

## 真菌可溶性蛋白简易制备方法

白玉明 樊凌雯\* 褚西宁

(山西大学生命科学系 太原 030006)

**摘要** 用固体培养物冻融法制备了8株真菌的可溶性蛋白样品,并进行了蛋白含量测定与电泳图谱比较分析。结果表明,供试菌样中蛋白含量高且较稳定,可溶性蛋白和酯酶同工酶电泳图谱的分离效果尚好,能分辨同种相关菌株间的差异而满足分类比较研究的一般要求;培养基空白样中虽含有一些蛋白,但电泳后不能形成可分辨的谱带

**关键词** 真菌,可溶性蛋白,固体培养物冻融,电泳图谱

微生物的可溶性蛋白及酯酶同工酶电泳图谱比较分析已成为分类研究中广泛采用的一种有效手段。文献报道中大多将液体培养的菌体分离、冷冻后再长时间研磨来制备可溶性蛋白样品<sup>[1-4]</sup>,这种制样方法操作繁琐且样品中蛋白含量波动较大。我们曾用固体培养物冻融法制备7株根霉的可溶性蛋白,并与菌丝体冷冻研磨样进行了三种电泳图谱的平行比较,取得了满意的结果<sup>[5]</sup>。本文报道对不同种类的8株真菌固体培养物冻融样及培养基空白样中的蛋白含量和电泳图谱比较分析结果,旨在证明推广应用这种简易制样方法的可行性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试菌株

所用8个菌株为本实验室收藏,依次为:

- (1) 米曲霉 *Aspergillus oryzae* AS. 3.951,
- (2) 米曲霉 *Asp. oryzae* AS. 3.800, (3) 串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme* AS. 3.2897,
- (4) 串珠镰刀菌 *F. moniliforme* AS. 3.2835,
- (5) 绳状青霉 *Penicillium funiculosum* AS. 3.3875, (6) 常见青霉 *P. frequentans* AS. 3.2556, (7) 白地霉 *Geotrichum candidum* AS. 2.498, (8) 扣囊拟内孢霉 *Endomycopsis fibuligera* AS. 2.1145。

#### 1.2 培养方法

1.2.1 斜面培养基(%) : 葡萄糖2, 蛋白胨1, 酵母粉0.5, 琼脂2, 自然pH, 121℃, 30min 湿热灭菌。

1.2.2 固体培养基(BHS) 麸皮: 米糠: 液体培养基(GPY) = 1: 1: 2 (GPY为斜面培养基不加琼脂), 自然pH, 按每150ml三角瓶10g湿料分装, 121℃ 30min 湿热灭菌。

1.2.3 培养条件 均采用26—28℃恒温静置培养, 斜面菌种培养2—3d, 固体培养物培养至基质中长满菌丝。

#### 1.3 样品制备

1.3.1 供试菌样<sup>[5]</sup> 供试菌固体培养物收获后经-20—-30℃冷冻过夜, 每瓶加15ml缓冲液(0.05mol/L Tris-HCl, pH 6.8), 室温融溶2—3h, 间或摇荡, 双层纱布过滤, 15000r/min离心20min, 取上清液即为可溶性蛋白样品。

1.3.2 培养基空白样: 制备GPY、BHS及麸皮固体培养基(BS, 麸皮: 水=1: 1)、麸皮豆粕固体培养基(BBS, 麸皮: 豆粕: 水=0.8: 0.2: 1) 平行2份, 1份不灭菌也不经保温培养, 1份灭菌并保温培养, 均按冻融法操作制样。

## 1.4 蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝色素结合法<sup>[6]</sup>,以牛血清白蛋白(BBA)为标准品,标准曲线回归方程为:

$$A_{595nm}^{1.0\%} = 12.87 \pm 0.36 \quad (r = 0.9985).$$

## 1.5 PAGE

分离胶 7.5%, 浓缩胶 3.5%, 样品按 200 $\mu$ g 蛋白/孔上样,空白样中凡上样量不足的均上样至样孔最大容许量(约为 100 $\mu$ l/孔),BBA 标品上样量为 10—20 $\mu$ g/孔,恒流电泳 4.0—4.5h。

## 1.6 染色与脱色

1.6.1 可溶性蛋白:考马斯亮蓝 R250 染色,冰乙酸-甲醇混合水溶液脱色<sup>[7]</sup>。

1.6.2 酯酶 Fast Blue RR 染色,30%乙醇中固定<sup>[8]</sup>。

## 1.7 相关菌株相似性综合分析<sup>[3,4]</sup>

相关菌株间电泳迁移率相同的蛋白和酶带数为  $N_s$ , 不同的为  $N_d$ , 按下式求得相似系数  $S_m$ , 根据  $S_m$  值判断相关菌株间的相似性:

$$S_m = \frac{N_s}{N_s + N_d}$$

# 2 结果与讨论

## 2.1 培养基空白样中的蛋白

用固体培养物冻融法制备真菌可溶性蛋白样品时,菌体与培养基质不能分离处理,如果培养基空白样电泳后有蛋白带出现,就很难说不会干扰供试菌样的电泳图谱。我们已经证明用麸皮(BS)固体培养物冻融制备根霉可溶性蛋白样品时,空白样中未出现可分辨的电泳谱带,几个供试菌株的固体培养物冻融样与菌丝体冷冻研磨样的电泳图谱分辨结果完全一致<sup>[5]</sup>。为了进一步考察改变培养基组分后、尤其是加大培养基中的蛋白含量后的空白样,我们以 BBA 标准液(按 1mg/ml 配制)为参照,对本试验中所用的两种培养基(GPY 和 BHS)以及 BS、BBS 一道进行了蛋白含量测定与电泳试验,结果表明(表 1 和图 1),BS、BHS 和 BBS 三种固体培养基的两种不同处理空白样中蛋白

含量及电泳图谱都差异甚大。灭菌后的空白样(1)中的蛋白含量仅为未灭菌样(0)中的 20—30%,三种未灭菌样(0)除背景深度着色外,均出现了可分辨的谱带,尤其 BBS(0)中的几条谱带甚为显著,但灭菌样(1)不仅谱带全部消失,背景着色程度也大大减低,加之接入的菌种在生长过程中会吸收利用培养基中的一些肽成分,培养基中的蛋白基本不会对供试菌的

表 1 培养基空白样中的蛋白含量测定结果

样品	处理方法	蛋白绝对含量(mg/ml)	蛋白相对含量(%)
BBA0	未处理	1.01	100
BBA1	离心	0.82	81
BBA2	灭菌、离心	0	0
GPY0	冻融、离心	0.02	0.2
GPY1	灭菌、培养、冻融、离心	0	0
BS0	冻融、过滤、离心	4.24	100
BS1	灭菌、培养、冻融、过滤、离心	1.08	25
BHS0	冻融、过滤、离心	2.20	100
BHS1	灭菌、培养、冻融、过滤、离心	0.66	30
BBS0	冻融、过滤、离心	8.80	100
BBS1	灭菌、培养、冻融、过滤、离心	1.98	23

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

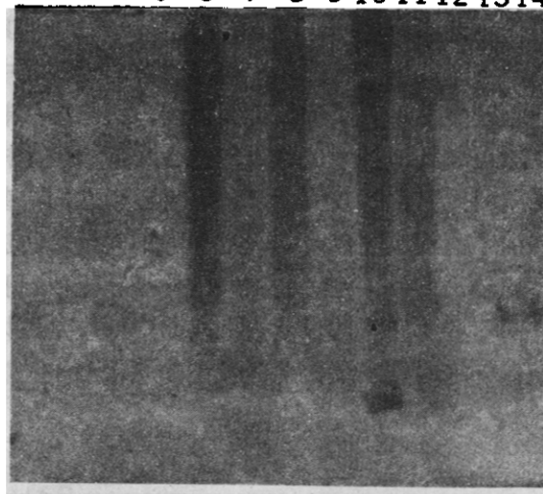


图 1 BBA 及几种培养基空白样蛋白电泳图谱

点样顺序: 1. BBA1; 2. BBA0; 3. BBA2; 4. GPY0; 5. GPY1; 6. BS0; 7. BS1; 8. BHS0; 9. BHS1; 10. BBS0; 11. BBS1; 12. BBA2; 13. BBA0; 14. BBA1。(1、2 号孔中 BBA 点样 10 $\mu$ l, 13、14 号孔中 BBA 点样 20 $\mu$ l)。

蛋白电泳图谱造成干扰。BBA 标液经灭菌及离

心处理后(2)蛋白基本被完全除掉,而仅以离心处理后(1)则没有发生电泳谱的明显变化。我们认为,导致培养基空白样中的蛋白出现上述变化的主要原因是高温灭菌处理时发生的蛋白热凝变性作用,大部分变性蛋白在过滤、离心时被除掉,剩余的一些分子量随机分布的肽片段,使背景有一定程度的均匀着色而不能形成明显的蛋白电泳谱带。GPY中虽含有较多蛋白胨(10mg/ml),但即使未经灭菌处理的样(0)中,也基本无电泳谱带出现,蛋白检出率仅为0.2%,这可能是考马斯亮蓝对蛋白胨着色能力差所致。总之,对培养基空白样中蛋白组分的考察结果,既为本试验工作提供了可靠的基础,也为今后采用其它固体培养基冻融制备真菌可溶性蛋白提供了参考依据。

## 2.2 供试菌样的蛋白含量

对8株供试菌样的蛋白含量测定结果如表2,从中可见所制备的供试菌样中蛋白含量高而稳定。在3批24个样品中,蛋白含量值大于2mg/ml的有20个,占到83%,蛋白含量变异范围为0.30—2.46mg/ml。在采用液体培养的菌丝体冷冻研磨制样时,蛋白含量波动更大,其原因可能是因菌丝球大小差异使离心收获物中含水量多寡不一所致。用固体培养物冻融法制样时可较好地控制培养物中的含水量,因此样品中的蛋白含量较为稳定,较有利于在同一菌株的不同批次间以及同一批次的不同菌株间进行比较。另外用该法制样时已分泌和释放到胞外的一些酶和蛋白也能进入样品,这应是固体培养物冻融样中蛋白含量较高的原因之一。

表2 三批供试菌样中蛋白含量测定  
统计分析表 (mg/ml)

菌号	1	2	3	4	5	6	7	8
X	4.09	3.07	2.35	3.71	1.98	2.77	2.70	3.23
±Sn	0.77	0.37	0.15	1.03	0.49	1.41	0.10	1.73
变异范围	0.30—2.46							

## 2.3 供试菌样的电泳图谱

2.3.1 可溶性蛋白图谱: 8株供试菌的可溶性蛋白图谱如图2,分离效果基本能令人满意,谱

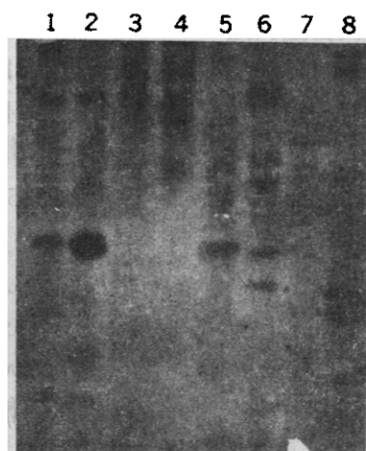


图2 8个供试菌样的可溶性蛋白图谱

带数目为8—11条。与其它真菌的可溶性蛋白谱带数多为10—20条的情况相比<sup>[3,4,9,10]</sup>,谱带数目似显偏少。但我们认为这并非由冻融制样操作所致,在我们已对比试验过的7株根霉中,固体培养物冻融样的可溶性蛋白谱带数目均有所增多<sup>[5]</sup>。培养条件尤其是培养基对可溶性蛋白图谱有较大的影响<sup>[3]</sup>,如果不是菌种本身代谢特性所致的话,通过选择更为合适的培养基或许会使谱带数偏少的情况得以改善。

2.3.2 酯酶同工酶谱: 8株供试菌的酯酶同工酶谱如图3,谱带清晰,数目为2—9条,这与其它真菌酯酶同工酶谱带数多为2—10条的情况甚为相符<sup>[4,10—13]</sup>。

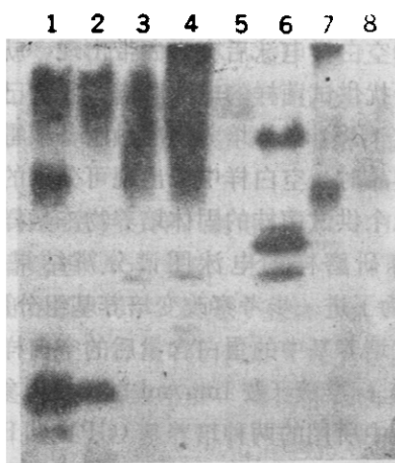


图3 8个供试菌样的酯酶同工酶谱

## 2.4 相关菌株的相似性综合分析

在 8 个供试菌株中, 1 与 2, 3 与 4 为同种相关, 5 与 6 为同属相关。从图 2、图 3 中已可看出电泳图谱的相似性与供试菌株间的相关性是基本一致的。对上述 3 对相关菌株两种电泳图谱相似性的综合分析结果如表 3。从中可以看出固体培养物冻融样能完全把同属相关的 5、6 号菌株加以区别, 也能分辨 1 与 2、3 与 4 同种相关菌株间的差异, Sm 值与预期值是比较吻合的。

表 3 三对供试相关菌株的相似水平

相关菌株	1, 2	3, 4	5, 6
相关等级	同种	同种	同属
Ns	.28	26	8
Nd	7	5	18
Sm	0.80	0.84	0.31
相似水平	非常相似	非常相似	不相似

总之, 从上述实验结果可以看出, 将固体培养物冻融制备真菌可溶性蛋白的方法进一步推广应用是基本可行的, 所得样品的电泳图谱有较好的分辨能力且有很好的重复性, 可满足真菌分类研究的一般要求。该方法简便易行, 尤其适宜于在供试菌株多时的制样操作, 而目前文献中未见同类报道, 谨将此法介绍给同行, 诚望在推广应用中经受更广泛的检验并得到进一

步的发展与完善。

致谢 本系袁静明教授参与初稿讨论与修改, 金晓弟工程师协助拍照, 谨此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Chang L Q, Stewards F C. Nutare. 1962, 193: 756—759.
- [2] Glyn A N, J Reid. Can J Bot. 1969, 47 (2): 1823—1831.
- [3] Huang He, Yu Ming-jiu. Mycosystema, 1988, 1: 61—71.
- [4] 褚西宁, 白玉明, 袁静明. 真菌学报, 1994, 13 (2): 121—126.
- [5] 白玉明, 金晓弟, 褚西宁. 山西大学学报 (自然科学版), 1994, 17 (3): 336—340.
- [6] [日] 菅原洁, 副岛正美. 蛋白质定量法 (第二版, 张旭译), 北京: 农业出版社, 1981, 186—188.
- [7] 朱广廉, 杨中汉. 植物生理通讯, 1982, 2: 43—47.
- [8] 张志良, 吴光耀. 植物生物化学技术与方法, 北京: 农业出版社, 1988, 93—95.
- [9] 徐敬友, 陆家云, 方中达. 真菌学报, 1993, 12 (1): 54—64.
- [10] 卢乡怀, 李明霞. 真菌学报, 1990, 9 (1): 50—55.
- [11] 赵桂东, 李清锐. 真菌学报, 1993, 12 (2): 163—170.
- [12] 陈都珍, 成恒嵩, 寇晓黎. 真菌学报, 1987, 6 (1): 34—41.
- [13] Roux P, Labarare J. Experimental Mycology. 1990, 14 (2): 101—112.