

李 权,李本鹏,齐文玉,等.樟脑对彩绒革盖菌抑制响应的差异蛋白质组学分析[J].江苏农业科学,2018,46(13):44-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.010

樟脑对彩绒革盖菌抑制响应的差异蛋白质组学分析

李 权^{1,2},李本鹏¹,齐文玉²,任 凯²,林金国²

(1.凯里学院,贵州凯里 556011;2.福建农林大学材料工程学院,福建福州 350002)

摘要:为探究樟脑对彩绒革盖菌的抑菌防腐机制,对彩绒革盖菌及其樟脑处理样的双向电泳图谱进行分析,采用基质辅助激光解析串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/MS)对差异蛋白质点进行分析与鉴定,经检索确定表达变化明显的差异蛋白质点28个,对鉴定出的15个蛋白质点分析发现8个蛋白质点上调表达,7个蛋白质点为下调表达。这些蛋白质参与彩绒革盖菌的细胞内蛋白质生物合成以及tRNA转位过程,对其新陈代谢、DNA复制、转录、翻译、细胞周期进程、信号传导、细胞凋亡和胞外分泌等过程有作用。

关键词:白腐菌;蛋白质组学;双向电泳;樟脑;彩绒革盖菌;抑制响应

中图分类号:Q946 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)13-0044-04

木材的腐朽不仅会造成大量的经济损失,还可导致严重的资源浪费,因此亟须对木材进行防腐处理^[1]。为此,很多国家每年都投入大量的人力、物力研发新型木材防腐剂,以延长木材的使用寿命。现今对植物提取物进行的研究通常集中在抑菌防腐、抗氧化及其应用等方面^[2-5]。Voda等将含有酚类、酚醚类和芳香醛的植物精油用于对木材腐朽菌的抑菌测试,探讨了精油中化合物的化学结构与抗真菌活性之间的关系,这是当前研究植物源提取物抑菌最常用的方法^[6];Lin等用5%肉桂叶的苯-乙醇提取物浸渍易腐朽的试材,明确了该植物提取物可以用于对易腐木材的防腐保护^[7];Tripathi等调查了马缨丹根和茎的乙醇提取物对木材腐朽菌的抑制效果^[8];我国台湾的Wang等从当地土肉桂叶片中提取精油用于木材防腐,结果发现提取物中的主要成分是肉桂醛,相比其他成分具有更强的抑菌防腐功效^[9];李坚等也都对当地的部分耐腐树种进行了提取,研究了植物提取物的抑菌防腐效果^[10]。经过检测明确了几种耐腐树种的心材提取物对部分木霉菌、木材腐朽菌等真菌具有较强的抑制活性。

综上所述,研究者已经探索了众多类型的植物源提取物的抑菌防腐功效,也报道了大量植物提取物对木材腐朽菌良好的抑菌防腐效果。然而目前为止,对于植物源提取物的研究多集中在现象报道阶段,真正的机制研究还很少,导致在发展和利用植物源提取物防腐方面存在着理论依据的缺失。本试验通过双向电泳技术与质谱分析技术相结合,分析受到樟脑抑制的木材腐朽菌与对照的差异表达蛋白质,从分子水平解析彩绒革盖菌相关蛋白质的表达,最终为探索樟脑对木材

腐朽菌的抑制机制提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 白腐菌为彩绒革盖菌(*Coriolus versicolor*),由福建农林大学生命科学学院提供。

1.1.2 仪器与药品 (1)仪器:固相pH值梯度等电聚焦仪Ettan™-IPGphor™ III IEF System;垂直板电泳仪Ettan™ Dalt II Vertical System,附件包括MutiTemp™ III恒温水浴以及EPS 3501 XL电源;5800型MALDI-TOF/TOF;ImageScanner III光密度扫描仪;超速冷冻离心机;THY-111B型恒温培养振荡器。(2)药品:固相pH值梯度干胶条(immobiline pH gradient,pH值3~10,长度=24 cm);IPG缓冲液、IPG覆盖液、TCA/ β -巯基乙醇、两性电解质pharmalyte(pH值3~10)、丙烯酰胺、SDS、过硫酸铵、甲叉双丙烯酰胺、尿素、硫脲、DTT、CHAPS、碘乙酰胺。樟脑购置于福建青松股份有限公司,用化学合成法制得,含量>96.0%。将樟脑用三氯甲烷溶剂制备成浓度为10 mg/mL的溶液。丙酮为分析纯,上海中试化工总公司生产。

1.2 方法

1.2.1 接种与培养 试验地点为福建农林大学植物保护学院实验室。在250 mL三角烧瓶中加入100 mL麦芽糖培养基(参照GB/T 13942.1—2009《木材耐久性能 第1部分:天然耐腐性实验室试验方法》麦芽糖琼脂培养基的配制不加琼脂),用5 mm打孔器在培养好的白腐菌培养皿上取出3个菌柄放入麦芽糖培养基中,将浓度为10 mg/mL的樟脑溶液1 mL加入到三角烧瓶中,与对照一起放入28℃、40 r/min振荡箱中培养14 d后取出并真空抽滤得到菌丝。

1.2.2 TCA丙酮法提取菌丝蛋白质 将抽干后的菌丝液氮研磨,加入20 mL的TCA/丙酮振荡均匀后放入-20℃中沉淀过夜。将沉淀过夜后的样品4℃、11 000 r/min离心15 min,去上清,再加入20 mL-20℃预冷的冷丙酮(内含0.07% β -巯基乙醇)振荡,静置2 h,然后11 000 r/min离心15 min,去上清(重复2次,洗至沉淀白色),再放到真空干燥

收稿日期:2017-11-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31760191);贵州省高校优秀科技创新人才奖励计划(编号:黔教合KY字[2015]508);贵州省科技厅科技合作计划(编号:黔科合LH字[2015]7751号)。

作者简介:李 权(1982—),男,四川金堂人,博士,副教授,主要从事木材科学研究。Tel:(0855)8503572;E-mail:liquan-8@163.com。

通信作者:林金国,博士,教授,主要从事木材科学方面的研究。Tel:(0591)83845951;E-mail:fjlinjg@126.com。

箱中真空抽干。按适当 20 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 标准加入裂解缓冲液,保持 25~30 $^{\circ}\text{C}$ 超声溶解 2 h,最后 11 000 r/min 离心 15 min 后取上清即为蛋白样品,对蛋白样品浓度定量(浓度范围为 5~10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)后放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2.3 蛋白质双向电泳

1.2.3.1 等电聚焦(IPG-IEF) 主动上样,水化和等电聚焦在 Ettan™-IPGphor™ III IEF System 上自动进行,程序设置如表 1 所示。聚焦完毕后,分别用胶条平衡缓冲液 I(加 DTT 10 mg/mL)和平衡缓冲液 II(加碘乙酰胺 25 mg/mL),各缓慢平衡 15 min。取出胶条后用滤纸小心吸去残余平衡液,用电极缓冲液润洗后转入浓度为 10% 的聚丙烯酰胺凝胶板中,加入相对质量标准的蛋白质,进行二向垂直电泳。

表 1 IEF 参数设置

步骤	电压(V)	时间(h)
1	30	13
2	500	1
3	1 000	6
4	8 000(梯度电压)	8
5	8 000	4
6	1 000	30

1.2.3.2 二向电泳与染色 将平衡好的 IPG 胶条贴于凝胶玻璃板上,加入 1 mL 琼脂糖封胶液封住胶条,将凝胶板插入 Ettan™ DALT II Vertical System 的缓冲液柜中。在 16 $^{\circ}\text{C}$ 水循环条件下进行电泳,恒功率 4 W/条,待示踪溴酚蓝至凝胶底部边缘时停止电泳,取出凝胶后待固定液固定后进行考染。

1.3 凝胶图像分析

凝胶显色后用 Image Scanner 扫描仪进行图像扫描,运用 Image Master™ 2D Platinum 7.0 凝胶图像分析软件进行 2-DE 图谱分析。

1.4 胶内酶解

建立差异蛋白质表达谱后,将新鲜的考马斯亮蓝染色的蛋白质点从 SDS-PAGE 凝胶上割下切碎,置于 96 孔微孔板中。切碎的胶条首先用 200 μL 新鲜的含 50 mmol/L NH_4HCO_3 的 50% 乙腈溶液脱色 2 次,然后用 200 μL 乙腈干燥 2 次。干燥脱水的胶条加入消化液(含有 12.5 ng/ μL 胰蛋白酶的 20 mmol/L NH_4HCO_3 溶液)孵育 20 min,然后转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育消化过夜。最后,用 200 μL 提取液(含 5% 甲酸的 50% 乙腈溶液)提取 2 次,收集上清液中的多肽合并。提取液在 N_2 保护下干燥。

1.5 MALDI-TOF/TOF 分析及数据的查询

MALDI 板用 5800 MALDI-TOF/TOF 分析仪(AB SCIEX)分析。每个点在 m/z 为 700~3 600 质谱范围内采用正离子反射模式获取一级质谱,激光累积 1 000 次激发。MS 数据用内标进行校准,母离子的选择按照如下标准:每点最多选择 50 个母离子,信噪比最低设置为 25,组分与组分间的质量偏差设置为 0.2 u。串联质谱采用 2 500 次激光累积和 100 分辨率的质量窗口(半峰高宽度,FWHM),碰撞能量设置为 2 kV,MS/MS 数据采用默认校准,得到的数据通过软件 GPS(V3.6)采用 MASCOT(V 2.3)进行检索。搜索参数如下:真菌蛋白质(1 757 520 条序列;762 750 636 个残基)、胰酶酶切,1 个漏切位点,一级质谱的容差为 0.1 u,二级质谱的容差

为 0.6 u。经过数据库检索后,蛋白质得分 > 75 分被认为鉴定成功($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 菌体总蛋白双向电泳图谱的绘制

设计 3 次生物学重复,从图 1 可以看出,所得电泳图谱背景清晰,蛋白质点分辨率高,蛋白质点大规模聚集现象和横纵向拖尾少。经软件对比发现,同一彩绒革盖菌的 3 次生物学重复之间的蛋白质点重复出现率超过 92%,试验结果可靠性极高。樟脑处理后彩绒革盖菌以及对照之间蛋白点的分布大体相似,个别点则有较明显的差异,说明这 2 种样品所表达的蛋白质的种类和数量有所差别。

2.2 凝胶扫描结果分析

采用 Image Master™ 2D Platinum 7.0 差异分析软件对樟脑处理白腐菌与对照的双向聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳图谱进行比对分析,由图 2 可知,2 种蛋白双向电泳图谱格局基本一致,蛋白质点主要集中在等电点(pI)4~7 的范围内。樟脑处理白腐菌电泳图和对照样电泳图中分别可分辨出 444、433 个蛋白质点,对各样品蛋白质双向电泳图谱进行比较,蛋白质丰度变化在 2 倍以上,并且 3 次生物学重复试验的置信率大于 95%(平均比值 > 2.0,方差 < 0.05)为条件进行筛选,共发现 28 个差异明显的蛋白点,鉴定出 15 个蛋白质点。其中编号为 254、256、651、211、205、620、635 的 7 个蛋白质点下调,编号为 634、618、624、540、613、201、537、605 的 8 个蛋白质点上调(图 3、表 2)。

2.2.1 6-磷酸葡萄糖胺脱氨酶(glucosamine-6-phosphate deaminase,GNPDA) 6-磷酸葡萄糖胺脱氨酶是一种催化酶^[11],在糖胺代谢中起重要作用,可以催化 6-磷酸葡萄糖通过脱氨和异构 2 步反应生成 6-磷酸果糖;6-磷酸葡萄糖胺脱氨酶对于 *N*-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)是否被利用最终进入糖酵解途径起关键作用^[12]。葡萄糖胺-6-磷酸脱氨酶(EC 3.5.99.6)是 GlcNAc 分解代谢途径的终末酶^[13]。

2.2.2 核糖体蛋白质 S5(ribosomal protein S5) 核糖体蛋白质 S5 是核糖体蛋白质家族的重要成员,在核糖体中发挥重要作用^[14],其生物学过程与细胞质翻译、核糖体小亚基组装等有关。核糖体蛋白质 S5 是构成核糖体的重要成分,具有连接病毒和核糖体、调控细胞分化凋亡等核糖体外的功能,在蛋白质翻译准确性,细胞内蛋白质生物合成以及 tRNA 转运过程中发挥着必不可少的作用^[15],与 mRNA 结合、rRNA 结合、核糖体的结构成分等分子功能有关。

2.2.3 丝/苏氨酸蛋白质磷酸酶(Ser/Thr protein phosphatase) 丝/氨酸硫醇蛋白质酶往往在其酶的活性中心含有丝氨酸的羟基或半胱氨酸的巯基,如胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、糜蛋白酶、凝血酶、组织蛋白酶、弹性蛋白酶等,凡能与这些酶的活性中心结合、有效地降低其酶活性、又不使蛋白酶变性的物质称为丝氨酸硫醇蛋白酶抑制剂或丝氨酸巯基蛋白酶抑制剂。丝/苏氨酸蛋白质磷酸酶属于蛋白质磷酸酶家族中重要的细胞内调节蛋白质,能够催化磷酸化丝氨酸或使蛋白质脱磷酸,并参与许多关键的生物学过程,在新陈代谢,DNA 复制、转录、翻译,细胞周期进程,信号传导,细胞凋亡和胞外分泌等过程中均起重要作用^[16]。

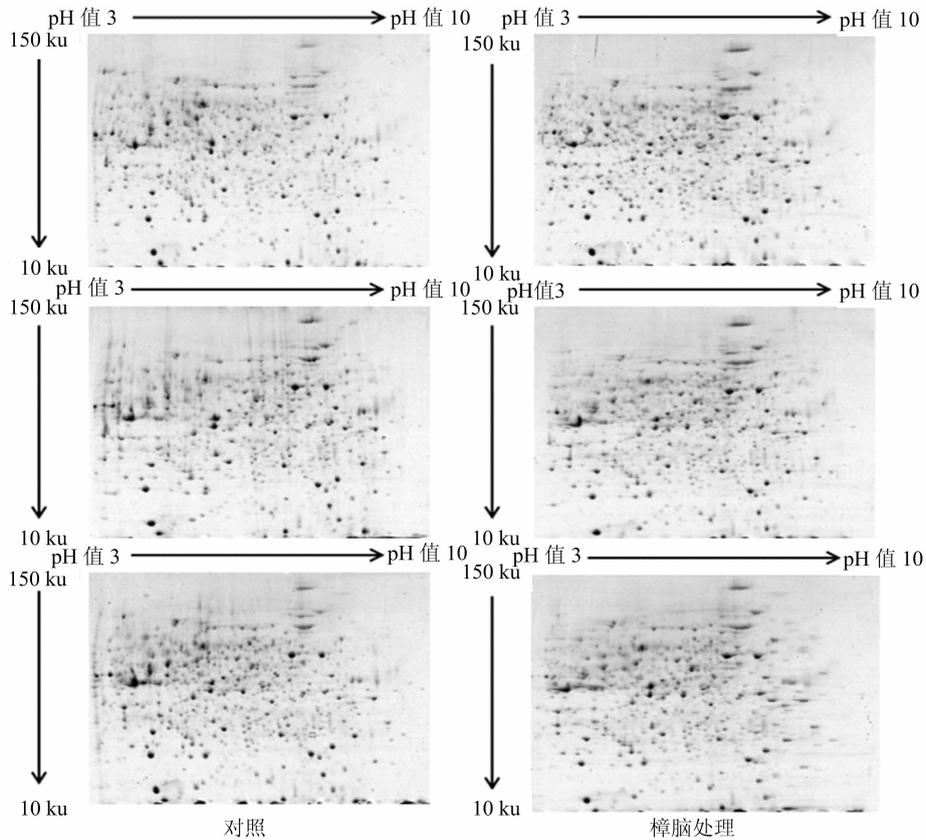


图1 樟脑处理彩绒革盖菌和对照样蛋白样品双向电泳图谱

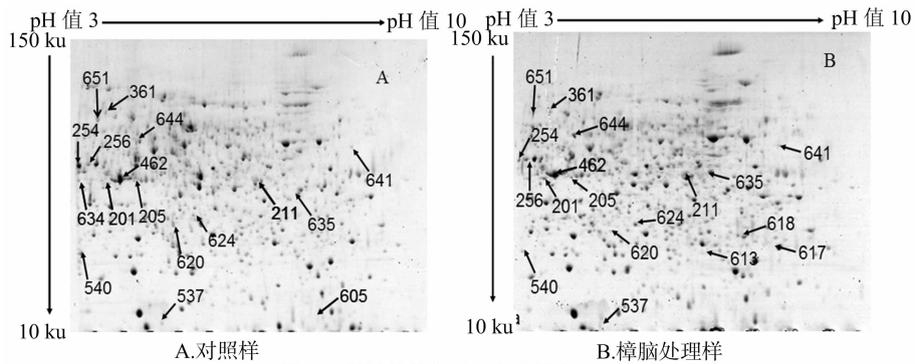


图2 彩绒革盖菌的双向电泳凝胶

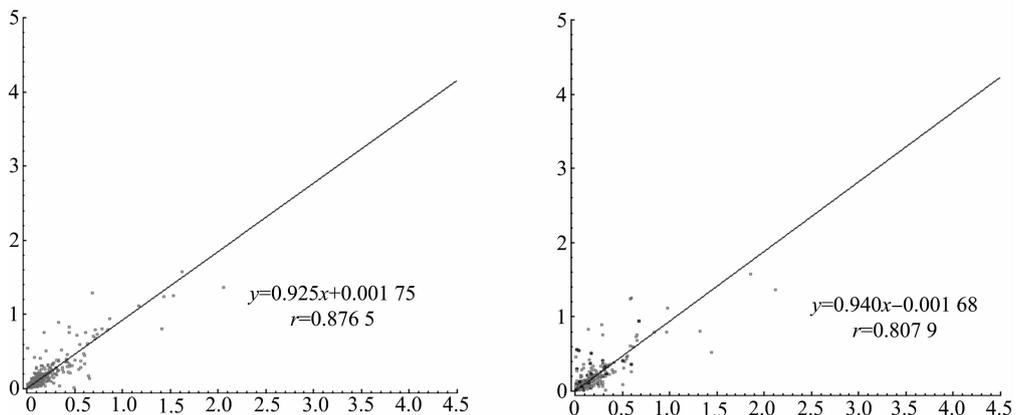


图3 对照与樟脑处理彩绒革盖菌中提取的蛋白质双向电泳凝胶图的匹配率

表2 樟脑处理彩绒革盖菌差异蛋白质点的质谱鉴定

编号	蛋白质名称	登录号	匹配肽段数(个)	分子量(u)/等电点	蛋白质得分	序列覆盖率(%)	种属来源
254	6-磷酸葡萄糖胺脱氨酶	gi 322698735	6	39 621/6.38	82	8	绿僵菌 CQMa 102
256	预测蛋白质	gi 150848907	6	108 482/9.45	50	12	富克葡萄孢盘菌 B05. 10
651	保守假定蛋白质	gi 225556205	10	26 830/6.71	46	15	荚膜阿耶罗菌 G186AR
634	假定蛋白质 FG07186. 1	gi 46125617	4	37 648/9.69	120	7	玉米赤霉 PH - 1
211	预测蛋白质	gi 149385127	19	169 836/5.32	49	4	木糖发酵酵母 CBS 6054
618	预测蛋白质	gi 119181844	10	14 950/4.78	61	14	粗球孢子菌 RS
624	核糖体蛋白 S5	gi 237781113	11	45 938/5.23	61	18	钩骨节皮真菌
205	假定蛋白质 MYCGRDRAFT_53981	gi 339476960	11	12 143/6.54	60	32	禾生球腔菌 IPO323
620	丝/苏氨酸蛋白质磷酸酶	gi 261194841	6	11 557/4.65	49	15	皮炎芽生菌 SLH14081
540	YALIOA02915p	gi 50543086	5	24 518/6.89	83	8	解脂耶罗威亚酵母
635	假定蛋白质 FG07186. 1	gi 46125617	4	37 648/6.01	85	34	玉蜀黍赤霉 PH - 1
613	预测蛋白质	gi 325088863	11	11 521/5.28	52	21	荚膜组织胞浆菌 H88
201	假定含锌乙醇脱氢酶	gi 218713585	2	36 839/4.52	61	24	柄篮状菌 ATCC 10500
537	假定 ssDNA 结合蛋白质	gi 184777969	10	18 807/5.23	45	31	米勒氏酵母
605	假定蛋白质 SMAC_01212	gi 336275249	9	12 243/5.89	45	11	大孢粪壳 k - hell

2.2.4 假定 ssDNA 结合蛋白质 (putative ssDNA binding protein) 假定 ssDNA 结合蛋白(SSB)在细菌、古细菌和真核细胞的 DNA 复制、重组和修复中起着重要作用。

3 结论

本试验采用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳技术和质谱技术得到樟脑处理彩绒革盖菌与对照的差异蛋白质表达图谱,经分析得出以下结论:以 2 个样品之间平均表达差异倍数大于 2 倍、且重复性好、差异表达变化明显的蛋白质点 15 个,其中 8 个蛋白质点上调表达,7 个蛋白质点下调表达;丝/苏氨酸蛋白质磷酸酶等蛋白质的下调表达,说明白腐菌在新陈代谢, DNA 复制、转录、翻译,细胞周期进程,信号传导,细胞凋亡和胞外分泌等方面也受到了抑制。本试验结果可为新型木材防腐剂的研制以及阐明樟脑抑制白腐菌的分子机制提供参考。

参考文献:

- [1] Janin A, Coudert L, Riche P, et al. Application of a CCA - treated wood waste decontamination process to other copper - based preservative - treated wood after disposal [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(2/3): 1880 - 1887.
- [2] Gierlinger N, Jacques D, Schwanninger M, et al. Heartwood extractives and lignin content of different larch species (*Larix* sp.) and relationships to brown - rot decay - resistance [J]. Trees, 2004, 18(2): 230 - 236.
- [3] Bhardwaj S K, Singla S K, Bhardwaj R K. Evaluation of plant extracts as antifungal agents against wood rotting fungi *Corioliol versicolor* (L. : Fr.) Quelet [J]. Journal of the Indian Academy of Wood Science, 2012, 9(1): 62 - 65.
- [4] Ahn S H, Oh S C, Choi I G, et al. Environmentally friendly wood preservatives formulated with enzymatic - hydrolyzed okara, copper and/or boron salts [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 178(1/2/3): 604 - 611.
- [5] Kamdem D P. Fungal decay resistance of aspen blocks treated with heartwood extracts [J]. Forest Products Journal, 1994, 44(1): 30 - 32.
- [6] Voda K, Boh B, Vrtacnik M, et al. Effect of the antifungal activity of

oxygenated aromatic essential oil compounds on the white - rot *Trametes versicolor* and the brown - rot *Coniophora puteana* [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 51(1): 51 - 59.

- [7] Lin C Y, Wu C L, Chang S T. Evaluating the potency of cinnamaldehyde as a natural wood preservative [J]. The International Research Group on Wood Protection, 2007, 7: 30444.
- [8] Tripathi S, Rawat K, Dhyani S, et al. Potential of *Lantana camara* Linn. weed against wood destroying fungi [J]. Indian Forester, 2009, 135(3): 403 - 410.
- [9] Wang S Y, Chen P F, Chang S T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(7): 813 - 818.
- [10] 李 坚, 杨冬梅, 苏文强. 长白落叶松提取物对木材防腐作用的研究 [J]. 林产化学与工业, 2007, 27(5): 49 - 52.
- [11] Solar T, Tursic J, Legisa M. The role of glucosamine - 6 - phosphate deaminase at the early stages of *Aspergillus niger* growth in a high - citric - acid - yielding medium [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(4): 613 - 619.
- [12] Horjales E, Altamirano M M, Calcagno M L, et al. The allosteric transition of glucosamine - 6 - phosphate deaminase; the structure of the T state at 2.3 Å resolution [J]. Structure, 1999, 7(5): 527 - 537.
- [13] Natarajan K, Datta A. Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine - 6 - phosphate deaminase from *Candida albicans* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(13): 9206 - 9214.
- [14] Weijers D, van Dijk M F, Vencken R J, et al. An *Arabidopsis* minute - like phenotype caused by a semi - dominant mutation in a *RIBOSOMAL PROTEIN S5* gene [J]. Development, 2001, 128(21): 4289 - 4299.
- [15] 伍文星, 张俊平. 核糖体蛋白 S5 的医学研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(4): 418 - 420.
- [16] 谭燕财, 林 洁, 马光旭, 等. 寄生虫丝/苏氨酸蛋白磷酸酶研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(1): 81 - 84.