基于抗体的水稻蛋白质组学——开端与展望

刘国振^①, 刘斯奇^②, 吴琳^②, 徐宁志^③

① 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001;

② 中国科学院北京基因组研究所, 北京 101318;

③ 中国医学科学院肿瘤医院, 北京 100021

E-mail: gzliu@genomics.org.cn

收稿日期: 2010-12-17; 接受日期: 2011-03-07

国家自然科学基金(批准号: 30670175, 30730007)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB109201)资助项目

doi: 10.1360/052010-760

摘要 为了深入开展水稻基因功能研究, 借鉴人类蛋白质研究中的相关理念, 提出了基于抗体的水稻蛋白质组学的策略. AbRP 的要点在于, 建立针对水稻蛋白质的抗体资源库, 利用大规模免疫分析技术, 揭示水稻蛋白质在不同时空条件下的表达状态并了解其相关功能. 用 AbRP 策略可以对特定的基因家族或途径相关蛋白质进行研究, 可以检测蛋白质的表达量及修饰的变化等. AbRP 的实施将为水稻基础和应用研究创建一个重要的支撑平台, 基于抗体的蛋白质表达数据与基因组、转录组数据相整合, 可望进一步丰富水稻乃至其他植物研究的公共数据资源.

关键词

基于抗体的水稻蛋白质组学
水稻
抗体
免疫印迹

水稻是最重要的粮食作物之一, 也是基础研究的模式植物. 近年来, 水稻基因组学研究获得了极大的发展, 包括不同亚种在内的多个水稻品种的全基因组测序已经完成^[1~3], 基因组学的成果为转录组学^[4]、蛋白质组学及功能基因组学的发展奠定了重要的基础. 在水稻蛋白质组学研究中, 利用双向电泳、多维液相色谱与质谱结合的技术, 分析了水稻不同生理条件下的蛋白质表达, 获得了许多与重要生物学过程相关的蛋白^[5~8]. 蛋白质是生物功能的主要执行者, 毫无疑问, 系统的蛋白质组学研究将在植物基础和应用研究中扮演越来越重要的角色. 然而, 从技术层面上而言, 蛋白质组分析仅仅依赖电泳、色谱和质谱的策略是远远不够的. 事实上, 在人类蛋白质组学研究计划中, 基于抗体的蛋白质组学策略

(antibody-based Proteomics, AbP)已经为蛋白质组分析奠定了一条新的方向. 为了推动水稻蛋白质组学研究的开展, 借鉴 AbP 的相关理念, 结合自身的工作, 提出了基于抗体的水稻蛋白质组学(antibody-based rice proteomics, AbRP)的研究策略. 旨在向广大同行介绍 AbRP 的基本设想, 以期对 AbRP 的研究日趋完善并具有可操作性.

1 概念的提出

采用多种抗体, 通过大规模免疫检测的方法, 分析组织或细胞内不同蛋白质在不同生理、时空条件下的存在状态并揭示其功能, 这一策略就称为“基于抗体的蛋白质组学(AbP)”.

英文引用格式: Liu G Z, Liu S Q, Wu L, et al. Antibody-based rice proteomics-the beginning and perspectives. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 173-177, doi: 10.1360/052010-760

AbP概念的提出可追溯到2001年,当时,Knepper和Masilamani^[9]用一组抗体进行了肾小管钠转运相关蛋白的分析,他们称之为“基于抗体的特定目标的蛋白质组学(antibody-based targeted proteomics)”。此后,类似的思路被不同的实验室广泛采用^[10~12]。应当说,早期的工作主要基于少数抗体的免疫学分析,只是形成了AbP理念的雏形。真正在人类蛋白质组学研究中践行这一策略是从瑞典科学家Uhlen领导的工作开始的。2005年,在The Knut and Alice Wallenberg基金的资助下,Uhlen^[13]领导了“瑞典人类蛋白质组资源项目”(the Swedish Human Proteome Resource(HPR) Program),旨在用AbP策略系统调查人类的蛋白质组。这个项目也是国际蛋白质组研究组织(human proteome organization, HuPO)人类抗体项目(human antibody initiative, HAI)的重要组成部分。在项目启动当年,制备了718个抗体,以后每年大致新增2000~3000个抗体,并进行系统表达谱的鉴定工作。2005年,项目组用所获得的700多个抗体对48个正常人组织及20个不同的肿瘤组织进行了免疫组化分析,获得了4万多张高分辨率的图片,形成了一个正常及肿瘤组织的蛋白质表达图集(Protein Atlas)^[14]。2009年,项目组报道了用800个抗体检测4个人脑组织及25个大鼠脑组织的研究结果,获得了这些抗体对应的蛋白质在不同组织、亚细胞区域的分布图及动态变化数据,其中大部分抗体的数据都是第一次获得^[15]。该项目产生的蛋白质表达数据已经公布在网上(www.proteinatlas.org),可以为相关研究提供蛋白质表达信息。HPR是一个国际合作项目,本实验室也参与了该计划的一些工作。

2 AbP策略的技术特点和可行性分析

与基于质谱的蛋白质组学路线相比,AbP的技术特点十分明确。相对于质谱的非选择性蛋白质鉴定而言,抗体可选择性地针对特定目标蛋白质群开展研究,这样的蛋白质群可以是序列相似的蛋白质家族,也可以是代谢途径、组织或器官特异基因或与特定功能、特定生物学过程相关的基因群等,这种“亚”蛋白质组研究将大大降低分析的复杂度;已有大量证据表明,在不同的生理条件下蛋白质还会表现不同的修饰形式^[16~22],抗体将有可能揭示这些蛋白质的修饰变化,从技术角度考虑,目前质谱分析一般只

能针对中高丰度的蛋白质,而高灵敏度和特异性的抗体则可应用于低丰度蛋白质的检测,质谱检测蛋白质的灵敏度还低于抗体方法,而且质谱仪的操作复杂性又远高于免疫学检测,另外后者的结果更为直观,较容易被一般生物学者所接受。

那么能否在水稻蛋白质组学研究中采用该策略呢?本课题组认为,在水稻中采用这一策略不但可行,而且与人的蛋白质组学研究相比,还具有一些技术上的有利因素。首先,水稻蛋白质与免疫动物的亲缘关系较远,经由动物产生的抗体理论上应具备更高的特异性和较低的背景;其次,水稻样品的采集比较容易,样品的均一性和重复性较好,这样会大大降低抗体鉴定的难度^[23]。在过去几年中,以水稻叶片、愈伤组织等为材料,通过双向电泳-质谱策略研究了水稻蛋白质的表达,鉴定了相关的差异表达蛋白质^[24,7,25,26]。通过制备水稻蛋白质抗体和基于抗体的蛋白质组学策略,鉴定发现了在白叶枯病抗性反应中表达发生变化的病程相关蛋白质^[27];在叶片生长过程中,发现有时特异性表达的蛋白质^[28];在对叶绿体相关蛋白质的研究中,发现了一些有意义的蛋白质协同表达现象^[29];在对组成型表达蛋白质的系统筛选中,发现了在水稻多种组织中稳定表达的蛋白质^[30];在对不同水稻品种的蛋白质表达研究中,发现了水稻亲本间蛋白质表达的多态性^[31]。这些工作为AbRP的提出积累了初步的工作经验和实验数据。

3 抗体是AbP策略的关键资源

人们对抗体的了解已经有100多年的历史,最早的抗体是经抗原免疫动物获得的免疫血清,是多克隆抗体。1975年,Kohler和Milstein^[32]应用杂交瘤技术制备出针对单个表位的抗体,即单克隆抗体,也被称为第二代抗体。抗体的应用极大地推动了医学和生物学的基础和应用研究,为疾病的诊断、预防和治疗提供了重要的资源。近年来,虽然人们也提出了多种不同的抗体制备策略,如重组抗体^[33]、噬菌体展示^[34,35]、aptamer^[36]等,但经由动物免疫系统制备抗体仍是主要路线。在免疫原的选择上,人们最初大多采用天然蛋白质的混合物,此后随着分子生物学技术的应用,可以方便地经由体外系统表达蛋白质,利用重组蛋白质制备特异抗体成为抗体制备的首选。另外,随着

化学合成多肽技术的成熟和成本降低, 也有许多文献报道采用合成多肽作为免疫原制备抗体. 在 HPR 项目中, 免疫原是人工选择的 100 个氨基酸左右的片段, 将该片段克隆在大肠杆菌中表达蛋白质, 将纯化的重组蛋白质免疫兔子制备多克隆抗体^[14]. 目前已累计完成 11200 个抗体的制备, 获得了 9 百万张免疫组化实验图片. 从该项目的执行来看, 高通量制备抗体是关键, 抗体资源库的建立为大规模实施 AbP 策略提供了保证.

实际上, 在蛋白质研究中, 抗体的作用无可替代. 除用于表达谱分析外, 抗体还是免疫共沉淀、免疫组化、ChIP-on-chip 等研究的关键资源, 可以用来揭示蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质与 DNA 的相互作用以及进行蛋白质的定位等. 与其他蛋白质相比, 抗体相对稳定, 易于储存、运输, 便于实验室间的交流及不同实验室间结果的比较.

4 水稻抗体资源库建设具有重要意义

在水稻研究早期, 人们往往利用来自动物或其他植物的同源蛋白质的抗体. 目前国际间商业渠道所能提供的水稻抗体约有 50 种. 有些实验室自主制备了水稻特异的抗体, 经文献检索和人工阅读摘要, 涉及水稻抗体的文献约 200 篇, 估计至今报道的水稻抗体数目在 150 个上下^[37~45]. 显然, 目前水稻抗体的现状远远落后于水稻研究需求, 扩大抗体数量已经成为许多水稻研究同行的共同期待, 也是实施 AbRP 策略的关键. 同水稻研究中先后建立的分子标记、基因组和 cDNA 文库、突变体库、全基因组基因芯片、全长 cDNA 克隆、转化等基础平台和关键技术体系类似^[46], 水稻抗体资源库将是又一个重要的水稻研究支撑平台, 组织开展抗体资源库建设将具有重要意义.

从操作层面来看, 自主制备抗体需要几个月的时间, 且抗体的鉴定标准不统一, 抗体质量难以保证, 自主制备抗体的成本也较高, 所以水稻抗体制备应该通过高通量、工业化的方式, 同时开展规范的评价, 这对节约社会成本、保证抗体的质量都至关重要. 在确定具体的抗体资源库路线时, 既要全面了解抗体技术的进步, 还要综合考虑成功率、成本、可操作性、用途及质量控制等因素. 因此设想, 开展水稻抗体资源库建设的目标应该是: 建立高通量、规范化的抗体

制备和 Western blotting 鉴定平台, 年生产鉴定抗体规模应该在 2000 个以上, 满足水稻研究群体及开展基于抗体的水稻蛋白质组学需要, 为此要建立配套的数据管理系统和生物资源的贮存系统; 建立水稻重要时期部位和重要生物学过程的蛋白质表达数据库, 形成蛋白质表达数据的标准格式, 并通过网站将数据及时向公众开放; 开展重要功能蛋白质抗体的免疫组化、免疫共沉淀和遗传鉴定等工作. 在过去一年时间里, 本实验室组织了 1000 个水稻蛋白质抗体的制备与鉴定工作, 获得了大量数据, 也为更大规模的抗体制备奠定了基础.

5 实施 AbRP 策略的意义

在了解基因组序列和转录信息的基础上, 了解蛋白质表达、定位信息对了解功能具有重要的科学意义, 与酵母双杂交、芯片、双向电泳-质谱、免疫共沉淀等技术体系相似, 利用 AbRP 策略可筛选生物学过程中的变化蛋白质, 发现鉴定与生物学过程相关的候选蛋白质. 由于主要农作物间有一定的亲缘关系, 蛋白质水平上的保守性允许抗体的跨物种使用, 蛋白质表达谱也可相互参照, 所以水稻的蛋白质学研究对其他植物有一定借鉴作用. 中国有丰富的水稻资源、有一支庞大且水平很高的研究队伍, 在水稻基础和应用研究中整体居国际领先地位, 采用基于抗体的蛋白质组学研究策略将是又一贡献. 另外, 作为水稻生产和研究大国, 抗体资源的国产化, 有助于推动水稻抗体的产业化.

6 展望

基于抗体的蛋白质组学策略能够揭示蛋白质的表达信息, 为蛋白质功能研究提供一种新的选择. 相信会有越来越多的水稻研究组将采用这一策略探讨具体的科学问题. 依托水稻基因组学研究的成果及中国在抗体制备方面的整体实力, 面向水稻抗体的高通量制备鉴定体系将会被迅速建立起来, 水稻抗体资源将会在政府资金和研究人员的大力支持下得到迅速积累, 预计在未来几年中, 将会制备鉴定数千乃至上万个针对重要水稻蛋白质的抗体. 与此相关的技术体系, 如蛋白质芯片^[47~49]、抗体芯片^[50,51]、高通量免疫印记、抗体靶蛋白的鉴定、修饰蛋白质特异

的抗体制备等也会受到重点关注和发展. 与人类蛋白质 Atlas 相类似的水稻蛋白质表达数据库(rice protein atlas, RPA)也将被逐步建立, 随着水稻蛋白质

表达数据的积累, 将会与基因组序列、转录数据整合, 成为整个行业研究的公共资源. 相信中国科学家将会在此领域为水稻基础和应用研究做出新的贡献.

参考文献

- 1 Goff S A. Collaboration on the rice genome. *Science*, 2002, 296: 45
- 2 Yu J, Hu S, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science*, 2002, 296: 79–92
- 3 International Rice Genome Sequencing Project. RGSP The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 2005, 436: 793–800
- 4 Wei G, Tao Y, Liu G, et al. A transcriptomic analysis of superhybrid rice LYP9 and its parents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7695–7701
- 5 Cui S, Huang F, Wang J, et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 2005, 5: 3162–3172
- 6 Zhao C, Wang J, Cao M, et al. Proteomic changes in rice leaves during development of field-grown rice plants. *Proteomics*, 2005, 5: 961–972
- 7 Yin L, Tao Y, Zhao K, et al. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation. *Proteomics*, 2007, 7: 755–768
- 8 Wan X Y, Liu J Y. Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7: 1469–1488
- 9 Knepper M A, Masilamani S. Targeted proteomics in the kidney using ensembles of antibodies. *Acta Physiol Scand*, 2001, 173: 11–21
- 10 Edwards R J, Boobis A R, Davies D S. A strategy for investigating the CYP superfamily using targeted antibodies is a paradigm for functional genomic studies. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31: 1476–1480
- 11 Pelech S, Sutter C, Zhang H. Kinetworks protein kinase multiblot analysis. *Methods Mol Biol*, 2003, 218: 99–111
- 12 Ho J, Kong J W, Choong L Y, et al. Novel breast cancer metastasis-associated proteins. *J Proteome Res*, 2009, 8: 583–594
- 13 Uhlen M, Ponten F. Antibody-based proteomics for human tissue profiling. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4: 384–393
- 14 Uhlen M, Bjorling E, Agaton C, et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4: 1920–1932
- 15 Mulder J, Bjorling E, Jonasson K, et al. Tissue profiling of the mammalian central nervous system using human antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8: 1612–1622
- 16 Komatsu S, Yano H. Update and challenges on proteomics in rice. *Proteomics*, 2006, 6: 4057–4068
- 17 Guendel I, Carpio L, Pedati C, et al. Methylation of the tumor suppressor protein, BRCA1, influences its transcriptional cofactor function. *PLoS One*, 2010, 5: e11379
- 18 Park J H, Nishidate T, Kijima K, et al. Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, 2010, 70: 2759–2769
- 19 Santonico E, Belleudi F, Panni S, et al. Multiple modification and protein interaction signals drive the Ring finger protein 11 (RNF11) E3 ligase to the endosomal compartment. *Oncogene*, 2010, 29: 5604–5618
- 20 Stephens A N, Hannan N J, Rainczuk A, et al. Post-translational modifications and protein-specific isoforms in endometriosis revealed by 2D DIGE. *J Proteome Res*, 2010, 9: 2438–2449
- 21 Tan F, Zhang K, Mujahid H, et al. Differential histone modification and protein expression associated with cell wall removal and regeneration in rice (*Oryza sativa*). *J Proteome Res*, 2011, 10: 551–563
- 22 Zou W, Chen X, Shim J H, et al. The E3 ubiquitin ligase Wwp2 regulates craniofacial development through mono-ubiquitylation of Goosecoid. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 59–65
- 23 Clancy C J, Cheng S, Nguyen M H. Antibody-based strategy to identify *Candida albicans* genes expressed during infections. *Methods Mol Biol*, 2009, 470: 169–185
- 24 Xie Z, Wang J, Cao M, et al. Pedigree analysis of an elite rice hybrid using proteomic approach. *Proteomics*, 2006, 6: 474–486
- 25 Zhao C, Zhao B, Ren Y, et al. Seeking transformation markers: an analysis of differential tissue proteomes on the rice germplasm generated from transformation of *Echinochloa crusgalli* genomic DNA. *J Proteome Res*, 2007, 6: 1354–1363
- 26 Wang W, Meng B, Ge X, et al. Proteomic profiling of rice embryos from a hybrid rice cultivar and its parental lines. *Proteomics*, 2008, 8: 4808–4821
- 27 Wu Q, Hou M, Li L, et al. Induction of pathogenesis-related proteins in rice bacterial blight resistant gene Xa21-mediated interactions with

- Xanthomonas Oryzae* pv. *Oryzae*. J Plant Pathol, 2011, in press
- 28 陈浩, 李莉云, 白辉, 等. 水稻 U-box 蛋白质在不同发育时期的表达分析. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36: 1208–1214
- 29 白辉, 王宪云, 曹英豪, 等. 水稻叶绿体蛋白质在生长发育过程中的表达研究. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37: 988–995
- 30 Li X, Bai H, Wang X, et al. Identification and validation of rice reference proteins for Western blotting. J Exp Bot, 2011, in press
- 31 王宪云, 刘钊, 曹英豪, 等. 水稻骨干亲本不同发育时期蛋白质表达的多态性研究. 中国农业科学, 2011, in press
- 32 Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, 256: 495–497
- 33 Valle R P, Jendoubi M. Antibody-based technologies for target discovery. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003, 6: 197–203
- 34 Geuijen C A, Bijl N, Smit R C, et al. A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. Eur J Cancer, 2005, 41: 178–187
- 35 Geuijen C A, Bakker A, Qde K J. Identification of target membrane proteins as detected by phage antibodies. Methods Mol Biol, 2009, 528: 141–158
- 36 Murphy M B, Fuller S T, Richardson P M, et al. An improved method for the *in vitro* evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. Nucleic Acids Res, 2003, 31: e110
- 37 Lin C, Fang J, Xu X, et al. A built-in strategy for containment of transgenic plants: creation of selectively terminable transgenic rice. PLoS One, 2008, 3: e1818
- 38 Sun S Y, Chao D Y, Li X M, et al. OsHAL3 mediates a new pathway in the light-regulated growth of rice. Nat Cell Biol, 2009, 11: 845–851
- 39 Jiao Y, Wang Y, Xue D, et al. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. Nat Genet, 2010, 42: 541–544
- 40 Park C J, Bart R, Chern M, et al. Overexpression of the endoplasmic reticulum chaperone BiP3 regulates XA21-mediated innate immunity in rice. PLoS One, 2010, 5: e9262
- 41 Wang M, Wang K, Tang D, et al. The central element protein ZEP1 of the synaptonemal complex regulates the number of crossovers during meiosis in rice. Plant Cell, 2010, 22: 417–430
- 42 Wang Y, Ren Y, Liu X, et al. OsRab5a regulates endomembrane organization and storage protein trafficking in rice endosperm cells. Plant J, 2010, 64: 812–824
- 43 Yue R, Wang X, Chen J, et al. A rice stromal processing peptidase regulates chloroplast and root development. Plant Cell Physiol, 2010, 51: 475–485
- 44 Zhang H, Liang W, Yang X, et al. Carbon starved anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development. Plant Cell, 2010, 22: 672–689
- 45 Zhao L, Hu Y, Chong K, et al. ARAG1, an ABA-responsive DREB gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. Ann Bot, 2010, 105: 401–409
- 46 Wang Y, Li J. Rice, rising. Nat Genet, 2008, 40: 1273–1275
- 47 Andersson A C, Stromberg S, Backvall H, et al. Analysis of protein expression in cell microarrays: a tool for antibody-based proteomics. J Histochem Cytochem, 2006, 54: 1413–1423
- 48 Voshol H, Ehrat M, Traenkle J, et al. Antibody-based proteomics: analysis of signaling networks using reverse protein arrays. Febs J, 2009, 276: 6871–6879
- 49 Song Q, Liu G, Hu S, et al. Novel autoimmune hepatitis-specific autoantigens identified using protein microarray technology. J Proteome Res, 2010, 9: 30–39
- 50 Borrebaeck C A, Wingren C. High-throughput proteomics using antibody microarrays: an update. Expert Rev Mol Diagn, 2007, 7: 673–686
- 51 Kim B K, Lee J W, Park P J, et al. The multiplex bead array approach to identifying serum biomarkers associated with breast cancer. Breast Cancer Res, 2009, 11: R22