

江 凯, 罗海波, 姜 丽, 等. 基于 iTRAQ 技术的采后乙烯利和 1-甲基环丙烯处理对茭白线粒体蛋白质表达谱的影响[J]. 江苏农业学报, 2019, 35( 1 ): 173-181.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.025

## 基于 iTRAQ 技术的采后乙烯利和 1-甲基环丙烯处理对茭白线粒体蛋白质表达谱的影响

江 凯<sup>1</sup>, 罗海波<sup>2</sup>, 姜 丽<sup>3</sup>, 周 涛<sup>2</sup>, 陶明煊<sup>2</sup>, 王韦华<sup>3</sup>, 郁志芳<sup>3</sup>

(1. 浙江医药高等专科学校食品学院, 浙江 宁波 315100; 2. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097; 3. 南京农业大学食品科学技术学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 利用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)标记结合二维液相色谱-串联质谱(2D-LC-MS/MS)技术, 探索乙烯利(ETH)和 1-甲基环丙烯(1-MCP)处理对茭白采后贮藏期间线粒体蛋白质表达谱的影响。共鉴定到 1 908 个特征肽段 $\geq 2$ 的可信蛋白质, 与贮藏 0 d 相比, 对照、ETH 和 1-MCP 处理的茭白贮藏 3 d 和 6 d 共有 315 个蛋白质具有 2.0 倍以上显著差异( $P < 0.05$ )。基因本体(GO)分子功能分析和 KEGG 通路分析结果显示, 茭白采后贮藏 3 d, 代谢途径、次生代谢产物生物合成、氨基酸生物合成、抗菌物质生物合成、碳代谢、光合作用中的碳固定、2-酮酸代谢、精氨酸生物合成、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、二羧酸代谢相关蛋白质显著富集; 贮藏 6 d, 光合作用中的碳固定、 $\alpha$ -亚麻酸代谢和二羧酸代谢途径减弱, 丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解和磷酸戊糖途径相关蛋白质显著富集。ETH 处理后贮藏 3 d, 氧化磷酸化以及甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢相关蛋白质显著富集; 贮藏 6 d, 丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、磷酸戊糖途径以及苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物合成代谢途径相关蛋白质显著富集。1-MCP 处理后贮藏 3 d, 三羧酸循环、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解途径相关蛋白质显著富集; 贮藏 6 d, 磷酸戊糖途径、C5 支链二元酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢途径相关蛋白质显著富集。以上结果表明, 代谢途径、次生代谢产物生物合成、氨基酸生物合成、抗菌物质生物合成、碳代谢、光合作用中的碳固定、2-酮酸代谢、精氨酸生物合成、 $\alpha$ -亚麻酸代谢和二羧酸代谢途径等可能与茭白采后衰老有关, 三羧酸循环、氧化磷酸化、磷酸戊糖途径、C5 支链酸代谢及相关氨基酸代谢途径可能在茭白采后衰老中发挥重要作用。

**关键词:** 茭白; 线粒体; 同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ); 生物信息学; 衰老

**中图分类号:** S645.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0173-09

## Effect of postharvest ethylene and 1-methylcyclopropene treatments on protein profile in *Zizania latifolia* mitochondria based on iTRAQ labeling technique

JIANG Kai<sup>1</sup>, LUO Hai-bo<sup>2</sup>, JIANG Li<sup>3</sup>, ZHOU Tao<sup>2</sup>, TAO Ming-xuan<sup>2</sup>, WANG Wei-hua<sup>3</sup>, YU Zhi-fang<sup>3</sup>

(1. Faculty of Food Science, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. Jinling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 3. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

收稿日期: 2018-06-05

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31401612)

作者简介: 江 凯(1985-), 男, 湖北红安人, 硕士, 讲师, 主要从事食品质量与安全研究。(E-mail) konanke2016@126.com

通讯作者: 罗海波, (E-mail) luohaibo\_1216@126.com

**Abstract:** Using isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling combined with 2D-LC-MS/MS techniques, the effects of ethylene (ETH) and 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatments on protein profile in *Zizania latifolia* mitochondria were explored. The

results showed that a total of 1 908 proteins with two or more peptides were identified. Compared with the *Z. latifolia* stored for 0 d, there were 315 proteins in the *Z. latifolia* stored for 3 d and 6 d under control, ETH and 1-MCP treatments showed significant ( $P < 0.05$ ) change in relative quantitation based on two-fold difference. The gene ontology (GO) and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis results of these differentially expressed proteins showed that the proteins associated with metabolic pathways, biosynthesis of secondary metabolites, biosynthesis of amino acids, biosynthesis of antibiotics, carbon metabolism, carbon fixation in photosynthesis, 2-keto acid metabolism, arginine biosynthesis, alpha-linolenic acid metabolism and dicarboxylate metabolism in postharvest *Z. latifolia* mitochondria were significantly enriched during storage at 25 °C for three days. After six days of storage, carbon fixation in photosynthesis, alpha-linolenic acid metabolism and dicarboxylate metabolism pathways were weakened, while the proteins associated with valine-leucine-isoleucine degradation, alanine-aspartate-glutamate metabolism and pentose phosphate pathway (PPP) were significantly enriched. ETH treatment significantly enriched the proteins associated with the oxidative phosphorylation (OXPHOS), glycine-serine-threonine metabolism, alanine-aspartate-glutamate metabolism, PPP and phenylalanine-tyrosine-tryptophan biosynthesis pathways after three and six days of storage. MCP treatment significantly enriched proteins associated with the tricarboxylic acid (TCA) cycle, alanine-aspartate-glutamate metabolism, valine-leucine-isoleucine degradation, PPP, C5-branched dibasic acid metabolism pathways after three and six days of storage. These results indicated that the metabolic pathways, biosynthesis of secondary metabolites, biosynthesis of amino acids, biosynthesis of antibiotics, carbon metabolism, carbon fixation in photosynthesis, 2-keto acid metabolism, arginine biosynthesis, alpha-linolenic acid metabolism and dicarboxylate metabolism were related to postharvest senescence of *Z. latifolia*, TCA, OXPHOS, PPP, C5-branched dibasic acid metabolism pathways and amino acids metabolism may be play critical roles in postharvest senescence of *Z. latifolia*.

**Key words:** *Zizania latifolia*; mitochondria; isobaric tags for relative and absolute quantification(iTRAQ); bioinformatics; senescence

衰老是茭白采后品质快速劣变和商品价值下降的重要因素,不仅会加速营养成分消耗损失,还会导致茭白因抗病能力下降而霉变甚至腐烂,从而直接影响茭白贮藏寿命和菜农经济利益<sup>[1]</sup>。茭白采后衰老与活性氧代谢、细胞结构降解、呼吸代谢及其伴随的能量代谢等生理过程密切相关,但采后衰老的分子机制尚不明确<sup>[2]</sup>。蛋白质是基因表达的产物,是生命活动的具体执行者以及生物细胞各种代谢和调控途径的靶分子,也是联系基因和生命活动的重要桥梁<sup>[3]</sup>。应用蛋白质组学技术研究茭白采后衰老过程中蛋白质表达谱的变化规律,有助于对茭白采后衰老及其调控的分子机制进行深层次的诠释。

线粒体是存在于绝大多数真核生物细胞内的一种重要细胞器,是细胞进行呼吸氧化、三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化的场所,也是能量产生的场所,在细胞生长发育、信号转导和细胞程序性死亡的过程中,线粒体也发挥了重要作用<sup>[4]</sup>。对茭白采后线粒体蛋白质差异表达谱进行研究,能够更加深入地准确地探明呼吸代谢及其伴随的能量代谢和活性氧代谢在茭白采后衰老中的作用机制。

近年来,利用蛋白质组学技术研究植物线粒体蛋白质表达差异,揭示采后衰老机制的研究逐渐增

多。Millar 等<sup>[5]</sup>对拟南芥培养细胞的线粒体蛋白质进行双向电泳分析,显示出大约 100 个高丰度线粒体蛋白质和 250 个低丰度线粒体蛋白质,对其中 170 个蛋白质进行质谱分析,81 个蛋白质得到成功鉴定,生物信息学分析结果显示,这些蛋白质在呼吸电子传递链、三羧酸循环、氨基酸代谢、蛋白质运输、膜转运、抗氧化防御、加工、组装和转录中发挥作用。Millar 等<sup>[6]</sup>研究了水稻幼苗在 6 d 缺氧后 1 d 有氧适应期和 7 d 有氧条件下线粒体蛋白质的表达差异,发现缺氧条件下呼吸氧化相关酶活性显著升高,但细胞色素 c 氧化酶丰度显著低于对照。Qin 等<sup>[7-8]</sup>研究苹果和桃果实衰老过程中的线粒体蛋白质,发现碳水化合物代谢、三羧酸循环、电子传递链及抗胁迫相关蛋白质存在表达差异,尤其在高氧胁迫下,锰超氧化物歧化酶表达量显著上调。Wu 等<sup>[9]</sup>研究了桃果实采后成熟衰老期间的线粒体蛋白质,发现能量代谢、氧化胁迫与桃果实采后成熟衰老密切相关,其中活性氧(ROS)积累是导致桃果实采后衰老的重要原因。此外,应用线粒体蛋白质组学技术揭示植物细胞质雄性不育机理方面也已有相关报道<sup>[10]</sup>。然而,关于茭白采后衰老期间线粒体蛋白质的研究较少。

同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术是一种体外标记技术,采用4种或8种同位素标签,可与氨基(包括氨基酸N端和赖氨酸侧链氨基)反应,实现连接,再通过质谱分析可同时对最多8种不同样品中的蛋白质进行定性和定量分析,与传统双向电泳(2D-PAGE)和荧光差异双向电泳(2D-DIGE)技术相比,具有通量高、重复性好、定量准确、分辨率高、数据丰富和自动化程度高等优势,目前已广泛应用于水稻<sup>[11]</sup>、大豆芽<sup>[12]</sup>、土豆<sup>[13]</sup>、冬虫夏草<sup>[14]</sup>、黄瓜<sup>[15]</sup>、西红柿<sup>[16]</sup>等植物材料的蛋白质组学研究中。

本试验拟采用 iTRAQ 标记结合二维液相色谱-串联质谱(2D-LC-MS/MS)技术,对茭白采后常温贮藏期间以及乙烯利(ETH)、1-甲基环丙烯(1-MCP)处理后线粒体蛋白质的表达谱进行比较,筛选差异表达蛋白质并进行生物信息学分析,探索茭白采后衰老的生物学基础,以期茭白贮藏保鲜新技术的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验材料 试验所用茭白为6月下旬成熟的安徽大别山露天茭白,采收后立即运回实验室,充分散去田间热后,挑选肉质茎长短和粗细均一的茭白,自来水清洗,立即浸泡在1 000  $\mu\text{L/L}$  乙烯利(ETH)溶液中30 min后密封19.5 h,或在10  $\mu\text{L/L}$  1-甲基环丙烯(1-MCP)环境中密封20.0 h,对照直接密封20.0 h,室温下晾干,每个样品质量均为3 kg,用高密度聚乙烯塑料袋敞口包装,每组3袋,置于25  $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏0 d、3 d和6 d,取样进行相关指标测定,同时提取线粒体,分离纯化后置于-70  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。不同样品分别编号为CK0d:茭白贮藏0 d;CK3d:茭白贮藏3 d;CK6d:茭白贮藏6 d;ETH3d:乙烯利处理后茭白贮藏3 d;ETH6d:乙烯利处理后茭白贮藏6 d;1-MCP3d:1-MCP处理后茭白贮藏3 d;1-MCP6d:1-MCP处理后茭白贮藏6 d。

1.1.2 试剂 乙烯利、1-甲基环丙烯、蔗糖、甘露醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇四乙酸、L-半胱氨酸、牛血清白蛋白、低密度梯度分离液(Percoll)、Tris-HCl(pH 6.8、pH 8.5、pH 8.8)、溴酚蓝、Bradford蛋白质浓度测定试剂盒等均购自寿德试验器材有限公司,尿素、硫脲、二硫苏糖醇、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐、碘乙酰胺、IPG buffer、甲酸和甲酸

铵均购自 General electric (GE)公司,十二烷基磺酸钠、三羧基氨基甲烷、甘氨酸、三氯乙酸、过硫酸铵、碳酸钠、*N,N,N',N'*-四甲基二乙胺购自 Amresco 公司,TEAB(Triethylammonium bicarbonate buffer)、蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司,胰蛋白酶(Trypsin Gold)购自 Promega 公司,乙腈、色谱水等购自 Thermo fish 公司,iTRAQ 8 plex 试剂盒购自 Applied biosystems 公司。

1.1.3 主要仪器设备 本试验所用仪器设备包括:智能生化培养箱(宁波江南仪器厂产品)、超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司产品)、微量高速冷冻离心机(Thermo 电子公司产品)、Beckman 高速冷冻离心机(Beckman 公司产品)、高速冷冻离心机(南京驰远生物科技有限公司产品)、Eppendorf 冷冻离心机(Eppendorf 公司产品)、ImageScanner 扫描仪(GE healthcare 公司产品)、真空冷冻干燥机(Thermo savant 公司产品)、超声波细胞粉碎机(上海生析超声仪器有限公司产品)、分析型液相色谱 Agilent 1200(Agilent 公司产品)、Eksigent nanoLC-Ultra<sup>TM</sup> 2D 系统(AB sciex 公司产品)、Triple TOF 5600 系统(AB sciex 公司产品)和 Protein Pilot 5.0 软件(AB sciex 公司产品)。

### 1.2 方法

1.2.1 线粒体提取与纯化 参照杜传来等<sup>[17]</sup>的方法提取纯化茭白线粒体。称取300 g 茭白样品,加入600 ml 提取液[50.00 mmol/L pH7.5 Tris-HCl,内含0.25 mol/L 蔗糖、0.30 mol/L 甘露醇、1.00 mmol/L 乙二醇四乙酸(EDTA)、0.1%牛血清白蛋白(BSA)、0.5% 聚乙烯比咯烷酮-40(PVP-40)、0.1% 半胱氨酸或10.00 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇],于4  $^{\circ}\text{C}$ 下匀浆,然后用4层纱布过滤,滤液在4  $^{\circ}\text{C}$ 下3 000 g 离心15 min,取上清液在4  $^{\circ}\text{C}$ 下16 000 g 离心15 min,将沉淀用60 ml 洗涤液(10.00 mmol/L、pH7.2 Tris-HCl,内含0.25 mol/L 蔗糖、0.30 mol/L 甘露醇、1.00 mmol/L EDTA、0.1% BSA)洗涤,4  $^{\circ}\text{C}$ 下13 000 g 离心15 min,得到的沉淀即为粗线粒体。将沉淀用悬浮液(10.00 mmol/L、pH7.2 Tris-HCl,内含0.25 mol/L 蔗糖、0.30 mol/L 甘露醇、1.00 mmol/L EDTA)悬浮,然后将粗体线粒体悬浮液小心铺在21% Percoll:27% Percoll:45% Percoll[pH7.2,含有10.00 mmol/L Tris、0.30 mol/L 蔗糖和1.00 mmol/L 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸]不连续



密度梯度离心介质上,4℃下40 000 g 离心 45 min (离心机加速、降速时要慢且平稳),取介于 27%和 45%层之间的溶液用 10 ml 悬浮液洗涤,于 4℃下 13 000 g 离心 15 min,保留沉淀于-70℃的冰箱中备用。

**1.2.2 茭白线粒体蛋白质 iTRAQ 分析** 茭白线粒体蛋白质 iTRAQ 分析由鹿明生物科技有限公司负责。参照 Isaacson 等<sup>[18]</sup>的方法提取蛋白质,采用 Smith 等<sup>[19]</sup>的方法测定蛋白质含量,参照 Wisniewski 等<sup>[20]</sup>的基于超滤辅助样品制备方法进行蛋白质还原烷基化及酶解。将 50 μl 样品(100 μg 酶解产物)转移到新的离心管中,加入 iTRAQ 试剂后室温反应 2 h,加入 100 μl 水终止反应,混合所有标记样品,涡旋振荡,离心至管底,真空冷冻干燥样品。样品用 100 μl 裂解液(内含 25 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和 25%乙醇,pH 2.7)溶解,采用强阳离子交换分离和反向色谱分析进行质谱鉴定。

**1.2.3 蛋白质定性和定量分析** 质谱分析原始数据为.wiff 文件,采用专用的 Proteinpilot 软件进行分析。数据处理采用含 Paragon 算法的 Protein Pilot Software v.5.0 软件进行,检索的数据库为水稻数据库,数据库来源于 Uniprot。采用特征肽段≥2 为可信蛋白质的评判鉴定标准。

**1.2.4 差异表达蛋白质筛选** 差异蛋白质的筛选标准为:与茭白贮藏 0 d(CK0d)相比,组间蛋白质变化倍数大于 2.0 且  $P < 0.05$ 。同一蛋白质在任意比较组中均为差异蛋白质的被列出。

**1.2.5 生物信息学分析** 通过 DAVID 生物信息数据库对筛选的差异表达蛋白质进行基因本体(GO)分类注释,采用京都基因与基因组百科全书 KEGG 数据库进行 Pathway 通路富集分析。

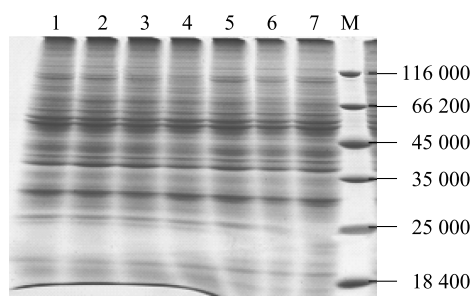
## 2 结果与分析

### 2.1 茭白线粒体蛋白质样品的 SDS-PAGE 分析

为检测提取的线粒体蛋白质样品是否降解,对所有茭白线粒体蛋白质样品进行 SDS-PAGE 双向电泳分析,10 μg 上样量,12.00%分离胶,0.12%考马斯亮蓝 G-250 染色。图 1 显示,所有茭白线粒体蛋白质样品 SDS-PAGE 图谱条带清晰完整,没有降解现象,可以进行后续试验。

### 2.2 茭白线粒体蛋白质的质谱鉴定

利用 iTRAQ 技术对茭白线粒体蛋白质进行相对



1:茭白贮藏 0 d 蛋白质;2:茭白贮藏 3 d 蛋白质;3:乙烯利处理后茭白贮藏 3 d 蛋白质;4:1-甲基环丙烯(1-MCP)处理后茭白贮藏 3 d 蛋白质;5:茭白贮藏 6 d 蛋白质;6:乙烯利处理后茭白贮藏 6 d 蛋白质;7:1-MCP 处理后茭白贮藏 6 d 蛋白质;Mr:标准蛋白质。

图 1 茭白线粒体蛋白质样品 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE analysis of protein samples from *Zizania latifolia* mitochondria

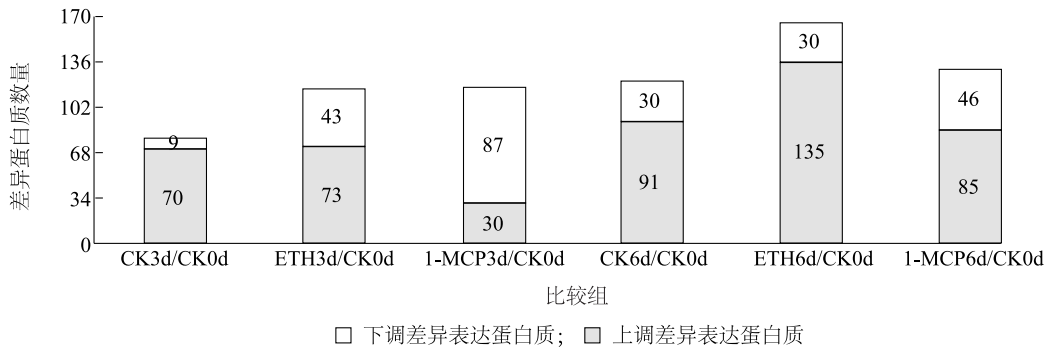
定量分析,采用肽段得分值>1.30 为评判标准,质谱匹配到的谱图数量为 56 980,谱图利用率 20.1%,匹配到特征肽段的谱图数量 19 540,去除冗余肽段前蛋白质总数为 5 072,鉴定到的蛋白质总数为 2 529。可信蛋白质筛选一般可以根据错误匹配率、肽段得分值和特征肽段来进行,本试验以特征肽段≥2 为筛选标准,得到可信蛋白质数目为 1 908 个。

### 2.3 ETH 和 1-MCP 对茭白贮藏期间线粒体蛋白质表达谱的影响

以组间蛋白质变化倍数大于 2.0 且差异显著( $P < 0.05$ )为差异蛋白质筛选标准,以茭白贮藏 0 d(CK0d)为相对定量参考进行比对。结果(图 2)显示,CK3d/CK0d、ETH3d/CK0d、1-MCP3d/CK0d、CK6d/CK0d、ETH6d/CK0d、1-MCP6d/CK0d 分别发现有 79、116、117、121、165、131 个蛋白质具有统计学的显著差异,其中上调蛋白质分别为 70、73、30、91、135 和 85 个,下调蛋白质分别为 9、43、87、30、30 和 46 个,去除 6 个比较组重复统计的蛋白质,共有 315 个蛋白质具有 2.0 倍以上统计学显著差异( $P < 0.05$ )。茭白贮藏期间,随贮藏时间的延长差异表达蛋白质数量总体呈上升趋势,ETH 和 1-MCP 处理均提高了差异表达蛋白质数量,说明 ETH 和 1-MCP 处理诱导了相关功能性蛋白质的差异表达。ETH 处理后在贮藏 3 d 和 6 d 时上调差异表达蛋白质数量分别为 73 和 135,高于对照茭白贮藏 3 d 和 6 d 的 70 和 91,而 1-MCP 处理后上调差异表达蛋白质

数量在贮藏第 3 d 和第 6 d 时分别为 30 和 85,均低于贮藏相同时间对照的上调差异表达蛋白质数量。同时,ETH 处理后下调差异表达蛋白质数量在贮藏 3 d 时显著增多,在贮藏 6 d 时与对照贮藏 6 d 无显

著差异,1-MCP 处理后下调差异表达蛋白质数量在贮藏第 3 d 和 6 d 均显著高于对照。ETH 和 1-MCP 诱导了茭白贮藏期间差异表达蛋白质数量变化,这可能是其调控茭白采后衰老的重要原因。



CK0d:茭白贮藏 0 d;CK3d:茭白贮藏 3 d;CK6d:茭白贮藏 6 d;ETH3d:乙烯利处理后茭白贮藏 3 d;ETH6d:乙烯利处理后茭白贮藏 6 d;1-MCP3d:1-MCP 处理后茭白贮藏 3 d;1-MCP6d:1-MCP 处理后茭白贮藏 6 d。

图 2 ETH 和 1-MCP 处理对茭白贮藏期间线粒体蛋白质表达谱的影响

Fig.2 Effects of ethylene (ETH) and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on mitochondrial protein profile in *Z. latifolia* during storage at 25 °C

对不同处理间差异表达蛋白质进行比对分析,发现随着茭白贮藏时间的延长,相同差异表达蛋白质数量逐渐增多(表 1)。贮藏 3 d 时,ETH3d/CK0d 处理与 CK3d/CK0d 相同差异表达蛋白质数量为 58,不同差异表达蛋白质数量为 79,这些蛋白质可能参与茭白的采后衰老过程。1-MCP3d/CK0d 处理与 CK3d/CK0d 相同的差异表达蛋白质仅为 27 个,且抑制了其中 21 个上调表达蛋白的上调趋势和 6 个下调表达蛋白的下调趋势,不同差异表达蛋白质 142 个,上述 169 个差异表达蛋白质可能参与1-MCP 延缓茭白采后衰老的调控过程。贮藏 6 d 与贮藏 3

d 相比,ETH6d/CK0d 与 ETH3d/CK0d 比较组相同和不同差异表达蛋白质数量分别为 67 和 148,高于对照茭白比较组(CK6d/CK0d 与 CK3d/CK0d)的 64 和 72。1-MCP6d/CK0d 与 1-MCP3d/CK0d 比较组相同和不同差异蛋白质数量分别为 30 和 162。贮藏 6 d 时,ETH6d/CK0d 与 CK6d/CK0d 相同和不同差异蛋白质数量分别为 103 和 79,高于1-MCP6d/CK0d 与 CK6d/CK0d 组的 88 和 75。ETH6d/CK0d 与 1-MCP6d/CK0d 的相同和不同差异表达蛋白质数量分别为 104 和 80。

表 1 不同处理间差异表达蛋白质统计

Table 1 Statistics of differentially expressed proteins in different treatments

比较组	不同差异表达蛋白质数量	相同差异表达蛋白质数量	相同上调差异表达蛋白质数量	相同下调差异表达蛋白质数量
ETH3d/CK0d 与 CK3d/CK0d	79	58	52	6
1-MCP3d/CK0d 与 CK3d/CK0d	142	27	21	6
1-MCP3d/CK0d 与 ETH3d/CK0d	170	49	28	21
CK6d/CK0d 与 CK3d/CK0d	72	64	59	5
ETH6d/CK0d 与 ETH3d/CK0d	148	67	61	6
1-MCP6d/CK0d 与 1-MCP3d/CK0d	162	30	24	6
ETH6d/CK0d 与 CK6d/CK0d	79	103	81	22
1-MCP6d/CK0d 与 CK6d/CK0d	75	88	65	23
1-MCP6d/CK0d 与 ETH6d/CK0d	80	104	83	21

各处理见图 2 注。

## 2.4 差异表达蛋白质生物信息学分析

2.4.1 常规生物信息学分析 对 ETH 和 1-MCP 处理后差异表达蛋白质参与的 GO [生物学过程 (BP)、细胞定位(CC)、分子功能(MF)] 和 KEGG 通路进行统计,结果(表 2)显示,CK3d/CK0d 总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP、CC、MF 和 KEGG 通路功能条目数分别为 1 163、142、269、65,其中显著富集 ( $P<0.05$ ) 的条目数分别为 377、67、136、25。ETH3d/CK0d 总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP、CC、MF 和 KEGG 通路功能条目数分别为 1 252、171、328、76,其中显著富集 ( $P<0.05$ ) 的条目数分别为 444、104、148、20。1-MCP3d/CK0d 总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP、CC、MF 和 KEGG 通路功能条目数分别为 1 086、128、325、73,其中显著富集 ( $P<0.05$ ) 的条目数分别为 363、61、165、32。CK6d/CK0d 总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP、CC、MF 和 KEGG 通路功能条目数分别为 1 274、167、346、

75,其中显著富集 ( $P<0.05$ ) 的条目数分别为 537、76、164、24。ETH6d/CK0d 总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP、CC、MF 和 KEGG 通路功能条目数分别为 1 458、164、442、76,其中显著富集 ( $P<0.05$ ) 的条目数分别为 692、80、234、30。1-MCP6d/CK0d 总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP、CC、MF 和 KEGG 通路功能条目数分别为 1 361、189、357、64,其中显著富集 ( $P<0.05$ ) 的条目数分别为 549、116、180、19。

与 CK3d/CK0d 相比,ETH3d/CK0d 和 ETH6d/CK0d 的总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP、CC、MF 和 KEGG 通路功能条目数均增多,1-MCP3d/CK0d 的总差异表达蛋白质参与涉及到的 BP 和 CC 功能条目数均减少,而参与涉及到的 MF 和 KEGG 通路功能条目数增多,ETH6d/CK0d 和 1-MCP6d/CK0d 的总差异表达蛋白质参与涉及到 BP、CC 和 MF 的功能条目数增多。

表 2 差异表达蛋白质生物信息学分析

Table 2 Bioinformatics analysis of differentially expressed proteins

比较组	生物学过程		细胞定位		分子功能		KEGG 通路	
	总条目数	显著富集条目数	总条目数	显著富集条目数	总条目数	显著富集条目数	总条目数	显著富集条目数
CK3d/CK0d	1 163	377	142	67	269	136	65	25
ETH3d/CK0d	1 252	444	171	104	328	148	76	20
1-MCP3d/CK0d	1 086	363	128	61	325	165	73	32
CK6d/CK0d	1 274	537	167	76	346	164	75	24
ETH6d/CK0d	1 458	692	164	80	442	234	76	30
1-MCP6d/CK0d	1 361	549	189	116	357	180	64	19

各处理见图 2 注。

2.4.2 GO 分析 将筛选到的差异表达蛋白质进行 GO 分类注释,茭白采后贮藏 3 d 差异表达蛋白质涉及的前 10 类生物学过程为:单有机物生物合成、单有机物生物代谢、氨基酸生物合成、小分子代谢、 $\alpha$ -氨基酸生物合成、含氧酸代谢、有机酸代谢、氨基酸代谢、 $\alpha$ -氨基酸代谢、有机化合物代谢。贮藏 6 d 时含氧酸代谢过程和有机酸代谢过程减弱,含碱基小分子代谢过程和羧酸代谢过程相关蛋白质显著富集。

ETH 处理后贮藏 3 d,含碱基小分子代谢过程、核苷酸代谢过程、磷酸核苷酸代谢过程、磷酸核糖代谢过程、核糖核苷酸代谢过程、小分子代谢过程和有机磷代谢过程相关蛋白质显著富集。贮藏 6 d 时,蛋白质折叠、分子伴侣介导的蛋白质折叠辅因子和羧酸代谢过程相关蛋白质显著富集。

1-MCP 处理后贮藏 3 d,乙醛酸循环体组织过程、有机磷代谢过程、羧酸代谢过程、单有机物生物降解过程、镉离子响应过程、核糖核苷酸代谢过程、金属离子响应过程相关蛋白质显著富集。贮藏 6 d 时,核苷酸代谢过程、磷酸核苷酸代谢过程、含碱基小分子代谢过程、磷酸核糖代谢过程、核糖核苷酸代谢过程、有机氮类化合物生物合成过程、嘌呤核苷酸代谢过程相关蛋白质显著富集。

茭白采后贮藏 3 d,差异表达蛋白质主要涉及叶绿体、质体、细胞器部分、细胞质部分和乙醛酸循环体。贮藏 6 d 时,乙醛酸循环体蛋白质减少,细胞质蛋白质显著增多。说明,核糖体仅存在于细胞质中,是真核细胞合成蛋白质的细胞器和蛋白质合成的场所,茭白采后常温贮藏期间糖类的合成减弱,而蛋白



质合成增强。

ETH 处理后贮藏 3 d, 线粒体蛋白质增多, 贮藏 6 d 细胞质蛋白质增多。1-MCP 处理后贮藏 3 d, 线粒体、细胞质、线粒体基质、细胞内细胞器、细胞内膜结合细胞器和膜结合细胞器的蛋白质显著增多, 贮藏 6 d 的变化与对照基本一致。

茭白采后贮藏 3 d, 差异表达蛋白质涉及的前 10 类分子功能为: 氢酶活性、辅助结合因子、催化活性、磷酸吡哆醛结合蛋白质、分子内氧化还原酶活性、酶活性、铜离子结合蛋白质、转移酶活性(转移含氮基团)、转移酶活性和 *N*-乙酰- $\gamma$ -谷氨酰磷酸还原酶活性。贮藏 6 d, 参与 *L*-2-酮戊二酸转氨酶活性和氧化还原酶活性的相关功能蛋白质增多。

ETH 处理后贮藏 3 d, 质子转运 ATP 合酶活性(旋转机制)、ATP 酶活性和氢离子跨膜转运的相关功能蛋白质增多。贮藏 6 d, 阴离子结合、氧化还原酶活性、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)结合、氧化还原酶活性(作用于 CH-OH 基团)、辅酶结合和离子结合的相关功能蛋白质显著增多。

1-MCP 处理后贮藏 3 d, 4-氨基丁酸转氨酶活性、钴离子结合、过渡金属离子结合、转氨酶活性、*L*-2-酮戊二酸转氨酶活性、氧化还原酶活性和阴离子结合相关功能蛋白质显著增多。贮藏 6 d, 碳氧酶活性、碳碳裂解酶活性、3-异丙基苹果酸脱水酶活性和辅酶结合相关蛋白质显著增多。

茭白采后贮藏期间涉及多种细胞定位和功能性蛋白质, 参与多类生物学过程, 但主要集中在氨基酸、有机酸和小分子等合成与代谢方面, ETH 和 1-MCP 处理抑制了部分生物学过程, 同时诱导了其他生物学过程, 如核酸代谢、蛋白质合成、有机酸代谢和金属离子响应等, 这些代谢过程可能与茭白采后衰老有密切联系。

**2.4.3 KEGG 通路分析** 将筛选到的差异表达蛋白质进行 KEGG 通路分析, 结果(表 3)显示, 与贮藏 0 d(CK0d)相比, CK3d 的茭白代谢途径、次生代谢产物生物合成、氨基酸生物合成、抗菌物质生物合成、碳代谢、光合作用中的碳固定、2-酮酸代谢、精氨酸生物合成、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、二羧酸代谢的相关蛋白质显著富集, CK6d 的茭白光合作用中的碳固定、 $\alpha$ -亚麻酸代谢和二羧酸代谢途径减弱, 丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解和磷酸戊糖途径的相关蛋白质显著富集。

ETH 和 1-MCP 处理对茭白采后贮藏期间 KEGG 通路有明显的影响。与 CK3d 相比, ETH3d 的  $\alpha$ -亚麻酸代谢和二羧酸代谢途径减弱, 氧化磷酸化以及甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢相关蛋白质显著富集, ETH6d 光合作用中的碳固定、 $\alpha$ -亚麻酸代谢和二羧酸代谢途径减弱, 丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、磷酸戊糖途径以及苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物合成代谢途径相关蛋白质显著富集。与 CK3d 相比, 1-MCP3d 光合作用中的碳固定、精氨酸生物合成和  $\alpha$ -亚麻酸代谢途径减弱, 三羧酸循环、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解途径相关蛋白质显著富集, 1-MCP6d 光合作用中的碳固定、精氨酸生物合成、 $\alpha$ -亚麻酸代谢和二羧酸代谢途径减弱, 磷酸戊糖途径、C5 支链二元酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢途径相关蛋白质显著富集。ETH 和 1-MCP 处理诱导了茭白采后贮藏期间 KEGG 通路的改变, 这些通路可能与 ETH 和 1-MCP 调控茭白采后衰老有密切联系。

### 3 讨论

iTRAQ 技术是一种新型定量蛋白质组学分析技术, 目前已成功应用于动物、植物和微生物等多种生物样品的比较蛋白质组学研究中<sup>[21-22]</sup>。本研究共鉴定出 1 908 个可信蛋白质, 数量远高于 Wu 等<sup>[9]</sup>采用传统双向电泳技术分析桃果实线粒体得到的蛋白质数量(约 350 个), 为茭白采后衰老生物学基础研究提供有益参考。

果蔬采后衰老是由多种因素引发和诱导的一系列生物学过程协同作用共同完成的结果。ETH 和 1-MCP 可有效调控果蔬采后衰老, 其作用的发挥需要通过调控蛋白质来完成。呼吸代谢、糖代谢、能量代谢、活性氧代谢、激素代谢等生物学过程与果蔬采后衰老密切相关, 糖酵解减弱而磷酸戊糖途径增强是植物组织衰老过程中的一种普遍现象<sup>[23-24]</sup>。本试验中, CK3d 和 CK6d 共有 13 条途径相关蛋白质显著富集, 表明这些生物学过程可能与茭白采后衰老相关。ETH6d 的苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物合成途径相关蛋白质显著富集, 该途径是木质素和酚类次生代谢产物合成的关键步骤, 其显著富集结果与前人研究结果<sup>[25-26]</sup>一致。1-MCP3d 的三羧酸循环、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解途径相关蛋白质显著增多, 1-MCP6d

的磷酸戊糖途径和 C5 支链二元酸代谢途径相关蛋白质显著富集,表明 1-MCP 处理延缓衰老可能与调控三羧酸循环、磷酸戊糖途径和相关氨基酸降解途

径有关,与应用传统双向电泳技术研究完整和鲜切茭白常温贮藏期间的比较蛋白质组学的结果<sup>[1]</sup>一致。

表 3 差异表达蛋白质显著富集的 KEGG 通路

Table 3 The significantly enriched KEGG pathway of differentially expressed proteins

KEGG 通路	与 CK0d 相比差异表达蛋白质显著富集的排名					
	CK3d	ETH3d	1-MCP3d	CK6d	ETH6d	1-MCP6d
代谢途径	1	1	1	3	2	3
次生代谢产物生物合成	2	3	5	2	3	2
氨基酸生物合成	3	2	9	1	1	1
抗菌物质生物合成	4	4	3	4	4	4
碳代谢	5	7	2	6	6	9
光合作用中的碳固定	6	10	—	—	—	—
2-酮酸代谢	7	8	10	5	5	5
精氨酸生物合成	8	9	—	7	7	—
$\alpha$ -亚麻酸代谢	9	—	—	—	—	—
二羧酸代谢	10	—	6	—	—	—
氧化磷酸化	—	5	—	—	—	—
甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢	—	6	—	—	—	—
三羧酸循环	—	—	4	—	—	—
丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢	—	—	7	9	8	10
缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸降解	—	—	8	8	—	6
磷酸戊糖途径	—	—	—	10	9	7
苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物合成	—	—	—	—	10	—
C5 支链二元酸代谢	—	—	—	—	—	8

—表示相关差异表达蛋白质显著富集的排名不属于 1~10 名。各处理见图 2 注。

生物信息学分析结果表明,代谢途径、次生代谢产物生物合成、氨基酸生物合成、抗菌物质生物合成、碳代谢、光合作用中的碳固定、2-酮酸代谢、精氨酸生物合成、 $\alpha$ -亚麻酸代谢和二羧酸代谢途径可能与茭白采后衰老有关。ETH 和 1-MCP 处理对这些通路有明显的调控作用,三羧酸循环、氧化磷酸化、磷酸戊糖途径、C5 支链酸代谢及相关氨基酸代谢途径可能在茭白采后衰老中发挥重要作用。然而,以上生物学过程与茭白采后衰老的确切关系仍未明确,相关差异表达蛋白质的生物学功能及其相互作用还有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 王伟华,姜 丽,陈 伟,等.完整和鲜切茭白常温贮藏期间的比较蛋白质组学研究[J].食品科学,2018, 39(13):7-16.

- [2] 王伟华,姜 丽,王利斌,等.采后 1-MCP 和乙烯利处理对茭白呼吸代谢及细胞结构的影响[J].现代食品科技,2017(12):129-136.
- [3] LIU R, WANG Y, QIN G, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals the role of the tonoplast in fruit senescence [J]. Journal of Proteomics, 2016, 146: 80-89.
- [4] PASSOS J F, VON ZGLINICKI T. Mitochondria, telomeres and cell senescence [J]. Experimental Gerontology, 2005, 40(6): 466-472.
- [5] MILLAR A H, SWEETLOVE L J, GIEGÉ P, et al. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome [J]. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1711-1727.
- [6] MILLAR A H, TREND A E, HEAZLEWOOD J L. Changes in the mitochondrial proteome during the anoxia to air transition in rice focus around cytochrome-containing respiratory complexes [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(38): 39471-39478.
- [7] QIN G, WANG Q, LIU J, et al. Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during fruit senescence [J]. Pro-



- teomics, 2009, 9(17): 4241-4253.
- [8] QIN G, MENG X, WANG Q, et al. Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis[J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8(5): 2449-2462.
- [9] WU X, JIANG L, YU M, et al. Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during peach fruit ripening and senescence[J]. Journal of Proteomics, 2016, 147: 197-211.
- [10] 陈 鹏,周瑞阳,蒋利和. 线粒体蛋白质组学技术及其在植物细胞质雄性不育机理研究中的应用[J]. 南方农业学报, 2011, 42(4):353-357.
- [11] MA J, SHENG H, LI X, et al. iTRAQ-based proteomic analysis reveals the mechanisms of silicon-mediated cadmium tolerance in rice (*Oryza sativa*) cells[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 104: 71-80.
- [12] JIN X, YANG R, GUO L, et al. iTRAQ analysis of low-phytate mung bean sprouts treated with sodium citrate, sodium acetate and sodium tartrate[J]. Food Chemistry, 2017, 218:285-293.
- [13] LIU B, ZHANG N, ZHAO S, et al. Proteomic changes during tuber dormancy release process revealed by iTRAQ quantitative proteomics in potato[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 86: 181-190.
- [14] YANG L T, QI Y P, LU Y B, et al. iTRAQ protein profile analysis of *Citrus sinensis* roots in response to long-term boron-deficiency [J]. Journal of Proteomics, 2013, 93: 179-206.
- [15] FAN H, XU Y, DU C, et al. Phloem sap proteome studied by iTRAQ provides integrated insight into salinity response mechanisms in cucumber plants[J]. Journal of Proteomics, 2015, 125: 54-67.
- [16] GONG B, ZHANG C, LI X, et al. Identification of NaCl and  $\text{NaHCO}_3$  stress responsive proteins in tomato roots using iTRAQ-based analysis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 446:417-422.
- [17] 杜传来,罗海波,彭 昕,等. 茭白线粒体蛋白双向电泳体系建立[J]. 南方农业学报, 2016, 47(3):332-336.
- [18] ISAACSON T, DAMASCENO C M B, SARAVANAN R S, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues[J]. Nature Protocols, 2006, 1(2):769.
- [19] SMITH P K, KROHN R I, HERMANSON G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid[J]. Analytical Biochemistry, 1985, 150 (1):76-85.
- [20] WISNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nature Methods, 2009, 6: 359-362.
- [21] 陈凌华,程祖铤,许 明,等. iTRAQ 技术及其在水稻蛋白质组学中的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(12): 14-23.
- [22] 雷欢欢,徐祥彬.基于 iTRAQ 技术研究非呼吸跃变型果实草莓生长发育的调控机制[D].杭州:杭州师范大学,2017.
- [23] LIU C, LIU B, ZHANG E L, et al. Elevated pentose phosphate pathway is involved in the recovery of hypoxia induced erythrocytosis[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(6):9441-9448.
- [24] 田世平,罗云波,王贵禧.园艺产品采后生物学基础[M].北京:科学出版社,2011:12.
- [25] LUO H, JIANG L, ZHANG L, et al. Quality changes of whole and fresh-cut *Zizania latifolia* during refrigerated (1 °C) storage [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(4):1411-1415.
- [26] 罗海波,陈 伟,王晓晴,等.酚类物质代谢与鲜切茭白褐变和木质化的关系研究[J].食品科技,2015, 40(6):51-55.

(责任编辑:王 妮)