

DOI:10.11937/bfyy.2016150032

苹果果实表皮总蛋白提取及双向电泳方法的优化

肖 龙^{1,2}, 丛佩华^{1,2}, 张彩霞^{1,2}, 宗泽冉^{1,2}, 田 义^{1,2}, 张利义^{1,2}

(1. 农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁 兴城 125100; 2. 中国农业科学院 果树研究所, 辽宁 兴城 125100)

摘 要:以苹果果实表皮为试材, 采用 3 种方法提取果实表皮总蛋白, 并对双向电泳(2-DE)操作体系进行优化。结果表明:改良酚提法适于苹果果实表皮总蛋白的提取, 优化后的 2-DE 分离体系为预制 IPG 胶条 18 cm pH 4~7, 上样量 600 μ g, 改进后的等电聚焦程序, 浓度 16% 的分离胶, 适于苹果果实表皮总蛋白的 2-DE 分离。

关键词:苹果; 果实表皮; 蛋白质组学; 双向电泳

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)15-0130-05

大量物种基因组测序完成后, 基因的功能和表达更加受到重视, 蛋白质组学随之产生, 成为后基因组时代的研究热点^[1]。蛋白质组学的研究中, 通过筛选不同品种、不同器官及不同组织中的功能蛋白, 分析其丰度、结构、性质和功能, 揭示相关基因的功能^[2]。如今, 在植物、动物及微生物领域的研究中, 蛋白质组学技术已经得到了广泛的应用^[3-4]。2-DE 分离技术、质谱技术及生物信息学分析, 是开展蛋白质组学研究的 3 项核心技术^[1]。

第一作者简介:肖龙(1984-), 男, 博士研究生, 研究方向为果树遗传育种。E-mail:1984xl@163.com

责任作者:丛佩华(1963-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事果树遗传育种等研究工作。E-mail:congph@163.com

基金项目:农业部现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-28); 国家科技支撑计划资助项目(2013BAD02B01)。

收稿日期:2016-04-21

蛋白质样品的分离纯化是开展蛋白质组学研究的关键步骤, 样品制备方法决定了蛋白样品的质量及 2-DE 分离结果^[5]。2-DE 分离技术操作步骤繁杂, 每一步操作都关系到所得凝胶图谱的质量及后续分析结果^[6]。

随着“金冠”(‘Golden Delicious’)苹果全基因组草图的公布^[7], 所产生的超大量数据, 为苹果属植物基因组学、蛋白质组学等研究的开展提供了重要的信息源。目前已有的涉及苹果属植物的蛋白质组学研究中, 材料多为茎、叶、花芽等^[8-10], 而以果实为材料的相关研究较少。苹果果实表皮在其生长发育、外观品质形成、应答非生物及生物胁迫等生理生化过程中, 存在有多种协同表达的蛋白。由于苹果果实表皮蛋白含量低, 并且含有蛋白酶及干扰蛋白提取和分离的多糖、果胶、色素、多酚等大量次级代谢物, 增加了其蛋白样品制备及 2-DE 分离的研究难度。现以‘杂交优系’苹果果实表皮为研究对象,

Effect of Berry Maturity and Impregnation Time on Fermentation Characteristics of ‘Beihong’ Grape Wine

CHEN Qing, SHAN Shouming, BAO Minhu, MAI Ling, PING Jicheng, LIU Chengmin
(Ningxia Institute of Grape and Wine, Ningxia University, Ningxia, Yinchuan 750021)

Abstract: Taking ‘Beihong’ grapevine as material, the effect of the berry maturity (25th September and 10th October) and impregnation time (3 days and 6 days) on fermentation characteristics was studied. The results showed that delayed harvest time in eastern foot of Helan mountain, the content of total soluble sugar was significantly increased, and the titratable acid content was significantly decreased, the content of anthocyanin and phenolic were also increased. Prolonged impregnation time significantly increased wine dry extract content, the content of total pigment and phenolic were also increased. So, suitable harvest time and impregnation time could significantly improved ‘Beihong’ wine quality.

Keywords: maturity; impregnation time; dry extract; wine

通过筛选适于其总蛋白的提取方法,比较了2-DE分离操作中,不同操作步骤对2-DE分离结果的影响,建立适于苹果果实表皮总蛋白提取及2-DE分离技术系统,以期苹果果实表皮蛋白质组学研究的开展提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自中国农业科学院果树研究所(辽宁兴城)国家苹果育种中心育种圃,于‘杂交优系’(“嘎啦”×“华富”)F₁代杂种实生苗果实成熟期,采收发育正常、果实表皮未受病虫侵害的果实。将所取果实用无菌水洗净、晾干,使用取皮器于冰上将果实表皮分离。所得果实表皮于冰上混匀、称重,使用液氮快速冷冻、标记,储存于-80℃冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 苹果果实表皮蛋白的提取 三氯乙酸丙酮法提取苹果果实表皮总蛋白:参考 SONG 等^[11]的方法,有所改进。取-80℃下保存的果实表皮样品4.0 g于冷研钵中,加入液氮研磨至样品呈粉末状,加入5倍体积冷10% TCA[含0.5%(v/v)β-巯基乙醇]使其匀浆,匀浆液于-20℃环境中静置3 h以上,小心将静置后的匀浆液使用500目尼龙布过滤,滤液离心20 min(15 000 r·min⁻¹,4℃),所得沉淀使用冷丙酮溶液(含20 mmol·L⁻¹ DTT)悬浮漂洗3~5次,室温下风干后称重,置于-80℃条件下保存备用。匀浆法提取苹果果皮总蛋白:参考 CHAN 等^[12]的方法,稍作改进。取-80℃下保存的果实表皮样品4.0 g于冷研钵中,液氮冷冻研磨至粉末状,加入8 mL匀浆缓冲液[20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.5),10 mmol·L⁻¹ EGTA,250 mmol·L⁻¹蔗糖,1 mmol·L⁻¹ PMSF,1%(v/v) Triton X-100,1 mmol·L⁻¹ DTT,DTT新鲜加入]继续研磨至匀浆。匀浆液离心30 min(15 000 r·min⁻¹,4℃),小心吸取上清液,加入TCA溶液(浓度10%)混匀,4℃条件下静置2 h以上,离心30 min(15 000 r·min⁻¹,4℃),弃上清,沉淀物经冷丙酮(含20 mmol·L⁻¹ DTT)悬浮漂洗3~5次后,称重、置于-80℃条件下保存备用。改良酚提法提取苹果果实表皮总蛋白:参考 ISAACSON 等^[13]、WANG 等^[14]的方法,有所改进。取-80℃条件下保存的果实表皮样品4.0 g于冷研钵中,加液氮研磨至粉末状,将其小心转入50 mL离心管中,悬浮于12 mL饱和酚(Tris-buffered,pH 8.0,Sigma)和12 mL匀浆缓冲液[20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,250 mmol·L⁻¹蔗糖,10 mmol·L⁻¹ EGTA,1 mmol·L⁻¹ PMSF,1%(v/v) Triton X-100,1 mmol·L⁻¹ DTT,10% (w/v) PVPP,EDTA-free GE Healthcare,PVPP,DTT,EDTA-free新鲜加入]中,涡旋振荡30 min(4℃)使其匀浆,匀浆液离心15 min(5 000 r·min⁻¹,4℃),

将上层酚相小心收集后,加入5倍体积0.1 mol·L⁻¹甲醇醋酸铵溶液混匀,-20℃环境中静置5 h以上,离心10 min(15 000 r·min⁻¹,4℃)弃上清,所得沉淀用冷丙酮(含20 mmol·L⁻¹ DTT)悬浮漂洗3次,室温风干后,称重、置于-80℃条件下保存备用。

1.2.2 蛋白样品的溶解与定量 分别称取以上3种方法制备的苹果果实表皮总蛋白样品干粉各20 mg,分别加入500 μL样品裂解液[7 mol·L⁻¹尿素;2 mol·L⁻¹硫脲;4%(w/v) CHAPS;2% IPG buffer 1%(w/v) DTT;IPG buffer,DTT新鲜加入]。将蛋白样品与裂解液混匀,室温下涡旋震荡5 h以上,使其充分溶解后,离心30 min(14 000 r·min⁻¹,4℃),小心吸取上清液,重复离心1次,所得上清液即为蛋白溶液样品。使用2-DE蛋白定量试剂盒(2-D QUANT KIT,GE)对所得样品溶液进行定量。

1.2.3 双向电泳 蛋白样品定量后,采用3种不同的预制IPG胶条(7 cm pH 4~7,11 cm pH 4~7,18 cm pH 4~7),采用3种不同上样量(500、600、700 μg),置于IPG泡涨盘中12~14 h完成被动水化。等电聚焦参考GE公司提供的程序进行,聚焦完成后将胶条先后置于含1% DTT、含2.5%碘乙酰胺的平衡液[6 mol·L⁻¹尿素,75 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.8);29.3%(v/v)甘油,2%(w/v) SDS]中分别平衡15 min,再转移至分离胶浓度分别为12%和16%的SDS-PAGE胶上进行第2向电泳。SDS-PAGE电泳程序设置:每块胶0.5 W条件下预热20 min、每块胶10 W下电泳5~6 h。整个电泳过程使用温度控制仪(MultiTemp III,GE)将温度控制在16℃。

1.3 项目测定

2-DE电泳完成后,小心取下凝胶,使用考马斯亮蓝R-350(CBB R-350)染色。染色凝胶经脱色液脱色后,使用Image Scanner扫描仪扫描获得其凝胶图谱。凝胶图谱采用Image Master 2D Platinum 7.0软件检测蛋白点。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白提取方法的比较

从表1可以看出,使用3种不同方法提取的苹果果实表皮总蛋白,浓度和产量从高到低依次为改良酚提法、TCA-丙酮法、匀浆法。改良酚提法提取所得蛋白样品的浓度和产量都明显高于其它2种方法,分别达到了29.07 g·L⁻¹、132.915 mg·g⁻¹。

使用2-DE分离操作对TCA-丙酮法、匀浆法及改良酚提法提取所得蛋白样品进行分离。由图1可知,分离所得蛋白点个数分别为173、64、490个。改良酚提法提取所得蛋白样品,经过2-DE分离后,所得蛋白点最多。

表 1 3 种苹果果实表皮总蛋白提取方法的比较

Table 1 Comparison of three protein extraction methods from apple fruit skin

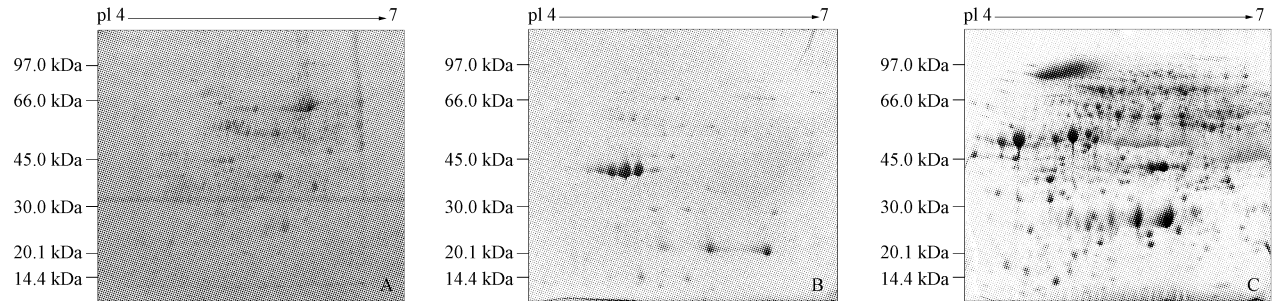
提取方法 Extraction methods	样品鲜样质量 Fresh weight of samples /g	蛋白质干粉质量 Weight of protein dry powder /mg	蛋白质浓度 Concentration of protein /(g · L ⁻¹)	蛋白质产量 Yield of protein /(mg · g ⁻¹)
TCA-丙酮法 TCA-acetone method	4	340.78	18.66	85.195
匀浆法 Homogenization method	4	217.06	8.91	54.265
改良酚提法 Modified phenol extraction method	4	531.66	29.07	132.915

2.2 不同 IPG 胶条的比较

使用 3 种不同的预制 IPG 胶条:7 cm pH 4~7(图 2A)、11 cm pH 4~7(图 2B)、18 cm pH 4~7(图 2C),上样量分别为 200、350、600 μg ,由图 2 可知,经 18 cm pH 4~7 的预制 IPG 胶条可以分离得到蛋白点 490 个,高于 11、7 cm 的 215 个和 114 个。

2.3 蛋白上样量的比较

使用 18 cm pH 4~7 的预制 IPG 胶条,选择 3 种蛋白样品上样量 500(图 3A)、600(图 3B)、700 μg (图 3C),由图 3 可知,上样量 600 μg ,经 2-DE 分离后得到蛋白点 490 个,高于上样量 500、700 μg 的 285 个和 362 个。



注:A. TCA-丙酮法;B. 匀浆法;C. 改良酚提法。

Note:A. TCA-acetone method;B. Homogenization method;C. Modified HB-phenol extraction method.

图 1 不同提取方法的蛋白质 2-DE 分析结果

Fig. 1 Result of 2-DE of the different extraction methods

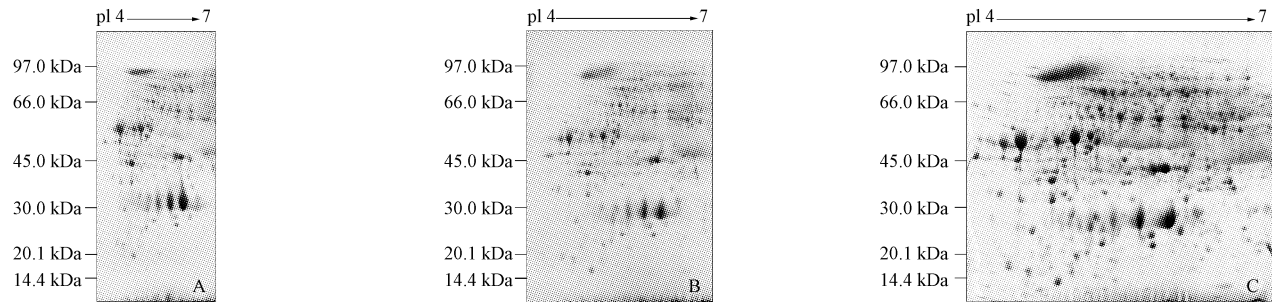


图 2 不同 IPG 胶条比较

Fig. 2 2-DE maps of the different IPG strips

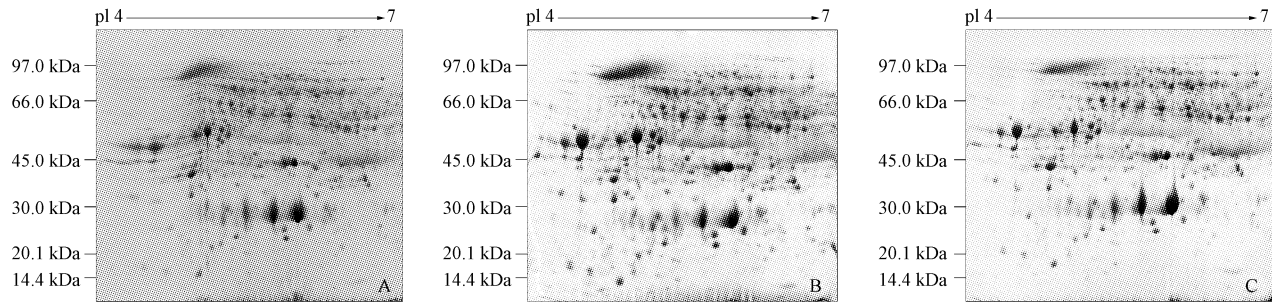


图 3 不同上样量的 2-DE 分析结果

Fig. 3 Result of 2-DE maps of protein under the different loaded samples

2.4 不同等电聚焦程序的比较

使用 18 cm pH 4~7 的预制 IPG 胶条,样品上样量 600 μ g,按照 GE 公司提供的程序进行等电聚焦,总聚焦功率较低,仅为 36 000 Vh,蛋白点未得到充分分离(图 4A)。改进后程序如表 2(每个胶条限流 50 μ A, 20 $^{\circ}$ C)所示,总聚焦功率达 50 000 Vh,聚焦充分,蛋白点分离充分,未出现条纹及蛋白质点拖尾等现象(图 4B)。该研究的双向电泳试验,均采用改进后的程序(表 2)进行等电聚焦。

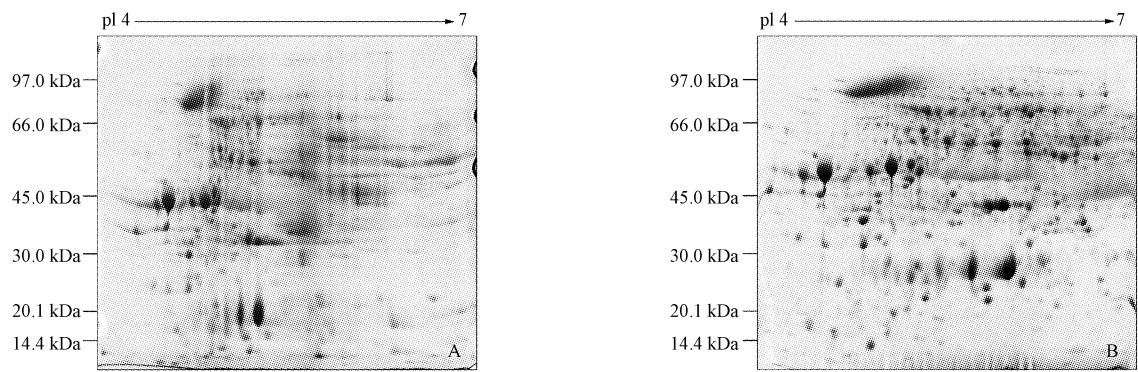
2.5 不同 SDS-PAGE 分离胶浓度的比较

使用 18 cm pH 4~7 的预制 IPG 胶条,上样量 600 μ g,第 2 向垂直电泳分离胶浓度分别为 12%、16%。

如图 5 所示,采用 12%的分离胶浓度,蛋白点分散、不够饱满清晰、没有在凝胶图像上得到完全的分离;采用 16%的分离胶浓度,蛋白点在双向电泳图谱上得到了充分的分离,蛋白点清晰,分布合理。

表 2 改进后的等电聚焦程序

步骤	电压模式	电压	时间
Step	Voltage mode	Voltage/V	Time/h
1	Step and Hold	500	2
2	Gradient	1 000	2
3	Gradient	8 000	3
4	Step and Hold	8 000	4
5	Step and Hold	500	6

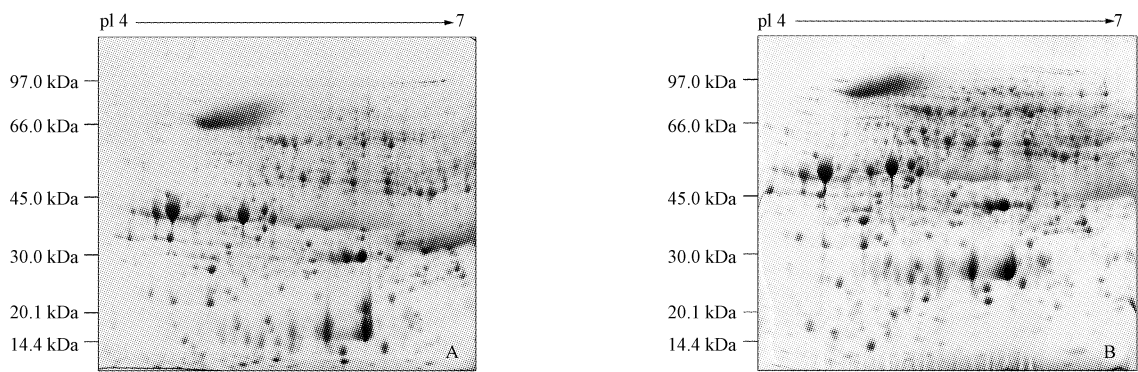


注:A. GE 公司提供程序;B. 改进后的程序。

Note:A. The program of GE company;B. The improved program.

图 4 不同等电聚焦程序所得 2-DE 分析结果

Fig. 4 Result of 2-DE maps of protein under the different programs of isoelectric focusing



注:A. 12%凝胶浓度;B. 16%凝胶浓度。

Note:A. 12% gel concentration;B. 16% gel concentration.

图 5 不同 SDS-PAGE 凝胶浓度的 2-DE 分析结果

Fig. 5 Result of 2-DE under different SDS-PAGE concentration

3 讨论与结论

植物材料不同,适宜的蛋白样品提取方法不同^[5]。果实表皮中蛋白质含量低,且含有多糖、酚、色素等,因

而从中提取高质量的蛋白样品尤为困难。该研究应用 TCA-丙酮法、匀浆法及改良酚提法提取苹果果实表皮总蛋白。经改良酚提法提取所得蛋白样品的浓度、提取率

均高于其它二者;且此样品经 2-DE 分离所得蛋白点数多于其它二者。该研究在改良酚提法的操作中,增大了提取缓冲液的用量,且在提取缓冲液加入蛋白酶抑制剂(EDTA-free,GE),所得样品的悬浮漂洗过程中增大了冷丙酮(含 20 mmol · L⁻¹ DTT)的使用量,这些改进有利于防止蛋白样品在提取过程中的无效损失且能更好除去样品中杂质。

2-DE 操作步骤繁杂,其中每一步操作都影响所得 2-DE 凝胶图谱的结果^[15-16]。该研究对苹果果实表皮总蛋白的 2-DE 操作步骤进行了优化。结果表明,与其它 2 种胶条(7、11 cm;pH 4~7)相比,经 18 cm pH 4~7 的预制 IPG 胶条可分离获得更多的蛋白点;与 500、700 μg 相比,上样量 600 μg 适于此样品使用预制 IPG 胶条(18 cm pH 4~7)的 2-DE 分离;与 GE 公司提供的程序相比,使用改进后的等电聚焦程序,所得 2-DE 图谱背景清晰,蛋白点分离充分;与浓度 12% 的分离胶相比,使用浓度 16% 的分离胶,分离所得蛋白点较多,且蛋白点清晰饱满。

综上所述,改良酚提法适于苹果果实表皮总蛋白的提取。优化后的 2-DE 操作体系(预制 IPG 胶条 18 cm pH 4~7、样品上样量 600 μg、改进的等电聚焦程序、浓度 16% 的分离胶)适于苹果果实表皮总蛋白的 2-DE 分离。

参考文献

- [1] PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomics[J]. Nature, 2000, 405(6788): 837-846.
- [2] 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.
- [3] QIN G Z, TIAN S P, CHAN Z L, et al. Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*: analysis based on proteomic approach[J]. Mol Cell Proteomics, 2007(6): 425-438.
- [4] CHANG W, HUANG L, SHEN M, et al. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry[J]. Plant Physiol, 2000, 122: 295-318.
- [5] 王清, 产祝龙, 秦国政, 等. 果实蛋白质组学研究的实验方法[J]. 植物学报, 2009, 44(1): 107-116.
- [6] GIRIBALDI M, PERUGINI I, SAUVAGE F X, et al. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF[J]. Proteomics, 2007, 7(17): 3154-3170.
- [7] VELASCO R, ZHARKIKH A, AFFOURTIT J, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.)[J]. Nature Genetics, 2010, 42: 833-839.
- [8] 曹尚银, 张秋明, 朱志勇, 等. 苹果花芽孕育蛋白质组学初步分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2281-2288.
- [9] CAO X, GAO Y, WANG Y, et al. Different expression and modification of protein during ontogenesis in *Malus domestica*[J]. Proteomics, 2011, 11(24): 4688-4701.
- [10] 张彩霞, 田义, 张利义, 等. 苹果枝条表皮应答轮纹病菌感染的蛋白质组学分析[J]. 植物病理学报, 2015, 45(3): 280-287.
- [11] SONG J, BRAUN G, BEVIS E, et al. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis[J]. Electrophoresis, 2006, 27(15): 3144-3151.
- [12] CHAN Z L, QIN G Z, XU X B, et al. Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(5): 1677-1688.
- [13] ISAACSON T, DAMASCENO C M B, SARAVANAN R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues[J]. Nature Protocols, 2006, 1(2): 769-774.
- [14] WANG X Q, YANG P F, GAO Q, et al. Proteomic analysis of the response to high-salinity stress[J]. Planta, 2008, 228: 167-177.
- [15] ROBERT W, ALOIS H, ANGEL G, et al. Towards higher resolution: Two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21: 2610-2616.
- [16] 丁承强, 马丹, 王绍华, 等. 水稻蛋白质组双向电泳优化流程及方法[J]. 植物学报, 2011, 46(1): 67-73.

Protein Extraction of Apple Fruit Skin and Two-dimensional Electrophoresis Optimization

XIAO Long^{1,2}, CONG Peihua^{1,2}, ZHANG Caixia^{1,2}, ZONG Zeran^{1,2}, TIAN Yi^{1,2}, ZHANG Liyi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Horticulture Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Xingcheng, Liaoning 125100; 2. Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100)

Abstract: Taking apple fruit skin as test material, and the suitable extraction of apple fruit skin protein was selected, and the two-dimensional electrophoresis (2-DE) operating steps of the protein sample were improved. The results showed that the modified phenol extraction was suited for the extraction of apple fruit skin protein, and the improved 2-DE operating system (IPG strip 18 cm pH 4—7, 600 μg sample loading), the improved program of isoelectric focusing, 16% SDS-PAGE gel was suited for the separation of the protein.

Keywords: apple; fruit skin; proteomics; two-dimensional electrophoresis (2-DE)