

油料蛋白

油茶种仁总蛋白提取及双向电泳分析

吴波,阮成江,杜维,闫蕊,刘凌悦

(大连民族大学资源植物研究所,辽宁大连116600)

摘要:以油茶种仁为实验材料,用不同方法提取油茶种仁总蛋白,同时对双向电泳条件进行了探索与优化,建立了一套适合油茶种仁总蛋白双向电泳分析的优化体系。结果表明:改良后的TCA-丙酮法可以有效提取出油茶种仁总蛋白,得到了816个蛋白点,蛋白点主要集中在等电点pH 4.0~6.0之间;选用17 cm pH 4~7 IPG胶条,优化的等电聚焦程序为250 V 0.5 h、1 000 V 2 h、8 000 V 5 h、8 000 V 60 000 Vh和500 V 24 h,可获得背景清晰、分辨率较高的双向电泳图谱。

关键词:油茶;种仁总蛋白;提取方法;双向电泳

中图分类号:TS229;TQ936

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)02-0079-05

Extraction of total protein from *Camellia oleifera* kernel and two-dimensional electrophoresis analysis

WU Bo, RUAN Chengjiang, DU Wei, YAN Rui, LIU Lingyue

(Institute of Plant Resources, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning, China)

Abstract: The total protein was extracted from *Camellia oleifera* kernel using different methods, and the conditions of two-dimensional electrophoresis were also explored and optimized to establish a set of optimal system of two-dimensional electrophoresis analysis for total protein in *Camellia oleifera* kernel. The results showed that total protein could be effectively extracted from *Camellia oleifera* kernel by the improved TCA-acetone method. 816 protein spots were obtained, and most of protein spots mainly concentrated at the isoelectric points pH 4.0-6.0. The optimal two-dimensional electrophoresis system was obtained as follows: length of IPG strip 17 cm with pH 4-7, isoelectric focusing program 250 V 0.5 h, 1 000 V 2 h, 8 000 V 5 h, 8 000 V 60 000 Vh and 500 V 24 h. Under these conditions, a 2-DE map with clear background and higher resolution could be obtained.

Key words: *Camellia oleifera*; total kernel protein; extraction method; two-dimensional electrophoresis

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)是我国南方的重要木本油料,种仁含油率高,油脂中富含不饱和脂肪酸(如油酸),可作为我国优质食用油的重要来源。提高油茶产量和含油量对当前我国解决食用油市场短缺具有重要意义^[1]。蛋白质是基因功能的执行者,从蛋白质组学水平上对油脂合成过程中的关键

蛋白进行深入研究,不仅能找出与油脂合成积累相关的关键蛋白,还可以与分子生物学手段协作,得到更多的生物学信息^[2]。目前国内外关于油茶蛋白质组学的研究中,已有油茶雌蕊蛋白提取^[3]、油茶籽粕蛋白提取及其功能特性研究^[4]等方面的报道,但对于油茶种仁总蛋白提取鲜有报道。油茶种仁中富含大量色素、酚类等干扰物质,在提取过程中酚类物质极易氧化产生大量氧化物会影响样品制备和电泳结果^[5]。本研究以油茶种仁为实验材料,建立了从油茶种仁中提取高质量总蛋白的方法,并建立了一套适合油茶种仁总蛋白双向电泳分析的优化体系,对今后深入研究油茶种仁蛋白质组学具有重要意义,也可为进一步改良油茶品种,提高种子含油量

收稿日期:2017-05-27;修回日期:2017-10-25

基金项目:贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2016]2517-1、黔科合支撑[2016]2519号和黔科合支撑[2013]201号);中央高校基本科研业务费重大专项(DC201501070102)

作者简介:吴波(1991),男,硕士研究生,研究方向为木本油料蛋白质组学(E-mail) 512703926@qq.com。

通信作者:阮成江,教授,博士(E-mail) ruan@dlnu.edu.cn。

和产量,培育出更适于食用油产业发展的高油、高品质的油茶良种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉屏1号油茶,2016年9月采自于贵州省玉屏县油茶种质资源圃,采摘后去壳破皮,将种仁速冻于液氮中,保存在 -80°C 冰箱备用。

二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、Tris-HCl、三氯乙酸(TCA)、KCl、乙二胺四乙酸(EDTA)、考马斯亮蓝G-250、琼脂糖、硫脲、尿素、丙烯酰胺、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、甘氨酸、甘油、甲叉双丙烯酰胺,购于生工生物工程(上海)股份有限公司;IPG胶条(pH 4~7)、Bio-Lyte(两性电解质),Bio-Rad公司;标准牛血清蛋白,美国MP公司。

离心机;旋涡振荡器;UH5300型分光光度计,Hitachi;PROTEANi12型等电聚焦仪、GS-900型校准光密度仪、proteanII XLCell垂直板电泳仪,Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 油茶种仁总蛋白的提取

1.2.1.1 TCA-丙酮沉淀法

参考 Damerval^[6]、Isaacson^[7]等提取方法并适当改进。取3g左右冷冻备用的油茶种仁在液氮下充分研磨成粉末,研磨过程中加入10% PVP。取灭菌后的50 mL离心管将研磨后的样品粉末放入其中,加入30 mL预冷的10% TCA-丙酮溶液(含质量分数10% TCA,质量分数0.1% DTT和1 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)),充分旋涡振荡混匀后,放置在试管架上置于 -20°C 静置过夜(沉淀17 h以上)。 4°C 条件下13 000 g离心30 min,弃上清收集沉淀,在沉淀物中加入 -20°C 预冷含质量分数为0.1% DTT的丙酮溶液,旋涡振荡至沉淀分散。放入 -20°C 静置沉淀2 h, 4°C 13 000 g条件下离心30 min,弃掉上清。再次加入含0.1% DTT的丙酮溶液进行清洗,旋涡混匀后在上述条件下离心,弃掉上清收集沉淀。重复此步骤2次,加入 -20°C 预冷的70%丙酮溶液进行润洗,超声波处理10 min,充分振荡混匀后在上述条件下离心,弃上清收集沉淀,重复此步骤3~5次,直至沉淀物颜色呈白色。将最终沉淀物经真空冷冻干燥机干燥成粉末,所得粉末即为总蛋白,将粉末转入灭菌的离心管中放入 -80°C 冰箱保存备用或直接进行下一步实验。

1.2.1.2 Tris-HCl法

参考 Gu等^[8]提取方法并适当改进。将3g左右冷冻备用的油茶种仁放入液氮预冷的研钵中,加入少量石英砂,倒入液氮迅速反复研磨。待充分研磨后,将研磨粉末放入已灭菌的50 mL离心管中,加入事先预冷的Tris-HCl提取液30 mL(0.5 mol/L蔗糖,1 mmol/L MgCl_2 ,50 mmol/L EDTA,0.15 mol/L KCl,0.05 mol/L Tris-HCl pH 6.8),上下颠倒混匀后,室温条件下振荡浸提2 h,使蛋白样品充分溶解。取出 4°C 13 000 g条件下离心30 min,弃上清,收集沉淀。加10 mL -20°C 预冷的含1% DTT丙酮溶液,涡旋振荡, -20°C 下放置10 min, 4°C 12 000 g离心20 min,弃上清,收集沉淀,重复此步骤3次。加入冷丙酮溶液,涡旋振荡5 min,超声波处理10 min,在 4°C 13 000 g条件下离心30 min,弃上清,所得沉淀于室温下自然风干使丙酮完全挥发后,置于 -80°C 下保存备用或直接进行下一步实验。

1.2.2 蛋白样品溶液制备

将2种方法提取得到的蛋白样品粉末各自取20.0 mg分别放入1.5 mL灭菌的离心管中,以质量体积比1:25分别加入蛋白裂解液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4% CHAPS,50 mmol/L DTT,0.2% Bio-Lyte)充分振荡混匀后, 4°C 放置2 h, 4°C 13 000 g条件下离心5 min,再将样品振荡离心,重复此步骤3次,直至蛋白样品充分溶解,最后 4°C 13 000 g离心20 min,小心吸取上清液转移至新离心管中,即为蛋白样品溶液。

1.2.3 蛋白质定量

蛋白质定量采用改良后的Bradford法^[9]。用牛血清蛋白(BSA)制作蛋白质标准曲线,利用UH5300型分光光度计在波长595 nm处测定蛋白样品吸光度,结合所绘制的标准曲线以及所测蛋白样品吸光度,利用标准曲线测定蛋白质样品含量。

1.2.4 蛋白质双向电泳(2-DE)

1.2.4.1 第一向等电聚焦(IEF)

实验采用17 cm IPG胶条进行等电聚焦。吸取定量后的蛋白样品溶液,加入水化上样缓冲液充分混匀后沿着水化盘槽边缘从左至右缓慢加入样品(0.5 g/L,400 μL)。用镊子去掉IPG胶条上的保护层,对应正负极,将胶条胶面朝下置于样品溶液上,加入3 mL矿物油覆盖胶条后,进行等电聚焦。等电聚焦设置3个程序(见表1),设置每根胶条最大电流50 μA ,温度 17°C 。等电聚焦结束后,立即进行IPG胶条平衡,平衡分2次,每次15 min。平衡液I(6 mol/L尿素,2% SDS,0.375 mol/L Tris-HCl pH

8.8、20%甘油、2% DTT),平衡液 II(6 mol/L 尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8、20%甘油、2.5% 碘乙酰胺(IAM)),平衡结束后立即进行第二向电泳。

表1 等电聚焦程序

程序	步骤	升压方式	电压/V	时间
程序 1	主动水化		50	12 h
	S1	慢速	250	0.5 h
	S2	快速	1 000	2 h
	S3	线性	8 000	5 h
	S4	快速	8 000	50 000 Vh
	S5	快速	500	24 h
程序 2	被动水化		0	12 h
	S1	慢速	250	0.5 h
	S2	快速	1 000	2 h
	S3	线性	8 000	5 h
	S4	快速	8 000	60 000 Vh
	S5	快速	500	24 h
程序 3	被动水化		0	12 h
	S1	慢速	250	0.5 h
	S2	快速	1 000	2 h
	S3	线性	8 000	5 h
	S4	快速	8 000	70 000 Vh
	S5	快速	500	24 h

1.2.4.2 第二向 SDS-PAGE 电泳

配制 SDS-PAGE 凝胶,将平衡后的胶条浸没在 $1 \times$ 电泳缓冲液(25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸、0.1% SDS,pH 8.3)中。将胶条胶面朝上与凝胶胶面充分接触,接触面切勿产生气泡以免影响电泳结果,加入低熔点琼脂糖封胶液(0.5% 琼脂糖、25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸、0.1% SDS、0.001% 溴酚蓝),待封胶液完全凝固后将胶条转移至电泳槽中进行电泳。起始电流设定为 10 mA/gel 30 min,待样品完全跑出 IPG 胶条后改变电流 20~30 mA/gel 5~6 h,待溴酚蓝指示剂跑到胶条底部约 2 cm 时即可停止电泳^[10]。

1.2.5 染色与脱色

电泳结束后将凝胶转移至固定液中(40%乙醇和 10%乙酸)固定 2 h 或过夜。之后用超纯水漂洗 3 次,每次 10 min。采用改良后的考马斯亮蓝染色液(含 4 倍体积的考马斯亮蓝储备液和 1 倍体积的甲醇)对 SDS-PAGE 凝胶进行染色^[11]。小心取出凝胶用超纯水清洗直至凝胶背景清晰为止。

1.2.6 凝胶扫描和图像分析

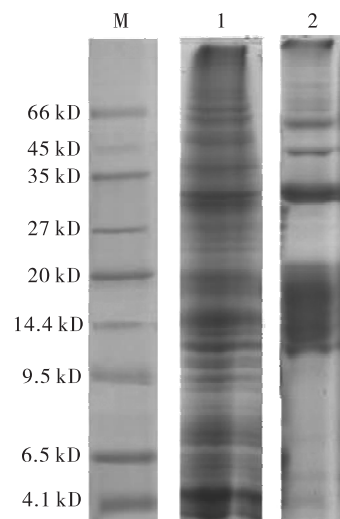
SDS-PAGE 凝胶脱色完全后,使用 GS-900 型校准光密度仪对凝胶进行图像扫描。扫描参数采用

投射模式,分辨率为 36.3 dpi。用 PDQuest 8.0.1 软件对扫描图像进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 2 种油茶种仁总蛋白提取方法的一维(SDS-PAGE)分析

本研究利用 2 种提取方法对油茶种仁总蛋白进行提取,油茶种仁总蛋白的 SDS-PAGE 凝胶分析见图 1。



注:M. 蛋白 Maker;1. TCA-丙酮法;2. Tris-HCl 法。

图1 不同提取方法油茶种仁总蛋白的 SDS-PAGE 凝胶分析

由图 1 可以看出,分离后的条带数目大小、位置均有明显差异,表明不同提取方法对油茶种仁总蛋白提取结果不同。采用改良后的 TCA-丙酮法所得的蛋白条带数较多,凝胶背景清晰,分散均匀,条带主要集中在 4~65 kD 之间,在 5、12、16、31 kD 附近出现 4 条明显的高丰度蛋白条带,高蛋白条带相对集中。而 Tris-HCl 法所得到的蛋白条带数明显较少,仅有 1 条明显高丰度蛋白条带,蛋白质缺失较多,在 10~20 kD 相对分子质量之间出现弥散现象。由此分析可知,2 种提取方法中改良后的 TCA-丙酮法提取效果较好。

2.2 不同提取方法对双向电泳图谱的影响

在等电聚焦程序 2 条件下,对利用 2 种不同方法所提的油茶种仁总蛋白进行双向电泳分析,结果见图 2。由图 2 可以看出,采用改良后的 TCA-丙酮法获得蛋白点数为 816 个,分布均匀,蛋白点圆润且形状规则,明显多于用 Tris-HCl 法所得蛋白点数(224 个)。从图谱质量上看,相较于 Tris-HCl 法,改良的 TCA-丙酮法所获得的凝胶图谱背景更清晰、横纵条纹较少、无明显的蛋白堆积现象,聚焦效果好。而 Tris-HCl 法中蛋白点缺失严重,在 10

kD 附近出现蛋白点弥散现象,出现不同程度的横条纹和纵条纹。在 2 种提取方法所得 2-DE 图谱中,改良后的 TCA-丙酮法对相对分子质量低于 65 kD 的蛋白具有更好的提取率,不会造成大量蛋白质丢失。

综合可知,对比 Tris-HCl 法,改良后的 TCA-丙酮法更适于油茶种仁总蛋白提取及双向电泳分析研究。

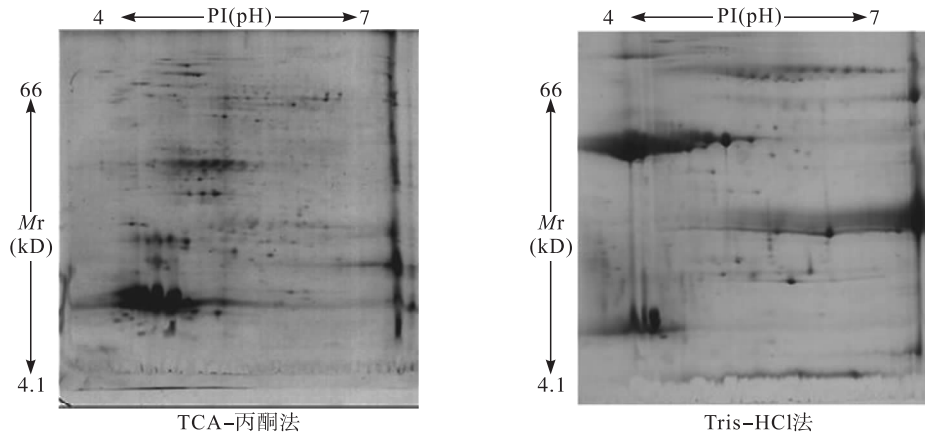


图 2 不同提取方法油茶种仁总蛋白的 2-DE 图谱分析

2.3 不同等电聚焦程序对双向电泳图谱的影响

利用 3 种不同等电聚焦程序对 TCA-丙酮法所提油茶种仁总蛋白样品进行分析,结果见图 3。由图 3 可以看出,不同等电聚焦程序对蛋白质双向电泳结果具有直接影响。程序 1 图谱中出现大量蛋白点缺失,出现许多横条纹,蛋白点未能被有效分离开。程序 2 图谱中背景清晰,蛋白点数量多,分布均匀,呈圆形或椭圆形,分离效果良好。程序 3 图谱中也能获得大量蛋白点,但与程序 2 相比有明显差异。在酸性偏中性区域出现蛋白点缺失(图中圆圈所圈

区域),不利于后期的胶内酶解取点分析。程序 1 中采用主动水化虽然可以除去样品中盐离子有利于大分子蛋白进入胶条,但低压过程会促使小分子蛋白跑出胶条造成小分子蛋白丢失。程序 3 采用被动水化,小分子蛋白达到了很好的分离效果,但聚焦时间过度造成胶内蛋白泳动受到干扰,导致蛋白点分布不均匀。而程序 2 采用被动水化方式,聚焦时间为 60 000 Vh,达到了更好的分离效果。由此可知,与其他 2 种程序相比,程序 2 更适合油茶种仁总蛋白双向电泳分析。

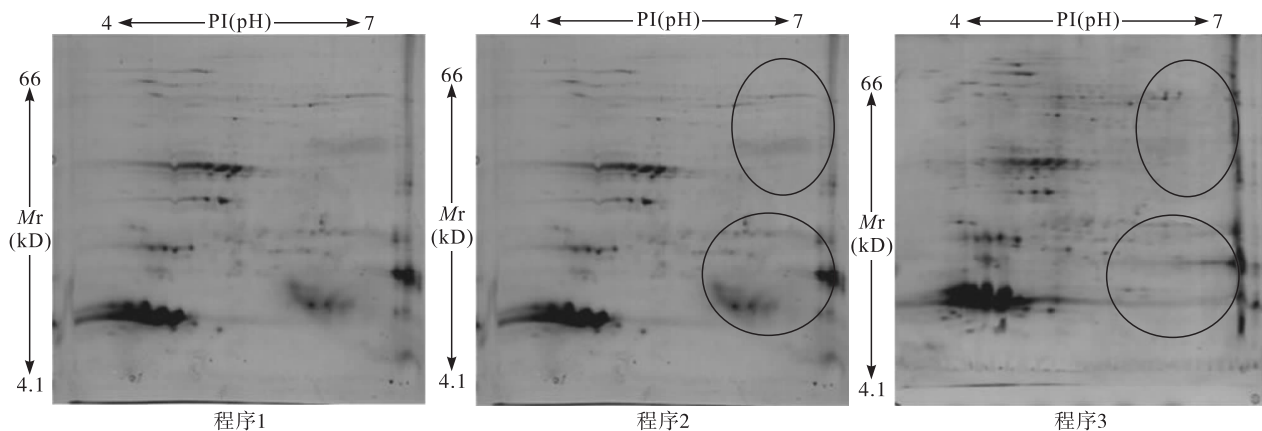


图 3 不同等电聚焦程序油茶种仁总蛋白的 2-DE 图谱分析

3 讨论

理想的蛋白质提取方法是后续的双向电泳分析的关键。不同植物含有的杂质成分各不相同^[12-14],因此需要针对油茶种仁组织选用合适蛋白质提取方法进行样品制备。油茶种仁中存在大量油脂、多酚、多糖类等代谢产物,油脂会与蛋白质共提取和共沉淀^[15],在沉淀过程中会引入大量杂质影响等电聚焦

效果。本研究采用改良后的 Tris-HCl 法和 TCA-丙酮法提取油茶种仁总蛋白,发现 Tris-HCl 法能获得大分子蛋白但小分子蛋白缺失严重,蛋白点分布不均匀;TCA-丙酮法蛋白提取率高,蛋白损失少,所得电泳结果背景清晰,适于作为油茶种仁总蛋白的提取方法。

等电聚焦参数对蛋白质分离有着直接的影响,

可以从 2-DE 图谱中得到直观的体现。样品中盐离子浓度过高会影响等电聚焦效果,因此本研究中设置了双重低压除盐并延长了除盐时间。等电聚焦伏时数不足,会导致蛋白聚焦不完全,容易产生横条纹。等电聚焦伏时数过大则会造成蛋白分解,影响蛋白分离^[16],本文优化的等电聚焦伏时数为 60 000 Vh,使得图谱背景清晰,分辨率高。

4 结论

本研究通过比较不同提取方法从油茶种仁中提取油茶种仁总蛋白并进行双向电泳分析。结果显示采用改良后的 TCA-丙酮法提取效果更好,得到 816 个蛋白点,蛋白点主要集中在等电点 pH 4.0~6.0 之间。并对双向电泳条件进行探索与优化,建立了一套适合油茶种仁总蛋白双向电泳分析的优化体系,可为后续开展油茶种仁蛋白质组学研究奠定技术基础。

参考文献:

[1] 李书国,李雪梅,陈辉.我国食用油质量安全现状、存在问题及对策研究[J].粮食与油脂,2005(12):3-6.
 [2] 李楠,许均瑜.蛋白质组学对于阿尔茨海默症诊断标记物筛选的研究进展[J].基因组学与应用生物学,2016,35(5):1108-1114.
 [3] 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.
 [4] 熊拯,陈敏娥,张炳亮.油茶籽粕蛋白质提取工艺及功能特性研究[J].粮油食品科技,2013,21(1):27-30.
 [5] CHEN J H, LIAU B C, JONG T T, et al. Extraction and purification of flavanone glycosides and kaempferol glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds by salting-out using hydrophilic isopropanol[J]. Sep Purif Technol, 2009, 67(1): 31-37.

[6] 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(1): 52-54.
 [7] ISAACSON T, DAMASCENO C M, SARAVANAN R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 769-774.
 [8] GU R S, LIU Q L, CHEN X M, et al. An improved method of 2D electrophoresis for protein analysis of woody plants[J]. J Beijing Forest Univ, 1999, 21(5): 7-10.
 [9] KRUGER N J. The Bradford method for protein quantitation[J]. Methods Mol Biol, 1994, 32: 9-15.
 [10] 余功明,胡春锦,魏源文,等.适于双向电泳分析的水稻纹枯病菌菌体蛋白提取方法的比较[J].西南农业学报,2011,24(6):2160-2163.
 [11] 胡晓倩,陈来同,赵健.SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法[J].中国生化药物杂志,2011,32(2):128-130.
 [12] 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.
 [13] 李勤,黄建安,刘硕谦,等.茶树蛋白质双向电泳样品制备技术研究[J].茶叶科学,2011,31(3):173-178.
 [14] 李涛,曾莉娟,王健华,等.槟榔叶片总蛋白质提取及双向电泳条件初探[J].热带作物学报,2009,30(6):746-750.
 [15] 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.
 [16] GORG A, WEISS W, DUNN M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4(12): 3665-3685.

(上接第78页)

[8] 陈燕妮,卢云,吴昊,等.N-酰基氨基酸系列表面活性剂的合成和应用[J].化学研究与应用,2001,13(2):192-195.
 [9] 孙建军,谢文磊,王志军,等.由脱脂豆粕合成N-硬脂酰基氨基酸表面活性剂[J].郑州粮食学院学报,1997,18(1):21-24.
 [10] 郭兴凤.蛋白质水解度的测定[J].中国油脂,2000,25(6):176-177.
 [11] 陈钧辉.生物化学实验[M].3版.北京:科学出版社,2003.
 [12] 程海涛,申献双.水力空化作用强化油酸酰氯酰化大

豆蛋白工艺的研究[J].中国油脂,2016,41(12):37-40.

[13] 陈程,王海坤,张存芳,等.响应面法优化超声辅助提取牡丹籽粕中多酚工艺[J].中国油脂,2017,42(3):127-130.
 [14] 李翔宇,田勇,陆姝欢,等.响应面法优化藻类来源磷脂型DHA的提取工艺[J].中国油脂,2017,42(4):118-122.
 [15] 胡伟,李湘洲,穆园园.响应面法优化超声乳化制备油茶籽油纳米乳液及其稳定性研究[J].中国油脂,2017,42(9):14-19.