

基于双向电泳技术的植物差异蛋白质组学研究进展

任丽萍^{1,2}, 范海延^{1,2}, 宋铁锋³, 王珊珊¹, 刘晶瑜¹

(¹沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110866;

²设施园艺省部共建教育部重点实验室, 沈阳 110866;

³辽宁省农业科学院蔬菜研究所, 沈阳 110866)

摘要:随着拟南芥、水稻等模式植物基因组测序的完成,植物基因组学的研究重点已经转变为功能基因组学研究,蛋白质组学研究是功能基因组学研究的核心内容之一,它有助于从分子水平上了解植物功能。经典的双向电泳技术是蛋白质组学研究的支撑技术,本文综述了基于双向电泳技术的植物在生长发育过程中和外界环境胁迫下不同器官及亚细胞结构的差异蛋白质组学研究进展,最后提出了蛋白质组学技术目前所面临的问题并展望了其前景。

关键词:差异蛋白质组;双向电泳;植物器官;细胞器;环境胁迫

中图分类号:Q945.8

文献标志码:A

论文编号:2010-3274

Advances in Differential Proteomics Based on 2-DE in Botany

Ren Liping^{1,2}, Fan Haiyan^{1,2}, Song Tiefeng³, Wang Shanshan¹, Liu Jingyu¹

(¹College of Biological Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161;

²Key Laboratory of Protected Horticulture, Shenyang 110161;

³Ministry of Education Liaoning academy of agricultural sciences, Shenyang 110866)

Abstract: The Genome has been sequenced for the model plant of Arabidopsis and rice, and functional genome researches become the focus of genomics research in plant. Proteomics study is one of the cores of functional genome researches, which helps to understand plant functions on molecular level. Two-dimensional electrophoresis is one of the main techniques of proteomics. This article gave an overview of the advances in plant differential proteomics study based on 2-DE, which included the differential proteomic study of the plant tissues, organs and subcellular compositions in the development and under stress by the external environmental conditions. At last, the problems in this area were analyzed and the prospects were provided.

Key words: differential proteomic; 2-DE; plant organs; organelles; environmental stress

0 引言

随着人类基因组计划的全面实施与推进,生命科学已经进入了后基因组时代,其主要研究对象已转变为功能基因组学的研究。基因的功能主要是通过其编码的蛋白质来实现的,对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明生命在生理和病理条件下的变化机制。传统的研究方式即对单个蛋白质的研究已无法满足后基因组时代的要求,要想全面以及更加深入的认识复杂的

生命活动,必然要从整体、动态、网络水平上对蛋白质进行研究,蛋白质组学是以活细胞内基因组编码的全部蛋白质为研究对象,其研究也被认为是后基因组时代生命科学的核心内容之一。蛋白质组学的研究策略有两种:一是采用高通量的蛋白质组研究技术分析生物体内尽可能多乃至所有的蛋白质;二是着重研究不同生长状态或病理情况下蛋白质的差异表达,进而去揭示细胞生理和病理状态的进程与本质、对外界

基金项目:国家自然科学基金(30700542);辽宁省教育厅课题(2008624);沈阳市科学技术计划(F10-205-1-04)。

第一作者简介:任丽萍,女,1986年出生,在读研究生,研究方向:植物蛋白质组学研究,E-mail:renliping860406@163.com。

通讯作者:范海延,女,1976,吉林省长春市,副教授,博士,研究方向:植物蛋白质组学研究。E-mail:hyfan@163.com。宋铁峰,1974年出生,副研究员,工作于辽宁省农业科学院蔬菜所瓜类研究室主任,主要从事黄瓜新品种选育及相关技术研究,E-mail:songtiefeng@126.com。

收稿日期:2010-11-12, **修回日期:**2010-12-20。

环境刺激的反应及细胞调控机制,同时获得对某些关键蛋白的定性和功能分析^[1]。由于蛋白质表达随空间和时间不断变化,要分析生物体内所有的蛋白质是一个难以实现的目标,所以后者的研究更加有针对性而且可实现性也更高。差异蛋白质组学是结构蛋白质组学研究的一个分支,得到了国内外众多研究者日益增多的关注^[1,2]。

随着拟南芥、水稻等模式植物基因组测序的完成,植物基因组学的研究重点也已经转变为功能基因组学研究,蛋白质组学研究将有助于我们从分子水平上了解植物功能。目前蛋白质组研究技术发展很快,新的研究方法和研究手段不断涌现,如多维色谱、荧光差异双向电泳、微流芯片、相对和绝对定量的同位素标记和细胞培养中氨基酸稳定同位素标记的定量蛋白质组技术等。而双向电泳技术由于具有高分辨率、高重复性、微量分析和制备等性能,目前仍然是蛋白质组研究中重要的支撑技术之一,被广泛用于植物生长发育过程和外界环境胁迫下差异蛋白质组学的研究。

1 植物发育相关的差异蛋白质组学研究

高等植物在整个发育过程中要经历细胞增大、分裂、分化和凋亡,胚胎发生,器官形成,开花及授精受精等过程,而这是一个非常复杂而有序的过程。植物体的蛋白质随发育时间、特定组织器官等变化而不断变化,蕴藏着巨大的、动态的生命活动的信息,利用蛋白质组学技术可从分子水平了解植物体的发育调控、发育异常等机制。植物发育过程的蛋白质组学研究还刚刚起步,但在植物研究中显示出了广阔的应用前景。

1.1 细胞器的差异蛋白质组分析

近年来发现某些植物细胞器蛋白随发育时间的增长存在差异,并对这些差异蛋白进行研究及分析鉴定。如 Maltman^[3]等利用密度梯度离心分离得到蓖麻内质网膜蛋白,2-DE 分析发现发芽5天和25天蓖麻种子的内质网膜蛋白表达存在明显的差异,如发芽25天的蓖麻种子内质网膜不存在天冬氨酸蛋白酶和N-氨基甲酰-L-氨基水解酶,经进一步鉴定发现这些蛋白大多参与内质网膜蛋白的加工和储存以及类脂化合物代谢作用。许珂^[4]等对玉米C型细胞质雄性不育系C48-2及其保持系线粒体蛋白质进行了分离,对其中10个重复性好且差异表达在2倍以上的蛋白点进行质谱分析,结果表明其中2个蛋白质点分别为谷氨酸脱氢酶(GDH)和依赖电压阴离子通道蛋白-1(VDAC-1)。GDH的高表达会影响正常的氮代谢,使细胞的能量供应发生障碍,有可能导致雄性不育;

VDAC-1是线粒体外膜上控制细胞通透性的蛋白,与植物的程序性死亡密切相关。

1.2 营养器官的差异蛋白质组分析

邵彩虹^[5]等在研究苗期不同时间段水稻叶片蛋白质组的表达差异时,得到参与光合作用的蛋白、防卫相关蛋白、蛋白质合成代谢和氨基酸合成代谢相关蛋白。而值得注意的是参与光合作用的4种蛋白均在二叶一心后表达量增强,这应与水稻幼苗的光合作用逐渐增强有关;与蛋白质合成代谢相关的2个蛋白,表达丰度在三叶期及以前均较高,三叶期后虽有所下降但仍保持较高的表达丰度;与氨基酸合成代谢相关的4个蛋白,自三叶期后表达量均较高,这表明幼苗体内与之相关的代谢活动十分旺盛,是幼苗素质增强的体现。对这方面的进一步研究有望探明在水稻生长发育过程中这些蛋白质所参与的代谢途径及其作用机理。之后,该实验室为揭示水稻孕穗期叶片蛋白质的表达差异,对孕穗期4个叶位的功能叶片蛋白质组变化进行了研究。结果表明差异表达的蛋白质大多参与光合作用和呼吸作用;其次为与蛋白结构及功能调控相关的蛋白质,其表达量都随叶位上升而上调;其余为参与氨基酸代谢的蛋白质,表达量在较低叶位叶片中无显著规律,在剑叶中的表达量显著上调。蛋白质是细胞功能的执行者,受细胞环境变化的影响,因此,上述蛋白质发生变化的原因应与水稻不同叶位叶片生长发育的特性有关^[6]。李兆伟^[7]应用蛋白质组学方法分析了水稻籽粒灌浆期不同时间叶鞘的蛋白质组变化,得到的差异蛋白分别参与叶鞘光合作用、激素调节、物质转运、植株衰老的抗性反应以及细胞信号转导,共同调控叶鞘的源、库、流转化。

1.3 生殖器官的差异蛋白质组分析

植物花粉发育存在6个时期(花粉母细胞、四分体、早期幼小孢子、单细胞花粉、双细胞花粉和三细胞花粉),相关研究证明不同发育时期的蛋白存在差异。Kerim^[8]等对水稻花粉发育的6个不同时期的蛋白质组进行了研究,得到159个在整个发育过程中始终存在表达差异的蛋白质,进一步鉴定表明其中部分蛋白质主要参与花粉萌发期间糖代谢、细胞延长和伸展等生理过程。徐晓燕^[9]等对大豆种子萌发的4个不同时期蛋白质差异表达情况进行了研究,结果初步鉴定出6种蛋白质,分别是核苷二磷酸激酶、热激蛋白、硫氧还蛋白、35ku种子成熟蛋白PM36。王珊^[10]等在研究果梅完全花与不完全花的差异表达蛋白过程中,发现在完全花中有1个特异蛋白、1个上调蛋白、21个下调蛋白,在不完全花中则有2个特异蛋白,这些差异蛋白点

可能与雌蕊的败育有关,而它们的具体功能仍在研究中。

2 植物逆境相关的差异蛋白质组学研究

逆境胁迫是制约植物生长发育、影响作物产量和质量的关键因子,揭示植物应答胁迫的分子机理一直是人们长期探索的重大课题。外界环境条件的改变会表现在植物蛋白质组水平的变化中,从蛋白质组数据着手,对其变化进行定性和定量分析,得到蛋白质与抗性之间的关系,进而去研究植物逆境胁迫下生理过程、代谢调控等方面的机制,目前是研究植物抗逆性的重要手段之一,而且在模式植物及主要农作物研究中已取得了一定的成果。

2.1 膜蛋白的差异蛋白质组学分析

细胞质膜是细胞与外界环境的屏障,也是物质、能量、信息交流的门户。它在水分、无机离子、有机小分子跨膜运输、感受及传递胁迫信号的过程中都发挥着重要作用^[11],所以膜蛋白质组学的研究也越来越重要。但由于膜蛋白尤其是内在膜蛋白的强疏水性、低丰度造成蛋白质提取、分离和鉴定相对困难,使膜蛋白成为蛋白质组研究中的一个技术难点。

Blomqvist^[12]分离了黑暗条件下生长的小麦叶中的黄化质体内膜蛋白,经2-DE得到约200个点,利MALDI-TOF/MS、LC-MS/MS和ESI-MS/MS鉴定了46个点,发现黄化质体中有21种蛋白不同于叶绿体,并发现前片质体(黄化质体的无规则膜聚集体)中的主要蛋白是原叶绿素氧化还原酶(POR),从而证明了黄化质体转变为叶绿体的重要过程,为研究植物叶片变绿的过程提供了重要的理论依据。Chen等^[13]在鉴定参与抗水稻白叶枯病(*X. oryzae* pv. *Oryzae*)早期防御反应的质膜蛋白成分时,采用改进的质膜蛋白制备方法,并分析了接种病原菌不同时间后表达抗病基因*Xa21*的水稻悬浮细胞质膜蛋白质组的差异。经鉴定发现了11个预测在植物防御中起作用的蛋白质,包括H⁺-ATPase、蛋白质磷酸化酶、过敏反应诱导蛋白、抑制素蛋白、锌指蛋白和C2结构域蛋白、USP及热激蛋白等。

2.2 植物叶片的差异蛋白质组学分析

叶片是高等植物光合作用和蒸腾作用的主要位置,其功能的行使是植物产量和品质形成的重要基础。范海延等^[14-15]以黄瓜抗白粉病品系R17和黄瓜感白粉病品系S17为试材在接种白粉病后不同时间段取样采用双向电泳技术研究白粉病菌胁迫下黄瓜叶片蛋白质组的变化。结果鉴定出的差异蛋白质主要是与光合和呼吸作用代谢、信号转导、抗逆性、物质运输相关

的蛋白质以及核染色体转录翻译相关的蛋白质和未知功能蛋白等。这些蛋白都可能是与抗性有关或与发育相关的蛋白网络中的一部分,它们各自作用的发挥以及群集调控可能在控制黄瓜寄主防御反应中发挥重要作用。李晶等^[16]在研究不同氮素水平下小黑麦旗叶蛋白表达谱差异时发现7个差异表达的蛋白分别是与蛋白质合成和信号转导相关的蛋白、与叶绿体发育相关的蛋白、与代谢有关的蛋白、与清除自由基有关的酶、与氮素同化有关的酶以及与植物碳代谢有关的酶等,这就从蛋白质角度说明氮素对植物的影响主要体现在功能蛋白方面。邵付菊等^[17]在对低温胁迫下棉花子叶蛋白质表达差异的研究中采用双向电泳技术得到49个差异蛋白,其中27个上调表达,其余22个表达下调,初步推测这些差异蛋白可能与低温胁迫相关,而其具体功能需进一步鉴定。

2.3 植物根系的差异蛋白质组学分析

根在植物中行使多种重要功能,包括水分和营养吸收,合成氨基酸、植物碱、有机氮和植物激素等。K. Aghaei等^[18]鉴定出7个蛋白的表达含量在盐浓度为2~7倍变化时上升或下降,其中胚胎发育晚期高丰度蛋白、 β -球蛋白、激发三肽前体、螺旋-环-螺旋蛋白表达上调,而蛋白酶抑制剂、凝集素、茎干糖蛋白前体表达下调。这些结果表明盐度可以改变大豆胚轴和根部一些特殊蛋白的表达水平来使植物适应盐碱条件。Coumans等^[19]分析了棉花根接种棉黑根腐病菌(*Thielaviopsis basicola*)分生孢子后的提取物,并鉴定了差异表达的蛋白点,结果表明这些蛋白质大多是与防御和胁迫相关的蛋白,如与致病、活性氧爆发相关的蛋白质、与糖和氮代谢相关的蛋白质以及与氨基酸和类异戊二烯合成相关的蛋白质,而其中一些是大多数植物防御反应共有的成分。Du等^[20]在研究盐胁迫下植物代谢变化时,以盐胁迫下苗期黄瓜根的干重和鲜重为对照进行双向电泳,结果发现34个差异蛋白点,经鉴定的29个蛋白大多与新陈代谢、能量运输以及对应急反应的调控有关。

2.4 植物其他部位的差异蛋白质组学分析

Rep等^[21]在研究感染维管束萎蔫真菌(*Fusarium oxysporum*)的番茄木质部液的蛋白表达差异时发现蛋白含量发生了明显的变化,经鉴定其中1个为PR-5家族的新成员,主要在互作早期积累。其他致病相关蛋白如PR-1和 β -1,3-葡聚糖酶仅出现在相容性互作中,并伴随病害形成。Lmin等^[22-23]检测到水稻幼孢子体经过早期冷害后,其花药蛋白质在2-DE胶上差异表达的70个斑点,并鉴定了18种蛋白质。在冷处理1、2和4

天后,37种花药蛋白质表达丰度的变化在2倍以上。其中,参与应答冷胁迫的蛋白质(如半胱氨酸合酶、20S蛋白酶体 β -6亚基、细胞色素c氧化酶- β 亚基等)表现为明显地上调。而水稻冷诱导花药蛋白质OsCIA的mRNA表达水平变化不明显,表明水稻花药可能通过转录后调控应答冷胁迫。Jennifer等^[24]通过蛋白质组学技术研究开花期大麦穗对小麦赤霉病禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)的抗性机制,结果得到43个差异表达的酸性蛋白,分别与活性氧爆发以及氧胁迫应答有关,如过氧化物酶、苹果酸脱氢酶和病程相关蛋白等。在敏感型基因型Stander中,这些酸性PR蛋白的表达量是降低的,而在高抗基因型CI4196、Svansota、Harbin和中抗基因型CDC Bold中,PR-3和PR-5蛋白的表达大量增加。与活性氧相关的蛋白在Stander、CDC Bold、CI4196中的大量表达来抵抗真菌的入侵,在Svansota、Harbin中表达变化相对较小,在基因型Chevron中没有变化。通过对六种基因型的接种研究发现了以上三种不同的应答模式。Campo等^[25]采用2-DE、质谱分析在研究真菌侵染玉米萌发种胚时发现差异表达的蛋白主要参与植物组织抗氧化和解毒、蛋白质的合成和折叠的作用,特别是翻译起始因子eIF-5A表达量提高,可能与植物防御反应直接有关。

植物的抗逆是一个极其复杂的生理过程,在逆境下植物会产生复杂的生物化学和生理学上的变化来响应这些信号,但引起这些响应的分子机制至今尚未完全阐明。通过本文可见,蛋白质组学技术在植物应答外界胁迫研究领域已取得了一定的成果。通过双向电泳技术与多种质谱技术以及各种数据库可提供的信息相结合,研究植物抗性分子机理,明确抗胁迫蛋白在植物体内的理化性质及生物学功能,认识抗胁迫蛋白的遗传机理,克隆重要的抗性相关基因,也将为植物抗胁迫品种的选择和培育等工作提供一定的资源。

3 问题与展望

迄今为止差异蛋白质组学在植物研究中的多个领域都有了进一步的应用,但仍然存在一些问题,比如低丰度蛋白质的获得和植物蛋白质的鉴定仍然是一个巨大的挑战,可以采用同位素标记、银染、荧光染色的方法以及一些去除高丰度蛋白的方法如PEG分级分离法。其次,尽管大量实验发现了许多生物反应的重要参与蛋白,但是缺乏对其内在机制的阐述。定位、修饰和相互作用仅仅提供了支持性的证据,只有进一步结合生物化学和基因功能验证才能对蛋白功能进行确定。再次,迄今运用于植物的差异蛋白质组学研究方法主要是双向电泳分离蛋白与质谱分析鉴定蛋白的相

结合。由于双向电泳技术本身的局限性,极酸、极碱、极高分子量和低丰度蛋白是不易被检测到的,而且质谱技术鉴定蛋白质强烈依赖于基因组数据库、生物信息学等,这就导致很多蛋白得不到准确鉴定。所以各种新型的技术方法比如多维蛋白质鉴定技术包括荧光差异双向电泳、同位素亲和标记等被应用于植物差异蛋白质组学研究和更强大的数据库检索以及完善各个数据库等生物信息学技术是很有必要和意义的。

近年来,不同条件下植物蛋白表达谱的研究日益增多,发现了许多与基因突变、发育、逆境、植物与微生物互作相关的新蛋白,但是进一步证明这些蛋白质功能研究的报道很少。因此,运用功能基因组学、生物化学等方法进一步证实新蛋白质功能将是今后植物蛋白质组学研究方向。另外,蛋白质组学与其他大规模学科如基因组学、生物信息学等领域的交叉,所呈现出的系统生物学研究模式,给植物生物学诸多方面的分子机理研究带来了新的机遇,也为从蛋白质功能水平上直接揭示植物生长、发育的本质和探讨与逆境相关的分子机制提供了新的机遇,成为未来植物科学最令人激动的新前沿。

文献参考

- [1] 何大澄,肖雪媛,等.差异蛋白质组学及其应用[J].北京师范大学学报,2002,38(4):558-559.
- [2] Paweletz C, Trock B, Pennanen M, et al. Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer[J].Dis Marker, 2001,17(4):301.
- [3] Maltman D J, Simon W J, Wheeler C H, et al. Proteomic analysis of the endoplasmic reticulum from developing and germinating seed of castor(*R. icinus communis*).Electrophoresis,2002,23:62-639.
- [4] 许珂,曹墨菊,朱英国,等.玉米C型细胞质雄性不育系C48-2及其保持系线粒体差异蛋白分析.[J]作物学报,2008,34(2):232-237.
- [5] 邵彩虹,王经源,林文雄,等.苗期水稻叶片发育进程的差异蛋白质组学分析[J].中国农业科学2008,41(11):3831-3837.
- [6] 邵彩虹,谢金水,黄永兰,等.孕穗期水稻不同功能叶的发育蛋白质组学分析[J].中国水稻科学2009,23(5):456-462.
- [7] 李兆伟,熊君,李振方,等.水稻灌浆期叶鞘蛋白质差异表达分析[J].作物学报,2008,34(4):619-626.
- [8] Kerim T, Lmin N, Weinman J J, et al. Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers.Proteomics,2003,738-751.
- [9] 徐晓燕,郑蕊,李春梅,等.大豆种子萌发过程中的差异蛋白质组研究[J].生物化学与生物物理进展,2006,33(11):1106-1112.
- [10] 王珊,蔡斌华,张镇等.果梅完全花与不完全花的差异蛋白分析[J].植物遗传资源学报,2008,(4):465-468.
- [11] Coumans J V, Poljak A, Rafferty M J, et al. Analysis of cotton (*Gossypium hirsutum*) root proteomes during a compatible interaction with the black root rot fungus *Thielaviopsis basicola*[J].

- Proteomics,2009,(9):335-349.
- [12] Blomqvist L A, Ryberg M, Sundqvist D. Proteomic analysis of the etioplast inner membranes of wheat (*Triticum aestivum*) by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Plantarum Physiologia*,2006,128(2):368-381.
- [13] Chen F, Yuan Y, Li Q, et al. Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defense response to bacterial blight[J]. *Proteomics*,2007,7:1529-1539.
- [14] 范海延,陈捷,邵美妮,等.白粉病菌胁迫下黄瓜 R17 叶片的蛋白质组分析[J]. *园艺学报*,2009,36(6):829-834.
- [15] 范海延,陈捷,邵美妮,等.应答白粉病菌胁迫的黄瓜 S17 叶片功能蛋白质组学初步分析[J]. *植物病理学报*,2009,39(6):650-652.
- [16] 李晶,吉彪,商文楠,等.不同氮素水平下黑麦旗叶蛋白质差异表达[J]. *植物生理学通讯*,2010,46(4):365-369.
- [17] 郇付菊,李扬,陈良,等.低温胁迫下棉花子叶蛋白质差异表达的双向电泳分析[J]. *华中师范大学学报*,2008,42(2):262-266.
- [18] Aghaei K, Ehsanpour A A, Shah A H, et al. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids*,2009,(36):91-98.
- [19] Coumans J V, Poljak A, Raftery M J, et al. Analysis of cotton (*Gossypium hirsutum*) root proteomes during a compatible interaction with the black root rot fungus *Thielaviopsis basicola*[J]. *Proteomics*,2009,9:335-349.
- [20] Du C X, Fan H F, Guo S R, et al. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress[J]. *Phytochemistry*, 2010,71: 1450-1459.
- [21] Rep M, Dekker H L, Vossen J H, et al. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato[J]. *Plant Physiol*,2002,130(10):904-917.
- [22] Lmin N, Kerlm T, Weinman J J, et al. Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein change in rice anthers [J]. *Mol Cell Proteomics*,2006,(5):274-292.
- [23] Lmin N, Jong F D, Mathesius U, et al. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts[J]. *Proteomics*,2004,(4):1883-1896.
- [24] Jennifer G, Francois E, Andre L, et al. Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare*[J]. *Proteomics*,2008,(8): 545-554.
- [25] Campo S, Carrascal M, Coca M, et al. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach[J]. *Proteomics*,2004,(4):383-396.