

# 大白菜育性相关蛋白差异表达

毕青,周雪,冀瑞琴,冯辉

(沈阳农业大学园艺学院,辽宁沈阳 110866)

**摘要:**为揭示复等位基因遗传的大白菜雄性不育分子机制,通过基于质谱的蛋白质组学同位素相对标记与绝对定量技术(iTRAQ),开展了大白菜核基因雄性不育蛋白质组学研究,以找到不育与可育材料中差异表达蛋白,从蛋白水平来进一步揭示大白菜雄性不育的分子遗传机制。通过研究,共发现了358个差异蛋白,其中可育中上调表达的蛋白有226个,下调表达的蛋白有132个,GO分析结果表明,鉴定的蛋白质组数据具有较好的生物学功能覆盖范围。通过双向电泳验证,差异蛋白点差异特性与iTRAQ结果类似,表明iTRAQ用于差异蛋白分析结果可靠。

**关键词:**大白菜;核基因雄性不育;iTRAQ;差异表达蛋白

中图分类号:Q78;S634.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)02-0128-04

doi:10.7668/hbxb.2015.02.023

## Differential Expression of Fertility-related Proteins in Chinese Cabbage

BI Qing,ZHOU Xue,JI Rui-qin,FENG Hui

(Horticulture Institute,Shenyang Agricultural University,Shenyang 110866,China)

**Abstract:**To better understand the molecular mechanisms of multiple-allele-inherited male sterility in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*), the iTRAQ quantitation technique based on mass spectrometry were used to study the differential expression between proteins fertile- and sterile-buds. This research would provide the basis for analyzing the molecular mechanism of multiple-allele-inherited male sterility in Chinese cabbage. In this research, a total of 358 differential expressed proteins (226 up-expressed and 132 down-expressed proteins in fertile buds) were found and Gene Ontology (GO) analysis showed that the proteins identified data has better coverage of biological functions. It is verified by two-dimensional electrophoresis (2-DE). This results is consistent with iTRAQ technique, which indicated that using iTRAQ to analyze protein profile is reliable.

**Key words:** Chinese cabbage; Male sterility; iTRAQ; Differential proteomics

大白菜雄性不育的利用是大白菜杂交制种最经济有效的手段之一,冯辉等<sup>[1]</sup>获得了100%不育株率的大白菜核不育系,并首次提出“大白菜核基因雄性不育复等位基因遗传假说”。由于该类不育系具有雄蕊退化彻底,不育性稳定的突出优点,倍受育种工作者的重视<sup>[2-4]</sup>。目前,不育机制尚不完全清楚。用蛋白质组学定量技术可以对蛋白质在不同状态、不同环境、不同处理等情况下表达量的变化进行分析,可对其相对含量进行定量,从而找到差异蛋白<sup>[5]</sup>。

同位素相对标记与绝对定量技术(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)是美国

应用生物系统公司在2004年推出的一项新的体外同位素标记技术。使用该技术可以对混合体系中的所有蛋白质进行精确定量和鉴定,从而寻找到差异表达蛋白<sup>[6-8]</sup>。基于iTRAQ技术的蛋白质组学研究具有如下突出优点:样品要求量低;敏感性、精确性强;可观察蛋白的动态变化。Ross等<sup>[9-10]</sup>首次用iTRAQ试剂对野生型酵母菌株和同源突变体菌株的多种蛋白质进行相对定量分析,目前,iTRAQ标记方法结合二维液相技术已成功应用于包括大肠杆菌、酵母、人体的唾液、人类成纤维细胞和乳腺上皮细胞等多种原核和真核生物样品的蛋白质组鉴定和相对定量研究中,是目前在比较蛋白质组学上应

收稿日期:2015-01-26

基金项目:国家自然科学基金项目(312721-57);辽宁省自然科学基金项目(2013020071)

作者简介:毕青(1989-),女,江苏泰州人,在读硕士,主要从事蔬菜遗传育种研究。

通讯作者:冀瑞琴(1976-),女,山西寿阳人,副教授,博士,主要从事蔬菜遗传育种研究。

用最为广泛的标记技术之一<sup>[11-14]</sup>。

本研究利用 iTRAQ 技术开展大白菜核基因雄性不育蛋白质组学研究,以期找到不育与可育材料中差异表达蛋白,从蛋白水平揭示复等位基因遗传的雄性不育大白菜不育分子遗传机制,为更好地利用大白菜雄性不育及杂种优势,加快育种进程,提供理论指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

大白菜雄性不育甲型两用系 AB01 不育与可育植株。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 不育与可育株花蕾的蛋白提取与蛋白定量

蛋白提取: TCA-丙酮沉淀法;蛋白定量 (Biorad Bradford 方法): 考马斯亮蓝染色,紫外检测器检测定量;配制样品溶液: 按定量结果用 UA (8 mol/L Urea, 0.1 mol/L Tris, pH 值 8.5) 将每个提取的蛋白质溶液样品分别稀释至 1 μg/μL, 每个样品 150 μL。

1.2.2 iTRAQ 具体方法参考文献<sup>[15]</sup>, 通过 Triple TOF™ 5600 LC-MS/MS (AB SCIEX) 系统获得的 MS/MS 质谱信息利用 ProteinPilot™ 4.1 软件 (AB SCIEX), 调用 Paragon™ Algorithm (4.0.0.0, 459), 在数据库 (<http://brassicadb.org/brad/index.php>) 中进行搜索。

1.2.3 双向电泳 双向电泳参照周雪等<sup>[16]</sup>的方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白质分子量统计

由 iTRAQ 试验结果可知,大白菜蛋白分子量主要集中在 10~100 kDa (图 1), 肽段长度主要集中在 6~30 个氨基酸残基 (图 2), 满足后续试验需求。

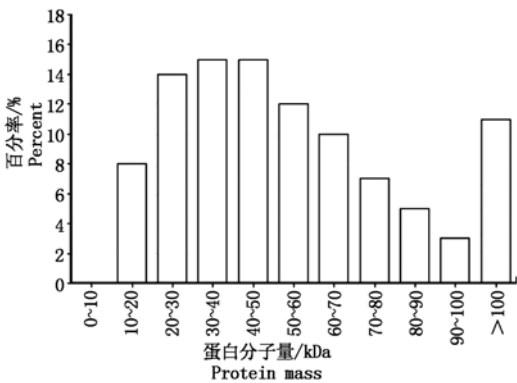


图 1 蛋白分子量统计图

Fig. 1 Protein mass distribution

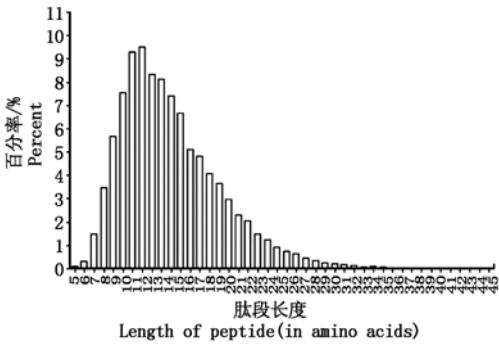


图 2 肽段长度统计图

Fig. 2 Peptide length distribution

### 2.2 差异蛋白统计

依据蛋白丰度水平,当差异倍数达到 1.5 倍以上,且经统计检验其 *P*-value 值小于 0.05 时,视为差异蛋白。以 1.5 和 0.666 作为差异蛋白上调、下调阈值,则通过 iTRAQ 试验鉴定到的可用于定量分析的蛋白中,差异蛋白为 358 个。上调的为 226 个,下调的为 132 个 (表 1)。

表 1 鉴定到的蛋白统计

Tab. 1 Identified proteins statistics

类型 Type	上调蛋 白数量/个 Up-regulated protein	下调蛋 白数量/个 Down- regulated protein	总差异 数值/个 Total differential expressed protein
SL_115-VS-FL_113	226	132	358

### 2.3 差异蛋白 GO 分析

生物学程序 (Biological progress) 分析发现,有 263 个蛋白参与了生物学程序,其中 209 个都参与了代谢过程。在代谢过程中,有 12 个花粉发育蛋白及 11 个花粉壁类似蛋白 (图 3)。细胞组分 (Cellular component) 分析表明,272 个蛋白为细胞组分相关蛋白。分子功能 (Molecular function) 分析表明,282 个蛋白具有分子功能。

### 2.4 双向电泳验证

可育株花蕾与不育株花蕾的 2-DE 图谱 (图 4) 中识别的蛋白点平均约为 780,750 个,图谱相似度较高,蛋白匹配率能够达到 94% 以上。挑取 9 个差异点进行质谱鉴定,其中 6 个点的蛋白 C. I. 分值在 95% 以上。而且这 6 个点差异特性与 iTRAQ 结果一致,即可育株中上调表达的点所对应的 SL-115-VS-FL-113 值均大于 2,相反可育株中下调表达的点所对应的 SL-115-VS-FL-113 值均小于 1 (表 2)。

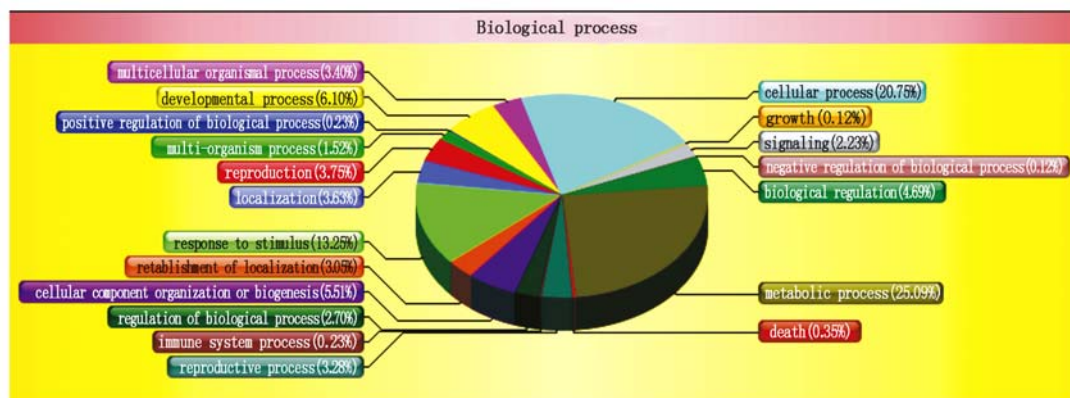
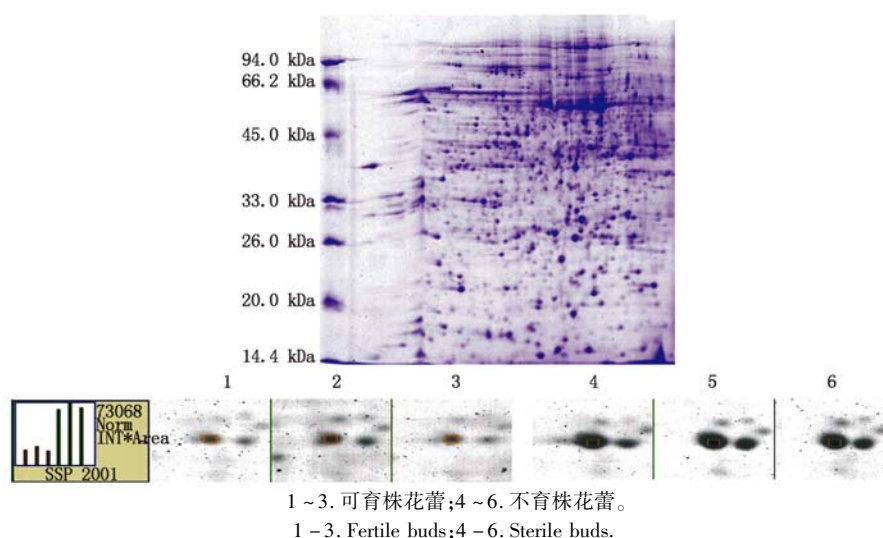


图 3 差异蛋白生物学程序 GO 分析

Fig. 3 Biological process of differential expressed proteins by Gene Ontology (GO)



1 ~ 3. 可育株花蕾; 4 ~ 6. 不育株花蕾。  
1 ~ 3. Fertile buds; 4 ~ 6. Sterile buds.

图 4 双向电泳检验示意图

Fig. 4 A sample for two-dimensional electrophoresis (2-DE)

表 2 iTRAQ 与双向电泳结果比较

Tab. 2 The comparison between iTRAQ and 2-DE

编号 No.	蛋白分值 Protein score	蛋白 C. I. 分值/% Protein score C. I.	可育/不育 (iTRAQ) SL_115-VS - FL_113 (iTRAQ)	双向电泳结果 2-DE results
1	252	100	3.187	可育花蕾中上调
2	83	99.978	12.365	可育花蕾中特异表达
3	158	100	2.168	可育花蕾中特异表达
4	135	100	0.138	可育花蕾中下调
5	103	100	0.746	不育花蕾中特异表达
6	59	95.181	0.853	不育花蕾中特异表达

### 3 讨论

随着大量物种基因组测序的完成,人们清楚地认识到仅从基因组和转录组信息并不能完全揭示生命活动的规律<sup>[17-19]</sup>。蛋白质组学已成为生命科学研究领域的热点和前沿<sup>[20]</sup>,目前已被广泛应用到细胞生物学、神经生物学等生命科学领域。在研究对象上,涵盖了原核微生物、真核微生物、植物和动物。仅植物研究中的应用就非常多,如大豆低氧和水胁迫<sup>[21]</sup>、高粱幼苗叶子在盐胁迫<sup>[22]</sup>、八倍体草莓的低

温胁迫<sup>[23]</sup>等条件下的应答机制研究等,并鉴定出许多相关的生物标记分子。本试验对大白菜花蕾的蛋白质组酶解样品进行 iTRAQ 试剂标记,结合二维液相色谱串联质谱对标记后蛋白质组样品分级分离鉴定,共获得 358 个差异蛋白,这一数值远大于通过双向电泳所获得的差异蛋白质数量,表明该方法鉴定差异蛋白更灵敏,而且较双向凝胶电泳方法具有更广的分子量、等电点和疏水性范围。

传统的双向电泳分辨率及敏感率低,而 iTRAQ 技术对任何类型的蛋白质均可以进行鉴定,包括双

向电泳无法鉴定的高分子量、极酸及极碱蛋白<sup>[24]</sup>; 而且 iTRAQ 可对多组样品同时定量, 可缩小因样品、批次间的不同而引起的误差, 相比于其他 2 种方法有较好的重复性<sup>[12]</sup>。本研究中, 对差异蛋白 GO 分析结果表明, 鉴定的蛋白质组数据具有较好的生物学功能覆盖范围, 为进一步探索大白菜雄性不育分子遗传机制奠定了重要基础。通过对双向电泳中获得的 9 个差异蛋白点进行质谱鉴定验证表明, 可信度较高的 6 个差异点在 iTRAQ 中都有相应差异点, 而且差异特性一致, 表明了 iTRAQ 技术的可靠性。

### 参考文献:

- [1] 冯 辉, 魏毓棠, 许 明. 大白菜核基因互作雄性不育性的研究[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(S4): 113 - 117.
- [2] Feng Hui, Wei Yutang, Xu Ming. Multiple allele model for genetic male sterility in Chinese cabbage[J]. Acta Horticulture, 1996, 467: 133 - 142.
- [3] 冯 辉. 大白菜核基因雄性不育性的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 1996.
- [4] 岳艳玲, 王玉刚, 冯 辉. 大白菜核基因雄性不育转育研究进展[J]. 北方园艺, 2005(5): 4 - 6.
- [5] 乌云塔娜, 张党权, 谭晓风. 蛋白质组学及其在植物研究中的应用[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 115 - 119.
- [6] 于 靖, 王 方. 蛋白质组学研究技术及其联合应用[J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(4): 371 - 374.
- [7] Wiese S, Reidegeld K A, Meyer H E, et al. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research[J]. Proteomics, 2007, 7: 340 - 350.
- [8] Ow S Y, Salim M, Noirel J, et al. Minimising iTRAQ ratio compression through understanding LC-MS elution dependence and high-resolution HILIC fractionation[J]. Proteomics, 2011, 11(11): 2341 - 2346.
- [9] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(12): 1154 - 1169.
- [10] Hardt M, Witkowska H E, Webb S, et al. Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva: quantitative analysis of native peptides using iTRAQ reagents[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(15): 4947 - 4954.
- [11] Wu W W, Wang G, Baek S J, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cIAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(3): 651 - 658.
- [12] Cong Y S, Fan E, Wang E. Simultaneous proteomic profiling of four different growth states of human fibroblasts, using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2006, 127(4): 332 - 343.
- [13] Zhang Y, Wolf-Yadlin A, Ross P L, et al. Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2005, 4(9): 1240 - 1250.
- [14] Desouza L, Diehl G, Rodrigues M J, et al. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cIAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. Journal of Proteome Research, 2005, 4(2): 377 - 386.
- [15] 陈 洁. iTRAQ 及非标定量方法分析百合纲类植物叶绿体差异蛋白[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [16] 周 雪, 冯 辉, 冀瑞琴. 适合双向电泳的大白菜花蕾蛋白提取及浓度测定方法[J]. 分子植物育种, 2013, 11(2): 249 - 254.
- [17] Abbott A. And now for the proteome[J]. Nature, 2001, 409(6822): 747.
- [18] Fields S. Proteomics in genomeland[J]. Science, 2001, 291(5507): 1221 - 1224.
- [19] Tyers Mike, Mann Matthias. From genomics to proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 193 - 197.
- [20] Cox Jürgen, Mann Matthias. Is proteomics the new genomics[J]. Cell, 2007, 130(3): 395 - 398.
- [21] Khatoon A, Rehman S, Oh M W, et al. Analysis of response mechanism in soybean under low oxygen and flooding stresses using gel-base proteomics technique[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(12): 10581 - 10594.
- [22] Ngara R, Ndimba R, Borch-Jensen J, et al. Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in *Sorghum bicolor* seedlings[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(13): 4139 - 4150.
- [23] Koehler G, Wilson R C, Goodpaster J V, et al. Proteomic study of low-temperature responses in strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa*) that differ in cold tolerance[J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1787 - 1805.
- [24] Sassetti C M, Boyd D H, Rubin E J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(1): 77 - 84.