

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 基于Nano LC-MS/MS的水稻多肽组学研究

孙婷婷, 张乐乐, 王倩, 李纯, 程备久, 张欣\*

安徽农业大学生命科学学院, 合肥230036

**摘要:** 植物活性多肽在植物的生长发育及抗病抗虫过程中发挥了重要的作用, 然而目前对于植物多肽组的系统性研究尚不多见。本研究采用尿素法提取水稻中的多肽组, 通过一系列的提取和纯化过程获得多肽, 再利用Nano LC-MS/MS对这些多肽进行结构测定, 得到的质谱数据利用Maxquant软件进行解析, 通过NCBI和UniProtKB数据库进行搜索比对。我们在水稻叶片和根部共鉴别出约110个多肽, 通过对多肽的分析发现, 这些多肽多分布在生命活动活跃的地方, 表明这些多肽参与了水稻重要的生理活动。

**关键词:** 植物多肽; 多肽组; 提取; 质谱

## Rice Peptidomics Based on Nano LC-MS/MS Analysis

SUN Ting-Ting, ZHANG Le-Le, WANG Qian, LI Chun, CHENG Bei-Jiu, ZHANG Xin\*

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

**Abstract:** Bioactive plant peptides play important roles in plant growth, development and insect resistance. However, the systematic research on the plant peptidomics is still rare. In the present study, the exploration of extracting and detection of natural plant peptides in rice were performed. The plant peptides were extracted by urea and detected using Nano LC-MS/MS instrument. The data were analyzed by Maxquant, NCBI and UniProtKB. About 110 peptides were identified in rice leaves and roots, and they distributed in many active sites in cells. The results indicated that these peptides might be involved in important physiological activities of rice.

**Key words:** plant peptides; peptidomics; extract; mass spectrum

随着拟南芥和水稻等植物基因组测序的完成, 科学家们加快了针对植物蛋白质中天然活性多肽的研究步伐。活性多肽根据来源和功能大致可分为两类: 一类是由较大的蛋白质前体经特定肽酶作用产生的肽(Fricke等2006), 通过细胞间的信号传导, 调控生物生长, 产生毒素抗病、抗虫和抗病原体; 另一类是在蛋白周转过程中由蛋白酶水解产生的降解肽, 主要参与氮的代谢(Schaller 2004)。植物活性多肽指的是在植物中具有特定生理功能的肽类的总称, 是源于蛋白质的多功能化合物(Siow和Gan 2013)。

植物活性多肽最初是以信号分子(多肽激素)的形式被发现(Farrokh等2008), 如植物硫肽激素(Matsubayashi等1997)、CLV和CLE (Fiers等2005; 2007)等。近十几年陆续有一些与抗性相关的生物活性肽在植物体内被发现, 如系统素(Pearce等2001, 2007)、hevein (Benko-Iseppon等2010)、AMPs (Farrokhi等2008)、 $\alpha$ -和 $\beta$ -thionin (Oard和Enright

2006)、 $\gamma$ -thionin (Garcia-Olmedo等1999; Pelegrini和Franco 2005)等, 并且这些多肽的生物功能还在进一步被开发和利用。例如, 植物体内有抗菌功能的多肽 $\gamma$ -thionin可以用于新型生物农药的研制(Thomma等2002, 2003); lunasin被发现还具有预防癌症的功能(Galvez等2001; Jeong等2003; Ortiz-Martinez等2014)。其他如人参所含的“谷胱甘肽”类似物、天花粉多肽、松花粉多肽、杏仁多肽和大豆多肽等均有一定药理作用(徐铮奎2008)。

发展针对植物多肽高通量的检测技术已开始引起关注(Farrokh等2008)。作为蛋白质组学的分支, 多肽组学近十年取得了较快的发展。蛋白质组学依赖的技术手段主要有2D胶和质谱(Lau等2004; Wang等2012; Komatsu等2013; Liu等2014)。然而

收稿 2015-01-03 修定 2015-05-28

资助 安徽省生物学重点学科经费(2014JXJS002)

\* 通讯作者(E-mail: xinzhang@ahau.edu.cn; Tel: 0551-65786021)。

由于2D胶的分辨率限制,无法分辨出一些小蛋白或多肽,因此,近年来用于研究分子量 $\leq 10$  kDa多肽信息的多肽组学成为蛋白质组学有力的补充。

理想的多肽提取方法应具备以下几个特征:(1)过程简单,如果提取的时间过长,蛋白或多肽的降解将会增多;(2)尽可能包含所有的天然多肽,而不是提取过程中产生的蛋白碎片;(3)提取的多肽质量好,纯度高,后期分析干扰小;(4)与LC-MS兼容,不能引入SDS及其他去垢剂。

在本研究中,我们参考植物蛋白质组的提取方法(Natarajan等2005; Ge等2012)以及动物多肽组的纯化过程(Zhang等2008, 2010; Li等2012; Ma等2014),尤其是考虑到植物材料的特殊性,对水稻叶片和根部的多肽的提取方法进行探索,利用高分辨级质谱质联用仪,对所提取的多肽进行Nano LC-MS/MS分析,利用NCBI数据库和UniProtKB数据库进行搜索比对,并手动验证质谱分析结果。本研究将为系统研究植物多肽组的生物学信息和多肽新功能的发现提供新的思路。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

水稻(*Oryza sativa* L.) ‘中花11’种子用清水冲洗后,点播于铺有2层纱布的培养皿中,每皿15株,共6盘。浸入适量的水后于28 °C培养室内发芽,白天光照14 h,光源为10 W白炽灯,其间及时补充清水。18 d后,水稻苗长至三叶期,测量株高、根长并称量植株总重量后,迅速剪下叶片和根部,冷冻于-80 °C冰箱中备用。按上述方法平行实验3次,取平均值进行分析。实验进行3次生物学重复。

### 2 试剂

尿素和盐酸均从国药化学试剂公司购买,乙腈(色谱纯)和甲酸(色谱纯)购于Sigma公司。

### 3 多肽的提取方法和质谱分析

#### 3.1 叶片多肽样品的制备

本实验中水稻苗正常生长18 d时,叶长、根长和株重等生物量之间平均水平无显著差异,将采集的植物叶片每两皿作为一组,分3组进行多肽的提取。液氮研磨叶片至粉末后,转移至2 mL离心管中,加入1 mL 8 mol·L<sup>-1</sup>尿素,在4 °C下震荡30 min。高速冷冻离心去除杂质(4 °C, 12 000×g, 20 min)。

取上清,加0.1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸调节pH至2~3。混匀后冰上放置15 min,离心去除沉淀(4 °C, 12 000×g, 30 min)。上清液通过Microcon<sup>®</sup> YM-10超滤管(Millipore, USA)除去分子量大于10 kDa的大分子蛋白,然后进行色谱前的除盐步骤。除盐用的是商品化的Pierce<sup>®</sup> C-18 spin column (Thermo Scientific, USA),步骤按照说明书进行,具体为:首先用200 L 50%乙腈活化柱子,然后用200 μL 5%乙腈冲洗柱子,上样后,再用200 μL 5%乙腈除杂,最后用20 μL 80%乙腈将多肽洗涤下来并收集,抽真空干燥。进行质谱分析前,样品用0.1%甲酸复溶,离心(4 °C, 12 000×g, 2 min),取上清液进行Nano LC-MS/MS分析。

将相应两皿水稻植株的根部作为一组,分3组进行根部多肽的提取,提取步骤和提取叶片中多肽的步骤相同。

#### 3.2 Nano LC-MS/MS分析

10 μL多肽样品于液相色谱UltiMate 3000 RSLC Nano System (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)进行60 min的梯度洗脱,流速设为0.3 μL·min<sup>-1</sup>,分析柱是国产石英毛细管柱(内径75 μm,长150 mm),填充物为C<sub>18</sub>树脂。然后样品直接进入Thermo Q Exactive质谱仪进行分析,仪器已安装了Xcalibur软件。质谱在数据依赖模式下工作。

#### 4 数据库的搜索及蛋白质的识别和验证

多肽(蛋白质)在离子源中进行电离,电离后的分子因接受了过多的能量会进一步碎裂成较小质量的多种碎片离子和中性粒子,它们在加速电场作用下获取具有相同能量的平均动能而进行质量分析器,再按质荷比依次进入离子检测器,绘制成质谱图。将从质谱获得的数据通过分析软件与蛋白质库数据进行比对,获得原始样品中肽段和蛋白质的序列信息(辛普森2006)。实验中,我们将得到的原始质谱数据提交到Maxquant (版本1.5.0.11)进行解析,使用NCBI数据库和UniProtKB数据库分别进行搜索,选择无酶水解项,最多2个错误切口,一级质谱的前体质量允许误差为蛋白质分子量的千分之五,二级质谱碎片质量容差设为0.02 Da;乙酰化值、氧化值和脱酰胺基值设置为动态修饰。使用PSORT WWW Server (<http://psort.hgc.jp/>)对多肽进行进一步分析。

数据库搜索是对提交到蛋白质数据库中的MS/MS数据进行肽序列匹配打分, 由于质谱数据中存在大量的噪声、不规则离子谱峰缺失或重叠, 因此还需要进行人工检查, 对数据进行噪声滤波, 提取特征数据。我们首先舍弃软件分析中得分低的多肽序列, 再根据Maxquant中多肽的保留时间, 检查原始质谱数据中肽的一级和二级质谱峰, 若丰度过低, 也要去除该序列。将3次得到的数据进行整理, 出现2次及以上的多肽片段留下, 仅得到1次的多肽片段要做进一步验证, 例如检查序列离子的完整性。

## 实验结果

### 1 水稻多肽样品的分析与结构测定

在对水稻叶片和根部的多肽进行提取纯化后, 用Nano LC-MS/MS对所提取的多肽进行分离检测, 得到多肽的总质谱图。在一级质谱中我们可以查看某条多肽的电荷和分子量, 该多肽的序列分析则通过二级质谱的解析得到。质谱图中横坐标表示蛋白质量与电荷的比值( $m/z$ ), 纵坐标表示蛋白的丰度, 若纵坐标过小, 即丰度不够, 表示此多肽得到的序列可信度低, 应舍弃, 或提高样品浓度再次验证。

使用2个数据库(NCBI和UniProtKB)同时对检测结果进行搜索分析。由于所有这些蛋白质和多肽的信息是在数据库里进行同源比对获得的, 因此还需要进行人工检查。在质子化肽段的碰撞诱导解离过程中, 多肽片段的酰胺键断裂产生互补的b型和y型的离子, 分别代表从肽的氨基端(N端)和羧基端(C端)获得的片段。利用质谱对多肽成功地进行测序, 依赖于由每个肽键随机断裂所形成的序列离子的系列完整性。图1显示了人工手动检查质谱峰的一个例子, 显示了较为完整的b/y序列离子, 可以验证为一条水稻latex-abundant蛋白的单肽链。表1列出了部分水稻叶片和根部的多肽信息。

综合3组实验数据, 将叶片的多肽与根部的多肽进行比较。去除3组平行实验中不能重复出现的多肽, 叶片中共鉴定出62个多肽, 根中共鉴定出57个多肽, 其中在叶和根中都存在的有9个, 有53个多肽是叶中特有的, 48个多肽是根中特有的(图2)。

### 2 多肽信息搜索分类

我们将获得的多肽信息进行搜索并整理分类。从图3可知, 叶片中的多肽除了分布在细胞质和细胞核以外, 还有将近40%的多肽分布在线粒体、叶绿体及内质网膜等重要的生命活动发生的地方, 其中11.39%的多肽分布在线粒体基质中,

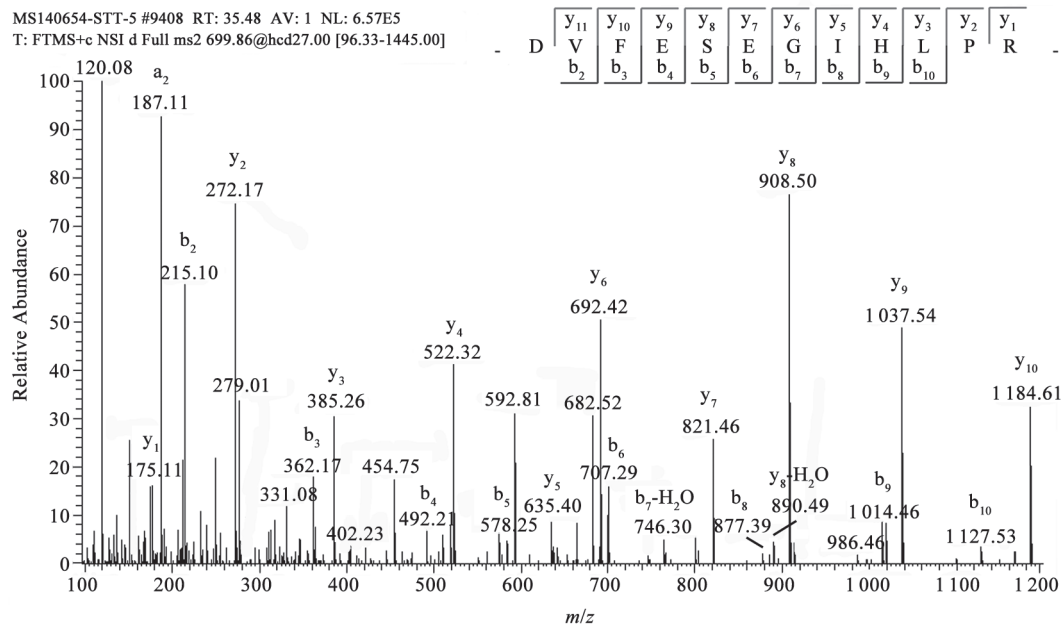


图1 手动验证水稻latex-abundant蛋白质谱峰图例

Fig.1 Manual verification of rice latex-abundant protein peak legend

表1 部分水稻叶片和根部的多肽信息

Table 1 Information of partially identified peptides in rice leaves and roots

多肽序列	质量/Da	电荷数	得分	对应基因号	蛋白质功能
FEFEPVDKLDLS	1 324.619	2	88.28	Os11g0532750	核酮糖二磷酸羧化酶
ASSQANLDKMQLR	1 460.741	2	102.90	Os03g0123600	PLAC8家族
AGIGPIRQDWEPVVVR	1 790.979	2	89.23	Os08g0366100	类Helix-turn-helix XRE-家族蛋白
DVFESEGIHLPR	1 397.694	3	182.71	Os01g0799900	类富含胶乳蛋白
YGSPIRVNDGVTVAR	1 602.848	3	139.34	Os06g0114000	类60 kDa的分子伴侣
AAAAYYGAGGAMKGGK	1 378.703	2	85.84	Os10g0170200	40S核糖体蛋白S20
ADLNVPLDDNQITDDTRVR	2 283.109	3	95.50	Os06g0668200	磷酸甘油酸激酶
AEQTEKAFLK	1 163.619	2	128.01	Os04g0613500	40S核糖体蛋白S11
ALVLHAGSGNKNAFK	1 525.837	2	91.31	Os02g0220500	延伸因子1- $\gamma$
GF EK TILK	934.549	2	155.42	Os02g0760300	类亲免素
SIGKNVSPIEVK	1 269.729	3	139.86	Os08g0560900	类光系统I反应中心亚基II
SLASAVPLAVDGESTSK	1 630.841	2	81.16	Os06g0194900	蔗糖合成酶2
TMASTVPLAVEGEPNSK	1 729.856	2	101.05	Os03g0401300	蔗糖合成酶2
YAWVLDKLLK	1 134.644	2	89.08	Os03g0177400	EF-1 $\alpha$
ALSVEKTSSGR	1 133.604	2	111.52	Os10g0559600	Agenet结构域蛋白
ATQTRPLVSVK	1 198.703	2	141.37	Os07g0180900	核糖体蛋白L4/L1e家族蛋白
GEAAGDRVLSR	1 129.584	2	85.52	Os03g0401300	蔗糖合成酶2
MDAAGAGAGGKLLK	1 145.586	2	99.26	Os01g0502700	类组蛋白H2A
MEAEAAAKRAR	1 202.619	3	91.55	Os07g0408700	类亚精胺合成酶2
MQIFVK	764.426	2	97.64	Os05g0242133	泛素结构域蛋白
NTVDGAKRGIVQ	1 256.684	2	93.84	Os05g0150800	类质体5,10-亚甲基四氢叶酸脱氢酶
PSTLAKTAIR	1 056.629	2	91.87	Os01g0694100	类白叶枯病抗性蛋白
MEGKEEDVR	1 091.492	2	88.06	Os04g0559700	类血浆膜蛋白
SLIAGEDFQHILR	1 497.794	2	120.59	Os03g0794700	类40S核糖体蛋白S18
SAFVGKYADELIKTAK	1 739.946	3	143.67	Os06g0608700	类果糖二磷酸醛缩酶细胞质同工酶

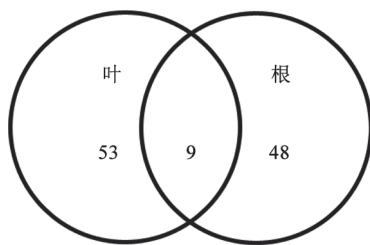


图2 多肽在水稻叶片与根部的分布情况  
Fig.2 The distribution of plant peptides  
in rice leaves and roots

6.33%的多肽在细胞质膜上, 5.06%的多肽在内质网膜上, 3.80%的多肽在过氧化物酶体上, 其他的多肽则多分布在叶绿体类囊体和叶绿体基质中。

## 讨 论

多肽组学研究的关键是多肽的提取和结构分析。目前, 应用于动物细胞及动物组织中多肽和多肽组的提取方法逐步成熟, 然而针对植物多肽

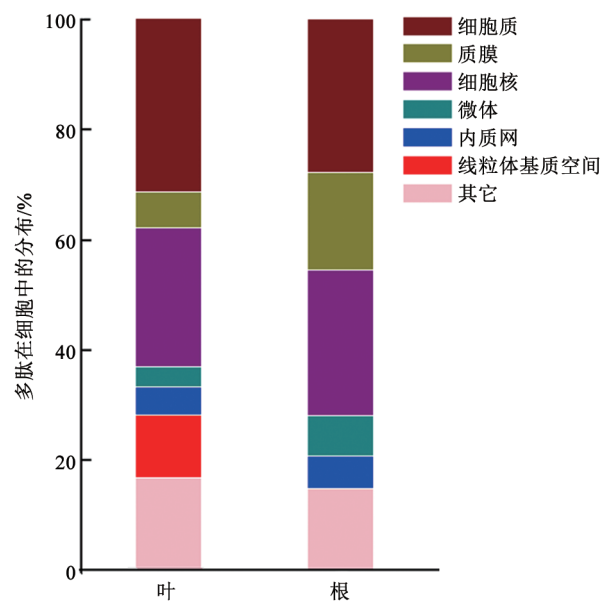


图3 水稻多肽的亚细胞分布  
Fig.3 Subcellular distribution of plant peptides  
in rice leaves and roots

组的研究目前尚不多见,其主要原因是对于植物多肽的提取方法尚无十分明确的方案。与动物细胞不同,植物细胞含有细胞壁,因此破壁方法和后处理过程中的技术控制就显得非常重要。另外,天然植物多肽丰度非常低,植物中含有的大量叶绿素、天然产物、植物蛋白等均可成为干扰因素,给多肽的获得和数据分析造成一定的困难(Baracat-Pereira等2012)。

水稻苗在三叶期生长旺盛,细胞急剧分裂,此时DNA进行大量复制、转录,生命活动所需的蛋白质也在此时期大量合成,因此我们选取该时期的植株进行多肽组研究。我们曾采用苯酚法进行植物多肽的提取,但未获得有效的数据,因此本实验采用尿素法提取水稻叶片和根部的多肽,样品采集和提取过程始终在低温下进行,以避免蛋白质和多肽的降解。我们使用的提取试剂中不包含在蛋白质组提取中常用到的SDS、Trixton等去垢剂。去垢剂虽然可以很快地破裂细胞,使提取蛋白质的效率更高,但它的致命缺点是与色谱不相容,而本实验中对多肽的分离检测必须采用高分辨的色质联用仪,因此不能使用去垢剂。过程中采用的无机盐提取剂可以在除盐步骤中被除去,得到的多肽相对纯净。

本实验利用高分辨率的QE orbitrap质谱检测到了一系列低丰度的小分子蛋白质和多肽。通过对质谱数据的整理分析,我们发现此方法提取效果良好,共得到110个多肽,其中叶片中有62个多肽,根部有57个多肽。通过对这些多肽进行定位我们发现,它们遍布于细胞的叶绿体类囊体、叶绿体基质、内质网膜、过氧化物酶体、线粒体基质、线粒体内膜、细胞质和细胞核中。根部多肽的分布与叶片的分布大致相同,但根中没有出现线粒体基质空间的多肽,而细胞质膜上的多肽占17.65%,远比叶片中的比例大,这可能是由于根在土壤中吸收各种无机离子,离子进入细胞的方式是主动运输,需要不同的蛋白质作为载体,因此根部细胞质膜上的多肽要比叶片中的多。

在对这些多肽的蛋白质前体功能进行搜索后发现,它们主要参与蛋白质代谢、糖代谢和脂类代谢等。例如,多肽片段ALVLHAGSGNKNAFK、YAWVLDKLK、YGSPRIVNDGVTVAR等参与蛋

白质合成过程,分别具有翻译延伸因子活性、GTP酶活性、肽基-脯氨酰顺反异构酶活性以及ATP结合蛋白等功能(Rice Annotation Project 2007);还有一些多肽片段参与糖酵解过程,如ADLNVPLDD-NQNITDDTRVR、AVTADVKLEGLR、SAFVGK-YADELIK TAK等,他们是糖代谢过程中相关酶的一部分;多肽片段AIKFEFEPVDKLD S是核酮糖二磷酸羧酶的一部分,它与Mg<sup>2+</sup>结合,在碳固定中发挥功能(Yu等2003)。另外,有些多肽是未定义过的多肽,例如ADEIQHLTR是未定义的多肽序列,但Paterson等人鉴定出此多肽前体在细胞中与金属离子结合,负责金属离子转运,它与Ca<sup>2+</sup>结合,一起应对渗透胁迫(Paterson等2009; Chen等2013)。此外,还有一些多肽在数据库中没有功能注释,但我们不能因为无注释而忽视这些多肽序列,相反,这些多肽可能具有的重要作用,亟待进行功能验证,这也是我们下一步的工作。

总之,建立合理、高效、简单易行的提取植物天然多肽的方法值得不懈地探索。本实验所提取的多肽在水稻植株的生长发育中参与重要的生命活动。进一步深入研究多肽在植物不同器官、不同生长时期、不同生长状态的含量变化,将使我们能够更加深入地了解多肽在调节植物生长发育中的重要作用,并极有可能发现一些新型多肽或拓展多肽未知的功能。

### 参考文献

- 徐铮奎(2008). 多肽类药物研究开发新进展. 中国制药信息, 24 (6): 1~3
- 理查德·辛普森著(2006). 何大澄译. 蛋白质与蛋白质组学实验指南. 北京: 化学工业出版社
- Baracat-Pereira MC, Barbosa MO, Magalhaes MJ, Carrijo LC, Games PD, Almeida HO, Netto JFS, Pereira MR, de Barros EG (2012). Separomics applied to the proteomics and peptidomics of low-abundance proteins: choice of methods and challenges - A review. Genet Mol Biol, 35: 283~291
- Benko-Iseppon AM, Galdino SL, Calsa T Jr, Kido EA, Tossi A, Belarmino LC, Crovella S (2010). Overview on plant antimicrobial peptides. Curr Protein Pept Sci, 11: 181~188
- Chen JF, Huang QF, Gao DY, Wang J, Lang Y, Liu T, Li B, Bai Z, Goicoechea JL, Liang C et al (2013). Whole-genome sequencing of *Oryza brachyantha* reveals mechanisms underlying *Oryza* genome evolution. Nat Commun, 4: 1~9
- Farrokhi N, Whitelegge JP, Brusslan JA (2008). Plant peptides and peptidomics. Plant Biotechnol J, 6: 105~134
- Fiers M, Golemic E, Xu J, van de Geest L, Heidstra R, Stiekema W,

- Liu CM (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a *CLAVATA2*-dependent pathway. *Plant Cell*, 17: 2542~2553
- Fiers M, Ku KL, Liu CM (2007). CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 39~43
- Fricker LD, Lim J, Pan H, Chen FY (2006). Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrom Rev*, 25: 327~344
- Galvez AF, Chen N, Macasieb J, de Lumen BO (2001). Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Res*, 61: 7473~7478
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P (1999). Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47: 479~491
- Ge P, Ma C, Wang S, Gao L, Li X, Guo G, Ma W, Yan Y (2012). Comparative proteomic analysis of grain development in two spring wheat varieties under drought stress. *Anal Bioanal Chem*, 402: 1297~1313
- Jeong HJ, Park JH, Lam Y, de Lumen BO (2003). Characterization of lunasin isolated from soybean. *J Agric Food Chem*, 51: 7901~7906
- Komatsu S, Han C, Nanjo Y, Altaf-Un-Nahar M, Wang K, He DL, Yang PF (2013). Label-free quantitative proteomic analysis of abscisic acid effect in early-stage soybean under flooding. *J Proteome Res*, 12: 4769~4784
- Lau ATY, He Q, Chiu JF (2004). A proteome analysis of the arsenite response in cultured lung cells: evidence for *in vitro* oxidative stress-induced apoptosis. *Biochem J*, 382: 641~650
- Li Z, Adams RM, Chourey K, Hurst GB, Hettich RL, Pan CL (2012). Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J Proteome Res*, 11: 1582~1590
- Liu XF, Hu YW, Pai PJ, Chen DJ, Lam H (2014). Label-free quantitative proteomics analysis of antibiotic response in *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Proteome Res*, 13: 1223~1233
- Ma J, Ward CC, Jungreis I, Slavoff SA, Schwaid AG, Neveu J, Budnik BA, Kellis M, Saghatelian A (2014). Discovery of human sORF-encoded polypeptides (SEPs) in cell lines and tissue. *J Proteome Res*, 13: 1757~1765
- Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y (1997). Phytosulfokine  $\alpha$ , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13357~13362
- Natarajan S, Xu CP, Caperna TJ, Garrett WA (2005). Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal Biochem*, 342: 214~220
- Oard SV, Enright FM (2006). Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep*, 25: 561~572
- Ortiz-Martinez M, Winkler R, Garcia-Lara S (2014). Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *J Proteomics*, 111: 165~183
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A et al (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457: 551~556
- Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA (2001). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*, 411: 817~820
- Pearce G, Siems WF, Bhattacharya R, Chen YC, Ryan C (2007). Three hydroxyproline-rich glycopeptides derived from a single petunia polyprotein precursor activate *defensin 1*, a pathogen defense response gene. *J Biol Chem*, 282: 17777~17784
- Pelegri PB, Franco OL (2005). Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 2239~2253
- Rice Annotation Project (2007). Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res*, 17: 175~183
- Schaller A (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183~197
- Siow HL, Gan CY (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chem*, 141: 3435~3442
- Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K (2002). Plant defensins. *Planta*, 216: 193~202
- Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K (2003). Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr Drug Targ*, 3: 1~8
- Wang X, Bian YY, Cheng K, Zou HF, Sun SSM, He JX (2012). A comprehensive differential proteomic study of nitrate deprivation in *Arabidopsis* reveals complex regulatory networks of plant nitrogen responses. *J Proteome Res*, 11: 2301~2315
- Yu YS, Rambo T, Currie J, Sasaki C, Kim HR, Collura K, Thompson S, Simmons J, Yang TJ, Nah G et al (2003). In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. *Science*, 300: 1566~1569
- Zhang X, Che FY, Berezniuk I, Sonmez K, Toll L, Fricker LD (2008). Peptidomics of *Cpe<sup>fat/fat</sup>* mouse brain regions: implications for neuropeptide processing. *J Neurochem*, 107: 1596~1613
- Zhang X, Pan H, Peng BN, Steiner DF, Pintar JE, Fricker LD (2010). Neuropeptidomics analysis establishes a major role for prohormone convertase-2 in neuropeptide biosynthesis. *J Neurochem*, 112: 1168~1179