

# 适于 SDS - PAGE 分析的苹果叶片蛋白质提取方法

曾广娟<sup>1,2</sup>, 李春敏<sup>2</sup>, 张新忠<sup>3</sup>, 陈东玫<sup>2</sup>, 赵永波<sup>2</sup>, 董文轩<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 河北省农林科学院 昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600; 3. 中国农业大学 园艺植物研究所, 北京 100193)

**摘要:**为探索苹果叶片蛋白质 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 分析的样品制备方法, 比较了三氯乙酸 (TCA)/ 丙酮沉淀法、改良的 Tris - HCl 法、酚 - 甲醇/ 醋酸铵沉淀法、二硫苏糖醇 (DTT)/ 丙酮法及 Tris - HCl 法等 5 种蛋白质的提取方法。制备的样品经 SDS - PAGE 分离采用银染显色。结果表明, 改良的 Tris - HCl 法在加大 PVPP 用量和蛋白质提取缓冲液的基础上, 将丙酮沉淀蛋白质的时间由 30 min 增加到 1 h, 使蛋白质的得率最高为 3.243  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 上样量 5  $\mu\text{L}$  得到的蛋白质条带数量最多, 条带最清晰为 41 条。利用这一改良方法对苹果实生树不同节位蛋白质的动态变化进行了研究, 共发现 6 条蛋白质差异带, 分子量分别为 71.9, 60.5, 52.6, 41.1, 35.3, 18.5 kDa, 条带清楚, 背景清晰。因此, 改良的 Tris - HCl 法适用于苹果叶片的 SDS - PAGE 分析。

**关键词:** 苹果; SDS - PAGE; 蛋白质提取

**中图分类号:** S661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091 (2009) 02 - 0075 - 04

## Leaf Protein Extraction Methods Suitable for SDS - PAGE Analysis in Apple

ZENG Guang - juan<sup>1,2</sup>, LI Chun - min<sup>2</sup>, ZHANG Xin - zhong<sup>3</sup>,  
CHEN Dong - mei<sup>2</sup>, ZHAO Yong - bo<sup>2</sup>, DONG Wen - xuan<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science, Changli 066600, China; 3. Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In order to develop an efficient protein extraction method suitable for SDS - PAGE analysis, five protocols for protein extraction in apple leaf, trichloroacetic acid/ acetone precipitation (TCA), modified Tris - HCl extraction, phenol extraction methanol/ ammonium acetate precipitation, DTT/ acetone and Tris - HCl extraction were compared. The extracts were separated by SDS - PAGE method followed by silver staining. The results showed that the modified Tris - HCl extraction presented the highest resolution of 3.243  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and the maximum bands of 41 strips with the 5  $\mu\text{L}$  sample volumes basing on the increased amount of PVPP and the extracting solution as well as prolonged 30 min of protein precipitation with cold acetone. Dynamic changes of proteins in leaves from different nodes in apple seedlings (Jonathan  $\times$  Golden Delicious) were analyzed with the improved Tris - HCl extraction method, six protein bands were detected with the molecular weight 71.9, 60.5, 52.6, 41.1, 35.3, 18.5 kDa respectively and the bands were clear with a light background. So the improved Tris - HCl extraction was the most appropriate method for apple leaf SDS - PAGE analysis.

**Key words:** Apple; SDS - PAGE; Extraction

苹果叶片蛋白质含量较低, 且富含多酚、色素及多糖等干扰物质, 这些物质给蛋白质样品制备带来了困难, 使可溶性蛋白质的数目大大减少<sup>[1-3]</sup>。植物蛋白质样品制备中, 增加蛋白质洗涤次数能提高

电泳结果的质量, 但常常导致一些蛋白质丢失。植物组织常用的蛋白质提取方法是三氯乙酸/ 丙酮沉淀法<sup>[4]</sup>, 只是目前尚没有对所有的植物样品都适用的蛋白质样品制备方法<sup>[5]</sup>。因而, 适用于苹果叶片

收稿日期: 2009 - 01 - 06

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2007000967)

作者简介: 曾广娟 (1970 - ), 女, 河北昌黎人, 在读博士, 副教授, 主要从事果树种质资源与遗传育种方面研究。

通讯作者: 董文轩 (1963 - ), 男, 河北三河人, 教授, 博士生导师, 主要从事果树种质资源与遗传育种方面的研究。

的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 分析的方法尚未建立,本研究旨在探索一种高质量的用于苹果叶片的 SDS - PAGE 技术的蛋白质样品制备方法,同时为提高苹果叶片双向电泳 (2 - DE) 的分析提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验在河北省农林科学院昌黎果树研究所进行。首先采集 4 年生苹果杂种实生树 (红玉 × 金冠) 的叶片用于蛋白质提取方法对比试验。之后剪取实生树 (编号为 02-19-132) 萌蘖枝和萌发枝上的叶片,从根茎部开始,每 5 节为一样品,直到 150 节,将样品迅速放入冰盒,带回实验室,用液氮处理,装入保鲜袋,置 - 40 °C 冰箱中备用。

### 1.2 蛋白质提取方法

1.2.1 三氯乙酸 (TCA)/丙酮法 参照 Damerval 等<sup>[4]</sup>方法。

1.2.2 改良的 Tris - HCl 法 参照谷瑞升等<sup>[6]</sup>的方法有所改进。将聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP) 的用量由 10 % 植物材料鲜质量增加到 40 % 植物材料鲜质量,将提取缓冲液的量由 3 倍于植物材料鲜质量改为 9 倍于植物材料鲜质量。具体操作如下:取冷冻叶片,液氮研磨,准确称取 0.5 g 粉末置 10 mL 离心管中,加入 0.2 g PVPP 和 4.5 mL 蛋白质提取缓冲液 (62.5 mmol/L Tris - HCl pH 6.8, 0.5 % SDS, 10 % 甘油, 5 % 巯基乙醇),涡旋 30 s, 4 °C 放置 1 h,充分溶解蛋白质。放置后的样品摇匀, 4 °C 12 000 g 离心 20 min,取上清 1.5 mL 转移至 10 mL 离心管中,加入 4.5 mL 预冷丙酮,摇匀, - 20 °C 放置 1 h 沉降蛋白质,之后 4 °C 5 000 g 离心 10 min。弃上清,沉淀在 - 20 °C 放置 1 h,使丙酮完全挥发。置 - 40 °C 冰箱备用。

1.2.3 酚 - 甲醇/醋酸铵沉淀法 参照 Wang 等<sup>[7]</sup>的方法进行。

1.2.4 二硫苏糖醇 (DTT)/丙酮法 取冷冻叶片,液氮研磨,准确称取 0.5 g 粉末置 10 mL 离心管中,加 2.5 mL 含 2 % DTT 的水溶液, 4 °C 12 000 g 离心 30 min,取上清液 1.5 mL,加入 4 倍体积的冷丙酮,置于 - 20 °C 冰箱中过夜。然后, 4 °C 12 000 g 离心 30 min,沉淀用 80 % 丙酮溶液清洗 3 次 (每次均放在 - 20 °C 冰箱中沉淀 1 h)。最后将沉淀冻干。置 - 40 °C 冰箱中备用。

1.2.5 Tris - HCl 法 参照谷瑞升等<sup>[6]</sup>的方法 在上述 5 种方法制备的蛋白质干粉中分别加入 250  $\mu$ L 上样缓冲液溶解蛋白质 (62.5 mmol/L Tris - HCl pH

6.8, 10 % 甘油, 5 % 巯基乙醇),其间涡旋 3 ~ 4 次, 1 h 后 4 °C 12 000 g 离心 20 min,取上清 200  $\mu$ L,加入 40  $\mu$ L 10 % SDS 和痕量溴酚蓝,混匀后在沸水浴中热处理 5 min,冷却至室温即为待测的蛋白质溶液。

### 1.3 蛋白质含量测定

参照 Bradford<sup>[8]</sup>法进行蛋白质定量分析。配制考马斯亮蓝 G-250 染色液和 BSA 标准蛋白质溶液,测定在 595 nm 波长下蛋白质 - 色素结合物的光密度值 OD<sub>595</sub>,绘制标准曲线,计算样品中蛋白质的含量。

### 1.4 SDS - PAGE

采用北京市六一仪器厂 DYY-11B 型三恒电泳仪进行不连续双垂直板 (22.0 cm × 14.5 cm × 1.0 mm) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)。分离胶浓度 12.5 %,浓缩胶浓度 4 %。将 15 g Tris, 72 g 甘氨酸, 5 g SDS 溶于 1 L 去离子水中即为 5 倍电极缓冲液,用时稀释 5 倍。预电泳 1 h,上样量分别为 3  $\mu$ L 和 5  $\mu$ L,开始电流 15 mA,进入分离胶后 25 mA,电泳时间:2.0 ~ 2.5 h。银染显色,每处理 2 次重复。凝胶用 UMAX Powerlook 2100XL (日本) 扫描仪扫描。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取蛋白质不同方法的结果比较

用 5 种提取方法获得的苹果叶片蛋白质的得率如图 1 所示,5 种提取方法的蛋白质得率分别是:1.732, 3.243, 2.604, 1.113, 1.896  $\mu$ g/ $\mu$ L,以改良的 Tris - HCl 法得到的蛋白质含量最高;其蛋白质得率分别是其他 4 种方法得率的 1.88, 1.25, 2.91, 1.71 倍。对不同蛋白质样品进行的 SDS - PAGE 分析和染色结果,进一步证实了以上蛋白质含量的测定结果 (图 2, 3);并且在蛋白质条带数量上 5 种提取方法的 5  $\mu$ L 上样量均优于 3  $\mu$ L 上样量;其中以改良的 Tris - HCl 法 (b2) 得到的蛋白质条带数最多为 41 条,其次是酚 - 甲醇/醋酸铵沉淀法 (c2),蛋白质条带数为 37 条,再次为 TCA/丙酮法得到 10 条蛋白质带,以 DTT/丙酮法最差,仅有 2 条蛋白质带。上述结果表明,TCA/丙酮法和 DTT/丙酮法溶解蛋白质的效果相对较差,改良的 Tris - HCl 法和酚 - 甲醇/醋酸铵沉淀法都能够有效地溶解蛋白质,蛋白质产率较高,所获得的蛋白质在凝胶电泳中显示的条带数较多。图 3 显示,改良的 Tris - HCl 法比酚 - 甲醇/醋酸铵沉淀法及 Tris - HCl 法分离蛋白质更清晰,分辨率更高,谱带分离效果更好。

从操作步骤及成本看,TCA/丙酮沉淀法和 DTT/丙酮法最简便、成本最低,但沉淀蛋白质都需过夜。甲醇/醋酸铵沉淀法步骤繁琐,成本较高,且

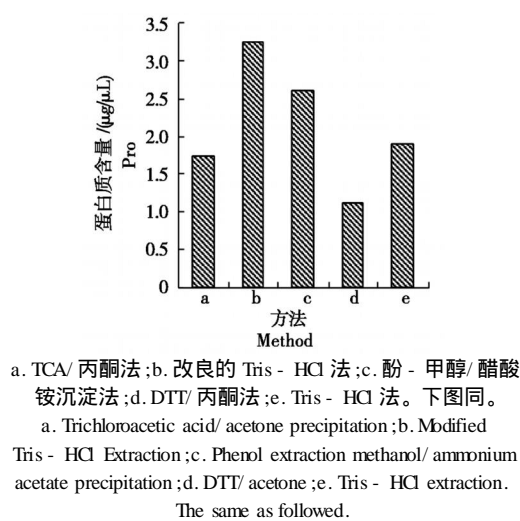


图 1 五种提取方法蛋白质的得率

Fig.1 The isolation rate of protein with five different methods

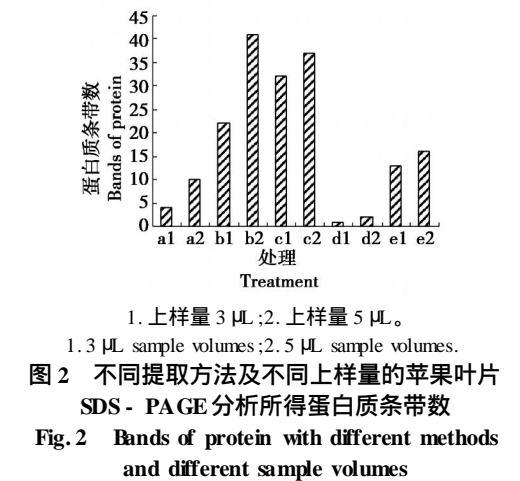


图 2 不同提取方法及不同上样量的苹果叶片 SDS - PAGE 分析所得蛋白质条带数

Fig.2 Bands of protein with different methods and different sample volumes

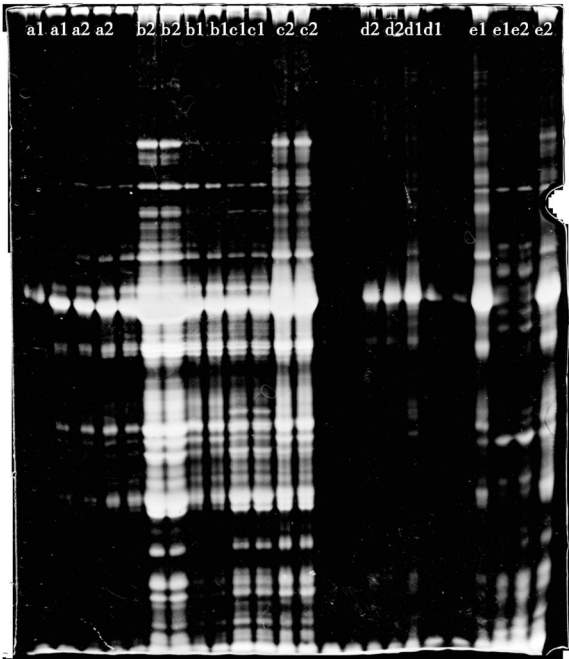


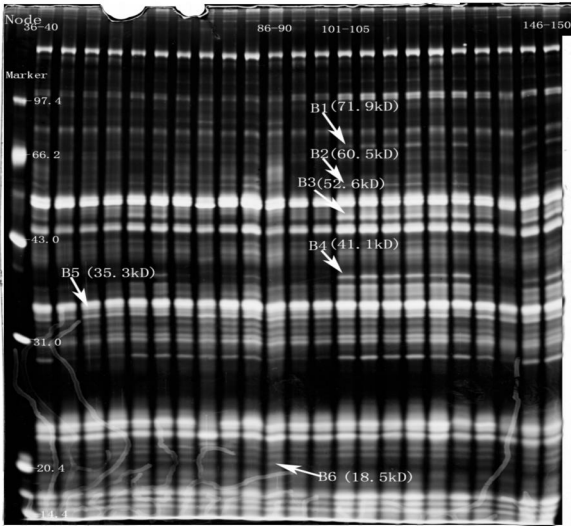
图 3 不同提取方法及不同上样量的苹果叶片 SDS - PAGE 分析

Fig.3 Comparison of SDS - PAGE patterns of apple proteins obtained by different extraction methods

Tris - 饱和酚是有毒的。改良的 Tris - HCl 法操作步骤简单,沉淀蛋白质无需过夜,成本适中。

2.2 利用改良的 Tris - HCl 法分析苹果实生树不同节位蛋白质的动态变化

对实生树 02-19-132 不同节位叶片样品采用改良的 Tris - HCl 法提取叶片蛋白质并进行 SDS - PAGE 分析,不同节位蛋白质的动态变化如图 4。结果表明:蛋白质条带清晰,背景浅,而且随实生树节位升高,蛋白质带发生变化,共检测到 6 条蛋白质差异带 B1 - B6,分子量分别为 71.9,60.5,52.6,41.1,35.3,18.5 kDa。该方法经 SDS - PAGE 分析后得到了很好的分离效果,蛋白质带表现出了良好的多态性。



从左至右第 1 泳道为标准蛋白质,第 2 泳道为实生树节位 36 ~ 40 节,第 3 泳道 41 ~ 45 节,依次向右,每 5 节为一 样品,最右泳道为 146 ~ 150 节。

From the left to the right :the 1st line is the marker , the 2nd line is node No. 36 - 40 ,the 3rd line is node No. 41 - 45 , and analogically ,the last line is node No. 146 - 150 .

图 4 苹果实生树( 02-19-132) 叶片蛋白质 SDS - PAGE 电泳结果

Fig.4 SDS - PAGE electrophoresis gel images of protein in apple seedlings

3 讨论

本研究比较分析了 TCA/ 丙酮法、改良的 Tris - HCl 法、酚 - 甲醇/ 醋酸铵沉淀法和 DTT/ 丙酮法及 Tris - HCl 法等 5 种蛋白质的提取方法,DTT/ 丙酮法直接将蛋白质溶解在上清液中而将杂质留在沉淀里,步骤简单,成本低,但需过夜,蛋白质得率最低,在图谱上得到的蛋白质条带最少。传统的 TCA/ 丙酮沉淀法是非常有效的蛋白质沉淀方法<sup>[4]</sup>,能够消除瞬时的蛋白质水解作用和其他蛋白酶的修饰<sup>[9]</sup>。然而,TCA/ 丙酮沉淀的最大缺点是蛋白质很难重新

溶解<sup>[10]</sup>。利用该方法从苹果叶片提取蛋白质产量低。酚-甲醇/醋酸铵沉淀法与其他几种蛋白质提取方法相比,步骤较繁琐,耗时相对较长,蛋白质损失较多,而且酚是有毒的。

SDS 在蛋白质溶解中是应用最广泛的表面活性剂,它与蛋白质有较强的结合能力<sup>[5,11]</sup>。此外,与其他植物样品相比,苹果叶片尤其富含多酚,因此本试验在原来 Tris-HCl 提取方法的基础上将 PVPP 量由 10% 植物材料鲜质量加大到 40%,利用 PVPP 吸附剂的吸附作用更好地将酚类化合物除去。将提取缓冲液的量由植物材料鲜质量的 3 倍增加到 9 倍,使叶片中的蛋白质充分溶解到缓冲液中。用预冷的丙酮沉淀蛋白质的时间由 30 min 增加到 1 h,将色素充分去除干净。总之,利用改良的 Tris-HCl 法最大限度的避免了各类干扰物质的影响,蛋白质得率高,所得蛋白质条带数量最多,最清晰,用该方法对苹果实生树不同节位蛋白质的动态变化进行研究,获得了满意的 SDS-PAGE 结果。因此认为:改良的 Tris-HCl 法可用于苹果叶片蛋白质的样品制备,适用于苹果叶片的 SDS-PAGE 分析。

#### 参考文献:

- [1] Granier F. Extraction of plant proteins for two - dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1988, 9: 712 - 718.
- [2] Gegenheimer P. Preparation of extracts from plants[J]. Meth Enzymol, 1990, 182: 174 - 193.
- [3] Tsugita A, Kamo M. 2 - D electrophoresis of plant proteins [J]. Methods Mol Biol, 1999, 112: 95 - 97.
- [4] Damerval C, De Vienne D, Zivy M, *et al.* Technical improvements in two - dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins[J]. Electrophoresis, 1986, 7(1): 52 - 54.
- [5] Görg A, Weiss W, Dunn M J. Current two - dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4: 3665 - 3685.
- [6] 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 等. 一种省时高效的木本植物蛋白双向电泳分析方法[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(5): 7 - 10.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Wu F S, Wang M Y. Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis from protease - rich plant tissues [J]. Anal Biochem, 1984, 139 (1): 100 - 103.
- [10] Nandakumar M P, Shen J, Raman B, *et al.* Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two - dimensional electrophoresis[J]. J Proteome Res, 2003, 2: 89 - 93.
- [11] Molloy M P, Herbert B R, Walsh B J, *et al.* Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two - dimensional gel electrophoresis [J]. Electrophoresis, 1998, 19: 837 - 844.