

一种优化的适用于双向电泳的水稻纹枯病菌 蛋白质提取方法

舒灿伟 陈健仪 赵 美 王陈骄子 周而勋

华南农业大学农学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广州 510642

摘要 为开展水稻纹枯病菌蛋白质组学的研究, 采用 TCA-丙酮法、SDS 法和 TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法对水稻纹枯病菌蛋白质提取质量进行比较, 并建立了双向电泳体系。对电泳后的图谱用 Quantity One 软件进行分析, 结果发现: TCA-丙酮法、SDS 法和 TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法所获得的蛋白质双向电泳图谱中, 分别记录得到 557、309 和 877 个蛋白质点。SDS 法提取的蛋白质样品杂质较多, 存在盐离子和小分子物质干扰, 得到的蛋白点较少; TCA-丙酮法提取的蛋白质样品呈黄色, 有色素残留; 而在 TCA-丙酮法的基础上, 增加酚/SDS 抽提步骤, 能够有效地去除样品中的盐离子和色素等杂质, 获得背景清晰、分辨率高的蛋白图谱。结果表明, 本研究建立了一种优化的 TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法, 该法适用于水稻纹枯病菌蛋白质双向电泳的提取。

关键词 水稻纹枯病菌; 双向电泳; 蛋白质组学; 丝状真菌; 三氯乙酸

中图分类号 S 435.111.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)05-0015-05

蛋白质组学(proteomics)是宏观地研究生物体内蛋白质差异表达、蛋白质功能以及蛋白质互作, 揭示基因表达调控和生命学行为的一门新科学。真菌, 尤其是丝状真菌蛋白质组学研究, 近年来取得了较大的研究进展^[1-2]。得益于大量已公布的真菌基因组序列, 真菌蛋白质组学研究正以越来越快的速度发展^[3]。双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术与高通量的蛋白质谱分析联用是目前进行蛋白质组学研究最常用的方法之一。2-DE技术可以从聚丙烯酰胺凝胶上检测到多达 1 800 个植物蛋白点^[4], 能分析数以百计的蛋白质, 因而成为蛋白质组学研究中的首要技术^[5]。

蛋白质纯度的优劣是决定 2-DE 技术的可重复性和获得高分辨率的关键^[6], 对于不同物种或样品, 蛋白质的提取方法也不尽相同, 为了获得较好的蛋白质质量, 可以对已报道的方法进行优化或改良。真菌样品的蛋白质比较难提取, 主要有这几方面因素: ①真菌的细胞壁结构主要是几丁质, 壁的厚度较大, 给破壁处理带来了一定难度; ②真菌富含多糖和色素类物质, 不容易去除; ③真菌会产生大量的分泌

蛋白酶, 可能使蛋白质降解^[7-8]。目前适用于 2-DE 技术的真菌蛋白质提取方法, 一般步骤包括三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)或甲醇沉淀法进行纯化处理, 再用苯酚提取蛋白质, 用甲醇醋酸铵盐浓缩蛋白质, 这些处理方法同样可以去除干扰蛋白电泳的杂质^[9-12]。

水稻纹枯病的病原菌为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的 AG-1 IA 融合亚群。该菌是重要的土传丝状真菌, 为害多达 260 多种植物, 对农业生产造成严重的经济损失^[13]。水稻纹枯病菌全基因组的公布促进了人们对该菌蛋白质的功能研究^[14]。Lakshman 等^[15]曾报道从立枯丝核菌(*R. solani*) AG-4 融合群的菌株提取蛋白质的方法, 但笔者使用该方法并不能从水稻纹枯病菌(*R. solani* AG-1 IA)中提取到适合于双向电泳的蛋白质。因此, 本研究对该方法进行优化, 拟先采用单向 SDS-PAGE 筛选方法, 比较 TCA-丙酮沉淀法、SDS 提取法和 TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法制备的水稻纹枯病菌蛋白质样品的质量, 再用 2-DE 技术分离蛋白质, 旨在建立一种适用于双向电泳的水稻纹枯病菌的蛋

收稿日期: 2017-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470247); 广东省自然科学基金(博士启动)项目(1614050001896)

舒灿伟, 博士, 讲师. 研究方向: 植物病原真菌及真菌病害. E-mail: shucanwei@scau.edu.cn

通信作者: 周而勋, 博士, 教授. 研究方向: 植物病原真菌及真菌病害. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

白质提取方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和培养条件

水稻纹枯病菌(*R. solani* AG-1 IA)GD-118 菌株,为笔者所在实验室保存的强致病力菌株。用 5 mm 直径的打孔器从刚长满培养皿的水稻纹枯病菌菌丝边缘打取菌饼,取 5~8 块菌饼接入装有 100 mL PDB 的三角瓶中,置于 28 ℃ 下培养 6 d 收集菌丝。用 ddH₂O 洗净残留的 PDB,用滤纸吸干水分后马上用液氮冷冻并保存在 -80 ℃ 冰箱备用。

1.2 主要试剂和仪器

TCA、N,N,N',N'-四甲基二乙胺(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)、Bio-Lyte 3/10、CHAPS 3-[3-Cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propanesulfonate、30% 丙烯酰胺单体贮液等均购于 BIO-RAD 公司;其他分析纯级试剂购于广州化学试剂公司。使用的主要仪器有 BIO-RAD PROTEAN IEF Cell 等电聚焦仪 MINI PROTEIN 3 电泳槽、GS-800 Calibrated Imaging Densitometer 型凝胶扫描仪和(美国 BIO-RAD 公司),制冷水浴循环器 SC150-A5B(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.3 水稻纹枯病菌总蛋白质提取方法

1) TCA-丙酮沉淀法。参考 Lakshman 等^[15]所报道的方法,略作修改。称取 4 g 冻干菌丝体,加液氮研磨成粉末,马上加入 35 mL 预冷的 10% TCA-丙酮溶液(含 0.07% β-巯基乙醇),涡旋混匀后冰浴过夜。将混合物在 4 ℃ 下以 11 000 r/min 离心 20 min,沉淀即为全蛋白;沉淀加入 5 倍体积预冷丙酮(含 0.07% β-巯基乙醇)重悬沉淀后在 -20 ℃ 静置 1 h,重复 4 次;最后一次弃上清,通风橱内干燥,制得蛋白干粉。

2) SDS 提取法。如上述方法研磨 4 g 菌丝体成粉末,马上加入 35 mL SDS 缓冲液(甘油 20%、SDS 2%、DTT 2%、Tris-HCl(0.1 mol/L, pH 6.8))后在 80 ℃ 下加热 5 min;随后在 4 ℃ 下以 11 000 r/min 离心 20 min,弃沉淀。上清液加入 4 倍体积预冷丙酮,涡旋混匀后冰浴过夜;以同样的条件离心 20 min,获得沉淀即为全蛋白。用预冷丙酮洗沉淀 1 次,干燥即得蛋白干粉。

3) TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法。如上述方法研磨 4 g 菌丝体成粉末后加入 35 mL 预冷的

10% TCA-丙酮溶液(含 0.07% β-巯基乙醇),涡旋混匀冰浴过夜。随后在 4 ℃ 下以 11 000 r/min 离心 20 min,分别用 80% 甲醇溶液(含 100 mmol/L 的醋酸铵)和 80% 丙酮洗涤沉淀,通风干燥 10 min。再加入 10 mL 酚/SDS 抽提液[Tris 饱和酚(pH 7.8):(甘油 30%、SDS 4%、β-巯基乙醇 5%、Tris-HCl(0.1 mol/L, pH 6.8)), V/V],振荡混匀温育 5 min 后 4 ℃ 11 000 r/min 离心,转移上层酚相至新离心管中,加入 5 倍体积的冷的含 100 mmol/L 的醋酸铵甲醇溶液,于 -20 ℃ 冰浴过夜。第 2 天将混合物在 4 ℃ 下,11 000 r/min 离心 20 min,沉淀用甲醇和 80% 丙酮各洗 1 次,干燥即得蛋白干粉。

1.4 水稻纹枯病菌总蛋白浓度测定

分别称取上述 3 种方法获得的蛋白质样品,每 25 mg 干粉加入 500 μL 裂解液裂解,室温放置 3~4 h,每 0.5 h 轻摇匀,在 4 ℃ 高速离心 20 min 后取上清液。样品可在 -80 ℃ 下保存或直接用于电泳。样品蛋白质的浓度用 BSA 方法测定^[16]。

1.5 水稻纹枯病菌总蛋白 SDS-PAGE 垂直电泳

取 150 μg 的蛋白质与等体积 2×SDS-PAGE 上样缓冲液混合后,在 100 ℃ 加热处理 3~5 min,冷却后以 11 000 r/min 离心 1 min。将上述处理好的蛋白质点进加样孔中,加入 1×电泳缓冲液后接上电源。开始用 80 V 电泳至浓缩胶部分成一水平线后,提高电压到 120 V 电泳至溴酚蓝到达距胶底 1 cm 处时停止电泳。

1.6 水稻纹枯病菌总蛋白双向电泳

双向电泳采用 Bio-Rad 双向电泳系统。试验方法参照 Bio-Rad 蛋白质组双向电泳操作指南,略有改动。第一向等电聚焦使用 7 cm 的 IPG 预制胶条(pH 3~10)。等胶条充分吸胀后,用湿润的滤纸吸干胶条上多余的液体,再转移到等电聚焦盘中进行等电聚焦电泳。IEF 聚焦结束的胶条,立即进行平衡和第二向 SDS-PAGE 电泳,方法如本文“1.5”所述。电泳结束后,轻轻撬开两层玻璃,取出凝胶,并切角以作记号。

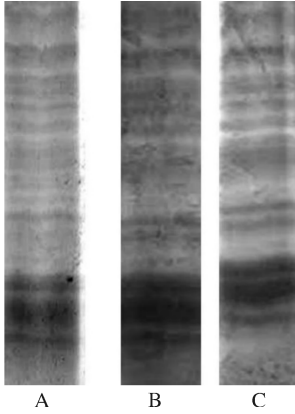
1.7 凝胶染色及图片处理

用 $V_{\text{冰醋酸}} : V_{\text{无水乙醇}} : V_{\text{水}} = 1 : 4 : 5$ 的溶液固定凝胶 1 h,然后用胶体金考马斯亮蓝 G-250 染色液振荡染色过夜(16 h),再用 ddH₂O 振荡脱色至凝胶背景干净。用 BIO-RAD GS-800 Calibrated Imaging Densitometer 型凝胶扫描仪扫描,并采用 Quantity One 软件进行图片获取。

2 结果与分析

2.1 3 种方法提取的蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果

从这 3 种方法所制备的样品总蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱(图 1)可以看出,3 种方法提取的水



A: TCA-丙酮沉淀法; B: SDS 提取法; C: TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法 A: TCA-acetone precipitation method; B: SDS method; C: TCA-acetone-phenol/SDS method.

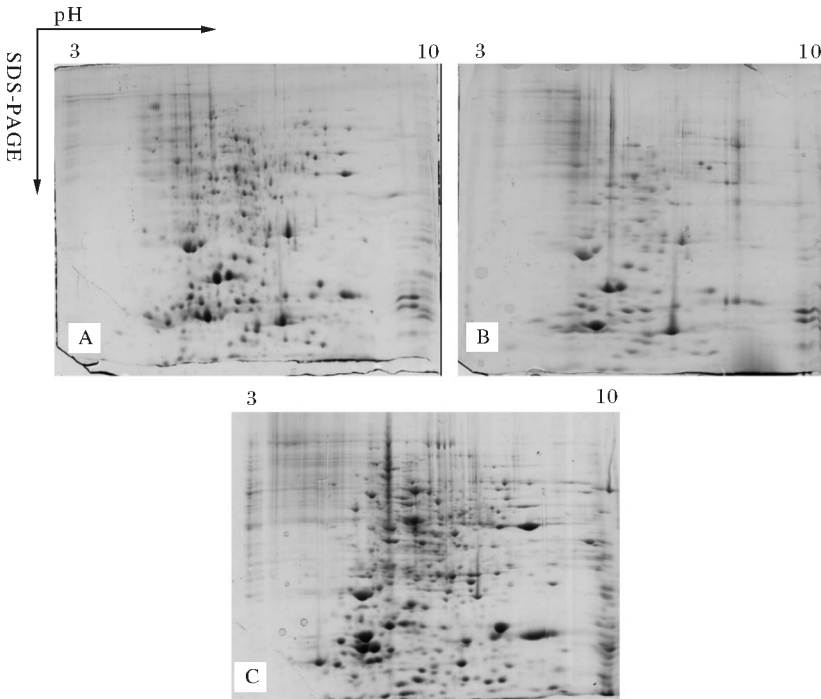
图 1 3 种方法分别提取水稻纹枯病菌总蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA proteins extracted with three methods

稻纹枯病菌总蛋白的样品性质、条带数量、大小位置以及着色程度都存在较大差异:用 TCA-丙酮沉淀法获得的蛋白粉末呈现黄色,含色素杂质较多,蛋白提取率不高,条带较浅,约有 28 条(图 1A);TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法比其他 2 种方法获得的条带更清晰,约有 30 条(图 1C),在 TCA-丙酮沉淀法的基础上加入酚/SDS 联合抽提液之后,能使纯化后的蛋白由黄色变为乳白色,有效去除色素等杂质;SDS 提取法提取得到的蛋白图条带较模糊,约有 23 条(图 1B),泳道中背景较深,说明蛋白质杂质较多,质量较差。

2.2 3 种方法提取蛋白质的双向电泳结果

将 3 种方法提取得到的蛋白质样品进行 2-DE 分离,电泳的参数选择了 7 cm pH 3~10 的胶条进行双向电泳。电泳结果的考马斯亮蓝染色结果(图 2)显示,TCA-丙酮沉淀法和 SDS 提取法得到的总蛋白样品较少,损失较多,分辨率低,这 2 种方法分别获得 557 和 309 个蛋白质点。TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法获得的蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶上共分离得到 877 个蛋白质点,没有弥散蛋白质点且斑点数量多于其他 2 种方法。该方法得到的蛋白质点没有明显拖尾现象,形状清晰圆润,分布位置居



A: TCA-丙酮沉淀法; B: SDS 提取法; C: TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法 A: TCA-acetone precipitation method; B: SDS method; C: TCA-acetone-phenol/SDS method.

图 2 3 种方法提取的水稻纹枯病菌总蛋白的 2-DE 图谱

Fig.2 2-DE patterns of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA proteins extracted with three methods

中,不偏向一侧,分离效果很明显,适合下一步挖点酶解。该方法所优化后的最终等电聚焦程序为:250 V,0.5 h;500 V,1 h;1 000 V,3 h;4 000 V,3 h;4 000 V,20 000 V·h。

3 讨论

双向电泳技术是蛋白质组学研究的经典技术之一,而蛋白质的质量是制约双向电泳成败的关键因素^[1]。由于研究的材料不同,提取蛋白质的方法也有所不同,因而摸索合适的蛋白质提取方法是开展蛋白质组学研究的首要条件。真菌,尤其是丝状真菌,由于细胞壁蛋白质与多糖、几丁质等紧密结合,比普通材料难以破碎,难以提取到高质量的蛋白质^[7, 10, 17]。这对于富含多糖和黑色素的水稻纹枯病菌样品来说,难度更大。

水稻纹枯病菌是一种重要的土传病原真菌,也是典型的丝状真菌。笔者在前期研究中发现,该菌富含多糖,还会产生富含黑色素的菌核^[18],其核酸提取方法难度较大。为了开展水稻纹枯病菌的蛋白质组学研究,笔者前期严格按照 Lakshman 等^[15]报道的方法,但是获得的双向电泳效果很差,这可能与各自所用的材料属于立枯丝核菌的不同融合群有关。因此,笔者根据已报道的方法,加以改进,摸索出了一种适用于水稻纹枯病菌蛋白质提取的有效方法。

本研究使用了3种蛋白质的提取方法对水稻纹枯病菌的蛋白质进行提取,从结果看,这些方法都能提取到蛋白质,但电泳的效果差别很大。从等量上样的 SDS-PAGE 电泳结果中可以看出,TCA/丙酮法和 TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法所提取的蛋白质数量相当,而 SDS 提取法获得的谱带背景较黑,表明所提取的蛋白质中含有较多的杂质,会影响后续的双向电泳。TCA/丙酮法和 TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法的单向电泳图谱上,获得的蛋白质条带相仿;但后续的双向电泳结果表明,使用 TCA-丙酮-酚/SDS 联合抽提法比 TCA/丙酮法所获得的蛋白点要多。这是由于在 TCA/丙酮法的基础上,增加了酚/SDS 抽提步骤,提高了蛋白质溶解于酚层的效率,高效去除了核酸和小分子物质。用甲醇和丙酮洗涤,有效地去除了一些杂质盐离子和色素,这2种试剂在干燥步骤充分发挥干净,不影响后续实验。所以该优化方法获得的电泳图谱背景干净,分辨率高,可以媲美余功明等^[19]所报道的方法。

在水稻纹枯病菌的蛋白样品中,高分子质量区域的蛋白质非常多,因此需要筛选合适的上样量,避免高丰度的蛋白质成片出现或者斑点过大^[19]。经过筛选,笔者发现每个上样孔加入 150 μg 的蛋白质能获得很好的结果,比前人所报道的方法更精确定量,方便实用。目前笔者已经使用该优化的方法,从水稻纹枯病菌的菌核中提取到高质量的蛋白质,该方法也有望在其他产菌核真菌中得到应用。

参 考 文 献

- [1] 李锐,贺亮,吴俐勤. 丝状真菌蛋白质组分析方法的建立[J]. 华北农学报, 2012, 27(S1): 93-96.
- [2] 张宇,贺丹,王丽. 丝状真菌蛋白质组学研究[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(3): 281-283.
- [3] 储俊. 大丽轮枝菌分泌蛋白质组学及酵母同源蛋白的结构和功能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2012.
- [4] CHO E L H, LEE K H. A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: the multiphor, the IPGphor and the protean IEF cell [J]. Electrophoresis, 2000, 21(5): 993-1000.
- [5] GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.[J]. Electrophoresis, 1993, 9(9): 130-132.
- [6] 刘伟霞. 适用于小麦叶片蛋白质组分析的双向电泳技术体系的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [7] 胡彬彬,林连兵,魏云林,等. 一种高效的真菌总蛋白质提取方法[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(9): 53-58.
- [8] 张成省,李多川,孔凡玉. 真菌菌丝细胞壁可溶性蛋白抽提方法研究[J]. 山东科学, 2004, 17(1): 12-16.
- [9] NANDAKUMAR M P, SHEN J, RAMAN B, et al. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis[J]. Journal of proteome research, 2003, 2(1): 89-93.
- [10] KNIEMEYER O, LESSING F, SCHEIBNER O, et al. Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. Current genetics, 2006, 49(3): 178-189.
- [11] NAHLIK K, DUMKOW M, BAYRAM O, et al. The COP9 signalosome mediates transcriptional and metabolic response to hormones, oxidative stress protection and cell wall rearrangement during fungal development.[J]. Molecular microbiology, 2010, 78(4): 964-979.
- [12] TEUTSCHBEIN J, ALBRECHT D, PÖTSCH M, et al. Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* [J]. Journal of proteome research, 2010, 9(7): 3427-3442.
- [13] 温娜娜. 基于 SSR 的玉米、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*

- AG1-1A)群体遗传结构分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [14] ZHENG A, LIN R, ZHANG D, et al. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen[J]. *Nature communications*, 2013, 4:1424.
- [15] LAKSHMAN D K, NATARAJAN S S, LAKSHMAN S, et al. Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*[J]. *Mycologia*, 2008, 100(6): 867-875.
- [16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding[J]. *Analytical biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [17] 密克, 王金子, 纪水养, 等. 一种适用于双向电泳分析的高效真菌线粒体提取及蛋白质制样方法[J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(1): 105-110.
- [18] CHEN J, WANG C, SHU C, et al. Isolation and characterization of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight[J]. *European journal of plant pathology*, 2015, 23(2): 1-10.
- [19] 余功明, 胡春锦, 魏源文, 等. 适于双向电泳分析的水稻纹枯病菌菌体蛋白提取方法的比较[J]. *西南农业学报*, 2011, 24(6): 2160-2163.

An optimized protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis of *Rhizoctonia solani* AG1 IA

SHU Canwei CHEN Jianyi ZHAO Mei WANG Chenjiaozi ZHOU Erxun

*College of Agriculture, South China Agricultural University/Guangdong Province
Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China*

Abstract To study proteome of *Rhizoctonia solani* AG1 IA, the causal agent of rice sheath blight disease, three protein extraction methods (TCA-acetone precipitation method, SDS method and TCA-acetone-phenol/SDS method) were compared and a two-dimensional electrophoresis procedure was set up. Gel electrophoresis patterns were analyzed by Quantity One software and the results showed that 557, 309 and 877 protein spots were calculated by using TCA-acetone precipitation method, SDS method and TCA-acetone-phenol/SDS method, respectively. Protein extracted by SDS method contained impurities such as salt ions and small molecules, and exhibited the fewest protein spots. Protein obtained by TCA-acetone precipitation method was yellow, indicating pigments contamination. Finally, a combined TCA-acetone precipitation and SDS method could get rid of salt ions, small molecules and pigments and produce a clear and high resolution electrophoresis pattern. Therefore, an optimized TCA-acetone-phenol/SDS extraction method was established in this study, which was suitable for proteins extraction from *R. solani* AG-1 IA for two-dimensional electrophoresis.

Keywords *Rhizoctonia solani*; two-dimensional electrophoresis; proteomics; filamentous fungi; trichloroacetic acid

(责任编辑:边书京)