

野生大豆与栽培大豆种子差异蛋白质组学研究*

李春梅 杨守萍 盖钧镒 喻德跃**

(南京农业大学大豆研究所, 国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要 运用蛋白质组学方法比较研究 3 个野生大豆 (*Glycine soja*) 和 3 个栽培大豆 (*Glycine max*) 的种子贮藏蛋白差异情况。结果发现, 在考马斯亮蓝染色的双向电泳 pH 4~7 的胶上, 经过 PDQuest 图像分析软件平均可检测到 550 个左右的蛋白质点。进一步分析发现, 表达量变化 2.5 倍以上的点有 10 个, 其中大部分蛋白质仅在栽培大豆中检测到。对这 10 个蛋白质点进行了胶内酶解, 用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱测定均得到了肽质量指纹图谱。搜索大豆 UniGene 库和 NCBI 库共鉴定出 5 个蛋白质, 主要是与大豆抗性、抗营养以及种子萌发相关的蛋白质, 包括大豆血凝素, 种子成熟蛋白 PM24, 糖结合蛋白, 胰蛋白酶抑制剂 p20 以及成熟多肽。对这些蛋白质可能的作用进行了讨论。

关键词 栽培大豆, 野生大豆, 蛋白质组, 双向电泳, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

学科分类号 Q51, Q946

野生种和近缘种是植物种质资源的重要组成部分。野生种及近缘种由于承受独特的环境压力, 其遗传多样性多大于栽培品种, 因而是作物改良中的重要基因来源。大豆起源于我国, 是重要的粮油兼用作物。主要包括栽培大豆(*Glycine max* (L.) Merr.) 和一年生野生大豆(*Glycine soja* Sieb. et Zucc) 2 个种, 二者构成大豆的初级基因库^[1]。与栽培大豆相比, 野生大豆拥有栽培种所缺乏的、具有潜在应用价值的丰富变异^[2]。

野生大豆仅分布于东亚的中国、朝鲜、日本以及俄罗斯远东^[3], 以我国分布最广, 占 90%, 而且种群大, 类型也极为丰富, 具有进化程度不同的类型。而我国栽培大豆资源数目最大, 类型也最为丰富。研究表明, 野生大豆种子的蛋白质含量高于栽培大豆, 如徐豹等^[4] (1984 年) 分析了中国不同地理来源的 1 695 份野生大豆和 1 635 份栽培大豆的蛋白质含量, 发现野生大豆的平均蛋白质含量为 (46.8±3.18)%, 最高达 55.37%, 而栽培大豆的平均蛋白质含量则为 (42.1±3.19)%。但目前对这种蛋白质差异的分子遗传基础仍然未知。

蛋白质组学 (proteomics) 技术为遗传分析 (如种内, 种间遗传差异) 提供了更准确的手段, 其核心技术包括双向电泳技术 (2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 和质谱技术 (mass spectrometry, MS)^[5]。前人已利用此技术获得了栽

培大豆种子的双向电泳图谱并建立了相应的蛋白质数据库^[6,7]。Natarajan 等^[8]利用蛋白质组学方法研究了一个野生大豆和一个栽培大豆种子在 7S 和 11S 蛋白质组成的差异, 但对野生大豆和栽培大豆种子间在其他蛋白质组成上的差异没有提供重要信息。

本研究以 3 个野生大豆 (ZYD4293, ZYD4152, 江浦野生豆 3) 和 3 个栽培大豆 (N2899, 贡豆 6, 南农 88-1) 为材料, 应用蛋白质组学方法在整体水平上比较了野生大豆和栽培大豆种子蛋白表达的差异, 并鉴定了除 7S 和 11S 组成以外的一些差异蛋白质, 从而有助于进一步了解野生大豆与栽培大豆种子蛋白之间的差异, 为鉴定野生大豆和栽培大豆的重要特异基因提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆种子 为野生大豆 (ZYD4293, ZYD4152, 江浦野生豆 3) 和栽培大豆 (贡豆 6, N2899, 南农 88-1), 由国家大豆改良中心种质资源研究室提供。

1.1.2 仪器与试剂。Bio-Rad IEF 等电聚焦仪、

* 国家重点基础研究发展计划 (973) 资助项目 (2004CB117206) 和国家高技术研究发展计划 (863) 资助项目 (2006AA10Z1C1)。

** 通讯联系人。Tel/Fax: 025-84396410, E-mail: dyu@njau.edu.cn

收稿日期: 2007-04-03, 接受日期: 2007-06-05

Amersham 电泳仪, IPG 预制胶条 pH 4~7 (Bio-Rad 公司)、尿素、硫脲、甘氨酸、三氨基甲烷、碘乙酰胺、低熔点琼脂糖、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫代苏糖醇(DTT)(AMRESO 分装), 载体两性电解质(pH 3~10)为 Bio-Rad 公司产品, 蛋白酶抑制剂为 Sigma 公司产品, 胰蛋白酶、 α -氨基-4-羟基肉桂酸(CCA)、三氟乙酸(TFA)为 Roche 公司产品, 三氯乙酸(TCA)、过硫酸铵等为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大豆种子可溶性蛋白 2-DE 样品的制备. 用 TCA 丙酮沉淀法, 参照徐晓燕等^[9]方法. 在制得的丙酮粉中加入蛋白质裂解缓冲液(7 mol/L 脲、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、2% 载体两性电解质 pH 3~10、0.1% 蛋白酶抑制剂)中溶解. 4℃ 搅拌摇床摇匀 2 h, 冰浴超声波处理 3 min, 离心, 取上清液, 即得蛋白质样品, Bradford^[10]法测定样品液中蛋白质的浓度后, 分装, -80℃ 冻存。

1.2.2 种子可溶性蛋白的 2-DE. 1mg 总蛋白与水化液(7 mol/L 脲、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、2% 载体两性电解质 pH 3~10、痕量溴酚蓝)充分混合, 上样总体积 350 μ l, 采用 pH 4~7, 17 cm 线性 IPG 预制胶条. 水化和聚焦在 18℃ 下自动进行, 在 50 V 电压水化 12 h 后, 经过 200 V 0.5 h、500 V 0.5 h、1 000 V 1 h、2 000 V 1 h、8 000 V 2 h 后, 稳定在 8 000 V 下进行 60 000 Vh. 聚焦完毕后, 胶条先在平衡液 I (0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 5% SDS, 1.5% DTT) 中在摇床上平衡 15 min, 再在平衡液 II (2.5% 碘乙酰胺替代 1.5% DTT, 其余组分同于平衡液 I) 中平衡 15 min. 然后在电极缓冲液(25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, pH 8.3)中进行第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度 12.5%。

1.2.3 考马斯亮蓝染色. 去离子水洗 3 次后, 12% TCA 固定 2 h. 去离子水洗 3 次, 20% 甲醇, 1.6% 磷酸, 8% 硫酸铵和 0.08% 考马斯亮蓝 - G250 染色 22 h, 去离子水漂洗脱色。

1.2.4 2-DE 图像分析. 凝胶用 Bio-Rad 公司 VersaDoc 3000 凝胶成像系统扫描并用 PDQuest 软件进行图像的分析处理, 包括背景消减、斑点检测、匹配、分子质量和等电点计算、获取斑点位置坐标及蛋白质质量值的标准化分析等。

1.2.5 差异表达蛋白质点的质谱分析及鉴定。

MALDI-TOF-MS 由上海基康生物技术有限公司分析. 仪器型号: Applied Biosystems Voyager DE Pro 飞行时间质谱分析仪 (ABI, 美国)。

a. 考染蛋白质点的胶内酶解 (In-Gel Digest/Extract Protocol). 挖下感兴趣的蛋白质点, 置于灭菌后的小管内, 同时切下空白胶块作对照. 用 50% 乙腈 (ACN) / 25 mmol/L 碳酸氢铵 (200 μ l, pH 8.0) 反复脱色, 每次 5 min, 至胶块为无色透明为止. 吸出清洗液, 将胶块浸入 100% ACN 中 5 min, 脱水, 胶块变白. 然后在真空干燥仪中室温抽干 15 min 左右, 至完全干燥. 加 20~25 μ l 25 mmol/L 碳酸氢铵, pH 8.0 溶液 (每毫升含 10~15 μ g Promega Sequencing Grade Modified Trypsin), 覆盖胶块, 等待吸胀 15 min 左右, 调整酶液 37℃ 反应 15 h 左右. 酶解后的肽片段用 50% 乙腈 (内含 0.5% TFA) 萃取 2 次, 合并萃取液, 冷冻干燥。

b. MALDI-TOF-MS 肽质量指纹分析. 样品脱盐后, 如待分析样品浓度 > 0.1 μ mol/L, 使用点渍法将样品与基质 (新鲜配制 10 g/L 的 α -氰基-4-羟基肉桂酸) 等体积于点样板上混合, 风干后准备进板. 最后将靶装入质谱仪进行分析, 仪器相应的参数为反射模式、氮激光 (337 nm, 0.5 ns pulse width, 20 Hz repetition rate), 离子延迟提取 100 ns, Grid voltage 70%, 真空度为 4e-008, 质谱信号的单次扫描累加 200 次, 正离子谱测定。

c. 质谱数据的数据库搜索. 获得的混合物肽片段数据用 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.html>) 搜索大豆的 UniGene 数据库 [DA_UniGene_Gma.2005.03.0, <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene>], 以及 Mascot (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF) 搜索 NCBI 数据库 [Viridiplantae (Green Plants)]. 搜索参数为: Trypsin、carbamidomethylation of Cys、oxidation of Met、Monoisotopic、0.2 Da Peptide mass tolerance、1 + Peptide charge state、1 Max missed cleavage Sequence coverage > 10%, 至少有 4 个肽片段匹配, 鉴定出蛋白的 MOWSE 值参照 Hajdich 等^[7]。

2 结果与分析

2.1 野生大豆与栽培大豆种子蛋白的双向电泳图谱分析

通过双向电泳技术得到野生大豆和栽培大豆种子蛋白的 2-DE 电泳图谱 (图 1)。

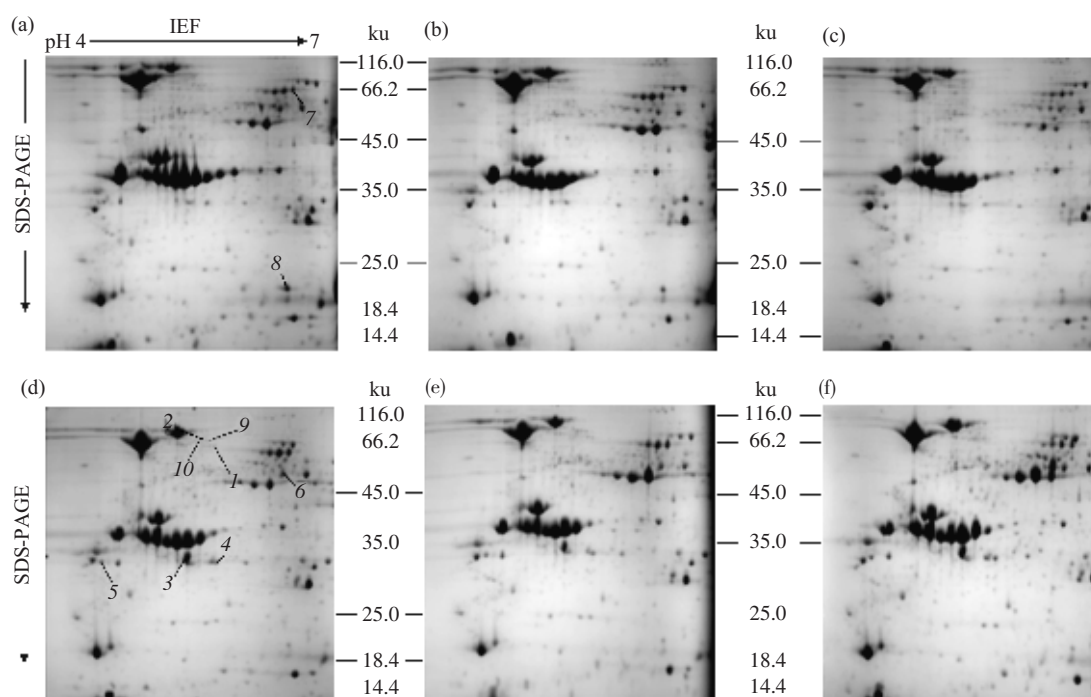


Fig. 1 2-DE maps of seed proteins from wild (*G. soja*) and cultivated (*G. max*) soybeans. The first dimension was run using a pH gradient from 4 to 7, and the second dimension was a 12% SDS-PAGE

(a),(b),(c),(d),(e),(f) corresponding to ZYD4293, ZYD4152, Jiangpuyeshengdou 3, Gongdou6, N2899, Nannong88-1. 1~10 indicating selected protein spots.

PDQuest 软件分析发现, 在 pH 4~7, 分子量 10~116 k_u 范围内, 经过 3 次重复, 在野生大豆(ZYD4293、ZYD4152、江浦野生豆 3)和栽培大豆(贡豆 6、N2899、南农 88-1)的 2-DE 图谱上平均检测到 557、448、553、629、579、575 个蛋白质点. PDQuest 软件分析栽培大豆贡豆 6 与 N2899 之间的蛋白质点相关系数(Correlation coefficient)为

0.803, 与南农 88-1 之间的蛋白质点相关系数为 0.842, 说明不同栽培大豆之间的主要蛋白质组成比较一致. 野生大豆江浦野生豆 3 与 ZYD4152 之间的蛋白质点相关系数为 0.806, 与 ZYD4293 之间的蛋白质点相关系数为 0.807, 说明不同野生大豆之间的主要蛋白质组成也比较一致.

2-DE 胶上单个蛋白质点的量被定义为构成这

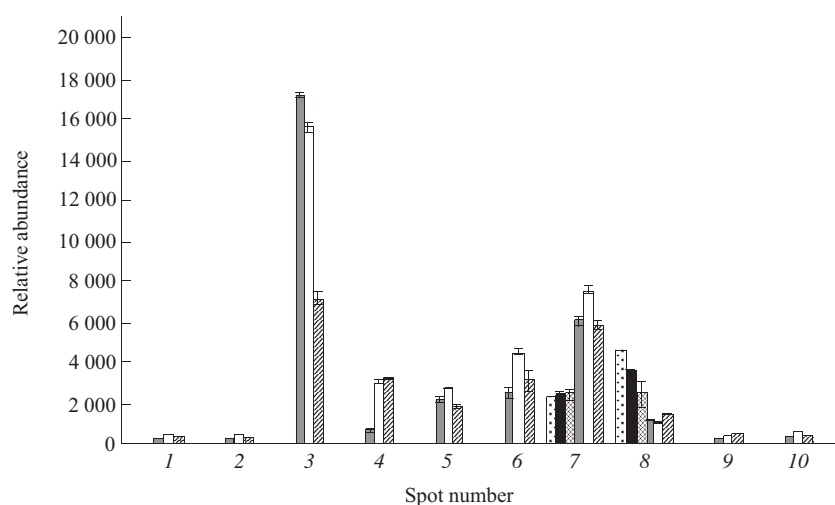


Fig. 2 Histograms showing the relative volume changes of 10 differentially displayed spots

□: ZYD4293; ■: ZYD4152; ▨: Jiangpuyeshengdou3; ▩: Gongdou6; □: N2899; ▨: Nannong88-1.

个点的所有像素强度值的总和，为了准确地反映蛋白质点量的变化，每个点的量均表示为相对的量，即一个蛋白质点的量占该胶内所有蛋白质点总量的比。PDQuest 软件分析各个蛋白质点相对量在野生豆和栽培豆中的差异表达，选取质量较好、重复性高、表达量变化超过 2.5 倍以上的蛋白质点 10 个做 MALDI-TOF-MS 分析。这些蛋白质点的相对丰度如图 2。

从图 2 可以看到，有 8 个蛋白质点 (spots 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10) 只在栽培大豆中检测到，而在野生大豆中未检测到。另 2 个蛋白质点 (spots 7, 8) 在栽培大豆和野生大豆中都能检测到，但 spot8 在野生大豆中表达量比较高，而 spot7 在

栽培大豆中表达量较高。

2.2 差异表达蛋白的 MALDI-TOF-MS 分析及数据库检索

将这 10 个蛋白质点挖点、脱色、还原、烷基化、胰酶酶解、萃取、脱盐后，MALDI-TOF-MS 分析，以基质峰、酶自动降解片段峰进行校正，去除角蛋白峰和胰酶自切峰，精确标定强度为基质峰强度 2 倍以上的峰，10 个点均获得肽质量指纹图谱(PMF)，图 3 是 Spot8 蛋白点 MAIDI-TOF-MS 分析得到的肽质量指纹图谱。PMF 数据用 MS-Fit 搜索大豆 UniGene 库，以及 Mascot 搜索 NCBI 库，初步鉴定出 5 个大豆蛋白和一个未知蛋白，鉴定结果如表 1。

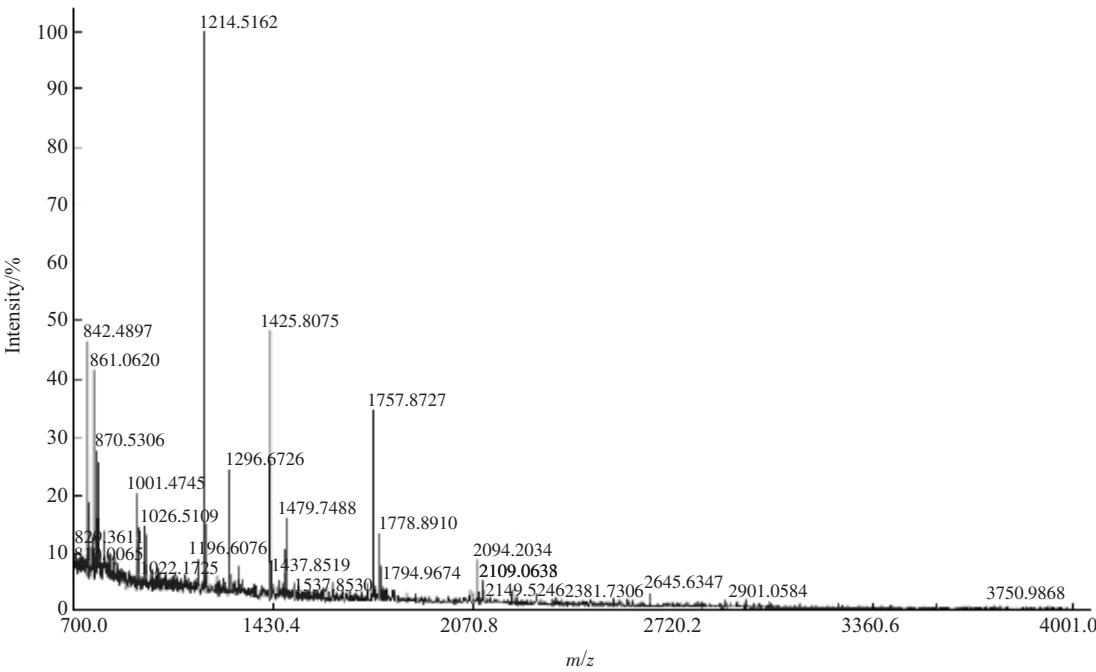


Fig. 3 A representative peptide mass fingerprinting of spot8

Table 1 Differentially-expressed proteins identified by PMF query

Spot No.	Sequence coverage/%	Theoretical M_r /pI	Experimental M_r /pI	Accession No.	Protein name
3	11	23.6/5.12	33.4/5.12	xp_465683	Hypothetical protein
4	41	27.5/5.15	32.4/5.88	gi 14719778	Chain A of soybean agglutinin
5	22	28.2/5.4	32.4/5.88	Gma.8529	Seed maturation protein PM24
6	18	50.6/6.33	55.3/6.62	gi 170010	Maturation polypeptide
7	12	60.4/6.42	62.6/6.49	gi 548900	Sucrose-binding protein precursor
8	41	18.1/6.19	21.7/6.44	Gma.1 0770	Trypsin inhibitor P20

3 讨 论

研究表明,野生大豆资源在改良栽培大豆中具有较大的应用潜力^[1].王转斌等^[12](2001年)将野生大豆DNA直接导入栽培大豆中,发现变异株中的蛋白质含量有所提高,而且有的变异株接近供体水平.鉴定野生大豆和栽培大豆中表达不同的蛋白质,是利用野生大豆来改良栽培大豆农艺性状和品质性状的一个途径,因此,我们利用蛋白质组学方法研究了野生大豆和栽培大豆种间的种子蛋白差异.

Natarajan等^[8]利用蛋白质组学方法研究了野生大豆PI 393551和栽培大豆PI 423954种子蛋白表达的差异,发现野生大豆的 β 伴大豆球蛋白的 α 亚基有7个点而栽培大豆中只有5个点.而在本研究中,我们发现野生豆ZYD4293的 β 伴大豆球蛋白的 α 亚基有7个点,而ZYD4152、江浦野生豆3与栽培大豆均只有5个点(未展示资料).鉴于本研究随机选取了3份野生大豆和3份栽培大豆,由此鉴定出来的野生大豆与栽培大豆之间的差异应具有代表性.

野生大豆是栽培大豆的祖先,具有抗逆性强、难于萌发等特点.图2中,10个蛋白质差异点在种间表达的差异,可能正是与野生大豆的这些特点有关.本研究对野生大豆与栽培大豆种子除7S和11S蛋白组成外的主要差异蛋白质点进行了分析,所鉴定的蛋白质主要与抗性、抗营养以及种子萌发相关,发现促进种子萌发的相关蛋白(spot6, spot7)在栽培大豆中表达较高,与抗逆性相关的蛋白质(spot8)在野生大豆中表达较高.

a. 与抗性、抗营养相关的蛋白质:种子成熟蛋白PM24、大豆凝集素和胰蛋白酶抑制剂p20的类似蛋白.

胚胎后期丰富蛋白(late embryogenesis abundant, LEA protein)具有的维持细胞脱水性可能与其结构上富含不带电荷的亲水氨基酸有关^[13].本研究的spot5被鉴定为种子成熟蛋白PM24,属于LEA蛋白V类^[14],但此类蛋白质较特殊,其亲水性以及热稳定性都很差^[15].该蛋白质在栽培大豆中表达量较高,而在野生豆中表达量较低,推测可能与野生豆的抗旱性较强有关^[16].

大豆凝集素是一种能与N-乙酰半乳糖胺/半乳糖特异性结合的糖蛋白,是大豆中储藏蛋白兼防御蛋白,主要存在于大豆种子中^[17].Spot4属于带

有红细胞抗原类似物的大豆外源凝集素,具有凝集动物红细胞和其他细胞的作用,在动物和人体内会引起一系列的抗营养作用,对动物和人类健康有一定的负面影响^[18, 19].不难发现,野生大豆中spot4的表达量明显低于栽培大豆,因此可以通过常规杂交方法降低栽培大豆中凝集素的表达量,达到改良栽培大豆营养价值的目的.

Spot8是类似于胰蛋白酶抑制剂p20的一种蛋白质,p20具有胰蛋白酶抑制剂的活性,可能属于大豆Kunitz型胰蛋白酶抑制剂的一个新的亚类^[20].蛋白酶抑制剂的功能是保护种子免受病菌和昆虫的干扰^[21],作为自身蛋白酶活性的调节因子^[22],在种子发育和萌发过程中调节蛋白酶的活性及作为贮藏蛋白为幼苗生长提供氮源和碳源^[23].野生大豆具有较强的抗逆性和适应能力,本研究中该蛋白质在野生大豆中的表达量高于栽培豆,是否与野生大豆的抗逆性及适应性有关还需进一步研究.

b. 与种子萌发相关的蛋白质:成熟多肽、糖结合蛋白前体.

Spot6是成熟多肽,编码PM2蛋白,是59 ku的LEA蛋白,属于LEA蛋白Ⅲ类^[14, 24].种子成熟蛋白可能是种子萌发以及幼苗生长所必需的^[25].本研究中,该蛋白在栽培大豆中有所表达,而在野生大豆中未检测到,可能与栽培大豆种子易于萌发有关^[26].

糖结合蛋白前体(sucrose-binding protein precursor)的功能和糖结合蛋白相似,有助于提高糖的吸收,是蔗糖转运途径的重要组成部分^[27~29].蔗糖作为可溶性的单糖,既可运输到胚部为合成新的细胞和细胞器提供结构物质,又可以作为种子呼吸作用的底物,为种子萌发提供能量.试验证明,野生大豆种子萌发出土较栽培大豆慢^[26].Spot7在野生大豆中表达量低,而在栽培大豆中高,可能在促进种子的萌发方面起着一定的作用.

Spot3在栽培豆中大量表达而在野生豆中未检测到,但通过数据检索其为一未知蛋白质,目前尚不了解此蛋白质的功能,有待后续进一步研究证明.

总之,今后将结合更多的技术如串联质谱(MS/MS)、Edman降解测序等鉴定出更多的蛋白质及相关基因,进一步研究野生大豆和栽培大豆之间的差异,为大豆种子性状的改良提供有价值的基因来源并为大豆的进化研究提供理论依据.

参 考 文 献

- Singh R J, Hymowitz T. Soybean genetic resources and crop improvement. *Genome*, 1999, **42** (4): 605~616
- Doyle J J, Doyle J L. Ribosomal gene variation in soybean (*Glycine*) and its relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 1985, **70** (4): 369~374
- Hymowitz T, Singh R J, Kolopara K P. The genomes of the *Glycine*. *Plant Breeding Review*, 1999, **16** (8): 289~317
- 徐 豹, 郑惠玉, 吕景良, 等. 中国大豆的蛋白质资源. *大豆科学*, 1984, **4**: 237~331
Xu B, Zheng H Y, LU J L, *et al.* *Soybean Science*, 1984, **4**: 237~331
- Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2002, **2** (1): 3~10
- Mooney B P, Thelen J J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry*, 2004, **65** (12): 1733~1744
- Hajdich M, Ganapathy A, Stein J W, *et al.* A Systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiology*, 2005, **137** (4): 1397~1419
- Natarajan S S, Xu C, Bae H, *et al.* Characterization of storage protein in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomics analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54** (8): 3114~3120
- 徐晓燕, 郑 蕊, 李春梅, 等. 大豆种子萌发过程中的差异蛋白质组研究. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33** (11): 1106~1112
Xu X Y, Zheng R, Li C M, *et al.* *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, **33** (11): 1106~1112
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, 1976, **72** (1): 248~254
- 杨光宇, 王 洋, 马晓萍, 等. 野生大豆种质资源评价与利用研究进展. *吉林农业科学*, 2005, **30** (2): 61~63
Yang G Y, Wang Y, Ma X P, *et al.* *Journal of Jilin Agriculture Sciences*, 2005, **30** (2): 61~63
- 王转斌. 将杨树和野生大豆 DNA 直接导入栽培大豆的研究. *东北林业大学学报*, 2001, **29** (3): 93~94
Wang Z B. *Journal of Northeast Forestry University*, 2001, **29** (3): 93~94
- 何军贤, 傅家瑞. 种子 Lea 蛋白的研究进展. *植物生理学通讯*, 1996, **32** (4): 241~246
He J X, Fu J R. *Plant Physiology Communications*, 1996, **32** (4): 241~246
- Boudet J, Buitink J, Folkert A, *et al.* Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, 2006, **140**: 1418~1436
- Cuming A C. LEA proteins. In: Shewry P R, Casey R, eds. *Seed Proteins*. UK: Kluwer Academic Publishers, 1999, 753~780
- 刘学义, 史 宏. 野生大豆抗旱性鉴定及研究. *大豆科学*, 2003, **22** (4): 264~268
Liu X Y, Shi H. *Soybean Science*, 2003, **22** (4): 264~268
- Liener E, Pallansch M J. Purification of a toxic substance from the defatted soybean flour. *Biological Chemistry*, 1952, **197** (1): 29~36
- Jordinson M, Beales I L, Calam J. Soybean agglutinin stimulated cholecystokinin release from cultured rabbit jejunal cells requires calcium influx *via* L type calcium channels. *Peptides*, 1998, **19** (9): 1541~1547
- Pusztai A, Even S W B, Grant G, *et al.* Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*, 1990, **46** (2): 308~316
- Yoshiyuki A, Akihito M, Yukari T, *et al.* Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding a 20-kDa protein with trypsin inhibitory activity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, **64** (6): 1305~1309
- Ryan C A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1990, **28** (4): 425~449
- Baumgartner B, Chrispeels M J. Purification and characterization of vicilin peptidohydrolase, the major endopeptidase in the cotyledons of mung-bean seedling. *European Journal of Biochemistry*, 1997, **77** (2): 223~233
- Richardson M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Rogers L, ed. *Methods in Plant Biochemistry*. New York: Academic Press, 1991. 259~305
- Hsing Y C, Chen Z, Chow T Y. Nucleotide sequences of a soybean complementary DNA encoding a 50-kilodalton late embryogenesis abundant protein. *Plant Physiology*, 1992, **99** (1): 354~355
- Hsing Y C, Chen Z, Shih M, *et al.* Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. *Plant Molecular Biology*, 1995, **29** (4): 863~868
- Boerma H R, Specht J E. *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*. 3rd. Madison: Wisconsin, USA, 2004. 303~396
- Grimes H D, Overvoorde P J, Ripp K, *et al.* A 62-KD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. *The Plant Cell*, 1992, **12** (4): 1561~1574
- Tegeder M, Wang X D, Frommer W B, *et al.* Sucrose transport into developing seeds of *Pisium sativum* L. *The Plant Journal*, 1999, **18** (2): 151~161
- Pedra J H F, Delu-Filho N, Pirovani C P, *et al.* Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. *Plant Science*, 2000, **152** (1): 87~99

Comparative Proteomic Analysis of Wild (*Glycine soja*) and Cultivated (*Glycine max*) Soybean Seeds*

LI Chun-Mei, YANG Shou-Ping, GAI Jun-Yi, YU De-Yue**

(Nanjing Agricultural University, Soybean Research Institute, National Center for Soybean Improvement, and National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract A proteomics approach was applied to analyze differential expression of proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) with immobilized pH gradient (IPG, ranges 4~7) strips was used to separate proteins. On the 2-DE gels stained by Coomassie brilliant blue, PDQuest image software detected about 550 protein spots, of which 10 spots show more than 2.5-fold changes in abundance between wild and cultivated soybeans. These 10 proteins treated by tryptic in-gel digestion were characterized by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and peptide mass finger printings of all were obtained. Soybean UniGene database and NCBI were used to identify proteins, of which 5 proteins were identified. They were soybean agglutinin, seed maturation protein PM24, maturation polypeptide, sucrose-binding protein precursor and trypsin inhibitor p20. The potential functions of these identified proteins were discussed.

Key words soybean, *Glycine soja*, *Glycine max*, 2-DE, MALDI-TOF-MS

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2004CB117206) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA10Z1C1).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84396410, E-mail: dyu@njau.edu.cn

Received: April 3, 2007 Accepted: June 5, 2007