

适用于盐生植物的双向电泳样品制备方法

李肖芳^{1,2}, 韩和平¹, 王旭初¹, 范鹏祥¹, 李银心^{1,*}

(1. 中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:比较了三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA)、三氯乙酸沉淀法(E-TCA)和酚抽法(Phe)3种方法对盐生植物盐角草(*Salicornia europaea* L.)总蛋白的提取效果。3种方法分别得到579、343和535个蛋白点;TCA和E-TCA法所得图谱均存在严重的横向纹理,Phe法所得图谱则背景干净,基本上没有纹理。说明Phe法不仅能很好地提取盐角草蛋白,而且能有效去除样品中的盐分。对Phe法的提取液进行了改进,所得图谱背景更加清晰,蛋白点数增加。为其他盐生植物以及嗜盐微生物蛋白质的提取提供了重要参考。

关键词:蛋白质提取;双向电泳(2-DE);酚;三氯乙酸(TCA);盐角草

文章编号:1000-0933(2006)06-1848-06 **中图分类号:**Q946.1 **文献标识码:**A

A protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis analysis of halophytes

LI Xiao-Fang^{1,2}, HAN He-Ping¹, WANG Xu-Chu¹, FAN Peng-Xiang¹, LI Yin-Xin^{1,*} (1. Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 2. The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6): 1848 ~ 1853.

Abstract: We compared three different methods, i. e. trichloroacetic acid/acetone precipitation (TCA), trichloroacetic acid precipitation (E-TCA), and phenol extraction (Phe), to determine their efficiency in extracting total proteins from *Salicornia europaea* L. by two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis. Generally, 579, 343, and 535 protein spots were generated by the three methods. The 2-DE gels of TCA and E-TCA showed strong horizontal streaks, while that of the Phe method had only a few faint streaks, which indicated effective removal of salt from the protein sample by the Phe method. Moreover, an optimized extraction buffer of the Phe method was capable of generating more protein spots and gave more clear background in the 2-DE map. Findings from this study are of great significance for developing effective protein extraction methods for other halophytes, and halophilic microorganisms.

Key words: protein extraction; two-dimensional electrophoresis (2-DE); Phenol; Trichloroacetic acid (TCA); *Salicornia europaea* L.

盐角草(*Salicornia europaea* L.)隶属藜科(Chenopodiaceae),盐角草属(*Salicornia* L.),叶退化而茎肉质化,是一种聚盐的盐生高等植物,也是世界上最抗盐的高等植物之一。它具有与海蓬子(*Salicornia bigelovii* Torr.)相似的耐盐功能和作物潜力,同时还具有聚盐能力,可用于盐碱地的脱盐修复,目前已经被作为海水蔬菜加以开

基金项目:国家“863”计划资助项目(2003AA627010);国家攻关计划资助项目(2005BA807B07)

收稿日期:2006-03-19;**修订日期:**2006-05-04

作者简介:李肖芳(1983~),女,河南开封人,硕士生,主要从事植物抗盐机理研究. E-mail: fanglx2003@hotmail.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yxli@ibcas.ac.cn

Foundation item: The project was supported by National “863” high technology program (No. 2003AA627010), China National “Gong Guan” Project (No. 2005BA807B07)

Received date: 2006-03-19; **Accepted date:** 2006-05-04

Biography: LI Xiao-Fang, Master candidate, mainly engaged in mechanisms of plant salt tolerance. E-mail: fanglx2003@hotmail.com

发利用。盐角草分布范围比海蓬子广^[1],作为作物开发利用具有更独特的先天优势。有关盐角草抗盐机理的研究也是一项具有重要意义的基础研究内容。

蛋白质是生理功能的最终执行者和生命现象的直接体现者,期望通过比较不同盐处理条件下的盐角草蛋白表达谱寻找与其抗盐有关的关键蛋白,为进一步研究盐角草的抗盐机理提供依据。

双向电泳是研究蛋白质表达变化最有效的工具之一。它利用等电点和分子量两个性质对蛋白质进行分离,可以使样品中的数千种蛋白质得到很好的分离^[2]。样品制备是双向电泳的关键步骤。而植物组织由于富含色素、多酚、多糖、有机酸等次生代谢物质和蛋白酶,其蛋白样品制备一直较为困难。盐角草是一种聚盐的真盐生高等植物,其体内除含有多种次生代谢物质外还含有大量盐分,而盐离子的存在严重干扰等电聚焦的进行,其蛋白质提取较其他植物更为困难,目前尚未见有关盐角草蛋白质提取和相关研究工作的报道。本文比较了 TCA 法、E-TCA 和 Phe 法^[3-5]3 种方法对盐角草总蛋白的提取效果,发现 Phe 法可以较好的提取盐角草蛋白和去除样品中的盐离子;并对 Phe 法的提取液进行了改进。

1 材料与方法

1.1 试剂

尿素(电泳级),AmpholineTM pH3.5~10 和碘乙酰胺购自 GE Healthcare(Piscataway, NJ, USA);Acr, Bis, SDS, DTT 购自 Merck(Darmstadt, Germany);PMSF, CHAPS, CBB G-250 和甘氨酸购自 Amresco(Solon, OH, USA); β -巯基乙醇购自 Fluka(Buchs, Switzerland);PVPP 购自 Sigma(St. Louis, MO, USA);Tris, EDTA 和 Tris 饱和酚购自鼎国公司(北京);Triton X-100,过硫酸铵和 TEMED 购自赛百盛公司(北京);三氯乙酸,丙酮,蔗糖,氯化钠,氯化钾,硼砂,乙酸铵,甲醇,乙醇,磷酸,甘油,硫酸铵和乙酸均为分析纯,购自北京化工厂。

1.2 植物材料

盐角草用 9cm×9cm 塑料花盆种植,生长在中国科学院植物研究所温室,日间温度为 25~30℃,夜间为 18~20℃,相对湿度 60%~80%,每天光照 16h。种子播种于用自来水充分湿润的蛭石上,以浅沙覆盖,种子萌发后用 1/4 Hoagland 营养液^[6]浇灌,每天 1 次,浇透。

播种 60d 后,当幼苗株高约为 5~7cm 时,开始盐处理,即向 1/4 Hoagland 营养液中加入 200 mmol/L 或 700 mmol/L NaCl,浇灌方法同前。

取 700 mmol/L NaCl 处理 2d 和 200 mmol/L NaCl 处理 90d 的盐角草的地上部分提蛋白。所取材料用液氮冻后置 -80℃ 保存。

1.3 蛋白质提取方法

1.3.1 三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA) 参照 Saravanan & Rose 的方法^[3]。

1g 材料置液氮中充分研磨,转至离心管中,加 4ml -20℃ 预冷的 10% TCA 丙酮溶液,涡漩, -20℃ 沉淀 2h 以上。离心(Sorvall Biofuge stratos, Germany)(15000 r/min, 4℃), 20min, 弃上清液,沉淀用丙酮(含 2% β -巯基乙醇, -20℃ 预冷)洗涤 3 次,室温干燥,所得干粉置 -80℃ 保存待用。

1.3.2 三氯乙酸沉淀法(E-TCA) 参照 Shen 等人的方法^[4]。

约 1g 材料置液氮中研磨,向研钵中加入 4ml 提取液(50 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA, 100 mmol/L 氯化钾, 2% β -巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF),待其融化后,继续研磨数分钟,转至离心管中,涡漩,离心(15000 r/min, 4℃) 20min。取上清液,向其中加入 1/4 体积 50% TCA 水溶液,置 4℃ 沉淀 2h 以上。离心(15000 r/min, 4℃) 20min, 弃上清液,沉淀用丙酮(含 2% β -巯基乙醇, -20℃ 预冷)洗涤 3 次,室温干燥,所得干粉置 -80℃ 保存待用。

1.3.3 酚抽法(Phe) 参照 Carpentier 等人的方法^[5]。

约 1g 材料置液氮中研磨,向研钵中加入 4ml 提取液(50 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA, 100 mmol/L 氯化钾, 2% β -巯基乙醇, 30% 蔗糖, 1 mmol/L PMSF;改进后配方为:100 mmol/L Tris, 50 mmol/L 抗坏血酸, 50 mmol/L 硼砂, 1% Triton X-100, 2% β -巯基乙醇, 1% PVPP),待其融化后,继续研磨数分钟,转至离心管中,加入等体积 pH8.0 Tris-饱和酚,涡漩,离心(10000 r/min, 4℃) 10min。

取酚层,以等体积提取液抽提 2 次,加入 5 倍体积 0.1 mol/L 乙酸铵甲醇溶液, -20℃ 沉淀 2h 以上。离心 (15000 r/min, 4℃) 20min, 弃上清液, 沉淀用 -20℃ 预冷甲醇洗涤 1 次, 再以丙酮 (含 2% β -巯基乙醇, -20℃ 预冷) 洗涤 2 次, 室温干燥, 所得干粉置 -80℃ 保存待用。

1.4 双向电泳

蛋白质干粉加适量裂解液 (9 mol/L 尿素, 1% DTT, 2% CHAPS, 1% AmpholineTM pH3.5 ~ 10), 室温溶解 1h 以上, 离心 (15000 r/min, 20℃) 20min, 取上清。蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[7]。

第一向等电聚焦使用 11cm 或者 24cm pH3 ~ 10 线性 IPG 胶条 (GE Healthcare), 在 Ettan IPGphor 电泳仪 (Ettan IPGphor II IEF Unit, GE Healthcare) 上完成。采用胶内水化方式上样。11cm 胶条上样量为 500 μ g, 水化和聚焦均在标准型胶条槽 (Regular Strip Holder, GE Healthcare) 内进行, 30V 12h, 100V 1h, 1000V 1h, 1000 ~ 8000V 线性上升 1h, 8000V 100kVh; 24cm 胶条上样量为 700 μ g, 水化 12h, 在水化盘 (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, GE healthcare) 内完成, 聚焦则在通用型杯上样胶条槽 (Ettan IPGphor Cup Loading Manifold, GE healthcare) 内进行, 100V 2h, 300V 2h, 500V 1h, 1000V 1h, 1000 ~ 8000V 线性上升 1h, 8000V 100kVh。胶条平衡 2 次, 第 1 次向平衡液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS) 中加入 1% DTT, 第 2 次向平衡液中加入 4% 碘乙酰胺。第二向 SDS-PAGE 采用 12.5% 分离胶 (SE600 RUBY 电泳仪和 Ettan Daltsix 电泳仪, GE Healthcare)。

染色采用改进的胶体考染法^[8]。

1.5 图像获得与分析

图像扫描采用 ImageScanner labscan 扫描仪 (GE Healthcare), 软件分析采用 ImageMasterTM 2D Platinum Software (Version 5.0, GE Healthcare)。

2 结果与分析

2.1 3 种方法提取盐角草蛋白的比较

首先以盐处理 2d 的盐角草幼苗为材料提蛋白, 通过双向电泳分析, 比较了 TCA、E-TCA 和 Phe 法 3 种方法的提取效果。如图 1 所示, TCA 和 E-TCA 法所得图谱在酸性端存在严重的横向纹理, E-TCA 法所得图谱的纵向纹理亦较为严重, 而 Phe 法所得图谱背景干净, 基本没有纹理。横向纹理是样品中盐离子浓度较高的一个显著特征。盐离子的存在, 可增加胶条的导电性并引起电内渗, 进而干扰蛋白质的聚焦, 在双向电泳图谱中造成水平方向的纹理。这说明 TCA 和 E-TCA 法所得样品中有较高浓度的盐离子, 而 Phe 法则可以很好地去除盐角草材料中积累的盐离子。

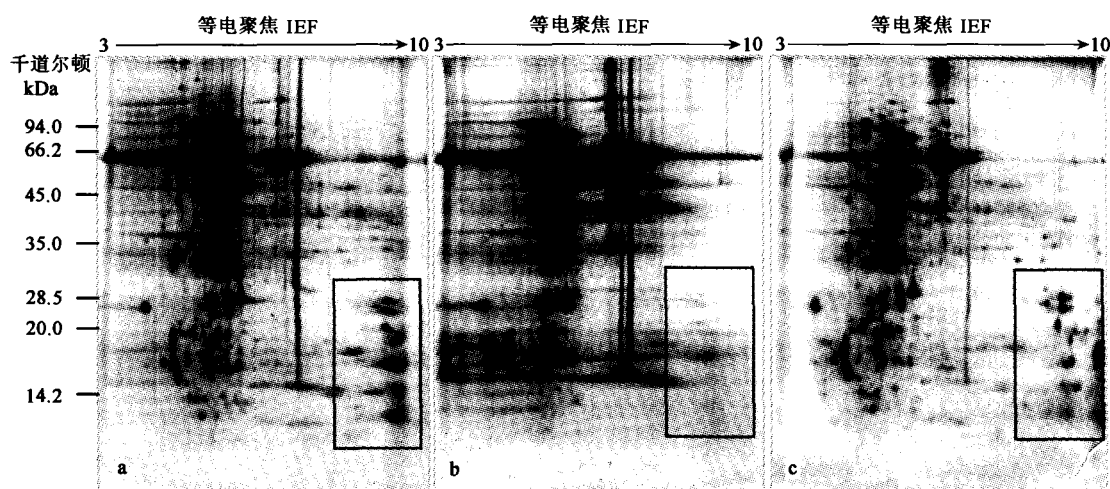


图 1 盐角草幼苗总蛋白的提取

Fig.1 Total proteins extracted from seedlings of *S. europaea*

a. TCA 法 TCA method; b. E-TCA 法 E-TCA method; c. Phe 法 Phe method

3 种方法所得图谱在蛋白点的数目和分布上也存在差异(图 2)。Phe 法和 TCA 法所得蛋白点较多,分别为 535 和 579;E-TCA 法则只有 343 个点。3 种方法中,所得蛋白主要集中在 pI 4 ~ 7 和 8 ~ 75kDa 范围内。TCA 法和 Phe 法在碱性端(pI 8 ~ 10)亦有较多显著的蛋白点,而 E-TCA 法则几乎没有蛋白(如图 1 中方框所示)。蛋白质提取过程中,沉淀后的蛋白溶解比较困难,导致蛋白的损失。经 TCA 变性沉淀的蛋白质更是如此。在 E-TCA 法中,蛋白质经历了溶解-沉淀-再溶解的复杂过程,样品中的盐离子虽然有利于蛋白的初步溶解,但在沉淀除盐的过程中也使蛋白的沉淀更为困难,因而其蛋白损失就较为严重。而 TCA 法中蛋白直接存在于沉淀中,只有一步溶解过程,减少了蛋白的损失。

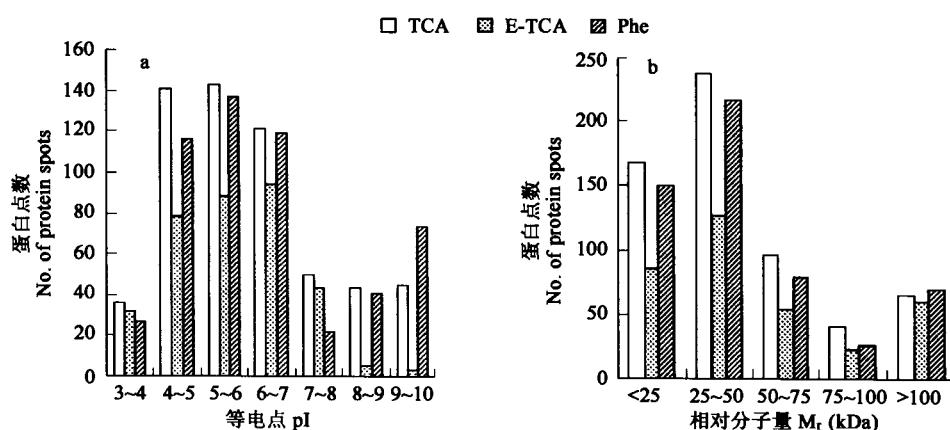


图 2 3 种方法所得蛋白点基于等电点(a)和相对分子量(b)的聚类分析

Fig.2 Classification of protein spots within different categories of pI(a) and M_r (b)

TCA:三氯乙酸/丙酮沉淀法;E-TCA:三氯乙酸沉淀;Phe:酚抽法

2.2 Phe 法提取液配方的改进

为了进一步验证 Phe 法的提取效果,以盐处理 90d 的盐角草为材料提取蛋白,经 24cm pH 3 ~ 10 IPG 胶条和 SDS-PAGE 分离,显示了较好的提取效果(图 3a)。改进提取液配方后,Phe 法表现出更强的去除杂质的能力(图 3b),其背景更加清晰,局部区域有蛋白点的增多或者信号强度的增强。

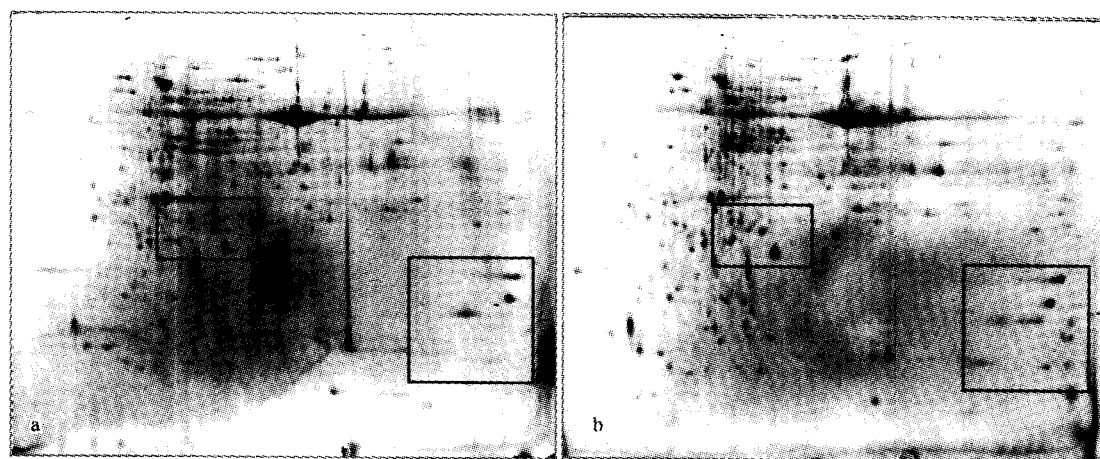


图 3 Phe 法改进前(a)后(b)提取盐角草蛋白的比较

Fig.3 Comparison of proteins extracted from *S. europaea* with Phe method (a) or the modified one (b)

3 讨论

通过比较 TCA 法、E-TCA 法和 Phe 法对盐角草总蛋白的提取效果,发现 Phe 法不仅可以很好的提取盐角

草总蛋白,而且能有效去除样品中的盐离子,保证等电聚焦的顺利进行。

盐是双向电泳中常见的一种杂质。样品溶液中的盐离子浓度超过 100 mmol/L^[9]时将严重影响等电聚焦的进行。去除盐离子的通常策略有透析、有机溶剂或 TCA 沉淀、色谱法等^[10,11]。透析法和色谱法需要一定的装置才能进行,而且耗时长,并且随着盐分的去除,体系离子强度降低,常伴有蛋白质的聚集和沉淀。沉淀法虽能有效的去除蛋白质样品中的盐离子,但蛋白质的再溶解比较困难。

Phe 法可以有效去除样品中的可溶性杂质^[12],因而也可以用来除盐。其原理为,酚是蛋白质的良好溶剂,在样品制备过程中,蛋白质和脂类溶于酚相,盐、核酸、多酚和多糖等可溶性物质进入水相,从而得以分离。酚层中的蛋白质可通过沉淀进一步纯化,一般选用乙酸铵的甲醇溶液。乙酸铵在甲醇、丙酮等有机溶剂中有较好的溶解度,因而可以在后面的沉淀洗涤(丙酮)过程中除去,避免重新引入离子。与透析法等方法相比,Phe 法除盐更简单易行。

最近,Kirkland 等^[13]报道了一种基于 Trizol 试剂(主要成分为酚和异硫氰酸胍)的蛋白质提取方法,可以很好地从嗜盐菌 *Haloferax volcanii* 中提取蛋白并有效去除样品中的盐离子。但他们对该法去除盐离子的解释是异丙醇沉淀和随后的异硫氰酸胍(乙醇溶液)及丙酮洗涤沉淀,即认为盐是与蛋白一起进入酚相的。而氯化钠在丙酮、乙醇、酚等有机溶剂中的溶解度是相当低的,它不可能主要的进入酚相,也不会通过丙酮洗涤被除去。因此,本文认为该法中盐是与 RNA 一起包含在水相中而除去的。另外,该法采用 Trizol 试剂,成本较使用 Tris 饱和酚高出许多。

由于盐影响蛋白质溶解度的能力是其离子强度的函数,而后者取决于离子浓度和电荷数,而与离子的种类和盐生植物对盐的生理生态适应特点无关。Breckle^[14]将盐生植物分为真盐生植物、泌盐盐生植物和假盐生植物是按照它们对盐分适应的生理生态特点划分的;盐生植物细胞汁液中富集盐的类型也可能包括氯化物,硫酸盐和碱性盐等不同盐类;但都不影响本方法的适用效果。

本文报道了 Phe 法可以很好地提取盐角草蛋白并能有效去除样品中的盐离子,这对其它盐生植物和嗜盐微生物蛋白质的提取都有重要的借鉴意义。

References:

- [1] Lu Z J, Glenn E P, Hodges R M, *et al.* Crop irrigated with seawater — *Salicornia bigelovii* L. World Agriculture, 2001, (2): 14 ~ 16.
- [2] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 1975, 250: 4007 ~ 4021.
- [3] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. Proteomics, 2004, 4: 2522 ~ 2532.
- [4] Shen S H, Jing Y X, Kuang T Y. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. Proteomics, 2003, 3: 527 ~ 535.
- [5] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, *et al.* Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. Proteomics, 2005, 5: 2497 ~ 2507.
- [6] Hoagland D R, Arnon D I. The water-culture method for growing plants without soil. Circ. Calif. Agric. Exp. Stat., 1938, 347: 1 ~ 39.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248 ~ 254.
- [8] Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis, 2004, 25: 1327 ~ 1333.
- [9] Görg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics, 2004, 4: 3665 ~ 3685.
- [10] Cho C W, Lee S H, Choi J, *et al.* Improvement of the two-dimensional gel electrophoresis analysis for the proteome study of *Halobacterium salinarum*. Proteomics, 2003, 3: 2325 ~ 2329.
- [11] Karadzic I M, Maupin-Furlow J A. Improvement of two-dimensional gel electrophoresis proteome maps of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. Proteomics, 2005, 5: 354 ~ 359.
- [12] 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. Electrophoresis, 2003, 24: 2369 ~ 2375.
- [13] Kirkland P A, Busby J, Stevens S, *et al.* Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins. Anal. Biochem.,

2006, 351: 254 ~ 259.

- [14] Breckle S W. Salinity tolerance of different halophyte types. In: Bassam N E, Damberdt M, Loughman B C, eds. Genetic aspects of plant mineral nutrition. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1990.

参考文献:

- [1] 吕忠进, Glenn E P, Hodges R M, 等. 全海水灌溉的作物——北美海蓬子(上). 世界农业, 2001, (2): 14 ~ 16.

附表 缩略词

Appendix Abbreviations

英文缩写 Shortings	英文名称 English names	中文名称 Chinese names	英文缩写 Shortings	英文名称 English names	中文名称 Chinese names
2-DE	Two dimensional electrophoresis	双向电泳	IPG	Immobilized pH gradient	固相 pH 梯度
Acr	Acrylmide	丙烯酰胺	PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
Bis	N, N'-methylenebisacrylamide	N, N'-甲叉双丙烯酰胺	PVPP	Polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
CBB	Coomassie Brilliant Blue	考马斯亮蓝	SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate	—	SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis	SDS 聚丙烯酰胺凝胶 电泳
DTT	Dithiothreitol	二巯基硫糖醇	TCA	Trichloroacetic acid	三氯乙酸
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸	TEMED	N, N, N', N'- tetramethylethylenediamine	N, N, N', N'-四甲基乙 二胺
IEF	Isoelectric focusing	等电聚焦	Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane	—