

网络出版时间:2013-08-26 17:51

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130826.1751.015.html>

黄瓜叶片细胞壁蛋白双向电泳体系的建立

林梓浩^a, 李玉红^a, 董从娟^a, 陈 鹏^b

(西北农林科技大学 a 园艺学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**建立一套适合黄瓜叶片细胞壁蛋白质组学研究的双向电泳体系,为黄瓜细胞壁蛋白质组学的后续研究奠定基础。**【方法】**以黄瓜品种“长春密刺”幼苗叶片为材料,比较 2 种不同提取介质(CaCl₂ 和 LiCl 溶液)对细胞壁蛋白的提取效果,对比 IPG 胶条梯度、裂解液、上样量及等电聚焦程序对黄瓜叶片细胞壁蛋白双向电泳结果的影响。**【结果】**以 0.2 mol/L CaCl₂ 和 3 mol/L LiCl 溶液依次提取黄瓜叶片细胞壁蛋白,选用 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条和裂解液 II (7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、40 g/L CHAPS、10 g/L DTT 和 1 mmol/L PMSF),上样量 800 μg,按聚焦程序 I (20 ℃ 水化 14 h,100 V 30 min,250 V 30 min,500 V 30 min,1 000 V 1 h,线性升压 5 h 至 10 000 V,10 000 V 聚焦 6.5 h)聚焦后进行双向电泳分离和考马斯亮蓝 G-250 染色,可获得重复性好、分辨率高的双向电泳图谱。**【结论】**建立并优化了适合于黄瓜叶片细胞壁蛋白质组学分析的双向电泳体系。

[关键词] 黄瓜;叶片;细胞壁蛋白;双向电泳;条件优化

[中图分类号] S642.201

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)09-0091-07

Establishment of a two-dimensional electrophoresis system for cell wall proteomics analysis of cucumber leaves

LIN Zi-hao^a, LI Yu-hong^a, DONG Cong-juan^a, CHEN Peng^b

(a College of Horticulture, b College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**This study aimed to establish a two-dimensional electrophoresis(2-DE)system for cell wall proteomic analysis of cucumber leaves. **【Method】**In the experiment, cucumber seedling leaves of Changchun Mici variety were used as material. Two different extraction buffers for cell wall proteins of cucumber leaves were compared, and factors including pH gradient of IPG strip, different lysis buffers, sample loading levels and isoelectric focusing conditions influencing 2-DE system were examined systematically. **【Result】**The optimized system included the following steps: (1) extracting the cell wall proteins from cucumber leaves continuously by 0.2 mol/L CaCl₂ and 3 mol/L LiCl; (2) separating the proteins with 17 cm pH 3-10 NL IPG strips; (3) using the lysis buffer II (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 40 g/L CHAPS, 10 g/L DTT and 1 mmol/L PMSF); (4) loading protein samples of 800 μg followed by isoelectric focusing program I (20 ℃ hydration 14 h, 100 V 30 min, 250 V 30 min, 500 V 30 min, 1 000 V 1 h, 5 h gradient 10 000 V and 6.5 h at 10 000 V), and (5) staining the gels by Coomassie Brilliant Blue G250 after SDS-PAGE electrophoresis (125 g/L). Reproducible profiles with high resolution were obtained by the optimized 2-DE system for cell wall proteins of cucumber leaves. **【Conclusion】**The optimized 2-DE system for cell wall proteins of cucumber leaves was established and it was suitable for proteome comparison analysis.

[收稿日期] 2012-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31071791);西北农林科技大学基本科研业务费专项(QN2009011)

[作者简介] 林梓浩(1988—),男,广东普宁人,在读硕士,主要从事蔬菜生物技术研究。E-mail: zizi357@163.com

[通信作者] 李玉红(1973—),女,河南淅川人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事瓜类遗传育种与生物技术研究。E-mail: liyuhong73@126.com

Key words: cucumber; leaves; cell wall proteins; two-dimensional electrophoresis (2-DE); condition optimization

植物细胞壁在植物生长过程中发挥着重要作用,参与植物细胞的生长与分化、细胞间的相互识别等许多生命活动,构筑起植物抵抗生物和非生物胁迫的第一道屏障^[1]。植物细胞壁是一个复合结构,在构成细胞壁的成分中,90%左右是多糖,10%左右是蛋白质、酶类以及脂肪酸。细胞壁蛋白是细胞壁生命活动的主要承担者,越来越多的证据显示,细胞壁蛋白在维持细胞壁结构、细胞分化、信号转导和植物防卫等方面具有重要作用,已成为植物学研究中的一个崭新领域^[2-3]。蛋白质组学作为功能基因组学的重要支柱,具有时空性、可调节性和高通量的技术特点,是目前生物研究的热点。近几年来,细胞壁蛋白质组学已成为一个活跃的研究领域。通过蛋白质组学分析,拟南芥细胞壁中已被鉴定的蛋白多达 400 种^[1]。另外,有关小麦^[3]、苜蓿^[4]、大豆^[5]、番茄^[6]、葡萄^[7]等植物细胞壁蛋白质组学的研究也取得了一定进展。Kong 等^[3]研究发现,细胞壁中与防卫、信号转导有关的蛋白各占细胞壁蛋白的 17%和 3%左右。

黄瓜是世界上分布最广泛的蔬菜作物之一,目前其全基因组序列测定工作已完成^[8]。蛋白质组学作为后基因组时代的重要研究领域,为黄瓜的生物学研究提供了新的方向。目前,人们已经对黄瓜子叶^[9]、叶片^[10]、根系^[11]、木质部^[12]、韧皮部^[13]、悬浮细胞系^[14]等材料的蛋白质组学进行了研究,而对黄瓜细胞壁蛋白质组学的研究尚未见报道。本试验通过比较黄瓜叶片细胞壁蛋白的提取方法,探索了黄瓜叶片细胞壁蛋白双向电泳的优化方案,以期黄瓜细胞壁蛋白质组的后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2011-06—2012-08 在西北农林科技大学园艺学院农业重点实验室完成。供试黄瓜品种为“长春密刺”,购于黑龙江省鑫星农业发展有限公司。

将黄瓜种子催芽后播种于装有腐熟牛粪、泥土、草炭和蛭石(体积比为 3:2:4:1)的营养钵中,温室培养至第 3 片真叶展开时,取第 2 片真叶保存于-70℃冰箱中待用。

1.2 主要仪器和试剂

PROTEAN IEF System 水平电泳系统、PRO-

TEAN II XL Cell 垂直电泳系统和 Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell 垂直电泳仪,购自美国 Bio-Rad 公司;UMAX Power look 2100XL 扫描仪,购自美国 UMAX 公司。

IPG 胶条和载体两性电解质(pH 3~10),购自美国 Bio-Rad 公司;尿素、硫脲、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵(AP)、甘氨酸 3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、四甲基乙二胺(TEMED)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)和考马斯亮蓝(CBB)G-250,购自 Sigma 公司。其余试剂均为国产分析纯,所有溶液均用超纯水配制。

1.3 细胞壁蛋白质的提取

黄瓜叶片细胞壁蛋白质的提取参照 Negri 等^[7]、Jamet 等^[15]的方法并做一定改进。取 5 g 黄瓜叶片,添加质量分数 15% PVPP,在液氮中充分研磨。依次加入 25 mL 蔗糖浓度为 0.8、0.6、0.4 mol/L 的 HAc-NaAc 缓冲液(50 mmol/L, pH 4.6; PMSF 1 mmol/L, EDTA-Na₂ 2 mmol/L),于 4℃振荡 30 min,然后 4℃下 10 000 g 离心 30 min,弃上清液。再用超纯水反复冲洗 3~4 次,每次 4℃下 10 000 g 离心 30 min,最终所得沉淀物即为细胞壁组分。

在已洗净的细胞壁组分中加入 8 mL 含 0.2 mol/L CaCl₂ 的 HAc-NaAc 缓冲液(25 mmol/L, pH 4.6),充分摇匀后静置于 4℃冰箱中浸提 2 h,然后 4℃下 10 000 g 离心 30 min,取上清液。该步骤重复 1 次后,再加入 8 mL 含 3 mol/L LiCl 的 HAc-NaAc 缓冲液(25 mmol/L, pH 4.6),充分摇匀后静置于 4℃冰箱中浸提 2 h,4℃下 10 000 g 离心 30 min,取上清液待用。

向不同提取介质所得的上清液中分别加入 3 倍体积的 100 g/L TCA/丙酮,-20℃过夜沉降,4℃下 10 000 g 离心 30 min,去上清,将所得沉淀用体积分数 90%丙酮清洗 2~3 次,每次 4℃下 10 000 g 离心 30 min,去上清,沉淀于-20℃冰箱中冷冻干燥,所得干粉即为细胞壁蛋白质(CWP)。

1.4 裂解液的筛选

取相同样品干粉,分别加入裂解液 I (9 mol/L 尿素、40 g/L CHAPS、10 g/L DTT 和 1 mmol/L

PMSF)和裂解液Ⅱ(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、40 g/L CHAPS、10 g/L DTT 和 1 mmol/L PMSF)溶解,充分振荡、涡旋,于 20 ℃水浴 1 h 以充分溶解蛋白。15 ℃、10 000 g 离心 1 h,取上清液,15 ℃、10 000 g 再次离心 1 h,取上清液。采用 Bradford 法进行蛋白质定量后,将样品分装放置,于-70 ℃保存或直接进行电泳。

1.5 双向电泳条件的筛选

第一向等电聚焦(Isoelectric focusing, IEF)在 Bio-Rad PROTEAN IEF 电泳仪上进行,样品用水化上样缓冲液Ⅰ(8 mol/L 尿素、40 g/L CHAPS、10 g/L DTT、体积分数 0.2% Bio-Lyte 和 0.01 g/L 溴酚蓝)或水化上样缓冲液Ⅱ(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、40 g/L CHAPS、10 g/L DTT、体积分数 0.2% Bio-Lyte 和 0.01 g/L 溴酚蓝)补足至 350 μL,用去离子水将盐桥滤纸片润湿后置于电极上,沿着聚焦盘槽的边缘自左而右线性加入样品。去除预制 IPG 胶条上的保护层,将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘中样品溶液上,在每根胶条上覆盖 2~3 mL 矿物油,对好正、负极,设置电泳程序进行等电聚焦。

IPG 胶条的聚焦程序依据《Bio-Rad 蛋白质组双向电泳实验操作手册》设定,并做了一些修改。17 cm IPG 胶条的聚焦程序为:20 ℃水化 14 h,100 V 30 min,250 V 30 min,500 V 30 min,1 000 V 1 h,线性升压 5 h 至 10 000 V,10 000 V 聚焦 6.5 h(聚焦程序Ⅰ),或 10 000 V 聚焦 7.5 h(聚焦程序Ⅱ)。7 cm IPG 胶条的聚焦程序为:20 ℃水化 14 h,250 V 30 min,500 V 30 min,线性升压 3 h 至 4 000 V,4 000 V 聚焦 5 h(聚焦程序Ⅲ)。

第二向 SDS-PAGE 电泳在 Bio-Rad PROTEAN Ⅱ上进行,分离胶质量浓度为 125 g/L。电泳参数为 75 V,电泳 40 min 后,调至 200 V 电泳直至溴酚蓝线到达凝胶底部。电泳结束后,将凝胶用固定液(含体积分数 40%乙醇和体积分数 10%乙酸)固定 1 h,ddH₂O 漂洗 3 次,每次 10 min;CBB G-250 染色液(含体积分数 20%乙醇、体积分数 10%磷酸、100 g/L 硫酸铵、1.2 g/L CBB G-250)染色过夜,用脱色液(含体积分数 10%乙醇和体积分数 10%乙酸)和 ddH₂O 漂洗至胶体背景清晰为止。

1.6 凝胶扫描与图像分析

凝胶图像采集采用 UMAX Power look 2100XL 扫描仪扫描,分辨率设置为 300 dpi。采用 PDQuest 8.0.1 软件进行图像的处理和分析。

2 结果与分析

2.1 细胞壁蛋白提取方法的比较

将用 CaCl₂ 和 LiCl 提取的 CWP 干粉用裂解液Ⅰ溶解并定量后,分别取 50 μg 样品进行 SDS-PAGE 电泳。结果(图 1)表明,2 种不同提取方法所提取的 CWP 电泳条带主要集中在 20~40 ku,高分子质量和低分子质量区域也有一些条带分布,并且这 2 种提取方法的电泳条带有一定的差异性,说明 2 种方法所提取的细胞壁蛋白组分不尽相同,为了保持样品中蛋白质的多样性,在后续的双向电泳体系建立过程中,将 2 种方法依次提取出来的 CWP 富集后用于双向电泳。

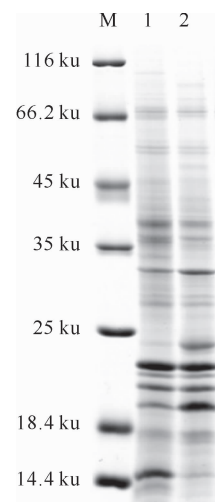


图 1 黄瓜叶片细胞壁蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
M. 蛋白 Marker;1. 用 CaCl₂ 提取的黄瓜叶片细胞壁蛋白;
2. 用 LiCl 提取的黄瓜叶片细胞壁蛋白

Fig.1 SDS-PAGE of cell wall proteins of cucumber leaves
M. Protein Marker;1. Cell wall proteins of cucumber leaves extracted by CaCl₂;2. Cell wall proteins of cucumber leaves extracted by LiCl

2.2 IPG 胶条对双向电泳结果的影响

为了选择最适合黄瓜叶片细胞壁蛋白分离的 IPG 胶条,分别采用 7 cm pH 3~10、17 cm pH 3~10 和 17 cm pH 3~10 非线性(NL)的 IPG 胶条进行比较。双向电泳 7 cm 的 IPG 胶条上样量为 250 μg,等电聚焦程序采用聚焦程序Ⅲ;17 cm 的 IPG 胶条上样量为 800 μg,等电聚焦程序采用聚焦程序Ⅰ。样品制备均采用裂解液Ⅰ。

采用 7 cm pH 3~10 IPG 胶条的双向电泳结果(图2A)表明,黄瓜叶片细胞壁蛋白主要分布在pH

6~8 的区域,酸性端 pH 3~5 的区域蛋白质点分布较少,碱性端 pH 9~10 的区域形成纵向拖尾,蛋白质点不能有效分离。由于 7 cm IPG 胶条较窄,出现了部分蛋白质点的堆叠。利用 PDQuest 8.0.1 检测到蛋白点 174 个。

采用 17 cm IPG 胶条的双向电泳结果表明,与线性 IPG 胶条(图 2B)相比,非线性 IPG 胶条(图 2C)分离所得蛋白点在凝胶上分布比较均匀,特别

是在 pH 6~8 的区域内,蛋白质点能更有效分离,一些低丰度蛋白可以清晰显现。用 PDQuest 8.0.1 分析显示,17 cm pH 3~10 IPG 胶条双向电泳图谱可得到蛋白点 431 个,17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条双向电泳图谱得到蛋白点 507 个。所以,选择 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条最适用于黄瓜叶片细胞壁蛋白的双向电泳分析。

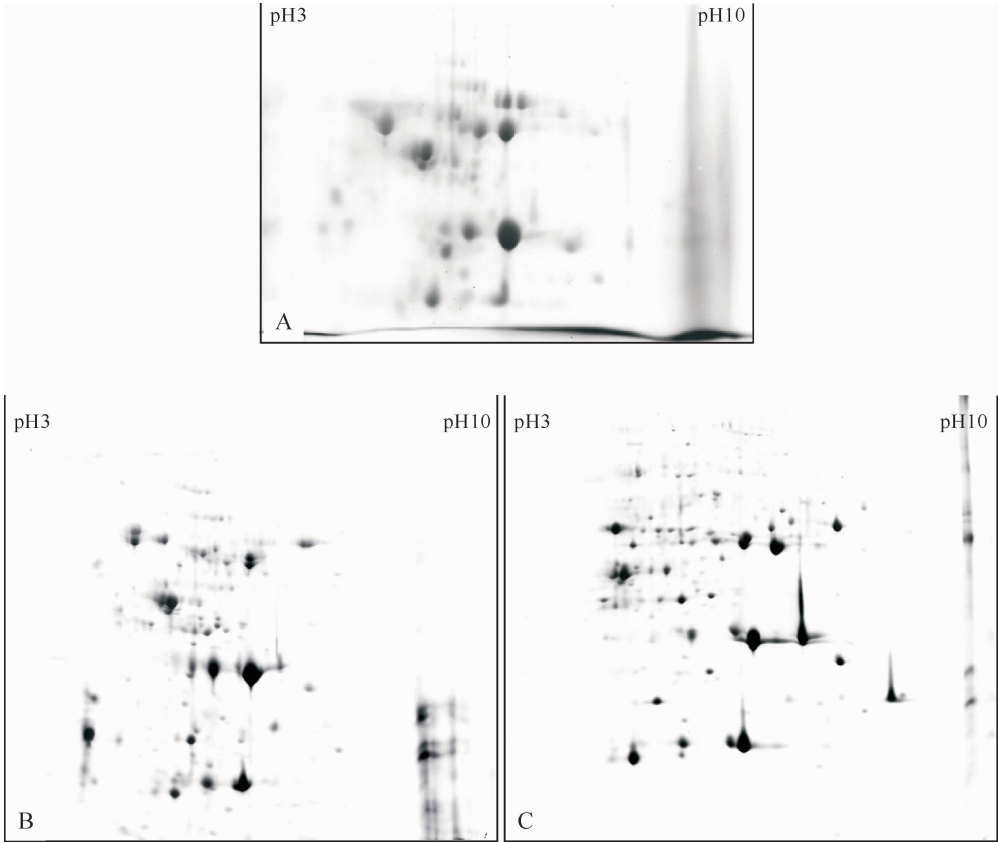


图 2 不同 IPG 胶条对黄瓜叶片细胞壁蛋白双向电泳结果的影响
A. 7 cm 线性;B. 17 cm 线性;C. 17 cm 非线性

Fig. 2 Effects of different IPG strips on the 2-DE map of cell wall proteins of cucumber leaves
A. 7 cm L;B. 17 cm L;C. 17 cm NL

2.3 裂解液对双向电泳结果的影响

不同裂解液对蛋白样品的溶解度存在差异,而且对双向电泳图谱的结果影响较大。分别用裂解液 I 和裂解液 II 制备样品,采用 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条进行双向电泳,上样量为 800 μg,等电聚焦程序采用聚焦程序 I。

通过试验对比和 PDQuest 8.0.1 分析,采用裂解液 I 的双向电泳图谱(图 3A)的蛋白质点为 527 个,采用裂解液 II 的双向电泳图谱(图 3B)的蛋白质

点为 714 个。结果表明,裂解液 II 对黄瓜叶片细胞壁蛋白的溶解度更大,其双向电泳图谱的蛋白质点明显增多,有效地减少了双向电泳图谱的空白区域,缺点是其双向电泳图谱的条纹有所增多,这可能是由于裂解液 II 溶解度比较大,样品中杂质增多而影响等电聚焦的效果。考虑到采用制备型凝胶进行双向电泳的目的是为了获得高含量的蛋白质点,从而满足质谱测序的需要,所以裂解液 II 更适用于黄瓜叶片细胞壁蛋白的双向电泳分析。

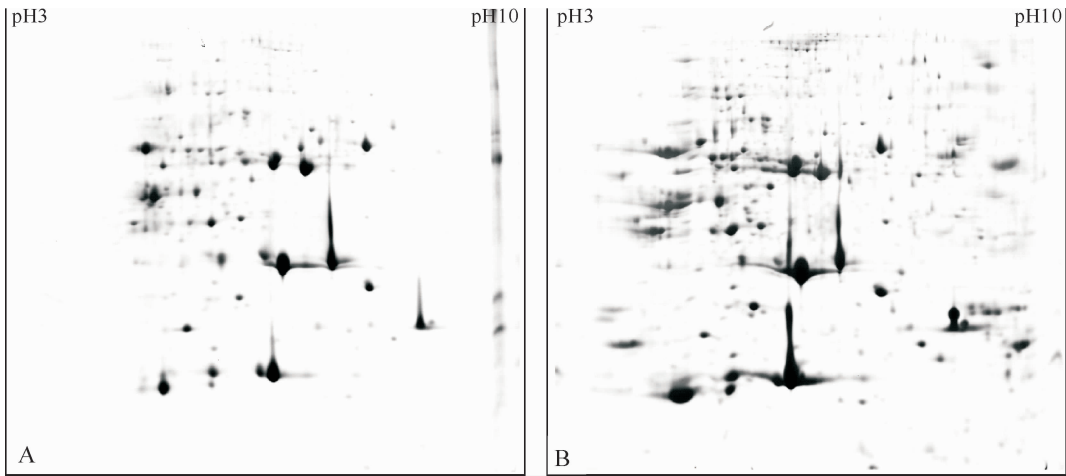


图 3 不同裂解液对黄瓜叶片细胞壁蛋白双向电泳结果的影响
A. 裂解液 I ;B. 裂解液 II

Fig. 3 Effects of different lysis buffers on the 2-DE map of cell wall proteins of cucumber leaves
A. Lysis buffer I ;B. Lysis buffer II

2.4 上样量对双向电泳结果的影响

为获取最佳的蛋白上样量,对于 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条分别选用 800 和 1 000 μg 的上样量进行双向电泳,样品制备均采用裂解液 II ,等电聚焦程序采用聚焦程序 I 。

利用 PDQuest 8.0.1 分析,上样量为 800 μg 的双向电泳图谱(图 4A)所得蛋白点为 768 个,上样量为 1 000 μg 的双向电泳图谱(图 4B)所得蛋白点为

879 个。结果表明,随着上样量的增加,双向电泳图谱的蛋白质点也有所增加,但是上样量 1 000 μg 的双向电泳图谱的蛋白质点拖尾严重,部分低丰度蛋白被高丰度蛋白所掩盖,酸性端 pH 3~5 区域的蛋白质点发生堆叠无法有效分离。鉴于此,选择适宜的上样量 800 μg 更有利于黄瓜叶片细胞壁蛋白的双向电泳分析。

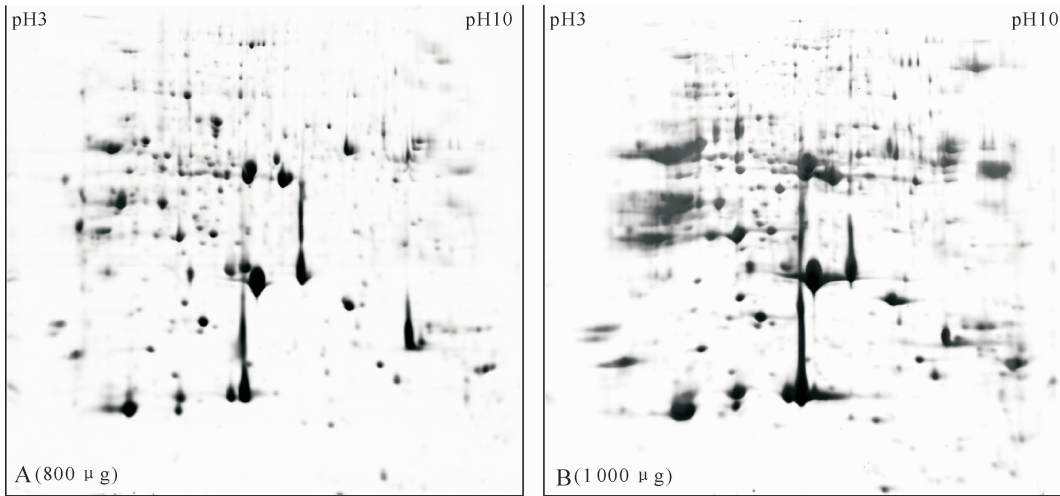


图 4 不同上样量对黄瓜叶片细胞壁蛋白双向电泳结果的影响

Fig. 4 Effects of different sample loading volumes on the 2-DE map of cell wall proteins of cucumber leaves

2.5 等电聚焦程序对双向电泳结果的影响

对黄瓜叶片细胞壁蛋白采用 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条,上样量 800 μg ,分别采用聚焦程序 I 和聚焦程序 II 进行聚焦。双向电泳结果表明,采用聚焦程序 I 的 2-DE 图谱(图 5A)聚焦充分,蛋白质

点呈圆球形,横条纹少;而采用聚焦程序 II 的 2-DE 图谱(图 5B)横条纹明显增多,可能是聚焦过度所致。所以聚焦程序 I 更适用于黄瓜叶片细胞壁蛋白的双向电泳分析。

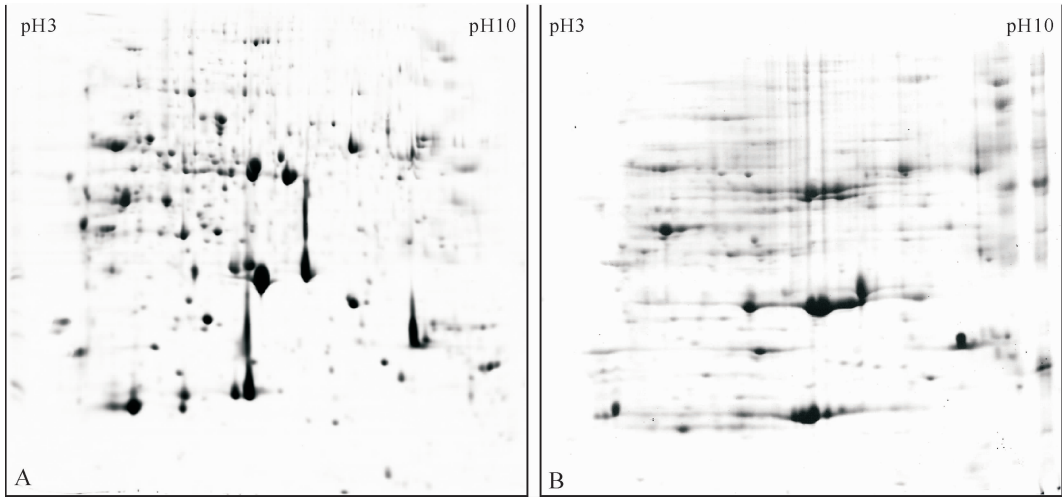


图 5 不同等电聚焦程序对黄瓜叶片细胞壁蛋白双向电泳结果的影响

A. 聚焦程序 I ;B. 聚焦程序 II

Fig. 5 Effects of different isoelectric focusing conditions on the 2-DE map of cell wall proteins of cucumber leaves

A. Isoelectric focusing program I ;B. Isoelectric focusing program II

3 讨 论

3.1 细胞壁蛋白提取方法的比较

根据与细胞壁其他成分结合程度的强弱,细胞壁蛋白可分为 3 种类型:松散结合型蛋白(Loosely bound CWP)、非紧密结合离子型蛋白(Weakly bound CWP)和紧密结合交联型蛋白(Strongly bound CWP)^[1]。

提取 CWP 的方法主要有盐溶液萃取法^[6-7]、真空渗透法^[16]和尿素提取法^[17]等。目前,多采用盐溶液萃取法提取细胞壁蛋白,常用的盐溶液有 NaCl、CaCl₂ 和 LiCl 等,其中,CaCl₂ 溶液是提取高等植物细胞壁蛋白的最有效试剂,而 LiCl 主要用于提取富含羟脯氨酸的糖蛋白^[1]。Negri 等^[7]通过探讨不同提取方法对葡萄果皮细胞壁蛋白双向电泳结果的影响,认为将 CaCl₂ 和 LiCl 溶液所提取的蛋白样品混合,能有效提高双向电泳图谱蛋白质点的数量;而且将丙酮沉降的蛋白干粉用 Tris 饱和酚复溶、0.1 mol/L 乙酸铵/甲醇沉降和体积分数 80% 丙酮清洗,能有效减少双向电泳图谱的条纹。Dahal 等^[6]在提取番茄茎干的细胞壁蛋白时,采用 0.2 mol/L CaCl₂ 和 3 mol/L LiCl 溶液接连浸提,然后将提取的蛋白溶液进行梯度离心,所得浓缩物经 2-D clean up 试剂盒沉降和清洗后用于双向电泳的分离与分析,其双向电泳图谱经检测约有 470 个蛋白质点。朱昀昊等^[18]在改进细胞壁蛋白提取方法的研究中,利用超声波破碎植物组织细胞和苯酚抽提的方法进一步减少细胞质蛋白和其他杂质的污染,获得了较

清晰的 SDS-PAGE 电泳图谱。本试验结合前人的经验,采用 0.2 mol/L CaCl₂ 和 3 mol/L LiCl 溶液结合起来依次提取细胞壁蛋白,并将所提取蛋白溶液混合后添加 3 倍体积的质量浓度为 100 g/L 的 TCA/丙酮进行沉降,用体积分数 90% 丙酮充分清洗并冷冻干燥,所得样品经裂解液复溶后适用于双向电泳,有效地解决了黄瓜叶片细胞壁蛋白的提取问题。

3.2 不同条件对双向电泳结果的影响

双向电泳的分析程序主要包括样品的制备、第一向等电聚焦 IEF、第二向 SDS-PAGE 分离、凝胶染色、图像的采集和分析等步骤。要建立一套重复性好和分辨率高的双向电泳体系,获得满意的双向电泳图谱,受到诸多条件和参数的影响,其中,除了样品的成功制备外,IPG 胶条选择、裂解液浓度、上样量、聚焦条件、染色方法等很多因素都会影响电泳结果。因此,对于每一种样品,为了获取最佳的电泳结果,需确定每一个特定的条件组合,建立一套稳定的分辨率高的双向电泳体系。

采用不同梯度的 IPG 胶条对同一样品进行分离,所得蛋白质点有明显差别。研究表明,CWP 含有大量的碱性糖蛋白,超过 60% 的 CWP 的 *pI* 值为 8.0~12.9,而富含羟脯氨酸的糖蛋白由于高度糖基化,双向电泳技术并不能对其进行有效的分离和检测^[19]。虽然窄 pH 梯度的 IPG 胶条可以提高上样量,在分离等电点相差不大的蛋白时能获得更高的分辨率,但由于细胞壁蛋白的特异性,采用宽 pH 梯度的 IPG 胶条更有利于其分离和分析。本试

验中,采用 7 cm pH 3~10 和 17 cm pH 3~10 NL 的 IPG 胶条对黄瓜叶片细胞壁蛋白进行分离,得到的蛋白质点相差 1.9 倍;且由于非线性胶条加大了中间区域的宽度,更有利于对富集在该区域的蛋白进行分离,所以采用 17 cm pH 3~10 NL 的 IPG 胶条更适合于黄瓜叶片细胞壁蛋白的双向电泳分离。

为了取得良好的等电聚焦效果,蛋白样品必须充分解聚和溶解。尿素是一种中性的促溶剂,它能破坏蛋白的疏水键和离子键,使蛋白质解折叠并充分伸展而暴露出疏水中心,提高样品的溶解度,因而在双向电泳中被用作变性剂。Herbert^[20] 研究发现,硫脲是高效率的变性剂,能溶于高浓度的尿素溶液,改善疏水性膜蛋白的溶解性,因此在裂解液中添加硫脲可以进一步提高蛋白样品的溶解度,特别是偏疏水性的蛋白质。翁瑜等^[21] 在对比 3 种常用的蛋白质提取方法时发现,硫脲裂解液对细胞蛋白质的溶解性最佳,且与双向凝胶电泳条件更兼容。本试验结果表明,采用添加硫脲的裂解液,黄瓜细胞壁蛋白 2-DE 图谱上的蛋白质点明显增多,更有利于 CWP 的双向电泳分析。

上样量的大小直接影响双向电泳的分辨率。上样量过低,低丰度蛋白无法显现;上样量过高,蛋白则无法有效分离,最佳的上样量需根据具体的试验对象探索确定。本试验采用 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条进行分离,800 μg 的上样量能获得较满意的 2-DE 图谱,1 000 μg 的上样量虽然能获得更多的蛋白质点,但引起了蛋白质点的堆叠和掩盖,不利于图谱分析。

双向电泳中第一向等电聚焦电泳(IEF)是利用蛋白质分子等电点的不同,在一个稳定、连续的 pH 梯度中进行蛋白质的分离和分析。等电聚焦程序对蛋白质分离有直接影响,会导致 2-DE 图谱上出现横向或纵向条纹、蛋白点的拖尾及不规则的蛋白质点,影响分辨率和重复性。如果等电聚焦不完全,在凝胶上容易产生水平条纹,但是过度等电聚焦会造成电渗和蛋白质飘移。本试验结果表明,采用聚焦程序 I 更适用于 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条进行黄瓜叶片细胞壁蛋白的分离。

4 结 论

本研究结果表明,采用 0.2 mol/L CaCl_2 和 3 mol/L LiCl 溶液依次提取黄瓜叶片细胞壁蛋白,选用 17 cm pH 3~10 NL IPG 胶条和裂解液 II,上样量 800 μg ,按聚焦程序 I 进行等电聚焦,第二向

SDS-PAGE 分离胶质量浓度为 125 g/L,可获得重复性好、分辨率高、背景清晰的双向电泳图谱,是适用于黄瓜叶片细胞壁蛋白的双向电泳体系。

[参考文献]

- [1] Jamet E, Albenne C, Boudart G, et al. Recent advances in plant cell wall proteomics [J]. *Proteomics*, 2008, 8(4): 893-908.
- [2] Lagaert S, Belin T, Volckaert G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(9): 1064-1073.
- [3] Kong F J, Oyanagi A, Komatsu S. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2010, 1804(1): 124-136.
- [4] Watson B S, Lei Z, Dixon R A, et al. Proteomics of *Medicago sativa* cell walls [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(12): 1709-1720.
- [5] Komatsu S, Kobayashi Y, Nishizawa K, et al. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress [J]. *Amino Acids*, 2010, 39(5): 1435-1449.
- [6] Dahal D, Pich A, Braun H P, et al. Analysis of cell wall proteins regulated in stem of susceptible and resistant tomato species after inoculation with *Ralstonia solanacearum*: A proteomic approach [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73(6): 643-658.
- [7] Negri A S, Prinsi B, Scienza A, et al. Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(13): 1379-1389.
- [8] Huang S, Li R, Zhang Z, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12): 1275-1281.
- [9] Hao J H, Dong C J, Zhang Z G, et al. Insights into salicylic acid responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons based on a comparative proteomic analysis [J]. *Plant Science*, 2012, 187: 69-82.
- [10] 范海延, 陈捷, 吕春茂, 等. 黄瓜杂交二代抗黄瓜白粉病的蛋白质组学初步分析 [J]. *园艺学报*, 2007, 34(2): 349-354.
Fan H Y, Chen J, Lü C M, et al. Proteomic analysis of F₂ generation of cucumber against the cucumber powdery mildew disease [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(2): 349-354. (in Chinese)
- [11] Du C X, Fan H F, Guo S R, et al. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(13): 1450-1459.
- [12] Buhtz A, Kolasa A, Arlt K, et al. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species [J]. *Planta*, 2004, 219(4): 610-618.
- [13] Walz C, Giavalisco P, Schad M, et al. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(12): 1795-1804.