

桃果实蛋白质双向电泳影响因素的研究

王一鸣¹, 花宝光^{1,3}, 王有年^{2*}, 孟海玲²

(¹ 北京农学院生物技术系, 北京 102206; ² 北京市农业应用新技术重点实验室, 北京 102206; ³ 北京农学院蛋白质组学研究平台, 北京 102206)

摘要: 以‘大久保’桃 (*Prunus persica* L. ‘Okubao’) 果实为试材, 通过比较不同上样量、不同上样缓冲液、不同平衡缓冲液、不同染色方式等条件下的双向电泳图谱, 探讨以上各因素对桃果实双向电泳图谱效果的影响。结果表明考马斯亮蓝染色后的电泳图谱虽然蛋白质点的数量少于银染色后的图谱, 但背景较为清晰, 适用于蛋白质组分析。采用固相 pH 梯度 17 cm 胶条, 100 μg 蛋白质上样量, 样品干粉溶于 375 μL 含有硫脲、碘基三甲基胺乙内脂 3-10 的上样缓冲液中, 等电聚焦后用含有磷酸三丁酯的平衡缓冲液还原, 进行 SDS-PAGE, 银染色得出的双向电泳图有蛋白点 1 209 个, 纹理较少, 适用于桃果实蛋白质组学分析且兼容于下游技术的蛋白质质谱鉴定。

关键词: 桃; 果实; 蛋白质; 双向电泳

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1579-06

Studies on Influence Factors of Protein Two-dimensional Electrophoresis in *Prunus persica* Fruit

WANG Yi-ming¹, HUA Bao-guang^{1,3}, WANG You-nian^{2*}, and MENG Hai-ling²

(¹ Department of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; ² Beijing Key Laboratory of New Technology in Agriculture Application, Beijing 102206, China; ³ Platform of Proteomics, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: Peach (*Prunus persica* L. ‘Okubao’) fruit was adopted in this experiment. Comparing different effects of two-dimensional electrophoresis (2-DE) gels that were involved with quantitative loading of sample, sample buffer, equilibration buffer and the type of staining to explore influence factors of 2-DE patterns on peach fruit. Although the two-dimensional gel stained by coomassie brilliant blue had gained less protein spots than the gel stained by silver, it had a clear background intensity and was applicable to the proteomic study. Furthermore, approximately 100 μg of protein was brought to a final volume of 375 μL sample buffer which contained thiourea and sulfobetaine 3-10 and loaded on 17 cm immobilized pH gradients strip, then the strip was incubated in equilibration buffer with tributyl phosphine after isoelectric focusing. The two-dimensional gel stained by silver detected 1 209 protein spots and had slight streaks. The results demonstrated that the protocol was suited to proteomic analysis of peach fruit and compatible with protein identification by mass spectrometry of downstream processing.

Key words: *Prunus persica*; Fruit; Protein; Two-dimensional electrophoresis

双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 作为蛋白质组研究的核心技术之一, 是目前常

收稿日期: 2007-07-25; 修回日期: 2007-10-20

基金项目: 北京市自然科学基金重点项目 (6071001); 北京市科委区县专项资金项目 (2006); 北京市都市农业学科群项目 (XK100190553); 北京市属市管高校人才强教计划项目 (PXM2007-014207-044536); 北京市属市管高校引进人才计划项目 (PXM2007-014207-044538)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wyn1951@126.com)

用的惟一能够连续在一块胶上分离数千种蛋白质的方法,也是目前分辨率最高的工具之一,广泛应用于生物研究的各个方面。影响双向电泳图谱效果的因素很多,有研究者在水稻、苜蓿和一些盐生植物上采用不同蛋白质提取方法、不同等电聚焦(IEF)电泳上样量、不同分离胶浓度、不同 pH 范围的固相 pH 梯度(immobilized pH gradients, IPG)胶条进行蛋白质双向电泳图的比较,结果令人较为满意,为后续试验提供了借鉴(Zhen et al., 2005; 李肖芳等, 2006; 王玉琪和彭新湘, 2006)。

果树果实中含有大量的多糖及色素、酚、醌等次生代谢产物,给果树蛋白质双向电泳研究增加了难度。过去曾经有人报道过使用管状载体两性电解质凝胶电泳研究果实蛋白质组学的结果(曹尚银等, 2005),对研究果树蛋白质组有一定的推动作用,但由于方法的局限性,很难实现对蛋白质组的研究需要。因此对应用 IPG-IEF 与 SDS-PAGE 系统双向电泳研究果树蛋白质组方法的需求就显得十分迫切。作者采用 IPG-IEF 为第 1 向,垂直 SDS-PAGE 为第 2 向,以发育中期的桃果实为试材,探索适用于全细胞蛋白质组分离的双向电泳技术,为研究桃树果实发育蛋白质组乃至果树蛋白质组提供方便。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以‘大久保’桃(*Prunus persica* L. ‘Okubao’)硬核期的果实为材料。样品采自北京市郊果园。现蕾期选取树势健壮,生长较为一致,株行距为 4 m×6 m 的 6 年生桃树 10 株,常规栽培管理,于内果皮硬核期从每株树外围长势相似的 1 年生结果枝上采 30 个果实,放入手提冰箱带回实验室,准备进行蛋白质的提取。

1.2 仪器

PROTEAN IEF System 水平电泳系统、PROTEAN II XL Cell 垂直电泳系统和 Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell 垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);PowerLook 2100XL 扫描仪(美国 UMAX 公司)。

1.3 试剂

pH 3~10 线性 7 cm 和 pH 3~10 线性 17 cm 固化 IPG 干胶条、磷酸三丁酯(TBP)、两性电解质 pH 3~10 购自美国 Bio-Rad 公司;磺基三甲胺乙内脂 3-10(SB3-10)购自美国 Amresco 公司;碘乙酰胺购自德国 Merck 公司;三氯乙酸(TCA)等药品为国产分析纯级。

1.4 溶液配制

上样缓冲液 I: 尿素 5 mol·L⁻¹、硫脲 2 mol·L⁻¹、40 mmol·L⁻¹ Tris、20 mg·L⁻¹ CHAPS、65 mmol·L⁻¹ DTT、20 mg·L⁻¹ SB3-10、0.2% 载体两性电解质、溴酚蓝 0.001%。

上样缓冲液 II: 尿素 8 mol·L⁻¹、40 mmol·L⁻¹ Tris、40 mg·L⁻¹ CHAPS、65 mmol·L⁻¹ DTT、0.2% 载体两性电解质、溴酚蓝 0.001%。

胶条平衡缓冲液储液: 0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8)、尿素 6 mol·L⁻¹、20% 甘油、2% SDS, -20℃ 保存。胶条平衡缓冲液 I: 使用前向 10 mL 平衡缓冲液储液中加入 200 mg DTT。胶条平衡缓冲液 II: 使用前向 10 mL 平衡液储液加 250 mg 碘乙酰胺。胶条平衡缓冲液 III: 使用前向平衡缓冲液储液中加入 TBP 至终浓度为 5 mmol·L⁻¹。

1.5 总蛋白质提取与定量

总蛋白质提取参照 Tal 等(2006)的方法。将提取出来的蛋白质干粉,以 1 mg:25 μL 比例加入水化上样缓冲液,充分浸泡,37℃ 助溶 30 min,其间振荡 2 次,21 000×g、28℃ 下离心 2 次,各 45 min,取上清液进行双向电泳或参照 Bradford 法(Ramagli, 1999)进行蛋白质定量。

1.6 等电聚焦电泳

参照 Sarry 等(2004)的方法设置等电聚焦程序,每根 7 cm 胶条限制电流 30 μA,17 cm 胶条限

制电流 50 μ A。等电聚焦结束后将 IPG 胶条在平衡缓冲液中平衡后进行第 2 向 SDS-PAGE 电泳。

1.7 SDS-PAGE 与染色

分离胶浓度为 12%。按如下参数进行电泳: 20℃ 恒温下, Mini 垂直电泳 75 V 15 min, 150 V 2.5 h; PROTEAN II XL Cell 垂直电泳系统 100 V 25min, 300 V 3.5 h。

考马斯亮蓝法染色时先用超纯水洗胶 3 次, 每次 5 min, 再加入足量考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 1 h, 然后用脱色液脱色至背景干净为止。银染色采用 Yan 等 (2000) 的方法, 所用溶液染色时现配, 碳酸钠溶液在未加甲醛前 4℃ 预冷。

1.8 图像扫描与数据分析

采用 PowerLook 2100 XL 扫描仪对凝胶进行图像扫描, PDQuest 2-DE 8.0.1 分析软件 (美国 Bio-Rad 公司) 对图像进行分析: 定义蛋白质点的大小、强弱, 检测和统计蛋白质点数目, 计算蛋白质点的等电点等, 同时对图像进行强度校正、背景消减、ID 校正、建立平均凝胶分析等。

2 结果与分析

2.1 上样缓冲液和染色方式对 2-DE 图谱的影响

图 1, A 和图 1, B 分别为含 220 μ g 蛋白质的样品溶于上样缓冲液 I 和上样缓冲液 II 中, 同时采用 7 cm 胶条进行等电聚焦电泳和 SDS-PAGE, 经考马斯亮蓝 R-250 染色后的图谱, 图 1, A 背景较为清晰, 图 1, B 上半部分蛋白点有拖尾现象。经 PDQuest 2-DE 8.0.1 软件分析, 使用 Normalization 方法, 在 Local regression 模式下 Floating Ball 47 背景抽提, Median 3 \times 3 噪声过滤类型, 点检测灵敏度 13.7849, 图 1, A 显示共检测出符合高斯模型的有效蛋白点 242 个, 图 1, B 显示共检测出 297 个。图 1, C 和图 1, D 分别为含 80 μ g 蛋白质的样品溶于上样缓冲液 I 和上样缓冲液 II, 其他条件不变, 经银染色后的图谱, 图 1, C 得出 615 个点, 图 1, D 得出 644 个点, 比图 1, C 多出 4.72%。通过比较发现, 使用上样缓冲液 I 的电泳图谱虽然点的数量少于上样缓冲液 II 的电泳图谱, 但背景较清晰, 特别是应用考马斯亮蓝染色时 (图 1, A), 已排除了背景干扰, 完全适用于蛋白质组分析。从图 1, C 和图 1, D 来看, 采用长度为 7 cm 的胶条不足以清晰、独立地区分蛋白质点, 因此需要进一步用更长的胶条来进行蛋白质双向电泳。

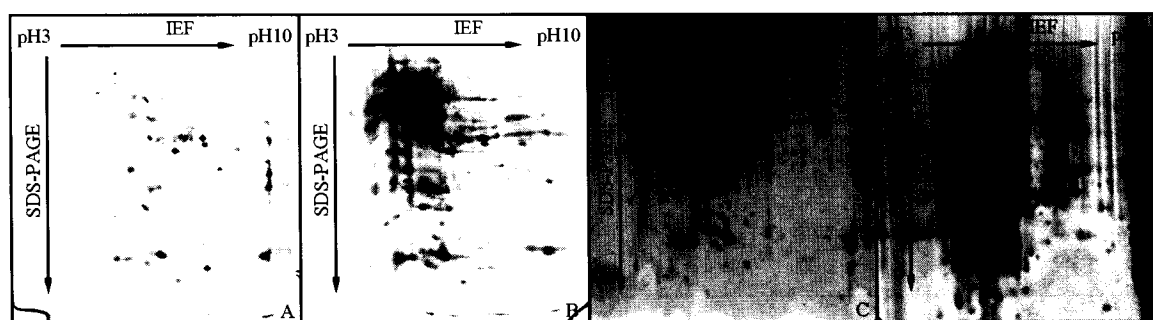


图 1 不同上样缓冲液与不同染色方式的 2-DE 图谱比较

A, B. 样品分别溶于上样缓冲液 I 和上样缓冲液 II, 考马斯亮蓝 R-250 染色;

C, D. 样品分别溶于上样缓冲液 I 和上样缓冲液 II, 银染。

Fig. 1 Comparison of 2-DE patterns with different sample buffer and staining protocol

A, B. The samples were dissolved in sample buffer I (contain thiourea and SB3-10) and sample buffer II respectively, then gels were stained by coomassie brilliant blue R-250; C, D. The samples were dissolved in sample buffer I

(contain thiourea and SB3-10) and sample buffer II respectively, then gels were stained by silver.

2.2 不同平衡缓冲液与上样量对 2-DE 图谱的影响

选择上样缓冲液 I 作为蛋白样品的裂解液, 上样量 250 μg , 采用 17 cm 胶条进行等电聚焦电泳, 图 2, A 为胶条等电聚焦结束经平衡缓冲液 I 还原 15 min, 再用平衡缓冲液 II 烷基化 15 min, SDS-PAGE 后银染色得出的结果, 其纵向纹理较多, 背景噪声大。图 2, B 为胶条等电聚焦结束经平衡缓冲液 III 平衡 15 min, SDS-PAGE 后银染色得出的结果, 其纹理情况好于图 2, A, 但仍有明显纵向条纹。图 2, A 有效蛋白点为 1 267 个, 图 2, B 为 1 281 个, 二者相比较蛋白质点的数量差异变化不显

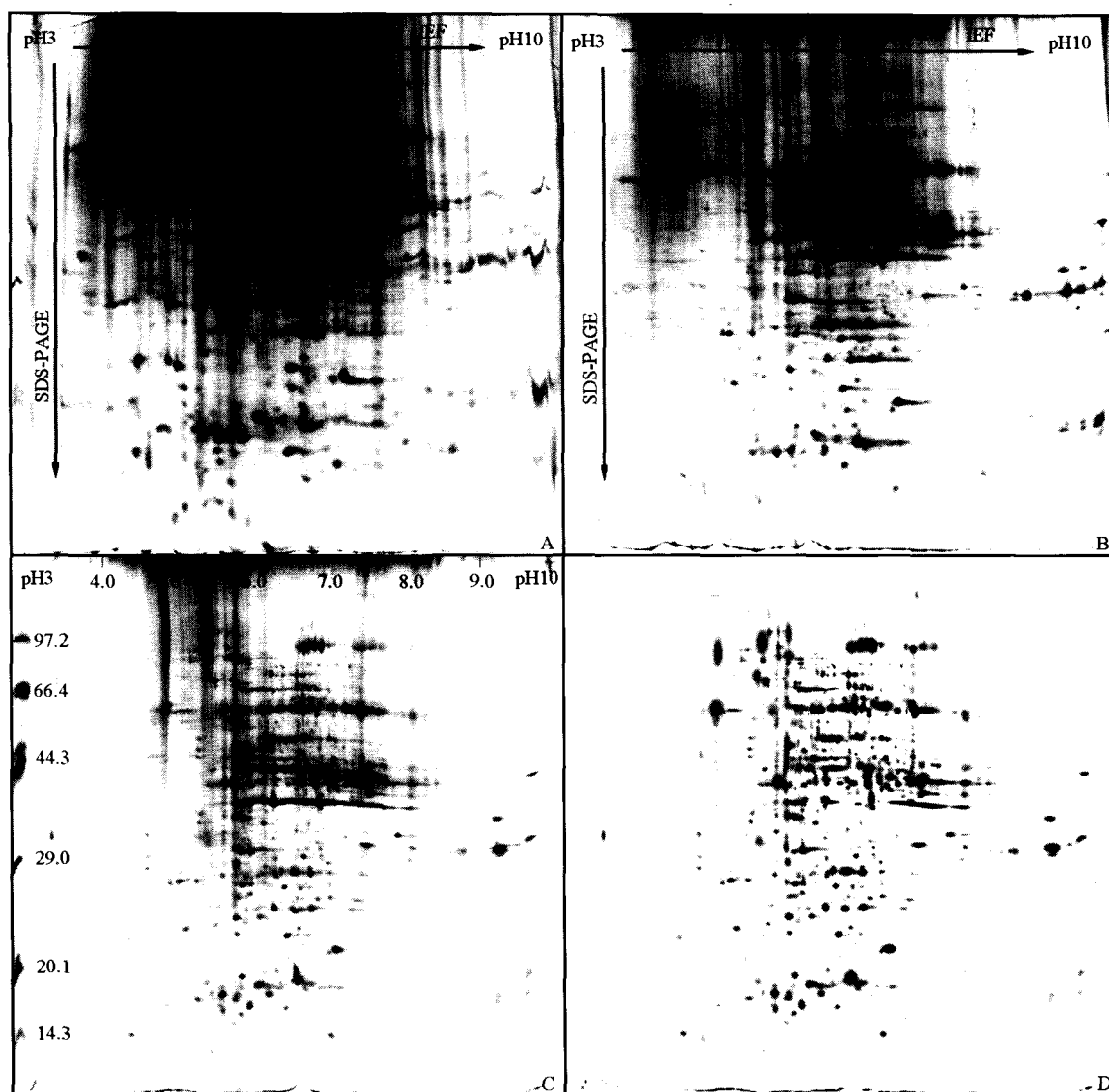


图 2 不同平衡缓冲液与不同上样量的 2-DE 图谱比较

A. 250 μg 上样量, 等电聚焦结束后胶条经平衡缓冲液 I、II 两步平衡;

B. 250 μg 上样量, 等电聚焦结束后胶条经平衡缓冲液 III 一步平衡;

C. 100 μg 上样量, 等电聚焦结束后胶条经平衡缓冲液 III 平衡; D: 图 2, C 的高斯图谱。

Fig. 2 Comparison of 2-DE patterns with different equilibration buffer and quantitative loading of sample

A. 250 μg protein was loaded on the strip. The strip was incubated in equilibration buffer I (contain DTT) and II (contain iodoacetamide) after IEF. B. 250 μg protein was loaded on the strip. The strip was only incubated in equilibration buffer III (contain TBP) after IEF; C. 100 μg protein was loaded on the strip.

The strip was incubated in equilibration buffer III (contain TBP) after IEF; D. The gaussian pattern of Fig. 2, C.

著。选择上样缓冲液 I 作为蛋白样品的裂解液, 上样量为 100 μg , 采用 17 cm 胶条进行等电聚焦电泳, 在平衡缓冲液 III 中平衡 15 min, 其他条件不变, 银染色后, 图 2, C 背景噪声降低了许多, 纵向条纹主要出现在 pH 4.5 ~ 6.0 范围内, 但对图谱的分析并没有产生过多影响。全图发现有效蛋白点 1 209 个, 虽然少于图 2, A 和图 2, B, 但从整体上减少了不确定点出现的可能。通过比较发现使用平衡缓冲液 III 进行胶条平衡得出的电泳图谱效果好于使用平衡缓冲液 I 与平衡缓冲液 II 得出的电泳图谱效果, 而且没有损失图谱上的蛋白质点; 上样量从 250 μg 减少至 100 μg 后, 去除了部分重叠的蛋白质点, 因此点的数量并没有明显下降, 电泳图谱的效果好很多。

模糊的、重叠的或条纹中的点不能被精确量化, PDQuest 软件会把原始图像上这样的点过滤后按照高斯曲线转化成三维的高斯点, 再由高斯点合成理想的高斯图像, 去除图谱上的干扰背景, 使蛋白点能更精准的被识别。图 2, D 是由图 2, C 转化成的高斯图, 可以看出高斯图中蛋白点较为圆润、突出, 背景清晰, 可满足蛋白组学双向电泳分析的需要。

3 讨论

3.1 样品制备

样品的制备是双向电泳成功与否的关键 (Blackstock & Weir, 1999)。植物组织含有大量的色素、酚类、醌类等次生代谢物质, 如果样品处理不当, 这些物质将会严重干扰等电聚焦结果。本试验中采用 TCA—丙酮沉降蛋白, 所得样品干粉溶于上样缓冲液。上样缓冲液 I 含有硫脲和 SB3-10, 硫脲与尿素结合会使蛋白质的溶解性更好, 尤其是疏水性膜蛋白 (Pasquali, 1997), SB3-10 同样也可有效溶解蛋白。结果表明干粉溶于含有硫脲和 SB3-10 裂解液后, 蛋白质含量为 $2.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$, 溶于不含硫脲和 SB3-10 的裂解液时, 蛋白质含量为 $1.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$, 由此可见上样缓冲液中的组分对蛋白质的溶解有很大帮助, 从图谱来看, 图 1, A 和图 1, C 背景效果与蛋白点的分离效果也好于图 1, B 和图 1, D。

3.2 图谱的背景

试验结果表明在其它条件一致情况下, 胶条平衡缓冲液组分不同会影响图谱的背景纹理。图 2, A 中所用平衡缓冲液中含有 DTT。DTT 作为还原剂, 在蛋白质与 SDS 充分结合的同时, 它可以断裂二硫键。平衡缓冲液 II 中的碘乙酰胺可以烷基化自由的 DTT 和蛋白质所带的自由巯基, 而 DTT 中的巯基带有电荷, 在二次平衡不完全时会在第 2 向 SDS-PAGE 中产生条纹的假象, 银染后观察会更明显。TBP 不带电荷, 在 SDS-PAGE 过程中不迁移 (Bjellqvist et al., 1993), 这也正是图 2, B 背景效果好于图 2, A 的原因。

在其它条件一致的情况下, 上样量的多少也会影响图谱的背景纹理。图 2, B 上样量为 250 μg , 图 2, C 上样量为 100 μg , 上样量过大会使蛋白点发生重叠, 合适的上样量会让图的背景更为清晰, 但会丢失分子量 20.1 ~ 29.0 kD 部分的少量低丰度蛋白。IPG 胶条的 pH 范围亦会对图谱的背景产生影响, 对于试材中中性偏酸性蛋白, 使用 pH 5 ~ 8 或酸碱范围更窄的胶条对等电点、分子量的分离和双向电泳图谱背景的效果应该都会更好 (王一鸣 等, 2007)。

3.3 染色

本研究表明考马斯亮蓝染色后的电泳图谱可完全满足蛋白质组研究的需要。考马斯亮蓝染色法虽然灵敏度低于银染色或荧光检测, 但操作简便, 蛋白点清楚、突出, 染色背景及对比度好, 且与下游蛋白质质谱鉴定方法兼容, 应用空间仍然很大; 为满足高通量差异蛋白组分析, 从成本考虑, 试验初期银染色的地位首屈一指, 但银染背景深, 噪声大, 不易控制。

References

- Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, Sanchez J C, Hochstrasser D. 1993. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis*, 14: 1357 – 1365.
- Blackstock W P, Weir M P. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends of Biotechnology*, 17 (3): 121 – 127.
- Cao Shang-yin, Zhang Qiu-ming, Guo Jun-ying, Chen Yu-ling. 2005. Progress in proteomics technology and its application on fruit tree. *Journal of Fruit Science*, 22 (2): 138 – 142. (in Chinese)
- 曹尚银, 张秋明, 郭俊英, 陈玉玲. 2005. 蛋白组学研究技术及其在果树学中的应用. *果树学报*, 22 (2): 138 – 142.
- Li Xiao-fang, Han He-ping, Wang Xu-chu, Fan Peng-xiang, Li Yin-xin. 2006. A protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis analysis of halophytes. *Acta Ecologica Sinica*, 26 (6): 1848 – 1853. (in Chinese)
- 李肖芳, 韩和平, 王旭初, 范鹏祥, 李银心. 2006. 适用于盐生植物的双向电泳样品制备方法. *生态学报*, 26 (6): 1848 – 1853.
- Pasquali C, Fialka I, Huber L A. 1997. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis*, 18 (14): 2573 – 2581.
- Ramagli L S. 1999. 2-D proteome analysis protocols. In: Link A J. *Methods in molecular biology*. Vol. 112. Totowa: Humana Press: 99 – 103.
- Sarry J E, Sommerer N, Sauvage F X, Bergoin A, Rossignol M, Albagnac G, Romieu C. 2004. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics*, 4 (1): 201 – 215.
- Tal I, Cynthia M B, Ramu S S, Yong H H, Carmen C, Montserrat S, Jocelyn K C. 2006. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols*, 1: 769 – 774.
- Wang Yi-ming, Hu Hao, Wang You-nian, Li Yi-song, Liu Yue-ping. 2007. Effects of two immobilized pH gradients strips on protein two-dimensional electrophoresis of peach (*Prunus persica*) mesocarp. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 22 (2): 13 – 16. (in Chinese)
- 王一鸣, 胡昊, 王有年, 李奕松, 刘悦萍. 2007. 两种固相 pH 梯度胶条对桃果实蛋白质双向电泳的影响. *北京农学院学报*, 22 (2): 13 – 16.
- Wang Yu-qi, Peng Xin-xiang. 2006. A two-dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic study of rice leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32 (2): 252 – 256. (in Chinese)
- 王玉琪, 彭新湘. 2006. 适用于水稻叶片蛋白质组分析的双向电泳技术. *植物生理与分子生物学学报*, 32 (2): 252 – 256.
- Yan J X, Robin W, Tom B, Harry R A, Westbrook J A, Wheeler C H, Dunn M J. 2000. A modified silver staining protocol for visualization of protein compatible with matrixassited laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21 (17): 3666 – 3672.
- Zhen T L, Aaron M E, Bonnie S W, Richard A D, Pedro J M, Lloyd W S. 2005. A two-dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of 1367 proteins from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4: 1812 – 1825.