

## 柑橘叶片蛋白质高效提取与溃疡病 PthA 蛋白质 Western blot 分析

李娜<sup>1,2</sup>, 覃磊<sup>1</sup>, 严佳文<sup>1</sup>, 陈佩<sup>1</sup>, 邓子牛<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 利用三氯乙酸-丙酮法、Tris-HCl 提取法、改良 PBS 法提取柑橘叶片蛋白质, 对提取蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳、质谱鉴定和 Western blot 分析, 结果表明, 用改良 PBS 法提取的蛋白质质量浓度达 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 其 SDS-PAGE 电泳条带清晰, 无杂质干扰, 能达到质谱对样品的要求。Western blot 分析结果表明, 与抗柑橘溃疡病相关的 PthA 蛋白质在转 *pthA-nls* 基因糖橙和转 *pthA-nls* 基因冰糖橙中成功表达, *pthA-nls* 基因已整合进甜橙基因组, 表达蛋白质具有免疫反应活性。

**关 键 词:** 柑橘叶片; 蛋白质; 溃疡病; 免疫印记

中图分类号: Q946.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0300-04

## Extraction of *Citrus* leaf protein and analysis of Western blot of the *Citrus* canker protein PthA

LI Na<sup>1,2</sup>, QIN Lei<sup>1</sup>, YAN Jia-wen<sup>1</sup>, CHEN Pei<sup>1</sup>, DENG Zi-niu<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Horticulture and Landscape, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The *Citrus* were used to extract protein and optimized by the TCA-acedone, Tris-HCl extraction and improved method of PBS, and then after SDS-PAGE, mass spectrometry and Western blot. The result showed protein concentration is 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  by the improved of PBS extraction methods. The SDS-PAGE result presented the bright and clear bands, with low background and could be identified by mass spectrometry. Furthermore, by applying transgenic *pthA-nls* gene in sweet orange plants, the PthA protein which is related to the *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. could be found. To be concluded, the *pthA-nls* gene has been transferred into sweet orange and the expressive protein produced immunoreaction.

**Key words:** *Citrus* leaf; protein; canker; Western blot

柑橘叶片中蛋白质含量低, 所含有的盐、有机酸、色素、酚、多糖等物质干扰蛋白质样品的制备。柑橘溃疡病(*Citrus* bacterial canker disease)是一种世界性的检疫性病害, 病原基因 *pthA* 是致病所必需的因子<sup>[1]</sup>。笔者前期以柑橘溃疡病致病基因 *pthA* 为出发点, 利用病原基因诱导植物获得抗性原理,

已将致病基因 *pthA* 的核定位信号 NLSs 导入感病甜橙中。笔者研究柑橘叶片蛋白质的提取, 旨在建立一套适合 SDS-PAGE 电泳、质谱分析和 Western blot 的蛋白质提取方法; 对柑橘溃疡病致病基因 *pthA* 诱导表达的 PthA 进行 Western blot 分析, 将致病基因 *pthA* 导入甜橙中, 使表达蛋白质具有免疫反应活

收稿日期: 2010-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871702); 湖南省科学技术厅项目(2008WK2007)

作者简介: 李娜(1980—), 女, 湖南湘潭人, 主要从事柑橘抗病分子育种研究; \*通讯作者, deng7009@163.com

性,为PthA抗病机理的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为普通糖橙、普通冰糖橙、转 $pthA-nls$ 基因糖橙和转 $pthA-nls$ 基因冰糖橙的叶片,均采自国家柑橘改良中心长沙分中心温室。抗PthA-NLS多肽单克隆抗体由湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室保存;Bradford蛋白质定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体、增强型辣根过氧化物酶底物显色试剂盒(HRP-DAB)购自天根生化科技北京有限公司。匀浆机为德国IKA公司生产的T10,电泳设备为美国GE公司生产,转印设备为美国伯乐公司生产。MALDI TOF/TOF质谱仪及相关软件均为德国布鲁克·道尔顿公司生产。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 柑橘叶片蛋白质的提取

(1) 用改良PBS法提取:对Ren等<sup>[2]</sup>报道的方法进行优化。取叶片约0.5 g,洗净,加入液氮研磨成粉末后加入10 mL离心管中,立即加入3 mL PBS (NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mmol/L, pH 7.4),混匀,在冰水混合物中匀浆,离心(9 500 g, 15 min, 4 ℃),取上清液,超声破碎(开8 s, 停5 s, 共3 min),离心(12 000g, 15 min, 4 ℃),取上清液。

(2) 用Tris-HCl法<sup>[3-5]</sup>提取。

(3) 用三氯乙酸-丙酮法<sup>[6-7]</sup>提取。

#### 1.2.2 蛋白质含量的测定

用Bradford蛋白质定量试剂盒进行定量,含考马斯亮兰G-250染色液和牛血清白蛋白(BSA)标准蛋白质溶液,测定595 nm波长下的吸光值,以不含BSA的样品为空白对照,绘制标准曲线,计算样品中蛋白质的含量。

#### 1.2.3 钠十二烷基的硫酸盐聚丙烯酰胺凝胶电泳

12%分离胶及5%浓缩胶制备参照文献[8]。将样品置于5×凝胶加样缓冲液中,100 ℃加热5 min,以使蛋白质变性。等量加样,重复,同时200 V等压SDS-PAGE电泳。电泳结束后另一块胶考马斯亮

兰染色(0.1%考马斯亮兰R-250, 50%甲醇, 10%冰醋酸, 40%蒸馏水)1 h,脱色(5%甲醇, 7%冰醋酸, 88%蒸馏水)2 h。胶片灯上观察,拍照。

#### 1.2.4 质谱鉴定

用MALDI TOF/TOF进行质谱分析,通过Mascot查询NCBI数据库,如果Mascot分数高于66分( $P < 0.05$ )则认为得到阳性鉴定,分数越大匹配程度越高,否则视为未得到鉴定。将凝胶上的蛋白质条带切下,胶内酶解,将酶解产物浓缩后点于Anchorchip样品靶上,与 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)共结晶,室温干燥后,用MALDI TOF/TOF进行鉴定,获得的质谱图经软件Flex Analysis 3.0分析后,用Biotoools 3.0软件进行数据库搜索。

#### 1.2.5 溃疡病PthA蛋白质的Western blot分析

从转 $pthA-nls$ 基因冰糖橙、转 $pthA-nls$ 基因糖橙和未转化普通冰糖橙、普通糖橙叶片中提取可溶性总蛋白质,经SDS-PAGE电泳,电转移至硝酸纤维素膜进行Western印迹杂交。将凝胶、滤纸、0.45  $\mu$ L硝酸纤维素膜(NC)置于盛有电泳转移缓冲液的容器中,浸泡15 min后,恒压100 V在1 L含20%甲醛电极缓冲液中转移90 min,将NC膜置于封闭液中封闭。漂洗,加入相应的抗PthA-NLS多肽单克隆抗体(1:1 000稀释)<sup>[9-10]</sup>孵育,洗涤。加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体,室温下于摇床孵育,洗涤,用HRP-DAB试剂盒在室温下染色8 min,显色后拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同方法提取柑橘叶片蛋白质的效果

利用三氯乙酸-丙酮法、Tris-HCl提取法、改良的PBS法对0.5 g柑橘叶片进行了蛋白质提取,并对得到的蛋白质液的浓度、体积、技术繁琐程度进行比较(表1)。

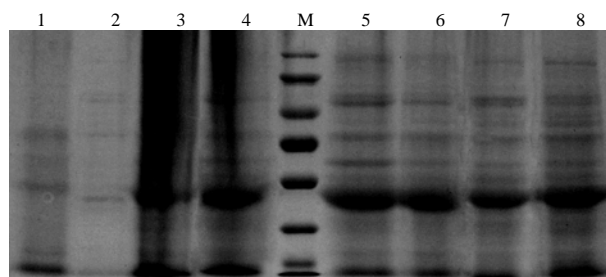
表1 不同方法提取柑橘叶片蛋白质的效果

| 提取方法        | 蛋白质液质量浓度<br>( $\mu$ g· $\mu$ L <sup>-1</sup> ) | 蛋白质液体积<br>( $\mu$ L) | 电泳背景 | 技术繁琐程度 |
|-------------|--|----------------------|------|--------|
| 三氯乙酸-丙酮法    | 9  | 300                  | 较低   | 复杂     |
| Tris-HCl提取法 | 18   | 800                  | 低    | 复杂     |
| 改良PBS法      | 30   | 1 500                | 低    | 简易     |

从表 1 可以看出,3 种方法提取的蛋白质效果及电泳结果差异较大,其中以改良 PBS 法的效果最好.用该方法提取的蛋白质液浓度较高,量多,能满足平行试验需要,而且技术操作简单,费时少,所需试剂少,成本低,所用试剂比使用丙酮、三氯乙酸等有机溶剂环保、无公害,有利于试验操作者的身体健康.

## 2.2 不同方法提取蛋白质的SDS-PAGE电泳结果

图1结果表明,1~2泳道带型模糊,蛋白质浓度低;3~4泳道背景较深,蛋白质浓度较低;5~8泳道带型清晰可见.



M 蛋白质相对分子质量标记;1~2 三氯乙酸-丙酮法提取糖橙、冰糖橙叶片蛋白质条带;3~4 Tris-HCl法提取糖橙、冰糖橙叶片蛋白质条带;5~8 改良PBS法提取普通糖橙、普通冰糖橙、转 $pthA-nls$ 基因的糖橙和冰糖橙叶片蛋白质条带.

图 1 不同方法提取蛋白质的SDS-PAGE电泳结果  
Fig.1 SDS-PAGE results of different extraction methods

## 2.3 质谱鉴定结果

在鉴定的2个特异性蛋白质条带中,Mascot得分分别为400和177,说明结果准确可靠.鉴定结果见表2,与已报道的柑橘属已知蛋白质匹配,表明经SDS-PAGE电泳分离的目的蛋白质已达到质谱对样品的要求.

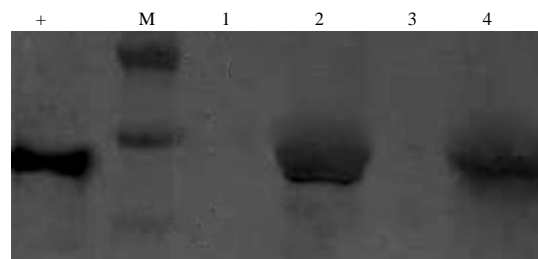
表 2 蛋白质质谱鉴定结果  
Table 2 Proteins identified by MALDI TOF/TOF

| NCBI编号       | 鉴定的蛋白质                    | 功能 |
|--------------|---------------------------|----|
| gi 114329664 | 核酮糖-1,5 二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基(脐橙) | 代谢 |
| gi 6634076   | 核酮糖-1,5 二磷酸羧化酶(柑橘×葡萄柚)    | 代谢 |

## 2.4 溃疡病PthA蛋白质的Western blot分析结果

图2结果表明,转 $pthA-nls$ 基因冰糖橙、转 $pthA-nls$ 基因糖橙在相对分子质量48 000处呈阳性免疫性反应,与阳性对照(PthA重组蛋白质)一致,

而未转化普通冰糖橙、普通糖橙无条带,说明 $pthA-nls$ 基因已整合进甜橙基因组并获得表达,表达蛋白质具有免疫反应活性.



+ 阳性对照;M 蛋白质相对分子质量(72 000、55 000、43 000)标记.

1 普通糖橙;2 转 $pthA-nls$ 基因糖橙;3 普通冰糖橙;4 转 $pthA-nls$ 基因冰糖橙.

图 2 溃疡病 PthA 蛋白质的 Western blot 分析结果  
Fig.2 Western blot results of transgenic  $pthA-nls$  plants

## 3 结论与讨论

提取的蛋白质质量直接关系到Western blot及后续其他蛋白质组学试验的成败.传统的三氯乙酸-丙酮法<sup>[11]</sup>是很有效的蛋白质沉淀方法,能够消除瞬时的蛋白质水解作用和其他蛋白质酶的修饰,其最大的缺点是蛋白质很难重新溶解,步骤较繁琐,耗时较多.Tris-HCl提取法经丙酮反复清洗,虽能较好地脱去盐离子<sup>[12]</sup>,但损失较大,所得蛋白质条带数少.改良PBS法在试验中加以超声波处理,使混合液均匀,大大增加了与提取液的接触面积<sup>[13]</sup>,进而提高了蛋白质样品的质量.该技术操作简单,适合柑橘叶片蛋白质的提取,且提取的蛋白质经SDS-PAGE电泳可得到带型清晰、表达量较高的目的条带,并可直接用于质谱鉴定.

柑橘溃疡病致病基因 $pthA$ 是亚洲型(A型)病菌引发病症所必需的因子. $pthA$ 基因位于柑橘溃疡病菌大质粒上,Swarup<sup>[14]</sup>在1991年克隆得到 $pthA$ 基因全长,共有4 275 bp,编码1 163个氨基酸残基,其中核定位信号区(NLS<sub>S</sub>)是致病基因 $pthA$ 的重要功能区和识别定位于寄主细胞的关键部位.点突变核定位信号区不能对柑橘诱发溃疡病,但对非寄主植物土豆能诱发病症,说明核定位信号是柑橘溃疡病的致病关键因素,阻止其发挥功能,就有可能实现抗病.前期已将 $pthA-nls$ 基因转入感病品种糖橙

和冰糖橙中,希望阻断其致病途径,从而实现抗病;或者使致病基因 $pthA$ 的核定位信号NLSs在甜橙中过量表达,使原有致病蛋白质失去功能,或表达蛋白质失去原有的时空性,或表达蛋白质激活甜橙本身的防御系统,从而干扰病原菌的正常生理代谢,以致转基因甜橙表现出抗性。本研究结果证实了 $pthA-nls$ 基因已整合进甜橙基因组并获得表达,表达蛋白质具有免疫反应活性,为进一步研究PthA的抗病机理奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 胡春华,徐磊,马先锋,等. PthA核定位信号肽抗血清制备及其对柑橘溃疡病的抑制作用[J]. 园艺学报, 2008, 35(6): 811-818.
- [2] Ren G Y, Li B F, Zhao X, et al. Screening of extraction methods for glycoproteins from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) oral-arms by high performance liquid chromatography[J]. J Ocean Univ China (Oceanic and Coastal Sea Research), 2009, 8(1): 83-88.
- [3] 王彩霞,罗丽. 成年态柑橘离体植株中特异表达蛋白质的初步研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(7): 70-72.
- [4] Audrius A Z, Andrew P. Extraction methods for analysis of *Citrus* leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1078: 201-205.
- [5] 谷瑞升,刘群录,陈雪梅,等. 木本植物蛋白质提取和SDS-PAGE分析方法的比较和优化[J]. 植物学通报, 1999, 16(2): 171-177.
- [6] 曾广娟,李春敏,张新忠,等. 适于SDS-PAGE分析的苹果叶片蛋白质提取方法[J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 75-78.
- [7] Rakwal R, Komatsu S. Role of jasmonate in the rice(*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2000, 21: 2492-2500.
- [8] 郑亚军,李艳,李新菊,等. 不同 SDS-PAGE 分离胶浓度下椰子贮藏蛋白质亚基的分离效果[J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 452-456.
- [9] 胡春华,龙桂友,戴素明,等. 抗PthA-NLS 多肽单克隆抗体的制备及单链抗体基因的构建[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 884-890.
- [10] Li N, Hu C H, Long G Y, et al. Preparation of monoclonal antibody against PthA-NLS and cloning of the relative *ScFv* gene[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(1): 101-105.
- [11] 曾广娟,李春敏,张新忠,等. 苹果叶片蛋白质双向电泳样品制备方法的比较[J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 105-109.
- [12] 范吉星,邓用川,黄惜,等. 红海榄根部总蛋白质提取方法的改进和双向电泳体系的建立[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(5): 549-553.
- [13] 袁坤,王明麻,黄敏仁. 一种适合杨树叶片的蛋白质提取方法[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(3): 118-120.
- [14] Swarup S, Yang Y, Kingsley M T. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene *pthA* pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts[J]. Mol Plant Microbe Interact, 1992, 5: 204-213.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠