

红莲型水稻细胞质雄性不育花药 蛋白质组学初步分析

文 李^{1,2}, 刘 盖¹, 张再君¹, 陶 钧², 万翠香¹, 李绍清¹, 朱英国¹

(1. 武汉大学发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 长沙理工大学生物系, 长沙 410077)

摘要:采用固相 pH 梯度-SDS PAGE 双向电泳对红莲型细胞质雄性不育水稻的不育系(YTA)和保持系(YTB)单核期花粉总蛋白质进行了分离,通过银染显色,获得了分辨率和重复性较好的双向电泳图谱。Image Master 2D V5.0 软件可识别约 1800 个蛋白质点,其中差异表达的蛋白质点数为 85。将其中 16 个差异点采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)进行了肽质指纹图分析,通过采用 Mascot 软件对 MSDB 数据库查询,其中 9 个蛋白质点得到了鉴定。YTA 相对于 YTB 有部分参与碳代谢和淀粉合成的酶缺失或表达量降低,这些蛋白质分别是 ADP-葡萄糖磷酸转移酶(AGPase), UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶,乙酰辅酶 A 合成酶和二氢硫辛酸脱氢酶等。其中 AGPase 是参与淀粉合成的蛋白,与花粉发育密切相关。乙酰辅酶 A 合成酶和二氢硫辛酸脱氢酶是细胞内合成乙酰辅酶 A 的重要酶,而乙酰辅酶 A 是进入 TCA 循环的重要底物,乙酰辅酶 A 的缺乏可以导致 TCA 循环不能顺利进行,从而不能提供小孢子发育所需要的大量能量。YTA 相对于 YTB 部分参与碳水化合物代谢的重要酶缺失或表达量降低,有可能导致因线粒体提供的能量不足,淀粉合成受阻,因而花粉不能正常发育。

关键词:水稻;花药;细胞质雄性不育;蛋白质组学

中图分类号:Q51;Q946

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2006)03-0311-06

Preliminary Proteomics Analysis of the Total Proteins of HL Type Cytoplasmic Male Sterility Rice Anther

WEN Li^{1,2}, LIU Gai¹, ZHANG Zai-Jun¹, TAO Jun², WAN Cui-Xiang¹, LI Shao-Qing¹, ZHU Ying-Guo¹

(1. Key laboratory of MOE for Plant Developmental Biology Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Biological Department of Changsha University of Science and Technology, Changsha 410077, China)

Abstract: The proteins of HL type cytoplasmic male sterility (CMS) rice anther of YTA and YTB (maintenance line) were separated by two-dimensional electrophoresis with immobilized pH (3-10, non-linear) gradients as the first dimension and SDS-PAGE as the second. The silver-stained proteins spots were analyzed using Image Master 2D software, there were about 1 800 detectable spots on each 2D-gel, and about 85 spots were differential expressed. With direct MALDI-TOF mass spectrometry analysis and protein database searching, 9 protein spots out of 16 were identified. Among those proteins, there were putative nucleic acid binding protein, glucose-1-phosphate adenylyltransferase (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase) (EC:2.7.7.27) large chain, UDP-glucuronic acid decarboxylase, putative calcium-binding protein annexin, putative acetyl-CoA synthetase and putative lipamide dehydrogenase etc. They were closely associated with metabolism, protein biosynthesis, transcription, signal transduction and so on, all of

收稿日期:2005-01-25;修回日期:2005-04-22

基金项目:国家重大基础研究 973 项目(编号:2001CB108806)资助[supported by Chinese National 973 Program (No.2001CB108806)]

作者简介:文 李(1971—),女,湖南人,讲师,在读博士研究生,专业方向:植物发育遗传学,从事水稻细胞质雄性不育机理蛋白质组学研究。

Tel:027-87218573;E-mail: superwenli@163.com

通讯作者:朱英国(1939—),男,湖北人,教授,博士生导师,研究方向:遗传学。Tel:027-68756530;E-mail: zhuygd@yahoo.com.cn

致 谢:本研究中 MALDI-TOF/MS 分析在国家卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室完成。

which are cell activities that are essential to pollen development. Some of the identified proteins, *i. e.* AGPase, putative lipoamide dehydrogenase and putative acetyl-CoA synthetase were deeply discussed on the relationship to CMS.

AGPase catalyzes a very important step in the biosynthesis of alpha 1,4-glucans (glycogen or starch) in bacteria and plants; synthesis of the activated glucosyl donor, ADP-glucose, from glucose-1-phosphate and ATP. The lack of the AGPase in male sterile line might directly result in the reduced of starch, and the synthesis of starch was the most important processes during the development of pollen.

In present research, the descent or reduction of putative lipoamide dehydrogenase and putative acetyl-CoA synthetase seemed involved in pollen sterility in rice. The degeneration and formation of various tissues during pollen development may impose high demands for energy and key biosynthetic intermediates. Under such conditions, the TCA cycle needs to operate fully, because the TCA cycle is an important source for many intermediates required for biosynthetic pathways, in addition to performing an oxidative, energy-producing role. Thus, it seemed reasonable to infer that the decrease of putative lipoamide dehydrogenase and putative acetyl-CoA synthetase in anther might prevent the conversion of pyruvate into acetyl-CoA, and as a result, the TCA cycle could no longer operate at a sufficient rate to meet all requirements in anther cells, which leads to pollen sterility.

This study gave new insights into the mechanism of CMS in rice and demonstrated the power of the proteomic approach in plant biology studies.

Key words: rice; anther; cytoplasmic male sterility; proteomics

细胞质雄性不育 (Cytoplasmic male sterility, CMS) 是雄性不育中最重要的一种类型, 是一种广泛存在于高等植物中的生物学现象, 由核基因和细胞质基因共同控制, 表现为核质互作的遗传现象。CMS 具有重要的应用和理论价值, 目前, 在生产上广泛应用的水稻, 玉米, 油菜等经济作物都是利用细胞质雄性不育材料配制杂交种, 在某种程度上, 细胞质雄性不育是农作物杂种优势利用的基础。CMS 是受细胞核和细胞质双重调控的一种母性遗传性状, 为细胞质遗传和核质互作的研究提供了极好的材料。对细胞质雄性不育机理的研究, 不仅有助于对核质互作及小孢子发育和成花机理的深入了解, 而且对一系列重大的发育生物学问题也有着推动作用^[1]。本实验室已在此方面进行了大量的分子生物学和生理生化研究^[2~4], 但是目前对水稻细胞质雄性不育及育性恢复的分子基础仍不清楚。蛋白质是基因表达的产物, 从蛋白质组学角度探讨细胞质雄性不育及育性恢复的机理, 找到与细胞质雄性不育及育性恢复相关的蛋白质, 从而找到相应的基因。本文对红莲型细胞质雄性不育水稻的不育系和保持系单核期花药总蛋白进行经固相 pH 梯度——SDS PAGE 双向电泳分离, 银染法显色, 进行了初步的图像分析, 找到了大量的差异表达的蛋白质, 并对其中的部分蛋白质点进行了 MALDI-TOF/MS 分析鉴定, 取得了初步的结果。本文首次利用蛋白质组技术对红莲型细胞质雄性不育水稻花药总蛋白质进行分析, 为进一步开展红莲型细胞质雄性不育水稻不育机理的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

取红莲型细胞质雄性不育水稻不育系 (YTA) 和保持系 (YTB) 穗子, 结合形态学和显微镜观察, 确定小孢子发育时期。选花粉发育单核期穗子, 4℃ 剥取水稻花药, 立即置 -70℃ 冰箱备用。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质提取方法

临用前取出花药, 加液氮研磨成粉末, 用 TCA/丙酮法提取总蛋白。用 -20℃ 预冷蛋白提取液 (10% TCA, 0.07% β -ME) 沉淀蛋白质, 置 -20℃ 沉淀过夜, 期间振荡多次, 18 000 \times g 离心 30 min, 弃上清, 用含 0.07% β -ME 丙酮溶液冲洗沉淀, 18 000 \times g 离心 30 min, 重复 5~6 次, 直至蛋白质沉淀物为纯白色。取沉淀物, 冻干, 制成干粉, -20℃ 备用。

1.2.2 第一向固相 pH 梯度等电聚焦

主要按 Görg 等^[5]的方法和 IPGphor 等电聚焦系统指南进行。花药总蛋白质提取物 (500 μ g) 与水化液 (8 mol/L 尿素 + 4% CHAPS + 18 mmol/L DTT + 0.5% IPG 缓冲液) 充分混合, 加入 IPG strip 持胶槽, 将 IPG 非线性干胶条 pH3~10 NL (180 mm \times 3 mm \times 0.5 mm) 去保护膜胶面朝下, 轻轻置入持胶槽中, 覆盖一层矿物油, 盖好持胶槽盖子, 置于 IPG-phor 等电聚焦仪的电极板上, 水化和聚焦在 20℃ 自动进行, 总电压时间积为 49 920 Vh, 其中水化在 30 V 低电压进行 14 h, 然后经过 500 V 1 h、1 000 V 1 h, 最后稳定在 8 000 V 下进行。

1.2.3 第二向垂直板 SDS-PAGE 电泳

等电聚焦结束后,迅速取出带样品的 IPG 胶条分别于 20 mL 平衡液 A(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8 + 6 mmol/L 脲 + 30 % 甘油 + 2 % SDS + 0.2 % DTT) 和 20 mL 平衡液 B (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8 + 6 mmol/L 脲 + 30 % 甘油 2 % SDS + 3 % 碘乙酰胺 + 痕量溴酚蓝) 中各平衡 15 min。将平衡后的 IPG 胶条移至 0.75 mm 厚的连续 12 % 均匀分离胶上端,并在其一端的外侧加上 SDS 标准蛋白质,排净气泡用 1 % 琼脂糖凝胶封闭,15 °C 循环水冷却,用 25 mA/2 块胶恒流电泳 30 min,换用 50 mA/2 块胶恒流电泳直至溴酚蓝到达距胶底边约 1 cm 处停止电泳。

1.2.4 银染

按 Pharmacia 公司的蛋白质银染试剂盒的操作手册进行。其基本过程依次是:40 % 乙醇 + 10 % 冰乙酸固定 30 min;30 % 乙醇 + 0.2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 6.8 % 乙酸钠;洗涤 3 次,每次 5 min;0.25 % AgNO_3 + 0.0148 % 甲醛染色 20 min;洗涤 2 次,每次 1 min;2.5 % Na_2CO_3 + 0.0074 % 甲醛显影至斑点清晰为止;加入 1.46 % EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 终止 10 min;洗涤 3 次,每次 5 min;用 30 % 乙醇 + 4.6 % 甘油保存。

1.2.5 凝胶图像分析

银染显色的凝胶扫描获取图像,用 Image Master 2D V5.0 分析软件对图像进行背景消减、斑点检

测、匹配和获取斑点位置坐标等。

1.2.6 2D 胶蛋白质点的肽质谱指纹图分析
参照文献[6]方法进行。

2 结果和讨论

2.1 实验结果

图 1 中 A 和 B 分别为红莲型细胞质雄性不育水稻不育系(YTA)和保持系(YTB)在小孢子发育单核期花药总蛋白质的双向电泳图谱。经扫描获得 2D 胶银染图像后,用 Image MasterV5.0 分析软件在 pI3-10,分子量 9.0~97 kDa 范围内平均识别出 1 500~1 800 个蛋白质点。通过严格一致的操作程序,包括电泳温度、电流电压和样品上样量,得到了重复性很高的 2D 电泳图谱,不育系和保持系花药总蛋白质 2D 电泳图谱十分接近,蛋白质大部分分布在分子量 30~90 kDa,等电点 4~7 之间。

通过对不育系和保持系花药总蛋白质 2D 图谱的分析,发现在 YTA/YTB 之间差异 85 点,其中 YTB 相对于 YTA 表达上调的有 58 点,表达下调的有 27 点(部分差异表达蛋白质点在图中用黑色圆圈标出)。图 2 中 A 和 B 分别为从图 1 中 A 和 B 中黑色方框标出的部分。图 3 为蛋白质点 4 的肽质谱指纹图谱。

表 1 中列出了采用 MALDI-TOF/MS 技术鉴定出来的蛋白质信息,表中编号对应图 1 和图 2 中标出的数字,并用箭头标明所对应应在 2DE 胶上的蛋白质点。

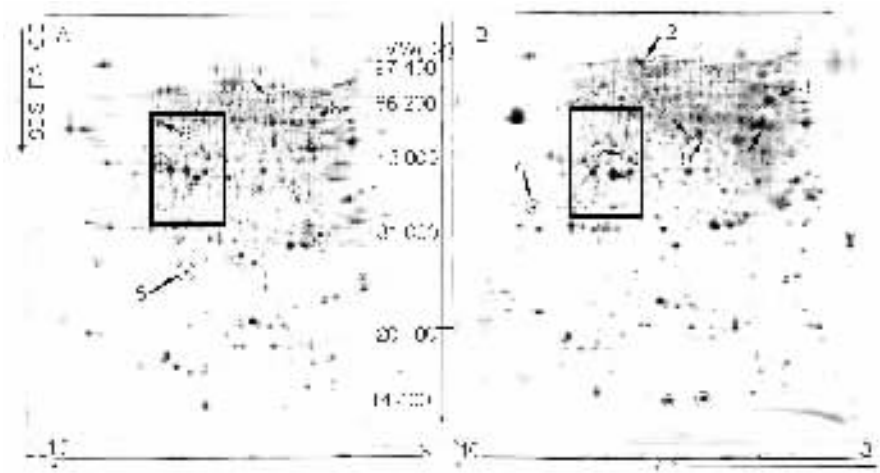


图 1 YTA 和 YTB 花药总蛋白质双向凝胶电泳图谱

部分差异表达蛋白质用黑圈圈出,其中已经鉴定出的蛋白质点用箭头标出并用数字标明。

A: YTA; B: YTB; 方框标出中部分放大图见图 2。

Fig. 1 Representative 2-DE protein Maps of total anther proteins from YTA and YTB

Some of the differentially expressed spots are circled, and the analyzed spots by MALDI-TOF/MS are indicated by arrows,

and the arbitrary identifiers correspond to those listed in Table 1. A: YTA; B: YTB. The enlargements of the framed areas are shown in Fig. 2.

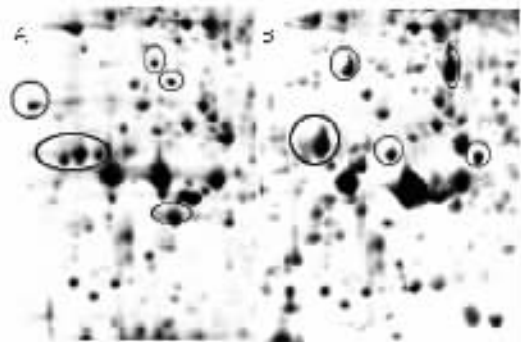


图2 图1中方框标出部分放大图

Fig.2 Enlargements of the framed regions illustrated in Fig.1

A: YTA; B: YTB.

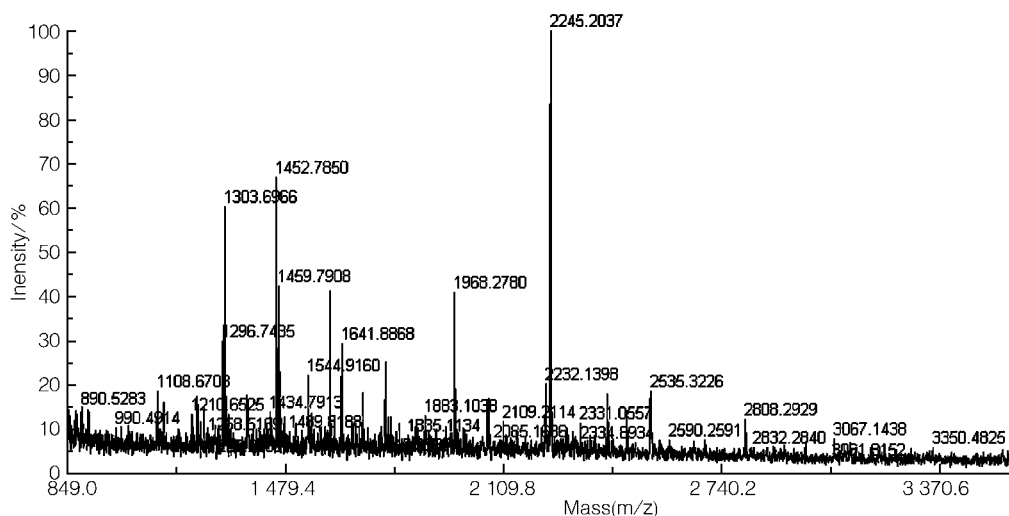


图3 YTB双向凝胶电泳图谱中蛋白质点4的肽质指纹图谱

蛋白质点从2D胶上切下并用胰酶降解后对酶解片段进行质谱分析,利用MASCOT软件对MSDB数据库进行搜索,该蛋白质为ADP-葡萄糖磷酸转移酶大亚基。

Fig.3 Peptides mass fingerprinting of protein spot 4 in YTB 2-DE map

The protein excised from gels was digested with trypsin and the resulting peptides were analyzed, Database searching using MASCOT software against MSDB database identified the protein as glucose-1-phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.27) large chain.

本实验首先用 18 cm pH3~10 线性胶条对花粉总蛋白质分析,发现大部分蛋白质都集中在 pH4~7 之间,当上样量为 500 μ g 时,有些蛋白质点存在相互覆盖的现象,后改用 18 cm pH3~10 非线性胶条 (pH 5~7 范围加宽),各蛋白质点之间分离效果较好,并且增加了新的蛋白质点(资料待发表)。

2.2.2 莲型细胞质雄性不育水稻花药蛋白质分析

由于 2DE 技术受本身分辨率限制,尽管本研究

2.2 讨论

2.2.1 如何获得高质量的植物蛋白质双向电泳图谱

双向凝胶电泳的重复性是比较差异样品的关键,除了实验过程中所应用的药品及仪器参数要保持一致之外,好的样品制备是获得好的 2D 电泳图谱的核心。

由于植物组织样品中含有大量的核酸、色素以及次生代谢产物,这些杂质会严重干扰第一向等电聚焦,同时也会影响双向电泳的重复性。本研究曾对比多种蛋白质提取方法,得到本实验所采用的最好方法,可以获得尽可能多的蛋白质点,样品中含杂质少,保证了 IPG 等电聚焦顺利进行(资料待发表),从而也能获得干净清晰的 2D 图谱。

在 2D 胶上检测到将近 2 000 个蛋白质点,但因细胞内含有 3~5 万种蛋白质,所以这些蛋白质并不代表整个水稻花药的蛋白质组。有许多疏水性蛋白及低丰度蛋白质由于受技术本身的限制而未能检测到,还有待于进一步改进技术,获得更大量的蛋白质信息。虽然在膜蛋白制备和双向电泳 pH 梯度范围扩展上有了较大改进,应用极窄 pH 梯度胶分离蛋白质组已有报道^[7,8],但对细胞内的低拷贝蛋白、极端

表 1 肽质指纹图鉴定图 1 中部分差异蛋白质点

Table 1 Rice pollen proteins identified by peptides mass fingerprinting in Fig.1

编号 No.	匹配蛋白质 Protein match to	来源物种 Organism	数据库登录号 Accession number	分子量/等电点 ^{a)} Mr(kD) /pI ^{a)}	各点表达量调节 ^{b)} Spot regulation ^{b)}	
					A	B
1	核酸结合蛋白 Putative nucleic acid binding protein	<i>Oryza sativa</i>	Q7XC34	48.4/5.21	-	+
2	RNA 结合蛋白 Putative RNA-binding protein.	<i>Oryza sativa</i>	Q852C0	97.3/9.34	-	+
3	UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶 UDP-glucuronic acid decarboxylase.	<i>Oryza sativa</i>	Q8W3J0	39.5/7.16	-	+
4	ADP-葡萄糖磷酸转移酶大亚基 glucose-1-phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.27) large chain	<i>Oryza sativa</i>	Q688T8	58.2/6.48	-	+
5	20S 蛋白酸 β4 亚基 20S proteasome beta 4 subunit	<i>Oryza sativa</i>	Q851D9	23.6/5.42	+	-
6	OSJNBa0089N06.5 蛋白 OSJNBa0089N06.5 protein	<i>Oryza sativa</i>	Q7XN77	61.5/7.14	+	-
7	Ca ²⁺ 结合膜联蛋白 Putative calcium-binding protein annexin	<i>Oryza sativa</i>	Q84Q48	35.5/9.44	-	+
8	乙酰辅酶 A 合成酶 Putative acetyl-CoA synthetase	<i>Oryza sativa</i>	Q6H798	78.5/5.69	+	++
9	二氢硫辛酸脱氢酶 Putative lipoamide dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	Q94GU7	58.8/6.35	-	+

a): 相匹配蛋白质的分子量和等电点; b): - 表示蛋白质点缺失, + 表示蛋白质点出现, ++ 表示表达量增加 2 倍以上。

a): Molecular weight and pI of matched protein; b): - indicates that the protein spot is absent, + indicates that the spot is present, ++ indicates more than two-fold increase.

酸性或碱性蛋白、分子量过大或过小蛋白、难溶蛋白(包括膜蛋白)等的电泳分离和检测仍面临很大困难。要克服这些缺点,就要从样品制备、检测和定量分析上做改进。随着生物信息学的发展,高效液相色谱技术、毛细管电泳技术、质谱技术以及蛋白质芯片技术的应用,色谱和毛细管电泳等技术的应用,可以提高蛋白质的分辨率,并可以获得低丰度和疏水性的膜蛋白质^[9,10]。

HL 型细胞质雄性不育水稻为配子体不育,不育系花粉在二核期败育,选用花粉发育单核期花药为实验材料,旨在找到与花粉败育密切相关的蛋白质。

在所鉴定出的蛋白质中有核酸结合蛋白(点 1 和 2, Putative nucleic acid binding protein 和 Putative RNA-binding protein.), UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶(蛋白质点 3, UDP-glucuronic acid decarboxylase), ADP-葡萄糖磷酸转移酶(蛋白质点 4, glucose-1-phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.27) large chain), 蛋白酶(点 5, 20S proteasome beta 4 subunit), Ca²⁺ 结合膜联蛋白(点 7, Putative calcium-

binding protein annexin), 乙酰辅酶 A 合成酶(点 8, Putative acetyl-CoA synthetase) 和二氢硫辛酸脱氢酶(点 9, Putative lipoamide dehydrogenase) 等, 这些蛋白质或酶参与碳代谢, 淀粉合成等多个生理生化反应以及信号转导和蛋白质表达调控等。

其中是参与淀粉合成的蛋白, 该酶催化 α-1, 4-葡聚糖形成反应, 该反应是植物淀粉形成的一个非常重要的步骤。在花粉发育过程中, 可育花粉发育到三核期有大量淀粉沉积, 而不育花粉到三核时完全败育, 显微镜下观测不到花粉沉积。AGPase 大亚基在 YTA 单核期花粉中无表达, 而在 YTB 中却有表达, 说明此酶的存在与花粉的正常发育密切相关, 此酶的缺乏, 使得淀粉的合成受阻, 或者淀粉的积累不够, 导致花粉不能正常发育。

乙酰辅酶 A 合成酶是将细胞内乙酸盐转化成乙酰辅酶 A 的重要酶, 而二氢硫辛酸脱氢酶是组成丙酮酸脱氢酶复合体(pyruvate dehydrogenase complex, PDC) 的三个亚单位之一, PDC 是线粒体内将丙酮酸转换成乙酰辅酶 A 的重要酶。YTA 中

这两个酶的表达量减少或缺失,直接影响细胞内乙酰辅酶 A 的含量。由于乙酰辅酶 A 是 TCA 循环、脂肪酸代谢的重要底物,乙酰辅酶 A 缺乏可能导致 TCA 循环不能正常进行,因而不能产生小孢子发育所需要的足够能量。Yui 等^[11]用将甜菜 PDH-E1(即丙酮酸脱氢酶, pyruvate dehydrogenase) α 亚基 cDNA 片段导入烟草花药糊粉层,以抑制内源 PDH-E1 的表达,结果出现和甜菜 CMS 相似的特征,结果表明花药糊粉层内 PDH 的活性不足可以导致 CMS。

目前,对于细胞质雄性不育机理比较认同的假说是,由于线粒体功能失调,不能提供小孢子发育所需的大量能量,从而导致花粉败育^[12]。而本实验室 Li 等^[3]的实验证明红莲型水稻 CMS 花粉败育过程是细胞程序化死亡(Programmed cell death, PCD)的过程,PCD 过程首先也是线粒体失去功能,植物线粒体在 PCD 中起着同动物线粒体相似的介导细胞死亡信号的作用,线粒体膜完整性消失,细胞色素 C 释放,乃至核膜完整性消失、液泡膜破裂,最后水解酶释放到细胞质中,引起细胞死亡等。本实验结果表明,雄性不育系中线粒体内与乙酰辅酶 A 合成相关的酶缺失或减少,也可能导致线粒体功能失调,影响能量代谢。而不育系中与淀粉合成相关酶缺失以及能量缺乏是引起雄性不育的主要原因。

本研究从蛋白质组学角度初步探讨了水稻红莲型细胞质雄性不育的机理,对水稻该类型细胞质雄性不育的机理有了新的认识,但是该实验结果还有待于更进一步的研究和验证。同时实验中获得了大量的差异表达蛋白质信息,分析这些蛋白质的结构、功能以及蛋白质之间的相互作用,并探讨这些蛋白质和细胞质雄性不育的关系,还有待于更进一步的研究。

参考文献(References):

[1] ZHU Ying - Guo , LI Rong - Qian , WANG Ming - Qian . Biology of Rice Male Sterility. Wuhan: Wuhan University Press, 2000, 100 ~ 123.
朱英国, 利容千, 王明全. 水稻雄性不育生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 2000, 100 ~ 123.

- [2] Yi P, Wang L, Sun Q P, Zhu Y G. Discovery of mitochondrial chimeric gene associated with cytoplasmic male sterility of HL-rice. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(9):744~747.
- [3] Li S Q, Wan C X, Kong J, Zhang Z J, Li Y S, Zhu Y G. Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Functional Plant Biology*, 2004, 31(4):369~376.
- [4] Liu X Q, Xu X, Tan Y P, Li S Q, Hu J, Huang J Y, Yang D C, Li Y, Zhu Y G. Inheritance and molecular mapping of two fertility-restoring loci for Honglian gametophytic cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetic Genomics*, 2004, 27 (5):586~594.
- [5] Görg A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W. Recent developments in two -dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: wide ph gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, 1999, 20(4 ~ 5):712~717.
- [6] XIE Jin-Yun, LI Xiao-Lan, CHEN Ping, CAO Meng-Lin, CHEN Liang-Bi, LIANG Song-Ping. Preliminary proteomics analysis of the proteins of thermo-sensitive genetic sterile rice anther. *Chinene Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 19(2):215~221.
谢锦云, 李小红, 陈平, 曹梦林, 陈良碧, 梁宋平. 温敏核不育水稻花药蛋白质组初步分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19 (2):215~221.
- [7] Babu G J, Wheeler D, Alzate O, Periasamy M. Solubilization of membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis: identification of *Sarcoplasmic reticulum* membrane proteins. *Analytical Biochemistry*, 2004, 325(1):121~125.
- [8] Schubert M, Petersson U A, Haas B J, Funk C, Schröder W P, Kieselbach T. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistr*, 2002, 277 (10):8354~8365.
- [9] Michels D A, Hu S, Schoenherr R M, Eggertson M J, Dovichi N J. Fully automated two-dimensional capillary electrophoresis for high sensitivity protein analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002, 1(1):69~74.
- [10] van Wijk K J. Challeges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology*, 2001, 126(2):501~508.
- [11] Yui R, Iketani S, Mikami T, Kubo T. Antisense inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit in anther tapetum causes male sterility. *Plant Journal*, 2003, 34 (1):57~66.
- [12] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *The Plant Cell*, 2004, 16:154~169.