

蛋白质组学在植物水分胁迫应答中的应用研究进展

李国龙¹, 吴海霞², 孙亚卿¹

(1 内蒙古农业大学 农学院, 呼和浩特 010018; 2 内蒙古自治区水利科学研究院, 呼和浩特 010020)

摘要: 水分胁迫是影响植物生长发育的主要生长因子。通过蛋白质组学技术可对水分胁迫下植物差异变化的蛋白和基因进行挖掘, 在研究植物抗旱生理机制方面意义重大。总结了植物蛋白质组学的基本方法与关键技术, 同时从光合与碳代谢相关蛋白、抗氧化系统、渗透调节蛋白、热激蛋白、胚胎发育晚期丰富蛋白、转录因子等方面综述了近几年国际上在植物水分胁迫蛋白质组研究方面的进展, 并展望了今后蛋白质组学技术发展的方向。

关键词: 植物; 蛋白质组学; 水分胁迫

中图分类号: Q946.1

文献标志码: A

Proteome and Its Applied Advances in Plant Drought Stress Response

LI Guolong¹, WU Haixia², SUN Yaqing¹

(1 College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2 Inner Mongolia Research Institute for Water Conservancy, Hohhot 010020, China)

Abstract: Plants are susceptible to infect drought stress during growth and development. It is specially significant to the proteomics in the study of physiological mechanisms of plant drought stress by exploring the different proteins and genes under the drought stress conditions. This paper reviewed the concept and research methods of proteomic, and current progress of plant drought stress, included in their photosynthesis and C metabolism, antioxidant enzyme systems, osmoregulation protein, heat shock protein (HSP), late embryogenesis abundant proteins (LEA) and transcription factors etc. At the same time, some proposals were put forward for future research.

Key words: plant; proteomics; drought stress.

水分胁迫等多种不利的环境因子是影响植物正常生长、发育的主要因素, 导致植物生长受抑, 产量降低, 甚至死亡。植物主要通过两种方式来响应逆境胁迫: 一是通过某种固有生理机制避开逆境胁迫, 如种子成熟; 二是通过某种主动可逆调控机制来增强对逆境的适应^[1-2], 而后者是植物抵抗逆境的主要方式。这种适应机制通常是由于某些基因的表达发生变化, 最终引起植物在转录组、蛋白质组、代谢组水平上产生不同的应答。目前一些研究已经证实基因表达在转录水平上的变化常常与蛋白质的变化并

不一致^[3-4], 因此准确地从 mRNA 变化水平来推测细胞内蛋白质浓度变化是困难的。然而, 蛋白质作为基因功能的执行者, 直接参与植物对逆境的响应。这种响应不仅体现在代谢水平上酶种类和活性的直接变化, 还体现在通过对转录与翻译水平的调控, 使得植物细胞膜、细胞质、细胞骨架以及细胞内诸多蛋白质成分在结构和功能上发生变化, 进而调控植物对胁迫的适应。因此, 研究植物在逆境条件下蛋白质水平上的反应, 对我们了解植物抗逆性生理机制有重要意义。利用蛋白质组学技术手段可对发生变

收稿日期: 2015-05-10; 修改稿收到日期: 2015-07-27

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2012MS0305); 国家自然科学基金(31360355)

作者简介: 李国龙(1977—), 男, 博士, 副教授, 从事植物生理生化及分子生物学研究。E-mail: lg19@sina.com

化的潜在功能蛋白进行定性和定量鉴定,确定参与抗逆的相关因子,明确植物与逆境间的防御关系,是全面了解植物逆境胁迫机制的有力手段。为此,本文综述了蛋白质组学研究的基本方法以及近几年在植物水分胁迫应答研究中的最新研究进展,以期为今后植物应答干旱胁迫研究提供参考。

1 蛋白质组学研究的基本方法

1.1 蛋白质检测和分离手段

双向电泳技术是目前进行蛋白质组差异分离的经典方法,在 20 世纪 70 年代产生并发展至今^[5-6]。该技术基于蛋白质的等电点和分子量的不同,通过等电聚焦将具有相等等电点的蛋白质聚焦在某一特定位置,然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)按分子量的不同将复杂蛋白混合物中的蛋白质在二维平面上分开。然后对凝胶进行考马斯亮兰染色、银染或荧光染色,利用相关软件对电泳图象进行分析。虽然该技术仍然是目前大规模分离蛋白质的首选技术,但也存在一定程度的不足,如实验结果可重复性不强,难以得到完全相同的分离结果;一些大分子、疏水蛋白、难溶性蛋白难以分离、检测等^[7-9]。

近年来,针对上述的不足,一系列新技术的介入为该研究方法提供了较好的补充与完善。荧光差异凝胶电泳(Differential gel electrophoresis, DIGE)是通过使用不同同位素与不同荧光染料同时标记不同处理的蛋白,使得不同处理的多个样品蛋白能够在同一块胶上被区分和鉴定,这样极大地提高了实验的灵敏度与可重复性,增强了结果的可靠性^[10-13]。同时,为增加疏水蛋白的可溶性,一些高效的疏水蛋白助溶剂也在被不断地改进和研发,如 Brij、CHAPS 和 ASB14 等^[14]。对于一些质量极端(很大或很小)、疏水性很强或 pH 值很高的蛋白质,不断发展完善的 MuD-PIT 技术则采用了强阳离子交换与反相色谱相结合来分离、分析多肽,使得尽可能多的蛋白质被分离、鉴定成为可能^[14-16]。上述研究方法的发展已经使蛋白质定性研究趋于完善,但对体系内蛋白质进行精确的定量和鉴定仍难以实现,鸟枪法蛋白组技术克服了传统策略对蛋白质定量的诸多问题,成为继双向电泳技术之后一种敏感、准确的定量蛋白质变化的新方法,被称为第二代蛋白质组学技术^[17]。

最早由 Gygi 等^[18]提出同位素亲和标签技术(isotope affinity coded tag, ICAT)是一种能比较 2 个不同样品中含半胱氨酸残基的特异性蛋白的标签策

略。分别通过重链和轻链标记 2 组样品后混合,经液相色谱分离质谱鉴定差异表达蛋白。ICAT 标记的肽段信号强度可对 2 组样品中同一蛋白的相对丰度进行定量。ICAT 技术可降低样品的复杂性,但其对半胱氨酸残基的特异性意味着那些有重要功能但不含半胱氨酸的蛋白将会被缺失。为了克服 ICAT 技术的这一主要局限,美国应用生物系统公司(Applied Biosystems Incorporation, ABI)开发了一种新的、功能强大的绝对和相对定量研究方法,即同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)^[19]。该技术可同时对 8 组样品进行定性和定量分析,通过 iTRAQ 试剂对肽段 N 端及赖氨酸侧链氨基标记同重元素(isobaric),标记后不同样本间的同一蛋白表现为相同的质荷比,而在二级质谱中,肽段丢失平衡基团后信号离子表现为不同质荷比的峰,根据波峰的高度及面积可以定量不同样品间的同一蛋白^[14,20]。细胞培养条件下稳定同位素标记技术(stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)是另一种细胞培养的体内标记策略,该技术采用含有轻、重同位素型必需氨基酸的培养基进行细胞培养,细胞传代若干代后,细胞内蛋白被同位素稳定标记,将蛋白质等量混合后进行分离和质谱鉴定,根据一级质谱图中两个同位素型肽段的面积比较进行相对定量。鉴于植物可利用硝酸盐中的氮合成氨基酸,故在植物研究中常用¹⁵N-KNO₃进行标记,并已应用到拟南芥的研究中,但该方法能否完全适合在植物细胞研究中应用还存在争议^[21-22]。

蛋白质芯片技术是一种高通量、高灵敏度、自动化程度高的蛋白质分析技术,它可以用于研究蛋白与蛋白、蛋白与核酸之间的相互作用、蛋白质的亚细胞定位以及蛋白质功能的生物化学分析等,特别在不同翻译后修饰蛋白质的鉴定上应用较多^[23-24]。

1.2 质谱鉴定

随着 John B. Fenn 发明了电喷雾离子化(Electrospray ionization, ESI)质谱,为利用质谱分离生物大分子提供了可能^[25]。目前,质谱技术已成为了研究蛋白质组学最重要的突破之一,已在蛋白质组学研究中处于核心地位^[26-27]。目前已成功应用到包括蛋白的定量鉴定、蛋白互作研究、定量蛋白质组学分析等方面。其基本原理是通过电离源将样品分子离子化,然后根据不同离子间质荷比(m/z)的差异来进行蛋白质分离,并确定其分子量与等电点等参

数。通常凝胶上的差异蛋白点先通过肽指纹图谱 (Peptide mapping fingerprint, PMF) 鉴定, 若要进一步鉴定, 可用串联质谱 (如 MALDI-TOF-TOF 和 LC-ESI-QTOF) 来测定肽段的氨基酸序列。目前随着质谱技术的进一步发展, 出现了质谱与标记技术 (如同位素标记) 结合, 诞生了质谱定量技术, 该技术目前也被逐步推广应用并日趋完善。基于质谱蛋白质组学定性和定量技术的逐步完善和普及, 目前已在植物研究领域, 包括蛋白新功能的揭示、逆境胁迫差异蛋白分析、蛋白质修饰、蛋白质结构分析等方面有着广泛应用^[28-31]。

1.3 生物信息学

通过质谱鉴定, 虽可明确蛋白质的种类, 但不能明确这些蛋白在复杂的生物体活动中充当什么角色, 执行什么功能, 具有什么样的空间构象, 具有哪些同源蛋白以及该些蛋白的具体属性。而这些问题解决则需借助生物信息学的辅助来得以完成。生物信息学是集生物学、计算机科学、数学、统计学为一体而形成的一门新兴应用科学。对于蛋白质组生物信息学而言, 主要内容包括对高通量质谱蛋白实验数据分析并获取对应生物学信息, 然后对获取的生物学信息进行处理、分析和解释, 阐释所含生物学意义, 进一步对蛋白质的功能和结构进行预测。而预测准确性的高低则主要依赖于蛋白质组数据库的完善程度。因此, 蛋白质组数据库是蛋白质组生物信息学研究的基础及其水平高低的标志。目前常用的蛋白质数据库有 SwissProt、TrEMBL、PIR、ExPASy、PDB、CITH、NRL-3D、HSSP、SCOP、Prosite、FSSP、NCBI、MISP 等^[32]。

2 植物水分胁迫应答相关蛋白

干旱、半干旱面积约占全球耕地面积的一半左右, 由于水分供应不足而引发的作物减产绝收、植被退化、严重水土流失、生态环境恶化等现象频发, 水分胁迫已成为当前影响植物特别是农作物生长、发育的主要环境因子。日趋严重的水分胁迫问题已促使大量的科技工作者开始着眼于对植物水分胁迫应答的相关研究。在众多研究中, 关于植物在水分胁迫条件下某些基因的上调或下调表达引发了相关蛋白质甚至代谢水平表达发生变化的研究尤为引人关注^[33]。而这些研究通常是借助蛋白质组学研究手段来深入了解和揭示植物对水分胁迫的响应机制。

2.1 光合作用与碳代谢相关蛋白

由于植物正常代谢活动在水分胁迫下受到影

响, 引起植物体内某些关键蛋白质的功能发生改变, 导致植物光合作用强度发生变化^[34]。近年来已有许多关于植物在水分胁迫下光合相关蛋白发生变化的报道, 其中的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 报道最多。以双向电泳分离结合质谱分析技术为手段, 已陆续在水稻 (*Oryza sativa* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、盐芥 (*Thellungiella halophila*)、红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 等植物叶片发现水分胁迫下该酶的表达上调现象^[35-38]; 而在对水分胁迫下水稻幼苗胚芽鞘和小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的蛋白分离和鉴定中却发现光合相关蛋白捕光色素蛋白复合体 (LHC) 和 PS II 放氧复合体 (OEC) 的表达呈现上调, 并在抗旱材料内大量积累, 从而来帮助植物增强抗旱性, 而 Rubisco 的大、小亚基却呈现出表达下调的趋势^[39, 40-43]。在对椰枣树 (*Phoenix dactylifera*) 的蛋白分离和鉴定发现 Rubisco 大、小亚基、叶绿素 a/b 结合蛋白在干旱胁迫下均发生了显著的变化^[44]; 而借助相同的研究手段对比研究不同抗旱性大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 品种发现, 水分胁迫下 Rubisco、苹果酸脱氢酶、乙醛酸丙氨酸氨基转移酶活性在抗旱性强的大麦品种中呈现出表达上调, 而转酮醇酶则呈现出降低的趋势^[45]。然而, 抗旱大麦水分胁迫下 Rubisco 大亚基和部分光合作用相关酶表达下调的现象也有所报道^[46]。诸多光合相关蛋白的参与以及规律的多样性进一步表明植物抗旱机制的复杂性。在对水稻、小麦、玉米 (*Zea mays* L.)、苜蓿 (*Medicago sativa*)、西瓜 (*Citrullus lanatus*) 等不同植物在水分胁迫条件下蛋白质的研究还发现, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶、ATP 合成酶、NAD-苹果酸脱氢酶、NADP-苹果酸脱氢酶、1, 7-二磷酸景天庚酮糖激酶、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、UDP-葡萄糖-6-脱氢酶、蔗糖合成酶、烯醇酶等诸多参与碳代谢的酶也发生了不同程度的差异表达变化^[47-56]。植物体内的光合作用和碳代谢非常复杂, 涉及到非常庞大的蛋白质体系, 目前该领域仍处在持续的研究和深入的挖掘中。

2.2 活性氧清除体系

活性氧 (ROS) 是植物体内正常氧代谢的副产物, 具有很强的氧化活性。活性氧通常由代谢活性较高的细胞器产生, 如叶绿体^[57]、线粒体^[58]、过氧化物酶体^[59]。在正常情况下植物体内的抗氧化系统如: 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (APX)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 会对体内的活性氧进行调控并维持在适宜的水平^[60]。目前

研究认为,活性氧的大量累积虽会对植物造成伤害,但同时在信号转导、防御应答、适应环境等方面也有重要作用^[61]。通过蛋白质组学手段研究报道最多的是超氧化物歧化酶(SOD),目前主要通过双向电泳分离、同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)及质谱鉴定分析已对水稻、小麦、玉米、披碱草(*Elymus sinosubmuticus*)、松树(*Pinus*)、青杨(*Populus cathayana*)、苜蓿、甜菜(*Beta vulgaris* L.)等植物的 SOD 在水分胁迫下的响应进行了研究,几乎所有的结果均表现为水分胁迫条件下植物体内的 SOD 表达上调,其抗旱材料中上调表达程度更强,只有在胁迫程度非常严重的时候才开始出现表达下调^[35,39,50,52,61-66]。

过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)常与 SOD 共同作用来维持植物体内 ROS 在较低的水平。在水分胁迫条件下,通过双向电泳对小麦、向日葵(*Helianthus annuus*)、玉米、苜蓿、甜菜、鹰嘴豆(*Cicer arinum*)、披碱草、大豆(*Glycine max*)的差异蛋白进行了分离鉴定,结果发现干旱可诱导 APX、GST 的表达上调,且抗旱性不同的材料间表达差异显著^[35,39,49,51,61-64,67-70]。在对水分胁迫下盐芥的差异蛋白分离鉴定中还发现通过增强硫氧还蛋白的上调表达,来增强自由基清除能力,提高抗旱性^[37]。目前对多种植物的大量研究已基本证实活性氧清除物质的缺乏可能是导致植物水分敏感的主要原因之一。

2.3 渗透调节蛋白

在水分胁迫下,植物细胞可通过调整代谢反应,为遭受逆境胁迫的植物提供能量和更多的可溶性物质,在提高植物抗旱性方面具有重要的作用。在植物抵御水分胁迫时的能量调控非常重要。Oliver 等^[71]借助双向电泳结合质谱分析技术在对复原草(*Sporobolus stapfianus*)的研究发现,在 30% 的相对含水量条件下,复原草的 ATP 合成酶以及 ATP 合成酶 CF₁α 亚基的表达量上调,使得水分胁迫下复原草体内的 ATP 合成量增加,促进其抗旱性;同样的结果也出现在对红麻的研究,发现红麻的耐旱性与其中 1 个 ATP 合酶 β 亚基明显上调表达有关^[38]。另外,在不同抗旱性花生(*Arachis hypogaea*)、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)的蛋白质差异表达研究中同样证实抗旱材料 ATP 合成酶上调表达量显著,ATP 合成量明显^[72-73]。甲硫氨酸合成酶可参与提供单碳来源的甲基循环反应,在该循环反应中,甲硫氨酸进一步转化为 S-腺苷甲硫氨酸

(SAM)。SAM 为很多水分胁迫条件下生成的化合物如甜菜碱、甲基化的多元醇类等提供甲基。甜菜碱和甲基化的多元醇类物质是可溶性物质,可以在细胞质内积累,调节水分胁迫下渗透平衡。关于鹰嘴豆幼苗和苜蓿根系的研究已表明,水分胁迫下甲硫氨酸合成酶表达量均表现为不同程度提高,这种在蛋白水平上的上调表达对提高植物的耐旱性发挥重要作用^[53,69]。3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)是糖酵解和糖异生过程中非常重要的一个酶。该酶活性的提高,会催化丙三醇上的碳进入到糖酵解途径并形成 ATP,为水分胁迫下植物生长提供能量,并为缓解渗透胁迫提供更多的可溶性物质。目前已从水稻、小麦、牧草的研究中证实了水分胁迫下 GAPDH 表达量上调,进而可能通过缓解渗透胁迫来提高植物耐旱性^[47-49,71]。

2.4 热激蛋白

水分胁迫常会导致蛋白质发生聚集或不正确的折叠,引发植物蛋白质功能紊乱。因此,阻止这种现象的发生进而维持蛋白质的正常功能对增强植物抗旱性至关重要。热激蛋白(HSP)是一个大的蛋白家族,在正常条件和胁迫环境下来维持细胞内蛋白质稳定性,帮助蛋白质完成正确的折叠、翻译和聚集^[74-75]。目前已发现 5 个热激蛋白家族:HSP100 家族、HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60 家族、小 HSP 家族^[76-77]。众多研究已表明,植物暴露在水分胁迫环境下,通常会诱导热激蛋白不同程度响应。通过双向电泳和荧光差异凝胶电泳(DIGE)对比分析水分胁迫下大麦的叶片发现,热激蛋白 HSP100 和 HSP90 在不同抗旱品种间均显示上调表达,而 HSP70 在不同抗旱品种中则呈现下调表达趋势^[78-79]。在对甜菜叶片的研究发现 3 个 HSP70 蛋白在水分胁迫下出现下调表达^[64]。而对家山黧豆(*Lathyrus sativus*)蛋白质组进行分析的结果却表明干旱胁迫会诱导 HSP70 的上调表达^[80],同时通过双向电泳在西瓜、披碱草的蛋白分离鉴定也发现水分胁迫下热激蛋白的上调表达^[62,81]。最近在对小麦的研究中也发现干旱胁迫会诱导抗旱小麦材料中 HSP60 和 HSP90 表达上调^[82]。目前研究已基本明确了热激蛋白会参与植物对水分胁迫的响应,但不同植物显示出不同的响应方式,应进一步去证实和完善。

2.5 胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA)

LEA 是 30 多年前前最早在棉花种子内被发现^[83],且以脱水素最为普遍。目前研究已发现水分

胁迫下这类蛋白通常被激活,并通过稳定细胞结构和减少组织脱水来对逆境产生响应或适应,但关于它们的确切功能目前仍有许多未知^[84]。凭借 iTRAQ 技术研究发现,干旱胁迫下 3 个不同抗旱性小麦材料脱水素 COR410 表达量明显增强,特别在非抗旱性材料中尤为明显^[66]。在对 7 个冬小麦的研究中也发现脱水素的积累与水分胁迫之间存在相关关系,其中 3 个品种 24 kD 脱水素表达呈现显著增强趋势^[85],虽然其具体功能还不能够明确,但推测该脱水素含量的增加在提高冬小麦对干旱的适应中起到重要作用。通过双向电泳分离并分析水稻幼苗水分胁迫条件下蛋白质的变化也发现 LEA 被上调表达^[50];而对不同抗旱性大麦品种幼苗和成熟植株的研究发现,水分胁迫下抗旱大麦品种脱水素 DHN3 和 DHN4 含量明显增加,而水分敏感品种未发生变化,认为脱水素 DHN3 和 DHN4 可与其他抗旱相关指标(如相对含水量)一并作为今后鉴定植物抗旱性强弱的参考依据之一^[86]。目前,人们对 LEA 蛋白,特别是脱水素的研究还不是十分深入,还有许多争议的问题存在,但在一定程度上已将 LEA 蛋白作为植物抗旱的分子标记物。

2.6 其他相关蛋白

在水分胁迫下还涉及到一些特殊蛋白,这些蛋白的差异表达会导致植物体内的次生代谢发生变化。如苯丙氨酸解氨酶(PAL),该酶是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,也是苯丙烷类代谢途径中最受关注的酶。关于该酶报道目前主要集中于对植物抗虫、抗病的研究中,在干旱逆境胁迫方面仅有少量报道。研究发现干旱会诱导玉米叶片 PAL 表达量的上调,进而使玉米叶片的抗氧化能力得以提高^[87]。人们也对比了不同抗旱性小麦在水分胁迫下 PAL 的变化,结果表明 PAL 活性与小麦抗旱性存在相关性,可作为小麦甚至其他作物抗旱育种的生理评价参考指标^[88]。其次,蛋白质合成延伸因子(EF-Tu)作为分子伴侣和其他蛋白质的保护成分,在蛋白质生物合成的延伸阶段起到重要作用^[89]。目前这类蛋白报道主要集中在对极端温度的胁迫适应研究中,在对水分胁迫的应答也有少量研究报道。曾经有报道通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和质谱分析发现延伸因子 EF-Tu 的上调表达可增强玉米对高温

和干旱的耐受性^[90],而在苜蓿、西瓜根系也分别分离鉴定到 EF-1、EF-2 在水分胁迫条件下的不同表达^[51,53]。另外,转录因子(TF)是调控基因表达的关键蛋白群体,其通过调控与序列的结合来调控目的基因的表达,目前一些植物转录因子家族已经在逆境胁迫适应中得到研究^[91]。关于该蛋白因子在水分胁迫方面的研究已经在小麦上有过报道,发现小麦受到长期干旱后,抗旱基因型材料体内转录因子 GmbZIP1、MYB 表达增强,推测这些因子可能在小麦抗旱性增强方面起到关键调控作用^[92]。目前的研究还发现水分胁迫下一些关联于信号转导、结构成分构建的蛋白质也发生变化,如有关水稻、大豆、小麦的研究报道 G 蛋白、G 蛋白 β 亚基、钙调素等在水分胁迫下呈现出差异性表达^[50,88-89],而对西瓜、松树、大豆、复原草的蛋白组学研究表明肌动蛋白(Actin)、维管蛋白(Tubulin)等也会对水分胁迫产生响应^[47,67,93-95]。

3 展 望

通过蛋白质组学方法在植物水分胁迫研究方面的应用,已为植物适应水分胁迫的蛋白质调控机制提供了许多有价值的信息。然而,由于试验设计、材料选择、应用技术等方面的限制,使得目前对该过程的认识还很不完善,很多方面研究结果不完全一致甚至相反。同时,随着玉米、大豆、水稻、拟南芥、甜菜等众多植物基因组测序工作的相继完成,也势必对蛋白质组学的研究手段和分析应用提出新的要求。为了能够更准确快速地揭示植物响应水分胁迫以及其它非生物胁迫的生理及分子机制,今后聚焦于多手段、多方面的深入、系统研究是必要的。一是在经典 2DE-MS 技术使用的同时,提高第二代蛋白质组学技术在植物中的应用,同时开展转录组学、代谢组学、基因组学与蛋白质组学的整合研究。二是在关注逆境胁迫下差异表达蛋白质研究的同时,通过对修饰蛋白的富集分离与质谱分析,进一步关注蛋白质的翻译后修饰分析,因为包括蛋白质磷酸化、甲基化、糖基化、泛素化等翻译后修饰与细胞周期、信号传导、细胞凋亡等诸多生物学问题密切相关。三是通过将蛋白质芯片技术与噬菌体展示和酵母双杂交技术结合,加快对蛋白质相互作用的系统研究。

参考文献:

- [1] LEVITT J. Responses of Plants to Environmental Stress (2nd Edition)[M]. New York, USA: Academic Press Inc, 1980.
- [2] LARCHER W. Physiological plant ecology[M]. 4th Edition. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2003.
- [3] GYGI S P, ROCHON Y, FRANZA B R, *et al.* Correlation between protein and mRNA abundance in yeast[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, **19**: 1 720—1 730.
- [4] BOGEAT-TRIBOULOT M B, BROSCHE M, RENAUT J, *et al.* Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions[J]. *Plant Physiology*, 2007, **143**: 876—892.
- [5] KLOSE J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals[J]. *Humangenetik*, 1975, **26**(3): 231—243.
- [6] OFARRELL P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, **250**(10): 4 007—4 021.
- [7] GÖRG A, WEISS W, DUNN M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. *Proteomics*, 2004, **4**(12): 3 665—3 685.
- [8] SHAW M M, RIEDERER B M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Proteomics*, 2003, **3**(8): 1 408—1 417.
- [9] GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, *et al.* The current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, **21**(6): 1 037—1 053.
- [10] MAROUGA R, DAVID S, HAWKINS E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, **382**: 669—678.
- [11] ALBAN A, DAVID S O, BJORKESTEN L, *et al.* A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard[J]. *Proteomics*, 2003, **3**: 36—44.
- [12] ROSS P L, HUANG Y N, MARCHESE J N, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, **3**: 1 154—1 169.
- [13] HARTMAN N T, SICILIA F, LILLEY K S, *et al.* Proteomic complex detection using sedimentation[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, **79**: 2 078—2 083.
- [14] VON ZYCHLINSKI A, KLEFFMANN T, KRISHNAMURTHY N, *et al.* Proteome analysis of the rice etioplast: Metabolic and regulatory networks and novel protein functions[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, **4**: 1 072—1 084.
- [15] ALBAN A, DAVID S O, BJORKESTEN L, *et al.* A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard[J]. *Proteomics*, 2003, **3**: 36—44.
- [16] WOLTERS D A, WASHBURN M P, YATES J R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, **73**, **5**: 683—5 690.
- [17] WU W W, WANG G, BAEK S J, *et al.* Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, iCAT, and iTRAQ, using 2D gel or LC-MALDI TOF/TOF[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, **5**(3): 651—658.
- [18] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**(10): 994—999.
- [19] ROSS P L, HUANG Y N, MARCHESE J N, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, **3**(12): 1 154—1 169.
- [20] CHOE L, D'ASCENZO M, RELKIN N R, *et al.* 8-Plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease[J]. *Proteomics*, 2007, **7**(20): 3 651—3 660.
- [21] ENGELSBERGER W R, ERBAN A, KOPKA J, *et al.* Metabolic labeling of plant cell cultures with K(15)NO₃ as a tool for quantitative analysis of proteins and metabolites[J]. *Plant Methods*, 2006, **2**: 14.
- [22] GRUHLER A, SCHULZE W X, MATTHIESEN R, *et al.* Stable isotope labeling of *Arabidopsis thaliana* cells and quantitative proteomics by mass spectrometry[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, **4**: 1 697—1 709.
- [23] ZHU H, SNYDR M. Protein chip technology[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, **7**(1): 55—63.
- [24] LIU J, LI Y, GAO J, *et al.* The progress of the proteomic technology[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2009, **22**(2): 151—156.
- [25] BJELLQVIST B, KRISTINA E K, RIGHETTI P G, *et al.* Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1982, **6**(4): 317—339.

- [26] PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomes[J]. *Nature*, 2000, 405: 837—846.
- [27] BERETTA L. Proteomics from the clinical perspective; many hopes and much debate[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(10): 785—786.
- [28] KOMATSU S, WADA T, ABALEA Y, et al. Analysis of plasma membrane proteome in soybean and application to flooding stress response[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(10): 4 487—4 499.
- [29] SEMANE B, DUPEA J, CUYPERS A, et al. Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress[J]. *Plant Physiology*, 2010, 167(4): 247—254.
- [30] HOSSAIN Z, NOURI M Z, KOMATSU S. Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 11(1): 37—48.
- [31] ELMORE J M, LIU J, SMITH B, et al. Quantitative proteomics reveals dynamic changes in the plasma membrane during *Arabidopsis* immune signaling[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, doi:10. 1074 /mcp. M111. 014555.
- [32] BAGINSKY S. Plant proteomics; Concepts, applications, and novel strategies for data interpretation[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009, 28(1): 93—120.
- [33] KOSOVÁ K, VÍTÁMVÁS P, PRÁŠIL L T, et al. Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response[J]. *Proteomics*, 2011, 74(8): 1 301—1 322.
- [34] CHAVES M M, FLEXAS J, PINHEIRO C. Photosynthesis under drought and salt stress; regulation mechanisms from whole plant to cell[J]. *Ann. Bot.*, 2009, 103(4): 551—560.
- [35] SALEKDEH G H, SIOPONGCO J, WADE L J, et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery[J]. *Proteomics*, 2002, 2(9): 1 131—1 145.
- [36] ZHANG Y T(章玉婷), ZHOU D Q(周德群), SU Y(苏 源) et al. Proteome analysis of potato drought resistance variety in Ninglang 182 leaves under drought stress[J]. *Hereditas(遗传)*, 2013, 35(5): 666—672(in Chinese).
- [37] WANG R(王 荣), HAN X S(韩旭思), GAO F(高 飞) et al. Preliminary proteomic analysis of drought stress-responsive proteins in *Thellungiella halophila* leaves[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica(西北植物学报)*, 2012, 32(3): 465—470(in Chinese).
- [38] QI J M(祁建民), JIANG H Q(姜海青), CHEN M X(陈美霞) et al. Differential protein analysis of *Kenaf* leaves under drought stress[J]. *Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)*, 2012, 45(17): 3 632—3 638(in Chinese).
- [39] ALI, G M, KOMATSU S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(2): 396—403.
- [40] LI X P, MULLER-MOULE P, GILMORE M A, et al. PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(23): 15 222—15 227.
- [41] CARUSO G, CAVALIERE C, FOGLIA P, et al. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Plant Sciences*, 2009, 177(6): 570—576.
- [42] RICCARDI F, GAZEAU P, JACQUEMOT M P, et al. Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(12): 1 003—1 011.
- [43] FAN F G(范锋贵), JIN X F(金秀峰), YE SH(叶 石) et al. Identification of differential expressed proteins responding to water-stress in seedling of wheat cultivar Jinmai 47[J]. *Journal of Triticeae Crops(麦类作物学报)*, 2013, 33(3): 566—572(in Chinese).
- [44] HADDAD A, ABDULRAHMAN L A, KHALID O A, et al. Proteome analysis for understanding abiotic stress (salinity and drought) tolerance in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) [J]. *International Journal of Genomics*, 2015, [http://dx. doi. org/10. 1155/2015/407165](http://dx.doi.org/10.1155/2015/407165)
- [45] ASHOUB A, BECKHAUS T, BERBERICH T, et al. Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress[J]. *Planta*, 2013, 237(3): 771—781.
- [46] WENDELBOE-NELSON C, MORRIS P C. Proteins linked to drought tolerance revealed by DIGE analysis of drought resistant and susceptible barley varieties[J]. *Proteomics*, 2012, 12(22): 3 374—3 385.
- [47] LIU J X, BENNETT J. Reversible and irreversible drought-induced changes in the anther proteome of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes IR64 and moroberekan[J]. *Molecular Plant*, 2010, doi:10. 1093/mp/ssq039.
- [48] HAJHEIDARI M, EIVAZI A, BUCHANAN B B, et al. Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(4): 1 451—1 460.
- [49] ARANJUELO I, MOLERO G, ERICE G, et al. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 62(1): 111—123.
- [50] KE Y, HAN G, HE H, et al. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(1): 133—138.

- [51] YOSHIMURA K, MASUDA A, KUWANO M, *et al.* Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C(3) xerophyte(wild watermelon) under water deficits[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49**(2): 226—241.
- [52] ZHU J, ALVAREZ S, MARSH E L, *et al.* Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, **145**(4): 1 533—1 548.
- [53] LARRAINZAR E, WIENKOOP S, WECKWERTH W, *et al.* *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress[J]. *Plant Physiology*, 2007, **144**(3): 1 495—1 507.
- [54] RICCARDI F, GAZEAU P, DE VIENNE D, *et al.* Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification[J]. *Plant Physiology*, 1998, **117**(4): 1 253—1 263.
- [55] LI X N, CAI J, LIU F L, *et al.* Physiological, proteomic and transcriptional responses of wheat to combination of drought or waterlogging with late spring low temperature[J]. *Functional Plant Biology*, 2014, **41**(7): 690—703.
- [56] Kim S G, Lee J S, Kim J T, *et al.* Physiological and proteomic analysis of the response to drought stress in an inbred Korean maize line [J]. *Plant Omics*, 2015, **8**(2): 159—168.
- [57] PFANNNSCHMIDT T. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, **8**(1): 33—41.
- [58] RASMUSSEN A G, SOOLE K L, ELTHON T E. Alternative NAD(P)H Dehydrogenases of plant mitochondria[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, **55**: 23—39.
- [59] DEL RÍO L A, CORPAS F J, SANDALIO L M, *et al.* Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53**(372): 1 255—1 272.
- [60] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2010, **48**(12): 909—930.
- [61] DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVA E, *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, **57**(5): 779—795.
- [62] GAZANCHIAN A, HAJHEIDARI M, SIMA N K, *et al.* Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**(2): 291—300.
- [63] COSTA P, BAHRMAN N, FRIGERIO J M, *et al.* Water deficit-responsive proteins in maritime pine[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, **38**(4): 587—596.
- [64] HAJHEIDARI M, ABDOLLAHIAN-NOGHABI M, ASKARI H, *et al.* Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress[J]. *Proteomics*, 2005, **5**(4): 950—960.
- [65] XIAO X, YANG F, ZHANG S, *et al.* Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress[J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, **136**(2): 150—168.
- [66] FORD K L, CASSIN A, BACIC A. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance[J]. *Front in Plant Science*, 2011, 2: doi:10.3389/fpls.2011.00044.
- [67] ELHAM F, JAVAD G, SETSUKO K, *et al.* Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance[J]. *Proteomics*, 2015, **114**: 1—15.
- [68] MEHDI G, MAHMOUD T, MOSTAFA V, *et al.* Differential response of root proteome to drought stress in drought sensitive and tolerant sunflower inbred lines[J]. *Functional Plant Biology*, 2013, **40**(6): 609—617.
- [69] BHUSHAN D, PANDEY A, CHOUDHARY M K, *et al.* Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, **6**: 1 868—1 884.
- [70] YAMAGUCHI M, VALLIYODAN B, ZHANG J, *et al.* Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone[J]. *Plant Cell Environment*, 2010, **33**(2): 223—243.
- [71] OLIVER M J, JAIN R, BALBUENA T S, *et al.* Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, *Sporobolus stapfianus*, in response to dehydration[J]. *Phytochemistry*, 2011, **72**(10): 1 273—1 284.
- [72] KOTTAPALLI K R, RAKWAL R, *et al.* Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes[J]. *Plant Cell Environment*, 2009, **32**(4): 380—407.
- [73] LU X K(陆许可), ZHANG D CH(张德超), YIN Z J(阴祖军), *et al.* Comparative analysis of proteomics in cotton(*Gossypium hirsutum* L.) leaves with different drought resistance levels under drought stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*(西北植物学报), 2013, **33**(12): 2 401—2 409(in Chinese).

- [74] TIMPERIO A M, EGIDI M G, ZOLLA L. Proteomics applied on plant abiotic stresses; role of heat shock proteins(HSP)[J]. *Proteomics*, 2008, **71**(4):391—411.
- [75] AL-WHAIBI M H. Plant heat-shock proteins;a mini review[J]. *Journal of King Saud University*, 2011, **23**(2):139—150.
- [76] KOTAK S, LARKINDALE J, LEE U, *et al.* Complexity of the heat stress response in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, **10**(3):310—316.
- [77] GUPTA S C, SHARMA A, MISHRA M, *et al.* Heat shock proteins in toxicology; how close and how far[J]. *Life Sciences*, 2010, **86**(11):377—384.
- [78] ASHOUB A, BECKHAUS T, BERBERICH T, *et al.* Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress[J]. *Planta*, 2013, **237**(3):771—781.
- [79] KAUSAR R, ARSHAD M, SHAHZAD A, *et al.* Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress[J]. *Amino Acids*, 2013, **44**(2):345—359.
- [80] CHATTOPADHYAY A, SUBBA P, PANDEY A, *et al.* Analysis of the grasspea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment[J]. *Phytochemistry*, 2011, **72**(10):1 293—1 307.
- [81] KAWASAKI S, MIYAKE C, KOHCHI T, *et al.* Responses of wild watermelon to drought stress; accumulation of an ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficits[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2000, **41**(7):864—873.
- [82] HAO P, ZHU J, GU A, *et al.* An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery[J]. *Proteomics*, 2015, **15**(9):1 544—1 563.
- [83] DURE L, GREENWAY S C, GALAU G A. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination; changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis[J]. *Biochemistry*, 1981, **20**(14):4 162—4 168.
- [84] BRAY E A. Molecular responses to water deficit[J]. *Plant Physiology*, 1993, **103**:1 035—1 040.
- [85] LOPEZ C G, BANOWETZ G M, PETERSON C J, *et al.* Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars[J]. *Crop Science*, 2003, **43**(2):577—582.
- [86] PARK S Y, NOH K J, YOO J H, *et al.* Rapid upregulation of Dehydrin3 and Dehydrin4 in response to dehydration is a characteristic of drought-tolerant genotypes in barley[J]. *Journal of Plant Biology*, 2006, **49**(6):455—462.
- [87] ASHRAF G. Effects of drought on the activity of phenylalanine ammonia lyase in the leaves and roots of maize inbreds[J]. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2011, **5**(9):952—956.
- [88] HURA T, GRZESIAK S, HURA K, *et al.* Physiological and biochemical tools useful in drought tolerance detection in genotypes of winter triticale; accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance[J]. *Annals of Botany*, 2007, **100**(4):767—775.
- [89] RAO D, MOMCILOVIC I, KOBAYASHI S, *et al.* Chaperone activity of recombinant maize chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, **271**(18):3 684—3 692.
- [90] RISTIC Z, YANG G, BHADULA S K. Two-dimensional gel analysis of 45 ku heat shock proteins from a drought and heat resistant maize line[J]. *Plant Physiology*, 1999, **154**(2):264—268.
- [91] NAKASHIMA K, ITO Y, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses[J]. *Plant Physiology*, 2009, **149**(1):88—95.
- [92] RAHAIE M, XUE G P, SCHENK P M. The role of transcription factors in wheat under different abiotic stress[J]. *Abiotic Stress-Plant Responses and Applications in Agriculture*, 2013, DOI:10. 5772/54795.
- [93] NOURI M Z, AND KOMATSU S. Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MSbased proteomics approaches[J]. *Proteomics*, 2010, **10**(10):1 930—1 945.
- [94] PENG Z, WANG M, LI F, *et al.* A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, **8**(12):2 676—2 686.
- [95] COSTA P, BAHRMAN N, FRIGERIO J M, *et al.* Waterdeficit-responsive proteins in maritime pine[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, **38**(4):587—596.