

# iTRAQ 技术及其在水稻蛋白质组学中的应用研究进展

陈凌华<sup>1,2</sup>, 程祖铎<sup>2</sup>, 许明<sup>2</sup>, 郑金贵<sup>2\*</sup>

(1.福建农林大学金山学院, 福州 350002; 2.福建农林大学作物科学学院, 福州 350002)

**摘要:**同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)是一种新型的高通量的蛋白质测序技术,其通过与高精度的质谱仪串联,可同时对多达8个样品进行定性与定量分析,测定蛋白范围广泛、检测限低、分析结果可靠、精度高;目前已广泛应用于植物体的结构、功能、表达等方面的研究。水稻是人类的主要粮食作物,也是首个完成基因组测序的谷类模式植物,在蛋白质组水平上研究水稻的生长发育、调控机制具有重要意义。综述了iTRAQ的原理、操作流程和优缺点,重点就iTRAQ技术在水稻组织器官、亚细胞水平、逆境胁迫、激素诱导、突变体等方面的蛋白质组学研究进行了分析,并对iTRAQ技术在水稻蛋白质组学上的应用研究进行了展望。

**关键词:**同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ);水稻;蛋白质组学;胁迫;激素;突变体

doi:10.13304/j.nykjdb.2017.0224

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2017)12-0014-10

## Research Advance in iTRAQ Technology and Its Application in Proteomics of Rice

CHEN Linghua<sup>1,2</sup>, CHENG Zuxin<sup>2</sup>, XU Ming<sup>2</sup>, ZHENG Jingui<sup>2\*</sup>

(1.Jinshan College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

2.College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:**Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) is a novel high-throughput technique for protein sequencing. This technology combined with high-resolution mass spectrometer is a powerful means for carrying out qualitative and quantitative analysis up to 8 samples simultaneously. This method can test wide range of protein with low limitation, and yet has reliabal and accurate results. Recently, iTRAQ technology has been widely used in studying plant structure, function and expression, etc.. Rice (*Oryza sativa* L.) is a main grain crop for human, and also the first cereal model plant completed genome sequencing. It is of great significance to study rice growth, development and regulation mechanism at the proteome level. This paper summarized the principle, operation procedure, advantages and disadvantages of iTRAQ technology, and focused on analyzing rice proteomics research in plant tissue and organ, subcellular level, environment stress, hormone induce, and rice mutant, etc.. Finally this paper prospected the application of iTRAQ technology in rice proteomics.

**Key words:**isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ); rice; proteomics; stress; hormone; mutant

1994年,“蛋白质组”的概念被首次提出,Wasinger等<sup>[1]</sup>在1995年发表了首篇蛋白质组学研究论文。所谓蛋白质组,是将蛋白质的概念和基因组的概念融合在一起,最终达到使用基因组来对蛋白质进行表达的目的。基因经过转录、翻译、翻译后修饰等复杂生化过程转变为蛋白质,蛋白质是最后生命功能的体现者。蛋白质组学通过

在大规模水平上研究不同时空发挥特定生理功能的蛋白质,进而阐明蛋白质整体的相关信息。通过获取关键蛋白质的定性、定量信息,才能有效研究蛋白质的功能与互作方式,蛋白的表达以及翻译后修饰等问题。

近年来随着科学技术的发展,以同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tags for relative and

收稿日期:2017-04-14; 接受日期:2017-06-05

基金项目:福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT160685)资助。

作者简介:陈凌华,讲师,硕士,研究方向为植物生物化学与分子生物学。E-mail:clinghua\_91@126.com。\*通信作者:郑金贵,教授,博士生导师,研究方向为作物品质遗传育种与生物技术。E-mail:jingui Zheng@126.com

absolute quantitation, iTRAQ) 为代表的高通量蛋白质组学技术已得到广泛深入的应用。iTRAQ 技术是美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems Inc., ABI) 于 2004 年研发的一种多肽体外同位素标记技术,它采用 4 种或 8 种同位素质量标签,特异性标记多肽,经质谱分析对样品蛋白或肽段进行准确的定性鉴别和定量分析<sup>[2]</sup>。目前,iTRAQ 方法广泛应用于高通量比较蛋白质组学分析,能科学揭示不同生理状态的胞内蛋白质的动态变化过程;并广泛应用于基因与蛋白的表达互作分析、信号转导、翻译后修饰等研究领域。

水稻是世界上最主要的三大粮食作物之一,全球 50% 以上人口以水稻为主食<sup>[3]</sup>,水稻也是我国最主要的栽培作物之一。水稻具有基因组小、重复序列少等特点,作为首个完成基因组测序的谷类模式作物,水稻蛋白质组学研究发展迅速。1993 年,首份水稻蛋白质组研究见报<sup>[4]</sup>,目前水稻的各组织、细胞(包含根、茎、叶、胚乳、胚、叶鞘、花粉等)的蛋白表达谱已建立<sup>[5]</sup>,组织特异性蛋白和功能相关蛋白得到深入研究。随着蛋白质组学技术的快速发展,iTRAQ 作为一种全面、系统的技术手段已广泛应用于水稻蛋白质组学研究的各方面。目前,水稻蛋白质组学的研究主要集中在组织器官、亚细胞等表达模式研究;突变体、激素诱导的蛋白质组学研究;环境胁迫应答和适应过程的差异蛋白和比较蛋白质组学研究等方面。本文综述了 iTRAQ 技术的原理、操作流程和优缺点,及其在水稻蛋白质组学中的相关研究,以期水稻蛋白质组学的研究提供理论参考。

## 1 iTRAQ 技术简介

### 1.1 iTRAQ 技术的基本原理与操作流程

iTRAQ 技术是种新型强大的蛋白质组学技术,以八标的 iTRAQ 试剂为例,它是由 8 种相对分子质量都是 305 的等量异位标签分子构成<sup>[6,7]</sup>。iTRAQ 试剂由 3 部分构成,分别为:报告基团(相对分子质量为 113、114、115、116、117、118、119 和 121)、平衡基团(相对分子质量为 192、191、190、189、188、187、186 和 184)和肽反应基团(含有一个相同的氨基酸特异性多肽)。因苯丙氨酸质荷比是 120,为避免其干扰质谱鉴定结果,标记试剂的报告基团中无相对分子质量为

120 的标签分子。肽反应基团将肽段的 N-端基团、每个赖氨酸的侧链与 iTRAQ 试剂相连,标记酶解肽段;平衡基团作为中间媒介将肽反应基团与报告基团连接起来。iTRAQ 标记的同一肽段在平衡基团的作用下具有相同的质荷比,所以样品在任何一种 iTRAQ 试剂标记后,在一级质谱测试中都具有相同的分子量;随后的串联质谱检测时,样品在碰撞诱导下解离,标记蛋白在二级质谱中分解为氨基酸部分、平衡基团与报告基团。报告基团在质谱图上表现出的波峰的面积与峰高表征了蛋白的相对丰度。同时多肽酰胺键断裂,一系列 y 离子和 b 离子形成,通过数据库检索比较可获得对应的蛋白前体。

iTRAQ 技术的操作流程(图 1)<sup>[8,9]</sup>是:①提取蛋白样品;②烷基化处理蛋白样品,打开二硫键;③蛋白质浓度测定,胰蛋白酶酶解得到肽段;④iTRAQ 标记酶解后肽段的 N-端以及赖氨酸侧链,报告基团通过平衡基团与反应基团相连;⑤等量混合标记肽段,强阳离子交换色谱(SCX)预分离;⑥液相串联质谱(LC-MS/MS)分析。iTRAQ 实验产生极其大量的质谱图谱,根据波峰高度和面积可获得数千个蛋白或多肽的定性定量信息。iTRAQ 蛋白数据的分析需借助生物信息学方法,iTRAQ 制造商(ABI)提供的软件如 MASCOT、Protein Pilot、Pro Quant 等已有效应用于蛋白数据分析与解释。

### 1.2 iTRAQ 技术的优缺点

iTRAQ 蛋白质定量技术的主要优势<sup>[10,11]</sup>有:①测定蛋白范围广泛,极大提高了蛋白鉴定的覆盖度;iTRAQ 试剂能同时标记肽段的 N-端基团和赖氨酸侧链的  $\epsilon$  氨基,因此样品中几乎所有蛋白质均能被 iTRAQ 标记,包含双向电泳技术(2D-DIGE)无法检测到的蛋白(如疏水蛋白、膜蛋白、低丰度蛋白、强碱性蛋白、小于 10 kDa 或大于 200 kDa 的蛋白等),以及翻译后修饰蛋白(磷酸化、糖基化等);②定量与定性同时进行,高通量,分析结果可靠,精度高;可提供每个组分的分子量和结构信息,可对单个蛋白的多个肽段进行定量,因 iTRAQ 试剂的报告离子为小分子物质,在质谱图中易区别于其他多肽片段离子,提高了定量的准确性和可信度,而且重复性好;③适用范围广:标记反应不在活细胞,适合所有类型蛋白质样品的分析,并可实现对蛋白质组在不同时间点、细胞周

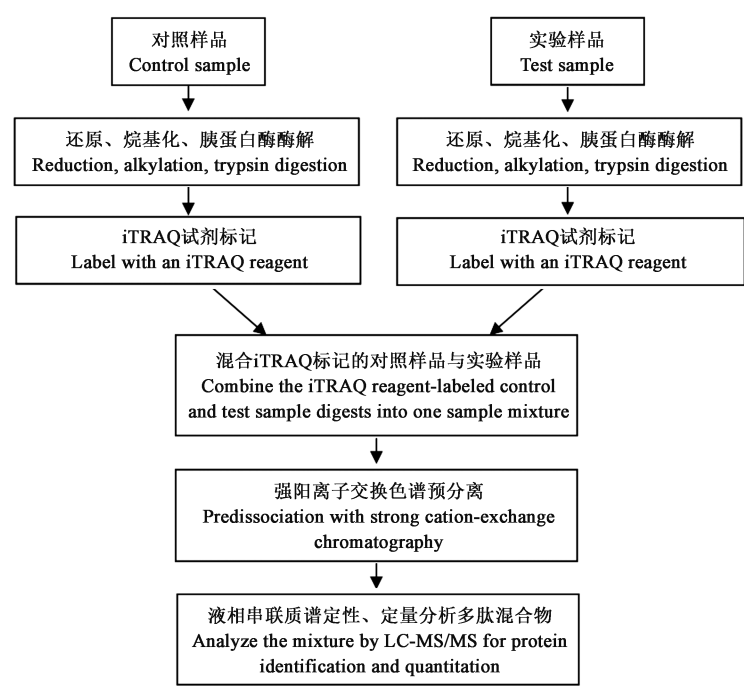


图 1 iTRAQ 技术操作流程<sup>[8,9]</sup>

Fig.1 Experimental process of iTRAQ technology<sup>[8,9]</sup>.

期以及信号传导过程的动态监测;④单次实验可同时进行多达 8 个样品的定量比较,并且检测限低,蛋白量达到 50 μg、浓度达到 5 μg/μL 即可进行检测,大大节省了样品用量、检测时间和实验过程中的技术误差等。⑤标记过程简单,质谱检测灵敏,能够处理复杂样本,分析时间快,分离效果好,自动化程度高。

但 iTRAQ 技术本身也存在某些不足之处,比如:①对于 iTRAQ 来说,它的灵敏度非常高,基本上全部的蛋白都能与之结合,这就在一定程度上决定了它容易受到其他杂蛋白或缓冲液的污染。所以,在进行处理之前,实验环境的控制是非常有必要的,预处理是必不可少的步骤,这样才能达到降低实验过程中误差的目的;②iTRAQ 试剂昂贵,需使用到质谱仪,在一定程度上也限制 iTRAQ 技术的应用;③质谱分析获得的数据量大而且复杂程度高,需使用大量的生物信息学分析。

2 iTRAQ 技术在水稻蛋白质组学中的应用

2.1 水稻组织器官蛋白质组学研究

蛋白质是有机体生命活动的主要体现者,水稻的各组织、器官在不同发育阶段的功能以及调

控的差异性,均可通过其蛋白在质与量上的变化体现出来。在蛋白质组的整体水平上对水稻的各个组织器官进行研究,能更详尽获得水稻各生长发育阶段组织器官表达的特异性,从而系统、全面地对水稻的生长发育、调控机理做出科学解释。

Zi 等<sup>[12]</sup>应用 iTRAQ 技术研究水稻胚胎发育过程的蛋白质组变化,获得 867 个显著性变化蛋白,其中上调蛋白比例为 25%,下调蛋白比例为 75%。上调蛋白主要分布在应激反应中,包含热激、脂质转移和活性氧相关蛋白,而且胁迫应答蛋白在种子发育成熟中发挥了重要作用(表 1)。Li 等<sup>[13]</sup>在对水稻花粉与柱头互作的分子机制的转录组与蛋白质组研究中,通过双向电泳技术获得 474 个蛋白点,而 iTRAQ 技术鉴定获得 521 个蛋白,明显大于双向电泳技术获得的蛋白数量;这一结果也表明 iTRAQ 技术在鉴定蛋白方面比传统的双向电泳技术更灵敏。对差异蛋白功能分析发现,授粉后,柱头活性氧大量累积,氧化还原平衡相关蛋白与转录子差异性表达,蛋白质泛素化,并在授粉期的信号转导过程中发挥重要作用。

Wang 等<sup>[14]</sup>通过 iTRAQ 技术研究水稻籽粒的颖壳在孕穗期、开花期和乳熟期的蛋白质的发育变化情况,检测到 5 268 个蛋白,差异表达蛋白

表 1 iTRAQ 技术在水稻组织器官蛋白质组学研究中的应用

Table 1 Application of iTRAQ technology in the proteomics study of tissues and organs of rice.

| 样品<br>Sample                               | 表达蛋白数<br>Number of<br>expressed proteins | 功能<br>Function   | 参考文献<br>Reference |
|--|--|--|-------------------|
| 胚胎 Embryos                                 | 867                                      | 胁迫应答蛋白 Stress responsive proteins  | [ 12]             |
| 花粉、柱头<br>Pollen, stigma                    | 521                                      | 氧化相关蛋白、蛋白质泛素化<br>Redox-regulated proteins, protein ubiquitination  | [ 13]             |
| 不同发育期颖壳<br>Hull in different growth stages | 563                                      | 叶绿素的生物合成<br>Chlorophyll biosynthesis   | [ 14]             |
| 灌浆期黑米籽粒<br>Black rice during filling stage | 230                                      | 代谢相关蛋白(氮代谢、糖代谢、光合作用、类黄酮合成代谢)<br>Metabolism related proteins (N-metabolism, glucose metabolism, photosynthesis, flavonoid biosynthesis) | [ 15]             |

有 563 个,其中 25 个差异表达蛋白在不同的发育阶段控制着水稻颖壳的发育,这些差异表达蛋白主要参与叶绿素的生物合成途径,其中镁原卟啉甲酯腺苷酸环化酶在叶绿素的碳环形成中起到关键作用。iTRAQ 技术可同时对多个时间点的蛋白质样品进行同步测定,有效地研究水稻不同生长周期的蛋白动态变化特性,并可应用于相关代谢途径研究。Chen 等<sup>[15]</sup>利用 iTRAQ 技术研究黑稻灌浆期籽粒花色苷的合成途径,在灌浆期的 5 个连续时间点上共获得 230 个与代谢途径相关的差异表达蛋白。研究发现,在籽粒花色苷合成过程中,氮代谢、光合作用、信号转导、氧化还原平衡和脂肪酸合成呈现下调的表达趋势,而类黄酮合成、糖代谢途径则处于显著的上调状态,其中参与花色苷代谢途径的蛋白查尔酮合成酶的表达模式和黑稻籽粒中花色苷含量变化过程呈高相关性。

2.2 水稻亚细胞水平的蛋白质组学研究

在水稻组织器官研究的基础上,进一步在亚细胞水平对水稻的蛋白质组进行研究,能获得有关水稻更全面的蛋白质组信息,从而为水稻相应的功能基因组学以及水稻全蛋白库的建立提供有力支持。

在水稻亚细胞水平研究方面,叶绿体研究开展的较早。Liu 等<sup>[16]</sup>应用 iTRAQ 技术研究水稻叶绿体功能时,获得 211 个差异表达蛋白,其中上调表达蛋白 63 个,下调表达蛋白 148 个;RNA 干扰的突变体在叶绿体编码的蛋白,以及核编码的叶绿体酶复合物方面呈现出低表达水平;而非叶绿体蛋白,如糖酵解和苯丙烷代谢途径的酶则呈现出上调的表达水平(表 2)。在水稻叶片维管束的分化与发育研究方面,Peng 等<sup>[17]</sup>以野生型水稻品种为对照,应用 iTRAQ 技术研究叶片中脉缺

表 2 iTRAQ 技术在水稻亚细胞水平蛋白质组学研究中的应用

Table 2 Application of iTRAQ technology in the subcellular proteome research of rice.

| 样品<br>Sample                 | 表达蛋白数<br>Number of expressed<br>proteins | 功能<br>Function   | 参考文献<br>Reference |
|------------------------------|--|--|-------------------|
| 叶绿体 Chloroplast              | 211                                      | 叶绿体酶复合物 Chloroplast enzyme complexes   | [ 16]             |
| 维管束<br>Vascular bundle       | 141                                      | 生物过程与代谢途径<br>Biological processes and metabolic pathways                                       | [ 17]             |
| 细胞质<br>Cytoplasm             | 45                                       | 应激反应、碳水化合物代谢、蛋白合成<br>Stress response, carbohydrate metabolism, protein synthesis               | [ 18]             |
| 内质网<br>Endoplasmic reticulum | 405                                      | 新陈代谢、应激/防御反应、蛋白转运与降解<br>Metabolism, stress/defense response, protein transport and degradation | [ 19]             |
| 花粉管 Pollen tube              | 192                                      | 蛋白转运、信号转导、细胞壁重塑与代谢<br>Transporters, signal transduction, wall remodeling and metabolism        | [ 20]             |



失突变体的维管束分化情况,获得 141 个差异表达蛋白,其主要参与生物过程与代谢途径,在维管束的分化过程中处于活跃状态,并积极参与相关基因的剪接过程。

Yan 等<sup>[18]</sup>采用 iTRAQ 技术研究水稻细胞质的雄性不育性时,发现 45 个差异表达蛋白质,这些蛋白主要分布于碳水化合物代谢、蛋白合成、应激反应等细胞进程。在细胞质雄性不育株系中,线粒体中活性氧的表达水平增加;碳水化合物代谢与应激反应处于下调状态,从而抑制花粉的发育。转基因水稻种子胚乳的贮藏蛋白的分泌缺陷会引起内质网的应激反应,从而产生粉状萎缩的种子。Qian 等<sup>[19]</sup>利用 iTRAQ 技术研究内质网的应激反应时获得 405 个差异表达蛋白,下调表达蛋白 265 个,主要参与机体的新陈代谢和应激与防御反应;上调表达蛋白 140 个,当水稻胚乳内质网的应激反应产生时,内质网的蛋白加工和降解相关蛋白酶体处于显著上调状态,转运高尔基体也积极参与内质网应激反应的蛋白转运。Yang 等<sup>[20]</sup>在研究水稻花粉管的生长以及其与雌蕊的互作中,以成熟与萌发花粉细胞膜为研究对象,应用 iTRAQ 技术获得 1 121 个膜相关蛋白,其中 192 个蛋白为差异表达蛋白,上调表达的有 119 个,下调表达的有 73 个。这些差异表达蛋白主要分布在信号转导、蛋白转运、细胞壁的重塑与代谢,以及膜运输过程。研究发现 37 个受体激酶与 209 个转运蛋白在花粉管的生长,以及花粉管与雌蕊的互作过程中具有重要作用。iTRAQ 技术对蛋白鉴定的灵敏度高,获得的蛋白定量信息,通过统计学手段可快速筛选出差异表达蛋白,这些差异表达蛋白一般为研究的关键目的蛋白,有利于后续研究工作的开展。

### 2.3 水稻胁迫蛋白质组学研究

在水稻蛋白质组学方面,研究的较为广泛有效的是植物与环境等客观因素的互作研究。影响水稻生长发育的环境因素主要涉及生物因素与非生物因素。当水稻受到环境胁迫时,水稻体内会产生相应生理变化去协调适应,而这些适应性改变都表现为生命活动的体现者——蛋白质的变化。通过蛋白质组学技术可对相关蛋白进行定性定量检测,从而研究逆境胁迫对水稻生长的不利影响,以及水稻自身如何通过调控体系降低逆境胁迫的影响从而有效地保护自身。

**2.3.1 非生物因素胁迫下的水稻蛋白质组学研究** 常见的非生物因素主要有温度(寒害或高温)、干旱、盐胁迫、金属等,自然界中这些胁迫因素广泛存在,它们会对植物体的生长发育产生不同程度影响,这主要表现为体内相关蛋白质的表达量以及表达种类上的变化。在蛋白质组水平上能更深入全面研究非生物因素对水稻胁迫的伤害机制,以及水稻对这些非生物因素诱导所产生的适应机制。

Neilson 等<sup>[21]</sup>在研究水稻对低温的应激反应时,应用 iTRAQ 技术获得 85 个与低温应激反应相关的蛋白质,功能分析显示这些差异表达蛋白主要集中在转运、光合作用、前体物代谢和能量的产生、以及组蛋白和维生素 B 的生物合成过程中(表 3)。在研究水稻的耐高温特性方面,Zhang 等<sup>[22]</sup>与黄小平等<sup>[23]</sup>均以耐热型和温度敏感型的两种水稻株系作为研究对象进行 iTRAQ 蛋白质组学分析。Zhang 等<sup>[22]</sup>获得水稻乳熟期的已知功能的 32 个差异表达蛋白,这些蛋白主要分布于信号转导、转录调控、氧化、应激防御、转运、能量代谢、生物合成等功能群。研究发现高夜温会破坏植物细胞的氧化还原平衡,从而激活钙依赖型蛋白激酶和 COP9 信号复合体,进而调控下游相关的高温应激反应的基因与蛋白。黄小平等<sup>[23]</sup>获得水稻籽粒灌浆期的差异表达蛋白 36 个,其中功能已知的蛋白质为 14 个,分别参与物质的代谢转运、光合作用、能量代谢、逆境应答反应,其中锌指蛋白与热激蛋白在对灌浆期夜间高温的耐受性方面起到重要作用。

Dong 等<sup>[24]</sup>采用 iTRAQ 技术对灌浆期的杂交水稻的强势粒与弱势粒进行比较蛋白质组学分析,在蛋白质水平上研究水稻的灌浆机制以及弱势粒在面临干旱胁迫时的应激反应。研究发现,相对于强势粒,弱势粒的相关酶(如腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶、颗粒结合淀粉合成酶、淀粉分支酶和支链淀粉酶)在灌浆期时生理活性较低,从而导致杂交稻在灌浆期时的库强弱,库容量较小。适度的干旱胁迫能通过调节与光合物质的供给、转化有关的蛋白活性从而促进弱势粒的灌浆,进而提高水稻的产量。

盐胁迫是水稻生长以及产量形成的重要限制因子。Liu 等<sup>[25]</sup>应用 iTRAQ 技术在代谢水平上研究水稻悬浮细胞对盐胁迫的反应。在高盐状态

表 3 iTRAQ 技术在水稻胁迫蛋白质组学研究中的应用  
Table 3 Application of iTRAQ technology in the stress proteome research of rice.

| 样品<br>Sample   | 逆境胁迫<br>Adverse stress             | 表达蛋白数<br>Number of<br>expressed<br>proteins | 功能<br>Function   | 参考文献<br>Reference |
|--|------------------------------------|---|--|-------------------|
| 幼苗 Rice seedling   | 低温胁迫 Cold stress                   | 85  | 转运、光合作用 Transport, photosynthesis  | [21]              |
| 乳熟期籽粒<br>Rice grain at milky stage                               | 高夜温<br>High night temperature      | 32  | 氧化、应激防御、信号转导<br>Oxidation, defense response, signal transduction   | [22]              |
| 灌浆期籽粒<br>Rice grain at filling stage                             | 高夜温<br>High night temperature      | 36  | 光合作用、逆境应答(锌指蛋白、热激蛋白)<br>Photosynthesis, defense response(zinc finger<br>proteins, heat shock protein)  | [23]              |
| 灌浆期强势粒与弱势粒<br>Superior and inferior<br>spikelet at filling stage | 干旱 Drought stress                  | 185   | 光合物质供给与转化相关蛋白<br>Proteins associated with photoassimilate<br>supply and conversion   | [24]              |
| 非生物<br>胁迫<br>Abiotic<br>stress                                   | 悬浮培养细胞<br>Suspension cultured cell | 盐胁迫 Salt stress                             | 521<br>碳水化合物与能量代谢途径、氧还信号途径、<br>植物生长素途径<br>Carbohydrate and energy metabolism pathways, redox<br>signaling pathways, auxin pathways                       | [25]              |
|  | 水稻幼枝 Rice shoot                    | 盐胁迫 Salt stress                             | 56<br>光合作用、抗氧化、氧化磷酸化<br>Photosynthesis, antioxidant and oxidative phosphorylation  | [26]              |
|  | 根系 Root                            | 铝胁迫<br>Aluminum stress                      | 106<br>应激防御、信号转导、糖酵解与糖异生代谢途径<br>Stress defense, signal transduction, glycolytic and<br>gluconeogenetic pathway   | [27]              |
|  | 细胞质膜<br>Plasma membrane            | 镉胁迫<br>Cadmium stress                       | 66<br>NO 通过抗氧化防御系统提高水稻对镉耐受性<br>NO increases cadmium tolerance in rice via the<br>antioxidant defense system  | [28]              |
|  | 悬浮培养细胞<br>Suspension cultured cell | 镉胁迫<br>Cadmium stress                       | 100<br>硅对水稻镉富集有解毒作用<br>(脂质转移蛋白和应激相关蛋白)<br>Silicon can alleviate cadmium stress(lipid-transfer<br>proteins, stress-related proteins)                      | [29]              |
|  | 幼苗 Rice seedling                   | 微重力 Microgravity                            | 454<br>光合作用相关蛋白 Photosynthesis-related proteins  | [30]              |
| 生物<br>胁迫<br>Biotic<br>stress                                     | 韧皮部 Phloem                         | 褐飞虱<br>Brown plant-hopper                   | 63<br>防御信号转导、氧还调控、糖与蛋白质代谢<br>Defense signal transduction, redox regulation,<br>carbohydrate and protein metabolism                                       | [31]              |
|  | 叶片 Leaf                            | 水稻条纹病毒<br>Rice stripe virus                 | 681<br>镁螯合酶和天冬氨酸蛋白酶与条纹病毒诱发的萎<br>黄病和细胞凋亡相关<br>The magnesium chelatase and aspartic proteases associated<br>with RSV-induced leaf chlorosis and cell death | [32]              |
|  | 叶片 Leaf                            | 稻瘟病 Rice blast                              | 53<br>氧化还原平衡、信号转导、光合作用、防御反应<br>Redox homeostasis, signal transduction,<br>photosynthesis, defense  | [33]              |

下,碳水化合物和能量代谢途径、氧化还原信号途径、植物生长素(吡啶-3-醋酸)途径和渗透物质的生物合成途径均发生了显著变化,从而保证有机体在盐的压力胁迫下能够维持正常的细胞功能。Xu 等<sup>[26]</sup>采用 iTRAQ 方法研究盐胁迫下水稻嫩枝的蛋白质组变化,发现 56 个蛋白质产生显著变

化,其中 16 个蛋白主要富集在光合作用、抗氧化和氧化磷酸化过程,其中光系统 I 在盐胁迫时对维持能量平衡与活性氧的产生起到重要作用。对经济作物水稻而言,微摩尔级(10 μm)的 Al<sup>3+</sup> 浓度也会迅速抑制水稻根系生长,影响水稻对矿质元素的吸收和产量的增加。Wang 等<sup>[27]</sup>应

用 iTRAQ 技术研究水稻根系对金属 Al 胁迫的应激机制时发现,在  $\text{Al}^{3+}$  的胁迫下根系蛋白在能量、应激防御、蛋白质转换、新陈代谢、信号转导、转运与胞内运输、细胞结构、细胞生长分化以及转录等方面发生显著变化,尤其是糖酵解与糖异生代谢途径在应对过量的金属 Al 累积的过程中呈现显著的上调表达效应。

水稻正常的生长发育受到重金属的种类和浓度的影响,特别是高浓度的重金属胁迫下,水稻的生长受到严重阻碍,引起产量减产,甚至会导致水稻死亡。Yang 等<sup>[28]</sup>利用 iTRAQ 技术研究重金属镉(Cd)对水稻生长发育的影响,在细胞质膜检测到 66 个差异表达蛋白;NO 在镉的胁迫下通过抗氧化防御系统提高抗氧化酶、谷胱甘肽、磷脂酸等活性来增强水稻对镉的耐受性。Ma 等<sup>[29]</sup>研究指出,硅对水稻的镉的富集具有解毒作用,硅能提高蛋白利用率并维持细胞处于正常生理状态。在短期(12 h)的镉处理下,硅能调控并提高水稻对镉的耐受力,硅能改善细胞壁通透性,并抑制细胞对镉离子的吸收,从而降低糖苷酶、细胞表面非特异性的脂质转移蛋白和应激相关蛋白的表达。

此外,非生物因素微重力对水稻生长发育也有影响。Chen 等<sup>[30]</sup>以航天和正常地面为实验条件,应用 iTRAQ 蛋白质组学技术研究微重力对水稻幼苗光合作用的影响,获得 454 个差异表达蛋白,与光合作用相关蛋白质有 38 个,其中下调表达蛋白 34 个,主要分布于光系统 I、脱氢酶和细胞色素 b 复合体。

### 2.3.2 生物因素胁迫下的水稻蛋白质组学研究

常见的生物因素主要是病菌与害虫,水稻的生长发育过程中受到这些生物因素影响后,会通过改变体内相关蛋白或酶的表达从而对外界的信号刺激作出感应,并引起有机体的适应性反应。

Du 等<sup>[31]</sup>在对褐飞虱抗性和敏感性的水稻韧皮部汁液进行 iTRAQ 蛋白质组学分析时,获得与代谢途径相关的差异表达蛋白 63 个,主要分布在防御信号转导、氧化还原调控、糖类代谢与蛋白质代谢等过程。褐飞虱抗性水稻通过提高受体样糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白和富含半胱氨酸受体蛋白激酶 5 的表达量,使得组织快速识别褐飞虱侵害,并通过提高过氧化物酶的活性激活机体的应激反应。水稻条纹病毒侵染水稻叶片会导致萎黄病发生和新生叶的死亡。Wang 等<sup>[32]</sup>应用 iTRAQ 技

术研究水稻叶片条纹病毒的作用机理时,获得 681 个差异表达蛋白(65.8%处于上调表达,34.2%处于下调表达)。生物信息学分析发现,镁螯合酶和天冬氨酸蛋白酶分别与水稻条纹病毒诱发的萎黄病和细胞凋亡密切相关,这为水稻条纹病毒的症状形成的作用机制提供了新的参考价值。唐成等<sup>[33]</sup>应用 iTRAQ 技术研究水稻叶片对稻瘟病的应激反应,获得与代谢途径相关的差异表达蛋白 53 个,主要分布于氧化还原平衡、信号转导、光合作用、氨基酸与蛋白质代谢、糖与能量代谢、防御反应等方面。水稻叶片被稻瘟病毒感染后,涉及活性氧代谢的蛋白质表达丰度增加,受体类激素蛋白呈现不同的表达趋势,显示出体内细胞正以不同的信号转导途径对外界侵扰作出免疫应答。

iTRAQ 技术在水稻胁迫蛋白质组学研究方面,采用正常与胁迫条件下的两个样本进行比较蛋白质组学分析,iTRAQ 技术具有高通量的优势,能一次性定性、定量比较样本的总蛋白,无需像双向电泳技术要对蛋白斑点做逐一鉴定,并且鉴定的蛋白数量大,结果能更客观直接反映两组对照样本的差异表达特性。

## 2.4 水稻激素蛋白质组学研究

植物激素对水稻的整个生育期都具有显著的调控功能。应用蛋白质组学手段,通过体内相关蛋白质的定性定量变化可以有效获取植物激素的信号传导方式,以及其对水稻生长发育的调控与作用机制。Rao 等<sup>[34]</sup>应用 iTRAQ 技术以水稻悬浮细胞为对象研究脱落酸的信号反应途径,获得 36 个差异表达蛋白质,主要涉及代谢过程中的相关酶以及氧化应激反应蛋白。在脱落酸的信号反应过程中,磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、蔗糖合成酶 2、氨肽酶 C 与乌头酸水合酶呈现显著上调效应,并有 11 个的代谢产物在脱落酸处理后发生显著性变化(表 4)。Li 等<sup>[35]</sup>应用 iTRAQ 技术研究油菜素内酯调控蛋白对水稻种子萌发的分子机制时,获得 800 个油菜素内酯响应蛋白,其中 88 个靶蛋白对油菜素内酯缺陷和不敏感体具有明显激活作用,并与核糖体结构蛋白、蛋白的生物合成以及碳水化合物代谢呈现高相关性。

## 2.5 水稻突变体蛋白质组学研究

通过对植物突变体的研究可获得遗传学上的



重要信息。利用蛋白质组学手段研究水稻突变体的蛋白表达水平的差异,揭示突变体生理生化状态的变化,并获取相关遗传信息,从而完善水稻某些性状的遗传机制研究。Reiland 等<sup>[36]</sup>采用 iTRAQ 技术并结合代谢物分析研究水稻黄化体的膜蛋白在早期的去黄化过程中的蛋白质变化,发现黄化体在光合作用初期就已经开始代谢,光照会引起天冬氨酸、苹果酸、反式丁烯二酸和琥珀

酸的积累,并由此激活光合作用和相应的碳水化合物储存(表 5)。Lin 等<sup>[37]</sup>以垩白突变体与腹白米为实验对象,研究水稻籽粒垩白形成的分子机制。通过 iTRAQ 蛋白质组学技术鉴定获得与籽粒垩白形成相关的蛋白质 113 个,其中 70 个蛋白上调表达,43 个蛋白下调表达。差异表达蛋白主要集中于代谢与调控途径,包括碳水化合物代谢,蛋白的合成、折叠与降解。

表 4 iTRAQ 技术在水稻激素蛋白质组学研究中的应用  
Table 4 Application of iTRAQ technology in the hormone proteome research of rice.

| 样品<br>Sample                        | 逆境胁迫<br>Adverse stress   | 表达蛋白数<br>Number of<br>expressed proteins | 功能<br>Function  | 参考文献<br>Reference |
|-------------------------------------|--------------------------|--|---|-------------------|
| 悬浮培养细胞<br>Suspension cultured cells | 脱落酸<br>Abscisic acid     | 36                                       | 代谢相关酶、氧化应激相关蛋白<br>Metabolic enzymes, oxidative stress related proteins  | [34]              |
| 种子 Seed                             | 油菜素内酯<br>Brassinosteroid | 88                                       | 油菜素内酯调控蛋白、核糖体结构蛋白、<br>蛋白合成、碳水化合物代谢<br>Brassinosteroid-regulated proteins, ribosomal<br>structural proteins, protein biosynthesis,<br>carbohydrate metabolisms | [35]              |

表 5 iTRAQ 技术在水稻突变体蛋白质组学研究中的应用  
Table 5 Application of iTRAQ technology in the mutant proteome research of rice.

| 样品<br>Sample               | 表达蛋白数<br>Number of<br>expressed proteins | 功能<br>Function  | 参考文献<br>Reference |
|----------------------------|--|---|-------------------|
| 黄化体 Etioplast              | 36                                       | 光合作用、碳水化合物与蛋白的积累<br>Photosynthesis, accumulation of carbohydrates and proteins            | [36]              |
| 垩白突变体<br>Chalkiness mutant | 113                                      | 碳水化合物代谢,蛋白合成、折叠与降解<br>Carbohydrate metabolism, protein synthesis, folding and degradation | [37]              |

3 展望

水稻是世界上最主要的三大粮食作物之一,也是首个完成基因组测序的谷类模式作物,在蛋白质水平上研究水稻的基因功能具有重要意义。高通量的 iTRAQ 蛋白质组学技术借助质谱方法,可实现 8 个样品的同步标记分析;该技术以其显著的优点已广泛应用于水稻的组织器官、亚细胞水平、胁迫、激素、突变体等蛋白质组学研究方面。虽然 iTRAQ 技术还存在某些不足之处,但其已成为水稻功能基因组学研究的重要手段。目前,水稻的各组织器官、不同发育期、各亚细胞水平的蛋白质组的数据库已建立,并随着测序技术的发展而不断完善。水稻的突变体和逆境胁迫蛋白质组

学研究也不断进步,通过对环境、生物胁迫应答和适应过程的差异蛋白质进行比较蛋白质组学研究,可获得水稻抵抗逆境的作用机理,有助于水稻抗逆性品种的改良优化。同时,蛋白质组学技术还有助于信号传导分子的机制研究,水稻中的脱落酸等植物激素的信号响应途径研究使得人们在蛋白和代谢物水平上对细胞信号转导有了新认识,所获得的研究成果能为其他信号途径研究提供参考价值。而且蛋白质组学还应用于代谢途径中不同营养元素的调控作用研究<sup>[38]</sup>。此外,iTRAQ 技术可结合基因组和转录组分析,加速获得有意义的目标蛋白。随着 iTRAQ 技术在水稻蛋白质组学研究方面的不断扩展,能更深入地阐明水稻生命活动的机理,从而对水稻的生长发育、代谢调控等过程作出更科学的阐述,这将有助于



水稻产量与品质的提升,并对水稻的基础研究和科学育种工作产生积极的贡献。

### 参 考 文 献

- [1] Wasinger V C, Cordwell S J, Poljak C A, *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* [J]. Electrophoresis, 1995, 16(7): 1090–1094.
- [2] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. Mol. Cell. Proteomics, 2004, 3(12): 1154–1169.
- [3] Khush G S. Green revolution: The way forward [J]. Nat. Rev. Genet., 2001, 2(10): 815–822.
- [4] Komatsu S, Kajiwara H, Hirano H. A rice protein library: A data-file of rice proteins separated by two-dimensional electrophoresis [J]. Theor. Appl. Genet., 1993, 86(8): 935–942.
- [5] Komatsu S, Tanaka N. Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome [J]. Proteomics, 2005, 5(4): 938–949.
- [6] 张根连, 范术丽, 宋美珍, 等. 植物蛋白质组学技术研究进展 [J]. 生物技术通报, 2011(7): 26–30.  
Zhang G L, Fan S L, Song M Z, *et al.* Development of plant proteomics research technology [J]. Biotechnol. Bull., 2011(7): 26–30.
- [7] Pierce A, Unwin R D, Evans C A, *et al.* Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases [J]. Mol. Cell. Proteomics, 2008, 7(5): 853–863.
- [8] 谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 等. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(7): 616–621.  
Xie X Z, Wang X, Liu L H, *et al.* iTRAQ technology and its application in proteomics [J]. Chin. J. Biochem. Mol. Biol., 2011, 27(7): 616–621.
- [9] Zieske L R. A perspective on the use of iTRAQ<sup>TM</sup> reagent technology for protein complex and profiling studies [J]. J. Exp. Bot., 2006, 57(7): 1501–1508.
- [10] 罗治文, 朱 樑, 谢谓芬. 同位素标记相对和绝对定量技术研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(10): 83–87.  
Luo Z W, Zhu L, Xie W F. Advances in isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques research [J]. China Biotechnol., 2006, 26(10): 83–87.
- [11] 刘原志, 章强强. iTRAQ 技术在真菌研究中的应用进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2015, 10(3): 185–189.
- [12] Zi J, Zhang J Y, Wang Q H, *et al.* Stress responsive proteins are actively regulated during rice (*Oryza sativa*) embryogenesis as indicated by quantitative proteomics analysis [J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e74229.
- [13] Li M, Wang K, Li S Q, *et al.* Exploration of rice pistil responses during early post-pollination through a combined proteomic and transcriptomic analysis [J]. J. Proteomics, 2016, 131: 214–226.
- [14] Wang S Z, Chen W Y, Xiao W F, *et al.* Differential proteomic analysis using iTRAQ reveals alterations in hull development in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. PLoS ONE, 2015, 10(7): e0133696.
- [15] Chen L H, Huang Y N, Xu M, *et al.* Black rice grain development reveals metabolic pathways associated with anthocyanin biosynthesis [J]. PLoS ONE, 2016, 11(7): e0159238.
- [16] Liu H J, Lau E, Lam M P Y, *et al.* OsNOA1/RIF1 is a functional homolog of AtNOA1/RIF1: Implication for a highly conserved plant cGTPase essential for chloroplast function [J]. New Phytol., 2010, 187(1): 83–105.
- [17] Peng X Y, Qin Z L, Zhang G P, *et al.* Integration of the proteome and transcriptome reveals multiple levels of gene regulation in the rice dl2 mutant [J]. Front. Plant Sci., 2015, 6: e351.
- [18] Yan J J, Tian H, Wang S Z, *et al.* Pollen developmental defects in ZD-CMS rice line explored by cytological, molecular and proteomic approaches [J]. J. Proteomics, 2014, 108: 110–123.
- [19] Qian D D, Tian L H, Qu L Q, *et al.* Proteomic analysis of endoplasmic reticulum stress responses in rice seeds [J]. Sci. Rep., 2015, 5: e14255.
- [20] Yang N, Wang T. Comparative proteomic analysis reveals a dynamic pollen plasma membrane protein map and the membrane landscape of receptor-like kinases and transporters important for pollen tube growth and interaction with pistils in rice [J]. BMC Plant Biol., 2017, 17: e2.
- [21] Neilson K A, Mariani M, Haynes P A. Quantitative proteomic analysis of cold-responsive proteins in rice [J]. Proteomics, 2011, 11(9): 1696–1706.
- [22] Zhang H Y, Lei G, Zhou H W, *et al.* Quantitative iTRAQ-based proteomic analysis of rice grains to assess high night temperature stress [J]. Proteomics, doi: 10. 1002/ pmic.201600365.
- [23] 黄小平, 张宏玉, 雷 刚, 等. 灌浆期夜间高温胁迫下耐热和热敏感水稻籽粒的比较蛋白质组分析 [J]. 中国水稻科学, 2017, 13(1): 13–22.  
Huang X P, Zhang H Y, Lei G, *et al.* Analysis on comparative proteomics of rice grain between heat-tolerant and heat-sensitive lines under high night temperature stress at filling stage [J]. Chin. J. Rice Sci., 2017, 13(1): 13–22.
- [24] Dong M H, Gu J R, Zhang L, *et al.* Comparative proteomics analysis of superior and inferior spikelets in hybrid rice during grain filling and response of inferior spikelets to drought stress using isobaric tags for relative and absolute quantification [J]. J. Proteomics, 2014, 109: 382–399.
- [25] Liu D W, Ford K L, Roessner U, *et al.* Rice suspension cultured cells are evaluated as a model system to study salt responsive networks in plants using a combined proteomic and metabolomic profiling approach [J]. Proteomics, 2013, 13(12–13): 2046–2062.
- [26] Xu J W, Lan H X, Fang H M, *et al.* Quantitative proteomic analysis of the rice (*Oryza sativa* L.) salt response [J]. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0120978.
- [27] Wang Z Q, Xu X Y, Gong Q Q, *et al.* Root proteome of rice

- studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants [J]. J. Proteomics, 2014, 98:189-205.
- [28] Yang L M, Ji J H, Harris-Shultz K R, *et al.*. The dynamic changes of the plasma membrane proteins and the protective roles of nitric oxide in rice subjected to heavy metal cadmium stress [J]. Front. Plant Sci., 2016, 7: e190.
- [29] Ma J, Sheng H C, Li X L, *et al.*. iTRAQ-based proteomic analysis reveals the mechanisms of silicon mediated cadmium tolerance in rice (*Oryza sativa*) cells [J]. Plant Physiol. Biochem., 2016, 104: 71-80.
- [30] Chen B Y, Wang Y P. Proteomic and physiological studies provide insight into photosynthetic response of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to microgravity [J]. Photochem. Photobiol., 2016, 92(4): 561-570.
- [31] Du B, Wei Z, Wang Z Q, *et al.*. Phloem-exudate proteome analysis of response to insect brown plant-hopper in rice [J]. J. Plant Physiol., 2015, 183: 13-22.
- [32] Wang B, Hajano J U D, Ren Y D, *et al.*. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of rice leaves infected by Rice stripe virus reveals several proteins involved in symptom formation [J]. Virol. J., 2015, 12: e99.
- [33] 唐成,陈露,安敏敏,等. 水稻幼苗叶片应答稻瘟病感染的差异蛋白谱分析[J]. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 2014, 13(4): 322-328.
- Tang C, Chen L, An M M, *et al.*. Proteomic analysis reveals an intimate protein pathways provoked by blast in rice seedling leaves [J]. J. Huaiyin Teachers Coll. (Nat. Sci.), 2014, 13(4): 322-328.
- [34] Rao S R, Ford K L, Cassin A M, *et al.*. Proteomic and metabolic profiling of rice suspension culture cells as a model to study abscisic acid signaling response pathways in plants [J]. J. Proteome Res., 2010, 9(12): 6623-6634.
- [35] Li Q F, Xiong M, Xu P, *et al.*. Dissection of brassinosteroid-regulated proteins in rice embryos during germination by quantitative proteomics [J]. Sci. Rep., 2016, 6: e34583.
- [36] Reiland S, Grossmann J, Baerenfaller K, *et al.*. Integrated proteome and metabolite analysis of the de-etiolation process in plastids from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Proteomics, 2011, 11(9): 1751-1763.
- [37] Lin Z M, Zhang X C, Yang X Y, *et al.*. Proteomic analysis of proteins related to rice grain chalkiness using iTRAQ and a novel comparison system based on a notched-belly mutant with white-belly [J]. BMC Plant Biol., 2014, 14: e1631.
- [38] Konishi H, Ishiguro K, Komatsu S. A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization [J]. Proteomics, 2001, 1(9): 1162-1171.

(责任编辑:陈凌云)