

青杨双向电泳实验体系的建立

陈国良^{1,2}, 蒋晶¹, 乔桂荣¹, 金梁², 孙月华², 杨晔¹, 周婧¹, 卓仁英¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400; 2. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃兰州 730020)

摘要: 用改良丙酮沉淀法、三氯乙酸(TCA)-丙酮沉淀法和酚抽法抽提青杨 *Populus cathayana* 的蛋白质, 分别获得了 437, 603 和 721 个蛋白斑点, 以酚抽法提取的分离纯化方法效果最佳, 不仅能很好地提取蛋白, 而且能有效去除样品中的盐分。通过比较, 分析了双向电泳不同条件对电泳结果的影响, 确立了 300 μg ·IPG 胶条⁻¹ 的最佳上样量、90 000 V·h 的聚焦时间以及 20 min 平衡时间的双向电泳条件。研究还比较了氯化钠胁迫前后双向电泳图谱差异, 发现有 46 个蛋白点存在差异, 其中 10 个下调, 36 个上调(4 个新诱导表达)。图 9 参 24

关键词: 植物学; 氯化钠胁迫; 蛋白质组学; 双向电泳; 青杨

中图分类号: S718.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)05-0644-08

Populus leafy proteomics with NaCl stress using two-dimensional electrophoresis analysis

CHEN Guo-liang^{1,2}, JIANG Jing¹, QIAO Gui-rong¹, JIN Liang², SUN Yue-hua²,
YANG Ye¹, ZHOU Jing¹, ZHUO Ren-ying¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, Gansu, China)

Abstract: Salt stress is one of the major abiotic stressed over the world. Most of the researchs were focused on improve the ability of plant species living in salt soil. Two-dimesional gel electrophoresis (2-DE) is one of the most useful methods in proteins research. To determine total protein extraction efficiency from *Populus cathayana* with two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis, three protein extraction methods (phenol extraction, improved acetone precipitation method, and TCA-acetone precipitation method) were compared. Electrophoresis conditions and leafy proteomics of *P. cathayana* with salt stress were also analyzed. Results showed that the three protein extraction methods generated 437, 603, and 721 protein spots with the phenol extraction method more effectively removing salt from the protein sample, generating more protein spots, and giving clearer background for the 2-DE map. The results showed that condition of 300 μg per IPG gel, 20 min equilibrium time, 90 000 V·h IEF time was the suitable treatment. Also, the leafy proteomics analysis revealed that 10 protein spots was down-regulators, 32 protein spots was up-regulators, and 4 new protein spots was induced by salt stress. These proteins may be important response to salt stress. [Ch, 9 fig. 24 ref.]

Key words: botany; NaCl stress; proteomics; two-dimensional electrophoresis (2-DE); *Populus cathayana*

杨树 *Populus* 是世界上分布最广, 适应性最强的树种, 主要分布于北半球温带和寒带地区, 在中国亚热带、暖温带和中温带均有分布^[1]。杨树是第 3 个完成全序列测定的植物^[2]。青杨 *Populus*

收稿日期: 2008-09-23; 修回日期: 2009-01-10

基金项目: 非盈利性科研院所基金资助项目(RISF060702)

作者简介: 陈国良, 从事林木抗逆基因工程研究。E-mail: glc_2008@163.com。通信作者: 卓仁英, 副研究员, 博士, 从事林木抗逆功能基因组学等研究。E-mail: zhuory@gmail.com

cathayana 为中国特有的树种, 广泛分布于东北、华北、西北及西南各省区, 耐盐性很差, 为典型的甜土木本植物, 并且与已经测序完成的毛果杨 *Populus trichocarpa* 亲缘关系很近, 可直接利用毛果杨的测序结果^[3]。因此, 研究氯化钠胁迫下其蛋白质合成成分变化, 对于深入了解木本植物盐碱伤害机理, 开展木本植物耐盐分子育种具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 试剂

尿素(电泳级)、Ampholine™ pH 3.5 ~ 10 和 脲乙酰胺购自 GE healthcare(Piscataway, NJ, USA); 丙烯酰胺(Acr), 甲叉双丙烯酰胺(Bis), 十二烷基硫酸钠(SDS), 二硫苏糖醇(DTT)购自上海生工; 苯甲基磺酰氟(PMSF), 3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS), 考马斯亮蓝 G-250(CBB G-250)和甘氨酸购自 Sigma(USA); β -巯基乙醇, 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP), 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 乙二胺四乙酸(EDTA), 饱和酚, 曲拉通(Triton X-100), 过硫酸铵和四甲基乙二胺(TEMED)等购自上海生工; 三氯乙酸、丙酮、乙酸铵、甲醇、乙醇、磷酸、甘油、硫酸、硫酸铵均为分析纯, 购自上海生工。

1.2 植物材料

选择大小、培养时间一致的青杨组织培养幼苗移栽到 Horgland 培养液^[4]中, 成活后在 25 °C 条件下加入 50 mmol·L⁻¹ 氯化钠处理 12 h 以上。对照不加氯化钠处理。

1.3 蛋白制备方法的选择

样品处理是双向电泳实验最基础也是最关键的环节之一。木本植物中大量的次生代谢物质如单宁及酚类等会干扰蛋白的提取和等电聚焦, 使 2-DE 结果产生水平条纹^[5-7]。针对不同的材料和不同的实验的目的, 应该采用不同的样品处理方法。本研究文对目前常用的 3 种植物蛋白质提取方法进行了比较。

方法 1: 改良丙酮沉淀法提取蛋白, 参照 Damerval 等的方法^[8]。1 g 青杨叶片按其鲜质量的 10% 加入水不溶性 PVPP 后用液氮研碎, 转移至 50 mL 离心管中; 5 min 后加入终浓度为 10 mmol·L⁻¹ 的 DTT, 充分混匀, 室温下放置 20 ~ 30 min; 4 °C 15 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清转入另一离心管中; 加入 5 倍于上清体积的丙酮, -20 °C 条件下沉淀至少 2 h (最好过夜); 4 °C 15 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清液, 将沉淀转入 1.5 mL Eppendorf 管中; 沉淀用 800 g·kg⁻¹ 和纯冷丙酮各洗 1 次后放入真空干燥机中干燥 (或超净台上吹干); 沉淀按 10 mg 干粉末加 200 μ L 蛋白抽提液的比例, 加入含有 9 mol·L⁻¹ 和 20 g·kg⁻¹ CHAPS, 10 g·kg⁻¹ DTT, 10 g·kg⁻¹ Ampholine (pH 3.5 ~ 10) 的蛋白裂解液; 4 °C 放置 4 h, 15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 上清液即为待分析的蛋白溶液。

方法 2: 三氯乙酸(TCA)-丙酮沉淀法提取蛋白, 参照 Saravanan & Rose 的方法^[9]。1 g 青杨叶片置于预冷的研钵中研磨成粉末 (研磨时按其鲜质量的 10% 加入水不溶性 PVPP), 转移至 50 mL 离心管中, 加入 5 倍体积预冷的 TCA-丙酮溶液 (含 100 g·kg⁻¹ TCA 和 0.7 g·kg⁻¹ β -巯基乙醇的丙酮液), -20 °C 沉淀至少 2 h (最好过夜); 4 °C 15 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清, 将沉淀转入 1.5 mL Eppendorf 管中; 沉淀用 800 g·kg⁻¹ 和纯冷丙酮各洗 1 次; 按 10 mg 干粉末沉淀加 200 μ L 蛋白抽提液的比例加入含有 9 mol·L⁻¹ 尿素、20 g·kg⁻¹ CHAPS、10 g·kg⁻¹ DTT 和 10 g·kg⁻¹ Ampholine (pH 3.5 ~ 10) 的蛋白裂解液; 4 °C 放置 4 h, 15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 获得的上清液即为待分析的蛋白溶液。

方法 3: 酚抽法(Phe), 参照 Carpentier 等的方法^[10]。1 g 青杨叶片放入预冷的研钵中研磨成粉末; 加入 10 mL 蛋白质提取缓冲液 (0.7 mol·L⁻¹ 蔗糖、50 mmol·L⁻¹ 硼酸, 50 mmol·L⁻¹ 抗坏血酸、40 mmol·L⁻¹ DTT、50 g·kg⁻¹ PVPP, pH 9), 待其融化后, 继续研磨数分钟, 转至 50 mL 离心管中; 4 °C 下保持 30 min, 期间震荡以重新混匀数次; 4 °C 15 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 加入与上清液等体积的 Tris-饱和酚, 充分震荡混合 10 min, 4 °C 下放置 30 min; 4 °C 8 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 回收酚相至一新离心管中; 在剩余的水相中再加入 1/2 体积的 Tris-饱和酚抽提, 混合 2 次所得酚相, 加入 5 倍于酚相体积预冷的 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵甲醇溶液, -20 °C 沉淀蛋白 2 h 或过夜; 4 °C 15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清液, 沉淀用 -20 °C 预冷乙酸铵甲醇洗涤 1 次; 沉淀再用预冷丙酮 (含 20 g·kg⁻¹ β -

巯基乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷) 洗涤 2 次; 按 10 mg 干粉末沉淀加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 蛋白抽提液的比例, 加入含有 $9\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ CHAPS、 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DTT、 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Ampholine(pH3.5 ~ 10) 的蛋白裂解液; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h , $15\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min , 获得的上清液即为待分析的蛋白溶液。

用十二烷基硫酸钠-胶体电泳(SDS-PAGE)和双向电泳(2-DE)比较 3 种提取方法得到的蛋白质浓度、条带数量差异。本实验中等电聚焦按照 $150\text{ V } 2\text{ h}$, $250\text{ V } 1\text{ h}$, $500\text{ V } 2\text{ h}$, $2\text{ }500\text{ V } 2\text{ h}$, $8\text{ }000\text{ V } 4\text{ h}$, $500\text{ V } 6\text{ h}$ 条件, 24 cm , pH 3 ~ 10 的胶条 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{IPG}^{-1}$ 上样量进行, 电泳按照 $120\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的丙烯酰胺, $5\text{ mA } 1\text{ h}$, 15 mA 电泳的条件进行。其他反应条件根据双向电泳条件实验结果进行改进。

1.4 双向电泳条件的建立

第一向等电聚焦使用 24 cm pH 3 ~ 10 IPG 胶条(GE healthcare), 在 Ettan IPGphor 电泳仪(Ettan IPGphor 3, GE healthcare) 上完成。采用胶内水化方式上样。水化和聚焦均在标准型胶条槽内进行。第二向 SDS-PAGE 采用 $125\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 分离胶及银染法^[11]。

1.4.1 蛋白上样量的比较 蛋白样品上样量对双向电泳过程和结果分析有重要影响^[12-16]。本研究使用 24 cm pH 3 ~ 10 的胶条, 设计 100 , 300 , $600\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{IPG}$ (第一向固相 pH 梯度) 胶条 $^{-1}$ 3 种不同蛋白上样量来进行比较, 以确定最佳的上样量。

1.4.2 等电聚焦参数对等电聚焦电泳的影响 根据制造商提供的等电聚焦电泳参数进行青杨叶片蛋白质的等电聚焦电泳, 但实验中各步骤在设定时间内未能达到所预先设置的电压。高电压是等电聚焦过程中蛋白质能否充分泳动到等电点的重要前提, 直接关系到等电聚焦的效果。因此, 实验设置了不同等电聚焦参数, 使电泳分别达到 $40\text{ }000$, $90\text{ }000$, $150\text{ }000\text{ V}\cdot\text{h}$ 。

1.4.3 平衡时间的优化 平衡目的是使蛋白质分子与 SDS 充分相互作用, 以确保第二向蛋白质分子的迁移。为了把握最佳的平衡时间及胶条中蛋白质随时间变化而丢失的情况, 本研究采用两步法, 分别在含有 DTT 和碘乙酰胺的平衡母液中平衡 10 , 20 和 50 min 来确定最佳平衡时间。

1.5 NaCl 胁迫后青杨蛋白质成分变化分析

选取生长健壮、大小一致的青杨无菌苗进行水培, 一部分培养在 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐水中, 一部分培养在蒸馏水中, 72 h 后采用酚抽法提取叶片蛋白。按照上述优化体系进行分析, 重复 3 次。

1.6 图像获取与分析

图像扫描采用 ImageScanner Labscan 扫描仪(GE healthcare), 软件分析采用 ImageMaster™ 2D Platinum Software(Version 5.0, GE healthcare)。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对蛋白质浓度和成分的影响

通过 SDS-PAGE 实验, 我们发现, 用方法 3(酚抽法)得到的蛋白条数要比其他 2 种方法多, 前 2 种方法提取的蛋白质条带差别不大。

双向电泳结果如图 1。方法 1 得到的蛋白质斑点比较少, 仅 437 个点, 横纹和纵纹多, 背景色

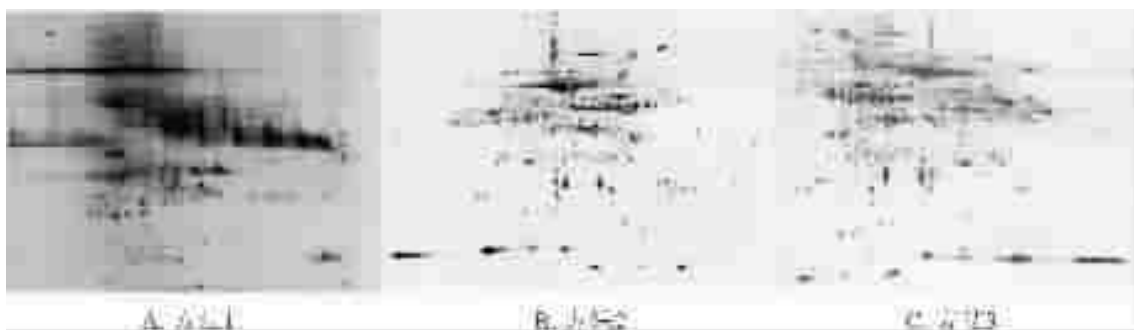


图 1 同一时期的材料 3 种不同蛋白提取方法的 2-DE

Figure 1 Comparison of protein extraction methods by 2-DE

重, 说明样品中蛋白质含干扰物质比较多(图 1A)。方法 2 得到的蛋白质斑点分布比较清晰, 共检测到 603 个点(图 1B)。方法 3 在双向电泳二维图谱上蛋白质得到了有效的分离, 经 ImageMaster2D 软件分析蛋白质点有 721 个, 且比较均匀地分布在凝胶上, 样品中杂质大大减少, 大多数蛋白质斑点呈圆形或椭圆形, 清晰可见, 分离出的各蛋白质点基本上没有拖尾、纹理和横向扩散(图 1C)。

2.2 双向电泳条件对双向电泳结果的影响

研究发现上样量对双向电泳结果有显著影响。在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{IPG}$ 胶条⁻¹ 上样量情况下, 2-DE 图谱有明显的纹理, 蛋白点非常少, 低丰度蛋白点模糊不清甚至无法显示(图 2A)。图 3B 中上样量达 $300 \mu\text{g}\cdot\text{IPG}$ 胶条⁻¹, 横向与纵向拖尾少, 蛋白质点呈圆形, 分离均匀, 检出的蛋白质点增加到 660 个以上, 低丰度蛋白数量明显增加。上样量达到 $600 \mu\text{g}\cdot\text{IPG}$ 胶条的蛋白分离效果差, 产生明显的横向条纹, 蛋白点多带有横向与纵向拖尾及不规则的点, 高丰度蛋白的斑点过大影响甚至遮盖其他蛋白点的显示(图 2C), 这是由于上样量过大, 使样品溶液中的杂质及离子含量增大, 聚焦效果较差, 影响蛋白点的有效分离。因此, 本实验采用 $300 \mu\text{g}\cdot\text{IPG}$ 胶条⁻¹ 的上样量进行后续的实验。

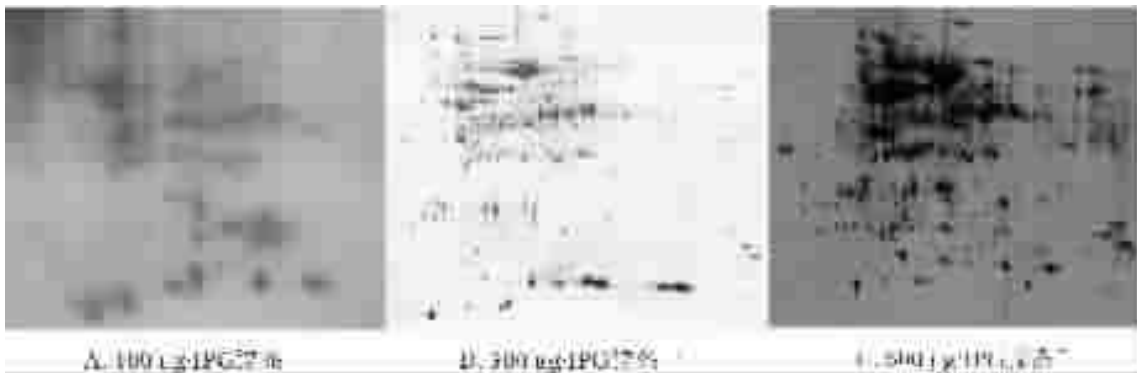


图 2 不同上样量 2-DE 图谱

Figure 2 2-DE gel of different loading quantity

等电聚焦时各蛋白质到达各自的等电点所需要的时间与电泳的伏·小时($\text{V}\cdot\text{h}$)数有关(图 3)。因此, 对于特定的胶条都有一个最小的聚焦伏·小时数, 只有达到这一数值时才能保证各蛋白质到达各自的等电点。植物绿色组织中含有高丰度的 Rubisco 大亚基, 达到聚焦往往需要更多的伏·小时数。

聚焦 $40\,000 \text{ V}\cdot\text{h}$ 的电泳图谱存在严重的横纹, 只能分辨少数蛋白点, 聚焦未完全, 大部分蛋白质还没有运动到自身的等电点, 结果在图谱上表现为一些水平的线状, 而不是成斑点状(图 3A)。聚焦 $90\,000 \text{ V}\cdot\text{h}$ 的电泳图谱基本没有纹理, 蛋白点清晰可辨, 且比较均匀的分布于整个图谱上, 为聚焦完全状态, 说明蛋白质已电泳至等电点位置(图 3B)。聚焦 $150\,000 \text{ V}\cdot\text{h}$ 的电泳图谱也存在一些纹理, 且斑点整体向碱性端移动了一定的距离, 这应该是由聚焦时间过长引起的(图 3C)。

平衡时间对电泳结果也有明显的影响。平衡 10 min 时蛋白质斑点的分离效果较差, 蛋白点多有拖尾现象, 形成“雨点”状, 这可能是平衡时间过短, SDS 与蛋白质结合不够(图 4A)。平衡 20 min

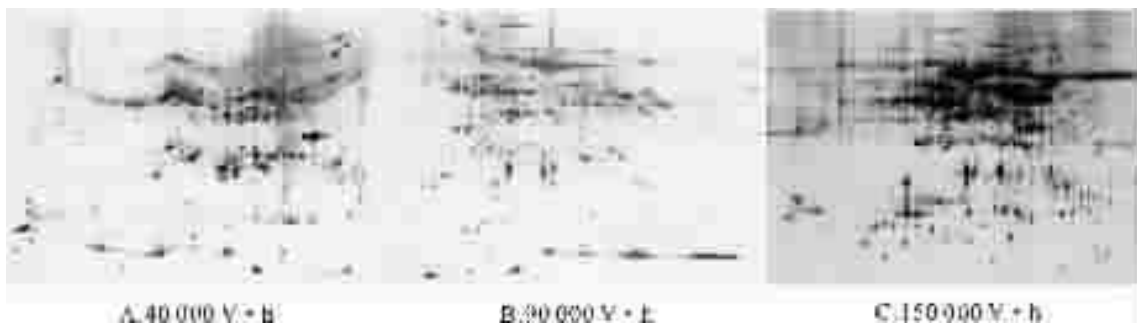


图 3 不同聚焦时间 2-DE 图谱

Figure 3 2-DE gel of different IEF time

时电泳图谱基本没有纹理、点拖尾,蛋白点清晰可辨,比较均匀地分布于整个图谱上,说明平衡时间合适(图 4B)。平衡 50 min 时图谱存在严重的纹理,蛋白点明显减少,且一些含量高的蛋白质相对变淡,说明平衡时间过长,在平衡时使一些蛋白质扩散而损失^[12](图 4C)。

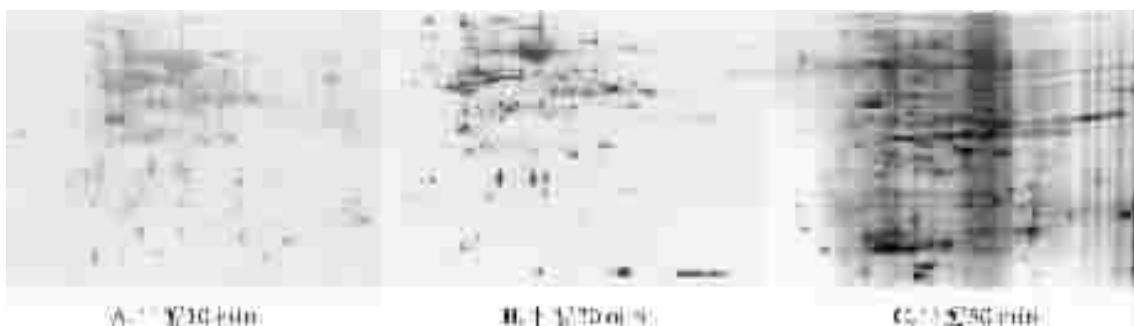


图 4 不同平衡时间 2-DE 图谱

Figure 4 2-DE gel of different equilidring time

2.3 盐碱胁迫对青杨蛋白质成分的影响

为了减少实验结果分析时引起的误差,双向电泳时蛋白质样品的上样量应该尽量一致,因此,蛋白质样品的准确定量非常关键。本实验在 Bradford 法的基础上做了一定的改进^[17],使样品能够在酸性的条件下进行检测,显著提高蛋白质定量检测的精确度。

2-DE 结果的重复性在蛋白质组研究中很重要。本实验采用 IPG 胶条对从蛋白质提取到 2-DE 的整个过程进行了多次重复,所得的 2-DE 图谱如见图 5A 和图 5B,利用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件分析凝胶上蛋白点数量和丰度基本一致,具有较好的重复性。

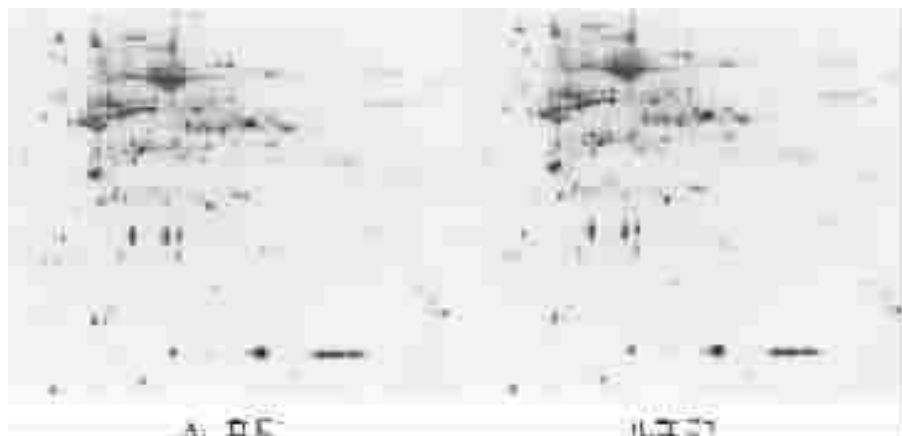


图 5 同一样品的 2 次双向电泳图谱比较

Figure 5 Reproducibility of 2-DE for the same sample

在盐胁迫 72 h 后,提取青杨叶片蛋白质,采用 24 cm, pH 3~10 的线性 IPG 干胶条上样,经过双向电泳,银染,获得蛋白质图谱(图 6)。从图中可以看出碱性端蛋白点较少,大部分蛋白集中在酸性端,说明青杨叶片蛋白质大部分属于酸性蛋白。采用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件结合肉眼对图谱进行分析可以看出,盐胁迫条件下蛋白图谱与对照条件下蛋白图谱具有一定相似性,但也存在差异性。在盐胁迫后,所表达的蛋白点数有所增加,且存在一些表达量上的差异。

凝胶上的蛋白点被鉴定之后,通过 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件自动匹配,显示 78 个差异点,通过肉眼观察和手动调整,结果显著差异的点有 46 个,其中 10 个下调,36 个上调(图 7)。大部分差异的蛋白点区别仅在于表达的蛋白量发生了变化,但有 4 个蛋白是新诱导表达的,它们只出现在盐处理的样品中,可能是盐处理后新合成的或者在对照样品中丰度很低以至检测不到。图 8 显示氯化

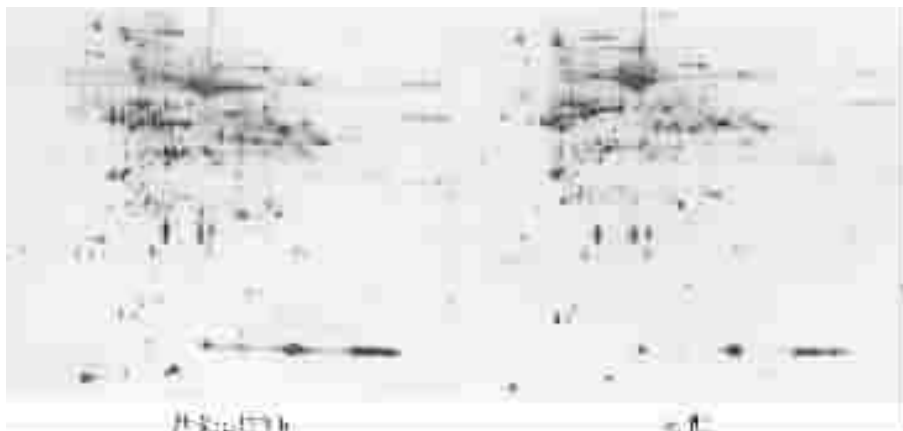


图 6 对照及盐处理 72 h 后双向电泳图

Figure 6 Maps of 2-DE of the control and salt after 72 h

钠胁迫后蛋白质表达下调的蛋白点；图 9 显示氯化钠胁迫后蛋白质表达上调的蛋白点。

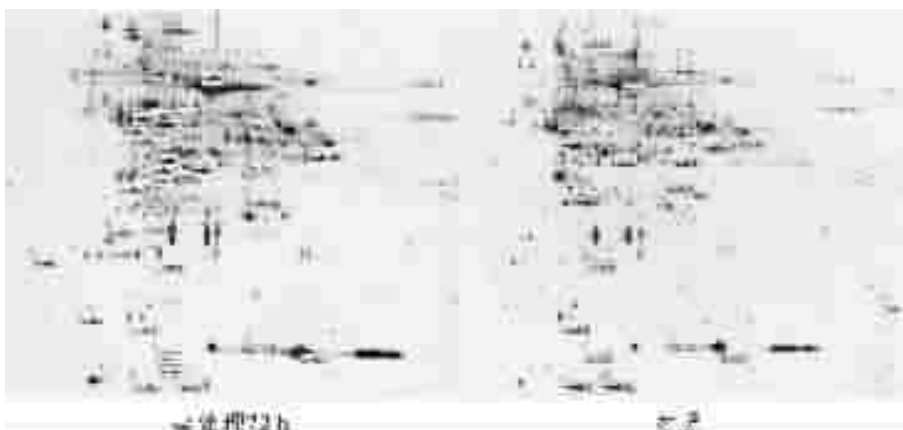


图 7 对照及盐处理 72 h 后双向电泳图分析

Figure 7 Comparison maps of 2-DE of the control and salt stress after 72 h

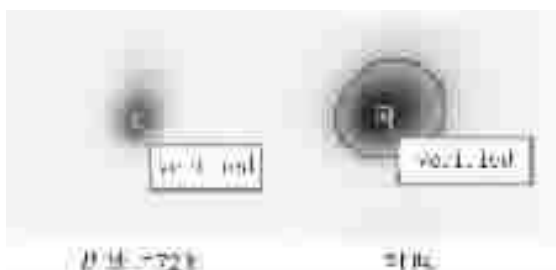


图 8 氯化钠胁迫后蛋白质表达下调

Figure 8 Protein expression down-regulate

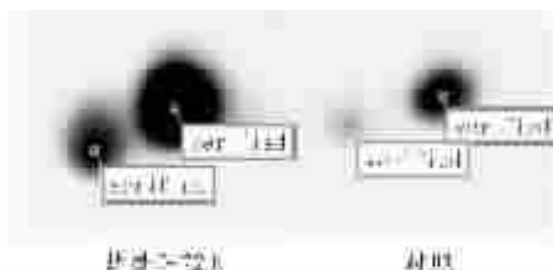


图 9 氯化钠胁迫后蛋白质表达上调

Figure 9 Protein expression up-regulate

3 讨论

样品制备是 2-DE 成功与否的关键步骤^[18]，样品质量的好坏直接决定双向电泳的分辨率、重复性和蛋白质谱的结果^[19]。为了获得更多的蛋白质信息，要求尽量提高样品蛋白质的溶解性并减少蛋白质的损失和降解。丙酮沉淀法步骤少，操作简单，但得到的蛋白质样品颜色发黄，蛋白浓度低，2-DE 图谱纹理多，背景色重，说明不能有效地去除酚等可溶性杂质。TCA 法步骤较少，能有效抑制蛋白酶的活性，对去除脂类杂质效果较好，但得到的蛋白质较难溶解，使 2-DE 图可检测到的蛋白点减

少,且对多糖的去除效果不好。酚抽法虽然步骤较多,但得到的蛋白呈乳白色,易溶解,2-DE图背景色干净,可检测到的蛋白点多,能有效去除盐离子、多酚和多糖等对电泳不利的可溶性物质。

干燥后的蛋白质干粉在进行电泳前应尽可能充分溶解,在样品溶解液中常加入的试剂有变性剂、去污剂、还原剂和载体两性电解质等,这些物质都可促进蛋白质溶解^[20]。本研究采用含 $9\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ CHAPS, $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DTT, $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 两性电解质的样品溶解液来溶解蛋白,得到了比较理想的2-DE图谱,其中尿素作为中性促进剂,能破坏氢键,很好地展开蛋白质分子,暴露疏水集团,降低疏水氨基酸残基与溶液结合的障碍,从而增加样品的溶解度。但尿素遇热后会分解产生氰酸盐,可能引起蛋白质氨基的甲酰化,因此,溶解后的蛋白质样品溶解液均不能加热超过 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

在本植物蛋白质提取方面前人提出了许多排除色素、酚、醌等干扰植物蛋白质样品制备的方法^[21-22]。本研究利用Tris-饱和酚的特性,即酚是蛋白质的良好溶剂,在样品制备过程中,蛋白质和脂类溶于酚相,盐、核酸、多酚和多糖等可溶性物质进入水相;其次,通过增加离心力和离心时间,尽可能地把密度大的糖离至上清液的上层;然后,在吸取中间相时细心操作,枪头避开上层含有多糖的水相小心吸取;最后,酚相中的蛋白质通过乙酸铵的甲醇溶液沉淀,再用冷丙酮多次清洗蛋白,去除色素和铵离子等杂质。在实验过程中发现,加入PVPP可以有效地去除多酚。

从电泳图中可以看出,用酚抽法提取的蛋白质稳定,包含了叶片中大部分可溶性蛋白,几乎没有横条纹和拖尾等纹理现象,得到了清晰的电泳图谱。说明此方法适于青杨叶片蛋白质的提取。

上样量大小主要取决于胶条的长度、pH范围以及染色方法等。一般来说,胶条越长,pH范围越广,上样量就越大,考马斯亮蓝染色比银染需要的上样量大^[21]。提高蛋白质的上样量有利于低丰度蛋白的检测,但上样量过高可导致高丰度蛋白斑点掩盖低丰度蛋白斑点,且样品中含有盐离子,上样量越大盐离子浓度也越大,引起聚焦时电压的上升,影响等电聚焦效果,易产生横向条纹,银染时易产生饱和现象。因此,在双向电泳中样品上样量的大小对电泳过程和结果分析有重要影响^[23-24]。

本研究发现,延长低电压的电泳时间,可使盐离子有效地移动到胶条的两极,有助于样品中盐离子泳出和后续聚焦所需的高电压。

本研究以优化的双向电泳对盐胁迫处理的青杨叶片蛋白进行了分离,获得分辨率较高的2-DE图谱,并获得了46个差异点,拟继续进行质谱分析,在蛋白水平上研究盐逆境胁迫下复杂的基因表达。

致谢:在蛋白质双向电泳中得到GE公司的李娜工程师、中国科学院植物研究所李肖芳硕士的大力帮助,特此致谢!陈国良、蒋晶、乔桂荣对实验工作贡献相同。

参考文献:

- [1] 赵能, 龚固堂, 刘军. 杨柳科植物的分类与分布[J]. 四川林业科技, 1998, **19** (4): 10 - 21.
ZHAO Neng, GONG Gutang, LIU Jun. On the classification and distribution of the family salicaceae[J]. *J Sichuan For Sci Technol*, 1998, **19** (4): 10 - 21.
- [2] TUSKAN G A, DIFAZIO S, JANSSON S, *et al*. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. *Science*, 2006, **313** (5793): 1596 - 1604.
- [3] 李宽钰, 黄敏仁, 王明麻, 等. 白杨派、青杨派和黑杨派的DNA多态性及系统进化研究[J]. 南京林业大学学报, 1996, **20** (1): 6 - 11.
LI Kuanyu, HUANG Minren, WANG Mingxiu, *et al*. Study on dna polymorphisms and phylogenetics of populus: aigeiros, tacamahaca and leuce section [J]. *J Nanjing For Univ*, 1996, **20** (1): 6 - 11.
- [4] HOAGLAND D R, ARNON D I. *The Water-culture Method for Growing Plants Without Soil*[R]. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.
- [5] 廖翔, 应天翼, 黄留玉, 等. 蛋白质组学研究中的双向电泳技术[J]. 生物技术通讯, 2003, **14** (6): 522 - 524.
LIAO Xiang, YING Tian-yi, HUANG Liu-yu, *et al*. Two-dimensional electrophoresis technology in proteomics [J]. *Letters Biotechnol*, 2003, **14** (6): 522 - 524.
- [6] BARRY R C, ALSAKER B L, ROBISON-COX J F, *et al*. Quantitative evaluation of sample application methods for

- semipreparative separations of basic proteins by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2003, **24** (19 – 20): 3390 – 3404.
- [7] DAMERVAL C, DE 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.
- [8] DAMERVAL C, MAURICE A, JOSSE J M, *et al.* Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression [J]. *Genetics*, 1994, **137** (1): 289 – 301.
- [9] SARAVANAN R S, ROSE J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. *Proteomics*, 2004, **4**: 2522 – 2232.
- [10] CARPENTIER S C, WITTERS E, LAUKENS K, *et al.* Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis [J]. *Proteomics*, 2005, **5**: 2497–2507.
- [11] YAN J X, ROBIN W, TOM B, *et al.* A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2000, **21**: 3666 – 3672.
- [12] 李肖芳, 韩和平, 王旭初, 等. 适用于盐生植物的双向电泳样品制备方法 [J]. *生态学报*, 2006, **26** (6): 1848 – 1853.
LI Xiaofang, HAN Heping, WANG Xuchu, *et al.* A protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis analysis of halophytes [J]. *Acta Ecol Sin*, 2006, **26** (6): 1848 – 1853.
- [13] 李善菊, 任小林. 植物水分胁迫下功能蛋白的研究进展 [J]. *水土保持研究*, 2005, **12** (3): 64 – 68.
LI Shanju, REN Xiaolin. Research progresses of functional protein under water stress [J]. *Res Soil Water Conserv*, 2005, **12** (3): 64 – 68.
- [14] BESTEL-CORRE G, DUMAS-GAUDOT E, POINSOT V, *et al.* Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2002, **3**: 89 – 92.
- [15] BRYNA E D, ROBIN D M, PATRICIA A, *et al.* The wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf proteome [J]. *Proteomics*, 2005, **5**: 1624 – 1633.
- [16] CAPELL T, BASSIE L, CHRISTOU P. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress [J]. *PNAS*, 2004, **101**: 9909 – 9914.
- [17] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analy Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [18] SHAW M M, RIEDERER B M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2003, **3**: 1408 – 1417.
- [19] BLACKSTOCK W P, WEIR M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular protein [J]. *Trends Biotechnol*, 1999, **17**: 121 – 127.
- [20] ALBRECHT G, MUSTROPH A, FOX T C. Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots [J]. *Physiol Plant*, 2004, **120** (1): 93 – 105.
- [21] 林金科, 郑金贵, 袁明, 等. 茶树蛋白质提取及双向电泳的改良方法 [J]. *茶叶科学*, 2003, **23** (1): 16 – 20.
LIN Jinke, ZHEN Jingui, YUAN Ming, *et al.* The improvement of isolation and the method of two-dimensional electrophoresis of protein from tea plant [J]. *J Tea Sci*, 2003, **23** (1): 16 – 20.
- [22] BAE M S, CHO E J, CHOI E Y, *et al.* Analysis of the arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress [J]. *Plant J*, 2003, **36** (5): 652 – 663.
- [23] 常俊丽, 杨广笑, 何光源. 蛋白质组学分离检测技术研究进展 [J]. *武汉植物学研究*, 2006, **24** (3): 261 – 266.
CHANG Junli, YANG Guangxiao, HE Guangyuan. Progress regarding techniques of separation and detection in proteomics [J]. *J Wuhan Bot Res*, 2006, **24** (3): 261 – 266.
- [24] PARDA A K, DAS A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2005, **60** (3): 324 – 349.