

大豆蛋白质组学研究进展

牛 宁,李占军,金素娟,赵 璇,王玉岭*

(石家庄市农林科学研究院,河北 石家庄,050041)

摘要:2010年大豆品种 Williams 82的基因组序列测定完成,大豆蛋白质组学研究在此基础上得到了快速发展,取得了一系列新的进展。本文综述了2011年至今,国内外研究人员应用蛋白质组学技术在大豆生长发育、根瘤互作、抗逆境、蛋白数据库等方面取得的研究成果,并对今后大豆蛋白质组学研究的发展进行了展望。

关键词:大豆;蛋白质组学;蛋白质组

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-9084(2014)05-0667-09

Advances in soybean proteomics

NIU Ning, LI Zhan-jun, JIN Su-juan, ZHAO Xuan, WANG Yu-ling*

(Shijiazhuang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: The availability of genome sequences of soybean cultivar Williams 82 had paved the way to soybean proteomics research in 2010. Subsequently, a rapid advance happened through the effort of researchers all over the world. This paper reviewed the progresses of soybean proteomics in growth and development, symbiotic interactions between soybean and rhizobia, abiotic and biotic stress, soybean proteome database *etc.* since 2011. Furthermore, the prospects of soybean proteomics were discussed.

Key words: Soybean; Proteomics; Proteome

大豆作为重要的粮油经济作物,不但富含蛋白质、脂肪、矿质营养以及抗氧化剂、异黄酮等维持人类健康所必需的物质,同样还是畜牧业重要的营养来源,因此对大豆的研究也是世界各国研究人员关注的焦点。蛋白质是生命现象的表现形式,是生理功能的执行者和生命活动的直接体现者。研究蛋白质表达与功能的蛋白质组学自创立以来发展迅速,同时在大豆研究上的应用也是方兴未艾,加之2010年大豆品种 Williams 82的基因组序列测定的完成^[1],给大豆诸多方面的分子机理研究带来了新的机遇,也为揭示大豆生长发育的本质提供了良好的途径。日益增加的蛋白组信息,快速扩展的植物基因组和 EST 序列库,为蛋白质的鉴定提供了帮助,为研究大豆的蛋白表达提供了必要的基础。近年来,蛋白质组学被广泛地应用于大豆的各方面研究,如生长发育、逆境胁迫、根瘤互作等方面,也取得了一系列新的进展。这些研究加深了我们对大豆生命

进程中蛋白质表达变化的认识,为研究大豆相关分子机理打下了良好的基础。本文综述了从2011年至今蛋白质组学在大豆研究中的相关进展,旨在为广大科研人员进行相关研究时提供参考与借鉴。

1 蛋白质组学在大豆中的研究进展

1.1 蛋白质组学在大豆生长发育方面的研究进展

蛋白质组学技术已经深入地应用到大豆生长发育研究的各个方面,包括授粉受精、种子发育、根的分化等,由于蛋白质的表达具有组织与器官特异性,因此在此类研究中往往聚焦于某一特定的组织或器官,如花、叶、种子、根等,由于根在根瘤互作中的重要地位,所以把根的相关研究进展放在1.2中与根瘤互作一起讨论。

授粉受精过程是植物生殖生长中非常重要的一个环节,在此过程中雌蕊和花粉间发生着大量的细胞间的相互作用。Li等^[2]运用比较蛋白质组学方

法以未授粉的雌蕊和已完成授粉的雌蕊为材料,分析了大豆雌蕊在授粉前后的蛋白质表达的差异情况。结果显示授粉后雌蕊中有 22 个蛋白上调表达,36 个蛋白下调表达。对差异蛋白功能分类表明大部分差异蛋白是代谢相关以及氧化还原相关蛋白。据此认为初级代谢的增强、花粉管生长复合物的合成以及氧化还原平衡系统的调整有助于授粉的成功完成。

蛋白质组学作为联系表型与基因组序列之间的有效工具已经得到应用,但是如何从大量的差异表达的蛋白中找到目标基因仍然需要更为有利的研究策略。因此,Chen 等^[3]通过相关研究,提出了一套完整的利用了一系列方法与软件,包括表型组学、蛋白质组学、基因组学、代谢组学等的技术体系来鉴定花叶不正常发育基因 *alf* 的反应蛋白。他们以 *alf* 近等基因系为材料,运用蛋白质组学与代谢组学综合分析了 *alf* 涉及的包括多条代谢途径在内的调控网络,鉴定了定位在 *ALF/alf* 位点相同位置的半醛谷氨酸氨基变位酶(GSA)和肽基脯氨酰顺反异构酶(PIN)为关键的反应因子。它们被注释的功能与 *alf* 突变体的叶形和叶绿素含量也是相一致的。因此上述研究证明了整合组学研究策略在提高目的基因发现上具有良好的效果。

关于大豆种子生长发育的蛋白质组学研究早已有报道^[4,5],近年来的研究重点已侧重到种子萌发过程中内部贮藏物质变化以及种子某一具体组织发育等的蛋白质组学研究上。种子萌发是一个复杂的生理过程,在此过程中发生了大量营养贮藏物质的流动。在不同作物中,这个过程可能被不同的调控和代谢途径所调节。蛋白质组学是一个有助于我们了解这些途径的有效方式。Han 等^[6]采用单向电泳结合液相色谱与质谱联用的技术分析了大豆萌发种子的蛋白质组图谱,同时比较了大豆与水稻的种子萌发的蛋白表达谱。结果显示分属 14 个功能分类的 764 个蛋白得到鉴定,其中代谢相关蛋白是最大的种类。深入分析发现脂类通过脂氧合酶途径发生降解,同时脂氧合酶可能还有助于在萌发的大豆种子贮藏物质发生快速流动的过程中活性氧的去除。此研究分析水稻与大豆萌发种子的蛋白质组图谱差异揭示了每种作物种子萌发时都有贮藏物质流动的特殊机制。在此之前,Kim 等^[7]还对大豆种子萌发与幼苗生长过程中贮藏蛋白的动态变化情况进行了分析。结果显示在种子萌发与幼苗生长中大豆种子的蛋白图谱发生了巨大的变化。80% 以上的鉴定蛋白都是两种主要贮藏蛋白大豆球蛋白和 β -伴大豆

球蛋白的亚基。这两种蛋白的大部分亚基到萌发 120h 时都以不同的速率完全降解,降解产物积累或进一步降解。另一方面,贮藏蛋白变化过程中 β -伴大豆球蛋白的变化趋势基本与大豆球蛋白相似,但是它的降解速度更快。 β -伴大豆球蛋白的 α 和 α' 亚基到萌发 96h 时大量消失,而 β 亚基的降解则慢于它们。以上结果表明种子萌发和幼苗生长中贮藏蛋白的亚基变化是存在差异的。

除了关注大豆种子生命过程中物质变化的情况外,对大豆种子及其它部位具体组织的研究也有报道。大豆的种皮是一个多功能的组织,它既是保护胚珠免受外界伤害的天然屏障,又在种子发育与休眠、病害防御、营养代谢等方面发挥着必不可少的作用。之前的种皮研究都是关于单个酶或是使用高通量转录谱结果推测功能,尚没有利用蛋白质组学技术进行过系统的大豆种皮研究。Miernyk 等^[8]就以大豆品种 Jack 种子发育 9 个阶段中的 S2、S4、S6、S8 和 S9 阶段种皮为材料,进行 shotgun 蛋白质组学分析。最终在不同阶段中分别有 306 (S2)、328 (S4)、273 (S6)、193 (S8) 和 272 (S9) 个蛋白得到了鉴定,归类成 11 个功能群体,其中包括了与种皮的功能相关的涉及中间代谢、类黄酮生物合成、蛋白折叠与降解的蛋白群体。植物的木质部除了担负运输水分、营养物质和代谢产物的功能外,还涉及植物面对病原体、共生生物以及环境胁迫时反应信号的转导过程。木质部汁液包含大量的蛋白,如代谢酶、胁迫相关蛋白、信号转导蛋白以及转录因子。而以前对木质部汁液的研究大部分都是利用控制环境下生长的植物材料。然而,田间植物在面临强光以及环境胁迫时的反应往往是在生长室中无法模拟的。因此,Krishnan 等^[9]利用田间生长的大豆植株的木质部汁液为材料研究了其蛋白与代谢物质的组成。双向电泳的结果显示共有 60 个差异表达的蛋白,其中 38 个蛋白通过质谱与液质联用得到鉴定。木质部汁液中丰度最大的蛋白经鉴定为 31kDa 和 28kDa 贮藏蛋白。

1.2 蛋白质组学在大豆根瘤互作方面的研究进展

大豆是氮肥需要量比较大的作物,而根瘤固氮在满足大豆氮素需求上发挥着重要的作用,根瘤作为大豆共生固氮的重要器官,对大豆的生长发育也有着重要的影响,因此本节重点讨论蛋白质组学在大豆根系以及根瘤互作相关方面的研究进展。

大豆根系的研究近年来多集中于根尖^[10]、根毛^[11,12]以及根际环境^[13]等方面。根尖分生组织是植物根系系统生长的基础。Mathesius 等^[10]建立了

大豆根尖的蛋白质组图谱并与已分化的其它根区域的蛋白质表达情况进行比较。总共从根尖材料中分离到了 550 个蛋白点,通过 MALDI-TOF MS/MS 成功鉴定了其中的 342 个。所有这些蛋白在已分化的根区中都存在,只是表达丰度不同。功能分类显示根中大部分蛋白为胁迫反应、糖酵解、氧化还原平衡以及蛋白质加工相关蛋白。同时他们还利用 DIGE 技术鉴定了 73 个在根尖与已分化根区存在积累差异的蛋白,其中在根尖中上调表达的蛋白主要属于蛋白合成与加工、细胞氧化还原平衡以及类黄酮合成途径,下调表达的主要为糖酵解、三羧酸循环以及胁迫反应相关蛋白。以上结果证实了根尖中胁迫与防御反应、氧化还原控制以及类黄酮代谢的重要性。

根毛是根尖表皮上的毛状物,主要功能是从土壤中摄取植物所需的水分与营养等物质。大豆根毛细胞是一种用于研究单细胞系统生物学的较好模型。Brechenmacher 等^[11]以大豆幼苗的根毛为材料,确立了这类单细胞的蛋白质组参考图谱,鉴定了 5 702 个蛋白,鉴定的大多数蛋白涉及基础代谢,其他蛋白的功能还包括根毛形成/功能、营养摄取(转运体)以及膜泡运输(细胞骨架与 ras 相关结合蛋白)等。这些蛋白中的一些是在根毛中特异表达的。同时他们还利用不同的蛋白酶完成 *in silico* digestion,证明了胰蛋白酶是用于大豆蛋白质组学研究最合适的蛋白酶。

越来越多的证据表明根中细胞外蛋白可能涉及根系与土壤环境的相互作用。Liao 等^[13]将 3 种豆科植物白羽扇豆、大豆和豇豆的根中释放的分泌物收集起来作为材料,在无菌的条件下分析它们的蛋白质组表达情况。通过 LC-MS/MS 鉴定了 42~93 个根中细胞外蛋白,并且划分为 14~16 个不同的功能分类,其中 14 个同源的蛋白至少在两种植物中都得到了鉴定。而在特异表达的蛋白中,白羽扇豆有 58 个特异表达的蛋白,大豆的数量是 85 个,豇豆是 31 个。它们中许多蛋白都可以归类于相同功能分类。相比之下,白羽扇豆中出现了两个特异蛋白条带,大小分别为 16kDa 和 30kDa,它们均属于 PR 相关蛋白。以上结果表明根中细胞外蛋白可能在根与根外环境间的交互关系中发挥着重要的作用。

由于根瘤固氮的重要性,所以根瘤固氮一直是大豆研究的热点,近年来在根瘤固氮的蛋白质组学研究上也取得了一些进展。Salavati 等^[14]为了揭示大豆植株与根瘤固氮菌共生的早期阶段的特点,对易固氮品种(En-b0-1)和不固氮品种(En1282)以及它们的亲本正常固氮品种(Enrei)的根分别接

种后的反应进行了蛋白质组学分析。正常固氮品种根接种细菌后出现了 48 个差异表达的蛋白点,从中共鉴定出 56 个蛋白。在这 56 个蛋白中,与代谢和能量产生相关蛋白在正常固氮品种中与易固氮品种相比是表达下调的,而在不固氮品种中的表达则是上调的。易固氮品种和不固氮品种各有 11 个蛋白对于接种反应是敏感的,这些蛋白中有 7 个蛋白在易固氮品种中与不固氮品种相比表达是下调的,其余 4 个则是上调表达的。同时还在转录水平上,对可能涉及调控过程的候选基因进行了相关分析。

1.3 蛋白质组学在大豆抗逆境方面的研究进展

逆境是指对植物正常生命活动不利的各种因素的总称。由于植物生长的地理位置和气候条件的千差万别,以及近年来人类生产生活的影响,造成了多种不利于植物生长发育的环境因素,导致植物不能正常生长甚至死亡。在这种大背景下,研究植物逆境相关生理与分子机理的工作也就迫在眉睫,而蛋白质组学作为能够联系植物表型与基因型之间的一个有效工具,在植物抗逆研究中发挥了重要作用。近年来,蛋白质组学在大豆抗逆上应用越来越多,已经涵盖了生物胁迫与非生物胁迫类别下所有的研究方向,表 1 分类总结了 2011 年以来大豆抗逆蛋白质组学的相关研究。

从表 1 可以发现,在各种胁迫中,各国科研人员对大豆淹水胁迫的蛋白质组学研究最多,投入精力最大,发表文章约占本文所记录的抗逆文章的半数左右,足见对淹水胁迫的重视程度。淹水胁迫是严重影响大豆生长与产量的环境胁迫之一。Khatoon 等^[17]利用蛋白质组学方法研究了淹水胁迫下大豆器官特异反应,以淹水处理 5d 的大豆幼苗的根、下胚轴和叶片为材料,结果显示 3 种器官中分别有 51、66、51 个蛋白发生差异表达。功能分类后发现在根中代谢相关蛋白为上调表达,而这些蛋白在下胚轴与叶片中则是下调表达的。另外在三种器官中异黄酮还原酶都是下调表达的,然而异黄酮还原酶基因的 mRNA 在叶片中却是上调表达。由此可见,异黄酮还原酶在转录水平上调而在蛋白水平下调表明淹水处理影响 mRNA 翻译成蛋白质。上述结果表明异黄酮还原酶在 mRNA 与蛋白水平上的差异以及病害/防御与代谢相关的蛋白表达的不平衡可能导致淹水胁迫下大豆幼苗三个器官正常生长受到抑制。Khatoon 等^[18]还利用蛋白质组学方法研究淹水胁迫对于大豆根系与土壤细菌间共生相互作用早期的影响。他们对经过淹水处理后大豆幼苗接种上根瘤菌,三天后淹水处理后接种的材料与对照的根

毛数量相比,淹水处理的均表现为增加的趋势。提取分离的 219 个蛋白中,淹水处理后接种相比对照分别有 14 个蛋白上调表达、8 个蛋白下调表达。这些蛋白在对照与淹水处理的幼苗中的表达情况也进行了比较,淹水处理幼苗中上调表达的 6 个蛋白与

对照相比受到了抑制。它们与病害/防御,蛋白合成、能量与代谢有关。这些结果表明病害/防御、能量与代谢相关蛋白可能特异地在淹水处理幼苗接种后受到调控,而这种调控可能导致在早期共生分化中根毛数量增加。

表 1 2011 年以来大豆抗逆蛋白质组学研究分类总结

Table 1 Proteomics analysis of soybean under abiotic and biotic stress since 2011

胁迫 Stress	材料 Materials	相关文献 References	
非生物胁迫 Abiotic stress	根 Root	[15]、[16]、[17]、[18]、[19]、 [20]、[21]、[22]、[23]、[24]、[25]	
	下胚轴 Hypocotyl	[18]、[20]、[25]	
	叶片 Leaf	[18]	
	根中内质网 Endoplasmic reticulum in root	[26]	
	子叶 Cotyledon	[23]	
	根与下胚轴中线粒体 Mitochondria in root and hypocotyl	[27]	
	叶片 Leaf	[28]、[29]	
	根 Root	[25]	
	下胚轴 Hypocotyl	[25]	
	种子 Seed	[30]	
	叶片 Leaf	[31]	
	根 Root	[31]	
	下胚轴 Hypocotyl	[31]	
	根瘤 Nodule	[32]	
	种子 Seed	[33]	
	高温高湿 High temp. and humidity	种子 Seed	[34]
低温 Cold	种子 Seed	[34]	
渗透胁迫 Osmotic stress	种子 Seed	[34]	
低氧 Low oxygen	根 Root	[15]	
臭氧 Ozone	叶片 Leaf	[35]	
镉 Cadmium	根 Root	[36]	
	叶片 Leaf	[36]、[37]	
铝 Aluminum	根 Root	[38]	
磷缺乏 Phosphorus deficiency	根瘤 Nodule	[39]	
生物胁迫 Biotic stress	锈病 Rust	叶片 Leaf	[40]
	花叶病毒病 SMV	叶片 Leaf	[41]
	疫霉病 <i>Phytophthora sojae</i>	下胚轴 Hypocotyl	[42]
	胞囊线虫 Cyst nematode	根 Root	[43]
	斜纹夜蛾 Cotton worm	叶片 Leaf	[44]

除了研究淹水胁迫下大豆各器官以及根瘤的反应外,对直接淹水反应器官一根中的细胞器,如内质网、线粒体的蛋白质组学研究也有涉及。Komatsu 等^[26]利用无标记与单向蛋白质组学两种方法分析了淹水胁迫大豆根尖中分离纯化的内质网的蛋白表达变化。结果发现淹水处理的材料中有 117 个蛋白上调表达以及 212 个蛋白下调表达。鉴定蛋白中 111 个蛋白涉及蛋白合成、翻译后修饰、蛋白折叠、蛋白降解与蛋白活化等功能分类。同时对差异表达的蛋白中 14 个推测定位于内质网的蛋白的 mRNA 的表达水平进行了分析,发现淹水处理 1d 时,8 个涉及胁迫、激素代谢、细胞壁和 DNA 修复的基因下调表达的结果。以上结果表明淹水胁迫可能主要通

过影响大豆根尖中内质网蛋白合成与糖基化功能而发生作用。Komatsu 等^[27]还利用蛋白质组学与代谢组学技术分析淹水胁迫下大豆线粒体的蛋白与代谢的变化情况。发现三羧酸循环和 γ -氨基丁酸途径相关的蛋白与代谢物质在淹水胁迫下是上调表达和增加的,而内膜载体蛋白和与电子传递链复合体 III、IV 和 V 相关蛋白则是下调表达的。淹水胁迫下 NADH 和 NAD 的含量是增加的,而 ATP 则是显著降低的。以上结果显示尽管通过三羧酸循环线粒体中 NADH 的产出增加了,但淹水胁迫还是直接损害了电子传递链的功能。

由于蛋白质组学在大豆抗逆研究中应用较多,涉及范围较广,限于篇幅,不再逐一叙述,仅选取几

个典型胁迫因素进行讨论。盐胁迫是世界上干旱和半干旱地区导致作物减产的主要环境限制因素之一。Ma 等^[28] 选用大豆盐敏感基因型品种 Jackson 和抗盐基因型品种 Lee 68 的幼苗进行氯化钠处理,分析它们叶片的蛋白质表达情况。总共 800 个蛋白点中 91 个是差异表达的,这其中 78 个成功得到鉴定,涉及 14 个代谢途径和细胞进程。他们基于这 78 个盐胁迫相关蛋白的大多数,绘制了一张盐胁迫蛋白质网络图,包括活性氧的产生和清除、蛋白水解加速和蛋白合成减少之间的平衡,光合作用的修复,能量的供应以及乙烯生物合成增加等方面。抗盐的 Lee 68 比不抗盐的 Jackson 在同时遭受盐胁迫时会表现出更强的自由基清除能力、能量补充能力、乙烯产生能力和光合能力,这些可能是其抗盐的主要原因。

干旱胁迫是大豆产量形成的主要限制因素,然而这种抑制的调控机制仍然存在争议。Mohammadi 等^[31] 运用蛋白质组学方法研究干旱胁迫处理的大豆幼苗的蛋白表达的变化。以干旱胁迫和 PEG 处理渗透胁迫的大豆幼苗为材料,处理后分别从根、叶和下胚轴中分离蛋白。根是受干旱胁迫最敏感的器官,其中干旱、PEG 及两者同时处理分别有 32、13、12 个蛋白表达发生变化。在 PEG 处理和干旱处理的幼苗叶片中,代谢相关蛋白表达上调,能量和蛋白质合成相关蛋白下调表达。对于干旱胁迫下 3 个器官中都存在表达变化的 3 个蛋白,它们的 mRNA 也是差异调控的,包括上调的热激蛋白 70 和肌动蛋白异构体 B 以及下调的蛋氨酸合成酶。干旱胁迫的 3 个器官中蛋氨酸合成酶的 mRNA 与蛋白水平均为下调,而在其他处理中没有此反应,表明蛋氨酸合成酶是一种干旱反应蛋白,干旱胁迫下蛋氨酸合成酶的下调表达抑制了大豆幼苗的正常生长。

臭氧严重影响农业产量,而大豆又对臭氧高度敏感。Galant 等^[35] 为了解臭氧的分子作用机制,对设施中大豆施加三个臭氧浓度后进行全蛋白质组以及氧化还原蛋白质组分析。在高浓度臭氧处理的叶片中,35 个蛋白在表达丰度上增加 5 倍,22 个蛋白在氧化反应上也有 5 倍的提高,还有 22 个蛋白在表达丰度和氧化反应都上调。这些变化涉及碳代谢、光合作用、氨基酸合成、类黄酮和类异戊二烯合成、信号和激素以及抗氧化途径。上述结果表明对大豆施加季节性臭氧改变了氧化还原相关蛋白的表达丰度和氧化性质,进而影响一系列的代谢过程,在一些情况下也有助于缓解氧化胁迫作用。

镉是一种剧毒的重金属元素,如果在环境中过

量存在,会对动植物造成严重的伤害。随着现代工业的粗放发展,造成镉在环境中不断积累,因此对镉胁迫的相关研究也在跟进。Hossain 等^[36] 利用比较蛋白质组学技术揭示镉胁迫下大豆反应的蛋白网络。以对镉积累有明显差异的两个大豆品种(高积累型与低积累型)以及它们的重组自交系 CDH-80(高镉积累型)的幼苗为材料用氯化镉处理 3d,发现材料根的生长都受到了镉的抑制,进而对根蛋白表达水平的品种差异进行了评估。NADP 依赖型链烯双键还原酶 P1 在低镉积累型品种中的表达更高。而叶片蛋白质组学分析表明差异表达的蛋白主要涉及代谢与能量产生。这些结果表明高镉积累型与低镉积累型品种以及 CDH-80 在应付镉胁迫的防御机理上存在某些共性的地方。涉及糖酵解和 TCA 循环的高丰度蛋白酶可能有助于镉刺激细胞产生更多的能量来满足高能的需求。此外,光合作用相关蛋白的上调表达则说明能量产生中光合同化物的快速消耗。同时,谷氨酰胺合成酶表达量增加可能与植物螯合肽调控镉离子的去除有关系。除此以外,抗氧化酶(SOD、APX、CAT)的表达量的增加能够保证在镉胁迫下减少活性氧造成的危害。在高镉积累品种中分子伴侣的上调表达可能也是一个防止蛋白再折叠或者错误折叠从而维持蛋白质结构与功能稳定,进而维持细胞内环境平衡的重要防御途径。

大豆胞囊线虫(SCN)近年来已经成为威胁我国大豆生产安全的重要植物病原线虫。SCN 分布广,危害严重,传播范围大。而黑豆一般对 SCN 有较强的抗性。Liu 等^[43] 就利用抗病的黑豆与易感的辽豆 15 杂交的 F₄ 分离群体作为实验材料,采用双向电泳和质谱技术分离鉴定 SCN 侵染大豆后差异表达的蛋白。凝胶分析显示抗病样品有 367 个蛋白点,而易感样品则为 372 个。在这些蛋白点中,来自抗病样品中的 23 个蛋白点和易感样品中的 4 个蛋白点是差异表达的,把它们进行肽指纹图谱和质谱鉴定,其中 16 个得到成功鉴定。进一步功能分析表明这 16 个鉴定蛋白中的大部分涉及防御、能量与代谢,说明以上途径相关蛋白可能与大豆抗 SCN 有关。

1.4 大豆蛋白质组数据库的研究进展

大豆相关蛋白质组数据库信息的匮乏曾是制约大豆蛋白质组学研究发展的一大瓶颈。近年来,随着蛋白质组数据库相关技术的飞速发展,多个大豆相关以及专类蛋白质组数据库得以建立^[45~48],数据库信息也大为丰富,为蛋白质组学后期的蛋白鉴定、分类等工作开展提供了有力的推动作用。

Lei 等^[45]建立了豆科植物专属蛋白数据库 Leg-Prot,包括了七种豆科植物(大豆、百脉根、苜蓿、蒺藜苜蓿、白羽扇豆、菜豆以及豌豆)的来自预测基因模型的氨基酸序列、由表达序列标签组装成 TC 序列和单一 EST 等相关信息。对在此数据库中使用质谱数据用于蛋白鉴定的成功率与 NCBI nr 数据库进行了比较,Mascot 搜索结果显示相比 NCBI nr 蛋白数据库,豆科专属蛋白数据库能提高蛋白平均得分 54%,匹配肽段平均数提高 50%,总的鉴定成功率也从 88% 提高到 93%。利用质谱数据在豆科专属库内搜索 Mascot 肽指纹图谱在鉴定成功率上有显著的提高,从 19% (NCBI nr) 提高到 34% (Leg-Prot),但是匹配肽段的平均得分与平均数量没有显著变化。以上结果表明豆科专属蛋白数据库相比通常使用的 NCBI nr 能够提高豆科植物蛋白鉴定的成功率与置信水平,并且豆科专属蛋白数据库可免费下载开放使用。Tavakolan 等^[47]利用蛋白质组学技术以及 MALDI - TOF - MS 与 LC - MS/MS 对栽培大豆种子中贮藏蛋白、过敏性蛋白等蛋白进行了分离鉴定,建立了命名为大豆蛋白数据库的种子蛋白数据库。这个蛋白数据库也是面向公众免费开放的,既对希望改造大豆蛋白品质、培育优质大豆品种的科研人员有辅助作用,同时也对希望更好地了解市场上在售的大豆产品的蛋白组成等信息有所帮助。

1.5 蛋白质组学在大豆其他研究领域的进展

蛋白质组学技术也被运用到大豆遗传多样性的研究中。关于种子蛋白含量高于种子干重 45% 的高蛋白大豆品种(种质)的生物化学信息非常有限,Krishnan 等^[49]对 9 个大豆品种的种子蛋白进行了 SDS - PAGE 分析,结果表明它们在与大豆品种 Williams 82 相比时种子贮藏蛋白的含量显著提高。进一步的种子蛋白双向电泳图谱显示在这些品种中一些种子贮藏蛋白组成上存在显著差异。这些蛋白对于各品种总蛋白含量的贡献率通过 Delta2D 图像分析软件进行定量分析显示在大部分品种中高蛋白数量的最大差异体现在种子 11S 贮藏蛋白上。

冀豆 17 是高产优质高抗的大豆品种,它的这些性状明显优于它的父母本。因此为了评估父母本对于后代获得优良性状的贡献程度以及研究优良品种的育成机理,Qin 等^[50]利用基于 iTRAQ 结合抗体的蛋白质组学方法分析了冀豆 17 和它的父母本的叶片的蛋白表达谱的差异,总共检测到 1 269 个蛋白,冀豆 17 与其父母本相比分别有 141 个和 181 个蛋白差异表达。功能分类发现所有差异蛋白都能归入

相应的分类中,但每个类别内蛋白的数量差异较大。蛋白表达聚类分析结果表明冀豆 17 与父本 Hobbit 之间蛋白表达谱相似程度高于其与母本 Zao5241 以及父母本之间。因此,可以得出父本 Hobbit 对冀豆 17 的基因型贡献更大。

在植物转基因研究中,蛋白质组学主要被用于评估转基因大豆与非转基因大豆在某些方面的蛋白表达差异。Barbosa 等^[51]报道了转基因与非转基因大豆种子差异表达的酶与蛋白的情况。转基因大豆种子中丙二醛、抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶以及过氧化氢酶的水平高于非转基因大豆。利用双向电泳分离大豆种子蛋白后,通过两种质谱鉴定了 192 个蛋白,其中肌动蛋白、胞质谷氨酰胺合成酶大豆球蛋白亚基 G1 和富含甘氨酸 RNA 结合蛋白出现差异表达。除此之外,涉及基因修饰的酶 CP4 EPSPS 也分别通过胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的消化降解以及二级质谱得到了鉴定。Arruda 等^[52]随后对相同材料的叶片样品进行了类似的分析,结果显示转基因植株叶片中抗氧化相关酶的活性以及丙二醛和过氧化氢的含量均高于非转基因叶片的水平。两者的 2 - D DIGE 分析发现 47 个蛋白的表达丰度出现差异,其中 26 个得到成功鉴定,其中包括涉及基因修饰的蛋白 CP4EPSPS。以上研究结果有助于我们理解基因修饰生物的相关特点。

2 问题与展望

拟南芥和水稻分别是进行双子叶和单子叶植物基因组研究所确立的模式植物,二者的全基因组测序分别于 2000 年和 2004 年完成。因它们作为模式植物所具备的特点,一直以来受到各国研究人员最大精力的投入,使其具备了较好的分子生物学研究基础以及丰富的基因与蛋白质数据库信息,这也为拟南芥和水稻蛋白质组学的深入研究奠定了坚实的基础。随着分离技术的不断进步,拟南芥和水稻蛋白质组学研究的实验材料由初始的组织器官水平逐渐发展到了亚细胞水平。直接以各种细胞器和细胞结构为对象,研究各种反应最初的作用机制,已经在细胞核^[53,54]、质膜^[55,56]、线粒体^[57,58]、微粒体^[59]、高尔基体^[60]等上进行了相应的研究,而在大豆亚细胞水平上的蛋白质组学研究虽然也进行了有益的尝试^[26,27],但是与拟南芥和水稻相比,研究水平仍显滞后。其次,蛋白质组学反映了特定时间或环境下,细胞内动态变化的蛋白质组的组成成分、表达水平与修饰状态等问题,但仅靠蛋白质组的数据尚不能对生命现象的内在机制作出全面认知,所以近年来,

在模式植物上进行蛋白质组学分析时,往往结合相应的基因组、转录组、代谢组等数据,进行整合组学的系统研究,这为植物生物学诸多方面的分子机理研究带来了新的机遇,并取得了一定的突破^[61,62]。而这种整合组学研究尚未在大豆上开展,以后需要加强。

结合模式植物蛋白质组学的研究进展以及当前大豆科研与生产的需求,今后大豆蛋白质组学研究应该会向两个维度发展,一个是宽领域,另一个是深层次。宽领域是指蛋白质组学今后不光是单独作战,而是要与表型组学、基因组学、代谢组学、转录组学等各相关学科联合起来,建立起相互的联系,互为支撑,从多角度全面解释大豆相关研究的分子机理,这样有助于我们更全面地理解大豆相关生命活动的分子调控规律。而深层次则是指今后大豆蛋白质组学研究不仅仅局限于目前的组织器官水平,更要深入到亚细胞水平,关注直接发挥相应功能的细胞器以及更微观结构,这样的话,就更容易阐明相关问题的内在机制,更好地解释大豆研究上的科学问题。

尽管近年来大豆蛋白质组学研究取得了一定进展与突破,但是与模式植物拟南芥、水稻等的研究水平相比,还有一定的差距。随着一些制约大豆蛋白质组学发展的关键技术,如大豆不同组织器官蛋白的提取、大豆相关蛋白数据库信息的丰富以及多项蛋白质组学新技术的广泛应用,相信大豆蛋白质组学研究一定会趁着这股东风,取得更大的进展,为大豆科研与生产提供强有力的推动与促进。

参考文献:

- [1] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. *Nature*,2010, 463:178 – 183.
- [2] Li M,Sha A H, Zhou X A, et al. Comparative proteomic analyses reveal the changes of metabolic features in soybean (*Glycine max*) pistils upon pollination [J]. *Sex Plant Reprod*,2012,25:281 – 291.
- [3] Chen L ,Xing G G,Xu Y J,et al. Identification of major responding proteins of abnormal leaf and flower in soybean with an integrative “omics” strategy[J]. *Computers & Electrical Engineering*,2012,25:281 – 291.
- [4] Hajduch M, Ganapathy A, Stein J W, et al. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high – resolution two – dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database[J]. *Plant Physiology*,2005,137:1 397 – 1 419.
- [5] Agrawal G K, Hajduch M, Graham K, et al. In – depth investigation of the soybean seed – filling proteome and comparison with a parallel study of rapeseed [J]. *Plant Physiology*,2008,148:504 – 518.
- [6] Han C, Yin X J, He D L, et al. Analysis of proteome profile in germinating soybean seed, and its comparison with rice showing the styles of reserves mobilization in different crops[J]. *PLoS ONE*,2013,8(2) :e56947.
- [7] Kim H K, Choi U K, Ryu H S, et al. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*,2011,1814:1 178 – 1 187.
- [8] Miernyk J A, Johnston M L. Proteomic analysis of the testa from developing soybean seeds[J]. *Journal of Proteomics*,2013,99:266 – 272.
- [9] Krishnan H B, Natarajan S S, Bennett J O, et al. Protein and metabolite composition of xylem sap from field – grown soybeans (*Glycine max*) [J]. *Planta*,2011,233: 921 – 931.
- [10] Mathesius U, Djordjevic M A, Oakes M, et al. Comparative proteomic profiles of the soybean (*Glycine max*) root apex and differentiated root zone [J]. *Proteomics*, 2011,11:1 707 – 1 719.
- [11] Brechenmacher L, Nguyen T H N, Hixson K, et al. Identification of soybean proteins from a single cell type: The root hair[J]. *Proteomics*,2012,12:3 365 – 3 373.
- [12] Nguyen T H N, Brechenmacher L, Aldrich J T, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of soybean root hairs inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*,2012,11:1 140 – 1 155.
- [13] Liao C S, Hochholdinger F, Li C J. Comparative analyses of three legume species reveals conserved and unique root extracellular proteins [J]. *Proteomics*, 2012, 12: 3 219 – 3 228.
- [14] Salavati A, Bushehri A A S, Taleei A, et al. A comparative proteomic analysis of the early response to compatible symbiotic bacteria in the roots of a supernodulating soybean variety[J]. *Journal of Proteomics*,2012,75:819 – 832.
- [15] Khatoun A, Rehman S, Oh W M, et al. Analysis of response mechanism in soybean under low oxygen and flooding stresses using gel – base proteomics technique [J]. *Mol Biol Rep*,2012,39:10 581 – 10 594.
- [16] Salavati A, Khatoun A, Nanjo Y, et al. Analysis of proteomic changes in roots of soybean seedlings during recovery after flooding [J]. *Journal of Proteomics*,2012, 75:878 – 893.
- [17] Khatoun A, Rehman S, Hiraga S, et al. Organ – specific proteomics analysis for identification of response mechanism in soybean seedlings under flooding stress

- [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 5 706 – 5 723.
- [18] Khatoun A, Rehman S, Salavati A, et al. A comparative proteomics analysis in roots of soybean to compatible symbiotic bacteria under flooding stress [J]. *Amino Acids* 2012, 43: 2 513 – 2 525.
- [19] Komatsu S, Nanjo Y, Nishimura M. Proteomic analysis of the flooding tolerance mechanism in mutant soybean [J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 79: 231 – 250.
- [20] Komatsu S, Thibaut D, Hiraga S, et al. Characterization of a novel flooding stress – responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 77: 309 – 322.
- [21] Nanjo Y, Nakamura T, Komatsu S. Identification of indicator proteins associated with flooding injury in soybean seedlings using label – free quantitative proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(11): 4 785 – 4 798.
- [22] Komatsu S, Han C, Nanjo Y, et al. Label – free quantitative proteomic analysis of abscisic acid effect in early – stage soybean under flooding [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(11): 4 769 – 4 784.
- [23] Komatsu S, Makino T, Yasue H. Proteomic and biochemical analyses of the cotyledon and root of flooding – stressed soybean plants [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (6): e65301.
- [24] Nanjo Y, Skultety L, Uváčková L, et al. Mass spectrometry – based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(1): 372 – 385.
- [25] Alam I, Sharmin S A, Kim K H, et al. Comparative proteomic approach to identify proteins involved in flooding combined with salinity stress in soybean [J]. *Plant Soil*, 2011, 346: 45 – 62.
- [26] Komatsu S, Kuji R, Nanjo Y, et al. Comprehensive analysis of endoplasmic reticulum – enriched fraction in root tips of soybean under flooding stress using proteomics techniques [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 77: 531 – 560.
- [27] Komatsu S, Yamamoto A, Nakamura T, et al. Comprehensive analysis of mitochondria in roots and hypocotyls of soybean under flooding stress using proteomics and metabolomics techniques [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10: 3 993 – 4 004.
- [28] Ma H Y, Song L R, Shu Y J, et al. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 1 529 – 1 546.
- [29] Hakeem K R, Khan F, Chandna R, et al. Genotypic variability among soybean genotypes under NaCl stress and proteome analysis of salt – tolerant genotype [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168: 2 309 – 2 329.
- [30] Xu X Y, Fan R, Zheng R, et al. Proteomic analysis of seed germination under salt stress in soybeans [J]. *J Zhejiang Univ Sci*, 2011, 12: 507 – 517.
- [31] Mohammadi P P, Moieni A, Hiraga S, et al. Organ – specific proteomic analysis of drought – stressed soybean seedlings [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 1 906 – 1 923.
- [32] Gil – Quintana E, Larrainzar E, Seminario A, et al. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought – stressed soybean [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(8): 2 171 – 2 182.
- [33] Wang L Q, Ma H, Song L R, et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre – harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 2 109 – 2 127.
- [34] Swigonska S, Weidner S. Proteomic analysis of response to long – term continuous stress in roots of germinating soybean seeds [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170: 470 – 479.
- [35] Galant A, Koester R P, Ainsworth E A, et al. From climate change to molecular response: redox proteomics of ozone – induced responses in soybean [J]. *New Phytologist*, 2012, 194: 220 – 229.
- [36] Hossain Z, Hajika M, Komatsu S. Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress [J]. *Amino Acids*, 2012, 43: 2 393 – 2 416.
- [37] Hossain Z, Makino T, Komatsu S. Proteomic study of β – aminobutyric acid – mediated cadmium stress alleviation in soybean [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 4 151 – 4 164.
- [38] Duressa D, Soliman K, Taylor R, et al. Proteomic analysis of soybean roots under aluminum stress [J]. *International Journal of Plant Genomics*, 2011, ID282531.
- [39] Chen Z J, Cui Q Q, Liang C Y, et al. Identification of differentially expressed proteins in soybean nodules under phosphorus deficiency through proteomic analysis [J]. *Proteomics*, 2011, 11: 4 648 – 4 659.
- [40] Wang Y, Yuan X Z, Hu H, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in resistant soybean leaves after *Phakopsora pachyrhizi* infection [J]. *J Phytopathol*, 2012, 160: 554 – 560.
- [41] Yang H, Huang Y P, Zhi H J, et al. Proteomics – based analysis of novel genes involved in response toward soybean mosaic virus infection [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 511 – 521.
- [42] Zhang Y M, Zhao J M, Xiang Y, et al. Proteomics

- study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae* [J]. *Proteome Science*, 2011, 9: 52.
- [43] Liu D W, Chen L J, Duan Y X. Differential proteomic analysis of the resistant soybean infected by soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Race 3 [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2011, 3(4): 160 – 167.
- [44] Fan R, Wang H, Wang Y L, et al. Proteomic analysis of soybean defense response induced by cotton worm (*Prodenia litura* Fabricius) feeding [J]. *Proteome Science*, 2012, 10: 16.
- [45] Lei Z T, Dai X B, Watson B S, et al. A legume specific protein database (LegProt) improves the number of identified peptides, confidence scores and overall protein identification success rates for legume proteomics [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72: 1 020 – 1 027.
- [46] Ohyanagi H, Sakata K, Komatsu k. Soybean proteome database 2012; update on the comprehensive data repository for soybean proteomics [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: Article 110.
- [47] Tavakolan M, Alkharouf N W, Khan F H, et al. Soy – ProDB: A database for the identification of soybean seed proteins [J]. *Bioinformatics*, 2013, 9(3): 165 – 167.
- [48] Murad A M, Rech E L. NanoUPLC – MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database [J]. *BMC Biotechnology* 2012, 12: 82.
- [49] Krishnan H B, Nelson R L. Proteomic analysis of high protein soybean (*Glycine max*) accessions demonstrates the contribution of novel Glycinin subunits [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(6): 2 432 – 2 439.
- [50] Qin J, Gu F, Liu D, et al. Proteomic analysis of elite soybean Jidou17 and its parents using iTRAQ – based quantitative approaches [J]. *Proteome Science*, 2013, 11: 12.
- [51] Barbosa H S, Arruda S C C, Azevedo R A, et al. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402(1): 299 – 314.
- [52] Arruda S C C, Barbosa H S, Azevedo R A, et al. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPS gene and non – transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 93: 107 – 116.
- [53] Jones A M E, MacLean D, Studholme D J, et al. Phosphoproteomic analysis of nuclei – enriched fractions from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(3): 439 – 451.
- [54] Aki T, Yanagisawa S. Application of rice nuclear proteome analysis to the identification of evolutionarily conserved and glucose – responsive nuclear proteins [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(8): 3 912 – 3 924.
- [55] 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: 1 529 – 1 539.
- [56] Kawamura Y, Uemura M. Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation [J]. *The Plant Journal*, 2003, 36(2): 141 – 154.
- [57] Millar A H, Trend A E, Heazlewood J L. Changes in the mitochondrial proteome during the anoxia to air transition in rice focus around cytochrome – containing respiratory complexes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 39 471 – 39 478.
- [58] Sweetlove L J, Heazlewood J L. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria [J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(6): 891 – 904.
- [59] Pang Q Y, Chen S X, Dai S J, et al. Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(5): 2 584 – 2 599.
- [60] Parsons H T, Christiansen K, Knierim B, et al. Isolation and proteomic characterization of the *Arabidopsis* Golgi defines functional and novel components involved in plant cell wall biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159: 12 – 26.
- [61] Cerny M, Jedelsky P L, Novak J, et al. Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature – shocks in *Arabidopsis* [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2014, doi:10. 1111/pce. 12270.
- [62] Sudre D, Gutierrez – Carbonell E, Lattanzio G, et al. Iron – dependent modifications of the flower transcriptome, proteome, metabolome, and hormonal content in an *Arabidopsis* ferritin mutant [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, doi:10. 1093/jxb/ert112.