

果实成熟衰老过程中蛋白质组学研究进展

张丽, 罗海波, 姜丽, 蒋娟, 傅淋然, 郁志芳*

南京农业大学食品科技学院, 南京210095

摘要: 蛋白质组学已开始应用于果实成熟衰老研究, 以明确蛋白差异表达与成熟衰老的关系和深入揭示果实成熟衰老过程的分子机制。本文综述了蛋白质组学在果实成熟衰老研究中的重要性、果实样品蛋白的提取制备方法, 重点介绍了蛋白质组学在果实成熟衰老机制、果实抗病性机制、冷害机制以及采后处理对果实成熟调控研究中的应用, 分析了蛋白质组学在果实成熟衰老研究中存在的不足, 提出了今后研究的方向。

关键词: 蛋白质组学; 果实; 成熟; 衰老; 进展

Advances in Proteomics Related to Fruit Ripening and Senescence

ZHANG Li, LUO Hai-Bo, JIANG Li, JIANG Juan, FU Lin-Ran, YU Zhi-Fang*

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Proteomics technique has already been used in fruit to investigate the changes in protein expression profiles during ripening and senescence and to unravel the molecular mechanisms involved in these processes. Here we review the application of proteomics in the analysis of fruit ripening and senescence, and the methods used for extracting the proteins from fruits. Particular attention was paid to the application of proteomics in study of fruit ripening and senescence, disease resistance, and chilling injury. The shortcoming for proteomics technique and the future directions are also discussed.

Key words: proteomics; fruit; ripening; senescence; advance

随着众多植物物种基因组测序工作的完成, 植物生物学的研究进入到了后基因组时代, 其中最重要的手段之一是蛋白质组学的研究(Ganesh等2005)。蛋白质组学主要以分离技术和生物质谱技术为支撑平台, 生物信息学为桥梁, 对蛋白质表达进行研究分析(Rose等2004)。与基因组学一样, 蛋白质组学可以系统地研究植物的生理生化变化, 动态描述蛋白质水平的表达差异, 并鉴定出与其生理生化变化相关的蛋白或基因, 以分析植物不同生长时期、不同环境条件对生命过程的影响, 从蛋白水平上解释植物各种生理过程的分子机理(Jorrín-Novo等2009)。

果实的成熟衰老是个复杂的生理过程, 涉及细胞壁的修饰、淀粉向糖的转化、色素的合成、芳香物质的积累和多酚类物质及抗氧化系统的变化等(Ziosi等2003), 这些过程不仅受到如基因表达、生长发育阶段和激素调控等因素的调控, 还受到果实采后处理方法、贮藏条件和时间等的调节。对于果实成熟衰老的分子机理, 国内外的研究者在基因表达、生理生化方面进行了大量的研究, 但是果实成熟衰老过程中蛋白质表达的研

究刚刚起步。果实成熟、衰老相关基因表达、蛋白质表达和生理生化的关系及研究归纳如图1。

近年来, 随着蛋白分离技术的改进和肽序列标签(peptide sequence tags, EST)的快速发展, 蛋白质组学在果实成熟衰老研究中的应用有了很大进展。Palma等(2011)认为在果实成熟衰老的研究中将蛋白质组学与上游的基因组学、转录组学和下游的代谢组学、表型组学相结合, 可以更加系统地阐述果实的生理代谢过程。利用蛋白质组学可以研究与成熟衰老相关的功能性蛋白或者基因的变化, 为果实成熟衰老过程中各个生理生化过程分子机理的研究提供全新的技术方法和证据。本文对蛋白质组学在果实成熟衰老研究中的应用方法、研究内容和进展进行了综述, 并提出存在的问题和今后的发展趋势。

收稿 2011-06-30 修定 2011-08-12

资助 国家科技人员服务企业行动项目(2009GJC10010)、江苏省研究生培养创新工程(CXZZ11-0658)和江苏高校优势学科建设工程项目(PADA)。

* 通讯作者(E-mail: yuzhi88@yahoo.com.cn; Tel: 025-84399098)。

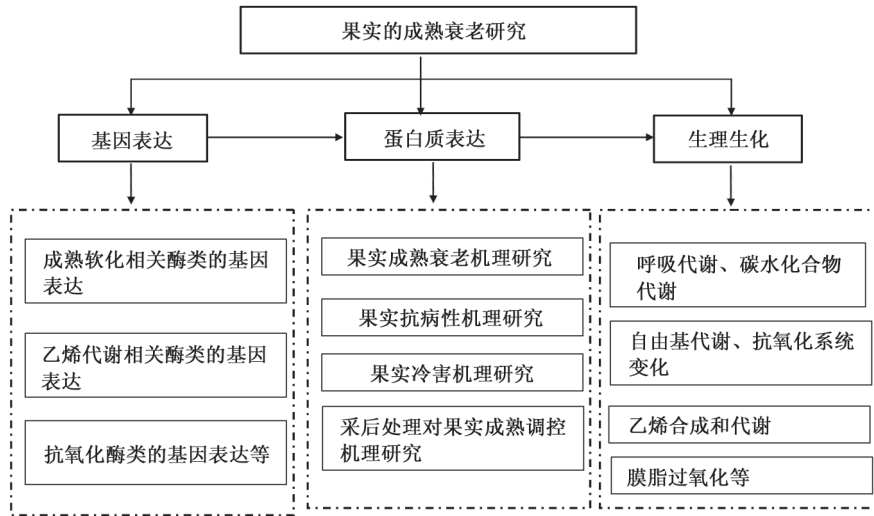


图1 果实成熟衰老在基因表达、蛋白表达和生理生化方面的研究

Fig.1 The study of gene expression, protein expression and physiology and biochemistry in fruit ripening and senescence

1 果实样品蛋白质的提取制备

虽然蛋白质分离技术不断更新,但是双向电泳技术仍是目前最重要的蛋白质分离手段。蛋白质的提取和制备是双向电泳技术的关键,果实中蛋白质含量相对较低,并且含有大量干扰性物质,如色素、淀粉、多酚、多聚糖、单宁和有机酸类等(Palma等2011),故果实蛋白质的提取是个难点,而且不同果实的组成成分以及果实特性不同,适用的方法也有差异。目前,适用于双向电泳的果实蛋白质提取方法主要有3种,即TCA/丙酮法、改

良TCA/丙酮法和酚抽法(图2)。

三氯乙酸(trifluoroacetic acid, TCA)和丙酮都是有效的蛋白沉淀剂,两者通常结合使用以除去内源性的大分子、代谢物和磷脂等,方法较简便, TCA/丙酮法作为经典的植物蛋白提取方法,适用于一些果实蛋白质的提取。王一鸣等(2007)利用TCA/丙酮法提取桃果实硬核期中果皮的蛋白得到了纯度较高的蛋白;钟凤林(2009)利用TCA/丙酮法提取瑛溪蜜柚果实汁胞的蛋白质;张鹏(2009)优化了TCA/丙酮法提取黄瓜果实蛋白质的方法,使

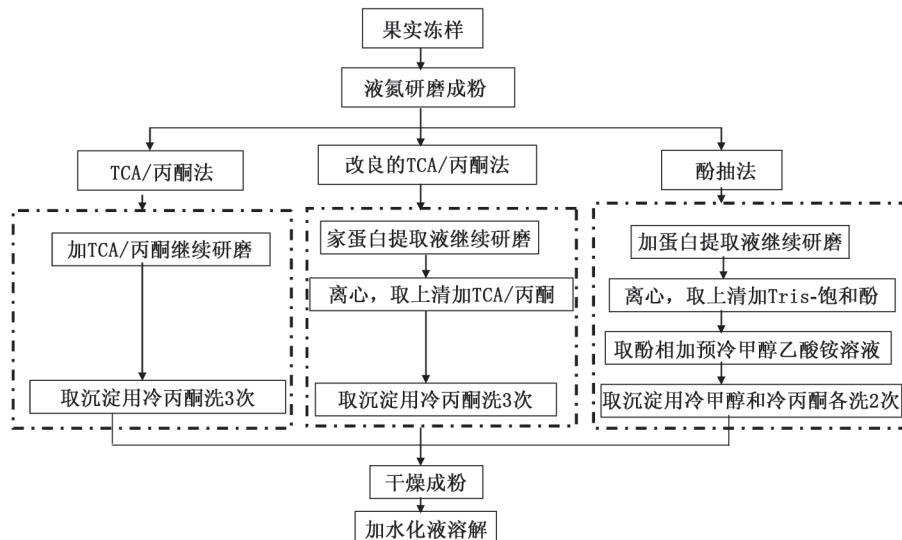


图2 三种提取果实蛋白质的方法与步骤

Fig.2 Three protocols of fruit protein extraction

用MM301细胞破碎仪30 Hz研磨3 min, 研磨过程中不加入PVP, 并且确定了用丙酮溶液反复清洗蛋白质沉淀的最佳次数为7次。但对于干扰物质较多的样品, TCA/丙酮法得到的蛋白纯度较低, 提取效果较差, 因此在蛋白提取过程中加入EGTA和Triton X-100等除盐试剂以及DTT和PMSF等保持蛋白稳定性的试剂, 然后再用TCA/丙酮沉淀, 可以得到较好的效果。

酚抽法是先先将蛋白抽提到以缓冲液饱和的苯酚中, 再用乙酸铵-甲醇溶液沉淀, 此法可以有效地除去如酚类、糖类和色素等大量的干扰物质, 此方法相对较为繁琐和费时, 但在果实蛋白质提取过程中的应用较多(表1)。Abdi等(2002)利用酚抽法(水饱和酚)提取了油桃、桃和李果实中的蛋白质, 得到了质量较高的双向电泳图谱。Vincent等

(2006)比较了酚抽法和TCA/丙酮法提取葡萄果实蛋白质的效果, 发现酚抽法虽然费时, 但是能得到分辨率较高的双向电泳图谱。Muccilli等(2009)提取柑橘果实的蛋白质研究表明, 酚抽法提取得到的蛋白质纯度较高, 只需要TCA/丙酮法蛋白20%用量就可以得到清晰的电泳图谱。王清等(2009)对酚抽法的提取缓冲液配方进行了改进, 增加了缓冲液中蔗糖的浓度, 由原先的250 mmol·L⁻¹变为1.05 mol·L⁻¹, 改进后的配方使得酚相由原先在下层变为上层, 回收酚相更加简便; 他们利用这3种蛋白提取方法分别提取芒果、桃、樱桃和苹果等果实的蛋白质, 结果发现对于桃、苹果和芒果, 虽然改良TCA/丙酮法和酚抽法都能获得质量较高的双向电泳图谱且两者差异不显著, 但电泳图谱中的蛋白点数都显著高于TCA/丙酮法; 以甜樱桃为试

表1 果实成熟衰老中蛋白质组学的应用方法及研究内容

Table 1 The protocols and research fields of proteomics in fruit ripening and senescence

研究领域	果实种类	部位	蛋白提取方法	分离方法	鉴定方法	参考文献
果实成熟	番茄	果肉	酚抽法	2-DE	MALDI-TOF-MS和 μLC-ESI-IT-MS/MS	Rocco等2006
	番茄	果肉	酚抽法	2-DE	MALDI-TOF和 LC-ESI-MS/MS	Faurobert等2007
	柑橘	果肉	酚抽法	2-DE	毛细管RP-HPLC/ nESI-MS/MS	Muccilli等2009
	桃	果肉	酚抽法	2-DE	LC-ESI-MS/MS	Prinsi等2011
	苹果	果肉	酚抽法	2-DE	MALDI-TOF-MS和 μLC-ESI-IT-MS/MS	Guarino等2007
	草莓	果肉	酚抽法	DIGE	MALDI-MS/MS	Alm等2007
	草莓	果肉	酚抽法	DIGE	nLC-ESI-IT-MS/MS	Bianco等2009
	桃、李和油桃	果肉	酚抽法	2-DE	Edman降解	Abdi等2002
	柑橘	果肉	酚抽法	2-DE	LC-MS/MS	Katz等2007
	葡萄	细胞壁	酚抽法	2-DE	LC-ESI-MS/MS	Negri等2008b
	葡萄	果皮	酚抽法	2-DE	nLC-MS/MS	Deytieux等2007
	柠檬	果皮	多步提取法	2-DE	LC-ESI-MS/MS	Pignataro等2010
	葡萄	果皮	酚抽法	2-DE	LC-ESI-MS/MS	Negri等2008a
	葡萄	质膜	两项分配法	2-DE	MALDI-TOF-MS	Zhang等2008
	番茄	色素细胞	酚抽法	2-DE	ESI-MS/MS	Barsan等2010
	苹果	线粒体	酚抽+梯度离心	2-DE	ESI-MS/MS	Qin等2009
	果实抗病性	桃	果肉	酚抽法	2-DE	ESI-Q-TOF-MS/MS
甜樱桃		果肉	酚抽法	2-DE	MALDI-Q-TOF	产祝龙2006
青霉菌		细胞内外	改良TCA/丙酮法	2-DE	ESI-Q-TOF-MS/MS	Qin等2007
冬枣		果肉	酚抽法	2-DE	ESI-Q-TOF-MS/MS	Wang等2009
采后处理	桃	果肉	酚抽法	DIGE	MALDI-TOF-TOF	Lara等2009
	桃	果肉	酚抽法	2-DE	MALDI-TOF-TOF	Zhang等2011
	柑橘	果肉	果肉和果皮	2-DE	RPLC-ESI-IT-MS/MS	Shi等2008
果实冷害	桃	果肉	酚抽法	2-DE	ESI-Q-TOF-MS/MS	Zhang等2010
	桃	果肉	酚抽法	DIGE	LC-MS/MS	Nilo等2010
	桃	果肉	酚抽法	2-DE	LC-MS-MS	Obenland等2008
	番茄	果肉	酚抽法	2-DE	LC-MS-MS	Page等2010

材进行的研究显示,用酚抽法提取蛋白质所获得的图谱质量好,而TCA/丙酮法和改良TCA/丙酮法效果都较差。卢丞文等(2010)利用酚抽法提取到了番茄果实中高纯度的蛋白,并用含有高浓度($9\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)尿素的水化液溶解,得到了清晰度较高的电泳图谱。吴满成等(2009)比较了TCA/丙酮法和酚抽法提取牛奶子果实中蛋白质的效果,结果发现酚抽法提取的蛋白纯度较高,得到的双向电泳图谱蛋白点数较多,胶面背景清晰且无明显的横纹和拖尾,而TCA/丙酮法得到的蛋白点数少,大分子端有明显的拖尾现象。以上结果表明,与TCA/丙酮法相比,酚抽法较好地除去了果实中的色素或盐离子等干扰物质,提取得到的蛋白纯度较高,双向电泳的图谱清晰度和分辨率高,横纹和拖尾较少,更适用于多数果实的蛋白质提取。

除此之外,Wang等(2003)报道了一种适用于植物叶片和果实的方法,即将TCA/丙酮和酚抽法相结合提取蛋白,结果表明这种方法不仅节省时间,而且能得到较好的双向电泳图谱。Barraclough等(2004)挑选了苹果和桃(低蛋白含量)、鳄梨(高脂质含量)和柠檬(高酸性)等具有代表性的果实,果实样品用裂解液(主要成分为尿素、硫脲、DTT、CHAPS和两性电解质)磨样并加入一定量的PVPP,然后加入丙酮沉淀,发现这种方法(尿素/硫脲提取法)提取的果实蛋白质得到双向电泳图谱质量较高,没有横纹和拖尾。王海玲等(2009)比较了以上两种方法提取桑葚果实蛋白质的效果,结果发现TCA/丙酮和酚抽法相结合提取蛋白得到的双向电泳图谱背景清晰,在阳极和阴极两侧都有良好的分离效果,检测到441个蛋白点;而尿素/硫脲提取法的等电聚焦明显偏向于阳极一侧,仅检测到104个蛋白点。

细胞壁蛋白质和质膜蛋白在细胞的生长和信号传导、抵御外界胁迫以及与质膜蛋白的相互作用等生理过程中发挥着重要作用(Pellenc等2004)。果实的细胞壁中含有大量的有机酸、萜类物质和蛋白酶类等干扰物质,膜蛋白大多是低丰度蛋白和碱性蛋白,且具有疏水性(金良等2010),另外在组织破碎过程中,细胞内的蛋白质易被细胞多糖等污染(朱响昊等2009),给果实细胞壁和质膜蛋白的提取造成一定的影响。Negri等(2008b)用酚抽法

建立了葡萄果实细胞壁蛋白的提取方法,并且比较了与盐提法(CaCl_2 和 LiCl)提取的效果,结果表明酚抽法得到的双向电泳图谱中的蛋白点数显著多于盐提法,因此确定了酚抽法更适合提取葡萄果实细胞壁的蛋白。Zhang等(2008)利用两相法对葡萄果实的质膜蛋白进行提取,得到了纯度较高的质膜蛋白。线粒体蛋白参与了三羧酸循环、电子传递链、碳代谢和胁迫反应等生理过程,在果实的成熟衰老中有着重要的生理功能。Qin等(2009)先用丙酮沉淀苹果果实的总蛋白,再用梯度离心法提取苹果果实的线粒体蛋白质,以研究苹果果实衰老过程中的线粒体蛋白差异表达。

以上研究者采用不同提取方法、用于不同目的并进行的比较研究结果表明,果实的特性、部位和研究目标等不同,适用的提取方法有差异。在应用蛋白质组学技术研究果实成熟衰老时,应加强提取方法针对性探索,使研究结果更科学和准确。

2 蛋白质组学在果实成熟衰老研究中的应用

蛋白质是生命体活动的体现者和执行者,蛋白质组学技术已成为研究果实成熟衰老过程中蛋白差异表达的主要手段,已被应用于番茄、桃、葡萄、柑橘、草莓、苹果等果实成熟衰老的研究(表1),研究的技术路线如图3所示。目前,蛋白质组学在果实成熟衰老研究中的应用主要集中在:(1)在成熟过程不同品种、不同成熟度果实的蛋白表达比较;(2)果实的抗病性研究;(3)果实的冷害机理研究;(4)采后处理对果实成熟调控机理的研究。这些结果为阐述果实成熟衰老过程中各个生理生化过程的分子机理提供了新的思路和理论依据(图1)。

2.1 果实成熟衰老机制研究

目前,判断果实采收成熟度的依据主要是根据果实颜色、硬度和可溶性固形物等,这些指标都受品种、生长条件和季节的影响而不同,因此需要寻找不受外界环境因素影响的指标来判断果实的成熟度。Abdi等(2002)利用2D-PAGE分离了4个品种核果类果实的蛋白质,分别是日本李、欧洲李、桃和油桃。结果发现在最佳采收期时有4个蛋白合成(Z1、Z2、Y和X),经过Edman降解法N端测序发现这些蛋白属于一系列参与防御的抗原

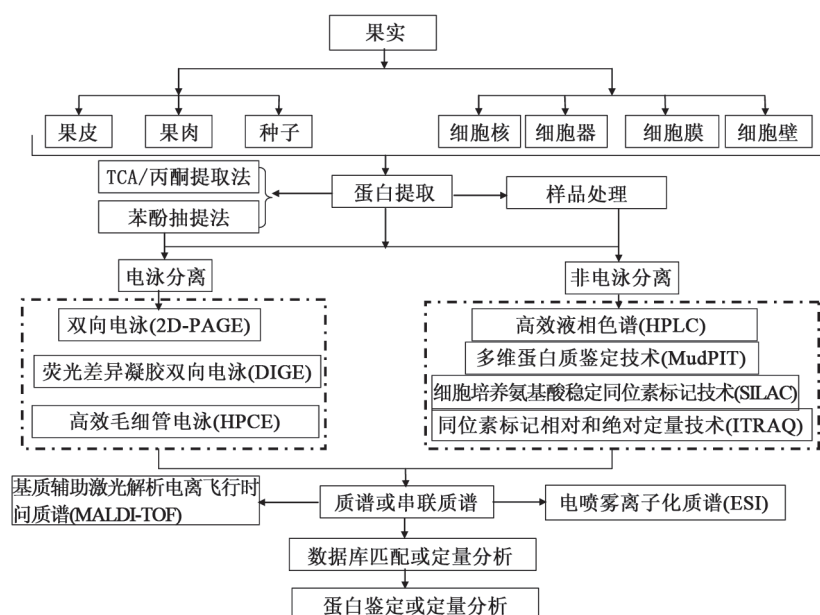


图3 蛋白质组学在果实成熟衰老研究中的技术路线

Fig.3 Technical route of the proteomics in fruit ripening and senescence

物质。这些在成熟过程中特异性表达的蛋白可以作为判断桃、李和油桃果实最佳成熟度的一种新方法。Guarino等(2007)研究了苹果(*Malus×domestica* Borkh. cv. Annurca)果实的蛋白质图谱,得到303个清晰的蛋白点中,有44类蛋白由28个基因编码,其中参与能量代谢和成熟胁迫与防御的蛋白(病程相关蛋白)的最多,其中能量代谢包括糖酵解途径、磷酸戊糖途径、呼吸作用和发酵作用等。

不同物种果实的成熟过程在生理生化、物质组成和结构方面有着较大的差异,根据成熟过程的特征果实分为呼吸跃变型和非跃变型,桃属于典型的呼吸跃变型果实,其在呼吸跃变前后不论在品质和生理生化方面还是基因表达方面都发生了巨大的变化。Trainotti等(2006)利用转录组学的技术(μ PEACH1.0微阵列基因芯片)研究了桃果实跃变之前基因表达的变化,发现在桃果实跃变前后有267个基因上调,109个基因下调。Prinsi等(2011)利用蛋白质组学的技术发现两个品种(软溶质和硬溶质)的桃果实跃变前后有53个蛋白差异表达,这些蛋白分别参与了基础代谢、次级代谢、乙烯合成以及胁迫反应,其中ACC氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO)在桃果实跃变前后变化最为显著,其次是腺昔甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine syn-

thetase)和 β -氰丙氨酸合成酶(β -cyanoalanine synthase),这3种酶都参与了乙烯的生物合成和代谢,在果实成熟过程中发挥着重要作用;蔗糖合成酶(sucrose synthase)和 α -淀粉酶(α -amylase)在软溶质和硬溶质的桃果实有差异表达,这两种酶与果实的品质变化有密切关系,并且软溶质桃果实中的活性氧含量要高于硬溶质,由此推测呼吸跃变型果实在成熟过程中承受的氧化胁迫较大,更容易腐烂变质。Faurobert等(2007)利用荧光差异凝胶双向电泳(fluorescence difference gel electrophoresis, DIGE)技术研究了樱桃番茄成熟过程中的蛋白差异表达,结果表明未成熟的番茄果实中,蛋白合成和氨基酸代谢的蛋白在细胞分裂阶段表达较多,随后表达量逐渐降低,在细胞膨胀阶段,参与光合作用和细胞壁形成的蛋白表达逐渐增加;而成熟果实中,碳水化合物代谢和抵抗胁迫的蛋白表达较多,这些蛋白变化贯穿着番茄果实成熟的全过程。Rocco等(2006)研究发现,两个不同地域品种的番茄果实成熟过程中有83个蛋白差异表达,经MALDI-TOF-MS和LC-ESI-IT-MS/MS质谱分析和ESTs数据库鉴定后,发现这些差异蛋白参与氧化还原作用、胁迫反应和防御、基础代谢、能量代谢和细胞信号传导等生理过程,在番茄果实成熟过程中发挥着重要作用。

跃变类果实如番茄、桃等果实的成熟过程已有大量研究,而非跃变果实的研究则相对较少。柑橘类果实是典型的非跃变类果实,解剖学结构也有明显的特征(Katz等2007)。Katz等(2007)运用LC-MS/MS的方法分析了成熟柑橘肉质膜蛋白图谱,通过NCBI nr(绿色植物)和柑橘类果实的ESTs数据库,最后鉴定出了1400个蛋白质,运用生物信息学的知识发现这些蛋白都与果实的成熟过程有着密切的联系。Muccilli等(2009)对成熟过程中不同基因型的柑橘(鲜艳香甜型和一般型)进行了比较蛋白质组学研究,利用双向电泳和毛细管RP-HPLC/nESI-MS/MS技术鉴定出了64个差异蛋白点,对其功能进行鉴定,发现大多数差异蛋白主要与糖代谢和花色苷合成有关。在鲜艳香甜型果实中,糖代谢和花色苷合成的蛋白表达较多,在普通型的果实中,胁迫反应和防御蛋白表达较多,说明鲜艳香甜型果实在成熟过程中合成较多的花色苷,起到抗胁迫的作用,而普通型果实缺乏合成花色苷的能力,在成熟过程中合成较多的防御蛋白进行自我防御。

草莓是典型的非呼吸跃变型果实,含有丰富的营养物质,由于草莓属于八倍体,与番茄、葡萄和柑橘类果实相比,基因组学和分子生物学的研究较缺乏,因此利用蛋白质组学研究草莓果实的成熟机理成为新的手段。Bianco等(2009)利用DIGE技术对3个不同基因型和同一品种的3个成熟度的草莓果实进行蛋白质图谱分析,然后利用多维蛋白质鉴定技术和纳升级液相色谱-串联质谱联用技术对电泳图谱进行鉴定,结果表明:在草莓果实成熟的过程中,与成熟相关的差异蛋白参与了能量和代谢(如glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase等)、次级代谢(chalcone synthase、flavanone 3-hydroxylase和anthocyanidin synthase等)、细胞结构(endopolygalacturonases、expansin)、信号传导(eukaryotic initiation factor、translationally controlled tumor protein)和胁迫反应(HSP、APX、methionine sulphoxide reductase)等生理生化过程;而与品种相关的特异性蛋白主要有病程相关蛋白(Fra a 1 allergen)和与芳香物质形成有关的蛋白(quinone oxidoreductase)。Alm等(2007)利用蛋白质组学的方法比较了两个不同品种(红色品种和白

色品种)草莓的蛋白表达差异,研究表明两个品种中有10%的蛋白具有极显著差异表达,与红色品种相比,白色品种中参与类黄酮合成的酶类下调表达,而自身防御的蛋白上调表达。同时,研究发现草莓中抗原物质Fra a 1的含量低于红色品种,而且不同品种不同生长环境的草莓中抗原物质的含量也不同。

果皮可以保护果实免受物理损伤和微生物侵染,Deytieux等(2007)比较了葡萄果皮成色初期和后期的蛋白电泳图谱,结果发现与成色后期相比,有11个蛋白在成色初期出现上调表达,分别参与光合作用、碳水化合物代谢,胁迫反应和传导途径。而在成色后期,有20个蛋白出现上调表达,多数是花青素合成的关键酶,如异黄酮3-O-葡萄糖基转移酶、异黄酮3-羟化酶和查尔酮合成酶等,另外还有参与碳代谢和有机酸代谢的酶类,这些酶类的变化导致了葡萄成熟后期色泽和风味的变化。果皮可以保护果实免受物理损伤和微生物侵染,Negri等(2008a)研究了葡萄成熟过程中果皮蛋白质的变化,通过LC-ESI-MS/MS鉴定出69个差异蛋白,分别参与了糖代谢、胁迫反应、氨基酸代谢等。研究发现参与基础代谢的成熟相关蛋白(包括糖酵解最后五步的蛋白)在果皮中被诱导表达,而与前人以全果肉位试材研究出现下调表达不同。Pignataro等(2010)利用蛋白质组学的方法(2DE, LC-ESI-MS/MS和ESTs数据库)鉴定出柠檬果实外皮含有大量的微生物糖类蛋白Cit s1(人类的一种抗原)异构体,分子量在20~120 kDa之间。

由于全细胞表达的蛋白质种类繁多,各种蛋白质在细胞内有一定的空间分布,各种亚细胞组分也有各自特征性的蛋白质种类组成,因此,分离亚细胞组分可以减少蛋白质的种类并富集低丰度蛋白,有望分离和鉴定出更多的新蛋白和新基因,以便了解这些低丰度蛋白的功能(Patton 1999)。Negri等(2008b)对葡萄的细胞壁进行蛋白质组学研究,比较了细胞壁和胞液中蛋白的差异,对47个蛋白点进行LC-ESI-MS/MS分析鉴定后发现,其中有些是一般的细胞壁蛋白,有些不是传统意义上位于非原生质体的蛋白质。Zhang等(2008)比较了‘Cabernet Sauvignon’品种的葡萄果实在果实成熟过程中质膜蛋白的变化。通过分析不同成熟阶段

的蛋白图谱变化,发现62个蛋白被鉴定为推测的质膜蛋白,包括ATP合酶、ABC转运和GTP结合蛋白等,这些蛋白分别参与了信号传导、代谢和蛋白合成等生理过程。葡萄果实成熟过程中,泛素蛋白水解酶(ubiquitin proteolysis)和细胞骨架蛋白(cytoskeleton proteins)上调表达,葡萄质膜的总蛋白含量下降,玉米素葡萄糖基转移酶(zeatin *O*-glucosyltransferase)的表达量变化最大,而泛素连接酶(ubiquitin-conjugating enzyme)则下调表达。

线粒体是真核细胞非常重要的细胞器,在细胞的整个生命活动中起着非常关键的作用。线粒体的蛋白质参与机体许多生理、病理过程,如ATP的合成、脂肪酸代谢、三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化过程。Qin等(2009)研究了苹果果实成熟衰老过程中的线粒体蛋白质组学。结果发现差异表达的线粒体蛋白参与了果实衰老过程中的三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化等生理过程。降低环境中的氧浓度可以显著减少线粒体蛋白的变化。将苹果果实置于100%高氧环境中,发现抗氧化酶(manganese superoxide dismutase)的活力下降,一种变性蛋白(羰基化氧化蛋白)表达量上升。由此可以看出活性氧可以改变特定线粒体蛋白质的表达从而调节果实的衰老。

色素细胞(chromatophores)在果实的成熟过程中发挥着重要作用,是果实中色素物质聚集的场所,可以通过研究色素细胞的变化解释果实的成熟机理。Barsan等(2010)研究了番茄果实中色素细胞的蛋白质组学,结果表明色素细胞的电泳图谱中共有988个蛋白,由802个基因编码。在色素细胞的这些蛋白点中,包括参与脂质香气物质合成的脂氧合酶途径的所有蛋白、参与淀粉合成和降解的蛋白、参与卡尔文循环和参与磷酸戊糖途径的蛋白,但是缺少叶绿素合成的蛋白,关于类囊体传递机制的蛋白也未检测到。这些结果与已有的生理生化资料结合,为研究番茄色素细胞的代谢途径提供了新的思路。

2.2 果实抗病性机制研究

果实自采后脱离母体就逐步走向衰老和死亡,经历着机体生理生化衰老、防御机制削弱以及病原菌侵染等变化过程,研究果实的抗病性为防治果实病害开辟了广阔的应用前景(田世平和产祝龙

2004)。许多生物因子和非生物因子可以诱导果实产生抗病性,如拮抗菌、病原菌及其分泌物、菌丝体提取物、水杨酸、草酸和茉莉酸等。利用蛋白质组学可以了解果实响应生物和非生物因子诱导时具有差异表达的蛋白的变化,进一步了解病原菌与果实之间的相互关系。

Chan等(2007)利用蛋白质组学的方法研究了桃果实对水杨酸和拮抗酵母的抗病性应答机理,结果发现与代谢、防御反应、转录、能量途径以及细胞结构相关的蛋白参与了两者的调控,生物和非生物激发子处理采后果实都可以激活抗氧化蛋白(谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和蛋氨酸亚砷还原酶等)以及病程相关蛋白(pathology related protein, PR-protein),这些蛋白最终诱导果实产生抗病性。产祝龙(2006)研究了不同成熟期的甜樱桃对水杨酸诱导的抗病性机理,利用蛋白质组学的方法鉴定出4个与果实抗病性相关的蛋白(temperature-induced lipocalin、过氧化物酶、过氧化氢酶和PR-protein),结果表明成熟度较低的果实对水杨酸较敏感,诱导抗病性蛋白快速表达,很快建立其自身的防御体系;而成熟度高的果实,抗病性蛋白的表达差异较小,对水杨酸的反应较弱。Wang等(2009)利用5 mmol·L⁻¹草酸处理冬枣果实,通过双向电泳和串联质谱分析(ESI-Q-TOF-MS/MS)发现草酸处理组和对照组有25个蛋白差异表达,其中乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)和ACC合成酶被显著抑制,降低了乙醇的含量,减少乙烯的合成,草酸诱导了防御蛋白和光合作用相关蛋白的表达,延缓了冬枣果实的衰老,增加果实对青霉菌的抗性。Afroz等(2009)研究了抗病能力不同品种的番茄在细菌性萎蔫病后的蛋白特异性表达,结果表明参与能量代谢、蛋白命运和防御的三类蛋白出现差异表达,其中一个60 kDa的分子伴侣和顶端膜抗原(apical membrane antigen)在抗病能力强的番茄中大量上调表达,用茉莉酸和水杨酸处理后,顶端膜抗原和蛋白质二硫异构酶出现了不同的表达,因此推测顶端膜抗原在番茄的诱导抗病性中发挥着重要作用。

青霉菌是苹果、桃、梨和樱桃等果实青霉病的主要致病菌之一,研究青霉菌的毒性以及外界对其毒性的影响可以为果实腐烂的防治提供理论

依据。Qin等(2007)研究了青霉菌细胞内外的蛋白图谱以及硼酸盐对其的响应,结果发现细胞内的特异性表达蛋白主要是防御蛋白(谷胱甘肽转移酶、过氧化氢酶以及热激蛋白等)和基础代谢类蛋白(3-磷酸甘油醛脱氢酶、精氨酸酶和二羟基丙酮酸脱水酶);硼酸盐处理后,抗氧化酶类(谷胱甘肽转移酶和过氧化氢酶)下调表达,活性氧大量产生,从蛋白水平证明谷胱甘肽转移酶和抗坏血酸氧化酶是清除活性氧的主要酶类;细胞外发现的有毒分泌蛋白在硼酸盐存在时下调表达,而且毒性也有所降低。由此可以推论,硼酸盐对青霉菌的生长和毒性有很好的抑制作用,可在生产实践中应用硼酸盐来防治果实的青霉病。

2.3 采后处理对果实成熟调控机制研究

适当的采后处理可以延长果实的贮藏时间,保持果实的品质,延缓其衰老。由于采后处理对果实成熟过程的调控机理仍不清楚,大大限制这些处理方法的利用和发展。利用蛋白质组学技术来研究果实采后处理后蛋白差异表达,以期从蛋白水平解释采后处理对果实成熟衰老的调控机理,为开发采后果实的保鲜技术提供理论支持。

热处理是一种安全有效的采后处理方法,可以延缓果实衰老,维持果实品质,在发达国家已经应用于商业生产(Paull和Chen 2000)。Lara等(2009)研究了39 °C热空气处理3 d后的桃果实的蛋白表达差异,研究表明受热处理调控的差异蛋白主要参与胁迫反应和防御、细胞骨架结构、基础代谢、转录和翻译调控以及蛋白质的贮藏和分解代谢。热处理诱导了抗氧化和抗胁迫蛋白(热激蛋白、病程相关蛋白、脱水蛋白和半胱氨酸蛋白酶),抑制了多酚氧化酶(PPO)的表达,从而减缓桃果实冷害的发生,延长了贮藏期。Zhang等(2011)将桃果实放在48 °C热水中浸泡10 min后贮藏于室温条件下发现,热处理组和对照组共有30个蛋白达到2倍的差异表达,经鉴定这些蛋白主要参与了胁迫反应和防御(43%)、细胞结构(17%)、蛋白代谢(13%)、能量和代谢(7%)、成熟衰老(3%),还有17%为功能未知。其中热处理诱导了两个分子量分别为17.7 kDa和17.4 kDa的小分子热激蛋白(mHSP)和18.4 kDa的应激蛋白(universal stress protein),参与抗坏血酸-谷胱甘肽循环的两个重要酶

类抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase)和双脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase)的表达,有效降低了活性氧的含量,抑制了糖酵解过程的酶类(ATP synthase subunit delta和D-3-phosphoglycerate dehydrogenase)和成熟相关蛋白(abscisic stress ripening protein)的表达,由此从蛋白水平部分解释了热处理可以延缓果实衰老,维持果实品质的生化机理。

果实贮藏过程中,涂膜和气调等方式使得果实处于缺氧或无氧状态,导致厌氧呼吸的增加和风味物质的丧失。Shi等(2008)研究了柑橘和葡萄在无氧胁迫下蛋白表达的变化,鉴定出了33个厌氧蛋白,这些蛋白在葡萄和柑橘果肉中表达有差异,在柑橘的全果肉、汁胞和果皮中的表达也各不相同。无氧环境导致葡萄果实产生的差异蛋白数明显小于柑橘,表明无氧条件对葡萄果实的影响小于柑橘。两类果实的外皮中,差异表达的蛋白中最多的是参与细胞防御的胁迫反应的蛋白,包括脱水蛋白(dehydrins)、抗氧化蛋白(APX和SOD)、脂氧合酶(LOX)和植物凝集素蛋白(lectin-related proteins)等;两类果实的果肉中,差异表达的厌氧蛋白主要参与能量产生、细胞循环、DNA合成以及蛋白合成。以上结果提示,不同品种和不同组织器官在无氧条件下的响应机制不同。

2.4 采后处理对果实冷害调控机制研究

低温贮藏是果实采后最主要的保鲜技术之一,已经被应用于果实的生产和运输,但果实在不适当的低温下会发生冷害,导致品质劣变,这对于冷敏性果实尤其重要,因而研究果实冷害机理以及发现抗冷性相关的蛋白对果实采后生产实践具有重要意义。有研究发现细胞膜的稳定性特别是细胞膜中不饱和脂肪酸含量和比例与果实的抗冷性有很大关系(Zhang和Tian 2009)。Zhang等(2010)将桃果实分别贮藏在0 °C和5 °C低温条件下,结果发现在5 °C贮藏21 d后,桃果实出现严重的冷害现象,经过分析两种贮藏条件下蛋白差异表达情况,发现共有44个差异点,经过质谱鉴定,这44个蛋白分别参与了能量与代谢、防御、蛋白代谢和贮藏、转录调节、细胞结构与生长等生理过程,其中与细胞膜稳定性关系密切的蛋白如烯醇酶(enolase)、主要抗原Pru p 1 (major allergen Pru p 1)、

temperature-induced lipocalin和typeII SK2 dehydrin等在0 °C贮藏21 d后出现上调表达,从而保持了细胞膜的稳定性;而与酚类物质代谢相关的蛋白(多酚氧化酶)在5 °C条件下上调表达,导致了果肉的褐变,以上结果可以部分解释桃果实5 °C比0 °C下更容易发生冷害的原因。Page等(2010)研究了近等基因系质地不同表型的两个品种的番茄分别在4 °C和20 °C贮藏后蛋白的差异表达,结果发现硬度大品种的果实采后对低温最敏感,硬度下降最快。经双向电泳和质谱分析后发现85个差异蛋白受温度和品种的调控,低温抑制了成熟相关蛋白的表达,酸性转化酶(acidic invertase)可能与多聚半乳糖醛酸酶的翻译后调节有关,小分子热激蛋白(mHSP)异构体和参与内质网胁迫防御蛋白与果实的抗冷性有关。Nilo等(2010)利用DIGE和LC-MS/MS技术鉴定出58个不同贮藏条件下桃果实在成熟和冷害过程中具有差异表达的蛋白,其中与成熟相关的蛋白包括内切多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲酯酶和ACC氧化酶,与冷害直接相关的蛋白包括脱水蛋白(dehydrin)和甜味蛋白(thaumatin),其他的差异蛋白分别参与了胁迫反应、细胞组成、碳水化合物代谢和信号传导等生理过程。

桃果实受到冷害的一个重要现象是果肉的絮败,Obenland等(2008)比较了桃果实对照和絮败组的蛋白表达差异,共鉴定出5个蛋白差异点,其中ACC氧化酶是乙烯合成的重要酶,在絮败组的桃果实中出现下调表达,而且絮败程度越高,ACC氧化酶表达越少,表明桃果实絮败与乙烯的生物合成有密切关系;热激蛋白在低温胁迫条件下被诱导表达,从而减少低温对果实的伤害;其他蛋白与果实的絮败没有直接的关系,但是在拟南芥的研究中发现磷酸甘油酸激酶作为糖酵解途径的重要酶类,在低温胁迫下出现诱导表达,增加体内的代谢,增强植物体在低温条件下的生存能力。

3 展望

目前,蛋白质组学应用于果实成熟衰老的研究处于起步阶段,重点在对果实成熟过程和采后处理后差异表达的蛋白进行鉴定,而在蛋白水平上对某些重要生理过程如乙烯的自我调控和信号传导、果实软化机理、呼吸代谢和膜脂过氧化等关键蛋白研究较少。另外,蛋白质组学的应用技

术主要以电泳技术和生物质谱结合为主(表1),但由于双向电泳技术和质谱检测的灵敏度等因素的限制,使得基于电泳技术的分离作用有限。

蛋白质组学在果实成熟衰老方面的研究,今后应着重加强利用非电泳技术如高效液相层析、多维蛋白质鉴定技术和同位素标记定量蛋白质组学等现代分离技术实现亚细胞蛋白质组学和定量蛋白质组学的研究,并分析蛋白间的相互作用、蛋白质翻译后磷酸化、糖基化和烷基化等及与果实成熟衰老的相关性;同时,积极探索利用生物信息学的技术,将蛋白质组学与转录组学和代谢组学有机结合,以期更全面和系统地阐述果实成熟衰老过程中各个生理生化过程的关系及相关的分子机理。

参考文献

- 产祝龙(2006). 果实对酵母拮抗菌和外源水杨酸诱导的抗病性应答机理[博士论文]. 北京: 中国科学院研究生院
- 金良, 陈尚武, 马会勤(2010). 葡萄蛋白质组学研究进展. 中国生物工程杂志, 30 (10): 100~107
- 卢丞文, 潘晓琪, 田慧琴, 罗云波, 朱本忠(2010). 番茄果实中蛋白质的提取和双向电泳条件的优化. 食品科技, 35 (10): 196~200
- 田世平, 产祝龙(2004). 诱导抗性在果蔬采后病害防治中的研究与应用. 植物病理学报, 34 (5): 385~394
- 王海玲, 池旭娟, 阚雪芹, 方向明, 刘艳艳, 谈建中(2009). 桑椹与叶片蛋白质双向电泳样品制备方法的比较试验. 蚕业科学, 35 (4): 847~850
- 王清, 产祝龙, 秦国政, 田世平(2009). 果实蛋白质组学研究的实验方法. 植物学报, 44 (1): 109~118
- 王一鸣, 花宝光, 王有年, 孟海玲(2007). 桃果实蛋白质双向电泳影响因素的研究. 园艺学报, 34 (6): 244~249
- 吴满成, 胡海涛, 余有见, 孙娜, 杨玲(2009). 牛奶子果实中蛋白质的提取和双向电泳分析方法的改良. 植物生理学通讯, 45 (7): 695~698
- 张鹏(2009). 黄瓜果实弯曲性QTL定位及蛋白质组差异研究[博士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学
- 钟凤林(2009). 琯溪蜜柚汁胞发育过程的差异蛋白质组学研究[博士论文]. 福州: 福建农林大学
- 朱昀昊, 陈绍宁, 胡秀丽, 叶永忠, 王伟(2009). 植物细胞壁蛋白质提取方法的改进. 河南农业大学学报, 43 (5): 557~559
- Abdi N, Holford P, McGlasson B (2002). Application of two-dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit. *Postharvest Biol Technol*, 26 (1): 1~13
- Afroz A, Khan MR, Ahsan N, Komatsu S (2009). Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. *Peptides*, 30 (9): 1600~1607
- Alm R, Ekefjård A, Krogh M, Häkkinen J, Emanuelsson C (2007). Proteomic variation is as large within as between strawberry va-

- rieties. *J Proteome Res*, 6: 3011–3020
- Barraclough D, Obenland D, Laing W, Carroll T (2004). A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples. *Postharvest Biol Technol*, 32 (2): 175–181
- Barsan C, Sanchez-Bel P, Rombaldi C, Egea I, Rossignol M, Kuntz M, Zouine M, Latche A, Bouzayen M, Pech JC (2010). Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J Exp Bot*, 61 (9): 2413–2431
- Bianco L, Lopez L, Scalone AG, Di Carli M, Desiderio A, Benvenuto E, Perrotta G (2009). Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. *J Proteomics*, 72 (4): 586–607
- Chan ZL, Qin GZ, Xu XB, Li BQ, Tian SP (2007). Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. *J Proteome Res*, 6 (5): 1677–1688
- Deytieu C, Geny L, Lapaillerie D, Claverol S, Bonneau M, Donèche B (2007). Proteome analysis of grape skins during ripening. *J Exp Bot*, 58: 1851–1862
- Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, Negroni L, Sommerer N, Causse M (2007). Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiol*, 143 (3): 1327–1346
- Ganesh KA, Masami Y, Yumiko I, Hitoshi I, Randeep R (2005). System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part II: Proteomes of the complex developmental stages. *J Chromatogr B*, 815: 125–136
- Guarino C, De Simone L, Santoro S (2007). Proteome of *Malus domestica* Borkh. cv. Annurca. *Acta Hort*, 763: 223–229
- Jorrín-Novo JV, Maldonado AM, Echevarría-Zomeño S, Villedor L, Castillejo MA, Curto M, Valero J, Sghaier B, Donoso G, Redondo I (2009). Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *J Proteomics*, 72 (3): 285–314
- Katz E, Fon M, Lee YJ, Phinney BS, Sadka A, Blumwald E (2007). The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta*, 226 (4): 989–1005
- Lara MV, Borsani J, Budde CO, Lauxmann MA, Lombardo VA, Murray R, Andreo CS, Drincovich MF (2009). Biochemical and proteomic analysis of ‘Dixiland’ peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. *J Exp Bot*, 60 (15): 4315–4333
- Muccilli V, Licciardello C, Fontanini D, Russo MP, Cunsolo V, Saletti R, Recupero GR, Foti S (2009). Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *J Proteomics*, 73 (1): 134–152
- Negri AS, Prinsi B, Rossoni M, Failla O, Scienza A, Cocucci M, Espen L (2008a). Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics*, 9: 378
- Negri AS, Prinsi B, Scienza A, Morgutti S, Cocucci M, Espen L (2008b). Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods. *J Plant Physiol*, 165 (13): 1379–1389
- Nilo R, Saffie C, Lilley K, Baeza-Yates R, Cambiazo V, Campos-Varga R, González M, Meisel L, Retamales J, Silva H, Orellana A (2010). Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). *BMC Genomics*, 11: 43
- Obenland DM, Vensel WH, Hurkman WJ (2008). Alterations in protein expression associated with the development of mealiness in peaches. *J Hort Sci Biotech*, 83 (1): 85–93
- Page D, Gouble B, Valot B, Bouchet JP, Callot C, Kretschmar A, Causse M, Renard CMCG, Faurobert M (2010). Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage. *Planta*, 232 (2): 483–500
- Palma JM, Corpas FJ, del Río LA (2011). Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *J Proteomics*, 74: 1230–1243
- Patton WF (1999). Proteome analysis. II. Protein subcellular redistribution: linking physiology to genomics via the proteome and separation technologies involved. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 722 (1-2): 203–223
- Paull RE, Chen N (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biol Technol*, 21 (1): 21–37
- Pellenc D, Schmitt E, Gallet O (2004). Purification of a plant cell wall fibronectin-like adhesion protein involved in plant response to salt stress. *Protein Expr Purif*, 34 (2): 208–214
- Pignataro V, Canton C, Spadafora A, Mazzuca S (2010). Proteome from lemon fruit flavedo reveals that this tissue produces high amounts of the Cit s1 germin-like isoforms. *J Agr Food Chem*, 58 (12): 7239–7244
- Prinsi B, Negri AS, Fedeli C, Morgutti S, Negrini N, Cocucci M, Espen L (2011). Peach fruit ripening: A proteomic comparative analysis of the mesocarp of two cultivars with different flesh firmness at two ripening stages. *Phytochemistry*, 72 (10): 1251–1262
- Qin GZ, Tian SP, Chan ZL, Li BQ (2007). Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*: analysis based on proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*, 6 (3): 425–438
- Qin GZ, Wang Q, Liu J, Li BQ, Tian SP (2009). Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during fruit senescence. *Proteomics*, 9 (17): 4241–4253
- Rocco M, D’Ambrosio C, Arena S, Faurobert M, Scaloni A, Marra M (2006). Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. *Proteomics*, 6 (13): 3781–3791
- Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jah0.n MM, Saravanan RS (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J*, 39 (5): 715–733
- Shi JX, Chen S, Gollop N, Goren R, Goldschmidt EE, Porat R (2008). Effects of anaerobic stress on the proteome of citrus fruit. *Plant Sci*, 175 (4): 478–486
- Trainotti L, Bonghi C, Ziliotto F, Zanin D, Rasori A, Casadoro G, Ramina A, Tonutti P (2006). The use of microarray μ PEACH1.0 to investigate transcriptome changes during transition from pre-climacteric to climacteric phase in peach fruit. *Plant Sci*, 170 (3):

606~613

- Vincent D, Wheatley MD, Cramer GR (2006). Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters. *Electrophoresis*, 27: 1853~1865
- Wang Q, Lai TF, Qin GZ, Tian SP (2009). Response of jujube fruits to exogenous oxalic acid treatment based on proteomic analysis. *Plant Cell Physiol*, 50 (2): 230~242
- Wang W, Scali M, Vignani R (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compound. *Electrophoresis*, 24: 2369~2375
- Zhang C, Tian S (2009). Crucial contribution of membrane lipids' unsaturation to acquisition of chilling-tolerance in peach fruit stored at 0 °C. *Food Chem*, 115 (2): 405~411
- Zhang CF, Ding ZS, Xu XB, Wang Q, Qin GZ, Tian SP (2010). Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. *Amino Acids*, 39 (1): 181~194
- Zhang JW, Ma HQ, Feng JD, Zeng L, Wang Z, Chen SW (2008). Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. *J Exp Bot*, 59 (11): 2979~2990
- Zhang L, Yu Z, Jiang L, Jiang J, Luo H, Fu L (2011). Effect of post-harvest heat treatment on proteome change of peach fruit during ripening. *J Proteomics*, 74: 1135~1149
- Ziosi V, Scaramagli S, Bregoli AM, Biondi S, Torrigiani P (2003). Peach (*Prunus persica* L.) fruit growth and ripening: transcript levels and activity of polyamine biosynthetic enzymes in the mesocarp. *J Plant Physiol*, 160 (9): 1109~1115