

甘蓝型油菜根系可溶性蛋白的提取 及双向电泳体系的优化

王振华 王志方 陈水森 徐芳森 石 磊

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/微量元素研究中心, 武汉 430070

摘要 以甘蓝型油菜品种青油 10 号幼苗期根系为材料, 采用三氯乙酸/丙酮沉淀法、酚提法及酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法分别提取甘蓝型油菜根系可溶性蛋白。以牛血清蛋白为标样, 使用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 计算蛋白提取率, 并对所提取的蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及双向电泳 (2-DE) 检测, 所得 2-DE 凝胶图片经 PD Quest 软件分析, 分别检测得到 644、645、669 个蛋白点。对双向电泳条件进行优化, 选择改进的酚提法提取蛋白, 采用 17 cm (pH 5~8) 的 IPG 胶条、蛋白上样量 150 μg 及 10% 的 SDS-PAGE 胶含量, 可以获得分辨率高、重现性高的 2-DE 凝胶图片。

关键词 甘蓝型油菜; 根系; 蛋白质提取; 双向电泳

中图分类号 Q 945.12; S 511 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0219-06

油菜作为一种双子叶植物, 需要较多的硼以维持其正常生长, 但我国的油菜主产地是缺硼较严重的地区, 硼缺乏严重影响了油菜的产量和品质的提高。研究油菜抗低硼胁迫的相关机制, 选育硼高效品种对推动我国油料生产的发展意义重大。笔者所在实验室一直关注不同油菜品种之间硼效率的差异, 通过两步筛选法获得了一批硼高效品种^[1]。徐芳森等^[2]对硼高效品种青油 10 号和硼低效品种 Bakow 进行杂交, 利用 F_2 群体 128 个单株构建遗传连锁图谱, 检测到控制硼高效的 1 个主效 QTL BE1 和 3 个微效 QTL。

蛋白质组学技术的兴起推动了植物抗逆性相关研究的进一步深入, 双向电泳是目前蛋白质组学研究中十分重要的分离技术。蛋白质根据其等电点和相对分子质量大小, 分别在一向等电聚焦和二向 SDS-PAGE 中被分离, 从而得到含有上千个清晰蛋白点的二维图谱^[3]。要获得 1 张分辨率良好的蛋白图谱, 高质量的蛋白样品是其根本保证^[4]。目前国内外关于油菜蛋白质组学研究的相关报道越来越多, 所用材料涉及了叶片^[5]、花蕾^[6]、种子^[7]等。不同器官的蛋白质组成特征是有差异的, 针对材料选择特异的提取方法可以得到更好的分离效果。

根系是植物矿质营养吸收最直接和最重要的器官。刘家友等^[8]研究表明, 硼的供应能够影响豌豆根边缘细胞和根细胞壁的多糖组分, 进而影响细胞壁稳定性。根系蛋白质提取使用的方法中最普遍的是三氯乙酸丙酮沉淀法^[9]和酚提法^[10], 所得结果在蛋白质含量、蛋白点的分布上差异较大, 缺少对比分析。笔者分别采用三氯乙酸丙酮沉淀法、酚提法及酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法, 以甘蓝型油菜品种青油 10 号苗期根系为材料, 提取样品可溶性全蛋白, 对比 3 种方法在蛋白质提取率及单、双向电泳的分离效果, 选择其中一种更适合根系可溶蛋白质的提取方法, 最终建立 1 套适合该材料的双向电泳技术体系, 为油菜及相关作物根系蛋白质的提取及其他蛋白质组学方面的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为甘蓝型油菜品种青油 10 号幼苗期根系。制作方法: 选取颗粒饱满的甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 青油 10 号种子, 经 70% 乙醇表面消毒后用纯水清洗干净, 纯水浸种 24 h, 播种于湿润纱布上, 幼苗 4 d 后移至自制的水培塑料槽

收稿日期: 2010-07-31

基金项目: 教育部高校博士点基金项目 (0090146110006) 和华中农业大学自主科技创新基金项目 (2009SC008)

王振华, 硕士研究生, 研究方向: 植物营养遗传。E-mail: wangzhenhua86@webmail. hzau. edu. cn

通讯作者: 徐芳森, 博士, 教授, 研究方向: 植物营养遗传。E-mail: fangsenxu@mail. hzau. edu. cn

中。培养液采用 Hogland-Arnon 配方, 培养液组分: KNO_3 5.04 mmol/L, KH_2PO_4 1.03 mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.99 mmol/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mmol/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.32 $\mu\text{mol/L}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.77 $\mu\text{mol/L}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9.14 $\mu\text{mol/L}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.37 $\mu\text{mol/L}$ 和 EDTA-Fe 0.07 $\mu\text{mol/L}$ 。光照强度为 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光周期为 16 h/8 h, 温度为 22 °C。每 5 d 更换 1 次培养液, 于第 20 天油菜生长到四叶一心时收获油菜根系, 纯水洗净擦干后称质量, 迅速置于液氮中, 然后转移至 -80 °C 保存备用。

1.2 蛋白提取方法

1) 三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法。参考 Tsugita 等^[11]的方法。称取 0.5 g 根样于液氮预冷的研钵中, 加液氮研磨至粉末状, 将粉末移至 10 mL 离心管中, 加入 10 倍体积的提取液(10% TCA/丙酮, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 0.07% 2-巯基乙醇), 涡旋震荡 1 min, -20 °C 静置 2 h 或过夜。然后在 4 °C 下 35 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。所得沉淀再用预冷的丙酮清洗 3~5 次, -20 °C 下冷冻干燥备用。

2) 酚提法。参考 Hurkman 等^[12]方法并加以改进。具体步骤如下: 取 0.3 g 根样于液氮预冷的研钵中, 加液氮充分研磨, 粉末移至 2 mL 离心管中, 用 80% 丙酮清洗 1 次。沉淀中加入 0.8 mL Tris 饱和酚和 0.8 mL 提取液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.8, 10 mmol/L EDTA, 0.4% 2-巯基乙醇, 0.9 mol/L 蔗糖), 涡旋震荡 1 min, 4 °C 条件下放置 30 min, 期间每 10 min 震荡 1 次, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min。上层酚相移至新离心管中, 加入 5 倍体积的 0.1 mol/L 甲醇/醋酸铵溶液, 涡旋震荡, 置于 -20 °C 下 1 h 或过夜。然后在 4 °C 下, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。沉淀依次用 0.1 mol/L 甲醇/醋酸铵和预冷的 80% 丙酮各清洗 2 次, 最后用预冷的 70% 乙醇清洗 1 次, -20 °C 下冷冻干燥备用。

3) 酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法。参考 Wang 等^[13]的方法。取 0.3 g 根样于液氮预冷的研钵中, 研磨所得粉末转至 2 mL 的离心管中, 加入 1.6 mL 10% TCA/丙酮, 4 °C 下 16 000 r/min 离心 3 min, 弃上清。所得沉淀用 0.1 mol/L 甲醇/醋酸铵溶液及 80% 丙酮各洗 1 次, 室温干燥。加 0.8 mL Tris 饱和酚重悬, 再加入 0.8 mL SDS-PAGE 电泳缓冲液(30% 蔗糖, 2% 十二烷基硫酸钠(SDS), 0.1 mol/L

Tris-HCl, pH 8.0, 5% 2-巯基乙醇)。涡旋震荡 30 s, 16 000 r/min 离心 3 min。移取上层酚相至新的离心管中, 加入 5 倍体积的 0.1 mol/L 甲醇/醋酸铵溶液, -20 °C 放置 30 min。16 000 r/min 离心 5 min, 所得沉淀依次用甲醇/醋酸铵溶液和预冷的 80% 丙酮各洗 1 次, -20 °C 下冷冻干燥备用。

4) 数据处理。称取液氮冻存根系材料 9 份, 按上述 3 种方法提取蛋白, 每种方法设 3 个重复。测定每管蛋白浓度, 计算蛋白总产量, 再除以每管根鲜质量求得蛋白提取率。公式: 蛋白总产量 = 蛋白浓度 × 裂解液体积; 提取率 = 蛋白总产量 / 根鲜质量; 蛋白总产量和提取率为各重复的均值。

1.3 蛋白定量与 SDS-PAGE

将蛋白干粉溶于裂解缓冲液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS)中。蛋白浓度检测采用 Bradford 法^[14]。单向检测使用 Bio-Rad 公司 Mini-PROTEAN 电泳槽, 采用 5% 浓缩胶和 12% 的分离胶。蛋白上样量每点样孔约 10 μg , 考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.4 双向电泳

等电聚焦使用 Bio-Rad 公司线性 IPG 胶条(17 cm, pH 5~8), 150 μg 蛋白溶于 350 μL 水化液, 被动水化上样, 等电聚焦程序参数设置如表 1。①聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 10% 凝胶, 80 V 进样 1 h, 120 V 电泳 9 h。②溴酚蓝到达凝胶底部时结束电泳, 凝胶转至染胶盒中。③用超纯水将凝胶清洗 1 次, 加入固定液(40% 乙醇、10% 醋酸水溶液)置于摇床上 2 h。④加入敏化液(30% 乙醇、6.8% 乙酸钠、0.2% 硫代硫酸钠水溶液), 敏化 30 min 后水洗 3 次, 每次 5 min。⑤加入银染液(0.25% 硝酸银溶液)染色 20 min, 水洗 3 次, 每次 1 min。⑥加入染色液(2.5% 碳酸钠、0.03% 福尔马林水溶液),

表 1 等电聚焦参数设置¹⁾

Table 1 The parameters of isoelectric focusing

步骤 Step	电压/V Voltage	时间/h Time
被动水化 Passive hydration	—	14
第 1 步 Step 1	250	0.5
第 2 步 Step 2	500	0.5
第 3 步 Step 3	1 000	0.5
第 4 步 Step 4	10 000	5
第 5 步 Step 5	10 000	6
第 6 步 Step 6	500	—

1) 聚焦温度为 20 °C, 电流上限为每胶条 50 μA 。The focusing temperature is 20 °C, and the ceiling value of electric current is 50 $\mu\text{A}/\text{gel}$ 。

反复摇动至蛋白点清晰呈现。⑦加入终止液(5%醋酸溶液),终止10 min后凝胶移至超纯水中保存^[17]。凝胶扫描使用Bio-Rad公司GS-800光密度扫描仪,扫描分辨率为300 dpi。

2 结果与分析

2.1 3种提取方法蛋白得率的对比分析

3种提取方法蛋白得率结果如表2所示。经方差分析3种方法的提取率达到显著差异,三氯乙酸/丙酮沉淀法最优,酚提法次之,酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法最差。从相对标准偏差的分析可见,3种方法在重复性的表现上与提取率恰相反。

2.2 单向电泳检测3组蛋白提取物

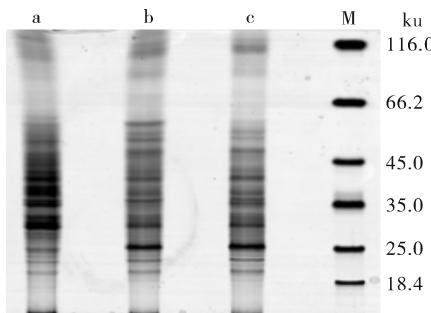
3种方法提取的蛋白在聚丙烯酰胺凝胶电泳后,经考马斯亮蓝R-250染色,结果如图1所示。a(三氯乙酸/丙酮沉淀法)泳道背景较深且高丰度蛋白覆盖了大量低丰度,b(酚提法)泳道不同蛋白含量差异较小,从高分子质量到低分子质量分布均匀,c(酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法)泳道背景较浅,蛋白泳带清晰。从单向电泳检测结果来看,三氯乙酸/丙酮沉淀法虽然涵盖了较多种类的蛋白,但是其丰度极不均衡,背景太深,对于双向电泳分离和凝胶染色十分不利,而另外2种方法在单向分离效果上较为类似,需要进一步进行双向电泳的对比分析。

表2 3种蛋白提取方法得率比较¹⁾

Table 2 Comparison of the protein yields among three protein extraction methods

提取方法	Extraction methods	蛋白总产量/mg	提取率/(mg/g)	相对标准偏差/%	SD
三氯乙酸/丙酮沉淀法	TCA/acetone precipitation	1.80	9.13 a *	9.1	
酚提法	Phenol extraction	0.73	5.27 b	2.4	
酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法	Phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation	0.84	4.40 c	2.2	

1) * 表示5%的显著水平。* shows the significant difference at 5% level.



M: Marker; a: 三氯乙酸/丙酮沉淀法 TCA/acetone precipitation; b: 酚提法 Phenol extraction; c: 酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法 Phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation.

图1 SDS-PAGE检测凝胶图片

Fig. 1 Gel image of SDS-PAGE

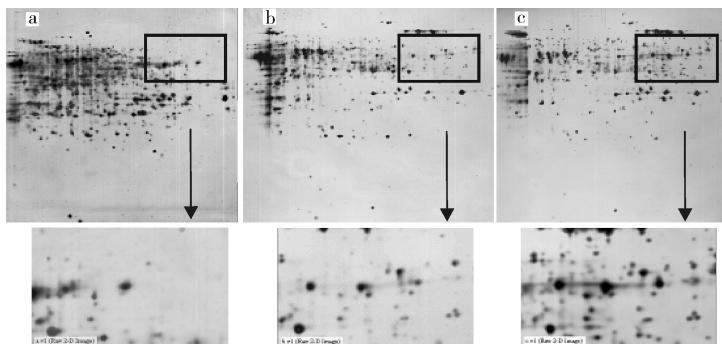
2.3 3组蛋白的2-DE分析

本试验蛋白提取的最终目的是用于双向电泳分离,2-DE胶的蛋白分离效果是方法选择的最重要标准。3组蛋白各上样100 μg,12%的凝胶含量进行双向电泳。如图2所示,a组凝胶中蛋白分离效果一般,有横纵条纹存在,蛋白点边界模糊;b、c2组效果较好,背景干净,蛋白点清晰,而且具有很好的匹配性。使用PD Quest软件进行背景消减,斑点检测,a、b、c3组分别得到644、645、669个蛋白点。c组检测到可辨识点略多,与b组相比多出的点主要集中在碱性端,在酸性端及小分子质量区域分离效

果则较差。统计3张胶中可检测到的蛋白点,a、b、c3组中重复出现的点有270个,a、b2组重复出现的点有354个,b、c2组重复出现的点有479个,a、c2组重复出现的点有346个(图3),由此也验证了不同蛋白提取方法具有偏好性,没有一种方法能够囊括所有蛋白^[17]。

2.4 双向电泳体系的优化

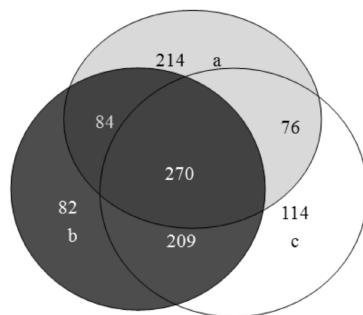
取酚提法得到的蛋白样品,分别以蛋白上样量及凝胶含量对双向分离的效果进行评价。当上样量为100 μg时,可以检测到的蛋白点仅为600个左右,上样量增至120 μg,蛋白点的数量增加(小分子质量区域表现明显),上样量增至150 μg时,可检测到接近1 000个点(图4)。当上样量高于200 μg时,银染背景过深,横纵条纹增多(图片未显示)。合适的蛋白上样量对双向电泳十分重要,太小会导致样品中的低丰度蛋白未达到最低检出限,而太大又造成背景过深。本试验最终选择150 μg的上样量,效果良好。凝胶含量在12%和10%时,蛋白在第二向分离时表现了不同的迁移状况。凝胶孔径大小由单体含量决定,含量越大,胶孔越小,电泳迁移越慢。胶体含量在12%时,蛋白点主要集中在胶的中上部分,纵向分布不均匀,当胶体含量降至10%时,蛋白整体向下迁移,而且小分子蛋白恰好未跑出凝胶。



a:三氯乙酸/丙酮沉淀法 TCA/acetone precipitation; b:酚提法 Phenol extraction; c:酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法 Phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation.

图2 不同提取方法所得双向电泳凝胶图片的比较

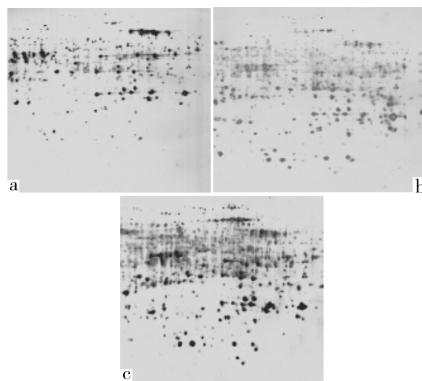
Fig. 2 Comparison of 2-DE gel images from different protein extraction methods



a:三氯乙酸/丙酮沉淀法 TCA/acetone precipitation; b:酚提法 Phenol extraction; c:酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法 Phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation.

图3 3种蛋白提取方法 2-DE 胶检测到蛋白点数量的组间比较

Fig. 3 Inter-group comparison of the protein spots detected on 2-DE gels from three extraction methods



a:上样量 100 μ g, 凝胶含量 12% Loading volume 100 μ g, 12% polyacrylamide gels; b:上样量 120 μ g, 凝胶含量 10% Loading volume 120 μ g, 10% polyacrylamide gels; c:上样量 150 μ g, 凝胶含量 10% Loading volume 150 μ g, 10% polyacrylamide gels.

图4 不同上样量及凝胶含量对凝胶图像效果的影响

Fig. 4 Effect of different sample volume and the gel concentration on resolution

对比可知 10% 胶体含量对于该样品较为合适 (图 4-a, b)。

通过对三氯乙酸/丙酮沉淀法、酚提法和酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法 3 种蛋白提取方法在蛋白提取率、单双向电泳以及可操作性上的差异进行了比较分析, 最终确定改良的酚提法最适合于油菜根系可溶性蛋白的提取, 进一步通过电泳条件的对比优化, 确定双向电泳时蛋白上样量 150 μ g、凝胶含量 10% 为获得重现性良好的 2-DE 凝胶图片的最优电泳条件。通过该体系获得了重现性良好的 2-DE 胶, 2 张胶上可匹配点达 1 000 个左右(图 5), 能够满足差异蛋白质组学研究的要求。

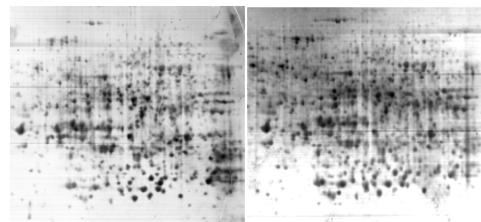


图5 具有良好重现性的 2-DE 胶
Fig. 5 2-DE gel with high reproducibility

3 讨 论

三氯乙酸/丙酮沉淀法是进行蛋白质组学分析最常用的提取方法, 提取过程中损失较少, 具有广泛的适用性, 在动植物组织^[17-18] 以及微生物材料^[19] 中都取得了很好的分离效果。但是沉淀所得大量蛋白粗提物, 需要强力的裂解缓冲液及机械辅助, 才能抽提到较纯的蛋白, 因此蛋白的溶解和纯化是该方法应用的瓶颈^[20]。本试验采用多次沉淀进行纯化, 机械震荡辅助溶解, 这些操作产生的随机误差较大, 导致提取率的相对标准偏差很大; 该方法的另一个问

题在于,高丰度蛋白的比例过高,往往会覆盖住一些含量较低的蛋白。

酚提法是一种非常适合植物材料尤其是难提取材料的蛋白提取方法。植物细胞由于细胞壁和众多胞内次生代谢物质的存在,给蛋白提取纯化带来了巨大挑战。酚提法先采用两相萃取将蛋白溶于上清液,然后再沉淀,与三氯乙酸/丙酮沉淀法的直接沉淀相比,避免了大量组织残渣和水溶性杂质的污染。该方法所得蛋白杂质较少,适合于进行双向电泳试验。笔者采用 Hurkman 等^[12]的方法加以改进,提高离心力,优化了沉淀、清洗步骤,获得了较好的分离效果。

酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法相当于将三氯乙酸/丙酮沉淀法与酚提法串联整合使用,其优势也在于能够很好地去除杂质,多用于顽固难提的材料,缺点则是步骤多耗时长。这种方法自报道以来已经被广为采用,蛋白提取率及纯度都有保证。

Isaacson 等^[21]认为不同的提取方法是互补关系,不存在绝对的优劣,在保证杂质去除率的基础上应该尽量减少操作步骤,综合考虑蛋白提取的难易、单双向电泳分离的优劣进行方法选择。三氯乙酸/丙酮沉淀法提取的蛋白量最大,但是其单双向电泳分离效果均没有优势,故首先被排除。酚提法在单双向电泳检测的效果上与酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法极为相似,2-DE 胶所涵盖的点中共有的蛋白点占 57.4%,酚提法特异的点占 19.9%,酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法特异的点占 22.7%。在最初的对比试验中,酚提法在 2-DE 胶上检测的点略少,但是它的蛋白提取率显著高于酚提取-甲醇/醋酸铵沉淀法,因此具有较大的提升空间。考虑最少操作步骤原则,选择酚提法并加以改进,优化后通过双向电泳获得的可辨识点显著增多,最终得到了 1 个省时高效的提取方法。

双向电泳第一向等电聚焦(IEF)与第二向 SDS-PAGE,分别影响蛋白点在凝胶横向和纵向上的分离。等电聚焦结果的优劣主要取决于样品的处理、上样方法及上样量。蛋白提取方法对样品质量影响最大。使用优化的酚提法提取蛋白,所得样品盐及其他杂质含量低,等电聚焦过程升压顺利,每次都能快速达到预定电压 10 000 V。目前上样方法主要有 3 种,即主动水化、被动水化和上样杯法。上样杯法一般用于较大上样量,不适用于本试验。主动水化法直接在聚焦盘以低电压促进上样,操作简便最

省时,但是未被胶条吸收的样品会导致图像拖尾。为避免这种情况可在水化盘中完成胶条水化溶胀,再转至聚焦盘聚焦,即本试验所使用的被动水化。影响第二向 SDS-PAGE 的因素有很多,比如平衡时间的控制,IPG 胶条与凝胶的接触是否良好、有无气泡、凝胶含量的选择等。平衡时间应严格控制在 15 min 左右,时间短于 10 min,不能充分完成还原甲基化,会导致横纹增多;若长于 20 min,蛋白损失量增大而且扩散严重,同样不利于蛋白分离。IPG 胶条 PAGE 胶良好接触首先要求凝胶胶面要平,试验中发现自底向上式的灌胶槽所制凝胶上表面更平滑。

参 考 文 献

- [1] 楚海燕,喻敏,王运华,等.甘蓝型油菜品种硼利用效率的差异研究[J].华中农业大学学报,1999,18(2):56-63.
- [2] XU F S, WANG Y H, MENG J. Mapping boron efficiency gene(s) in *Brassica napus* using RFLP and AFLP markers [J]. Plant Breeding, 2001, 120(4): 319-324.
- [3] GYGI S P, CORTHALS G L, ZHANG Y, et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9390-9395.
- [4] XIE H, PAN S, LIU S, et al. A novel method of protein extraction from perennial *Bupleurum* root for 2-DE [J]. Electrophoresis, 2007, 28(5): 871-875.
- [5] 张蕊,刘海衡,胡胜武,等.油菜黄化突变体蛋白质组分析:两种蛋白质提取方法比较[J].生物化学与生物物理进展,2010,37(9):1025-1032.
- [6] 刘海衡,胡胜武,刘胜毅,等.油菜不同器官高质量总蛋白提取方法和双向电泳体系的优化[J].中国油料作物学报,2009,31(4):426-433.
- [7] HAJDUCH M, CASTEEL J E, HURRELMEYER K E, et al. Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus* developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis [J]. Plant Physiol, 2006, 141(1): 32-46.
- [8] 刘家友,喻敏,刘丽屏,等.硼对豌豆根边缘细胞和根细胞壁多糖组分含量的影响[J].华中农业大学学报,2009,28(3):311-315.
- [9] VARTANIAN N, DAMERVAL C, DE VIENNE D. Drought-induced changes in protein patterns of *Brassica napus* var. *oleifera* roots [J]. Plant Physiol, 1987, 84(4): 989-992.
- [10] ALVAREZ S, BERLA B M, SHEFFIELD J, et al. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches [J]. Proteomics, 2009, 9(9): 2419-2431.
- [11] TSUGITA A, KAWAKAMI T, UCHIYAMA Y, et al. Separation and characterization of rice proteins [J]. Electrophoresis, 1994, 15(5): 708-720.

- [12] HURKMAN W J, TANAKA C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Plant Physiol*, 1986, 81(3): 802-806.
- [13] WANG W, VIGNANI R, SCALI M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27 (13): 2782-2786.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [15] YAN J X, WAIT R, BERKELMAN T, 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 (17): 3666-3672.
- [16] SARAVANAN R S, ROSE J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. *Anal Biochem*, 2004, 322(2): 252-258.
- [17] WANG X, CHANG L, WANG G C, et al. Protein extraction from the earthworm *Eisenia fetida* for 2-DE [J]. *Proteomics*, 2010, 10(5): 1095-1099.
- [18] VERONIQUE S, CATHERINE B, MICHEL C. Use of two-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants [J]. *Planta*, 1994, 192(4): 557-566.
- [19] GRASSL J, WESTBROOK J A, ROBINSON A, et al. Preserving the yeast proteome from sample degradation [J]. *Proteomics*, 2009, 9(20): 4616-4626.
- [20] CARPENTIERS 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(10): 2497-2507.
- [21] ISAACSON T, DAMASCENO C M, SARAVANAN R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 769-774.

Comparison of protein extraction methods from *Brassica napus* roots and optimization of two-dimensional electrophoresis

WANG Zhen-hua WANG Zhi-fang CHEN Shui-sen XU Fang-sen SHI Lei

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Microelement Research Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The aim of the study is to establish a procedure on root protein extraction applied for proteomics analysis in *Brassica napus* seedlings. Three methods (TCA/acetone, phenol extraction and phenol extraction-methanol/ammonium acetate precipitation) for protein extraction were assessed with *Brassica napus* cultivar “Qingyou 10” root at seedling stage as experiment materials. The protein concentration was determined using Bradford protein assay with BSA as a standard, and the protein samples were separated by SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis (2-DE) in turn. Then, the 2-DE gel images were analyzed by PD quest, detecting 644, 645, 669 clear spots, respectively. Evaluating comprehensively the efficiency of protein extraction among the three methods and optimal 2-DE condition, modified phenol extraction, along with the 2-DE parameters, 17 cm (pH 5-8) IPG strip, 150 μ g protein loading volume and 10% PAGE gel concentration, were chosen to obtain high reproducible and clear 2-DE gel image, which could satisfy the demand for protein isolation and identification in proteomics study.

Key words *Brassica napus*; roots; protein extraction; two-dimensional electrophoresis

(责任编辑:陆文昌)