

丝状真菌蛋白质组分析方法的建立

李锐¹ 贺亮² 吴俐勤¹

(1. 浙江省农业科学院 农产品质量标准研究所 浙江 杭州 310021; 2. 上海医药工业研究院 国家(上海)新药安全评价研究中心 上海 201203)

摘要: 旨在建立丝状真菌蛋白质组的分析方法,对丝状真菌蛋白质组学进行初步探索。使用液氮冷冻研磨、蜗牛酶消化、尿素裂解、硫酸铵沉淀预分级和二维液相色谱分离相结合的蛋白质组研究方法进行丝状真菌的蛋白质组分析;建立的丝状真菌蛋白提取分级分离方法有效的提高了蛋白的分离效率和提取数量,可以应用在丝状真菌蛋白质组研究中,共鉴定了396个蛋白,包括了参与各种细胞生理过程的蛋白,为进一步开展丝状真菌蛋白质组的研究打下了良好的基础。研究中建立的蜗牛酶消化破壁、尿素裂解的蛋白提取方法,可以显著提高丝状真菌胞浆蛋白的鉴定数量,特别是对于那些功能重要但丰度低的蛋白,适合于丝状真菌蛋白质组的研究。

关键词: 丝状真菌; 蜗牛酶; 尿素裂解; 蛋白质组

中图分类号: S855.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0093-04

Establishment of Analytical Method in *Filamentous fungal* Proteome

LI Rui¹, HE Liang², WU Li-qin¹

(1. Institute of Quality Standards for Agricultural Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, National (Shanghai) Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China)

Abstract: To develop the methods of *Filamentous fungal* proteome analysis for preliminary research. Liquid nitrogen grinding, snailase digestion, urea lysis and ammonium sulfate fractionation, two-dimensional liquid chromatography separation methods was established for application in *Filamentous fungal* proteome analysis. The method increases the efficiency of extraction and separation of the protein for applying to *Filamentous fungal* proteome analysis. 396 *T. rubrum* proteins were unambiguously identified involving in major biological processes and this experiment was a basis for further fungal proteomic research. These results suggested that this protein extraction, prefractionation and separation methods were effective and sensitive for detection interest proteins in *Filamentous fungal* proteome analysis, especially important functional low abundance proteins.

Key words: *Filamentous fungi*; Snailase; Ureolysis; Proteome

真菌、细菌和病毒都是人类和动物感染性疾病的重要病因。然而,与细菌和病毒相比,真菌的研究整体来说还比较落后^[1],丝状真菌(*Filamentous fungi*)通常指那些菌丝体比较发达而又不产生大型子实体的真菌,某些丝状真菌与人类和动物的健康密切相关,由曲霉、毛霉、镰刀菌、青霉等丝状真菌引起的人类和动物感染日益多见^[2]。在众多的致病性丝状真菌中,红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)是其中重要的一类,也是一种最常见的致病性皮肤癣菌,世界性广泛分布,人类60%以上的浅部真菌病感染

为红色毛癣菌所致,也是我国最常见的一种皮肤癣菌^[3],它主要侵犯皮肤、指甲(趾甲),偶可侵犯毛发,引起脓癣、脓肿和肉芽肿等深部感染^[4],所致癣病病程持久,且难治愈,易复发,同时还容易导致人和宠物之间的相互传播^[5]。红色毛癣菌的广泛流行,使其成为研究病源性丝状真菌的代表性菌株。

蛋白质组学的出现使生命科学研究进入一个全新的时代,成为21世纪生命科学与生物技术的前沿学科,蛋白质组学技术是生命科学取得重要突破与生物技术创新的重要手段^[6]。液相质谱(LC-MS/MS)已

收稿日期: 2012-07-22

基金项目: 国家“863”项目(2006AA020504)

作者简介: 李锐(1978-),男,河南正阳人,助理研究员,博士,主要从事兽医病原生物学研究。

成为蛋白组学研究中广泛使用的分析工具^[7]。本研究结合二维液相质谱,以红色毛癣菌为试验材料,就丝状真菌蛋白组分析中的蛋白提取分级分离方法进行研究,然后得到的肽片段混合物用多维蛋白鉴定技术进行鉴定,对红色毛癣菌菌丝体胞浆蛋白质组进行了初步的分析。真菌蛋白质组学分析方法的建立有助于真菌感染的预防、诊断、治疗和致病机制的了解。

1 材料和方法

1.1 试验菌株与培养基

菌株为北京大学真菌研究中心保存的红色毛癣菌临床分离株 BMU01672,经形态学鉴定以及对其核糖体 DNA18S 转录间隔区 PCR 扩增、测序鉴定为红色毛癣菌。培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面,YPD 液体培养基。

1.2 主要试剂与仪器

二硫苏糖醇(DTT) 碘乙酰胺(IAA) 购自 Sigma 公司,蛋白酶 K 购自 Merck 公司,蜗牛酶购自北京经科宏达生物技术有限公司,YeastBuster™ Protein Extraction Reagent kit 购自 Novagen 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自 PIERCE 公司。二维液相色谱串联质谱(LCQ Deca XPplus) 购自 Thermo Finnigan (San Jose, USA)。

1.3 红色毛癣菌的菌丝体培养

接种少许菌落于 PDA 斜面,28℃ 培养 7~10 d,待菌体长满斜面,用 10 mL 无菌生理盐水反复冲洗斜面,冲洗液经 100 目灭菌细胞筛过滤去除菌丝体,所得孢子滤液经显微镜镜检计数,以 10^4 个/mL 的密度将孢子接种于 100 mL YPD 液体培养基中,28℃ 150 r/min 培养 3 d,培养物经细胞筛过滤,并用 PBS (pH 值 6.4) 冲洗 3 次去除培养液获得菌丝体。

1.4 红色毛癣菌菌丝体胞浆蛋白的提取

本试验设计了菌丝体胞浆蛋白的 6 种提取方法:

① 取适量菌丝体研磨,加入 5 mL 裂解液(含 8 mol/L Urea、200 mmol/L Na_2CO_3),吹打混匀,冰上孵育 30 min 后剧烈震荡 20 min,4℃ 13 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液进行蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-page)。

② 裂解液中添加 1% 阴离子表面活性剂 SDS,其余与①相同。

③ YeastBuster™ Protein Extraction Reagent 试剂盒提取(见产品说明书)。

④ 菌丝体沉淀首先采用蜗牛酶消化,加入蜗牛酶 300 mg,1 mol/L DTT 50 μL ,PBS (pH 值 6.4) 调体积至 20 mL 混匀,37℃ 水浴 3 h,4℃ 2 500 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀加等体积冰预冷的 PBS

(pH 值 6.4) 轻柔吹打分散,4℃ 2 500 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 2 次,洗净蜗牛酶,后续步骤完全相同于①。

⑤ 裂解液中添加 1% 去污剂 SDS,其余相同于④⑥。

⑥ 菌丝体首先采用蜗牛酶消化,然后使用 YeastBuster™ Protein Extraction Reagent 试剂盒提取。

1.5 硫酸铵沉淀进行预分级

取 1 mL/L 菌丝体细胞裂解液上清,加入 56 mg 硫酸铵即 20% 饱和度,冰上孵育 30 min,4℃ 13 000 r/min 离心 20 min,留上清(A 组分),沉淀加入裂解液溶解;离心所得上清中补加 100 mg 硫酸铵即达到 40% 饱和度,冰上孵育 30 min,4℃ 13 000 r/min 离心 20 min,留上清(B 组分),向离心所得沉淀中加入裂解液溶解(C 组分)。将菌丝体胞浆蛋白以不同饱和度硫酸铵沉淀预分为 A、B、C 三部分,每部分蛋白溶液以 BCA 法参照 PIERCE 公司 BCA 蛋白定量试剂盒的说明进行蛋白定量。

1.6 各预分级的组分蛋白酶消化

将未进行预分级的菌丝体胞浆总蛋白和预分级的 A、B、C 三组分蛋白溶液以裂解液调至蛋白浓度为 1 mg/mL,各取 1 mL 加入 1 mol/L 的 DTT 至终浓度为 1 mmol/L,37℃ 水浴 30 min,加入 1 M 的 IAA 至终浓度为 10 mmol/L,避光室温孵育 30 min,加入 10 μg 蛋白酶 K(蛋白底物:酶 = 100:1),37℃ 水浴孵育 3 h,补加 10 μg 蛋白酶 K,37℃ 水浴 1.5 h。每部分溶液中加入甲酸至终浓度为 5%,经 10 kDa 超滤离心管 4℃ 13 000 r/min 离心 40 min 过滤,各部分滤出液经 OASIS 固相萃取小柱脱盐处理,各得到 1 mL 90% 乙腈混合肽洗脱液,真空干燥,分别用 50 μL 5% 甲酸溶解,待上样检测。

1.7 对混合肽样品的多维蛋白鉴定

用于洗脱的流动相为 A(95% 水,5% 乙腈,0.1% 甲酸)、B(100% 乙腈,0.1% 甲酸)和 C(1 mmol/L 氯化铵,0.1% 甲酸)。时间为 0~35% B 70 min,35%~60% B 20 min,60%~80% B 5 min,80% B 10 min,100% A 15 min。强阳离子交换柱采用步进式洗脱,每步以 x% C 洗脱 5 min,随后以 100% A 脱盐,1~15 步的 x% C 分别为 1%,2%,2.5%,3%,3.5%,4%,4.5%,5%,5.5%,6%,6.5%,7%,8%,10%,50%。

电喷雾的条件为喷雾电压为 3.3 kV,氮气作为辅助鞘气流速为 12 μL ,离子传输管的温度为 160℃。一级质谱的全扫描范围是 m/z 400~1800,其后紧随 3 个数据依赖二级质谱扫描,二级质谱的碰撞能量为 35% 的标准碰撞能量。

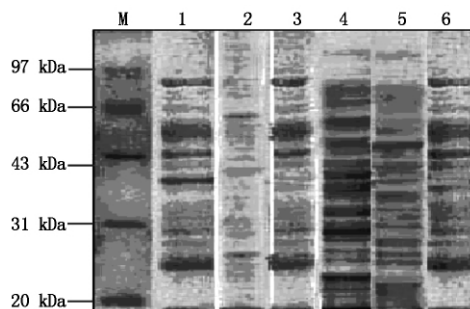
1.8 串联质谱数据分析

所有获得的二级质谱数据用 SEQUEST (Bio-works 3.1SR) 软件进行红色毛癣菌 BMU01672 的 EST 数据库检索; SEQUEST 所鉴定的肽可以有 3 种电荷状态(+1、+2 及 +3),可接受的鉴定结果必须符合如下标准: $\Delta Cn > 0.1$, +1 价多肽 $X_{corr} > 1.9$, +2 价多肽 $X_{corr} > 2.2$, +3 价多肽 $X_{corr} > 3.75$ 。如果一个蛋白质有 2 个或多个多肽通过上述筛选方法 ,这个蛋白质即被鉴定。

2 结果与分析

2.1 菌丝体胞浆蛋白提取方法的分析

试验针对丝状真菌的细胞壁结构特点首先采用液氮研磨破壁 ,然后根据是否采用蜗牛酶消化和加入表面活性剂 SDS 设计了 6 种方法提取胞浆蛋白 ,然后处理后得到的可溶性蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 1)。



M. 蛋白 Marker; 1. 无蜗牛酶消化、无 SDS; 2. 无蜗牛酶消化、加 SDS; 3. 无蜗牛酶消化、试剂盒提取; 4. 蜗牛酶消化、无 SDS; 5. 蜗牛酶消化、加 SDS; 6. 蜗牛酶消化、试剂盒提取。

M. Protein Marker; 1. Without snailase digestion and SDS; 2. Without snailase digestion ,with SDS; 3. Without snailase digestion ,With extraction reagent; 4. Without snailase digestion and SDS; 5. With snailase digestionand SDS; 6. With snailase digestion and extraction reagent.

图 1 菌丝体胞浆蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAGE of *Trichophyton rubrum* cytoplasmic proteins

结果显示 ,方法 4 的蛋白显带最多 ,也最清晰; 其次是方法 5 ,其蛋白显带也较多和较清晰; 方法 6 的蛋白显带比方法 4 和 5 的要少 ,但其蛋白显带也较清晰; 方法 2 其蛋白显带非常模糊 ,基本无法辨认 ,效果最差。由此可见 ,方法 4 处理真菌菌丝 ,使细胞内的蛋白质释放的效果最佳 ,且在操作过程中蛋白质性状较稳定 ,变性较少 ,是最有效的蛋白提取方法 ,可用于后续的研究中。

2.2 硫酸铵沉淀法进行预分级

胞浆总蛋白进行预分级后 A、B、C 三部分样品鉴定的蛋白数量分别为 188 ,178 ,186 个 ,未进行样品预分级所鉴定的 163 个蛋白均被涵盖其中 ,使用硫酸铵沉淀法预分离方法得到的 3 个组分所鉴定的蛋

白合并后剔除重叠部分共鉴定了 396 个蛋白(图 2)。

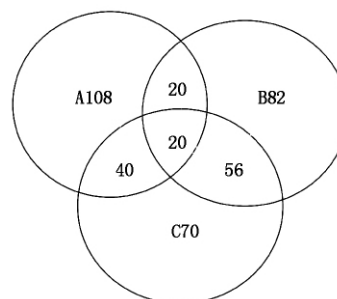


图 2 硫酸铵沉淀法预分级 A、B、C 组分的鉴定结果

Fig.2 Identification of cytoplasmic protein pre-fractionated by ammonium sulphate precipitation

2.3 菌丝体胞浆蛋白的鉴定结果

试验鉴定的 396 个红色毛癣菌蛋白中 ,有 298 个蛋白的 EST 与 NCBI 的 NR 数据库比较获得了较明确的功能提示 ,另外有 98 个为功能未知蛋白 ,鉴定蛋白在 COG 库中的功能分类见表 1。

表 1 396 个已鉴定蛋白在 COG 系统中的分类

Tab.1 Classification of 396 identified protein in COGs system

功 能 Functional Classification	数目
信息存储与加工 Information storage and processing	
翻译 ,核糖体结构及生物发生 Translation ,ribosomal structureand biogenesis	55
转录 Transcription	7
DNA 复制 ,重组与修复 DNA replication ,recombination and repair	7
细胞过程 Cellular Processes	
细胞分裂与染色体分离 Cell cycle control ,cell division ,chromosome partitioning	3
翻译后修饰 ,蛋白折叠 ,伴侣 Posttranslational modification ,protein turnover ,chaperones	36
细胞外膜的生物合成 ,外膜 Cell outer membrane biosynthesis; outer membrane	18
细胞动力与分泌 Cell and secretion	3
无机离子转运与代谢 Inorganic ion transport and Metabolism	18
信号传导机制 Signal transduction mechanisms	3
代谢 Metabolism	
能量产生与转化 Energy production and conversion	27
碳水化合物转运与代谢 Carbohydrate transport and metabolism	25
氨基酸的转运与代谢 Amino acid transport and metabolism	40
核苷的转运与代谢 Nucleotide transport and metabolism	12
辅酶代谢 Coenzyme metabolism	2
脂代谢 Lipid metabolism	8
次级代谢产物的生物合成 ,转运及分解代谢 Secondary metabolites biosynthesis transport and catabolism	20
功能不明确 Poorly characterized	14
仅有功能预测 General function prediction only	98
功能未知 Function unknown	98
总数 Total	396

3 讨论

蛋白质组研究中有效地将复杂样品中目的蛋白提取出来是质谱分析成功与否的关键。丝状真菌的细胞壁是由胞壁蛋白质与葡聚糖、甘露聚糖及几丁质错综交织形成厚而坚韧的壁状结构,因此,细胞破壁是释放胞内蛋白的关键步骤。蜗牛酶是从蜗牛的嗦囊和消化道中制备的混合酶,如含有纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等,对丝状真菌的细胞成分有破坏和分解作用。本研究发现单纯的液氮研磨方法难以达到满意的蛋白提取结果,而同时结合蜗牛酶消化就能显著提高丝状真菌胞浆蛋白提取的数量。

文献中报道表面活性剂(SDS、TritonX-100)可以改变细胞壁或膜的通透性,使细胞内容物有选择的渗透出来,可以提高所提取蛋白质的数量^[8],但本试验使用 SDS 来提取蛋白的效果并不好,原因可能在于表面活性剂等化学渗透法的通用性较差,蛋白提取效果取决于化学试剂的类型和真菌的种类,不同的真菌选择的化学试剂种类和成分配比也各异,有待于进一步的深入研究。

Novagen 的酵母专用蛋白抽提试剂设计用于快速、高效而温和地抽提酵母细胞中可溶活性蛋白,优点是可以避免激烈的机械处理造成的氧化和热度升高对目的蛋白的破坏作用。研究结果可以看出该试剂盒提取蛋白的效果不是最好,且试剂盒的试剂成分未能详知,可能影响到样品后续的质谱鉴定结果,研究表明该试剂盒不适用于提取丝状真菌胞浆蛋白。

红色毛癣菌菌丝体中提取胞浆总蛋白的过程中使用含 8mmol/L Urea、200 mmol/L Na₂CO₃ 溶液作为细胞裂解液,选用的蛋白酶 K 在此条件下活性增强^[9],选用蛋白酶 K 对胞浆总蛋白进行酶切,水解蛋白会产生 6~20 个氨基酸的肽,这种大小的肽片段非常适合于液相质谱的检测。文献报道将复杂蛋白样品进行预分级,降低样品的复杂程度可以提高对低丰度蛋白的鉴定机率和数量^[10],本试验采用不同饱和度的硫酸铵分级沉淀法,硫酸铵沉淀法是经典的蛋白质浓缩方法,不同饱和度的硫酸铵可以破坏溶液中蛋白质分子周围的水化膜,而使蛋白质发

生沉淀,然后分别进行鉴定,尽管各部分样品间所鉴定的蛋白存在一定的重复率,但结果显示与未预分级样品相比显著提高了蛋白的鉴定数量,特别是对于那些功能重要但丰度低的蛋白。这表明对高度复杂的蛋白样品采用不同饱和度的硫酸铵预分级方法可用于丝状真菌蛋白质组的分析。

参考文献:

- [1] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000.
- [2] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [3] Jennings M B. Study of clinically suspected onychomycosis in a podiatric population[J]. J Am Pediatr Med Assoc 2002 92(6): 327-330.
- [4] Smith K J, Welsh M, Skelton H. Trichophyton rubrum showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients[J]. Br J Dermatol 2001, 145(2): 344-348.
- [5] Seckin D, Arıkan S, Haberal M. Deep dermatophytosis caused by Trichophyton rubrum with concomitant disseminated nocardiosis in a renal transplant recipient[J]. J Am Acad Dermatol 2004 51(5 Suppl): S173-6.
- [6] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology[J]. Nat Biotechnol 2001, 19(3): 242-247.
- [7] Jonsson A P. Mass spectrometry for protein and peptide characterisation[J]. Cell Mol Life Sci 2001 58: 868-884.
- [8] Motoyuki S, Hiroyuki W. Development of a sample preparation method for fungal proteomics[J]. Microbiol 2005, 247: 17-22.
- [9] Wu C C, MacCoss M J, Howell K E et al. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins[J]. Nat Biotechnol 2003 21(5): 532-538.
- [10] Righetti P G, Castagna A, Antonioli P et al. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium[J]. Electrophoresis 2005 26(2): 297-319.