

钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)2-DE 分析蛋白制备方法改进及试用于螺旋手性差异蛋白研究*

王景梅 汪志平 于金鑫 刘新颖 邵 斌 蓝瑾瑾 马丽芳 陈子元

(浙江大学原子核农业科学研究所 农业部核农学重点开放实验室 杭州 310029)

提要 采用冻融破壁和蛋白质分步提取等技术,对钝顶节旋藻 2-DE 分析蛋白制备方法作了改进,并试用于螺旋手性差异表达蛋白研究,结果表明:(1)钝顶节旋藻细胞反复冻融 5 次完全破碎,用 Tris-HCl 提取液提取 3 次可提得近 87%的水溶性蛋白,再用 SDS(十二烷基磺酸钠)提取液可从沉淀中提得水不溶性蛋白;(2)将上述水溶性和水不溶性蛋白分别用 TCA/丙酮法纯化后作双向电泳(2-DE)分析,可辨蛋白点分别达 500 和 760 多个,而两者间的匹配率仅 7%,说明分离度好且质量高;(3)利用此法获得了 13 个与钝顶节旋藻螺旋手性相关的候选蛋白,其中 5 个为首次发现,候选蛋白功能涉及光合作用、能量代谢、物质外排和环境适应等;(4)本文所建的“冻融破壁分步提纯法”与现有节旋藻 2-DE 蛋白制备方法相比,具有操作简便、仪器设备简单、成本低廉及信息量更丰富等优点。

关键词 钝顶节旋藻,蛋白质,制备方法,双向电泳,螺旋手性

中图分类号 Q51

节旋藻(*Arthrospira*)是一种多细胞、不分枝、无异形胞、光合放氧的原核丝状蓝藻,其中钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)和极大节旋藻(*Arthrospira maxima*)因适合工厂化培植,且富含优质蛋白和多种生物活性物质,已成为当前全球研发规模最大、应用领域最广的经济微藻(胡鸿钧, 2003; Wang *et al.*, 2005; Pfeiffer *et al.*, 2011)。节旋藻藻丝的典型形态为规则的螺旋形或波浪形,且具有明显的手性特征,绝大多数品系的本征取向为左手,但其手性及其取向在某些条件下会发生逆变,甚至完全丧失变直呈手中性(Mühling *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005)。节旋藻的螺旋手性及其取向是生产上重要的经济性状,一旦发生逆变,特别是变成手中性,即意味着种质退化而严重影响生产(胡鸿钧, 2003; Wang *et al.*, 2005)。同时,节旋藻的形态结构简单、手征性典型且可互变,因而是开展有关生物手性的起源、进化、形成与逆变等重大科学理论问题研究的理想材料(Thitamadee *et al.*, 2002;

Nakajima *et al.*, 2004; Blackmond, 2011)。为此,国内外已从形态学(Mühling *et al.*, 2003)、生理生化(陈必链等, 2000; Ma *et al.*, 2010)和分子遗传(Wang *et al.*, 2005)等方面对节旋藻的螺旋手性问题作了探索,并取得了一些有意义的成果。

已有研究表明,以双向电泳(2-DE)为核心分离技术的蛋白质组学技术,可在节旋藻手性形成与调控机制等研究中发挥重要作用(Hongsthong *et al.*, 2007; 林重阳等, 2009; Sa-Correia *et al.*, 2010)。但因节旋藻蛋白质的含量高(占细胞干重的 50%—70%)、种类多且丰度极不均匀(如藻蓝蛋白含量占总蛋白的 20%—40%),因而需将蛋白质进行分级分离后再分别作 2-DE 分析,方可获得较好的分离效果和较多的信息(黄晖等, 2007; Hongsthong *et al.*, 2007)。已有研究均参照高等植物或固氮菌等细菌的相应方法,先用压榨或超声波等破碎节旋藻细胞,进而经超速离心或蔗糖密度梯度离心将蛋白分离成水溶性和水不溶性

* 国家自然科学基金项目, 30771669 号, 10975118 号; 国家公益性行业(农业)科研专项, 201107003 号; 浙江省院士基金, J20080388 号, J20110445 号。王景梅, 硕士研究生, E-mail: wangjm724@163.com

通讯作者: 汪志平, 博士, 副研究员, E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

收稿日期: 2011-09-15, 收修改稿日期: 2012-04-06

等组分,再用试剂盒纯化制得 2-DE 分析蛋白(Hongsthong *et al.*, 2007, 2008, 2009; 林重阳等, 2009)。值得注意的是,节旋藻在分类学上虽属蓝细菌,且具光合作用等与植物类似的功能,但其细胞壁与高等植物或大多数细菌的明显不同,它主要由多糖和粘多肽组成,仅含极少量纤维素,只要冻-融数次即可使其破裂(胡鸿钧, 2003; Wang *et al.*, 2005),而不必用压榨、研磨或超声波等可能破坏蛋白的较剧烈的破碎方法。据此,本文针对当前节旋藻蛋白质 2-DE 图的信息量和分辨率尚有待提高等问题,对节旋藻 2-DE 分析蛋白的制备方法作了必要的改进与优化,并将其试用于节旋藻螺旋手性差异蛋白的比较研究。

1 材料与方法

1.1 材料

藻丝呈左手螺旋的钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)品系 ZJU0101,以及由其变直呈手中性的藻丝 ZJU0101/S 均经单细胞克隆培养获得,保存于浙江大学原子核农业科学研究所生物资源与分子工程实验室。参照汪志平(2000)的方法培养, OD_{560nm} 至约 0.8 时,用 300 目尼龙筛绢过滤采收,藻泥用灭菌蒸馏水洗 3 次并沥至不自然滴水后用或置 -65°C 冷冻保存备用。

1.2 试剂与仪器

等电聚焦胶条(24cm, pH 4—7)、矿物油、IPG buffer (pH 4—7)和蛋白质分子量标准等购自 GE Healthcare Biosciences(美国);二硫苏糖醇(DTT)和碘乙酰胺等购自 Bio-Rad(美国);丙烯酰胺、甲氧丙烯酰胺、尿素、硫脲、丙磺酸(CHAPS)、低熔点琼脂糖、Tris、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)和四甲基乙二胺(TEMED)等购自 Amresco(美国)。所用的等电聚焦仪、垂直电泳系统和紫外-可见扫描分光光度计等为 Amersham Pharmacia Biotech(美国)产品;冷冻干燥仪为 VirTis(美国)产品;扫描仪 GS-800 和 PDQuest 软件等为 Bio-Rad(美国)产品。

1.3 水溶性与水不溶性蛋白提取

取约 0.75g 钝顶节旋藻藻泥于 5ml 离心管中,并加入 Tris-HCl 提取液(125mmol/L Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 6.8)约 3ml,在 -20°C 冷冻约 1.5h 后再在 4°C 融化约 1h,如此反复冻融 4—8 次直至出现深蓝紫色荧光,并在显微镜下镜检无完整细胞。 4°C 下 12000r/min 离心 20min 得上清 I-1;沉淀中加入 3ml Tris-HCl 提取液轻轻摇匀后置于 4°C 15min, 4°C 下 12000r/min 离心

20min 得上清 I-2;如此再抽提 7 次并依次得上清 I-3—I-9。在最后的沉淀中加入 3ml SDS 提取液(64mmol/L Tris-HCl, 10%甘油, 2% SDS, 5% β -巯基乙醇, pH 6.8)并轻轻摇匀, 4°C 放置 6h,每 30min 摇匀一次, 4°C 下 12000r/min 离心 20min 得上清 II。上述上清 I-1—I-9 为钝顶节旋藻水溶性蛋白,上清 II 为水不溶性蛋白。在所提蛋白样品中加入 3 倍体积预冷的含 10% TCA 和 0.07% DTT 的丙酮溶液,混匀后 -20°C 静置 4h, 4°C 下 12000r/min 离心 20min,弃上清。沉淀中加入 3ml 含 0.07% DTT 的预冷丙酮溶液,洗涤后 -20°C 静置 2h, 4°C 下 12000r/min 离心 20min,弃上清,如此反复抽提 3—5 次至上清完全无色,沉淀经真空冷冻干燥作电泳分析等研究。

1.4 蛋白质浓度测定及 SDS-PAGE 分析

蛋白质浓度测定参照 Bradford(1976)的考马斯亮蓝 G-250 法进行;蛋白质 SDS-PAGE 分析参照 Laemmli(1970)和汪志平(2000)的方法进行,分离胶浓度为 12.5%。

1.5 蛋白质双向电泳及质谱鉴定

参照 Giavalisco 等(2003)的方法,将“1.3”中制得的真空冷冻干燥蛋白样品用适量裂解液(7mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 2% IPG buffer, 40mmol/L DTT, 1mmol/L PMSF)充分溶解, 4°C 下 12000r/min 离心 20min 得上清。双向电泳参照余初浪等(2006)的方法,采用 24cm pH 4—7 IPG 胶条,上样的总体积 450 μl 、总蛋白量 800 μg 。等电聚焦程序为:50V 主动水化 12h, 500V 线性除盐 1h, 1000V 线性除盐 3h, 8000V 线性升压 4h, 8000V 快速聚焦 11000Vh, 500V 保持。聚焦后的胶条经两次平衡后转至浓度为 12.5%的胶上作第二向电泳,先以 2W/gel 电泳 45min 后,再以 17W/gel 电泳使溴酚蓝至胶底部。用考马斯亮蓝 G-250 染色,脱色并扫描后,图像用 PDQuest 等软件分析。切取差异蛋白点,低温送至上海中科新生命生物科技有限公司作 MOLDI-TOF MS 分析,并利用 Mascot 程序搜索 NCBI 等数据库对所得的肽质量指纹图谱(PMF)进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 钝顶节旋藻的水溶性与水不溶性蛋白制备

随着冻融次数的增加,钝顶节旋藻 ZJU0101 藻液呈现的蓝紫色荧光越来越强,说明藻体内的藻蛋白随细胞逐渐破碎而不断溶出,冻融 5 次后,显微镜镜检结果显示,藻细胞已完全破裂。用 Tris-HCl 提

取液抽提上述破壁节旋藻的水溶性蛋白, 共提取 9 次, 依次得上清 I-1—I-9, 各次提取液中蛋白质的浓度, 以及含量占 9 次提得水溶性蛋白总量的比例如图 1 所示。由图 1 可知, 上清 I-1 中蛋白量占水溶性蛋白总量的 77.1%, 上清 I-2 中陡然降至 6.6%, 上清 I-3 中降至 3.1%; 此后, 继续缓慢下降, 至上清 I-9 中趋于 0, 此时上清 I-9 也基本无色。纵观上清 I-1—I-9 由其中藻蓝蛋白呈现蓝紫色荧光的强度, 其变化趋势与上述蛋白质浓度和比例的一致, 即上清 I-1 的最强, 上清 I-2 的明显减弱, 此后依次减弱至没有。随着

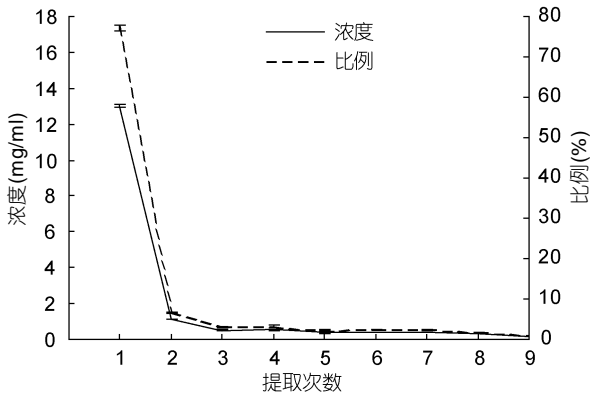


图 1 钝顶节旋藻 ZJU0101 各次水溶性提取液中蛋白质的浓度及比例

Fig.1 Protein concentration and proportion in each water-soluble extractant of *A. platensis* ZJU0101

注: 上清 I-1—I-9 依次为用 Tris-HCl 提取液提取 9 次各次所得的水溶性蛋白, 上清 I-1 上样 0.6μl, 上清 I-2—I-9 各上样 3μl; 上清 II P1 和 P2 分别为先用 Tris-HCl 提取液提取 9 次和 3 次后再用 SDS 提取液提得的水不溶性蛋白, 各上样 3μl。M 为蛋白分子量标准

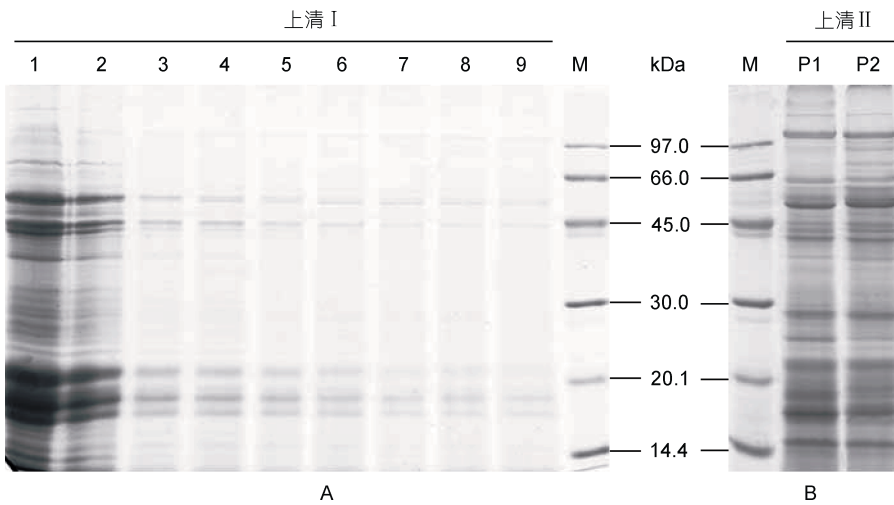


图 2 钝顶节旋藻 ZJU0101 的水溶性蛋白(A)和水不溶性蛋白(B)SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE of water-soluble proteins (A) and water-insoluble proteins (B) of *A. platensis* ZJU0101

Tris-HCl 提取液抽提次数的增加, 沉淀也由蓝绿色转变成青绿色, 用 SDS 提取液可从中提得茶黄色的水不溶性蛋白。

图 2 为钝顶节旋藻 ZJU0101 水溶性蛋白——上清 I-1—I-9 及水不溶性蛋白——上清 II 的 SDS-PAGE 图谱。图 2-A 显示, 水溶性蛋白主要集中于上清 I-1 和上清 I-2 中, 可辨析的蛋白带达 40 余条, 主带在 17.5、18.6、21.1、38.5、43.8、46.3、54.7 和 80.6kDa 处; 从上清 I-3 起, 蛋白带的条数及黑度均逐渐减小, 只有 20kDa 附近的藻胆蛋白亚基及 45kDa 附近等丰度较高的蛋白带仍清晰可辨(Wang *et al*, 2005)。上述变化趋势与从图 1 所得的结果吻合。图 2-B 显示, 水不溶性蛋白带也有近 40 条, 主带在 15.0、17.4、18.7、21.7、25.5、28.8、42.6、53.3、64.2 和 106.8kDa 处, 与水溶性蛋白的有显著差异, 两者的匹配率仅 12.5%。可见, 此法不仅能将钝顶节旋藻中的蛋白质有效地提出, 而且能将蛋白质较好地分成水溶性和水不溶性组分, 这对将 2-DE 等蛋白质组学技术进一步用于节旋藻螺旋手性问题等研究具有重要意义。

同时, 在图 1 中, 上清 I-2 和上清 I-3 是蛋白浓度与比例随提取次数变化曲线的拐点, 上清 I-1—I-3 中的水溶性蛋白含量占钝顶节旋藻水溶性蛋白总量的 86.8%, 且涵盖了上清 I-4—I-9 中的蛋白带; 图 2-B 中, 先用 Tris-HCl 提取液提取 9 次和 3 次, 再用 SDS 提取液提得的水不溶性蛋白——上清 II P1 和 P2 的电泳图谱基本一致。因此, 在后续 2-DE 等研究中, 只要用 Tris-HCl 提取液对冻融破壁的节旋藻抽提 3 次, 得上清 I-1—I-3 合并后即水溶性蛋白, 沉淀再用 SDS 提取液提取即得水不溶性蛋白。

2.2 钝顶节旋藻不同螺旋手性藻丝蛋白质的 2-DE 分析

利用上述方法分别提取钝顶节旋藻 ZJU0101 及其变直呈手中性藻丝 ZJU0101/S 的水溶性蛋白和水不溶性蛋白, 并分别经 TCA/丙酮法除去色素等杂质后作双向电泳(2-DE)分析。由图 3 可知, (1) ZJU0101 的水溶性和水不溶性蛋白在随分子量展开的垂直方向上的分布与图 2 中的基本一致, 而在随等电点(pI)展开的水平方向则多了许多蛋白点, 可辨蛋白点分别达 512±

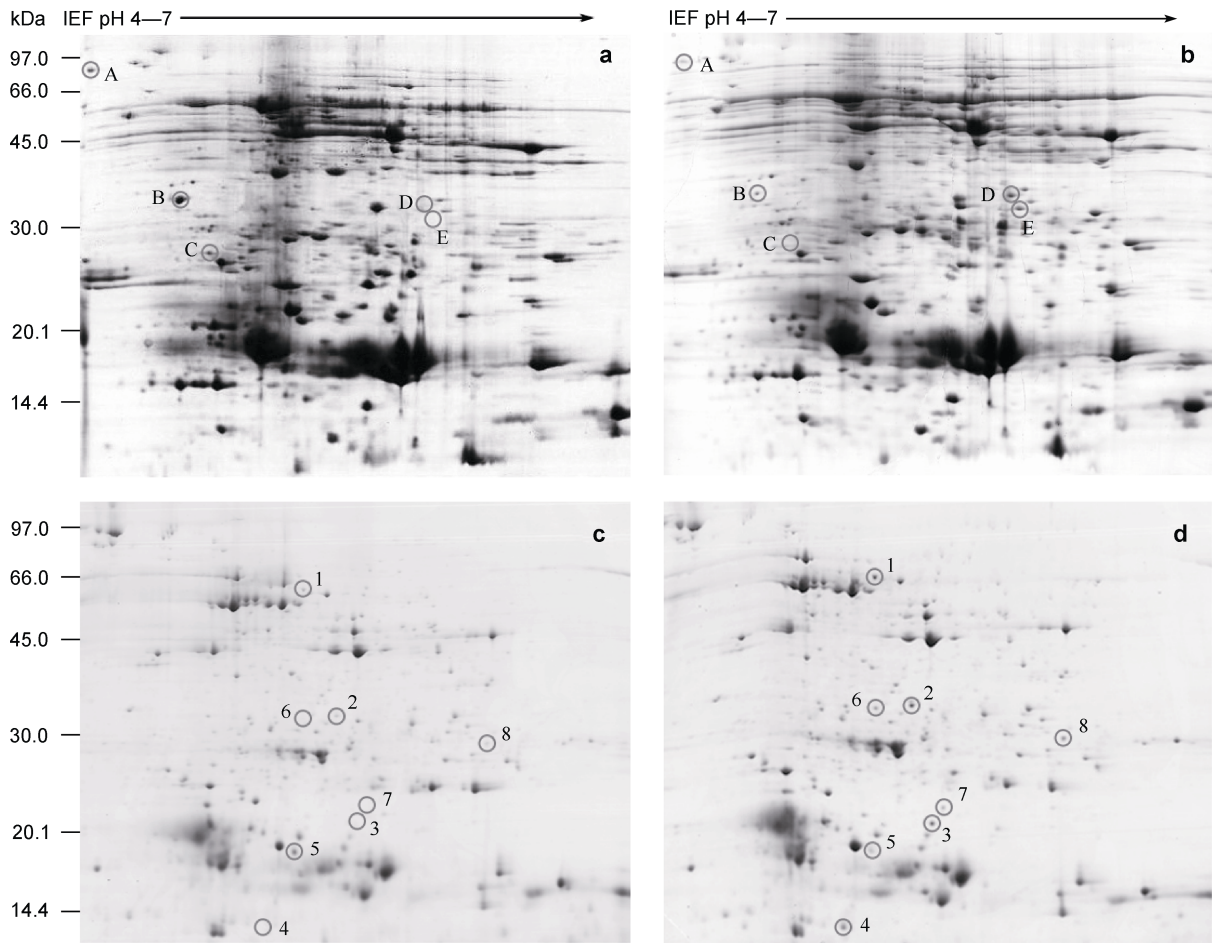


图3 钝顶节旋藻 ZJU0101 及 ZJU0101/S 的水溶性和水不溶性蛋白双向电泳

Fig.3 Two-dimensional electrophoresis of water-soluble and water-insoluble proteins of *A. platensis* ZJU0101 and ZJU0101/S
注: a 和 c 分别为左手螺旋藻丝 ZJU0101 的水溶性和水不溶性蛋白; b 和 d 分别为手中性藻丝 ZJU0101/S 的水溶性和水不溶性蛋白

22 和 765 ± 27 个, 信息量分别比 SDS-PAGE 的增加约 13 和 19 倍。(2) ZJU0101 的水溶性和水不溶性蛋白 2-DE 图谱明显不同, 两者间的匹配率仅为 7%, 说明用本文方法能制得适于 2-DE 分析的较高质量的钝顶节旋藻水溶性蛋白和水不溶性蛋白。(3) ZJU0101/S 的水溶性和水不溶性蛋白点分别为 501 ± 18 和 780 ± 29 个, 与 ZJU0101 对应蛋白 2-DE 图的匹配率分别为 91% 和 95%, 均大于 90%, 可作差异蛋白质组学等进一步分析(李明云等, 2010)。(4) 与 ZJU0101 相比, ZJU0101/S 的 5 个水溶性蛋白点和 8 个水不溶性蛋白点的表达发生了显著变化, 蛋白点 1、2、8 的表达上调, 蛋白点 A、B、5 的表达下调, 蛋白点 D、E、3、4、6、7 新增, 蛋白点 C 消失。

2.3 钝顶节旋藻不同螺旋手性藻丝差异蛋白点的质谱鉴定

进一步对图 3 中 ZJU0101 和 ZJU0101/S 间 13 个呈显著差异的蛋白点进行 MOLDI-TOF MS 分析, 得

到肽质量指纹图谱(PMF), 进而根据各蛋白点的 pI、分子量、蛋白质得分、序列覆盖率及物种来源等进行鉴定。由表 1 可知, 13 个被检蛋白点均得到了成功鉴定, 检出率达 100%, 说明检测效果良好(李太武等, 2008); 13 个蛋白点的蛋白序列物种来源均为钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*), 与本文的研究材料一致; 13 个蛋白点的蛋白质得分为 86—689, 均高于 60, 说明从数据库中检索出的结果有效(Wei *et al.*, 2012)。通过进一步搜索 Swiss-Prot 等数据库显示, 蛋白点 A(溶血素型钙结合域蛋白)与钙吸收有关; 蛋白点 B(DnaK)是一种分子伴侣, 与环境适应有关; 蛋白点 C 和 6 均为 F_0F_1 ATP 合酶 β 亚基, 与能量代谢有关; 蛋白点 D(CpcI)、E(CpcH)、3(藻胆体连接多肽)、4(藻胆蛋白 V 链)、5(藻胆体连接多肽)和 7(棒状连接多肽 CpcI)均与光合作用有关; 蛋白点 1(外膜通道蛋白)与物质外排有关; 蛋白点 8(T_1 家族肽酶)与肽链的水解有关; 蛋白点 2 为假想蛋白, 未获得相关的功能信息。

表 1 ZJU0101 和 ZJU0101/S 间差异表达蛋白的鉴定
Tab.1 Identification of differentially expressed proteins between ZJU0101 and ZJU0101/S

蛋白点 序号	蛋白名称	等电点/分子(kDa)		数据库登录号	蛋白得分/物种
		实验值	理论值		
A	Hemolysin-type calcium-binding region protein	4.05/80.0	4.11/85.4	gi 284053204	277/ <i>Arthrospira platensis</i> NIES-39
B	DnaK	4.45/37.2	4.86/67.2	gi 291567838	689/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca
C	F ₀ F ₁ ATP synthase subunit beta	4.60/29.3	4.91/52.3	gi 284053202	502/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca
D	Cpcl	5.67/36.5	8.33/32.8	gi 253994359	524/ <i>Arthrospira platensis</i> NJ 1999
E	CpcH	5.70/34.6	8.71/30.8	gi 157042617	588/ <i>Arthrospira platensis</i> Sp-1
1	Out membrane efflux protein	5.67/62.1	4.98/74.8	gi 284050808	516/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca
2	Hypothetical Protein Aplap_07632	5.41/33.5	5.66/67.4	gi 284051330	265/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca
3	Phycobilisome linker polypeptide	5.48/19.7	9.25/29.4	gi 284052217	499/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca
4	Chain V, Structure of A Light-Harvesting Phycobiliprotein	4.96/13.4	4.96/18.3	gi 20150060	86/ <i>Arthrospira platensis</i>
5	Phycobilisome linker polypeptide	5.20/18.4	9.25/29.4	gi 284052217	449/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca
6	F ₀ F ₁ ATP synthase subunit beta	5.25/32.0	4.91/53.3	gi 284053202	619/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca
7	Rod linker polypeptide Cpcl	5.50/20.4	8.87/32.8	gi 5726479	170/ <i>Arthrospira platensis</i>
8	T ₁ family peptidase	6.21/29.8	5.70/29.0	gi 284051428	219/ <i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca

3 讨论

蛋白质样品制备是获得高分辨率和高信息量 2-DE 凝胶图谱, 取得高水平蛋白质组学研究成果的必要前提与关键步骤(Blackstock *et al*, 1999; Ringham *et al*, 2007)。Hongsthong 等(2007, 2008, 2009)用压榨法破碎钝顶节旋藻细胞, 并用密度梯度超速离心法制得水溶性和水不溶性等蛋白组分, 再经试剂盒纯化后作 2-DE 分析, 所得水溶性和水不溶性蛋白图谱的相似性较高, 可辨蛋白点各约 400 个, 匹配率约 50%; 林重阳等(2009)用超声波破碎钝顶节旋藻细胞, 并用 Triton 提取液抽提全蛋白, 经 TCA/丙酮法纯化后再作 2-DE 分析, 因受藻胆蛋白等高丰度蛋白影响较大, 上样量等受限, 可辨蛋白点仅约 200 个。本文用反复冻融法破碎钝顶节旋藻细胞后, 先用 Tris-HCl 提取液提得水溶性蛋白, 再用 SDS 提取液从沉淀中提得水不溶性蛋白, 两者再用 TCA/丙酮法纯化后, 2-DE 图谱的可辨蛋白点分别达 500 多和 700 多个, 且匹配率仅 7%; 同时, 利用上述方法及相关蛋白质组技术, 鉴定出 13 个可能与节旋藻螺旋手性相关的蛋白, 其中 DnaK、CpcH、F₀F₁ATP 合酶 亚基、溶血素型钙结合域蛋白和 T₁ 家族肽酶是新发现的(Hongsthong *et al*, 2007; 林重阳等, 2009)。这表明, (1) 反复冻融不仅能有效破碎节旋藻的细胞壁, 而且所需的仪器设备与操作均比压榨法和超声波法简便, 且作用力较温和而对蛋白质的损伤更小; (2) Tris-HCl 和 SDS 提取液分步提取, 不仅能将破壁节旋藻中的

水溶性蛋白和水不溶性蛋白较彻底地分离, 而且不存在如密度梯度超速离心分离过程中难免丢弃某些蛋白组分等问题, 从而既可有效减小高丰度的藻胆蛋白等对周边低丰度蛋白的掩盖, 又能使蛋白组分尽可能不丢失(林重阳等, 2009; 李明云等, 2010); (3) TCA/丙酮法不仅能有效去除节旋藻蛋白提取液中的色素和糖类等对 2-DE 有影响的杂质, 而且可对蛋白样品进行浓缩, 以便于后续研究, 因而在效果、操作和成本上均优于试剂盒纯化法(Carpentier *et al*, 2005); (4) 用 SDS 提取液提取节旋藻蛋白, 不仅提取效率显著比 Triton 提取液的高, 而且对蛋白质样品 2-DE 等电聚焦基本无影响。

SDS 和 Triton 均为常用于蛋白质, 特别是膜蛋白等水不溶性蛋白提取的去垢剂, 但前者为离子型, 而后者为非离子型, 因而前者对细胞膜及蛋白质的作用力, 以及对蛋白质的提取效率均大于后者(汪家政等, 2000), 本文 SDS 提取液对节旋藻蛋白的提取效率也显著高于 Triton 提取液的。通常认为 SDS 因带强负电荷会影响 2-DE 第一向蛋白质的等电聚焦, 而尽量避免用 SDS 提取液制备蛋白质(Joo *et al*, 2003), 但本文及 Wang 等(2003)和 Deng 等(2007)的研究结果均显示, 在蛋白质提取过程中使用 SDS, 基本不影响蛋白质 2-DE 的等电聚焦。这也许是因蛋白样品在 2-DE 前经含尿素和硫脲的裂解液裂解及低温离心等预处理过程中, SDS 会与蛋白分子脱离, 甚至被去除(Giavalisco *et al*, 2003)。

综上所述, 本文依据节旋藻细胞的组成与结构特点, 在已有研究基础上通过改进所建的节旋藻 2-DE 分析蛋白样品制备方法——冻融破壁分步提纯法, 与已有方法相比, 具有操作简便、仪器设备简单、成本低廉、图谱分辨率高和信息量更丰富等优点, 能更好地满足节旋藻螺旋手性、环境适应、育种与养殖等相关的蛋白质组学研究。

参 考 文 献

- 李太武, 詹 堃, 苏秀榕, 2008. 泥蚶肉质的蛋白组学研究. 海洋与湖沼, 39(6): 678—682
- 李 明 云, 吴 玉 珍, 冀 德 伟 等, 2010. 低温选择大黄花 (*Pseudosciaena crocea*) 的肝脏蛋白质组双向电泳分析. 海洋与湖沼, 41(3): 348—351
- 余初浪, 严顺平, 孙卫宁等, 2006. 适于水稻根、叶、悬浮细胞总蛋白质分析的高分辨率双向电泳方法. 中国水稻科学, 20(5): 549—552
- 汪志平, 2000. 蛋白质 SDS-PAGE 用于螺旋藻分类及突变体鉴定的研究. 浙江大学学报, 26(6): 583—587
- 汪家政, 范 明, 2000. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 11—14
- 陈必链, 王明兹, 庄惠如, 2000. 半导体激光对钝顶螺旋藻形态和生长的影响. 光子学报, 29(5): 411—414
- 林重阳, 沈晓文, 赵振坤等, 2009. 钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 两种不同形态藻丝体的光合作用和蛋白质差异表达分析. 高等学校化学学报, 30(6): 1152—1157
- 胡鸿钧, 2003. 螺旋藻生物学及生物技术原理. 北京: 科学出版社, 9—12
- 黄 晖, 汪志平, 张巧生等, 2007. 高藻胆蛋白钝顶螺旋藻新品系的选育及 RAPD 分析. 核农学报, 21(6): 567—571
- Blackmond, 2011. The origin of biological homochirality. *Philos Trans R Soc Biol Sci*, 366: 2878—2884
- Blackstock W P, Weir M P, 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*, 17(3): 121—127
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Carpentier S C, Wittes E, 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5(10): 2497—2502
- Deng Z P, Zhang X, Tang W Q *et al*, 2007. A proteomics study of brassinosteroid response in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics*, 6(12): 2058—2071
- Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H *et al*, 2003. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. *Electrophoresis*, 24: 207—216
- Hongsthong A, Sirijuntarut M, Prommeenate P *et al*, 2007. Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. *Mol Biotechnol*, 36(2): 123—130
- Hongsthong A, Sirijuntarut M, Prommeenate P *et al*, 2008. Proteome analysis at the subcellular level of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in response to low-temperature stress conditions. *Fems Microbiol Letters*, 288(1): 92—101
- Hongsthong A, Sirijuntarut M, Yutthanasirikul R *et al*, 2009. Subcellular proteomic characterization of the high-temperature stress response of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Proteome Sci*, 7: 33—51
- Joo W A, Lee D Y, Kim C W, 2003. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(7): 1574—1577
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680—685
- Mühling M, Harris N, Belay A *et al*, 2003. Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*. *J Phycol*, 39(2): 360—367
- Ma Z L, Gao K S, 2010. Spiral breakage and photoinhibition of *Arthrospira platensis* (Cyanophyta) caused by accumulation of reactive oxygen species under solar radiation. *Environ Exp Botany*, 68(2): 208—213
- Nakajima K, Furutani I, Tachimoto H *et al*, 2004. SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, 16(5): 1178—1190
- Pfeiffer C, Bauer T, Surek B *et al*, 2011. Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine. *Food Chem*, 129(4): 1766—1769
- Ringham H, Bell R L, Smejkal G B *et al*, 2007. Application of pressure cycling technology to tissue sample preparation for 2-DE. *Electrophoresis*, 28(6): 1022—1024
- Sa-Correia I, Teixeira M C, 2010. 2D electrophoresis-based expression proteomics: a microbiologist's perspective. *Expert Rev Proteomics*, 7(6): 943—953
- Thitamadee S, Tuchihara K, Hashimoto T, 2002. Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature*, 417: 193—196
- Wang W, Scali M, Vignani R *et al*, 2003. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24: 2369—2375
- Wang Z P, Zhao Y, 2005. Morphological reversion of *Spirulina platensis*: from linear to helical. *J Phycol*, 41(3): 622—628
- Wei R, Zhang Y J, Shen L F *et al*, 2012. Comparative proteomic and radio biological analyses in human lung adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biochem*, 359(1—2): 151—159

AN IMPROVED METHOD OF 2-DE ANALYSIS PROTEIN PREPARATION AND USING FOR INVESTIGATION OF HELICAL-HANDED DIFFERENTIAL PROTEINS IN *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

WANG Jing-Mei, WANG Zhi-Ping, YU Jin-Xin, LIU Xin-Ying, SHAO Bin,

LAN Jin-Jin, MA Li-Fang, CHEN Zi-Yuan

(Institute of Nuclear Agriculture Sciences, Zhejiang University, Key Laboratory of Nuclear Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture of China, Hangzhou, 310029)

Abstract Based on the techniques of cell wall breaking by freeze-thaw and proteins extracting step-by-step, protein preparation method for 2-DE analysis of *Arthrospira platensis* was improved, and then was applied to investigation of helical chirality-related proteins. The results indicated that: (1) After *Arthrospira* cells were completely ruptured by five cycles of freeze-thaw, about 87% of water-soluble proteins could be extracted by Tris-HCl extractant for three times, and then water-insoluble proteins were extracted by SDS (twelve sodium dodecyl sulfate) extractant from the precipitate. (2) The above water-soluble and water-insoluble proteins were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) after they were purified by the method of TCA/acetone. Owing to effective separation and high quality, the amount of detected protein spots in the water-soluble and water-insoluble protein patterns was more than 500 and 760 respectively, and their matching rate was only 7%. (3) By this method, 13 candidate proteins including five new were identified as related to helical chirality in *Arthrospira*, and their function were involved in photosynthesis, energy metabolism, exocytosis, environmental adaptation, etc. (4) Compared to the existing protein preparation methods for 2-DE analysis of *Arthrospira*, the method of “breaking cell wall by freeze-thaw and then extracting step-by-step” presented in this paper, has the advantages of simplification in operation and instruments, low cost and more information, and so on.

Key words *Arthrospira platensis*, Protein, Preparation method, Two-dimensional gel electrophoresis, Helical chirality