

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

适用于双向电泳分析的链格孢菌体蛋白提取方法的筛选

李贞彪, 王军节*, 王 鹏

(北方民族大学生物科学与工程学院, 植物性农产品贮藏与加工重点实验室, 银川 750021)

摘要 为筛选出一套适用于双向电泳分析的链格孢菌蛋白的提取方法,以该菌为研究材料,首先采用 TCA-丙酮法、磷酸-TCA-丙酮法、SDS 提取法和 TCA/丙酮-SDS/酚抽提法分别提取菌丝蛋白质,然后进行蛋白质浓度的测定和单向 SDS-PAGE 试验,并建立双向电泳体系。结果表明:TCA/丙酮-SDS/酚抽提法所获得的蛋白质浓度为 15.9 mg/mL,分别是其他三种方法所得蛋白浓度的 2.64、4.61 和 1.43 倍;SDS-PAGE 图谱中形成的条带数目最多、丰度最好;所获得的 2-DE 图谱背景清晰干净,无明显的横纵条纹,分辨率高,可辨别的蛋白质点数为 1 138 个,是 TCA-丙酮法所分离蛋白点数的 1.89 倍。由此可知,TCA/丙酮-SDS/酚抽提法为链格孢菌蛋白提取的最优方法,该方法所提取的蛋白质适用于双向电泳分析及后续的蛋白质组学研究。

关键词 链格孢; 采后病害; 蛋白质提取; 双向电泳; TCA/丙酮-SDS/酚抽提法

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018285

Screening of extraction method of the total protein from *Alternaria alternata* suitable for two-dimensional electrophoresis analysis

LI Zhenbiao, WANG Junjie, WANG Peng

(College of Biological Science and Engineering, Key Laboratory of Storage and Processing of Plant Agro-Products, North Minzu University, Yinchuan 750021, China)

Abstract In order to screen the extraction methods of total protein from *Alternaria alternata* suitable for two-dimensional electrophoresis analysis, the mycelia proteins in the pathogen were extracted by four methods of TCA-acetone, phosphate-TCA-acetone, SDS and TCA/acetone-SDS/phenol, respectively. Furthermore, the protein concentration was analyzed and the separation effect of total protein was detected by SDS-PAGE. In addition, a suitable 2-D gel electrophoresis system for mycelia protein was established. The results showed that the protein concentration extracted by the method of TCA/acetone-SDS/phenol reached 15.9 mg/mL, which was 2.64, 4.61 and 1.43 times of that extracted by the methods of TCA-acetone, phosphate-TCA-acetone and SDS, respectively. Moreover, the most and clearest protein strips in SDS-PAGE gel were obtained by TCA/acetone-SDS/phenol extraction method, and the 2-DE map with a distinct background, high resolution, without obvious horizontal and vertical stripes were also obtained. The number of protein points reached 1 138, which is 1.89 times of that isolated by the TCA-acetone method. It is suggested that the TCA/acetone-SDS/phenol extraction method is the best extraction method of mycelia protein from *Alternaria alternata*. Meanwhile, the protein extracted by the method is suitable for two-dimensional electrophoresis analysis and subsequent proteomic research.

Key words *Alternaria alternata*; postharvest disease; protein extraction; two-dimensional electrophoresis; TCA/acetone-SDS/phenol method

收稿日期: 2018-07-04

修订日期: 2018-08-08

基金项目: 宁夏自然科学基金(NZ16087);北方民族大学重点科研项目(2015KJ35)

* 通信作者 E-mail: smkxwj@163.com

链格孢 *Alternaria alternata* 是一种能侵染多种农作物和经济作物的重要植物病原真菌,广泛分布在土壤、空气和农作物残体中,可寄生、腐生和兼性寄生或腐生^[1]。*A. alternata* 是半知菌亚门链格孢属的模式种^[2],其菌落边缘整齐,初白色,而后逐渐变为不同程度的褐色,气生菌丝呈短绒状,其分生孢子梗为深色,单枝,顶端单生或串生分生孢子,分生孢子呈黑褐色,形状大小不一,呈倒棍棒状或倒梨形,有横隔膜^[3]。该菌可侵染苹果^[4]、梨^[5]、草莓^[6]、柑橘^[7]、枸杞^[8-9]、甜瓜^[10]、番茄^[11]等多种果蔬,引起采后烂损,并且其侵染过程产生的交链孢霉毒素给果蔬及其制品销售带来食品安全隐患^[12]。全面解析病菌的分子致病机理对制定该病害的有效控制策略有重要意义。目前,已有研究人员对该病菌分子致病机理开展了较为广泛的研究,但研究主要集中在毒素^[13]和代谢产物^[14-15]上,从蛋白质水平揭示链格孢分子致病机理的研究尚未见报道。

近年来,蛋白质组技术已经广泛应用于植物病原真菌致病机理的研究中。双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术是蛋白质组学研究中一种有效的蛋白质分离方法,而获得高分辨率 2-DE 图谱的关键步骤是蛋白质提取^[16]。目前,适用于 2-DE 技术的植物病原真菌总蛋白提取常用 TCA/丙酮法^[17]、酚抽提法^[18]及其衍生的改良方法。江珊等^[19]采用改进的 TCA/丙酮法对稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 菌丝体蛋白质进行双向电泳分析,获得了高分辨率电泳图谱,较改进前 TCA/丙酮法蛋白质点数量平均提高 687 个点。Fernández-Acero 等^[20]研究了磷酸盐缓冲液预处理对 TCA-丙酮法提取灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 菌丝体总蛋白的效果,发现在 TCA/丙酮沉淀蛋白质样品之前使用磷酸盐缓冲液进行预处理可显著提高灰葡萄孢菌丝体总蛋白的提取效果。González 等^[21]研究发现 TCA/丙酮结合苯酚提取法所提取的灰葡萄孢菌丝体蛋白含量高于磷酸-TCA-丙酮法,且该方法提高了蛋白点的分辨率,减少了拖尾,有更多的蛋白点被检测出。舒灿伟等^[22]对采用不同蛋白提取方法所提取的水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 蛋白质样品质量进行比较研究,结果表明,优化的 TCA/丙酮-酚/SDS 联合抽提法适用于进行双向电泳的水稻纹枯病菌蛋白质的提取。但目前有关链格孢中蛋白质

的有效提取方法研究鲜有报道。

本研究采用 TCA-丙酮、磷酸-TCA-丙酮、SDS 提取和 TCA/丙酮-SDS/酚联合抽提等方法提取链格孢总蛋白,从蛋白质浓度和电泳分辨率等方面比较了不同提取方法的提取效果,对较理想的两种方法进行双向电泳对比分析,旨在探索优化出一套适合双向电泳分析的链格孢总蛋白的提取方法,为相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

链格孢 *Alternaria alternata* 由本实验室分离自黑霉病发病枸杞果实。

1.1.2 主要试剂和仪器

丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、Tris、二硫苏糖醇(DTT)、溴酚蓝、过硫酸铵(Ap)、甘氨酸、尿素、硫脲、碘乙酰胺(IAA)、四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 R-250 购自 Amresco 公司;IPG 胶条(pH 3~10,17 cm,非线性)、两性电解质 Bio-Lyte(pH 3~7)、矿物油为 Bio-Rad 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

IEF 等电聚焦电泳仪、双向垂直板电泳仪、制冷水浴循环器、UV 凝胶成像系统、GS-800 Calibrated Imaging Densitometer 型彩色扫描仪,为 Bio-Rad 公司产品;低温高速离心机为长沙湘仪离心机仪器有限公司生产;紫外可见分光光度计为上海元析仪器有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 病原菌培养与收集

参照赵明治等^[23]的方法并略作修改。将链格孢接种于 PDA 平板上,于 28℃ 培养箱中培养 7 d 后,用 5 mm 直径的无菌打孔器在菌落边缘打取菌饼,取 3~5 个菌饼接入装有 100 mL PDB 的 250 mL 三角瓶中,置于 28℃、170 r/min 下恒温振荡培养 3 d,收集菌丝,超纯水洗涤 3 次,用真空抽滤器将培养的菌丝体抽滤成干燥的菌饼后立刻用液氮冷冻于 -80℃ 保存,备用。

1.2.2 菌体蛋白的提取

分别采用 TCA-丙酮法、磷酸-TCA-丙酮法、SDS 提取法和 TCA/丙酮-SDS/酚联合抽提法提取菌丝蛋白,操作流程见图 1。

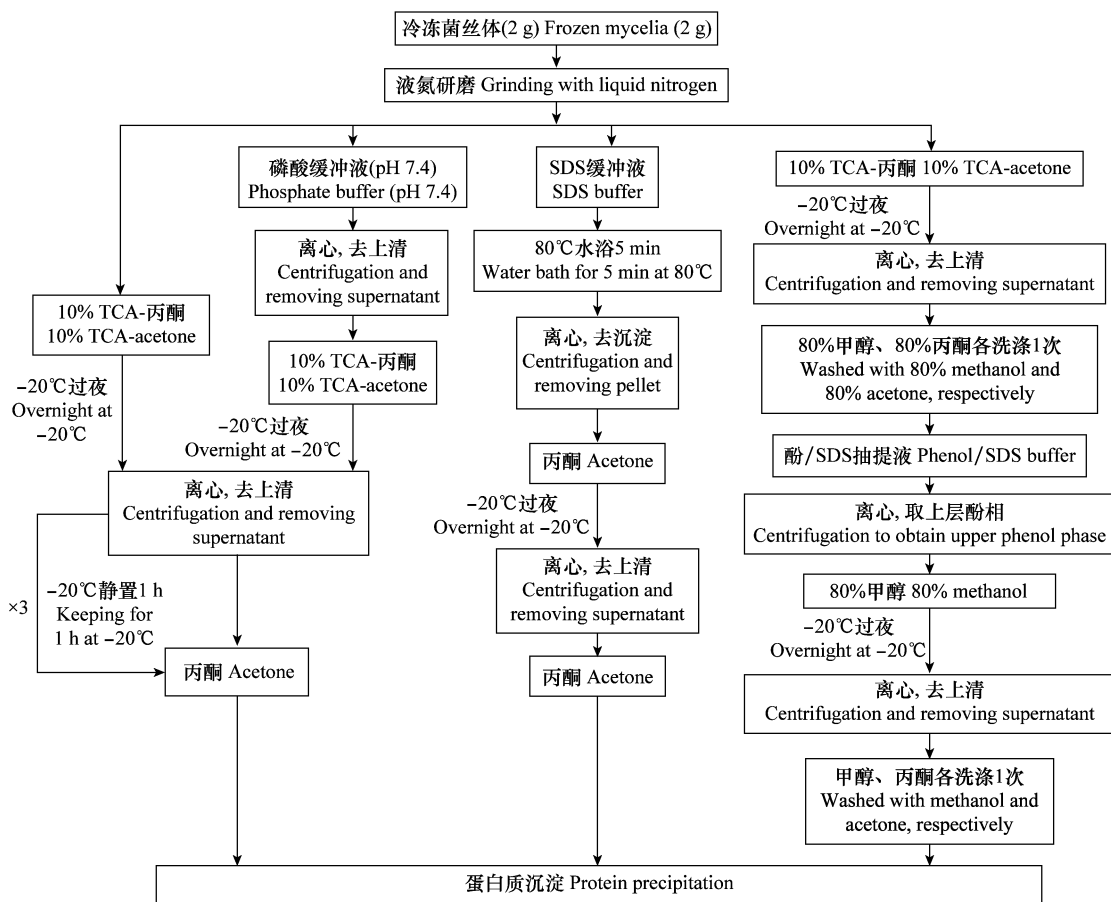


图1 4种菌丝蛋白质提取方法流程图

Fig. 1 Flowchart of four mycelia protein extraction protocols

TCA-丙酮法参照 Damerval 等^[24]的方法,略作修改。取2 g干燥的菌丝置于研钵中,加液氮研磨至细粉,转入50 mL离心管中。加入30 mL预冷的质量分数为10% TCA 丙酮溶液(含体积分数0.07%的巯基乙醇),涡旋振荡混匀,−20℃过夜沉淀蛋白质。4℃、12 000 r/min 离心20 min,弃上清;再加入含体积分数0.07%巯基乙醇的预冷丙酮,充分混匀,−20℃静置1 h;重复离心洗涤沉淀3次以去除残留的TCA;室温下,将沉淀置于通风橱内,使蛋白质沉淀中残留的丙酮挥发干净;收集干燥后的蛋白质干粉,于−20℃下保存。

磷酸-TCA-丙酮法参照 Fernández-Acero 等^[20]和张小泉^[25]的方法,略作修改。将2 g干燥的菌丝液氮研磨至细粉后转入50 mL离心管,加入30 mL预冷的10 mmol/L 磷酸钾-磷酸缓冲液(pH 7.4,含体积分数0.07%的巯基乙醇),涡旋振荡混匀,−20℃下静置2 h;4℃、12 000 r/min 离心20 min,弃上清;将得到的沉淀重悬于预冷的质量分数为

10% TCA-丙酮溶液(含0.07%的巯基乙醇)中,涡旋振荡混匀,−20℃过夜沉淀蛋白质;4℃、12 000 r/min 离心20 min,弃上清;加入含体积分数0.07%巯基乙醇的预冷丙酮,充分混匀,重复洗涤3次。室温下,待丙酮挥发干净后收集干燥的蛋白质干粉,于−20℃下保存。

SDS提取法参照舒灿伟等^[22]的方法,略作修改。如前所述,将2 g干燥的菌丝研磨成细粉后转入50 mL离心管,立刻加入30 mL预冷的SDS缓冲液(含30%甘油、4% SDS、5%巯基乙醇、0.1 mol/L, pH 6.8 Tris-HCl),涡旋振荡混匀;在80℃下恒温水浴5 min;随后4℃、12 000 r/min 离心20 min,弃沉淀;将所得的上清液加入含体积分数0.07%巯基乙醇的预冷丙酮,涡旋振荡混匀,−20℃过夜。4℃、12 000 r/min 离心20 min,弃上清,获得的沉淀再用预冷丙酮洗涤1次。室温下,待丙酮挥发干净后收集干燥的蛋白质干粉,于−20℃下保存。

TCA/丙酮-SDS/酚联合抽提法参照舒灿伟

等^[22]和 Wang 等^[26]的方法,略作修改。如前所述,将 2 g 干燥的菌丝研磨成细粉后转入 50 mL 离心管,立刻加入 30 mL 预冷的质量分数为 10% TCA 丙酮溶液(含体积分数 0.07% 的巯基乙醇),涡旋振荡混匀,−20℃ 过夜沉淀蛋白质。4℃、12 000 r/min 离心 20 min,弃上清;再分别用体积分数 80% 甲醇溶液(含 100 mmol/L 醋酸铵)和体积分数 80% 丙酮溶液各洗涤 1 次,沉淀通风干燥 10 min。向所得沉淀中同时加入 5 mL 水饱和酚和 5 mL SDS 缓冲液(水饱和酚与 SDS 缓冲液 1:1 混合),振荡混匀,室温静置 5 min;离心,吸取上层酚相转移至新的 50 mL 离心管中,再加入 5 倍体积预冷的 100 mmol/L 醋酸铵甲醇溶液,−20℃ 过夜沉淀。4℃、12 000 r/min 离心 20 min,弃上清;沉淀用上述甲醇和丙酮溶液再各洗涤 1 次,收集干燥后的蛋白质干粉,于−20℃ 下保存。

1.2.3 蛋白质溶解

分别称取上述 4 种方法获得的蛋白质样品干粉 50 mg 加入 1 000 μL 裂解液(8 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% W/V CHAPS,1% W/V DTT,0.2% V/V Bio-Lyte pH 3~10)中,涡旋混匀后室温放置 3~4 h,每 30 min 轻轻摇匀 1 次,然后在 4℃、12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,将样品分装后于−80℃ 下保存或直接用于电泳。

1.2.4 蛋白质定量

制备的蛋白样品均参照 Bradford 法^[27]测定蛋白质的含量。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,在 595 nm 下测定不同浓度标准液的吸光度制作标准曲线,标准方程为 $y=0.0079x+0.0159$, $R^2=0.9978$,然后根据样品的吸光度、稀释倍数计算出不同提取方法获得的蛋白质浓度,结果分别用 mg/mL 表示。

1.2.5 SDS-PAGE 分析

采用等体积上样的方法,将裂解后的蛋白质样品与 2× SDS-PAGE 上样缓冲液按 1:1 的体积比充分混合,100℃ 下沸水浴 3~5 min,将各方法所得到的蛋白样品调整至同一浓度后移取 10 μL 样品混合液进行上样,开始时用 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,电泳结束后将凝胶转移至盛有 20 mL 考马斯亮蓝 R-250 染色液的容器内,在水平摇床上缓慢振荡 1 h,使凝胶颜色与染色液颜色

一致为止。染色完毕后,将凝胶转移至含有适量脱色液的容器内,水平摇床缓慢振荡 4~8 h 至条带清晰为止。

1.2.6 双向电泳分析

双向电泳试验参照张小泉^[25]的方法,略作修改。蛋白样品与水化液(8 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% W/V CHAPS,65 mmol/L DTT,0.2% V/V Bio-Lyte pH 3~10,0.001% 溴酚蓝)充分混合,蛋白质上样量为 400 μg/泳道,上样总体积 350 μL,选用 IPG 胶条(17 cm、pH 3~10、非线性)。等电聚焦程序设置为:20℃,50 V 水化 12 h;除盐:250 V 线性 0.5 h,500 V 快速 0.5 h,750 V 快速 1 h,1 000 V 快速 1 h;升压:5 000 V 线性 2 h,10 000 V 线性 3 h;聚焦:10 000 V 快速 60 000 Vh;保持:500 V 快速,任意时间。聚焦结束后,胶条依次在含有 2% DTT 的平衡缓冲液(0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mol/L 尿素,20% 甘油,2% SDS)和含有 2.5% 碘乙酰胺的平衡缓冲液中进行平衡,每次平衡 15 min。采用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE,电泳参数设置为 50 V/gel、1.5 h,200 V/gel、8 h,待溴酚蓝指示剂到达距底部边缘 1 cm 处时即可停止电泳。

1.2.7 凝胶染色与图像处理

电泳结束后,先将凝胶用超纯水漂洗 3 次,再转入考马斯亮蓝染色液中,置于水平摇床上,室温下缓慢染色 10 h(或过夜)左右。再将凝胶转入脱色液 I(甲醇:水:冰乙酸=45:45:10)中,水平摇床上缓慢脱色 1 h,再转入脱色液 II(乙醇:水:冰乙酸=45:45:10)中缓慢脱色 4~8 h,期间更换脱色液 II 2~3 次,直到蓝色背景消失。染色后的凝胶采用 BIO-RAD GS-800 Calibrated Imaging Densitometer 型彩色扫描仪扫描,并用 Quantity one 软件获取图片。扫描后的凝胶图像用 PDQuest 8.0.1 软件进行图谱分析。

1.2.8 数据处理与分析

所有试验数据采用 Excel 2016、IBM SPSS 21.0 软件统计分析与作图分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白质提取效果的比较

不同提取方法均能获得菌丝蛋白,且获得蛋白的浓度差异显著。由表 1 可知,磷酸-TCA-丙酮法获得蛋白质浓度最低,为 3.447 mg/mL, TCA-丙酮法和 SDS 提取法提取蛋白浓度较高,分别为 6.027 mg/mL

和 11.124 mg/mL,而获得最高蛋白质浓度方法为 TCA/丙酮-SDS/酚联合抽提法,为 15.900 mg/mL,分别是 TCA-丙酮法、磷酸-TCA-丙酮法和 SDS 提取法的 2.64、4.61 和 1.43 倍。

表 1 不同方法提取菌丝蛋白质浓度的比较¹⁾

Table 1 Comparison of mycelia protein concentration from *Alternaria alternata* extracted by four methods

提取方法 Extraction method	蛋白质浓度/mg·mL ⁻¹ Protein concentration
TCA-丙酮法 TCA-acetone method	(6.027±0.171)c
磷酸-TCA-丙酮法 Phosphate-TCA-acetone method	(3.447±0.119)d
SDS 提取法 SDS method	(11.124±0.325)b
TCA/丙酮-SDS/酚抽提法 TCA/acetone-SDS/phenol method	(15.900±0.889)a

1) 同列数据后标示不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters in the same column indicated the significant difference at 5% level.

2.2 SDS-PAGE 电泳效果分析

从这 4 种提取方法所制备的菌丝蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱(图 2)可以看出,4 种方法提取的菌丝蛋白的样品颜色、条带数目、清晰程度都存在较大差异。采用 TCA-丙酮法获得的蛋白质粉末呈现浅灰色,含有少量色素杂质,蛋白提取率较高,条带较清晰,约有 25 条;相比于 TCA-丙酮法,磷酸-TCA-丙酮法所获得的蛋白质粉末呈深灰色,含色素杂质较多,蛋白提取率不高,条带相对较浅,尤其是分子量较大的蛋白质丰度较差,约有 26 条;SDS 提取法所获得的蛋白质为白色粉末,条带背景较模糊,条带数约为 27 条,高分子量蛋白质条带微弱,而低分子量蛋白质条带颜色较深,且背景十分模糊。而 TCA/丙酮-SDS/酚抽提法相比其他 3 种方法所获得的蛋白条带数目更多、更清晰,尤其是高分子量蛋白质条带,总共约有 28 条。因此,从 SDS-PAGE 电泳的比较结果可以初步筛选出 TCA-丙酮法和 TCA/丙酮-SDS/酚抽提法更适合于进一步进行双向电泳检测。

2.3 两种方法提取蛋白的双向电泳比较

通过 SDS-PAGE 电泳初步筛选出 TCA-丙酮法和 TCA/丙酮-SDS/酚抽提法为较好的提取方法,再在严格控制双向电泳参数和方法相同的条件下,分别对这两种方法所提取的蛋白质进行双向电泳检测,试验结果如图 3 所示。

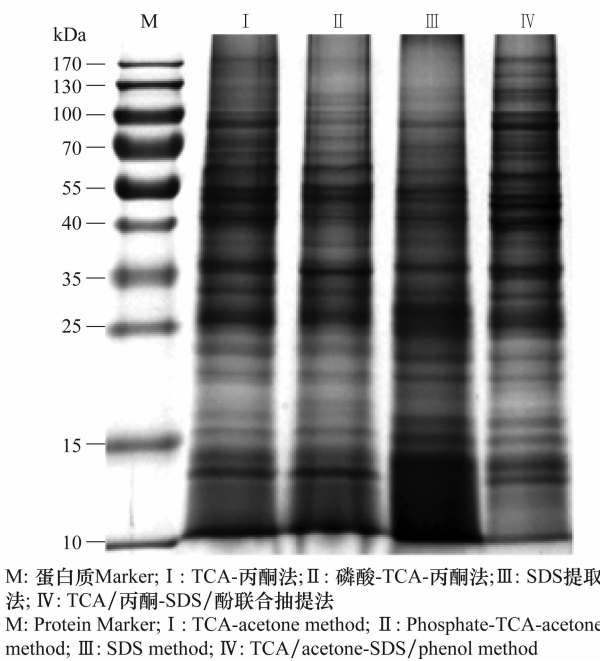


图 2 不同方法提取菌丝蛋白质的 SDS-PAGE 图谱
Fig.2 SDS-PAGE maps of mycelia proteins from *Alternaria alternata* extracted by four methods

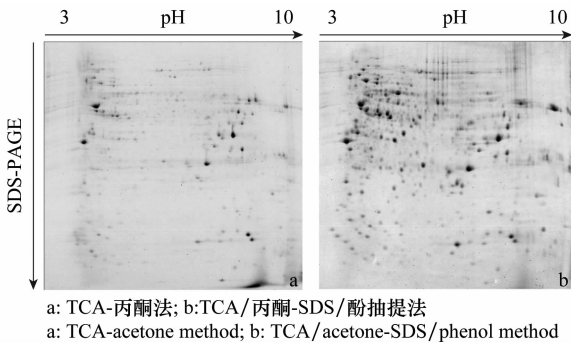


图 3 两种不同提取方法提取菌丝蛋白的 2-DE 图谱
Fig.3 2-DE maps of mycelia proteins from *Alternaria alternata* extracted by two methods

从图中可以看出,两种蛋白提取方法效果有明显的差异。从蛋白质的分辨率来看,采用 TCA/丙酮-SDS/酚抽提法所提取蛋白质的双向电泳图谱的蛋白质分辨率明显优于 TCA-丙酮法的蛋白质样品图谱。从双向电泳图谱中可分辨点的数目来看,TCA-丙酮法所提取的蛋白质样品较少,2-DE 图谱中蛋白点数较少,为 603 个,且图谱横纹较多,分辨率较低(图 3a)。相比而言,TCA/丙酮-SDS/酚抽提法所得到的电泳图谱背景干净,几乎没有明显的拖尾现象,蛋白点独立清晰圆润,分布较均匀,没有弥散的蛋白质点,且点数明显多于 TCA-丙酮法,为 1138 个。说明该提取方法获得的蛋白样品杂质较

少,得到了理想的分离效果。由此表明,TCA/丙酮-SDS/酚抽提法所获得的蛋白质更适合于链格孢菌丝蛋白的双向电泳分析。

3 讨论

本研究分析比较了 4 种不同方法提取的链格孢菌体蛋白质的浓度和单向电泳分离效果,结果表明 TCA-丙酮和 TCA/丙酮-SDS/酚联合抽提两种方法提取效果较好。其中,TCA-丙酮法为经典的蛋白质提取方法,其操作简单并能降低次生代谢物干扰、减少蛋白降解、消除蛋白质水解和其他蛋白酶修饰^[28-29]。相比 TCA-丙酮法,磷酸-TCA-丙酮法中磷酸处理可适当去除一些杂质而获得背景更清晰的单向电泳条带,但该处理也会导致高分子量蛋白的缺失造成高分子量蛋白条带较少。该研究结果与 Fernández-Acero 等^[20]和 Lakshman 等^[30]的研究不相符,可能由于研究材料的不同所致。SDS 提取法获得的蛋白质浓度较高,但单向图谱条带背景模糊且颜色较深,高分子量蛋白条带颜色相比其他方法较浅,说明该方法对高分子量蛋白提取效率较低;低分子量蛋白条带颜色很深且有拖尾现象,说明提取的蛋白可能含有盐离子、核酸、多糖等杂质,且提取过程中可能由于高温处理导致蛋白质发生了部分降解,本研究结果与舒灿伟等^[22]的研究结果一致。而 TCA/丙酮-SDS/酚联合抽提法获得的蛋白质从单向电泳图谱可以看出蛋白条带清晰,数目最多,说明该方法提取的蛋白质条带丰度好、纯度高、污染少,整体质量较好。但该方法与 TCA-丙酮法所提取的蛋白质条带数目、蛋白丰度差异较小。

因此,进一步进行双向电泳试验并分析电泳图谱质量,结果发现 TCA/丙酮-SDS/酚联合抽提法所获得的蛋白质点数及图谱分辨率均明显高于 TCA-丙酮法,尤其能分离出更多的酸性蛋白点数。这可能是由于在 TCA-丙酮法基础上,增加 SDS/酚抽提步骤能溶解更多蛋白以及高效去除核酸、小分子物质等杂质有关。SDS 是一种表面活性剂,能有效溶解和变性蛋白质,尤其是膜蛋白;酚抽提可大大增加蛋白的溶解性,同时能很好地去除样品中盐离子、多糖、脂类、色素等杂质,被广泛应用于含较多干扰物的组织材料的蛋白质提取^[31]。方法中使用的醋酸铵-甲醇溶液可以进一步对蛋白质进行纯化和浓缩,再用甲醇和丙酮洗涤沉淀可以有效去除一些盐离子

和色素等杂质,还可去除脂类等干扰等电聚焦的物质。此外,由于甲醇与丙酮互溶,在丙酮洗涤沉淀时还能溶解样品中残留的甲醇,最后随丙酮的挥发而挥发。所以使得该方法获得的电泳图谱较 TCA-丙酮法背景更干净,分辨率更高,蛋白质点数更多。Wang 等^[26]将 TCA/丙酮沉淀法和苯酚提取法联合使用,综合了 TCA 丙酮沉淀法和酚法的优点,其结果表明 SDS/酚联合抽提法比酚、SDS 缓冲液单独提取的效果更好。Fernández-Acero 等^[32]的试验结果也表明 TCA/丙酮沉淀法和苯酚提取法的联合使用可以更好地提高灰葡萄孢蛋白质斑点的数量和清晰度,同时减少条纹的出现。本试验结果也与舒灿伟等^[22]和冯浩等^[33]的研究结果一致。

由此可见,TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法是一种适用于多数丝状病原菌菌丝体蛋白质双向电泳的提取方法。此外,iTRAQ 技术作为一种新的、功能强大的比较蛋白质组学技术,具有高通量、重复性好、能够处理复杂样本等优点,其在真菌研究中的应用价值已得到初步验证^[34]。但 iTRAQ 试剂几乎可以与样本中的所有蛋白结合,容易受样本中的杂质蛋白及样本处理过程中缓冲液的污染等缺点也制约了该技术的应用,需要对样本进行预处理并尽量减少操作过程中的污染^[35]。本研究表明 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法可以高效地去除蛋白样品中的杂质,得到较高纯度及丰度的蛋白质,有望在 iTRAQ 技术中得到广泛的应用。

4 结论

本研究采用液体培养方式收集菌丝体材料,然后经液氮研磨获得菌丝体干粉,再分别采用 4 种不同的提取方法获得蛋白质样品,经 Bradford 法定量分析蛋白质浓度后,采用 SDS-PAGE 分析初步筛选出 TCA-丙酮法和 TCA/丙酮-SDS/酚抽提法这两种方法作为较适宜的提取方法。研究还对初步筛选出的两种提取方法所提取的蛋白质进行了 2-DE 电泳检测,胶体考马斯亮蓝染色得到的凝胶经 PDQuest 软件分析,结果得出 TCA/丙酮-SDS/酚抽提法为链格孢菌体蛋白提取的最优方法,该方法所提取的蛋白质适用于双向电泳分析及后续的蛋白质组学研究。

参考文献

[1] 康子腾,姜黎明,罗义勇,等.植物病原链格孢属真菌的致病机

- 制研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(9): 908-914.
- [2] 张天宇. 中国真菌志. 第十六卷, 链格孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] YAGO J I, LIN C H, CHUNG K R. The SLT2 mitogen-activated protein kinase-mediated signalling pathway governs conidiation, morphogenesis, fungal virulence and production of toxin and melanin in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(7): 653-665.
- [4] 李庆亮, 李捷, 李夏鸣, 等. 细胞壁降解酶在苹果霉心病菌致病过程中的作用研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(31): 90-95.
- [5] 蔺经, 杨青松, 李晓刚, 等. 喀霉胺对梨黑斑病菌(*Alternaria alternata*)的毒力及其药效评价[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 162-163.
- [6] 黄颖倩. 草莓病原菌及其拮抗菌的筛选、鉴定与抑菌特性初探[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [7] 梅秀凤. 柑橘褐斑病和黑腐病原菌及内生型链孢菌的比较研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [8] 袁惠君, 李虎军, 贾鸿震, 等. 永登枸杞鲜果晾晒过程中霉腐病原真菌的分离鉴定[J]. 食品工业科技, 2016, 37(21): 135-138.
- [9] 刘瑜, 王海, 王艳丹, 等. 枸杞鲜果霉变菌种分离鉴定及其生物学特性[J]. 农业工程学报, 2017, 33(S1): 374-380.
- [10] 谢东锋, 毕阳, 邓建军, 等. 采前壳聚糖对厚皮甜瓜果实潜伏侵染及其采后主要病害的控制[J]. 甘肃农业大学学报, 2008(2): 96-99.
- [11] 吴仁锋, 汪志红. 番茄早疫病研究概述[J]. 中国植保导刊, 2009, 29(3): 16-18.
- [12] 王婧, 翟伟卜, 高环, 等. 链格孢引起的病害严重危害农作物生产并危及农产品安全[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 9-15.
- [13] 刘娟. 柑桔园链格孢菌的鉴定与防治[D]. 重庆: 西南大学, 2001.
- [14] HYON G S, IKEDA K, HOSOGI N, et al. Inhibitory effects of antioxidant reagent in reactive oxygen species generation and penetration of appressoria of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype [J]. Phytopathology, 2010, 100(9): 840-847.
- [15] VÉLÉZ H, GLROOK N J, DAUB M E, et al. Mannitol biosynthesis is required for plant pathogenicity by *Alternaria alternata* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 285(1): 122-129.
- [16] 苏玉斌. 金龟子绿僵菌致病力与发育的差异蛋白质组学研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [17] BHADARIA V, ZHAO Wensheng, WANG Lixia, et al. Advances in fungal proteomics[J]. Microbiological Research, 2007, 167: 193-200.
- [18] CARPENTIER S C, WITTERS E, LAUKENS K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis [J]. Proteomics, 2005, 5(10): 2497-2507.
- [19] 江珊, 周晓罡, 苏源, 等. 氮胁迫条件下稻瘟病菌菌丝体蛋白质组学研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2012, 33(4): 72-76.
- [20] FERNÁNDEZ-ACERO F J, JORGE I, CALVO E, et al. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* [J]. Proteomics, 2006, 6(S1): S88-S96.
- [21] GONZÁLEZ F R, ALORIA K, VALERO G J, et al. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains [J]. Journal of Proteomics, 2014, 97: 195.
- [22] 舒灿伟, 陈健仪, 赵美, 等. 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[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(5): 15-19.
- [23] 赵明治, 杨秀芬, 张明, 等. 一种促进植物根系生长的极细链格孢菌蛋白质分离、纯化和生物功能[J]. 中国生物防治, 2007(2): 170-173.
- [24] DAMERVAL C, DE VIENNE D, ZIVY M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins [J]. Electrophoresis, 2010, 7(1): 52-54.
- [25] 张小泉. 丙烷脒对灰葡萄孢作用的蛋白质组学初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [26] WANG Wei, VIGNANI R, SCALI M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27: 2782-2786.
- [27] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [28] 陈晶瑜, 郭宝峰, 何付丽, 等. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较[J]. 中国农学通报, 2010, 26(23): 97-100.
- [29] WU Fangsheng, WANG Mengyun. Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues [J]. Analytical Biochemistry, 1984, 139(1): 100-103.
- [30] 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.
- [31] CARPENTIER S C, WITTERS E, LAUKENS K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis [J]. Proteomics, 2005, 5: 2497-2507.
- [32] FERNÁNDEZ-ACERO F J, COLBY T, HARZEN A, et al. Proteomic analysis of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* during cellulose degradation [J]. Proteomics, 2009, 9(10): 2892-2902.
- [33] 冯浩, 王海英, 冯雅琼, 等. 苹果树腐烂病菌菌丝蛋白双向电泳体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(6): 155-162.
- [34] 刘原志, 章强强. iTRAQ 技术在真菌研究中的应用进展[J]. 中国真菌学杂志, 2015, 10(3): 185-189.
- [35] 谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 等. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(7): 616-621.

(责任编辑: 田 喆)