

海南油茶种仁蛋白质提取及双向凝胶电泳-质谱初步鉴定

叶洲辰, 吴友根, 于靖, 张军锋, 杨东梅, 胡新文

(海南大学热带农林学院, 海口 570100)

摘要:以海南油茶成熟种仁为试验材料,比较2种不同方法对该植物蛋白提取效率的影响,同时结合单向SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、双向凝胶电泳技术(2-DE)、质谱(MS)鉴定手段和Mascot Distiller软件进行分析。结果表明:改良后的BPP抽提法可以有效提取油茶种仁蛋白,通过Image Master 2D Platinum 5.0分析后,在凝胶图上共检测出847个蛋白点,集中分布在等电点(pI)pH 5.0~6.0、相对分子质量86~42 kDa范围内;其图谱背景清晰,蛋白点形状圆润、分辨率高、分布均匀,基本无明显拖尾现象;选取12个高分辨率的蛋白点,经质谱成功鉴定了10个,分别代表10种蛋白质,鉴定成功率达83.3%。BPP抽提法适用于后续油茶种仁的蛋白质组学分析研究。

关键词:油茶;种仁;蛋白;双向凝胶电泳;TCA-丙酮沉淀法;BPP抽提法;蛋白质组学

中图分类号:TS201.2;S794.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)03-0103-08

Extraction of kernel protein from *Camellia oleifera* in Hainan and preliminary identification by two-dimensional gel electrophoresis combined with mass spectrometry

YE Zhouchen, WU Yougen, YU Jing, ZHANG Junfeng,
YANG Dongmei, HU Xinwen

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570100, China)

Abstract: The protein was extracted from mature kernel of *Camellia oleifera* in Hainan using two different methods, and analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), mass spectrometry (MS) and Mascot Distiller software. The results showed that the protein could be effectively extracted from *Camellia oleifera* kernel by the improved BPP extraction method. Approximately 847 protein spots were detected in the 2-DE gel image analyzed with Image Master 2D Platinum 5.0, and most of the protein spots mainly concentrated at the range of isoelectric points pH 5.0-6.0 and relative molecular weights (M_r) 86-42 kDa. The background of gel image was clear, and the protein spots had regular shape, high resolution and uniform distribution, and there was no obvious tailing phenomenon. Twelve high resolution protein spots were selected, and ten protein spots represented ten unique proteins were successfully identified by MS, and the identification success rate was up to 83.3%. The BPP extraction method could be applied in the further study of *Camellia oleifera* kernel proteomics.

Key words: *Camellia oleifera*; kernel; protein; two-dimensional gel electrophoresis; TCA-acetone precipitation method; BPP extraction method; proteomics

收稿日期:2019-06-28;修回日期:2019-10-25

基金项目:海南省重大科技计划项目(ZDKJ2017004);海南省重点研发专项(ZDYF2016157)

作者简介:叶洲辰(1991),女,博士研究生,研究方向为南药植物种质资源开发与利用(E-mail) 1196247235@qq.com。

通信作者:吴友根,教授,博士(E-mail) wygeng2003@163.com。

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)为山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)家族中的一种常绿小

乔木或灌木^[1],与油桐、核桃、乌桕齐名,是我国重要的纯天然高级油料作物^[2],同时与橄榄、油棕、椰子并称为世界四大木本油料树种,具有较高的栽培价值和生态效益^[3]。我国是油茶的原产地和主产地,该植物主要分布在江西、湖南等长江以南省份的高山丘陵地带^[4]。油茶籽油的脂肪酸组成与橄榄油类似,且富含维生素、茶多酚、角鲨烯等活性成分,被誉为“油中软黄金”,是联合国粮农组织(FAO)重点推广的高级食用植物油^[5]。然而我国油茶籽油产量远不能满足人们的需求,尤其是海南油茶,该省地处油茶资源分布的最南缘,海峡隔离,亚热带季节明显,孕育了独具特色的油茶资源,但含油量低却是制约该产业发展的一个关键因素。因此,提高油茶籽油产量对解决当前我国食用油市场短缺具有重要意义^[6]。

国内外关于油茶的研究多集中于良种选育、低产改造、砧木嫁接、促花保果、组织培养和药理活性检测等方面,其重要代谢产物的合成过程及调控机制仍不明确,随着基础分子生物学技术的开展,如油茶组织 DNA 和 RNA 提取方法优化^[7-8],SRAP、SCAR、ISSR 等分子标记体系建立^[9-11],以及关键基因克隆与遗传转化等^[12],油茶籽油的生物合成过程被初步了解,但 mRNA 水平所提供的基因表达信息尚未能完整揭示这些合成代谢途径的分子调控机制。基因功能的执行者是蛋白质,我们通常是以蛋白质组为研究对象,通过大规模、高通量的分析蛋白表达量,探究油茶代谢途径中其所发挥的作用模式及功能机理^[13]。单向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及双向凝胶电泳(2-DE)是蛋白质组学研究的主要技术,通过与分子生物学手段协作,获取相应的关联信息,并根据凝胶上每个蛋白点的存在与否、丰度及位置来可视化分析从核酸层次到蛋白质水平上的转变,这将有助于找出与油脂合成积累相关的重要蛋白,从而调控油料的含油量与产油质量^[14]。近年来对于不同物种叶片^[15]、种子^[16]及花蕊^[17]等的蛋白质提取优化研究已相对成熟,但油料作物种仁蛋白质组学分析技术起步较晚,且油茶属于多年生木本植物,其种仁富含大量油脂、色素、酚类等次生代谢物质,在提取过程中会对蛋白样品制备及凝胶电泳结果造成干扰,而目前关于海南油茶种仁蛋白提取方法筛选及双向凝胶电泳-质谱鉴定等方面的研究却鲜有报道。鉴于此,本研究以海南油茶成熟种仁为试验材料,优化了从油茶种仁中提取高质量蛋白的方法,并进行了油茶种仁蛋白的双向凝胶电泳分析,同时结合质谱鉴定手段和 Mascot Distiller 软件进行检索,旨在对今后深入开展

油茶种仁蛋白质组学研究提供参考,以期为进一步培育出更适于海南食用油产业发展的高品质油茶良种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

供试样品于 2018 年 11 月采自海南省琼海市阳江镇油茶种质资源基地(19°12'10" N; 110°24'32" E),经海南大学杨好伟教授鉴定为 *Camellia oleifera* Abel.,油茶果采摘后去壳破皮,将种仁速冻于液氮中,并带回实验室贮存在 -80℃ 冰箱备用。

十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAM)、牛血清白蛋白(BSA)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、维生素 C(V_C)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、胰蛋白酶、硫脲和尿素均购自美国 Sigma 公司;IPG 缓冲液(IPG buffer, pH 4~7)、线性 24 cm IPG 胶条(pH 4~7)、矿物甘油和琼脂糖均购自瑞典 GE Healthcare 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、考马斯亮蓝(CBB-G250)、溴酚蓝(BPB)和 β-巯基乙醇(BME)均购自美国 Bio-Rad Labs;乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、苯甲磺酰氟(PMSF)、Tris 饱和酚(pH > 7.8)、三羟甲基氨基甲烷和甘氨酸均购自北京索莱宝科技有限公司;四硼酸钠、蔗糖、乙腈、硫酸铵、碳酸氢铵、氯化钙、甲醇、丙酮、乙酸、磷酸、乙醇,分析纯,均购自北京化学试剂厂。

1.1.2 仪器与设备

Mettler Toledo AL204 型电子分析天平(香港长江和记宝业有限公司),CT15RT 型高速冷冻离心机(上海天美科学仪器有限公司),UV-1000 型紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),SY21-K 型数显恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司),DHG-9030A 型烘箱(上海一恒科技有限公司),THZ-300C 型恒温摇床(上海一恒科技有限公司),Ettan IPGphor 3 型等电聚焦仪(瑞典 GE Healthcare 公司),Ettan DALTsix 型垂直电泳仪(瑞典 GE Healthcare 公司),Image Scanner III 型投射扫描仪(瑞典 GE Healthcare 公司),5800 MALDI-TOF MS/MS 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 海南油茶种仁蛋白提取

1.2.1.1 油茶种仁预处理

将采集的海南油茶种仁样品分为 2 组,每组 3

份生物学重复,每份各称取 1.0 g,分别置于预冷研钵中,加入适量 1.0% PVPP,用液氮充分研磨至粉末后, -80℃ 保存备用。分别采用 TCA - 丙酮沉淀法和 BPP 抽提法提取油茶种仁蛋白。

1.2.1.2 TCA - 丙酮沉淀法

参考 Wang 等^[18]的方法并适当改进。取 1.0 g 海南油茶种仁粉末,加入 10 mL 预冷的 10% TCA - 丙酮溶液(PMSF 1.0 mmol/L, DTT 10 mmol/L),充分混匀后, -20℃ 静置过夜;于 4℃、12 000 r/min 离心 30 min,弃上清;再加入 10 mL 预冷的 10% TCA - 丙酮溶液,旋涡振荡至沉淀物分散, -20℃ 静置 2 h 后,于 4℃、12 000 r/min 离心 30 min,弃上清,以上步骤重复 2 次,收集沉淀。

1.2.1.3 BPP 抽提法

略微改进 Wang 等^[19]的方法。取 1.0 g 海南油茶种仁粉末,加入 10 mL BPP 蛋白提取液(EDTA 100 mmol/L, V_c 50 mmol/L, 三羟甲基氨基甲烷 10 mmol/L, 四硼酸钠 50 mmol/L, 1.0% PVPP, 1.0% Triton X - 100, 2.0% BME, 30% 蔗糖, pH 8.0),在室温下涡旋混匀 10 min,于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,将上层 BPP 相转移至新的 50 mL 离心管中,此步骤重复 2 次,合并 BPP 提取层,并加入等体积 Tris 饱和酚,室温涡旋振荡 10 min,离心(4℃、12 000 r/min)15 min 后,转移上层酚相至另一新离心管中,再加入等体积 BPP 蛋白提取液,室温涡旋 10 min,于 4℃、12 000 r/min 离心 20 min,然后小心吸取上清液与 5 倍体积预冷的过饱和硫酸铵甲醇溶液充分混匀, -20℃ 静置过夜后,悬浮液离心(4℃、12 000 r/min)15 min,弃上清,收集沉淀。

1.2.2 蛋白裂解液的制备

将提取的油茶种仁蛋白沉淀用预冷甲醇清洗 2 次,随后用预冷丙酮清洗 2 次,弃上清,室温下自然风干后,加入样品裂解液(尿素 7.0 mol/L, 硫脲 2.0 mol/L, DTT 13 mmol/L, 2.0% CHAPS),22℃ 恒温裂解 2 h 以上,于 4℃、12 000 r/min 离心 30 min,转移上清液即蛋白裂解液至 1.5 mL 离心管中, -20℃ 保存备用。

1.2.3 蛋白质得率测定

蛋白定量采用 Bradford^[20]方法,通过紫外分光光度计在波长 595 nm 处测定吸光值,每个材料重复 3 次,以牛血清白蛋白(BSA)作为标准品,BSA 质量浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线,得到 TCA - 丙酮沉淀法和 BPP 抽提法标准曲线方程分别为 $y = 0.0585x + 0.0132$ ($R^2 = 0.9999$) 和 $y = 0.0542x +$

0.0481 ($R^2 = 0.9999$)。测定油茶种仁蛋白裂解液 595 nm 处的吸光值,代入标准曲线方程中,计算蛋白质质量浓度。按下式计算蛋白质得率。

蛋白质得率 = 蛋白质质量浓度 × 蛋白裂解液体积 / 油茶种仁质量

1.2.4 蛋白质单向 SDS - PAGE^[21]

根据蛋白定量结果确定相应上样量(30 μg),配制成总体积为 25 μL 的上样体系(Load buffer, 蛋白裂解液),循环水浴保持 16℃,电泳参数设置为 6 W/gel、1 h 和 8 W/gel、5 h,待指示线迁移至距胶底部约 1.0 cm 处时,停止电泳。

1.2.5 蛋白质双向凝胶电泳(2 - DE)

1.2.5.1 蛋白水化上样

根据蛋白定量结果确定其上样量(1 300 μg),配制成总体积为 455 μL 的上样体系(DTT, IPG buffer, 蛋白裂解液),充分混匀后加入水化盘中,缓慢放置 IPG 胶条,于 22℃ 恒温水化 18 h 以上,待胶条完全吸收水化液即可。

1.2.5.2 第一向等电聚焦(IEF)

开机自检后,待等电聚焦仪面板温度冷却至 20℃ 时准备聚焦,环境温度保持 20℃,每根胶条限流 50 μA,最高电压限制 10 000 V,程序设置如下: Constant, 250 V, 3 h; Constant, 500 V, 2 h; Constant, 1 000 V, 1 h; Gradate, 8 000 V, 3 h; Constant, 8 000 V, 110 000 Vh; Constant, 1 000 V, 18 h。

1.2.5.3 IPG 胶条平衡

第一向等电聚焦结束后,胶条依次在含有 1.0% DTT 的平衡缓冲液(尿素 6.0 mol/L, 三羟甲基氨基甲烷 50 mmol/L, 2.0% SDS, 0.002% BPB, 30% 甘油, pH 8.8)和含有 4.0% IAM 的平衡缓冲液中进行平衡,每次分别在平衡槽内平衡 15 min。

1.2.5.4 第二向 SDS - PAGE

平衡结束后,转移胶条水平放置于 12.5% SDS - PAGE 凝胶的上端,用含有溴酚蓝的 1.0% 琼脂糖封固胶条,在 Ettan DAL Tsix 垂直电泳仪中进行电泳,循环水浴保持 16℃,电泳参数设置为 6 W/gel、1 h 和 8 W/gel、5 h,待指示线迁移至距胶底部约 1.0 cm 处时,结束电泳。

1.2.6 凝胶染色及图像采集分析

电泳结束后,采用考马斯亮蓝染色液进行染色^[22],再小心取出凝胶,用脱色液清洗直至背景清晰为止。脱色完全后通过 Image Scanner III 型投射扫描仪对凝胶进行图像扫描,参数设置为:投射扫描,灰度阶 256,分辨率 300 dpi, TIF 格式保存。然后用 Image Master 2D Platinum 5.0 软件进行凝胶图

像数据分析。

1.2.7 蛋白质胶内酶解

从凝胶上挖取目标蛋白点放至 PCR 薄壁管中,并用 100 μL 去离子水清洗 3 次,摇床振荡 30 min;除去水,加入 100 μL 脱色液(碳酸氢铵 50 mmol/L, 50% 乙腈)脱色 30 min,直至胶粒完全变为透明为止;除去脱色液,再加入 80 μL 乙腈,室温脱水 20 min;除去乙腈,将胶粒放置在超净工作台中微风干燥 1 h;随后加入 3.0 μL 胰蛋白酶工作液(20 ng/ μL),使酶液完全浸入胶粒,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 1 h,再吸去多余酶液,并加入 5.0 μL 酶缓冲液(氯化钙 0.5 mmol/L, 碳酸氢铵 50 mmol/L, pH 8.0 ~ 8.5),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温酶解约 16 h;待酶解完成后,室温、12 000 r/min 条件下离心 5 min,吸取上清液进行质谱分析^[23]。

1.2.8 蛋白质谱鉴定

采用 5800 MALDI-TOF MS/MS 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪对酶解得到的肽段混合物进行质谱鉴定,经基质峰、酶自切峰校正,根据海南油茶种仁转录组测序结果进行蛋白预测,并建立数据库,然后通过 Mascot Distiller 软件分析质谱数据,当匹配值小于 0.05,且检索分数超过标准线时,认为该蛋白被成功鉴定,得分越高,其可信度越高。质谱条件:基质辅助激光解吸电离源;扫描方式一级质谱全扫描(MS),二级质谱全扫描(MS/MS);扫描范围为 m/z 1 000 ~ 4 000;激光强度为 3 700;多肽及多肽碎片的碎裂方式为碰撞诱导电离(HCD)。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法对海南油茶种仁蛋白提取效率的影响

为探究不同方法之间蛋白提取效率的差异,在油茶种仁鲜重均为 1.0 g 的条件下,对采用 2 种提取方法所得样品蛋白的质量浓度和得率进行比较分析,结果见表 1。

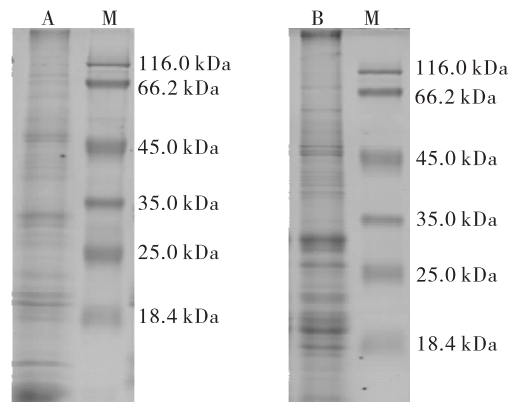
表 1 不同提取方法对海南油茶种仁蛋白提取效率的影响

提取方法	样品质量/g	蛋白质质量浓度/($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	蛋白质得率/(mg/g)
BPP 抽提法	1.0	12.704 \pm 0.117	5.082
TCA-丙酮沉淀法	1.0	9.432 \pm 0.051	3.773

由表 1 可知,相对于 TCA-丙酮沉淀法,BPP 抽提法所得油茶种仁蛋白具有较高的质量浓度和得率,分别为 12.704 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 5.082 mg/g,故判断此方法提取海南油茶种仁蛋白效果良好。

2.2 不同方法提取的蛋白单向 SDS-PAGE 图谱比较分析

分别对采用 2 种提取方法所得的海南油茶种仁蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 1。



注:M. Protein Marker; A. TCA-丙酮沉淀法; B. BPP 抽提法。

图 1 不同方法提取的海南油茶种仁蛋白的单向 SDS-PAGE 图谱

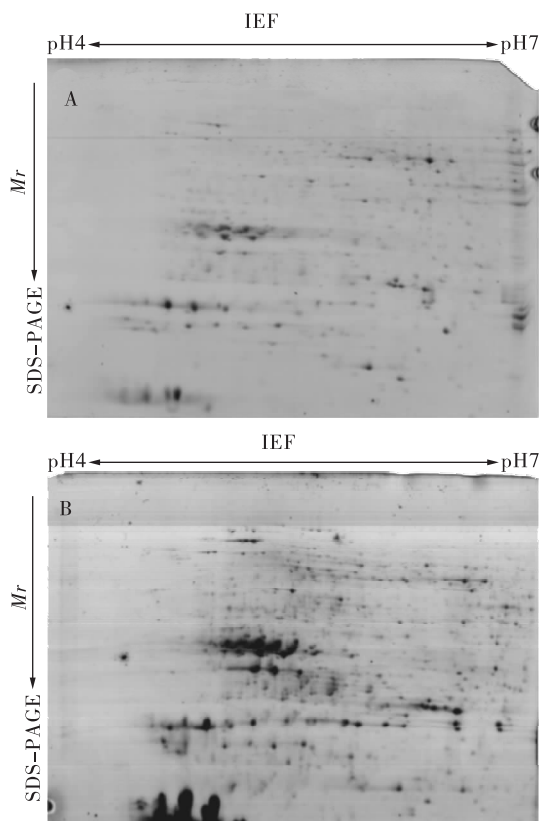
由图 1 可知,二者的蛋白条带都主要集中在 18.4 ~ 66.2 kDa 范围之内,且在 18.4、25、45 kDa 附近均出现 3 条明显的高丰度蛋白条带,但彼此分离后的条带数目、位置及丰度值却存在显著差异。采用 BPP 抽提法所得蛋白条带分离均匀,背景清晰,高丰度蛋白条带相对集中,提取效果较好;而 TCA-丙酮沉淀法所得蛋白条带数相对较少,蛋白质缺失严重,轮廓模糊,在相对分子质量小于 18.4 kDa 处出现弥散现象,故判断 BPP 抽提法优于 TCA-丙酮沉淀法。

2.3 不同方法提取的蛋白 2-DE 图谱比较分析

分别对采用 2 种方法所提取的海南油茶种仁蛋白进行 2-DE 分析,结果见图 2。

由图 2 可知,蛋白提取方法对 2-DE 结果影响较大,BPP 抽提法所得蛋白的 2-DE 图谱背景干净,蛋白点分散均匀、分离充分、数量较多、轮廓清晰,形状规则呈圆形或近圆形,基本无明显拖尾现象,经 Image Master 2D Platinum 5.0 软件分析后,在凝胶图上共检测出 847 个蛋白点,集中分布在等电点(pI) pH 5.0 ~ 6.0、相对分子质量(M_r) 86 ~ 42 kDa 范围内,而在偏酸性端 pH 4.0 ~ 4.5 以及高相对分子质量(>102 kDa)区域内几乎没有蛋白点,虽存在少量蛋白堆积现象,但整体聚焦效果较好。对于 TCA-丙酮沉淀法所得蛋白的 2-DE 图谱,蛋白点数较少(662 个),分辨率较低,形状不圆润,无大量高丰度蛋白,且出现不同程度的横向条纹。综合分析 2 种提取方法所得蛋白的 2-DE 图谱,认为 BPP 抽提法具有更好的提取率,不会造成蛋白质大量损

失,更适于油茶等油料作物种仁蛋白的提取及 2-DE 等分析研究。

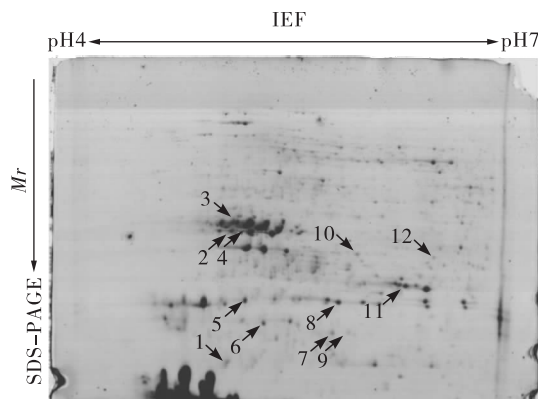


注: A. TCA-丙酮沉淀法; B. BPP 抽提法。

图2 不同方法提取的海南油茶种仁蛋白的 2-DE 图谱

2.4 质谱鉴定

为了确定 BPP 抽提法所得海南油茶种仁蛋白的质谱兼容性,从 2-DE 凝胶上选取了 12 个高分辨率蛋白点进行质谱鉴定(图 3),质谱鉴定信息见表 2。



注:箭头所示的点为选取进行质谱鉴定的蛋白点。

图3 海南油茶种仁蛋白质谱鉴定的 2-DE 图谱

由表 2 可知,有 10 个蛋白点被成功鉴定,鉴定成功率为 83.3%,数据库搜库得分均超过 100,且序列覆盖率可达 14%~25%,说明酶解产物中包含较多的目标蛋白肽段序列,该鉴定结果相对可靠。其中,蛋白点 1 为蛋白二硫键异构酶(PDI),蛋白点 2 为 Rubisco 亚基结合蛋白(RBP),蛋白点 3 为热激蛋白 70(Hsp70),蛋白点 4 为伴侣蛋白 60(CPN60-2),蛋白点 5 为焦磷酸化酶(PPase),蛋白点 6 为尿黑酸 1,2-双氧化酶(HGD),蛋白点 7 为丝氨酸蛋白酶(EDA2),蛋白点 8 为球蛋白(GBP),蛋白点 10 为 ATP 合酶 β 亚基(ATPase β),蛋白点 12 为乙醛脱氢酶(ALDH2B4)。这些蛋白质主要参与氨基酸代谢、脂类代谢、碳水化合物运输与代谢、能源生产与转化等生物过程,还可作为分子伴侣在蛋白翻译后修饰方面发挥重要作用。

表 2 海南油茶种仁蛋白点的质谱鉴定信息

蛋白点	蛋白名称	Unigene 号	蛋白点得分	等电点/相对分子质量	总(匹配)肽段数	序列覆盖率/%	物种
1	蛋白二硫键异构酶 (Probable protein disulfide isomerase A6)	Unigene073236	181	5.07/32.49	4 (4)	19	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>
2	Rubisco 亚基结合蛋白 (RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha-like isoform X1)	Unigene065534	128	5.11/61.98	5 (5)	18	<i>Nelumbo nucifera</i>
3	热激蛋白 70 (Heat shock cognate 70 kDa protein 2-like)	Unigene082146	603	5.11/71.82	7 (7)	19	<i>Gossypium hirsutum</i>
4	伴侣蛋白 60 (CPN60-2, mitochondrial)	Unigene072846	404	5.38/64.90	6 (6)	15	<i>Gossypium arboreum</i>
5	焦磷酸化酶 (Pyrophosphorylase)	Unigene075595	620	5.41/52.33	8 (8)	25	<i>Actinidia eriantha</i>
6	尿黑酸 1,2-双氧化酶 (Homogentisate 1,2-dioxygenase isoform X1)	Unigene067291	209	5.51/51.62	6 (5)	25	<i>Ipomoea nil</i>

续表 2

蛋白点	蛋白名称	Unigene 号	蛋白点得分	等电点/相对分子质量	总(匹配)肽段数	序列覆盖率/%	物种
7	丝氨酸蛋白酶 (Probable serine protease EDA2)	Unigene072184	357	5.85/49.52	5 (5)	16	<i>Juglans regia</i>
8	球蛋白 (Globulin - like protein)	Unigene063890	351	5.94/52.80	5 (5)	21	<i>Actinidia chinensis</i>
10	ATP 合酶 β 亚基 (ATP synthase subunit β , mitochondrial - like)	Unigene071859	493	6.06/59.59	7 (7)	18	<i>Solanum lycopersicum</i>
12	乙醛脱氢酶 (Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial - like)	Unigene087228	224	6.44/58.87	5 (5)	14	<i>Ziziphus jujuba</i>

注:蛋白点代表图 3 中标记的蛋白点号;Unigene 号代表油茶种仁转录组测序鉴定所得基因号;蛋白点得分代表检索 Mascot Distiller 软件所得计算分数;蛋白点 9 和蛋白点 11 未经质谱鉴定成功(蛋白得分低于标准线);总(匹配)肽段数括号内数值代表总肽段数中可信值大于 95% 的肽段数。

2.5 讨论

蛋白样品制备是蛋白质组学研究的首要前提,其质量是决定后续单向 SDS - PAGE 及 2 - DE 结果的关键因素。目前为止,尚未发现一种适用于所有植物蛋白的提取方法,因为不同植物组织或细胞内部的次生代谢产物存在差异,这些物质会与蛋白结合形成各种能破坏其结构的复合物,从而不同程度地干扰后续蛋白的分离与鉴定,故针对不同植物材料,选择合适的蛋白提取方法尤为重要^[23]。曹锐等^[24]发现新型 TCA - 丙酮法适用于莲子叶和胚芽组织的蛋白质提取,而传统 TCA - 丙酮法则适用于提取莲的胚轴组织蛋白。邱智敏等^[17]研究表明采用 TCA - 丙酮结合酚抽法提取油茶雌蕊蛋白能够得到更多较为清晰的蛋白点。油茶属于油料作物,其种仁中富含油脂、多酚、多糖等会与蛋白发生共沉淀的代谢产物,从而难以获得无污染、无缺失的高质量植物蛋白,严重影响等电聚焦效果和电泳图谱的分辨率^[25]。

为寻找适合于油茶种仁蛋白的提取方法,本研究进行了 TCA - 丙酮沉淀法和 BPP 抽提法的对比试验,结果发现 BPP 抽提法所得凝胶图谱背景清晰,蛋白点数量较多(847 个),形状基本规则,无明显拖尾现象,而 TCA - 丙酮沉淀法所得蛋白点数较少(662 个),分离不充分,无大量高丰度蛋白,且出现了不同程度的横向条纹及弥散现象,故认为 BPP 抽提法能够有效防止蛋白变性,减少蛋白降解以及避免蛋白修饰,且可降低样品中脂类、盐类及糖类等对蛋白分离和鉴定造成的干扰,使结果具有良好的重复性^[15]。占志勇等^[16]研究发现 TCA - 丙酮法会损失大量油桐种仁蛋白,而酚抽法则适用于富含抑

制电泳复合物的顽拗性植物组织蛋白提取,与本试验结果一致。吴波等^[26]对传统 TCA - 丙酮法进行改进,显著提高了油茶种仁蛋白(816 个)的提取数量,但其 2 - DE 图谱上却出现了许多较为明显的纵向条纹。何艺凡等^[27]认为采用 TCA - 丙酮结合酚抽法(聚焦条件 62 000 V · h,凝胶浓度 10% SDS)提取油茶种仁蛋白的分离效果较好,虽与本研究的提取优化方法以及电泳体系条件存在差异,但二者所得图谱的高丰度蛋白点分布却基本一致,说明尽管不同方法对同一植物材料的适用性不同,若根据植物自身因素来改良制备技术仍可获得大量的优质蛋白^[28],如在提取液中加入 Triton X - 100、PVPP、BME 等,能够有效抑制蛋白酶活性,防止多酚等物质发生氧化,进而保证蛋白的得率与质量^[29-30]。

从 BPP 抽提法所得的 2 - DE 凝胶上选取 12 个高丰度蛋白点进行质谱鉴定,成功率高达 83.3%,表明该方法所得蛋白具有良好的质谱兼容性。其中,蛋白二硫键异构酶(蛋白点 1)具有独特的底物特异性、伴侣活性及氧化还原性等重要生物功能,可促进和催化蛋白内或蛋白间形成正确的二硫键^[31];热激蛋白 70(蛋白点 3)属于进化高度保守的蛋白超家族成员,通常作为分子伴侣参与蛋白多肽链的转运、降解和组装以及免疫识别、细胞凋亡等生理过程,由应激诱导产生,通过对受损蛋白进行修复而保护机体免受伤害^[32];伴侣蛋白 60(蛋白点 4)是一类存在于线粒体中的寡聚蛋白复合体,能利用 ATP 水解帮助新合成或未成熟的多肽完成折叠装配,同时在受体信号转导及细胞凋亡等过程中发挥重要作用^[33];球蛋白(蛋白点 8)是双子叶植物贮藏蛋白的

主要类型,负责提供种子萌发和生长所需的大部分营养物质^[34];乙醛脱氢酶(蛋白点12)通过利用NAD(P)⁺能将许多内源依赖性酶、脂肪族和芳香族醛氧化成羧酸,是乙醇代谢途径中最关键的酶,同时还具有响应环境胁迫和病原菌侵染的抗逆特性^[35]。基于上述结果,判断本研究所优化的BPP抽提法,以及进行的油茶种仁蛋白单向SDS-PAGE和2-DE图谱效果较好,质谱鉴定技术兼容性较高,能满足后续蛋白质组学分析的试验要求。

3 结论

本研究以海南油茶成熟种仁为试验材料,从蛋白质提取方法的筛选与优化入手,比较不同方法对该植物种仁蛋白提取效率的影响,同时结合单向SDS-PAGE和2-DE技术、质谱鉴定手段和Mascot Distiller软件进行分析。结果显示,相对于TCA-丙酮沉淀法,改良后的BPP抽提法对油茶种仁蛋白的提取得率更高,其图谱背景清晰,蛋白点数量较多(847个),形状圆润规则,整体分布均匀,高丰度蛋白相对集中,基本无明显拖尾现象,说明此样品制备方法具有稳定高效等特点,更适用于油茶种仁蛋白的提取及单向、双向电泳等的凝胶成像分析。此外,对该植物种仁蛋白进行双向电泳结合质谱检测手段的初步探索,选取12个高分辨率的蛋白点,经质谱成功鉴定了10个,分别代表10种蛋白质,鉴定成功率达83.3%。该方法可为后续深入开展油茶蛋白质组学研究奠定技术基础,同时也为其他油料作物种仁蛋白的分离鉴定提供科学依据。

参考文献:

[1] 徐雪峰, 闫浩, 杜金凤, 等. 海南油茶籽含油率及脂肪酸组成分析[J]. 生物化工, 2018, 4(6): 45-48.

[2] 郭水连, 章起明, 李鹰, 等. 气象条件对油茶合理采摘期的影响研究[J]. 中国农学通报, 2018, 34(20): 106-110.

[3] ZEB A. Triacylglycerols composition, oxidation and oxidation compounds in camellia oil using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chem Phys Lipids, 2012, 165(5): 608-614.

[4] FENG S L, CHENG H R, FU L, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activities of polysaccharides from *Camellia oleifera* leaves[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 68: 7-12.

[5] 王碧芳. 海南油茶50个优株果实经济性状评价[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2016.

[6] 郑道君, 潘孝忠, 张冬明, 等. 海南油茶资源调查与分析[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(1): 130-135, 169.

[7] 宋志波, 刘敏, 贾宝光, 等. 油茶总RNA的提取与内参基因的初选[J]. 经济林研究, 2014, 32(2): 93-98.

[8] 黄国文, 管天球, 赵雨云, 等. 一种快速高效的油茶叶片DNA提取方法[J]. 分子植物种, 2018, 16(13): 4350-4354.

[9] 刘扬, 彭赞, 贺瑞, 等. 基于ISSR标记的海南油茶种质资源遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(2): 517-523.

[10] 谢荟, 祝文娟, 张应中, 等. 基于SRAP分子标记的广宁红花油茶种质资源遗传多样性研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2017, 37(8): 93-97, 113.

[11] 李海波, 刘勇, 赵佳, 等. 12个油茶良种的SCAR分子标记鉴别[J]. 浙江林业科技, 2017, 37(2): 17-23.

[12] 卿卓, 苏睿, 赵文正, 等. 腾冲红花油茶1,6-二磷酸果糖醛缩酶基因克隆及组织表达分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(21): 6982-6989.

[13] RAO V S, SRINIVAS K, SUJINI G N, et al. Protein-protein interaction detection: methods and analysis[J]. Int J Proteomic, 2014(2): 147-648.

[14] 沙伟, 李雯煜, 张丽丽, 等. 砂藜总蛋白质提取方法的选择及双向电泳体系的建立[J/OL]. 基因组学与应用生物学, 2019(3): 1-12 [2019-06-28]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q20190318.1415.003.html>.

[15] 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.

[16] 占志勇, 陈益存, 韩小娇, 等. 一种适合油桐种仁蛋白质分离的双向电泳技术体系[J]. 林业科学研究, 2012, 25(6): 745-750.

[17] 邱智敏, 郑碧娟, 陈辉, 等. 油茶雌蕊蛋白双向电泳分离体系的建立[J]. 热带作物学报, 2016, 37(3): 548-554.

[18] 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.

[19] WANG X C, LI X F, DENG X, et al. A protein extraction method compatible with proteomic analysis for the eukaryote *Salicornia europaea* [J]. Electrophoresis, 2007, 28(21): 3976-3987.

[20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.

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

[22] 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.

率先升高后降低,560 W 时呈整体上升趋势,420 W 呈波动状态。

参考文献:

- [1] 国家林业和草原局规划财务司. 2018 年全国林业和草原发展统计公报[R]. 北京:国家林业和草原规划财务司,2019.
- [2] 何荣荣,谭运寿,王丽君,等. 响应面法对亚临界水提取茶桔饼中茶皂素的优化研究[J]. 食品工业,2018,39(11):96-101.
- [3] 郭玉华,徐云,张雪茹,等. 油茶籽饼粕多糖的提取工艺优化及结构鉴定[J]. 安徽农业科学,2019,47(1):175-178,197.
- [4] 郭显荣,黄卫文,龚吉军,等. 不同提油方法的油茶粕蛋白制备工艺研究[J]. 食品与机械,2013(6):147-149.
- [5] 侍银宝. 油茶果皮多酚的分离纯化及其生物活性研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2014.
- [6] YANG K M, HSU F L, CHEN C W, et al. Quality characterization and oxidative stability of camellia seed oils produced with different roasting temperatures[J]. J Oleo Sci, 2018, 67(4):389-396.
- [7] 罗凡,费学谦,李康雄,等. 预处理条件对油茶籽液压榨油效率和品质的影响研究[J]. 中国粮油学报,2016,31(4):94-99.
- [8] 龙婷,吴雪辉,容欧,等. 热风-微波联合干燥油茶籽的工艺研究[J]. 南方农业学报,2016,47(7):1181-1186.
- [9] 刘国琴,李琳,胡松青,等. 功率超声和微波处理对花生

油脂肪酸组成的影响[J]. 中国油脂,2005,30(7):46-49.

- [10] 韩晓丹,熊伟,胡居吾,等. 微波干燥-亚临界流体萃取红花茶油的工艺研究及其脂肪酸组成分析[J]. 生物化工,2017,3(4):1-6.
- [11] 纪鹏,周建平,刘向宇. 微波辅助水代法提取油茶籽油条件研究[J]. 现代食品科技,2010,26(5):486-489.
- [12] 龙婷,吴雪辉,容欧,等. 油茶籽预处理方法对茶油品质的影响研究[J]. 中国粮油学报,2017,32(7):79-83.
- [13] 刘斌,姜铁民,李菊芳,等. 婴幼儿配方奶粉加工过程中美拉德反应指示物和过敏原的变化[J]. 中国食品学报,2018,18(8):184-190.
- [14] 罗凡,费学谦,杨楠,等. 热处理延长油茶籽油氧化稳定性的机理研究[J]. 中国油脂,2018,43(9):17-22,29.
- [15] 戴维,仲山民,郑剑. 响应面法优化微波辅助提取油茶饼粕多糖[J]. 食品研究与开发,2017(19):45-49.
- [16] 姚菲,吴苏喜. 微波处理对油茶籽提油速率和油脂品质的影响[J]. 食品工业,2012(5):66-68.
- [17] WANI I A, HAMID H, HAMDANI A M, et al. Physico-chemical, rheological and antioxidant properties of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) as affected by pan and microwave roasting[J]. J Adv Res, 2017, 8(4):399-405.
- [18] LEIVA G E, NARANJO G B, MALEC L S. A study of different indicators of Maillard reaction with whey proteins and different carbohydrates under adverse storage conditions[J]. Food Chem, 2017, 215:410-416.

(上接第 109 页)

- [23] ISLAM N, LONSDALE M, UPADHYAYA N M, et al. Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis[J]. Proteomics, 2004, 4(7):1903-1908.
- [24] 曹锐,陈浩,丁毅. 莲种子蛋白质提取方法比较与双向电泳分析[J]. 植物科学学报,2018,36(1):127-135.
- [25] YAO Y, YANG Y W, LIU J Y. An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2-DE[J]. Electrophoresis, 2006, 27(22):4559-4569.
- [26] 吴波,阮成江,杜维,等. 油茶种仁总蛋白提取及双向电泳分析[J]. 中国油脂,2018,43(2):79-83.
- [27] 何艺凡,宋倩倩,林文俊,等. 油茶种仁蛋白双向电泳体系的建立[J]. 森林与环境学报,2018,38(1):33-37.
- [28] 孙勇,王旭初,易小平. 香蕉枯萎病菌双向电泳体系的建立及蛋白质组学初步研究[J]. 中国农学通报,2012,28(34):211-218.
- [29] SHAW M M, RIEDERER B M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003, 3(8):1408-1417.

- [30] CARPENTIER S C, WITTERS E, LAUKENS K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis[J]. Proteomics, 2005, 5(10):2497-2507.
- [31] MATSUSAKI M, KANEMURA S, KINOSHITA M, et al. The protein disulfide isomerase family: from proteostasis to pathogenesis[EB/OL]. [2019-06-28]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030441651930087>.
- [32] 张安英. 草鱼热激蛋白 70(HSP70)的细胞因子功能及参与炎症反应调节的研究[D]. 成都:电子科技大学,2018.
- [33] 周丽. 水稻叶绿体伴侣蛋白 Cpn60 超表达株系农艺性状和抗盐性研究[D]. 杭州:浙江大学,2015.
- [34] SINGH A, MEENA M, KUMAR D, et al. Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed[J]. Crit Rev Food Sci, 2015, 55(11):1491-1502.
- [35] 刘美兰,华园榕,龙洪旭,等. 油桐乙醛脱氢酶基因 ALDH2B4 和 ALDH2B7 的克隆与表达分析[J]. 植物生理学报,2017,53(8):1459-1467.