

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200326056

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

水稻细菌性条斑病感染水稻明恢 63 诱导差异蛋白质组学研究

Proteomic approach to the different expressed proteins induced by infection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in rice cultivar minghui63

黄青云

指导教师姓名: 陈 亮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 27 日

论文答辩时间: 2006 年 7 月 20 日

学位授予日期: 年 月 日

答辩委员会主席: 王鸣刚 教授

评 阅 人:

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
1. 前言	4
1. 1 水稻细菌性条斑病概况	4
1. 2 水稻蛋白质组学研究进展	9
1. 3 植物抗病反应研究	20
1. 4 本课题研究的内容和意义	27
2 材料与方法	28
2. 1 材料	28
2. 2 方法	29
3 结果与分析	35
3. 1 水稻叶片受细条病菌侵染后的症状观察	35
3. 2 细条病侵染叶片的病理显微观察	36
3. 3 “明恢 63” 叶片蛋白质在细条病侵染期间的差异表达	39
3. 4 差异表达蛋白质的 MALDI-TOF 质谱分析与鉴定	41
4 讨论	46
4. 1 水稻叶片全蛋白双向电泳及质谱分析过程中存在的问题与解决途径 ..	46
4. 2 水稻明恢 63 应答细菌性条斑病侵染的蛋白质调控网络	48
参考文献	54
致 谢	59

Contents

Chinese abstract.....	1
English abstract.....	2
1 Introduction.....	4
1. 1 Introduction of Bacterial Leaf Streak	4
1. 2 Research progress on rice proteomics.....	9
1. 3 Research of plant resistant response.....	20
1. 4 Content and significance of this research.....	27
2 Materials and methods.....	28
2. 1 Materials.....	28
2. 2 Methods	29
3 Results and analysis.....	35
3. 1 Symptom observations of rice leaves infected with XooC	35
3. 2 Microscopic observations of rice leaves infected with XooC	36
3. 3 Proteins differential express of rice leaves infected with XooC.....	39
3. 4 MALDI—TOF/MS analysis and identification of proteins	41
4 Discussion	46
4. 1 Question and resolvent of 2—DE and MALDI—TOF/MS	46
4. 2 Proteins responsive and regulative network	48
Reference.....	54
Acknowledgement.....	59

摘 要

水稻细菌性条斑病（简称细条病），广泛分布于华南、中南稻区。该病是细条病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xooc) 引起的一种细菌性病害，于 20 世纪 50 年代在我国广东省首先发现，后因感病的杂交水稻大面积推广，致使此病迅速蔓延，病区不断扩大，已成为我国水稻主要病害和重要的检疫对象。目前国内外对于水稻细条病的研究仅仅限于基因组学的研究以及抗性基因的转化，而对该病菌侵染水稻后诱导机体蛋白应答的系统性研究还未见报导。因此，运用差异蛋白质组学手段开展水稻对细条病菌侵染的应答相关蛋白研究，无论是在阐明水稻的抗性分子机理和基因表达调控方面，还是在高产、优质、高抗的水稻品种的分子育种方面具有重要意义。

本试验以水稻品种“明恢 63”和强毒力细条病菌株“89773-1-1”为供试材料，在水稻主茎六叶一心期时，提取叶片全蛋白运用双向凝胶电泳分离，研究了叶片在接菌处理和不接菌的对照条件下不同时期蛋白质组差异表达谱，质谱分析鉴定差异蛋白质，通过对差异表达蛋白质的分析，探讨水稻对细条病菌侵染的防卫应答系统。

在细菌侵染后 2 h、5 h、12 h、48 h 4 个处理时间梯度进行取样，提取叶片全蛋白样品，通过双向电泳-质谱技术，比较其蛋白质表达情况。结果发现，共有 33 个蛋白质点在不同侵染时期发生了差异表达，其中表达量上升的有 21 个；表达量下降的有 12 个。经 MALDI-TOF/MS 检测及肽指纹图谱 (PMF) 分析，其中 27 个蛋白点在有关数据库中得到了归属鉴定。进一步对这 27 个蛋白及其特性进行综合分析，认为这些蛋白参与了水稻对细条病侵染的信号识别及防卫应答，其中包括信号转导类蛋白、防卫相关蛋白、代谢相关蛋白和参与蛋白质合成的蛋白等。

结果表明，中感水稻品种“明恢 63”对细条病菌侵染后的生物应答受复杂的网络调控机制控制。这些功能蛋白的鉴定为探明水稻对细条病的抗性机理，明确细条病菌与寄主植物水稻相互作用的分子基础及其抗病信号转导途径及寻找与抗细条病菌密切相关的差异表达蛋白质和基因奠定了基础。

关键词：水稻；细菌性条斑病；差异蛋白质组学；MALDI-TOF/MS

Abstract

Rice bacterial leaf streak (BLS) distributes widely in South China. BLS which was caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xooc) firstly discovered in the 1950's in Guangdong, and then spread quickly because the infective hybridized rice was popularized. So BLS is one of the major rice diseases in South China and becomes an important subject of quarantine in our country. Presently, the research of rice BLS is only limited in the research of genomics and the transformation of resistant gene, while very few systemic research on the response to BLS at the level of proteins have been reported.

So it is greatly significant to investigate the responses proteins to BLS by means of differential proteomics, either in illuminating the molecular mechanism of rice resistance and the control to the express of gene, or the molecular breeding of the rice with high yield, high quality, and high resistance.

The materials in this experiment are rice cultivar minghui63 (*Oryzae sativa* L.) and "89773-1-1", the pathogen Xooc strong pathogenicity in South China. The rice bacterial leaf streak was inoculated to the leaves in six-leaf stage and the leaf proteins were extracted. The defense-response system of rice against Bacterial Leaf Streak was probed into by the analysis of the differentially expressed proteins of Minghui 63 leaf after BLS infection in different inoculation time with the methods of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry.

Proteins were extracted from leaves 2, 5, 12, and 48 hours after rice Bacterial Leaf Streak inoculation and separated by two-dimensional (2-D) polyacrylamide gel electrophoresis. 33 proteins resolved on the 2-DE gels were induced or increased in the inoculated leaf. 21 proteins were up-regulated, while 12 proteins were down-regulated. 27 proteins were determined by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, and identified protein database matching. Further analysis of these 27 proteins showed them involved in signal recognition and defense response, including signal transduction proteins, defense associated proteins, metabolism associated proteins and protein synthesis

associated proteins.

This research indicates that there is a complex regulative network which controls the response to the Xoo in rice cultivar minghui63. Basing on the discovery of these functional proteins, we can probe into the rice resistance mechanism to BLS, definitude the molecular basic of the relative reaction between BLS and rice, investigate the transduction pathway of resistant signals, and explore the resistant—related proteins and genes.

Key word: rice ; Bacterial Leaf Streak (BLS) ; Two — dimensional gel electrophoresis; Differential proteomics; MALDI—TOF/MS

1. 前言

1. 1 水稻细菌性条斑病概况

水稻是世界上最重要且栽培历史最悠久的农作物，全球有半数以上的人口以水稻为生。病害是水稻生产的主要限制因子之一，也是影响水稻产量并危及粮食安全的重要原因。

水稻细菌性条斑病 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*, Xooc)，简称细条病 (Bacterial leaf streak, BLS)，是热带和亚热带稻区水稻上的一种重要病害，随着其发病面积和危害性的不断攀升，已成为继稻瘟病、纹枯病、白叶枯病之后的第四大病害^[1]。

水稻细菌性条斑病症状于 1918 年由 Reinking 首次在菲律宾被描述，该病广泛分布在亚洲的热带、亚热带稻区。1955 年中国广东首次发现细条病，后来因引种、南繁等使该病在中国蔓延传播，危害面积逐年增加。

1. 1. 1 水稻细菌性条斑病病原菌及分类与菌系分化

1918 年 Reinking 首先报道了菲律宾水稻上发生细菌性条斑病。1958 年 Pordesimo 研究了菲律宾水稻条斑病的病原，误将其作为白叶枯病菌命名为 *Xanthomonas translucens* f. sp. *Oryzae*。1955 年我国广东省首先发现水稻细条病危害^[2]，1957 年方中达等将其确认为一种新的细菌性病害，命名为细菌性条斑病，病原为 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*^[3]。其后，Go to 对此病菌和稻谷类黑颖病菌的几个变种作了比较研究后提出用 *X.translucens* f. sp. *oryzae* 代替 *X.oryzicola*，随后，Bradbury 又将其修正为 *X.translucens* f. sp. *Oryzicola*。最终，Dye 重新命名为 *X.campestris* pv. *Oryzicola*^[4]。

1990 年 Swing 等根据病原的表型、基因型、化学分类资料认为细菌性条斑病致病型菌 (*X.oryzae* pv. *oryzicola*(Xooc)) 和引起水稻白叶枯病的黄单胞杆菌白叶枯致病型菌 (*X.oryzae* pv. *oryzae*(Xoo)) 是同属于水稻黄单胞菌种 (*X.oryzae*) 下的两个变种，前者在分类上属黄单胞菌属稻黄单胞菌稻生致病型。菌体短杆状，大小 $1\sim 2\times 0.3\sim 0.5$ (μm)，单胞，间或双胞，但不成链状，单根极生鞭毛，好气性，革兰氏染色反应阴性，不形成芽孢荚膜，在肋本氏 (Wakimoto) 琼脂培养基上菌落圆形，光滑，周边整齐，中部稍隆起，无荧光，质粘，有光泽，不透

明,草黄色至密黄色。斜面上生长线状。在营养培养液中生长,有少量沉淀,并形成菌环,但不形成明显的菌膜。在孔乐和费美氏营养液中不生长。生理生化反应与白叶枯菌相似,不同之处该菌能使明胶液化,使牛乳酪化,使阿拉伯糖产酸,对青霉素、葡萄糖反应钝感,该病菌生长最适温度26~30℃,最低8℃,最高38℃,致死温度51℃,在pH 5.4~7.7范围内均能生长,最适为pH 5.9~7.2。

水稻细条病病菌存在致病力分化,不同地方菌系群不尽相同。有关水稻条斑病菌的致病力分化研究始于1965年。Goto最早发现来自菲律宾和日本的条斑病菌株对同一品种的致病力不同,根据在BP176品种上的严重度将菲律宾和日本的菌株分为4群^[5]。尽管有报道认为水稻细菌性条斑病菌不存在生理小种,但Shekhawat等根据测定结果将15个菌株分成8个小种群^[6-7]。之后,进一步的研究表明,水稻细菌性条斑病菌确实存在致病性分化^[8]。

我国学者也对细条病病菌致病力的分化进行了研究。徐羨明等^[9]根据各细条病分离菌株在DD100、DV85、BJ1、南粳15、辛尼斯、IR80和水源290等七个鉴别品种上的抗感反应,把供试的31个广东省水稻细条病菌菌株分为6个菌群,其中以IV群和V群为优势菌群。夏怡厚等^[10]于1988—1991年,从福建省内外收集和分离了161个菌株,用针刺接种法,先后在25个水稻品种上进行了病菌致病力的测定根据从中选择的17个水稻品种对选择的16个菌株所做的试验结果表明,水稻条斑病菌菌株间存在明显的致病力差异,而且这种差异是数量性的。1991年,根据125个菌株对选择的4个鉴别品种的侵染反应,将这些菌株划分为致病力强弱不同的4个菌群。0群菌致病力退化;I群菌致病力弱;II群菌致病力中等;III群菌致病力最强。其中II和III群菌占优势。郭亚辉、许志刚等^[11]在历年测定的基础上,选择了从国内各地收集的28个水稻条斑病菌株,用针刺法接种在以国际水稻研究所(IRRI)和中国农科院转育的抗白叶枯病的近等基因系材料为主的供试鉴别品种上,结果表明,不同菌株间的致病力差异显著,条斑病菌株与水稻品种间的互作反应大多表现弱互作模式,部分菌株与品种间存在强互作关系,根据供试菌株在鉴别品种IRBB5、IRBB7、IRBB3、IRBB21和JG30上致病力的差异,可区分成5种反应模式。这些分类结果是主要采用常规生物学测定的方法对水稻细菌性条斑病菌的群体进行研究的,由于采用的鉴别品种、接种方法和菌系划分标准不同以及环境条件差异的影响,导致结果不尽一致。

随着分子生物技术的发展,采用分子技术对水稻细条斑病病菌分化的研究有所进展。Raymundo^[12]利用一个重复 DNA 序列作探针,对水稻细菌性条斑菌作RFLP分析,同时用 Pst1 酶切基因组 DNA 进行染色体 DNA 指纹分析,将菲律宾 124 个菌株划分为4 个谱系,参试菌株的群体遗传多样性为 0.92,表示不同RFLP 型典型菌株间的致病力存在差异。姬广海等^[13-14]采用 RAPD 技术和 Rep-PCR 技术,在遗传距离为0.30时,将我国水稻细条病菌菌株划分为7个遗传相似组(谱系),在遗传距离为0.50时,则聚类归属于6个簇,并发现致病类群间差异显著。

从以上研究可以看出,来自不同生态区的条斑病菌的致病力并不相同,大体上可分为强、中、弱三个类型,强毒菌株的致病力强,致病谱宽,在抗病育种和品种抗性中,应尽量选用强致病力的菌株。

1. 1. 2 水稻细菌性条斑病的危害和侵染症状及流行规律

水稻细菌性条斑病在水稻整个生育期皆可发生,但以孕穗~抽穗初期发生危害最大。该病主要为害叶片,有时也为害叶鞘,影响水稻的光合作用,病害严重时能引起稻株早期死亡或不能抽穗。即使能够抽穗结实,但秕谷增多,千粒重降低,引起严重减产。一般减产10%~20%,严重的减产40%~50%。

苗期的典型症状首先出现在第一片真叶上,病斑可出现在叶子的任何部位。病斑初呈暗绿色水渍状半透明小斑点,继而逐渐沿叶脉方向扩展。由于扩展时受叶脉限制,形成宽约0.25~1 mm、长约1~5 mm左右的暗绿色水渍状细条斑,病斑由暗绿转为黄褐色,但两端仍呈暗绿色。成株期发病,初期症状与苗期相似,叶片上暗绿色水渍状半透明小点逐渐扩展成长短不一的水渍状细条斑,颜色由暗绿色转为褐色或橙褐色,但条斑两端仍为暗绿色水渍状,病斑长度一般在 10 mm 左右,最长可达 70 mm 以上。田间湿度大时,病部表面有蜜黄色菌脓溢出,呈露珠状,密密集生,数量比白叶枯病多且小,干结后呈黄色树胶状小粒,形如虚线,不易脱落。发病严重时,条斑融合成不规则的黄褐色至枯白色大斑块,外观与白叶枯病有些相似,但对光观察,病斑呈半透明状。病害流行时,叶片卷曲,完全呈一片白色。

细菌性条斑病流行因素包括病原、寄主和环境条件3个方面。

水稻细菌性条斑病原一般由种子带菌引起,并由发病田块向周围传播。病菌在我国南方稻区有再生稻和野生稻等自然寄主存在的地方可以在田间周年存活,

从而成为主要的侵染源。但在长江流域，因冬季无自然寄主存在，故病田收获的种子、病田残株及病稻草，成为下季初侵染的主要来源。病菌在稻谷上的存活期在12~16个月，在室内病草上的存活期也在12个月以上。病谷播后，病菌就会侵害幼苗的根及芽鞘而发病，插秧时又将病秧带入田间造成危害。病菌主要通过气孔和微伤口侵染叶片，在夜间潮湿条件下，病斑表面溢出菌脓。菌脓干燥后成小黄珠，可借风、雨、露水、分泌水和叶片接触等进行再次侵染，也可通过灌溉水、雨水、昆虫及人畜活动而传到其他田块。洪水、串灌、漫灌往往引起细条病的连片发生。病害的远距离传播主要通过种子调运等途径。

水稻细条病的寄主植物为禾本科 (Gramineae)，稻 (*Oryza sativa*) 和其它稻属植物 (*Oryza spp*)，人工接种也可侵染李氏禾 (*Leersia hexandra*) 但致病性较弱。一般来说，水稻不同品种对细条病的感病程度差异很大。粳稻通常较抗病，而籼稻品种绝大多数感病，受害严重。一般杂交稻比常规稻感病，矮秆品种比高秆品种感病，糯稻最感病。早稻极少发生细条病，晚稻较易感染。水稻细菌性条斑病症状因品种不同也有所差异，通常在杂交籼稻和常规籼稻上，病斑多而密，后期呈黄褐色；而粳稻上病斑较少，后期近褐色。在感病品种上，病斑发展较快，病斑上菌脓密集，有时在叶鞘上也能产生病斑；在抗病品种上病斑发展较慢，条斑短，近褐色，菌脓亦较少。

细菌性条斑病的发生与流行，与气候环境条件、生育期及施肥、灌溉等关系密切。病斑的形成和扩展与温度、湿度等因子密切相关，早稻前期温度较低，不利于病害发展，因此在苗期和分蘖初期，症状常不明显，直至生育后期才出现病斑，但在双季晚稻及杂交晚稻上，由于育秧期间气温高，在苗期就能见到典型的细菌性条斑病症状。洪涝淹漫或长期深灌，偏施或迟施氮肥的稻田，常常发病严重。高温高湿有利于病害发生，特别是遇台风暴雨或洪涝侵袭，易使稻叶擦伤，造成伤口，更有利于病菌入侵为害。在适温条件下 (22~33 ℃)，降雨量大、雨日频繁，病原细菌数量大，而水稻又处于易感病阶段，则导致细条病的严重暴发流行。

水稻细菌性条斑病传染快，一旦发生，单纯依靠药剂防治往往很难控制，目前生产上还没有防治水稻细条病危害的有效方法。

1. 1. 3 水稻抗细菌性条斑病研究新进展

从近几年水稻细条病的病害管理实践表明,要有效控制水稻细条病的发展和危害,种植抗病品种是防治水稻细条病经济有效的措施。因此,水稻细条病抗源的筛选和抗病品种的选育已是水稻抗病育种的研究热点之一,明确水稻细条病病原菌致病型和水稻抗性遗传机理及其相互作用的分子基础,从本质上阐明其抗病机理,显得十分重要。

以往国内外对水稻细菌性条斑病的研究大多集中在抗源筛选、抗性鉴定和抗病生理生化等方面,而对抗性的分子遗传机理研究较少,特别是有关水稻细条病的相关抗性基因的定位、克隆以及由病原菌诱导的抗性基因表达与调控等分子基础研究尚不深入^[15]。近年来,这些方面的工作取得了一些新的进展:

吴为人等^[16]以高感和高抗细条病的两个籼稻品种 H359 和 Acc8558 为亲本,建立了一个重组自交系群体。利用该群体构建了一张包含 225 个分子标记的连锁图。1996 和 1997 连续两年对该群体进行了细条病抗性鉴定。采用 t 测验法、复合区间定位法及多性状复合区间定位法对细条病抗性基因(QTL)进行了定位分析。共检测出 11 个 QTL,分别位于第 1、2、3、4、5、7、8 和 11 号染色体上,效应大小彼此接近,其中大多数抗病等位基因来自抗病亲本 Acc8558,只有位于第 3 和第 4 号染色体上的 2 个 QTL 的抗病等位基因来源于感病亲本 H359。

郑景生等^[17]用中抗和高抗细菌性条斑病(简称细条病)的两个籼稻品种明恢 86 和佳辐占为亲本构建了 F₂ 群体,应用 SSR 标记在水稻第 2 染色体的 RM279~RM154 之间检测到 1 个与水稻细条病抗性有关的 QTL,其可解释遗传表型变异的 13.7%,其加性效应为 0.9576,来自抗病亲本佳辐占。

陈志伟等^[18]以均匀分布于水稻 12 条染色体上的 104 个 SSR 标记,通过图示基因型分析法对抗水稻细菌性条斑病的近等基因系 H359R 的基因组组成进行分析,并结合初步定位的遗传图谱、水稻物理图谱以及水稻 SSR 遗传图谱的线性比较结果,对 H359R 携带的细条病抗性 QTL 进行分析。结果表明,抗病近等基因系 H359R 包含 3 个来自抗病亲本 Acc8558 的抗性 QTL 区段,1 个来自感病亲本 H359 的抗性 QTL 区段,证实了之前对细条病抗性 QTL 初步定位的可靠性。同时该结果也显示,只要聚合 4—5 个主要 QTL 的抗病等位基因,即能培育出高抗细条病的品种。

这些有关细条病的抗性分子生物学等方面的研究进展,促进了水稻抗细菌性

条斑病基因的克隆和及其在抗病分子育种方面的应用。但是要明确细条病与寄主相互作用的分子基础及信号转导机制，尚需进一步研究。

1. 2 水稻蛋白质组学研究进展

1. 2. 1 水稻蛋白质组学及其研究方法和技术

1. 2. 1. 1 水稻蛋白质组学

植物蛋白质组学是在基因组学的研究成就和高通量的蛋白质分析技术得到突破的背景下产生的新兴学科，基因组研究的发展是蛋白质组学产生的重要前提。

植物基因组学的研究主要集中在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 两种模式植物上。2000 年12 月，美、英等国科学家宣布测出拟南芥基因组的完整序列，2002 年是水稻基因组学研究取得重大成就的一年，首先中国的科学家和Syngenta公司的科学家分别完成水稻栽培品种籼稻和粳稻基因组框架图的绘制^[19,20]，继后日本和中国的科学家又分别公布了粳稻第1号和第4号染色体的全序列以及籼稻粳稻基因的“精细结构图”^[21,22]，被认为是基因组学研究的又一个重要里程碑。

然而从 mRNA 转录到蛋白质的翻译并不是简单的对应。基因组仅仅是遗传密码和遗传信息的载体，真正执行生命功能的是蛋白质，而蛋白质亦具有自身特有的活动规律，随着生命活动的进程表现出动态的紧密协调的变化，蛋白质在合成之后具有相对独立的修饰、转运和相互间作用能力，同时还具有对外界因素发生反应的能力。因此，只有从蛋白质组学的角度对所有蛋白质的总和进行研究，即开展蛋白质组学研究，才能更加贴近对生命现象和本质的掌握，生命活动的本质和活动规律才能找到答案。

蛋白质组学 (Proteomics) 一词是由澳大利亚学者威尔金斯 (Marc Wilkins) 和威廉姆斯 (Keith Williams) 在1994 年首次提出，并由Wasinger等^[23]第一次在出版物中使用。蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象，从整体蛋白质水平上，在一个更加深入、更加贴近生命本质的层次上去探索和发现生命活动的规律和重要的生理、病理现象等。蛋白质组 (Proteome) 指的是基因组 (Genome) 表达的全部蛋白质及其存在方式，是一种细胞、组织或完整生物体在特定时空上所拥有的全套

蛋白质。与基因组概念不同的是，蛋白质组作为一个整体，在不同的条件下，在一个生物体的不同组织中是不相同的。而一个生物体仅有一个特定的基因组。蛋白质组是一个基因组的直接产物。然而一个蛋白质组中的蛋白质数量可能超过基因提供的数量，这是由于基因的拼接和翻译后的修饰造成的。因此，蛋白质组的研究是为了识别及鉴定一个细胞或组织所表达的全部蛋白质以及它们的表达模式^[24]。蛋白质组学将基因组序列信息与特定组织器官中蛋白质的种类连接起来。

植物蛋白质组学研究是在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 的基因组序列公布后才逐渐活跃起来的。1999 年 Thiellement 等^[25] 发表首篇植物蛋白质组学综述了此前蛋白质组学在植物方面的研究进展，其中大部分研究还未涉及到质谱技术鉴定蛋白质，如今质谱已经成为蛋白质组学研究的重要工具。蛋白质组学研究也不再局限于单纯分离新的蛋白质，还拓展到蛋白质鉴定、蛋白质间的相互作用和蛋白质修饰等，成为一门从蛋白质整体水平上来认识生命活动规律的新兴学科。

水稻基因组由 430 Mb 组成，在禾谷类中较小，由于其基因易于操作，并且其基因组与其他单子叶植物基因组具有高度的同源性，从而成为单子叶植物分子和遗传生物学的模式生物，水稻蛋白质组学的研究逐渐掀起热潮。

目前蛋白质组学在水稻中的应用主要有以下几个方面：

1) 发育的蛋白质组学研究。在植物发育过程中，不同组织和器官功能上的分化，也表现在其蛋白质的差异上，水稻蛋白质组学研究将有助于对水稻发育机制的研究。目前水稻蛋白质组数据库包含了 23 张参考图，有详细的采样部位、样品制备及电泳条件，鉴定方法，点击蛋白点链接相应的信息等。

2) 在环境胁迫下的蛋白质组学研究。环境因子 (包括生物和非生物因子胁迫) 的影响会引起大量蛋白质在种类和表达量的变化。研究各种胁迫处理下的水稻蛋白质，可以分离出新的蛋白及基因，同时也可以深入了解环境胁迫的伤害机制及水稻对这些胁迫的适应机制。

3) 突变体的蛋白质组学研究。突变体是遗传学研究的重要材料，通过正求遗传学研究可以找到产生突变性状的基因。应用蛋白质组学方法对基因突变引起的蛋白质表达变化进行研究可以揭示突变体的生理生化及遗传机制，得到植物遗传学的重要数据，对表型突变的内在生化过程进行研究。

另外,一些与代谢密切相关的亚细胞结构(如水稻线粒体,质膜,高尔基体膜,叶绿体)蛋白质组学及水稻核蛋白质组的研究也有所进展。随着水稻结构基因组及水稻功能基因组研究的不断深入,水稻蛋白质组学研究将有更大突破,将会更好地阐明水稻生长、发育、进化及代谢调控等生命活动的规律。

1. 2. 1. 2 水稻蛋白质组学研究方法和技术

蛋白质组学研究方法和技术有很多,并且不断发展和出现新的技术,最经典的研究方法是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(Two-dimensional PAGE,简称2-DE)技术。双向电泳后的凝胶经过染色(如银染、考马斯亮蓝染色等),然后用图谱软件分析及后续的质谱或氨基酸序列等分析,再通过数据库检索鉴定蛋白质,从而获得有关蛋白质性质、表达变化及翻译后加工等方面的信息。双向电泳、计算机图像分析与大规模数据处理技术以及质谱技术被称为蛋白质组研究的三大支撑技术。

1. 2. 1. 2. 1 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)

2D-PAGE方法的应用始于20世纪70年代,O'Farrell于1975年首次使用该技术成功分离大肠杆菌的蛋白质^[26],后来发展的固相pH梯度(IPG)技术,解决了2D-PAGE中pH梯度的不稳定性,从而使2D-PAGE的重复性得到提高。最近,多种用于蛋白质组学研究的蛋白质分离方法得到了发展,如基于芯片技术的应用、蛋白复合物的质谱直接分析、亲和标签的使用以及大规模酵母双杂交筛选系统。但是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳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,这是因为它是迄今为止分析组分复杂蛋白质分辨率最高的工具之一,并且它与后续的显色及质谱工作的兼容性也比较好。

2D-PAGE技术的第一向等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)是根据蛋白质等电点不同而将其分离;第二向SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)是根据蛋白质(亚基)分子质量不同将第一向分离后的蛋白质进一步分离。2D-PAGE同时利用了蛋白质间等电点和分子量两种不同特性来分离蛋白质,分离能力非常强大,一次双向电泳可以分离几千甚至上万种蛋白,这是目前所有电泳技术中分辨率最高、信息量最多的技术。

双向电泳技术应用过程中的关键步骤一般包括样品制备(蛋白提取),IEF,平衡,SDS-PAGE,染色,扫描,保存等。样品制备和溶解是双向电泳的关键,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库