



分类号 S435

学号 2013802149

南京农业大学

全日制专业学位硕士学位论文

稻瘟菌侵染后差异表达水稻蛋白的鉴定和
OsAGO18 多克隆抗体的初步制备

卢唯

指导教师 赵弘巍 教授

学位类别 农业推广硕士

专业名称 植物保护

研究方向 植物微生物互作

答辩日期 二〇一五年六月

**THE IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED
PROTEINS INDUCED BY RICE BLAST FUNGUS &
PREPARATION OF POLYCLONAL OSAGO18 ANTIBODY**

By

Wei Lu

A DISSERTATION

Submitted to Nanjing Agricultural University

**In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master Degree of Science**

Supervised by

Professor Hongwei Zhao

**College of Plant Protection,
Nanjing Agriculture University,
Nanjing 210095, P.R. CHINA**

June 2015

摘 要	I
ABSTRACT	III
第一章 文献综述	1
1.1 稻瘟菌侵染水稻后水稻叶片蛋白质组学研究概况	1
1.1.1 稻瘟菌侵染水稻过程	1
1.1.2 蛋白质组学研究方法	1
1.2 水稻质膜蛋白及病程相关 PRRs 的研究概况	2
1.2.1 质膜功能和结构	2
1.2.2 质膜的分离纯化方法	3
1.2.3 质膜蛋白的检测	3
1.2.4 已知病程相关 PRR1	4
1.3 水稻 AGO18 的多克隆抗体制备依据	4
1.3.1 OsAGO18 在植物抗病过程中作用研究概况	4
1.3.2 植物蛋白真核表达的优势	5
第二章 水稻总蛋白和质膜蛋白在稻瘟菌侵染前后变化研究	7
前言	7
2.1 试验材料、试剂及仪器	8
2.1.1 试验材料	8
2.1.2 主要试剂	8
2.1.3 试验器材	8
2.2 试验方法	8
2.2.1 溶液的配制	8
2.2.2 稻瘟菌侵染水稻日本晴	10
2.2.3 质膜蛋白的提取	10
2.2.4 总蛋白提取方法	11
2.2.5 蛋白的水解及同位素标记	12
2.3 实验结果	14
2.3.1 侵染	14
2.3.2 质膜纯度验证	14

2.3.3 质膜与总蛋白中变化的蛋白	16
2.3.4 接种亲和菌株和非亲和菌株一致差异表达蛋白.....	18
2.3.5 接种亲和菌株和非亲和菌株特异的差异表达蛋白.....	19
2.3.6 接种亲和菌株和非亲和菌株变化蛋白功能分析.....	19
2.4 讨论.....	19
2.5 小结.....	20
第三章 OSAGO18 多克隆抗体的初步制备.....	23
前言.....	23
3.1 实验材料、试剂及仪器.....	24
3.1.1 试验材料.....	24
3.1.2 试验试剂.....	24
3.1.3 主要仪器.....	24
3.2 试验方法.....	25
3.2.1 水稻叶片 RNA 提取.....	25
3.2.2 引物设计和载体构建.....	25
3.2.3 重组质粒的烟草瞬时表达.....	34
3.2.4 多克隆抗体的制备.....	37
3.3 实验结果.....	37
3.3.1 烟草瞬时表达结果.....	37
3.3.2 蛋白纯化结果.....	38
3.4 讨论.....	38
3.5 小结.....	39
参考文献.....	41
附 录.....	45
致 谢.....	47

稻瘟菌侵染后差异表达水稻蛋白的鉴定和 OsAGO18 多克隆抗体的初步制备

摘 要

植物与病原微生物在漫长的共进化过程中逐步形成了先天免疫系统，该系统包括两个方面，一是基于细胞表面的模式识别受体 PRRs 对病原物相关分子模式 PAMPs 的识别，这个过程被称作病原物相关分子模式触发的免疫反应 (PTI)；第二种免疫来自于细胞内部，主要依靠植物本身的抗病基因编码产生的蛋白或者小分子物质起作用，这一过程被称为效应因子触发的免疫反应 (ETI)。为发现 PTI 和 ETI 中变化并起关键作用的蛋白，本项研究选用水稻 (栽培品种日本晴)，使用亲和性稻瘟菌 Guy11 和非亲和互作菌株 2539 对水稻叶片进行侵染试验，提取 24h、96h 和未侵染植株叶片的总蛋白和质膜蛋白，使用 iTRAQ 标记技术进行 LC-MS/MS 定量检测。通过使用 6.4% Dextran T-500/ PEG-3350 聚合物的双水相体系，富集到了质膜且占总数的 43.35%；在对蛋白进行定量分析后发现，质膜蛋白的 4 组数据中共有上调蛋白 124 个，下调蛋白 41 个；总蛋白的 2 组数据中共有上调蛋白 173 个，下调蛋白 49 个。在质膜蛋白和总蛋白中都显著上调的蛋白有 21 个，下调蛋白 5 个，其中被确定为质膜蛋白的有 6 个。

接种 24h 后，在亲和菌株 Guy11 与非亲和菌株 2539 处理组之间均呈现差异表达的蛋白共有 22 个；接种 96h 后均呈现差异表达的蛋白共有 33 个。接种非亲和菌株后被诱导上调表达的蛋白在 96h 多于亲和菌株，且随着侵染的继续，被诱导产生的蛋白数量也随着增多。在四个处理中均显著上调的蛋白有 6 个。在对蛋白功能进行分析后的数据表明，一些蛋白具有与抗病相关的功能或活性如：丝氨酸/苏氨酸激酶活性、ATP/核苷酸结合作用、金属离子结合功能、转运功能、信号接收功能。这些具有一致性的蛋白中，很有可能存在着定位于质膜上，且能够在早期的防卫反应中识别病原物的 PRRs。

已发表的结果和本实验室未公布的数据显示 OsAGO18 在水稻对条纹叶枯病毒 (RSV) 和稻瘟菌的抗性中均起作用。当 RSV 侵染水稻后，它能减轻 microRNA168 对水稻抗性蛋白 AGO1 的干扰。为了加深对 OsAGO18 在对稻瘟病抗性中作用的研究，我们选取从 N 端开始 636bp 的特异性片段，设计了重组蛋白 AGO18₆₃₉，采用烟草瞬时表达后纯化出 300 μ g 抗原，将用于 AGO18 的多克隆抗体制备。得到的抗体将用于

研究 AGO18 在抗病过程中的作用以及互作对象的鉴定。

关键词：质膜蛋白；双水相；iTRAQ；串联质谱；烟草瞬时表达；多克隆抗体

THE IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEINS INDUCED BY RICE BLAST FUNGUS & PREPARATION OF POLYCLONAL OSAGO18 ANTIBODY

ABSTRACT

To defend against phytopathogens, the plants have evolved a two-branched innate immune system. The first branch is pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)-triggered immunity (PTI), which is activated by plant cell-surface pattern recognition receptors (PRRs). The second immunity is from intracellular components and is called effector-triggered immunity (ETI), which depends on the resistance gene encoding protein to defend the infection. We use the *Magnaporthe grisea* strain Guy11 and 2539 to infect rice cultivar *Nipponbare*. We extracted the total protein and plasma membrane proteins, and used a quantitative proteomics approach with iTRAQ LC-MS/MS technologies to discover the key proteins in PTI and ETI. About 43.35% plasma membranes was enrichment by using a dextran T-500 and polyethylene glycol 3350, 6.4% (w/w) for PM isolation system. In this work, we have found 124 upregulated and 41 down-regulated plasma proteins, and 173 upregulated and 49 down-regulated total proteins, in which 21 upregulated and 5 down-regulated proteins show agreement in both the PM and total proteins dataset. After infected by *M. oryzae* for 24h and 96h, there are 22 and 33 proteins were induced by Guy11 or 2539. More upregulated proteins were induced by 2539 than Guy11, and as the infection continue advanced, the number of proteins also increased. There are 6 upregulated proteins were identified in 4 treatments, some of which possess functions that were related to resistance such as, protein serine/threonine kinase activity, ATP / nucleotide binding, metal-binding, transportor, receptor etc. These could act as PRRs,

which are localized on the plasma membrane and able to recognize pathogens in the early defense responses.

Rice resistance to evolutionarily diverse viruses requires Argonaute18 (AGO18). Unpublished data from our laboratory show that AGO18 is also required in rice blast resistance. The antiviral function of AGO18 depends on its activity to sequester microRNA168 (miR168) to alleviate repression of rice AGO1 essential for antiviral RNAi. In order to reveal the function of OsAGO18 in the study of blast resistance, we produced recombinant protein AGO18₆₃₉ by using tobacco transient expression. There are 300 μ g AGO18₆₃₉ antigen has been purified to prepare polyclonal AGO18 antibody. The antibody will be used to study the role of AGO18 playing in disease resistance.

KEY WORD: Plasma membrane; Aqueous two-phase; iTRAQ; LC-MS/MS; Transient expression; Polyclonal antibody

第一章 文献综述

1.1 稻瘟菌侵染水稻后水稻叶片蛋白质组学研究概况

1.1.1 稻瘟菌侵染水稻过程

稻瘟病是影响水稻产量的最严重病害，稻瘟菌变异能力强，在生产中由于出现新的生理小种而使一个抗稻瘟品种丧失抗性的情况经常发生^[1]，对水平抗性的需求推动了蛋白质组学在水稻抗稻瘟病中的发展。目前对稻瘟病的研究主要集中在对其致病菌 *Magnaporthe oryzae* 的营养生长、无性繁殖、以及附着胞形成机制等方面。对 *M.oryzae* 的整个侵染过程已形成较完整的理解。首先，分生孢子通过分泌附着液附着在水稻叶片的表面并在 0.5 到 1.5h 之内萌发，在侵入位点形成附着胞^[2]。在侵染大约 24h 后，附着胞内积聚的强大渗透压驱动侵染钉穿透水稻表皮蜡质层，进入表皮细胞。大约在侵染后 32h 后，初级侵入菌丝形成并开始扩增，在侵染约 48h 后，次级侵入菌丝形成并扩展到临近表皮细胞；次级菌丝在侵染后约 72h 侵入叶片海绵细胞组织；在高湿度条件下，叶面表面的病斑在侵染后 96h 肉眼可见，同时伴随着分生孢子产生；病斑持续扩大，侵染大约 144h 后，菌丝充满叶片组织^[3]。

1.1.2 蛋白质组学研究方法

水稻细胞从感受到病原菌到发起免疫反应的整个过程中，会分泌不同的蛋白质来抵御病菌的侵染，发现这些特异性表达的蛋白是本次研究的主旨。双向电泳 2-DE (Two-dimensional electrophoresis) 是一种等电聚焦电泳与 SDS-PAGE 相结合的蛋白质电泳检测技术。双向电泳后的凝胶经染色蛋白呈现二维分布图，水平方向反映出蛋白在等电点上的差异，而垂直方向反映出它们在分子量上的差别，所以双向电泳可以将分子量相同而等电点不同的蛋白质以及等电点相同而分子量不同的蛋白质分开，采用双向电泳对拟南芥进行全蛋白分析时共得到 4763 个蛋白点^[4]，但只有很少的部分能够被分析鉴定，随着蛋白分离和鉴定技术和生物信息预测的发展，蛋白质组学已成为植物病理学研究的重要手段。利用双向电泳结合质谱研究水稻 CO39 经 MeJA 处理，发

现 21 个差异表达的蛋白^[5]，对不同抗性品种的试验中发现，感病品种与 CO39 都有 13 个受茉莉酸甲酯调控的蛋白发生了变化^[6]，当用 Lycoprotein elicitor CSB 处理水稻 CO39 和 C101A51 叶片 12、24h 后，21 个差异表达的蛋白经由(LTQ)-MS/MS 鉴定出。但在实际应用中，2-DE 面临的挑战是高分辨率和重复性，受样品本身理化性质的影响，分辨率和重复型会有很大的变化，对低丰度的蛋白以及膜蛋白的分离鉴定并不理想。

LC-MS/MS（串联质谱）的发展极大推动了蛋白质组学的研究，同位素标记技术的应用使蛋白质的定量数据更为简便可靠。采用 N¹⁵ 对拟南芥膜蛋白进行标记试验中得到比未标记样品多 5 倍的数据通量^[7]。同位素标记相对和绝对定量技术（iTRAQ）是近年来最新开发的一种新的蛋白质组学定量研究技术，具有较好的定量效果和较高的重复性^[8]，并可对多达 16 种不同样本同时进行定量分析。采用 iTRAQ 标记技术，对稻瘟菌侵染水稻 24、48 和 72h 的水稻总蛋白进行标记的试验中发现，在稻瘟菌侵染过程中，有 53 个蛋白质的表达量发生了改变^[9]。蛋白数据库和生物信息分析的不断完善使得对得到的蛋白质认识更为清晰。GO 分析后表明，这些在侵染过程中变化的蛋白参与了氧化还原平衡、防御、信号传导、光合作用以及主要功能物质代谢^[9]。

1.2 水稻质膜蛋白及病程相关 PRRs 的研究概况

1.2.1 质膜功能和结构

质膜是所有活细胞与外界环境的接触的面，也是最为复杂且活跃的膜。蛋白质是质膜上的一个重要组成成分，根据在膜上存在位置的不同，膜蛋白可分为两类，一是通过强疏水或亲水作用同膜脂牢固结合不易分开的，称为整合蛋白（Integral protein）或膜内在蛋白；二是附着在膜的表层，与膜结合比较疏松容易分离的，称为膜周边蛋白（Peripheral protein）或外在蛋白^[10]。无论是整合蛋白还是膜周边蛋白，接受和识别各种刺激和信号，它们参与细胞信号传导、渗透调节和营养代谢等活动的基本生物功能。

1.2.2 质膜的分离纯化方法

我们通常利用超速离心的方法分离细胞膜和细胞质，而要针对性的获得质膜，之前的研究利用蔗糖梯度离心^[11]，梯度离心后各个细胞组分会分布在不同浓度的蔗糖梯度中^[12]，质膜分布浓度为 38%至 40%^[13]，然而蔗糖梯度离心的纯化效率低且容易受操作影响，更为优化的方案是采用两相分离纯化质膜^[14]，该方法主要依靠不同膜结构之间的表面特性的不同对总微粒体进行分离，选用 Dextran T 500/ PEG 3350 聚合物质量分数为 6.3%的双水相体系可以获得高纯度的质膜微囊，且随分配次数的增加，可以有效减少其他内膜的污染。质膜蛋白质经增溶缓冲液溶解及 1-D SDS-PAGE 发现纯化后的质膜有效减少了特定蛋白质条带的丰度，使蛋白质条带的分布更为均匀^[15]。同样，利用两相分离方法对白羽扇豆根质膜蛋白的 H^+ ATP 酶活性检测发现，提取的质膜蛋白中定位于质膜上的钒敏感型 H^+ ATP 酶活力与对照相比达到了 96%，而定位于液泡上、内质网和高尔基体上的硝酸盐敏感型 H^+ ATP 酶相对活力为 4%，定位于线粒体和叶绿体的钼酸盐敏感型 H^+ ATP 酶相对活力为 25%，非特异性磷酸酶的活力则为 1%^[16]，数据表明两相分离提取的质膜含量很高但仍有其他膜系统存在。在对蓝藻质膜的提取试验中，先对总微粒体进行蔗糖梯度分离，再对质膜部分进行两相分离可以得到纯度更高的质膜^[17]。

1.2.3 质膜蛋白的检测

膜蛋白的分析被膜固有的疏水性所限制，现有的膜蛋白提取主要通过去垢剂、有机酸和离液剂等^[18]，使用这些方法会对样品有不同程度的损失，膜蛋白在膜上的结合方式也是影响因素之一，对于跨膜蛋白，则需要先在碱性溶液中先将其从膜上脱落下来，并溶解疏水蛋白以增加其在 2D 凝胶上的分布^[19]。实验表明甲醇和三氟乙醇的使用也能增加被鉴定蛋白的数量^[20]，但尿素对蛋白质从膜上的分离却仍是最为有效的方法之一，高浓度尿素会使蛋白质三维结构改变，使其变成链状的一级结构，从而使其能够从膜上脱落，却不能保持蛋白的三维结构^[21]。新的研究表明从去污剂胶束中释放的完整的质膜蛋白复合体可以在气相质谱检测中被观察到^[22]，从而揭示了蛋白质复合体与脂质的结合方式，这项技术需要对复合体进行纯化、定量、脱脂，使得未来的

蛋白质组学将可以从 Stoichiometry、功能结构和蛋白质装配动力学(dynamics of protein assemblies) 对蛋白质的功能作出更全面的解释^[23]。

1.2.4 已知病程相关 PRR1

质膜蛋白在防御反应中发挥重要的信号转导作用, 与其它植物系统一样, 水稻对稻瘟菌 PAMP 的识别主要是通过定位于质膜上的 PRRs 来实现。水稻 CEBiP 是一个定位于质膜的一类受体蛋白激酶, 对几丁质有非常高的亲和性。CEBiP 缺失突变体表现出对几丁质诱导的不敏感性, 显示 CEBiP 在几丁质信号感受和传递中的重要作用^[24]。Pi-d2 是从水稻品种 Digu 中分离得到的一个定位于质膜上的类受体蛋白激酶。携带 Pi-d2 的转基因植株对稻瘟菌 ZB15 呈抗性。当 Pi-d2 跨膜区域的一个氨基酸发生突变后, 水稻对 ZB15 的抗性消失, 显示质膜定位对稻瘟病抗性的重要性^[25]。水稻质膜蛋白 CEBiP 是几丁质诱导因子的特异性受体, 细胞膜受体激酶 (OsCERK1) 也是质膜上的几丁质受体蛋白, 它通过与 CEBiP 相互作用, 来调控由细菌或真菌引起的反应^[26], Os-LYP4 和 Os-LYP6 是两个具有识别细菌的肽聚糖与真菌的几丁质双重功能的蛋白^[27], 进一步研究发现, OsCERK1 参与将 Os-LYP4 与 Os-LYP6 识别的信号向细胞内进行转导, 并且细胞质受体激酶 (RLCK176) 在该信号通路中起重要作用^[28]。本次实验采用两相分离分离纯化水稻质膜蛋白, 并使用 8M 尿素溶解蛋白来研究在抗稻瘟过程中膜蛋白上量变化的蛋白。

1.3 水稻 AGO18 的多克隆抗体制备依据

1.3.1 OsAGO18 在植物抗病过程中作用研究概况

植物的 microRNA 通过与序列互补的靶标 mRNA 完全结合 (与编码区结合), 从而降解 mRNA 以达到抑制蛋白质翻译的目的^[29]。AGO 蛋白是 microRNA 介导的基因沉默途径中的重要组成成分, 在丁香假单胞菌侵染拟南芥试验中已证明 miR393 通过与 AGO1 结合以达到在植物抗病免疫过程中对基因的调控作用^[30]。在水稻条纹叶枯病毒 (RSV) 侵染水稻后发现 AGO18 和 AGO2 都显著上调表达, 但水稻矮缩病毒 (RDV) 并不能诱导 AGO 蛋白的表达^[31], 但进一步研究发现 AGO18 的抗病毒功能主要取决

于它能减轻 microRNA168 对水稻抗性蛋白 AGO1 的干扰, 稳定遗传的 AGO18 转基因水稻显示出其广谱的抗病毒特性, 同时也显示了两个不同的 AGO 蛋白一种新型的协同抗病毒特性^[32]。

1.3.2 植物蛋白真核表达的优势

真核表达系统具有翻译后的加工修饰体系, 表达的外源蛋白更接近于天然蛋白质。因此, 利用真核表达系统来表达目的蛋白越来越受到重视。瞬时表达 (Transient expression) 是一种快速的研究基因表达、蛋白质亚细胞定位及基因间互作的一种重要手段, 与传统的转基因相比, 瞬时表达不需要整合到染色体上, 因此具有简单、快速、周期短、准确等优势^[34]。本研究利用烟草的瞬时表达以得到经过真核修饰的蛋白, 使蛋白更为接近其在水稻中的结构, 从而在免疫后能够得到效果更佳的抗体。利用该抗体, 可以对 AGO18 在水稻免疫反应中的变化从蛋白质的水平上进行观察。

第二章 水稻总蛋白和质膜蛋白在稻瘟菌 感染前后变化研究

摘要: 植物与病原微生物在漫长的共进化过程中逐步形成了先天免疫系统, 为发现在抗病过程中中变化并起关键作用的蛋白, 本项研究选用水稻(栽培品种日本晴), 使用亲和性稻瘟菌 Guy11 和非亲和互作菌株 2539 对水稻叶片进行感染试验, 提取 24h、96h 和未感染植株叶片的总蛋白和质膜蛋白, 使用 iTRAQ 标记技术进行 LC-MS/MS 定量检测。通过使用 6.4%_Dextran T-500/PEG-3350 聚合物的双水相体系, 富集到了质膜且占总数的 43.35%; 在对蛋白进行定量分析后发现, 质膜蛋白的 4 组数据中共有上调蛋白 124 个, 下调蛋白 41 个; 总蛋白的 2 组数据中共有上调蛋白 173 个, 下调蛋白 49 个。在质膜蛋白和总蛋白中都显著上调的蛋白有 21 个, 下调蛋白 5 个, 其中被确定为质膜蛋白的有 6 个。

接种 24h 后, 在亲和菌株 Guy11 与非亲和菌株 2539 处理组之间均呈现差异表达的蛋白共有 22 个; 接种 96h 后均呈现差异表达的蛋白共有 33 个。接种非亲和菌株后被诱导上调表达的蛋白在 96h 多于亲和菌株, 且随着感染的继续, 被诱导产生的蛋白数量也随着增多。在四个处理中均显著上调的蛋白有 6 个。在对蛋白功能进行分析后的数据表明, 一些蛋白具有与抗病相关的功能或活性如: 丝氨酸/苏氨酸激酶活性、ATP/核苷酸结合作用、金属离子结合功能、转运功能、信号接收功能。这些具有一致性的蛋白中, 很有可能存在着定位于质膜上, 且能够在早期的防卫反应中识别病原物的 PRRs。

关键词: 质膜蛋白; 双水相; iTRAQ; 串联质谱

前言

PAMPs 是病原微生物表面存在的一些保守分子, 它对维持微生物的基本生物学特征十分重要, 很少发生变异。稻瘟菌的 PAMPs 包括麦角甾醇、多聚半乳糖醛酸内切酶、木聚糖酶, 以及细胞壁衍生物葡聚糖和几丁质等。PAMPs 只由病原物产生, 并不存在于寄主植物中, 因此寄主植物可以将它们识别为“非我”成分, 并产生相应抗性。植物依靠其细胞表面的 PRRs 来感知 PAMPs, 而在稻瘟菌感染水稻的过程中, 水稻细胞表面的 PRRs 和体内免疫相关蛋白及产生机制却仍不清楚。

本次实验选用水稻品种日本晴，该品种已完成全基因组测序，使用稻瘟菌 Guy11 和稻瘟菌 2539 对日本晴进行侵染试验（已有研究表明 Guy11 与日本晴为亲和互作，2539 与日本晴为非亲和互作）。本研究旨在从蛋白质组学的研究角度来发现在抵抗稻瘟菌过程中水稻体内蛋白质水平的变化，并对发现的差异表达蛋白进行分析。

2.1 试验材料、试剂及仪器

2.1.1 试验材料

水稻日本晴由江苏省农科院提供，稻瘟菌 Guy11 从南京农业大学植物保护学院植物病理系真菌实验室获得并保存

2.1.2 主要试剂

质膜蛋白的提取：

Dextran T-500、PEG-3350 购买于都莱公司

蛋白分析：

胰蛋白酶 Trypsin 购买于 Promega 公司，iTRAQ® Reagents-8plex Kit 购买自 Sigma 公司

2.1.3 试验器材

本研究中所涉及到的主要器材有：匀浆机、冷冻离心机、超速离心机、水浴锅、电泳仪、冷冻浓缩仪、Nano-RSLC 液相系统和 LTQ Orbitrap XI 质谱仪购于美国 Thermo 公司。

2.2 试验方法

2.2.1 溶液的配制

(1) Homogenization Buffer pH8.0 的配制

成分	终浓度
Trizma base	50mM
Sucrose	500mM

成分	终浓度
Glycerol	10%(w/v)
EDTA-Na ₂	20mM
EGTA	20mM
NaF	50mM
PVP	0.6%(w/v)
Ascorbic acid	10mM
PMSF	0.1mM
DTT	0.5mM

注：Ascorbic Acid、PMSF、DTT 在使用前加入。

(2) Microsomal Buffer 的配制

成分	终浓度
Phosphate buffer pH 7.8	5mM
Sucrose	330mM
NaF	10mM
PMSF	0.1mM
DTT	2mM

注：PMSF、DTT 在使用前加入。

(3) Washing Buffer pH8.3 的配制

成分	终浓度
Trizma base	10 mM
Boric acid	10 mM
Sucrose	200 mM
KCL	9 mM
EDTA-Na ₂	5 mM
EGTA	5 mM
NaF	50 mM
PMSF	0.1 mM
DTT	2 mM

注：PMSF、DTT 在使用前加入。

(4) 两相分离溶液配制:

成分	加入量	终浓度
Dextran T-500 20%(w/w)	11.82g	6.4%(w/w)
PEG-3350 40%(w/w)	5.76g	6.4%(w/w)
Phosphate buffer 0.2M, PH7.8	0.9mL	5mM
KCl,2M	0.09mL	5mM
Sucrose 1.6M	6.74mL	300mM
H ₂ O 定量至 27g		

注：两相分离溶液应现配现用，配制好后 2000rcf，4℃离心 10min 备用。其组分所有溶液均存放于-20℃。

2.2.2 稻瘟菌侵染水稻日本晴

(1) 取生长于 PDA 培养基的稻瘟菌菌块接种于 RDC 培养基上，28℃黑暗培养 5 天后，刮去表面气生菌丝，置于 25℃黑光灯诱导培养 4 天后洗取表面产生的分生孢子，孢子悬浮液：0.2%TWEEN-20，0.2%明胶，孢子浓度 1×10^5 /mL。每盆 5mL（每盆 20-25 株）对生长 2 周的水稻进行喷雾侵染。

(2) 25℃，黑暗保湿 24 小时，移至 25℃光照培养培养箱中继续保湿培养。取侵染 24h、96h 和未侵染 96h 的水稻提取质膜蛋白，共计 7 个处理（表 4-1）。

表 4-1 各个处理组处理方案

Table4-1 Treatment options

提取方案	质膜蛋白 (PM)				总蛋白 (Tatol)			
接种菌株	2539		Guy11		Mock	2539	Guy11	Mock
侵染时间 (h)	24	96	24	96	0	96	96	96

2.2.3 质膜蛋白的提取

(1) 快速称取水稻叶片 20g，加入 100mL Homogenization Buffer 在使用预冷的匀浆机研磨均匀。

(2) 用 Homogenization Buffer 润湿过的纱布过滤，取滤液。

(3) 滤液用超纯水湿润的 100-um 的小滤网过滤，取滤液。

(4) 将滤液分装到 50mL 离心管中，25000rcf，4℃离心 25min，取上清液。

(5) 上清使用超纯水湿润的 70-um 小滤网过滤后再用 40-um 小滤网过滤，取滤液。

(6) 将滤液分装至 25mL 超速离心管中配平，100000ref，4℃ 离心 1h。

(7) 小心除去上清，将沉淀溶于 2ml Microsomal Buffer 用塑料小毛刷将沉淀轻轻刷起使得沉淀充分溶解，加入 Microsomal Buffer 重定容成 9mL。

(8) 两相分离，将 9mL 的蛋白重悬液加入到配置好的两相分离液中，轻轻上下颠倒 20 次，溶液充分混匀后 2000ref，4℃ 离心 10min，之后每次交换后离心 2000ref，4℃ 离心 10min（图 4-1）。

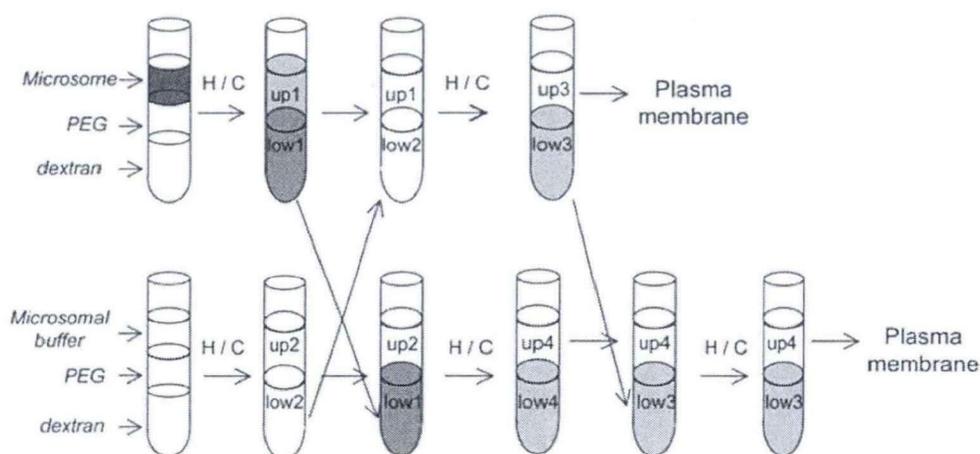


图 4-1 两相分离[35]

Fig.4-1 Aqueous two-phase partitioning

(9) 小心吸取上层液体，用 Washing Buffer 重定容成 100mL。

(10) 将溶液分装至 25mL 超速离心管中并配平，100000g，4℃ 离心 1h。

(11) 小心倒掉上清，用移液枪尽量吸干液体，用 500uL Washing Buffer 重悬沉淀，保存于-70℃。

注：所有操作均在 4℃ 下进行。

2.2.4 总蛋白提取方法

(1) 从-80℃中取出植物材料，放置于液氮中。

(2) 预冷研钵并加入适量石英砂，加入植物组织 20g 仔细研磨成细粉。

(3) 研磨充分后加入植物粉末 5 倍体积的 UEB（即 1g 植物材料对应 5mL UEB），再加入 PVPP 继续进行研磨。

(4) 待研钵中的溶液完全溶解后分装离心 110000g 离心 2h 取上清。

(5) 上清用预冷的丙酮与甲醇有机混合液（丙酮:甲醇=12:1）以上清:混合液=1:3 的比例缓缓加入，加入后于-20℃冰箱过夜沉淀蛋白。

(6) 10000 rpm 离心 30min，去除上清，将沉淀置于干净的超净台上吹干约 10min。

(7) 将吹干后的沉淀用需要体积的 UEB 重悬，-20℃保存。

UEB Buffer 的配制:

成分	终浓度
Tris-HCl pH7.6	150mM
Urea	8M
SDS	0.5%
TritonX-100	1.2%
NaF	50mM
Glycerol 2-phosphate	1%
DTT	5mM
Ascorbic Acid	5mM
PVPP	2%
PMSF (Freshly Added)	1mM

注：DTT、Ascorbic Acid、PVPP、PMSF 在使用时加入，PVPP 只在研磨需要时加入。

2.2.5 蛋白的水解及同位素标记

(1) 将蛋白溶解于 THU 溶液（50mM Tris-HCL，8M Urea，PH 8.0）

(2) 溶解完全后，Bradford 蛋白定量。

(3) 活化超滤管，加 100uL 超纯水至超滤管中，离心 14000g，10min。

(4) 取已定量的蛋白至活化好的超滤管中，离心 14000g，10min。

(5) 在超滤管中加入 200uL 的 THU 溶液（50mM Tris-HCL，8M Urea，PH 8.0）

(6) 往溶液中加入 0.5M DTT，2uL 至终浓度为 5mM

(7) 95℃加热 15-20min 或者 60℃加热 45-60min，冷却至室温。

(8) 加入 0.5M IAM 至终浓度为 25mM，室温暗处孵育 45min，离心 14000g，20min，弃滤液。

(9) 加入 iTRAQ dissolution buffer 100uL，离心 14000g，20min，弃废液

(10) 加入 iTRAQ dissolution buffer 50uL，离心 14000g，20min，弃废液

(11) 用 iTRAQ dissolution buffer 溶解胰蛋白酶，按 Trypsin 酶与底物蛋白得出量之比在 1:20-1:100 之间，加入酶液，37℃ 孵育 8-12h。

(10) 再次加入同等剂量的 Trypsin 酶溶液，37℃ 孵育 24h

(11) 将滤芯转移到新的收集管中，14000g，30min，取滤液

(12) 将样品浓缩至合适体积，大概为 30-50uL，使用 ODA280 测定肽段浓度。

(13) 取对应 40ug 蛋白的肽段液，加入 iTRAQ dissolution buffer，使样品体积到达 50uL。

(14) 标记样品：将 8 个处理的样品加入配制好的不同标记的 iTRAQ® Reagents-8plex (表 4-2)，涡旋翻转样品，使得标记与样品充分混合。

表 4-2 iTRAQ® Reagents-8plex 标记样品

Table4-2 Labeling the Protein Digests with the iTRAQ® Reagents-8plex

样品	质膜蛋白 (PM)			总蛋白 (Total)		
	2539	Guy11	Mock	2539	Guy11	Mock
侵染菌株	2539	Guy11	Mock	2539	Guy11	Mock
侵染时间 (h)	24	96	24	96	0	96
标记	113	114	115	116	117	118
						119
						121

(15) 低速离心，室温静置 2h。

(16) 标记完成后，将 8 份样品混合成一管进行后续 LC-MS/MS 质谱检测。

2.3 实验结果

2.3.1 侵染

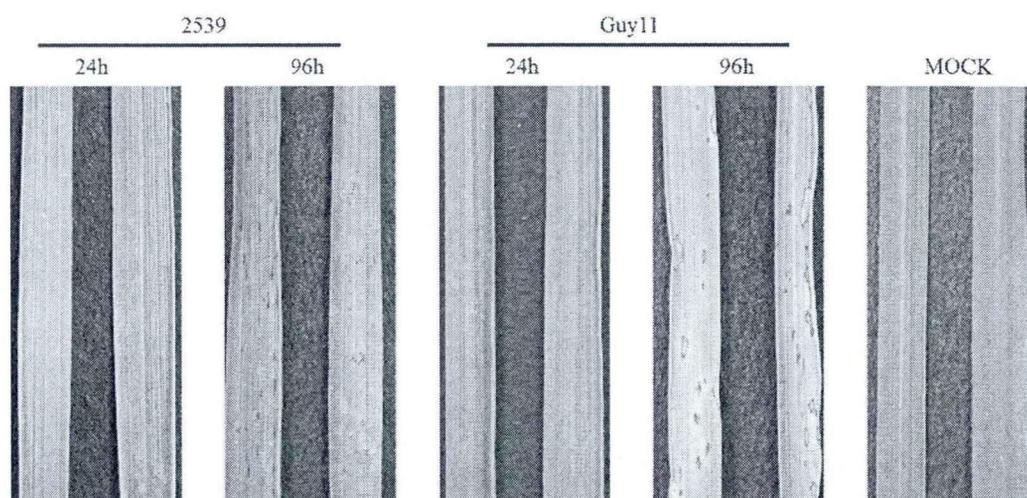


图 4-2 稻瘟菌侵染日本晴 24h、96h 发病情况
Fig.4-2 *M.oryzae* infecting Nipponbare after 24h, 96h

侵染结果显示在稻瘟菌 Guy11 侵染水稻日本晴 24h 后，与 Mock 相比，两个处理均未表现出病斑(图 4-2);在侵染 96h 后 Guy11 侵染的水稻叶片出现明显的典型病斑，而 2539 只表现小的病斑，与 Guy11 处理产生的病斑差异显著。

2.3.2 质膜纯度验证

采用 6.4% Dextran T 500/ PEG 3350 聚合物的双水相体系对总微粒体进行纯化得到的质膜进行 LC-MS/MS 检测，得到 2406 个蛋白，并对得到蛋白进行亚细胞定位归类(图 4-3)，质膜蛋白的数量为 1043 个，占总数的 43.35%。

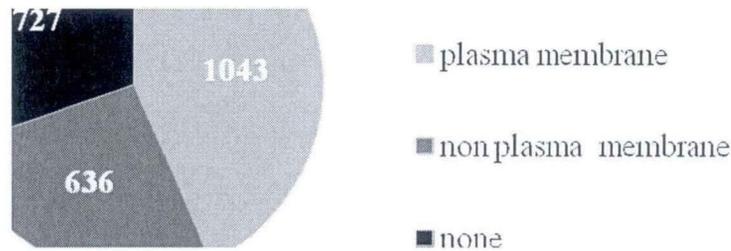


图 4-3 蛋白组分比例

Fig.4-3 The proportion of cell components

对蛋白的亚细胞定位统计后发现，许多其他结构的膜蛋白被鉴定到，两相分离方法是依靠膜表面的理化特性来纯化质膜蛋白，因此其他膜系统的蛋白也会被分离到，同时一些定位在质膜上的蛋白同时也被定位在其他的亚细胞结构（图 4-4），说明采用 6.4% Dextran T-500/ PEG-3350 聚合物的双水相体系富集到了质膜蛋白。

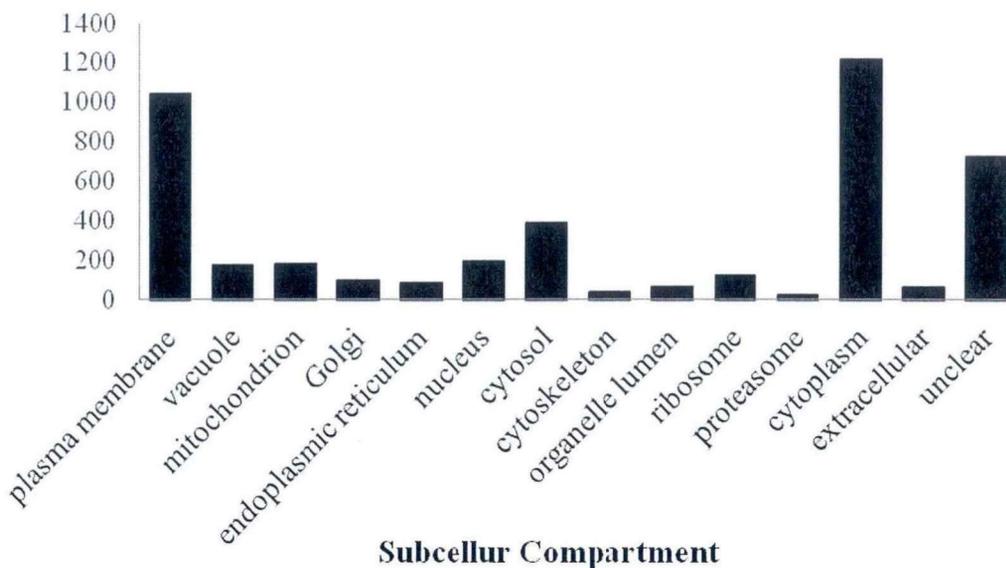


图 4-4 蛋白亚细胞定位分布

Fig.4-4 localization of all proteins identified by LC-MS/MS.

注：纵坐标为蛋白数量，横坐标为亚细胞定位名称

2.3.3 质膜与总蛋白中变化的蛋白

在对质膜蛋白的四组数据的分析后，上调的蛋白（处理/Mock \geq 1.5 为上调）共计有 124 个，在 Uniprot 中比对后确定为质膜蛋白的有 38 个，64 个定位未知，其他亚细胞结构的蛋白 29 个。下调的蛋白（处理/Mock \leq 0.5 为下调）共计 41 个，其中 9 个被鉴定为质膜蛋白，20 个定位未知，其他亚细胞结构蛋白 12 个。在对总蛋白的两组数据进行分析后，上调的蛋白共计 173 个，下调的蛋白共计 49 个。在质膜蛋白和总蛋白中都显著上调的蛋白有 22 个；在质膜蛋白和总蛋白中都显著下调的蛋白有 5 个（图 4-5），对这些蛋白的功能进行分析后发现，稻瘟病的侵染诱导了水稻体内氧化还原平衡、信号传导、能量代谢、光合作用等代谢途径相关蛋白的表达量发生改变。

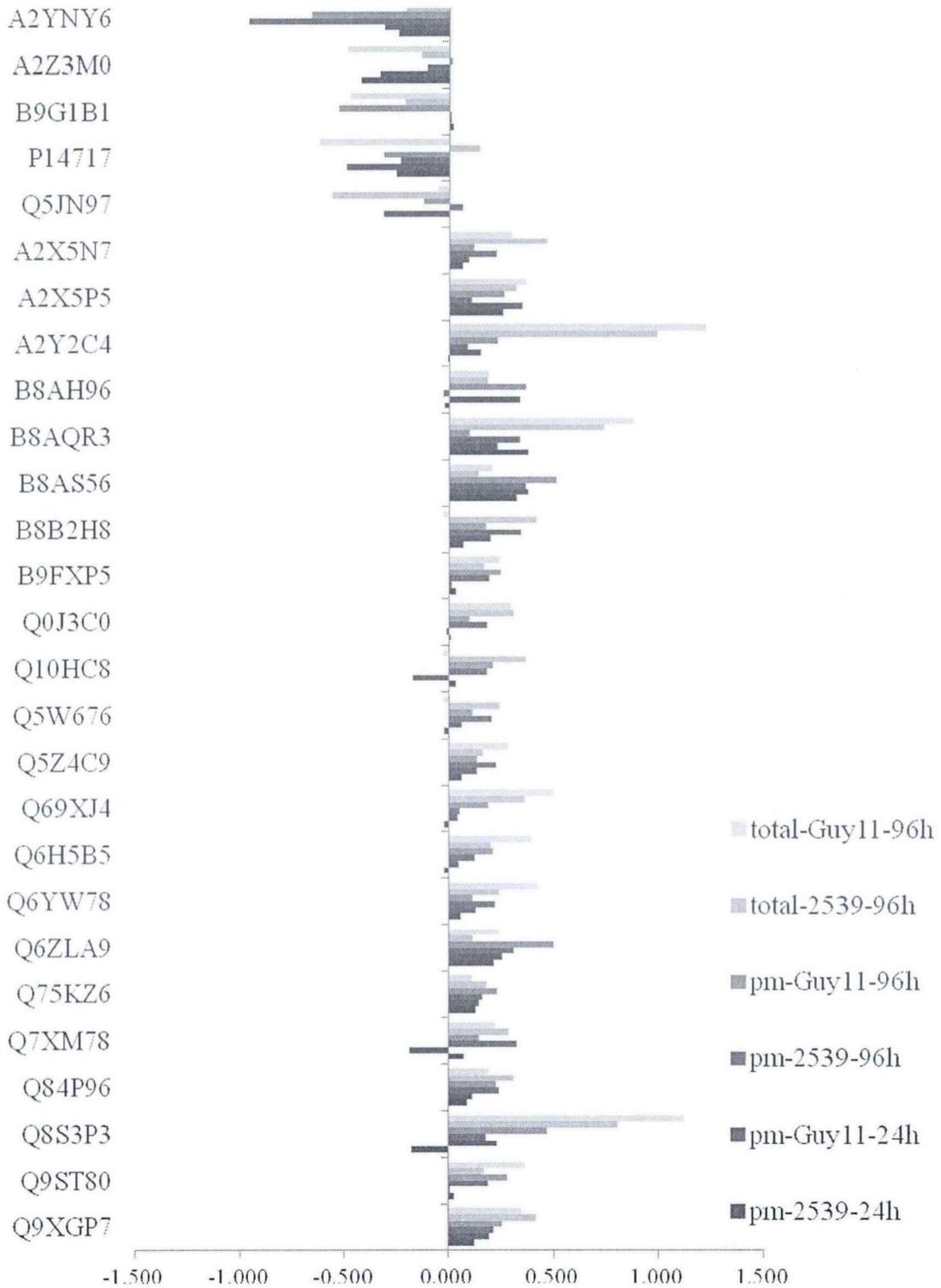


图 4-5 质膜蛋白和总蛋白中一致的差异表达蛋白

Fig.4-5 Consistent proteins of PM and Total

注：横坐标为蛋白表达量 log10 ， 纵坐标为 Accession Number

2.3.4 接种亲和菌株和非亲和菌株一致差异表达蛋白

在质膜数据组中，接种亲和菌株 Guy11 与非亲和菌株 2539 24h 后，处理组之间一致的差异表达蛋白共 27 个，其中上调的蛋白有 17 个，下调的蛋白 5 个，细胞定位在质膜上的蛋白 7 个，这些蛋白的功能包括：细胞内蛋白转运、核苷酸结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、水解酶活性、蛋白激酶活性、响应盐胁迫、对真菌的防御反应、酶活调节等。

接种 96h 后一致的差异表达蛋白共 33 个，其中上调的蛋白 29 个，下调的蛋白 4 个，定位在质膜上的蛋白 8 个。在质膜数据组中，2539 侵染后 24h 和 96h 均显著上调表达的蛋白 19 个，下调的蛋白 1 个；Guy11 侵染后 24h 和 96h 均上调的 17 个，下调的 4 个。这些蛋白的功能包括：氧化还原酶活性、水解酶活性、核苷酸结合、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性、蛋白质转运、蛋白激酶活性等。

四个处理中均显著上调的蛋白 5 个，都显著下调的蛋白 0 个（图 4-6）。这些蛋白的生物功能涉及氧化还原、物质转运和 ATP/GTP/核酸物质结合等功能。

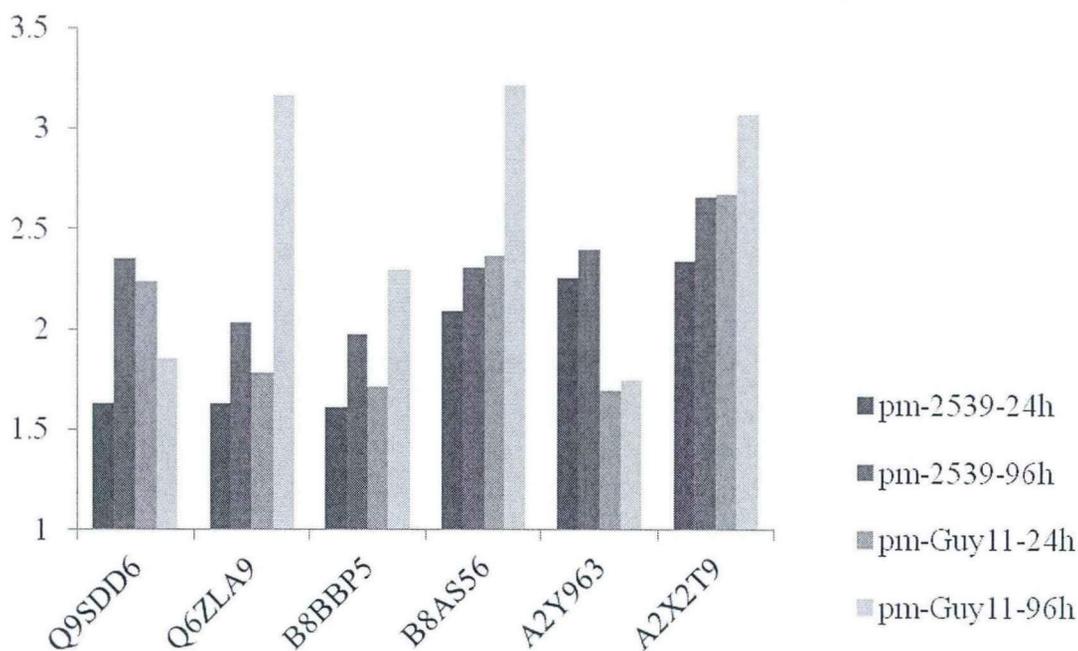


图 4-6 质膜蛋白数据组中均显著上调的蛋白
Fig.4-6 Upregulated proteins of plasma membrane

注：横坐标为蛋白表达量，纵坐标为 Accession Number

2.3.5 接种亲和菌株和非亲和菌株特异的差异表达蛋白

接种 24h 后非亲和菌株处理组特异性上调蛋白 22 个，亲和菌株处理组 22 个；接种 96h 后，非亲和菌株处理组特异性上调蛋白 43 个，亲和菌株处理组 29 个（图 4-7）。结果显示，接种非亲和菌株后诱导表达的蛋白在 96h 多于亲和菌株，随着侵染的继续，被诱导产生的蛋白数量也随着增多，这表明在水稻与稻瘟互作关系间，由于亲和关系病原物的侵入抑制了寄主产生这些与病害相关的蛋白，最终导致寄主的感病；在非亲和和侵染中，寄主能够有效的识别病原物并产生相应的病程相关蛋白，阻止病害的发展。

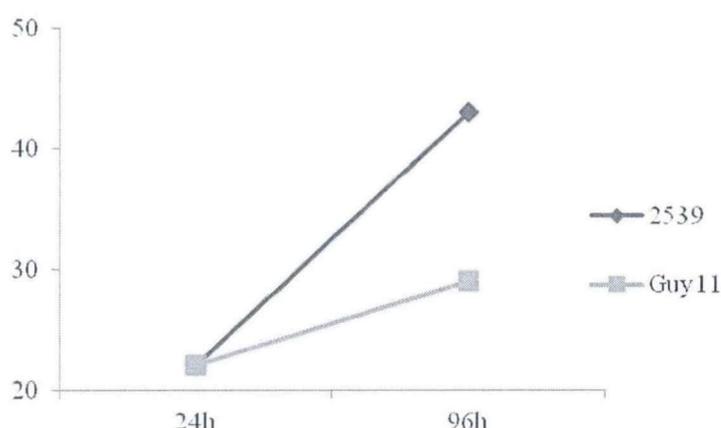


图 4-7 稻瘟菌特异性诱导上调蛋白数量变化

Fig.4-7 Specific upregulation proteins induced by 2539 and Guy11

注：横坐标侵染时间、纵坐标蛋白数量

2.3.6 接种亲和菌株和非亲和菌株变化蛋白功能分析

在对质膜蛋白数据组的蛋白功能进行分析后，一些被认为与抗病相关的功能在一些蛋白中被预测到，其中具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的有 7 个，具有 ATP/核苷酸结合作用的有 18 个，具有金属离子结合功能的有 21 个，具有转运功能的蛋白 32 个，信号接收蛋白 2 个，钙离子结合蛋白 2 个。结合表达量与蛋白功能，初步认为可能与抗病相关的蛋白共 26 个，其中上调表达的 21 个，下调表达的 5 个。

2.4 讨论

1. 采用 6.4% Dextran T-500/ PEG-3350 聚合物的双水相体系对总微粒体进行纯化

得到的质膜占总数的 43.35%，许多其他结构的膜蛋白被鉴定到，两相分离方法是依靠膜表面的理化特性来纯化质膜蛋白，其他细胞结构的膜部分也具有与质膜相同的理化特性，这是该方法的局限性；但大部分被鉴定到的蛋白定位未知，且在细胞中细胞膜是一个互相连接的整体，所以我们可以推测，使用两相分离的方法能够得到纯度接近 80% 的质膜蛋白。

2. 对所有处理组的数据进行分析，在质膜蛋白和总蛋白中都显著上调的蛋白有 22 个，在质膜蛋白和总蛋白中都显著下调的蛋白有 5 个，具体分析这 26 个蛋白的变化量，定位在膜上的蛋白其上调表达量会比总蛋白的高，是因为质膜蛋白的提取是对质膜蛋白的富集，所以在变化的量上并不会完全相同，但可以认为这 26 个蛋白在两组数据中具有相同的变化趋势。

3. 选用已完成全基因测序的水稻品种日本晴和与它之间存在亲和互作关系的稻瘟菌 Guy11 和存在非亲和互作关系的稻瘟菌 2539，具有一致性的差异表达蛋白功能进行分析后我们初步认为有 26 个蛋白有可能是抗稻瘟病相关蛋白（附录），并在 PTI 中起关键作用。

2.5 小结

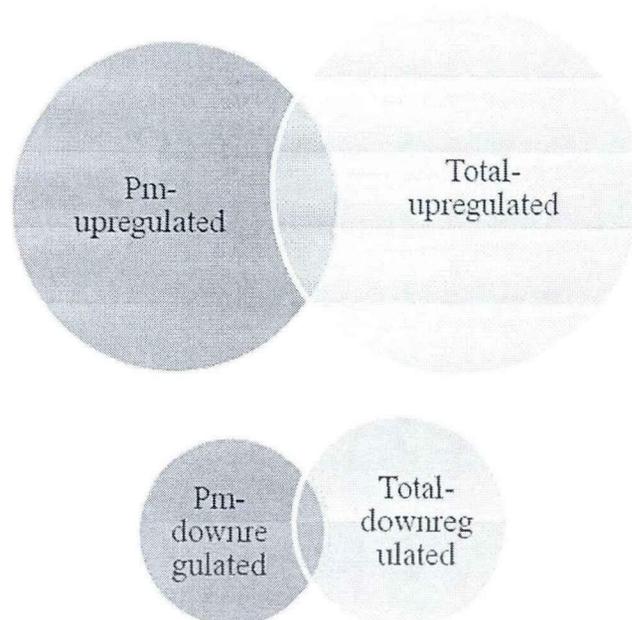


图 4-8 质膜蛋白和总蛋白数据关系

Fig.4-8 Membrane proteins and total protein data relationships

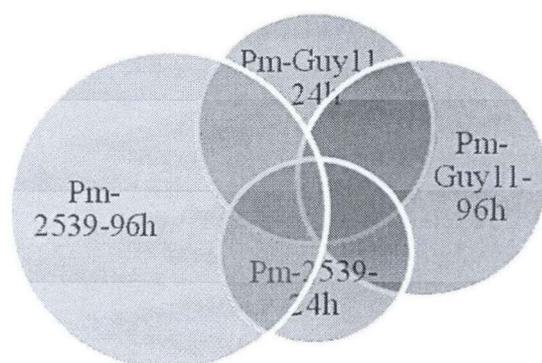


图 4-9 质膜蛋白四组处理间数据关系

Fig. 4-9 Data relationships between the four treatments of plasma membrane proteins

通过对质膜蛋白与总蛋白进行比较（图 4-8）和质膜蛋白 4 个处理间进行比较（图 4-9），我们总结出 26 个潜在的 PRRs 蛋白和 27 个在总蛋白和质膜蛋白中都上调的蛋白，在未来的研究中将会对这些蛋白进行进一步的验证。

第三章 OsAGO18 多克隆抗体的初步制备

摘要: 已发表的结果和本实验室未公布的数据显示 OsAGO18 在水稻对病毒和稻瘟菌的抗性中均起作用。当 RSV 侵染水稻后, 它能减轻 microRNA168 对水稻抗性蛋白 AGO1 的干扰。为了加深对 OsAGO18 在对稻瘟病抗性中作用的研究, 我们选取从 N 端开始 636bp 的特异性片段, 设计了重组蛋白 AGO18639, 采用烟草瞬时表达后纯化出 300 μ g 抗原, 将用于 AGO18 的多克隆抗体制备。得到的抗体将用于研究 AGO18 在抗病过程中的作用以及互作对象的鉴定。

关键词: 烟草瞬时表达; 多克隆抗体

前言

水稻 miRNA 对植物的生长发育具有重要的调控作用。它通过与 AGO 蛋白相互作用, 进一步形成效应复合物, 剪切靶 mRNA, 从而抑制基因的表达。通过对 AGO18 蛋白功能域的分析, AGO18 蛋白具有 siRNA 结合位点 (PAZ) 和 RISC 中的酶切功能域 (PiWi), 在水稻抗 RSV 的过程中, 起作用的是 PAZ, AGO18 通过结合 miRNA168, 以阻止 miRNA168 对 AGO1 的影响, 从而达到抗病的作用。

在实验室其他成员做的前期研究中发现, 突变体 *ago18* 对稻瘟菌 Guy11 的抗性相较于对照日本晴 (NPB) 显著变弱 (图 5-1)。为了更好的研究 AGO18 在水稻抗稻瘟的过程中的变化和更为全面的功能, 设计重组蛋白 AGO18₆₃₉, 选取从 N 端开始 636bp 的片段, 利用烟草瞬时表达, 获得经过植物真核修饰的蛋白的, 以求在结构上更为接近 AGO18 在水稻中的结构, 从而得到特异性更高的多克隆抗体。

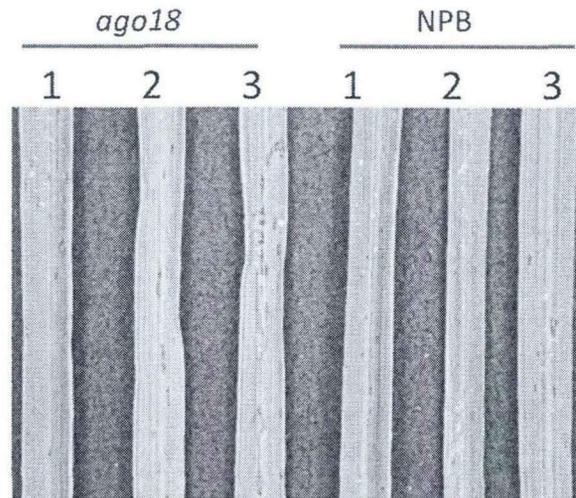


图 5-1 稻瘟菌 Guy11 侵染水稻 72h 发病情况(王秀娟)
Fig.5-1 *M.oryzae* Guy11 infecting Nipponbare after 72h

注：侵染方法同第四章材料与与方法（4.2.1 稻瘟菌侵染水稻日本晴）

3.1 实验材料、试剂及仪器

3.1.1 试验材料

水稻日本晴由江苏省农科院提供、本氏烟、大肠杆菌 JM109、农杆菌 GV3101、新西兰大白兔

3.1.2 试验试剂

pENTR Directional TOPO、pEarleyGate 202(N-FLAG)都购买自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、Primer star GXL、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 ECOR I 和 Bam H I 酶都购买自 Takara 公司。

免疫佐剂 QuickAntibody-Rabbit8W 购买自北京博奥龙免疫技术公司。

3.1.3 主要仪器

高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、摇床、恒温培养箱、离心机、冰箱、恒温水浴锅、液氮罐。

3.2 试验方法

3.2.1 水稻叶片 RNA 提取

(1) 取 2 周的水稻叶片 2g, 加入适量石英砂, 研磨成粉末至有 15mL TRIZOL 的 50mL 离心管中, 混合均匀, 振荡器振荡 1min.

(2) 12000rcf, 10min, 4℃ 离心。

(3) 小心吸取上清转移至新的 50mL 离心管中, 加入 4mL 氯仿, 振荡器振荡 1min.

(4) 12000rcf, 10min, 4℃ 离心。

(5) 小心吸取上清转移至新的 50mL 离心管中, 加入 7.5mL 异丙醇, 混合均匀后-20℃过夜沉淀。

(6) 次日取出离心管, 13000rcf, 25min, 4℃ 离心, 倒掉上清, 加入 5mL 75% 乙醇重悬沉淀, 用移液器吸打混匀。

(7) 12000rcf, 5min, 4℃ 离心, 弃上清, 加入 4mL 75%乙醇重悬沉淀, 摇晃离心管混匀。

(8) 小心弃上清, 留少量上清, 12000rcf, 2min, 4℃ 离心, 用枪吸掉上清, 在超净台中吹干 20-30min (沉淀由白色变成透明即可)。

(9) 取 350uL DEPC-H₂O 溶解 RNA, 用手用力将沉淀弹起混匀, 使得管壁上的 RNA 也能溶解下来。

(10) 200g, 1min, 4℃ 离心, 使得管壁上的 RNA 速离下来, 将 RNA 转移至 1.5mL EP 管中, 测定核算浓度, -70℃ 保存。

3.2.2 引物设计和载体构建

3.2.2.1 引物设计

从 NCBI 上下载水稻日本晴 LOC_Os07g28850 全长序列进行分析, 选取 AGO18 蛋白序列作为检测的模板序列, 进行引物的设计, 为使目的片段的两边带 EcoR I 和 BamH I 酶切位点, 以便于与 pENTR/D-TOPO 载体 (图 5-2) 构建完整。设计的引物为:

AGO18 上游引物: CCGGAATTC ATGGCGAGCCGAGGAGG

AGO18 下游引物: CGCGGATCC TCACGGCTGCTGGTGGTAGC

其中 GAATTC 和 GGATCC 为酶切位点

AGO18 短片段全长 639bp:

ATGGCGAGCCGAGGAGGAGGCCAGCACCCAGCGCCACCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCCCGGCGGGTACGGACGCGGCGGCGGCGGCGGCCGCGGGCGCGGCCGGGA
CGGGGCGCCGTACTCGGGTGGTCGTGGGCGCGGTCAGGACGGATCGTACCCTG
GCGGCCGCGGTGGGGGCTATGGCGGTGGTGGTGGTGGAGGTGGGCCGCCGTAC
TATGGCGGAGGAGGTGGTGGTGGTGGAGGAGGAGGAGGCCAAGGGCGTGGGT
ACTATGATGATGGCGGCGATGGCCGCGGGTACCAGCGGGGCATGGAGGGAGGC
GGAGGCCGTGGAGGTTATCGCGGGGACGGCGATGGTGGCTACGGACGAGGCGG
TGGCGGTTATCACGGGGACGGTGAGCGTGGCTACGGCCGAGGCGGTGGCGGTG
GCGGTGGAGGCGGCGGCGGCTATCGTGGGGATGACGAGGGTCGTAGCAGCTAC
GGCCGAGCCCGTGGCGGTGGCGGTGGCGGTGGCGGCTATCATGGGGACGGCGA
GGCTGGATACGGCCGTGGACGCGGCGGCAGGGACTACGATGGCGGCCGCGGCG
GCGGAGGAAGAAGAGGAGGACGCGGCGGCGGTGGTTCGAGCTACCACCAGCA
GCCGTGA

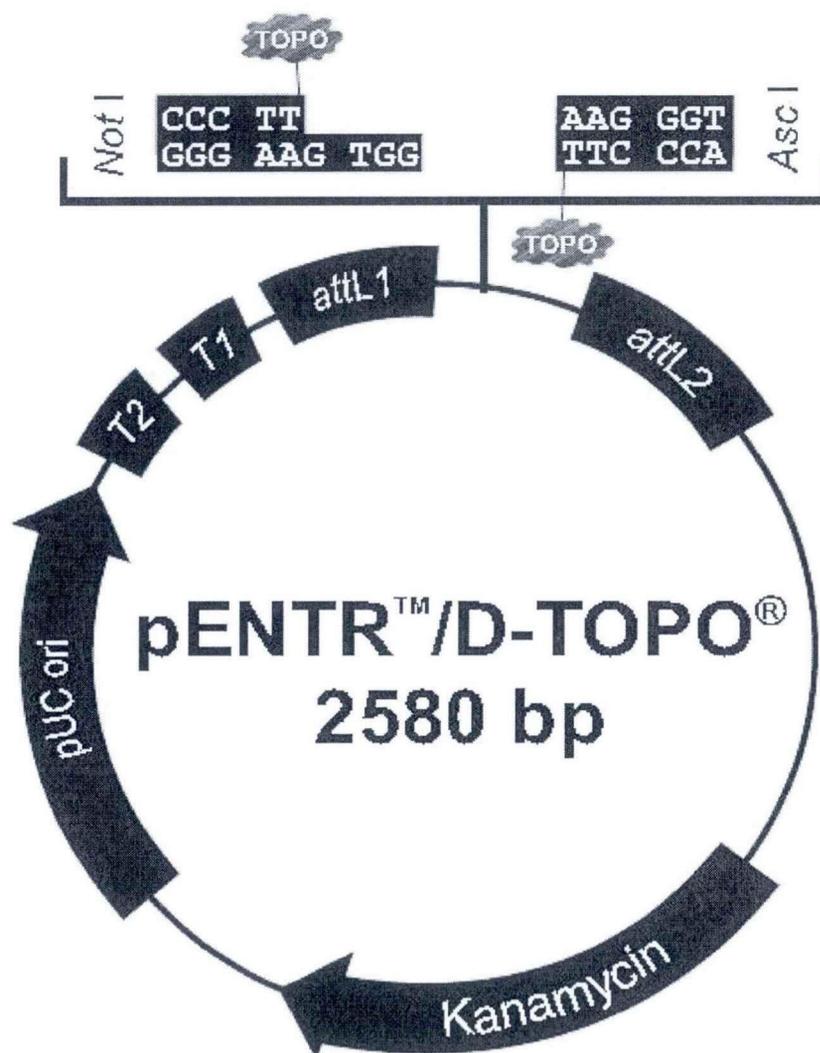


图 5-2 pENTR/D-TOPO

Fig.5-2 Structural scheme of the pENTR D-TOPO

3.2.2.2 RT-PCR

(1) 基因组 DNA 消除反应

5 X gDNA Eraser Buffer	2uL
gDNA Eraser	1uL
Total RNA	7uL

25°C 30min 置于 PCR 仪中反应。

(2) RT 反应

取出 PCR 管并迅速插到冰上，依次加入以下试剂并最后轻轻混合均匀：

第一步中的 10uL 的溶液	10uL
5 X PrimeScript Buffer 2	4uL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1uL
RT Primer Mix * ⁴	1uL
RNase Free dH ₂ O	4uL

放入 37℃ 反应 15min, 85℃, 5sec, 4℃ 保存。

(3) PCR 反应扩增目的片段。

Primer Star-GXL PCR 反应体系和步骤:

ddH ₂ O	12uL
5 X PS GXL buffer	4uL
dNTP Mixture (各 2.5mM)	1.6uL
上游引物 (20uM)	1uL
下游引物 (20uM)	1uL
cDNA 模板	0.2uL
Primer Star-GXL 酶	0.2uL

反应步骤:

- ①98℃ 预变性 2min;
- ②98℃ 变性 10sec
55℃ 退火 15sec
72℃ 延伸 1min/kb (共 35 个循环)
- ③72℃ 充分延伸 10min;
- ④10℃ 冷却 10min。

3.2.2.3 PCR 产物纯化

- (1) 将全部 PCR 产物跑 1.5% 琼脂糖胶。
- (2) 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段:
 - ①在紫外灯下切下含有目的片段 DNA 的琼脂糖凝胶, 用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量 (提前记录 1.5mL 离心管重量), 该重量作为一个凝胶体积 (如 100mg=100uL)。
 - ②加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A, 混合均匀后于 75℃ 加热, 间断混合 (每 2-3min), 直至凝胶完全融化。
 - ③加入 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B, 混合均匀。

④吸取混合液，转移到 DNA 制备管中，12000rcf，离心 1min，弃滤液。

⑤将制备管置回 2mL 离心管，加入 500uL Buffer W1，12000rcf 离心 30sec，弃滤液。

⑥将制备管置回 2mL 离心管，加入 700uL Buffer W2，12000rcf 离心 30sec，弃滤液。以同样的方法用 W2 再洗涤一，12000rcf 离心 1min。

⑦将制备管置于 2mL 离心管中，12000rcf 离心 1min。

⑧将制备管置于洁净的 1.5mL 离心管中，在制备膜中央加入 30uL ddH₂O，室温静置 1min。12000rcf，离心 1min 洗脱 DNA。

3.2.2.4 酶切

将目的片段和载体通过设计的引物两头的酶切位点进行 EcoR I 和 Bam H I 双酶切。

(1) 酶切体系

E pENTR-MCS::osAGO18	2uL
10 x Q cut buffer	1uL
Q.cut EcoR I	0.5uL
Q.cut BamH I	0.5uL
ddH ₂ O	6uL

30℃反应 1h。酶切产物

3.2.2.5 连接

纯化后的酶切产物和酶切载体采用 T4 DNA 连接酶进行连接

10uL 连接体系如下：

(1) 连接体系

目的片段（EcoR I 和 Bam H I 酶）	4uL
pENTR :: PUC19-MCS（EcoR I 和 BamH I 酶）	4uL
10 X T4 DNA Ligase buffer	1uL
T4 DNA Ligase	1uL

(2) 反应条件

置于 PCR 仪中，16℃连接过夜

3.2.2.6 大肠杆菌感受态细胞的制备

- (1) 将保存的大肠杆菌 JM109 的甘油菌在无抗 LB 平板上划线，倒置于 37℃ 的恒温培养箱中过夜培养。
 - (2) 挑取单菌落接置于 2mL 无抗液体 LB 培养基中，37℃，200rpm，初培 6h。
 - (3) 将初培菌液吸入 100mL 无抗培养 LB 培养基中，加入 2mL 2M MgSO₄，37℃，200rpm，扩培 12h，至 OD₆₀₀=0.25-0.3。
 - (4) 将扩培好的菌液分装于预冷的 50mL 离心管，冰浴 10min，5000rpm，4℃ 离心 10min。
 - (5) 弃上清，用预冷的 15mL 0.1mM CaCl₂ 重悬菌体。
 - (6) 再冰浴 10min，5000rpm，4℃ 离心 10min。
 - (7) 弃上清，用 5mL 0.1mM CaCl₂ 在冰上轻轻重悬起菌体。
 - (8) 分装悬浮均匀的菌液于预冷的 EP 管中，100uL 每管，于-70℃ 保存。
- 注：整个操作过程应无菌操作，防止污染。

3.2.2.7 转化

- (1) 取一支-70℃ 保存的感受态细胞置于冰上待其缓慢融化，加入 10uL 连接产物，冰置 30min。
 - (2) 将 EP 管置于 42℃ 水浴锅中，热激 90s；快速拿开插入冰里，冰置 2min
 - (3) 向 EP 管中加入 1mL LB 液体，混合均匀后再将 EP 管置于 37℃、200rpm 培养 1h。
 - (4) 取出 EP 管 1000rcf 离心 1min，去 700 上清。
 - (5) 用剩余液体悬起菌体，然后取 100uL 菌液滴到相应抗性（50ug/mL Kan）LB 平板上进行涂板，置于 37℃ 过夜培养。
- 注：整个操作过程应无菌操作，防止污染。

3.2.2.8 筛选阳性克隆

利用 PCR 和片段上游和载体下游引物来筛选阳性克隆，其中载体下游引物 为：

M13F:

(1) Taq-PCR 反应体系和步骤如下:

ddH ₂ O	19.25uL
10 X PCR buffer (Mg ²⁺)	2.5uL
dNTP Mixture (10mM)	2uL
上游引物	0.5uL
下游引物	0.5uL
Taq	0.25uL

挑取单菌落加入到反应体系中。

(2) 反应步骤

①94℃预变性 2min;

②94℃变性 30sec

57℃退火 30sec

72℃延伸 1min/kb

③72℃充分延伸 10min;

④10℃冷却 10min。

3.2.2.9 重组质粒的提取和测序验证

使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒提取重组质粒:

(1) 沾取阳性菌落至 3mL Kan 抗性 (50ug/mL) 的 LB 液体培养基中, 200rpm, 37℃过夜培养。

(2) 吸取 3mL 过夜培养的菌液, 12000rcf, 离心 1min, 弃尽上清。

(3) 加入 250uL Buffer S1 悬浮菌体, 悬浮均匀, 不应留有小菌块。

(4) 加入 250uL Buffer S2, 温和并充分地上下翻转 4-6 次混合均匀使菌体充分裂解, 直至形成透亮的溶液, 此步骤不宜超过 5min。

(5) 加入 350uL Buffer S3, 温和并充分地上下翻转混合 6-8 次, 12000rcf, 离心 10min。

(6) 吸取上清并转移到制备管 (置于 2mL 离心管 (试剂盒提供) 中), 12000rcf, 离心 1min, 弃滤液。

(7) 将制备管置回离心管, 加 500uL Buffer W1, 12000rcf, 离心 1min, 弃滤

液。

(8) 将制备管置回离心管，加 700 μ L Buffer W2，12000rcf，离心 1min，弃滤液；以同样的方法再用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次。弃滤液。

(9) 将制备管置回 2mL 离心管中，12000rcf，离心 1min。

(10) 将制备管置回新的 1.5mL 离心管中，在制备管膜中央加入 60 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 ddH₂O，室温静置 1min，12000rcf，离心 1min，将质粒 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

(11) 取 5 μ L 质粒与载体上游引物送至美吉公司测序。

3.2.2.10 置换表达载体

利用 LR 反应将目的片段连接到 pEarlyGate 201 载体（图 5-3）：

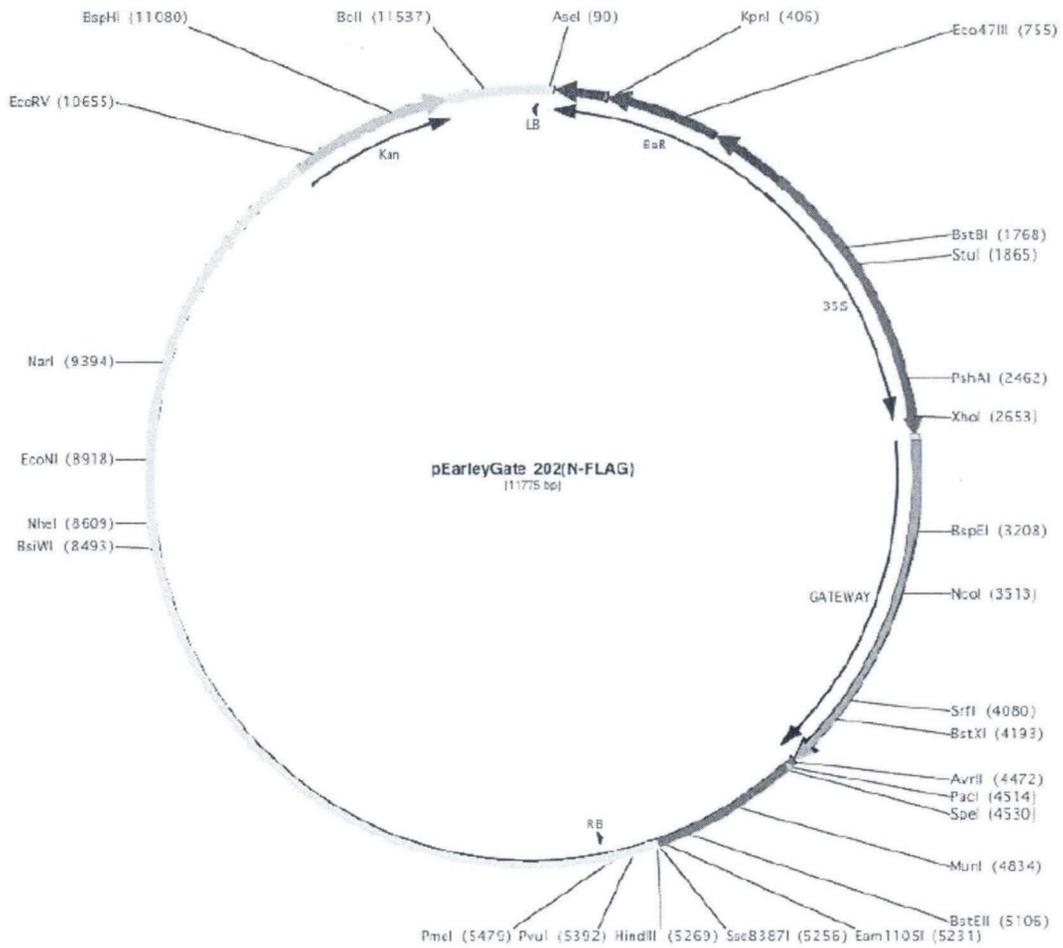


图 5-3 pEarleyGate 202(N-FLAG)

Fig.5-2 Structural scheme of the pEarleyGate 202(N-FLAG)

(1) LR 反应之前酶切

酶切体系:

ddH ₂ O	30uL
10 X NEB Buffer 3.1	5uL
Nru I	1uL
pENTR.MCS::osAGO18 (测序正确的质粒)	4uL

放置于 37°C 反应 1h.

酶切产物用 PCR clean up 试剂盒回收。

(2) LR 反应

pFI	1uL
LR clonase TM /II	1uL
E pENTR.MCS::osAGO18 (酶切产物)	4uL

28℃过夜反应。

3.2.3 重组质粒的烟草瞬时表达

3.2.3.1 农杆菌 GV3101 感受态细胞的制备

- (1) 将保存的农杆菌 GV3103 的甘油菌在具有 RG 抗性 (Rifampicin/ Gentamicin 50ug/mL) LB 平板上划线, 倒置于 28℃ 的恒温培养箱中培养 24h。
- (2) 挑选平板上的单菌落至 4mL 的 RK 抗性的 LB 液体培养基中, 置于 28℃, 200rpm 初培 12h。
- (3) 吸取 1mL 初培好的菌液至 100mL 的 RK 抗性的 LB 液体培养基中, 置于 28℃, 200rpm 扩培至 OD600=0.5-1.0。
- (4) 将菌液分装至预冷的 50mL 离心管中, 4000rcf, 5min, 4℃ 离心, 弃上清, 超净台内吹干 60sec。
- (5) 用预冷的 25mL 10% 甘油重悬菌体, 4000rcf, 5min, 4℃ 离心, 弃上清。
- (6) 用预冷的 12.5 mL 10% 甘油重悬菌体, 4000rcf, 5min, 4℃ 离心弃上清。
- (7) 用预冷的 6.5mL 10% 甘油重悬菌体, 4000rcf, 5min, 4℃ 离心, 弃上清。
- (8) 用预冷的 2mL 10% 甘油重悬菌体, 预冷的 10% 甘油稀释至 100mL, 分装菌液于预冷的 1.5mL EP 管中, 100uL 每管, 于-70℃ 保存。

3.2.3.2 农杆菌转化

将 LR 反应后的质粒转入农杆菌中:

- (1) 从冰箱中取出农杆菌感受态细胞, 插入冰里 30min, 加入 6uL 质粒, 冰上 30min。
- (2) 将农杆菌吸入预冷的电极杯中电转, 2500V, 5sec, 立即加入 700uL 无抗性液体 LB 培养基, 电转之前确保电极杯外壁干燥。
- (3) 从电极杯中吸出菌液到 1.5mL EP 管中, 200rpm, 28℃ 扩培 1.5h。
- (4) 取出菌液, 5000rpm 离心 5min。
- (5) 吸出 400uL 上清, 剩余液体将菌体重悬均匀, 吸出 200uL 滴到 RGK (Rifampicin/ Gentamicin/Kan 50ug/mL) 抗性的 LB 平板上进行涂板, 置于

28℃培养 24h.

注：整个操作过程应无菌操作，防止污染。

3.2.3.3 烟草瞬时表达

(1) 挑选平板上的单菌落于 1mL RGK 抗性液体 LB 液体培养基中进行初培，200rpm，28℃培养 12h。同时对 76 号菌株

(2) 吸取 200uL 菌液加入盛有 50mL RGK 抗性 LB 液体培养的锥形瓶中，200rpm，28℃培养 24h。

(3) 将菌液加入 50mL 离心管中，5000rcf，4℃离心 15min。

(4) 弃上清，用预冷的 ddH₂O 2mL 重悬菌体，再次加入 20mL 预冷的 ddH₂O 混合均匀，5000rcf，4℃离心 15min。

(5) 弃上清，重复一遍第四步，将菌体再洗一遍。

(6) 弃上清，用 2mL 预冷 50mM MgCl₂（包含 0.1mM 乙酰丁香酮）重悬菌体，继续加入预冷的该溶液使得 OD₆₀₀=1.0

(7) 使用无菌注射器，用 OD₆₀₀=1.0 的菌液注射，3 周大的烟草叶。

(8) 烟草恢复生长 3 天后，收集叶片用于下一步检测。

注：注射的同时注射一盆 CK 以作对照。

3.2.3.4 WESTERN BLOT 检测目的蛋白的表达

(1) 蛋白的提取

①用 1.5mL EP 管取 5 个烟草叶片小圆片，加入 7 个直径 1mm 的小钢珠放入液氮中冷却 5min，将 EP 管拿出置于空盒中猛烈摇晃，使得叶片被打成粉末。

②加入 200uL 2XSDS Loading Buffer 溶解，混合均匀。

③10000rcf，4℃离心 30min，取上清 30uL 保存于-20℃

(2) SDS-PAGE

取 30uL 样品与 CK 进行 SDS-PAGE。配制分离胶浓度为 12%，浓缩胶浓度为 5%，跑胶时全程 90V 恒压，溴酚蓝（蓝色的线）完全跑出胶底部时，停止电泳。

分离胶的配方	
ddH ₂ O	1.7mL
30% Acrylamide mix	2.0mL
1.5M Tris(PH 8.8)	1.3 mL
10% SDS	0.05 mL
10% APS	0.05 mL
TEMED	0.002 mL

浓缩胶的配方	
ddH ₂ O	1.4mL
30% Acrylamide mix	0.33mL
1.0M Tris(PH 6.8)	0.25mL
10% SDS	0.02 mL
10% APS	0.02 mL
TEMED	0.002 mL

(3) 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 用 Anti-FLAG 进行免疫

3.2.3.5 目的蛋白的纯化 (Co-IP) 和富集

(1) 取烟草叶片 4g, 加入石英砂液氮中研磨均匀, 将粉末加入 20mL IP Extraction Buffer (20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 5mM DTT, 0.1mM PMSF, PH 7.5)

(2) 4℃充分混匀 30min.

(3) 10000rcf, 4℃离心 15min, 取上清, 过 100-μM 的小滤网, 在滤液中加入 100μL Anti-FLAG Beads (购买于 AB-Mart 公司)。

(4) 4℃, 360°翻转 12h.

(5) 200rcf, 4℃离心 30sec, 收集 beads。

(6) 在 beads 中加入 1mL IP Washing Buffer (Tris-HCl 20mM, NaCl 300mM, MgCl₂ 5mM, Triton X-100 0.5%, DTT 5mM, PMSF 0.1mM) 4℃, 360° 翻转 10min。

(7) 200rcf, 4℃离心 30sec, 收集 beads, 重复 6、7 步 4-5 遍至珠子不再为绿色, 把杂蛋白去除干净。

(8) 200rcf, 4℃离心 1min, 尽量吸取干净多余液体, 加入 1mL IP Elution

Buffer, 轻轻上下混匀 15 次, 2000rcf, 4°C 离心 3min, 收集上清。

(9) 重复第 8 步两遍, 收集上清。

(10) 在 beads 中加入 1mL Storage Buffer, 上下混匀 15 次, 200rcf, 4°C 离心 30sec, 弃上清。再次加入 1mL Storage Buffer, 将珠子保存于 4°C 冰箱中。

3.2.4 多克隆抗体的制备

3.2.4.1 溶解体系的置换

因为在真核表达蛋白纯化的过程中溶解蛋白的溶液为 0.2M PH2.1 甘氨酸溶液, 对免疫动物不利, 因此在做免疫之前需要对表达的蛋白进行超滤以置换溶解体系, 使用 3kD 的蛋白超滤管, 4°C 离心 20min, 弃滤液, 最后用生理盐水溶解蛋白, -80°C 保存。

3.2.4.2 多克隆抗体制备

一种蛋白免疫两只兔子, 免疫之前取阴性血清 1mL。将蛋白浓度稀释为 1ug/uL, 取 50uL 与等体积 QuickAntibody-Rabbit8W 混合, 然后按表 5-1 方案进行免疫。

表 5-1 兔多克隆免疫方案

Table5-1 Immune rabbit polyclonal antibody preparation plan				
免疫次序	间隔天数	抗原剂量	佐剂剂量	注射部位
1		50ug	50ul	背部皮下
2	21	50ug	50ul	背部皮下
加强免疫	取血清前 3 天	30ug		背部皮下

3.3 实验结果

3.3.1 烟草瞬时表达结果

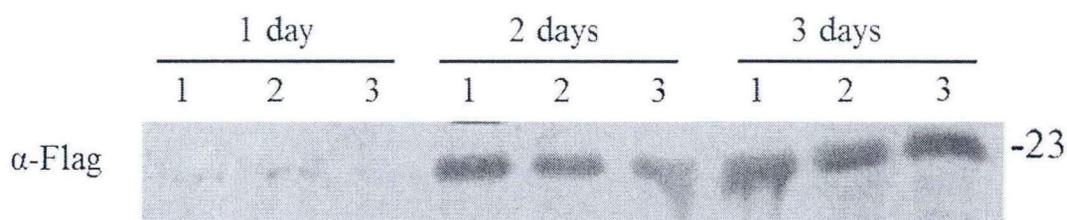


图 5-4 烟草瞬时表达

Fig.5-4 Transient expression in tobacco

注：1、2、3 表示注射菌液 OD₆₀₀ 为 1.000、2.000、3.000

结果显示，注射 3 天后蛋白表达量最多，三个浓度的菌液之间没有差异。选择 OD₆₀₀=1.000 的菌液浓度，注射三天后的叶片表达的蛋白最多。

3.3.2 蛋白纯化结果

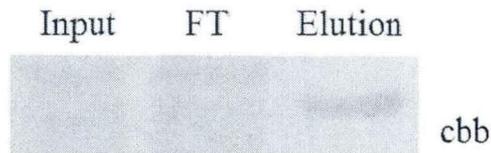


图 5-5 OsAGO639 纯化结果
Fig.5-5 Purification of OsAGO18639

注：input：未纯化蛋白、FT：纯化后上清、elution：纯化后蛋白

使用带有 Flag 标签的琼脂糖珠对烟草瞬时表达的蛋白进行纯化，使用 pH2.1 的甘氨酸溶液能够将目的蛋白洗脱得更完全，结果显示蛋白被成功纯化并洗脱下来，并通过这个方法富集到 300 μ g 蛋白进行下一步的免疫。

3.4 讨论

1. 在之前的研究中发现 AGO18 在 RSV 诱导下显著上调表达^[32]，且通过结合 miRNA168 降低 miRNA168 对水稻抗病蛋白 AGO1 的干扰^[36]，从而达到抗病的作用^[33]。本实验室成员王秀娟在对突变体 *ago18* 接种稻瘟菌 Guy11 后发现，相较对照日本晴，*ago18* 表现更为感病。

2. 对 LOC_Os07g28850 全长序列进行分析发现，从 N 端开始的 636bp 的片段具有特异性，选取该片段作为目的片段，进行重组质粒的构建，表达 OsAGO18₆₃₉ 作为兔多克隆抗体抗原。选择烟草瞬时表达作为表达手段是因为，该方法得到的蛋白是在植物体内经过真核修饰的蛋白，在结构上更为接近水稻中的状态。

3. 为了得到达到足够进行免疫的抗原量，通过对农杆菌不同浓度和不同注射时间的实验发现，蛋白表达量在各浓度间没有差异，只与注射时间相关，且注射时间 3 天后蛋白表达量最多。

3.5 小结

选取 LOC_Os07g28850 全长序列进行分析发现,从 N 端开始的 636bp 的片段连接到 pENTR/D-TOPO 载体上构建重组质粒,利用 LR 反应将目的片段交换至 pEarleyGate 202(N-FLAG)载体上,构建好的质粒转入农杆菌中进行烟草瞬时表达得到 300ug 目的蛋白,使用佐剂 QuickAntibody-Rabbit8W 可对兔子进行免疫得到多克隆抗体。通过该方法可对植物中抗病相关蛋白进行蛋白水平上的分析,是观察抗病蛋白在病程过程中时间和空间上的变化的有力手段。

参考文献

- [1]. 鄂志国等, 稻瘟病抗性基因的鉴定及利用进展. 中国水稻科学, 2008. 22(5).
- [2]. Parker, D., et al., Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. *Nat Protoc*, 2008. 3(3): p. 435-45.
- [3]. Wilson, R.A. and N.J. Talbot, Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat Rev Microbiol*, 2009. 7(3): p. 185-95.
- [4]. Kamo, M., et al., Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1995. 16(3): p. 423-30.
- [5]. 张智慧等, 外源茉莉酸甲酯诱导的水稻叶片蛋白质差异表达分析. 植物病理学报, 2012. 42(2).
- [6]. Li, Y., et al., Comparative proteomic analysis of methyl jasmonate-induced defense responses in different rice cultivars. *PROTEOMICS*, 2014. 14(9): p. 1088-1101.
- [7]. Lanquar, V., et al., ¹⁵N-Metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in *Arabidopsis* cells. *PROTEOMICS*, 2007. 7(5): p. 750-754.
- [8]. Hultin-Rosenberg, L., et al., Defining, comparing, and improving iTRAQ quantification in mass spectrometry proteomics data. *Mol Cell Proteomics*, 2013. 12(7): p. 2021-31.
- [9]. 唐成等, 水稻幼苗叶片应答稻瘟病侵染的差异蛋白谱分析. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 2014(4).
- [10]. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Day and Good Membranes and viruses in immunopathology*, 1972: p. 7-47.
- [11]. Osborn, M.J., et al., Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J Biol Chem*, 1972. 247(12): p. 3962-72.
- [12]. Storrie, B. and E. Amadden, [16] Isolation of subcellular organelles. *Methods in Enzymology*, 1990: p. 203-225.
- [13]. Poole, R.J., et al., Density Gradient Localization of Plasma Membrane and Tonoplast from Storage Tissue of Growing and Dormant Red Beet 1: Characterization of Proton-Transport and ATPase in Tonoplast Vesicles. 2005.
- [14]. Larsson, C., S. Widell and P. Kjellbom, Preparation of high-purity plasma-membranes. *Methods in Enzymology*, 1987. 148: p. 558-568.
- [15]. 何磊等, 水稻叶片质膜的纯化及质膜蛋白质双向电泳分析. 华南农业大学学报, 2012. 33(1):

第 11-17 页.

- [16]. Yan, F., et al., Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiol*, 2002. 129(1): p. 50-63.
- [17]. Zhang, L.F., et al., Proteomic analysis of plasma membranes of cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 in response to high pH stress. *J Proteome Res*, 2009. 8(6): p. 2892-902.
- [18]. Santoni, V., et al., Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *The Plant Journal*, 1998. 16(5): p. 633-641.
- [19]. Santoni, V., Plant plasma membrane protein extraction and solubilization for proteomic analysis. *Methods Mol Biol*, 2007. 355: p. 93-109.
- [20]. Zhang, H., et al., Differential recovery of membrane proteins after extraction by aqueous methanol and trifluoroethanol. *Proteomics*, 2007. 7(10): p. 1654-63.
- [21]. 许激扬, 生物化学 (第 2 版)
{URL}:http://f.wanfangdata.com.cn/Book/default.aspx?id=Book_BK0063119. 2010: 东南大学出版社. 310.
- [22]. Hopper, J.T., et al., Detergent-free mass spectrometry of membrane protein complexes. *Nat Methods*, 2013. 10(12): p. 1206-8.
- [23]. Laganowsky, A., et al., Mass spectrometry of intact membrane protein complexes. *Nat Protoc*, 2013. 8(4): p. 639-51.
- [24]. Kaku, H., et al., Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(29): p. 11086-91.
- [25]. Chen, X., et al., A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J*, 2006. 46(5): p. 794-804.
- [26]. Kouzai, Y., et al., Targeted gene disruption of OsCERK1 reveals its indispensable role in chitin perception and involvement in the peptidoglycan response and immunity in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 2014. 27(9): p. 975-82.
- [27]. Liu, B., et al., Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *Plant Cell*, 2012. 24(8): p. 3406-19.
- [28]. Kouzai, Y., et al., Targeted gene disruption of OsCERK1 reveals its indispensable role in chitin perception and involvement in the peptidoglycan response and immunity in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 2014. 27(9): p. 975-82.
- [29]. Jin, H. and J.K. Zhu, How many ways are there to generate small RNAs? *Mol Cell*, 2010. 38(6): p. 775-7.
- [30]. Zhang, X., et al., Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(*)-mediated

- silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Mol Cell*, 2011. 42(3): p. 356-66.
- [31]. Seo, J.K., et al., Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013. 26(6): p. 617-25.
- [32]. Wu, J., et al., Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA. *Elife*, 2015. 4.
- [33]. 吴英杰等, 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化. *东北林业大学学报*, 2010. 38(9).
- [34]. Santoni, V., Plant plasma membrane protein extraction and solubilization for proteomic analysis. *Methods Mol Biol*, 2007. 355: p. 93-109.
- [35]. Brodersen, P., et al., Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(5): p. 1778-83.

附录

Accession	Function in Rice (Uniprot)	MSU ID	Gene product name
	Kinase, Receptor, Serine/threonine-protein		TKL_IRAK_DUF26-lc.24 - DUF26 kinases
Q7X8H4	Kinase, Transferase, ATP-binding, Nucleotide-binding	LOC_Os07g43560.1	have homology to DUF26 containing loci, expressed
A2WSH0	Transport, ATP-binding, Nucleotide-binding	LOC_Os01g42380.1	pleiotropic drug resistance protein, putative, expressed
B8BBP5	ATP-binding, Nucleotide-binding	LOC_Os08g10300.1	SHR5-receptor-like kinase, putative, expressed
B9FDD5	Response to fungus	LOC_Os04g58710.1	AMP-binding domain containing protein, expressed
	Kinase, Serine/threonine-protein kinase,		TKL_IRAK_DUF26-lc.15 - DUF26 kinases
B9FXP5	Transferase, ATP-binding, Nucleotide-binding	LOC_Os07g35370.1	have homology to DUF26 containing loci, expressed
A2YMN1	Photosynthesis, Chlorophyll, Chromophore, Magnesium, Metal-binding	LOC_Os07g37550.1	chlorophyll A-B binding protein, putative, expressed
A2X2T9	Heme, Iron, Metal-binding	LOC_Os02g14440.1	peroxidase precursor, putative, expressed
	ATP binding, Protein serine/threonine		OsWAK60 - OsWAK receptor-like protein
B7F891	kinase activity, Calcium ion binding, Polysaccharide binding	LOC_Os04g30240.1	kinase, expressed
	Electron carrier activity, Iron-sulfur cluster		2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain
B8AQR3	binding, NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity, ATP synthesis coupled electron transport	LOC_Os03g50540.1	containing protein, expressed
Q53PA7	Transmembrane transport	LOC_Os11g24450.1	mitochondrial carrier protein, putative, expressed
	Cell growth, Cell Morphogenesis, cysteine biosynthetic process, Gluconeogenesis,		late embryogenesis abundant protein,
Q75LD9	Glycolytic process, Golgi vesicle transport, Response to desiccation, Response to salt stress	LOC_Os03g62620.2	putative, expressed
	ATP binding, Protein serine/threonine		SHR5-receptor-like kinase, putative,
B8BBP9	kinase activity	LOC_Os08g10310.1	expressed
B8AS56	GTP-binding, Nucleotide-binding	LOC_Os03g05280.1	ras-related protein, putative, expressed
	actin filament organization, Exocytosis,		exocyst complex component 5, putative,
A2ZJB7	Protein transport, Vesicle docking	LOC_Os12g13590.1	expressed
	Structural molecule activity, Intracellular		coatamer subunit beta, putative, expressed
A2Y963	protein transport, Vesicle-mediated transport	LOC_Os02g11830.2	

Accession	Function in Rice (Uniprot)	MSU ID	Gene product name
A2YNY6	Kinase, Serine/threonine-protein kinase, Transferase, ATP-binding, Nucleotide-binding	LOC_Os07g43570.1	TKL_IRAK_DUF26-1c.25 - DUF26 kinases have homology to DUF26 containing loci, expressed
B8AQD9	ATP binding, Protein kinase activity	LOC_Os03g50450.1	inactive receptor kinase At2g26730 precursor, putative, expressed
Q6Z8K7	defense response to fungus, Jasmonic acid mediated signaling pathway, Response to chitin	LOC_Os02g51470.1	ATP synthase F1, delta subunit family protein, putative, expressed
Q2QSR7	Response to chitin, Defense response to fungus, Jasmonic acid mediated signaling pathway	LOC_Os12g23180	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein, putative, expressed
B9FL76	ATP binding, Protein serine/threonine kinase activity	LOC_Os05g44770.1	receptor-like protein kinase 5 precursor, putative, expressed
Q75KZ6	Kinase, Receptor, Serine/threonine-protein kinase, Transferase	LOC_Os05g40770.1	leucine-rich repeat family protein, putative, expressed
Q5QMM2	Kinase, Serine/threonine-protein kinase, Transferase	LOC_Os01g60280.1	ATP binding protein, putative, expressed
B8BBP8	ATP binding, Protein serine/threonine kinase activity	LOC_Os08g10300.1	SHR5-receptor-like kinase, putative, expressed
A2X345	Response to chitin, Defense response to fungus, Jasmonic acid mediated signaling pathway,	LOC_Os02g15750.1	expressed protein
Q5W676	Kinase, Transferase, Glycolysis, ATP-binding, Nucleotide-binding	LOC_Os05g44760.1	
Q8S3P3	Kinase, Receptor, Transferase	LOC_Os04g56430.1	cysteine-rich receptor-like protein kinase, putative, expressed

致 谢

从课题的开展到论文的完成，期间遇到许多问题和挑战，但都在老师和同学们的帮助下度过了。在这里我首先要感谢赵老师，给我机会让我接触到这些新知识，在实验的初期，他细致生动的给我讲解了各类试验的方法和原理，面对问题时他也总是耐心的倾听和指导，并一直不断地给我鼓励。

我还要感谢我的实验搭档宋晓欧，我们一起摸索实验方法、解决问题、共进退，同时还要特别感谢我的舍友王秀娟，我们一起走过了六年的大学时光，在学习和生活中互相鼓励。感谢生命科学院戴琛老师在质谱检测上的帮助和建议，感谢王招云师姐和乔露露师兄在建立稻瘟菌侵染体系的帮助，感谢聂萍萍师姐对我各种大小问题的耐心解答，感谢实验室的同学们，在完成论文期间给予的建议和帮助、平时的工作和生活上的关照，让我在一个温馨融洽的欢乐集体中度过了两年的研究生生活。最后，非常感谢我的家人对我的理解和支持，无论我遇到什么挫折都能在那找到最暖心的安慰。

值此论文完稿之际，我将要离开学校走入社会，心中明白会有更多需要学习知识、应对的烦恼，希望我能坚持真我，实现放在心头想了又想的梦想。

卢 唯

2015年4月16日南京农业大学理科楼C704