

雪莲组织中蛋白质提取方法比较

高芳*

(白城医学高等专科学校, 吉林 白城 137000)

[摘要] **目的:**比较雪莲组织中蛋白质的提取方法。**方法:**采用酚法、TCA/丙酮法、尿素法提取雪莲组织中蛋白质,所得蛋白质进行一维 SDS-PAGE 和双向电泳检测,通过比较电泳图谱确定雪莲组织中蛋白质的最佳提取方法。**结果:**酚法提取的雪莲组织蛋白质杂质最少、纯度最高,一维 SDS-PAGE 和双向电泳图谱显示其具有较多的蛋白质点,且蛋白质种类较多。**结论:**3 种提取方法均有一定的蛋白质损失,建议采用酚法从雪莲组织中提取蛋白质,为雪莲蛋白质组学研究提供参考。

[关键词] 雪莲; 蛋白质; 双向电泳

[中图分类号] R283.6, R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0032-03

[doi] 10.11653/syjf2013150032

Comparison of Extraction Methods for Protein in Tissue of *Saussurea involucrate*

GAO Fang*

(Baicheng Medical College, Baicheng 137000, China)

[Abstract] **Objective:** To comparative analyze different extraction methods for protein in tissue of *Saussurea involucrate*. **Method:** Protein in tissue of *S. involucrate* was extracted by phenol method, TCA/acetone method and urea method, prepared protein was detected by one-dimensional SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis, then optimum extraction method for protein in tissue of *S. involucrate* was determined by comparing electrophoretic patterns. **Result:** Phenol extraction method was optimal with the highest purity and the least impurities, one-dimensional SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis showed that there were more protein spots and species. **Conclusion:** Three extraction methods had some protein loss, but phenol method was the best for extracting protein from tissue of *S. involucrate*, this study could provide reference for investigating proteomics of *S. involucrate*.

[Key words] *Saussurea involucrate*; protein; two-dimensional gel electrophoresis

雪莲多生长于海拔 >4 200 m 的高原地区,主要分布于我国西部。目前,由于从雪莲中提取蛋白质的方法不够成熟,提取量和纯度不高^[1-2],使得雪莲蛋白质组学的研究较少。本实验通过对酚法、TCA/丙酮法、尿素法提取雪莲组织中蛋白质的效果进行比较分析,确定实验室条件下从雪莲组织中提取蛋白质的最优方法,为雪莲蛋白质组学研究提供依据。

1 材料

Milli-Q Integral 型纯水/超纯水系统(美国密理博公司)。雪莲产自新疆昭苏天山,购自中国(新疆)雪莲谷集团公司,经新疆克拉玛依市食品药品监督管理局张天旗副教授鉴定为菊科植物天山雪莲 *Saussurea involucrate* (Kar. et Kir.) Sch. Bip. 的干燥地上部分。聚乙烯吡咯烷酮(PVP,上海厚诚精细化工有限公司)。

2 方法和结果

2.1 蛋白质的提取

2.1.1 酚法 取雪莲组织 2 g 置于液氮中研磨至粉末,加入提取液(450 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷

[收稿日期] 20130122(002)

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目(2011153C86)

[通讯作者] *高芳,副教授,从事天然产物提取工艺研究, Tel: 1384350846, E-mail: admini@126.com

盐酸缓冲液(Tris-HCl), $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{EDTA}$, $600 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT), $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF) 10 mL 充分溶解, 置于冰上震动 15 min ; 加入 $\text{pH } 6.6 \sim 7.9$ 的 Tris 饱和酚 5 mL , 于 $24 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡 15 min , 离心 15 min ($6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$), 取上酚相。向酚相中加入提取液(同上) 4 mL , 振荡 5 min , 离心 15 min , 取上酚相移至新试管中, 加入 5 倍量含 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵的甲醇溶液, 震荡, 于 $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵化过夜。离心 15 min , 弃去上清液, 加入 5 倍量含 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵的甲醇溶液洗沉淀 4 次, 用冷丙酮洗 12 次, 每次 30 mL , 离心 7 min , 沉淀于 $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 将丙酮挥干, 即得蛋白质。

2.1.2 TCA/丙酮法 取雪莲组织 2 g 置于液氮中研磨至粉末, 加入含 15% 三氯乙酸的丙酮 ($26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 20 mL , 放置于 $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度下沉淀过夜, 离心 45 min ($14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$), 弃去上清液, 用冷丙酮 ($26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 洗沉淀 4 次, 每次 30 mL , 离心 45 min , 放置 1.5 h , 沉淀于 $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 将丙酮挥干, 即得蛋白质。

2.1.3 尿素法 取雪莲组织 2 g 置于液氮中研磨至粉末, 置于 20 mL 离心管中, 加入提取液 [$4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 6% 3[(3-胆酰胺基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸盐 (CHAPS), $26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟] 10 mL , 颠倒震荡摇匀 45 s , 离心 45 min ($14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$), 收集上清液, 再离心 2 次, 合并上清液, 加入 5 倍量冷丙酮, 于 $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下沉淀过夜, 离心 45 min , 除去上清液, 用冷丙酮 ($26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 洗沉淀 4 次, 每次 30 mL , 离心 45 min , 放置 1.5 h , 弃去上清液, 沉淀于 $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 将丙酮挥干, 即得蛋白质。

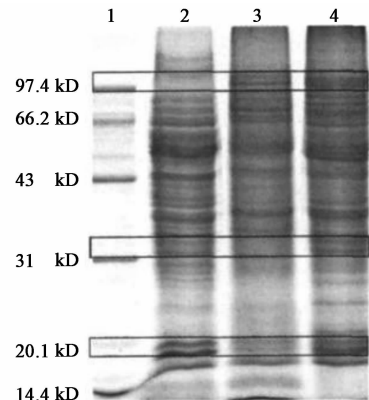
2.2 蛋白质的裂解和定量^[3,4] 配置裂解液 ($4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 6% CHAPS, $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 4% 两性电解质), 称取 3 种方法提取出的蛋白质粉末各 15 mg , 置于离心管中, 各加入裂解液 $250 \text{ } \mu\text{L}$, 混匀, 于室温下间断振荡裂解 5 h , 离心 45 min ($14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $21 \text{ }^\circ\text{C}$), 收集上清液, 进行蛋白质定量。结果酚法、TCA/丙酮法、尿素法提取的蛋白干粉质量分别为 (62.45 ± 2.771), (70.16 ± 1.421), (68.14 ± 1.922), 纯度依次为 (19.62 ± 0.461)%, (4.21 ± 0.052)%, (6.13 ± 0.135)%, 显示 3 种方法提取的蛋白干粉质量无统计学差异, 酚法提取的蛋白质纯度与 TCA/丙酮法和尿素法存在极显著性差异, TCA/丙酮法和尿素法无统计学差异, 说明酚法提取雪莲组织中蛋白质的

纯度较另 2 种方法具有明显优势。

2.3 蛋白质双向电泳试验 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 参数设定为在等电聚焦电泳 (Protean IEF Cell) 上进行第一向 SDS-PAGE, 将 $\text{pH } 4 \sim 7$ 的 7 cm IPG 胶条置于含有 150 U 蛋白质的水化液 ($4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 6% CHAPS, $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 4% 两性电解质) $150 \text{ } \mu\text{L}$ 中, 于 $24 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 15 h ; 进行第一向等电聚焦电泳, 参数设置如下: 分别在 $500, 1000, 4500 \text{ V}$ 电压下快速升压 $2, 1.5, 4 \text{ h}$, 并在 4500 V 电压下聚焦 26000 v h , 500 V 持续 100 h 。聚焦完成后, 分别在平衡液 I [$7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $0.412 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 3% 十二烷基磺酸钠 (SDS), 3% DTT, 15% 甘油, $\text{pH } 9.0$], II ($7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $0.412 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 3% SDS, 3% 碘乙酰胺, 15% 甘油, $\text{pH } 9.0$) 中放置 20 min 。在小型垂直电泳槽系统 (MINI-Protean Tetra SYSTEM) 上进行第二向等电聚焦电泳, 应用 15% 分离胶系统, 用 0.8% 琼脂糖密封液固定胶条, 溴酚蓝指示线胶条前和分离胶后分别为 $90, 180 \text{ V}$, 当达到向上距分离胶下边 0.6 cm 时停止。电压 50 V 持续 60 min , 160 V 恒定电压, 电流限定 35 mA 。

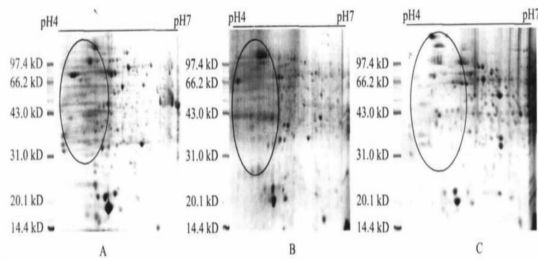
2.4 SDS-PAGE 比较 于每个泳道中加入相同质量的蛋白质, 结果见图 1。说明 3 种方法提取的雪莲蛋白质的分子大小、数目、相对分子质量均存在较大差别, 根据各个条带的染色深浅可看出 3 种方法提取到的蛋白质质量也不相同。尿素法提取的蛋白质图谱背景较深、条带染色浅; TCA/丙酮法和酚法提取的蛋白质条带背景清晰、数目多, 但酚法图谱中低、中、高相对分子质量蛋白质条带的清晰程度和数目要好于 TCA/丙酮法, 即酚法提取的雪莲组织中蛋白质的种类较多, 纯度较高。

2.5 双向电泳分析 相同质量蛋白质上样, 结果见



1. 标准蛋白; 2. TCA/丙酮法; 3. 尿素法; 4. 酚法
图 1 不同方法提取的雪莲组织中蛋白质的 SDS-PAGE

图 2。TCA/丙酮法、尿素法、酚法基本上具有相同的图谱模式,在 pH 4~7 间密集了大部分蛋白质点,相对分子质量 10~100 KD。利用 PDQUESTC 8.0 软件分析蛋白点发现,酚法、TCA/丙酮法、尿素法的蛋白点分别为 (289 ± 14) 、 (231 ± 9) 、 (219 ± 18) ,酚法提取的蛋白点比 TCA/丙酮法约多 58 个,比尿素法约多 70 个,具有极显著的统计学差异,结果和一维 SDS-PAGE 图谱一致。酚法提取的蛋白质图谱较 TCA/丙酮法和尿素法的横纹和纵纹数目较少,点之间的分辨率较高,为进一步的挖点分析提供方便。



A. TCA/丙酮法;B. 尿素法;C. 酚法

图 2 不同方法提取的雪莲组织中蛋白质的双向电泳

3 讨论

目前,TCA/丙酮法被广泛用于从植物组织中提取蛋白质,该法可沉淀植物叶片中全部蛋白,通过裂解液(包含去垢剂)来增加溶解量,操作简单且重复性较好。尿素法在提取原材料前研磨处理时,需加入 PVP 除掉材料中醌类和酚类化合物,同时硫脲结合较高浓度的尿素可使蛋白质的溶解性进一步加强,但可能会影响蛋白质的纯度和双向电泳的效果^[5-7]。

应用 TCA/丙酮法提取雪莲组织蛋白质的电泳图谱较酚法条数少,主要因为前者提取的蛋白质不容易复溶和完全沉淀^[8]。酚法操作较为复杂,在植物组织蛋白的提取中不常使用,但提取雪莲组织蛋白质效果较好,主要是由于饱和酚是一种较好的溶解剂,可使雪莲组织中多糖等杂质溶解于水中,蛋白质溶解于饱和酚中,通过乙酸铵沉淀来纯化分离组织蛋白^[9]。酚法提取雪莲组织中蛋白质的提取率最低,但是蛋白纯度明显高于另 2 种方法,提取的蛋白质种类数也是最多的。雪莲的生长环境较为特

殊,积累了大量多糖及多酚等代谢产物,导致提取高纯度蛋白质变得困难^[10-11],因此选取合适方法显得尤为重要。

[参考文献]

- [1] 邢建国,王新春,马晓莉,等. 天山雪莲微乳的小鼠局部药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):153.
- [2] 谢敏,邢建国,王新春,等. 天山雪莲透皮微乳制备处方优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):8.
- [3] Herman E M, Helm R M, Jung R, et al. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean[J]. Plant Physiol,2003,132(5):36.
- [4] 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(9):248.
- [5] Shaw M M, Riederer B M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003, 8(3):1408.
- [6] Audrius A Z, Andrew P B. Extraction methods for analysis of citrus leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis[J]. J Chromatography A,2010,1078(1/2):201.
- [7] Nandakumar M P. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional gel electrophoresis[J]. J Proteome Res, 2003,2(1):89.
- [8] REN L P, FAN H Y, WANG S S, et al. Improvement of cucumber leaf protein preparation method for 2-DE[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin,2011,31(8):1706.
- [9] Faurobert M, Pelpoir E. Chaib phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues[J]. Methods Mol Bio,2007,335(13):9.
- [10] Gia V P, Nordhoff E, Lehrachh, et al. Extraction of proteins from plant tissues[J]. Electrophoresis,2010,24(1/2):207.
- [11] 陈绍红,刘少彬,赵云涛. 苦瓜提取物抑制蛋白质的非酶糖基化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):211.

[责任编辑 全燕]