

## 塔玛亚历山大藻双向电泳蛋白的三种提取方法比较

原雅纬<sup>1,2</sup>, 郑伟<sup>1,2</sup>, 李少菁<sup>1</sup>, 王桂忠<sup>1</sup>, 郑天凌<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005

<sup>2</sup>厦门大学 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

**摘要** 【目的】比较 3 种蛋白质提取方法, 找到适用于塔玛亚历山大藻蛋白的最佳的提取方法, 为后续用双向电泳(2-DE)技术研究不同条件下塔玛亚历山大藻蛋白的差异表达奠定基础。【方法】以塔玛亚历山大藻为研究对象, 运用 Tris-HCl 提取法、TCA 沉淀法和 lysis buffer 提取法分别提取塔玛亚历山大藻蛋白, 并通过双向电泳技术, 对这 3 种方法进行了比较分析, 筛选出最适于塔玛亚历山大藻的蛋白提取方法。并运用以上得出的方法, 以不加杀藻物质的无菌塔玛亚历山大藻为对照, 比较分析了塔玛亚历山大藻在加入杀藻物质后的蛋白差异表达状况。【结果】在这 3 种方法中, lysis buffer 提取法得到的蛋白溶解性好, 进行双向电泳时, 可得到干净的背景、清晰的蛋白点, 并且蛋白点的数目较多, 酸性蛋白、碱性蛋白、大分子量和分子量的蛋白均有提出来, 蛋白点在胶面上分布均匀。用这种方法初步分析了加入杀藻物质后塔玛亚历山大藻蛋白的差异表达情况, 并鉴定出 14 个与塔玛亚历山大藻生理活动密切相关的蛋白质。【结论】lysis buffer 提取法获得了最多的蛋白点, 双向电泳图谱清晰, 适于用来提取塔玛亚历山大藻蛋白。

**关键词:** 塔玛亚历山大藻, 甲藻, 双向电泳, 蛋白提取方法, 蛋白质组学

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 08-1113-06

塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 是 1 种可以产生麻痹性贝毒的海洋甲藻, 其适应能力强, 生存范围广, 在美国、南美、欧洲、菲律宾、香港等海域均有较高的赤潮发生频率<sup>[1-4]</sup>。在我国北至胶州湾、南至大鹏湾都有发现。由于塔玛亚历山大藻特殊的进化地位(间核生物), 庞大的基因组(是人类基因组的 30 倍), 普通的分子生物学方法无法对其发挥作用。而蛋白质组学则可以避免其分子上的复杂结构, 从而在藻类学的研究上具有广阔前景。在蛋白质组学的研究中, 样品的制作至关重要, 决定了后续试验的成败<sup>[5]</sup>。本文以

塔玛亚历山大藻为试验材料, 比较了 3 种蛋白质提取方法。为后续进一步的研究奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和藻种:** 本试验采用实验室前期分离得到的杀藻细菌假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. SP48(后面简称为 SP48)<sup>[6]</sup>。塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) ATGD98-006 为实验室前期分离得到的 1 株无菌藻<sup>[7]</sup>。

基金项目: 国家“863 计划”(2008AA09Z408); 国家自然科学基金重点项目、主任基金项目 and 面上项目(40930847, 30940002, 31070442); 长江学者和创新团队发展计划项目(40821063)

\* 通信作者。Tel: +86-592-2183217; E-mail: microzh@xmu.edu.cn

作者简介: 原雅纬(1984-), 女, 河南新乡人, 博士研究生, 研究方向为海洋微生物学。E-mail: yawei1983@126.com

收稿日期: 2011-02-16; 修回日期: 2011-05-05

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 购自厦门鹭隆生物科技发展有限公司); 三氯乙酸 (TCA, 购自上海化学试剂厂); 丙酮 (购自国药集团化学试剂有限公司); 十二烷基硫酸钠 (SDS, 购自厦门鹭隆生物科技发展有限公司); 二硫苏糖醇 (DTT)、尿素、硫脲、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS)、聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)、IPG 胶条 (购自美国 GE Healthcare 公司);  $\beta$ -巯基乙醇 (购自美国 Amresco 公司); 碘乙酰胺 (购自美国 Fluka 公司); 聚丙烯酰胺 (购自美国 Bio-Rad 公司), 硝酸银 (购自美国 Sigma 公司); 实验用所有药品均为分析纯。超声细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 电泳仪 (购自北京六一仪器厂); 脱色摇床 (购自北京六一仪器厂); 等电聚焦仪 Ettan IPGphor3 (购自美国 GE Healthcare 公司); 垂直电泳槽、扫描仪 (购自美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.2 培养方法

将菌种 SP48 接种于 2216E 液体培养基中培养。培养温度为 28℃, 150 r/min, 培养 24 h。此株杀藻细菌通过间接作用方式杀藻, 即通过向发酵液中分泌杀藻物质, 来杀死塔玛亚历山大藻。本试验中把 SP48 的细菌发酵液制成冻干粉, 将此冻干粉作为杀藻剂添加于塔玛亚历山大藻培养液中。

在 1 L 的三角瓶中分装 800 mL f/2 培养基, 将塔玛亚历山大藻按 10% 的比例接种其中。为保持其旺盛的生长活力, 每 7 天接种 1 次。在 20℃ 的光照培养箱中培养, 光照周期为 12 h: 12 h 光照时间: 黑暗时间。当藻细胞浓度达到  $1 \times 10^4$  时, 在试验组藻培养液中加入一定剂量的杀藻剂, 而对照组则不加任何物质, 在以上条件下培养 24 h 后, 收集藻细胞。

## 1.3 藻蛋白提取方法

收集处于对数生长其后期的塔玛亚历山大藻, 收集藻细胞, 经无菌海水润洗后, 用于以下几种蛋白提取方法制作样品。

**1.3.1 Tris-HCl 法:** 在离心管中加入 1 mL Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液, 冰浴超声破碎藻细胞。4℃ 10000  $\times$  g 离心 30 min, 取上清。在上清液中加入 3 倍体积的 10% 的 TCA/丙酮溶液, 4℃ 沉淀 30 min 后, 10000  $\times$  g 离心 30 min, 去上清。用含有

20 mmol/L DTT 的丙酮 (预冷) 清洗 3 次后, 将沉淀冷冻干燥成粉末状, 备用。使用时, 加入水化液将其溶解。

**1.3.2 直接 TCA 沉淀法:** 在离心管中加入 1 mL 10% TCA/丙酮溶液, 冰浴超声破碎。4℃ 下 10000  $\times$  g 离心 30 min, 去上清。用 80% 的丙酮 (预冷) 清洗沉淀 1 次。再加入含有 20 mmol/L DTT 的丙酮 (预冷) 清洗 3 次。冷冻干燥。使用时加入水化液溶解。

**1.3.3 lysis buffer 法:** 在离心管中加入 1 mL lysis buffer, 冰浴超声破碎藻细胞。在 4℃ 下 10000  $\times$  g 离心 30 min, 取上清。在上清液中加入 3 倍体积的 10% 的 TCA/丙酮溶液, 4℃ 下静置 30 min。10000  $\times$  g 离心 30 min, 去上清。加入含有 20 mmol/L DTT 的丙酮 (预冷) 反复清洗 3 次后, 将沉淀冷冻干燥, 备用。使用时加入水化液将其溶解。

## 1.4 双向电泳

以上 3 个样品在使用前, 用 Bradford 改良法<sup>[8]</sup>测定蛋白含量。取 60  $\mu$ g 蛋白上样, 胶条为 pH 梯度为 3-10 的 IPG 胶条, 放入等电聚焦仪中水化、等电聚焦。

一向等电聚焦后, 每根胶条都需要分别在平衡缓冲液 I 和平衡缓冲液 II 中平衡 15 min。然后将胶条转移至 12% 的聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上, 开始第二向垂直电泳。

## 1.5 凝胶染色

凝胶染色采用银染法。

## 1.6 图像分析

采用 Umax magicscan 软件扫描凝胶图像, 并用 PDQuest 软件进行图像分析。

## 1.7 蛋白鉴定

将目标蛋白点从 2-DE 胶上切下, 送至上海中科新生命生物科技有限公司进行基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱 (MALDI-TOF MS/MS) 鉴定, 并将获得的数据与 NCBI 蛋白数据库进行比对。

# 2 结果和分析

## 2.1 三种方法获得的蛋白电泳图谱比较

3 种方法提取的蛋白量如表 1 所示。Tris-HCl 法和 lysis buffer 法得到的蛋白总量差不多, 没有明显的区别。而 TCA 沉淀法得到的蛋白量相对较多,

是另外 2 种方法得到的蛋白的 2 倍。但是 ,就可溶性蛋白而言 ,lysis buffer 法比 Tris-HCl 和 TCA 沉淀法要高出许多 ,可以达到21. 17 mg/mL。而 TCA 沉淀法得到的可溶性蛋白却只有3. 4 mg/mL。两者相差 6 倍之多。

由于 TCA 沉淀法在最初细胞破碎时就将蛋白沉淀下来 ,与此同时 ,一同被沉淀的还有大量的细胞碎片。所以 TCA 法得到的蛋白干粉的量比较多 ,而其中的可溶性蛋白却并不多。Tris-HCl 提取法在细胞破碎时为胞内蛋白提供了一个缓冲环境 ,使得蛋白保持其活性 ,当加入 TCA/丙酮沉淀时 ,再将溶液中的蛋白沉淀出来。这是最基础的提取蛋白的方法 ,其效果也比较一般。而用 lysis buffer 法提取藻蛋白时 ,由于 lysis buffer 本身对蛋白具有较好的溶解性能 ,因而在最初细胞破碎时 ,就已将绝大部分的胞内蛋白溶解在其中 ,当加入 TCA/丙酮沉淀时 ,将其中的蛋白被沉淀出来 ,此点与 Tris-HCl 提取法相似。但由于 lysisbuffer 与水化液的成分相似 ,因而

lysis buffer 法得到的蛋白其溶解性更好 ,其中的蛋白含量也非常的高。

表 1 三种蛋白提取方法提取效果比较

Table 1 Comparison of extracting efficient of samples

Item for discussion	extracted with three buffers		
	Tris-HCl extracts	TCA extracts	lysis buffer extracts
Weight of protein extracts ( mg)	1. 8	3. 3	1. 5
Protein content ( mg/mL)	7. 99	3. 4	21. 17
Protein separation	-	-	+
Total number of spots	392	472	705

就双向电泳图谱而言( 图 1) ,Tris-HCl 提取法得到的 2-DE 图( 图 1-A) ,背景较为干净 ,蛋白点的分散程度也比较好 ,但整体上的蛋白点较少 ,只有 392 个点。而且大部分蛋白都只集中在酸性区域 ,小分子量的蛋白也比较少。且图中还有一些纵条纹和横条纹 ,说明蛋白提取物中仍含有一些杂质 ,从而影响了等电聚焦 ,使得聚焦不够彻底。

TCA 沉淀法得到的 2-DE 图谱( 图 1-B) 中 ,经过

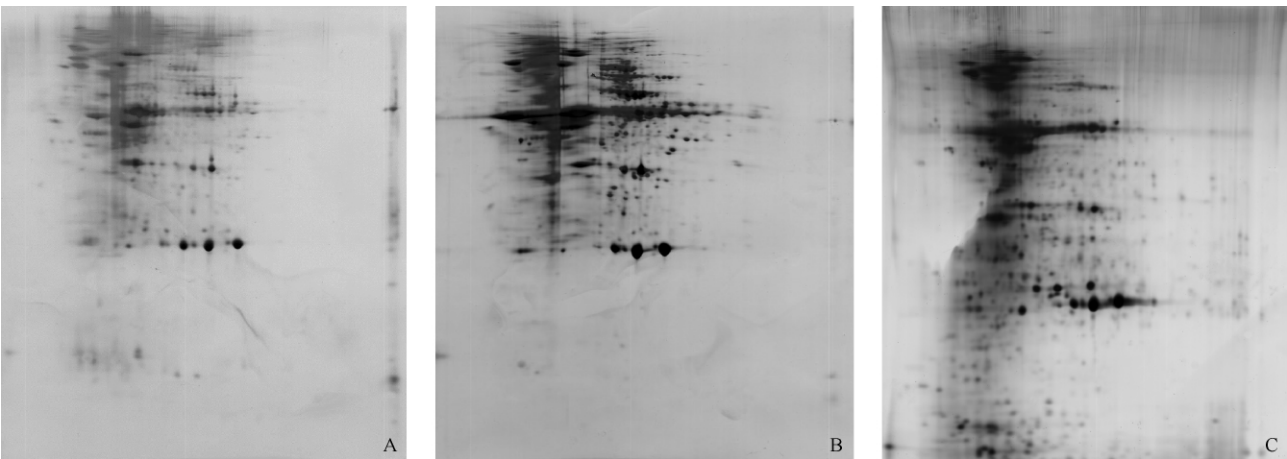


图 1 不同蛋白提取方法得到的塔玛亚历山大藻蛋白的 2-DE 图谱( pH 3 - 10)

Fig. 1 2-DE protein profiles of samples extracted with three buffers ( pH 3 - 10) . A: Tris-HCl buffer; B: TCA/acetone buffer; C: lysis buffer.

软件分析 ,虽然有 472 个点 ,但是蛋白拖带现象较为严重 ,横条纹和纵条纹都很明显 ,因而会对软件分析造成一定的影响。图中 ,蛋白点的分散度不好 ,中间有一部分蛋白点连在一起没有分开。说明其提取物中的杂质较多 ,严重影响了双向电泳中第一步的等电聚焦的效果。而且同 Tris-HCl 提取法相似 ,蛋白大多集中在酸性区域 ,大分子量的蛋白较多 ,几乎没有小分子蛋白。

在这 3 种蛋白提取方法中 ,Lysis buffer 法得到的 2-DE 图谱( 图 1-C) 最好。不仅蛋白点数量多 ,经

软件分析后共有 705 个点。而且这些蛋白点清晰 ,分散程度好 ,且酸性、碱性蛋白以及大分子量、小分子量的蛋白点都有得到。蛋白点在整张图中均匀分布。

藻类细胞中含有大量的盐、核酸、多糖、脂类以及一些酚类物质 ,这些杂质都会影响到双向电泳的效果。尤其是第一向等电聚焦 ,对样品的要求比较高 ,如果样品没有很好的处理 ,则会对后续步骤造成无法挽回的影响。在本实验中 ,TCA 沉淀法虽然操作步骤少 ,耗时短 ,简便易行 ,但其并没有很好的去

除样品中的杂质,跑出的电泳图中不仅蛋白点少,而且横条纹和纵条纹较多,蛋白分离程度不好。这与 Chan<sup>[9]</sup>, Lee<sup>[10]</sup>和 Wang<sup>[11]</sup>等人的研究结果不同。

Chan 等人认为 TCA 沉淀法的效果与 Tris 缓冲液提取法的效果相当,但这 2 种方法要比 lysis buffer 法的效果要好很多。Lee 也认为 TCA 沉淀法比 lysis buffer 法提取蛋白得到的 2-DE 图谱要好。Wang 等人认为 TCA 沉淀法与 lysis buffer 的效果不相上下, lysis buffer 要略好一些,但由于 TCA 沉淀法的操作步骤简单、耗时短,因而他们认为 TCA 沉淀法更可取。但是在本实验中, TCA 沉淀法的效果却并不理

想。Tris-HCl 提取法的效果也不太好,与 TCA 沉淀法效果相当。反而 Lysis buffer 无论是点的数量,还是电泳分离的整体效果都大大优于 TCA 沉淀法和 Tris-HCl 提取法得到的塔玛亚历山大藻蛋白样品。因而,在后续的试验中,采用 lysis buffer 法作为此株塔玛亚历山大藻蛋白的提取方法。

## 2.2 不同处理的塔玛亚历山大藻差异蛋白分析

以不加杀藻物质的藻蛋白为对照,在加入杀藻物质 24 h 后,观察塔玛亚历山大藻蛋白的变化情况。运用 lysis buffer 法提取藻蛋白,经双向电泳分离后,扫描得到双向电泳图谱(图 2)。

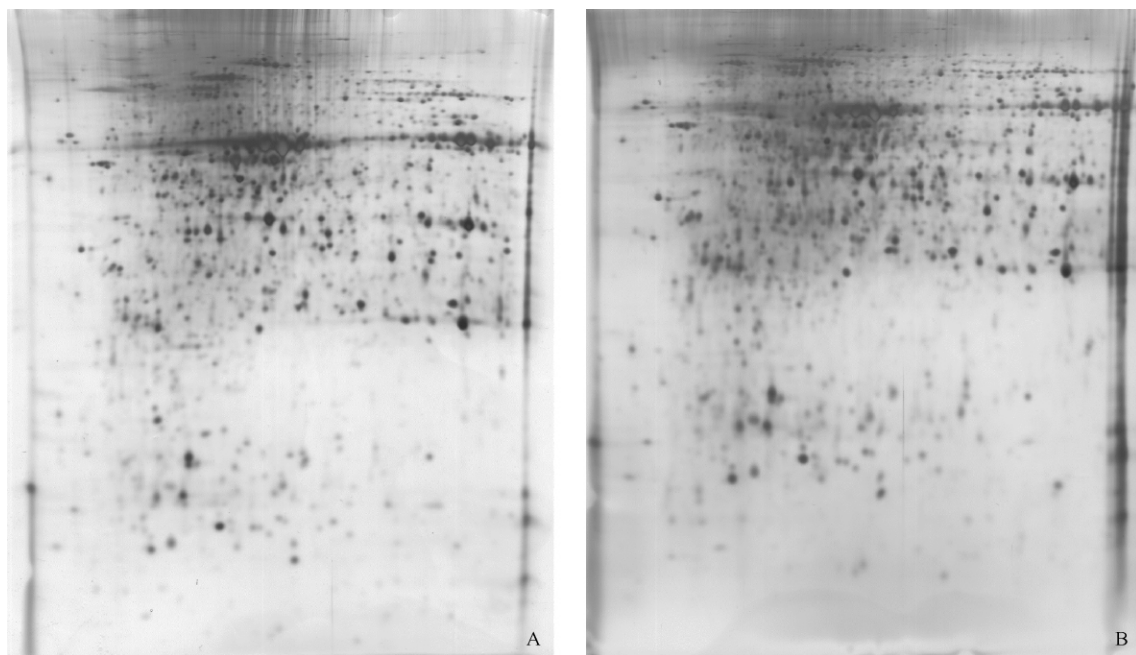


图 2 不同处理的塔玛亚历山大藻 2-DE 图谱 (pH4-7)

Fig. 2 2-DE protein profiles of *Alexandrium tamarense* with different treatment. A: the control; B: 2-DE protein profiles of *Alexandrium tamarense* adding algicidal substances.

运用 PDQuest 软件对得到的电泳图谱进行比较分析。一共找到了 49 个差异蛋白,选其中 20 个进行质谱鉴定,如图 3 所示。与不加杀藻物质的藻蛋白相比,其中有 4 个是增量表达的蛋白,如图 3 中的点 P4、P8、P10、P15,其余 16 个均为减量表达蛋白。

将其中 17 个蛋白点切下,并进行 MALDI-TOF MS/MS 分析,与 NCBI 蛋白数据库比对后,得到了 14 个蛋白点的数据信息。在这些蛋白点中,有 2 个属于结构蛋白,有与细胞壁相关的肌动蛋白、中间细丝蛋白等,其余 12 个为功能蛋白,多为各种酶类,包括与蛋白合成相关的转录起始因子、翻译调节因子

等,也有与藻类光合作用密切相关的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶及其大亚基等。

## 3 结论

本实验比较了针对塔玛亚历山大藻的 3 种蛋白样品制作方法,认为 lysis buffer 法得到的蛋白样品较好,用此方法得到的蛋白溶解性好,其 2-DE 图谱点分布均匀、清晰。在此基础上,初步研究了加入杀藻物质后塔玛亚历山大藻蛋白的变化情况,为后续杀藻物质对塔玛亚历山大藻的作用机制的研究奠定了基础。

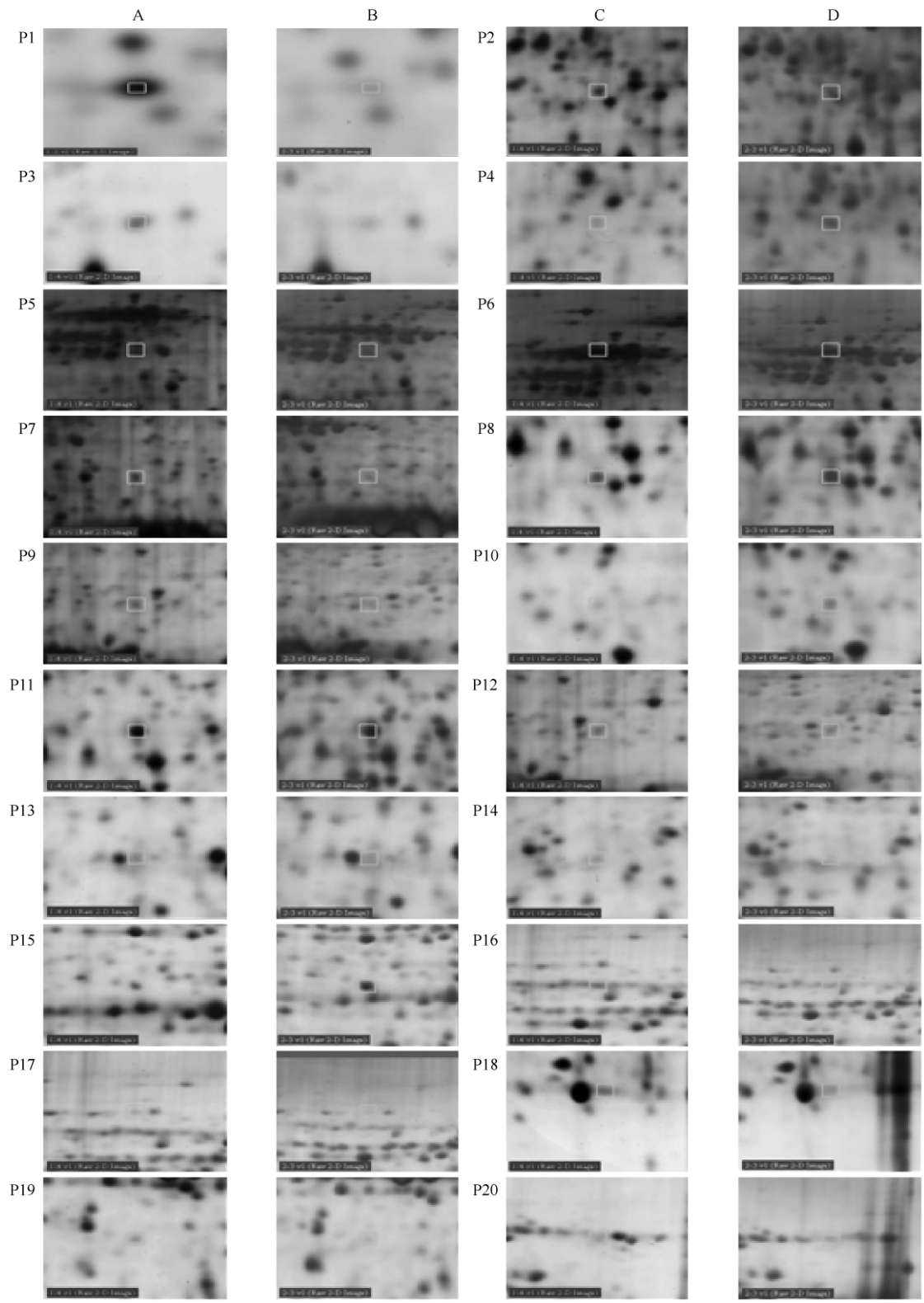


图 3 不同处理后塔玛亚历山大藻的差异蛋白局部放大图

Fig. 3 Proteins differentially expressed in control and algicidal substances treated. Proteins in the A line are in control and those in the B line are with algicidal substances treated.

## 参考文献

- [1] Anderson DM, Kulis DM, Qi YZ, Zheng L, Lu S, Lin YT. Paralytic shellfish poisoning in Southern China. *Toxicon*, 1996, 34 (5): 579-590.
- [2] 齐雨藻. 中国沿海赤潮. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] 吕静琳, 王宾香, 郑天凌. 海洋细菌活性蛋白、活性肽研究的若干新进展微. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2010, 50 (9): 1121-1128.
- [4] 郑天凌, 吕静琳, 周艳艳, 苏建强, 杨小茹, 张金龙, 田蕴, 熊小京, 章军, 蔡明刚, 郭东晖, 谢忠. 海洋有害赤潮调控功能菌的发现与研究. *厦门大学学报(自然科学版)* [ *Journal of Xiamen University (Natural Science)* ], 2011, 50 (3): 445-454.
- [5] 阮松林, 马华升. 植物蛋白质组学. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [6] Su JQ, Yang XR, Zheng TL. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, 2007, 6: 799-810.
- [7] Su JQ, Yang XR, Zheng TL, Hong HS. An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarense*—a PSP-producing dinoflagellate. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, 69 (3): 425-430.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [9] Chan LL, Lo SC, Hodgkiss IJ. Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 2002, 2 (9): 1169-1186.
- [10] Lee FWF, Lo SCL, The use of Trizol reagent (phenol/guanidine isothiocyanate) for producing high quality two-dimensional gel electrophoretograms (2-DE) of dinoflagellates. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 73: 26-32.
- [11] Wang DZ, Lin L, Chan LL, Hong HS. Comparative studies of four protein preparation methods for proteomic study of the dinoflagellate *Alexandrium* sp. using two-dimensional electrophoresis. *Harmful Algae*, 2009, 8 (5): 685-691.

# Comparison of three protein extraction methods for proteomic analysis of *Alexandrium tamarense* with two-dimensional electrophoresis

Yawei Yuan<sup>1 2</sup>, Wei Zheng<sup>1 2</sup>, Shaojing Li<sup>1</sup>, Guizhong Wang<sup>1</sup>, Tianling Zheng<sup>1 2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory for Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

<sup>2</sup>Key Laboratory for Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystem, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract [Objective]** In order to find the best extraction method for proteins of *Alexandrium tamarense* for two-dimensional electrophoresis (2-DE) analysis. **[Methods]** Three methods for extracting proteins from *A. tamarense* were compared, including trihydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl) buffer extraction, trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation and lysis buffer extraction. Alga was cultivated in normal f/2 media (control) and supplemented with algicidal substances. Proteins obtained using the best extraction method were separated with 2-DE. Protein-expression differences were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS). **[Results]** Among the three protein extraction methods, lysis buffer extraction shows the best detection of the number and quality of protein spots with a clear background. Then, the lysis buffer extraction method was successfully applied to profiling protein expression in algicidal substances stress conditions and 14 differential expression proteins were identified using MALDI-TOF/MS. **[Conclusion]** Lysis buffer extraction was the most effective protein extraction method for *Alexandrium tamarense*.

**Keywords:** *Alexandrium tamarense*, dinoflagellates, two-dimensional electrophoresis, protein extraction

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2008AA09Z408), by the National Nature Science Foundation of China (40930847, 30940002, 40876061) and by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (40821063)

\* Corresponding author. Tel: +86-592-2183217; Fax: +86-592-2184528; E-mail: microzh@xmu.edu.cn

Received: 16 February 2011 / Revised: 5 May 2011