

王琳,范云峰,梁建生.双向电泳中不同样品裂解液对水稻叶片疏水蛋白溶解效果比较[J].江苏农业科学,2017,45(18):54-56.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.013

双向电泳中不同样品裂解液对水稻叶片疏水蛋白溶解效果比较

王琳,范云峰,梁建生

(扬州大学生物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

摘要:为更好地溶解水稻叶片疏水蛋白,比较 4 种常用裂解液分别含有 4% 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲胺]-1-丙磺酸(CHAPS)、2% CHAPS+2% SB3-10、4% ASB-14、4% TritonX-100 去垢剂配方对水稻叶片疏水蛋白溶解性的影响。结果表明,含有 4% CHAPS 去垢剂的裂解液对水稻叶片疏水蛋白的溶解效果最佳。

关键词:双向电泳;裂解液;疏水蛋白;溶解效果

中图分类号: S188;S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0054-02

双向电泳(2-DE)中样品裂解液发展最大的限制来源于既要尽可能充分地溶解样品,又要保证不影响等电聚焦(isoelectric-focusing,简称 IEF)。对于膜蛋白,用脲和硫脲组合作为离液剂已成共识^[1-5],所以选择恰当的去垢剂是改进裂解液配方的突破口。去垢剂主要有离子型、非离子型和两性离子型 3 类。离子型去垢剂一般不用于 IEF,以十二烷基硫酸钠(SDS)为代表。传统的非离子型去垢剂多以聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)和脂肪醇聚氧乙烯醚(NP-40)为代表,两性离子型以 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲胺]-1-丙磺酸(CHAPS)为代表。CHAPS 有较强的溶解疏水蛋白的能力,现在较为常用。此外,一些新的两性离子去垢剂如 SB3-10、氨基磺酸甜菜碱-14(ASB-14)也越来越多地被应用到 2-DE 中。有研究认为,SB3-10、ASB-14 溶解膜蛋白的效果更好一些^[6]。另外有研究发现,ASB-14 溶解膜蛋白的效果优于 SB3-10 和 CHAPS 的组合^[7]。但对于水稻叶片疏水蛋白的溶解效果,哪种去垢剂最好,目前的研究还没有确定的答案。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以水稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)为试验材料。

1.2 试剂

双向电泳系统(Bio-RAD)、线性固相 pH 梯度(immobilize pH gradients,简称 IPG)预制胶条(Bio-RAD),IPG 缓冲液、覆盖液、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲胺]-1-丙磺酸购自 Amersham pharmacia 公司;尿素、四甲基乙二胺

(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(dethilthreitol,简称 DTT)、甘氨酸、过硫酸铵、甲叉双丙烯酰胺均购自 Amresco 公司;其他常用试剂为国产分析纯;所有溶液和缓冲液均使用 MilliQ 系统提供的电阻不小 18.2 MΩ 的去离子水。

1.3 水稻叶片疏水蛋白的制备、沉淀与保存

取水稻鲜叶约 10 g,冻干,用粉碎机粉碎冻干叶片,筛出叶片粉末,加入 40 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.4),振荡 10 min,超声波处理 1 min,4 ℃、21 697 r/min 离心 1 h,取上清,留沉淀,反复多次,直至 Bradford 法测得的上清液蛋白质浓度为 0,最终沉淀中所含的蛋白质即为水稻叶片的疏水蛋白,将沉淀真空冻干,于 -78 ℃ 保存。

在水稻叶片疏水蛋白冻干粉中加入 250 μL 4 种不同的裂解液 A(含 7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS)、裂解液 B(含 7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,2% CHAPS 和 2% SB3-10)、裂解液 C(含 7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% ASB-14)和裂解液 D(含 7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% TritonX-100),30 ℃ 水浴 1 h,其间充分振荡,超声波处理 3 次(50 s/次),20 ℃、14 953 r/min 离心 15 min,取上清,用 Bradford 法测上清液的蛋白质浓度。

1.4 双向电泳

配制含 150 μg 蛋白质的水化液,重水化 pH 值 4~7 的 IPG 胶条,等电聚焦 35 000 Vh。平衡胶条。将胶条移至二向 12.5% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶上,进行二向电泳,电泳结束后剥胶,银染法染色显示蛋白质点^[8]。扫描仪扫描双向电泳凝胶图并进行分析。

2 结果与分析

目前针对膜蛋白质的溶解有多种方法,在不同情况下其溶解效果不同,但在特定情况下却各有优势。在 2-DE 中,对膜蛋白的溶解用脲和硫脲的组合作为离液剂已成共识,所以各种膜蛋白质裂解液的最大不同来自于对不同的非离子型或两性离子型去垢剂的使用。本试验比较了目前在 2-DE 膜蛋白质溶解中应用较为普遍的 4 种裂解液^[9-12]的蛋白溶

收稿日期:2017-3-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31271622);扬州大学科技创新培育基金(编号:2016CXJ087)。

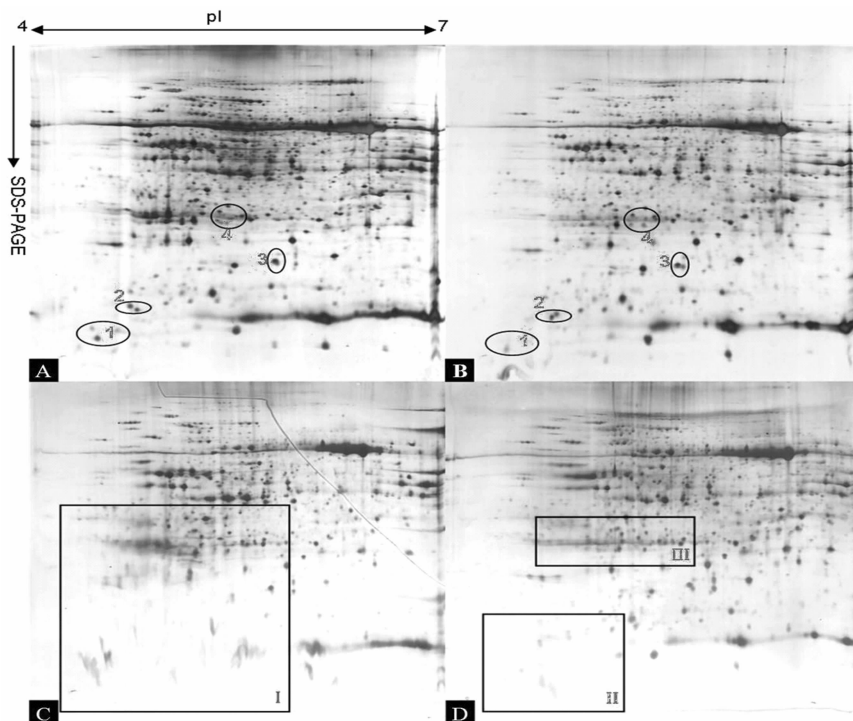
作者简介:王琳(1978—),女,江苏徐州人,博士,讲师,主要从事植物生理和生化研究。E-mail:wanglin@yzu.edu.cn。

通信作者:梁建生,博士,教授,主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。Tel:(0514)87979054;E-mail:jssliang@163.com。

解效果。

从图 1 可以看出,虽然是相同的上样量 100 μg ,但是 A、B、C、D 4 种裂解液的结果却是有差别的。A 和 B 要好于 C 和 D,因为 A 和 B 的 2-DE 图谱上有更多蛋白质点(接近 1 500 个),C 和 D 只有 1 200 个左右的蛋白质点。在本试验中 ASB-14 会使分子量较低的蛋白质在酸性端模糊难辨(图 1-C 的 I 区域)。这种结果不但使 2-DE 的覆盖率大大降

低,而且会影响到 2-DE 的重复性,从而增大了变异系数和分析难度,影响结果的准确性。图 1-D 的区域 II、III 与图 1-A 和图 1-B 中的相同区域相比,不但蛋白质点数少,而且相同蛋白质的灰度值也不及图 1-A 和图 1-B,但是图 1-D 的这 2 个区域与图 1-C 相比,结果较好。因此认为在 2-DE 中,用裂解液 A 和 B 溶解水稻叶片的疏水蛋白的效果要好于 D,D 的效果优于 C。



A、B、C、D 所代表的裂解液中分别含有去垢剂 CHAPS、SB3-10/CHAPS、ASB-14、TritonX-100。1、2、3、4 和 I、II、III 为有差异的区域

图1 不同裂解液对膜蛋白溶解效果的比较

2-DE 是全面分析蛋白质的技术,比较 A 和 B,虽然两者都有高效溶解蛋白质的能力,但是两者对特定蛋白质的溶解能力却是不同的。在图 1-A、图 1-B 中示意了对应的区域 1、2、3 和 4,在这些区域中可以发现 A 和 B 的溶解效力还是有细微差异的。如在区域 1 和 4,A 要优于 B;在区域 3,B 要优于 A;在区域 2,两者各自溶解了不同的蛋白质。总的来说,含有 4% CHAPS 去垢剂的裂解液对水稻叶片疏水蛋白的溶解效果最佳。

3 讨论与结论

目前有研究认为 SB3-10、ASB-14 溶解膜蛋白的效果较好^[6],而 ASB-14 的溶解能力相对于 SB3-10/CHAPS 则更强^[7]。本试验通过比较了几种常用的裂解液对水稻叶片疏水蛋白的溶解效果后发现,CHAPS(4%)的溶解效果最好,CHAPS(2%)和 SB3-10(2%)的组合次之,TritonX-100(4%)溶解效果较差,而 ASB-14(4%)由于易造成酸性端低分子量区域模糊,因此效果最差。

参考文献:

[1] Pasquali C, Fialka I, Huber L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. Electrophoresis, 1997, 18

(14):2573-2581.

[2] Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3/4): 307-316.

[3] Rabilloud T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1998, 19(5):758-760.

[4] Molloy M P, Herbert B R, Walsh B J, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1998, 19(5): 837-844.

[5] Musante L, Candiano G, Ghiggeri G M. Resolution of fibronectin and other uncharacterized proteins by two-dimensional polyacrylamide electrophoresis with thiourea[J]. Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications, 1998, 705(2):351-356.

[6] Chevallet M, Santoni V, Poinas A, et al. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1998, 19(11):1901-1909.

[7] Molloy M P, Herbert B R, Williams K L, et al. Extraction of escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1999, 20(4/5):

郭芳, 刘海鹏, 李保国, 等. 应用响应面法优化红树莓组培苗增殖培养条件[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(18): 56–59.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.014

应用响应面法优化红树莓组培苗增殖培养条件

郭芳¹, 刘海鹏¹, 李保国¹, 张雪梅¹, 齐国辉¹, 李迎超², 张玲³, 许洋²

(1. 河北农业大学林学院/河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北保定 071000; 2. 中国林业科学研究院林业研究所/国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 3. 河北至高点农业科技有限公司, 河北邢台 054400)

摘要:在单因素试验基础上, 根据 Box – Behnken 中心组合 (BBD) 试验原理, 选取 6 – BA 浓度、光照度、增殖周期为试验因素, 以增殖系数为响应值, 采取 3 因素 3 水平响应面法进行回归模型分析, 以优化红树莓组培苗增殖的培养条件。结果表明, 以无透气孔的塑料盖为封口材料, 红树莓组培苗增殖的最佳培养条件为 6 – BA 1.59 mg/L、光照度 1 391 lx、增殖周期 42 d, 在此条件下红树莓组培苗的增殖系数预测值为 10.950, 验证得到的实际值为 11.019。

关键词:响应面法; 培养条件; 红树莓; 增殖系数; 光照度; 增殖周期

中图分类号: S663.204⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0056-04

红树莓 (*Rubus idaeus* L.) 为蔷薇科悬钩子属多年生落叶灌木, 别称覆盆子、马林、托盘等, 果实为聚合果, 富含果糖、维生素、氨基酸等, 风味香醇, 酸甜可口, 在世界上被誉为“黄金水果”, 具有防癌、抗氧化、解热镇痛、抗凝血等保健药功能, 现广泛应用于化妆、医药、食品、保健等领域, 成为最具潜力的第 3 代新兴保健水果^[1-2]。发展红树莓, 大量的优质苗木是关键。目前, 红树莓苗木生产主要依靠根孽繁殖, 不仅繁殖系数低、速度慢, 而且连续根孽繁殖会造成品种退化, 易通过苗木传播土壤病虫害。利用组织培养技术进行红树莓脱毒快繁是快速繁育优良苗木的最佳途径, 我国已在猕猴桃、枣树、草莓等树种上建立了相关的繁育体系^[3-5]。对于红树莓, 前人的研究大多集中在最佳培养基筛选^[6-10], 而对其培养条件的优化研究尚无报道。

6 – BA 为人工合成的细胞分裂素类化合物, 能够显著促进细胞分裂、调控营养物质运输、促进植物新陈代谢等^[11]。光强直接影响植物的生长发育和结构特征, 而封口材料则会

影响培养瓶内的通气性, 进而影响容器内湿度及气体与外界的交换。响应面分析法作为一种优化工艺条件的有效方法, 可以精确表述因素和响应值之间的关系, 现已被广泛用于多因素影响的试验优化上。本研究在 6 – BA、光照度、封口方式及增殖周期等单因素对红树莓组培苗增殖影响试验的基础上, 将响应面法应用于红树莓组培苗增殖培养条件的优化, 以确立红树莓组织培养育苗技术体系, 为红树莓组织培养工厂化育苗提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为“海尔特兹”红树莓继代组培苗 1 cm 左右的带芽茎段。MS 基本培养基, 其蔗糖含量为 30 g/L, 琼脂为 5 g/L, 高压灭菌前 pH 值为 5.8。

1.2 试验设计

1.2.1 单因素试验

1.2.1.1 6 – BA 浓度对红树莓组培苗增殖的影响 光照度 2 000 lx、增殖周期 30 d、封口方式选择无透气孔的塑料盖, 设定 6 – BA 处理浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L。

1.2.1.2 光照度对红树莓组培苗增殖的影响 6 – BA 1.0 mg/L、增殖周期 30 d、封口方式选择无透气孔的塑料盖, 设定光照处理强度分别为 500、1 000、1 500、2 000、2 500 lx。

1.2.1.3 增殖周期对红树莓组培苗增殖的影响 6 – BA 1.0 mg/L、光照度 2 000 lx、封口方式选择无透气孔的塑料盖,

liver microsomes [J]. Analytical Biochemistry, 1983, 135 (2): 453–455.

[11] Rabilloud T, Blisnick T, Heller M, et al. Analysis of membrane proteins by two – dimensional electrophoresis; comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum* – infected erythrocyte ghosts [J]. Electrophoresis, 1999, 20 (18): 3603–3610.

[12] Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? [J]. Electrophoresis, 2000, 21 (6): 1054–1070.

收稿日期: 2016 – 04 – 17

基金项目: 河北省科技支撑计划 (编号: 16226806D); 国家现代农业科技成果惠民示范工程 (编号: Z141100002314009)。

作者简介: 郭芳 (1990—), 女, 河北卢龙人, 硕士研究生, 从事经济林栽培生理研究。E – mail: guofang901003@163.com。

通信作者: 李保国, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事经济林栽培生理和山区开发技术研究及经济林栽培教学工作。E – mail: 13582620586@163.com。

701–704.

[8] Yan J X, Wait R, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix – assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization – mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000, 21 (17): 3666–3672.

[9] O' Farrell P H. High resolution two – dimensional electrophoresis of proteins [J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250: 4007–4021.

[10] Perdue G H, Schaap H W, Selivonchick D P. The use of a zwitterionic detergent in two – dimensional gel electrophoresis of trout