

它能很好地解释实验结果。

2.3 叶绿体 4.5 S rRNA 作为公用探针的优点及意义

叶绿体 4.5 S rRNA 由于其自身特点而非常适合于用做探针。a. 它一般由 100 个左右核苷酸组成,分子量约为 33kD。这样大小的核苷酸片段正好适合于作为探针。片段过大难于分离纯化,片段过小者则由于能与模板 DNA 互补配对的部分太短而使结合不稳定。b. 4.5 S rRNA 的分离纯化步骤简便易行,不会被植物细胞中其它 RNA 成分污染,所得 RNA 纯度较高。c. 天然植物 4.5 S rRNA 与植物中其它 RNA 分子相比,显著特点是其 5' 端未经磷酸化,即无需脱磷反应,易于直接进行 4.5 S rRNA 5' 端 ^{32}P 标记。植物核酸序列在进行过程中保守性很大。目前所测定的 4.5 S rRNA 序列同源性一般说来均在 95% 以上,也就是说植物叶绿体 4.5 S rRNA 的基因序列相似性在 95% 以上,一般认为核酸序列有 50% 同源性即可做为杂交探针,所以任何一种植物的 4.5 S rRNA 均可做为其它植物 4.5 S rRNA 基因的探针与之进行分子杂交。

选用的油菜属于双子叶纲,而高粱属于单子叶纲,两者亲缘关系很远。杂交的成功,更进一步证明 4.5 S rRNA 可以作为公用探针使用,

同时也说明其序列同源性很大,在进化过程中保守性很强。

以上结果表明,从某种植物来源的 4.5 S rRNA 可以用作多种植物叶绿体基因组研究的公用探针。这具备两方面的意义: a. 在研究某些比较珍贵或稀有的植物叶绿体基因组时,可以用其它容易获得的植物来制备 4.5 S rRNA 作为探针; b. 用某种植物的 4.5 S rRNA 为探针,可以解决某些植物,特别是介于低等和高等植物边缘的植物叶绿体 DNA 上是否有 4.5 S rRNA 基因存在的问题。而且根据不同植物中 4.5 S rRNA 序列同源性的大小比较可以对植物进行分类学上的研究。

参 考 文 献

- 1 Takaiwa F, Sugiura M. *Nucleic Acids Res*, 1980; 8 (18): 4125
- 2 Cheng Zhenqi, Xiao Xiao, Wang E-sheng. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 866(1): 89
- 3 Cheng Zhenqi, Zhang Hong, Li Guoyu. *FEBS Lett*, 1986; 200(1): 193
- 4 张虹,程振起,李 潘. 遗传学报, 1986; 13(6): 411
- 5 谷丽雅等,生物化学杂志, 1985; 1(5,6): 97
- 6 Alessio D J M. In: Ricrwood D. eds, *RNA sequencing. Gel Electrophoresis of Nucleic Acid*, Oxford: IRL Press, 1982: 176—182
- 7 Bookjans G et al. *Anal Biochem*, 1984; 141(1): 244
- 8 Maniatis et al. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 150—161
- 9 Southern E M *J Mol Biol*. 1975; 98: 508

水稻叶片蛋白质快速双向电泳分析的新方法

刘立军 薛光行

(中国农业科学院作物育种栽培研究所,北京 100081)

提 要

介绍了利用 PhastSystem 全自动快速电泳仪进行水稻叶片蛋白质双向电泳的方法,此方法具有快速(电泳全过程仅需 3.5 h),操作简单和成本低廉的特点,同时具有良好的重复性和高分辨率。

关键词 叶片蛋白, PhastSystem 电泳仪,双向电泳

目前国内外已有不少分析植物叶片蛋白的双向电泳方法^[1-3],但它们普遍存在耗时长、操作复杂、成本较高等问题。利用瑞典 Pharmacia 公司全自动快速电泳仪 PhastSystem 可将蛋白

质电泳的效率和重复性大大提高^[4,5]。已有用它从事微生物蛋白质双向电泳分析的报道^[6,7],但

用之于植物叶片蛋白质的分析尚无先例。本文介绍的是利用 PhastSystem 分析水稻叶片蛋白质的快速双向电泳的新方法。

1 材料和方法

1.1 试剂和贮液

1.1.1 主要试剂

两性载体电解质 (Ampholine) pH 3—10, pH4—6.5, pH6—8, SDS PAGE 成品胶 (商品名: PhastGel Gradient), SDS 缓冲胶条 (商品名: PhastGel SDS Buffer Strip) 为 Pharmacia 公司产品, TEMED (Koch-Light 公司), DTT (Serva 公司), 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, Tris, SDS, 巯基乙醇, NP-40, 碘乙酰胺, 戊二醛等为进口分装或国产优级纯试剂。

1.1.2 贮液 (文中涉及贮液时仅用其代号 A、B 等表示)

A. 蛋白提取液: 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 5% 正丁醇, pH 7.5, 在 4℃ 下可长期保存。

B. 样品缓冲液: 8 mol/L 尿素, 9% 巯基乙醇, 4% NP-40 在 4℃ 下可长期保存, 若有晶体析出, 在室温下使之复溶即可使用。

C. 凝胶贮液: 29.1g 丙烯酰胺、0.9g 甲叉双丙烯酰胺用无离子水定容到 100ml。

D. 2D 处理液: 0.112 mol/L Tris, 0.112 mol/L HAC, 1% DTT, 2.5% SDS 在室温下可长期保存。

E. 2D 平衡液: 0.112 mol/L Tris, 0.112 mol/L HAC, 1% DTT, 2.5% SDS, 0.26 mol/L 碘乙酰胺, 0.1% 溴酚蓝用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 6.4, 在室温下可长期保存。

F. 银染固定液: 50% 乙醇-10% 乙酸。

G. 银染增敏液: 80ml 95% 乙醇、28.3g 结晶乙酸钠、1.3ml 25% 戊二醛、0.5g 硫代硫酸钠用水溶解后定体积至 250ml。

H. 硝酸银溶液: 24μl 甲醛、0.10g 硝酸银用水溶解后定体积至 100ml, 用时现配。

I. 银染显色液: 100ml 2.5% 碳酸钠溶液中加入 6μl 甲醛, 用时现配。

J. 银染终止液: 1% 乙酸-5% 甘油。

1.2 样品制备

取人工气候箱中栽培的水稻植株新完全展开叶片, 称鲜重后洗净、拭干、剪碎, 按 10:1 (W/W) 加入不溶性聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-AT), 用液氮将叶片研成粉末, 随即按鲜叶: 提取液 (W/V) 为 1:2 加入贮液 A, 在 4℃ 下提取 20—30 min 之后离心 (0—4℃, 12000 r/min, 30min) 处理。离心毕取上清液与贮液 B 以 1:1 混合即可上样, 样液在 -30℃ 下保存。

1.3 电泳

1.3.1 第一向分离采用聚丙烯酰胺水平板等电聚焦电泳

凝胶规格为 44mm × 50mm × 0.5mm, 每块凝胶中含: 0.3ml 贮液 C, 0.6g 尿素, 0.5ml 18% 甘油, 0.09 ml Ampholine, 34 μl 20% NP-40, 17.3 μl 2% ApS, 1.8 μl TEMED, 0.215 ml 无离子水。凝胶制作方法参考 Pharmacia 公司提供的资料^[4]。样液由自动加样装置加到凝胶上。电泳全过程由电泳仪内存的预设程序自动控制, 此步电泳程序如下:

SAMPLE APPLICATOR DOWN AT 1.2 0Vh
SAMPLE APPLICATOR UP AT 1.3 0Vh
SEP 1.1 2000 V 5.0 mA 5.0 W 15℃ 100Vh
SEP 1.2 200 V 5.0 mA 5.0 W 15℃ 20Vh
SEP 1.3 2000 V 5.0 mA 5.0 W 15℃ 800Vh
SEP 1.4 1000 V 5.0 mA 5.0 W 15℃ 200Vh (此为保护步骤, 当 SEP 1.3 完成即可结束电泳。)

电泳结束后, 从凝胶上切下准备做第二向电泳的样品条 (宽度约 2—3mm) 备用, 并立即将凝胶的其余部分存入低温 (-25℃ 以下) 冰箱, 待用时取出, 处理方法与新制备的相同。根据作者经验, 凝胶以此方法保存一周, 不会对第二向电泳的结果带来明显影响。

1.3.2 第二向分离采用梯度 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1.3.2.1 此步电泳所使用的凝胶为 Pharmacia 公司的成品胶 (商品名: Phast Gel Gradient)。同时, 以该公司出品的缓冲胶条 (商品名: PhastGel SDS Buffer Strip) 代替普通

SDS 电泳中所使用的电极缓冲液。

1.3.2.2 第一向凝胶样条的处理：将样品条在室温的贮液 D 和贮液 E 中分别浸泡 3—4 min, 充分除去胶中的 Ampholine 和尿素, 同时使样品蛋白 SDS 化 (贮液 E 还使凝胶中具有作为电泳指示剂的溴酚蓝)。随后将样品条胶面向下横贴在第二向胶上, 其前缘距分离胶与浓缩胶的界面约 1—2mm。

1.3.2.3 电泳：贴妥样品条后, 将装有缓冲胶条的支持架安放好, 随即开始电泳。与第一向一样, 电泳过程也是由预设程序自动控制的。此步程序如下:

SAMPLE APPLICATOR DOWN AT 2.1 1Vh
 SAMPLE APPLICATOR UP AT 2.2 0Vh
 SEP 2.1 250 V 2.5 mA 3.0 W 15°C 5 Vh
 SEP 2.2 250 V 5.0 mA 3.0 W 15°C 5 Vh
 SEP 2.3 250 V 10.0 mA 3.0 W 15°C 150 Vh
 (实际上, 最后一步所需 Vh 取决于所选用的凝胶浓度, 程序中所给出的 Vh 数超出了实际需要, 工作时可以溴酚蓝前缘跑到凝胶端位做为结束电泳的指示。)

1.3.2.4 染色：参照 Heukeshoven J 和 Dernick R 1985 年和 1986 年的银染方法进行银染色^[11,12]。

染色过程可利用 PhastSystem 的自动染色单元由预设程序控制自动完成, 程序如下:

步 骤	试剂	入口管号	出口管号	时间 (min)	温度 (°C)
1	贮液 F	1	0	30	30
2	贮液 G	2	0	30	30
3	蒸馏水	3	0	3	20
4	蒸馏水	3	0	3	20
5	超纯水	4	0	3	20
6	超纯水	4	0	3	20
7	贮液 H	5	0	20	20
8	贮液 I	6	0	0.5	20
9	贮液 I	6	0	5	20
10	贮液 J	7	0	10	20

染色完成后, 将凝胶放在冰箱 (4°C) 中过夜, 使凝胶板脱水, 再用薄膜 (市售保鲜膜即可) 覆盖。这样的胶板可供长期保存。

1.4 扫描

利用 Pharmacia Ultrosan 扫描仪和 Gel-Scan 扫描软件, 可对各向胶板图谱进行一维或二维扫描处理, 得到多种统计及半定量信息。

2 结果与讨论

2.1 应用本方法得到的水稻叶片蛋白双向电泳图谱：

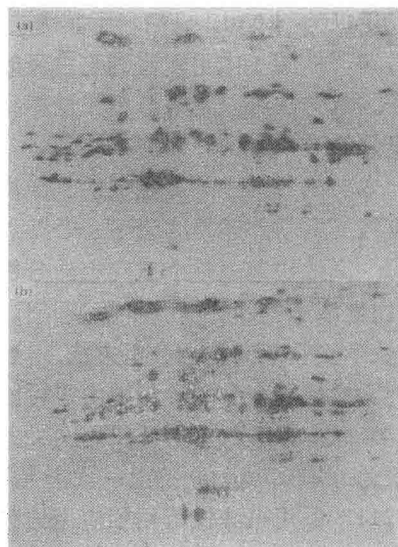


图 1 水稻叶片蛋白质(肽)的双向电泳图谱及重复



图 2 水稻叶片蛋白质(肽)的 IEF 分离图谱(下)及等电点标准品图谱

用本方法对同一样品进行多次重复分析, 所得双向电泳图谱的再现性良好, 说明本方法的重复性是可以令人满意的。其主要原因有:

a. IEF 电泳使用多孔定体积加样器, 并利用仪器本身的程序化控制功能自动加样, 这就使一块 IEF 凝胶上的所有样品及每一次电泳时的凝胶上的样品都能等体积且在电泳进程的固定时间被加到胶上。

b. 第一向 IEF 胶样品条的处理采用了规范化操作, 中间处理时间短 (不超过 10min) 且条件温和 (室温), 这就避免许多干扰因素影响。

c. 无论 IEF 电泳还是 SDS-PAGE, 其电泳的全过程都是由电泳仪按预设程序自动控制

完成的。在实验中,作者多次记录电泳全过程的电参数变化情况,发现各次电泳之间重复性相当好。

2.2 加样量与分辨率

本方法采用银染色,蛋白(肽)染色斑大约为 270—280 个,与用其它双向电泳方法相比,同一材料的银染图谱大体相等或多一些^[4,7],而所用样品量仅为 4.0 μ l,只相当于其它方法的 1/10—1/15,从图 1 中可以看到蛋白斑的分离情况良好,本方法可以用来分析微量样品并同时具有良好的分辨率。

2.3 本方法除上述的高重复性、加样量少而分辨率较高两项外还具有以下几个特点:

2.3.1 高效快速:整个双向电泳分析过程(包括两次电泳和其间的衔接步骤)不超过三个半小时,快于其它双向电泳分析方法。这就为短时间内大量植物样品的分析提供了可能。

2.3.2 成本低廉:本方法所用两种凝胶的规格都仅为 PhastSystem 的上代产品 Pharmacia 2117 多用电泳仪所用相应用途凝胶的 1/10 左右,因此,可以说是在增强功能的情况下大大减少了制胶用试剂、支持膜和染色用试剂的消耗量,大幅度降低了成本。另外,本文所示图 1 使用的 SDS 梯度胶和 SDS 缓冲胶条均为 Pharmacia 公司制成品。实际上,SDS 梯度胶和 SDS 缓冲胶条均可自制^[10],这可以进一步降低成本。

2.3.3 保存方法简便,观察方法多。由于所用两种凝胶均衬有支持膜且胶厚度小,面积小,所以制成干板后,将凝胶夹在底片夹中即可,不会出现其它种类凝胶常发生的断裂、卷皱等问题。这两种凝胶干板不仅能直接观察、翻拍照片、全图版扫描和局部放大,而且还可以直接制成幻灯片。

2.4 不同 pH 范围 Ampholine 的选用和 SDS PAGE 胶梯度的确定

2.4.1 Gianazza(1980)通过对 800 多种蛋白质 pI 值的统计,发现绝大部分蛋白质的 pI 值在 4—7 之间^[13]。鉴于此,同时又出于兼顾的考虑,作者选用了 pH 范围 3—10、4—6.5、6—

8 三种 Ampholine 配合使用,这样不仅可以相对扩大绝大部分蛋白质分布的区域、优化分离效果,而且也不失落 pI 值较高(低)的蛋白质。

2.4.2 在本方法中所使用的 SDS PAGE 胶梯度范围是 10%—15%,这是根据本实验室以往的工作确定的。对一个新的未知样品,可先选用宽梯度范围进行试验,根据试验结果进一步选定。以染色斑分离状况好,且在图板上分布均匀为佳。

2.5 目的蛋白等电点和分子量的测定

2.5.1 等电点测定:为了测定目的蛋白等电点,应在 IEF 电泳时将每个样品都做两个以上的重复,待 IEF 电泳结束,切下其中一个样品做第二向分离,并将另外的重复样条染色,得到第一向分离的图谱。测定等电点可采用表面电极直测法或等电点标准品做 pI 曲线法(见图 2)。

2.5.2 分子量测定:当 IEF 胶样品条处理完毕,在 SDS 梯度胶上贴妥后,可将分子量标准品溶液加在样品条左(或右)端外的胶面上。电泳、染色完成后,就可以根据分子量标准品的迁移率做出迁移率-分子量曲线,推算出蛋白质分子量。

参 考 文 献

- 1 Patrick H, O'Farrell. *J Biol Chemistry*, 1975; 250 (10): 4007
- 2 Hari V. *Biochemistry*, 1981; 113:332
- 3 Colas des France C et al. *Plant Physiol*, 1985, 78 (1):178
- 4 曹以诚等. 武汉大学学报专刊, 1987; 7:73
- 5 李大东等. 见: 国家高技术研究发展计划生物技术领域专家委员会: 863 计划生物技术领域年会论文摘要(1989—1990)北京; 1990: 8
- 6 Pharmacia A B. *PhastSystem Separation Technique File*, No. 100
- 7 Pharmacia A B. *PhastSystem Separation Technique File*, No. 110
- 8 Pharmacia AB. *PhastSystem Technical*, No. 2
- 9 A Gory, W Postel et al. *Electrophoresis*, 1988; 9(1)
- 10 Pharmacia AB: *PhastSystem Technique File*, No. 4
- 11 Henkeshoven J, Dernick R. *Electrophoresis*, 1985; 6:103
- 12 Henkeshoven J, Dernick R. *Electrophoresis*, 1986; 1:22
- 13 Gianazza. *Isoelectric Focusing: Pharmacia Fine Chemical AB*, 1982