


## 双向电泳联用质谱技术研究松材线虫和拟松材线虫的蛋白差异

view metadata, citation and similar papers at [core.ac.uk](http://core.ac.uk)

brought to you by  COR

provided by Xiamen University Inst

罗茂春<sup>1</sup>, 刘颖<sup>2</sup>, 林静雯<sup>2</sup>, 王勤<sup>2</sup>, 潘沧桑<sup>2</sup>, 陈亮<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>龙岩学院生命科学学院, 福建龙岩 364012; <sup>2</sup>厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

**摘要:** 松材线虫是造成松树萎蔫病的病原, 对松林威胁很大。其近似种拟松材线虫与松材线虫在形态学上极其相似, 却不具致病性。所以, 松材线虫和拟松材线虫的快速检测至关重要。应用双向电泳联用质谱技术, 研究松材线虫和拟松材线虫的蛋白差异, 并对差异蛋白进行MALDI-TOF/MS分析以及数据库鉴定, 共鉴定了45个差异蛋白, 其中松材线虫22个、拟松材线虫23个。不仅为松材线虫和拟松材线虫的准确鉴定打下基础, 差异蛋白的进一步研究可望揭示松材线虫的致病机理。

**关键词:** 松材线虫; 拟松材线虫; 双向电泳; MALDI-TOF/MS

中图分类号: Q959

文献标志码: A

论文编号: 2013-0970

### Analysis of Differential Proteins Between *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* Using Two Dimensional Polyacrylamide Electrophoresis and Mass Spectrometry

Luo Maochun<sup>1</sup>, Liu Ying<sup>2</sup>, Lin Jingwen<sup>2</sup>, Wang Qin<sup>2</sup>, Pan Cangsang<sup>2</sup>, Chen Liang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Longyan University, Longyan Fujian 364012;

<sup>2</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen Fujian 361005)

**Abstract:** The plane-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus* is the causal agent of pine wilt disease, which is the most serious conifer disease in the world. However, it is difficult to differentiate isolates of *B. xylophilus* from the closely related species *B. mucronatus*, which is not pathogenic to pine trees. So it is very important to distinguish *B. mucronatus* from *B. xylophilus* rapidly. The author applied the two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to study the proteomics of the two nematodes, and had obtained 45 differentiate proteins, 22 of which were from *B. xylophilus* and others were from *B. mucronatus*. The results supplied new insights into the rapid identification of *B. xylophilus* the virulence of *B. xylophilus*.

**Key words:** *Bursaphelenchus xylophilus*; *B. mucronatus*; two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; MALDI-TOF/MS

## 0 引言

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)引起的松材线虫枯萎病是一种严重的林业病害。目前该病在日本、美国、韩国、加拿大、墨西哥、希腊、葡萄牙和中国均有分布。中国于1982年发现该病, 目前该病已扩展到江苏、浙江、安徽、广东、山东、湖北、香港和台湾等

地<sup>[1-3]</sup>。松材线虫是许多国家的检疫对象, 在中国属于二级检疫危害生物<sup>[4-5]</sup>。拟松材线虫(*B. mucronatus*)是松材线虫近似种, 但不具有致病性。拟松材线虫与松材线虫在形态上极其相似, 在检验检疫工作中单从形态学上难以区分, 而松材线虫属于高度危险的外来有害生物, 扩散性极强, 可对国内的广袤松林造成危害。

**基金项目:** 国家自然科学基金“‘检测管’诱引松材线虫的机理研究”(30470234)。

**第一作者简介:** 罗茂春, 男, 1961年出生, 福建武平人, 副教授, 本科, 主要从事遗传与细胞生物学教学及细胞结构研究。通信地址: 364012 福建省龙岩市东肖北路1号 龙岩学院生命科学学院, Tel: 0597-3109965, E-mail: lmc@lyun.edu.cn。

**通讯作者:** 陈亮, 男, 1963年出生, 河南博爱人, 教授, 博士, 研究方向: 细胞分子生物学。通信地址: 361005 福建省厦门市思明南路422号 厦门大学生命科学学院, Tel: 0592-2186050, E-mail: chenlg@xmu.edu.cn。

**收稿日期:** 2013-04-07, **修回日期:** 2013-07-23。

目前广泛应用的蛋白质组学技术以双向电泳技术和质谱分析技术为核心,可以把细胞或组织内的蛋白质进行最大限度的分离和分析鉴定<sup>[6-7]</sup>。本研究以松材线虫和拟松材线虫为材料,提取蛋白质双向凝胶电泳分离,软件比对差异蛋白质,质谱分析差异蛋白质。通过对差异蛋白质的分析,以期对松材线虫和拟松材线虫的准确鉴定打下基础;对差异蛋白的进一步研究可望揭示松材线虫的致病机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间、地点

研究试验于2009—2011年在厦门大学生命科学学院进行。

### 1.2 试验材料

本试验所用的松材线虫和拟松材线虫由本实验室保存。

### 1.3 试验方法

1.3.1 线虫培养 在PDA(20 g土豆,2 g葡萄糖,1.5 g琼脂粉,蒸馏水补足至100 mL)平板上移入灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*,本实验室保存)在26℃下培养4~5天,将松材线虫和拟松材线虫接到菌丝上进行培养。在26℃的培养箱中培养1周左右,用贝曼漏斗法分离收集线虫。用无菌水洗3次后,2000 r/min离心10 min,收集线虫,尽量去除多余水分,放在-80℃冰箱中保存备用。

1.3.2 蛋白质样品的制备 从-80℃冰箱中取出线虫,加入3倍体积裂解液。裂解液参考Gebhard等<sup>[8]</sup>的配方修改得到(8 mol/L尿素,4% Chaps,40 mmol/L Tris碱,65 mmol/L DTT,2%pH 3~9.5两性电解质,100 mg/L PMSF)。冰上研磨,放入4℃冰箱过夜保存,让蛋白质充分溶解。第2天取出4℃、12000 g离心10 min,收集上清,此步骤重复2次。采用Bradford法(考马斯亮蓝染色法)测定上清中的蛋白质浓度,分装,-20℃冰箱冷藏备用。

1.3.3 蛋白质双向电泳及双向电泳图谱分析 蛋白质双向电泳参见文献<sup>[9-11]</sup>,第一向等电聚焦电泳(IEF)时,上样量为80 μg。第二向SDS-PAGE电泳时,聚丙烯酰胺凝胶浓度为12.5%。采用银染染色。

采用Umax powerlookIII扫描仪进行扫描,构建蛋白质表达图谱;借助Melanie4软件对图谱进行分析,就蛋白质电泳图谱中的斑点进行检测,并进行匹配性分析,找出2种线虫的差异蛋白点。

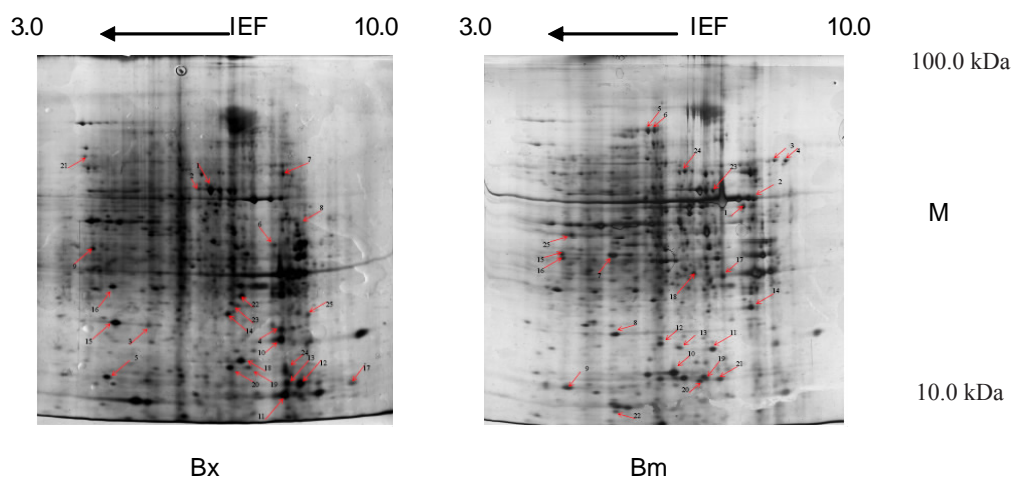
1.3.4 质谱分析 将凝胶上的蛋白质差异点切下,参照Fernandez等<sup>[12]</sup>和Gharahdaghi等<sup>[13]</sup>的方法稍作修改进行蛋白质胶内消化,萃取出肽段,用2 μL 0.5% TFA溶解肽段,取1 μL样品加入等体积基质HCCA饱和溶液,混合均匀,上样1 μL至ReFlexTM III MALDI-TOF质谱仪点样钢板。室温干燥后,进行质谱分析。在获得肽质量指纹图谱后进行标峰,并得到质谱分析数据。

1.3.5 生物信息学分析 将质谱分析所得数据通过MASCOT软件进行查询。查询条件:对表观*pI*值及分子量未做要求;肽片段分子量最大容许误差范围为100~500 mg/kg,蛋白种属选择秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*),固定修饰为碘乙酰胺处理,可变修饰为氧化还原,分别交换选择MSDB、NCBIInr和SwissPort数据库进行查询。

## 2 结果与分析

### 2.1 松材线虫和拟松材线虫蛋白质差异表达

对2种线虫的蛋白质样品按蛋白质双向电泳进行分离,得到蛋白质二维凝胶图谱,采用蛋白质图像分析软件Melanie4分析,每块胶上可以分离到1000多个蛋白点,这些蛋白点主要分布在等电点为3~10,分子量为10~100 kDa的范围内。通过2种线虫蛋白质凝胶进行比较,在Bx和Bm蛋白凝胶上分别选取25个蛋白差异点进行后续的质谱分析(图1)。



图中箭头指示差异蛋白点;IEF及箭头代表等电聚焦电泳及pH范围;Bx和Bm分别代表松材线虫和拟松材线虫,M代表分子量

图1 松材线虫和拟松材线虫的蛋白质的双向电泳图

2.2 差异表达蛋白质的MALDI-TOF质谱分析与鉴定

对 50 个差异蛋白点进行 MALDI-TOF/MS 分析, 获得了 45 个蛋白的肽质量指纹图谱(松材线虫 22 个, 拟松材线虫 23 个)。其余的 5 个蛋白点可能由于丰度太低, 或者由于样品制备过程中某些不可知因素没有检查到有效峰或峰值过底而未能得到肽质量指纹图

谱。

将所得的肽指纹图谱数据提交至 Mascot 网站, 选用 MSDB、NCBIInr 和 SwissPort 数据库进行比对, 得到差异蛋白的序列信息, 45 个蛋白点得到鉴定(表 1~2)。其中, BM 的 18、24 号蛋白点在蛋白数据库中找到的同源匹配蛋白具有显著性。

表 1 松材线虫各差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果

编号	数据库	登陆号	得分	分子量	等电点	鉴定的蛋白质名称
X1	NCBIInr	gij171987364	42/57	46178	7.56	蛋白酶体调节粒子, 类腺苷三磷酸酶家族成员
X2	NCBIInr	gij115535101	33/57	148728	8.24	P 糖蛋白家族成员(pgp-13)
X4	NCBIInr	gij171999815	33/57	19173	9.3	编号为 ZK822.2 的蛋白
X5	NCBIInr	gij32565604	25/57	16810	6.92	编号为 Y45F3A.4 的蛋白
X6	NCBIInr	gij17561376	34/57	33783	9.42	蛇根碱受体
X8	NCBIInr	gij50310753	56/79	18566	10.91	未命名蛋白
X9	NCBIInr	gij32564821	33/57	44303	4.87	编号为 K02E7.6 的蛋白
X10	swissport	YQ37_CAEEL	26/47	45338	9.63	推定的编号为 C09F5.7 的蛋白
X11	NCBIInr	gij171996126	27/57	6630	4.31	编号为 T24E12.12 的蛋白
X12	NCBIInr	gij32565178	30/57	17502	8.42	CalPoNin 家族成员蛋白
X13	NCBIInr	gij17557129	37/57	15383	7.88	编号为 ZK1098.7 的蛋白
X14	swissport	YKK0_CAEEL	28/47	16355	5.01	推定的编号为 C02F5.10 的蛋白
X15	NCBIInr	gij32566240	22/57	32216	8.71	核激素受体家族成员
X16	NCBIInr	gij171989924	32/57	49415	6.25	编号为 R151.2d 的蛋白
X17	NCBIInr	gij115533676	28/57	16795	9.69	编号为 F27C1.13 的蛋白
X18	NCBIInr	gij17556921	28/57	18881	8.03	编号为 ZK370.6 的蛋白
X19	NCBIInr	gij17541820	43/57	37917	5.67	编号为 R07H5.8 的蛋白
X20	NCBIInr	gij7509485	29/57	18394	4.22	推定的编号为 Y24F12A.d 的蛋白
X22	NCBIInr	gij17542954	24/57	18572	8.87	编号为 Y11D7A.5 的蛋白
X23	NCBIInr	gij17559716	22/57	17418	6.04	编号为 F15E11.1 的蛋白
X24	NCBIInr	gij17535083	22/57	20276	6.23	编号为 K12H6.5 的蛋白
X25	NCBIInr	gij17539930	38/57	41565	9.19	编号为 F20C5.4 的蛋白

表 2 拟松材线虫各差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果

编号	数据库	登陆号	得分	分子量	等电点	鉴定的蛋白质名称
M1	NCBIInr	gij17568993	54/57	48430	5.81	编号为 M03F4.6 的蛋白
M2	swissport	NEPL1_CAEEL	25/47	86890	5.68	中性溶酶-1
M3	swissport	YH20_CAEEL	36/47	117038	5.81	推定的解旋酶 W08D2.7
M4	NCBIInr	gij32564153	40/57	100073	9.21	含有 PAZ/PIWI 的家族成员
M5	swissport	KPC1_CAEEL	26/47	81899	7.69	类蛋白激酶 C1
M6	swissport	GALT3_CAEEL	33/47	69495	7.61	多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶
M8	NCBIInr	gij25375439	28/57	22752	6.24	编号为 F40H6.3 的蛋白
M9	NCBIInr	gij17534039	21/57	20661	4.41	编号为 F44G4.5 的蛋白
M10	NCBIInr	gij68228784	33/57	29213	5.15	类β-内酰胺酶
M11	NCBIInr	gij17570443	36/57	29809	5.45	编号为 Y62H9A.12 的蛋白
M12	NCBIInr	gij17505769	41/57	51836	7.57	编号为 C30F12.2 的蛋白

续表2

编号	数据库	登陆号	得分	分子量	等电点	鉴定的蛋白质名称
M13	NCBIInr	gi 17542052	44/57	14860	10.82	核仁核糖核蛋白家族成员
M14	swissport	ADH1_CAEEL	33/47	38185	6.07	醇脱氢酶
M15	swissport	NAS35_CAEEL	36/47	68981	7.84	锌金属蛋白酶 dpy-31 前体
M16	swissport	YQT3_CAEEL	40/47	42404	5.21	推定的编号为 F25B5.3 蛋白
M17	swissport	RAB3_CAEEL	40/47	25086	5.18	Ras 相关蛋白 Rab-3
M18	swissport	YOL6_CAEEL	48/47	18881	8.03	推定的编号为 ZK370.6 的蛋白
M19	swissport	YXEK_CAEEL	43/47	33539	8.36	推定的编号为 F53C11.3 的氧化还原酶
M20	NCBIInr	gi 17535055	40/57	23580	6.96	编号为 K10H10.4 的蛋白
M21	NCBIInr	gi 17558308	38/57	11567	9.86	编号为 C29F3.3 的蛋白
M22	NCBIInr	gi 17541320	34/57	17202	5.22	DNaJ 区域家族成员(dnj-15)
M23	NCBIInr	gi 17534677	40/57	36531	7.68	GTP(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)家族成员(gpd-1)
M24	NCBIInr	gi 86562513	59/57	11484	9.19	胰岛素相关家族成员(ins-5)

试验比对到的45个蛋白点中,有13种蛋白研究的较清楚。Bx有3种,分别为编号为X1的蛋白酶体调节粒子、编号为X6的蛇根碱受体、编号为X15的核激素受体家族成员。Bm有10种,分别为编号为M3的推定的解旋酶W08D2.7、编号为M5类蛋白激酶C-1、编号为M6的多肽N-乙酰半乳糖胺转移酶、编号为M13的核仁核糖核蛋白家族成员、编号为M14的醇脱氢酶、编号为M15的锌金属蛋白酶dpy-31前体、编号为M19推定的编号为F53C11.3的氧化还原酶、编号为M22的原核的热休克蛋白、编号为M23甘油醛-3-磷酸脱氢酶、编号为M24的胰岛素相关家族成员。

### 3 结论与讨论

笔者获得的松材线虫和拟松材线虫的双向电泳图谱上有1000多个蛋白点,对50个蛋白差异点(松材线虫和拟松材线虫各25个)进行MALDI-TOF/MS质谱分析以及软件比对,有45个蛋白得到了鉴定,其中松材线虫22个,拟松材线虫23个,拟松材线虫的18、24号蛋白点在蛋白数据库中找到的同源匹配蛋白具有显著性。由于松材线虫和拟松材线虫的遗传背景不清楚,因此比对结果可能准确性有偏差。在笔者比对到的45个蛋白点中,其中有13种蛋白较有意义。

根据质谱鉴定的结果,将所鉴定出的蛋白归纳为以下几个功能类群。

#### 3.1 代谢相关蛋白

鉴定出5个与代谢有关的蛋白,分别为编号为X1的蛋白酶体调节粒子(proteasome regulatory Particle),属于类ATP酶家族成员、编号为M6的多肽N-乙酰半乳糖胺转移酶(polypeptide N-acetylgalactosaminyltrans

ferase)、编号为M14的醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase 1)、编号为M19的推定的编号为F53C11.3的氧化还原酶(putative oxidoreductase F53C11.3)、编号为M23的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GPDGH)。

Bolla等<sup>[14]</sup>曾对不同致病型松材线虫的碳水化合物代谢进行研究,他们的结论是由于2类线虫的乙醇脱氢酶的基因不同,非致病型松材线虫的碳水化合物代谢是经无氧循环道路产生乙醇,而致病型松材线虫的碳水化合物的代谢是由葡萄糖产生琥珀酸乳酸盐,并且通过甘油的产生保持氧化还原平衡,不产生乙醇。

鉴定出的4个Bm代谢相关蛋白中,编号为M14的醇脱氢酶可能参与了无氧循环道路的碳水化合物代谢。编号为X1的Bx代谢相关蛋白即蛋白酶体调节粒子参与了呼吸链电子传递,因此不可能是无氧循环道路中的一些酶。进一步证实了2种的代谢途径存在差异。

#### 3.2 信号识别蛋白

共鉴定出3个信号识别蛋白,分别是编号为X6的蛇根碱受体(serpentine receptor)、编号为X15的核激素受体家族成员(nuclear hormone receptor family member)、编号为M5的类蛋白激酶C-1(protein kinase C-like 1)。在这3种蛋白中研究最多的是蛋白激酶C。

类蛋白激酶C1属于Ser/Thr蛋白激酶家族,PKC亚家族,可以充当佛波醇酯的受体,能够促使肿瘤的发生。蛋白激酶C是G蛋白偶联受体系统中的效应物,同蛋白激酶A一样,蛋白激酶C属于多功能丝氨酸和苏氨酸激酶。蛋白激酶C能激活细胞质中的靶酶参与

生化反应的调控,同时也能作用于细胞核中的转录因子,参与基因表达的调控,不过所调控的基因多与细胞的生长和分化相关。

鉴定出这3种信号识别蛋白为差异蛋白,说明2种线虫中存在着不同的配体-受体类型,并且存在着不同的识别系统。

### 3.3 信号传递蛋白

鉴定出的编号为M24的胰岛素相关家族成员(INSulin related family member)是信号传递蛋白。此蛋白是胰岛素/胰岛素信号通道相关的一种蛋白质,以往研究证实编码胰岛素/胰岛素样生长因子信号通道中一种元件的*daf-2*基因发生突变后可延长秀丽小杆线虫的寿命<sup>[15-16]</sup>。在拟松材线虫中出现差异蛋白*ins-5*,可能是因为松材线虫和拟松材线虫的胰岛素/胰岛素信号通道存在差别。笔者鉴定出此蛋白为差异蛋白,表明2种线虫在受到应激条件下有不同的应激反应。

### 3.4 蛋白质合成相关蛋白

鉴定出一个与蛋白质合成有关的蛋白,编号为M22的原核的热休克蛋白(prokaryotic heat shock protein)。它是一组分子量不等的酸性蛋白(pH 5.0~6.5),广泛存在于原核和真核细胞中,在同一物种不同组织内均有表达,具有高度保守地氨基酸序列。在应激状态下,热休克蛋白在细胞内合成显著增加,主要作为分子伴侣参与蛋白质合成、折叠、积聚、装配、运输和降解,维持细胞蛋白稳定,防止蛋白变性。

有3个蛋白功能不属于以上几类。编号为M3的推定的解旋酶W08D2.7(putative helicase W08D2.7)是一种与共抑制(RNAi)有关的一种酶。编号为M13的核仁核糖核蛋白家族成员(small nuclear ribonucleoprotein family member)是一个与基因表达调控有关的蛋白。编号为M15的锌金属蛋白酶*dpy-31*前体(zinc metalloproteinase *dpy-31* precursor)是与表皮胶原质成熟相关的一种蛋白质。它们在线虫中的具体作用还有待于进一步研究。还有一些只知编号的蛋白,其功能未能得到确认。

综上所述,松材线虫和拟松材线虫这些功能蛋白的鉴定,说明2种线虫的碳水化合物的代谢途径和信号转导途径可能存在差异。这些差异可能与拟松材线虫不具致病性而松材线虫具致病性有关。

笔者运用双向电泳联用质谱技术的研究,为松材线虫的蛋白组学水平上的准确鉴定打下了基础,更重要的是为揭示松材线虫的致病机理以及寻找与致病机理相关的差异蛋白质和基因提供了参考。

### 参考文献

- [1] 秦复牛,潘沧桑.松材线虫病研究进展(综述)[J].安徽农业大学学报,2003,30(4):370-376.
- [2] 潘沧桑.松材线虫病研究进展(综述)[J].厦门大学大学学报:自然科学版,2011,50(2):476-483.
- [3] 何善勇,温俊宝,骆有庆,等.气候变暖情境下松材线虫在我国的适生区范围[J].应用昆虫学报,2012,49(1):236-243.
- [4] 贺水山,闻伟刚,杨兰英,等.松材线虫PCR快速检测方法研究[J].植物检疫,2002,16(6):321-324.
- [5] 刘源岗,龙瑞敏.松材线虫的快速检测[J].安徽农业科学,2007,35(28):8926-8928.
- [6] 范怀忠,伍尚忠,广东省.珠江三角洲水稻细菌性条斑(白叶枯)研究简报[J].植病知识,1957,1(1):6-8.
- [7] Fountoulakis M, Schuller E, Hardmeier R, et al. Rat brain proteins: two-dimensional protein database and variations in the express level [J]. Electrophoresis,1999,20:3572-3579.
- [8] Gebhard G, Hans-JoÈrg Banaj, Hans H, et al. Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans* Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis[J].Eur J Biochem,1999,264:872-879.
- [9] 黄青云,林涛,陈芳育,等.双向电泳联用质谱技术研究水稻明恢63对细菌性条斑病病侵染的应答[J].厦门大学学报,2006,45(5):86-90.
- [10] 张志刚,邱德文,官春云,等.双向电泳联用质谱技术研究棉苗对链格孢菌蛋白激发子诱导的应答[J].棉花学报,2008,20(6):425-430.
- [11] 韩吉春,崔海峰,时鹏涛,等.棉花叶片双向电泳体系的研究[J].棉花学报,2012,24(1):27-34.
- [12] Fernandez J, Gharahdaghi F, Mische S M. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) [J]. Electrophoresis, 1998,19(6):1036-1045.
- [13] Gharahdaghi F, Weinberg C R, Meagher D A, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J]. Electrophoresis,1999,20:601-605.
- [14] Bolla R I, Frtzsimmons K, Winter R E. Carbaohydrate concentration in pine as affected by inoculation with *Bursaphelenchus xylophilus*[J].Journal of Nematology,1987,19(1):51-57.
- [15] Sarah B. P, Michael C, Robert W, et al. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family[J]. Spectrometry (MALDI-TOF-MASS) Electrophoresis,1998,19:1036-1045.
- [16] Evans E A, Chen W C, Tan M W. The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in *C-elegans* [J]. Aging Cell,2008,7(6):879-893.