

技术与方法 Techniques and Methods

植物线粒体呼吸状态的研究方法及其在植物生物学中的应用

刘美君, 孙学娟, 张子山, 刘玉亭, 高辉远*

山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 线粒体呼吸状态是指当线粒体中呼吸底物及ADP以不同浓度存在时线粒体的呼吸速率, 它是用来研究线粒体功能的重要指标。本文结合我们的研究经验, 详细阐述了线粒体呼吸状态的研究方法, 介绍了该方法在分析线粒体电子传递链功能和氧化磷酸化活性中的应用, 此外概述了线粒体呼吸状态的测定和分析方法在植物生理生态研究中的具体应用。

关键词: 线粒体; 呼吸状态; 氧化磷酸化; 呼吸控制; P/O比; 胁迫

Quantitative Research of Plant Mitochondrial Respiration State and Its Application in Plant Biology

LIU Mei-Jun, SUN Xue-Juan, ZHANG Zi-Shan, LIU Yu-Ting, GAO Hui-Yuan*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: Mitochondrial respiration state is the respiratory rate in the presence of different concentrations of respiratory substrate and ADP, and it is widely used to study mitochondrial function. In this study, the quantitative research of the mitochondrial respiration state was introduced, and the analysis of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation activity were summarized in detail. The application of the study in mitochondrial respiration state in plant biology was also introduced.

Key words: mitochondrial; respiration state; oxidative phosphorylation; respiration control; ratio of P/O; stress

线粒体是细胞物质代谢和能量代谢的枢纽 (Rhoads和Subbaiah 2007; Sweetlove和Fait 2007), 同时也是逆境胁迫的主要攻击位点之一 (Jones 2000; Lam等2001), 在生物和非生物逆境胁迫条件下, 细胞线粒体正常功能的维持对生物抵抗逆境能力的大小起至关重要的作用。在线粒体呼吸过程中, 呼吸电子传递伴随着跨线粒体膜质子梯度的形成, ATP合酶利用这一跨膜质子梯度合成ATP, 在正常细胞中, 线粒体的电子与质子传递是与氧化磷酸化相偶联的, 因此ADP的供应会影响到呼吸电子传递的速率。在通常情况下, 呼吸电子传递的底物如琥珀酸、NADH是充足的, ADP的供应往往作为限制因素, 从而调节整个呼吸过程 (Pacelli等2011)。为了精确地研究这种基于ADP的呼吸控制, Chance和Williams (1956)根据呼吸底物以及ADP不同存在情况下的线粒体呼吸速率, 提出呼吸状态(又称状态呼吸, respiration state)的概念, 状态I呼吸(内源呼吸)是指在没有添加任何呼吸底物及ADP情况下线粒体的呼吸速率; 加入ADP之后

的呼吸速率称为状态II呼吸; 在呼吸底物和ADP都存在时的呼吸速率称为状态III呼吸(也称为最大呼吸); ADP被消耗殆尽但呼吸底物仍然剩余时的呼吸速率称为状态IV呼吸(也称为剩余呼吸)。由于在完整的生物细胞内, 线粒体呼吸受到细胞内其它物质代谢以及能量代谢的影响, 直接测定细胞的呼吸不能精确地反映线粒体的功能, 因此建立一种能够相对精确测定线粒体内各种状态呼吸的方法至关重要。目前国际上利用氧电极研究动物线粒体状态呼吸已经成为研究线粒体功能的热点 (Pacelli等2011; Hüttemann等2012), 而状态呼吸在我国特别是在植物科学研究中的应用还非常有限。

在Chance和Williams (1956)提出的呼吸状态测定过程中, 反应体系内ADP存在与否决定了呼吸状态III和状态IV。在测定过程中, ADP逐渐减

收稿 2013-10-18 修定 2013-12-25

资助 高校博士点专项基金(20113702110008)和国家自然科学基金(31370276)。

* 通讯作者(E-mail: gaohy@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8245985)。

少,因此不容易确定ADP消耗殆尽的准确时间,实际操作中状态III和状态IV呼吸很难准确区分。为了提高测定可操作性,我们在Chance和Williams (1956)的理论基础上,提出了一种精确测定呼吸状态的改进方法。本文概括论述了植物线粒体的提取方法、改进后的呼吸状态的测定方法及其在植物科学研究中的应用,为线粒体功能的研究方法在植物科学研究中的普及和应用提供参考。

1 研究方法

1.1 植物细胞线粒体的提取

本文以烟草(*Nicotiana tabacum* Linn) BY-2悬浮细胞为试验材料说明植物细胞线粒体的提取与测定方法。取鲜重为7~8 g BY-2细胞,加入10 mL提取液[0.4 mol·L⁻¹甘露醇、1 mmol·L⁻¹ EGTA、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4)、0.1% BSA和1% PVP-40其中,BSA和PVP-40要现用现加],用低温冷冻过的研钵在冰浴中研磨细胞,将研磨后的细胞在2 500×g下离心10 min,弃沉淀。取上清液再于18 000×g离心12 min,弃上清,沉淀用洗涤介质(同提取液)洗涤2次,并再在10 000×g下离心5 min,去上清液,将沉淀放在甘露醇缓冲液[0.4 mol·L⁻¹甘露醇、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4)和1 mmol·L⁻¹ EGTA]中悬浮,即获得线粒体粗提液(Millar等2001)。用甘露醇缓冲液调整线粒体悬浮液的浓度,用Bradford (1976)的方法测定线粒体悬浮液的蛋白质浓度,得到含有10 mg·mL⁻¹蛋白质浓度的线粒体制备液。用该浓度的线粒体进行线粒体呼吸状态的测定。线粒体的提取过程要在1 h内完成,提取后的线粒体粗提液要在冰浴中保存。植物叶片线粒体的提

取方法与植物细胞线粒体提取方法类似,具体方法参考Martino和Pallotta (2011)和Lee等(2008)。

1.2 线粒体呼吸状态的测定

1.2.1 传统方法 利用Oxytherm或Oxygraph氧电极(Hansatech, 英国)测定线粒体的呼吸状态。通常所有的呼吸速率值均于25 °C恒温条件下测定,由于研究目的不同,可以根据具体需要选择在不同温度下测定。用Oxytherm测定呼吸时,反应室的温度可由Oxytherm系统本身的半导体控温装置控制。用Oxygraph氧电极测定时,反应室的温度需用外接的超级恒温水浴控制。

在Williams的传统方法中,呼吸状态的测定步骤如图1-A所示。

(1)将1.5~2 mL的线粒体反应液(75 mmol·L⁻¹蔗糖、225 mmol·L⁻¹甘露醇、0.05 mmol·L⁻¹ EGTA、5 mmol·L⁻¹ KCl、5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄和10 mmol·L⁻¹ HCl)注入反应室,启动电磁搅拌器,待温度平衡后(3~5 min)开始记录。

(2)向样品室加入0.2 mL线粒体制备液(使反应体系内蛋白质终浓度大约为1 mg·mL⁻¹),此时记录仪上氧气浓度开始下降(图1-A中的I阶段),这是线粒体状态I呼吸,这时线粒体以线粒体中有限的呼吸底物为原料进行的呼吸,也称为内源呼吸。

(3)待氧信号下降斜率稳定后,向反应室加入适量ADP溶液(使反应液中ADP的终浓度为1 mmol·L⁻¹),待氧信号下降斜率稳定后的耗氧速率即为状态II呼吸。

(4)此时向反应室加入适量的呼吸底物,加入呼吸底物的种类由研究目的决定。由于植物线粒

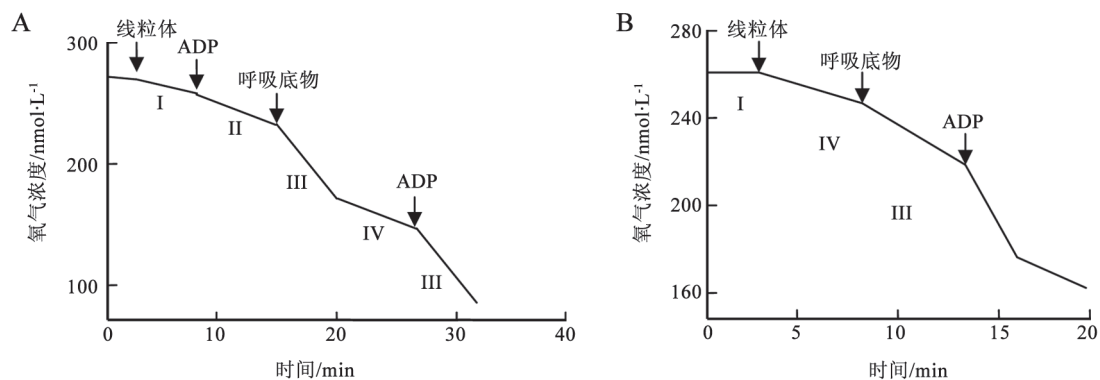


图1 线粒体呼吸状态测定示意图

Fig.1 Schematic diagram of determination of the respiration states of the mitochondria

A: 传统方法; B: 改进方法。

体有多条电子传递途径: 以NADH为底物时, 电子传递经复合体I、复合体III和复合体IV; 以琥珀酸为底物, 电子传递经复合体II、复合体III和复合体IV; 以 α -酮戊二酸为底物, 电子传递经复合体I、复合体III和复合体IV, 因此在测定过程中根据研究目的不同, 选择合适的呼吸底物用于状态呼吸的测定。呼吸底物可以是终浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 α -酮戊二酸, 可以是终浓度为 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琥珀酸, 也可以是终浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NADH。由于实验材料不同, 线粒体对于不同呼吸底物的利用效率不同, 因此呼吸底物浓度需根据实验材料进行调整, 直至呼吸速率不再随呼吸底物浓度增加而增加。在这种既有ADP又有呼吸底物存在时的耗氧速率即为状态III呼吸, 也称为最大呼吸。

(5)随着呼吸的进行, 反应室内ADP逐渐被消耗, 氧气信号下降的斜率逐渐减小, 当氧气信号下降斜率再次稳定后, 即进入状态IV呼吸, 这种当ADP被耗尽后, 只有呼吸底物存在时的呼吸也称为剩余呼吸。

1.2.2 改进方法 在Williams的呼吸状态测定方法中, 由于反应室内ADP的量随着呼吸进行逐渐减少, 氧气信号下降的斜率也随之逐渐减小, 很难准确地确定ADP被消耗殆尽的时刻, 因此状态III呼吸和状态IV呼吸很难准确区分, 并且此测定过程耗时较长, 导致反应室内氧气含量消耗较大影响到后期的呼吸速率。因此, 我们在Williams的理论基础上, 改进了传统的线粒体呼吸状态测定方法, 该方法不仅能够精确测定状态III呼吸和状态IV呼吸, 还简化了测定步骤、增加了实验可操作性。具体测定步骤如下(图1-B)。

(1)将 $1.5\sim 2 \text{ mL}$ 的线粒体反应液($75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $225 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 和 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl)注入反应室, 启动电磁搅拌器, 待温度平衡后($3\sim 5 \text{ min}$)开始记录。

(2)向样品室加入 0.2 mL 线粒体制备液(使反应体系内蛋白质终浓度大约为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 此时记录仪上氧气浓度开始下降(图1-B中的I阶段), 此时线粒体以线粒体中有限的呼吸底物为原料进行呼吸即为Williams呼吸状态理论中的状态I呼吸也称为内源呼吸。

(3)待氧气信号下降的斜率稳定后, 向反应室

中加入适量的呼吸底物, 加入呼吸底物的种类和浓度参见上面1.2.1节中步骤(4)。这种只有呼吸底物没有ADP存在时的耗氧速率即为Williams呼吸状态理论中的状态IV呼吸。

(4)待状态IV呼吸稳定后, 再加入适量的ADP, 使反应液中的ADP的终浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 此时氧气浓度出现较大幅度的下降, 氧气信号的下降斜率较状态I和状态IV都大, 这时的耗氧速率代表了在足够底物和ADP存在下的线粒体呼吸速率, 为Williams呼吸状态理论中的状态III呼吸, 即最大呼吸。

为了获得较长时间稳定的状态III呼吸, 以便进行后续实验, 如研究外加各种呼吸抑制剂对于线粒体呼吸的影响等, 在步骤(4)中需加入过量的ADP (使反应液中的ADP的终浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。准确获得线粒体状态III和状态IV呼吸后, 通过计算呼吸控制率可以反映线粒体电子传递和氧化磷酸化的偶联程度。呼吸控制率(respiration control ratio, RCR)为状态III (呼吸底物与ADP都充足时)呼吸速率与状态IV (只有呼吸底物存在时)呼吸速率的比值。当RCR大于1时, 表示二者偶联程度高, 线粒体呼吸正常, 并且RCR数值越大, 电子传递与氧化磷酸化偶联程度越高。RCR数值越接近于1, 电子传递和氧化磷酸化偶联程度越低, 当该比值等于1时, 则表示线粒体内膜跨膜质子梯度的形成受阻, 电子传递与氧化磷酸化已经完全解偶联, 这表明线粒体失去了磷酸化的能力不再产生ATP (程丹丹等2011)。

1.2.3 两种方法的差异 本文提出的状态呼吸的测定方法与Williams早期建立的呼吸状态测定方法的不同之处在于本方法省去了只有ADP存在而没有底物时的呼吸(Williams呼吸状态理论中的状态II), 但早期Williams定义的状态II呼吸在实际研究中很少被提及和应用。本文改进的状态呼吸测定方法能够准确地测定状态III和状态IV呼吸, 本方法更具可操作性, 经我们多次测试, 利用传统方法测定的RCR为 1.44 ± 0.46 , 利用改进的方法测定的RCR为 1.37 ± 0.16 , 这表明改进后的方法与传统的测定结果能够很好的吻合, 但是用传统方法测定的RCR, 其平均值的标准误差较大。由于传统方法在测定状态IV时需要根据经验来判断ATP消耗殆尽的时间, 因此每次状态IV的测定值都不尽相同, 由表1可以看出, 传统方法测定的状态IV呼吸速率

表1 改进方法与传统方法测定BY-2细胞线粒体呼吸状态的对比

Table 1 Comparison of the determination of the respiration states of the mitochondria of BY-2 cells between the traditional method and the improved method

状态	改进方法		传统方法	
	呼吸速率/nmol (O ₂)-mg ⁻¹ (蛋白)·min ⁻¹	所需时间/min	呼吸速率/nmol (O ₂)-mg ⁻¹ (蛋白)·min ⁻¹	所需时间/min
I	1.18±0.23	4.52±0.56	1.20±0.38	4.47±0.61
II	—	—	1.57±0.22	5.98±0.75
III	4.66±0.38	6.34±0.53	4.83±0.42	9.42±2.85
IV	3.39±0.29	7.18±1.48	3.35±0.80	9.89±4.32

每个数据为3次独立测定的平均值±SE。

平均值的标准误(SE)为0.8, 显著高于改进方法测定平均值的SE (0.29), 而且一个有经验的研究者使用传统方法完成一次完整的状态呼吸测定需要大约30 min的时间, 而使用改进方法只需要大约18 min的时间(表1)。

1.3 线粒体呼吸中P/O比的测定

线粒体呼吸的磷氧比(P/O比)是指一对电子通过呼吸电子传递链最终传至1/2 O₂并将ADP和无机磷转化成ATP的分子数, 即为 $\Delta\text{ATP}/\Delta\text{O}$, 因为每生成一分子的ATP需要消耗一分子的ADP, 因此P/O比也可用 $\Delta\text{ADP}/\Delta\text{O}$ 表示。P/O比的测定方法与状态呼吸测定步骤相同。状态IV呼吸测定完毕后, 记录样品室中反应液的氧气浓度, 根据反应室中反应液的体积可以计算出此时反应室中的氧气含量。随后进入步骤(4), 加入少量的ADP (终浓度为100 nmol·L⁻¹)。加入ADP后, 线粒体呼吸速率被极大地促进, 此时的呼吸速率为最大呼吸。待氧电极记录的耗氧斜率逐渐减小至稳定时, 再次记录样品室中反应液的氧气浓度, 计算出此时反应室中的氧气含量。根据步骤(4)反应前后反应室中的氧气含量, 可以计算出整个步骤(4)的耗氧总量(此时算出的是O₂分子数目), 最后将步骤(4)加入ADP的量(分子数目)除以步骤(4)的耗氧总量(换算成O原子数目)即得到被测线粒体的P/O比。

离体的线粒体不能长时间浸泡在反应液中, 而且反应杯中的氧气有限, 因此测定过程时间要短, ADP的加入量不宜太多。

2 线粒体呼吸状态的意义及应用

生物或非生物胁迫都会直接或间接地影响植物线粒体的功能(Borecký和Vercesi 2005; Trono等2013; Fu等2010), 降低氧化磷酸化的效率。线粒体

呼吸状态能够动态地反映线粒体电子传递和氧化磷酸化的偶联过程(Trono等2011)。通过对呼吸状态的分析, 可以研究线粒体功能对于不同逆境胁迫的响应, 进而分析线粒体功能与植物对逆境响应之间的关系。

2.1 逆境胁迫对于不同呼吸底物电子传递的影响

在高等植物中, 线粒体呼吸底物可以源于种类繁多的代谢过程产生的糖类和有机酸类, 如光合作用合成的糖类, 有机酸代谢形成的丙酮酸、苹果酸、柠檬酸、延胡索酸、琥珀酸、草酰乙酸、 α -酮戊二酸、以及糖酵解过程产生的丙酮酸、乙醇、乳酸以及多种代谢过程中产生的乙酰辅酶A等。根据呼吸底物进入电子传递链部位的不同, 可将呼吸底物分为两大类, 一类是从呼吸链复合体I进入呼吸链的呼吸底物, 如NADH; 另一类是从呼吸链复合体II进入呼吸链的呼吸底物, 如琥珀酸等。不同的胁迫对植物线粒体呼吸电子传递链的具体伤害位点也不同。通过分析加入不同的呼吸底物时线粒体的呼吸状态, 可以了解胁迫对线粒体电子传递链破坏的具体位置。孙学娟等(2012)研究表明, 在正常烟草BY-2细胞线粒体中, 加入复合体II的呼吸底物琥珀酸后, 状态III和状态IV呼吸较状态I呼吸都显著增加, 但在CuCl₂处理后的烟草BY-2细胞的线粒体中加入琥珀酸后, 呼吸耗氧速率较加入呼吸底物之前的耗氧速率并没有增加。这表明CuCl₂处理完全损坏了线粒体内基于复合体II的电子传递链。而程丹丹等(2011)通过研究复合体II呼吸底物对呼吸速率的影响, 表明赤星病菌代谢产物可以部分抑制烟草BY-2细胞线粒体复合体II的电子传递功能。Valenti等(2007)研究表明, 烟草BY-2细胞经热胁迫后, 依赖于NADH的呼

吸受抑制程度较大, 而依赖于琥珀酸的呼吸受抑制较轻, 说明热胁迫能够破坏复合体I的活性。而在盐胁迫水稻根部发生细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)初期, 依赖于NADH、琥珀酸以及苹果酸的各种呼吸都被抑制, 这表明水稻根部线粒体电子传递链的复合体I和II都受到破坏, 电子传递链的功能受到严重的损伤(Chen等2009)。

2.2 逆境胁迫对于线粒体电子传递和氧化磷酸化的影响

植物线粒体中存在两条呼吸途径, 即产生跨膜质子梯度并偶联ATP合成的细胞色素(cytochrome oxidase, COX)呼吸途径和耗氧但不偶联ATP合成的交替氧化酶(alternative oxidase, AOX)呼吸途径。此外, 线粒体内膜上存在一种解偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)与ATP合成酶竞争 H^+ 。当植物遭受逆境胁迫后, 线粒体受损, 线粒体膜破裂或线粒体的COX呼吸途径受损后会导致跨膜质子梯度形成受阻, 或者AOX活性增加导致呼吸电子传递链耗氧增加但不明显增加跨膜质子梯度(Jacoby等2011), 以及UCP的活性增加导致用于推动ATP合成的跨膜质子梯度减小(Jarmuszkiwicz等2002, 2010; Ploszczyca等2011), 这些原因都会导致电子传递与氧化磷酸化解偶联, 使线粒体氧化磷酸化效率降低。

RCR为呼吸底物和ADP都充足时与只有呼吸底物存在时的氧气消耗速率的比值, 反映了线粒体内膜跨膜质子梯度产生ATP的能力。RCR表示正常线粒体跨内膜质子梯度对电子传递的限制。因为在正常细胞中跨线粒体内膜的质子梯度越高对电子传递过程中质子向线粒体膜间质传输阻力越大, 当加入ADP后, 由于电子传递和氧化磷酸化相互偶联, 质子通过ATP合酶而进入线粒体内, 从而减少了跨膜质子梯度对于电子传递的限制同时伴随产生ATP。当线粒体受损, 导致电子传递与氧化磷酸化解偶联, 这种限制就会减小甚至消失。P/O比指当一对电子通过呼吸电子传递链传至 $1/2 O_2$ 所产生的ATP的分子数。P/O的大小不仅与跨线粒体内膜的质子梯度有关, 还与呼吸底物的电子进入线粒体电子传递链的位点有关, 当电子由NADH从复合体I传至 O_2 时P/O的最大值为3, 当电子由 $FADH_2$ 从琥珀酸-Q还原酶通过辅酶Q进入电子传

递时P/O的最大值为2。P/O比常用来反映线粒体呼吸底物通过氧化磷酸化产生ATP的能力。但是, 在实际测定过程中, 由于我们选定一种呼吸底物进行测定, 排除了底物不同对P/O比数值的影响, 因此, 在实验中P/O比也可反映线粒体电子传递用于氧化磷酸化的效率。RCR和P/O比都能反映线粒体电子传递与氧化磷酸化的偶联程度, 但是两者的生物学意义不同, 因此在实际应用中, 研究者应根据研究目的的不同, 选用不同的参数。

植物细胞线粒体的RCR常用以衡量线粒体电子传递和氧化磷酸化偶联程度。赤星病菌代谢产物处理烟草BY-2细胞1.5 h后, RCR=1.1, RCR比对照细胞降低了27.3%, 表明赤星病菌代谢产物直接破坏了烟草BY-2细胞线粒体的氧化磷酸化, 这在赤星病菌引起烟草BY-2细胞程序化死亡过程中起到了主要的作用(程丹丹等2011; Cheng等2011)。而P/O比常用以反映线粒体电子传递用于氧化磷酸化的效率。硬质小麦叶片线粒体内存在的一种受ATP调控的 K^+ 通道(PmitoK_{ATP})可以减小线粒体内膜膜电位从而影响跨膜质子梯度的形成以及ATP的合成。Trono等(2011)研究表明, 与对照植株相比, 当用KCl激活硬质小麦叶片的PmitoK_{ATP}后, 小麦经轻度甘露醇胁迫后, P/O比不变。通常甘露醇胁迫会导致ATP合成受阻, 呼吸电子传递进而受到跨膜质子梯度的反馈抑制。但是当加入KCl激活PmitoK_{ATP}后, 减小了线粒体内膜膜电位, 减少了跨膜质子梯度对于电子传递的限制, 从而减轻了甘露醇胁迫对线粒体氧化磷酸化的影响。

3 展望

植物遭受的外界胁迫可能直接破坏线粒体呼吸电子传递链的不同复合体从而使电子传递受阻, 或者导致线粒体自身解偶联蛋白活性增加, 使植物线粒体氧化磷酸化效率下降, 影响细胞的正常能量代谢。通过测定线粒体状态呼吸, 我们可以研究逆境胁迫对植物线粒体电子传递链的影响以及对氧化磷酸化偶联程度和氧化磷酸化效率的影响, 并在此基础上可以进一步分析逆境伤害线粒体电子传递链的具体位点。

随着呼吸状态理论的逐步完善和呼吸状态测定方法的日渐成熟, 呼吸状态的研究将在植物生物学研究中起重要的作用, 尤其在阐明逆境胁迫对

植物能量代谢的影响过程中起重要的作用。本文改进的呼吸状态的测定方法,使呼吸状态的测定更为简便、精确,丰富了植物科学的研究方法。

参考文献

- 程丹丹, 孙学娟, 高辉远, 杨程, 张立涛, 孟庆伟(2011). 烟草赤星病菌代谢产物诱导的烟草BY-2细胞ROS爆发和ATP损耗. 中国农业科学, 44 (8): 1610~1617
- 孙学娟, 刘美君, 高辉远, 杨程, 张子山, 孟庆伟(2012). CuCl₂胁迫对烟草BY-2悬浮细胞死亡的诱导. 植物生理学报, 18 (2): 173~180
- Borecký J, Vercesi AE (2005). Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. Biosci Rep, 25 (3-4): 271~286
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Chance B, Williams GR (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. In: Meister A (ed). Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. New York: Interscience Publishers, INC, 65~134
- Chen X, Wang Y, Li JY, Jiang AL, Cheng YW, Zhang W (2009). Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice. Plant Physiol Biochem, 47 (5): 407~415
- Cheng DD, Jia Y, Gao HY, Zhang LT, Zhang ZS, Xue ZC (2011). Characterization of the programmed cell death induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco BY-2 cells. Physiol Plant, 141: 117~129
- Fu LJ, Shi K, Gu M, Zhou YH, Dong DK, Liang WS, Song FM, Yu JQ (2010). Systemic induction and role of mitochondrial alternative oxidase and nitric oxide in a compatible tomato-tobacco mosaic virus interaction. Mol Plant-Microbe Interac, 23 (1): 39~48
- Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, Varughese A, Lu G, Liu J, Ramzan R et al (2012). Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. Biochim Biophys Acta, 1817: 598~609
- Jacoby RP, Taylor NL, Millar AH (2011). The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. Trends Plant Sci, 16: 614~623
- Jarmuszkiewicz W, Behrendt M, Navet R, Sluse FE (2002). Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. FEBS Lett, 532: 459~464
- Jarmuszkiewicz W, Ploszczyca AW, Krzeminska NA, Sluse FE (2010). Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. Biochim Biophys Acta, 1797: 792~799
- Jones A (2000). Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? Trends Plant Sci, 5: 225~230
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. Nature, 411: 848~853
- Lee CP, Eubel H, O'Toole N, Millar AH (2008). Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic *Arabidopsis*. Metabolism Mol Cell Proteom, 7: 1297~1316
- Martino CD, Pallotta ML (2011). Mitochondria-localized NAD biosynthesis by nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) heterotrophic tissues. Planta, 234: 657~670
- Millar AH, Sweetlove LJ, Giege P, Leaver CJ (2001). Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. Plant Physiol, 127: 1711~1727
- Pacelli C, Latorre D, Cocco T, Capuano F, Kukat C, Seibel P, Villani G (2011). Tight control of mitochondrial membrane potential by cytochrome c oxidase. Mitochondrion, 11 (2): 334~341
- Ploszczyca AW, Koziel A, Krzeminska NA, Jarmuszkiewicz W (2011). Impact of oxidative stress on *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial bioenergetics depends on cell growth stage. J Bioenerg Biomembr, 43: 217~225
- Rhoads DM, Subbaiah CC (2007). Mitochondrial retrograde regulation in plants. Mitochondrion, 7: 177~194
- Sweetlove LJ, Fait A (2007). The mitochondrion: an integration point of cellular metabolism and signalling. Crit Rev Plant Sci, 26 (1): 17~43
- Trono D, Soccio M, Laus MN, Pastore D (2013). The existence of phospholipase A2 activity in plant mitochondria and its activation by hyperosmotic stress in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Plant Sci, 199-200: 91~102
- Trono D, Soccio M, Laus MN, Pastore D (2011). Potassium channel-oxidative phosphorylation relationship in durum wheat mitochondria from control and hyperosmotic-stressed seedlings. Plant Cell Environ, 34: 2093~2108
- Valenti D, Vacca RA, Pinto MC, Gara LD, Marra E, Passarella S (2007). In the early phase of programmed cell death in Tobacco Bright Yellow 2 cells the mitochondrial adenine nucleotide translocator, adenylate kinase and nucleoside diphosphate kinase are impaired in a reactive oxygen species-dependent manner. Biochim Biophys Acta, 1767 (1): 66~78