

## 不同生态型芦苇叶片蛋白质双向电泳系统的筛选和优化\*

林文芳\*\* 陈林姣 彭浩 朱学艺\*\*\*

(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

**摘要** 通过优化组合植物蛋白质提取方法及与之匹配的蛋白质裂解液, 采用改进的 O Farrel 双向电泳系统, 以自然生境野生芦苇叶片为材料, 筛选出一种适合纤维含量高、革质化明显的 4 种不同生态型芦苇(水生芦苇、轻度盐化草甸芦苇、重度盐化草甸芦苇、沙丘芦苇)叶片蛋白质分析的双向电泳系统, 即以饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法提取叶片蛋白质样品, 经裂解液[8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 2% Ampholine(pH3.5~10 pH5~8 = 1 4)]裂解后按 80  $\mu$ g 上样, 银染后获得背景清晰、蛋白质分辨率较高的双向电泳图谱。该系统用于水稻等植物叶片蛋白质双向电泳分析, 同样获得较好的电泳图谱和分辨率。

**关键词** 芦苇, 不同生态型, 蛋白质制样, 裂解液, 双向电泳

**学科分类号** Q946

蛋白质双向凝胶电泳 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE) 是目前唯一可以从等电点和分子质量两方面将数千种蛋白质同时分离与展示的技术, 因而具有较高的分辨率和灵敏度, 已成为蛋白质组学研究中的主要技术手段。目前, 已报道的双向电泳方法大多采用 O Farrell<sup>[1]</sup> 首创或对其稍加改进的系统, 该系统最初主要用于动物和微生物细胞或组织的全蛋白质分析<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着植物蛋白质组学研究的广泛开展, O Farrell 双向电泳技术及其改进方法越来越多地应用于植物蛋白质组学的研究中<sup>[4-9]</sup>, 然而, 由于植物材料, 特别是适应恶劣自然生境的植物叶片中常含有大量色素、酚类、有机酸、脂类及其他次生代谢产物, 这些物质常常会干扰叶片蛋白质的提取分离及电泳行为, 加之适应自然干旱和盐渍等生境的植物叶片多纤维含量高或严重革质化, 使得双向电泳技术在这些旱生和盐生植物蛋白质组研究中的应用受到一定影响, 所以筛选能够适用于极端生境植物材料的双向电泳系统十分必要。

样品制备是蛋白质双向电泳分析中的关键步骤之一, 不断筛选更为有效的植物蛋白质制样方法始终是从事植物蛋白质组学研究的实验室不断追求和改进的方向。在利用双向电泳技术进行植物蛋白质组的研究中, 已有多种蛋白质提取方法应用于不同

植物的蛋白质制样中, 例如: 硫酸铵沉淀法、三氯乙酸(TCA)沉淀法、丙酮沉淀法、TCA-丙酮沉淀法以及用饱和酚提取, 在甲醇中以醋酸铵沉淀的方法等<sup>[10-14]</sup>, 这些制样方法各有利弊, 其中, 又以 TCA-丙酮沉淀法应用较多<sup>[10, 11, 14, 15]</sup>。

蛋白质双向电泳分析中的第二个关键步骤是沉淀蛋白质的重新溶解, 其中, 裂解液在蛋白质样品的溶解和变性中发挥着重要作用。不同的裂解液在植物蛋白质双向电泳研究中已有大量文献报道<sup>[6, 7, 10, 14, 16]</sup>, 但研究中发现, 除了蛋白质制样方法外, 不同裂解液的组成、浓度及其配比对植物蛋白质双向电泳行为和分辨率同样具有较大的影响<sup>[16]</sup>。然而, 目前尚未见不同蛋白质制样方法及不同裂解液对同种植物蛋白质双向电泳影响的对比研究, 也没有将不同制样方法与不同裂解液匹配组合, 筛选出适用于极端生境植物的蛋白质双向电泳系统的报道。

\* 国家自然科学基金(30470164), 厦门大学新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCETXMU)和福建省自然科学基金(C0410001)资助项目。

\*\* 福建农林大学生命科学院。

\*\*\* 通讯联系人。

Tel: 0592-2183151, E-mail: zhuxueyi90@xmu.edu.cn

收稿日期: 2008-01-29, 接受日期: 2008-03-05

甘肃省河西走廊荒漠地带自然生长有 4 种不同生态型芦苇(*Phragmites communis* Trin.)，即水生芦苇(*swamp reed*, SR)、轻度盐化草甸芦苇(*light salt meadow reed*, LSMR)、重度盐化草甸芦苇(*heavy salt meadow reed*, HSMR)和沙丘芦苇(*dune reed*, DR)<sup>[17]</sup>。由于长期适应盐渍和干旱生境，这些芦苇叶片纤维含量高、革质化明显，并积累有大量次生代谢物及其他小分子物质<sup>[17, 18]</sup>，致使其叶片蛋白质提取相当困难。在对不同生态型芦苇蛋白质组学的比较分析中，经尝试使用多种蛋白质提取制样方法和不同裂解液处理蛋白质样品后，本文通过对其中主要采用的两种蛋白质制样方法——三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法、饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法，以及适用于植物材料的 4 种常用裂解液的改进配方<sup>[1, 7, 9, 14]</sup>进行了比较分析，优化筛选出一套适于不同生态型芦苇叶片蛋白质制样及分析的双向电泳系统，该系统用于水稻等植物叶片蛋白质双向电泳分析时，同样获得了较好的 2-DE 结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验取样地及材料

实验材料取样地位于甘肃省河西走廊临泽县境内<sup>[17]</sup>。2006 年 6 月下旬，取自然生长的 4 种不同生态型芦苇。每一植株取第二片完全展开的叶，分别大量取样混合包装后，立刻放入液氮中保存备用。水稻(*Oryza sativa* L.) 温室培养，培养至 5 叶期，取其上部完全展开的第 2~3 片叶，叶片立刻放入液氮中保存备用。

### 1.2 叶片全蛋白的提取制备

1.2.1 TCA-丙酮提取法。根据 Damerval<sup>[11]</sup>及 Tsugita 等<sup>[19]</sup>所述的方法稍加改进提取植物叶片全蛋白。取液氮中冻存的叶片 0.5 g 研磨成细粉，加

入 2.5 ml 预冷的研磨提取液(8 mol/L 尿素，20 mmol/L DTT，2% NP-40)，研磨匀浆后转入离心管，4、5 000 g 离心 5 min，去除沉淀，上清液在 4℃ 下以 10 000 g 离心 10 min，吸取上清加入 10 倍体积 10% TCA-丙酮，混悬后-20℃ 放置 2 h 以上。然后 4、5 000 g 离心 5 min，弃去上清，沉淀中加入 100%丙酮，混悬后-20℃ 放置 0.5 h，同上离心，重复 2 次，蛋白质可悬于丙酮中-80℃ 保存，或制成丙酮干粉保存于-80℃ 中。

1.2.2 饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法。根据 Hurkmann 和 Tanaka<sup>[12]</sup>所述的方法稍加修改提取植物叶片全蛋白。取液氮中冻存的叶片 0.5 g 研磨成细粉，加入 2.5 ml 预冷的研磨提取液(8 mol/L 尿素，20 mmol/L DTT，2% NP-40)，研磨匀浆后转入离心管，4、15 000 g 离心 3 min，取上清加入 1.2 倍体积的水饱和酚，混匀，4、10 000 g 离心 20 min，取含有色素相加入 5 倍体积 0.1 mol/L 醋酸铵/甲醇，-20℃ 沉降 4 h 以上。然后 4、28 000 g 离心 3 min，沉淀用甲醇混悬，-20℃ 放置 0.5 h，5 000 g 离心 5 min，重复 2 次，蛋白质可悬于丙酮中-80℃ 保存，或制成干粉保存于-80℃ 中。

### 1.3 第一向等电聚焦电泳

1.45 ml 的 IEF 胶由以下成分组成：尿素 0.825 g，30%丙烯酰胺 200  $\mu$ l，NP-40(10%)300  $\mu$ l，超纯水 295  $\mu$ l，两性电解质 50  $\mu$ l(pH 3.5~10 pH 5~8=1:4)，10% APS 和 TEMED 各 1.6  $\mu$ l 配制 17 cm 长的一向胶。4 种不同裂解液的组成及浓度配比见表 1，其中，裂解液 C 为 O Farrell 电泳系统裂解液<sup>[1]</sup>，但 NP-40 增大 1 倍，裂解液 A、B、D 依据文献报道的方法<sup>[6, 9, 10, 14, 20]</sup>，但上述裂解液中两性电解质均采用 pH 3.5~10 和 pH 5~8 以 1:4 比例混合使用(表 1)。

Table 1 Components and concentrations of four different lysis buffers

Lysis buffer	Components and concentration
A	30 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl <sub>2</sub> , 6 mmol/L Ascorbic acid, 1% PVP, 5% Glycerol, 0.02% -Mercaptoethanol
B	8 mol/L Urea, 50 mmol/L DTT, 4% CHAPS, 2% Ampholine (pH 3.5~10 pH 5~8=1:4)
C	9.5 mol/L Urea, 4% NP-40, 5% -Mercaptoethanol, 2% Ampholine (pH 3.5~10 pH 5~8=1:4)
D	7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 2% Ampholine (pH 3.5~10 pH 5~8=1:4)

蛋白质样品中加入裂解液后室温放置 1 h，充分溶解后 10 000 g 离心 2 min，取上清按照 Bradford<sup>[21]</sup>方法测蛋白质含量。以 80  $\mu$ g 蛋白质上样，上面覆盖 10  $\mu$ l 稀释 1 倍的裂解液，再封

50 mmol/L NaOH 至管口。上槽电极液为：50 mmol/L NaOH，下槽液为 25 mol/L 的 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>。室温下 200 V  $\times$  15 min，300 V  $\times$  20 min，400 V  $\times$  30 min，500 V  $\times$  30 min，600 V  $\times$  16 h 进行聚焦。

## 1.4 第二向 SDS-PAGE

一向胶条在 0.06 mol/L Tris-Cl (pH 6.8), 2%SDS, 100 mmol/L DTT, 10%甘油, 0.05% 溴酚蓝组成的平衡液中平衡 30 min 后, 进行第二向 SDS-PAGE, 二向 SDS-PAGE 胶浓度为 12.5%, 稳流 20 mA/板(200 mm × 200 mm × 1 mm), 待溴酚蓝至胶底边缘 0.5 cm 左右停止电泳。

## 1.5 染色及扫描

参照郭尧君<sup>[22]</sup>和安发玛西亚双向电泳实验技术指南的银染方法进行染色, 染色后胶块以 UMAX Power Look 2100 型凝胶图像扫描仪以 600 dpi 进行扫描, 所得的图谱以 PDQuest (Bio-Rad) 软件进行图像分析, 扫描后的凝胶可直接切取蛋白质点进行酶解处理后用于质谱分析。

## 2 结 果

### 2.1 蛋白质样品制备

由 TCA-丙酮提取法和饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法提取的芦苇叶片全蛋白质进行双向电泳分析的结果可见(以水生芦苇显示, 图 1a~h), 二者无论在蛋白质总数还是蛋白质电泳行为上都存在一定差异。相同条件下, 用饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法制备的蛋白质样品, 其双向电泳结果(图 1a, c, e, g)总体优于 TCA-丙酮法制备的蛋白质样品电泳结果(图 1b, d, f, h), 表现在前者蛋白质点聚合较好, 银染后凝胶背景比较清晰, 而后的全蛋白质电泳结果背景相对较深, 且纵纹(图 1b, h)和横纹(图 1f)较多。用双向电泳凝胶成像分析软件 PDQuest 分别对 2 种制样方法在 4 种不同裂解液(A, B, C, D)中裂解得到的双向电泳图谱进行分析, 结果表明, 饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法制备的样品, 2-DE 电泳结果中的蛋白质点数依次为 A<sub>1</sub>: 269, B<sub>1</sub>: 334, C<sub>1</sub>: 428, D<sub>1</sub>: 539, 而 TCA-丙酮法提取的蛋白质得到的蛋白质点数分别为 A<sub>2</sub>: 226, B<sub>2</sub>: 279, C<sub>2</sub>: 309, D<sub>2</sub>: 388, 均以饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法提取的全蛋白质双向电泳图谱蛋白质点数较多, 说明该法更有利于微量蛋白的提取和分析(图 1g, h)。对图 1 中 D<sub>1</sub> 和 D<sub>2</sub> 结果进行局部区域切取(方框显示部分)的放大图谱(图 2a, b)分析结果显示, 其蛋白质点数分别是 246 和 161。以饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法制样的 2-DE 电泳结果中蛋白质点 g<sub>1</sub>、h<sub>1</sub>、i<sub>1</sub>、j<sub>1</sub>、k<sub>1</sub>、l<sub>1</sub>、m<sub>1</sub>(图 2b)与改进的 TCA-丙酮提取法制样的 2-DE 结果对应的蛋白质点 g<sub>2</sub>~m<sub>2</sub>(图 2a)相比面积大、染色深, 说明前者提取到的蛋白质量更

大; a<sub>1</sub>、b<sub>1</sub>、c<sub>1</sub>、d<sub>1</sub>、e<sub>1</sub>、f<sub>1</sub> 和 o<sub>1</sub> 的蛋白质点(图 2a)与 a<sub>2</sub>~f<sub>2</sub> 和 o<sub>2</sub>(图 2b)相比, 后者相应的蛋白质点小或几乎无; n<sub>1</sub> 在饱和酚-醋酸铵/甲醇法获得的双向电泳图谱上可检测到(图 2a), 而 TCA-丙酮提取法中不存在(图 2b)。上述结果表明, 饱和酚-醋酸铵/甲醇沉淀法制备的全蛋白质样品更适宜芦苇植物叶片双向电泳分析。

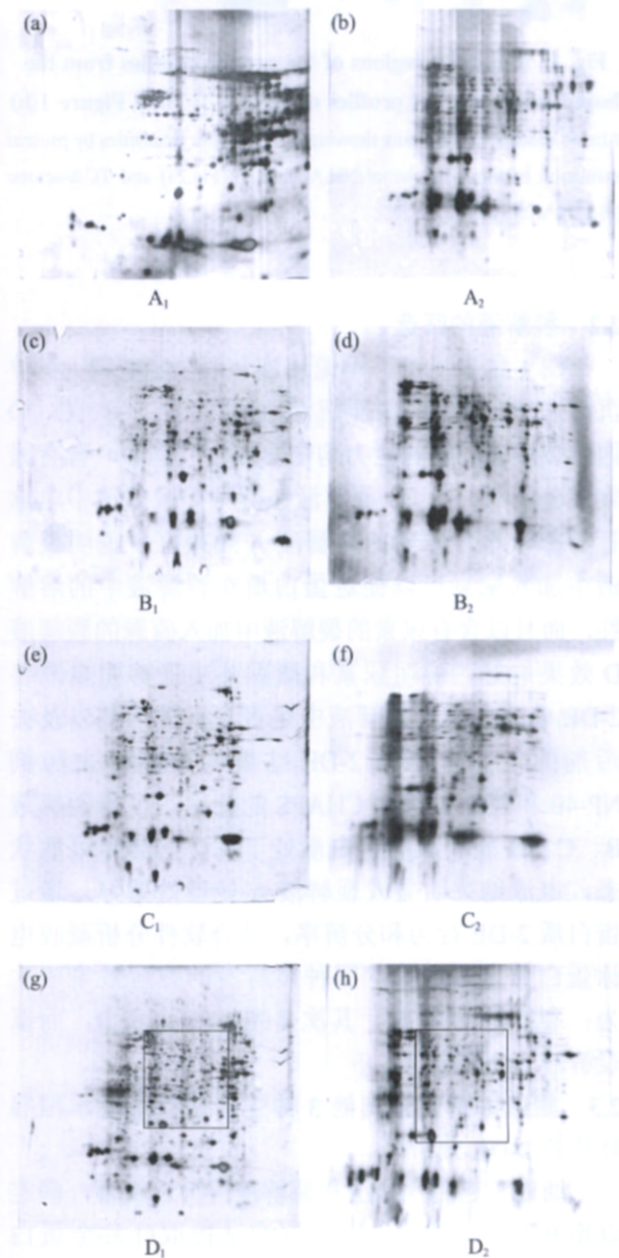
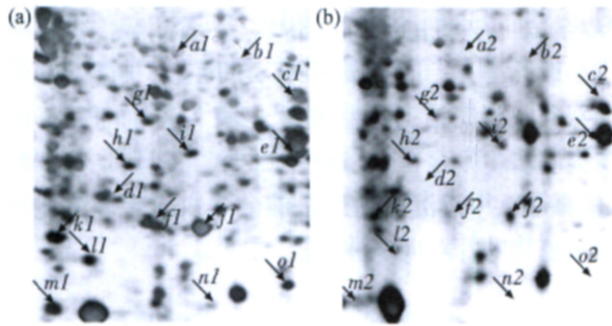


Fig. 1 Different 2-DE profiles of leaf total proteins extracted from swamp reed by methods of phenol/NH<sub>4</sub>Ac-methyl (a, c, e, g) and TCA-actone (b, d, f, h)

Each sample (80 μg proteins) was treated with four different lysis buffers (A, B, C and D). The separated proteins in the 2D gels were detected by silver staining. The boxed areas in (g) and (h) was enlarged and showed in Figure 2a and Figure 2b, respectively.



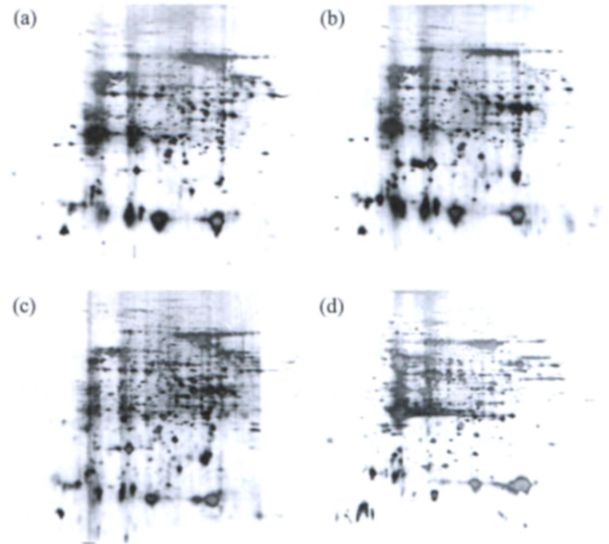
**Fig. 2** Enlarged regions of the protein profiles from the boxed areas in 2-DE profiles of Figure 1(g) and Figure 1(h) Arrows indicate the proteins showing different spot intensities by protein extraction methods of phenol-NH<sub>4</sub>Ac/methyl (Fig.2a) and TCA-actone (Fig.2b) with lysis buffer D.

### 2.2 裂解液的筛选

图 1 结果显示, 不论用饱和酚 - 醋酸铵 / 甲醇沉淀法还是 TCA- 丙酮沉淀法制样, A、B、C、D 四种裂解液的裂解能力均依次增大, 其中, 含有尿素成分的 B、C、D 裂解液在两种提取方法中电泳行为都较不含尿素的裂解液 A 效果好, 说明裂解液中加入尿素可以促进蛋白质在裂解液中的溶解性, 而且以含有尿素的裂解液中加入硫脲的裂解液 D 效果最好, 说明尿素和硫脲共用能够明显改善 2-DE 电泳行为. 裂解液中是否含有去污剂以及去污剂的特性也影响 2-DE 结果, 非离子去污剂 NP-40 和两性去污剂 CHAPS 的使用, 使得裂解液 B、C、D 处理后的蛋白质处于完全溶解和离散状态, 电泳结果明显较裂解液 A 处理效果好. 通过蛋白质 2-DE 行为和分辨率, 结合软件分析凝胶电泳蛋白质点的数目, 四种裂解液的裂解效果依次为: 裂解液 D 最好, 其次是裂解液 C 和 B, 而以裂解液 A 效果最差.

### 2.3 筛选体系用于其他 3 种生态型芦苇及水稻等叶片的 2-DE 分析

通过上述制样方法和裂解液的筛选组合, 确定以饱和酚 - 醋酸铵 / 甲醇沉淀法提取叶片全蛋白质, 以含有尿素和硫脲的裂解液 D 进行上样前的裂解处理, 通过一向 IEF 和二向 SDS-PAGE 对其他 3 种生态型芦苇: LSMR (图 3a), HSMR (图 3b) 和 DR (图 3c) 及实验室栽培水稻(图 3d)、拟南芥以及野生红树植物进行 2-DE 电泳分析 (后二者结果未显示), 表明该筛选体系同样适用这些植物材料的 2-DE 分析(图 3).



**Fig. 3** Different 2-DE patterns of leaf total proteins extracted from 3 terrestrial habitat ecotypes of reed growing in natural habitats and cultured rice by selected 2-DE system Each sample (80 μg proteins) was used and the 2-DE gels were detected by silver staining. (a) LSMR. (b) HSMR. (c) DR. (d) Rice.

## 3 讨 论

双向电泳技术是蛋白质组学研究的核心技术, 尽可能完全地获得某一组织或器官在特定时期表达的蛋白质种类和数量则是双向电泳分析的前提和基础, 所以, 蛋白质提取制样和提取蛋白质的充分再溶是该技术成功应用的关键. 对于植物材料全蛋白质的样品制备, 目前文献多采用的是 TCA- 丙酮法<sup>[11, 14, 18]</sup>, 即植物材料在液氮中研磨后, 加入含 0.07% - 巯基乙醇的 10% TCA- 丙酮, 没有滤去组织残渣直接沉淀提取蛋白质, 这样得到的蛋白质在电泳过程中容易产生横纹和纵纹干扰, 电泳行为和重复性受到一定影响, 本研究中对该法进行了部分改进, 将叶片在液氮中研成细粉后, 4 下加入提取液继续研磨, 离心除去残渣后再用 10% TCA- 丙酮提取蛋白质, 2-DE 电泳分辨率和电泳行为较直接沉淀提取蛋白质有所改善, 但由于 TCA- 丙酮法易富集碱性蛋白<sup>[23]</sup>, 加之该法提取的蛋白质难以完全再溶<sup>[10, 11, 18]</sup>, 致使电泳结果中蛋白质数量相对较少 (图 1).

和改进的 TCA- 丙酮法相比, 饱和酚提取, 随后在甲醇中用醋酸铵沉淀蛋白质的制样方法, 容易去除样品中的多糖和酚类物质, 且提取的蛋白质质量较大, 更适于杂质含量较高的植物蛋白质样品提取, 其不足之处在于耗时稍长. 但是无论其 2-DE 分辨率还是电泳结果中的蛋白质数量都明显优于前

者，在植物蛋白质 2D 电泳的制样中显示出一定优势(图 1)。

除了选择适宜的蛋白质制样方法外，增加蛋白质在裂解液中的溶解度和解聚状态，同时防止蛋白质在裂解处理过程中的降解。丢失是利用双向电泳技术分析植物蛋白质的核心所在。裂解液的组成中主要包括离液剂、还原剂及各种去污剂等<sup>[10]</sup>。在本文对比筛选的 4 种裂解液中，以尿素和硫脲并用的 D 裂解液效果最好。作为变性剂，尿素可以改变溶液中的氢键结构，使蛋白质解折叠并充分伸展而暴露出疏水中心，增加蛋白质的溶解度，而硫脲的加入可以进一步提高溶解度，特别是偏疏水性的蛋白质(如膜蛋白)<sup>[10, 12, 16]</sup>，从而整体上提高了 2-DE 胶上蛋白质数量和含量。表面活性剂的使用可以溶解经过变性剂处理而暴露出的蛋白质的疏水基团，相对于非离子去污剂 NP-40，两性离子去污剂 CHAPS 更为温和，增溶效果更好，它能够确保蛋白质完全溶解并防止蛋白质通过疏水相互作用而发生聚合<sup>[13]</sup>，这也是采用裂解液 D 产生较好 2-DE 结果的另一原因。在变性剂和表面活性剂联用条件下使用还原剂，可使样品蛋白中的二硫键断裂，肽链都处于无二硫键连接的、分离的还原状态<sup>[10, 15]</sup>，4 种裂解液中使用的 2 种还原剂 - 巯基乙醇和 DTT 中，前者不仅要求浓度较高，而且其中含有的某些不纯的物质容易干扰试验结果<sup>[10]</sup>，而低浓度的 DTT 则可克服这一不足，可见，裂解液 D 是裂解蛋白质所需各成分以适宜浓度和比例较为理想的匹配组合。

此外，利用本系统在第一向等电聚焦中没有进行预电泳，而是适当延长整个聚焦的时间(总的伏小时数达到 10 000 Vh 左右)，实验结果证明同样可以得到较好的效果。经过对多种植物叶片全蛋白 2-DE 电泳的反复试验还发现，对于胶管内径为 1.5 mm、胶长度为 17 cm 的胶而言，不同植物全蛋白的加载量在 70 ~ 80  $\mu\text{g}$  为宜。上样量过大，蛋白质互相重叠，不易分开；上样量太小，则低丰度蛋白点难以显出。第二向 SDS-PAGE 胶浓度大多以 12.5% 为宜，对于不同样品可根据第二向电泳行为对其胶浓度稍做调整。

经过对芦苇植物叶片全蛋白样品提取方法、样品裂解液及凝胶浓度的筛选，并结合适宜的电泳染色方法及电泳参数设置的筛选和优化，建立了一套重复性较好、清晰度较高、适合不同生态型芦苇叶片全蛋白分析的双向电泳系统，为进行不同生态型

芦苇蛋白质组的深入研究奠定了基础。经实验室培养的水稻(图 3, 4)、拟南芥及野生红树植物叶片(未显示)的全蛋白双向电泳对比实验证实，该方法同样取得较好结果，说明这一优化 2-DE 体系适用于多种植物叶片蛋白质组的分析，可作为不同植物材料叶片蛋白质组研究中预试分析和微调优化且相对经济的 2-DE 体系。该 2-DE 体系用于 Bio-Rad 和 GE Healthcare 不同 pH 梯度 17 cm 和 18 cm 长的商品 IPG 胶条，适当加大上样量后，分离的蛋白质点数更多，电泳行为和效果更好，目前已在不同实验室多种植物材料叶片蛋白质组分析研究中应用。

### 参 考 文 献

- 1 O Farrell P H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J Biol Chem*, 1975, 250: 4007 ~ 4021
- 2 Anderson N L, Anderson N G. High resolution two-dimensional separation of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5421 ~ 5425
- 3 Kletzin A, Seegerer A, Klink F. Changes in protein composition of facultatively aerobic sulfur-dependent archaebacteria depending on growth conditions. *Arch Microbiol*, 1989, 151(3): 282 ~ 284
- 4 Wu F S, Wang M Y. Extraction of protein for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Anal Biochem*, 1984, 139: 100 ~ 103
- 5 Holloway P, Arundel P. High-resolution two-dimensional electrophoresis of plant proteins. *Anal Biochem*, 1988, 172: 8 ~ 15
- 6 Flengsrud R, Kobro G. A method for two-dimensional electrophoresis of proteins from green plant tissues. *Anal Biochem*, 1989, 177: 33 ~ 36
- 7 Shen S H, Sharma A, Komatsu S. Proteomics approach to identify would-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics*, 2003, 3: 527 ~ 535
- 8 余初浪, 严顺平, 孙卫宁, 等. 适于水稻根、叶、悬浮细胞总蛋白质分析的高分辨率双向电泳方法. *中国水稻科学*, 2006, 20(5): 549 ~ 552
- 9 Yu C L, Yan S P, Sun W N, et al. *Chin J Rice Sci*, 2006, 20(5): 549 ~ 552
- 10 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. *生态学报*, 2006, 26 (6): 1848 ~ 1853
- 11 Li X F, Han H P, Wang X C, et al. *Acta Ecol Sin*, 2006, 26 (6): 1848 ~ 1853
- 12 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法. 北京: 科学出版社, 2003. 48 ~ 57
- 13 Qian X H, He F C. *Proteomics: Theory and Methods*. Beijing: Science Press, 2003. 48 ~ 57
- 14 Damerval C, de Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52 ~ 54
- 15 Hurkman W J, Tanaka C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by Two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*, 1986, 81: 802 ~ 806
- 16 Molloy M P, Herbert B, Walsh B J, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998, 19 (5): 837 ~ 844

- 14 何瑞锋, 丁毅, 张剑锋, 等. 植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化. 遗传, 2000, 22(5): 319 ~ 321  
He R F, Ding Y, Zhang J F, et al. Hereditas, 2000, 22 (5): 319 ~ 321
- 15 Molloy M P. Two dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. Anal Biochem, 2000, 280 (1): 1 ~ 10
- 16 Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. Proteomics, 2004, 4: 2522 ~ 2532
- 17 朱学艺, 王锁民, 张承烈. 河西走廊不同生态型芦苇对干旱和盐渍胁迫的响应调节. 植物生理学通讯, 2003, 39 (4): 371 ~ 376  
Zhu X Y, Wang S M, Zhang C L. Plant Physiol Commu, 2003, 39 (4): 371-376
- 18 浦铜良, 程佑发, 张承烈. 沙丘芦苇特有一小分子化合物及其对叶绿体的逆境保护效应. 科学通报, 2000, 45 (12): 1308 ~ 1313  
Pu T L, Cheng Y F, Zhang C L. Chin Sci Bull, 2000, 45 (12): 1308 ~ 1313
- 19 Tsugita A, Kamo M, Kawakami T, et al. Two-dimensional electrophoresis of plant proteins and standardization of gel patterns. Electrophoresis, 1996, 17: 855 ~ 865
- 20 Islam N, Lonsdale M, Upadhyaya N M, et al. Protein extraction from mature rive leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. Proteomics, 1986, 4(7): 1903 ~ 1908
- 21 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of icrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248 ~ 254
- 22 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 141 ~ 142  
GUO Y J. Experimental Technique of Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press, 1999. 141 ~ 142
- 23 软松林, 马华升, 王世恒, 等. 植物蛋白质组研究进展. 蛋白质组关键技术. 遗传, 2006, 28 (11): 1472 ~ 1486  
Ruan S L, Ma H S, Wang S H, et al. Hereditas, 2006, 28(11): 1472 ~ 1486

## Selection and Optimization of 2-DE System for Leaf Proteome Profiling of Different Ecotypes of Reed Growing in Natural Habitats\*

LIN Wen-Fang\*\*, CHEN Lin-Jiao, PENG Hao, ZHU Xue-Yi \*\*\*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** An optimized two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) system for analyzing plant proteins was developed by evaluating different reagents and concentrations used in the sample extraction solutions and lysis buffers. Two main sample preparation methods, referred to as trichloroacetic acid (TCA)-acetone method and phenol extraction-ammonium acetate/methanol (phenol-NH<sub>4</sub>Ac/methanol) precipitation method, were compared. Four ecotypes of reed plants (*Phragmites communis* Trin.) from the desert region of north-western China were used as experimental materials: (1) swamp reed (SR) which grows in water about 1 m deep; (2) dune reed (DR) which grows on 5 ~ 10 m high sand dunes; (3) heavy salt meadow reed (HSMR) which grows on low-lying salt flats; and (4) light salt meadow reed (LSMR) which grows in the transition area between DR and HSMR growing areas. The optimized phenol-NH<sub>4</sub>Ac/methanol precipitation method consisted of extracting leaf proteins of different ecotypes of reed with water-saturated phenol and then precipitating with a 5-fold volume of 0.1 mol/L NH<sub>4</sub>Ac in methanol, followed by dissolving in the lysis buffer. The optimized protein lysis buffer consisted of 7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% CHAPS, 2% Ampholine(pH 3.5 ~ 10 pH 5 ~ 8 = 1 4) and 65 mmol/L DTT. The prepared protein sample (80 μg) was then separated by 2-DE gel and detected by silver staining method. This improved 2-DE system resulted in a 2-D protein profile of higher resolution and higher protein yields as analyzed by PDQuest software. Good results were also obtained when this 2-DE system was used in 2-D analysis of proteins from other plant materials, such as rice leaves, indicating that it is a suitable 2-DE system for analyzing leaf proteins of different plant species.

**Key words** *Phragmites communis* Trin., different ecotypes, leaf protein preparation, lysis buffer, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE)

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470164), The New Century Excellent Talents of Xiamen University (NCETXMU) and The Natural Science Foundation of Fujian Province of China (C0410001).

\*\*Present address: School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-592-2183151, E-mail: zhuxueyi90@xmu.edu.cn

Received: January 29, 2008 Accepted: March 5, 2008