



## 棉花胚珠与纤维蛋白质的两种提取方法比较研究

刘康, 胡凤萍, 张天真\*

(南京农业大学棉花研究所 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘要:** 分别用三氯乙酸—丙酮沉淀和苯酚抽提两种方法, 提取棉花胚珠和纤维总蛋白质, 发现用三氯乙酸—丙酮沉淀法提取得到的蛋白质, 获得率为  $2.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 双向电泳后, 用胶体考马斯亮蓝染色法染色后检测的蛋白质点数极少; 银染色后, 发现蛋白质点数没有明显的增加。而用苯酚抽提法得到的蛋白质获得率达到  $10.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 是三氯乙酸—丙酮沉淀法的 5 倍, 双向电泳后, 用胶体考马斯亮蓝染色法染色后检测的蛋白质点数可以达到 923 个; 银染色, 可以检测到 1061 个蛋白质点。等电点 pI 从 pH 3~10 都有分布, 但是集中在 pH 4.3~8.6。结果表明: 酚抽提法具有获得蛋白质种类更多、pI 分布范围较宽, 蛋白质容易溶解等优点, 而且该方法操作简便, 是适用于棉花胚珠和纤维的蛋白质组学研究的理想方法。

**关键词:** 棉花; 胚珠; 纤维; 蛋白质

**中图分类号:** S562.035.3      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2005)06-0323-05

## Effect of Two Methods of Protein Extraction from Cotton Ovule and Fiber

LIU Kang, HU Feng-ping, ZHANG Tian-zhen\*

(Cotton Institute, Nanjing Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Total protein of cotton ovule and fiber were extracted using Trichloroacetic acid (TCA)-acetone precipitation method and phenol isolation method, respectively, we found that for the TCA-acetone precipitation method, the protein harvest rate was  $2.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . The protein sample was separated with 2-dimension gel electrophoresis (2-DE) and visualized with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (cCBB G-250) and silver staining methods respectively, in cCBB G-250 gels, few protein spots were detected, no considerable change observed in silver stained gel as well. For phenol isolation method, however, the harvest rate reached  $10.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , which was as 5 folds high as that of TCA-acetone precipitation method, 923 spots were detected on cCBB stained 2-DE gel, and 1061 spots detected on silver stained 2-DE gel, the isoelectric point (pI) values of the proteins ranged from 3 to 10, focusing between 4.3 and 8.6. The results demonstrated that phenol isolation method, which may harvest more kinds of protein with wider pI distribution range and better dissolvability, is easy-handling and thus is optimal for extracting cotton ovule and fiber protein in proteomic research.

**Key words:** cotton; ovule; fiber; protein

IPG (immobilized pH Gradient) 分离技术的发明与应用, 大大提高了蛋白质双向电泳的重复性和可操作性, 从而使之成为蛋白质组学研究中蛋白质

分离的首选方案<sup>[1]</sup>。而蛋白质样品的分离与制备则成为关系双向电泳成败和优劣的关键因素。本文比较和评价了常用于提取植物总蛋白质的三氯

收稿日期: 2005-05-22      作者简介: 刘康 (1965-), 男, 副教授, kangliu@njau.edu.cn \* 通讯作者 cotton@njau.edu.cn

基金项目: 国家转基因专项 (JY03A1602) 和教育部科学技术重大项目 (10418)

乙酸-丙酮沉淀<sup>[2]</sup>和苯酚抽提<sup>[3]</sup>两种方法在提取棉花胚珠和纤维总蛋白质时的效果和适用性,为棉花纤维发育的蛋白质组学研究的开展提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

德克萨斯遗传标准系(TM-1)开花后6d胚珠及其附着的纤维。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 三氯乙酸-丙酮沉淀法提取总蛋白质。**植物组织用液氮磨成粉末,悬浮于四倍体积-20℃含10%TCA、2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT的丙酮中,-20℃沉淀45 min,35000 g 4℃离心15 min,弃上清,将沉淀再悬浮于-20℃含2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT的丙酮中,-20℃沉淀1 h,35000 g 4℃离心15 min,弃上清,悬浮、沉淀步骤总共重复3次,最后将沉淀真空干燥(4℃),得到粗蛋白质,-70℃密封保存备用。

**1.2.2 酚抽提法提取总蛋白质。**植物组织用液氮研磨至粉末,加入3倍体积的提取缓冲液(500 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.65,50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl,2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT),3倍体积 This-HCl(pH 8.0)缓冲液饱和酚匀浆1 min,12000 g 20℃离心10 min,收集酚相以及界面,丢弃水相与沉淀,加入10×体积分含0.1 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Ac的冷甲醇,-20℃过夜后离心,沉淀悬浮于含0.1 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Ac的冷甲醇,洗涤3次,冷丙酮洗涤1次,4℃真空干燥,得到粉末状粗蛋白,-70℃密封保存备用。

**1.2.3 蛋白质的溶解。**将上述两种方法提取出来的蛋白质粉末,以1 mg:25 μL的比例加入蛋白质裂解液(7 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素,2 mmol·L<sup>-1</sup> 硫脲,4% CHAPS,60 mmol·L<sup>-1</sup> DTT,0.8% Pharmalyte pH 3~10,痕量溴酚蓝),充分浸泡,涡旋,必要时超声波助溶。20000 g、15℃离心1 h,上清液即为蛋白质溶液,立刻进行双向电泳或者分装后-70℃保存。

**1.2.4 蛋白质的定量。**按照Bradford方法<sup>[4]</sup>略作修改对蛋白质进行定量:首先用超纯水配制20、40、60、80、100 μg·μL<sup>-1</sup>梯度的溶液BSA(牛血清白蛋白)溶液,取60 μL的各种浓度的BSA溶液,加入到3 mL的Bradford试剂,涡旋,常温下反应2 min后,在595 nm下比色,3次重复求平均光密度值(OD值),制作标准曲线。然后测

定样品浓度:将蛋白质样品用裂解液稀释100~200倍,使OD<sub>595</sub>值≤0.5,测得的OD<sub>595</sub>即可以根据标准曲线求得样品蛋白质的浓度。

**1.2.5 双向电泳。**第一向等电聚焦:13 cm长IPG胶条(pH 3~10)购自安马西亚公司,上样量为每根胶条含150 μg蛋白质的样品溶液与水化液(7 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素,2 mmol·L<sup>-1</sup> 硫脲,4% CHAPS,60 mmol·L<sup>-1</sup> DTT,0.8% Pharmalyte pH 3~10,痕量溴酚蓝)的混合液250 μL,设置以下程序进行主动水化和聚焦:30 v,7 h→60 v,7 h→200 v,1 h→500 v,1 h→1000 v,1 h→8000 v,至达到40000 vh结束电泳。胶条平衡:将聚焦好的胶条分别在含有0.1%DTT和0.25%碘乙酰胺的平衡液(6 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素,30%甘油,50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.8,0.001%溴酚蓝,2%SDS)中平衡15 min。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:12% T,2.6% C胶在Ettan DALT II 12块胶系统中进行:2 W/胶电泳45 min后15 W/胶电泳至溴酚蓝前沿刚好达到胶的最底部。

**1.2.6 聚丙烯酰胺胶的胶体考马斯亮蓝染色法<sup>[5]</sup>染色。**将SDS-PAGE胶先用12% TCA固定4 h,再用超纯水洗涤2遍,每次10 min,然后在0.1% CBB G250、2% (V/V) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和20%甲醇的胶体染色液中染色14~16 h。用水漂洗(脱色)直到理想的背景和清晰度。

**1.2.7 聚丙烯酰胺胶的银染色法染色固定。**在40%乙醇、10%乙酸中轻摇固定1 h。敏化:每块胶用含30%乙醇、0.2%硫代硫酸钠、6.8%乙酸钠混合溶液处理30 min。染色:0.25%硝酸银20 min。洗涤:超纯水洗涤2次,每次1 min。显影:每块胶加入100 mL的显影液(2.5%碳酸钠、0.015%甲醛)显影到理想的背景和清晰度。停影:5%乙酸,振荡10 min。最后水洗3次每次5 min。

**1.2.8 图像扫描与分析。**用Bio-Rad凝胶扫描系统,采集图像,用PDQuest 2-D分析软件对图像进行分析:定义蛋白质点的大小、强弱、检测和统计蛋白质点数目,计算蛋白质点的等电点和分子量等,具体操作参考仪器和软件使用指南。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种方法提取的蛋白质重量的比较

比较了两种提取方法所获得的粗提物重量、

蛋白质重量及其获得率。三氯乙酸沉淀法获得的粗提物占样品鲜重的 4.3%, 远远大于酚抽提法的 1.4%, 但是后者的蛋白质获得率却几乎是前者的 5 倍。从这个结果可以看出: 由于三氯乙酸沉淀法是将所有的干物质没有选择性地沉淀下来, 损失可能较少, 但是, 蛋白质与膜或者其它组分的结合并没有很好地分离, 很难溶解到裂解液中去, 加上由于纤维素等非蛋白质成分含量高, 往往需要相当大量的裂解液才能湿润粗提物从而溶

解蛋白质, 这样获得的蛋白质溶液浓度低 ( $<10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 双向电泳时加样体积增大, 如果掌握不好, 还需要浓缩过程, 而浓缩蛋白质不仅费事, 而且通常会损失部分蛋白质。苯酚抽提蛋白质时, 由于只收集苯酚与水相的界面以及酚相, 大量的沉淀物丢弃以后, 所得到的蛋白质粗提物量虽然少, 但是, 蛋白质含量高, 更容易溶解于裂解液并获得高浓度的蛋白质溶液(表 1)。

表 1 两种提取方法获得的蛋白质

Table 1 The protein samples extracted with two methods

提取方法	样品鲜重 / g	粗提物干重 / g	粗提物获得率 / %	蛋白质含量 / mg	蛋白质获得率 / (mg · g <sup>-1</sup> )
TCA 沉淀法	6.26	0.2707	4.3%	14.7	2.3
酚抽提法	5.9	0.0827	1.4%	61.4	10.4

## 2.2 两种方法提取的蛋白质的 2D 胶图谱的比较

采用苯酚抽提法提取的 TM-1 6dpa 胚珠和纤维的总蛋白质双向电泳图谱(图 1), 从图上可以看出: 蛋白质等电点分布范围很广, 从 pH 3~10 都有蛋白质点显示, 不过主要集中在 pH 4.3~8.6。为了比较 CBB(图 1A)与银染(图 1B)两种染色方法的染色效果, 两块胶的蛋白质上样量完全相同均为 120  $\mu\text{g}$ , 而且电泳同时进行, 用 PDQuest 图像分析软件分析之后发现: 在 CBB 染色的胶上检测到 922 个蛋白质点, 而银染色的胶上则检测到 1061 个蛋白质点, 比 CBB 染色的胶多出 139 个蛋白质点, 增加约 15%。为了了解增加的蛋白质点是不是因为银染的灵敏度较高(一

般认为可以达到 1 ng) 所致, 对两块胶进行了匹配分析, 结果发现匹配率只有 20%。这个结果偏低, 可能是由于银染是采用高浓度的甲醇和乙酸固定胶导致胶脱水、胶面积缩小, 而 CBB 染色时是用 12% 三氯乙酸固定胶, 胶面积没有变化, 由于电脑软件匹配是采用点对点的方式进行, 所以对面积不同的胶进行匹配, 匹配率必然下降。不过目测比较两块胶上的蛋白质点分布, 可以明显看出两者之间还是存在很大差异。这说明两种染色方法并不仅仅只有染色灵敏度的差异, 而是两种染料对不同的蛋白质的敏感性不一样导致能被染色的蛋白质种类不同, 这个结果与前人<sup>[6]</sup>的报道是一致的。

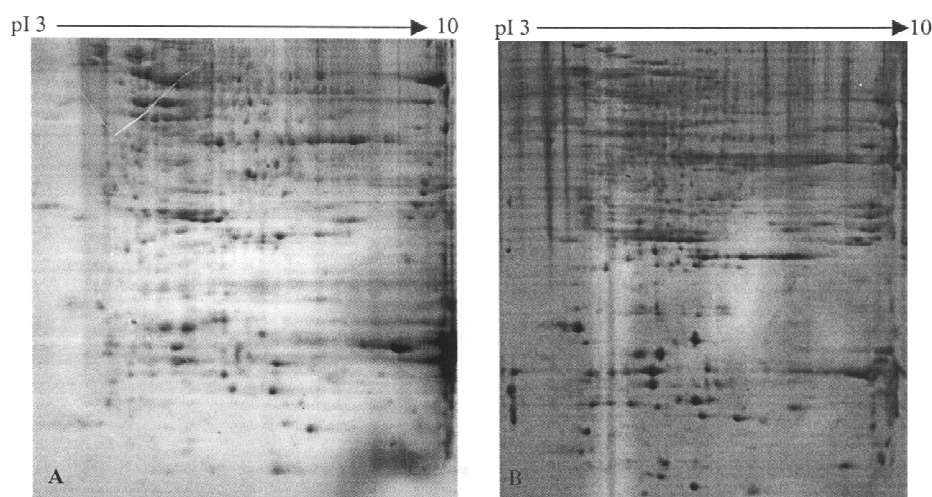


图 1 采用苯酚抽提法提取的 TM-1 6dpa 胚珠和纤维的总蛋白质双向电泳图谱(IPG 胶条: pH 3~10, 13 cm; 蛋白质上样量均为 120  $\mu\text{g}$ 。A: CBB G-250 染色的胶 B: 银染色的胶)

Fig. 1 2-DE gel profiles of total protein of 6dpa ovules and fiber from TM-1 line with phenol partition method (IPG strips: pH 3~10, 13 cm, protein loading quantity: 120  $\mu\text{g}$ . A Gel stained with CBB G250, B Gel stained with silver)

图 2 是采用三氯乙酸-丙酮沉淀法提取的 TM-1 6dpa 胚珠和纤维的总蛋白质双向电泳图谱,虽然上样量是用酚抽提得到的蛋白质的 5 倍,但无论是 CBB 染色还是银染色,都只能检测到屈指可数的几个蛋白质点。说明这种方法并不适宜于棉花胚珠和纤维蛋白质的提取。其原因尚待研

究。为了验证该方法在棉花上的适用性,用这种方法提取了棉花根系中的蛋白质并进行双向电泳(图 3),PDQuest 图像分析软件分析可以检测到 400 个蛋白质点。这个结果告诉我们,三氯乙酸-丙酮沉淀方法适用于提取棉花其他组织的蛋白质。

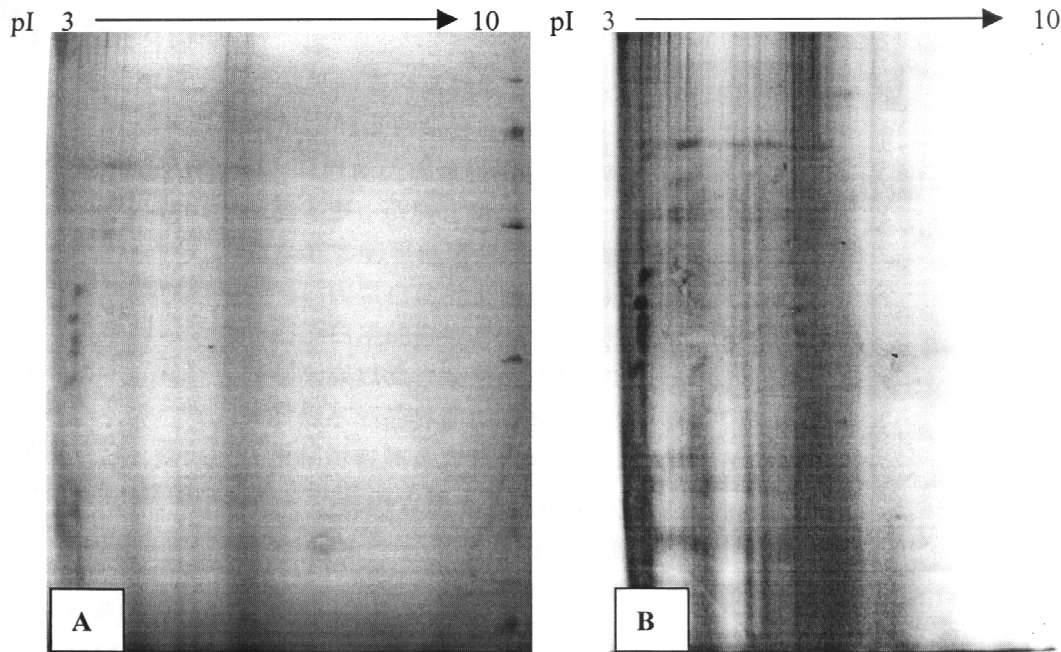


图 2 采用三氯乙酸-丙酮沉淀法提取的 TM-1 6dpa 胚珠和纤维的总蛋白质双向电泳 (IPG 胶条: pH 3~10, 13 cm; 蛋白质上样量均为 600  $\mu$ g, A 和 B 是同一块胶先用 CBB G-250 染色后,再经过固定、银染得到 B)

Fig 2 2-DE gel profiles of total protein of 6dpa ovules and fiber from TM-1 line with acetone-TCA precipitation method (IPG strips: pH 3~10, 13 cm, protein loading quantity: 600  $\mu$ g, A is the profile of the gel stained with CBB G-250, B is the profile of the same gel after fixation followed by silver staining)

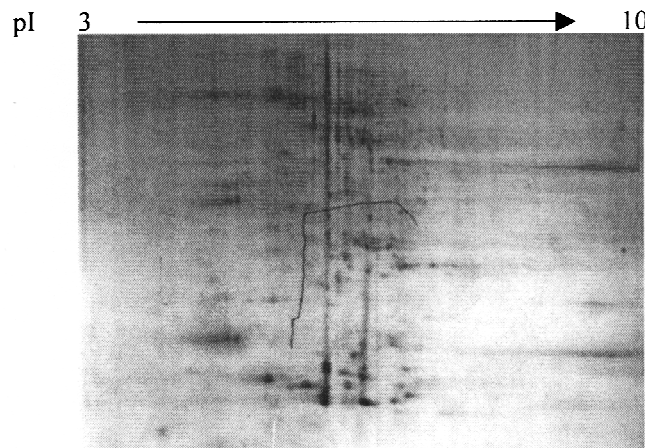


图 3 采用三氯乙酸-丙酮沉淀法提取的 TM-1 四叶期根总蛋白质双向电泳 (IPG 胶条: pH 3~10, 17 cm; 蛋白质上样量为 600  $\mu$ g, 银染)

Fig 3 2-DE gel profiles of total protein of 4-leaf old roots of TM-1 line with acetone-TCA precipitation method (IPG strips: pH 3~10, 17 cm, protein loading quantity: 600  $\mu$ g, silver staining)

### 3 结论与讨论

本文报道了两种常见的蛋白质提取方法提取棉花胚珠和纤维蛋白质的效果:三氯乙酸-丙酮沉淀法是目前最常用的蛋白质提取方法,该方法具有操作简单方便、容易使蛋白酶失活等优点,缺点是:(1)有时候沉淀难以溶解,尤其是该方法是选择性地把所有干物质沉淀下来,沉淀的干物质太多,杂质含量高,不容易获得高浓度的蛋白质溶液,蛋白质的获得率比较低。(2)三氯乙酸影响等电聚焦(IEF)要从样品中彻底去除。(3)可能发生蛋白质的降解和修饰从而影响后面蛋白质的质谱鉴定。苯酚抽提法则被认为更适宜于含双向电泳干扰物质多的植物样品的蛋白质的提取,该方法先用苯酚抽提蛋白质,然后用甲醇和乙酸铵沉淀蛋白质,最后用丙酮洗涤以除去杂质。这种方法有很多优点:一是获得的蛋白质含量高;因为该方法只收集苯酚与水相的界面以及酚相,大量的沉淀物丢弃以后,所得到的蛋白质粗提物量少,蛋白质含量相对较高,容易溶解于裂解液并获得高的浓度的溶液(最高可达  $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),获得率也高。二是该方法操作也很简单,对实验设备要求不高。三是获得的蛋白质种类更多,等电点分布更广。本文用苯酚抽提法每胶最多可以检测到 1061 个蛋白质点,而用三氯乙酸-丙酮沉淀法只能检测到几个蛋白质点。因此在研究棉花胚珠和纤维的蛋白质组时,宜采用酚抽提法。我们也用苯酚抽提法提取了根部蛋白质,双向电泳,银染后的胶上可以检测到 800 多个蛋白质点,是用三氯乙酸-丙酮法 400 个点的 2 倍,但是两种方法获得的蛋白质种类有较大差异。因此研究棉花其它组织的蛋白质组时,可以同时采用两种提取方法,以获得尽可能多的蛋白质信息。

不过苯酚抽提法有一个不小的缺点:样品里

的杂质,尤其是棉花体内的酚类物质及其氧化产物醌类物质较多,使蛋白质溶液呈棕色。这两类物质都比较严重干扰等电聚胶电泳,往往使最后胶上有较多的水平和纵向条纹,而且酚和醌对蛋白质可能有修饰作用。提取蛋白质时即使加入 PVP(聚乙烯吡咯啉酮)效果也不理想,目前我们正在研究进一步的改良方法。

#### 参考文献:

- [1] PALZKILL T. Proteomics [M]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [2] DAMERVAL C, Vienne D, Zivy Z, 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.
- [3] FERGUSON D L, Turley R B, Triplett B A, et al. Comparison of protein profiles during cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber cell wall development with partial sequences of two proteins [J]. J Agr Food Chem, 1996, 44: 4022-4027.
- [4] BRADFORD 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.
- [5] NEUHOFF V, Arnold N, Taube D, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamine gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue dyes G-250 and R-250 [J]. Electrophoresis, 1988, 9: 255-262
- [6] REINER W, Naven T. Proteomics in Practice-a laboratory manual of proteome analysis [M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GMBH, 2002. ●