

蛋白质组学在果实发育生物学研究中的应用

张 巍¹, 刘悦萍², 李 阳¹

(1. 北京农学院 植物科学技术学院, 北京 102206; 2. 北京农学院 生物技术学院, 北京 102206)

摘 要:相对于基因组,蛋白质组对生命现象的诠释更直接、更准确,近年得到了快速发展。概述了蛋白质组学在果树花芽分化、果实发育、采后贮藏等果实发育机制方面的研究现状;提出蛋白质组学在果树学应用上所存在的问题,同时对其应用前景进行了展望。

关键词:蛋白质组学;花芽分化;果实发育;采后贮藏

中图分类号:Q 819 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)19-0172-03

随着一些物种如小鼠、大鼠等基因组测序工作的完成,特别是人类基因组计划草图的公开发表、以及后续家蚕、水稻、杨树、黄瓜等生物基因组测序的完成,预示生命科学研究步入了后基因组时代,此时生命科学研究面临的迫切任务之一便是对基因组的功能注释。早期功能基因组的研究主要是从细胞中 mRNA 的水平来考虑的,仅包括了转录水平调控,并不能全面代表蛋白质的表达水平。蛋白质复杂的翻译后修饰、蛋白质的亚细胞定位或迁移、蛋白质和蛋白质间的相互作用等则几乎无法从 mRNA 水平来判断。蛋白质组学是采用高分辨率的蛋白质分离手段,结合高效率的蛋白质鉴定技术,全景式的研究各种特定情况下蛋白质谱,在蛋白质整体水平上对生物体进行研究。因此蛋白质组学的研究能更好地帮助人们了解生命的本质,各器官的分子结构、功能及其行使该功能的机制等^[1]。

1994 年澳大利亚科学家 Wilkins 等首次提出了蛋白质组学(Proteomic)概念^[2],并且最初定义为“一个基因组所表达的全部蛋白质”^[3],即某一时刻,某一组织、器官、细胞或个体所有蛋白质的总体。蛋白质组是一个动态概念。它不仅在同一种有机体的不同组织和不同细胞内不同;而且同一组织、细胞的不同发育阶段,直至最后消亡的全部过程也在不断变化。蛋白质组学是分子研究的终点,也是对生物体性状最直接的反映,同时也是目前研究较多、成果较丰富的学科。

由于果树的基因组相对庞大,测序任务进展缓慢,目前所有果树中,仅有葡萄^[4]和桃^[5]完成了测序,柑桔

和苹果的基因组测序正在进行中。我国在 2010 年 10 月启动了桃基因组的重测序工作。目前部分果树资源基因组测序的完成为进行蛋白质组学的研究提供了信息平台,应用蛋白质组学技术在果树学多个领域开展了研究^[6-13]。现对蛋白质组学技术在果实发育生物学方面的应用现状及前景进行概述。

1 蛋白质组学在果实发育机制研究中的应用

1.1 蛋白质组学在果树花芽分化研究中的应用

果树花芽分化的研究是果树生理学研究的重要内容,也是果树发育生物学的热点。近几年来,果树花芽分化的机理研究已经深入到了各个领域,蛋白质组学技术对果树花芽分化机理的研究也倍受关注。

曹尚银^[14-15]等运用蛋白质组学技术对富士苹果树短枝停长后 3~9 周的花芽、叶芽进行了蛋白质的分析研究。试验表明,短枝停长后 3~6 周叶芽和花芽的 2-DE 图谱相同,从短枝停长后的第 7 周开始叶芽和花芽的 2-DE 图谱明显不同,其中花芽 2-DE 图谱检测到蛋白点数量有所增加,而叶芽的 2-DE 图谱没有变化。试验初步认定在第 7 周的花芽、叶芽的 2-DE 图谱中共有 283 个蛋白点在表达上有明显的质和量的变化,4 个蛋白点可能是花序分化表达的“关键蛋白”;3 个蛋白点可能是侧花程序表达的“关键蛋白”;1 个蛋白点可能是花萼程序表达的“关键蛋白”。试验又对富士苹果花芽形态分化开始时的特异蛋白点进行了肽质量指纹图谱分析,并进行了蛋白质鉴定与功能预测,初步认定 1 个蛋白点是与合成酶有关的蛋白;1 个蛋白点是与转录有关的 RNA 结合蛋白。因为果树花芽分化是一个高度复杂的生理生化和形态发生过程,因此对其机理的阐明需要多个学科、多种技术方法的结合。

1.2 蛋白质组学在果实发育研究中的应用

果实在发育过程中,蛋白质含量不断变化,与成熟时相比,处在发育阶段的果实蛋白质含量相对较高。Faurobert M 等^[16]研究番茄发育和成熟过程中主要蛋白质组变化的试验时发现,共有 7 种蛋白参与果实发育,分别为胁迫反应相关蛋白,碳水化合物代谢相关蛋

第一作者简介:张巍(1986-),女,在读硕士,研究方向为果树发育生理与分子生物学。

责任作者:刘悦萍(1976-),女,博士,副教授,现主要从事果实发育生理及分子生物学研究工作。

基金项目:北京市科技新星计划资助项目(2008B22);北京市属市管高校人才强教计划资助项目;北京市教委科研资助项目(KM200610020005)。

收稿日期:2011-07-19

白,氨基酸代谢相关蛋白,信号传导相关蛋白,光合作用、呼吸作用相关蛋白,蛋白质命运相关蛋白,次生代谢相关蛋白。其中与胁迫反应相关的蛋白含量最多,在果实发育后期上调;与氨基酸代谢和蛋白质合成相关的蛋白在细胞分裂时期有表达,不久后该蛋白表达下降;在细胞膨大时期,与光合作用、细胞壁合成相关的蛋白会持续增加;大部分与碳水化合物代谢和氧化还原过程相关的蛋白在果实发育前期表达量增加,含量稳步增长,在果实成熟时含量最大。果实在发育过程中,高表达的蛋白主要存在于细胞质和叶绿体中,主要参与糖、蛋白质代谢,光合作用,细胞壁代谢等过程。而在果实成熟过程中,高表达的蛋白主要是与胁迫反应相关的蛋白。

Deytieux C 等^[17]对葡萄成熟过程中的蛋白质组进行了分析,发现在葡萄果实着色前后 11 种蛋白有差异表达,它们主要与化合物代谢、胁迫反应和转录有关。其中 5 种蛋白质涉及到了光合作用和碳水化合物的代谢,3 种蛋白质是与胁迫反应相关的热击蛋白。在葡萄着色后期,得到 20 个差异表达蛋白,其中 18 个蛋白被鉴定。5 个蛋白与花青素的合成有关,5 个蛋白参与能量转化,另外 3 个蛋白被认定为是蛋白的伴随产物,它们与肽分子的稳定有关。而在葡萄成熟时,蛋白表达量下降,这些蛋白主要参与花青素的合成、含氮化合物和含碳化合物的代谢。

Giribaldi M 等^[18]研究了内比奥罗葡萄从花后 1 个月到完全成熟过程中果实蛋白质组的动态变化,共得到了 730 个蛋白点,其中 118 个为差异蛋白点,93 种蛋白得到成功鉴定,它们大多数与能量、新陈代谢、蛋白质合成与降解相关。在转色期前后,与果实表面蜡质和萜类化合物合成相关的乙酰 CoA 转乙酰酶、柠檬酸裂解酶以及与氨基酸代谢有关的甲硫氨酸合酶、谷氨酸脱氢酶等大量表达。在果实成熟过程中,糖酵解能力下降,细胞骨架进行了重新排列。

果实发育成熟是果实生命周期的一个阶段,这期间经历着一系列复杂的代谢变化,包括呼吸作用的改变,叶绿素以及多糖的降解,类胡萝卜素、芳香物质和各类植物激素的合成等。近年来,越来越多的证据已经证明,果实成熟是一系列成熟相关基因时空表达以及相互作用的结果。蛋白质组学技术在果实发育研究中的应用,可为全面、系统地阐明果实发育机制提供有价值的线索。

1.3 蛋白质组学在果实采后研究中的应用

近年来,随着蛋白质组学的发展,双向凝胶电泳及质谱技术已经逐渐渗透到果实采后生理及病理学研究的各个方面。Wang 等^[19]应用蛋白质组学技术研究了草酸对枣的胁迫反应,结果表明,适量草酸作用能抑制乙烯产生,提高胱硫醚 β -合酶的表达;能抑制乙醇脱氢酶的表达及其活性,降低乙醇的含量;同时能引起抗性蛋白的表达,抑制果实变红,延缓枣的衰老过程,提高果实抵抗青霉菌侵袭的能力。

Qin^[20]等研究了果实的衰老与细胞器线粒体之间的关系,研究人员从活性氧代谢的角度,通过蛋白质组学、蛋白免疫杂交以及其它生理生化分析,揭示了线粒体蛋白氧化损伤与果实成熟衰老的关系。研究发现,包括线粒体外膜蛋白、三羧酸循环相关蛋白以及抗氧化酶在内的线粒体蛋白在果实正常成熟衰老过程中发生了不同程度的氧化损伤。在果实成熟过程中,一些线粒体蛋白的羧基化水平会提高。通过 H_2O_2 的处理,可以提高线粒体蛋白的羧基化水平,进而加速果实衰老;而降低温度可以延缓果实衰老。一旦线粒体受到活性氧的攻击而发生功能损伤,细胞的各种代谢活动将会发生紊乱,从而导致衰老或者凋亡的发生。通过加速果实衰老和延缓衰老的方式,研究人员进一步从正反两方面开展了工作,并认为这些蛋白在果实成熟衰老过程中可能发挥着重要作用。

Chan 等^[21]对膜醌毕赤酵母和水杨酸在防治桃软腐病方面进行了研究,认为膜醌毕赤酵母菌和水杨酸能提高桃抵抗病菌侵袭的能力。通过蛋白质组的分析,由它们诱导产生的蛋白得到了鉴定,6 个抗氧化的蛋白,3 个与病原体相关的蛋白以及转录修饰相关蛋白,这些蛋白在抵御氧化损伤、抑制病原体侵袭、识别外源基因等方面起着至关重要的作用。最后一类是与糖酵解和三羧酸循环相关的酶。其中抗氧化蛋白和病原体相关蛋白由膜醌毕赤酵母菌和水杨酸共同调控;膜醌毕赤酵母菌和水杨酸的作用能改变糖酵解和三羧酸循环代谢;在采后的果实中,外源水杨酸不会抑制过氧化氢酶的活性,而会引起内源 H_2O_2 含量的变化。

到目前为止,线粒体氧化损伤主要集中在对线粒体脂质和 DNA 的研究上,关于线粒体蛋白的损伤却研究较少,而对于果实中活性氧如何损伤线粒体蛋白的研究更是未见任何报道。大量的研究表明,乙烯、双氧水、超氧阴离子等在控制果实的成熟衰老过程中发挥着极其重要的作用,但是有关活性氧如何调控果实的成熟衰老,即活性氧调节果实成熟的作用机制还鲜有报道。

2 蛋白质组学在果实发育学应用中存在的问题

多数果树是多年生、世代长的物种,它们高度杂合,生长周期长,杂交或自交后代不易获得,不同生理阶段存在着形态和结构上的差异,遗传转化体系的建立也较困难,因此应用分子生物学手段进行研究存在着技术上的难题。

蛋白质组学研究技术具有的高通量、大规模、整体性蛋白质水平,是目前了解果树生长、发育的有利工具。目前,蛋白质组学技术在果树学方面的应用日趋成熟,但蛋白质组学技术本身还存在很多不尽人意的地方,比如:双向电泳的分辨率有限,低丰度蛋白质难以检测,疏水性蛋白质或不溶性蛋白提取和分离效果差,不同研究结果的可比性差等缺点。由于蛋白质

组学的研究需要借助基因组数据库,目前已完成测序工作的果树资源不是很多,限制了在果树学领域进行广泛的蛋白质组学研究,所以非测序植物的蛋白质谱鉴定率不理想。

3 蛋白质组学在果树学研究领域的前景

随着蛋白质组学的飞速发展,给果树诸多方面分子机理研究带来了新的机遇,也为揭示果树生长发育的本质提供了捷径^[22]。蛋白质组学与代谢调控研究相结合将有助于了解果实采摘前后的生理过程,也有利于了解影响果实生长发育和成熟的因素^[23]。蛋白质组学技术也会帮助人们了解许多与信号传导相关的成分,进而揭示果实的病理过程和抗逆防御机制。虽然蛋白质组研究当前还处于一个初期发展阶段,相关技术手段及其配套应用还不是很成熟,但蛋白质组学研究最终将成为系统生物学的最重要内容之一。

参考文献

- [1] 王英超,党源,李晓艳,等. 蛋白质组学及其技术发展[J]. 生物技术通讯,2010,21(1):139-144.
- [2] Chapman E J, Prokhnovsky A I, Gopinath K. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step[J]. Genes Dev, 2004, 18(10):1197-1186.
- [3] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A. Progress with proteome projects; why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996(13):19-50.
- [4] Jaillon O, Aury J M, Noel B. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla[J]. Nature, 2007, 449(27):463-467.
- [5] Peach Genome [EB/OL]. <http://www.rosaceae.org/peach/genome>.
- [6] 钟凤林. 琯溪蜜柚汁胞发育过程的差异蛋白质组学研究[D]. 福州:福建农林大学,2009.
- [7] Ytterberg A J, Jean-Benoit P, K J. van Wijk. Protein Profiling of Plastoglobules in Chloroplasts and Chromoplasts. A Surprising Site for Differential Accumulation of Metabolic Enzymes[J]. Plant Physiology, 2006, 140:984-997.
- [8] Trainotti L, Tadiello A, Casadoro G. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age; the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58:3299-3308.

- [9] Costa G, Torrigiani P. Jasmonate-induced transcriptional changes suggest a negative interference with the ripening syndrome in peach fruit [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59:563-573.
- [10] Tani E, Polidoros A N, Tsaftaris A S. Characterization and expression analysis of Fruitfull-and Shatterproof-like genes from peach (*Prunus persica*) and their role in split-pit formation[J]. Tree Physiology, 2007, 27:649-659.
- [11] Diane B, David O, William L. A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples [J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 32:175-181.
- [12] Delphine V, Matthew D, Grant R. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters[J]. Electrophoresis, 2006, 27:1853-186.
- [13] Obenland D, Vensel W, Hurkman W. Alterations in protein expression associated with the development of mealiness in peaches[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2008, 83:85-93.
- [14] 曹尚银, 张秋明, 朱志勇, 等. 苹果花芽孕育蛋白质组学初步分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10):2281-2288.
- [15] 曹尚银. 苹果花芽孕育的蛋白质组学及其特异蛋白的研究[D]. 湖南农业大学, 2005.
- [16] Faurober M, Mihr C, Bertin N, et al. Major Proteome Variations Associated with Cherry Tomato Pericarp Development and Ripening[J]. Plant Physiology, 2007, 143:1327-1346.
- [17] Deytieu C, Geny L, Lapailierie D, et al. Proteome analysis of grape skins during ripening[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(7):1851-1862.
- [18] Giribaldi M, Perugini L, Sauvage F X, et al. Analysis of protein changes during grape berry ripening by I-DE and MALDI-TOF [J]. Proteomics, 2007, 7:3154-3170.
- [19] Wang Q, Lai T F, Qin G Z, et al. Response of Jujube Fruits to Exogenous Oxalic Acid Treatment Based on Proteomic Analysis[J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50(2):230-242.
- [20] Qin G Z, Meng X H, Wang Q, et al. Oxidative Damage of Mitochondrial Proteins Contributes to Fruit Senescence: A Redox Proteomics Analysis [J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8:2449-2462.
- [21] Chan Z L, Qin G Z, Xu X B, et al. Proteome Approach To Characterize Proteins Induced by Antagonist Yeast and Salicylic Acid in Peach Fruit[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(5):1677-1688.
- [22] 曹尚银, 张秋明, 郭俊英, 等. 蛋白质组学研究技术及其在果树学中的应用[J]. 果树学报, 2005, 22(2):138-142.
- [23] Katz E, Fon M, Lee Y J, et al. The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism[J]. Planta, 2007, 226:989-1005.

Application of Proteomics Technology on Fruit Development

ZHANG Wei¹, LIU Yue-ping², LI Yang¹

(1. Department of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206; 2. Department of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract: Proteomics was more directly and exactly than genomics to explain the activity of life. In recent years, proteomics had developed much faster and be paid more attention in worldwide. This review summarized recent progress of proteomics on flower-bud differentiation, fruit development and post-harvest storage. The prospect of proteomics and its trouble on fruit tree were discussed.

Key words: proteomics; flower-bud differentiation; fruit development; post-harvest storage