



研究报告

沈阳地区北虫草野生与市售菌株人工培育子实体的蛋白质组学比较

齐贺^{1,2} 王千慧¹ 刘颖¹ 卜桐¹ 黄竹青¹ 付赵军¹ 张帆¹ 郑剑玲^{*1}

1 辽宁省基础医学研究所 辽宁 沈阳 110101

2 辽宁中医药大学 辽宁 沈阳 110032

摘要:【背景】北虫草作为冬虫夏草的代用品,具有与冬虫夏草类似的药理活性,其富含的蛋白质和氨基酸通常作为衡量真菌营养价值的重要指标,从中分离纯化具有潜在临床应用价值的蛋白质或多肽,已成为一个研究热点。【目的】检测沈阳北虫草野生与市售菌株人工培育子实体的蛋白质组成,分析相同培育条件下获得的蛋白种类、数量及其功能的差异,为深入研究鉴定沈阳地区北虫草药用蛋白和针对性驯化提供了蛋白质组学数据基础。【方法】采集沈阳棋盘山野生北虫草菌株,与市售人工栽培北虫草菌株同期分别经组织分离、液体发酵后培育获得子实体,通过蛋白提取、胰酶酶解后,采用非标定量技术液相色谱-质谱联用方法,对野生和市售来源培育的子实体样本进行定量蛋白组的研究。【结果】共鉴定到9233条特异性肽段和1923个蛋白,其中含有1163个可定量蛋白,野生来源培育子实体有214个蛋白表达发生上调,181个蛋白表达发生下调,对这些差异蛋白进行功能富集分析发现,其主要参与能量生产/转换、氨基酸转运/代谢、抗氧化功能。在相同的营养摄取条件下,野生来源培育菌种在各个能量代谢、氨基酸代谢功能中的相关蛋白表达量高于市售来源培育的菌种。野生来源培育菌种的一种抗氧化重要蛋白(Gene Name: *ISF_02112*)表达量远远高于(Fold Change>9)市售来源培育菌种。同时与抗氧化和代谢功能相关的差异蛋白有22个。【结论】沈阳地区北虫草野生菌株经适当人工培育会保留部分优良的生物学特性,2种来源菌株培育的子实体具有丰富及优异抗氧化功能的蛋白,子实体蛋白的抗氧化能力与其整体代谢能力相关。本研究结果为深入研究鉴定北虫草药用蛋白和针对性驯化提供蛋白质组学数据基础。

关键词: 北虫草, 子实体, 蛋白质组学

Foundation items: Natural Science Foundation of Liaoning Province (20170540486); Project of Science and Technology Research of Liaoning Province (L201901)

***Corresponding author:** Tel: 86-24-89800426; E-mail: zhengjiandr@hotmail.com

Received: 18-07-2020; **Accepted:** 13-11-2020; **Published online:** 26-02-2021

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20170540486); 辽宁省科学技术研究项目(L201901)

***通信作者:** Tel: 024-89800426; E-mail: zhengjiandr@hotmail.com

收稿日期: 2020-07-18; **接受日期:** 2020-11-13; **网络首发日期:** 2021-02-26

Proteomics comparison of cultivated fruiting bodies of wild and commercial strains of *Cordyceps militaris* in Shenyang

QI He^{1,2} WANG Qianhui¹ LIU Ying¹ BU Tong¹ HUANG Zhuqing¹ FU Zhaojun¹
ZHANG Fan¹ ZHENG Jianling^{*1}

1 Liaoning Institute of Basic Medicine, Shenyang, Liaoning 110101, China

2 Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China

Abstract: [Background] As a substitute of *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris* has similar pharmacological activities with *Cordyceps sinensis*. It is rich in protein and amino acids, which is usually used as an important index to measure the nutritional value of fungi. It has become a research focus to isolate and purify proteins or peptides with potential clinical application value from *Cordyceps militaris*. [Objective] The protein composition of fruiting bodies of wild and commercial strains of *Cordyceps militaris* in Shenyang were detected, and the differences of protein types, quantities and functions under the same cultivation conditions were analyzed, which provided the proteomic data basis for further study and identification of protein for medicinal use and targeted domestication of northern caterpillar in Shenyang area. [Methods] Wild *Cordyceps militaris* strains were collected from Qipan Mountain of Shenyang. Fruiting bodies of wild and artificially cultivated *Cordyceps militaris* strains were obtained by tissue isolation and liquid fermentation respectively at the same time. The quantitative proteome of fruit body samples from wild and commercial sources was studied by non-standard quantitative technology liquid chromatography-mass spectrometry after protein extraction and trypsin enzymolysis. [Results] A total of 9 233 specific peptide fragments and 1 923 proteins were identified, including 1 163 quantifiable proteins. 214 proteins were up-regulated and 181 proteins were down-regulated in fruit bodies cultured from wild sources. After functional enrichment analysis, these differential proteins were mainly involved in energy production/conversion, amino acid transport/metabolism and antioxidant function. Under the same nutritional conditions, the expression of protein related to energy metabolism and amino acid metabolism of wild-type strains was higher than that of commercial strains, and the expression of an important antioxidant protein (Gene Name: *ISF_02112*) from wild cultivated strains was much higher than that in commercial strains (fold change>9). There were 22 differentially expressed proteins related to both antioxidant and metabolic functions. [Conclusion] Some excellent biological characteristics of wild *Cordyceps militaris* in Shenyang can be preserved by proper artificial cultivation. The fruiting bodies cultivated by the two strains have rich and excellent antioxidant proteins, and the antioxidant capacity of fruiting body proteins is related to their overall metabolic capacity. The results of this study provide the basis of proteomics data for further study and identification of the herbal protein and targeted domestication of *Cordyceps militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*, fruiting bodies, proteomics

北虫草(*Cordyceps militaris*)为麦角菌科、虫草属真菌,又名北冬虫夏草、蛹虫草^[1]。野生菌种来源于鳞翅目昆虫的蛹体上,也可用人工代料培育。其具有与冬虫夏草类似的药理活性,较易栽培,常被当作冬虫夏草的代用品^[2]。北虫草为药食两用真菌,含有极其丰富的蛋白质和氨基酸,而从中分离纯化获得具有临床应用价值的成分已成为北虫草研究的一个热点,目前分离获得了为数不多的具有

功效的蛋白质和肽的组分,如蛋白肽 Cordymin,具有提高机体抗氧化能力,缓解氧化应激状态,起到抗炎作用;虫草环肽 Cordyceptide A,具有免疫增强和抗癌作用;北虫草蛋白 CMP,具有抗癌和抗真菌作用^[3-5]。有研究显示野生虫草和人工虫草在化学成分上完全一致,含量上有所差异^[6]。目前有研究对冬虫夏草子实体形成的相关蛋白、子实体蛋白和菌丝体鉴定了差异表达蛋白,也有研究对

人工培育的北虫草菌丝体及子实体进行了蛋白质组的测序^[7-8]。沈阳地区北虫草野生菌株经分离培育的子实体的蛋白质组学未见报道。针对沈阳地区的北虫草野生菌株与市售菌株的人工培育子实体进行蛋白质组学研究,以期获得活性蛋白质成分,对推动相关产业的健康发展具有科学和产业意义。本研究通过对沈阳棋盘山野生北虫草子实体和市售北虫草子实体进行组织分离获得活体菌株,经人工培育出子实体后对其进行定量蛋白组的研究,对鉴定到的蛋白质进行蛋白功能注释,并对所有差异表达蛋白进行功能分类、功能富集及基于功能富集的聚类分析。本研究补充丰富了沈阳地区北虫草的数据库,为人工传代培育方法可能影响北虫草生长过程及生物学活性提供了有用的信息,为进一步探究鉴定北虫草药用蛋白和针对性驯化提供了蛋白质组学数据基础。

1 材料与方法

1.1 北虫草菌种

野生北虫草菌种由本实验室分离自沈阳棋盘山的野生北虫草子实体(wc组),对比菌种为沈阳周边新鲜市售北虫草子实体(ac组)。

1.2 主要试剂和仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂,Calbiochem公司;胰酶, Promega公司;尿素、二硫苏糖醇、碘代乙酰胺, Sigma公司;乙腈, Fisher Chemical公司;三氟乙酸, Sigma-Aldrich公司;甲酸, Fluka公司。超高效液相-质谱仪, Thermo Fisher Scientific公司;酶标仪,北京凯奥科技发展有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司; -80 °C 冰箱, 中科美菱低温科技有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 北虫草培育

(1) 菌种分离纯化

配制斜面培养基(g/L):蛋白胨 10.0,琼脂 20.0,

葡萄糖 20.0,磷酸氢二钾 0.1,硫酸镁 0.1, pH 6.0。全溶后灭菌备用。75%酒精进行子实体表面消毒,无菌水冲洗,水分吸干,置于无菌培养皿中备用。无菌剪刀在子实体上部 1.5 cm 以内剪切长度为 0.1-0.2 cm 的小段,用无菌镊子取组织块接种于斜面上。置于 22 °C 条件下培养。选择无污染且生长健壮的菌丝,接入新的斜面培养基上,进行纯化培养, 23-25 °C 条件下培养 10 d, 菌丝长满斜面。

(2) 液体菌种发酵

选用菌丝洁白、见光后转色的菌种,配制液体营养液成分:蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 10.0 g, 500 mL 纯化水。无菌操作,接种铲切取试管斜面直径 0.1-0.2 cm 母种菌块接入液体培养基中。22 °C 静置培养 24 h,以利于菌丝恢复生长。然后放入摇床 22 °C、160 r/min 振荡培养 7 d,得到长满菌丝球的液体菌种。

(3) 栽培

配制栽培营养液:磷酸二氢钾 75.0 g,硫酸镁 38.0 g,蛋白胨 75.0 g,葡萄糖 500.0 g, VB₁ 0.5 片,蒸馏水 500 mL,小麦与水比例 1:1.5。1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。液体菌种与营养液比例 1:4.5,接种枪喷洒已稀释好的菌液,温度保持 18 °C 遮光培养。当菌丝生长至培养基 1/2 时,温度 22 °C、湿度 60% 培养。培养基上部出现菌丝突起时,给予 10 °C 的温差刺激,见光转色。封口薄膜上打小孔通气,温度范围保持在 18-22 °C 之间,空气相对湿度范围保持在 80%-90%之间。

(4) 采收干燥

子实体不再生长时开始采收,于阴凉处自然风干 72 h,得干燥品。平均每 100 g 子实体得到 14 g 干燥品。-80 °C 冷冻。

1.3.2 样品蛋白提取、浓度测定

2 组样品从-80 °C 冰箱取出,研钵液氮预冷,称取 0.5 g 组织样品,研磨成粉末。然后分别加入粉末 4 倍体积量的含 10 mmol/L 二硫苏糖醇、1% 蛋白酶抑制剂的缓冲液,经 30%功率超声波 4 °C

裂解 5 min 后, 加入等体积的 pH 8.0 三羟甲基氨基甲烷饱和的苯酚溶液, 4 °C 条件下 5 500 r/min 离心 10 min 后取上清, 加入 5 倍体积的 0.1 mol/L 乙酸铵/甲醇沉淀过夜, 分别用甲醇和丙酮进行洗涤^[9-11]。8 mol/L 尿素复溶, 取 5 μ L 蛋白样品, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 按照说明书操作, 用酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光度; 然后根据标准曲线计算样品蛋白浓度。

SDS-PAGE: 分别吸取等量蛋白样品于离心管中, 加入 5 μ L 蛋白上样缓冲液(4 \times)和适量 2% 十二烷基磺酸钠溶液, 使总体积为 20 μ L; 依次上样 1 μ L 预染蛋白 Marker 和 20 μ L 蛋白样品, 样品相邻空白孔上样 20 μ L 蛋白上样缓冲液(1 \times)封闭; 沸水浴加热 5 min, 以充分变性蛋白。置冰上 5 min, 使用前 10 000 r/min 离心 1 min。电泳时, 在浓缩胶中电流控制为 15 mA, 电泳 15 min, 使蛋白样品浓缩成一条线; 在分离胶中电流控制为 30 mA, 凝胶板上的样品溴酚蓝条带至距凝胶底端 1 cm 时, 停止电泳; 取出凝胶, 室温下染色 2 h, 脱色液脱色并间隔一段时间更换脱色液, 脱色至凝胶背景无色、蛋白条带清晰。

1.3.3 胰酶酶解

取 120 μ g 样品蛋白进行酶解, 用裂解液将体积调整至一致, 缓慢加入终浓度 20% 三氯乙酸, 涡旋混匀, 4 °C 沉淀 2 h。4 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用预冷的丙酮洗涤沉淀 2-3 次。晾干沉淀后加入终浓度 200 mmol/L 的四乙基溴化铵, 超声打散沉淀, 以 1:50 的体积比(蛋白酶:蛋白)加入胰蛋白酶, 酶解过夜。先后加入二硫苏糖醇(Dithioth-Reitol, DTT)和碘乙酰胺(IAA)分别至终浓度为 5 mmol/L、11 mmol/L, 期间 56 °C 条件下还原 30 min, 然后室温条件下避光孵育 15 min 备用。

1.3.4 液相色谱-质谱联用分析

使用超高效液相系统进行分离肽段, 首先采用液相色谱流动相 A 相[0.1% (体积分数)甲酸水溶液]条件下溶解肽段。流动相 A: 2% 乙腈和 0.1% 甲酸的水溶液; 流动相 B: 90% 乙腈和 0.1% 甲酸的水

溶液^[9]。液相色谱的梯度分别为: 0-90 min, 5%-25%B; 90-112 min, 25%-35%B; 112-116 min, 35%-80%B; 116-120 min, 80%B, 流速为 500 nL/min。

经分离后的肽段进入 NSI 离子源中电离, 然后进入质谱分析。离子源电压设置为 2.1 kV, 采用高分辨 Orbitrap 对肽段母离子及其二级碎片进行检测。设置一级质谱扫描范围 350-1 800 m/z , 扫描分辨率 70 000; 二级质谱扫描范围起点 100 m/z , 扫描分辨率 17 500。一级扫描后选择前 10 个信号强度最高的肽段母离子依次进入 HCD 碰撞池进行碎裂, 同法操作二级质谱分析。自动增益控制设置为 5E4, 最大注入时间设置为 100 ms, 串联质谱扫描的动态排除时间设置为 30 s, 信号阈值设置为 40 000 ions/s。

1.3.5 数据库搜库

使用 Maxquant (V1.5.2.8)对二级质谱数据进行检索。参数如下: 数据库为 *Cordyceps fumosorosea*_ARSEF_2679_1081104_PR_20191223 (10 050 条序列), 添加反库和常见的污染库, 计算误发现率(False Discovery Rate, FDR)和消除鉴定结果中污染蛋白的影响, FDR 设置为 1%。参数设置: 漏切位点数为 2; 酶切方式为 Trypsin/P; 最小肽段长度为 7 个氨基酸残基; 肽段最大修饰数为 5; 一级母离子质量误差容忍度各为 20 ppm、5 ppm, 二级碎片离子质量误差容忍度为 0.02 Da。

1.3.6 质谱质控检测

肽段基本均为 7-20 个氨基酸, 长度分布符合基于 Trypsin 酶解和 HCD 碎裂方式规律。同时 10 kD 以上蛋白的分布比较均匀, 表明蛋白样品制备没有产生明显偏倚。在真菌全蛋白组中绝大多数为中低丰度蛋白, 在质谱的鉴定结果中覆盖率较低。大部分蛋白的覆盖度在 20% 以下, 与之相符。谱图的一级质量误差在 10 ppm 以内, 符合质谱的高精度特性。

1.3.7 生物信息学分析

对鉴定到的蛋白采用 InterProScan 进行 GO 功能注释; 亚细胞定位采用 WoLFPSORT/CELLO (V.1.5.2.8)分析; KEGG 通路分析采用 KAAS/KEGG

Mapper (V.2.0/V2.5); 聚类热图采用 R Package Pheatmap (V.2.0.3); 富集分析采用 Perl Module (V.1.31); 蛋白互作采用 BLAST/R Package NetworkD3 (V.2.2.26)。

2 结果与分析

2.1 北虫草培育结果及蛋白浓度

野生来源北虫草经分离、培育的子实体干燥品呈长棒状, 橙黄色, 长 5–10 cm, 外形上略呈宽平, 而市售来源北虫草经分离、培育的子实体干燥品特点是顶部膨大明显。培育结果见图 1。野生来源与市售来源北虫草培育的子实体蛋白浓度检测分别为 5.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 6.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 数据定量分析

通过谱图解析共鉴定到 9 233 条特异性肽段, 共计鉴定到 1 163 个可定量蛋白。以 1.5 倍为差异表达变化阈值, 以统计学检验 t -test $P < 0.05$ 为显著性阈值, 其中 wc/ac 比较组有 214 个蛋白表达发生上调, 181 个蛋白表达发生下调(图 2)。

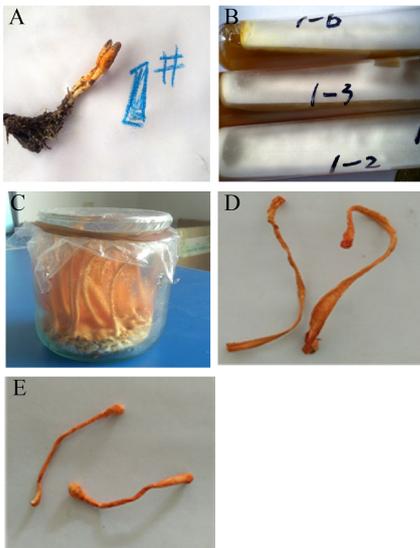


图 1 北虫草培育结果

Figure 1 Cultivation results of *Cordyceps militaris*

注: A: 野生菌株; B: 斜面菌种; C: 子实体; D: 野生来源培育的子实体干燥品; E: 市售来源培育的子实体干燥品

Note: A: Wild *Cordyceps* strains; B: Slant strain; C: Cultivating fruiting bodies; D: Dried wild fruit bodies; E: Dried products of cultivated fruit bodies on the market

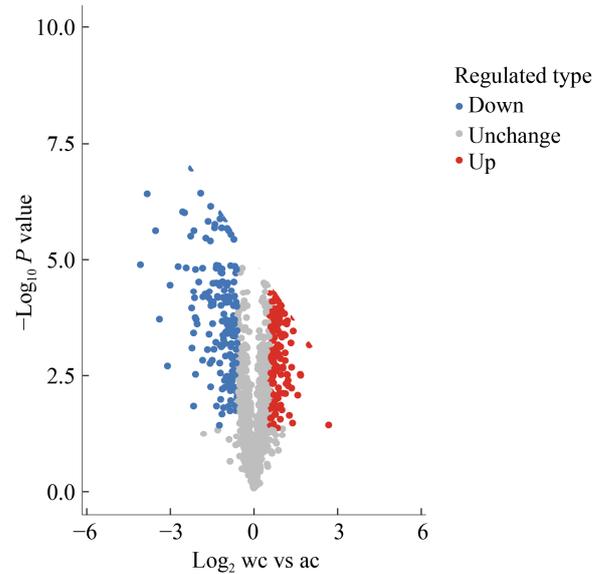


图 2 北虫草蛋白表达的火山图(野生来源组/市售来源组)

Figure 2 Volcano maps of differential proteins (wc/ac)

2.3 GO 二级注释分类

对差异蛋白进行基因本论(Gene Ontology, GO)注释, 从生物进程(Biological Process)、分子功能(Molecular Function)和细胞组成(Cellular Component)这 3 个角度阐释差异蛋白的生物学作用(图 3)。在生物进程中, 有机物代谢过程(Organic Substance Metabolic Process)、细胞代谢过程(Cellular Metabolic Process)对应蛋白较多, 分别为 188 个、185 个。细胞组成中, 细胞内功能(Intracellular)、细胞内细胞器(Intracellular Organelle)对应蛋白较多, 分别为 239 个、202 个。分子功能中, 转运酶活性(Transferase Activity)、有机环化合物结合(Organic Cyclic Compound Binding)对应蛋白较多, 皆为 60 个。对 GO 功能进一步挖掘后, 具有氧化还原酶活性、氧化还原酶复合物功能的差异蛋白分别有 27 个、4 个。

2.4 亚细胞结构定位分类

为了探究差异蛋白在细胞中的定位情况, 进行了亚细胞结构定位分析。发现它们在胞浆和线粒体中定位的比例占 60.00% (图 4)。

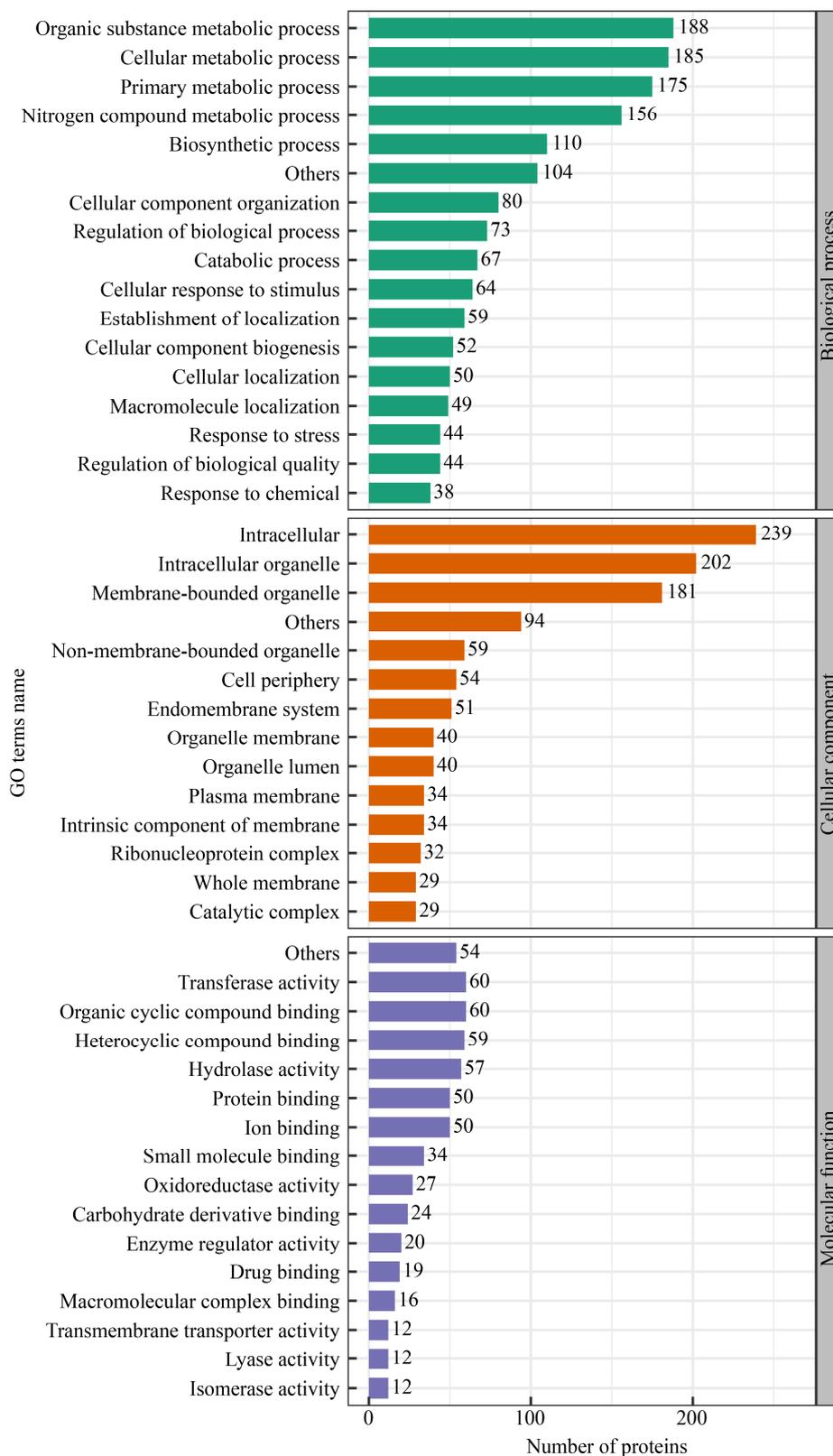


图 3 差异蛋白的注释分类

Figure 3 Distribution of differential proteins

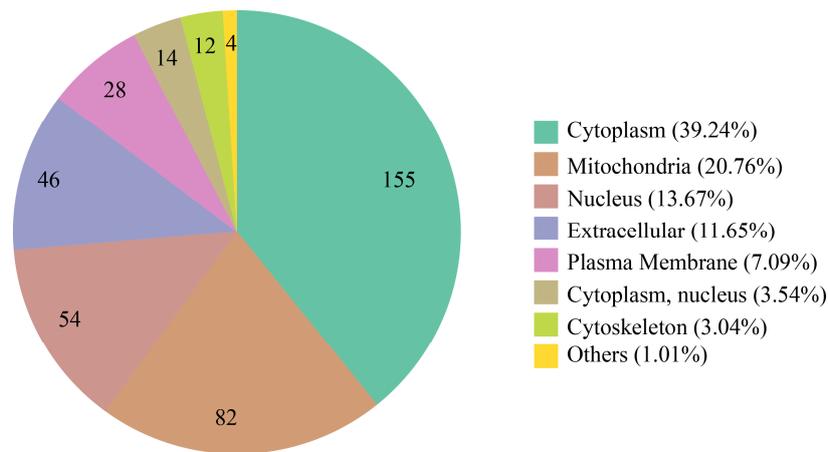


图 4 差异表达蛋白的亚细胞定位

Figure 4 Subcellular localization of differentially expressed proteins

2.5 差异蛋白功能聚类分析

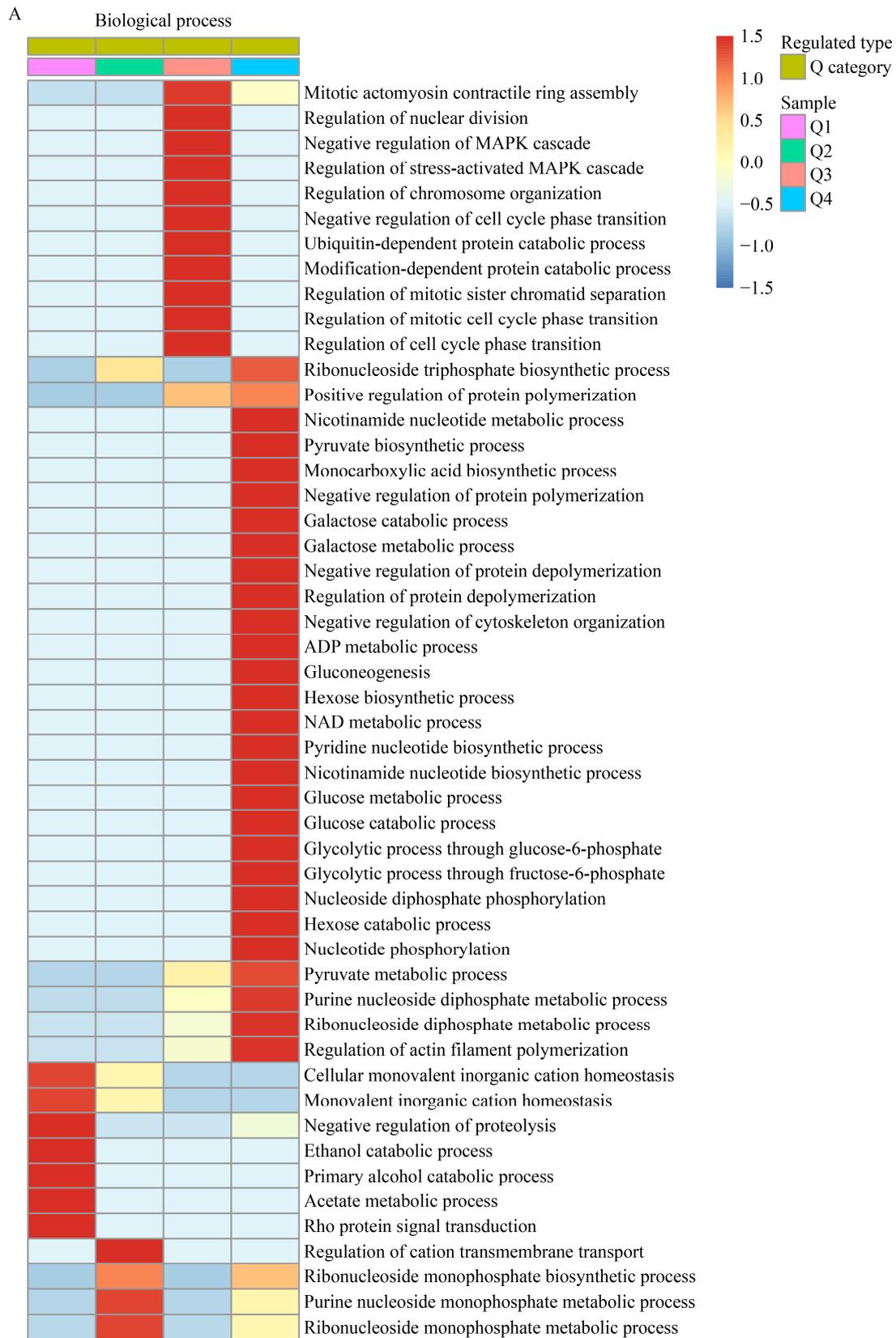
为了发现差异蛋白是否存在某些功能的显著性富集趋势, 根据其差异表达倍数将其分成了 4 个部分($Q1 < 0.667$, $0.667 < Q2 < 0.769$, $1.3 < Q3 < 1.5$, $1.5 < Q4$), 并对每一组 GO 分类, KEGG 通路进行富集, 寻找不同变化区间的蛋白功能相关性。结果中发现, GO 分类层面(图 5A、5B), 生物进程中, 野生培育高表达的蛋白(Q4)糖代谢(Glucose Metabolic Process)、己糖分解代谢的过程(Hexose Catabolic Process)、葡萄糖分解代谢的过程(Glucose Catabolic Process)等和能量代谢相关的功能富集程度较高。分子功能中, 野生培育低表达的蛋白(Q1)的乙醛脱氢酶(NAD)活性[Aldehyde Dehydrogenase (NAD) Activity]和高表达的蛋白(Q4)酶激活剂活性(Enzyme Activator Activity)、激酶活化剂活性(Kinase Activator Activity)等和氧化、代谢相关的酶活性功能富集程度较高。KEGG 通路层面(图 6), 在野生培育低表达蛋白(Q1)缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解(Valine, Leucine and Isoleucine Degradation), 以及高表达蛋白(Q4)酪氨酸代谢(Tyrosine Metabolism)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(Cysteine and Methionine Metabolism)等, 它们和氨基酸代谢相关的通路富集程度较高。

2.6 蛋白互作网络

对所有差异蛋白进行蛋白网络互作分析, 并重点关注具有代谢、抗氧化、氨基酸代谢等相关功能的蛋白的互作情况。结果(图 7)显示, 同时与抗氧化和代谢功能相关的蛋白有 22 个, 主要包括过氧化氢酶-过氧化物酶、Arg-6 蛋白、谷氨酸-5-半醛脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、烯醇化酶、磷酸转移酶、磷酸甘油酸激酶等。

3 讨论

北虫草是一种富含高蛋白、氨基酸的药食两用真菌。近年来有关从虫草中寻找具有功效的蛋白质和肽的组分受到关注。人工代料栽培菌种的使用普遍, 但野生菌种资源相对缺乏。本研究结果发现, 在相同的营养条件下, 野生菌株经分离培育后子实体与市售菌株培育子实体在外形、蛋白浓度等方面有所区别, 在蛋白质组学上两者也有差异。本研究采用基于液相色谱-质谱的非标记定量技术进行蛋白质组定量, 该方法现已用于临床来源样本比对、实验室生物信号通路研究等方面, 可检出低丰度的蛋白, 而且分离蛋白能力强^[12-13]。野生来源菌株培育子实体在能量代谢、氨基酸代谢功能中的相关蛋白表达量高于市售来源菌株传代栽培的子实体, 原因可能是野生菌株生长环境恶劣, 其能量和氨基酸



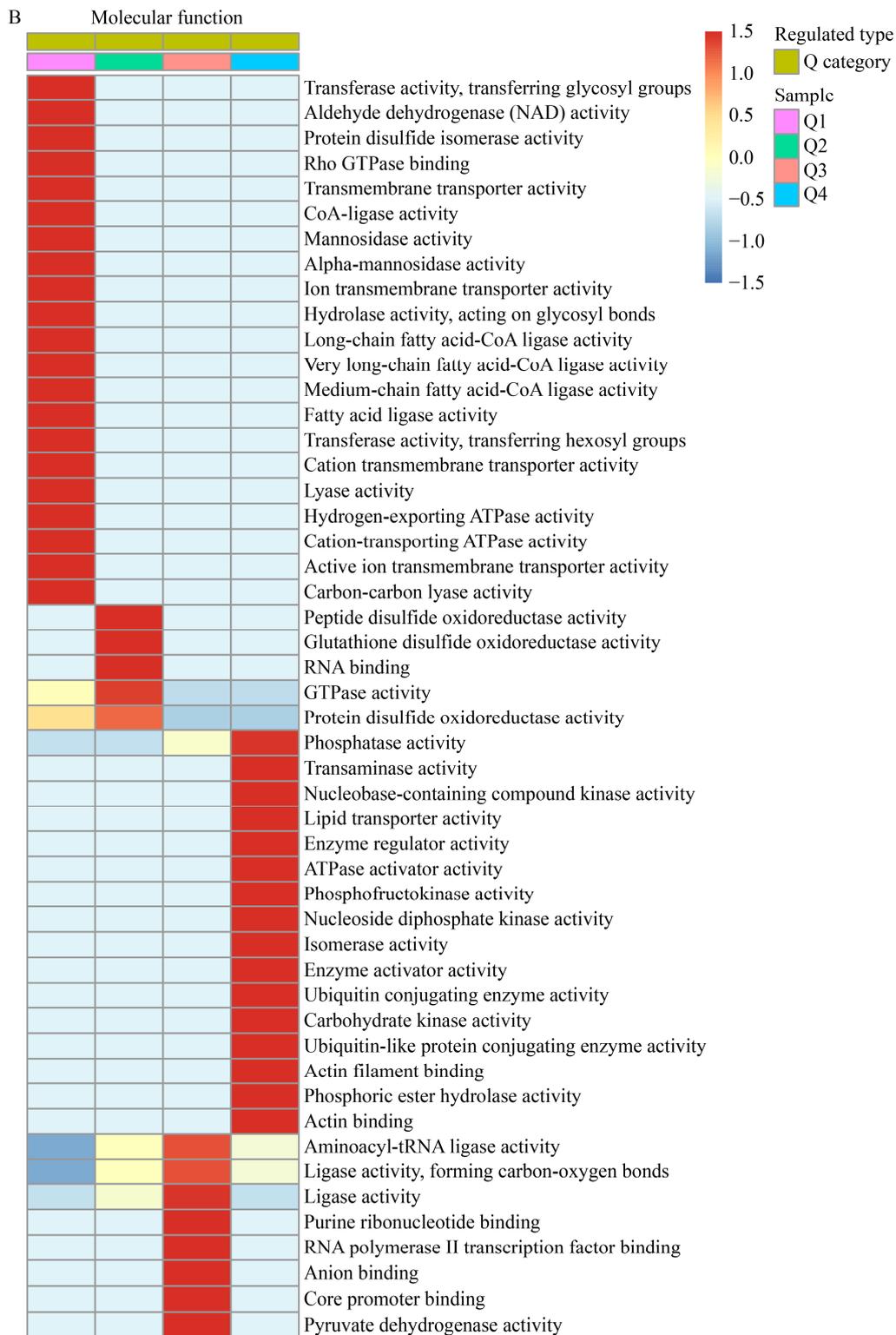


图 5 GO 功能分类生物过程(A)和分子功能(B)中聚类差异表达蛋白富集

Figure 5 Cluster differential expression protein enrichment map in GO functional classification (biological process) (A) and (molecular function) (B)

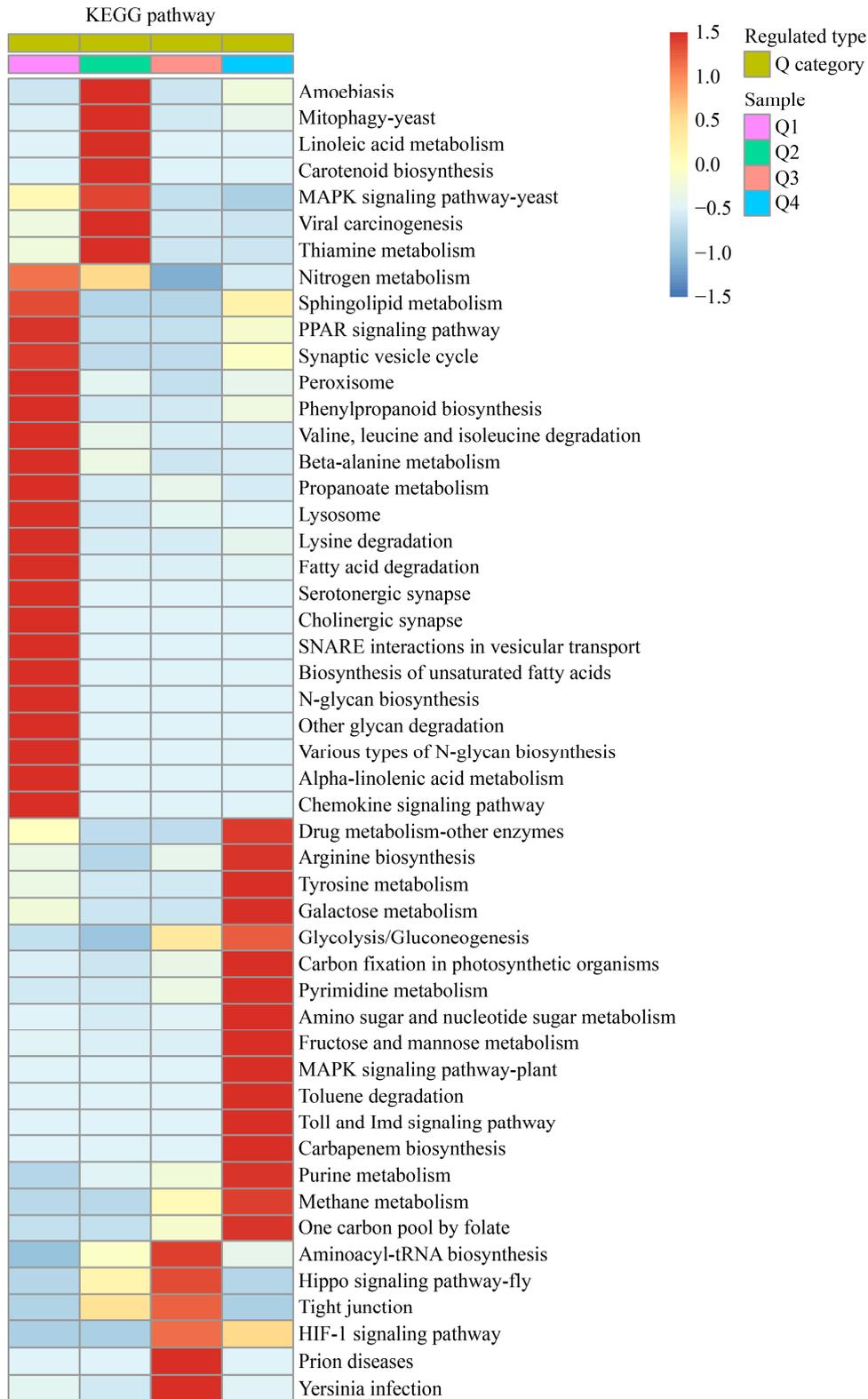


图 6 KEGG 通路中聚类差异表达蛋白富集

Figure 6 Enrichment of cluster differentially expressed proteins in KEGG pathway

代谢能力强于市售菌株,而野生菌株被分离纯化后经适当人工培育会保留其部分优良的生物学特性。

文献[14-17]报道北虫草具有较强的抗氧化能力。研究表明蛹栽培的子实体中超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)含量高于小麦栽培的子实体,而小麦栽培的菌核中 SOD 含量与相应的子实体相比无显著差异^[18]。SOD 是第一个被发现以超氧阴离子为其作用底物的酶,超氧阴离子自由基是生物体内正常的代谢产物,积累到一定程度可使细胞膜脂质发生过氧化而引起细胞损伤甚至死亡, SOD 通过催化超氧阴离子自由基发生歧化反应进而减轻或消除机体代谢过程中产生的过多的超氧阴离子自由基,从而起到抗氧化作用^[19-20]。本研究重点关注了野生来源和市售来源北虫草菌株经小麦培养基栽培的子实体抗氧化相关的蛋白及其基因,差异蛋白功能分析显示,本研究中 2 种来源的北虫草菌株培育的子实体具有氧化还原酶活性、氧化还原酶复合物功能的差异蛋白分别有 27 个、4 个。乙醛脱氢酶(NAD)活性相关蛋白(Gene Name: *ISF_08138*)在野生来源菌株中表达较低,乙醛脱氢酶在生物体内可将乙醛氧化成乙酸,这可能说明野生菌种的机体氧化能力较弱。进一步挖掘数据,发现一种抗氧化重要蛋白(Gene Name: *ISF_02112*)具有 SOD 活性,在野生菌株培育子实体中的表达量远远高于市售菌株培育子实体(Fold Change>9);具有过氧化氢酶活性的蛋白(Gene Name: *katG*)表达量高于市售来源菌种(Fold Change>2),说明在此种抗氧化能力方面野生菌株培育子实体优于市售菌株培育子实体。接着对所有差异蛋白进行网络互作分析,结果显示,同时与抗氧化和代谢功能相关的蛋白有 22 个,从较为宏观的蛋白调控角度揭示了子实体蛋白的抗氧化能力与其整体代谢能力相关。

北虫草菌株容易变异已是不争的事实,虫草从业者一般会通过选择优良野生北虫草菌株进行分离纯化及栽培试验选育优良的生产菌种。本研

究提供了沈阳地区野生菌株与市售菌株采用小麦培养基培育子实体获得不同功能蛋白的相对表达量、抗氧化功能蛋白及基因信息,丰富了北虫草菌种、功能相关蛋白研究等数据库。为进一步培育优良菌种、扩大北虫草产业化发展、开发药用功能蛋白或小肽提供了蛋白质组学数据基础。如何获得预期功能的菌种及功能蛋白的提取仍有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Xu XH. New Cultivation Techniques of *Cordyceps Militaris*[M]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 2010 (in Chinese)
徐秀华. 北虫草栽培新技术[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2010
- [2] Tang XS, Chen HP, Song LW, Yu XJ, Guan B, Chen B. Comparison of cordycepin in *Cordyceps militaris*, *Cordyceps flower* and *Cordyceps sinensis* produced in different areas[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2016, 29(2): 116-119 (in Chinese)
唐晓双, 陈和平, 宋林涓, 于兴军, 关斌, 陈斌. 不同产地的蛹虫草、虫草花与冬虫夏草中虫草素含量对比[J]. 航天医学与医学工程, 2016, 29(2): 116-119
- [3] Hu FL, Li ZZ. Secondary metabolites and their bioactivities of *Cordyceps* and its related fungi[J]. Mycosystema, 2007, 26(4): 607-632 (in Chinese)
胡丰林, 李增智. 虫草及相关真菌的次生代谢产物及其活性[J]. 菌物学报, 2007, 26(4): 607-632
- [4] Jiang H, Liu K, Meng S, Chu ZY. Chemical constituents of the dry sorophore of *Cordyceps militaris*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2000, 35(9): 663-668 (in Chinese)
姜泓, 刘珂, 孟舒, 初正云. 人工蛹虫草子实体化学成分[J]. 药学学报, 2000, 35(9): 663-668
- [5] Park BT, Na KH, Jung EC, Park JW, Kim HH. Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*[J]. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 2009, 13(1): 49-54
- [6] Wang J, Liu YM, Cao W, Yao KW, Liu ZQ, Guo JY. Anti-inflammation and antioxidant effect of Cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*, in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats[J]. Metabolic Brain Disease, 2012, 27(2): 159-165
- [7] Feng K, Wang LY, Liao DJ, Lu XP, Hu DJ, Liang X, Zhao J, Mo ZY, Li SP. Potential molecular mechanisms for fruiting body formation of *Cordyceps* illustrated in the case of

- Cordyceps sinensis*[J]. Mycology, 2017, 8(4): 231-258
- [8] Yin YL. Research and application for mushroom proteins[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Wuhan University, 2014 (in Chinese)
尹亚琳. 大型真菌蛋白研究及应用[D]. 武汉: 武汉大学博士学位论文, 2014
- [9] Huang XY. Network pharmacology-based study and proteomic on the mechanism of yiqihuatanquyu decoction for Chinese herbal medicine in chronic intermittent hypoxia-induced myocardial injury in rats[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Medical University, 2019 (in Chinese)
黄孝云. 基于网络药理学及蛋白质组学探究益气化痰祛瘀方干预 CIH 大鼠心肌损伤研究[D]. 福州: 福建医科大学硕士学位论文, 2019
- [10] Xu WL. Mechanism study of radon regulated protein-miRNA network in skin tissues[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2018 (in Chinese)
徐王磊. 氡影响皮肤组织蛋白质-miRNA 调控网络的机制研究[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2018
- [11] Maitudi·M. Screening early diagnostic biomarker proteins of acute aortic dissection by 4D label-free proteomics[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Medical University, 2020 (in Chinese)
买吐地·买吐逊. 基于 4D Label-free 定量蛋白组学技术筛选急性主动脉夹层早期诊断标志物[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学硕士学位论文, 2020
- [12] Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, Calvo E, Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, De La Cuesta F, Lopez JA, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis[J]. Journal of Proteomics, 2014, 96: 92-102
- [13] Willison KR, Klug DR. Quantitative single cell and single molecule proteomics for clinical studies[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(4): 745-751
- [14] Liu YT, Li YW, Zhang HL, Li C, Zhang ZQ, Liu AP, Chen H, Hu B, Luo QY, Lin BK, et al. Polysaccharides from *Cordyceps militaris* cultured at different pH: sugar composition and antioxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 349-358
- [15] Choi E, Oh J, Sung GH. Antithrombotic and antiplatelet effects of *Cordyceps militaris*[J]. Mycobiology, 2020, 48(3): 228-232
- [16] Rao PF, Chen H, Zhou HM, Chen RC, Luo MX, Chen Q, Xu MM, Guo JK, Ke LJ. Studies on anti-oxidative capacity, thermal stability and its channel tropism of *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(7): 59-64 (in Chinese)
饶平凡, 陈汉, 周河美, 陈瑞琛, 骆梅香, 陈琦, 许明明, 郭静科, 柯李晶. 蛹虫草的抗氧化性和热稳定性及归经作用研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(7): 59-64
- [17] Wu Q, Huang ZQ, Liu Q, Wang LQ, Zhou QY, Wang HJ, Wu Y, Sun Y. Mechanism of antioxidant and hypoxia of north *Cordyceps* small molecule peptide[J]. Letters in Biotechnology, 2014, 25(6): 842-845 (in Chinese)
仵强, 黄竹青, 刘芹, 王立强, 周青阳, 王洪军, 吴扬, 孙艳. 北虫草小分子肽抗氧化和耐缺氧机制研究[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(6): 842-845
- [18] Guo MM, Guo SP, Yang HJ, Bu N, Dong CH. Comparison of major bioactive compounds of the caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (ascomycetes), fruiting bodies cultured on wheat substrate and pupae[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2016, 18(4): 327-336
- [19] Yang L, Liao MF, Ji XR, Jing ZP. Current research of superoxide dismutase in the medical field[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(2): 396-398,310 (in Chinese)
杨琳, 廖明芳, 季欣然, 景在平. 超氧化物歧化酶在医学领域的研究现状[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2): 396-398,310
- [20] Zhu XM. Physiological activity of superoxide dismutase[J]. Contemporary Medicine, 2011, 17(15): 26-27 (in Chinese)
朱秀敏. 超氧化物歧化酶的生理活性[J]. 当代医学, 2011, 17(15): 26-27