

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200426078

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

松材线虫和拟松材线虫的差异蛋白质组学研究

Proteomic approach to the differentially expressed proteins

between *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*

刘 颖

指导教师姓名: 沈明山教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007年4月28日

论文答辩时间: 2007年8月4日

学位授予日期: 2007年 月 日

答辩委员会主席: 陶涛教授

评 阅 人: _____

2007年8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

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目录

摘要	1
Abstract	3
1 前言	5
1.1 松材线虫病概述	5
1.1.1 松材线虫的危害以及分布.....	5
1.1.2 松材线虫与拟松材线虫概述.....	6
1.2 松材线虫的检测技术研究进展	8
1.2.1 形态学诊断.....	8
1.2.2 寄主成分的化学方法诊断.....	8
1.2.3 寄主物理方法诊断.....	8
1.2.4 生物化学方法诊断.....	8
1.2.5 分子生物学诊断.....	10
1.3 蛋白质组学及其相关技术	11
1.3.1 开展蛋白组学研究意义.....	11
1.3.2 开展蛋白质组学研究的核心分析技术.....	12
1.3.3 蛋白质组学应用研究.....	16
1.3.4 差异蛋白质组定性分析.....	18
1.4 我国研究松材线虫检测技术的迫切性	20
1.5 本研究的的目的和意义	21
2 材料和方法	23
2.1 实验材料	23
2.1.1 试验用线虫.....	23
2.1.2 线虫培养的菌种及培养基.....	23
2.1.3 收集材料.....	23
2.1.4 部分主要试剂.....	23
2.1.5 部分主要仪器.....	24
2.1.6 实验用试剂配制.....	24
2.2 实验方法	26
2.2.1 灰葡萄孢菌的培养.....	26
2.2.2 松材线虫和拟松材线虫的培养.....	26
2.2.3 线虫显微观察.....	27
2.2.4 蛋白质提取.....	27
2.2.5 蛋白质双向电泳(2-DE).....	27
2.2.6 银染.....	28
2.2.7 蛋白图谱比对及差异点的确定.....	28
2.2.8 蛋白质的肽质量指纹鉴定.....	28
2.2.9 质谱分析.....	29
2.2.10 肽质量指纹图谱的分析和数据库检索.....	29

3 结果与分析.....	31
3.1 松材线虫和拟松材线虫的显微观察.....	31
3.2 松材线虫和拟松材线虫的蛋白质差异表达.....	32
3.3 差异表达蛋白点的 MALDI-TOF 质谱分析与鉴定.....	33
4 讨论.....	41
4.1 松材线虫和拟松材线虫双向电泳(2-DE)及质谱分析过程中存在的问题与解决途径.....	41
4.1.1 双向电泳过程中出现的问题及解决方法.....	41
4.1.2 银染与质谱的兼容性.....	42
4.1.3 影响肽指纹图谱鉴定的因素.....	42
4.2 松材线虫和拟松材线虫的差异蛋白的鉴定.....	42
4.2.1 松材线虫和拟松材线虫代谢途径的差异.....	43
4.2.2 松材线虫和拟松材线虫信号传导通路的差异.....	44
4.2.3 松材线虫和拟松材线虫蛋白质合成的差异.....	44
4.3 鉴定到的差异蛋白与松材线虫病的致病机理.....	44
参考文献.....	48

摘要

松材线虫病是一种重要的林业病害,向来有“松树的癌症”的称号,对松树的危害十分严重,它的病原是松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*),它是包括日、韩、美、加拿大、墨西哥、尼日利亚和我国等许多国家重要的林业病害,也是许多国家的检疫对象,在我国属于二级检疫危害生物,造成的损失难于估计。但是因为它和致病性弱的拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)在形态上极其相似,从形态上难以区分,尤其是低龄期幼虫,这对松材线虫检疫和防治带来了很大的困难。目前国内外对于松材线虫的检测技术仅限于传统的形态鉴定、血清学、PCR 分子技术等方面;致病机理的研究则仅限组织病理学等方面,而未见有关蛋白组学方面的报导。因此,运用差异蛋白组学手段,通过对松材线虫和拟松材线虫差异蛋白的研究,无论是对松材线虫的准确鉴定和致病机理的研究都具有重要意义。

本试验以松材线虫和拟松材线虫为供试材料,提取两种线虫的全蛋白,进行双向凝胶电泳,研究了两种线虫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,不仅为松材线虫和拟松材线虫的准确鉴定打下基础,差异蛋白的进一步研究、可望揭示松材线虫的致病机理。

在同等条件下,提取两种线虫的蛋白样品,通过双向电泳—质谱技术,比较出两者的差异蛋白。结果共找出 50 个差异蛋白质点,松材线虫和拟松材线虫各 25 个。经 MALDI-TOF-MS 检测及肽指纹图谱(PMF)分析,45 个蛋白点在有关数据库中得到了归属鉴定,其中松材线虫 22 个,拟松材线虫 23 个。进一步对 45 个蛋白及特性进行综合分析,发现这些蛋白包括代谢相关蛋白、信号转导类蛋白和参与蛋白质合成的蛋白等,推测这些差异蛋白参与了不同的代谢途径和信号传导通路,并与拟松材线虫弱治病性和松材线虫的致病性有关。这些蛋白主要是一些蛋白酶。为“酶学说”这个致病机理的观点提供了依据。

结果表明:松材线虫和拟松材线虫的碳水化合物的代谢途径和信号转导途径都存在差异,松材线虫是唯一病原以及“酶学说”(松材线虫的酶使松树薄壁细胞的细胞壁和细胞膜遭到萎蔫的说法)的致病机理观点更符合本实验。差异蛋白的进一步研究,可望准确、快速鉴定松材线虫和拟松材线虫,并为进一步揭示松材线虫的致病机理以及寻找与致病机理相关的差异蛋白质和基因奠定了基础。

关键词：松材线虫；拟松材线虫；差异蛋白组学

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Pine wilt disease is one of the most important pine tree diseases, and its causal agent is *Bursaphelenchus xylophilus*, which is a great threat to the pine forestry in many countries such as China Japan, Korea, the US, Canada, Mexico, and Nigeria, etc. It is one of the most important quarantine organisms, and also listed on A2 in China, which lead to imponderable loss every year. However, it is difficult to differentiate isolates of *B. xylophilus* from the closely related species *Bursaphelenchus mucronatus*, which is not pathogenic to pine trees, especially the juveniles. It makes the quarantine and prevention very difficult to carry on. Presently, technologies of detecting *B. xylophilus* are merely limited in traditional morphological, serology and PCR molecular identification. Research in mechanism of pathology is just limited in tissue pathology. However, few researches in differential proteomics have been reported. Therefore, it is of great significantly to investigate exact identification and pathological mechanism of *B. xylophilus* by utilizing method of differential proteomics.

In this study, we extracted the total proteins of the two nematodes, and applied two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to study the proteomics of the two nematodes. Through analyzing differential proteomics of the two nematodes, we found an approach to identify the two nematodes exactly. Furthermore, an advanced research of this will uncover the pathological mechanism of *B. xylophilus*.

In equal conditions, we extracted the total proteins of the two nematodes, and applied two-dimensional electrophoresis to analyze the differences between the two nematodes. As a result, we have obtained 50 differentiate proteins,25 of which were from *B. xylophilus* and others were from *B. mucronatus*.45 proteins were determined by matrix-assisted laser desorption/ ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS),and identified protein database matching (PMF),22 of which were from *B. xylophilus* and others were from *B. mucronatus*. Further analysis of these 45 proteins showed them involved in differentiate metabolism pathway and signal transduction, including metabolism associated proteins, signal pathway proteins and

protein synthesis associated proteins. It is supposed that these different proteins participate in different metabolism pathways and signal transduction pathways, and these discriminations are related to *B. xylophilus*' capability to infect while *B. mucronatus*' low capability to infect. Most of these different proteins are protein enzymes, which provide evidences to "the theory of enzyme" which consider that it is enzymes from *B. xylophilus* cause atrophy of cell wall and cell membrane from parenchyma cells.

It is shown that, there are something different in metabolism pathways of carbohydrate and signal transductions pathways between the two nematodes. This discovering support the point of view that *B. xylophilus* is the exclusive pathogeny of pine wilt disease, and "the theory of enzyme".

Identifying the differentiate proteins between the two nematodes will enable us to identify the two nematodes rapidly and accurately. Integrating the differentiate proteins and other data between the two nematodes will assist us to reveal the virulence of *B. xylophilus* and search for proteins and genes which is related to pine wilt disease.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; *Bursaphelenchus mucronatus*; Differential proteomics

1 前言

1.1 松材线虫病概述

1.1.1 松材线虫的危害以及分布

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 引起的松材线虫萎蔫病是一种急剧毁灭性的森林病害, 被认为是松树的“爱滋病”。松材线虫主要由墨天牛属松褐天牛和其他几种天牛为媒介来进行传播, 危害最严重的松树种类主要有赤松和黑松, 并且有导致树木死亡速度快、传播蔓延迅速、防治难度大的特点, 松树一旦感染该病, 最快的 40 天左右即可枯死, 3—5 年便造成大面积毁林的恶性灾害。因此松树线虫病的问题不仅影响国土生态安全, 而且已成为影响世界经济贸易的重要因素之一^[1]。

由于其危害的严重性和防止的难度而受到世界各国的重视, 相继被列为各国检疫对象, 在我国属于二级检疫对象。可危害 30 多种松树, 此外落叶松、白云杉、水杉、黄杉、冷杉或雪松也可感病。在日本主要危害赤松、黑松、琉球松、日本五针松。另外在德国鱼鳞松、雪松、日本落叶松上也曾监测到松材线虫。在美国曾在 20 种松树、2 种雪松、2 种落叶松和 1 种冷杉上监测到松材线虫病, 但主要为害南欧黑松、赤松、欧洲赤松、火炬松、湿地松等。在我国主要为害黑松、赤松、马尾松、海岸松、火炬松、黄松等植物^[2]。

松材线虫早在 20 世纪 30 年代就在美国由 Steiner 和 Buhner 报道, 直至 60 年代末在日本被确认为松树枯萎的病原^[3]。目前在世界上该线虫在日本、美国、韩国、加拿大、墨西哥、希腊、葡萄牙、尼日利亚均有分布^[4]。在北美的美国、加拿大和墨西哥三个国家该病影响了木材的出口, 但并未对松树造成严重危害。而在东北亚, 松材线虫引起了松树的大量死亡, 尤其是日本, 松材线虫已在全国分布, 造成严重损失。

我国从 1982 年在南京中山陵风景区的黑松上首次发现松材线虫后, 现在已发展到江苏、浙江、安徽、四川、广东、上海、香港、台湾等地, 主要危害黑松和马尾松等, 很可能还有未被发现的疫区, 至少上述省份之间的省份很危险, 很难保证不被传染。自 1982 年以来, 在中山陵等 6 省 1 市及香港和台湾地区的部分地区松林, 枯死松树 2000 多万株, 对我国的松林资源, 自然景观和生态环

境造成了严重的破坏。目前，山东、江苏、浙江、安徽、广东等省部分地区，危害面积已近 13 万亩，损失 250 亿元，并且已经直接威胁到全国 5 亿多亩松林和危及到黄山、张家界等著名风景名胜区、世界自然文化遗产和重点生态区域的安全^[5,6,7]，是我国二级检疫对象。

松材线虫侵入树木后，外部症状的发展过程可分为四个阶段：①外观正常，树脂分泌减少或停止，蒸腾作用下降；②针叶开始变色，树脂分泌停止，通常能够观察到天牛或其它甲虫侵害和产卵的痕迹；③大部分针叶变为黄褐色，萎蔫，通常可见到甲虫的蛀屑；④针叶全部变为黄褐色，病树干枯死亡，但针叶不脱落。此时树体上一般有次期性害虫栖居。因松材线虫侵染而枯的树木，由于其它真菌的寄生，木质部往往呈现青灰色^[2]。

1.1.2 松材线虫与拟松材线虫概述

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 属于线性动物门(Nemathelminthes)，线虫纲(Nematoda)，垫刃目(Tylenchida)，滑刃科(Aphelenchoididae)，滑刃线虫属(*Bursaphelenchus*)。松材线虫最早由美国学者 Steiner 和 Buhrer 于 1934 年在美国路易斯安娜州一个工厂的兰变的长叶松(*Pinus palustins*)圆木中分离到的，命名为 *Aphelenchoides xylophilus*。当时并不知此虫与松树死亡有关。1970 年 Nickle 将其放在伞滑刃属中(*Bursaphelenchus Fucsh*)。1972 年 Mamiya 等人证实线虫是引起松树萎蔫病的病原，并定名为 *Bursaphelenchus lignicolus*^[8]。1981 年经 Nickle 等人鉴定，确认 *B. lignicolus* 是 *B.xylophilus* 的同义命。因此，松材线虫的学名由 *B. lignicolus* 改为 *B.xylophilus*^[9]。松材线虫生活史可分为繁殖和分散两个周期，繁殖周期发生在生长季节，连续重复出现卵，1-4 龄幼虫(J₁, J₂, J₃, J₄)和成虫。分散周期涉及松材线虫的休眠和传播，也包括幼虫和成虫各虫态，但分散型三龄幼虫(L_{III})和四龄幼虫(L_{IV})在形态结构和生理生化上发生了某些变异，并表现特殊功能。当病树死亡，树体内线虫种群达到最高峰的时候出现分散型三龄幼虫，L_{III}角质膜显著增厚，体腔内含物浓稠，肠内积聚；类脂小滴，特别具有耐饥能力，也能抗干燥和低温等不良环境，是松材线虫的休眠阶段；L_{III}蜕皮后形成分散型四龄幼虫，特称为 dauerlarvae(DL)，即持久性幼虫。L_{IV}形态结构变化很大，除角质膜较厚外，它没有口针，食道退化，此幼虫肠内聚集类脂外还储存糖原以及在体表覆盖保护性的胶粘物。L_{IV}特别抗干燥，适于昆虫媒介传播^[10]。

在植物线虫病中，属于昆虫传播的仅有椰子红环腐(*Rhadinaphelenchus cocophilus*)和松树线虫萎蔫病。已报道的传媒多为翘翘目昆虫，日本有九种天牛可以携带松材线虫，但最重要的传媒是分布广和带虫量大的松褐天牛。日本学者发现从病树中羽化的 75-100% 的松褐天牛都污染了松材线虫，每头平均携带 L_{IV} 1500 条，最高达 230000 条。在松褐天牛 4 龄幼虫越冬和化蛹期间(冬季至春季)，松材线虫 L_{III} 不断向天牛蛹室集中；在春末，集中于天牛蛹室内的松材线虫 L_{III} 蜕变为 L_{IV} 。一旦天牛羽化， L_{IV} 则移至尚未飞出病树的天牛成虫体表，大多数 L_{IV} 再通过腹部气门进入遍布天牛全身的气管内。松褐天牛携带的 L_{IV} ，可以通过天牛在健康的树上补充营养和在衰弱的树上产卵所造成的伤口侵入寄主。 L_{IV} 转移至松枝上的途径可能实现通过天牛气门从气管移出至体表，在爬向天牛尾尖，最后脱离携带者，到达天牛取食的松枝伤口。

拟松材线虫和松材线虫一样也是伞滑刃属(*Bursaphelenchus* Fucsh)的种。1979 年 Mamiya 等人从枯死松树上发现了另一种致病性较弱的线虫——拟松材线虫，并定名为 *Bursaphelenchus mucronatus* [11]，此种线虫常与松材线虫混生或单独出现在病树木上，两者形态很相似，较难区分，但致病性却有明显差别。拟松材线虫并不引起松树萎蔫病，因而准确区分这两种线虫，对于松材线虫病的防治及进出口检疫均具有重要意义。曾有不少学者对这两种线虫进行了形态学研究，其主要区别是拟松材线虫的雌虫具有尾突。拟松材线虫的雌虫和幼虫尾部有明显的指形突，有的松材线虫也有尾尖突，但一般不超过 2um，尾尖突长达 3.5 um 以上的为拟松材线虫。但这一特征也不稳定，美国学者曾分离出具有尾突的“M”型松材线虫，此线虫可与松材线虫杂交产生后代，但却不能与拟松材线虫杂交，明显地属于松材线虫，但却具有拟松材线虫的特征。此外法国学者还对分布于欧洲的拟松材线虫进行了研究，结果发现欧洲的拟松材线虫既可以和松材线虫杂交，又可以和拟松材线虫杂交，属于一种中间类型。随着酶学、分子和生化寄生虫学应用与松材线虫和拟松材线虫的检测，更多的研究结果表明，松材线虫和拟松材线虫种间和种内都存在差异性，但种间差异大于种内差异，因此属于两个独立的种。Beckenbach 等 [12] 用 PCR 对松材线虫和拟松材线虫分类表明，松树寄生线虫大致可分为三大类群：北美和日本的松材线虫，日本的拟松材线虫和欧洲的拟松材线虫。

1.2 松材线虫的检测技术研究进展

1.2.1 形态学诊断

这两种线虫常混生或单独出现再病树木上,两者形态很相似,较难区分。鉴定树中的拟松材线虫时,最重要的是与松材线虫的区分。传统鉴定的方法是通过形态学鉴定,由于形态常受到环境和地理条件的影响,形态特征有时并不可靠。特别是在种间进行鉴定时,难以找到合适特征。生殖器官的构造是低等动物分种的重要依据,而松材线虫和拟松材线虫有相似的雄虫交合刺远端膨大和雌虫阴门盖两个重要特征,所以通常选用雌虫的不同尾型及雄虫交合伞形状作为鉴定依据^[9]。松材线虫雌虫尾部亚圆筒状,尾端宽圆,无尾尖突或尾端指状,有明显尾尖突。雄虫交合伞卵圆形,包于端部。拟松材线虫雌虫雌虫尾部和幼虫尾部都呈圆锥形,尾端指状,有明显尾尖突。雄虫交合伞板状,端部平截。Mamiya 和 Enda 根据雌虫和幼虫的尾尖区分松材线虫和拟松材线虫^[11]。程瑚瑞等根据雌虫的尾形以及尾尖突长区分拟松材线虫和松材线虫^[13], Nickle 等提出可用雌虫尾形区分它们,但是不易于掌握,如果没有丰富的形态学鉴定经验,常常造成不正确的鉴定^[9]。

1.2.2 寄主成分的化学方法诊断

松树受到松材线虫侵害以后,松树的化学成分发生变化,病树和健树的乙醚抽出物的含量有所不同,而且 pH 值也不相同^[14]。王玉燕等根据病健木 pH 值的不同,用指示剂区分病健木,接着研究了用有机溶剂提取液进行颜色反应以及几种松树松材线虫病木和健木 pH 值的差异^[15,16,17]。

1.2.3 寄主物理方法诊断

赵博光等研究了病树和健康树木在电波传递上的差异,进行松材线虫侵染的检测与鉴定,这种方法用于实验室的生测试验,可以大大缩短试验药物及病原筛选实验的工作时间,提高试验效率,节省大量的人力和物力,为实验室生测提供了一种方法^[18]。

1.2.4 生物化学方法诊断

1.2.4.1 酶学

同工酶分析技术是一项被广泛应用于生物遗传变异、系统进化、物种鉴定和分类等方面的生物化学分析技术。80 年代后,国内外学者先后对一些松材线虫

和拟松材线虫株系进行了同工酶差异研究。Guiran 等^[19]采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析来自法国海岸松上的松材线虫,日本赤松上的松材线虫和拟松材线虫的几种同工酶谱发现,3个株系的酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱差异显著,能根据酶谱差异很容易地将它们区别开来。胡凯基等^[20]应用电泳技术对来自中国、日本、加拿大、法国及挪威的松材线虫和拟松材线虫株系作酶电泳分析发现,谷氨酸草酰乙酸转氨酶是唯一可区分两种线虫的酶。该酶具有种内均一性和种间特异性,有相当的稳定性,可用于松材线虫和拟松材线虫的初步生化鉴定。但他们对松材线虫与拟松材线虫的酯酶进行分析的结果表明:酯酶的稳定性并不理想,同一株系在不同菌上培养后也有变化。这可能与酶本身易受外界环境条件如培养线虫的条件(湿度和温度等)、提取过程及提取物的贮藏条件、分析方法及线虫本身即线虫的各发育阶段或在某一阶段线虫不同的生理状况等的影响有关。因此,酶虽然在密切相关的种类间保持着高度保守性,但由于上述因素,利用电泳分析线虫蛋白易导致结果的不稳定性。因而采用该方法进行种类鉴定尽量用相同的发育阶段的线虫,以便减少误差。Kojima^[21](1994)对松材线虫的分泌物进行了电泳分析,结果表明松材线虫分泌的纤维素酶的谱带类型与拟松材线虫的纤维素酶谱不同,而且松材线虫分泌的纤维素酶还具有分解结晶纤维素的能力。

1.2.4.2 血清学

血清学技术现已成为细菌、病毒、植原体等的主要检测手段,在植物病害诊断上具有十分重要的价值。利用血清学技术和方法进行种类鉴定,其所需蛋白量少,测定结果也不会受到线虫的生理状态如卵的滞育的影响,而且能在短时间内快速完成。在松材线虫鉴定方面有相关报道^[22],1993 Lawler 等^[23](1993)采用血清学技术鉴定松材线虫和拟松材线虫,他们用松材线虫和拟松材线虫分别免疫小白鼠制备抗血清(多克隆抗体),用酶联免疫吸附检测技术(ELISA)和蛋白印迹术(Western blots)检查抗体,研究结果表明松材线虫与拟松材线虫的多克隆抗体可用 Western 杂交将两者区分开来,用酶联免疫吸附法却不易将两者区分开,这说明虽然酶联免疫吸附检测技术(ELISA)的敏感度高,但种间区分度并不好,这跟多克隆抗体的特异性差有关。但免疫后获得的多克隆抗体的带型表明:日本和美国的松材线虫分离物与加拿大分离物比起来其亲缘关系更近。

1.2.4.3 激素

Riga 和 Webster^[24] (1992)研究表明, 松材线虫与拟松材线虫产生的性外激素具有种特异性, 即松材线虫或拟松材线虫只有各自的雌虫才能吸引各自相应的雄虫, 这是各自雌虫释放性外激素引起的反应。因此可利用测定性外激素来区分两者。

1.2.5 分子生物学诊断

自 20 世纪 80 年代末到 90 年代初国外较多学者开始将分子生物学技术引入松材线虫的检测研究中。Bolla 等^[25]首先从两个致病型的松材线虫和一个拟松材线虫中提取 DNA 进行杂交, 结果显示了 DNA 的种间和种内差异。Tares S 等^[26]和 Abad 等^[27]用同源和异源 DNA 探针检测松材线虫和拟松材线虫, 所用同源和异源 DNA 探针不仅能清楚地区分松材线虫和拟松材线虫, 而且还能对来源于不同地理种源地株系加以区别。1993 年 Harmeý 等人^[28]从松材线虫基因库中得到一个 1190bp 的 DNA 片段, 用该片段作为探针能在种级水平区分 *Bursaphelenchus spp.*。Tares S 等人^[29]1994 年从日本的松材线虫中分离出了具有种特异性的卫星 DNA 做诊断探针, 该探针能对单个线虫破碎后直接进行测定, 并能快速准确地从混合线虫中检测出病原线虫——松材线虫。RAPD 技术是 Williams 于 1990 年建立的以 10 个寡聚核苷酸为随机引物的分子标记技术。目前该技术已成功地在多种植物寄生线虫的研究中得到利用^[30]。德国德 Braasch 等^[31]建立了检测松材线虫及相关种的 RAPD-PCR 技术, 用特定的引物能区分两种线虫。郑经武等^[32]对松材线虫和拟松材线虫的 RAPD 分析结果显示, 引物 P253 可在松材线虫和拟松材线虫中产生具有种鉴定特异性片段。ITS (Internal transcribed spacer)-PCR-RFLP 分析技术是近年来发展起来的可靠性更高的一种可在种级水平上区分物种的简便快速的方法。Iwahori^[33]等利用该技术用于松材线虫和拟松材线虫的比较鉴定, 通过对松材线虫和拟松材线虫含有 ITS 1 5.8 srDNA 和 ITS2 区域的核糖体基因片段的扩增, 获得了 872bp 的片段, 再用 Hinf I 酶解, 根据酶解片段的差异, 可区分这两种线虫。贺水山^[34]等根据松材线虫 rDNA 基因部分序列, 通过单个碱基的故意错配, 设计了一对特异引物, 运用 PCR 方法, 最终扩增出一条 301bp 的特异性带, 实现了单条线虫的检测。许建平^[35]等人也用 PCR 方法设计了一对特异性引物, 这对引物能很好地区分松材线虫和拟松材线虫。张路平等^[36]对松材线虫 7 个株系和拟松材线虫 2 个株系的线粒体 DNA 进行了随机扩增多态性的

研究,结果显示,松材线虫和拟松材线虫种间以及拟松材线虫种内都表现出很大的变异性,但种间明显大于种内的变异,并且支持将松材线虫和拟松材线虫划为两个种这种分类法;还得出两个拟松材线虫株系(法国株系和日本株系)之间的相似值和松材线虫各株系间的相似值极为接近,认为这两个株系的变异为种内变异,应同属于一个种。把松材线虫和拟松材线虫分为两个种群,松材线虫分为两个亚组,一个是以日本为代表的株系,一个是以北美洲(美国和加拿大)为代表的株系。陆伟^[37]等利用 PCR-RFLP 和 DNA 测序技术分析了松材线虫和拟松材线虫中的 ITS 区。通过对松材线虫和拟松材线虫 ITS 1 5.8 s rDNA 和 ITS2 区域的核糖体基因片段的扩增,获得了 900bp 的片段,再用 5 种限制性酶切进行分析,根据酶切片段的差异,可区分这两种线虫。许多学者^[6,38,39,40,41,42]在这方面进行过相关研究。用曹爱新^[2]用实时荧光 PCR 技术对松材线虫进行了检测。许多学者^[6,38,39,40,41,42]在这方面进行过相关研究。

1.3 蛋白质组学及其相关技术

1.3.1 开展蛋白组学研究意义

蛋白组(Proteome)概念最早是由澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 于 1994 年提出的^[43],即某一个基因组(Genome)或者一个细胞、组织表达的全部蛋白质(Protein),即某一个体、器官、组织或细胞基因组编码的全部蛋白质的表达谱。具体说它是对不同时间和空间上发挥功能的特定的蛋白质组群进行研究,进而在蛋白质的水平上探索其作用模式、功能机理、调节调控以及蛋白质组群内的相互作用从而为临床诊断、病理研究、药物筛选、新药开发、新陈代谢途径研究等提供理论依据和基础。基因组在几乎所有的细胞中都是完整的,一个有机体只有一个基因组,同时,基因组储存的是稳定的信息,其成分不随时间变化,与之不同,蛋白质组是高度动态的,根据有机体的发育和生理状态,蛋白表达也不断发生变化。而且,与 DNA 和 RNA 不同,蛋白质是高度异质性的,其一级结构和高级空间结构各不相同。这些不同使得蛋白质组的研究存在许多困难,用于蛋白质组的分析方法明显落后于基因组分析方法,尚没有一种简便的方法能一步实现对复杂蛋白质混合物的定性、定量分析。

从整体上看,蛋白质组研究包括两个方面,一方面是对蛋白质表达模式的研究即蛋白质组组成的研究,另一方面是对蛋白质组功能模式(目前主要集中在蛋

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