

## 差异蛋白质组学在食用真菌中的研究进展

陶永新<sup>1</sup>, 朱 坚<sup>2</sup>, 廖剑华<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>福建农林大学菌物研究中心, 福州 350002; <sup>2</sup>福建农林大学园艺学院, 福州 350002;

<sup>3</sup>福建省农业科学院食用菌研究所, 福州 350014)

**摘要:** 差异蛋白质组学是蛋白质组学的研究策略之一。本文简介了差异蛋白质组学应用于食用菌的主要技术方法, 并概述了到目前为止, 国内外在食用菌中应用差异蛋白质组学研究的内容及进展。同时指出差异蛋白质组学将是食用菌未来研究的强有力手段之一。

**关键词:** 食用菌; 差异蛋白质组学; 研究进展

中图分类号: S646

文献标志码: A

论文编号: 2011-0331

### Advance in Differential Proteomics of Edible Fungi

Tao Yongxin<sup>1</sup>, Zhu Jian<sup>2</sup>, Liao Jianhua<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

<sup>2</sup>College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

<sup>3</sup>Institute of Edible Fungi, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350014)

**Abstract:** Differential proteomics is one of the strategies in proteomics research. This article introduced the main technologies and methods of researching differential proteomics in edible fungi, and outlined the advance of domestic and international researching differential proteomics in edible fungi. It was pointed out that differential proteomics would be one powerful tool for future research in edible fungi.

**Key words:** edible fungi; differential proteomics; researching advance

### 0 引言

目前, 差异蛋白质组学在食用菌中的研究尚属起步阶段。近年来, 人们逐渐开始从蛋白质组学方面对食用菌进行研究, 并取得了一定成就。但与植物相比, 其研究的深度和广度还不够, 体现在涉及的食用菌种类较少, 仅在双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)<sup>[1-2]</sup>, 香菇 (*Lentinula edodes*)<sup>[3]</sup>, 金针菇 (*Flammulina velutipes*)<sup>[4]</sup>, 灵芝 (*Ganoderma lucidum*)<sup>[5]</sup>, 和真姬菇 (*Hypsizigus marmoreus*)<sup>[6]</sup>等几种食用菌上有见报道; 内容主要集中在研究环境胁迫、病理情况下的差异表达蛋白, 以及揭示特异组织形态、不同生活阶段等的遗传发生机理。通过对不同条件下食用菌的差异蛋白质组学的研究, 对发生过程中蛋白调控网络进行认识, 找到发生该

过程的标志性蛋白或起重要作用的一些蛋白, 可作为检测标记或靶分子来进一步研究。差异蛋白质组学的研究不仅有利于揭示食用菌一些生命活动的规律及调控机制, 更为食用菌的遗传育种等方面的研究奠定一定的理论基础。

### 1 差异蛋白组学(differential proteomics)简介

1994年, 澳大利亚科学家Wilkins和Williams首次提出蛋白质组(proteome)一词, 它是指由一个基因组(genome), 或一个细胞、组织表达的所有的蛋白质及其活动方式。蛋白质组学的研究模式有二种: 第一种是检测基因编码的所有蛋白质, 建立蛋白质组学数据库, 称为“完全蛋白质组学”; 第二种是着重寻找和筛选有意义因素引起的样本间差异蛋白质, 揭示机理并对

**基金项目:** 省属公益类科研院所基本科研专项(2009R10038-1)

**第一作者简介:** 陶永新, 男, 1987年出生, 山西孝义人, 硕士研究生, 研究方向: 食用菌的遗传育种与分子生物学。通信地址: 350002 福建省福州市福建农林大学菌物研究中心, E-mail: taoyongxinsucceed@163.com。

**通讯作者:** 朱坚, 男, 1964年出生, 福建人, 副教授, 硕士生导师。主要从事食用菌栽培、生理和遗传育种研究。通信地址: 350002 福建农林大学园艺学院, E-mail: zhujian6469@126.com。

**收稿日期:** 2011-02-10, **修回日期:** 2011-04-15。

关键蛋白进行定性和功能分析。称之为“差异蛋白质组学”<sup>[7]</sup>。

由于蛋白质组具有动态性、多样性、时间性、空间性和特异性,表现在:蛋白质的合成受时空等多种因素调控,在不同组织细胞中蛋白质合成及表达的种类和数量有很大的差异,即使在细胞发育的不同阶段,蛋白质组的构成也在不断的变化,是动态的过程。还有,病理状态与正常生理条件下的细胞蛋白质组分也有很大不同<sup>[8]</sup>。差异蛋白质组学就是研究分析比较不同条件下蛋白质组的变化和差异,发现和鉴定在不同生理条件下的特殊标志蛋白和关键蛋白,来揭示一定的生物学现象和规律。因此,相比完全蛋白质组学企图涵盖全部蛋白质耗时费钱来说,研究差异蛋白质组学显得更有意义和价值<sup>[9-10]</sup>。

## 2 差异蛋白质组学的常用研究技术

差异蛋白质组学研究不要求捕获“全部”蛋白,只要求找出有意义的差异蛋白,所以与完全蛋白质组学相比,在技术上可实现性比较高<sup>[11]</sup>。对蛋白的定量差异分析可分为基于胶的差异分析(GEL-BASED APPROACHES)和非胶差异分析(NO-GEL-BASED APPROACHES)<sup>[12]</sup>。本文主要介绍基于胶的差异分析,即建立在双向凝胶电泳基础上的经典差异蛋白质组学研究。一般需完成三大步骤:(1)蛋白质组分的提取和分离;(2)准确区分差异蛋白质点,建立差异蛋白谱;(3)通过质谱分析并加以信息比对,研究差异表达蛋白的结构功能和实际意义<sup>[13]</sup>。各步关键技术的要点及在食用菌中的研究情况综述如下。

### 2.1 食用菌样品蛋白质的提取

适于双向电泳的食用菌蛋白的提取方法是进行食用菌蛋白质组学研究的基础。不同的食用菌材料,它的最适蛋白质提取方法也不同。尽管处理方法多种多样,但总的原则一般是尽量提高样品蛋白质的溶解度,抽提最大量总蛋白,减少蛋白的损失和人为修饰,并使蛋白处于完全变性状态<sup>[14]</sup>。

食用菌蛋白质的提取首先是对样品细胞的破碎。黄碧芳(2010)在对虎奶菇菌丝体自溶蛋白质制备方法的研究中,比较了超声波破碎法和液氮研磨法两种破碎方法,最后用双向电泳检测效果,结果发现液氮研磨时,由于时间短、温度低,蛋白降解少,得到的粗蛋白和纯蛋白产量均高于超声波法。对食用菌蛋白的提取分离常采用 Tris-饱和酚法和 TCA/丙酮沉淀法<sup>[15-16]</sup>。刘晓云(2009)在对灵芝子实体原基总蛋白质的提取方法的建立中,比较了 Tris-饱和酚法和 TCA/丙酮沉淀法对灵芝子实体原基总蛋白质的提取效果。得出 Tris-饱和

酚法得到的蛋白质点多,无拖尾现象,分辨率较高,且稳定性和重复性均优于 TCA/丙酮沉淀法<sup>[5]</sup>。因为 TCA/丙酮法经历溶解、沉淀、再溶解的复杂过程,蛋白质沉淀后再溶解较困难,导致蛋白质的大量损失。相比而言,Tris-饱和酚法中酚是蛋白的良好溶剂,抽提中蛋白进入酚相,其他可溶物质进入水相,从而得以分离。并且,蛋白在酚相中的可溶性好,因而在溶解后再离心时蛋白不会重新沉淀下来。因此,综合液氮研磨和 Tris-饱和酚抽提对于食用菌蛋白质可达到良好的提取效果。陆兆明(2009)在双孢蘑菇菌丝体蛋白的提取中也证明了此法的良好性<sup>[17-18]</sup>。但还要根据具体材料的不同来作适当调整和选用。

### 2.2 双向凝胶电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)

20世纪70年代,O'Farrell建立起了双向凝胶电泳技术。它是根据蛋白质分子量大小和电荷不同来分离蛋白质的一种方法,因其可靠、有效,是目前蛋白质组学研究中最常用的技术之一<sup>[19]</sup>。该技术分两步来完成,目的是使蛋白质分别从等电点和分子量两个方向来实现分离:第一向为等电聚焦电泳(IEF),根据蛋白质的等电点不同,在 pH 梯度胶内等电聚焦分离。近年来兴起的固定 pH 梯度 IPG (immobilized pH gradient) 胶条的使用,使得这一步的灵敏度和重复性得到很大的提高。且商品化的 IPG 胶条 pH 范围从 2.5~12,使得分离极酸、极碱蛋白成为可能。第二向是十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),依据蛋白质分子量大小的差别,通过蛋白质与 SDS 形成复合物后,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移速率不同达到分离蛋白质的目的<sup>[20]</sup>。

2-DE 具有高灵敏度、高分辨率的特点。使用窄 pH 胶条、微 pH 胶条和长胶条,分辨率可达到  $\Delta \text{pI} = 0.001$ 。分子量上能分辨出微克级的蛋白质,最高一板胶可分离得到 11000 多个蛋白质点<sup>[21]</sup>。虽然 2-DE 具有与其他蛋白质分离技术无可比拟的分离能力,但也存在内在缺陷,如低丰度蛋白、许多极酸、极碱以及疏水蛋白难以检测等<sup>[22-23]</sup>。还有 2-DE 的重复性较差也是困扰 2-DE 结果分析和限制应用的主要因素。为解决重复性差的问题,Unlu 等人将不同来源的蛋白分别用两种不同的荧光染料标记,混合后进行 2-DE,根据检测到的不同荧光基团来测定分析差异蛋白<sup>[24]</sup>。将 2-DE 改良成为一种新技术——双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)。由于它是对两种样品中的蛋白质采用不同的荧光标记后混合,并在同一胶内进行 2-DE 分离,消除了 2 次电泳时胶与胶之间的差异以及胶中蛋白质

点的空间位置变化,极大提高了2-DE的重复性和定量的准确性<sup>[9,25]</sup>。

### 2.3 质谱技术(Mass Spectrometry, MS)

质谱(MS)是一种对蛋白质进行高通量分析的重要手段,在差异蛋白质组学的研究中具有重要作用<sup>[26]</sup>。它的基本原理是将样品离子化后,带电粒子进入磁场或电场中,通过测定样品离子的质荷比(M/Z),来判定样品成分和进行结构分析。80年代初出现的两项离子化技术:基质辅助激光解吸电离(MALDI)和电喷雾离子化(ESI),使质谱广泛应用于高分子蛋白的分析中。MALDI常与飞行时间质谱(TOF-MS)联用,称为基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)<sup>[19]</sup>。目前常采用此法来测定肽质量指纹(PMF),它以多肽的质荷比(M/Z)为依据,同现有的蛋白酶解肽段数据库进行比对,进而实现对蛋白质的鉴定。因其对样品的纯度要求不是很高,而被广泛应用于经2-DE分离的蛋白质鉴定。但是由于肽质量指纹是基于相对分子质量的精确度,对于多种可能性的蛋白质翻译易导致错误鉴定。相对于PMF而言,串联质谱(MS/MS)是利用蛋白质的肽段氨基酸序列的特异性来鉴定蛋白,仅一条肽段就能获得蛋白质的可靠鉴定,常用于混合蛋白质的鉴定,并可鉴定蛋白质翻译后修饰,也是目前鉴定蛋白质常用的方法<sup>[12]</sup>。MALDI-TOF-MS特点是灵敏度高,检测蛋白质量范围小。常用于分析高分子量的蛋白质。MS/MS特点分辨率高、精确度高、检测蛋白质量范围广。目前,通过2D分离的蛋白质样品经常采用PMF和MS/MS相结合的方法来鉴定,极大提高了蛋白质样品鉴定的准确性和灵敏度,实现了蛋白质样品快速、准确、灵敏、大规模和高通量的检测<sup>[27-28]</sup>。

### 2.4 生物信息学(Bioinformatics)

生物信息学是随着人类基因组计划(HGP)而发展起来的。它是以生物大分子(DNA和蛋白质)为研究对象,以获取、加工、储存、分配、分析和释读生物信息为手段,综合运用数学、计算机科学和生物学工具,以理解数据中的生物学含义的一门新兴学科,也是差异蛋白质组学研究一个必不可少的组成部分。生物信息学在蛋白质组学中主要用于蛋白质序列比较分析、蛋白质结构-功能关系的研究、点突变的设计及家族鉴定、蛋白质空间结构预测、建模和分子设计以及蛋白质功能预测等。生物信息学伴随着生命科学的发展而发展,其数据库的建立和应用软件的开发日益成熟,目前已有许多的蛋白质组学数据库和分析软件可用于蛋白质组学数据的分析。蛋白质组数据库贮存了有机

体、组织或细胞所表达的全部蛋白质信息,目前应用最普遍的数据库是NRDB和dbEST数据库。NRDB由SWISS-PROT和GENPETP等几个数据库组成,dbEST是由美国国家生物技术信息中心/欧洲生物信息学研究所(NCBI/EBI)共同编辑的核酸数据库;计算机分析软件主要有蛋白质双向电泳图谱分析软件、蛋白质鉴定软件、蛋白质结构和功能预测软件等<sup>[9]</sup>。

## 3 差异蛋白组学在食用菌中的研究

差异蛋白质组学在食用菌中的研究属兴起阶段,其研究的方面也相对狭窄,归结起来,主要运用在以下三个方面的研究:(1)条件胁迫下,食用菌正常菌株和胁迫菌株的差异表达蛋白;(2)食用菌的特异组织形态发生的机理及相关特异表达蛋白;(3)食用菌生活史不同阶段的蛋白质的差异表达。

### 3.1 食用菌条件胁迫下差异蛋白质组学研究

目前,差异蛋白质组学在食用菌上的研究较多的集中在条件胁迫这一方面。研究思路是条件胁迫(如高温、低温、营养条件不良等)下,诱导机体产生的差异表达蛋白,质谱测定并根据肽质量指纹图谱初步鉴定这些差异蛋白的种类,结合该蛋白的功能分析条件胁迫可能的相关机理。如黄桂英(2008)研究发现,低温胁迫下真姬菇菌丝体相对适温条件产生26个上、下调的差异表达蛋白<sup>[29]</sup>。其中经鉴定的14种中,有参与组成细胞骨架的肌动蛋白、微管蛋白;有参与蛋白合成与分解的蛋白酶体和乙酰乳酸合酶;有参与物质能量代谢的ATP合酶、转醛醇酶、甲酸脱氢酶等;参与信号转导调控的鸟苷酸结合蛋白等。由此,可以看出真姬菇低温胁迫下的调控是一个复杂的多蛋白和酶参与,共同协作完成的过程<sup>[6]</sup>。陆兆明(2009)对双孢蘑菇耐热性的分子机理研究时发现,热胁迫下诱导出现5种蛋白质,抑制表达蛋白质4种,23种蛋白表达量上、下调;分析表明这些蛋白中包括热激蛋白在内的分子伴侣对高温抗逆起重要作用,其余还有物质和能量代谢相关蛋白,与基因转录、翻译相关的信号转导等相关蛋白<sup>[18]</sup>。通过分析这些差异表达蛋白,表明双孢蘑菇在细胞热休克机制的上游即出现应对机制,从而从转录水平上对热激反应进行调控。其他菇如金针菇的低温胁迫的差异蛋白也都已有研究<sup>[30]</sup>。

### 3.2 食用菌不同组织形态发生差异蛋白质组学研究

在食用菌的某一组织形态如菌柄、菌盖、菌褶等的形成过程中,会涉及到多个基因共同参与调控,这一系列相关基因进行特异表达,并产生一系列特异蛋白相互协调共同起作用来完成特异组织的分化过程。如金针菇在完全黑暗中会形成菌柄细长、无菌盖的针状菇;

当给一定散射光刺激时菌盖便开始发育膨大,日本 Yuichi SAKAMOTO(2007)对此生理过程进行了差异蛋白质组学的研究<sup>[31]</sup>。研究发现金针菇光照2天后菌柄顶尖开始膨大,4天后菌盖和菌柄连接处开始形成子实层,6天后形成菌褶。通过对该过程取样,成功鉴定出一种与细胞壁形成相关的蛋白PSH。该蛋白是一种疏水蛋白,只在菌盖形成过程中受光诱导才会产生特异表达,而在菌柄中的转录水平则很低。正是由于该蛋白光照比黑暗中的表达量上调,才致使散射光下金针菇菌盖变得饱满肥厚。其他方面,还有学者正对双孢蘑菇不同菌落形态的差异蛋白质组学进行研究。

### 3.3 食用菌生活史不同阶段的蛋白的差异表达

食用菌在其生活史不同阶段,其菌丝体的组织结构也不同。如多数食用菌的生活史是由担孢子萌发形成单核菌丝,两条可亲和的单核菌丝交配形成双核菌丝。在此过程中,同样会涉及到复杂的蛋白差异表达。日本 Yuichi SAKAMOTO(2001)分别对金针菇双核菌丝和不结实单核菌丝,以及双核菌丝形成的子实体进行了差异蛋白质组学的研究<sup>[32]</sup>,发现菌丝体在形成子实体之前,有19个特异蛋白仅在双核菌丝而没有在单核菌丝中表达;另一方面,却有9个特异蛋白只在单核菌丝而没有在双核菌丝中表达。并且发现这些特异蛋白在菌丝形成原基的过程和原基形成子实体的过程中,表达量有着不同的动态变化规律,根据表达量的上、下调将这些蛋白划分成7种类型。进一步研究发现:子实体形成过程产生27种特异表达蛋白。对比菌丝体和子实体阶段的特异蛋白,发现蛋白Pf1、Pf3和Pf6在子实体形成过程起重要作用。对Pf1和Pf3进行N端氨基酸测序发现两者同源性较高,很有可能是由相同的基因家族编码的,并鉴定出此二者蛋白与基因FDS的编码序列同源性很高,可能是此基因不同的转录修饰水平产生的两种不同蛋白。综合对这些特异蛋白和相关基因的分析,对揭示金针菇子实体的形成有重要意义。

## 4 展望

虽然,目前食用菌差异蛋白质组学研究的深度和广度都远低于动植物和其他真菌类,但随着食用菌中双孢蘑菇、草菇等的基因组与转录组测序的完成,食用菌的后基因组时代也来临;加之双向电泳和生物质谱技术的不断成熟,从差异蛋白质组学来揭示食用菌生长过程中或在外界环境刺激下的反应途径及调控机制已引起人们越来越多的重视。随着各种食用菌蛋白质组图谱和数据库的不断完善以及技术的成熟,差异蛋白质组学研究必将成为研究食用菌的强有力技术手段

之一,应用前景非常广阔。

### 参考文献

- [1] 白雪,陈兰芬,宋思扬,等.高温诱导双孢蘑菇蛋白质表达变化的分析[J].厦门大学学报:自然科学版,2001,40(6): 1342-1345.
- [2] Braaksma A, Schaap D J. Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 1996, 7(1-2): 119-127.
- [3] Gergely V, Kubachka K M, Mounicou S, et al. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1101(1-2): 94-102.
- [4] Sakamoto Y. Protein expression during *Flammulina velutipes* fruiting body formation[J]. *Mycoscience*, 2010, 51(3): 163-169.
- [5] 刘晓云,苏明声,杨俊璋,等.灵芝子实体原基双向电泳和总蛋白质提取方法的建立[J].菌物学报,2009,28(6): 802-805.
- [6] 胡开辉,黄桂英,颜松,等.斑玉蕈低温胁迫下菌丝体酶活变化及差异蛋白质组学研究[J].菌物学报,2009,(4): 584-590.
- [7] 何大澄,肖雪媛.差异蛋白质组学及其应用[J].北京师范大学学报:自然科学版,2002,38(4): 558-562.
- [8] 刘勇,张峻华.蛋白质组学研究进展及展望[J]. *JOURNAL OF NEIJIANG TEACHERS COLLEGE*,2003,18(2): 45-48.
- [9] 李鑫.比较蛋白质组学研究与应用进展[J].国际免疫学杂志,2006,29(3): 156-160.
- [10] 梁宇,荆玉祥,沈世华.植物蛋白质组学研究进展[J].植物生态学报,2004,28(1): 114-125.
- [11] 刘卫群,李浩.差异蛋白质组学在植物研究中的应用[J].安徽农业科学,2006,34(17): 4201-4203.
- [12] Monteoliva L, Albar J P. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches[J]. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2004, 3(3): 220-239.
- [13] 袁雪宇,吴国亭,韩玉麒.差异蛋白质组学技术和应用前景[J].同济大学学报:医学版,2004,25(4): 349-351.
- [14] Shaw M M, Riederer B M. Sample preparation for two - dimensional gel electrophoresis[J]. *Proteomics*, 2003, 3(8): 1408-1417.
- [15] 黄碧芳.不同温度对虎奶菇胞内胞外蛋白差异表达的影响[D].福州:福建农林大学,2008,21-29.
- [16] 黄碧芳,朱鸿萍,李彩斌,等.虎奶菇菌丝体自溶蛋白质制备方法比较[J]. *Edible fungi of China*, 2010,29(1):52-54.
- [17] 陆兆明.双孢蘑菇热胁迫蛋白表达差异分析[D].厦门:厦门大学,2008,23-45.
- [18] 陆兆明,徐祯,王珂,等.双孢蘑菇耐温差异蛋白质组学研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2009,48(4): 590-593.
- [19] 王阳梦,董银卯,何聪芬.蛋白质组学核心技术研究进展[J].北京工商大学学报:自然科学版,2006,24(4): 9-14.
- [20] 王玉琪,李庆华,李瑞红.蛋白质组学:后基因组时代的新兴学科[J].中国农学通报,2002,18(5): 74-76.
- [21] 孙薇,贺福初.差异蛋白质组学研究技术新进展[J].化学通报,2005,68(6): 401-407.
- [22] 赵宏伟,田秀珠,王波.差异蛋白质组学研究与应用进展[J].医学与

- 哲学 (临床决策论坛版),2006,27(4): 45-47.
- [23] 曹志成,余坚文,梁荣能.蛋白质组学—引领后基因组时代[J].中国生物工程杂志,2005,25(1): 33-38.
- [24] 张群业,陈竺.差异表达蛋白质组学中的常用技术[J].国外医学:遗传学分册,2004,27(2): 64-67.
- [25] 孙言伟,姜颖,贺福初.差异蛋白质组学的研究进展[J].生命科学,2005,17(2): 137-140.
- [26] Fischer B, Grossmann J, Roth V, et al. Semi-supervised LC/MS alignment for differential proteomics[J]. Bioinformatics, 2006, 22 (14): 132-140.
- [27] 孟凡臣,张艳贞,胡英考,等.生物质谱及其在蛋白质组学研究中的应用[J]. Letters in biotechnology,2006,17(3): 468-470.
- [28] 应万涛,焦丽燕,钱小红.生物质谱与蛋白质组学[J]. 生物技术通讯, 2004,15(3): 259-262.
- [29] 黄桂英.真姬菇低温胁迫下菌丝体酶活变化及差异蛋白质组学研究[D].福州:福建农林大学,2008,20-44.
- [30] Sakamoto Y, Ando A, Tamai Y, et al. Protein expressions during fruit body induction of *Flammulina velutipes* under reduced temperature[J]. Mycological Research, 2002, 106(2): 222-227.
- [31] Sakamoto Y, Ando A, Tamai Y, et al. Pileus differentiation and pileus-specific protein expression in *Flammulina velutipes*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(1): 14-24.
- [32] Sakamoto Y, Ando A, Tamai Y, et al. Differential protein expression in the fruiting dikaryon and the non-fruiting monokaryon of *Flammulina velutipes*[J]. Mycological Research, 2001, 105(2): 177-182.