

# 刺槐根系可溶性蛋白 SDS-PAGE 分离方法的改进

陈明涛,赵 忠\*,权金娥

(西北农林科技大学 西部环境与生态教育部重点实验室,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**在利用常规 SDS-PAGE 方法分离刺槐根系可溶性蛋白的过程中,将样品处理液中的 SDS、 $\beta$ -巯基乙醇、丙三醇的含量均增加 50%。这样改进后的方法得到了分离效果明显较常规方法好的电泳图谱。经分析得出:常规 SDS-PAGE 方法中样品处理液的 SDS 和  $\beta$ -巯基乙醇浓度不足以充分溶解刺槐根系中的可溶性蛋白,丙三醇的浓度也不足以将样品很好地沉聚于点样槽底部。该试验为植物组织可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分离提供了一套效果较好的参考方法。

**关键词:**刺槐根系;可溶性蛋白;SDS-PAGE;改进

中图分类号:S792.27      文献标志码:A      文章编号:1001-7461(2011)01-0128-03

## Methodological Improvement of Separating Soluble Protein by SDS-PAGE from *Robinia pseudoacacia* Root

CHEN Ming-tao, ZHAO Zhong\*, Quan Jin-e

(Key Laboratory of Environment and Ecology in Western China, Ministry of Education, Northwest A & F university, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** An improvement was made in the conventional method SDS-PAGE for separating soluble protein from the roots of *Robinia pseudoacacia* by increasing the content of SDS,  $\beta$ -mercaptoethanol and glycerine to 50%. The separating effect of improved method was much better than the conventional one. Causes of the improvement were discussed: in the conventional method, the concentrations of SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol were not high enough to completely dissolve the soluble protein, and the concentration of glycerine was also not high enough to precipitate the sample.

**Key words:** *Robinia pseudoacacia* root; soluble protein; SDS-PAGE; improvement

根系在植物生长过程中起着关键的作用。近年来,对根系的研究已成热点<sup>[1-3]</sup>。水分胁迫条件下根系可产生干旱诱导蛋白<sup>[4]</sup>。蛋白质 SDS-PAGE 技术的发展为根系干旱诱导蛋白的研究提供了有力的工具。常规 SDS-PAGE 方法对植物组织可溶性蛋白均有较好的分离效果<sup>[5-9]</sup>,但本试验用常规方法分离刺槐(*Robinia pseudoacacia*)根系可溶性蛋白时发现上样时样品不能很好的沉聚于点样槽底部,最终得到的电泳图谱效果不好(图 1)。因此作者通过分析,对常规方法做了改进,旨在为植物根系可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分离提供一套效果较好的参考方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

2009 年 7 月下旬,于西北农林科技大学林学院苗圃选择生长健壮、植株大小基本一致的刺槐 2 a 生苗木,取根尖部位约 2~3 cm 长的细根,液氮研磨,保存于-70℃冰箱。

### 1.2 可溶性蛋白的提取

提取缓冲液:0.062 5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH6.8),0.5% SDS,10% 甘油,5%  $\beta$ -巯基乙醇,1 mol·L<sup>-1</sup> PMSF(酒精助溶,现用现配);上样缓冲液(与常规方法不同,见表 1):0.01 mol·L<sup>-1</sup>

收稿日期:2010-01-04    修回日期:2010-03-11

基金项目:国家自然科学基金项目(30671673)

作者简介:陈明涛,男,硕士,主要从事干旱生理方面研究。E-mail: 312046922@ qq.com

\* 通讯作者:赵忠,男,教授,博士生导师,主要从事半干旱地区植被恢复与重建研究。E-mail:zhaozh@nwsuaf.edu.cn

(pH6.8), 7.5%β-巯基乙醇, 3% SDS, 15% 甘油, 0.02% 溴酚蓝。

表 1 SDS、β-巯基乙醇、丙三醇使用量比较

Table 1 Comparison of application amount of SDS, β-mercaptoethanol and glycerine /%

名称	常规使用量	改进后使用量
SDS	2(W/V)	3.0(W/V)
β-巯基乙醇	5(V/V)	7.5(V/V)
丙三醇	10(V/V)	15.0(V/V)

提取过程:称取 0.5 g 刺槐根系样品,加入液氮充分研磨,转入 50 mL 离心管。加入 10 mL 提取缓冲液,摇匀后-4℃放置 2 h。4℃12 000 g 离心 20 min,取上清,加满-20℃预冷丙酮,摇匀,-20℃放置 1 h 沉降蛋白。4℃5 000 g 离心 10 min,倒掉上清液,加入少量-20℃丙酮,将沉淀捣碎,转入 2 mL 离心管,4℃5 000 g 离心 10 min。倒掉上清液,再用-20℃丙酮将沉淀清洗一次,以尽量去除沉淀中非蛋白物质。之后沉淀在-20℃放置 20 min,使丙酮完全挥发。用 200 μL 上样缓冲液溶解沉淀,1 h 后煮沸 5 min,4℃12 000 g 离心 20 min,留上清液,-20℃保存。

1.3 电泳过程

本实验采用 BIO-RAD 垂直板电泳槽。分离胶浓度 13.5%, 浓缩胶浓度 5%。

电极缓冲液:含 0.1% SDS、0.384 mol·L<sup>-1</sup> 甘氨酸的 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH8.3)。凝胶贮备液(W/V):浓缩胶 10% Arc-0.5% Bis、分离胶 30% Arc-0.8% Bis。浓缩胶缓冲液:0.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH6.8)。分离胶缓冲液:1.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH8.8)。

蛋白 Mark 由 14.4kD、20.0kD、26.0kD、33.0kD、45.0kD、66.2kD、94.0kD 七种分子量的蛋白质组成。上样量 10 μL,电泳时间 12 h。浓缩胶电压 80 V,分离胶 120 V。

1.4 染色与脱色

染色液:含 0.1%(W/V)考马斯亮兰 R250, 50%(V/V)甲醇、10%(V/V)冰醋酸和 40% 蒸馏水,染色时间 4 h。脱色液:含 5% 甲醇、7% 冰醋酸和 88% 蒸馏水,脱色时间 5 h。

2 结果与分析

两种方法所得的电泳图谱效果差异很明显(图 1、图 2)。图 1 的条带拖尾严重,而图 2 条带效果较好。在其他试验条件一致的情况下,增加样品处理液中 SDS、β-巯基乙醇、丙三醇的含量对结果的影响很明显。

图 1 常规方法得到的刺槐根系可溶性蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis patterns of soluble protein of Robinia pseudocacia root by regular method

图 2 改进方法得到的刺槐根系可溶性蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE Electrophoresis patterns of soluble protein of Robinia pseudocacia root by improvement method

在蛋白质溶解中,SDS 可使蛋白质的氢键、疏水键打开,引起蛋白质构象的变化;β-巯基乙醇可将蛋白质分子中的二硫键还原,使多肽分成单个亚单位。二者因此与蛋白质形成一种复合物。SDS 是一种阴离子去污剂,在水溶液中以单体和分子团的形式存在。单体的浓度与 SDS 总浓度、离子强度及温度有关,为了使单体与蛋白质结合形成 SDS-蛋白质复合物,需要降低离子强度来增加单体的浓度<sup>[10-11]</sup>。当 SDS 单体浓度大于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 时,大多蛋白平均结合比为 1.4 g SDS : 1 g 蛋白。由于 SDS 带有大量负电荷,当其与蛋白质结合时,所带的负电荷大大超过了天然蛋白质原有的电荷,因而消除和遮掩了不同种类蛋白质间原有电荷的差异,使蛋白质带有相同密度的负电荷,因而其在电场中

的运动只和蛋白质大小有关,因而可将不同大小分子量的蛋白质分离开。在蛋白质没有充分溶解的条件下,由于蛋白质的凝聚颗粒在电泳过程中会发生缓慢溶解,使电泳图谱的蛋白质轨迹上出现拖尾<sup>[11]</sup>(图 1)。本试验整个过程均使用超纯水,尽最大可能地降低离子强度而增加 SDS 单体的浓度;并且增加了 SDS 总浓度以提高其单体的浓度;增加  $\beta$ -巯基乙醇浓度以弥补实验过程中其挥发引起的浓度减少,充分还原蛋白质分子的二硫键;二者的综合效果便是促使蛋白质多肽分解成单个亚单位,促进蛋白质的充分溶解。

在利用常规方法的过程中还发现,点样时样品不能很好地沉聚于点样槽底部,甚至扩散于电极缓冲液中,造成蛋白质在电泳之前在点样槽中位置的分散;而丙三醇的作用是点样时使样品溶液沉聚于点样槽底部<sup>[11]</sup>。增加丙三醇用量后,样品便可以很好地沉聚于点样槽底部。采取以上措施后,得到了较清晰的电泳图谱(图 2)。

### 3 结 论

常规 SDS-PAGE 方法的样品处理液中的 SDS 和  $\beta$ -巯基乙醇浓度不足以充分溶解刺槐根系中的可溶性蛋白;点样时丙三醇的浓度也不足以将样品很好地沉聚于点样槽底部。将 SDS、 $\beta$ -巯基乙醇、丙三醇的含量增加了常规含量的 50%后,以上问题得以解决,最终得出较理想的电泳图谱,为植物根系可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分离提供了一套效果较好的参考方法。

#### 参考文献:

[1] 李文华,刘建军,康博文. 叶面喷施 ALA 对几种苗木根系形态的影响[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(1): 90-94.  
LI W H, LIU J J, KANG B W. Effects of foliar spraying ALA on root morphology of seedlings of several species[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(1): 90-94.

[2] 柴成武,徐先英,唐卫东,等. 石羊河流域荒漠区主要固沙植物根系研究[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(4): 21-26.

CHAI C W, XU X Y, TANG W D, *et al.* Root system of the main sand fixing plants in desert zone of Shiyanghe River basin [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(4): 21-26.

[3] 朱维琴,吴良欢,陶勤南. 作物根系对于干旱胁迫逆境的适应性研究进展[J]. 土壤与环境, 2002, 11(4): 430-433  
ZHU W Q, WU L H, TAO Q N. Advances in the studies on crop root against drought stress[J]. Soil and Environmental Sciences, 2002, 11(4): 430-433.

[4] 张宏一,朱志华. 植物干旱诱导蛋白研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(3): 268-270.  
ZHANG H Y, ZHU Z H. Research progress in drought-induced proteins in plants[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2004, 5(3): 268-270.

[5] 王延华,邹晓莉. 蛋白质理论与技术[M]. 北京:科学出版社, 2005: 108-110.

[6] 许晓岗,王俊,童丽丽,等. 垂丝海棠插穗生根与可溶性蛋白和激素变化的关系[J]. 北方园艺, 2008(1): 107-111.  
XU X G, WANG J, TONG L L, *et al.* Studies on changes of soluble proteins in the cuttings rooting of *malus halliana* roehne [J]. Northern Horticulture, 2008(1): 107-111.

[7] 徐民俊,刘桂茹,杨学举,等. 冬小麦品种干旱诱导蛋白的研究[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(4): 11-15.  
XU M J, LIU G R, YANG X J, *et al.* The study of drought induced protein of winter wheat cultivars[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2002, 25(4): 11-15.

[8] 郭红彦,谭鹏鹏,吴青霞,等. 银杏营养贮藏蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版, 2007, 27(01): 16-20.  
GUO H Y, TAN P P, WU Q X, *et al.* Study on VSPs in *Ginkgo Biloba* by the technology of SDS-PAGE [J]. Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Science Edition, 2007, 27(01): 16-20.

[9] 郭红彦,吴青霞,彭方仁. 银杏枝条营养贮藏蛋白质的组分及动态变化[J]. 林业科学, 2009, 45(3): 24-28.  
GUO H Y, WU Q X, PENG F R. Components and dynamics of vegetative storage proteins in the branch of *Ginkgo biloba* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45(3): 24-28.

[10] 何忠效. 生物化学实验技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2004: 204-205.

[11] 杨建雄. 生物化学与分子生物学[M]. 北京:科学出版社, 2002: 137.

## 重要更正启事

本刊 2009 年第 4 期发表的《保定市城市绿地系统规划探析》一文,因第一作者将第二作者姓名误写为“张红艳”,正确的应为“张洪燕”。特此说明更正。