

当归种子蛋白质提取方法及SDS-PAGE技术体系研究^Δ

张延红*,高素芳,王 燕,李金田,杜 骏[#](甘肃中医药大学药学院,兰州 730000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1751-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.07

摘要 目的:建立适用于当归种子蛋白质提取及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的技术体系,为当归种子蛋白质研究和品种纯度检测提供技术支撑。方法:以蛋白质含量和电泳条带数量等为指标,采用浓缩胶法、盐溶蛋白法、电极缓冲液法、二巯基苏糖醇(DTT)法、尿素法、巯基乙醇法、三羟甲基氨基甲烷(Tris)法、丙酮沉淀法等8种方法提取当归种子蛋白质,筛选最优提取方法;再以最优提取方法为基础,考察不同料液比、样品稀释倍数(上样量)和分离胶浓度对当归种子蛋白质提取及SDS-PAGE效果的影响。结果:8种提取方法中以巯基乙醇法提取蛋白质的含量较高(29.931 mg/g),且电泳条带数目多、泳道背景清晰;当以巯基乙醇法为最优提取方法时,料液比为1:10、上样量为5倍、分离胶浓度为15%条件下电泳效果最好,共得到18条条带。结论:建立的蛋白质提取方法和SDS-PAGE技术体系适用于当归种子纯度的检测。

关键词 当归;种子;蛋白质提取;SDS-PAGE

Study on the Protein Extraction Method in *Angelicae sinensis* Seed and Its SDS-PAGE Technical System

ZHANG Yanhong, GAO Sufang, WANG Yan, LI Jintian, DU Tao (School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the technical system that is suitable for protein extracting in *Angelicae sinensis* seed and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and provide technical support for detecting the protein quality and variety purity. METHODS: Using protein content and number of electrophoretic bands as indexes, 8 methods, including concentrated gel method, salt-soluble protein method, electrode buffer method, dithiothreitol (DTT) method, urea method, mercaptoethanol method, trimethylolaminomethane (Tris) method, and acetone precipitation method, were conducted to extract the protein in *A. sinensis* seed and screen the optimal extraction method. Then based on optimal extraction method, effects of different materials-lipid ratios, sample dilution times (sample volume) and separate gel concentration on SDS-PAGE were investigated. RESULTS: Mercaptoethanol method extracted the highest protein contents (29.931 mg/g), with many electrophoretic bands and clear background. When mercaptoethanol method was used as optimal extraction method, electrophoresis effects were the best in the conditions of materials-lipid ratio of 1:10, sample volume of 5 times, separate gel concentration of 15%, which obtained 18 bands totally. CONCLUSIONS: Established protein extraction method and SDS-PAGE technical system are suitable for detecting the purity of *A. sinensis* seed.

KEYWORDS *Angelicae sinensis*; Seed; Protein extraction; SDS-PAGE

蛋白质是基因表达的产物,能反映生物DNA组成上的差异,几乎所有植物种子都具有特异性种子蛋白,其电泳谱带具有高度的稳定性、专一性。蛋白质电泳技术就是根据种子蛋白的这些特点,利用电泳谱带的多态性来鉴定品种的真实性和纯度。此外,种子蛋白作为遗传标记常被用于种属间关系、品种鉴定及植物繁育系统的鉴别。种子检验是保证种子质量的重要措施,采用电泳分离的蛋白图谱检测农作物种子纯度已有文献报道^[1-2]。利用种子蛋白质电泳图谱鉴定种子纯度具有不需将种子萌发、送检样品可及时进行分析、电泳后的染

色步骤相对简单等优点。此外,该技术还可用于测定蛋白质分子量和蛋白质浓度,是许多研究领域的重要分析技术。当归为伞形科多年生草本植物当归[*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels]的干燥根^[3-4],是甘肃特色药材之一。本试验以当归种子为研究材料,对其蛋白质的提取方法及电泳条件进行研究,旨在建立适宜于当归种子蛋白质提取和电泳的技术体系,为当归种子蛋白质研究和品种纯度检测提供技术支撑。

1 材料

1.1 仪器

DYY-10C型电泳仪、DYCZ-23A型垂直电泳槽(北京市六一仪器厂);BX7200HP超声波清洗器(上海新苗医疗器械制造有限公司);TGL16M型高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

1.2 种子与试剂

Δ 基金项目:国家中医药管理局“国家基本药物所需中药材种子种苗繁育基地建设”基金资助项目(No.国中医药办规财发[2013]41号)

* 副教授,博士。研究方向:药用植物育种和组织培养方面的教学和研究。E-mail: zhyh456789@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药用植物育种的教学和 研究。E-mail: gslzdt@163.com

当归种子由甘肃省定西市农业科学研究院刘效瑞老师提供,经晋玲教授鉴定为当归种子;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、二巯基苏糖醇(DTT)、乙二胺四乙酸(EDTA)、丙酮、甘油、考马斯亮蓝、十二烷基硫酸钠(SDS)、冰醋酸、甲醇、甘氨酸等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蛋白质提取

经查阅文献[5-13]及预试验确定选用以下蛋白质提取方法进行筛选比较。

2.1.1 浓缩胶法 在文献[5]方法上加以改进。称取当归种子0.2 g,加稀释4倍的浓缩胶缓冲液(0.5 mmol/L的Tris-HCl, pH 6.7)2 mL冰浴研磨,超声震荡30 min,离心(3 500 r/min,离心半径5 cm,下同)30 min,取上清液,加入等体积40%的蔗糖溶液,4 ℃贮存备用。

2.1.2 盐溶蛋白法 称取当归种子0.2 g,加入1.5 mol/L的氯化钠溶液2 mL,在冰浴条件下研磨,离心20 min,取上清液,4 ℃贮存备用^[5]。

2.1.3 电极缓冲液法 在文献[6]方法上加以改进。称取当归种子0.2 g,加入样品提取液[40%的蔗糖10 mL,电极缓冲液(3.03 g Tris, 14.4 g 甘氨酸, 1.0 g SDS,加双蒸水溶解定容至1 000 mL, pH 8.3)2 mL,加水8 mL混匀]2 mL在冰浴条件下研磨,离心20 min,取上清液,4 ℃贮存备用。

2.1.4 DTT法 称取当归种子0.2 g,加入50 mmol/L Tris-HCl(含1.5% DTT和0.6 mmol/L的EDTA缓冲液, pH 8.0)样品提取液2 mL(4 ℃预冷备用),室温浸泡1 h,然后研磨至糊状后4 ℃下离心(10 000 r/min)20 min,离心2次^[6],上清液即为蛋白质提取液。

2.1.5 尿素法 取32.43 g尿素、120 μL乙二醇溶于1 000 mL双蒸水中得到提取液。称取冷藏30 min后的当归种子0.2 g,研磨后装入离心管中,加入提取液(料液比为1:10),室温下提取1 h后涡旋混合约1 min,再于4 ℃下离心(10 000 r/min)10 min,取上清液备用^[7]。

2.1.6 巯基乙醇法 在文献[8]方法上加以改进。称取当归种子0.2 g,加入pH 8.0的50 mmol/L Tris-HCl(含1% SDS、1% 巯基乙醇、40%的蔗糖溶液)提取液2 mL,置沸水中加热3 min,立即置于冰上冷却,取上清液备用。

2.1.7 Tris法 称取样品0.2 g,加入pH 8.0的0.15 mol/L Tris-HCl提取液2 mL,4 ℃浸泡6 h,离心(4 000 r/min)15 min,取上清液备用^[8]。

2.1.8 丙酮沉淀法 称取当归种子0.2 g,加入样品提取液(pH 8.0的62.5 mmol/L Tris-HCl、0.5% SDS、10%甘油、5%巯基乙醇)2 mL,涡旋混合30 s,4 ℃放置1 h。样品摇匀后,在4 ℃下离心(12 000 r/min)20 min,上清液

转移至3 mL离心管中,加入1 mL预冷丙酮,摇匀,-20 ℃放置1 h沉降蛋白质,4 ℃下离心(5 000 r/min)10 min,弃上清液。沉淀在-20 ℃放置1 h,使丙酮充分挥发,沉淀备用^[9]。

2.2 蛋白质含量测定与电泳

蛋白质含量和纯度是评价提取方法的重要指标,蛋白纯度不同,对电泳的影响也不同。较多的杂质将严重影响电泳结果。采用考马斯亮蓝法测定上述8种方法提取的蛋白质含量^[10];采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术^[11],比较各方法提取的蛋白质电泳的条带数目和泳道干净程度,筛选适宜的蛋白质提取方法。本试验数据均采用Excel 2003作图,SPSS 18.0软件进行Duncan多重比较。

2.2.1 电泳技术操作步骤 (1)电泳槽的安装:将2块玻璃板垂直插入玻璃槽固定好,将溶化的1.5%琼脂趁热注入电泳槽平板玻璃底部,以防漏液。(2)聚合:取配制好的分离胶(浓度10%)混匀后小心注入电泳槽的玻璃板间,留出约3 cm左右的空间以灌注浓缩胶[浓度3%,配制方法:蒸馏水2.7 mL、30%丙烯酰胺(29.2 g)/N,N-亚甲基双丙烯酰胺(0.8 g)0.67 mL、浓缩胶缓冲液0.5 mL、10% SDS 50 μL、10%过硫酸铵50 μL、四甲基乙二胺4 μL;浓缩胶缓冲液是0.5 mmol/L Tris-HCl(pH=6.7)。将上述试剂混匀后,倒入玻璃板间(分离胶上方),插入梳子,室温静置聚合2 h左右。(3)电泳:待浓缩胶完全聚合后,取出梳子,吸去多余的水,用微量注射枪向加样孔内点样,在电泳槽中加电极缓冲液(将3.03 g Tris、14.4 g 甘氨酸、1.0 g SDS溶于900 mL超纯水中,然后定容至1 000 mL即为电极缓冲液)适量,并在上样缓冲液中加7~8滴溴酚蓝指示剂。接上电泳仪,恒压60 V,待蓝色溴酚蓝移至分离胶时,转换电压至120 V;待蓝色的溴酚蓝移至下端1~1.5 cm时,停止电泳。(4)染色和脱色:取出胶板后放入考马斯亮蓝G-250染色液,染色1 h。然后再用蒸馏水冲洗2遍,倒入脱色液,期间多次更换至背景清晰为止,拍照。

2.2.2 分离胶配方 配方见表1。

表1 分离胶配方(mL)

Tab 1 Solution formula of separating gel(mL)

试剂	分离胶浓度		
	10%	12%	15%
蒸馏水	3.5	2.9	1.9
30%丙烯酰胺/N,N-亚甲基双丙烯酰胺	3.4	4	5
分离胶缓冲液	2.5	2.5	2.5
50%甘油	0.6	0.6	0.6
10% SDS	0.1	0.1	0.1
10%过硫酸铵	0.1	0.1	0.1
四甲基乙二胺	0.01	0.01	0.01

2.2.3 蛋白质含量测定及电泳结果 当归种子8种提取方法的蛋白质含量测定结果见表2,电泳图见图1。

表2 不同提取方法蛋白质含量比较

Tab 2 Comparison of protein contents by different extraction methods

提取方法	蛋白质含量,mg/g
丙酮沉淀法	41.288 ^a
浓缩胶法	32.487 ^b
DTT法	30.645 ^{bc}
巯基乙醇法	29.931 ^{bc}
尿素法	25.963 ^{bcd}
盐溶蛋白法	24.764 ^d
电极缓冲液法	19.740 ^{de}
Tris法	13.233 ^e

注:同一指标不同组别间,若字母相同,则代表差异无统计学意义($P>0.05$);若字母完全不同,则代表差异有统计学意义($P<0.05$)

Note: if there is same letter in the same index among different groups, it indicates the difference is not statistically significant ($P>0.05$); if the letters are completely different, then it indicates the difference is statistically significant ($P<0.05$)

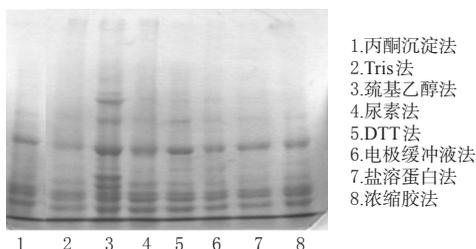


图1 不同提取方法蛋白质电泳图

Fig 1 Protein electrophoretogram by different extraction methods

由表2及图1可知,丙酮沉淀法提取的蛋白质含量最高,与其余7种方法比较差异有统计学意义($P<0.05$),但图谱显示该法电泳条带较模糊;巯基乙醇法与DTT法提取的蛋白质含量差异无统计学意义($P>0.05$);盐溶蛋白法提取出的蛋白质含量较低,其电泳图谱条带较宽、条带颜色浅淡;Tris法提取出的蛋白质含量最低,图谱也显示其条带较宽、颜色较淡。故当归种子不同提取方法的蛋白质含量测定结果与蛋白质电泳图谱二者有一定的对应关系。

总的来说,8种方法电泳条带多分布于中下部,其中巯基乙醇法电泳效果最好,总条带数10条,明带8条、暗带2条,泳道背景清晰。尿素法、DTT法、电极缓冲液法、盐溶蛋白法、浓缩胶法电泳条带的数目和亮度差异不大,均为4~5条,其中盐溶蛋白法的条带明显变宽。丙酮法和Tris法电泳条带较模糊,数目较少。因此,巯基乙醇法是当归种子最适宜的蛋白质提取方法。

2.3 提取与电泳条件的优化

在采用巯基乙醇法提取蛋白质的基础上对提取条件(料液比)及电泳条件(上样量、分离胶浓度)进行进一步的优化试验。

2.3.1 料液比 称取当归种子0.2 g,分别加入1、2、3、4、

5 mL样品提取液,料液比分别为1:5、1:10、1:15、1:20、1:25。按“2.1.6”项下方法提取,将提取的蛋白质样品用上样缓冲液(浓缩胶缓冲液1 mL、10% SDS 1.6 mL、50%甘油0.8 mL、巯基乙醇0.4 mL、0.05%溴酚蓝0.2 mL、双蒸水4.0 mL,混合均匀)按1:4稀释^[9],比较蛋白质含量、电泳条带数目和泳道干净程度,筛选适宜的料液比,结果见表3、图2A。

表3 不同料液比条件下蛋白质含量比较

Tab 3 Comparison of protein contents under different materials-liquid ratios

料液比	蛋白质含量,mg/g
1:10	29.287 ^a
1:15	26.382 ^b
1:20	23.073 ^c
1:25	20.997 ^d
1:5	13.247 ^e

注:同一指标不同组别间,若字母相同,则代表差异无统计学意义($P>0.05$);若字母完全不同,则代表差异有统计学意义($P<0.05$)

Note: if there is same letter in the same index among different groups, it indicates the difference is not statistically significant ($P>0.05$); if the letters are completely different, then it indicates the difference is statistically significant ($P<0.05$)

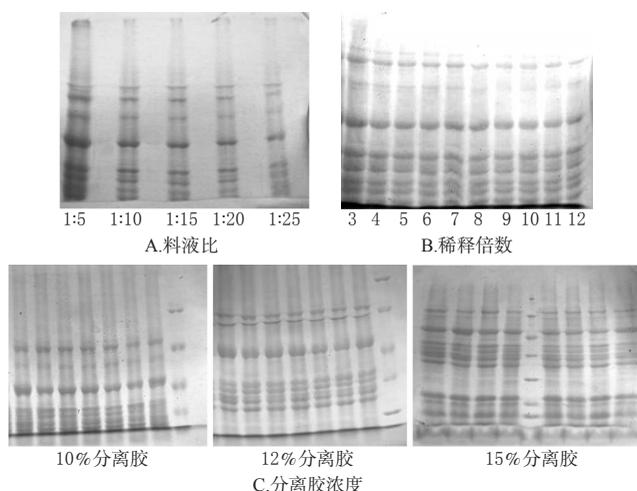


图2 不同条件下蛋白质的电泳图谱比较

Fig 2 Comparison of protein electrophoretogram under different conditions

由表3可知,当料液比为1:10时,提取液中的蛋白含量最高,与其余料液比比较差异具有统计学意义($P<0.05$),提取效果最好。由图2A可见,不同料液比对电泳效果的影响显著。料液比为1:5时泳道颜色浓重,背景不干净,条带不清晰、拖尾严重,提取液的泳道颜色最深,且条带较宽。其原因是提取液体积太少,蛋白质提取不充分,杂质太多,此结果与蛋白质含量测定结果相一致。当料液比为1:10和1:15时,电泳效果较好,泳道干净,条带清晰、数目多,泳道上方有极细的暗带分出。当料液比为1:20和1:25时,泳道下部条带颜色变淡;且料液比为1:25时,条带变模糊,第4、5条明带间已无暗

带。因此,料液比优选1:10。

2.3.2 样品稀释倍数(上样量) 在“2.3.1”项试验的基础上,采用巯基乙醇法提取蛋白质,以料液比为1:10提取种子蛋白质。取提取后的蛋白质样品30 μ L用上样缓冲液分别稀释3、4、5、6、7、8、9、10、11、12倍,比较电泳条带数目和泳道干净程度,筛选适宜的稀释倍数,结果见图2B。

由图2B可知,稀释3倍的蛋白质液拖尾较严重,可能因蛋白质浓度太高所致。稀释4、5、6、7倍的条带数最多,总数11条,亮带8条、暗带3条,从下向上第4、5带间可清晰看到2条暗带。稀释8~12倍的条带颜色变淡变细,且有些暗带消失。因此,样品稀释倍数优选5倍。

2.3.3 分离胶浓度 在“2.3.2”项试验的基础上,采用巯基乙醇法提取蛋白质,按料液比为1:10、样品稀释5倍上样。配制3%的浓缩胶及10%、12%、15%的分离胶进行蛋白质电泳,比较电泳条带数目和泳道干净程度,筛选适宜的分离胶浓度,详见图2C。

由图2C可知,15%分离胶与10%、12%分离胶电泳效果比较,前者条带数目明显更多,且主要是在下部分离出更多清晰的亮带和暗带,中上部的亮带差异不大,但有新的暗带出现。因此,15%的分离胶可使蛋白质分离更完全,电泳得到18条带,其中11条亮带、7条暗带。计算其分子量^[8]介于11.88~30.18 KD之间。

筛选后的当归种子提取方法为巯基乙醇法,料液比为1:10,电泳上样量为稀释5倍,分离胶浓度为15%。

3 讨论

通过本次试验建立了适合当归种子蛋白质电泳的技术体系。不同提取方法对蛋白质含量及电泳效果的影响很大,本试验采用8种提取方法,其中巯基乙醇法蛋白质提取和电泳效果均最好。其原因可能是提取液中的SDS使蛋白质非共价键和二硫键断裂,并中和蛋白质表面电荷;同时加入的巯基乙醇是一种强还原剂,其可使被还原的二硫键不易再氧化,从而使很多不溶性蛋白质溶解并与SDS定量结合^[16-17]。由于SDS和巯基乙醇的双重作用,蛋白质完全变性和解聚,解离成亚基或单个肽链,因此,蛋白质溶解性增加、提取量增加、电泳效果好。而丙酮沉淀法的提取液中也含有SDS和巯基乙醇,也取得了较好的提取效果,但丙酮沉淀法耗时长、方法复杂。在本试验中该法图谱显示电泳条带较模糊,其原因是该法提取的蛋白质呈固体状,故上样时将蛋白质沉淀用上样缓冲液稀释了8倍,而其余方法样品只稀释了5倍,故丙酮沉淀法的稀释倍数大于其他方法。

本课题组通过党参、大黄、红芪、苦豆子、甘草、黄芪、板蓝根和柴胡9种药材种子蛋白质提取及SDS-PAGE研究发现(待发表),巯基乙醇法均有很好的提取和电泳效果,适用性很广,而且用时短,方法简单易行,可供其他植物种子借鉴使用。

当归种子蛋白质分子量较小,采用15%的分离胶较12%、10%的分离胶蛋白质电泳图谱分离出的条带更多,分离效果更好。在对9种药材的种子蛋白质电泳时发现,15%的分离胶可获得更多的电泳条带。另外,在研究过程中本课题组发现利用冷藏和冷冻两种方式保存了1周的蛋白质提取液,在电泳时冷冻法保存的蛋白质提取液其电泳条带分离得更清晰,且在冷冻保存1个月仍能取得良好的电泳效果。其原因可能是温度越低越有利于蛋白质的保存。因此,冷冻法能够更长时间地保存蛋白质提取液,不会导致蛋白变性。

参考文献

- [1] 吴正三,陈明.作物种子纯度检验的电泳方法[J].种子,1998,17(3):29-30.
- [2] 侯颖,张琥瑛.应用蛋白凝胶电泳法鉴定玉米种子纯度[J].种子科技,1999(5):36-37.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:133.
- [4] 王芳,李东.当归的化学及药理研究进展[J].中国药房,2003,14(10):630-631.
- [5] 宋艳梅,李峰,周丽曼.瓜蒌种子蛋白质6种提取方法比较[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):95-97.
- [6] 李莹莹,吴彩娥,杨剑婷,等.白果蛋白质提取及SDS-PAGE分析[J].食品科学,2010,31(22):36-40.
- [7] 李开拓,郭志雄,潘东明,等.荔枝果皮总蛋白质提取及双向电泳体系的建立[J].热带亚热带植物学报,2011,19(1):69-74.
- [8] 曾广娟,李春敏,张新忠,等.适于SDS-PAGE分析的苹果叶片蛋白质提取方法[J].华北农学报,2009,24(2):75-78.
- [9] 张相年,赵树进,李超.蛋白质分离技术的应用和进展[J].中国药业,2006,15(2):72-73.
- [10] 翟旭光,潘志芬,商闯,等.燕麦麦谷蛋白SDS-PAGE电泳分析[J].西南农业学报,2009,22(1):24-28.
- [11] 曹向宇,刘剑利,芦秀丽,等.薏米蛋白提取方法比较研究[J].食品科学,2011,32(8):88-92.
- [12] 杜绍华,卜志国.枣树叶蛋白质提取及SDS-PAGE单向电泳条件优化[J].安徽农业科学,2012,40(13):7631-7632.
- [13] 蔡金星,刘秀凤,常学东,等.蚕豆蛋白质提取分离及其应用研究[J].食品工业科技,2007,28(10):142-144.
- [14] 刘伟强,谢特新,林健荣.SDS-PAGE电泳检测桑种子纯度的蛋白质提取液筛选[J].蚕业科学,2007,33(1):95-97.
- [15] 朱正美,刘辉.简明免疫学技术[M].北京:科学出版社,2002:170-174.
- [16] 高艳利,杨思文,樊凯奇.SDS-PAGE电泳技术分析蛋白质的研究[J].辽宁化工,2007,36(7):459-463.
- [17] 尚虹丽,孟鑫,张挺.薏米蛋白提取及其SDS-PAGE电泳[J].中国农学通报,2012,28(18):260-265.

(收稿日期:2016-08-27 修回日期:2016-11-08)

(编辑:刘 萍)