

橡胶树胶乳死皮相关蛋白的鉴定及分析

袁 坤,徐智娟,王真辉,杨礼富*

(中国热带农业科学院 橡胶研究所,农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室,海南 儋州 571737)

摘 要:橡胶树死皮(tapping panel dryness, TPD)是一种复杂的生理综合症,严重制约了天然橡胶产量的提高。为了分离鉴定橡胶树胶乳中与死皮发生密切相关的蛋白,采用双向电泳技术(2-DE)比较了其健康树和死皮树胶乳蛋白质组的差异。结果显示,在健康树和死皮树蛋白图谱上分别检测到 $1\,158\pm25$ 和 $1\,173\pm30$ 个蛋白点,其中 54 个蛋白点差异表达。经基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析和数据库检索后,成功鉴定 16 个蛋白,这些蛋白中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶、紫色酸性磷酸酶、动力相关蛋白、烯醇酶以及小橡胶粒子蛋白等可能在死皮发生过程中具有关键作用。为从分子水平上阐明橡胶树死皮发生机制提供了一定的理论依据。

关键词:橡胶树;死皮;双向电泳;质谱;蛋白质组

中图分类号:S796 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2012)06-0105-05

Identification and Analysis of Latex Proteins Related to Tapping Panel Dryness in *Hevea brasiliensis*

YUAN Kun, XU Zhi-juan, WANG Zhen-hui, YANG Li-fu*

(Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Tapping panel dryness (TPD) in *Hevea brasiliensis* is a complex physiological syndrome and it seriously limits the increase of natural rubber production. In order to separate and identify the proteins closely correlated with TPD in *H. brasiliensis*, the proteomes from healthy and TPD trees were compared by 2-DE. $1\,158\pm25$ and $1\,173\pm30$ protein spots were observed in the protein profiles of healthy and TPD trees respectively. Among them, 54 protein spots were expressed differentially. Subjected to MALDI-TOF-MS and database searching, 16 proteins were identified successfully. Some of them, such as the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), purple acid phosphatase (PAP), dynamin-related protein (DRP), enolase and small rubber particle protein (SRPP), might play key roles in the process of TPD occurrence. The current study will provide theoretical bases for further elucidating the mechanism underlying TPD in *H. brasiliensis* at the molecular level.

Key words: *Hevea brasiliensis*; TPD; 2-DE; MALDI-TOF-MS; proteome

橡胶树(*Hevea brasiliensis*)死皮给橡胶种植园带来了巨大的危害,是制约天然橡胶生产的重要因子。所谓橡胶树死皮,即乳管丧失部分或全部产胶能力,表现为割线排胶减少甚至完全停止排胶。有

关橡胶树死皮成因的假说多达 10 余种,如局部性严重创伤反应^[1]、乳管衰老^[2]、遗传及环境影响^[3]、防护机制^[4]等。近年来,科研人员还从分子生物学角度对橡胶树死皮开展了一些研究工作。S. Chen^[5]

收稿日期:2012-05-10 修回日期:2012-06-28

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(YWFZX2008-12、2009-12、2010-9);海南省重点科技项目(90107);现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-34-02A)。

作者简介:袁坤,女,博士,副研究员,研究方向:植物抗逆分子生物学。E-mail:yuankun628@126.com

*通信作者:杨礼富,男,博士,研究员,研究方向:植物分子生物学。E-mail:yf19i@126.com

等从橡胶树中分离了一个 *HbMyb1* 转录因子,并发现其可能是细胞凋亡的负调控因子,从而提出了“橡胶树死皮是由强割和强乙烯刺激引起的程序性细胞死亡”的观点;D. J. Li^[6]等的研究表明,橡胶树死皮涉及泛素-蛋白酶体、活性氧代谢及橡胶生物合成途径;闫洁^[7-8]和陈春柳^[9]等从橡胶树胶乳 C-乳清、黄色体和橡胶粒子中分离了一些与橡胶树死皮相关的蛋白。尽管从不同角度对橡胶树死皮已经开展了不少研究工作,但有关橡胶树死皮发生的分子机理尚不清楚;目前普遍认为死皮是一种生理综合症,其发生和发展机理非常复杂。

为了分离鉴定橡胶树全胶乳中与死皮发生密切相关的蛋白,拟采用双向电泳技术比较健康树和死皮树胶乳蛋白表达谱的差异,采用质谱技术对差异表达蛋白进行鉴定,最后运用生物信息学方法对这些差异蛋白进行功能解析,以研究其中一些蛋白可能在死皮发生过程中的作用,以期为从分子水平上阐明橡胶树死皮机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

橡胶树无性系 RRIM600,1970 年定植于八一农场 303 队。胶园即将更新,强割时间为 2006 年,乙烯利刺激浓度为 3.5%,割制为 d/4。选取长势良好,无病虫害,割面无褐斑、割线全线排胶的健康树 3 株作为对照;选取割线部分排胶的死皮树 3 株作为处理。样品采集时,将新鲜胶乳直接滴于液氮中,带回实验室在 -80 ℃ 保存待用。

1.2 方法

1.2.1 蛋白提取 胶乳总蛋白的提取参照徐智娟^[10]、刘昭军^[11]等的方法,即三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法提取胶乳总蛋白。将胶乳颗粒置于抽提液(7 mol · L⁻¹ 尿素,2 mol · L⁻¹ 硫脲,4% (W/V) CHAPS,1 mmol · L⁻¹ PMSF,65 mmol · L⁻¹ DTT)中,充分摇匀后于 4℃,14 000 r · min⁻¹ 离心 1 h,吸取下清液到另一离心管中,加入 4 倍体积的含有 2 mmol · L⁻¹ DTT 的 10% (W/V) TCA-丙酮溶液,混匀,-20℃ 沉淀 4 h 以上或过夜。然后于 4℃,14 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,弃上清。将沉淀悬浮于 -20℃ 预冷的含 2 mmol · L⁻¹ DTT 的丙酮溶液中,涡旋混匀,-20℃ 静置 1 h 后,于 4℃,14 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,弃上清。悬浮、洗涤步骤重复 3 次,最后将沉淀于 4℃ 挥干,得蛋白干粉。将蛋白粉末加入裂解液(5 mol · L⁻¹ 尿素,2 mol · L⁻¹ 硫脲,4% (W/V) CHAPS,1 mmol · L⁻¹

PMSF,40 mmol · L⁻¹ DTT)中,涡旋混匀,待其充分溶解后于 4℃,14 000 r · min⁻¹,离心 15 min,上清即为所需要的蛋白溶液。蛋白浓度采用 Bio-Rad 公司的蛋白定量试剂盒(Quick Start™ Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set)进行测定。

1.2.2 双向电泳(2-DE) 第一向等电聚焦凝胶电泳(IEF)采用 17 cm,pH 4~7 固相 pH 梯度 IPG 胶条,重水化液(8 mol · L⁻¹ 尿素,4% (W/V) CHAPS,40 mmol · L⁻¹ DTT,0.2% Bio-Lyte pH 3~10,0.002% 溴酚蓝),每根胶条总上样量为 200 μg,上样体积为 300 μL,做 3 个重复。于 25℃,水化 12 h,然后采用 Protean IEF Cell 等电聚焦仪(Bio-Rad)进行等电聚焦,聚焦温度为 20℃,极限电流为 50 μA · gel⁻¹,聚焦程序为:100 V,1 h;200 V,1 h;500 V,1 h;1 000 V,1 h;3 000 V,1 h;10 000 V,3 h;10 000 V,60 000 Vh。胶条平衡如下:第 1 步将胶条置于平衡液 1(6 mol · L⁻¹ 尿素,50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH8.8),30% (V/V) 甘油,2% (W/V) SDS,2% (W/V) DTT)中平衡 15 min,第 2 步将胶条置于平衡液 2(6 mol · L⁻¹ 尿素,50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH8.8),30% (V/V) 甘油,2% (W/V) SDS,2.5% (W/V) 的碘乙酰胺)中平衡 15 min。将平衡后的胶条转移至 12.5% 的 SDS-PAGE 胶上端。电泳条件为 100 V 电泳 30 min,200 V 电泳至结束。

1.2.3 凝胶染色和扫描 采用快速银染法^[12]对凝胶蛋白点进行显色,并使用 GS-800™ 校准型光密度仪对凝胶进行扫描。

1.2.4 图像分析 采用 Imagemaster 2D Platinum 5.0(GE)软件对胶图进行分析,点匹配的过程中进行手动检查和纠正,至少 3 倍上调或下调的蛋白点作为一个差异表达蛋白。

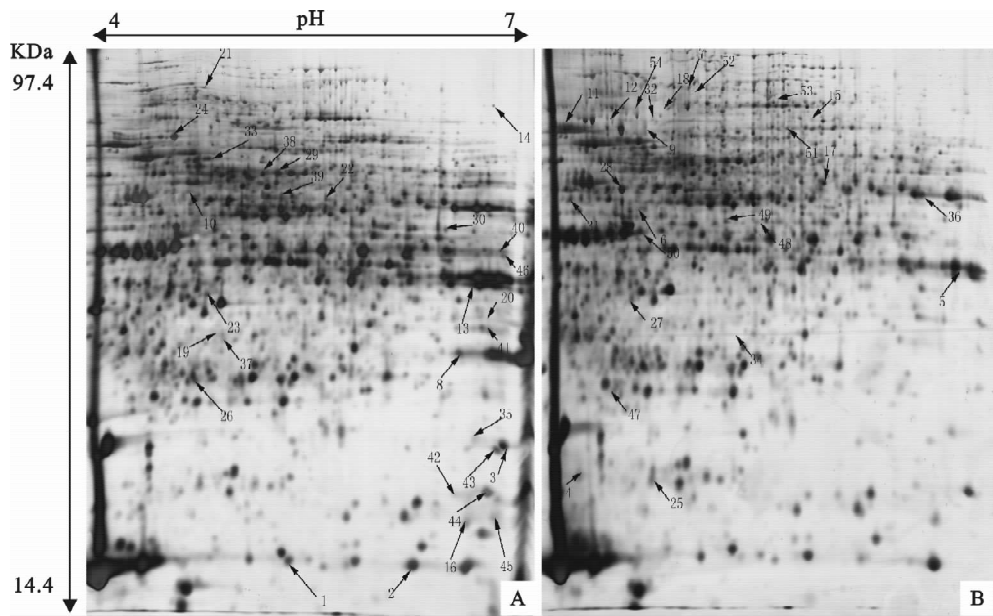
1.2.5 蛋白酶解、MALDI-TOF MS 分析及质谱鉴定 参照闫洁^[7]等的方法对差异表达蛋白进行胶内酶解,质谱分析和鉴定工作由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成。使用 Mascot 软件(<http://www.matrixscience.com>),搜索 NCBI 数据库,搜索参数:物种分类(taxonomy)为绿色植物(viridiplantae),固定修饰(fixed modification)选择 carbamidomethyl(C)修饰,可变修饰(variable modification)为 Gln->pyro-Glu(N-term Q)和 oxidation (M),质谱值(mass values)选择单同位素峰(monoisotopic),肽段的质量容忍误差(peptide mass tolerance)设定为 ±100 mg · L⁻¹,允许最大错误剪切位数(max missed cleavage)为 1。当蛋白

质得分(score)大于 71 时,鉴定结果可信。

2 结果与分析

2.1 蛋白的 2-DE 分离和差异表达分析

胶乳总蛋白经 2-DE 分离、软件分析后显示,在橡胶树健康树与死皮树 2-DE 蛋白图谱上分别检测到 $1\,158\pm25$ 和 $1\,173\pm30$ 个蛋白点,其中有 54 个差异表达蛋白点:在健康树中上调或新出现的蛋白点有 29 个,在死皮树中上调或新出现的蛋白点有 25 个(图 1)。



注:A:健康树;B:死皮树,数字和箭头表示差异表达的蛋白点。

图 1 健康树和死皮树胶乳蛋白的差异表达

Fig. 1 Differential expression of latex proteins in healthy and TPD trees

表 1 差异表达蛋白的质谱鉴定

Table 1 Identification of the differentially expressed proteins by PMFs

点编号	同源蛋白名称	登录号	分子相对质量/ 等电点 (kDa/pI ^{a)})	得分	覆盖率 /%	同源蛋白来源	表达 变化 ^{b)}
1	predicted protein	gi 224109654	13. 7/ 5. 50	73	16	<i>Populus trichocarpa</i>	↓
5	glyceraldehyde-3-phosphate dehydro- genase	gi 262317091	11. 5/7. 82	99	62	<i>Manihot alutacea</i>	↑
6	Tubulin beta chain	gi 1351202	46. 4/5. 63	218	40	<i>Glycine max</i>	↓
7	hypothetical protein	gi 147816540	101. 3/9. 46	72	16	<i>Vitis vinifera</i>	+
9	putative retrotransposon protein	gi 284434538	67. 5/5. 07	80	24	<i>Phyllostachys edulis</i>	+
10	purple acid phosphatase isoform a2	gi 237847791	61. 3/6. 21	75	15	<i>Triticum aestivum</i>	↓
15	predicted protein	gi 168068872	75. 1/8. 21	80	14	<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>Patens</i>	+
18	DRP	gi 51477379	100. 0/9. 15	94	16	<i>Cucumis melo</i>	+
19	enolase	gi 14423688	48. 0/5. 57	96	27	<i>Hevea brasiliensis</i>	↓
23	SET domain-containing protein	gi 224101881	40. 8/5. 90	75	33	<i>Populus trichocarpa</i>	—
27	unknown protein	gi 15220924	35. 8/8. 75	83	29	<i>Arabidopsis thaliana</i>	↑
28	small rubber particle protein	gi 37622210	18. 9/8. 99	95	45	<i>Hevea brasiliensis</i>	↑
30	PREDICTED: hypothetical protein	gi 225449545	45. 8/9. 15	72	16	<i>Vitis vinifera</i>	—
32	small rubber particle protein	gi 14423933	22. 3/4. 80	77	37	<i>Hevea brasiliensis</i>	↑
34	unknown protein	gi 18398247	43. 0/5. 44	72	23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+
35	unknown	gi 118486823	29. 6/8. 37	110	38	<i>Populus trichocarpa</i>	—

注:a)表示匹配的蛋白的理论分子量和等电点;b)表示与健康树相比,该蛋白点在死皮树中的差异表达情况:↑、↓、+、—分别表示上调、下调、新增加、消失。

2.2 差异表达蛋白的质谱鉴定

54 个差异表达蛋白点经质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析和数据库搜索后, 有 16 个蛋白点得到成功鉴定 (表 1)。蛋白点 5 鉴定为 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 该酶是糖酵解中的一个关键酶, 催化 3-磷酸甘油醛脱氢氧化成为 1,3-二磷酸甘油酸, 并将能量转移给 ADP 生成 ATP; 蛋白点 6 鉴定为 β -微管蛋白 (tubulin beta chain), 该蛋白是一种细胞骨架蛋白。

蛋白点 9 和 10 分别鉴定为逆转录转座子蛋白 (putative retrotransposon protein) 和紫色酸性磷酸酶 (purple acid phosphatases, PAP), 其得分分别为 80 和 75; 蛋白点 18 则与甜瓜中的动力相关蛋白 DRP (dynamin-related protein) 相匹配, 该蛋白被报道可能与能量产生相关^[13]。

在本研究中, 有 3 个蛋白点经质谱鉴定后, 发现其来源于橡胶树中, 这 3 个蛋白点分别是蛋白点 19、28 和 32。其中蛋白点 19 为烯醇酶 (enolase 1), 蛋白点 28 和 32 均为小橡胶粒子蛋白 (small rubber particle protein, SRPP)。此外, 蛋白点 23 与杨树中的包含 SET 结构域的蛋白 (SET domain-containing protein) 相匹配, 其余蛋白均为未知蛋白。

3 讨论

橡胶树死皮是影响天然橡胶产量的重要因子。本研究采用蛋白质组学技术分离鉴定了橡胶树胶乳中与死皮相关的蛋白, 结果显示, 有 54 个蛋白差异表达, 其中 16 个蛋白获得成功鉴定, 其中, 在死皮树中上调和下调表达的蛋白各 4 个, 在死皮树和健康树中特异表达 (新出现) 的蛋白分别为 5 个和 3 个, 这些蛋白可能在死皮发生过程中具有重要作用。

蛋白点 5 鉴定为 3-磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH 且在死皮树中上调表达, 该酶与细胞代谢途径相关。Venkatachalam^[14]等采用抑制消减杂交 (SSH) 技术, 从橡胶树中也分离到一个在死皮树中上调表达的 GAPDH 蛋白, 这与本研究的结果类似。D. Baek^[15]等在对拟南芥的研究中发现, GAPDH 转录本在氧化胁迫下大量增加, 抑制了活性氧的产生, 参与了活性氧介导的细胞死亡 (programmed cell death, PCD)^[16]。研究表明橡胶树死皮发生与活性氧信号和细胞凋亡 (PCD) 密切相关^[5-6, 14, 17-18]。据此, GAPDH 蛋白的功能可能与在拟南芥中的类似, 即该蛋白可能在死皮发生过程中抑制了活性氧的产生, 并参与了细胞凋亡过程。

10 号蛋白点鉴定为紫色酸性磷酸酶 (purple

acid phosphatase, PAP), 该酶在死皮树中表达受到抑制。李东屏和王道文^[19]报道了拟南芥 2 个紫色酸性磷酸酶基因 (AtPAP9 和 AtPAP10) 在磷饥饿条件下被诱导表达; 同时, G. G. Bozzo^[20]等研究发现, 番茄悬浮细胞在缺磷状态下诱导 2 个紫色酸性磷酸酶基因 (SAP1 和 SAP2) 显著上调表达。紫色酸性磷酸酶在死皮发生中的作用尚不清楚。

蛋白点 18 与动力相关蛋白 DRP (Dynamin-related protein) 相匹配, 该蛋白在死皮树中诱导表达, 而在健康树中未检测到。在哺乳动物的研究中发现 DRP 蛋白与细胞凋亡相关^[21-22]。该蛋白在死皮发生过程中是否参与细胞凋亡尚需进一步的试验验证。

蛋白点 19 与橡胶树中的烯醇酶 (enolase) 相匹配, 该酶是糖酵解中的一个关键酶, 它能催化磷酸甘油酸酯生成磷酸烯醇丙酮酸酯。据 S. Wagner^[23]等报道, 烯醇酶 Hev b 9 参与了胶乳过敏反应。此外, 赵静雅^[24]等从油菜中克隆了一个烯醇酶基因, 并发现该基因在盐胁迫下上调表达, 而在低温胁迫下表达水平下降。

蛋白点 28 和 32 都鉴定为小橡胶粒子蛋白 SRPP, 且在死皮树中表达量上升, 该蛋白在橡胶生物合成中扮演重要角色^[25-26]。D. J. Li^[6]等在转录组水平上发现一个 SRPP 基因在死皮树中下调表达, 而闫洁^[7]等在蛋白质组水平上从橡胶树胶乳 C-乳清中分离到 2 个 SRPP 蛋白, 并在死皮树中上调表达, 这与 D. J. Li^[6]等的研究结果相反, 而与本研究的结果类似。SRPP 蛋白很可能与死皮树中胶乳生物合成下降有关。

其余所鉴定的蛋白, 如逆转录转座子蛋白 (putative retrotransposon protein) 和 SET 结构域蛋白 (SET domain-containing protein) 可能在死皮发生过程中也具有重要功能。此外, 在本研究中, 54 个差异蛋白中只有 16 个蛋白获得成功鉴定, 且在这 16 个蛋白中, 有 7 个蛋白为未知蛋白 (predicted/hypothetical/unknown protein), 这可能与橡胶树数据库资源不全有关。

4 结论

所鉴定的 16 个差异表达蛋白中, 在死皮树中上调和下调表达的蛋白各 4 个, 在死皮树和健康树中特异表达 (新出现) 的蛋白分别为 5 个和 3 个。其中一些蛋白可能在死皮发生过程中发挥重要作用, 如 3-磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH、紫色酸性磷酸酶 PAP、动力相关蛋白 DRP、烯醇酶 enolase 以及小橡胶粒子蛋白 SRPP 等。

参考文献:

[1] 周建南. 国外巴西橡胶树死皮的研究[J]. 热带农业科学, 1995 (2): 73-78.

[2] CHUA S E. Physiological changes in hevea trees under intensive tapping [J]. Journal of the Rubber Research Institute of Malaya, 1967, 20(2): 100-105.

[3] PUSHPADAS M V, NAIR K K, KRISHNAKUMARI M. Brown bast and nutrition; a case study [J]. Rubber Board Bulletin, 1975, 12(3): 83-88.

[4] 许闻献, 校现周. 橡胶死皮树过氧化物酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶的研究[J]. 热带作物学报, 1988, 9(1): 31-36.

[5] CHEN S, PENG S, HUANG G, *et al.* Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(1): 51-58.

[6] LI D J, DENG Z, CHEN C L, *et al.* Identification and characterization of genes associated with tapping panel dryness from *Hevea brasiliensis* latex using suppression subtractive hybridization [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 140-152.

[7] 闫洁, 陈守才, 夏志辉. 橡胶树死皮病胶乳 C-乳清差异表达蛋白质的筛选与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(6): 28-36.

YAN J, CHEN S C, XIA Z H. Screening and identification of differential expressed proteins in C-serum on latex of tapping panel dryness (TPD) in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. China Biotechnology, 2008, 28(6): 28-36. (in Chinese)

[8] 闫洁, 陈守才. 橡胶树死皮病黄色体蛋白质组差异分析与初步鉴定[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(8): 858-862.

YAN J, CHEN S C. Differential analysis of two-dimensional gel electrophoresis profiles and preliminary identification of lutoid proteome on the latex of TPD in *Hevea brasiliensis* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2008, 47(8): 858-862. (in Chinese)

[9] 陈春柳, 闫洁, 邓治, 等. 橡胶树死皮橡胶粒子膜蛋白差异分析与初步鉴定[J]. 中国农学通报, 2010, 26(5): 304-308.

CHEN C L, YAN J, DENG Z, *et al.* Differential analysis of 2-DE profiles and preliminary identification of lutoids proteins from TPD tree in *Hevea brasiliensis* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(5): 304-308. (in Chinese)

[10] 徐智娟, 袁坤, 丁璇, 等. 橡胶树胶乳全蛋白的提取及双向电泳分析[J]. 热带农业科学, 2010, 30(4): 1-4.

XU Z J, YUAN K, DING X, *et al.* The extraction and two-dimensional electrophoresis analysis of total proteins from the rubber tree latex [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2010, 30(4): 1-4. (in Chinese)

[11] 刘昭军, 张胜, 赵忠, 等. 文冠果枝条韧皮部蛋白质双向电泳体系的建立[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(3): 55-61.

LIU Z J, ZHANG S, ZHAO Z, *et al.* Optimization of two-dimensional gel electrophoresis for proteome from the phloem of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(3): 55-61. (in Chinese)

[12] BLUM H, BEIER H, GROSS H J. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels [J]. Electrophoresis, 1987, 8(2): 93-99.

[13] LEEUWEN H V, GARCIA-MAS J, COCA M, *et al.* Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2005, 273(3): 240-251.

[14] VENKATACHALAM P, THULASEEDHARAN A, RAGHOTHAMA K. Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. Planta, 2007, 226(2): 499-515.

[15] BAEK D, JIN Y, JEONG J C, *et al.* Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. Phytochemistry, 2008, 69(2): 333-338.

[16] 马引利, 余小平. 植物细胞程序性死亡研究进展[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 58-62.

MA Y L, SHE X P. The progress of the studies on plant programmed cell death [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(3): 58-62. (in Chinese)

[17] VENKATACHALAM P, THULASEEDHARAN A, RAGHOTHAMA K. Molecular identification and characterization of a gene associated with the onset of tapping panel dryness (TPD) syndrome in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) by mRNA differential display [J]. Molecular Biotechnology, 2009, 41(1): 42-52.

[18] PENG S Q, WU K X, HUANG G X, *et al.* HbMyb1, a Myb transcription factor from *Hevea brasiliensis*, suppresses stress induced cell death in transgenic tobacco [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(12): 1429-1435.

[19] 李东屏, 王道文. 拟南芥紫色酸性磷酸酶基因 (AtPAPs) 对磷饥饿的响应[J]. 生命科学研究, 2003, 7(1): 65-69.

LI D P, WANG D W. Responses of putative purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis thaliana* (AtPAPs) to phosphorus starvation [J]. Life Science Research, 2003, 7(1): 65-69. (in Chinese)

[20] BOZZO G G, RAGHOTHAMA K G, PLAXTON W C. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures [J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(24): 6278-6286.

[21] FRANK S, GAUME B, BERGMANN-LEITNER E S, *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis [J]. Developmental Cell, 2001, 1(4): 515-525.

[22] MEN X L, WANG H Y, LI M, *et al.* Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2009, 41(4): 879-890.

[23] WAGNER S, BREITENEDER H, SIMON-NOBBE B, *et al.* Hev b 9, an enolase and a new cross-reactive allergen from *Hevea latex* and molds. purification, characterization, cloning and expression [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(24): 7006-7014.