

棉叶总蛋白提取及 SDS-PAGE 电泳的改良

沙月霞^{1,2}, 简桂良², 肖崇刚¹, 卢美光², 曹承忠²

(1. 西南农业大学植物保护学院, 重庆 400716; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要:对棉花叶片总蛋白的几种提取方法及影响蛋白定量和 SDS-PAGE 电泳的因素进行了比较, 确立了一套适用于棉花蛋白提取、定量、凝胶制备、电泳、脱色以及干胶制备的方法。发现利用 25 mmol · L⁻¹, pH8.0 Tris-HCl 缓冲液提取的棉花叶片总蛋白, 提取效率高, 蛋白齐全。采用改良后的棉花 SDS-PAGE 电泳方法—改良丙酮沉降法, 电泳结果显示, 条带清晰、数量多、分辨率高。

关键词:棉花叶片; 总蛋白提取; 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: S435.621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2005)03-0146-05

An Improved Method for Extraction and SDS-PAGE of Total Protein in Cotton Leaves

SHA Yue-xia^{1,2}, JIAN Gui-liang², XIAO Chong-gang¹, LU Mei-gaung², CAO Cheng-zhong²

(1. Plant Protection College, South-West Agricultural University, Chongqing 400716, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, The State Key Lab for Biology of Plant Diseases and Insect Pest, Beijing 100094, China)

Abstract: The methods of total protein extraction in cotton leaves were compared and SDS-PAGE were improved. Ameliorated steps included protein extraction, modified pyruvic subside and destaining. The experimental cultivars were resistance cultivars: Wenwu, 9456D, X033 (*Gossypium hirsutum*), sea-island cotton Hai7124 (*G. barbadense*) and susceptible cultivar, Junmian 1. which were induced by *Verticillium dahliae*. Same varieties were planted without pathogeny. All of the experimental breeds were planted in cotton disease garden in Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Four methods could be used to extract the total protein in cotton leaves. It was citrate, 1, 200 and 25 mmol · L⁻¹, pH6.8 Tris-HCl. The results showed that it could make better to utilize 25 mM, pH8.0 Tris-HCl on total protein extraction. Using this method, the protein was got completely and efficiently. Moreover, satisfied results were achieved in SDS-PAGE. We used three ways in SDS-PAGE. It was modified pyruvic subside, (NH₄)₂SO₄ subside and direct extract. The method of modified pyruvic subside in SDS-PAGE in cotton leaves can be used to test toothful. We can get clear electrophoresis result; the *cingula* were clear, numerous and with high resolution. But the results of the other two methods were not satisfied. Direct extract to SDS-PAGE in cotton, the consistency was low, it was difficult to detect the protein. the method of (NH₄)₂SO₄ subside in SDS-PAGE, the *cingula* was not recognizable. In addition, both of them were complex in the experiment. When we used modified pyruvic subside in SDS-PAGE, confecting different consistent separate gel, the consistency of 10%~12% fit for SDS-PAGE of total protein in cotton leaves. Through SDS-PAGE, we

收稿日期: 2004-12-20 作者简介: 沙月霞(1974-), 女, 硕士, e-mail: yuexiasha@126.com;

* : 通讯作者: jianguiliang@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30471130), 国家 863 计划(2001AA212031, 2003AA207051)

found a conclusion that the temperature related to destaining: the higher temperature (lower than 45°C), the shorter time of destaining. Depending on experiment, we got an appropriate method on total protein extraction, fix quantify, gel preparation, electrophoresis, destaining and wafer preparation in cotton leaves.

Key words: cotton leaves; total protein extraction; SDS-PAGE

SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)是分析生物体蛋白质常用的方法,其技术多采用 Laemmli(1970)分析细菌蛋白的方法^[1]。由于棉花等木本植物组织中的色素、酚、醌等次生代谢物质较细菌和草本植物中多,因而 SDS-PAGE 分析受到了很大的干扰,加之蛋白的提取、定量以及凝胶浓度、染色、脱色方法多种多样,造成电泳结果不稳定和蛋白电泳谱带差异大,电泳分析常不能获得满意的结果。影响 SDS-PAGE 分析结果的因素是多方面的^[2],其中蛋白的提取和纯化、凝胶的制备、蛋白的定量以及电泳后凝胶染色和脱色是重要环节。本试验对棉花总蛋白的提取和 SDS-PAGE 电泳方法进行了比较,在此基础上建立了适宜棉花叶片蛋白提取和 SDS-PAGE 的一套方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

棉花品种:文五、9456D、X033、海 7124(海岛棉),分别种植于中国农业科学院植保所棉病组黄萎病圃和无菌温室;采新鲜已展开的嫩叶,用无菌水冲洗干净,吸水纸擦干。

1.2 蛋白提取方法

1.2.1 Tris-HCl 缓冲液提取法。称取棉花叶片样品 0.2 g 于 2 ml 已灭菌的离心管中,用液氮研磨成粉状,分别加入 0.8 ml 的 1 mol·L⁻¹、200 mmol·L⁻¹、25 mmol·L⁻¹ 的 pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液^[3-11],另外根据其鲜重的 10% 加入水不溶性的 PVPP(粉状 PVPP 用 10% 的盐酸煮沸 10 min,NaOH 中和,再用去离子水清洗几次,直至中和,纯化后的 PVPP 不必干燥就可直接使用),与研碎的样品混匀(根据实际情况将 PVPP 与相应量的缓冲液混匀后加入样品中),置于 4°C 以下冰浴浸提 3 h,每间隔 1 h 将样品摇匀,充分溶解蛋白;4°C,13000 r·min⁻¹ 离心 20 min,离心后取上清液(蛋白溶液)待测。

1.2.2 柠檬酸盐提取法。采用柠檬酸盐缓冲

液^[3]提取溶解蛋白[配制方法:2.45 g 无水柠檬酸,10.96 g 无水柠檬酸三钠(浓度为 0.5 mol·L⁻¹),8.77 g NaCl(0.15 mol·L⁻¹),加水至 1 L]^[1],方法同 1.2.1。

1.3 电泳待测样品处理方法

1.3.1 改良丙酮沉淀法。将上述提取的各种待测蛋白溶液分别转移至 7 ml 的离心管中,按体积比 1:2.5 加入预冷的丙酮^[12-13],摇匀,-20°C 放置 1 h 沉降蛋白,随后在 4°C,13000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后去上清液,沉淀在 -20°C 放置 30 min,使丙酮完全挥发。加入电泳上样缓冲液溶解沉淀[电泳上样缓冲液配方:25 ml 4 倍 Tris-HCl,pH 6.8 (0.1 mol·L⁻¹);20 ml 甘油(20% w/v);3.1 g DTT(二硫苏糖醇),加水定容至 100 ml],缓冲液的用量为每克植物材料(鲜重)300 μl,4°C 放置过夜;4°C,13000 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液即为电泳蛋白样品溶液。

1.3.2 硫酸铵沉降法。将上述提取的各种待测蛋白溶液分别转移至烧杯中,上清液直接加入固体硫酸铵(如有颗粒用研钵研成粉末),用磁力搅拌器搅拌,边搅拌边缓慢抖入,使其饱和度达到 80%,搅拌 4 h(一切操作均在 4°C 下进行)。按体积比 1:2 加入 -20°C 预冷的 80% 丙酮,混匀,-20°C 放置 1 h,4°C,13000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取沉淀 -20°C 放置 30 min 以挥发丙酮。蛋白沉淀按所取材料鲜重:电泳上样缓冲液=1 g:0.3 ml,用电泳上样缓冲液溶解,4°C 放置过夜使沉淀溶解;4°C,13000 r·min⁻¹ 离心 5 min。上清液即为待分析的电泳蛋白样品溶液。

1.3.3 直接电泳法。称取 0.2 g 棉花叶片于 2 ml 已灭菌的离心管中(共称 5 管),用液氮研磨成粉状,加入 0.8 ml 的电泳上样缓冲液,按材料鲜重的 10% 加入水不溶性 PVPP(处理同 1.3.1),将研碎的样品摇匀,并在 4°C 以下冰浴浸提 3 h,充分溶解蛋白,4°C,13000 r·min⁻¹ 离心 20 min,离心后去沉淀取上清液即为待测蛋白溶液。将待测蛋白溶液转移至 7 ml 的离心管中,-20°C 冷冻

24 h,使冰体凝固结实,低温抽真空浓缩至干粉,用 300 μ l 电泳上样缓冲液稀释后即为待测的电泳蛋白样品溶液。

1.4 蛋白定量

参见 Bradford(1976)方法。考马斯亮蓝 G-250 蛋白显色液的配制^[1]:将 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 5 ml 95%的乙醇,加入 10 ml 磷酸,然后补足水至 100 ml,用 Whatman 1 号滤纸过滤,于 4 $^{\circ}$ C 保存。分别配制 1 mg \cdot ml⁻¹牛血清白蛋白(BSA)、0.5 mg \cdot ml⁻¹ BSA、0.1 mg \cdot ml⁻¹ BSA、0.05 mg \cdot ml⁻¹ BSA、0.01 mg \cdot ml⁻¹ BSA、0.005 mg \cdot ml⁻¹ BSA、0.001 mg \cdot ml⁻¹ BSA。把各种浓度的 BSA 及待测蛋白溶液与显色液以 1:1 的比例混匀,测其 OD 值,根据已知浓度 BSA 的 OD 值做标准曲线就可以知道待测蛋白溶液的浓度。

1.5 凝胶的制备

采用的是 Laemmli(1970)变性不连续系统电泳,胶板宽 11 cm,长 18 cm,厚 0.75 mm,需要配制的贮存液有:30% Acr/Bis[含 29% (w/v) Acrylamide 及 1% (w/v) N,N'-bismethylene-acrylamide], 10% (w/v) SDS, 1.5 mol Tris-HCl (pH8.8), 1mol Tris-HCl (pH6.8), 10% (w/v) 过硫酸铵。按下列顺序及用量制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶。

表 1 12% 分离胶和 5% 浓缩胶的成分及用量

Table1 Component and quantity of 12% separate gel and 5% compress gel

制备成分	12% 分离胶 (45ml)	5% 浓缩 胶(6ml)
超纯水	14.8	4.10
30% Acr/Bis	18.0	1.00
1.5 mol Tris-HCl (pH8.8)	11.3	-
1 mol Tris-HCl (pH6.8)	-	0.75
10% (w/v) SDS	0.45	0.06
10% (w/v) 过硫酸铵	0.45	0.06
TEMED*	0.18	0.006

注: * TEMED: N, N, N, N'-四甲(基)乙二胺

1.6 电极缓冲液

可配成 5 倍贮存液:用 900 ml 超纯水中溶解 15.1 g Tris 和 94 g 甘氨酸,然后加入 5 g SDS(电泳级),用水补至 1000 ml,使用时稀释至 1 倍电极缓冲液。

1.7 点样及电泳

点样前待测的电泳蛋白样品溶液应按按体积比 1:0.2 加入 10% SDS 及微量的溴酚蓝进行显色,混匀上述溶液并在 100 $^{\circ}$ C 沸水中热处理 3~5 min。点样体积为 15~20 μ l 适宜,点样孔之间点样体积不易相差太大。电泳槽接通电源,浓缩胶上电压为 50V,进入分离胶后为 200V,电泳 6~7 h 溴酚蓝到达凝胶底部。

1.8 染色和脱色

染色液(500 ml)配方是:1.25 g 考马斯亮蓝 R-250, 50 ml 冰乙酸, 225 ml 甲醇, 225 ml 超纯水,染色 2,3 h。对三种不同的脱色液进行了比较,脱色快而又不会降解蛋白条带的脱色液(1000 ml)配方是 100 ml 冰乙酸, 450 ml 甲醇, 450 ml 去离子水。

1.9 胶板的保存

脱色后的胶板可以放在 20% 的甘油中保管也可以制成干胶^[12]。干胶的制法:将两张相同大小的胶膜用去离子水浸湿,一张平放于电泳所用的玻璃板上,膜四周至少伸出玻璃板 2 cm,膜与玻璃板间没有气泡。在膜上滴 10~20 滴 50% 的甘油水溶液,并将脱色完毕的胶板放在膜上,在胶板上再滴 10~20 滴 50% 的甘油液,用另一张胶膜覆盖胶板及底层胶膜,去除膜与胶板间的气泡。将合在一起的伸出玻璃板的双层膜折与玻璃板后,待充分干燥后,即制成了干胶。

2 结果与分析

2.1 不同电泳方法的电泳结果

利用改良丙酮沉淀法、硫酸铵沉降法以及直接电泳法对棉花叶片总蛋白进行了电泳,并对蛋白液的浓度、体积以及电泳结果、技术繁琐程度进行了比较,结果见表 2。

由上表及下图中可以看出,用改良丙酮沉淀法进行 SDS-PAGE 的效果较好。不但提取的蛋白量较多(200~250 μ l),足以满足电泳所需量,且蛋白浓度为 70~80 μ g \cdot μ l⁻¹,远远高于考马斯亮蓝检测下限,电泳条带清晰分辨率高,方法简便,在一定程度上更宜于棉花特异蛋白分子量的确定。直接电泳法在细菌蛋白提取中广为使用,而且方法也简便,但对木本植物来说效果很差,虽提取的样品量多,但由于蛋白浓度太低检测不出电泳条带;硫酸铵沉降法技术较复杂且杂质干扰较多(图 1、2)。

表 2 不同电泳方法的电泳结果

Table 2 The results of different methods in SDS-PAGE

电泳方法	1 g 棉花叶片可获得		电泳结果			技术 繁琐 程度
	蛋白体 积/ μl	蛋白量 / $(\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1})$	杂质 干扰	清晰 条带		
改良丙酮 沉淀法	200~250	70~80	少	多	简易	
硫酸铵 沉降法	250~280	35~40	较多	少	繁琐	
直接电泳法	280~300	-	-	-	简易	

注:- :浓度低,检测不出

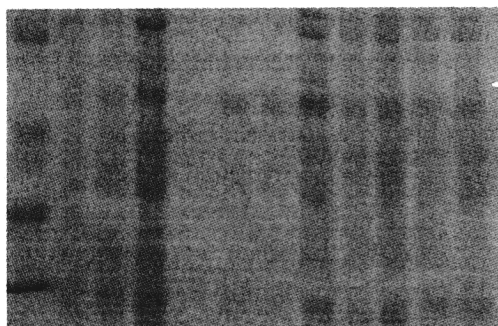


图 1 改良丙酮沉淀法电泳结果

Fig. 1 The result of SDS-PAGE by modified pyruvic subside

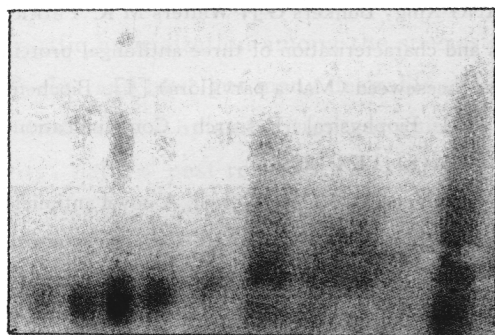


图 2 硫酸铵沉淀法电泳结果

Fig. 2 The result of SDS-PAGE by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ subside

1.6 不同蛋白提取方法的提取效率

用改良丙酮沉淀法进行 SDS-PAGE 电泳对不同方法所提蛋白液检测,结果发现:用 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液所提取的蛋白液电泳结果比另外三种好,因为可辨认的清晰条带多,尤其总条带多且浓度高;用 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液提取的样品电泳清晰条带较多,但没有 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液所提的蛋白可分辨的条带多;用 1 mol pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液所提取的蛋白电泳条带除高

分子量的条带清楚外,小分子量的条带可辨率很低;用柠檬酸盐缓冲液提取的蛋白样品在胶板上的条带非常模糊,分辨率很低,很难检测到,且蛋白浓度较低;由此可知,应用 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液提取棉花叶片总蛋白提取效率较高。

2.3 分离胶浓度和脱色液对棉花叶片蛋白电泳结果的影响

通过制备几种不同浓度(8%、10%、12%、15%)的分离胶进行试验,发现对于棉花叶片总蛋白来说(蛋白的分子量一般在 $11.2 \text{ Kd}\sim 84 \text{ Kd}$ 之间),比较适宜的浓度应为 10%~12%,条带均匀分布于整个胶板,若分离胶浓度较高,则条带上移;浓度较小则条带下移。

脱色时更换了几种不同配比的脱色液,比较结果见表 3。

表 3 不同配比的脱色液比较

Table 3 Comparison of different formula destaining

标号	配方	脱色时间/h	背景深浅
1	10%冰乙酸,45%甲醇,45%去离子水	3~4	无或很浅
2	10%冰乙酸,30%甲醇,60%去离子水	3~4	浅但蛋白显色浅
3	10%冰乙酸,15%甲醇,45%去离子水	4~6	较深

由表 3 可知,配方 1 是比较理想的脱色液。试验还发现:以配方 1 为脱色液,温度在 35°C 以上时,脱色时间可以缩短至 2~3 h,且蛋白条带不会降解;若脱色温度低于 20°C 需 4~6 h 且电泳谱带的染色强度被降低。由此可知,脱色时间和温度有很大的关系:温度较高则脱色时间短;温度较低则脱色时间相对较长。

3 讨论

3.1 建立了一套理想的总蛋白提取方法

采用 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液提取棉花叶片总蛋白及使用改良丙酮沉淀法进行 SDS-PAGE,确立了一套理想的棉花总蛋白提取、定量、凝胶制备、电泳、凝胶染色和脱色以及胶板保存的方法。在以往棉花蛋白提取中,耿川东曾用柠檬酸盐缓冲液提取过棉花茎部蛋白^[3];谷瑞升曾用电泳缓冲液——Tris-HCl 加甘油和巯基乙醇提取过杨树的蛋白;也曾有人用 CBS

(碳酸钠缓冲液)和 PBST(洗涤缓冲液)提取过棉花 Bt 蛋白。但采用耿川东的柠檬酸盐缓冲液和谷瑞升的硫酸铵沉淀法处理样品后获得的样品量非常少而且浓度很低,加上棉花叶片自身的蛋白量很少,还有棉酚和次生代谢物质的干扰,因此,这两种方法很难适于棉花蛋白大量的提取和 SDS-PAGE。而作者在前人的基础上采用改良的方法,在 Tris-HCl 缓冲液中去掉了甘油和巯基乙醇,采用 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液所提取的总蛋白,蛋白齐全、所需求的信息量大,保证了蛋白齐全且不易失活。非常适宜棉花即存或诱导的抗菌蛋白研究。

3.2 新方法灵敏度高,易操作

与已报道的电泳方法比较,传统的 SDS-PAGE 都是采用直接提取法和硫酸铵沉淀法电泳,结果往往检测灵敏度低、条带不清晰、干扰大。本实验采用改良丙酮沉淀法,保留丙酮的基础上结合直接提取法,去掉硫酸铵沉淀盐析步骤,使用浓度较高且 -20°C 预冷丙酮,保证了蛋白的活性;改良丙酮沉淀法进行的 SDS-PAGE 电泳,不仅简便易操作,且样品检测的浓度要求低,克服了微量样品电泳效果不好的缺陷,非常适合蛋白样品量比较少的环境下进行电泳;通过比较研究温度与脱色液相互关系发现,优化的脱色液配方及提高脱色温度,可使脱色时间缩短,胶片背景变浅,目标蛋白带清晰,脱色效果显著提高,从而使电泳效果大大提高。

3.3 减少了 SDS 和丙酮的影响

蛋白在定量时,蛋白中含有的 SDS 和丙酮都极显著地影响测定的准确性。所以本试验采用了先用不含 SDS 的电泳上样缓冲液溶解沉淀并使丙酮完全挥发,尽量减少 SDS 和丙酮对测定结果的影响。待测完浓度后再按 1/5 蛋白液体积加入 10% SDS 以及微量溴酚蓝显色,这些操作都与其它 SDS-PAGE 方法不同。利用改良的棉花叶片总蛋白提取和 SDS-PAGE 方法,可为以后的黄萎病菌诱导的棉花特异蛋白的提取、分子量的确定、分离和纯化奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] 奥斯伯, F 布伦特, R 金斯顿, 等. 精装分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 334-338.
- [2] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 218.
- [3] 耿川东, 谢伟军, 龚蓁蓁, 等. 抗棉花黄萎病菌的抗菌蛋白研究[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(4): 206-210.
- [4] 袁凤华. 马铃薯抗菌蛋白分离、纯化、理化特性及免疫金定位[D]. 中国农业科学院, 1995.
- [5] 崔晓慧. 黑芝麻中抗菌蛋白的分离纯化及其主要性质[D]. 中国农业科学院, 2000.
- [6] BOWLES D J. Defense-related proteins in higher plants[J]. Annu Rev Biochem, 1990, 59: 873-907.
- [7] GREGORY B M, Adam J B, Guido S. Understanding the functions of plant disease resistance proteins[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54: 23-62.
- [8] CHUNG, Roland P T, Neumann G M, et al. Purification and characterization of basic proteins with *in vitro* antifungal activity from seeds of cotton *Gossypium hirsutum*[J]. Plant Science, 1997, 127: 1-16.
- [9] WANG Xing, Thoma R S, Carroll J A. Temporal generation of multiple antifungal proteins in primed seeds[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2002, 292(1): 236-242.
- [10] WANG Xing, Bunkers G J, Walters M R. Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 282(5): 1224-1228.
- [11] FENG J, Yuan F H, Gao Y, et al. A novel antimicrobial protein isolated from potato (*Solanum tuberosum*) shares homology with an acid phosphatase[J]. Biochemical Society, 2003, 376: 481-48.
- [12] 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, 16(2): 171-177.
- [13] BROEKAERT W F, Terras F R G, Cammue B P A. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system[J]. Plant Physiol, 1995, 108(4): 1353-1358. ●