

www.pibb.ac.cn

植物细胞壁蛋白质组学研究进展*

刘艳丽1) 金孝芳1)** 马林龙1) 曹 丹1) 龚自明1) 焦春海2) 韦朝领3)**

(¹⁾湖北省农业科学院果树茶叶研究所,武汉 430209; ²⁾湖北省农业科学院,武汉 430209; ³⁾安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室,合肥 230036)

摘要 植物细胞壁蛋白质在细胞代谢和发育调控、细胞壁组分修饰、信号转导及胁迫响应等生物学事件中具有重要功能.最近,国内外学者开展了大量植物细胞壁蛋白质组学的研究工作,并取得了巨大进展.本文详述了细胞壁蛋白质的分类、提取、鉴定及生物信息学分析的最新进展,总结了植物细胞壁蛋白质组学的应用和面临的挑战,提出了植物细胞壁蛋白质组学研究的框架图,以期为植物细胞壁蛋白质组学的广泛研究提供借鉴.

关键词 植物,细胞壁蛋白质,分类,分离,鉴定 学科分类号 Q81,Q94

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0454

细胞壁又称为细胞外基质,位于细胞的最外 部,是细胞感知外界环境信号和细胞间相互交流的 首要亚细胞结构.细胞壁主要由细胞壁多糖(纤维 素、半纤维素和果胶)、细胞壁蛋白质(cell wall proteins, CWPs)、木质素和脂质组成^[1]. 其中, 细 胞壁多糖约占细胞壁总质量的 90%~95%, CWPs 约占 5%~10%^[2-4].现已证实, CWPs 所占比重较 小,但在细胞代谢和发育调控、细胞壁组分修饰、 信号转导、胁迫响应等生物学事件中具有重要功 能^[5-9]. 基于 CWPs 功能的重要性,大量研究利用 高通量蛋白质组学技术开展了 CWPs 的鉴定和解 析. 植物细胞壁蛋白质组学研究始于 2000 年, 现已 在 拟 南 芥 [10-20]、 二 穗 短 柄 草 Brachypodium distachyon L.^[21-23]、亚麻 Linum usitatissimum L.^[24-25]、 水稻^[26-28]、大豆 Glycine max M.^[29]、玉米 Zea mays L.^[5]、小麦 Triticum aestivum L.^[30]、甘蔗 Saccharum officinarum L.^[31-32]、番茄 Lycopersicon esculentum Mill.^[33]、葡萄 Vitis vinifera L.^[34-35]、海州香薷 Elsholtzia splendens N.^[36-37]、紫花苜蓿 Medicago sativa L.^[38-40]、鹰嘴豆 Cicer arietinum L.^[41-42]、烟草 Nicotiana tabacum L.^[43]等植物上进行了研究,并在 CWPs 提取、分离鉴定和功能解析上取得了明显突 破.本文以前人工作为基础,详述了 CWPs 的分

类、提取方法、鉴定及生物信息学分析,总结了植物细胞壁蛋白质组学的应用和面临的挑战,提出了 植物细胞壁蛋白质组学研究的框架图,以期为细胞 壁蛋白质组学在国内的广泛研究提供借鉴.

1 CWPs 的分类、提取和鉴定

1.1 CWPs 的分类

在细胞壁中,CWPs 嵌在不溶性多糖基质中且 与其他细胞壁组分相互作用.依据结合的紧密程 度,细胞壁蛋白质可划分为疏松结合细胞壁蛋白质 (loosely bound CWPs)、松散结合细胞壁蛋白质 (weakly bound CWPs)和紧密结合细胞壁蛋白质 (strong bound CWPs)三种类型^[6,44-45].疏松结合 CWPs 同其他细胞壁组分没有或很少结合,能在细 胞间隙自由移动;松散结合细胞壁蛋白质通过弱作

- ** 通讯联系人. Tel: 027-87770310
- 金孝芳. E-mail: jxf1130@126.com
- 韦朝领. E-mail: weichl@ahau.edu.cn

收稿日期: 2017-12-11, 接受日期: 2018-07-10

^{*}湖北省农业科学院青年科学基金项目(2017NKYJJ05),湖北省农 业科学院首席科学家专项资助,茶树生物学与资源利用国家重点实 验室开放基金(SKLTOF20160104)资助项目.

用键如范德华力、氢键、离子键和疏水相互作用与 细胞壁基质结合,结合力较弱;紧密结合细胞壁蛋 白质通过共价键及其他作用力与细胞壁基质紧密结 合^[6,44-45].

1.2 CWPs 的提取

1.2.1 CWPs 提取剂

CWPs 与细胞壁基质结合及结合力的差异使 CWPs 极具复杂性,导致 CWPs 提取非常困难.因 此,选择适宜的提取方法和提取剂对成功提取 CWPs 乃至后期研究至关重要. 疏松结合 CWPs 稳 定性差,提取时易丢失,从植物组织中提取宜采取 不破坏细胞壁的技术如真空渗透10,也可使用低离 子强度缓冲液(如 NaAc)提取^[4]. 疏松结合 CWPs 与其他细胞壁组分结合力弱,可采用低离子强度盐 溶液如 NaCl、LiCl、CaCl₂ 和螯合剂(如 EGTA、 CDTA)提取^[20, 37, 40]. CaCl, 通过离子交换提取带电分 子,能够提取约 60%的 CWPs^[16],是最有效的高等 植物 CWPs 提取剂,已被广泛应用于植物 CWPs 提 取^[20, 24-25, 31, 34, 37-40]; NaCl 和 LiCl 分别用于提取富含羟 脯氨酸糖蛋白和强离子结合蛋白[46-47]. 至于紧密结 合 CWPs, 其与胞外基质紧密结合, 难以提取. 因 此,目前鉴定的大多数 CWPs 都是疏松结合 CWPs 和松散结合 CWPs^[48].

1.2.2 CWPs 提取方法

鉴于植物材料的差异,研究者们采用破坏和不破坏细胞壁的方法提取 CWPs^[46].一般悬浮培养的细胞、原生质体再生细胞壁采用不破坏细胞壁的方法^[15, 46, 49-50],而植物组织或器官如根、茎、叶、果实、种子等则采用破坏细胞壁的方法^[46].2016年,Calderan-Rodrigues等^[31]首次同时采用破坏性(破碎细胞壁)和非破坏性(真空渗透)方法提取了植物组织(甘蔗茎)CWPs,并证实二种方法的结合提高了CWPs的覆盖度.由于 CWPs 提取剂的偏好性,一步法的提取难以获得高质量 CWPs.因此,在细胞壁组织富集的基础上,多采用二步法或三步法提取CWPs^[11, 22, 24-25, 31, 37-40, 51](表 1).

在二步法提取上,Liu 等^[37]采用 CaCl₂和 NaCl 提取了海州香薷根 CWPs;Watson和 Sumner^[38]采 用 CaCl₂和 LiCl 提取了苜蓿茎 CWPs;Verdonk 等^[39]采用 EGTA 和 LiCl 提取了苜蓿茎 CWPs; 2016年,Francin-Allami 等^[22]和 Calderan-Rodrigues 等^[31]采用 CaCl₂和 LiCl 分别提取了二穗短柄草谷粒 和甘蔗茎 CWPs;2017年,Duruflé 等^[11]使用 CaCl₂ 和 LiCl 提取了拟南芥成熟茎 CWPs,同年 Canut 等^[51]也使用 CaCl₂和 LiCl 提取了拟南芥胚轴、根和 地上器官及二穗短柄草叶和节间 CWPs.

在三步法提取上,Negri 等^[34]使用 CaCl₂、LiCl 和 Tris-phenol 提取了葡萄果皮和种子 CWPs,Day 等^[25]采用多种缓冲液漂洗、CaCl₂和 LiCl 提取了亚 麻茎 CWPs,2015 年,Printz 等^[40]采用 CaCl₂、 EGTA 和 LiCl 提取了苜蓿茎 CWPs,并与 Watson、 Sumner^[38]和 Verdonk 等^[39]的二步法进行了比较,结 果显示三步法提取效果更好.2017 年,Chabi 等^[24] 采用 NaCl、CaCl₂和 LiCl 三步法提取了亚麻根、 茎、叶 CWPs.综上,不同提取方法和提取剂的 使用利于较高质量 CWPs 的提取,CaCl₂和 LiCl 是 最广泛应用的二种 CWPs 提取剂.然而,值得注意 的是使用不同提取剂多次抽提易导致胞内蛋白质污 染^[15].

2 CWPs 的质控、分离和鉴定

2.1 CWPs 的质控

CWPs 不仅提取困难,在提取过程中还常常伴随胞内蛋白质的污染.因此,在提取后,常通过检测胞内蛋白质标记物 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)活性^[5, 26, 30, 36, 52]和 Western-blot 分析^[28]检验 CWPs 的纯度和污染情况.采用 G6PDH 活性检测的方法,Kong等^[30]和 Zhu等^[5]分别对小麦根和玉米根 CWPs 的纯度进行了检验,Chen等^[26]则对水稻愈伤组织松散结合 CWPs 的污染情况进行了评估. 2015年,Cho等^[28]以定位于细胞质和胞间连丝的actin和定位于内质网腔的BiP 为抗体,采用 Western-blot 检验了水稻愈伤组织紧密结合 CWPs的纯度.

2.2 CWPs 的分离和鉴定

蛋白质的分离方法和质谱分析技术是影响 CWPs 鉴定的重要因素.目前,蛋白质分离和鉴定 的方法主要有基于 2D SDS-PAGE(two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DGE)和 基于 LC(liquid chromatograph)蛋白质分离的质谱分 析 技术^[53].随着质谱技术的发展,因 2D SDS-PAGE 分离方法对极酸性和碱性蛋白质、糖基 化蛋白质分离较差、样品需多次重复等不足,已逐 渐被基于 LC 的分离方法所取代.2015年,Printz 等^[40]通过比较实验进一步证实,1-DGE 偶联 LC-MS/MS(mass spectrometer)蛋白质分析技术较

植物	组织	细胞壁富集				
			第一步	第二步	第三步	参 考又瞅
海州香薷	根	组织研磨, 5 mmol/L 醋酸 钠, 0.4 mol/L、0.6 mol/L、 1 mol/L 蔗糖, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸钠、 0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸钠、 1 mol/L 氯化钠, pH 4.6		[37]
紫花苜蓿	茎	组织研磨,50 mmol/L 醋酸 钠、50 mmol/L 氯化钠、 30 mmol/L 抗坏血酸, pH 5.5	50 mmol/L 醋酸 钠、0.2 mol/L 氯 化钙, pH 5.5	50 mmol/L 醋酸钠、 3 mol/L 氯化锂, pH 5.5		[38]
紫花苜蓿	茎	组织研磨, 5 mmol/L 醋酸 钠, 0.4 mol/L、0.6 mol/L、 1 mol/L 蔗糖, pH 4.6	5 mmol/L醋酸钠、 50 mmol/LEGTA, pH4.6	5 mmol/L 醋酸钠、 3 mol/L 氯化锂, pH 4.6		[39]
二穗短柄草	谷粒	组织研磨, 5 mmol/L 醋酸 钠, 0.4 mol/L、0.6 mol/L、 1 mol/L 蔗糖, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸 盐 缓冲液、0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6, 二次	5 mmol/L 醋酸盐缓 冲液、2 mol/L氯化 锂, pH 4.6, 二次		[22]
拟南芥	花子	组织研磨, 5 mmol/L 醋酸 钠, 0.4 mol/L、0.6 mol/L、 1 mol/L 蔗糖, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸 盐 缓冲液、0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸盐缓 冲液、2 mol/L氯化 锂, pH 4.6		[11]
拟南芥	下胚轴、根、 莲座叶	组织研磨, 5 mmol/L 醋酸 钠, 0.4 mol/L、0.6 mol/L、 1 mol/L 蔗糖, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸 盐 缓冲液、0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸盐缓 冲液、2 mol/L氯化 锂, pH 4.6		[51]
二穗短柄草	叶、节间					
葡萄	果皮、种子	组织研磨,蛋白质提取缓 冲液	50 mmol/L 醋酸 钠、0.2 mol/L 氯 化钙	50 mmol/L 醋酸钠、 3 mol/L 氯化锂	Tris-phenol	[34]
亚麻	茎、种子	组织研磨	一系列洗涤缓冲液	50 mmol/L 醋酸钠、 0.2 mol/L 氯化钙	50 mmol/L 醋酸 钠、3 mol/L 氯化 锂	[25]
亚麻	根、茎、叶	组织研磨,蛋白质提取缓 冲液	5 mmol/L醋酸钠、 1.5 mol/L氯化钠, pH4.6	5 mmol/L 醋酸钠、 0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸 钠、0.2 mol/L 氯 化锂, pH 4.6	[24]
紫花苜蓿	艾	组织研磨, 5 mmol/L 醋酸 钠, 0.4 mol/L、0.6 mol/L、 1 mol/L 蔗糖, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸钠、 0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸钠、 50 mmol/L EGTA, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸 钠、3 mol/L 氯 化锂, pH 4.6	[40]
甘蔗	书 大 子	组织研磨, 5 mmol/L 醋酸 钠, 0.4 mol/L、0.6 mol/L、 1 mol/L 蔗糖, pH 4.6	5 mmol/L 醋酸钠、 0.2 mol/L 氯化钙	5 mmol/L 醋酸钠、 2 mol/L 氯化锂	-	
		组织剪切	5 mmol/L 醋酸钠、 0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6, 真空渗透 二次	5 mmol/L 醋酸钠、 2 mol/L 氯化锂, pH 4.6, 真空渗透 二次		[31]

Table 1	The extraction of plant CWPs using two-steps and three-steps extraction proce					
	表1 二步法和三步法提取植物细胞壁蛋白质					

2-DGE 偶联 MALDI TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight)鉴定了更多的 CWPs.同年,Cho等^[28]在研究水稻愈伤组织紧密 结合 CWPs 时,也发现多维蛋白质鉴定技术 (1-DGE 偶联 2DLC-MS/MS)对 CWPs 检出率较 2-DGE 偶联 MALDI TOF/TOF 更高.

3 CWPs 的特点、生物信息学分析及功能 分类

3.1 CWPs 的特点

由于提取方法的局限, CWPs 不可避免地受到 胞内蛋白质污染.因此,质谱分析后据 CWPs 的特 征利用生物信息学软件进行检验也是排除污染蛋白 质的重要措施.典型 CWPs 属于分泌途径蛋白质, 它是指在核糖体合成、经内质网、高尔基体和运输 囊泡,最后被分泌到胞外并定位在细胞壁的蛋白 质.典型的 CWPs 具有三个特点:一是具有靶标到 分泌途径的 N 端信号肽 (15~30 个氨基酸),与非 分泌途径上的线粒体蛋白、叶绿体蛋白和细胞质蛋 白相区别;二是 C 端无内质网滞留信号 KDEL 或 HDEL 信号序列,与具滞留信号的内质网蛋白相区 别;三是无跨膜结构域,与具有一个或多个跨膜结 构域的膜蛋白相区别^[4,12,31,54].然而,值得一提的 是,在细胞壁蛋白质组学研究中,鉴定到的具有一 个跨膜结构域的质膜蛋白也常常被归入到细胞壁蛋 白质中.

随着植物细胞壁蛋白质组学研究深度和范围的 扩大,越来越多的实验表明,许多不具N端信号 肽的蛋白质仍可能通过外泌体、溶酶体膜、转运蛋 白和未知通道等多种途径被分泌到胞外^[4-5,55-56],这 些蛋白质被称为非典型 CWPs,例如苹果酸脱氢 酶、β-葡萄糖苷酶、烯醇酶、jacalin 类凝集素 (jacalin-related lectin)等.最近,Pinedo等^[57]通过亲 和色谱法和免疫定位验证了不具N端信号肽的 jacalin 类凝集素定位胞外,证实了非典型 CWPs 的 存在.

3.2 CWPs 评估所用软件

在应用生物信息学系统评估鉴定的 CWPs 时, 一般先应用 SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/ SignalP/)预测N端是否具有信号肽^[58],使用Prosite (http://prosite.expasy.org/)预测是否具有内质网滞留 信号, 使用 TMHMM server (http://www.cbs.dtu. dk/services/TMHMM/)预测是否具有跨膜结构域及 几个跨膜结构. 然后, 应用亚细胞定位预测软件 TargetP (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)^[59] WoLF PSORT (https://wolfpsort.hgc.jp/)^[60]、 Loctree 3(https://rostlab.org/services/loctree3/)^[61]预测蛋白质 是否定位在"细胞壁"或"胞外基质(excellular matrix). 最后,使用细胞壁蛋白质网站 WallProtDB (http://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/WallProtDB/index. php/blast)进行比对确认^[62]. 至于非典型 CWPs,可 使用 Secretome (http://www.cbs. dtu.dk/services/ SecretomeP-1.0/) 进行预测 [63].

3.3 CWPs 功能分类

CWPs功能划分有助于蛋白质功能的了解.根据相同功能域蛋白质具相同功能的原则和部分

CWPs 已知功能, Jamet 等将鉴定的拟南芥 CWPs 划分为九个功能组:作用于多糖的蛋白质、氧化还 原酶、信号蛋白、蛋白酶、脂质代谢相关蛋白、与 多糖和蛋白质具相互作用域蛋白、结构蛋白、各种 各样的蛋白质和未知功能蛋白质[4-45].作用于多糖 的蛋白质主要为糖苷水解酶、糖苷酯酶、糖苷裂解 酶和扩展蛋白;氧化还原酶主要是过氧化物酶、多 糖氧化酶、小檗碱桥酶(S)- 网硬蛋白;蛋白酶主要 包括枯草杆菌蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸 蛋白酶和丝氨酸羧肽酶;与多糖和蛋白质具相互作 用域蛋白主要有通过富含亮氨酸重复序列(LRR)结 构域结合的蛋白质、蛋白酶抑制剂和酶抑制剂;信 号蛋白主要是 LRR- 受体蛋白激酶和阿拉伯半乳糖 蛋白; 而脂质代谢相关蛋白质主要是脂酶/酰基水 解酶^[44-45]. 目前,其他植物 CWPs 的功能分类,大 多数采用 Jamet 等的方法使用 WallProtDB 进行功 能分类[11-12, 23-24, 28, 31-32, 39-40, 64] (附件表 S1). 在鉴定的已 知功能 CWPs 中,作用于多糖的蛋白质、氧化还原 酶、各种各样功能蛋白质和蛋白酶占较高比例, 信号蛋白和结构蛋白所占比例较小(图1).此 外,少数研究者仍沿用 GO 分类或 Mapman 分类方 法[26,30,36-37]





4 植物细胞壁蛋白质组学应用和面临的 挑战

近 10 年,随着蛋白质组学技术的迅猛发展, 植物细胞壁蛋白质组学的研究也得到了空前发展. 目前,植物细胞壁蛋白质组学的研究主要集中在三 个方面:其一是植物组织如根、茎、叶及诱导产生的愈伤组织的细胞壁蛋白质组学研究,旨在挖掘和鉴定更多的 CWPs^[5,11-15,23-26,28,31-32,34-35,38,41,43];其二是植物响应逆境胁迫的细胞壁蛋白质组学,旨在研究逆境条件下植物 CWPs 的动态和丰度变化,探讨CWPs 在植物响应逆境胁迫中的作用^[10,27,29-30,33,36-37,42,50]; 其三是不同发育阶段或发育状态的植物细胞壁蛋白质组学,旨在解析细胞壁蛋白质组学,旨在解析细胞壁蛋白质在植物生长、发育 过程中的作用^[19,21-22,39]. 基于上述植物细胞壁蛋白质 组学研究,我们总结了植物细胞壁蛋白质组学研究 流程(图 2). 由图 2 可知,植物材料可采用非破坏 性和破坏性二种方法提取细胞壁蛋白质,质控后使 用 1D SDS-PAGE 耦联 HPLC-MS/MS 技术进行质 谱分析,最后对鉴定的 CWPs 进行评估和生物信息 学分析.



 Fig. 2 A work flowchart underling proteomics profiling of plant cell walls

 图 2 植物细胞壁蛋白质组学研究流程图

然而,植物细胞壁蛋白质组学研究仍面临着许 多挑战.一是高质量 CWPs 的提取.紧密结合 CWPs 与细胞壁基质紧密结合,至今尚无有效的提 取策略,难以获得高质量 CWPs.二是胞内蛋白质 污染和非典型 CWPs 的区分.CWPs 与胞内蛋白质 之间仅有细胞膜间隔,提取时不可避免地受到胞内 蛋白质污染,而非典型 CWPs 具有胞内蛋白质的特 征,二者很难区分.目前虽可采用 Secretome 软件 对非典型 CWPs 进行预测,但验证却是一项极其艰 巨的任务.三是质谱对翻译后修饰 CWPs 的检出局 限.据报道,CWPs 发生有 *O*-糖基化、*N*-糖基化、 脯氨酸羟基化、磷酸化等翻译后修饰^[45].翻译后修 饰蛋白不仅具有相对丰度低及不均一性的特性,且 在二级质谱肽段断裂时某些翻译后修饰位点(如糖 基化和磷酸化)会优先断裂而抑制主链断裂,降低 了修饰位点的鉴定成功率进而降低了翻译后修饰蛋 白质的鉴定^[65].四是大量未知功能 CWPs 的功能解 析^[44,46].未知功能 CWPs 是指含有未知功能结构域 的一类 CWPs,此类蛋白质功能解析是蛋白质组学 研究的重大难题.

附件 表 S1 见本文网络版附录(http://www.pibb.ac. cn)

参考文献

- Roberts K. How the cell wall acquired a cellular context. Plant Physiol, 2001, 125(1): 127–130
- [2] Carpita N C, Gibeaut D M. Structural models of primary cell walls in flowering plants, consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J, 1993, 3(1): 1–30
- [3] Cassab G I, Varner J E. Cell wall proteins. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1992, 39(4): 321–353
- [4] Albenne C, Canut H, Elisabeth J. Plant cell wall proteomics: the leadership of *A rabidopsis thaliana*. Front Plant Sci, 2013, 4(4): 111
- [5] Zhu J M, Chen S X, Alvarez S, *et al.* Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. Plant Physiol, 2006, 140(1): 311–325
- [6] Jamet E, Canut H, Boudart G, *et al.* Cell wall proteins: a new insight through proteomics. Trends Plant Sci, 2006, **11**(1): 33–39
- [7] Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. Acta Physiol Plant, 2011, 33(1): 35–51
- [8] Sasidharan R, Voesenek L A C J, Pierik R. The regulation of cell wall extensibility during shade avoidance: a study using two contrasting ecotypes of *Stellaria longipes*. Plant Physiol, 2008, 148(3): 1557–1569
- [9] Wang X, Komatsu S. Plant subcellular proteomics: application for exploring optimal cell function in soybean. Journal of Proteomics, 2016, 143(4): 45–56
- [10] Duruflé H, Hervé V, Ranocha P, et al. Cell wall modifications of two Arabidopsis thaliana ecotypes, Col and Sha, in response to sub-optimal growth conditions: an integrative study. Plant Sci, 2017, 263: 183–193
- [11] Duruflé H, San Clemente H, Balliau T, et al. Cell wall proteome analysis of Arabidopsis thaliana mature stems. Proteomics, 2017, 17(8): 1600449
- [12] Hervé V, Duruflé H, San Clemente H, et al. An enlarged cell wall proteome of Arabidopsis thaliana rosettes. Proteomics, 2016, 16(24): 3183–3187
- [13] Nguyen-Kim H, San Clemente H, Balliau T, et al. Arabidopsis thaliana root cell wall proteomics: increasing the proteome coverage using a combinatorial peptide ligand library and description of unexpected Hyp in peroxidase amino acid sequences. Proteomics, 2016, 16(3): 491–503
- [14] Chivasa S, Ndimba B K, Simon W J, et al. Proteomic analysis of the Arabidopsis thaliana cell wall. Electrophoresis, 2002, 23 (11): 1754–1765
- [15] Borderies G, Jamet E, Lafitte C, *et al.* Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. Electrophoresis, 2003, **24**(19–20): 3421–3432
- [16] Boudart G, Jamet E, Rossignol M, et al. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. Proteomics, 2005, 5 (1):

212-221

- [17] Bayer E M, Bottrill A R, Walshaw J, et al. Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. Proteomics, 2006, 6(1): 301–311
- [18] Minic Z, Jamet E, Negroni L, et al. A sub-proteome of Arabidopsis thaliana trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. J Exp Bot, 2007, 58(10): 2503–2512
- [19] Irshad M, Canut H, Borderies G, et al. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. BMC Plant Biol, 2008, 8(1): e94
- [20] Feiz L, Irshad M, Pont-Lezica R F, et al. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. Plant Methods, 2006, 2(1): 10
- [21] Douché T, San Clemente H, Burlat V, et al. Brachypodium distachyon as a model plant toward improved biofuel crops: search for secreted proteins involved in biogenesis and disassembly of cell wall polymers. Proteomics, 2013, 13(16): 2438–2454
- [22] Francin-Allami M, Lollier V, Pavlovic M, et al. Understanding the remodelling of cell walls during *Brachypodium distachyon* grain development through a sub-cellular quantitative proteomic approach. Proteomes, 2016, 4(3): 21
- [23] Francin-Allami M, Merah K, Albenne C, et al. Cell wall proteomic of *Brachypodium distachyon* grains: a focus on cell wall remodeling proteins. Proteomics, 2015, 15(13): 2296–2306
- [24] Chabi M, Goulas E, Lille U. A cell wall proteome and targeted cell wall analyses provide novel information on hemicellulose metabolism in flax. Mole Cell Proteomics, 2017, 16(9):1634–1651
- [25] Day A, Fénart S, Neutelings G, et al. Identification of cell wall proteins in the flax (*Linum usitatissimum*) stem. Proteomics, 2013, 13(5): 812–825
- [26] Chen X Y, Kim S T, Cho W K, et al. Proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli. J Plant Physiol, 2009, 166 (7): 675–685
- [27] Pandey A, Rajamani U, Verma J, et al. Identification of extracellular matrix proteins of rice (*Oryza sativa* L.) involved in dehydration-responsive network: a proteomic approach. J Proteome Res, 2010, 9(7): 3443–3464
- [28] Cho W K, Hyun T K, Kumar D, et al. Proteomic analysis to identify tightly-bound cell wall protein in rice calli. Mol Cells, 2015, 38(8): 685–696
- [29] Komatsu S, Kobayashi Y, Nishizawa K, et al. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. Amino Acids, 2010, 39 (5): 1435–1449
- [30] Kong F J, Oyanagi A, Komatsu S. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. BBA, 2010, 1804(1): 124–136
- [31] Calderan-Rodrigues M J, Jame E, Douché T, et al. Cell wall proteome of sugarcane stems: comparison of a destructive and a nondestructive extraction method showed differences in glycoside hydrolases and peroxidases. BMC Plant Biol, 2016, 16(1): 14
- [32] Calderan-Rodrigues M J, Jamet E, Bonassi R M B C, et al. Cell

wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. Proteomics, 2014, **14**(6): 738-749

- [33] Pich A, Braun H P, Wydra K, et al. Analysis of cell wall proteins regulated in stem of susceptible and resistant tomato species after inoculation with *Ralstonia solanacearum*: a proteomic approach. Plant Mol Biol, 2010, 73(6): 643–658
- [34] Negri A S, Prinsi B, Scienza A, et al. Analysis of grape berry cell wall proteome: a comparative evaluation of extraction methods. J Plant Physiol, 2008, 165(13): 1379–1389
- [35] Delaunois B, Colby T, Belloy N, et al. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. BMC Plant Biol, 2013, 13(1): 24
- [36] Liu T T, Shen C F, Wang Y, et al. New insights into regulation of proteome and polysaccharide in cell wall of *Elsholtzia splendens* in response to copper stress. Plos One, 2014, 9(10): e109573
- [37] Liu T T, Huang C K, Shen C F, et al. Isolation and analysis of cell wall proteome in *Elsholtzia splendens* roots using ITRAQ with LC-ESI-MS/MS. Appl Biochem Biotechnol, 2015, **176**(4): 1174– 1194
- [38] Watson B S, Sumner L W. Isolation of cell wall proteins from *Medicago sativa* stems. Methods Mol Biol, 2007, 355: 79–92
- [39] Verdonk J C, Hatfield R D, Sullivan M L. Proteomic analysis of cell walls of two developmental stages of alfalfa stems. Front Plant Sci, 2012, 3(3): 279
- [40] Printz B, Morais R D S, Wienkoop S, *et al.* An improved protocol to study the plant cell wall proteome. Front Plant Sci, 2015, 6(3): 237
- [41] Bhushan D, Pandey A, Chattopadhyay A, et al. Extracellular matrix proteome of chickpea (*Cicer arietinum* L.) illustrates pathway abundance, novel protein functions and evolutionary perspect. J Proteome Res, 2006, 5(7): 1711–1720
- [42] Bhushan D, Pandey A, Choudhary M K, et al. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(11): 1868–1884
- [43] Millar D J, Whitelegge J P, Bindschedler L V, et al. The cell wall and secretory proteome of a tobacco cell line synthesizing secondary wall. Proteomics, 2009, 9(9): 2355–2372
- [44] Jamet E, Albenne C, Boudart G, et al. Recent advances in plant cell wall proteomics. Proteomics, 2008, 8(4): 893–908
- [45] Boudart G, Minic Z, Albenne C, et al. Cell wall proteome //Šamaj J, Thelen J. Plant Proteomics. Berlin: Springer, 2007: 169–185
- [46] Ghahremani M, Stigter K A, William P. Extraction and characterization of extracellular proteins and their post-translational modifications from *Arabidopsis thaliana* suspension cell cultures and seedlings: a critical review. Proteomes, 2016, 4(3): 25
- [47] Jamet E, Boudart G, Borderies G, et al. Isolation of plant cell wall proteins // Posch A. Applications and Protocols in Expression Proteomics. Methods in molecular biology. Totowa: Humana Press, 2017:187–201
- [48] Albenne C, Canut H, Hoffmann L, et al. Plant cell wall proteins: a

large body of data, but what about runaways? Proteomes, 2014, **2** (2): 224–242

- [49] Kwon H K, Yokoyama R, Nishitani K. A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. Plant Cell Physiol, 2005, 46(6): 843–857
- [50] Tran H T, Plaxton W C. Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. Proteomics, 2008, 8 (20): 4317– 4326
- [51] Canut H, Albenne C, Jamet E. Isolation of the cell wall. Methods in Molecular Biology, 2017, 1511: 171–185
- [52] Meng X N, Song T F, Fan H Y, et al. A comparative cell wall proteomic analysis of cucumber leaves under *Sphaerotheca fuliginea* stress. Acta Physiol Plant, 2016, **38**(11): 260
- [53] 刘艳丽. 莲愈伤组织诱导及子叶愈伤组织建成的蛋白质组学[D]. 武汉: 中国科学院武汉植物园, 2015 Liu Y L. Callus induction and quantitative proteomic analysis of cotyledons-derived callus formation in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.spp. baijianlian).Wuhan: Wuhan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, 2015
- [54] Lum G K, Meinken J, Orr J, et al. PlantSecKB: the plant secretome and subcellular proteome knowledgeBase. Comput Mol Biol, 2014, 4(1): 1–17
- [55] Rose J K C, Lee S J. Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. Plant Physiol Biochem, 2010, 153(2): 433–436
- [56] Agrawal G K, Jwa N S, Lebrun M H, et al. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. Proteomics, 2010, 10(4): 1–29
- [57] Pinedo M, Regenten M, Elizalde M, et al. Extracellular sunflower proteins: evidence on non-classical secretion of a jacalin-related lectin. Protein Pept Lett, 2012, 19(3): 270–276
- [58] Petersen N T, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods, 2011, 8(10): 785–786
- [59] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol, 2000, 300(4): 1005–1016
- [60] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Res, 2007, 35 (Web Server issue): W585–587
- [61] Goldberg T, Hecht M, Hamp T, et al. LocTree3 prediction of localization. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (Web Server issue): W350-W355
- [62] San Clemente H, Jamet E. WallProtDB, a database resource for plant cell wall proteomics. Plant Methods, 2015, 11(1): 2
- [63] Bendtsen J D, Jensen L J, Blom N, et al. Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng Des Sel, 2004, 17(4): 349–356
- [64] Liu Y L, Cao D, Ma L L, et al. TMT-based quantitative proteomics analysis reveals the response of *Camellia sinensis* to fluoride. J.

Prog. Biochem. Biophys.

proteomics, 2018, **176**: 71-81 [65] 刘金凤, 王京兰, 钱小红, 等. 翻译后修饰蛋白质组学研究的技 术策略. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, **23**(2): 93-100 Liu J F, Wang J L, Qian X H, et al. Chinese J Biochem Mol Biol, 2007, 23(2): 93-100

Advance in Plant Cell Wall Proteomics*

LIU Yan-Li¹, JIN Xiao-Fang^{1)**}, MA Lin-Long¹, CAO Dan¹, GONG Zi-Ming¹, JIAO Chun-Hai², WEI Chao-Ling^{3)**}

(¹⁾ Institute of Fruit and Tea, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430209, China;
 ²⁾ Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430209, China;
 ³⁾ State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract Cell wall proteins (CWPs) play very important roles in cell metabolism and developmental regulation, modification of cell wall constitutes, signaling transduction, stress response and other biological events in plants. Recently, the domestic and foreign researchers have developed various studies underling proteomics profiling of plant CWPs and achieved great advance. This review describes the latest research progress of plant CWPs in the classification, extraction, identification and bioinformatics analyses, summarizes the utilization and facing challenge of plant cell wall proteome, and proposes a work model underline proteomics profiling of plant cell walls, which will be useful for the deep study on plant cell wall proteome.

Key words plant, cell wall proteins, classification, isolation, identification **DOI**: 10.16476/j.pibb.2017.0454

^{*} This work was supported by grants from Science Fund for Young Scholar (2017NKYJJ05) and Research Fund for Chief Scientist of Hubei Academy of Agricultural Science, and Open Fund of State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization (SKLTOF20160104).

^{**}Corresponding author. Tel: 86-27-87770310

JIN Xiao-Fang. E-mail: jxf1130@126.com

WEI Chao-Ling. E-mail: weichl@ahau.edu.cn

Received: December 11, 2017 Accepted: July 10, 2018

附 录

Table S1 Functional classification of cell wall proteins 表 S1 植物细胞壁蛋白质功能分类

	作用于多	氧化还原	信号	蛋白酶	脂质代谢	结构蛋白	具相互作	各种各样	未知功能	总数
	糖蛋白质	酶	蛋白		相关蛋白质		用域蛋白	蛋白质	蛋白质	
玉米根[28]	86	51	8	54	19	8	27	58	78	389
	(22.1%)	(13.1%)	(2.1%)	(13.9%)	(4.9%)	(2.1%)	(6.9%)	(14.9%)	(20.1%)	
甘蔗茎[32]	8	21	1	6	3	0	8	14	8	69
	(11.6%)	(30.4%)	(1.4%)	(8.7%)	(4.3%)		(11.6%)	(20.3%)	(11.6%)	
甘蔗茎[31]	17	18	1	11	14	0	1	10	12	84
	(20.2%)	(21.4%)	(1.2%)	(13.1%)	(16.7%)		(1.2%)	(11.9%)	(14.3%)	
二穗短柄草[23]	81	36	18	39	30	0	15	27	54	299
	(27%)	(12%)	(6%)	(13%)	(10%)		(5%)	(9%)	(18%)	
拟南芥莲座	94	40	10	53	42	4	34	53	33	361
[]十[12]	(26.1%)	(11.1%)	(2.8%)	(14.7%)	(11.7%)	(1.1%)	(9.4%)	(14.7%)	(9.1)	
紫花苜蓿 ¹⁹⁹	47	42	27	29	13	4	39	50	21	272
	(17.3%)	(15.4%)	(9.9%)	(10.7%)	(4.8%)	(1.5%)	(14.3%)	(18.4%)	(7.7%)	
紫花苜蓿[40]	65	72	6	22	17	3	35	22	5	247
	(26.3%)	(29.2%)	(2.4%)	(8.9%)	(6.9%)	(1.2%)	(14.2%)	(8.9%)	(2%)	
拟南芥茎[11]	83	35	11	50	33	3	33	31	23	302
	(27.5%)	(11.6%)	(3.7%)	(16.5%)	(11%)	(0.9%)	(11%)	(10.1%)	(7.6%)	
亚麻根、茎、	66	44	45	41	10	1	12	48	89	355
[]十[24]	(18.6%)	(12.4%)	(12.7%)	(11.5%)	(2.8%)	(0.3%)	(3.4%)	(13.5%)	(25.1%)	
茶树叶片[64]	14	6	5	4	3	0	1	3	5	41
	(34.1%)	(14.6%)	(12.2%)	(9.8%)	(7.3%)		(2.4%)	(7.3%)	(12.2%)	
变异	11.6~34.1%	11.1~30.4%	1.4~12.7%	8.7~16.5%	3~16.7%	0.3~2.1%	1.2~14.3%	7.3~20.3%	2~25.1%	41~389
均值	23.2%	15.1%	5.5%	12.8%	7.6%	1.0%	8.5%	13.1%	13.6%	100%