纳升液相色谱-静电场轨道阱质谱法检测鹅膏 菌属毒性相关内源性前体蛋白

王希希,白 玉,李鹏昊,李晓辉,高 舸,王 炼* (成都市疾病预防控制中心,成都 610041)

摘 要:目的 建立纳升液相色谱-静电场轨道阱质谱法测定鹅膏菌属中 MSDIN 毒性相关前体蛋白的方法。 方法 样品经纯水提取、超滤分离后,采用 StageTips C₁₈进行样品除盐;以 0.1%甲酸水溶液和含 0.1%甲酸的 乙腈/水(4:1, *V:V*)溶液为流动相,采用梯度洗脱方式,经 Acclaim[™] PepMap[™] 100 C₁₈ (70 mm×75 µm, 3 µm)预 富集,Acclaim[™] PepMap[™] 100 C₁₈ (150 mm×75 µm, 3 µm)分离,采用电喷雾离子源正离子模式测定,Protein Discover 软件对蛋白质进行鉴定;分别对蛋白提取液种类、蛋白质纯化方法和蛋白酶种类进行对比和优化。 **结果** 优化前处理条件后选择纯水作为提取溶剂,提取液经 Vivaspin Turbo 4 (3 kDa)分离纯化和 StageTips C₁₈ 除盐后,样品在非酶解状态下进行分析;将本方法用于 2017—2020 年四川地区食物中毒事件中收集到的 23 株鹅膏菌属类蘑菇,共鉴定 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白 50 个;与市售 8 种可食用蘑菇比较,差异表达前 体蛋白 41 个,其中 13 条前体蛋白为全部 23 株鹅膏菌属类蘑菇共有,可作为鹅膏菌属潜在的特征性靶标分子。 **结论** 该方法简单快速、特异性强,可作为形态学鉴定、DNA 测序和毒素检测的补充方法,初步用于鹅膏菌 属的快速识别。

关键词:纳升液相色谱-静电场轨道阱质谱法; MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白; 鹅膏菌属

Determination of toxic related endogenous precursor proteins of Amanita by nanolitron liquid chromatography-electrostatic field orbital trap mass spectrometry

WANG Xi-Xi, BAI Yu, LI Peng-Hao, LI Xiao-Hui, GAO Ge, WANG Lian*

(Chengdu Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of MSDIN genes coded, endogenous toxic proproteins in *Amanita* genus by nanolitron liquid chromatography-electrostatic field orbital trap mass spectrometry. **Methods** After the water extraction and ultrafiltration, the sample was desalted by StageTips C_{18} . A gradient elution program was used with a 0.1% formic acid aqueous solution and a mixture of acetonitrile/water (4:1, *V:V*) containing 0.1% formic acid as the mobile phase. Proteins, which were first bonded in an AcclaimTM PepMapTM100 C_{18} (70 mm×75 µm, 3 µm) pre-enrichment column, then separated on an AcclaimTM PepMapTM100 C_{18} (150 mm×75 µ m, 3 µm) column. The ionization mode was set as positive ion mode of electrospray ion source. Protein Discover software was applied

基金项目: 成都市医学科研课题项目(2021231)

Fund: Supported by the Chengdu Medical Research Project (2021231)

^{*}通信作者:王炼,博士,主任技师,主要研究方向为食品理化检验。E-mail: septwolvesnjwl@163.com

^{*}Corresponding author: WANG Lian, Ph.D, Senior Technologist, Chengdu Center For Disease Control and Prevention, No.4, Longxiang Road, Wuhou District, Chengdu 610041, China. E-mail: septwolvesnjwl@163.com

for protein identification. The types of protein extract, methods of protein purification and types of protease were compared and optimized. **Results** After optimizing the pre-treatment conditions, set water was used as the extraction solvent, the extract was then separated and purified by Vivaspin Turbo 4 (3 kDa) and desalinated by StageTips C_{18} . The sample was analyzed in a non enzymatic condition. A total of 50 MSDIN related proproteins were identified in 23 *Amanita* strains that collected in food poisoning incidents in Sichuan from 2017 to 2020. Compared with proteins found in 8 edible mushrooms, 41 proproteins were identified as *Amanita* specificity. Among which 13 proproteins were found in all 23 test strains, and could serve as the potential characteristic target molecules. **Conclusion** The method is capable of simplicity, velocity and specificity, and can be preliminarily applied for rapid identification of *Amanita* as complementary methods for morphological identification, DNA sequencing and toxins detection.

KEY WORDS: nanolitron liquid chromatography-electrostatic field orbital trap mass spectrometry; MSDIN toxic related endogenous precursor proteins; *Amanita*

0 引 言

由于野生蘑菇具有较高营养价值,一直深受世界各 国人民的喜爱。而误食蘑菇中毒一直是一个对人类健康造 成威胁的全球性问题。北美真菌协会发布的蘑菇中毒年度 报告显示,每年约有 100 人因误食毒蘑菇而中毒^[1];我国 已知蘑菇种类在 4000种以上,2010—2022年中国疾病预防 控制中心年度报道^[2-5]蘑菇中毒事件 10845 起,中毒病例 40931例,死亡 836人,病死率为 2.04%。蘑菇中毒是我国 食物中毒事件中导致死亡的主要原因。在蘑菇中毒相关的 死亡人数当中,有 60%的死亡数由含鹅膏肽类毒素的蘑菇 引发,主要包括:绝大多数的鹅膏菌属(*Amanita*)、有盔孢 伞属(*Galerina*)和环柄菇属(*Lepiota*)中的部分种类^[6]。

在含有鹅膏肽类毒素的蘑菇中,鹅膏菌属是最常见 且最具有代表性的,其主要含有 3 种环状肽类毒素:鹅膏 毒肽、鬼笔毒肽和毒伞肽;基因测序结果表明其来自于同 一个基因家族,由此基因家族编码的内源性前体蛋白的氨 基酸序列都以"MSDIN"起始,因此将鹅膏肽类毒素相关基 因家族命名为"MSDIN"基因家族^[6-8];随着转录组学的发 展,其编码的毒性前体蛋白类物质由最初的 15 个不断增 加和更新。在最近的研究中^[9],科研人员在 6 种鹅膏菌中, 新鉴定了 24 个 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白,并发现 双抱鹅膏(*A. bisporigera*)和绿盖鹅膏(*A. phalloides*)可以合 成一系列环状肽段,通过对其结构进行预测,发现多数为 未知的毒性相关前体蛋白。由于鹅膏菌"MSDIN"相关基因 的多样性,仍有许多毒性相关内源性前体蛋白未被发现。

鹅膏肽类毒素引起食物中毒后,病人往往具有 1~2 d 的假愈期^[10-11],之后便会产生明显的器官衰竭症状^[12],目 前最为有效的治疗手段便是中毒后尽早进行血液透析 治疗^[13-15];为了能够快速指导临床治疗,对于患者中毒性 质的判断,显得尤为重要^[16];在食物中毒事件中,残留食 物的天然外形已经破坏,无法进行细致的肉眼特征识别; 只能通过对具体的毒素检测(主要包括放射免疫法^[17-18]、光 谱法^[17]、色谱法^[19]和色谱-质谱法^[20-26])来推断中毒原因, 由于鹅膏肽类毒素标准品数量较少且难以获取,导致检测 结果无法有效覆盖鹅膏菌属;纳升液相色谱-静电场轨道 阱质谱法具有灵敏度高,特异性强和分析通量大等特点, 与蛋白质和肽组学相关理论和技术相结合,可以利用已有 蛋白质、多肽的氨基酸或 mRNA 序列信息,在无法获得标 准品的情况下,同时对上千种目标蛋白质进行定性和半定 量检测^[27];通过获取 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白的 序列信息,能够涵盖潜在鹅膏肽类毒素,从而识别包括鹅 膏菌属在内的其他产鹅膏毒素类真菌,在判定具体的中毒 原因前,提前判断是否为鹅膏肽类毒素中毒,降低此类事 件漏检的概率,为临床提供诊断依据。

鉴于此,本研究应用蛋白质组学相关原理,将转录组 学研究中 MSDIN 毒性相关基因信息扩展至毒性相关内源 性前体蛋白的研究,建立纳升液相色谱-静电场轨道阱质 谱法,用以分析鹅膏菌属 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋 白,研究鹅膏菌属 MSDIN 相关前体蛋白的表达特征;通 过比较 23 株鹅膏菌属类蘑菇与市售可食用蘑菇之间的差 异,总结 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白在不同鹅膏菌 属中、以及在市售可食用蘑菇中的表达情况,并最终筛选 出 MSDIN 相关前体蛋白作为潜在的特征性靶标分子,用 于鹅膏菌属类蘑菇的快速识别和鉴定,为相关研究提供方 法参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

23 株蘑菇由食物中毒事件现场获取,由北京擎科生物科技股份有限公司通过 DNA测序确认其均为鹅膏菌属。

UltiMate 3000 RSLCnano 纳升液相色谱系统、Q Exactive Plus 质谱仪、Varioskan 酶标仪、Mutifuge X Pro

冷冻高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Dry Block Heater 2 恒温加热器、Vortex 3 涡旋均质仪(德国 IKA 公司); KB240 恒温培养箱(德国 BINDER 公司); EZ-2 Elite 溶剂蒸发工作站(英国 GeneVac 公司); Pulverisette 11 刀式 研磨机(德国 FRITSCH公司); PL602E 电子天平(精度 0.01 g, 瑞士梅特勒-托利多公司)。

Vivacon 500 (30 kDa)、Vivaspin Turbo 4 (3 kDa)、 Vivaspin 15R (5 kDa)超滤离心浓缩管(德国赛多利斯公司); Empore C₁₈ 固相萃取膜(47 mm ID, 美国默克有限公司); Oasis PRiME MCX 96 孔微量洗脱板(2 mg/30 µm, 美国 Waters 公司); Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、Protease Inhibitor Cocktail、放射免疫沉淀(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 质谱 级胰蛋白酶(20 µg, 美国 Promega 公司); 碳酸氢铵、尿素、二 硫苏糖醇(1,4-dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(3-indoleacetic acid, IAA)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)(生物纯, 美国 Sigma 公司); 甲酸、乙腈(质谱纯, 美 国 Fisher 公司); 其他试剂均为国产分析纯(成都市科隆化 学品有限公司); 实验用水为 MilliQ 纯水仪(美国 Millipore 公司)制备的超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

将收集到蘑菇样放入不锈钢研磨容器中,加入足量 液氮覆盖蘑菇样品,使用刀式研磨机粉碎后,分装成若干 份,-80℃保存;

1.2.2 蛋白提取

取粉碎后样品 2.0 g 于 15 mL 离心管中, (1)纯水提取 法:加入 3.0 mL 的超纯水, 4℃涡旋混匀 5 min; (2) RIPA 裂 解液提取法:加入 3 mL 裂解液, 4℃颠倒混匀 30 min。之 后立即分别加入 30 µL Protease Inhibitor Cocktail 和 PMSF, 涡旋混匀 2 min 后, 1000 r/min 离心 10 min, 移取上清液至 超滤离心浓缩管, 4000 r/min 离心 15 min, 滤液通过 Bradford 法测定其蛋白含量。

吸取蛋白含量约 20 μg 的样液于 1.5 mL EP 管中,加 入 1 mol/L DTT,使其终浓度为 50 mmol/L,90°C孵育 5 min 后;加入 0.5 mol/L IAA, 37°C避光孵育 30 min 后,12000 r/min 离心 5 min,取上清液蒸干备用。

1.2.3 蛋白样品酶解

使用膜内酶解(filter-aided sample preparation, FASP)^[28-30]法: Vivaspin Turbo 4 (3 kDa)超滤离心浓缩管经 200 μL 100mmol/L NaOH 和 8 mol/L 尿素活化后,将样品 转移至超滤管中,加入 200 μL 8 mol/L 尿素,12000 r/min 离心 20 min,重复3次;之后向超滤离心管中加入 200 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液,12000 r/min 离心 20 min,重复2 次;在离心至净干的超滤管内加入 10 μL 胰蛋白酶溶液 (20 μg/mL)和 90 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液,混匀后置于 电热恒温培养箱中 37℃孵育 14~16 h; 孵育结束后, 将超滤管 12000 r/min 离心 15 min, 收集滤液, 并向同个超滤管 中加入 200 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液, 12000 r/min 离心 15 min 后,将两次收集到的滤液合并, 蒸干备用。

1.2.4 样品浓缩除盐

(1) StageTips 除盐:使用 Empore C₁₈ 固相萃取膜和 200 μL 移液器吸头,制作 StageTips^[31-32]小柱用以除盐,具 体步骤如下:向蒸干的样品中加入 100 μL 0.5%乙酸溶液 (buffer B),使其充分溶解;依次向 StageTips 小柱中分别加 入 200 μL 甲醇(buffer A)、含 0.5%乙酸的乙腈/水(4:1, *V:V*) 混合液(Buffer D)和 Buffer B进行活化;加入 100 μL 充分溶 解样液过柱后,将其进行二次过柱,200 μL Buffer B 淋洗 小柱后,丢弃流出液,然后分别使用 200 μL 含 0.5%乙酸的 乙腈/水(3:2, *V:V*)混合液(Buffer C)、2×200 μL Buffer D 洗脱 并进行收集。

(2) Oasis PRiME MCX 96 孔微量洗脱板除盐:分别使 用 200 μL 甲醇和水活化小柱,然后将样品提取液过柱,使 用 200 μL 2%甲酸水、5%甲醇水溶液淋洗小柱,最后使用 2×25 μL 氨化乙腈溶液[2%氨化乙腈/水溶液(3:2, V:V)]洗脱 并进行收集。

将上述洗脱液 50℃蒸干,加入 40 μL 0.1%甲酸溶液复溶,涡旋混匀 5 min,上机分析。

1.2.5 纳升液相色谱-质谱仪分析

色谱参数:采用双柱系统: Acclaim PepMap 100 C₁₈ (70 mm×75 μm, 3 μm)用于进样阶段的样品在线富集和除 盐; Acclaim PepMap 100 C₁₈ (150 mm×75 μm, 3 μm)用于样 品中多肽组分的分离; 流动相 A: 0.1%甲酸水溶液; 流动 相 B: 含 0.1%甲酸的乙腈/水(4:1, *V:V*)溶液; 采用梯度洗脱 方式(表 1),流速: 300 nL/min; 进样量: 4 μL, 进样方式: μL Pickup。

质谱参数:离子传输管的温度: 280℃,一级质谱采集 范围为 m/z: 300~1800,喷雾电压: 2.8 kV。一级质谱质量分 辨率: 70 k (m/z 200),自动增益控制(automated gain control, AGC)值: 3×10⁶;二级质谱质量分辨率: 17.5 k; AGC 值: 1×10⁵,最大注入时间: 200 ms,隔离窗口宽度: 1.6 m/z。每 次全扫描后选择响应值前 20 的母离子进行二级碎片全扫 描,归一化碰撞能量: 27 eV,离子碎裂方式:高能碰撞解 离(high energy collision dissociation, HCD),动态排空时间: 30 s,电荷排除选项:中性分子、+1 价离子和电荷数≥7 的 离子。

1.3 数据处理

使用 Protein Discover 软件进行蛋白质鉴定,蛋白标 准数据库:将 GeneBank中 MSDIN 相关基因通过软件转换 成氨基酸序列信息,与 Uniprot-Swiss-MSDIN-Amanita (Version 2019-08-17)中的蛋白质序列进行交叉比对,取并 集构建本研究 MSDIN 毒性相关内源性蛋白质谱库, GeneBank 中序列转化的独有氨基酸系列条目以基因名注释,其余条目以蛋白质名或者 Uniprot ID 注释;蛋白酶设为 none;母离子允许最大误差为 10 ppm,子离子允许最大误差为 0.02 Da;固定修饰包括:半胱氨酸(cysteine, Cys)烷基化,可变修饰包括:蛋白质 N 端(protein N-term)乙酰化和甲硫氨酸(methionine, Met)的氧化。特征肽段(Unique peptide)鉴定氨基酸覆盖度≥80%,鉴定到的蛋白质至少要有 1 个特征肽段,蛋白质鉴定假阳性率(false discovery rate, FDR)≤0.01。

Perseus 软件对原始数据进行归一化和缺失值处理, 采用 t 检验对比有毒蘑菇和可食用蘑菇中毒性前体蛋白的 表达情况,以 P<0.05 为差异有统计学意义;采用 Protein Discover 软件生成质谱图谱, Simca 14.1 软件绘制分类饼状 图和散点图。

	表 1 纳升液相色谱梯度洗脱程序					
Table 1	Gradient elution program for nanoflow liquid					
	chromatography					

5 T J						
时间	流动相 A/%	流动相 B/%	流速/(nL/min)			
0.00	97	3	300			
5.00	92	8	300			
85.00	78	22	300			
100.00	70	30	300			
110.00	10	90	300			
120.00	10	90	300			

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 MSDIN 内源性前体蛋白提取液的选择

内源性前体蛋白在细胞内合成,存在于细胞内、外液中,为了最大限度提取内源性前体蛋白,本研究分别使用 RIPA 裂解液和水对前体蛋白的提取效果进行对比;在样品 称样量与提取液加入量一致的情况下(2.0 g样品加入 3.0 mL 提取液),纯水样品 4°C涡旋混勾 5 min, RIPA 裂解液的样品 4°C颠倒混勾 30 min后,使用 Bradford 试剂盒,根据提取液 的不同,分别设置样品空白和蛋白标准曲线,结果显示: RIPA 提取液中蛋白质量浓度为 2.3 mg/mL,纯水提取液中 的蛋白质量浓度为 1.7 mg/mL;可见,在样品取样量一致 的情况下, RIPA 提取液的提取效果更好。

2.1.2 MSDIN 内源性前体蛋白分离纯化方法的选择

在 1.2.2 中得到的蛋白初提液中既包含了本研究重点 关注的 MSDIN 内源性前体蛋白,也包含了其他蛋白质分 子(如组蛋白等);鉴于 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白的 分子量大小介于 0.6~4.1 kDa,为了进一步分离目标前体蛋 白,选用 Vivaspin Turbo 4 (3 kDa)和 Vivaspin 15R (5 kDa)超 滤管对 RIPA 提取液和水提取液进行过滤浓缩, 3 kDa 超 滤液经 Bradford 试剂盒测定后, RIPA 超滤液质量浓度变 为 0.74 mg/mL; 纯水超滤液质量浓度为 0.58 mg/mL; 5 kDa 超 滤液经 Bradford 试剂盒测定后, RIPA 液质量浓度为 0.93 mg/mL, 纯水超滤液质量浓度为 0.67 mg/mL。经不同分子孔径超滤 后的两种裂解液,分别按照 1.2 的实验方法进行测定, MSDIN 内源性前体蛋白的鉴定数分别是 $N_{(3 \text{ kDa, RIPA})}$ 为 56 个, $N_{(5 \text{ kDa, RIPA})}$ 为 53 个, $N_{(3 \text{ kDa, & & & })}$ 为 50 个, $N_{(5 \text{ kDa, RIPA})}$ 为 56 个, $N_{(5 \text{ kDa, RIPA})}$ 为 53 个, $N_{(3 \text{ kDa, & & & })}$ 为 50 个, $N_{(5 \text{ kDa, & & & })}$ 为 44 个(图 1)。考虑到 RIPA 裂解液中含有十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)等成分,与质谱联用分析时, 样本需使用 8 mol/L 尿素缓冲液进行反复离心冲洗,过程 较为烦琐、费时,因而,本研究选择纯水作为提取溶剂,提 取液经 Vivaspin Turbo 4 (3 kDa)分离纯化,以降低样品复 杂程度,提高内源性蛋白的鉴定数量。



图 1 不同种类蛋白提取液经过不同分子量孔径超滤管 过滤后的蛋白鉴定数



2.1.3 MSDIN 内源性前体蛋白鉴定蛋白酶选择

基于液相色谱-高分辨质谱技术的蛋白质组学研究, 常常采用"鸟枪法(shotgun)"的模式^[33-36]:对混合蛋白质的 酶解多肽产物进行分析以及数据库检索,从而确定蛋白质 的种类;根据质谱仪的结构特点和肽类物质在质谱中的裂 解特征,含有 8~15 个氨基酸的肽段,其质谱响应较稳定, 且产生的质谱二级碎片丰富,鉴定度也较高。MSDIN 相关 内源性前体蛋白含有 6~37 个氨基酸,为提高其鉴定度,本 研究在样本超滤液中分别加入胰蛋白酶、赖氨酰肽链内切 酶和未加入任何蛋白酶,通过 FASP 膜内酶解,按照 1.2.4 步骤进行除盐后,上机分析。结果显示:经胰蛋白酶裂解 后的样品中,共鉴定出 MSDIN 相关前体蛋白 57 个;赖氨 酰肽链内切酶酶解样品中鉴定到的蛋白数量为 18 个;未 进行酶解的样品中蛋白鉴定数为 43 个,其中 40 个蛋白质 鉴定结果与胰蛋白酶加入组重合(图 2)。由于酶解过程耗时 较长(14~16 h),考虑到本研究用于食物中毒事件中鹅膏菌 属鉴定时,中毒人员救治对时效性的严格要求,本研究选择非酶解条件下,对 MSDIN 相关前体蛋白进行分析。



图 2 不同蛋白酶作用下 MSDIN 内源性前体蛋白鉴定数 Fig.2 Identified numbers of MSDIN endogenous precursor protein under the action of different proteases

2.1.4 MSDIN 内源性前体蛋白除盐方法的选择

MSDIN 内源性前体蛋白提取液中混有大量细胞内、 外液中的缓冲盐成份,在进行质谱分析之前,为了防止离 子抑制现象的发生,提高方法灵敏度,需要去除提取液中 的盐类物质。对比了混合模式阳离子交换 MCX 和 StageTips C₁₈条件下,内源性前体蛋白的鉴定结果:在其 他前处理条件一致的前提下,使用 MCX 96 孔微量洗脱板 的蛋白鉴定数为 13,而使用 StageTips C₁₈除盐后鉴定蛋白 数量为 50(其中包含了 MCX 方法中的 13 个蛋白质分子), 因此,选择使用 StageTips C₁₈对 MSDIN 内源性前体蛋白进 行除盐。

2.2 MSDIN 内源性前体蛋白的质谱特征

MSDIN 内源性前体蛋白的母离子电荷分布为+3~+6 价之间,按照质荷比(*m*/*z*)计算得到的蛋白分子量分布为 1.2~4.0 kDa,未出现胰蛋白酶酶解反应后特征性的+2 价离

子,说明样品处理过程中,未发生明显的蛋白酶解和非特 异性降解,但是低质量端的前体蛋白数量较少,提示超滤 膜的孔径可能不足以截留分子量低于 1.0 kDa 前体蛋白; 前体蛋白母离子响应值介于 2.0E⁺⁵~3.0E⁺⁵,其中以响应值 位于 2.0E⁺⁵ 附近为主,响应值偏低,考虑适当增加蛋白上 样量可能会进一步提高蛋白质鉴定数量(图 3)。





Fig.3 Mass spectrometry properties of MSDIN precursor proteins

2.3 MSDIN 毒性相关前体蛋白的鉴定结果

对 2017—2020 年四川地区食物中毒事件中收集到的 23 株鹅膏菌属毒蘑菇分析后, Protein Discover 软件共鉴定 内源性前体蛋白 50 个(表 2),结果显示:在自然状态下,多 数前体蛋白并非以完整的氨基酸序列形式存在,而是在其 氨基酸序列的 N 端和 C 端发生 3~5 个氨基酸的丢失,但其 毒性序列如"GIGCNPCV"处于序列中部,未发生暴露,仍 处于毒性前体状态;通过考察质谱信号响应值的相对强 弱,表 2 中列出了质谱响应最高的前体蛋白存在形式;进 一步分析发现,在已有的 50 个前体蛋白中,23 株鹅膏菌 属类蘑菇共有前体蛋白仅 13 个(表 3),其特征肽段二级质 谱信息见(图 4),提示鹅膏菌属中 MSDIN 毒性相关前体 蛋白具有一定的遗传多样性,与基因组和转录组相关研 究结果^[6]—致。

表 2 23 株鹅膏菌属蘑菇中鉴定出的 50 种 MSDIN 内源性前体蛋白 Table 2 Fifty kinds of MSDIN precursor protein identified from 23 strains of Amanita species

编号	名称	形态总数	首要存在形态	物种信息
U5L408	alpha-amanitin proprotein 5	16	NATRLPIWGIGCNPCVGDEVAALLTRGEA	Amanita exitialis
U5L3M7*	beta-amanitin proprotein	17	SDINATRLPIWGIGCDPCVGDDVTAL	Amanita exitialis
A0A023IWM8	alpha-amanitin proprotein	18	SDINATRLPIWGIGCNPSVGDEVTAL	Amanita rimosa
A0A023IWG4*	alpha-amanitin proprotein	15	SDINATRLPIWGIGCNPSVGDEVTAL	Amanita fuliginea
D6CFW3	beta-amanitin proprotein	17	INATRLPIWGIGCDPCIGDDVTALLTRGEA	Amanita phalloides
A0A023IWE3	alpha-amanitin proprotein	14	NATRLPIWGIGCNPCVGDEVTALLTRGEA	Amanita fuligineoides
U5L406*	alpha-amanitin proprotein 1	16	NATRLPIWGIGCNPCVGDDVTSVLTRGEA	Amanita exitialis

编号	名称	形态总数	首要存在形态	物种信息
A8W7M4*	alpha-amanitin proprotein	15	MSDINATRLPIWGIGCNPCVGDDVTTLLTRGEA	Amanita bisporigera
A0A023IWK6	beta-amanitin proprotein	13	NATRLPIWGIGCDPCVGDEVTALLTRGEA	Amanita phalloides
U5L3J9	MSDIN-like toxin proprotein 8	11	SDINATRLPFVFVASPPCVGDDIA	Amanita exitialis
U5L396*	MSDIN-like toxin proprotein 6	11	SDINTTRLPFVFVASPPCVGDDIAMVLTRG	Amanita exitialis
A8W7M9	MSDIN-like toxin proprotein 1	10	SDINVTRLPGFVPILFPCVGDDVNTAL	Amanita bisporigera
A0A023IWE2	beta-amanitin proprotein	14	DINATRLPIWGIGCDPCVGDDVTAVLTRGEA	Amanita pallidorosea
A8W7N0*	MSDIN-like toxin proprotein 2	9	SDINTARLPFYQFPDFKYPCVGDDIEMVL	Amanita bisporigera
P0CU62	cycloamanide F proprotein	9	SDINATRLPIVGILGLPCIGDDVNSTLTHGE	Amanita phalloides
A0A023IWM7*	beta-amanitin proprotein	10	SDINATRLPIWGIGCDPCVGDDVAALTTRGE	Amanita rimosa
A0A023IWD9	MSDIN-like toxin proprotein 4	8	SDINATRLPVWIGYSPCVGDDCIALLTR	Amanita exitialis
A8W7N8	MSDIN-like toxin proprotein 10	7	SDINATRLPGAYPPVPMPCVGDADNFTLTRGE	Amanita bisporigera
U5L409*	MSDIN-like toxin proprotein 2	6	SDINATRLPIIWAPVVPCISDDNDSTLTR	Amanita exitialis
A0A023IWM5#	MSDIN-like toxin proprotein 2	5	SDINATRLPIILAPIIPCINDDVNSTLTSG	Amanita phalloides
A8W7P0	MSDIN-like toxin proprotein 12	6	SDINATRLPHPFPLGLQPCAGDVDNLTLTKGEG	Amanita bisporigera
A8W7N4	MSDIN-like toxin proprotein 6	6	INGTRLPIPGLIPLGIPCVSDDVNPTLTRGE	Amanita bisporigera
U5L3J5	amanexitide proprotein 1	7	SDINTARLPVFSLPVFFPFVSDDIQAVLTRGESL	Amanita exitialis
A8W7N3	MSDIN-like toxin proprotein 5	7	SDINTARLPYVVFMSFIPPCVNDDIQ	Amanita bisporigera
A0A023IWG2#	MSDIN-like toxin proprotein 6	5	SDINATRLPLILLAALGIPSDDADSTLTRGER	Amanita phalloides
A0A023IWG1*	MSDIN-like toxin proprotein 3	6	SDINATRLPVWIGYSPCVGDDAVAL	Amanita fuligineoides
U5L3K1	amanexitide proprotein 2	5	SDINATRLPVFSLPVFFPFVSDDIQAVLTRGESL	Amanita exitialis
U5L3M6 [#]	MSDIN-like toxin proprotein 5	6	SDINATRLPLFFPPDFRPPCVGDADNFTLTRGENL	Amanita exitialis
A8W7M7	phallacidin proprotein 1	4	SDINATRLPAWLVDCPCVGDDVNRLLTRGESL	Amanita bisporigera
P0CU61	cycloamanide E proprotein	5	SDINAARLPSFFFPVPCISDDIEMVLTRGES	Amanita phalloides
A0A023IWE0#	MSDIN-like toxin proprotein 1	5	SDINATCLPAWLALCPCVGDDVNPTLT	Amanita fuligineoides
A8W7N6*	MSDIN-like toxin proprotein 8	6	SDINTARLPCIGFLGIPSVGDDIEMVLRHG	Amanita bisporigera
P0CU58	cycloamanide B proprotein	5	SDINAARLPSFFFPIPCISDDIEMVLTRGESLC	Amanita phalloides
A8W7N1*	MSDIN-like toxin proprotein 3	5	SDINTARLPFFQPPEFRPPCVGDDIEMVLTRG	Amanita bisporigera
A0A023IWK5 [#]	MSDIN-like toxin proprotein 2	5	SDINATRVPAWLAECPCVGDDISHLLTRGE	Amanita rimosa
A0A023IWK3	MSDIN-like toxin proprotein 2	4	SDINATRLPVWIGCSPCVGDDCIA	Amanita fuliginea
P0CU65	phalloidin proprotein	4	SDINASRLPAWLATCPCVGDDVNPTLSRGES	Amanita phalloides
U5L3J7	MSDIN-like toxin proprotein 7	3	SDINATRLPAWLTDCPCVGDDVNRLLTRGESL	Amanita exitialis
A0A023IWI8	phallacidin proprotein	3	SDINATRLPAWLVDCPCVGDDINRLLTR	Amanita pallidorosea
A0A023IWE1#	MSDIN-like toxin proprotein 4	3	SDINGTRLPWLATCPCVGEDVNPTLSR	Amanita phalloides
U5L3X0	MSDIN-like toxin proprotein 1	4	SDINATRLPIFWFIYFPCVSDVDSTL	Amanita exitialis
A8W7P1*	beta-amanitin proprotein	4	SDINATRLPIWGIGCDPCIGDDVT	Amanita phalloides
A0A023IWK4	MSDIN-like toxin proprotein 3	3	SDINATRLPSFFFPIPCISDDIEMVLTRGE	Amanita phalloides
A8W7P3	phalloidin proprotein (fragment)	2	SDINATRLPAWLATCPCAGDDVNPLLTR	Amanita ocreata
U5L3M8*	MSDIN-like toxin proprotein 3	3	SDINVIRAPLLILSILPCVGDDIEVLRRGEG	Amanita exitialis
A0A023IWI4 [#]	MSDIN-like toxin proprotein 2	2	SDINATRLPHLVRYPPYVGDGTDLTLNRGE	Amanita fuligineoides
A8W7N9 [#]	MSDIN-like toxin proprotein 11	2	SDINATRLPGMEPPSPMPCVGDADNFTL	Amanita bisporigera
P0CU64	phalloidin proprotein	2	SDINTTCLPAWLATCPCTGDDVNPTLTCGE	Amanita phalloides
A8W7P2	MSDIN-like toxin proprotein a	2	SDINATRLPIIGILLPPCIGDDVTLLL	Amanita phalloides
A8W7N2#	MSDIN-like toxin proprotein 4	2	SDINTARLPLFLPPVRMPPCVGDDIEMVLTRG	Amanita bisporigera

注:*为23株鹅膏菌属毒蘑菇共有前体蛋白;*为可食用蘑菇中检出的前体蛋白。

Table 5 Monitoring information of 15 kinds of common precursor proteins lacitatication 25 Amanaa species							
编号	特征肽段	质荷比/Da	电荷数	质量误差/ppm	信噪比		
U5L3M7	SDINATRLPIWGIGCDPCVGDDVTAL	676.08423	+4	7.06	41.6		
A0A023IWG4	SDINATRLPIWGIGCNPSVGDEVTAL	675.33917	+4	5.79	39.4		
U5L406	NATRLPIWGIGCNPCVGDDVTSVLTRGEA	754.37323	+4	3.70	20.3		
A8W7M4	MSDINATRLPIWGIGCNPCVGDDVTTLLTRGEA	1163.56091	+3	8.28	5.35		
U5L396	SDINTTRLPFVFVASPPCVGDDIAMVLTRG	798.66492	+4	4.72	13.7		
A8W7N0	SDINTARLPFYQFPDFKYPCVGDDIEMVL	849.15802	+4	1.99	9.37		
A0A023IWM7	SDINATRLPIWGIGCDPCVGDDVAALTTRGE	1072.52612	+3	5.55	11.3		
U5L409	SDINATRLPIIWAPVVPCISDDNDSTLTR	531.27893	+6	6.96	16.8		
A0A023IWG1	SDINATRLPVWIGYSPCVGDDAVAL	878.09943	+3	9.06	53.7		
A8W7N6	SDINTARLPCIGFLGIPSVGDDIEMVLRHG	1065.87427	+3	6.47	4.88		
A8W7N1	SDINTARLPFFQPPEFRPPCVGDDIEMVLTRG	905.20337	+4	1.03	13.4		
A8W7P1	SDINATRLPIWGIGCDPCIGDDVT	844.39697	+3	5.58	34.6		
U5L3M8	SDINVIRAPLLILSILPCVGDDIEVLRRGEG	1115.96387	+3	6.21	8.82		



itoring information of 13 kinds of common precursor proteins identified from 23 Amanita species





图 4 鹅膏菌属蘑菇 13 种共有前体蛋白特征肽段二级质谱图

Fig.4 Secondary mass spectras of the 13 kinds of common precursor protein characteristic peptides of Amanita species





图 4(续) 鹅膏菌属蘑菇 13 种共有前体蛋白特征肽段二级质谱图

Fig.4 Secondary mass spectras of the 13 kinds of common precursor protein characteristic peptides of Amanita species

2.4 鹅膏菌属特征性前体蛋白的验证结果

为进一步验证鹅膏菌属毒性前体蛋白的特异性,本研究选取市售的可食用蘑菇8种,以50种已鉴定到的鹅膏 菌属毒性前体蛋白为蛋白质标准谱库,按照1.2 实验方法 进行分析,结果显示41个前体蛋白(包括13种本研究中鹅 膏菌共有前提蛋白)未在可食用蘑菇中检出(表2),证明本 研究筛选出的鹅膏菌毒性前体蛋白具有种属特异性,可初 步用于鹅膏菌属的鉴定。

3 讨论与结论

本研究建立了纳升液相色谱-静电场轨道阱质谱法分 析鹅膏菌属 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白, 在非酶解 处理的情况下,鉴定了 50 种 MSDIN 毒性相关内源性前体 蛋白, 其中13个具有鹅膏菌属种属特性, 可以作为潜在的 靶标蛋白分析,在发生鹅膏菌属相关的食物中毒事件后, 由于烹饪破坏,无法获取原始样品进行形态分析,且常见 毒素(主要包括6种:α-鹅膏毒肽、β-鹅膏毒肽、γ-鹅膏毒肽、 二羟基鬼笔毒肽、羧基二羟基鬼笔毒肽及羧基三羟基鬼笔 毒肽)检测为阴性的情况下,初步用于鹅膏菌属的快速识 别,为中毒患者得到及时救治提供科学依据。对 50 种 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白自然状态下的存在形式 进行了分析,结果发现:单一 MSDIN 前体蛋白以多种形 态存在,与通过转录水平得到证实的前体蛋白的完整序列 信息比较,可以推测可能存在多种转录后的翻译调控机制 或者翻译后的一系列酶促反应,来调控不同鹅膏菌中 MSDIN 毒性前体蛋白的主要存在形态,进而影响其毒性; 但由于研究样本数量、地域代表性有限, 需扩大样本量之 后,进一步进行验证和深入挖掘。本研究借鉴蛋白质组学 方法, 在蛋白层面对 MSDIN 毒性相关内源性前体蛋白进 行分析,与传统基因组学和转录组学研究结果比较,更直 观的反映了作为毒素直接载体的前体蛋白的存在形态,为 MSDIN 相关毒素毒理学、酶促反应体内转化和生物活性蛋 白合成路径研究起到了积极的提示和促进作用。

参考文献

- MICHELOT D, MELENDEZ-HOWELL LM. Amanita muscaria: Chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology [J]. Mycol Res, 2003, 107(2): 131–46.
- [2] LI WW, SARA MP, LIU Z, *et al.* Mushroom poisoning outbreaks—China, 2010–2020 [J]. China CDC Weekly, 2021, 3(24): 518–522.
- [3] LI HJ, ZHANG HS, ZHANG YZ, et al. Mushroom poisoning outbreaks—China, 2021 [J]. China CDC Weekly, 2022, 4(3): 35–40.
- [4] LI P, DENG W, LI T. The molecular diversity of toxin gene families in lethal *Amanita* mushrooms [J]. Toxicon, 2014, 83: 59–68.
- [5] LI HJ, ZHANG YZ, ZHANG HS, et al. Mushroom poisoning outbreaks—China, 2022 [J]. China CDC Weekly, 2023, 5(3): 45–50.

- [6] HE Z, LONG P, FANG F, et al. Diversity of MSDIN family members in amanitin-producing mushrooms and the phylogeny of the MSDIN and prolyl oligopeptidase genes [J]. BMC Genom, 2020, 21: 440.
- [7] ZHOU S, LI X, LVLI Y, et al. Novel cyclic peptides from lethal Amanita mushrooms through a genome-guided approach [J]. J Fungi (Basel), 2021, 7(3): 204.
- [8] LUO H, HALLEN-ADAMS H, LVLI Y, et al. Genes and evolutionary fates of the amanitin biosynthesis pathway in poisonous mushrooms [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2022, 119(20): e2201113119.
- [9] HE MQ, WANG MQ, CHEN ZH, et al. Potential benefits and harms: A review of poisonous mushrooms in the world [J]. Fungal Biol Rev, 2022, 42: 56–68.
- [10] LÜLI Y, ZHOU S, LI X, et al. Differential expression of amanitin biosynthetic genes and novel cyclic peptides in Amanita molliuscula [J]. J Fungi, 2021, 7(5): 384.
- [11] HE Y, ZHANG CH, DENG WQ, et al. Transcriptome sequencing analysis of the MSDIN gene family encoding cyclic peptides in lethal *Amanita fuligineoides* [J]. Toxicon, 2020, 183: 61–68.
- [12] TIEWSOH I, BHATTACHARYA PK, BARMAN B, et al. Delayed liver toxicity and delayed gastroenteritis: A 5 year retrospective analysis of the cause of death in mushroom poisoning [J]. J Family Med Prim Care, 2022, 11(5): 1963–1969.
- [13] DIAZ JH. Amatoxin-containing mushroom poisonings: Species, toxidromes, treatments, and outcomes [J]. Wild Environ Med, 2018, 29(1): 111–118.
- [14] JANATOLMAKAN M, JALILIAN M, REZAEIAN S, et al. Mortality rate and liver transplant in patients with mushroom poisoning: A systematic review & meta-analysis [J]. Heliyon, 2022, 9(1): e12759.
- [15] WU J, GONG X, HU Z, et al. Acute liver failure caused by Amanita verna: A case series and review of the literature [J]. BMC Surg, 2021, 21(1): 436
- [16] ENJALBERT F, RAPIOR S, NOUGUIER-SOULÉ J, et al. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2002, 40(6): 715–757.
- [17] BARBOSA I, DOMINGUES C, RAMOS F, et al. Analytical methods for amatoxins: A comprehensive review [J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 232: 115421.
- [18] GAO J, LIU N, ZHANG X, *et al.* Utilizing the DNA aptamer todetermine lethal α-amanitin in mushroom samples and urine by magnetic bead-ELISA (MELISA) [J]. Molecules, 2022, 27(2): 538.
- [19] SHARMA S, AYDIN M, BANSAL G, et al. Determination of amatoxin concentration in heat-treated samples of *Amanita phalloides* by high-performance liquid chromatography: A forensic approach [J]. J Forensic Leg Med, 2021, 78: 102111.
- [20] XU F, GONG B, XU Z, et al. Reverse-phase/phenylboronic-acid-type magnetic microspheres to eliminate the matrix effects in amatoxin and phallotoxin determination via ultrahigh-performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry [J]. United Kingdom, 2020, 2020: 127394.
- [21] BAMBAUER TP, WAGMANN L, WEBER AA, *et al.* Analysis of α and β -amanitin in human plasma at subnanogram per milliliter levels by reversed phase ultra-high performance liquid chromatography coupled to

orbitrap mass spectrometry [J]. Toxins, 2020, 12(11): 671.

- [22] WEI J, WU J, CHEN J, et al. Determination of cyclopeptide toxins in Amanita subpallidorosea and Amanita virosa by high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry [J]. Toxicon, 2017, 133: 26–32.
- [23] 薛荣旋,刘国平,黄莹偲,等. 分散固相萃取结合超高效液相色谱-串 联质谱法快速测定毒蘑菇中的 6 种野生蘑菇毒素[J]. 食品安全质量检 测学报, 2021, 12(17): 6918–6923.
 XUE RG, LIU GP, HUANG YS, *et al.* Rapid determination of 6 kinds of wild mushroom toxins in poisonous mushrooms by dispersive solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatographytandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(17): 6918–6923.
- [24] 许欣欣,陈春晓,仲岳桐,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定毒蘑菇中 5 种强毒性蘑菇毒素含量[J].食品安全质量检测学报,2020, 11(19):6936-6941.

XU XX, CHEN CX, ZHONG YT, et al. Determination of 5 kinds of virulent mushroom toxins in poisonous mushroom by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(19): 6936–6941.

[25] 伍福仙,张志清,王瑾,等.超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱 法检测毒蘑菇中 4 种常见毒素含量[J].食品安全质量检测学报, 2019, 10(22):7656-7664.

WU FX, ZHANG ZQ, WANG J, *et al.* Determination of 4 kinds of common toxins in poisonous mushrooms by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(22): 7656–7664.

- [26] 郎乐, 王庆峰, 刘斌. 超高效液相色谱-串联质谱法测定野生蘑菇中的 6 种鹅膏肽类毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(6): 1506–1510 LANG L, WANG QF, LIU B. Determination of 6 kinds of amatoxins and phallotoxins in wild mushrooms by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(6): 1506–1510.
- [27] ROZANOVA S, BARKOVITS K, NIKOLOV M, et al. Quantitative mass spectrometry-based proteomics: An overview [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2228:85–116..
- [28] HSU CC, TSAI CF, TAO WA, et al. Phosphoproteomic strategy for profiling osmotic stress signaling in arabidopsis [J]. J Vis Exp, 2020, (160): 10. 3791/61489
- [29] WIŚNIEWSKI JR. Filter-aided sample preparation for proteome analysis [J].

Methods Mol Biol, 2018, 1841: 3-10.

- [30] PRESTAGIACOMO LE, GABRIELE C, MORELLI P, et al. Proteomic profile of EPS-urine through FASP digestion and data-independent analysis [J]. J Vis Exp, 2021, (171): 10.3791/62512.
- [31] KAYILI HM, RAGOUBI ZME, SALIH B. An integrated stage-tip-based glycomic and glycoproteomic approach for simple and rapid N-glycosylation profiling of glycoproteins [J]. Biomed Chromatogr, 2022, 36(12): e5503.
- [32] SHI J, MENG S, WAN L, *et al.* Deep N-terminomics of Mycobacterium tuberculosis H37Rv extensively correct annotated encoding genes [J]. Genomics, 2022, 114(1): 292–304.
- [33] LÓPEZ M, REGUEIRO U, BRAVO SB, et al. Shotgun proteomics for the identification and profiling of the tear proteome of keratoconus patients [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2022, 63(5): 1.
- [34] DANKO K, LUKASHEVA E, ZHUKOV VA, et al. Detergent-assisted protein digestion—on the way to avoid the key bottleneck of shotgun bottom-up proteomics [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13903.
- [35] ABRIL AG, CALO-MATA P, BÖHME K, et al. Shotgun proteomics analysis, functional networks, and peptide biomarkers for seafoodoriginating biogenic-amine-producing bacteria [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 7704.
- [36] DI-RENZO T, REALE A, NAZZARO S, et al. Shotgun proteomics for the identification of yeasts responsible for pink/red discoloration in commercial dairy products [J]. Food Res Int, 2023, 169: 112945.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



王希希,博士,副主任技师,主要研究 方向为卫生检验/蛋白质组和基因组学。 E-mail: pizzawx@sina.cn



王 炼,博士,主任技师,主要研究方 向为食品理化检验。 E-mail: septwolvesnjwl@163.com