

基于 LC-MS/MS 策略建立十字花科黑腐病菌蛋白质表达谱的方法研究*

Method Research of Proteomic Profile Identification on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by LC-MS/MS

岑卫健¹, 甘永亮², 于凯², 付强¹, 韦宇拓^{1,2}, 姜伯乐^{1,2**}

CEN Wei-jian¹, GAN Yong-liang², YU Kai², FU Qiang¹, WEI Yu-tuo^{1,2}, JIANG Bo-le^{1,2}

(1. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530005; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

(1. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:【目的】建立十字花科黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)的蛋白质组学研究平台, 用于分离、鉴定该菌的致病相关蛋白质。【方法】*Xcc* 8004 经过液体培养, 分别提取胞内蛋白质和胞外蛋白质, 对所有蛋白质进行液体酶解, 通过强阳离子交换色谱预分离多肽混合物, 预分离后的馏分采用 EASY-nLC 结合 LTQ-Orbitrap 质谱鉴定蛋白质表达谱。【结果】建立了基于 bottom-up 策略的蛋白质组鉴定方法, 采用第一维离子交换预分离和第二维反相色谱分离结合, 实现了高通量鉴定蛋白质组表达谱的技术体系。通过 SEQUEST 检索, 在胞内蛋白质样品中共鉴定蛋白质数目为 1595 个, 胞外蛋白质样品共鉴定蛋白质数目为 1241 个。【结论】建立的 LC-MS/MS 方法适合用于十字花科黑腐病菌蛋白质组学的研究, 为研究微生物植物相互作用奠定了方法与理论基础。

关键词: *Xcc* 蛋白质表达谱 LC-MS/MS LTQ-Orbitrap

中图分类号: Q-331 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2014)02-0103-05

Abstract: 【Objective】A proteomics technical platform of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) was established for the separation and identification of pathogenic bacteria associated proteins. 【Methods】The intracellular proteins and extracellular proteins of *Xcc* 8004 strains were extracted after liquid cultured. After in-solution digestion of total proteins, the peptides mixtures were separated by strong cation exchange (SCX) column. The proteome profiles were acquired by EASY- nLC combined LTQ-Orbitrap mass spectrometer. 【Results】Based on bottom-up method, the proteins were analyzed by cation exchange column and nanoflow reversed-phase liquid chromatography. The high proteomic profile identification was realized. The

mass spectrometry data were searched with SEQUEST. As a result, a total of 1595 proteins were obtained from intracellular proteins and a total of 1241 proteins were obtained from extracellular proteins. 【Conclusion】LC-MS/MS workflow could be utilized successfully in the proteomics research of *Xcc* pathogenesis, which provides the basis for studying the interaction of microbe and plant.

Key words: *Xcc*, proteome profile, LC-MS/MS, LTQ-Orbitrap

收稿日期: 2014-03-26

修回日期: 2014-03-31

作者简介: 岑卫健(1982-), 女, 实验师, 主要从事大型仪器的管理及技术指导研究。

* 广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019097), 广西大学科研项目(XJZ130364), 广西研究生教育创新计划项目(T32401)资助。

** 通讯作者: 姜伯乐(1971-), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事植物病理学方面的研究。E-mail: jbl1971@gxu.edu.cn.

【研究意义】十字花科黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 又称野油菜黄单胞菌野油菜致病变种,是一种能在全球范围内引起所有十字花科黑腐病的重要植物病原细菌^[1]。弄清植物病原微生物致病分子机理是有效控制病害的前提。

【前人研究进展】目前, *Xcc* 已经完成了全基因组的测序,这些基因组信息为我们从分子水平全面认识植物病原微生物的致病机理奠定了基础。*Xcc* 注释预测的与致病性相关的基因大约 300 个,鉴定致病蛋白并研究其功能,对于阐明病原菌的致病机理、寄主范围、分子进化以及鉴定药物靶标具有极其重要的意义^[2]。

【本研究切入点】蛋白质组学不仅研究特定细胞、组织、体液及亚结构中的蛋白质,而且还研究蛋白质异构体、翻译后修饰及其相互作用等,其中基因组、转录组和蛋白质组之间的关联也是蛋白质组学研究的一项重要内容。虽然常用的 2-DE 技术可以有效地结合胶上提取酶切和质谱技术,实现对几千种蛋白的分离和分析,但是由于其有限的动态范围及对极端蛋白的歧视等因素,限制了该方法的进一步发展。因此,基于多维液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)的 shot-gun 技术^[3,4]迅速发展,并广泛应用于蛋白质表达谱、修饰谱、蛋白复合物及药物检测等的研究中^[5~7]。**【拟解决的关键问题】**目前鉴定的植物病原菌致病因子包括胞外多糖(EPS)、脂多糖(LPS)、胞外酶、植物毒素、III 型效应物(T3SE)等^[8],而很多致病因子都是低丰度蛋白。因此,建立高通量高分辨率的 *Xcc* 蛋白表达谱显得更为重要。本研究拟通过 HPLC 阳离子交换柱分离多肽,采用 EASY-nLC 结合 Orbitrap 质谱鉴定 *Xcc* 各组分的蛋白表达谱,为下一步鉴定致病相关因子和研究微生物-植物互作提供方法学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株:本研究使用菌株为 *Xcc* 8004 野生型^[1]。

仪器:LTQ Orbitrap 高分辨率质谱仪(美国 Thermo 公司),液相色谱仪(美国 Waters 公司),紫外分光光度计(美国 PE 公司),冷冻高速离心机(美国 Beckman 公司),台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),超纯水仪(美国 Millipore 公司),数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),PolyLC SCX 阳离子交换柱,Thermo Scientific EASY-nLC 1000 纳升级液相色谱,Scientific Orbitrap Elite 组合式质谱,北京六一仪器厂电泳设备。

试剂:CHAPS、PMSF、丙烯酰胺等购自 Amres-

co 公司,二硫苏糖醇(DTT)、碳酸氢铵、氯化钠、三氟乙酸(TFA)、吡啶-3-乙酸(IAA)、磷酸二氢钾、胰蛋白酶均购自美国 Sigma 公司,乙腈购自 Thermo 公司,10 kD 超滤管购自 Millipore 公司,所有使用水均使用 Millipore 过滤的超纯水。

NYGB 培养基:蛋白胨 5g,酵母提取物 3g,甘油 20g,定容至 1L,调节 pH 值为 7.0,用于扩大培养。

XCM2 培养基:磷酸氢二钾 10.5g,磷酸二氢钾 4.5g,琥珀酸 2.36g,水解酪蛋白 0.15g,定容至 1L,调节 pH 值为 6.6~7.0,使用前加入终浓度为 0.01mmol/L 硫酸镁,用于诱导培养。

1.2 方法

1.2.1 菌种培养

接一环 *Xcc* 8004 于 10mL NYGB 培养基中,28℃,200rpm 摇床培养 16h 至 $OD_{600} = 0.6$ 左右;按 5% 转接量转接于新鲜 NYGB 培养基中,28℃,200rpm 摇床扩大培养 4~6h,至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$;用 50mL 离心管分装后,4000rpm,10min 离心收集菌体,用 NYGB 培养基洗涤菌体 2~3 次,再用 XCM2 培养基洗涤菌体 1 次,适当调节 OD_{600} ;按 5% 转接量转接于 XCM2 培养基中,28℃,200rpm 摇床培养 12h。

1.2.2 蛋白样品制备

(1) 胞内蛋白的制备

取培养好的菌液 1mL 于离心管中,12000rpm 离心收集菌体,0.9% NaCl 洗涤菌体 2 次,加入裂解液冰上裂解 30min,超声波破碎,12000rpm,4℃ 离心取上清,加入 3 倍体积预冷的丙酮于 -20℃ 沉淀过夜,12000rpm,10min 离心沉淀蛋白,将得到的沉淀块晾干去除残留的丙酮后,用适量的 100mmol/L 三乙胺-碳酸缓冲液(TEAB)溶解,BCA 法测定蛋白浓度后 -20℃ 保存备用。

(2) 胞外蛋白的制备

将诱导培养好的菌液转移至 500mL 离心管中,8000rpm,20min 离心,收集上清,加入蛋白酶抑制剂 PMSF 后,用 22 μ m 的细菌过滤器过滤除菌;无细胞上清通过 Millipore 的 10kD 超滤管浓缩至 5mL 左右;浓缩后的蛋白粗液用 4:1 的氯仿/正丁醇抽提^[9],收集两相之间的沉淀块即为分泌蛋白;将得到蛋白沉淀块用适量的水化液复溶,再加入 3 倍体积预冷的丙酮 -20℃ 沉淀过夜;12000rpm,10min 离心沉淀蛋白,将得到的沉淀块晾干去除残留的丙酮后,用适量的 100mmol/L 的 TEAB 溶解,BCA 法测定蛋白浓度后 -20℃ 保存备用。

1.2.3 蛋白样品酶解

变性:取 100 μ g 蛋白样品,加入 5 μ L 2% SDS, 5 μ L 200mmol/L 磷酸三(2-氯乙基)酯 (TCEP),补水至 100 μ L 后,55 $^{\circ}$ C 孵育 1h; 烷化:加入 5 μ L 375mmol/L IAA,室温避光孵育 30min;加入 3~6 倍体积的预冷丙酮,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 3h 或过夜;酶解:8000rpm,10min 离心沉淀蛋白,将得到的沉淀块晾干去除残留的丙酮,用 100 μ L 100mmol/L TEAB 溶解沉淀,加入 2.5 μ L 胰蛋白酶(1 μ g/ μ L),37 $^{\circ}$ C 酶解过夜。

1.2.4 HPLC 阳离子交换分离多肽

蛋白样品经液体酶解,真空抽干,复溶于流动相 A(10mmol/L 磷酸二氢钾,20% ACN),使用 SCX 强阳离子交换柱作为第一维分离,收取 6 个分离馏分。液相条件:色谱柱:SCX 阳离子交换柱(5 μ m,100mm \times 2.1mm);流动相 A:10mmol/L 磷酸二氢钾,20% 乙腈;流动相 B:10mmol/L 磷酸二氢钾,500mmol/L 氯化钾,20% 乙腈;流速:0.3mL/min;梯度:0~15min,0% B;15~50min,0~40% B;50~55min,40%~100% B;55~63min,100% B;63~65min,100%~0% B;检测波长为 214nm。

1.2.5 EASY-nLC 结合 Orbitrap 质谱分析

第一维分离得到的 6 个馏分的肽段,经过脱盐处理,真空抽干,重溶于流动相 A(10% ACN)采用 LC-MS/MS 分析,液相条件:色谱柱:C18 反相毛细管柱;流动相:A:2% 乙腈+0.1% 甲酸;B:98% 乙腈+0.1% 甲酸;流速:300nL/min;梯度:0~5min,5% B;5~50min,5%~35% B;50~52min,35%~100% B;52~55min,100% B。

质谱条件:电喷雾电压 1.5kV,采用正离子模式 Orbitrap 检测一级全谱,扫描分辨率为 60000;质量扫描范围是 $m/z=350\sim 2000$;10 个 LTQ 二级质谱用 CID 碰撞模式完成,二级扫描分辨率为 15000;串联质谱 CID 碰撞能量是 35% 归一化能量,数据依赖的自动化模式采集信号。将质谱结果在 NCBI 下载的 Xcc 8004 蛋白数据库中进行检索,数据库检索软件为 SEQUEST。

2 结果与分析

2.1 蛋白样品的质量检测

按照 1.2.2 所述的蛋白提取方法,分别制备胞内及胞外蛋白样品,经过 BCA 方法测定蛋白浓度,取 10 μ g 蛋白样品及酶解之后的样品上 SDS-PAGE 胶(图 1)。结果表明,提取的蛋白样品条带清晰,样品经酶解后,没有残余的蛋白条带,表明酶解充分,符合

下一步的质谱鉴定。

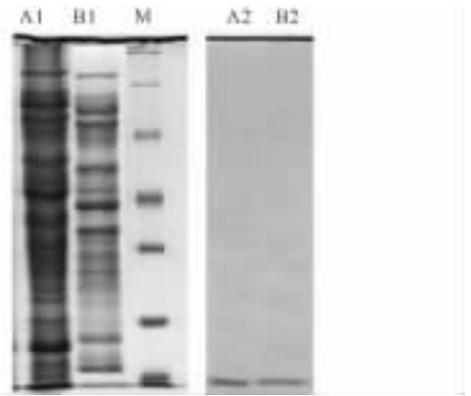


图 1 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 Chromatogram of SDS-PAGE

A1: 胞内蛋白;B1: 胞外蛋白;M: 蛋白标品;A2: 酶解后的胞内蛋白;B2: 酶解后的胞外蛋白

A1: Intracellular protein; B1: Extracellular protein; M: Protein marker; A2: Digested of intracellular protein; B2: Digested of extracellular protein.

2.2 质谱条件的优化

蛋白样品进行酶解处理后,HPLC 阳离子交换柱分离多肽,经 EASY-nLC 分离后结合 Orbitrap Elite 质谱进行分析,通过改变流动相 A 和流动相 B 的比例优化色谱分离条件,色谱条件优化后的总离子流图见图 2。在色谱条件不变的情况下,将对照品牛血清白蛋白(BSA)的酶解样品分别采用 CID 和 HCD 两种不同的碰撞模式,得到了不同的肽段覆盖率。在 CID 模式下,牛血清白蛋白的覆盖率达到了 76.11%,而在 HCD 模式下覆盖率只有 50.08%,表明采用 CID 的碰撞模式得到的肽段覆盖率较高,结果见表 1。

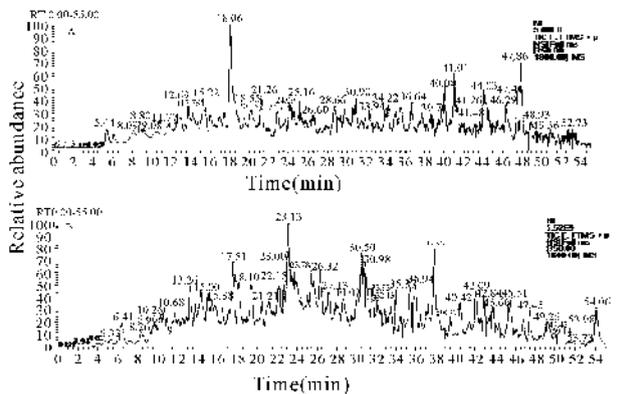


图 2 LC-MS/MS 离子总流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of LC-MS/MS

A: 胞内蛋白样品;B: 胞外蛋白样品

A: Intracellular proteins ; B: Extracellular proteins

2.3 蛋白的鉴定

液体酶解样品采用 HPLC 经 SCX 柱进行分离,收集 6 个多肽馏分,每个馏分分别进样 EASY-nLC

分离后结合 Orbitrap Elite 质谱分析,将质谱结果与 NCBI 下载的 Xcc 8004 蛋白数据库通过 SEQUEST 检索,在胞内蛋白样品中得到了 1595 个蛋白,胞外蛋

白样品中得到 1241 个蛋白,表 2 中列出了胞内蛋白样品部分蛋白的质谱鉴定数据。

表 1 不同碰撞模式下的 BSA 肽段覆盖率(%)

Table 1 BAS peptide coverage on different types of activation

碰撞模式 Activation type	登录号 Accession number	名称 Description	分值 Score	覆盖率 Coverage (%)	唯一肽段数 Unique Peptides	总肽段数 Total peptides
CID	30794280	牛血清白蛋白 Serum albumin precursor [Bos taurus]	2824.51	76.11	2	59
	94966811	α 1-酸性糖蛋白前体 alpha-1-acid glycoprotein precursor [Bos taurus]	41	35.64	1	8
HCD	30794280	牛血清白蛋白 Serum albumin precursor [Bos taurus]	254.11	50.08	1	30
	94966811	α 1-酸性糖蛋白前体 alpha-1-acid glycoprotein precursor [Bos taurus]	2.13	4.46	1	1

表 2 部分胞内蛋白质谱结果列表

Table 2 Several intracellular proteins from MS results

登录号 Accession number	名称 Description	分值 Score	覆盖率 Coverage(%)	唯一肽段数 Unique peptides	总肽段数 Total peptides	氨基酸长 AAs	分子量 MW[kDa]	等电点 Calc. pI
66768044	热休克蛋白 90 Heat shock protein 90	124.86	100.00	11	123	634	70.8	5.27
66769844	转录调控因子 NrdR Transcriptional regulator NrdR	25.93	100.00	1	37	174	19.9	7.37
66767769	LysR 家族转录调控因子 LysR family transcriptional regulator	4.28	99.68	1	37	310	34.3	7.37
66768531	依赖 ATP 的 Clp 蛋白酶亚基 ATP-dependent Clp protease subunit	15.17	81.27	4	40	331	36.62	8.54
66769380	HrpX 蛋白 HrpX protein	1.69	81.93	1	57	476	52.2	8.09
66769381	HrpG 蛋白 HrpG protein	10.31	71.76	1	29	262	29.1	7.88
66767105	双组分系统感受蛋白 Two - component system sensor protein	7.76	69.68	1	53	498	54.2	7.75
66767983	GumC 蛋白 GumC protein	11.72	77.28	1	63	449	50.4	6.44
77761273	DNA 修复蛋白 RadA DNA repair protein RadA	29.90	78.02	2	50	330	48.7	7.15
66770139	NADH dehydrogenase	40.4	79.03	4	72	744	79.0	6.60
66768646	应激调控因子 RpfG Response regulator RpfG	9.20	76.98	1	41	378	42.1	5.55
66770446	乙酰辅酶 A 合成酶 Acetyl-CoA synthetase	48.83	74.19	6	73	647	71.4	5.69

3 结论

2001年, Mehta 和 Rosato 首次建立了 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 在寄主体内增殖, 再回收菌体进行 2D-PAGE 蛋白组差异鉴定细菌致病相关蛋白的方法^[10]。Andrade 等对寄主内生生长的 *Xcc* 菌株进行回收, 并通过 2D-PAGE 对其蛋白表达谱进行分析, 建立了 *Xcc* 与寄主互作的蛋白组研究方法^[11]。对不同状态下的蛋白质在表达和修饰水平上进行精确定量, 对于探索蛋白质的生物功能、发现疾病的生物标志物都具有重要意义, 也是当前蛋白质组学的一个重要研究前沿。LC-MS/MS 是近年来用于定量蛋白质组学研究的主要技术。与质谱技术结合可以研究细胞和组织等在不同的生理状态下蛋白质水平的差异, 可以同时多个样品进行定量比较, 尤其适用于观察不同生理、病理过程中蛋白质组的动态变化^[12]。本研究通过 HPLC 阳离子交换柱分离多肽, 采用 EASY-nLC 结合 Orbitrap 质谱鉴定了一大批蛋白质, 成功建立了适合于鉴定十字花科黑腐病菌的不同组分内蛋白表达谱的实验技术方法, 为深入研究植物病原细菌的致病分子机理, 筛选潜在的细菌药物靶标奠定基础。

参考文献:

[1] Daniels M J, Barber C E, Turner P C, et al. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1[J]. EMBO J, 1984, 3(13): 3323-3328.

[2] Nomura K, He S Y. Powerful screens for bacterial virulence proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 3527-3528.

[3] John R, Yates III. Mass spectrometry and the age of the proteome[J]. J Mass Spectrom, 1998, 33(1): 1-19.

[4] Link A J, Eng J, Schieltz D M, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 676-682.

[5] Schirmer E C, Florens L, Guan T, et al. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics[J]. Science, 2003, 301(5638): 1380-1382.

[6] Andersen J S, Wilkinson C J, Mayor T, et al. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling[J]. Nature, 2003, 426(6966): 570-574.

[7] 潘艳坤, 莫建光, 韦英亮, 等. 高效液相色谱——串联质谱法测定青刀豆中毒死蜃代谢物磷酸二乙酯[J]. 广西科学, 2012, 19(4): 348-351.

Pan Y K, Mo J G, Wei Y L, et al. Determination of chlorpyrifos metabolite DEP in green string bean using HPLC-MS/MS[J]. Guangxi Sciences, 2012, 19(4): 348-351.

[8] Martin G B, Bogdanove A J, Sessa G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54: 23-61.

[9] Wang J Z, Wang F Z, Shang J J, et al. An efficient method for extraction of secreted proteins of a filamentous fungus, *Cryphonectria parasitica* [J]. J Proteomics Bioinform, 2011, 4(6): 125-128.

[10] Mehta A, Rosato Y B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant [J]. Proteomics, 2001, 1(9): 1111-1118.

[11] Andrade A E, Silva L P, Pereira J L, et al. *In vivo* proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 281(2): 167-174.

[12] Unwin R D, Pierce A, Watson R B, et al. Quantitative proteomic analysis using isobaric protein tags enables rapid comparison of changes in transcript and protein levels in transformed cells[J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(7): 924-935.

(责任编辑: 陆雁)