

何丽平,吴友根,张军锋,等. 广藿香叶片总蛋白双向电泳体系的建立[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):306-309.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.088

# 广藿香叶片总蛋白双向电泳体系的建立

何丽平, 吴友根, 张军锋, 胡新文

(热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学园艺园林学院,海南海口 570228)

**摘要:**比较 2 种方法提取广藿香叶片总蛋白质的得率与聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白条带,同时对广藿香叶片总蛋白质双向电泳条件进行了优化,利用 MALDI-TOF-TOF 和 Swiss-Prot 软件对部分蛋白点进行质谱鉴定。结果表明:使用 TCA/丙酮法提取广藿香叶片总蛋白,在 10 万 Vhs 聚焦强度下,可获得高分辨率双向电泳图谱,BPP 酚抽法获得的蛋白不适用于双向电泳分析;经质谱成功鉴定了 9 个蛋白点,鉴定成功率 90%。

**关键词:**广藿香;叶片;双向电泳;蛋白质提取

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0306-04

广藿香[*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]为唇形科刺蕊草属植物,是我国常用中药,具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑等功效<sup>[1]</sup>,是著名国家中药保护品种藿香正气丸(胶囊、水)和抗病毒口服液的重要原料,也是其他 30 多种中成药的主要原料<sup>[2]</sup>。但是广藿香连作障碍现象十分突出,造成产量和品质明显下降,每茬收获后必须间种其他农作物后方可再种,严重影响了广藿香规范化生产与种植、药农种植积极性和区域经济发展,从而难以保障广藿香药材的质量及其标准化、现代化的实施。据报道,广藿香连作障碍的原因可归结为根系分泌物质的自毒作用<sup>[3]</sup>和根际微生物群落多样性变化<sup>[4]</sup>,但无论何种机制,连作障碍现象都最终在广藿香植株上表现出来。近年来,随着现代系统生物学的快速发展,差异蛋白质组学技术逐渐成为研究连作障碍机理的有力工具,其中蛋白质双向电泳(2-DE)图谱的建立是进行蛋白质组学分析的前提和基础,而蛋白样品的制备则是双向电泳技术的核心与关键。本研究比较不同的广藿香叶片总蛋白提取与分离方法,旨在为广藿香叶片差异蛋白质组学分析奠定基础,进而为揭示广藿香连作障碍机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收稿日期:2015-03-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360210,81360618);海南省中药现代化专项资金项目(编号:ZY201413)。

作者简介:何丽平(1990—),女,四川内江人,硕士研究生,研究方向为南药植物资源与利用。E-mail:lipinghe18@163.com。

通信作者:吴友根,博士,教授,主要从事南药种质资源、活性成分及其开发利用的教学与科研工作。E-mail:wygeng2003@163.com。

广藿香植物材料于 2014 年 4 月种植于海南大学园艺园林学院广藿香种质资源圃。当年 11 月采集植株叶片,液氮速冻保存,用于总蛋白质提取。

### 1.2 试剂

三氯乙酸(TCA)、尿素(urea)、硫脲(thiourea)、3-[ (3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、硫酸铵、考马斯亮蓝 G-250,购自美国 Sigma 公司。24 cm IPG 胶条(pH 值 4~7)和琼脂糖,购自瑞典 GE Healthcare 公司。丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP),购自美国 Bio-Rad Labs 公司。其他药品均为国产分析纯,购自北京化工厂。

### 1.3 方法

**1.3.1 蛋白质样品的制备** 分别称取广藿香叶片 2 份,每份 1 g,分别放于预冷研钵中,加入适量 PVPP,用液氮研磨至粉末,装入离心管,-80℃冰箱中保存待用。广藿香叶片总蛋白提取流程按照 TCA/丙酮法、BPP(四硼酸钠/交联聚乙烯吡咯烷酮/苯酚 Borax/PVPP/Phenol)酚抽法进行。

**1.3.1.1 TCA/丙酮法** 参照 Wang 等提取顽拗植物组织蛋白的方法<sup>[5]</sup>,并略有改动。将 1 g 材料粉末加入 10 mL 预冷的含 10% TCA、0.07% 巯基乙醇的丙酮中,充分混匀后,-20℃沉淀过夜,4℃、15 000 g 离心 30 min,弃上清液。加入 10 mL 预冷的含 0.07% 巯基乙醇的丙酮,混匀后-20℃放置 1 h,4℃、15 000 g 离心 30 min,弃上清液。以上步骤重复 2 次。将沉淀用甲醇洗涤 2 次,丙酮洗涤 2 次,室温干燥后溶解于蛋白裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,2% CHAPS,13 mmol/L DTT)中,-20℃保存备用。

**1.3.1.2 BPP 酚抽法** 采用 BPP 法<sup>[6]</sup>提取蛋白质。1 g 材料粉末中加入 5 mL BPP 蛋白提取液[100 mmol/L EDTA,

[18]盛华刚,朱立俏,张超,等. 金荞麦提取液的大孔树脂分离纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(15):1832-1835.

[19]盛华刚,林桂涛. 大孔树脂纯化夏枯草总黄酮和总皂苷工艺研究[J]. 山东中医药大学学报,2012,36(5):436-438.

[20]中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2000.

[21]刘斌,石任兵,余超. 影响大孔吸附树脂吸附分离中草药化学成分的因素[J]. 中草药,2002,33(5):475-476.

[22]何泉宇. 大叶蛇葡萄标准提取物制备工艺及其初步稳定性研究[D]. 湖北:湖北中医药大学,2012:1-59.

[23]贾韶千,吴彩娥,杨剑婷,等. 枸杞中黄酮类化合物纯化工艺的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2010,34(2):85-88.

10 mmol/L Tris, 50 mmol/L 硼砂, 50 mmol/L 维生素 C, 1% PVPP (W : V), 1% Triton - 100 (V : V), 2% 2 - 巯基乙醇 (V : V)、30% 蔗糖 (W : V), pH 值 8.0]。在室温下涡旋混匀 10 min, 再加入等体积的 Tris 饱和酚 (pH 值 > 7.8)。室温涡旋 10 min, 4 ℃、15 000 g 离心 15 min。转移上层酚相至另一个新离心管, 加入等体积蛋白提取液, 室温涡旋 5 min, 4 ℃、15 000 g 离心 15 min。吸取上层清液转入另一个新离心管, 并加入 5 倍体积冰冷的过饱和硫酸铵甲醇溶液, 混匀后在 -20 ℃ 沉淀 6 h 以上。4 ℃、15 000 g 离心 15 min, 去除上清液, 收集沉淀。将沉淀用甲醇洗涤 2 次, 丙酮洗涤 2 次, 室温干燥后溶解于蛋白裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 13 mmol/L DTT) 中, -20 ℃ 保存备用。

**1.3.2 蛋白定量** 蛋白质质量主要参考 Bradford 的方法<sup>[7]</sup>, 在紫外分光光度计上进行蛋白浓度测定, 用牛血清蛋白 (BSA) 作为标准蛋白, 绘制标准曲线, 测定样品在波长 595 nm 处的吸光度, 每个样品至少重复 3 次, 计算样品蛋白浓度。

### 1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS - PAGE) 电泳

**1.3.3.1 一维凝胶电泳 (1 - DE)** 1 - DE 主要采用不连续胶 SDS - PAGE 法<sup>[8]</sup>, 用 4% 浓缩胶和 12.5% 分离胶进行电泳分离, 蛋白梯度上样分别为 10、20、30 μg, 电泳参数设置为 5 W/gel 50 min, 7 W/gel 2 h。

**1.3.3.2 二维凝胶电泳 (2 - DE)** 第 1 向等电点聚焦在 Ettan IPGphor II 等电聚焦仪 (GE Healthcare) 上完成。使用 24 cm 的 pH 值 4 ~ 7 线性 IPG (GE Healthcare) 干胶条, 每根胶条上样量为 1 300 mg 蛋白, 上样体积 455 μL, 常温水化 18 h, 每根胶条上覆盖 5 mL 矿物油防止样品挥发。采用 2 种聚焦程序, 设定为: 250 V, 3 h; 500 V, 2 h; 1 kV, 1 h; 8 kV, 3 h; 8 kV 下进行 10 万 Volt hour (Vhs) 和 11 万 Vhs 聚焦, 每根胶条限流 50 μA。第 2 向电泳前进行胶条平衡, 将聚焦好的胶条放入平衡缓冲液 (50 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.02% 溴酚蓝) 中平衡, 先后浸泡在 1% DTT 的胶条平衡液和含 4% 碘乙酰胺的胶条平衡液中, 各

15 min。平衡结束后, 转移胶条垂直放于 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶的上端, 用含有适量溴酚蓝的 1% 琼脂糖封住胶条, 保证胶条与凝胶充分接触, 在 Ettan Dalt six 电泳仪 (GE Healthcare) 中进行电泳, 电泳参数设置为 5 W/gel 1 h, 7 W/gel 3.5 h。

**1.3.4 凝胶染色及图像采集分析** 凝胶染色主要采用考马斯亮蓝 (G - 250) 染色液进行染色<sup>[9]</sup>。脱色干净的凝胶采用 Image Scanner III 扫描仪 (GE Healthcare) 进行扫描, 扫描设置为灰阶 256, 投射扫描, 分辨率为 300 dpi, 图像以 TIF 格式保存, 用 ImageMaster 2D Platinum 软件 (Amersham Bioscience) 进行图像分析。

**1.3.5 蛋白质质谱鉴定** 挖取感兴趣的蛋白点, 使用简化胶内酶解法进行酶解<sup>[10]</sup>。酶解得到的肽段混合物质谱鉴定 (MALDI - TOF MS) 采用 AB SCIEX 公司的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪 (5800 MALDI - TOFMS/MS)。将获得的胰蛋白酶解肽段信息通过 Mascot 引擎搜索 NCBI 中的绿色植物数据库, 获得蛋白鉴定信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取方法获得的总蛋白量及 SDS - PAGE 电泳单向条带比较

由图 1 - a 可知, 采用 TCA/丙酮法可从 1 g 广藿香叶片材料中提取 4.61 mg 蛋白, 采用 BPP 酚抽法可以得到 7.79 mg 蛋白。利用 2 种方法提取所得的广藿香叶片总蛋白 SDS - PAGE 电泳条带见图 1 - b。结果表明, 采用梯度上样量 10、20、30 μg 蛋白质样品进行 SDS - PAGE 电泳后, TCA/丙酮法与 BPP 酚抽法提取的蛋白质条带数量差别不大, 但在条带清晰度上有较大差异。TCA/丙酮法所得蛋白产量低于 BPP 酚抽法所得蛋白产量, 但是其电泳条带清晰; 而 BPP 酚抽法在 30 ~ 42 ku 处以及 52 ~ 75 ku 处条带较为模糊。说明 BPP 酚抽法所提取的蛋白质纯度不够, 含有干扰物质等杂质, 可直接影响其蛋白定量和 SDS - PAGE 电泳过程。

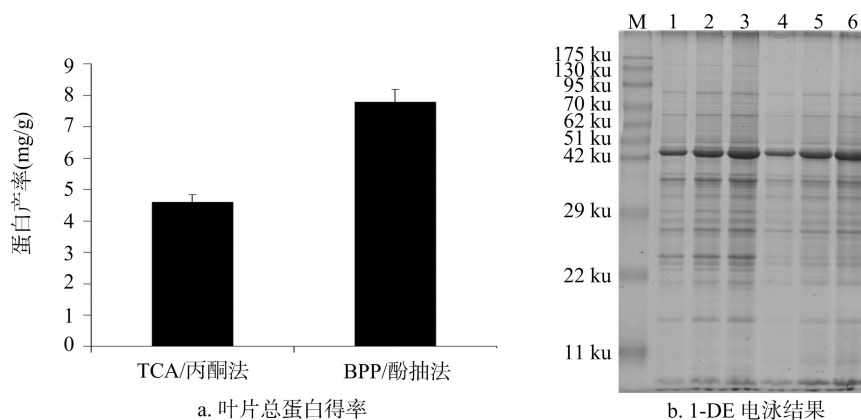


图1-b中泳道1~3为TCA/丙酮法提取的总蛋白电泳条带, 蛋白上样量依次为10、20、30 μg; 泳道4~6为BPP酚抽法提取的总蛋白电泳条带, 蛋白上样量依次为10、20、30 μg

图1 不同提取方法总蛋白产量和 SDS-PAGE 电泳结果

### 2.2 广藿香叶片蛋白的 2 - DE 分析

如图 2 所示, 利用 BPP 酚抽法得到的样品蛋白 2 - DE 图

谱中蛋白点数量较少 (183 个), 形状不圆滑, 横条纹、纵条纹也较多, 说明该方法得到的样品中确实有大量干扰物质存在,

与 SDS-PAGE 电泳蛋白条带反映的结果一致。所以,尽管通过 BPP 酚抽法得到的样品蛋白量较多,但因其质量无法满足双向电泳的要求,不能用于广藿香叶片蛋白质组学分析。TCA/丙酮法得到的 2-DE 图谱中蛋白点数量较多(579 个),形状多数圆滑,尤其集中在 pH 值 5~6 范围内。TCA/丙酮法所得图谱分辨率比 BPP 酚抽法好,可见 TCA/丙酮提取法可减少广藿香叶片总蛋白质在提取过程中的蛋白质损失,有效

去除广藿香叶片中次生代谢物质等杂质,表现为所获得电泳图谱中蛋白质点数量多,蛋白点清晰,无拖尾现象。

对 TCA/丙酮法所得总蛋白进行不同聚焦强度比较,由图 3 可以看出,聚焦 10 万 Vhs 条件下,中高分子量处蛋白点的聚焦情况有明显改善,蛋白点的分离效果相对较好,蛋白点数明显多于聚焦 11 万 Vhs,这可能与聚焦过度引起部分蛋白点丢失有关。

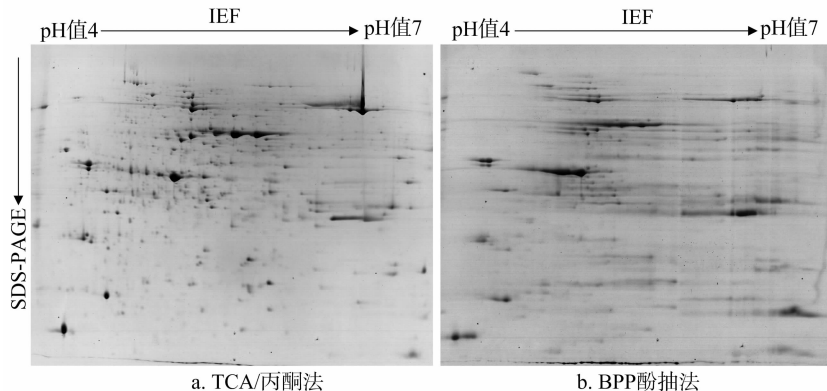


图2 2种提取方法所得广藿香叶片总蛋白的 2-DE 图谱(聚焦11万Vhs)

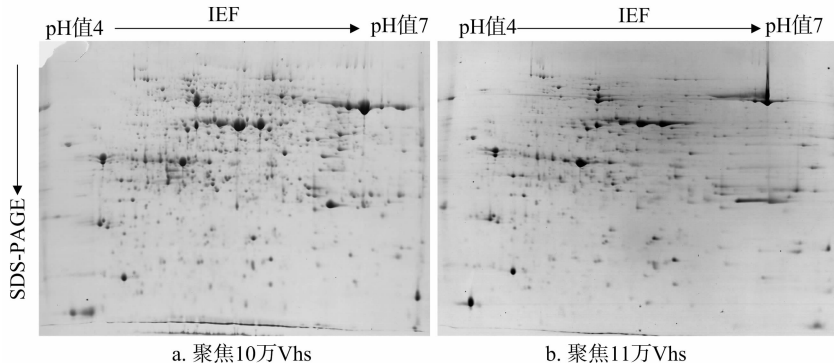


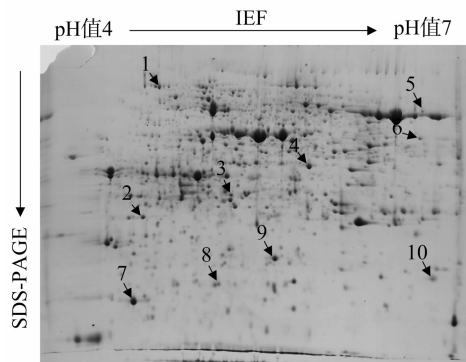
图3 不同等电点聚焦强度所得广藿香叶片总蛋白的 2-DE 图谱

### 2.3 质谱鉴定与功能分析

对利用 TCA/丙酮法获得的 10 个高分辨率蛋白点(图 4)进行质谱鉴定,其中 9 个蛋白点被成功鉴定(蛋白得分 > 49),鉴定成功率 90%(表 1),表明该方法所得蛋白点具有良好的质谱兼容性。蛋白点 1 为热激蛋白 70,是热激蛋白家族的一员,在细胞内主要参与新生肽的折叠与成熟、损伤蛋白的降解和蛋白运输。蛋白点 3 为预测蛋白——谷胱甘肽 S-转移酶 L3 状 X1 异构亚型,是谷胱甘肽代谢的膜相关蛋白,在植物的初级代谢和二级代谢、胁迫耐受和细胞信号转导中行使功能,从而影响植物生长发育。蛋白点 5 为预测蛋白——二氢硫辛酸脱氢酶,它以 FAD 为辅基,是参与丙酮酸形成乙酰-CoA 以及  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢形成琥珀酰-CoA 过程中多酶体系的一种酶。蛋白点 10 为光合系统 I 反应中心第 4 单元叶绿体蛋白,其功能是稳定 Psac 与光合反应中心之间的相互作用,协助铁氧还原蛋白与光合系统的对接,与铁氧还原蛋白——NADP 还原酶互作。

### 3 结论与讨论

样品制备是蛋白质组学研究的重要因素,样品质量好坏直接决定电泳图谱进行软件分析的结果。最优的样品制备方



箭头所示的点为进行质谱鉴定的蛋白点  
图4 广藿香叶片总蛋白质谱鉴定的 2-DE 图谱

法应该能有效除去影响蛋白质可溶性和电泳分离结果的各种杂质,防止蛋白变性,保持其活性,减少蛋白质的降解、磷酸化和甲基化修饰,并有高的分辨率和良好的重复性。

然而广藿香叶片组织中含有大量挥发油、黄酮类、倍半萜类、萜类、蒽醌类等次生代谢物<sup>[11-13]</sup>,这些不利因素将直接导致难以获得无污染、无修饰、完整、高质量的植物细胞蛋白质,严重影响蛋白质的提取效果、等电聚焦及双向电泳图谱的分辨率。TCA/丙酮法、BPP 酚抽法是 2 种常用的蛋白质提取方

表 1 广藿香叶片蛋白点的质谱鉴定信息

蛋白点	蛋白名称	NCBI 登录号	蛋白点得分	匹配肽段数(个)	等电点/分子量(ku)	物种
1	热激蛋白 70	gi 2654208	526	7(4)	5.19/76.27	<i>Spinacia oleracea</i>
2	假设蛋白 EUGRSUZ_K02606	gi 629082550	438	4(3)	7.76/30.12	<i>Eucalyptus grandis</i>
3	预测:谷胱甘肽 S-转移酶 L3 状 X1 异构亚型	gi 697182383	103	1(1)	4.95/27.26	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>
4	假设蛋白 MIMGU_mgv1a008865 mg	gi 604319636	472	4(3)	8.68/40.81	<i>Erythranthe guttata</i>
5	预测:二氢硫辛酸脱氢酶	gi 697162914	259	5(3)	6.96/53.69	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>
6	未知蛋白	gi 217071898	96	3(0)	6.52/48.48	<i>Medicago truncatula</i>
8	假设蛋白 MIMGU_mgv1a014752 mg	gi 604319857	196	1(1)	4.99/19.85	<i>Erythranthe guttata</i>
9	未知蛋白	gi 255627487	99	1(1)	8.67/24.54	<i>Glycine max</i>
10	复合名:全=光合系统 I 反应中心第 4 单元叶绿体蛋白;缩= PSI-E;标志:前体	gi 131178	78	2(0)	9.99/13.36	<i>Spinacia oleracea</i>

注:蛋白点代表图 4 中的蛋白点号;蛋白名称代表鉴定出来的蛋白名称;NCBI 登录号代表 NCBI 数据库中的登录号;蛋白点得分代表检索软件 Mascot 计算得分;蛋白点 7 经质谱鉴定,未鉴定成功(蛋白得分小于 49 分)。匹配肽段数括号内数值代表总匹配肽段数中可信值大于 95% 的肽段数。

法。TCA/丙酮法可有效沉淀蛋白<sup>[14]</sup>,能够抑制蛋白酶活性,消除蛋白质水解作用和其他蛋白酶的修饰作用,有效降低蛋白样品中盐、糖、脂类、核酸等杂质对试验的干预<sup>[15]</sup>。BPP 酚抽提法虽然被广泛应用于植物组织蛋白质提取,但对于广藿香叶片材料并不适用。在影响等电聚焦的因素中,等电聚焦强度对获得理想的 2-DE 图谱至关重要<sup>[16]</sup>。不同植物甚至同一植物不同组织的蛋白样品分离所需的等电聚焦强度不同,同一样品不同胶条长度所需的等电聚焦强度也有差别。本研究使用的胶条长 24 cm,承载的蛋白量多,聚焦充分,蛋白点分离效果好,便于进行蛋白质组学的研究。比较不同聚焦强度下的广藿香叶片蛋白的 2-DE 图谱后,发现在 10 万 Vhs 聚焦强度下,蛋白点最多,可达 613 个蛋白点,且分离效果好。从 2-DE 凝胶选取的 10 个蛋白点中鉴定出 9 个蛋白点,这些蛋白质参与光合反应、代谢及能量代谢,表明使用 TCA/丙酮法提取广藿香叶片总蛋白,聚焦强度为 10 万 Vhs 时,不仅能得到理想的 2-DE 图谱,而且分离的蛋白点具有良好的质谱兼容性。本研究为广藿香叶片蛋白质组学研究奠定了坚实基础,也为其他中药材的叶片总蛋白提取提供了依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2009.

[2] 吴友根,郭巧生,郑焕强. 广藿香本草及引种历史考证的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(20):2114-2117,2181.

[3] 李玲梅,李明. 广藿香根系分泌物的化感自毒作用研究[J]. 湖北农业科学,2011,50(24):5168-5171.

[4] 吴友根,郭巧生,郑焕强. 广藿香种植土壤和药材中有机氯农药及重金属残留分析[J]. 中国中药杂志,2008,33(13):1528-1532.

[5] Wang W, Scali M, Vignani R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds[J]. Electrophoresis, 2003, 24(14):2369-2375.

[6] Saravanan R S, Rose J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. Proteomics, 2004, 4(9):2522-2532.

[7] 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(1/2):248-254.

[8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259):680-685.

[9] Wang X C, Wang D Y, Wang D, et al. Systematic comparison of technical details in CBB methods and development of a sensitive GAP stain for comparative proteomic analysis[J]. Electrophoresis, 2012, 33(2):296-306.

[10] 王旭初,范鹏祥,李银心. 一种适用于质谱分析的简化胶内酶解方法[J]. 植物生理与分子生物学报,2007,33(5):449-455.

[11] Wu Y G, Guo Q S, He J C, et al. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(1):63-72.

[12] Wu Y G, Li C G, Li X C, et al. Comparison of the essential oil compositions between *pogostemon cablin* and *agatache rugosa* used as herbs[J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2013, 16(6):705-713.

[13] Wu L H, Wu Y G, Guo Q S, et al. Comparison of genetic diversity in *Pogostemon cablin* from China revealed by RAPD, morphological and chemical analyses[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(18):4549-4559.

[14] 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(7):52-54.

[15] Tsugita A, Kamo M. 2-D electrophoresis of plant proteins[J]. Meth Mol Biol, 1999, 112:95-97.

[16] 王凤茹. 双向电泳应该注意的几个关键问题[J]. 生物技术通报, 2005(6):62-64.