

大豆种子萌发过程中的差异蛋白质组研究*

徐晓燕¹⁾ 郑蕊^{1,2)} 李春梅¹⁾ 盖钧镒¹⁾ 喻德跃^{1)**}

(¹⁾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;

²⁾宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘要 运用蛋白质组学技术对大豆 (*Glycine max*) N2899 种子萌发 0 h、8 h、36 h、60 h 4 个时期蛋白质的差异表达情况进行了研究. 结果发现, 在考马斯亮蓝染色的双向电泳 pH3~10 胶上, PDQuest 图像分析软件可识别的点约 350 个, 其中表达量变化 2.5 倍以上的蛋白质点有 24 个, 而绝大部分大豆种子贮藏蛋白在萌发期尚未降解. 在萌发的第一阶段, 24 个差异表达蛋白中有 10 个蛋白质的丰度发生变化. 第二阶段, 差异表达蛋白的种类和量增加, 其中 15 个蛋白质是动态变化的, 14 个蛋白质在胚根突破种皮时表达量达到峰值, 表明吸胀后种子内的生命活动越来越强. 对这 24 个蛋白质点进行胶内酶解, 用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱测定均获得肽质量指纹图谱. 搜索大豆的 UniGene 库初步鉴定出 6 个蛋白质, 分别是核苷二磷酸激酶、热激蛋白、硫氧还蛋白、35 ku 种子成熟蛋白及种子成熟蛋白 PM36. 对这些蛋白质在种子萌发过程中可能的作用进行了讨论.

关键词 大豆, 种子萌发, 蛋白质组, 双向电泳, 基质辅助激光解吸飞行时间质谱

学科分类号 Q51

种子是由受精胚珠发育而来的, 种子内有能发育成完整植株的胚以及供胚发育所需的营养物质. 在适宜温度、水分和有氧条件下, 有活性的种子就可以萌发. 从狭义上讲, 萌发是指种子吸水后, 胚轴伸长胚根突破种皮^[1]. 萌发包括打破种子的休眠机制、引发种内的代谢、萌发时间的调控等一系列的生理过程, 这些过程是如何相互协调的, 还不甚清晰^[2]. 而蛋白质是生理功能的执行者, 研究种子在一定的温度湿度条件下萌发时期蛋白质的变化, 反映了基因组被激活时基因的表达情况, 也能反映种子内生理代谢从相对静止状态到活跃状态的转变, 对探讨萌发的机理及完善种子生物学研究有重要的意义.

蛋白质组学 (proteomics) 技术为研究这些动态变化的蛋白质提供了很好的手段, 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)^[3]. 该方法已被成功应用于豆科植物苜蓿和大豆种子发育的研究^[4,5]. 但尚未有应用于豆科植物种子萌发的研究报道, 目前仅在拟南芥、大麦、橡胶树种子等少数植物中有相关的报道^[6~8].

本研究以 N2899 大豆种子为研究材料, 从整体水平比较大豆种子不同萌发时期蛋白质表达的差

异, 并鉴定差异蛋白质, 从而有助于理解大豆种子萌发的分子机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆种子 N2899, 由国家大豆改良中心种质资源研究室提供.

1.1.2 主要试剂. 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、碘乙酰胺、二硫代苏糖醇 (DTT) 为 AMRESO 公司分装; IPG 预制胶条, 载体两性电解质 (pH 3~10) 等均为 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.

* 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2004CB117206, 2002CB111304), 国家自然科学基金重大项目 (30490250), 教育部跨世纪优秀人才基金资助.

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 025-84396410, E-mail: dyu@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-05-22, 接受日期: 2006-06-30

1.2 方法

1.2.1 不同萌发时期大豆种子样品的准备. 选取干燥度一致、饱满、种皮色泽正常的种子, 经 0.1% HgCl_2 溶液浸没消毒 2 min 后用纯水漂洗 6 次, 置于 18 ml 纯水、垫有双层 9 cm 定性滤纸的玻璃培养皿中, 每皿 30 粒, 盖上盖, 25℃ 恒温光照培养箱中避光发芽. 随机选取吸胀后 8 h、36 h、60 h 种子去皮, -80℃ 保存, 60 h 取胚根突破种皮 2~3 mm 的种子. 为了测定种子的鲜重和干重, 400 粒种子置于器皿中避光发芽, 在 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 分别随机取 10 粒种子, 以后每隔 12 h 取一次样, 直至萌发的种子不再增加为止. 样品称鲜重、干重, 同时统计发芽的种子数, 均重复 3 次.

1.2.2 大豆种子可溶性蛋白 2-DE 样品制备. 用 TCA 丙酮沉淀法, 参照郑蕊等^[9]方法. 在制得的 0 h (干种子)、8 h、36 h、60 h 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), 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 法^[10]测定样品液中蛋白质的浓度后, 分装, -80℃ 冻存.

1.2.3 大豆种子可溶性蛋白的 2-DE. 1 mg 总蛋白质与水化液 (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 μl , 采用 pH 3~10, 17 cm 线性 IPG 预制胶条. 水化和聚焦在 19℃ 自动进行, 水化在 50 V 电压下 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, 最后稳定在 8 000 V 下进行 50 000 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, 2% DTT) 中, 在摇床上平衡 15 min, 再在平衡液 II (2.5% 碘乙酰胺替代 2% DTT, 其余组分同平衡液 I) 中平衡 15 min. 然后进行第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度 12.5%.

1.2.4 考马斯亮蓝染色. 双蒸水洗后, 12% TCA 固定 2 h. 双蒸水洗, 20% 甲醇, 1.6% 磷酸, 8% 硫酸铵和 0.08% 考马斯亮蓝-G250 染色 16~24 h, 双蒸水漂洗脱色.

1.2.5 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.

1.2.6 差异表达蛋白点的质谱分析及鉴定.

MALDI-TOF-MS 由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所蛋白质组学研究中心分析.

a. 考马斯亮蓝染色蛋白质点的胶内酶解. 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. 用含 50% 乙腈的 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液脱色后, 加入含 10 mmol/L DTT 的 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液, 56℃ 还原 1 h, 再用含 50 mmol/L 碘乙酰胺的 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液于室温暗室中烷基化 40 min. 真空冷冻干燥后, 加入 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (每毫升含 12.5 μl 胰蛋白酶) 酶解, 37℃, 过夜. 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. 在样品中加入 5 μl 0.5% TCA 溶液, 用 ZipTipTM C₁₈ 器嘴脱盐后, 用饱和的基质溶液 (CCA) 与蛋白质样品溶液混合, 取 1 μl 点在靶体上, 做质谱分析. 采用线性模式, 离子源加速电压 20 kV, 反射电压 23 kV, 正离子反射检测, 质谱使用基质峰和胰蛋白酶自降解离子峰作为内部标准校正.

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/ucshtml4.0/msfit.htm>) 搜索大豆的 UniGene 数据库 [DA_UniGene_Gma.2005.03.02, <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene>]. 搜索参数为: Trypsin、carbamidomethylation of Cys、oxidation of Met、Monoisotopic、0.15Da Peptide mass tolerance、1+ Peptide charge state、1 Max missed cleavage. Sequence coverage > 10%, 至少有 4 个肽片段匹配, 鉴定出蛋白质的 MOWSE 值参照文献[5].

2 结果与分析

2.1 大豆种子萌发过程中含水量的变化

Bewley^[11]根据种子萌发过程含水量的变化, 将萌发过程分为三个阶段: 快速吸水期 (第一阶段); 缓慢吸水期 (第二阶段); 生长吸水期 (第三阶段), 此时胚根已突破种皮, 幼苗生长开始. 为了明确供试大豆品种 N2899 吸水 and 出芽规律, 优化萌发期蛋白质组研究的取样时期, 我们测定了多个时期种子的干重和湿重, 统计出芽率. 得到了 N2899 萌发过程中含水量与时间的关系 (图 1) 和萌发率与时间的关系 (图 2).

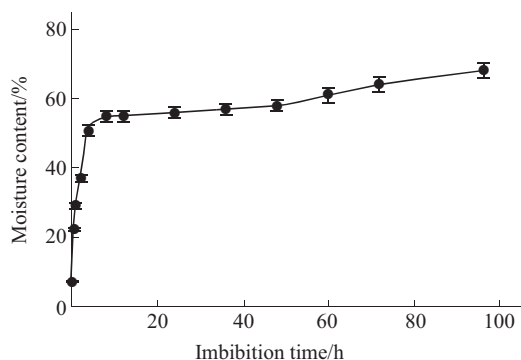


Fig. 1 Change of moisture content during soybean seed germination

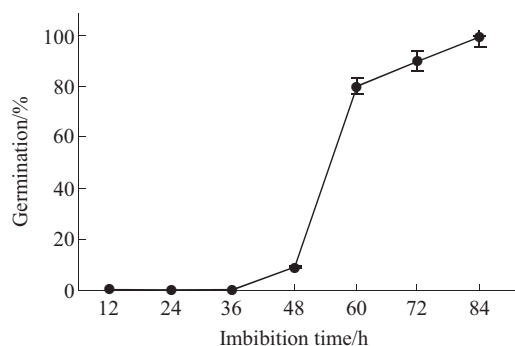


Fig. 2 Percentage of soybean seed germination

从图 1 我们可以看到种子萌发的三个阶段：第一阶段是从 0 h (干种子) 到 8 h, 种子的含水量快速增加, 第二阶段是从 8 h 到 60 h, 种子含水量缓慢增加, 幅度小, 含水量仅从 55% 增加到 61%. 第三阶段是 60 h 后, 表现为种子鲜重的持续增加. 其中种子发芽集中在 48~72 h 之间的, 占 81% (图 2), 表明种子出芽时间比较集中. 因此将 N2899 萌发过程中蛋白质的取样时间定为 0 h、8 h、36 h、60 h (图 3) 是合适的.



Fig. 3 Germinating soybean seeds at specific stage of 0 h、8 h、36 h and 60 h after imbibition

2.2 不同萌发时期种子差异蛋白质组分析

2.2.1 不同萌发期种子蛋白的双向电泳图谱分析.

通过双向电泳技术得到大豆种子吸胀后 0 h、8 h、36 h、60 h 的 2-DE 电泳图谱(图 4). PDQuest 软件分析发现, 在 pH 3~10, 分子质量 10~

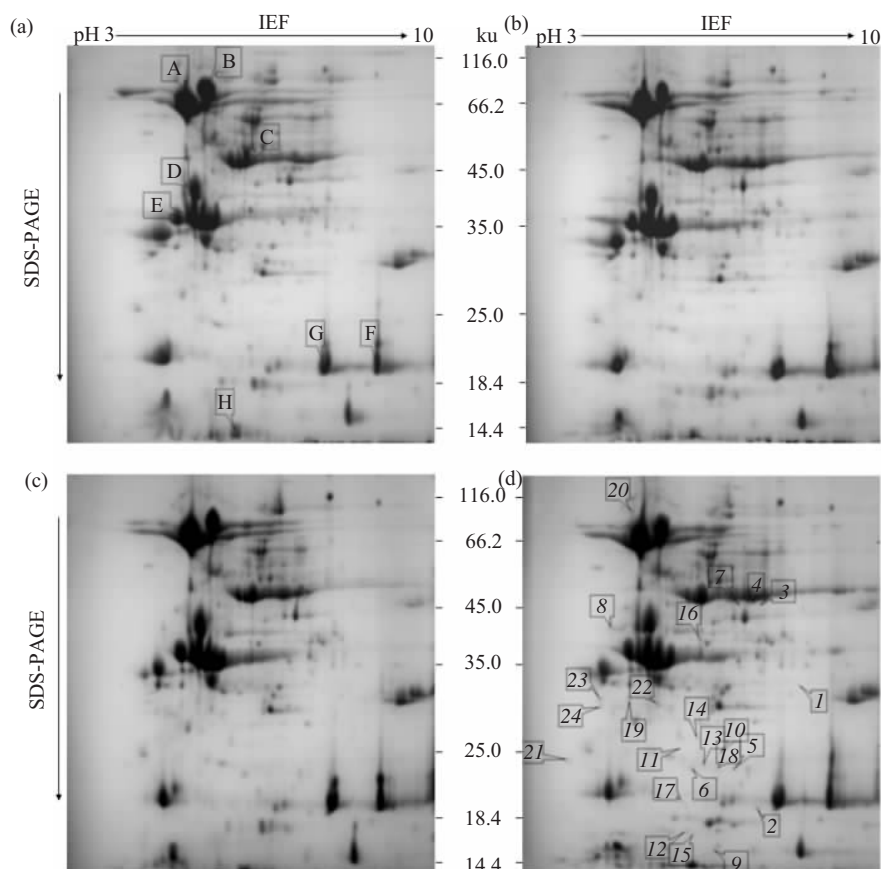


Fig. 4 2-DE maps of soybean seed proteins at different germinating stages

(a), (b), (c), (d) corresponding to 0 h、8 h、36 h、60 h. A~C indicating subunits of 7 S.

D~H indicating subunits of 11 S. 1~24 indicating selected protein spots.

120 ku 范围内 0 h、8 h、36 h、60 h 的 2-DE 图谱上平均分别检测到 341、349、353、376 个蛋白质点. 随机选取 15 个互相匹配的点在 12 块胶(4 个样品 3 次重复) 中进行重复性分析, 发现第一向偏差平均为 4.13 mm, 第二向为 4.76 mm. 各个时期 2-DE 图谱十分接近, PDQuest 软件分析 0 h 与 8 h 时的蛋白质点相关系数(Correlation coefficient)为 87.7%, 与 36 h 的为 81.6%, 与 60 h 的为 79.9%, 说明蛋白质的变化是渐进的.

2-DE 胶上单个蛋白质点的量被定义为构成这个点的所有像素强度值的总和, 为了较准确地反应蛋白质点的量的变化, 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随发育进程出现与否以及表达量的增减, 对质量较好、重复性高的、表达量变化超过 2.5 倍以上的蛋白质点 24 个(图 4D)做 MALDI-TOF-MS 分析, 这些差异蛋白质点都是低丰度蛋白质, 高丰度蛋白质在种子萌发期变化不明显. 这些蛋白质点的相对丰度如图 5.

从图 5 可以看到, 萌发的第一阶段 0~8 h, 24 个差异表达蛋白中就有 6 个蛋白质相对于干种子中表达量增加, 4 个是降低的(表达量差异 2.5 倍以上); 第二阶段 8~60 h, 有 15 个蛋白质均是动态变化的, 胚根突破种皮时 14 个的蛋白质表达量达到峰值.

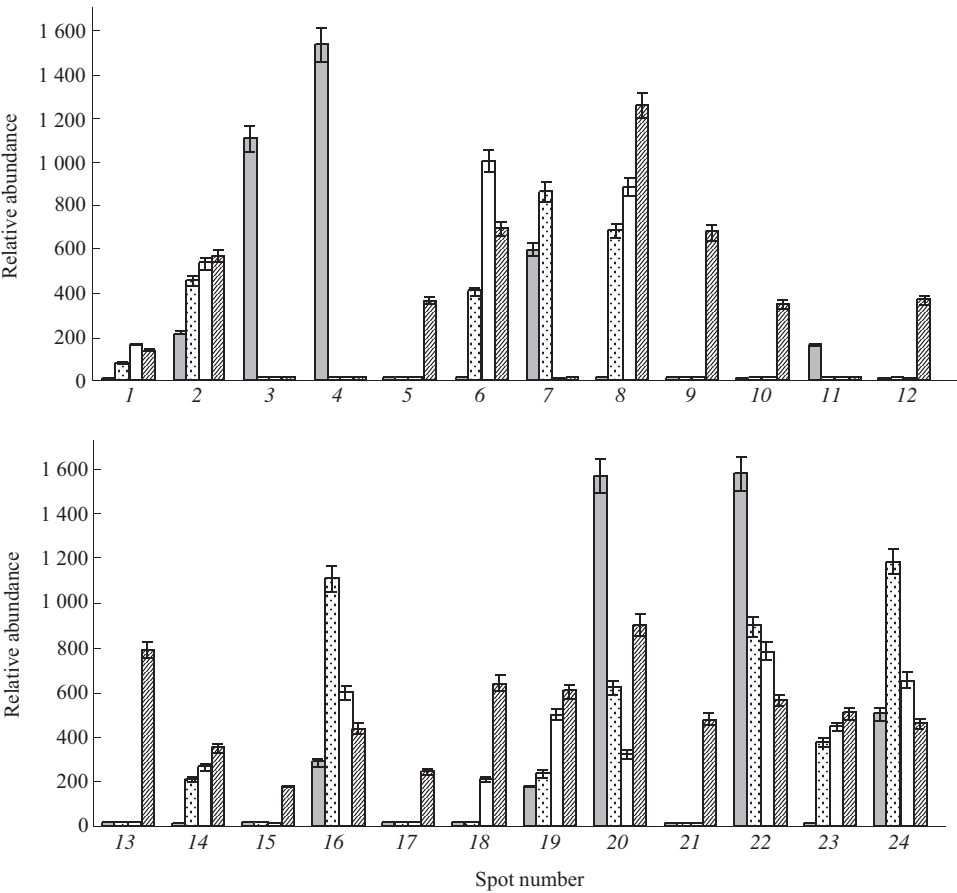


Fig. 5 Histograms showing the relative volume changes of 24 differentially displayed spots

■: 0 h; ▨: 8 h; ▤: 36 h; ▩: 60 h.

2.2.2 差异表达蛋白的 MALDI-TOF-MS 分析及数据库检索. 将这 24 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, 24 个点均获得肽质量指纹图谱(PMF), 图 6 是 Spot17 蛋白 MALDI-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, 初步鉴定出了 6 个蛋白质, 鉴定结果如表 1.

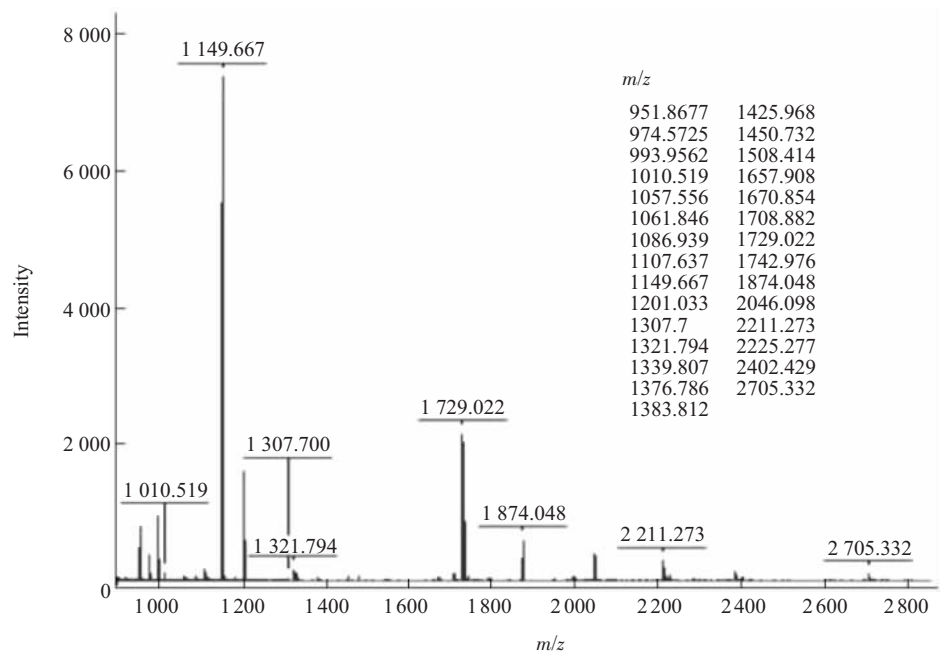


Fig. 6 A representative peptide mass fingerprinting of spot 17

Table 1 Differentially-expressed proteins identified by PMF query

Spot No.	Theoretical Mr/pI	Experimental Mr/pI	Sequence coverage(%)	Accession No.	Protein name
9	16.3/ 6.9	15.5/6.9	31	Gma.9551	nucleoside diphosphate kinase
11	24.4/5.2	24.4/6.2	27	Gma.1897	proglycinin A _{1a} B _{1b} subunit
12	17.5/5.6	16.8/ 6.4	45	Gma.5401	thioredoxin fold
16	35.3/6.0	38.4/6.5	40	Gma.8535	35 ku seed maturation protein
17	18.5/5.8	19.6/ 6.3	36	Gma.12370	HSP 18.5 ku
22	26.3/5.3	28.9/ 5.8	22	Gma.8540	seed maturation protein PM36

3 讨 论

种子在高等植物的生命周期中占据核心地位, 种子的萌发是幼苗生长的先决条件. 生物体在不同的发育阶段会合成类型数量不同的蛋白质, 而这些动态变化的蛋白质构成了细胞某一时刻的特征性生命活动基础, 是认识生命活动本质的一个恰当而直接的途径^[1]. 因此我们运用蛋白质组学技术着重研究萌发过程中动态变化的蛋白.

3.1 萌发期大豆种子贮藏蛋白的变化

球蛋白是大豆种子主要的贮藏蛋白, 鉴于 Mooney 等^[2], Hajduch 等^[3], 郑蕊等^[9]已研究得到大豆成熟干种子的双向电泳图谱和鉴定出的蛋白质, 可推测图 4a 高丰度的 A、B、C 分别是 7S β -伴大豆球蛋白的 α' 、 α 、 β 亚基, D、E、F、G、H

属于 11 S 大豆球蛋白. PDQuest 软件分析, 它们的含量一直保持较高的水平, 几乎没有变化. 胚轴伸长, 胚根突破种皮, 萌发期结束, 紧接着是幼苗的生长. 因此贮藏蛋白的降解并非在萌发期而是在幼苗生长阶段^[13]. 当然这种界限并不是绝对的, 萌发过程中很少量的贮藏蛋白在有限的区域降解, 它们可能是由贮藏的蛋白酶降解的^[14], 本研究中, 检测到 A_{1a}B_{1b} 球蛋白亚基(Spot11), 在种子萌发的第一阶段就发生降解, 这些局部降解的贮藏蛋白供萌发期幼胚的生长和呼吸. 而苗期生长需要大量的能量, 大量的未降解的贮藏蛋白又保证了幼苗初期的生长. 另外贮藏蛋白不仅在大豆子叶中积累, 胚芽、胚轴和胚根中也存在, 在这些组织中的降解并不是同时发生的, 胚芽、胚轴和胚根贮藏蛋白的降解优先于子叶中的^[15].

3.2 差异表达蛋白功能的推测

大豆种子成熟蛋白可能是种子正常萌发及幼苗生长所必需的^[6]. Spot16 被鉴定为 35 ku 种子成熟蛋白. 在胚胎发生后期合成和积累, 属于胚胎后期丰富 (late embryogenesis abundant, LEA) 蛋白 III 类^[7]. 在本研究中, 该蛋白质在萌发的第一阶段表达量升高, 第二阶段开始降低, 表明种子吸水后预存的代谢系统被重新活化, 该蛋白质可能是由种子成熟过程中已保存的蛋白质合成复合体的迅速降解所产生. LEA 蛋白在种子成熟时作为脱水保护剂发挥作用, 萌发时被降解利用. 绝大部分种子成熟蛋白属于 LEA 蛋白家族成员 (如 GmPM1、GmPM8、GmPM9 等), 都有 LEA 蛋白的保守结构域, Spot16 也含有 LEA 蛋白的保守区. 而种子成熟蛋白 PM36 (GmPM36, Spot22) 含有 TENA_THI-4 保守结构域, 属于硫胺(维生素)家族. Hsing 等^[18] (1998 年) 曾报道过, GmPM4 可作为维生素的一种贮藏的形式, 供种子萌发所利用. GmPM36 含有维生素的结构域, 作为维生素的贮藏形式, 可能与 GmPM4 一样, 种子吸胀后逐渐被降解, 供种子萌发高维生素量的需求.

核酸是种子萌发的基础物质之一. 而 Spot9 被鉴定为核苷二磷酸激酶 (NDPK), 它的首要功能是通过催化 NDP 和 NTP 之间磷酸基的转移反应来维持细胞内 NTP 的浓度, 为核酸的合成提供原料. 另外 NDPK 还可以调节细胞的增殖、分化和发育^[19]. 该酶 60 h 时大量表达, 表明此时核酸合成活跃.

Spot 12 被鉴定为硫氧还蛋白折叠体. 硫氧还蛋白 (Trx) 是一种 NADPH 依赖的包含 FAD 结构域的二聚体酶, 起氧化还原载体的作用. 种子萌发及幼苗生长早期, Trx 能提高淀粉酶和蛋白酶的活性, 增加贮藏蛋白的水溶性, 使种子中贮藏的营养物质更易水解, 启动碳氮代谢^[20]. Wong 等^[21] 在大麦种子萌发的研究过程中发现, 随着 Trx 活性的上升, 淀粉酶活性、贮藏蛋白的相对还原态都有所上升. 本研究中该酶 60 h 表达量迅速增加, 有助于促进种子的萌发. 转 *trxs* 基因的大麦种子萌发时, α -淀粉酶和 β -淀粉酶活力比非转基因种子高, 转基因种子的发芽势也明显高于对照^[20]. 另外该蛋白质在抗氧化防御中也有着重要作用^[22]. 因此, 可以通过基因工程的方法导入该基因以改进大豆种子的发芽性状.

Spot17 被鉴定为 18.5 ku 热激蛋白 (HSP). 目前人们普遍认为, 热激蛋白在植物体内的表达具有多

样性, 不但在热刺激条件下表达, 在正常的生理条件下热激蛋白也能表达^[23]. HSP 基因转录和 HSP 合成在发育的种子、萌发的种子中都能发生^[24]. 该蛋白质在胚根突破种皮时大量表达, 可能在保护细胞膜结构系统和抗氧化系统免受伤害或少受伤害中起重要的保护作用^[25], 从而保证大豆种子的正常萌发.

总之, 本研究中检测到的这些差异蛋白, 在种子萌发过程中可能起重要的作用, 今后将结合串联质谱技术、Edman 降解测序技术以鉴定出更多的蛋白质, 进一步明确这些蛋白质在种子萌发中的作用, 有助于开展种子萌发的分子和生理机制的深入研究.

参考文献

- Bewley J D. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 1997, **9** (1): 1055~1066
- Bove J, Jullien M, Grappin P. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol*, 2001, **3** (1): 1002.1~1002.5
- Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2002, **2** (1): 3~10
- Gallardo K, Signor C L, Vandekerckhove J, *et al.* Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol*, 2003, **133** (2): 664~682
- 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 Physiol*, 2005, **137** (4): 1397~1419
- Gallardo K, Job C, Groot S P, *et al.* Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol*, 2001, **126** (2): 835~848
- Ostergaard O, Finnie C, Laugesen S, *et al.* Proteome analysis of barley seeds: identification of major proteins from two-dimensional gels (pI 4~7). *Proteomics*, 2004, **4** (8): 2437~2447
- Wong P F, Abubakar S. Post-germination changes in *Hevea brasiliensis* seeds proteome. *Plant Sci*, 2005, **169** (2): 303~311
- 郑蕊, 喻德跃. 适于蛋白质组研究的大豆种子蛋白双向电泳技术的改进. *大豆科学*, 2005, **24** (3): 166~170
Zheng R, Yu D Y. *Soybean Sci*, 2005, **24** (3): 166~170
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem*, 1976, **72** (1): 248~254
- 何大澄, 肖雪媛. 差异蛋白质组学及其应用. *北京师范大学学报*, 2002, **38** (4): 558~562
He D D, Xiao X Y. *J Beijing Normal Univ*, 2002, **38** (4): 558~562
- 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
- 13 Wang Y, Wang B M, Liang H G. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, 1985, **26** (6): 1557~1566
 - 14 Müntz K, Belozersky M A, Dunaevsky Y E, *et al.* Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot*, 2001, **52** (362): 1741~1752
 - 15 Schlereth A, Becker C, Horstmann J, *et al.* Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa*). *J Exp Bot*, 2000, **51** (349): 1423~1433
 - 16 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 Mol Biol*, 1995, **29** (4): 863~868
 - 17 Chow T Y, Liu S M, Lin T Y, *et al.* Isolation and characterization of three seed cDNA encoding LEA III proteins up-regulated by maturation. *Plant Physiol*, 1999, **121** (3): 1054
 - 18 Hsing Y C, Tsou C H, Hsu T F, *et al.* Tissue- and stage-specific expression of a soybean (*Glycine max* L.) seed-maturation, biotinylated protein. *Plant Mol Biol*, 1998, **38** (3): 481~490
 - 19 Narayanan R, Ramaswami M. Regulation of dynamin by nucleoside diphosphate kinase. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, **35** (1): 49~55
 - 20 刘雷, 尹均. 硫氧还蛋白基因对大麦发芽特性的影响. *作物学报*, 2005, **31** (12): 1562~1566
 - Liu L, Yin J. *Acta Agron Sin*, 2005, **31** (12): 1562~1566
 - 21 Wong J H, Kim Y B, Ren P H, *et al.* Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleuron. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (25): 16325~16330
 - 22 刘雷, 尹均. 硫氧还蛋白的研究. *东北农业大学学报*, 2003, **34** (2): 219~225
 - Liu L, Yin J. *J Northeast Agric Univ*, 2003, **34** (2): 219~225
 - 23 Vierling E. The role of heat shock protein in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, **42** (6): 579~620
 - 24 刘军, 黄上志, 付家瑞. 不同活力玉米种子胚萌发期间热激蛋白的合成. *植物学报*, 2000, **42** (3): 253~257
 - Liu J, Huang S Z, Fu J R. *Acta Bot Sin*, 2000, **42** (3): 253~257
 - 25 黄上志, 黄祥富, 林晓东, 等. 热激对水稻幼苗耐冷性及热激蛋白合成的诱导. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, **30** (2): 189~194
 - Huang S Z, Huang X F, Lin X D, *et al.* *J Plant Physiol Mol Biol*, 2004, **30** (2): 189~194

Differential Proteomic Analysis of Seed Germination in Soybean*

XU Xiao-Yan¹⁾, ZHENG Rui^{1,2)}, LI Chun-Mei¹⁾, GAI Jun-Yi¹⁾, YU De-Yue^{1)**}

¹⁾Nanjing Agricultural University, Soybean Research Institute, National Center for Soybean Improvement, and National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China;

²⁾School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract A proteomic approach was used to analyze differential expression of proteins during soybean (*Glycine max*) N2899 seed germination at specific stages of 0 h, 8 h, 36 h and 60 h after imbibition. The results show that on the 2-DE gels stained by coomassie brilliant blue, PDQuest image software detected about 350 protein spots, of which 24 spots show more than 2.5-fold changes in abundance, and most of soybean seed storage proteins weren't mobilized during seed germination. At the first stage of germination, 10 proteins show changes in abundance. At the second stage, the quantities and categories of differentially expressed proteins increased and the abundance of 15 proteins dynamically changed. During radicle protrusion seed coat, the abundance of 14 proteins reached a peak. These suggested that the internal metabolisms of imbibition seeds became more active. These 24 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 fingerprintings of all were obtained. Soybean UniGene database was used to identify proteins, of which 6 proteins were identified. They were nucleotide diphosphate kinase, proglycinin A_{1a}B_{1b} subunit, thioredoxin fold, 35 ku seed maturation protein, heat shock protein and seed maturation protein PM36. The potential functions of these proteins during seed germination were discussed.

Key words soybean, seed germination, proteome, 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE), matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2004CB117206, 2002CB111304), The National Natural Science Foundation of China (30490250) and Outstanding Scholars from The Ministry of Education of China.

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

Received: May 22, 2006 Accepted: June 30, 2006