

白芷种子蛋白质提取方法的比较

吴萍, 郭俊霞, 李青苗, 夏燕莉, 张美, 肖特, 方清茂 (四川省中医药科学院, 四川成都 610041)

摘要 [目的] 建立适用于白芷种子的 SDS-PAGE 蛋白质样品提取方法。[方法] 比较 5 种提取方法所获得白芷种子总蛋白质产量以及 SDS-PAGE 电泳的谱带数目、强度和电泳分辨率等方面的差异。[结果] 方法 a 所提蛋白质含量高, 杂质少, 电泳谱带清晰; 方法 b 所提蛋白质溶液电泳谱带清晰, 分辨率较高, 但提取含量较低; 方法 c 和 d 所提蛋白质杂质较多, 纯度不高, 分辨率较低; 方法 e 所提蛋白质纯度较高, 但蛋白条带缺失较多。[结论] 方法 a 提取白芷种子蛋白质的效果最好, 所提蛋白效率较高, 杂质少, 电泳谱带清晰, 分辨率高, 谱带数多, 优于其他提取法。

关键词 白芷种子; 蛋白质提取; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 S567.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)06-0118-03

Comparison of Protein Extraction Methods for *Angelica dahurica* Seeds

WU Ping, GUO Jun-xia, LI Qing-miao et al (Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Chengdu, Sichuan 610041)

Abstract [Objective] To establish a suitable protein extraction protocol for total proteins extraction from *Angelica dahurica* seeds. [Method] We compared the total protein yield and SDS-PAGE electrophoretic band number and strength, lectrophoresis resolution by five different methods. [Result] Method a had higher protein content, less impurity and clearer electrophoresis band. Method b had clearer electrophoresis band, higher resolution, but lower protein content. Methods c and d had more impurity, lower purity and resolution. Method e had higher protein purity, but more lack of protein bands. [Conclusion] Method a has the best extraction effects of protein from *A. dahurica* seeds, which has higher protein extraction efficiency, less impurity, clearer band, higher resolution, more band number. Thus, method a is superior to other four methods.

Key words *Angelica dahurica* seed; Protein extraction; Polyacrylamide gel electrophoresis

种子是遗传因素的载体之一。受遗传基因控制的蛋白质分子普遍存在于种子内, 并在植物的生长发育过程中起着重要作用^[1]。种子蛋白是基因表达的产物, 能在种子内积累到很大量而不降解, 其电泳谱带具有高度稳定性、专一性和叠加性, 在植物的生长发育过程中起着重要作用^[2]。种子蛋白作为一种遗传标记被越来越多地应用于种、属关系, 种间或种内遗传多样性分析, 品种鉴定、物种起源及植物种质资源的研究^[3]。1991 年, 国际种子检验协会将蛋白质电泳方法正式定为标准的品种鉴定方法, 并纳入种子检验规程^[4]。目前, 蛋白质电泳技术已广泛应用于农作物、蔬菜、牧草等种子的品种鉴定^[5]、纯度测定^[6]、亲缘关系分析^[7]。但药用植物种子的蛋白质电泳研究报道甚少, 而关于白芷种子蛋白质电泳的研究鲜有报道。

白芷为伞形科植物白芷 [*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.] 或杭白芷 [*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan] 的干燥根, 因初生根杆为芷, 色白, 故名白芷, 以根入药, 其性温, 气芳香, 味辛、微苦, 归胃、结肠、肺经, 具有散风除湿、通窍镇痛、消肿排脓等功效^[8], 可药食两用。白芷以种子繁殖为主, 多采用育苗移栽, 在常规保存手段下, 隔年陈种子发芽率不高, 而制约种子发芽率的原因尚不清楚。细胞或组织中受体分子、信号分子等参与基因表达调控, 即基因调控均需要蛋白质的参与^[9], 陈年白芷种子发芽率降低也是基因表达调控的结果。蛋白质提取是电泳

的第 1 步, 蛋白质样品制备的好坏直接决定结果的成败。笔者以白芷种子为材料, 采用 5 种蛋白质提取方法进行比较分析, 以期优化出一套适于白芷种子的蛋白质提取方法, 为探索白芷种子衰老等理论机制的研究提供技术平台。

1 材料与方法

1.1 供试材料 供试白芷 (*Angelica dahurica*) 种子来源于遂宁市永兴镇中脊村, 2015 年采收。

1.2 主要仪器与试剂 Mini-PROTEAN Tetra 小型垂直电泳槽、PowerPac™ HC 高电流电泳仪购自美国 Bio-rad 伯乐公司; Heraeus Multifuge X3 低温离心机购自美国 Thermo 公司; 甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基磺酸钠 (SDS)、尿素、硫脲、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS)、三氯乙酸 (TCA)、β-巯基乙醇 (2-ME)、TEMED、过硫酸铵均购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质提取。方法 a: 取种子粉碎, 过 40 目筛, 称 0.1 g 于离心管中, 加入 2 mL 预冷的提取液 A (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris-base, 2% 2-ME), 混悬后冰上静置 3~4 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 上清液置于 -80 °C 冰箱中备用。

方法 b: 取种子粉碎, 过 40 目筛, 称 0.1 g 于离心管中, 加入预冷的提取液 B (100 mmol/L HEPES, pH 7.5, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Na₃VO₄, 10 mmol/L NaF, 5% 甘油, 2% 2-ME) 2 mL, 混悬后冰上静置 3~4 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 上清液置于 -80 °C 冰箱中备用。

方法 c: 取种子粉碎, 过 40 目筛, 称 0.1 g 于离心管中, 加入 2 mL 预冷的提取液 C (150 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 25% 甘油, 2% 2-ME), 混悬后冰上静置 3~4 h, 4 °C、12 000

基金项目 四川省基本科研业务专项 (A2015N13); 四川省科技创新苗子工程 (2016077)。

作者简介 吴萍 (1986—), 男, 四川遂宁人, 助理研究员, 硕士, 从事中药资源与种植研究。

收稿日期 2017-01-25

r/min 离心 20 min, 上清液置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

方法 d: 取种子粉碎, 过 40 目筛, 称 0.1 g 于离心管中, 加入稀释 8 倍的浓缩胶缓冲液 2 mL [含 4.95% 丙烯酰胺混合液(29:1), 12.5% 0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% 过硫酸铵, 1% TEMED], 冰浴 30 min 后, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min, 冷却, 10 000 r/min 离心 15 min 取上清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

方法 e: 每份材料取研磨后过 40 目筛的种子粉末 0.1 g 于离心管中, 加入 2 mL 样品提取液 E (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-ME, 10% 甘油, 0.1% 溴酚兰), 混匀, 室温放置 1~2 h。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行电泳, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。上样时 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沸水加热 4 min 后进行。

1.3.2 紫外分析仪定量测定蛋白质含量。以牛血清白蛋白为标准蛋白, 采用紫外分析仪定量测定上述样品的蛋白质含量。

1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳。采用 SDS-PAGE 法, 分离胶 12%, 浓缩胶 5%, 垂直平板电泳, 加样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。电泳缓冲液为 Tris-Gly (pH 8.3) 系统, 起始电压 75 V, 在指示剂进入分离胶后改为 150 V, 恒压电泳, 待指示剂至胶板下沿 1 cm 左右停止电泳。

1.3.4 染色与脱色。胶剥离后放入加有 R_{250} 染色液的染色皿中, 染液漫过胶即可, 置于摇床上, 转速约为 45 r/min, 时间约 1 h, 完成后染液倒去并用水洗去染液。取出染色过的胶放于加有脱色液的染缸里, 脱色液漫过胶即可, 置于摇床上, 转速约为 45 r/min, 本底色脱净, 条带清晰可见即可, 完成后倒掉脱色液。

1.3.5 图谱分析。用 Quantity one 软件进行拍照并做图像分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白质产量的比较 蛋白质产量和纯度是评价提取方法的重要指标。产量越高, 蛋白质提取越完全。蛋白质纯度不同, 对电泳的影响也不同, 较多的杂质将严重影响电泳结果。因此, 蛋白质产量越高, 纯度越好, 提取方法越好。

由图 1 可知, 提取方法 a、b、c、d、e 的蛋白质含量测定结果分别为 93.2、52.5、66.4、90.3、40.6 mg/g。其中, 方法 a 所提的蛋白质含量最高, 为 93.2 mg/g, 方法 e 所提的蛋白质含量最低, 为 40.5 mg/g, 极差为 52.7 mg/g。

2.2 电泳结果比较 图 2 为 5 种白芷种子蛋白质提取方法的 SDS-PAGE 电泳图谱。结果显示, 不同的提取方法所得的 PAGE 图谱各异, 存在条带数目、强度、清晰度等方面的差异。泳道 A 谱带较全且清晰; 泳道 B 谱带高分子量蛋白质有缺失, 条带较弱; 泳道 C、D、E 谱带缺失较多, 其中泳道 C 出现纹理状, 样品中杂质较多; 泳道 D 条带模糊且背景较深, 拖尾严重, 可能是由于样品中杂质和不溶性蛋白质较多; 泳道 E 条带较弱, 蛋白质缺失严重。

由表 1 可知, 白芷种子的 SDS-PAGE 电泳图谱共有 15 条谱带, 均为中、低分子量蛋白质, 主要集中在 $14.4\text{ }^{\sim}66.2\text{ kD}$ 。方法 a 谱带数目最多为 14 条, 其次是方法 b 有 11 条,

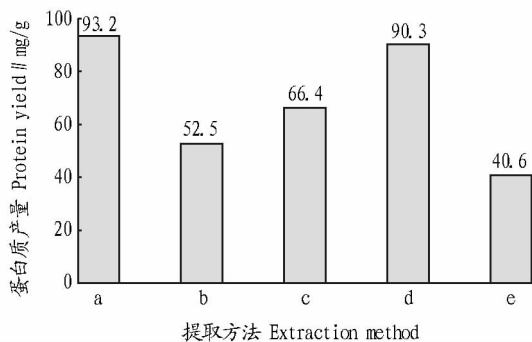
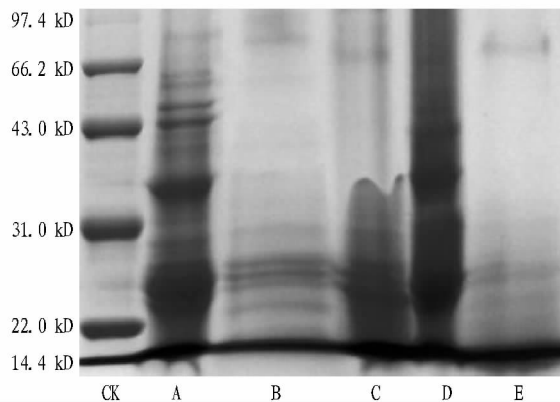


图 1 不同提取方法蛋白质产量的比较

Fig. 1 Comparison of protein yields by different extraction methods



注: 泳道 A、B、C、D、E 分别对应蛋白质提取方法 a、b、c、d、e

Note: Lanes A, B, C, D and E were protein extraction methods a, b, c, d and e, respectively

图 2 5 种方法提取白芷种子蛋白质电泳图谱

Fig. 2 Protein electrophoretogram of *Angelica dahurica* seeds by five extraction methods

方法 c 有 6 条, 而方法 d 和 e 均仅有 4 条。不同泳道谱带的分子量见图 3。结果显示, 方法 a 提取的蛋白质(泳道 A)种类较多, 提取效率较高, 这与蛋白质产量的分析结果一致。

3 结论与讨论

种子保存的核心问题是如何控制种子的生命力^[10]。蛋白质在种子抗衰老过程中作用很大, 贮藏过程中蛋白质分解是种子老化乃至活力丧失的明显特征及原因^[11]。种子活力在基因水平上的差异也是通过基因表达的产物蛋白体现出来的。聚丙烯酰胺凝胶电泳是常用研究蛋白质表达的方法之一, 具有设备简单、操作方便和分辨率高等优点。蛋白质样品的提取是电泳的第一步, 直接决定结果的成败。该研究针对白芷种子蛋白质样品制备设计 5 种方法, 通过蛋白质产量及电泳结果的分析, 得出方法 a 更适合于白芷种子蛋白质的制备, 可能是因为方法 a 中蛋白质提取液含有尿素和硫脲, 两者发挥协同作用增强了蛋白质的溶解, 甚至可以溶解一些非水溶的贮藏蛋白质。

蛋白质产量和纯度是评价提取方法的重要指标^[1]。该研究以白芷种子为材料, 选取 5 种不同的蛋白质提取方法进行比较分析。结果显示, 方法 a 和 d 所提蛋白质含量明显高

表1 不同提取方法的分子量及电泳谱带数目差异

Table 1 Comparison of electrophoresis band number and molecular weight of different extraction methods

谱带名称 Band name	分子量 Molecular weight//kDa				
	方法 a Method a	方法 b Method b	方法 c Method c	方法 d Method d	方法 e Method e
R ₁	—	80.353	86.208	—	—
R ₂	75.960	70.445	71.544	—	—
R ₃	58.736	—	59.889	—	63.112
R ₄	54.732	54.245	—	—	—
R ₅	47.309	—	—	—	—
R ₆	42.669	42.141	—	—	—
R ₇	40.709	—	—	40.881	—
R ₈	39.226	—	—	—	—
R ₉	34.739	35.585	—	35.852	—
R ₁₀	30.926	33.024	—	—	—
R ₁₁	28.085	29.896	28.605	29.769	—
R ₁₂	25.800	26.603	24.688	—	25.553
R ₁₃	24.142	25.214	—	24.983	—
R ₁₄	22.814	24.187	22.379	—	22.990
R ₁₅	20.929	22.138	—	—	20.658
谱带数 Band number	14	11	6	4	4

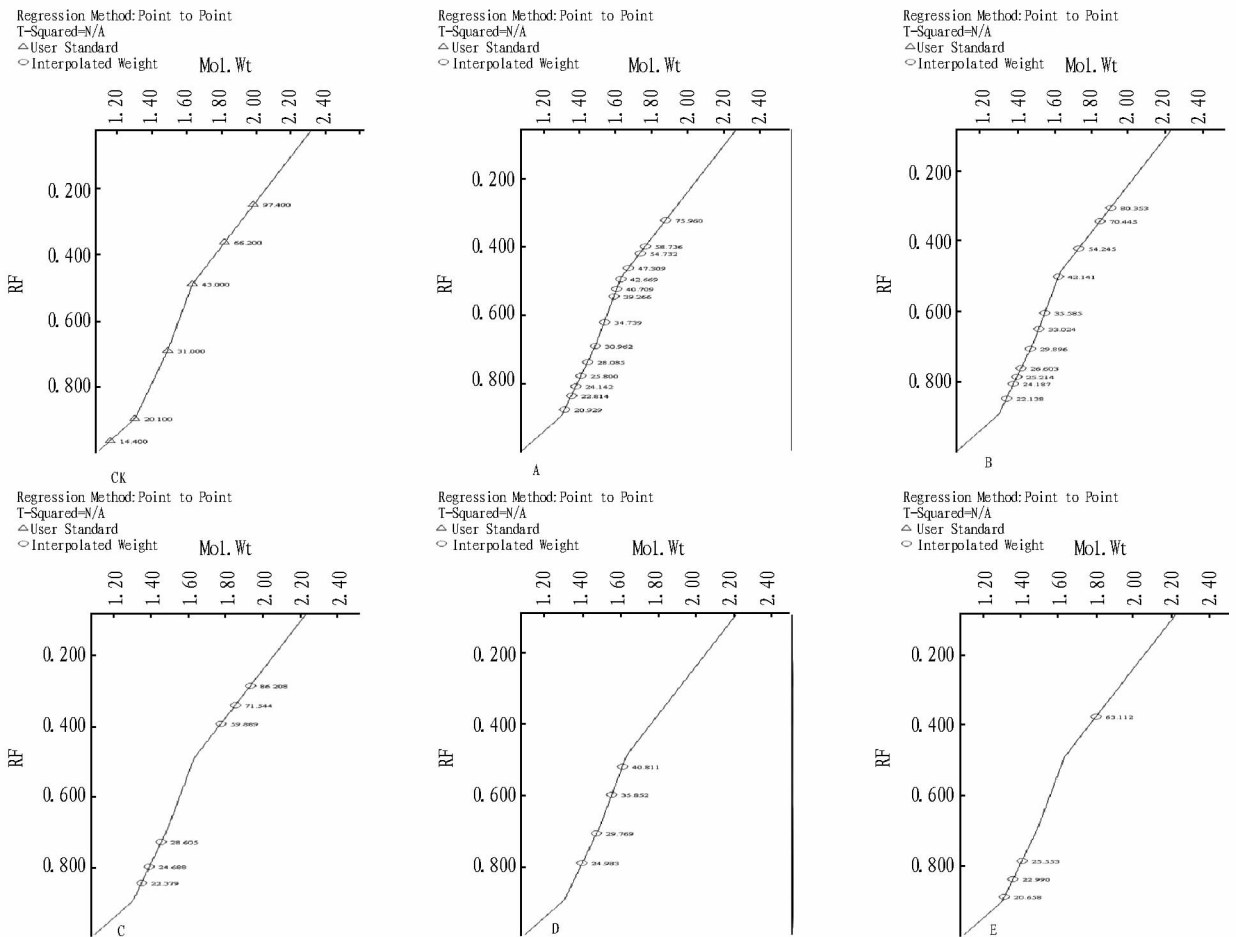


图3 不同泳道谱带的分子量

Fig. 3 The molecular weight of different bands

于其他3种提取方法。其中,方法d提取的蛋白质溶液,电泳谱带背景较深,杂质较多,分辨率较低;而方法a和b所提蛋白质溶液,电泳谱带清晰,分辨率较高;虽然方法a所提蛋白质溶液的电泳谱带在部分条带出现高丰度蛋白质,致使谱带展宽,但对电泳的分辨率影响不大。方法c虽然所提蛋白质含量高于方法b和e,但杂质较多,提取纯度较低,影响电泳的分辨率。方法e虽然所提蛋白质纯度较高,但蛋白质损

失严重,蛋白质条带缺失较多。因此,综合各方面情况,方法a提取白芷种子蛋白质的效果最好,其提取效率高,杂质少,电泳谱带清晰,分辨率高,谱带数多。

参考文献

- [1] 李晓琳,邵爱娟,陈敏,等. 酸浆种子蛋白提取方法的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):14-17.

(下转第123页)

表 1 核桃青皮不同提取物及不同部分总酚含量比较

Table 1 The comparison between total phenol content of extracts and different parts of walnut green husk

样品 Samples	总重 Total weight mg	总体积 Total volume mL	反应用体积 Reaction volume mL	吸光度 Absorbance A_{760}	反应中总酚含量 Total phenol content in the reaction//mg	每克中总酚含量 Total phenol content per gram mg/g	每部分总酚量占总 提物中的百分比 The proportion of total phenol of each fraction in total extract//%
Ext.	20	100	0.1	0.196	0.001 096	54.815	5.48
Fr. 1	20	100	0.1	0.095	0.000 391	19.597	1.96
Fr. 2	20	100	0.1	0.274	0.001 642	82.014	8.20
Fr. 3	20	100	0.1	0.297	0.001 801	90.034	9.00
Fr. 4	20	100	0.1	0.249	0.001 466	73.297	7.33
Fr. 5	20	100	0.1	0.196	0.001 096	54.816	5.48
Fr. 6	20	100	0.1	0.105	0.000 461	23.084	2.31

表 2 提取物及各部分样品清除 DPPH· 和 ABTS· 的能力

Table 2 DPPH· and ABTS· radicals scavenging rates of extract and fractions

样品 Samples	IC ₅₀ //mg/mL	
	DPPH·	ABTS·
Ext.	0.550	0.050
Fr. 1	8.860	0.103
Fr. 2	0.230	0.019
Fr. 3	0.210	0.015
Fr. 4	0.340	0.027
Fr. 5	0.390	0.028
Fr. 6	0.700	0.076
VC	0.370	0.020

3 结论

福林-酚比色法具有良好的稳定性和可靠性,可用于测定核桃青皮和各部分总酚含量。经过 HP-20 大孔树脂对核桃青皮提取物干浸膏样品进行预处理,单从其得率来看,效果较好,总回收率达 95.46%。预处理所得的样品中,总酚含量从高到低依次为 Fr. 3、Fr. 2、Fr. 4、Fr. 5、Ext.、Fr. 6、Fr. 1。说明经过大孔树脂 HP-20 预处理后,核桃青皮中多酚类物质得到了很好的富集,通过 DPPH· 和 ABTS· 自由基清除试验表明核桃青皮粗提物及其各纯化部分均具有一定的抗氧化能力,而且经过大孔树脂 HP-20 的预处理后,Fr. 2、Fr. 3 和 Fr. 4 部分的抗氧化能力明显增强,甚至超过 VC 的抗氧化能力。试验结果表明,核桃青皮粗提物与各纯化部分的抗氧化能力与其总酚的含量呈正相关。该研究可以为进一步开发利用核桃资源以及其抑菌、杀虫、抗氧化、抗肿瘤等生物方面的活性研究提供依据,也为更进一步深入研究核桃青皮中

活性成分的提取、分离和结构鉴定提供理论基础。

参考文献

- [1] 图尔贡江·伊力亚则,孙宇,倪慧,等.核桃青皮的研究进展[J].中国现代中药,2015,17(1):77-81.
- [2] 翟梅枝,晏婷,王元,等.胡桃属植物青皮和叶的化学成分及其生物活性研究进展[J].西北植物学报,2011,31(10):2133-2138.
- [3] 周媛媛,刘雨新,孟颖,等.青龙衣中的醌类成分研究[J].中医药学报,2015(3):8-10.
- [4] 沈广志,邹桂华,梁婷,等.核桃楸的化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015(17):219-224.
- [5] 黄成钢,阎新佳,邹晓祺,等.青龙衣的化学成分和抗肿瘤活性研究[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2014(5):517-521.
- [6] 周媛媛,刘兆熙,孟颖,等.青龙衣乙酸乙酯部位的化学成分研究[J].中医药信息,2015,32(3):20-22.
- [7] 张世珍,高兴盛,冉翠香,等.核桃青皮中多酚类化合物的提取及含量分析[J].南方农业,2014,8(30):159-162.
- [8] 朱霞,李焕荣,罗游. Folin-Ciocalteu 比色法测定核桃青皮中多酚含量条件的优化[J].食品与机械,2014(4):122-125.
- [9] 张春梅,陈朝银,赵声兰,等.大孔吸附树脂纯化核桃内种皮总多酚的工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(17):27-30.
- [10] PARKIN D M, FERNANDEZ L M. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer [J]. Breast journal, 2006, 12(S1):70-80.
- [11] 梁杏,张旭,陈朝银,等.核桃饼粕多酚纯化工艺及其抗氧化活性的研究[J].中国酿造,2015,34(4):55-61.
- [12] 颜小捷,谷澎秋,卢凤来,等. FOLIN-酚比色法测定裸花紫珠中总酚含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):74-78.
- [13] 王亚凤,黄永林,刘金磊,等.壳斗科植物种子的多酚类含量及抗氧化能力[J].广西科学,2016,23(2):180-183.
- [14] 刘春丽,颜小捷,杨子明,等.龙眼果皮及果核中植物多酚含量的测定及抗氧化能力研究[J].食品科技,2014(11):203-206.
- [15] 朱霞,李焕荣,罗游. Folin-Ciocalteu 比色法测定核桃青皮中多酚含量条件的优化[J].食品与机械,2014(4):122-125.
- [16] WANG R J, WANG S, XIA Y J, et al. Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia* [J]. International journal of biological macromolecules, 2015, 72: 771-775.
- [17] 关小丽,黄永林,刘春丽,等.荔枝皮化学成分的研究(I) [J].广西植物,2014,34(2):151-154.

(上接第 120 页)

- [2] 马瑞君,王钦,孙坤,等.云南沙棘种子蛋白谱带多样性分析[J].兰州大学学报(自然科学版),2002,38(3):78-81.
- [3] 胡志昂,王洪新.蛋白质多样性和品种鉴定[J].植物学报,1991,33(7):556-564.
- [4] 国际种子检验协会(ISTA).国际种子检验规程[M].北京:中国农业出版社,1996:196.
- [5] 兰海燕,李立会.蛋白质凝胶电泳技术在作物品种鉴定中的应用[J].中国农业科学,2002,35(8):916-920.
- [6] 王文宏,朱旭辉.应用蛋白质凝胶电泳法鉴定玉米种子纯度的探讨[J].杂粮作物,2002,22(1):57-58.

- [7] 吴浩,彭昕,张煜炯,等.蛋白质电泳指纹图谱在各产地贝母亲缘关系研究中的应用[J].中成药,2015,37(8):1757-1761.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第 1 部[M].北京:化学工业出版社,2010.
- [9] GÖRG A, WEISS W, DUNN M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. Proteomics, 2004, 4:3665-3685.
- [10] 王文军,景新明.种子蛋白质与蛋白质组的研究[J].植物学通报,2005,22(3):257-266.
- [11] ABDUL-BAKI A A. Biochemical aspects of seed vigor [J]. Hortscience, 1980, 15:765-771.