

植物蛋白质组学研究进展

梁宇 荆玉祥 沈世华*

(中国科学院植物研究所光合作用和环境分子生理学重点实验室 北京 100093)

摘要 蛋白质组学是后基因组时代功能基因组学研究的新兴学科和热点领域。该文简要介绍了蛋白质组学产生的科学背景、研究方法和研究内容。蛋白质组学研究方法主要有双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)、质谱(Mass-spectrometric)技术、蛋白质芯片(Protein chips)技术、酵母双杂交系统(Yeast two-hybrid system)、植物蛋白质组数据库等。其应用的范围包括植物群体遗传学、在个体水平上植物对生物和非生物环境的适应机制、植物的发育和组织器官的分化过程,以及不同亚细胞结构在生理生态过程中的作用等诸多方面。同时对植物蛋白质组学的发展前景进行了展望。

关键词 双向电泳 质谱 蛋白质组 植物蛋白质组学

ADVANCES IN PLANT PROTEOMICS

LIANG Yu JING Yu-Xiang and SHEN Shi-Hua*

(Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Proteomics is one of the most active research fields in the post-genomic era. The concepts, research methods and major applications of proteomics in plant science are briefly introduced in this paper.

The term "proteomics" comes from two words, "protein" and "genome" and refers to the proteins expressed by the whole genome or the presence and action modes of all the proteins in a cell, tissue, organ, and whole organism. It is generally acknowledged that the field of plant proteomics was based much on the development and improvement of techniques and methods, such as two-dimensional electrophoresis (2D-E), mass spectrometry (MS), protein chips, yeast two-hybrid system, and proteomic databases. In population genetics, proteomic techniques are helpful in studies of genetic diversity and mutation. In individual plants, proteomic studies are helpful in understanding the response of plants to biotic and abiotic environmental factors. Proteomic differences among different plant tissues or organs could be used to better understand tissue differentiation and development of the plant embryo. Proteomic differences also exist between organelles in plant cells, and plant proteomic studies could be used to understand mechanisms that control many physiological processes. Different perspectives of proteomics were also discussed in this paper.

Key words Two-dimensional electrophoresis (2D-E), Mass spectrometry (MS), Proteome, Plant proteomics

1 蛋白质组学概念、内容及其产生背景

1.1 蛋白质组学的概念

蛋白质组(Proteome)一词是由英文单词蛋白质(Protein)的前半部分加上基因组(Genome)的后半部分组合而成,它是指基因组表达产生的所有相应的蛋白质,即细胞或组织或机体全部蛋白质的存在及活动方式(Wasinger *et al.*, 1995)。蛋白质组学(Proteomics)一词是由澳大利亚学者威尔金斯(Marc Wilkins)和威廉姆斯(Keith Williams)在1994年意大利召开的一次科学会议上首次提出,并由Wasinger

等(1995)第一次在出版物中使用。蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,从整体蛋白质水平上,在一个更加深入、更加贴近生命本质的层次上去探索和发现生命活动的规律和重要的生理、病理现象等。

1.2 植物蛋白质组学的研究内容

蛋白质组学研究主要包括蛋白质的表达模式和蛋白质的功能模式两个方面。

蛋白质表达模式的研究是蛋白质组学研究的基础内容,主要是研究特定条件下某一细胞或组织的所有蛋白质的表征问题。常规的方法是提取蛋白质,经2D-E(Two-dimensional electrophoresis)分离形

收稿日期:2003-06-13 接受日期:2003-11-03

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2001CB108902)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-307)和中国科学院植物研究所创新方向性项目(A)

在本论文写作过程中中国科学院植物研究所马克平研究员提供了宝贵意见,在此表示衷心感谢!

* 通讯作者 Author for correspondence E-mail: shshen@ns.ibcas.ac.cn

成一个蛋白质组的二维图谱,通过计算机图像分析得到各蛋白质的等电点、分子量、表达量等,再结合以质谱分析为主要手段的蛋白质鉴定,建立起细胞或组织或机体在所谓“正常生理条件下”的蛋白质组图谱和数据库。然后,在此基础上,可以比较分析在变化了的条件下蛋白质组所发生的变化,如蛋白质表达量的变化、翻译后的加工修饰、蛋白质在亚细胞水平上定位的改变等,从而发现和鉴定出特定功能的蛋白质及其基因。

蛋白质功能模式的研究是蛋白质组学研究的重要目标。无论是基因组研究还是蛋白质组研究,最终目标是揭示所有基因或蛋白质功能及其作用模式。一方面,蛋白质与蛋白质、蛋白质与 DNA 之间的相互作用、相互协调是细胞进行信号传导及代谢活动的基础。另一方面,蛋白质的结构是蛋白质发挥其功能的前提,对蛋白质结构的认识也成为了解大量涌现的新基因功能的一个重要途径。

1.3 植物蛋白质组学的产生背景

植物蛋白质组学是在基因组学的研究成就和高通量的蛋白质分析技术得到突破的背景下产生的新兴学科,基因组研究的发展是蛋白质组学产生的重要前提。

基因组研究是生物科学近十几年来的研究热点。人类基因组计划被誉为 20 世纪的 3 大科技工程之一,并取得了辉煌的成就。2000 年 6 月科学家公布人类基因组工作草图(Macilwain *et al.*, 2000),标志着人类在解读自身“生命之书”的路上迈出了重要一步。2001 年 2 月,中、美、日、德、法、英等 6 国科学家和美国塞莱拉公司联合公布人类基因组图谱及初步分析结果(Lander *et al.*, 2001),宣告了一个新的纪元——后基因组(即功能基因组)时代的到来。

植物基因组学的研究主要集中在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)两种模式植物上。2000 年 12 月美、英等国科学家宣布测出拟南芥基因组的完整序列(The Arabidopsis Genome Initiative, 2000),这是人类首次全部破译高等植物的基因序列。2002 年是水稻基因组学研究取得重大成就的一年,首先中国的科学家和 Syngenta 公司的科学家分别发表籼稻和粳稻基因组“工作框架图”(Yu *et al.*, 2002; Goff *et al.*, 2002),继后日本和中国的科学家又分别公布了粳稻第 1 号和第 4 号染色体的全序列(Feng *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2002)以及籼稻粳稻基因的“精细结构图”,被认为是基因组学研究的又一个重要里程碑。

基因组密码的破译,拉开了生命科学研究的序幕,但是,要真正揭示生命活动的奥秘,基因组研究本身又无能为力。因为,基因组仅仅是遗传密码和遗传信息的载体,在生命活动的不同过程中恒定不变,不能反映有机体在生命活动过程中基因表达的时空关系和网络调控。在后基因组时代,研究重心转移到基因功能的解析,即利用结构基因组所提供的信息和高通量的实验手段在转录组(Transcriptome)和蛋白质组水平上系统地分析基因的功能(Oliver, 2000)。

拟南芥和水稻的功能基因组学研究已经开始,其中美国和日本科学家做了大量的工作。其它植物如玉米(*Zea mays*)(Touzet *et al.*, 1996)、小麦(*Triticum aestivum*)(Weiss *et al.*, 1997)、苜蓿(*Medicago truncatula*)(Catoira *et al.*, 2000)、松树(*Pinus pinaster*)(Costa *et al.*, 1999)等的功能基因组学研究也已经有人涉及。

蛋白质是基因功能的体现者和执行者。现在已经证明,一个基因并不只产生一个相应的蛋白质,它可能会产生几个,甚至几十个蛋白质。机体所处的不同环境和本身的生理状态差异,会导致基因转录产物有不同的剪切和转译成不同的蛋白。蛋白再进行加工修饰和转移定位,才具有活性和生物功能,产生相应的生理作用,适宜相应的生存环境(Li & Assmann, 2000)。在转录水平上所获取的基因表达的信息并不足以揭示该基因在细胞内的确切功能。直接对蛋白质的表达模式和功能模式进行研究就成为生命科学发展的必然趋势。因此,研究基因组编码的全蛋白质功能及其相互作用关系的蛋白质组学应运而生(Anderson & Anderson, 1998)。尽管蛋白质组学在 20 世纪 90 年代中后期才出现,但由于学科的前沿性和巨大的应用市场,*Nature*、*Science* 杂志在公布人类基因组序列草图的同时,分别发表了述评和展望,将蛋白质组学的地位提到前所未有的高度,认为它是功能基因组学前沿研究的战略制高点和新世纪最大的战略资源——“有用基因”争夺战的重要“战场”(Kaiser, 2000; Macilwain, 2000)。

2 蛋白质组学的研究方法

蛋白质组学研究方法和技术有很多,并且不断发展和出现新的技术。本文限于篇幅,只能简要介绍主要的蛋白质组学研究技术。

2.1 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)

2D-PAGE 方法的应用始于 20 世纪 70 年代

(O'Farrell *et al.*, 1975),但迄今为止,它仍然是分离蛋白质的最有效的方法。与基因组研究不同的是,蛋白质组学并没有类似于 PCR 反应的扩增方法,因此,分离样品的精确性就成了至关重要的问题。目前常用的大规格胶(20 cm × 20 cm)是可再生的,并且借助于考马斯亮蓝和银染,可以对蛋白质进行定量,应用荧光染料,还可以使一定范围内的上千种蛋白质定量地显现出来,这些都大大提高了 2D-PAGE 的精确性(Steinberg *et al.*, 1996),当然 2D-PAGE 技术还远远没有达到完善的地步,例如要使低水平表达的蛋白质(即“低拷贝数蛋白质”,每细胞 10 ~ 1 000 个拷贝)显现出来仍有困难,而高水平表达的蛋白质(即所谓“管家蛋白质”,每细胞大于 1 000 个拷贝)有时也会出现小部分的模糊。最近一些 2D-PAGE 相关技术,如高度敏感的质谱(Mass-spectrometric)和 EST 数据库的发展,使分离和鉴定蛋白质的工作又大大前进了一步。

2.2 质谱(Mass-spectrometric)技术

质谱技术是近年来蛋白质组学研究最重要的技术突破之一(Pandey & Mann, 2000),其原理是将样品分子离子化,根据离子间质荷比(m/z)的差异来分离并确定质量,是高灵敏度、高特异性地快速鉴定生物分子的技术。质谱测定中首先将通过 2D-PAGE 分离到的蛋白质用特定的蛋白酶(例如胰蛋白酶)消化成肽段,然后用质谱仪进行分析。

质谱鉴定有两条主要途径。一是“肽链质量图谱”途径。测量质谱的方法是基质辅助激光解吸/电离法(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI),通过测定一个蛋白质酶解混合物中肽段的电离飞行时间来确定其分子量等数据,所以也称为基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF),最后通过相应的数据库搜索鉴定蛋白质(Berndt *et al.*, 1999)。随着数据库中的全长基因序列越来越多, MALDI 鉴定的成功率也越来越高。二是串联质谱途径,将胰蛋白酶消化后的蛋白质单个肽链直接从液相经“电喷雾离子化”而被电离,分解为氨基酸或含有 C 末端的片段,片段化离子被喷射到“串联质谱仪”进行质量测定,以得到序列信息。它的主要优点是:对鉴定蛋白质来说,由几个肽链片段化得到的序列信息比一系列的肽链质量更具有特异性(Pandey *et al.*, 2000)。片段的数据不仅可以在蛋白质序列数据库中搜寻,还可以在核酸数据库,例如 EST 数据库,甚至原始的基因组数据库中搜寻。

最近发展起了一种新型的质谱仪,它将 MALDI

离子源与高效的串联质谱仪系统结合起来(可将单个肽链片段化)(Shevchenko *et al.*, 2000),把高产量的肽链图谱法与高特异性的肽链序列法结合起来。并将两步的质谱分析合并为一步。质谱技术还可用于蛋白质磷酸化、硫酸化、糖苷化以及其它一些修饰的研究(Pandey *et al.*, 2000)。

2.3 蛋白质芯片(Protein chips)技术

蛋白质芯片技术是一种高通量、微型化和自动化的蛋白质分析技术。在蛋白质芯片技术途径中,首先将一系列的“诱饵(Bait)”蛋白质(如抗体)按照一定的排列格式固定在经特殊处理的材料表面上(Lueking *et al.*, 1999)。然后以我们感兴趣的样品为探针来探查该表面,那些与相应的抗体相结合的蛋白质就会被吸附在表面上。而后把未与抗体结合的蛋白质洗掉,把结合的蛋白质洗脱下来,经凝胶电泳之后通过质谱法进行鉴定。这种技术实际上是一种大规模的酶联免疫分析。可以迅速地将我们感兴趣的蛋白质从混合物中分离出来,并进行分析。蛋白质芯片上的“诱饵”蛋白可根据研究目的不同,选用抗体、抗原、受体、酶等具有生物活性的蛋白质。

蛋白质芯片要比 DNA 芯片复杂得多。芯片制作过程中保持蛋白质的生物活性,成为限制蛋白质芯片发展的瓶颈技术。近年来,在蛋白质芯片制作方面获得突破性进展(MacBeath & Schreiber, 2000)。对蛋白质芯片的检测可以通过对不同状态细胞的蛋白质进行荧光标记,从测定荧光的强度上可以得知结合在抗体上的蛋白质的富集程度。或直接利用 MALDI/MS 技术检测结合到芯片上的物质来检测(Davies *et al.*, 1999)。

蛋白质之间的相互作用是蛋白质组研究中的一个关键问题(Blackstock *et al.*, 1999),将直接导致我们对蛋白质的生物功能的了解。蛋白质芯片技术可被用来进行这方面的研究。将诱饵蛋白固定在固相支持物上,用蛋白质混合物进行探查。把未与诱饵蛋白结合的蛋白质洗掉,把结合的蛋白质洗脱下来,经凝胶电泳分离之后,通过质谱法进行鉴定。这样,在一个实验中,与诱饵蛋白相互作用的所有蛋白质都可以被鉴定(Neubauer *et al.*, 1998)。蛋白质芯片能够同时分析上千种蛋白质的变化情况,使得在基因组水平研究蛋白质的功能(如酶活性、抗体的特异性、配体-受体交互作用以及蛋白质与蛋白质或核酸或小分子的结合)成为可能。

2.4 酵母双杂交系统(Yeast two-hybrid system)

酵母双杂交系统正成为研究蛋白质间相互关系

的有力工具。其理论基础是转录因子的结构模型,即当转录因子的 DNA-结合结构域与激活结构域紧密结合以后,将导致一系列基因转录的增加。酵母双杂交系统利用转录因子 GAL4 的 DNA-结合结构域(GAL4-BD)与激活结构域(GAL4-AD)的特异载体,将许多开放阅读框架(ORFs)分别连在这两种载体上,构成文库,然后转入酵母细胞,并与酵母细胞克隆杂交。当其中两个 ORF 编码的蛋白质在酵母细胞中表达,并发生相互作用时,就会将 GAL4-BD 和 GAL4-AD 结合在一起,从而导致报告基因转录的增加。通过培养基营养缺陷筛选法,可将没发生相互作用的酵母克隆筛选掉,而将发生相互作用的酵母克隆保留下来。然后对发生相互作用的蛋白质进行分析,通过测序就可以鉴定 ORF。因此,酵母双杂交系统对大规模筛选分析蛋白质间的相互作用来说是一项简便易行的方法。

酵母双杂交系统的具体应用可分为两种方法,即阵列法(Array method)和文库筛选法(Library screening method)(Pandey *et al.*, 2000)。用阵列法鉴定了 192 个 ORF,文库筛选法对 87% 的酵母基因组进行了研究。总共发现了 957 个可能的相互作用的蛋白(Walhout *et al.*, 2000)。另一个研究组分析了 10% 的酵母基因组,发现了 183 个可能的相互作用蛋白(Ito *et al.*, 2000)。上述两项大规模研究所发现的蛋白质间的相互作用大多数是新的。但是利用酵母双杂交系统的研究工作仅仅是潜在的蛋白质间的相互作用,结果还需要进一步的生物学实验验证或者排除。Vidal 和 Endol(1999)对酵母双杂交系统的改进,叫做“反向”双杂交,它可被用来鉴定破坏蛋白质间相互作用的复合物和肽链。

2.5 植物蛋白质组数据库

目前标准而且可重复的 2D-PAGE 蛋白质分析方法使得大规模的蛋白质组研究成为可能,再加上其它技术的辅助(如蛋白质免疫检测、微序列分析、质谱等),可以使我们获得大量的蛋白质表达的信息。这些信息可以贮存在蛋白质数据库中,并与其它数据库相联接。通过互联网可以查到的植物蛋白质组数据库有:

<http://www.rs.noda.sut.ac.jp/~kamon/2de.html>

<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/2D/>

<http://www.edi.ac.uk/swissprot>

<http://psort.nibb.ac.jp/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

<http://www.inra.fr.Internet/?Produita/Predotar>

<http://spinx.rug.ac.be/8080/ppmdb/index.html>

<http://www.biokemi.su.se/chloroplast/>

目前的数据库集中在模式植物拟南芥,重要的粮食作物水稻、玉米,以及松树等植物上,这些数据库都提供可以点击的 2D-PAGE 图像,还包括植物各器官(根、茎、叶、芽、种子)各组织(愈伤组织、木质部、韧皮部)或基因型间多肽形式的比较。

蛋白质组数据库的一个重要特征是它们建立了与基因组计划的联系。目前的蛋白质组数据库所包含的植物都是已完成或正在进行系统测序的物种。有的是在基因组水平(如拟南芥、水稻),有的是在转录组水平(如拟南芥、玉米、水稻、松树的表达序列标签 ESTs)。有趣的是在拟南芥原生质膜蛋白质数据库中发现许多蛋白质与未知的 ESTs 相关联,这为研究在亚细胞水平表达的蛋白质的编码基因提供了第一手资料。利用蛋白质组数据库和 ESTs 数据库,第一次将植物中的转录本与相关的蛋白质联系起来。

3 蛋白质组学在植物科学研究中的应用

3.1 植物群体遗传蛋白质组学

3.1.1 遗传多样性蛋白质研究

基于基因组学的一些遗传标记,如 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)、SSR(Simple Sequence Repeat)、ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)等,已经广泛地应用于植物遗传研究中。与基因组学的遗传标记相比,由于蛋白质组学的研究对象是基因表达的产物,是介于基因型和表型之间的特性,因而蛋白质组学标记是联系基因多样性和表型多样性的纽带,具有独特的意义。

通过蛋白质组比较来检测遗传多样性的变化已有许多成功的尝试。Barreneche 等(1996)比较了 6 个欧洲国家的 23 种橡树,分析了幼苗的总蛋白质,共得到 530 种蛋白质,其中 101 个具有多态性。实验结果显示种内和种间的距离非常接近,并且证实无梗花栎(*Quercus petraea*)和夏栎(*Quercus robur*)两个种的遗传分化水平很低。Picard 等(1997)利用 2D-PAGE 分析了亲缘关系很近的硬粒小麦不同株系的遗传多样性,发现品系间的多态性很低并且 7 个蛋白可以用于基因型的鉴定。David 等(1997)也利用 2D-PAGE 技术比较了栽培于不同环境下但起源于同一种群的小麦,结果所有的种群都与原种群有

差别, David 等认为, 这不是由随机漂移引起, 而是由适应其各自的气候条件而形成。

3.1.2 突变体的蛋白质组学研究

突变体研究是植物遗传学的重要研究手段之一, 应用蛋白质组学的方法对基因突变引起的蛋白质表达变化进行研究可以揭示一些植物生理生态过程的机制。具体做法通常是对在相同条件下栽培的突变体及野生型植物的 2D-PAGE 图谱进行比较, 受到影响的蛋白质通过质谱法或 Edman 测序法进行鉴定, 为研究表型突变背后的生化过程提供有价值的信息。

Santoni 等(1994)对模式植物拟南芥发育突变体的总蛋白质进行了分析, 结果显示突变体具有与野生型植物不同的独特的 2D-PAGE 图谱, 并且得到了与下胚轴长度有关的一个肌动蛋白的同源异构体。Herbik 等(1996)分析了野生型和缺铁突变体番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 的蛋白质 2D-PAGE 图谱, 鉴定了参与无氧代谢和胁迫防御的几种酶, 如甘油醛-3-磷酸脱氢酶、甲酸脱氢酶、抗坏血酸过氧化物酶、超氧化物歧化酶、质体蓝素等, 并分析了这些酶在获得铁的过程中的功能。von Wieren 等(1997)比较了野生型和铁摄取缺陷型突变体玉米的蛋白质 2D-PAGE 图谱, 确定了 4 个与铁离子跨膜运输有关的多肽。Komatsu 等(1999a)比较了水稻绿苗和白化苗的蛋白质 2D-PAGE 图谱, 发现了在绿苗中参与光合作用的蛋白质, 而白化苗中仅有此蛋白质前体。而抗坏血酸过氧化物酶只在白化苗中存在, 说明抗氧化酶在白化苗中起细胞保护功能。

当已知突变的基因时, 可用蛋白质组学技术研究受此基因控制的有关信息。玉米中的 *Opaque 2* (*O2*) 基因编码一个属于亮氨酸拉链家族的转录因子, 这个转录因子对蛋白质的表达有多种效应。Damerval 和 Le Guillonnx (1998) 将野生型与 *O2* 基因突变体的蛋白质 2D-PAGE 图谱进行比较, 鉴定出属于各种代谢途径的一些酶, 说明 *O2* 基因是玉米代谢中联系多种代谢途径的调节基因。这些结果表明, 单一位点的突变可以引起蛋白质表达的多种效应, 而用蛋白质组学技术可以看到这些效应。

3.2 植物环境信号应答和适应机制蛋白质组学

3.2.1 非生物环境因子蛋白质组学研究

在植物的生存环境中, 一些非生物因子胁迫, 如干旱、盐渍、寒害、臭氧、缺氧、机械损伤等, 对植物的生长发育和生存都会产生严重影响。这些胁迫可以引起大量的蛋白质在种类和表达量上的变化, 而蛋

白质组学研究可以使我们更好地了解非生物胁迫的伤害机制以及植物对非生物环境的适应机制。

Salekdeh 等(2002)研究两个水稻品种 (*Oryza sativa* L. cv CT9993 和 cv IR62266) 干旱胁迫下以及恢复灌溉后的蛋白质组。分析叶提取物电泳胶上的 1 000 多个蛋白点, 发现有 42 个蛋白点的丰度在干旱胁迫状态下变化明显, 其中 27 个点在两个品种中显示了不同的反应方式。恢复正常灌溉 10 d 以后, 所有蛋白的丰度完全或是在很大程度上恢复成与对照一样。Costa 等(1998)发现海岸松 (*Pinus pinaster*) 中 38 个受干旱影响的蛋白质, 其中 24 个由干旱诱导, 并且不同基因型对干旱胁迫的反应差别很大。

Ramani 和 Apté(1997)用放射性同位素自显影双向电泳法研究水稻幼苗盐胁迫下多基因的瞬时表达表明, 至少有 35 个蛋白质被盐胁迫诱导和 17 个蛋白质被抑制, 包括 20 个在这之前未曾报道的低丰度蛋白。这些发现对寻找渗透压应答新基因, 尤其是那些在水稻盐耐性获得中起瞬时调节作用的基因十分重要。

Agrawal 等(2002)用 2D-PAGE、氨基酸测序和免疫杂交法, 首次检测了臭氧对水稻幼苗蛋白的影响。臭氧对叶片强烈的可见坏死伤害和随之而来的抗坏血酸过氧化物酶蛋白的增加, 反映在二维电泳胶上蛋白质点分布的变化。在被检测的具有可重复结果的 56 个蛋白中, 52 个蛋白点随控制条件的不同发生的变化可以通过肉眼判定。检测的 56 个蛋白中, 6 个蛋白是 N-端阻断, 14 个蛋白的序列无法测定, 36 个蛋白的 N-端序列和一个蛋白的内部序列被测定。研究发现臭氧造成叶片光合蛋白的剧烈减少(包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶)和各种防御、胁迫相关蛋白的表达。

Shen 等(2003)应用蛋白质组学方法研究水稻叶鞘伤害反应相关蛋白, 首次揭示了水稻叶鞘伤害信号应答过程中蛋白质的变化。比较伤害前后蛋白质表达谱, 发现伤害后至少有 10 个蛋白被诱导或上调, 19 个蛋白被抑制或表达量下降。通过 N-端或内部氨基酸测序, 分析了其中的 14 个蛋白, 鉴定了 9 个蛋白的功能, 其它蛋白由于 N-端阻断, 无法得到氨基酸序列信息。此外, 还通过 MALDI-TOF-MS 测定了 11 种蛋白质, 并与水稻数据库相吻合。在基因功能被确认的蛋白质中, 表达量下降的蛋白有 2 个钙网蛋白、组蛋白 H1 和血红蛋白和一种假定的过氧化物酶, 表达量增加的蛋白包括胰蛋白酶抑制因子 (BBI), 两种假定的蛋白激酶受体类似物、钙调素

相关蛋白、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基、2 个甘露糖结合外源凝集素。其中 4 种蛋白质已被证实为与伤害反应直接作用的蛋白质。

Chang 等(2000)对玉米进行缺氧和低氧胁迫研究,发现低氧处理的效应不仅仅是缺氧胁迫诱导的糖酵解酶的增加。通过质谱法共鉴定了 46 个蛋白质,均为在植物中首次得到鉴定。

3.2.2 生物环境因子蛋白质组研究

植物的生长发育不仅与非生物因子密切相关,还受到生物因子如动物、植物、微生物等的极大影响。例如,当植物受到竞争、动物取食、微生物共生或寄生、病菌侵害时,植物将改变体内蛋白质的表达和酶类的活性等来完成这些信号的感应、传递以及生物学效应的实现。因此,通过对蛋白质的研究有助于人们更好地了解生物之间的相互作用机制。目前关于非生物因子对植物影响的蛋白质组学研究主要集中在植物与根瘤菌以及植物与菌根真菌的共生关系上。

众所周知,根瘤菌与植物相互识别后,进入植物细胞内变成具有固氮能力的类菌体。类菌体周隙(PS, Peribacteroid space)是类菌体周膜(Peribacteroid membrane, PBM)与细菌质膜之间的间隙,是共生体成员之间交换代谢产物的媒介。Saalbach 等(2002)用蛋白质组学的方法,鉴定了 PBM 与 PS 中的蛋白。结果表明 PS 甚至 PBM 的制备物中含有大量的类菌体蛋白。有趣的是,除了一些 PS/PBM 蛋白,还有许多内膜蛋白,包括 V-ATPase, BIP 和一个完整的 COPI-coated vesicles 的膜蛋白存在于 PBM 中,这证明了 PBM 是由宿主细胞的内膜系统产生的。Wienkoop 和 Saalbach(2003)选取豆科模式植物日本百脉根(*Lotus japonicus*),用蛋白质组学的手段研究 PBM 的蛋白质组。通过纳米液相色谱分离多肽,然后用串联质谱(MS/MS)进行分析。检索非丰度蛋白数据库和通过串联质谱得到的绿色植物表达序列标签数据库,鉴定了大约 94 个蛋白,远远多于迄今为止所报道的 PBM 蛋白的数目。特别是一些膜蛋白得到检测,如糖和硫酸盐转运子、内膜联合蛋白(如 GTP 结合蛋白)和囊泡受体、信号相关蛋白(如受体激酶、Calmodulin, 14-3-3 蛋白和病原体应答蛋白包括 HIR 蛋白)。通过非变性凝胶电泳分析了两个特征蛋白复合物。结果鉴定了 PBM 中参与特定生理过程的蛋白和结瘤特异表达序列标签数据库(EST)中的 PBM 蛋白质组。

Bestel-Corre 等(2002)用双向凝胶电泳和银染分

析接种灌木菌根真菌(*Glomus mosseae*)或根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的模式植物苜蓿不同时期的根蛋白质组。MALDI-TOF-MS 分析胰蛋白酶消化的蛋白质组,在结瘤的根中鉴定到了苜蓿的一个豆血红蛋白。内部测序、四极质谱分析和数据搜寻证明了先前预测的由菌共生体诱发表达的蛋白。

3.2.3 植物激素蛋白质组学研究

激素在植物一生中起着重要的调控作用,研究植物激素的信号传导和作用机理是蛋白质组学的重要组成部分之一。

Moons 等(1997)鉴定了水稻根中 3 个受 ABA 诱导的蛋白质,其氨基酸序列测定确定其中 2 个属于胚胎后期丰富蛋白(LEA)的 2 组和 3 组,第三个未知。用 ABA 处理水稻根并提取其 mRNA 构建 cDNA 文库,然后用由氨基酸序列推导出的寡核苷酸做探针进行筛选,分离到了相关的 cDNA,但在 cDNA 数据库中找不到与之相同的序列。通过在基因组 DNA 文库中筛选及免疫杂交分析,表明这是一个新的基因家族,编码高度亲水具有双重结构域的蛋白质,并被 ABA 诱导在不同组织中表达。Rey 等(1998)在马铃薯的叶绿体中发现了一个受干旱诱导的蛋白质,没有已知的蛋白质与之相同。利用 N-端序列制备的血清在叶子 cDNA 表达文库中筛选,分离到了新的具有典型硫氧还蛋白特征的 cDNA 序列,并被硫氧还蛋白活性的生化实验所证实。

蛋白质组学技术不仅可鉴定早就已知的典型的受环境胁迫诱导的蛋白质,如 LEA 蛋白质(Riccardi *et al.*, 1998),脱水素(Dehydrin)(Moons *et al.*, 1997),还鉴定了其它一些蛋白质,如对胁迫引起的损害起保护作用的蛋白酶抑制剂、热激蛋白 HSP 和与氧化胁迫有关的酶、参与糖酵解、木质素合成的酶等(Costa *et al.*, 1998; Riccardi *et al.*, 1998; Rey *et al.*, 1998; Pruvot *et al.*, 1996)。用赤霉素和茉莉酸处理水稻的蛋白质组变化也进行了研究。Shen 和 Komatsu(2003)将水稻叶鞘用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素处理不同时间后的蛋白经 2D-PAGE 分离和计算机图像分析,看到 33 个蛋白发生变化,其中 21 个蛋白点表达增强,12 个蛋白点表达减弱,说明赤霉素处理水稻叶鞘起码有 30 多个基因的产物与之相关。对其中的钙网蛋白(Calreticulin)进行了深入分析,发现它有 2 个不同等电点(pI)蛋白点,随赤霉素处理时间增加, pI 4.0 的蛋白点逐渐消失,而 pI 4.1 蛋白点浓度则逐渐增加。由此说明钙网蛋白在赤霉素信号传递调节叶鞘伸长中是一个重要组分(Shen *et al.*,

2003)。Rakwal 和 Komatsu(2000)用外源茉莉酸(Jasmonic acid)处理水稻的幼苗组织,通过 2D-PAGE 分析发现在水稻的茎和叶中诱导了新蛋白质。对蛋白质点进行 N-端和内部测序及免疫杂交分析,发现茎中有 28 kD 的蛋白酶抑制剂(BBPIN)和酸性的与病理有关的 17 kD 蛋白质(PR-1)。免疫杂交分析表明茉莉酸处理后这些蛋白质的表达具有组织特异性和发育阶段特异性,说明外源茉莉酸处理可以引起与植物自我防御机制有关的基因在茎、叶组织中的特异性表达。

3.3 植物组织器官蛋白质组学

对于植物来说,蛋白质组学上的差异不但存在于不同基因型以及同一基因型的不同植株之间,也存在于同一植株的不同组织和器官之间。在植物的发育过程中,不同组织和器官在功能上的分化,也表现在不同器官蛋白质的组成和数量的差异上,蛋白质组学的研究有助于我们对植物发育过程机制的理解。

关于植物组织和器官的蛋白质组学研究已经有很多报道。Tsugita 等(1994)用 2D-PAGE 分离了水稻根、茎、叶、种子、芽、种皮及愈伤组织等部位的蛋白质,总共得到 4 892 个蛋白点,其中 3% 的蛋白质得到了鉴定。对水稻胚、胚乳、叶鞘和悬浮细胞蛋白质组学的研究也取得了进展,并且水稻的蛋白质数据库已经建立(Komatsu *et al.*, 1993; 1999a; 1999b; Zhong *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 2003)。其它组织和器官,如拟南芥的愈伤组织和花粉,也有研究涉及(Prime *et al.*, 2000; Mayfield *et al.*, 2001)。

Blee 等(2001)研究了转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞壁的蛋白质组。他们首先建立了转入 *Tcyt* 基因的烟草悬浮培养细胞株系。该基因可使细胞产生高水平的内源细胞分裂素,从而使该细胞株系表现出细胞聚集增加、细胞变长、细胞壁加厚 5 倍等特征。转化细胞壁的蛋白质组与对照烟草细胞的初生壁蛋白质组有很大差异。发现了许多初生壁中不存在的新蛋白质。已鉴定出的包括分子量为 32 kD 的几丁质酶、34 kD 的过氧化物酶、65 kD 的多酚氧化酶和 68 kD 的木聚糖酶,以及一些结构蛋白质。

3.4 植物亚细胞蛋白质组学

植物的蛋白质组学研究目前已经深入到亚细胞水平,即研究在一个细胞器内表达的蛋白质组。研究比较多的细胞器是叶绿体。据估计高等植物大约共有约 21 000 到 25 000 个蛋白质(Bouchez & Hoffe, 1998),叶绿体的蛋白质占其中 10% ~ 25% (van Wi-

jk *et al.*, 2000),充分证明了叶绿体在植物细胞中的重要性。另外,关于线粒体与细胞壁的研究也有报道。

Peltier 等(2000)利用 2D-PAGE、质谱及 Edman N-端序列测定等方法,系统地分析了豌豆(*Pisum sativum*)叶绿体中类囊体的蛋白质,并在数据库中进行了搜索,鉴定了 61 个蛋白质,其中 33 个蛋白质的功能及功能结构域得到了确认。Yamaguchi 和 Subramanian(2000),Yamaguchi 和 Subramanian(2000)利用 2D-PAGE、色谱、MS、Edman 测序等多种方法鉴定了菠菜(*Spinacia oleracea*)叶绿体中的核糖体 30 S 和 50 S 亚基的蛋白质。发现菠菜的质体核糖体是由 59 个蛋白质组成的,其中 53 个与大肠杆菌有同线性,而 6 个是非核糖体特异性蛋白质(PSRP-1 到 PSRP-6)。许多蛋白质表现出翻译后的修饰。PSRP 蛋白质可能参与质体中特有的翻译及其调控过程,包括蛋白质通过质体 50 S 亚基在类囊体膜上的定位和转移。

利用 Blue-native 凝胶电泳(Peltier *et al.*, 2001),以及 MALDI-TOF 和 ESI-MS/MS 分析,鉴定了拟南芥叶绿体中一个 350 kD 的由 10 个不同的亚基组成的 ClpP 蛋白酶复合体,并发现了一个不属于任何已知的叶绿体基因家族的新的叶绿体蛋白。

Vener 等(2001)利用质谱技术研究了拟南芥叶绿体中类囊体膜蛋白质的磷酸化现象。研究发现,光系统 II 核心中的 D1、D2、CP43 蛋白质位于 N-端的苏氨酸(Thr)被磷酸化,外周蛋白 PsbH 的 Thr-2 被磷酸化,而成熟的光捕获蛋白 LCHII 的 Thr-3 被磷酸化。Vener 还研究了不同生理条件下这些蛋白质的磷酸化状态。结果表明,这些类囊体蛋白质中,没有任何一个在稳定的连续光照条件下完全磷酸化,或者在长期黑暗适应的条件下完全去磷酸化。他们还检测到在光/暗转换的条件下,PsbH 的 Thr-4 有迅速而可逆的超磷酸化现象。D1、D2、CP43 蛋白受到热激以后出现显著的去磷酸化。光合蛋白受到热激后磷酸化的变化比在光/暗转换的条件下要迅速。Vener 指出,质谱法为研究复杂样品中蛋白质磷酸化的化学计量学提供了新的途径。

Peltier 等(2002)通过蛋白质组分析与基因组预测筛选法结合,研究拟南芥叶绿体类囊体基质蛋白质组。通过双向电泳分离类囊体可溶蛋白质,再用质谱进行分析鉴定。鉴定了 81 个蛋白,用 N-端测序对蛋白质的定位进行预测。通过实验数据修正所鉴定蛋白的基因注释,发现了一个有趣的选择性

重叠。实验中还发现了大量同源基因的表达。研究表明基质蛋白质组的主要功能包括帮助折叠,催化类囊体蛋白的水解和抗氧化。鉴定的基质蛋白和它们的同源物的特性可以被应用于通过基因组预测基质蛋白质组。Schubert 等(2002)系统地描述了模式植物拟南芥类囊体基质蛋白的特性,证明类囊体基质有其自己特异的蛋白质组,并且鉴定了其中的 36 个蛋白。除了大量的肽基脯氨酸顺反异构酶和蛋白酶,还发现了一些新的 PsbP 结构域蛋白。比较模式植物拟南芥与另一个典型的高等植物菠菜的类囊体基质蛋白质组,发现二者相似性很高。作为对本实验的补充, Schuber 等还从拟南芥整个基因组数据库推测基质蛋白质组,估计叶绿体类囊体基质约有 80 个蛋白。

位于叶绿体外膜和内膜上的参与由核编码的叶绿体蛋白质的运输蛋白质复合体得到了详尽的研究(May & Soll, 1999; Keegstra & Cline, 1999)。膜上的疏水性蛋白质较多,用有机溶剂提取叶绿体蛋白和 1D-PAGE 分离,大约有 5%~10% 的膜蛋白,即 15~20 个蛋白质是疏水性的(Seigneurin-Berny *et al.*, 1999)。从绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中分离出一种含有酰基脂类的低密度叶绿体膜片段,类似于叶绿体内膜和类囊体膜。一些与叶绿体 mRNA 相结合的蛋白质非常富集,说明这些膜是叶绿体基因表达的场所(Zerges & Rochaix, 1998)。

蛋白质组学技术可以用于研究叶绿体蛋白质的翻译后修饰。这方面目前已有许多报道,包括翻译后的甲基化(对 RbcS)(Grimm *et al.*, 1997),棕榈酰化(对 D1)(Mattoo & Edelman, 1987)等。但是对于翻译后的修饰并没有全面、系统地开展。随着最近的 2D-PAGE 和质谱技术的发展和改进,这方面的研究变得更容易,这将产生许多意想不到的新发现。

蛋白质组学技术还可以对异构体基因表达及其 mRNA 前体的剪接、mRNA 的编辑研究提供重要帮助。目前已有关于叶绿体蛋白质 mRNA 编辑(Sutiga & Sugiura, 1996)和剪接(Mano *et al.*, 1997)的报道。在豌豆和菠菜中已发现多基因家族(van Wijk, 2000)。这些现象当然可以通过分析 mRNA 或 cDNA 而发现,但蛋白质组学技术却是一个强大的替代或补充方法。

Heazlewood 等(2003)用等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳、Blue-native PAGE 和反相高效液相质谱(LC/MS)的方法对纯化的水稻线粒体蛋白进行分离,再用胰蛋白酶消化,然后进行串联质谱分析(MS/MS)。

查找水稻基因组的开放阅读框译码和 6 个表达序列标签(EST, Expressing sequence tags)译码,与质谱分析所得数据进行比对,鉴定了其中 149 个蛋白点(91 个非冗余基因的产物),包括亲水/疏水蛋白、强酸/碱性蛋白和大分子蛋白(分子量为 6.7~2.52 kD)的序列。确定了 85 个蛋白的功能,包括线粒体的许多主要的功能蛋白。Millar 等(2001)分析拟南芥组培细胞线粒体蛋白双向凝胶电泳的结果,有大约 100 个高丰度蛋白和 250 个低丰度蛋白。用 MALDI-TOF-MS 分析其中 170 个蛋白点。查找数据库中拟南芥基因组的编码序列,鉴定了其中的 91 个蛋白。又通过序列比较鉴定了这 91 个蛋白中 81 个蛋白的功能。这些功能包括呼吸电子传递链,三羧酸循环,氨基酸代谢,蛋白质的输入、加工与组装,转录,膜转运和抗氧化防御。Werhahn 和 Braun(2002)联合应用 3 种不同的凝胶电泳方法鉴定了线粒体蛋白质组的部分蛋白。首先,用蓝色非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Blue-native polyacrylamide gel electrophoresis)分离线粒体蛋白质复合体。用电洗脱法完全洗去蛋白质中的考马斯亮蓝。然后用等电聚焦,最后用十二烷基磺酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质复合体的亚基。该方法的可行性已通过分离 ATP 合酶复合体、细胞色素 C 还原酶复合体和线粒体外膜移位酶前体蛋白而得到验证。利用这一方法可以分离高等真核生物中蛋白亚基的异构物。

4 前景和展望

蛋白质组学提供了一系列能够在蛋白质水平上大规模地直接研究基因功能的强有力的工具。特别是利用多种质谱法对凝胶电泳分离的蛋白质进行研究,是通过生化途径研究蛋白质功能的重大突破。对蛋白质组的研究将继续在大规模、灵敏度和完整性等方面进行改进。在目前情况下,翻译后的修饰还不能进行大规模的研究。但对于特定的类别如磷酸化,已经开始形成一套普遍的研究方法。我们可以预计,蛋白质组学将不再仅仅是用二维凝胶电泳来监测蛋白质的表达。在不久的将来,蛋白质组学将提供大量的蛋白质间相互作用的数据,这可能是蛋白质组学对生命科学所造成的最重要,也是最直接的影响。目前,少数物种的基因组序列测定已经完成,这使许多蛋白质组的研究策略成为可能。基因组研究的进展也会直接促进大规模的蛋白质组研究。

蛋白质组学是一门新兴的学科,才刚刚起步,目

前仍然存在着一些技术上的挑战和缺陷。主要有以下几个方面(van Wijk, 2001):

1) 蛋白质的动态分辨率问题。以现有的技术, 细胞内的低拷贝数蛋白质很难被检测到。如果把蛋白质组分解为几个亚蛋白质组(Sub-proteome)将提高动态分辨率。将质谱技术与原理不同的其它分离技术(例如多向色谱法)相结合, 也会大大提高分辨率。

2) 蛋白质组的纯化问题。为了得到有意义的结果及提高分辨率, 制备纯的蛋白质组(95% ~ 99%)是必要的。由于质谱技术的高敏感性, 如果蛋白质组被污染, 将会导致蛋白质组被错误地注释。因此, 保证蛋白质组纯度的步骤是必需的。

3) 蛋白质组定量的问题。许多蛋白质组学的检测技术都不是定量的(例如质谱技术), 或者只在一定范围内定量(例如银染和考马斯亮蓝染色)。这就使定量地研究蛋白质表达的正调节或负调节变得很困难。目前已有几项技术用来改进这种状况。例如在 SDS-PAGE 胶上用荧光染料来检测蛋白质, 以及在蛋白质片段化并用 MS 技术分析之前先做标记(如同位素亲合标记)。

4) 疏水性膜蛋白的分离、显形及鉴定的问题。众所周知, 疏水性膜蛋白比亲水性蛋白质更难操作。膜蛋白更易于聚集在管壁上, 由于蛋白质组的研究经常是在纳摩尔甚至飞摩尔水平进行, 这种特性将会导致巨大的损失, 或完全丢失。另外, α -螺旋跨膜蛋白在变性的 2D-PAGE 胶上不能很好地溶解或根本就不溶解。如果要分离这些蛋白质, 需要有机溶剂分馏法或者反相 HPLC 等技术的辅助。

蛋白质组学如与其它功能基因组学的工具相结合, 将发挥更大的作用。例如把 DNA 微阵列与蛋白质组分析相结合, 将会确定基因调控是在转录水平还是在翻译水平或蛋白质积累水平进行的。把反向遗传学及正向遗传学与蛋白质组学相结合, 将更深入地研究基因的功能。

不同植物的亚蛋白质组 2D-PAGE 参考图谱将来可能会成为构成和理解植物蛋白质组的中心工具。现在已经有一些亚蛋白质组数据库可以得到。这些参考图谱对随后的蛋白质差异表达和翻译后修饰有很大帮助。大多数蛋白质都会与其它蛋白质有瞬时的或稳定的相互作用。而研究这些相互作用将会更深入地理解基因的功能。因此, 蛋白质间相互作用的数据对于植物蛋白质组学界, 甚至植物学界来说都是非常有用的工具。

随着研究的不断进展和深入, 在完善现有的研究手段的同时, 还必须发展一些新的研究技术。同时加强国际间的学术合作及资料交流, 建立全球共享的数据库系统, 最终揭示基因组的结构与功能。我们相信, 随着蛋白质组研究的深入发展, 在阐明诸如生长、发育、进化及代谢调控等生命活动的规律等方面会有重大突破。

参 考 文 献

- Agrawal, G. K., R. Rakwal, M. Yonekura, A. Kubo & H. Saji. 2002. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, **2**: 947 ~ 959.
- Anderson, N. L. & N. G. Anderson. 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, **19**: 1853 ~ 1861.
- Barreneche, T., N. Bahrman & A. Kremer. 1996. Two dimensional gel electrophoresis confirms the low level of genetic differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Forest Genetics*, **3**: 89 ~ 92.
- Berndt, P., U. Hobohm & H. Langen. 1999. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis*, **20**: 3521 ~ 3526.
- Bestel-Corre, G., E. Dumas-Gaudot, V. Poinso, M. Kieu, J. F. Dierick, T. D. J. van Remacle, V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi. 2002. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, **23**: 122 ~ 137.
- Blackstock, W. P. & M. P. Weir. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, **17**: 121 ~ 127.
- Blee, K. A., E. R. Wheatley, V. A. Bonham, G. P. Mitchell, D. Robertson, A. R. Slabas, M. M. Burrell, P. Wojtaszek & G. P. Bolwell. 2001. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta*, **212**: 404 ~ 415.
- Bouchez, D. & H. Hoffe. 1998. Functional genomics in plants. *Plant Physiology*, **118**: 725 ~ 732.
- Catoira, R., C. Galera, F. de Billy, R. V. Penmetza, E. P. Journet, F. Maillat, C. Rosenberg, D. Cook, C. Gough & J. Denarie. 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, **12**: 1647 ~ 1666.
- Chang, W. W., L. Huang, M. Shen, C. Webster, A. L. Burlingame & J. K. Roberts. 2000. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiology*, **122**: 295 ~ 318.
- Costa, P., C. Pionneau, G. Bauw, C. Dubos, N. Bahrman, A. Kremer, J. M. Frigerio & C. Plomion. 1999. Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. *Electrophoresis*, **20**: 1098 ~ 1108.

- Costa, P., N. Bahrman, J. M. Frigerio, A. Kremer & C. Plomion. 1998. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Molecular Biology*, **38**: 587 ~ 596.
- Damerval, C. & M. Le Guilloux. 1998. Characterization of novel proteins affected by the *O2* mutation and expressed during maize endosperm development. *Molecular and General Genetics*, **257**: 354 ~ 361.
- David, J. L., M. Zivy, M. L. Cardin & P. Brabant. 1997. Protein evolution in dynamically managed populations of wheat: adaptive responses to macro-environmental conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**: 932 ~ 941.
- Davies, H., L. Lomas & B. Austen. 1999. Profiling of amyloid beta peptide variants using SELDI Protein Chip arrays. *Biotechniques*, **27**: 1258 ~ 1261.
- Feng, Q., Y. Zhang, P. Hao, S. Wang, G. Fu, Y. Huang, Y. Li, J. Zhu, Y. Liu, X. Hu, P. Jia, Y. Zhang, Q. Zhao, K. Ying, S. Yu, Y. Tang, Q. Weng, L. Zhang, Y. Lu, J. Mu, Y. Lu, L. S. Zhang, Z. Yu, D. Fan, X. Liu, T. Lu, C. Li, Y. Wu, T. Sun, H. Lei, T. Li, H. Hu, J. Guan, M. Wu, R. Zhang, B. Zhou, Z. Chen, L. Chen, Z. Jin, R. Wang, H. Yin, Z. Cai, S. Ren, G. Lv, W. Gu, G. Zhu, Y. Tu, J. Jia, Y. Zhang, J. Chen, H. Kang, X. Chen, C. Shao, Y. Sun, Q. Hu, X. Zhang, W. Zhang, L. Wang, C. Ding, H. Sheng, J. Gu, S. Chen, L. Ni, F. Zhu, W. Chen, L. Lan, Y. Lai, Z. Cheng, M. Gu, J. Jiang, J. Li, G. Hong, Y. Xue & B. Han. 2002. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature*, **420**: 316 ~ 320.
- Goff, S. A., D. Ricke, T. H. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B. M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W. L. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T. C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sasubudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R. M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant & S. Briggs. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, **296**: 92 ~ 100.
- Grimm, R., M. Grimm, C. Eckerskorn, K. Pholmeyer, T. Röhl & J. Soll. 1997. Post import methylation of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in chloroplasts. *FEBS Letters*, **408**: 350 ~ 354.
- Heazlewood, J. L., K. A. Howell, J. Whelan & A. H. Millar. 2003. Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiology*, **132**: 230 ~ 242.
- Herbik, A., A. Giritch, C. Horstmann, R. Becker, H. J. Balzer, H. Baulmeim & U. W. Stephan. 1996. Iron and copper-nutrition dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant chloronerva. *Plant Physiology*, **111**: 533 ~ 540.
- Ito, T., K. Tashiro, S. Muta, R. Ozawa, T. Chiba, M. Nishizawa, K. Yamamoto, S. Kuhara & Y. Sakaki. 2000. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: a comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 1143 ~ 1147.
- Kaiser, J. 2000. Plant genetics. From genome to functional genomics. *Science*, **288**: 1715.
- Keegstra, K. & K. Cline. 1999. Protein import and routing system of chloroplast. *Plant Cell*, **11**: 557 ~ 570.
- Komatsu, S., A. Muhammad & R. Rakwal. 1999a. Separation and characterization of proteins from green and etiolated shoots of rice (*Oryza sativa* L.): towards a rice proteome. *Electrophoresis*, **20**: 630 ~ 636.
- Komatsu, S., H. Kajiwarra & H. Hirano. 1993. A rice protein library: a data-file of rice proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 953 ~ 942.
- Komatsu, S., R. Rakwal & Z. Li. 1999b. Separation and characterization of proteins in rice (*Oryza sativa*) suspension cultured cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **55**: 183 ~ 192.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum & International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**: 860 ~ 921.
- Li, J. & S. M. Assmann. 2000. Mass spectrometry. An essential tool in proteome analysis. *Plant Physiology*, **123**: 807 ~ 809.
- Lueking, A., M. Horn, H. Eickhoff, K. Bussow, H. Lehrach & G. Walter. 1999. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Analytical Biochemistry*, **270**: 103 ~ 111.
- MacBeath, G. & S. L. Schreiber. 2000. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, **289**: 1760 ~ 1763.
- Macilwain, C. 2000. World leaders heap praise on human genome landmark. *Nature*, **405**: 983 ~ 984.
- Mano, S., K. Yamaguchi, M. Hayashi & M. Nishimura. 1997. Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. *FEBS Letters*, **413**: 21 ~ 26.
- Mattoo, A. K. & M. Edelman. 1987. Intramembrane translocation and posttranslocation palmitoylation of the chloroplast 32-kD herbicide-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**: 1497 ~ 1501.
- May, T. & J. Soll. 1999. Chloroplast precursor protein translocation. *FEBS Letters*, **452**: 52 ~ 56.
- Mayfield, J. A., A. Fiebig, S. E. Johnstone & D. Preuss. 2001. Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science*, **292**: 2482 ~ 2485.
- Millar, A. H., L. J. Sweetlove, P. Giege & C. J. Leaver. 2001. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol*, **127**: 1711 ~ 1727.
- Moons, A., J. Gielen, J. Vandekerckhove, D. van der Straeten, G. Gheysen & M. van Montagu. 1997. An abscisic-acid and salt-stress-responsive rice cDNA from a novel plant gene family. *Planta*, **202**: 443 ~ 454.
- Neubauer, G., A. King, J. Rappsilber, C. Calvio, M. Watson, P. Ajuh, J. Sleeman, A. Lamond & M. Mann. 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics*, **20**: 46 ~ 50.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **250**: 4007 ~ 4021.

- Oliver, S. 2000. Guilt-by-association goes global. *Nature*, **403**: 601 ~ 603.
- Pandey, A. & M. Mann. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, **405**: 837 ~ 846.
- Peltier, J. B., G. Friso, D. E. Kalume, P. Roepstorff, F. Nilsson, I. Adamska & K. J. van Wijk. 2000. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell*, **12**: 319 ~ 341.
- Peltier, J. B., J. Ytterberg, D. A. Liberles, P. Roepstorff & K. J. van Wijk. 2001. Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 16318 ~ 16327.
- Peltier, J. B., O. Emanuelsson, D. E. Kalume, J. Ytterberg, G. Friso, A. Rudella, D. A. Leberles, L. Soderberg, P. Roepstorff, G. von Heijne & K. J. van Wijk. 2002. Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell*, **14**: 211 ~ 236.
- Picard, P., M. Bourgoignie-Greneche & M. Zivy. 1997. Potential of two-dimensional electrophoresis in routine identification of closely related durum wheat lines. *Electrophoresis*, **18**: 174 ~ 181.
- Prime, T. A., D. J. Sherrier, P. Mahon, L. C. Packman & P. Dupree. 2000. A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis*, **21**: 3488 ~ 3499.
- Pruvot, G., S. Cuine, G. Peltier & P. Rey. 1996. Characterization of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants. *Planta*, **198**: 471 ~ 479.
- Rakwal, R. & S. Komatsu. 2000. Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis. *Electrophoresis*, **21**: 2492 ~ 2500.
- Ramani, S. & S. K. Apte. 1997. Transient expression of multiple genes in salinity-stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bura Rata). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **233**: 663 ~ 667.
- Rey, P., G. Pruvot, N. Becuwe, F. Eymery, D. Rumeau & G. Peltier. 1998. A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. *The Plant Journal*, **13**: 97 ~ 107.
- Riccardi, F., P. Gazeau, D. de Vienne & M. Zivy. 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology*, **117**: 1253 ~ 1263.
- Saalbach, G., P. Erik & S. Wienkoop. 2002. Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics*, **2**: 325 ~ 337.
- Salekdeh, G. H., J. Siopongco, L. J. Wade, B. Ghareyazie & J. Bennett. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, **2**: 1131 ~ 1145.
- Santoni, V., C. Bellini & M. Caboche. 1994. Use of two-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Planta*, **192**: 557 ~ 566.
- Sasaki, T., T. Matsumoto, K. Yamamoto, K. Sakata, T. Baba, Y. Katayose, J. Wu, Y. Niimura, Z. Cheng, Y. Nagamura, B. A. Antonio, H. Kanamori, S. Hosokawa, M. Masukawa, K. Arikawa, Y. Chiden, M. Hayashi, M. Okamoto, T. Ando, H. Aoki, K. Arita, M. Hamada, C. Harada, S. Hijishita, M. Honda, Y. Ichikawa, A. Idonuma, M. Iijima, M. Ikeda, M. Ikeno, S. Ito, T. Ito, Y. Ito, Y. Ito, A. Iwabuchi, K. Kamiya, W. Karasawa, S. Katagiri, A. Kikuta, N. Kobayashi, I. Kono, K. Machita, T. Maehara, H. Mizuno, T. Mizubayashi, Y. Mukai, H. Nagasaki, M. Nakashima, Y. Nakama, Y. Nakamichi, M. Nakamura, N. Namiki, M. Negishi, I. Ohta, N. Ono, S. Saji, K. Sakai, M. Shibata, T. Shimokawa, A. Shomura, J. Song, Y. Takazaki, K. Terasawa, K. Tsuji, K. Waki, H. Yamagata, H. Yamane, S. Yoshiki, R. Yoshihara, K. Yukawa, H. Zhong, H. Iwama, T. Endo, H. Ito, J. H. Hahn, H. I. Kim, M. Y. Eun, M. Yano, J. Jiang & T. Gojobori. 2002. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature*, **420**: 312 ~ 316.
- Schubert, M., U. A. Petersson, B. J. Hass, C. Funk, W. P. Schroder & T. Kieselbach. 2002. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 8354 ~ 8365.
- Seigneurin-Berny, D., N. Rolland, J. Garin & J. Joyard. 1999. Technical advance: differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *The Plant Journal*, **19**: 217 ~ 228.
- Shen, S. & S. Komatsu. 2003. Characterization of proteins responsive to gibberellin in the leaf sheath of rice (*Oryza sativa* L.) seedling using proteome analysis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **26**: 129 ~ 136.
- Shen, S., Y. Jing & T. Kuang. 2003. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics*, **3**: 527 ~ 535.
- Shevchenko, A., A. Loboda, A. Shevchenko, W. Ens & K. G. Standing. 2000. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Analytical Chemistry*, **72**: 2132 ~ 2141.
- Steinberg, T. H., R. P. Haugland & V. L. Singer. 1996. Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Analytical Biochemistry*, **239**: 238 ~ 245.
- Sutiga, M. & M. Sugiura. 1996. Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Molecular Biology*, **32**: 315 ~ 326.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**: 796 ~ 815.
- Touzet, P., D. de Vienne, J. C. Huet, C. Ouali, F. Bouet & M. Zivy. 1996. Amino acid analysis of proteins separated by two-dimensional electrophoresis in maize: isoform detection and function identification. *Electrophoresis*, **17**: 1393 ~ 1401.
- Tsugita, A., T. Kawakami, Y. Uchiyama, M. Kamo, N. Miyatake & Y. Nozu. 1994. Separation and characterization of rice proteins. *Electrophoresis*, **15**: 708 ~ 720.
- van Wijk, K. J. 2001. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology*, **126**: 501 ~ 508.
- van Wijk, K. J. 2000. Proteomics of the chloroplast: experimentation and prediction. *Trends in Plant Science*, **5**: 420 ~ 425.
- Vener, A. V., A. Harms, M. R. Sussman & R. D. 2001. Vier-

- stra. Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 6959 ~ 6966.
- Vidal, M. & H. Endoh. 1999. Prospects for drug screening using the reverse two-hybrid system. *Trends in Biotechnology*, **17**: 374 ~ 381.
- von Wiren, N., J. B. Peltier, D. Rouquie, M. Rossignol & J. F. Briat. 1997. Four root plasmalemma polypeptides under-represented in the maize mutant *ys1* accumulate in a Fe-efficient genotype in response to iron-deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, **35**: 945 ~ 950.
- Walhout, A. J., R. Sordella, X. Lu, J. L. Hartley, G. F. Temple, M. A. Brasch, N. Thierry-Mieg & M. Vidal. 2000. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science*, **287**: 116 ~ 122.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. M. Duncan, R. Harris, K. L. Williams & I. Humphery-Smith. 1995. Progress with gene-product mapping the Mollicutes: mycoplasma genitalium. *Electrophoresis*, **16**: 1090 ~ 1094.
- Weiss, W., G. Huber, K. H. Engel, A. Pethran, M. J. Dunn, A. A. Gooley & A. Gorg. 1997. Identification and characterization of wheat grain albumin/globulin allergens. *Electrophoresis*, **18**: 826 ~ 833.
- Werhahn, W. & H. P. Braun. 2002. Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **23**: 640 ~ 646.
- Wienkoop, S. & G. Saalbach. 2003. Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiology*, **131**: 1080 ~ 1090.
- Yamaguchi, K. & A. R. Subramanian. 2000. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 28466 ~ 28482.
- Yamaguchi, K., K. von Knoblauch & A. R. Subramanian. 2000. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 28455 ~ 28465.
- Yu, J., S. Hu, J. Wang, G. K. Wong, S. Li, B. Liu, Y. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Zhang, M. Cao, J. Liu, J. Sun, J. Tang, Y. Chen, X. Huang, W. Lin, C. Ye, W. Tong, L. Cong, J. Geng, Y. Han, L. Li, W. Li, G. Hu, X. Huang, W. Li, J. Li, Z. Liu, L. Li, J. Liu, Q. Qi, J. Liu, L. Li, T. Li, X. Wang, H. Lu, T. Wu, M. Zhu, P. Ni, H. Han, W. Dong, X. Ren, X. Feng, P. Cui, X. Li, H. Wang, X. Xu, W. Zhai, Z. Xu, J. Zhang, S. He, J. Zhang, J. Xu, K. Zhang, X. Zheng, J. Dong, W. Zeng, L. Tao, J. Ye, J. Tan, X. Ren, X. Chen, J. He, D. Liu, W. Tian, C. Tian, H. Xia, Q. Bao, G. Li, H. Gao, T. Cao, J. Wang, W. Zhao, P. Li, W. Chen, X. Wang, Y. Zhang, J. Hu, J. Wang, S. Liu, J. Yang, G. Zhang, Y. Xiong, Z. Li, L. Mao, C. Zhou, Z. Zhu, R. Chen, B. Hao, W. Zheng, S. Chen, W. Guo, G. Li, S. Liu, M. Tao, J. Wang, L. Zhu, L. Yuan & H. Yang. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, **296**: 79 ~ 92.
- Zerges, W. & J. D. Rochaix. 1998. Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Biology*, **140**: 101 ~ 110.
- Zhong, B., H. Karibe, S. Komatsu, H. Ichimura, Y. Nagamura, T. Sasaki & H. Hirano. 1997. Screening of rice genes from a cDNA catalog based on the sequence data-file of proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *Breeding Science*, **47**: 245 ~ 251.

责任编辑：葛 颂 责任编辑：姜联合