

双孢蘑菇耐温差异蛋白质组学研究

陆兆明, 徐 祯, 王 珂, 陈 澄, 陈岑绿璐, 宋思扬*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用蛋白质组学和荧光定量 PCR 方法, 研究双孢蘑菇(*Agaricus bisporus* Lange (Imbach)) 02 菌株在常温与高温胁迫下的蛋白质表达差异, 发现了 6 个差异蛋白质点, 经 NCBI 数据库比对分析, 表明 6 个差异蛋白质分别为 HSP70 家族的 HSS1 热激蛋白、异柠檬酸裂解酶、细胞色素 P450 单氧化酶及 3 个未知蛋白质。这些蛋白质在双孢蘑菇受热胁迫下具有保护自身稳定的功能。

关键词: 双孢蘑菇; 双向电泳; 热胁迫; 蛋白表达差异

中图分类号: Q 935

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)04-0590-04

双孢蘑菇(*Agaricus bisporus* Lange (Imbach)) 属于真菌门, 担子菌纲, 无隔担子菌亚纲, 伞菌目, 蘑菇科, 蘑菇属^[1], 是一类稳温结实性菌株, 温度对其生长至关重要^[2], 是全球性的具有很高经济价值和重要生态意义的栽培食用菌^[3]。02 菌株是人工栽培双孢蘑菇中耐热特性较好的品种。本文采用双向电泳手段分析它在常温与热胁迫条件下的蛋白质表达差异, 探讨其耐热的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

双孢蘑菇 02 菌株由福建省蘑菇研究推广站提供。

1.2 方法

1.2.1 双孢蘑菇的培养与诱导

挑取菌丝块接种于液体 PDA 培养基^[4], 在 24℃、160 r/min 的摇床条件下连续培养两周^[5], 分为两部分进行处理。热处理组处理方法为: 在 160 r/min, 30℃的摇床条件诱导 6 h, 再经 160 r/min, 35℃热处理 12 h; 对照组处理方法为: 在 160 r/min, 24℃摇床培养 18 h。此部分重复 3 次。

1.2.2 蛋白质提取和浓度测定

收集培养的菌丝体, 用纱布挤干。采用酚抽提的方法提取蛋白质, 将菌体用液氮研磨至粉末, 每 100 mg 左右菌体, 加入 0.5 mL 抽提液(500 mmol/L Tris-

HCl pH 7.8, 50 mmol/L EDTA, 2% β-巯基乙醇, 2 mmol/L PMSF), 冰浴抽提 10 min, 加入同体积 Tris 饱和酚, 室温下震荡, 4℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 保留有机相酚层。加入 4 倍体积预冷的甲醇, -20℃孵育至少 6 h, 4℃, 13 000 r/min 离心 10 min, 获粗蛋白沉淀。用预冷的甲醇洗涤粗蛋白沉淀, 4℃, 13 000 r/min 离心 5 min, 去甲醇, 取沉淀置于超净台内吹干得蛋白质干粉, -70℃保存^[6]。采用 TIANGEN 的 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定蛋白含量。

1.2.3 蛋白质双向电泳分析、染色及肽质量指纹图谱鉴定

双向电泳参考文献[6]进行, 对凝胶进行硝酸银染色、胶内酶切参考文献[7]进行, 并进行质谱分析, 获得肽质量指纹图谱。

1.2.4 RT-PCR 引物设计及 RNA 反转录

(1) 设计 RT-PCR 引物

根据 NCBI 数据库中双孢蘑菇已有的热激蛋白 HSP70 基因和甘油醛 3-磷酸脱氢酶基因设计 RT-PCR 引物如下:

F HSP70(RT): 5'-TCGAGGTTGACTCCCTGTATCAG-3'

R HSP70(RT): 5'-CATGTCCATCTTAGCATCCTTG-3'

F GAPDH(RT): 5'-TACGCCACCAACCGCTACTCAA-3'

R GAPDH(RT): 5'-CGGGCTTCTCAAGACGAACAACAA-3'

(2) 双孢蘑菇菌丝体 RNA 的提取及 RNA 反转录

使用 Invitrogen Trizol 试剂盒提取 RNA。RNA 反转录(Fermentas Kit)参考文献[8]。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

PCR 扩增体系(20 μL): 2×SYBR 10 μL; ddH₂O 6.5 μL; PRIMER(sense) (20 μmol/L) 0.5 μL; PRIMER(Antisense) (20 μmol/L) 0.5 μL; 模板

收稿日期: 2008-12-19

基金项目: 国家基础科学人才培养基金(J0630649), 国家自然科学基金(30570254)资助

* 通讯作者: sy.song@xmu.edu.cn

(cDNA) (0.4 μg/μL) 2.5 μL. PCR 扩增程序: 95 °C 20 s; 60 °C 20 s; 72 °C 20 s, 45 个循环; 72 °C 7 min^[9].

2 结果与分析

2.1 O2 菌株常温与高温胁迫条件下的双向电泳图谱对比

常温培养和热处理的 O2 菌株通过蛋白质双向电泳技术, 完成总蛋白分离, 并将得到的双向电泳凝胶扫描, 得到两张凝胶电泳图, 图 1 为热处理后的 O2 菌株和常温条件下 O2 菌株的蛋白质双向电泳图. 应用双向电泳图片对比软件 ImageMaster 2D Platinum 5.0 分析图谱, 通过软件分析, 两张双向凝胶电泳图上都有约 950 个蛋白质点. 比较两张双向电泳图后, 发现有 32 个蛋白质斑点有较为明显的差别. 其中热处理后有诱导新出现蛋白, 有表达量上调的蛋白质, 也有抑制表达的蛋白质, 及表达量下调的蛋白质. 从热处理的菌株图中可以看出一些位点的蛋白质表达量比常温下的有所升高. 为此我们挑选了其中的 6 个差异明显的蛋白质点进行详细的对比分析, 结果如图 2 所示.

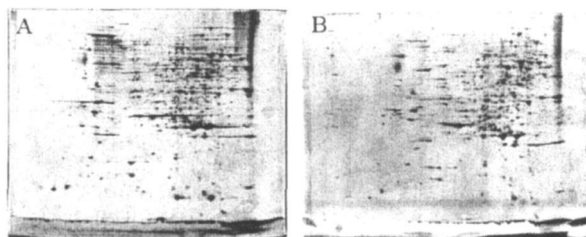


图 1 O2 菌株的 2-DE 图谱
A. 热处理组; B. 对照组

Fig. 1 2-DE gel images of *A. bisporus* strain O2

2.2 差异蛋白质的 MALDI-TOF 质谱分析

将 6 个差异蛋白质分别进行胶内酶解, 然后进行 MALDI-TOF-MS 分析, 得到蛋白质肽质量指纹图谱, 根据各自蛋白质的肽质量指纹图谱与数据, 通过 MASCOT 数据库检索对比后发现, 其中 3 个与数据库中已有蛋白质数据有较高的匹配性, 匹配的蛋白质分别是属于 HSP70 家族的热激蛋白 HSS1、异柠檬酸裂解酶和细胞色素 P450 单氧化酶, 还有 3 个蛋白质并未在数据库中找到与之匹配的蛋白质(表 1).

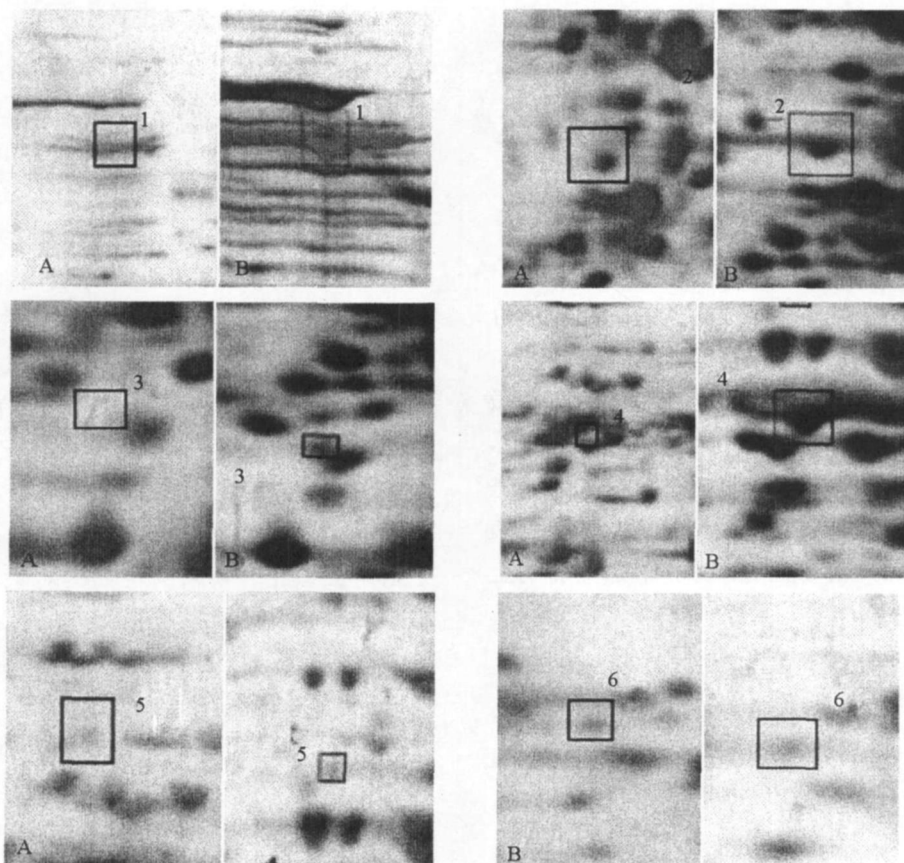


图 2 蛋白质差异点对比图

A. 常温; B. 热处理

Fig. 2 The comparison of protein expression

表 1 02 菌株热处理组与常温培养组之间差异蛋白质的 PMF 分析

Tab. 1 The PMF results of different protein spots of *A. bisporus* 02 strains between under heat stress group and normal temperature group

组别	鉴定蛋白质	得分	序列覆盖率/%	分子量(ku)/等电点	数据库序号	物种
1	热激蛋白 HSS1	72	20	70709/5.13	HSP71_PU CGR	<i>Puccinia graminis</i>
2	异柠檬酸裂解酶	36	12	60630/6.79	ACEA_CO CIM	<i>Coccidioides immitis</i>
3	细胞色素 P450 单氧化酶	64	40	21809/9.47	GI 23503470	<i>Aspergillus oryzae</i>

为了研究鉴定出的蛋白质的功能,在 COGs 数据库中对鉴定出的蛋白质进行功能分类.热激蛋白 HSS1 属于与应激反应相关的分子伴侣类蛋白质,异柠檬酸(裂合)酶是能量代谢类的蛋白质,细胞色素 P450 单氧化酶是物质代谢类的蛋白质(表 2).

表 2 鉴定蛋白的功能分类(COGs)

Tab. 2 Distribution of the proteins spots identified among different classes identified by biological process (COGs)

鉴定蛋白质	功能分类	热处理后表达情况
热激蛋白 HSS1	分子伴侣	上调
异柠檬酸裂解酶	能量代谢	上调
细胞色素 P450 单氧化酶	物质代谢	热激诱导产生

2.3 差异热激蛋白 HSS1 的 RT-PCR 验证

1 号初步鉴定是热休克蛋白 HSP70 家族的成员,它的表达量上调.我们挑选 1 号蛋白进行进一步的分析,根据双孢蘑菇热激蛋白 HSP70 已知的基因序列,利用 primer 5.0 设计引物.以甘油醛-3-磷酸脱氢酶做为内参基因,以引物 HSP70(RT)进行 real time PCR,得到 CT 值.应用 $2^{-\Delta CT}$ 公式对目的基因相对表达量进行计算,发现 02 菌株经过热处理后,HSP70 基因的表达量都在常温培养的 5 倍以上,出现了非常显著的上

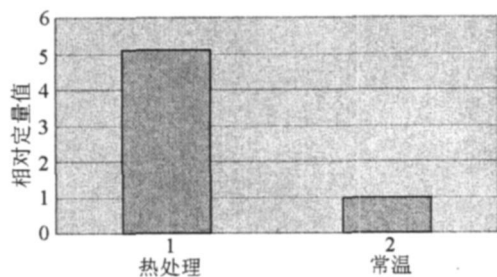


图 3 热激蛋白基因 HSP70 的实时荧光定量 PCR 结果

Fig. 3 The result of real time PCR of HSP70

升(图 3),从而在基因转录水平上印证了蛋白质双向电泳所得出的结论.

3 讨论

本文采用双向电泳技术分离到一些热激处理差异表达的蛋白质,并使用 MALDI-TOF-MS 质谱技术和肽质量指纹图谱(PMF)技术鉴定了一些差异表达的蛋白质,还采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术分析了部分蛋白质基因在转录水平上的差异.

根据对 02 菌株在常温下以及在热胁迫条件下的蛋白质表达差异的分析对比,我们认为,在热胁迫的条件下,02 菌株的热休克蛋白 HSP70 的表达量上升,说明在双孢蘑菇中也存在热休克蛋白.在以往的文献中对 HSP 的功能研究很多,其主要功能是分子伴侣作用,它可以和新生、未折叠、错折叠或聚集的蛋白质结合,加速肽链的正确折叠和重折叠,使某些蛋白质聚合物在不需要时解离,维持某些肽链的伸展状态,在线粒体和内质网中发挥作用,同时还能促进某些变性蛋白质的降解和清除,重新激活某些酶的作用,维持细胞正常的生理功能^[10].双孢蘑菇可以通过提高自身热休克蛋白的表达量来保护使其免受外界有害的高温影响.

2 号蛋白质异柠檬酸裂解酶是乙醛酸循环中的关键酶之一,乙醛酸循环是三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle, TCA)的一条回补途径,可利用诸如乙酸、乙醇等二碳化合物来满足细胞对碳源的需求,具有为众多重要生物合成反应提供有关中间代谢物的功能,它普遍存在于植物和微生物中,如果该酶的活性受到抑制,将影响能量代谢途径^[11].一些研究发现,在缺氧等恶劣生存环境下,一些微生物会利用脂肪酸为碳源,以乙醛酸循环途径合成细胞物质^[12].他们的结果表明在热胁迫环境中,双孢蘑菇也可能通过乙醛酸循环回补途径来适应环境的变化.

3 号蛋白质细胞色素 P450 单加氧酶通过介导植物组织中的许多氧化反应,与脂肪酸、色素、胆固醇、木质素、植保素以及生物外源性物质的生物合成和代谢

有关^[13]. 也有许多研究报道了细胞色素 P450 单加氧酶通过参与植保素的合成而参与了植物的防御反应^[14-15]. 在真菌中, 细胞色素 P450 也参与了许多的生物转化过程, 包括解毒反应以及初级和次级代谢产物的产生^[16]. 在 O2 菌株热处理后, 细胞色素 P450 单加氧酶表达量上调, 表明单加氧酶可能通过生物合成和代谢相关途径参与热应激反应.

4, 5, 6 号蛋白的功能不明, 还有待进一步研究.

参考文献:

- [1] Elliott T J. Sex and the single spore[J]. Mushroom Science, 1972, VIII: 11- 18.
- [2] Miller R E, Kananen D L. Bipolar sexuality in the mushroom [J]. Mushroom Science, 1972, VIII: 197- 203.
- [3] 黄毅. 食用菌生产理论与实践[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1988.
- [4] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪, 等. 现代生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [5] 王泽生. 双孢蘑菇规范化集约化栽培技术[C]. 福州: 福建省科学技术协会, 1998.
- [6] 朱友林, 王建, 余潮. 植物蛋白质双向电泳及其考马斯亮兰银染复合染色法[J]. 南昌大学学报: 理科版, 1999, 23(2): 101- 104.
- [7] 陈亮明, 张冬林, 李志辉, 等. PAGE 银染和条带回收方法的改进[J]. 中南林业科技大学学报, 2007, 27(6): 163 - 165.
- [8] 邱建明, 董泽平, 杭长寿, 等. 应用反转录套式 PCR 方法检测肾综合征出血热病人血清中的汉坦病毒特异性 RNA[J]. 病毒学报, 1997, 13(2): 119.
- [9] 高斌, 刘敬忠. 实时荧光 PCR 技术的研究及其应用进展[J]. 诊断学理, 2005, 4(6): 507- 509.
- [10] 张君岚, 黄善生, 凌亦凌. 不同家族热休克蛋白的生理功能及病理意义[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(5): 549 - 553.
- [11] 申严杰. 酵母双杂交筛选结核分枝杆菌异柠檬酸裂合酶的相互作用蛋白[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [12] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [13] Donaldson R P, Luster D C. Multiple forms of plant cytochrome P450[J]. Plant Physiology, 1991, 96: 669 - 674.
- [14] Whitbred J M, Schuler M A. Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea[J]. Plant Physiol, 2000, 124(1): 47- 58.
- [15] Chapple C. Molecular- genetic analysis of plant cytochrome P450 dependent monooxygenases[J]. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 1998, 49: 311- 343.
- [16] 于晓玲. 香菇 GPD_RAS 启动子和细胞色素 P450 基因的克隆[D]. 海口: 华南热带农业大学, 2004.

Differential Proteomics Studies on Thermotolerance of *Agaricus bisporus*

LU Zhaoming, XU Zhen, WANG Ke, CHEN Cheng,

CHEN CEN Lulu, SONG Siyang*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Agaricus bisporus* is a kind of cultivated edible mushroom which has high economic value and important ecology significance. Environment temperature is the main restrained factor in its development, and this greatly limits its cultivation season. In this study, 2D electrophoresis and real time PCR are employed to discover the proteomic difference in *Agaricus bisporus* O2 strain after high temperature induction, and 6 differential expressed protein spots were finally obtained. Compared with the NCBI data base, spot 1 is the heat shock protein, spot 2 is isocitrate lyase and spot 3 is cytochrome P450 monooxygenase. The other three spots are novel. Presumably, those proteins confer the thermotolerance on strain O2 under high temperature.

Key words: *Agaricus bisporus* Lange (Imbach); 2D electrophoresis; heat stress; protein expression difference