

## 蛋白质组学及其在植物营养学研究中的应用

金晓芬 杨肖娥\* 冯英

浙江大学环境与资源学院, 教育部环境修复与生态健康重点实验室, 杭州 310029

### Proteomics and Its Application in Plant Nutrition Research

JIN Xiao-Fen, YANG Xiao-E\*, FENG Ying

Key Laboratory of Environmental Remediation and Ecosystem Health of Ministry of Education, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

**提要** 概述了作为后基因组学时代功能基因组学研究的重要组成部分的蛋白质组学及其技术在植物营养学中的应用, 包括养分和环境胁迫下植物的蛋白质组学、植物激素蛋白质组学的研究进展, 并对其前景作了展望。

**关键词** 蛋白质组学; 养分与环境胁迫; 激素调控

人类基因组“工作框架图”的完成, 意味着后基因组时代的到来。生命科学研究的重点已经从结构基因组学转移到了功能基因组学的研究, 而功能基因组学主要包括转录组学、蛋白质组学和代谢组学。“蛋白质组”(proteome)这个概念最先是Wilkins等<sup>[1]</sup>提出, 指由一个基因组, 或一个细胞、组织表达的所有的蛋白质。蛋白质组学有望在基因组序列与细胞学行为之间起到桥梁作用<sup>[2]</sup>。因此, 蛋白质组学的研究越来越受到人们的关注, 与基因组学共同承担起从整体水平上解析生命现象的重任。

与植物遗传学和生理学相结合, 植物蛋白质组学的研究得到了一定的发展<sup>[3]</sup>。目前, 在植物的遗传多样性、突变体、生理学、蛋白质数据库、组织及器官、亚细胞水平等有关蛋白质组学的研究已经取得了一些进展。随着拟南芥、水稻基因组序列的完成和其他植物基因组及EST序列数据的越来越多<sup>[4,5]</sup>, 植物蛋白质组学的研究将会越来越活跃, 并将对植物生物学产生重大影响。

#### 1 应用于蛋白质组学研究的生物技术

蛋白质组学是后基因组时代涌现的新研究领域, 包括表达蛋白组学(expression proteomics)和功能蛋白组学(functional proteomics)两部分内容。表达蛋白组学研究基因编码所有蛋白质的识别和定量, 及其在细胞中的定位和在后转录阶段进行的修饰; 功能蛋白组学主要研究蛋白质之间的相互作用, 确定蛋白质在特定通道和细胞结构中的作用, 说明蛋白质结构和功能间的相互关系。蛋白质组学规模化对蛋白质的研究可以追溯到30年前O'Farrell<sup>[6]</sup>创建的蛋白质高分辨率双向凝胶电泳

(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE), O'Farrell从双向电泳的大肠杆菌细胞抽提物中分离到1100个蛋白质组分。蛋白质组学借用许多技术整体分析基因的表达情况。目前, 2-DE技术、蛋白质双向电泳图谱的数字化和采用分析软件进行的大规模数据处理技术以及质谱技术(mass spectrometry, MS)是表达蛋白质组学研究中的三大基本支撑技术。

**1.1 2-DE** 蛋白混合物的重复性、高分辨分离是一个成功的蛋白质组学的关键。目前, 2-DE依然是大多数蛋白质组研究中分离复杂蛋白混合物所选择的核心技术, 这是由于它在同时分离成千蛋白质时所具有的无可比拟的分离能力, 以及随后的可用于计算机定量分析差异表达蛋白质的高灵敏度的显色技术, 还有对2-DE胶上蛋白质用高灵敏度微量化学方法进行鉴定和表征相对比较容易<sup>[7]</sup>。

样品制备是2-DE的核心技术。由于2-DE所分析样品的多样性, 没有一种制备方法可以普遍适用于各种样品<sup>[7]</sup>。对于植物样品, 比较常用的是三氯乙酸-丙酮沉淀法<sup>[8]</sup>。此后, 许多研究者在此方法的基础上进行了改进。

虽然目前对蛋白质组学中蛋白分离方法的研究有些进展, 但还没有其他方法可像2-DE那样, 具有同时分离和显现几千个蛋白质的能力。2-DE的局限性主要是疏水蛋白和膜蛋白的分析以及缺乏

收稿 2005-01-06 修定 2005-10-27

资助 国家杰出青年基金(39925024)和浙江省自然科学基金重点项目(Z504219)。

\*通讯作者(E-mail: xyang@zju.edu.cn; Tel: 0571-86971907)。

灵敏和可靠的蛋白质定量方法<sup>[7]</sup>。

**1.2 MS** 20世纪80年代后期,电喷雾离子化质谱(electro-spray ionization mass spectrometry,ESI-MS)和基质辅助的激光解析离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry,MALDI-TOF-MS)技术的发明,以及它们在蛋白质分析中的成功应用加速了蛋白质组学规模化研究。对2-DE所产生的上千个蛋白可用传统的方法如Edman降解法等进行分析,但这些方法非常费时费力。MS可解决这一难题。目前,用于分析蛋白质和肽的样品离子化技术主要包括MALDI-TOF-MS和ESI-MS。基质辅助激光解析离子化质谱(matrix-assisted laser desorption ionization,MALDI)通常与飞行时间质谱(time of flight mass spectrometry,TOF-MS)相结合,TOF主要用于测量分析物飞过固定的路径所需的时间。另一种鉴别蛋白质的方法是串联质谱(MS/MS)。经质谱分析的肽段进一步断裂并再次进行质谱分析时可得到肽序列的部分信息<sup>[9]</sup>。

MS能清楚地鉴定蛋白质并能准确地测量肽和蛋白质的相对分子质量、氨基酸序列及翻译后的修饰,是蛋白质组学研究中的一种有效手段。此种技术还能快速鉴定大量蛋白质点,而且灵敏度较高,在一些情况下仅需 $10^{15}$  fmol的蛋白<sup>[9,10]</sup>。但此种技术只能分离气体状态的带电分子,而且1次只能分析带正电或带负电的分析物。

**1.3 酵母双杂交系统(yeast-2-hybrid system)** 蛋白质相互作用的双杂交系统是以真核细胞的转录因子的结构核活性特点为基础的<sup>[11]</sup>,其建立得益于人们对真核生物调控转录起始过程的知识。

用酵母双杂交系统检测蛋白质之间的相互作用时常会出现假阳性或假阴性的问题,因此人们对此系统作了改进,并且将其扩展应用于检测DNA-蛋白质、RNA-蛋白质、小分子-蛋白质之间的相互作用中<sup>[9~11]</sup>。

**1.4  $\mu^{\circ}\times\text{Ö}\acute{\text{E}}\acute{\text{U}}\acute{\text{I}}\acute{\text{r}}\acute{\text{D}}\acute{\text{A}}\acute{\text{I}}\acute{\text{c}}\acute{\text{N}}\acute{\text{S}}$**  在蛋白质组学的研究中,2-DE和MS分析后描述蛋白质的一种方法是肽质量指纹图谱。这种方法需精确地确定多肽经过蛋白酶消化后少数几个肽的相对分子质量后搜索GenBank、PIR、SWISS-PROT Database和EMBL(TrEMBL)等数据库。

SWISS-PROT(<http://www.expasy.ch/>)是目前在蛋白质组学领域中应用最广泛的数据库,也是

一个对数据人工审读很严格的一个蛋白注释性的数据库。该数据库除了含蛋白质序列信息外,对每一条数据都有详细注释,包括蛋白表达、功能、结构域、突变体、翻译后的修饰,以及齐全的引文和与许多其他数据库的链接等。一般来说,任何蛋白质序列数据的搜寻和比较都应当从SWISS-PROT开始。另外,还有一种不同类型的蛋白质组数据库就是2-DE蛋白表达数据库。这些数据库以生物、细胞或组织的2-DE胶分离为基础,数据库中包含了2-DE胶图谱、相关的研究样品以及胶上鉴定的蛋白信息。

## 2 蛋白质组学在植物营养学研究中的应用

**2.1 养分和环境胁迫下植物的蛋白质组学** 目前,众多植物营养学家们通过多年的努力已经筛选到许多养分胁迫下的植物突变体,而且对这些突变体的养分吸收、转运的生理生化机制都已经或正在进行深入的研究,试图揭示其养分吸收调控的机制。同时,应用蛋白质组学的方法对这些突变体基因突变引起的蛋白质表达变化的研究也已起步,期望能通过这些研究进一步揭示植物的细胞调控机制。

养分缺乏和过量胁迫会影响植物的正常生长发育,引起一些生理生态过程的改变,这些改变可以引起大量蛋白质种类和表达量上发生变化(表1)。Suzuki等<sup>[12]</sup>对分别在缺铁或充分供铁溶液培养的大麦根提取的蛋白以双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis,2-D PAGE)结合Edman降解测序进行分析的结果表明,在缺铁培养的植物根系中,有7个蛋白(标记为C、D、G、V、W、X、Y)的含量高于足铁溶液培养的植物根系。序列分析时发现,D蛋白为分子量为36 kD的缩氨酸,W蛋白是甲氨酸脱氢酶,C蛋白为腺嘌呤磷酸核糖基转移酶,Y蛋白质与*Ids3*基因的cDNA序列的翻译产物完全匹配。因此,在缺铁胁迫的大麦根系中,甲氨酸脱氢酶、腺嘌呤磷酸核糖基转移酶、*Ids3*基因产物积累量增加。Herbik等<sup>[13]</sup>分析了野生型番茄(*Lycopersicon esculentum*)和缺铁突变体的蛋白质2-DE图谱,并在PVDF膜上用电印迹法找到染色后的蛋白质点,采用气相蛋白质测序仪进行蛋白质测序和同源关系的比较研究,鉴定了参与无氧代谢和胁迫防御的几种酶,如甘油醛-3-磷酸脱氢酶、甲酸脱氢酶、抗坏血酸过氧化物酶、超氧化物歧化酶(SOD)等。在铁缺乏的野生株和铁充

表1 养分与环境胁迫下植物的蛋白质组变化

植物种类	胁迫类型	蛋白质组变化情况	参考文献
水稻	不同氮水平	有12个蛋白表达有差异, 其中9个蛋白的氨基酸序列分别与RuBisCO大亚基、酸耐性调节蛋白、核蛋白、SOD、二硫化物异构酶前体、HI0056蛋白同源	14
小麦	不同氮水平	55个蛋白点在品种间存在显著差异, 76个蛋白受氮素处理水平的影响显著, 20个蛋白在品种和氮素处理交互影响下差异显著	15
拟南芥	缺钾	100多个在缺K <sup>+</sup> 胁迫3 h和7 d的拟南芥幼苗的蛋白中, 29个蛋白与新陈代谢有关, 17个蛋白参与信号转导, 14个蛋白在翻译和转录中起作用, 6个蛋白与防御机制相关, 2个蛋白参与养分转运和储存	16
大麦	缺铁	有7个蛋白质含量提高, 确认了其中4个蛋白质为缩氨酸、甲氨酸脱氢酶、腺嘌呤磷酸核糖转移酶、 <i>Ids3</i> 基因产物	12
番茄	缺铁	鉴定了参与无氧代谢和胁迫防御的几种酶, 如甘油醛-3-磷酸脱氢酶、甲酸脱氢酶、抗坏血酸过氧化物酶、SOD等, 这些酶的表达量都有增加	13
玉米	缺氧和低氧	46个蛋白质的含量发生变化	20
水稻	干旱	有42个蛋白点的丰度在干旱胁迫下变化明显, 其中27个点在两个品种中显示了不同的反应方式; 恢复正常灌溉10 d后, 所有蛋白质的丰度完全或在很大程度上恢复到与未作处理的一样	17
海岸松	干旱	有38个蛋白质受干旱影响	18
甜菜	干旱	79个蛋白点有明显变化, 两种不同基因型甜菜在干旱胁迫下的有些蛋白上调或下调方式有差异	19
水稻	盐胁迫	有35个蛋白质被盐胁迫诱导, 17个蛋白质被抑制	22
烟草	盐胁迫	有20个蛋白点的丰度有变化	25
水稻	盐胁迫	50 mmol·L <sup>-1</sup> NaCl处理24 h, 有8个蛋白上调1~3倍, 其中7个蛋白表达水平在24 h达到最高而处理48 h后表达水平下降, 但其中1个蛋白(被鉴定为SOD)却是表达一直增强的	23
小麦	热胁迫	热处理引起23个蛋白上调1.4~3.5倍, 而19个蛋白明显下调(1.4~7.8倍)	26
水稻	臭氧	52个蛋白表达有差异, 臭氧引起叶片中与光和作用有关的蛋白量显著减少	21
拟南芥	除草剂安全剂 benoxacor	分子量为26 kD的一个多肽含量显著地增加, 这个多肽的分子量与大多数植物的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)亚基相似	24

足与铁缺乏的突变株的根尖中, 这些酶的表达量都增加。Konishi等<sup>[14]</sup>采用2-D PAGE等蛋白质组学方法分析了不同氮素水平下水稻感染稻瘟病后的蛋白质表达特点。他们发现, 不同氮素水平下有12个蛋白表达有差异, 其中9个蛋白的氨基酸序列分别与RuBisCO大亚基(024、087、122、#a)、酸耐性调节蛋白(093)、核蛋白(109)、SOD(158)、二硫化物异构酶前体(#b)、HI0056蛋白(#c)同源。Bahrman等<sup>[15]</sup>研究了不同氮素水平[0、2、8、20 mg(N)·植株<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>]下2个小麦品种(2个品种低氮水平下产量不同)蛋白表达差异。他们通过2-DE等技术分离到524个蛋白点, 其中55个蛋白点在品种间存在显著差异, 76个蛋白受氮素处理水平的影响显著, 20个蛋白在品种和氮素处理交互影响下差异显著。采用液相-质谱(LC-MS/MS)鉴定了14个蛋白质, 并分析了蛋白的可能功能, 发现有8个是与碳代谢过程有关的蛋白质。Kang等<sup>[16]</sup>在分离鉴定100多个在缺K<sup>+</sup>胁迫3 h和7 d的拟南芥幼苗的蛋白中发现, 有29个蛋白与新陈代谢有关, 17个蛋白参与信号转导, 14个蛋白在翻译和转录中起作用, 6个蛋白与防御机制相关, 2个蛋白参与养分的转运和储存。

在植物的生长生存环境中, 常常受到来自非生物因子的胁迫, 如干旱、渍涝、盐害、低温等, 这些胁迫严重的影响了植物的生长发育和生存。应用蛋白质组学技术研究这些胁迫下植物组织细胞中蛋白质在种类和表达量上的变化, 可以进一步了解植物适应这些不利条件的机制。Salekdeh等<sup>[17]</sup>提取了2个水稻品种(*Oryza sativa* L. cv. CT 1993和cv. IR 62266)干旱胁迫下以及恢复灌溉后的叶片蛋白质, 并进行了蛋白质组分析, 结果在电泳胶上得到了1000多个蛋白点, 发现有42个蛋白点的丰度在干旱胁迫下变化明显, 其中27个点在两个品种中显示了不同的反应方式。恢复正常灌溉10 d以后, 所有蛋白质的丰度完全或在很大程度上恢复到与未作处理的一样。Costa等<sup>[18]</sup>发现, 海岸松(*Pinus pinaster*)中38个受干旱影响的蛋白质中, 有24个是由干旱诱导产生, 而且不同基因型对干旱胁迫的反应差别很大。Hajheidari等<sup>[19]</sup>发现, 干旱胁迫下, 甜菜(*Beta vulgaris* L.)叶子中79个蛋白点有明显变化, 而且两种不同基因型甜菜在干旱胁迫下的有些蛋白上调或下调方式有差异。Chang等<sup>[20]</sup>对玉米根尖在缺氧和低氧胁迫下的蛋白质合成模式进行了分析, 通过[S<sup>35</sup>]-甲

硫氨酸标记总蛋白质进行定量分析, 在含氧正常、低氧、缺氧环境中找到了262种单个蛋白质, 其分子量在36~99 kD之间, 其pI为6.88~5.70。同时对48种蛋白质经离析、胰酶消化以后运用MS鉴定出了46种蛋白质, 并发现这46种蛋白质合成比例发生了改变。他们认为, 低氧处理的效应不仅仅是缺氧胁迫诱导的糖酵解酶的增加。Agrawal等<sup>[21]</sup>发现, 水稻幼苗在臭氧胁迫下, 52个蛋白表达有差异, 臭氧引起叶片中与光和作用有关的蛋白显著减少。Ramani和Apte<sup>[22]</sup>用放射性同位素自显影2-DE研究了水稻幼苗盐胁迫下多基因的瞬时表达发现, 至少有35个蛋白质受盐胁迫诱导, 17个蛋白质受抑制, 其中有20个是首次报道的低丰度蛋白。这些发现对寻找渗透压应答新基因, 尤其是那些在植物耐盐性获得中起瞬时调节作用的基因有重要意义。Abbasi和Komatsu<sup>[23]</sup>研究了不同浓度(50、100、150 mmol·L<sup>-1</sup>) NaCl处理不同时间(6~48 h)的水稻叶鞘中蛋白的表达变化, 发现50 mmol·L<sup>-1</sup>NaCl处理24 h的有8个蛋白上调1~3倍, 其中7个蛋白表达水平在24 h时达到最高, 而处理48 h后表达水平下降, 但其中1个蛋白(鉴定为SOD)表达却是一直增强的。DeRidder等<sup>[24]</sup>提取经100 μmol·L<sup>-1</sup>除草剂安全剂benoxacor处理的拟南芥幼苗的蛋白, 以2-DE分析时发现, 与未经除草剂安全剂处理的相比, 分子量为26 kD的一个多肽含量显著地增加, 这个多肽的分子量与大多数植物的谷胱甘肽-S-转移酶亚基相似。Dani等<sup>[25]</sup>提取了盐胁迫下烟草(*Nicotiana tabacum*)叶子的非原生质体, 通过2-DE分析发现, 有20个蛋白点的丰度有变化。Majoul等<sup>[26]</sup>研究热胁迫对六倍体小麦籽粒蛋白质组的影响时发现, 有43个蛋白受热处理影响, 其中只有1个蛋白是由热胁迫诱导产生的, 与未经处理的相比, 热处理引起23个蛋白上调1.4~3.5倍, 而19个蛋白明显下调(1.4~7.8倍)。

**2.2 植物激素的蛋白质组学** 激素对植物的生长发育有重要的调控作用。目前, 应用蛋白质组学的技术研究植物激素的信号转导和调控机制也已经取得了一些进展。

Komatsu等<sup>[27]</sup>将从经过含1 μmol·L<sup>-1</sup>油菜素内酯处理48 h的水稻的叶基部提取的蛋白质进行2-D PAGE与MS分析的结果表明, 与用水处理相比, 有6个蛋白质的量增加, 这6个蛋白质是:

LJ133、LJ195、LJ258、LJ262、LJa、LJb。序列分析表明, 其中有2个蛋白点(LJ258、LJ262)与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基同源, 1个蛋白(LJ133)与糖降解的一个关键酶——甘油醛-3-磷酸脱氢酶同源, 其他的3个蛋白质(LJ195、LJa、LJb)未显示出与数据库中的蛋白质显著同源。Shen和Komatsu<sup>[28]</sup>将用5 μmol·L<sup>-1</sup>赤霉素处理水稻叶鞘不同时间后以2-DE分离和图像分析表明, 有33个蛋白点发生变化, 其中21个蛋白点表达增强, 12个蛋白表达减弱, 说明赤霉素处理的水稻叶鞘中至少有30多个基因的产物与之有关。他们对其中的钙网蛋白(calreticulin)进一步分析时发现, 它有2个不同pI的蛋白质, 随着赤霉素处理时间增加, pI 4.0的蛋白点逐渐消失, 而pI 4.1蛋白点浓度逐渐增加。由此他们认为, 钙网蛋白是赤霉素信号传递调节叶鞘伸长中一个重要组分。Moons等<sup>[29]</sup>鉴定水稻根中3个ABA诱导的蛋白质并测定其氨基酸序列的结果表明, 其中有2个蛋白质属于胚胎后期丰富蛋白(LEA)的2组和3组, 还有1个还未得到确认。Rakwal和Komatsu<sup>[30]</sup>用外源茉莉酸处理水稻的幼苗组织后, 以2-D PAGE分析时发现, 水稻的茎和叶中可诱导出新蛋白质的产生。对蛋白质点进行N端和内部测序及免疫杂交技术分析的结果表明, 茎中有28 kD的蛋白酶抑制剂(BBPIN)和酸性的与病理相关的分子量为17 kD的蛋白质(PR-1)。

### 3 结束语

蛋白质组学为在蛋白质水平上大规模地研究基因的功能提供了一套有力的工具和方法, 目前正广泛应用于生命科学研究领域。蛋白质组学研究的途径有两条: 一条是与基因组学的研究一样, 力图“查清”生物体基因编码的所有蛋白质, 建立蛋白质组学数据库; 另一条途径则是着重于寻找和筛选任何有意义的因素引起的2个样本之间的差异蛋白质谱, 从而揭示细胞生理和病理状态的进程与本质、对外界环境刺激的反应途径以及细胞调控机制, 同时获得对某些关键蛋白的定性和功能分析。目前, 这两条途径已在植物个体水平上如遗传多样性、基因突变、植物生理等的蛋白质组, 植物组织和器官如叶绿体水平和亚细胞水平上的植物蛋白质组研究中取得了较大进展。

现在, 蛋白质组学研究技术在植物营养学中的应用还仅仅处于起步阶段。其应用前景有以下

两个方面: (1)在整体蛋白质水平上研究植物养分吸收、转运机制; (2)寻找逆境胁迫诸如干旱、洪涝、低温、养分缺乏或过量、有毒污染物等因素引起的差异蛋白质图谱, 揭示植物逆境营养生理机制以及细胞调控机制。今后, 随着蛋白质组学的研究技术方法的不断创新与发展, 其在植物营养学中的应用将会成为人们深入了解植物的养分吸收转运机制、逆境生理分子机制的新途径。

### 参考文献

- 1 Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13: 19~50
- 2 Dove A. Proteomics: translating genomics into products? *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 233~236
- 3 Guo YM, Shen SH, Jing YX et al. Plant proteomics in the post-genomic era. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(6): 631~641
- 4 van Wijk KJ. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol*, 2001, 126: 501~508
- 5 Jun Yu, Songnian Hu, Jun Wang et al. A Draft sequence assembly of the rice genome (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*). *Science*, 2002, 296(5565): 79~92
- 6 O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, 250(10): 4007~4021
- 7 Pennington SR, Dunn MJ. 钱小红, 贺福初译. 蛋白质组学从序列到功能. 北京: 科学出版社, 2002
- 8 Damerval C, Vienne D, Zivy M et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52~54
- 9 邹清华, 张建中. 蛋白质组学的相关技术及应用. *生物技术通讯*, 2003, 14(3): 210~213
- 10 Perrot M, Saglicocco F, Mini T et al. Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae* (update 1999). *Electrophoresis*, 1999, 20(11): 2280~2298
- 11 梁国栋. 最新分子生物学实验技术. 北京: 科学出版社, 2001
- 12 Suzuki K, Itai R, Suzuki K et al. Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. *Plant Physiol*, 1998, 116: 725~732
- 13 Herbig A, Geritch A, Horstmann C et al. Iron and copper-nutrition dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotamine-free mutant chloronerva. *Plant Physiol*, 1996, 111: 533~540
- 14 Konishi H, Ishiguro K, Komatsu S. A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. *Proteomics*, 2001, 1: 1162~1171
- 15 Bahrman N, Gouis JL, Negroni L et al. Differential protein expression assessed by two-dimensional gel electrophoresis for two wheat varieties grown at four nitrogen levels. *Proteomics*, 2004, 4: 709~719
- 16 Kang JG, Pyo YJ, Cho JW et al. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by K<sup>+</sup> deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, 2004, 4: 3549~3559
- 17 Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2002, 2: 1131~1145
- 18 Costa P, Pionneau C, Bauw G et al. Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. *Electrophoresis*, 1999, 20: 1098~1108
- 19 Hajheidari M, Noghabi MA, Askari H et al. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 2005, 5: 950~960
- 20 Chang WW, Huang L, Shen M et al. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol*, 2000, 122: 295~318
- 21 Agrawal GK, Rakwal R, Yonekura M et al. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, 2002, 2: 947~959
- 22 Ramani S, Apte SK. Transient expression of multiple genes in salinity-stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bura Rata). *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 233: 663~667
- 23 Abbasi FM, Komatsu S. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics*, 2004, 4: 2072~2081
- 24 DeRidder BP, Dixon DP, Beussman DJ et al. Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1497~1505
- 25 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
- 26 Majoul T, Bancel E, Tribol E et al. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics*, 2004, 4: 505~513
- 27 Komatsu S, Konishi H, Shen SH et al. Rice proteomics: a step toward functional analysis of the rice genome. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(1): 2~10
- 28 Shen SH, Komatsu S. Characterization of proteins responsive to gibberellin in the leaf sheath of rice (*Oryza sativa* L.) seedling using proteome analysis. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26: 129~135
- 29 Moons A, Gielen J, Vandekerckhove J et al. An abscisic-acid and salt-stress responsive rice cDNA from a novel plant gene family. *Planta*, 1997, 202: 443~454
- 30 Rakwal R, Komatsu S. Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis. *Electrophoresis*, 2000, 21: 2492~2500