

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.016

杨树叶片蛋白质双向电泳图谱的建立

索慧英¹, 郑 密², 卢 晗³, 曲冠证³, 李 莹^{2*}

(1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨体育学院, 黑龙江 哈尔滨 150008;
3. 东北林业大学林木育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: [目的] 探究适用于杨树叶片蛋白质组学研究的单向电泳体系, 建立杨树叶片蛋白质的双向电泳图谱。 [方法] 本研究以小黑杨 (*Populus simonii*×*P. nigra*) 叶片为材料, 对小黑杨叶片双向电泳体系的 2D 裂解液、蛋白的纯化、IPG 胶条的 pH 范围、蛋白上样量、等电聚焦时间和 SDS(Sodium Dodecyl sulfate) 平衡时间进行优化。利用优化后的双向电泳体系分别对小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片蛋白质进行双向电泳实验。 [结果] 采用 2D 裂解液 II 对小黑杨叶片蛋白质进行溶解, 可显著提高蛋白的溶解性, 双向电泳图谱中可分辨出 326 个蛋白质, 比采用 2D 裂解液 I 溶解的蛋白样品多 209 个蛋白质。通过蛋白裂解液提取小黑杨叶片蛋白质, 利用 2D clean-up 试剂盒法对蛋白样品进行纯化, 所得的双向电泳图谱背景清晰、蛋白质的分离效果较好。小黑杨叶片蛋白质主要集中在 pH 4~7 内, 选用 24 cm、pH 4~7 的线性 IPG 胶条进行双向电泳, 可获得分离效果较好的 393 个蛋白质。蛋白上样量提高至 1 mg 时, 可分辨的蛋白质的个数明显增加, 由 326 个增加至 454 个。10 000 V 的等电聚焦时间为 13 h, SDS 平衡时间为 40 min 时可得到背景清晰、蛋白质个数多、分辨率较高的双向电泳图谱; 采用优化后的双向电泳体系对小黑杨、大青杨 (*Populus ussuriensis* Kom.) 和 84 K 杨 (*Populus alba*×*P. glandulosa*) 叶片蛋白质进行双向电泳实验, 分别可检测到 531、828、525 个蛋白质, 且蛋白质分离效果好、图谱分辨率高。 [结论] 优化后的双向电泳体系提高了小黑杨叶片蛋白质双向电泳图谱的分辨率和重复性, 采用优化后的双向电泳体系成功的建立了小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片蛋白质的双向电泳图谱, 该体系适用于小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片蛋白质组学的分析, 为杨树叶片蛋白质组学的研究奠定了基础。

关键词: 小黑杨; 蛋白质; 双向电泳; 优化

中图分类号: S722

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)02-0128-10

杨树是林木遗传研究的模式树种^[1], 是北半球种植面积最广, 适应性最强的落叶阔叶树种^[2], 在我国生态建设中发挥着巨大的作用。近年来, 我国杨树转基因已取得重大进展, 主要集中在其重要的经济及生态价值的基因功能研究上。小黑杨 (*Populus simonii*×*P. nigra*) 是小叶杨 (*Populus simonii* Carr) 与欧洲黑杨 (*Populus nigra* L.) 的杂交品种, 其生长迅速、抗寒、抗旱性强, 生态潜力巨大, 在中国北方得到了广泛种植^[3]。近年来, 对于小黑杨的研究主要集中在利用转基因技术来增强

抗病性^[4]、抗虫性^[5]、耐盐性^[6-7] 以及基因功能的研究^[8-9] 等方面, 利用蛋白质组学对小黑杨进行研究的报道相对较少。然而, 蛋白质作为生命活动的主要承担者^[10], 执行大多数的生物功能, 通过蛋白质组学的研究可以获取在遗传层面无法获得的信息, 因此, 进行蛋白质组学的研究具有很高的价值。

蛋白质组学的概念最初是由澳大利亚科学家 Wilkins 等^[11] 提出的, 蛋白质组学研究中最常用的技术之一是双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE)^[12], 双向电泳技术与质谱技术相结合, 已成为

收稿日期: 2019-05-10 修回日期: 2019-12-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31300554); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2572018BW04); 东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室创新项目 (2013B08)

* 通讯作者: 李莹: xlbtdl@163.com

蛋白质组学中分离蛋白质的有效方法^[13]。双向电泳技术已经被广泛应用于植物的蛋白质组学研究中,如 Romeo 等^[14]通过双向电泳技术分析意大利杨根部响应锌胁迫的关键因素, Liu 等^[15]利用双向电泳技术分析了毛果杨早期茎从初生生长到次生生长的蛋白质组学的变化。尽管双向电泳体系优化已有广泛研究,但由于植物的生物学特性、生理生化特性不尽相同,对于不同植物物种,最适的电泳条件不同^[16]。因此,必须针对植物的不同特点进行双向电泳体系的优化以进行蛋白质组学的研究。杨树叶片富含色素、多酚、多糖、有机酸等次生代谢物质,对电泳过程干扰很大,导致双向电泳图谱背景高、蛋白质不清晰,从而使杨树叶片双向电泳技术和蛋白质组学的研究受到很大的限制。因此,在进行杨树叶片蛋白质组学的研究之前,对杨树叶片蛋白质的双向电泳体系进行优化是十分重要的。

目前,关于杨树叶片蛋白质双向电泳体系优化相关的研究尚未见报道。本研究以小黑杨叶片为材料,对双向电泳技术中的主要影响因素进行探讨,探究出了适用于小黑杨叶片蛋白质组学研究的电泳体系;该体系同样适用于大青杨与 84 K 杨叶片的蛋白质双向电泳,因此,该双向电泳体系可用于杨树叶片蛋白质组学的分析,并为其他木本植物叶片的蛋白质组学的研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验以东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室内种植的小黑杨、大青杨和 84 K 杨为材料。从植株上剪下长 20.0 cm, 径 0.5~1.0 cm 的枝条,并将枝条插入装有草炭土、蛭石和珍珠岩(体积比为 5:3:2)的塑料盆中。培养条件:温度 25~30℃,湿度 70%~80%,光照 16 h·d⁻¹。扦插苗培养 3 个月后,采集自茎尖起的第 3~5 片叶片,将采摘下来的叶片立刻放入液氮中速冻处理,装入样品袋,将叶片碾碎后混合,存放于-80℃冰箱备用。

1.2 试剂和仪器

使用的主要药品有二硫苏糖醇、碘乙酰胺、硫脲、尿素、十二烷基硫酸钠、Tris base、甘氨酸均购自 Sigma 公司; IPG buffer、固相 pH 梯度 IPG 干胶条、矿物油均购于美国 GE Healthcare 公

司; 乙二胺四乙酸、氯化钠、丙三醇、苯甲咪盐酸水合物、 β -甘油磷酸二钠水合物、三氯乙酸、 β -巯基乙醇、四甲基乙二胺、无水乙醇、冰乙酸、硝酸银、无水乙酸钠、硫代硫酸钠、无水碳酸钠、甲醛、戊二醛、考马斯亮蓝 R250 均购自国药集团化学试剂有限公司; TritonX-100、溴酚蓝、过硫酸铵、丙烯酰胺、N,N'-一甲叉双丙烯酰胺均购自 Biotopped 公司; 标准分子量蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 其他常规试验试剂均为国产分析级试剂。

使用的主要仪器有冷冻离心机(Eppendorf, 德国), 超声波细胞粉碎机(兰仪, 上海), 万分之一天平(Sartorius, 德国), 高速冷冻离心机离心机(Eppendorf, 德国), 漩渦混合器(Crystaln, 美国), 制冰机(Scotaman, 意大利), 酶标仪(永创, 上海), 水浴锅(中兴伟业, 北京), Ettan IPGphor3(GE Helthcare, 美国), EttanDALTsix(GE Helthcare, 美国), ImageScanner III(GE Helthcare, 美国), ImageMaster™ 2D Platinum 7.0(GE Helthcare, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 小黑杨叶片蛋白质双向电泳体系的优化 本研究以小黑杨叶片为材料,对小黑杨叶片蛋白质双向电泳体系的 2D 裂解液、蛋白的纯化、IPG 胶条的 pH 范围、蛋白上样量、等电聚焦时间和 SDS 平衡时间进行优化。

1.3.1.1 双向电泳裂解液的选择 蛋白样品提取后需要用 2D 裂解液重新溶解再进行双向电泳实验。本实验选择了 2 种 2D 裂解液溶解小黑杨叶片蛋白质,即: 2D 裂解液 I (9.8 mol·L⁻¹Urea, 4% CHAPS, 10% DTT) 和 2D 裂解液 II (7 mol·L⁻¹Urea, 2 mol·L⁻¹Thiourea, 4% CHAPS, 10% DTT), 比较 2 种 2D 裂解液对小黑杨叶片蛋白质分离的影响。

1.3.1.2 小黑杨叶片蛋白样品的纯化 小黑杨叶片蛋白质提取后含有较多的多糖、多酚等非蛋白类物质,影响双向电泳图谱的分辨率。为了获得高纯度的蛋白质样品,提高蛋白质的分离效果,笔者对小黑杨叶片蛋白质样品进行纯化。本实验采用 TCA-丙酮法和 2D clean-up kit 法对小黑杨叶片蛋白质进行纯化,采用纯化后的蛋白样品进行双向电泳实

验, 比较 2 种方法对小黑杨叶片蛋白质的纯化效果。

三氯乙酸—丙酮 (TCA-丙酮) 法: 取 280 μL 蛋白上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入 1.4 mL -20°C 保存的蛋白提取液 I (含 0.07% β -巯基乙醇, 10% 三氯乙酸), 上下颠倒混匀, -80°C 存放 2 h。12 000 g, 4°C , 离心 20 min。弃除上清, 用蛋白提取液 II (含 0.07% β -巯基乙醇) 洗涤沉淀 3 次, 直至沉淀呈白色。将沉淀真空干燥 3~5 min, 取适量 2D 裂解液 (7 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 1%DTT, 4%CHAPS) 溶解蛋白样品。将样品进行液氮冷冻处理, -80°C 冰箱保存。

2D clean-upkit (GE, 美国) 法: 取 100 μL 蛋白上清液加入 300 μL 沉淀剂, 混匀, 冰上培育 15 min; 再加入 300 μL 共沉淀剂, 混匀; 4°C , 12 000 g 离心 5 min; 离心后弃去上清液, 在离心管中加入 40 μL 共沉淀剂, 冰浴 5 min; 4°C , 12 000 g 离心 5 min; 弃上清, 加入 25 μL 去离子水, 振荡 5~10 秒; 加入 1 mL 预冷的洗涤缓冲液和 5 μL 洗涤添加剂, 振荡直至沉淀完全散开, 置于 -20°C 冰箱保存 30 min; 4°C , 12 000 g 离心 5 min, 将上清液移走弃去, 用适量的 2D 裂解液溶解沉淀, 4°C , 12 000 g 离心 5 min, 留取上清, 将蛋白样品液氮冷冻, 放 -80°C 冰箱中保存以备日后分析。

1.3.1.3 IPG 胶条 pH 范围的选择 进行等电聚焦前需要选择合适的 pH 范围的 IPG 胶条, 使用不同 pH 范围的 IPG 胶条分离小黑杨叶片蛋白质得到的双向电泳图谱的分辨率不同。为了找到适用于小黑杨叶片蛋白质分离的 IPG 胶条的 pH 范围, 本实验分别采用 24 cm、pH 3~10 和 pH 4~7 的线性 IPG 胶条进行双向电泳实验, 比较 2 种不同范围的 IPG 胶条对小黑杨叶片蛋白质的分离效果。

1.3.1.4 蛋白上样量的选择 进行等电聚焦前笔者对蛋白上样量进行选择。为了获得能够呈现更多的蛋白质信息且分辨率较高的双向电泳图谱, 本实验分别取 600 μg 和 1 mg 蛋白样品进行双向电泳实验, 比较 2 种蛋白上样量可检测到的蛋白质的数目和蛋白质的分离效果。

1.3.1.5 等电聚焦时间的选择 在等电聚焦程序的设定中, 10 000 V 的等电聚焦时间会影响蛋白质的分离效果。为了获得背景清晰, 分辨率较高的双向电泳图谱, 本实验对 10 000 V 的等电聚焦时间进行优化, 比较 6、11、13 h 对小黑杨叶片蛋白质的分

离效果。

1.3.1.6 SDS 平衡时间的选择 等电聚焦结束后需要对胶条进行平衡, 平衡时间的长短会影响双向电泳图谱的分辨率。为了找到合适的平衡时间, 本实验设定了 3 个平衡时间, 分别为: 40、50、60 min, 将平衡好的胶条进行 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) 电泳, 分析不同平衡时间对双向电泳图谱分辨率的影响。

1.3.2 小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片蛋白质双向电泳图谱的建立

1.3.2.1 小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片总蛋白质的提取 参考索慧英等^[17]方法。分别取小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片, 每种叶片取 3 份, 每份 1 g, 分别加入液氮研磨至细粉。将样品分别转移至 15 mL 离心管中, 每份加入 1.5 mL 蛋白裂解液 (2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 137 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 40 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 6.8), 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 0.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ benzamidine, 50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ β -glycerophosphate), 充分混匀, 冰浴条件下超声破碎处理 6 min ($\varphi 2$, 26°C , 3/9sec); 12 000 g, 4°C , 离心 20 min; 留取上清, 分别将每种叶片提取出的蛋白上清液转移至一个离心管中, 充分混合均匀后进行液氮冷冻处理, 存放于 -80°C 冰箱保存备用。

1.3.2.2 小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片总蛋白质的纯化 采用 2D clean-upkit 法对小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片总蛋白质进行纯化, 操作步骤见 1.3.1.2, 其中, 获得的蛋白沉淀用 2D 裂解液 II 进行溶解。将蛋白样品液氮冷冻, 放 -80°C 冰箱中保存。

1.3.2.3 蛋白质含量的测定 本实验采用改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (生工, 上海) 测定蛋白浓度, 使用牛血清蛋白 (BSA) 作为标准样品, 分别取浓度为 1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSA 标准溶液 0、4、8、12 μL 于 0.5 mL 的离心管中, 用去离子水分别添加至终体积为 40 μL , 旋涡振荡混合均匀。分别从每管中取出 20 μL 溶液加入到酶标板中, 在每个孔中分别加入 200 μL 的 Bradford 工作液, 吸打混匀, 室温反应 5 min。使用酶标仪读取波长为 595 nm 的吸光值, 以不同 BSA 含量 (mg) 为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。

将待测蛋白样品稀释至合适浓度,按照上述操作步骤测定蛋白样品的吸光值,记录吸光值。根据所测样品的吸光值,在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量,除以样品稀释液的总体积,乘以样品稀释倍数即为样品的实际浓度。每个样品重复测定3次,取平均值做为该样品的浓度值。

1.3.2.4 双向凝胶电泳 第一向等电聚焦 (Isoelectric focusing, IEF),取1 mg 蛋白样品加入水化液(9.8 mol·L⁻¹ Urea, 0.002%BPB, 2%IPG buffer, 2%CHAPS)至总体积为450 μL,充分混匀,将样品自左而右线性加入到水化槽中,将24 cm、pH 4~7线性IPG胶条保护膜去除,胶面朝下缓慢的置于样品溶液上并覆盖矿物油,将水化槽置于等电聚焦仪中。在20℃条件下进行等电聚焦,等电聚焦参数设置见表1。

等电聚焦结束后将胶条进行两步平衡。第一步:将胶条置于平衡缓冲液I(75 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH8.8), 6 mol·L⁻¹Urea, 30%Glycerol, 2%SDS, 1% DTT)中平衡40 min。第二步:将胶条转移到平衡缓冲液II(75 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8), 6 mol·L⁻¹ Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 2.5% 碘乙酰胺)中平衡40 min。平衡结束后进行第二向SDS-PAGE电泳,分离胶的浓度为13%,电泳条件为1 W·gel⁻¹,电泳30 min后调整为13 W·gel⁻¹,至溴酚蓝指示剂到达距凝胶底部1 cm处停止电泳,将凝胶取出,进行银染染色。

1.3.2.5 银染及图像的扫描与分析 参考严冬等^[18]方法。固定30 min,致敏30 min,漂洗3次,每

次10 min;染色20 min后立即水洗2次,每次1 min;显色至蛋白质点清晰后终止5 min。染色后的凝胶利用ImageScanner III扫描仪与ImageMaster™ 2D Platinum 7.0分析软件进行图像的采集与分析,分辨率为300 dpi。

2 结果与分析

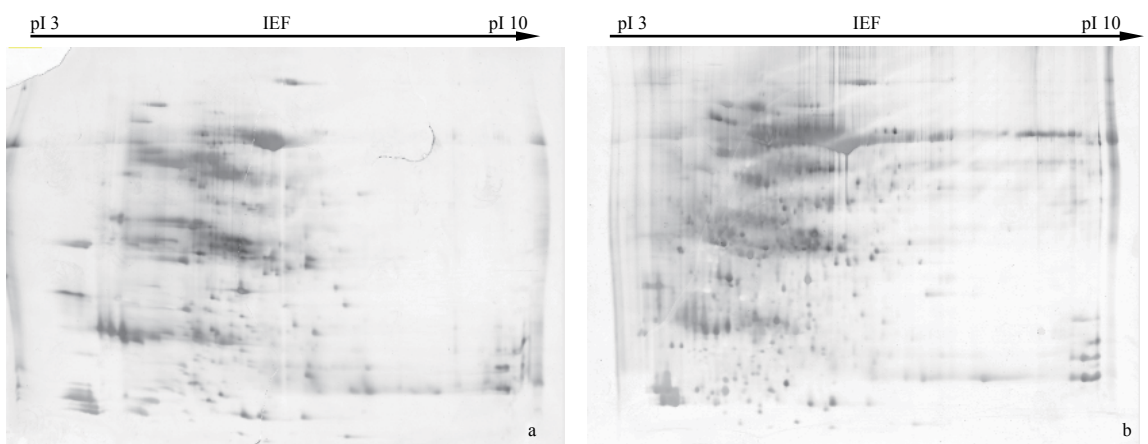
2.1 小黑杨叶片蛋白质双向电泳体系的优化

2.1.1 双向电泳裂解液的选择 本研究比较了2D裂解液I和2D裂解液II对蛋白质分离的影响。选用24 cm、pH 3~10的线性IPG胶条,蛋白上样量为300 μg,进行双向电泳。图1表明:使用2D裂解液I的图谱(图1a)中可检测到117个蛋白质,图中蛋白质的溶解性差,碱性端蛋白质个数少,且蛋白质的聚焦效果不好,未能有效分离;使用2D裂解液II的图谱(图1b)分辨率高,可检

表1 等电聚焦程序

Table 1 The program of isoelectric focusing electrophoresis

步骤Steps	电压Voltage/V	升压模式Boosting mode	时间Time/h
Step1	50	快速Rapid	24
Step2	500	快速Rapid	5
Step3	1 000	线性Linear	1
Step4	8 000	线性Linear	3
Step5	8 000	快速Rapid	3.75
Step6	10 000	线性Linear	3
Step7	10 000	快速Rapid	13



注: IEF 表示等电聚焦; a.2D裂解液I; b.2D裂解液II.

Notes: IEF indicates Isoelectric focusing; a. 2D lysis buffer I; b.2D lysis buffer II.

图1 2种2D裂解液溶解的小黑杨叶片蛋白质的2-DE图谱

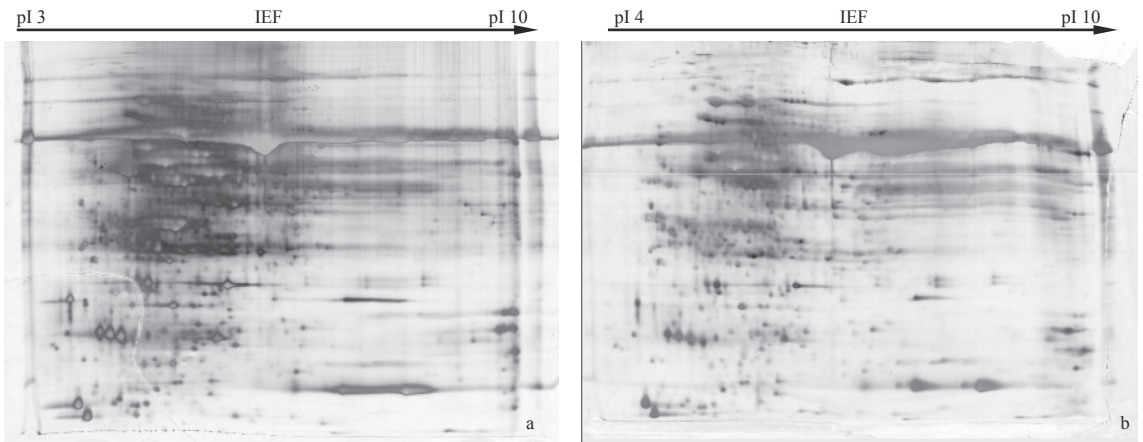
Fig. 1 2-DE profiles of proteins from *Populus simonii* × *P. nigra* leaves dissolved with two kinds of 2D lysis buffer

测到 326 个蛋白质。实验结果表明：选用 2D 裂解液 II 溶解小黑杨叶片蛋白质可获得分辨率较高的 2-DE 图谱。

2.1.2 小黑杨叶片蛋白样品的纯化 本研究比较了 TCA-丙酮法和 2D clean-up kit 法对小黑杨叶片总蛋白质纯化的效果。选用 24 cm、pH 3~10 的线性 IPG 胶条，蛋白上样量为 600 μg ，进行双向电泳。图 2 表明：采用 TCA-丙酮法（图 2a）纯化的蛋白样品，可检测到 364 个蛋白质，其双向电泳图谱有较高的背景，蛋白质未能有效分离且大分子量的蛋白聚焦效果较差；采用 2D clean-up kit 法（图 2b）纯化的蛋白样品，其双向电泳图背景清晰，图谱分辨率较高，蛋白质的整体聚焦效果好，可检测到的蛋白质个数为 450 个。实验结果表明：2D

clean-up kit 法适用于小黑杨叶片双向电泳蛋白样品的纯化。

2.1.3 IPG 胶条 pH 范围的选择 本研究比较了 pH 3~10 和 pH 4~7 的线性 IPG 胶条对蛋白质分离的效果。选用 24 cm 的 IPG 胶条，蛋白上样量为 600 μg 进行双向电泳。图 3 表明：采用 pH 3~10 的 IPG 胶条的双向电泳图谱（图 3a）中，小黑杨叶片蛋白主要分布在酸性端至中性区域，碱性端分布较少，可检测到 354 个蛋白质；采用 pH 4~7 的 IPG 胶条（图 3b）分离所得蛋白在凝胶上分布比较均匀，可检测到 393 个蛋白质，分离效果明显优于前者，更有利于蛋白质组学研究中差异蛋白质的分离和鉴定。该实验结果表明：小黑杨叶片中的碱性蛋白较少，主要集中在酸性端且主要分布在 pH

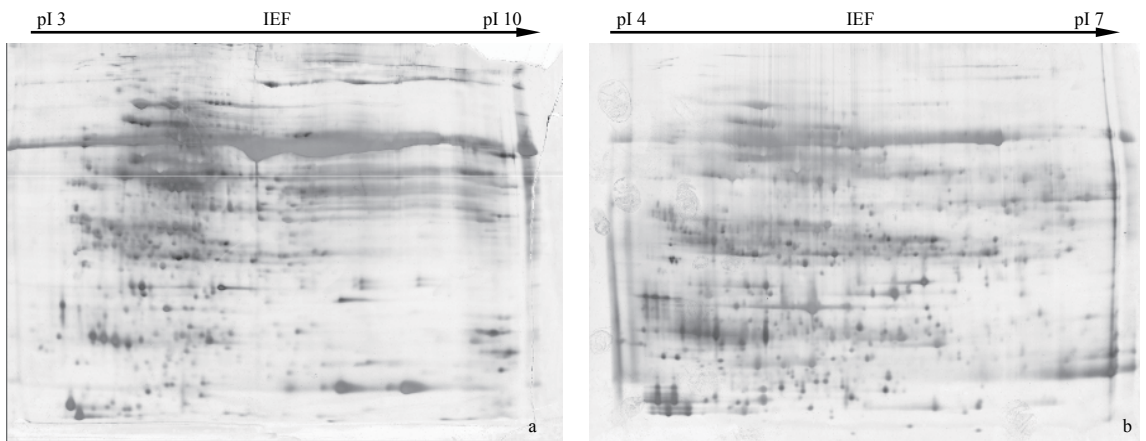


注：a.TCA-丙酮法；b.2D clean-up kit 法。

Notes: a. TCA/Acetone method; b. 2D clean-up kit method.

图 2 2 种纯化方法纯化的小黑杨叶片蛋白质的 2-DE 图谱

Fig. 2 2-DE profiles of proteins from *Populus simonii* × *P. nigra* leaves purified by two kinds of purification methods



a. pH 3~10; b.pH 4~7.

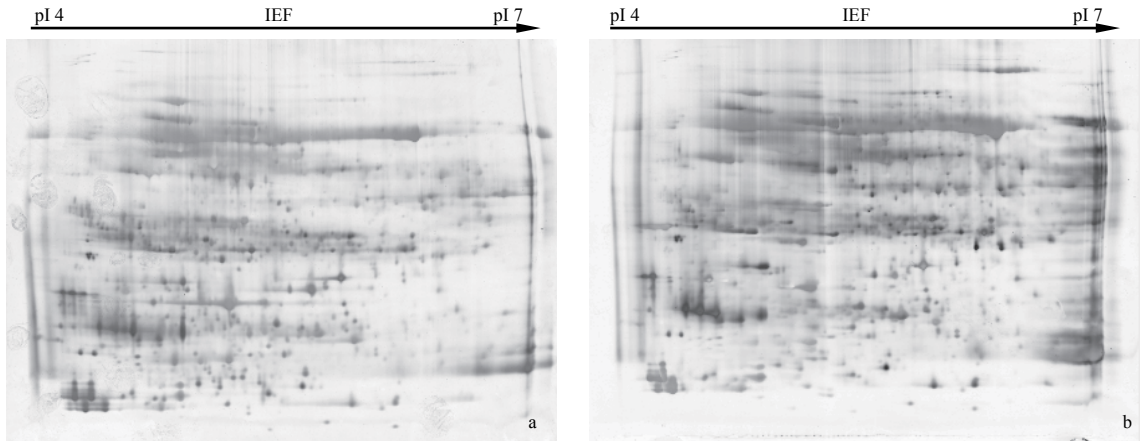
图 3 不同 pH 范围的 IPG 胶条分离的小黑杨叶片蛋白质的 2-DE 图谱

Fig. 3 2-DE profiles of proteins from *Populus simonii* × *P. nigra* leaves separated with different IPG pH ranges

4~7 范围内, 所以 pH 4~7 的 IPG 胶条适用于小黑杨叶片蛋白质的分离。

2.1.4 蛋白上样量的选择 本研究对蛋白上样量 600 μg 和 1 mg 进行比较, 选用 24 cm、pH4~7 的线性 IPG 胶条进行双向电泳。图 4 表明: 蛋白上样量为 600 μg 的图谱 (图 4a) 可检测到 393 个蛋

白质; 蛋白上样量提高到 1 mg (图 4b) 可检测到蛋白质的个数明显增加, 低丰度蛋白得以显现, 可检测到 454 个蛋白质。实验结果表明: 本研究的双向电泳体系可以对 1 mg 的小黑杨叶片蛋白质进行很好的分离。



注: a. 上样量 600 μg ; b. 上样量 1 mg.

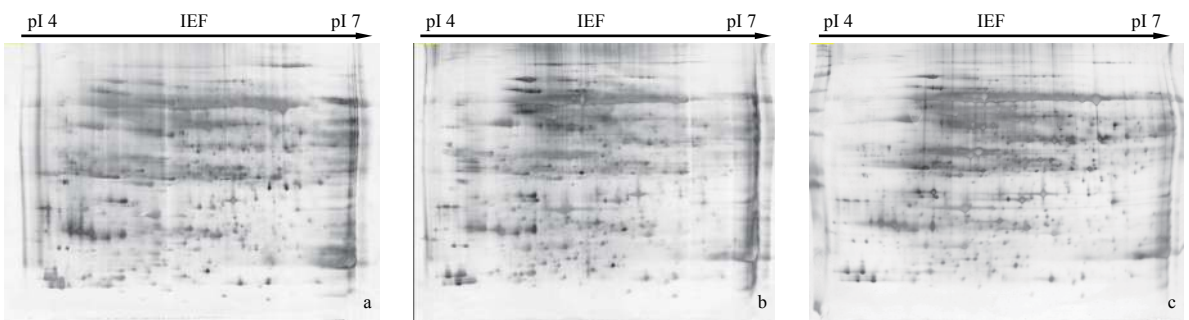
Notes: a. 600 μg of loading amount; b. 1 mg of loading amount.

图 4 不同上样量的小黑杨叶片蛋白质的 2-DE 图谱

Fig. 4 2-DE profiles of proteins from *Populus simonii* × *P. nigra* leaves with different loading amount

2.1.5 等电聚焦时间的选择 本研究对 10 000 V 的等电聚焦时间进行了优化, 比较了 6、11、13 h 条件下等电聚焦的效果。本研究选用 24 cm、pH 4~7 的胶条, 蛋白上样量为 1 mg 进行双向电泳。图 5 表明: 聚焦时间为 6 h 的电泳图谱 (图 5a) 中, 蛋白质的聚焦不充分有水平拖带, 且蛋白质未能有效分离, 通过软件分析可检测到的蛋白质的个数为 454 个; 聚焦时间为 11 h 的图谱 (图 5b)

中, 可分辨的蛋白质的个数明显增加, 可检测到 510 个蛋白质, 聚焦效果明显增强, 但仍存在水平拖尾; 聚焦时间为 13 h 的图谱 (图 5c) 中, 图像背景清晰, 横向拖带较少, 可检测到 539 个蛋白质, 且胶图中各蛋白质圆滑清晰, 聚焦情况良好。实验结果表明: 蛋白上样量达到 1 mg, 10 000 V 的等电聚焦时间为 13 h 时胶图中蛋白点的聚焦效果好, 所获得的图谱分辨率较高。



注: a. 10 000 V 的等电聚焦时间为 6 h; b. 10 000 V 的等电聚焦时间为 11 h; c. 10 000 V 的等电聚焦时间为 13 h.

Notes: a. 6 h IEF time of 10 000 V; b. 11 h IEF time of 10 000 V; c. 13 h IEF time of 10 000 V.

图 5 不同聚焦时间小黑杨叶片蛋白质的 2-DE 图谱

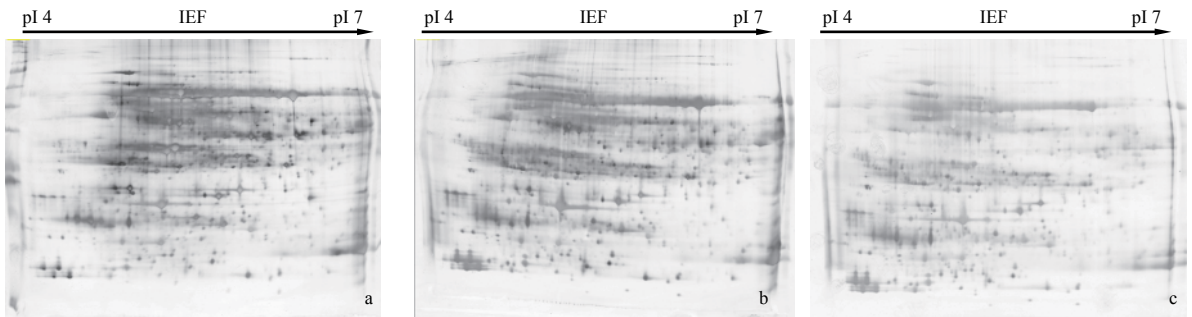
Fig. 5 2-DE profiles of proteins from *Populus simonii* × *P. nigra* leaves with different IEF time

2.1.6 SDS 平衡时间的选择 本研究对平衡时间 40、50、60 min 进行比较分析。本实验采用 pH

4~7, 24 cm 的胶条, 蛋白上样量为 1 mg 进行双向电泳。图 6 表明: 平衡时间为 40 min 时, 可检测的

蛋白质的个数为 539 个 (图 6a); 平衡时间延长至 50 min 时, 蛋白质的个数减少, 可检测到 436 个蛋白质 (图 6b); 当平衡时间延长至 60 min 时, 随着胶条中蛋白损失量的逐渐增加, 蛋白质的

显色程度逐渐降低, 可检测到的蛋白质为 363 个 (图 6c)。结果表明: 在小黑杨叶片蛋白质的分离中, 适宜的平衡时间为 40 min。



注: a. 平衡时间为 40 min; b. 平衡时间为 50 min; c. 平衡时间为 60 min.

Notes: a. 40 min equilibration time; b. 50 min equilibration time; c. 60 min equilibration time.

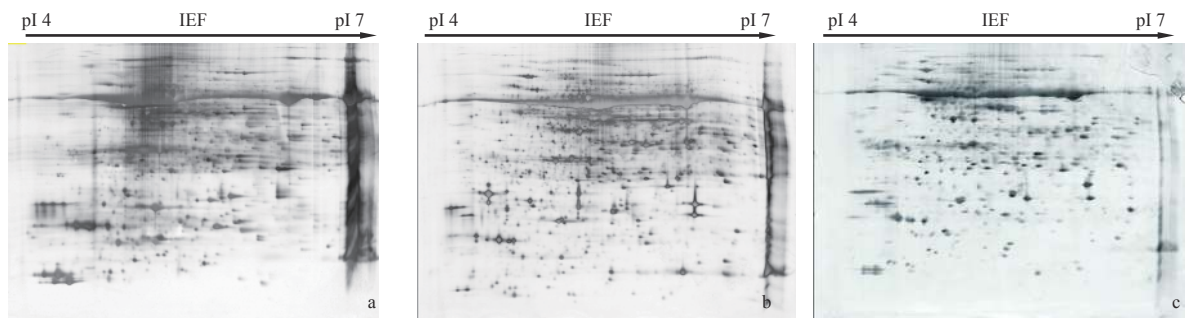
图 6 不同平衡时间下小黑杨叶片蛋白质的 2-DE 图谱

Fig. 6 2-DE profiles of proteins from *Populus simonii*×*P. nigra* leaves with different equilibration time

2.2 小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片蛋白质双向电泳图谱的建立

本研究采用优化后的双向电泳体系对小黑杨 (图 7a)、大青杨 (图 7b) 和 84 K 杨 (图 7c) 的叶片蛋白质进行双向电泳实验, 选用 2D 裂解液 II 溶解蛋白样品, 2D clean-up kit 法纯化蛋白样品,

使用 24 cm、pH 4~7 的 IPG 胶条, 蛋白上样量为 1 mg, 10 000 V 的等电聚焦时间为 13 h, 平衡时间为 40 min 进行双向电泳。获得的图谱分别可检测到 531、828 和 525 个蛋白质, 且蛋白质的分离效果较好, 图谱的分辨率较高。结果表明: 本研究优化的双向电泳体系适用于杨树叶片蛋白质组学的研究。



注: a. 小黑杨; b. 大青杨; c. 84 K 杨

Notes: a. *Populus simonii*×*P. nigra*; b. *Populus ussuriensis*; c. *Populus alba*×*P. glandulosa*.

图 7 3 种杨树叶片蛋白质的 2-DE 图谱

Fig. 7 2-DE profiles of proteins from three kinds of poplar leaf

3 讨论

3.1 蛋白质组学在木本植物研究中的应用

目前, 蛋白质组学技术在白桦 (*Betula platyphylla* Suk.)^[19]、旱柳 (*Salix matsudana* Koidz)^[20]、茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)^[21] 及杨树^[15] 等植物的蛋白质组学研究中进行了广泛的应用, 在推动木本植物蛋白功能的研究与发展中起到了重要的作用。如宁德利^[22] 利用蛋白质组学技术分析了小

黑杨顶芽进入休眠、保持休眠及解除休眠 3 个阶段的蛋白质的变化, 获得了 74 个差异蛋白质; 张小玲等^[23] 利用蛋白质组学技术分析了杨树不同种质成熟花粉萌发的特性及致敏蛋白的差异, 发现不同种质间杨树的花粉活力、致敏蛋白的数量及表达量存在明显差异。对于杨树叶片蛋白质组学的研究也有一些报道, 如 Kieffer 等^[24] 研究了镉胁迫对杨树叶片蛋白质表达的影响, 获得了 125 个差异表达蛋白质, 对 118 个差异蛋白进行了鉴定与分析, 阐明

了碳代谢与氧化胁迫机制参与杨树叶片镉胁迫的应答;岳宁等^[25]对胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)异形叶锯齿阔卵型以及披针形叶片蛋白质分别进行双向电泳实验,对图谱比较分析后发现了73个差异表达蛋白质,揭示了胡杨为了适应生存环境,叶片中蛋白质的表达发生了变化,形成了不同形状的叶片;金鑫^[26]对小黑杨叶片参与H₂O₂胁迫应答的蛋白质进行了分析,获得了81个小黑杨叶片响应H₂O₂胁迫的差异表达蛋白质。由于杨树叶片中含有较多的多糖、酚类及核酸等物质,对蛋白质的分离产生了较大的影响,导致在杨树叶片蛋白质组学的研究中获得差异蛋白质的个数较少,图谱的背景较高,图谱不够清晰。为了进一步获得更多的差异蛋白质,对蛋白质的功能进行全面的分析与分析,对杨树叶片蛋白质双向电泳体系进行优化是十分必要的。迄今为止,杨树叶片蛋白质双向电泳体系优化相关的研究尚未见报道。在蛋白质组学的研究中,获得高质量的双向电泳图谱,在2-DE凝胶展示更多的蛋白质是进行后续分析的前提,因此,对杨树叶片蛋白质进行双向电泳体系的优化可为后续的杨树叶片蛋白质组学的研究奠定基础。

3.2 适用于双向电泳的杨树叶片总蛋白质的制备

在双向电泳体系中,蛋白样品制备的好坏直接关系到图谱质量的好坏。在进行等电聚焦前需要将蛋白样品重新溶解,确保样品在2D裂解液中有良好的溶解性,这对获得分辨率高且蛋白质个数多的二维凝胶图谱是至关重要的。尿素是一种常用的离液剂,在蛋白质的溶解中应用较多,它可以改变或破坏蛋白质内部的氢键、疏水键等次级键的结构,使蛋白质变性及蛋白酶失活^[27]。硫脲是一种增溶剂,在膜蛋白的提取中应用较多^[28],但由于其不溶于水,溶于高浓度尿素的特性,需与尿素混合使用^[29];硫脲可提高蛋白的溶解性,增强2-DE的效果。本研究采用尿素与硫脲联用的2D裂解液II溶解小黑杨叶片蛋白质获得了蛋白质个数多、聚焦效果较好的双向电泳图谱。

小黑杨叶片中富含多糖、色素、核酸等物质,在胶图中呈现出较高的背景,影响蛋白质的识别。本研究采用TCA-丙酮沉淀法与2D clean-up kit法对获得的蛋白样品进行纯化,TCA-丙酮沉淀法是基于蛋白在酸和/或疏水条件下变性使蛋白浓缩并去除污染物的原理^[30],最早用于小麦蛋白的提取,是目前提取植物蛋白的常用方法之一。TCA能有

效地抑制蛋白酶对蛋白质的水解作用,保证在制样过程中蛋白质不被降解^[31];然而,该方法的最大的缺点是样品中的非蛋白成分很难去除^[32],导致双向电泳图谱有较高的背景,从而掩盖部分蛋白质,影响蛋白质组学的分析。2D clean-up kit法可通过定量沉淀蛋白质去除核酸、盐类、脂类和酚类等干扰物质,在苜蓿细胞壁^[33]和豌豆种子^[34]的蛋白质样品制备中已有使用报道;同时,该方法可以有效的浓缩蛋白样品,特别适用于上样量大的样品。本研究通过比较2种蛋白纯化方法发现,对于小黑杨叶片蛋白而言,采用2D clean-up kit对蛋白样品进行纯化可有效去除杂质和干扰物质,获得背景清晰,分辨率较高的双向电泳图谱,可满足小黑杨蛋白质组学研究的要求。

3.3 杨树叶片总蛋白质双向电泳图谱分辨率的提高

双向电泳对蛋白质的分离效果主要受IPG胶条的pH范围、蛋白上样量和等电聚焦条件等因素的影响。选择合适的pH范围的胶条能提高图谱的分辨率,通常情况下选择pH 3~10的胶条进行分离蛋白质,选用较宽pH范围的胶条,可以使双向电泳图谱中呈现更多的蛋白质,更能全面反映植物组织细胞内蛋白质的表达情况;但如果胶条的pH范围与蛋白样品中蛋白的等电点范围相差较大,则会使蛋白过于集中无法完全分离,造成部分蛋白点重合影响分析效果^[35]。Görg等^[36-37]研究表明,使用窄pH范围的IPG胶条分离蛋白质样品,可提高图谱的分辨率,并可提高该pH范围内所检测到的蛋白质的数量。在本研究中,与pH 3~10的IPG胶条相比,采用pH 4~7的IPG胶条可以分离出更多的蛋白质。

合适的蛋白上样量可以提高双向电泳图谱的分辨率。上样量过低,低丰度蛋白难以检测,可检测到的蛋白质少。提高上样量有利于低丰度蛋白的检测,但上样量过高会产生横纵条纹,高丰度蛋白会影响其他蛋白的分离和分析^[29],蛋白质容易凝聚或沉淀而造成损失。在胶条的长度及染色方法确定的前提下,优化上样量对提高蛋白质的分离效果和增加低丰度蛋白的检测均具有重要意义。本研究中,小黑杨叶片蛋白质的上样量为1 mg时可以检测到更多的蛋白质,获取更多的蛋白质信息。

等电聚焦程序的设置会影响蛋白质的分离效果,聚焦时间与胶条的长度、pH范围、两性电解

质载体及蛋白样品的上样量有关^[28]。聚焦不完全会造成图谱中有大量的横向拖尾、蛋白质不能有效分离,蛋白质的等电点难以确定。聚焦过度会造成横条纹、蛋白质的损失和蛋白质漂移。在本研究中,采用 10 000 V 的等电聚焦时间为 13 h 对小黑杨叶片蛋白质进行分离,可以获得分辨率较高的双向电泳图谱。

SDS 平衡的主要目的是促使 SDS 与蛋白分子充分结合,保证蛋白分子在第二向中能够进行有效的迁移;平衡时间过短,蛋白没有结合足够的 SDS,易产生纵向拖尾;平衡时间过长大量蛋白会从 IPG 胶条中出来进入平衡液中,造成蛋白的损失。

4 结 论

本研究优化后的双向电泳体系为:采用 2D 裂解液 II 溶解总蛋白质,用 2D clean-up kit 法对总蛋白质进行纯化,选用 24 cm、pH 4~7 的线性 IPG 胶条,蛋白上样量为 1 mg,10 000 V 的等电聚焦时间为 13 h,SDS 平衡时间为 40 min。利用优化后的双向电泳体系对小黑杨、大青杨和 84 K 杨叶片蛋白质进行双向电泳实验,分别可检测到 531、828、525 个蛋白质,得到的蛋白质分离效果好,双向电泳图谱背景清晰,分辨率高,重复性好。本研究成功的建立了小黑杨、大青杨与 84 K 杨叶片蛋白质的双向电泳图谱,该体系可满足小黑杨、大青杨与 84 K 杨蛋白质组学的分析和研究,为杨树叶片蛋白质组学的研究奠定了基础。

参 考 文 献:

- [1] Bradshaw H D, Ceulemans R, Davis J, et al. Emerging model systems in plant biology: Poplar (*Populus*) as a model forest tree[J]. *Plant Growth Regul*, 2000, 19 (3): 306-313.
- [2] Chen S, Jiang J, Li H Y, et al. The salt-responsive transcriptome of *Populus simonii*×*Populus nigra* via DGE[J]. *Gene*, 2012, 504(2): 203-212.
- [3] 崔长占, 黄传林, 于国民, 等. 小黑杨扦插苗生长规律的研究[J]. *高师理科学刊*, 1999, 19(2): 37-39.
- [4] 王占斌, 张福丽, 王志英, 等. 小黑杨转抗真菌病基因的初步研究[J]. *林业科技*, 2006, 31(6): 22-24.
- [5] Lin T, Wang Z Y, Liu K Y, et al. Transformation of spider neurotoxin gene with prospective insecticidal properties into hybrid poplar *Populus simonii*×*P. nigra*[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49(4): 593-598.
- [6] 杨传平, 刘桂丰, 梁宏伟, 等. 耐盐基因Bet-A转化小黑杨的研究[J]. 2001, 37(6): 34-38.
- [7] 白 爽, 宋启平, 刘桂丰, 等. 转betA基因的小黑杨花粉植株耐盐性分析[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(1): 41-44.
- [8] Zhao H, Wang S, Chen S, et al. Phylogenetic and stress-responsive expression analysis of 20 WRKY genes in *Populus simonii*×*Populus nigra*[J]. *Gene*, 2015, 565(1): 130-139.
- [9] 孙 琦, 曲春浦, 郑美珠, 等. 小黑杨FLC基因的克隆及功能解析[J]. *植物研究*, 2015, 35(3): 363-369.
- [10] Guo Y M, Shen S H, Jing Y X, et al. Plant proteomics in the post-genomic Era[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(6): 631-641.
- [11] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1996, 13(1): 19-50.
- [12] Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, et al. Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Clinical Proteomics*, 2014, 11(1): 16-26.
- [13] Zukas A A, Breksa A P. Extraction methods for analysis of Citrus leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1078(1-2): 201-205.
- [14] Romeo S, Trupiano D, Ariani A, et al. Proteomic analysis of *Populus euramericana* (clone I-214) roots to identify key factors involved in zinc stress response[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(12): 1054-1063.
- [15] Liu J W, Hai G H, Wang C, et al. Comparative proteomic analysis of *Populus trichocarpa* early stem from primary to secondary growth[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 126: 94-108.
- [16] 赵玲玲, 毕 青, 周 雪, 等. 大白菜根系蛋白质双向电泳体系优化[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(1): 178-183.
- [17] 索慧英, 刘 静, 曲冠证, 等. NaHCO₃胁迫下刚毛柞柳叶片蛋白质差异表达谱的建立[J]. *北京林业大学学报*, 2018, 40(9): 17-26.
- [18] 严 冬, 刘殿昆, 司冬晶, 等. 适用于双向电泳的杨树叶片蛋白质提取方法的研究[J]. *植物研究*, 2016, 36(3): 469-475.
- [19] 孙国荣, 彭永臻, 阎秀峰, 等. 干旱胁迫对白桦实生幼苗叶片蛋白质的影响[J]. *林业科学*, 2003, 39(4): 151-154.
- [20] 张小果, 乔桂荣, 李翠云, 等. 旱柳根系蛋白质双向电泳体系的建立[J]. *浙江农林大学学报*, 2011, 28(4): 653-661.
- [21] 任 燕, 陈 暄, 房婉萍, 等. 茶树雌蕊总蛋白质双向电泳分离体系的建立[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(5): 420-428.
- [22] 宁德利. 小黑杨(*Populus simonii*×*P. nigra*)休眠芽的蛋白质组学和转录组学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [23] 张小玲, 王留强, 孙 佩, 等. 杨树不同种质花粉萌发和致敏蛋白的差异[J]. *林业科学*, 2017, 53(2): 54-64.
- [24] Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, et al. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants[J]. *Proteomics*, 2008, 8(12): 2514-2530.
- [25] 岳 宁, 郑彩霞. 胡杨异形叶蛋白质表达的电泳分析[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(32): 18058-18061.
- [26] 金 鑫. 小黑杨(*Populus simonii*×*P. nigra*)叶片H₂O₂应答的生理与蛋白质组学分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
- [27] 陈蕊红, 张改生, 刘 卫, 等. 小麦花药蛋白质组双向电泳技术体系的优化[J]. *核农学报*, 2008, 22(4): 404-409.
- [28] Pasquali C, Fialka I, Huber L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. *Electrophoresis*, 1997,

- 18(14): 2573-2581.
- [29] 罗泽宇, 杨粤军, 刘选明. 拟南芥蛋白质组研究中双向电泳技术条件的优化[J]. 激光生物学报, 2008, 17(4): 539-543.
- [30] Damerval C, 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.
- [31] 陈晶瑜, 郭宝峰, 何付丽, 等. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较[J]. 中国农学通报, 2010, 26(23): 97-100.
- [32] 王玉琪, 彭新湘. 适用于水稻叶片蛋白质组分析的双向电泳技术[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(2): 252-256.
- [33] Fuente M D, Borrajo A, Bermudez J, *et al.* 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds[J]. *Journal of Proteomics*, 2011, 74(2): 262-267.
- [34] Watson B S, Sumner L W. Isolation of cell wall proteins from *Medicago sativa* stems[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2007, 355: 79-92.
- [35] 陈伟, 黄榕辉, 林小敏, 等. 秋茄根系蛋白质组的双向电泳技术优化[J]. 福建农业学, 2012, 27(8): 863-868.
- [36] Görg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(4/5): 712-717.
- [37] Görg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized PH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1037-1053.

Two-dimensional Electrophoresis Profiles for Proteins of Poplar Leaf

SUO Hui-ying¹, ZHENG Mi², LU Han³, QU Guan-zheng³, LI Ying²

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Harbin Sport University, Harbin 150008, Heilongjiang, China; 3. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] To explore a two-dimensional electrophoresis (2-DE) system suitable for proteomics research of poplar leaf and to establish 2-DE profiles for proteins of poplar leaf. [Method] 2-DE was used to conduct the optimization of 2D lysis buffer, the purification of protein, the immobilized pH gradient (IPG), sample loading amount, isoelectric focusing (IEF) time and the equilibration time of the 2-DE system of *Populus simonii*×*P. nigra* leaves. 2-DE experiments for proteins of *P. simonii*×*P. nigra*, *P. ussuriensis* and *P. alba*×*P. glandulosa* leaves were carried out using optimized 2-DE system. [Result] The solubility of proteins of *P. simonii*×*P. nigra* leaves could be significantly improved by using 2D lysis buffer II. There were 326 proteins detected by using 2D lysis buffer II, which were 209 more than that detected by using 2D lysis buffer I. The proteins of *P. simonii*×*P. nigra* leaves were extracted by plant protein lysis buffer and purified by 2D clean-up kit. The background of the 2-DE profile was clear and the protein separation effect was better. The proteins of *P. simonii*×*P. nigra* leaves was mainly distributed in the range of pH 4~7, and 393 proteins could be obtained with good separation using IPG strips of 24 cm in length with the pH ranges from 4 to 7. The proteins detected increased from 326 to 454 when the proteins loading amount was up to 1 mg. With the condition of 6 h IEF time of 10 000 V and 40 minutes of Sodium Dodecyl Sulfate equilibration time, the background of 2-DE profile was more clear, more proteins were detected and the resolution was higher. There were 531, 828 and 525 proteins, which were detected from *P. simonii*×*P. nigra*, *P. ussuriensis* and *P. alba*×*P. glandulosa* leaves separately by using optimized 2-DE system. The separation of the protein was clear and the resolution was high. [Conclusion] This study optimized the key steps of 2-DE system of protein of *P. simonii*×*P. nigra* leaves and establish 2-DE profiles for proteins of *P. simonii*×*P. nigra*, *P. ussuriensis* and *P. alba*×*P. glandulosa* leaves by optimized 2-DE system. This research reveals that it is possible to improve the resolution and repeatability of 2-DE system of protein of *P. simonii*×*P. nigra* leaves by the optimized system. Using the optimized 2-DE system, the authors have successfully established 2-DE profiles for proteins of *P. simonii*×*P. nigra*, *P. ussuriensis* and *P. alba*×*P. glandulosa* leaves. This system is suitable for the proteomics analysis of *P. simonii*×*P. nigra*, *P. ussuriensis* and *P. alba*×*P. glandulosa* leaves. This result is a reference for proteomics analysis of poplar leaf.

Keywords: *Populus simonii*×*P. nigra*; protein; two-dimensional electrophoresis; optimization