

大豆蛋白质组学研究进展

刘 春¹, 麻 浩², 刘健晖¹, 张占琴^{2,3}, 王立群²

(1. 衡阳师范学院 生命科学系, 湖南 衡阳 421008; 2. 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 3. 新疆农垦科学院 作物研究所, 新疆 石河子 832000)

摘 要:大豆是提供人类植物蛋白和油料以及发展可持续农业的重要作物,但由于不适合做遗传学和基因组学研究的模式系统,其基因组信息尚不丰富。因此,蛋白质组学技术是大豆大分子功能分析的有力工具。该文综述了大豆蛋白提取方法、大豆综合蛋白质组学和差异蛋白质组学的应用研究,同时讨论了大豆蛋白质组数据库,并对大豆蛋白质组学研究进行了展望。

关键词:大豆;蛋白质组学;2D-PAGE;MALDI-TOF MS;蛋白质组数据库

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0712-05

Advances in Soybean Proteomics

LIU Chun¹, MA Hao², LIU Jian-hui¹, ZHANG Zhan-qin^{2,3}, WANG Li-qun²

(1. Department of Life Science, Hengyang Normal University, Hengyang 421008, Hunan; 2. National Key Lab of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu; 3. Institute of Crop Science, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 83200, Xinjiang, China)

Abstract: Soybean is an important crop to supply a major portion of the world's demand for vegetable oil and protein, it is also an important crop for sustainable agriculture, but it is relatively poor model systems for genetics and genomics research, there are little information provides insight into many important aspects of soybean biology. Hence, proteomics is a powerful tool for its functional analysis. This review briefly introduces extraction methods for soybean protein, comprehensive proteomics and differential proteomics analysis of soybean, and the involved soybean proteome databases are listed, future perspective about soybean proteomics is also presented.

Key words: Soybean; Proteomics; 2D-PAGE MALDI-TOF MS; Proteome database

大豆是满足世界主要植物性油料和蛋白质需求的重要作物,但由于大豆等栽培豆类植物相对来说缺少遗传学和基因组研究的模式系统,其基因组的测序工作2006年才起步。在这种情况下,蛋白质组学技术成为豆类大分子功能分析的有力工具,该技术方法已被成功应用于大豆成熟种子、大豆种子发育与萌发、大豆雄性不育、大豆根毛、大豆叶片、大豆根瘤线粒体、大豆根瘤细胞溶质及相关的大豆差异蛋白质组的研究。

1 大豆蛋白提取方法的研究

适于双向电泳的大豆蛋白提取方法是开展大豆蛋白质组学研究的基础,因此,国内外已进行了许多这方面的研究。2005年,Natarajan等^[1]比较了4种蛋白质提取方法,提取溶剂分别是脲、硫脲/脲、酚和一种改良的三氯乙酸/丙酮法,通过双向电泳精确分析了大豆品种Williams 82种子蛋白质。结

果表明,硫脲/脲和三氯乙酸/丙酮提取法对于双向电泳分离大豆种子蛋白来说是有效和可靠的,而脲和酚试剂提取法下双向电泳所能分辨的蛋白点有所减少。硫脲/脲和三氯乙酸/丙酮提取法排除了非蛋白质和蛋白水解成分在等电聚焦阶段的干扰。利用改良的三氯乙酸/丙酮法获取15个蛋白点后,接着进行MALDI-TOF-MS和LC-MS,都获得了高质量质谱,说明三氯乙酸/丙酮法与MS分析具有兼容性。4种提取方法下大豆种子的2种主要贮藏蛋白—— β 伴大豆球蛋白(7S)和大豆球蛋白(11S)的酸性与碱性多肽链均能很好的分离。低丰度非贮藏蛋白如乙醇脱氢酶、胰蛋白酶抑制剂、过敏蛋白和蔗糖结合蛋白在用脲和酚试剂提取下只有弱点或检测不到蛋白质点,但用硫脲/脲和三氯乙酸/丙酮法提取的却分辨得很清楚。郑蕊等^[2]以大豆种子为材料,通过对样品制备、电泳条件以及染色方法等关键步骤进行改进,在大豆种子蛋白分析研究获得了质量较高的双向电泳图谱。由于大豆种

收稿日期:2010-03-09

基金项目:衡阳师范学院科学基金资助项目(09A40);湖南省高等学校科研资助项目(08C171)。

第一作者简介:刘春(1978-),男,硕士,讲师,研究方向为植物生化与分子生物学。E-mail:liuchunxl@163.com。

子中高丰度的 7S 和 11S 蛋白掩盖了低丰度种子蛋白的提取和分析,Natarajan 等^[3]研究了适于双向电泳的大豆种子低丰度蛋白的提取方法,从而在单向聚丙烯酰胺凝胶电泳和双向电泳上与主要的贮藏蛋白组分相区别。结果表明利用 40% 的异丙醇提取大豆粉可提高低丰度蛋白的提取率并适于后续的双向电泳分离和鉴定。Krishnan 等^[4]报道了用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 肌醇六磷酸进行简单的分级分离沉淀去除大豆叶片蛋白质提取物中二磷酸核酮糖羧化酶的方法。该法快速廉价,可去除大豆叶片可溶蛋白提取物中 85% 的二磷酸核酮糖羧化酶,用该法提取的大豆叶片蛋白进行的双向电泳上,利用荧光可以检测到约 230 个先前并不明显的蛋白点以及先前检测不到的 28 个磷酸化蛋白质。王雪等^[5]针对大豆叶片中蛋白含量较低,含有大量色素、酚类、醌类等次生代谢产物干扰蛋白质双向电泳分离效果的问题,以大豆叶片为材料,对样品制备、蛋白质裂解液组分、等电聚焦(IEF)参数等条件进行研究表明:采用 TCA/丙酮法提取大豆叶片总蛋白,裂解缓冲液为 $9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% CHAPS, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 0.5% Bio-Lyte, IEF 等电聚焦条件为 24 000Vh 时, 2-DE 图谱分离到的蛋白点效果最好。

2 大豆综合蛋白质组分析

2.1 大豆种子蛋白质组分析

Mooney 等^[6]改进肽指纹技术鉴定了一些先前双向电泳中已检测到的蛋白质点,并建立了一种基于自动化处理的高通量分析方法。利用这种方法分析了从双向凝胶电泳中获得的 96 个蛋白质点。利用肽指纹谱鉴定了 44 种蛋白质点。Hajduch 等^[7]利用双向电泳分别在大豆品种 Maverick 开花后 14、21、28、35 和 42 d 分析了其种子蛋白,考虑冗余因素,在 422 个蛋白点中鉴定出 216 个独立的蛋白质,其中共有 82 个蛋白质与代谢有关,52 个蛋白质点为种子贮藏蛋白 β -伴大豆球蛋白(7S)和大豆球蛋白(11S)。在种子发育期分别在代谢和贮藏蛋白中观察到一个全面的下调和上调现象,表明随着种子逐渐成熟代谢活动放缓。92 个未知蛋白点可归入疾病和防卫,能量产生,细胞生长和分化,信号转导,蛋白质合成等 5 个表达模式群,13 个蔗糖结合蛋白与 UniGene 中先前报道的蛋白质相匹配。这一结果支持先前在种子和胚芽发育期蔗糖是一个重要的信号分子的结论。

2.2 大豆其它器官的蛋白质组分析

Oehrle 等^[8]分析了大豆根瘤细胞溶质的蛋白

质组,发展了大豆根瘤细胞溶质蛋白质分离方法,该法极大的提高了双向电泳中蛋白质的分辨率。其中最丰富的蛋白质被选来做质谱分析。被鉴定的蛋白质可按功能分为:C 代谢 28%, N 代谢 12%, 活性氧代谢 12% 以及囊泡运输 11%。前三类被认为是共生生物固氮过程的生理功能。与囊泡运输有关的一系列蛋白质说明细胞膜组分与生物大分子之间的交换很活跃。在 69 个被鉴定的蛋白质中有些是糖酵解途径中三碳糖部分的酶,进一步研究表明该酶在蔗糖合成途径中给类细菌提供苹果酸。Brenchenmacher 等^[9]建立了一张大豆根毛细胞蛋白质参考图谱。利用单项电泳-液相色谱和多维蛋白质鉴定技术分析了大豆根毛细胞的蛋白质组,从大豆根毛蛋白质组参考图谱上检测到 1492 个不同的蛋白质点。接着利用质谱鉴定了其中的 527 个蛋白质,鸟枪法分析补充鉴定了 1134 个蛋白质,包括 443 个微粒体特异蛋白,联合利用 2D-PAGE 和鸟枪法鉴定了 169 个蛋白。这些被鉴定的蛋白质不仅与基本细胞代谢有关而且在功能上具有水分和营养吸收、囊泡运输以及激素和次生代谢等根毛细胞的特异性,这些数据对于深入了解单一已分化的植物细胞类型的代谢活动是有用的。

Ahsan 等^[10]比较分析不同发育阶段叶子和花的蛋白质组,揭示了大豆蛋白质器官特异性功能分化。对不同发育阶段叶子的蛋白质组分析发现 26 个差异表达蛋白质,在三叶期叶绿体被膜内外转运蛋白装置的易位子蛋白显著增加。免疫印迹分析显示伴侣蛋白 60 在幼叶中表达丰富,而 HSP 70 和 ATP 合成酶 b 在所有组织中组成型表达。净光合作用率和叶绿素含量与叶龄相关。比较花芽和花蛋白质组显示 29 个差异表达蛋白质,其中与线粒体蛋白质运输和组装、次生代谢和花粉管生长相关的蛋白质在花发育期间上调。综合叶片和花的蛋白质组结果,发现在发育期间各种类型的组织与特异蛋白质相关,其中涉及能量代谢、糖代谢、大分子的折叠与组装和转运的蛋白质在组织器官的成熟过程中可能起了关键的作用。

3 大豆差异蛋白质组分析

差异蛋白质组是蛋白质组学研究的一个主要内容,其核心在于寻找某种特定因素引起的样本间蛋白质组的差异,揭示并验证蛋白质组在发育、生理或病理过程中的变化。进一步对蛋白质组差异信息分析后,理论上可以推断造成这种变化的原因。

3.1 大豆种子差异蛋白质组分析

Natarajan 等^[11]利用蛋白质组学分析方法研究了野生型 (*Glycine soja*) 和栽培型 (*Glycine max*) 大豆种子贮藏蛋白的差异。蛋白质组方法被用来分离、鉴定和比较 2 种主要的蛋白质, β -伴大豆球蛋白和 大豆球蛋白, 在野生型和栽培种大豆种子之间的差异。利用双向电泳和 3 种不同的 IPG 胶条有效的分离一系列高丰度和低丰度贮藏蛋白。在 pH3 ~ 10 时大部分 β -伴大豆球蛋白亚基能很好的分离, 而 pH 范围为 4 ~ 8 和 6 ~ 11 时能分别分离大豆球蛋白酸性和碱性多肽链。虽然 2 种基因型的蛋白点在 pH 3 ~ 10 时整体分布图谱具有相似性, 但蛋白点的数量和强度变化在联合利用 pH 4 ~ 7 和 pH 6 ~ 11 胶条时分辨率要好些。在野生型和栽培型大豆中分别检测到 44 和 34 个贮藏蛋白点。李春梅等^[12]运用蛋白质组学方法比较研究 3 个野生大豆和 3 个栽培大豆的种子贮藏蛋白差异情况。结果发现, 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, 利用 MALDI-TOF-MS 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。

徐晓燕等^[13]运用蛋白质组学技术对大豆 (*Glycine max*) N2899 种子萌发 0、8、36、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 MALDI-TOF-MS 测定均获得肽质量指纹谱。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。

3.2 大豆雄性不育差异蛋白质组分析

曾维英等^[14]对 NJCMS2A 和 NJCMS2B 的二胞花粉期花药进行蛋白质组比较分析, 在分子量 18.4 ~ 116.0 kD、等电点 4 ~ 7 线性范围内, 检测到约 217 个蛋白点, 其中差异表达蛋白点 25 个, 利用 MALDI-TOF-MS 对差异表达蛋白进行分析, 获得肽质量指纹图谱, 用 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库,

鉴定出 14 个差异表达蛋白, 其中 10 个在 NJCMS2A 中出现而在 NJCMS2B 中缺失和 4 个在 NJCMS2A 中缺失而在 NJCMS2B 中出现。对热激蛋白 22 kD、半胱氨酸蛋白酶、V 型 H^+ -ATP 酶 A 亚基、MADS 盒蛋白和淀粉分支酶等主要差异蛋白进行功能分析, 推测不育系 NJCMS2A 雄性不育性可能与能量代谢紊乱、细胞程序化死亡 (PCD)、淀粉合成受抑制和花器官发育调节基因作用失控等有关。稍后曾维英等^[15]以大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 和其保持系 NJCMS1B 的种子、叶片和花药为材料, 采用同样的方法, 寻找差异表达蛋白。结果发现两系花药间存在较多差异表达蛋白点, 种子间仅有少量差异表达蛋白点, 而苗期叶片间基本没有差异表达蛋白点, 表明不育基因表达具有时空性和器官特异性, 与育性有关的蛋白主要在花药中表达。

3.3 大豆抗逆境差异蛋白质组分析

Xu 等^[16]利用双向电泳系统的研究了紫外线 B 对大豆叶片蛋白质组的影响, 结果表明高黄酮类含量可在蛋白质组水平降低大豆对紫外线 B 辐射的敏感性。Ren 等^[17]利用蛋白质组技术研究了大豆处于高温条件下收获的种子的活力和蛋白质组成, R5 至 R8 期昼夜温度为 37/30°C 的大豆较之昼夜温度为 27/18°C 的其单个脂肪酸与总脂肪酸的比率改变、糖浓度降低, 但总蛋白和植酸浓度未变。蛋白质组学分析检测到 20 个蛋白质的丰度由于高温的影响而改变。14 个蛋白点被鉴定为种子贮藏蛋白的 7 个亚基。其余的 6 个蛋白被鉴定为应答非生物胁迫或具有呼吸方面功能的相关蛋白, 如蔗糖结合蛋白、第 III 类酸性内切壳多糖、HSP22、LEA 蛋白、Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂和甲酸脱氢酶。其结果表明种子发育期高温改变大豆种子物质组成、降低种子活力, 并且改变种子蛋白质表达模式。Danchenko 等^[18]利用高通量蛋白质组学技术研究大豆对高辐射环境的适应机理。结果表明在切尔诺贝利 (乌克兰北部城市, 1986 年切尔诺贝利核电站发生泄漏事故) 地区大豆对辐射的适应机理与其对重金属胁迫、辐射损伤防护和种子贮藏蛋白的转移的适应性有关。

赫卫等^[19]对大豆光周期敏感型品种东农 42 分别进行 16 h 和 8 h 光照处理, 提取处理和对照相同叶位叶片的全蛋白质进行双向电泳, 通过 PDQuest 和液相离子阱质谱 (LC-ESI-MS) 技术对差异表达蛋白进行分析, 获得二级质谱图谱, 用 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库, 鉴定出 16 个差异表达蛋白, 其中 12 个表达量上调, 4 个表达量下调。对谷胱甘肽 S-转移酶、二硫键异构酶、TCTP、半胱氨酸合成酶、

Rieske 铁硫蛋白前体、金属蛋白酶等主要差异蛋白进行功能分析,表明这些蛋白与植物的光合作用、信号转导、细胞凋亡的调控、防卫解毒和能量代谢等多种植物的生理生化功能相关。

邱红梅等^[20]利用双向电泳及 MALDI-TOF-MS 技术分析绥农 10 号真叶接种疫霉菌 1 号生理小种后的蛋白质组变化。在抗病品种绥农 10 号叶片中共获得 19 个差异表达蛋白点,其中有 12 个上调表达,6 个下调表达,1 个特异表达(仅在接种后出现)。利用生物质谱分析 8 个上调表达点、1 个下调表达点和 1 个特异表达点,最终鉴定得到 8 个有注释功能的蛋白,根据功能可分为 4 类,第 1 类为参与新陈代谢的蛋白,包括二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基及前体、琥珀酰-辅酶 A;第 2 类为参与信号转导的蛋白,包括激酶受体类蛋白、氧化还原酶和半胱氨酸氧化还原酶;第 3 类为参与细胞内物质运输的蛋白,包括衣壳蛋白的 zeta-3 亚基;第 4 类为转录因子,是在茉莉酸途径中参与介导的 F-box 蛋白。这些蛋白可为进一步研究大豆抗病机制奠定基础。

4 大豆蛋白质组数据库

4.1 植物蛋白质组数据库

2-DE 技术通过大小和电荷分析蛋白质。在仔细的标化条件下,单是凝胶上的位置就足够识别一些蛋白质。SWISS-2DPAGE 是在 ExPASy 服务器上的数据库(<http://www.expasy.ch/ch2d/>),为在 2D 凝胶上预测蛋白质迁移提供了许多标化的凝胶图象和工具。比较已知细胞类型或组织的凝胶和 SWISS-2DPAGE 的图象集可以帮助识别关键标志物,但是实际上详细的比对低到中等丰度的蛋白质有困难,除非凝胶在同一实验室中在严格控制条件下电泳。其难度是由于蛋白质样品本身的变化性、样品制备的不可重复性以及任何凝胶系统不能完全分辨样品中的所有蛋白质。质谱(Mass Spectrometry, MS)分析是一种测量离子荷质比(电荷-质量比)的分析方法,其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离,生成不同荷质比的带正电荷的离子,经加速电场的作用,形成离子束,进入质量分析器。在质量分析器中,再利用电场和磁场使发生相反的速度色散,将它们分别聚焦而得到质谱图,从而确定其质量。MS 有希望帮助排除凝胶对凝胶方式比对的需要,它可以从凝胶分离的蛋白质酶解肽段获得高度精确的质量,在有效的数据库情况下它们就能进行蛋白质识别。通过肽段质量识别蛋白质的资源包括 ExPASy 的 PeptIdent 工具、PROWL 的 PepFrag、Protein Prospector 的 MS-FIT 和

MA-TAG 以及 SEQUEST。通过肽质量识别蛋白质需要进入一个蛋白质序列数据库。最常用的数据库是 SWISS-PROT、TrEMBL(<http://www.expasy.ch/sprot/>)和美国的国立生物技术信息中心(NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的蛋白质序列非重复(nr)集合。SWISS-PROT 是 ExPASy 服务器上的蛋白质序列的注解的集合;TrEMBL 是一个给以自动注解的蛋白质预测序列的大集合,直到它们完全注解后并进入 SWISS-PROT;NCBI nr 数据库含有整个 GenBank 保存的 DNA 序列所翻译的蛋白质序列以及 PDB(<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>)、SWISS-PROT 和 PIR 数据库(<http://pir.georgetown.edu/>)里的蛋白质序列。蛋白质序列数据库也提供额外的信息,包括简要的功能描述(如果已知)、序列特征(比如修饰信号)的注解、二级和三级结构的预测、关键参考文献和与其它数据库的链接^[21]。

4.2 大豆蛋白质组数据库

近年来,几种植物的蛋白质组数据库也已建立,尤其是水稻、拟南芥等模式植物,其蛋白质组数据库资源日益丰富。相比之下,大豆蛋白质组数据库相对滞后,Hajdich 等 2005 年建立了一张高分辨率的蛋白质组参考图谱,该图谱可分辨 679 个蛋白质点,及每个点相应的 MALDI-TOF-MS 质谱数据^[7]。在此基础上整合其它油料蛋白的信息资源建立了一个可以查询大豆和其它油料作物的研究进展的数据库(<http://www.oilseedproteomics.missouri.edu/>)。

Sakata 等^[22]建立了一个大豆对水涝响应的大分子功能分析的蛋白质组数据库,当前释放了 21 张大豆蛋白双向电泳参考图谱,电泳样品来源于大豆品种 Enrei 的几种器官、组织和细胞器。在这些参考图谱中检测到 7311 个蛋白点并鉴定了其中的 532 个蛋白质,该数据库可通过诸如登录号、特征描述及等电点和分子量范围等蛋白质属性来查询。大豆蛋白质组数据库同样整合了多种组学资源,揭示了 106 个 mRNA、51 个蛋白质和 89 个代谢分子之间的关系在水涝胁迫的整个过程中是变化的,一个统一的隶属于 mRNA、蛋白质和代谢分子的临时表达标签有助于基于临时表达模式的数据检索。基于动态的 HTML 图形用户界面有助于用统一的方法检视代谢组网络和多组学模式。该数据库入口为 <http://proteome.dc.affrc.go.jp/Soybean/>。

5 展望

尽管当前大豆蛋白质组研究的深度与广度仍

然显著低于其它植物,但是大豆蛋白质组参考图谱为大豆中天然产物生物合成机理、与生物/非生物胁迫相关的功能基因组学研究创造了一个起点。后续研究将致力于发展有益于快速比较大豆品种、突变体和转基因品系间蛋白质差异的大豆蛋白质组图谱。而大豆生理、组成成分分析研究将受益于日益增加的大豆蛋白质参考图谱数量和详细的描述。从大豆蛋白质组学中获得的信息将有助于预测植物蛋白的功能和相应基因的分子克隆。鉴定新基因、测定植株对胁迫反应的表达模式以及理解其在胁迫条件下的基因功能,将提供提高大豆胁迫耐受性的有效的基因工程策略。

参考文献

- [1] Natarajan S, Xu C, Caperna T J, et al. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 342: 214-220.
- [2] 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[J]. *大豆科学*, 2005, 24 (3): 166-170. (Zheng R, Yu D Y. Improvement of two-dimensional electrophoresis of soybean seed protein for proteome analysis[J]. *Soybean Science*, 2005, 24(3): 166-170.)
- [3] Natarajan S S, Krishnan H B, Lakshman S, et al. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 394 (2): 259-268.
- [4] Krishnan H B, Natarajan S S. A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1958-1964.
- [5] 王雪, 段玉玺, 陈立杰. 适用于大豆叶片蛋白质组分析的双向电泳最佳条件研究[J]. *大豆科学*, 2009, 28 (2): 325-328. (Wang X, Duan Y X, Chen L J. A two-dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic analysis of soybean leaves[J]. *Soybean Science*, 2009, 28 (2): 325-328.)
- [6] Mooney B P, Krishnan H B, Thelen J J. High-throughput peptide mass finger printing of soybean seed proteins; automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1733-1744.
- [7] 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[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137: 1397-1419.
- [8] Oehrle N W, Sarma A D, Waters J K, et al. Proteomic analysis of soybean nodule cytosol [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69: 2426-2438.
- [9] Brechenmacher L, Lee J, Sachdev S, et al. Establishment of a protein reference map for soybean root hair cells [J]. *Plant Physiology*, 2009, 149: 670-682.
- [10] Ahsan N, Komatsu S. Comparative analyses of the proteomes of leaves and flowers at various stages of development reveal organ-specific functional differentiation of proteins in soybean[J]. *Proteomics*, 2009, 9: 4889-4907.
- [11] Natarajan S S, Xu C, Bae H, et al. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, 54: 3114-3120.
- [12] 李春梅 杨守萍 盖钧镒, 等. 野生大豆与栽培大豆种子差异蛋白质组学研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34 (12): 1296-1302. (Li C M, Yang S P, Gai J Y, et al. Comparative proteomic analysis of wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34 (12): 1296-1302.)
- [13] 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[J]. *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. Differential proteomic analysis of seed germination in soybean[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33 (11): 1106-1112.)
- [14] 曾维英, 杨守萍, 喻德跃, 等. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS2A 及其保持系的花药蛋白质组比较研究[J]. *作物学报*, 2007, 33 (10): 1637-1643. (Zeng W Y, Yang S P, Yu D Y, et al. Comparative study on anther proteomics between cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS2A and its maintainer of soybean[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33 (10): 1637-1643.)
- [15] 曾维英 杨守萍 盖钧镒, 等. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 和其保持系的不同器官蛋白质组比较[J]. *大豆科学*, 2008, 27 (1): 8-14. (Zeng W Y, Yang S P, Gai J Y, et al. Comparative proteome analysis of different organs between cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A and its maintainer in soybeans[J]. *Soybean Science*, 2008, 27 (1): 8-14.)
- [16] Xu C, Sullivan J H, Garrett W M. et al. Impact of solar Ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69: 38-48.
- [17] Ren C, Bilyeu K D, Beuselinck P R. Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature[J]. *Crop Science*, 2009, 49: 1010-1022.
- [18] Danchenko M, Skultety L, Rashydov N M, et al. Proteomic analysis of mature soybean seeds from the chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8: 2915-2922, 2915.
- [19] 赫卫, 姜振峰, 赵琳, 等. 不同光长条件下大豆蛋白质组比较研究[J]. *大豆科学*, 2009, 28 (3): 388-393. (Hao W, Jiang Z F, Zhao L, et al. A comparative study on soybean leaf proteomics under different photoperiod treatments[J]. *Soybean Science*, 2009, 28 (3): 388-393.)
- [20] 邱红梅 刘春燕 张代军, 等. 大豆抗疫霉根腐病的蛋白组研究[J]. *作物学报*, 2009, 35 (3): 418-423. (Qiu H M, Liu C Y, Zhang D J, et al. Proteome analysis on resistance to phytophthora root rot in soybean[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35 (3): 418-423.)
- [21] Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, et al. The SWISS-PROT protein knowledge-base and its supplement TrEMBL in 2003 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 365-70.
- [22] Sakata K, Ohyanagi H, Nobori H, et al. Soybean proteome database: A data resource for plant differential proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8 (7): 3539-3548.