

## 油菜叶绿体被膜的制备和 Toc33 的检测

陈云伟<sup>1</sup> 张年辉<sup>1</sup> 赵云<sup>1</sup> 杜林方<sup>1,\*</sup> Masato NAKAI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>四川大学生命科学学院, 成都 610064; <sup>2</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

## Preparation of Envelope Membrane of Rape Chloroplast and Detection of Toc33

CHEN Yun-Wei<sup>1</sup>, ZHANG Nian-Hui<sup>1</sup>, ZHAO Yun<sup>1</sup>, DU Lin-Fang<sup>1,\*</sup>, Masato NAKAI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064; <sup>2</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

**提要** 采用蔗糖密度离心方法分离完整叶绿体, 进一步分离叶绿体被膜, 借助 SDS-PAGE 分析了 2 种油菜叶绿体被膜的蛋白组分。用对拟南芥叶绿体外被膜上存在 Toc33 的特异抗体, 检测到油菜叶绿体被膜上存在 Toc33 转运蛋白。Toc33 在 2 种油菜中的相对含量不同, 黄化油菜叶绿体被膜中高于野生油菜叶绿体被膜。

**关键词** 油菜叶绿体被膜; 制备; Toc33 检测

叶绿体是植物进行光合作用的细胞器, 具有双层被膜: 内被膜和外被膜。叶绿体中存在的蛋白质 70% 是由核基因编码, 在胞质 80S 核糖体上合成, 再转运进入叶绿体的<sup>[1]</sup>。前体蛋白需要跨过叶绿体的双层被膜, 而内被膜与外被膜存在着的转运复合体参与前体蛋白的跨膜转运。外被膜上的转运复合体参与前体蛋白与叶绿体表面的结合, 以及依赖于 ATP/GTP 的跨外被膜转运; 而内被膜存在的转运复合体参与受 ATP 水解供能的跨内被膜转运<sup>[2]</sup>。外被膜上的转运复合体主要由 Toc34、Toc160 和 Toc75 蛋白等构成, 而内被膜存在的转运复合体由 Tic 系列蛋白构成<sup>[3]</sup>。

Toc34 和 Toc160 为 GTP 结合蛋白。有证据表明, Toc160 参与前体蛋白的结合, 而 Toc34 可以调节前体蛋白与 Toc160 的识别<sup>[4]</sup>。Toc75 则构成外被膜的转运通道<sup>[2]</sup>。已有的研究表明, 双子叶植物豌豆和拟南芥中存在 Toc34<sup>[3]</sup>, 最近, 在单子叶植物玉米中也证实存在 Toc34<sup>[5]</sup>。此外, 拟南芥还含有 Toc33<sup>[3]</sup>, 而玉米有 2 个 Toc34 (ZmToc34-1 和 ZmToc34-2)<sup>[6]</sup>。Toc34 可以磷酸化, 磷酸化的 Toc34 对 GTP 结合受到抑制, 从而抑制 Toc34 对前体蛋白的结合<sup>[6]</sup>。最近, Sun 等<sup>[7]</sup>报道豌豆晶体结构。油菜 (*Brassica napus*) 叶绿素减少的突变体 *Cr3529* 表型<sup>[8]</sup>, 与拟南芥转运突变体类似<sup>[3]</sup>。为了探讨油菜 *Cr3529* 的突变机制, 我们分离了完整叶绿体和叶绿体被膜, 检测到油菜被膜存在 Toc33, 并且 2 种油菜中 Toc33 的相对含量不同。

## 材料与方 法

油菜 (*Brassica napus*) 及其突变体 *Cr3529* 种植于试验田, 取第 8、9 片真叶。

完整叶绿体的分离参考文献 9 的方法, 略作改进。新鲜叶片剪碎, 加入 4 倍体积的缓冲液 A [含 300 mmol·L<sup>-1</sup> D-山梨糖醇、0.1% (W/V) BSA、0.1% (V/V) β-巯基乙醇和 5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 液, pH 8.0], 中等速度匀浆 2 min, 4 层砂布和 1 层白布过滤, 滤液以 700 × g 离心 10 min 后, 弃沉淀, 上清液在 2 000 × g 离心 10 min, 所得沉淀为叶绿体, 用 A 液悬浮。离心管中制备蔗糖梯度 [底部: 含 52% (W/V) 蔗糖和 25 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.8; 上部: 30% (W/V) 蔗糖和 25 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.8]。A 液悬浮的叶绿体上样于 30% (W/V) 蔗糖层的表面, 50 000 × g、4℃ 离心 30 min, 蔗糖界面中的绿色条带为完整叶绿体。小心吸取, 用 3 倍体积 A 液稀释, 以 2 000 × g 离心 15 min, 沉淀悬浮于缓冲液 B (含 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 25 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0) 中, 离心洗涤 1 次得到完整叶

收稿 2003-05-13 修定 2003-10-27

资助 国家自然科学基金 (30270124、30170500) 和教育部博士点基金项目。

\* 通讯作者 (E-mail: dulinf@mail.sc.cninfo.net, Tel: 028-85412766)。

叶绿体。叶绿素含量测定采用Arnon法<sup>[10]</sup>。

被膜组分的分离参照文献11的方法进行。完整叶绿体悬浮在C液(含0.6 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖和2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA的10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5)中至叶绿素为1.5 mg·L<sup>-1</sup>, 于-20℃中迅速冷冻2 h, 再于室温下放置融化, 保证完全叶绿体的破裂。破碎后的叶绿体以4 500×g离心15 min 1次, 所得上清液再离心1次以尽量除去类囊体, 再以40 000×g离心30 min, 所得沉淀为叶绿体被膜蛋白。蛋白质含量测定采用Lowry法<sup>[9]</sup>, 以BSA为标准品。

SDS-PAGE按文献12的方法进行, 用13.75%的分离胶和5%的浓缩胶, 上样量28 μg蛋白质。电泳后的胶板一分为二, 一份用考马斯亮蓝R-250染色, 另一份电转移至硝酸纤维膜后, 进行蛋白印迹并用丽春红染色, 检测转移是否完全。

电转移和免疫印迹分析参照文献13的方法, 4℃下恒流400 mA转移4 h。硝酸纤维膜经封闭后, 与一抗(对拟南芥Toc33特异的抗体, Masato Nakai 提供)温育, 再与蛋白IgG-HRP(与辣根过氧化酶共价偶联的免疫球蛋白蛋白G)温育后, 以新鲜配制的4-氯萘酚为底物进行显色。

## 结果与讨论

### 1 完整叶绿体的分离

叶片匀浆后常采用蔗糖梯度或Percoll梯度离心的方法分离完整叶绿体。我们参照文献9的方法, 并略作改进, 采用52%~30%蔗糖梯度离心的方法。叶片剪碎后中等速度匀浆, 过滤后的滤液离心, 得到的上清液再离心, 沉淀为叶绿体, 再经52%~30%蔗糖梯度离心。离心后, 经检测呈现浅绿色的30%蔗糖组分中, 含有破碎的叶绿体, 蔗糖界面之间的深绿色条带为完整叶绿体, 未破碎的细胞沉淀于52%蔗糖底部。取蔗糖界面的深绿色条带, 稀释后离心所得到的沉淀为完整叶绿体。

100 g鲜重的野生型油菜和突变体Cr3529叶片可以分别得到3.12和2.85 mg叶绿素量的完整叶绿体, 其中突变体Cr3529较少(表1)。实验中曾采用软浆叶和豌豆等材料, 由100 g鲜重叶片中, 可以分别得到5.25和4.55 mg叶绿素量的完整叶绿体。油菜得率较低的原因尚不清楚。

匀浆速度和时间、蔗糖梯度的制备和完整叶绿体的吸取是实验的关键。采用中等速度匀浆2

min即可, 时间过长, 叶绿体会破碎, 会降低完整叶绿体的得率; 制备蔗糖梯度时, 界面要清晰, 上样应小心, 待平衡后再离心; 应小心吸取完整的叶绿体, 动作要轻微。

### 2 叶绿体被膜的制备

完整叶绿体的破裂有研磨法和冻融法, 文献报道前者可破裂50%~70%叶绿体, 而后者可破裂70%叶绿体<sup>[3]</sup>。我们采用冻融法进行叶绿体的破裂, 然后离心先除去类囊体膜, 再分离得到被膜组分。

由100 g野生型油菜和突变体Cr3529叶片所分离的完整叶绿体, 除类囊体时4 500×g离心1次, 可以分别制备得到蛋白量分别为580和189 μg的叶绿体被膜(表1); 除类囊体时离心2次, 可以从100 g叶片中制备得到蛋白量分别为28.8和28.2 μg的叶绿体被膜。叶绿体被膜本身无色, 类囊体膜含有叶绿素而呈绿色, 与类囊体相比, 叶绿体被膜只占很小的一部分, 因此从破裂的叶绿体除类囊体时离心2次, 尽量除去类囊体膜, 提高被膜的纯度, 但是得率显著降低。分离的被膜仍带浅绿色, 表明含有少量的类囊体膜。由于样品量较少, 我们没有再进一步分离内外被膜。

表1 不同材料叶片提取叶绿体和被膜的比较

油菜类型	完整叶绿体		叶绿体被膜蛋白量/μg
	叶绿素/mg	蛋白量/mg	
野生型	3.12	3.30	579.7
Cr3529 突变型	2.85	4.55	189.1

按100 g新鲜叶片计算。

采用SDS-PAGE电泳对分离过程中完整叶绿体、类囊体和被膜的蛋白组分进行分析(图1), 结果表明: 与完整叶绿体相比, 类囊体膜具有较多的分子量为28~30 kD的LHCII蛋白, 突变体类囊体膜的LHCII组分也比野生型的少; 野生型油菜叶绿体被膜可以分离出近20条主要蛋白带, 其中分子量为28和90 kD的是内被膜的主要蛋白, 75 kD为外被膜的蛋白。突变体叶绿体被膜的蛋白组分与野生型的几乎没有差别。

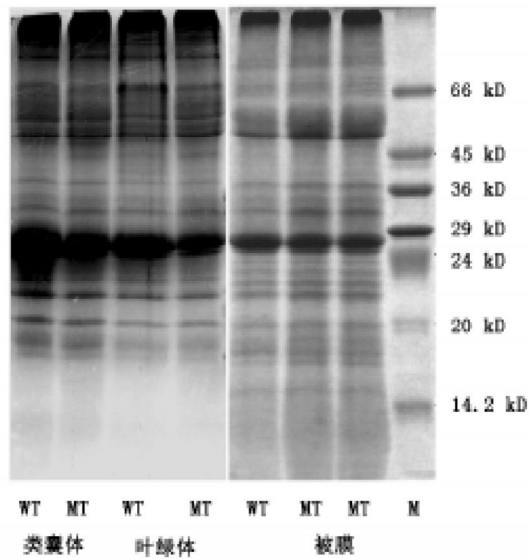


图1 2种油菜叶绿体、类囊体膜和被膜的SDS-PAGE

M: 标准分子量蛋白; WT: 野生型; MT: 突变体。被膜蛋白质上样量为10 μg; 叶绿体和类囊体蛋白质上样20 μg。考马斯亮蓝R-250染色。

### 3 Toc33的检测

加大上样量(28 μg 蛋白质)后, SDS-PAGE分离类囊体膜和叶绿体被膜蛋白转移到硝酸纤维素膜, 经丽春红染色显示转移完全, 用对拟南芥Toc33特异的抗体进行免疫印迹反应。免疫印迹结果(图2)显示: 两种油菜类囊体膜中均检测不到杂交带; 而野生型油菜及其突变体的叶绿体被膜中, 均有1条明显的、分子量为33 kD的杂交带, 表明油菜叶绿体被膜中存在Toc33蛋白。以相同

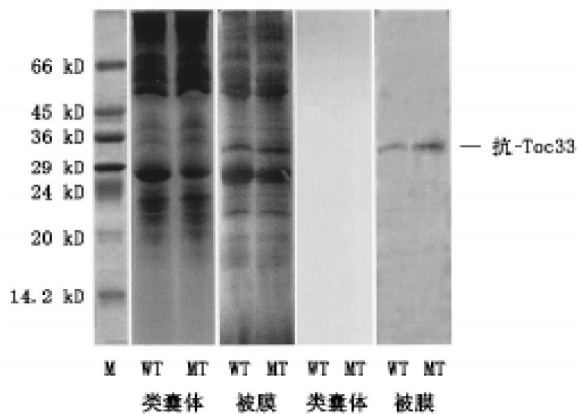


图2 免疫印迹检测Toc 33

WT: 野生型; MT: 突变体。被膜蛋白质上样量28 μg; 类囊体蛋白质作为对照上样量50 μg。

蛋白上样量时, 突变型油菜叶绿体被膜所含Toc33略高于野生型油菜叶绿体被膜。这与拟南芥转运突变体明显不同<sup>[3]</sup>, 拟南芥转运突变体由于T-DNA的插入, 导致Toc33编码基因失活, 叶片出现黄化。油菜与拟南芥都是十字花科的双子叶植物, 它们的亲缘关系近。用拟南芥Toc33特异的抗体可以在油菜叶绿体被膜中检测到油菜存在Toc33蛋白, 表明它们的同源性高。据此, 我们认为: 油菜突变体Cr3529可能不是Toc33的转运突变体。

采用分离得到的完整叶绿体可以进行前体蛋白的体外导入实验, 而制备的叶绿体被膜, 还可以进一步用于制备外被膜和内被膜, 进行转运复合体的研究。

### 参考文献

- Bauer J, Chen K, Hiltbunner A et al. The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature*, 2000, 403:203~207
- Schnell DJ, Kessler F, Blobel G. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, 1994, 266:1007~1012
- Jarvis P, Chen L, Li H et al. An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science*, 1998, 282:100~103
- Kessler F, Blobel G, Patel HA et al. Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science*, 1994, 266:1035~1039
- Sveshnikova N, Soll J, Schleiff E. Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:4973~4978
- Hirohashi T, Nakai M. Molecular cloning and characterization of maize Toc34, a regulatory component of the import machinery of chloroplast. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1491:309~314
- Sun YJ, Forouhar F, Li HM et al. Crystal structure of pea Toc34, a novel GTPase of the chloroplast protein translocon. *Nature Struct Biol*, 2002, 9(2):95~100
- Zhao Y, Wang M-L, Zhang Y-Z et al. Inheritance and agronomic performance of a chlorophyll-reduced seeding mutant in oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its utilization in F1 hybrid production. *Plant Breed*, 2000, 154:131~135
- 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天等. 植物基因与分子操作. 北京: 北京大学出版社, 1995
- Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24(1):1~15
- Keegstra K, Yousif AE. Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes. *Methods Enzymol*, 1986, 118:316~325
- 杜林方, 唐晓松, 梁厚果. 具放氧功能的PSII反应中心复合物的分离及其特性. *植物生理学报*, 1992, 18(1):17~23
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989