

适于双向电泳分析的银杏叶绿体蛋白质提取方法

梁霏霏, 施大伟, 何梅, 徐鸣

(南京林业大学生物与环境学院, 南京 210037)

摘要: 【目的】研制银杏等木本植物的叶绿体蛋白质的有效提取方法。【方法】参照并改进 Pflieger 和 Rossier 的方法用于叶绿体的分离, 并利用透射电镜进行观察和测定叶绿体的完整率。分别取由 10g 银杏叶片提取的完整叶绿体颗粒, 用 TCA-丙酮沉淀法和 Tris-平衡酚抽提法进行叶绿体蛋白质的提取。最后用单向电泳 (SDS-PAGE) 和双向电泳 (2-DE) 分析两种方法叶绿体蛋白质的产量以及在双向电泳中的蛋白质点数量。【结果】通过透射电镜观察, 提取的叶绿体平均完整率在 85% 左右, 叶绿体的分离和纯化质量较高, 使得降低了样品的复杂性降低, 提高了蛋白质的富集。然后与 TCA-丙酮沉淀法相比, 采用 Tris-平衡酚抽提法提取的银杏叶绿体蛋白质, 提取效率更高, 蛋白质质量更好, 更适于双向电泳分析, 且提取过程比普通酚抽法更为简便, 有利于减少蛋白降解。【结论】初步建立了适于双向电泳分析的银杏叶片以及富含杂质的木本植物叶片的叶绿体蛋白质提取的方法体系。

关键词: 银杏; 叶绿体; 蛋白质提取; 电泳。

中图分类号: Q503

The Extraction Method of Chloroplast Protein from Ginkgo biloba L. which is suitable for the Analysis of two-dimensional electrophoresis

Liang Feifei, Shi Dawei, He Mei, Xu Ming

(College of Life and Environment, Nanjing Forest University, Nanjing 210037)

Abstract: 【Object】The experiments were aimed at developing the measurement of chloroplast protein efficient extraction and separation from ligneous plants such as ginkgo. 【Method】Referred to the method with which came up by Pflieger and Rossier and improved that in order to separate the chloroplast with more efficiently. Otherwise, use the transmission electron microscope to observe and measure the percentage of the complete one in all the chloroplast. Two groups complete chloroplast were extract from 10g ginkgo leaves respectively, with the former one used TCA-acetone precipitation method while the latter one adopt Tris-balance of phenol extraction method to extract chloroplast protein. Established from the extracted protein above, then, analyzed the production in the two extraction methods by SDS-PAGE electrophoresis and dimensional electrophoresis (2-DE). And compared the protein spots number in dimensional electrophoresis (2-DE) by the two extracted methods. 【Result】Observing from the transmission electron microscope the completion percentage of the extracted chloroplast was about 85%. The quality of the chloroplast separating and purifying was superior which decrease the complexity of specimen while increase the enrichment of protein. Compared with TCA-acetone precipitation method, the Tris-phenol extraction method has a higher extraction efficiency, which has a more convenient progress than normal phenol method and was beneficial to protein degradation. Also the extracted protein have a better quality and dimensional electrophoresis analyses was more suitable to do. 【Conclusion】The experiments initially established the chloroplast protein extraction system that suit the ginkgo leaves and impurity enriched ligneous plants which analyzed by the dimensional electrophoresis.)

Key words: Ginkgo; chloroplast; protein extraction; electrophoresis.

基金项目: 江苏省大学生实践创新训练计划项目 (201410298089X); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 梁霏霏 (1994-), 女, 本科生, 生物与环境学院, 生物科学专业

通信联系人: 施大伟, 博士, 讲师, 主要从事植物生理与细胞生物学研究. E-mail: 2304173022@qq.com

0 引言

近些年来,亚细胞蛋白质组学在不同水平上为蛋白质的定位和功能研究提供了新的见解^[1]。叶绿体作为绿色植物中重要的细胞器之一具有复杂的结构,是植物通过光合作用还原和同化二氧化碳、形成碳水化合物的场所,同时也是植物次生物质代谢的场所,研究表明树木光合作用的下降与其叶绿体蛋白结构组分的变化有关^[2],因此叶绿体蛋白质组的研究受到越来越多人关注。然而,叶绿体被分成许多间隔,而每个间隔都具有自身特有的蛋白组,这使得对光合作用蛋白进行比较研究较为困难。因此,对完整叶绿体整个蛋白质组的全面分析成为光合作用蛋白质组学较为理想的研究途径。

双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术是将蛋白质等电点和分子质量两种特性结合起来进行蛋白质分离的技术,具有较高的分辨率和灵敏度。2-DE 技术是研究蛋白质组的核心方法之一,已经成为复杂体系中检测和分析蛋白质的一种强有力的生化手段^[3]。蛋白样品制备是进行高质量 2-DE 的先决条件^[4]。近年来,不同种类植物蛋白提取的方法正在不断被改进^[5],有关完整叶绿体蛋白样品制备方法的报道却较少。在对茶树叶绿体蛋白的分离中,是将 TCA-丙酮直接加入完整的叶绿体中进行蛋白的沉淀^[6];而 TCA-丙酮与酚抽提法相结合要比 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,可以得到较理想的玉米叶绿体双向电泳图^[7]。然而对于银杏等木本植物而言,还缺乏一种比较有效的叶绿体蛋白质提取方法。

银杏叶片中富含多酚、色素、多糖及碳水化合物等干扰物质,会影响蛋白质的提取的质量^[10]。这些干扰物质的存在使得银杏叶绿体蛋白样品的制备变得更加困难。本文旨在建立一种适宜于银杏叶绿体分离及其蛋白质提取的方法体系,为进一步研究银杏叶绿体蛋白质组学奠定基础。

1 实验材料

1.1 实验材料

以 10 年生雌性银杏实生树叶片为实验材料,采自江苏省南京市南京林业大学校园内用于叶绿体提取。

1.2 实验试剂

巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、CHAPS、固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)缓冲液、Tris、SDS 等试剂为 Bio-rad 公司产品。Percoll、三氯乙酸(TCA)、尿素、硫脲、碘乙酰胺等试剂为 Sigma 公司产品。IPG 胶条为 GE Healthcare 公司产品。其他常用试剂均为国产分析纯。用双蒸水来配制实验所需各种溶液。

1.3 仪器设备

JEM-1400 透射电子显微镜为日本电子株式会社产品。Mini-PROTEAN 3 Cell 为 Bio-rad 公司产品。IPGphor III 等电聚焦仪、Ettan DALT 大型垂直电泳系统、ImageScanner III 扫描仪和 ImageMaster 2D Platinum 6.0 图像分析软件均购买自 GE Healthcare 公司。所有样品离心在 Allegra X-22R (Beckman Coulter) 上进行。

2 实验方法

2.1 叶绿体的分离与完整率检测

2.1.1 叶绿体的分离

银杏完整叶绿体的分离参照 Pflieger 和 Rossier^[1]的方法并加以改进。每步分离步骤均在
85 4℃下进行。采用经 24 小时以上暗处理后耗尽淀粉粒的银杏叶片 10g 进行分离。将叶片冰浴
下用研钵碾碎,加入一定量的提取缓冲液研磨成浆后 4 层纱布过滤,取滤液。提取缓冲液成
分为: 0.3M 山梨醇, 1mM MgCl₂, 50mM HEPES/KOH (pH 7.8), 2mM EDTA, 0.04% 巯基
乙醇, 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP)。滤液于 4℃, 1500g 离心 10min 进行沉积得叶绿体沉
淀颗粒,并用 6ml 分离缓冲液悬浮,分离缓冲液成分为: 0.3M 山梨醇, 1mM MgCl₂, 50mM
90 HEPES/KOH (pH 7.8), 2mM EDTA。

用分离缓冲液分别配制 40%和 80% Percoll,由上至下分别加入 5ml 的 40% Percoll 和 2.5ml
的 80% Percoll,形成 Percoll 密度梯度液。将悬浮的叶绿体颗粒 1ml 加入到制好的 Percoll
密度梯度液的顶端,经 4℃, 6000g 离心 30min 后。在 80%和 40% Percoll 细胞分离液之间的
分界面上收集完整叶绿体,并用分离缓冲液清洗两次,分离得到完整的叶绿体颗粒。

2.1.2 叶绿体完整率检测

叶绿体完整率利用透射电镜进行观察测定。将提取的完整叶绿体颗粒用 4%戊二醛溶液
4℃下固定 2h 以上后用磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 20min。然后用 1%溶化的琼脂预包埋材
料后脱水、包埋、聚合、切片、染色后在透射电子显微镜 (JEM-1400) 下进行观察。

2.2 叶绿体蛋白的提取

2.2.1 TCA-丙酮沉降法

取由 10g 银杏叶片提取的完整叶绿体颗粒,加入 3ml 冷冻的样品处理液 I,于 -20℃下
沉降过夜。沉降过后,4℃下 16000g 离心 30min,弃上清,加入 3ml 冷冻的样品处理液 II,
漩涡混匀后放入 -20℃下沉降 2h。沉降后,4℃下 16000g 离心 10min,取沉淀,再次加入 3ml
冷冻的样品处理液 II,再次于 4℃下 16000g 离心 10min,沉淀经冰冻的甲醇清洗一次,冰冻
105 的丙酮清洗三次后,在室温空气中风干后置于 -80℃下保存待用。样品处理液 I 成分为:
2%TCA, 0.02%DTT, 丙酮溶解。样品处理液 II 成分为: 0.02%DTT, 丙酮溶解。

2.2.2 Tris-平衡酚抽提法

参照 Fan 等^[3]的 BPP 方法并加以改进。将 1.5ml 蛋白质提取缓冲液加入到由 10g 银杏叶
片所提取的叶绿体颗粒中,室温下漩涡混匀 5min,加入等体积的 Tris-平衡酚(pH 8.0),超声
110 波混匀 10min。蛋白质提取缓冲液成分为: 100mM Tris, 100 mM EDTA, 50 mM 硼砂, 50 mM
维生素 C, 1% Triton X-100, 2% 巯基乙醇, 30%蔗糖。混合液经 4℃, 15000g 离心 15min
后,将上层的酚相转移到新离心管中。酚相中加入 5 倍体积的 0.1M 醋酸铵(用 80%甲醇配)
溶液,放入 -20℃条件下 6h 以上以沉淀蛋白,后经 4℃, 15000g 离心 15min 得蛋白质颗粒。
蛋白质颗粒重新悬浮,用冰冻的甲醇和丙酮各清洗两次,每次清洗均经 4℃, 15000g 离心
115 5min,仔细倒出上清液留沉淀即为叶绿体蛋白质。清洗好的蛋白质颗粒在室温空气中风干后

置于-80℃下保存待用。

2.3 叶绿体蛋白的纯度分析

2.3.1 单向电泳 (SDS-PAGE) 分析

120 参照 Laemmli^[8] 的方法进行。在蛋白质颗粒中加入一定量的样品缓冲液，混匀，置于沸水浴中加热 5min，冷却后经 10000rpm 离心 15min，取上清。所得上清液参照 Bradford^[4] 的方法测定蛋白质含量，以牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准样品。SDS-PAGE 在 Mini-PROTEAN 3 Cell 上进行，每个泳道加入的蛋白量为 30μg。

2.3.2 双向电泳 (2-DE) 分析

125 在蛋白质颗粒中加入一定量的水化上样液，充分振荡后，置于 30℃ 水浴中 1h，经 15000g 离心 15 分钟后取上清。上清液参照 Bradford^[9] 的方法测定蛋白质含量。水化上样液的成分为：7M 尿素，2M 硫脲，4% CHAPS，50 mM DTT，0.2% IPG 缓冲液 (pH 3-10)，0.002% 溴酚蓝。

130 将含有 1000μg 蛋白的上清样品加入到装有 24cm 线性 IPG 胶条 (pH 3-10) 的 IPG 胶条盒中，在室温下溶胀 24h。聚焦在 IPGphor III 等电聚焦仪上进行，条件如下：100V 下 2h，300V 下 1h，500 V 下 1h，1000 下 1h，8000V (梯度) 下 2h，8000V 下 100000Vh。等电聚焦结束后，胶条一次在平衡液 I 和平衡液 II 中各平衡 15min。平衡液 I 的成分为：6M 尿素，2% SDS，50 mM Tris-HCl (pH 8.8)，20% 甘油，2% DTT；平衡液 II 的成分为：6M 尿素，2% SDS，50 mM Tris-HCl (pH 8.8)，2.5% 碘乙酰胺。第二向蛋白的分离在 Ettan DALT 大型垂直电泳系统中进行，条件是每根胶条 7W 电泳 45min，18W 电泳 6h，温度稳定在 16℃。

135 第二向电泳之后，凝胶参照明亮兰 (CBB) R-250 法^[5] 进行染色和显色。凝胶图像扫描用 ImageScanner III 扫描仪，扫描时光学分辨率设为 300dpi，模式设为 16 灰阶。采用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare) 对图像进行分析。

3 结果与讨论

3.1 叶绿体的形态与完整率

140 研究细胞器蛋白质组的根本在于要分析部分的纯度。事实上，亚细胞蛋白质组的完整性很大程度上取决于我们怎样将要提取的组分与其它细胞的干扰物质分离开来。因此，本研究首先参照 Pflieger 和 Rossier^[1] 的方法并加以改进对银杏叶片的叶绿体进行分离。提取叶绿体的完整性采用电子显微镜进行检测分析。图 1 显示，此方法所提取出的银杏叶绿体大部分形状规则，呈梭形或纺锤形，且大部分较为完整，无破损现象。在透射电镜观察过程中随机选取 5 个视野，统计视野中完整和破损的叶绿体数量，计算叶绿体完整率的平均值。结果如表 1 所示。表中显示叶绿体的完整率约 85%，表明分离得到的银杏叶绿体完整度较好。

145

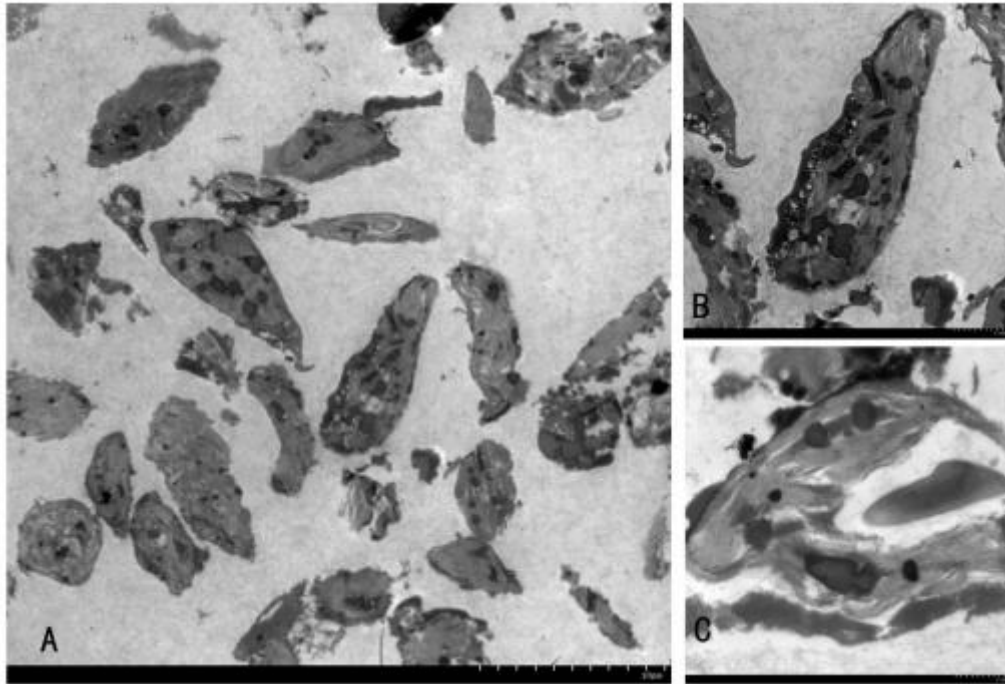


图1 射电镜下所提取的银杏叶绿体形态

表1 透射电镜下叶绿体的完整率

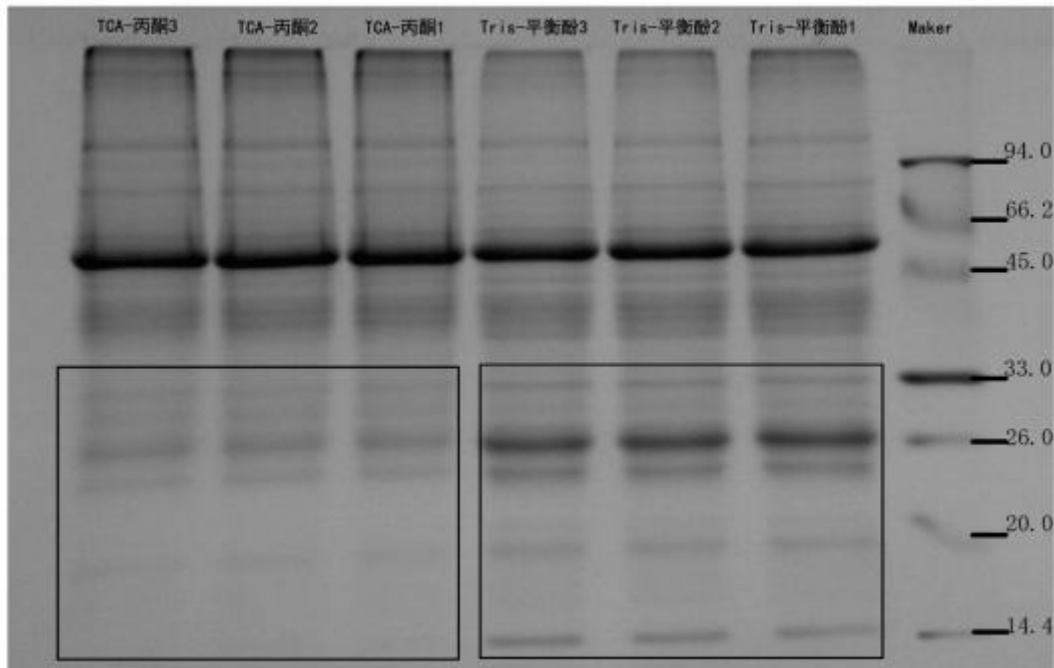
观察视野	叶绿体数个数	完整率 (%)	平均完整率 (%)
1	29	86.2	
2	32	87.5	
3	38	84.2	85.46
4	37	83.7	
5	35	85.7	

150 3.2 蛋白质纯度分析

蛋白质样品的制备是双向电泳的关键步骤。由于叶绿体中存在着较高含量难以溶解的膜蛋白，因此想要全面地研究整个的叶绿体蛋白质组较为困难^[3]。本研究采用的是改进后的BPP法进行完整叶绿体蛋白的提取^{[3][4]}。为了更好地评价本研究的方法，我们又采用了常用的TCA-丙酮沉降法进行叶绿体蛋白的制备^[1]，并首先运用单向电泳（SDS-PAGE）对这两种方法所提取的银杏完整叶绿体蛋白的质量进行比较分析。

在改进的BPP法（Tris-平衡酚抽提法）中，叶绿体蛋白先溶解于酚类溶液中，然后由甲醇-醋酸铵溶液进行沉淀；而在TCA-丙酮沉降法中，叶绿体蛋白则先由TCA沉淀，然后经丙酮清洗制备获得。在单向电泳凝胶上，用两种方法进行分离得到的叶绿体蛋白条带在高和低分子量区域均比较清晰（图2）。但仍有一些低分子量蛋白质条带（用方框标注），在用Tris-平衡酚抽提法分离的叶绿体蛋白质泳道中更多更清晰，表明TCA-丙酮沉降法并未对本植物银杏完整叶绿体蛋白进行充分的提取。虽然仅通过单向电泳不足以证明两种方法的优劣，还需进一步进行双向电泳的验证，但是也能在一定程度上表明Tris-平衡酚抽提法对提

取叶绿体蛋白质更为有效。



165 图 2 两种方法提取银杏叶绿体蛋白质的单向凝胶图谱

170 用上述两种方法提取的叶绿体蛋白进一步运用双向电泳进行分析。在进行电泳之前，我们首先对两种方法提取出叶绿体蛋白质的产量作了比较，如表 2 所示。蛋白产量以从 10g 银杏叶片（鲜重）分离得到的叶绿体所提取出的蛋白质量来计算。当研究材料较少时，高的蛋白质产量显得特别重要，尤其是叶绿体的分离需要大量的植物叶片。与 TCA-丙酮沉淀法相比，Tris-平衡酚抽提法得到的蛋白质量更高，由 10g 鲜叶中提取了 1.85 ± 0.05 mg 叶绿体蛋白。以上结果表明，在提取叶绿体蛋白时，基于酚的方法要比用 TCA 的提取方法具有更高的蛋白产量，这也与用其他植物组织进行提取的研究结果一致^{[5][17]}。

表 2 两种方法叶绿体蛋白质产量和双向电泳蛋白质点数量

提取方法	蛋白质 (mg/10g FW)	双向电泳蛋白点数 (pH3-10)
Tris-平衡酚抽提法	1.85 ± 0.05	887 ± 11
TCA-丙酮沉淀法	1.22 ± 0.07	613 ± 13

175 为了进一步比较这两种方法提取叶绿体蛋白的效果，将两种方法提取的蛋白以等蛋白量（1000 μ g）上样至 pH 3-10 的 IPG 胶条上，并进行双向电泳的分析。以上结果表明，酚抽提法较高的蛋白质产量是其有效提取更多蛋白质的基础。对比两种方法的双向电泳凝胶图谱可以看出，虽然两种银杏叶绿体蛋白质提取方法得到的 2-DE 图谱背景均比较清晰，且没有明显的条纹影响，但 Tris-平衡酚抽提法得到的 2-DE 图谱（图 3）蛋白质点数明显多于 TCA-丙酮沉淀法（图 4），蛋白点质量也更好。软件进一步分析显示，用酚抽提法可以产生更多的蛋白质点，约 887 ± 11 个。

180

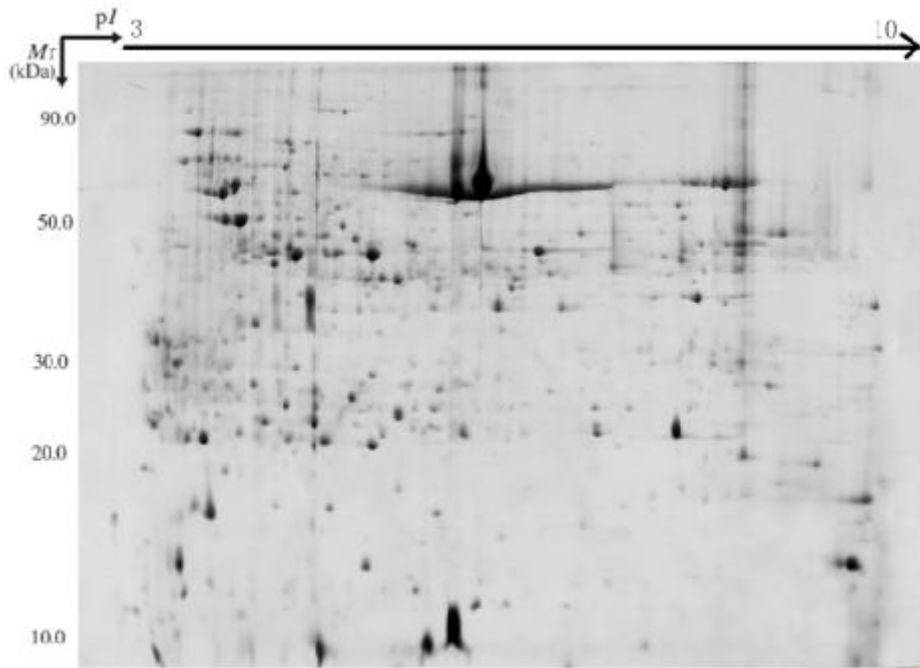


图 3 Tris-平衡酚抽提法提取的蛋白质双向电泳图

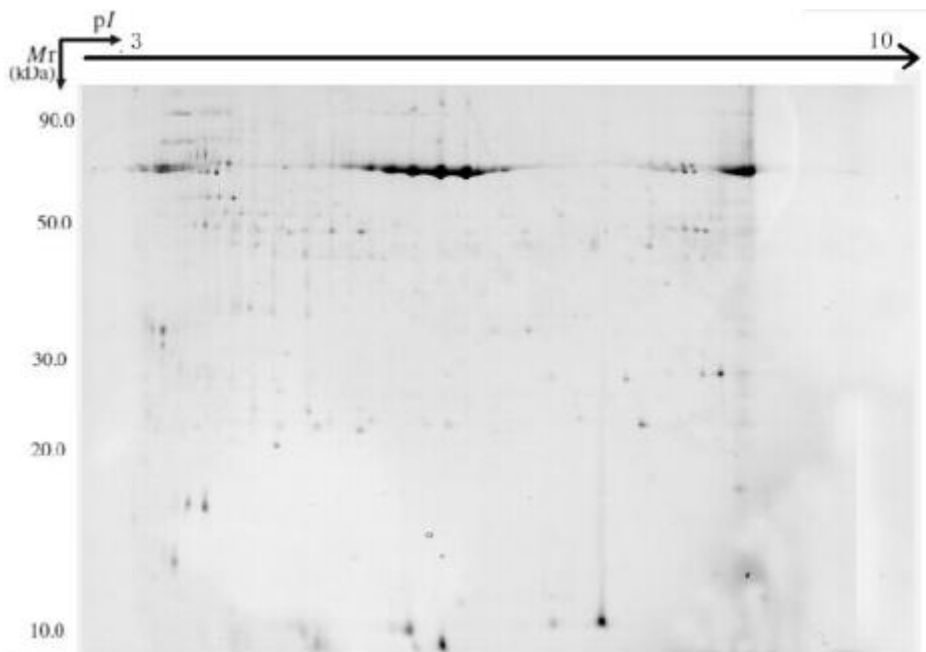


图 4 TCA-丙酮沉淀法提取的蛋白质双向电泳图

185

叶绿体蛋白中有很多是疏水性的膜蛋白^[1]。在 2-DE 电泳分离过程中，会造成这些疏水性蛋白的一定损失，其原因可能是这些蛋白在水溶液介质中易发生聚集和沉淀。在本研究所使用的基于酚的提取方法中，以水为溶剂的重悬缓冲液被直接加入到叶绿体颗粒中，可以有效地裂解叶绿体，破坏脂质和蛋白的相互作用，从而使膜蛋白得以分离。另外，酚作为蛋白质、脂质和色素类物质的一种强力溶剂，在提取中被加入，可以有效溶解膜蛋白。最终，溶解在酚相中的蛋白被以甲醇为溶剂的醋酸铵沉淀，而那些严重影响第一向等电聚焦（IEF）的脂质和色素类物质，则不会沉淀下来^[3]。用 TCA-丙酮法提取分离得到蛋白质点较少，原因可能是用 TCA 沉淀的蛋白再次溶解有一定困难，这也在一些研究中得到证实^[5]。

195

4 结论

蛋白质组学的关键之一是蛋白质样品的制备，样品制备的质量直接影响双向电泳的效果。本研究采用了 percoll 密度梯度液提取银杏叶绿体，实验条件更容易满足，且通过透射电镜观察，提取的叶绿体平均完整率在 85%左右，高质量叶绿体的分离和纯化，降低了样品的复杂性，提高了蛋白质的富集。然后采用了 Tris-平衡酚抽提法提取银杏叶绿体蛋白质，与传统的 TCA-丙酮沉淀法相比，提高了提取效率，蛋白质质量更好，用于双向电泳实验所得到的图谱清晰，所分离的蛋白点更多，形态更好，条纹影响相对较小，图谱分辨率更高，而且提取过程比普通酚抽法更为简单、方便，有利于减少蛋白降解，从而为银杏叶绿体蛋白质组学研究奠定基础，同时其它富含杂质的木本植物叶片的叶绿体蛋白质组学研究也可借鉴。

[参考文献] (References)

- [1] Pflieger D, Rossier J (2008) Purification and proteomic analysis of chloroplasts and their sub-organellar compartments. *Organelle Proteomics Methods Mol Biol* 432:19-36
- [2] Xiao XW, Yang F, Zhang S, Korpelainen H, Li CY. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress [J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, 136:150-168.
- [3] Fan PX, Wang XC, Kuang TY, Li YX (2009) An efficient method for the extraction of chloroplast proteins compatible for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis* 30: 3024-3033.
- [4] Wang, X. C., Li, X. F., Deng, X., Han, H. P., Shi, W. L., Li, Y. X., *Electrophoresis* 2007, 28, 3976-3987.
- [5] 曾广娟, 李春敏, 张新忠, 腾云龙, 董文轩 (2009) 适于双向电泳分析的苹果叶片蛋白质提取方法. *色谱* 27: 484-488
- [6] 张立明, 刘亚军, 王云生, 高丽萍, 夏涛 (2011) 茶树叶绿体及其蛋白的分离研究. *激光生物学报* 20 (6): 802-808
- [7] 杨彦芳, 李娜娜, 赵飞云, 胡秀丽 (2015) 玉米叶绿体蛋白质提取及其双向电泳体系建立. *河南农业科学* 44 (6): 24-28
- [8] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227:680-685
- [9] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- [10] Lu T, He XY, Chen W, Yan K, Zhao TH .Effects of elevated O₃ and/or elevated CO₂ on lipid peroxidation and antioxidant systems in *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Bull Environ Contam Toxicol* ,2009,83:92-96.