

差异蛋白质组学技术及其在园艺植物中的应用

张鹏,朱育强,陈新娟,陈丽萍,周胜军

(浙江省农业科学院蔬菜所 杭州 310021)

摘要:差异蛋白质组学是蛋白质组学研究的一个重要内容,简要介绍了差异蛋白质组学产生的意义、背景以及研究方法。差异蛋白质组学主要包括双向聚丙烯酰胺凝胶电泳、质谱技术和生物信息学等研究技术,在园艺植物研究的诸多方面得到应用。

关键词:差异蛋白质组;双向电泳;质谱;园艺植物

中图分类号:S603,Q51

文献标志码:A

论文编号:2010-2960

Differential Proteomics Technology and its Application in Horticultural Plants

Zhang Peng, Zhu Yuqiang, Chen Xinjuan, Chen Liping, Zhou Shengjun

(Institute of Vegetable, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract: Differential proteomics is a major research area in proteomics era. The value, concept, research method and application of differential proteomics in horticultural plants are briefly introduced in this paper. Differential proteomics is based on the method of two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and bioinformatics. Differential proteomics technology could be used to understand the mechanism that controls many processes in horticultural plants.

Key words: differential proteomics; two-dimensional gel electrophoresis; mass spectrometry; horticultural plants

0 引言

鉴于基因组研究的局限性,1994年澳大利亚Macquarie大学的Wilkins和Williams等在意的一次科学会议上首次提出了蛋白质组(Proteome)这个概念,并于1995年7月的Electrophoresis杂志上发表^[1]。蛋白质组是指某一物种、个体、器官、组织或者细胞基因组的全部蛋白质产物的表达谱,或称一种细胞内存在的全部蛋白质。蛋白质组学(proteomics)是指研究蛋白质组的科学,本质上是在大规模水平上研究蛋白质的特征,包括蛋白质的表达水平、翻译后的修饰、蛋白与蛋白相互作用等,由此获得蛋白质水平上的关于组织变化,细胞代谢等过程的整体而全面的认识^[2]。近年来,蛋白质组学有了长足的发展,技术已经趋于成熟,并广泛应用于各个领域。成为生命科学研究进入

后基因组时代的里程碑,也是后基因组时代生命科学研究的核心内容之一^[3]。

1 差异蛋白质组学研究的背景和意义

尽管现在已有多个物种的基因组被测序,但无法确定基因的表达时间、位置及程度,且表达的类型和表达程度随生物体外界环境及内在状态的变化而表现极大的差别。研究者们越来越意识到,仅仅完成基因组的测序并不足以阐明生物的功能,于是研究重点逐渐由获取基因序列信息转向研究基因的功能。目前,功能基因组中所采用的策略都是从细胞中mRNA的角度来考虑,其前提是细胞中mRNA的水平反映了蛋白质表达的水平。但事实并不完全如此,从mRNA角度考虑并不能全面代表蛋白质表达水平,mRNA不同的稳定性和不同的翻译效率都能够影响新蛋白质的产

基金项目:浙江省公益技术研究农业项目“小果型黄瓜抗病种质材料创新技术研究”(2010C32004)。

第一作者简介:张鹏,男,1978年出生,黑龙江齐齐哈尔人,助理研究员,博士,研究方向:遗传育种与分子生物学。通信地址:310021 浙江省杭州市江干区石桥路198号 浙江省农科院蔬菜研究所, Tel: 0571-86411359, E-mail: yinxiang0586@126.com。

通讯作者:周胜军,男,1968年出生,浙江诸暨人,副研究员,学士,研究方向:设施园艺与遗传育种。通信地址:310021 浙江省杭州市江干区石桥路198号 浙江省农科院蔬菜研究所, Tel: 0571-86404237, E-mail: zsj6869@163.com。

收稿日期:2010-10-13, **修回日期:**2010-12-07。

生,更重要的是,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-蛋白质相互作用等则几乎无法从 mRNA 水平来判断。蛋白质是基因功能的执行体,是生命现象的直接体现者,它通过其自身特有的活动控制和调节着诸多的生命活动。因此,蛋白质本身的存在形式和活动规律仍依赖于直接对蛋白质的研究来解决。无论是从基因组的局限、还是蛋白质组研究的自身发展而言,大规模、全方位的蛋白质组学研究势在必行^[4]。

蛋白质组学从整体上对体系内蛋白质进行研究,常见2种研究策略:第1种是检测蛋白质组理化参数的“完全蛋白质组学”,分析生物体内尽可能多乃至接近所有的蛋白质,随着对蛋白质组学的深入理解和具体工作的开展,人们逐渐认识到在短时间内建立人类蛋白质组学“完整的”数据库和实现网络资源共享是难以实现的,或者说条件尚未成熟^[5]。第2种是差异蛋白质组学,主要是筛选和鉴定不同种类或状态下各样本之间蛋白质组的区别与变化,实现对体系内代谢调控的动态监测,揭示细胞生理和病理状态的进程与本质、对外界环境刺激的反应途径以及细胞调控机制,同时获得对某些关键蛋白的定性和功能分析,从而揭示机体对内外环境变化产生反应的本质规律^[6-11]。

与基因组的稳定性相比,蛋白质则具有可变、多样的特点,即使同一细胞,在不同生理或病理环境中,其蛋白表达也是不同的。蛋白质组的这种特点参与和影响着整个生命过程,这为差异蛋白质组的出现与兴起奠定了逻辑基础,差异蛋白质组研究的理论假设是承认某一细胞或组织在发生某种正常或异常变化时,其蛋白质组会发生相应的、有规律的改变。如能对此类蛋白进行验证,进一步证明其与该变化密切相关,则可认为差异蛋白是这种变化的一类标志性蛋白^[12-14]。差异蛋白质组学研究由于并不要求捕获“全部”蛋白,而重在找出有意义的差异蛋白,因而有着高得多的可实现性^[15]。这种观点更倾向于把蛋白质组学作为研究生命现象的手段和方法。因此,它对园艺植物的发育和组织器官分化、突变体、对生物和非生物胁迫的适应机制、生理生化过程以及亚细胞结构研究等方面均有着重要的理论与实践意义。

2 蛋白质组差异的形成原因及表现形式

蛋白质组复杂多变的特点与其作为细胞功能执行者的身份直接相关。在细胞中,除管家蛋白外,多数蛋白参与功能行使,参与对环境刺激的反应,当细胞功能或细胞环境发生改变时,细胞中的蛋白表达相应变化,以能动应对各种环境,形成与该变化密切相关的蛋白

质组差异。此外,异形体的存在也是造成蛋白质组复杂多变的原因,由于细胞内基因剪切方式的不同、翻译共修饰或翻译后修饰的存在(比如磷酸化、甲基化、糖基化、硫酸化、酰基化等)、肽段的断裂以及组织特异性表达,能够形成多种蛋白异形体,且存在时间长短不一。因此,蛋白质组随细胞类型差别或所处环境改变而不同,由此形成差异^[16-17]。

差异蛋白质组研究有多种途径和方法,在不同的实验手段中差异蛋白质组的表现形式各不相同。当以传统的二维电泳(2-DE)技术进行研究时,电泳图上差异蛋白点表现的几种基本形式为:(1)电泳迁移率的改变;(2)蛋白点出现或消失,蛋白点浓度的增大或减少;(3)某种蛋白点分裂形成的异形体在浓度或位置上的改变。有些蛋白质的变化形式会同时呈现几种基本形式的变化,比如某种蛋白在表达量上调的同时被磷酸化,则呈现迁移率和浓度的变化^[18]。以液相色谱技术研究时,蛋白质差异则反映为相应时间段色谱图的不同^[14]。

3 差异蛋白质组学研究技术

双向凝胶电泳、质谱技术和生物信息学是蛋白质组研究的三大核心技术^[19]。即通过双向凝胶电泳将蛋白质彼此分离,然后利用质谱对蛋白质进行鉴定,最后应用生物信息学数据库对鉴定结果进行存储、处理、对比和分析^[20]。

3.1 蛋白质的分离技术

3.1.1 蛋白质的提取与样品制备 样品制备是双向电泳的第一步,是决定双向电泳成败的关键因素。在制备过程中,应考虑所选目标体系是否便于研究,所含组分不宜过于复杂,这对后续的分选、鉴定蛋白质非常重要,尤其是2-DE成功与否的关键^[21-22]。由于样品的多样性,没有一种通用的方法适用于各种样品,但都遵循几个基本的原则:(1)尽可能的提高样品蛋白质的溶解度,减少蛋白质的损失;(2)减少蛋白质的人为修饰;(3)破坏蛋白质与其他生物大分子之间的相互作用,使蛋白质完全处于变性状态。目前,应用最多的是三氯乙酸和丙酮迅速沉淀蛋白质,它的优点是沉淀蛋白质迅速且钝化其内的蛋白质降解,还能够除去样品中干扰等电聚焦的物质,如盐类、色素、多酚类化合物等,但该方法容易丢失蛋白质^[23-26]。一些蛋白质样品制备方法可以通过Bio-Rad等网站进行查询下载^[27]。

3.1.2 蛋白质的分离技术 双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis 2-DE)是目前唯一能将数千种蛋白质同时分离与展示的分选技术,由O'Farrell在1975年建立,至今经历了35年的发展,目前仍是蛋白

质组研究的核心技术^[28-29]。双向电泳技术应用2个不同分离原理依据蛋白质的特性进行分离。第一向依据蛋白质所带电荷量的不同,用等电点(pI)聚焦技术分离蛋白质;第二向是依据蛋白质分子量大小的差别,通过蛋白质与SDS形成复合物后,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移速率不同达到分离蛋白质的目的。固相pH梯度(IPG)技术的引入,提高了双向电泳的稳定性^[30]。主要技术路线流程为:蛋白样品制备-干胶条水合-等电聚焦-聚焦后胶条平衡-SDS-PAGE电泳-凝胶染色-图像扫描^[27]。二维差异凝胶电泳(2D-DIGE)是双向电泳技术的重要突破。它采用2种不同的荧光染料分别标记不同的蛋白样品,然后样品等量混合,在同一块凝胶上分离。2D-DIGE技术克服了双向电泳过程中不同凝胶间重复性差的问题,同时可以在同一块胶上更精确直观地观察两种样品蛋白质的差异表达^[31]。此外,高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳技术(CE)和同位素标记亲和和标签技术(Isotope-coded affinity tags, ICAT)^[32]也是分离蛋白质的有效方法。目前,作为新型分离技术,二维色谱(2D-LC)、二维毛细管电泳(2D-CE)、液相色谱-毛细管电泳(LC-CE)等方法都有补充和取代双向凝胶电泳之势。

3.2 蛋白质鉴定技术

蛋白质分离后需要对单一蛋白质进行鉴定,蛋白质鉴定技术是蛋白质组研究的支柱。传统的蛋白质鉴定方法有Edman降解法、氨基酸分析法等^[33]。Edman降解法测定的肽序列非常准确,但速度较慢,费用偏高。氨基酸分析法方法经济快速,但灵敏度低。20世纪80年代,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)2项具有划时代意义的软电离质谱技术的出现^[34-36]开辟了质谱学新领域-生物质谱(Bio-mass spectrometry),质谱技术由于具有极高的灵敏度而成为蛋白质组研究的核心工具,并且解决了极性大,热不稳定蛋白和多肽的离子化、分子量测定等问题,是目前蛋白质组研究技术中最具活力和潜力的技术。

MALDI-TOF-MS质谱通过测定一个蛋白质的肽段混合物中肽段的电离飞行时间来确定其分子量或部分肽序列等数据,最后通过相应的数据库搜索鉴定蛋白质。ESI-MS/MS质谱途径是肽链直接从液相经“电喷雾离子化”而被电离。肽链离子被喷射到“串联质谱仪”,使混合物中的肽链分解为氨基酸或含有C末端的片段,得到的序列信息更具有特异性。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和原始的基因组数据库中搜寻^[37]。ESI-MS/MS与HPLC相结合可对分子量较大的蛋白质酶解肽谱进行定性定量分析^[38]。

3.3 蛋白质分析技术

经质谱鉴定的样品,只能知道其中含有什么蛋白,但无法获悉这些蛋白的属性、空间构象、在生物体中的执行的功能以及与之同源的蛋白信息,这时需要借助生物信息学知识来解决这些问题。生物信息学是采用计算机技术和信息论方法研究蛋白质及核酸序列等各种生物信息的采集、储存、传递、检索、分析和解读的一门新兴学科,集合数学、统计、计算机与生物医学等工具,阐明大量生物学数据所包含的生物学意义。蛋白质组数据库是蛋白质组研究水平的标志和基础^[20]。通过利用生物信息学技术比较所获得的序列是否与已知蛋白结构相似,或者所获得序列中是否含有特殊蛋白家族的结构域或功能保守残基来预测新蛋白的功能^[39],也可以通过组成蛋白质的20种氨基酸的物理和化学性质分析已知或未知蛋白质的性质,如等电点/相对分子量、疏水性、跨膜螺旋、卷曲螺旋及信号肽等。对于那些与数据库中已知功能但无同源性的序列或找到同源性的但功能未知的蛋白质,可与保守的基序比较来判断其功能^[41]。目前,在互联网上已经建立了许多蛋白质组数据库,如NCBI、SWISS-PROT(<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>)、PIR(<http://pir.georgetown.edu/>)、PROSITE等^[40],这些数据库的建立使蛋白质快速鉴定成为可能。

虽然有时蛋白质的序列相似,但是却执行着不同的功能;或同源基因编码的蛋白质,虽然序列差别很大,但是对于生物体来说执行的却是同样的功能。这主要是因为蛋白质的空间结构发挥了作用,因此,需要对蛋白质的结构进行分析预测。在PDB蛋白数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/>)、Scop(<http://scop.mrcimbcam.ac.uk/scop/>)蛋白质结构分类数据库、PHD(<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>)等数据库可对蛋白质序列和结构进行分析可以检索到一些蛋白质高级结构的同源性。当鉴定一个未知蛋白结构时,通常在DALI(<http://www2.ebi.ac.uk/dali/>)和CATH(http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath_new/)等数据库中采用扫描和对比法来搜索同源结构^[41]。此外,可以利用酵母双杂交技术和蛋白质芯片技术分析蛋白之间相互作用。

4 差异蛋白质组学技术在园艺植物中的应用

在园艺植物蛋白质组研究过程中,由于作物种类

的不同,样品的提取方法以及双向电泳条件往往存在差异。因此,试验过程中应根据样品自身的特点对提取方法和双向电泳条件进行优化,从而获得理想的分离效果。对于园艺植物的差异蛋白质组研究,研究者们根据样本的不同分别对其最适的制备方法进行探索,徐幼平等比较了三氯乙酸(TCA)、酚和十二烷基硫酸钠(SDS)3种提取方法在所获番茄叶片总蛋白产量及其在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨率等方面的区别,并对3种蛋白溶解液以及超声处理在蛋白质溶解中的作用进行了分析探讨。结果表明,采用TCA提取法获得蛋白沉淀,再以溶解液II(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,2%CHAPS,2%SB3-10,65 mmol/L DTT,0.2%两性电解质)溶解,结合超声助溶的方法体系可以获得高得率和高电泳分辨率的番茄叶片总蛋白样品,该方法适用于双向电泳分析等下游操作^[42]。张鹏利用TCA-丙酮沉淀法,对适用于双向电泳的黄瓜果实的蛋白质样品的提取方法及技术体系进行了优化,结果表明:在研磨过程中不加入PVP效果较好,在黄瓜果实蛋白质提取过程中最佳抽提次数为7次,适用于双向电泳的最佳的上样量为40 mg/mL^[43]。李凤玉等对黄瓜离体子叶节的蛋白质双向电泳的条件进行优化的结果显示:黄瓜子叶节蛋白质主要分布在pH 4~7范围,用酚抽提法制备蛋白质干粉,第一向等电聚焦固相pH梯度胶条(24 cm)的最适蛋白上样量为1200 μg,第二向SDS-PAGE采用11.5%的分离胶,可以得到1100多个蛋白点^[44]。范海延等对黄瓜叶片蛋白提取方法、裂解缓冲液、等电聚焦(IEF)参数进行研究。认为丙酮法或三氯乙酸/丙酮法提取黄瓜蛋白质较好;裂解缓冲液为9.5 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,1%二硫苏糖醇(DTT),2 mmol/L三丁基磷(TBP),4%3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲胺基]丙磺酸内盐(CHAPS),0.2%两性电解质,0.002%溴酚蓝,0.25%吐温-20,10%异丙醇,5%甘油,10 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)时,电泳图谱效果最好;IEF等电聚焦条件为25000 Vh时,2-DE图谱蛋白点多且清晰^[45]。

黎飞等通过对IPG胶条梯度、上样方式、上样量、聚焦条件等4方面条件的优化,建立了番茄子叶总蛋白双向电泳体系,即采用TCA丙酮沉淀法提取番茄子叶总蛋白,选用24 cm pH3-7NL的IPG胶条,采用水化上样,上样量300 μg,按聚焦程序I或II聚焦后进行双向电泳分离和银染染色。若采用制备胶,则将上样量提高至1.5 mg,按聚焦程序III进行聚焦后进行双向分离,并采用胶体考马斯亮蓝染色。采用该优化的体系可以获得分辨率高、重复性好的双向电泳图谱^[46]。刘丽娟等建立了适合生菜叶片总蛋白质分离的双向电泳

方法:采用三氯乙酸-丙酮沉淀法进行总蛋白质提取,用24 cm固相pH梯度等电聚焦8000 V×8 h结合12%的SDS-PAGE进行双向电泳分离,银染法和考马斯亮蓝染色法染色都获得了较好的结果,具有较高的分辨率和重复性^[47]。

陈移亮通过对双向电泳各个环节条件的比较选择,认为蝴蝶兰叶片蛋白质双向电泳的较佳方案为:选用pH 4~7的IPG胶条可以得到较好的分离效果。裂解液中含7 mmol/L尿素、2 mmol/L硫脲、6% Triton X-100、2%两性电解质载体、65 mmol/L DTT,提取总蛋白时每1 mg干粉加入25 μL裂解液,蛋白提取液上样体积为45 μL;第二向电泳使用10%~15%梯度胶,使用改进的去除戊二醛的银染方法^[48]。王一鸣等以‘大久保’桃(*Prunus persica* L. ‘Okubao’)果实为试材,探讨不同上样量、不同平衡缓冲液、不同染色方式等因素对桃果实双向电泳图谱效果的影响。结果表明,考马斯亮蓝染色后的电泳图谱虽然蛋白质点的数量少于银染色后的图谱,但背景较为清晰,适用于蛋白质组分析。采用固相pH梯度17 cm胶条,100 μg蛋白质上样量,样品干粉溶于375 μL含有硫脲、磺基三甲基胺乙内脂3~10的上样缓冲液中,等电聚焦后用含有磷酸三丁酯的平衡缓冲液还原,进行SDS-PAGE,银染色得出的双向电泳图有蛋白点1209个,纹理较少,适用于桃果实蛋白质组学分析且兼容于下游技术的蛋白质质谱鉴定^[49]。

目前,质谱和生物信息学技术是差异蛋白质组鉴定和分析的主要工具,2种技术在园艺植物差异蛋白质组学研究中的应用方法上较蛋白质的提取分离技术相对固定,因此,应用范围广泛。在黄瓜育种栽培研究中的应用主要包括以下几个方面:黄瓜弯曲果实腹部脊部的蛋白质组比较鉴定^[43]、黄瓜雌核发育早期蛋白质组的鉴定^[50]、黄瓜芽黄突变体与正常黄瓜的蛋白表达差异分析鉴定^[51]、黄瓜叶片耐低温胁迫差异蛋白质的鉴定^[52]、黄瓜幼苗Cd²⁺抗性蛋白质组分改变的研究^[53]、嫁接黄瓜和接穗自根植株在NaCl胁迫下蛋白质组差异鉴定^[54]、诱导后黄瓜抗病性相关蛋白质组的变化^[55,56]、黄瓜F₂代白粉病抗感池的蛋白质组比较^[57]、白粉病菌胁迫不同时间黄瓜叶片蛋白质组的变化^[58]、黄瓜嫁接苗和自根苗的蛋白质组差异研究^[59]和黄瓜离体子叶节培养物差异蛋白的表达鉴定等^[60]。同时,也用于分析鉴定苦瓜种子发育过程中^[61]、西瓜在干旱胁迫下根部的差异蛋白质^[62]。

质谱技术与生物信息学在番茄的果皮发育和成熟的蛋白质组^[63]、发芽种子胚和胚乳间蛋白质组比较^[64]、

转基因植株蛋白质组差异研究^[65-67]、突变体与野生型的花粉囊蛋白质组比较^[68]、盐胁迫下蛋白质表达差异^[69]和抗病性研究^[70-72]等方面得到应用。此外,油菜^[73-76]、胡萝卜^[77-80]、花椰菜^[81]、菠菜^[82]、甜菜^[83]、葡萄^[84]、荔枝^[85]、龙眼^[86]等园艺植物的差异蛋白质组研究也是利用质谱技术与生物信息学进行鉴定分析。

差异蛋白质组学技术通过筛选和鉴定不同种类或状态下各样本之间蛋白质组的区别与变化,获得对关键蛋白的定性和功能分析,从而揭示细胞生理和病理状态的进程与本质以及机体对内外界环境变化产生反应的本质规律,对园艺植物遗传育种研究具有重要的理论与实践意义。

5 问题与展望

蛋白质组学是一门新兴的学科,虽然刚刚起步,但却为大规模地直接研究基因功能提供了强有力的工具。目前,蛋白质组学在园艺植物研究的多个领域得到初步应用,因质谱技术的高敏感性,蛋白质组的纯化问题也是制约植物蛋白质组学研究的的关键问题^[87]。同时,受技术体系的限制,低丰度蛋白的获得仍然是一个巨大的挑战。因此需要开发新的质谱技术,在不需要对蛋白质混合物进行分离的前提下,直接分析和鉴定全蛋白质,同时提高低丰度蛋白的检出率。对于未进行基因组测序的植物来说,蛋白质鉴定也是一个亟待解决的问题。相信随着越来越多植物基因组的测序进行以及EST数据库的丰富,差异蛋白质组学在园艺植物中的应用会越来越广泛。

参考文献

- Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa P A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* [J]. *Electrophoresis*, 1995,16(7):1090-1094.
- 赵欣,蒲小平.蛋白质组学在药物研究中的应用[J].*中国药理学通报*,2009,(8):988-991.
- 林秀琴,袁坤,王真辉,等.植物响应逆境胁迫的比较蛋白质组学研究进展[J].*热带农业科学*,2009,29(2):52-57.
- 曾嵘,夏其昌.蛋白质组学研究进展与趋势[J].*中国科学院院刊*, 2002,(3):167-169.
- JURI R, MATTHIAS M. What does it mean to identify a protein in proteomics [J].*Trends in Biochemical Sciences*, 2002,27(2):74.
- 袁雪宇,吴国亭,韩玉麒.差异蛋白质组学技术和应用前景[J].*同济大学学报:医学版*,2004,25(4):349-351.
- 赵宏伟,田秀珠.差异蛋白质组学研究与应用进展[J].*临床决策论坛版*,2006,(4):45-47.
- Graves P R, Timothy A J. Haystead[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002,66(1):39-63.
- Blackstock W P, Weir M P. Proteomics:quantitative and physical mapping of cellular proteins[J].*Trends Biotechnol*,1999,17(3):121-127.
- Jung E, Heller M, Sanchez J C, et al. Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes[J].*Electrophoresis*,2000, 21(6): 3369- 3377.
- 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*,2010,21:139-144.
- Werner T. Promoters can contribute to the elucidation of protein function[J]. *Trends Biotechnol*,2003,21(1):9-13.
- Righetti P G, Castagna A, Antonucci F, et al. The proteome:anno Domini 2002[J]. *Clin Chem Lab Med*,2003,41(4):425-438.
- 孙言伟,姜颖,贺福初.差异蛋白质组学研究进展[J].*生命科学*,2005, 17(2):137-140.
- 何大澄,肖雪媛.差异蛋白质组学及其应用[J].*北京师范大学学报:自然科学版*,2002,38(4):558-562.
- Unwin R D, Gaskell S J, Evans C A, et al. The potential for proteomic definition of stem cell populations[J]. *Exp Hematol*,2003,31 (12):1147-1159.
- Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2004,5(9):699-711.
- Klose J, Nock C, Herrmann M, et al. Genetic analysis of the mouse brain proteome[J]. *Nat Genet*,2002,30(4):385-383.
- Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by two-diam ensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations [J]. *Trends in Analytical Chemistry*,2003,22(5):273-280.
- 杨礼富.蛋白质组学研究技术与展望[J].*热带农业科学*,2007,27(2): 58-62.
- Weiss G H, Kiefer J E. Some properties of a measure of resolution in gel electrophoresis and capillary zone electrophoresis[J].*Electrophoresis*, 1997,18(11):2008-2011.
- Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses [J]. *Electrophoresis*,1996,17(5):813-829.
- Damerval C, Zivy M, Granier F, et al. Two-dimen-sional electrophoresis in plant biology[J]. In: *Chrambach A, Dunn M J, Radola B J. Advances in Electrophoresis*.1988,2:263-340.
- Jacobs Danise I, van der Heijden Robrt, Verpoorte Robert. Proteomics in plant biotechnology and secondary metabolism research [J]. *Phytochemical Analysis*,2000,11(5):277-287.
- Granier F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis[J]. *Electrophoresis*,1988,9(11):712-718.
- 刘卫群,李浩.差异蛋白质组学在植物研究中的应用[J].*安徽农业科学*,2006,34(17):4201-4203.
- 阮松林,马华升,王世恒,等.植物蛋白质组学研究进展— I. 蛋白质组关键技术[J].*遗传*,2006,28(11):1472-1486.
- 黄丽俊,王建华.蛋白质组研究技术及其进展[J].*生物学通报*,2005, 40(8):4-6.
- 高华,高述民,孙芳芳.蛋白质组学及其在植物研究中的应用[J].*安徽农学通报*,2010,16(08):31-32.
- 柳展基,杨小红,毕玉平.蛋白质组学在农业中的应用[J].*分子植物育种*,2006,4(3):106-110.
- Unlu M, Morgan M E, Minden J S. Difference gel electrophoresis:a single gel method of detecting changes in protein extracts[J]. *Electrophoresis*, 1997,18(11):2071-2077.

- [32] Hood B L, Veenstra T D, Conrads T P. Mass spectrometry based proteomics[J]. International Congress Series, 2004, 1266: 375-380.
- [33] Nesvizhskii A I, Aebersold R. Analysis statistical validation and dissemination of large-scale proteomics datasets generated by tandem MS[J]. DDT, 2004, 9(4): 173-181.
- [34] Li Lingjun, Garden Rebecca W, Sweedler Jonathan V. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(4): 151-160.
- [35] Scaif Mark, Westphall Michael S, Smith Lloyd M. Charge reduction electrospray mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(1): 52-60.
- [36] LoPachin R M, Jones R C, Patterson T A, et al. Application of proteomics to the study of molecular mechanisms in neurotoxicology. R. M[J]. Neuro Toxicology, 2003, 24: 761-775.
- [37] Liang Y, Jing Y X, Shen S H. Advances in plant proteomics[J]. Acta Phytoecologica Sinica, 2004, 28: 114-125.
- [38] 李维平, 李云. 生物质谱技术与蛋白质组学[J]. 生命科学研究, 2004, 5(2): 113-116.
- [39] 吴亚丹. 植物蛋白质组学的研究策略[J]. 现代农业科学, 2009, 16(5): 12-16.
- [40] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册(第3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 20-33.
- [41] 季芝娟, 薛庆中. 植物蛋白质组学研究进展[J]. 生命科学, 2004, 16(4): 241-245.
- [42] 徐幼平, 徐秋芳, 蔡新忠. 适于双向电泳分析的番茄叶片总蛋白提取方法的优化[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(2): 71-74.
- [43] 张鹏. 黄瓜果实弯曲性 QTL 定位及蛋白质组差异研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009: 56-62.
- [44] 李凤玉, 潘德灼, 陈伟. 黄瓜子叶节的蛋白质组双向电泳条件的优化[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 963-967.
- [45] 范海延, 陈捷, 张春宇, 等. 适于黄瓜叶片蛋白质组分析的双向电泳方法最佳条件的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(3): 365-367.
- [46] 黎飞, 徐秋芳, 臧宪朋, 等. 番茄子叶总蛋白双向电泳体系的建立[J]. 园艺学报, 2010, 37(4): 661-668.
- [47] 刘丽娟, 舒烈波, 陈海荣, 等. 适用于生菜叶片蛋白质双向电泳方法的建立及初步应用[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 106-110.
- [48] 陈移亮. 蝴蝶兰叶片蛋白质双向电泳方法初探[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(1): 40-44.
- [49] 王一鸣, 花宝光, 王有年, 等. 桃果实蛋白质双向电泳影响因素的研究[J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1579-1584.
- [50] 韩毅科, 杜胜利, 魏爱民, 等. 黄瓜离体雌核发育早期的特异蛋白研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2006, 39(6): 1-5.
- [51] 胡丹凤, 李鸿彬, 陈远良, 等. 黄瓜芽黄突变体叶片的蛋白质组学研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2010, 28(2): 138-143.
- [52] 许培磊, 白吉刚, 王秀娟, 等. 低温对不同基因型黄瓜叶片蛋白质组的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 588-596.
- [53] 王艳, 李雪梅, 彭永康. 黄瓜 Cd²⁺ 抗性的变化及其与蛋白质组分改变的关系[J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2008, 28(1): 14-18.
- [54] 杨立飞, 朱月林, 胡春梅, 等. NaCl 胁迫下嫁接黄瓜叶片中特异蛋白的分离与鉴定[J]. 西北植物学报, 2006, 12: 249-256.
- [55] 屈中华, 薛春生, 刘力行, 等. 生物型种衣剂诱导后黄瓜叶片蛋白质组初步研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(21): 6487-6489.
- [56] Saligrama A D, Junko S, Hideo I, et al. Proteomics Approach for Investigating the Disease Resistance Using Cucumber as Model Plant [J]. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2008, 4(3): 231-238.
- [57] 范海延, 陈捷, 吕春茂, 等. 黄瓜杂交二代抗黄瓜白粉病的蛋白质组学初步分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 349-354.
- [58] 范海延, 陈捷, 邵美妮, 等. 白粉病菌胁迫下黄瓜 R17 抗病品系叶片蛋白质组分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(6): 829-834.
- [59] 李跃建, 梁根云, 刘小俊, 等. 黄瓜嫁接苗和自根苗的蛋白质组学研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(8): 1147-1152.
- [60] 李凤玉, 潘德灼, 梁海曼, 等. PP333 诱导黄瓜子叶节差异蛋白表达的分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 655-660.
- [61] 孙海燕, 童富淡, 胡家恕, 等. 苦瓜种子发育过程中水溶性蛋白组分的研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(2): 134-138.
- [62] Kazuya Y, Akikoma S, Masayo S, et al. Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits[J]. Plant Cell Physiol, 2008, 49(2): 226-241.
- [63] Mireille F, Christina M, Nadia B, et al. Major Proteome Variations Associated with Cherry Tomato Pericarp Development and Ripening [J]. Plant Physiology, 2007, 143: 1327-1346.
- [64] Sheoran I S, Olson D J H, Ross A R S, et al. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds[J]. Proteomics, 2005, 5: 3752-3764.
- [65] Corpillo D, Gardini G, Vaira A M, et al. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: the case of a virus-resistant tomato[J]. Proteomics, 2004, 4(1): 193-200.
- [66] 薛柯. 基因插入导致番茄表型变异及其蛋白质组差异分析[D]. 西安: 西北大学, 2008: 29-34.
- [67] 祁洋. 转基因番茄叶绿体特征及其蛋白质差异研究[D]. 西安: 西北大学, 2009: 24-32.
- [68] Sheoran I S, Ross A R S, Olson D J H, et al. Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*): A proteomic analysis[J]. Journal of Proteomics, 2009, 71: 624-636.
- [69] 张恩平, 张淑红, CORDEWENERA JAN, 等. 盐胁迫下不同盐敏感型番茄在蛋白质表达上的差异[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 25-28.
- [70] Casado-Vela J, Selles S, Bru Martinez R. Proteomic approach to blossom-end rot in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* M.): antioxidant enzymes and the pentose phosphate pathway[J]. Proteomics, 2005, 5(10): 2488-2496.
- [71] Corbett M, Virtue S, Bell K, et al. Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2005, 18(4): 334-342.
- [72] Houterman P M, Speijer D, Dekker H L, et al. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants[J]. Mol Plant Pathol, 2007, 8: 215-221.
- [73] Zhu M, Dai S, McClung S, et al. Functional differentiation of *Brassica napus* guard cells and mesophyll cells revealed by comparative

- proteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, (8): 752-766.
- [74] 孙海燕. 甘蓝型油菜响应低磷胁迫的差异蛋白质组学研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2009: 35-58.
- [75] 乐寅婷, 李梅, 陈倩, 等. 油菜叶片蛋白质组对机械损伤应答的初步分析[J]. *植物生态学报*, 2008, 32(1): 220-225.
- [76] 皇甫海燕, 官春云. 甘蓝型油菜抗菌核病近等基因系和感病亲本蛋白差异的初步研究[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(10): 2000-2007.
- [77] 朱长甫, 镰田博, 何弈昆, 等. 胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 胚性细胞蛋白的分离研究[J]. *实验生物学报*, 1997, 30(1): 13-18.
- [78] 朱长甫, 镰田博, 原田宏, 等. 与胡萝卜胚胎发生相关的胚性细胞蛋白 63cDNA 分离及其基因表达的研究[J]. *植物学报*, 1997, 39(12): 1091-1098.
- [79] Dodeman V L, Guilloux M L, Ducreux G, et al. Somatic and zygotic embryos of *Daucus carota* L. Display different protein patterns until conversion to plants [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39(10): 1104-1110.
- [80] 周燕, 高述民, 李凤兰. 胡萝卜体细胞胚胎发生中的细胞组织化学和蛋白质组成变化[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(2): 181-183.
- [81] Andrade A E, Silva L P, Pereira J L, et al. *In vivo* proteome analysis of *Xanthomonas camp estris pv. camp estris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 281: 167-174.
- [82] Timperio A M, D' Amici G M, Barta C, et al. Zolla L. Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58, 3695-3710.
- [83] Hajbeidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, et al. Proteomic analysis sugar beet leaves under drought stress [J]. *Proteomics*, 2005, 5: 950-960.
- [84] Neila J, Hatem B J, Houda S, et al. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165: 471-481.
- [85] 陈伟, 吕柳新, 黄春梅, 等. “乌叶”荔枝胚胎发育过程特异蛋白的变化 [J]. *园艺学报*, 2001, 28(6): 504-508.
- [86] 刘浩. 龙眼 (*Dimocarpus Longan Lour*) 种子败育的蛋白质组学研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009: 26-46.
- [87] 张彩霞, 李壮, 陈莹, 等. 植物与病原菌互作的蛋白质组学研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(3): 626-632.