

茯苓菌丝蛋白双向电泳体系的建立及质谱鉴定

李洪波¹, 向小亮², 罗海燕¹, 胡兴^{*1}

(1. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418008; 2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东 广州 510530)

摘要: 为建立茯苓菌丝体蛋白双向电泳体系并鉴定部分蛋白质, 作者采用双向电泳技术对摇瓶培养的茯苓菌丝体蛋白进行分离, 并利用 MALDI-TOF/TOF 对部分蛋白质进行鉴定。结果表明, 2-DE 图谱获得蛋白质点数较多、清晰、蛋白质点分离较完全且图谱背景清晰, 挑取蛋白质点进行鉴定。本研究确定的双向电泳条件分离蛋白质效果及重复性好, 为下一步利用该方法寻找具有重要功能的新茯苓菌丝体蛋白创造了条件。

关键词: 茯苓; 菌丝体; 总蛋白质; 双向电泳; 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱

中图分类号: Q 51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)12-1311-05

Establishment of *Poria cocos* Mycelium Protein 2-DE and MALDI-TOF/TOF Analysis

LI Hongbo¹, XIANG Xiaoliang², LUO Haiyan¹, HU Xing^{*1}

(1. Department of Life Sciences, Huaihua College, Huaihua 418008, China; 2. Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Abstract: To establish an efficient 2-DE protocol for analysis of *Poria cocos* protein and identification of the selected protein spots, the total protein of flask liquid fermented *P. cocos* was separated by 2-DE and the selected protein spots were analysis by MALDI-TOF/TOF. The results showed an efficient 2-DE of flask liquid fermented *P. cocos* total protein was established, high quantity protein spots was obtained, most of protein spots had high resolution and clear background, and then the selected protein spots was identified. This study established an useful conduction of 2-DE of *P. cocos* protein, a high resolution and reproducibility 2-DE image which will be expected to have excellent applications in finding new important functional proteins with proteomics analysis.

Keywords: *Poria cocos* (Schw.) Worf, mycelium, total protein, 2-DE, MALDI-TOF/TOF

收稿日期: 2015-06-26

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目(3K111); 湖南省重点学科建设项目(2011042)。

作者简介: 李洪波(1980—), 男, 湖南永州人, 理学博士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

E-mail: lihongbo8007@163.com

* 通信作者: 胡兴(1970—), 男, 湖南衡阳人, 理学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

E-mail: huxing98@126.com

引用本文: 李洪波, 向小亮, 罗海燕, 等. 茯苓菌丝蛋白双向电泳体系的建立及质谱鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(12): 1311-1315.

茯苓(*Poria cocos* (Schw.) Worf)为担子菌纲多孔菌科真菌,药用部位为菌核。茯苓为常用中药材,亦可作食用。茯苓用作食材可以煮粥、熬汤、泡茶、加工成各种糕点和面条等。茯苓的药理作用主要表现在利尿、镇静、抗肿瘤、增强免疫等方面,其主要活性成分为茯苓多糖和三萜系化合物^[1-4]。茯苓蛋白质约占茯苓菌丝体干质量的1.5%,目前对茯苓菌丝体蛋白的研究报道还很少。近年来,与免疫调节功能相关的茯苓蛋白陆续被发现^[5-8]。最近,研究者从茯苓中发现一种与樟芝免疫调节蛋白1(Acal)同源性很高的蛋白质即茯苓免疫调节蛋白-1,通过构建茯苓菌丝体的EST库还发现了另一种可能具有免疫调节蛋白WCPCP等^[9-10]。茯苓真菌寄生于松树根部,通过分解松树根或树干中的纤维素和半纤维素进行自身营养供给,形成菌核,因此茯苓在生长过程中会分泌具有重要潜在应用价值的酶类,如纤维素酶、半纤维素酶及木质素酶等。茯苓菌丝体中有哪些蛋白质,具有重要功能的蛋白质还有待发现和开发。蛋白质双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是多年来蛋白质组学研究的主要方法,在食用菌研究中也得到较多应用^[10-13]。液体发酵培养可以连续大规模地生产茯苓菌丝体,缩短生产周期并能节省大量松木,减少对环境的破坏,而且液体发酵培养可以对培养基成分和发酵条件进行精确控制^[14]。因此,应用2-DE技术研究摇瓶培养条件下的茯苓菌丝蛋白质组学,为进一步深入研究茯苓菌丝中的重要功能蛋白质和差异基因表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 “湘靖28号”茯苓种由作者所在实验室保存。

1.1.2 试剂 IPG Strips、40% Acr/Bis(37.5:1)溶液、Bio-Lyte:BioRad公司;尿素、CHAPS、考马斯亮蓝G-250:Sigma公司;Bradford蛋白质定量试剂盒:上海生工生物工程有限公司。

茯苓菌丝体摇瓶培养基(g/L):葡萄糖20,酵母浸膏3.5,蛋白胨4.5, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5; pH 6.0, 121 °C灭菌20 min。

1.2 方法

1.2.1 茯苓菌丝体培养 将50 mL摇瓶培养基装

入250 mL锥形瓶,用菌铲挑取于平板生长良好的茯苓“湘靖28”菌丝体数环,接种至摇瓶中,160 r/min、26 °C振荡培养4 d作为液体发酵菌种。300 mL摇瓶培养基装入2 L锥形瓶,以10%接种液体发酵菌种,26 °C摇瓶转速为160 r/min时培养7 d。发酵液于6 000 r/min离心15 min,收集沉积的菌丝球^[14]。

1.2.2 蛋白质的提取 用多层无菌滤纸挤去样品菌丝球中残存的水分,迅速加液氮研磨成粉末,加入预冷的10%三氯乙酸丙酮溶液(含0.07% β -巯基乙醇),混匀,置于-20 °C过夜,然后在0~4 °C下15 000 r/min离心30 min,去上清液,沉淀用预冷的80%丙酮(含0.07% β -巯基乙醇)重悬,重复沉淀、离心多次,至上清液无色后,沉淀经真空干燥制成蛋白质干粉,再经尿素-硫脲蛋白提取液溶解出菌丝干粉中的蛋白质,按生工公司改良Bradford蛋白质定量试剂盒说明书测定蛋白质质量浓度。取茯苓菌丝体蛋白质200 μ g用于IEF(等电聚焦)及SDS-PAGE分析。

1.2.3 蛋白质双向电泳 GE公司Multiphor II双向电泳系统。第一向等电聚焦(Isoelectric focusing, IEF)在Ettan IPGphor II IEF等电聚焦仪(GE Healthcare)上完成。等电聚焦的样品通过水化上样方式加样。IEF采用13 cm非线性胶条,聚焦程序参照pH3-11NL的IPG胶条的聚焦程序根据操作手册《2-D Electrophoresis principle and methods》设定,SDS-PAGE凝胶浓度为10 g/dL,考马斯亮蓝染色法对胶条染色过夜,用ddH₂O漂洗至背景清晰为止。凝胶扫描:UMAX Powerlook 2100xl光密度扫描仪。凝胶分析软件:ImageMaster 2D Platinum。采用ImageMaster 2D Platinum对凝胶中蛋白质点的数目进行分析,符合一个蛋白质点的参数设置为:Smooth:2.0;Min Area:5.0;Saliency:2.0。

1.2.4 蛋白质鉴定 质谱分析在中山大学中山医学院蛋白质组学中心,采用基质辅助激光解吸电离(MALDI)串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF)Ultraflex III对选取的10个蛋白质点进行分析,获得二级肽指纹图谱,并进行数据库检索与蛋白质鉴定。检索的数据库包括NCBI数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),根据质谱数据,蛋白质得分在73以上,检索结果可信度高($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 双向电泳结果重现性

三氯乙酸丙酮溶液沉淀茯苓摇瓶培养的菌丝体总蛋白质,再经尿素-硫脲蛋白提取液溶解出菌丝干粉中的蛋白质,取蛋白质 200 μg 用于 IEF 及 SDS-PAGE 分析。经多次重复实验,Image Master 2D Platinum 软件并结合肉眼分析,蛋白质组表达基本相似,其中的两次 IEF 及 SDS-PAGE 分析结果见图 1。可以看出,利用该方法获取 2-DE 蛋白质斑点

分辨率高,脱色后所得到的图像背景干净,两次 2-DE 的结果高度一致,说明利用该方法所得到的 2-DE 结果重现性较好。

利用 pH3-11NL 的胶条分离得到的蛋白质点相对分子质量主要集中在 50 000~105 000 之间,其中,大部分蛋白质相对分子质量在 70 000 以上,而 pH 8 以上的碱性蛋白质斑点非常少,相对分子质量在 40 000 以下的蛋白质点同样很少。采用 ImageMaster 2D Platinum 对凝胶中蛋白质点的数目进行分析,符合一个蛋白质点数为 452 个,见图 2。

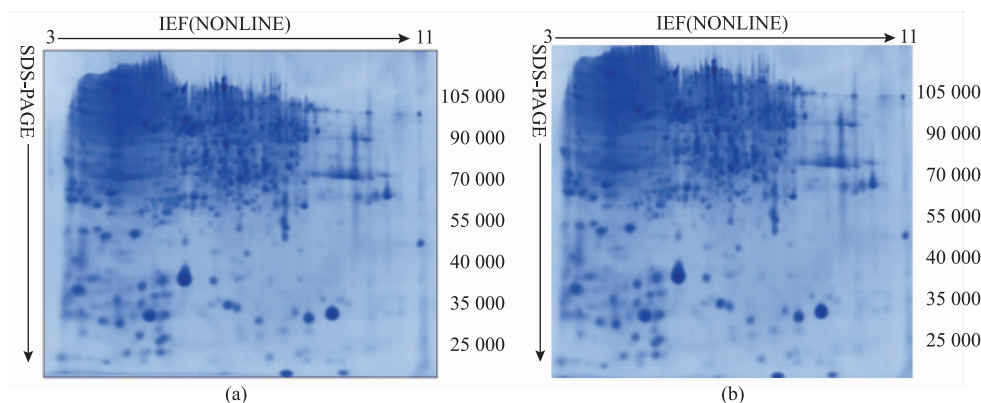


图 1 茯苓菌丝体总蛋白质双向电泳考染结果

Fig. 1 2-DE map stained with coomassie R-250 of *Poria cocos* mycelium total protein

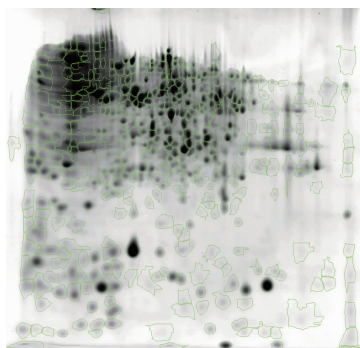


图 2 凝胶中蛋白质点的数目进行分析

Fig. 2 Protein spots analysis of the coomassie R-250 stained gel

2.2 蛋白质质谱鉴定

所选择的 10 个蛋白质点见图 3,所选蛋白质相对分子质量在 100 000 以下、等电点在 3~11、与其它蛋白质间距较大且丰度相对较高。所选择的 10 个高丰度表达且相对分子质量较低的蛋白质进行质谱(MALDI-TOF/TOF MS)分析和数据库检索,获得的 10 个蛋白质点有 6 个蛋白质得分值在 55 以上,并在数据库中找到了与之匹配的蛋白质,其中 3

个蛋白质(3、5 和 10)在 NCBI 蛋白质组数据库中得分较高(大于 73),这 3 个蛋白质斑点数的质谱分析结果在数据库中的鉴定结果可信度高,其中得分最高的 10 号蛋白质点分值达 212,10 号蛋白质点的质谱分析和数据库检索结果见图 3。表 1 显示了 6 个蛋白质在 NCBI 库中鉴定到蛋白质的相关信息,获得身份鉴定的 6 个蛋白质分别为:60S 核糖体蛋白 L40、自噬性溶酶体蛋白 Apg16、泛素、细胞色素 P450、热休克蛋白 STH1 和真核起始因子-5a。

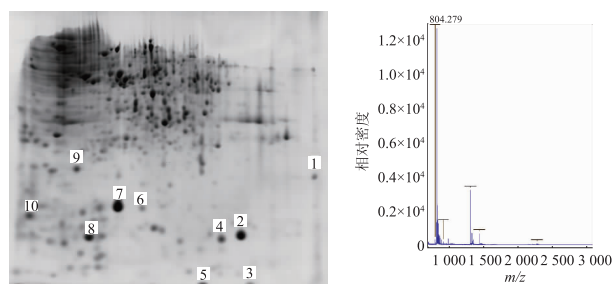


图 3 蛋白质点的选取及质谱分析

Fig. 3 Protein spots selection and MS analysis

表 1 蛋白质的鉴定

Table 1 Identification results of selected proteins

序号	登录号	得分	预测相对分子质量	蛋白质名称
1	gil336270996	44	36013	假定蛋白
2	gil342882862	42	23407	假定蛋白
3	gil300708909	78	16000	60S 核糖体蛋白 L40
4	gil260946103	58	23080	自噬性溶酶体蛋白 Apg16
5	gil325096355	113	15797	泛素
6	gil327343529	57	61878	细胞色素 P450
7	gil346979457	54	46941	假定蛋白
8	gil241951140	48	92099	假定蛋白
9	gil320584052	61	63913	热休克蛋白 STI1
10	gil70990614	212	21492	真核起始因子-5a

3 结 语

蛋白质的提取是双向电泳的第 1 步,也是最为关键的,决定双向电泳的成败。如果需要研究组织中尽可能多的蛋白质,可以选择 TCA-丙酮法,这也是目前应用最广的蛋白质提取方法,本研究采用该方法获得了较好的提取效果^[11-13]。第二向凝胶浓度对蛋白质的分离效果影响很大,这就需要确定一个较适宜的分离胶浓度。本研究采用 10 g/dL 的分离胶浓度效果更好,蛋白质点分布更加均匀,这样在调整好上样量后能够分离到更多的蛋白质,但对于相对分子质量较小的蛋白质 10 g/dL 的胶质量浓度就显得偏低。经软件分析共得到不到 500 个蛋白质点,这与蛋白质上样量相对较少、染色和 SDS-PAGE 胶质量浓度等都有关系。本研究主要目的是探索提取真菌菌丝体总蛋白质中常用的三氯乙酸丙酮溶液沉淀结合尿素-硫脲法对茯苓菌丝体总蛋白质提取的适用性,因此蛋白质的上样量相对差异蛋白分析要少得多,而差异蛋白 2-DE 分析的上样量至少为本研究的 5 倍以上。三氯乙酸丙酮溶液沉

淀结合尿素-硫脲法对茯苓菌丝体总蛋白质提取的重现性好,说明该方法对于茯苓菌丝体总蛋白质的提取同样适用。选取的蛋白质点经质谱鉴定后,6 个经鉴定的蛋白质都是组成型表达基因的产物,由于还没茯苓的蛋白质数据库,且已经报道的茯苓蛋白质还非常少,因此数据库检索大部分蛋白质得分较低,只有 3 种蛋白质的得分在 73 分以上。另外,茯苓菌丝体总蛋白质质谱鉴定结果说明,样本全蛋白质检索需要检测的样品数量大,并且大多数具有应用价值的重要功能蛋白质往往并非是组成型基因表达的蛋白质,通过减少检测样品的数量来提高发现茯苓菌丝体重要功能蛋白质的效率,在后续的研究中,我们将利用不同组分的培养基在不同条件下对茯苓菌丝体差异表达蛋白质进行鉴定,以期发现如纤维素酶、半纤维素酶、木质素酶等酶类和其它重要生物活性蛋白质,为茯苓经济价值的深入开发奠定理论与技术基础。总之,本研究为茯苓菌丝体蛋白质组学研究提供了可靠的蛋白质提取方法和较为合适的双向电泳条件,为下一步差异蛋白的鉴定奠定了技术基础。

参考文献:

- [1] WANG W, DONG H, YAN R, et al. Comparative study of lanostane-type triterpene acids in different parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf by UHPLC-Fourier transform MS and UHPLC-triple quadrupole MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 102:203-214.
- [2] SUN Y. Biological activities and potential health benefits of polysaccharides from *Poria cocos* and their derivatives[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 68: 131-134.
- [3] FENG Y L, LEI P, TIAN T, et al. Diuretic activity of some fractions of the epidermis of *Poria cocos*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3):1114-1118.
- [4] HU Bin, YANG Yiping, YE Yang. Chemical constituents from *Poria cocos*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2006, 37(5):655-8.(in Chinese)

- [5] RIOS J L. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos*[J]. **Planta Med**, 2011, 77(7): 681-691.
- [6] CHEN X, ZHANG L, CHEUNG P C. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated beta-(1→3)-d-glucan from *Poria cocos*[J]. **Int Immunopharmacol**, 2010, 10(4): 398-405.
- [7] CHANG H H, YE H C H, SHEU F. A novel immunomodulatory protein from *Poria cocos* induces toll-like receptor 4-dependent activation within mouse peritoneal macrophages[J]. **J Agric Food Chem**, 2009, 57(14): 6129-6139.
- [8] CHANG H H, SHEU F. A Novel fungal immunomodulatory protein (PCP) isolated from *Poria cocos* activates mouse peritoneal macrophage involved in Toll-like receptor 4[J]. **FASEB J**, 2007, 21(702): 15.
- [9] WU Zongxun, SUN Zhiwen. Construction and analysis of EST library in *Wolfiporia cocos*[J]. **Bio Formosa**, 2007, 42(1): 47-53. (in Chinese)
- [10] LI Hongbo, YANG Ruixue, CHEN Jing, et al. Preparation and analysis of the antibody against *Poria cocos* immunomodulatory protein WCFIP1[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2014, 45(20): 2912-2916. (in Chinese)
- [11] HOU Y, ZHENG Z, XU S, et al. Proteomic analysis of *Fusarium graminearum* treated by the fungicide JS399-19[J]. **Pestic Biochem Physiol**, 2013, 107(1): 86-92.
- [12] SU Y, GUO Q, TU J, et al. Proteins differentially expressed in conidia and mycelia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu stricto[J]. **Can J Microbiol**, 2013, 59(7): 443-448.
- [13] QIU J, SU Y, GELBIC I, et al. Proteomic analysis of proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Aschersonia placentia*[J]. **Can J Microbiol**, 2012, 58(12): 1327-34.
- [14] LI Yi, YANG Sheng, LI Chen, et al. Compound medicinal medium of flask liquid fermentation of *Poria cocos* and its chemical constituents[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2012, 43(8): 1519-1522. (in Chinese)

科技信息

欧盟拟禁止在食品中使用山梨酸钙

2017年11月17日,据《食品导航》网站消息,由于缺乏山梨酸钙防腐剂的使用安全性数据,欧盟将在食品中禁止使用山梨酸钙。

据悉,欧盟曾批准食品中可以使用3种山梨酸盐:山梨酸(E200)、山梨酸钾(E202)和山梨酸钙(E203),允许摄入量为3毫克/公斤体重·每天(ADI)。2015年6月30日欧盟相关机构发布征求3种山梨酸盐对人体健康的安全性评价数据,但时至今日仍缺乏山梨酸钙的安全性评价数据,因此,欧盟将禁止食品中使用山梨酸钙,并在欧盟刊物发布(EFSA Journal)该消息之日起20天后,此项措施生效。

[信息来源]厦门WTO工作站. 欧盟拟禁止在食品中使用山梨酸钙 [EB/OL]. (2017-11-21). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=55822>