

叶露幻,郑宝刚,沈唯军,等. 水稻剑叶类囊体膜蛋白复合物的蓝绿温和胶电泳分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):42-45.

水稻剑叶类囊体膜蛋白复合物的蓝绿温和胶电泳分析

叶露幻¹, 郑宝刚¹, 沈唯军¹, 陈国祥¹, 吕川根²

(1. 南京师范大学生命科学学院植物资源与环境研究所, 江苏南京 210023; 2. 江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏南京 210014)

摘要:以水稻两优培九剑叶为材料,通过蓝绿温和胶电泳对其类囊体膜蛋白复合物进行分析。亚细胞组分是植物蛋白质组学研究的重点,而高度疏水且结构复杂的膜蛋白复合物在传统二维电泳中难以得到很好分离,故采用纯化完整叶绿体,温和去污剂增溶膜蛋白,非变性梯度凝胶电泳的方法,直观地分离并展示了两优培九水稻剑叶类囊体9条蛋白质复合物条带,并显示出丰度与组成的差异。以蓝绿温和胶为一向,含尿素的变性电泳为二向的二维电泳将两优培九水稻剑叶类囊体膜蛋白复合物分离为亚基,得到51个蛋白质点,为对水稻光合机构响应逆境等变化的蛋白质组学研究提供方法。

关键词:水稻剑叶;类囊体膜;蛋白质复合物;蓝绿温和胶电泳

中图分类号: S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0042-04

水稻作为重要的粮食作物和模式植物,关于其光合作用的研究已从形态结构、生理生化和细胞水平深入到蛋白质与基因的分子水平,叶绿体是植物进行光合作用的主要场所,探究其组成功能特性在对作物的特性分析、改良育种以及对植物的发育进化研究中都起到关键作用。

蛋白质组学(Proteomics)随着模式植物基因组测序完成,以及高通量蛋白质分析技术的突破,可从整体角度分析细胞内蛋白质组成的动态变化、表达水平与修饰状态,对了解蛋白质的互作与联系,揭示其功能与细胞活动规律具有重要意义^[1]。目前植物蛋白质组学已经深入到亚细胞水平,即研究细胞器内表达的蛋白质组,叶绿体因其特殊的功能及占整个植物组织10%~25%的各种结构和功能蛋白质而成为研究的焦点^[2]。当前蛋白质组学仍然主要依托于以凝胶电泳为主的蛋白质分离技术、以质谱为基础的蛋白质鉴定技术和生物信息学^[3]。最常用来分离蛋白质的技术是以等电聚焦(Isoelectric focusing, IEF)为第一向的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(IEF/SDS-PAGE),即通常所说的2-DE。电泳后的凝胶经染色呈现二维分布图,水平方向反映蛋白亚基在等电点上的差异,垂直方向反映它们在分子量上的异同。随着固相化pH梯度(即IPG胶条)、银染法、DIGE荧光染色技术等方法上的改进,使得2-DE的载样量、灵敏性、重复性和精确度都大大提高。目前2-DE已经成功运用于分离拟南芥叶绿体囊腔蛋白^[4]、豌豆叶片类囊体膜周蛋白^[5]和水稻叶绿体全蛋白^[6]等。然而尽管分辨率很高,但IEF/SDS-PAGE对于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往往不能得到理想的结果^[7]。

类囊体是存在于叶绿体基质中的复杂的膜结构,光合作用的光能吸收、传递和转化过程是在镶嵌于类囊体膜中的具有一定分子排列及空间构象的色素蛋白质复合物及相关的电子载体中完成的,最主要的4种膜蛋白复合物:光系统I(photosystem I, PS I)、光系统II(photosystem II, PS II)、细胞色素b6/f复合体(Cytochrome b6/f complex, Cyt b6/f)和ATP合酶复合体(ATP synthase complex, ATPase),三维结构显示PS II主要分布在基粒类囊体上,PSI和ATPase主要分布在基质类囊体上,Cyt b6/f则均匀分布在这2种类型的类囊体上^[8]。正是这种多跨膜疏水性大分子结构,在运用2-DE分离时类囊体膜蛋白无法直接很好地被含高浓度尿素和硫脲的裂解液提取并保持水溶状态,并且容易在等电聚焦过程中发生聚集^[9];而1D SDS-PAGE分析类囊体膜蛋白则会直接变性式破坏复合体的大分子结构,丢失大量结构和互作方面的信息。

为解决这些局限性,非变性电泳技术已发展为当前蛋白质复合体分离的主要方法,其中Schägger等建立的蓝绿温和凝胶电泳系统(blue-native polyacrylamide gel-electrophoresis, BN-PAGE),最初用于研究哺乳动物和真菌线粒体中的多亚基蛋白质复合物,可以在凝胶中直接展示各种丰度的膜蛋白,目前在类囊体膜蛋白分离中运用最普遍^[10]。BN-PAGE以考马斯亮蓝G-250D代替SDS使蛋白质复合物带负电荷,用温和的去污剂,如Dodecylmaltoside(DM)、TritonX-100和毛地黄皂苷等增溶膜蛋白,在类囊体蛋白复合物的分析研究中,可以分离10 000到10 000 000的蛋白质,比凝胶过滤和蔗糖密度超速离心更高效,并使复合物以近似天然形态被分离,可以进行多样的后续分析。

本研究运用并优化二维SDS/BN-PAGE方法对水稻剑叶类囊体膜蛋白复合物进行分离,为在蛋白质组学水平上分析水稻叶片光合作用机制提供方法。

1 材料与方法

1.1 提取完整叶绿体

水稻杂交组合两优培九由江苏省农业科学院粮食作物研

收稿日期:2013-03-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31271621);江苏省普通高校自然科学基金研究计划(编号:11KJA180001);江苏省高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介:叶露幻(1988—),女,江苏无锡人,硕士研究生,从事植物光合生理生化研究。E-mail: yeluhuan@hotmail.com。

通信作者:陈国祥,博士,教授,博士生导师。E-mail: gxchen@njnu.edu.cn。

究所提供,在剑叶全展 10 d 左右进行采集,参照 Chen 等的方法^[11]并加以改进提取完整叶绿体。叶片用蒸馏水洗净擦干 4 ℃ 暗处放置过夜耗尽淀粉粒,去除中脉剪碎,加入 5 倍体积提取缓冲液 (330 mmol/L Sorbitol, 50 mmol/L HEPES - KOH pH 值 7.8, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L NaHCO₃, 0.05% BSA, 5 mmol/L Ascorbic acid), 低温条件下用高速组织捣碎机进行 5 次 2 s 研磨,4 层纱布过滤,200 g 离心 2 min 去除组织沉淀,2 000 g 离心 5 min 得到粗叶绿体沉淀。用悬浮缓冲液 (330 mmol/L Sorbitol, 50 mmol/L HEPES - KOH pH 值 7.6, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT) 悬浮叶绿体并配制 Percoll 梯度介质,将叶绿体悬浮液铺于介质表面,用 Beckman L8 离心机 SW28 水平转子 4 500 g, 4 ℃ 离心 10 min 抽取中间绿色层,再用悬浮缓冲液洗涤 1~2 次,充分去除 Percoll,得到沉淀即为完整叶绿体颗粒。

1.2 类囊体膜蛋白样品的制备

完整叶绿体在低渗裂解液 (50 mmol/L HEPES - KOH pH 值 7.6, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF) 中冰浴 30 min 涨破,14 000 g 离心 3 min 得到类囊体膜沉淀,用 5 倍体积洗涤缓冲液 (50 mmol/L BisTris - HCl pH 值 7.0, 330 mmol/L Sorbitol) 洗涤 1~2 次,按 Porra 等^[12]的方法测定叶绿素含量。用适量样品缓冲液 (25 mmol/L BisTris - HCl pH 值 7.0, 20% Glycerol) 悬浮类囊体膜并调整叶绿素浓度为 1 mg/mL,缓慢滴加等体积含 2% (质量体积比) DM 的样品缓冲液,轻轻混匀冰浴增溶 30 min,可见悬浊液慢慢变为澄清,15 000 g 离心 10 min 去除不溶物质,得到深绿色上清液即为类囊体膜蛋白溶液,按 Bradford 法^[13]测定蛋白质浓度。

1.3 一向 Blue - native PAGE

采用北京六一仪器厂 DYCZ - 28A 型单板夹芯式垂直电泳仪进行制胶和蓝绿温和胶电泳。使用 Amersham SG30 梯度混合器灌制 10 cm × 10 cm, 1 mm 厚度 5% ~ 12% 非变性梯度聚丙烯酰胺分离胶和 4% 浓缩胶,凝胶中均含有 32 : 1 Arc/Bis, 50 mmol/L BisTris pH 值 7.0 和 500 mmol/L 6 - amino - N - caproic acid, 分离胶含 10% Glycerol, 制胶后在室温聚合,然后在保湿条件下 4 ℃ 存放过夜。类囊体膜蛋白样品中加入 1/10 体积上样缓冲液 (5% Coomassie brilliant blue G250, 100 mmol/L BisTris - HCl pH 值 7.0, 500 mmol/L 6 - amino - N - caproic acid, 30% Glycerol) 混匀后上样电泳。电泳中先使用含 0.01% Coomassie brilliant blue G250 的阴极缓冲液 (15 mmol/L BisTris, 50 mmol/L Tricine, pH 7.0), 当电泳蓝色前沿前进到分离胶 1/2 距离时更换为不含 G250 的阴极缓冲液,阳极缓冲液始终为 50 mmol/L BisTris - HCl。电泳时需接入冷却水系统保证 4 ℃ 条件。

1.4 二向 SDS - Urea - PAGE

灌制 10 cm × 10 cm, 1.5 mm 厚度 15% SDS - Urea - 聚丙烯酰胺凝胶,在普通变性凝胶中加入 6 mol/L Urea。一向 BN - PAGE 结束后,立即切下进行二向分离,放入 5 ml 平衡缓冲液 (50 mmol/L Tris - HCl pH 值 6.8, 6 mol/L Urea, 4% SDS, 5% β - mercaptoethanol, 20% Glycerol) 中平衡 30 min, 结束后用去离子水冲洗胶条 3 次,去除巯基乙醇。将处理过的胶条推入胶板紧贴分离胶表面,以低熔点琼脂糖封胶液封胶,进行 4 ℃ 电泳。

1.5 凝胶分析

一维 Blue - native PAGE 在电泳过程中即可显现条带,电泳后直接用脱色液脱去背景蓝色后扫描图像,使用 Bio - Rad Quantity One V4. 6. 2 进行电泳条带分析;二维 BN/SDS - PAGE 凝胶使用常规考马斯亮蓝染色,脱色后进行扫描。

2 结果与分析

2.1 一维 Blue - native PAGE 分离类囊体膜蛋白复合物

因为在电极缓冲液中加入了考马斯亮蓝, BN - PAGE 过程将电泳与染色同时进行,电泳后结合叶绿素的蛋白质复合物呈绿色,不含叶绿素的蛋白质复合物呈蓝色。水稻两优培九剑叶类囊体膜以 1% (质量体积比) DM 增溶膜蛋白,在 5% ~ 12% 梯度 BN - PAGE 分离到了 9 条主要的蛋白质复合物条带,其中 3 条呈现蓝绿色,3 条呈现蓝色,3 条呈现绿色 (图 1)。电泳采用 Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis 作为相对分子量标准。利用 Bio - Rad Quantity One V4. 6. 2 进行表观分子量预测,参考 Shao 等^[14]及陈熙等^[15]的研究,对各复合物条带的鉴别结果见表 1。

表 1 两优培九剑叶类囊体膜蛋白复合物鉴别结果

编号	条带颜色	复合物名称	表观分子量(ku)
I	蓝绿	Supercomplexes	749
II	蓝绿	PS I core + LHC I	606
III	蓝	F ₀ F ₁ - ATPase	578
IV	蓝绿	PS I core	423
V	蓝	F ₁ - ATPase / Cytb ₆ f	315
VI	蓝	PS II core	228
VII	绿	LHC II ₃ (Trimeric)	185
VIII	绿	LHC II ₂ (Dimeric)	165
IX	绿	LHC II ₁ (Monomeric)	111

在类囊体膜蛋白中,光系统核心主要含有叶绿素 a 而呈现蓝绿色,捕光复合物因含有较多的叶绿素 b 而更偏向黄绿色。其中 PS II 的捕光系统围绕在核心复合体周围,一般呈现分离状态,LHC II 是类囊体膜上结合色素最多且含量最高的蛋白质复合物,在活体中多以三聚体存在,离体后会出现解聚;而 PS I 的捕光系统则位于其中心,在分离过程中与核心复合体的分离程度在个体间有较大差别^[16]。作为比较,我们选用了一种与两优培九没有亲源关系的水稻品种 R299 进行试验,同时以 40 μg 蛋白质进行 BN - PAGE,图 2 显示,两优培九剑叶 PS I 出现明显的两条带,分别在 606 000 和 423 000 位置,而 R299 仅在略低于 606 000 处出现 1 条高丰度条带,可以推测 BN - PAGE 中 R299 的 PS I 核心复合体与捕光天线没有明显分离。另外,在高分子量区域可以分离到一些丰度很低的超级复合物 (Supercomplexes),在两优培九中出现极少,而 R299 中则有明显的两个条带,根据文献报道,这些大分子量蛋白可能是一些 PS I - PS II、PS I - PS I 多聚体^[8]。ATPase 由 F1 和 F0 两部分组成,其中 F1 嵌于膜内,F0 暴露于叶绿体基质侧,两者在 BN - PAGE 中出现分离。

2.2 二维 BN/SDS - PAGE 分离各复合物亚基

两优培九剑叶类囊体膜各蛋白质复合物经过 BN - PAGE 分离后,用二维变性电泳继续解析复合物的组分,高浓度的尿

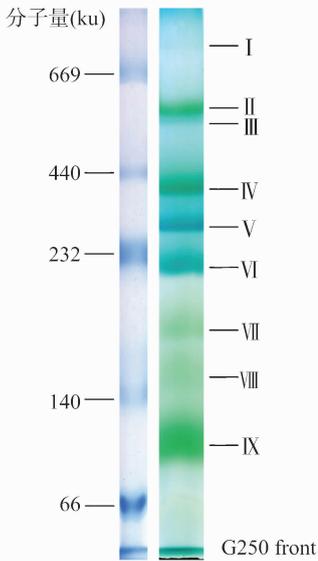


图1 两优培九剑叶类囊体膜蛋白复合物的BN-PAGE分离

素通过破坏疏水键和离子键使蛋白质去折叠,增加了膜蛋白

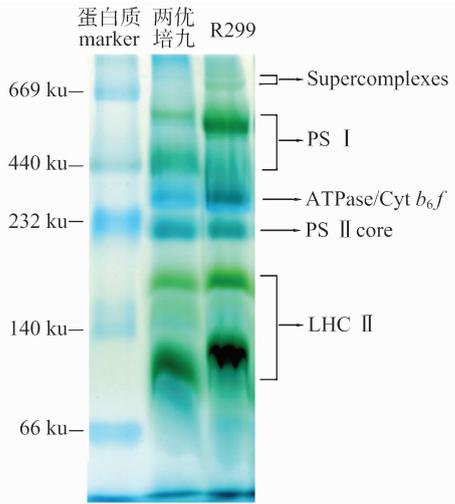


图2 BN-PAGE显示类囊体膜蛋白质复合物在不同水稻之间的差异

在胶内的溶解度,同时断裂二硫键解聚膜蛋白复合体成亚基,按分子量大小在胶内分开。在10 cm × 10 cm 二维BN/SDS-PAGE凝胶中分离得到51个蛋白质点(图3)。

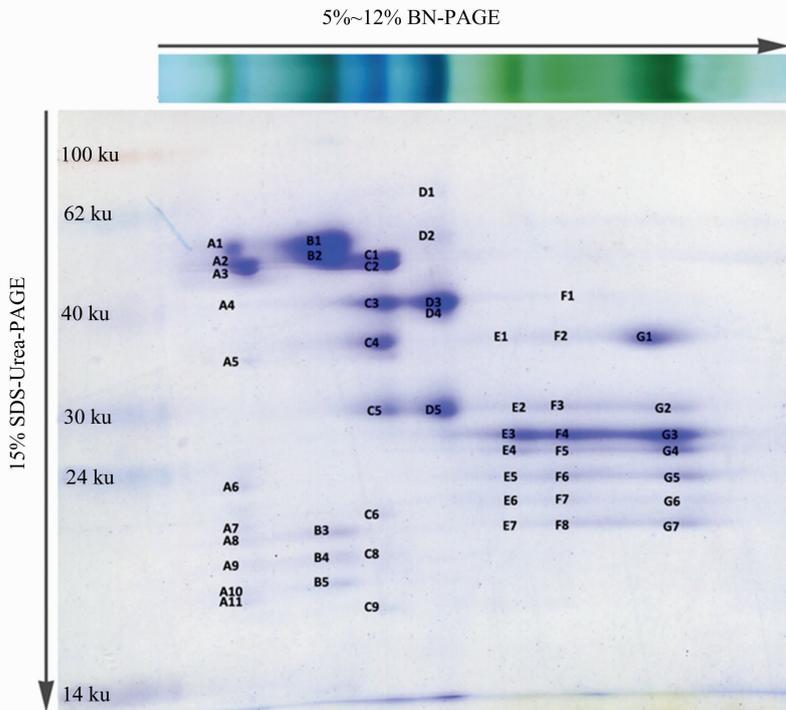


图3 二维BN/SDS-PAGE分离的蛋白质复合物亚基

3 讨论

我们优化了蓝绿温和胶电泳在水稻叶片类囊体膜蛋白分离中的方法,在一维BN-PAGE中使类囊体膜上各个主要的蛋白质复合物清晰直观地得到区分,并且能够显示出丰度与组成的差异。目前利用BN-PAGE比较类囊体膜蛋白差异性已经是拟南芥相关突变体研究中常用的手段^[17],我们试图探索适用于水稻类囊体膜蛋白的分离技术,为对光合机构响应逆境等变化的蛋白组学研究提供方法。

对一维BN凝胶进行后续处理,可以更进一步对蛋白质

复合物深入分析。由于不同的非离子性去污剂对不同复合物稳定性的影响不同,通过在二向的阴极缓冲液中加入低浓度的温和去污剂,可引起程度低于SDS的解离,从而超复合物的特殊亚复合体可从整体中剥离。将BN-PAGE第一向电泳条带切下,结合变性电泳作为BN/SDS-PAGE二维电泳,可将复合物彻底解离成蛋白质亚基,得到其分子量以及单个蛋白质之间的相互作用信息。BN胶也可以通过电洗脱等方法富集获得感兴趣的蛋白质复合物,结合IEF/SDS-PAGE来减轻复合体的复杂性,三维BN/IEF/SDS-PAGE可以分离到蛋白质多肽组分,还能够区分相同相对分子量蛋白质亚

基的不同异构体^[18]。

本研究将水稻类囊体膜一维 BN 凝胶进行二向 SDS-Urea-PAGE 分离,在考马斯亮蓝染色中获得 51 个蛋白质点,可以用于进一步的质谱鉴定,或者运用 Western blot 做比对分析。不过,试验发现整个二维蛋白质图谱还可以在分辨率上继续改进,比如扩大凝胶面积、加大蛋白质上样量以及使用银染法。同时,图谱中主要出现的蛋白点还是围绕一向 BN-PAGE 丰度较高的复合物,对于本身相对含量较少的蛋白质则需要探索更为合适的分离方法。

参考文献:

- [1] van Wijk K J. Challenges and prospects of plant proteomics[J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 501-508.
- [2] 梁宇,荆玉祥,沈世华. 植物蛋白质组学研究进展[J]. 植物生态学报, 2004, 28(1): 114-125.
- [3] 喻娟娟,戴绍军. 植物蛋白质组学研究若干重要进展[J]. 植物学报, 2009, 44(4): 410-425.
- [4] Schubert M, Petersson U A, Haas B J, et al. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(10): 8354-8365.
- [5] Peltier J B, Friso G, Kalume D E, et al. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins[J]. Plant Cell, 2000, 12(3): 319-341.
- [6] Komatsu S. Rice proteome database: a step toward functional analysis of the rice genome[J]. Proteomics, 2005, 59(1): 179-190.
- [7] Braun R J, Kinkl N, Beer M, et al. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(4): 1033-1045.
- [8] Dekker J P, Boekema E J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1706(1/2): 12-39.
- [9] Sunderhaus S, Eubel H, Braun H P. Two-dimensional blue native/

blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes[J]. Methods in Molecular Biology, 2007, 372: 315-324.

- [10] 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[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(4): 639-643.
- [11] Chen X, Zhang W, Xie Y J, et al. Comparative proteomics of thylakoid membrane from a chlorophyll b-less rice mutant and its wild type[J]. Plant Science, 2007, 137(4): 397-407.
- [12] Porra R J, Thompson W A, Kriedemann P E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics, 1989, 975(3): 384-394.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [14] Shao J Y, Yu J. Isolation of thylakoid membrane complexes from rice by a new double-strips BN/SDS-PAGE and bioinformatics prediction of stromal ridge subunits interaction[J]. PloS One, 2011, 6(5): 20342.
- [15] 陈熙,崔香菊,张炜. 低叶绿素 b 水稻突变体类囊体膜的比较蛋白质组学[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(7): 653-659.
- [16] Lincoln T, Eduardo Z. 植物生理学[M]. 4版. 北京:科学出版社, 2009: 108-111.
- [17] Peng L, Ma J, Chi W, et al. Low PS II Accumulation1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2006, 18(4): 955-969.
- [18] Eubel H, Braun H P, Millar A H. Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions[J]. Plant Methods, 2005, 1(1): 11.

粳稻新品种“南粳 9108”获得全国优良食味粳稻品评一等奖

2013年8月19-20日在吉林省长春市召开的“第十一届粳稻发展论坛暨2013全国优良食味粳稻品评会”上传出喜讯,江苏省农业科学院粮食作物研究所培育的优良食味粳稻新品种“南粳 9108”获得一等奖。

“第十一届粳稻发展论坛暨2013全国优良食味粳稻品评会”由北方稻作科学技术协会主办,中国科学院东北地理与农业生态研究所承办。江苏省农业科学院粮食作物研究所所长王才林参加了会议,并担任品评会专家组组长。此次大会共收到参评品种18个,其中黑龙江2个、吉林6个、辽宁3个、新疆3个、宁夏、山东、江苏各1个、日本2个。以“武育粳3号”为标准品种,以大家公认、最好吃的原产于日本新潟县的粳稻品种“越光”为暗对照。整个过程双重密码操作,聘请国内外知名水稻食味品尝专家及水稻育种专家22人(其中日本专家4人)进行现场品评,并利用日本最先进的食味仪检测。品评结束后当场公布品评结果,解密编号,使结果公开透明,更具有权威性、客观性。最终,“南粳 9108”凭借优良的适口性和独特的自然香味喜获一等奖殊荣,总分仅次于获得特等奖的粮粳9号,在所有参评品种中名列第二。

“南粳 9108”是江苏省农业科学院粮食作物研究所所以日本优质粳稻关东 194 为父本,与江苏高产粳稻武香粳 14 杂交,经数代外观与食味品质筛选和条纹叶枯病抗性及早糯性分子标记辅助选择培育而成的优质粳稻。稻米品质优,属于半糯性品种,米饭晶莹剔透,饭粒饱满,表面泛着一层油光,入口绵软鲜香有嚼劲,富有弹性,冷而不硬。

江苏省农业科学院粮食作物研究所分别于2008年和2011年育成优良食味粳稻新品种“南粳 46”和“南粳 5055”,分别属于中熟晚粳和早熟晚粳,适合在江苏太湖、苏南和沿江地区种植。“南粳 9108”是继南粳 46 和南粳 5055 之后的又一优良食味粳稻新品种,比淮稻 9 号早熟 2~3 天,属迟熟中粳类型,适合在淮河以南地区种植,可以满足苏中地区对优良食味粳稻新品种的需求。(“南粳 9108”的选育报告详见本期 86-88 页)