

综述

iTRAQ技术在动物生产中的应用

马 静¹ 武开乐¹ 库西塔别克·买买提依不拉音¹ 邵 伟^{1,2*}¹新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052; ²新疆肉乳用草食动物营养实验室, 乌鲁木齐 830052)

摘要 近年来, 蛋白质组学的迅速发展使得相关实验技术也突飞猛进。与其他技术相比, 同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术以其高通量、高灵敏度、高重复性和能对各种复杂样品进行相对和绝对定量研究等优点迅速被广大学者接受, 成为蛋白质组学定量研究的主要手段之一。iTRAQ技术的不断优化, 使得它在动物、微生物等领域得到广泛应用。该文主要介绍了iTRAQ技术的基本原理和优缺点, 并对iTRAQ技术在肉牛肌肉发育及品质中的作用进行了分析; 介绍了奶牛乳蛋白质差异分析及乳房炎防御蛋白质筛选; 介绍了绵羊产肉性能、毛囊发育及肠道免疫; 介绍了生猪骨骼肌发育, 猪圆环病毒II型(porcine circovirus type 2, PCV2)疾病防御, 并进行冻存精液的影响因素的分析; 介绍了肉鸡肌肉发育; 同时也对蛋壳品质及鸡传染性法氏囊病(infectious bursal disease, IBD)防御机制研究等方面的研究进展进行了综述, 以期为畜牧科学研究和生产实践提供依据。

关键词 同位素标记相对和绝对定量; iTRAQ; 蛋白质组学; 肉品质; 差异蛋白质表达

Application of iTRAQ Technology in Animal Production

Ma Jing¹, Wu Kaile¹, Kuxitabieke·Maimaitiyibulayin¹, Shao Wei^{1,2*}¹College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumchi 830052, China;²Laboratory of Herbivore Nutrition for Meat and Milk in Xinjiang, Urumchi 830052, China)

Abstract In recent years, the rapid development of proteomics has led to rapid advance in related experimental techniques. Compared with other technologies, isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) technology is widely accepted by the majority of scholars with its high-throughput, high sensitivity and high repeat ability, which allows it to be employed in a variety of complex samples for relative and absolute quantitative research. It has become one of the main means of proteome quantitative research when it is combined with multi-dimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry technologies. With the continuous optimization of iTRAQ technology, it has been widely used in animals, microorganisms and other fields. This paper mainly covers the basic principles, advantages and disadvantages of iTRAQ technology and its application in animal production, and mainly summarizes the following contents. The impact of iTRAQ technology in beef muscle development and quality are analyzed. The differential analysis of milk protein in dairy cows and the screening of defense protein for mastitis are introduced and the meat performance, hair follicle development and intestinal immunity of sheep are illustrated. This paper goes over briefly the development of skeletal muscle of

收稿日期: 2017-07-06 接受日期: 2017-09-18

新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(批准号: 2015KL018)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18999119394, E-mail: 67696000@qq.com

Received: July 6, 2017 Accepted: September 18, 2017

This work was supported by the Open Project Program of the Extremophiles Lab of Xinjiang (Grant No.2015KL018)

*Corresponding author. Tel: +86-18999119394, E-mail: 67696000@qq.com

网络出版时间: 2017-12-04 12:00:21

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1200.006.html>

pig, the defense of porcine circo virus type 2 (PCV2), and the analysis of the influencing factors of frozen semen are included. The muscle development of broilers is elaborated and the research progress of eggshell quality and the defense mechanism of infectious bursal disease (IBD) are analyzed, in order to provide the basis for the scientific research and production practice of animal husbandry.

Keywords isobaric tags for relative and absolute quantification; iTRAQ; proteomics, meat quality; differentially expressed proteins

随着人类基因组计划的顺利完成, 生命科学研究进入了功能基因组学时代。相较于基因, 蛋白质从组成、结构和功能上显得更为复杂, 更贴近生命活动的本质, 针对蛋白质组学的研究成为功能基因组学的核心研究内容之一。如今, 与蛋白质组学相关的技术和设备更新换代较快, 一些新的方法也被应用于蛋白质组学研究中, 同步分析多个样本的蛋白质含量, 鉴别不同组织与个体的差异蛋白质也变得愈加精确与便捷。目前常用的有双向荧光差异凝胶电泳(two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)、同位素编码的亲和签(isotope-coded affinity tags, ICAT)、稳定同位素标记氨基酸介质细胞培养技术(stable isotope labeling of amino acids in culture, SILAC)和同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)等。然而, 2-DE、ICAT、SILAC等技术存在不同的技术限制和缺陷, iTRAQ技术以其独特的优势弥补了不足, 在蛋白质组学定量研究中得到了广泛的应用。

1 iTRAQ标记技术的概念与操作程序

iTRAQ技术是由美国应用生物系统公司在2004年开发的一种功能强大的多肽体外标记的新技术^[1]。iTRAQ试剂是一种小分子同重元素化学物质, 由报告基团、肽反应基团和平衡基团三部分组成。采用4种或8种同位素编码的标签, 通过特异性标记多肽的氨基基团, 然后进行串联质谱分析, 可同时比较4种或8种不同样品中蛋白质的相对含量或绝对含量。以8种不同的同位素试剂为例, 标记试剂基团形成8种相对分子质量均为305的等量异位标签, 通过连接反应与酶解后的肽段氨基酸N-端及赖氨酸侧链连接的胺发生标记反应, 完成多肽的稳定同位素标记, 可同时比较8种不同样品中蛋白质的相对含量或绝对含量^[2]。

iTRAQ的操作程序如下。样品先经胰蛋白质

酶裂解、烷基化, 所产生的肽段用iTRAQ试剂多重标签进行差异标记, 再将标记样本相混合, 进行LC-MS/MS分析; 最后采用生物信息学技术, 对每一个iTRAQ实验产生的成千上万个光谱、数千个可识别多肽和上百个可鉴定蛋白质进行分析和解释。许多新近开发的数据管理和分析工具可以用来分析这些庞大的数据, 如ProQuant、ProteinPilot等。最近, Shadforth等^[3]开发了i-Tracker软件, 可以通过noncentroided串联质谱峰列表中提取离子峰报告率, 并可以很容易地与Mascot及Sequest蛋白质鉴定工具连接。

2 iTRAQ标记技术在动物生产中的应用

2.1 肉牛生产中的应用

随着人们生活水平的提高以及人们对肉类品质的密切关注, 肉品质方面的研究也越来越多。肉品质受多方面因素的影响, 利用蛋白质组学技术可以寻找、筛选并鉴定与肉质有关的标记蛋白质, 全面而深入地研究肉品质的形成机制及其与持水性、嫩度和风味等特性之间的相关性^[4]。目前, 在肉品质研究中最常用、最成熟的技术是采用高分辨率的双向电泳技术结合先进的质谱方法对蛋白质或多肽进行鉴定, 已利用双向电泳在牛肉中发现了3个与嫩度相关的标记蛋白质^[5]。虽然国外已有多个牛肉双向电泳的报道, 但大部分蛋白质分离效果不很理想, 导致获得的蛋白质少, 影响全面评估牛肉中重要功能蛋白质的发现和鉴定。

贺花等^[6]在研究中使用iTRAQ结合质谱的方法, 对秦川牛背最长肌样品中的蛋白质进行分离和鉴定, 共成功鉴定1 321个蛋白质, 对于较小分子量(<20 kDa)和较大分子量(>100 kDa)的蛋白质, 均能达到很好的分离效果。郝瑞杰^[7]在用iTRAQ技术对不同品种/品系/类群牛背最长肌的蛋白质进行分析后, 筛选到了6个与脂肪细胞增殖和分化有关的蛋白质, 初步推测了肌内脂肪沉积的可能调控机理。

Bjarnadottir等^[8]利用iTRAQ技术研究年轻挪威红公牛背最长肌较嫩与较硬的肉发现3个与嫩度相关的蛋白质。

2.2 奶牛生产中的应用

2.2.1 乳蛋白质的差异分析 蛋白质是乳中发挥各种功能的关键分子,不同的物种及泌乳时期,乳中蛋白质组分及含量存在一定的差异。Yang等^[9]利用iTRAQ技术得到了黑白花奶牛、荷斯坦奶牛、牦牛、水牛、山羊、骆驼、马和人奶中乳脂球膜蛋白质表达谱,分析了哺乳动物种间乳脂球膜蛋白质组分的显著差异及其可能的生理功能。

泌乳期间,初乳与常乳在蛋白质组成上只存在细微的改变,但是乳蛋白质含量变化显著。Reinhardt等^[10]采用iTRAQ结合串联质谱技术分析了初乳和常乳乳脂球膜蛋白质的含量变化,发现常乳中有26个蛋白质含量上调,19个蛋白质含量下调,主要涉及脂肪合成、分泌和传递等生物学功能。杨永新等^[11]检测了分娩后第1、7和21 d牛奶蛋白质的含量变化,结果发现,牛初乳中主要涉及物质转运和免疫活性等生物学功能的IgG、IgM、转铁蛋白质和白蛋白质等含量上调。Zhang等^[12]的研究显示,产犊后前9 d期间有三分之一的蛋白质,尤其是免疫球蛋白的含量显著下降。

2.2.2 乳房炎防御蛋白质的筛选 奶牛乳腺炎是一种发病率高、治愈难、淘汰率高和经济损失大的乳腺疾病之一,严重影响动物健康、牛奶质量和牛奶生产效益。诱发奶牛乳腺炎的因素很多,病因复杂,但病原微生物感染为主要因素,金黄色葡萄球菌是最严重主要的致病菌之一。李蕊等^[13]采用iTRAQ技术结合液质联用技术,共筛选到168个与奶牛金黄色葡萄球菌型乳腺炎密切相关的差异表达蛋白质;通过生物信息学分析发现,有30个差异蛋白质与乳腺组织的防御、免疫和炎症反应有关。

Timothy等^[14]分别将健康的牛和被金黄色葡萄球菌感染而患乳腺炎的牛分泌的乳汁分离为乳清、乳脂球膜和外来体三部分,并使用iTRAQ技术进行检测。目前共发现,2 971种乳蛋白,其中有300多种蛋白质被证明与宿主的防御系统有关,又有94种蛋白质在健康奶牛与被感染奶牛的乳汁表现出很大的差异。

2.3 羊生产中的应用

2.3.1 产肉性能及品质分析 随着经济的发展,人

们对羊肉的需求也在不断增加,尤其是瘦肉多、脂肪少、肉质鲜嫩的羔羊肉,深受欢迎。因此挖掘肉用特性相关的分子基础,具有较大的理论和实践意义。

*FABP4*能够参与细胞内脂肪酸的转运,调控脂肪酸代谢,是研究动物脂肪沉积及代谢的重要候选基因。许瑞霞等^[15]利用qPCR和iTRAQ技术研究*FABP4*基因在阿勒泰羊尾脂沉积与代谢中的作用,结果显示,在非饥饿组与饥饿组尾脂中*FABP4* mRNA与蛋白质水平的差异均不显著($P>0.05$)。这表明,*FABP4*基因可能不是绵羊尾脂沉积与代谢两种极端差异表型的决定基因。

赵珺等^[16]对内蒙古绒山羊背最长肌、臂三头肌和臀肌进行差异分析;筛选得到8条与肌肉肉质显著相关的通路,建立了绒山羊骨骼肌差异蛋白质谱,找到了3种骨骼肌的差异蛋白质并挖掘到了与肉质相关的基因。陈立娟等^[17]通过蛋白质组学技术研究蛋白质磷酸化对羊肉嫩度的调控机制,分析得到蛋白质磷酸化可能通过对宰后肌肉糖酵解和肌肉收缩的作用影响肉的嫩度。

2.3.2 毛囊发育及结构分析 羊毛的发育和生长受到多方面的影响,体重下降、毛囊发育等都会对其产生明显影响。Almeida等^[18]利用iTRAQ技术探讨饲养控制对羊毛纤维结构和蛋白质的影响及这些蛋白质在毛囊纤维形成中的作用,确定了体重变化对羊毛纤维直径及羊毛品质改变的影响。于梦然等^[19]利用iTRAQ结合LC-MS/MS技术比较山羊皮肤毛囊生长期和休止期差异表达蛋白质,尝试寻找影响毛囊发育的重要蛋白质,得到158个差异表达蛋白质,72个蛋白质表达上调,86个蛋白质表达下调。另外,在这些差异表达蛋白质中有9种角蛋白质表达上调,2种角蛋白质表达下调。

2.3.3 肠道免疫研究 崔凯等^[20]采用iTRAQ技术分别对断母乳湖羊羔羊肠道差异表达蛋白质进行分析,共鉴定得到5 338个蛋白质,差异蛋白质389个,其中143个表达上调,246个表达下调。差异表达蛋白质主要参与生物学过程包括免疫系统、物质代谢、生物黏附和细胞移动等过程。Nagaraj等^[21]引进iTRAQ技术研究绵羊抵抗胃肠道线虫感染的作用机理,鉴定得到了4 468个蛋白质,其中有158个差异蛋白质,80个表达上调,78个表达下调。这些差异蛋白质可能为抗寄生虫的免疫反应提供了有效的的基础。

2.4 生猪生产中的应用

2.4.1 肌肉生长发育影响探究 Xu等^[22]分析了梅山猪背最长肌组织4个时间点的蛋白质表达谱,发现了66个差异表达的蛋白质,这些差异蛋白质的功能主要与骨骼肌的生长和发育密切相关。熊火等^[23]用蛋白质组学分析得出饲喂高脂饲料显著影响生长育肥猪骨骼肌中涉及葡萄糖和能量代谢、脂质代谢以及应激反应的相关蛋白质含量。程小芳等^[24]配制3个不同低蛋白质水平日粮饲喂断奶21天的仔猪,通过iTRAQ技术比较分析饲喂低蛋白质日粮平衡氨基酸对断奶仔猪背最长肌生长相关蛋白质表达规律,初步推测,17%蛋白质水平日粮可能最有利于断奶仔猪骨骼肌生长。Zhang等^[25]为了阐明非淀粉多糖酶(non-starch polysaccharide enzyme, NSPE)对骨骼肌影响的机制,应用iTRAQ同量异位标签来研究在生长猪的最大肌肉(LM)中蛋白质组变化,发现总共51种蛋白质在对照组和NSPE组之间的LM中差异表达。差异表达蛋白质的功能分析显示,与能量生产、蛋白质合成、肌肉分化的蛋白质的丰度增加有关。

2.4.2 免疫相关分析 猪圆环病毒II型(porcine circovirus type 2, PCV2)是断奶后多系统衰竭综合征的主要致病因子,该病毒在全世界范围传播,导致养猪业蒙受巨大的经济损失。借助iTRAQ技术结合二维液相色谱串联质谱法定量地识别肺泡巨噬细胞中PCV2感染组与未感染组的差异蛋白质表达情况。Lu等^[26]在感染后的不同时间段内共鉴定到145个差异显著的细胞蛋白质,这些差异蛋白质与细胞结构、细胞黏连、信号转导及它们的相互作用等生物过程相关,为后期阐明PCV2的发病机制奠定了基础。

2.4.3 精液冻存的影响分析 冷冻损伤是精液冷冻保存所必须面对的一个难题,它会破坏细胞结构,引起细胞蛋白质水平的改变,降低精子的活性和功能。Chen等^[27]利用iTRAQ技术与液相串联质谱分析对种猪新鲜精子及冻融后精子的蛋白质提取物进行处理,总共得到了41种差异表达蛋白质,其中35种表达上调,6种表达下调($P < 0.05$)。他们通过生物信息学软件进行处理,这些差异蛋白质大多数与精子获能、黏连、能源供应和精卵结合等功能密切相关,并认为,精液冻存会影响蛋白质含量和降低受精能力。

2.5 肉鸡生产中的应用

随着家禽业生产力的不断发展,鸡肉在国内肉

类消费占据很大部分。付瑞琦等^[28]用iTRAQ技术在不同发育阶段的北京油鸡的胸肌组织中共鉴定到517个蛋白质,其中210个显著下调,210个显著上调,初步筛选出了调控肌肉发育与脂肪代谢的关键蛋白质。王红杨等^[29]利用iTRAQ技术获得影响胚胎期至生长早期鸡胸肌发育及肌内脂肪沉积的关键通路及核心蛋白质。

氨是与高氨血症相关的代谢紊乱毒素,大多数针对氨的毒性研究主要集中在神经系统以及胃肠道上。暴露于高浓度氨气下影响免疫器官和小肠绒毛的发育,同时严重减低了平均日增重和采食量。张继泽等^[30]研究发现,肉鸡暴露于高浓度氨气下可诱发氧化应激,严重影响小肠黏膜的营养吸收和免疫功能。Zhang等^[31]利用iTRAQ技术鉴定出不同浓度氨气条件下鸡肝脏组织中的30个差异蛋白质,这些蛋白质均与营养代谢、免疫应答、转录和翻译、应激反应及解毒作用相关。

2.6 蛋鸡生产中的应用

在商业化和集约化蛋鸡生产中常出现蛋壳破损等问题,对鸡蛋品质和生产成本带来严重影响及经济损失。肖俊峰^[32]采用iTRAQ技术检测蛋壳中基质蛋白质差异表达以探究日粮锰水平对蛋壳基质蛋白质表达的影响。结果显示,基础日粮添加100 mg/kg锰显著影响蛋壳中68种基质蛋白质,其中31种表达上调,37种表达下调,并通过生物信息学发现这些差异表达的蛋白质与鸡蛋的形成与免疫相关。鸡传染性法氏囊病(infectious bursal disease, IBD)是一种高度接触性传染病,会导致鸡发生严重的免疫抑制疾病,增加了对其他病原的易感性,对养鸡业造成巨大的经济损失。孙彦婷等^[33]采用iTRAQ结合LC-MS/MS质谱鉴定法对传染性法氏囊病毒感染鸡胚成纤维DF-1细胞24 h后的胞质、胞核亚细胞组分的差异表达蛋白质谱进行分析,共发现88个差异蛋白点,主要与免疫反应过程、信号转导、能量代谢和细胞凋亡等方面相关,为传染性法氏囊病毒病的致病机制研究提供了大量生物信息。

3 iTRAQ标记技术的优缺点

与其他传统技术相比,iTRAQ具有如下优点:
(1)具有高度的灵敏性,受蛋白质丰度、等电点和分子质量等情况的限制低,能检测到低丰度蛋白质^[34];
(2)可鉴定的范围很广泛,几乎可对任何种类的蛋白

质进行分析^[35]; (3)每种蛋白质有更多的肽段可被分析, 从中可获得更为详尽的样品信息, 提高了蛋白质鉴定的覆盖率和可信度; (4)可同时标记2~8个样本, 标记过程更简单, 标记效率更高, 并可同时比较不同实验处理对样品蛋白质含量的影响; (5)可以对多种样本进行鉴定, 除培养细胞、组织外, 还包括血清/血浆、唾液、泪液、鼻分泌物和脑脊液等^[36]; (6)自动化程度高, 可以液质联用, 节省更多的时间及人力。

但是, iTRAQ技术也存在着一些不足: (1) iTRAQ试剂几乎可以与样本中的所有蛋白质结合, 容易受样本中的杂质蛋白质及样本处理过程中缓冲液的污染, 需要对样本进行预处理并尽量减少操作过程中的污染^[37]; (2)高丰度蛋白质干扰了低丰度蛋白质的检测和鉴定; (3)只能对相对丰度进行比较, 因此只能提供相对的定量; (4)筛选出的蛋白质具有技术假阳性问题, 很多蛋白质需经修饰如磷酸化后才能发挥作用, 此时是由修饰后蛋白质而不是原来蛋白质的表达量决定; (5)数据的复杂度更高, 需要更多的信息学工具来分析解释; (6)目前iTRAQ试剂仍非常昂贵, 在一定程度上限制了它的广泛应用。

4 总结与展望

蛋白质组学的研究已成为当今生命科学研究领域中的一个重要分支。iTRAQ作为其中的新兴技术已引领蛋白质定量分析的蓬勃发展。大量研究表明, iTRAQ技术在家畜及模型动物蛋白质组学领域中的应用已趋于成熟, 该技术在寻找结构与功能差异的蛋白质或探究疾病发生的生物标志物等方面具有更多的优势。国内结合多维液相色谱和串联质谱的iTRAQ标记技术可以同时分离和鉴定成百上千种蛋白质, 具有较好的应用前景。目前, iTRAQ技术虽然还有一些缺点和不足之处, 但其在生命科学领域中的应用价值已凸显, 随着科技的不断完善, 该技术必将在未来的蛋白质组学研究中得到更加广泛的应用, 为进一步了解蛋白质在生命过程中的动态变化作出应有的贡献。

参考文献 (References)

1 Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(12): 1154-69.

2 陈潇飞, 何晓红, 叶绍辉, 宋 伸, 杨 敏, 王月月, 等. iTRAQ技术及其在动物蛋白质组学中的研究进展. 黑龙江畜牧兽医 (Chen Xiaofei, He Xiaohong, Ye Shaohui, Song Shen, Yang Min, Wang Yueyue, *et al.* ITRAQ technology and its research advances in animal proteomics. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*) 2016; 7: 57-60.

3 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. 中国生物工程杂志 (Luo Zhiwen, Zhu Liang, Xie Weifen. *Research progress of isobaric tags for relative and absolute quantification. China Biotechnology*) 2006; 26(10): 83-7.

4 赵 珺, 李金泉, 杜瑞平, 张文广. 蛋白质组学技术的发展及其在肉质研究中的应用. 畜牧与饲料科学 (Zhao Jun, Li Jinquan, Du Ruiping, Zhang Wenguang. *Development of proteomics technology and its application in meat quality. Animal Husbandry and Feed Science*) 2012; 33(2): 22-4.

5 D'Alessandro A, Rinalducci S, Marrocco C, Zolla V, Napolitano F, Zolla L. Love me tender: an omics window on the bovine meat tenderness network. *J Proteomics* 2012; 75(14): 4360-80.

6 贺 花. 秦川牛肌肉生长发育相关基因和蛋白质的筛选及其初步鉴定. 西北农林大学(硕士论文) (He Hua. *Identification and characterization of differentially expressed genes and proteins during longissimus muscle development in qinchuan cattle. Northwest A&F University*), 2014.

7 郝瑞杰. 不同品种/品系/类群牛背最长肌的比较蛋白质组学分析. 西北农林大学(硕士论文) (Hao Ruijie. *Comparative proteomics analysis of longissimus muscle from different breeds of cattle. Northwest A&F University*), 2015.

8 Bjarnadóttir SG, Hollung K, Høy M, Bendixen E, Codrea MC, Veiseth-Kent E. Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine *Longissimus thoracis* muscle assessed by isobaric Tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. *J Animal Sci* 2012; 90(6): 2035-43.

9 Yang Y, Bu D, Hao X, Sun P, Wang J, Zhou L. Proteomic analysis of cow, yak, buffalo, goat and camel milk whey proteins: quantitative differential expression patterns. *J Proteome Res* 2013; 12(4): 1660-7.

10 Reinhardt TA, Lippolis JD. Development change in the milk fat globule membrane proteome during the transition from colostrums to milk. *J Dairy Sci* 2008; 91(6): 2307-18.

11 杨永新, 王加启, 卜登攀, 张乐颖, 李珊珊, 张春林, 等. 奶牛初乳与常乳乳蛋白质变化的比较蛋白质组学研究. 中国农业大学学报 (Yang Yongxin, Wang Jiaqi, Bu Dengpan, Zhang Leying, Li Shanshan, Zhang Chunlin, *et al.* *Developmental changes of the milk protein from colostrums to milk in the periparturient dairy cattle. Journal of China Agricultural University*) 2010; 15(2): 47-52.

12 Zhang L, Boeren S, Hageman JA, Hooijdonk TV, Vervoort J, Hettinga K. Perspective on calf and mammary gland development through changes in the bovine milk proteome over a complete lactation. *J Dairy Sci* 2015; 98(8): 5362-73.

13 李 蕊. 基于iTRAQ技术对奶牛金黄色葡萄球菌人工诱导型乳腺炎差异表达蛋白质分析. 扬州大学(硕士论文) (Li Rui. *The differentially expressed protein analysis of staphylococcus aureus artificial induced mastitis in dairy cow based on the iTRAQ technology. Yang Zhou University*), 2015.

14 Reinhardt TA, Sacco RE, Nonnecke BJ, Lippolis JD. Bovine

- milk proteome: quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Proteomics* 2013; 82(8): 141-54.
- 15 许瑞霞, 高磊, 赵伟利, 张伟, 宋广超, 甘尚权, 等. *FABP4*基因在阿勒泰羊尾脂沉积与代谢模型中的表达变化规律. 遗传 (Xu Ruixia, Gao Lei, Zhao Weili, Zhang Wei, Song Guangchao, Gan Shangquan, *et al.* Analysis of *FABP4* expression pattern in rump fat deposition and metabolism of Altay sheep. *Hereditas* 2015; 37(2): 174-82.
- 16 赵珺. 内蒙古绒山羊骨骼肌肌肉差异研究. 内蒙古农业大学(硕士学位论文)(Zhao Jun. Differential analysis of innermongolian cashmere skeletal muscle. Inner Mongolia Agricultural University), 2015.
- 17 陈立娟. 羊肉嫩度的磷酸化蛋白质组分析. 中国农业科学院(硕士学位论文)(Chen Lijuan. Analysis of phosphoproteome of ovine muscle with different tenderness. Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2015.
- 18 Almedia AM, Plowman JE, Harland DP, Thomas A, Kilminster T, Scanlon T, *et al.* Influence of feed restriction on the wool proteome: A combined iTRAQ and fiber structural study. *J Proteomics* 2014; 103(3): 170-7.
- 19 于梦然. 内蒙古绒山羊生长期和休止期皮肤蛋白质差异谱挖掘和验证. 内蒙古大学(硕士学位论文)(Yu Mengran. Mining and verifying skin protein differentially expression profiles of inner mongolia cashmere goat during anagen and telogen. Inner Mongolia University), 2015.
- 20 崔凯. 基于转录组与蛋白质组联合分析揭示羔羊断母乳应激调控机制. 中国农业科学院(硕士学位论文)(Cui Jian. Transcriptomics and proteomics analysis on the regulation mechanism of weaning stress in lambs. Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2016.
- 21 Nagaraj SH, Harsha HC, Reverter A, Colgrave ML, Sharma R, Andronicos N, *et al.* Proteomic analysis of the abomasal mucosal response following infection by the nematode, *haemonchus contortus*, in genetically resistant and susceptible sheep. *J Proteomics* 2012; 75(7): 2141-52.
- 22 Xu Y, Qian H, Feng X, Xiong Y, Lei M, Ren Z, *et al.* Differential proteome and transcriptome analysis of porcine skeletal muscle during development. *J proteomics* 2012; 75(7): 2093-108.
- 23 熊火, 蔡欣, 刘静波, 陈亮, 张宏福. 高脂饲料对生长育肥猪肉品质和骨骼肌蛋白质组的影响. 畜牧兽医学报(Xiong Huo, Cai Xin, Liu Jingbo, Chen Liang, Zhang Hongfu. Effects of High-fat diet on meat quality traits and skeletal muscle proteome of growing-finishing pigs. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*) 2016; 47(10): 2052-9.
- 24 程小芳. 低蛋白质日粮平衡氨基酸对断奶仔猪骨骼肌生长相关蛋白质表达规律研究. 华中农业大学(硕士学位论文)(Cheng Xiaofang. Effects of low protein diets with amino acids balanced on growth related proteins expression profiling in the skeletal muscle of weaned piglets. Central China Agricultural University), 2015.
- 25 Zhang J, Gao Y, Lu Q, Sa R, Zhang H. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of longissimus muscle from growing pigs with dietary supplementation of non-starch polysaccharide enzymes. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015; 16(6): 465-78.
- 26 Lu Q, Bai J, Zhang LL, Liu J, Jiang ZH, Michal JJ, *et al.* Two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling approach revealed first proteome profiles of pulmonary alveolar macrophages infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Proteome Res* 2012; 11(5): 2890-903.
- 27 Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, *et al.* Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction* 2014; 147(3): 321-30.
- 28 付睿琦. 利用蛋白质组学技术研究北京油鸡肌肉发育和肌肉脂肪沉积的分子机制. 中国农业科学院(硕士学位论文)(Fu Ruiqi. The study of molecular mechanism of muscle growth and intramuscular fat deposition in Beijing-you chickens with proteomics techniques. Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2013.
- 29 王红杨. 胚胎期至生长早期鸡肌肉发育及肌肉脂肪沉积蛋白质组研究. 中国农业科学院(硕士学位论文)(Wang Hongyang. The proteomic study of muscle development and intramuscular fat deposition of chickens at embryonic and early growth stages. Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2015.
- 30 张继泽. 动物健康养殖研究中蛋白质组学技术的应用. 北京: 北京农业科学院(硕士学位论文)(Zhang Jize. The application of proteomic technology in study of healthy animal production. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2015.
- 31 Zhang J, Li C, Tang X, Lu Q, Sa R, Zhang H. High concentrations of atmospheric ammonia induce alterations in the hepatic proteome of broilers (*Gallus gallus*): An iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. *PLoS One* 2015; 10(4): e0123596.
- 32 肖俊峰. 日粮锰源和水平对产蛋鸡蛋壳品质的影响及其机理. 中国农业科学院(硕士学位论文)(Xiao Junfeng. Effect and mechanism of dietary manganese sources and supplementation on eggshell quality of laying hens. Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2014.
- 33 孙彦婷. 基于iTRAQ技术的传染性法氏囊病毒感染DF-1细胞的亚细胞蛋白质组分析. 浙江大学(硕士学位论文)(Sun Yanting. iTRAQ-based subcellular proteomic analysis of DF-1 cells infected with infectious bursal disease virus. Zhejiang University), 2014.
- 34 王林纤, 戴勇, 涂植光. iTRAQ标记技术与差异蛋白质组学的生物标志物研究. 生命的化学(Wang Linxian, Dai Yong, Tu Zhiguang. iTRAQ labeling technology and differential proteomics biomarker studies. *Chemistry of Life*) 2010; 30(1): 135-40.
- 35 Unwin RD, Griffiths JR, Whetton AD. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS. *Nat Protoc* 2010; 5(9): 1574-82.
- 36 王英超, 党源, 李晓艳. 蛋白质组学及其技术发展. 生物技术通讯(Wang Yingchao, Dang Yuan, Li Xiaoyan, Wang Xinglong. Proteomics and the development of proteomics techniques. *Letters in Biotechnology*) 2010; 21(1): 139-44.
- 37 谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 董世雷, 皮雄娥, 刘伟, 等. iTRAQ技术及其在蛋白质组学中的应用. 中国生物化学与分子生物学报(Xie Xiuzhi, Wang Xin, Liu Lihua, Dong Shilei, Pi Xiong, Liu Wei, *et al.* iTRAQ technology and its application in proteomics. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2011; 27(7): 616-21.