

龙眼花芽与叶芽差异蛋白分析

庞国彩^{a,b}, 谢东丽^{a,b}, 陈清西^{a,c}, 陈伟^{a,b*}, 龙强^{a,b}

(福建农林大学, a. 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室; b. 生命科学学院; c. 园艺学院, 福州 350002)

摘要:以龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)花芽和叶芽为材料,对龙眼花芽与叶芽分化发育过程中的差异蛋白质进行分析和鉴定,并探讨其生物学功能。本研究共鉴定出10个差异蛋白质:ATP synthase beta subunit, fructokinase, LHCII type I chlorophyll a/b binding protein, peroxidase, ascorbate peroxidase, 14-3-3 protein, 14-3-3 family protein, putative cytosolic cysteine synthase 7, retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass, Protein Group similar to late embryogenesis abundant proteins。这些差异蛋白质可能与龙眼花芽与叶芽的物质和能量代谢、自由基清除和抗氧化作用、信号转导和基础代谢、氨基酸代谢等生理过程密切相关。

关键词:龙眼; 花芽; 叶芽; 蛋白质组; 双向电泳; 质谱

中图分类号:Q946.1

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2009)03-0242-07

Analysis of Differential Proteins during Development Stages of Flower Bud and Leaf Bud in Longan

PANG Guo-cai^{a,b}, XIE Dong-li^{a,b}, CHEN Qing-xi^{a,c}, CHEN Wei^{a,b*}, LONG Qiang^{a,b}

(a. Key Laboratory of Ministry of Education for Genetic, Breeding and Multiple Utilization of Crops; b. College of Life Science; c. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The proteomes during development stages of flower bud and leaf bud in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) were isolated and identified by using 2-DE technology and MS analysis. Ten proteins were identified by MALDI-TOF/TOF/MS, such as ATP synthase beta subunit, fructokinase, LHCII type I chlorophyll a/b binding protein, peroxidase, ascorbate peroxidase, 14-3-3 protein, 14-3-3 family protein, putative cytosolic cysteine synthase 7, retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass, protein group similar to late embryogenesis abundant proteins. These proteins might involve in substance and energy metabolism, scavenging and anti-oxidation of free radical, signal transduction and basic metabolism, amino acid metabolism and other physiological processes.

Key words: Longan; Flower bud; Leaf bud; Proteome; Two-dimensional electrophoresis; Mass spectrometry

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)是中国重要的南亚热带果树。花芽的形成是花和果实形成的基础,直接决定龙眼的产量和品质^[1]。花芽的形成受许多因素影响,气候因子如光照、温度^[2]、空气、水分^[3];可溶性糖、内源激素及植物生长调节剂^[4]在花芽形成和成花过程中具有重要的作用。龙眼一般以秋梢和夏延秋梢为结果母枝。陈清西^[5]研究发现,龙眼结果母枝粗度对成花也有影响,结果母枝

粗度小于0.6 cm均不能抽生花穗,而大于0.7 cm才能抽生花穗。

果树花芽分化机理是果树栽培的理论依据之一,也是果树发育生物学研究的热点之一,它与克服果树大小年结果、改善果实品质及促进幼树提早结果等密切相关。近年来,蛋白质组学的飞速发展,为果树花芽分化的分子机理研究提供了新的途径^[6]。目前,果树花芽分化的蛋白质组学研究已取

收稿日期:2008-08-13 接受日期:2008-10-24

基金项目:国家自然科学基金项目(30571293);教育部博士点基金项目(200803890009);福建省自然科学基金项目(B0710006);福建省教育厅科技计划项目(JA05236)资助

* 通讯作者 Corresponding author

得了一些进展。Iwahorid 等报道温州蜜柑(*Citrus unshiu*)的诱导芽和非诱导芽的蛋白质数量和质量存在差异^[7]。Yamane 等^[8]用双向电泳技术从杏树(*Prunus mume*)花芽中分离得到1个蛋白质 dehydrin (the group of D-11 LEA),与低温打破花芽休眠有关。朱志勇等^[9]以新红星苹果(*Malus domestica* 'Skarkrimson')花芽为材料,研究了蛋白质的提取方法及其双向电泳的条件。曹尚银等^[10]运用蛋白质组学技术对富士苹果树短枝停长后3~9周的花芽、叶芽的蛋白质进行了研究。

有关龙眼花芽分化的生理生化研究已有许多报道,如内源激素,树体营养等^[1],但目前对龙眼花芽分化的蛋白质组学研究尚未见报道。本文以龙眼花芽和叶芽为材料,应用双向电泳、质谱和生物信息学等蛋白质组学技术研究龙眼花芽与叶芽分化过程中的差异蛋白质,鉴定并分析其功能,为了解龙眼花芽分化与蛋白质差异表达之间的相互关系提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

在福建省福州市,龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)花芽形态分化的始期为1月中下旬,花芽生理分化期先于形态分化期1个月左右^[11]。根据陈清西^[5]田间调查得知,乌龙岭龙眼夏延秋梢(结果母枝)粗度>0.7 cm才有可能成花,<0.6 cm不能成花。本试验于2006年12月30日,在福建农林大学龙眼园中,选取10 a生乌龙岭龙眼树(同一株)树冠中上部的夏延秋梢直径>0.7 cm顶芽(花芽)和<0.5 cm的顶芽(叶芽)各20个,迅速放入液氮罐中,带回实验室于-80℃冰箱保存备用。所有试验设3个重复。

1.2 蛋白质测定

参考 Carpentier 等^[12]的酚抽提-醋酸铵甲醇沉淀法提取蛋白质。裂解液的配方为7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% 3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲胺基]丙磺酸内盐(CHAPS),2%两性电解质 3-10,0.002% 溴酚蓝,40 mmol/L 二硫苏糖醇。再水化液的配方为7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,2% CHAPS,0.5% IPG-buffer,0.002% 溴酚蓝,40 mmol/L 二硫苏糖醇。蛋白质含量参照 Bradford 法^[13]进行测定。

1.3 双向电泳和图像分析

等电聚焦电泳(IEF): IPG 胶条长度为24 cm,

pH 4~7 (Amersham Biosciences),于 IPGphor II (Amersham Biosciences)上进行。蛋白质上样量为1.2 mg。程序设置如下:30 V 12 h,200 V 1 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,Gradient 8 000 V 1 h,8 000 V 5.5 h,46 000 Vhs。

等电聚焦结束后,取出胶条进行两次平衡(每次15 min)。平衡液 I 15 mL,包含6 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,30% (v/v)甘油,2% (w/v)十二烷基磺酸钠(SDS),痕量溴酚蓝,1.0% (w/v)二硫苏糖醇;平衡液 II 15 mL,包含6 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,30% (v/v)甘油,2% (w/v)十二烷基磺酸钠(SDS),痕量溴酚蓝,2.5% (w/v)碘代乙酰胺。

SDS-PAGE 凝胶配制参照郭尧君^[14]的方法,平衡后将胶条转移至14%的 SDS-PAGE 胶上,0.5% 琼脂糖封胶,于 Ettan DALT-six System (Amersham Biosciences)上进行第二向 SDS-PAGE 电泳。恒流设置:10 mA 胶⁻¹ 45 min,40 mA 胶⁻¹ 8 h。循环水浴温度为18℃。考马斯亮兰 G-250 染色。将胶用蒸馏水冲洗3次,用 Epson 扫描仪(分辨率设置为300 dpi,24 位全彩)扫描,保存图像用于分析。

1.4 蛋白质鉴定和数据库搜索

蛋白质酶解 脱色,50%乙腈+50 mmol/L 碳酸氢铵 100 μL,20 min;移去其中的溶液。重复两次。干胶,100%乙腈 100 μL,10 min;移去其中的乙腈,然后放入37℃烘箱中5~10 min以确保完全干胶。酶解,加入5~10 μL的12.5 ng μL⁻¹ trypsin 酶溶液,4℃冰箱中约30 min,以确保胶粒能很好地吸收酶液,取出后在37℃烘箱中酶解过夜。肽段提取,50%乙腈+0.1% TFA 60 μL,30~40 min后,将溶液转移到新的96孔板内。重复3次。将肽段溶液在N₂流下吹干浓缩,以备用于质谱鉴定。

质谱分析与数据库检索 样品用4700串联飞行时间质谱仪[4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOF™) (Applied Biosystems, USA)]进行质谱分析,激光源为355 nm波长的Nd:YAG激光器,加速电压为20 kV,采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。PMF质量扫描范围为700~3500 Da,且强度最大的5个峰进行串联质谱分析;谱图用myoglobin酶解肽段进行外标校正。所得结果用GPS (Applied Biosystems, USA)-MASCOT (Matrix Science, London, UK)进行数据库检索。搜索参数设置:数据库为NCBIInr;检索种属为:all,数据检索

的方式为 combined;最大允许漏切位点为 1;酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置:PMF 100×10^{-6} , MS/MS 0.6Da;在数据库检索时胰酶自降解峰和污染物质的峰都手工剔除。

2 结果

2.1 龙眼花芽和叶芽蛋白质组双向电泳

龙眼花芽和叶芽蛋白质组的双向电泳图谱基本一致,表明花芽和叶芽中主要的蛋白质成分在龙眼花芽分化期间保持较稳定状态。龙眼花芽和叶芽蛋白质的 Mr 主要分布在 25 ~ 66 kDa 之间,pI 大多分布于 4.5 ~ 6 之间(图 1)。

根据 2-D 软件 PDQuest 的分析结果,选出蛋白质峰值丰度差异 2 倍以上的差异蛋白质点,经质谱 MALDI-TOF-TOF/MS 鉴定出 10 个蛋白质(表 1)。图 2 所示为 10 个差异蛋白质点的局部图。截取该蛋白质点对应的双向电泳图谱位置及其临近区域图进行比较,可更加明显地显示其蛋白质表达差异。根据 PDQuest 软件分析数据做出柱状图(图 3),显示了花芽与叶芽差异蛋白质的峰值丰度差异(2 倍以上),某些差异蛋白质点(3, 4, 5, 9, 10)没有显示其在叶芽中的峰值,表明这些蛋白质在叶芽双向电泳图谱上表达量较低,软件分析没有得到相关数据。确定的 10 个差异蛋白质点的表达量在花芽中明显高于叶芽,说明这些差异蛋白质可能与龙眼花芽的分化发育有密切的关系。

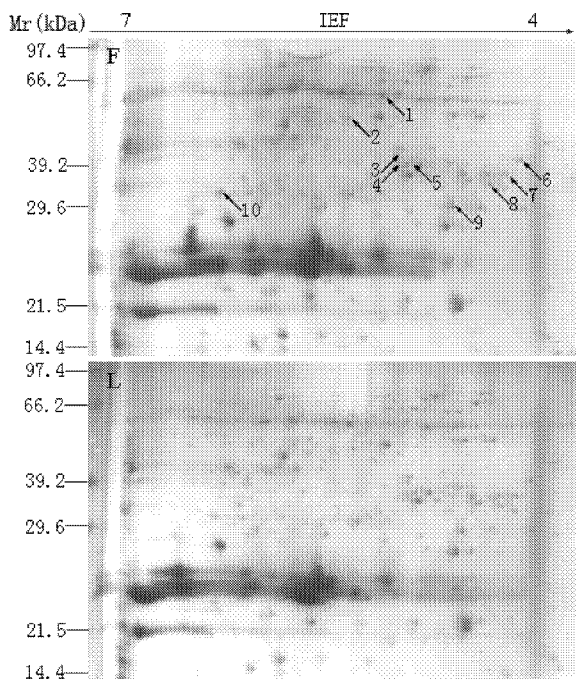


图 1 龙眼花芽和叶芽蛋白质组的双向电泳图谱比较
Fig. 1 Comparison of 2-DE patterns of the proteins in Longan flower and leaf buds
F. 花芽 Flower bud; L. 叶芽 Leaf bud

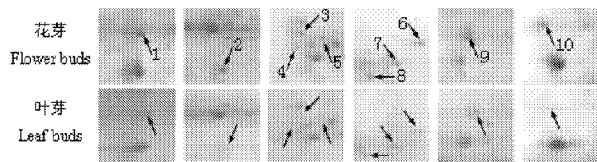


图 2 龙眼花芽和叶芽差异蛋白质点的比较
Fig. 2 Comparison of differential proteins in longan flower bud and leaf bud

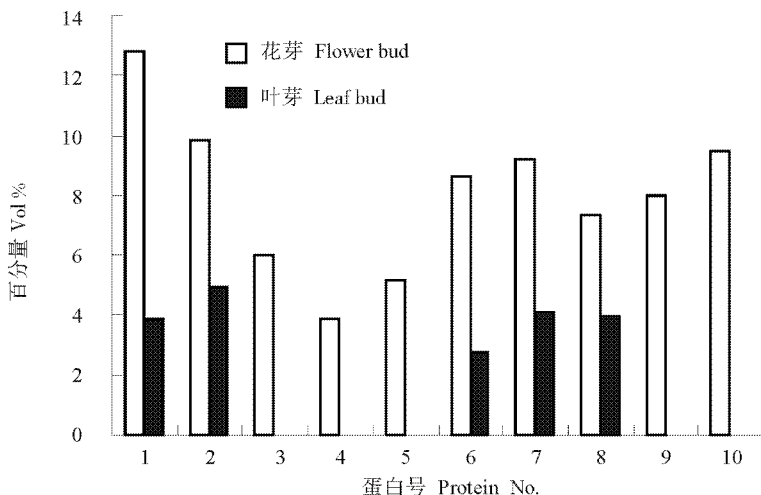


图 3 差异蛋白质点丰度的 Vol% 值比较
Fig. 3 Comparison of Vol% of differential proteins

2.2 差异蛋白质的质谱分析

从胶上切取差异表达的蛋白质点进行 MALDI-TOF-TOF/MS 分析。经蛋白质数据库搜索鉴定出 10 个差异蛋白质,每个点代表一种蛋白质,详细质谱分析结果在表 1 中列出。以具有最高蛋白得分 (protein score)438 的蛋白点 1 为例,在图 4 中显示其 PMF 图(A)和串联质谱图(B)。这些鉴定出的蛋白质与龙眼花芽与叶芽分化的许多生理过程密切相关。ATP synthase beta subunit, fructokinase, LHCII type I chlorophyll a/b binding protein 与物质和能量代谢过程有关; peroxidase, ascorbate peroxidase 与自由基清除和抗氧化作用有关;14-3-3 protein,14-3-3 family protein 与龙眼花芽与叶芽的信号转导过程有关, putative cytosolic cysteine

synthase 7 与氨基酸代谢过程相关, Protein Group similar to late embryogenesis abundant proteins 与抵抗环境胁迫的影响相关, retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass 在龙眼花芽与叶芽分化发育中的作用尚不清楚。

3 讨论

龙眼属于顽拗型植物,芽中含有较多的酚类等干扰物质,不利于进行双向电泳。因此本试验采用酚抽提-醋酸铵甲醇沉淀方法提取蛋白质,对陈清西^[5]方法进行了改进,得到了比 TCA/丙酮法清晰的图谱。但结果与陈清西^[5]的有差异,可能是这两种提取方法的不同所致。

表 1 龙眼花芽与叶芽差异蛋白质的 MALDI-TOF-TOF/MS 鉴定

Table 1 Identification of differential proteins in longan flower bud and leaf bud by MALDI-TOF-TOF/MS

编号 No.	蛋白质 Protein	物种 Species	登入号 Accession No.	理论分子量 /等电点 Theoretical MW/pI	实验测得分子 量/等电点 Experimental MW/pI	序列覆盖率 Sequence coverage	蛋白质 得分 Protein score	上调(+) /下调(-) Up(+)/ down(-)
1	ATP synthase beta subunit	美洲商陆 <i>Phytolacca americana</i>	gil33327759	53379.3/5.2	65163/5.36	57%	438	+
2	Peroxidase	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	gil14031049	39038.5/5.99	51912/5.35	10%	123	+
3	Fructokinase	-	gil585973	33743.5/5.47	42158/5.62	30%	113	+
4	Retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass	水稻 <i>Oryza sativa</i> var. <i>japonica</i>	gil77556671	127534/8.12	39331/5.61	23%	68	+
5	Putative cytosolic cysteine synthase7	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Gil76556494	34217.1/5.71	41004/5.69	28%	150	+
6	Protein Groupsimilar to late embryogenesis abundant proteins	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	gil21592483	35884.7/4.71	41004/6.28	30%	67	+
7	14-3-3 protein	银灰杨 <i>Populus × canescens</i>	gil8099063	29306.6/4.68	37728/6.20	62%	303	+
8	14-3-3 family protein	苹果 <i>Malus × domestica</i>	gil155375985	29678.9/4.75	35689/6.11	72%	387	+
9	Type I chlorophyll a/b binding protein	绿豆 <i>Vigna radiata</i>	gil8954293	27900.1/5.29	31498/5.90	30%	96	+
10	Ascorbate peroxidase	马蹄莲 <i>Zantedeschia aethiopica</i>	gil2997688	27452.8/5.31	34233/4.62	26%	135	+

蛋白点 1 (ATP synthase beta subunit) 经 MASCOT 软件 NCBI nr 数据库搜索到的氨基酸序

列,其中匹配到的肽段序列用下划线标出(图 5)。

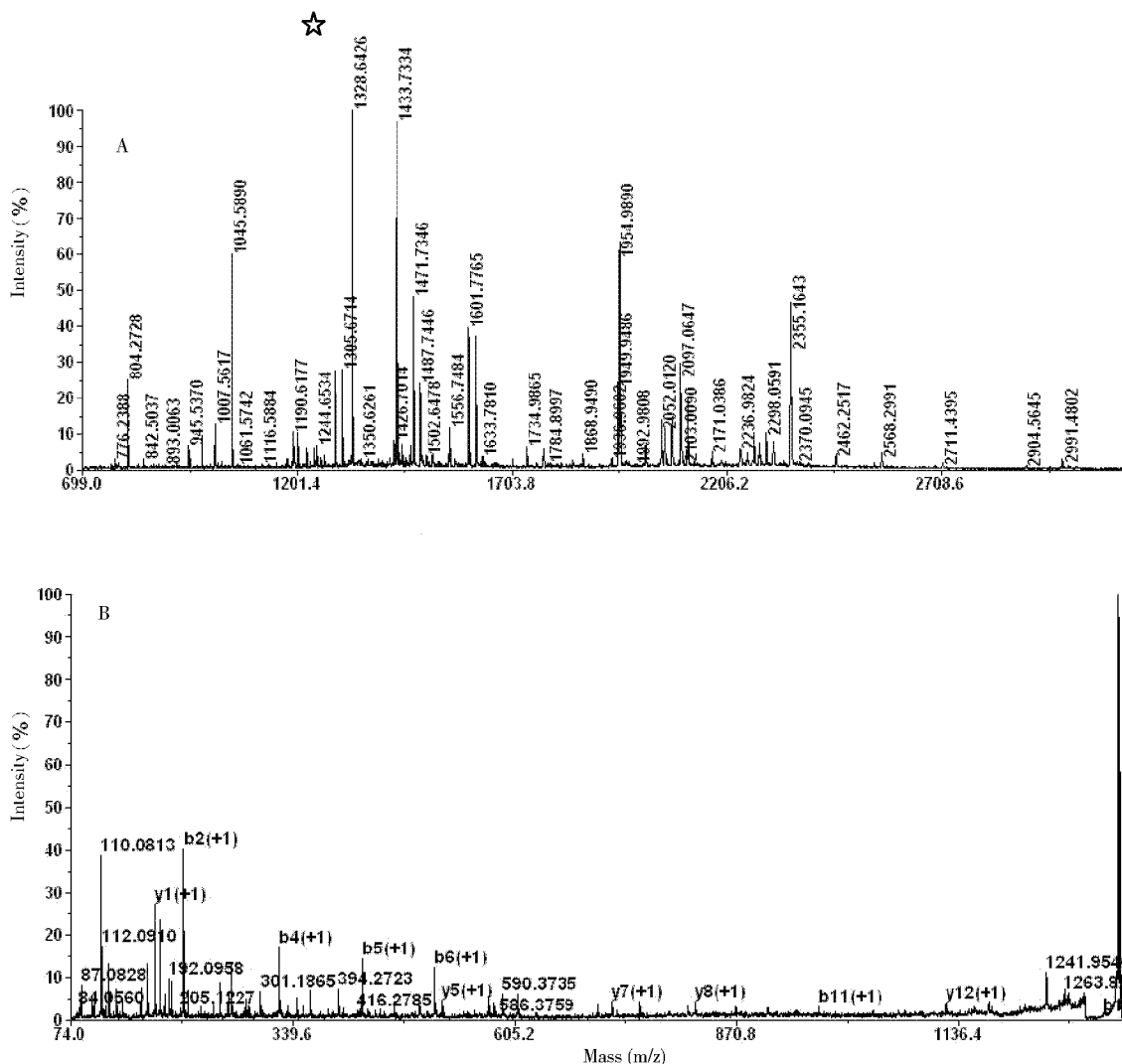


图 4 蛋白点 1 的质谱(4700 Proteomics Analyzer)分析图

Fig. 4 MS analysis of protein spot 1 (4700 Proteomics Analyzer)

A: PMF 图, 匹配的肽段峰上标有质量值 The MALDI-TOF MS map, in which matched peptide peaks are labeled with mass value

B: 离子得分最高的肽段(☆)的质谱图 The MALDI-TOF-TOF/MS analysis of the peptide with the biggest ion score (☆)

1 INPXNFXSGV STXEKRNLR IVQXXGPVLD VXFPPGKMPN IYNALVVEGR
 51 DTAGQPINVK CEWQQLGNN RVRVAMSAT DGLTRGMEVS DTGAPLSVPV
 101 GGATLGRIFM VLGEPVDNLG PWDTRTTSPI HRSAPAFQTQL DTKLSIFETG
 151 IKVVDLLAPY RRGKIGLFG GAGVGKTVLI MELINNIAKA HGVSVFEGV
 201 GERTREGNDL YMEMKESGVI NEQNIAESKY ALVYQMNPEP PGARMRVGLT
 251 ALTMAEYFRD VNEQDVLLFI DNIFRFWQAG SEVSALLGRM PSAVGYQPTL
 301 STEMGSLQER ITSTKEGSIT SIQAVYVPAD DLTDPAFATT FAHLDATTWL
 351 SRGLAARKGIY PAVDPLDSTS TMLQPRIVGE EHYETAQRVK QTLQRVKEIQ
 401 DIIAILGLDE LSEEDRLTVA RARKIERFLS QFFFVAEVEFT GSPGKYVGLV
 451 ETIRGFQLIL SGEFDGLPEQ AFYLVGNIDE ATAKMNLDV ESKLK⁺

图 5 蛋白点 1(ATP synthase beta subunit)的氨基酸序列

Fig. 5 Amino acid sequence of protein No.1 (ATP synthase beta subunit)

下划线为匹配肽段序列。Matched peptide sequences have been marked underline)

本研究对生理分化期的龙眼花芽和叶芽蛋白质进行双向电泳分离,经质谱分析和蛋白质数据库搜索鉴定,获得10个上调差异蛋白(丰度差异2倍以上)的关键信息。下调的差异蛋白点中未发现有2倍以上的差异,因此不列为差异蛋白点进行研

究。蛋白点1鉴定为ATP synthase beta subunit (ATP合酶 β 亚基)。该酶分别位于植物类囊体膜、质膜或线粒体内膜上,是生物体内进行氧化磷酸化和光合磷酸化的能量代谢关键酶^[15]。

蛋白点3鉴定为fructokinase(果糖激酶,FRK),在果糖磷酸化中起重要作用。D-果糖经果糖激酶催化产生果糖-6-磷酸,进入糖酵解途径。在蔗糖分解反应中产生的果糖必须经己糖激酶(hexokinase, HXK)或果糖激酶(FRK)的磷酸化之后才能进入下一步代谢反应;由于FRK对果糖的亲合性远高于HXK,FRK在果糖代谢中起主要作用^[16]。

蛋白点9鉴定为LHCII type I chlorophyll a/b binding protein(捕光天线叶绿素a/b结合蛋白),是由蛋白质分子、叶绿素分子、类胡萝卜素分子和脂类分子组成,位于光合膜中的一个复杂分子体系,在光合作用光反应过程中起重要作用^[17];捕光叶绿素蛋白复合体对原初光化学过程起着扩大捕光截面和调节、保护等方面的作用^[18]。ATP合酶 β 亚基、果糖激酶、捕光天线叶绿素a/b结合蛋白在龙眼花芽中上调表达,可能增强了花芽的光合作用和呼吸作用,得以满足花芽生理分化期对物质和能量较强的需求,这可能是有利于花芽分化发育的原因之一。

蛋白点2和10鉴定为peroxidase(过氧化物酶,POD)和ascorbate peroxidase(抗坏血酸过氧化物酶,Asb-POD),这两个酶可清除活性氧自由基,从而防止自由基的毒害。例如,Asb-POD被认为是叶绿体中清除 H_2O_2 的关键酶^[19-21]。过氧化物酶被认为与植物的生长、发育、逆境耐受、防御反应等有关,直接参与了细胞壁的木质化和角质化、生长素代谢、受伤组织的栓化愈合和对病原的防御反应^[22]。这两种酶直接影响龙眼花芽与叶芽细胞自由基的清除和抗氧化作用,而花芽分化需要活跃的自由基清除系统和抗氧化作用,因此它们的上调表达,可能促进了花芽的分化发育。

蛋白点7和8鉴定为14-3-3 protein和14-3-3 family protein。14-3-3蛋白是植物生长发育的重要

调节因子,在调控植物基础代谢中处于中心地位。例如调控糖、氨基酸、核酸和蛋白质等物质的生物合成^[23]。14-3-3蛋白在不同物种中发现与许多蛋白结合,在信号转导、凋亡、细胞周期调控、淀粉合成、N素代谢和ATP调节中发挥作用^[24]。当蛋白14-3-3 protein和14-3-3 family protein在花芽中上调表达时,可能促进龙眼花芽分化过程的信号转导及基础代谢,在花芽的分化发育过程中执行一定的生物学功能。

蛋白点5鉴定为putative cytosolic cysteine synthase 7(推定的胞质半胱氨酸合成酶)。半胱氨酸合成酶负责半胱氨酸合成的最后一步。在氧化条件下,两个半胱氨酸氧化形成胱氨酸;而在还原条件下,胱氨酸可还原为半胱氨酸。胱氨酸-半胱氨酸氧化还原体系是植物体内重要的氧化还原系统,对光合作用有着重要的调节作用^[25]。在多肽链中,两个毗连的半胱氨酸残基间形成二硫键对于蛋白质的三级结构是十分重要的。正是由于二硫键的形成,才使蛋白质真正具有酶蛋白的功能。由于该蛋白会影响到氨基酸、蛋白质的代谢及其结构的稳定性,而这在龙眼花芽生理分化期是十分重要的。因此它在花芽中上调表达,可能是龙眼花芽分化发育所必需的。

蛋白点6鉴定为Protein Group similar to late embryogenesis abundant proteins(晚期胚胎富集蛋白,LEA蛋白),是一种重要的功能蛋白,可以保护植物免受环境胁迫。LEA蛋白存在于细胞质和细胞核中,具有很高的亲水性和热稳定性,能保护细胞免受环境胁迫,特别是干旱脱水的损伤。LEA基因的表达受发育阶段、激素、离子变化、脱水等多种因素的诱导,没有组织特异性。当该蛋白在花芽中上调表达时,可以保护龙眼花芽不易受到环境胁迫的影响,这可能有利于花芽的分化发育。

蛋白点4鉴定为retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass(反转录转座子蛋白,推定为Ty1-copia类)。高等植物中的反转录转座子主要属于Ty1-copia类。现已在100多种植物中检测到Ty1-copia类反转录转座子。该蛋白在龙眼花芽与叶芽分化发育中的具体功能不清楚。

综上所述,本研究鉴定出龙眼花芽与叶芽中的10个差异蛋白质,它们分别参与物质和能量代谢、自由基清除和抗氧化作用、信号转导与基础代谢、氨基酸代谢等生理过程,从而影响龙眼花芽与叶芽

的分化发育,这为了解龙眼花芽分化与蛋白质差异表达之间的关系,以及为龙眼花芽分化的分子调控奠定了基础。

参考文献

- [1] Li S G(李松刚), Chen Q X(陈清西). A review of differentiation and regulation of flower buds in longan [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2002, 31(4): 68-72.(in Chinese)
- [2] Valiente J I, Albrigo L G. Flower bud induction of sweet orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck: Effect of low temperatures, crop load, and bud age [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2004, 129(2): 158-164.
- [3] De Fa E, Vacher V, Humbert F. Winter buds and twigs of *Picea abies* L. (Karst.) until bud-burst: A biological, histological and NMR study [J]. Ann Bot (Lond), 2000, 86(6): 1097-1107.
- [4] Rao M S, Purohit S D. *In vitro* shoot bud differentiation and plantlet regeneration in *Celastrus paniculatus* Willd [J]. Biol Plant, 2006, 50(4): 501-506.
- [5] Chen Q X(陈清西). Studies on mechanism of physiological and biochemistry for the formation of floral bud by temperature and root pruning in Longan [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2006: 6-7.(in Chinese)
- [6] Cao S Y(曹尚银), Zhang Q M(张秋明), Wu S(吴顺). Advances in research on the mechanism of flower-bud differentiation of fruit trees [J]. J Fruit Sci(果树学报), 2003, 20(5): 345-350.(in Chinese)
- [7] Iwahori S, Garcia L, Santamarina P. The influence of ringing on bud development and flowering in *Satsuma mandarin* [J]. J Exp Bot, 1990, 41(10): 1341-1346.
- [8] Yamane H, Kashiwa Y, Kakehi E, et al. Differential expression of dehydrin in flower buds of two Japanese apricot cultivars requiring different chilling requirements for bud break [J]. Tree Physiol, 2006, 26(12): 1559-1563.
- [9] Zhu Z Y(朱志勇), Cao S Y(曹尚银), Xu X B(徐小彪), et al. Improvement of isolation and method of two-dimensional electrophoresis of protein from apple plant [J]. J Fruit Sci(果树学报), 2007, 24(4): 549-552.(in Chinese)
- [10] Cao S Y(曹尚银), Zhang Q M(张秋明), Zhu Z Y(朱志勇), et al. Preliminary proteomics analysis of the total proteins of flower-bud induction of apple trees [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 2007, 40(10): 2281-2288.(in Chinese)
- [11] Wang C C(王长春), Ke G W(柯冠武). Studies on morphologic differentiation of flower buds in longan [J]. J Fujian Acad Agri Sci(福建省农科院学报), 1992, 7(1): 55-58.(in Chinese)
- [12] Carpentier S C. Comparison of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis [J]. Proteomics, 2005, 5(10): 2497-2507.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [14] Guo Y J(郭尧君). Experimental Technique of Protein Electrophoresis [M]. Beijing: Science Press, 1999: 1-72.(in Chinese)
- [15] Ni Z L(倪张林), Wei J M(魏家绵). The structure and catalytic mechanism of ATP synthase [J]. J Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学学报), 2003, 29(5): 367-374.(in Chinese)
- [16] Renz A, Stitt M. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers [J]. Planta, 1993, 190(2): 166-175.
- [17] Liu X D(刘贤德), Ma W M(马为民), Shen Y G(沈允钢). State transition of the photosynthetic apparatus in plant [J]. J Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学学报), 2006, 32(2): 127-132.(in Chinese)
- [18] Yu S W(余叔文), Tang Z C(汤章城). Plant Physiology and Molecular Biology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2001: 171-187.(in Chinese)
- [19] Nakano Y, Asada K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical [J]. Plant Cell Physiol, 1987, 28(1): 131-140.
- [20] Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [J]. J Exp Bot, 2002, 53(372): 1305-1319.
- [21] Lin K H, Lo H F, Lin C H, et al. Cloning and expression analysis of ascorbate peroxidase gene from eggplant under flooding stress [J]. Bot Stud, 2007, 48: 25-34.
- [22] Li J(李晶), Yan X F(阎秀峰), Zu Y G(祖元刚). Generation of activated oxygen and change of cell defense enzyme activity in leaves of Korean pine seedling under low temperature [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 2000, 42(2): 148-152.(in Chinese)
- [23] Xiao Q(肖强), Zheng H L(郑海雷). The 14-3-3 proteins and plant signal transduction [J]. Chin J Cell Biol(细胞生物学杂志), 2005, 27(4): 417-422.(in Chinese)
- [24] Robert J F, Michael S M, Matthew F R. The 14-3-3s [J]. Genome Biol, 2002, 3(7): 3011-3017.
- [25] Garcia A B, Engler J D A, Iyer S, et al. Effects of osmoprotectants on NaCl stress in rice [J]. Plant Physiol, 1997, 115(1): 159-169.