昆明学院学报　2016, 38(3):78~81　CN 53-1211/G4　ISSN 1674-5639
Journal of Kunming University

植物差异蛋白组学研究中几项主要技术的探讨

程　霞[1],苏　源[1],窦玉敏[1],刘开庆[1],邓　纲[2*]
(1. 昆明学院 生命科学与技术系,云南 昆明 650214;2. 云南大学 农学院,云南 昆明 650091)

摘要:蛋白质是细胞内的关键物质,是生命活动的体现者. 对蛋白质的研究,将有助于阐明生命现象的某些重要机制. 目前植物高通量差异蛋白组学技术的发展日新月异,但主要包括双向电泳(2-DE)、双向荧光差异凝胶电泳(DIGE)、同位素亲和标签(ICAT)、同重同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)4 种技术方法. 因此,就以上 4 种技术方法进行探讨,以期更好他利用蛋白组学相关技术.

关键词:双向电泳;双向荧光差异凝胶电泳;同位素亲和标签;同重同位素标记相对和绝对定量
中图分类号:Q946.1　**文献标识码**:A　**文章编号**:1674-5639(2016)03-0078-04
DOI:10.14091/j.cnki.kmxyxb.2016.03.017

Discussing about Several Main Technologies in Plant Differential Proteomics Study

CHENG Xia[1], SU Yuan[1], DOU Yu-ming[1], LIU Kai-qing[1], DENG Gang[2*]
(1. Life Science and Technology Department, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China;
2. College of Agricultural Science, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

Abstract: Protein is the key material in the cell and the agent of life activity. The study of protein will help clarify some important mechanism of life phenomenon. At present, the plant high-throughput differential proteomics has developed quickly, but it mainly includes four technical methods, two-dimensional electrophoresis (2-DE), Differential In-Ge1 Electrophoresis (DIGE), Isotope Coded Affinity Tag (ICAT) and with heavy isotope labeling relative and absolute quantitative (iTRAQ). In this paper, we discussed the above four technical methods in order to better use proteomics technology.

Key words: two-dimensional electrophoresis; differential In-Ge1 electrophoresis; isotope coded affinity tag; isobaric tags for relative and absolute quantitation

蛋白质组学是研究生物体各种层次下总蛋白质的各种生理生化特性及不同时空下的变化规律. 它以植物组织或细胞中的总蛋白质为研究对象,这是继人类基因组计划完成后在分子生物学水平上对生命活动的第 2 步探索,是后基因组时代研究的核心内容之一[1-2]. 传统的研究策略通常是采用基因芯片,基因序列表达分析等方法从转录水平(mRNA)分析基因的表达变化[3]. 而有研究[2]表明,基因的 mRNA 表达水平与蛋白水平表达并不完全呈正相关关系,他们之间的相关系数大约只有 0.3. 从基因到蛋白质的表达,存在着 mRNA 剪接,蛋白质翻译调控及修饰,蛋白的成熟后剪接,蛋白质在亚细胞的定位和蛋白与蛋白之间的相互作用等过程[4-5]. 因此,基因组中绝大部分基因及其功能都有待于在蛋白质水平上得到揭示与阐述. 而差异蛋白组学就是研究生物体在特定条件下所表达的差异蛋白质,是目前使用最广泛的蛋白组学研究策略之一.

植物蛋白组学起步虽然较人类和微生物蛋白组学晚,但近年来随着高通量蛋白组学技术的发展成熟和越来越多植物全基因组序列测定的完成,差异

收稿日期:2016-05-04
基金项目:云南省教育厅资助项目(2014Y391);云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金和主任基金;2016 年昆明学院大学生科研资助项目(XJD16064).
作者简介:程霞(1979—),女,河南许昌人,讲师,在读博士,主要从事植物蛋白组学研究.
*通讯作者:邓纲(1986—),男,湖南邵阳人,讲师,博士,主要从事植物蛋白组学研究,E-mail: gangdengplant@126.com.

蛋白组学被广泛应用于植物遗传多样性分析,逆境下的生物及非生物胁迫,植物生长发育等领域的研究,并取得了迅速发展,其涉及植物的各组织器官细胞,细胞和亚细胞等水平的研究[6-8]. 虽然高通量植物差异蛋白组学的发展日新月异,但主要包括双向电泳(2-DE)、双向荧光差异凝胶电泳(DIGE)、同位素亲和标签(ICAT)、同重同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)4 种技术方法. 本文就以上 4 种主要技术与方法进行了优缺点的比较,以期在蛋白组学研究中更好地利用相关技术.

1　双向电泳(2-DE)

2-DE(Two-Dimensional Electrophoresis)的基本原理为,首先根据蛋白质等电点的差异在不同 pH 梯度的胶内进行等电聚焦分离,然后转到聚丙烯凝胶上进行电泳,按照相对分子质量的大小进行第 2 次分离. 蛋白质分子经过两次分离后,按照其等电点和相对分子质量的不同二维的分布在聚丙烯凝胶上,接着经过各种方法(硝酸银、考马斯亮蓝、荧光等)对蛋白质进行染色,最终有效地将蛋白质以图谱的形式显示出来. 基于对应蛋白质点灰度、荧光强弱比较不同处理、不同生理病理条件、不同时间等情况下,细胞、组织和体液内某种蛋白质含量的高低,从而获得某条件下的差异蛋白点,最后采用质谱技术进行蛋白质的鉴定.

双向凝胶因其成本低,操作简单目前仍然是蛋白组学研究中一种重要的分离方法,但其也存在一些局限性,主要表现在以下几个方面[9-14]:1)由于 IPG 胶条只能分离 pH 3 ~ 11 的蛋白质,所以极酸或极碱的蛋白质不能通过双向电泳进行有效分离. 2)由于疏水性蛋白质在蛋白提取过程中不能有效地溶解于裂解液中,导致一些疏水性蛋白(如膜蛋白等)不能在 2-DE 胶上显现. 3)相对分子质量大于 200 kDa的蛋白质分子进入 IPG 胶条时比较难,而相对分子质量小于 10 kDa 的蛋白质分子又容易从胶条中扩散,导致 2-DE 不能有效分离相对分子质量偏大或偏小的蛋白质分子. 4)即使使用最宽的 24 cm的 IPG 胶条,最多也只能分离染色到 3 000 多个蛋白点. 同时由于 2-DE 分辨率等因素的限制,导致低丰度蛋白被高丰度蛋白所掩盖而不能被检测. 5)2-DE 的重复性有待进一步提高,且工作量大、费时、费力,难以实现自动化. 目前 2-DE 的主要优势应用是同工酶和异构酶的发现,食品分析,蛋白质的修饰等方面.

2　双向荧光差异凝胶电泳(DIGE)

DIGE(Differential In-Ge1 Electrophoresis)的原理是,将不同的样品用不同荧光标记后等量混合,接着用单一的 2-DE 胶进行分离,在不同波长激光的激发下,发出不同荧光,目的是实现两个蛋白质样品之间差异蛋白的定量分析(Lilley and Dupree, 2006). 该技术克服了 2-DE 过程中不同次凝胶间存在重复性差的问题,使蛋白点的匹配,差异定量分析等更加准确. 在 DIGE 分析时,为了排除系统误差,在实验设计时,通过交叉染色可以有效地消除定量分析时的系统误差[15].

与传统基于染色分析的 2-DE 方法相比较,DIGE 在避免不同胶之间重复性差需要定量分析等问题上有非常明显的优势,但是与传统 2-DE 相比,DIGE 也存在一些问题. 尽管不同染料标记的蛋白质样品,其相对分子质量和等电点没有明显的改变,2-DE中不会发生偏移,但是标记的蛋白质与相同的而未标记的蛋白质相比,它们在 2-DE 胶上的位置发生了偏移而不在同一位置,这会对下一步挖去差异点进行质谱鉴定产生影响,可能存在蛋白质点被其他未标记蛋白质点污染的问题[16-18]. 因此在切点挖胶前,用传统染料对 2-DE 进行染色以找到需要切取的差异蛋白点位置,再取点进行后续的质谱分析;或者在进行 DIGE 分析时,同时跑一块 2-DE 胶用传统考马斯亮蓝或蛋白染料进行染色,依据 DIGE 分析差异蛋白质点信息,在传统染色 2-DE 胶上进行挖取对应的差异蛋白质点[19]. 如今,DIGE 广泛应用于植物差异蛋白质组学的各项研究中.

3　同位素亲和标签(ICAT)

Gygi(1999)[2]率先建立了 ICAT (Isotope Coded Affinity Tag)技术. 该技术由 3 个部分组成:即活性反应基团,可特异性的与蛋白质肽段上的半胱氨酸残基反应;引入稳定同位素的连接子;亲和标签用来分离含半胱氨酸的多肽. 相对于其他定量蛋白组学研究,ICAT 定量有以下优点[20-22]:1)因为蛋白质分离是在肽段水平上进行,任何来源的蛋白质样品均可进行定量分析. 2)通过选择含有半胱氨酸残基的亲和性肽段,结果可降低后续质谱分析的复杂性.

3)烷基化反应即使在有盐、去垢剂及稳定剂存在下都可以进行. 4)能够测量和鉴定出各种低丰度蛋白,提高蛋白鉴定的效率. 5)ICAT 可与任何类型的免疫,物理分离方法兼容,因此能很好地定量分析微量蛋白质.

ICAT 虽然引入了内标,但是仍然存在一些缺点,有待改进[23-25]. 如:1)只有含半胱氨酸残基的蛋白质被标记和分析,不含半胱氨酸残基的蛋白质将被丢失,因此对总蛋白的鉴定并非完全. 2)ICAT 在 MS/MS 质谱分析过程中一直保留在蛋白质的肽段上,这将影响下阶段肽段的检测同时增加数据搜索分析的复杂性. 3)ICAT 的标记效率不可能是 100%,最高只有 80% 左右. 4)在 ICAT 标记时,ICAT 对高丰度蛋白标记的倾向性,导致低丰度蛋白质标记效率低下而不能被后续鉴定和定量. 这些都大大限制了 ICAT 技术的应用和发展.

4 同重同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)

iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation)是一种可同时对 4 种或 8 种蛋白质样品进行标记,一次实现对标记的蛋白质进行精确定量的比较蛋白组学研究方法. 该试剂由 3 部分组成:一端是标签分子部分,由相对分子质量为 114,115,116,117 Da 等的报告集团组成,从而可形成 4 种或 8 种不同的标记. 另一端为肽反应部分,是将 iTRAQ 试剂与蛋白质或蛋白质酶解肽段氨基酸反应,因细胞中所有蛋白质或蛋白质酶解肽段均存在氨基末端,所以通过 iTRAQ 试剂标记后可对所有蛋白质及酶解肽段进行鉴定分析,大大提高了蛋白鉴定的效率. 试剂分子的中间部分为相对分子质量为 31,30,29,28 Da 的质量平衡臂,可确保所有的 iTRAQ 标记的相对分子质量为 145 Da,这保证了 iTRAQ 标记的同一肽段的核质比相同,提高了鉴定结果的准确性. iTRAQ 的操作流程见图 1.

iTRAQ 与 ICAT 相比,有如下优点[26-30]:1)iTRAQ 标签通过对所有蛋白质的末端氨基或蛋白质酶解肽段的末端氨基酸标记,因此可以标记所有的蛋白质或蛋白质酶解肽段,这样既能提高蛋白质鉴定的覆盖率,同时可使蛋白质定量结果更加可靠. 2)标记过程操作实现了高通量、速度快、标记完全,标记效率可达 98% 以上. 3)ICAT 标记一次只能分析两个样品,而 iTRAQ 试剂可以同时分析 4 个或 8 个样品,有效实现了多重比较,并减少了不同批次实验之间的系统误差.

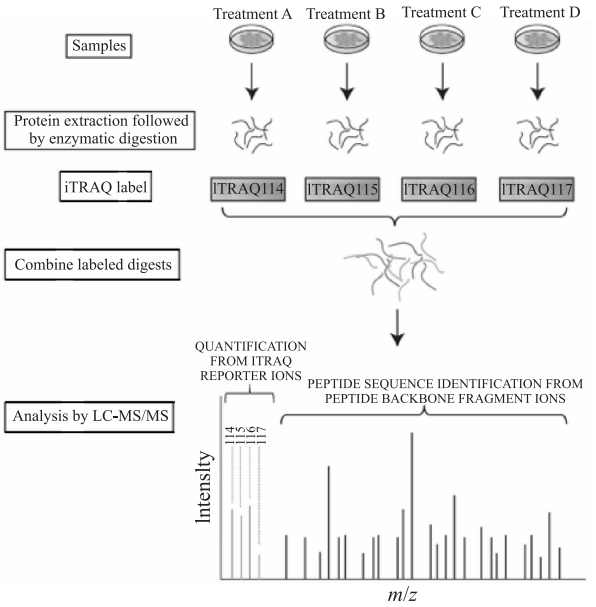

图1 iTRAQ定量蛋白组学流程

iTRAQ 试剂除了可用来进行相对定量外,还可以进行绝对定量,通过用 iTRAQ 试剂标记已知的标准蛋白质,实现样品的绝对定量分析[31]. 目前,iTRAQ 已成为定量蛋白组学研究中一种比较主流及普遍的技术和工具.

综上所述,蛋白质是继基因组之后研究生命活动的最重要大分子物质,对蛋白质结构和功能的研究,将有助于阐明各种情况下生命活动的作用机制. 目前 iTRAQ 技术虽然只能对样品进行定量分析,且存在试剂价格仍然较昂贵等不足和缺点,但该技术在蛋白组学研究中存在明显的优势,必然在未来蛋白组学水平上解释生命活动的机制中发挥重要作用.

[参考文献]

[1] ANDERSON N L, ANDERSON N G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words [J]. Electrophoresis, 1998, 19: 1853 - 1861.

[2] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(10): 994 - 999.

[3] 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.

[4] JURI R, MATTHIAS M. What does it mean to identify a pro-

tein in proteomics[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2002,27(2):74 – 82.

[5]PATTERSON S D,AEBERSOD H. Proteomics: the first decade and beyond[J]. Nature Genet,2003,33:311 – 323.

[6]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.

[7]WEMER T. Promoters can contribute to the elucidation of proteinfunction[J]. Trends Biotechnol, 2003, 21 (1): 9 – 13.

[8]RIGHETTI P G,CASTAGON A,ANTONUCCI F,et al. The proteome:anno Domini 2002[J]. Clin Chem Lab Med, 2003,41(4):425 – 438.

[9]郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999.

[10]海燕,曹刚强,凌华,等. 双向电泳过程中的常见问题及解决方法[J]. 安徽农业科学,2009(3):32 – 37.

[11]LINK A J,ROBISON K,CHURCH G M. Comparing the pred icted and ob-served properties of proteins encoded in the genom e of Escherichia coliK-12[J]. Electrophoresis, 1997,12:382 – 396.

[12]HARDER A,WILDGRUBER R,NAWROCK I A,et al. Comparison of yeast cellprotein solub ilization procedures for two-d im ensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1999,8:126 – 138.

[13]LUCHE S,SANTON I V,ABILLOUD T. Evaluation of non ion ic and zw itteri-on ic detergents as membrane protein solub ilizers in two-d im ensionalelectrophoresis[J]. Proteomics,2003,28:96 – 112.

[14]李德军,邓治,陈春柳,等. 植物组织双向电泳样品制备方法研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(24):23 – 29.

[15]MAROUGA R,DAVID S,HAWKINS E. The developmentof the DIGE system:2D fluorescence difference gel analysistechnology[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005,20:1325 – 1341.

[16]RAIS I,KARAS M,SCHGGER H. Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane protein-and mass spectrometric identification[J]. Proteomics, 2004,38:987 – 999.

[17]RITA M,STEPHEN D,EDWARD H. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005,382(3):669 – 678.

[18]杜俊变,王丽惠,段江燕. 2D-DIGE 技术在蛋白质组学中的应用[J]. 生物学杂志,2011(3):46 – 52.

[19]甄艳,许淑萍,赵振洲,等. 2D-DIGE 蛋白质组技术体系及其在植物研究中的应用[J]. 分子植物育种,2008(2):19 – 25.

[20]ZHOU H,RANISH J A,WATTS J D,et al. Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry[J]. Nature Biotechnology,2002,20(5):512 – 517.

[21]龙晓辉,张耀洲. 定量蛋白质组同位素标记技术及应用[J]. 细胞生物学杂志,2005(3):332 – 349.

[22]YU L R,JOHNSON M D,CONRADS T P,et al. Proteome analysis of camptothecin-treated cortical neurons using isotope-coded affinity tags[J]. Electrophoresis, 2002, 23(11):1591 – 1599.

[23]荣举,许丽艳,李恩民. 同位素亲和标签(ICAT)系列技术及其在蛋白质组研究中的应用[J]. 癌变·畸变·突变,2003,15(4):30 – 37.

[24]刘慧玲,张养军,钱小红. 稳定同位素化学标记结合质谱技术在定量蛋白质组学中的应用[J]. 生物技术通讯,2006,17(3):6 – 11.

[25]孟丽丽,齐孟文. 稳定同位素标记方法在蛋白质组学定量分析中的应用[J]. 同位素,2005(4):8 – 14.

[26]谢秀枝,王欣,刘丽华,等. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2011,27(7):616 – 621.

[27]ZHOU L,BEUERMAN R W,CHAN C,et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics[J]. Journal of Proteome Research, 2009,8(11):132 – 149.

[28]王林纤,戴勇,涂植光. iTRAQ 标记技术与差异蛋白质组学的生物标志物研究[J]. 生命的化学,2010(1):147 – 156.

[29]GARBIS S D. Search for potential markers for prostate cancer diagnosis,prognosis and treatment in clinical tissue specimens using amine-specific isobaric tagging(iTRAQ) with two-dimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. Journal of Proteome Research, 2008,7(8):3146 – 3158.

[30]潘三强,宿宝贵,吕来清. 二维电泳和 iTRAQ 的实验比较[J]. 神经解剖学杂志,2008(5):9 – 14.

[31]李伟. iTRAQ 多重化学标记串联质谱技术在比较蛋白质组学中的应用[J]. 生命的化学,2006(5):17 – 25.