



叶绿体蛋白质组研究进展

彭浩, 林文芳, 朱学艺*

(厦门大学 生命科学学院, 福建厦门 361005)

摘要: 亚细胞蛋白质组学是近年来蛋白质组学中的一个热点。通过细胞器的纯化和亚细胞组分的分离, 降低了样品的复杂性, 增大了相应蛋白质组分的富集, 有利于由此分离获得的蛋白质的序列分析及功能鉴定。叶绿体蛋白质组为植物亚细胞蛋白质组学研究中相对全面的一部分, 利用亚细胞分离结合双向电泳技术系统地鉴定叶绿体中蛋白质组分是获取叶绿体蛋白质信息、确定其功能的重要手段。本文就近年来植物叶绿体蛋白质组涵盖的叶绿体内、外被膜、叶绿体基质、类囊体膜和类囊体腔蛋白的研究进行综述, 以全面认识叶绿体蛋白的组成、特点及其在叶绿体生理生化代谢网络中的作用。

关键词: 叶绿体; 类囊体; 亚细胞蛋白质组; 双向电泳; 质谱

中图分类号: Q75 文献标识码: A

Research Progress in Chloroplast Proteome

PENG Hao, LIN Wen-fang, ZHU Xue-yi*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Subcellular proteomics is currently the most effective approach to characterize subcellular compartments. Based on the powerful combination of subcellular fractionation with proteomic analysis, it makes possible to characterize all chloroplast proteins completely. Chloroplast proteome is one of the most intensive aspects of the plant subcellular proteomics research. By using subcellular proteome technique, more and more chloroplast proteins have been identified. The present review summarizes the recent progress in proteins located in the different chloroplast compartments, including the inner and outer envelop membranes, chloroplast stroma, thylakoid membranes and thylakoid lumen. We hope it contributes to understand the characters of chloroplast proteins and their functions in the chloroplastic metabolism networks.

Key words: chloroplast; thylakoid; subcellular proteome; two-dimensional electrophoresis (2-DE); mass spectrometry

近年来, 以双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)为基本技术的蛋白质组学研究已进一步深入到亚细胞水平, 即研究一个细胞器内表达的蛋白质组。结合采用亚细胞分离和多级提取制样技术, 在电泳图谱中获得针对一定细胞和亚细胞定位的“亚蛋白质组”(subproteome)已成为蛋白质

组学研究中的一个焦点。目前, 以模式植物拟南芥构建的蛋白数据库包含了线粒体、内质网、细胞壁、质膜等细胞器的亚蛋白质组信息。作为植物光合作用的主要细胞器, 叶绿体亚蛋白质组的研究更受关注, 通过percoll梯度分离纯化完整叶绿体, 结合多级分离制样技术分离叶绿体的不同组分, 经过2-DE

* 收稿日期: 2007-0-0; 修改稿收到日期: 2007-12-14

基金项目: 国家自然科学基金(30470164); 厦门大学新世纪优秀人才支持计划项目(NCETXMU)

作者简介: 彭浩(1982-), 女(汉族), 硕士, 主要从事植物蛋白质组学方面的研究。

* 通讯作者: 朱学艺, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物响应环境因子的功能蛋白质组学研究。E-mail: zhuxueyi90@xmu.edu.

电泳获得单个蛋白点, 酶解后进行质谱分析, 获取蛋白相关信息^[1]。

叶绿体是植物通过光合作用还原和同化二氧化碳、形成碳水化合物的场所, 同时也是植物氨基酸、脂肪酸和萜类化合物合成以及亚硝酸盐和硫酸盐还原的场所^[2]。就高等植物而言, 叶绿体蛋白质数目占其蛋白总数的 10% ~ 25%^[3], 充分说明了叶绿体在植物细胞中的重要性。参与叶绿体中特殊生化合成和代谢过程的蛋白质大都高度区隔化定位, 构成每一区域各自特异的亚蛋白质组^[2]。根据结构组成和生化特性, 可将叶绿体分为 6 个区域, 即内被膜(inner envelope membrane, IEM)、外被膜(outer envelope membrane, OEM) 和类囊体膜(thylakoid membrane), 以及由上述膜结构将叶绿体区隔化形成的 3 个亚区室, 即: 被膜间区(inter-membrane space, IMS)、基质区(stroma) 和类囊体腔(thylakoid lumen)^[3,4]。为了全面了解植物叶绿体的生物发生、结构功能及其对不同环境的光合响应调节机制, 明确叶绿体不同膜区和膜间隔微区定位的亚蛋白质组信息, 以进一步揭示它们在叶绿体代谢网络中的作用。

1 叶绿体蛋白

由于叶绿体的重要功能及其在植物细胞中半自主性的特殊地位, 叶绿体相关蛋白的研究较植物其它亚细胞组分蛋白质组的研究要相对全面, 但要系统认识植物叶绿体蛋白质的组成及其在不同代谢网络中的作用还需进一步研究。Abdallah 等^[5]利用生物信息学方法, 预测拟南芥叶绿体蛋白质组包含 1 900 ~ 2 500 个蛋白(其中 87 个是由叶绿体 DNA 编码的, 其余则由核编码并运输到叶绿体中), 而 Leister^[6]则认为, 成熟的叶绿体大约含有 3 000 个蛋白。随着拟南芥基因组测序工作的完成, 以是否具有转运肽序列为特征, 利用 TargetP 或 ChloroP 软件对叶绿体蛋白质组预测结果有 3 600 多个蛋白定位于叶绿体中^[7]。由于转运肽序列的非高度保守性, 使利用该特征序列对蛋白亚细胞定位的预测可能会出现一定的偏差, 目前的研究报道大多远不及预测数目, 一般仅几百个蛋白, 这其中还包括功能有待进一步鉴定的大量未知蛋白, 如 Tanaka 等^[8]在水稻亚细胞蛋白质组学的研究中得到了 252 个叶绿体蛋白质, 并鉴定了其中 89 个参与叶绿体光合作用和 ATP 合成的蛋白质。但由于植物叶绿体中含量较高的蛋白, 如: Rubisco 等成分的存在, 致使其中

低丰度蛋白检测困难, 这仍是目前叶绿体亚蛋白质组研究中的主要障碍之一。

1.1 叶绿体内、外被膜蛋白

叶绿体被膜为蛋白质、离子、信号分子及代谢物出入叶绿体的必经之场所, 它为这些物质的出入提供了一个完备而复杂的网络系统。由于叶绿体的半自主性, 其大部分蛋白是由核基因编码、胞质合成后被转运到叶绿体中的^[2,9,10], 所以, 叶绿体被膜运输系统发挥着至关重要的作用。叶绿体被膜上参与运输核编码蛋白的运输复合体——Toc/Tic 复合物形成的蛋白通道输入装置由叶绿体外被膜转运蛋白(translocator of outer envelope membrane of chloroplasts, Toc) Toc159、Toc75、Toc34^[9] 和叶绿体内被膜转运蛋白(translocator of inner envelope membrane of chloroplasts, Tic) Tic110 等蛋白组成^[11]。其中, Toc34 和 Toc159 锚定在外被膜上并专一性地与 GTP 结合, 使得 GTP 结合结构域暴露在细胞质中; Toc75 形成一蛋白输入通道, 在输入介导联系蛋白 Hsp70 的协同作用下, 将蛋白质转入叶绿体中^[9,12]。Davila-Aponte 等^[13]通过分析豌豆(*Pisum sativum*) 表达序列标签(expressing sequence tags, ESTs) 数据库后, 发现了豌豆叶绿体蛋白转运组分的同源物——转运蛋白 Tic110 和 Toc75, 并指出这 2 个转运蛋白在单、双子叶植物及不同类型的质体中均存在。Ferro 等^[14]从拟南芥中鉴定出了与豌豆同源性很高的多种 Toc 和 Tic 蛋白类似物, 还发现了参与叶绿体蛋白输入中可能作为细胞辅助因子停靠蛋白成分的 Toc64, 以及内被膜上的 Tic55, 后者有预测的铁硫簇, 并显示为 Tic 复合物中心的一部分。

虽然大部分叶绿体定位蛋白质的转运机制都与 Toc/Tic 转运蛋白复合物有关, 但对豌豆叶绿体内膜上的 32 ku 内被膜蛋白(inner envelope protein, IEP) IEP32 的叶绿体定位输入途径的研究发现, IEP32 的输入既不受 Toc34 和 Toc159 的水解去除影响, 也没有因为 Toc75 输入通道阻断剂或精胺的作用而受到抑制, 但 IEP32 需要转运蛋白 Tic22 的协助, 且通过一个尚未明确的途径直接从膜间隙插入到内膜中, 说明 IEP32 的识别和定位不是由叶绿体外被膜转运蛋白 Toc159、Toc75、Toc34 组成的亚单位完成的^[11]。此外, 对缺失 Toc64 蛋白突变体的研究表明, Toc64 蛋白并不为小立碗藓(*Physcomitrella patens*) 叶绿体蛋白输入所必需^[15]。由此可以看出, 叶绿体蛋白质输入机理的细节仍不十分清

楚,而且 Toc/Tic 本身仍有许多参与该输入过程的被膜蛋白组分还有待进一步研究鉴定。

参与离子及细胞代谢物的转运是被膜蛋白的另一主要功能^[2]。Ferro 等^[12]利用蛋白质组学结合生物信息技术分别鉴定出 54 个菠菜 (*Spinacia oleracea*) 叶绿体被膜蛋白和 112 个拟南芥叶绿体被膜蛋白,其中 89 种为已知或推定存在的蛋白,包括代谢物运输蛋白、离子通道、离子泵、通透蛋白、孔蛋白等^[14]。一些具有多个 α 螺旋跨膜结构域、预测执行运输功能的转运蛋白及一些底物专一的代谢物转运蛋白也先后被鉴定,如:促使无机磷交换的 PEP-无机磷转运蛋白^[12]、有 10 个跨膜螺旋且与 C₄ 羧酸盐运输蛋白有部分同源性的蛋白^[14]、具有调节光合作用的跨膜转运被膜蛋白——磷酸/丙糖磷酸转运蛋白^[16]、具有多个 α 螺旋跨膜区,为控制碳、氮代谢所必需的被膜磷酸丙糖二羧酸转运蛋白^[17]、协助叶绿体中无机磷净输入的 H⁺/Pi 转运蛋白^[14]、葡萄糖 6 磷酸-无机磷转运蛋白^[14] 以及 2 酮戊二酸/苹果酸转运蛋白家族、Na⁺/牛磺胆酸转运蛋白家族、木酮糖-5 磷酸-磷酸盐转运器、谷氨酸-苹果酸转运器、腺苷酸转运器等^[12, 14, 18, 19],这些转运蛋白的鉴定为全面揭示叶绿体内、外物质交换的特点和转运机制奠定了基础。

叶绿体被膜,尤其是内被膜是叶绿体膜组成中特殊脂类(半乳糖脂)、极性脂(甘油酸脂、酰基脂)、色素(叶绿素和类胡萝卜素)和异戊二烯醌类(质醌、 α -生育酚)的生物合成及代谢的主要场所^[20, 21]。在叶绿体被膜极性脂合成中,最早被确认的是内被膜附近催化溶血磷脂酸生物合成的甘油 3 磷酸酰基转移酶^[22]和定位在内膜上催化叶绿体甘油酯前体——磷脂酸合成的溶血磷脂酸酰基转移酶^[23],随后参与叶绿体其它脂类合成的酶,如磷脂酰甘油合成酶、磷脂酰甘油磷酸合成酶等也都相继从菠菜和拟南芥叶绿体被膜中得到鉴定,2002~2003 年, Ferro 等^[10, 13]从菠菜叶绿体中又鉴定出了催化叶绿体单半乳糖二酰甘油合成中的关键酶——单半乳糖二酰甘油合成酶,从而使深入研究这些蛋白酶类在叶绿体特有膜脂组分的合成、组装中的调控机制成为可能。

膜脂脂肪酸反式双键的形成是降低膜脂熔点、提高膜脂流动性的关键,这些双键的形成由不同的去饱和酶催化^[2]。拟南芥被膜中鉴定的 2 个脂肪酸去饱和酶 FD6C、FD3C,分别在脂肪酸的 ω_6 、 ω_3 位置处插入双键,前者催化单不饱和脂肪酸形成亚油

酸(18:2),后者引入第三个双键形成亚麻酸^[14]。涉及该过程的被膜电子传递成分有:苯醌氧化还原酶、推测的黄素氧化还原酶及参与质体合成脂肪酸并定位于外被膜上向外输出用于内质网磷脂合成的乙酰辅酶 A 合成酶类似物也都得到了鉴定^[14, 24]。此外,参与叶绿体异戊二烯醌类生物合成的 2 个关键酶:依赖 S-腺苷蛋氨酸 L-蛋氨酸的甲基转移酶和异戊二烯基转移酶的候选蛋白 IEP37 和 HP43、在叶绿素前体物质合成中发挥着重要作用的原叶绿素酸酯氧化还原酶、叶黄素循环途径中的关键酶—— β -胡萝卜素羟化酶等定位在被膜上的关键蛋白酶类的分布及功能也已确证^[12]。

叶绿体被膜,特别是内被膜作为活性氧自由基(ROS)存在的主要场所,还与叶绿体基质中主要的抗氧化体系——抗坏血酸-谷胱甘肽循环有着密切的联系^[20]。目前,已从拟南芥被膜提取物中鉴定出参与抗氧化胁迫的酶,如:磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶、抗坏血酸过氧化物酶和超氧化物歧化酶等,其中已知后 2 种为可溶性酶蛋白,尽管尚不清楚磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶是可溶性的还是膜定位的蛋白,但它们都必须膜附近才能发挥活性作用^[19];对河西走廊不同生态型芦苇完整叶绿体亚蛋白组的 2-DE 的对比分析中发现,沙丘芦苇中参与叶绿体抗氧化酶系统的蛋白组分明显高于水生芦苇,这与对叶绿体抗氧化系统蛋白酶活性分析结果一致^[25]。此外,叶绿体内被膜还与叶绿体基因组 DNA 的复制和转录相关,从绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中分离出的含有酰基脂类的低密度叶绿体膜组分中,富集有大量与叶绿体 mRNA 相结合的蛋白质,说明这些膜组分是叶绿体基因表达的场所^[26]。

随着叶绿体被膜蛋白质组成分的不断鉴定和功能确证,不仅呈现出被膜上复杂运输网络中的组成分子,而且还提供了参与叶绿体中有关脂质和色素代谢等重要生化反应的关键蛋白。综合叶绿体膜蛋白的研究结果共鉴定了 429 个蛋白,其中 28% 功能尚未知或不明确,13% 涉及蛋白转移、降解或折叠,10% 参与激素或脂肪酸代谢,9% 参与离子或小的有机分子的代谢,还有相当数量的蛋白参与 DNA 或 RNA 的相互作用或蛋白定位^[27]。目前,通过蛋白质组学技术尚未能确证叶绿体被膜上的所有蛋白成分,但结合生化方法及计算机模拟(*in silico*)技术已从不同植物中逐渐建立起了叶绿体被膜蛋白质组主要分子成员及其相关功能的关键信息。然而,构建

一个近乎完整的叶绿体被膜蛋白质组信息库仍需进一步研究证据的支持, 并不断整合多种植物材料的综合研究结果。

1.2 叶绿体基质蛋白

叶绿体基质是光合碳同化和叶绿体内多种物质合成代谢的关键场所, 而且参与叶绿体基因组转录和翻译的蛋白成分大多也分布在其中^[2]。Peltier 等^[28]从拟南芥完整叶绿体中进一步分离出基质蛋白组分, 结合一向无色不变性电泳(colorless native PAGE, CN-PAGE)和二向 SDS-PAGE 分析共鉴定出 241 个基质蛋白, 包括 39 个未知蛋白、30 个蛋白参与碳代谢(calvine 循环、磷酸戊糖氧化途径、糖酵解等代谢)的蛋白。其中, 参与基质中蛋白质靶向定位、折叠、分选和蛋白降解功能的蛋白最多, 共有 34 个, 占鉴定蛋白总数的 14%; 参与叶绿体蛋白质合成的蛋白共 29 个, 占总数的 12%; 有 21% 的蛋白参与叶绿体基质中的次生代谢过程(包括 7% 的蛋白参与氨基酸代谢, 4% 的蛋白参与核酸合成和降解, 近 6% 的蛋白参与四吡咯合成, 4% 的蛋白参与维生素 B₁、B₂、异戊二烯以及脂/脂肪酸的合成)。为了确保不同蛋白质与其代谢途径之间最佳的催化配比, 及时清除细胞内一些具有潜在毒性的不可逆损伤或错误折叠的蛋白, 或通过对转录和翻译因子的蛋白水解作用而控制基因表达, 这些作用是由叶绿体基质中以蛋白复合物形式存在的蛋白质分解系统完成的, 如: 从拟南芥叶绿体基质中鉴定出的具有 11 个不同蛋白组成的 325~350 ku 的 Clp 蛋白酶复合物^[29], 200~240 ku 的 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶^[30]、基质信号识别颗粒等^[31]。从豌豆幼苗叶绿体基质中分离纯化的 29 ku 的蛋白磷酸酶可使磷酸肽, 如类囊体捕光复合物 $\text{LHG-}\text{P}^{\oplus}$ 的 N 端去磷酸化, 但对基质中 64 ku 的主要蛋白则无去磷酸化作用, 这种酶不能区分多肽合成底物中磷酸苏氨酸和磷酸丝氨酸的去磷酸化, 这和定位在类囊体膜上的蛋白磷酸酶截然不同。这种酶确切的生理功能尚不完全清楚, 但已基本明确它在 LHG- P^{\oplus} 的去磷酸化中发挥作用^[32]。此外, 利用 2-DE 结合质谱和 Edman 测序等技术还鉴定出了菠菜叶绿体基质核糖体 30S 和 50S 亚基蛋白, 发现菠菜的质体核糖体是由 59 个蛋白质组成的, 其中 53 个与大肠杆菌同源, 而 6 个是质体特有的非核糖体蛋白(PSRP-1 到 PSRP-6), 这些 PSRP 蛋白质可能参与质体编码蛋白的翻译和调控过程, 包括蛋白质通过质体 50S 亚基在类囊体膜上的定位和转移等^[33, 34]。

与被膜蛋白质组研究相比, 基质蛋白的研究相对滞后, 其主要原有二, 一是基质蛋白的分离纯化相对困难; 二是基质中高丰度蛋白, 如 Rubisco 的存在对低丰度蛋白研究的干扰^[35], 所以, 通过亲和纯化或其他分离技术去除这些高丰度蛋白或蛋白复合物, 同时结合多级分离技术进一步纯化基质组分无疑将是全面分析基质蛋白质组的关键所在。此外, 结合叶绿体不同发育过程、环境变化和叶绿体突变体基质蛋白质的分析, 有望揭示基质中不同生化途径之间的相互联系, 从而有利于进一步洞悉叶绿体的详尽功能。

2 类囊体蛋白

类囊体是叶绿体的关键组成部分, 光反应及大部分与光合作用有关的蛋白和蛋白复合物都定位于类囊体膜及类囊体腔中^[2]。近年来, 通过对类囊体蛋白质组的研究已鉴定了 384 种蛋白^[27], 其中涉及光合电子传递、ATP 合成和光呼吸的蛋白比例最大, 占总数的 30%; 没有明确功能者占 25%; 18% 参与蛋白折叠、加工和水解; 8% 直接或间接参与抗氧化防御。

2.1 类囊体膜蛋白

类囊体膜又称光合膜, 光合作用的 4 个多亚基蛋白复合体——光系统 iv(PS iv)、光系统 II (PS II)、ATP 合成酶(ATPase)以及细胞色素 b₆f 复合体(Cytb₆f)都定位在类囊体膜上, 它们在类囊体膜上的区隔分布使得类囊体膜呈现出横向异质性^[2, 36]。4 个蛋白复合体共有 100 多个蛋白组成, 其中 65 个蛋白有 1 个或多个跨膜区, 这些蛋白和许多其它辅助因子共同完成光合电子传递和光合磷酸化的过程^[2, 36, 37]。高等植物 PS II 中心复合物是包含有 30 多个组分的超复合物膜蛋白^[38], 其中包括疏水性亚基 D1、D2、CP43、CP47、Cytb₅₅₉ α 、Cytb₅₅₉ β 、PsbH-PsbN 以及 22 ku 蛋白和分子量分别为 10、17、23、33 ku 的 4 个亲水性亚基^[39]。Kashino 等^[40]对蓝藻 PS II 蛋白组成中的 31 个蛋白分析, 不仅确证了 PS II 中功能已知的上述蛋白组分, 还发现了水解酶 FtsH 的 2 个同工蛋白和 5 个新的未知蛋白成分 S111252、S111390、S111638、S111414 和 S111130 蛋白。现已证实 FtsH 具有降解快速周转的 D1 蛋白的功能, 是植物抵抗光抑制过程中 PS II 复合物修复的关键成分之一^[41]。

Shi 和 Schroder 等^[42]对菠菜类囊体膜 PS II 蛋白组分中低分子量疏水蛋白 PsbW 的研究发现: 与

叶绿素 a 蛋白 CP47 和 CP43 不同, P_{sbW} 存在于所有 PS Ⅱ反应中心的提取物中,但通过对反应中心蛋白数目的分析发现: P_{sbW} 在 PS Ⅱ反应中心的提取物中所占比例小于 BBY 颗粒提取物,说明 P_{sbW} 蛋白定位在 D1/D2 异质二聚体附近,但它至少可以部分地从 PS Ⅱ反应中心解离。进一步研究发现, P_{sbW} 包含 1 个跨膜区,其 C 端暴露于叶绿体基质侧, N 端朝向类囊体腔,在 PS Ⅱ二聚体复合物的稳定中发挥作用^[38]。

就 PS *iv* 蛋白复合物而言,植物和部分藻类类囊体膜都含有 8 个核编码的亚基: P_{saD}、P_{saE}、P_{saF}、P_{saG}、P_{saH}、P_{saK}、P_{saL}、P_{saN} 和 6 个叶绿体编码的亚基: P_{saA}、P_{saB}、P_{saC}、P_{saI}、P_{saJ}、P_{saM}, 其中 P_{saA}、B、G、I、J、M、K、L 为疏水性亚基,其余为亲水性亚基^[2]。随着对类囊体膜 PS *iv* 复合物特性研究的深入,发现对 PS *iv* 组装及稳定发挥重要作用的 3 个类囊体蛋白,即: B_{tpA}、Y_{cf3} 和 Y_{cf4}, 其中, Y_{cf4} 蛋白通过假定的跨膜结构域与类囊体膜紧密相连; Y_{cf3} 为 PS *iv* 组装中的关键组分,是形成稳态 PS *iv* 复合物所必需的蛋白,但它对 PS *iv* 形成后的稳定没有作用,该蛋白的氨基酸序列,尤其是 N 端序列,从蓝藻到高等植物都十分保守^[43]; 而外在类囊体膜蛋白 B_{tpA} 则是低温条件下稳定 PS *iv* 反应中心蛋白 p_{sbA} 和 p_{sbB} 蛋白组分所必需的一个调节因子, b_{tpA} 缺失的集胞藻 PCC6803 突变株在低温条件下无法进行光合自养并呈现出 PS *iv* 复合物的快速降解^[44]。通过免疫杂交、非变性蓝绿胶电泳(Blue-Native PAGE)、双向电泳和电子顺磁共振分析,证实纯化的集胞蓝藻 PCC6803 质膜中含有与 PS *iv* 或 PS Ⅱ反应中心密切相关的蛋白,如 P_{saA}、P_{saB}、P_{saC}、P_{saD} 以及 D1、D2、cyt_{b559α}、cyt_{b559β}、P_{sbO} 和 C_{tpA}^[45, 46]。其中, PS Ⅱ组分中的亲水性蛋白 C_{tpA} 在 PS Ⅱ复合物的组装中发挥着关键作用^[47], 缺失 C_{tpA} 功能的突变体由于不能组装成含 4 个锰的复合物,导致锰簇蛋白无法与 PS Ⅱ反应中心复合物组装成完整的有功能的 PS Ⅱ最终使光合放氧过程无法正常进行^[46, 47]。这些存在于集胞蓝藻质膜上的光合亚单位组装成含叶绿素的色素蛋白复合物,然后通过膜泡运输或膜的侧向运动定位到类囊体膜上^[46], 因此,集胞蓝藻细胞中的质膜并非类囊体膜,是其光合反应中心复合物形成的最初位点,这对全面认识蓝藻光合膜系统的生物发生具有至关重要的贡献。

细胞色素 b₆f (Cyt_{b6}f) 是一个整合在类囊体膜

上的蛋白复合体,由 9 个不同的亚基和一些辅助因子组成,主要包括 Cyt_f、Cyt_{b6}、细胞核基因编码的 Rieske 氏(铁硫)蛋白(Rf_{eS})、结合在 Q_p 位点的 IV 亚基以及一些功能未知的小分子量蛋白^[48], 稳态 Cyt_{b6}f 复合物的形成是多亚基聚集组装的结果。脉冲标记研究显示,在缺少组装伴侣 Cyt_{b6} 或亚基 IV 的突变体中, Cyt_f 的合成速率仅为野生型中的 10%,但在 G 端锚定蛋白缺失的突变株中,其合成速率则显著增加,说明未组装的 Cyt_f 的 G 端结构域通过负反馈机制调控其自身的翻译^[49]。相对于其它 3 个类囊体膜蛋白复合物,ATP 合成酶的多肽亚基组分研究最为充分,主要包括膜内质子流动通道 CF₀ 柄和膜外基质的亲水头部 CF₁ 两大部分,其中,已明确 CF₁ 由 5 个不同亚基(α、β、γ、δ 和 ε)组成;而 CF₀ 至少有 4 个亚基(*iv*、Ⅲ、Ⅳ和 Ⅴ)组成^[2]。对不同生态型芦苇叶绿体蛋白质组的对比分析发现,其 ATP 酶亚基组分,尤其是 β 亚基,在沙生芦苇中显著增加,这与沙生芦苇类囊体膜 ATP 酶的活性明显高于水生芦苇结果相符^[25]。

除了上述 4 大蛋白复合物外, PS *iv* 和 PS Ⅱ的捕光蛋白复合物(light-harvesting complex proteins, LHCP) LHC *iv* 和 LHC Ⅲ也嵌合在类囊体膜上^[2]。对拟南芥 LHC Ⅲ复合物的主要蛋白组分 Lhcb1、Lhcb2、Lhcb3 的研究明确了 LHC Ⅲ是由 3 个高度同源的基因 Lhcb1、Lhcb2 和 Lhcb3 编码产物组成的均质或异质三聚体^[50]。Hippler 等^[51] 通过双向电泳对莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 类囊体膜蛋白的分析中检测到 30 多个蛋白点,其中至少有 13 个点与 LHC Ⅲ蛋白组分对应,有 18 个蛋白点为 LHC *iv* 蛋白组分。鉴于拟南芥中编码 LHC Ⅲ蛋白组分的 5 个 Lhcb1、4 个 Lhcb2 和 1 个 Lhcb3 基因以及编码 LHC *iv* 蛋白组分仅有的 6 个基因已经明确,由此认为,莱茵衣藻中明显增加的 LHCP 蛋白点数目除了编码这些蛋白的基因数目较多外,还存在蛋白翻译后的修饰,这一结论与 LHCP 蛋白组分的特异抗体杂交结果一致^[51]。而且,在 LHCP 复合物中各蛋白组分是否表达以及表达量的多少与其相应蛋白复合物在不同环境和组织中所具有的不同功能直接相关^[52], 暗示它们可能参与植物的逆境光合响应调节。对不同生态型芦苇类囊体膜色素蛋白复合体的对比研究表明,与水生芦苇相比,适应干旱生境的沙丘芦苇类囊体膜中 LHCP 蛋白含量明显降低,但其基因的稳态转录水平却高于水生芦苇,说明沙丘芦苇类囊体膜中 LHCP 复合物减少可能在转

录后翻译和/或组装过程受到调节所致^[53]。

Wang 等^[54]对集胞蓝藻 PCC6803 的类囊体膜的外周蛋白进行双向电泳和质谱分析,得到了 200 多个蛋白,对其中 116 个蛋白的研究表明:78 个蛋白点来自 51 个基因,部分蛋白在 2-DE 胶上呈现出分子量倍增的几个蛋白点,说明这些蛋白也存在有不同程度的翻译后修饰。利用 2-DE 对分离出的 76 个蛋白点中的 63 个鉴定结果表明,这些蛋白主要包括酮糖转移酶、NADH 脱氢酶亚基 NdhI 和 NdhK 等^[54];通过尿素洗涤类囊体膜,并以单向 SDS-PAGE 进行分析,鉴定出包括 DNA 连接酶等 13 种蛋白,另有 14 种蛋白是未知的或未预测到的完整的膜蛋白,例如,ATP 合酶亚基 AtpG 以及 Cytb6/f 复合体(Ⅱ)亚基 PetG 等^[55]。此外,还发现了一些新的整合在类囊体膜上以及膜周边的蛋白,包括参与蛋白折叠和色素生物合成过程中的酶类,如参与类胡萝卜素生物合成中的八氢番茄红素脱氢酶和 1 个类胡萝卜素结合蛋白,叶绿素生物合成酶、光依赖型原叶绿素还原酶以及焦磷酸合成酶还原酶等^[56]。

Friso 等^[37]对拟南芥类囊体外周蛋白和完整的类囊体膜蛋白的研究共鉴定出 154 个蛋白,其中 76 个是具有 α -螺旋的跨膜蛋白,27 个是具有叶绿体转运肽但功能未知的新蛋白,如红素氧还蛋白和类 DnaJ 蛋白,前者是光合作用能量传递和转化过程中的关键成分,而后者有 1 个 J 功能域,DnaJ 蛋白通过其 J 功能域调节 HSP70 功能而参与蛋白的折叠、装配和运输过程,二者在类囊体的生物发生以及生理功能中可能具有重要作用。进一步对 100 个定位在类囊体中的 83 个蛋白进行分析后发现,约 20 个蛋白参与蛋白插入、组装、折叠或水解,16 个参与蛋白翻译过程^[37]。前述蛋白的鉴定进一步说明类囊体膜表面是叶绿体蛋白质合成的重要位点。

2.2 类囊体腔蛋白

在叶绿体内部,类囊体膜和囊腔形成一个完整的类囊体网络,共同行使光合作用光反应的功能^[2]。20 世纪 70 年代,由于菠菜内翻外类囊体颗粒的获得,PS Ⅱ的内在蛋白 PsbO、PsbP 和 PsbQ 得以鉴定;后来发现这 3 个蛋白以可溶状态存在于类囊体腔基质中^[56]。2000 年,Peltier 等^[57]鉴定出了这些蛋白的新的同工蛋白,并发现这些同工蛋白混存于类囊体腔中,如同工蛋白 PsbO₁ 和 PsbO₂,在缺失 PsbO₁ 的拟南芥突变体中,其作用可由 PsbO₂ 替代完成^[57]。在蓝藻 PS Ⅱ蛋白组成的分析中发现 5 个新的未知蛋白中,S111414 和 S111638 最终也被确

认为 2 个类囊腔蛋白,前者是 1 个类 PsbP 蛋白,它与拟南芥类囊腔定位的 3 个具有 PsbP 结构域的蛋白同源;后者与拟南芥 PS Ⅱ放氧复合体蛋白 PsbQ₁ 同源,与高等植物不同的是,蓝藻中以 PsbU 和 PsbV 分别代替了 PsbP 和 PsbQ^[40]。

已鉴定的类囊腔定位蛋白质体蓝素(plastocyanin, PC)位于类囊体膜腔表面、具有铜离子的小分子量蛋白,在光合作用中执行将电子从 Cytb6/f 复合物转向 PS Ⅱiv 的功能^[2],对 PC 有加工作用的蛋白酶及其活性位点也已明确^[58]。结合 2-DE 技术的应用,最初对菠菜类囊腔蛋白质组的系统研究认为,类囊腔中至少有 25 个蛋白^[59],通过末端测序,Kieselbach 等^[59]鉴定了分子量分别为 40、29、17.4 和 16.5 ku 的 4 个新蛋白,其中:17.4 ku 蛋白为一新发现的五肽重复家族成分,16.5 ku 蛋白为 Tat 运输途径的多肽组分之一,40 ku 蛋白被鉴定为类囊腔中的一个新的类亲免蛋白 TLP40;而 29 ku 蛋白则为一新发现的未知蛋白。对豌豆类囊腔蛋白质组的分析则认为其类囊腔可溶性蛋白和外周蛋白至少有 200 到 230 个不同组分^[60]。通过与蛋白数据库比对,鉴定了 61 个蛋白质,其中 33 个蛋白质的功能及功能结构域得到了确认,而 10 个蛋白功能未能确定;18 个蛋白因为没有表达序列标签或全长基因,无法通过数据库信息进一步鉴定;9 个以前未被确定且具有类囊腔转运肽的蛋白的全序列已经明确,其中 7 种蛋白具有 2 个精氨酸序列^[60],这是 Tat 途径底物的特征^[60]。在已知拟南芥基因全序列的优势条件下,Schubert 等^[61]将蛋白质组分析法与基因组预测筛选法结合,对拟南芥类囊腔亚蛋白质组的 2-DE 分析结果表明:在 3~10 的 pH 范围内,大约有 300 个蛋白质点,而 pH 4~7 的酸性端区域约有 200 个蛋白质点。同时 Goulas 等^[62]进一步研究表明,拟南芥类囊腔蛋白质组的主要功能是帮助类囊腔蛋白折叠,催化类囊腔蛋白的水解和抗氧化。对拟南芥与菠菜的类囊腔蛋白质组的比较分析结果显示:2 种植物的类囊腔蛋白成分序列同源性很高^[62],说明拟南芥类囊腔蛋白可以作为其他植物类囊腔亚蛋白质组分的研究参考。至今,Goulas 等^[62]经实验鉴定的拟南芥类囊腔定位蛋白共有 47 个,除 Schubert^[61]鉴定的 36 个蛋白外,还有 5 个蛋白在二者的研究结果中完全重叠;另外 6 个蛋白分别是:细胞色素 C6(Act6)、2 个类 PsbQ 蛋白、类过氧化氢还原酶 Q、PsbP2 蛋白、推定的 FK5BP 型同工酶——AtFKBP16-1 以及 FK560 结

合的亲霉素^[62]。除参与光合作用光反应的蛋白外,类囊体腔定位的蛋白还包括叶黄素循环中的紫黄质去环氧化酶(violaxathin de-epoxidase, VDE)、菠菜和大麦中 D1 蛋白 G 末端加工酶(proteases)、豌豆中 D1 蛋白水解酶 DegP1、PS ②组装/稳定因子 Hcf136、番茄和菠菜中的多酚氧化酶、推定的抗坏血酸过氧化氢酶、一些未知功能的蛋白,如五肽蛋白,以及含有未知结构域或功能域的蛋白等^[63]。

由于叶绿体的半自主性,部分核编码的类囊体膜或类囊体腔定位蛋白还需要其专一引导转运肽,虽然整合到类囊体膜上的蛋白质的转运肽机制还不清楚,但对定位于类囊体腔的蛋白的研究已经明确,其 N 端双向转运肽具有 2 个引导结构域:即转运肽的叶绿体基质引导结构域和类囊体腔引导结构域,二者分别引导蛋白质进入叶绿体基质并穿过腔膜进入类囊体腔。而且,类囊体腔蛋白的运输过程涉及 Sec 和 Tat 系统,其中,通过 Tat 系统转运的蛋白质底物含有特征性的双精氨酸保守序列核心 S/ TRRxFLK 的信号肽,而以 Sec 途径运输的蛋白质,其 N 端具有以疏水性氨基酸为主的信号肽序列。在已经鉴定的拟南芥类囊体腔蛋白中,几乎一半以上的蛋白都由双精氨酸结构的 Tat 途径运输^[58,61],而拟南芥类囊体腔中的 2 个新蛋白——质体蓝素池中含量较高的组分和推定的抗坏血酸过氧化氢酶,则由依赖 Sec 和 pH 梯度差转运途径运至类囊体腔^[64]。

此外,各种胁迫条件下,处理与对照组植物叶绿体对环境信号应答和逆境响应机制的比较蛋白质组学研究是揭示植物在逆境条件下光合作用调节机制的重要途径之一。对冷胁迫条件下拟南芥类囊体腔蛋白组响应变化的分析结果揭示,类囊体腔蛋白对冷害并不敏感,100 个蛋白中仅有 8 个蛋白发生了变化,其中 4 个 PS ②外在蛋白亚基中, P_{sbO₂} 含量增加,而 P_{sbO₁} 积累却减少,但 P_{sbP} 则表现出同工蛋白增减不一的变化特点: P_{sbP₁} 蛋白在 2-DE 图谱上不同迁移率的蛋白点上或增或减,而 P_{sbP₂} 蛋白则在冷胁迫下减少;其余 4 个冷胁迫诱导的蛋白分别是: PS ②组装因子 Hcf136 蛋白、亲环蛋白(cyclophilin)以及在植物信号转导中发挥部分作用的 2 个 FKBP 型亲霉素^[62]。由此看出,在冷胁迫下,拟南芥中只有 8% 的冷胁迫响应蛋白在变化,说明类囊体腔定位的大部分蛋白可能为维持类囊体功能所必需,即使在不同环境条件下,也始终保持一定数量的稳定蛋白。

3 结 语

随着叶绿体亚蛋白质组研究的深入,定位于叶绿体不同区域中的重要功能蛋白已逐渐明晰,为全面认识植物叶绿体蛋白质组不同区隔定位的分子成员及其各自的功能奠定了基础。然而,该方面研究也存在一些问题,特别是:功能已明确、本应存在于膜组分提取物中的蛋白却没能被检测到,如:参与膜脂合成的蛋白、催化脂肪酸代谢的酶蛋白、参与色素和异戊二烯醌类合成的酶蛋白以及部分被膜上参与蛋白输入和转运的蛋白等,说明膜蛋白制样方法和检测技术还有待进一步改进。另外,除拟南芥和水稻等个别植物基因组数据库已经建立外,大多数植物只存在数量极为有限甚至完全空白的 DNA 和蛋白序列,以这些植物进行叶绿体蛋白质组的研究中,测序后的蛋白只能通过与之有同源性的物种进行匹配比对,进而确证蛋白的属性和功能,这在一定程度上限制了新的叶绿体蛋白成员的发掘。用基质蛋白的抗体进行的检测显示,叶绿体被膜和类囊体膜组分中常含有部分相应的基质蛋白组分,如:被膜组分中常含有 Rubisco 复合物、磷酸甘氨酸激酶、甘油酰磷酸脱氢酶以及参与氧化胁迫防御的抗坏血酸-谷胱甘肽循环的蛋白酶类;类囊体膜组分也常含有一些保护膜免受氧化伤害的酶类^[2]。对棉花叶绿体中游离和膜结合的 Calvin 循环多酶复合体的研究结果表明,与膜结合者的活性显著高于游离者^[65],说明不论定位于基质还是被膜上的蛋白,其功能的正常发挥都需要诸多蛋白分子的共同辅助和参与,提示要全面认识叶绿体亚蛋白质组及其生理调节机制,需要综合运用多种材料及不同分离和鉴定技术,从不同植物材料中不断积累尽可能全面的资料和信息,同时注重蛋白质与蛋白质间相互作用信息数据库的积累。毫无疑问,叶绿体亚蛋白组成员信息库构建得越全面,越有利于其综合功能的全面掌握。随着植物蛋白质组学研究中样品制备、高通量自动分析、质谱技术以及生物信息学领域的不断发展,结合不同植物材料叶绿体不同发育过程、叶绿体突变体和不同环境条件下,特别是适应自然逆境的野生植物材料叶绿体蛋白质响应变化信息的完善,实现对叶绿体亚蛋白质组所有组成和功能蛋白分子的系统整合剖析,进一步明确叶绿体亚蛋白质组的详尽功能,将有望在揭示植物叶绿体适应环境变化的调节机制以及阐明叶绿体在植物生长发育及代谢调控等生命活动中的规律等方面有新突破。

参考文献:

- [1] 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学. 理论与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 51– 52.
- [2] BU CHAN AN B B, GRUISSEM W, JONES R L. Photosynthesis. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants(植物生物化学与分子生物学)[M]. 瞿礼嘉, 顾红雅, 白书农, 赵进东, 陈章良译. 北京: 科学出版社, 2004: 131– 483.
- [3] VAN WIJK K J. Proteomics of the chloroplast: Experimentation and prediction[J]. *Trends Plant Sci.*, 2000, **5**(10): 420– 425.
- [4] BÉDARD J, JARVIS P. Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins[J]. *J. Exp. Bot.*, 2005, **56**: 2 287– 2 320.
- [5] ABDALLAH F, SALAMINI F, LEISTER D. A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*[J]. *Trends Plant Sci.*, 2000, **5**(4): 141– 142.
- [6] LEISTER D. Chloroplast research in the genomic age[J]. *Trends Genet.*, 2003, **19**(1): 47– 56.
- [7] EMANUELSSON O, NIELSEN H, BRUNAK S, VON HEIJNE G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence[J]. *J. Mol. Biol.*, 2000, **300**: 1 005– 1 016.
- [8] TANAKA N, FUJITA M, HANDA H, MURAYAMA S, UEMURA M, KAWAMURA Y, MITSUI T, MIKAMI S, TOZAWA Y, YOSHINAGA T, KOMATSU S. Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments[J]. *Mol. Genet. Genomics*, 2004, **271**(5): 566– 576.
- [9] HOFMANN N R, THEG S M. Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion[J]. *Trends Plant Sci.*, 2005, **10**(9): 450– 457.
- [10] HOFMANN N R, THEG S M. Protein- and energy-mediated targeting of chloroplast outer envelope membrane proteins[J]. *Plant J.*, 2005, **44**(6): 917– 927.
- [11] NADA A, SOLL J. Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway[J]. *J. Cell Sci.*, 2004, **117**: 3 975– 3 982.
- [12] FERRO M, SALVI D, RIVIERE-ROLLAND H, VERMAT T, SEIGNEURIN-BERNY D, GRUNWALD D, GARIN J, JOYARD J, ROLLAND N. Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**(17): 1 1487– 1 1492.
- [13] DAVILA-APONTE J A, INOUE K, KEEGSTRA K. Two chloroplastic protein translocation components, Tic110 and Toc75, are conserved in different plastid types from multiple plant species[J]. *Plant Mol. Bio.*, 2003, **51**: 175– 181.
- [14] FERRO M, SALVI D, BRUGIÉRE S, MIRAS S, KOWALSKI S, LOUWAGIE M, GARIN J, JOYARD J, ROLLAND N. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Mol. Cell Proteomics*, 2003, **2**(5): 325– 345.
- [15] HOFMANN N R, THEG S M. Toc64 is not required for import of proteins into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*[J]. *Plant J.*, 2005, **43**(5): 675– 687.
- [16] FLÜGGE U I. Phosphate translocations in plastids[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999, **50**: 27– 45.
- [17] WEBER A, FLÜGGE U I. Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants[J]. *J. Exp. Bot.*, 2002, **53**: 865– 874.
- [18] NEUHAUS H E, WAGNER R. Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1465**: 307– 323.
- [19] ROLLAND N, FERRO M, SEIGNEURIN-BERNY D, GARIN J, DOUCE R, JOYARD J. Proteomics of chloroplast envelope membranes[J]. *Photosynth. Res.*, 2003, **78**: 205– 230.
- [20] BLÉE E, JOYARD J. Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides[J]. *Plant Physiol.*, 1996, **110**: 445– 454.
- [21] JOYARD J, TEYSSIER E, MIEGE C, BERNY-SEIGNEURIN D, MARECHAL E, BLOCK M A, DORNE A J, ROLLAND N, AJLANI G, DOUCE R. The biochemical machinery of plastid envelope membranes[J]. *Plant Physiol.*, 1998, **118**: 715– 723.
- [22] JOYARD J, DOUCE R. Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **486**(2): 273– 285.
- [23] DOUCE R, JOYARD J. Biochemistry and function of the plastid envelope[J]. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1990, **6**: 173– 216.
- [24] SHOCKEY J M, FULDA M S, BROWSE J A. *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism[J]. *Plant Physiol.*, 2002, **129**(4): 1 710– 1 722.
- [25] ZHU X Y, CHEN G C, ZHANG C L. Photosynthetic electron transport, photophosphorylation, and antioxidants in two ecotypes of reed (*Phragmites communis* Trin.) from different habitats[J]. *Photosynthetica*, 2001, **39**(2): 183– 189.

- [26] ZERGES W, ROCHAIX J D. Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *J. Cell Biol.*, 1998, **140**(1): 101– 110.
- [27] VAN WIJK K J. Plastid proteomics[J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2004, **42**(12): 963– 977.
- [28] PELTIER J B, CAI Y, SUN Q, ZABROUSKOV V, GIACOMELLI L, RUDELLA A, YTTERBERG A J, RUTSCHOW H, VAN WIJK K J. The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts[J]. *Mol. Cell Proteomics*, 2006, **5**(1): 114– 133.
- [29] PELTIER J B, RIPOLL D R, FRISO G, RUDELLA A, CAI Y, YTTERBERG J, GIACOMELLI L, PILLARDY J, VAN WIJK K J. Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications[J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**: 4768– 4781.
- [30] KAVAKLI I H, KATO C, CHOIS B, KIM K H, SALAMONE P R, ITO H, OKITA T W. Generation, characterization, and heterologous expression of wild type and up-regulated forms of *Arabidopsis thaliana* leaf ADP-glucose pyrophosphorylase[J]. *Planta*, 2002, **215**: 430– 439.
- [31] SCHÜNNEMANN D. Structure and function of the chloroplast signal recognition particle[J]. *Curr. Genet.*, 2004, **44**: 295– 304.
- [32] HAMMER M F, MARKWELL J, SARATH G. Purification of a protein phosphatase from chloroplast stroma capable of dephosphorylating the light-harvesting complex- LHCII [J]. *Plant Physiol.*, 1997, **113**(1): 227– 233.
- [33] YAMAGUCHI K, SUBRAMANIAN A R. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50S subunit of an organelle ribosome (chloroplast)[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(37): 28466– 28482.
- [34] YAMAGUCHI K, VON KNOBLAUCH K, SUBRAMANIAN A R. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30S subunit of an organelle ribosome (chloroplast)[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(37): 28455– 28465.
- [35] YU CH L(余初浪), YAN SH P(严顺平), SUN W N(孙卫宁), YANG L(杨玲). High-resolution two-dimensional electrophoresis for total proteins in rice roots, leaves and suspension cells[J]. *Chinese J. Rice Sci.* (中国水稻科学), 2006, **20**(5): 549– 552(in Chinese).
- [36] WOLLMAN F A, MINAI L, NECHUSHTAI R. The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes I[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1411**: 21– 85.
- [37] FRISO G, GIACOMELLI L, YTTERBERG A J, PELTIER J B, RUDELLA A, SUN Q, WIJK K J. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database[J]. *Plant Cell*, 2004, **16**: 478– 499.
- [38] SHI L X, LORKOVIC Z J, OELMULLER R, SCHRODER W P. The low molecular mass PsbW protein is involved in the stabilization of the dimeric photosystem PSII complex in *Arabidopsis thaliana*[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(48): 37945– 37950.
- [39] ANDREAS P M W, JÓRG S, LARS M V. Using mutants to probe the *in vivo* function of plastid envelope membrane metabolite transporters[J]. *J. Exp. Botany*, 2004, **400**(55): 1231– 1244.
- [40] KASHINO Y, LAUBER W M, CARROLL J A, WANG Q, WHITMARSH J, SATOH K, PAKRASHI H B. Proteomic analysis of a highly active photosystem PSII preparation from the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides[J]. *Biochemistry*, 2002, **41**(25): 8004– 8012.
- [41] LINDAHL M, SPETEA C, HUNDA T, OPPENHEIM AB, ADAM Z, ANDERSSON B. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem PSII , D1 protein[J]. *Plant Cell*, 2000, **12**: 419– 431.
- [42] SHI L X, SCHRODER W P. Compositional and topological studies of the PsbW protein in spinach thylakoid membrane[J]. *Photosynth. Res.*, 1997, **53**: 45– 53.
- [43] NAVER H, BOUDREAU E, ROCHAIX J D. Functional studies of Ycf3. Its role in assembly of photosystem PSII and interactions with some of its subunits[J]. *Plant Cell*, 2001, **13**(12): 2731– 2746.
- [44] ZAK E, PAKRASHI H B. The BtpA protein stabilizes the reaction center proteins of photosystem PSII in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 at low temperature[J]. *Plant Physiol.*, 2000, **123**: 215– 222.
- [45] ZAK E, NORLING B, MAITRA R, HUANG F, ANDERSSON B, PAKRASHI H B. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**(23): 13443– 13448.
- [46] HUANG F, PARMRYD I, NILSSON F, PERSSON A L, PAKRASHI H B, ANDERSSON B, NORLING B. Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: identification of plasma membrane proteins[J]. *Mol. Cell Proteomics*, 2002, **1**: 956– 966.
- [47] SMITH D, HOWE C J. The distribution of photosystem PSII and photosystem PSI polypeptides between the cytoplasmic and thylakoid membranes of *Cyanobacteria*[J]. *FEMS Lett.*, 1993, **110**: 341– 348.
- [48] HAMEL P, OLIVE J, PIERRE Y, WOLLMAN F A, DE VITRY C. A new subunit of cytochrome bc_1L complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(22): 17072– 17079.

- [49] WOLLMAN F A. The structure, function and biogenesis of cytochrome b6f complexes [A]. In: Rochaix J D, Goldschmidt-Clermont M, Merchant S (eds). *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* [M]. Springer Netherlands, 1998, 7: 459–476.
- [50] JANSSON S. A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci.*, 1999, 4: 236–240.
- [51] HIPLER M, KLEIN J, FINK A, ALLINGER T, HOERTH P. Towards functional proteomics of membrane protein complexes analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant J.*, 2001, 28(5): 595–606.
- [52] KLIMMEK F, SJODIN A, NOUTSOS C, LEISTER D, JANSSON S. Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants [J]. *Plant Physiol.*, 2006, 140(3): 793–804.
- [53] ZHU X Y, WANG S M, ZHANG C L. Composition and characteristic differences in photosynthetic membranes of two ecotypes of reed (*Phragmites communis* Trin.) from different habitats [J]. *Photosynthetica*, 2003, 41(1): 97–104.
- [54] WANG Y, SUN J, CHITNIS P R. Proteomic study of the peripheral proteins from thylakoid membranes of the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(9): 1746–1754.
- [55] SRIVASTAVA R, PISAREVA T, NORLING B. Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Proteomics*, 2005, 5(18): 4905–4916.
- [56] ETTINGER W F, THEG S M. Physiologically active chloroplasts contain pools of unassembled extrinsic protein of the photosynthetic oxygen-evolving enzyme complex in the thylakoid lumen [J]. *J. Cell Biol.*, 1991, 115(2): 321–328.
- [57] PELTIER J B, FRISO G, KALUMED E, ROEPSTORFF P, NILSSON F, ADAMSKA I, VAN WIJK K J. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(3): 319–341.
- [58] KIRWIN P M, ELDERFIELD P D, WILLIAMS R S, ROBINSON C. Transport of proteins into chloroplasts. Organization, orientation and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network [J]. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263(34): 18128–18132.
- [59] KIESELBACH T, HAGMAN A, ANDERSSON B, SCHRÖDER W P. The thylakoid lumen of chloroplasts. Isolation and characterization [J]. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(12): 6710–6716.
- [60] PELTIER J B, FRISO G, KALUMED E, ROEPSTORFF P, NILSSON F, ADAMSKA I, VAN WIJK K J. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 319–341.
- [61] SCHUBERT M, PETERSSON U A, HAAS B J, FUNK C, SCHRÖDER W P, KIESELBACH T. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(10): 8354–8365.
- [62] GOULAS E, SCHUBERT M, KIESELBACH T, KLECZKOWSKI L A, et al. The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature [J]. *Plant J.*, 2006, 47(5): 720–734.
- [63] SCHUBERT M. The chloroplast lumen proteome of *Arabidopsis thaliana* [D]. Intellecta DocuSys, Gteborg (ISBN: 91-7140-654-9), Stockholm. 2006: 7–37.
- [64] KIESELBACH T, BYSTEDT M, HYNDS P, ROBINSON C, SCHRÖDER W P. A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplasts thylakoid lumen [J]. *FEBS Lett*, 2000, 480(2–3): 271–276.
- [65] BABADZHANOVA M P, BABADZHANOVA M A, ALIEV K A. Free and membrane-bound multienzyme complexes with Calvin cycle activities in cotton leaves [J]. *Russian J. Plant Physiol.*, 2002, 49: 592–597.