

基于 TMT 质谱分析技术筛选水稻根尖响应汞胁迫差异表达蛋白

祁忠达^{1,2,3} 韦艳^{1,2} 龙水庭^{1,2,3} 代佑罡^{1,2} 仇广乐^{3*}

(¹贵州医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生学系, 贵阳 550000; ²贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 550000; ³中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550081)

摘要 稻米是人群汞暴露的最主要途径之一,为了从蛋白质水平上揭示水稻 (*Oryza sativa* L.) 适应重金属汞胁迫的分子机制,本研究以拔节期金优 431 水稻品种为材料,对比分析对照组和 50、150、300 mg · kg⁻¹氯化汞胁迫组,采用同位素相对标记与绝对定量 TMT (Tandem Mass Tag) 技术,结合定量蛋白质组平行反应监测 (parallel reaction monitoring, PRM) 技术,鉴定水稻根尖部位响应汞胁迫差异表达蛋白,对所获得差异蛋白进行生物信息学分析,从而筛选出汞胁迫响应显著的潜在靶标蛋白。同时,选择 20 个差异表达蛋白通过平行反应监测试验进行了蛋白验证。结果表明,在变化倍数 ≥ 1.3、*P* < 0.05 条件下,共鉴定 5253 种定量蛋白,包含 364 种差异蛋白,其中 258 种表达上调,106 种表达下调。基因本体分子功能提示,这些差异性蛋白主要参与催化活性、绑定转运活性和抗氧化活性。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路显著性富集于代谢途径、次生代谢产物生物合成、苯丙烷类生物合成等。错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05。成功鉴定并验证到的差异蛋白分别涉及抗氧化还原蛋白、金属螯合肽合成蛋白、金属硫蛋白相关蛋白等。差异表达蛋白中,与抗氧化、重金属胁迫防御响应和信号通路等相关的蛋白总体上调,而与代谢和能量产生与转运相关蛋白表达量总体下调。

关键词 水稻; 蛋白组学; TMT; PRM; 汞胁迫

Screening differentially expressed proteins in response to mercury stress in rice roots by proteomic quantification based on stable isotope labeling and parallel reaction monitoring.

QI Zhong-da^{1,2,3}, WEI Yan^{1,2}, LONG Shui-ting^{1,2,3}, DAI You-gang^{1,2}, QIU Guang-le^{3*}
(¹Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; ²Key Laboratory of Ministry of Education for Environmental Pollution and Disease Surveillance, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; ³State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, China).

Abstract: Mercury (Hg) is highly toxic. Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important pathways for Hg exposure to populations. To reveal the molecular mechanism of rice adaptation to Hg stress, the Jinyou 431 rice cultivar grown under supplementation of 0 mg · kg⁻¹ (CK), 50 mg · kg⁻¹ (low), 150 mg · kg⁻¹ (middle), and 300 mg · kg⁻¹ (high) HgCl₂ was selected to investigate root tips' differentially expressed proteins in response to Hg stress using the isotope relative labeling and the absolute quantitative technique TMT (Tandem Mass Tag) combined with parallel reaction monitoring (PRM) quantitative proteomic technique. Bioinformatics analysis of the obtained differential proteins was performed to screen the target proteins responding significantly to Hg stress. A total of 20 differentially expressed proteins identified were selected for protein validation. The results showed that 5253 quantitative proteins and 364 differential proteins

国家自然科学基金项目 (41573135) 资助。

收稿日期: 2019-01-29 接受日期: 2019-03-25

* 通讯作者 E-mail: qiuguangle@vip.skleg.cn

were identified (variation fold ≥ 1.3 , $P < 0.05$) , out of which 258 were up-regulated and 106 down-regulated. The molecular function of gene ontology suggests that differential proteins are mainly involved in catalytic activity , binding transport activity , and antioxidant activity. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway significantly enriches in metabolic pathways , secondary metabolite biosynthesis , and phenylpropanoid biosynthesis (with false discovery rates of < 0.05) . The identified and validated differential proteins are related to antioxidant reductase , metal chelate peptide synthesis protein , and metallothionein-related proteins-like. The expression levels of proteins involved in responding and signaling pathway to antioxidants and heavy metal stress defense were generally up-regulated , while the expression levels of those involved in metabolism , energy production and transport were generally down-regulated.

Key words: rice; proteomics; TMT; PRM; mercury stress.

水稻是传统的粮食作物, 稻米对汞、尤其甲基汞具有较强的富集能力, 汞矿区稻米对甲基汞的富集能力一般高出无机汞, 高达 100 倍以上(Qiu *et al.* , 2008; 黄中伟, 2012)。根系是水稻最先感受逆境的部分, 也是水稻吸收矿质营养、水分以及有害物质的主要器官。大量研究结果显示, 土壤中汞含量和水稻汞含量呈正相关(Meng *et al.* , 2010; Qiu *et al.* , 2013), 但目前关于土壤汞进入水稻体内吸收转运机制并不清楚。随着近年来蛋白组学质谱分析技术的迅速发展, 无疑为开展水稻响应各种胁迫后的分子机制研究提供了契机。因此, 利用质谱分析技术, 从分子层次研究水稻根系对汞胁迫的蛋白组学响应, 能揭示水稻汞抗性相关蛋白以及水稻重金属抗性相关蛋白的反应机制, 对进一步探讨降低汞元素在水稻体内富集具有重要指导意义。

本研究采用 TMT(Tandem Mass Tag) 标记技术, 结合 PRM(Parallel Reaction Monitoring) 验证技术, 筛选并验证水稻根尖在重金属汞胁迫后的蛋白质变化, 试图从蛋白质组学的角度分析水稻根系在汞胁迫应答过程中的作用, 以期发现与水稻吸收汞金属元素相关的潜在靶标蛋白, 深入了解水稻响应汞胁迫的耐性分子机制, 为今后应用分子生物学技术, 研究水稻的汞胁迫响应机制、生长发育和代谢调控等过程提供基础数据支持。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

选取金优 431 水稻品种和贵阳市百花湖岸边水稻土作为供试材料, 在拔节期将水稻秧苗移栽至塑料箱(60 cm \times 30 cm \times 40 cm), 待水稻生长特征稳定后随机分组设置为对照组和胁迫组, 分别添加 0 mg \cdot kg $^{-1}$ (CK)、50 mg \cdot kg $^{-1}$ (low)、150 mg \cdot kg $^{-1}$

(middle)、300 mg \cdot kg $^{-1}$ (high) 氯化汞并混匀, 胁迫 30 d 后采样, 在保护根茎的前提下清洁样品, 根、茎和叶分装-20 $^{\circ}$ C 条件下保存, 根尖部分(3~5 cm) 液氮保存用于蛋白质提取, 平行样品-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.1.1 蛋白提取 植物组织: 准确称取 2 mg 根尖组织样品, 充分研磨成粉末, 加入 4 倍体积裂解缓冲液, 超声裂解后在温度 4 $^{\circ}$ C 下, 以 20000 $\times g$ 离心力离心 10 min, 取上清液加入 20% 的三氯乙酸, 在温度 4 $^{\circ}$ C 静置 2 h, 以 12000 $\times g$ 离心力离心 3 min, 取沉淀部分用丙酮清洗 3 次, 以 8 mol \cdot L $^{-1}$ 尿素复溶, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.1.2 胰酶酶解与 TMT 标记 胰酶 37 $^{\circ}$ C 条件下酶解蛋白, 酶解肽段干燥后以 0.5 mol \cdot L $^{-1}$ TEAB 溶解, 根据 TMT 试剂盒操作说明按步骤标记肽段(王秀臻, 2018)。

1.1.3 HPLC 分级与液相色谱-质谱联用分析 肽段经过高 pH 反向 HPLC 分级, 分级梯度为 8%~32% 乙腈, pH=9, 60 min 时间分离 60 个组分, 冷冻干燥。

1.2 差异蛋白的选择

若某个蛋白的差异倍数(fold change) > 1.30 或 < 0.77 , 同时统计检验, 若 t -test $P < 0.05$, 便可认为是差异蛋白(Zhao *et al.* , 2015)。以空白实验组为对照, 共鉴定出 1436 种差异蛋白, 而差异倍数达到 1.3 倍的差异蛋白共 470 种, 差异倍数小于 1.30, 大于 0.77 的蛋白点不作为差异蛋白讨论, 以期假阳性率较低。

1.3 生物信息学分析方法

1.3.1 蛋白注释方法 Gene Ontology 分析 蛋白质组学注释分析选择 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)。

1.3.2 KEGG 通路富集 KEGG(Kyoto Encyclope-

dia of Genes and Genomes) 分析,选择在线服务工具 KAAS 对提交的蛋白进行注释,之后通过 KEGG mapper 将注释过的蛋白匹配入数据库中相应的通路中。

1.4 PRM 验证

肽段使用 EASY-nLC 1000 超高效液相系统进行分离后,注入 NSI 离子源中进行电离,然后进入 Q Exactive™ Plus 质谱进行分析,肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨的 Orbitrap 进行检测和分析,数据采集模式使用数据非依赖型扫描(DIA)程序(李琳等 2018)。

1.5 数据处理

TMT 试验二级质谱数据使用 Maxquant (v1.5.2.8) 进行检索。检索参数设置:数据库为 Uniprot Oryza_indica (37385 条序列),添加了反库以计算随机匹配造成的假阳性率(FDR),酶切方式设置为 Trypsin/P;漏切位点数设为 2;肽段最小长度设置为 7 个氨基酸残基;肽段最大修饰数设为 5;First search 和 Main search 的一级母离子质量误差容忍度分别设为 20 和 5 ppm,二级碎片离子的质量误差容忍度为 0.02 Da。将半胱氨酸烷基化设置为固定修饰,可变修饰为甲硫氨酸的氧化,蛋白 N 端的乙酰化。定量方法设置为 TMT-10plex,蛋白鉴定、PSM 鉴定的 FDR 都设置为 1%。

PRM 试验中的肽段参数:蛋白酶设置为 Trypsin [KR/P],最大漏切位点数设置为 0,肽段长度设置为 7~25 个氨基酸残基,设置半胱氨酸烷基化为固定修饰。Transition 参数:母离子电荷设置为 2、3,子离子电荷设置为 1,离子类型设置为 b、y。碎片离子选择从第三个开始到最后一个,离子匹配的质量误差容忍度设置为 0.02 Da(于莉等 2018)。

2 结果与分析

2.1 TMT 鉴定的蛋白信息

本次试验共鉴定 5253 个蛋白,其中 4108 个蛋白有定量信息。在 1.3 倍变化阈值 t -test $P < 0.05$ 为标准,鉴定胁迫与对照组共同表达 364 种差异蛋白,其中上调蛋白 258 种,下调蛋白 106 种。上述差异蛋白中,High/CK 比较组中 18 个蛋白表达上调,27 个蛋白表达下调,Middle/CK 比较组中 149 个蛋白表达上调,156 个蛋白表达下调,Low/CK 比较组中 83 个蛋白表达上调,37 个蛋白表达下调(表 1)。

表 1 差异表达蛋白统计信息

Table 1 Differentially expressed protein statistics

比较组	上调 (>1.3)	下调 (<1/1.3)
High/CK	18	27
High/Low	30	86
High/Middle	98	87
Low/CK	83	37
Middle/CK	149	156
Middle/Low	52	102

2.2 水稻根系响应汞胁迫的差异蛋白表达模式分析

图 1 显示,低汞组与中汞组表达变化一致的蛋白有 71 个,低汞组与高汞组表达变化一致的蛋白有 14 个,中汞组与高汞组表达变化一致的蛋白有 32 个,3 个汞胁迫组变化一致的蛋白有 12 个,在 Uniprot 蛋白数据库(<https://www.uniprot.org/>)中根据功能发现 68 个重金属元素结合相关蛋白。

在汞胁迫处理下,试验鉴定出 3 个胁迫组与对照组中水稻根部具有相同表达模式的差异蛋白共有 12 个(表 2),包括过氧化氢酶(B8AGH7)、木质素合成酶(A2XXF7)、类萌发素蛋白(A2WNK8)、肽甲硫氨酸亚砷还原酶(B8APW2)、过氧化物酶体(B8AUI3)、谷胱甘肽 S-转移酶(B8A962)、紫酸性磷酸酶(B8BFG7)、枯草杆菌蛋白酶(B8AAU1)、类甜蛋白(A2XKB8),以及 Uniprot 数据库中未知功能属性的 3 种蛋白 A2X6I6、A2ZK03 和 A2ZK04。在上述差异蛋白中,B8AGH7、A2WNK8 和 A2XXF7 3 个蛋白与重金属胁迫响应最为密切。

2.3 差异蛋白的 GO 富集分析

在 GO 富集分析中,有 315 个差异蛋白富集到 29 个 GO term(二级分类)中。图 2 所示,上述差异蛋白,在生物过程条目中,主要富集于代谢过程(36%)、单生物过程(22%)和细胞过程(20%);在

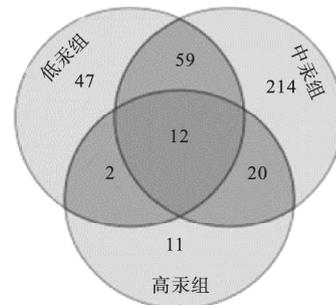


图 1 差异表达蛋白维恩图

Fig.1 Venn diagram for the differential proteins of treated groups

表 2 实验组共同表达显著差异蛋白

Table 2 Co-expressing significantly different proteins in experimental groups

蛋白名称	基因名称	蛋白编码	生物学功能	低/对照	中/对照	高/对照
Catalase	OsI_05576	B8AGH7	免受过氧化氢的毒性	1.463(↑)	1.479(↑)	1.351(↑)
Cinnamyl alcohol dehydrogenase 7	OsI_17363	A2XXF7	锌离子结合位点	0.681(↓)	0.555(↓)	0.696(↓)
Germin-like protein 1-1	OsI_01439	A2WNK8	活性氧转化	1.302(↑)	1.319(↑)	1.331(↑)
Peptide methionine sulfoxide reductase B5	OsI_11657	B8APW2	还原蛋白质中的 R 型甲硫氨酸亚砷	1.646(↑)	2.078(↑)	1.501(↑)
Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO3	GLO3	B8AU13	还原被氧化的蛋氨酸	1.318(↑)	1.783(↑)	1.318(↑)
glutathione S-transferase	OsI_05201	B8A962	谷胱甘肽结合反应的关键酶	1.501(↑)	1.72(↑)	1.707(↑)
Purple acid phosphatase 3	OsI_32568	B8BFG7	催化活性	0.707(↓)	0.478(↓)	0.754(↓)
Subtilisin-like protease SBT3.10	OsI_04057	B8AAU1	丝氨酸内肽酶	1.843(↑)	1.825(↑)	1.451(↑)
Thaumatococcus-like protein	OsI_12893	A2XKB8	抗逆反应	0.727(↓)	0.587(↓)	0.719(↓)
unknown	OsI_07828	A2X6I6	功能未知	4.847(↑)	5.393(↑)	7.73(↑)
unknown	OsI_38155	A2ZK03	功能未知	0.659(↓)	0.542(↓)	0.61(↓)
unknown	OsI_38156	A2ZK04	功能未知	0.666(↓)	0.493(↓)	0.622(↓)

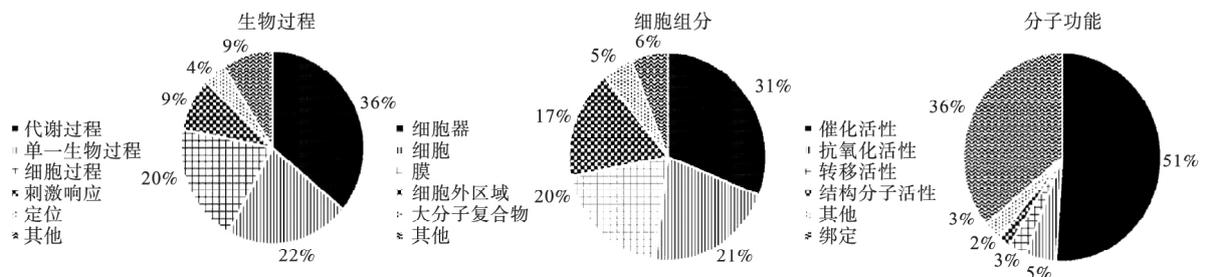


图 2 差异蛋白的 GO 富集分析

Fig.2 Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed proteins

细胞组分条目里,主要富集于细胞(31%)、细胞器(21%)和膜(20%);在分子功能条目里,富集于前3位的条目分别是催化活性(51%)、结合(36%)和抗氧化活性(5%)。由此可见,水稻在汞金属胁迫下差异表达蛋白具有多种分子功能,并参与了多个生物过程。

2.4 差异蛋白的 Pathway 富集分析

通过 Pathway 显著性富集发现,不同胁迫组差异表达蛋白总体显著富集的 pathway 通路 ($P < 0.05$) 集中分布在 23 个分类代谢途径中。主要为次生代谢物的生物合成、糖酵解/糖异生、碳代谢和苯丙烷类生物合成等。这些重要的代谢通路中,差异蛋白表达丰度的改变证明水稻根响应汞胁迫的过程相对比较明显(表 3)。图 3 所示,在中剂量胁迫组相比对照组,苯丙烷类生物合成代谢途径中,深灰色点位表达上调;灰色点位表达下调;浅色表示点位有多个蛋白,包含上调及下调。而且还发现,不同胁迫组共同表现显著上调的差异蛋白 B8AGH7,参与其中 11 条代谢通路,共同表现下调的差异蛋白表现

A2XXF7 参与 3 条代谢通路,二者均为重金属响应蛋白。

2.5 差异蛋白质的 PRM 验证

TMT/iTRAQ 体外标记定量方法,可以很好地用于差异蛋白质筛选,但是 Savitski 等(2013)报道认为,肽段共洗脱会产生定量比值压缩效应,造成定量差异低于实际差异。TMT/iTRAQ 标记蛋白质组学方法,适合于前期的差异蛋白质高通量筛选,对其所筛选到的蛋白质很有必要进行后期验证。传统的 Western blotting 实验方法体系依赖抗体,对于没有合适抗体的蛋白质样本无法使用,且单次试验只能在有限数量范围内验证蛋白质,无法进行高通量的验证实验(王素兰等,2017)。

靶向蛋白质组学技术可有目的地检测目标蛋白质,具有高度的选择性和灵敏性,被认为可补充和替代 Western blotting 用于差异蛋白质的后期验证(Aebersold *et al.*, 2013)。本研究在差异倍数大于 1.3 倍的 364 个蛋白中,选取了 20 个蛋白进行 PRM 验证。从表 4 可以发现, TMT 和 PRM 的定量结果总体趋

表3 胁迫组与对照组差异表达蛋白 KEGG 通路显著性富集分析 ($P < 0.05$, $FDR < 0.05$)

Table 3 The differentially expressed protein KEGG pathway in stress/control group

	通路编号	代谢通路	基因数量	P 值
High	osa00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3(1.22%)	0.0045
	osa00480	Glutathione metabolism	3(1.22%)	0.0094
	osa01200	Carbon metabolism	4(1.63%)	0.0385
Middle	osa04146	Peroxisome	2(0.82%)	0.0451
	osa01110	Biosynthesis of secondary metabolites	56(22.86%)	<0.0001
	osa00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms	12(4.90%)	<0.0001
	osa00250	Alanine , aspartate and glutamate metabolism	10(4.08%)	<0.0001
	osa00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	17(6.94%)	<0.0001
	osa00410	Beta-Alanine metabolism	7(2.86%)	0.0002
	osa00940	Phenylpropanoid biosynthesis	14(5.71%)	0.0006
	osa00330	Arginine and proline metabolism	6(2.45%)	0.0021
	osa00592	Alpha-Linolenic acid metabolism	6(2.45%)	0.0042
	osa00910	Nitrogen metabolism	4(1.63%)	0.0048
	osa00360	Phenylalanine metabolism	5(2.04%)	0.0097
	osa00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	3(1.22%)	0.0150
	osa00350	Tyrosine metabolism	5(2.04%)	0.0198
	osa00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	7(2.86%)	0.0240
	osa01200	Carbon metabolism	18(7.35%)	0.0250
	osa00380	Tryptophan metabolism	3(1.22%)	0.0270
	Low	osa00960	Tropane , piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	3(1.22%)
osa00790		Folate biosynthesis	3(1.22%)	0.0428
osa00592		Alpha-Linolenic acid metabolism	4(1.63%)	0.0016
osa00630		Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5(2.04%)	0.0022
osa01110		Biosynthesis of secondary metabolites	19(7.76%)	0.0027
osa00904		Diterpenoid biosynthesis	2(0.82%)	0.0039
osa00900		Terpenoid backbone biosynthesis	3(1.22%)	0.0092
osa00740		Riboflavin metabolism	2(0.82%)	0.0105
osa00710		Carbon fixation in photosynthetic organisms	4(1.63%)	0.0199
osa00380		Tryptophan metabolism	2(0.82%)	0.0199
osa00910		Nitrogen metabolism	2(0.82%)	0.0236
osa01200		Carbon metabolism	8(3.27%)	0.0248
osa00250		Alanine , aspartate and glutamate metabolism	3(1.22%)	0.0380

表4 PRM 和 TMT 的定量结果比较

Table 4 Comparison of PRM and TMT quantification results

蛋白编号	基因名称	蛋白名称	低/对照		中/对照		高/对照	
			TMT	PRM	TMT	PRM	TMT	PRM
A2WK73	OsI_00222	Multicopper oxidase LPR1	1.31	1.24	2.50	1.46	0.74	0.89
A2WMV6	OsI_01177	Germin-like protein 5-1	1.34	1.33	1.41	1.19	1.12	1.01
A2WVK8	OsI_01439	Germin-like protein 1-1	1.84	1.36	2.35	1.40	1.79	1.35
A2WPA9	OsI_01682	Peroxidase	1.43	1.33	1.44	1.33	1.05	1.12
A2WZD6	OsI_05314	Peroxidase	1.26	1.22	1.61	1.33	1.32	1.09
A2X2T0	OsI_06495	Peroxidase	1.07	1.05	1.78	1.35	1.26	1.04
A2XIA2	OsI_12162	Pyruvate phosphate dikinase	0.67	0.74	0.66	0.61	1.31	0.90
A2XN31	OsI_13961	Germin-like protein 3-7	1.76	1.38	2.02	1.32	1.67	1.18
A2XXF7	OsI_17363	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 7	0.51	0.68	0.33	0.55	0.58	0.66
A2Y053	SAM1	S-adenosylmethionine synthase 1	0.78	0.98	1.81	1.47	1.16	0.98
A2Y375	OsI_19463	Trans-cinnamate 4-monooxygenase	1.03	1.01	2.37	1.42	1.65	1.08
A2YB91	PPF-BETA	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta	0.45	0.76	0.52	0.67	0.87	0.92
A2YQI0	OsI_27546	Alcohol dehydrogenase	1.18	1.33	1.44	1.45	1.12	1.14
A2YRY8	OsI_28084	Germin-like protein 8-4	2.05	1.66	1.66	1.28	0.98	0.84
B8A753	OsI_01672	Peroxidase	1.43	1.49	1.41	1.23	1.26	1.07
B8AGH7	OsI_05576	Catalase	1.95	1.52	2.25	1.48	1.71	1.41
B8AQ75	OsI_11725	Peroxidase	0.46	0.76	0.40	0.68	0.89	1.05
B8AWG6	OsI_20922	Glutamate synthase 2 [NADH] , chloroplastic	0.37	0.62	0.26	0.44	0.74	0.76
B8BA60	OsI_27578	Peroxidase	1.73	1.45	2.22	1.47	1.22	1.14
POC511	rbcL	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	2.29	1.40	2.59	1.07	2.67	1.56

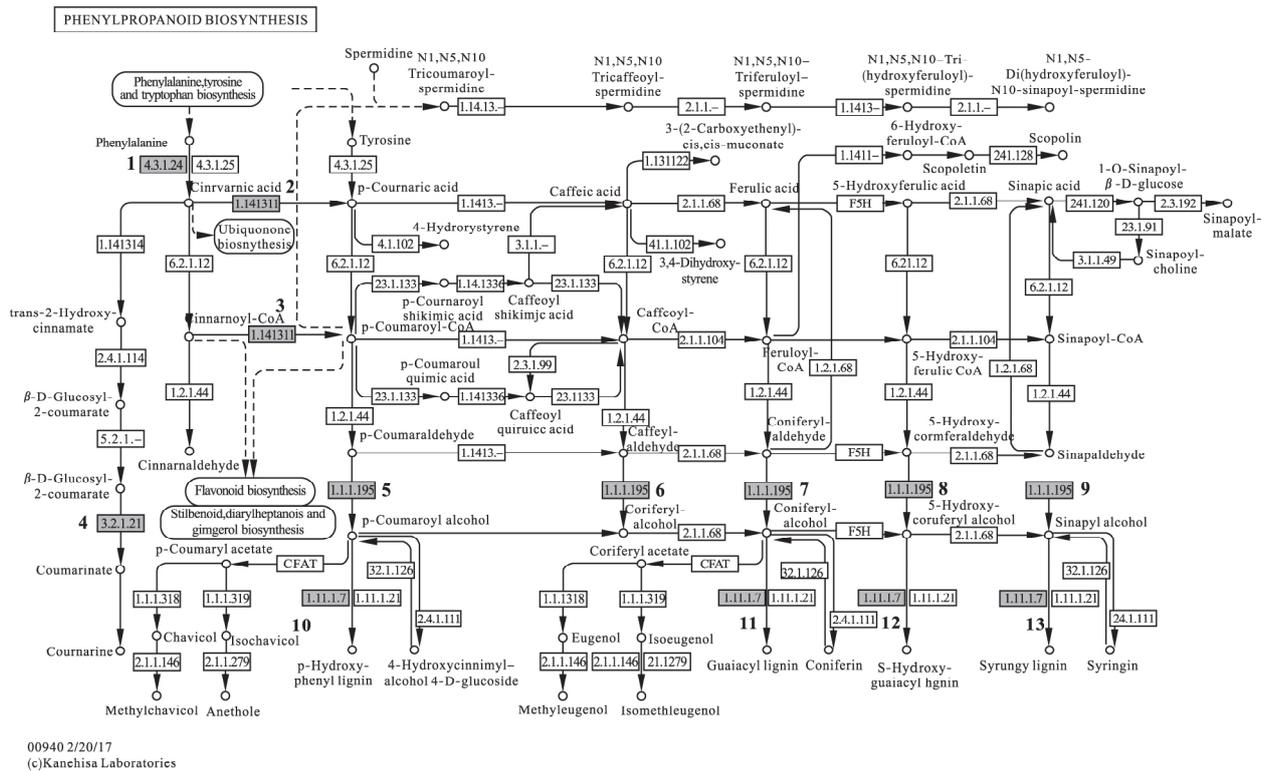


图 3 差异表达蛋白显著富集的 KEGG 通路 (Middle/CK)
Fig.3 KEGG pathway enriched by differentially expressed proteins (Middle/CK)

势一致性较高,筛选到的差异变化蛋白质可能是水稻根尖组织响应汞金属胁迫的标志蛋白质,本研究结果将为重金属胁迫响应蛋白标志物的筛选提供参考依据。

3 讨论

3.1 抗氧化还原相关蛋白

本次试验检测并验证不同浓度 Hg 胁迫下水稻根系响应多种与自由基清除的 CAT、POD、GLPs 相关蛋白,有 27 种蛋白直接参与氧化还原,另有 5 种类萌发素蛋白,表明水稻根系部分生成大量活性氧 (ROS),应激酶活性增加来应对自由基的清除,从而直接调控保护水稻的生长发育。氧化胁迫是 Hg 等重金属对水稻最重要的伤害之一,这种胁迫导致水稻体内 ROS 增加。ROS 能诱导清除活性氧相关的酶活性升高,也可直接攻击生物大分子,导致 Hg 胁迫下水稻植株内相关酶活性丧失 (赵天宏等, 2008)。

研究表明 过氧化氢酶 (CAT) 是 C₃ 植物 (包含水稻) 中 H₂O₂ 清除的关键酶 (Willekens *et al.*, 1994)。过氧化物酶 (POD) 是植物在逆境条件下,酶促防御系统的一种关键酶,参与植物体内 ROS 清

除。类萌发素蛋白 (GLPs) 是病程相关蛋白 (PRs) 家族中的一类胞外糖蛋白,在植物中普遍存在,主要以酶、受体和结构蛋白的形式参与多种生理生化过程,具有超氧化物歧化酶 (SOD) 活性,它可以将 ROS 分解为 H₂O₂,来提高水稻对 Hg 等重金属元素的防御能力 (李莹等, 2014)。因此,本研究检测到的 27 种氧化还原相关蛋白和 5 种类萌发素蛋白在 Hg 金属胁迫后明显起到重要应激响应作用。

3.2 植物螯合肽相关蛋白

金属植物螯合肽 (PCs) 是一种由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的含巯基螯合多肽,植物体中重金属最重要的配体之一,谷胱甘肽 (GSH) 是植物螯合肽合成的前体 (Zenk *et al.*, 1996)。植物螯合肽 PCs 主要通过重金属-PC 形式螯合重金属离子,参与重金属解毒及体内重金属平衡的自我调节 (Grill *et al.*, 1986)。除了解毒作用,PCs 对某些有益重金属也有维持体内平衡的作用,例如: PC 可与 Cu²⁺、Zn²⁺ 等结合,并输送至新合成需 Cu²⁺、Zn²⁺ 脱辅基蛋白,以赋予其酶活性参与新陈代谢 (邬飞波等, 2003)。

本实验中富含半胱氨酸重复分泌蛋白显著表达以及 A2Y053 蛋白 (表 4) 显著上调并经过验证,说

明汞胁迫能促进 GSH 的合成,而且 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAMS)可催化甲硫氨酸和 ATP 生成 S-腺苷甲硫氨酸,进而形成甲硫氨酸和半胱氨酸(Baric *et al.* 2004; Alvarez *et al.* 2009; 肖清铁等 2011)。

3.3 重金属胁迫响应相关蛋白

金属硫蛋白(metallothioneins, MT)是一类分子量较低,富含半胱氨酸的短肽,MT对多种重金属都具有亲和性(Cobbett *et al.* 2000)。MT的主要功能是结合金属离子,起到运输、存储和解毒作用,在MT的结构域上含有7个以上的半胱氨酸残基重金属结合位点,从而起到降低细胞内金属离子含量的作用。

本次试验中,对所有差异蛋白经过 uniprot 数据库搜索,发现364种差异蛋白中有68种蛋白与金属离子结合呈现响应关系,以各实验组共同显著表达的三个蛋白过氧化氢酶(B8AGH7)、木质素合成酶(A2XXF7)和类萌发素蛋白(A2WNK8)为代表,它们具有与金属离子结合,例如: Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等相关功能属性。另外,具显著表达的半胱氨酸相关蛋白酶类有富含半胱氨酸的受体样蛋白激酶(A2XRW3)、富含半胱氨酸的重复分泌蛋白(A2XF52)、衰老特异性半胱氨酸蛋白酶(A2Z431、A2WW32)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂(A2Z431)和半胱氨酸蛋白酶(A2X8X3),推测这些蛋白与汞离子胁迫与结合关系密切,而关于这些蛋白的定性定量尚待进一步研究证实。

本次试验还发现,10种以B8A962为代表的谷胱甘肽硫转移酶蛋白,Chakrabarty等(2009)报道,谷胱甘肽-S-转移酶的表达水平上调,可以催化有毒分子与还原型谷胱甘肽的结合,通过依赖的转动途径进入液泡而起到解毒作用。王飞娟等(2010)在汞耐性水稻突变体实验中,认为高表达水平的谷胱甘肽-S-转移酶,可能是由于为了保持体内低水平的活性氧自由基并减少产生的有毒分子,从而促进水稻对汞金属的耐受性。

3.4 其他蛋白

肉桂醇脱氢酶(CAD)是木质素合成途径的关键酶之一,而木质素是维管束系统和细胞壁的主要成分之一。此次试验水稻体内表现出重金属结合响应的CAD蛋白(A2XXF7)在各胁迫组内被抑制而显著下调,说明汞离子胁迫可能导致植株的机械强度减弱,水稻生长能力受损。

植物受到生物或非生物胁迫时,病程相关蛋白

(pathogenesis-related proteins, PRs) PR-5 家族(又称类甜蛋白,thaumatin-like proteins, TLPs)在植物组织内迅速表达并积累,当植物经受胁迫时被诱导表达,在植物的防御反应中发挥作用,具有抗菌活性、酶抑制活性和过敏原活性等(Abad *et al.*, 1996)。本研究中A2XKB8蛋白显著下调,可能是因为产生的TLPs作用功能受到明显干扰,而超出蛋白活性的阈值范围。

4 结 论

通过结合TMT标记的高通量蛋白质组相对定量技术和PRM的靶向蛋白质组定量验证技术的方法,对水稻根尖的差异蛋白质进行了高通量的筛选和验证。从蛋白质水平探讨了水稻根尖在汞胁迫下的抗性响应过程,364种差异蛋白(变化倍数 ≥ 1.3 , $P < 0.05$)中表达上调的258种,表达下调的106种,发现12种汞胁迫而共同变化显著差异蛋白,包括氧化应激蛋白、重金属螯合蛋白,以及一些可能作为水稻耐重金属潜在靶标蛋白。GO显著性分析说明,根尖组织中细胞组分、代谢过程以及催化活性响应最明显;KEGG代谢通路分析说明,免受过氧化氢的毒性类蛋白和金属离子结合位点蛋白参与的代谢途径较多,PRM验证结果和TMT实验结果总体趋势一致性较高。本研究结果有助于加深人们对水稻抗汞分子吸收机理的认识,并从根系防止汞金属胁迫提供研究依据,为深入认识水稻重金属胁迫响应的应答分子调控机制奠定了基础,对保障粮食安全、维护人群健康和可持续生产具有重要意义。

参考文献

- 黄中伟. 2012. 稻田生态系统中总汞和甲基汞的分布研究(硕士学位论文). 焦作: 河南理工大学.
- 李琳. 2018. 基于串联质谱标签法和平行反应监测技术的氟喹诺酮耐药沙门菌蛋白质组学分析. 微生物学通报, 45(7): 1535-1545.
- 李莹, 柳参奎. 2014. 植物类萌发素蛋白研究进展. 中国农学通报, 30(30): 246-254.
- 王飞娟. 2010. 汞胁迫下水稻根蛋白质组学及抗性相关基因功能分析(博士学位论文). 杭州: 浙江大学.
- 王素兰, 高华萍, 张菁, 等. 2017. 基于稳定同位素标记和平行反应监测的蛋白质组学定量技术用于肝癌生物标志物的筛选和验证. 色谱, 35(9): 934-940.
- 王秀臻. 2018. 柔嫩艾美耳球虫入侵DF1细胞的转录组学及蛋白质组学分析(博士学位论文). 泰安: 山东农业大学.
- 邬飞波, 张国平. 2003. 植物螯合肽及其在重金属耐性中的

- 作用. *应用生态学报*, **14**(4): 632-636.
- 肖清铁, 戎红, 周丽英, 等. 2011. 水稻叶片对镉胁迫响应的蛋白质差异表达. *应用生态学报*, **22**(4): 1013-1019.
- 于莉. 2018. 基于新一代代谢组学技术的小细胞肺癌代谢特征和早期诊断的研究(博士学位论文). 沈阳: 中国医科大学.
- 赵天宏, 孙加伟, 付宇. 2008. 逆境胁迫下植物活性氧代谢及外源调控机理的研究进展. *作物杂志*, (3): 10-13.
- Abad LR, D'Urzo MP, Dong L, *et al.* 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*, **118**: 11-23.
- Aebersold R, Burlingame AL, Bradshaw RA. 2013. Western blots versus selected reaction monitoring assays: Time to turn the tables? *Molecular & Cellular Proteomics*, **12**: 2381-2382.
- Alvarez S, Berla BM, Sheffield J, *et al.* 2009. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics*, **9**: 2419-2431.
- Baric I, Fumic K, Glenn B, *et al.* 2004. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 4234-4239.
- Chakrabarty D, Trivedi PK, Misra P, *et al.* 2009. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*, **74**: 688-702.
- Cobbett CS. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 211-216.
- Grill E, Gekeler W, Winnacker EL, *et al.* 1986. Homophytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Letters*, **205**: 47-50.
- Meng B, Feng X, Qiu G, *et al.* 2010. Distribution patterns of inorganic mercury and methylmercury in tissues of rice (*Oryza sativa* L.) plants and possible bioaccumulation pathways. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **58**: 4951-4958.
- Qiu G, Feng X, Li P, *et al.* 2008. Methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) grown at abandoned mercury mines in Guizhou, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 2465-2468.
- Qiu G, Feng X, Meng B, *et al.* 2013. Environmental geochemistry of an abandoned mercury mine in Yanwuping, Guizhou Province, China. *Environmental Research*, **125**: 124-130.
- Savitski MM, Mathieson T, Zinn N, *et al.* 2013. Measuring and managing ratio compression for accurate iTRAQ/TMT quantification. *Journal of Proteome Research*, **12**: 3586-3598.
- Willekens H, Langebartels C, Tiré C, *et al.* 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 10450-10454.
- Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants: A review. *Gene*, **179**: 21-30.
- Zhao YL, Zhou YH, Chen JQ, *et al.* 2015. Quantitative proteomic analysis of sub-MIC erythromycin inhibiting biofilm formation of *S. suis* in vitro. *Journal of Proteomics*, **116**: 1-14.

作者简介 祁忠达,男,1993年生,硕士研究生。主要从事水稻汞胁迫蛋白组学研究。E-mail: QZD00@gmc.edu.cn
责任编辑 魏中青
