

基于 iTRAQ 技术筛选水稻根尖甲基汞胁迫响应差异蛋白及其生物信息学分析

龙水庭^{1,2} 韦艳¹ 徐晓航² 刘琳² 仇广乐^{2*}

(¹贵州医科大学公共卫生学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 550025; ²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 为了解水稻(*Oryza sativa* L.)对甲基汞胁迫响应的分子机制,采用两优302为实验材料,利用同位素相对标记与绝对定量技术(iTRAQ),联合液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS),筛选水稻甲基汞胁迫下的根尖蛋白组差异表达蛋白,并结合生物信息学对差异蛋白进行分析。结果表明,对照组与处理组共定量了3508个蛋白质,在差异倍数(fold change) ≥ 1.20 或 ≤ 0.83 ,且 $P < 0.05$ 条件下,筛选出88个差异蛋白,其中32个蛋白表达上调,56个蛋白表达下调,其中15个差异蛋白(包括类萌发素蛋白和脂氧合酶等12个已知蛋白和3个未知蛋白)具有与金属离子结合相关属性。基因本体(gene ontology, GO)分子功能提示,差异性蛋白主要涉及催化活性、结合和转运活性等生物学过程,京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析显示,差异蛋白显著富集于内质网蛋白加工、氧化磷酸化、淀粉与蔗糖代谢和苯丙素生物合成等代谢通路。研究结果为今后调控水稻中MeHg的吸收提供依据。

关键词 iTRAQ; 甲基汞胁迫; 差异蛋白; 水稻

Screening differentially expressed proteins in root tips in response to methylmercury stress by iTRAQ technique and their bioinformatics analysis. LONG Shui-ting^{1,2}, WEI Yan¹, XU Xiao-hang², LIU Lin², QIU Guang-le^{2*} (¹School of Public Health, Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; ²State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, China).

Abstract: To understand the molecular mechanism of rice (*Oryza sativa* L.) in response to methylmercury (MeHg) stress, we analyzed the expressed proteins in root tips of rice Liangyou 302 under MeHg stress using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Differential proteins were elucidated in view of bioinformatics and molecular biology. The results showed that a total of 3508 proteins were quantified in both the control and MeHg treatment. According to fold change (≥ 1.20 or ≤ 0.83) and $P < 0.05$, a total of 88 differentially expressed proteins were identified, out of which 32 proteins were up-regulated and 56 proteins were down-regulated. There were 15 differentially expressed proteins associated with the characteristic of metal ion binding, including 12 known proteins of germination-like proteins, lipoxygenase, and three unknown proteins. Results from the molecular functions of gene ontology (GO) suggested that differentially expressed proteins were mainly involved in catalytic activity, binding and transport activity, while the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway exhibited that they were significantly enriched in protein processing in endoplasmic reticulum, oxidative phosphorylation, starch and sucrose metabo-

国家自然科学基金项目(41573135)资助。

收稿日期: 2019-11-22 接受日期: 2020-04-02

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

lism, and phenylpropanoid biosynthesis. Our results provide insight into regulating absorption of MeHg in rice.

Key words: iTRAQ; methylmercury stress; differentially expressed protein; rice.

汞(Hg)是一种有毒重金属,对植物生长具有显著危害(刘慧等,2015)。土壤中的汞可经植物根系进入体内,经食物链传递造成人体健康暴露风险(王飞娟,2010)。研究发现,汞污染区水稻可以在籽粒中富集毒性更强的甲基汞(Methylmercury, Me-Hg),大米摄入已成为居民甲基汞暴露的主要途径(Feng *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2008)。而水稻富集甲基汞是“根吸收-茎叶转运贮存-籽粒积累”的动态过程,土壤甲基汞是水稻甲基汞的主要来源(Meng *et al.*, 2010; Strickman *et al.*, 2016)。

水稻根系直接接触土壤,是生长发育过程中最先感受逆境胁迫的部位(罗光宇等,2018)。其作为主要粮食作物之一,籽粒高度积累甲基汞的现象,对长期食用人群造成潜在的健康暴露风险。然而,关于水稻根系吸收并转运土壤甲基汞的分子生物学机制尚不清楚。近年来随着现代分子生物学技术的迅速发展,蛋白质组学分析技术已被大量应用于植物抗逆、抗病的研究(Lan *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016; 汪宝卿等,2017),为水稻响应逆境胁迫的分子机制研究提供了契机和方向。

本研究拟从分子生物学角度,探讨水稻根系甲基汞胁迫的蛋白组学响应机制,利用同位素相对标记与绝对定量技术(iTRAQ),比较分析水稻在甲基汞胁迫下的根尖蛋白质表达变化,试图了解水稻根系响应甲基汞胁迫的蛋白组学调控机制,以期发现水稻甲基汞抗性相关蛋白,为深入理解水稻响应汞胁迫的调控机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以贵州省普遍栽种的两优 302 和贵阳市百花湖农田水稻土作为供试材料,在分蘖早期选取生长一致的秧苗移栽塑料桶中(直径 30 cm,高度 27 cm,干重土壤 7.5 kg)。设置对照组和胁迫组,其中胁迫组施加氯化甲基汞,使土壤甲基汞浓度为 50、150 和 300 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$,每个处理组 3 个重复。水稻氯化甲基汞胁迫 60 d 后,孕穗期采集根尖(3~5 cm)样品,液氮速冻后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。本实验选取对照组和 300 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度处理组根尖样品进行差异表达蛋白

质研究,对照组样本标记为 A1、A2、A3,处理组样本标记为 B1、B2、B3。

1.2 蛋白提取与定量

样品加液氮研磨成粉末,按 1:3 比例加入 BPP 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ vortex 振荡 10 min;加入等体积的 Tris-饱和酚,4 $^{\circ}\text{C}$ vortex 振荡 10 min,12000 $\times g$ 离心 20 min 后取酚相,加入等体积 BPP 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ vortex 振荡 10 min,12000 $\times g$ 离心 20 min 取酚相,加入 5 倍体积预冷乙酸铵甲醇溶液混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀;次日 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 $\times g$ 离心 20 min 弃上清。向沉淀中加入 90%预冷丙酮混匀后离心弃上清,重复 2 次;最后沉淀溶解于蛋白裂解液(8 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素+1% SDS,含蛋白酶抑制剂 cocktail);冰上超声 2 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 $\times g$ 离心 20 min 取蛋白上清,BCA 试剂盒定量蛋白,SDS-PAGE 电泳。

1.3 还原烷基化和酶解

取蛋白样品,加入裂解液、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TEAB 和 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTCEP,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 60 min;加入 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺(Iodoacetamide)室温下避光反应 40 min;然后每管各加入预冷的丙酮(体积比=6:1), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 4 h 后 10000 $\times g$ 离心 20 min,取沉淀;用 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TEAB 充分溶解样品;加入 Trypsin 酶(质量比=1:50) 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜。

1.4 iTRAQ 标记

酶解蛋白样品用真空泵抽干肽段,以 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TEAB 复溶肽段,采用 iTRAQ 试剂盒(AB Sci-ex)进行标记,其中 iTRAQ8-113、114 和 115 分别标记对照组 3 个重复样本(A1、A2、A3),iTRAQ8-116、117 和 118 标记处理组重复样本(B1、B2、B3)。

1.5 高 pH UPLC 分离液相与串联质谱分析

用 UPLC 上样缓冲液复溶后的多肽样品,用反相 C18 柱进行高 pH(pH=10)液相分离;分离后样品用质谱仪 Q-Exactive(Thermo, USA)进行质谱分析,数据用软件 Thermo Xcalibur 4.0(Thermo, USA)进行采集后,使用软件 Proteome Discoverer TM Software 2.2 进行查库鉴定及定量分析(Unwin *et al.*, 2010)。

本文使用蛋白质数据库 uniprot-proteome%3AUP000007015-*Oryza sativa* subsp. indica (Rice) - 37383s-20190314.fasta(收录序列 37383 条,下载于

20190314), 查库使用软件 ProteomeDiscoverer™ Software 2.2。查库时将 RAW 文件提交至 Proteome-Discoverer 服务器, 选择已经建立好的数据库, 然后进行数据库搜索。

1.6 蛋白质鉴定及生物信息学分析

差异蛋白的筛选根据某个蛋白表达量的差异倍数 $FC(\text{fold change}) \geq 1.20$ 或 ≤ 0.83 , 且满足 t 检验 $P < 0.05$ 进行判断。即 $FC(B/A) \geq 1.20$ 倍为上调表达蛋白, $FC(B/A) \leq 0.83$ 倍为下调表达蛋白(冯耿, 2017)。采用 BLAST2go (<https://www.blast2go.com/>) 软件对鉴定到的差异蛋白进行 GO(Gene Ontology) 功能分析, 通过 KOBAS(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn>) 和 python 软件对差异蛋白进行 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路分析。

2 结果与分析

2.1 水稻根尖蛋白 SDS-PAGE

水稻根尖蛋白 SDS-PAGE 电泳分离后染色, 结果如图 1 所示, 各组蛋白质条带清晰丰富, 均一性好, 对照组和处理组 2 组样品的 6 个条带无明显差别, 表明 2 组样品间蛋白提取差异性较小, 样品定量一致性较好, 满足 iTRAQ 标记实验分析。

2.2 水稻根尖差异蛋白筛选结果

本次实验共定量了 3508 个蛋白信息, 其中 88

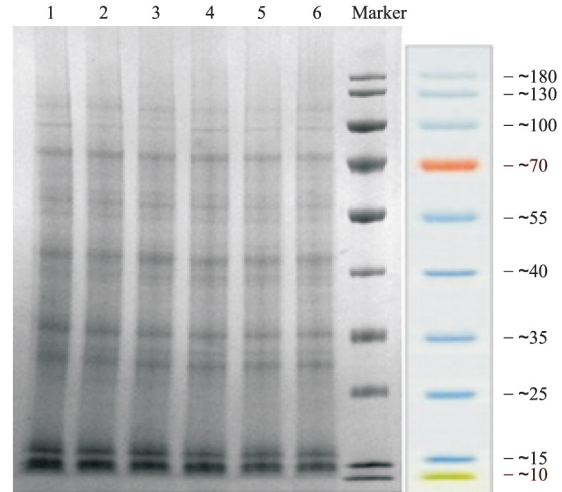


图 1 水稻根尖蛋白 SDS-PAGE 图谱 (Marker: 1、2、3-对照组; 4、5、6-处理组)

Fig.1 SDS-PAGE spectrum of rice root tip protein (Marker: 1, 2, 3, control groups; 4, 5, 6, stress groups)

个差异蛋白, 表达上调蛋白 32 个, 表达下调蛋白 56 个。表 1 和表 2 分别列出了表达上调与下调的差异蛋白及生物学功能。

2.3 GO 分析结果

对差异蛋白主要功能类别进行 GO 功能注释, 分析结果显示, 差异蛋白的生物学功能覆盖范围较广, 涉及 36 个生物学功能, 如图 2 所示。其中生物过程 15 个 (41.6%), 主要涉及代谢过程、细胞过程

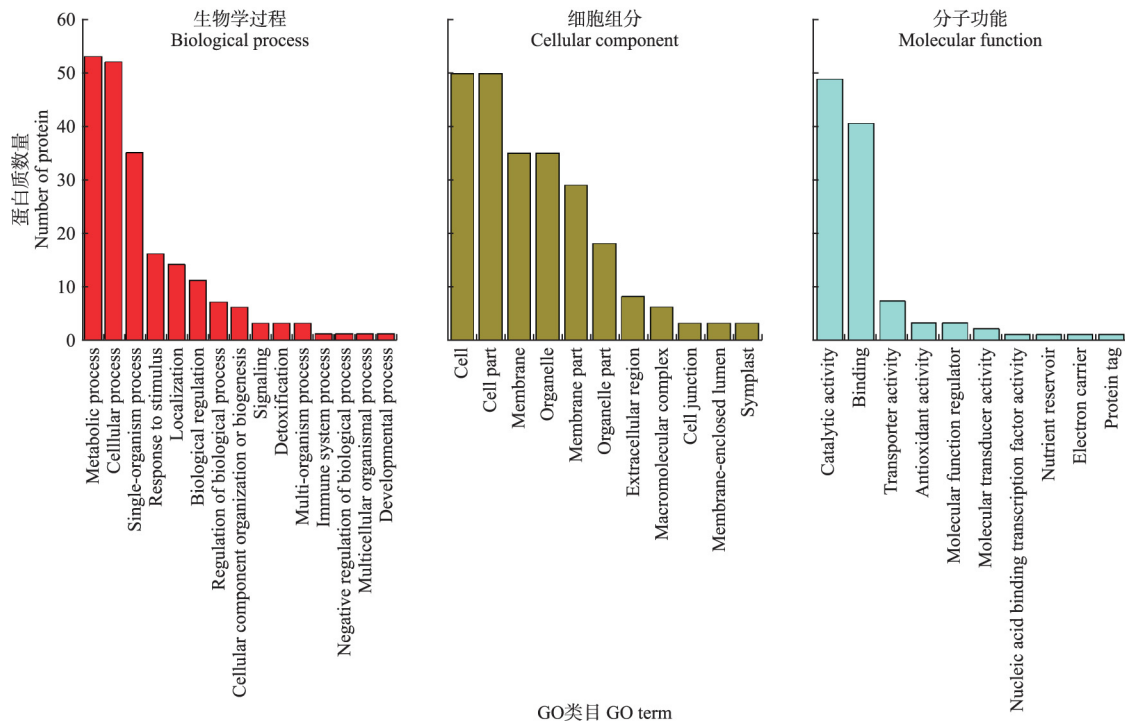


图 2 差异表达蛋白 GO 功能注释图

Fig.2 GO function annotation of differentially expressed proteins

表 1 处理组 (B) 较对照组 (A) 表达上调的 32 个差异蛋白集

Table 1 Up-regulated 32 differentially expressed proteins of stress group (B) compared with control group (A)

蛋白编码 Uniport No	基因名称 Gene name	蛋白描述 (Protein name)	生物学功能 Biological functions	差异倍数 (B/A) FC(B/A)	P 值 B/A (P value B/A)
A2XMU5	OsI_13868	AAI domain-containing protein	功能未知	1.830	0.041
B8AGI4	OsI_05593	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	葡萄糖-1-磷酸尿苷脂转移酶活性	1.606	0.037
A2Z8R3	OsI_34106	Uncharacterized protein	功能未知	1.556	0.048
A2YVI4	OsI_29344	Uncharacterized protein	核糖核酸酶 T2 活性	1.536	0.003
A2YCI2	OsI_22823	Uncharacterized protein	通道活性	1.447	0.001
A2YIN7	OsI_25087	AAI domain-containing protein	脂质结合	1.416	0.034
B8BHW2	OsI_34332	Cytochrome b5 heme-binding domain-containing protein	金属离子结合	1.357	0.030
A2XZJ1	OsI_18149	Cytochrome b5 heme-binding domain-containing protein	金属离子结合	1.354	0.044
A2XSL4	OsI_15603	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase 5, chloroplastic	金属离子结合	1.328	0.009
A2WLZ1	OsI_00860	Uncharacterized protein	功能未知	1.319	0.005
A2WYE1	OsI_04943	Small ubiquitin-related modifier	蛋白质类泛素化	1.309	0.014
A2X5T8	OsI_07574	UCR_hinge domain-containing protein	泛醇细胞色素 c 还原酶活性	1.295	0.027
A2X7Z6	OsI_08345	Uncharacterized protein	通道活性	1.268	0.046
A2XAM7	OsI_09307	Uncharacterized protein	通道活性	1.261	0.009
A2YIP9	OsI_25100	Uncharacterized protein	功能未知	1.261	0.031
A2YP57	OsI_27047	Uncharacterized protein	功能未知	1.260	0.008
B8AJX7	OsI_13440	Serine hydroxymethyltransferase	甘氨酸羟甲基转移酶活性	1.253	0.020
A2YHCO	OsI_24586	Peroxidase	金属离子结合	1.240	0.014
B8BE24	OsI_32232	Thioredoxin-like_fold domain-containing protein	功能未知	1.236	0.030
B8AJQ5	OsI_12007	NAD(P) -bd_dom domain-containing protein	功能未知	1.235	0.043
A2XYW8	GLU6	Endoglucanase 13	碳水化合物结合	1.234	0.013
A2YBI4	OsI_22465	Phytocyanin domain-containing protein	电子传递活性	1.234	0.018
A2WMG6	OsI_001009	Salt stress root protein RS1	功能未知	1.230	0.047
B8B869	OsI_25271	AAI domain-containing protein	功能未知	1.226	0.020
A2WNS2	OsI_01506	Peroxidase	金属离子结合	1.222	0.011
A2XCH7	OsI_10010	Tonoplast intrinsic protein 11	通道活性	1.217	0.026
B8BC40	OsI_29751	Uncharacterized protein	S-腺苷蛋氨酸依赖甲基转移酶活性	1.215	0.014
A2Z7W8	OsI_33803	MFS domain-containing protein	无机磷酸盐跨膜转运蛋白活性	1.208	0.037
B8AM03	OsI_11143	Uncharacterized protein	功能未知	1.207	0.026
A2ZKK1	OsI_38348	Uncharacterized protein	未折叠蛋白结合	1.206	0.025
B8B6Z9	OsI_26347	Uncharacterized protein	水解酶活性	1.204	0.049
A2ZIS0	OsI_37721	Uncharacterized protein	催化活性	1.200	0.048

表 2 处理组 (B) 较对照组 (A) 表达下调的 56 个差异蛋白

Table 2 Down-regulated 56 differentially expressed proteins of stress group (B) compared with control group (A)

蛋白编码 Uniport No	基因名称 Gene name	蛋白描述 Protein name	生物学功能 Biological functions	差异倍数 (B/A) FC(B/A)	P 值 B/A (P value B/A)
A2YGE7	OsI_24247	Expansin-like EG45 domain-containing protein	功能未知	0.561	0.025
A2WUL5	OsI_03568	Tr-type G domain-containing protein	GTP 酶活性	0.596	0.031
B8B9R0	OsI_28781	Uncharacterized protein	DNA 结合	0.602	0.017
B8B2L2	OsI_24520	Amy domain-containing protein	阳离子结合	0.636	0.036
B8AA11	OsI_02374	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	硫醇依赖泛素酰水解酶活性	0.648	0.018
A2WKJ8	OsI_00351	Uncharacterized protein	功能未知	0.682	0.024
A2ZGY9	OsI_37038	Glyco_hydro_18 domain-containing protein	碳水化合物代谢	0.689	0.020
A2YLZ3	OsI_26248	TOND1	功能未知	0.696	0.043
A2ZEN8	OsI_36252	LRRNT_2 domain-containing protein	功能未知	0.698	0.048
A2WU94	OsI_03445	Uncharacterized protein	蛋白质转运	0.702	0.019
B8BL89	OsI_36603	Uncharacterized protein	功能未知	0.704	0.031

续表 2

Table 2 Continued

蛋白编码 Uniport No	基因名称 Gene name	蛋白描述 Protein name	生物学功能 Biological functions	差异倍数 (B/A) FC(B/A)	P 值 B/A (P value B/A)
A2YXN9	OsI_30109	Uncharacterized protein	功能未知	0.707	0.046
B8BMG3	OsI_38692	Bet_v_1 domain-containing protein	防御反应	0.710	0.018
A2WX99	dl119	DL119 protein	功能未知	0.729	0.001
B8BHL9	OsI_34133	Uncharacterized protein	功能未知	0.732	0.003
A2ZLJ0	OsI_38687	Bet_v_1 domain-containing protein	防御反应	0.736	0.039
A2XF52	OsI_10995	Uncharacterized protein	功能未知	0.745	0.011
B8ACP2	OsI_00847	Mannosyltransferase	α -1,2 甘露糖转移酶活性	0.761	0.016
B8BKV0	OsI_36335	Uncharacterized protein	丝氨酸型内肽酶活性	0.762	0.042
A2Z8T9	OsI_34132	Uncharacterized protein	功能未知	0.763	0.000
POC511	rbcl	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	镁离子结合;	0.763	0.006
A2XEH6	OsI_10733	SHSP domain-containing protein	热响应	0.765	0.009
A2WZ34	OsI_05202	Uncharacterized protein	功能未知	0.771	0.049
B8B7D9	OsI_24954	Uncharacterized protein	内脱氧核糖核酸酶活性	0.772	0.017
A2WSF2	OsI_02790	Uncharacterized protein	跨膜转运体活性	0.773	0.007
A2X6V5	NBP35	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NBP35	金属离子结合	0.774	0.016
B8AKK2	OsI_13703	Uncharacterized protein	金属离子结合	0.784	0.016
A2YJX3	OsI_25529	M20_dimer domain-containing protein	水解酶活性	0.785	0.000
A2XWN6	OsI_17065	Polyprenol reductase 1	多萜醇还原酶活性	0.788	0.040
A2WU38	OsI_03384	Polyprenol reductase 1	天冬氨酸型内肽酶活性	0.788	0.041
A2X1P8	OsI_06126	Uncharacterized protein	无机二磷酸酶活性	0.791	0.020
A2WLG6	OsI_00679	SHSP domain-containing protein	热响应	0.791	0.003
A2XZF8	OsI_18107	Glutamine amidotransferase type-1 domain-containing protein	磷酸基甲酰甘氨酸合成酶活性	0.792	0.023
A2ZJA7	OsI_37907	Uncharacterized protein	锌离子结合	0.797	0.004
A2XPL8	OsI_14582	HATPase_c domain-containing protein	未折叠蛋白结合	0.802	0.002
A2YU26	OsI_28834	Lectin_legB domain-containing protein	碳水化合物结合	0.802	0.003
B8AHE3	OsI_05791	Terpene cyclase/mutase family member	β -淀粉蛋白合成酶活性	0.804	0.025
A2WXX4	OsI_04655	Dirigent protein	植物次生代谢	0.804	0.030
Q01M19	APX3	Probable L-ascorbate peroxidase 3	金属离子结合	0.809	0.029
A2WYV5	OsI_05117	Uncharacterized protein	天冬氨酸型内肽酶活性	0.811	0.003
A2WZ52	OsI_05222	Germin-like protein	锰离子结合	0.811	0.032
B8BK10	OsI_36108	Uncharacterized protein	锌结合	0.812	0.029
A2Y523	OsI_20099	Protein YIPF	功能未知	0.814	0.004
B8ABJ0	OsI_02777	Uncharacterized protein	功能未知	0.814	0.012
B8BEQ8	OsI_31006	Protein kinase domain-containing protein	ATP 结合	0.817	0.023
B8BAL0	OsI_27723	RING-type domain-containing protein	泛素蛋白转移酶活性	0.818	0.039
B8ASX9	OsI_16901	Malate dehydrogenase	L-苹果酸脱氢酶活性	0.821	0.017
B8AWU4	OsI_20948	B5 domain-containing protein	镁离子结合	0.823	0.001
A2YWV7	OsI_29820	Lipoxygenase	金属离子结合	0.824	0.000
B8AAN8	OsI_00955	Protein kinase domain-containing protein	ATP 结合	0.824	0.007
A2X691	OsI_07729	Abhydrolase_3 domain-containing protein	水解酶活性	0.825	0.041
B8B5N5	OsI_25817	Protein kinase domain-containing protein	ATP 结合	0.826	0.043
A2Y851	OsI_21225	Uncharacterized protein	肽酶活性	0.829	0.044
B8B3X7	OsI_22104	Uncharacterized protein	功能未知	0.829	0.013
B8BBT4	OsI_29644	Uncharacterized protein	功能未知	0.829	0.007
B8AXF2	OsI_19671	Uncharacterized protein	水解酶活性	0.829	0.041

和单生物过程等功能; 细胞组分 11 个 (30.5%), 主要涉及细胞部分、细胞和膜等功能; 分子功能 10 个 (27.7%), 主要涉及催化活性、结合和转运活性等

功能。

2.4 KEGG 分析结果

Pathway 分析发现, 差异表达蛋白涉及 28 条代

谢通路,见表 3。主要为内质网蛋白加工、氧化磷酸化、淀粉与蔗糖代谢和苯丙素生物合成等。这些重要的代谢通路中,上调表达蛋白与下调表达蛋白均有参与的通路有 5 条,内质网蛋白加工由 4 个下调表达蛋白(A2WLG6、A2XEH6、A2XPL8、B8BKIO) 参与。上调表达蛋白尿苷三磷酸-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶(B8AGI4) 与丝氨酸羟甲基转移酶(B8AJX7), 分别参与了 4 条和 3 条通路,而下调蛋白苹果酸脱氢酶(B8ASX9) 参与 5 条通路。

图 3 所示,差异蛋白参与的氧化磷酸化代谢通路中,绿色背景框代表本次试验水稻物种匹配到的蛋白质,边框不同颜色代表不同的蛋白集中的蛋白,红色边框表示下调表达蛋白,蓝色边框表示上调表达蛋白。Pathway 通路富集分析结果显示此通路的差异表达蛋白有 3 个,上调 2 个(A2X5T8、A2YP57), 下调 1 个(A2X1P8), 其中上调蛋白 A2X5T8 作为亚基 Ndufa6 参与此途径的复合体 I:

NADH-Q 还原酶复合体,A2YP57 作为亚基 QCR6 参与复合体 III: 细胞色素 C 氧化还原酶复合体; 而下调蛋白 A2X1P8 参与复合体 V: ATP 合成酶复合体, 3 个蛋白参与此通路中的不同复合体响应甲基汞胁迫。

2.5 差异蛋白质互作网络分析

参考物种(plants, *Oryza sativa* Indica Group), 采用网络建模的方法构建 88 个差异表达蛋白质相互作用网络,除去 55 个独立蛋白质,显示 33 个存在相互作用的差异表达蛋白质网络,见图 4。圆表示蛋白,虚线表示两蛋白间存在互作关系,相连的虚线越多,圆越大,表明该蛋白在该互作网络中重要性越强。图 4 显示,代表蛋白 A2XPL8 的圆最大,与其他蛋白的互作关系最强。A2XPL8 为含 HATPase-C 功能域结合蛋白,具有未折叠蛋白结合活性且参与植物-病原体互作通路,推测此蛋白可能调控其他差异蛋白响应甲基汞的胁迫。

表 3 差异蛋白的 KEGG 显著性分析

Table 3 Differentially expressed proteins KEGG pathway

通路名称 Pathway name	富集蛋白 Protein number	P 值 P-value	通路 ID Pathway ID
Protein processing in endoplasmic reticulum	A2WLG6; A2XEH6; A2XPL8; B8BKIO(↓)	0.114	map04141
Oxidative phosphorylation	A2X5T8; A2YP57(↑), A2X1P8(↓)	0.178	map00190
Phenylpropanoid biosynthesis	A2YHC0; A2WNS2(↑), B8AXF2(↓)	0.466	map00940
Starch and sucrose metabolism	B8AGI4(↑), B8B2L2; B8AXF2(↓)	0.152	map00500
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	B8AJX7(↑), B8ASX9; P0C511(↓)	0.046	map00630
Glutathione metabolism	Q01MI9; A2WZ34(↓)	0.365	map00480
Carbon fixation in photosynthetic organisms	B8ASX9; P0C511(↓)	0.260	map00710
Cyanoamino acid metabolism	B8AJX7(↑), B8AXF2(↓)	0.092	map00460
One carbon pool by folate	B8AJX7(↑)	0.160	map00670
Ascorbate and aldarate metabolism	Q01MI9(↓)	0.368	map00053
Pentose and glucuronate interconversions	B8AGI4(↑)	0.310	map00040
N-Glycan biosynthesis	B8ACP2(↓)	0.263	map00510
Fatty acid biosynthesis	A2XSL4(↑)	0.263	map00061
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	B8AWU4(↓)	0.340	map00970
Galactose metabolism	B8AGI4(↑)	0.493	map00052
alpha-Linolenic acid metabolism	A2YWV7(↓)	0.421	map00592
Glycine, serine and threonine metabolism	B8AJX7(↑)	0.446	map00260
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	B8AGI4(↑)	0.716	map00520
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	A2XSL4(↑)	0.230	map01040
Pyruvate metabolism	B8ASX9(↓)	0.696	map00620
Linoleic acid metabolism	A2YWV7(↓)	0.103	map00591
Purine metabolism	A2XZF8(↓)	0.575	map00230
Cysteine and methionine metabolism	B8ASX9(↓)	0.556	map00270
RNA transport	A2WYE1(↑)	0.689	map03013
Endocytosis	A2WU94(↓)	0.682	map04144
Citrate cycle (TCA cycle)	B8ASX9(↓)	0.628	map00020
Plant-pathogen interaction	A2XPL8(↓)	0.660	map04626
Steroid biosynthesis	B8AHE3(↓)	0.083	map00100

注: ↑ 表示上调蛋白; ↓ 表示下调蛋白。Note: ↑ represents up-regulated protein; ↓ represents down-regulated protein.

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

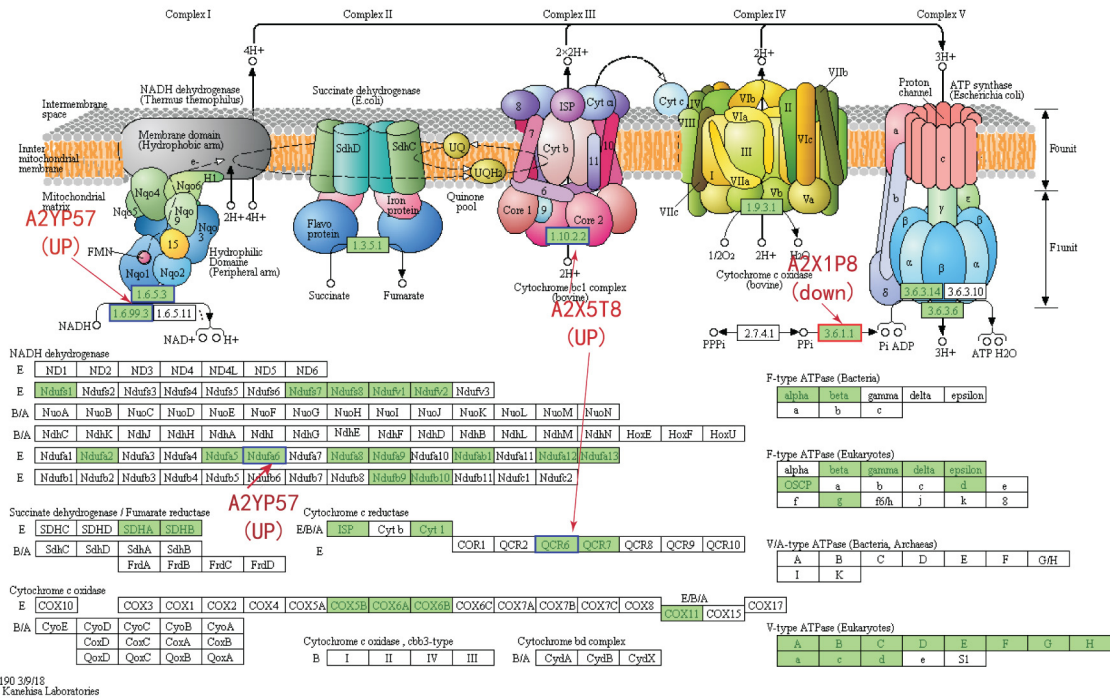


图 3 KEGG 通路的氧化磷酸化代谢途径
Fig.3 Oxidative phosphorylation of KEGG pathway

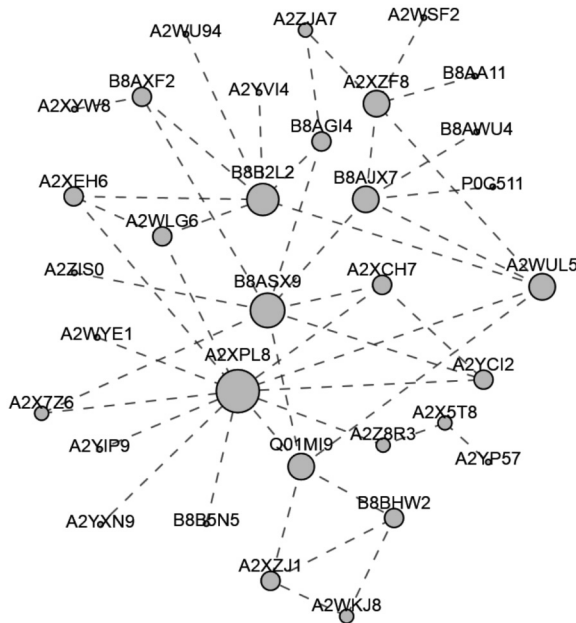


图 4 差异蛋白质相互作用网络分析
Fig.4 Differentially expressed proteins interaction network analysis

3 讨论

目前,水稻响应重金属胁迫的蛋白质组学已在重金属镉(Lee *et al.*, 2010)、砷(Ahsan *et al.*, 2010)和铝(Fukuda *et al.*, 2007) 等有研究,但响应汞胁迫

的蛋白质组学研究,尤其甲基汞鲜见报道。本实验利用 iTRAQ 技术对水稻甲基汞胁迫后的根尖进行差异蛋白表达分析,在差异倍数(fold change) >1.20 或<0.83,且 $P < 0.05$ 条件下,共鉴定了 88 个差异蛋白,其中 32 个蛋白表达上调,56 个蛋白表达下调。

经 uniprot 数据库搜索,发现有 15 种蛋白与金属离子结合呈现响应关系,其中上调蛋白 5 个,下调蛋白 10 个(表 1, 2 粗体部分),以类萌发素蛋白(A2WZ52)和链式二磷酸核酮糖羧化酶(POC511)为代表,它们具有与金属离子,例如: Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 等离子结合的相关功能属性。这些与金属离子结合蛋白,很可能通过参与不同生物学功能途径响应甲基汞胁迫。

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,普遍存在于植物中,其主要以酶、受体和结构蛋白的形式参与多种生理生化过程,可以清除植物体内过多的活性氧(ROS),GLPs 催化反应产生的 H_2O_2 ,诱导植物对重金属胁迫的防卫反应(李红丽等,2013)。重金属 Cd 和 Zn 处理拟南芥和遏蓝菜后检测不同基因表达水平的研究结果显示,拟南芥有 2 个 GLPs 基因在所有处理中均大量诱导表达,暗示 GLPs 参与应对 Zn、Cd 胁迫(van de Mortel *et al.*, 2008)。本次实验中类萌发素蛋白(A2WZ52)显著下调,可能是甲基汞胁迫使 GLPs 作用功能受到干扰,抑制了其表达活性。

苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)普遍存在于动、植物和细菌等生物体中,是生物糖代谢的关键酶之一,在细胞线粒体的能量代谢以及植物的活性氧代谢等生理活动中起着重要的作用(汪新颖等,2009)。金属离子胁迫绿豆 MDH 变化情况的研究表明, Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 对 MDH 活性有不同程度的抑制(汪少芸等,2006)。试验发现差异蛋白苹果酸脱氢酶(B8ASX9)显著下调表达,表明甲基汞胁迫使水稻苹果酸脱氢酶活性受到了抑制。

真核细胞内质网是细胞内分泌蛋白和膜蛋白合成、折叠与修饰的主要场所,当植物受到多种外界环境因素胁迫时,内质网会聚集大量错误折叠或未折叠的蛋白,对细胞产生毒害作用,引起内质网胁迫(杨正婷等,2016)。真核细胞已进化出一套复杂的应激反应系统-未折叠蛋白质应答(unfolded protein response, UPR)来应对非正确折叠或未折叠的蛋白质在内质网内的堆积,减少胁迫对组织和机体产生伤害(曹剑等,2008),热激蛋白如 BiP 在激活非折叠蛋白质识别信号转导途径这一过程中发挥着关键作用(Shen *et al.*, 2002)。Pathway 分析中,内质网蛋白加工通路参与的差异蛋白最多。热激活性蛋白 A2XE6(含小休克蛋白功能域结合蛋白)与 A2WLG6(含小休克蛋白功能域结合蛋白)、未折叠

蛋白结合活性蛋白 A2XPL8(含 HATPase_c 功能域结合蛋白)和具有锌结合活性功能的蛋白 B8BK10 等 4 个下调蛋白富集于此通路参与甲基汞胁迫过程。未折叠蛋白结合活性蛋白(A2XPL8)和热激蛋白(A2XE6, A2WLG6)显著下调参与内质网蛋白加工,可能是水稻在甲基汞胁迫过程中存在细胞内质网胁迫且超过其自身应答能力,抑制了应答蛋白的表达。

线粒体是真核细胞重要的细胞器,是细胞内进行呼吸作用的主要场所,可以通过氧化磷酸化途径产生 ATP。线粒体中参与氧化磷酸化的主要是呼吸链,也称电子传递链,是线粒体不可缺少的组成部分,由 5 种蛋白复合物构成,分别为复合体 I 泛醌氧化还原酶(NADH: ubiquinone oxidoreductase)、复合物 II 琥珀酸泛醌氧化还原酶(SDH: ubiquinone oxidoreductase)、复合物 III 细胞色素 C 氧化还原酶(Cyt: cytochrome C-oxidoreductase)、复合物 IV 细胞色素氧化酶(Cox: cytochrome oxidase)和 ATP 合成酶(邱念伟等,2013)。植物线粒体是植物体内对外界环境改变最敏感的细胞器之一,外界环境的胁迫会使线粒体蛋白复合体功能发生改变。在正常呼吸条件下,线粒体中会产生活性氧(ROS),在各种生物和非生物逆境下 ROS 产生得更多,植物中约 90% 的内源性 ROS 来源于线粒体的氧化呼吸作用(马晓蕾等,2013)。各种外界环境胁迫下,线粒体中 ROS 会不断积累,使其功能紊乱并产生氧化应激(曾德永等,2018),植物中的超氧阴离子自由基 O_2^- 常在线粒体呼吸电子传递链的 NAD(P)H 脱氢酶(复合体 I)以及细胞色素 bc1 复合体(复合体 III)这 2 个部位出现(朱素琴等,2012)。本次实验中,氧化磷酸化代谢通路有 2 个上调蛋白(A2X5T8、A2YP57)和 1 个下调蛋白(A2X1P8)参与。在此通路中,蛋白 A2X5T8 作为亚基 Ndufa6 上调表达参与复合体 I: NADH-Q 还原酶复合体,同时蛋白 A2YP57 作为亚基 QCR6 上调表达参与复合体 III: 细胞色素还原酶复合体;而 A2X1P8 下调表达参与 ATP 合成酶复合体,3 个蛋白参与此途径的不同复合体反应响应甲基汞胁迫。差异蛋白 A2X5T8、A2YP57 上调表达参与氧化磷酸化通路的复合体 I 和复合体 III 反应过程,表明水稻在甲基汞胁迫下体内积累 ROS,会通过增加线粒体内参与抗氧化途径相关蛋白的表达以适应胁迫伤害,抗氧化相关蛋白的表达变化情况与早前无机汞胁迫研究结果相似(Chen *et al.*, 2012)。

差异蛋白构建蛋白网络互作分析发现,蛋白A2X1P8(含HATPase-C功能域结合蛋白)与多种差异蛋白相互作用,且参与植物病理相关代谢途径,表明这个蛋白积极响应甲基汞胁迫,可进一步验证及分析其在通路中的具体功能。本实验结果发现,大量未知显著差异蛋白参与一些重要生物学功能过程与途径响应甲基汞胁迫过程,暗示了水稻响应甲基汞胁迫过程中分子机理的复杂性,可能存在其他与胁迫直接相关的因子通过重要途径参与响应过程,有待进行后续鉴定和验证研究。

4 结论

本实验利用iTRAQ技术研究了水稻甲基汞胁迫后根尖响应差异蛋白,对照组和处理组共定量3508个蛋白质,在差异倍数(fold change) ≥ 1.20 或 ≤ 0.83 ,且 $P < 0.05$ 条件下,筛选出88个差异蛋白,其中32个蛋白表达上调,56个蛋白表达下调。发现包括类萌发素蛋白、脂氧合酶和过氧化物酶等15个显著差异蛋白与金属离子结合相关,提示这些差异蛋白参与了水稻甲基汞胁迫的响应。生物信息学分析发现,差异蛋白主要参与细胞部分、代谢过程以及催化活性等生物学过程,参与的代谢通路有内质网蛋白加工、蔗糖与淀粉代谢、氧化磷酸化与乙醛酸和二羧酸酯代谢等,暗示这些代谢通路在水稻响应甲基汞胁迫的过程中发挥着重要作用。本研究从蛋白组水平初步筛选了水稻响应甲基汞胁迫相关代谢通路和响应蛋白,为水稻响应甲基汞胁迫提供了基础数据,丰富了水稻重金属汞蛋白组学研究,对以后调控水稻根系甲基汞吸收具有重要意义。

参考文献

- 曹 剑, 宋保亮. 2008. 未折叠蛋白质应答. 生命的化学, **28**(6): 673-676. [Cao J, Song B. 2008. Advance in study of unfolded protein response. *Chemistry of Life*, **28**(6): 673-676.]
- 冯 耿. 2017. 水稻条纹病毒胁迫下抗感品种的差异蛋白质组研究(硕士学位论文). 北京: 中国农业科学院. [Feng G. 2017. Differential Proteome between Resistant and Susceptible Varieties to Rice Stripe Tenuvirus (Master's thesis). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences.]
- 李红丽, 刘迪秋, 何 华, 等. 2013. 类萌发素蛋白在植物防卫反应中的作用. 植物生理学报, **49**(4): 331-336. [Li H, Liu D, He H, et al. 2013. The role of Germin-like protein in plant defense responses. *Plant Physiology Journal*, **49**(4): 331-336.]
- 刘 慧, 马 文, 戴九兰. 2015. 水稻汞污染研究进展. 山东建筑大学学报, **30**(2): 170-176. [Liu H, Ma W, Dai J. 2015. Research progress of mercury pollution on rice. *Journal of Shandong Jianzhu University*, **30**(2): 170-176.]
- 罗光宇, 肖敏敏, 刘爱玲, 等. 2018. 蛋白质组学在水稻作物非生物胁迫研究中的应用. 分子植物育种, **6**(2): 423-426. [Luo G, Xiao M, Liu A, et al. 2018. Application of proteomics in the study of abiotic stress in rice. *Molecular Plant Breeding*, **6**(2): 423-426.]
- 马晓蕾, 周丽娟, 孙孟超, 等. 2013. 线粒体复合体及其对活性氧的调控研究进展. 安徽农业科学, **41**(19): 8095-8096. [Ma X, Zhou L, Sun M, et al. 2013. Research advance on plant mitochondria complexes and its regulation on active oxygen species. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, **41**(19): 8095-8096.]
- 邱念伟, 王 颖, 王兴安. 2011. 呼吸作用电子传递过程中的物质与能量转变. 生物学通报, **46**(12): 9-13. [Qiu N, Wang Y, Wang X. 2011. Material and energy transformation during respiration electron transfer. *Bulletin of Biology*, **46**(12): 9-13.]
- 汪宝卿, 解备涛, 张海燕, 等. 2017. 基于iTRAQ技术的不同耐旱性甘薯苗期根系差异蛋白分析. 核农学报, **31**(10): 1904-1912. [Wang B, Xie B, Zhang H, et al. 2017. Analysis of differential proteome in roots during seedling stage of sweet potato with different drought tolerance based on iTRAQ method. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, **31**(10): 1904-1912.]
- 汪少芸, 叶秀云, 饶平凡. 2006. 绿豆中苹果酸脱氢酶的性质及生物进化的研究. 中国食品学报, **6**(1): 262-266. [Wang S, Ye X, Rao P. 2006. The research on further property and phylogenetic relationship of malate dehydrogenase from mung bean. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, **6**(1): 262-266.]
- 汪新颖, 王 波, 侯松涛, 等. 2009. 苹果酸脱氢酶的结构及功能. 生物学杂志, **26**(4): 69-72. [Wang X, Wang B, Hou S, et al. 2009. Structure and function of malate dehydrogenases. *Journal of Biology*, **26**(4): 69-72.]
- 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. [Wang F. 2010. Comparative Proteomic Study and Functional Analysis of Tolerance-related Genes from Rice Roots during Hg²⁺ Stress (PhD thesis). Hangzhou: Zhejiang University.]
- 杨正婷, 刘建祥. 2016. 植物内质网胁迫应答研究进展. 生物技术通报, **32**(10): 84-96. [Yang Z, Liu J. 2016. Endoplasmic reticulum stress response in plants. *Biotechnology Bulletin*, **32**(10): 84-96.]
- 曾德永, 崔 杰, 张 萌, 等. 2018. 植物线粒体抗氧化应激效应影响的研究进展. 江苏农业科学, **46**(21): 31-37. [Zeng D, Cui J, Zhang M, et al. 2018. Research progress on the effects of plant mitochondrial antioxidative stress. *Jiangsu Agricultural Sciences*, **46**(21): 31-37.]
- 朱素琴, 何玲艳, 张千千, 等. 2012. 植物细胞内 ROS 的种类及其产生部位. 安徽农业科学, **40**(34): 16536-16540. [Zhu S, He L, Zhang Q, et al. 2012. Reactive

- oxygen species and generation sites in plant cell. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, **40**(34): 16536–16540.]
- Ahsan N, Lee DG, Alam I, *et al.* 2010. Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, **8**: 3561–3576.
- Chen TT, Zhang L, Shang HH, *et al.* 2016. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of cotton roots and leaves reveals pathways associated with salt stress. *PLoS ONE*, **11**: e0148487.
- Chen YA, Chi WC, Huang TL, *et al.* 2012. Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, **55**: 23–32.
- Feng XB, Li P, Qiu GL, *et al.* 2008. Human exposure to methylmercury through rice intake in mercury mining areas, Guizhou Province, China. *Environmental Science and Technology*, **42**: 326–332.
- Fukuda T, Saito A, Wasaki J, *et al.* 2007. Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Science*, **172**: 1157–1165.
- Lan P, Li W, Wen TN, *et al.* 2011. iTRAQ protein profile analysis of *Arabidopsis* roots reveals new aspects critical for iron homeostasis. *Plant Physiology*, **155**: 821–834.
- Lee K, Bae DW, Kim SH, *et al.* 2010. Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 161–168.
- 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.
- Shen J, Chen X, Hendershot L, *et al.* 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Developmental Cell*, **3**: 89–111.
- Strickman RJ, Mitchell CPJ. 2016. Accumulation and translocation of methylmercury and inorganic mercury in *Oryza sativa*: An enriched isotope tracer study. *Science of the Total Environment*, **574**: 1415–1423.
- Unwin RD, Griffiths JR, Whetton AD. 2010. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS. *Nature Protocol*, **5**: 1574–1582.
- van de Mortel JE, Schat H, Moerland PD, *et al.* 2008. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment*, **31**: 301–324.
-
- 作者简介** 龙水庭,女,1992年生,硕士研究生,研究方向为生物地球化学与人群健康暴露评估。E-mail: 1078799343@qq.com
- 责任编辑** 魏中青
-