

一种改良的植物蛋白质双向电泳方法

逯 斌 林 兵

(中国科学院遗传研究所)

O' Farrell 等^[1]介绍的蛋白质双向电泳技术,将两个独立的参数(等电点和分子量)结合起来,使蛋白质的电泳分辨率有了极大提高,特别是对复杂系统中的蛋白质分析,提供了一种有效手段。但是这种电泳系统一般只适用于动物和微生物,植物组织中由于含有诸多干扰因素(如色素、酚、醌等次生代谢物),双向电泳往往不易得到满意的结果。我们根据植物组织的特点,对样品制备作了改进,在植物生长发育过程的调节蛋白、植物蛋白质的遗传变异以及与生殖发育过程相关的蛋白质等的研究中得到了令人满意的结果,所用的材料包括小麦、玉米、摩擦禾等,说明这种改进后的方法广泛适用于植物材料。

材 料 与 方 法

1. 贮液 A. 可溶性蛋白提取液: 20mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 1mmol/L PMSF。B. “UKS”样品缓冲液^[2]: 9.5mol/L 尿素, 5mmol/L K₂CO₃, 1.25% SDS, 0.5% 2-巯基乙醇, 2% 两性电解质 pH 3.5—10, 6% Triton X-100。C. 银染用银氨溶液 (120ml): 5ml 20% AgNO₃ 水溶液滴加入 113ml 0.072% NaOH 和 2.5ml 浓氨水混合液中。

2. 材料 (1) 长约 2—3cm 的小麦幼苗。(2) 玉米、摩擦禾绿色叶片。

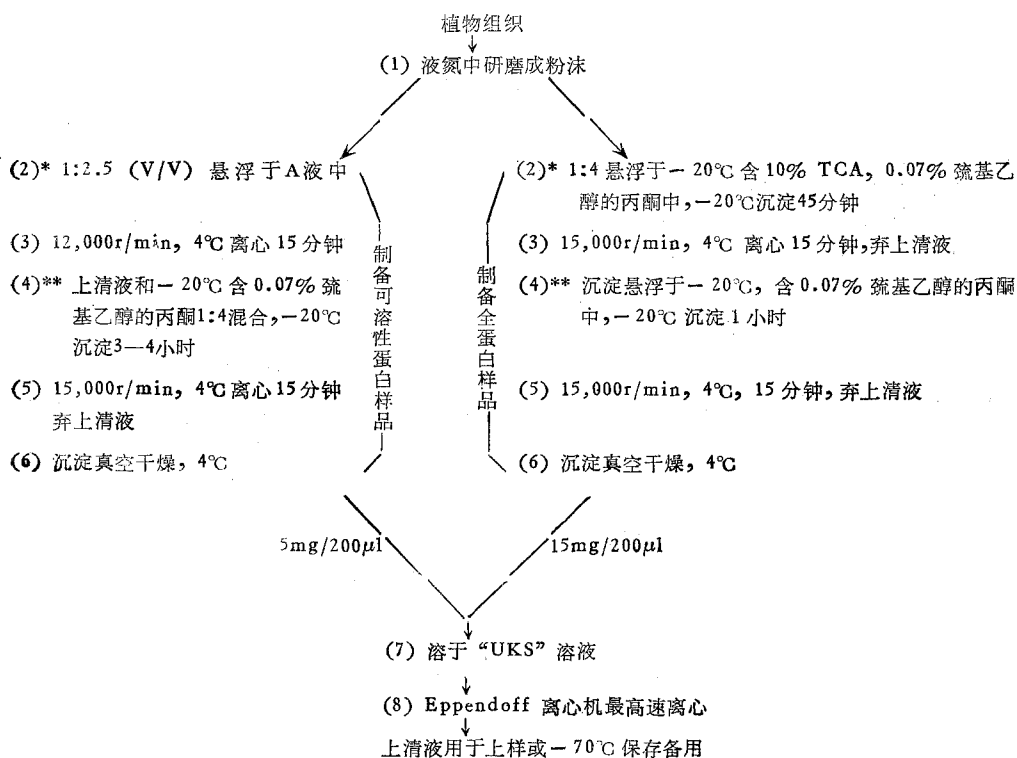


图 1 电泳样品的制备

*: 可加入不溶性 PVP, 有效去除醌的影响。

** : 可重复一次, 以彻底清除色素。

3. 材料处理(按图 1 程序)

4. 电泳方法 按 O' Farrell (1975)^[1] 方法略加改动。玻璃管选用 16cm 长、内径 2.5mm 的玻璃管(可用 1ml 的吸量管制备)。聚焦预电泳过程为 200V 15 分钟、300V 30 分钟、400V 30 分钟,上样后聚焦时间为 400V 16 小时、600V 1 小时。第二向 SDS-PAGE 电泳采用 13—15% 的分离胶、浓缩胶 4.5%、凝胶厚度 1mm。200V 6 小时或 75V 过夜(约 13—14 小时)。

5. 凝胶的染色 我们用考马斯亮兰 R-250 和银

染都得到了很好的结果。银染程序为:将胶于 50% 甲醇中过夜,在银氨溶液中振荡 30 分钟,双蒸水洗 3 次,每次 1 分钟,在显影液(100ml 0.005% 柠檬酸 + 50μl 38% 甲醛)中显影 10 分钟左右,5% 醋酸水溶液停影,50% 甲醇固定。

结果与讨论

1. 样品的制备是做好双向电泳的关键一步,根据不同的目的(如分析水溶性蛋白、醇溶性蛋白、全蛋白等),可用不同的方法。但以下二方面非常重要:(1) 要保证欲分析的蛋白质溶解完全;(2) 应尽量去除各种干扰电泳结果的因素。

植物组织中对双向电泳影响最大的就是一些植物色素、酚类及酚氧化成的醌等,它们对等电聚焦过程中 pH 梯度的形成有较大影响,因而得不到满意的电泳效果(如图 2a)。我们所用的两种制样程序基本上可以去除它们的影响,因而得到了满意的电泳结果(如图 2b)。

2. 双向电泳中常见的干扰、干扰原因及解决办法(如表 1)。

表 1 常见的干扰、干扰原因及解决办法

干 扰	原 因	解决方法
横向干扰	1. 样品离心不够、含不溶性颗粒太多	1. 增加离心
	2. 聚焦时间不够	2. 延长聚焦时间
	3. 两性电解质浓度过低,或使用存放过久的两性电解质	3. 加大两性电解质的浓度
竖向干扰	1. IEF 胶柱平衡不够	1. 延长平衡时间
	2. 第二向胶不均匀	2. 改变做胶条件如聚合剂、温度等
图谱中点的分布偏上或偏下	第二向胶浓度过高或过低	改变分离胶浓度或使用梯度胶

参 考 文 献

- [1] O' Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, 4007.
 - [2] C. Damerval et al.: *Electrophoresis*, 1986, **7**, 52.
- [本文于 1988 年 9 月 10 日收到]

参 考 文 献

- [1] Moore GP et al.: *Ann. Rev. Physiol.*, 1966, **28**, 493.
- [2] 曹阳等:《生物物理学报》, 1989, **5**, 119.
- [3] Johnson DH et al.: *Biophys. J.*, 1976, **16**, 719.
- [4] Yamamoto M et al.: *J. Neurophysiol.*, 1983, **49**, 1182.

[本文于 1988 年 10 月 12 日收到]

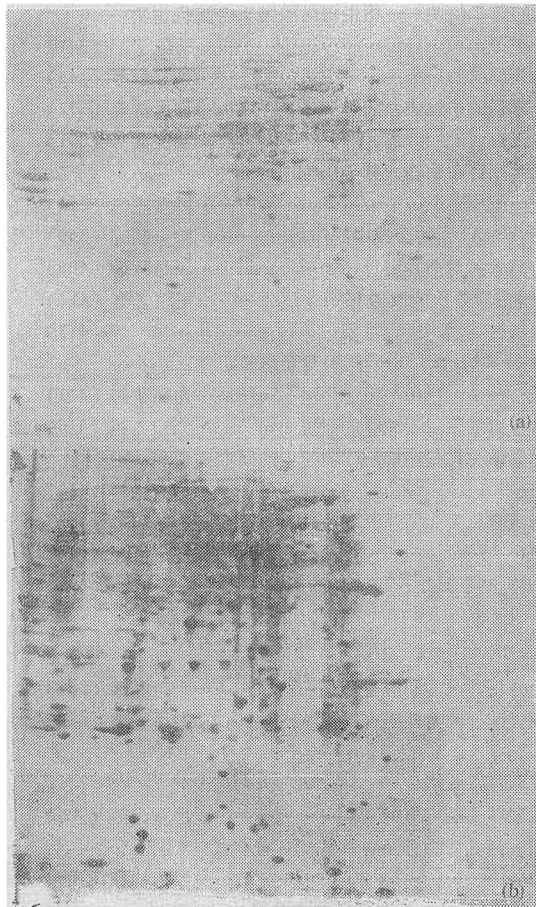


图 2 小麦芽水溶性蛋白的双向电泳图谱
(a) 用以前方法制备的样品
(b) 用本文所述改进方法制备的样品

(上接第 478 页)

较小,即均值与 CV 的关系相对恒定。

结果表明,体感皮层神经元 ISI 均值与 CV 关系复杂,分离研究长间隔和短间隔能揭示 ISI 内在性质,提示两者可能反映不同的神经机制并相互影响,外周刺激影响较小。