

低叶绿素 b 水稻突变体类囊体膜的比较蛋白质组学*

陈 熙¹⁾ 崔香菊¹⁾ YING-XIN ZHAO²⁾ 张 炜^{1)**}

¹⁾南京农业大学生命科学学院生物化学与分子生物学系,

南京农业大学-GE Healthcare Biosciences 蛋白质组学合作示范实验室, 南京 210095;

²⁾Department of Chemistry, University of Tennessee, Knoxville, TN37996, USA)

摘要 采用蓝绿温和胶凝胶电泳 (blue-native polyacrylamide gel-electrophoresis, BN-PAGE), 以及改进的第二向 SDS-PAGE 分离了水稻低叶绿素 b 突变体 ZH249-Y 和野生型 ZH249-W 类囊体膜蛋白复合物, 系统比较了突变体和野生型各复合物亚基的表达差异. 结果显示, 第一向 BN-PAGE 分离了 PS I -LHC I、LHC I 缺失的 PS I、ATP 合成酶、细胞色素 b6f、CP43 缺失的 PS II 及 LHC II 六种复合物. 上述各复合物经第二相 SDS-Urea-PAGE 分离后, 利用胶内酶解, 高效液相层析分离肽段, 电喷雾串联质谱鉴定了复合物的亚基. 结合免疫印迹研究, 证明和野生型相比, 突变体光系统 II 捕光天线复合体的表达量适度下降, 但光系统 I 捕光天线破坏严重, 同时光系统 II 核心蛋白和 ATP 合成酶的表达量上升. 研究结果对揭示低叶绿素 b 水稻突变体较高光化学效率和光稳定性的分子基础提供了线索, 同时也表明, 改进的 BN/SDS-PAGE 双向电泳不仅可以有效地分离膜蛋白复合物及亚基, 也可以进行不同生理条件下, 或野生型和突变体之间膜蛋白质组的比较研究.

关键词 蓝绿温和胶凝胶电泳, 低叶绿素 b 突变体, 水稻 (*Oryza sativa* L.), 类囊体膜, 比较蛋白质组学

学科分类号 Q946

叶绿体类囊体膜是植物光合作用光反应的场所, 光化学反应系统由类囊体膜上的多亚基蛋白复合物光系统 I (PS I) 及捕光天线复合物 LHC I、光系统 II (PS II) 捕光天线复合物 LHC II、细胞色素 b6f 和 ATP 合成酶组成. 这些膜蛋白复合物的合成、组装及稳定性显著影响类囊体膜的结构与功能如垛叠程度、基粒数目以及光化学效率^[1]. 因此研究这些复合物的结构与功能, 对于认识类囊体膜稳定性及光化学效率的分子机制、提高农作物的光合效率, 从而达到高产的目的具有重要意义.

以等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 为第一向的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (2D-PAGE), 是目前最常用来分离蛋白质的技术. 但一些分子质量较大的蛋白质 (大于 200 ku), 偏酸偏碱的蛋白质以及疏水性较强的膜蛋白的分离, 采用 2D-PAGE 往往不能得到理想的结果^[2]. 1991 年, Schagger 等^[3]为了研究哺乳动物和真菌线粒体中的多亚基蛋白质复合物, 建立了一种温和凝胶电泳系统, 称之为

蓝绿温和胶凝胶电泳 (blue-native polyacrylamide gel-electrophoresis, BN-PAGE). BN-PAGE 以考马斯亮蓝 G-250 代替 SDS 使蛋白质复合物带负电荷, 用一些温和的去污剂如 dodecylmaltoside (DM), Triton X-100 和毛地黄皂甙 (digitonin) 等增溶膜蛋白复合物, 从而使复合物以近似天然的状态分离. 这种方法后来用于各种生物膜, 包括质膜^[4]、类囊体膜^[5,6]、叶绿体外膜^[7]等膜系统的研究. 在分离类囊体膜蛋白复合物时, 结合叶绿素的蛋白质复合物如 PS I, PS II 呈绿色, 而不含叶绿素的蛋白质复合物如 Cyt b6f, ATP 合成酶呈蓝色, 因此又称之为蓝绿温和胶电泳. 在蛋白质复合物得到分离后, 将第一向的泳道切下进行第二向的 SDS-PAGE, 各个复合物的亚基就能得到分离.

*国家自然科学基金(30400030)和江苏省基础研究计划创新人才基金(BK2004416)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 025-84396556, E-mail: wzhang@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-01-17, 接受日期: 2006-03-02

蓝绿温和胶作为一种很好的电泳技术,在蛋白质复合物的分离以及研究蛋白质与蛋白质相互作用中发挥着越来越重要的作用^[9],但由于在第二向 SDS-PAGE 分离时蛋白质斑点容易发生拖尾和横纹现象,使得其在比较蛋白质组学中的应用鲜见报道.本文对传统的 BN/SDS-PAGE 做了一些改进,即将 BN-PAGE 分离得到的各个复合物条带直接切下,经平衡后插入第二向 SDS-PAGE 的加样孔中,由于位置固定,各条带间的干扰较小,大大减少了拖尾和横纹现象,可以得到清晰锐利的蛋白质条带(斑点),方便了后续的比较分析.

近年张荣铎等^[8~10]在高产水稻田间发现了一个自然条件下产生的低叶绿素 b 突变体(*Oryza sativa* L. cv ZH249-Y),其叶绿素 a/b 比为 4.7.和其他多数低叶绿素 b 突变体常有的性状如类囊体膜稳定性下降、光化学效率小于或接近野生型,耐受强光能力下降等相比,该突变体具有以下两方面的特点和优势: a. 类囊体膜较稳定,对强光的耐受性强于野生型; b. 具有较高的光化学效率,所吸收光能中分配给 PS II 的能量较多,PS II 量子效率提高,因而整个光合电子传递中过剩的激发能较少,导致类囊体膜经受氧化胁迫的程度比野生型轻微.由于具有这些优势,该突变体在叶绿素 b 下降的前提下依然维持可观的田间产量,对比野生型的 0.85 kg/m² 产量,突变体达到 0.68 kg/m² 的产量.目前,对该突变体上述优势性状的分子基础尚缺乏系统研究.本文利用上述改进的 BN/SDS-PAGE 分离了突变体 ZH249-Y 和野生型 ZH249-W 类囊体膜主要蛋白质复合物的各亚基,通过纳升级液相层析偶联电喷雾串连质谱分析(Nano-LC-ESI-MS/MS)鉴定了野生型和突变体之间表达水平发生显著变化的蛋白质斑点.并采用免疫印迹对所得结果进行了验证,研究结果为深入探讨低叶绿素 b 突变体光合机构的稳定性及高效率奠定了基础.同时也证明了改进的 BN/SDS-PAGE 完全可用于比较蛋白质组学的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为水稻(*Oryza sativa* L.)恢复系“镇恢 249”(ZH249-W)和它的隐性单基因低叶绿素 b 突变体(ZH249-Y).将水稻种子于 1g/L HgCl₂ 中消毒 15 min 后,冲洗干净,30℃浸种 48 h,催芽 24 h 后,种植于培养箱,光周期 12 h(光)/12 h(暗),日夜温度为 30℃(日)/25℃(夜),生长至第 4 叶全展后

用于实验.

1.2 叶绿体的提取和类囊体的制备

取 4 叶全展的水稻叶片各 20 g,在含有 330 mmol/L 山梨醇, 50 mmol/L Hepes-KOH, pH 7.6, 2 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L EDTA-Na₂, 5 mmol/L 抗坏血酸的匀浆液中用组织捣碎机捣碎,4 层纱布过滤; 300 g 离心 1 min 去除细胞碎片,上清经 1 000 g 离心 2 min,得到的沉淀悬浮于 330 mmol/L 山梨醇, 50 mmol/L Hepes-KOH, pH 7.6, 1 mmol/L DTT 的溶液中,将悬浮液置于 35%, 70% 的 Percoll 梯度上, 10 500 g 离心 10 min,在 Percoll 梯度的中间得到完整的叶绿体.用含 50 mmol/L Hepes-KOH, pH 7.6, 2 mmol/L MgCl₂ 低渗缓冲液将完整叶绿体在冰上涨破, 14 000 g 离心 3 min,得到的沉淀为类囊体,分装后-80℃保存备用^[11].

1.3 蓝绿温和胶电泳

1.3.1 样品增溶.类囊体悬浮于含 25 mmol/L BisTris-HCl, 20%甘油, pH 7.0 的悬浮液中,用等体积含不同浓度去污剂(DM, Triton X-100 和毛地黄皂甙等)的悬浮液冰上增溶 30 min, 14 000 g 离心 3 min,上清加入 1/10 体积的溶液(1%考马斯亮蓝 G-250, 100 mmol/L BisTris-HCl, pH 7.0, 30%蔗糖, 500 mmol/L 6-amino-n-caproic acid)后混匀,上样进行电泳^[5, 6, 12].

1.3.2 凝胶制作.配制 5%~13.5%梯度的分离胶, 4%的浓缩胶,凝胶中含有 50 mmol/L BisTris, pH 7.0, 500 mmol/L 6-amino-n-caproic acid. 4℃保存过夜,第二天进行电泳.

1.3.3 温和电泳.电泳开始时电极缓冲液为含 0.01%考马斯亮蓝 G-250, 50 mmol/L Tricine, 15 mmol/L BisTris 的阴极缓冲液和含 50 mmol/L BisTris-HCl, pH 7.0 的阳极缓冲液.当前端考马斯亮蓝 G250 走至分离胶的 1/2 至 2/3 处时,阴极端换为含 50 mmol/L Tricine, 15 mmol/L BisTris 的缓冲液.电泳在 4℃下进行.

1.3.4 SDS-Urea-PAGE.第一相胶条切下,经尿素/β-巯基乙醇样品处理液(6 mol/L 尿素, 5% SDS, 10% β-巯基乙醇, 50 mmol/L Tris·HCl, pH 7.0, 20%甘油)室温下平衡 20 min,去离子水清洗 3 次,从胶条上切下各复合物条带,插入凝胶加样孔中,进行第二向电泳,即 SDS-Urea-PAGE,浓缩胶和分离胶中均含有 6 mol 尿素.凝胶配置及电泳按常规方法进行.

1.4 Nano-LC-ESI-MS/MS

1.4.1 酶解消化.

考马斯亮蓝染色凝胶的脱色: 将电泳染色后凝胶中的蛋白质点切成 $1\sim 2\text{ mm}^2$ 大小, 清洗几次后用含 50% 乙腈, 25 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.0) 溶液浸泡胶块, 振荡 20 min 后弃去溶液, 重复 $1\sim 2$ 次至胶块中蓝色褪尽.

酶切: 将脱色好的凝胶在含 10% 乙酸, 40% 甲醇的溶液中固定, 水漂洗后加入乙腈脱水, 脱水胶块加入胰蛋白酶溶液 (10 mg/L Trypsin, 50 mmol NH_4HCO_3 , pH 8.0) 再水化, 37°C 保温过夜.

肽段抽提: 酶解胶块加 $40\text{ }\mu\text{l}$ 5% TFA 于 40°C 保温 1 h, 吸出上清, 加入 $40\text{ }\mu\text{l}$ 5% TFA, 50% 乙腈于 37°C 保温 1 h, 小心吸出上清, 抽真空干燥, 4°C 保存待用.

1.4.2 质谱分析.

HPLC-ESI-MS/MS 分析采用 ThermoFinnigan 公司的电喷雾串联质谱仪 LCQ Deca XP 偶联在线 HPLC 系统 (Agilent 公司) 和纳升喷雾源. 抽提出的干燥肽段用溶液 A (2% 乙腈, 97.9% 水, 0.1% 甲酸) 溶解, C18 脱盐, 脱盐后用 5%~90% 的溶液 B (90% 乙腈, 9.9% 水, 0.1% 甲酸) 洗脱. 进样流速 $1\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$, 洗脱流速 $0.1\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$, 洗脱肽段直接进行质谱分析, LCQ 选取 data-dependent 模式, 得到的质谱数据用 SEQUEST 程序检索 NCBI 水稻数据库, 一级质谱 MS 和二级质谱 MS/MS 的质量容差分别选取 $\pm 3.0\text{ u}$ 和 $\pm 1.0\text{ u}$ ^[13].

1.5 免疫印迹

用浓缩胶和分离胶都含有 6 mol/L 尿素的 SDS-PAGE 分离突变体和野生型中的类囊体膜蛋白 (15 μg 蛋白质上样量), 然后用 Bio-Rad mini trans-blot electrophoretic transfer cell 将分离的蛋白质电转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.0, 0.05% Tween 20) 室温封闭 1 h, 加入一抗 (AgriSera 公司) 4°C 反应过夜, 经 TBST 清洗后, 用辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗 (Sigma 公司) 室温孵育 1.5 h, 最后用 TBST 清洗. ECL 试剂盒 (KPL 公司) 检测.

2 结 果

2.1 蓝绿温和胶电泳分离类囊体膜蛋白复合物

我们采用了不同浓度的去污剂, 包括 DM、Triton X-100 和毛地黄皂甙等来增溶类囊体膜, 发

现终浓度为 2% 的 DM 能取得最佳的结果. 从图 1 中可以看出, 通过蓝绿温和胶电泳, 有 8 条主要的条带被清晰地分离出来. 通过后面的第二向 SDS-PAGE 和质谱分析, 确定重要的条带分别为 PS I -LHC I、LHC I 缺失的 PS I、ATP 合成酶和细胞色素 b6f 复合物、CP43 缺失的 PS II 及 LHC II 的三聚体和单体. 一些超级复合物 (supercomplexes) 也被分离出来, 由于其丰度较低, 在第二向中很难得到明显的蛋白质斑点, 因此无法进行质谱分析. 但根据文献报道, 可以判断这些超级复合物主要是一些 PS I -PS II, PS I -PS I 等分子质量在 1 000 ku 以上的蛋白质复合物.

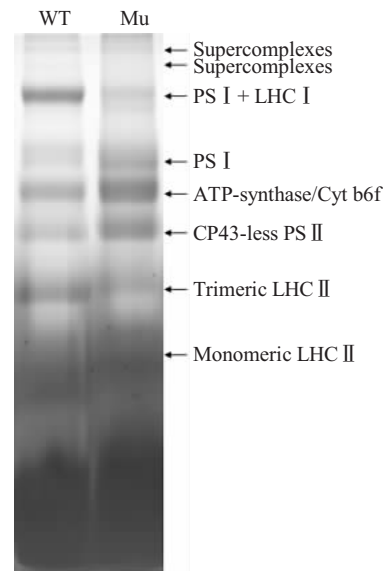


Fig. 1 BN-PAGE analysis of thylakoid membrane from Zhenhui-249Y mutant (Mu) and its wild type (WT)

Thylakoid membranes from WT and Mu were solubilized with 2% DM and separated by BN gel electrophoresis. Each lane was loaded with 100 μg of solubilized protein.

2.2 野生型和突变体类囊体膜蛋白复合物亚基的比较

从图 1 可以看出, 和野生型相比, 突变体 PS I -LHC I 及 LHC II 的量显著下降, 而 ATP 合成酶 / 细胞色素 b6f 复合物、CP43 缺失的 PS II 的表达量上升. 为了进一步比较这些复合物中各亚基的表达差异, 将野生型和其突变体经 BN-PAGE 分离后的各复合物条带切下, 插入第二向的 SDS-Urea-PAGE 凝胶加样孔中, 电泳结果见图 2.

对图 2 中分离出的蛋白质点经胶内酶解, 肽段分离, 电喷雾串联质谱分析, 所得结果采用 SEQUEST 软件检索 NCBI 蛋白数据库, 鉴定结果见表 1.

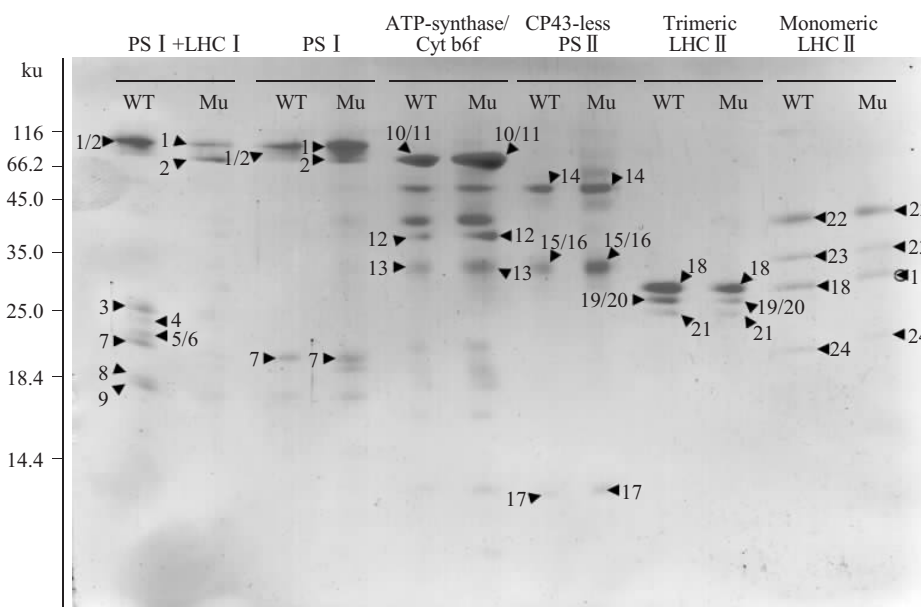


Fig. 2 Second dimensional SDS-PAGE of the thylakoid membrane complexes from Zhenhui-249Y (Mu) and its wild type (WT)

Identified protein spots were numbered in the Figure 2 and Table 1.

Table 1 Proteins identified by nano-HPLC-ESI-MS/MS from the spots in Figure 2

Band number	Apparent <i>Mr</i> /ku	Protein name	NCBI reference	No. of Peptides
1	82	Photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A1, psaA(PsaA)	gi:42795555	8
2	70	Photosystem I P700 apoprotein A2, psaB(PsaB)	gi:42795554	10
3	25	LHCA3*1; chlorophyll binding(LHCA3)	gi:15219941	2
4	23	LHCA1(LHCA1)	gi:30694146	4
5	21	LHCA2; chlorophyll binding (LHCA2)	gi:15233120	2
6	21	Chloroplast light-harvesting complex I protein precursor Lhca4 (LHCA4)	gi:63029283	3
7	20	Putative photosystem I reaction center subunit II, chloroplast Precursor(Photosystem I 20 kDa subunit) (PS I -D) (PsaD)	gi:50948511	6
8	17	Putative photosystem I reaction center subunit IV (PsaE)	gi:50936537	2
9	16	Photosystem-I F subunit precursor(PsaF)	gi:3885892	2
10	65	ATP synthase CF1 alpha chain; atpA (AtpA)	gi:42795552	26
11	65	ATP synthase beta subunit (AtpB)	gi:6815115	12
12	34	Putative ATP synthase gamma chain 1, chloroplast (H(+)-transporting two-sector ATPase/F(1)-ATPase/ATPC1)(AtpC)	gi:50509502	2
13	32	Cytochrome B6 (PetB)	gi:669082	3
14	46	Photosystem II 47kDa protein _ chloroplast (CP47)	gi:50725585	2
15	32	Chloroplast photosystem II 32kD protein (D1)	gi:42409133	2
16	32	Photosystem II protein D2; psbD (D2)	gi:42795476	2
17	10	Cytochrome b559 alpha chain; psbE (PsbE)	gi:42795566	3
18	27	Chlorophyll a/b-binding protein CP26 precursor - maize (CP26)	gi:62733871	7
19	26	Putative chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHC II type I CAB) (LHCP)(Lhcb1)	gi:50252362	2
20	26	Chlorophyll a-b binding protein (LHC II type II CAB) (LHCP) (Lhcb2)	gi:46576667	2
21	25	Putative chlorophyll A-B binding protein of LHC II type III, chloroplast precursor (CAB) (Lhcb3)	gi:34393384	3
22	42	PS II 43kDa protein (CP43)	gi:11965	7
23	33	Chlorophyll a/b protein CP29, photosystem II subunit CP29 (CP29)	gi:1683497	4
24	20	Chlorophyll a/b-binding apoprotein CP24 precursor (CP24)	gi:733458	2

从图 2 及质谱鉴定结果可见, LHC I 在野生型和突变体之间的差异十分显著, 突变体 LHC I 的四个亚基 Lhca1~Lhca4 (蛋白质点 3, 4, 5, 6) 的表达比野生型有显著下降(图 2, 蛋白质点 3~6). 同时突变体 LHC II 各组分均较野生型有下降, 但下降幅度不如 LHC I 显著, 表达量约为野生型的 1/3, 这与前期报道相一致^[14]. 与捕光天线含量下降相反, 突变体 PS II 反应中心蛋白质表达量显著上升, 如 CP47(点 14), CP43(点 22), 尤其是 D1 蛋白在突变体中上升非常明显. 突变体 ATP 合成酶 α (点 10)、 β (点 11)、 γ (点 12) 亚基含量高于野生型. 一些反应中心小亚基如 *psaE*, *psaF*, *psbE* 等也被分离到, 它们的表达在野生型和突变体之间也有显著差异.

2.3 免疫印迹

为了进一步验证类囊体复合物各亚基在 ZH249-W 及其突变体中的表达水平, 将分离到的类囊体进行了免疫印迹, 结果见图 3. 光系统 I 捕光天线的四个亚基中有三个 Lhca1, Lhca2 和 Lhca4 在突变体中较之野生型显著下降, 光系统 II 的捕光天线 Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 和 CP26 也有所下降, 但幅度较小, 同时 ATP 合成酶的 β 亚基, CP47 以及光系统 II 的核心蛋白 D1 在突变体中比野生型表达量有较多的上升. 这些结果与上述 BN/SDS-PAGE 的结果吻合.

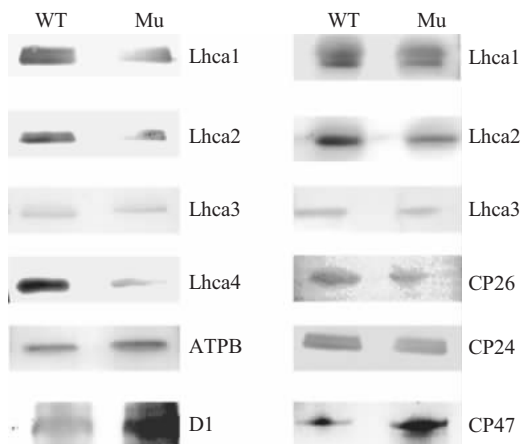


Fig. 3 Western-blot analysis of protein differential expression between Zhenhui-249Y (Mu) and its wild type (WT)

Same amount of proteins (15 μ g) from WT and Mu thylakoid membrane were loaded for analysis.

3 讨 论

普通的双向电泳作为非常有效的蛋白质分离技术被运用到蛋白质研究中. 一般来说, 利用双向电泳, 水溶性的蛋白质比较容易得到分离, 而那些疏水性较强的膜蛋白特别是一些多次穿膜蛋白很难得到分离, 对模式生物基因组的预测分析表明, 大约有 25% 的基因编码产物是膜蛋白^[15]. 这也就需要有其他的方法来对那些疏水性的蛋白质进行分离和研究.

蓝绿温和胶电泳系统在电泳之前在蛋白质样品中加入考马斯亮蓝 G-250, 使蛋白质带上负电荷, 同时不破坏蛋白质复合物的结构, 使蛋白质复合物在近似天然的状态下分开^[16]. 如图 2 所示, 这种电泳方法可以在一个泳道上将类囊体膜蛋白复合物中的光系统 I、光系统 II、细胞色素 b6f 复合物、ATP 合成酶、捕光天线 II 等分开. 说明利用蓝绿温和胶电泳可以达到分离疏水性极强, 分子质量大的膜蛋白复合体的目的. 同时由于第一向只能分离分子质量大于 100 ku 的复合物, 因此制备类囊体时无须进行十分严密的纯化, 因为杂蛋白通常不会进入第二向.

目前, 利用蓝绿温和胶分离类囊体膜蛋白复合物, 再利用第二向的 SDS-Urea-PAGE 将各个蛋白质复合体的亚基进一步分离, 已经成为类囊体膜蛋白质组学研究的重要工具. 在以往普通的 BN/SDS-PAGE 中, 由于第一向蓝绿胶中分离的复合物条带之间的距离太小, 在第二向的分离中很容易出现蛋白质斑点的重叠, 而且由于第一向往第二向转移平衡时 β -巯基乙醇或 DTT 处理浓度很高, 导致第二向容易出现条带的横纹和拖尾现象, 这就严重影响了不同条件或处理下样品的比较, 也为后续的质谱鉴定带来干扰^[17].

而本实验中采取区别于普通 BN/SDS-PAGE 方法, 将第一向蓝绿胶中的复合物条带切下进行第二向的 SDS-PAGE 分离, 可以明显降低上述影响(图 2). 再利用 Nano-LC-ESI-MS/MS 对蛋白质进行鉴定, 就能够比较蛋白质复合物中各个亚基之间的差异. 这种差异用蛋白质印迹的方法进一步验证, 结果与 BN/SDS-PAGE 吻合, 证明了本文所使用的将蓝绿胶中的电泳条带切出再做 SDS-PAGE 分离, 可以应用于比较蛋白质组学的研究.

高等植物中, 叶绿素 b 均结合在 LHC 复合体如 LHC I 和 LHC II 上, 因此随着叶绿素 b 的减少 LHC 含量下降是一个普遍现象. 但值得注意的是, 本研究中突变体 LHC I 含量的下降幅度超过了 LHC II, 这必然导致吸收光能更多地向 PS II 分配. 与捕光天线含量下降相反, 突变体 PS II 反应中心蛋白 CP47, CP43, D1 和 D2 蛋白表达量上升, 尤其是 D1 蛋白在突变体中上升非常显著. D1 蛋白的显著升高解释了突变体电子传递速率较快的现象, 也是光能主要流向 PS II 后的必然结果, 否则突变体 PS II 的光损伤和氧化胁迫会更加严重. 除了叶绿素结合蛋白, 我们还观察到突变体 ATP 合成酶 α 、 β 、 γ 亚基含量高于野生型. 这一现象的一个合理推测就是突变体叶绿体基质中 ATP 的水平高于野生型. 已有报道证明, ATP 的合成成为强光下 D1 蛋白的周转(turn over), 即光破坏后的从头合成提供能量^[8]. 因此我们认为, 突变体中 ATP 合成酶的增加与 D1 蛋白的加速周转, 进而提高 PS II 的稳定性是彼此相关的.

第二向分离中还发现 psaF, psbE 等反应中心小亚基, 但由于这些亚基的功能尚未未知, 因此对它们在突变体光合特性中发挥的作用还有待更多的研究.

综上所述, 本研究结果对揭示低叶绿素 b 水稻突变体较高光化学效率和光稳定性的分子基础提供了线索, 同时本实验中所采用的改进的 BN/SDS-PAGE 可以更直观地比较类囊体膜中各个蛋白质复合物亚基的表达差异, 生物质谱对蛋白质进行鉴定, 为类囊体膜等生物膜系统的比较蛋白质组学提供了更好的思路.

致谢 感谢南京农业大学生命科学学院张荣铨教授提供水稻品种 ZH249-W 和 ZH249-Y.

参 考 文 献

- Dekker J P, Boekema E J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1706** (1~2): 12~39
- Eubel H, Braun H P, Millar A H. Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods*, 2005, **1** (1): 11~23
- Schagger H, Vonjagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane-protein complexes in enzymatically. *Active form Anal Biochem*, 1991, **199** (2): 223~231
- Kjell J, Rasmussen A G, Larsson H, *et al.* Protein complexes of the plant plasma membrane resolved by blue native PAGE. *Physiol Plantarum*, 2004, **121** (4): 546~555
- Aro E M, Suorsa M, Rokka A, *et al.* Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J Exp Bot*, 2005, **56** (411): 347~356
- Ciambella C, Roepstorff P, Aro E M, *et al.* A proteomic approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics*, 2005, **5** (3): 746~757
- Küchler M, Decker S, Hörmann F, *et al.* Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J*, 2002, **21** (22): 6136~6145
- 戴新宾, 曹树青, 许晓明, 等. 低叶绿素 b 高产水稻突变体及其光合特性的研究. *植物学报*, 2000, **42** (12): 1289~1294
Dai X B, Cao S Q, Xu X M, *et al.* *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42** (12): 1289~1294
- 许晓明, 张荣铨, 唐运来. 低叶绿素含量对突变体水稻吸收光能分配特性的影响. *中国农业科学*, 2004, **37** (3): 339~343
Xu X M, Zhang R X, Tang Y L. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, **37** (3): 339~343
- 龚红兵, 陈亮明, 刁立平, 等. 水稻叶绿素 b 减少突变体的遗传分析及其相关特性. *中国农业科学*, 2001, **34** (6): 686~689
Gong H B, Chen L M, Diao L P, *et al.* *Scientia Agricultura Sinica*, 2001, **34** (6): 686~689
- Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A. *Cells: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 362~367
- 李贝贝, 郭进魁, 周云, 等. 一种分析叶绿体类囊体膜色素蛋白复合物的蓝绿温和胶电泳系统. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (4): 639~643
Li B B, Guo J K, Zhou Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (4): 639~643
- Zhang W, Zhou G, Zhao Y, *et al.* Affinity enrichment of plasma membrane for proteomics analysis. *Electrophoresis*, 2003, **24**(16): 2855~2863
- Dai X B, Xu X M, Kuang T Y, *et al.* Photoinhibition characteristics of a low chlorophyll b mutant of high yield rice. *Photosynthetica*, 2003, **41** (1): 57~60
- Jones D T. Do transmembrane protein superfolds exist?. *FEBS Lett*, 1998, **423** (3): 281~285
- Rexroth S, Meyer J M W, Tittingdorf Z, *et al.* Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis*, 2003, **24** (16): 2814~2823
- Simposon R J. *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. 717~724
- Allakhverdiev S I, Nishiyama Y, Takahashi S, *et al.* Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis*. *Plant Physiol*, 2005, **137** (1): 263~273

Comparative Proteomics of Thylakoid Membrane From a Low Chlorophyll b Rice and Its Wild Type*

CHEN Xi¹⁾, CUI Xiang-Ju¹⁾, YING-XIN ZHAO²⁾, ZHANG Wei^{1)**}

¹⁾Biochemistry & Molecular Biology, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing Agricultural University-GE
Healthcare Biosciences Proteomics Research Cooperative Demonstration Laboratory, Nanjing 210095, China;

²⁾Department of Chemistry, University of Tennessee, Knoxville, TN37996, USA)

Abstract An improved two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel-electrophoresis (BN/SDS-PAGE) followed by nano-HPLC-ESI-MS/MS was used to study thylakoid membrane protein complexes between a low chlorophyll b rice mutant (*Oryza sativa* L. Zhenhui 249Y) and its wild type (*Oryza sativa* L. Zhenhui 249W). The PS I -LHC I super-complexes, LHC I -less PS I , ATP synthase, Cytochrome b6f, CP43-less PS II , trimeric and monomeric LHC II were resolved. 24 proteins, which belong to the subunits of four major photosynthetic apparatus were identified. Comparative study indicated that the mutant had moderately decreased amount of LHC II , greatly decreased amount of LHC I , and increased amount of PS II reaction center and ATP synthase. Western blotting verified BN/SDS-PAGE analysis. These results provided clues about molecular foundation of higher photochemical efficiency and light stability of the mutant, and showed that the improved BN/SDS-PAGE is suitable for not only membrane protein complex separation, but also for comparative study of complex subunits in different physiological condition or between mutant and its wide type.

Key words blue native polyacrylamide gel electrophoresis, low chlorophyll b mutant, *Oryza sativa* L., thylakoid membrane, comparative proteomics.

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30400030) and The Grant to Innovative Young Scholars of Jiangsu Province (BK2004416).

**Corresponding author . Tel: 86-25-84396556, E-mail: wzhang@njau.edu.cn

Received: January 17, 2006 Accepted: March 2, 2006