

坛紫菜叶状体蛋白质双向电泳样品制备方法的比较

杭楠, 谢潮添, 陈昌生*, 纪德华, 徐燕

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 蛋白质样品的制备是双向电泳分析的关键。为探索适用于坛紫菜叶状体蛋白质双向电泳样品的制备方法, 实验对3种常用植物蛋白质分离方法进行了优化和改进, 并分别同3种蛋白质裂解液联用, 比较了9种方法的总蛋白质得率及双向电泳图谱效果。结果发现, 采用三氯乙酸/丙酮沉淀法与裂解液 C(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 2% TritonX-100, 2% IPG Buffer pH 3~10, 65 mmol/L DTT) 联用的方法, 坛紫菜叶状体的蛋白质得率最高, 且双向电泳图谱显示此法获得的蛋白质点数最多, 蛋白点形状规则, 水平和垂直拖尾情况较轻, 图像清晰。实验结果还发现, 在进行双向电泳分析时, 采用 pH 4~7 的胶条可以使坛紫菜叶状体蛋白质得到更为有效的分离。

关键词: 坛紫菜; 蛋白质组; 双向电泳; 样品制备

中图分类号: S 917

文献标志码: A

伴随着基因组研究的不断深入, 人们逐渐发现单纯从基因组水平并不能完全揭示生命活动的规律, 只有深入研究基因组的表达产物——蛋白质组, 才能更直接地了解生命活动的本质。双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 技术以其具有的高分辨率和高灵敏性, 已成为蛋白质组学研究三大核心技术之一^[1]。在应用 2-DE 技术分离蛋白质时, 样品制备是其成功的关键, 2-DE 图谱的点数、蛋白质的溶解、实验的重复性在很大程度上都取决于样品的制备^[2]。但由于植物组织中含有的色素、多糖、酚类及其他次生代谢产物都会严重干扰蛋白样品的分离与纯化, 而且每种植物或组织所含有的成分也不尽相同, 迄今为止没有一种样品制备方法可以适用于所有样品^[3]。因此在进行植物蛋白质组学研究时, 必须根据不同的植物或组织, 优化和选择样品的制备方法。

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*) 原产于福建, 是我国特有的暖温带性种类, 其产量占全国紫菜年总产量的 80% 以上, 是闽浙沿海水产养殖的主要对象^[4]。近年来, 围绕坛紫菜的种质改良, 已经开展了一系列的基因组学研究, 取得了不少成

果^[5-10], 但对于坛紫菜的蛋白质组学研究, 目前很少见报导。已有的关于藻类蛋白质组的研究, 也主要集中在海带^[11-14]和模式单细胞种类, 如微囊藻, 鱼腥藻和集胞藻等^[15-16]。

由于坛紫菜叶状体含有的大量色素、多糖和多酚等次生代谢物质, 在蛋白质沉淀过程中很容易与蛋白质发生共沉淀, 使用各种有机溶剂萃取也难以完全除去, 严重影响了蛋白质的提取率和完整性, 以及样品中蛋白质的溶解, 并且使蛋白质样品溶液很粘稠, 直接影响了蛋白质样品的质量, 难以得到理想的电泳结果。因此, 本研究对 3 种常用的植物组织蛋白质沉淀方法进行优化和改进, 并分别同 3 种蛋白质裂解液联用, 以期建立一套适用于坛紫菜叶状体总蛋白质提取的方法, 为后续坛紫菜的蛋白质组学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

坛紫菜叶状体材料取自福建省坛紫菜种质资源库培养的纯系 Z-26, 大小为(10 ± 2) cm。培养条件: 温度(21 ± 1) °C, 光照强度 1 500 ~ 2 000

收稿日期: 2011-04-30 修回日期: 2011-05-20

资助项目: 国家自然科学基金项目(40806065); 海洋公益性行业科研专项(201105008); 公益性行业(农业)科研专项(200903030); 福建省杰出青年基金项目(2010J06016); 福建省教育厅新世纪优秀人才项目(JA10186)

通讯作者: 陈昌生, E-mail: cschen@jmu.edu.cn

lx,光照周期为 12 h:12 h(光照:黑暗),充气,每 3 天更换一次培养液。

1.2 主要药品及仪器

丙酮、甲醇、乙醇、甲醛、乙酸、硫代硫酸钠、硝酸银、碳酸钠、EDTA、三氯乙酸(TCA)、85%磷酸、NaCl、正丁醇、甘油等均购自国药集团化学试剂有限公司;Tris 饱和酚(pH > 7.5)、DTT 购自北京百泰克生物技术有限公司;β-巯基乙醇、CHAPS、低熔点琼脂糖购自 AMRESCO 公司;甘氨酸、Tris-base、Tris-HCl、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、TEMED、SDS、尿素(Urea)、硫脲(Thiourea)、过硫酸铵、溴酚蓝、甲叉双丙烯酰胺购自上海捷瑞生物工程有限公司;丙烯酰胺、碘乙酰胺购自 sigma 公司;IPG-buffer(pH 3~10)、IPG 线性干胶条(pH 3~10 和 pH 4~7)购自 GE Healthcare 公司。

双向电泳系统 Ettan 购自 GE Healthcare 公司;光照培养箱 PYX-250G-A 购自广东科力实验仪器有限公司,高速冷冻离心机 3K18 购自 Sigma 公司;紫外分光光度计 Cary 50 购自美国瓦里安有限公司,电子天平 BS323S 购自北京赛多利斯有限公司。

1.3 实验方法

蛋白质沉淀 (1) 三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA/ACE 法):参考 SARAVANAN 等^[17]的方法,稍做修改。称取 0.1 g 新鲜藻体于液氮中充分研磨成粉,加入 20 mg PVPP 和 -20 °C 预冷的 TCA/ACE 溶液 3 mL(含 0.07% β-巯基乙醇和 10% 的质量分数 TCA),在 -20 °C 的条件下沉淀 2 h 以上,然后离心(4 °C,14 000 × g)10 min,弃上清。加入等体积的冰浴丙酮(含 0.07% 的 β-巯基乙醇),混匀后离心(4 °C,14 000 × g)10 min,反复此步骤直至上清液无色。最后冷冻干燥沉淀,-20 °C 保存备用。

(2) 尿素/硫脲沉淀法(UREA/THI 法):参考王玉琪等^[18]的方法,稍做修改。称取 0.1 g 新鲜藻体于液氮中充分研磨成粉,加入 20 mg PVPP 和 2 mL 蛋白提取液(含 50 mmol/L Tris-HCl,7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,1% TritonX-100,2% β-巯基乙醇),振荡混匀 1 min 后离心(4 °C,12 000 × g)15 min,将上清液转入另一干净的离心管,加入 4 倍体积 -20 °C 预冷丙酮,充分振荡 30 s,-20 °C 沉降过夜,离心(4 °C,12 000 × g)15

min,弃上清。沉淀分别用冷丙酮和 80% 冷丙酮清洗 1 次,每次均放于 -20 °C 沉淀 30 min 后离心(4 °C,14 000 × g)10 min。最终所得的沉淀冷冻干燥后,于 -20 °C 保存备用。

(3) 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法(酚法):参考 WANG 等^[19]的方法,稍做修改。方法(1)中得到的最终沉淀,按照每 100 毫克沉淀干粉加入 0.5~0.8 mL 提取液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,2% TritonX-100,1 mmol/L EDTA,10 mmol/L DTT,30% 甘油)和等体积的 Tris 饱和酚(pH > 7.5),充分振荡后,4 °C 下放置 30 min,离心(4 °C,12 000 × g)15 min,然后将酚相转至另一干净离心管,加入 5 倍体积 -20 °C 预冷的含 0.1 mol/L 醋酸铵的甲醇溶液,充分振荡 30 s,-20 °C 沉降过夜。离心(4 °C,14 000 × g)10 min,弃上清。沉淀分别用含 0.1 mol/L 醋酸铵的甲醇溶液、冷丙酮和 80% 冷丙酮清洗各 1 次,最终沉淀冷冻干燥后,于 -20 °C 保存备用。

蛋白质溶解 将上述 3 种蛋白质沉淀方法得到蛋白质沉淀后,按 25 μg/mL 的质量浓度分别用下列 3 种蛋白裂解液进行充分裂解。(1) 蛋白裂解液 A:7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,40 mmol/L Tris-base,1% IPG Buffer(pH 3~10),65 mmol/L DTT;(2) 蛋白裂解液 B:8 mol/L 尿素,4% CHAPS,40 mmol/L Tris-base,2% IPG Buffer(pH 3~10),65 mmol/L DTT;(3) 蛋白裂解液 C:7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,2% CHAPS,2% TritonX-100,2% IPG Buffer(pH 3~10),65 mmol/L DTT。

充分振荡后,室温放置 1 h,期间反复振荡,使之充分溶解,13 000 × g 室温离心 15 min,取上清即为蛋白溶液。

蛋白浓度的测定 将上述蛋白溶液按照 BRADFORD^[20]的方法进行定量。用 100 μg/mL 的 BSA(牛血清白蛋白)做为标准蛋白,用含 0.01% (质量分数)考马斯亮蓝 G-250,4.7% (质量分数)乙醇,8.5% (质量分数)H₃PO₄的考马斯亮蓝溶液染色,使用紫外分光光度计以 595 nm 波长测定 OD 值,绘制标准曲线。根据标准曲线公式计算样品蛋白质浓度。

双向电泳 按照 GE 公司的双向电泳操作说明书,稍作修改后进行,具体步骤如下:取含 80 μg 蛋白质的上述蛋白质提取液,用上样水化缓冲

液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2% (质量分数) IPG Buffer (pH 3~10), 0.001% 溴酚蓝) 补充体积至 250 μ L 后, 将 13 cm, pH 3~10 的固相 pH 梯度线性胶条覆盖于该蛋白溶液上方, 被动水化 12 h, 然后进行等电聚焦(20 $^{\circ}$ C, 100 V, 1 h; 200 V, 1 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 8 000 V, 2.5 h; 8 000 V, 24 000 Vh; 500 V, 12 h)。聚焦结束后, 分别用含 2% DTT 和 2.5% 碘乙酰胺的胶条平衡缓冲液[6 mol/L 尿素, 2% SDS, 75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 29.3% 甘油] 平衡胶条各 15 min。平衡结束后, 将胶条紧贴在 12% 的聚丙烯酰胺凝胶上方, 进行第二向电泳(恒流 30 mA, 3~3.5 h)。

银染及图像扫描分析 电泳结束后采用改进的银染方法对凝胶进行染色, 具体步骤如下:

(1) 将 SDS-PAGE 胶放入固定液(50% 甲醇, 12% 乙酸, 0.0175% 甲醛) 中固定 2 h; (2) 35% 酒精漂洗 3 次, 每次 20 min; (3) 用含 0.05% 硫代硫酸钠的敏化液敏化 3 min; (4) 双蒸水漂洗 3 次, 每次 10 s; (5) 银染液(0.2% 硝酸银, 0.027% 甲醛) 染色 20 min; (6) 双蒸水漂洗 2 次, 每次 10 s; (7) 显色液(6% 碳酸钠, 0.001% 硫代硫酸钠, 0.0175% 甲醛) 中显色约 3 min; (8) 迅速转入 3.75% EDTA 终止液中, 终止显色 15 min; (9) 双蒸水漂洗 3 次, 每次 5 min。

染色完成后, 用 GE 公司的 Image Scanner 扫描仪扫描图像, 所获图像用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 分析软件进行分析。

2 结果

2.1 不同沉淀方法分离的坛紫菜叶状体总蛋白质得率比较

坛紫菜叶状体中富含多糖、多酚等次生代谢物质, 这些物质会严重影响第一向的等电聚焦。为了获得高质量, 可用于 2-DE 分析的坛紫菜蛋白质样品, 本实验改进和优化了 3 种常用的植物蛋白质沉淀方法。从蛋白质得率来看(图 1), 不同沉淀方法的蛋白质得率差异显著。TCA/ACE 法所得的蛋白质沉淀为紫红色, 得率最高, 且沉淀易于分散溶解; UREA/THI 法所得的蛋白质沉淀也为紫红色, 但得率最低; 而酚法所得的蛋白质沉淀呈胶状, 不易分散溶解, 得率居中。

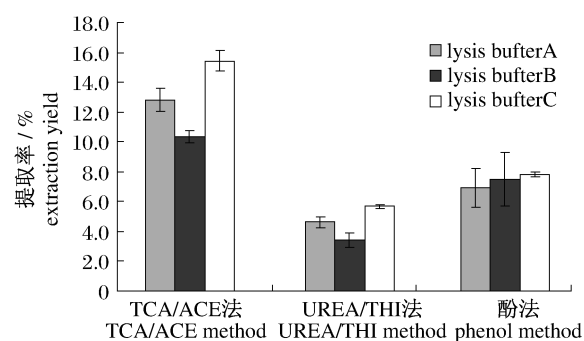


图 1 不同方法分离的坛紫菜叶状体蛋白质得率比较

Fig. 1 The yield of *P. haitanensis* thalli protein extracted by difference methods

2.2 不同裂解方法坛紫菜叶状体总蛋白质得率比较

为完成聚焦良好的第一向等电聚焦, 蛋白必须完全溶解和解聚, 因此样品裂解液必须包含一定的组分以确保在进行第一向等电聚焦之前的完全溶解和变性, 不同的裂解方法对蛋白质样品的影响也很大。本实验中选用的 3 种不同的裂解液对蛋白质沉淀的溶解效果差异显著(图 1)。裂解液 A 与裂解液 C 中尿素与硫脲的结合使蛋白质的溶解性明显优于裂解液 B 单纯使用尿素, 而裂解液 C 中由于加入了非离子去污剂 TritonX-100, 更加增强了裂解能力, 裂解效果最好。

2.3 不同方法获得的双向电泳图像比较

分别采用 3 种蛋白沉淀方法与 3 种裂解液联合使用所得到的 9 种蛋白质样品, 以长度为 13 cm, pH 3~10 线性干胶条进行等电聚焦, 12% SDS-PAGE 进行第二向分离, 银染后结果如图 2 所示, 右上角数字为采用 Image Master 2D 软件统计所得的图谱总蛋白点数。由图中可知, 采用 UREA/THI 法分离的蛋白质样品跑出来的图谱(图 2-d, e, f) 和使用裂解液 B 所得蛋白质的电泳图谱(图 2-a, b, c) 的蛋白点均显著少于其它方法所得图谱的蛋白点数, 并且聚焦不清晰。图 2-a, c, g, i 总蛋白点数都超过了 1 000, 但是酚法步骤烦琐, 提取时间长, 蛋白图谱(图 2-g, i) 有轻微的横向拖尾的现象; 而 TCA/ACE 沉淀法步骤相对简单, 提取时间短, 减少了蛋白在提取过程中的损失, 所得的蛋白图谱(图 2-a, c) 蛋白质点清晰, 分辨率高, 分布均匀, 分离效果较好, 其中尤以 TCA/ACE 法与

裂解液 C 联用所得的蛋白图谱(图 2-c)最为清晰,蛋白质点聚焦最好,基本没有水平和垂直拖尾现象,且蛋白点数最多。

2.4 不同 pH 梯度胶条电泳图谱比较

由图 2 和表 1 可以看出,不同方法分离的坛紫菜叶状体蛋白质 2-DE 图谱中,平均有 86.6%

的蛋白点都分布在 pH 4~7 的范围内。故本实验进一步采用长度为 13 cm, pH 4~7 的线性干胶条对 TCA/ACE 法与裂解液 C 联用制备的蛋白质样品重新进行 2-DE 分析,结果电泳图谱上出现了 1 323 个蛋白质点,且蛋白质点清晰,没有横向或纵向拖尾现象(图 3)。

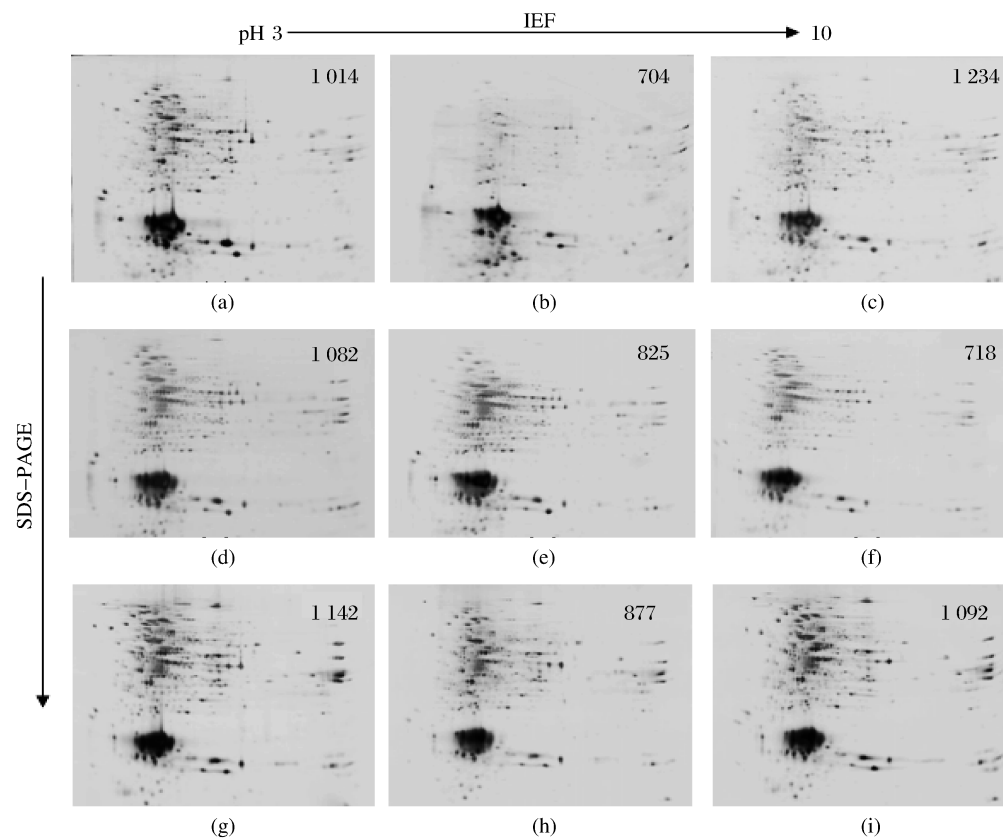


图 2 不同方法分离的坛紫菜叶状体蛋白质 2-DE 图谱

(a) TCA/ACE 法 + 裂解液 A; (b) TCA/ACE 法 + 裂解液 B; (c) TCA/ACE 法 + 裂解液 C; (d) UREA/THI 法 + 裂解液 A; (e) UREA/THI 法 + 裂解液 B; (f) UREA/THI 法 + 裂解液 C; (g) 酚法 + 裂解液 A; (h) 酚法 + 裂解液 B; (i) 酚法 + 裂解液 C。右上角数字为各图谱的总蛋白点数。

Fig. 2 2-DE map of *P. haitanensis* thalli protein extracted by difference methods

(a) TCA/ACE method with lysis buffer A; (b) TCA/ACE method with lysis buffer B; (c) TCA/ACE method with lysis buffer C; (d) UREA/THI method with lysis buffer A; (e) UREA/THI method with lysis buffer B; (f) UREA/THI method with lysis buffer C; (g) Phenol method with lysis buffer A; (h) Phenol method with lysis buffer B; (i) Phenol method with lysis buffer C. The number in top right corner was the number of protein spots in each map.

表 1 pH 4~7 范围内的蛋白质点数及比率

Tab. 1 The number and rate of protein spots between pH 4-7

	1-A	1-B	1-C	2-A	2-B	2-C	3-A	3-B	3-C	平均 average
pH 3~10	1 014	704	1 234	1 082	825	718	1 142	877	1 092	965
pH 4~7	901	538	1 034	936	738	656	991	772	960	836
比率/% rate	88.9	76.4	83.8	86.5	89.5	91.4	86.8	88.0	87.9	86.6

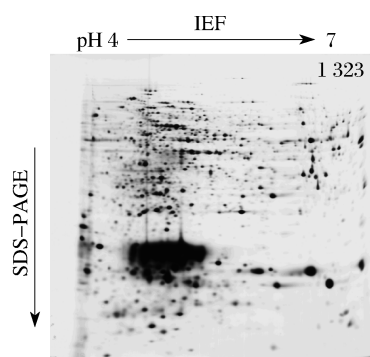


图3 TCA/ACE法与裂解液C联用制备的坛紫菜蛋白质样品采用pH 4~7胶条的2-DE图谱
 右上角数字为该图谱的总蛋白点数。

Fig. 3 2-DE map in IPG strips (pH 4-7) of *P. haitanensis* thalli protein extracted by TCA/ACE method with lysis buffer C

The number on top right corner was the number of protein spots.

3 讨论

3.1 坛紫菜叶状体蛋白质不同提取方法的比较分析

一个完整的双向电泳实验涉及从蛋白样品的制备到染色分析等一系列复杂的过程,其中蛋白样品的制备是双向电泳最为关键的环节,蛋白样品的纯度和完整性直接决定双向电泳结果的准确性和重复性^[1]。对不同来源的蛋白质进行样品制备时,由于不同物种、不同器官或组织所含的化学组分不同,其适用的方法也不同,必须针对所研究的实验材料,摸索最佳的样品制备方法^[3]。本实验比较了3种常用植物蛋白提取方法分离坛紫菜叶状体总蛋白的效果,以其筛选出适用于坛紫菜双向电泳分析的最佳蛋白提取方法。

TCA/ACE法是基于蛋白在酸性或疏水条件下变性使蛋白浓缩并去除污染物的原理,是目前提取植物蛋白的最常用方法之一^[1]。该方法具有操作步骤简单,用时短,可以有效抑制蛋白酶对蛋白质的水解作用和其他化学修饰的特点,但此法获得的蛋白质沉淀很难完全溶解^[1]。在本实验中,分离得到的坛紫菜叶状体总蛋白并没有出现难溶的现象,且蛋白得率高(图1),2-DE图谱分辨率高,蛋白点形状规则(图2),多次实验结果也表明此法重复性好,是适用于坛紫菜叶状体蛋白质提取的最佳方法。

UREA/THI法是直接用裂解液提取蛋白再

沉淀的一种方法,具有防止样品蛋白丢失,保证样品蛋白完整度的特点。但在抽提过程中会带入过多的盐离子,从而影响2-DE图谱的分离结果^[18]。本实验中,该法分离得到的坛紫菜叶状体总蛋白得率最低(图1),所获得的2-DE图谱中,蛋白质点数也显著少于其它方法,且有明显拖尾,背景噪音大等现象(图2),这可能与该法对坛紫菜叶状体蛋白裂解不完全,且抽提过程带入过多的盐离子相关,因此不适用于坛紫菜叶状体蛋白的分离。

酚法是利用Tris-饱和酚的特性,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,最后,酚相中的蛋白质通过含乙酸铵的甲醇溶液沉淀,并用冷丙酮多次清洗而获得。大量实验结果表明该法在处理含有大量干扰物质的顽拗植物组织时能得到理想的结果^[1]。但本实验结果却发现,采用该法分离得到的坛紫菜叶状体蛋白样品呈胶状,不易分散溶解,说明样品中仍然含有大量难溶解的杂质,因此该法也不适用于坛紫菜叶状体蛋白的分离。

3.2 不同裂解液比较分析

在双向电泳实验中分离获得样品的总蛋白后,还需对所获得的蛋白质样品进行变性、解聚和增溶等处理,以破坏蛋白质分子间的相互作用,使蛋白质处于变性、解聚的单分子状态,从而能够在电泳中很好地分离。因此要获得高质量的2-DE图谱,除了对蛋白质进行有效的分离外,还需筛选出一套适用的裂解液配方,以实现蛋白质的有效溶解。本实验对3种裂解液对坛紫菜叶状体总蛋白的溶解性进行了比较分析,结果发现,含有尿素、硫脲、CHAPS和TritonX-100的裂解液C的蛋白得率显著高于其他两种裂解液(图1)。这可能是由于高浓度的尿素和硫脲联用,强烈破坏了蛋白分子间形成的氢键,从而防止由氢键引起的蛋白质聚集及蛋白迁移中二级结构的形成。同时兼性离子去污剂CHAPS和非离子去污剂TritonX-100也可以有效减少脂类污染,破坏蛋白之间的疏水性作用,增加疏水性蛋白的溶解^[21]。加入低浓度的IPG Buffer,也可以通过电荷与电荷之间的相互作用减少蛋白聚合,从而增强其溶解性。此外,还原剂DTT能帮助断裂蛋白质的二硫键,使待分析的蛋白分离成为单一的蛋白亚基,处于一种还原状态,使变性的蛋白质展开更完全,溶解更彻底。

3.3 不同 pH 范围胶条的选择

在双向电泳实验中,不同 pH 范围胶条的选择也是有效分离蛋白质的关键,具体实验中应根据实验对象和实验目的的不同选择合适 pH 范围的胶条。本实验采用宽 pH 范围的胶条(pH 3 ~ 10)进行坛紫菜叶状体蛋白质的分离时发现大部分蛋白质点都分布在 pH 4 ~ 7 的范围内,平均达 86.6%。GIANAZZA 等^[22]对 800 多种蛋白质的 pI 进行统计,结果发现大部分蛋白质的 pI 介于 pH 4 ~ 7,此外白书农等^[23]的研究结果也表明植物功能性蛋白质的等电点通常分布于 pH 4 ~ 6 的区域内。因此,本实验进一步采用窄 pH 范围的胶条(pH 4 ~ 7)分离坛紫菜叶状体总蛋白,结果发现图谱中出现了更多的蛋白质点,分离效果有了明显提高,何瑞锋等^[24]在水稻叶片蛋白质的分离中也得到了相似结果。由此说明采用窄 pH 范围的胶条可以使原来在宽 pH 范围胶条中被互相掩盖的蛋白质点也得到有效的分离。

综上所述,适用于坛紫菜叶状体蛋白质 2-DE 分析的最佳样品制备方法为 TCA/ACE 法与裂解液 C 联用的实验方案。同时采用窄 pH 范围的胶条(pH 4 ~ 7)可以使该范围内的蛋白质得到更为有效的分离。但需要指出的是,本实验所得的电泳图谱中,高丰度蛋白都没有得到有效去除,在 23 ku 左右均出现表达量很高的蛋白质斑点,这是后续工作中亟待解决的重要问题之一。

参考文献:

- [1] 陈晶瑜,郭宝峰,何付丽,等. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较[J]. 中国农学通报,2010,26(23):97-100.
- [2] 翁瑜,曾群力,姜槐,等. 双向凝胶电泳比较三种常用蛋白质提取方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2005,21(5):691-694.
- [3] 郝强,葛秀秀,张睿鹏,等. 北方常绿阔叶木本植物叶片蛋白质双向电泳技术体系优化[J]. 西北植物学报,2010,30(9):1906-1912.
- [4] 张元,谢潮添,陈昌生,等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应[J]. 水产学报,2011,35(3):379-386.
- [5] FAN X L, FANG Y J, HU S N, *et al.* Generation and analysis of 5 318 expressed sequence tags from the filamentous sporophyte of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2007, 43(6):1287-1294.
- [6] XIE C T, CHEN C S, JI D H, *et al.* Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(3):367-374.
- [7] XIE C T, CHEN C S, XU Y, *et al.* Construction of a genetic linkage map for *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on sequence-related amplified polymorphism and simple sequence repeat markers [J]. *Journal of Phycology*, 2010, 46(4):780-787.
- [8] 余大为,张海波,王月,等. 坛紫菜叶绿体 psal 基因片段的序列分析[J]. 水产科学,2007,26(5):289-291.
- [9] 张晓龙,杨锐,仪茜茜,等. 坛紫菜胞质型抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆及特征分析[J]. 海洋学报,2010,32(5):165-174.
- [10] 左正宏,李博文,聂鑫怡,等. 坛紫菜别藻蓝蛋白 α 亚基基因的原核表达与鉴定[J]. 水生生物学报,2006,30(3):323-326.
- [11] YOTSUKURA N, NAGAI K, KIMURA H, *et al.* Seasonal changes in proteomic profiles of Japanese kelp *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(4):443-451.
- [12] KIM E Y, KIM D G, KIM Y R, *et al.* An improved method of protein isolation and proteome analysis with *Saccharina japonica* (Laminariales) incubated under different pH conditions [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(1):123-130.
- [13] LORETTO C, ALEJANDRA M, FANNY G, *et al.* Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96(2):85-89.
- [14] LORETTO C, ANDRE R, GERALDINE D, *et al.* Two-Dimensional gel electrophoresis analysis of brown algal protein extracts [J]. *Journal of Phycology*, 2008, 44(5):1315-1321.
- [15] 高政权,王广策,曾呈奎. 蛋白质组学的研究概况及其在海洋生物学中的应用[J]. 海洋与湖沼,2003,34(3):334-344.
- [16] 钱方,朱斌琳,章军. 蛋白质组学研究在赤潮藻研究中的应用[J]. 海洋科学,2006,30(5):83-86.
- [17] SARAVANAN R S, ROSE J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant

- tissues[J]. *Proteomics*, 2004, 4(9): 2522 – 2532.
- [18] 王玉琪, 彭新湘. 适用于水稻叶片蛋白质组分析的双向电泳技术[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, 32(3): 252 – 256.
- [19] 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.
- [20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1 – 2): 248 – 254.
- [21] 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 48 – 57.
- [22] GIANAZZA E, ARTONI E, RIGHETTI P G. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients in presence of urea and neutral detergents [J]. *Electrophoresis*, 1983, 4(5): 321 – 326.
- [23] 白书龙, 谭克辉. 湖北光敏核不育水稻农垦 58S 叶片 60 ku 蛋白特异性及其功能的讨论 [J]. *植物学报*, 1997, 39(2): 189 – 192.
- [24] 何瑞锋, 丁毅, 张剑锋, 等. 植物叶片蛋白质双向电泳的改进与优化 [J]. *遗传*, 2000, 22 (5): 319 – 321.

Comparison of protein preparation methods of *Porphyra haitanensis* thalli for two-dimensional electrophoresis

HANG Nan, XIE Chao-tian, CHEN Chang-sheng*, JI De-hua, XU Yan

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Protein preparation is a key step in two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis. In order to establish a suitable protein preparation method for *Porphyra haitanensis* thalli, three sample preparation methods of plant, trichloroacetic acid/acetone precipitation (TCA/ACE) method, urea/thiourea extraction (UREA/THI) method and phenol extraction methanol/ammonium acetate precipitation method, and three protein lysis buffers were compared. The results showed that the optimal method of proteins preparation of *P. haitanensis* thalli was extracted using TCA/ACE method and dissolved with the lysis buffer C (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 2% CHAPS, 2% TritonX-100, 2% IPG Buffer pH 3 – 10, 65 mmol/L DTT). Using this method, the yield was the highest and 2-DE map has the most spots, clear backgrounds, high resolution and great repeatability. At the same time, we also found that using the IPG strips (pH 4 – 7) in 2-DE analysis can extract the protein of *P. haitanensis* thalli better than IPG strips (pH 3 – 10).

Key words: *Porphyra haitanensis*; proteome; two-dimensional electrophoresis; sample preparation

Corresponding author: CHEN Chang-sheng. E-mail: cschen@jmu.edu.cn