

# iTRAQ 结合 2D LC-MS/MS 技术在草菇不同生长发育时期蛋白质组分析中的应用

刘靖宇<sup>1,2</sup> 江玉姬<sup>1</sup> 谢宝贵<sup>1\*</sup> 陈炳智<sup>1</sup> 廖伟<sup>1</sup> 邓优锦<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学 菌物研究中心 福建 福州 350002)

(2. 山西农业大学 食品科学与工程技术学院 山西 太谷 030801)

**摘要:** 【目的】旨在采用 iTRAQ 标记结合二维液相色谱串联质谱技术对草菇不同生长发育阶段的差异蛋白质组进行研究。【方法】首先将提取的草菇不同生长阶段蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 其次将经二维液相色谱串联质谱技术获取的串联质谱数据通过 MASCOT 软件搜库, 之后对鉴定蛋白质数据进行了主成分分析(Principal component analysis, PCA)、层次聚类(Hierarchy clustering)分析、K-均值(K-means)聚类和 Gene Ontology (GO)注释分析。【结果】试验结果显示, 共计获得 2 335 个不同肽段, 鉴定到 1 039 个蛋白质, 其中 1 030 个蛋白质具有定量信息。在子实体阶段中显著上调蛋白质 64 个, 下调蛋白质 150 个。生物信息学分析表明, iTRAQ 标记技术结合二维液相色谱串联质谱可对不同生长发育时期的草菇蛋白样品进行有效地分离和鉴定。【结论】这一研究结果为深入研究草菇乃至其他大型担子菌子实体形成和发育的分子机制提供借鉴。

**关键词:** 草菇, 蛋白质组, iTRAQ, 二维液相色谱串联质谱

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助(No. CARS 24)

\*通讯作者: ✉: mrcfafu@163.com

收稿日期: 2012-02-26; 接受日期: 2012-05-02

# Comparative analysis of proteomic profile at different development stages of *Volvariella volvacea* by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS

LIU Jing-Yu<sup>1,2</sup> JIANG Yu-Ji<sup>1</sup> XIE Bao-Gui<sup>1\*</sup> CHEN Bing-Zhi<sup>1</sup>  
LIAO Wei<sup>1</sup> DENG You-Jin<sup>1</sup>

(1. Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. Institute of Food Science and Engineer, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

**Abstract:** [Objective] This work aims to investigate differential expression proteins at different development stages of *Volvariella volvacea* using isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ)-coupled two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry (2D LC-MS/MS) proteomics approach. [Methods] Firstly, the proteins extracted from *V. volvacea* at different development stages were analyzed by SDS-PAGE. Secondly, the tandem mass spectrometry data obtained from 2D LC-MS/MS were used to search using MASCOT search engine. After that, principal component analysis, hierarchical clustering and Gene Ontology were used to analyze the detected results. [Results] Results showed that 1 039 protein groups, included a total of 2 335 unique peptides, were identified. Among them, 1 030 protein groups were provided quantitative information. Contrast to mycelia, 64 up-regulated and 150 down-regulated significantly differential proteins were found in fruiting bodies at different development stages of *V. volvacea*. Bioinformatics analysis revealed that iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS was a unique method for isolating and identifying protein groups of *V. volvacea* at different development stages. [Conclusion] It is helpful to insight into the molecular mechanism of the fruiting body formation and development of *V. volvacea* and other macro-basidiomycetes in the future.

**Keywords:** Straw mushroom, Proteome, iTRAQ, 2D LC-MS/MS

大型真菌具有特殊的生理和遗传功能,其中以大型担子菌的子实体生长发育过程尤为独特,是目前微生物学领域的研究热点之一<sup>[1-4]</sup>。由于基因仅是遗传信息的携带者,蛋白质才是生理功能的执行者和生命活动的直接体现者,单纯基因组和转录组信息并不能完全推测参与该生物过程的所有基因的功能。蛋白质组学旨在采用高通量和高灵敏度的技术手段建立在不同时间与空间的生物机体内所有表达蛋白质的动态表达谱,这将更有利于揭示内外环境对生物机体生长发育

的影响机制<sup>[5]</sup>。因此,利用蛋白质组学将有可能揭示子实体生长发育的独特机制,从蛋白质组学获得的信息也可通过确证和纠正基因的分配来改善基因组的注释,逐步实现对其基因组的全面注释以及基因组、转录组和蛋白质组数据的对接<sup>[6]</sup>。大型真菌的蛋白质组学研究开展比较缓慢,目前报道主要集中在其胁迫生理研究<sup>[7-9]</sup>。

“Proteome”(蛋白质组)一词其含义是指一个基因组、一种生物或一种细胞/组织所表达的全套蛋白质<sup>[10-11]</sup>。因此,所采用的蛋白质组分离和鉴

定技术将很大程度影响具体实验结果的效果。双向电泳是目前蛋白质组学研究的主要方法,但该技术本身存在分离蛋白范围有限、歧视效应、与质谱联用差等诸多缺陷<sup>[5,12]</sup>。因此,近年来,基于二维液相色谱对蛋白或肽段的进行分离的非凝胶技术发展迅速,并在补充双向电泳的技术缺陷中显示了很好的实验效果,甚至目前有的学者认为该类技术有取代双向电泳的发展趋势<sup>[13-15]</sup>。

iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantification, 同位素标记相对和绝对定量) 标记技术是 2004 年由美国 ABI (应用生物系统公司)开发的一种同位素标记的蛋白质组学定量技术<sup>[16]</sup>。该技术可同时对 2-8 个样品进行相对和绝对定量研究,具有良好的精确性和重复性,是目前在比较蛋白质组学上应用的实验效果最为灵敏的标记技术之一<sup>[17]</sup>。本实验室在完成草菇基因组、转录组和表达谱测序的基础上,进一步采用 iTRAQ 标记结合纳升级液相色谱串联质谱技术对草菇子实体生长发育阶段的蛋白质组进行分离和分析,以期全面解析其遗传、生理、生化及生物学特性提供参考,这也是迄今为止首次将该技术应用于大型真菌子实体形态建成的蛋白质组学研究报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株和培养基

**1.1.1 供试菌株:** 草菇菌株 PYD1521 (菌种保藏编号 H15-21)由福建省食用菌种质资源保藏与管理中心提供。

**1.1.2 培养基:** 液体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 000 mL, pH 自然。在液体培养基中添加琼脂 20 g/L 成为固体 PDA 培养基。

### 1.2 菌落形态观察

PYD1521 平板培养物接种于 PDA 固体培养基平板(直径 90 mm), 35 °C 暗培养 7 d 观察菌落形态, 重复 5 皿。草菇菌丝培养和收集参照赵光

辉的方法<sup>[18]</sup>。

### 1.3 子实体采集及显微观察

原基(Yb)、纽扣期(Nb)和蛋形期(Db)子实体的采集参照 Zhang 和 Yau 的方法<sup>[19]</sup>。将采集的 3 个不同发育阶段的子实体置于体式显微镜(Motic SMI-168)下观察内部显微结构以进一步检验采集样本。出菇实验参照赵光辉的方法<sup>[18]</sup>。

### 1.4 主要仪器和试剂

SCX 蛋白液相色谱系统 AKTA Purfier 100, GE Healthcare 公司; Easy nLC, Proxeon Biosystems 公司(现名 Thermo Fisher Scientific); Q Exactive MS 质谱仪, Thermo Finnigan 公司; Empore™ SPE Cartridges C18, Sigma 公司; 测序级胰蛋白酶(TPCK-Trypsin), Promega 公司; RP-C18 resin, Agilent 公司; iTRAQ 试剂和溶解缓冲液, ABSCIEX 公司; 乙腈(Acetonitrile ACN)、甲酸(Formic acid)和三氯乙酸(Trichloroacetic acid, TCA), Merck 公司; 强阳离子交换色谱柱(Strong Cation Exchange Column, SCX)、Polysulfoethyl 4.6x100mm column (5μ, 200Å), PolyLC Inc, Maryland。

### 1.5 实验方法

**1.5.1 蛋白提取与 SDS-PAGE 电泳:** 称取 2 g 草菇菌丝或子实体组织, 磷酸盐缓冲溶液(在 800 mL 蒸馏水中溶解 NaCl 8.00 g、KCl 0.20 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, HCl 调节溶液 pH 至 7.4, 加水定容至 1 L)清洗 2 次。用手术刀切成 0.5 mm 小块, 加入适量液氮研磨至粉末并转入 50 mL 离心管中, 之后加入 30 mL 预冷的三氯乙酸(TCA)丙酮溶液(TCA: 丙酮=1: 9), 混匀, -20 °C 沉淀过夜, 离心弃上清。加入 20 mL 预冷的丙酮清洗沉淀块(重复 1 次), 放入通风橱风干。称取约 20 mg 沉淀粉末, 加入 1 mL STD 缓冲液(十二烷基磺酸钠 4%, 二巯基苏糖醇 100 mmol/L, Tris-HCl 150 mmol/L, pH 8.0)混匀, 沸水浴

5 min。超声破碎(80 W, 超声 10 s, 间歇 15 s, 共 10 次)沸水浴 5 min, 离心取上清。取 2  $\mu$ L SDS-PAGE 电泳检测。蛋白 Marker 为 Blue Plus II Protein Marker (14–100 kD) (TransGen)。

**1.5.2 FASP 酶解与肽段定量:** 取 200  $\mu$ g 样品于 30  $\mu$ L STD 缓冲液沸水浴 5 min, 冷却至室温。加入 200  $\mu$ L UA 缓冲液(尿素 8 mol/L, Tris-HCl 150 mmol/L, pH 8.0)混匀, 转入 30 kd 超滤离心管, 14 000 $\times$ g 离心 15 min。加入 200  $\mu$ L UA 缓冲液 14 000 $\times$ g 离心 15 min, 弃滤液。加入 100  $\mu$ L 碘乙酰胺(IAA), 600 r/min 振荡 1 min, 避光室温 30 min, 14 000 $\times$ g 离心 10 min。加入 100  $\mu$ L UA 缓冲液, 14 000 $\times$ g 离心 10 min, 重复 2 次。加入 100  $\mu$ L 溶解缓冲液(三乙基碳酸氢铵 0.5 mol/L, pH 8.5), 14 000  $\times$ g 离心 10 min, 重复 2 次。加入 40  $\mu$ L 胰蛋白酶缓冲液(将 2  $\mu$ g 胰蛋白酶溶于 40  $\mu$ L 溶解缓冲液), 600 r/min 振荡 1 min, 37  $^{\circ}$ C 下放置 16–18 h。换新收集管, 14 000  $\times$ g 离心 10 min, 取滤液,  $OD_{280}$  肽段定量。

**1.5.3 iTRAQ 标记:** 参照  $OD_{280}$  定量结果, 将 PYD1521、原基、纽扣期和蛋形期等 4 个酶解后的肽段样品各取约 100  $\mu$ g, 分别用 8 标 iTRAQ 试剂中的 115、116、117 和 118 等 4 个标记分子进行标记(具体操作按照试剂盒说明书进行)后, 等量混合。

**1.5.4 第一维强阳离子交换液相色谱分级:** 采用 SCX 色谱柱分离样品, 流速设置为 1 000  $\mu$ L/min, 收集 30 份穿流及洗脱组分, 并根据色谱峰合并为 10 份, 之后经 C18 Cartridge 脱盐后冻干,  $-80^{\circ}$ C 保存。强阳离子交换液相色谱分级梯度设置如下: 0–25.00 min, 缓冲液 A 100%; 25.01–32.00 min, 缓冲液 A 90%, 缓冲液 B 10%; 32.01–42.00 min, 缓冲液 A 80%, 缓冲液 B 20%; 42.01–47.00 min, 缓冲液 A 55%, 缓冲液 B 45%; 47.01–60.00 min, 缓冲液 B 100%; 60.01–75.00 min, 缓冲液 A 100%。SCX 缓冲液: 缓冲液 A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$

10 mmol/L pH 3.0, 乙腈 25%)、缓冲液 B ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mmol/L pH 3.0, KCl 500 mmol/L, 乙腈 25%)。

**1.5.5 第二维纳升级串联液相高效色谱:** 第二维采用纳升流速 HPLC 液相系统 Easy nLC 进行分离。将 1.5.1 获得的样品, 用 C 液(5%乙腈, 0.1%甲酸) 50  $\mu$ L 溶解, 样品由自动进样器上样到 Zorbax 300SB-C18 peptide traps (Agilent Technologies, Wilmington, DE), 再经色谱柱分离, 流速为 200 nL/min。液相梯度如下: 0–110 min, B 液线性梯度范围 4%–28%; 110–130 min, B 液线性梯度范围 28%–40%; 130–135 min, B 液线性梯度范围 40%–90%; 135–140 min, B 液维持在 90%。液相 A 液为 0.1%甲酸水溶液, B 液为 0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为 100%)。色谱柱 75  $\mu\text{m}\times 150$  mm (RP-C18)以 95%的 A 液平衡。

**1.5.6 Q Exactive 质谱鉴定:** 将标记好的酶解产物经二维液相色谱分级分离并脱盐后用 Q-Exactive 质谱仪(Thermo Finnigan)进行质谱分析。分析时长: 140 min; 检测方式: 正离子; 母离子扫描范围: 300–1 800 m/z; 一级质谱分辨率: m/z 为 200 时 70 000 次; AGC target:  $1e6$ ; 一级最大 IT 值: 10 ms; 扫描范围数目(Number of scan ranges): 1; 动态排除(Dynamic exclusion): 40.0 s。多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照下列方法采集: 每次全扫描(Full scan)后采集 10 个碎片图谱, 二级质谱激活类型(MS2 Activation Type): HCD; 隔离窗(Isolation window): 1.6 m/z; 二级质谱分辨率: m/z 为 200 时 17 500 次; 微碎片图谱数(Microscans): 1; 二级最大 IT 值: 60 ms; 规一化碰撞能量(Normalized collision energy): 30 eV; 填充率(Underfill ratio): 0.1 %。

**1.5.7 Q Exactive 质谱数据分析:** 定量方法: 原始文件(Raw file)用 Proteomics Tools 分析软件抽提肽段报告离子峰定量信息, 并以 PYD1521 组(115)为内参对信号强度进行归一化分析处理, 采

用软件计算的各肽段比值的加权平均值作为蛋白质定量结果。最后,将定量及鉴定结果进行合并处理。蛋白鉴定方法:原始数据采用 MASCOT 软件鉴定多肽分子。搜库参数如下:肽段质量误差(Peptide mass tolerance)为 20 ppm;串联质谱误差(MS/MS tolerance)为 0.1 Da;胰酶消化(Enzyme=Trypsin);允许最大的胰酶漏切位点数:2 个;固定修饰(Fixed modification): iTRAQ 8-plex (K)和 iTRAQ 8-plex(N-term);可变修饰(Variable modification): Oxidation (M);数据库选用 uniprot\_Agaricales.fasta 并结合反转序列库。MASCOT 结果过滤参数为:蛋白阳性结果错误率(Protein FDR)  $\leq 0.05$ ;肽段阳性结果错误率(Peptide FDR)  $\leq 0.05$ 。

**1.5.8 生物信息学分析:**所有鉴定蛋白采用 MATLAB 软件的 Princomp 函数进行主成分分析(Principal component analysis, PCA),采用 Cluster 3.0 进行层次聚类(Hierarchy clustering)分析,并通过 Java Treeview 实现可视化。聚类参数:样本间距离用欧氏距离度量;连接类型用平均值的方法。利用 MATLAB 的函数实现 K-means 的计算并图示化。原始数据经过每个基因的最大值归一化后,初始化为 16 个类。基因之间的距离用相关性计算,即 1 减去样本之间的相关性。每个质心点在归一化到(0, 1)正态分布后,为该类别中基因方向的平均值,聚类结果重复 50 次,每次产生一个新的初始化的类别重心位置。利用 Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>)软件中的 BiNGO 插件完成 Gene Ontology(GO)功能富集度计算。鉴定蛋白的 GO 信息来自 UNIPROT (<http://www.uniprot.org>)网站,用 PERL 程序 ForBiNGO.pl 实现格式转换作为输入文件,利用超几何检验计算输入基因列表中 GO 功能的富集度,并用 GO Slim 方法进行 GO 层次的汇总。每个样本的差异基因单独进行 BinGO 计算,并用

PERL 程序 CombineBiNGO.pl 进行合并。

## 2 结果与分析

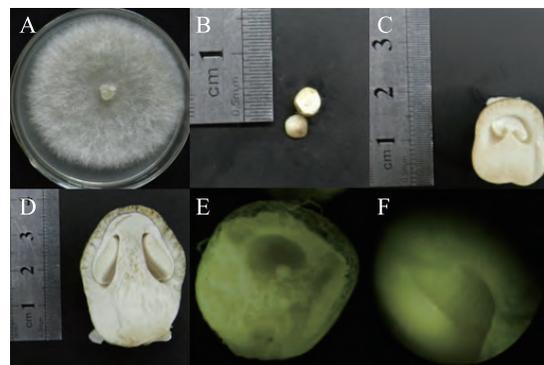
### 2.1 供试菌株的菌落形态和 3 个不同发育时期子实体内部显微观察

可孕菌株 PYD1521 的菌落形态观察实验显示(图 1A):该菌株菌丝阶段气生菌丝旺盛、生长速度快,35 °C 暗培养 7 d 即可长满直径为 90 mm 的平板。

原基(Yb)选取高度为 0.4 cm–0.6 cm,基部宽度为 0.3 cm–0.5 cm,外菌膜已形成,内部中空,在体式显微镜(Motic SMI-168)下可观察到腔内基部中心出现菌丝扭结,但未有明显组织分化的子实体(图 1B 和 1E)。

纽扣期(Nb)选取高度 1.8 cm–2.3 cm,基部宽度为 0.8 cm–1.2 cm,外菌膜完整,菌盖已形成,有明显的组织分化,在体式显微镜(Motic SMI-168)下可观察到菌褶初步分化(图 1C 和 1F)。

蛋形期(Db)选取子实体高度 3.5 cm–4.0 cm,基部宽度为 1.5 cm–2.1 cm,外菌膜完整,肉眼即可见菌褶已发育完全,但菌柄与菌褶相比未明显伸长,仍处于等长状态,菌褶白色与菌柄微分开(图 1D)。



**图 1 草菇菌丝菌落和不同发育时期子实体形态**  
**Fig. 1 Shapes of mycelia and characters of different developed fruiting bodies of *Volvariella volvacea***

注: A 为菌丝菌落形态; B、C 和 D 分别为原基、纽扣期和蛋形期子实体形态; E 和 F 分别为原基和纽扣期子实体显微形态。

Note: A: Colony shape of mycelia; B–D: Shapes of fruiting bodies at primordium, button and egg stages respectively; E–F: Microscopic characters of fruiting bodies at primordium and button stages respectively.

## 2.2 SDS-PAGE 电泳结果

SDS-PAGE 电泳结果显示(图 2): 4 组样品之间平行度较好, 相应的蛋白条带清晰, 初步表明蛋白提取效果理想, 样品纯度适于进行下一步二维液相色谱分级分离实验。

## 2.3 二维液相色谱串联质谱鉴定结果

通过二维液相色谱串联质谱鉴定共计获得唯一肽段 2 335 个, 鉴定到 1 039 个蛋白质, 1 030 个蛋白质具有相对定量信息(具体定量数据未公开)。

## 2.4 差异蛋白筛选结果

以可孕菌株 PYD1521 为内参对鉴定到的 1 030 个蛋白质数据进行整理, 通过控制两倍上下调来筛选差异蛋白质。分析结果显示(表 1), 与草菇菌丝阶段相比子实体阶段可获得差异蛋白质总数 214 个, 占到所有鉴定蛋白质总数的 20.8%, 其中上调蛋白质 64 个、下调蛋白质 150 个, 下调蛋白质数是上调蛋白质数的 2.3 倍。

## 2.5 主成分分析结果

采用 MATLAB 软件的 Princomp 函数完成无

缺失值 1 030 个蛋白的定量数据的进行主成分计算分析, 提取的前 3 个主成分累积方差贡献率为 83.17%。结果显示(图 3), 菌丝样本 PYD1521 与

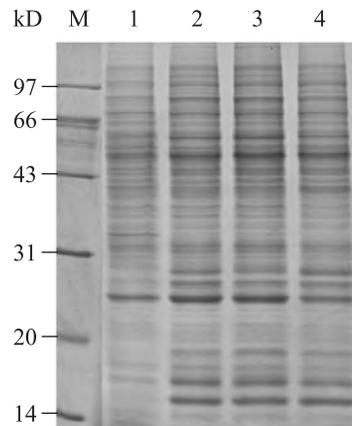


图 2 草菇菌丝和不同发育时期子实体蛋白样品的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of proteins extracted from mycelia and fruiting bodies at different development stages of *Volvariella volvacea*

注: M: Blue plus II protein marker (14–100 kD); 1: PYD1521; 2: 原基; 3: 纽扣期; 4: 蛋形期。

Note: M: Blue plus II protein marker (14–100 kD); 1: PYD1521; 2: Primordium stage; 3: Botton stage; 4: Egg stage.

表 1 不同发育时期草菇子实体与菌丝相比的差异蛋白列表

Table 1 Differential expressed protein numbers of fruiting bodies at different development stages comparing with mycelia of *Volvariella volvacea*

样品名 Sample name	差异蛋白质数目 Differential expression protein number	上调蛋白质数目 Up-regulated number	下调蛋白质数目 Down-regulated number
原基期 Primordia stage (Yb)	166	42	124
纽扣期 Botton stage (Nb)	109	33	76
蛋形期 Egg stage (Db)	159	38	121
原基与纽扣期共有 Shared by primordia and botton stages	96	28	68
原基与蛋形期共有 Shared by primordia and egg stages	117	18	99
纽扣期与蛋形期共有 Shared by botton and egg stages	88	19	69
三个发育阶段共有 Common to three development stages	65	16	65
合计 Total	214	64	150

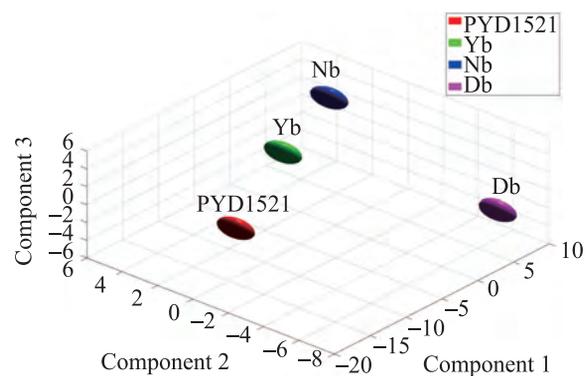


图 3 草菇菌丝和不同发育时期子实体蛋白质组的主成分分析(PCA)分析

Fig. 3 Principal component analysis for the proteome of mycelia and fruiting bodies at different development stages of *Volvariella volvacea*

注: PYD1521: 菌丝; Yb: 原基; Nb: 纽扣期; Db: 蛋形期.

Note: PYD1521: Mycelium sample; Yb: Primordia stage; Nb: Botton stage; Db: Egg stage.

其余 3 个子实体样本在第一主成分(Component 1)、第二主成分(Component 2)和第三主成分(Component 3)上均存在较大差别,且显著高于子实体样本间的差别;3 个子实体样本中,蛋形期(Db)与原基(Yb)和纽扣期(Nb)相比,在 3 个主成分上也存在明显差异,而原基(Yb)和纽扣期(Nb)较为接近。主成分三维图(图 3)直观地显示了 4 个不同样本的蛋白质组差异,这一结果与它们的形态特征和内部发育状况吻合(图 1)。

## 2.6 层次聚类分析结果

用 Cluster 3.0 实现包含缺失值的 1 030 个蛋白质的定量数据的样本维和基因维的分层聚类计算。分析结果(图 4)显示,3 个子实体样本蛋白质表达量的上调与下调较为一致,而与菌丝样本 PYD1521 差异较大。原基与纽扣期样本相似度较高,先被聚成同一个亚簇后再与蛋形期样本聚类,最终形成与菌丝样本明显不同的一簇。这一聚类结果符合子实体生长发育阶段的时间性(图 1)以及营养生长于生殖生长的明显区分,与主成分分析结果一致(图 3)。

## 2.7 K-平均值聚类结果

采用 1.5.8 中的方法将 1 030 个鉴定蛋白质根据每个蛋白质表达模式的相似性聚成 16 个类别(图 5 A-P)。该分析结果显示了草菇不同生长发育阶段中的共趋势蛋白质群,如图 5A、H 和 K 为在草菇原基阶段特异高表达的蛋白质群,图 5C、M 和 N 为纽扣期特异高表达的蛋白质群,这为后续验证工作的开展奠定了较好的基础。

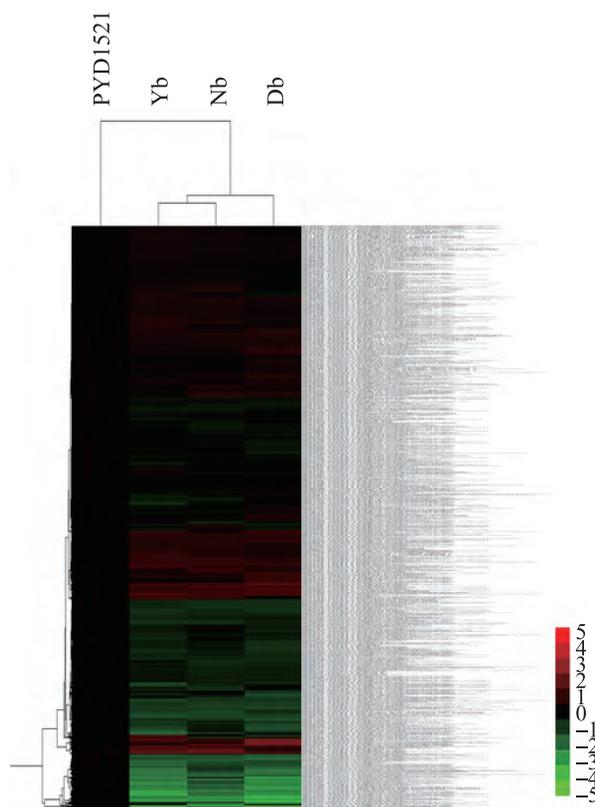


图 4 草菇菌丝和不同发育时期子实体蛋白质组的层次聚类分析

Fig. 4 Hierarchy clustering analysis for the proteome of mycelia and fruiting bodies at different development stages of *Volvariella volvacea*

注: 鉴定蛋白质不同表达变化倍数用不同颜色表示,红色代表上调,绿色代表下调,黑色代表无显著差异.

Note: The expression values for each protein were indicated by different color bars. Up-regulated, down-regulated and invariant proteins were marked in red, green and black respectively.

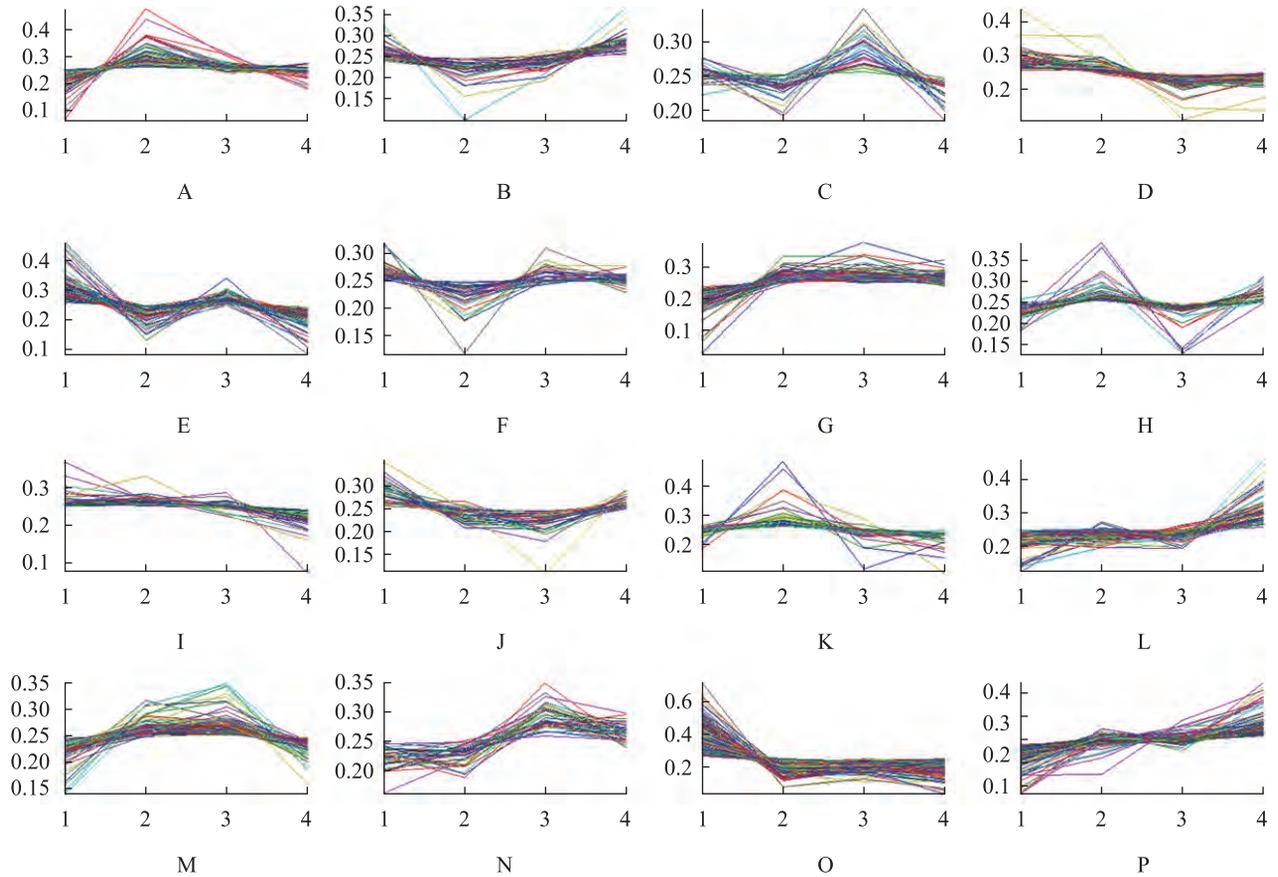


图 5 所有鉴定蛋白质的 K-均值聚类结果

Fig. 5 K-means clustering analysis for the proteome of mycelia and fruiting bodies at different development stages of *Volvariella volvacea*

注: 数字 1-4 分别表示菌丝、原基、纽扣期和蛋形期样本; 每个子图中的实线表示每个基因的表达量。

Note: Number 1, 2, 3 and 4 indicate samples of mycelia and fruiting bodies at primordium, button and egg stages respectively. The expression values for each protein were indicated by the solid lines.

## 2.8 BINGO 注释结果

结果显示, 鉴定蛋白具有较为广泛的生物学功能覆盖范围(图 6), 从生物学途径(Biological Process)中可以看出草菇在子实体形态建成过程中参与小分子代谢机制的蛋白、对化学物质和氧胁迫的应答蛋白以及乙醇代谢蛋白持续高表达, 在蛋形期中酮类代谢和乙酰辅酶 A 代谢旺盛。从

分子功能(Molecular Function)中可以看出抗氧化活性、碳水化合物代谢激酶、磷酸化修饰以及信号通路分子 *Ras* 和 *Rho* 的活性在草菇子实体发育的 3 个阶段均持续较高, 纽扣期抗氧化活性和核苷酸转移活性较高, 蛋形期中的核苷酸结合活性显著增高。该结果与子实体不同生长发育阶段的特征相一致(参见 1.2.1)。

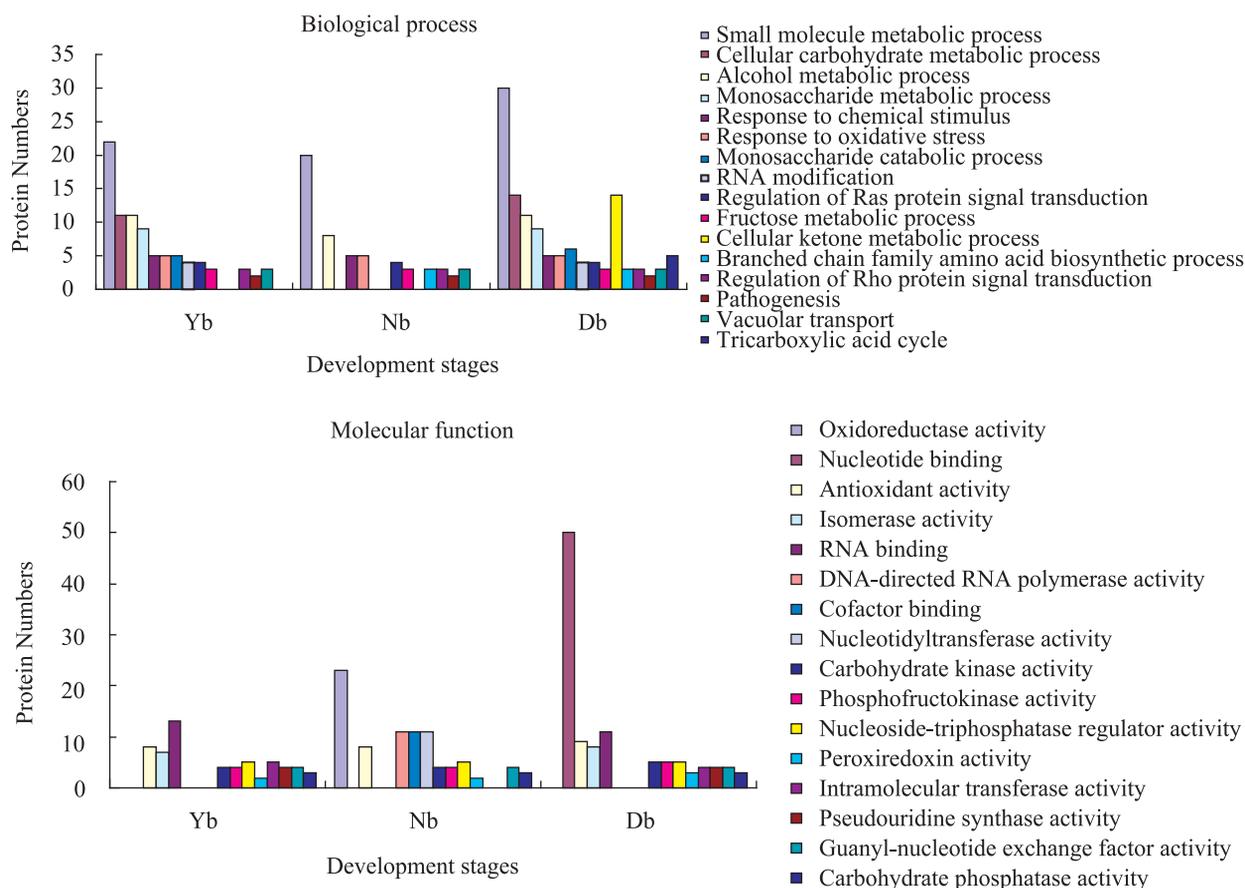


图 6 草菇不同发育时期子实体差异蛋白的 BINGO 注释

Fig. 6 BINGO analysis for differential expressed proteins of fruiting bodies at different development stages of *Volvariella volvacea*

注: Yb: 原基期; Nb: 纽扣期; Db: 蛋形期.

Note: Yb: Primordium stage; Nb: Botton stage; Db: Egg stage.

### 3 讨论

随着大量物种基因组测序的完成,人们清楚地认识到仅从基因组和转录组信息并不能完全揭示生命活动的规律<sup>[20-22]</sup>。目前作为功能基因组学研究内容之一的蛋白质组学已成为生命科学研究领域的热点和前沿<sup>[6]</sup>。iTRAQ 试剂是一种小分子同重元素化学物质,包括报告基团、肽反应基团和中间连接的平衡基团 3 个部分,不同的报告基团区分不同的样本,肽反应基团能与肽段的赖氨酸侧链和 N 端基团发生共价反应。酶解后,每个蛋白质都会产生大量肽段,理论上, iTRAQ

试剂能对每个肽段进行标记,每一个肽段都被看作是独立的测量,所有的测试都是机会均等的,因此该方法能对多个样本混合物进行准确的蛋白质相对定量研究<sup>[16]</sup>。自 Ross 等<sup>[23]</sup>首次用 iTRAQ 试剂对野生型酵母菌株和同源突变体菌株的多种蛋白质进行相对定量分析以来, iTRAQ 标记方法结合二维液相技术已成功地应用于包括大肠杆菌、酵母、人体的唾液、人类成纤维细胞和乳腺上皮细胞等多种原核和真核生物样品的蛋白质组鉴定和相对定量研究,是目前在比较蛋白质组学上应用最为广泛的标记技术之一<sup>[16-17,23-27]</sup>。本研究首先对草菇菌丝和 3 个不同发育阶段子实

体蛋白质组酶解样品进行 iTRAQ 试剂标记,之后采用二维液相色谱串联质谱对标记后蛋白质组样品分级分离鉴定,共获得 1 030 个具有定量信息的蛋白质。其中与草菇菌丝阶段相比在草菇子实体阶段具有显著表达差异的鉴定蛋白质 214 个,这一数值远大于之前通过双向电泳在食用真菌蛋白样品间获得的差异蛋白质数量<sup>[4,7-8,28-29]</sup>。与之前的相应研究报道相比,通过该方法鉴定到的蛋白还具有更广的分子量、等电点和疏水性范围,大部分差异表达蛋白质分子量为 10-100 kD,等电点为 3-12,其中以 5-7 之间最多,而疏水性介于 -1.0-0.5 之间(数据未公开发表)。

为了进一步检验 iTRAQ 标记结合纳升级液相色谱串联质谱技术在本研究中应用的实验效果,首先,通过主成分分析以解决在用统计分析方法研究多变量的课题时变量个数太多所引起的课题复杂性<sup>[30]</sup>,并基于原有变量建立的两两不相关的反映课题的原有信息的新变量信息,提取累积方差贡献率为 83.17% 的前 3 个主成分构建了蛋白质组信息分析的三维分析图。该分析结果显示来源于草菇菌丝阶段和子实体阶段的 4 个样本间的分布和聚类情况与样本的生物学特征和发育时间序列实际情况完全一致,这一结果也表明采用该 2D LC-MS/MS 鉴定方法获得的鉴定蛋白质数据能够涵盖样本生长发育的特征<sup>[23,26]</sup>。

其次,基于鉴定蛋白质组在草菇不同生长发育时期的相对表达量数据采用分层聚类分析和 K-means 算法进行分析,从而对鉴定蛋白质组数据可靠性以及是否利于后续分析和验证工作进行初步评价。分层聚类分析将数据分配进入有严格等级的层层嵌套的子集,形成的一个家谱似的树状结构(树枝的长度表示两组数据的相似程度)和通过 K-means 算法实现的较典型的逐点修改迭代的动态聚类分析结果显示在草菇不同生长发育阶段具有代表性的差异表达蛋白质群。这一分

析结果也进一步佐证了采用 iTRAQ 标记结合纳升级液相色谱串联质谱技术获得的草菇菌丝和不同发育阶段子实体蛋白质组鉴定数据的可靠性较好,该研究工作也为后续生物信息学分析和验证工作的开展奠定了较好的基础。

最后,由于在不同真核生物中的大多数基因拥有相似的主要生物学功能,因此在某些物种获得基因或蛋白质的生物学信息,可用于辅助揭示其他物种中相应的基因或蛋白质。综合这些信息的 GO 注释目前已成为功能基因生物信息学分析的核心内容之一<sup>[31-32]</sup>。因此,本研究从 Gene Ontology(GO)数据库中获取了所有鉴定蛋白的细胞学组件、生物学途径和分子功能的 GO 注释,并基于以菌丝样本为参照的差异表达蛋白层次聚类 and K-means 计算中的共趋势表达蛋白群聚类结果,利用 Cytoscape 软件中的 BiNGO 插件对每个子实体样本的差异蛋白质单独进行 GO 功能富集度计算分析和图示化。这一结果表明该鉴定蛋白质组数据具有较好的生物学功能覆盖范围,采用 iTRAQ 标记结合二维液相色谱串联质谱技术构建的草菇不同生长时期蛋白质表达谱数据为进一步探索草菇子实体形态建成机制奠定了重要基础。

综合上述实验数据和生物信息学分析结果,采用 iTRAQ 标记结合纳升级液相色谱串联质谱技术可实现对草菇菌丝和不同发育阶段子实体蛋白质组的有效分离和鉴定,该方法为深入全面地研究草菇乃至其他大型真菌的蛋白质组提供了技术保证;利用该高通量蛋白质组学研究方法建立的草菇菌丝和不同生长发育阶段子实体蛋白质组表达图谱,为后续该类大型真菌子实体生长发育机制的研究奠定了重要基础。

**致谢:** 本研究内容依托福建省食用菌工程技术研究中心、国家食用菌品种改良中心福建分中心和

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所蛋白质研究分析中心的科研平台完成。

## 参 考 文 献

- [1] Idnurm A, Heitman J. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(4): 615–626.
- [2] Terashima K, Yuki K, Muraguchi H, et al. The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light[J]. *Genetics*, 2005, 171(1): 101–108.
- [3] Park SK, Peñas MM, Ramírez L, et al. Genetic linkage map and expression analysis of genes expressed in the lamellae of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2006, 43(5): 376–387.
- [4] Sakamoto Y, Ando A, Tamai Y, et al. Pileus differentiation and pileus-specific protein expression in *Flammulina velutipes*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(1): 14–24.
- [5] Jorrín JV, Maldonado AM, Castillejo MA. Plant proteome analysis: a 2006 update[J]. *Proteomics*, 2007, 7(16): 2947–2962.
- [6] Cox J, Mann M. Is proteomics the new genomics?[J]. *Cell*, 2007, 130(3): 395–398.
- [7] 胡开辉, 黄桂英, 颜松, 等. 斑玉蕈低温胁迫下菌丝体酶活变化及差异蛋白质组学研究[J]. *菌物学报*, 2009, 28(4): 584–590.
- [8] 陆兆明, 徐祯, 王珂, 等. 双孢蘑菇耐温差异蛋白质组学研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2010, 48(4): 590–593.
- [9] Liang Y, Chen H, Tang MJ, et al. Proteome analysis of an ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* under salt shock[J]. *Mycological Research*, 2007, 111(8): 939–946.
- [10] Kahn P. From genome to proteome: looking at a cell's proteins[J]. *Science*, 1995, 270(5235): 369–370.
- [11] Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1995, 13: 19–50.
- [12] 阮松林, 马华升, 王世恒, 等. 植物蛋白质组学研究进展 I. 蛋白质组关键技术[J]. *遗传*, 2006, 28(11): 1472–1486.
- [13] Neverova I, Van Eyk JE. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 815(1/2): 51–63.
- [14] Sheng S, Chen D, Van Eyk JE. Multidimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phase of the human serum proteome[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006, 5(1): 26–34.
- [15] Dunkley TPJ, Hester S, Shadforth IP, et al. Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(17): 6518–6523.
- [16] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2004, 3(12): 1154–1169.
- [17] Wu WW, Wang GH, Baek SJ, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAI and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(3): 651–658.
- [18] 赵光辉. 草菇杂交育种研究[D]. 福建农林大学硕士学位论文, 2011.
- [19] Chang ST, Yau CK. *Volvariella volvacea* and its life history[J]. *American Journal of Botany*, 1971, 58(6): 552–561.
- [20] Abbott A. And now for the proteome...[J]. *Nature*, 2001, 409(6822): 747.
- [21] Fields S. Proteomics in genomeland[J]. *Science*, 2001, 291(5507): 1221–1224.
- [22] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 193–197.
- [23] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2005, 3(12): 1154–1169.

- [24] Hardt M, Witkowska HE, Webb S, et al. Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva: Quantitative analysis of native peptides using iTRAQ reagents[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(15): 4947-4954.
- [25] Cong YS, Fan E, Wang E. Simultaneous proteomic profiling of four different growth states of human fibroblasts, using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2006, 127(4): 332-343.
- [26] Zhang Y, Wolf-Yadlin A, Ross PL, et al. Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2005, 4(9): 1240-1250.
- [27] DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, et al. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Proteome Research*, 2005, 4(2): 377-386.
- [28] 刘晓云, 苏明声, 杨俊璋, 等. 灵芝子实体原基双向电泳和总蛋白提取方法的建立[J]. *菌物学报*, 2009, 28(6): 802-805.
- [29] 陈美元, 王泽生, 廖剑华, 等. 双孢蘑菇基质降解能力退化的差异蛋白质组学分析[J]. *菌物学报*, 2011, 30(3): 508-513.
- [30] Pedreschi R, Hertog MLATM, Carpentier SC, et al. Treatment of missing values for multivariate statistical analysis of gel-based proteomics data[J]. *Proteomics*, 2008, 8(7): 1371-1383.
- [31] Matis M, Žakelj-Mavrič M, Peter-Katalinić J. Mass spectrometry and database search in the analysis of proteins from the fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. *Proteomics*, 2005, 5(1): 67-75.
- [32] Wu XM, Zhu L, Guo J, et al. Prediction of yeast protein-protein interaction network: insights from the Gene Ontology and annotations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(7): 2137-2150.

## 稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如:  $t$  (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C-5 °C 不可写成 3-5 °C; 3%-6%不可写成 3-6%等。