

植物响应病原菌胁迫的蛋白质组学研究进展

赵大伟, 范海延*, 武春飞, 杨凯

(沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161)

摘要: 随着拟南芥、水稻等模式植物基因组测序的完成, 植物基因组学的研究重点已经转变为功能基因组学研究。蛋白质组学成为后基因组时代的重要研究手段, 它有助于从分子水平上了解植物功能。主要介绍了双向电泳技术、生物质谱、蛋白质质谱数据的生物信息学分析等蛋白质组学研究的主要技术手段及植物应答病原菌胁迫的蛋白质组学研究进展, 并对蛋白质组学在研究植物抗病机制方面的应用前景做出展望。

关键词: 植物; 蛋白质组学; 病原菌

中图分类号: Q945.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)06-0758-05

Progress in proteomics of plants in response to pathogen

ZHAO Da-Wei, FAN Hai-Yan*, WU Chun-Fei, YANG Kai

(College of Bioscience and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: With the completeness of the two model plants (*Arabidopsis* and rice), genomic sequencing project, the emphasis of plant genomic research has focused on functional genome research. Proteomics is one of the most active research fields in the post-genomic era, which helps us to understand the function of molecule of plant. The main research methods of proteomics, such as two-dimensional electrophoresis, mass-spectrometric, protein database and bioinformatics software and its application in the interaction between pathogen and plant were briefly introduced in this paper, and the prospects of plant proteomics related to the resistance of disease were discussed.

Key words: plant; proteomics; pathogen

植物在生长发育过程中会遇到各种生物胁迫, 如当植物受到病原菌侵害时, 体内蛋白质的表达会改变来完成信号的感应、传递, 引起植物相应的反应机制, 蛋白质组是动态的, 有时空性和可调节性(刘丽杰等, 2007), 因此, 对蛋白质组的研究有助于人们全面了解植物病害的发生与寄主抗病机制。蛋白质组学技术不仅能确定直接的防御相关因子, 还能揭示寄主能量代谢、信号传导等与防御反应的关系, 使人们获得植物-病菌互作的全息景象。同时, 应用蛋白质组技术可以标记植物在生物胁迫条件下特异表达的蛋白质并进行鉴定, 发现许多与生物逆境相

关的蛋白质, 为植物抗病基因的发现提供新线索。

蛋白质分离技术、鉴定技术和数据分析技术是蛋白质组研究的三大技术。蛋白质的分离技术将混合蛋白质分离成单一蛋白质以简化复杂蛋白质混合物, 比较不同样品的蛋白质的不同表现。高通量的生物质谱能快速大量地测定蛋白质的精确质量和肽序列。生物信息学软件采用特定的算法将质谱数据与蛋白质、表达序列标签(EST)和基因组序列数据库的数据相比对, 根据匹配情况鉴定蛋白质。本文将对蛋白质组研究技术及植物响应病原菌胁迫的蛋白质组学研究进展作以综述。

收稿日期: 2009-02-06 修回日期: 2009-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(30700542); 辽宁省教育厅课题(2008624)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700542)]

作者简介: 赵大伟(1978-), 男(满族), 辽宁凤城人, 博士, 副教授, 从事植物蛋白质组学研究, (E-mail) hyfan@163.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hyfan@163.com)

1 蛋白质组学研究的主要技术

1.1 蛋白质分离技术—双向凝胶电泳

虽然目前蛋白质组学技术发展很快,如毛细管等电聚焦、多维色谱、微流芯片等技术均已建立,但双向电泳仍然是目前蛋白质组学研究的主要分离方法。双向凝胶电泳(2-DE)的高分辨率、高重复性和微量制备的性能是其它分离方法所不能匹敌的。但2-DE也存在一定的不足,应该通过一些实验手段来改善。如:(1)许多较大的疏水性蛋白质由于其本身的低溶解度导致蛋白质沉淀和聚集,在凝胶上显示为横越分子质量区域的条纹。可通过使用不同强度和不同比例搭配的变性剂和表面活性剂,并进行分步溶解,以获得更多的蛋白质。(2)蛋白质染色技术的灵敏度不高,动态范围相对较小,点密度最多能反映100倍的蛋白质浓度范围,具有高密码子偏倚值的基因,倾向较高水平的表达,其产物蛋白质易被检测,而许多生物学上有重要的功能的蛋白质以相对低水平表达,被高丰度蛋白掩盖。可采用免疫沉淀或亲和色谱的方法,去除大部分高丰度蛋白,同时增加样品的上样量。(3)2-DE的分辨率的高低极大地影响了后续的蛋白质点的分析,可使用大胶增加双向的分离长度和放大胶即重叠几次窄范围IPG凝胶的电泳结果来生成复杂样品的2-DE蛋白质图谱,使用窄pH梯度要进行预分级处理。Unlu等(1997)建立了双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)技术,采用两种荧光试剂(如Cy2, Cy3, Cy5)分别标记两个样品,然后混合在一起进行双向凝胶电泳,并用相应激发波长来检测被不同的荧光基团所标记的蛋白质。这种方法能有效地降低蛋白质在2-DE图谱中的位置差异,提高了2-DE的重复性。使用内标Cy2,可消除由于上样量不同而导致的实验误差,提高定量的准确性(Hoorn等,2006)。

1.2 蛋白质鉴定技术—生物质谱

生物质谱(bio-mass spectrometry, MS)技术具有高灵敏度、高分辨率和高质量精确性适用于多肽的鉴定,根据软电离离子化技术的不同分为两种:(1)基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)能测定完整肽段的质量。用MALDI-TOF-MS测得的蛋白质酶解肽段质量数据在数据库中检索,寻找相似质量的肽,从而鉴定蛋白质(Spyros等,2005)。(2)电喷雾电离串联质谱(ESI-

MS-MS)可以测定肽碎片的质量并分析肽序列。ESI-MS-MS可以得到肽MS-MS谱图来鉴定蛋白质(Fenn等,1989),一是谱图从头解释得到的肽序列即肽序列标签(peptide sequence tag, PST),然后用得到的肽序列通过数据库的检索鉴定蛋白质;二是运用算法使谱图数据直接与数据库中肽序列相匹配来鉴定蛋白质。

1.3 蛋白质分析技术—蛋白质质谱数据的生物信息学分析

1.3.1 蛋白质识别常用数据库 Swiss-port 数据库对数据审核很严格,可以说只有实际存在的蛋白质才被收入。每一条数据都有高水平的注释,包括功能、结构域、翻译后修饰,以及最低水平的冗余和到许多其他数据库的链接(马袁君等,2007; Magrane & Apweiler, 2000)。TrEMBL 中的数据是从EMBL 数据库库中的核酸序列翻译过来的氨基酸序列,完成了自动注释(Boeckmann等,2003)。TrEMBL-NEW 是从EMBL 库中的核酸序列翻译出来的氨基酸序列,但是还没被赋予Swiss-port 索取号,因此只能借助蛋白质标识符检索。NR 数据库是NCBI 的非冗余蛋白质序列数据库,由Swiss-port、Swiss-port 补充、PIR(蛋白质序列数据库,包含自然界中野生型序列已知的蛋白质信息)(Wu等,2004)、PDB(蛋白质结构数据库)组成,各个不同数据库中完全相同的序列在NR 数据库中被合并(杨少友,2007)。

1.3.2 蛋白质鉴定的分析软件 PepSea 分析肽图时获得肽序列标签,检索较大质量的蛋白质时计分较高,随机匹配的可能性较大(Fenyo, 2000)。Sequest 不对谱图进行从头解释,而快速地将MS-MS谱图指定到数据库中特定的肽序列,但不对得到匹配质量作出判断(Jimmy等,1994)。PeptIdent/MultiIdent 在给定质量误差极限之内对相匹配的数目给出得分,在检索较大质量蛋白质时随机匹配的可能性较大(Wilkins等,1998)。MS-Fit/Protein Prospector 利用肽图进行蛋白质鉴定,检索较大蛋白质时计分偏高。MOWSE 利用数据库中蛋白质的平均组成来提高鉴定的灵敏度,计分中考虑了肽段的相对丰度,降低了随机匹配的概率,提高了计分和鉴定的准确性(Clauser等,1999)。ProFound 基于Bayesian 判别法对蛋白质进行分类,同时考虑单一或多种蛋白质的信息。先在数据库中查询单一蛋白,比较与实验数据的吻合程度。然后将计分最高

的两个或多个蛋白质相融合并与实验数据做比对(杨少友,2007)。Mascot 算法考虑了随机概率对实际数据与相匹配的蛋白序列之间一致性的影响,分进行了调整(David 等,1999)。

2 病原菌胁迫下的植物蛋白质组学研究

2.1 大豆疫霉菌诱导拟南芥的蛋白质组学研究

大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)是卵菌类的模式物种,拟南芥对大豆疫霉菌具有非寄主抗性。孙果忠等(2008)利用双向电泳分离水杨酸、创伤和大豆疫霉菌诱导拟南芥叶片后蛋白质表达变化,并对 28 个差异表达的蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 鉴定,这 28 个蛋白点的表达模式分 3 种类型:13 个点的表达随着伤口、水杨酸和大豆疫霉菌的诱导而上调;11 个点的表达随着伤口、水杨酸和大豆疫霉菌的诱导而下调;4 个点在伤口和大豆疫霉菌诱导中的表达行为与水杨酸诱导中的表达行为相反。这些蛋白涉及了物质代谢酶、调节因子或分子伴侣、氧化还原酶、防御相关蛋白、蛋白激酶、叶绿体酶和功能未知蛋白等。

2.2 水稻主要病害蛋白质组学研究

陈芳育等(2007)运用双向电泳分析高抗水稻品种“佳辐占”受强毒力细菌性条斑病原菌(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*)侵染 2 d 后的叶片蛋白质组变化,共发现 38 个蛋白质发生差异表达,其中 32 个上调,5 个下调,1 个新增。用 MALDI-TOF-MS 分心和数据库检索鉴定出其中的 33 个差异表达蛋白质,并将它们分为 4 个功能类群,即信号转导相关蛋白、防卫相关蛋白、代谢相关蛋白和蛋白质稳定相关蛋白,这些蛋白分别参与了信号识别、信号传递、抗氧化、糖代谢、细胞壁加固、植保素合成等抗病生理反应,其中差异表达的 8 个 R 蛋白和 3 个 PR 蛋白可能与水稻对细菌性条斑病的抗病性密切相关。曾亚等(2008)采用双向电泳-质谱分析技术,比较分析了水稻在接种白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)1、4、8、24、72 h 后蛋白质表达谱的差异。通过比较接种白枯叶病菌和对照之间及接种不同白枯叶病菌生理小种之间的表达差异,发现了 72 个差异表达的抗病相关蛋白,对其中部分蛋白点进行了电离子喷雾二级质谱学分析鉴定,确定了 11 个抗病反应中差异表达的蛋白质,包括 RNA 结合蛋白、琥珀酰辅酶 A 连接酶 α 亚基、1,

5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶、非顶端分生组织蛋白、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶、叶片衰老相关类蛋白、碳酸酐酶 3、转导素家族蛋白/WD-40 重复家族蛋白、乙酰乳酸合成酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶 B 亚基和细胞基质 3-磷酸甘油醛脱氢酶。Fang 等(2007)研究了水稻在接种白叶枯病菌 12 h 和 24 h 后质膜蛋白质的变化,在 2-D 图谱上有 20 个差异蛋白点,其中 11 个蛋白点经过 MS/MS 鉴定,包括 9 种假定的质膜蛋白、H⁺-ATPase、蛋白质磷酸酶(protein phosphatase)、hypersensitive-induced response protein (OsHIR1)、prohibitin (OsPHB2)、锌指蛋白(zinc finger)和 C2 domain protein、universal stress protein(USP)和热震惊蛋白(heat shock protein)。

2.3 麦类作物应答病菌的蛋白质组学研究

梁根云等(2007)运用双向电泳技术分析了条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)侵染的 2 个小麦品种(川麦 107 和 80-8)的对照和发病 14 d 叶片的差异表达蛋白,从 2-D 图谱上发现了 9 个差异表达的蛋白,其中 P5 是在接种并发病的川麦 107 中新诱导出的一个差异蛋白质。通过 MALDI-TOF-MS 获得 6 个蛋白质的 PMF,数据库搜索鉴定出 2 个蛋白质是脱氢抗坏血酸还原酶(Dehydroascorbate reductase, DHAR)和磷酸核酮糖激酶(Phosphoribulokinase, PRK)。Jennifer 等(2008)将禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的孢子悬浮液接种在开花期的大麦穗上,在 2-D 图谱上发现了 43 个差异表达的酸性蛋白,分别是苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase),过氧化物酶(peroxidase)和病程相关蛋白(pathogenesis-related protein)三类。在高抗基因型 CI4196、Svansota、Harbin 和在中抗基因型 CDC Bold 中,PR-3 和 PR-5 蛋白大量表达。在敏感型基因型 Stander 中,这些酸性 PR 蛋白的表达量降低。与氧化应激反应相关蛋白在 Stander、CDC Bold、CI4196 中表达大量增加来抵抗真菌的入侵,在 Svansota、Harbin 中少量变化,在基因型 Chevron 中没有变化。通过对六种基因型的接种研究发现了以上三种不同的应答模式。

2.4 黄瓜抗黄瓜白粉病(*sphaerotheca fuliginea*)的蛋白质组学研究

范海延等(2007)通过分组分离法建立黄瓜 F2 代抗感池,利用 2-DE 差异显示和质谱分析研究了抗病池和感病池的差异蛋白质组。质谱分析鉴定出 9 种抗感池表达差异蛋白点,分别为抗病基因蛋白,

14-3-3 脑蛋白家族蛋白,粪叶啉原氧化酶Ⅲ,碳酸酐酶, α -半乳糖苷酶,推定的蛋白,17.8 kD 的热激蛋白,假想蛋白,(S)-2-羟酸氧化酶。其中有 3 种蛋白的性质及生物学功能未知,其余 6 种蛋白分别与光合作用、呼吸作用、抗病反应及信号转导等有密切关系。这些蛋白都可能是与抗性有关或与发育相关的蛋白网络中的一部分,它们在黄瓜抗病反应中起着不同的作用。

2.5 白菜应答炭疽病的蛋白质组学研究

Nidhi 等(2007)以黑胥病(*Leptosphaeria maculans*)抗性品种埃塞俄比亚芥(*Brassica carinata*)和感病品种甘蓝型油菜(*B. napus*)为材料,在接种后 6、12、24、48 h 和 72 h 的 2-D 图谱上有 64 个差异表达的蛋白点,选出 51 个点进行串联质谱测定,主要为抗氧化酶(antioxidant enzymes)、光合和代谢酶类(photosynthetic and metabolic enzymes);这些酶在品种 *B. carinata* 中表达量上升,而在品种 *B. napus* 中表达量没有变化。

2.6 黄萎病胁迫下棉花的蛋白质组学研究

王雪等(2007)以陆地棉低酚棉品种豫无 620 为材料,在接种黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)后 24、48 h 和 72 h,采用双向电泳技术研究黄萎病胁迫下棉花叶片的蛋白质组变化,结果表明棉苗在黄萎病胁迫下,24 h、48 h 和 72 h 三个时间的叶片蛋白质图谱与未接种对照组均存在显著差异,病菌胁迫下的棉苗叶片被诱导产生大量新的蛋白质,而且在三个时间均出现了 DB1、DB2 和 DB3 差异蛋白点。通过 MALDI-TOF-MS 分析和数据库检索,发现 DB1、DB2 和 DB3 分别与 DEAD/H box RNA helicase、丝氨酸蛋白酶抑制剂和 ODR-3 蛋白具有 70%、42% 和 85% 的同源性,推测这些蛋白可能在棉花对黄萎病的抗性反应中发挥作用。

2.7 Douglas-fir 应答 *Phellinus sulphurascens* 的蛋白质组学研究

M. Aminul Islam 等(2008)以花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)为材料,在接种 *Phellinus sulphurascens* 后,提取根部蛋白质进行双向电泳,有 1 303 种蛋白质差异表达,有 277 个显著($P < 0.05$),从上调中的 74 个选出 47 个蛋白,从下调的 85 个选出 23 个蛋白,进行 LC-MS/MS 分析和肽谱检索,发现这些蛋白属于以下的功能组:抗病相关蛋白(27%)、代谢相关蛋白(16%)、转录因子(11%)、信号转导(10%)、次级代谢相关蛋白(7%)、能量代谢相关蛋白(3%)和蛋白质

合成相关蛋白(3%),这为研究植物与病原菌相互作用的机制提供了大量的重要数据。

植物在与病原物的共同进化过程中形成了一套复杂的分子机制以应答环境中的病原物并做出相应的反应。以往人们对植物受到病原菌侵害时的单一防御反应相关酶蛋白和信号做了大量研究,但多数是依据少数生理因子与抗性关系得出结论,影响到结论的全面性。上述研究表明植物在防御病原菌反应中有防御和胁迫相关蛋白、代谢酶、翻译和蛋白质转换蛋白及未知功能蛋白等参与。在许多植物-病原菌互作的研究中下列蛋白通常上调 2 倍以上,如 SOD、HSP70、 β -1,3 葡聚糖酶、14-3-3-家族蛋白等,这些蛋白都在植物-病原菌互作中起一定作用。随着拟南芥基因组序列和病原物基因组序列的公布,利用蛋白质组学技术不仅能确定应答生物胁迫的直接防御相关因子,而且还能揭示寄主能量代谢、信号传导等与防御反应的关系,有助于人们更全面地了解植物应答生物胁迫反应的机制。

3 展望

蛋白质组学有一些局限,如双向电泳的分辨率低,低丰度蛋白很难检出,功能性抗菌蛋白在双向电泳过程中不能被有效地检出,可以采用同位素标记、银染、荧光染色等高灵敏度的方法;植物响应病原菌胁迫的蛋白质组学研究中经常以未进行全基因组测序的植物为材料,对这些植物的所产生的抗菌蛋白进行质谱鉴定时,要求大量的表达标签(EST)数据,以提高鉴定率;对不同材料进行电泳和质谱分析时,技术参数和差异蛋白判定的标准不同,很难进行数据的整合和再分析工作,这需要运用多技术手段,将基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学结合起来进行研究(高飞等,2008)。

植物受到病原菌侵染后将通过改变体内蛋白质表达和酶类活性等来完成这些信号的感应、传导以及生物学效应的实现。蛋白质组学技术不仅能确定直接的防御相关因子,而且还能揭示植物能量代谢、信号转导等与防御反应的关系,获得植物-病原菌互作的全貌(陈捷等,2007)。因此,对病原菌与植物互作过程中蛋白质组学的研究,通过双向电泳技术与多种质谱分析技术相结合及各类数据库提供的基因及蛋白质序列信息,鉴定病原菌与植物互作反应中的调解蛋白,整体蛋白质(蛋白质组层面)上明确

病原菌侵染后的调节蛋白关键种类、相互关系及表达过程;分析植物抗病相关蛋白种类,蛋白质群集调控规律,进而推测抗病相关基因种类及序列,克隆新的抗病相关基因,为植物抗病分子育种提供基因资源;同时,运用蛋白质组分析发现的,在病理状态下表达异常或者特异性表达的蛋白质,以及细胞信号传递通路中的关键性蛋白,都可能作为药物设计与发现的靶分子。

参考文献:

- Aminul Islam M, Rona N, Sturrock, *et al.* 2008. A proteomics approach to identify proteins differentially expressed in Douglas-fir seedlings infected by *Phellinus sulphurascens* [J]. *proteomics*, **71**(4):425-438
- Boeckmann B, Pattabiraman N, Lowry A, *et al.* 2003. The SWISS-PORT protein in knowledge base and its supplement TrEMBL in 2003 [J]. *Nucleic Acids Res*, **31**(1):365-370
- Chen FY(陈芳育), Huang QY(黄青云), Zhang HX(张红心), *et al.* 2007. Proteomic analysis of rice cultivar jiafuzhan in the response to *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzicola* Infection (水稻品种“佳辅占”应答细菌性条斑病原菌侵染的蛋白质组学分析) [J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **33**(7):1 051-1 058
- Chen J(陈捷), Xu SF(徐书法), Huang XL(黄秀丽), *et al.* 2007. Advance in research of proteomics related to several maize diseases(玉米几种重要病害蛋白质组学研究进展) [J]. *Acta Phytopathol Sin*(植物病理学报), **37**(5):449-455
- Clauser KR, Baker P, Burlingame AL. 1999. Role of accurate mass measurement (+/-10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching [J]. *Anal Chem*, **71**:2 871-2 882
- David NP, Darryl JCP, David MC, *et al.* 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data [J]. *Electrophoresis*, **20**(18):3 551-3 567
- Fang Chen, Yuexing Yuan, Qun Li, *et al.* 2007. Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defense response to bacterial blight [J]. *Proteomics*, **7**(9):1 529-1 539
- Fan HY(范海延), Chen J(陈捷), Lü CM(吕春茂), *et al.* 2007. Proteomic analysis of F2 generation of cucumber against the cucumber powdery mildew disease(黄瓜杂交二代抗黄瓜白粉病的蛋白质组学初步分析) [J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **34**(2):349-354
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, *et al.* 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large bio-molecules [J]. *Science*, **246**(4 926):64-71
- Fenyó D. 2000. Identifying the proteome; software tools [J]. *Curr Opin Biotechnol*, **11**:391-395
- Gao F(高飞), Wang YP(王彦平), Zhou YJ(周宜君), *et al.* 2008. Research progress on proteomics to uncover abiotic stress tolerance mechanisms in plant(植物应答非生物胁迫的蛋白质组学研究进展) [J]. *J Agric Sci Tech* (中国农业科技导报), **10**(6):9-15
- Hoorn EJ, Hofert JD, Knepper MA. 2006. The application of DIGE-based proteomics to renal physiology [J]. *Nephron Physiol*, **104**(1):61-72
- Jennifer G, Francois E, Andre L, *et al.* 2008. Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare* [J]. *Proteomics*, **8**:545-554
- Jimmy K, Ashley L, John R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database [J]. *Mass Spectrom Rev*, **5**:976-989
- Liang GY(梁根云), Ji HL(姬红丽), Zhang ZY(章振羽), *et al.* 2007. Proteome analysis of slow-rusting variety chuanmai 107 inoculated by wheat stripe rust (*Puccinia striiformis*) (条锈菌侵染慢锈性小麦品种川麦 107 后的蛋白质组学分析) [J]. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), **27**(2):335-340
- Liu LJ(刘丽杰), Yu JH(于景华), Tang ZH(唐中华), *et al.* 2007. Advances in non-model plant proteomics(非模式植物蛋白质组学研究进展) [J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(2):217-223
- Magrane M, Apweiler R. 2000. Musmusculus in the SWISS-PORT database; its relevance to developmental research [J]. *Gensis*, **26**(1):1-4
- Ma YJ(马袁君), Cheng ZL(程震龙), Sun YQ(孙野青). 2007. Bioinformatics and application in proteomics(生物信息学及其在蛋白质组学中的应用) [J]. *Chin J Bioinf*(生物信息学), **1**:38-39(48)
- Nidhi Sharma, Naomi Hotte, Muhammad H. Rahman, *et al.* 2008. Towards identifying *Brassica* proteins involved in mediating resistance to *Leptosphaeria maculans*; A proteomics-based approach [J]. *Proteomics*, **8**(17):3 516-3 535
- Spyros G, Gert L, Michael F. 2005. Limitations of current proteomics techniques [J]. *J Chromatography A*, **1077**:1-18
- Sun GZ(孙果忠), Zhu ZD(朱振东), Wu XF(武小菲), *et al.* 2008. Comparative proteomics of *Arabidopsis* induced by *Salicylic acid* wound and *Phytophthora sojae* (大豆疫霉菌、水杨酸和创伤诱导的拟南芥蛋白质谱的比较研究) [J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **41**(4):1 030-1 039
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS. 1997. Difference gel electrophoresis; single gel method for detecting changes in protein extracts [J]. *Electrophoresis*, **18**(11):2 071-2 077
- Wang X(王雪), Ma J(马骏), Zhang GY(张桂寅), *et al.* 2007. Proteomic analysis of cotton leaf under *Verticillium dahliae* stress(黄萎病菌胁迫条件下棉花叶片的蛋白质组学分析) [J]. *Cotton Sci*(棉花学报), **19**(4):273-278
- Wilkins MR, Gasteiger E, Wheeler CH, *et al.* 1998. Multiple parameter cross-species protein identification using Multi-Ident-a world-wide web accessible tool [J]. *Electrophoresis*, **19**(18):3 199-3 206
- Wu CH, Nikolskaya HZ, Huang HZ, *et al.* 2004. PIREF; family classification system at the protein information resource [J]. *Nucleic Acids Res*, **32**(1):112-114
- Yang SY(杨少友). 2007. Protein identification system based on mass spectrometry data(基于质谱数据的蛋白质识别系统) [D]. Dissertation of Master Degree of Shanghai Jiaotong Univ (上海交通大学硕士学位论文)
- Zeng Y(曾亚), Ding XH(丁新华), Shen xl(沈祥陵), *et al.* 2008. Analysis of protein expression profiling in rice disease resistance gene-Mediated Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (水稻抗病基因介导的抗白叶枯病反应中蛋白质表达谱的比较分析) [J]. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), **22**(3):234-242