



生命科学实验指南系列

Plant Proteomics
Methods and Protocols

植物蛋白质组学 实验指南

〔法〕 H.蒂勒门特 M.齐维 C.达默韦尔 V.米琴 主编
沈世华 等 译



科学出版社

生命科学实验指南系列

植物蛋白质组学实验指南

Plant Proteomics

Methods and Protocols

H. 蒂勒门特

M. 齐维

[法]

C. 达默韦尔

主编

V. 米琴

沈世华 等 译

科学出版社

北京

图字：01-2008-2162 号

内 容 简 介

本书由国际植物蛋白质组学研究领域的数位专家合作编写而成，系统介绍了植物细胞总蛋白、细胞器蛋白的分离提取，蛋白质的修饰，经典的蛋白质双向电泳、质谱技术等植物蛋白质组学研究的常用技术方法。对实验流程的描述简洁易懂，并配有实例，同时对关键步骤做了特别注释，无论对教学还是科研都有很高的参考价值。

本书可作为高等院校和科研院所的植物学、蛋白质组学、分子生物学专业的科研人员和研究生的参考书。

Translation from the English Language edition:

Plant Proteomics edited by Hervé Thiellement

Copyright © 2007 Humana Press Inc.

Springer is a part of Springer Science + Business Media

All Rights Reserved

图书在版编目(CIP)数据

植物蛋白质组学实验指南/(法)蒂勒门特(Thiellement, H.)等主编;
沈世华等译. —北京:科学出版社, 2013. 1

(生命科学实验指南系列)

书名原文: Plant proteomics: methods and protocols

ISBN 978-7-03-036460-9

I. ①植… II. ①蒂…②沈… III. ①植物蛋白-基因组-实验-指南
IV. ①Q946. 1-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 010382 号

责任编辑: 夏 梁 贺密青 / 责任校对: 彭 涛

责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 1 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 1 月第一次印刷 印张: 21

字数: 495 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

编者名单

- AJITH ANAND • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
EMMANUELLE BANCEL • *INRA Station d'Amélioration et Santé des Plantes, Clermont Ferrand, France*
MURIEL BARDOR • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
GÉRARD BRANLARD • *INRA Station d'Amélioration et Santé des Plantes, Clermont Ferrand, France*
HANS-PETER BRAUN • *Abteilung Angewandte Genetik, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Hannover, Hannover, Germany*
LINDA BRECI • *Department of Chemistry, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
DELPHINE CENTENO • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
JAMILA CHAÏB • *INRA Avignon, UR de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France*
FRANÇOIS CHEVALIER • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
MIREILLE CHEVALLET • *Laboratoire d'Immunologie, CEA, Grenoble, France*
CATHERINE DAMERVAL • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
FRÉDÉRIC DELOM • *Plant Biochemistry & Molecular Physiology, INRA, Montpellier, France*
KÅRE ENKILDE • *BioCentrum-DTU, Biochemistry and Nutrition Group, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*
HOLGER EUBEL • *ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, The University of Western Australia, Perth, Australia*
MIREILLE FAUROBERT • *INRA Avignon, UR de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France*
LOÏC FAYE • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
TANJA FEILNER • *Department of Biochemistry, University College Cork, Cork, Ireland*
ANNE-CATHERINE FITCHETTE • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
LISA GIACOMELLI • *Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York*
RÉMY GIBRAT • *Plant Biochemistry & Molecular Physiology, INRA, Montpellier, France*

- FERNANDO GONZÁLEZ-CAMACHO • *Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain*
- ANGELIKA GÖRG • *Technische Universität München, Fachgebiet Proteomik, Freising-Weihenstephan, Germany*
- PAUL A. HAYNES • *Bio5 Institute for Collaborative Bioresearch and Department of Biochemistry and Molecular Biophysics1, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
- EMILY HATTRUP • *Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
- JOSHUA L. HEAZLEWOOD • *ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, The University of Western Australia, Perth, Australia*
- JESCO HEINEMEYER • *Abteilung Angewandte Genetik, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Hannover, Hannover, Germany*
- FATIMAH HICKMAN • *Bio5 Institute for Collaborative Bioresearch, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
- SUSANNE JACOBSEN • *BioCentrum-DTU, Biochemistry and Nutrition Group, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*
- JOHANN JOETS • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
- MATTHEW KEELER • *Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
- JULIA KEHR • *Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam, Germany*
- BIRGIT KERSTEN • *RZPD German Resource Center for Genome Research GmbH, Berlin, Germany*
- SETSUKO KOMATSU • *Laboratory of Gene Regulation, Department of Molecular Genetics, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan*
- OLIVIER LANGELLA • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
- CÉLINE LALANNE • *INRA, UMR BIOGECO, Equipe de Génétique, 69 route d'Arcachon, 33612 Cesta Cédex, France*
- ZHENTIAN LEI • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
- JESSICA LETARTE • *Bio5 Institute for Collaborative Bioresearch2, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
- DAGMAR LEWEJOHANN • *Abteilung Angewandte Genetik, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Hannover, Hannover, Germany*
- SYLVIE LUCHE • *Laboratoire d'Immunologie, CEA, Grenoble, France*
- VALÉRIE MÉCHIN • *UMR de Chimie Biologique, Thiverval Grignon, France*
- FRANCISCO JAVIER MEDINA • *Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain*

- A. HARVEY MILLAR • *ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, The University of Western Australia, Perth, Australia*
- KIRANKUMAR S. MYSORE • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
- LUC NEGRONI • *Faculté de Médecine, Plate-forme Protéomique, Nice, France*
- ESTHER PELPOIR • *INRA Avignon, UR de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France*
- JEAN-BENOIT PELTIER • *Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York*
- CHRISTOPHE PLOMION • *NRA, UMR BIOGECO, Equipe de Génétique, Cestas, France*
- THIERRY RABILLOU • *Laboratoire d'Immunologie, CEA, Grenoble, France*
- MARTIJN REP • *Plant Pathology, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands*
- VALÉRIE ROFIDAL • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
- MICHEL ROSSIGNOL • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
- VÉRONIQUE SANTONI • *Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, INRA, Montpellier, France*
- NICOLAS SOMMERER • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
- IB SØNDERGAARD • *BioCentrum-DTU, Biochemistry and Nutrition Group, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*
- LLOYD W. SUMNER • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
- WOJCIECH SZPONARSKI • *Plant Biochemistry & Molecular Physiology, INRA, Montpellier, France*
- HERVÉ THIELLEMENT • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
- OLIVIA TRAN DINH • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
- MARIA V. TURKINA • *Division of Cell Biology, Linköping University, Linköping, Sweden.*
- ALEXANDER V. VENER • *Division of Cell Biology, Linköping University, Linköping, Sweden.*
- BONNIE S. WATSON • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
- WALTER WEISS • *Technische Universität München, Fachgebiet Proteomik, Am Forum 2, Freising-Weihenstephan, Germany*
- KLAAS J. VAN WIJK • *Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York*
- MICHEL ZIVY • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*

前言

本书的宗旨是提供已被植物蛋白质组学领域的科学家验证的先进实验方法和解决问题的对策。在 25 年前，当第一篇关于植物蛋白质组学的文章发表时，这个领域确实很小，但是随着这些年飞速的发展，在全世界范围内的大多数国家，有很多实验室正在开展植物蛋白质组学研究。

双向电泳仍然是研究植物蛋白质组学的最常用的基本方法，但第一向电泳采用 IPG 技术（第 13 章）和检测蛋白质点采用荧光染料新方法（第 14 章和第 15 章），使双向电泳技术得到了很大的改进。对于植物组织，因为其中常含有酚、蛋白酶和其他次级代谢产物而影响蛋白质的提取，但在这方面已经有良好的进展。对于从特殊植物组织（第 3~5 章）和细胞器（第 6 章和第 10 章）中提取蛋白质的操作步骤已经进行了标准优化（第 1 章和第 2 章）。而这些蛋白质提取的方法取决于膜蛋白在提取液中的增溶情况（第 11 章和第 12 章）。尽管传统的 Edman 测序方法最早用于蛋白质鉴定，但是质谱的出现是技术上一个重要革新，因为它不仅能高通量鉴定从双向电泳中分离的蛋白质点（第 19 章和第 20 章），还能直接鉴定第一向蛋白质条带中的蛋白质（第 27 章和第 28 章）。结合其他技术如双向液相色谱或完整蛋白质的液相色谱技术，质谱同样可以从混合物中鉴定多肽（第 21 章和第 22 章）。现今，植物蛋白质组学主要关注的研究领域是翻译后修饰的分析和蛋白质之间的互作关系（第 24~29 章）。最后，通过蛋白质组学方法得到的各种数据（定性和定量数据、光谱数据）已经整理成数据库并通过互联网共享（第 23 章），同时为了有效地分析数据的丰度，统计工具也是必不可少的（第 16 章和第 17 章）。

对于初学者来说，不论是在潮湿或干燥的实验室，按照书中作者提供的各种详细的植物蛋白质组学实验方法，都能取得理想的实验结果。专业的蛋白质组学科研人员同样能从此书中获益来解决他们不常碰到的技术问题。

H. 蒂勒门特

M. 齐维

C. 达默韦尔

V. 米琴

目 录

前言

第 1 章	三氯乙酸-丙酮法提取植物全蛋白	1
第 2 章	顽拗性植物组织的蛋白质组学研究: 苯酚法提取蛋白质	8
第 3 章	谷类植物种子蛋白质提取	13
第 4 章	木质部和韧皮部汁液蛋白质提取	22
第 5 章	木本植物蛋白质提取	30
第 6 章	拟南芥叶绿体蛋白质组学分析	34
第 7 章	植物线粒体制备及其亚结构分级分离	39
第 8 章	根分生细胞核蛋白质提取	51
第 9 章	核蛋白提取	60
第 10 章	紫花苜蓿茎细胞壁蛋白质提取	65
第 11 章	植物质膜蛋白的提取和溶解	76
第 12 章	双向电泳前去垢剂和离液剂对蛋白质的增溶作用	91
第 13 章	植物蛋白质组学中的双向电泳技术	98
第 14 章	双向凝胶荧光染色与成像	117
第 15 章	番茄叶和根二维差异凝胶电泳 (DIGE)	128
第 16 章	二维凝胶的定量分析	142
第 17 章	蛋白质组数据的多元分析	158
第 18 章	2D 凝胶的蛋白 Edman 测序	172
第 19 章	肽质量指纹图谱——MALDI-TOF 法鉴定蛋白质	178
第 20 章	利用纳升级液相色谱-串联质谱进行蛋白质鉴定	191
第 21 章	水稻叶片和根蛋白质的纳升级二维液相色谱串联质谱	202
第 22 章	膜蛋白的分离、鉴定及其功能分析——GFC/IEC/SDS-PAGE 和 MALDI-TOF-MS 方法	217
第 23 章	2-DE 蛋白质组学的 PROTECdb 数据库	227
第 24 章	磷酸化蛋白鉴定	248
第 25 章	植物蛋白质组学和糖基化	258
第 26 章	鉴定分析植物蛋白复合物的蓝绿非变性凝胶电泳	280
第 27 章	完整蛋白质从 SDS-PAGE 胶中的电洗脱及其 MALDI-TOF MS 分析	289
第 28 章	植物蛋白芯片的构建和抗原-抗体相互作用的研究	298
第 29 章	利用植物蛋白质芯片研究蛋白磷酸化	310
索引		320

第1章 三氯乙酸-丙酮法提取植物全蛋白

Valérie Méchin, Catherine Damerval 和 Michel Zivy

摘要 本章我们介绍一种适用于各种植物组织全蛋白抽提的高效方法。该方法利用三氯乙酸和含有 β -巯基乙醇的丙酮在沉淀蛋白质的同时使其变性。同时，我们还将介绍分别在进行经典的 IEF 电泳或用 IPG 胶条电泳之前的蛋白质溶解方法。整个过程简单易行，但在操作过程中必须注意以下两点：①抽提必须在低温下进行；②蛋白质溶解过程应在 22~25℃ 条件下进行以免尿素沉淀。

关键词 蛋白质抽提；蛋白质溶解；三氯乙酸（TCA）；丙酮；总蛋白；离合剂；变性剂；还原剂；植物蛋白质组学

1.1 前言

在蛋白质组研究中，双向电泳图谱的比较占有重要地位。双向电泳必须能很好地分离各个蛋白质，应尽量避免拖尾、横纹或因蛋白质降解而产生的假相。蛋白质在图谱上的分布模式必须是可重复的。蛋白质样品的制备是这些条件得以保持的重要前提。植物蛋白提取的难点在于植物细胞中蛋白质的含量低，同时还含有很多干扰蛋白提取的有机物，如酚类、色素、脂类及核酸等^[1]。提取出的蛋白必须溶解在与等电聚焦（IEF）电泳缓冲系统兼容的样品溶液中。

经过在各种植物组织中的试验，我们建立了一种以三氯乙酸和丙酮使蛋白质变性并沉淀的提取方法。本方法起源于 Wu 和 Wang^[2] 最初关于三氯乙酸沉淀蛋白质能高效抑制蛋白酶活性的报道。提取出来的蛋白质最后溶解在尿素-碳酸钾-SDS（UKS）^[3] 溶液中。用本方法提取的蛋白质样品在电泳中具有很好的重复性，同时对于高分子质量和高等电点的蛋白质也有很好的分辨率，因而被广泛使用，且命名为三氯乙酸/丙酮法^[4,5]。UKS 样品缓冲液适合用于最初的自制管胶进行的等电聚焦电泳。这种自制管胶进行等电聚焦时，pH 梯度是在施加电压后由两性电解质移动形成。20 世纪 90 年代开始出现的商品化的 IPG 胶条用于等电聚焦电泳，大大提高了电泳的重复性，因而被广泛使用。然而，使用 IPG 胶条进行等电聚焦时，需要施加很高的电压，而 UKS 溶液中的高含盐量和 SDS 使得该缓冲液不适合这种等电聚焦系统^[6]，因而必须采用新的样品缓冲液。

本章，我们将着重描述分别为进行传统的等电聚焦和现代的 IPG 等电聚焦电泳制备样品所采用的不同步骤。

1.2 材 料

1.2.1 蛋白沉淀溶液

含 10% (*m/V*) 三氯乙酸和 0.07% β -巯基乙醇 (2ME) (*V/V*) 的丙酮 (低温)。应在使用前新鲜配制, 并置于 -20°C 条件下直到使用 (见注释 1)。

注意: 3 种试剂均有毒, 必须在通风橱中配制。

1.2.2 清洗溶液

含 0.07% 2ME (*V/V*) 的丙酮, 可在 -20°C 下贮存约 1 个月。

1.2.3 R2D2 蛋白质溶解缓冲液

5mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、2% 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS; *m/V*)、2% 癸基二甲基胺基丙烷硫酸盐 (SB3-10) (*m/V*)、20mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)、5mmol/L 磷化氢、0.5% 两性电解质 (pharmalyte) (*V/V*) pH 4~6.5、0.25% 两性电解质 (pharmalyte) (*V/V*) pH 3~10, 以双蒸水配制。配制时可以稍微加热 (不高于 30°C , 见注释 2) 以溶解尿素。配制好的溶液可以分装保存在 -80°C 下数月 (注释 3)。

1.2.4 UKS 蛋白质溶解缓冲液

9.5mol/L 尿素、5mmol/L K_2CO_3 、1.25% SDS、5% DTT、6% Triton X-100、2% 两性电解质 (ampholines) pH 3.5~9.5, 以双蒸水配制。 K_2CO_3 可以配制成 2.8% (*m/V*)、SDS 配制成 10% (*m/V*) (过滤)、Triton X-100 配制成 20% 的贮存液, 加入其他成分和 3ml 双蒸水直到尿素溶解 (可加热至 30°C 以下, 见注释 2)。配制好的溶液可以分装保存在 -80°C 条件下数月。

1.2.5 蛋白质浓度测定

溶解于 UKS 或 R2D2 中的蛋白质可以用 Amersham Biosciences 的 2-D Quant 试剂盒进行定量。该方法的主要原理是先将蛋白质沉淀, 然后用铜离子与蛋白质进行特异结合, 具体过程参见产品说明书 (ref. 80-6483-56)。该方法与绝大多数在蛋白质制备过程中使用的试剂都兼容。

1.2.6 IPG 胶条水化液 (仅适用于 UKS 制备的样品)

(1) 溶液 A: 7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、1.4% CHAPS (*m/V*)、16mmol/L DTT、5mmol/L 磷化氢、0.3% 两性电解质 (pharmalyte) pH 3~10 (*V/V*), 双蒸水配制。

(2) 溶液 B: 7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、0.5% CHAPS (*m/V*)、10mmol/L

DTT、5mmol/L 磷化氢，双蒸水配制。

1.3 方 法

1.3.1 蛋白质沉淀与变性

(1) 用研钵和研槌在液氮中将植物材料研磨成细小的粉末（见注释4）。

(2) 将约 200 μ l 粉末转移到 2ml 的离心管中，加入 1.8ml 预冷的三氯乙酸-2ME-丙酮溶液（见注释5），混和后置于 -20°C 1h。三氯乙酸和丙酮可以使蛋白质变性并沉淀，同时还可以使各种多酚氧化酶和其他氧化酶类失活，从而阻止因酚类被氧化为醌类而导致的蛋白质互相结合形成难溶的复合体。该方法同酚抽提法^[7,8]一样都能使蛋白酶失活^[3]。丙酮还可以溶解植物细胞内的各种色素、脂质以及萜类化合物。而 2ME 则可以阻止蛋白沉淀过程中二硫键的形成。

(3) 10 000g 下冷冻离心机中离心 10min。

1.3.2 2ME-丙酮溶液清洗蛋白质样品

(1) 弃掉离心所得上清后用 1.8ml 预冷的清洗液（见注释5）悬浮沉淀。 -20°C 静置 1h。清洗目的在于去除残存的三氯乙酸，避免因为酸化作用而导致的蛋白质难以复性溶解。

(2) 10 000g 下冷冻离心机中离心 15min。

(3) 弃掉上清液，重复清洗操作 2 次（见注释6）。

(4) 将沉淀进行真空干燥 1h（或 SpeedVac 中干燥 20~30min）以完全去除残留的丙酮。

(5) 称量沉淀重量（见注释7）。

1.3.3 蛋白质的溶解

(1) 溶解蛋白质样品所需 UKS 或 R2D2 的量根据不同植物组织而定。例如，对于玉米和葡萄叶片的蛋白质样品我们按 60 μ l/mg 干粉的比例进行溶解，而对玉米粒的蛋白样品则按 50 μ l/mg 干粉的比例进行溶解。

(2) 振荡 1min 即可重新溶解干粉样品。此时，样品中含有细胞碎片。

(3) 10 000g 室温下离心 15min，收集上清于另一离心管中。

(4) 再次离心 15min，上清液即为所得蛋白质样品，可以在 -50 或 -80°C 保存数月。

一般而言，用于悬浮和溶解蛋白质样品的溶液中都含有离合剂、变性剂以及还原剂^[9]。离合剂可以打断蛋白质内部的非共价键，从而帮助蛋白质去折叠。最普遍使用的离合剂是尿素和硫脲。常常将两者结合使用以提高对蛋白质的溶解效率。而在使用离合剂的同时，必须使用变性剂才能增加对蛋白质的溶解。CHAPS 是一种兼性离子变性剂，它和非离子变性剂 Triton X-100 具有相同的助溶能力，但是它能更有效地阻止蛋白质之间的相互作用。SB3-10 比 CHAPS 具有更强的助溶能力，但是它在尿素浓度较

高的溶液中难以溶解。巯基还原剂（最常见的如 DTT）和氢化磷可以阻止二硫键的形成。磷化氢比 DTT 具有更强的选择性和更高的效率，它在酸性条件和 pH 大于 7.5 的环境下仍能保持还原能力。常常以 TCEP-HCl (tris carboxyethyl phosphine) 的形式保存，相比 TBP 的保存形式，该形式更稳定、难挥发、更容易溶于水。

在 R2D2 蛋白质溶解液适用于用 IPG 胶条进行等电聚焦，该溶液的配制结合使用尿素与硫脲（见注释 2）、CHAPS 与 SB3-10、DTT 与磷化氢。

UKS 溶液是早期在发现硫脲与兼性离子变性剂可以大大增加蛋白质的溶解前常常使用的一种蛋白质溶解液。该溶液含有较高浓度的尿素（接近饱和，见注释 2），使用的是 Triton X-100 而不是 CHAPS 和 SB3-10。UKS 的特点在于含有离子变性剂 SDS，可以大大提高蛋白质的溶解效率，抑制蛋白酶的活性^[10]。尽管作为离子变性剂 SDS 与等电聚焦缓冲系统不兼容，但是因为 Triton X-100 的存在能和 SDS 形成胶态离子，在电泳过程中移到阴极，故缓冲系统能够容忍该浓度 SDS 的存在。UKS 也含有 K_2CO_3 可以使得缓冲系统碱生化，从而组织蛋白质与蛋白质以及蛋白质与核酸之间的互动，抑制蛋白酶活性。

R2D2 既可以用来溶解蛋白质样品，也可以用来水化 IPG 胶条；而当使用 UKS 溶解的蛋白质样品时，则必须使用另外一种 IPG 胶条水化液。两种溶解液的蛋白质溶解能力大致相当，因此，建议只使用其中一种。如果制备的样品中可能会有较多的蛋白酶时，推荐使用 UKS。向两种溶液中加入两性电解质可以提高等电聚焦电泳的分辨能力。

1.3.4 IEF 电泳前蛋白质样品的准备

(1) 蛋白质样品在电泳前需要再次离心，去除沉淀。

(2) 若采用硝酸银染色法，每根胶条（24cm 长，自制胶或 IPG 胶条）的上样量约为 50 μ g 蛋白质（图 1-1A、B）；若采用 CBB 染色法，则为 150~500 μ g（图 1-1C、D）。

(3) 溶解在 R2D2 中的蛋白质样品可以在用 R2D2 溶液补足体积至 450 μ l 后直接用来水化 IPG 胶条^[6]。

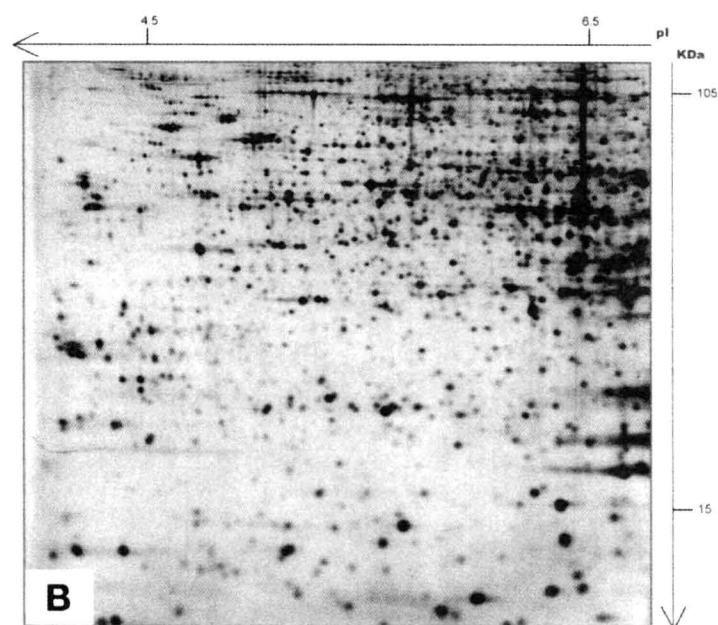
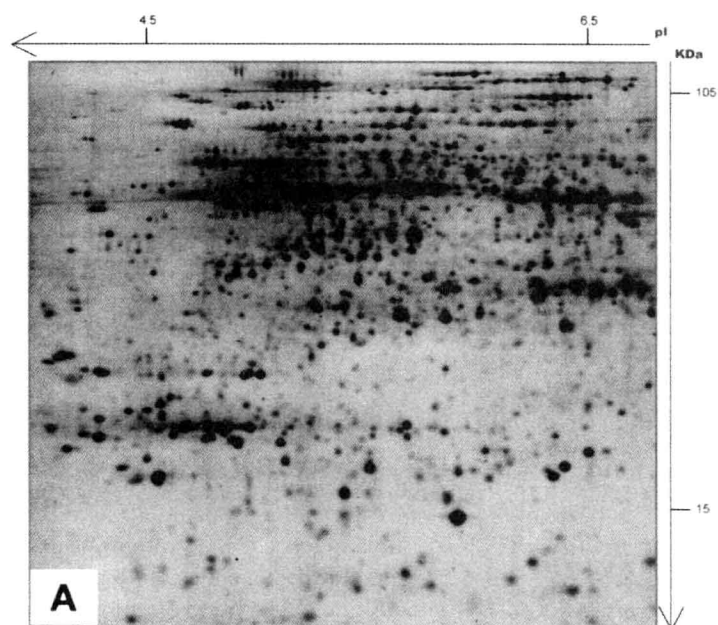
溶解在 UKS 中的样品可以直接用来进行传统的等电聚焦电泳^[3]。若采用 IPG 胶条进行等电聚焦，则必须用另外配制的水化液（图 1-1A、B，见注释 8）补足体积至 450 μ l 后进行水化。单独配制的水化液含有硫脲、CHAPS 及三氢化磷，同时还可以降低 SDS 的浓度，提高分辨率。

1.4 注 释

(1) 蛋白质沉淀剂和重悬液在使用前必须预冷。始终将丙酮溶液放在 4℃ 条件下。

(2) UKS 和 R2D2 溶液中均含有较高浓度的尿素，需要稍微加热溶解。但切记加热温度不可超过 30℃，否则尿素会裂解产生异硫氰酸从而导致蛋白质的氨甲酰化。

(3) SB3-10 在尿素中很难溶解（这也是为什么尿素浓度限制在 5mol/L 的原因），因此在解冻 R2D2 溶液时需要较长时间，必须待溶液完全澄清后方可使用。



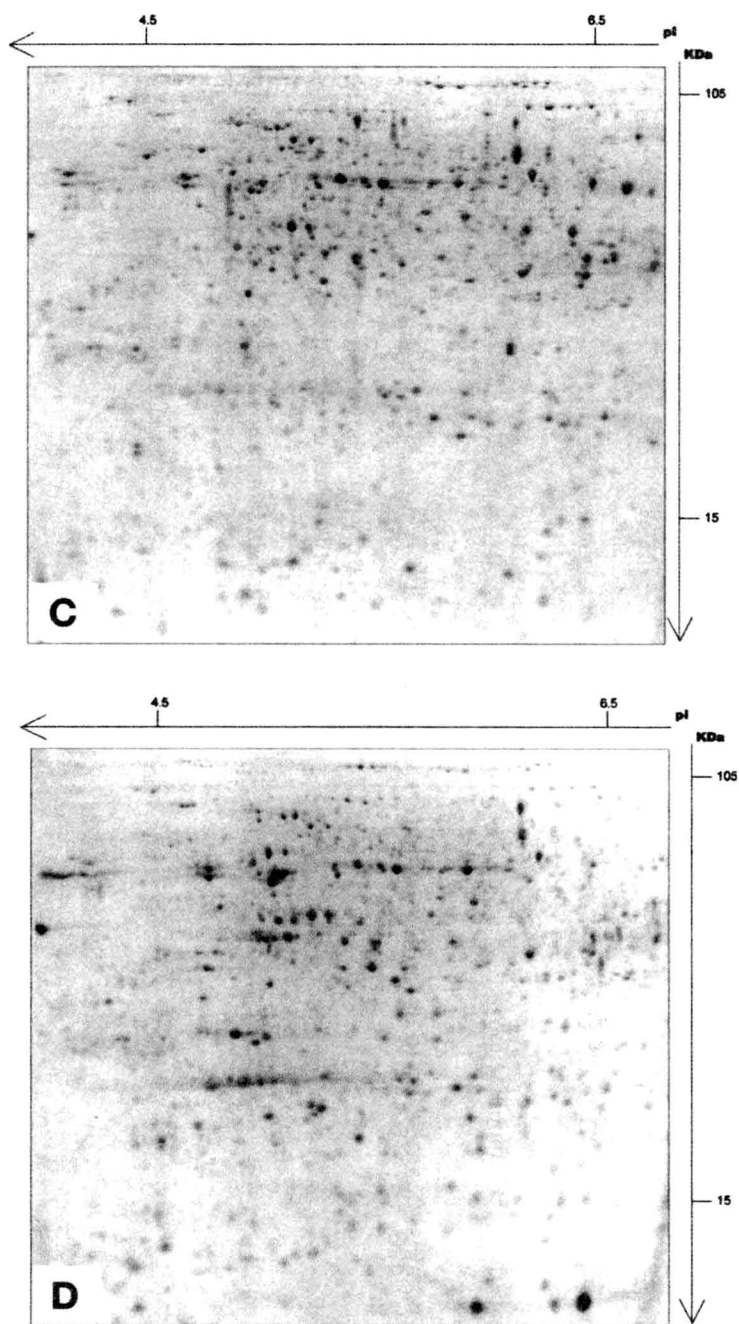


图 1-1 三氯乙酸/丙酮法提取蛋白质后用 R2D2 溶液溶解的蛋白质样品的双向电泳图谱

A 和 B 分别代表玉米叶片和授粉 14 天后的玉米胚乳蛋白质样品。C 和 D 分别代表葡萄茎和根的蛋白质样品。含 50 μ g (A、B) 或 250 μ g (C、D) 蛋白质样品的水化液浸泡 IPG 胶条 (线性, pH4~7) 进行被动水化 1h; 然后在 50V 电压、22 $^{\circ}$ C 主动水化 12h; 依次按 200V 0.5h、500V 0.5h、1000V 和 10 000V 分别 1h (总计达到 84 000Vh) 的程序电泳进行等电聚焦。完成了等电聚焦的 IPG 胶条经过平衡后横置于第二向电泳胶的顶端, 用 1% 的琼脂糖密封胶条和第二向胶之间的缝隙, 注意不要有气泡。一般第二向采用连续的 11% 分离胶和 25% 浓缩胶, 以 1, 4-双丙烯酰胺为交联剂。在 SDS-PAGE 完成后分别用硝酸银 (A、B) 或 CBB G-250 (C、D) 进行染色

(4) 要想获得较高的蛋白质提取效率, 必须将植物组织预先研磨成非常细小的粉末。对于某些坚硬的植物组织(如玉米粒), 在研磨前必须先将其破碎。也可以用加有金属小球(6mm 直径)的自动粉碎机进行磨样。

(5) 在蛋白质干燥前, 所有操作都必须在低温下(低于 4℃)进行以免蛋白酶降解蛋白质。

(6) 对于含色素较多的样品, 可以增加清洗的次数, 或者延长清洗的时间(过夜), 以最后得到白色的沉淀。

(7) 也可以将蛋白质干粉冻存在 -80℃ 条件下, 但是将干粉取出进行溶解前, 最好再次进行干燥。

(8) 根据所需样品的体积量决定水化前是选择溶液 A 还是溶液 B。当只需要 20~90 μl 样品量时, 用溶液 A 去稀释溶解在 UKS 中的蛋白质样品, 当需要较大体积的样品量时, 选择溶液 B。这样可以控制合适的离子浓度进行 IPG 等电聚焦。

参 考 文 献

1. Damerval, C., Zivy, M., Granier, F., and de Vienne, D. (1988) Two-dimensional electrophoresis in plant biology, in *Advances in electrophoresis* (Chrambach, A., Dunn, M., and Radola, B., eds.), VCH, Weinheim, New York, pp. 265–340.
2. Wu, F. and Wang, M. (1984) Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Anal. Biochem.* **139**, 100–103.
3. Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* **7**, 52–54.
4. Saravanan, R. S. and Rose, J. K. (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**, 2522–2532.
5. Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., and Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **5**, 2497–2507.
6. Méchin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M., and Damerval, C. (2003) An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**, 1299–1302.
7. Hurkman, W. and Tanaka, C. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**, 802–806.
8. Granier, F. (1988) Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **9**, 712–718.
9. Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 660–663.
10. Colas des Francs, C., Thiellement, H., and de Vienne, D. (1985) Analysis of leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis: protease action as exemplified by ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase degradation and procedure to avoid proteolysis during extraction. *Plant Physiol.* **78**, 178–182.

第2章 顽拗性植物组织的蛋白质组学研究：苯酚法提取蛋白质

Mireille Faurobert, Esther Pelpoir 和 Jamila Chaib

摘要 蛋白质提取除了经典的三氯乙酸 (TCA) / 丙酮沉淀方法外, 另一个可行的方法是苯酚提取法, 该方法可以从富含多糖、脂质和酚类化合物的植物组织中有效地获得蛋白质, 并去除非蛋白质成分。本章提出一种改良的实验方法, 可用于双向电泳 (2-DE) 和进一步的蛋白质组学研究。苯酚提取之后, 蛋白质在甲醇中和乙酸铵一起沉淀, 沉淀重悬于等电聚焦缓冲液 (isoelectric focusing buffer), 电泳前用改良的 Bradford Assay 方法测定蛋白质浓度。

成功使用这个方案的关键点有两个: ①在第一步中使样品保持低温状态; ②在离心后小心转移到苯酚层。

关键词 提取方法; 蛋白质; 苯酚; 植物蛋白质组学; 膜蛋白; 双向电泳; 糖蛋白

2.1 前言

提取蛋白质是蛋白质组学研究的第一步。植物组织的蛋白质含量较低, 并且存在多种非蛋白质成分, 如细胞壁及贮藏多糖、脂质和酚类化合物, 使蛋白质的提取难度增大。植物蛋白质的可溶性与它们的细胞内定位关系密切, 传统的蛋白质提取方法是用水合缓冲液、去垢剂或直接沉淀法^[1]。除了普遍使用的 TCA/丙酮沉淀法^[2], Hurkman 和 Tanaka^[3]在 1986 年报道了一种先用苯酚提取然后用甲醇/乙酸铵沉淀的蛋白质提取方法, 能有效去除核酸干扰, 因为核酸可以与蛋白质相互作用, 使双向电泳背景深, 分辨率低。

苯酚提取法首先是应用于纯化碳水化合物 (去除蛋白质), 然后是用于纯化核酸。对于分子生物学家来讲, 酚抽提是一种从核酸溶液中去蛋白质的首选方法。

苯酚是最简单的芳香醇, 芳香环上带有一个极性羟基, 弱酸性, 并且有腐蚀性和毒性。苯酚与水部分混溶: 当达到饱和时, 水相含有大约 7% 的苯酚, 有机相含有大约 28% 的水。苯酚主要是通过氢键和蛋白质相互作用, 使蛋白质变性并且溶于有机相中。因此, 和一般认为的不同, 蛋白质并不是留在水相和有机相的界面上, 而是进入了苯酚中。

苯酚提取法主要应用于研究黏韧性植物组织或器官, 如木薯^[4]和油菜的幼苗^[5], 马铃薯、苹果和香蕉的叶片^[6], 橄榄叶^[7], 以及番茄、鳄梨和香蕉的果实^[8]。

Carpentier 等、Saravanan 和 Rose 比较用 TCA/丙酮沉淀法和苯酚提取法从黏韧性

组织中提取蛋白质，发现两种方法都有效，但苯酚提取法能够更有效地除去干扰物质，得到背景浅、垂直拖尾少的高质量凝胶。这两种方法可减少蛋白质在样品准备过程中由于内在蛋白质水解活动而引起的降解。同时，苯酚提取法可以得到更多糖蛋白。

苯酚提取法有高度的清洁能力。它能够作为一种分离剂，降低蛋白质和其他分子间的相互影响。苯酚提取法最主要的不足在于它时间消耗过长（至少 6h），另外苯酚和甲醇都是有毒的。

2.2 材 料

2.2.1 苯酚

饱和 Tris-HCl 缓冲液，pH6.6/7.9（Amresco-Interchim, biotechnology grade）。

2.2.2 提取缓冲液

准备一份含有 500mmol/L Tris-HCl 缓冲液、500mmol/L EDTA、700mmol/L 蔗糖、100mmol/L KCl 的溶液，并用 HCl 调 pH 至 8.0。这种溶液可以在 4℃ 保存一周。

在提取之前加入 2% β -巯基乙醇和 1mmol/L 苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride）（PMSF，见注释 1）。

2.2.3 沉淀液

含 0.1mol/L 乙酸铵的冷甲醇。此溶液可以被保存在 -20℃。

2.2.4 等电聚焦缓冲液

9mol/L 尿素、4% CHAPS、0.5% Triton X-100、20mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）、1.2% 两性电解质（pharmalytes），pH3~10（见注释 2）。Triton X-100 的初始浓度为 10%。这种溶液需分装后保存在 -20℃，可保存数月。

2.2.5 测定蛋白质溶液的浓度

用来自 Bio-Rad 的染色剂，根据改良的考马斯亮蓝法，测定蛋白质浓度（见注释 3）。

2.3 方 法

2.3.1 蛋白质提取

(1) 新鲜植物组织在液氮中冷冻，然后在自动低温粉碎机中预先冷却的钢杯中将材料研磨成细碎的粉末（见注释 4）。

(2) 在一个 15ml 的离心管（falcon tube）中加入 3ml 提取缓冲液，并加入 1g 研碎的植物组织，涡旋后在冰浴中振荡 10min（见注释 5）。