

# 水稻根部蛋白质组样品制备的方法研究

袁丽环

(山西师范大学 生命科学学院, 山西 临汾 041004)

**摘要:** 为了选择适用于水稻根部蛋白质组分析的样品制备方法, 以水稻苗期幼嫩根尖为材料, 采用 TCA/丙酮沉淀法、Tris 法、尿素/硫脲法对水稻根部总蛋白质进行提取并比对, 通过 Bradford 法、SDS-PAGE 电泳技术对蛋白质含量和种类进行分析。结果显示, Tris 法提取出的水稻根部蛋白质含量和种类明显少于其他 2 种方法; 尿素/硫脲法和 TCA/丙酮沉淀法提取的蛋白质种类和含量都较多, 其中, 尿素/硫脲法的蛋白质图谱中蛋白条带多, 染色深而且很清晰, 尤其适用于较低分子量蛋白质的提取, TCA/丙酮沉淀法则适于高分子量蛋白质的提取。因此, 进行水稻根部总蛋白质组分析时, 可选用尿素/硫脲法。

**关键词:** 水稻; 根部蛋白质; 提取方法; SDS-PAGE

中图分类号: Q503 S511 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2012)10-0025-03

## A Study on Sample Preparation Method of Rice Root Proteome

YUAN Li-huan

(School of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

**Abstract:** In order to develop the sample preparation methods for rice root proteome analysis, the TCA/acetone precipitation method, direct extraction method and urea/thiourea method were used to extract the rice root protein, and the protein contents and types of samples were analyzed using Bradford method and SDS-PAGE electrophoresis. The results indicated that the direct extraction method was the worst among the three methods, giving the least protein bands and protein content; the TCA/acetone precipitation method and the urea/thiourea method were the optimal methods, both producing more protein bands, while the latter showed more protein types and more clear bands, especially for the low-molecular weight proteins, while the TCA/acetone precipitation method was more suitable for the preparation of high molecular weight proteins. It was suggested that different methods had different specialties and the urea/thiourea method was the optimal method for total protein extraction of rice roots.

**Key words:** rice; root protein; extraction method; SDS-PAGE

从组织和细胞中提取蛋白质是蛋白质组研究中的关键。植物组织因含有大量蛋白酶和次级代谢产物等都会干扰蛋白质的提取, 而且不同植物干扰物质也不尽相同<sup>[1-2]</sup>。找出适于水稻根部总蛋白提取的方法对于水稻根部蛋白质组的研究意义重大。本研究以水稻幼根为材料, 对 TCA/丙酮沉淀法(三氯醋酸-丙酮沉淀法)、Tris 法(直接提取法)、尿素/硫

脲法 3 种提取方法进行比较分析, 旨在筛选出经济有效的适用于 SDS-PAGE 法和双向电泳(2-DE)的蛋白质提取的技术方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本试验于 2011 年 5 月在山西师范大学的温室

收稿日期: 2012-04-03

基金项目: 山西省“十一五”教育规划项目(GH-06044)

作者简介: 袁丽环(1970-), 女, 北京人, 实验师, 硕士, 主要从事植物生理生化研究。E-mail: yuanlihuan1998@163.com

进行,供试水稻徐稻三购自徐州农业科学院。种子用 0.1% 升汞消毒,充分清洗后用去离子水浸泡 48 h,在 28 ℃ 暗培养催芽 24 h 后转入营养液中。2 周内幼苗生长在光照培养箱中,白天黑夜各 12 h,温度分别控制在 28 ℃ 和 25 ℃,光照强度为 300~400  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,湿度适中。2 周后收集根尖(3~5 cm)待用。

## 1.2 总蛋白质提取方法

1.2.1 TCA/丙酮沉淀法 参照 Damerval 等<sup>[3]</sup>的方法改进。称取-80 ℃ 下储存的 0.6 g 水稻根,液氮研磨时加入 0.03 g PVPP;研磨成粉末后等量转入 4 支 1.5 mL EP 管中;加入-20 ℃ 预冷的 10% 三氯乙酸/丙酮沉淀剂 1 mL;剧烈振荡 15 s;-20 ℃ 放置 1 h;期间每隔 15 min 振荡 1 次;4 ℃ 15 000 r/min 离心 20 min;弃上清液;沉淀干燥 3~5 min;-80 ℃ 保存。

1.2.2 Tris 法 参照杨君等<sup>[4]</sup>的方法改进。称取-80 ℃ 下储存的 0.6 g 水稻根,液氮研磨时加入 0.03 g PVPP;研磨成粉末后加入 3 倍体积的蛋白质提取缓冲液(65 mmol/L Tris-HCl pH 值 6.8,0.5% SDS,5% 水不溶性 PVPP,10% 甘油,5%  $\beta$ -巯基乙醇),混匀;将离心管置于温控摇床,4 ℃ 振荡浸提 1 h;4 ℃ 15 000 r/min 离心 5 min;取上清,加入 3 倍体积的-20 ℃ 预冷的 10% TCA 丙酮溶液,混匀后置-20 ℃ 沉降蛋白质 1 h;4 ℃ 15 000 r/min 离心 15 min;弃上清液;沉淀用冷丙酮和 80% 冷丙酮各洗涤 2 次;4 ℃ 15 000 r/min 离心 15 min;真空冷冻干燥,置-80 ℃ 保存。

1.2.3 尿素/硫脲法 参照 Herman 等<sup>[5]</sup>的方法改进。称取-80 ℃ 下储存的 0.6 g 水稻根于液氮中研磨成粉,加入 20 mg PVPP 和 2 mL 冷蛋白提取液(含 50 mmol/L Tris-HCl,7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,1% Triton-X 100,2%  $\beta$ -巯基乙醇),继续研磨 1 min,转移至 5 mL 离心管。4 ℃ 15 000 r/min 离心 15 min,上清液转入 10 mL 离心管,加入 4 倍体积-20 ℃ 预冷丙酮,涡旋 30 s,-20 ℃ 沉降过夜。离心,弃上清;沉淀分别用冷丙酮和 80% 冷丙酮清洗各 1 次,每次均放于-20 ℃ 沉淀 30 min 后离心。沉淀冷冻干燥后于-80 ℃ 保存备用。

## 1.3 蛋白质质量浓度的测定

1.3.1 标准曲线的制作 参照 Bradford<sup>[6]</sup>的方法进行。每标样重复 3 次读数,取平均值,以蛋白质质量浓度为横坐标( $x$ , g/L),吸光度为纵坐标( $y$ ,  $A_{595}$ )作标准曲线,建立回归方程。

1.3.2 样本蛋白质质量浓度的测定 取 10  $\mu\text{L}$  待

测蛋白质溶液,用超纯水稀释至终体积 100  $\mu\text{L}$ 。加入 1 mL Bradford 工作液,翻转摇匀,3~5 min 后测样品的  $A_{595}$  值,代入回归方程,求蛋白质质量浓度。

## 1.4 SDS-PAGE 测定根部总蛋白质

按 Sambrook 等<sup>[7]</sup>的 SDS-PAGE 程序进行电泳。使用 DYY 212 型电泳仪和 DYCZ 228C 型垂直双板夹芯式电泳槽。

## 1.5 图像获得与分析

图像扫描采用凝胶成像系统,采用凝胶定量软件 Quantity One 进行图像分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 水稻根部总蛋白质的比较分析

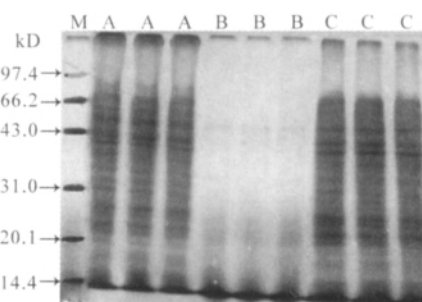
从表 1 可以看出,3 种提取方法中尿素/硫脲法提取的总蛋白质是 Tris 法的 4.5 倍,TCA/丙酮沉淀法是 Tris 法的 4.1 倍,略低于尿素/硫脲法。

表 1 3 种方法提取的水稻根总蛋白质质量浓度

方法	样本质量/g	总蛋白质质量浓度/(g/L)
TCA/丙酮沉淀法	0.6	1.071
Tris 法	0.6	0.262
尿素/硫脲法	0.6	1.170

## 2.2 SDS-PAGE 凝胶分析

从图 1 可以看出,3 种提取方法所获得的总蛋白经 SDS-PAGE 分离后,条带数目、位置和染色深浅均有差异。Tris 法提取的蛋白质条带明显少于其他 2 种方法,且染色浅、含量少、质量较差(蛋白条带较模糊,泳道中背景较深),在低分子量区域蛋白质条带清晰,说明适于分子量极低的蛋白质的提取;尿素/硫脲法和 TCA/丙酮沉淀法提取的总蛋白质经 SDS-PAGE 分离后,条带数目多,蛋白质组分完全,杂质少,质量高(蛋白条带清晰,泳道中背景浅),相对而言尿素/硫脲法的蛋白质图谱中条带多,染色深而且很清晰。表明使用这 3 种制备方法提取的水稻根部蛋白质组分有所不同,使用尿素/硫脲提取法结果较好。



A. TCA/丙酮沉淀法;B. Tris 法;C. 尿素/硫脲法

图 1 3 种样品制备方法提取的水稻根部总蛋白 SDS-PAGE 分离结果

条带的光密度值(OD)是一个相对值,可用在同一张电泳图片上的分子量相同的条带之间进行蛋白质相对表达量的分析。从图 2 可知,3 种蛋白质制备方法在相对分子量范围(MW)内条带量的分布上存在差异。对于中等分子量(25~50 kD)的蛋白质的提取,TCA/丙酮沉淀法与尿素/硫脲法提取的条带量没有明显差异;对于高分子量蛋白(>50 kD)来说,TCA/丙酮沉淀法提取的条带量最多;对于低分子量蛋白(<25 kD)的提取,尿素/硫脲法提取的效果明显优于另外 2 种方法。

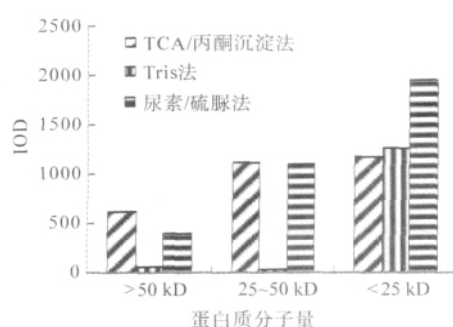


图 2 3 种样品制备方法提取的蛋白质质量在相对分子量范围的分布

### 3 结论与讨论

通过分光光度计法对提取出的蛋白质质量浓度进行估测后发现,尿素/硫脲法提取的蛋白质质量最高,TCA/丙酮沉淀法次之,Tris 法最少;对通过 SDS-PAGE 法得到的凝胶进行分析后发现,Tris 法适用于分子量极低的蛋白质的提取,该法提取的总蛋白含量与种类明显少于另 2 种方法;尿素/硫脲法提取的蛋白条带多,染色深而且清晰,说明该法取得的蛋白种类多且含量高,尤其对于较低分子量的蛋白质提取效果很好。另外,TCA/丙酮沉淀法提取出来的蛋白质较难溶解,所含杂质也较多<sup>[8]</sup>,适于某些高分子量蛋白质的提取。因此,建议选用尿素/硫脲法进行水稻根部总蛋白质的提取。

在试验中发现,3 种提取方法所使用的 12 000 r/min 的离心率离心不完全,上清液仍浑浊,将离心率提高到 15 000 r/min 后,效果改善;TCA/丙酮沉

淀法提取的蛋白质沉淀杂质较多,且难溶解,加入 PVPP 及延长蛋白质沉淀在裂解液中的溶解时间(过夜),得到较纯且裂解充分的蛋白质<sup>[9]</sup>;3 种方法的样品处理最好在短时间内完成,研磨要充分,必须在低温条件下操作,避免蛋白质遇高温失活<sup>[9]</sup>;由于在蛋白质含量测定时用蛋白裂解液代替传统方法中的水,使试验结果形成单一变量,减少了误差。

#### 参考文献:

- [1] Fountoulakis M. Proteomics: current technologies and applications in neurological disorders and toxicology [J]. *Amino Acids*, 2001, 21: 363-381.
- [2] Fountoulakis M, Takacs B. Enrichment and proteomic analysis of low-abundance bacterial proteins [J]. *Methods in Enzymology*, 2002, 358: 288-306.
- [3] Damerval C, De Vienne D, Zivy M, *et al.* Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7(1): 52-54.
- [4] 杨君, 杨云强, 杨永平, 等. 箭毒木种子蛋白质样品制备及双向电泳改良方法 [J]. *云南植物研究*, 2009, 31(4): 357-362.
- [5] Herman E M, Helm R M, Jung R, *et al.* Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132: 36-43.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982: 202-203.
- [8] 张晓婷, 郑奇君, 高飞, 等. 蛋白质组学在水稻生长发育研究中的应用研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2011, 40(1): 1-5.
- [9] Wang Y Q, Peng X X. A two dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic study of rice leaves [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(2): 252-256.