

杏树皮可溶性总蛋白的提取与浓缩方法探讨

张俊环, 王玉柱, 孙浩元, 杨 丽

(北京市农林科学院 林业果树研究所 北京 100093)

摘 要: 为从杏树皮组织中获取高质量的可溶性总蛋白, 选择经过冬季自然低温驯化的 1 a 生杏树新梢为试材, 比较分析提取缓冲液中分别添加 2% SDS, 不同浓度的 Tween 20, 以及高浓度 PVPP 对可溶性总蛋白提取浓度和质量的影响。结果表明: 提取杏树皮可溶性总蛋白的最佳缓冲液体系为: 5 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(其中含 2 mM EDTA- Na_2 , 10 mmol/L 抗坏血酸, 0.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 1%(w/v)PVPP, pH 8.0)和 0.5% Tween 20。丙酮浓缩方法中加入蛋白粗提液 2 倍体积的冷丙酮是最理想的。经过提取和浓缩的蛋白浓度可达 0.773 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 电泳分析中的条带多而清晰, 可用于后续的目的蛋白纯化试验及功能分析。

关键词: 杏; 树皮; 可溶性总蛋白; 提取

中图分类号: Q 946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0051-03

植物可溶性总蛋白的提取, 是对植物进行多种生化分析的前提。但是不同植物材料, 它的提取方法和提取的难易程度是有很大的差别的^[1], 所得蛋白溶液的质量直接影响下一步的分析(如目的蛋白的分离纯化、特异蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blot 分析、蛋白酶活性的检测等)^[2-4]。植物抗冻蛋白(Antifreeze proteins, AFPs)是低温诱导基因表达所产生的蛋白, 广泛存在于多种植物体内, 被认为是植物体内重要的抗冻剂^[5], 并成为近年来抗寒生物学领域研究的热点^[6-7]。杏树抗干旱, 耐瘠薄, 是山区绿化及生态农业建设的理想树种, 具有良好的生态效益; 但是, 北京地区早春骤然低温、晚霜和寒潮的气候特征严重影响广大杏栽培区的收益。因此, 该试验选择经过冬季自然低温驯化的山杏 1 a 生新梢为试材, 探讨从新梢组织中提取高质量可溶性蛋白的方法, 以为下一步进行抗冻蛋白的分离纯化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2008 年 1 月 24 日, 从北京市农林科学院林业果树研究所内的杏资源圃采取经过冬季低温驯化的山杏 1 a 生新梢, 带回实验室, 用蒸馏水冲洗干净后, 刮取其韧皮

组织, 液氮速冻后, -80°C 保存备用。

1.2 蛋白提取

取 0.5 g 样品, 液氮中研磨, 加入 5 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(其中含 2 mM EDTA- Na_2 , 10 mmol/L 抗坏血酸, 0.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 1%(w/v)PVPP, pH 8.0)和不同组分: I, 2% SDS; II, 0.1% Tween 20; III, 0.5% Tween 20; IV, 1.0% Tween 20; V, 加 PVPP 至 10%(w/v); VI 对照, 即不添加其它成分。匀浆于 4°C 下 10 000 rpm 离心 20 min, 上清液即为蛋白粗提液。3 次重复。

1.3 丙酮浓缩

向一定体积的蛋白粗提液中分别加入 1、2、3、4 倍体积的冷丙酮(-20°C), 并在 -20°C 条件下放置 30 min, 之后于 4°C 下 12 000 rpm 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀在 4°C 下晾干后, 加入 1~2 倍沉淀体积的 Tris-HCl 缓冲液进行抽提, 之后于 4°C 下 12 000 rpm 离心 15 min, 取上清液, 进行浓度检测, 3 次重复。

1.4 蛋白浓度检测

按 Bradford(1976)方法^[8], BSA 为标准蛋白质。

1.5 SDS-PAGE 电泳

按照 Laemmli(1970)的方法^[9], 采用 Bio-Rad Mini 电泳系统(Bio-Rad, Richmond California, USA), 进行 SDS-PAGE, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法的粗提取液结果

采用 2 种方法对 6 种不同提取方案所得的蛋白粗提液进行浓度检测, 分别是 Bradford 法和凝胶电泳法。Bradford 法所测得的计算结果见表 1, 可以看出不同提取方法所得蛋白粗提液的蛋白浓度差异显著, 方法 I、III

第一作者简介: 张俊环(1974), 女, 山东菏泽人, 博士, 助理研究员, 现主要从事果树逆境生理与分子生物学研究工作。E-mail: zhang_junhuan@163.com。

通讯作者: 王玉柱(1960), 男, 北京平谷人, 博士, 研究员, 现主要从事果树资源与育种工作。

基金项目: 北京市优秀人才培养 D 类资助项目(20061D02005 00047)。

收稿日期: 2009-06-20

和 IV 所得的蛋白浓度显著高于其它 3 种方法, 方法 II 和 IV 之间差异不大, 但又都高于方法 I。

为了进一步检测不同方法所得结果的差异, 又进行了 SDS-PAGE 电泳, 结果显示(图 1), 同样的电泳上样量, 只有 I、II 和 IV 泳道有较弱的少量蛋白条带, 而方法 II、V 和 VI 没有蛋白条带出现, 表明后者蛋白浓度较低, 这与 Bradford 法所测得的计算结果相一致, 表明方法 I、II 和 IV 优于其它提取方法。

表 1 不同提取方法所得提取液的蛋白含量比较

Table 1 Changes of protein concentration of crude extracts by six methods						
处理 Treatments	I	II	III	IV	V	VI
上清液蛋白浓度 The protein concentration of supernatant/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0.19	0.041	0.256	0.272	0.021	0.010

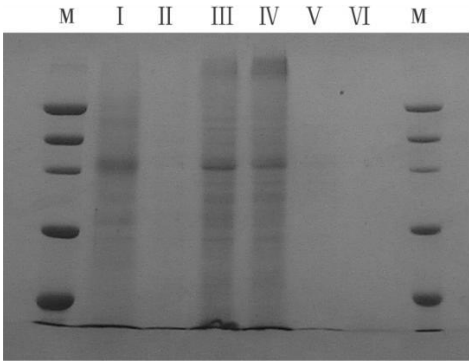


图 1 不同提取方法所得提取液的 SDS-PAGE 电泳结果
Fig.1 The SDS-PAGE of protein extracts by six extraction methods

由图 1 还可以看出, 即使方法 I、II 和 IV 能跑出少量的条带, 但条带太弱, 不清晰, 表明浓度太低, 这样低的浓度不能用于下一步的蛋白纯化试验, 为此需要做进一步的浓缩来提高蛋白浓度。

2.2 不同体积丙酮浓缩方法比较

该试验采用了丙酮浓缩法, 因为不同的丙酮用量会对最后的结果有很大的影响, 所以对不同体积的丙酮浓缩方法进行了比较, 向一定体积的蛋白粗提液中分别加入 1、2、3、4 倍体积的冷丙酮(-20°C), 结果如图 2 所示, 当加入 1 倍体积和 2 倍体积的丙酮时(图 2 A, B), 可观察到少量的絮状沉淀悬浮于液体中, 随着丙酮用量的增加, 沉淀量增加(图 2 C), 但当加到 4 倍体积时, 蛋白沉淀严重收缩并沉于离心管底部(图 2 D)。离心后收集沉淀, 低温晾干后, 用一定体积的提取缓冲液使沉淀溶解, 之后再离心取上清, 并用 Bradford 法进行了浓度检测, 结果显示, 用 2 倍体积的丙酮浓缩, 所得的蛋白浓度最高, 其次为 3 倍体积, 4 倍体积浓缩效果最差(表 2)。

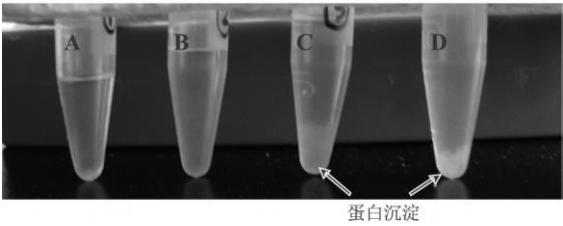


图 2 不同体积丙酮浓缩所得的蛋白沉淀状
Fig.2 The deposits from different acetone condensing methods

表 2 不同浓缩方法所得悬浮液的蛋白含量比较

Table 2 Changes of protein concentration of suspension from different acetone condensing methods				
处理 Treatments	A	B	C	D
浓缩液蛋白浓度 The protein concentration of condensate/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0.162	0.227	0.210	0.147

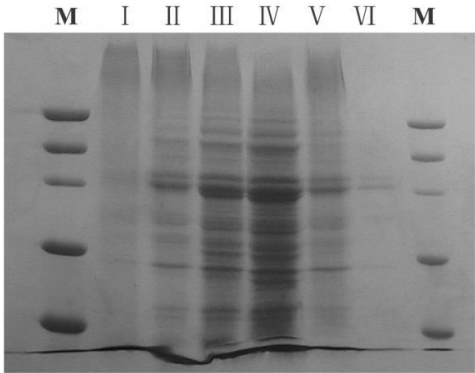


图 3 不同提取方法所得提取液的浓缩液的 SDS-PAGE 电泳结果
Fig.3 The SDS-PAGE of different protein extracts after condensing treatments

表 3 对不同提取方法所得提取液进行丙酮浓缩后的蛋白含量比较

Table 3 The protein concentration of different protein extracts after condensing treatments						
处理 Treatments	I	II	III	IV	V	VI
浓缩液蛋白浓度 The protein concentration of condensate/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	0.244	0.468	0.738	0.773	0.395	0.146
所得浓缩液体积 The volume of condensate/ μL	200	80	200	200	100	95
浓缩所得蛋白总量 The amount of total protein after condensing/ μg	48.8	46.8	147.6	154.6	39.5	14.6

2.3 不同提取方法的粗提取液浓缩结果

用粗体液 2 倍体积的冷丙酮对 6 种不同提取方案所得的蛋白粗提液进行了浓缩处理, 并对浓缩所得的蛋白溶液进行了浓度测定和 SDS-PAGE 电泳检测, 结果表明, 对相同体积的蛋白粗体液进行浓缩, 所得的蛋白量有明显的差异, 方法 II 和 IV 显著高于其它 4 种方法, II 和

Ⅳ间差异不大,方法Ⅳ略高于Ⅲ 电泳检测结果与此相对应,泳道Ⅱ和Ⅳ检出的清晰蛋白条带最多,最亮(图3),表明2种方法所得的蛋白溶液中的蛋白含量最高,考虑到提取液中去污剂添加量太大也会对后续试验带来些许不利影响,所以综合考虑,方法Ⅱ是最理想的提取方案。

3 结论与讨论

丙酮浓缩法一直是蛋白溶液浓缩的常用方法,但不同材料通常要用不同的丙酮用量,才能达到最理想的结果。丙酮体积太少,蛋白溶液中的蛋白分子沉淀不完全,会影响最后的蛋白得率;但若使用的丙酮量太大,蛋白分子收缩太严重,使复性困难,最后得到的蛋白浓缩液也是明显偏低的。所以该试验中以2倍体积丙酮所得的结果最理想,与在桃叶片材料上的结果相一致^[10]。

蛋白提取缓冲液中,加入去垢剂可以提高蛋白在缓冲液中的溶解度,从而使蛋白分子更容易从材料中游离出来。去垢剂分为离子型(如十二烷基硫酸钠(SDS))和非离子型(如 TritonX-100, Tween-20 等)。离子型去垢剂的缺点是使蛋白质高度变性,后续试验需要保持蛋白活性的就不宜使用;而非离子型去垢剂对蛋白和蛋白间的相互作用干扰较弱,对于分离功能性的蛋白复合物较为有利^[11]。该试验对2%SDS和0.1%、0.5%、1.0% Tween-20进行了比较试验,结果表明,蛋白提取缓冲液中添加0.5% Tween-20是最理想的。

PVPP可以结合材料中酚类物质,保护蛋白质不被氧化分解。杏树皮材料中的酚类物质含量较高,所以试验设计方法Ⅴ中提高PVPP的用量达10%(w/v),结果所得蛋白溶液中的蛋白含量比对照(添加1%(w/v)的PVPP)略有提高,但仍远远低于方法Ⅲ(0.5% Tween-20+1%(w/v)的PVPP)的蛋白含量(表1、3),可见,PVPP的用量也不是越多越好。

综合分析6种蛋白提取方案,最后确定杏树皮可溶性总蛋白提取的最佳缓冲液体系为:5 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(其中含2 mM EDTA-Na₂, 10 mmol/L 抗坏血酸 0.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 1%(w/v) PVPP, pH 8.0)和0.5% Tween 20。丙酮浓缩方法中:加入蛋白粗提液2倍体积的冷丙酮是最理想的。经过提取和浓缩的蛋白浓度可达0.773 μg/μL,电泳分析中的条带清晰,可用于后续的目的蛋白纯化试验及功能分析。

参考文献

[1] 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 等. 木本植物蛋白提取和 SDS-PAGE 分析方法的比较和优化[J]. 植物学通报, 1999, 6(2): 171-177.
[2] 尉姗姗, 尹林克, 牟书勇, 等. 新疆沙冬青抗冻蛋白的提取分离及其热滞活性测定[J]. 云南植物研究, 2007, 29(2): 251-255.
[3] Zhang J H, Huang W D, Pan Q H, et al. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins ingrape berry by heat-pretreatment[J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 38(1): 80-90.
[4] 张俊环, 黄卫东. 葡萄幼苗在温度逆境交叉适应过程中活性氧及抗氧化酶的变化[J]. 园艺学报, 2007, 34(5): 1073-1080.
[5] 康国章, 王正询, 孙谷畴. 植物的冷调节蛋白[J]. 植物学通报, 2002, 19(2): 239-246.
[6] 费云标, 魏令波, 高素琴, 等. 沙冬青抗冻蛋白分离纯化及其理化特性分析[J]. 科学通报, 2000, 45(20): 2185-2189.
[7] 刘尚, 廖祥儒, 张建国, 等. 一种女贞叶抗冻蛋白的分离纯化[J]. 植物学通报, 2007, 24(4): 505-510.
[8] Bradford N M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-259.
[9] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-683.
[10] Wang X Q, Huang W D, Zhan J C. Effect of low light on the activity of sucrose synthase in leaves of Nectarine[J]. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2005, 80(3): 358-362.
[11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 60-668.

Study on the Extracting and Condensing Methods of Total Proteins from the Shoot Barks of Apricot

ZHANG Jun-huan, WANG Yu-zhu, SUN Hao-yuan, YANG Li

(Institute of Pology and Forestry, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093 China)

Abstract: The condition of extracting soluble total proteins from the shoot barks of apricot by different solvents was discussed. The optimum extracting condition was determined as: 50 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 2 mmol/L EDTA-Na₂, 10 mmol/L ascorbic acid, 0.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 1% (w/v) PVPP and 0.5% (w/v) Tween20. The acetone condensing method was also investigated and the results showed that the volume ratio of the rude protein extracts to acetone was 1 : 2, the reacting result was most desirable; the protein concentration was higher to 0.773 μg/μL, and many clear bands was detected by SDS-PAGE, which indicating that the protein extracts had a good quality for deeply study, such as protein purification and function analysis.

Key words: Apricot; Shoot bark; Soluble total proteins; Extraction