

高丹草及其亲本种子胚差异蛋白质组学分析

薛春雷¹, 逯晓萍¹, 韩平安², 张坤明¹, 张瑞霞³, 董婧¹

1. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019

2. 内蒙古农牧业科学院生物研究中心, 呼和浩特 010020

3. 呼和浩特市种子管理站, 呼和浩特 010019

摘要 高丹草是综合高粱和苏丹草双亲优良性状的一年生禾本科饲草, 其杂种优势特别明显, 但杂种优势形成机理还不明确。为了揭示高丹草杂种优势形成机理, 本研究以杂种高丹草及其亲本的成熟胚为试材, 利用Label free结合质谱技术, 采用生物信息学分析方法在蛋白质组学水平进行研究。研究结果鉴定出差异蛋白124个, 其中加性积累蛋白48个, 占差异蛋白总数的38.71%, 加性积累蛋白中上调蛋白19个, 下调蛋白29个。鉴定出非加性积累蛋白为76个, 占差异蛋白总数的61.29%, 非加性积累蛋白的表达模式以超高亲表达所占比例最大(29个), 其次是偏高亲表达模式(18个), 偏低亲表达模式次之(14个), 另外还有超低亲表达模式(10个), 以及不属于该四种表达模式蛋白5个, 因此, 加性积累蛋白在高丹草成熟胚杂种优势形成上起主导作用。加性与非加性积累蛋白涉及多个功能组, 主要是胁迫响应、碳水化合物代谢、转录调控、发育调控、信号转导、蛋白质代谢等功能类别。

关键词 高丹草; 成熟胚; 蛋白质组; Label free; 质谱分析

高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)、苏丹草(*Sorghum Sudanense* (Piper) Stapf)的遗传背景差异较大, 但两者都是二倍体($2n=2x=20$)植物, 且无生殖隔离, 二者种间杂交产生的F1代杂交种即为高丹草。高丹草是以取食茎叶为主的一年生禾本科饲用牧草, 综合了高粱和苏丹草的诸多优点, 产草量高, 分蘖能力强, 再生性好(可多次刈割), 营养价值高, 具有较强的抗性(抗寒、抗旱、耐低温、抗病虫害), 草质柔软, 适口性好, 既可青饲又可青贮, 深受牛、羊、鱼的喜爱, 是牛、羊、鱼的首选

饲料, 在畜牧业及渔业生产上具有广泛的应用前景^[1-2]。

近年来, 经过科研工作者们不懈的努力, 中国高丹草品种改良已取得了可喜的成果, 相继选育出大量品质优良的高丹草新品种, 如蒙农青饲1号^[3]、2号^[4]、3号^[5]、皖草2号^[6]、皖草3号^[7]、GB-4-2^[8]等。这些品质优异的饲草新品种在农牧业生产中发挥着重要的作用。

用蛋白质组学方法研究高丹草蛋白质结构和功能, 有助于认识其杂种优势的变化机制。蛋白质组学分析常用的经典研究方法是基于凝胶的2-DE技术。

收稿日期: 2017-11-01; 修回日期: 2018-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160302, 31460375); 呼和浩特市科技计划项目(2012-重-计-8-2)

作者简介: 薛春雷, 博士研究生, 研究方向为作物遗传育种, 电子信箱: xcl13474717283@163.com; 逯晓萍(通信作者), 教授, 研究方向为饲用作物遗传改良, 电子信箱: lxp1960@163.com

引用格式: 薛春雷, 逯晓萍, 韩平安, 等. 高丹草及其亲本种子胚差异蛋白质组学分析[J]. 科技导报, 2018, 36(14): 88-98; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2018.14.012

然而2-DE方法耗时费力,灵敏性差,低丰度蛋白、极性蛋白、疏水性蛋白难以被检测到^[9],因此,基于非凝胶的鸟枪蛋白质组学(shotgun proteomics)成为了一种新方法,用于识别并定量相关蛋白^[10]。同时,由于质谱仪具有高分辨率、高准确度的特点以及新的分子生物学工具和差异蛋白定量算法的不断更新,用label free方法对生物样品进行定量分析的研究也受到了众多科研人员的推崇。

Label free方法是基于质谱数据对大规模蛋白质组进行定量研究的一种非标记定量方法,即蛋白经质谱分析后,根据肽段峰值强度或者肽段的谱图数(spectral counts)对蛋白进行定量分析^[11]。Liu等^[12]的研究成果已证明了肽段的质谱数与蛋白的相对丰度间存在线性关系。因此,利用label free方法对蛋白进行相对定量是一种非常科学、可靠的研究手段,该方法克服了2-DE法的诸多缺点,细胞、组织、血液等样品均可采用,应用范围比较广;蛋白用量也少,先进的质谱仪可检测纳克级别的样品,且该方法高通量,省时省力,速度快,可重复性较好,相对于标记定量方法,费用低廉。

胚是种子的重要部分,是植物的幼体。胚的差异会导致植物的活力、生长势等性状特征表现出显著的差别。植物的胚也常被作为试验模型来研究杂种优势,目前,利用label free方法在蛋白质组水平上研究杂种优势已成功应用在玉米^[13],向日葵^[14]等作物上,进茜宁等^[15]对先玉335及其亲本的胚芽进行差异蛋白质组学分析表明,杂种的蛋白点中有81%是非加性表达,推测非加性蛋白的累积是胚芽杂种优势形成的主要原因。然而,在牧草上以胚作为试验材料进行蛋白质组学的研究还未见报道。本研究利用label free结合质谱的方法对强优势的杂种高丹草及其亲本的种子胚进行定量分析,为揭示杂种优势产生的分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

母本高粱(11A)种子,父本苏丹草(Bai)种子,F1代杂交种高丹草种子。

1.2 方法

1.2.1 高丹草成熟胚总蛋白质提取

将高丹草及其亲本种子的颖壳去掉,用解剖刀手

动切割种子,将胚与胚乳分离。高丹草成熟胚总蛋白的提取参照Han等^[16]方法并加以改进。其中,裂解缓冲液为裂解缓冲液(Lysis Buffer, LB), 8 mol·L⁻¹尿素, 2 mol·L⁻¹硫脲, 4%的3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate, CHAPS), 20 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷, 30 mmol·L⁻¹二硫苏糖醇, 2%两性电解质pH值为4~7。将每个试验材料3个重复的生物学成熟胚等量混合后称取1 g,将样品放入研钵中,加液氮将其磨成粉末后加入10 mL裂解缓冲液,混合的匀浆经超声处理后,在冰上裂解1 h,在相对离心力为25000×g, 4℃条件下离心30 min,取上清液,将预冷的3倍体积的丙酮加入上清液,放4℃冰箱沉淀除盐2 h,随后离心15 min(25000×g, 4℃),所得沉淀在同样条件下用冷丙酮洗涤两次,丢弃上清液,收集沉淀,室温干燥后加LB使其完全溶解,所得溶液即为蛋白样品。采用考马斯亮蓝法测定蛋白样品浓度后分装,置于-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2.2 液内酶解与质谱分析

将完全溶解的蛋白溶液加入40 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃,涡旋混匀后加入50 μL 100 mmol 二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)打破二硫键,室温反应1 h。再加入125 μL 100 mmol 碘乙酰胺(Iodacetamide, IAM)完成烷基化反应,避光室温反应1 h。加入胰蛋白酶(Trypsin)以1:50酶/蛋白的比例37℃消化14 h。之后加入1 μL甲酸终止酶切反应,得到干燥浓缩的肽段,每个样品加入60 μL 0.1%的甲酸重新溶解用于质谱分析。

液相色谱-串联质谱(Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)分析使用四极杆-静电场轨道阱串联的高分辨质谱仪(Q Exactive LC-MS/MS, Thermo Fisher Scientific, Germany)对样品进行分离。肽段洗脱的流动相A相为体积比0.1%甲酸(FA)水溶液, B相为体积比0.1%FA乙腈溶液,以250 nL/min(标准升/每分钟)的流速洗脱A相120 min。B的洗脱梯度为3%到8%洗脱5 min,从8%到20%洗脱80 min,从20%到30%洗脱20 min,从30%到90%洗脱5 min,最后从90%到90%洗脱10 min。质谱的喷雾电压为1.9 kV,母离子扫描范围质荷比(m/z)值为300~3000。

1.2.3 蛋白质鉴定与定量

串联质谱(Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)原始

数据导入到 Peaks7.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) 软件进行数据转化与处理, 对样品的蛋白进行鉴定与相对定量分析。数据库为 NCBI 中的玉米 (*Zea Mays*) 蛋白序列库, 非冗余序列共 59385 条。参数设置如下: 母离子与子离子的容忍值分别设为 50×10^{-6} 和 $0.05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。酶切的遗漏位点数设为 1。Maximum missed cleavages per peptide for 2, 固定修饰为 carbamidomethyl (C), 可变修饰为 oxidation (M)。杂种与亲本蛋白满足如下条件被视为显著性变化: $-10 \log P$ 得分是 20 (P 值为 0.01), 折叠变化 ≥ 2 , 假阳性率 $\leq 1.0\%$ ($-10 \log P \geq 20.0$)^[17]。(质谱鉴定由中国农业科学院蜜蜂研究所完成)。

1.2.4 差异蛋白的表达模式

根据 Wang^[18]、Hoecker 等^[19]的研究将差异表达模式分为加性积累表达模式和非加性积累表达模式。加性积累表达模式定义为: 杂种蛋白表达丰度与双亲均值蛋白表达丰度差异不显著, 而杂种蛋白表达量与双亲均值蛋白表达量差异显著即为非加性积累表达模式。

非加性积累表达模式又包括 4 种形式: 超高亲表达 (杂种和双亲都表达, 且杂种表达量高于高表达的亲本); 超低亲表达 (杂种和双亲都表达, 且杂种表达量低于低表达的亲本); 偏高亲表达 (杂种和双亲中都表达, 且杂种表达量与低亲表达量差异显著, 与高亲表达量

差异不显著); 偏低亲表达 (杂种和双亲中都表达, 且杂种表达量与高亲表达量差异显著, 与低亲表达量差异不显著)。

1.2.5 生物信息学分析

鉴定到的蛋白通过搜索 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>), 并结合搜索拟南芥数据库获得的结果, 将蛋白的分子功能以及参与的生物学进程进行功能分类。利用 GeneMania (<http://genemania.org/>) 对已鉴定的差异蛋白进行网络互作预测分析。

2 结果与分析

2.1 高丹草成熟胚加性与非加性积累蛋白的鉴定

依据加性与非加性积累蛋白的概念, 对成熟胚的差异蛋白分别进行分析。

高丹草成熟胚鉴定到差异蛋白 124 个 (表 1、表 2), 其中加性积累蛋白 48 个, 占差异蛋白总数的 38.71%, 且上调蛋白 19 个, 下调蛋白 29 个。非加性积累蛋白 76 个, 占差异蛋白总数的 61.29%, 非加性积累蛋白的表达模式以超高亲表达所占比例最大 (29 个), 其次是偏高亲表达模式 (18 个), 偏低亲表达模式次之 (14 个), 另外还有超低亲表达 (10 个) 模式, 以及不属于该 4 种表达模式蛋白 5 个 (图 1)。

表 1 高丹草成熟胚鉴定到的加性积累蛋白

Table 1 Proteins from sorghum-sudangrass hybrid mature embryo that showed additive accumulation

蛋白名	登录号	得分	覆盖率	比率	表达模式
胁迫响应					
catalase isozyme 2	gil806776638	61.83	22	1.00:2.92:3.92	↑
flower-specific gamma-thionin precursor	gil226496355	104.83	24	1.00:2.07:2.30	↑
HSP protein	gil293331695	74.26	13	1.00:0.34:0.80	↓
mannitol dehydrogenase	gil226528549	22.87	7	1.00:0.10:1.63	↑
formate dehydrogenase 1 mitochondrial -like	gil670437960	67.62	16	1.00:3.56:9.58	↑
heat shock protein 81-1-like	gil670378712	99.84	16	1.00:0.49:0.92	↓
thioredoxin-like protein 5	gil226501248	62.23	6	1.00:1.75:2.95	↑
zeamatin precursor	gil162458913	110.28	20	1.00:0.34:0.75	↓
ethylene response protein	gil413923623	78	17	1.00:3.98:1.87	↓
pathogenesis-related protein 1	gil195640234	60	14	1.00:0.61:1.36	↑
碳水化合物代谢					
glucose-6-phosphate isomerase cytosolic granule-bound starch synthase 1 chloroplastic / amyloplastic precursor	gil162460322	97.48	13	1.00:0.48:0.73	↓
ATP-dependent 6-phosphofructokinase 6-like	gil821161537	37.99	7	1.00:2.12:1.43	↓
glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 2 chloroplastic/amyloplastic isoform X1	gil670418309	50.21	11	1.00:0.41:0.60	↓
	gil670414196	70.6	12	1.00:2.13:1.75	↓

表1 高丹草成熟胚鉴定到的加性积累蛋白(续)

Table 1 Proteins from sorghum-sudangrass hybrid mature embryo that showed additive accumulation (continued)

蛋白名	登录号	得分	覆盖率	比率	表达模式
succinyl-CoA ligase beta-chain	gil226500228	21.61	10	1.00:2.65:3.18	↑
hexokinase-1	gil195648488	61.48	23	1.00:2.47:1.35	↓
phosphoglycerate mutase-like protein	gil413917830	35.31	14	1.00:0.44:0.89	↓
转录调控					
10-deacetylbaconin III 10-O acetyl trans-ferase	gil226501390	57.04	15	1.00:0.36:0.25	↓
chromodomain-containing protein CRD101	gil162458446	32.32	5	1.00:0.05:0.75	↓
116 kDa U5 small nuclear ribonucleo-protein component-like	gil670438619	23.76	9	1.00:0.74:1.78	↑
protein translation factor SUI1 homolog	gil162457992	67.55	11	1.00:3.54:2.20	↓
AGO1a	gil683687529	40.23	12	1.00:0.58:1.32	↑
eukaryotic translation initiation factor isoform 4G-1-like	gil670375925	29.89	15	1.00:1.57:2.07	↑
信号转导					
calcosin	gil226501910	60	14	1.00:0.45:0.77	↓
putative protein phosphatase 2C 63	gil670379127	104.16	20	0:1.00:1.35	↑
calcyclin-binding protein	gil195608970	23.6	6	1.00:2.03:2.09	↑
ras protein RIC2	gil413946075	48.05	17	1.00:0.48:0.67	↓
氨基酸代谢					
chorismate synthase 2	gil226500284	45.46	14	1.00:0.22:0.45	↓
alanine aminotransferase 2	gil670425398	57.7	16	1.00:2.02:1.24	↓
alanine aminotransferase	gil413934299	69.18	14	1.00:0.49:0.68	↓
发育调控					
amino acid selective channel protein	gil226491624	26.76	10	1.00:0:0.96	↓
protein MOTHER of FT and TF 1-like	gil670376644	57.84	15	1.00:2.41:2.47	↑
蛋白质降解					
aspartic proteinase oryzasin-1 precursor	gil226506070	70.81	21	1.00:0.39:0.86	↓
lysosomal alpha-mannosidase precursor	gil803378389	45.85	6	1.00:2.93:2.10	↓
蛋白质贮藏					
legumin-like protein	gil525343211	46.83	13	1.00:1.59:3.13	↑
basic 7S globulin-like	gil670417639	38.38	18	1.00:1.43:2.09	↑
细胞骨架					
tubulin alpha-3 chain	gil162458676	35.92	8	1.00:0.42:0.85	↓
tubulin beta-7 chain	gil162460038	60	16	1.00:3.13:2.84	↓
次级代谢					
geraniol 8-hydroxylase-like	gil670362759	22.81	12	1.00:0.09:1.27	↑
anthranilate N-benzoyltransferase protein 2	gil195655387	61.51	14	1.00:0.46:0.59	↓
蛋白质合成					
30S ribosomal protein S16	gil226500660	52.65	14	1.00:2.26:1.50	↓
蛋白质折叠					
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like	gil670396925	20.35	19	1.00:0.62:1.70	↑
未知蛋白					
hypothetical protein precursor	gil293335955	25.07	8	1.00:0.33:0.74	↓
LOC100282486	gil226498606	38.59	10	1.00:32.18:27.6	↑
LOC100283461	gil226491594	64.31	14	1.00:6.24:2.82	↓
uncharacterized protein LOC100193917 isoform X1	gil670382812	26.04	13	1.00:27.97:2.52	↓
uncharacterized protein LOC100279911 isoform X2	gil670393451	25.05	10	1.00:0:0.76	↓
uncharacterized protein LOC100280242 isoform X1	gil670359695	34.04	17	1.00:0.28:1.05	↑

注: ↑和 ↓ 分别代表蛋白上调、下调表达; ++, --, +, -, D 分别代表超高亲表达, 超低亲表达, 偏高亲表达, 偏低亲表达与其他表达模式。

表2 高丹草成熟胚鉴定到的非加性积累蛋白

Table 2 Proteins from sorghum-sudangrass hybrid mature embryo that showed non-additive accumulation

蛋白名	登录号	得分	覆盖率	比率	表达模式
胁迫响应					
17.5 kDa class II heat shock protein	gil806904706	61.46	15	1.00:3.04:3.33	+
22.0 kDa class IV heat shock protein precursor	gil226501206	41.35	13	1.00:2.14:1.13	+
allene oxide synthase1	gil162460508	41.47	5	1.00:2.90:0.70	-
antimicrobial peptide MBP-1 precursor	gil226510357	88.84	21	1.00:0.54:0.48	++
catalase isozyme 3	gil162461460	98.04	23	1.00:2.94:4.82	++
endochitinase A precursor	gil226506778	89.64	18	1.00:0.40:0.18	--
glutathione transferase19	gil162458082	47.05	14	1.00:2.17:2.09	+
indole-3-acetaldehyde oxidase	gil162458911	24.44	7	1.00:1.36:2.90	++
isoflavone reductase homolog IRL	gil162461348	105.38	16	1.00:1.26:2.88	++
low molecular weight heat shock protein precursor	gil162458147	52.25	15	1.00:2.90:0.97	-
methylenetetrahydrofolate reductase 1	gil162459521	23.17	4	1.00:0.48:1.18	+
NADP-dependent oxidoreductase P2	gil226496675	57.54	7	0:1.00:0.35	D
11 kDa late embryogenesis abundant protein-like	gil670444915	54.52	10	1.00:0.41:1.20	+
heat shock 70 kDa protein 14-like	gil670417158	60.02	23	1.00:0.54:1.46	++
heat shock protein 83-like isoform X1	gil670414787	33.24	5	1.00:1.13:0.54	-
indole-3-acetaldehyde oxidase-like isoform X2	gil670422258	60.98	11	1.00:11.15:11.43	+
osmotin-like protein partial	gil670391377	60	25	1.00:0.79:1.90	++
peroxidase 2-like	gil670379539	35.69	8	1.00:0.87:1.94	++
STS14 protein-like	gil670368209	57.36	13	1.00:2.12:2.62	++
pyruvate decarboxylase 1	gil821595451	66.17	23	1.00:0.07:0.17	D
basic endochitinase A	gil413948897	22.74	5	1.00:2.62:3.62	++
methionine adenosyltransferase	gil413950042	35.05	6	1.00:2.85:3.37	+
碳水化合物代谢					
aminomethyltransferase	gil226530732	71.36	19	1.00:0.43:0.93	+
beta-galactosidase precursor	gil226503159	50.57	13	1.00:0.29:1.02	+
malate dehydrogenase glyoxysomal	gil226508898	57.87	12	1.00:0.54:0.23	--
malate synthase glyoxysomal	gil162461243	42.08	11	1.00:2.38:0.99	-
granule bound starch synthase IIa precursor isoform X1	gil670419910	48.89	14	1.00:1.60:2.01	+
pyruvate kinase cytosolic isozyme isoform X1	gil670443198	27.89	5	1.00:0.70:0.12	--
pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phospho-transferase alpha subunit isoform 1	gil413938545	68.5	14	1.00:5.56:1.10	-
non-cyanogenic beta-glucosidase	gil413944980	60	26	1.00:0.20:0.42	D
beta-1,3-glucanase	gil326936822	90.51	17	1.00:0.18:0.44	-
beta-glucosidase precursor	gil226508936	29.84	5	1.00:0:2.06	--
发育调控					
11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1B-like	gil670376646	88.99	25	1.00:0.72:1.47	++
exportin-1-like	gil670405307	59.58	11	1.00:0.65:2.27	++
protein mago nashi	gil195612480	38.04	19	1.00:3.10:3.92	++
protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	gil212723648	23.61	6	1.00:0.86:0.30	--
prohibitin 2	gil162462211	54.3	10	1.00:0.82:1.84	++
putative subtilase family protein	gil414864415	40.01	13	1.00:0.26:0.93	+
vacuolar processing enzyme1 precursor	gil162462929	60	23	1.00:0.60:2.08	++
seed maturation protein PM41	gil219363507	97.68	27	1.00:0.61:1.51	++
蛋白质合成					
eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-1 isoform 1	gil226501918	24.78	5	1.00:0.63:1.36	++
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	gil670406121	27.4	6	1.00:3.11:2.67	+
midasin isoform X2	gil670417963	20.11	6	1.00:0.40:1.79	++

表2 高丹草成熟胚鉴定到的非加性积累蛋白(续)

Table 2 Proteins from sorghum-sudangrass hybrid mature embryo that showed non-additive accumulation (contumed)

蛋白名	登录号	得分	覆盖率	比率	表达模式
nucleolin 2-like	gil670370821	60	13	1.00:1.17:0.35	--
40S ribosomal protein S8	gil162464180	29.73	6	1.00:1.22:0.54	--
蛋白分子转运					
aquaporin TIP3-1	gil162460933	66.03	13	1.00:0:1.54	-
nuclear export mediator factor NEMF	gil670387544	59.38	11	1.00:0.35:0.36	-
transmembrane protein 205-like	gil670445902	60	13	1.00:0.50:0.13	--
hexose transporter	gil226533060	25.33	5	1.00:2.31:1.01	-
AP-4 complex subunit epsilon-like	gil670432850	59.58	11	1.00:75.6:87.97	+
转录调控					
high mobility group protein1	gil293335943	27.48	8	1.00:1.08:10.67	+
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I-like	gil670380466	55.34	14	1.00:4.28:6.17	++
ribosome-inactivating protein 9	gil293334241	44.91	13	1.00:7.88:0	--
eukaryotic translation initiation factor 5	gil195622350	48.37	12	1.00:1.19:2.05	++
蛋白质降解					
cysteine protease 1 precursor	gil226529105	44.72	14	1.00:0.59:0.13	--
aspartic proteinase nepenthesin-1 precursor	gil525342727	66.05	25	1.00:0.29:0.24	-
alpha-L-fucosidase 2 precursor	gil195637886	88.94	35	1.00:0.26:0.99	+
信号转导					
ADP-ribosylation factor 1	gil226496383	63.61	11	1.00:2.99:3.12	+
Nicalin precursor	gil226500442	60	13	1.00:2.65:1.15	-
phospholipase D family protein isoform X1	gil670428155	23.34	10	1.00:0.39:0.56	D
电子转移					
mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase 13 kD-like subunit	gil226500644	60	13	1.00:6.02:0.94	-
NADH ubiquinone oxidoreductase B22-like subunit	gil226495713	61.82	30	1.00:3.31:1.19	-
细胞骨架					
xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 isoform X1	gil670402194	20.42	6	1.00:0:0.65	D
glycine-rich cell wall structural protein precursor	gil226504946	98.17	23	1.00:0.07:0.80	+
蛋白质折叠					
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP53	gil670445977	40.76	14	1.00:0.64:1.43	++
氨基酸代谢					
2-isopropylmalate synthase B	gil413924840	57.93	12	1.00:0.82:6.90	++
未知蛋白					
hypothetical protein	gil226502784	21.22	14	1.00:0:1.17	+
hypothetical protein precursor	gil219362415	57.29	12	1.00:0.07:0.10	-
hypothetical protein precursor	gil212721258	36.02	22	1.00:0.69:1.68	++
LOC100280650 precursor	gil226509468	92.46	21	1.00:0.52:1.16	+
LOC100282946	gil226499664	56.82	16	1.00:1.48:2.81	++
uncharacterized LOC100278233	gil226531043	67.92	12	1.00:0.33:2.89	++
uncharacterized protein LOC100276862 isoform X1	gil670359331	35.8	6	1.00:1.96:2.66	++
uncharacterized protein LOC100274265	gil226505722	53.4	16	1.00:1.13:3.51	++
uncharacterized protein LOC100274741	gil226507034	51.88	15	1.00:0.77:2.11	++

注: ↑和 ↓ 分别代表蛋白上调、下调表达; ++, --, +, -, D 分别代表超高亲表达, 超低亲表, 偏高亲表达, 偏低亲表达与其他表达模式。

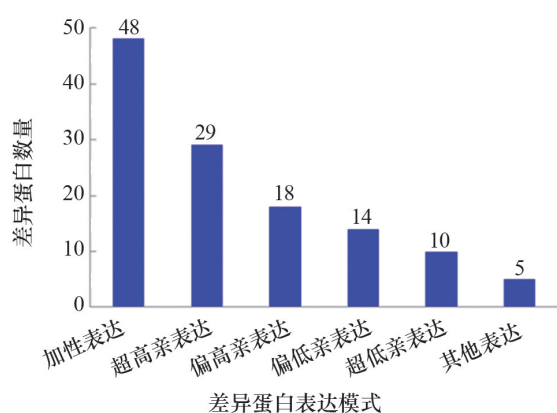


图1 高丹草成熟胚差异蛋白表达模式

Fig. 1 Pattern of differentially expressed protein of mature embryo of sorghum-sudangrass hybrid

2.2 加性与非加性积累蛋白的功能分类

为确定差异蛋白的功能,利用 Uniprot 数据库分别

对加性与非加性积累蛋白进行功能分类,蛋白的功能分类基于其参与的分子生物学进程执行。

加性积累蛋白共涉及13个功能类别(图2(a)),所占比例最大的是胁迫响应功能组(10个),其次是碳水化合物代谢功能类别(7个),转录调控(6个)与未知蛋白(6个)所占比例并列第三,另外还有诸多功能类别,分别是信号转导(5个),氨基酸代谢(3个),蛋白质贮藏(2个),蛋白质降解(2个),细胞骨架(2个),次级代谢(2个),蛋白质折叠(1个),蛋白质合成(1个),发育调控(1个)。

非加性积累蛋白同样涉及13个功能类别(图2(b)),胁迫响应蛋白所占比例依然位居首位(22个),其次是碳水化合物代谢(11个),发育调控与未知蛋白比例居于第三位,同时还有9个功能类别,分别是蛋白(分子)转运(5个),蛋白质合成(5个),转录调控(4个),蛋白质降解(3个),信号转导(2个),电子转移(2个),细胞骨架(2个),氨基酸代谢(1个),蛋白质折叠(1个)。

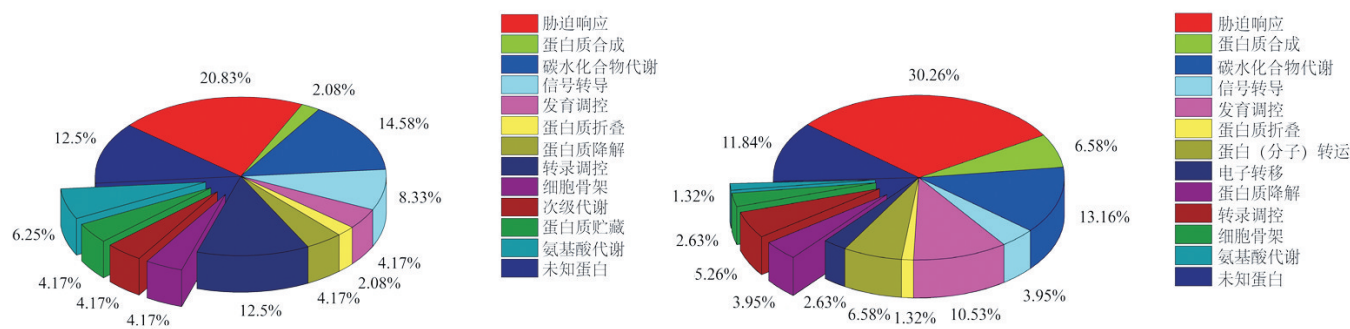


图2 高丹草成熟胚加性与非加性积累蛋白功能分类

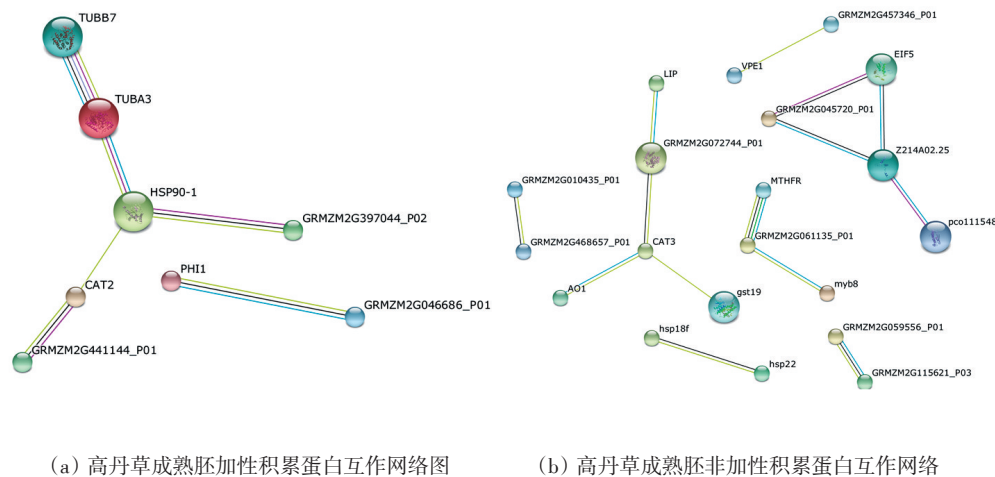
Fig. 2 Pie charts representing the proportion of functional classifications of additive and non-additive accumulation proteins of mature embryo of sorghum-sudangrass hybrid

2.3 网络分析

利用 STRING 对高丹草成熟胚鉴定到的加性、非加性积累蛋白分别进行网络互作预测分析。

加性积累蛋白网络分析共链接上8个蛋白(图3(a)),分别涉及了细胞骨架(TUBB7, TUBA3),胁迫响应(HSP90-1, CAT2, GRMZM2G441144_P01),蛋白质折叠(GRMZM2G397044_P02),碳水化合物代谢(PHI1, GRMZM2G046686_P01)等功能类别。非加性积累蛋白

网络分析共链接上20个蛋白(图3(b)),涉及到胁迫响应(CAT3, AO1, gst19, hsp18f, hsp22, MTHFR, myb8),碳水化合物代谢(GRMZM2G072744_P01, LIP),电子转移(GRMZM2G059556_P01, GRMZM2G115621_P03),蛋白质降解(GRMZM2G010435_P01, GRMZM2G468657_P01),蛋白质合成(Z214A02.25, GRMZM2G045720_P01),发育调控(peo111548, VPE1, MTHFR, GRMZM2G45734_P01),转录调控(EIF5)。



(a) 高丹草成熟胚加性积累蛋白互作网络图

(b) 高丹草成熟胚非加性积累蛋白互作网络

图3 高丹草成熟胚网络分析

Fig. 3 Network analysis of mature embryo of sorghum-sudangrass hybrid

3 讨论

蛋白质组学是近些年迅速发展起来的一种高通量技术,它能够在整体水平上研究细胞(组织)内的全部蛋白质,包括蛋白质的组成及其活动规律,更直接地与基因功能相关联,被广泛地应用到探索作物杂种优势的分子机理研究中。本研究利用 label free 结合质谱的方法对高丹草及其亲本的成熟胚在蛋白质水平进行了定量分析。鉴定到差异蛋白为 124 个,其中加性积累蛋白占差异蛋白总数的 38.71% (48/124),非加性积累蛋白占差异蛋白总数的 61.29% (76/124),且超高亲表达模式所占比例高。因而可以看出,在高丹草成熟胚中非加性积累蛋白所占比重更大,推测非加性表达蛋白在调控杂种优势形成上起的作用更大。功能分类和互作网络分析表明抵抗胁迫环境的能力增强可能是杂种优势产生的主要因。

3.1 胁迫响应蛋白

植物在进化过程中,为了应对生物与非生物胁迫形成了一套特有的防御体系使自身得以生存^[20]。在本研究中胁迫响应蛋白为 33 个,占差异表达蛋白的 26.6% (32/124),是比例最多的功能组。抗氧化、分子伴侣、抗病毒或者细菌等多种类型的胁迫响应蛋白均被鉴定到。有多个抗氧化蛋白,非加性积累的过氧化氢同工酶 3、过氧化物酶 2 均呈超高亲表达,加性积累的过氧化氢同工酶 2 呈上调表达。这充分表明了高丹草的成熟胚抗性强,使种子能够更好的保存其活性。胚胎

发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant proteins, LEA proteins)是非常熟悉的胁迫响应蛋白之一,它是种子发育后期产生的一类小分子多肽,对于旱、低温、盐渍均有抵抗性,进而保护植物^[21]。在本研究中,LEA 蛋白呈偏高亲表达,说明杂种的成熟胚响应逆境的能力较强。高丹草成熟胚胁迫响应蛋白的杂优表达模式说明杂种对逆境有更强的适应性,为后期的种子萌发等做好了充分准备。

3.2 碳水化合物代谢相关蛋白

本研究鉴定到多个蛋白参与糖酵解、三羧酸循环等过程,如加性积累蛋白胞质葡萄糖-6-磷酸异构酶,ATP 依赖的 6-磷酸果糖激酶,己糖激酶 1,琥珀酰辅酶连接酶 β 链等,且这些蛋白在杂种成熟胚均呈下调表达。在非加性积累蛋白中胞质丙酮酸激酶同工酶异构体 X1,焦磷酸-果糖-6 磷酸-1-磷酸转移酶 α 亚基异构体 1 等分别呈超低亲及偏低亲表达模式。如上蛋白的低表达水平表明,杂种与亲本相比,呼吸代谢更微弱,消耗的有机物少,为后期的种子萌发提供更多的有机物。

3.3 转录调控

在高丹草的成熟胚中鉴定到众多真核翻译起始因子差异蛋白,加性积累蛋白真核翻译起始因子异构体 4G-1 呈上调表达,非加性积累蛋白真核翻译起始因子 3 亚基 1,真核翻译起始因子 5 以及高迁移率族蛋白 1 均为超高亲表达模式。此外,还有多个与转录调控相关蛋白为下调表达,如 10-脱乙酰巴卡丁三-10-乙酰基转

移酶,蛋白翻译因子SUI1同系物等。进一步分析发现,转录调控相关蛋白涉及了多种表达模式,这正说明了转录调控是一个多级的复杂的过程,需要众多因子(顺式作用元件,反式作用因子等)协同作用^[21],这可能是杂种优势形成的原因之一。

3.4 发育调控、信号转导

在高丹草成熟胚中鉴定到许多差异表达蛋白与发育调控、信号转导相关。如非加性积累蛋白:11 β -羟类固醇脱氢酶1B, mago nashi 蛋白。11 β -羟类固醇脱氢酶在种子成熟过程扮演重要角色^[23],调控植物的生长发育。以上两个胚发育相关蛋白在本研究中均为超高亲表达,推测杂交种可能成熟较好,胚发育也更加完善。本研究中检测到4个加性,3个非加性的差异蛋白涉及信号转导(表1、表2)。综合分析,信号转导相关蛋白在杂种成熟胚的表达量与亲本相比表达偏低的居多,推测主要是因为种子的成熟胚是休眠器官,所以信号转导的各个途径不活跃。

3.5 蛋白质代谢相关功能组

在高丹草的成熟胚中鉴定到了上调表达模式的蛋白质合成相关蛋白,真核生物肽链释放因子亚基1-1同工酶1,为超高亲表达模式。真核生物肽链释放因子1指导新生多肽链合成的终止^[24],此调控行为是翻译的关键步骤,且该蛋白在通路富集分析中也同样被显著富集到。由此可见,其在高丹草成熟胚杂种优势形成上有很大的作用。同时还鉴定到两个种子贮藏蛋白,即加性积累的类豆球蛋白和基本的7s类球蛋白,这两个蛋白均显著高表达,说明杂种相比亲本储藏了更多的营养物质供后期种子萌发所用。参与转运功能的蛋白多数呈超低亲或者偏低亲表达模式,这是因为此时的多种代谢活动均比较微弱。

3.6 其他功能组

本研究还鉴定到重要功能蛋白参与细胞骨架组分、氨基酸代谢、次级代谢等功能。参与氨基酸代谢的蛋白有4个,如广泛存在于动植物体内的丙氨酸转氨酶,此酶是重要的转氨酶,催化谷氨酸与丙酮酸转化成丙氨酸和 α -酮戊二酸,进而为合成蛋白质贡献氨基酸供体^[25]。本研究中,杂种的丙氨酸转氨酶,丙氨酸转氨酶2等的蛋白表达水平略低于高表达亲本。次级代谢对维持生物的生命活动具有一定的作用,萜类与黄酮类是比较常见的次级代谢产物。本研究鉴定到两个加性积累蛋白参与次级代谢,分别是香叶醇8-羟化酶和

邻氨基苯甲酸盐-N 苯甲酰转移酶蛋白2,前者参与类单萜的生物合成进程,呈上调表达,后者参与类黄酮的生物合成进程,呈下调表达,这两个蛋白如何调节高丹草的杂种优势尚需后续试验的相关研究。

4 结论

通过对杂种高丹草及亲本成熟胚的定量分析,鉴定到差异蛋白为124个,加性积累蛋白为48个,占差异蛋白总数的38.71%,非加性积累蛋白为76个,占差异蛋白总数的61.29%,非加性积累蛋白在高丹草成熟胚杂种优势形成上起主导作用,且在非加性积累蛋白中,超显性表达(超高亲、超低亲)贡献更大。加性与非加性积累蛋白涉及多个功能组,主要是胁迫响应、碳水化合物代谢、转录调控、发育调控、信号转导、蛋白质代谢等功能类别。生物信息学分析同时也证明了杂种成熟胚的生理代谢作用趋向微弱,酶的活性降低,而胁迫响应蛋白表达显著上调,抵抗胁迫环境的能力增强,可能是杂种优势产生的主要原因。

参考文献(References)

- [1] Lu X P, Yun J F, Gao C P, et al. Quantitative trait loci analysis of economically important traits in *Sorghum bicolor* S. *sudanense* hybrid[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2011, 91(1): 81-90.
- [2] 韩平安, 逯晓萍, 王亚男, 等. 基于重组自交系群体的高丹草抗倒高产种质的筛选[J]. 中国草地学报, 2014, 36(5): 51-57.
Han Ping'an, Lu Xiaoping, Wang Yanan, et al. Screening of the lodging-resistance and high-yielding germplasm of *sorghum* \times *sudan* grass hybrid based on recombinant inbred line populations[J]. Acta Agrestia Sinica, 2014, 36(5): 51-57.
- [3] 于卓, 秦永梅, 赵晓杰, 等. 优良饲用作物新品种——蒙农青饲1号高丹草选育[J]. 中国草地, 2004(2): 2-10.
Yu Zhuo, Qin Yongmei, Zhao Xiaojie, et al. Breeding of forage crop-*sorghum bicolor* \times *sorghum sudanense* cv. Mengnong Qingsi No.1[J]. Grassland of China, 2004(2): 2-10.
- [4] 于卓, 赵晓杰, 赵娜, 等. 蒙农青饲2号高丹草选育[J]. 草地学报, 2004, 12(3): 176-182.
Yu Zhuo, Zhao Xiaojie, Zhao Na, et al. Breeding of *sorghum bicolor* *sorghum sudanense* cv. Mengnong Qingsi No.2[J]. Acta Agrestia Sinica, 2004, 12(3): 176-182.
- [5] 于卓, 马艳红, 李小雷, 等. 蒙农3号高丹草选育[J]. 中国草地学报, 2008, 30(6): 1-9

- Yu Zhuo, Ma Yanhong, Li Xiaolei, et al. Breeding of *sorghum bicolor* × *sorghum sudanense* cv. Mengnong No.3[J]. Acta Agraria Sinica, 2008, 30(6): 1-9.
- [6] 詹秋文, 钱章强. 高粱与苏丹草杂种优势利用的研究[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 73-77.
- Zhan Qiuwen, Qian Zhangqiang. Heterosis utilization of hybrid between Sorghum [*Sorghum bicolor*(L.) Moench] and Sudan-grass [*Sorghum sudanense*(Piper)Stapf] [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(1): 73-77.
- [7] 詹秋文, 林平, 钱章强. 皖草3号的选育及其特征特性[J]. 作物杂志, 2006(4): 35-36.
- Zhan Qiuwen, Lin Ping, Qian Zhangqiang. Breeding and characteristics of Wan Grass No.3[J]. Crops, 2006(4): 35-36.
- [8] 薛春雷, 逯晓萍, 温莹, 等. 高丹草新品种GB-4-2选育研究[J]. 内蒙古农业科技, 2013(1): 24-27.
- Xue Chunlei, Lu Xiaoping, Wen Ying, et al. Breeding of new *sorghum bicolor* × *sorghum sudanense* GB-4-2[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2013(1): 24-27.
- [9] Panchaud A, Affolter M, Moreillon P, et al. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: Status quo and outlook[J]. Journal of Proteomics, 2008, 71(1): 19-33.
- [10] Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis[J]. Science, 2006, 312(5771): 212-217.
- [11] Zhu W, Smith J W, Huang C M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 2010(1): 840518.
- [12] Liu H, Sadygov R G, Yates J R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(14): 4193-4201.
- [13] Marcon C, Lamkemeyer T, Malik W A, et al. Heterosis-associated proteome analyses of maize (*Zea mays* L.) seminal roots by quantitative label-free LC-MS[J]. Journal of Proteomics, 2013, 93(19): 295-302.
- [14] Mohayjeji M, Capriotti AL, Cavaliere C, et al. Heterosis profile of sunflower leaves: A label free proteomics approach[J]. Journal of Proteomics, 2014, 99(1): 101-110.
- [15] 进茜宁, 付志远, 丁冬, 等. 玉米杂交种先玉335及其亲本种子萌发过程中胚芽蛋白质组学分析[J]. 作物学报, 2011, 37(9): 1689-1694.
- Jin Xining, Fu Zhiyuan, Ding Dong, et al. Proteomic analysis of plumule in seed germination for an elite hybrid pioneer 335 and its parental lines in maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(9): 1689-1694.
- [16] Han B, Li C, Zhang L, et al. Novel royal jelly proteins identified by gel-based and gel-free proteomics[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(18): 10346-10355.
- [17] Elias J E, Gygi S P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry[J]. Nature Methods, 2007, 4(3): 207-214.
- [18] Wang Z, Xue Z, Wang T. Differential analysis of proteomes and metabolomes reveals additively balanced networking for metabolism in maize heterosis[J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13(9): 3987-4001.
- [19] Hoecker N, Lamkemeyer T, Sarholz B, et al. Analysis of non-additive protein accumulation in young primary roots of a maize (*Zea mays* L.) F(1)-hybrid compared to its parental inbred lines[J]. Proteomics, 2008, 8(18): 3882.
- [20] Duressa D, Soliman K M, Chen D, et al. Gene expression profiling in soybean under aluminum stress: Genes differentially expressed between Al-tolerant and Al-sensitive genotypes[J]. American Journal of Molecular Biology, 2011, 1(3): 156-173.
- [21] 刘洋, 邢鑫, 李德全. LEA蛋白的分类与功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(8): 36-43.
- Liu Yang, Xing Xin, Li Dequan. Studies on the classification and function of LFA Proteins[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(8): 36-43.
- [22] 章成, 史冬燕, 曾黎琼, 等. 真核生物转录调控的研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(2): 164-171.
- Zhang Cheng, Shi Dongyan, Zeng Liqiong, et al. Research progress in gene transcription regulation in eukaryota[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2007, 22(2): 164-171.
- [23] Baud S, Dichow N R, Kelemen Z, et al. Regulation of HSD1 in seeds of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50(8): 1463-1478.
- [24] 王艳, 柴宝峰, 梁爱华. 肽链释放因子识别终止密码子的机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(1): 22-29.
- Wang Yan, Chai Baofeng, Liang Aihua. Stop codon recognition mechanism of the polypeptide release factors[J]. Chinese Journal of Biochemistry Molecular Biology, 2010, 26(1): 22-29.
- [25] Dong M, Gu J, Zhang L, et al. Comparative proteomics analysis of superior and inferior spikelets in hybrid rice during grain filling and response of inferior spikelets to drought stress using isobaric tags for relative and absolute quantification[J]. Journal of Proteomics, 2014, 109: 382-399.

Differential proteomics analysis of the embryo in sorghum-sudangrass hybrid and its parents

XUE Chunlei¹, LU Xiaoping¹, HAN Pingan², ZHANG Kunming¹, ZHANG Ruixia³, DONG Jing¹

1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China

2. Biological Research Center, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Science, Hohhot 010020, China

3. Hohhot Seed Management Station, Hohhot 010019, China

Abstract Sorghum-sudangrass hybrids are annual gramineous forage crops with intergrated excellent parental traits. Their heterosis is particularly prominent, but the molecular mechanism of the heterosis is not yet very clear. To reveal the molecular mechanism, the mature embryos of sorghum-sudangrass hybrids and their parents are analyzed by the Label free mass spectrometry and the bioinformatics methods based on proteomics in this study. 124 differentially expressed proteins are identified, among which 48 are additive accumulation proteins, accounting for 38.71% of the total proteins. 19 and 29 of them are up-regulated proteins and down-regulated proteins, respectively. 76 of them are non-additive accumulation proteins, accounting for 61.29% of the total proteins. 29 proteins are of the above-high-parent expression, with the greatest proportion among the non-additive accumulation expression patterns. Followed by the high-parent expression patterns(18 proteins), the low-parent expression patterns (14 proteins), the below-low-parent expression patterns(10 proteins). Besides, there are 5 proteins which do not belong to the above four kinds of protein expression patterns. Therefore, non-additive proteins play especially dominant roles in the heterosis of the mature embryo of sorghum-sudangrass hybrids. Additive and non-additive accumulation proteins cover multiple functional groups, which involve the stress response, the carbohydrate metabolism, the transcriptional regulation, the development regulation, the signal transduction, the protein metabolism and others.

Keywords Sorghum-sudangrass hybrid; embryo; proteomics; label free; mass spectrometry ●



(责任编辑 田恬)