

文章编号:1004-4213(2010)12-2118-5

# 梯度胶对人参蛋白双向电泳分离效果的影响<sup>\*</sup>

孙立伟<sup>1</sup>,雷秀娟<sup>2</sup>,麻锐<sup>1</sup>,陈佳庆<sup>1</sup>,姜锐<sup>1</sup>,赵大庆<sup>3</sup>

(1 北华大学 生命科学中心,吉林 吉林 132013)

(2 中国农业科学院特产研究所,吉林 吉林 132109)

(3 长春中医药大学,长春 130117)

**摘 要:**为了建立高质量、高分辨率人参蛋白双向电泳图谱来对人参蛋白进行功能分析与研究,提出一种利用双向梯度胶电泳技术.第一向等电聚焦电泳分离后,第二向分别采用 12.5%浓度的均一胶和 10%~12.5%、12.5%~15%、10%~15%三种不同浓度的 SDS-PAGE 梯度胶来获取人参蛋白双向电泳图谱,并利用 Image Scanner 和 Image Master 2D Platinum version6.0 对图像进行扫描及比较分析.结果表明,采用 10%~15%浓度梯度胶获得双向电泳图谱中蛋白点圆滑、形状规则,分离效果好;有效地减少了人参中高丰度蛋白对中低丰度蛋白的掩盖,Mw>75 kDa 的可检测到的低丰度和大分子量蛋白点数明显增加.研究结果为高质量人参蛋白表达图谱的建立奠定了良好的实验基础,同时也为其它五加科植物蛋白质组学研究工作的发展提供了方法学上的指导.

**关键词:**梯度胶;人参蛋白;双向电泳

**中图分类号:**Q816

**文献标识码:**A

**doi:**10.3788/gzxb20103912.2118

## 0 引言

人参为五加科名贵中药材,具有抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、防辐射、提高记忆力和免疫力等生物学功能<sup>[1-4]</sup>.近年来人们对人参的研究已逐渐从皂苷等小分子转向了相关大分子.目前已有报道人参属植物核糖核酸酶活性蛋白具有抗真菌、抗人类免疫缺陷病毒逆转录酶活性<sup>[5]</sup>;达玛烷二醇合酶、鲨烯合成酶、氧鲨烯环化酶及鲨烯环氧酶等具有调节人参皂苷生物合成的作用<sup>[6-9]</sup>,这说明蛋白质作为一类生物大分子在发挥人参生物学功效时具有重要的作用.随着植物蛋白质组学的迅速发展和植物基因组数据库的不断完善,利用蛋白质组学的方法对人参内全部蛋白的动态表达进行研究对于探讨人参发挥功效的分子作用机制等问题来说是十分必要并行之有效的.

2002 年 John 等<sup>[10]</sup>首次利用双向电泳(Two-Dimensional Electrophoresis, 2-DE)技术对高丽人参及美国产西洋参蛋白表达图谱进行了比较研究.研究表明,高丽人参及美国产西洋参内均存在一大类相似的高丰度储存蛋白,在第二向使用 12.5%均一胶进行 2-DE 时这些高丰度蛋白会严重掩盖周围

低丰度蛋白,致使一些低丰度蛋白无法被成功分离.而在生物体内往往正是这些难以检测到的低丰度蛋白或分子量极大、极小的蛋白发挥着重要的不可替代的生物学功效.因此,需要寻找一种尽可能有效地分离全部人参蛋白的方法.

梯度胶能通过放大某个分子量区域内的浓度梯度从而使这个区域内的蛋白点间距增大,最终达到较好的分离效果.同时由于梯度胶具有更宽的分离范围,对于一些较大和较小的蛋白的分离来讲也是非常有效的.所以本文采用三种不同浓度的梯度胶和一种均一浓度胶分离人参蛋白,并通过凝胶图像扫描分析软件对所得 2-DE 图谱的比较分析后,最终确定出有效分离人参蛋白的梯度胶浓度.这一研究结果为人参蛋白表达图谱的建立及相关蛋白结构功能的研究奠定了良好基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新鲜的五年生人参样品产自吉林抚松地区. IPG 胶条(7 cm, PH3-10, PH4-7), IPG Buffer3-10, IPG Buffer4-7 购自 GE Healthcare 公司; Urea, Thiourea, CHAPS, DTT 购自 Amresco 公司; 蛋白酶抑制剂购自 Promega 公司. Ettan IPGphor 水平等电聚焦仪, SDS-PAGE miniVE 电泳仪, Image Scanner 扫描仪, Image Master 2D Platinum version6.0 (GE Healthcare 公司); 蠕动泵(保定兰

<sup>\*</sup> 国家科技部支撑计划项目(2007BAI38B02)和吉林市科技发展计划项目(200813)资助

Tel:0432-64608354 Email:sunliwei1970@yahoo.com

收稿日期:2010-08-10

修回日期:2010-09-25

格横流泵有限公司);梯度混合仪(BIO-RAD 公司).

## 1.2 人参蛋白样品的制备

将人参样品研磨成精细粉末,称取 0.3 g 加入 2 mL 预冷丙酮提取液(10% TCA 和 0.07%  $\beta$  巯基乙醇),震荡混匀后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置 2 h,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 14 000 rpm, 离心 15 min 取沉淀. 加入 2.0 mL 含 0.07%  $\beta$  巯基乙醇的预冷丙酮溶液,混匀后离心. 重复洗涤,使上清无色澄清,最后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 14 000 rpm, 离心 15 min 取沉淀,挥发去除丙酮. 将所得沉淀中加入 4~6 倍体积裂解液,置于冰水浴中进行超声波破碎处理,悬浊液室温,15 000 rpm,离心 5 min,取上清并用 Bradford 法测定蛋白浓度.

## 1.3 不同浓度梯度胶的灌制

分别利用梯度灌胶模具灌制 SDS-PAGE 12.5% 的均一胶和 10%~12.5%、12.5%~15%、10%~15% 的梯度胶.

## 1.4 2-DE

一向等电聚焦程序设置为:30 V, 12 : 00 h; 200 V, 1 : 00 h; 500 V, 1 : 00 h; 1 000 V, 1 : 00 h; 5 000 V, 4 000 Vhr; 5 000 V, 6 000 Vhr. 二向 SDS-PAGE 程序设置为 5 mA, 0.5 h; 10 mA, 2.5 h. 利用考马斯亮蓝法染色,利用 Image Scanner 扫描仪和 Image Master 2D Platinum version 6.0 分析软件进行图像扫描和分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 12.5% 均一胶和三种不同浓度梯度胶 2-DE 图谱的比较(PH3-10, 7 cm IPG 胶条, 考染)

本实验采用 GE healthcare 公司的 2-DE 体系对五年生人参总蛋白样品进行 2-DE 分析,第二向 SDS-PAGE 分别使用了 12.5% 均一胶和 10%~12.5%、12.5%~15%、10%~15% 三种不同浓度的梯度胶,结果见图 1~4.

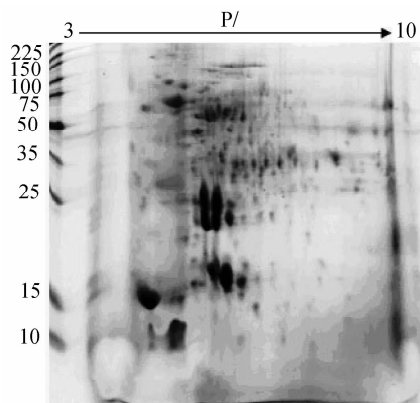


图 1 采用 12.5% 均一胶获得的人参 2-DE 图谱  
Fig. 1 The 2-DE map of ginseng obtained using 12.5% homogeneous gel

使用 12.5% 均一胶得到的 2-DE 图谱中  $M_w$  在 15~50 kDa 范围内的酸性区蛋白点多数有竖向拖尾现象,在  $M_w$  偏小( $<15\text{ kDa}$ )的区域内分离得到的蛋白点数较少,在  $M_w$  偏大( $>50\text{ kDa}$ )的区域内的部分蛋白点仍重叠在一起,分离效果较差(图 1).

使用 10%~12.5% 的梯度胶得到的 2-DE 图谱在  $M_w$  为 20~25 kDa 范围内的分离效果最好,但在  $M_w$  为 25~75 kDa 范围内的蛋白点数较少,中偏碱性区域内的一些点竖向拖尾现象严重,蛋白点轮廓模糊,不规则,分离效果较差(图 2).

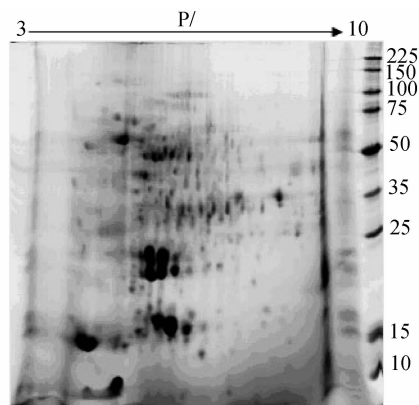


图 2 采用 10%~12.5% 梯度胶获得的人参 2-DE 图谱  
Fig. 2 The 2-DE map of ginseng obtained using 10%~12.5% gradient gel

12.5%~15% 的梯度胶 2-DE 图谱在 50~100 kDa 范围偏酸性区域的一些蛋白点相互重叠,分辨率低,并且  $M_w$  为 25 kDa 的高丰度蛋白处竖向拖尾现象极为严重(图 3).

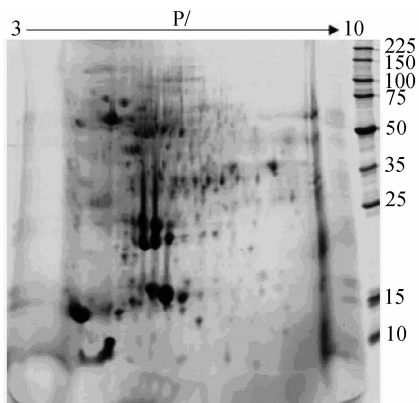


图 3 采用 12.5%~15% 梯度胶获得的人参 2-DE 图谱  
Fig. 3 The 2-DE map of ginseng obtained using 12.5%~15% gradient gel

最后使用 10%~15% 梯度胶得到的 2-DE 图谱中蛋白点分布均匀, $M_w$  在 10~150 kDa 范围内的所蛋白点均得到了较好的分离,尤其在  $M_w$  为 30~75 kDa 范围内,蛋白点分离效果最好,点形状圆滑、规则,几乎没有竖向拖尾现象,同时在  $M_w$  偏小( $<15\text{ kDa}$ )和偏大( $>50\text{ kDa}$ )区域内的蛋白点也得到了比较理想的分离效果,如图 4.

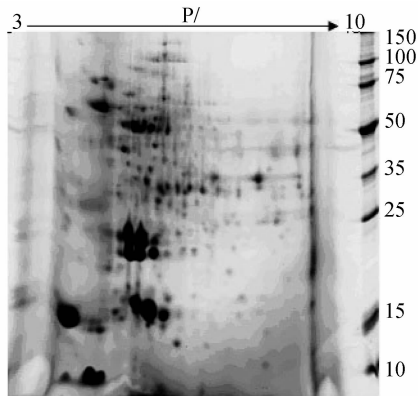


图4 采用10%~15%梯度胶获得的人参2-DE图谱  
Fig.4 The 2-DE map of ginseng obtained using 10%~15% gradient gel

## 2.2 12.5%均一胶和三种不同浓度梯度胶局部2-DE图谱的比较(PH3-10,7 cm IPG 胶条,考染)

从图1~4中2-DE图谱可以看出,人参蛋白主要集中在Mw为10~150 kDa的范围内,但它们在 各段分子量范围内的蛋白点数及蛋白量分布并不均匀. Mw为15~25 kDa区域内两簇高丰度储存蛋白的存在,使得仅采用12.5%均一浓度的SDS-PAGE胶很难得到理想的分离效果(图5(a),12.5%均一胶). 三种不同浓度的梯度胶在一定程度上改善了高丰度蛋白的分离情况,其中10%~12.5%和10%~15%梯度胶分离效果相似,都能得到理想的2-DE图谱(图5(b)~(d)分别为:10%~12.5%梯度胶,12.5%~15%梯度胶,10%~15%梯度胶).

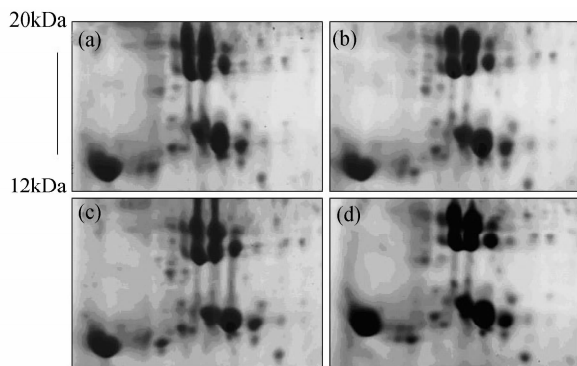


图5 人参蛋白Mw在12 kDa~20 kDa范围的2-DE图谱  
Fig.5 Region 2-DE map of ginseng (Mw:12~20 kDa)

Myung等<sup>[3]</sup>报道,高丽参中含有大量抗氧化类蛋白(SOD、CAT等)能量产生相关蛋白(NAD、ATP合酶等),对这些蛋白的质谱鉴定结果表明,它们Mw多数集中在25~60 kDa范围内,因此,提高这一范围内蛋白点的分辨率和分离效果是极为重要的.由图6可以看出,10%~12.5%(图6(b))和12.5%~15%(图6(c))梯度胶对这一区域内蛋白点的分离效果较差,低丰度蛋白点竖向拖尾现象严重.12.5%均一胶(图6(a))和10%~15%(图6(d))梯度胶分辨率相似,但10%~15%梯度胶可分离出

的低丰度蛋白点数明显增多.

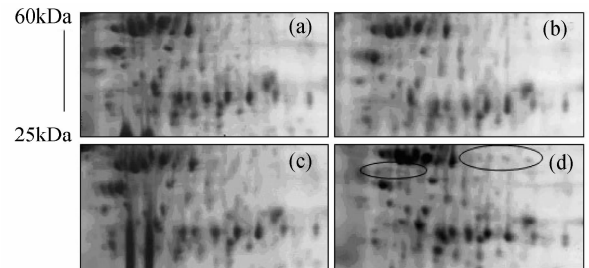


图6 人参蛋白Mw在25~60 kDa范围的2-DE图谱  
Fig.6 Region 2-DE map of ginseng (Mw:25~60 kDa)

皂苷生物合成途径的研究是近年来人参研究的一大热点. Liang等<sup>[4]</sup>利用现代分子生物学技术对其中一些关键酶的研究表明,这些酶大都具有较大的分子量(如DS,Mw为88.3 kDa). 提高大分子量范围内蛋白点的分离效果,可以为人参皂苷合成途径的研究提供蛋白分子水平上的实验指导. 图7(d)(10%~15%梯度胶)和图8(d)(10%~15%梯度胶)箭头所示蛋白点为利用10%~15%梯度胶分离出的特异蛋白点(图7(a)~(c)分别为12.5%均一胶,10%~12.5%梯度胶,12.5%~15%浓度梯度胶),图8(d)椭圆内所示的两个蛋白点分辨率明显高于其它三者(图8(a)~(c)分别为12.5%均一胶,10%~12.5%梯度胶,12.5%~15%浓度梯度胶).

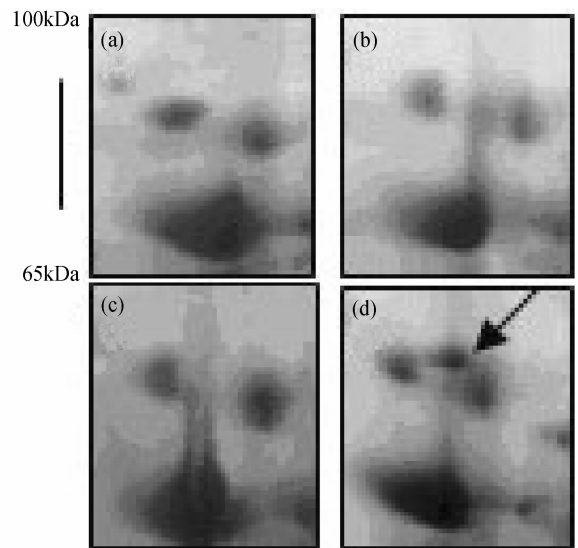


图7 人参蛋白Mw在65~100 kDa范围的2-DE图谱  
Fig.7 Region 2-DE map of ginseng (Mw:65~100 kDa)

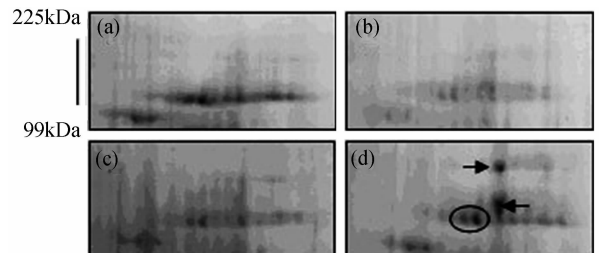


图8 人参蛋白Mw在90~225 kDa范围的2-DE图谱  
Fig.8 Region 2-DE map of ginseng (Mw:90~225 kDa)

这说明 10%~15% 梯度胶对分离一些低丰度大分子量蛋白具有明显优势。

### 2.3 10%~15% 梯度胶 2-DE 图谱分析 (PH4-7, 7 cm IPG 胶条, 考染)

在上述实验过程中发现人参蛋白大多集中在 PH4-7 的范围内. 为使样品蛋白能得到最大程度的分离, 本实验又进一步利用 PH4-7 的窄范围 IPG 胶条和 10%~15% 梯度胶进行了人参蛋白的 2-DE 分离, 结果见图 9. 在整个凝胶范围内的所有蛋白点都得到了很好的分离, 这为后续的质谱鉴定工作打下了良好的实验基础。

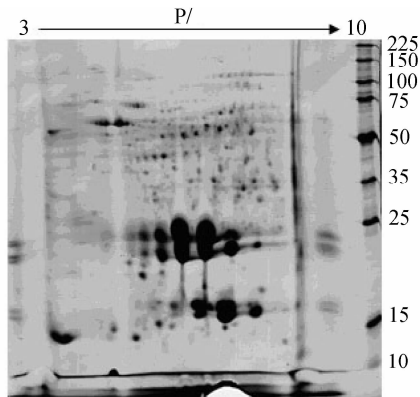


图 9 采用 10%~15% 浓度梯度胶和 PH4-7, 7 cm IPG 胶条获得的人参 2-DE 图谱

Fig. 9 The 2-DE map of ginseng obtained using 10%~15% gradient gel and PH4-7, 7 cm IPG strip

## 3 结论

本文讨论了不同浓度的梯度胶对人参蛋白 2-DE 分离效果的影响, 着重分析了不同浓度梯度胶对人参中高丰度蛋白、低丰度蛋白及大分子量蛋白分离效果的影响. 结果表明, 使用 10%~15% 梯度胶可有效减少人参中高丰度储存蛋白对中低丰度功

能蛋白的掩盖, 可分离出人参中一些分子量偏大及丰度较低的蛋白。

### 参考文献

- [1] WANG Yu-tang, YOU Jing-yan, YU Yong, *et al.* Analysis of ginsenosides in Panax ginseng in high pressure microwave-assisted extraction[J]. *Food Chemistry*, 2008, **110**(1): 161-167.
- [2] SHI Wei, WANG Yutang, LI Juan, *et al.* Investigation of ginsenosides in different parts and ages of Panax ginseng[J]. *Food Chemistry*, 2007, **102**(3): 664-668.
- [3] NAM M H, KIM S, LIU J R, *et al.* Proteomic analysis of Korean ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer)[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, **815**(1/2): 147-155.
- [4] LIANG Y, ZHAO S. Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis[J]. *Plant Biology*, 2008, **10**(4): 415-421.
- [5] LAM S K, NG T B. Isolation of a novel thermostable heterodimeric ribonuclease with antifungal and antiproliferative activities from roots of the sanchi ginseng Panax notoginseng [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **285**(2): 419-423.
- [6] TANSAKUL P, SHIBUYA M, KUSHIRO T, *et al.* Dammareniol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in Panax ginseng[J]. *FEBS Letter*, 2006, **580**(22): 5143-5149.
- [7] LEE M H, JEONG J H, SEO J W. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in Panax ginseng overexpressing squalene synthase gene[J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45**(8): 976-984.
- [8] HAN J Y, KWON Y S, YANG D C, *et al.* Expression and RNA interference-induced silencing of the dammareniol synthase gene in Panax ginseng[J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, **47**(12): 1653-1662.
- [9] HAN J Y, IN J G, KWON Y S, *et al.* Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in Panax ginseng [J]. *Phytochemistry*, 2010, **71**(1): 36-46.
- [10] LUM J H, FUNG K L, CHEUNG P Y, *et al.* Proteome of Oriental ginseng Panax ginseng C. A. Meyer and the potential to use it as an identification tool[J]. *Proteomics*, 2002, **2**(9): 1123-1130.

## Effects on Two-Dimensional Electrophoresis Separation of Panax Ginseng Proteins by Gradient Polyacrylamide Gels

SUN Li-wei<sup>1</sup>, LEI Xiu-juan<sup>2</sup>, MA Rui<sup>1</sup>, CHEN Jia-qing<sup>1</sup>, JIANG Rui<sup>1</sup>, ZHAO Da-qing<sup>3</sup>

(1 *Life Science Research Center, Beihua University, Jilin, Jilin 132103, China*)

(2 *Institute of Special Economic Animal and Plant of Science, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin, Jilin 132109, China*)

(3 *Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China*)

**Abstract:** In order to promote the research and analysis of panax ginseng proteins through the high quality and resolution 2-DE maps of panax ginseng, a two dimensional electrophoresis technology by gradient polyacrylamide gels is presented. In this work, total sample proteins are firstly extracted from the ginseng root, and then are separated by IEF and 12.5% homogeneous polyacrylamide gel and 10%~12.5%, 12.5%~15%, 10%~15% gradient polyacrylamide gels. After all images are scanned and analyzed by Image Scanner and Image Master 2D Platinum version 6.0 system, the optional concentration of gradient polyacrylamide gel is obtained. A lot of low abundance protein spots and large molecular weight spots are observed in 10%~15% gradient polyacrylamide gel map, which indicate that the separation efficiency of gradient gel is highly improved. The results establish the foundation of high quality 2-DE maps of panax ginseng, and provide a tool for the proteomic analysis of other Araliaceae plants.

**Key words:** Gradient polyacrylamide gel; Panax ginseng proteins; 2-DE



**SUN Li-wei** was born in 1970. As a professor, she is engaged in the research of proteomics of traditional Chinese medicine (Herb), small molecules and protein interactions, and protein-protein interactions.