

Omics Analysis of
Halophyte *Thellungiella salsuginea*

盐生植物盐芥的 组学分析

· 阎秀峰 庞秋颖 著



科学出版社

盐生植物盐芥的组学分析

阎秀峰 庞秋颖 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是作者对盐生模式植物——盐芥多年研究成果的总结。作者利用双向电泳-质谱(2-DE-MS)技术、同位素标记相对和绝对定量-液质联用(iTRAQ LC-MS)技术、高分辨核磁共振(NMR)技术分析了盐芥的蛋白质组和代谢组,并遵循靶向代谢组学思路分析了盐芥的芥子油苷-黑芥子酶系统,进而总结了盐芥应对盐胁迫的生理特征和代谢途径,为深入研究盐芥乃至植物耐盐性机制提供了基础资料。本书还阐述了植物及盐芥应对非生物胁迫的蛋白质组学、代谢组学研究现状,突出了实验技术要点,对植物非生物胁迫的组学研究有一定的参考价值。

本书可供高等院校生物类相关专业师生、科研院所从事植物抗性生理生态学研究的相关科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

盐生植物盐芥的组学分析 / 阎秀峰, 庞秋颖著. —北京: 科学出版社, 2012

ISBN 978-7-03-035160-9

I. ①盐… II. ①阎… ②庞 III. ①十字花科-基因组-研究 IV. ①Q949.720.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 162083 号

责任编辑: 张会格 刘 晶 / 责任校对: 宋玲玲

责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencecp.com>

骏立印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 7 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2012 年 7 月第一次印刷 印张: 8 3/4 插页: 2

字数: 164 000

定价: 58.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

随着人类及多种模式生物基因组测序的完成，人们对基因的探索进入后基因组时代，开始利用转录组学、蛋白质组学和代谢组学等“功能基因组学”技术来认知复杂信号网络调控下的生理代谢过程，从而深入解析基因的功能。功能基因组学早期的研究策略多是从 mRNA 入手来解析基因的功能，这是基于细胞中 mRNA 的水平反映蛋白质表达乃至最后的细胞代谢的假设前提，而事实并非完全如此。目前已知在 DNA→mRNA→蛋白质→代谢产物的生物学过程中存在三个层次的调控，即转录水平的调控、翻译水平的调控和翻译后水平的调控。mRNA 实际上仅仅代表了转录水平的调控结果，并不能反映蛋白质的表达水平（翻译水平的调控结果），更不能完全说明在代谢水平上发生的生命事件（翻译后水平的调控结果）。生物体响应环境信号会诱发基因的特定时空表达，而体现生物体响应和适应环境信号的是以蛋白质及代谢产物为标志的生理代谢过程。显然，蛋白质组学和代谢组学技术是从“整体”上认知生物体响应环境信号的生理反应的重要手段。

盐芥是一种与拟南芥亲缘关系非常近的盐生植物，具有类似于拟南芥的生活周期短、基因组结构小、易于遗传操作、便于转化、利于进行基因组分析等优点，因而受到研究者的青睐而成为耐盐性研究的理想模式植物。我们通过解析、比较盐胁迫作用前后的盐芥蛋白质表达谱差异，从整体上分析盐胁迫条件下各类代谢途径的响应与变化，从而识别出与盐胁迫相关的特异蛋白，可以系统地解释环境信号所引发的生理代谢变化，有利于寻找典型代谢特征和特异代谢途径。我们对盐芥代谢组的进一步分析，则是通过比较代谢过程的最终产物——代谢物对盐胁迫的响应，对蛋白质组学关于代谢途径变化的研究结果给予验证，同时从代谢物角度提供更多解释生理代谢过程响应盐胁迫的信息。

本书主要包含 4 章。第一章简要介绍了盐芥属植物的系统分类、分布和起源、生物学特性和研究概况；第二章利用蛋白质组学技术分析了盐胁迫盐芥蛋白质差异表达谱，并辅以生物信息学方法明确差异表达蛋白的功能信息，探讨盐生植物应答盐胁迫的代谢特征和分子调控机制；第三章利用高分辨核磁共振技术分析了盐芥代谢组对盐胁迫的响应，进而阐述盐芥耐盐相关的代谢特征和特异代谢途径；第四章遵循靶向代谢组学思路对盐芥重要的次生代谢产物——芥子油苷及

其水解酶——黑芥子酶进行了研究，是对非靶向代谢组学研究的重要补充。此外，本书还介绍了植物应对非生物胁迫的蛋白质组学、代谢组学研究现状和国际主流的蛋白质组学、代谢组学研究的技术方案。本书部分内容的研究工作惠受国家自然科学基金项目（31070351、31170368）的资金支持，特此致谢。

本书仅是我们对盐芥组学研究工作的一份总结，许多内容还不够系统全面，一些结论也显得稚嫩，很多问题还有待于进一步探讨。由于我们的知识水平所限，书中难免有不妥之处，敬请读者批评指正。

阎秀峰 庞秋颖

2012年4月

目 录

前言

第一章 盐芥概述	1
第一节 盐芥属植物的系统分类、分布和起源	1
第二节 盐芥的生物学特性	3
第三节 盐芥的研究概况	4
参考文献	6
第二章 盐芥蛋白质组学分析	9
第一节 植物耐盐相关蛋白质组的鉴定与分析	9
一、盐胁迫信号转导	10
二、离子选择性吸收和区隔化	11
三、渗透调节	11
四、抗氧化酶系统	12
五、其他耐盐相关蛋白	12
第二节 盐胁迫盐芥和拟南芥可溶性蛋白表达分析	13
一、盐胁迫对拟南芥和盐芥生长的影响	13
二、可溶性蛋白提取及双向电泳	14
三、蛋白质胶内酶解和蛋白质鉴定	17
第三节 盐胁迫盐芥和拟南芥膜蛋白表达分析	28
一、膜蛋白的制备	29
二、iTRAQ 标记和 2D LC-MS/MS	29
第四节 拟南芥和盐芥耐盐相关蛋白的功能分析	35
一、光合作用相关蛋白	37
二、能量代谢相关蛋白	40
三、物质代谢相关蛋白	42
四、胁迫防御相关蛋白	45
五、蛋白质合成相关蛋白	47
六、蛋白质修饰、加工相关蛋白	48
七、细胞结构相关蛋白	49

八、信号转导相关蛋白	50
九、转运相关蛋白	51
十、转录组与蛋白质组的比较分析	51
本章小结	52
参考文献	53
第三章 盐芥代谢组学分析	60
第一节 代谢组学在植物非生物胁迫研究方面的应用	60
一、温度胁迫	63
二、干旱胁迫	64
三、盐胁迫	65
四、其他非生物胁迫	66
第二节 盐芥代谢组的提取与分离	66
第三节 盐芥响应盐胁迫的代谢组学分析	71
一、盐芥响应盐胁迫的代谢组主成分分析	71
二、盐芥响应盐胁迫的主要代谢物含量变化	72
三、盐芥响应盐胁迫的代谢途径分析	77
本章小结	83
参考文献	84
第四章 盐芥芥子油苷的鉴定与分析	91
第一节 植物芥子油苷代谢及其与非生物环境的关系	91
一、芥子油苷在植物中的分布	92
二、芥子油苷的合成	93
三、芥子油苷的水解(芥子油苷-黑芥子酶系统)	94
四、芥子油苷在植物与非生物环境关系中的作用	96
第二节 盐芥芥子油苷的分离与鉴定	100
一、盐芥芥子油苷的提取	101
二、盐芥芥子油苷的高效液相色谱分析	101
三、盐芥芥子油苷种类的鉴定	103
四、盐芥芥子油苷的超高效液相色谱分析	107
第三节 盐芥芥子油苷-黑芥子酶系统的发育调控	109
一、盐芥芥子油苷的器官差异	109
二、盐芥芥子油苷的生育时期差异	111
三、盐芥黑芥子酶活性的检测	112
四、盐芥不同发育时期黑芥子酶活性	113

第四节 盐芥芥子油苷-黑芥子酶系统对盐胁迫的响应	115
一、盐胁迫对不同发育时期盐芥形态和生理的影响	115
二、盐胁迫对盐芥根中芥子油苷-黑芥子酶的影响	116
三、盐胁迫对盐芥莲座叶中芥子油苷-黑芥子酶的影响	119
四、盐胁迫对盐芥花和角果中芥子油苷-黑芥子酶的影响	122
本章小结	124
参考文献	124

图版

第一章 盐芥概述

盐胁迫是植物生长发育的重要限制因子，植物对盐胁迫的响应与适应机理是植物生理生态学研究的重点和热点之一。多年来，人们利用模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 从生命的不同层次和水平针对植物耐盐性进行了诸多的研究 (Zhu, 2000; 2001; Parida and Das, 2005; Munns and Tester, 2008; Urano *et al.*, 2010)，但作为甜土植物的拟南芥与盐生植物的耐盐性存在很大差异，其在轻度盐胁迫 (约 100 mmol/L NaCl) 条件下就无法完成生活史，因而在植物耐盐机理研究方面受到局限 (Volkov *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004)。一种与拟南芥亲缘关系非常近的盐生植物——盐芥 (*Thellungiella* spp.) 受到研究者的青睐，它可以在 500 mmol/L NaCl 的生境下完成生活史 (Wang *et al.*, 2004)，有 90% ~ 95% 的 cDNA 序列与拟南芥相同，可以比较借鉴拟南芥的很多信息 (基因、蛋白质数据库及突变体系等) (Wang *et al.*, 2004)，也具有类似于拟南芥的生活周期短、基因组结构小、易于遗传操作、便于转化、利于进行基因组分析的优点，因而盐芥成为植物耐盐性研究的理想模式植物 (Volkov *et al.*, 2003; Inan *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006)。

第一节 盐芥属植物的系统分类、分布和起源

盐芥为白花菜目 (Capparales) 十字花科 (Brassicaceae) 盐芥属 (*Thellungiella*) 的一年或二年生草本植物，是拟南芥的近缘种，一度被归为拟南芥属 (*Arabidopsis*)。分类学者根据盐芥属植物细胞核和叶绿体的 DNA 序列推断，盐芥属和拟南芥属属于不同的进化分支 (Amtmann, 2009)。随着盐芥属植物基因组信息的发表 (Dassanayake *et al.*, 2011)，比较基因组学分析也印证了盐芥属与拟南芥属的独立存在 (图 1-1)。目前，有限的分子证据还不能彻底解决整体的系统发育关系，盐芥属的分类学地位尚不十分清楚。

盐芥属包含 4 个野生近缘种，分别为 *Thellungiella salsuginea* (Pallas) O. E. Schulz、*T. halophila* (C. A. Meyer) O. E. Schultz、*T. parvula* (Schrenk) Al-Shehbaz and O'Kane、*T. botschantzevii* D. A. German，分布于西伯利亚、中亚、北美洲，以及中国的内蒙古、江苏和新疆的准噶尔盆地南缘。由于分布区生态条件的

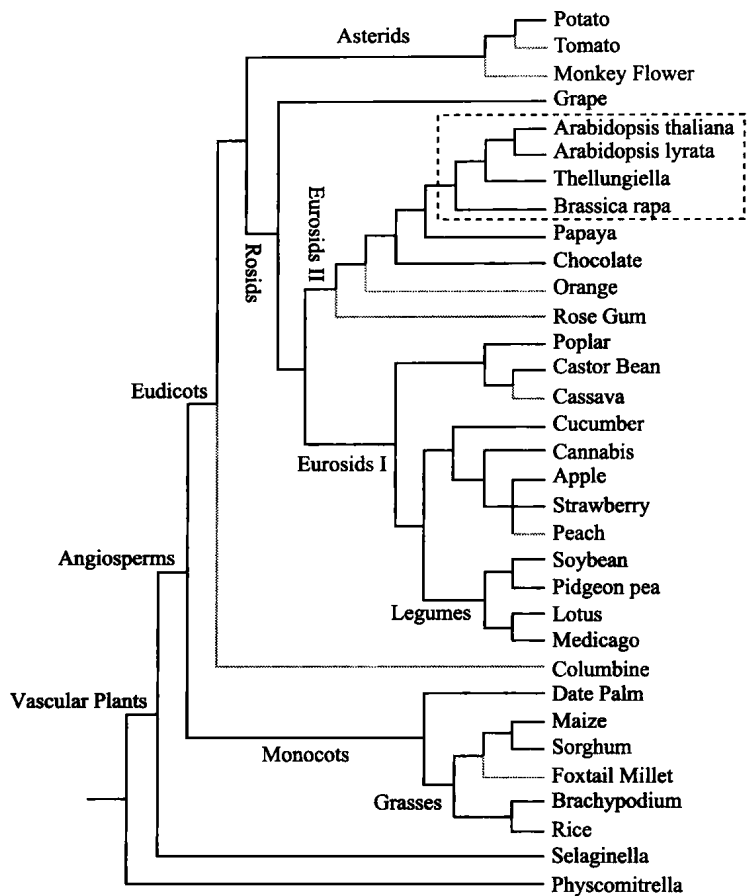


图 1-1 基于比较基因组学构建的系统进化树

美国比较基因组学网站 <http://genomeevolution.org/> 2011 年 11 月 8 日更新

差异，盐芥属植物分化出很多生态型。除了目前研究较多的两个生态型——*T. salsuginea* Shandong 生态型（分布于中国山东，图版 I A 右）和 *T. salsuginea* Yukon 生态型（分布于加拿大 Yukon 地区，图版 I A 左）以外，尚有分布在俄罗斯和哈萨克斯坦的 *T. salsuginea* Altai、Buriatia、Tuva、Yakutsk 生态型，*T. halophila* Bayanaul 生态型（图版 I B），*T. botschantzevii* Alei、Saratov 生态型，还有一些生态型分布在美国。生态型的分化是物种进化的基础，盐芥这些生态型的收集将为作者研究这种耐逆境的盐生植物如何在不同生境条件下分化为不同的生态型、分析种内生态适应的形成提供基础资源。英国格拉斯哥大学（University of Glasgow）的 Amtmann（2009）报道，目前实验室常用的山东生态型都标记为 *T. halophila* ecotype Shandong，但通过比对，实际上山东生态型应该属于 *T.*

salsuginea (图版 I A、B), 国内研究人员通常将 *T. salsuginea* 和 *T. halophila* 区分成“盐芥”(孙稚颖等, 2007) 和“小盐芥”(董美芳等, 2005; 刘发光等, 2007)。为避免混淆, 研究工作中以标明的生态型为准。本书以后几个章节所述的盐芥均指 *T. salsuginea* Shandong 生态型。

第二节 盐芥的生物学特性

盐芥植株大小、形态特征都与模式植物拟南芥非常相似(图版 II)。植株高 10~45 (60) cm, 无毛。茎于基部或近中部分枝, 光滑, 基部常淡紫色。基生叶近莲座状, 早枯, 具柄, 叶片卵形或长圆形, 全缘或具不明显、不整齐小齿, 表面蜡质; 茎生叶无柄, 长圆状卵形, 下部叶长约 1.5 cm, 向上渐小, 顶端急尖, 基部箭形抱茎, 全缘或具不明显小齿。花序花时伞房状, 果时伸长成总状, 花梗长 2~4 mm, 萼片卵圆形, 边缘白色膜质, 花瓣白色, 长圆状倒卵形, 顶端钝圆。果柄丝状, 斜向上展开。长角果线状, 略弯曲, 于果梗端内翘, 使角果向上直立。种子黄色, 椭圆形, 花期 4~5 月。

模式植物拟南芥以其植株矮小、生育期短、种子量大、自交亲和、基因组小、单拷贝基因较多、易通过简单的浸花程序被根瘤农杆菌转化等优点, 成为现代生物学许多领域特别是分子生物学领域理想的模式植物。不过, 拟南芥属于典型的甜土植物, 对盐胁迫比较敏感, 因此一般认为它不适合用于耐盐性机理的研究。盐芥是一种与拟南芥亲缘关系非常近的盐生植物, 有 90%~95% 的 cDNA 序列与拟南芥相同, 可以比较借鉴拟南芥的很多信息(基因、蛋白质数据库及突变体系等)。野生条件下分布的盐芥是天然适应非生物胁迫环境的植物, 可以在 -15℃ 低温或 500 mmol/L NaCl 的生境下完成生活史, 耐盐能力远强于只能耐受 100 mmol/L NaCl 的拟南芥(Wang *et al.*, 2004)。与拟南芥生物学特性相似, 盐芥植株矮小, 成熟个体一般直径 60~80 mm, 高 10~60 cm, 适合于在温室大量种植, 生长条件容易控制, 在筛选变异植株时很容易排除由环境变化而导致的植物形态发育变异。盐芥也是严格自花授粉植物, 易得到纯系和保持变异, 生长周期短, 在温室条件下完成生活史需 3~4 个月, 花期较长, 种子产量高, 单株收获种子 4000~8000 粒, 容易扩增变异株的种子库。但是, 实验室培养的盐芥开花必须经过 4 周以上的低温春化处理, 这样就延长了生长周期。为了克服这个问题, 上海大学通过 RNAi 技术培育出不依赖于春化处理即能启动生殖发育程序的早花盐芥(Fang *et al.*, 2006), 使盐芥更适合作为耐盐性研究的模式植物。盐芥有 7 条染色体(拟南芥 5 条), 基因组比较小, 并且同样可以用花浸染法转化。利用这种方便的转化方法就有可能获得成千上万个 T-DNA 插入突变体, 进而鉴

定获得影响耐盐性的突变体。

综上所述,盐芥具有类似于拟南芥的生活周期短、基因组结构小、易于遗传操作、便于转化、利于进行基因组分析等优点,因而盐芥受到研究者的青睐,成为耐盐性研究的理想模式植物 (Volkov *et al.*, 2003; Inan *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006)。

第三节 盐芥的研究概况

山东师范大学的曹子谊教授、张慧教授最早将盐芥引入实验室作为实验材料,并首次提议将其作为研究植物耐盐性的模式系统 (<http://thellungiella.org/>)。美国加利福尼亚大学河滨分校 (University of California, Riverside) 的 Jian-Kang Zhu 实验室以盐芥为材料开展了大量的研究工作,英国格拉斯哥大学 (University of Glasgow) 的 Anna Amtmann 实验室也做了许多重要的研究工作。Jian-Kang Zhu 实验室的工作主要是通过构建盐芥的 EMS 和 T-DNA 插入突变库,发现盐芥耐盐机制中的关键基因并对其进行功能验证,解析了许多直接参与盐芥和拟南芥抗盐胁迫的基因,很多突变体筛选的工作仍在进行中 (Zhu, 2001; Inan *et al.*, 2004; Taji *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2010)。Anna Amtmann 实验室侧重于盐芥耐盐的生理机制和基因组进化,对盐芥离子运输方面的独特生理机制进行了广泛深入的研究,并试图从基因组进化角度解析盐芥独特的耐盐机制 (Volkov *et al.*, 2003; Amtmann *et al.*, 2005; Volkov and Amtmann, 2006; Wang *et al.*, 2006; Amtmann, 2009)。此外, Wong 等 (2005) 利用 Yukon 生态型盐芥分别构建了冷、干旱和高盐诱导的 DNA 文库,测序得到 6578 个 EST、3628 个非冗余基因。Ni 等 (2007) 构建了 Gateway 载体系统的基因组文库, Wang 等 (2010) 构建了盐芥的表达基因组文库 (BIBAC), 其有利于进行大规模耐盐基因筛选和绿色荧光蛋白基因定位的工作。美国能源部联合基因组研究所 (U. S. Department of Energy Joint Genome Institute) 已经宣布对盐芥基因组进行测序。随着测序工作的完成,相信盐芥这一非常有价值的非生物胁迫抗性研究模式系统将会为人们提供更多抗逆方面的信息。这些研究使人们认识到盐芥作为实验材料对于植物耐盐生理机制探索的重要价值,盐芥作为耐盐研究的模式植物正受到世界范围内学者的关注。

在众多的工作中,有关盐芥和拟南芥耐盐性的比较研究对于阐释植物耐盐机制具有重要意义。总结过去 10 年间的相关工作,以下几个方面的研究成果值得关注。

(1) 盐芥的耐盐性在很大程度上源于其不同于拟南芥的、独特的生理生化

机制, K^+ 和 Na^+ 的组织特异性吸收和外排, 以及这两种离子的细胞区域化调节可能在盐芥的耐盐性方面发挥了重要作用 (Amtmann *et al.*, 2005)。盐芥具有控制 Na^+ 在根中积累的能力, 并且吸收 K^+ 的能力要高于拟南芥, 因而保持了更高的 K^+/Na^+ , 显示了比拟南芥更强的抗盐性 (Vera-Estrella *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Volkov and Amtmann, 2006; Ghars *et al.*, 2008)。Vera-Estrella 等 (2005) 还发现盐胁迫增加了盐芥叶片和根中液泡膜与质膜的 H^+ -ATPase 的 H^+ 转运及水解活性, 也增加盐芥叶片和根中液泡膜 Na^+/H^+ 交换的活性, 表明盐芥通过控制离子穿过液泡膜与质膜的策略来分配和储存 Na^+ 。

(2) 在盐芥中筛选得到了一些耐盐相关基因, 如 *TsVP* (Gao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008)、*ThCBL9* (Sun *et al.*, 2008)、*ThHSC70* (Zhang *et al.*, 2004)、*ThCYP1* (Chen *et al.*, 2007)、*ThIPK2* (Zhu *et al.*, 2009)。过表达这些基因可以提高玉米、棉花、烟草等植物的耐盐能力, 但过表达来源于拟南芥的同源基因也能够赋予植物较高的耐盐能力 (Gaxiola *et al.*, 2001), 因而这些所谓的耐盐相关基因并不能解释为什么盐芥的耐盐能力显著高于拟南芥。

(3) 借助大规模、高通量的组学手段, 人们发现拟南芥中的绝大部分胁迫诱导基因在盐芥中是组成型表达的, 而可能正是这种组成型的表达赋予了盐芥高度的耐盐性。Taji 等 (2004) 利用芯片技术对两者进行了比较基因组学研究。他们提取用 250 mmol/L NaCl 处理 2h 的盐芥、拟南芥及未处理的盐芥 mRNA, 与包含大约 7000 个基因的拟南芥全长 cDNA 微阵列进行杂交, 结果显示在 250 mmol/L NaCl 胁迫条件下盐芥中诱导表达的基因远远少于拟南芥, 而大量已知的与生物胁迫和非生物胁迫相关的可诱导基因, 如 *Fe-SOD*、*P5CS*、*PDF1.2*、*AtNCED*、*P-protein*、 *β -glucosidase*、*SOS1*, 非胁迫条件下在盐芥中就以高水平表达。Gong 等 (2005) 用超过 25 000 个拟南芥 DNA 片段的芯片进行杂交, 结合定量 RT-PCR 和代谢产物分析, 发现盐芥与拟南芥对盐胁迫的响应既有共同点也存在差异, 二者 40% 的基因对盐胁迫的响应是相似的, 分别与限制核糖体的功能、光合作用、细胞生长、激活渗透调节物质、转运活性、ABA 依赖途径相关, 盐芥中另外 60% 的调节基因与拟南芥中的表达不同。Pang 等 (2010) 利用双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 与同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 蛋白质组学技术分别鉴定并比较了盐芥、拟南芥盐胁迫差异表达的可溶性蛋白及疏水膜蛋白, 结果也发现盐芥中诱导表达的差异蛋白数量远远少于拟南芥。

长期以来, 如何提高植物的耐盐性、提高盐胁迫下农作物的产量一直是人们十分关注的问题。植物在盐胁迫下的反应机制和耐盐机理的研究, 是通过生物工程方法或其他措施改造植物、提高其耐盐能力的前提, 因此成为当前植物学中的研究热点之一 (Zhu, 2000; 2001; Hussain *et al.*, 2008; Munns and Tester, 2008)。

盐芥与拟南芥有着相似的分子基础,但应对盐胁迫的适应机制却不相同。随着分子生物学和生物技术的迅速发展,通过植物代谢组学、转录组学、蛋白质组学和基因组学整合,有助于从整体水平上把握植物胁迫应答机制。从代谢的角度去分析植物耐盐性将为全面、深入认识植物耐盐生理生化机制提供一条新的研究途径。

参 考 文 献

- 董美芳,袁王俊,尚富德. 2005. 小盐芥营养器官的结构特点与其盐渍环境的关系研究. 西北植物学报, 25 (6): 1077-1082.
- 刘发光,李美茹,李洪清. 2007. 小盐芥的组织培养和植株再生. 植物生理学通讯, 43 (1): 121-122.
- 孙稚颖,张学杰,李法曾. 2007. 拟南芥属与盐芥属的亲缘关系: 叶表皮和分子证据. 云南植物研究, 29 (6): 632-638.
- Amtmann A. 2009. Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. Molecular Plant, 2 (1): 3-12.
- Amtmann A, Bohnert H J, Bressan R A. 2005. Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models. Plant Physiology, 138 (1): 127-130.
- Chen A P, Wang G L, Qu Z L, et al. 2007. Ectopic expression of *ThCYP1*, a stress-responsive cyclophilin gene from *Thellungiella halophila*, confers salt tolerance in fission yeast and tobacco cells. Plant Cell Reports, 26: 237-245.
- Dassanayake M, Oh D H, Haas J S, et al. 2011. The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. Nature Genetics, 43: 913-918.
- Fang Q, Xu Z K, Song R T. 2006. Cloning, characterization and genetic engineering of FLC homolog in *Thellungiella halophila*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 347: 707-714.
- Gao F, Gao Q, Duan X G, et al. 2006. Cloning of an H^+ -PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 57: 3259-3270.
- Gaxiola R A, Li J, Undurraga S, et al. 2001. Drought- and salt- tolerant plants result from overexpression of the *AVP1* H^+ -pump. PNAS, 98: 11444-11449.
- Ghars M A, Parre E, Debez A, et al. 2008. Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K^+/Na^+ selectivity and proline accumulation. Journal of Plant Physiology, 165: 588-599.
- Gong Q, Li P, Ma S, et al. 2005. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 44: 826-839.
- Hussain T M, Chandrasekhar T, Hazara M, et al. 2008. Recent advances in salt stress biology - a review. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 3: 8-13.

- Inan G, Zhang Q, Li P, *et al.* 2004. Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiology*, 135: 1718-1737.
- Li B, Wei A Y, Song C X, *et al.* 2008. Heterologous expression of the TsVP gene improves the drought resistance of maize. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 146-159.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Reviews of Plant Biology*, 59: 651-681.
- Ni W S, Lei Z Y, Chen X, *et al.* 2007. Construction of a plant transformation-ready expression cDNA library for *Thellungiella halophila* using recombination cloning. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 1313-1319.
- Oh D H, Dassanayake M, Haas J S, *et al.* 2010. Genome structures and halophyte-specific gene expression of the extremophile *Thellungiella parvula* in comparison to *Thellungiella salsuginea* (*T. halophila*) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 154: 1040-1052.
- Pang Q Y, Chen S X, Dai S J, *et al.* 2010. Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research*, 9 (5): 2584-2599.
- Parida A K, Das A B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324-349.
- Sun Z B, Qi X Y, Li P H, *et al.* 2008. Overexpression of a *Thellungiella halophila* CBL9 homolog, *ThCBL9*, confers salt and osmotic tolerances in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 51: 25-34.
- Taji T, Seki M, Satou M, *et al.* 2004. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology*, 135: 1697-1709.
- Urano K, Kurihara Y, Seki M, *et al.* 2010. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (2): 132-138.
- Vera-Estrella R, Barkla B J, Garcia-Ramirez L, *et al.* 2005. Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiology*, 139: 1507-1517.
- Volkov V, Amtmann A. 2006. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K⁺/Na⁺ homeostasis under salinity stress. *Plant Journal*, 48 (3): 342-353.
- Volkov V, Wang B, Dominy P J, *et al.* 2003. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant Cell and Environment*, 27: 1-14.
- Wang B, Davenport R J, Volkov V, *et al.* 2006. Low unidirectional sodium influx into root cells restricts net sodium accumulation in *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1161-1170.
- Wang W, Wu Y, Li Y, *et al.* 2010. A large insert *Thellungiella halophila* BIBAC library for genomics

- and identification of stress tolerance genes. *Plant Molecular Biology*, 72: 91-99.
- Wang Z, Li P, Fredricksen M, *et al.* 2004. Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. *Plant Science*, 166: 609-616.
- Wong C E, Li Y, Labbe A, *et al.* 2006. Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140: 1437-1450.
- Wong C E, Li Y, Whitty B R, *et al.* 2005. Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella* reveal that gene expression in response to cold, drought and salinity shows little overlap. *Plant Molecular Biology*, 58 (4): 561-574.
- Zhang X, Guo S L, Yin H B, *et al.* 2004. Molecular cloning and identification of a heat shock cognate protein 70 gene, *Thhsc70*, in *Thellungiella halophila*. *Acta Botanica Sinica*, 46: 1212-1219.
- Zhu J K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124: 941-948.
- Zhu J K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 66-71.
- Zhu J Q, Zhang J T, Tang R J, *et al.* 2009. Molecular characterization of ThIPK2, an inositol polyphosphate kinase gene homolog from *Thellungiella halophila*, and its heterologous expression to improve abiotic stress tolerance in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 136 (4): 407-425.

第二章 盐芥蛋白质组学分析

基因是遗传信息的携带者，而蛋白质是生命活动的体现者，随着生物基因组信息的逐渐发表，基因密码中所隐藏的蛋白质资讯引起人们极大的研究兴趣。自1995年澳大利亚科学家 Wilkins 提出了蛋白质组 (proteome) 这一概念后 (Wilkins *et al.*, 1995)，很快在全球的生命科学领域引发了对蛋白质组学研究的热潮。在整体水平上研究细胞内蛋白质的组成及活动规律，进而了解蛋白质之间的相互作用与联系，是“后基因组时代”揭示细胞生命活动规律的一个重要的研究领域。目前，双向电泳 (2-DE) 与质谱 (mass spectrometry, MS) 联用是蛋白质组学研究最常用的方法。随着质谱技术和生物信息学的进步，多维蛋白质鉴定技术 (multidimensional protein identification technology, MudPIT)、双向荧光差异凝胶电泳 (two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)、 ^{15}N 体内代谢标记 (^{15}N metabolic labeling)、同位素标记的亲亲和标签 (isotope-coded affinity tag, ICAT)、同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute protein quantitation, iTRAQ) 等技术的应用极大地促进了蛋白质组学的发展。在植物科学研究领域，蛋白质组学将成为后基因组时代的重要研究手段。就如沃森和他的同伴所说：“我们想系统全面地了解基因的功能和研究整个生物系统，就不可避免地要研究蛋白质组”。

第一节 植物耐盐相关蛋白质组的鉴定与分析

近些年来，蛋白质组学研究技术已被应用到生命科学的各个领域，涉及各种重要的生物学现象，如信号转导、细胞分化、细胞周期调控等。虽然与人类和酵母蛋白质组学相比，植物蛋白质组学起步较晚，但是自1997年第一篇植物蛋白质组学文章发表以来，伴随着蛋白质组学技术体系的不断完善，植物蛋白质组学发展迅速。近年来，以水稻 (*Oryza sativa*) 和拟南芥等模式植物为代表的多种植物组织 (器官) 的蛋白质表达谱分析相继完成，并且植物发育和生殖过程中不同阶段的蛋白质组变化及此过程中植物响应各种环境因子的差异表达蛋白质组也被大量报道。

植物在生长发育过程中会遭遇各种不利环境，如高温、低温、干旱、高盐、