

文章编号:1674-7054(2010)01-0012-05

红树叶蛋白质样品制备方法的比较 及其双向电泳分析

彭存智¹, 李 蕾², 刘志昕¹

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 农业部转基因植物及植物用微生物环境安全监督检验测试中心, 海南海口 571101; 2. 海南师范大学 生命科学学院, 海南海口 571101)

摘 要: 采用水溶液提取法(磷酸盐缓冲液系统)、三氯乙酸-丙酮沉淀法和 Phenol 改良提取法, 对红树叶进行蛋白质提取, 并比较分析了这 3 种方法的蛋白质提取率、完整性、溶解性等。结果表明: 水溶液提取法得到的是胶状沉淀, 基本为多糖类物质, 蛋白质含量很低; 三氯乙酸-丙酮沉淀法提取的蛋白质纯度较高, 但双向电泳背景最低, 提取率较低, 蛋白质的完整性差; Phenol 改良提取法的蛋白质提取率高, 约为三氯乙酸-丙酮法的 10 倍, 双向电泳凝胶背景比三氯乙酸-丙酮沉淀法要深, 蛋白质的完整性好, 能够被电泳分离的蛋白质点是三氯乙酸-丙酮沉淀法的 7 倍左右。Phenol 改良提取法在蛋白质的提取率以及完整性方面远远高于其他 2 种蛋白质提取方法。

关键词: 红树; 蛋白质提取; 双向电泳

中图分类号: Q 816 **文献标志码:** A

红树(*Rhizophora apiculata* Bl.) 是热带特有的一种红树林植物, 主要生长在海湾和海水可渗入的河口或泻湖中, 能够在海水环境中正常生长, 具有极强的耐盐性。为适应海水环境, 红树叶片中含有大量的多糖类物质, 这些物质作为渗透胁迫保护剂, 可以使植物细胞和外界维持正常的渗透压平衡, 减轻离子毒害作用, 还可利用其亲水性作用于各蛋白复合体或膜表面起到保护效果^[1]。但是多糖类物质可溶于水, 在蛋白质沉淀过程中很容易与蛋白质共沉淀。大量多糖类物质的存在, 即使用丙酮等有机溶剂萃取也无法有效地完全除去。多糖类物质的存在严重影响了蛋白质的提取率和完整性, 以及样品中蛋白质的溶解, 并且使蛋白质样品溶液很粘稠, 直接影响了蛋白质样品的上样量和电泳的质量, 难以得到好的电泳结果。双向电泳技术对蛋白质分离具有高分辨率, 一直是生物化学, 尤其是蛋白质组研究中最重要的一项基本技术之一。但双向电泳技术同时对蛋白质样品的要求也很高, 蛋白质样品的纯度以及完整性直接关系到双向电泳结果的准确性和重复性。笔者以红树叶为实验材料, 通过 3 种提取植物蛋白质常用方法(水溶液提取法、三氯乙酸-丙酮沉淀法和 Phenol 改良提取法) 在蛋白质提取率、完整性、溶解性等方面进行了比较分析, 最终建立了红树这类植物提取高质量蛋白质样品的方法。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料 从河口挖掘生长正常的红树幼苗, 种植在装有松软沙土的水桶中, 每 2~3 d 换 1 次淡水, 每 15 d 补充 1 次液肥, 每天接受光照 12~16 h。培养 2~3 个月后, 采集一部分嫩叶作为对照提取蛋白, 采集的部位是嫩梢的第 2 片叶。幼苗用 500 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液处理, 处理 12 d 后同样采集嫩梢的第 2 片叶作为盐处理的材料提取蛋白。

收稿日期: 2009-06-18

基金项目: 中国热带农业科学院中央公益性科研院所基本科研业务费专项资助(ITBBZX083)

作者简介: 彭存智(1972-), 男, 贵州贵阳人, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所副研究员。

通信作者: 刘志昕(1963-), 男, 吉林延吉人, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所研究员。

1.1.2 主要化学试剂和仪器设备 主要化学试剂均购自 Amersham Biosciences 公司,双向电泳设备是 Amersham Biosciences 公司的 Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System 和 Ettan DALT twelve Large Format Vertical System。

1.2 红树叶全蛋白的提取

1.2.1 水溶液提取法(磷酸盐缓冲液系统) 取叶片 1 g,加入 0.1 g PVPP 于液氮中研磨成均匀的粉末,移入 10 mL 离心管中,加入 5 mL 磷酸盐提取缓冲液,放置冰上用玻璃棒充分搅拌 5 min。4 ℃,15 000 g 离心 30 min,上清液转入新的 50 mL 离心管中,4 ℃暂时保存。剩下的沉淀中加入 5 mL 磷酸盐提取缓冲液重悬,超声波处理重悬物 6 次,离心 30 min,取上清液。2 次上清液合并,加入合并后的上清液的 4~5 倍体积的冷丙酮,混匀,-20 ℃放置 3 h 以上并过夜。同上操作离心,弃上清,沉淀用 $\varphi = 80\%$ 的冷丙酮洗 2 次,离心 10 min,沉淀真空干燥,-20 ℃冰箱保存。

1.2.2 三氯乙酸-丙酮沉淀法^[2] 取叶片 500 mg,加入 50 mg PVPP 于液氮中研磨成均匀的粉末,加入 8 mL $\rho = 10\%$ 三氯乙酸(丙酮配制,含 $\varphi = 0.07\%$ 2-ME),-20 ℃沉淀 1 h,4 ℃,15 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,沉淀重悬于 3 mL 冷丙酮中(含 $\varphi = 0.07\%$ 2-ME),-20 ℃放置 2 h(每隔一段时间震荡 1 次),离心,重复上一步骤 2 次,离心,沉淀重悬于 $\varphi = 80\%$ 丙酮中,-20 ℃放置 1 h,离心并除去丙酮,真空干燥,-20 ℃冰箱保存。

1.2.3 Phenol 改良提取法 此方法来自 Hurkman W J 的酚提取法^[3],并经过一定改良和优化。取叶片 500 mg,加入 50 mg PVPP 于液氮中研磨成均匀的粉末。加入 2 mL 蛋白质提取缓冲液(0.7 mol·L⁻¹ Sucrose,0.5 mol·L⁻¹ Tris,30 mmol·L⁻¹ HCl,50 mmol·L⁻¹ EDTA,0.1 mol·L⁻¹ KCl, $\varphi = 1\%$ PVP,50 mmol·L⁻¹ Ascorbic acid),充分混匀。加入 2 mL 的水饱和酚,室温震荡混合 10 min,4 ℃,8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,回收酚相,转入新的离心管中,加入 2 mL 蛋白质提取缓冲液混匀,4 ℃,8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,回收酚相,转入新的离心管中,此步骤可重复 1~2 次。在酚相中加入 5 倍酚相体积的甲醇(含有 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵),于 -20 ℃沉淀 4 h 以上并过夜。用甲醇溶液洗涤沉淀 1 次,再依次用预冷的甲醇洗涤 2 次,用预冷的 $\varphi = 80\%$ 丙酮洗涤 1 次。真空干燥,-20 ℃冰箱保存。

1.3 蛋白质样品浓度测定 采用 Bradford 方法^[4]进行蛋白质样品浓度的测定。

1.4 红树叶蛋白质的双向电泳 采用 Amersham Biosciences 公司的 18 cm pH 3~10 IPG 胶条进行双向电泳实验。具体操作方法根据 Amersham Biosciences 公司双向电泳操作手册进行^[5]。设置每条胶条的极限电流为 50~70 μ A,等电聚焦时的温度为 17 ℃。

1.5 考马斯亮蓝染色 根据 Giovanni C 的方法进行^[6]。染好的胶片立即扫描并保存图片,凝胶在 $\varphi = 4\sim 7\%$ 冰醋酸溶液中可保存 1~2 个月。

1.6 2-D 凝胶图像分析 使用图像扫描仪扫描染色结束的 2-D 凝胶,运用 2-D 凝胶图像分析软件 IMAGE MASTER 2-D PLATINUM 对凝胶去除纹理和背景,并进行分析,包括 2-D 凝胶图像的数字化的蛋白质点的大小、强弱、有无、数量、等电点和分子质量等方面的分析。

2 结果与分析

2.1 红树叶蛋白质的提取 用水溶液提取法(磷酸盐缓冲液系统)提取红树叶蛋白质得到的沉淀中有大量黄褐色半透明的胶状物,这些胶状物基本是红树叶中大量存在的多糖类物质,这说明大量的多糖类物质在蛋白质沉淀的过程中共同沉淀下来。采用三氯乙酸-丙酮法获得的是灰白色沉淀,每 500 mg 叶片材料可得 80~100 μ g 蛋白质沉淀,加入 100 μ L 蛋白质样品溶解液基本能够完全溶解,得到无色透明的溶液。实验结果表明,三氯乙酸-丙酮法可以有效地除去胶状的多糖类物质,也没有色素的沉淀。采用 Phenol 改良提取法得到的是浅黄色到白色的蛋白质沉淀,每 500 mg 叶片材料可得 800~1 000 μ g 蛋白质沉淀,约为三氯乙酸-丙酮法的 10 倍。加入 400 μ L 蛋白质样品缓冲液,经过超声波处理并在 4 ℃静置过夜后,蛋白质沉淀基本能够溶解,最后得到浅黄色的半透明蛋白质溶液。实验结果表明,Phenol 改良提取法提取红树叶蛋白质的获得率较高,同时由于多糖类物质难溶于苯酚中,基本杜绝了这类物质与蛋白质的共同沉淀。但是,在样品中仍然含有少量的色素物质。

2.2 红树叶片蛋白质的 PAGE 凝胶电泳 通过水溶液提取法提取的红树叶片蛋白质沉淀, 经过 PAGE 凝胶电泳后未能观察到蛋白质条带, 说明红树叶片中的多糖类物质严重干扰了蛋白质的有效沉淀, 导致沉淀中实际上没有蛋白质存在或太少而不能通过 PAGE 凝胶电泳观察到, 因此, 该方法完全不适合用于红树等富含多糖类物质的植物蛋白质的提取。通过三氯乙酸-丙酮法提取的红树叶片蛋白质, 经过 PAGE 凝胶电泳后仅观察到少量的蛋白质条带, 数量在 10~15 条之间, 且同样条件下大部分条带染色较浅, 说明蛋白质的沉淀仍然明显受到红树叶片中多糖类物质干扰, 因此, 也不符合 2-D 凝胶电泳的要求。采用 Phenol 改良提取法提取的红树叶片蛋白质, 经过 PAGE 凝胶电泳后可以观察到大量的蛋白质条带, 带形纤细、清晰, 条带分离效果好(见图 1), 未见明显的蛋白质降解现象, 完全符合 2-D 凝胶电泳的初步要求。

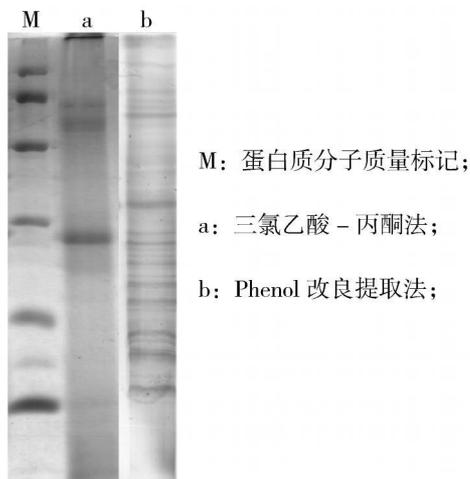


图 1 红树叶片蛋白质的 PAGE 凝胶电泳图

2.3 红树叶片蛋白质的 2-D 凝胶电泳 由于水溶液提取法在 PAGE 凝胶电泳中未能观察到有效的蛋白质条带, 因此, 该样品

未作进一步的 2-D 凝胶电泳, 只采用三氯乙酸-丙酮法和 Phenol 改良提取法所提取的红树叶片蛋白质样品进行 2-D 凝胶电泳的比较分析。笔者按照 Amesham 2-D protocol 中介绍的方法^[5]进行操作, 将红树蛋白质样品水化上样。本实验使用的是 pH 3~10、18 cm 的 IPG 胶条, 第二向 $\varphi = 12.5\%$ 的 PAGE。每种样品的上样量均为 420 μg 。双向电泳结束后, 将 PAGE 凝胶剥下进行考马斯亮蓝染色, 染色结束的凝胶立刻放置在扫描仪中进行扫描, 获得相应的双向电泳图谱(见图 2)。通过直接对双向电泳图谱目测的初步观察可以看到, 蛋白质主要集中在等电点 5~8 和分子质量 28~66 KD 之间。三氯乙酸-丙酮法所提取红树叶片蛋白质的双向电泳图中(见图 2a), 其背景比较低, 蛋白质点较少, 蛋白质的分离情况不佳, 部分蛋白质点融合在一起, 未能完全分离开。Phenol 改良提取法所提取红树叶片蛋白质的双向电泳图中(见图 2b), 蛋白质点数量明显增多, 边沿清晰, 分离情况良好, 不过凝胶图谱有少量条纹存在。将图谱输入双向电泳分析软件 IMAGE MASTER 2-D PLATINUM 进行测定分析, 结果表明, 图 2a 中大约有 140 个蛋白点, 图 2b 中大约有 967 个蛋白点, 蛋白点的数量是图 2a 的 7 倍左右。由此说明, 三氯乙酸-丙酮法提取的红树叶片蛋白质虽然纯度较高, 酚类、多糖类等物质清除得比较干净, 但是蛋白质丢失的现象很严重。图 2b 中蛋白质点数量的明显增加说明 Phenol 改良提取法所提取的红树叶片蛋白质样品中总蛋白完整性好, 蛋白质丢失少。尽管仍然有微量的酚类、多糖类等物质残留, 并造成双向电泳图(图 2b)的背景要深一些, 且有少量条纹存在, 但这些少量的残留物对蛋白质的电泳、分离以及软件分析的准确性没有明显影响。

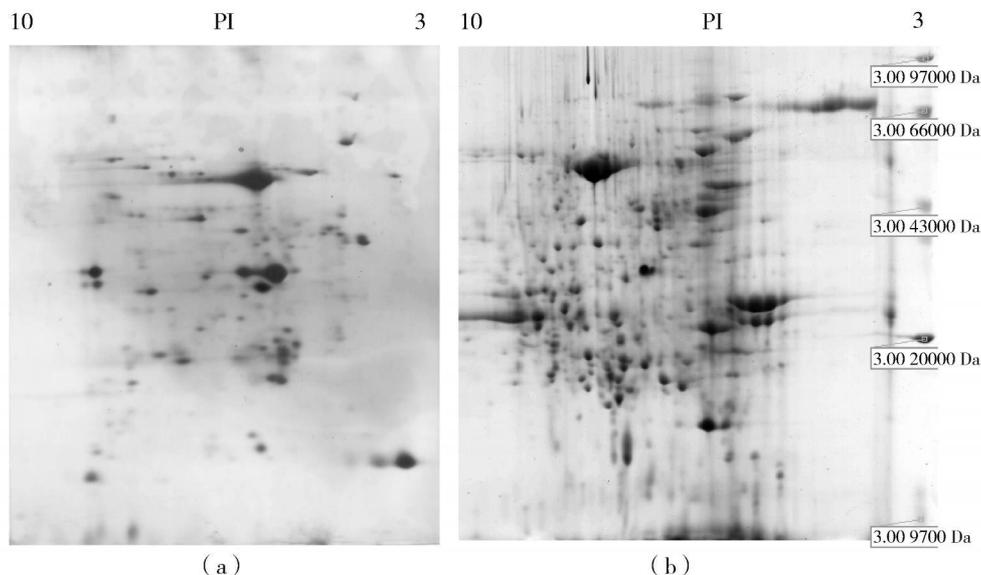


图 2 红树幼苗叶片的蛋白质双向电泳图
a: 三氯乙酸-丙酮法; b: Phenol 改良提取法

3 讨 论

红树作为生长在特殊环境中的植物,其细胞中含有大量特殊的次生代谢产物,如多糖类、多酚类物质,这些物质的含量远远超过了普通的植物,对蛋白质的提取有着严重的干扰作用。双向电泳技术对蛋白质分离的高分辨率也意味着对蛋白质样品的高质量要求,同时,总蛋白的完整性直接影响到双向电泳实验结果的完整性和可靠性,因此,优化适用红树叶蛋白质的提取方法,得到高质量、完整的蛋白质样品是本研究成功的关键因素之一。

笔者分别采用和比较了 3 种方法来制备红树双向电泳蛋白质样品,其中水溶液提取法(磷酸盐缓冲液系统)是提取植物蛋白质运用最广泛的传统方法,并进一步发展了许多缓冲液系统。这类蛋白质提取方法简单快捷,对大部分植物如禾本科植物等都有较好的提取效果,但对富含多糖等易溶于水物质的植物则效果很差,例如,在利用磷酸盐缓冲液系统提取红树叶蛋白质的实验中,蛋白质的提取率几乎为零,在蛋白质的电泳中无法得到可观测的蛋白质条带。

三氯乙酸-丙酮沉淀法是将三氯乙酸沉淀法和丙酮沉淀法相结合的蛋白质提取方法,此法比单独使用三氯乙酸沉淀法和丙酮沉淀法更有效,对导致蛋白酶的失活,进而减少蛋白质降解也非常有效,同时去除各种干扰化合物的效果很明显,能够获得背景清晰的图谱,是目前国际上最常用的蛋白质提取方法之一。但是,由于红树一类植物生理的特殊性,在组织中含有大量的多糖类物质,这些物质的量已经严重影响到三氯乙酸-丙酮沉淀法对蛋白质的有效沉淀。在本研究中,该方法提取的红树蛋白质虽然在去除多糖和色素类等干扰物质方面效果很好,蛋白质沉淀呈灰白色,并且在 PAGE 电泳和双向电泳的凝胶图像中背景很低,但是提取蛋白质的获得率较低,每 500 mg 叶片材料,只得到 80 ~ 100 μg 蛋白质沉淀。在 PAGE 电泳和双向电泳的凝胶图像中可见的蛋白质条带和点较少,说明蛋白质的丢失比较严重,不能满足实验分析和研究的正常需要。

酚提取法在实际运用时大部分都做了少量的改进,而且针对不同植物材料的蛋白质提取效率以及质量各有不同,长期以来人们对这种蛋白质提取方法的评价褒贬不一^[7-8]。总体来说,蛋白质的提取率都比较高,这与蛋白质提取液和酚对植物都同时有裂解和溶解的作用相关。由于多糖类物质不溶于酚相,不会影响到酚相中蛋白质的沉淀,在蛋白质沉淀中也基本不存在多糖类物质,因此,酚提取法对于去除如多糖类等难溶于酚相的干扰物质方面有特别好的效果。但是,多酚类以及盐类物质可部分溶于酚相,要完全清除这类干扰物也比较困难,这造成双向电泳的背景往往比较深,并存在一些竖条纹,严重的会影响蛋白质的分离和图谱分析。针对这些问题,笔者在提取方法上做了部分改良,使所提取蛋白质的质量明显提高,完全符合双向电泳的实验要求。本实验中,酚提取法主要从以下两方面进行改良,首先是在多酚类物质的清除方面进行改良。通过添加聚乙烯吡咯烷酮(PVP)用于去除提取液中的多酚,PVP 具有类似蛋白质的内酰胺结构,具有较强的生物相容性和极性,可以通过其内酰胺结构中的 N 原子和 O 原子与多酚形成氢键,从而吸附多酚,抑制多酚的氧化以及与蛋白质的结合^[9]。PVP 的适用量通常在 $\varphi = 1\% \sim 5\%$ 之间,添加过多会引起提取液过于粘稠,影响蛋白质的正常沉淀,添加不够又不足以起到应有的作用,因此,在研磨植物材料时,笔者同时添加了 1/10 具有类似功能的聚乙烯多聚吡咯烷酮(PVPP, PVP 的多聚物)粉末,由于不溶于水,不会引起提取液的粘稠。在 PVP 和 PVPP 的同时作用下,多酚类物质的氧化基本受到抑制。其次是增加了用等体积蛋白质提取缓冲液洗涤酚相溶液的步骤。这样可以达到稀释酚相溶液中盐和色素等杂质,进一步降低蛋白质沉淀中杂质含量的目的。洗涤的次数可以根据植物材料的实际情况而定。改良后的酚提取法在蛋白质的提取率以及完整性方面比未改良的酚提取法要优越许多,也远远高于上面所述的 2 种蛋白质提取方法,完全能满足双向电泳图谱分析的要求。但是,改良后的酚提取法仍然存在一些缺点,尤其是在色素,如叶绿素的清除方面不太理想,得到的蛋白质沉淀多为淡黄色。此外,在双向电泳凝胶图中仍然有少量的竖纹路,这说明蛋白质沉淀中盐的含量仍然偏高。针对以上缺点,笔者将对酚提取法做进一步改进,相关后续研究仍在继续中。

值得一提的是,由于调控蛋白大部分都是膜蛋白和双亲蛋白,在酚相中都有很好的溶解性,酚提取法对于这类调控蛋白有较高的提取率,这对蛋白质组学在调控方面的研究有很大的帮助。

参考文献:

- [1] BOHNERT H J, SHEN Bo. Transformation and compatible solutes[J]. *Scientia Horticulturae*, 1999, 78: 237 – 260.
- [2] DAMERVAL C, VIENNE D, ZIVY Z, *et al.* Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52 – 54.
- [3] HURKMAN W J, TANAKA C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Plant Physiology*, 1986, 81: 802 – 806.
- [4] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 – 254.
- [5] TOM B I, TIRRA S. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients Principles and methods[G]. Amersham Biosciences Corp, 1998: 27 – 72.
- [6] GIOVANNI C, MAURIZIO B, LUCA M, *et al.* A very sensitive colloidal Coomassie G – 250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1327 – 1333.
- [7] 刘康, 胡凤萍, 张天真. 棉花胚珠与纤维蛋白质的两种提取方法比较研究[J]. *棉花学报*, 2005, 17 (6): 323 – 327.
- [8] 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.
- [9] 黎新明, 崔英德. 交联 PVP 对茶多酚的吸附作用[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(4): 7 – 10.

Comparison and Analysis of Protein Extraction from *Rhizophora apiculata* Bl

PENG Cun-zhi¹, LI Lei², LIU Zi-xin¹

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Environmental Safety Supervision
and Inspection Centre for Genetically Modified Plants and Microorganisms used in Plants, Ministry of Agriculture,
Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101 China;

2. Department of Biology, Hainan Normal University; Haikou 571158, China)

Abstract: In order to extract high quality protein sample for two dimensional electrophoresis (2-DE) assay, aqueous solution method, trichloroacetic acid-aceton method and the advanced phenol isolated method were used to extract the proteins from *Rhizophora apiculata* Bl, and the harvest rate, the integrality and the solubility of the three methods were compared and analyzed. The results showed that the colloidal deposition, which was composed of polysaccharide but little of protein, was isolated by the aqueous solution method; the proteins, which were isolated by trichloroacetic acid-aceton method, was purer than that from others and the background in 2-DE was most clearest, but the integrality of protein sample was not enough for 2-DE; 800—1000 μg protein deposition could be harvested from 500 mg leaves material by the advanced phenol isolated method, and the protein spots which were detected on 2-DE gel map were seven times than that by trichloroacetic acid-aceton method. These data demonstrated that the advanced phenol extraction method was more excellent than others based on the great protein harvest ratio and integrality.

Key words: *Rhizophora apiculata* Bl.; protein extraction; two-dimensional electrophoresis