

# 马尾松根部蛋白双向电泳分离体系的构建

徐超, 吴小芹\*, 林司曦, 张红岩

(南京林业大学, 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 江苏 南京 210037)

**摘要:**为了在蛋白质水平探讨外生菌根提高马尾松抗旱能力的机制,笔者通过对菌根化和非菌根化马尾松植株根部蛋白提取和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶染色条件进行研究,建立了一套较为适合马尾松根部蛋白双向电泳分离的试验体系。结果表明:在每 IPG 胶条 300  $\mu\text{g}$  上样量条件下,采用酚抽法辅以适度超声波破碎进行马尾松根部蛋白提取、敏化和银染后水洗时间均为 5 min  $\times$  3 次的快速银染程序进行染色,可以获得较为理想的马尾松根部蛋白双向电泳图谱,该方法可为其他松属树种的蛋白质组学等研究提供参考。

**关键词:**菌根; 根部蛋白; 双向电泳; 马尾松

中图分类号: S718.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-2006(2011)01-0015-04

## Establishment of two-dimensional gel electrophoresis system for analyzing the root protein of *Pinus massoniana*

XU Chao, WU Xiaoqin\*, LIN Sixi, ZHANG Hongyan

(Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** Plant vital activities could be revealed on protein level. Obtaining good two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) profile is the precondition for experimental procedures such as mass spectrum analysis, and so on. In order to explore the mechanism of mycorrhiza underlying drought resistance of *Pinus massoniana* on protein level, a set of optimized experiment system of 2-DE for analyzing root protein extracted from *P. massoniana* has been established. The ideal 2-DE profile could be obtained when protein was extracted by phenol extraction and shattered the cells with ultrasonic crusher, and then the gels were stained by fast silver stain and washed three times for 5 min after sensitizing and dying. The suitable concentration of protein was 300  $\mu\text{g}$  per IPG gel. It also provided reference for the proteomic studies on other pine species.

**Key words:** mycorrhiza; root protein; 2-DE system; *Pinus massoniana*

马尾松(*Pinus massoniana*)是我国的特有树种,在我国森林资源总量中占有举足轻重的地位。菌根是广泛存在于自然界中的一种菌根真菌与寄主植物的共生体结构,有关菌根在生态系统中可以提高植物对营养物质的吸收,提高植物耐旱、耐盐、抗病等方面的作用已经得到普遍认同。蛋白质作为生命存在和运动的物质基础,是细胞增殖、分化、衰老和凋亡等重大生命活动的参与者。生物生理

功能的调控以及病理性的变化往往由蛋白质群体共同完成,因此蛋白质组学研究有利于对生命现象和生命本质的了解。双向电泳分离技术是蛋白质组学研究的重要手段之一,该技术因具有较高的分辨率和灵敏度,已成为蛋白质特别是复杂系统中的蛋白质检测和分析的一种基本手段,而获得高质量的蛋白样品、清晰的双向电泳图谱(2-DE 图谱)是开展蛋白质组学研究的重要前提。植物组织含有

收稿日期:2009-12-29

修回日期:2010-04-29

基金项目:国家自然科学基金项目(30571471);“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD08A1002)

作者简介:徐超(1979—),博士。\* 吴小芹(通信作者),教授。E-mail: xqwu@njfu.com.cn。

引文格式:徐超,吴小芹,林司曦,等. 马尾松根部蛋白双向电泳分离体系的构建[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2011,35(1): 15-18.

的蛋白质较多且是动态变化的,因此植物蛋白质组的研究比较复杂,目前还没有找到一种通用的制备方法能够适用于各种植物样品<sup>[1]</sup>。林木蛋白质组的研究之所以进展缓慢,其中一个重要原因是蛋白样品的制备非常困难<sup>[2]</sup>。而松属树种,除易形成外生菌根外,组织中含有丰富的多酚、色素、多糖等次生代谢物质,这使得蛋白样品的制备难度加大<sup>[3]</sup>,限制了松属树种蛋白质组学研究的开展。笔者以菌根化和非菌根化马尾松为材料,在根部蛋白提取、分离和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)快速银染等方面进行研究,旨在建立一套较为适合菌根化和非菌根化马尾松根部蛋白双向电泳分离的试验体系,为在蛋白质组学水平探讨外生菌根提高马尾松等松属树种的抗逆性提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植株及蛋白质定量标准曲线绘制

供试植株为 2.5 年生的马尾松菌根化(接种紫金蜡蘑 *Laccaria aemthystea*) 和非菌根化(未接菌根)植株。在温室内采集植株营养根,蒸馏水洗净后迅速置于冰盒内带回实验室,于液氮中充分研磨至粉末状并转入离心管中,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

采用 2-D quant Kit (amersham biosciences, USA) 绘制蛋白质含量测定的标准曲线。根据反应液在 480 nm 时吸光值与蛋白质浓度成负相关的原理,测定该波长下不同浓度梯度蛋白质反应液的吸光值,每样品重复 3 次。在 Excel 工作表中,以蛋白含量( $\mu\text{g}$ )为横坐标,以 480 nm 条件下的吸光值为纵坐标,用 Chart Wizard 绘制标准曲线。

### 1.2 马尾松根部蛋白的提取

采用 2-D Clean-Up Kit (amersham biosciences, USA)、TCA-丙酮沉淀法和酚抽法分别提取菌根化和非菌根化马尾松的根部蛋白<sup>[4-6]</sup>;第 1 向电泳采用 24 cm、pH 为 4~7 的线性 IPG 胶条,每 IPG 胶条蛋白上样量为 150  $\mu\text{g}$ ;双向电泳后进行快速银染,其中敏化和银染后的水洗时间均为 20 s  $\times$  3 次,显色 2 min。对以上提取蛋白质的 2-DE 图谱进行比较。

采用已筛选出的酚抽法提取菌根化和非菌根化马尾松的根部蛋白,并稍加改良:用 10 倍体积量比的蛋白提取液悬浮组织样品,涡旋混匀后辅以超声波破碎(JY88-II,宁波新芝生物科技公司)。超声波破碎频率均设 0%、10%、20%、30%、40% 共 5 种处理,每个循环工作 1 min 间歇 1.5 min,共循环 4 次,每处理设 3 个重复。用 2-D quant Kit 对提取的蛋白质进行定量,操作方法同前。

菌根化和非菌根化马尾松根部蛋白的上样量均设每 IPG 胶条上样量 150、300、450  $\mu\text{g}$  共 3 种处理梯度,通过比较不同上样量条件下 2-DE 图谱的显色效果,确定较佳上样量。马尾松根部蛋白的提取采用酚抽法并辅以超声波破碎,超声频率均为 30%;第 1 向电泳采用 24 cm、pH 为 4~7 的线性 IPG 胶条;快速银染过程中敏化和银染后的水洗时间均调整为 5 min  $\times$  3 次,显色 2 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 马尾松根部蛋白质提取及超声频率对提取的影响

使用 2-D quant Kit 进行蛋白质定量,得到的标准曲线为  $Y = -0.0039X + 0.4103$ ,  $R = 0.9974$ ,相关系数较高,可以用于后续试验中菌根化和非菌根化马尾松根部蛋白的定量。为了提高马尾松根部蛋白的提取得率,用不同的超声频率对液氮研磨后的组织样品进行辅助破碎。试验发现,随着超声频率的增加,菌根化和非菌根化马尾松根部蛋白的提取得率均呈先上升后下降趋势。当超声频率由 0 增加到 30% 时,二者的蛋白提取得率都逐渐升高,且不同超声频率时各处理间差异不显著。超声频率为 30% 时,均达到最高值,分别为 2.781、2.776  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,两种处理之间差异不显著;当超声频率增加到 40% 时,蛋白提取得率却显著下降,分别降为 1.361 和 1.311  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,表明超声波破碎仅在一定程度上提高马尾松根部蛋白的提取得率(图 1)。

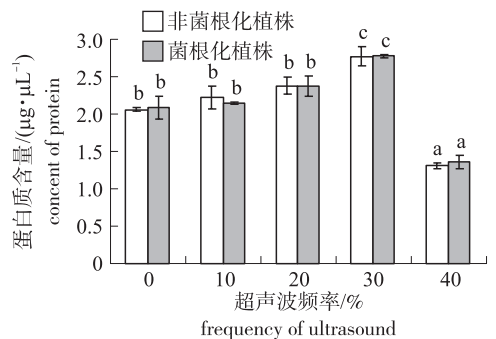


图 1 不同超声频率条件下马尾松根部蛋白的提取得率  
Fig. 1 Content of root protein extracted from *P. massoniana* under different ultrasound frequencies

### 2.2 不同提取方法及蛋白上样量对马尾松根部蛋白 2-DE 图谱效果的影响

提取方法对植物蛋白的提取质量有很大的影响,进而影响蛋白质的双向电泳分离效果。此次研究表明,应用 TCA-丙酮沉淀法和 2-D Clean-Up Kit 提取菌根化和非菌根化马尾松根部蛋白的 2-DE 图谱背景

污染都很严重,纵条纹明显,酸性端背景较为模糊(图 2A、2B、2C、2D);酚抽法提取蛋白的 2-DE 图谱则明显

克服了酸性端污染严重的现象,蛋白质点清晰可见,背景干净,但颜色略深(图 2E、2F)。

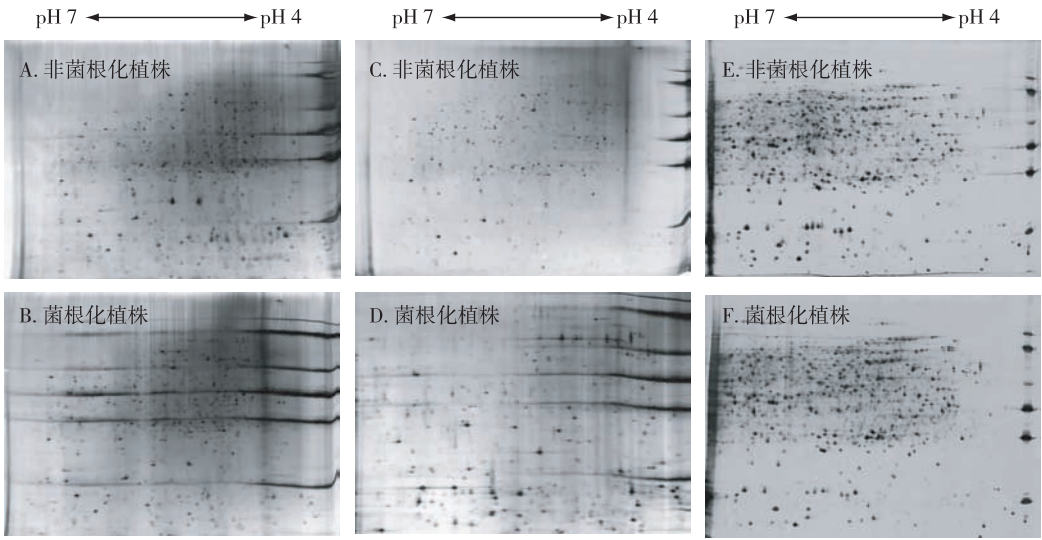


图 2 不同提取方法获得马尾松根部蛋白的 2-DE 图谱

Fig.2 2-DE map of root protein extracted from *P. massoniana* in different method

注:A,B 为 TCA-丙酮沉淀法处理;C,D 为 2-D Clean-Up Kit 处理;E,F 为酚抽法处理。

快速银染过程中敏化和银染后的水洗时间均调整为 5 min × 3 次、显色 2 min 后,对马尾松根部蛋白不同上样量时的 2-DE 图谱进行观察,结果表明:凝胶背景颜色明显变浅;上样量为每 IPG 胶条 150 μg 时,菌根化和非菌根化马尾松植株分别得到 1 789、1 597 个蛋白点,显色后的蛋白点非常清晰,但蛋白点颜色较浅(图 3A、3B);每 IPG 胶条上样量为 300 μg 时,与每 IPG 胶条 150 μg 的上样量相比,蛋白质点较大且颜

色较深,背景清晰,其中,菌根化植株得到 2 556 个蛋白点,非菌根化植株得到 2 420 个蛋白点,低丰度蛋白点的数量明显增加(图 3C、3D);上样量为每 IPG 胶条 450 μg 时,所获得蛋白点数均在 2 700 ~ 2 800 之间,蛋白点较多,但重叠严重,部分蛋白点很难准确定位(图 3E、3F)。因此,上样量为每 IPG 胶条 300 μg 时能够较为准确地反映出马尾松根部蛋白质组的基本情况,为较佳上样量。

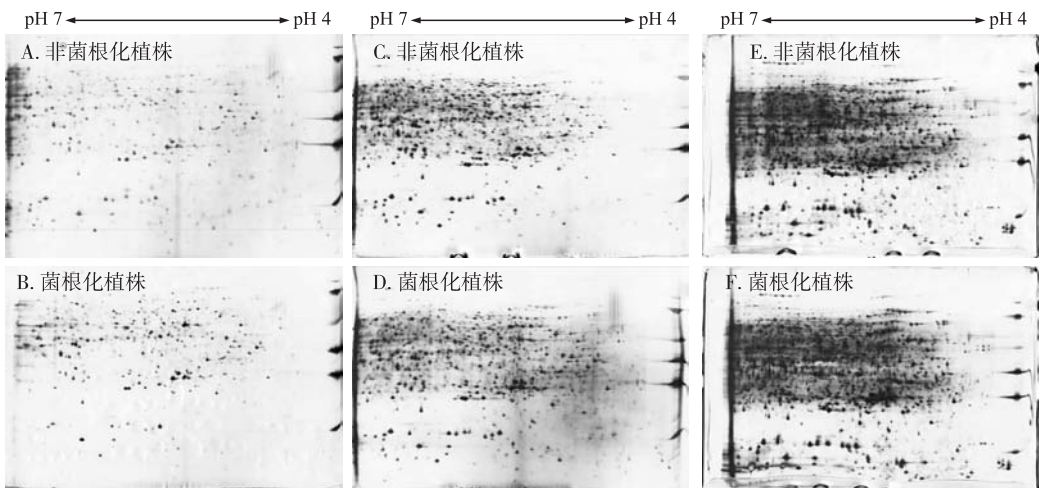


图 3 马尾松根部蛋白不同上样量条件下的 2-DE 图谱

Fig.3 2-DE profile of root protein extracted from *P. massoniana* under different loading concentration

注:A,B. 每 IPG 胶条 150 μg 上样量;C,D. 每 IPG 胶条 300 μg 上样量;E,F. 每 IPG 胶条 450 μg 上样量。

### 3 讨论

高质量的 2-DE 图谱是对蛋白质进行质谱分析等研究的前提条件,而蛋白样品质量的好坏直

接决定 2-DE 图谱的分辨率和重复性<sup>[7]</sup>,因此,蛋白样品的制备是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳成功与否的关键步骤<sup>[8]</sup>。在木本植物的蛋白质提取中,有人先后提出了许多排除色素、酚、酮等干扰

物质的制备方法<sup>[9-10]</sup>。其中,2-D Clean-Up Kit 和 TCA-丙酮沉淀法步骤较少,对去除脂类等杂质的效果较好<sup>[4,11]</sup>,操作简单,较为常用,但得到的蛋白质较难溶解,2-DE 图谱中可检测到的蛋白质点较少,且对多糖的去除效果不佳<sup>[12]</sup>;酚抽法能有效去除盐离子、多酚和多糖等对电泳有较大影响的可溶性物质<sup>[13]</sup>,得到的蛋白质呈乳白色,易溶解,且 2-DE 图谱背景干净,可检测到的蛋白质点较多。由于酚抽法操作步骤较多,蛋白质提取得率较低。袁坤等<sup>[14]</sup>在对杨盘二孢菌侵染后杨树叶片差异蛋白的研究中,超声波辅助破碎组织细胞可以明显提高蛋白质的提取得率。因此,此次试验增加了低温条件下超声波辅助破碎步骤,对酚抽法加以改良,明显提高了马尾松根部蛋白的提取得率。此次酚抽法提取的蛋白质均包含了根部组织中大部分可溶性蛋白,几乎无横条纹和拖尾现象,蛋白点呈圆形,分离均匀,重复性高,效果较好,说明此方法适用于菌根化和非菌根化马尾松根部蛋白的提取。而且,在一定范围内适当增加超声频率,可显著提高蛋白质的提取得率,但随着超声时间的延长,蛋白质提取液的温度逐渐升高,可能导致蛋白质降解或变性,故超声频率要适中,超声时间也不宜过长。

在快速银染体系中,每一步骤的残留液都会对凝胶的显色效果产生影响。为了增强银染后蛋白点的清晰度和对比度,此次试验对马尾松根部蛋白快速银染流程中的水洗时间略作优化,结果显示延长水洗时间可以显著改善显色效果,降低凝胶背景的灰度。适中的蛋白上样量也是获得高质量 2-DE 图谱的因素之一<sup>[15]</sup>。一般来说,IPG 胶条越长,上样量就越大。提高蛋白上样量有利于低丰度蛋白的检测,但上样量过高可导致高丰度蛋白质斑点掩盖低丰度蛋白质斑点<sup>[16]</sup>,且上样量越大,样品中含有的盐离子浓度也越大,将直接影响到等电聚焦时电压的上升,从而影响等电聚焦效果,且易产生横向条纹,银染时易产生饱和现象。而上样量过少不利于蛋白点的检测,特别是低丰度蛋白可能无法在凝胶上显示,从而影响到电泳的准确性<sup>[17]</sup>。此次试验还发现,在不同上样量条件下得到的蛋白质 2-DE 图谱中,菌根化马尾松根部蛋白的种类或数量均高于非菌根化马尾松,表明菌根化马尾松在干旱胁迫过程中确实产生了某些特异蛋白,这些蛋白是否与菌根化马尾松生长速度快、抗旱能力强有密切关系尚待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 郭旭,杨云生. 双向电泳技术在蛋白质组研究中的应用进展[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(5):638-640.
- [2] Anderson N L, Anderson N G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words[J]. Electrophoresis, 1998(11): 1853-1861.
- [3] Tan J Z, Liu M J, Zhang G Y, et al, Analysis of leaf proteins from mulberry mutant Cty-Ym by using mass spectrometry and two-dimensional electrophoresis [J]. Acta Sericologica Sinica, 2005(1): 8-13.
- [4] 王明娟,季孔庶. 珍珠黄杨叶片的蛋白质提取方法探讨[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(1):105-108.
- [5] 陈国良. 盐胁迫下青杨叶片蛋白质组的双向电泳体系构建与差异表达[D]. 兰州:兰州大学,2008.
- [6] Xiao X G, Fan Y, Zhang S, et al, Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress [J]. Physiologia Plantarum, 2009 (136): 150-168.
- [7] Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins[J]. Trends in Biotechnology, 1999,17(3):121-127.
- [8] Rabilloud T, Giraudel A, Adessi C, et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 1997, 18 (3-4): 307-316.
- [9] 林金科,郑金贵,袁明,等. 茶树蛋白质提取及双向电泳的改良方法[J]. 茶叶科学,2003,23(1):16-20.
- [10] 王经源,陈舒奕,梁义元,等. ISO-DALT 双向电泳方法的优化与改进[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2006,35(2): 187-190.
- [11] Yahata E, Maruyama F W, Nishio Z, et al. Wheat cultivar-specific proteins in grain revealed by 2-DE and their application to cultivar identification of flour[J]. Proteomics, 2005,5(15): 3942-3953.
- [12] Nandakumar M P, Shen J, Raman B, et al. Solubilization of trichloroacetic acid(TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis[J]. Journal of Proteome Research, 2003,2(1):89-93.
- [13] 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(10):2497-2507.
- [14] 袁坤,潘惠新,杨礼富,等. 杨树叶片蛋白质组分析[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2009,33(3):13-16.
- [15] Gorg A, Obermaier C, Boguth G. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000,21(6): 1037-1053.
- [16] 何瑞锋,丁毅,余金洪. 水稻温敏叶绿素突变体叶片蛋白的双向电泳分析[J]. 作物学报,2001,27(6):875-879.
- [17] 严顺平. 水稻响应盐胁迫和低温胁迫的蛋白质组研究[D]. 上海:中国科学院上海生命科学研究院,2006.