

无硫复合护色剂处理的干制苹果片中差异蛋白表达的分析

李新明¹, 郭志利¹, 李群¹, 高忠东¹, 王峰¹, 田志芳¹, 徐琳¹, 王贤萍², 刘森¹

(1. 山西省农业科学院农产品加工研究所, 山西太原 030031; 2. 山西省农业科学院果树研究所, 山西太原 030031)

摘要 [目的]分析经无硫复合护色剂处理的苹果片在干制后差异蛋白的表达情况。[方法]采用无标记(Label-free)定量蛋白质组学技术对复合护色剂处理的干制苹果片进行蛋白质组学研究,探讨蛋白质组表达水平的差异。所提取的蛋白质样品经酶解、色谱质谱检测分析,用Label-free定性定量软件maxquant(1.5.0.12)结合搜库定性软件Andromeda,对每个样本进行定性定量,通过蛋白质相对定量的比较寻找差异表达蛋白。[结果]与非处理苹果片相比,差异蛋白总数为909个,上调差异蛋白319个,下调差异蛋白590个;生物学过程主要集中在代谢过程、细胞过程。分子功能主要在结合、催化活性、能量代谢等部分。细胞组件主要集中在细胞膜相关的部件。[结论]该研究可为解析复合护色剂处理后干制苹果片中次生代谢物差异的成因及其抑制褐变的蛋白质机制提供参考。

关键词 干制苹果片;Label-free;褐变;护色;差异蛋白

中图分类号 TS255.42 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)28-0071-03

Analysis of Differential Protein Expression in Dried Apple Slices Treated with Sulfur Free Composite Color Protection Agent

LI Xin-ming, GUO Zhi-li, LI Qun et al (Institute of Agricultural Product Processing, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract [Objective] To analyze the expression of differentially expressed proteins in dried apple slices treated with sulfur free composite color protection agent. [Method] Proteomic analysis of dry apple slices treated with composite color protection agents was carried out using unlabeled (Label-free) quantitative proteomic techniques to investigate the differences in protein expression levels. The analysis of the extracted protein samples by enzymolysis and GC-MS detection, using Label-free quantitative software maxquant (1.5.0.12) combined with qualitative database search software Andromeda, the qualitative and quantitative of each sample, the protein relative quantitative comparison for different expression of protein. [Result] Compared with untreated apple slices, the total number of differentially expressed proteins was 909, up to 319 differentially expressed proteins and 590 down regulated proteins. The biological process mainly focused on the metabolic process and the cellular process. The molecular functions were mainly binding, catalytic activity, energy metabolism and so on. Cell components were mainly concentrated in cell membrane related components. [Conclusion] This study can provide a reference for the analysis of the causes of the secondary metabolite differences in the dried apple slices and the mechanism of protein inhibition of browning.

Key words Dried apple slices; Label-free; Browning; Color protection; Differential proteins

蛋白质组学分析方法已经在许多领域得到广泛应用,如生命科学领域(细胞生物学、神经生物学等),涉及的生物种类范围很多,如原核生物、真核生物、植物和动物等。在医学领域,蛋白质组学将成为寻找疾病分子标记和药物靶标最有效的方法之一^[1]。蛋白质组学分析研究中需要使用多种方法,鉴定蛋白质需要应用质谱方法,标记或染色等可以通过定量分析等方法来完成。如今,不使用其他方法,同时实现蛋白质的定性和定量仅靠质谱就可完成,这就是无标记(Label-free)定量蛋白质组学研究方法,也是现在定量蛋白质组学研究的有效新方法,它直接利用蛋白质质谱鉴定中产生的肽段数据(重复肽段数和强度)进行蛋白相对定量^[2-4]。

去皮后苹果的果肉褐变主要为酶促褐变,导致褐变的酶有很多种,其中多酚氧化酶是最主要的,酶促反应的进行需要4个因素,即氧、多酚氧化酶、底物、铜离子^[5]。抑制这种反应可以通过除去氧,降低活性铜离子和底物浓度或直接钝化酶来实现^[6]。还有一种褐变为非酶褐变。在苹果干制过程中,温度会引起果肉中各种蛋白的表达变化,通过检测这些功能蛋白的差异表达,可以从分子水平为褐变抑制提供理

论指导。

1 材料与方法

1.1 材料 供试苹果为太谷产的红富士苹果。

1.2 方法

1.2.1 样品处理。洗净苹果,将苹果切成1 mm的薄片,均等分成2份;其中一份放置于空气中4 h,同时另一份置于复合护色液中浸泡4 h;将2份苹果放置于45℃烘箱中烘至恒重。

1.2.2 蛋白质提取。取样品100 mg于5 mL管中,加入5颗钢珠,液氮冻存5 min,放入高通量组织研磨仪中,70 Hz 1 min;加入1 mL Lysis buffer,漩涡振荡30 s,冰上静置10 min;加入100 mg玻璃珠,漩涡振荡30 s后立即放入冰上冷却,重复6次;15 000 r/min 4℃离心30 min,收集上清液;加入终浓度25%的TCA于-20℃2 h沉淀蛋白,15 000 r/min 4℃离心10 min,去上清,蛋白沉淀用80%丙酮洗涤3次,小心去掉上清液,晾干2~3 min;用300 μL 8 mol/L urea (100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)复溶蛋白沉淀,BCA蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度,样品浓度最好≥2 mg/mL;样品置于-80℃内,待酶解。

1.2.3 蛋白质的酶解。先将蛋白用10 mmol/L DTT在37℃下进行变性处理,随后加入20 mmol/L IAA(iodoacetamide)室温反应45 min进行还原烷基化处理,蛋白样品用100 mmol/L TEAB稀释至尿素终浓度为1 mol/L,首先加入trypsin (1:50)过夜进行第1次酶解,第2次用1:100 trypsin进行

基金项目 山西省农业科学院博士研究基金项目(YBSJJ1514);山西省重点研发计划重点项目(201603D21102);山西省重点实验室项目(201605D111006)。

作者简介 李新明(1970—),男,山西太原人,副研究员,博士,从事食品科学研究。

收稿日期 2017-06-21

酶解 4 h。大概每个样本有 100 μg 的蛋白用 trypsin 进行了酶解。

在用 trypsin 进行酶解后,肽段混合物用 5% 甲酸进行酸化处理后,通过 C_{18} Spin Columns 进行除盐处理;除盐洗脱产物用 Pierce TM Quantitative Colorimetric Peptide Assay 试剂盒进行定量,冻干,最后用一定量的流动相(0.1% 甲酸水溶液)复溶肽段。

1.2.4 色谱质谱检测流程。检测用 LTQ orbitrap Velos 液质联用仪配备戴安 ultramate 3000 nano-UPLC 进行分析,上机量 10 μL ,首先进入保护柱(C_{18} PepMap100,300 $\mu\text{m} \times 1 \text{ mm}$,5 μm ,100 \AA),随后进入分析柱(AcclaimPepMap C_{18} ,15 $\text{cm} \times 75 \mu\text{m}$,2 μm ,100 \AA ,Dionex)以流速 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 进行分析,流动相梯度为 5% ~55% 流动相 B(流动相 B:乙腈,0.1% 甲酸;流动相 A:超纯水,0.1% 甲酸)以 180 min 进行检测。

质谱参数:阳离子模式,CID 碰撞模式,120 000 分辨率,

质量范围 350 ~1800,NCE 为 35%,前 15 离子强度用于 MS-MS 分析。

1.3 分析方案 Orbitrap 原始数据定性定量方法:对获得的 Label free 蛋白质原始数据,用 Label free 定性定量软件 maxquant(1.5.0.12)结合搜库定性软件 Andromeda,对每个样本进行定性定量,参考蛋白质数据库为 uniprot(收录了共 34 361条记录)。定性和检索方法:对每个样本进行“运行间匹配”,匹配时间窗口为 0.5 min,对齐时间窗口为 20 min。酶切类型为胰蛋白酶全酶切,母离子质量误差为 $\pm 10 \times 10^{-6}$,固定修饰为半胱氨酸,可变修饰为天冬酰胺、赖氨酸(肽段 N 端)和蛋氨酸(氧化),肽段和蛋白 FDR < 0.01,最少匹配 unique peptide 数目为 1,同时采用 LFQ 和 iBAQ 两参数进行蛋白定量,对获得的蛋白结果过滤掉污染序列、反向序列等获得最后的结果用于后续分析。

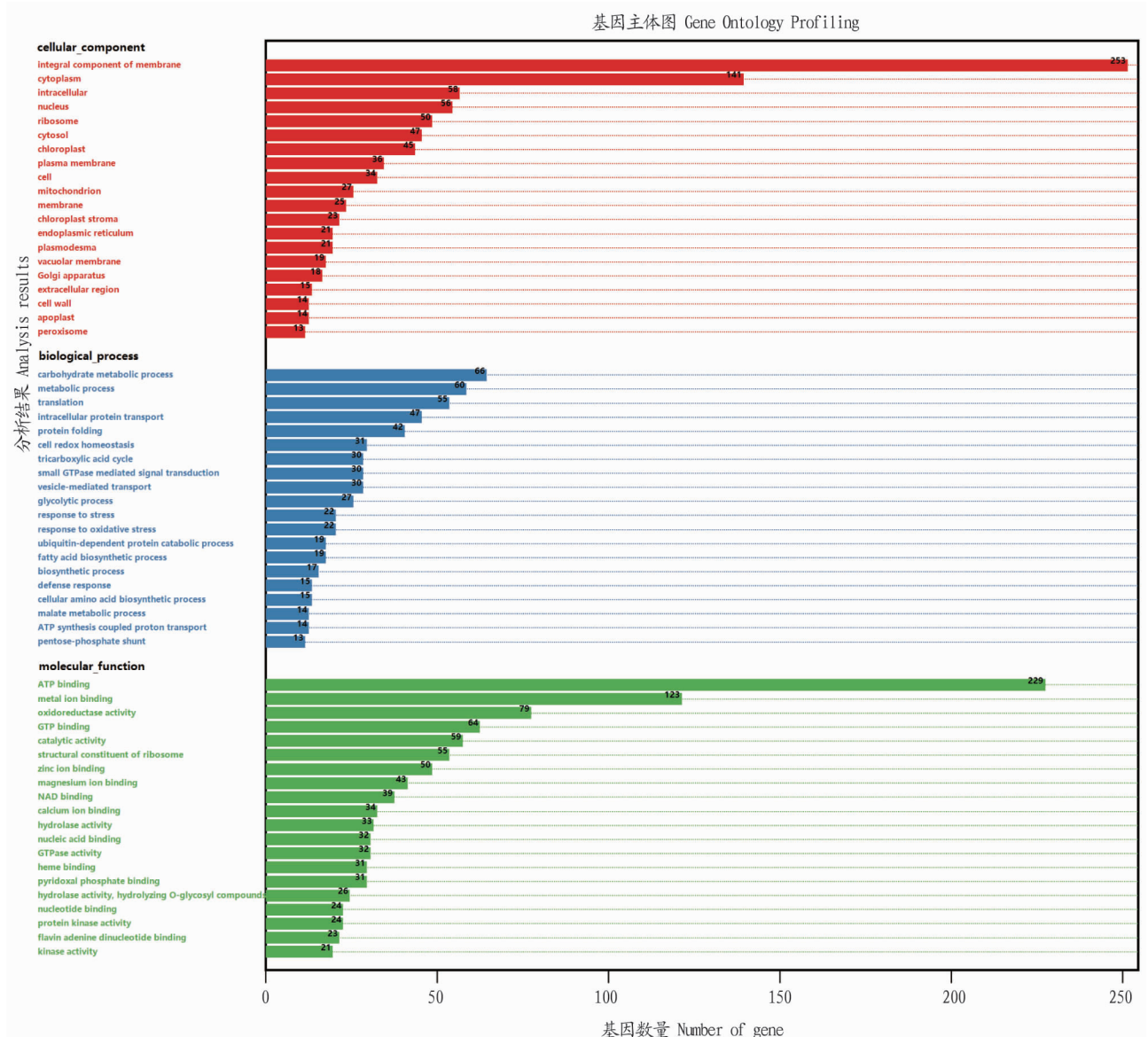


图1 总体蛋白 GO 分析

Fig.1 Total protein GO analysis

2 结果与分析

2.1 蛋白鉴定统计分析 经过定性定量分析,一共有15 180个潜在多肽的MS-MS数据,最终经过maxquant搜库以后共有7 988个多肽的MS-MS数据可以归属到已知蛋白,最终样本可以识别到1 797个蛋白(unique peptide \geq 1)。

2.2 功能注释

2.2.1 总体蛋白GO分析。蛋白参与的生物过程(BP)、所处的细胞位置(CC)、发挥的分子功能(MF)三方面功能信息是GO数据库的重要包含内容,可以把不同的功能概念组合为DAG(有向无环图)的结构。在蛋白表达谱分析中,GO常用于提供蛋白功能分类标签和蛋白功能研究的背景知识。利用GO的知识体系和结构特点,旨在发掘与蛋白差异表达现象关联的单个特征蛋白功能类或多个特征功能类的组合。

图1为GO的第2级(level 2)注释信息所整理的GO分布图。可以发现生物学过程主要集中在代谢过程、细胞过程。分子功能主要集中在结合、催化活性、能量代谢等部分。细胞组件主要集中在细胞膜相关的部件。

2.2.2 差异蛋白分析。

2.2.2.1 柱状图分析。对 A^-/A^+ 各蛋白的比例进行柱状图分析,考察蛋白的比例分布,发现大多数蛋白的比例的对数位于0附近(图2)。

2.2.2.2 差异分析。最后筛选LFQ信号强度差异倍数的 \log_2 值的绝对值在 $\log_2(1.5)$ 以上[$|\log_2(\text{Fold change})| \geq \log_2(1.5)$]为最终差异的蛋白,最终获得差异蛋白数。差异蛋白总数为909个,其中下调总数为590个,上调总数为319个。

ID:蛋白编号, $\log_2(A^-/A^+)$:组别间倍性变化值的 \log_2 值,uniprot列为经过蛋白搜库之后的匹配结果。

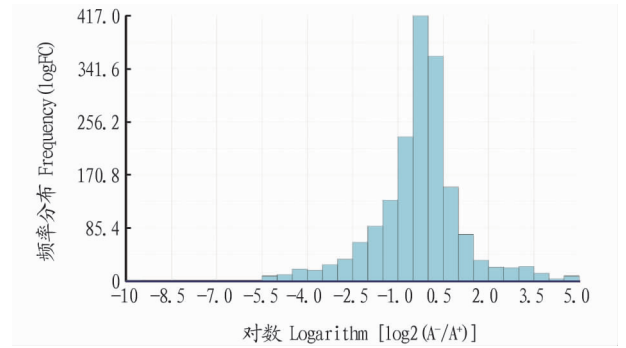


图2 柱状图分析

Fig. 2 Histogram analysis

3 结论

经复合护色剂处理的苹果片,在干制后,果肉中的蛋白差异表达分析并与非处理对照比较表明,差异蛋白总数为909个,其中下调总数为590个,上调总数为319个。其中,生物学过程主要集中在代谢过程、细胞过程。分子功能主要集中在结合、催化活性、能量代谢等部分。细胞组件主要集中在细胞膜相关的部件。

参考文献

- [1] 尹稳,伏旭,李平. 蛋白质组学的应用研究进展[J]. 生物技术通报,2014(1):32-38.
- [2] 赵慧辉,杨帆,王伟,等. 无标记定量法研究冠心病不稳定性心绞痛血瘀证的差异蛋白质组[J]. 高等学校化学学报,2010,31(2):285-292.
- [3] 郭春燕,詹克慧. 蛋白质组学技术研究进展及应用[J]. 云南农业大学学报,2010,25(4):583-591.
- [4] 杨倩,王丹,常丽丽,等. 生物质谱技术研究进展及其在蛋白质组学中的应用[J]. 中国农学通报,2015,31(1):239-246.
- [5] 姜爱丽,钟璐,胡文忠,等. 3种褐变抑制剂对减轻鲜切苹果褐变效果的影响[J]. 食品与发酵工业,2010,36(7):45-48.
- [6] 魏敏,周会玲,陈小利,等. 低温贮藏对鲜切富士苹果褐变的影响[J]. 西北林学院学报,2011,26(5):131-134.
- [7] 陆健健,何文珊,童春富,等. 湿地生态学[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [8] 陆健健,王强. 建设上海郊野公园,发挥湿地生态系统功能[J]. 上海城市规划,2013(5):19-23.
- [9] 王敏,石乔莎. 城市高密度地区绿色碳汇效能评价指标体系及实证研究:以上海市黄浦区为例[J]. 中国园林,2016(8):18-24.
- [10] 王立龙,陆林. 湿地公园研究体系构建[J]. 生态学报,2011,31(17):5081-5095.
- [11] 陈克林,陆健健,吕宪国. 中国湿地百科全书[M]. 北京:北京科学技术出版社,2009.
- [12] 王立龙,陆林,唐勇,等. 中国国家级湿地公园运行现状、区域分布格局与类型划分[J]. 生态学报,2010,30(9):2406-2415.
- [13] 吴江. 上海崇明岛东滩湿地公园生态规划研究[D]. 上海:华东师范大学,2005.
- [14] 吴后建,但新球,王隆富,等. 2001-2008年我国湿地公园研究的文献学分析[J]. 湿地科学与管理,2009,5(4):40-43.
- [15] 晋秀龙,陆林. 旅游生态学研究体系[J]. 生态学报,2009,29(2):898-909.
- [16] 张庆辉,赵捷,朱晋,等. 中国城市湿地公园研究现状[J]. 湿地科学,2013,11(1):129-135.
- [17] 张薇,陈凯,段茵,等. 湿地公园康复性景观功能分区研究:以闽江河口国家湿地公园为例[J]. 防护林科技,2017(3):41-44.
- [18] 吴后建,但新球,刘世好,等. 湖南省国家湿地公园保护价值评价[J]. 应用生态学报,2017,28(1):239-249.
- [19] 张翔. 张掖黑河湿地发展碳汇的优势与对策[J]. 湿地科学与管理,2016,12(4):30-32.
- [20] 刘颂,张莉. 城市绿地效能评价方法研究[J]. 中国城市林业,2013,11(5):6-9.
- [21] 王敏,石乔莎. 城市绿色碳汇效能影响因素及优化研究[J]. 中国城市林业,2015,13(4):1-5.
- [22] 方精云. 北半球中高纬度的森林碳库可能远小于目前的估算[J]. 植物生态学报,2000,24(5):635-638.
- [23] 任巧. 宝钢厂区植被碳储量测算、固碳效益定量化评价及碳库扩容对策[D]. 上海:华东师范大学,2012.
- [24] CAIRNS M A, BROWN S, HELMER E H, et al. Root biomass allocation in the world's upland forests[J]. Oecologia, 1997, 111(1):1-11.
- [25] 黄柳菁,张颖,邓一荣,等. 城市绿地的碳足迹核算和评估:以广州市为例[J]. 林业资源管理,2017(2):65-73.
- [26] 刘波,何师意. 洪湖湿地地质碳汇效应初步研究[J]. 资源环境与工程,2016,30(6):862-871.

(上接第70页)

应用好水体尤为重要,计划在南边浅水区增种荷花,沿水岸线增种水生植物,如再力花、菖蒲、旱伞草、紫芋等。

参考文献