

网络出版时间:2017-05-10 13:38

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2017.06.021

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170510.1338.042.html>

苹果树腐烂病菌菌丝蛋白双向电泳体系的建立

冯 浩,王海英,冯雅琼,高小宁,韩青梅,黄丽丽

(西北农林科技大学 植物保护学院,旱区作物逆境生物学国家重点实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】建立苹果树腐烂病菌菌丝蛋白双向电泳体系,鉴定不同致病力材料的差异表达蛋白,为从蛋白质组学角度揭示苹果树腐烂病菌致病机理奠定基础。【方法】以苹果树腐烂病菌野生型 03-8 菌丝为材料,从蛋白提取方法、IPG 胶条长度及胶条的 pH 范围 3 个方面对双向电泳体系进行优化,并利用该优化体系对苹果树腐烂病菌野生型 03-8 和致病力丧失突变体 X900 的菌丝蛋白进行双向电泳分析和比较,对二者的差异表达蛋白进行鉴定和分析。【结果】采用 TCA/丙酮法-SDS/酚蛋白抽提法及 17 cm pH 4.0~7.0 IPG 胶条,对苹果树腐烂病菌菌丝蛋白进行双向电泳可以得到理想的蛋白图谱。利用该体系对苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 及其致病力丧失突变体菌株 X900 的菌丝总蛋白进行双向电泳分析发现,2 个菌株共存在 27 个差异表达蛋白点,其中有 15 个显著差异表达蛋白点;质谱分析结果表明,突变体 X900 中缺失的 2 个蛋白点 4633 和 8518 分别为丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和假想蛋白,其他 13 个显著差异表达蛋白点分别为 1 个微管蛋白、1 个线粒体内膜转移酶亚基、1 个丙酮酸脱羧氧化酶、1 个腺苷高半胱氨酸激酶、2 个压力诱导的磷蛋白、1 个己糖磷酸肌醇激酶、1 个热激蛋白和 5 个假想蛋白。GO 分析表明,该差异蛋白主要参与能量代谢、胁迫应答、细胞结构组成和未知功能。【结论】建立了适合苹果树腐烂病菌菌丝蛋白的双向电泳体系,并通过该体系分析获得了不同致病力材料的一系列差异表达蛋白。

[关键词] 蛋白提取;双向电泳;蛋白质组;质谱鉴定;苹果树腐烂病菌

[中图分类号] S436.611.1⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)06-0155-08

Development of two dimensional electrophoresis for hyphal proteins of *Valsa mali*

FENG Hao, WANG Haiying, FENG Yaqiong, GAO Xiaoning, HAN Qingmei, HUANG Lili

(College of Plant Protection, State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The research established a 2-DE gel electrophoresis system for identification of differentially expressed proteins from different virulent strains to provide theoretical basis for studying-pathogenesis from proteome level. 【Method】The protein extraction method, IPG strip type for 2-DE gel electrophoresis, and pH of mycelia protein were optimized. Then the differences in intracellular proteins between wild strain 03-8 and a no pathogenicity mutant X900 were analyzed under the optimized conditions and identified by mass spectrometry. 【Result】The TCA/acetone-SDS phenol method for mycelia protein extraction with 17 cm IPG strip at pH of 4.0—7.0 were suitable for 2-DE gel electrophoresis to obtain ideal protein profile. With the second conditions, the intracellular proteins of wild strain 03-8 and mutant X900 were analyzed, and 27 proteins were differentially expressed, among which 15 showed significant difference in ex-

[收稿日期] 2016-04-01

[基金项目] 教育部高校博士点基金项目(20120204110002);公益性行业(农业)科研专项(201203034)

[作者简介] 冯 浩(1985—),男,河北秦皇岛人,讲师,博士,主要从事苹果树腐烂病菌致病机理研究。

E-mail: xiaosong04005@163.com

[通信作者] 黄丽丽(1961—),女,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事园艺、园林植物病害综合防治研究。

E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

pression. Mass spectrometry showed that the protein points 4633 and 8518 lost in mutant X900 were serine threonine protein kinase and hypothetical protein. The other 13 proteins included one tubulin β , one mitochondrial membrane transferase subunit, one pyruvate decarboxylase, one adenosylhomocysteinase, 2 stress-induced-phosphor proteins, one inositol hexakisphosphate kinase, one heat shock protein, and 5 hypothetical proteins. GO analysis showed that the proteins mainly involved in energy metabolism, stress responses, cell structure and unknown functions. 【Conclusion】 A suitable 2-DE gel electrophoresis system was established for mycelia protein of *Valsa mali* and a series of different proteins were determined from different virulent strains.

Key words: protein extraction; 2-DE; proteome; LC-MS/MS mass spectrometry; apple tree valsa canker

由黑腐皮壳属真菌(*Valsa mali* Miyabe et Yamada)引起的苹果树腐烂病(Valsa canker)是苹果生产中的重大病害^[1],全面解析病菌的分子致病机理对该病害的有效防控策略的制定具有重要意义。近年来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。Yin 等^[2]对该病菌的全基因组信息进行了挖掘,发现病菌果胶酶、次生代谢物合成、氮转运相关蛋白和酸性外泌蛋白酶等相关基因的扩增和表达,可能是苹果树腐烂病菌适应性侵染树皮的主要决定因子。Ke 等^[3]对苹果树腐烂病菌侵染寄主组织的样品进行了转录组分析,发现在侵染过程中,病菌会诱导大量基因差异性表达。此外, Li 等^[4]首次证实了该病菌存在效应蛋白并可作为毒性致病因子。然而,从蛋白水平揭示苹果树腐烂病菌致病分子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遗传发育和抗逆反应等诸多生物学领域^[5-9]。随着蛋白质组技术功能的不断开发,该技术在植物病原菌致病机理研究中也得到了广泛的应用。Xu 等^[10]研究发现,不同致病力的禾谷镰刀菌菌丝蛋白质组存在差异,并且差异蛋白与菌株致病力变异有关。在分析马铃薯晚疫病菌的发酵液蛋白质组时发现,利用质谱鉴定的 9 个病菌外泌蛋白与推测的具有致病功能的质谱数据一致^[11]。利用蛋白质组学结合基因组信息研究发现,引起小麦赤霉病的禾谷镰刀菌小种致病力与小种分泌胞外降解酶的能力呈正相关^[12]。此外,蛋白质组技术还应用于病菌检测、病菌生理机能等方面研究^[13-14]。

双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)作为蛋白质组学的主要技术手段,能够高灵敏度分析不同条件下生物体总蛋白的表达差异,从而分离鉴定差异蛋白的种类。然而双向电泳图谱的结果容易受到各种因素的影响,而电泳图谱的好坏直接影响软件分析结果的精确度,进而影响质谱鉴定

的准确性,因此建立高分辨率的双向电泳条件是成功开展蛋白质组学分析的基础。本试验建立了适合苹果树腐烂病菌菌丝总蛋白的双向电泳体系,并对该病菌野生型 03-8 及其致病力丧失突变体 X900 的差异蛋白进行鉴定分析,以期苹果树腐烂病菌的蛋白质组学研究提供技术支撑,进而为全面揭示该病菌的致病分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8,由西北农林科技大学植物保护学院果树病害综合治理实验室采集并保存;突变体菌株 X900 也由该实验室通过农杆菌介导的遗传转化体系获得, -80 ℃甘油保存。蛋白质组学研究所用试剂均购自 MP 公司,其他试剂均为国产分析纯。培养基为质量分数 0.5% 可溶性淀粉 MS 培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养与发酵 将苹果树腐烂病菌野生型 03-8 及突变体 X900 分别接种于 PDA 平板培养基上。25 ℃活化培养 3 d 后,在菌落边缘的幼嫩菌丝打菌饼(直径为 6 mm),接种于质量分数 0.5% 可溶性淀粉 MS 培养基中(每 200 mL 培养基 8 个菌饼),25 ℃静置培养 10 d。期间每天在固定时间人工摇动 2 次,最后用定性滤纸(滞留粒径为 11 μ m)过滤分离菌丝。

1.2.2 菌丝体蛋白质提取 分别采用 TCA/丙酮法^[15]和 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法^[16]提取菌丝蛋白。

TCA/丙酮法:取 1 g 菌株 03-8 干燥的菌丝,液氮研磨后转入 50 mL 离心管,加入预冷的质量分数 10% TCA 丙酮溶液(含体积分数 0.07% 巯基乙醇),充分混匀, -20 ℃过夜,12 000 r/min 离心 5 min 后去上清,加入含体积分数 0.07% 巯基乙醇的

丙酮洗涤沉淀, -20℃静置1 h, 重复洗涤、离心过程至沉淀无色, 将沉淀冷冻干燥至粉末。

TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法:取1 g 菌株 03-8 干燥的菌丝, 液氮研磨后加入10 mL 预冷的质量分数10% TCA 丙酮溶液(含质量分数0.2% DTT), 涡旋混匀, -20℃沉淀过夜; 4℃、12 000 r/min 离心15 min, 用100 mmol/L 醋酸铵、体积分数80% 甲醇溶液、体积分数80% 丙酮溶液各洗涤1次, 加入10 mL SDS/酚(水饱和酚与 SDS 缓冲液1:1 混合) 抽提液, 振荡混匀, 冰置5 min, 4℃、12 000 r/min 离心15 min, 将上层酚相转移至5 倍体积预冷的100 mmol/L 醋酸铵甲醇溶液中, 沉淀置于-20℃下4 h; 4℃、12 000 r/min 离心15 min, 沉淀用预冷甲醇、体积分数80% 丙酮各洗1次, 冷冻干燥至粉末。

1.2.3 蛋白质量浓度测定 利用考马斯亮蓝法^[17]进行蛋白质量浓度的测定。分别将0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ L mg/mL 牛血清白蛋白加入到试管中, 用PBS 补足到150 μ L, 各3个重复。将适当体积的待测蛋白样品加入到试管中, 并用PBS 补足到150 μ L, 向试管中加入2.85 mL 的考马斯亮蓝染液, 充分混匀, 静置5~10 min, 以不含牛血清白蛋白标准液的吸光值作为“0”对照, 波长调至595 nm, 根据所测吸光值制作标准曲线, 计算蛋白质量浓度及不同提取方法获得的菌丝蛋白量。

1.2.4 不同方法提取菌丝蛋白的双向电泳检测 将2种方法提取的苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 的菌丝蛋白进行双向电泳分析, 等电聚焦利用 IPG 固体胶条, 蛋白上样量400 μ g, 用水化上样缓冲液定容至300 μ L, 加少许溴酚蓝作为指示剂。将聚焦好的 IPG 胶条用平衡液平衡后置于12% 聚丙烯酰胺凝胶上方进行 SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 电泳参数为先每板胶5 mA 运行1 h, 再改为每板胶25 mA 运行至结束。SDS-PAGE 电泳结束后凝胶固定30 min, 双蒸水洗3次, 考马斯亮蓝染色4 h^[17]。用 UMAX Power Look 2100xl 扫描凝胶, PDQuest 8.0 进行图片处理和分析。

1.2.5 不同 IPG 胶条长度对菌丝蛋白双向电泳的影响 将 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法提取的苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 的菌丝蛋白, 分别用7和17 cm IPG 胶条进行双向电泳检测。具体步骤同1.2.4节。

1.2.6 不同 pH 值 IPG 胶条对菌丝蛋白双向电泳

的影响 将 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法提取的苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 的菌丝蛋白分别用17 cm pH 3.0~10.0 和 pH 4.0~7.0 2种 pH 梯度 IPG 胶条进行双向电泳分析, 具体步骤同1.2.4节。

1.2.7 双向电泳图谱分析 分别将苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 和突变体 X900 的双向电泳图谱上传到 PDQuest 8.0 软件上, 标记图谱上的 Marker 大小及 pH 范围, 并将图谱上的蛋白点进行一一匹配, 根据蛋白点的灰度比值、匹配程度等参数自动确定显著差异表达蛋白点。

1.2.8 蛋白胶点酶解及质谱分析 将显著差异表达蛋白胶点从双向电泳凝胶上取下, 用胰蛋白酶溶液酶解, 样品冻干。将样品溶解点至对应靶位上, 用串联飞行时间质谱仪(4800 Plus MALDI-TOF-TOF Analyzer)进行测试分析^[18]。一级质谱(MS)扫描范围为800~4 000 u, 选择信噪比大于50的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析, 每个样品点上选择8个母离子, 二级质谱(MS/MS)累计叠加2 500次, 碰撞能量2 kV, CID 关闭。

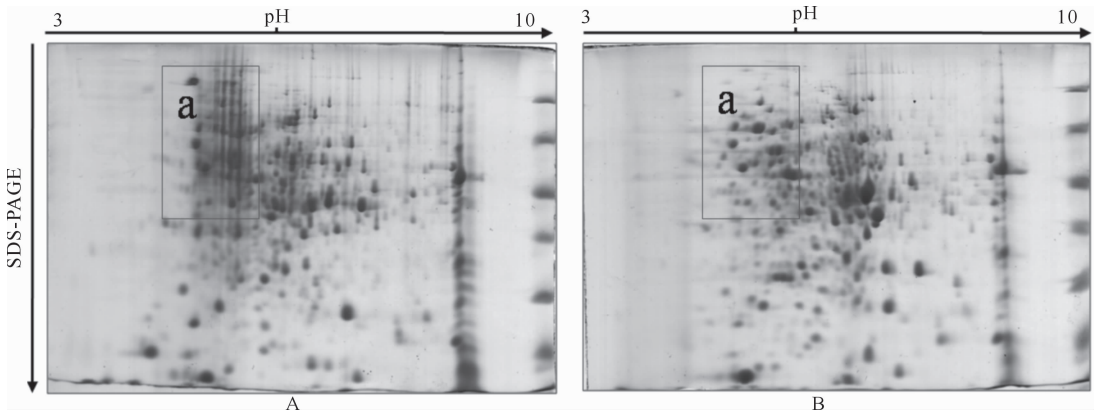
1.3 数据库检索

质谱测试用 Mascot 2.2 软件检索稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)和粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的数据库, 根据搜索结果适当放大至子囊菌门甚至是真菌数据库进行搜索。

2 结果与分析

2.1 2种方法提取苹果树腐烂病菌菌丝蛋白蛋白质的双向电泳检测

采用 TCA/丙酮法、TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法, 分别提取苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 菌丝蛋白, 除蛋白提取方法不同外, 其他试验条件完全一致, 试验结果如图1所示。从图1的a区域可以看出, 2种菌丝蛋白提取方法效果差异十分明显, 采用 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法提取的菌体蛋白双向电泳图谱的蛋白质分辨率明显优于 TCA/丙酮法的蛋白样品图谱。从双向电泳图谱上可分辨点的数目看, TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法得到的图谱可识别960个点, 电泳图谱背景较干净, 蛋白点独立清晰, 几乎没有纵纹现象, 说明蛋白样品杂质较少, 而 TCA/丙酮法提取的蛋白样品只有842个蛋白点, 且图谱纵纹较多(图1-A), 分辨率较低, 部分蛋白点重叠。因此, 后续的苹果树腐烂病菌菌丝蛋白提取均采用 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法。



A. TCA/丙酮法;B. TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法
A. TCA/acetone precipitation;B. TCA/acetone precipitation-phenol/SDS extraction

图 1 不同方法提取 03-8 菌丝蛋白的 2-DE 电泳图谱

Fig. 1 2-DE patterns of 03-8 mycelial protein by two different extraction methods

2.2 IPG 胶条长度对苹果树腐烂病菌菌丝蛋白双向电泳的影响

本试验对用 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法提取的苹果树腐烂病菌 03-8 的菌丝蛋白分别采用 7 和 17 cm pH 3.0~10.0 IPG 胶条进行 IEF 等点聚焦,严格控制其他试验条件不变,结果如图 2 所示。由

图 2 可见,与 7 cm IPG 胶条的电泳图谱相比,17 cm IPG 胶条的电泳图谱中蛋白点比较分散、独立、分辨率较高,便于 PDQuest 8.0 软件分析,但蛋白点仍集中在小范围等电点区域,故后续试验可用 17 cm IPG 胶条,但对胶条的 pH 范围应进行进一步缩小。

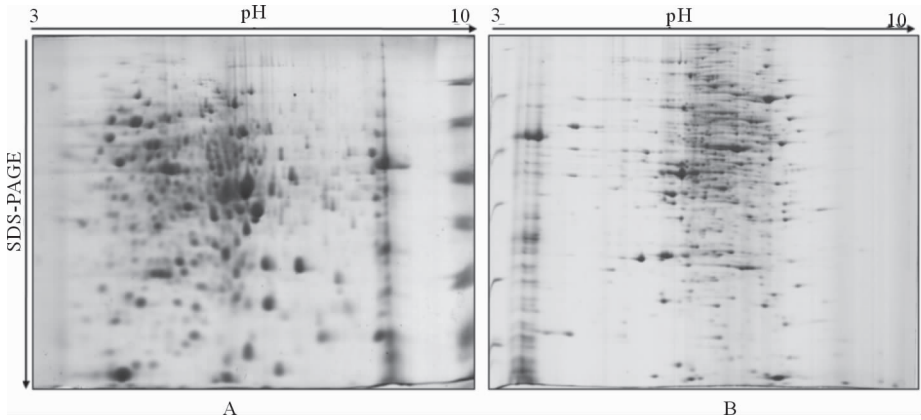


图 2 7 cm (A)和 17 cm (B)胶条分离苹果树腐烂病菌菌丝蛋白质的 2-DE 图谱

Fig. 2 2-DE patterns of total proteins extracted from *Valsa mali* using 7 cm and 17 cm IPG strips

2.3 pH 对苹果树腐烂病菌菌丝蛋白双向电泳的影响

本试验对用 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法提取的苹果树腐烂病菌 03-8 的菌丝蛋白分别采用 17 cm pH 3.0~10.0 和 pH 4.0~7.0 2 种 pH 梯度 IPG 胶条进行分离,结果如图 3 所示。

用 PDQuest 8.0 软件分析,17 cm pH 3.0~10.0 IPG 胶条共检测到 660 个点,部分点存在重叠现象,本试验中苹果树腐烂病菌菌丝蛋白绝大多数位于 pH 4.5~7.5,仅有很少蛋白点位于 pH 7.5~10.0(图 3)。经过 3 次生物学重复试验发现,采用 17 cm pH 4.0~7.0 IPG 胶条共检测到 1 065~

1 092 个点,蛋白点清晰独立,得到较好的分离效果,基本没有蛋白点重叠现象,与 pH 3.0~10.0 IPG 胶条相比横纹较少,可见使用 17 cm pH 4.0~7.0 IPG 胶条等电聚焦效果明显好于 17 cm pH 3.0~10.0 IPG 胶条,蛋白样品得到了理想的分离效果,便于后续图谱的软件分析,故后续研究采用 17 cm pH 4.0~7.0 的 IPG 胶条。

2.4 苹果树腐烂病菌野生型及突变体菌丝蛋白质的双向电泳图谱比较

基于建立的双向电泳体系,利用 17 cm pH 4.0~7.0 线性 IPG 胶条进行蛋白质的分离分析,通过严格一致的程序操作,得到重复性好的蛋白质图

谱,且蛋白点独立无重叠。采用 PDQuest 8.0 软件分析,在分子质量 14.4~116.0 ku、pH 4.0~7.0 条件下,野生型 03-8 和突变体 X900 的 2-DE 图谱上分别检测到 1 133~1 401 和 1 293~1 457 个蛋白

点,二者存在 27 个差异表达蛋白点,其中有 15 个为显著差异表达蛋白点,而且有 2 个蛋白点(4633、8518)仅在野生型 03-8 中出现,在突变体 X900 缺失(图 4)。

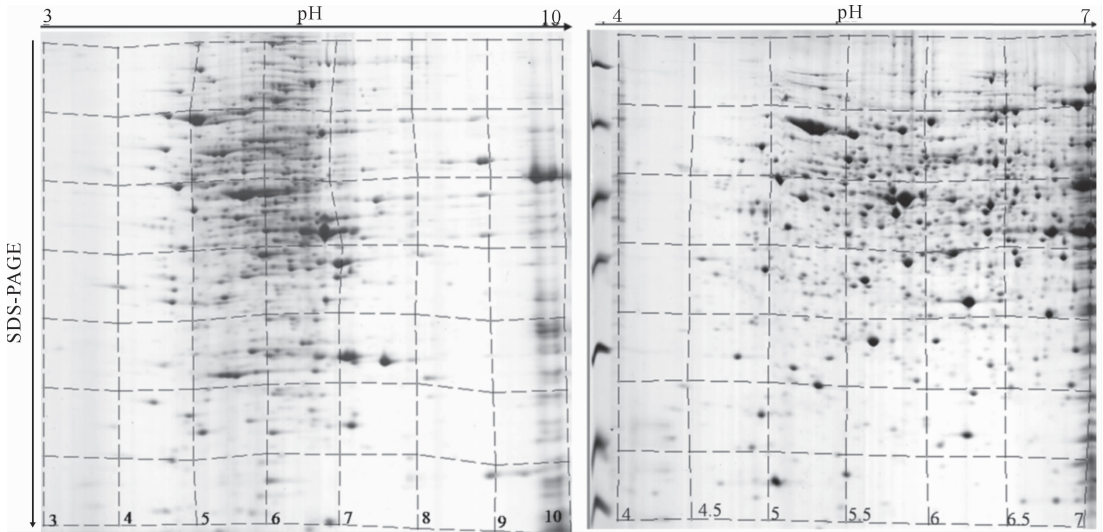
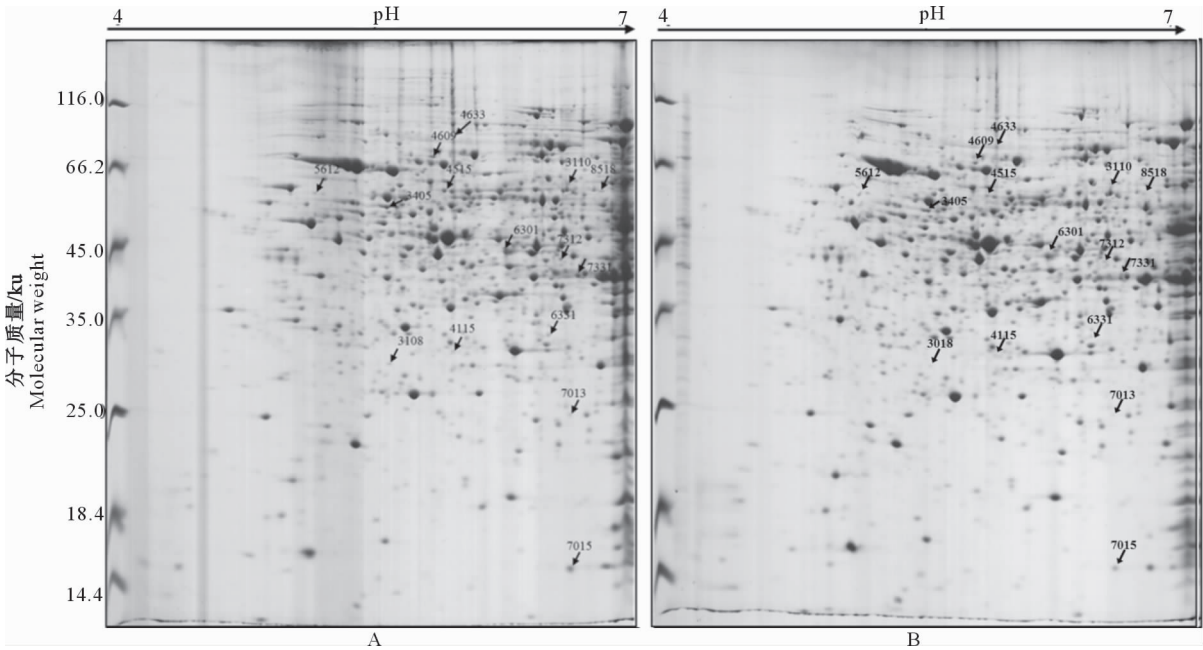


图 3 不同 pH 范围胶条对苹果树腐烂病菌菌丝蛋白双向电泳的影响
Fig. 3 Effects of pH on 2-DE patterns of total proteins extracted from *Valsa mali*



箭头标示两个样品间显著差异表达的蛋白点;A. 野生型 03-8;B. 突变体 X900
The arrows indicate differentially expressed proteins between two samples;A. Wild type 03-8;B. Mutant X900

图 4 苹果树腐烂病菌野生菌株 03-8 和突变体 X900 双向电泳蛋白表达谱的比较
Fig. 4 2-DE patterns of total proteins extracted from *Valsa mali* 03-8 and X900

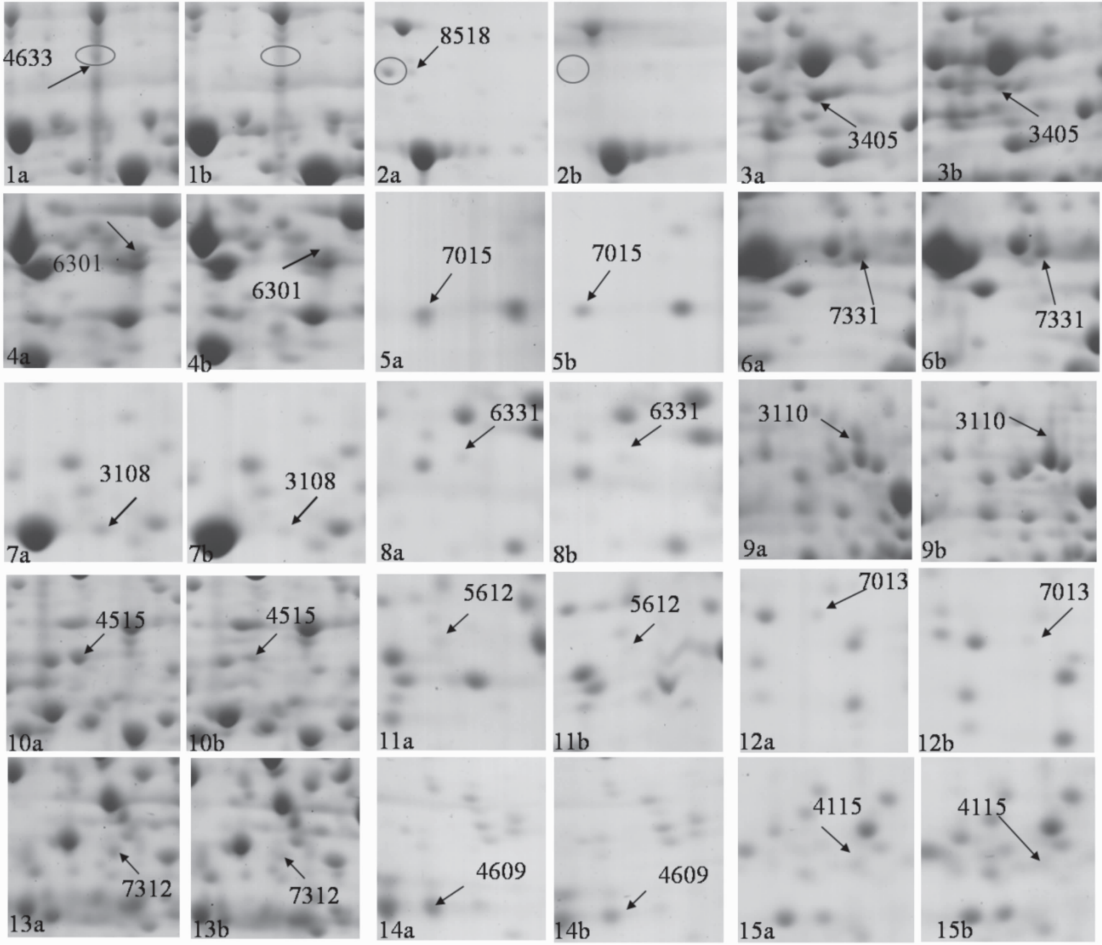
2.5 苹果树腐烂病菌野生型与突变体差异表达蛋白的质谱分析

采用基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF)技术,对 15 个显著差异表达蛋白点(图 5)进行质谱鉴定分析,获得肽质量指纹图谱,用

Mascot 2.2 软件搜索 NCBI 和 uniprot 数据库鉴定蛋白点,结果见表 1。由表 1 可知,突变体 X900 中缺失的 2 个蛋白点 4633 和 8518 经鉴定分别为丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和假想蛋白,其他 13 个显著差异表达蛋白点经鉴定分别为 1 个微管蛋白、1 个线

粒体内膜转移酶亚基、1 个丙酮酸脱羧氧化酶、1 个腺苷高半胱氨酸激酶、2 个压力诱导的磷蛋白、1 个己糖磷酸肌醇激酶、5 个假想蛋白和 1 个热激蛋白。

依据 GO 分类标准及相关文献信息查询,将 15 个显著差异蛋白分为 4 个功能类群:能量代谢、胁迫应答、细胞结构组成和未知功能。



a. 野生型 03-8;b. 突变体 X900;箭头所指为不同材料的显著差异表达蛋白点;1a 与 1b 处于两块胶的相同位置,其他同 1a 和 1b
a. Wild type 03-8;b. Mutant X900;The arrows indicates differentially expressed proteins between different strains;
1a and 1b are the same areas on two gels,others are same to 1a and 1b

图 5 苹果树腐烂病菌野生型 03-8 与突变体 X900 间的 15 个显著差异表达蛋白点
Fig. 5 15 differentially expressed protein spots between wild type 03-8 and mutant X900 of *Valsa mali*

表 1 苹果树腐烂病菌野生型 03-8 与突变体 X900 菌丝显著差异表达蛋白点的基本信息

蛋白点 Protein point	分子质量/ku Molecular weight	等电点 PI	覆盖率/% Coverage rate	GenBank 登录号 Accession number	蛋白名称 Name of protein	来源物种 Original species
4633	45.36	9.27	27.00	gi 413954705	丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine-protein kinase	玉蜀黍 <i>Zea mays</i>
8518	23.28	5.06	21.39	gi 351638435	假想蛋白 Hypothetical protein	稻瘟菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>
3108	50.66	5.05	80.00	TIM8_DEBHA	线粒体内膜转移酶亚基 Mitochondrial membrane transferase subunits	德巴利氏酵母菌 <i>Debaryomyces hansenii</i>
3405	21.89	6.66	24.00	TBA2_NEUCR	微管蛋白 Tubulin β	粗糙脉孢菌 <i>Neurospora crassa</i>
7331	13.03	8.77	14.00	VIPI1_YEAST	己糖磷酸肌醇激酶 Inositol hexakisphosphate kinase	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

表 1(续) Continued table 1

蛋白点 Protein point	分子质量/ku Molecular weight	等电点 PI	覆盖率/% Coverage rate	GenBank 登录号 Accession number	蛋白名称 Name of protein	来源物种 Original species
6301	10.27	6.54	14.00	SAHH_CANAL	腺苷高半胱氨酸激酶 Adenosylhomocysteinase	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>
6331	64.53	5.24	13.47	gi 440484683	压力诱导的磷酸蛋白 Stress-induced-phospho protein	稻瘟菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>
5612	65.03	5.33	32.02	gi 351646352	压力诱导的磷酸蛋白 Stress-induced-phospho protein	稻瘟菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>
4515	62.97	6.05	10.18	gi 350287735	丙酮酸脱羧氧化酶 Pyruvate decarboxylase	粗糙脉孢菌 <i>Neurospora tetrasperma</i>
4115	20.13	10.40	50.80	gi 340915073	假想蛋白 Hypothetical protein	嗜热毛壳菌 <i>Chaetomium thermophilum</i>
4609	72.54	6.09	31.09	gi 440478194	热激蛋白 Heat shock protein	稻瘟菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>
7015	49.66	5.36	25.00	gi 492558337	假想蛋白 Hypothetical protein	枯草芽孢杆菌 <i>Brevibacterium mcbrellneri</i>
7312	13.05	9.40	21.71	gi 88182813	假想蛋白 Hypothetical protein	球毛壳菌 <i>Chaetomium globosum</i>
3110	13.73	10.59	16.26	gi 340959584	假想蛋白 Hypothetical protein	嗜热毛壳菌 <i>Chaetomium thermophilum</i>
7013	11.41	6.65	26.18	gi 28919603	假想蛋白 Hypothetical protein	粗糙脉孢菌 <i>Neurospora crassa</i>

3 讨 论

目前,从蛋白水平揭示苹果树腐烂病菌致病机理的报道尚少,而蛋白质作为生物体行使功能的最终端,对生物体不同生物学功能的发挥具有关键作用。为此,开展蛋白水平研究有利于直接揭示生物体生命活动的本质。

双向电泳技术已经成功应用于研究植物、动物及微生物的蛋白质组学分析^[18-20]。然而由于研究对象总蛋白成分差异很大,即使是同一物种,其不同发育阶段、不同组织都可能存在很大差异,因此套用模式程序可能得不到理想的试验结果。同时,双向电泳技术对蛋白样品要求很高,较多的盐离子和杂质会干扰第一项等点聚焦,并且产生条纹,甚至会导致等电聚焦过程无法顺利完成,加之该技术影响因素较多,如样品的制备方法和 IPG 胶条类型都会影响双向电泳的最终结果,所以对每种样品都要通过严格的试验来确定。为此,对于不同条件下的试验材料,应建立一套专属的双向电泳技术体系。Wang 等^[16]发现,TCA 丙酮法与酚抽提法结合后用于提取蛋白能够融合 TCA 丙酮沉淀法和酚抽提法的优点。本试验结果表明,酚-SDS 抽提法结合 TCA/丙酮法联合提取比单独使用 TCA/丙酮法提取效果更好。另外,不同长度 IPG 胶条有不同的 pH 适应范围,本试验中苹果树腐烂病菌菌丝蛋白主要分布在 pH 4.0~7.0,使用该胶条仅减少了约 5% 的位于 pH 7.0~10.0 蛋白质可识别点,但能使 pH 4.0~

7.0 的菌丝蛋白有较好的分辨率。该体系的建立为从蛋白水平解析苹果树腐烂病菌的致病分子机理提供了技术保障。

在之前的研究中,研究人员已经完成了苹果树腐烂病菌的全基因组测序工作,发现基因组中水解酶类、次生代谢物合成和酸性外泌蛋白酶等相关基因的扩增可能是病菌适应性侵染树皮的主要决定因子^[2]。此外,病菌与苹果互作样品转录组测序工作的完成为挖掘病菌致病相关基因提供了重要依据^[3]。基于转录组信息,证实水解酶基因在病菌致病过程中发挥重要作用^[21]。此外,Li 等^[4]首次发现报道了苹果树腐烂病菌存在效应蛋白,并证明其为病菌毒性因子。然而,从转录水平到直接关联生物体表型特征的蛋白水平还有很多层次的调控。为此,要全面探究病菌致病机理,必须同步检测转录水平和蛋白水平表达量^[22]。基于前期筛选获得的致病力丧失的突变体材料^[23],本研究从蛋白水平探寻了致病相关因子。从试验结果可以看出,苹果树腐烂病菌的致病性并不是由个别基因控制的,可能由与基础代谢、信号通路等相关的基因共同调控,这意味着病菌致病机理的复杂性。同时,质谱鉴定也发现了大量未知差异蛋白。Peltier 等^[24]利用 2-DE 技术,系统分析了从豌豆类囊体外周蛋白质组中分离到的 200 多个蛋白,其中仅有 33 个蛋白的功能得到确认。因此,在今后的研究中,应加大对功能未知蛋白的研究,分析这些蛋白在苹果树腐烂病菌致病性中的作用。

4 结 论

本试验发现,采用 TCA/丙酮法-SDS/酚抽提法提取菌丝蛋白,再用 17 cm pH 4.0~7.0 IPG 胶条进行双向电泳可以得到理想的蛋白图谱。利用该技术体系,对苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 及突变体菌株 X900 的菌丝总蛋白进行了差异蛋白质组学分析,获得了参与病菌致病的候选相关蛋白,为从蛋白水平解析病菌的致病机理奠定了基础。

[参考文献]

[1] Wang X,Zang R,Yin Z,et al. Delimiting cryptic pathogen species causing apple valsa canker with multilocus data [J]. Ecology and Evolution,2014,4(8):1369-1380.

[2] Yin Z,Liu H,Li Z,et al. Genome sequence of valsa canker pathogens uncovers a potential adaptation of colonization of woody bark [J]. New Phytologist,2015,208(4):1202-1216.

[3] Ke X,Yin Z,Song N,et al. Transcriptome profiling to identify genes involved in pathogenicity of *Valsa mali* on apple tree [J]. Fungal Genetics and Biology,2014,68:31-38.

[4] Li Z,Yin Z,Fan Y,et al. Candidate effector proteins of the necrotrophic apple canker pathogen *Valsa mali* can suppress BAX-induced PCD [J]. Frontiers in Plant Science,2015,6:579.

[5] Ahsan N, Lee D G, Lee S H, et al. A proteomic screen and identification of waterlogging-regulated proteins in tomato roots [J]. Plant and Soil,2007,295:37-51.

[6] Corpillo D,Gardini G,Vaira A M,et al. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: the case of a virus-resistant tomato [J]. Proteomics,2004,4(1):193-200.

[7] Holzmüller P, Grébaut P, Brizard J P, et al. "Pathogeno-proteomics" toward a new approach of host-vector-pathogen interactions [J]. Animal Biodiversity and Emerging Diseases Prediction and Prevention,2008,1149:66-70.

[8] Lodha T D,Hembram P,Tep N,et al. Proteomics: a successful approach to understand the molecular mechanism of plant-pathogen interaction [J]. American Journal of Plant Sciences,2013,4:1212-1226.

[9] Rocco M,D'Ambrosio C,Arena S,et al. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening [J]. Proteomics,2006,6(13):3781-3791.

[10] Xu S,Chen J,Liu L,et al. Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata* in maize in China [J]. Journal of Integrative Plant Biology,2007,49(4):487-496.

[11] Torto T A,Li S,Styer A,et al. EST mining and functional expression assays extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora* [J]. Genome Research,2003,13(7):

1675-1685.

[12] Kikot G E,Hours R A,Alconada T M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review [J]. Journal of Basic Microbiology,2009,49(3):231-241.

[13] Rosen R,Ron E Z. Proteomics of a plant pathogen: *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Proteomics,2011,11(15):3134-3142.

[14] Ye Y,Mar E C,Tong S,et al. Application of proteomics methods for pathogen discovery [J]. Journal of Virological Methods,2010,163(1):87-95.

[15] Damerval C,Vienned D D,Zivy M,et al. Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins [J]. Electrophoresis,1986,7(1):52-54.

[16] Wang W,Scali M,Vignani R,et al. Protein extraction for two dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds [J]. Electrophoresis,2003,24(14):2369-2375.

[17] Candiano G,Bruschi M,Musante L,et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. Electrophoresis,2004,25(9):1327-1333.

[18] Renuse S,Harsha H C,Kumar P,et al. Proteomic analysis of an unsequenced plant-*Mangifera indica* [J]. Journal of Proteomics,2012,75(18):5793-5796.

[19] Kim Y S,Jung H,Gil H W,et al. Proteomic analysis of changes in protein expression in serum from animals exposed to paraquat [J]. International Journal of Molecular Medicine,2012,30(6):1521-1527.

[20] Wickramasekara S,Neilson J,Patel N,et al. Proteomics analyses of the opportunistic pathogen *Burkholderia vietnamiensis* using protein fractionations and mass spectrometry [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology,2011,70:19-28.

[21] 宋娜,戴青青,宋娜,等. 苹果树腐烂病菌 GTP-环化水解酶 II 基因敲除载体构建及其突变体的表型分析 [J]. 中国农业科学,2014,47(15):2980-2989.

Song N,Dai Q Q,Song N,et al. Construction of knockout vector of GTP cyclohydrolase II gene and mutant's biological characteristics of *Valsa mali* [J]. Scientia Agricultura Sinica,2014,47(15):2980-2989.

[22] Vogel C,Marcotee E M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analysis [J]. Nature Reviews Genetics,2012,13(4):227-232.

[23] Hu Y,Dai Q Q,Liu Y Y,et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the causative agent of valsa canker of apple tree *Valsa mali* var. *mali* [J]. Current Microbiology,2014,68:769-776.

[24] Peltier J B,Friso G,Kalume D E,et al. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of the luminal and peripheral thylakoid proteins [J]. Plant Cell,2000,12(3):319-341.