

基于 Label – free 技术的不同钾浓度下烟草苗期叶片差异蛋白质组学研究

肖泽凡¹,朱崇文¹,戴林建¹,宋 浩²,钟 军¹

(1. 湖南农业大学 农学院 烟草系,湖南 长沙 410128; 2. 湖南中烟工业有限责任公司,湖南 长沙 410014)

摘要: 为了解烟草在不同钾浓度下苗期叶片差异蛋白质的表达情况,分别在高钾和正常钾营养液中培育烤烟品系,应用 Label – free 蛋白质定量技术分析高钾与正常钾处理苗期叶片的差异蛋白质,对分离鉴定的差异蛋白质进行系统的生物信息学分析,探讨不同钾浓度下差异蛋白质的分布、功能及其作用机制。结果表明,与正常钾处理相比,高钾处理烟草苗期叶片中共有 41 个差异蛋白质,20 个发生下调表达,21 个发生上调表达;高钾处理中烤烟苗期叶片差异蛋白质主要定位在细胞组分和有膜细胞器中,大部分差异蛋白质为碳水化合物代谢相关功能蛋白质,且主要参与物质代谢相关途径。

关键词: 烟草; 叶片; 高钾; 差异蛋白质组学; 蛋白质非标记定量

中图分类号: S572 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 – 3268(2019)05 – 0037 – 07

Differential Proteomics Analysis of Tobacco Leaf at Seedling Stage under Different Potassium Concentration with Label-free Technology

XIAO Zefan¹,ZHU Chongwen¹,DAI Linjian¹,SONG Hao²,ZHONG Jun¹

(1. Tobacco Department of Agricultural College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. China Tobacco Hunan Industrial Co., Ltd., Changsha 410014, China)

Abstract: In order to understand the differential protein expression situation of tobacco leaf at seedling stage under different potassium concentration, the flue-cured tobacco was cultivated in high potassium and normal potassium nutrient solution to analyze the differential proteins of leaf at seedling stage with Label-free protein quantitative technique, and these differential proteins isolated and identified were systematically analyzed by bioinformatics to explore the distribution, function and mechanism of differential proteins under different potassium concentration. The results showed that there were 41 differential proteins by comparing the high potassium treatment with the normal potassium treatment, 20 proteins were down-regulated and 21 proteins were up-regulated. The differential proteins affected by high potassium concentration were mainly located in cell components and membrane organelles, a large part of differential proteins were functional proteins which were related to carbohydrate metabolism, and mainly involved in substance metabolism pathways.

Key words: Tobacco; Leaf; High potassium; Differential proteomics; Label-free

钾是植物重要的矿质元素,参与众多生理活动,如酶的活化、气孔开闭、膜电势的维持以及渗透调节等^[1]。钾离子参与多种酶的活化,在植物生长发育

及蛋白质合成中发挥重要功能^[2]。烟草是典型的喜钾作物,钾也是烟草吸收最多的一种矿质元素,对提高烟叶燃烧性、改善烟叶品质、减少焦油产生均有

收稿日期:2018 – 11 – 01

基金项目:湖南中烟工业公司科技计划项目(201743000934100)

作者简介:肖泽凡(1994 –),男,湖南郴州人,在读硕士研究生,研究方向:烟草育种。E – mail:497400485@qq.com

通信作者:钟 军(1973 –),女,湖南长沙人,教授,博士,主要从事烟草育种相关研究。E – mail:zhbjp2005@126.com

重要作用^[3]。因此,研究不同钾浓度环境下烟叶蛋白质的差异对烟草栽培调控意义较大。

蛋白质组学是研究细胞、组织或生物体全套蛋白质组成及其变化规律的学科,具体包括蛋白质的表达水平、翻译后修饰的种类等,从整体水平上研究蛋白质的组成和调控规律^[4]。张柳等^[5]研究了烟草叶片衰老过程的蛋白质差异,认为与光合作用等合成代谢相关的蛋白质多下调表达,与逆境反应和呼吸作用等分解代谢相关的蛋白质多上调表达。徐莹等^[6]研究 3 个主栽烟草品种的差异蛋白质,鉴定出的蛋白质大部分参与光合作用、物质代谢或与抗逆性相关。可见,蛋白质组学分析能够揭示烟叶蛋白质的变化和相关功能,为丰富烟草基础科学研究提供基础。蛋白质非标记定量(Label-free)技术是蛋白质组学研究中常见的方法,它是一种不对蛋白质进行任何标记的定量方式,可对不同来源的同一样本的定量数据进行比较,数据移植性高,且对质谱仪的分辨率、灵敏度和稳定性等有着很高的要求^[4]。黄宇等^[7]基于 Label-free 方法对小麦抗病基因系和背景品种叶片蛋白质进行比较分析,发现大部分差异蛋白质具备结合和催化等功能,参与代谢、细胞过程和应激反应等生物进程,为进一步研究小麦条锈病抗性奠定了基础。

目前,蛋白质组学在各个领域都有着广泛的应用,烟草中也有不少相关研究,但在不同钾浓度环境下应用 Label-free 方法探索烟草差异蛋白质的研究较少。鉴于此,在高钾和正常钾水平下对烤烟品系进行水培培育,并利用 Label-free 技术鉴定高钾与正常钾浓度下苗期叶片差异蛋白质的表达情况,探究不同钾浓度下叶片差异蛋白质的定位、功能以及参与的通路途径,为进一步了解高钾环境中烟叶蛋白质的变化以及烤烟栽培调控提供基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料、试剂与仪器

供试烤烟材料为戴林建等^[8]自育的烤烟高钾品系 HKDN-5,该品系农艺性状稳定,株高、节距、茎围等农艺性状和叶片中总氮、蛋白质、烟碱、钾等化学成分含量较普通烤烟优势明显^[9]。

主要试剂有 Tris 饱和酚、牛血清蛋白、Trypsin,均购自 Promega 生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。

主要仪器:Q-Exactive 质谱仪,购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Nano ACQUITY 超高效液相色谱仪,购自美国 Waters Corporation 公司。

1.2 试验设计

取供试烟草种子播种于育苗盘中,采用漂浮方式培养。试验材料分为 2 组,第 1 组为高钾营养液(K^+ 质量浓度为 720 mg/L)处理,在 Hoagland's 营养液中增加硝酸钾含量来实现高钾处理,同时以减少配方中硝酸铵的含量来保证氮适量;第 2 组为正常营养液(K^+ 质量浓度为 240 mg/L)处理(对照)。2 组处理保持温度、营养、光照等各种其他因素一致。

1.3 样品采集、蛋白质制备及浓度测定

待烟苗生长到 5~6 片叶,2 组均选取长势正常的 4~5 株植株,取其叶片制成混合样,每组取 3 个重复样,用铝箔纸包好,编号,装入布袋,迅速投入液氮罐中保存备用。采用苯酚法^[10]提取烟叶蛋白质,同时采用 Bradford 法^[11]测定蛋白质浓度。

1.4 蛋白酶解与 nano-HPLC-MS/MS 分析

取 100 μ g 叶片样品至新试管中,加入 8 mol/L 尿素定容至 100 μ L。之后向试管中加入 11 μ L 1 mol/L DTT,于 37 $^{\circ}$ C 下放置 1 h,随后将试管中的混合液体移至 10 K 超滤管中,14 000 \times g 离心 10 min,加入 120 μ L 55 mmol/L 碘乙酰胺,在室温下避光温育 20 min。取超滤管连续离心 3 次,每次离心在超滤管中加入 100 mmol/L TEAB,离心后置换尿素体系,加入胰蛋白酶(Trypsin),蛋白质与酶的质量比为 50:1,酶解过夜后冻干。

将冻干的肽段重溶于 30 μ L 0.1% 甲酸水溶液中,用 nano-HPLC 分离,进行在线电喷雾串联质谱分析。试验在 Nano ACQUITY UPLC 系统上进行,分离的肽段进入到 Q-Exactive 质谱仪。Q-Exactive 质谱仪在数据依赖采集模式下运行,自动在 MS 和 MS/MS 采集间切换。在 70 K 质量分辨率下获得全扫描谱图,随后在 17.5 K 分辨率下进行后续 HCD MS/MS 扫描。将 10 μ L 肽段样品以 10 μ L/min 流量上样到捕集柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap C18,100 μ m \times 2 cm),随后在分析柱(Acclaim PepMap C18,75 μ m \times 15 cm)中以线性梯度分离:120 min 内 0.1% 甲酸 ACN 溶液从 3% 均匀增加至 32%。柱子在初始条件下平衡 10 min,柱流量控制在 300 nL/min,电喷雾电压 2 kV。

1.5 数据分析

采用 PEAKS Studio version 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) 对串联质谱图进行分析。利用 PEAKS DB 对 UniProt-Nicotiana 数据库(ver. 201711,73606 entries)进行搜索,设置 trypsin 酶解。搜库参数为,碎片离子质量容许误差 0.05 u,

母离子质量容许误差 0.001%,最大漏切数 2,固定修饰 Carbamidomethylation 57.02,可变修饰 Oxidation (M) 15.99、Deamidation (NQ) 0.98、Acetylation (Protein N-term) 42.01。肽段经过 1% FDR 和 1 Unique peptide 质控过滤。筛选差异倍数 1.5 倍以上、含有至少 2 条 unique 肽段、ANOVA 算法中 Significance 大于 13(即 $P < 0.05$) 的蛋白质作为差异蛋白质。并对其进行 GO(Gene ontology)分析,包括蛋白质的分子功能、细胞中所处的位置以及参与的生物过程,通过 COG & KOG 注释分析进行蛋白质功能预测、分类,通过 KEGG pathway 分析富集到该通路($P < 0.05$)的蛋白质参与的生物过程。

2 结果与分析

2.1 不同钾浓度下烟草叶片蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果

由图 1 可见,高钾和正常钾浓度下烟草叶片蛋白质分布均匀,均无极高丰度的蛋白质,符合色谱质谱检测对蛋白质丰度的要求,两者也具有相似的蛋白质条带。

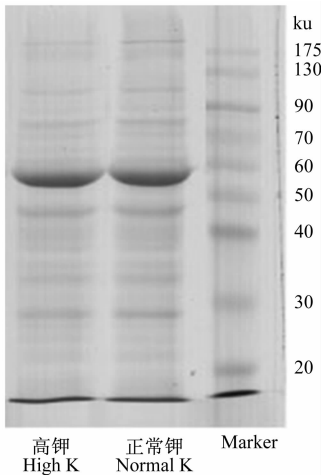


图 1 不同钾浓度下烟草叶片蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果
Fig.1 SDS-PAGE electrophorogram of tobacco leaf proteins at differential potassium concentrations

2.2 不同钾浓度下烟草叶片差异蛋白质的鉴定及统计分析

对差异倍数 1.5 以上,差异显著度 $P < 0.05$ 的叶片差异表达蛋白质数量进行统计,结果见表 1。由表 1 可知,与正常钾浓度处理相比,高钾浓度下差异表达蛋白质总数为 41 个,其中下调的蛋白质有 20 个,上调的蛋白质有 21 个。大部分上调蛋白质的差异倍数高于下调蛋白质,且集中在[2,4)差异倍数区间,占上调差异蛋白质总数的 57.1%。下调差异蛋白质主要集中在[1.5,2)差异倍数区间,占

下调差异蛋白质总数的 75.0%。差异蛋白质总数主要集中在[1.5,4)差异倍数区间,合计 38 个,占差异蛋白质总数的 92.7%。

表 1 不同差异倍数的烟草叶片差异蛋白质数量 个
Tab.1 The quantity of differential proteins at different difference multiplier in tobacco leaves

项目 Item	1.5≤a<2	2≤a<4	4≤a<8	a≥8	总计 Total
下调蛋白质 Down-regulated protein	15	5	0	0	20
上调蛋白质 Up-regulated protein	6	12	3	0	21
总计 Total	21	17	3	0	41

注:a 表示差异倍数。
Note:The letter a means difference multiplier.

2.3 不同钾浓度下烟草叶片差异蛋白质的生物信息学分析

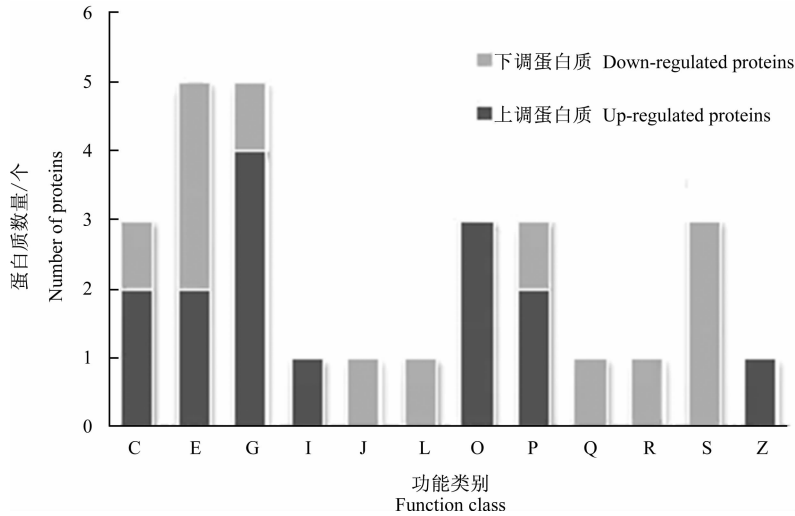
2.3.1 差异蛋白质的 GO 注释 Gene ontology (GO) 是一个国际标准化的基因本体功能分类体系工具,用来全面描述生物体中基因和蛋白质的属性。GO 共分为三大类,分别为细胞组成、基因或蛋白质的分子功能、参与的生物过程。由表 2 可见,高钾处理与正常钾处理的烟草叶片差异蛋白质全部定位在细胞组分和有膜细胞器中;77% 的差异蛋白质具有水解酶活性的分子功能,其他参与碳水化合物结合;70% 的差异蛋白质参与细胞代谢、单体代谢和单体细胞过程。

2.3.2 差异蛋白质的 KOG 注释 如图 2 所示,高钾处理与正常钾处理的差异蛋白质具有的功能不同,可分为 12 种,分别为能量产生和转换,氨基酸运输和代谢,碳水化合物运输和代谢,脂质运输和代谢,翻译、核糖体结构和生物起源,复制、重组和修复,翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白,无机离子运输和代谢,次生代谢产物生物合成运输和分解代谢,一般功能,未知功能,细胞骨架等相关蛋白质,分别表示为 C、E、G、I、J、L、O、P、Q、R、S、Z 功能蛋白质。其中,数量最多的为 E、G 类蛋白质,且 G 类蛋白质上调数量最多,E、S 类蛋白质下调数量最多;I、O、Z 类功能只有上调蛋白质,J、L、Q、R、S 类功能只有下调蛋白质。说明高钾浓度主要影响烟叶蛋白质关于碳水化合物运输和代谢(G 类)以及氨基酸运输和代谢(E 类)方面的功能,且碳水化合物运输、代谢相关功能类蛋白质在高钾浓度下会出现上调表达,这在促进烟叶生长发育方面发挥着重要作用。

表 2 不同钾浓度下烟草叶片差异蛋白质的 GO 注释结果

Tab.2 GO annotation of differential proteins of tobacco leaf at differential potassium concentrations

细胞组成 Cellular component	百分比/% Percentage	分子功能 Molecular function	百分比/% Percentage	参与生物过程 Biological process	百分比/% Percentage
细胞组分 Cell part	60	碳水化合物结合 Carbohydrate binding	23	单体代谢过程 Single-organism metabolic process	27
有膜细胞器 Membrane-bounded organelle	40	水解酶活性 Hydrolase activity	77	分解代谢过程 Catabolic process	13
				应激反应 Response to stress	10
				生物刺激反应 Response to biotic stimulus	4
				单体细胞过程 Single-organism cellular process	17
				细胞代谢过程 Cellular metabolic process	26
				细胞壁组织或生源论 Cell wall organization or biogenesis	3



C: 能量产生和转换; E: 氨基酸运输和代谢; G: 碳水化合物运输和代谢; I: 脂质运输和代谢;
J: 翻译、核糖体结构和生物起源; L: 复制、重组和修复; O: 翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白;
P: 无机离子运输和代谢; Q: 次生代谢产物生物合成运输和分解代谢; R: 一般功能; S: 未知功能;
Z: 细胞骨架等相关蛋白质

C. Energy generation and conversion; E. Transport and metabolism of amino acids; G. Transport and metabolism of carbohydrate; I. Transport and metabolism of lipid; J. Translation, ribosome structure and biogenesis;
L. Copy, recombination and repair; O. Translation modification, protein conversion and chaperone;
P. Transport and metabolism of inorganic ions; Q. Biosynthetic transport and catabolism of secondary metabolites; R. General function; S. Unknown function; Z. Cytoskeleton and other related proteins

图 2 不同钾浓度下烟草叶片差异蛋白质的 KOG 注释结果
Fig.2 KOG map of differential tobacco leaf proteins at differential potassium concentrations

在高钾与正常钾处理的烟叶差异表达蛋白质中,有 28 个具有 KOG 号。对这些具有 KOG 号且差异倍数 ≥ 2 的差异蛋白质进行列表(表 3),能较为直观地了解差异倍数较大的差异蛋白质的具体名称、上下调变化情况及其具有的 KOG 功能等,进一步了解其在烟叶生长发育过程中可能发挥的作用。

由表 3 可知,在差异倍数 ≥ 2 的差异蛋白质中,有 10 个(7 个上调,3 个下调)参与 C、E、G、I、P 和 Q 等代谢过程;3 个(均上调)参与 O 和 Z 等细胞过程和环境信息处理过程;1 个(下调)参与 S 过程。

2.3.3 差异蛋白质的 KEGG pathway 分析 KEGG 是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的,用于

表 3 不同钾浓度下烟草叶片差异蛋白质鉴定

Tab.3 Identification of differential proteins of tobacco leaf at differential potassium concentrations

功能分类	基因名称	特异肽段	蛋白质名称	倍性变化	KOG 功能
Functional classification	Gene name	Unique peptide	Protein name	Fold change	KOG function
代谢相关 Metabolism related	LOC107799522	2	SNF1 相关激酶调节亚基	2.06	C
	LOC107762966	5	谷氨酸脱氢酶	-2.94	E
	LOC107828285	9	β-半乳糖苷酶	2.07	G
	LOC107778191	7	β-半乳糖苷酶	-2.70	G
	LOC107763450	3	α-葡萄糖苷酶	2.55	G
	LOC107795866	4	肌醇-3-磷酸合成酶	3.43	I
	LOC107768675	2	铜转运蛋白	4.23	P
	LOC107791841	2	乙醇脱氢酶	-2.69	Q
	LOC107806565	6	UDP-鼠李糖:鼠李糖基转移酶	2.00	G、C
	LOC107813306	2	丝氨酸羧肽酶	3.70	O、E
细胞过程和环境信息处理相关 Cell process and environmental	LOC107784347	3	14-3-3 蛋白	5.97	O
information processing related	LOC107826880	2	β-微管蛋白	2.01	Z
其他 Others	LOC107813306	2	丝氨酸羧肽酶	3.70	O、E
	LOC107798618	3	病机相关蛋白	-2.08	S

注:倍性变化为正数,表示差异蛋白质上调表达,反之,为下调表达。

Note:Fold change is a positive number, which indicates the upward expression of differential protein, conversely, it is down expression.

查询代谢通路、酶促通路的基因以及生物化学物质的在线数据库,可确定蛋白质参与的最主要的信号转导通路和生化代谢通路,基于 pathway 的分析更有助于了解基因或蛋白质的生物学功能^[12]。根据差异蛋白质的 KEGG pathway 分析得出,高钾与正常钾处理的烟叶差异蛋白质共参与 96 条途径。包含 42 个代谢通路、21 个合成途径通路和其他降解通路等。其中,包括脂肪酸降解途径,丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢途径,α-亚麻酸代谢途径,苯丙素合成途径等通路。这些途径基本均与物质代谢途径相关,可见,在高钾环境中,苗期烟叶差异蛋白质主要与物质代谢相关,为烟叶更好地生长发育提供基础。

3 结论与讨论

3.1 与代谢相关的烟草叶片差异蛋白质

本试验结果表明,与正常钾处理相比,高钾处理下烟草苗期叶片参与代谢相关的差异蛋白质有 β-半乳糖苷酶、铜转运蛋白、肌醇-3-磷酸合成酶、丝氨酸羧肽酶、乙醇脱氢酶和谷氨酸脱氢酶等,且大部分都表现为上调表达。

β-半乳糖苷酶又名乳糖酶,广泛存在于动物、植物以及微生物中,能够水解乳糖,且具有半乳糖苷转移功能^[13],该酶具有较强的转糖基活性,能够高效转化乳糖生产低聚半乳糖^[14]。研究发现,该酶具有 2 个功能团,分别是可作为亲和试剂攻击糖基第一个碳原子上的亲和中心的咪唑基和可使半乳糖苷残基上的氧原子质子化的巯基。β-半乳糖苷酶

水解乳糖的产物为烟叶的生长提供物质基础。铜转运蛋白^[15]是一种定位于细胞膜的跨膜转运蛋白,除了转运铜离子外,也可以转运其他金属离子。转运体相关的蛋白质发生适量上调表达,更有利于机体在高钾环境中的生长发育。在高钾营养下,代谢途径增强,使糖类物质累积,而其水解酶活性的加强便是维持内环境稳定的应对之策。肌醇-3-磷酸合成酶是一个高度保守的酶,是植酸合成中催化形成肌醇环的重要酶,该酶主要将葡萄糖 6-磷酸转化成肌醇-磷酸^[16]。研究表明,由肌醇诱导合成的肌醇-3-磷酸可以在叶绿体中起渗透压的作用^[17]。丝氨酸羧肽酶是一类属于 α/β 水解酶家族的蛋白酶,在许多生化途径中起作用,该酶基因是植物的一种抗逆基因,在植物生长发育及抵抗逆境方面发挥重要作用^[18]。乙醇脱氢酶是乙醇发酵的主导酶,能够催化乙醛和乙醇间的氧化还原反应,在植物无氧呼吸过程中发挥功能^[19],是植物非正常呼吸链的重要水解酶,很多研究表明,该酶与植物抗逆生理也密切相关^[20]。谷氨酸脱氢酶是生物界广泛存在的多聚酶之一,能够催化谷氨酸合成,维持植物体内氮循环稳定,对植物体的抗逆境能力起着重要作用^[21]。但在高钾浓度下,植株的钾营养丰富且其他条件也较为适宜,致使抗逆类酶发生下调表达。

3.2 与细胞过程和环境信息处理相关的烟草叶片差异蛋白质

烟草苗期叶片中 β-微管蛋白和 14-3-3 蛋白在高钾浓度下发生上调表达。β-微管蛋白对植物体生长进程起着关键性作用,具体表现为参与细

胞骨架形成过程,且在高钾环境中作用更明显。微管是真核生物细胞骨架的重要组成部分,微管骨架在细胞分裂、细胞极性生长和细胞分化等过程中起着极其重要的作用^[22]。 β -微管蛋白普遍存在于真核细胞中,不仅在维持细胞形态、保持细胞内部结构的有序性中起重要作用,而且与细胞器的组成与运输、信号物质的传导、细胞的分化发育以及细胞分裂增殖等方面发挥重要作用,是细胞不可缺少的重要组成部分^[23]。14-3-3 蛋白是一类广泛存在于真核生物且高度保守的可溶性酸性蛋白质,参与调控信号传递、细胞循环、代谢、跨膜运输以及逆境响应等多种细胞过程^[24];而且该蛋白质还能改变酶活性、调节植物生长、影响离子通道活性、介导植物激素信号、光信号以及影响生物和非生物逆境胁迫等^[25]。高钾营养条件下,各类代谢途径或运输途径均强化,故该蛋白质表达也发生上调。

3.3 烟草叶片其他差异蛋白质的表达

病机相关蛋白是高钾处理与正常钾处理烟草叶片中差异倍数在 2 倍以上的蛋白质,且发生下调表达,可能是因为在高钾环境中并不需要此类蛋白质发挥作用。

此外,高钾浓度下的差异蛋白质在遗传信息处理相关过程中差异并不明显,可能是在本试验所设定钾浓度下该方面的蛋白质作用变化并不显著。钾在植物体内有 2 种跨膜转运机制,分别是钾离子通道和钾离子转运体^[26]。而在本试验鉴定的蛋白质中,并未发现与已报道的钾转运体^[27]或离子通道直接相关的蛋白质,推测可能的原因有烟叶苗期此类蛋白质的差异并不明显、此类蛋白质主要作用在根系中,也可能与高钾浓度或烤烟高钾品系的特殊性相关。具体的原因有待进一步研究。

综上,高钾环境中烤烟苗期叶片差异蛋白质主要定位在细胞组分和有膜细胞器中,具有水解酶活性、碳水化合物结合等分子功能,参与细胞代谢过程、单体代谢过程和单体细胞过程等生物过程。大部分差异蛋白质为碳水化合物运输和代谢相关功能的蛋白质,且主要参与物质代谢等相关途径,这些差异蛋白质在高钾环境中对促进烟叶生长发育发挥着关键作用。

参考文献:

- [1] LEBAUDY A, VÉRY A A, SENTENAC H. K^+ channel activity in plants: Genes, regulations and functions [J]. FEBS Lett, 2007, 581 (12): 2357-2366.
- [2] XU J, LI H D, CHEN L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2006, 125 (7): 1347-1360.
- [3] 樊文强, 孙鑫, 杨爱国, 等. 基于关联分析发掘烟草高钾优异等位变异 [J]. 中国烟草学报, 2016, 22 (2): 100-107.
- [4] 秦爱, 郑晓敏, 王坤. 基于质谱的植物蛋白质组学研究方法 [J]. 植物科学学报, 2018, 36 (3): 470-478.
- [5] 张柳, 王铮, 张亚婕, 等. 烟草叶片衰老期过程中的蛋白质组学分析 [J]. 植物生理学报, 2014, 50 (4): 488-500.
- [6] 徐莹, 晏国全, 张扬, 等. 中国 3 个主栽烟草品种的差异蛋白质组学研究 [J]. 中国农业科学, 2016, 49 (16): 3084-3097.
- [7] 黄宇, 冯晶, 饶力群, 等. 质谱非标记定量分析小麦抗条锈病近等基因系蛋白质变化 [J]. 生物技术通报, 2014 (6): 88-95.
- [8] 戴林建, 徐双红, 朱列书, 等. 高钾植物 DNA 导入栽培烟草引起后代性状变异研究 [J]. 作物研究, 2010, 24 (2): 109-111.
- [9] DAI L J, PAN Z, ZHONG J. Analysis of F_1 heterosis of agronomic traits and chemical components on self-bred high-potassium new lines [J]. Agricultural Science & Technology, 2017, 18 (1): 27-31, 40.
- [10] 林世锋, 张拓, 史跃伟, 等. 烟草根系蛋白质双向电泳样品制备方法的比较 [J]. 贵州农业科学, 2012, 40 (8): 71-74.
- [11] 周利. 低钾胁迫对烟草蛋白质表达的影响研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [12] 许洁, 王红旗, 孔德康. 基于 iTRAQ 技术荧蒽降解菌的比较蛋白质组学分析 [J]. 中国环境科学, 2018, 38 (1): 284-292.
- [13] 汪永保. 菠萝蜜成熟软化相关酶基因表达及 β -半乳糖苷酶基因克隆和序列分析 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.
- [14] 胡树兵, 段绪果, 吴敬. 重组 β -半乳糖苷酶的制备及转化条件优化 [J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36 (12): 1241-1245.
- [15] 朱云城, 王二琼, 马国林, 等. 铜转运蛋白 C 端金属结合域与 Ag^+ 及 Hg^{2+} 的相互作用 [J]. 物理化学学报, 2014, 30 (1): 1-7.
- [16] LOEWUS F A, MURTHY P P N. Myo-inositol metabolism in plants [J]. Plant Sci, 2000, 50: 1-19.
- [17] 赵宁春, 程方民, 张小明. 作物种子中植酸代谢及其相关酶的研究进展 [J]. 作物杂志, 2008 (5): 10-13.
- [18] 冯紫洲, 刘春梅, 衡宝山, 等. 蓖麻 *ReSCP* 基因克隆与生物信息学分析 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45 (12): 27-30.

- [25] CALLEWAERT L, MICHIELS C W. Lysozymes in the animal kingdom[J]. J Biosci, 2010, 35(1):127-160.
- [26] KAJLA M K, ANDREEVA O, GILBREATH T M, *et al.* Characterization of expression, activity and role in anti-bacterial immunity of *Anopheles gambiae* lysozyme c-1 [J]. Comp Biochem Physiol (B; Biochem Mol Biol), 2010, 155(2):201-209.
- [27] ZDYBICKA-BARABAS A, STACZEK S, MAK P, *et al.* Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1828(6):1449-1456.
- [28] 路子云, 冉红凡, 刘文旭, 等. 黏虫室内饲养方法的改进[J]. 河北农业科学, 2014, 18(6):57-61.
- [29] 曹慧, 李宗芸, 王秋香. 果蝇先天性免疫研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2009, 46(2):196-202.
- [30] 孙国庆, 哈福, 苗永旺, 等. 动物溶菌酶基因的研究进展[J]. 中国牛业科学, 2012, 38(3):51-54.
- [31] 柳忠玉, 雷健, 李晓筱, 等. 虎杖转录因子 *pcmybl* 基因的克隆及原核表达[J]. 河南农业科学, 2018, 47(1):96-102.
- [32] JOLLÈS P, JOLLÈS J. What's new in lysozyme research? [J]. Mol Cell Biochem, 1984, 63(2):165-189.
- [33] VOGEL H, ALTINCICEK B, GLÖCKNER G, *et al.* A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella* [J]. BMC Genomics, 2011, 12:308.
- [34] 阮班军, 代鹏, 王伟, 等. 蛋白质翻译后修饰研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(7):1027-1037.
- [35] 罗莉, 李坤, 王保成, 等. 包涵体变复性技术研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(4):290-293.
- [36] 凌同, 余黎, 白慕群. 昆虫杆状病毒表达系统的研究进展与应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(2):70-78.
- [37] 梁振普, 刘雅静, 张小霞, 等. 昆虫杆状病毒基因组学研究进展[J]. 河南农业科学, 2018, 47(9):1-7.
- [38] VILCINSKAS A, MATHA V. Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal humoral defence reactions in *Galleria mellonella* [J]. Anim Biol, 1997, 6:19-29.
- [39] BECKERT A, WIESNER J, BAUMANN A, *et al.* Two c-type lysozymes boost the innate immune system of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* [J]. Dev Comp Immunol, 2015, 49(2):303-312.

(上接第 42 页)

- [19] 刘登望, 李林. 湿涝对幼苗期花生根系 ADH 活性与生长发育的影响及相互关系[J]. 花生学报, 2007, 36(4):12-17.
- [20] 沙向红. 盐胁迫对玉米幼苗根系乙醇脱氢酶与乙醛脱氢酶表达的影响[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(3):47-50.
- [21] 李文滨, 周失, 李永光. 大肠杆菌谷氨酸脱氢酶基因的克隆及功能分析[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(1):53-58.
- [22] 李园莉, 孙杰, 夏桂先, 等. 棉花微管蛋白基因 *GhTub1* 在纤维细胞中的特异表达[J]. 中国科学(C 辑), 2002, 32(5):385-391.
- [23] 刘圣明. 灰葡萄孢菌抗多菌灵 β -微管蛋白基因在禾谷镰孢菌中的表达研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [24] AITKEN A. 14-3-3 proteins: A historic overview [J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(3):162-172.
- [25] 李昕文, 沙爱华, 黄家权. 大豆 14-3-3 家族基因对低磷胁迫响应及其与磷转运蛋白 PHT6 的互作[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(3):308-314.
- [26] HOSOO Y, KIMURA Y, NANATANI K, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding KUP/HAK/KT-type potassium uptake transporter from *Cryptomeria japonica* [J]. Trees, 2014, 28(5):1527-1537.
- [27] 鲁黎明, 杨铁钊. 烟草钾转运体基因 *NtHAK1* 的克隆及表达模式分析[J]. 核农学报, 2011, 25(3):469-476.