

## 板栗疫病菌致病性机理的双向凝胶电泳法研究

姜明国<sup>1,4</sup>, 何小丹<sup>1</sup>, 裴氏秋河<sup>1</sup>, 江欢欢<sup>1</sup>, 黄永颜<sup>1</sup>, 陈保善<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 广西大学 生命科学与技术学院, 南宁 530005; 2. 广西亚热带生物资源保护与利用重点实验室, 南宁 530005; 3. 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室, 南宁 530005; 4. 广西民族大学 化学与生态工程学院, 南宁 530007)

**摘要:** 双向凝胶电泳技术是蛋白质组学研究的基础性技术平台。如何得到一张高质量的双向凝胶电泳图谱是进行后续研究的关键。为探索适用于板栗疫病菌可溶性总蛋白的最佳提取条件, 从蛋白质组学角度来探索板栗疫病菌致病性机理, 比较了目前在丝状真菌中常用的两种蛋白质提取方法, 制备的蛋白质样品经双向凝胶电泳后, 在凝胶上呈现的蛋白质斑点的丰度和分布特点。结果表明, 两种方法获得的蛋白质主要集中分布在 pH4~7 的范围内; TCA-丙酮沉淀法得到的图谱分辨率高但是蛋白质总量很少。裂解液-TCA-丙酮沉淀法得到的蛋白质总量较大, 通过 cleanup kit 处理后图谱分辨率可以达到差异蛋白组的要求。随机提取几个银染蛋白点用 MALDI-TOF MS/MS 进行分析, 可以得到高质量的肽质量指纹谱。表明该样品制备方法可以满足蛋白质鉴定的要求。

**关键词:** 蛋白质提取; 双向凝胶电泳; 蛋白质组; 板栗疫病菌

中图分类号: Q945.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)01-0117-04

## Study on the pathogenicity of *Cryphonectria parasitica* by 2-DE

JIANG Ming-Guo<sup>1,4</sup>, HE Xiao-Dan<sup>1</sup>, PEISHI Qiu-He<sup>1</sup>, JIANG Huan-Huan<sup>1</sup>, HUANG Yong-Yan<sup>1</sup>, CHEN Bao-Shan<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Nanning 530005, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Nanning 530005, China; 3. Key Laboratory of Ministry of Education for Microbial and Plant Genetic Engineering, Guangxi University, Nanning 530005, China; 4. Guangxi University for Nationality, Nanning 530007, China)

**Abstract:** Comprehensive protein extraction from *Cryphonectria parasitica* is a key step to achieve high quality protein separation in two dimensional electrophoresis(2-DE). Two routine cellular total protein extraction methods were compared in order to determine an optimal one for filamentous fungi. Then the extracted total proteins were subjected to 2-DE, and the better extraction method was determined by the indexes of protein distribution and abundance on corresponding silver-stained gel. Data showed that most proteins were distributed in the pH ranging from 4 to 7; Buffer-TCA-Acetone got much more whole protein, which was treated with cleanup kit could be separated very well by 2-DE. But TCA-Acetone method precipitated total protein which is less although which shows fine differentiation among protein spots. So we consider that Buffer-TCA-Acetone is appropriate protocol for *C. parasitica*. Several silver-stained protein spots were picked for MALDI-TOF MS/MS to identify and high-quality PMF and MS/MS spectra were obtained. Buffer-TCA-Acetone is suitable sample preparation protocol for *C. parasitica* proteomics.

**Key words:** protein extraction; 2-DE; proteomics; *Cryphonectria parasitica*

收稿日期: 2006-09-12 修回日期: 2007-03-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30130020); 广西自然科学基金(0229001)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30130020); Natural Science Foundation of Guangxi(0229001)]

作者简介: 姜明国(1973-), 男, 在读博士研究生, 讲师, 研究方向: 分子病毒学, (E-mail)mzxyjiang@163.com。

\* 通讯作者(Author for correspondence)

低毒病毒/板栗疫病菌系统已经成为研究病毒与宿主相互作用的一个崭新的病毒/宿主模型系统(Nuss,2005)。低毒病毒(hypovirus)是一类寄生在板栗疫病菌上的无衣壳双链RNA病毒。它的侵染会导致板栗疫病菌的致病力降低(称为低毒性),也会导致板栗疫病菌的一些其他性状,如菌落色素、产孢能力的改变等。板栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)的基因组是单倍体,遗传性状十分稳定,分生孢子仅有一个细胞核,具有高效的遗传操作体系,是十分理想的宿主材料。该系统同时具备了酵母的易操作性和类似于拟南芥的基因组规模和多细胞结构,可以用与宿主基因和靶基因的研究。芯片技术已被引入低毒病毒/板栗疫病菌相互作用的研究,鉴定了一批对病毒感染有响应的宿主基因(Dave等,2003;Allen等,2003)。但在蛋白组学水平上,则尚无报道。为了在蛋白质组学水平上开展低病毒与宿主相互作用的研究,本文首先探讨了适合于双向凝胶电泳的宿主真菌总蛋白的制备方法,并初步检测其用于蛋白质质谱鉴定的可行性。

## 1 材料

板栗疫病菌菌株(*Cryphonectria parasitica* EP155(ATCC38755)),不带病毒的野生强毒株。培养条件:在PDA上玻璃纸培养7d,温度24~26℃,自然光照下倒置培养。试剂:IPG胶条(pH3~10, pH4~7, 24 cm), 2-D Clean-Up, Ettan 2-D Quant, Silver Stain Plus kit, IPGbuffer, CHAPS, 二硫苏糖醇(DTT), 矿物油均购自GE Healthcare公司, 十二烷基硫酸钠(SDS), 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 牛血清白蛋白(BSA)等试剂购自AMRESCO.; 设备: Ettan IPGphor; Ettan DALT Twelve system; Imagemaster Scanner及凝胶图像分析软件均购自GE Healthcare。飞行时间质谱仪, 4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, USA。

## 2 实验方法

### 2.1 板栗疫病菌及可溶性总蛋白的提取

2.1.1 三氯乙酸(TCA)-丙酮沉淀法 称取2g EP155干燥菌丝体,加液氮反复研磨至粉末状;用15 mL含0.07% DTT的10% TCA-丙酮溶液悬浮样品,充分振荡后,4℃ 3 500 g离心15 min,取上清

-20℃沉淀过夜。4℃ 45 000 g离心1 h,弃上清;沉淀用1 mL含0.07% DTT的丙酮溶液洗两次,取出沉淀真空干燥,加入1 mL裂解液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4% w/v CHAPS,1% w/v DTT,0.5% CA and a cocktail of protease inhibitors)充分溶解。4℃,45 000 g离心45 min,上清用定量试剂盒测定蛋白样品的蛋白浓度。蛋白样品溶液小量分装,-80℃保存。

2.1.2 裂解液(TCA)-丙酮沉淀法 将2g菌丝体粉末转至含有7 mL蛋白提取液(Choi等,1995)(pH7.5 0.5 mol/L Tris-HCl,5%甘油,1% SDS,2% DTT,10 mmol/L硫脲,1 mmol/L PMSF)的50 mL离心管中。振荡摇匀,于室温放置20 min。4℃,10 000 r/min离心30 min,转上清于另一离心管中。向管中加入3倍体积的TCA丙酮溶液-20℃沉淀2 h。其余方法同方法2.2.1。

### 2.2 蛋白质定量

取10 μL蛋白质样品采用Ettan 2-D Quant法(GE Healthcare)定量,以BSA为标准蛋白。

### 2.3 双向凝胶电泳

2.3.1 双向凝胶电泳 取含250 μg蛋白质提取液,用上样水化缓冲液(8 mol/L尿素,2% CHAPS,15 mmol/L DTT和0.5% IPG缓冲液补充体积达450 μL后,将24 cm pH 3~10或24 cm pH4~7的固相pH梯度线性胶条胶面朝下,使水化液浸湿整个胶条,并确保胶条两端与槽两端电极接触。等电聚焦条件(20℃,30 V,6 h;60 V,6 h;200 V,1 h;500 V,1 h;1 000 V,1 h;1 000~8 000 V,30 min;8 000 V,80 kVh)。聚焦结束后,分别用含2% DTT和4%丙酮酰胺的胶条平衡缓冲液平衡缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl,pH8.8,6 mol/L尿素,30%(w/v)甘油和2%(w/v)SDS)平衡胶条各10 min。平衡后,将胶条紧贴在12.5%的聚丙烯酰胺凝胶上方,采用Ettan Dalt Twelve System进行第二向电泳,电泳参数5 w per gel,45 min;20 w per gel,5 h 20 min。

2.3.2 凝胶染色 电泳结束后采用银染方法(夏其昌,2004)对凝胶进行染色,然后用Imagescanner扫描图像,所获图像用Imagemaster图像分析软件统计三次重复实验的双向电泳图谱。

### 2.4 质谱鉴定

将银染后的蛋白点从凝胶上切割下来,用50 μL无菌去离子水清洗两次,加20 μL铁氰化钾(30 mmol/L):硫代硫酸钠(100 mmol/L)(1:1)浸没切

割下来的凝胶 30 min 等胶上染的颜色褪去后, 无菌去离子水清洗两次, 胶粒在  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (200 mmol/L) 中平衡 10 min, 无菌去离子水清洗两次, 然后用乙腈脱水。胶粒用胰蛋白酶 trypsin (40 ng/ $\mu\text{L}$  trypsin in 50 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ) 酶解 5 h, 酶解后用乙腈: 5% 三氟乙酸 (1: 1) 提取, 提取后用 Zip-tip 脱盐后, 直接点样于 MALDI 板上, 用基质辅助激光解吸/电离飞行时间串联质谱 (MALDI-TOF MS/MS) (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) 进行肽质量指纹谱分析。

### 3 结果

#### 3.1 蛋白质提取效率

TCA-丙酮沉淀法提取的总蛋白浓度为 0.65

mg/mL, 总蛋白产量为 0.17 mg/g 菌体; 裂解液 TCA-丙酮沉淀法提取的总蛋白浓度是 2.05 mg/mL, 总蛋白产量为 3.05 mg/g 菌体, 因此裂解液 TCA-丙酮沉淀法提取, 蛋白质产率明显较高。

3.1.1 双向凝胶电泳图谱比较 用 pH3~10 的 IPG 非线性胶条进行了初步分析, 两种方法得到的双向电泳图谱蛋白点都集中在 pH4~7 的范围内。TCA-丙酮沉淀法分离效果好, 背景浅、无拖尾及横纹 (图 1:A), 裂解液 TCA-丙酮沉淀法所得的图谱背景较深 (图 1:B)。但通过 PlusOne 2-D Clean-Up Kit 处理后, 使背景变淡、能够清晰分辨出蛋白点。裂解液 TCA-丙酮沉淀法明显增加了一些新蛋白点。裂解液 TCA-丙酮沉淀法所得蛋白在 pH4~7 的胶条中得到很好的分离 (图 1:C)。水化上样量 0.25 mg, 经电泳、银染后采用 Imagemaster 软件分

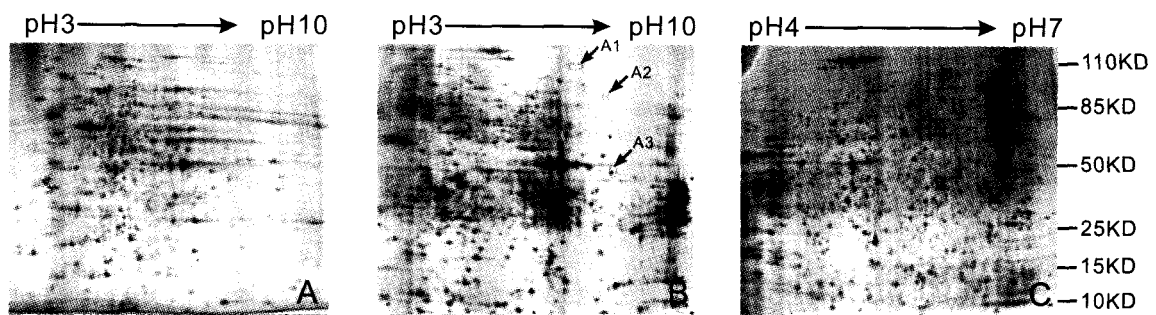


Fig. 1 (A) Proteins were extracted by TCA; (B) Proteins were extracted by using lysis buffer combined with TCA; (C) Proteins were separated in pH4~7.

析 2DE 图谱上的蛋白质斑点数量, 结果表明: TCA-丙酮沉淀法胶上蛋白点平均有  $830 \pm 12$  个, 裂解液 TCA-丙酮沉淀法胶上蛋白点平均有  $1340 \pm 10$  个。说明裂解液 TCA-丙酮沉淀法得到的蛋白质点有很大增加。

3.1.2 蛋白质斑点可用于质谱的鉴定 随机选取双向电泳凝胶上表达量从低到高的三个斑点 (图 1:B) A1、A2 和 A3 酶解后进行飞行质谱分析, 三个样品均能得到 PMF 谱图和 MS/MS 谱图, 其中斑点 A1 经 MALDI-TOF MS/MS 所得的 PMF, 可清晰的分辨出 18 条肽质量指纹图谱 (图 2:A), PMF 谱图的肽段数目适中、分布合理。取 1810.9874 肽进行 MS/MS 可得到高分辨率的图谱 (图 2:B)。经与数据库比较, 该多肽与新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* B-3501A), 一个假定蛋白 (gil50258344) 有较高的同源性 (Protein Score 87, Protein C. I. % 99.999)。

### 4 讨论

样品的制备是影响双向电泳结果的最重要因素。由于丝状真菌具有坚硬的细胞壁, 所以采用一些剧烈的方法来提取可溶性的总蛋白进行双向电泳。从图谱看, TCA-丙酮沉淀法和裂解液 TCA-丙酮沉淀法两种方法提取到总蛋白斑点在分布上差别不大。TCA-丙酮沉淀法得到的蛋白质纯度高, 分离效果也好。为了能够提高蛋白质提取量我们增加了震荡时间和用超声波处理, 蛋白质提取量稍有增加。但是, 得到的量太少难以满足多次分析的需要。裂解液 TCA-丙酮沉淀法得到的蛋白质量较大, 但背景也较深, 这是由于丝状真菌中的酚类和多糖没有处理干净所致。经 PlusOne 2-D Clean-Up Kit 处理后使背景变淡、能够清晰分辨出蛋白点。

实验的重复性是 2-D 分析另一个重要的问题。

考察实验的重复性主要看蛋白质点是否检出、蛋白质点在胶上的位置变化和蛋白质点量的变化。裂解液 TCA-丙酮沉淀法得到蛋白质在上样量 0.25 mg 的情况下经 3 次实验检出蛋白质点在  $1340 \pm 10$  个, 重复性很高。采用 24 cm 的 pH4-7 胶条可得到具有较高区分度的  $1210 \pm 8$  个蛋白质点双向电泳凝胶图。

样品裂解液我们尝试了用 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% w/v CHAPS, 1% w/v DTT,

0.5% CA and a cocktail of protease inhibitors 和 8 mol/L 尿素, 2% CHAPS, 15 mmol/L DTT 和 0.5% IPG, 硫脲提高了蛋白质样品的溶解性, 改善疏水性膜蛋白的溶解性(Choi 等, 1995)。同时, 硫脲和尿素联用能提高蛋白质在固相 pH 梯度胶条的溶解度(Herbert, 1999; Rabilloud 等, 1997)。在第二次平衡时使用的碘乙酰胺价格昂贵, 而且不便于储藏。我们用等量的丙烯酰胺代替, 达到了同样平

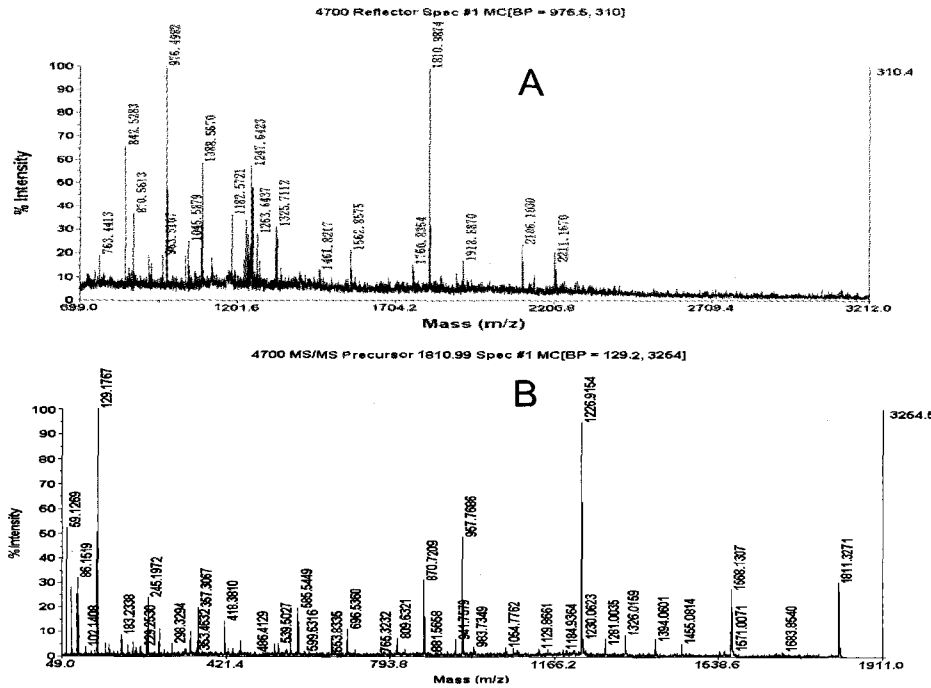


Fig. 2 A1 protein spot is analyzed by 4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems

A. Peptide mass fingerprint (PMF) spectra of spot A1; B. MS/MS spectra of 1810.9874 Peptide in spot A1

衡效果(夏其昌等, 2004)。就蛋白质样品的制备而言, 两种方法各有优缺点。考虑到实验的可重复性, 裂解液 TCA-丙酮沉淀法相对适合板栗疫病菌可溶性总蛋白的提取。采用高灵敏度的银染法进行染色, 采取肉眼可见的蛋白点进行 MALDI-TOF MS/MS 测定可以得到高分辨率的 PMF 和 MS/MS 图谱, 这进一步证明本研究采用的蛋白制备方法, 可以应用于低毒病毒/板栗疫病菌病毒与宿主相互作用系统的差异蛋白组学的研究。

致谢 质谱分析在复旦大学肿瘤蛋白组学中心进行, 在此表示感谢。

#### 参考文献:

夏其昌, 曾嵘, 等. 2004. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京: 科学出版社  
钱小红, 贺福初. 2004. 蛋白质组学[M]. 理论与方法科学出版社

Allen T D, Dawe A L, Nuss D L. 2003. Use of cDNA microarrays to monitor transcriptional responses of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* to infection by virulence-attenuating hypoviruses[J]. *Eukaryotic Cell*, **2**, 1253-1265  
Dawe A L, McMains V C, Maria Panglao, et al. 2003. An ordered collection of expressed sequences from *Cryphonectria parasitica* and evidence of genomic microsynteny with *Neurospora crassa* and *Magnaporthe grisea*[J]. *Microbiology*, **149**, 2 373-2 384  
Choi H, Chen BS, Donald L. 1995. onald L. Nuss Virus-mediated or transgenic suppression of a G-protein a subunit and attenuation of fungal virulence Proc[J]. *Natl Acad Sci USA Microbiology*, **92**; 305-309  
Herbert B. 1999. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, **20**(4-5): 660-663  
Nuss DL. 2005. Hypovirulence; Mycoviruses at the fungal-plant interface[J]. *Nat Rev Microbiol*, **3**(8): 632-642  
Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, et al. 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, **18**(3-4): 307-316