



中央民族大学青年学者文库
China Minzu University Young Scholars' Series

◎ 高 飞 / 著

盐芥应答非生物 胁迫的蛋白质 组学分析

Proteomic Analysis of
Abiotic Stress Response in
Thellungiella Halophila

中央民族大学出版社
China Minzu University Press



中央民族大学青年学者文库
China Minzu University Young Scholars' Series

◎ 高 飞 / 著

盐芥应答非生物 胁迫的蛋白质 组学分析

Protein Analysis of
Abiotic Stress Response in
Thellungiella Halophila

中央民族大学出版社
China Minzu University Press

图书在版编目 (CIP) 数据

盐芥应答非生物胁迫的蛋白质组学分析/高飞著. —北京:
中央民族大学出版社, 2018.5 重印

ISBN 978-7-5660-0582-3

I. ①盐… II. ①高… III. ①十字花科—抗性—蛋白质—
化学分析 IV. ①Q949.72

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 284843 号

盐芥应答非生物胁迫的蛋白质组学分析

著 者 高 飞

责任编辑 满福玺

封面设计 布拉格

出 版 者 中央民族大学出版社

北京市海淀区中关村南大街 27 号 邮编: 100081

电话: 68472815(发行部) 传真: 68932751(发行部)

68932218(总编室) 68932447(办公室)

发 行 者 全国各地新华书店

印 刷 厂 北京建宏印刷有限公司

开 本 880×1230 (毫米) 1/32 印张: 6

字 数 150 千字

版 次 2018 年 5 月第 2 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5660-0582-3

定 价 25.00 元

版权所有 翻印必究



高 飞 理学博士，中央民族大学生命与环境科学学院副教授，主要从事逆境植物分子生物学相关研究。发表论文30多篇，其中含SCI收录论文7篇。编写教材2部，出版译著1部。

中央民族大学
青年教师学术著作出版
编审委员会

主任：鄂义太 陈 理

委员：（按姓氏笔画排序）

云 峰 文日焕 白 薇 冯金朝 刘永佑

李东光 李曦辉 杨圣敏 邹吉忠 宋 敏

郭卫平 游 斌

总 序

中央民族大学是我们党为解决民族问题、培养少数民族干部和高级专门人才而创办的高等学府。建校六十多年来，中央民族大学认真贯彻党的教育方针和民族政策，坚持社会主义办学方向，坚持为少数民族和民族地区发展服务的办学宗旨，培养了成千上万的优秀人才，取得了许多具有开创性意义的科研成果，创建和发展了一批民族类的重点学科，走出了一条民族高等教育又好又快发展的成功之路。

今天，荟萃了 56 个民族英才的中央民族大学，学科门类齐全、民族学科特色突出，跻身于国家“211 工程”和“985 工程”重点建设大学的行列。中央民族大学已经成为我国民族工作的人才摇篮，民族问题研究的学术重镇，民族理论政策的创新基地，民族文化保护和传承的重要阵地。

教师是学校的核心和灵魂。办好中央民族大学，关键是要有一支高素质的教师队伍。为建设一支能够为实现几代民大人孜孜以求的建成国际知名的、高水平的研究型大学提供坚实支撑的教师队伍，2012 年 4 月，学校做出决定，从“985 工程”队伍建设专项经费中拨出专款，设立“中央民族大学青年学者文库”基金，持续、择优支持新近来校工作的博士、博士后出站人员以及新近取得博士学位或博士后出站资格的在职教职工出版高水平的博士学位论文和博士后出站报告。希望通过实施这一学术成果出版支持计划，不断打造学术精品，促进学术探究，助推中央民

族大学年轻教师成长，形成长江后浪推前浪、一代更比一代强的教师队伍蓬勃壮大的良好局面。

青年教师正值学术的少年期。诚如梁启超先生脍炙人口的名言所祈愿：少年智则国智，少年富则国富，少年强则国强，少年独立则国独立，少年自由则国自由，少年进步则国进步，少年胜于欧洲，则国胜于欧洲，少年雄于地球，则国雄于地球。希望在各方面的共同努力下，在广大青年教师的积极参与下，《中央民族大学青年学者文库》能够展示出我校年青教师的学术实力，坚定青年教师的学术自信，激发青年教师的学术热忱，激励广大青年教师向更高远的学术目标攀登。唯有青年教师自强不息，中央民族大学的事业才能蒸蒸日上！

中央民族大学青年教师学术著作出版

编审委员会

2013年6月19日

前 言

高盐、低温等非生物胁迫是全球农业减产的重要因素。据统计,非生物胁迫因素每年造成的减产占全球主要农作物产量损失的50%,是影响未来全球农业可持续发展的重要因素之一。研究植物应答高盐、低温等非生物胁迫的分子机理,并通过遗传工程方法改造农作物,具有重大意义。

盐芥具有较强的耐盐、耐低温逆境能力,与拟南芥、油菜的基因同源性高,是植物抗非生物逆境研究的理想模式植物。国内外已对盐芥进行了一些生理生化和转录组学研究,增进了对盐芥抗逆机理的认识。但是由于基因表达与蛋白表达并不完全一致,基因表达模式研究不能替代蛋白质表达水平的研究。在本书中,作者主要应用比较蛋白质组学技术研究了盐芥对于高盐、干旱和低温等非生物胁迫的应答规律,鉴定了一批逆境响应蛋白,揭示了盐芥适应非生物胁迫而进行的代谢调整策略,为进一步深入研究盐芥的耐逆分子机制奠定了基础,对国内外从事植物耐逆研究的同行具有一定的参考价值。

本书的主要内容来自作者2005—2008年在北京师范大学生命科学学院攻读博士学位期间的科研工作。在此对张根发教授致以诚挚的感谢!对所有支持和配合我从事科研工作的老师和同学表示衷心的感谢!对我的妻子和父母表示感谢!

作者的研究工作曾获得国家重点基础研究发展规划项目:植物应答高盐、低温胁迫的分子调控机理(项目编号:

2006CB100100) 的资助, 在此表示衷心的感谢!

衷心感谢国家自然科学基金项目 (项目编号: 31070361) 和教育部科学技术研究重点项目 (项目编号: 210266) 对我在盐芥耐逆机理研究方面的支持。

本书的出版获得了中央民族大学“青年教师发展计划”的资助, 在此表示衷心的感谢!

高 飞

2013 年 10 月于北京

目 录

第一章 绪 论	(1)
1.1 植物应答非生物逆境的蛋白质组学研究	(1)
1.1.1 植物蛋白质组学研究的意义	(1)
1.1.2 植物应答非生物逆境的 蛋白质组学研究进展	(3)
1.1.3 植物蛋白质组学领域存在的 问题和未来的展望	(19)
1.2 植物耐受非生物逆境研究模式植物——盐芥	(21)
1.2.1 盐芥的基本生物学特征	(21)
1.2.2 盐芥是植物耐受非生物 逆境研究的理想模型	(22)
1.2.3 盐芥耐受非生物逆境机理研究进展	(23)
1.3 科学问题的提出和整体试验设计	(25)
第二章 盐芥应答高盐胁迫的蛋白质组学分析	(27)
2.1 材料与方法	(29)
2.1.1 植物材料与胁迫处理	(29)
2.1.2 生理指标的测定	(30)
2.1.3 蛋白提取和蛋白定量	(30)
2.1.4 双向电泳、染色、扫描和软件分析	(31)
2.1.5 胶内酶解和质谱分析	(33)
2.1.6 统计处理	(34)

2.2 结果与讨论	(35)
2.2.1 盐芥对于高盐胁迫的生理反应	(35)
2.2.2 盐芥叶片总蛋白响应短期高盐胁迫的 蛋白质组学分析	(37)
2.2.3 盐芥根总蛋白响应短期高盐 胁迫的蛋白质组学分析	(53)
2.2.4 盐芥叶片总蛋白响应长期高盐 胁迫的蛋白质组学分析	(74)
第三章 盐芥响应高盐胁迫的磷酸化蛋白质组学分析	(84)
3.1 材料与方法	(85)
3.1.1 植物材料与胁迫处理	(85)
3.1.2 蛋白提取和蛋白定量	(85)
3.1.3 双向电泳、染色、扫描和软件分析	(86)
3.1.4 胶内酶解和质谱分析	(86)
3.2 结 果	(86)
3.2.1 盐芥根总蛋白的双向电泳和 磷酸化染色分析	(86)
3.2.2 差异磷酸化蛋白点的质谱鉴定	(88)
3.3 讨 论	(95)
第四章 盐芥根响应高盐胁迫的基因差异表达分析	(101)
4.1 材料和方法	(102)
4.1.1 植物材料与胁迫处理	(102)
4.1.2 cDNA 合成和纯化	(103)
4.1.3 抑制消减杂交	(106)
4.1.4 制备消减杂交文库	(106)
4.1.5 EST 测序和序列分析	(106)
4.2 结 果	(107)

4.2.1	短期高盐胁迫的 EST 文库的 构建和序列分析	(107)
4.2.2	EST 序列的功能分类分析	(107)
4.3	讨 论	(113)
4.3.1	与盐芥其他 EST 的比较	(113)
4.3.2	盐芥根对高盐胁迫的感受、信号 转导和基因调控	(114)
4.3.3	根功能的维持参与盐芥根 对高盐胁迫的耐受	(118)
4.3.4	生长素介导的信号通路参与 盐芥根对高盐胁迫的耐受	(120)
第五章 盐芥高盐响应基因 enolase 的 克隆及初步分析		(122)
5.1	材料与方法	(123)
5.1.1	RNA 提取和 cDNA 的合成	(123)
5.1.2	3'RACE 获得基因全长	(123)
5.1.3	原核表达	(124)
5.1.4	生物信息学分析	(125)
5.2	结果和分析	(126)
5.2.1	全长序列的克隆	(126)
5.2.2	生物信息学分析	(127)
5.2.3	融合蛋白的表达和纯化	(129)
第六章 盐芥响应低温、干旱胁迫的蛋白质组学分析		(132)
6.1	材料与方法	(134)
6.1.1	植物材料与胁迫处理	(134)
6.1.2	生长和生理指标的测定	(135)
6.1.3	蛋白提取、定量和双向电泳	(135)
6.1.4	Western blot 分析	(135)

6.1.5	实时定量 PCR 分析	(136)
6.1.6	统计处理	(137)
6.2	结果与讨论	(138)
6.2.1	盐芥对于低温和干旱胁迫的生理反应	(138)
6.2.2	盐芥叶片可溶性总蛋白的应答 低温胁迫的双向电泳分析	(140)
6.2.3	盐芥叶片低温胁迫差异表达 蛋白的质谱鉴定	(143)
6.2.4	盐芥叶片应答低温胁迫的代谢调整分析	(152)
6.2.5	盐芥低温响应蛋白 mRNA 水平和蛋白 表达水平的对比分析	(164)
6.2.6	盐芥叶片总蛋白响应干旱胁迫的 双向电泳分析和质谱鉴定	(166)
6.2.7	干旱胁迫对盐芥叶片蛋白质组的影响	(168)
6.2.8	盐芥叶片应答干旱胁迫的代谢调整分析	(171)
附 录		(174)

第一章 绪 论

1.1 植物应答非生物逆境的蛋白质组学研究

1.1.1 植物蛋白质组学研究的意义

高盐、低温、干旱等非生物逆境能对植物，特别是农作物的生长、发育和结实造成严重的不良影响，是全球农业减产的最重要因素。据估计，非生物胁迫每年造成的世界主要农作物产量减少占全部产量损失的 50%^①，而病虫害等生物胁迫造成的农作物产量损失占不到 20%。

寻找和鉴定植物抗逆关键基因，阐述植物抗非生物逆境的分子机理，进而应用植物基因工程方法改造农作物，提高主要作物对非生物逆境的耐受能力，从而保持全球粮食的稳定供应，维持未来农业的可持续发展，是植物生命科学研究面临的重要挑战之一。

^① Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H. S., et al., Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 2002, 130: 2129-2141.

目前,在抗逆基因的寻找和鉴定方面已经进行了大量的研究工作,并得到了一大批抗逆相关基因^①。目前研究人员使用的主要方法包括:基因阵列/芯片、基因表达连续分析 (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)、扩增片段长度多型性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 和大规模平行信号测序 (Massively Parallel Signature Sequencing, MPSS) 等。但是,这些基于 mRNA 数量的检测方法并不能完全揭示特定基因的表达情况,因为几乎所有基因都要通过将遗传信息传递到蛋白质来实现其功能。虽然 mRNA 的数量与蛋白质的丰度之间存在紧密联系,但是通过进行科学实验研究,研究人员越来越清晰地认识到, mRNA 的数量并不总能反映相应蛋白质的表达量。如 Yan 等发现 44 个水稻低温响应蛋白的数量与其 mRNA 数量没有相关性^②。这种 mRNA 数量与对应蛋白质表达量的一致可能与以下因素有关。

(1) 同一个基因的 mRNA 可能翻译出多个多肽/蛋白质。同一个 mRNA 的可能蛋白产物包括:折叠不正确的蛋白质,被降解的部分蛋白质,经过不同种类翻译后修饰的蛋白质,翻译后修饰程度不同的蛋白质等。

(2) 同一个基因的 mRNA 及其蛋白质的降解速率不同;同一个基因的 mRNA 数量应该与其蛋白质的生成速率正相关,但

① Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., et al., Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*. 2001, 13: 61-72. Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., et al., Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*. 2002, 31: 279-292.

② Yan, S., Zhang, Q., Tang, Z., et al., Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, 5: 484-496.

由于它们的降解速率可能不同,因而导致 mRNA 数量不能体现蛋白质数量。

(3) 蛋白质具有复杂的亚细胞定位机制。在真核生物中, mRNA 一般位于细胞质中;而由某一 mRNA 翻译得到的蛋白质可以分布在细胞质、细胞膜、细胞核、叶绿体、线粒体等细胞器或亚细胞结构中,甚至存在于多个亚结构中;而且在特定条件下,蛋白质还会发生细胞内转运,改变其亚细胞定位。

(4) 蛋白质的数量和活性受到广泛的环境影响。这些影响可能是溶质环境的物理化学因素,如 pH 值,渗透势等,也可能是各种特定的分子间相互作用,包括蛋白质与相关酶、受体、活性抑制剂等,这些分子包括蛋白质、糖类、脂类等。

单纯研究细胞内 mRNA 的数量,远不能提供基因的终产物——蛋白质的数量、活性和定位信息,更不能反映蛋白质在细胞内的空间动态分布。这种对蛋白质的时间、空间、数量、活性等的研究需求推动了十几年来(从 1994 年蛋白质组概念被提出开始)蛋白质组学的快速发展。

1.1.2 植物应答非生物逆境的蛋白质组学研究进展

植物应答非生物逆境的蛋白质组学研究的具体内容包括应用蛋白质组学手段分析干旱、高盐、高温和低温、强光以及杀虫剂、重金属等有毒物质对于植物的影响。这些研究不仅鉴定了新的基因,确定了这些基因的功能和调控模式,还揭示了广泛的细胞生理过程与植物非生物逆境胁迫应答有关。这些蛋白质组学研究主要针对植物组织的全部可溶性蛋白进行,但也有少数工作针对特定的亚细胞结构中的蛋白质进行,如叶绿体和线粒体蛋白质组。蛋白质组学研究发现非生物逆境不仅能够引起植物蛋白表达丰度的变化,还能影响蛋白质的翻译后修饰,以及蛋白质的亚细

胞定位。研究发现,不同非生物胁迫能对植物蛋白质组产生一些共同的影响,如都能诱导热激蛋白类分子的表达增强、促进抗氧化系统的活性上升以及 RuBisCO (核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶, Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase) 亚基蛋白的降解。结合代谢组学和遗传学进行的蛋白质组学研究将有助于对于植物耐受非生物逆境的耐受机制的进一步了解,同时,将蛋白质组研究与生理和农学性状结合起来,可以鉴定更多的具有作物遗传改良潜力的基因。

蛋白质组学是近十几年来刚刚成熟并完善起来的分子生物学技术,但实际上,早在 20 世纪 80 年代后期,植物响应非生物逆境的蛋白质组学研究就已经开始。尽管在当时,对于植物基因组中绝大多数蛋白的具体功能一无所知,一些早期的蛋白质组学研究已经发现非生物逆境能诱导新蛋白的合成^①、非生物逆境引起植物不同膜组分的变化^②、非生物逆境对于植物蛋白质组的影响因植物遗传背景的不同而有差异^③。

蛋白测序技术的诞生使得受非生物逆境影响的具体蛋白名单开始见诸报道。Costa 等利用蛋白测序技术鉴定了海岸松 (maritime pine) 干旱胁迫下针叶中 10 个差异表达蛋白的身份^④,其中包括丰度上调的咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶、低分子量热激蛋白、铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn SOD)、谷胱甘肽过氧化物

① Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* 1987, 83: 517-524.

② Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., Dupont F. M., The effects of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots. *Plant Physiol.* 1988, 88: 1263-1273.

③ Zivy, M., Genetic variability for heat shock proteins in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1987, 74: 209-213.

④ Costa, P., Bahrmann, N., Frigerio, J. M., et al., Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol. Biol.* 1998, 38: 587-596.