

白念珠菌总蛋白质组二维电泳条件的建立和优化

阎 澜,张军东,曹永兵,高平挥,姜远英*

(第二军医大学药学院药理学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**建立并优化白念珠菌总蛋白质组分析的二维电泳条件。**方法:**以白念珠菌国际标准菌株 SC5314 为材料,制备其总蛋白质组样品。以真菌细胞破碎方法、裂解液成分、上样量、固相 pH 梯度胶条的选择为侧重点,通过不同条件下电泳图谱的比较建立最佳二维电泳技术条件。**结果:**成功建立白念珠菌总蛋白质制备方法,优化了白念珠菌蛋白质组分析的二维凝胶电泳技术,获得重复性和分辨率都较理想的白念珠菌总蛋白质二维电泳图谱。**结论:**优化后的二维电泳条件符合白念珠菌的特点,为白念珠菌蛋白质组分析奠定基础。

[关键词] 白念珠菌;蛋白质组;电泳,凝胶,双向

[中图分类号] R 739.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0438-04

Establishment and optimization of two-dimensional gel electrophoresis condition for *Candida albicans* proteome analysis

YAN Lan, ZHANG Jun-dong, CAO Yong-bing, GAO Ping-hui, JIANG Yuan-ying* (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To develop and optimize a two-dimensional(2-DE) gel electrophoresis condition for *Candida albicans* proteome analysis. **Methods:** Total cellular protein of *Candida albicans* strain SC5314 was extracted and subjected to 2-DE under different conditions. The optimal conditions for sample preparation and 2-DE were screened by comparing the following parameters: cell broken methods, contents of lysis buffer, on-gel protein contents, and linear or non-linear immobilized pH gradient gels. **Results:** We successfully established the method for *Candida albicans* protein sample preparation and optimized 2-DE condition for *Candida albicans* proteome analysis. A satisfactory 2-DE map with good repetition and resolution was obtained. **Conclusion:** The optimized condition of 2-DE in this article is suitable for *Candida albicans* strain, which paves a way for analysis of global protein profile in *Candida albicans*.

[KEY WORDS] *Candida albicans*; proteome; electrophoresis, gel, two-dimensional

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 438-441]

白念珠菌是人体的条件致病真菌,但在艾滋病、器官移植等免疫缺陷患者中,极易引起严重的系统性感染。据统计,深部白念珠菌感染病死率达 40%^[1]。氟康唑是临床应用最广泛的抗真菌药物,但由于其仅具有抑菌作用,因此在长期给药过程中产生了快速发展的耐药性^[2-3]。大量研究表明,白念珠菌对氟康唑耐药性的获得是多基因在多层次水平变异累积的复杂过程^[4]。因此,有必要从整体水平系统地分析耐药白念珠菌的蛋白表达谱,鉴定耐药相关蛋白质并了解其功能,从而全面研究耐药性的发生发展过程。本研究拟通过二维电泳技术对敏感和耐药白念珠菌总蛋白质进行分离,在细胞水平分析耐药前后蛋白质表达谱的变化,为差异表达蛋白的筛选和功能研究奠定基础。研究中经过大量实验摸索,建立并优化了白念珠菌总蛋白质的二维电泳技术条件。

1 材料和方法

1.1 试剂及器材

1.1.1 试剂 尿素(urea)、硫脲(thiourea)、丙磺基酸盐

(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、癸基二甲基丙磺基胺(n-decyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate, SB3-10)、载体两性电解质(pharmalyte 3-10)、碘乙酰胺(iodoacetamide)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(ammonium persulfate, AP)、RC DC 蛋白定量试剂盒(protein assay kit)购自 Bio-Rad 公司; Tris 碱、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、乙二胺四乙酸(EDTA)、甘氨酸、聚丙烯酰胺(37.5:1, 30%)、甘油、溴酚蓝均为进口分装,购自上海华舜生物工程有限公司;三氯醋酸(TCA)、丙酮、硝酸银、碳酸钠、醋酸钠、无水硫代硫酸钠、甲醇、乙醇、甲醛、醋酸为国产分析纯。

[基金项目] 国家自然科学基金(30672626),上海市基础研究重点项目(03JC14006, 04JC14003)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30672626) and Key Programs of Science and Technique Foundation of Shanghai (03JC14006, 04JC14003)。

[作者简介] 阎 澜,博士。E-mail: ylan20001228@sina.com

* Corresponding author. E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

1.1.2 器材 0.5 mm 直径酸洗玻璃珠购自 Sigma 公司;玻璃珠涡漩器(Mini Bead-beater)购自冷泉港生物科技股份有限公司;超纯水机(Hitech-KFlow)购自上海华耀贸易有限公司;固相 pH 梯度胶条(IPGs)、PTOTEAN IEF 等电聚焦电泳仪、Protein II xi Cell 垂直电泳槽及附件、GS-690 光密度扫描仪、PDQuest 2-D 凝胶图像分析软件购自 Bio-Rad 公司。

1.2 菌株及培养液 白念珠菌(*Candida albicans*)国际标准株 ATCCMYA-2876(SC5314)由美国乔治敦大学 Fonzi WA 教授惠赠。YEPD 培养液:酵母浸膏 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,加三蒸水 900 ml 溶解,加入 2 mg/ml 氯霉素水溶液 50 ml,定容至 1 000 ml,高压灭菌,4℃ 保存。

1.3 白念珠菌总蛋白质样品制备 白念珠菌 SC5314 于 YEPD 培养液中振荡培养(200 r/min, 30℃),连续 2 次活化 16 h,使 $D_{600} = 1.0$, $1\ 500 \times g$ 离心 5 min 收集细胞,PBS 缓冲液清洗 3 次彻底去除培养液,收集湿菌,分别按照下列方法制备白念珠菌总蛋白质样品。方法一:重悬于 10 ml 裂解液 A(5 mol/L urea, 2% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2% pharmalyte 3-10, 0.5 mg/ml DNase I, 70 U RNase A, 100 mmol/L PMSF, 100 mmol/L EDTA),与 10 ml 酸洗玻璃珠一起置于玻璃珠涡漩器中,冰浴,高速涡漩振荡 30 s,停歇 30 s,如此重复 6~10 次。4℃ 下 $5\ 000 \times g$ 离心 15 min,去除玻璃珠和细胞碎片。上清 10℃ 下 $10\ 000 \times g$ 离心 30 min,弃沉淀,上清液悬浮于 10% TCA 的丙酮溶液,-20℃ 过夜。离心所得蛋白质沉淀重悬于冰丙酮溶液,离心后室温挥干,溶解于上述裂解液,-70℃ 保存。方法二:使用裂解液 B(5 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 2% SB3-10, 2% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2% pharmalyte 3-10, 0.5 mg/ml DNase I, 70 U RNase A, 100 mmol/L PMSF, 100 mmol/L EDTA),玻璃珠破菌、冰丙酮沉淀等方法与上述(1)一致。方法三:使用裂解液 B 和玻璃珠破菌并提取蛋白,离心去除玻璃珠后,10℃ 下 $13\ 000 \times g$ 离心 60 min,收集上清液即为蛋白质提取物,-70℃ 保存。方法四:使用裂解液 B 并在冰浴中以超声破碎菌,每处理 10 s,间歇 10 s,如此重复 6~10 次,10℃ 下 $13\ 000 \times g$ 离心 60 min,收集上清液-70℃ 保存。

蛋白质浓度测定按照 Bio-Rad 公司 RC DC 蛋白定量试剂盒说明进行,标准品为牛血清 γ 球蛋白。

1.4 白念珠菌总蛋白质的二维凝胶电泳

1.4.1 第一维——固相 pH 梯度等电聚焦(immobilized pH gradients isoelectri focusing, IPG-IEF) 根据 1.3 项下最佳样品制备方法制备白念珠菌总蛋白,比较不同上样量的二维凝胶电泳结果。

分别采用 17 cm 宽 pH3~10 线性和非线性 IPG 胶条进行白念珠菌蛋白的二维凝胶电泳分离,比较蛋白分离结果。

等电聚焦程序:被动水化 12 h,主动水化 50 V 12 h;除

盐 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 2 000 V 1 h;升压 8 000 V 6 h;聚焦达到 60 000 V·h。

1.4.2 胶平衡 等电聚焦结束后,取出胶条,置于 10 ml 平衡液中(6 mol/L urea, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-Cl pH 8.8, 20% 甘油, 0.2 g DTT)平衡 12 min,接着进行另 12 min 平衡(6 mol/L urea, 2% SDS, 0.375 mol/L tris-Cl pH 8.8, 20% 甘油, 0.25 g 碘乙酰胺)。取出胶条滤干,准备第二维电泳。

1.4.3 第二维——十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 平衡好的 IPG 胶条转移至 SDS-PAGE 均匀胶上方,用溶液(0.5% 低熔点琼脂糖, 25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, 痕量溴酚蓝)包埋固定 IPG 胶条。加入电极缓冲液,以恒流(10 mA, 两块胶)30 min 使样品进胶,而后提高电流至 40 mA 进行 SDS-PAGE 电泳。当溴酚蓝前沿移至凝胶底线结束。

1.4.4 凝胶染色——银染 按照文献^[5]方法进行。电泳后将凝胶浸泡在固定液(25 ml 乙酸, 100 ml 甲醇, 125 ml 超纯水)中 60 min 或过夜;将凝胶在浸泡液(75 ml 甲醇, 0.5 g 无水硫代硫酸钠, 17 g 醋酸钠, 165 ml 超纯水)中 30 min;超纯水洗 3 次,每次 5 min;将凝胶在银溶液(0.625 g 硝酸银, 超纯水加至 250 ml)中放置 20 min;超纯水洗 1 次,5 min;接着在显色液(6.25 g 碳酸钠, 100 μ l 甲醛, 超纯水加至 250 ml)中放置 2~10 min;将凝胶放在终止液(5% 乙酸)中终止反应;用超纯水洗 3 次,每次 5 min。

1.4.5 凝胶图像分析和统计学处理 凝胶用 GS-690 光密度仪扫描, MELANIE 3.0 二维凝胶电泳图像处理软件分析电泳图谱。

2 结果

2.1 白念珠菌总蛋白质制备方法的比较 按照方法一分离获得的蛋白质斑点数目只有 15~20 个;核酸清除比较完全,无明显横向、纵向拖尾。此外,采用非线性 IPG 胶条可以较好的分离 pH 4~7 范围内蛋白质(图 1)。

按照方法二分离获得总蛋白质的二维电泳图谱如图 2 示。裂解液中强变性剂硫脲和表面活性剂 SB3-10 的加入使获得的蛋白质斑点明显增加, 80~90 个,主要是中、小相对分子质量蛋白质,大相对分子质量蛋白相对较少,碱性蛋白质也较少。

与方法二相比,方法三所用裂解液同样含有硫脲和 SB3-10,但未采用 TCA 沉淀方法,蛋白质斑点数目明显增加, 900~950 个,尤其是大相对分子质量蛋白质,同时还含有一定数量的碱性蛋白质(图 3)。但由于蛋白质上样量过高(800 μ g),高丰度蛋白质横向拖尾,碱性区蛋白质未聚焦到位。

按照方法四未分离得到蛋白质,提示超声法不能完全打破白念珠菌细胞壁(图略)。

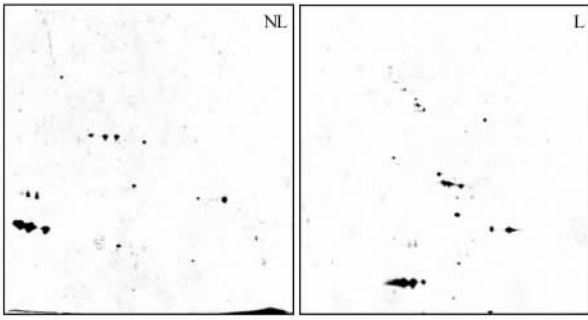


图 1 按照方法一制备白念珠菌 SC5314 总蛋白质的 2-DE 图谱

Fig 1 Two-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis of total protein extracted from *C. albicans* strain SC5314 by using lysis A and trichloroacetic acid precipitation
NL: Non-linear pH3-10 IPG; L: Linear pH3-10 IPG

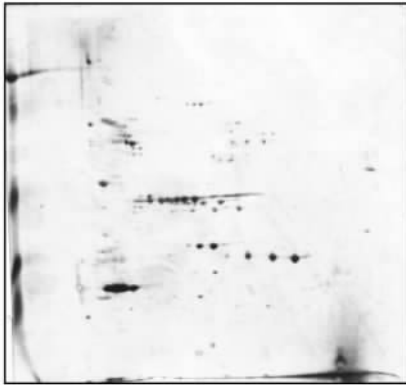


图 2 按照方法二制备白念珠菌 SC5314 总蛋白质的 2-DE 图谱

Fig 2 Two-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis of total protein extracted from *C. albicans* strain SC5314 by using lysis B and trichloroacetic acid precipitation

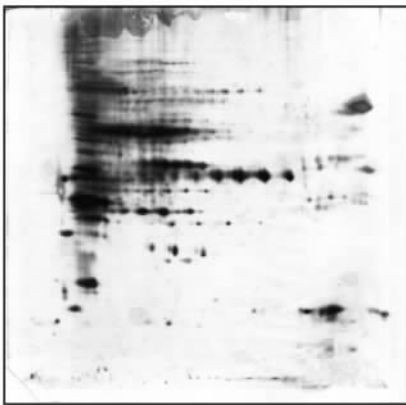


图 3 按照方法三制备白念珠菌 SC5314 总蛋白质的 2-DE 图谱

Fig 3 Two-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis of total protein extracted from *C. albicans* strain SC5314 by using lysis B

2.2 不同上样量比较 按照总蛋白质制备方法三分离蛋白质,以 800 μg 上样时,蛋白质斑点总数为 900~950 个,与 300 μg 上样组比较斑点总数无增加,且有明显横向、纵向拖尾(图 3);以 600 μg 上样时,蛋白质斑点总数以及拖尾现象与 800 μg 上样时类似(图略);以 300 μg 上样时,蛋白质斑点总数约为 1 500~1 800 个,拖尾现象较少,较多碱性蛋白质被分离(图 4)。

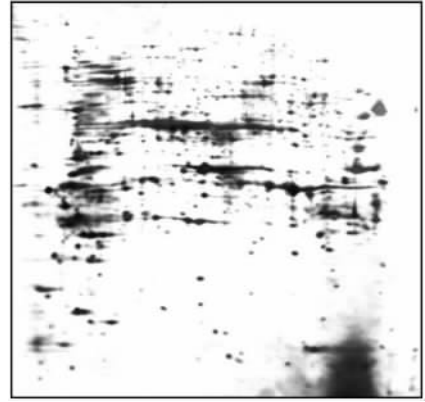


图 4 按照方法三制备白念珠菌 SC5314 总蛋白质的 2-DE 图谱(蛋白上样量为 300 μg)

Fig 4 Two-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis of total cell protein extracts (containing 300 μg) from *C. albicans* strain SC5314 by using lysis B

3 讨论

二维凝胶电泳可将数千种蛋白质同时分离与展示,是蛋白质组学研究三大核心技术之一^[6]。经典的二维电泳实验流程包括蛋白质样品的提取和处理、IEF、SDS-PAGE、染色等步骤。白念珠菌蛋白质组分析与其他来源的蛋白质组分析具有共性,也有其特殊之处,其中以样品制备的差别最为突出。

真菌细胞破碎是其样品制备的前提。白念珠菌具有坚硬的细胞壁,胞壁蛋白质与葡聚糖、甘露聚糖以及几丁质结合成牢固的聚合物,对于低渗处理等温和的裂解方法有较强的抵抗力,因而需使用剧烈的机械破碎方法打破菌体。本研究尝试使用超声破碎法,发现即使延长长时间的高强度超声处理也无法使白念珠菌破裂;而高速、剧烈振荡的玻璃珠可以打破真菌细胞壁,促其完全释放细胞内容物。此外,考虑到蛋白酶抑制剂本身对蛋白质的修饰可能会出现在二维电泳图谱中,本研究采用尽可能简化的原则,仅加入 PMSF 和 EDTA,并保证在细胞破碎时操作于冰浴中进行,从而抑制蛋白酶活性,防止蛋白降解。

理想的样品制备应使样品尽可能在避免蛋白质损失、降解和修饰下达到足够的溶解状态^[6],因此选择合适的裂解液也十分重要。裂解液的基本组成包括变性剂、去污剂和还原

剂等。尿素是最常用的变性剂,通过改变或破坏氢键结构,使蛋白质去折叠,所有离子基团暴露于溶液中。本研究通过比较二维电泳图谱质量,发现硫脲的加入可以进一步提高溶解度。去污剂与高浓度变性剂合用可防止蛋白质通过疏水作用而聚合。CHAPS是最常用的两性离子去污剂,SB3-10是具有长线性烷基尾端的两性离子表面活性剂,可比CHAPS更有效地破坏去折叠后的蛋白质分子间的疏水作用。本研究比较二维电泳图谱质量,进一步肯定了含SB3-10裂解液的优势。此外,还原剂DTT可以断裂二硫键,保持蛋白处于还原状态;DNase I和RNase A可降解核酸,将其变为单核苷酸或寡核苷酸,降低蛋白样品的黏度。本研究采用该配方的裂解液显著提高了蛋白质溶解性能,也改善了蛋白分离效果和图像的显色质量,获得了高分辨率的二维电泳图谱。但是不可避免的,会有一些溶解性差的蛋白在样品制备时丢失,或在上样时很难进入干胶条,或在等电聚焦过程中在电场的驱动下难以达到其等电点pH区域。

三氯醋酸沉淀可以选择性清除影响电泳的杂质,如盐离子、核酸、脂类等^[7]。但是本研究发现白念珠菌总蛋白经三氯醋酸沉淀处理后,蛋白质数目明显减少,表明沉淀并不是完全有效的,许多蛋白在沉淀后不容易重悬。因而,为了防止丢失大量蛋白,本研究最终未采取三氯醋酸沉淀。

低丰度蛋白质的分离是二维电泳研究的热点和难点,提高上样量有利于低丰度蛋白质的检测,但是上样量过高,高丰度蛋白质斑点过大会影响其周围蛋白质点的分离。因此样品处理后,选择合适的上样量对获得高质量的2-DE图谱也十分重要。一般说来,要根据IPG胶条的pH梯度、长度和样品中蛋白质的性质来调整上样量,此外,还可根据分析目的不同进行调整,研究高丰度蛋白质时,可适当降低上样量,以免高丰度蛋白拖尾;而研究低丰度蛋白质时,可使用窄范围pH梯度胶,提高上样量,以使低丰度蛋白显影良好^[8]。由于本研究的目的是扫描整个白念珠菌细胞总蛋白表达谱,因而采用宽范围(17 cm)pH3~10非线性的IPG胶条,研究结果证明大部分碱性蛋白质都能得到分辨,且pH4~7区域的分辨率更高。比较上样量为100、300、600和800 μg 的2-DE结果,发现以300 μg 上样时分离效果最好,即在保持高丰度蛋白质不拖尾的情况下尽可能显示低丰度蛋白。此外,在IPG胶条被水化之前进行6~12 h主动重吸收,可使小分子蛋白充分吸收入胶条,从而减少蛋白质的丢失。

为了更好地使细胞内低组分蛋白在2-DE胶中得以成像,蛋白质的染色技术也十分重要。本研究初期的银染结果凝胶背景较深,有些凝胶表面黏附的银离子较多,形成银膜,在一定程度上降低了分辨率。而后,我们在显色过程中注意

多换两次液体,获得了满意的结果。

白念珠菌基因组计划已经完成了遗传信息库的构建,所有基因的遗传信息得以解码^[9-10],但是人们仍未完全明白这些基因的功能,也无法确知这些基因在白念珠菌生命活动中如何精细调控。蛋白质组学,不仅可与基因组学共同从整体水平解析生命现象,而且比基因组学更能准确地反映生命活动规律^[11]。研究和克服白念珠菌耐药性的问题,是真菌病防治极富挑战性的课题。本研究成功建立了白念珠菌总蛋白质的提取和制备方法,优化了白念珠菌蛋白质组分析的二维凝胶电泳技术,为在整体水平获得与耐药相关的蛋白质表达谱数据,进而开展耐药相关基因的克隆和功能研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 陈纂源. 医学微生物学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,1996:198-207.
 - [2] Graybill J R. Changing strategies for treatment of systemic mycoses [J]. Braz J Infect Dis,2004, 4:47-54.
 - [3] 陈端,单斌,骈准燕,等. 医院真菌感染1225例分析[J]. 中华检验医学杂志,2005, 28:387-388.
 - [4] Akins R A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans* [J]. Med Mycol, 2005, 43:285-318.
 - [5] Pitarch A, Sanchez M, Nombela C, et al. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome [J]. Mol Cell Proteomics, 2002, 1: 967-982.
 - [6] 钱小红,贺福初. 蛋白质组学——理论与方法[M]. 北京:科学出版社,2003:1-57.
 - [7] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3-4):328-337.
 - [8] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000, 21:1037-1053.
 - [9] Jones T, Federspiel N A, Chibana H, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:7329-7334.
 - [10] Braun B R, van Het Hoog M, d'Enfert C, et al. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome [J]. Plos Genet,2005,1:36-57.
 - [11] Niimi M, Cannon R D, Monk B C. *Candida albicans* pathogenicity: a proteomic perspective [J]. Electrophoresis, 1999, 20:2299-2308.
- [收稿日期] 2006-11-07 [修回日期] 2007-02-28
[本文编辑] 贾泽军