致一些低分子量和低丰度蛋白质超出凝胶所容纳的范围,不能在双向电泳图谱上显现。上样量的多少与 IPG 胶条的长度、pH 值和蛋白质染色方法密切相关。本研究在选用长度 17 cm、pH 5~8 IPG 胶条,采用硝酸银染色的基础上借鉴以往的操作经验,比较了不同上样量(300 μg 、380 μg 、450 μg)的双向电泳效果,结果表明蛋白质点数量随上样量的增加而增多,但是当上样量增加到 450 μg 时,蛋白质点数量比上样量 380 μg 时略有增多,但是蛋白质点之间出现了互相重叠,相互干扰现象,表明 380 μg 的上样量较佳。在此基础上比较了分离胶浓度 12% 和 13% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱,发现 12% 的分离胶浓度能够更有效地分离小麦籽粒蛋白质。3 次重复试验结果表明,本研究建立的双向电泳体系重复性较好。

综上所述,应用本研究建立的双向电泳体系,能够获得重复性好、蛋白质点清晰、数量丰富的双向电泳图谱,该体系适合于小麦籽粒全蛋白质的双向电泳分析。

参考文献:

[1] 郭明明,赵广才,郭文善,等.播期对不同筋力型小麦旗叶光

合及籽粒灌浆特性的影响[J].麦类作物学报,2015,35(2):192-197.

[2] 吴晓丽,汤永禄,李朝苏,等.不同生育时期渍水对冬小麦旗叶叶绿素荧光及籽粒灌浆特性的影响[J].中国生态农业学报,2015,23(3):309-318.

[3] 刘希伟,张敏,姚凤娟,等.花后不同强度遮光对糯小麦和非糯小麦干物质积累和产量的影响[J].麦类作物学报,2015,35(4):521-527.

[4] 石培春,李英枫,韩璐,等.不同品质类型小麦籽粒淀粉含量积累的动态差异[J].石河子大学学报:自然科学版,2012,4(30):417-421.

[5] TISCHNER R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants[J]. Plant Cell and Environment, 2002,23:1015-1024.

[6] LIU C W, CHANG T S, HSU Y K, et al. Comparative proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in roots and leaves of rice[J]. Proteomics, 2014,14:1759-1775.

[7] PENG Z Y, WANG M C, LI F, et al. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat[J]. Molecular Cellular Proteomics, 2009,8(12):2676-2686.

[8] GALLARDO K, JOB C, GROOT S P C, et al. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination: a comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds[J]. Plant Physiology, 2002,129:823-837.

[9] HOUSTON N L, HAJDUCH M, THELEN J J. Quantitative proteomics of seed filling in castor: comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and nonphotosynthetic seed metabolism[J]. Plant Physiol, 2009,151:857-868.

[10] ROCCO M, CORRADO G, ARENAC S, et al. The expression of tomato prosystemin gene in tobacco plants highly affects host proteomic repertoire[J]. Journal Proteomics, 2008,71:176-185.

[11] 王慧娜,高建华,张淑英,等.不同方法提取的小麦籽粒蛋白双向电泳凝胶分离效果的分析比较[J].分子植物育种,2014,12(4):788-795.

[12] 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.

[13] 水燕,管政兵,赵朝阳,等.克氏原螯虾卵巢发育 IV 期与 IV 期的比较蛋白质组学研究[J].江苏农业科学,2013,41(3):179-183.

[14] 增广娟,李春敏,张新忠,等.适于双向电泳分析的苹果叶片蛋白质提取方法[J].色谱,2009,27(4):484-488.

[15] 石海波,王云生,冯勇,等.玉米籽粒蛋白质双向电泳技术体系的优化[J].华北农学报,2015,30(1):171-176.

[16] 李奇松,陈军,林世圣,等.水稻籽粒蛋白双向电泳条件的优化及其蛋白质组学方法的比较[J].作物学报,2012,38(5):921-927.

[17] 王娜,谢惠民,王川.冬小麦叶片抗旱蛋白质组双向电泳技术体系的优化[J].麦类作物学报,2011,31(3):443-449.

(责任编辑:张震林)