

温度对拟南芥 STN7 激酶表达及 LHC 蛋白磷酸化的影响

胡源, 高秀, 蒋佳宏, 冉艳, 杜林方*

四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064;

四川大学纳米生物医学技术与膜生物学研究所, 成都 610041

* 联系人, E-mail: dulinfang@scu.edu.cn

2008-04-16 收稿, 2008-06-05 接受

国家自然科学基金(批准号: 30270124)、教育部博士点基金(批准号: 20020610094)、教育部新世纪人才支持计划(批准号: NCET-04-0861)和四川大学 985 项目资助

摘要 拟南芥 STN7 蛋白激酶参与了 LHC 蛋白的磷酸化和状态转换过程. 本研究根据 STN7 激酶的蛋白序列, 合成了一段含 11 个氨基酸的亲水肽段, 与牛血清蛋白 BSA 偶联后, 免疫家兔制备得到合成多肽的抗体, 免疫双扩散和 Western blot 检测表明该多肽抗体效价和特异性较高. 借助该多肽抗体、磷酸化抗体和低温(77 K)荧光, 研究了温度对拟南芥 LHC 蛋白的磷酸化、状态转换和 STN7 激酶表达的影响. 结果表明, 温度不仅调节 LHC 蛋白的磷酸化水平, 而且还调节 STN7 激酶的表达水平. 另外, LHC 蛋白的磷酸化随温度的变化趋势与 STN7 激酶表达量的变化趋势相对一致, 并且与状态转换密切相关, 为 LHC 蛋白磷酸化及 STN7 激酶表达调控机理研究提供了有用的信息.

关键词

LHC 磷酸化
STN7 蛋白激酶
合成多肽
77 K 荧光
温度影响

植物在生长过程中, 外界环境, 如光照强度和温度不断变化. 植物可以通过状态转换(state transitions)机制调节两个光系统之间激发能的分配, 以适应短期环境因素的变化. 早期的研究认为, 光系统 (PS) 的捕光天线色素蛋白复合体 LHC 的可逆磷酸化与状态转换有关^[1,2], 但其分子机制至今仍未阐明. 最近研究发现, 拟南芥类囊体膜结合的 STN7 蛋白激酶参与了 LHC, Lhcb4.2 (CP29) 蛋白的磷酸化和状态转换过程^[3,4]. STN7 激酶属于核基因编码, 定位于类囊体膜的蛋白激酶^[5], 第 167 位的 Lys 定点突变成 Arg 或 Gln 都会导致其激酶功能的丧失^[3], 但其催化调控机制尚无研究报道.

环境温度是影响植物光合机构效率和光合基因表达的一个重要因素, 低温或高温处理会对光合机构造成一定的危害^[6,7]. 类囊体膜蛋白磷酸化程度发生变化可能是植物响应环境温度变化的一种方式^[8]. 然而, 温度对植物 LHC 蛋白磷酸化和 STN7 激酶表

达调控尚未见相关报道, 因此研究温度对 LHC 蛋白磷酸化和 STN7 激酶表达的影响具有非常重要的意义. 由于 STN7 激酶定位于类囊体膜上, 难以纯化制备抗体, 为此本研究在结构预测的基础上^[9], 选择了位于类囊体膜外侧的亲水肽段, 合成后偶联牛血清蛋白(BSA)作为抗原免疫家兔, 制备得到特异抗合成多肽的抗体, 以研究不同温度对拟南芥 STN7 激酶蛋白表达的影响; 并通过低温(77 K)荧光分析, 研究了不同温度条件下 LHC 蛋白磷酸化与状态转换的关系, 以期能了解 LHC 蛋白磷酸化、状态转换和 STN7 激酶表达的关系.

1 材料与方法

() STN7 多肽设计、合成和抗体制备. 根据 NCBI 收录的 STN7 激酶的序列(NP_564946), 在结构预测和跨膜区预测^[9]的基础上, 结合哈佛大学的 Antigenic Peptides 程序进行抗原决定簇分析, 选择位

于类囊体膜外侧、亲水性和抗原性较好的区域,设计出含11个氨基酸残基的多肽(SKKRSNEEGEY),并返回到NCBI数据库中进行比对分析,检测其特异性.此11肽由北京赛百盛公司合成并纯化,经HPLC检测其纯度为89.89%.为提高合成多肽抗体的免疫原性,按照本实验室制备D1蛋白多肽抗体的方法^[10],与载体蛋白BSA连接后,每次取0.5 mL BSA-多肽偶联产物作抗原,与等体积的完全福氏佐剂进行充分乳化,多点皮下注射家兔.每隔7 d加强一次免疫,经免疫双扩散法测定其效价达到要求后,颈动脉放血,分离血清,分装于-20 °C保存.

() 材料培养和温度处理叶片. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia)温室培养(22 °C, 10 h/14 h, 昼/夜, 光照强度为 100 μmol·m⁻²·s⁻¹). 成熟叶片暗置过夜后,漂浮在液体培养基 MY 上,分别在低温(6 °C, LT)、生长温度(22 °C, GT)和高温(35 °C, HT)下光照 3 h.

() 拟南芥类囊体膜提取及叶绿素含量测定. 参照魏慧敏等人^[11]的方法,从温度处理后的叶片中提取类囊体膜,整个过程 4 °C 避光进行.提取的类囊体膜用液氮速冻,储存于-80 °C 冰箱中,并按Porra等人^[12]的方法测定叶绿素a和b含量.

() Urea-SDS-PAGE 电泳与 Western blot 分析. Urea-SDS-PAGE 参照文献[13]所述方法进行,采用15%含6 mol/L尿素的分离胶和5%浓缩胶.每泳道样品含5 μg叶绿素,类囊体膜蛋白组分经SDS-PAGE(尿素胶)分离后,用考马斯亮蓝R-250染色或电转移至PVDF膜上进行Western blot免疫检测反应.用磷酸化的苏氨酸抗体(Zymed公司)检测磷酸化的LHC 蛋白,并用制备的多肽抗体检测STN7 激酶表达含量.采用ECL发光系统(Amersham Biosciences)检测,并用凝胶成像系统(Bio Imaging System)进行定量分析^[14].

() 类囊体膜低温(77 K)荧光光谱测定. 采用Hitachi FL-4500 荧光分光光度计测定拟南芥类囊体膜的77 K 荧光发射光谱.类囊体膜与等体积的甘油快速混合后加入4 mm 的石英管,插入液氮杜瓦瓶,进行荧光光谱测定.激发光波长分别为436 nm(激发叶绿素a)和475 nm(激发叶绿素b),记录600~800 nm处发射光谱(狭缝宽度为5 nm),样品叶绿素终浓度为15 μg/mL,分别进行3次扫描和测定.对反映PS II 和PS I 的峰值进行了分析,分别计算436 nm 激发或

475 nm 激发条件下的 F_{727}/F_{685} 比值.

2 结果

2.1 STN7 多肽抗体制备与鉴定

STN7 激酶是膜蛋白. ProtScale程序分析表明,该蛋白含有较多的疏水性氨基酸残基^[9],可供选择的多肽设计位点不多,综合考虑多肽的亲水性、抗原性、多肽位置和合成要求,选择位于膜外的一段亲水肽段,该区域具有较好的免疫原性.将合成多肽与载体蛋白BSA偶联并免疫新西兰家兔,经过4次加强免疫注射后,用免疫双扩散方法检测发现STN7 抗血清能够特异地识别多肽抗原,效价达到1:128(数据未列出).

为了验证多肽抗体的特异性,我们将拟南芥类囊体膜组分电泳后转移至PVDF膜,用上述制备的STN7 抗血清进行Western杂交(图1),可清楚看到在大约64 kD左右有一条蛋白杂交条带,与STN7 激酶分子量相同,并且光照处理叶片的含量明显增加,表明该抗体能够用于STN7 表达研究.

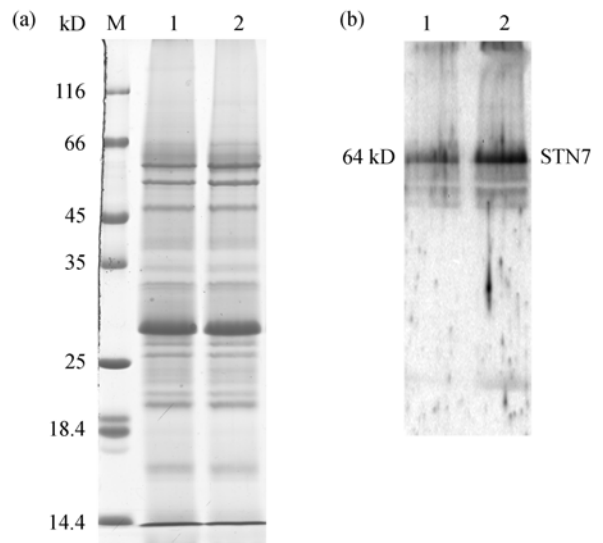


图1 STN7 抗体的 Western blot 鉴定

(a) 拟南芥类囊体膜蛋白的 SDS-PAGE 电泳; (b) 类囊体膜蛋白转移到 PVDF 膜上,用制备的抗体进行 Western blot 检测. 1, 未光照; 2, 光照 3 h

2.2 温度对拟南芥 LHC 蛋白磷酸化的影响

为了考察温度变化时, LHC 蛋白磷酸化的稳态变化,将成熟的拟南芥叶片暗置过夜后,移至不同温度(6 °C, 22 °C 和 35 °C)条件下进行光照 3 h. 变性尿素胶电泳分离类囊体膜蛋白组分后,用考马斯亮蓝染

色, 同时用磷酸化苏氨酸抗体进行蛋白杂交分析. 图 2(b)显示在 43, 32, 30 和 28 kD 的位置上分别检测到了 4 条磷酸化蛋白的杂交带, 与他人检测到的类囊体膜蛋白磷酸化结果一致^[11,14,15], 经 LHC 抗体杂交确定 28 kD 处为磷酸化的 LHC 蛋白. 结果表明, LHC 蛋白的磷酸化受温度调控, 在低温 6 下磷酸化水平最低, 当温度上升到 25 时, 其磷酸化水平上升了 40%, 而当温度继续上升到 35 时, 其磷酸化水平继续增加约 6%(图 2(c)), 说明其磷酸化已达到饱和状态.

2.3 温度对拟南芥类囊体膜低温(77 K)荧光的影响

通过测定类囊体膜低温 77 K 荧光发射光谱可以了解两个光系统之间能量分配和状态转换^[16,17], 因此本研究测定了不同温度条件下拟南芥类囊体膜的 77 K 荧光光谱, 以期考察温度对光能在两个系统间的分配和状态转换的影响情况. 图 3 显示, 无论是 436 nm 还是 475 nm 波长光激发拟南芥类囊体膜, 在 685~695 和 727 nm 处都有两个荧光峰, 分别代表 PS 和 PS 的特征荧光发射峰, 其中 685 nm 的荧光峰来自

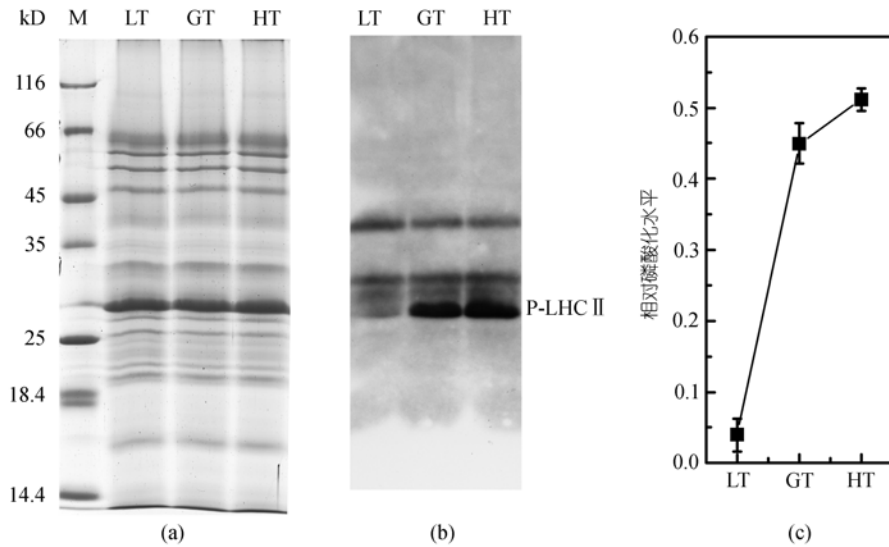


图 2 拟南芥类囊体膜蛋白 SDS-PAGE 电泳与 Western blot 检测

(a) 类囊体膜蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 每孔道为 5 μ g 叶绿素; (b) 类囊体膜蛋白转移到 PVDF 膜上, 用磷酸化苏氨酸抗体进行 Western blot 检测; (c) LHC 蛋白的相对磷酸化水平. 叶片在低温(6 $^{\circ}$ C, LT)、生长温度(22 $^{\circ}$ C, GT)和高温(35 $^{\circ}$ C, HT)下光照 3 h, 制备类囊体膜

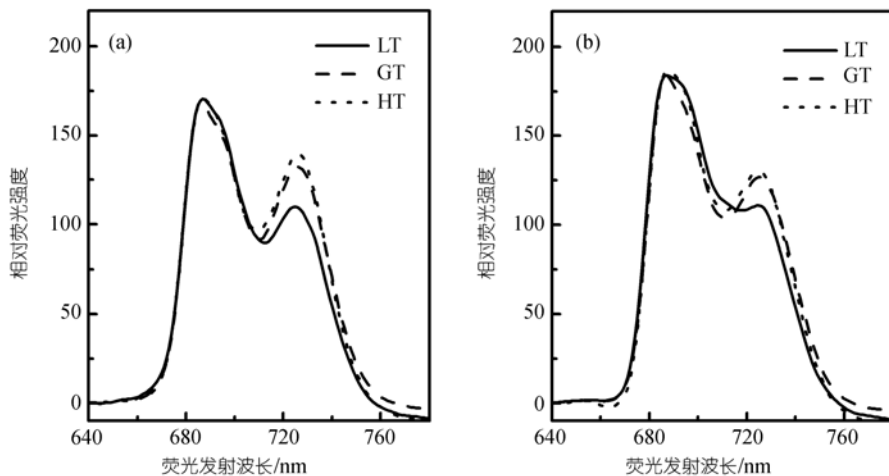


图 3 拟南芥类囊体膜的低温(77 K)荧光发射光谱

(a) 激发光波长为 436 nm (激发叶绿素 a); (b) 激发光波长为 475 nm (激发叶绿素 b). 77 K 荧光光谱测定 3 次, 在 685 nm 均一化

于PS 的反应中心, 而 727 nm 的荧光峰来自于PS 的天线蛋白^[18,19].

由于 $F_{PS} / F_{PS} (F_{727}/F_{685})$ 比值大小可以反映激发能在两个光系统之间的分配情况, 我们分别计算了 436 或 475 nm 激发条件下的 F_{727}/F_{685} 的比值(表 1), 对光能在两个光系统之间的分配做了分析. 436 nm 波长光激发叶绿素 *a* 时, 在低温 6 °C 下 F_{727}/F_{685} 的比值最小, 为 0.693 ± 0.008 , 温度升高到 22 °C, F_{727}/F_{685} 比值增加到 0.806 ± 0.021 , 增加了 16%, 而当温度从 22 °C 升高到 35 °C, F_{727}/F_{685} 增加到 0.854 ± 0.036 , 仅仅增加了 6%. 当 475 nm 波长光激发 Chl *b* 时, 同样在低温 6 °C 下 F_{727}/F_{685} 的比值最小, 为 0.656 ± 0.009 , 温度升高到 22 °C, F_{727}/F_{685} 增加到 0.729 ± 0.022 , 增加了 11%, 而当温度从 22 °C 升高到 35 °C, F_{727}/F_{685} 增加到 0.758 ± 0.021 , 仅仅增加了 4%. 结果表明随着温度的升高, 更多的激发能被分配到 PS 。

表 1 拟南芥类囊体膜的低温荧光光谱 F_{PS} / F_{PS} 比值

温度条件	$F_{PS} / F_{PS} (F_{727}/F_{685})$	
	$E_x = 436 \text{ nm}$	$E_x = 475 \text{ nm}$
LT (6 °C)	0.693 ± 0.008	0.656 ± 0.009
GT (22 °C)	0.806 ± 0.021	0.729 ± 0.022
HT (35 °C)	0.854 ± 0.036	0.758 ± 0.021

2.4 温度对拟南芥 STN7 激酶蛋白表达的影响

由于 STN7 激酶参与了 LHC 蛋白的磷酸化, 借助制备的多肽抗体, 我们考察了温度变化对 STN7 激酶表达的影响. 图 4 显示低温 6 °C 时, STN7 激酶的表达量较弱, 随着温度的升高其表达量逐渐增加, 在高温 35 °C 时表达量相对较多. 值得注意的是, STN7 激酶蛋白相对含量随温度变化趋势与 LHC 蛋白磷酸化响应温度变化的趋势是一致的.

3 讨论

自从 1977 年 Bennett^[20] 发现存在着光诱导的 LHC 蛋白磷酸化现象以来, 对 LHC 蛋白磷酸化的调控机制和生理意义的研究一直是热点. 大量研究表明, LHC 蛋白的磷酸化不仅受质体醌还原水平的调控^[21,22], 而且还受到高光照强度条件下叶绿体中硫醇氧化还原状态的下调作用^[23] 以及在底物水平发生光诱导调控^[24]. 我们的研究表明, 温度影响 LHC 蛋白的磷酸化, 与生长温度 22 °C 相比, LHC 蛋白的磷酸化水平在低温 6 °C 相对较低(图 2), 此时非磷酸化的 LHC 与 PS 结合, 使 PS 的光能吸收相对较多,

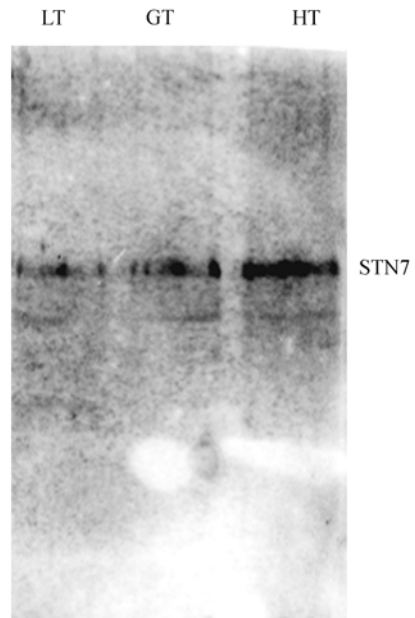


图 4 拟南芥 STN7 激酶在不同温度条件下的表达

导致 F_{PS} / F_{PS} 比值相对最低(表 1); 而在高温 35 °C 时, LHC 蛋白的磷酸化水平达到最大, 此时大部分磷酸化的 LHC 与 PS 解离, 迁移并与 PS 结合, 降低了 PS 的光能吸收, 导致 F_{PS} / F_{PS} 比值达到最高. 这一结果说明了 LHC 蛋白的磷酸化与状态转换密切相关, 证实了早期假说的正确性.

另外, 植物在响应外界环境和自身生理过程的变化时, 除基因转录水平的调控外, 翻译后蛋白水平的调控也起着重要的作用, 而抗体是研究蛋白质功能和蛋白表达水平的一个非常重要的工具. 由于 STN7 激酶是类囊体膜蛋白, 难以纯化得到, 另外膜蛋白原核表达难以形成正确的蛋白折叠方式, 给纯化带来一定的困难, 因此难以制备抗体. 而研究得知, 多肽中如果有 7 个氨基酸序列与某一功能蛋白保守区的氨基酸序列完全相同, 并且这几个氨基酸亲水性强, 具有良好的免疫原性, 则该多肽可以替代该蛋白作为抗原制备抗体^[25], 我们曾用该方法成功地制备了类囊体膜蛋白(D1 蛋白)^[10] 和线粒体内膜上交替氧化酶的多肽抗体^[26]. 为了提高多肽的免疫原性, 我们将多肽与载体蛋白 BSA 偶联后, 免疫家兔得到的抗血清与拟南芥类囊体膜蛋白表现出较好的杂交性(图 1), 说明制备的该抗体能够用于 Western 杂交来研究 STN7 激酶的表达. 借助该抗体, 我们进一步研究了温度对 STN7 激酶蛋白表达的影响, 结果表明 STN7 激酶的表达同样受温度影响(图 4), 进而控制着

LHC 蛋白的磷酸化水平.

综上所述, 温度变化不仅影响了 STN7 激酶的活性大小, 使其作用底物 LHC 蛋白的磷酸化水平发生变化, 从而导致拟南芥叶片对光能吸收和分配的

改变; 同时, STN7 激酶为核基因编码, 其表达水平也发生了相应的变化, 暗示着这是拟南芥光合机构响应温度变化的一种方式, 这为 STN7 激酶表达调控与 LHC 蛋白磷酸化关系的研究提供了有用的信息.

参考文献

- 1 Bennett J. Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 42: 281—311[DOI]
- 2 Allen J F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1098: 275—335
- 3 Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, et al. State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 2005, 433: 892—895[DOI]
- 4 Tikkanen M, Piippo M, Suorsa M, et al. State transitions revisited—a buffering system for dynamic low light acclimation of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2006, 62: 779—793[DOI]
- 5 Bonardi V, Pesaresi P, Becker T, et al. Photosystem core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature*, 2005, 437: 1179—1182[DOI]
- 6 Allen D J, Ort D R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Science*, 2001, 6: 36—42[DOI]
- 7 Camejo D, Rodríguez P, Morales M A, et al. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 281—289[DOI]
- 8 Vener A V. Environmentally modulated phosphorylation and dynamics of proteins in photosynthetic membranes. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767: 449—457[DOI]
- 9 胡源, 杜林方, 蒋佳宏. 拟南芥 STN7 和 STN8 蛋白激酶的结构预测和功能分析. *生物物理学报*, 2008, 24: 99—106
- 10 李晓鹏, 杜林方, 梁厚果, 等. PS 反应中心 D1 蛋白的小肽抗体的制备和鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24: 283—285
- 11 魏慧敏, 郭军伟, 张爽, 等. 强光照处理菠菜叶片产生的交联聚合物中 D1 蛋白部分发生磷酸化. *科学通报*, 2005, 50(24): 2745—2749
- 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. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 975: 384—394[DOI]
- 13 杜林方, 孙逊, 潘用华, 等. 钙离子对光系统 放氧反应的影响. *中国科学 B 辑*, 1995, 25: 144—150
- 14 Rintamaki E, Salonen M, Suoranta U M, et al. Phosphorylation of light-harvesting complex and photosystem core proteins shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins. *J Biol Chem*, 1997, 272: 30476—30482[DOI]
- 15 Pursiheimo S, Rintamäki E, Baena-Gonzalez E, et al. Thylakoid protein phosphorylation in evolutionally divergent species with oxygenic photosynthesis. *FEBS Lett*, 1998, 423: 178—182[DOI]
- 16 Strasser R J, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. Analysis of the fluorescence transient. In: Papageorgiou G C, Govindjee, eds. *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. 321—362
- 17 Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Austr J Plant Physiol*, 1995, 22: 131—160
- 18 Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 42: 313—349[DOI]
- 19 Murata N, Satoh K. Absorption and fluorescence emission by intact cells, chloroplasts and chlorophyll-protein complexes. In: Govindjee, Amez J, Fork D C, eds. *Light Emission by Plants and Bacteria*. New York: Academic Press, 1986. 137—159
- 20 Bennett J. Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature*, 1977, 269: 344—346
- 21 Verner A V, van Kan P J M, Rich P R, et al. Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *b/f* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1585—1590[DOI]
- 22 Finazzi G, Zito F, Barbagallo R P, et al. Contrasted effects of inhibitors of cytochrome *b6f* complex on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*: The role of Qo site occupancy in LHCII kinase activation. *J Biol Chem*, 2001, 276: 9770—9774[DOI]
- 23 Rintamaki E, Martinsuo P, Pursiheimo S, et al. Cooperative regulation of light-harvesting complex phosphorylation via plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 11644—11649[DOI]
- 24 Zer H, Vink M, Keren N, et al. Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: Reversible light-induce conformational changes expose the phosphorylation site of the light harvesting complex . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8277—8282[DOI]
- 25 Young C R, Atassi M Z. Antibodies to sperm-whale myoglobin evoked by free synthetic peptides of an antigenic site. *Immunol Commun*, 1982, 11: 9—16
- 26 李驰峻, 梁厚果, 杜林方, 等. 用合成多肽制备抗体研究绿豆抗氧呼吸与交替氧化酶表达关系. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2001, 1: 66—70