

石榴叶片蛋白提取方法研究

田忠景, 康美玲, 王秀文

(枣庄学院 生命科学学院, 山东 枣庄 277160)

摘要:以“大红袍”石榴叶片为试材,研究比较了三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法、Tris-HCl 提取法和酚-甲醇/醋酸铵沉淀法对石榴叶片总蛋白质的提取效果间的差异。结果表明:TCA/丙酮沉淀法所得电泳图谱背景不清晰;酚-甲醇/醋酸铵沉淀法步骤繁琐,蛋白质信息量少;Tris-HCl 提取法为最适方法,所得图谱背景清晰,蛋白质信息量最大。

关键词:石榴;蛋白质组;垂直板电泳;考马斯亮蓝染色

中图分类号:Q 51 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0137-03

石榴(*Punica granatum* Linn)为石榴科石榴属落叶灌木或小乔木,又名若榴、安石、丹若^[1],原产伊朗、阿富汗等中亚地带。山东枣庄峄城为了更好地利用石榴资源,建立了冠世榴园风景区和国家级石榴种质资源圃。蛋白质组学可以通过对蛋白质性质、结构和丰度的考察来揭示其功能^[2-5],进而找到不同品种、不同组织和部位等的差异蛋白,使之成为筛选的靶分子,指导基因组的分析。如今与蛋白质相关的研究技术取得了突飞猛进的发展并开始在很多领域得到广泛应用。蛋白质组的研究在农作物和果树方面也取得了较大的进展,但果树方面有关石榴的蛋白质组研究仍鲜见报道,而获得高质量的蛋白质是进一步研究的基础,该研究对石榴叶片蛋白质的提取条件进行了探索,以获得高效、丰富的蛋白质,进而为更好的研究石榴蛋白质组奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以“大红袍”石榴叶片为材料,样品采自驿城石榴国

家种质资源圃。采取时间 2011 年 7 月 28 日,采摘后即放入冰盒,带回实验室后于液氮中保存备用。

1.2 试验方法

采用 3 种不同的方法从石榴叶片中提取蛋白质并采用 PAGE 电泳进行分析鉴定。

1.2.1 三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法 取“大红袍”冷冻叶片,利用液氮进行研磨,研磨完毕准确称取 0.5 g“大红袍”叶片粉末至 10 mL 离心管中,加 3 mL 预冷 10% TCA/丙酮^[6],冰箱内沉淀过夜,4 000 r/min 离心 10 min,加入 5 mL 冷丙酮充分震荡至沉淀完全溶解,4 000 r/min 离心 10 min,重复 3 次,以便完全去除叶绿素等杂质,再加入 5 mL 80%冷丙酮充分溶解沉淀,4 000 r/min 离心 10 min,室温风干,待丙酮挥发完后(在通风橱内),加入蛋白质裂解液^[7] 2 mL(12 mL 冰醋酸,18 g 尿素加蒸馏水溶解,再加 4 mL TEMED,0.05 g 甲基绿定容至 100 mL),振荡器震荡 2~4 h,以使蛋白质充分溶解于蛋白质裂解液中,3 800 r/min 离心 10 min,取上清即为待测蛋白质上样液。

1.2.2 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法 取“大红袍”冷冻叶片,利用液氮进行研磨,然后快速称取 0.5 g 叶片粉末至 10 mL 离心管中,加入 3 mL 预冷的丙酮(含少量 β -巯基

第一作者简介:田忠景(1978-),男,硕士,讲师,研究方向为生化与分子生物学。E-mail:jingzt03@163.com.

收稿日期:2012-05-16

Abstract: Using ovary of *Hemerocallis hybrida* ‘Shaman’ as explant, callus induction and differentiation, the effect of hormone combinations on reproductive efficiency of plantlets, setting of rooting medium, the key technical parameters of domestication and cultivation in the process of its tissue culture were systematically studied. The results showed that the best culture medium of ‘Shaman’ callus differentiation was MS+4 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA+1 mg/L 2,4-D and adventitious bud differentiation rate reached 49.2%. When 6-BA concentration was 3 mg/L and (0.3~0.5)mg/L IBA, propagation coefficient would be possible to reach 5.8~6.4 times. The suitable rooting medium included 1/2 MS+0.4 mg/L NAA+20 g/L sucrose+6.5 g/L agar, the average rooting number reached 5.7 roots. The substrate for transitional cultivation of tissue culture seedling was thick riversand, vermiculite+peat soil, peat soil, when the temperature was 24~28℃, the relative humidity was 85%~90%, survival rate of tube seeding reached 90%.

Key words: *Hemerocallis hybrida*; explant; callus; tissue culture

乙醇),充分震荡,3 500 r/min 4℃离心 10 min,重复 1 次,以尽量减小叶绿素等杂质的影响,再加入-20℃ 10% TCA/丙酮^[8]3 mL 清洗 6 次至上清液无色,3 500 r/min 4℃离心 5 min,然后用 10%三氯乙酸(TCA)水溶液清洗 3 次,3 500 r/min 4℃继续离心 8 min,利用 80%预冷的丙酮(里边含少量的 0.07%的 β -巯基乙醇)洗涤 3 次。然后加入 2 mL 的 Tris 平衡酚(pH 8.0)和 2 mL 的 SDS 缓冲溶液(0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0,2%的 SDS,5% β -巯基乙醇,30%的蔗糖),充分震荡,沉淀完全溶解后,3 500 r/min 4℃下离心 5 min,离心结束后把上层酚相转移至 1 个新的离心管中,随后加入 5 倍体积冰中放置的 0.1 mol/L 甲醇乙酸铵溶液,冰箱内沉淀蛋白质 30 min,3 500 r/min 4℃离心 5 min,用 0.1 mol/L 甲醇乙酸铵溶液洗 1 次,用冷丙酮清洗 1 次,洗完后 3 500 r/min 4℃离心 5 min。待丙酮挥发完后(在通风厨内进行),加入蛋白质裂解液,振荡器震荡 2~4 h,3 800 r/min 离心 10 min,取上清液即为待测蛋白质上样液。

1.2.3 Tris-HCl 法 取冷冻的“大红袍”叶片,液氮中进行研磨,研磨完毕后迅速称取 0.5 g 叶片粉末至 10 mL 离心管中,随后加入交联聚乙烯吡咯烷酮 0.3 g 以及蛋白质提取液^[9]4.5 mL(0.5% SDS,5% β -巯基乙醇,10% 甘油,65 mmol pH 6.8 的 Tris-HCl),混匀后于 4℃充分震荡浸提 1 h,主要目的在于可以充分溶解样品中的蛋白质,浸提结束后转速采用 3 800 r/min 于 4℃离心 20 min,离心结束后用移液器吸取上清液 800 μ L,再与 10 倍体积预冷的 10%TCA/丙酮混匀,然后置冰箱内冷冻沉降蛋白质 3 h,沉降结束后 3 500 r/min 于 4℃再次离心 10 min,所得蛋白质沉淀用 5 mL 预冷的丙酮洗涤 3 次,重复上述离心 1 次,用 80%预冷的丙酮洗涤 1 次,室温下风干(通风厨内操作),加入蛋白质裂解液 2 mL,振荡器震荡 2~4 h,3 800 r/min 离心 10 min,取上清即为待测蛋白质上样液。

1.2.4 SDS-PAGE 垂直板电泳 首先取琼脂糖凝胶少量封底,等胶凝固后,用注射器加聚丙烯酰胺凝胶^[10-12](分离胶),插入梳子,继续添加浓缩胶,待凝固后拔出梳子,每一点样孔中点样 50 μ L。加入 1.5%的冰醋酸做为电解液^[12],设定电泳仪为恒流 25 mA,电泳 100 min 左右。

2 结果与分析

石榴叶片蛋白的制备是垂直板电泳成功分离各类蛋白质的最重要因素,特别是叶片蛋白的再溶性和纯度更是直接影响蛋白质电泳的分离效果,石榴叶片中因含有大量的多糖、色素、多酚、醌类以及其它多种次生代谢产物,对垂直板电泳的分离效果有较强的干扰,因此试验中要尽量去除这些杂质以便达到较好的分离效果。

2.1 不同方法所提蛋白电泳图谱

2.1.1 TCA/丙酮沉淀法 从操作步骤和试验成本来看^[15],TCA/丙酮沉淀法比较简便、成本较低,但是沉淀蛋白质需要进行过夜处理,消耗时间相对比较长,且 TCA/丙酮沉淀法的另一方面不足是蛋白质一般难以重新溶解^[16-17],故该法不太适于石榴叶片蛋白的提取。

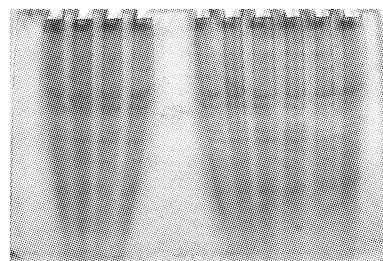


图 1 TCA/丙酮沉淀法电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of protein samples extracted by TCA-acetone method

2.1.2 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法 与另外 2 种蛋白质提取方法相比,酚-甲醇/醋酸铵沉淀法试验步骤繁琐,成本亦随之提升。从图 2 还可以看出,电泳谱带呈现为弥散型,这可能与 Tris-平衡酚溶解多糖和核酸的能力较差有关;且 Tris-平衡酚具有较强毒性^[18],兼之蛋白在提取过程中亦多有损失,因此还会使得电泳谱带数减少。所以该法亦不甚适合作为石榴叶片蛋白质样品的制备。

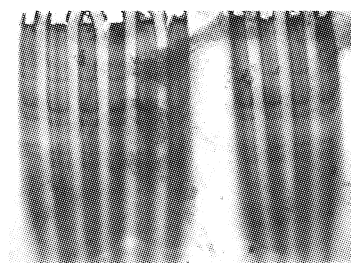


图 2 酚-甲醇/乙酸铵沉淀法电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of protein samples extracted by phenol-methanol/ammonium acetate precipitation method

2.1.3 Tris-HCl 沉淀法 用含 SDS 的 Tris-HCl 蛋白质提取缓冲液与 TCA/丙酮沉淀相结合来提取石榴叶片蛋

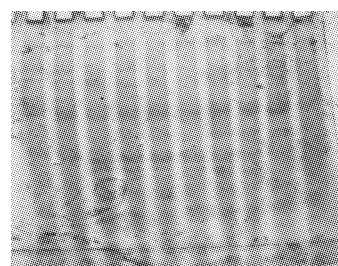


图 3 Tris-HCl 法电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of protein samples extracted by Tris-HCl method

白,结果表明在较低的温度下蛋白质沉淀效果更好,还有在提取中利用聚乙烯吡咯烷酮吸附剂的吸附作用能够将酚类化合物除去,与此同时用预冷的丙酮洗涤蛋白质数次,能够将大部分色素去除掉,而用 80% 预冷的丙酮则能够将一些水溶性杂质去除掉。

2.2 不同方法比较

对 3 种不同方法提取所得“大红袍”石榴叶片蛋白质进行垂直板电泳分离后所得条带最大值^[13-14]作图进行比较。由图 4 可知,TCA-丙酮沉淀法所得蛋白质条带数目最大值为 15 条,酚-甲醇/乙酸铵沉淀法所得蛋白质条带数目最大值为 13 条,Tris-HCl 法所得蛋白质条带数目最大值为 24 条。其中 Tris-HCl 提取法所得蛋白质条带数最多,分别比酚-甲醇/乙酸铵沉淀法和 TCA/丙酮沉淀法分离得到的蛋白质条带数目最大值多 10 条和 8 条,蛋白质条带数分别增加 77% 和 53%。再从提取过程来看 Tris-HCl 提取法还较好的避免了很多干扰物质的影响,同时结果亦表明所得蛋白图谱清晰,丰度较高,为石榴蛋白的进一步分析奠定了基础。

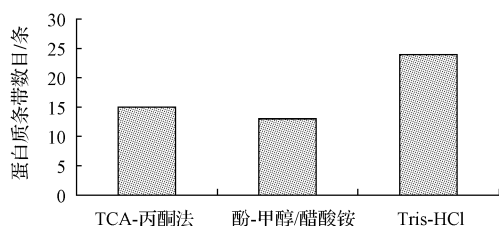


图 4 3 种方法提取“大红袍”石榴叶片蛋白质垂直板电泳条带数目的比较

Fig. 4 Comparison of different methods

3 结论

通过对石榴叶片蛋白的不同提取方法进行比较分析,Tris-HCl 法是比较合适的一种提取方法。在现有试验方法研究的基础上,相信经过进一步的摸索和各项试

验条件的优化,将来会找到更高效地获得石榴叶片蛋白质的试验技术,为石榴的进一步研究提供帮助。

参考文献

- [1] 肖军,王义国.石榴粗大插条扦插方法[J].北方果树,2009(1):30.
- [2] 张鹭.蛋白质组学及其技术体系简介[J].吉林特产高等专科学校学报,2004,13(2):31-34.
- [3] 刘小林.蛋白质组学及其研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(31):9810-9812.
- [4] 张宏一.蛋白质组学研究技术及其进展[J].生物技术通报,2005(4):31-35.
- [5] 杨礼富.蛋白质组学研究技术与展望[J].热带农业科学,2007,27(2):58-62.
- [6] 朱志勇,曹尚银,徐小彪,等.新红星苹果花芽蛋白质提取及双向电泳的改良方法[J].果树学报,2007,24(4):549-552.
- [7] 曹景林,朱龙付,谭家福.适用于蛋白质双向电泳的棉花胚性培养物蛋白质提取技术[J].棉花学报,2009,21(1):3-9.
- [8] 曾广娟,李春敏,张新忠.苹果叶片蛋白质双向电泳样品制备方法的比较[J].中国农学通报,2008,24(8):105-109.
- [9] 范海延,陈捷,张春宇.适于黄瓜叶片蛋白质组分析的双向电泳方法最佳条件的研究[J].沈阳农业大学学报,2008,39(3):365-367.
- [10] 张少斌,刘慧.双向电泳技术在植物蛋白质组研究中的应用[J].安徽农业科学,2006,34(10):2049-2050.
- [11] 王莹,朱海涌,肖芳茹.垂直板凝胶电泳常见问题及解决方法[J].河南职技师院学报,1998,26(1):50-51.
- [12] 王光西,熊瑛,税青林,等.聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳检测人血清Hp的初步研究[J].泸州医学院学报,1998,21(2):142-144.
- [13] 杨梅,陈伟,林恩祖,等.杉木叶片蛋白质组的双向电泳技术优化[J].热带亚热带植物学报,2007,15(5):438-442.
- [14] 韩晓敏,肖传国,李兵,等.大鼠脊神经蛋白质组研究中双向电泳技术的建立[J].华中科技大学学报(医学版),2006,35(4):538-541.
- [15] 何瑞峰,丁毅,张剑锋,等.植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化[J].遗传,2000,22(5):319-321.
- [16] 朱宏,马旭俊,马兴宏,等.小麦叶片蛋白质的双向电泳分析[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,2001,17(1):98-100.
- [17] 谷瑞升,刘群录,陈雪梅,等.一种省时高效的木本植物蛋白双向电泳分析方法[J].北京林业大学学报,1999,21(5):7-10.
- [18] 刘健平,陈国华,陈本美,等.蛋白质组双向电泳实验中一些常见失误的分析[J].生命科学研究,2003,7(2):177-180.

Study on Protein Extraction Methods of Pomegranate Leaves

TIAN Zhong-jing, KANG Mei-ling, WANG Xiu-wen

(College of Life Science, Zaozhuang University, Zaozhuang, Shandong 277160)

Abstract: Taking the leaves of *Punica granatum* Linn ‘Dahongpao’ as material, three protocols for total protein extraction, trichloroacetic acid/acetone precipitation (TCA), phe-nol extraction methanol/ammonium acetate precipitation and Tris-HCl extraction were compared. The results showed that TCA/Acetone extration was unclear background; the Tris-HCl extraction was the most appropriate for pomegranate leaf proteome analysis on account of the highest resolution and more informative.

Key words: *Punica granatum* Linn; proteome; vertical polyacrylamide gel electrophoresis; coomassie brilliant blue staining