

• 药材与资源 •

TMT 蛋白质组学与生物信息学分析不同石杉碱甲含量的蛇足石杉叶状体的蛋白差异

余 晓, 涂艺声*, 叶丽娟, 黄 倩, 袁慧慧

江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022

摘 要: 目的 分析不同石杉碱甲 (Hup A) 含量蛇足石杉叶状体 (离体培养物, 分别为株系 A、B、C) 的蛋白差异, 探究可能与 Hup A 积累合成的相关酶。方法 利用定量蛋白质组学串联质谱标签 (tandem mass tag, TMT) 技术对不同株系蛇足石杉叶状体进行定量蛋白质组学检测和鉴定, 再对差异蛋白进行 GO 和 KEGG 等生物信息学分析。结果 株系 B 的 Hup A 含量最低, 株系 C 的 Hup A 含量最高, 是 B 的 2 倍, 株系 B 和 C 两者有 78 个差异蛋白, 且差异蛋白 GO 富集分析, 分子功能 (MF) 所占比例为 28.75%; 通过不同株系间蛋白质差异表达的比对, 分析得到这 3 个株系在以氨基酸为起始的生物碱代谢通路中共有 2 种差异蛋白 (P93541、Q8RXU4)。P93541 蛋白在 Hup A 低含量的株系 B 中表达下调, 在相对高含量的株系 A 和 C 中均上调; 而 Q8RXU4 蛋白在低含量的株系 B 中表达上调, 在相对高含量的株系 A 和 C 中均表达下调。结论 Hup A 含量差异与蛋白表达差异呈正相关, 分析得到 2 种可能与 Hup A 积累相关的酶 P93541、Q8RXU4, 为 Hup A 生物合成生物信息学分析提供了依据。

关键词: 蛇足石杉; 叶状体; 石杉碱甲; 定量蛋白质组学串联质谱标签; 差异蛋白; 株系

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)12-2950-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.031

TMT proteomics and bioinformatics to analyze protein differences in different Hup A content of thallus of *Huperzia serrata*

YU Xiao, TU Yi-sheng, YE Li-nan, HUANG Qian, YUAN Hui-hui

College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract: Objective To analyze the differences in protein of thallus of *Huperzia serrata* (*in vitro* cultures, strains A, B, and C, respectively) with different Hup A content, and to explore related enzymes that may be synthesized with Hup A accumulation. **Methods** Quantitative proteomics was performed *in vitro* cultures of *Huperzia serrata* with different Hup A content using quantitative proteomics tandem mass tag (TMT) techniques, followed by differential protein analysis: GO, KEGG and other biological information analysis. **Results** Strain B had the lowest Hup A content and strain C had the highest Hup A content, which was twice than that of B. There were 78 differential proteins between the strain B and C. Analysis of differential protein GO enrichment showed that MF accounted for 28.75%; Analysis of differential protein expression showed that three strains shared two differential proteins (P93541, Q8RXU4) in the alkaloid metabolic pathway starting from amino acids. P93541 protein was down-regulated in the low-yield strain B and up-regulated in the relatively high-yield strains A and C. The Q8RXU4 protein was up-regulated in the low-yield strain B and down-regulated in the relatively high-yield strains A and C. **Conclusion** This study found that the difference in Hup A content was positively correlated with the protein expression. Two enzymes P93541 and Q8RXU4 that may be related to Hup A accumulation were analyzed, providing a basis for bioinformatics analysis of Hup A biosynthesis.

Key words: *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.; thallus; huperzine A; TMT; differentially expressed protein; strain

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 又名千层塔, 是常用民间中药, 为石杉科石杉属蕨类植物, 在我国的分布主要集中于东部及东南部^[1]。研

究表明, 蛇足石杉的次级代谢产物石杉碱甲 (huperzine A, Hup A) 可应用于阿尔茨海默病的治疗和改善患者认知功能^[2]。自然环境下, 野生蛇足

收稿日期: 2018-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660597); 国家自然科学基金资助项目 (81360614); 江西省自然科学基金项目 (20132BAB204023)

作者简介: 余 晓 (1993—), 女, 硕士在读, 主要研究方向为植物生物技术。E-mail: 635363279@qq.com

*通信作者 涂艺声 Tel: 13707916290 E-mail: ysttz2012@163.com

石杉生长缓慢,又被长期掠夺式的开采以致其生物资源锐减^[3];由于植株叶片薄,消毒十分困难,蛇足石杉的植物组织培养技术还没有成熟,不能使蛇足石杉大量快速繁殖^[4];研究者也一直致力于人工合成 Hup A,综观目前为止所报道的各种合成方法,均具有一定的局限性,很难以较低成本大量得到高光学活性的 Hup A^[5]。本实验室通过无性繁殖技术获得蛇足石杉叶状体^[6-7],发现离体叶状体是产生 Hup A 的最佳培养物形态^[8],H₂O₂ 诱变蛇足石杉培养物,建立了不同 Hup A 产量的后代株系^[9],为进一步研究不同 Hup A 积累能力的蛇足石杉叶状体的蛋白质组和转录组以及代谢组提供原材料,有望逐步揭示 Hup A 合成的代谢过程。

蛋白质作为生命活动的直接执行者,在蛇足石杉合成 Hup A 的过程中发挥着重要的作用。蛋白质组学已在植物领域广泛应用,例如利用高通量的差异表达蛋白质组学,揭示多种植物根部响应盐胁迫的多种调节机制^[10],以及了解红树植物物种的耐盐性和分泌能力^[11]。本研究利用串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)定量蛋白质组学方法,分析不同 Hup A 积累能力的蛇足石杉叶状体的差异表达蛋白,并进行生物信息学分析,筛选与合成生物碱有关的目的蛋白,结合不同株系的 Hup A 含量特性关联分析,揭示 Hup A 生物合成相关的分子信息。

1 材料

样品源自离体培养的庐山野生蛇足石杉植株茎外植体,由中国科学院庐山植物园詹远怀研究员提供并鉴定为蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.。由本实验室离体培养得到蛇足石杉叶状体^[7]。本研究选取上述蛇足石杉叶状体诱导创建的 3 个不同积累 Hup A 能力的株系 A、B、C^[9],A 为中产株系、B 为低产株系、C 为高产株系,收取培养 80 d 的叶状体作研究材料,各样本重复 3 次(A 株系分别为 A1、A2、A3; B 株系分别为 B1、B2、B3; C 株系分别为 C1、C2、C3)。

2 方法

2.1 蛇足石杉叶状体的培养与处理

叶状体的培养参照陈曼等^[12]的方法进行。首先在无菌条件下将叶状体剪切成小块后接种于经高温高压灭菌的 1/4 MS 固体培养基中,密封并置于(22±1)℃培养箱,光照强度 377 mol/(m²·s),光照周期为每天 15 h 光照。培养至 80 d 时,提取检测 3 个株系 Hup A 的含量,方法参照 Krishnamurthy 等^[11]进行,同时取

出株系 A、B、C 新鲜材料用液氮预处理 15 min,然后置于-80℃冰箱,待用于 TMT 定量蛋白质组学检测鉴定与差异蛋白表达信息分析(送上海美吉生物医药科技有限公司检测鉴定)。相关数据统计与分析采用 SPSS 22.0 软件进行相关分析。

2.2 蛋白质提取

采用 tris-平衡酚抽提法(BPP 法)^[13]提取蛇足石杉叶状体蛋白质,从-80℃冰箱取 0.2 g 叶状体放入液氮预冷的研钵中,加液氮研磨成粉。按 1:3 加入 BPP 溶液,4℃旋涡振荡 10 min。加入等体积的 Tris-饱和酚,4℃旋涡振荡 10 min。15 000×g 于 4℃离心 15 min,吸取上层酚相。加入等体积的 BPP 溶液,4℃旋涡振荡 10 min。15 000×g 于 4℃离心 15 min,吸取上层酚相。加入 5 倍体积预冷的乙酸铵甲醇溶液,-20℃过夜沉淀蛋白,离心弃上清,沉淀加入 90%预冷丙酮混匀后离心弃上清,重复该步骤 2 次。沉淀用蛋白裂解液溶解,离心取蛋白上清。

2.3 蛋白质定量

使用 BCA 试剂盒配制 BCA 工作液和不同质量浓度的标准蛋白质溶液,其质量浓度分别为 0、0.125、0.250、0.500、0.750、1.000、1.500、2.000 mg/mL。各样品均取 2 μL 和 18 μL 水混合,加入 200 μL BCA 工作液。振荡混匀,37℃反应 30 min,在 562 nm 处读取吸光度。

2.4 还原烷基化和酶解

取蛋白样品 100 μg 置于离心管中,用裂解液补充体积到 100 μL。加入终浓度 10 mmol/L TCEP 还原剂,在 37℃下反应 60 min。加入终浓度 40 mmol/L 碘乙酰胺,室温下避光反应 40 min。每管各加入预冷的丙酮,-20℃沉淀 4 h,10 000×g 离心 20 min,取沉淀。用 100 μL 100 nmol/L TEAB 充分溶解样品,按照质量比 1:50(酶:蛋白)加入 Trypsin 在 37℃酶解过夜。次日,干燥保存。

TMT 标记与混样,将 9 个样品酶解得到的肽段各取 100 μg,均加入一管 TMT 试剂,室温孵育 2 h,分别用 TMT10-126 标记 A1,127N 标记 A2,127C 标记 A3,128N 标记 B1,129N 标记 B2,129C 标记 B3,130N 标记 C1,130C 标记 C2,130 标记 C3。加入羟胺,室温反应 15 min。将等量标记产物混合于一管中,真空浓缩抽干。

2.5 RPLC 一维分离

用第一维高 UPLC 上样缓冲液复溶多肽样品,用反相 C₁₈ 柱进行高 pH 液相分离。A 相 2%

乙腈 (氨水调至 pH 10), B 相 80% 乙腈 (氨水调至 pH 10), 0~2 min, 100% A; 2~17 min, 0~3.8% B; 17~35 min, 3.8%~24% B; 35~38 min, 24%~30% B; 38~39 min, 30%~43% B; 39~40 min, 43%~100% B; 40~46 min, 100%~0 B。紫外检测波长为 214 nm, 体积流量为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, 洗脱时间为 66 min。根据峰形和时间共收取 20 个馏份, 合并成 10 个馏份, 真空离心浓缩。

2.6 液相串联质谱

第二维采用纳升体积流量 HPLC 液相系统 Easy-nLC 1200 进行分离。肽段用质谱上样缓冲液溶解; 上样后经色谱分离 120 min, 体积流量为 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。EASY-nLC 液相梯度洗脱, A 相 2% 乙腈 (氨水调至 pH 值为 10), B 相 80% 乙腈 (氨水调至 pH 值为 10), 0~1 min, 0~5% B; 1~63 min, 5%~23% B; 63~88 min, 23%~48% B; 88~89 min, 48%~100% B; 89~95 min, 100% B。

2.7 蛋白质的质谱数据统计

对质谱下机的原始文件经 Proteome DiscovererTM Software 进行分析。使用 R 语言中的 t. test 函数计算样本间差异显著性 P 值, 显著差异表达蛋白的筛选标准为 $P < 0.05$, 其中蛋白质在 2 个样品间差异倍数小于 0.83 和大于 1.2 的分别为下调和上调蛋白。显著差异的蛋白质进行表达模式聚类分析, 在得到的结果图中绿色代表蛋白在样本中表达量较低, 红色代表表达量较高。

2.8 生物信息学分析

选择 GO (gene ontology, <http://www.geneontology.org/>) 对所有的差异蛋白进行功能聚类分析, 采用 KEGG (Kyoto encyclopedia of gene and genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) 通路数据库对差异蛋白涉及的代谢通路进行分析。

3 结果与分析

3.1 3 个株系叶状体 HupA 的含量

表 1 为 3 个株系叶状体的 HupA 含量, 表明 3

表 1 3 个株系的 HupA 含量

Table 1 Content of HupA in three strains

株系	Hup A/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
A	90.29 $\pm$ 0.74 a
B	50.56 $\pm$ 0.74 b
C	101.13 $\pm$ 1.48 c

不同小写字母数值间差异显著 $P < 0.05$

Lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

个株系间的 HupA 含量表现为显著差异 ($P < 0.05$), 其中株系 C 的含量最高, 为株系 A 的含量的 1.12 倍; 株系 B 的含量最低, 为对照株系 A 的含量的 56%, 为株系 C 的 50%。

3.2 蛋白质的质谱鉴定及相对定量

对所有肽段的质量进行评估得到肽段匹配误差分布图 (图 1), 其基于数据库搜索策略的肽段匹配误差应在 1×10^{-6} 以下。共鉴定得到的多肽数 3 201, 蛋白数为 5 409, 蛋白质组的数为 1 402, 见图 2。3 个株系可定量的蛋白质为 1 398 个, 3 个株系间的差异蛋白总数为 137 个, 见表 2。

3.3 3 个株系的差异蛋白质表达模式分析

用 R 语言中 gplot 软件包对有显著差异的蛋白进行表达模式聚类分析, 结果见图 3。从株系间的

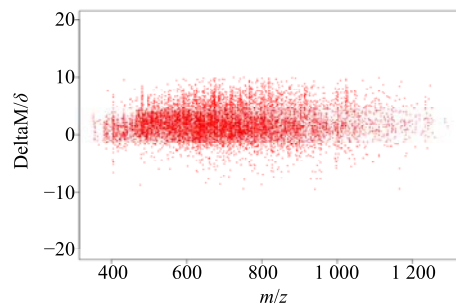


图 1 肽段匹配误差分布

Fig. 1 Peptide matching error distribution

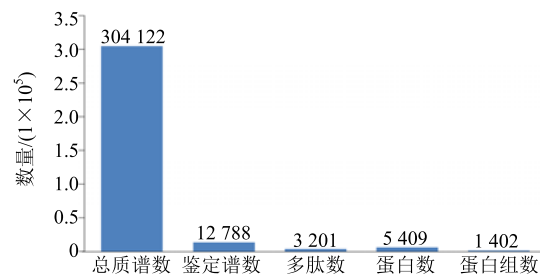


图 2 鉴定的蛋白质信息分析

Fig. 2 Information analysis of identification of protein

表 2 3 个株系的显著差异蛋白统计分析

Table 2 Statistical analysis of significant differentially expressed protein of three strains

对比样	蛋白质总数	差异蛋白数	上调蛋白数	下调蛋白数
A vs B	1 398	35	25	10
A vs C	1 398	24	9	15
B vs C	1 398	78	21	57

vs: 前是参照样本, 后是样本, 下同

vs: preceding the reference sample, followed by the sample, same as below

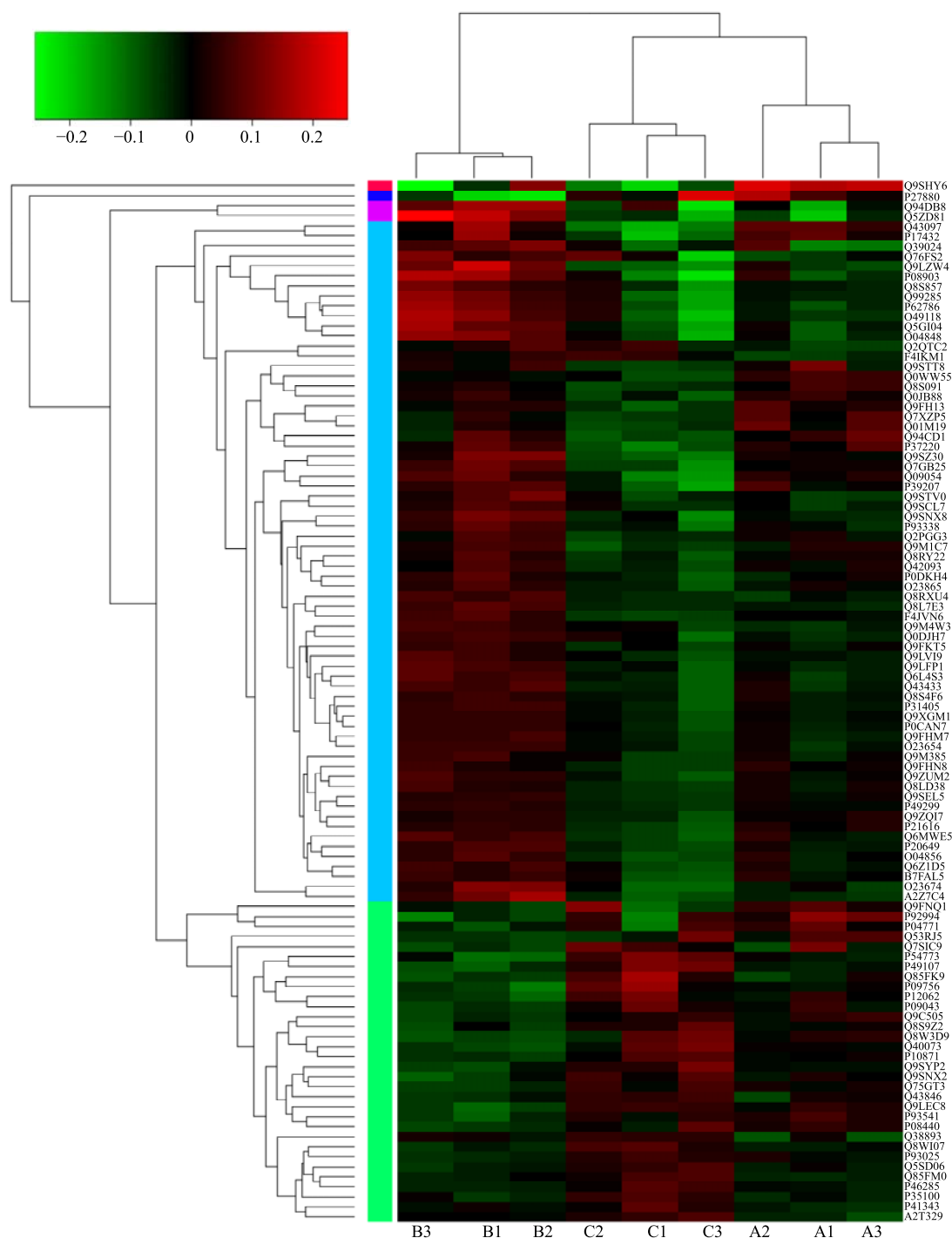


图 3 差异蛋白表达模式聚类分析

Fig. 3 Expression pattern clustering analysis of differentially expressed protein

差异蛋白表达聚类可以得出, 每个株系的 3 个重复性比较好, 即株系 B 聚为一类, 株系 A 和 C 各聚为一小类, 且两者与株系 B 聚为另一大类; 又从差异蛋白的表达聚类, 其差异蛋白 (图 3 右侧蛋白名称) 由上到下看出: 蛋白 Q94DB8D 到蛋白 A2Z7C4 的表达量 (红色为高表达量, 渐淡

渐减, 直至绿色低表达) 在株系 B 中较株系 A、株系 C 表达量高, 且株系 C 表达量最低; 蛋白 Q9FNQ1 到蛋白 A27329 的表达量株系 B 最低, 株系 C 最高, 对照株系 A 介于前两者中间, 显示了这些差异蛋白表达模式信息与其株系的 HupA 含量高低顺序间正向或反向关联一致。

3.4 3 个株系差异蛋白质的 GO 功能富集分析

蛋白质的 GO 功能注释分为生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 3 个方面。针对两两分组合比的差异表达蛋白进行 GO 富集, 得到

差异蛋白 GO 富集柱状图。在株系 A 与 C 差异蛋白 GO 功能富集中, BP 占总功能的 57.5%, MF 占 23.75%, CC 占 18.75% (图 4-A)。在株系 A 与 B 差异蛋白 GO 功能富集中, BP 占总功能的 65%,



A-A vs C 的差异表达蛋白 GO 富集 B-A vs B 差异表达蛋白 GO 富集 C-B vs C 差异表达蛋白 GO 富集

A-GO enrichment of differentially expressed protein in strains A and C B-GO enrichment of differentially expressed protein in strains A and B

C-GO enrichment of differentially expressed protein in strains B and C

图 4 差异表达蛋白 GO 富集

Fig. 4 GO enrichment of differentially expressed protein

分子 MF 占 25%，而 CC 的蛋白功能仅占 10% (图 4-B)。在株系 B 与 C 的差异蛋白 GO 功能富集中，BP 占总功能的 50%，MF 占 28.75%，CC 占 21.25% (图 4-C)，可见株系间 HupA 含量差异越大，差异蛋白 GO 富集分析中 MF 所占比例也高。

3.5 分组比对差异蛋白 KEGG 通路富集分析

KEGG 代谢通路分析表明，一个蛋白质参与一个或多个代谢通路，株系 A 与 B 之间的差异蛋白共参与了 28 个代谢通路，其中差异蛋白参与数量最多的 5 条代谢通路有氨基酸的生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸的代谢、氮代谢以及糖酵解 (表 3)，分别有 4、3、2、2、2 个差异蛋白参与这些通路。株系 A 与 C 之间的差异蛋白只参与了 10 个代谢通路，其中差异蛋白参与最多的代谢通路为氨基酸的生物合成，有 2 个差异蛋白参与其中，其他通路只有 1 个差异蛋白参与，选取部分通路示意

见表 4。B 与 C 之间的差异蛋白共参与了 84 个代谢通路，其中差异蛋白参与数量最多的 5 条代谢通路有氨基酸的生物合成、氧化磷酸化、吞噬过程、甘氨酸 (丝氨酸、苏氨酸) 代谢和精氨酸、脯氨酸代谢 (表 5)，分别有 5、4、3、2、2 个差异蛋白参与这些通路。可见相对高产 HupA 的株系 A、C 间的差异蛋白较少，而高产株系 C 与低产株系 B 间的差异蛋白多，且分布参与的代谢通路广，提示 HupA 生物合成途径可能为复杂多途径调控系统。

3.6 KEGG 分析生物碱前体氨基酸起始的代谢通路中株系间表达的差异蛋白

基于富集的差异蛋白进行 KEGG 代谢通路注释比对 A 与 B，B 与 C，以氨基酸起始合成生物碱的代谢通路中，发现以甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸起始合成生物碱的代谢通路 (ko00260) 中都有差异蛋白 Q8RXU4 (4.1.2.5) 的参与 (图 5，绿色标注

表 3 A vs B 差异蛋白参与数量最多的 5 条通路富集分析

Table 3 Enrichment analysis of top five pathways involved in differentially expressed proteins of A vs B

通路	差异蛋白数	蛋白编号	通路 ID 号
biosynthesis of amino acids	4	Q8RXU4、Q9SCL7、P04771、P08440	ko01230
arginine and proline metabolism	3	Q9SCL7、P04771、P93541	ko00330
alanine/aspartate/gluamate metabolism	2	P04771、P4541	ko00250
nitrogen metabolism	2	P04771、P93541	ko00910
glycolysis	1	P08440	ko00010

表 4 A vs C 差异蛋白参与的 5 条通路富集分析

Table 4 Enrichment analysis of top five pathways involved in differentially expressed proteins of A vs C

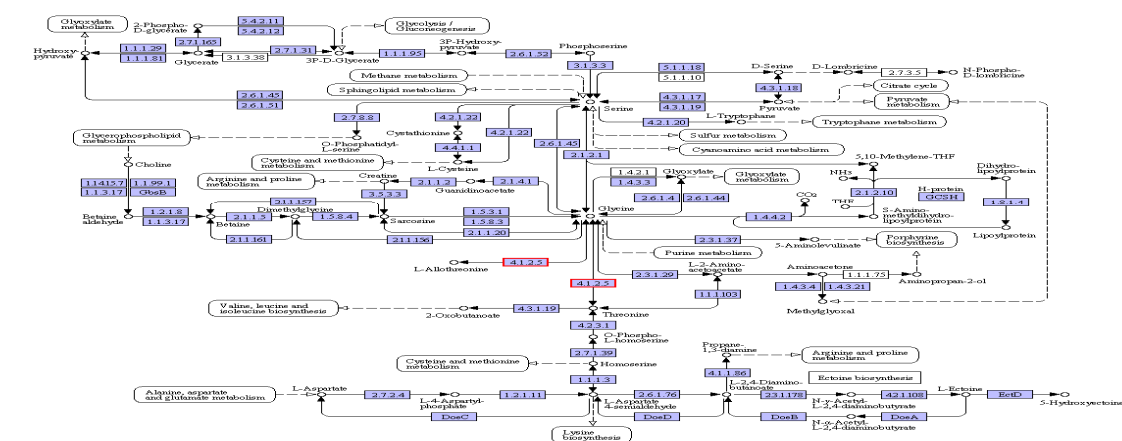
通路	差异蛋白数	蛋白编号	通路 ID 号
biosynthesis of amino acids	2	Q9SZ30、Q09054	ko01230
photosynthesis	1	P54773	ko00195
glutathione metabolism	1	Q7XZP5	ko00480
carbon metabolism	1	Q09054	ko01200
glycolysis	1	Q09054	ko00010

表 5 B vs C 差异蛋白参与数量最多的 5 条通路富集分析

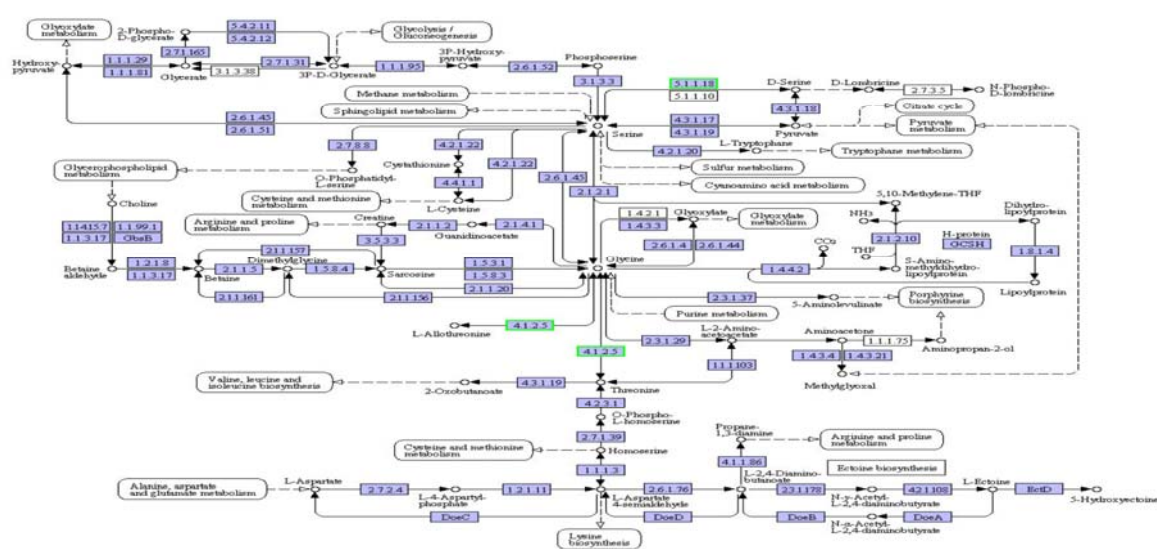
Table 5 Enrichment analysis of top five pathways involved in differentially expressed proteins of B vs C

通路	差异蛋白数	蛋白编号	通路 ID 号
biosynthesis of amino acid	5	Q8RXU4、Q9SCL7、Q9SZ30、Q9ZQ17、Q09054	ko01230
oxidative phosphorylation	4	Q9XGM1、P0CAN7、O23654、P20649	ko00190
phagosome	3	Q0XGM1、P0CAN7、O23654	ko04145
glycine serine and threonine metabolism	2	Q8RXU4、Q2PGG3	ko00260
arginine and proline metabolism	2	Q9SCL7、P93541	ko00330

GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM



GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM



A-A vs B metabolic pathway B-B vs C metabolic pathway

Fig. 5 Metabolic pathways (ko00260)

随着蛋白质组学技术的提高,在定量鉴定蛇足

由于石杉碱甲生物合成和代谢复杂,还没有公认的关键酶和限速酶。有报道蛇足石杉根茎叶的石杉碱甲含量不同,但赖氨酸脱羧酶的表达量无明显差异,分析得出赖氨酸脱羧酶不是 Hup A 合成的关键酶^[14];在 Hup A 的生物合成与代谢调控关键

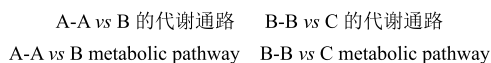


图 6 代谢通路 (ko00250)
Fig. 6 Metabolic pathways (ko00250)

基因的表达分析中,得到双加氧酶是其关键酶和限速酶^[15];比较蛇足石杉和龙骨马尾杉的 454-EST,指出细胞色素 P450 基因参与了生物碱的合成^[16];还有参与植物萜类合成的关键基因包括鲨烯合酶(HsSQS1)基因^[17]、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(HsDXR1)基因^[18]与生物碱合成有关。本实验以不同 Hup A 含量的蛇足石杉叶状体为研究材料,发现它们蛋白质组的表达水平存在一定差异,Hup A 含量高的株系下调的蛋白多,上调的蛋白少,在差异蛋白 GO 富集中,Hup A 含量越高,MF 功能的差异蛋白总体比例越高。

根据 3 个株系间的差异蛋白的 KEGG 以氨基酸起始合成生物碱的代谢通路比较分析,筛选到 2 个共有差异蛋白分别为 P93541、Q8RXU4。蛋白 P93541 是谷氨酸脱氢酶,研究表明,谷氨酸脱氢酶在植物氮代谢过程中发挥着重要的作用,既能催化铵与 α -酮戊二酸合成谷氨酸^[19],又能催化谷氨酸的氧化同时释放出铵;在植物处于逆境或胁迫时发挥着重要作用,主要功能可能是解除逆境或胁迫条件下高浓度的铵毒害^[20]。Q8RXU4 是苏氨酸醛缩酶,研究发现,苏氨酸醛缩酶催化苏氨酸生成甘氨酸和乙醛^[21],在植物氨基酸代谢中发挥作用。这些结果提示 Hup A 的生物合成可能受多条途径调控,P93541、Q8RXU4 2 个蛋白表达量与 3 个不同株系的 Hup A 含量高低顺序呈明显相关性,它们为蛇足石杉叶状体积累石杉碱甲的生物合成途径提供了一定的分子信息,为深入探究差异蛋白功能,揭示生物合成 Hup A 的关键酶系提供依据。

参考文献

- [1] 吴 荭, 庄 平, 冯正波, 等. 中国蛇足石杉资源调查与评估 [J]. 自然资源学报, 2005, 20(1): 59-67.
- [2] 徐红冰, 王晓平, 刘皋林. 石杉碱甲的药理研究及临床应用 [J]. 世界临床药物, 2014, 35(1): 60-63.
- [3] 齐耀东, 王德立. 蛇足石杉的种群结构和致危因素 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(1): 96-102.
- [4] 马英姿, 刘红海, 许 欢, 等. 蛇足石杉的离体培养 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(4): 465-470.
- [5] 郑书岩, 郁春辉, 沈征武. 石杉碱甲的合成研究进展 [J]. 有机化学, 2013, 33(11): 2261-2270.
- [6] 涂艺声, 丁明华. 产石杉碱甲的离体蛇足石杉叶状体诱导和增殖的培养方法: CN102550416A [P]. 2012-07-11.
- [7] 吉枝单, 涂艺声, 陈 曼, 等. 蛇足石杉离体培养产石杉碱甲的条件优化及动力学研究 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 488-492.
- [8] 徐贤柱, 涂艺声, 吉枝单, 等. 蛇足石杉离体培养物形态变化与石杉碱甲积累的研究 [J]. 植物学报, 2015, 50(6): 733-738.
- [9] 叶丽娟, 涂艺声, 黄 倩, 等. H₂O₂ 诱导蛇足石杉培养物的后代株系变化分析 [J]. 中药材, 2017, 40(11): 2502-2507.
- [10] 赵 琪, 戴绍军. 蛋白质组学研究揭示的植物根盐胁迫响应机制 [J]. 生态学报, 2012, 32(1): 274-283.
- [11] Krishnamurthy P, Tan X F, Lim T K, *et al.* Proteomic analysis of plasma membrane and tonoplast from the leaves of mangrove plant *Avicennia officinalis* [J]. *Proteomics*, 2014, 14(21/22): 2545-2557.
- [12] 陈 曼, 涂艺声, 叶丽娟, 等. 氨基酸对蛇足石杉叶状体增殖及石杉碱甲积累的影响 [J]. 植物学报, 2017, 52(2): 218-224.
- [13] Fan P X, Wang X, Kuang T Y, *et al.* An efficient method for the extraction of chloroplast proteins compatible for 2-DE and MS analysis [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(17): 3024-3033.
- [14] Du C, Li J, Tian X R, *et al.* Determination of huperzine A and semi-quantitative RT-PCR analysis of lysine decarboxylase gene in different parts of *Huperzia serrata* from western Hunan [J]. *J Chin Med Mate*, 2013, 36(3): 361-364.
- [15] 张君诚, 陈作毅, 宋育红. 石杉碱甲生物合成与代谢调控关键基因的差异表达分析 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 1-5.
- [16] Luo H, Li Y, Sun C, *et al.* Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus* reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynthesis and developmental regulation [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 209-213.
- [17] Yin X M, Bai Z C, Niu Y Y, *et al.* Cloning and analysis of squalene synthase (HsSQS1) gene in *Huperzia serrata* [J]. *Acta Pharm Sinica*, 2012, 47(8): 1079-1084.
- [18] 罗红梅, 李 标, 林余霖, 等. 蛇足石杉 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (HsDXR1) 基因克隆与表达分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 342-348.
- [19] Abiko T, Obara M, Ushioda A, *et al.* Localization of NAD-isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in rice roots: Candidates for providing carbon skeletons to NADH-glutamate synthase [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(10): 1724-1734.
- [20] 黄国存, 田 波. 高等植物中的谷氨酸脱氢酶及其生理作用 [J]. 植物学通报, 2001, 18(4): 396-401.
- [21] Franz S E, Stewart J D. Threonine aldolases [J]. *Adv Appl Microb*, 2014, 88(88): 57-101.