

油菜黄化突变体蛋白质组分析：两种蛋白质提取方法比较*

张蕊¹⁾ 刘海衡²⁾ 赵惠贤^{1)**} 胡胜武^{2)**}

(¹⁾ 西北农林科技大学生命学院, 杨凌 712100; ²⁾ 西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100)

摘要 以芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 及其野生型 L638-g 五叶期叶片为材料, 用 IEF/SDS-PAGE 双向凝胶电泳技术对两种不同蛋白质提取方法(TCA/ 丙酮沉淀法和改进的 PEG 分级沉淀法)进行了比较, 同时在 IPG 胶条 pH 范围及 SDS-PAGE 胶浓度选择上进行了探索与优化. 结果表明, 以 pH 4~7 17 cm 的线性 IPG 胶条进行 IEF, 11% SDS-PAGE 进行第二向电泳, 每 350 μ l 体系上样量为 180 μ g, 蛋白质可以得到较好的分离, 2-DE 图谱质量最佳. 用改进的 PEG 分级沉淀法提取的突变体 L638-y 叶片总蛋白的 2-DE 图谱可清晰识别的蛋白质点数目为(1235 $\pm$ 6)个, 比 TCA/ 丙酮沉淀法多识别出 330 个蛋白质点; 用该方法提取蛋白质时, 在突变体 L638-y 与其野生型 L638-g 叶片总蛋白 2-DE 图谱上可识别出差异蛋白质点数目为 190 个, 比用 TCA/ 丙酮沉淀法提取蛋白质时多鉴别出 100 个差异蛋白质点. 由此表明, 研究芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 叶片蛋白质组变化, 采用改进的 PEG 分级沉淀法提取蛋白质更为简单有效.

关键词 芥菜型油菜, 黄化突变体, 叶片蛋白, 蛋白质提取, 双向电泳

学科分类号 Q51, Q946.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00176

蛋白质组技术已广泛应用于植物遗传、发育和生理生态等诸多生物学领域^[1]. 双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学研究中分离蛋白质的主要技术之一. 利用 2-DE 技术可以对生物细胞或组织全蛋白质表达进行定性或定量的综合性分析, 尤其可以揭示不同条件下蛋白质表达的改变. 蛋白质样品制备是蛋白质 2-DE 分析中的关键步骤之一, 也是进行蛋白质组学分析的前提^[2]. 建立更为有效的蛋白质制样方法, 高分辨率地分离蛋白质一直是植物蛋白质组学研究中 2-DE 技术不断改进的方向.

在植物蛋白质组学研究中, 用于植物组织蛋白质提取的方法有: 硫酸铵沉淀法^[3]、三氯乙酸(TCA)沉淀法^[4]、丙酮沉淀法^[5]、TCA/ 丙酮沉淀法^[6], 以及在甲醇中用醋酸铵沉淀^[7]等. 其中, TCA/ 丙酮沉淀法可使蛋白酶失活进而减少蛋白质降解, 同时可以去除杂质, 比单独使用 TCA 或丙酮效果好^[8-9], 因此, 其应用最为广泛. 但该方法的缺点是沉淀的蛋白质复溶难、蛋白质损失较多, 而且用于提取植物叶片蛋白质时制得的蛋白质样品

中高丰度蛋白, 如核酮糖 -1, 5- 二磷酸羧化酶 / 加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO, 占叶片总蛋白的 30%~50%), 大量存在而影响低丰度蛋白的检测. 据新近报道, 可以通过 PEG 分级沉淀^[10-12]、RuBisCO 免疫耗竭柱(Immunodepletion columns)^[13]或一定浓度的钙离子和植酸钠^[14]等方法来解决上述问题. Xi 等^[11]和 Acquadro 等^[12]先后在拟南芥和朝鲜蓟中用 PEG 分级沉淀法分离叶片总蛋白, 有效地降低了总蛋白质中高丰度蛋白 RuBisCO 的含量, 使双向电泳能够分离鉴定出更多的低丰度蛋白, 但该方法操作步骤繁多, 不够简化. 目前, 植物蛋白质组学的研究主要集中在拟南芥、苜蓿、水稻、小麦、大麦和大豆

* 国家油菜产业技术体系(nycytx-00505)和西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目资助.

** 通讯联系人.

赵惠贤. Tel: 029-87092387, E-mail: hxzhao212@nwsuaf.edu.cn

胡胜武. Tel: 029-87082604, E-mail: swhu83251@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2010-04-05, 接受日期: 2010-05-20

等几个有限的物种^[5]。

油菜黄化突变体 L638-y 是本研究小组在芥菜型油菜(*B. juncea* L.)品系 L638-g 中发现的叶片黄化的天然突变体,该黄化突变无致死效应,属于总叶绿素(Chl)缺乏型突变体^[16]。植物叶绿素缺乏突变体不仅在研究植物叶绿素的生物合成、叶绿体结构、分化发育及遗传控制、鉴定基因功能、了解核质基因互作等方面具有特殊的价值,而且可以作为苗期指示性状,用于杂交种纯度的鉴定。分析芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 及其野生型 L638-g 叶片蛋白质组变化,将有助于揭示该突变体黄化的分子机制及鉴定黄化相关基因。迄今,未见关于植物黄化突变体叶片蛋白质组研究中蛋白质样品有效制备方法方面的研究报道。

本研究以芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 和其野生型 L638-g 的五叶期叶片为材料,比较了两种不同蛋白质样品制备方法对 2-DE 分析结果的影响,同时对用于 2-DE 分析的胶条 pH 及 SDS-PAGE 胶浓度也进行了优化。旨在探索出一种适合于油菜黄化突变体叶片蛋白质组分析的最佳样品制备方法,为开展油菜缺绿突变体蛋白质组学及差异表达蛋白质的研究提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

以本课题组发现、选育的芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 和其原始品系(即野生型)L638-g 为试验材料。2009 年 9 月 18 日将其种植于西北农林科技大学农作二站试验地,常规田间管理。于 2009 年 10 月 25 日(五叶期)分别选取植株第三位叶片,用液氮速冻后存于-80℃冰箱中备用。

1.2 叶片总蛋白的提取

1.2.1 TCA/丙酮沉淀法。参照 Damerval 等^[6]的方法,略有改动。取叶片 400 mg(去叶脉)置于研钵中,加入 0.1 g PVP 于液氮中碾成粉末。转入 2.0 ml 离心管中并加入 1.5 ml 于-20℃预冷的提取液(含 10% TCA 和 0.07% DTT 的丙酮溶液), -20℃沉淀过夜。于 4℃, 20 000 g 离心 1 h, 弃上清。沉淀悬浮于 1.5 ml -20℃预冷的丙酮溶液(含 0.07% DTT)中, -20℃沉淀过夜。同上离心,重复洗涤沉淀 3~4 次至蛋白质为乳白色。最后将沉淀真空冷冻干燥成干粉,于-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 PEG 分级沉淀法。参考 Xi 等的方法^[17],并根据其研究结果对该方法进行了适当改进,以简化

操作步骤,并尽可能降低 RuBisCO 对低丰度蛋白分离鉴定的影响。操作流程见图 1。详细步骤如下:取 400 mg 冻储备用的油菜叶片置于研钵中,加液氮研磨成粉末,转入 2.0 ml 离心管中并加入 1.5 ml 4℃预冷的蛋白质提取液(其中含 0.5 mol/L Tris-HCl pH8.7, 2% NP-40, 20 mmol/L MgCl₂, 2% DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 1% PVPP),混匀,4℃, 12 000 g 离心 15 min, 收集上清液,沉淀用 1.5 ml Mg/NP-40 提取液洗涤 1 次,同样参数离心,上清液与前步收集的上清液合并,沉淀部分作为组分 1(Fraction 1, F1)。向上清液中加入 50% PEG 储备液使其终浓度达到 8%,冰浴静置 30 min, 4℃, 1 500 g 离心 10 min, 所得沉淀称为组分 2 (Fraction 2, F2)。向上清液中继续加入 50% PEG 储备液,使其终浓度达到 16%,冰浴静置 30 min, 4℃, 12 000 g 离心 15 min, 所得沉淀称为组分 3 (Fraction 3, F3)。上清液加入 4 倍体积的 TCA/丙酮溶液(10% TCA, 0.07% DTT), 4℃, 20 000 g 离心 15 min, 得到的沉淀为组分 4(Fraction 4, F4)。将含 RuBisCO 较多的 F1、F3 组分分别单独保留,将不含 RuBisCO 的 F2 和 F4 组分合并称为 Ft。分别对 F1、F3 及 Ft 进行以下洗涤和处理:a. TCA/丙酮溶液(10% TCA, 0.07% DTT), -20℃静置 1 h, 离心收集沉淀;b. 100%丙酮(含 0.07% DTT), -20℃静置 1 h, 离心收集沉淀;c. 80%丙酮, -20℃静置 1 h, 离心收集沉淀;离心参数均为 4℃, 20 000 g, 15 min 离心。最后,经真空冷冻干燥,得到相应的蛋白质干粉样品。

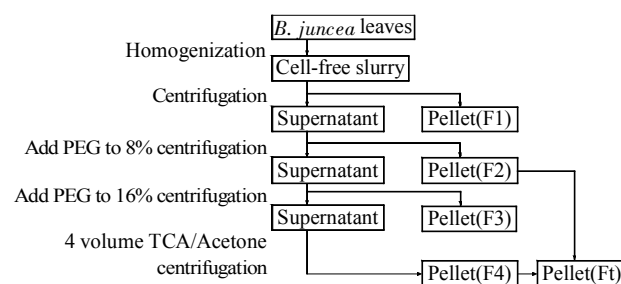


Fig. 1 Schematic work flow of a differential PEG precipitation for the fractionation of proteome proteins from leaves of *B. juncea*

1.3 蛋白质样品溶解与浓度测定

蛋白质干粉与蛋白质裂解缓冲液[含 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT,

2%两性电解质 Biolyte(其中 1% pH 3~10, 1% pH 4~6)]按 100:1 的比例充分混合, 于 4℃ 搅拌、悬浮振荡 2 min, 在液氮与 35℃ 水浴中交替冻融 3 次, 每融一次涡旋振荡 2 min, 24℃ 下 20 000g 离心 15 min, 上清液即为蛋白质样品。用 GE 定量试剂盒 2-D Quant Kit(购自 GE Healthcare Life Sciences 集团)定量后, 用 1.5 ml 离心管分装, 于 -80℃ 贮存备用。

1.4 双向电泳(2-DE)

参照 Görg 等^[17]和 Bio-Rad 双向电泳实验指南进行。参考本研究小组以前研究报道^[18], 双向电泳上样量选用 180 μg 蛋白质, 将含 180 μg 蛋白质的上述蛋白质溶液, 加适量水化上样缓冲液[7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2%两性电解质 Biolyte(其中 0.1% pH 4~6, 0.1% pH 5~7), 痕量溴酚蓝]至终体积为 350 μl 后, 缓慢均匀加入 IPG 胶条槽, 将 IPG 胶条(pH 3~10 或 pH 4~7, 17 cm)胶面朝下覆盖于样品上, 并覆盖 2 ml 矿物油, 置于 PROTEAN IEF Cell 型等电聚焦电泳仪上, 20℃ 50V 自动进行水化 14 h 后, 进行等电聚焦(200V 1 h, 500V 1 h, 1 000V 1 h, 10 000V 5 h, 10 000V 80 000Vh)。聚焦结束后, 分别用含 2% DTT 和 2.5% 碘乙酰胺的缓冲液(含 1.5 mol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, 20% 甘油, 2% SDS, 0.001% 溴酚蓝, 2% DTT)平衡胶条各 15 min, 平衡完毕后, 将胶条紧贴在制备好的 10%(或 11%或 12%)聚丙烯酰胺凝胶上方, 进行第二向电泳; 至溴酚蓝到达胶底部为止。

1.5 染色及图像扫描

电泳结束后采用改进的银染方法对凝胶进行染色^[19]。用 UMAX Powerlook 2100XL 型·432·光密度扫描仪对经银染的 2-DE 凝胶进行扫描照相, 分辨

率设为 600 dpi。

1.6 凝胶图像分析和数据处理

用 PDQuest 8.0.1 软件对扫描获得的图像进行分析, 包括背景消减、斑点检测和匹配等, 以获取可辨的各蛋白质斑点, 实验重复 3 次。蛋白质斑点选定标准是: 斑点个体独立, 形态明显, 3 次实验重复出现。其中, PEG 分级沉淀法所得 F1、F3 和 Ft 三组分蛋白 2-DE 凝胶中斑点特征完全相同(即位置相同、形态相同)的共有蛋白质点视为相同蛋白质点。统计 PEG 分级沉淀法制备的蛋白质在 2-DE 中分辨的蛋白质点时, F1、F3 和 Ft 组分中相同蛋白质点不重复统计。

2 结果与分析

2.1 胶条 pH 范围对 2-DE 图谱的影响

以 TCA/ 丙酮沉淀法提取的油菜叶片蛋白质为材料, 第一向 IEF 电泳分别采用 17 cm, pH 3~10 和 pH 4~7 的线性 IPG 胶条, 第二向电泳用 10% SDS-PAGE 进行蛋白质分离, 凝胶经银染, 获得了重复性较好的 2-DE 图谱(图 2)。从图 2a 可以看出, 用 pH 3~10 的胶条进行电泳时, 2-DE 图谱中蛋白质点大部分集中在 pH 4~7 范围内, 高丰度蛋白质点区域(图 2a 中的椭圆区域)蛋白质点重叠, 分辨率偏低, 仅检测到大约(300±11)蛋白质点。从图 2b 可以看出, 用 pH 4~7 的胶条进行电泳时, 2-DE 图谱中蛋白质点广泛分布在整个凝胶上, 可检测到大约(760±6)个蛋白质点, 极显著地提高了蛋白质样品的分辨率。这表明 pH 4~7 的线性胶条适合于油菜叶片总蛋白的 2-DE 分离。但从图 2a 和 b 都可以看出, 低分子质量蛋白质点区域蛋白质几乎泳出凝胶, 这说明第二向 SDS-PAGE 的浓度尚需进一步优化。

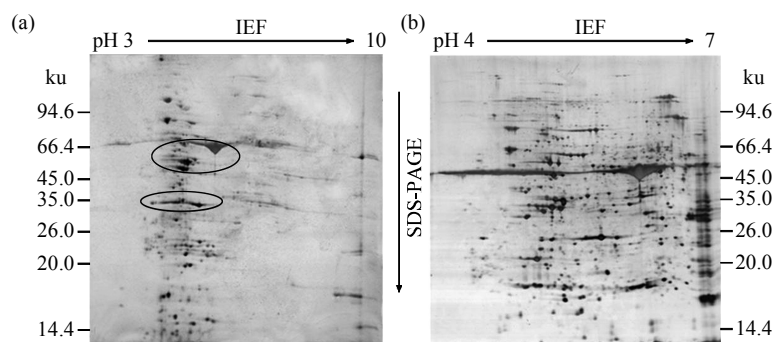


Fig. 2 2-DE maps by using linear IPG strip with pH 3~10(a) and pH 4~7(b) for IEF, followed by the electrophoresis of 10%SDS-PAGE and silver stained

The proteins were prepared by using TCA/acetone precipitation, and 180 μg/350 μl protein was loaded.

2.2 凝胶浓度对 2-DE 图谱的影响

以 TCA/ 丙酮沉淀法提取的油菜叶片总蛋白为样品, 用上述优化的胶条进行第一向 IEF 电泳; 然后, 再分别以用 10%、11% 及 12% 的 SDS-PAGE 胶浓度进行第二向电泳, 所得 2-DE 图谱见图 3. 由图 3 可以看出, 当用 10% 的凝胶进行第二向电泳时, 高分子质量区域蛋白质点得到很好分离, 但是分子质量在 14.4 ku 以下蛋白质几乎全泳出胶外,

无法得以识别(图 3a). 改用 12% 凝胶后, 分子质量在 20 ku 以下的蛋白质点得到了很好的分离, 但分子质量在 66.4 ku 以上的蛋白质点分辨率大大降低(图 3c). 当用 11% 的凝胶进行第二向电泳时, 2-DE 图谱中高、低分子质量区域蛋白质点均获得了较好的分离(图 3b). 这表明, 第二向电泳用 11% 的胶浓度更适合于油菜叶片总蛋白 2-DE 的分离.

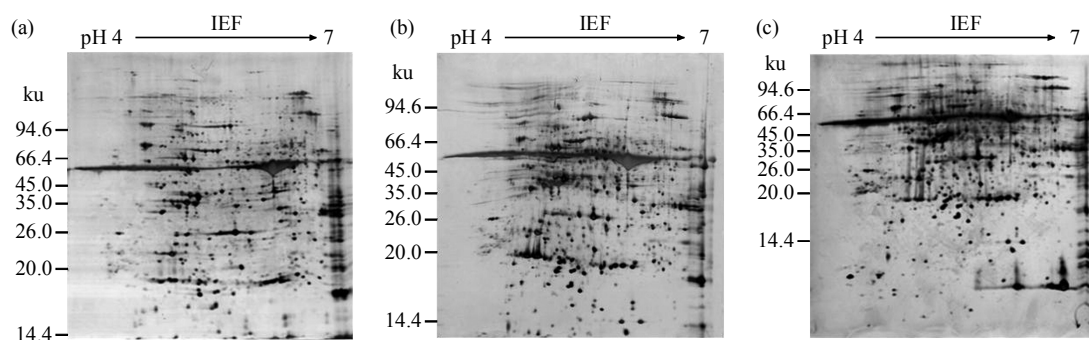


Fig. 3 2-DE patterns of the protein sample by using the concentrations of SDS-PAGE 10%(a), 11%(b), and 12%(c), following IEF with pH 4~7 linear IPG strip

The proteins were prepared by using TCA/acetone precipitation, and 180 μ g/350 μ l protein was loaded.

2.3 两种蛋白质提取方法对 2-DE 图谱的影响

为确定合适的蛋白质样品制备方法, 最大程度降低油菜黄化突变体叶片中高丰度蛋白 RuBisCO 对低丰度蛋白分离效果的影响, 本研究分别用 TCA/ 丙酮沉淀法和 PEG 分级沉淀法提取芥菜型油

菜野生型 L638-g 和黄化突变体 L638-y 叶片总蛋白; 用上述优化的 2-DE 方法对通过这 2 种方法制备的蛋白质样品分别进行 2-DE 分离, 得到了重复性很好的 2-DE 图谱(图 4).

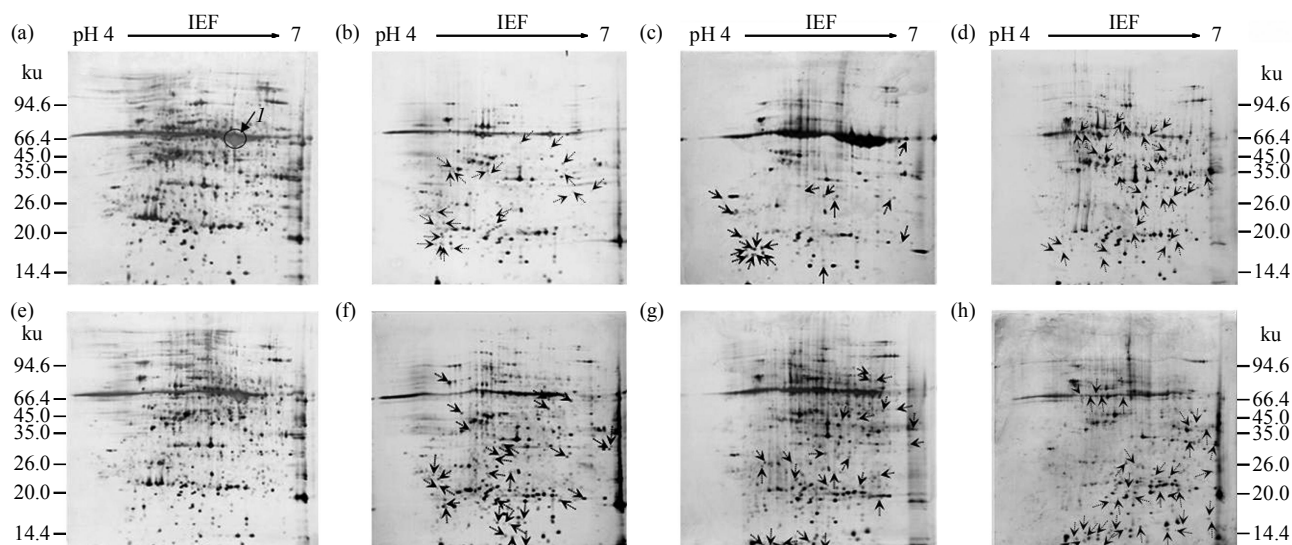


Fig. 4 2-DE patterns of proteins extracted with TCA/acetone precipitation and polyethylene glycol fractionation from the leaves of wild type L638-g (a, b, c, d) and mutant line L638-y(e, f, g, h) of *B. juncea*

(a) and (e) Proteins prepared with TCA/acetone precipitation. (b), (c), (d), (f), (g) and (h) Proteins prepared with polyethylene glycol fractionation. (b) and (f) F1 fraction. (c) and (g) F3 fraction. (d) and (h) Ft fraction. The spot marked in (a) was analysis by MALDI-TOF/MS. The protein spots pointed with arrows were those only detected in PEG fractionation, but not in TCA/acetone precipitation.

从图 4 可以看出，在 TCA/ 丙酮法制备的蛋白质的 2-DE 图谱中，分子质量在 20~26 ku 之间和 45.0~66.4 ku 之间的区域高丰度蛋白质点相互重叠，独立蛋白质点少，很难分辨，并且在 66.4 ku 左右有一道明显的横纹，占整个图谱的比例较大，其中，占比例最大的蛋白质点(图 4a 中 Spot No.1)经质谱检测为 RuBisCO 大亚基(表 1)。在 PEG 分

级沉淀法提取的蛋白质的 2-DE 图谱中 RuBisCO 主要存在于 F3 组分中(图 4c, g)，F1 中也有极少量(图 4b, f)，Ft 组分几乎不含 RuBisCO(图 4d, h)。这样，在等蛋白质量上样的情况下，F1 和 Ft 中低丰度蛋白的比例就会大大增加，从而使低丰度蛋白特别是分子质量小于 26.0 ku 的蛋白质点能够很清楚地显示出来(图 4b, f, d, h)。

Table 1 The protein identified by MALDI-TOF MS

Protein spot ³⁾	Protein name	Assession No.	Species	Theoretical/Experimental		M ¹⁾	SC ²⁾
				M/ku	pI		
1	RuBisCO large subunit	gi 1346967	<i>B. oleracea</i>	53.4/64.1	6.04/5.88	22	43

For identification, the resulting peptide fingerprint was searched against the NCBI nr or SWISS-Prot database restricted to plants, using the program MASCOT(<http://www.matrixscience.com>). ¹⁾ Number of mass values matched. ²⁾ Sequence coverage. ³⁾ The spot marked in Figure 4a.

用图像分析软件分别对上述两种方法提取的突变体 L638-y 及其野生型 L638-g 叶片总蛋白 2-DE 图谱(图 4)上的蛋白质点进行统计和比较，并分析和统计了 PEG 分级沉淀相邻组分 2-DE 图谱间重叠点(overlap)亦即匹配点(matches)数目(图 5)。从图 5 可看出，用 TCA/ 丙酮沉淀法提取蛋白质时，在 L638-g 叶片总蛋白 2-DE 图谱(图 4a)上可清晰识别出的蛋白质点有(815±10)个(图 5b)，在 L638-y 叶片总蛋白 2-DE 图谱(图 4e)上可识别的蛋白质点有(905±11)个(图 5d)，用 PEG 分级沉淀法提取蛋白质时，从 L638-g 叶片总蛋白 2-DE 图谱(图 4b, c, d)上

共可识别出蛋白质点有(1 045±8)个(F1、F3 或 Ft 中共有的相同蛋白质点不重复统计)，从 L638-y 叶片总蛋白 2-DE 图谱(图 4f, g, h)上共可识别出蛋白质点为(1 235±6)个。由图 5 还可看出，用 PEG 分级沉淀法比 TCA/ 丙酮法提取法在 L638-g 叶片总蛋白 2-DE 图谱中，多识别 230 个蛋白质点(图 4b,c, d 中箭头所示蛋白质点)，在 L638-y 叶片总蛋白 2-DE 图谱中多识别 330 个蛋白质点(图 4f, g, h 中箭头所示蛋白质点)。PEG 分级沉淀法制备的蛋白质样品的 2-DE 图谱分辨率显著提高，尤其是能更有效地显现出低丰度蛋白质点(图 6)。

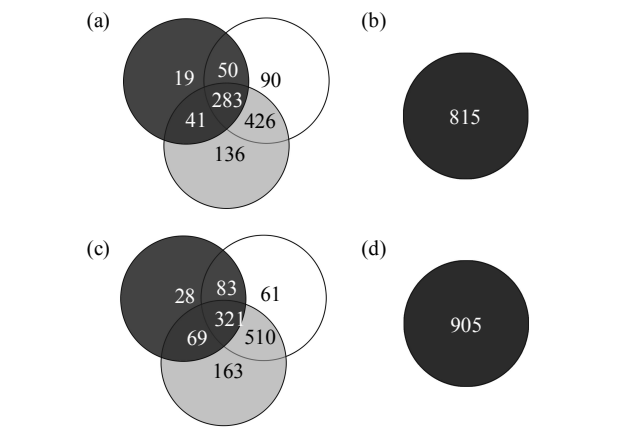


Fig. 5 Comparison of the number of protein spots in 2-DE of the proteins extracted with TCA/acetone precipitation (b, d) and polyethylene glycol fractionation (a, c) method from the leaves of the wild type L638-g (a, b) and the mutant line L638-y (c, d)

○: PEG fractionation, F1; ●: PEG fractionation, F3; ○: PEG fractionation, Ft; ●: TCA/acetone precipitation.

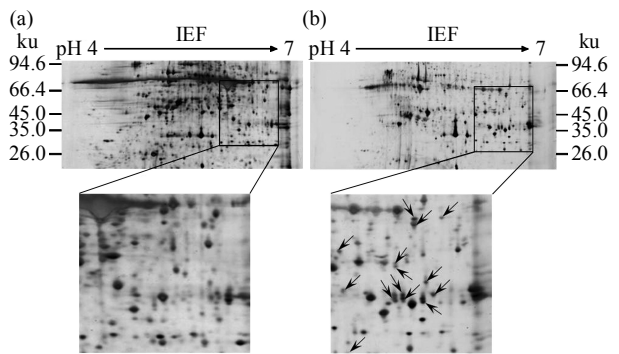


Fig. 6 Comparison of 2-DE maps of proteins extracted by TCA/acetone precipitation (a) with that of Ft fraction prepared by PEG fractionation (b)

将用上述两种提取方法制备的 L638-y 叶片总蛋白 2-DE 图谱中不同分子质量或 pI 区域清晰可辨的蛋白质点数目进行统计和比较，结果见图 7。由图 7 可以看出，除了在等电点 5.0~5.4 范围内，两

种提取方法分离的蛋白质点数目相似之外, 在不同分子质量区域或其他等电点区域内, PEG 分级沉

淀法均比 TCA/ 丙酮沉淀法能够显著地鉴别出更多的蛋白质点.

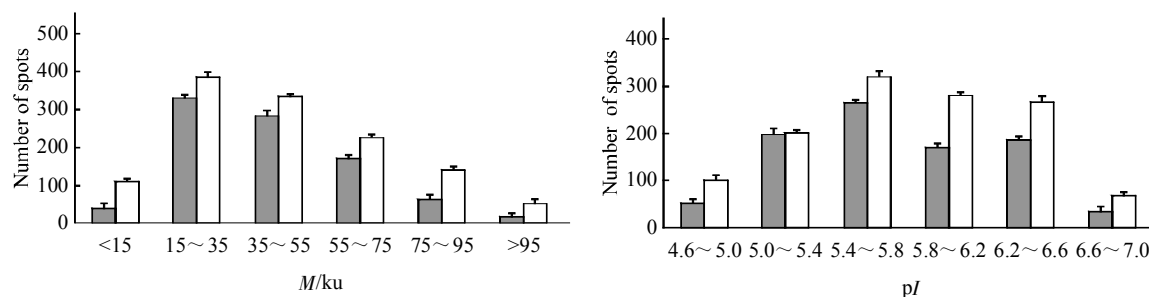


Fig. 7 The distribution of protein spots in 2-DE corresponding to the range of molecular mass (*M*) and isoelectric point (*pI*)

Proteins extracted from leaves of the mutant L638-y with TCA/acetone precipitation and PEG fractionation. ■: TCA; □: PEG.

由此可见, 用 PEG 分级沉淀法提取 L638-g 和 L638-y 叶片总蛋白, 进行 2-DE 分析, 可以大大提高分辨率, 分离鉴别出更多的差异蛋白质点. 因此, 在进行油菜黄化突变体 L638-y 叶片蛋白质组 2-DE 分析时, 用 PEG 分级沉淀法提取蛋白质比 TCA/ 丙酮沉淀法更适合, 能够提高分辨率, 有效分离低丰度蛋白质.

3 讨 论

样品制备是蛋白质组研究过程中的首要步骤, 是 2-DE 分析中蛋白质高分辨率分离的关键^[20-21], 尽可能完全地获得某一组织或器官在特定时期表达的蛋白质种类和数量则是双向电泳分析的前提和基础. 目前, 生物组织全蛋白 2-DE 分析中蛋白质样品制备方法应用较为广泛的是 TCA/ 丙酮法^[8], 但该方法制备的植物叶片蛋白质样品高丰度蛋白 RuBisCO 含量较大, 影响低丰度蛋白的检测, 而低丰度蛋白往往是调节因子和信号接受分子等一些非常重要的蛋白质, 因拷贝数太低难以检测^[22-23]. Xi 等^[11]和 Acquadro 等^[12]先后在拟南芥和朝鲜蓟中用 PEG 分级沉淀法提取叶片总蛋白, 使大量 RuBisCO 成分主要集中在个别沉淀组分中, 有效地降低了其他组分中 RuBisCO 的含量, 使双向电泳能够分离鉴定出更多的低丰度蛋白. 但是, 该方法操作步骤繁多, 不够简化, 特别是在样品较多的情况下, 很费时费力. 本研究根据 Xi 等^[11]的研究结果对其报道的叶片总蛋白 PEG 分级沉淀提取方法进行了适当改进, 包括: a. 将 PEG 分级沉淀次

数由 5 次减少到 4 次(因为用原方法所得的 F4 和 F5 组分均不含 RuBisCO, 故其最后一次沉淀去除 RuBisCO 的操作被省略); b. 根据分级沉淀所得各组分中 RuBisCO 含量不同(RuBisCO 主要存在于 F3 组分, F1 中也有极少量, F2 和 F4 组分几乎不含 RuBisCO), 将其归并为 3 组: F1、F3 和 Ft 组分, 再分别对其进行 2-DE 分析. 这样就简化了实验操作步骤, 避免了对各分级沉淀组分分别进行 2-DE 时的繁琐. 同时, 作者用 Xi 等^[11]报道的 PEG 分级沉淀提取方法和上述改进的 PEG 分级沉淀提取法分别制备芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 叶片全蛋白样品, 并进行 2-DE 分析, 所得结果基本一致(图片资料在本文中没有示出), 说明本研究对 Xi 等^[11]报道的 PEG 分级沉淀提取叶片蛋白质方法所作的改进是可行的.

本研究对 F1、F3 和 Ft 各组分 2-DE 图谱间蛋白质点进行匹配分析发现, 相邻组分间均有很多相同蛋白质点, 各组分也都存在一些各自独有的蛋白质点, 这在黄化突变体中尤为明显(图 5a, c). 这与 Xi 等^[11]的研究结果一致. 因此, 将 3 组蛋白质 F1、F3 和 Ft 的 2-DE 图谱分别和综合分析, 使获得的数据信息更准确、完全. 用 TCA/ 丙酮沉淀法提取野生型 L638-g 和黄化突变体 L638-y 叶片总蛋白, 进行 2-DE 分析时, 在 2-DE 图谱上分别可以识别出(815±10)个和(905±11)个蛋白质点(图 5b, d), 识别出的差异蛋白质点有 90 个, 当用改进的 PEG 分级沉淀法时, 在 L638-g 和 L638-y 叶片总蛋白 2-DE 图谱上分别可以鉴别出(1 045 ± 8)个和

(1 235±6)个蛋白质点(图 5a, c), 识别出的差异蛋白质点有 190 个, 比 TCA/ 丙酮沉淀法提取蛋白质时多鉴别 100 个差异表达的蛋白质点。因为, 前者有效地将叶片中高丰度的 RuBisCO 集中在 F3 组分中, F1 组分 RuBisCO 含量很少, 而 Ft 组分几乎不含有 RuBisCO, 这样, 在同样的蛋白质上样量条件下, 增加了总蛋白中低丰度蛋白的含量, 故在 F1 和 Ft 的组分中排除了 RuBisCO 对低丰度蛋白的检测干扰。

总之, 研究芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 叶片蛋白质组, 采用本研究改进的 PEG 分级沉淀法, 能高分辨率地分离识别更多种类和数量的蛋白质。该方法不仅适用于油菜黄化突变体, 而且可以拓展到其他植物叶色突变体蛋白质组学的研究。

参 考 文 献

- [1] 阮松林, 马华升, 王世恒, 等. 植物蛋白质组学研究进展 II 蛋白质组技术在植物生物学研究中的应用. 遗传, 2006, **8**(12): 1633–1648
- [2] Ruan S L, Ma H S, Wang S H, *et al.* Hereditas (Beijing), 2006, **8**(12): 1633–1648
- [3] Islam N, Lonsdale M, Upadhyaya N M, *et al.* Protein extraction from mature rice leaves for two dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. Proteomics, 2004, **4**(7): 1903–1908
- [4] McKinney M M, Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. J Immunological Methods, 1987, **92**(2): 271–278
- [5] Saravanan R S, Rose J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. Proteomics, 2004, **4**(9): 22–32
- [6] 何瑞锋, 丁毅, 张剑锋, 等. 植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化. 遗传, 2000, **22**(5): 319–321
- [7] He R F, Ding Y, Zhang J F, *et al.* Hereditas (Beijing), 2000, **22**(5): 319–321
- [8] Damerval C, Vienne D D, Zivy M, *et al.* Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. Electrophoresis, 1986, **7**(1): 52–54
- [9] Bellato C M, Garcia A K M, Mestrinelli F, *et al.* The induction of differentially expressed proteins of Xylella fastidiosa with citrus extract. Microbiol, 2004, **35**(3): 235–342
- [10] Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H, *et al.* Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. Electrophoresis, 2003, **24**(1–2): 207–216
- [11] Meyer Y, Grosset J, Chartier Y, *et al.* Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. Electrophoresis, 1988, **9**(11): 704–712
- [12] Sun T K, Kyu S C, Yu S J, *et al.* Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. Electrophoresis, 2001, **10**(22): 2103–2109
- [13] Xi J, Wang X, Li S Y, *et al.* Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. Phytochemistry, 2006, **67**(21): 2341–2348
- [14] Acquadro A, Falvo S, Mila S, *et al.* Proteomics in globe artichoke: Protein extraction and sample complexity reduction by PEG fractionation. Electrophoresis, 2009, **30**(9): 1594–1602
- [15] Cellar N A, Kuppannan K, Langhorst M L, *et al.* Cross species applicability of abundant protein depletion columns for ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. J Chromatography B, 2008, **861**(1): 29–39
- [16] Krishnan H B, Natarajan S S. A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (Glycine max) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. Phytochemistry, 2009, **70**(17–18): 1958–1964
- [17] 喻娟娟, 戴绍军. 植物蛋白质组学研究若干重要进展. 植物学报, 2009, **44**(4): 410–425
- [18] Yu J J, Dai S J. J Integrative Plant Biology, 2009, **44**(4): 410–425
- [19] 李玮, 于澄宇, 胡胜武. 芥菜型油菜叶片黄化突变体的初步研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, **35**(9): 80–89
- [20] Li W, Yu C Y, Hu S W. J Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2007, **35**(9): 80–89
- [21] Görg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. Electrophoresis, 1999, **20**(4–5): 712–717
- [22] 刘海衡, 胡胜武, 刘胜毅, 等. 油菜不同器官高质量总蛋白提取方法和双向电泳体系的优化. 中国油料作物学报, 2009, **31**(4): 426–433
- [23] Liu H H, Hu S W, Liu S Y, *et al.* Chin J Oil Crop Sciences, 2009, **31**(4): 426–433
- [24] Blum H, Beier H, Gross H J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 1987, **8**(2): 93–99
- [25] Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol, 1999, **17**(3): 121–127
- [26] Rabilloud T, Link A J. Solubilization of proteins in 2D electrophoresis: an outline. Methods Mol Biol, 2D Proteome Analysis Protocols, 1999, **112**: 9–19
- [27] Gygi S P, Corthals G L, Zhang Y N, *et al.* Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(17): 9393–9395
- [28] Tirumalai R S, Chan K C, Prieto D A, *et al.* Characterization of the low molecular weight human serum proteome. Mol Cell Proteomics, 2003, **2**: 1096–1103

Comparison of Two Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Chlorophyll-deficient Mutants in *Brassica Juncea* L.*

ZHANG Rui¹⁾, LIU Hai-Heng²⁾, ZHAO Hui-Xian^{1)**}, HU Sheng-Wu^{2)**}

¹⁾ College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

²⁾ College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract Proteomics has become a powerful technology being successfully used in plant science research to investigate different biological processes, including plant genetics, development, physiological ecology and responses to climate change. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) is a potential analytical tool in proteomics to identify qualitative and quantitative changes of proteins and reveal the changes of protein expression under different growth conditions. However, protein sample preparation is the key fundamental steps of 2-DE analysis, and it is also a prerequisite for proteomics analysis. L638-y is a chlorophyll-deficient mutant naturally generated from the wild type L638-g in *Brassica juncea* L., which is typical characterized with yellow leaves and no other different traits from the wild type except leaves color. In order to efficiently analyze the differential expression proteins between the mutant L638-y and its wild type L638-g, two protein extraction methods for proteomic analysis, TCA/acetone extraction method and an improved polyethylene glycol (PEG) fractionation method, were compared. Total proteins were extracted from leaves of the mutant L638-y and its wild type L638-g at five leaves period with the two protocols, then the samples were analyzed by 2-DE, pH of IPG strip and concentration of SDS-PAGE being optimized. The results showed that when using 17 cm linear IPG strips pH ranged from 4 to 7, 11% SDS-PAGE, loading 180 μ g/350 μ l, proteins were better separated. Much more protein spots had been observed in 2-DE maps of the protein samples prepared by the PEG fractionation than TCA/acetone precipitation. In 2-DE profiles of the protein sample from mutant L638-y prepared by the PEG fractionation, as much as 1 235 $\pm$ 6 protein spots were identified, 330 more spots than those by TCA/acetone precipitation method. By using the PEG fractionation, 190 differential protein spots were identified between the 2-DE maps of the mutant L638-y and wild type L638-g, 100 more spots than those by TCA/acetone precipitation. Thus, the improved PEG fractionation is more efficient and simple for proteomic analysis of chlorophyll-deficient mutants in *Brassica Juncea* L.

Key words *Brassica Juncea* L., chlorophyll-deficient mutant, leaves proteins, protein extraction, two-dimensional electrophoresis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00176

*This work was supported by grants from The Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (nycytx-00505) and the Funds of Northwest A & F University for Top-talents.

**Corresponding author.

ZHAO Hui-Xian. Tel: 86-29-87092387, E-mail: hxzhao212@nwsuaf.edu.cn

HU Sheng-Wu. Tel: 86-29-87082604, E-mail: swhu83251@nwsuaf.edu.cn

Received: April 5, 2010 Accepted: May 20, 2010