

一种四步法提取分离白念珠菌总蛋白质方法的建立

许懿¹, 阎澜¹, 张军东², 姜远英^{1*}

(1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院皮肤科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**建立白念珠菌总蛋白质分步提取分离的方法。**方法:**利用四种溶解能力不同的溶液分步提取白念珠菌总蛋白, 定量后, 分别进行一维等电聚焦分离和二维聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。**结果:**成功分步提取获得白念珠菌不同溶解度的蛋白, 得到各步提取蛋白的二维凝胶电泳图谱。**结论:**四步法提取白念珠菌总蛋白质是研究白念珠菌蛋白质组的有效方法, 为进一步研究白念珠菌耐药机制以及抗真菌药物作用机制奠定基础。

[关键词] 白念珠菌; 蛋白质组; 四步法; 电泳, 凝胶, 双向

[中图分类号] Q 510.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)09-0999-04

Establishment of a "Four-step method" for extraction and separation of *Candida albicans* total proteins

XU Yi¹, YAN Lan¹, ZHANG Jun-dong², JIANG Yuan-ying* (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Dermatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To introduce a "Four-step method" for extraction and separation of *Candida albicans* total proteins. **Methods:** Proteins of *C. albicans* were extracted step-by-step with 4 kinds of solutions with different solubilities. After quantification, the protein samples were separated by isoelectric focusing electrophoresis and then by SDS-PAGE. **Results:** Proteins with different solubilities were successfully extracted step-by-step from *C. albicans* and were separated by two-dimensional gel electrophoresis. **Conclusion:** The "Four-step method" for extraction of *C. albicans* proteins is an effective approach to study *C. albicans* membrane proteome and lays a foundation for further investigation of the mechanisms of antifungal agents and drug resistance in *C. albicans*.

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

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9): 999-1002]

蛋白质提取是二维凝胶电泳(2-DE)样品制备中的一个关键环节。目前, 国内外实验室大都采用一步法提取复杂样品中的总蛋白质。此法主要存在两点不足: (1) 由于样品中的蛋白质种类繁多、数量至万且性质各异, 所以一种溶液的一步蛋白提取方法是很难提取到样品的蛋白质组, 这将成为阻碍蛋白质组研究实现大规模化的瓶颈之一; (2) 由于在细胞等样品中, 蛋白质之间表达量的差别巨大, 当样品没有经过预分离而直接进行 2-DE 分离, 高丰度蛋白质就会掩盖低丰度蛋白质的表达, 给鉴定工作带来困难。因而, 如何提高复杂样品的提取分离效率是一个亟待解决的问题。1998 年 Molloy 等^[1]介绍了一种根据蛋白质的不同溶解性提取膜蛋白质的方法, 采取大肠杆菌为样本。我们以白念珠菌为样本, 建立了四步提取分离白念珠菌总蛋白的方法。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 白念珠菌 SC5314 由 William A

Fonzi 教授馈赠。

尿素 (urea)、硫脲 (thiourea)、丙磺酸盐 (CHAPS)、辛酰基硫代甘氨酸三甲内盐 (caprylyl sulfobetain, SB 3-10)、载体两性电解质 (Bio-lyte 3-10)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAA)、四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸胺 (ammonium persulfate, AP)、二维电泳专用矿物油购自 Bio-Rad 公司; Tris 碱、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、甘氨酸、聚丙烯酰胺 (37.5 : 1, 30% W/V)、考马斯亮蓝 G-250、低熔点琼脂糖、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; 甘油 (glycerol,

[基金项目] 国家自然科学基金(30630071, 30672626); 上海市基础研究重点项目(04JC14003). Supported by National Natural Science Foundation of China(30630071, 30672626), and Key Project in Basic Research of Shanghai Municipal Government(04JC14003).

[作者简介] 许懿, 硕士生. E-mail: xuyi8375@126.com

* Corresponding author. E-mail: jiangyycn@yahoo.com.cn

Gly)、硝酸银、碳酸钠、醋酸钠、无水硫代硫酸钠、甲醇、乙醇、甲醛、乙酸、磷酸、盐酸为国产分析纯。

0.5 mm 直径酸洗玻璃珠购自 Sigma 公司;玻璃珠涡旋器(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)、PTOTTEAN IEF 等电聚焦电泳仪、Protein II xi Cell 垂直电泳槽及附件、GS-800 凝胶光密度扫描仪、PDQuest 2-D 凝胶图像分析软件购自 Bio-Rad 公司。

1.2 白念珠菌蛋白的提取 白念珠菌连续 2 次活化 16 h,使菌液在 600 nm 处光密度为 1.0,室温下 $3\ 000\times g$ 离心 5 min 收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次彻底去除培养液,收集湿菌,备用。

1.2.1 一步法 将湿菌重悬于 10 ml 裂解液[5 mol/L urea,2 mol/L thiourea,2%(W/V) SB 3-10、2%(W/V) CHAPS、65 mmol/L DTT、0.2%(W/V) Bio-lyte 3-10、100 mmol/L PMSF],与 10 ml 酸洗玻璃珠一起置于玻璃珠涡旋器中,冰浴,高速涡旋振荡 1 min,停歇 1 min,如此重复 6 次。 4°C 下 $5\ 000\times g$ 离心 10 min,去除玻璃珠和细胞碎片。上清 10°C 下 $10\ 000\times g$ 离心 10 min 弃沉淀,上清液 -70°C 保存。本研究经过 3 次独立一步提取白念珠菌总蛋白,每次提取蛋白质分别用非线性 pH 3~10 范围的 IPG 胶条进行 3 次完整 2-DE,建立了重复性、分辨率较高的白念珠菌总蛋白 2-DE 图谱。

1.2.2 四步法 第一步:水溶液提取:10~15 mg 湿菌加入 5 ml 裂解液 I [40 mmol/L Tris-base pH 7.5、100 mmol/L PMSF、0.2%(W/V) Bio-lyte 3-10、65 mmol/L DTT],与等体积酸洗玻璃珠一起置于玻璃珠涡旋器中,冰浴,高速涡旋振荡 1 min,停歇 1 min,如此重复 6 次。将混有玻璃珠的破菌液移入 50 ml 大离心管中, 4°C 下 $5\ 000\times g$ 离心 10 min,上清液 10°C 下 $10\ 000\times g$ 离心 10 min,收集分装上清液即为第一步提取物,于 -20°C 冰箱中储存备用。余下的沉淀用 40 mmol/L Tris-base pH 7.5 溶液洗 2 次,吸干废液。

第二步:含 urea / thiourea / CHAPS / DTT 的溶液提取:在含有上一步沉淀物的大离心管中加入 2 ml 裂解液 II [7 mol/L urea,2 mol/L thiourea,4%(W/V) CHAPS、0.2%(W/V) Bio-lyte 3-10、65 mmol/L DTT],强烈振荡混匀 5 min 后, 10°C 下 $10\ 000\times g$ 离心 10 min。收集上清液即为第二步提

取物,于 -20°C 冰箱中储存备用。余下的沉淀用 40 mmol/L Tris-base pH 7.5 溶液洗 2 次,吸干废液。

第三步:含 urea / thiourea / CHAPS / DTT / SB 3-10 的溶液提取:在含有上一步沉淀物的大离心管中加入 1 ml 裂解液 III [5 mol/L urea,2 mol/L thiourea,2%(W/V) CHAPS、0.2%(W/V) Bio-lyte 3-10、65 mmol/L DTT,2% W/V SB 3-10],强烈振荡混匀 5 min 后, 10°C 下 $10\ 000\times g$ 离心 10 min。收集上清液即为第三步提取物,于 -20°C 冰箱中储存备用。余下的沉淀用 40 mmol/L Tris-base pH 7.5 溶液洗 2 次,吸干废液。

第四步:含 1%(W/V) SDS 的溶液提取:在含有上一步沉淀物的大离心管中加入 0.5 ml 裂解液 IV [1%(W/V) SDS],强烈振荡混匀 5 min 后,在 $>90^{\circ}\text{C}$ 水浴中作用 3 min, 10°C 下 $10\ 000\times g$ 离心 10 min。收集上清即为第四步提取液,于 -20°C 冰箱中储存备用。此步后基本无残余蛋白沉淀,只有少许黑渣,弃去。

本研究经过 3 次独立四步法分步提取白念珠菌不同溶解能力的蛋白,每次各步提取蛋白分别进行 3 次完整 2-DE,建立了不同溶解能力的白念珠菌蛋白质非线性 pH 3~10 二维凝胶电泳图谱。

1.2.3 蛋白定量 按照 Bradford 法^[2]进行定量。

1.3 二维凝胶电泳

1.3.1 固相 pH 梯度等电聚焦(IPG-IEF) 采用 17 cm pH 3~10 的 IPG 胶条进行白念珠菌蛋白的二维凝胶电泳分离。等电聚焦程序:50 V 12 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,2 000 V 1 h,8 000 V 6 h,线性升压(10 000 V/h)聚焦 6 h 达到 60 000 V。

1.3.2 胶平衡 等电聚焦结束后,取出胶条,置于 10 ml 平衡液 A [50 mmol/L Tris pH 6.8,6 mol/L urea,30%(W/V) Gly,2%(W/V) SDS,1%(W/V) DTT]中平衡 12 min,接着将胶条置于平衡液 B [50 mmol/L Tris(pH 6.8)、6 mol/L urea,30%(W/V) Gly,2%(W/V) SDS,2.5%(W/V) IAA]中平衡 12 min。取出胶条滤干,准备第二相电泳。

1.3.3 第二相 SDS-PAGE 配制 SDS-PAGE 均匀胶[20 cm \times 20 cm,10%(W/V)]。100 ml 凝胶液中各分量:39.6 ml 超纯水,33.4 ml 30%(W/V) 丙烯酰胺储液,25 ml 1.5 mol/L Tris(pH 8.8),1 g SDS,1 g 过硫酸胺,40 μl TEMED。平衡好的 IPG

胶条转移至 SDS-PAGE 均匀胶上方,用封胶液 [0.5%(W/V) 低熔点琼脂糖、25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸、0.1%(W/V) 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/2 块胶)30 min 使样品进胶,而后提高电流至 40 mA 进行 SDS-PAGE。当溴酚蓝前沿移至凝胶底线结束。

1.4 银染凝胶染色 按照文献^[3]方法进行。

1.5 图像采集分析 染色后的胶用 GS-800 凝胶光密度扫描仪透射扫描,得到的数字化图像,用 PDQuest 2-D 软件进行分析。图像分析过程包括图谱的剪切、蛋白质点的检测、不同凝胶间的匹配,并对不同凝胶上蛋白质点的量进行标准归一化处理。

2 结果

2.1 一步法提取白念珠菌总蛋白质非线性 pH 3~10 二维凝胶电泳图谱 该 2-D 图谱通过银染检测到约 1 700 个蛋白质点,分布于 pH 3~10、相对分子质量 10 000~80 000 范围。如图 1 所示。

2.2 四步法分步提取白念珠菌蛋白质非线性 pH 3~10 二维凝胶电泳图谱 第一步提取的二维凝胶

电泳图上检测到约 800 个蛋白点,多数分布在 pH 3~7、相对分子质量 10 000~80 000 范围(图 2A)。第二步提取的二维凝胶电泳图上检测到约 1 000 个蛋白点,多数分布在 pH 5~8、相对分子质量 10 000~80 000 范围(图 2B)。第三步提取的二维凝胶电泳图上检测到约 500 个蛋白点,多数分布在 pH 8~10、相对分子质量 10 000~80 000 范围(图 2C)。第四步提取的二维凝胶电泳图上检测到约 100 个蛋白点,多数分布在 pH 10 左右、相对分子质量 10 000~80 000 范围(图 2D)。

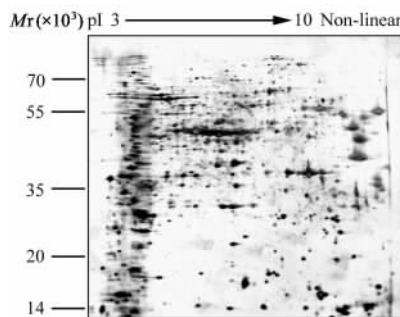


图 1 白念珠菌 SC5314 总蛋白 2-DE 图谱
Fig 1 2-D gel of *Candida albicans* SC5314 total proteins (pH 3-10 non-linear)

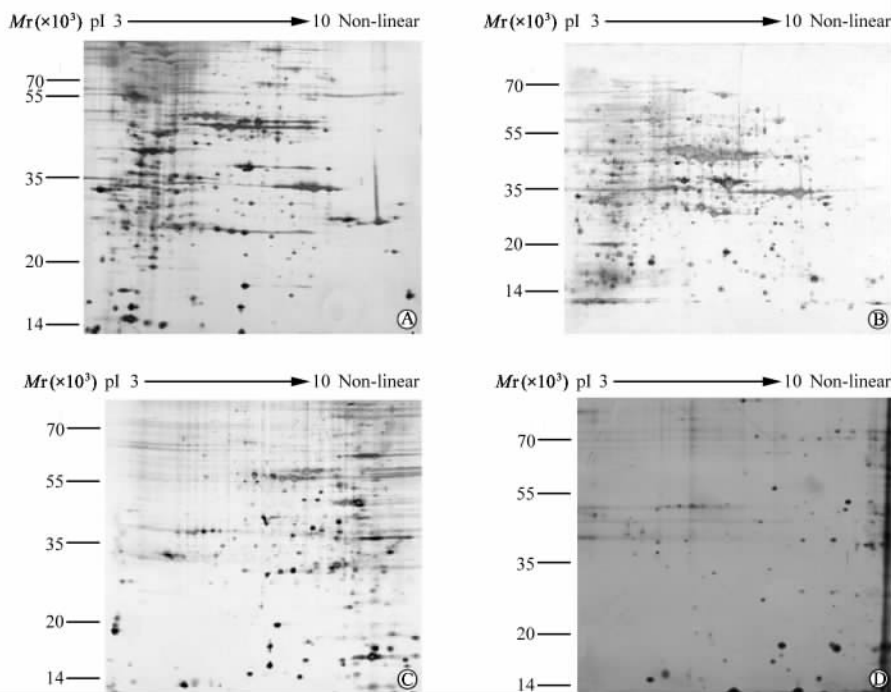


图 2 白念珠菌 SC5314 提取蛋白 2-DE 图谱
Fig 2 2-D gel of *Candida albicans* SC5314 proteins (pH 3-10 non-linear)
A: The first step; B: The second step; C: The third step; D: The fourth step

3 讨论

利用蛋白质溶解性能的差异对白念珠菌蛋白进行分离,各步裂解液的选择是本研究的关键。第一步,选用 Tris 碱水溶液(pH 7.5),所提取蛋白为水溶性蛋白^[1],在 2-DE 图上基本分布在 pH 3~7 的酸性区域。第二步选用含有 urea/thiourea/CHAPS/DTT 的裂解液 II 对第一步提取后的沉淀物进行提取。其中,urea 是双向电泳样品制备时最常用的变性剂,thiourea 则可以帮助许多难溶的蛋白质进行溶解,urea 和 thiourea 能够破坏蛋白分子间形成的氢键,从而防止由氢键引起的蛋白质聚集及蛋白迁移中二级结构的形成;CHAPS 为两性去垢剂,它可以在蛋白质经过变性剂处理而暴露疏水基团后溶解疏水基团,消除疏水基团之间的相互作用,增强蛋白质在其 pI 值处的溶解性;DTT 为还原剂,它能帮助打开蛋白质的二硫键,使得待分析的蛋白质分离成为单一的蛋白亚基,已变性的蛋白质展开更完全,溶解更彻底。这些试剂可将部分不溶于第一步提取液的蛋白溶解^[1],所提取蛋白多分布在 pH 5~8 的中性区域,提示该步蛋白多为中性较难溶蛋白。裂解液 III 比裂解液 II 多加一种表面活性剂 SB 3-10,它是一种有效的膜蛋白溶解剂,对难溶的脂溶性蛋白具有良好的溶解作用。该步所提蛋白多分布在 pH 8~10 的碱性区域,提示该步蛋白为碱性脂溶性蛋白,即膜蛋白。第四步裂解液为 1% (W/V) SDS 溶液,SDS 为强离子型去垢剂,在加热的条件下具有极强的蛋白溶解作用,能够提取用前 3 种裂解液都不溶解的蛋白质,该步所提蛋白分布在 pH 10 左右,提示为极难溶的碱性膜蛋白。本研究中,白念珠菌蛋白质点在图谱中的分布位置与其他实验室研究结果^[4-6]基本一致,疏水性膜蛋白质所占比例较小,主要通过第三、第四步提取液获得,约 80% 的蛋白质可以溶解在前两步的裂解液中^[1],提示本研究结果可靠性较高。

目前,实验室广泛采用一步法提取蛋白质,操作简单,但是是一种提取液对许多蛋白质特别是膜蛋白都缺乏溶解力,常常造成蛋白质的主动丢失,而且对于已溶解的蛋白质的分离,其分辨率也是 2-DE 技术所面临的一个挑战。在本研究中,一步法提取蛋白总数约为 1 700 个,四步法累计提取蛋白总数约

为 2 400 个,表明四步法较一步法提取蛋白更完全。并且,在第三、第四步的 2-DE 图谱中可以清晰地看到一步法 2-DE 图谱中无法显示的疏水蛋白质,如膜蛋白,而膜蛋白大都为担负重要生命活动的功能性蛋白,以白念珠菌为例,与其耐药相关的 Mdr1p、Cdr1p、Cdr2p 等蛋白均为膜蛋白^[7],而抗真菌药物的作用靶点也大都为膜蛋白^[8],因此,膜蛋白的研究在真菌耐药性及抗真菌药物研究中具有重要的意义。本研究成功建立白念珠菌总蛋白质的提取和制备方法,为进一步研究药物作用机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Molloy M P, Herbert B R, Walsh B J, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19:837-844.
- [2] Choi W, Yoo Y J, Kim M, et al. Identification of proteins highly expressed in the hyphae of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis[J]. *Yeast*, 2003, 20:1053-1060.
- [3] Pitarch A, Sánchez 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 Proteom*, 2002, 1:967-982.
- [4] Mukherjee P K, Mohamed S, Chandra J, et al. Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism[J]. *Infect Immun*, 2006, 74:3804-3816.
- [5] Shin Y K, Kim K Y, Paik Y K. Alterations of protein expression in macrophages in response to *Candida albicans* infection [J]. *Mol Cell*, 2005, 20:271-279.
- [6] Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, et al. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5:79-96.
- [7] White T C, Marr K A, Bowden R A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11:382-402.
- [8] Rodaki A, Young T, Brown A J. Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: implications for antifungal drug target discovery[J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5: 1371-1377.

[收稿日期] 2007-03-26

[修回日期] 2007-05-15

[本文编辑] 尹 荼