

玉米叶片 2 种总蛋白质提取方法的比较

齐建双,王彦玲,铁双贵,卢彩霞,岳润清,韩小花,燕树锋,孙若楠

(河南省农业科学院 粮食作物研究所,河南 郑州 450002)

摘要:为比较不同方法提取的玉米叶片蛋白质对双向电泳效果的影响。采用 TCA-丙酮沉淀和 TRIzol 试剂盒 2 种方法,提取国审玉米品种郑单 958 叶片全基因组蛋白质,并对提取的蛋白质样品进行双向电泳。结果表明:TCA-丙酮方法提取的蛋白质一向水平聚焦电压上升缓慢且达不到程序设置的电压,而 TRIzol 试剂盒方法实时监测图与程序设置图相吻合;对电泳胶图分析后可知,TRIzol 试剂盒法分离出的蛋白点多于 900 个,低丰度蛋白质得到充分显现,大多数蛋白点分子量为 20~80 kDa,pH 值为 4~7,蛋白点的形状较规则;TCA-丙酮沉淀法分离出的蛋白点仅有 350 个,表明样品中蛋白质分离种类较少,高丰度蛋白质过度显现,低丰度蛋白质检出率大大降低。

关键词:玉米叶片;蛋白质提取方法;双向电泳

中图分类号:S513.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0162-03

doi:10.7668/hbxb.2015.01.027

Comparison Two Methods of Corn Leaves Total Protein Extraction

QI Jian-shuang, WANG Yan-ling, TIE Shuang-gui, LU Cai-xia,

YUE Run-qing, HAN Xiao-hua, YAN Shu-feng, SUN Ruo-nan

(The Cereal Crops Institute of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To compare the effect of corn leaf protein extraction by different methods with Two-dimensional electrophoresis. Two methods of TCA-acetone precipitation and TRIzol Kit were used to extract the leaf genome-wide protein from maize variety Zhengdan 958, and the effect of protein extractions were evaluated by two-dimensional electrophoresis. The results showed that the focus voltage of proteins extracted by TCA-acetone method rose slowly and could not be up to the program settings, while the Real-time monitoring map of TRIzol Kit method coincided well with the program settings. After analysis of gel by ImageMaster 2D-Platinum, more than 900 protein spots were separated by Trizol Kit method, and the low abundance proteins displayed fully. For majority of the protein spots, the molecular weight (MW) was 20~80 kDa, the pH value was 4~7, and the shape was regular. The protein spots separated by TCA-acetone precipitation method were 350 only, showing the less protein types separated from a sample, while the high abundance protein over expressed and the detection rate of low abundance proteins reduced greatly.

Key words: Maize leaf; Extraction methods of protein; Two-dimensional electrophoresis

玉米是我国种植面积最大的粮食作物。近年来,国内外关于玉米的研究多集中在玉米的形态、生理和基因定位克隆等方面,对玉米叶片等器官蛋白质提取及其双向电泳效果研究相对较少。由于玉米叶片中含有大量的色素、酚类和醌类等次生代谢物和蛋白酶^[1-3],加上植物组织中蛋白质含量较低^[4]等因素会干扰双向电泳的分离效果,不能很好地显示出蛋白质差异。本研究以国审玉米杂交种郑单 958 为试验材料,采用授粉后 9~12 d 的幼胚和成熟

胚分别在 MS 培养基上育苗,用 TCA-丙酮沉淀和 TRIzol 试剂盒 2 种方法,提取玉米叶片蛋白质后,进行双向电泳分析,旨在为玉米叶片蛋白质组水平分析提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

郑单 958 种子由河南秋乐种业科技有限公司金娃娃子公司提供。

收稿日期:2014-11-04

基金项目:河南省重大专项(12110011000)

作者简介:齐建双(1979-),女,河南滑县人,助理研究员,硕士,主要从事玉米遗传育种研究。

通讯作者:铁双贵(1960-),男,河南安阳人,研究员,博士,主要从事玉米分子育种研究。

由玉米幼胚获得幼苗: 取授粉后 9~12 d 的郑单 958 幼穗, 在无菌实验室中将玉米幼穗苞叶剥离, 放入 75% 酒精浸泡 15 min, 然后将其取出置于超净工作台上用刀片将玉米幼胚取出放入 MS 完全培养基上, 在培养箱中光照培养一个月, 光照 14 h/d, 光照强度为 $250 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 昼夜温度分别为 28, 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

由玉米成熟胚获得幼苗: 选择成熟饱满一致的郑单 958 种子, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 空气中热激 10 min, 放入 75% 酒精浸泡 30 min, 用无菌水冲洗 2~3 次后在无菌蒸馏水中浸泡 24 h, 取出种子用 75% 酒精浸泡 5 min, 用灭菌水冲洗 3 次, 然后用 2% HgCl_2 浸泡 15 min, 用无菌水冲洗 5~6 次。在超净工作台上, 将灭菌后的种子胚剥离, 置于 MS 完全培养基上, 在培养箱中光照培养一个月, 光照 14 h/d, 光照强度为 $250 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 昼夜温度分别为 28, 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白质提取 TCA-丙酮沉淀法: 参照李冠军等^[3]的 TCA-丙酮法提取蛋白质。将研钵在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷, 然后加入 0.5~1.0 g 玉米样品、0.1 g DTT、0.1 g PVP, 在液氮中研磨成粉末, 转入 10 mL 离心管, 悬浮于 6~8 倍体积的 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮(含 TCA 和 DTT), 振荡混匀后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 加入 6~8 倍体积的 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮(含 DTT), 混匀后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2~3 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 重复洗涤 2 次, 然后用封口膜封住管口, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 挥发除去丙酮, 使之成为蛋白质干粉, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

TRIzol 试剂盒提取法: 参照 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, USA) 说明书提取蛋白质。将玉米叶片于液氮中研磨, 分装于 2 mL 离心管中, 每管约含 0.1~0.2 g 鲜样; 加入 1 mL TRIzol, 剧烈振荡混匀后, 室温放置 15 min; 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 min, 室温静置 3 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 15 min; 取下层有机相, 加入乙醇倒置混匀沉淀 DNA, 室温静置 3~5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 500 r/min 离心 10 min; 取上清, 加入 0.5 mL 异丙醇室温静置 10 min, 沉淀蛋白质, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 加入 0.3 mol/L 盐酸胍/95% 乙醇, 重悬沉淀, 室温静置 20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 500 r/min 离心 5 min, 此步骤重复 3 遍; 用乙醇重悬沉淀, 室温静置 20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 500 r/min 离心 5 min; 弃上清, 并将残余液体彻底吸干; 将离心管置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 干燥; 将蛋白质干粉溶重悬于上样水化液中, 室温振荡溶解 2 h, 室温 13 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清蛋白质溶液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.2.2 蛋白质浓度测定 参照 Bradford 法测量蛋白质浓度^[5-10]。

1.2.3 蛋白质双向电泳 主要包括等点聚焦电泳 (IPG-IEF)、胶条平衡、SDS-PAGE、凝胶染色 4 个步骤, 其中凝胶染色采用改良 G-250 考马斯亮蓝染色法。

1.2.4 胶图分析 用 Amersham 公司的 ImageScanner III 扫描仪扫描凝胶, 将扫描结果用 ImageMaster 2D Platinum 分析, 包括蛋白点数的统计、定位及相对丰度分析。

2 结果与分析

2.1 两种蛋白质提取方法对一向水平聚焦的影响

双向电泳最关键的环节是蛋白质样品提取质量的好坏, 它直接影响一向电泳水平聚焦的质量。从图 1 和图 2 可以清晰地看到 TCA-丙酮法和 TRIzol 法分别提取的蛋白质的聚焦效果: TCA-丙酮方法提取的蛋白质一向水平聚焦电压上升缓慢且达不到程序设置的电压, 实时监测图 (线 2) 与程序设置图 (线 1) 偏离度较大; 而 TRIzol 试剂盒法实时监测图 (线 2) 与程序设置图 (线 1) 达到了高度吻合。TRIzol 试剂盒法不但提高了蛋白质样品的质量, 也提高了一向水平聚焦的效果。

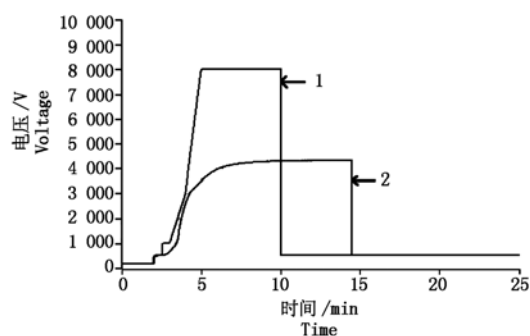


图 1 采用 TCA-丙酮方法提取蛋白质一向水平聚焦的监测图

Fig. 1 Monitor diagram of horizontal focusing for protein extracted by TCA-acetone

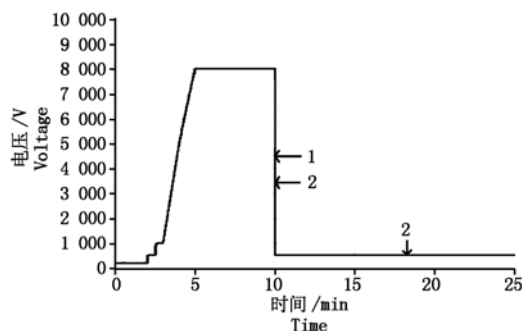
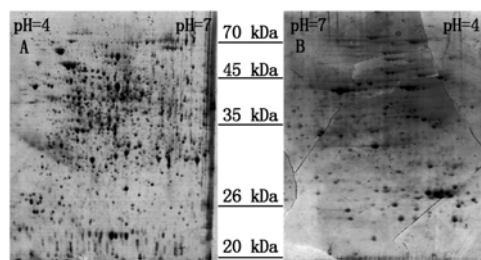


图 2 采用 TRIzol 试剂盒方法提取蛋白质一向水平聚焦的监测图

Fig. 2 Monitor diagram of horizontal focusing for protein extracted by TRIzol

2.2 两种方法提取蛋白质样品的双向电泳结果比较

在相同的双向电泳设定参数下,对采用不同方法提取的蛋白质样品进行双向电泳,结果见图3。结果表明:经过 ImageMaster 2D Platinum 软件分析,TRIZol 试剂盒法分离出的蛋白点较多(图3-A),经统计有900多个,低丰度蛋白质得到充分的显现,且大多数蛋白点分子量为20~80 kDa,pH值为4~7,蛋白点的形状较规则,点周围较为圆润,胶图背景清晰,横竖条纹和拖尾现象较少,蛋白质分离效果比较理想。TCA-丙酮沉淀法分离出的蛋白点较少(图3-B),经统计不足350个,表明样品中蛋白质分离种类较少,高丰度蛋白质过度显现,低丰度蛋白质检出率大大降低,且有较多的拖尾和竖条纹,胶图背景不是特别清晰。综上,采用 TRIZol 试剂盒法比 TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白质纯度高,包含更加丰富的蛋白质种类。



A. TRIZol 法;B. TCA-丙酮沉淀法。
A. The TCA-acetone method;B. The TRIZol method.

图3 玉米芽总蛋白质双向电泳图

Fig.3 The two-dimensional gel electrophoresis of embryo protein of maize Zhengdan 958

3 结论与讨论

玉米叶片蛋白分析尤为重要,特别是一些对生长发育、逆境条件胁迫相关的低丰度蛋白质的分离和鉴定特别重要。玉米叶片是高度组织化的器官,其内含有众多表达基因,表达蛋白的种类非常丰富。因此,研究与叶片生长发育相关蛋白非常重要,但常因叶片中含有酚类、色素等干扰性物质,会影响叶片蛋白质的提取和双向电泳分析。

TCA-丙酮沉淀法是目前提取植物蛋白质的常用方法之一,具有减少蛋白质降解、降低次生代谢物质的干扰等优点。由于玉米叶片中的非蛋白成分很难除去,蛋白质较难重新溶解,采用 TCA-丙酮法可能会丢失膜蛋白和疏水性蛋白,导致 2-DE 图谱上有较多的横条纹和纵条纹。该方法常用于幼嫩叶片等组织中蛋白质的提取,对复杂的植物组织该方法并不是最佳的选择。

TRIZol 试剂盒法能最大限度地避免提纯过程中内源及外源性的核糖核酸酶(RNA 酶)和蛋白酶对 RNA 和蛋白质的降解,保持 RNA 完整性;该方法简化了操作步骤,节省时间,提高工作效率,减少 RNA 降解的机会,节省了单独提取蛋白质所需的蛋白酶抑制剂。

TRIZol 试剂盒法与 TCA-丙酮沉淀法相比,TRIZol 沉淀蛋白质的方法可有效地除去色素、酚类等干扰电泳的化学物质,特别是能有效除去玉米叶片中高丰度蛋白质,例如 Rubisco(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶),减少高丰度蛋白对 2-DE 结果的干扰。玉米叶片中高丰度蛋白质(如 Rubisco)的存在对其他蛋白质,特别是低丰度蛋白质的检测影响也很大,显著降低低丰度蛋白质的检出率。因此,与 TCA 丙酮沉淀法相比,TRIZol 试剂盒法更加适合双向电泳分析所用的玉米叶片全基因组蛋白质的提取。

参考文献:

- [1] 陈晶瑜,郭宝峰,何付丽,等. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较[J]. 中国农学通报,2010,23(26): 97-100.
- [2] Canovas F M,Dumas G E,Lecorbet, *et al.* Plant proteome analysis[J]. Proteomics,2004,4:285-289.
- [3] 李冠军,付凤玲. 玉米叶片总蛋白提取和双向电泳技术改进[J]. 玉米科学,2006,14(6):100-103.
- [4] Sarma A D,Oehrlé N W,Emerich D W. Plant proteion isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Analytical Biochemistry,2008,379:192-195.
- [5] Whitaker J R,Granum P E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm [J]. Analyt Biochem,1980,109:156-159.
- [6] Kalb V F,Bernlohr R W. A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts [J]. Analyt Biochem,1977,82:362-371.
- [7] Sapan C V,Lundblad R L,Price N C. Colorimetric protein assay techniques [J]. Biotechnol Appl Biochem,1999,29:99-108.
- [8] Smith P K,Krohn R I,Hermanson G T, *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid[J]. Analyt Biochem,1985,150:76-85.
- [9] Zuo S S,Lundahl P A. Micro-Bradford membrane protein assay [J]. Analyt Biochem,2000,284:162-164.
- [10] 李 宁. 几种蛋白质测定方法的比较[J]. 山西农业大学学报,2006,26(2):132-134.