

适用于条斑紫菜的双向电泳样品制备方法

赵宇鹏¹, 周伟^{2,3}, 赵佩佩^{2,3}, 才金玲¹, 朱大玲¹, 潘光华¹, 刘洪艳¹,
王广策²

(1. 天津科技大学 海洋科学与工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了建立适于条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)蛋白质组学分析的样品提取方法, 作者以条斑紫菜叶状体为材料, 比较了饱和硫酸铵沉淀法、三氯乙酸/丙酮沉淀法和酚提取方法3种方法对条斑紫菜叶状体总蛋白的提取效果。结果表明, 针对条斑紫菜叶状体细胞中含有大量多糖, 多酚化合物, 色素等干扰物质的特点, 通过酚提取方法能有效去除这些干扰杂质, 得到清晰、稳定、干净的双向电泳图谱和相对较多的蛋白质点数, 为提高其他大型海藻的总可溶性蛋白提取效率提供了重要参考。

关键词: 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*); 双向电泳; 蛋白提取; 硫酸铵; 三氯乙酸; 酚

中图分类号: S917.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)05-0019-06

紫菜(*Porphyra*)是一类原始红藻, 属于红藻门(Rhodophyta)原红藻纲(Rhodophyceae)红毛菜亚纲(Bangiophycidae)红毛菜目(Bangiales)红毛菜科(Bangiaceae)紫菜属(*Porphyra*)^[1]。目前中国的栽培物种包括长江以南的坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)和长江以北的条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*), 其中条斑紫菜的产值最高。条斑紫菜是一种高蛋白、低脂肪的营养丰富的海藻, 富含人体所需的维生素和微量元素, 既可食用、药用又可作为加工业的重要原料, 还可以用于水环境监测和治理, 因此对于紫菜的研究具有非常高的应用价值, 对于条斑紫菜蛋白组成的了解有助于分析其营养成分等方面的品质, 对生产应用具有指导作用^[2]。

蛋白质组学是以细胞内存在的全部蛋白质及其活动规律为研究对象, 它是继基因组学之后在分子水平上了解生命过程逻辑性的第二步, 是后基因组时代生命科学研究和核心内容之一。早在蛋白质组概念提出来之前的1975年, 二维凝胶电泳技术经过长期发展, 和质谱技术、生物信息学成为蛋白质组学研究的三大核心技术^[3]。双向电泳是研究蛋白质表达最有效的工具, 是一种同时对上千种蛋白质进行分离的高分辨率的方法^[4]。近年来双向电泳技术在植物应用中有不少报道, 但大部分集中在一些高等模式生物上, 对于条斑紫菜的应用还没见报道, 条斑紫

菜富含色素、多酚、多糖等次生代谢产物, 其蛋白样品制备相对于其他植物更加困难。作者比较了硫酸铵沉淀法、丙酮—TCA法和酚提取方法等几种方法, 对条斑紫菜叶状体总蛋白的提取效果, 发现酚提取法能更好地提取蛋白, 更高效地除去样品的盐离子及其他干扰杂质, 适用于组织复杂的植物^[5-7], 并在此方法基础上进行了改进。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

条斑紫菜叶状体采自江苏南通栽培海区, 取回实验室后用消毒海水洗净, 阴干, 冻存于-80 待用。

1.2 试剂与仪器

二维电泳系统、扫描仪、固化 IPG 干胶条 pH 3~10 线性 17 cm、IPG(Immobilized pH gradients)缓冲液、IPG 覆盖油、两性电解质购自美国 Bio-Rad 公司;

收稿日期: 2012-02-16; 修回日期: 2012-12-06

基金项目: 海洋公益性项目(201105023-7); 江苏省前瞻性联合研究项目(BY2011188); 中国科学院院先导项目(XDA05030401)海洋公益性项目(201105008-2)

作者简介: 赵宇鹏(1986-04), 男, 山东聊城人, 硕士, 主要从事藻类蛋白质组学研究, 电话: 15822282308, E-mail: zhaoyu-peng54862304@163.com; 王广策, 通信作者, 电话: 13505326219, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn

过硫酸铵、硫脲、CHAPS、PMSF、考马斯亮蓝 G-250、溴酚蓝等购自 Amersha Pharmacia 公司。尿素、甘氨酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、碘乙酰胺、DTT、SDS、PVP、TEMED、 β -巯基乙醇均购自美国 Sigma 公司。蛋白酶抑制剂、琼脂糖、蛋白 Marker、低分子量标准蛋白质、牛血清蛋白(BSA)购自北京鼎国生物技术公司。三氯乙酸、平衡饱和酚丙酮、乙醇等其他所用药品或试剂为国产分析纯级。

1.3 蛋白质提取方法

-80 冻存叶状体材料称质量, 放入预冷的研钵中, 加入少量石英砂(二氧化硅), 加入 10% PVPP^[8], 研磨成粉末, 一直加入液氮保证组织不解冻(不溶的 PVPP 可以有效吸附酚类化合物)。

1.3.1 饱和硫酸铵沉淀法

(1) 研磨好的材料粉末加入 2 倍体积预冷的蛋白提取液(8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L 抗坏血酸, 1% β -巯基乙醇, 0.5 mmol/L PMSF, pH7.8), 混匀后于 4 放置过夜。

(2) 离心 10 000 r/min, 20 min, 4 , 去沉淀, 缓慢加入硫酸铵(冰浴)至饱和, 再次 4 过夜; 离心 10 000 r/min, 20 min, 4 , 取沉淀。

(3) 沉淀用裂解液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 60 mmol/L DTT, 40 mmol/L Tris-HCl, pH8.8)重悬后离心 10 000 r/min, 20 min, 4 , 去除不溶物。上清用超滤管反复除盐, 得到浓缩的蛋白。

1.3.2 三氯乙酸/丙酮沉淀法^[9]

(1) 研磨好的材料粉末加入蛋白提取液(10%的三氯乙酸, 即 10 g 三氯乙酸溶解在 100 mL 丙酮中, 加 70 μ L β -巯基乙醇或 DTT), -20 $^{\circ}$ C 过夜, 期间摇 2~3 次, 蛋白质会形成白色沉淀。

(2) 10 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 用枪头小心吸取上清丢弃, 加 0.07% β -巯基乙醇于丙酮溶液中, 悬浮沉淀, 放-20 约 1 h, 期间摇 1~2 次。

(3) 重复步骤 2 2~3 次, 取沉淀-20 低温晾干, 约 4~5 h, 打开离心管盖子。

(4) 取出蛋白干粉, 加 0.1 mol/L NaOH^[10]溶液, 1 min, 加入蛋白裂解液, 4 上下轻轻摇匀, 30 min~1 h 左右 15 $^{\circ}$ C 离心, 10 000 g, 约 20 min。取上清超滤除盐。

1.3.3 酚提取方法^[11-13]

酚提取缓冲液: 0.7 mol/L 蔗糖 0.1 mol/L KCL; 0.5 mol/L Tris-HCl pH7.5; 50 mmol/L EDTA。储存在

4 约 1 个月。 β -巯基乙醇终浓度 2%(体积分数), PMSF 终体积分数为 1 mmol/L(储存液用异丙醇配成 100 mmol/L), 使用前添加。也可以使用全效蛋白酶抑制剂。

(1) 取研磨好粉末加入酚提取缓冲液, 晃匀放置 10 min, 4 , 间或摇晃几次。

(2) 加入等体积 pH7.5 Tris 饱和酚。

(3) 4 $^{\circ}$ C 震荡混合物 30 min, 然后 5 000~10 000g,

4 离心 30 min, 酚溶解的蛋白质, 色素, 脂类在酚相中; PVPP, 不溶的细胞碎片, 糖类, 核酸, 盐都存在于水相或形成沉淀。

(4) 收集上层酚相, 丢弃水相和沉淀(不要扰动界面上物质, 宁可浪费一些蛋白也不多吸污染物)。

(5) 加入与酚相体积相同的提取缓冲液, 重复 3、4 步骤两次。

(6) 在收集酚相里加入 5 倍体积预冷的 0.1 mol/L 乙酸钠的甲醇溶液来沉淀蛋白质。在-20 过夜, 蛋白形成白色沉淀(对大多数蛋白来说 30 min 可以沉淀, 一般来说过夜沉淀操作方便, 沉淀完全)。

(7) 5 000~10 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 用枪头小心吸取上清并丢弃。

(8) 加入两倍体积的冰预冷甲醇来清洗沉淀(基于最后收集的酚相的体积), 轻轻混匀, 5 000~10 000 g, 4 离心 30 min, 用枪头小心吸取上清并丢弃。

(9) 重复步骤 8 两次。目的是为了除掉乙酸钠和酚, 脂类以及色素。

(10) 使用丙酮代替甲醇重复步骤 9 两次, 方便除掉甲醇并使沉淀更快更有效的干燥。

(11) 把沉淀晾干(如果有颜色, 说明存在色素或氧化的酚类化合物污染, 可以重新用酚提取, 但是要注意蛋白的损失)。

(12) 把粉末转移到 1.5 mL 离心管中, 加裂解液溶解, 离心取上清测蛋白浓度。

(13) 可用超滤管浓缩至所需浓度, 冻存在-20 或者 -80 。

1.4 蛋白浓度测定

参照 Bradford 方法^[14]测定提取的条斑紫菜叶状体总蛋白质浓度。

1.5 双向电泳

等电聚焦: 采用 IPGphor 等电聚焦系统, 17 cm 的 IPG 胶条, pH=3 ~ 10。

(1)取冻存蛋白溶解和上样缓冲液按 1:4 比例上样,离心 15 000 r/min, 30 min, 17 cm 胶条上样 1 mg 蛋白和缓冲液混合后总体积 300~600 μ L。

(2)上样,取胶条至于聚焦盘里吸收液体 1 h。然后覆盖矿物油,50 V 电压下主动水化 16 h,水化结束后用洗瓶冲洗胶条两次,把胶条背面放在滤纸上吸去多余水分和矿物油,放到另一根槽里,分别用湿润滤纸做盐桥,覆盖矿物油,进行聚焦。等电聚焦参数如表 1:

表 1 等电聚焦电泳(IEF)参数

Tab. 1 The parameters of isoelectric focusing electrophoresis (IEF)

聚焦步骤	电压(V)	时间(h)
主动水化	50	16
1	250	1
2	500	1h
3	1000	1
4	10000	5
5	10000	80000 Vh(伏·时)
6	500	任意时间

注:20 , 每个胶条限流 50 μ A

(3)平衡,将聚焦好的 IPG 胶条取下,平衡 2 次,每次 15 min。第 1 次向平衡母液(50 mmol/L Tris.HCl, pH8.8, 6 mol/L 尿素, 30%甘油, 2% SDS)中加入 1% DTT, 第 2 次向平衡母液中加入 4% 碘乙酰胺。

SDS-PAGE 电泳:使用 DALT—Six 系统,进行 SDS-PAGE 电泳。温度 15 , 80V \times 30min, 200 V 电泳至溴酚兰前沿刚好跑出凝胶。

1.6 凝胶染色及分析

染色采用改进的胶体考马斯亮蓝染色法^[15],图像扫描采用 BioRad GS-800,软件分析采用 PDQuest 2-DE 8.0.1。

2 结果

2.1 3 种方法提取条斑紫菜叶状体总蛋白的图谱结果

通过双向电泳分析,比较了 3 种方法的提取效果,由图 1 可以看出饱和硫酸铵沉淀法和三氯乙酸/丙酮沉淀法所得图谱结果比较相近,背景比较重,在酸性区聚焦不是很好,低分子量区域出现横向条

纹及不规则的蛋白点,蛋白集中度高,使多个蛋白点连在一起或成线状,形成拖尾和糊状使蛋白点的等电点难以确定,影响蛋白质的分布和观察,尤其在碱性端出现大量空白几乎无蛋白质点出现,而且在高分子量区也只检测到很少的几个蛋白质点。酚提取方法所得到的图谱背景干净,分离效果比较理想,基本没有纵向条纹,横向扩散也很轻微。蛋白质点较多,尤其在碱性范围内和高分子量区域的蛋白质点较另两种法明显增多而且蛋白质点比较清晰,大多数蛋白质点呈圆形或椭圆形,清晰可见。这说明饱和硫酸铵沉淀法和三氯乙酸/丙酮沉淀法所得到的样品中盐离子和其他干扰杂质比较多,而酚提取方法则能很好的除掉这些盐离子和杂质,保证聚焦的顺利进行。

2.2 3 种提取方法获得的蛋白量差异比较

蛋白质获得量及纯度的高低是检验提取方法优劣的主要指标。图 2 和图 3 对 3 种提取方法分别从 1 g 材料所获得的粗蛋白量、纯蛋白量以及蛋白质纯度等进行比较分析。数据显示,在蛋白获得量方面,饱和硫酸铵沉淀法获得的粗蛋白量最高,其次是三氯乙酸/丙酮沉淀法,酚提取方法所得含量最低;而 3 种方法所获得的纯蛋白量比较,酚提取方法远远高于其他两种方法。蛋白质纯度是影响电泳结果的关键因素,从蛋白纯度这方面来看,酚提取方法也要远远高于其他两种方法,这可能与提取方法的除杂效果有关。由这种结果可以看出,饱和硫酸铵沉淀法去除样品杂质不完全,提取率较低;三氯乙酸/丙酮沉淀法获得的蛋白样品纯度可以,但可能会对样品蛋白造成的损失较大;酚提取方法获得的蛋白样品纯度较高,杂质处理较好。

2.3 3 种方法所得图谱在蛋白点的数目比较

饱和硫酸铵沉淀法和三氯乙酸/丙酮沉淀法取的样品中大部分蛋白质已丢失,杂质太多,蛋白质斑点比较少,分别为 163 和 178;酚提取方法使蛋白质组分得到有效分离,蛋白质样品的杂质大大减少,能检测出 587 个点。由此可见饱和硫酸铵法杂质难除,影响电泳;三氯乙酸/丙酮沉淀法,变性沉淀的蛋白质使沉淀后的蛋白溶解比较困难,导致蛋白的大量损失;酚提取方法除杂效果较其他两种方法好,所提蛋白质纯度高,所得到蛋白点较多,能反映出蛋白点的分布。

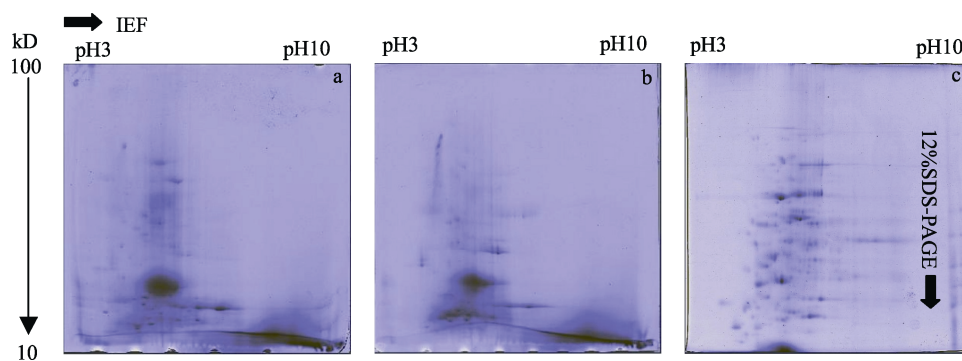


图 1 条斑紫菜叶状体总蛋白的提取

Fig. 1 Total proteins extracted from thalli of *Porphyra yezoensis*

a. 饱和硫酸铵沉淀法; b. 三氯乙酸/丙酮沉淀法; c. 酚提取方法

a. saturated ammonium sulfate precipitation; b. trichloroacetic acid/acetone precipitation (TCA); c. phenol extraction (Phe)

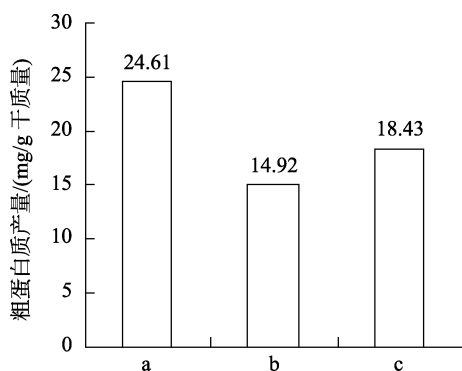


图 2 不同提取方法蛋白量比较

Fig. 2 Comparison of the crude protein yields by different extraction methods

a. 饱和硫酸铵沉淀法; b. 三氯乙酸/丙酮沉淀法; c. 酚提取方法 (图 3, 图 4 同)

a. saturated ammonium sulfate precipitation; b. trichloroacetic acid/acetone precipitation (TCA); c. phenol extraction (Phe)(The same as Fig.3, Fig.4)

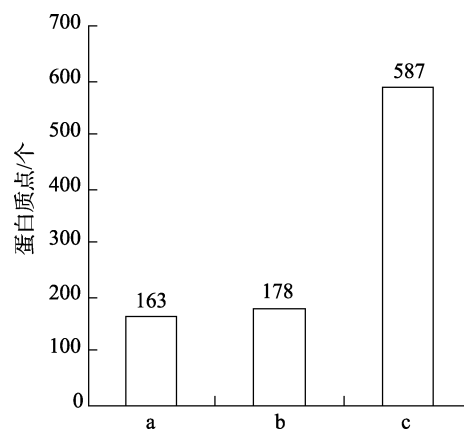


图 4 3 种方法所得蛋白点数比较

Fig. 4 Classification of protein spots with different extraction methods

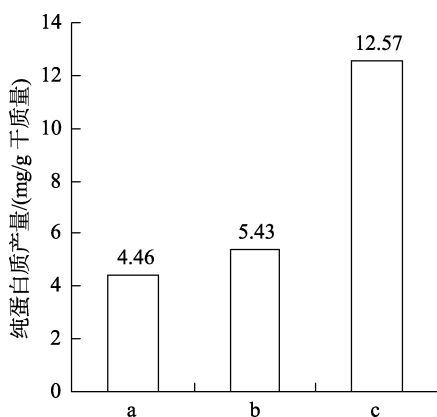


图 3 不同提取方法蛋白量比较

Fig. 3 Comparison of the pure protein yields by different extraction methods

3 讨论

样品制备是双向电泳的第一步,其成功与否是决定双向电泳成败的关键。蛋白提取过程有几条原则需要遵循:(1)尽可能溶解全部蛋白质,打断蛋白质之间的非共价键结合,使样品中的蛋白质以分离的多肽链形式存在;(2)避免蛋白质的修饰作用和蛋白质的降解作用;(3)避免脂类、核酸、盐等物质的干扰作用;(4)蛋白质样品与第一向电泳的相容性^[16]。近年来双向电泳技术在植物应用中不少报道,但大部分集中在一些高等模式生物上,对于条斑紫菜的应用还没见报道,条斑紫菜富含色素,多酚,多糖等次生代谢产物和大量盐分,其蛋白样品制备相对于其他植物更加困难。

本实验分别采用了饱和硫酸铵沉淀法、三氯乙

酸-丙酮沉淀法、酚提取法提取蛋白。结果显示饱和硫酸铵沉淀法所得蛋白样品中残留杂质太多, 最终蛋白样品在进行第一向电泳时无法很好聚焦, 影响了电泳, 使最终图谱结果不理想。三氯乙酸-丙酮沉淀法则较好解决了以上的盐离子浓度高的难题, 制备过程也相对简单, 但蛋白质沉淀下来后较难重悬, 样品得率较低。酚提取法采用先溶解提取蛋白质, 然后再沉淀离心的方法, 在提取上利用 Tris 一饱和酚的特性, 即酚是蛋白质的良好溶剂, 在样品制备过程中, 蛋白质和脂类溶于酚相, 盐、核酸、多酚和多糖等可溶性物质进入水相, 与酚相中的蛋白质分开^[12], 另外, 在实验过程中加入 PVPP 可以有效的去除多酚^[11], 使所得蛋白样品受多糖、色素、脂类、核酸、盐等物质的干扰最小, 得到的电泳图谱最理想, 很多富含多糖植物组织蛋白质的提取一般采用酚提取法, 另外在 3 种方法所获得粗蛋白质量和蛋白点总数的比较上, 直观地看出相比于前两种方法, 酚提取方法和发现酚提取法能更好地提取蛋白和除去样品的盐离子及其他干扰杂质, 获得的蛋白样品纯度较高, 为提高其他大型海藻的总可溶性蛋白提取提供了重要参考。

参考文献:

- [1] Candia A, Lindstrom S, Reyes E. *Porphyra* sp. (Bangiales, Rhodophyta): reproduction and life form[J]. *Hydrobiologia*, 1999, 398/399: 115-119.
- [2] 范晓, 韩丽君, 郑乃余. 我国常见食用海藻的营养成分分析[J]. *中国海洋药物杂志*, 1993, 12(4): 32-38.
- [3] Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-Poljak. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1090-1094.
- [4] Ange|ika G, Walter W, Michael J D. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. *Proteomics*, 2004, 4: 1-21.
- [5] Iwahashi Y, Hosoda H. Effect of heat stress on tomato fruit protein expression[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1766-1771.
- [6] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis[J]. *Proteomics*, 2005, 5: 2497-2507.
- [7] Yang Y, Thannhauser T W, Zhang S. Development of an integrated approach for evaluation of 2-D gel image analysis: Impact of multiple proteins in single spots on comparative proteomics in conventional 2-D gel/MALDI workflow[J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 2080-2094.
- [8] 魏琳, 陈由强, 叶冰莹, 等. 卷柏总蛋白质提取方法及双向电泳条件的建立[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17: 46-48.
- [9] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. *Proteomics*, 2004, 4: 2522-2532.
- [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] Wang W, Scali M, Vignani R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf plant tissue containing high levels of interfering compounds[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24: 2369-2375.
- [12] 李肖芳, 韩和平, 王旭初, 等. 适用于盐生植物的双向电泳样品制备方法[J]. *生态学报*, 2006, 26: 1848-1853.
- [13] 魏开华, 应天翼. 蛋白质组学实验技术精编[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010(第一版), 21-22.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [15] Candiano G, Brusehi M, Musante L, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1327-1333.
- [16] 冯海燕, 景志忠, 房永祥, 等. 双向凝胶电泳技术及其应用[J]. *生物技术通报*, 2009, 1: 59-68.

A protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis analysis of *Porphyra yezoensis*

ZHAO Yu-peng¹, ZHOU Wei^{2,3}, ZHAO Pei-pei^{2,3}, CAI Jin-ling¹, ZHU Da-ling¹,
PAN Guang-hua¹, LIU Hong-yan¹, WANG Guang-ce²

(1. College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb.,16,2012

Key words: *Porphyra yezoensis*; two-dimensional electrophoresis; protein extraction; ammonium sulfate; trichloroacetic acid; phenol

Abstract: Three different methods including saturated ammonium sulfate precipitation, trichloroacetic acid/acetone precipitation (TCA) and phenol extraction (Phe) have been compared to determine their efficiency in extracting total proteins from thalli of *Porphyra yezoensis* by two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis. The results showed that phenol protein extraction method gave the distinct stable and clear 2-DE map and was capable of generating more protein spots under the situation that there are many interfering substances of salinity, polysaccharide and pigments in the cells of *P. yezoensis* thalli. Findings from this study are of great significance for developing effective protein extraction methods for other macroalgae.

(本文编辑: 谭雪静)