

# 茶树叶片类脱水素蛋白的 Western-blot 分析

舒锡婷<sup>1,2</sup>, 欧阳娜<sup>1</sup>, 江昌俊<sup>1,2</sup>, 邓威威<sup>1</sup>, 李叶云<sup>1\*</sup>

(1 安徽农业大学 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036; 2 安徽省大别山区农林特色产业协同创新中心, 合肥 230036)

**摘 要:** 为了解茶树脱水素种类与功能, 采用 Western-blot 技术, 研究了不同季节及越冬过程中茶树叶片脱水素蛋白家族的表达模式。结果显示: (1) 茶树叶片总蛋白提取采用酚-甲醇/醋酸铵沉淀法, 用时短、蛋白浓度高、SDS-PAGE 电泳条带清晰, 背景干净, 满足茶树 Western-blot 技术要求。(2) 在不同季节及越冬期中发现 14~95 kD 共 9 种不同分子量的茶树类脱水素蛋白, 其中 95、65、48、37、34 和 14 kD 等 6 种蛋白表达量较为稳定, 季节与越冬期变化不明显; 58 kD 脱水素仅在冬季表达, 越冬期不断上升, 2 月份增加到最高, 表达丰度高; 28 kD 脱水素蛋白在冬季表达量高, 越冬期与茶树抗寒力变化规律一致; 21 kD 脱水素在夏季和越冬期后期有较高的表达。研究表明, 这 3 种脱水素可能在茶树抗逆中起着重要作用。

**关键词:** 茶树; 脱水素; 蛋白质提取; 蛋白质印迹法

中图分类号: Q789

文献标志码: A

## Expression Patterns of Dehydrin-like Proteins in Tea Plant (*Camellia sinensis*) by Western-blot Analysis

SHU Xiting<sup>1,2</sup>, OUYANG Na<sup>1</sup>, JIANG Changjun<sup>1,2</sup>, DENG Weiwei<sup>1</sup>, LI Yeyun<sup>1\*</sup>

(1 State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 2 Collaborative Innovation Center of Agricultural Industry of Ta-pieh Mountains, Hefei 230036, China)

**Abstract:** To investigate the types and functions of dehydrin in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze], we studied the expression profiling of tea dehydrin protein family in different seasons and wintering period by Western-blot. The results showed that: (1) the phenol-methanol/ammonium acetate precipitation method was suitable for total protein extraction from tea leaves, and met the requirements for Western-blot analysis, together with short time, high concentration, clear electrophoretic bands, and no contaminated background in SDS-PAGE. Nine kinds of dehydrin-like proteins in tea plant with the molecular weights ranging from 14–95 kD, were found in different seasons and during overwintering. The expressions levels were relatively stable in the 6 kinds of dehydrin-like proteins (molecular weights 95, 65, 48, 37, 34 and 14 kD). The 58 kD dehydrin occurred only in winter, and showed a continuous expression in overwintering period, which achieved the highest expression in February. The highest expression of 28 kD dehydrin was found in winter, whose variation pattern was in accordance with the cold resistance for tea plant. The 21 kD dehydrin expression level was higher in summer and the later period of overwintering. It provided that the three dehydrins (58, 28 and 21 kD) might play important roles in stress tolerance for tea

收稿日期: 2015-09-10; 修改稿收到日期: 2015-12-03

基金项目: 国家自然科学基金(31270729); 安徽省 2016 年度自然科学基金青年项目(1608085QC60)

作者简介: 舒锡婷(1989–), 女, 在读硕士研究生, 主要从事茶树生物技术与育种研究。E-mail: dongchahua@126.com

\* 通信作者: 李叶云, 博士, 副教授, 主要从事茶树抗逆栽培与育种研究。E-mail: lyy@ahau.edu.cn

plants.

**Key words:** tea plant; dehydrin; protein preparation; Western-blot

脱水素是一种植物抗逆功能蛋白,在植物抵御逆境胁迫过程中发挥着重要功能,具有防冻剂活性<sup>[1]</sup>、保护细胞生物膜<sup>[2]</sup>、消除活性氧自由基<sup>[3]</sup>、结合重金属离子<sup>[2]</sup>等多种作用。脱水素广泛存在于植物中,有 5 种不同类型,其分子量从 9~200 kD 不等,属于多基因家族。脱水素基因数目因不同物种差异较大,现已报道拟南芥有 10 种,大豆有 3 种,水稻有 8 种<sup>[4]</sup>。研究发现大麦 13 种脱水素中 DHN5 (86 kD) 的积累量与半致死温度  $LT_{50}$  (lethal temperature when 50% sample die) 具有相关性,其积累与低温驯化条件下大麦的抗冻能力有关<sup>[5]</sup>。在杜鹃<sup>[6]</sup>、西红柿<sup>[7]</sup>也分别发现有一种脱水素蛋白的积累量与其抗逆能力密切相关,可作为品种抗冻能力筛选的标志。低温与干旱是制约茶树高产优质栽培的主要逆境因子,在开展茶树低温胁迫差异表达谱分析中,*CsDHN1* 和 *CsDHN2* 两种不同分子量的茶树脱水素基因获得克隆与鉴定,在低温、干旱和 ABA 诱导下上调表达<sup>[8-9]</sup>。根据植物脱水素蛋白结构域 K 片段的保守性,应用蛋白质免疫印迹法 (Western-blot) 技术,可进一步挖掘更多的茶树脱水素家族基因,全面了解其参与茶树抗逆的作用。

Western-blot 是一种能对蛋白进行定性和半定量的分析方法<sup>[10]</sup>,与荧光定量 PCR 一起,常用于重要基因的表达分析,也是蛋白组学研究的关键技术之一<sup>[11]</sup>。从茶树叶片中提取高质量的总蛋白,是开展茶树 Western-blot 技术研究的前提。由于茶树叶片次生代谢物质丰富,含有大量的多酚、色素及多糖类等,影响蛋白样品的制备及电泳分离<sup>[12]</sup>。目前,关于茶树叶片总蛋白质的提取已有文献报道,主要有改良的 Tris-HCl 抽提法<sup>[13]</sup>、TCA/丙酮-clean up kit 法<sup>[14]</sup>、改良酚抽法<sup>[15]</sup>等,但仅用于茶树双向电泳分析,尚无针对于 Western-blot 方面的研究。

本研究比较分析 3 种茶树叶片总蛋白的提取方法,并应用 Western-blot 技术,检测了季节、越冬过程中茶树脱水素蛋白家族的表达模式,以了解茶树脱水素种类与功能,为开展茶树抗逆分子机理研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料采自安徽农业大学大杨店试验茶园无

性系国家品种‘龙井 43’,于 2012 年 3 月至 2013 年 3 月采样,采集无病虫害、长势一致的当年生枝条中部第 3 至第 5 位叶,混匀后取样,各重复取样 3 次,存于 -80 °C 冰箱备用。

### 1.2 月气温确定与越冬期茶树抗寒力测定

根据气象部门发布的天气信息,记录实验区域 2012 年 3 月至 2013 年 3 月每天的最高气温与最低气温、日平均气温,计算春季(3 月中旬~5 月中旬)、夏季(5 月下旬~9 月中旬)、秋季(9 月下旬~11 月中旬)、冬季(11 月下旬~3 月上旬)各季节最高温、最低温和季度平均气温以及越冬期月平均气温。

茶树抗寒力测定。参照李叶云等<sup>[16]</sup>方法,根据越冬期茶树 9 个生理生化指标的测定值,应用主成分分析结合隶属函数法对茶树抗寒性进行分析,以综合评价值  $D$  表示抗寒力大小。 $D$  值在 0~1 之间, $D$  值越接近 1,表示抗寒力越强,反之,抗寒力则越弱。

### 1.3 蛋白提取方法

**1.3.1 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法** 参照 Wang 等<sup>[17]</sup>的方法,并作部分改良。取茶树叶片,放入研钵中加入液氮,充分研磨后称取 0.2 g 粉末放入 2 mL 离心管中,加入 10% TCA 丙酮,充分混匀,12 000 r/min,4 °C 离心 3 min,弃上清;加入 0.1 mol/L 醋酸铵 80% 甲醇,充分混匀,离心弃上清;加 80% 丙酮,充分混匀,离心弃上清,沉淀干燥 10 min;加 Tris-平衡酚及 SDS 缓冲液(比例为 1:1),混匀,50 °C 温育 5 min,离心;取上层酚相至 2 mL 离心管,再向管中加入 0.1 mol/L 醋酸铵 80% 甲醇,-20 °C 静置 10 min;离心弃上清,加 100% 甲醇,混匀,离心弃上清,加 80% 丙酮,混匀,离心,自然干燥 5 min,向管中加入 100  $\mu$ L 蛋白裂解液<sup>[18]</sup>,混匀,静置 10 min,离心取上清,-20 °C 密封保存备用。

**1.3.2 试剂盒法** 采用试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司,产品编号 BSP004)进行蛋白提取,提取方法参照试剂盒说明书。

**1.3.3 TCA-丙酮沉淀法** 参照谷瑞升等<sup>[19]</sup>的方法,取茶树叶片 1 g,加入 5 mL 的提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 20 mmol/L KCl, 13 mmol/L DTT),100  $\mu$ L 0.1 mol/L PMSF 和 NP-40,匀浆后 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min;取上清,加入 15 mL 10% TCA-丙酮,4 °C 静置 4 h 或者过

夜,离心弃上清,沉淀用 15 mL 0.07% DTT-丙酮洗 2~3 次,每次静置 1 h,每 30 min 摇匀 1 次,离心弃上清;沉淀干燥后加蛋白裂解液 100  $\mu$ L,混匀,静置 10 min,离心取上清,-20  $^{\circ}$ C 密封保存备用。

1.4 蛋白质含量的测定

参见 Bradford<sup>[20]</sup>方法,取样品 5~10  $\mu$ L,加考马斯亮兰 G-250 蛋白显色液,测定 595 nm 波长吸光值,以 BSA(牛血清蛋白)为标准蛋白。

1.5 SDS-PAGE 和 Western-blot

参照分子克隆实验指南<sup>[21]</sup>,使用 SDS-PAGE 垂直电泳系统(Bio-Rad),蛋白质上样量 30  $\mu$ g,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(12%分离胶和 5%浓缩胶)进行分离,考马斯亮蓝 R-250 进行胶体染色。

用迷你电泳转印系统(Bio-Rad)湿法转印,恒压 100 V,4  $^{\circ}$ C 75 min;脱脂奶粉封闭 1 h;一抗内参抗体  $\beta$ -Actin(Life Science Products & Services,产品编号 AB10007)1:2 500 稀释;脱水素抗体(abcam,产品编号 AB22681)1:1 000 稀释杂交;一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育 3 h,TBST 漂洗 10 min,共 4 次;二抗(Life Science Products & Services,产品编号 AB10058)1:5 000 稀释,4  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 漂洗 10 min,共 4 次;加适量显影液(Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Substrate,产品编号 170-5060),使用凝胶成像系统(Bio-Rad ChemiDoc XRS)拍照。

1.6 数据处理

采用 Excel 2007、SPSS 及 GraphPad Prism 5 软件对数据进行处理,用 Quantity One 软件对脱水素蛋白的表达量进行分析。将图片上每个特异条带灰度值数字化,目的蛋白的灰度值除以内参  $\beta$ -Actin 的灰度值以校正误差,所得结果代表目的蛋白相对含量(表达丰度)。Western-blot 中以春季(不同季节)或 10 月(越冬期)目的蛋白相对含量为“1”后,计算其它季节或月份各目的蛋白的表达水平(倍数)。

2 结果与分析

2.1 不同总蛋白提取方法的效率比较

样品总蛋白质制备是 Western-blot 试验首要

步骤。如表 1,TCA-丙酮沉淀法所需的样品质量多、花费时间长,而获得的蛋白质含量、浓度明显低于其它 2 种方法。试剂盒法所需的时间短,只需 10 min 完成,样品量少,仅为 TCA-丙酮沉淀法的 1/5,蛋白质含量接近酚-甲醇/醋酸铵沉淀法,但蛋白质浓度较低略高于 1/3。酚-甲醇/醋酸铵沉淀法也只需较少的样品,较短时间,即获得 80  $\mu$ L 左右总蛋白,蛋白质含量、浓度最高,能完全满足后续电泳分析的需求。

2.2 不同总蛋白提取方法的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

为进一步比较 3 种提取总蛋白方法的优劣,对提取的总蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果(图 1)表明,TCA-丙酮法(泳道 1、2)、酚-甲醇/醋酸铵沉淀法(泳道 5、6)均有明显的条带,其中酚-甲醇/醋酸铵沉淀法泳道背景干净,条带分布清晰;而试剂盒法(泳道 3、4)条带较弱,条带少。用内参抗体和脱水素抗体分别检测 3 种茶树叶片总蛋白提取效果(图 2),结果表明,TCA-丙酮法、酚-甲醇/醋酸铵沉淀法均能检测到内参蛋白  $\beta$ -Actin 和目标蛋白脱水素的表达,而试剂盒法均无杂交条带显示。对于内参蛋白的杂交效果,2 种方法条带亮而清楚,并无明显差

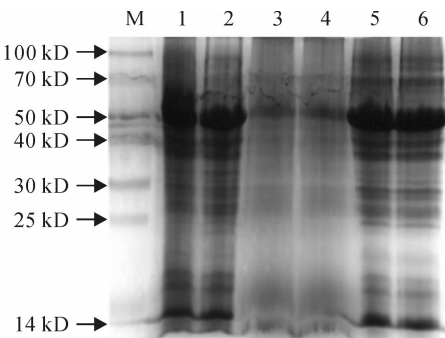


图 1 不同提取方法的蛋白 SDS-PAGE 结果  
M. Marker 14~100 kD;1、2. TCA-丙酮沉淀法;  
3、4. 试剂盒法;5、6. 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法

Fig. 1 SDS-PAGE of total protein extracted by different methods

M. Marker 14~100 kD;1、2. Acetone extraction method;3、4. Kit method;5、6. Phenol-methanol/ammonium acetate precipitation

表 1 3 种提取茶树叶片总蛋白方法的比较

Table 1 Comparison of three methods of total protein extracted from tea leaves

提取方法 Extraction method	所需时间 Experimental time/h	样品质量 Sample weight/g	蛋白质含量 Protein content / (mg · g <sup>-1</sup> )	蛋白质质量浓度 Protein mass concentration / (mg · mL <sup>-1</sup> )
TCA-丙酮沉淀法 TCA/Acetone precipitation	5	1	0.68±0.04	3.42±0.21
试剂盒法 Kit method	0.16	0.2	4.24±0.07	4.24±0.07
酚-甲醇/醋酸铵沉淀法 Phenol-methanol/ammonium acetate precipitation	1	0.2	4.43±0.15	11.08±0.01

异;但对于脱水素蛋白,酚-甲醇/醋酸铵沉淀法明显优于 TCA-丙酮法,后者条带细弱。因此,从提取效率和杂交效果来看,酚-甲醇/醋酸铵沉淀法提取的叶片总蛋白质适宜茶树 Western-blot 分析。

2.3 不同季节茶树脱水素蛋白的 Western-blot 分析

在中国江北茶区,1 月和 7 月温差在 15~25℃,茶树表现为短季节生长,一般正常生长期包括春、夏、秋(3 月中旬~11 中旬)和冬季休眠期(11 月下旬~3 月中旬),夏季气温高,冬季寒冷(图 3,A)。

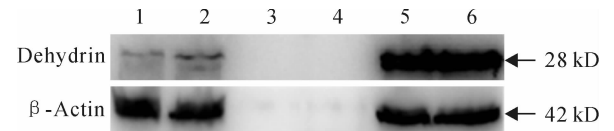
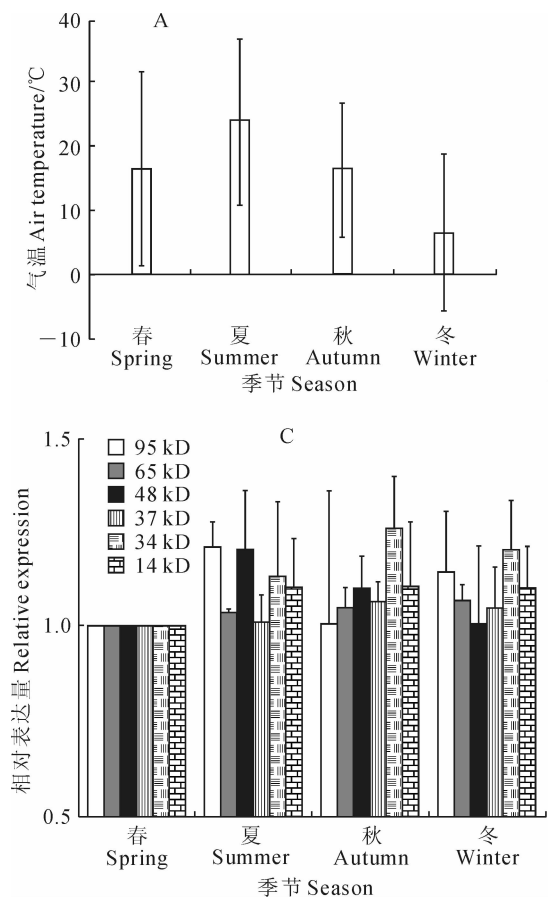


图 2 不同提取方法的蛋白 Western-blot 分析  
Fig.2 Western-blot of total protein extracted by different methods



从茶树春、夏、秋、冬四季叶片中共检测出 9 条比较明显的脱水素蛋白条带,分子量分别为 14~95 kD (图 3,B)。从图 3,C 可以看出,分子量为 95、65、48、37、34 和 14 kD 等 6 种脱水素表达量较为稳定,季节之间变化不明显(低于 2 倍);从图 3,D 可以看出 58 kD 脱水素仅在冬季大量表达;28 kD 脱水素在冬季表达量高,是春季的 17.55 倍,春、夏、秋表达较低且无明显差异;28 kD 脱水素表达丰度显著高于 58 kD。这表明 58 和 28 kD 这 2 种脱水素蛋白可能响应低温胁迫。21 kD 脱水素丰度较低,夏季的表达量高于其它季度,是春季 6.73 倍,表明其可能优先响应高温或干旱。

2.4 越冬期茶树脱水素蛋白的 Western-blot 分析

在自然越冬过程中,12 月份和 1 月份气温最低,茶树通过冷驯化抗寒力达到最高,2 月份气温回升后茶树解除休眠,抗寒力又不断降低(图 4,A)。

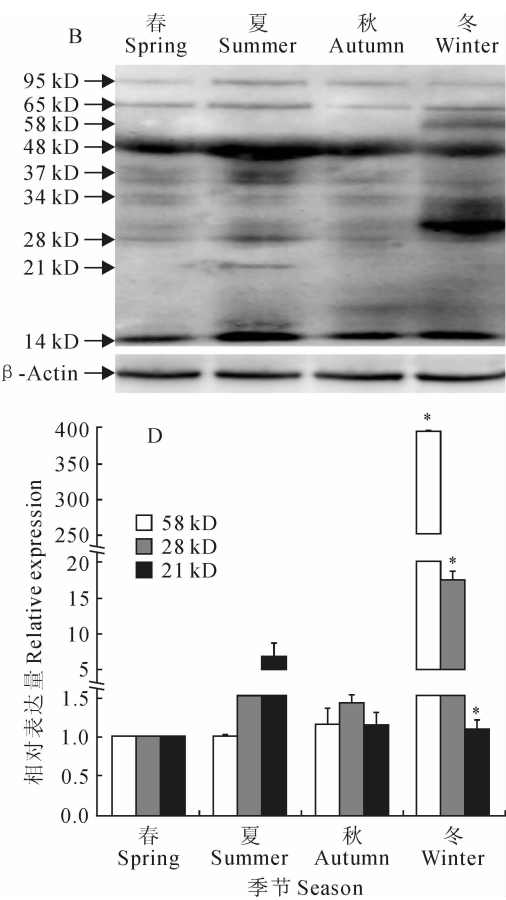


图 3 不同季节茶树脱水素蛋白差异表达

A. 茶园四季的气温变化(2012 年 3 月至 2013 年 3 月);B. Western-blot;C. 脱水素表达水平(95、65、48、37、34 和 14 kD);D. 脱水素表达水平(58、28 和 21 kD);\* 表示同类蛋白与春季相比表达差异达 0.05 水平

Fig.3 Different expression of dehydrin of tea leaves in different seasons by Western-blot

A. Changes in air temperature in tea plantation during four seasons (from Mar. 2012 to Mar. 2013);  
B. Western-blot;C. Dehydrin expression (95, 65, 48, 37, 34 and 14 kD);D. Dehydrin expression (58, 28 and 21 kD);  
\* means significant difference with spring at the 0.05 level

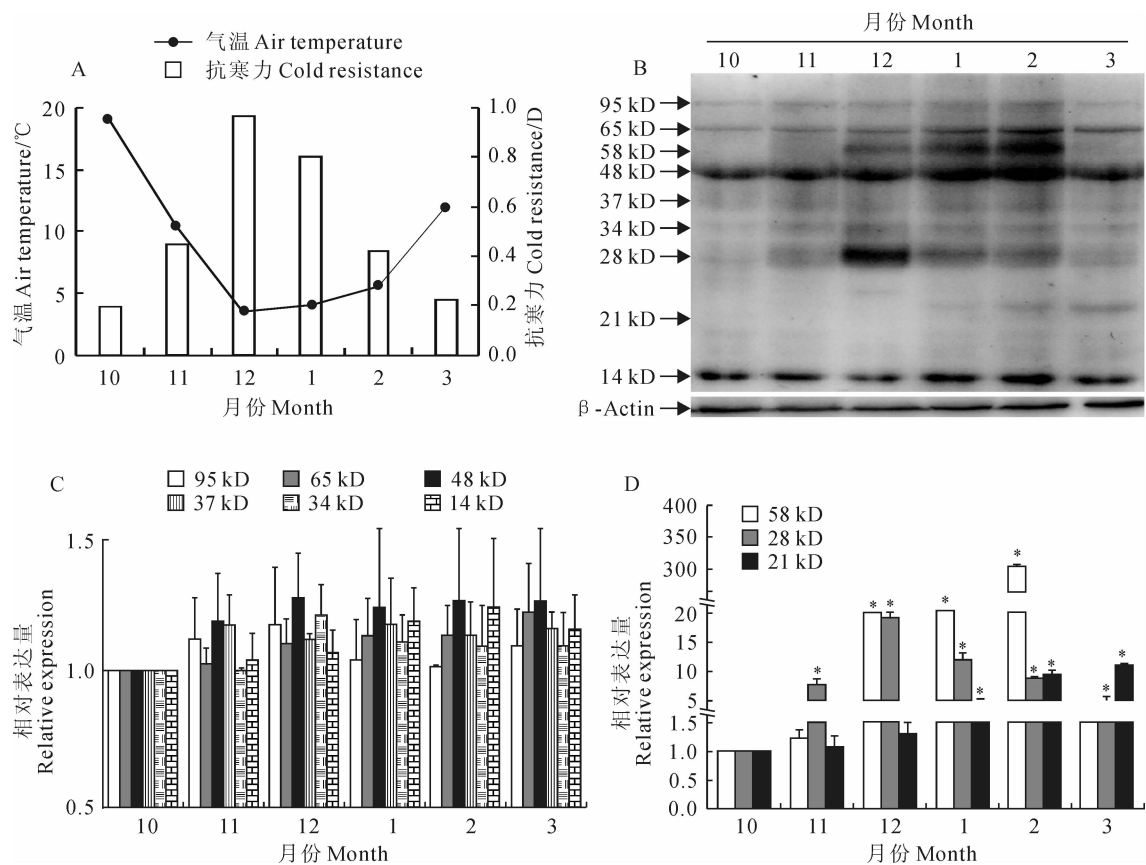


图 4 越冬期茶树脱水素蛋白差异表达

A. 茶树自然越冬期(2012 年 10 月至 2013 年 3 月)的月气温变化;B. Western-blot;C. 脱水素表达水平(95、65、48、37、34 和 14 kD);D. 脱水素表达水平(58、28 和 21 kD);\* 表示同类蛋白与 10 月份表达差异达 0.05 水平

Fig. 4 Different expression of dehydrin in tea leaves during overwintering by Western-blot

A. Changes in monthly air temperature during natural overwintering for tea plant (from Oct. 2012 to Mar. 2013); B. Western-blot; C. Dehydrin expression(95, 65, 48, 37, 34 and 14 kD); D. Dehydrin expression(58, 28 and 21 kD);

\* means significant difference with October at the 0.05 level

越冬过程中共检测出 9 种不同分子量的类脱水素蛋白, 分子量为 14~95 kD(图 4, B)。从图 4, C 可以看出, 分子量为 95、65、48、37、34 和 14 kD 等 6 种脱水素蛋白表达量没有明显的变化(低于 2.0 倍); 从图 4, D 可以看出 58 kD 脱水素蛋白表达量在 12 月份急剧增加, 并不断上升, 2 月增加到最高, 是越冬前(10 月)的 302.17 倍。28 kD 脱水素蛋白表达量从 11 月逐渐升高, 12 月表达量最高, 达到越冬前(10 月)的 19.45 倍, 此后在 1 月和 2 月逐渐下降, 与茶树越冬期抗寒力变化一致。21 kD 脱水素蛋白表达丰度不高, 越冬后期 1 月至 3 月不断积累, 是越冬前(10 月)的 10.92 倍, 这可能与越冬后期茶园干旱有关。

### 3 讨论

#### 3.1 茶树总蛋白提取方法比较

Western-blot 技术可以定性检测目标蛋白的表

达与否或半定量分析表达量的变化, 高质量的蛋白样品制备对实验结果影响很大。TCA-丙酮沉淀法是植物总蛋白质提取研究中常用的方法<sup>[22]</sup>, 本实验中 TCA-丙酮沉淀法虽可以获得较清晰的 SDS-PAGE 图谱, 但 Western-blot 图谱中目的蛋白条带不理想, 并且样品蛋白浓度过低, 时间长。植物总蛋白提取试剂盒法提取方便, 蛋白浓度较高, 但 SDS-PAGE 电泳条带少, 不能检测到内参蛋白和目标蛋白, 表明该试剂盒物种选择性强, 不能用于茶树总蛋白提取。Wang 等<sup>[17]</sup>已成功将酚-甲醇/醋酸铵沉淀法应用于橄榄树、苹果、柠檬、红木叶片等次生代谢丰富、蛋白质含量低的材料的蛋白质双向电泳的样品制备, 在本实验中该方法可较好地满足茶树 Western-blot 要求, Marta 等<sup>[23]</sup>也采用此方法提取总蛋白, 研究蓝桉(*Eucalyptus globulus*)脱水素的差异表达。为提高样品蛋白浓度, 本实验做了部分改良, 参考 Rabilloud<sup>[24]</sup>等方法, 沉淀干燥后加入

含有硫脲蛋白裂解液,提高了蛋白质的溶解性,获得了高浓度蛋白样品。改良的酚-甲醇/醋酸铵沉淀法所需材料少,用时短,一次提取总蛋白的量可以满足多次实验要求,是一种适宜于茶树 Western-blot 技术研究总蛋白提取方法。

### 3.2 茶树脱水素的鉴定与差异表达

脱水素的一个重要结构特征是它具有 3 类非常保守的区域:K、S 和 Y 片段,其中 K 片段是所有脱水素都具有的<sup>[25]</sup>,以人工合成的 K 片段多肽制备的多克隆抗体可检测植物中不同分子量的脱水素蛋白。本研究从茶树叶片中检测出 14~95 kD 9 种类脱水素蛋白,但未检测到高分子量脱水素。Sauter 等<sup>[26]</sup>发现杨属植物黄花柳存在 103、114、116、120 kD 等 4 个仅在冬季表达高分子量脱水素。茶树 95、65、48、37、34 和 14 kD 等 6 种脱水素表达较稳定,季节与越冬期表达变化不明显。58、28 kD 脱水素在越冬期表达量高,而其它季节较弱,应与冷驯化密切相关。21 kD 脱水素在夏季和越冬期后期有一定的表达,其它月份未检测到,可能与高温和干旱有关。28、21 kD 脱水素在蛋白、mRNA 表达模式上较为吻合<sup>[8-9]</sup>,响应低温与脱水。Zhu 等<sup>[27]</sup>在大麦中发现 58 kD 脱水素 DHN5 响应低温胁迫,在 4 ℃低温处理 12 h 时表达量达到最高。在常绿桃树和落叶桃树中,越冬期 11 月至 1 月 60kD 脱水素蛋白有

较高水平表达<sup>[28]</sup>;蓝桉人工低温驯化中,发现 60、27 kD 脱水素在叶片中有明显积累<sup>[23]</sup>,这些与茶树 58、28 kD 脱水素的变化规律较一致。在水稻和野生稻种子发育中,随种胚干重的增加,21 kD 脱水素不断积累。在茶树成熟种子中也检测 21 kD 脱水素 mRNA 表达水平是叶片的 11.2 倍<sup>[8]</sup>,在茶树蛋白质组分析中发现成熟叶中表达量是芽的 5.8 倍<sup>[29]</sup>,这表明 21 kD 脱水素与水分胁迫密切相关。刘兰等<sup>[30]</sup>发现耐旱小麦在干旱胁迫下 37 kD 脱水素有表达,胁迫程度加剧表达量增加。茶树 37 kD 脱水素表达在季节与越冬期差异不明显,是否响应干旱胁迫需进一步研究。在蓝莓叶片,14 kD 脱水素蛋白高丰度表达,强烈响应低温胁迫,且与干旱胁迫也有一定相关性,蛋白和 RNA 水平表达模式非常一致<sup>[31]</sup>。西红柿中过量表达 14 kD 脱水素可提高抗旱和盐胁迫<sup>[32]</sup>,但这与茶树并不一致,可能与物种差异有关。

本实验通过 Western-blot 技术初步鉴定了 9 种不同分子量的茶树类脱水素蛋白以及在其季节和越冬期的表达模式,今后随着本实验室茶树基因组测序的完成,可以克隆出整个茶树脱水素家族基因,进一步对这些脱水素进行鉴定与功能分析,为了解茶树的抗逆分子机理奠定基础。

### 参考文献:

- [1] CLOSE T J. Dehydrins-emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins[J]. *Physiologia Plantarum*, 1996, **97**(4): 795—803.
- [2] DANYLUK J, PERRON A, HOUDE M, *et al.* Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat[J]. *Plant Cell*, 1998, **10**(4): 623—638.
- [3] RINNE P L, KAIKURANTA P L, VANDERPLAS L H, *et al.* Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): Production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration[J]. *Planta*, 1999, **209**(4): 377—388.
- [4] SUN X, LIN H H. Role of plant dehydrins in antioxidation mechanisms[J]. *Biologia*, 2010, **65**(5): 755—759.
- [5] BRAVO L A, CLOSE T J, CORCUERA L J, *et al.* Characterization of an 80 kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation[J]. *Physiol. Plant*, 1999, **106**(2): 177—183.
- [6] LIM C C, KREBS S L, ARORA R. A 25-kDa dehydrin associated with genotype and age-dependent leaf freezing-tolerance in *Rhododendron*: A genetic marker for cold hardiness? [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, **99**(5): 912—920.
- [7] WEISS J, EFEEA-CORTINES M. Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2009, **50**(4): 311—319.
- [8] 李叶云. 茶树响应低温胁迫的基因表达谱分析及抗寒相关基因的研究[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2012.
- [9] 房超. 茶树脱水素基因 *Dhn2* 的原核表达和体外功能鉴定[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2011.
- [10] 李燕, 张健. 分子生物学实用实验技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2011. 19—37.
- [11] LI Q S(李奇松), CHEN J(陈军), LIN SH SH(林世圣), *et al.* Optimization of two-Dimensional electrophoresis condition for rice grain protein and comparison of relevant proteomic methods[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2012, **38**(5): 921—927 (in Chinese).
- [12] LIN J K(林金科), ZHENG J G(郑金贵), YUAN M(袁明), *et al.* The improvement of isolation and the method of two Dimensional e-

- lectrophoresis of protein from tea plant[J]. *Journal of Tea Science*(茶叶科学), 2003, **23**(1):16—20(in Chinese).
- [13] LI Q(李 勤), HUANG J A(黄建安), LIU SH Q(刘硕谦), *et al.* Protein extraction method suitable for tea plant[J]. *Journal of Tea Science*(茶叶科学), 2011, **31**(3):173—178(in Chinese).
- [14] REN Y(任 燕), CHEN X(陈 暄), FANG W P(房婉萍), *et al.* Establishment of two-Dimensional electrophoresis system for pistil proteome analysis in tea plant[J]. *Journal of Tea Science*(茶叶科学), 2013, **33**(5):420—428(in Chinese).
- [15] ZHOU Q Q(周琼琼), SUN W J(孙威江). Establishment of extraction methods and two-Dimensional electrophoresis conditions for proteomic analysis of *Camellia sinensis*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), 2014, **35**(8):1 517—1 522(in Chinese).
- [16] LI Y Y(李叶云), SHU X T(舒锡婷), ZHOU Y Q(周月琴), *et al.* Change in physiological characteristics and cold resistance evaluation of three cultivars of *Camellia sinensis* during natural overwintering period[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 2014, **23**(3):52—58(in Chinese).
- [17] WANG W, RITA V, MONICA S, *et al.* A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis[J]. *Electrophoresis*, 2006, **27**(13):2 782—2 786.
- [18] LI Y(李 洋), HAN Y Y(韩莹琰), FAN SH X(范双喜), *et al.* Optimization of SDS-PAGE and western-blot for total protein in seedling young leaves of *Lactuca sativa* L. [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报), 2012, **28**(31):153—156(in Chinese).
- [19] GU R SH(谷瑞升), LIU Q L(刘群录), CHEN X M(陈雪梅), *et al.* Comparison and optimization of the methods on protein extraction and SDS-PAGE in woody plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 1999, **16**(2):171—177(in Chinese).
- [20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**:248—254.
- [21] SAMBROOK J, FRITISCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd[M]. *Gene Cloning & DNA Analysis An I NTRODUCTION*, New York, 1989.
- [22] JILL M F, PAMMENTERZ N W, BERJAK P, *et al.* Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat[J]. *Seed Science Research*, 1996, **6**:175—182.
- [23] FERNANDEZ M, AGUILA S V, ARORA R, *et al.* Isolation and characterization of three cold acclimation-responsive dehydrin genes from *Eucalyptus globulus*[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, **8**(1):149—162.
- [24] RABILLOUD T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses[J]. *Electrophoresis*, 1996, **17**(5):813—829.
- [25] CLOSE T J. Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature[J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, **100**(2):291—296.
- [26] SAUTER J J, WESTPHAL S, WISNIEWSKI M. Immunological identification of dehydrin-related proteins in the wood of five species of *Populus* and in *Salix caprea* L.[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1999, **154**(5—6):781—788.
- [27] ZHU B, CHOI D W, FENTON R, *et al.* Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance[J]. *Molecular And General Genetics*, 2000, **264**(1—2):145—153.
- [28] ARORA R, WISNIEWSKI M. Accumulation of a 60 kD dehydrin protein in peach xylem tissues and its relationship to cold acclimation [J]. *Hort Science*, 1996, **31**(6):923—925.
- [29] LI C F, YAN Z, YU Y, *et al.* Global transcriptome and gene regulation network for secondary metabolite biosynthesis of tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. *BMC Genomics*, 2015, **16**(1):1—12.
- [30] LIU L(刘 兰), ZHANG L SH(张林生), XING Y(邢 媛), *et al.* Expression analysis of dehydrin protein in two different drought resistant wheat cultivars at different stages under drought stress[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2011, **31**(9):1 786—1 792(in Chinese).
- [31] DHANARAJ A L, SLOVIN J P, ROWLAND L J. Isolation of a cDNA clone and characterization of expression of the highly abundant, cold acclimation-associated 14 kD dehydrin of blueberry[J]. *Plant Science*, 2005, **168**(4):949—957.
- [32] MUNOZ-MAYOR A, PINEDA B, GARCIA-ABELLAN J O, *et al.* Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, **169**(5):459—468.

(编辑:宋亚珍)