

玉米籽粒蛋白质双向电泳技术体系的优化

石海波^{1,2},王云生²,冯 勇²,高聚林¹,白 海³,苏二虎²,
张来厚²,赵瑞霞²,刘志雄²,黄灵忠²,姜丽丽⁴

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古农牧业科学院 玉米研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031;
3. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010031; 4. 内蒙古医科大学 分子病理学实验室, 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要:为了获得玉米籽粒双向电泳中蛋白质提取的最佳方法,建立最佳的玉米籽粒蛋白双向电泳技术体系,对酚抽提法、三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA/丙酮沉淀法)和可溶性蛋白提取法3种不同提取方法得到的蛋白质进行了分析,并在相同条件下进行双向电泳比对分析,结果表明:可溶性蛋白提取法获得的蛋白纯度高、浓度适中、双向电泳蛋白质点最丰富,最适合双向电泳研究;利用可溶性蛋白提取法获得的蛋白,对第一向等电聚焦参数等条件,以及不同pH值范围的IPG预制凝胶条进行了比较分析,结果表明:采用pH值3~10的IPG预制凝胶条时,采取电压梯度上升的方式,总聚焦70 000 Vhs、上样量800 μ g效果最佳,采用pH值4~7的IPG预制凝胶条时,总聚焦80 000 Vhs、上样量900 μ g效果最佳,并且采用pH值4~7的IPG预制凝胶条相比pH值3~10的凝胶条能分离到更多的点,最后结合蛋白质点MALDI-TOF-TOF质谱鉴定分析,建立了一套适用于玉米籽粒的蛋白质双向电泳技术方法,即采用可溶性蛋白提取法提取蛋白,采用24 cm、pH值4~7的IPG干胶条,上样900 μ g电泳效果最佳,等点聚焦程序:500 V、1 h,1 000 V、1 h,2 000 V、1 h,4 000 V、2 h,8 000 V、4 h,8 000 V、80 000 Vhs,500 V保持。试验研究为后续玉米籽粒发育差异蛋白研究奠定了技术基础。

关键词:玉米;籽粒;蛋白组学;双向电泳

中图分类号:S513.03 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)01-0171-06

doi:10.7668/hbxb.2015.01.029

Optimization of Maize Grain Protein Two-dimensional Electrophoresis System

SHI Hai-bo^{1,2}, WANG Yun-sheng², FENG Yong², GAO Ju-lin¹, BAI Hai³,
SU Er-hu², ZHANG Lai-hou², ZHAO Rui-xia², LIU Zhi-xiong²,
HUANG Ling-zhong², JIANG Li-li⁴

(1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 2. Maize Research Institute of Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot 010031, China; 3. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot 010031, China; 4. The Molecular Pathology Laboratory of Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010059, China)

Abstract: In order to obtain the best protein extraction methods of maize grain for 2-DE, and establish the best grain protein 2-DE technology system, quality of the proteins extracted by 3 different extraction methods were analyzed, and analysis of 2-DE for comparison in the same condition was done, results showed that the protein extracted by soluble protein extraction method had high purity, moderate concentration and the most abundant protein spots of 2-DE, was most suitable for the study of 2-DE; in order to determine the most appropriate isoelectric focusing conditions, isolated distribution clearer protein spots, use the protein extracted by soluble protein extraction method, protein electrophoresis sample quantity and IEF parameters were optimized, the most suitable pH range of IPG precast gel for maize grain protein was determined, binding protein MALDI-TOF-TOF mass spectrometry analysis, a set of protein 2-DE technique method suitable for maize grain was established, that is, protein extraction use the soluble

收稿日期:2014-11-09

基金项目:内蒙古农牧业科学院青年创新基金项目(2011QNJJN09);国家粮食丰产科技工程项目(2011BAD16B13;2012BAD04B04;2013BAD07B04)

作者简介:石海波(1976-),女,内蒙古呼和浩特人,副研究员,博士,主要从事玉米栽培育种及分子生物学研究。

通讯作者:高聚林(1964-),男,内蒙古呼和浩特人,教授,博士,主要从事作物生理生态研究。

protein extraction method, isolated distribution use the 24 cm, pH 4–7 IPG dry strip, the proper amount of sample for electrophoresis was 900 μ g, IEF procedures: 500 V, 1 h, 1 000 V, 1 h, 2 000 V, 1 h, 4 000 V, 2 h, 8 000 V, 4 h, 8 000 V, 80 000 Vhs, 500 V keep. It was laid the foundation for the further study of grain development related proteins.

Key words: Maize; Grain; Proteomics; Two-dimensional electrophoresis

蛋白质组学产生于 20 世纪 90 年代, 主要对生物体全部或部分蛋白在生命活动过程中的表达、功能和作用进行研究^[1]。双向电泳 (Two dimensional electrophoresis, 2-DE) 技术最早建立于 1975 年^[2], 是最为经典的蛋白质分离技术, 借助于固相 pH 梯度胶条, 双向电泳可以一次性分离几千甚至上万蛋白质点, 具有较高的分辨率和灵敏度。2-DE 技术早期主要应用于医学、细菌以及动物组织和细胞的蛋白质组学分析^[3-5]。近年来, 在植物中的研究报道日益增多^[6-8]。蛋白质组学研究中目的蛋白的定性主要依靠质谱分析技术^[9-12], 只有目的蛋白质得到鉴定, 才能对玉米籽粒蛋白进行功能分析, 因而质谱分析是蛋白质组学研究中不可缺少的组成部分^[13], 蛋白质点 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定要求胶体染色方法与其兼容, 对蛋白质胶体染色条件、胶点体积大小等也有要求。

玉米作为我国第一大粮食作物, 其中 90% 以上是普通粒用玉米, 种植目的是为了获得高产、优质的玉米籽粒, 随着人们对籽粒产量和品质的要求不断提高, 籽粒蛋白质组研究将愈来愈受到人们的重视。为了深入研究玉米籽粒发育过程蛋白质组的表达差异, 探索产量形成及调控相关蛋白和基因, 其总蛋白质的提取及双向电泳条件的建立是首要环节。玉米籽粒中含有大量的淀粉和多糖等物质, 如果蛋白质提取过程去除不干净, 对等点聚焦过程干扰较大, 将影响蛋白质的分离效果。本试验以郑 58 籽粒为研究材料, 对蛋白质样品制备方法、固相胶条等点聚焦参数, 以及胶体染色方法与质谱的兼容性等进行了研究, 建立了一套玉米籽粒 2-DE 技术方法, 为玉米籽粒蛋白质组研究提供了技术条件。

1 材料和方法

1.1 试验材料

玉米自交系郑 58 成熟新鲜种子作为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白质提取 方法 1 酚提取法: 参照 Dumas-Gaudot 等^[14]的方法。方法 2 三氯乙酸/丙酮法 (TCA/丙酮法): 参照 Damerval 等^[15]的方法。方法 3 可溶性蛋白质提取法: 称取玉米种子 2 g 放入预冷

的研钵中加少许 PVPP 液氮研磨成粉末, 转至 50 mL 的离心管中, 加入 10 mL 蛋白质提取液 (25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 20 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L EDTA); 振荡摇匀, 冰上放置 30 min; 4 $^{\circ}$ C, 10 500 r/min 离心 30 min, 将上清液转入另一离心管中, 向管中加入 4 倍体积的含 10% TCA 和 0.007% DTT 的丙酮溶液, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 4 h 或过夜; 4 $^{\circ}$ C, 11 000 r/min 离心 30 min, 弃上清; 用 2 倍体积的含 0.007% DTT 的丙酮溶液沉淀 1 h; 4 $^{\circ}$ C, 11 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用适量乙醇 (V): 乙醚 (V) (1:1) 洗 3 次, 每次沉淀 30 min, 4 $^{\circ}$ C, 11 000 r/min 离心 30 min; 最后真空冷冻干燥, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

蛋白质定量采用 Bradford 方法, 标准蛋白质为牛血清白蛋白。

1.2.2 双向电泳 等电聚焦采用 Ettan IPGphor IITM 等点聚焦系统, 仪器运行条件为 20 $^{\circ}$ C, 每根胶条电流 50 mA; 第二向垂直电泳于 EttanTM DALT six electrophoresis unit (GE Healthcare, USA) 垂直电泳系统中进行, 功率参数设置为每根胶条 1 W、1 h, 每根胶条 16 W、6 h; Multi Temp III 循环冷却系统恒温 15 $^{\circ}$ C。

1.2.3 胶片扫描及图片分析 采用 ProXPRESS 2D Proteomic Imaging System 扫描仪扫描脱色后的凝胶, 扫描软件 ProSc-an4.0, 图像分析使用 ImageMasterTM 2D Platinum Software Version 5.0 软件。

1.2.4 质谱鉴定及数据库搜索 蛋白质胶点送深圳华大基因科技服务公司进行蛋白点的酶解、洗脱和 MALDI-TOF-TOF 质谱分析, 获得肽质量指纹图谱。使用 Mascot 软件在 NCBI 玉米数据库中进行比对。

2 结果与分析

2.1 适合双向电泳的蛋白质最佳提取方法筛选

2.1.1 蛋白质不同提取方法比较 蛋白质获得量和纯度的高低是检验蛋白质提取方法优劣的主要指标之一。试验中对 3 种提取方法所获得的蛋白质粉末干质量、纯蛋白质获得量以及蛋白质纯度等进行了比较分析 (表 1)。

表 1 蛋白质提取方法比较

Tab. 1 Comparison of protein different extraction methods

提取方法 Extraction method	粗蛋白质获得量/(mg/g) Yield of crude protein	体积/mL Volume	浓度/(mg/mL) Concentration	纯蛋白质获得量/(mg/g) Yield of pure protein	蛋白质纯度/% Purity of protein
酚提取法 Phenol extraction method	6.85 ± 0.441	0.5	9.36 ± 0.624	2.34 ± 0.156	34.13 ± 0.198
TCA/丙酮沉淀法 TCA-acetone method	77.94 ± 7.540	5.0	2.91 ± 0.307	7.28 ± 0.767	9.34 ± 0.091
可溶性蛋白质提取法 Soluble protein extraction method	1.84 ± 0.095	0.5	5.42 ± 0.156	1.35 ± 0.039	73.56 ± 3.453

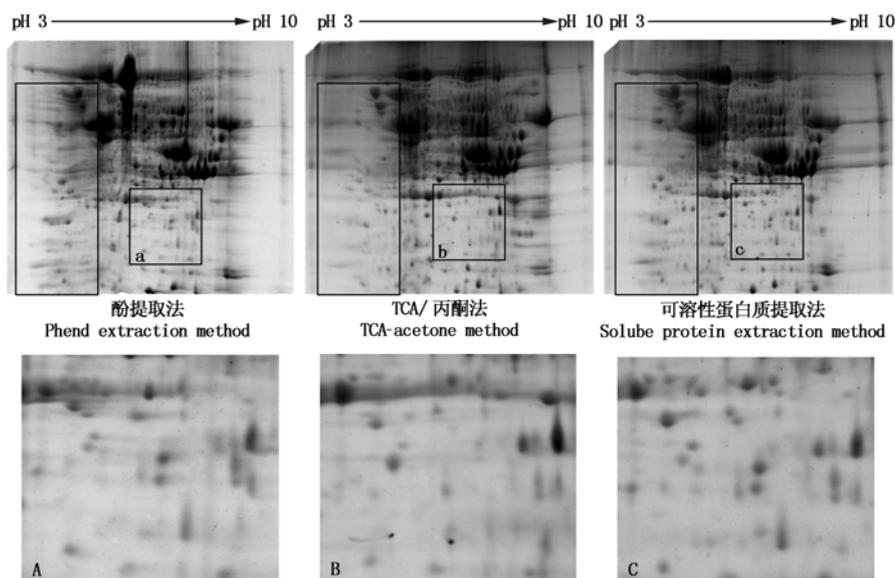
注: 纯蛋白质获得量 = 浓度 × 体积 / 鲜样质量。

Note: Protein yield = Concentration × Volume / Fresh sample quality.

表 1 数据显示, 酚提取法获得的蛋白质浓度最大, 达到 9.36 mg/mL, TCA/丙酮沉淀法最低, 为 2.91 mg/mL, 可溶性蛋白质提取法为 5.42 mg/mL, 浓度适中, 酚提取法和可溶性蛋白质提取法明显高于 TCA/丙酮沉淀法; TCA/丙酮沉淀法获得粗蛋白质量最多, 达 77.94 mg/g, 而可溶性蛋白质提取法最少, 仅为 1.84 mg/g, 酚提取法居中; 从纯蛋白质获得量和蛋白质纯度来看: TCA/丙酮沉淀法纯蛋白质获得量也最多, 但蛋白质纯度最低, 仅为 9.34%, 刚刚满足电泳上样要求; 酚提取法纯蛋白获得量和蛋白质纯度均居中; 可溶性蛋白质提取法纯蛋白获得量最少, 但纯度最高, 达 73.56%, 是酚提取法的

近 2 倍, 是 TCA/丙酮沉淀法的近 7 倍多。由此可见, TCA/丙酮沉淀法虽然获得的蛋白质量大, 但纯度最低, 浓度也最低; 酚抽提法虽然获得的蛋白质浓度最高, 且获得量较大, 但纯度较低; 而可溶性蛋白质提取法虽然纯蛋白质获得量最小, 但纯度最高, 浓度也适宜电泳要求。

2.1.2 不同提取方法提取的蛋白质电泳分析 在上样量、等电聚焦时间等条件相同的条件下, 采用 13 cm、pH 值 3 ~ 10 的胶对酚提取法、TCA/丙酮法和可溶性蛋白质提取法 3 种方法提取到的蛋白进行了电泳, 结果见图 1。



A、B、C 分别为 a、b、c 区域放大后的图片。

A, B, C were a, b, c region amplified.

图 1 不同提取方法提取的蛋白质双向电泳图

Fig. 1 Comparison of different extraction methods of protein

由图 1 可以看出, 在 pH 值 3 ~ 10 的胶面上用酚提取法提取的蛋白质 2-DE 图谱, 蛋白点较模糊, 分辨率低, 横竖纹干扰严重; TCA/丙酮法所得的 2-DE 图谱蛋白点较清晰, 凝胶背景也较为干净, 横竖条纹干扰较少; 比较 3 张图谱, 可溶性蛋白质提取法

的蛋白点最为清晰, 背景最干净。

经 ImageMaster™ 2D Platinum Software Version 5.0 软件统计分析, 酚提取法, 在胶面上可检测到 319 个蛋白点, TCA/丙酮法则可检测到 363 个清晰的蛋白点, 比酚提取法多 44 个蛋白点, 可溶性蛋白

质提取法可检测到 421 个蛋白点,比酚提取法多 102 个蛋白点,比 TCA/丙酮法多 58 个蛋白点。在分子量区域,酚提取法蛋白点模糊难辨,横纹干扰严重,而 TCA/丙酮法和可溶性蛋白质提取法在此区域的蛋白点较清晰,在低分子量区域可溶性蛋白质提取法比酚提取法和 TCA/丙酮提取法的分辨率更高。

综上,通过对蛋白质不同提取方法的提取结果与提取的蛋白质电泳结果的比较分析,表明可溶性

蛋白质提取法的试验效果最佳,可以作为 2-D 电泳研究中玉米籽粒蛋白质提取的最佳方法。

2.2 玉米籽粒双向电泳技术体系的建立

2.2.1 等点聚焦条件优化 试验采用 pH 值 3 ~ 10、24 cm 的 IPG 胶条,水化上样,在等点聚焦条件优化前上样量 1 000 μ g,聚焦 60 000 Vhs,调整聚焦条件后,上样量 800 μ g,采取电压梯度上升的方法,聚焦 70 000 Vhs,等点聚焦程序见表 2,电泳结果见图 2。

表 2 等点聚焦优化前后程序

Tab.2 Procedure of isoelectric focus

步骤 Step	优化前 Before optimization			优化后 After optimization		
	升压方式 Booster way	电压/V Voltage	时间/h Time	升压方式 Booster way	电压/V Voltage	时间/h Time
S1	Step	500	1	Step	500	1
S2	Grqde	1 000	1	Grqde	1 000	1
S3	Grqde	8 000	1	Grqde	2 000	1
S4	Step	8 000	60 000 Vhs	Grqde	4 000	2
S5	Step	500	任意时间	Grqde	8 000	4
S6	-	-	-	Step	8 000	70 000 Vhs
S7	-	-	-	Step	500	任意时间

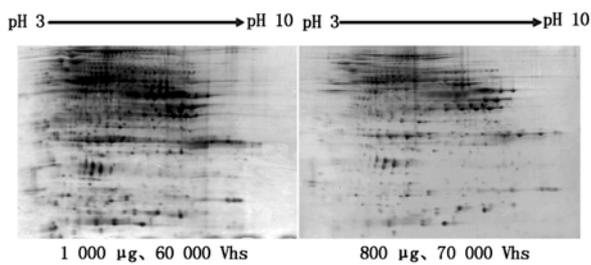


图 2 不同上样量和聚焦时间的比较

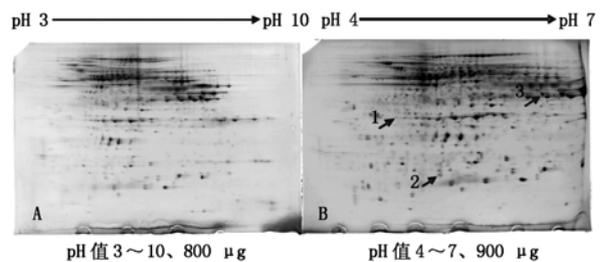
Fig.2 Comparison of different sample volume and focusing time

从图 2 可以看到,聚焦条件优化前高分子量蛋白点分离效果较差,形成连片斑点,且横纹较重;等点聚焦条件优化后明显改善这种情况,高分子量蛋白点分离效果明显提高,横纹明显减少,蛋白质点更为清晰,在胶体整体分辨率提高的同时一些蛋白点染色也变浅。前者胶片上检测到胶点 519 个,后者 374 个,可见上样量减少的同时,能检测到的蛋白点的数量也随之减少。

2.2.2 等电点范围和上样量的确立 为了分离得到分布均匀清晰的蛋白质点,进行了不同等电点和上样量的多次比对试验。结果表明,在等电点 pH 值 3 ~ 10 的胶面上,尽管减少上样量,但还是有蛋白点分离不开,如果继续减少上样量则一些低丰度表达的点就会检测不到;试验中发现玉米籽粒蛋白在酸性端和碱性端蛋白质点较少,蛋白质点主要居中在 pH 值 4 ~ 7,所以采用 pH 值 4 ~ 7 的胶条,增加上

样量至 900 μ g,仍采取表 2 中优化后的聚焦程序,聚焦增加至 80 000 Vhs。

从图 3 可以看出,pH 值 4 ~ 7 分离效果明显高于 pH 值 3 ~ 10,且蛋白质点分布更为均匀。改进后胶面有 620 个点,较 pH 值 3 ~ 10 的胶面 374 个点增加了 246 个点,蛋白点形状规则,能更好地满足研究分析的需求。



1 ~ 3. MALDI-TOF-TOF 质谱分析选取的蛋白质点。
1 - 3. The MALDI-TOF-TOF Mass Spectrometry protein points.

图 3 不同等电点范围的比较

Tab.3 Comparison of different isoelectric point range

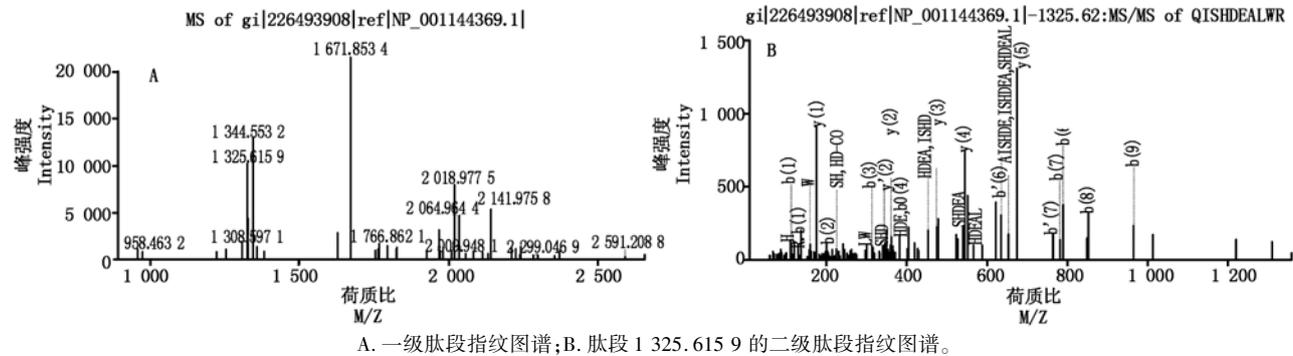
2.3 染色方法与质谱鉴定兼容性分析

蛋白质点 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定不仅对蛋白质点质量有要求,而且要求胶体染色方法与其兼容。为检测本研究改进的考马斯亮蓝染色法与质谱鉴定的兼容性,以及不同蛋白点的真实性,随机挖掘了图 3 中 B 胶片不同分子量、等电点、灰度值以及不同斑点面积的 3 个点,送深圳华大基因科技服务公司进行 MALDI-TOF-TOF 质谱分析。经蛋白质点胶内酶解、洗脱和 MALDI-TOF-TOF 质谱上机,获得

肽质量指纹图谱(图4)。

使用 Mascot 软件在 NCBI nr 玉米数据库中进行比对,3 个蛋白点都匹配到了相应的蛋白(表3)。从表3列出的3个蛋白点鉴定的蛋白信息可以看出,1号点得分312,覆盖率47.59%,为一个未描述

的蛋白 LOC100277287;2号点得分112,覆盖率24.37%,为一个脂蛋白;3号点得分313,覆盖率68.28%,是一个类豆球蛋白。说明改进后的考马斯亮蓝染色的灵敏度完全符合 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定的需要。



传统的双向蛋白胶体染色方法有考马斯亮蓝染色法和银染法。银染法染色分辨率较高,但染色程度较难掌控,有假阳性现象,且胶点质谱分析费用较高。相对于银染法,考马斯亮蓝染色法分辨率较低,但准确性和稳定性较高,胶点质谱分析费用较银染低。传统的考马斯亮蓝染色法步骤较繁琐,本研究在传统的考马斯亮蓝染色法基础上,进行了简化和改进。随机挖点的质谱分析结果表明改进的考马斯亮蓝染色法与质谱鉴定兼容,稳定性高,且灵敏度完全符合鉴定的需要。

参考文献:

- [1] Wilkins M R, Williams K L, Appel R D, *et al.* Proteome Research: New frontiers in function genomics [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1997.
- [2] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. *Biol Chem*, 1975, 208: 15 - 22.
- [3] Stastny J, Prasad R, Fosslie E. Tissue proteins in breast cancer, as studied by use of two-dimensional electrophoresis [J]. *Clinical Chemistry*, 1984, 30: 1914 - 1918.
- [4] Wang Y, Sun J, Chitnis P R. Proteomic study of the peripheral proteins from thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21 (9): 1746 - 1754.
- [5] Nishizawa Y, Komori N, Usukura J, *et al.* Initiating ocular proteomics for cataloging bovine retinal proteins: microanalytical techniques permit the identification of proteins derived from a novel photoreceptor preparation [J]. *Experimental Eye Research*, 1999, 69: 195 - 212.
- [6] Yang P F, Shen S H, Kuang T Y. Comparative analysis of the endosperm proteins separated by 2-D electrophoresis for two cultivars of hybrid Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48 (9): 1028 - 1033.
- [7] Long G Y, Song J Y, Deng Z N, *et al.* Ptc1 gene induced by cold stress was identified by proteomic analysis in leaves of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 5859 - 5866.
- [8] Liu X T, Zhai R, Feng W T, *et al.* Proteomic analysis of Zaosu' pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) and its early-maturing bud sport [J]. *Plant Science*, 2014, 224: 120 - 135.
- [9] 甄 艳, 施季森. 质谱技术在蛋白质组学研究中的应用 [J]. *南京林业大学学报*, 2011, 35 (1): 103 - 108.
- [10] 张晓婷, 郑奇君, 高 飞, 等. 蛋白质组学在水稻生长发育研究中的应用研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2011, 40 (1): 1 - 5.
- [11] 林必博. 棉花蛋白提取方法及其蛋白质组学研究进展 [J]. *山西农业科学*, 2011, 39 (7): 740 - 743.
- [12] 邵彩虹, 唐秀英, 李明心, 等. 6-苄基腺嘌呤延缓水稻衰老效应的蛋白质组学分析 [J]. *华北农学报*, 2014, 29 (1): 14 - 19.
- [13] 吴亚丹. 植物蛋白质学的研究策略 [J]. *现代农业科学*, 2009, 16 (5): 12 - 13, 16.
- [14] Dumas-Gaudot E, Amiour N, Weidmann S, *et al.* A technical trick for studying proteomics in parallel to transcriptomics in symbiotic root fungus interactions [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 451 - 453.
- [15] Damerval C, de Vinne D, Zivy M, *et al.* Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52 - 54.
- [16] 增广娟, 李春敏, 张新忠, 等. 适于双向电泳的苹果叶片蛋白质提取方法 [J]. *色谱*, 2009, 27 (4): 484 - 488.
- [17] 付忠军, 丁 冬, 进茜宁, 等. 玉米花丝蛋白质双向电泳条件的优化 [J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45 (12): 1215 - 1220.
- [18] 陈蕊红, 张改生, 刘 卫, 等. 小麦花药蛋白组双向电泳技术体系的优化 [J]. *核农学报*, 2008, 22 (4): 104 - 409.