

玉米叶绿体蛋白质提取及其双向电泳体系建立

杨彦芳,李娜娜,赵飞云,胡秀丽*
(河南农业大学 生命科学院,河南 郑州 450002)

摘要: 为了获得纯化、完整的玉米叶绿体蛋白质,以玉米品种郑单 958 为试验材料,利用差速离心与蔗糖密度梯度法分离叶绿体,并对其纯度和完整度进行检测;通过光学显微镜直接观察叶绿体的形态结构并测定过氧化氢酶的活性及 Hill 反应速率,证明已分离出纯度较高、完整的叶绿体。随后采用 2 种不同的蛋白质提取方法分别提取玉米叶绿体总蛋白质,并用 Bradford 法进行蛋白质定量,SDS-PAGE 电泳结果表明,TCA 丙酮沉淀法对玉米叶绿体蛋白质的提取不充分,而 TCA 丙酮与酚抽提相结合明显比 TCA 丙酮沉淀法效果好,提出的叶绿体蛋白质的条带数目多,丰度较高,并得到了较理想的玉米叶绿体双向电泳图。

关键词: 玉米;叶绿体;蛋白质;提取;双向电泳

中图分类号: Q942.5;S513 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)06-0024-05

Extraction and Establishment of Two-dimensional Electrophoresis System for Chloroplast Proteins of Maize

YANG Yanfang, LI Nana, ZHAO Feiyun, HU Xiuli*
(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to obtain the pure and intact chloroplast protein, the maize variety Zhengdan 958 was used as experimental material to isolate the chloroplasts by differential centrifugations, and then the intact chloroplasts were purified by sucrose density gradient method. The morphological structure and purity of chloroplasts were observed by optical microscope, and the catalase activity and Hill reaction rate were detected. The maize chloroplast proteins were extracted using two different methods and quantified by Bradford method. The SDS-PAGE electrophoresis results showed that the extraction of maize chloroplast proteins by TCA acetone precipitation method was insufficient. Compared with TCA acetone precipitation, the proteins extracted by TCA acetone and phenol extraction combination were high abundance and their two-dimensional electrophoresis figure was perfect.

Key words: *Zea mays*; chloroplast; protein; extraction; two-dimensional electrophoresis

叶绿体是高等植物进行光合作用的重要细胞器。在叶绿体中含有大量的蛋白质,已有研究证明,高等植物全蛋白质组大约包含 21 000~25 000 种蛋白质^[1-2],而叶绿体中的蛋白质占整个植物组织蛋白质的 10%~25%,说明在植物细胞中叶绿体起着非常重要的作用^[3]。叶绿体蛋白质组在整个细胞

代谢过程中起着至关重要的作用,包括光合作用和氨基酸的生物合成^[4]。对植物叶绿体蛋白质组学进行研究,有助于深入了解叶绿体在光合作用过程中发挥的重要作用。而制备完整纯化的玉米叶绿体是研究玉米叶绿体蛋白质组学、光合作用及其调控机制的重要基础。国内外研究人员对甘蔗^[5]、菠

收稿日期:2014-12-21
基金项目:国家自然科学基金项目(31171470)
作者简介:杨彦芳(1985-),女,河南濮阳人,在读硕士研究生,研究方向:分子生物学与蛋白质组学。
E-mail: yangyanfang090@126.com
* 通讯作者:胡秀丽(1976-),女,河南郑州人,副教授,博士,主要从事分子生物学与蛋白质组学研究。
E-mail: xiulihu@126.com

菜^[6-7]、拟南芥^[8]、水稻^[9]等植物已进行了叶绿体分离研究。近期对不同植物叶绿体蛋白质提取的研究已有报道,但对应用于双向电泳的玉米叶绿体蛋白质的研究还很少。本研究根据玉米叶片纤维素含量高的特点,在前人研究的基础上,对玉米叶绿体蛋白质进行了初步研究,旨在建立一种适宜于玉米叶绿体的分离及其蛋白质组研究的体系,为进一步研究玉米叶绿体蛋白质组学奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以耐干旱玉米品种郑单958为试验材料。用2% NaClO对玉米种子消毒10 min,自来水冲洗后浸种8 h,然后在培养箱中28℃发芽1 d,随后选取萌发一致的种子种在盛有培养介质的周转箱中,并放在光照培养箱中培养。光照培养箱的温度为28℃/22℃(昼/夜),光合有效辐射为400 μmol/(m²·s),相对湿度为75%±5%,光周期为14 h/10 h(昼/夜)。当玉米幼苗的第2片叶完全展开后,取下该叶片作为试验材料。

1.2 叶绿体的分离

1.2.1 粗叶绿体的提取 称取50 g玉米叶片置于200 mL预冷的叶绿体提取缓冲液(含0.33 mol/L山梨醇、10 mmol/L焦磷酸钠、4 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L抗坏血酸、2 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、0.1% BSA)中,匀浆机匀浆10 s,停10 s,重复5次,6层纱布过滤,滤液于4℃、1 500 r/min条件下离心10 min,取上清于4℃、4 000 r/min条件下离心15 min,所得沉淀即为粗叶绿体,用叶绿体提取缓冲液将沉淀悬浮备用^[10]。

1.2.2 蔗糖密度梯度纯化叶绿体 向50 mL离心管底部依次分别加入15 mL质量分数为30%和52%的蔗糖,取3 mL粗提叶绿体缓慢加入离心管,于4℃、6 000×g条件下离心10 min,在质量分数30%~52%蔗糖界面处的绿色区域即为完整的叶绿体,收集该层,用1/5叶绿体提取缓冲液悬浮,于4℃、4 500×g条件下离心10 min,沉淀即为完整纯化的叶绿体,用叶绿体提取缓冲液悬浮保存于4℃或直接用于提取蛋白质^[5-6]。分别取1 mL纯化后的叶绿体进行以下各项试验,每项试验设3次重复。

1.3 叶绿素含量的测定

叶绿素含量依据严衍禄等^[11]和Hu等^[12]的方法测定。取1 mL纯化的叶绿体,4℃、4 000 r/min条件下离心10 min,弃去上清液,加入1 mL体积分数95%的乙醇混匀,随后倒入研钵中匀浆,滤纸过滤,

并用乙醇定容至25 mL,利用分光光度计测665 nm和649 nm处的吸光度,按照下面的公式计算叶绿素的含量:

$$\text{叶绿素 a 含量} = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$$

$$\text{叶绿素 b 含量} = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$$

1.4 叶绿体纯度的鉴定

1.4.1 光学显微镜检测 利用光学显微镜观察叶绿体的形态结构,观察所提的叶绿体是否有杂质存在。

1.4.2 过氧化氢酶活性检测 过氧化氢酶活性测定参照Bhushan等^[13]的方法。在比色皿中加入960 μL 50 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH值7.5)和粗提叶绿体或纯化叶绿体各30 μL,反应起始时加入10 μL体积分数3%的过氧化氢,记录5 min内240 nm下吸光度的变化情况,以不加过氧化氢的反应体系为对照。通过比较粗提叶绿体与纯化叶绿体在240 nm处的吸光度值判断所提叶绿体的纯度。

1.5 叶绿体完整度的测定

通过Hill反应速率测定叶绿体被膜完整度。根据邹琦^[14]的方法测定叶绿体的Hill反应速率。反应液含有0.33 mol/L山梨醇、1 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L MnCl₂、2 mmol/L EDTA、5 mmol/L焦磷酸钠、50 mmol/L Tris-HCl(pH值7.6)、10 mmol/L铁氰化钾、10 mmol/L NH₄Cl,向反应液中加入0.1 mL叶绿体,用氧电极测定未胀破叶绿体的放氧速率。测胀破叶绿体的放氧速率时,向上述0.1 mL叶绿体溶液中加入0.9 mL蒸馏水并搅拌,使叶绿体被膜胀破,在相同条件下测定放氧速率。

$$\text{叶绿体被膜完整度} = (A - B) / A \times 100\%$$

式中:A为胀破叶绿体单位时间内的放氧量;B为未胀破叶绿体单位时间内的放氧量。

1.6 蛋白质提取及含量测定

1.6.1 TCA丙酮沉淀法 取制备好的叶绿体,用10% TCA丙酮低温快速研磨,分装于2 mL的离心管中,-20℃放置1 h,4℃、12 000 r/min条件下离心10 min,弃上清液,用丙酮(含体积分数0.07%β-巯基乙醇)清洗沉淀2~3次至上清为无色,沉淀于通风橱中晾干,加入200 μL定量液(含4 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、50 mmol/L Tris-HCl(pH值6.8)、20 mmol/L DTT、体积分数0.1% SDS),使沉淀充分溶解,20℃、12 000 r/min条件下离心15 min,取上清液,保存于-20℃备用。

1.6.2 TCA丙酮与酚抽提相结合法 起始与TCA丙酮沉淀法相同,当沉淀晾干后,加入约800 μL蛋白质提取液(含体积分数10% SDS、1 mol/L Tris-

HCl(pH 值 7.6)、1 mol/L DTT、500 mmol/L EDTA - Na₂、质量分数 30% 蔗糖),混匀,于 42 ℃ 水浴锅中水浴 30 min,摇床振荡 10 min,使蛋白质充分溶解,20 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清加入等体积的 Tris - 平衡酚,20 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,吸取上清液,以 1:4 的体积比加入 0.1 mol/L 乙酸铵甲醇,-20 ℃ 过夜沉淀,4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液,加 1 mL 甲醇悬浮沉淀,4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液,用冷丙酮清洗沉淀 2~3 次,4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min,于通风橱中晾干沉淀,加入 200 μL 定量液,使沉淀充分溶解,20 ℃、12 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液,保存于 -20 ℃ 备用。采用 Bradford^[15] 的方法测定蛋白质的含量。

1.7 SDS - PAGE 及双向电泳

试验过程中所用分离胶质量分数为 13.5% ,染

色液为考马斯亮蓝 G - 250,脱色液为体积分数 10% 的乙酸。等电聚焦中所用 IPG 胶条长为 11 cm, pH 值 4~7,以上试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 玉米叶绿体纯度、被膜完整度的检测结果

从图 1 中可以看出,叶绿体在纯化前后杂质明显减少,表明已获得较纯的叶绿体。通过测定 240 nm 处过氧化氢的吸光度,间接反映过氧化氢酶的活性。由图 2 可知,随着反应时间的延长,粗提叶绿体中过氧化氢的吸光度逐渐下降,即过氧化氢含量逐渐降低;纯化叶绿体中过氧化氢含量也在降低,但降低幅度较小,说明粗提叶绿体中过氧化氢酶的活性明显比纯化后的叶绿体中过氧化氢酶活性高,提取的叶绿体具有较高的纯度。

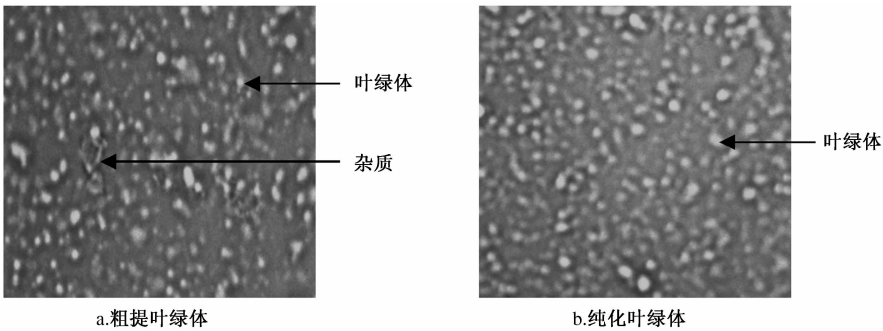


图 1 光学显微镜观察叶绿体纯化前后的变化(1 000 ×)

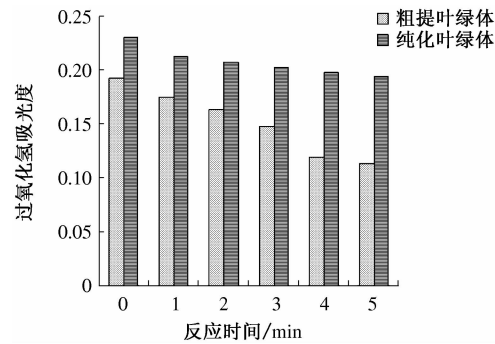


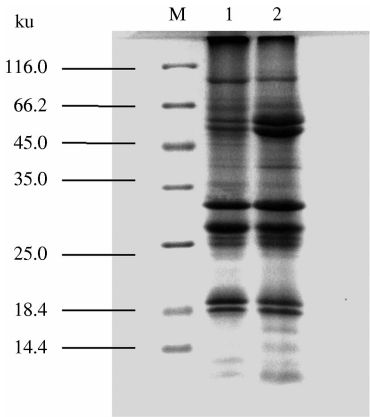
图 2 叶绿体纯化前后不同反应时间过氧化氢吸光度的变化

通过氧电极测出未胀破叶绿体的 Hill 反应速率为 11.9 μmol/(mg · h),胀破叶绿体的 Hill 反应速率为 136.4 μmol/(mg · h),由叶绿体被膜完整度公式可知,叶绿体被膜完整度为 91.3% ,说明所提叶绿体具有较高的完整度。

2.2 2 种蛋白质提取方法的比较

图 3 显示,2 种方法提取的蛋白质在各个分子质量区域中都得到了比较清晰的分离。但是,与 TCA 丙酮与酚抽提相结合法相比,TCA 丙酮沉淀法

在低分子质量区域(18.4 ku 以下)有一些蛋白质条带的丢失;在高分子质量区域(45~66.2 ku)有一些蛋白质的丰度有所降低。说明 TCA 丙酮沉淀法对玉米叶绿体总蛋白质的提取不充分,而 TCA 丙酮与酚抽提相结合法更适宜于玉米叶绿体总蛋白质的提取。



1. TCA 丙酮沉淀法; 2. TCA 丙酮与酚抽提相结合法

图 3 2 种蛋白质提取方法的叶绿体蛋白质 SDS - PAGE 电泳结果

2.3 玉米叶绿体蛋白质双向电泳及图像分析

通过 TCA 丙酮与酚抽提相结合法提取玉米叶绿体总蛋白质,将 800 μg 蛋白质样品均匀加入水化槽中并于等电聚焦仪完成等电聚焦,随后采用 SDS - PAGE 进行垂直电泳,经过染色、脱色和扫描获得了分辨率高、重复性较好的玉米叶绿体蛋白质双向电泳图像(图 4)。蛋白质双向电泳图像分析结果表明,蛋白质具有较广的分布范围,基本覆盖了凝胶的各个区域,蛋白质点清晰,拖尾较少,叶绿体总蛋白质得到了较好的分离。

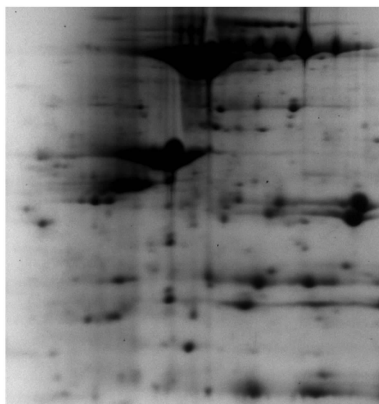


图 4 玉米叶绿体蛋白质双向电泳结果

3 结论与讨论

由于叶绿体与其他亚细胞结构密度相差较大,用差速离心法比较容易分离。完整叶绿体的提取可以先用差速离心法制备粗提叶绿体,再通过蔗糖密度梯度离心法进一步纯化。孙富等^[5]研究表明,蔗糖密度梯度离心法所提取的叶绿体完整度比 Percoll 梯度离心法增加 13.5%。另外,张年辉^[16]用蔗糖密度梯度方法分离的完整叶绿体的完整性大于 90%。本研究结果表明,差速离心法和蔗糖密度梯度离心法相结合能够分离出纯化、完整的叶绿体。

双向电泳技术在植物研究中的应用越来越广泛,但是决定双向电泳图谱质量高低的关键因素是蛋白质的提取^[17-18]。提取的蛋白质纯度高才能得到质量好的电泳图谱。目前,研究蛋白质提取的方法有很多种,例如:TCA 丙酮沉淀法、Trizol 沉淀法、Tris - HCl 法、尿素 - 硫脲法、酚法等。但是,没有一种方法可以适用于所有植物蛋白质的提取,因为每种植物所含有的化学成分不同,所以应根据需要选择不同的蛋白质提取方法。本研究根据玉米叶片纤维素含量高的特点,选取 TCA 丙酮沉淀法和 TCA 丙酮与酚抽提相结合法比较玉米叶绿体的蛋白质提取效果。在玉米叶绿体蛋白质提取中,由于 TCA 丙

酮沉淀法提出的蛋白质含杂质较多,本试验采用 TCA 丙酮沉淀法提取出玉米叶绿体蛋白质后,进一步对蛋白质进行了纯化,SDS - PAGE 电泳图谱显示得到了较清晰的电泳条带。对大多数植物组织来说,TCA 丙酮与酚抽提相结合法增强了基于双向电泳的蛋白质组分析^[19-22]。蛋白质样品的制备是蛋白质组学首要且关键的技术。本试验在制备蛋白质样品的过程中,用 0.1% SDS 与尿素、硫脲相结合,再溶入 DTT 和 Tris - HCl (pH 值 6.8) 溶解蛋白质干粉,促使了更多蛋白质的溶解。本研究结果表明,TCA 丙酮沉淀法对玉米叶绿体蛋白质的提取不充分,而 TCA 丙酮与酚抽提相结合法更适宜于玉米叶绿体总蛋白质的提取,明显比 TCA 丙酮沉淀法效果好,且得到了较理想的玉米叶绿体双向电泳图。本研究结果为玉米叶绿体蛋白质组学的研究提供了有力的参考依据,为下一步研究玉米叶绿体亚细胞蛋白质组学奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bouchez D, Hofte H. Functional genomics in plants [J]. Plant Physiol, 1998, 118 (3): 725-732.
- [2] Meinke D W, Cherry J M, Dean C. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis [J]. Science, 1998, 282: 679-682.
- [3] Peltier J B, Friso G, Kalume D E, et al. Proteomics of the chloroplast: Systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins [J]. The Plant Cell, 2000, 12 (3): 319-341.
- [4] Kleffmann T, Russenberger D, Von Zychlinski A, et al. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions [J]. Current Biology, 2004, 14 (5): 354-362.
- [5] 孙富, 黄巧玲, 黄兴, 等. 甘蔗叶绿体分离及其蛋白质提取方法的研究 [J]. 南方农业学报, 2011, 42 (5): 463-467.
- [6] 唐新科, 周平兰, 谭爱武. 菠菜叶绿体蛋白质提取与分离 [J]. 湘潭师范学院学报: 自然科学报, 2008, 30 (4): 33-35.
- [7] Gilles M, Roland D. Slow passive diffusion orthophosphate between intact isolated chloroplasts and suspending medium [J]. Plant Physiology, 1981, 67: 470-473.
- [8] Aronsson H, Jarvis P. A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts [J]. FEBS Letter, 2002, 529: 215-220.
- [9] Tanaka N, Fujita M, Handa H, et al. Proteomics of the rice cell: Systematic identification of the protein populations in subcellular compartments [J]. Molecular Genetics and

Gnomics,2004,271:566-576.

[10] Munnebosch S, Alegrel L. Drought-induced changes in the redox state of-tocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of labiatae species differing in carnisic acid contents[J]. Plant Physiology,2003,131(4):1816-1825.

[11] 严衍禄,刘心生. 叶绿素测定方法的研究[J]. 北京农业大学学报,1982,8(2):53-67

[12] Hu X L, Wu X L, Li C H, et al. Absciscic acid refines the synthesis of chloroplast proteins in maize (*Zea mays*) in response to drought and light [J]. Plos One, 2012, 7(11):e49500.

[13] Bhushan D, Pandey A, Chattopadhyay A, et al. Extracellular matrix proteome of chickpea (*Cicer arietinum* L.) illustrates pathway abundance, novel protein functions and evolutionary perspective [J]. Proteome Res, 2006, 5(7):1711-1720.

[14] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

[15] 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 Biochemisry,1976,72:248-254.

[16] 张年辉. 优化的蔗糖密度梯度离心法分离完整叶绿体[J]. 实验技术与管理,2010,27(7):44-46.

[17] 贾岩龙,柴玉荣,曲东京,等. 杜氏盐藻完整叶绿体的分离及其蛋白提取[J]. 生物技术通报,2008(3):135-138.

[18] 朱宏,张中恒,王同昌,等. 小麦叶片蛋白质双向电泳的改良[J]. 东北林业大学学报,2004,32(4):68-69.

[19] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. Proteomics,2004,4:2522-2532.

[20] Wang W, Vignani R, Scali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues proteomic analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27:2782-2786.

[21] 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.

[22] 刘伟霞,潘映红. 适用于小麦叶片蛋白质组分析的样品制备方法[J]. 中国农业科学,2007,40(10):2169-2176.

(上接第 12 页)

confers sheath blight resistance[J]. Biologia Plantarum, 2010,54(3):443-450.

[51] M'hamdi M, Chikh-Rouhou H, Boughalleb N, et al. Ribosome Inactivating Protein of barley enhanced resistance to *Rhizoctonia solani* in transgenic potato cultivar 'Desirée' in greenhouse conditions [J]. Biotechnol Agron Soc Environ,2013,17(1):20-26.

[52] Kim J K, Jang I C, Wu R, et al. Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight [J]. Transgenic Research, 2003,12:475-484.

[53] M'hamdi M, Chikh-Rouhou H, Boughalleb N, et al. Enhanced resistance to *Rhizoctonia solani* by combined expression of chitinase and ribosome inactivating protein in transgenic potatoes (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Spanish Journal of Agricultural Research,2012,10(3):778-785.

[54] Datta K, Tu J, Oliva N, et al. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars [J]. Plant Science,2001,160(3):405-414.

[55] Kumar K K, Poovannan K, Nandakumar R, et al. A high throughput functional expression assay system for a defense gene conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani* [J]. Plant Science,2003,165:969-976.

[56] Kim J K, Duan X, Wu R, et al. Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance bar gene[J]. Molecular Breeding,1999,5:85-94.

[57] Moon Y H, Song S K, Choi K W, et al. Expression of a cDNA encoding *Phytolacca insularis* antiviral protein confers virus resistance on transgenic potato plants[J]. Mol Cells,1997,7(6):807-815.

[58] Krishnan R, McDonald K A, Dandekar A M, et al. Expression of recombinant trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, in transgenic tobacco[J]. Journal of biotechnology,2002,97(1):69-88.

[59] Vandenbussche F, Peumans W J, Desmyter S, et al. The type-1 and type-2 ribosome-inactivating proteins from *Iris* confer transgenic tobacco plants local but not systemic protection against viruses [J]. Planta, 2004, 220:211-221.