

# 植物盐胁迫应答蛋白质组学研究的技术策略\*

张恒<sup>1,2</sup> 戴绍军<sup>1,2\*\*</sup>

(<sup>1</sup>东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

**摘要** 土壤盐渍化是限制植物生长和分布的关键因素之一. 揭示植物响应盐胁迫的分子机理是借助分子生物学手段提高植物耐盐性的基础, 也是当前植物生理与分子生态学研究的热难点问题. 高通量的蛋白质组学技术体系包括双向电泳技术、蓝色自然胶电泳技术、双向荧光差异凝胶电泳技术、液相色谱技术, 以及各种生物质谱技术, 已经被广泛应用于植物应答盐胁迫研究, 为解析植物耐盐分子机制提供了重要信息. 本文综述了应用于植物盐胁迫应答蛋白质组学研究的技术策略.

**关键词** 植物 蛋白质组学 盐胁迫 技术策略

**文章编号** 1001-9332(2011)08-2201-10 **中图分类号** Q94 **文献标识码** A

**Technical strategies in the research of plant salt-responsive proteomics: A review.** ZHANG Heng<sup>1,2</sup>, DAI Shao-jun<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>*Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China*; <sup>2</sup>*Ministry of Education Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Harbin 150040, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2011, 22(8): 2201-2210.

**Abstract:** Soil salinization is one of the key factors limiting plant growth and distribution. To explore plant molecular salt-responsive mechanisms is the basis of enhancing plant salt tolerance in virtue of molecular biological techniques, and also, the hotspot of plant physiology and molecular ecology. High throughput proteomics approaches include two-dimensional electrophoresis (2-DE), blue-native/SDS-PAGE (BN/SDS-PAGE), two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D DIGE), liquid chromatography (LC), and various mass spectrometry (MS) techniques, being widely applied in the research of plant salt-response and supplied important information for understanding plant molecular salt-tolerant mechanisms. In this paper, a review was made on the technical strategies applied in the research of plant salt-responsive proteomics.

**Key words:** plant; proteomics; salt stress; technical strategy.

土壤盐渍化严重地影响植物的生长发育和区域分布<sup>[1]</sup>. 一直以来, 人们利用细胞学、形态学、生理生态学和分子生物学等研究方法对植物盐胁迫应答机制进行了分析, 发现植物能够通过控制盐离子摄入与外排、区隔化体内离子、合成渗透保护物质、增强抗氧化酶活性等方式响应盐胁迫<sup>[2]</sup>. 同时, 利用基因克隆与转化技术, 分析了部分盐胁迫应答基因的功能<sup>[3-4]</sup>, 并利用基因芯片技术分析了拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[5]</sup>、水稻(*Oryza sativa*)<sup>[6-8]</sup>和盐芥(*Thellungiella halophila*)<sup>[9-10]</sup>等植物盐胁迫应答转录组的变化特征, 建立了盐胁迫应答相关的cDNA文库和EST数据库. 近年来不断完善的蛋白质组学技术为深入分析植物盐胁迫应答的代谢和调控机制提供了高通量的技术平台, 利用此平台中的双向电泳技术、凝胶染色技术、液相色谱技术、荧光/同位素标记技术, 以及生物质谱技术能够系统地分析植物体各器官、组织、细胞和亚细胞结构中盐胁迫应答蛋白质组的变化, 确定每种蛋白质的表达丰度、修饰状态, 以及蛋白质复合体组成等特征<sup>[11]</sup>. 此平台不断被应用于植物盐胁迫应答蛋白质组学研

\* 国家自然科学基金项目(31071194)、黑龙江省杰出青年科学基金项目(JC201011)、中央高校基本科研业务费专项(DL09DA03)和国家博士后科学基金面上项目(第48批)资助.

\*\* 通讯作者. E-mail: daishaojun@hotmail.com

2011-01-30 收稿, 2011-05-16 接受.

究<sup>[12-13]</sup>。然而,由于研究对象(包括物种、器官/组织、细胞和细胞器)的不同,选择何种研究策略更有利于盐胁迫应答蛋白质组学研究是目前值得思考的问题。本文通过综述近年来植物盐胁迫响应蛋白质组学研究进展,着重分析了植物材料选择、蛋白质样品制备与分离、蛋白质鉴定与生物信息学分析等的技术策略。

## 1 研究对象选择的策略

### 1.1 已知基因组背景的模式植物

模式植物拟南芥与水稻的基因组背景清楚,基因与蛋白质数据库信息量大,并且已经有了很好的分子生物学研究基础,对其进行盐胁迫应答蛋白质组学分析,可以结合转录组学和分子生物学研究结果深入分析植物盐胁迫应答的调控机制。目前人们已经分析了拟南芥和水稻叶片<sup>[14-18]</sup>、根<sup>[19-23]</sup>、地上

部分<sup>[24-25]</sup>、花序<sup>[26]</sup>、悬浮培养细胞<sup>[27]</sup>、质外体<sup>[28]</sup>、微粒体膜<sup>[14]</sup>和质膜<sup>[29-30]</sup>等器官/细胞/亚细胞结构中563种盐胁迫应答蛋白质的表达模式变化(图1和表1),发现参与碳和能量代谢(24.7%)、基础代谢(16.9%)和胁迫防御(15.6%)等过程的蛋白质在拟南芥和拟南芥盐胁迫应答过程中发挥了重要的作用,并且不同器官/细胞/亚细胞结构的盐胁迫应答具有特异性,如地上部分/光合组织和悬浮培养细胞中参与光合作用、碳和能量代谢、基础代谢过程的蛋白质表达模式变化显著;根可以通过调控信号转导和离子转运相关蛋白质感知/传递盐胁迫信号,维持离子平衡,并通过调节抗氧化酶以及碳和能量代谢相关蛋白质表达提高植物抗胁迫能力,使其维持相对正常的生长代谢活动;生殖器官(花序)通过改变参与渗透胁迫调节、转录调控、蛋白质加工和活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS)清除等过程的

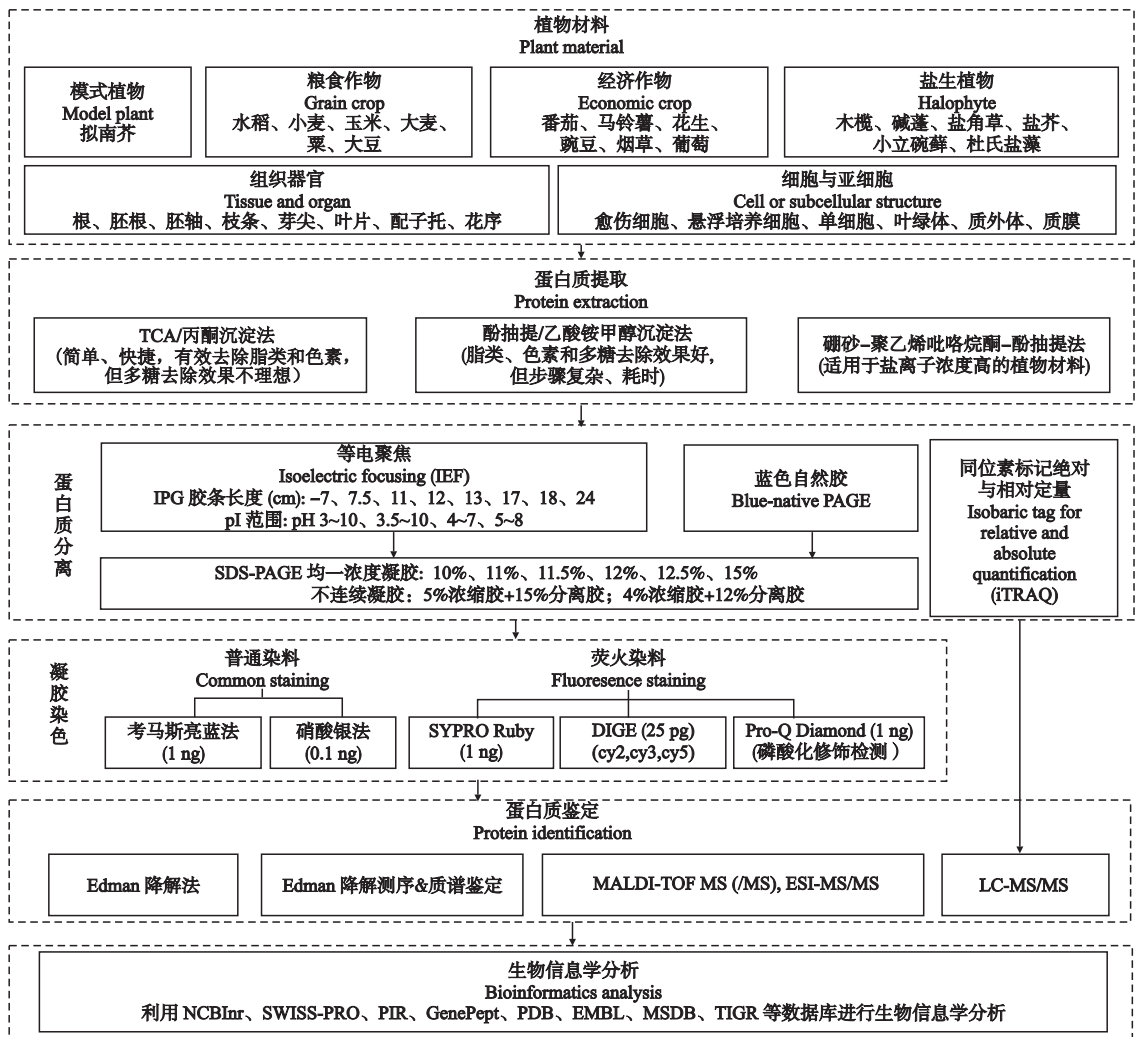


图1 植物盐胁迫蛋白质组学研究技术路线

Fig. 1 Research strategy of salt-responsive proteomics in plants.

蛋白质表达模式应答盐胁迫;质膜和质外体中参与维持细胞骨架稳定、物质/离子转运、信号转导和 ROS 清除过程的蛋白质在植物盐胁迫应答中具有重要意义。

## 1.2 有价值的农作物与经济作物

农作物和经济作物多为甜土植物,土壤盐渍化会导致作物严重减产<sup>[3]</sup>。一直以来,人们采用种间杂交、驯化筛选、诱变和标记辅助筛选等育种方法,以及转基因策略来提高作物耐盐性<sup>[31]</sup>,但是并不能全面揭示作物的盐胁迫应答机制。蛋白质组学研究为深入分析作物的耐盐机制提供了丰富信息。通过对多种粮食作物[如小麦(*Triticum aestivum*)<sup>[32-35]</sup>、玉米(*Zea mays*)<sup>[36-37]</sup>、大麦(*Hordeum vulgare*)<sup>[38]</sup>、粟(*Setaria italica*)<sup>[39]</sup>和大豆(*Glycine max*)<sup>[40]</sup>]与经济作物[番茄(*Solanum lycopersicum*)<sup>[41-42]</sup>、马铃薯(*Solanum tuberosum*)<sup>[43]</sup>、花生(*Arachis hypogaea*)<sup>[44]</sup>、豌豆(*Pisum sativum*)<sup>[45]</sup>、烟草(*Nicotiana tabacum*)<sup>[46-47]</sup>和葡萄(*Vitis vinifera*)<sup>[48-49]</sup>]的盐胁迫应答蛋白质组动态变化进行分析(图 1 和表 1),结果发现,这些作物与水稻和拟南芥相似,参与光合作用、碳和能量代谢、胁迫防御、基础代谢和信号转导等过程的蛋白质在盐胁迫应答过程中表达模式变化明显。

## 1.3 盐生植物

与甜土植物相比,盐生植物具有特异的耐盐机制和结构,能够在超过 200 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 的环境中完成生活史<sup>[3]</sup>。形态学、生理学和分子生物学研究表明,盐生植物不仅能够利用盐腺和盐囊泡等结构增强盐离子的外排能力,还可以通过有效调节离子转运、ROS 清除和渗透物质合成等过程中相关基因/蛋白质的表达来适应盐胁迫环境<sup>[3]</sup>。对木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)<sup>[50]</sup>、碱蓬(*Suaeda aegyptiaca*)<sup>[51]</sup>、盐角草(*Salicornia europaea*)<sup>[52]</sup>、盐芥<sup>[17]</sup>、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)<sup>[53]</sup>和杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)<sup>[54-55]</sup> 6 种盐生植物进行蛋白质组分析,发现了 205 种盐胁迫应答蛋白质(图 1 和表 1),表明盐生植物中既含有与甜土植物相同(似)的抗逆基因/蛋白质,也具有自己独特的盐胁迫应答机制。

## 1.4 细胞/亚细胞结构

各种细胞/亚细胞结构,如悬浮培养细胞、愈伤组织细胞、单细胞藻类、叶绿体、质膜和质外体等,应对盐胁迫的蛋白质组也发生动态变化。植物细胞/亚细胞盐胁迫响应蛋白质组学研究不仅可以高通量地揭示细胞/亚细胞结构的盐胁迫响应特异机制<sup>[56]</sup>,而且有助于克服传统蛋白质组学研究方法中所存在的一些障碍,提高低丰度蛋白质、小分子量蛋白质和特殊性质蛋白质的检测效率。人们利用蛋白质组学技术分析了拟南芥悬浮培养细胞<sup>[16]</sup>、花生愈伤组织

表 1 植物盐胁迫响应蛋白质组学研究对象与方法

Table 1 Objects and strategies in plant salt-responsive proteomics studies

物种 Species	取材部位 Tissue	样品制备 Protein preparation	样品分离 Protein separation				鉴定与生物信息学分析 Identification and bioinformatic analysis		文献 Reference	
			等电聚焦 IEF		SDS-PAGE 浓度 Concentration (%)	染色方法 Staining	质谱 Mass spectrometry	数据库 Database		
			IPG 胶条 长度 Length (cm)	pH						
拟南芥 <i>A. thaliana</i>	根	TCA/丙酮	24	3~10	NL	12.5	CBB	LC-MS/MS	NCBIInr	[14]
	幼苗		13	4~7		12		MALDI-TOF-MS		[15]
	悬浮细胞	TCA	18	4~7		12	DIGE, 银染	MALDI-TOF-MS		[16]
拟南芥 <i>A. thaliana</i> 、 盐芥 <i>T. halophila</i>	叶片 微粒体膜	酚/乙酸铵-甲醇 丙酮	24	4~7		12.5	CBB	MALDI-TOF/TOF-MS LC-MS/MS	NCBIInr	[17]
水稻 <i>O. sativa</i>	花序	TCA/丙酮	18	4~7		12	银染	MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr	[21]
	叶片	裂解液	12	3.5~10, 5~8		15(分离)+ 5(浓缩)	CBB	nESI-LC-MS/MS	Swiss-Prot, NCBI EST	[22]
	叶片	酚/乙酸铵-甲醇	17	3~10		12	CBB	MALDI-TOF-MS		[27]
	叶鞘、盾片、根	TCA	11	3.5~10, 6~10		15(分离)+ 5(浓缩)	CBB	Edman 降解	Swiss-Prot, PIR, GenPept, PDB	[18]
	叶片核纤层	TCA/丙酮	24	4~7		12.5	CBB	MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr	[25]
	根	TCA/丙酮	18	4~7		12	CBB	MALDI-TOF/TOF-MS, ESI-Q/TOF-MS	NCBI, Swiss-Prot, EMBL, PIR	[26]
	根	TCA	13	3.5~10, 5~8		15(分离)+ (5浓缩)	CBB	MALDI-TOF-MS	NCBIInr	[23]
	根	酚/乙酸铵-甲醇	24	3~10	NL	12(分离)+ 4(浓缩)	SYPRO Ruby, Pro-Q Diamond	MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr	[20]

续表 1

Table 1

物种 Species	取材部位 Tissue	样品制备 Protein preparation	样品分离 Protein separation				鉴定与生物信息学分析 Identification and bioinformatic analysis		文献 Reference
			等电聚焦 IEF		SDS-PAGE 浓度 Concentration (%)	染色方法 Staining	质谱 Mass spectrometry	数据库 Database	
			IPG 胶条 长度 Length (cm)	pH					
小麦 <i>T. aestivum</i>	根	TCA/丙酮	13	4~7	12	银染	MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr	[29]
	根质膜	丙酮沉淀	18	4~7	11.5	银染	MALDI	NCBIInr	[24]
	根质膜	裂解液	24	4~7	12	CBB	MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr	[19]
	根质外体	Tris-HCl 缓冲液	13	3~10	12.5	CBB	MALDI-TOF-MS		[30]
	地上部分	TCA/丙酮	24	4~7	12.5	CBB	MALDI-TOF-MS	NCBIInr	[28]
	叶片	TCA/丙酮	24	4~7	12.5	CBB	MALDI-TOF-MS	MSDB, NCBIInr	[32]
	叶片	TCA/丙酮		3~10		CBB	MALDI-TOF-MS		[35]
	根	TCA/丙酮	17	5~8	10, 12.5	CBB, 银染	MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr, MSDB, Swiss-Prot	[34]
大麦 <i>H. vulgare</i>	根、叶片	TCA/丙酮	17	5~8	10	银染	MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr, MSDB, Swiss-Prot	[33]
	根	TCA/丙酮	13	3~10	11.25	CBB	MALDI-TOF-MS, nanoLC-ESI-Q/TOF-MS	TIGR	[38]
玉米 <i>Z. mays</i>	叶绿体	TCA/丙酮	18	3~10	12	CBB	MALDI-TOF-MS	PPDB	[36]
	根, 地上部分	DTT-TCA/丙酮	11	4~7	12.5	CBB	MALDI-TOF-MS		[37]
粟 <i>S. italica</i>	幼苗	TCA/丙酮	7	3~10	12.5	银染	MALDI-TOF-MS	NCBIInr	[39]
大豆 <i>G. max</i>	胚轴、根	TCA/丙酮	11	3.5~10, 5~8	15(分离)+ 5(浓缩)	CBB	Edman 降解, ESI-Q/TOF-MS	Swiss-Prot, PIR, GenPept, PDB	[40]
葡萄 <i>V. vinifera</i>	芽尖	TCA/丙酮	11	4~7	12.5	CBB	MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr, TIGR EST	[49]
葡萄 <i>V. vinifera</i>	叶片, 茎, 根	酚/乙酸铵-甲醇		3/10, 4/6, 5/7, 6/8		银染	Edman 降解	NCBI	[48]
豌豆 <i>P. sativum</i>	根	TCA/丙酮	7	4~7	13	CBB, 银染	ESI-Q/TOF-MS	NCBIInr	[45]
花生 <i>A. hypogaea</i>	愈伤细胞	Bio Rad 试剂盒		4~7		CBB, 银染, Pro-Q Diamond	ESI-Q/TOF-MS		[44]
烟草 <i>N. tabacum</i>	叶片质外体	丙酮	7	3~10	12	CBB	LC-MS/MS	NCBIInr	[46]
	叶片	裂解液		3~10, 5~8	15(分离)+ 5(浓缩)	CBB	Edman 降解, MALDI-TOF-MS	Swiss-Prot, PIR, GenPept, PDB	[47]
番茄 <i>L. esculentum</i>	叶片、根	TCA/丙酮	24	4~7	12.5	DIGE, 银染			[42]
	胚轴、胚根	酚抽提	13	4~7	12.5	CBB, 银染	LC-ESI-Q -Trap-MS	NCBIInr	[41]
马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	地上部分、根	TCA	11	3.5~10, 5~8	15(分离)+ 5(浓缩)	CBB	Edman 降解	Swiss-Prot, PIR, GenPept, PDB	[43]
盐角草 <i>S. europaea</i>	地上部分	BPP	24	4~7	12.5	CBB	MALDI-TOF/TOF-MS	NCBIInr	[52]
碱蓬 <i>S. aegyptiaca</i>	叶片	TCA/丙酮	18	4~7	12.5	CBB	LC-MS/MS	NCBI, EMBL	[51]
木樨 <i>B. gymnorhiza</i>	根、叶片	Bio Rad 试剂盒	7.5	3~10	5~20	SYPRO Ruby	LC-MS/MS	NCBIInr	[50]
小立碗藓 <i>P. patens</i>	配子托	酚抽提	13	4~7	15	CBB	LC-MS/MS	NCBI	[53]
杜氏盐藻 <i>D. salina</i>	悬浮细胞	酚/乙酸铵-甲醇	18	3~10 NL	11	CBB	MALDI-TOF-MS, nanoLC-MS/MS	NCBI	[55]
	质膜	裂解液		BN/PAGE	6~18	CBB	nanoLC-MS/MS	MSDB, NCBI	[54]

BN: 蓝色自然胶 Blue native; BPP: 硼砂-聚乙烯吡咯烷酮-酚抽提法 Borax-PVPP-Phe; CBB: 考马斯亮蓝染色 Coomassie brilliant blue; DIGE: 荧光差异凝胶电泳 Difference gel electrophoresis; EMBL: 欧洲分子生物学数据库 European molecular biology data library; ESI: 电喷雾电离 Electrospray ionization; IEF: 等点聚焦 Isoelectric focusing; EST: 表达序列标签数据库 Expressed sequence tag; IPG: 固相 pH 梯度 Immobilized pH gradients; iTRAQ: 同位素标记绝对和相对定量 Isobaric tag for absolute and relative quantification; LC: 液相色谱 Liquid chromatography; MALDI: 基质辅助激光解吸电离 Matrix assisted laser desorption ionization; MS: 质谱 Mass spectrometry; MSDB: 伦敦皇家学院蛋白质组学数据库 Proteomics database of Imperial College London; NCBIInr: 美国国立生物技术信息中心非单一蛋白质数据库 National Center for Biotechnology Information non identical; NL: 非线性 Nonlinear; PDB: 美国国家实验室蛋白质结构数据库 Protein data bank of America National Laboratory; PIR: 蛋白质信息资源数据库 Protein information resource; PPDB: 植物蛋白质组数据库 Plant proteomics data bank; Q: 四级杆 Quadrupole; SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; Swiss-Prot: 瑞士蛋白质序列数据库 Protein data bank of Swiss; TCA: 三氯乙酸 Trichloroacetic acid; TIGR: 美国基因组研究所数据库 The America Institute of Genomic Research Database; TOF: 飞行时间 Time of flight; Trap: 离子阱 Ion-trap.

细胞<sup>[44]</sup>、杜氏盐藻细胞<sup>[55]</sup>和质膜<sup>[54]</sup>、玉米叶绿体<sup>[36]</sup>、烟草叶片质外体<sup>[46]</sup>、水稻根质外体<sup>[30]</sup>和质膜<sup>[19,24]</sup>中盐胁迫应答蛋白质表达模式的动态变化(图 1 和表 1),发现单细胞中参与光合作用、碳和能

量代谢和 ROS 清除过程的蛋白质表达丰度变化差异显著;叶绿体通过增强光合作用、调节蛋白质的正确降解和折叠,以及维持氧化平衡来响应盐胁迫;在质外体应对盐胁迫过程中,细胞壁代谢、胁迫防御和



信号转导相关蛋白质受到了影响;质膜中参与维持膜结构稳定、物质/离子运输和信号转导过程的蛋白质在植物盐胁迫应答过程中具有重要的作用。

## 2 蛋白质样品制备技术策略

植物蛋白质样品制备是进行蛋白质组学分析的前提和关键. 由于植物细胞中富含蛋白酶、多糖、多酚、核酸、色素、有机酸及一些次生代谢物等,并且各种成分的种类与比例又因发育时期和生长环境不同而有所差异,因此针对不同材料,有效地去除(或抑制)植物细胞中的蛋白酶、细胞壁多酚、多糖、淀粉、脂类和多种次生代谢物质,减小对蛋白质分离和鉴定的影响,成为蛋白质样品制备的关键<sup>[56]</sup>. 目前应用于盐胁迫应答蛋白质组学研究的蛋白质样品制备方法主要包括:三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法、酚抽提/乙酸铵甲醇沉淀法以及两种方法的改良(图 1 和表 1).

### 2.1 三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法

TCA/丙酮沉淀法基于酸性或者疏水条件下蛋白质易于沉淀的特性来制备蛋白质样品,能够去除色素、脂类等杂质,并且操作简单快捷,因此该方法在盐胁迫蛋白质样品制备过程中被广泛应用,超过 60% 的相关研究中采用了 TCA 沉淀、丙酮沉淀或者 TCA/丙酮沉淀的方法制备样品. 但是,该方法对多糖等物质的去除效果并不理想.

### 2.2 酚抽提/乙酸铵甲醇沉淀法

酚抽提过程能够将蛋白质溶解于酚相,结合乙酸铵/甲醇沉淀可以有效去除脂类、多糖等杂质,因此,酚抽提/乙酸铵甲醇沉淀法已经应用在拟南芥<sup>[17]</sup>、水稻<sup>[20,27]</sup>、葡萄<sup>[48]</sup>、番茄<sup>[41]</sup>和杜氏盐藻<sup>[55]</sup>盐胁迫响应的蛋白质组研究. 然而,该方法与 TCA/丙酮沉淀法一样,不能解决蛋白质干粉难以完全重新溶解的问题,并且样品制备过程复杂,所需时间长. 此外,在盐胁迫响应蛋白质组学研究中,植物材料中含有的高浓度盐分会影响电泳的等电聚焦过程<sup>[57]</sup>.

### 2.3 上述两种方法的改良方法

Wang 等<sup>[57]</sup>改进的硼砂-聚乙烯吡咯烷酮-酚抽提法(Borax/PVPP/Phe 抽提法,BPP 抽提法)所采用的提取液中含有硼砂和聚乙烯吡咯烷酮,能够很好地去掉植物材料中的多糖、多酚以及酚醛类物质,同时,提取液中的抗坏血酸和  $\beta$ -巯基乙醇作为强还原剂能够抑制酚类物质氧化,而硼砂与抗坏血酸已经被证实对多种植物的顽固组织(recalcitrant tissue)

和储藏器官蛋白质的分离提取具有较好的效果. 经过这种抽提后,再利用饱和硫酸铵-甲醇沉淀的方法能够使蛋白质沉淀更加完全. 该研究组应用此方法对盐生植物盐角草幼苗中盐胁迫响应蛋白质组进行分析,检测到 196 个盐响应差异蛋白质点. 这些盐胁迫应答相关蛋白质主要参与光合作用与碳和能量代谢过程<sup>[52]</sup>.

## 3 蛋白质样品的分离与检测技术策略

### 3.1 双向电泳

双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是一种高通量的蛋白质样品分离技术. 等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)可以分别根据蛋白质的等电点和分子量对其进行分离. 同时,双向电泳仪器的改进和蛋白质凝胶染色技术的更新大大提高了 2-DE 的重现性和分辨率,使之成为蛋白质组学研究的重要技术平台之一.

**3.1.1 IPG 胶条的选择** 近年来,随着商品化固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条长度和 pH 范围的不断完善,已经逐渐取代了自制管胶,成为等电聚焦的重要载体材料. 在已报道的植物盐胁迫响应蛋白质组学研究中,多种长度(7、7.5、11、12、13、17、18 或 24 cm)与 pH 范围(3~10、3.5~10、4~7 或 5~8)的 IPG 胶条或自制管胶被使用(图 1 和表 1). 增加胶条长度并/或缩小胶条 pH 范围有利于分离并在双向电泳凝胶上获得更多的蛋白质斑点. Pang 等<sup>[17]</sup>采用 pH 4~7、24 cm 长的 IPG 胶条对拟南芥叶片蛋白质进行了分离,共检测到约 1100 个蛋白质点,而在碱蓬叶片蛋白质组的研究中采用 pH 4~7 的 18 cm IPG 胶条检测到 700 余个蛋白质点<sup>[51]</sup>.

**3.1.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)** SDS-PAGE 凝胶浓度会影响蛋白质样品根据分子量大小的分离. 在植物盐胁迫响应蛋白质组学研究中多采用均一浓度凝胶,凝胶浓度为 10%<sup>[33]</sup>、11%<sup>[38,55]</sup>、11.5%<sup>[24]</sup>、12%<sup>[15-16,19,21,26-27,29,36,46]</sup>、15%<sup>[53]</sup> 或 12.5%<sup>[14,17,25,28,32,37,39,41-42,49,51-52]</sup>(图 1 和表 1). 较高浓度的 SDS-PAGE 凝胶有助于低分子量蛋白质的分离. Wang 等<sup>[34]</sup>在对小麦耐盐蛋白质组研究中采用了 12.5% 和 10% 两种浓度的凝胶,10% 的凝胶能够分离蛋白质分子量范围为 31.0~97.4 kDa,而 12.5% 的凝胶可使检测的最低分子量达到 14.4 kDa.

也有研究采用了分离胶与浓缩胶(浓度小于5%)相结合的方法<sup>[18,20,22-23,40,43,47]</sup>(图1和表1),希望能够通过浓缩胶首先将蛋白质样品浓缩到一个小的区域,之后再经过分离胶得到更好的分离效果.然而,在2-DE分离过程中,等电聚焦过程已经利用非限制性、低丙烯酰胺浓度的IPG胶条取代浓缩胶,起到了对蛋白质样品浓缩的作用<sup>[58]</sup>,因此在SDS-PAGE过程中不再需要使用浓缩胶.

### 3.2 凝胶染色

蛋白质凝胶染色方法的灵敏度决定了蛋白质样品的检测效率.目前盐胁迫应答蛋白质组学研究的染色方法主要包括考马斯亮蓝(coomassie brilliant blue, CBB)染色、硝酸银染色和各种荧光染料染色(图1和表1).CBB染色法和硝酸银染色法是普遍采用的两种染色方法.

**3.2.1 考马斯亮蓝(CBB)染色** CBB染色法经济实用、操作简单、背景清晰,染色得到的蛋白质点可直接被用于后续的质谱分析<sup>[58]</sup>,但是其检测灵敏度低、检测动态范围小,尽管经过不断地改进已经可以对纳克(ng)级的蛋白质点进行检测<sup>[58-59]</sup>,但仍无法满足一些需要精确定量和低丰度蛋白质样品检测的要求.

**3.2.2 硝酸银染色** 与CBB染色法相比,硝酸银染色法检测灵敏度高,可以检测到0.1 ng的蛋白质点<sup>[58]</sup>.Wang等<sup>[34]</sup>在对小麦盐胁迫应答机制进行的研究中采用了CBB和硝酸银染色两种染色方法,分别得到650和1100左右的蛋白质点.但是硝酸银染色法操作复杂、重复性差、背景高,并且染色过程中醛类物质的使用还会影响质谱分析的兼容性,限制了该方法的应用<sup>[58-59]</sup>.

**3.2.3 荧光染料染色** 荧光染料可以提高对蛋白质样品检测的灵敏度.目前在植物盐胁迫应答蛋白质组学研究中采用较多的主要是用于荧光差异凝胶电泳(difference gel electrophoresis, DIGE)的cy2、cy3和cy5染色技术<sup>[16,42]</sup>、SYPRO Ruby染色技术<sup>[20,50]</sup>,以及用于磷酸化蛋白质分析的荧光染色技术.

2D-DIGE是“第二代”蛋白质组学技术的代表之一,该方法将不同荧光染料(cy2、cy3和cy5)分别标记的对照与处理样品等量混合后进行2-DE电泳分离,将所得蛋白质谱图应用DeCyder™差异图像分析软件进行分析,实现了在同一张凝胶上同时对2种蛋白质样品进行分离和比对分析<sup>[60]</sup>,最低可以检测到0.25 ng的蛋白质样品斑点,大大减小了实验误差,提高实验的可重复性和定量的准确性.因此,

2D-DIGE有利于低丰度蛋白质的检测和微量样品的分析<sup>[61]</sup>.Ndimba等<sup>[16]</sup>应用2D-DIGE对盐胁迫条件下的拟南芥细胞悬浮培养物进行了蛋白质组学研究,共检测到2949个蛋白质点,其中差异表达蛋白质点为266个.此外,对番茄根的蛋白质组学研究也采用了2D-DIGE技术,检测到包含37个差异点在内的384个蛋白质点<sup>[42]</sup>.然而,由于通过DIGE技术得到的凝胶上的蛋白质点中所含有的蛋白质丰度不足以进行质谱分析,因此还需要通过制备凝胶(preparative gel)获得足够的蛋白质样品,从而获得差异表达蛋白质斑点的胶粒来进行质谱分析<sup>[56]</sup>.

SYPRO Ruby是一种与Edman降解测序和质谱鉴定相兼容的荧光染色方法.该方法能够对ng级的蛋白质样品进行检测,并且SYPRO Ruby与蛋白质丰度成很好的线性关系.Tada等<sup>[50]</sup>应用SYPRO Ruby染料对盐胁迫条件下红树科植物木榄的蛋白质组进行了分析,发现果糖-1,6-二磷酸醛缩酶和渗透调蛋白在盐胁迫应答过程中具有重要作用.

### 3.3 蛋白质翻译后修饰的研究方法

**3.3.1 同工型蛋白质的研究方法** 2DE凝胶可用于直接检测因翻译后修饰(尤其是磷酸化和糖基化修饰)形成的多个同工型蛋白质斑点.Vincent等<sup>[49]</sup>对不同葡萄品种盐胁迫和水分胁迫蛋白质组的变化进行分析,鉴定得到的191个蛋白质点中43.5%为同工型蛋白质,其中核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)大亚基存在5种同工型,ATP合成酶 $\beta$ 亚基、微管蛋白 $\alpha$ 亚基和TSR(transformer serine/arginine-rich ribonucleoprotein)存在4种同工型,OEE2蛋白(oxygen evolving enhancer protein 2)存在3种同工型,肌动蛋白、抗坏血酸过氧化物酶、热激蛋白70、RNA结合蛋白、NAD依赖型山梨醇脱氢酶和翻译调控肿瘤蛋白同源物各具有2种同工型.Ndimba等<sup>[16]</sup>应用DIGE技术对盐胁迫和渗透胁迫条件下拟南芥蛋白质组进行分析,鉴定得到的75种差异表达蛋白质中31种为同工型蛋白质.此外对小立碗藓<sup>[53]</sup>以及小麦<sup>[32,34]</sup>等多个物种进行的盐响应蛋白质组学研究也发现多种蛋白质被修饰.这些被修饰的蛋白质可能对于盐胁迫条件下调节蛋白质功能、促进植物体对胁迫条件的应答具有重要作用.

**3.3.2 磷酸化蛋白质的研究方法** 磷酸化作为一种重要的蛋白质翻译后修饰方式,在植物盐胁迫应答的信号转导和转录调控过程中具有重要作用<sup>[62]</sup>.Pro-Q Diamond荧光染料能够在无同位素标记和特

异性抗体结合的情况下直接对聚丙烯酰胺凝胶中的磷酸化蛋白质进行染色,通过荧光扫描仪直接显示和分析磷酸化蛋白质,并且可以根据荧光强度对蛋白质磷酸化水平进行比较. Pro-Q Diamond 经常与 SYPRO Ruby 配合使用,从而实现对磷酸化蛋白质的检测. Chitteti 等<sup>[20]</sup>应用这两种荧光染料对盐胁迫应答过程中水稻根磷酸化蛋白质进行了研究. 在检测到的 28 种差异表达磷酸化蛋白质中,54.5% 的磷酸化蛋白质定位于膜上,而 17.4% 的蛋白质参与了转运过程,并且具有核苷酸结合活性和催化活性的蛋白质均为 21.5%,这表明盐胁迫过程中磷酸化蛋白质可能具有特定作用. 此外, Jain 等<sup>[44]</sup>应用 Pro-Q Diamond 染料对花生愈伤组织细胞盐响应过程中的磷酸化蛋白质进行研究,鉴定得到了 RNA 结合蛋白、14-3-3 蛋白、热激蛋白 70 和多种病程相关蛋白质 (pathogenesis-related protein, PR 蛋白),并对不同磷酸化水平的 PR 蛋白在盐胁迫响应过程中的作用进行了深入分析.

### 3.4 定量蛋白质组学研究策略

2-DE 对于极端性质蛋白质 (如疏水性膜蛋白、极酸性/极碱性蛋白质、极高分子量/极低分子量蛋白质,以及低丰度蛋白质) 的分离与定量仍具有一定的局限性<sup>[56]</sup>. 同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tag for relative and absolute quantification, iTRAQ) 技术的出现一定程度上解决了疏水性膜蛋白分离和蛋白质样品精确定量的问题<sup>[17,63]</sup>. iTRAQ 技术以标记伯氨基的方法对样品中的所有肽段或蛋白质进行标记,通过肽段在二级裂解过程中的中性丢失现象产生的质量数为 114、115、116 和 117 的小分子质谱峰来定量,并可以进行多重定量标记<sup>[64]</sup>. 目前已经可以对 8 个样品同时标记,大大提高了分析效率,减小了实验误差. Pang 等<sup>[17]</sup>采用 iTRAQ 结合 LC-MS 技术作为传统 2-DE 的补充,对 NaCl 处理的拟南芥、盐芥微粒体蛋白质组变化进行了比较 (图 1 和表 1),分别鉴定得到 32 和 31 种差异表达蛋白质,其中大部分为叶绿体膜、线粒体膜和质膜相关蛋白质.

### 3.5 蓝色自然胶/SDS-PAGE 电泳

蓝色自然胶电泳 (blue-native/SDS-PAGE, BN/SDS-PAGE) 是分析蛋白质复合体的有效技术手段. 在样品制备和第一向电泳过程中均不含有 SDS 等变性剂和二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 等还原剂,保持了蛋白质复合体的天然状态,通过对不同样品中蛋白质复合体稳定性和亚基组成的变化来解释不

同生长时期或者处理条件下蛋白质复合体的表达差异. 在第二向 SDS-PAGE 电泳时,结合使用变性剂,将蛋白质复合体成员分离,从而明确蛋白质复合体的组成. Katz 等<sup>[54]</sup>采用此技术对盐胁迫条件下杜氏盐藻质膜蛋白质组变化进行了分析 (图 1 和表 1),共鉴定到 55 种蛋白质,其中约 60% 为膜整合蛋白或者膜相关蛋白质,推测杜氏盐藻质膜相关蛋白质复合体表达的变化可能有利于其在高盐胁迫条件下维持膜结构的稳定性.

## 4 蛋白质鉴定与生物信息学分析技术策略

### 4.1 蛋白质 Edman 降解鉴定技术

Edman 降解法是传统的蛋白质鉴定方法,利用三氟乙酸水解苯异硫氰酸酯与肽链 N-端氨基酸残基形成的苯氨基硫甲酰衍生物释放出 N-端氨基酸,经环化作用形成的苯乙内酰硫脲 (phenylthiohydantoin, PTH) 衍生物 (即 PTH-氨基酸) 可以通过高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 技术进行鉴定,实现从蛋白质 N 端开始对序列中氨基酸的逐个鉴定,从而获得完整序列信息. 在对盐胁迫条件下水稻叶鞘<sup>[18]</sup>、葡萄<sup>[48]</sup>和马铃薯<sup>[43]</sup>蛋白质组的研究中采用了该方法进行差异点鉴定 (图 1 和表 1). 但是此方法费时费力,难以实现高通量分析,而且对于 N 端封闭的肽段无法进行测序分析<sup>[26]</sup>. 因此也有研究同时采用了 Edman 降解和质谱技术对差异蛋白质点进行鉴定. Aghaei 等<sup>[40]</sup>对大豆根和胚轴盐应答蛋白质组研究检测到了 7 个差异表达蛋白质点,其中利用 Edman 降解技术测定了 6 个蛋白质斑点,另有一个 N 端封闭的肽段通过生物质谱技术鉴定为胚胎发育晚期丰富蛋白 (late embryogenesis abundant protein, LEA 蛋白).

### 4.2 蛋白质生物质谱鉴定技术

20 世纪 80 年代末,基质辅助激光解吸电离 (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) 和电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 这两种软电离技术出现,并与各种质量分析器 [如:四极杆 (quadrupole, Q)、飞行时间 (time-of-flight, TOF) 或离子阱 (ion-trap, IT)] 进行组合,产生了多种类型的生物质谱仪 (mass spectrometry, MS). 生物质谱具有高灵敏度、高通量等特点,可以对 pmol ( $10^{-12}$  mol) 至 fmol ( $10^{-15}$  mol) 水平的蛋白质 (多肽) 进行准确的质量数分析,并且可以分析蛋白质表达丰度、翻译后修饰状态/位点,以及蛋白质相互作用,成为蛋白质组学研究的核心技术. 其中, MALDI-TOF MS/MS、ESI-Q-TOF



MS 和 ESI-Q-Trap MS 是目前植物盐胁迫蛋白质组学研究中广泛应用的质谱仪(图1和表1)。

**4.2.1 MALDI-TOF MS/MS 鉴定策略** 在 MALDI-TOF MS/MS 中,先将蛋白质(多肽)溶液与基质分子混合形成晶体,通过激光照射使晶体中的基质分子积蓄能量并迅速产热直至升华,致使基质和蛋白质(多肽)分子离子化为单电荷离子,进而通过 TOF 将不同质量数的蛋白质(多肽)分子分离。此种质谱仪自动化程度高、速度快,对蛋白质样品中去污剂和盐离子的耐受性强<sup>[56]</sup>,能够对大多数蛋白质(多肽)进行高通量鉴定。目前,大约有 50% 的盐胁迫蛋白质组学研究采用此技术对差异表达蛋白质进行鉴定。但是, MALDI-TOF 鉴定技术对数据库的完整性要求较高,适用于基因组或者 EST 数据库信息较为详细完整的物种的鉴定<sup>[26]</sup>,因此 MALDI-TOF 主要应用于拟南芥<sup>[15-16]</sup>、水稻<sup>[19-21,23-25,27-30]</sup>和葡萄<sup>[49]</sup>等基因组信息完整物种的盐胁迫差异蛋白质鉴定。此外,对小麦<sup>[32-35]</sup>、玉米<sup>[36-37]</sup>和粟<sup>[39]</sup>等禾本科植物以及盐角草<sup>[52]</sup>的研究中也应用了 MALDI-TOF 质谱鉴定技术。

**4.2.2 ESI-MS/MS 鉴定策略** ESI 技术通过在毛细管出口处施加高电压所形成的高电场,使从毛细管流出的蛋白质(多肽)离子化,进而以多电荷或单电荷离子的形式进入质量分离器,电荷数的增加降低了检测样品的质/荷比( $m/z$ ),从而扩展了分子量的分析范围。在电喷雾电离源后面,将四极杆质量分析器与飞行时间质量分析器或离子阱质量分析器串联,可以将多肽进一步打碎为氨基酸,从而完成氨基酸序列分析。在对豌豆<sup>[45]</sup>、花生<sup>[44]</sup>、烟草<sup>[46]</sup>、番茄<sup>[41]</sup>、碱蓬<sup>[51]</sup>、木榄<sup>[50]</sup>、小立碗藓<sup>[53]</sup>和杜氏盐藻<sup>[54]</sup>等非模式植物盐胁迫差异蛋白质的鉴定中,较多地使用了 ESI-MS/MS 鉴定技术。

**4.2.3 联合使用 MALDI-TOF MS/MS 和 ESI-MS/MS 的鉴定策略** 将 MALDI-TOF MS/MS 和 ESI-MS/MS 两种质谱技术联合使用,更有利于通过不同的离子化方式鉴定蛋白质。例如, Liska 等<sup>[55]</sup>用这种方法鉴定了杜氏盐藻盐胁迫差异蛋白质组中约 80% 的蛋白质。对水稻根<sup>[26]</sup>和大麦根<sup>[38]</sup>的盐胁迫差异蛋白质组的研究中也采用了这种鉴定策略。

#### 4.3 数据库搜索

随着蛋白质组学技术的不断发展,相应的蛋白质组数据库也在不断地建立和完善。目前在植物盐胁迫蛋白质组学研究所采用的数据库包括 NCBI nr (National Center for Biotechnology Information

non identical,美国国立生物技术信息中心非单一蛋白质数据库)、SWISS-PROT(瑞士蛋白质序列数据库)、PIR (Protein Information Resource,蛋白质信息资源数据库)、GenPept、PDB (Protein Data Bank,美国国家实验室蛋白质结构数据库)、EMBL (European Molecular Biology Laboratory,欧洲分子生物学数据库)、MSDB (伦敦皇家学院蛋白质组学数据库)、TIGR (The America Institute of Genomic Research Database,美国基因组研究所数据库)等(图1和表1)。其中约 50% 的盐胁迫差异蛋白质组学研究中采用了 NCBI nr 数据库,该数据库中的条目按 GenBank CDS 翻译库 (GenBank 编码序列翻译库)、PIR、SWISS-PROT、PRF (日本蛋白质研究基金会数据库)和 PDB 编录,并且为这些数据库中的序列信息提供了相互参照引用,避免了重复。此外,为了得到更为详尽、精准的蛋白质鉴定信息,研究人员在对小麦<sup>[32-34]</sup>、大豆<sup>[40]</sup>、马铃薯<sup>[43]</sup>和碱蓬<sup>[51]</sup>等基因组信息不清楚的植物进行的研究中,将质谱数据在多个数据库进行搜索,提高了蛋白质的鉴定率。

#### 5 存在的问题

植物耐盐性受到多基因网络体系的调控,各种信号与代谢途径之间相互交错、彼此关联。蛋白质组学技术体系为从整体上研究盐胁迫相关代谢和信号网络提供了可能,但是由于受到技术方法的限制,仍然存在如下不足:1) 极端性质蛋白质的分离和鉴定技术还不成熟。利用 2DE-MS 技术,仅能够实现参与光合作用、能量和物质代谢、蛋白质代谢,以及胁迫防御等过程的中高丰度蛋白质进行检测,而对参与关键调控过程的转录因子、信号转导途径相关的低丰度表达蛋白质检测效率低。此外,由于受到 IPG 胶条和 SDS-PAGE 凝胶浓度的限制,对于膜蛋白、极高(低)分子量蛋白质和极酸(碱)性蛋白质的分离很难实现。2) 蛋白质翻译后修饰分析技术有待完善。尽管通过双向电泳技术可以得到一些同工型信息,并通过荧光染料染色技术可以对蛋白质修饰类型进行推测,但是翻译后修饰种类繁多,很难利用现有技术高通量地分析某种特定的翻译后修饰。目前盐胁迫蛋白质组研究中仅对磷酸化修饰蛋白质在胁迫应答过程中的表达丰度变化进行了分析<sup>[20,44]</sup>,仍缺乏对于修饰位点的准确分析。3) 由于不同实验室使用的技术体系存在差异,很难进行实验室间研究结果的比较。因此,进一步完善相关技术体系是今后丰富植物盐胁迫响应蛋白质组学研究策略的前提。



## 参考文献

- [1] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 2002, **25**: 239–250
- [2] Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **60**: 324–349
- [3] Flowers TJ, Colmer TD. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 2008, **179**: 945–963
- [4] Munns R. Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, 2005, **167**: 645–663
- [5] Jiang YQ, Deyholos MK. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biology*, 2006, **6**: 25
- [6] Chao DY, Luo YH, Shi M, *et al.* Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis. *Cell Research*, 2005, **15**: 796–810
- [7] Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, *et al.* Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 2001, **13**: 889–905
- [8] Walia H, Wilson C, Condamine P, *et al.* Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology*, 2005, **139**: 822–835
- [9] Taji T, Seki M, Satou M, *et al.* Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology*, 2004, **135**: 1697–1709
- [10] Wang ZL, Li PH, Fredricksen M, *et al.* Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. *Plant science*, 2004, **166**: 609–616
- [11] Dai S-J (戴绍军). Research advances on pollen proteomics. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 2007, **24**(3): 319–329 (in Chinese)
- [12] Joseph B, Jini D. Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2010, **9**: 307–313
- [13] Khan PSSV, Hoffmann L, Renaut J, *et al.* Current initiatives in proteomics for the analysis of plant salt tolerance. *Current Science*, 2007, **93**: 807–817
- [14] Pang QY, Chen SX, Dai SJ, *et al.* Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research*, 2010, **9**: 2584–2599
- [15] Abbasi FM, Komatsu S. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics*, 2004, **4**: 2072–2081
- [16] Kim DW, Rakwal R, Agrawal GK, *et al.* A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. *Electrophoresis*, 2005, **26**: 4521–4539
- [17] Parker R, Flowers TJ, Moore AL, *et al.* An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany*, 2006, **57**: 1109–1118
- [18] Sengupta S, Majumder AL. Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: A physiological and proteomic approach. *Planta*, 2009, **229**: 911–929
- [19] Jiang YQ, Yang B, Harris NS, *et al.* Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**: 3591–3607
- [20] Chitteti BR, Peng ZH. Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. *Journal of Proteome Research*, 2007, **6**: 1718–1727
- [21] Li XJ, Yang MF, Chen H, *et al.* Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: Proteomic evidence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, **1804**: 929–940
- [22] Salehdeh GH, Siopomgep J, Wade LJ, *et al.* A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research*, 2002, **76**: 199–219
- [23] Yan S, Tang Z, Su W, *et al.* Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 2005, **5**: 235–244
- [24] Kim YO, Pan S, Jung CH, *et al.* A zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein, atRZ-1a, has a negative impact on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under salt or drought stress conditions. *Plant and Cell Physiology*, 2007, **48**: 1170–1181
- [25] Wen FP, Zhang ZH, Bai T, *et al.* Proteomics reveals the effects of gibberellic acid (GA3) on salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant Science*, 2010, **178**: 170–175
- [26] Dooki AD, Mayer-Posner FJ, Askari H, *et al.* Proteomic responses of rice young panicles to salinity. *Proteomics*, 2006, **6**: 6498–6507
- [27] Ndimba BK, Chivasa S, Simon WJ, *et al.* Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2005, **5**: 4185–4196
- [28] Zhang L, Tian LH, Zhao JF, *et al.* Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*, 2009, **149**: 916–928
- [29] Cheng YW, Qi YC, Zhu Q, *et al.* New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics*, 2009, **9**: 3100–3114
- [30] Malakshah SN, Rezaei MH, Heidari M, *et al.* Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Biochemistry, Biotechnology and Biochemistry*, 2007, **71**: 2144–2154
- [31] Flowers TJ. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**: 307–319
- [32] Caruso G, Cavaliere C, Guarino C, *et al.* Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **391**: 381–390
- [33] Peng ZY, Wang MC, Li F, *et al.* A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, **8**: 2676–2686
- [34] Wang MC, Peng ZY, Li CL, *et al.* Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. *Proteomics*, 2008, **8**: 1470–1489
- [35] Huo C-M (霍晨敏), Zhao B-C (赵宝存), Ge R-C (葛荣朝), *et al.* Proteomic analysis of the salt tolerance mutant of wheat under salt stress. *Acta Genetica*

- Sinica* (遗传学报), 2004, **31** (12): 1408–1414 (in Chinese)
- [36] Zörb C, Herbst R, Forreiter C, *et al.* Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. *Proteomics*, 2009, **9**: 4209–4220
- [37] Zörb C, Schmitt S, Neeb A, *et al.* The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science*, 2004, **167**: 91–100
- [38] Witzel K, Weidner A, Surabhi GK, *et al.* Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**: 3545–3557
- [39] Veeranagamallaiah G, Jyothsnakumari G, Thippeswamy M, *et al.* Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedling. *Plant Science*, 2008, **175**: 631–641
- [40] Aghaei K, Ehsanpour AA, Shah AH, *et al.* Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids*, 2009, **36**: 91–98
- [41] Chen S, Gollop N, Heuer B. Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: Effect of genotype and exogenous application of glycine-betaine. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**: 2005–2019
- [42] Keeler M, Letarte J, Hattrup E, *et al.* Two-dimensional differential in-gel electrophoresis (DIGE) of leaf and roots of *Lycopersicon esculentum*. *Methods in Molecular Biology*, 2007, **355**: 157–174
- [43] Aghaei K, Ehsanpour AA, Komatsu S. Proteome analysis of potato under salt stress. *Journal of Proteome Research*, 2008, **7**: 4858–4868
- [44] Jain S, Srivastava S, Sarin NB, *et al.* Proteomics reveals elevated levels of PR 10 proteins in saline-tolerant peanut (*Arachis hypogaea*) calli. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, **44**: 253–259
- [45] Nat NVK, Sanjeeva S, Laksiri G, *et al.* Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. *Annals of Applied Biology*, 2004, **145**: 217–230
- [46] Dani V, Simon WJ, Duranti M, *et al.* Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*, 2005, **5**: 737–745
- [47] Razavizadeh R, Ehsanpour AA, Ahsan N, *et al.* Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. *Peptides*, 2009, **30**: 1651–1659
- [48] Jellouli N, Ben Jouira H, Skouri H, *et al.* Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 2008, **165**: 471–481
- [49] Vincent D, Ergul A, Bohlman MC, *et al.* Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**: 1873–1892
- [50] Tada Y, Kashimura T. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant and Cell Physiology*, 2009, **50**: 439–446
- [51] Askari H, Edqvist J, Hajheidari M, *et al.* Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics*, 2006, **6**: 2542–2554
- [52] Wang XC, Fan PX, Song HM, *et al.* Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in shoots of *Salicornia europaea* under different salinity. *Journal of Proteome Research*, 2009, **8**: 3331–3345
- [53] Wang XQ, Yang PF, Gao Q, *et al.* Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta*, 2008, **228**: 167–177
- [54] Katz A, Waridel P, Shevchenko A, *et al.* Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, **6**: 1459–1472
- [55] Liska AJ, Shevchenko A, Pick U, *et al.* Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiology*, 2004, **136**: 2806–2817
- [56] Chen SX, Harmon AC. Advances in plant proteomics. *Proteomics*, 2006, **6**: 5504–5516
- [57] Wang XC, Li XF, Deng X, *et al.* A protein extraction method compatible with proteomic analysis for the euhalophyte *Salicornia europaea*. *Electrophoresis*, 2007, **28**: 3976–3987
- [58] Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004, **4**: 3665–3685
- [59] Wang XC, Li XF, Li YX. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnology Letters*, 2007, **29**: 1599–1603
- [60] Barbier-Brygoo H, Joyard J. Focus on plant proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, **42**: 913–917
- [61] Fu CX, Hu J, Liu T, *et al.* Quantitative analysis of redox-sensitive proteome with DIGE and ICAT. *Journal of Proteome Research*, 2008, **7**: 3789–3802
- [62] Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, **53**: 247–273
- [63] Zhu MM, Dai SJ, McClung S, *et al.* Functional differentiation of *Brassica napus* guard cells and mesophyll cells revealed by comparative proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, **8**: 752–766
- [64] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, **3**: 1154–1169

作者简介 张恒,女,1983年生,博士研究生.主要从事分子细胞生物学研究,发表论文5篇. E-mail: hrb-zhang@hotmail.com

责任编辑 李凤琴