



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101718745 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200910232522. 3

CN 101173904 A, 2008. 05. 07, 全文.

(22) 申请日 2009. 12. 07

审查员 郑瑜

(73) 专利权人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗 1 号

(72) 发明人 麻浩 马洪雨 王显生 何小玲

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 张素卿

(51) Int. Cl.

G01N 27/447(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

G01N 1/30(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1408333 A, 2004. 04. 14, 全文.

WO 2004106923 A, 2004. 12. 09, 全文.

CN 101260146 A, 2008. 09. 10, 全文.

CN 101250217 A, 2008. 08. 27, 全文.

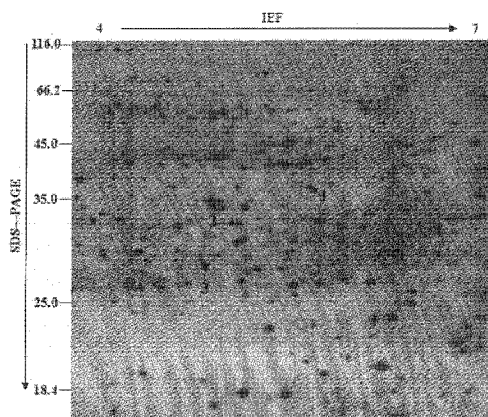
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

黄麻根系总蛋白双向电泳方法

(57) 摘要

本发明涉及一种黄麻的总蛋白质双向电泳方法,属于生物技术领域。是针对能够生存在沿海滩涂的黄麻根系总蛋白采用双向电泳技术进行分离,采用本技术方案对生长在沿海滩涂地的黄麻根系进行实验取得了很好的效果。目前,经过反复实验证明,采用双向电泳方法对其进行分离,分离得到蛋白点多,经 PDQuest 软件检测,蛋白点多于 1100 个,图谱清晰,无横纵纹现象,蛋白点圆,重复性好,是一套适用于黄麻根系总蛋白组分析的双向电泳方法。



1. 一种黄麻根系总蛋白双向电泳方法,其特征在于按下列步骤进行:

1) 采集黄麻根系,超纯水清洗干净,用液氮罐装运回,在实验室  $-70^{\circ}\text{C}$  以下保存备用;

2) 将 2g 黄麻根系迅速放入冰浴的研钵中加入液氮研磨,研磨过程中加入 0.2g 聚乙烯吡咯烷酮,直到研磨成细粉,转入预冷  $-20^{\circ}\text{C}$  的 50ml 离心管;

3) 加入 3 倍体积  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷的三氯乙酸提取液,充分混合后,放在  $-20^{\circ}\text{C}$  1.5h,三氯乙酸提取液配制:质量体积比 10%三氯乙酸 TCA,质量体积比 0.07%二硫苏糖醇 DTT,1mM 苯甲基磺酰氟 PMSF,溶剂为丙酮;

4) 35000g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15min,取沉淀,加入 25ml 预冷的样品洗涤液,充分混合后,放在  $-20^{\circ}\text{C}$  1h,期间间隔涡旋;样品洗涤液配制:质量体积比 0.07% DTT,1mM PMSF,溶剂为丙酮;

5) 20000g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15min,取沉淀,加入 25ml 预冷的样品洗涤液,充分混合后,放在  $-20^{\circ}\text{C}$  1h,期间间隔涡旋;

6) 重复步骤 5) 一次;

7) 20000g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15min,去掉上清后,用滤纸封口,真空干燥;

8) 将粗蛋白溶于裂解液,室温 1.5h;裂解液配制:7M 尿素、2M 硫脲、质量体积比 4% 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸 CHAPS、65mM DTT、1mM PMSF、体积比 0.2% 载体两性电解质;

9) 离心,得到上清液用 3 倍体积预冷的样品洗涤液  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 0.5h 后再 20000g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15min 离心,弃上清液;

10) 沉淀再次溶解于步骤 8) 中的 500  $\mu\text{l}$  裂解液,充分溶解后,离心,取上清;

11) 蛋白质定量:采用 Bradford 法测定其蛋白浓度;

12) 第一向等电聚焦电泳:按上样量 350  $\mu\text{g}$ ,上样体积 330  $\mu\text{l}$ ,对已定量好的蛋白样品进行稀释,上样水化液同步骤 8) 中的裂解液,将样品加入固相 pH 梯度 IPG 胶条聚焦盘内后,再将 pH 4-7,17cm 的 IPG 胶条胶面向下放入盘中,除去胶面与样品液间的气泡,用 2.5ml 矿物油 / 条,覆盖胶条,进行等电聚焦;

13) 胶条平衡:将聚焦好后的固相 pH 梯度 IPG 胶条进行平衡 I、II,每次平衡时间为 20min,平衡缓冲液配制如下:

胶条平衡缓冲液母液:6M 尿素,质量体积比 2% 十二烷基磺酸钠 SDS,0.375M pH8.8 的 Tris-HCl,体积比 20% 甘油,溶剂为水。

胶条平衡缓冲液 I:每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.2g DTT;

胶条平衡缓冲液 II:每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.25g 碘乙酰胺;

14) 第二向 SDS-PAGE 电泳:将平衡好的胶条置于胶浓度为质量体积比 12% 的 SDS-PAGE 胶上,用质量体积比 0.5%、含有质量体积比 0.002% 溴酚蓝的低熔点琼脂糖封胶液封住顶部,按如下参数进行电泳:  $16^{\circ}\text{C}$  恒温下,恒功率,先用 1 瓦 / 条,1.5h;再用 15 瓦 / 条,4 ~ 6h;

15) 染色方法:采用硝酸银法进行染色。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,整个过程的溶液配制均需用超纯水。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,裂解液与上样水化液均需现用现配。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,整个过程所需的 DTT 均需现用现加。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 12) 中的等电聚焦参数设置如下: 50V 水化,13h ;250V 慢速,1h ;500V 慢速,1h ;2000V 线性,1h ;8000V 线性,4h ;8000V 快速,60000V. h ;500V 快速,保持。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 14) 中胶浓度质量体积比 12% 的 SDS-PAGE 凝胶所用的溶液体积比含量为,水:质量体积比 30% 丙烯酰胺: 0.375M pH8.8 的 Tris-HCl :质量体积比 10% 十二烷基硫酸钠:质量体积比 10% 过硫酸铵:体积比 10% 四甲基乙二胺= 33 : 40 : 25 : 1 : 1 : 0.15。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 15) 中的染色方法程序如下:

步骤 1 :取 50ml 冰乙酸、200ml 无水乙醇、加水至 500ml 固定,1.5h ;

步骤 2 :取 1g 硫代硫酸钠,56.36g 三水合乙酸钠,150ml 无水乙醇,加水至 500ml 敏化,30min ;

步骤 3 :500ml 水漂洗三遍,5min/ 次 ;

步骤 4 :1.25g 硝酸银溶于 500ml 水,避光银染,20min ;

步骤 5 :500ml 水漂洗二遍,1min/ 次 ;

步骤 6 :12.5g 无水碳酸钠,0.2ml 甲醛,加水至 500ml,显色共 2 次 ;第一次待溶液变黄后倒掉,第二次显色到理想的背景和清晰度 ;

步骤 7 :7.3g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶于 500ml 水终止,10min。

## 黄麻根系总蛋白双向电泳方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种黄麻的根系总蛋白双向电泳方法,属于生物技术领域。是能够在沿海滩涂大面积生长的黄麻根系的蛋白质组分离,该方法可直接应用于能够在沿海滩涂生存的高耐盐植物研究开发利用。

### 背景技术

[0002] 抗逆性是植物在系统进化过程中,为适应不良环境获得的一种对策。在植物的生存环境中一些非生物因子胁迫,对植物的生长发育和生存都会产生严重的影响,为了应对外界环境的不利影响,植物在进化过程中形成了完整的防御机制。为了解析其防御机制就势必需要分离一些与逆境相关的蛋白质。

[0003] 黄麻 (*Orchorus olitorius* L.) 又称络麻、绿麻,是一种能在沿海滩涂地大面积生长的一年生草本韧皮纤维经济作物,在沿海滩涂开发热的今天可作为滩涂改良的先锋作物。由于其能够耐受沿海滩涂高盐胁迫,因此成了耐盐性研究中的一种优秀的指示植物材料。

[0004] 但由于其植物体内含有盐渍化条件下产生的多种次生代谢物(色素、酚类、醌类等),众多干扰使得作为蛋白质组研究的核心技术-双向电泳成为挑战,常规方法不能成功制备纯度高的蛋白,在电泳过程中,合理的参数设定可有效的除盐,聚焦等。以黄麻植物根系为材料,进行根系总蛋白的制备,建立适用于黄麻根系蛋白质组学分离的双向电泳方法,可为盐渍化环境下植物材料耐盐性蛋白质组学研究提供实验基础和参考。

[0005] 本发明的突破点就是建立盐渍化环境下的高耐盐植物黄麻的双向电泳方法体系,利用该方法可对黄麻进行蛋白质组学研究分析。

### 发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明目的在于提供一种黄麻根系的总蛋白分离的双向电泳方法,是针对能够生存在沿海滩涂的植物黄麻的根系总蛋白采用双向电泳方法进行分离,该技术经反复实验证明样品制备全、分离蛋白点多、重复性好、图谱清晰,是一套适用于黄麻根系总蛋白组分析的双向电泳技术。

[0008] 技术方案

[0009] 本发明所述的一种黄麻根系的总蛋白双向电泳方法,按下列步骤进行:

[0010] 1) 采集黄麻根系,超纯水清洗干净,用液氮罐装运回,在实验室  $-70^{\circ}\text{C}$  以下保存备用;

[0011] 2) 将 2g 黄麻根系迅速放入冰浴的研钵中加入液氮研磨,研磨过程中加入 0.2g 聚乙烯吡咯烷酮,直到研磨成细粉,转入预冷  $-20^{\circ}\text{C}$  的 50ml 离心管;

[0012] 3) 加入 3 倍体积  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷的三氯乙酸提取液,充分混合后,放在  $-20^{\circ}\text{C}$  1.5h,三氯乙酸提取液配制:质量体积比 10% 三氯乙酸 TCA,质量体积比 0.07% 二硫苏糖醇 DTT, 1mM

苯甲基磺酰氟 PMSF, 溶剂为丙酮;

[0013] 4) 35000g, 4℃ 离心 15min, 取沉淀, 加入 25ml 预冷的样品洗涤液, 充分混合后, 放在 -20℃ 1h, 期间间隔涡旋; 样品洗涤液配制: 质量体积比 0.07% DTT, 1mM PMSF, 溶剂为丙酮;

[0014] 5) 20000g, 4℃ 离心 15min, 取沉淀, 加入 25ml 预冷的样品洗涤液, 充分混合后, 放在 -20℃ 1h, 期间间隔涡旋;

[0015] 6) 重复步骤 5) 一次;

[0016] 7) 20000g, 4℃ 离心 15min, 去掉上清后, 用滤纸封口, 真空干燥;

[0017] 8) 将粗蛋白溶于裂解液, 室温 1.5h; 裂解液配制: 7M 尿素、2M 硫脲、质量体积比 4% 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸 CHAPS、65mM DTT、1mM PMSF、体积比 0.2% 载体两性电解质;

[0018] 9) 离心, 得到上清液用 3 倍体积预冷的样品洗涤液 -20℃ 沉淀 0.5h 后再 20000g、4℃、15min 离心, 弃上清液;

[0019] 10) 沉淀再次溶解于步骤 8) 中的 500 μl 裂解液, 充分溶解后, 离心, 取上清;

[0020] 11) 蛋白质定量: 采用 Bradford 法测定其蛋白浓度;

[0021] 12) 第一向等电聚焦电泳: 按上样量 350 μg, 上样体积 330 μl, 对已定量好的蛋白样品进行稀释, 上样水化液同步骤 8) 中的裂解液, 将样品加入固相 pH 梯度 IPG 胶条聚焦盘内后, 再将 pH 4-7, 17cm 的 IPG 胶条胶面向下放入盘中, 除去胶面与样品液间的气泡, 用 2.5ml 矿物油 / 条, 覆盖胶条, 进行等电聚焦;

[0022] 13) 胶条平衡: 将聚焦好后的固相 pH 梯度 IPG 胶条进行平衡 I、II, 每次平衡时间为 20min, 平衡缓冲液配制如下:

[0023] 胶条平衡缓冲液母液: 6M 尿素, 质量体积比 2% 十二烷基磺酸钠 SDS, 0.375M pH8.8 的 Tris-HCl, 体积比 20% 甘油, 溶剂为水。

[0024] 胶条平衡缓冲液 I: 每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.2g DTT;

[0025] 胶条平衡缓冲液 II: 每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.25g 碘乙酰胺;

[0026] 14) 第二向 SDS-PAGE 电泳: 将平衡好的胶条置于胶浓度为质量体积比 12% 的 SDS-PAGE 胶上, 用质量体积比 0.5%、含有质量体积比 0.002% 溴酚蓝的低熔点琼脂糖封胶液封住顶部, 按如下参数进行电泳: 16℃ 恒温下, 恒功率, 先用 1 瓦 / 条, 1.5h; 再用 15 瓦 / 条, 4 ~ 6h;

[0027] 15) 染色方法: 采用硝酸银法进行染色。

[0028] 整个过程的溶液配制均需用超纯水。

[0029] 整个过程的裂解液与上样水化液均需现用现配。

[0030] 整个过程所需的 DTT 均需现用现加。

[0031] 步骤 12) 中的等电聚焦参数设置如下: 50V 水化, 13h; 250V 慢速, 1h; 500V 慢速, 1h; 2000V 线性, 1h; 8000V 线性, 4h; 8000V 快速, 60000V. h; 500V 快速, 保持。

[0032] 步骤 14) 中胶浓度质量体积比 12% 的 SDS PAGE 凝胶所用的溶液体积比含量为, 水: 质量体积比 30% 丙烯酰胺: 0.375M pH8.8 的 Tris-HCl: 质量体积比 10% 十二烷基磺酸钠: 质量体积比 10% 过硫酸铵: 体积比 10% 四甲基乙二胺 = 33: 40: 25: 1: 1: 0.15。

[0033] 步骤 14) 电极缓冲液配制如下:按质量体积比 0.1% 十二烷基硫酸钠,0.025mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 0.192mol/L 甘氨酸进行配制,溶剂为水,并调制 pH 值为 8.3。

[0034] 步骤 15) 中的染色方法程序如下:

[0035] 步骤 1:取 50ml 冰乙酸、200ml 无水乙醇、加水至 500ml 固定,1.5h;

[0036] 步骤 2:取 1g 硫代硫酸钠,56.36g 三水合乙酸钠,150ml 无水乙醇,加水至 500ml 敏化,30min;

[0037] 步骤 3:500ml 水漂洗三遍,5min/次;

[0038] 步骤 4:1.25g 硝酸银溶于 500ml 水,避光银染,20min;

[0039] 步骤 5:500ml 水漂洗二遍,1min/次;

[0040] 步骤 6:12.5g 碳酸钠,0.2ml 甲醛,加水至 500ml,显色共 2 次;第一次待溶液变黄后倒掉,第二次显色到理想的背景和清晰度;

[0041] 步骤 7:7.3g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶于 500ml 水终止,10min。

[0042] 有益效果

[0043] 本发明针对黄麻体内含有盐渍化条件下产生的多种次生代谢物(色素、酚类、醌类等),众多干扰使得作为蛋白质组研究的核心技术-双向电泳成为挑战,首次建立了一套适合黄麻根系蛋白质组学研究的单向电泳方法。

[0044] 本套方法首次将黄麻根系总蛋白样品进行制备,采用双向电泳方法对其进行分离,分离得到蛋白点多,经 PDQuest 软件检测,蛋白点多于 1100 个,图谱清晰,无横纵纹现象,蛋白点圆,重复性好。可在黄麻根系蛋白组学中直接运用。

#### 附图说明

[0045] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0046] 图 1 黄麻室内水培根系总蛋白双向电泳图谱。

[0047] 1 为乙醇脱氢酶 2 为黄酮醇合成酶;3 为 RBAP2 蛋白。

[0048] 图 2 沿海滩涂生长的黄麻根系总蛋白双向电泳图谱。

[0049] 1 为乙醇脱氢酶;2 为黄酮醇合成酶;3 为 RBAP2 蛋白。

#### 具体实施方式

[0050] 实施例 1

[0051] 采用美国 Beckmen 高速低温离心机、双向电泳 PROTEAN IIXi/XL Cell(美国 BIO-RAD)

[0052] 1) 采集室内水培黄麻根系,超纯水清洗干净,用过滤纸吸干根系表面水份,立即放入液氮罐迅速冷冻,然后在实验室  $-70^{\circ}\text{C}$  以下冰箱保存备用;

[0053] 2) 将 2g 黄麻根系样品迅速放入冰浴的研钵中加入液氮研磨,研磨过程中加入 0.2g 聚乙烯吡咯烷酮,直到研磨成细粉,转入预冷  $-20^{\circ}\text{C}$  的 50ml 离心管;

[0054] 3) 加入 3 倍体积  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷的三氯乙酸提取液,充分混合后,放在  $-20^{\circ}\text{C}$  1.5h,三氯乙酸提取液配制:质量体积比 10% 三氯乙酸 TCA,质量体积比 0.07% 二硫苏糖醇 DTT,1mM 苯甲基磺酰氟 PMSF,溶剂为丙酮;

[0055] 4) 35000g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15min,取沉淀,加入 25ml 预冷的样品洗涤液,充分混合后,放

在  $-20^{\circ}\text{C}$  1h, 期间间隔涡旋; 样品洗涤液配制: 质量体积比 0.07% DTT, 1mM PMSF, 溶剂为丙酮;

[0056] 5) 20000g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15min, 取沉淀, 加入 25ml 预冷的样品洗涤液, 充分混合后, 放在  $-20^{\circ}\text{C}$  1h, 期间间隔涡旋;

[0057] 6) 重复步骤 5) 一次;

[0058] 7) 20000g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15min, 去掉上清后, 用滤纸封口, 真空干燥;

[0059] 8) 将粗蛋白溶于裂解液, 室温 1.5h; 裂解液配制: 7M 尿素、2M 硫脲、质量体积比 4% 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸 CHAPS、65mM DTT、1mM PMSF、体积比 0.2% 载体两性电解质;

[0060] 9) 离心, 得到上清液用 3 倍体积预冷的样品洗涤液  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 0.5h 后再 20000g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15min 离心, 弃上清液;

[0061] 10) 沉淀再次溶解于步骤 8) 中的  $500\mu\text{l}$  裂解液, 充分溶解后, 离心, 取上清;

[0062] 11) 蛋白质定量: 采用 Bradford 法测定其蛋白浓度: 将蛋白质定量标准梯度稀释后用考马斯亮蓝 G-250 染色, 在波长 595nm 下测定吸光值, 做标准曲线, 并计算出蛋白质含量;

[0063] 12) 第一向等电聚焦电泳: 按上样量  $350\mu\text{g}$ , 上样体积  $330\mu\text{l}$ , 对已定量好的蛋白样品进行稀释, 上样水化液同步骤 8) 中的裂解液, 将样品加入固相 pH 梯度 IPG 胶条聚焦盘内后, 再将 pH 4-7, 17cm 的 IPG 胶条胶面向下放入盘中, 除去胶面与样品液间的气泡, 用 2.5ml 矿物油 / 条, 覆盖胶条, 进行等电聚焦, 等电聚焦程序设置如下: 50V 水化, 13h; 250V 慢速, 1h; 500V 慢速, 1h; 2000V 线性, 1h; 8000V 线性, 4h; 8000V 快速, 60000V.h; 500V 快速, 保持。

[0064] 13) 胶条平衡: 将聚焦好后的固相 pH 梯度 IPG 胶条进行平衡 I、II, 每次平衡时间为 20min, 平衡缓冲液配制如下:

[0065] 胶条平衡缓冲液母液: 6M 尿素, 质量体积比 2% 十二烷基磺酸钠 SDS, 0.375M pH8.8 的 Tris-HCl, 体积比 20% 甘油, 溶剂为水。

[0066] 胶条平衡缓冲液 I: 每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.2g DTT;

[0067] 胶条平衡缓冲液 II: 每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.25g 碘乙酰胺;

[0068] 14) 第二向 SDS-PAGE 电泳: 将平衡好的胶条置于胶浓度为质量体积比 12% 的 SDS-PAGE 胶上, 用质量体积比 0.5%、含有质量体积比 0.002% 溴酚蓝的低熔点琼脂糖封胶液封住顶部, 按如下参数进行电泳:  $16^{\circ}\text{C}$  恒温下, 恒功率, 先用 1 瓦 / 条, 1.5h; 再用 15 瓦 / 条, 4 ~ 6h;

[0069] 胶浓度质量体积比 12% 的 SDS-PAGE 凝胶所用的溶液体积比含量为, 水: 质量体积比 30% 丙烯酰胺: 0.375M pH8.8 的 Tris-HCl: 质量体积比 10% 十二烷基硫酸钠: 质量体积比 10% 过硫酸铵: 体积比 10% 四甲基乙二胺 = 33 : 40 : 25 : 1 : 1 : 0.15。

[0070] 电极缓冲液配制如下: 按质量体积比 0.1% 十二烷基硫酸钠, 0.025mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 0.192mol/L 甘氨酸进行配制, 溶剂为水, 并调制 pH 值为 8.3。

[0071] 15) 中的染色方法程序如下:

[0072] 步骤 1: 取 50ml 冰乙酸、200ml 无水乙醇、加水至 500ml 固定, 1.5h;

[0073] 步骤 2: 取 1g 硫代硫酸钠, 56.36g 三水合乙酸钠, 150ml 无水乙醇, 加水至 500ml 敏

化,30min;

[0074] 步骤3:500ml 水漂洗三遍,5min/次;

[0075] 步骤4:1.25g 硝酸银溶于500ml 水,避光银染,20min;

[0076] 步骤5:500ml 水漂洗二遍,1min/次;

[0077] 步骤6:12.5g 碳酸钠,0.2ml 甲醛,加水至500ml,显色共2次;第一次待溶液变黄后倒掉,第二次显色到理想的背景和清晰度;

[0078] 步骤7:7.3g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶于500ml 水终止,10min。

[0079] 通过上述双向电泳整个流程对室内培养的黄麻根系总蛋白进行分离,结果如图1所示,结果表明该黄麻根系总蛋白样品分离效果较好,图谱清晰,蛋白点圆且多,经PDQuest软件检测,蛋白点多于1100个。图1中横向为等电聚焦,纵向为SDS-PAGE,纵向数字为蛋白质分子量标准,单位是kD。举例蛋白点1、2、3经质谱鉴定后分别为乙醇脱氢酶;黄酮醇合成酶;RBAP2蛋白。

[0080] 实施例2

[0081] 采用美国 Beckmen 高速低温离心机、双向电泳 PROTEAN IIXi/XL Cell(美国 BIO-RAD)

[0082] 1) 采集江苏省大丰市沿海滩涂所种植的黄麻根系,用超纯水清洗干净,用过滤纸吸干根系表面水份,放入液氮罐迅速冷冻,运回,然后在实验室  $-70^\circ\text{C}$  以下冰箱保存备用;

[0083] 2) 将2g 黄麻根系样品迅速放入冰浴的研钵中加入液氮研磨,研磨过程中加入0.2g 聚乙烯吡咯烷酮,直到研磨成细粉,转入预冷  $-20^\circ\text{C}$  的50ml 离心管;

[0084] 3) 加入3倍体积  $-20^\circ\text{C}$  预冷的三氯乙酸提取液,充分混合后,放在  $-20^\circ\text{C}$  1.5h,三氯乙酸提取液配制:质量体积比10%三氯乙酸TCA,质量体积比0.07%二硫苏糖醇DTT,1mM 苯甲基磺酰氟PMSF,溶剂为丙酮;

[0085] 4) 35000g,  $4^\circ\text{C}$  离心15min,取沉淀,加入25ml 预冷的样品洗涤液,充分混合后,放在  $-20^\circ\text{C}$  1h,期间间隔涡旋;样品洗涤液配制:质量体积比0.07% DTT,1mM PMSF,溶剂为丙酮;

[0086] 5) 20000g,  $4^\circ\text{C}$  离心15min,取沉淀,加入25ml 预冷的样品洗涤液,充分混合后,放在  $-20^\circ\text{C}$  1h,期间间隔涡旋;

[0087] 6) 重复步骤5) 一次;

[0088] 7) 20000g,  $4^\circ\text{C}$  离心15min,去掉上清后,用滤纸封口,真空干燥;

[0089] 8) 将粗蛋白溶于裂解液,室温1.5h;裂解液配制:7M 尿素、2M 硫脲、质量体积比4% 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸CHAPS、65mM DTT、1mM PMSF、体积比0.2%载体两性电解质;

[0090] 9) 离心,得到上清液用3倍体积预冷的样品洗涤液  $-20^\circ\text{C}$  沉淀0.5h后再20000g、 $4^\circ\text{C}$ 、15min 离心,弃上清液;

[0091] 10) 沉淀再次溶解于步骤8) 中的  $500\ \mu\text{l}$  裂解液,充分溶解后,离心,取上清;

[0092] 11) 蛋白质定量:采用Bradford法测定其蛋白浓度:将蛋白质定量标准梯度稀释后用考马斯亮蓝G-250染色,在波长595nm下测定吸光值,做标准曲线,并计算出蛋白质含量;

[0093] 12) 第一向等电聚焦电泳:按上样量  $350\ \mu\text{g}$ ,上样体积  $330\ \mu\text{l}$ ,对已定量好的蛋白



样品进行稀释,上样水化液同步步骤 8) 中的裂解液,将样品加入固相 pH 梯度 IPG 胶条聚焦盘内后,再将 pH 4-7,17cm 的 IPG 胶条胶面向下放入盘中,除去胶面与样品液间的气泡,用 2.5ml 矿物油 / 条,覆盖胶条,进行等电聚焦,等电聚焦程序设置如下:50V 水化,13h;250V 慢速,1h;500V 慢速,1h;2000V 线性,1h;8000V 线性,4h;8000V 快速,60000V.h;500V 快速,保持。

[0094] 13) 胶条平衡:将聚焦好后的固相 pH 梯度 IPG 胶条进行平衡 I、II,每次平衡时间为 20min,平衡缓冲液配制如下:

[0095] 胶条平衡缓冲液母液:6M 尿素,质量体积比 2% 十二烷基磺酸钠 SDS,0.375M pH8.8 的 Tris-HCl,体积比 20% 甘油,溶剂为水。

[0096] 胶条平衡缓冲液 I:每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.2g DTT;

[0097] 胶条平衡缓冲液 II:每 10ml 胶条平衡缓冲液母液加入 0.25g 碘乙酰胺;

[0098] 14) 第二向 SDS-PAGE 电泳:将平衡好的胶条置于胶浓度为质量体积比 12% 的 SDS-PAGE 胶上,用质量体积比 0.5%、含有质量体积比 0.002% 溴酚蓝的低熔点琼脂糖封胶液封住顶部,按如下参数进行电泳:16℃ 恒温下,恒功率,先用 1 瓦 / 条,1.5h;再用 15 瓦 / 条,4 ~ 6h;

[0099] 胶浓度质量体积比 12% 的 SDS-PAGE 凝胶所用的溶液体积比含量为,水:质量体积比 30% 丙烯酰胺:0.375M pH8.8 的 Tris-HCl:质量体积比 10% 十二烷基硫酸钠:质量体积比 10% 过硫酸铵:体积比 10% 四甲基乙二胺 = 33 : 40 : 25 : 1 : 1 : 0.15。

[0100] 电极缓冲液配制如下:按质量体积比 0.1% 十二烷基硫酸钠,0.025mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 0.192mol/L 甘氨酸进行配制,溶剂为水,并调制 pH 值为 8.3。

[0101] 15) 中的染色方法程序如下:

[0102] 步骤 1:取 50ml 冰乙酸、200ml 无水乙醇、加水至 500ml 固定,1.5h;

[0103] 步骤 2:取 1g 硫代硫酸钠,56.36g 三水合乙酸钠,150ml 无水乙醇,加水至 500ml 敏化,30min;

[0104] 步骤 3:500ml 水漂洗三遍,5min/次;

[0105] 步骤 4:1.25g 硝酸银溶于 500ml 水,避光银染,20min;

[0106] 步骤 5:500ml 水漂洗二遍,1min/次;

[0107] 步骤 6:12.5g 碳酸钠,0.2ml 甲醛,加水至 500ml,显色共 2 次;第一次待溶液变黄后倒掉,第二次显色到理想的背景和清晰度;

[0108] 步骤 7:7.3g Na<sub>2</sub>EDTA 溶于 500ml 水终止,10min。

[0109] 通过上述双向电泳整个流程对江苏省大丰市沿海滩涂地采集的黄麻根系总蛋白进行分离,结果如图 2 所示,结果表明该黄麻根系总蛋白样品分离效果较好,图谱清晰,蛋白点圆且多,经 PDQuest 软件检测,蛋白点多于 1100 个。图 2 中横向为等电聚焦,纵向为 SDS-PAGE,纵向数字为蛋白质分子量标准,单位是 kD。举例蛋白点 1、2、3 经质谱鉴定后分别为乙醇脱氢酶;黄酮醇合成酶;RBAP2 蛋白。

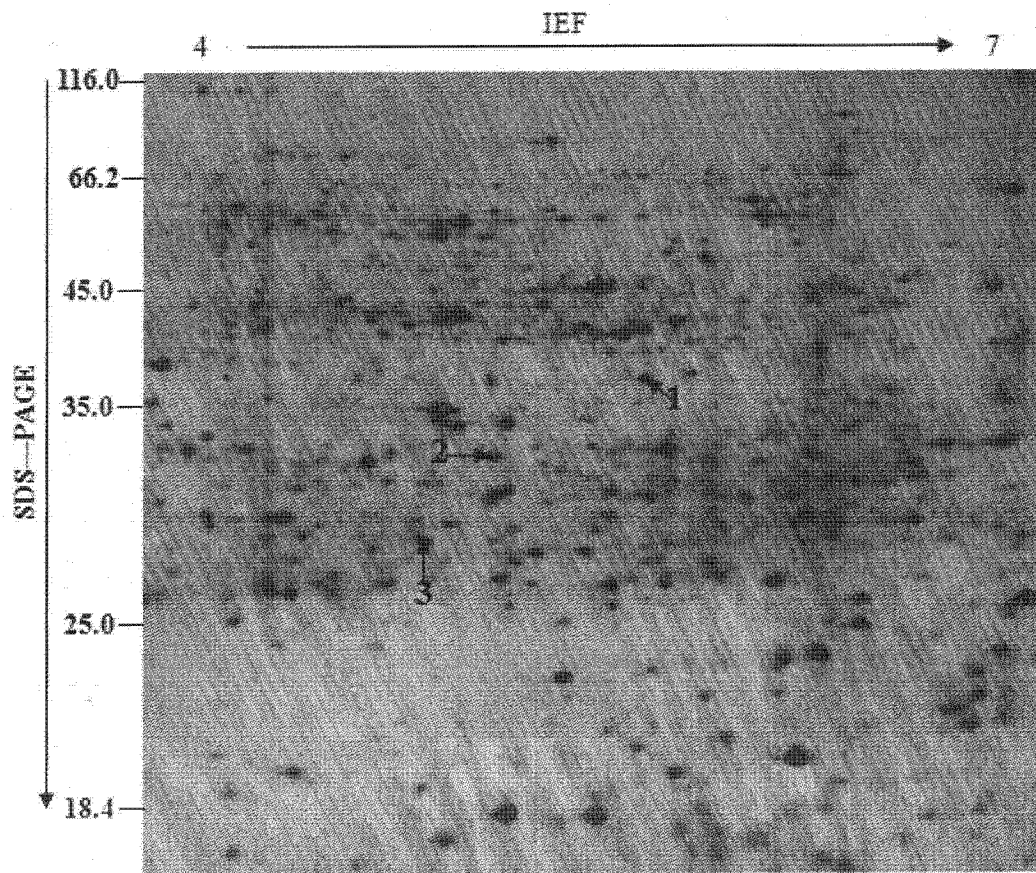


图 1

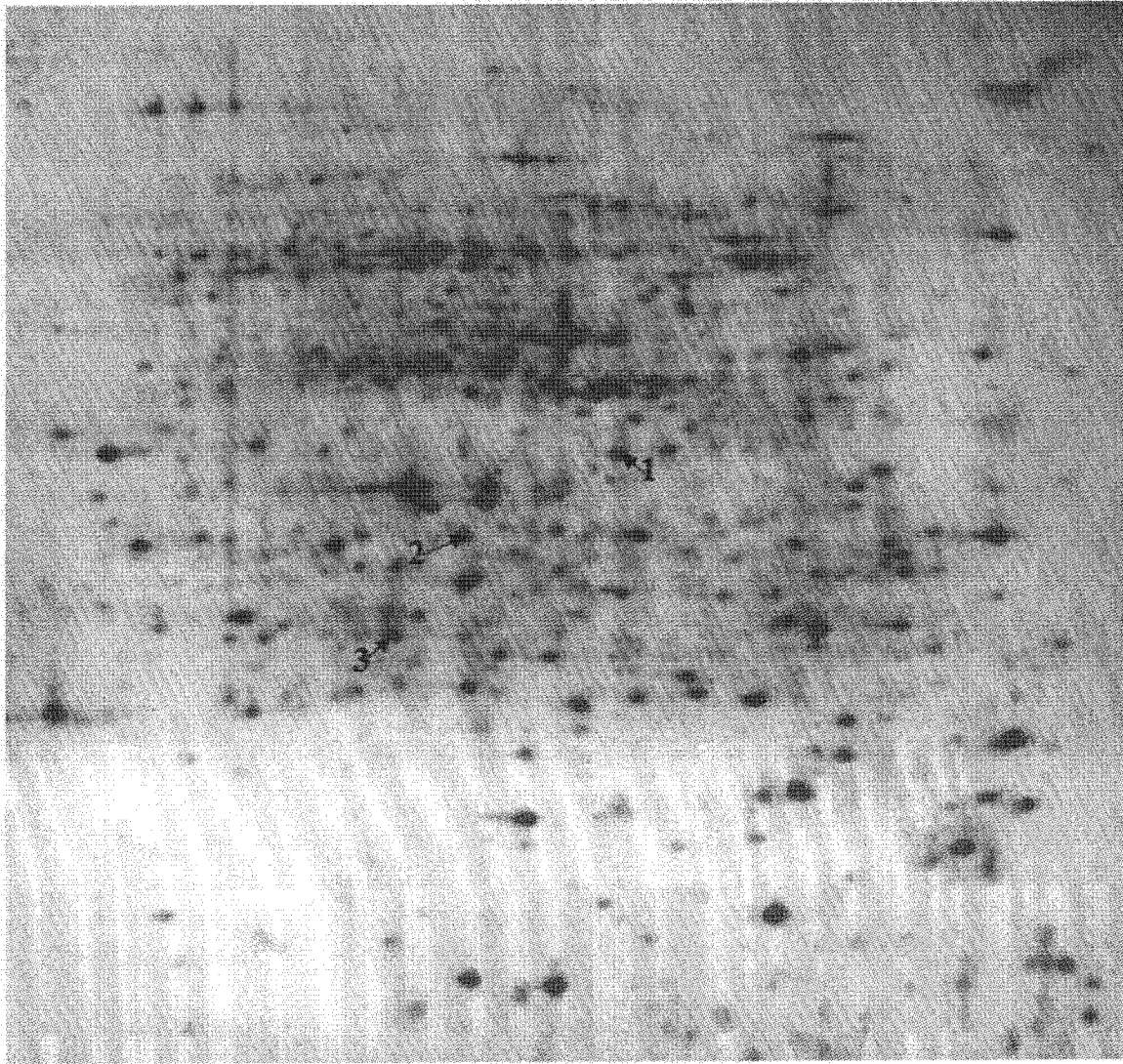


图 2