



## 研究报告

### Research Report

## 拟南芥 *Psrp-4* 基因参与光合作用机制的研究

左然<sup>1</sup> 徐美玲<sup>1</sup> 温泽文<sup>1</sup> 张东远<sup>✉</sup>

山东省能源资源重点实验室, 中科院青岛生物能源与过程研究所, 青岛, 266101

✉ 通讯作者: zhangdy@qibebt.ac.cn 作者

基因组学与生物技术, 2012 年, 第 1 卷, 第 6 篇 doi:10.5376/gb.cn.2012.01.0006

收稿日期: 2012 年 04 月 26 日

接受日期: 2012 年 06 月 14 日

发表日期: 2012 年 06 月 15 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 3 期 257–262 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

左然等, 2012, 拟南芥 *Psrp-4* 基因参与光合作用机制的研究, 基因组学与生物技术(online) Vol.1 No.6 pp.34–39 (doi:10.5376/gb.cn.2012.01.0006)

引用格式(英文):

Zuo et al., 2012, Studies on the Functions of Plastid-specific Ribosomal Protein 4 Gene (*Psrp-4*) of Arabidopsis in Photosynthesis, Jiyinzuxue Yu Shengwu Jishu (online) Vol.1 No.6 pp.34–39 (doi:10.5376/gb.cn.2012.01.0006)

**摘 要** 叶绿体核糖体是植物特有的细胞器之一, 其主要功能是合成质体基因编码的蛋白质。已有研究表明在叶绿体核糖体内含有 6 个质体特有蛋白 PSRP (plastid-specific ribosomal protein), 分别命名为 PSRP1-PSRP6。然而, 这些蛋白在叶绿体蛋白合成过程以及光合作用中的作用机制研究尚处初级阶段。在本研究中, 为了阐明 PSRP-4 蛋白在叶绿体发育过程中的作用机制, 我们利用 Gateway 系统构建了 *Psrp-4* 基因(*At2g38140*)的 RNAi 表达载体, 转化野生型拟南芥后获得了 *Psrp-4* 基因表达量明显降低的 *psrp-4* 突变体。研究结果表明: *psrp-4* 突变体比野生型生长略微缓慢, 但叶片颜色与野生型差别不大, 能够进行正常的光合作用。在高光胁迫条件下, 测定 *psrp-4* 突变体光合化学效率, 发现与野生型差异不明显; 进一步的蛋白免疫印记实验证明 *Psrp-4* 基因表达量的降低对 PS II 反应中心 D1 蛋白的周转也没有明显影响。因此, 推测 PSRP-4 蛋白可能不是叶绿体蛋白合成以及光合作用的正常进行所必须的。

**关键词** 叶绿体核糖体; 高光胁迫; *Psrp-4* 基因; 拟南芥

## Studies on the Functions of Plastid-Specific Ribosomal Protein 4 Gene (*Psrp-4*) of Arabidopsis in Photosynthesis

ZuoRan<sup>1</sup> Xu Meiling<sup>1</sup> Wen Zenwen<sup>1</sup> Zhang Dongyuan<sup>✉</sup>

Shandong Provincial Key Laboratory of Energy Genetics, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266101

✉ Corresponding author, zhangdy@qibebt.ac.cn Authors

**Abstract** Chloroplast ribosome is an organelle which is specific to plants. Its main function is to synthesize proteins encoded by plastogenes. Study shows that chloroplast ribosome contains six PSRPs (plastid-specific ribosomal proteins), named as PSRP1-PSRP6; however, the study on the functions of those proteins in photosynthesis and protein synthesis in chloroplast is still in its infancy. To investigate the roles of PSRP-4 in chloroplast development, RNAi vector of *Psrp-4* gene (*At2g38140*) which was subsequently transformed into wild type *Arabidopsis* was constructed using Gateway technology. *psrp-4* mutant showed significant reduction in expression level. Our results indicated that the growth rate of *psrp-4* mutants was slightly lower than the wild type's; however, the leaf color of mutant and wild type plants were identical and photosynthesis in the mutant plants proceeded normally. Under high light treatment, photosynthesis efficiency of *psrp-4* mutant plants was similar to that of wild-type plants. Further western blot analysis showed that the turnover rate of D1 protein, the PS II reaction center, was not significantly affected by the down-regulation of the *Psrp-4* gene. The results above suggested that PSRP-4 might not play a pivotal role in protein synthesis or photosynthesis in chloroplast.

**Key words** Chloroplast ribosome; High light stress; *Psrp-4* gene; *Arabidopsis*

叶绿体是光合作用发生的主要场所。除了进行光合作用外, 叶绿体还参与氨基酸、脂肪酸、

维生素以及次级代谢产物等许多重要细胞组分的合成(Neuhaus and Emes, 2000)。叶绿体蛋白由叶绿



体基因和核基因共同编码完成, 其中 100 多个蛋白是在叶绿体核糖体中合成(Martin et al., 2002)。已有研究表明叶绿体核糖体共有 6 个特有蛋白, 它们由核基因编码, 并命名为 PSRP, 编号 1 至 6 (plastid-specific ribosomal protein1 to 6) (Yamaguchi and Subramanian, 2000)。

PSRP-4 蛋白是叶绿体核糖体上的特有蛋白之一。对菠菜叶绿体核糖体蛋白研究表明 PSRP-4 是 30S 小亚基里带正电荷最多的蛋白, 该蛋白与极端嗜热菌(*Thermos thermophilus*) 30S 亚基核糖体小蛋白具有高度同源性(Leontiadou et al., 2001)。拟南芥中共发现两个 *Psrp-4* 同源序列, 其中一个与菠菜 *Psrp-4* 基因高度同源, 命名为 *Ath-Psrp-4* (GenBank 登录号为 AT2g38140)。Ath-PSRP-4 蛋白前体包含 50 个氨基酸的转运肽, 并且具有另外两个特点: 即与富含赖氨酸精氨酸 Thx 蛋白高度同源以及富含脯氨酸疏水结构域。另一个同源基因为假定基因, 命名为 *Ath-Psrp-4h* (Gene bank 登录号为 AT2g2129), 该假基因在拟南芥的 EST 数据库中尚且没有确定转录本(Yamaguchi and Subramanian, 2003), *Ath-PSRP-4h* 假定蛋白转运肽更短, 推测其可能是线粒体蛋白。然而, 关于 Ath-PSRP-4 蛋白在叶绿体蛋白合成以及光合作用中的作用机制尚无报道。

基因缺失突变体是目前基因功能研究的有效手段之一。其中 RNAi 技术作为一项快速、高效、便于操作的技术, 是创制基因缺失突变体的重要方法(Hannon, 2002), 在植物基因功能的研究得到广泛的应用(Chuang and Meyerowitz, 2000)。

本文通过对 *Psrp-4* 基因进行序列分析, 利用 Gateway 系统(Earley et al., 2006)构建该基因的 RNAi 载体并转化拟南芥, 分析了基因对拟南芥光合作用的影响, 为进一步探究核糖体的分子调控机制及其在叶绿体蛋白周转中的作用奠定基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 *Psrp-4* 基因分析及克隆

*Psrp-4* 基因在拟南芥中全长为 730 bp, 含有三个外显子(图 1A)。*Psrp-4* 基因序列及其氨基酸序列分析表明, 该基因 cDNA 全长 556 bp, 其中 ORF (the open reading frame)编码一条约为 118 个残基的蛋白质。提取野生型拟南芥总 RNA, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到共 3 条带, 分别为

28S RNA、18S RNA 和 5S RNA。其中, 28S RNA 与 18S RNA 的亮度比例约为 2:1, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.9-2.0 之间, 表明总 RNA 质量较好(图 1B)。用本实验设计的引物进行 PCR 扩增 *Psrp-4* 基因 RNAi 片段, 并经电泳检测, 得到一条分子量为 150 bp 左右的条带(图 1C), 片段大小与预测相同。

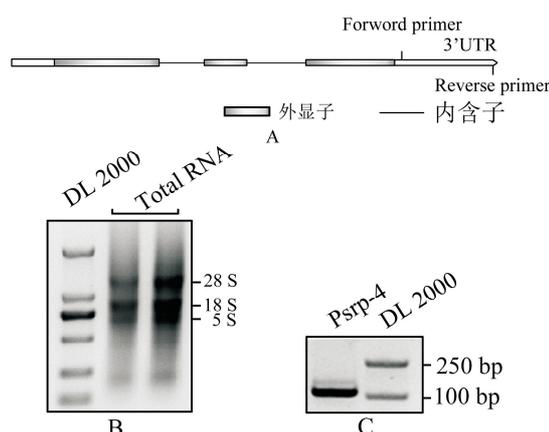


图 1 *Psrp-4* 基因分析及 RNAi 片段克隆

注: A: *Psrp-4* 基因结构分析及 RNAi 引物设计位点; B: 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图; C: *Psrp-4* 基因 RNAi 片段 PCR 扩增(Marker: DL2000)

Figure 1 *Psrp-4* gene analysis and clone.

Note: A: Analysis of *Psrp-4* gene structure and primer sites designed for RNAi fragment cloning; B: Gel electrophoresis of total RNA; C: PCR products of *Psrp-4* RNAi fragment (Marker: DL2000)

### 1.2 利用 Gateway 技术构建 *Psrp-4* 基因 RNAi 载体

BP 反应后阳性克隆检测: 将克隆得到的 *Psrp-4* 基因 RNAi 片段与 Gateway 入门载体 pGWC-T 进行连接反应, 转化大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$  感受态, 涂布抗生素平板, 随机挑取单克隆并进行菌体 PCR 反应, 经琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物片段大小与目的基因片段一致(图 2A)。将检测所得阳性克隆测序, 测序结果经比对与目的序列相同, 表明 RNAi 片段已成功插入到入门载体中, 命名为 *Psrp-4*-RNAi-pGWC。利用该质粒进行后续 LR 反应后, 再次转化大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$  感受态并涂布抗生素平板。

LR 反应后阳性克隆检测: 为检测目的 RNAi 片段是否成功插入到 RNAi 载体即 pJawoh18 载体中, 挑取克隆菌液, 进行 PCR 扩增检测。结果表明, PCR 产物片段与目的片段序列大小相同(图 2B)。测序正确, 命名该表达载体为 *Psrp-4*-pJaw oh18。

转化: 将 *Psrp-4*-pJawoh18 表达载体电击转化农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101, PCR

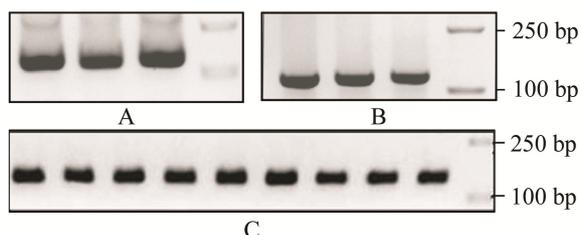


图 2 *Psrp-4* 基因 RNAi 载体构建

注: A: BP 反应后阳性克隆的验证; B: LR 反应后阳性克隆 PCR 检测; C: *Psrp-4* 基因 RNAi 载体 PCR 鉴定(2%琼脂糖电泳分析, Marker: DL2000)

Figure 2 Construction of *Psrp-4* RNAi vector.

Note: A: PCR detection of positive clones derived from BP reaction; B: PCR detection of positive clones derived from LR reaction; C: PCR identification of *Psrp-4* gene RNA interference vector (2% agarose gel electrophoresis, Marker: DL2000)

扩增检测, 获得阳性克隆(图 2C)。选取阳性克隆测序, 表明得到成功转化的农杆菌。

### 1.3 转基因植株的获得及表达分析

pJawoh18 载体中携带除草剂抗性标记基因 *Bar*, 喷洒 Basta 后非转基因植株(即野生型拟南芥)枯化死亡, 而转基因植株抗除草剂, 叶片颜色为绿色, 可正常生长(图 3A)。通过此方法鉴定并获得 5 株转基因植株。

为鉴定 *Psrp-4* 基因的表达量, 以 *Actin* 基因作为内参基因, 对 5 棵阳性植株进行了半定量 PCR。分析结果显示 *Psrp-4* 基因在 5 个转基因拟南芥中都能正常转录表达, 但表达量不同程度地低于野生型拟南芥(图 3B), 说明在转基因植株中该基因的表达受到了抑制。我们选择 *Psrp-4* 基因表达抑制最为强烈的 2 号转基因植株作为后续的实验材料, 并命名为 *psrp-4* 突变体。

### 1.4 野生型和 *psrp-4* 突变体植株生长曲线测定

在正常生长条件下, 突变体和野生型的幼苗在培养间生长 3 周后, *psrp-4* 突变体比野生型植株略小, 叶片颜色正常, 可进行正常的光合自养(图 4A); 在生长过程中突变体植株的叶面积增长速率要比野生型的稍微缓慢, 但差别不明显(图 4B), 与表型观察结果相同。结果说明, 在正常培养条件下, *psrp-4* 突变体可进行正常生长, 与野生型拟南芥相比没有明显区别。

### 1.5 强光诱导 *psrp-4* 突变体的光抑制情况

我们将野生型和 *psrp-4* 突变体的离体叶片分

别强光胁迫( $1\ 200\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ )处理 1~4 h 后, 检测其最大光化学效率(Fv/Fm)的变化(图 5A)。经过 4 h 高光处理后, *psrp-4* 突变体的最大光化学效率降低速度及下降幅度与野生型相比均无明显的变化。结果表明, 与野生型相比, *psrp-4* 突变体的 PS II 对光能的利用效率变化不大, 光系统的电子传递正常, 没有受到损伤。

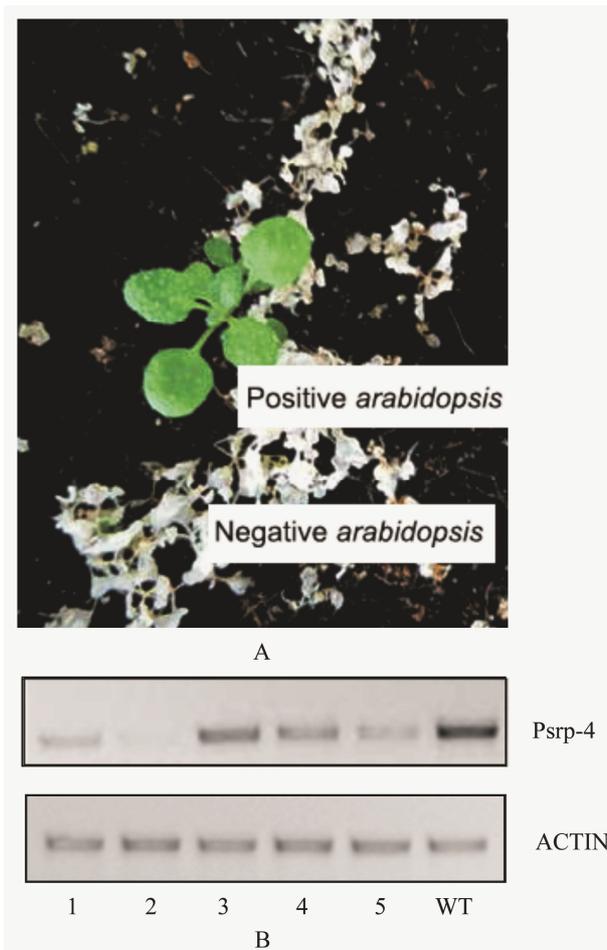


图 3 转基因植株的获得与分析

注: A: Basta 筛选转基因植株; B: *Psrp-4* 基因的半定量 RT-PCR 检测(1~5 为转基因拟南芥; WT: 野生型拟南芥)

Figure 3 Obtainment and analysis of transgenic plants.

Note: A: Basta resistance screening for transgenic plants; B: Semi-quantitation RT-PCR detection of *Psrp-4* gene expression (1-5: transgenic *Arabidopsis*; WT: wild-type *Arabidopsis*)

为了进一步检测 PS II 反应中心 D1 蛋白和 D2 蛋白含量的变化, 我们进而提取经强光处理后的野生型和 *psrp-4* 突变体拟南芥叶片的类囊体膜进行蛋白免疫印记分析。结果发现, 强光处理条件下, *psrp-4* 突变体中 D1 蛋白和 D2 蛋白的变化情



况与野生型拟南芥的基本一致(图 5B)。

## 2 讨论

近年来, 植物叶绿体研究被越来越多的学者所

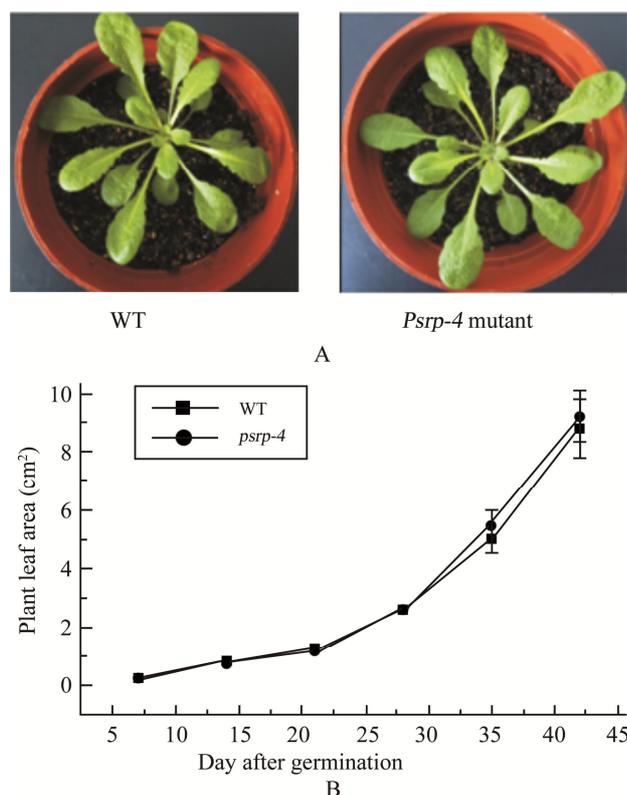


图4 野生型和 *psrp-4* 突变体植株表型及生长曲线  
 注: A: 正常生长5周的野生型与 *psrp-4* 突变体; B: 野生型与 *psrp-4* 突变体生长曲线  
 Figure 4 Phenotype and growth rate of WT and *psrp-4* mutant plants.  
 Note: A: Phenotype of 5-week-old WT and *psrp-4* mutant under normal conditions; B: Growth kinetics of *psrp-4* mutant and WT plants

重视, 拟南芥基因组序列分析表明, 约 1/5 的核基因编码的产物定位于叶绿体(Leister, 2003), 大部分功能尚不明确(Friso et al., 2004)。叶绿体核糖体是植物特有的细胞器核糖体, 研究证实许多叶绿体核糖体组成蛋白在叶绿体蛋白的合成和光合作用过程中起着重要的作用。玉米 *PRPS17* 基因突变后, 造成 PS II 复合物的数量减少, 并影响光合电子的传递(Schultes et al., 2000); 在拟南芥中, *PRPL11* 被敲除后, 叶片颜色及生长速率发生变化(Pesaresi et al., 2001), 而 *PRPS21* 被敲除后, 植株光合作用受到抑制(Morita-Yamamuro et al., 2004)。

在拟南芥中, *Psrp-4* 有两个基因拷贝, *AT2g38140* 和 *AT2g2129*、*AT2g2129* 为假基因, 在

拟南芥的 EST 数据库中尚且没有确定转录本。因此我们对 *AT2g38140* 进行了基因克隆与 RNAi 载体构建, 并进行了光合相关功能研究。

研究结果显示, 在正常生长条件下, 与野生型相比, *psrp-4* 突变体生长速度有所减慢, 但差异并不明显, 说明在正常生长条件下 *Psrp-4* 基因对拟南芥植株的生长发育的作用并不显著。

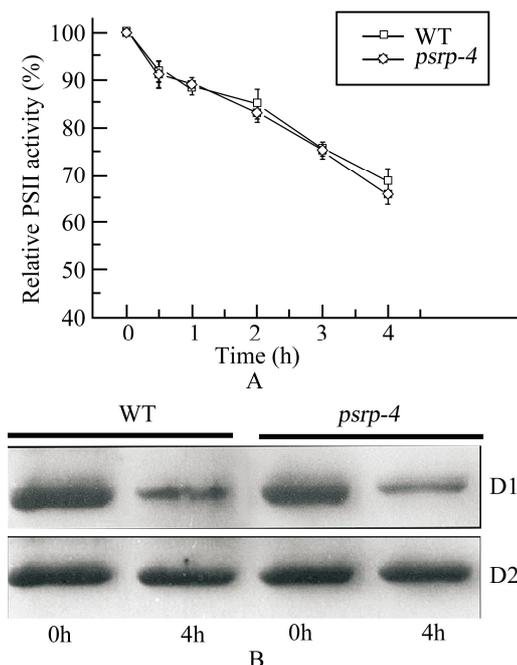


图5 强光胁迫条件下 *psrp-4* 突变体 PS II 的活性变化及反应中心 D1 蛋白的降解  
 注: A: 野生型(方形)和 *psrp-4* 突变体(圆形)在强光 ( $1\ 200\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) 处理条件下 PS II 的最大光化学效率 ( $F_v/F_m$ ) 的变化; B: 在林可霉素存在条件下, 强光 ( $1\ 200\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) 处理时 PS II 中心 D1, D2 蛋白的含量变化  
 Figure 5 PS II activity changes and degradation of D1 protein, the PS II reaction center, under photoinhibition conditions  
 Note: A: PS II photosynthesis efficiency ( $F_v/F_m$ ) changes of WT (squares) and *psrp-4* mutant (circles) under high light illumination ( $1\ 200\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ); B: Amount changes of D1 and D2 proteins in PS II reaction center under high light illumination ( $1\ 200\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) in the presence lincomycin

光是光合作用所必需的, 但若光强过高, 会造成光胁迫。光系统 II (PS II) 是执行光诱导电荷分离和电子传递的基本单位, 该系统对高光胁迫敏感, 因而我们将野生型拟南芥和 *psrp-4* 突变体的离体叶片进行高光处理后, 测定其最大光化学量子产量 ( $F_v/F_m$ )。结果显示, 相比于野生型拟南芥, *psrp-4* 突变体的光系统没有明显的变化。同时, D1 蛋白的快速周转是 PS II 的重要修复机制



(Long et al., 1994)。而 D2 蛋白的降解速度则远比 D1 蛋白低。为了证明 PS II 蛋白是否发生了变化, 我们以 D2 蛋白作为 D1 蛋白降解的参照, 进行了蛋白免疫印记实验。实验发现, 与野生型拟南芥相比, *psrp-4* 突变体 PS II 的核心蛋白 D1/D2 并未发生明显变化, 这与上述光化学效率的实验结果是一致的。

以上实验数据说明, 在转基因植株中, *Psrp-4* 基因的表达受到了抑制, 但其生长发育和光系统特征与野生型相比均无明显变化, 说明 *Psrp-4* 基因在光系统中并未起到重要的作用。但是由于 RNAi 并未完全敲除 *Psrp-4* 基因, 可能较低表达量的 *Psrp-4* 基因即可满足植物生长发育的需要, 因此需要进一步的实验如定购 T-DNA 插入突变体等进行验证。这些初步的研究结果, 为进一步认识和了解 *Psrp-4* 基因在拟南芥中的作用机制创造了条件。

### 3 材料与方 法

#### 3.1 植物材料、菌株和质粒

拟南芥为野生型 Col-0 (*Arabidopsis thaliana*)、pGWC-T 载体、pJawoh18 载体为实验室所有; 大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$  购自 TaKaRa 公司, 农杆菌 GV3101 为实验室保存。

#### 3.2 试剂与酶

植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 快速回收试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒等购自北京天根生化试剂有限公司; PCR 试剂、Solution I、反转录试剂盒等购自 TaKaRa 公司; 引物合成和测序由华大基因完成。

#### 3.3 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

总 RNA 的提取参照 RNA prep pure Plant Kit (QIAGEN) 说明书进行; cDNA 合成按 Prime Script II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 说明合成。

#### 3.4 目的基因片段克隆及序列测定

根据 NCBI 中公布的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *Psrp-4* 基因(GenBank 登录号为 AT2G38140)的 3'UTR 区保守区设计 1 对特异性 PCR 引物 F: 5'-ATGAGATTCTTCACTTGTGTC-3'; R: 5'-AAAGACTCAATGATTCATAAAGA-3'。利用该对引物, 以上述制备好的拟南芥的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 29 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。2%琼

脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后, 切胶回收目的条带并进行纯化, 利用紫外分光光度计测定产物浓度。

#### 3.5 利用 Gateway 技术构建 *Psrp-4* 基因 RNAi 载体

BP 反应: 配制以下连接反应体系: pGWC-T 1  $\mu$ L (约 50 ng), Solution I 5  $\mu$ L, *Psrp-4* 基因 PCR 回收产物 3  $\mu$ L, 终体积 10  $\mu$ L。25 $^{\circ}$ C 反应 4 h。转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态, 并涂布含有 Amp 的 LB 平板, 待转化菌落长出后, 随机挑取单克隆, 进行 PCR 鉴定后送往华大基因测序。

提取经测序验证的阳性克隆菌液质粒作为入门载体, 进行 LR 反应。

LR 反应: 在 0.5 mL 离心管中配制以下反应体系(总体积 5  $\mu$ L): 入门载体克隆 1  $\mu$ L (30~50 ng), pJawoh18 vector 1  $\mu$ L (30~50 ng), LR Enzyme Mix 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L。25 $^{\circ}$ C 水浴 4 h, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态, 经菌液 PCR 鉴定后测序。提取测序正确的阳性克隆菌液质粒即为重组载体。

#### 3.6 农杆菌及拟南芥的遗传转化

将重组载体通过电击法转化农杆菌菌株 GV3101, 采用花序滴定法转化野生型拟南芥。收取转化后拟南芥种子并充分干燥, 置 4 $^{\circ}$ C 春化 48 h 后均匀播撒于培养土中, 7 d 后待幼苗子叶完全张开时喷洒浓度为 0.1% 的 Basta 溶液进行转基因植株筛选。

#### 3.7 半定量 PCR (Semi-quantitation RT-PCR) 分析

通过半定量 RT-PCR 法对转基因拟南芥 *Psrp-4* 基因的表达量进行分析, 采用相关试剂盒进行野生型拟南芥和转基因植株叶片的总 RNA 提取与 cDNA 合成。根据目的基因设计特异引物 P4rtF: 5'-CTCAGCCCAACTAAACCAAT-3'; P4rtR: 5'-CACCTATCAGGCACACCTT-3'。以肌动蛋白基因 *Actin5* 为内参照基因, 引物序列为 AcF: 5'-TCTTCTTCCGCTCTTTCTTTCC-3'; AcR: 5'-TCTTACAATTTCCCGCTCTGC-3'。RT-PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。根据电泳检测的结果调整模板浓度, 直至各样品的 *Actin5* 基因的扩增条带亮度一致, 然后利用 *Psrp-4* 引物扩增调整过的模板 32 个循环, 进行电泳检测基因表达量。

#### 3.8 生长曲线测定

分别选取 10 株突变体和野生型拟南芥植株, 从长出两片真叶时开始测定, 测定生长在同一位置的 2 片叶, 将叶片固定在滤纸上并用铅笔描出轮廓, 按轮廓剪下滤纸片后称重并与单位面积重量换算得



出叶面积。计算公式: 叶面积=(剪下滤纸片的重量×单位面积)/单位面积重量。并以叶面积为纵坐标, 测定时间点为横坐标, 绘制植株生长曲线图。

### 3.9 高光胁迫实验

取温室中培养 5 周的转基因植株与野生型植株完全展开的叶片, 将离体叶片叶面向上浸于水中, 室温条件下, 用强度为  $1\ 200\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  光照处理相应时间。利用荧光测定仪 PAM-2000 测定相关指标。测定后, 立即将叶片投入液氮速冻后置  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存, 直至后续实验使用。

### 3.10 蛋白免疫印记分析

分别提取转基因植株与野生型拟南芥的类囊体膜, 采用 Laemmli (1970) 系统进行 SDS-PAGE 电泳, 通过 Bio-rad 装置将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白进行转膜。经封闭液封闭后, 加入蛋白特异性一抗, 进行过夜处理。最后加入辣根过氧化物酶二抗, 反应 2 小时。经发光液发光后用 X-ray 底片曝光处理。

### 作者贡献

左然完成该研究的实验结果分析及写作工作, 徐美玲主要参与了该研究的实验内容, 温泽文参与实验数据分析, 张东远对本研究进行了实验设计。

### 致谢

感谢国家自然科学基金面上项目 (31070217) 的资助, 感谢匿名评审专家的评审建议和修改建议。

### 参考文献

Chuang C.F., and Meyerowitz E.M., 2000, Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(9): 4985-4990 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.060034297> PMID:10781109

Earley K.W., Haag J.R., Pontes O., Opper K., Juehne T., Song K., and Pikaard C.S., 2006, Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics, Plant J., 45(4):616-629 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x> PMID:16441352

Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.B., Rudella A., Sun Q., and van Wijk K.J., 2004, In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database, Plant Cell, 16(2): 478-499 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.017814> PMID:14729914 PMID:14729914

Hannon G.J., 2002, RNA interference, Nature, 418(6894): 244-251 <http://dx.doi.org/10.1038/418244a> PMID:12110901

Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685 <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> PMID:5432063

Leister D., 2003, Chloroplast research in the genomic age, Trends in Genetics, 19(1): 47-56 [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)00003-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00003-3)

Leontiadou F., Triantafyllidou D., and Choli-Papadopoulos T., 2001, On the characterization of the putative S20-Thx operon of *Thermus thermophilus*, Biol. Chem., 382(7): 1001-1006 <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2001.126> PMID:11530930

Long S.P., Humphries S., and Folkowski P.G., 1994, Photo-inhibition of photosynthesis in nature, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 45(1): 633-662 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.003221>

Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M., and Penny D., 2002, Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(19): 12246-12251 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.182432999> PMID:12218172 PMID:129430

Morita-Yamamuro C., Tsutsui T., Tanaka A., and Yamaguchi J., 2004, Knock-out of the plastid ribosomal protein S21 causes impaired photosynthesis and sugar-response during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*, Plant Cell Physiol., 45(6): 781-788 <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pch093> PMID:15215513

Neuhaus H.E., and Emes M.J., 2000, Nonphotosynthetic metabolism in plastids, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 51: 111-140 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.111> PMID:15012188

Pesaresi P., Varotto C., Meurer J., Jahns P., Salamini F., and Leister D., 2001, Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis, Plant J., 27(3): 179-189 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01076.x> PMID:11532164

Schultes N.P., Sawers R.J.H., Brutnell T.P., and Krueger R.W., 2000, Maize high chlorophyll fluorescent 60 mutation is caused by an Ac disruption of the gene encoding the chloroplast ribosomal small subunit protein 17, Plant J., 21(4): 317-327 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00676.x> PMID: 10758483

Yamaguchi K., and Subramanian A.R., 2000, The plastid ribosomal proteins: Identification of all the proteins in the 30S subunit of an organelle ribosome (chloroplast), J. Biol. Chem., 275(37): 28466-28482 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M004350200> PMID:10874039 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M005012200> PMID:10874046

Yamaguchi K., and Subramanian A.R., 2003, Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit, Eur. J. Biochem., 270(2): 190-205 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03359.x> PMID:12605670