

· 化学与分析 ·

酸浆种子蛋白提取方法的比较研究

李晓琳, 邵爱娟, 陈敏, 黄璐琦*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**建立适用于酸浆种子的 SDS-PAGE 和 2-D PAGE 蛋白样品提取方法。**方法:**比较直接提取法、TCA-丙酮法、Tris-丙酮法、饱和酚法、改良饱和酚法等 7 种提取方法所获酸浆种子总蛋白含量以及 SDS-PAGE 电泳的谱带数目、强度和电泳分辨率等方面的差异。**结果:**HEPES buffer 直接提取法提取蛋白效率较高, 杂质少, 电泳谱带清晰, 分辨率高; PVP buffer 和 Lysis buffer A 直接提取法次之, 但杂质较多; TCA-丙酮法、Tris-丙酮法、饱和酚法和改良的饱和酚法差别不大, 蛋白纯度较高, 但提取效率低, 谱带数目少; 此外, Lysis buffer A 法、丙酮法和酚法易产生高丰度蛋白的干扰。**结论:**直接提取法中的 HEPES buffer 法最好, 优于丙酮法、酚法和其它直接提取法。

[关键词] 酸浆种子; 蛋白提取; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0014-04

Comparison of Protein Extraction Methods for the Semen Seu Fructus Physalis

LI Xiao-lin, SHAO Ai-juan, CHEN Min, HUANG Lu-qi*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To compare seven protein extraction protocols (PVP buffer, HEPES buffer, Lysis buffer A extraction and TCA/acetone, tris-base/acetone, phenol/ammonium acetate, acetone/phenol/ammonium acetate precipitation) and establish a suitable one for total proteins extraction from Semen Seu Fructus Physalis. **Methods:** The protein yield, protein purity and SDS-PAGE patterns was determined and analyzed. **Results:** HEPES buffer extraction produce the purer sample, much more clear bands and highest resolution. PVP buffer and Lysis buffer A extraction had most impurities. TCA/acetone, tris-base/acetone, phenol/ammonium acetate, acetone/phenol/ ammonium acetate precipitation methods had the purest sample, but protein yield and band numbers were lowest. Besides, the methods employing Lysis buffer was easy to produce high-abundance proteins and interfered in the electrophoresis resolution. **Conclusion:** HEPES buffer extraction was the best sample preparation protocol for SDS-PAGE and 2-D PAGE.

[Key words] Semen Seu Fructus Physalis; protein extraction; SDS-PAGE

种子是遗传因素的载体之一。受遗传基因控制的蛋白质分子普遍存在于种子内, 并在植物的生长

发育过程中起着重要作用。种子蛋白具有多态性、特异性和稳定性。1991 年国际种子检验协会将蛋白电泳方法正式定为标准的品种鉴定方法, 并纳入种子检验规程^[1]。经过近二十年的发展, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、等电聚焦电泳 (IEF) 和同工酶电泳等已广泛应用于农作物、蔬菜、牧草等种子的品种鉴

[收稿日期] 2009-07-13

[基金项目] 国家科技基础条件平台项目 (2005DKA21004)

[通讯作者] * 黄璐琦, Tel: (010) 64014411-2853; E-mail: huangluqi@263.net

定、纯度测定和亲缘关系分析等。双向电泳技术也越来越多的用于种子的形成与发育、休眠与萌发、保存与活力等研究中^[2]。但药用植物种子的蛋白电泳研究报道较少。

酸浆 *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino 为茄科酸浆属药用植物,其干燥宿萼或带果实的宿存萼作为锦灯笼药用,具有清热解毒、利咽、化痰、利尿的功效^[3]。酸浆种子蛋白电泳的研究尚未报道。药用植物种子中由于富含色素、酚、脂类、多糖以及一些次生代谢产物等干扰物质,较难获得提纯的蛋白。因此,本研究以酸浆种子为材料,就直接提取法、TCA-丙酮法、Tris-丙酮法、饱和酚法、改良饱和酚法等蛋白质提取方法进行比较分析,以期优化筛选出一套适于药用植物种子的蛋白提取方法。

1 仪器与试剂

1.1 实验材料 实验材料为野生酸浆 *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino 的干燥成熟种子,采自辽宁省抚顺县,由中国中医科学院中药研究所黄璐琦研究员鉴定。取4℃保存的种子,加入10% (w/v)的聚乙烯基吡咯烷酮,液氮中研磨成细粉,分装成若干份,每份0.1 g, -80℃冰箱中保存备用。

1.2 仪器与试剂 Heoffer SE600 电泳槽、EV265 电泳仪(Heoffer 公司), PGENERAL T6 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), 5810R 低温离心机(德国 Eppendorf 公司)。

甘氨酸(glycine)、三羟甲基氨基甲烷(Tris base)、十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素(Urea)、硫脲(thiourea)、CHAPS、三氯乙酸(TCA)、β-巯基乙醇(2-ME)、TEMED 购自 AMRESO 公司,聚乙烯基吡咯烷酮、过硫酸铵等其余试剂购自上海生工生物工程公司。

2 方法与结果

2.1 酸浆种子总蛋白的提取

2.1.1 直接提取法 取酸浆种子粉末3份,分别采用3种蛋白提取液(即PVP buffer、HEPES buffer 和 Lysis buffer A)直接提取蛋白。蛋白提取液的组成见表1。具体方法为加入预冷的提取液1 mL,混悬后冰上静置3~4 h,4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min,上清液置于-80℃冰箱中备用。

2.1.2 TCA-丙酮法 取酸浆种子粉末1份,加入1

mL 冰预冷的10% (w/v) TCA 和0.07% (v/v) 2-ME 的丙酮溶液,混悬后-20℃静置2 h,然后4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min,弃上清,沉淀重悬于0.07% 2-ME 的冰预冷丙酮溶液中,4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min,弃上清,重复洗涤两次后冷冻干燥沉淀,保存于-80℃备用。

2.1.3 Tris-丙酮法^[4] 取酸浆种子粉末1份,加入1 mL 冰预冷的提取液 Lysis buffer B(见表1),混悬后-20℃静置2 h,4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min,弃上清,沉淀重悬于0.07% 2-ME 的冰预冷丙酮溶液中,4℃、12 000 r·min⁻¹离心20 min,弃上清,重复洗涤两次后冷冻干燥沉淀。

2.1.4 饱和酚法 根据 Hurkman 和 Tanaka(1986)的饱和酚法稍作修改^[5]。取酸浆种子粉末1份,加入1 mL冰预冷的提取液 Lysis buffer C(见表1)和1 mL 的 tris 饱和酚,混悬后,4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上层酚相,加入1 mL 提取液重复提取一次,取上层酚相,加入5倍体积的0.1 M 的醋酸铵甲醇溶液,-20℃沉淀过夜,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min,收集沉淀,分别用甲醇和冷丙酮重复洗涤2次,冷冻干燥沉淀,保存于-80℃备用。

2.1.5 改良的饱和酚法 该法是 Xu 等人改良的提取植物叶片全蛋白的饱和酚沉淀法^[6]。取酸浆种子粉末1份,加入1 mL 冰预冷的10% (w/v) TCA 和2% (v/v) 2-ME 的丙酮溶液中,充分振荡后,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,沉淀用0.1 M 的醋酸铵/80% 甲醇溶液洗涤1次,再用80%的冷丙酮溶液洗涤1次。沉淀真空干燥后,重悬于1 mL 冰预冷的提取液 Lysis buffer D(见表1)中,再加入1 mL 的 tris 饱和酚,充分振荡后,4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上层酚相,加入1 mL 提取液重复提取1次,取上层酚相,向酚相中加入5倍体积的0.1 M 的醋酸铵甲醇溶液,-20℃沉淀过夜,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min,收集沉淀,分别用冷甲醇和80%的冷丙酮重复洗涤2次,冷冻干燥沉淀,保存于-80℃备用。

2.2 蛋白沉淀的溶解 分别称取一定量的蛋白沉淀,用适量的 Lysis buffer F(见表1)溶解,放摇床上震荡30 min,直至沉淀完全溶解。然后4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液用于蛋白含量测定和电泳分析。

2.3 蛋白含量测定 采用文献^[7]中 Bradford 法对所提蛋白进行定量,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2.4 电泳与图像分析 SDS-PAGE 电泳采用 Laemmli 的方法^[8],分离胶 13%,浓缩胶 5%。电泳在 15 °C 下进行,每条泳道上样量为 5 μg 蛋白样品。电泳条件为浓缩胶 15 mA,45 min,分离胶 25 mA,4 h,硝酸银染色。用数码相机拍照,用 GeneTools 软件进行图像分析。

表 1 蛋白提取液和裂解液组成和浓度

蛋白提取液和裂解液	组成和浓度
PVP buffer	150mM Tris-HCl, pH 8.0, 25% Glycerol, 2% 2-ME
HEPES buffer	100mM HEPES, pH 7.5, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 10mM Na ₃ VO ₄ , 10mM NaF, 5% Glycerol, 2% 2-ME
Lysis buffer A	7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 40mM Tris-base, 2% 2-ME
Lysis buffer B	40mM Tris-base, 5M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 2% 2-ME
Lysis buffer C	0.5M Tris-HCl, pH7.5, 0.7M Sucrose, 0.1M KCl, 50mM EDTA, 2% 2-ME
Lysis buffer D	10mM Tris-HCl, pH8.0, 30% sucrose, 2% SDS, 2% 2-ME
Lysis buffer F	9M Urea, 4% CHAPS, 2% 2-ME

附:上述各溶液均含有 a cocktail of protease inhibitors

2.5 实验结果

2.5.1 蛋白产量及纯度的比较 蛋白产量和纯度是评价提取方法的重要指标。产量越高,蛋白提取越完全。蛋白纯度不同,对电泳的影响也不同,较多的杂质将严重影响电泳结果。因此,蛋白产量越高,纯度越好,提取方法越好。图 1 为每种提取方法对应的蛋白产量。如图 1 所示,直接提取法蛋白产量均较高,其次是丙酮法,酚法最低。其中 Lysis buffer 直接提取法最高,TCA-丙酮法和 HEPES buffer 直接提取法也较高。由于部分提取方法得不到蛋白粗粉,无法计算纯度,因此仅从最终蛋白样品溶液的颜色简单的比较一下蛋白纯度。直接提取法和 TCA-丙酮法均带有淡黄色,说明含有色素等杂质,蛋白纯度较低,而 Tris-丙酮法和酚法无色透明,说明蛋白纯度较高。

2.5.2 电泳结果的比较 图 2 为酸浆种子蛋白的 7 种提取方法的 SDS-PAGE 电泳图谱,谱带数目及分子量见表 2。如图,酸浆种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱共有 23 条谱带,均为中、低分子量蛋白。两种

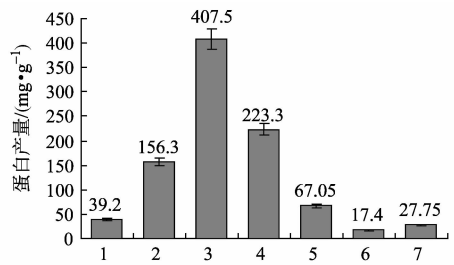


图 1 不同提取方法蛋白产量的比较

1. PVP buffer; 2. HEPES buffer; 3. Lysis buffer A;
4. TCA-丙酮法; 5. Tris-丙酮法; 6. 饱和酚法; 7. 改良饱和酚法

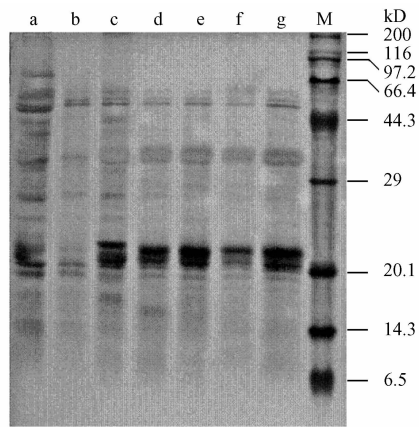


图 2 7 种方法提取酸浆种子蛋白的 SDS-PAGE 图谱
M:Maker; a:PVP buffer;b:HEPES buffer;c:Lysis buffer A;d:TCA-丙酮法;e:Tris-丙酮法;f:饱和酚法;g:改良饱和酚法

丙酮法和两种酚法的电泳图谱差异不大,但同直接提取法相比,谱带数目和谱带强度差异显著。直接提取法谱带数目较多,其中,PVP buffer 法有 22 条,Lysis buffer A 法有 17 条,其余方法均为 13 条,缺失了 97.6 kDa ~ 109.2 kDa 等部分蛋白。结果表明,PVP buffer 法和 Lysis buffer A 法提取的蛋白种类较多,提取效率较高,这与蛋白产量的分析结果一致。但 PVP buffer 法的泳道中背景较深,可能是由于样品中杂质和不溶性蛋白较多。而 TCA-丙酮法、Tris-丙酮法、饱和酚法、改进的饱和酚法没有泳道背景,样品中杂质和不溶性蛋白较少。

此外,除 PVP buffer 和 HEPES buffer 法外,其余方法中 R10、R11 和 R18、R19、R20 两个区间的 5 条谱带为高丰度蛋白,谱带强度较高,展宽严重,掩盖了分子量大小相近的蛋白,同时也使我们忽略了一些低丰度蛋白,降低了电泳的分辨率。而 PVP buffer 和 HEPES buffer 法提取的样品中不含有高丰度蛋

白,因此电泳谱带清晰。

3 讨论

本文以酸浆种子为材料,对药用植物种子的蛋白提取和 SDS-PAGE 方法进行了摸索,分别用 PVP buffer、HEPES buffer、Lysis buffer A 直接提取法、TCA-丙酮法、Tris-丙酮法、饱和酚法、改良饱和酚法提取蛋白,并对 7 种方法进行了比较分析。

表 2 不同提取方法的电泳谱带数目及分子量差异

谱带名称	PVP buffer	HEPES buffer	Lysis buffer A	TCA- 丙酮法	Tris- 丙酮法	饱和 酚法	改良饱 和酚法
R1	108.7	—	—	—	—	—	—
R2	106.7	—	—	—	—	—	—
R3	97.0	—	—	—	—	—	—
R4	82.3	81.3	82.8	81.8	—	—	—
R5	76.7	76.7	77.2	76.3	77.2	78.7	79.2
R6	—	72.0	72.5	72.5	72.5	73.9	73.4
R7	70.2	69.4	65.1	—	68.9	70.7	69.8
R8	60.7	—	57.3	—	—	—	—
R9	49.3	—	—	—	—	—	—
R10	42.0	41.5	—	44.5	44.2	46.2	—
R11	39.7	—	40.2	40.7	40.5	43.4	41.3
R12	36.6	38.2	37.0	38.2	—	39.0	38.5
R13	33.9	33.0	35.0	—	—	—	—
R14	30.4	—	31.2	32.4	32.2	30.8	30.8
R15	25.7	27.5	27.3	—	—	—	—
R16	21.8	24.4	24.2	24.2	24.5	—	24.9
R17	20.2	—	21.5	—	19.1	19.4	19.9
R18	19.2	18.8	19.8	18.0	17.3	18.5	18.2
R19	16.7	16.5	17.2	17.1	16.1	16.8	16.3
R20	15.7	15.3	16.2	16.2	15.2	15.6	15.4
R21	13.0	—	13.8	13.9	13.3	12.3	12.2
R22	10.0	10.6	10.3	10.3	10.5	9.8	9.5
R23	9.7	—	—	—	—	—	—
谱带数目	22	13	16	13	13	13	13

TCA-丙酮法、Tris-丙酮法、饱和酚法、改良饱和酚法为植物根和叶片蛋白的二维电泳样品提取方法,提取的样品纯度较高,但提纯步骤较多,蛋白损失严重,用于一维电泳时蛋白条带缺失较多。此外,Lysis buffer 中含有高浓度的尿素或硫脲,可以增强蛋白的溶解,甚至可以溶解一些非水溶的贮藏蛋白。而种子中贮藏蛋白的含量较高,使用 Lysis buffer 直接提取或溶解蛋白沉淀易产生而高丰度蛋白,致使谱带展宽严重,掩盖分子量相近的蛋白,影响低丰度蛋白的检测,降低电泳的分辨率。而直接提取法中

PVP buffer 和 HEPES buffer 法提取的主要是酶等水溶性的持家蛋白,贮藏蛋白含量较少,没有高丰度蛋白,电泳谱带清晰。PVP buffer 法虽然蛋白谱带数目最多,但提取效率和蛋白纯度较低,影响电泳的分辨率。因此,对于含色素、多糖等杂质较少的种子,在不影响电泳分离效果的情况下可以采用。

综合各方面结果,直接提取法中的 HEPES buffer 法最好,蛋白提取效率较高、杂质少,电泳谱带清晰,分辨率高,可以同时满足一维和二维电泳的样品要求,因此,优于丙酮法、酚法和其它直接提取法。虽然 Lysis buffer A 法蛋白提取效率高、蛋白谱带数目多,但易产生高丰度蛋白,因此贮藏蛋白含量较少的种子的一维电泳可优先选用该法。而 TCA-丙酮法、Tris-丙酮法、饱和酚法、改良饱和酚法更适用于二维电泳的样品制备。

[参考文献]

[1] 国际种子检验协会(ISTA). 国际种子检验规程[M]. 北京:中国农业出版社, 1996:196.

[2] 王文军,景新明. 种子蛋白质与蛋白质组的研究[J]. 植物学通报, 2005, 22:257-266.

[3] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 一部, 北京:化学工业出版社, 2005:250.

[4] Damerval C, D D Vienne, M Zivy, *et al.* Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins[J]. *Electrophoresis*, 1986, 7:52-54.

[5] Hurkman W J, C K Tanaka. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Plant Physiol*, 1986, 81:802-806.

[6] C Xie, D Wang, X Yang. Protein extraction methods compatible with proteomic analysis for the cotton seedling [J]. *Crop Sci*, 2009, 49:395-402.

[7] 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.

[8] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227:680-685.