

# 双向电泳技术在园艺植物蛋白质组学研究中的应用

王璐, 杜国强, 师校欣

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

**摘要:** 双向电泳技术是蛋白质组研究的核心技术之一, 本文对其原理、发展概况、优缺点及其在园艺植物蛋白质组学研究中的应用做了介绍, 并对其今后的发展做了展望。

**关键词:** 双向电泳; 蛋白质组学; 园艺植物

中图分类号: S603 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)增刊-0054-04

## Application of Two-dimensional Electrophoresis in Proteomic Studies of Horticultural Plants

WANG Lu, DU Guo qiang, SHI Xiao xin

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** Two-dimensional polyacrylamide electrophoresis (2D-PAGE) is one of the fundamental separation methods for proteome research. This paper reviewed its theory, development, advantage and shortage, and the application in proteomic studies of horticultural plants. Perspectives of 2-D gel were also discussed.

**Key words:** Proteome; Two-dimensional Electrophoresis; Horticultural plant

1994年 Marc Wilkins 和 Keith Williams 提出蛋白质组<sup>[1]</sup>这一概念后, 蛋白质组在生物学界得到了充分关注。蛋白质组分析的开门技术双向电泳<sup>[2]</sup> (Two dimensional electrophoresis, 2-DE) 也随之成为生物研究的热点技术之一。本文对蛋白质双向电泳的原理、发展概况、优缺点及其在园艺植物蛋白质组学研究中的应用进行了介绍。

### 1 蛋白质双向电泳技术原理

双向电泳的基本原理: 第一向为等电聚焦电泳 (载体两性电解质 pH 梯度或固相 pH 梯度 Isoelectric focusing, IEF), 根据蛋白质等电点不同进行分离; 第二向为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 按亚基分子量大小进行分离<sup>[3]</sup>。经过电荷和质量两次分离后, 可以得到蛋白质分子的等电点和分子量信息。分离的结果与单向电泳不同, 是点不是带, 根据 Cartesian 坐标系统, 从左到右是等电点的增加, 从上到下是分子量的增加<sup>[4]</sup>。

### 2 蛋白质双向电泳技术发展概况

1975年 O'Farrell<sup>[5]</sup> 首先提出双向电泳系统, 使用了 9 mol/L 尿素, 2% NP-40, 4% T, 5% C 的管状载体两性电解质 (CA) 凝胶等电聚焦为第一向。聚焦后在含 SDS 缓冲液中平衡后, 用琼脂糖包埋在垂直板状 SDS 凝胶的浓缩胶上, 以不连续 SDS 梯度凝胶电泳作第二向, 并利用放射自显影方法得到了近 5 000 个蛋白点的图谱。Andersin 把这种等电聚焦 SDS 电泳技术称之为 ISO-DALT (ISO 即等电点, DALT 即道尔顿)<sup>[6]</sup>。在 ISO-DALT 系统中, 载体两性电解质 pH 梯度是在电泳过程中形成, pH 梯度不稳定, 受电场和时间影响大, 且阴极飘移会造成碱性蛋白质的丢失<sup>[7]</sup>。1975年 Gasparic 等<sup>[8]</sup> 合成了固相 pH 介质, 因此随着 1982 年固相 pH 梯度 (Immobilized pH gradients, IPG) 等技术的完善<sup>[9]</sup>, IPG 逐步替代了 CA, 发展成 IPG-DALT。

近年来, 随着蛋白质组概念<sup>[10]</sup> 的出现, 蛋白质

收稿日期: 2006-05-20

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2004000368); 河北农业大学博士、引进人才启动基金资助项目

作者简介: 王璐 (1980-), 女, 河北唐山人, 在读硕士, 主要从事果树生物技术研究; 杜国强为通讯作者。

双向电泳技术越来越受到大家的关注, 已经成为研究领域不可或缺的实用技术之一。

### 3 蛋白质双向电泳技术的优缺点

#### 3.1 优越性

3.1.1 分辨率高 传统的单向电泳方法一次最多只能分辨 100 种蛋白质组分, 而双向电泳具有极高的分辨率, 样品经过电荷和质量两次分离后, 可以得到分子的等电点、分子量等信息<sup>[11]</sup>。一次电泳能够分离 5 000~8 000 多种蛋白质, 这是其他任何分析鉴定技术无法与其相比的, 是目前所有电泳技术中分辨率最高, 信息量最多的技术, 可以直接从植物细胞提取液中检测某个蛋白质<sup>[12]</sup>。虽然双向电泳程序比较繁琐, 但王振英、彭永康研究<sup>[13]</sup>表明在电泳程序方面只要选择具有广泛的 pH 范围两性电解质, 选择合适的染色液, 并控制合适的染色条件, 就可获得较高的分辨率。

3.1.2 重演性好 其一, 随着电泳第一向等电聚焦的发展, 等电聚焦形成的 pH 梯度有载体两性电解质 pH 梯度、固相 pH 梯度和用二者的“杂交”技术形成的 pH 梯度。这些技术引入双向电泳中以后, 大大提高了双向电泳的分辨率和重复性<sup>[14]</sup>; 其二, 在双向电泳中, 蛋白质样品的制备及实验温度对实验结果的重演性有重要作用, 只要控制好影响这两方面的因素, 就可以获得较好的重演性<sup>[15]</sup>。

#### 3.2 缺点

蛋白质双向电泳技术具有以上所说的诸多优点, 但目前仍多采用 O' Farrell 的方法进行, 该方法存在诸如试剂耗量大、成本高、程序繁琐、技术难以掌握等缺点, 从而出现蛋白质斑点的拖尾、粘连、扩散和纹理现象等问题<sup>[7]</sup>; 采用固相 pH 梯度双向电泳, IPG 胶条多从国外购买, 价格昂贵, 自制胶条过程复杂, 且胶条性质不稳定, 同时需要专一的双向电泳设备<sup>[16]</sup>。

### 4 在园艺植物蛋白质组学研究中的应用

#### 4.1 在特异蛋白质组学研究中的应用

不同基因型、不同植物组织器官、不同的生理状态和环境因子等都会诱导基因表达产物的差异, 从而出现特异蛋白。借助于考马斯亮蓝和银染, 双向电泳可以对蛋白质进行定量; 应用荧光染料, 还可以使一定范围内的上千种蛋白质定量地显现出来<sup>[17]</sup>。

胡金勇等<sup>[18]</sup>利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳对鸢尾(*Iris japonica*) 绿白嵌合叶片的蛋白质进行分

离, 并初步鉴定了蛋白质的相对分子量和等电点。每个电泳图谱共检测到 400 余个蛋白点, 其中至少 13 个蛋白的表达变化明显, 表明嵌合叶片的绿色与白色叶组织具有明显不同的蛋白质双向电泳图谱。

薛妙男等<sup>[19]</sup>比较分析了沙田柚(*Citrus grandis* var. *shatinyu*) 自交授粉花柱和异交授粉花柱的双向凝胶电泳图谱, 两者的蛋白质分布格局相似, 具有重叠性, 分析出了 100 多个蛋白点。在自交花柱电泳图谱中发现了 3 种特异蛋白质, 这些蛋白可能与自交不亲和有关。

秦新民等比较分析了沙田柚自交、异交花粉管蛋白的双向电泳图谱, 两者的蛋白分布格局相似, 具有重叠性, 分辨出了 200 多个蛋白点, 在异交花粉管电泳图谱中发现了 1 种特异蛋白, 在自交花粉管电泳图谱中发现了 2 种特异蛋白, 这些蛋白可能与自交不亲和有关<sup>[20]</sup>。

谷瑞升等<sup>[21]</sup>等利用双向电泳方法对胡杨(*Populus euphratica*) 悬浮培养细胞和毛白杨(*P. tomentosa*) 试管苗叶片的蛋白进行分析, 获得了满意结果。在胡杨器官发生的研究中, 鉴定出了胡杨愈伤组织器官发生分子量为 20 kDa, pI 为 5.5~6.5 的标记蛋白。

#### 4.2 在组织器官蛋白质组学研究中的应用

对于植物来说, 蛋白质组学上的差异不但存在于不同基因型以及同一基因型的不同植株之间, 也存在于同一植株的不同组织和器官之间。在植物的发育过程中, 不同组织和器官在功能上的分化, 也表现在不同器官蛋白质的组成和数量的差异上, 蛋白质双向电泳技术研究不同组织器官蛋白质组学上的差异, 有助于我们对植物发育过程机制的理解<sup>[22]</sup>。

林鸣等<sup>[23]</sup>利用 SDS 单向电泳对黄瓜(*Cucumis sativus*) 的根、茎、叶、花萼、花冠、雄蕊、花柱和子房的可溶性蛋白进行了分析和比较。检测到花冠中的 23.5 kDa 和 33.0 kDa, 雄蕊中的 18.8, 28.5, 31.0, 37.0 kDa 和 39.0 kDa, 花柱中的 45.0 kDa 及子房中的 32.5 kDa 蛋白, 分别为各自器官中的器官特异蛋白质。对花冠、雄蕊、花柱和子房的可溶性蛋白的 IEF-SDS 双向电泳分析也确定了相应于 SDS 单向电泳上特异蛋白带的蛋白质斑点。而且相应于 SDS 单向电泳上的一条带, 在 IEF-SDS 双向电泳上可能是一个以上的分子量相同而等电点不同的几个蛋白质斑点。各种器官的蛋白质含量以雄蕊为最高、花萼为最低。

### 4.3 在亚细胞蛋白质组学研究中的应用

植物的蛋白质组学研究目前已经深入到亚细胞水平<sup>[24]</sup>,即研究在一个细胞器内表达的蛋白质组,研究比较多的细胞器是叶绿体。据估计高等植物共有约 21 000~25 000 个蛋白质,叶绿体的蛋白质占其中 10%~25%,充分证明了叶绿体在植物细胞中的重要性。另外,关于线粒体与细胞壁的研究也有报道<sup>[25]</sup>。

Peltier 等利用 2D-PAGE、质谱及 Edman N-端序列测定等方法,系统地分析了豌豆(*Pisum sativum*)叶绿体中类囊体蛋白质,并在数据库进行了搜索,鉴定了 61 个蛋白质,其中 33 个蛋白质的功能及功能结构域得到了确认。

Yamaguchi 和 Subramanian 利用 2D-PAGE、色谱、MS、Edman 测序等多种方法鉴定了菠菜(*Spinacia oleracea*)叶绿体中的核糖体 30S 和 50S 亚基的蛋白质。发现菠菜的质体核糖体是由 59 个蛋白质组成的,其中 53 个与大肠杆菌有同线性,而 6 个是非核糖体质体特异性的蛋白质(PSRP-1 到 PSRP-6)。许多蛋白质表现出翻译后的修饰。

### 4.4 在环境因子蛋白质组学研究中的应用

植物蛋白质产物与环境因子有很密切的关系,环境因子引起基因组表达的变化,不同的环境因素,如空气、水、阳光等的影响会导致相同的基因转录产物剪切和转译成不同的蛋白,表达蛋白再进行加工修饰和转移定位,使之具有活性和生物功能,产生相应的生理作用,适宜相应的生存环境<sup>[26]</sup>。植物蛋白质组学的研究主要集中在环境因子对基因组表达的影响。

赵红等<sup>[27]</sup>等应用蛋白质双向凝胶电泳方法,研究了  $Ce^{4+}$  诱导悬浮培养红豆杉(*Taxus cuspidata*)细胞凋亡过程中蛋白质的表达,分析了凋亡细胞与正常细胞的蛋白质组差异。发现在  $Ce^{4+}$  诱导 4 d 后的凋亡样品中有 13 个新的蛋白质点出现,而在对照组细胞样品中未检测到,此外,还发现凋亡细胞中有一些蛋白质的含量明显高于对照组。表明  $Ce^{4+}$  诱导的红豆杉细胞凋亡过程中有新蛋白质的合成及原有某些蛋白质量的改变。说明  $Ce^{4+}$  诱导了某些功能蛋白的表达,红豆杉细胞凋亡的发生可能与这些新蛋白质的合成有关。

日本紫花牵牛(*Pharbilis nil* cv. *Violet*)子叶完全展开后,短日照诱导前、诱导后和两个短日照间的长日照处理对植株的花芽分化都有一定的抑制作用。

范国强、曹克辉<sup>[28]</sup>双向凝胶电泳分析表明,长日照处理的牵牛子叶内存在短日照处理子叶内没有的两种蛋白质。这些蛋白质可能与长日照抑制牵牛植株的花芽分化有一定关系。

魏令波等<sup>[29]</sup>用双向电泳-电泳回收法从沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)叶片热稳定蛋白质中分离到一种抗冻蛋白 afp,和其他抗冻蛋白进行比较,没有发现相同的类型。

### 4.5 在非环境因子蛋白质组学研究中的应用

蛋白质是基因功能的体现者和执行者。业已证明,一个基因并不只产生一个相应的蛋白质,它可能会产生几个,甚至几十个蛋白质。在植物的生存环境中,一些非环境因子的影响,如嫁接、修剪等对植物的生存和发育也会产生严重的影响,这些影响会导致大量的蛋白质在种类和表达量上的变化<sup>[26]</sup>。

肖桂山等<sup>[30]</sup>用 PAG 等电聚焦、SDS-PAGE 梯度电泳和双向电泳分析了黄瓜同种异体嫁接组合不同发育时期的全蛋白变化。结果表明,与愈伤处理比较,嫁接后第 2 天到第 10 天嫁接组合的不同发育时期,稳定地出现 3 种新合成的特异蛋白质。

曾义安等<sup>[31]</sup>以黑籽南瓜为砧木,嫁接津绿 2 号 1 和津研 4 号 2 个黄瓜品种,通过等电聚焦聚丙烯酰胺双向电泳对叶片可溶性蛋白进行分析对比,发现在嫁接植株叶片中产生了 1~2 种特异蛋白。

## 5 结论

近年来,双向电泳技术应用于微生物、动植物蛋白质组分的研究,均获得较重要的结果。由于双向电泳技术的改进尤其是 IFC 技术的出现,提高了实验的重复性,加之蛋白质数据库和双向电泳图谱数据库的建立,为各实验室有效地比较和分析蛋白质提供了可能。现在不少的公司和研究组织致力于开发新的蛋白质组技术或提高双向电泳的效率和自动化程度,以期进行大规模蛋白质组研究,如目前已经商品化的等电聚焦仪有 Amersham Pharmacia Biotech 公司的 Multiphor、IPGphor 和 Bio-Rad 公司的 Protean IEF cell<sup>[32]</sup>;同时在一些科研机构 and 生物技术公司的努力下,第 3 代双向电泳图像分析软件 Image Master 2D、PD Quest、Melanie II 等也相继诞生<sup>[33]</sup>;最近一些 2D-PAGE 相关技术,如高度敏感的质谱(Mass spectrometric)和 EST 数据库的发展,使分离和鉴定蛋白质的工作又大大前进了一步<sup>[34]</sup>。因此双向电泳技术必将越来越广泛的被应用于园艺植物研究方面。

但同时双向电泳技术应用于园艺植物蛋白质组分的分析仍然存在着两大难题: 一是极端蛋白质( 极酸、极碱、极低拷贝数等) 的分离, 二是如何检出蛋白斑点数量的最大数目并避免多蛋白点的重叠及交叉污染的蛋白斑点, 这一问题随着第一向采用多重叠 pH 梯度 IPG 胶条已有很大的改善和解决。因此双向电泳上游和下游相关技术的改进、优化将成为其今后发展的重点方向。

## 参考文献:

- [1] Gorg A G, Boguth C, Obermaier M, *et al.* The Immobililine family: from “vacuum” to “plenum” chemistry[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1079–1086.
- [2] Hoving S, Voshol H, Vanstrum J. Towards high performance two dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 617.
- [3] Chiari M, Righetti P G. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis immobilized pH gradient in the first dimension (IPG-DALT), The state of the art and controversy of vertical versus horizontal systems [J]. *Electrophoresis*, 1992, 13: 187–191.
- [4] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 215–226.
- [5] O’ Farrell P H. High Resolution Two Dimensional Electrophoresis of Proteins[J]. *The Journal of Chemistry*, 1975, 250(10): 4007–4021.
- [6] Bjellqvist B, Righetti P G, Gorg A. Isoelectric focusing in immobilized pH gradient: principle, methodology and some applications[J]. *Biochem Biophys Methods*, 1982, 6: 317–339.
- [7] Righetti P G. Immobilized pH gradients: Theory and methodology[M]. Amsterdam: Elsevier, 1990: 9–139.
- [8] Gasparic V, Bjellqvist B, Rosengren A. Swedish Patent [M]. 1975, No. 7514049–1.
- [9] 崔杰峰, 刘银坤. 蛋白质组学研究的支撑技术 2 双向凝胶电泳[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2003, 24(5): 283–287.
- [10] Herbert B R, Molloy M P, Gooley A A, *et al.* Improved protein solubility in two dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(5): 845.
- [11] 刘家尧, 骆爱玲, 梁 峥. 植物蛋白电泳分析的方法学研究及技术改进[J]. 植物学通报, 1998, 15(3): 69–72.
- [12] 王振英, 彭永康. 双向电泳分析植物蛋白质的重演性、敏感性和清晰度[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2001, 21(4): 34–36, 64.
- [13] Corbett J, Dunn M J, Posch A, *et al.* Positional reproducibility of protein spots in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison[J]. *Electrophoresis*, 1994, 15(8–9): 1205–1211.
- [14] 周先碗, 胡晓倩. 生物化学仪器分析与实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 193.
- [15] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 262–283.
- [16] 高原, 王国秀, 刘中来. 一种经济、简便的双向电泳方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(1): 156–158.
- [17] 孙言伟, 姜 颖, 贺福初. 差异蛋白质组学的研究进展[J]. 生命科学, 2005, 17(2): 137–140.
- [18] 胡金勇, 曾 英, 桑玉英. 双向电泳分析鸢尾绿白嵌合叶片的蛋白质[J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 387–391.
- [19] 薛妙男, 杨继华. 沙田柚自交、异交花柱蛋白质的双向电泳[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2000, 18(3): 83–85.
- [20] 秦新民, 李惠敏, 薛妙男, 等. 沙田柚自交、异交花粉管蛋白双向电泳分析[J]. 广西植物, 2004, 16: 566–569.
- [21] 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.
- [22] Foutoulakis M, Takacs B. Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two dimensional gels[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22: 1593.
- [23] 林 鸣, 黄宗翼. 黄瓜器官特异蛋白的研究[J]. 植物学报, 1996, 38(7): 525–529.
- [24] Galvani M, Hamdan M, Herbert B, *et al.* Alkylation kinetics of proteins in preparation for two dimensional maps: A matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry investigation [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22: 2058.
- [25] 梁 宇, 荆玉祥, 沈世华. 植物蛋白质组学研究进展[J]. 植物生态学报, 2004, 28(1): 114–125.
- [26] Steinberg T H, Haugland RP, Singer V L. Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 23(9): 238–245.
- [27] 赵 红, 乔建军, 葛志强, 元英进. 钨诱导东北红豆杉凋亡细胞蛋白质的双向凝胶电泳分析[J]. 中国稀土学报, 2003, 21(6): 740–742.
- [28] 范国强, 曹克辉. 长日照处理对牵牛开花抑制作用研究 I. 不同时间长日照处理对花芽分化和子叶蛋白质的影响[J]. 西北植物学报, 1996, 16(2): 125–130.
- [29] 魏令波, 江 勇, 舒念红, 等. 沙冬青叶片热稳定抗冻蛋白特性分析[J]. 植物学报, 1999, 41(8): 837–841.
- [30] 肖桂山, 杨世杰. 黄瓜同种异体嫁接组合形成过程中特异蛋白质的产生[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(2): 32–37.
- [31] 曾义安, 朱月林, 黄保健, 杨立飞. 嫁接黄瓜的光合特性及叶片激素含量和可溶性蛋白研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(1): 16–19.
- [32] 廖 翔, 应天翼, 黄留玉, 等. 蛋白质组学研究中的双向电泳技术[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(6): 522–524.
- [33] 贾宇峰, 刘少君, 郭尧君. 双向电泳图像分析软件[J]. 现代科学仪器, 2000, 5: 20–23.
- [34] 季芝娟, 薛庆中. 植物蛋白质组学研究进展[J]. 生命科学, 2004, 16(4): 241–246, 240.