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

魏慧敏 郭军伟 张 爽 黄 博 刘映秋 杜林方*

(四川大学生命科学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都, 610064. * 联系人, E-mail: dulinfang@yahoo.com)

摘要 利用 D1 蛋白特异性抗体, 在强光照($800\sim 2500\ \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)处理 3 h 的菠菜叶片类囊体膜中检测到 4 种 D1 蛋白聚合物, 它们的相对含量与处理时光照强度相关. 进一步分析表明, 70 kD 聚合物为 D1 蛋白与 CP43 交联产物, 65 和 60 kD 聚合物是 D1 蛋白与 D2 蛋白交联产物, 41 kD 聚合物是 D1 蛋白与细胞色素 b_{559} α 亚基交联物. $1000\ \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照处理生成的 D1/Cyt b_{559} 聚合物最多, 光强增加时其含量下降. 磷酸化苏氨酸抗体 Western blot 分析结果显示, D1/Cyt b_{559} 和 D1/CP43 聚合物中存在磷酸化蛋白; 外加磷酸酯酶处理后, 磷酸化的 D1/Cyt b_{559} 和 D1/CP43 聚合物减少. 上述结果表明, 强光照处理叶片引起 D1 蛋白与其他 PS 核心蛋白交联, 所生成的聚合物中部分 D1 蛋白以磷酸化形式存在.

关键词 D1 蛋白 蛋白磷酸化 蛋白聚合物 叶片 光抑制 CP43 细胞色素 b_{559}

光系统 (PS) 是催化原初光化学反应和裂解水放氧的色素蛋白复合物. 由 D1 和 D2 蛋白组成的 PS 反应中心结合 PS 上所有的氧化还原电子传递体^[1]. 过分光照会导致植物光合机构的损伤和叶绿体电子传递受阻, 发生光抑制, 并引起 D1 蛋白的氧化损伤^[2]. 光抑制可分为两类, 即由单线氧分子引起的受体侧光抑制和由内源性阳离子自由基(产生的 P680^+ 和 TyrZ^+)引起的供体侧光抑制^[3]. 光损伤的 D1 蛋白降解后可以被新合成的 D1 蛋白取代^[4].

D1 蛋白的周转代谢迅速且依赖于光照^[5]. 高强度光照下发生磷酸化是 D1 蛋白的特点之一^[6,7]. 这种可逆的磷酸化可以使损伤的 D1 蛋白避免水解, 而起到调控 D1 蛋白周转代谢的作用^[8], 因为磷酸化的 D1 蛋白只有在去磷酸化后才能被降解^[9,10]. PS 反应中心进行光抑制处理时, D1 蛋白要与 Cyt b_{559} 的 α 亚基发生交联, 产生 D1/Cyt b_{559} 聚合交联物^[11,12]. 强光照处理 PS 颗粒^[13-15]、类囊体和叶绿体^[14]也会产生 D1/D2 和 D1/CP43 聚合物. 但是 D1 蛋白与邻近的 PS 亚基聚合(交联)的现象只见于体外试验中^[11-16]. 迄今为止, 尚无实验观测到活体中 D1 蛋白交联聚合的现象, 并且 D1 蛋白周转代谢中发生聚合和磷酸化之间的关系也不清楚. 本文在强光处理的菠菜叶片中检测到 4 种 D1 蛋白的聚合物, 并证明存在磷酸化的 D1/Cyt b_{559} 和 D1/CP43 聚合交联物.

1 材料与方法

() 材料. 新鲜菠菜 (*Spinacia oleracea* L) 和蕹菜 (*Ipomoea aquatica* Forsk) 购买于市场.

() 叶片的光照处理与类囊体膜的提取. 将菠菜的叶柄浸泡于清水中, 叶片暗适应 12 h 后 $25\ 400\sim 2500\ \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强照射 3 h. 参照 Rintamäki 等人^[9]的方法从光照处理的叶片中提取类囊体膜, 样品冻存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱.

() 叶绿素浓度的测定. 类囊体膜样品用 80% 丙酮抽提色素, 按 Arnon^[17]的方法测定叶绿素浓度.

() 磷酸酯酶的提取. 参照刘映秋和杜林方^[18]的方法, 从蕹菜类囊体膜中纯化得到磷酸酯酶, 分装后冻存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱.

() 类囊体膜的体外去磷酸化. $2500\ \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强照射处理 3 h 的菠菜叶片提取类囊体膜, 经 $10\ \text{mmol/L}$ Mes-NaOH (pH 6.0) 的缓冲液洗涤 2 次. 类囊体膜悬浮液(浓度为 $0.5\ \text{Chl mg/mL}$)中分别加入一定终浓度的磷酸酯酶, 于 $30\ ^\circ\text{C}$ 水浴中暗处孵育 2 h 后, 立即加入电泳样品处理液以中止去磷酸化反应.

() SDS-PAGE 电泳与 Western blot 分析. 类囊体膜经样品处理液($0.125\ \text{mol/L}$ Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 20% 甘油, 5% β -巯基乙醇)增溶, 用 15% SDS-PAGE(含 $6\ \text{mol/L}$ 尿素)分离类囊体膜蛋白并电

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972005-1529>

转移印迹至PVDF膜上(Perkin-Elmer Life Sciences)^[19]. 每孔上样量 5 μg Chl. 分别用特异性D1 抗体^[20]或多克隆磷酸化苏氨酸抗体(Thr (P), Zymed) 进行 Western blot 检测. 显色试剂用 ECL 发光系统(Amersham). 用于鉴定D1 蛋白聚合物的其他抗体中, Cyt b_{559} α 亚基抗体、D2 抗体、CP43 抗体和CP47 抗体由Roberto Barbato教授赠送, PsbO抗体由本实验室制备^[21]. 采用Bio Imaging System系统(GeneGeniu, Syngene)进行定量分析.

2 结果

2.1 强光照处理菠菜叶片引起 D1 蛋白交联聚合

菠菜叶片经不同光强光照处理后提取类囊体膜, 用 SDS-PAGE 检测类囊体膜蛋白的组成变化, 电泳结果如图 1(a)所示. 与 400 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 低光强照射处理的样品相比, 800~2500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强光处理菠菜叶片的类囊体膜蛋白组分存在一定的差异: 强光照处理的样品中, 分子量为 43, 47 和 60 kD蛋白带的含量略高于低光照处理的样品. 用 D1 抗体进行Western blot分析, 结果如图 1(b)所示. 400 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 低光处理的样品中检测到 3 条D1 蛋白杂交带: 31 kD杂交带为非磷酸化D1 蛋白, 32 kD杂交带为磷酸化D1 蛋白^[20,22], 信号较弱的 25 kD杂交带可能是D1 蛋白翻译时的中间体^[1,23]. 800~2500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强光照处理的样品中, 除以上 3 种杂交带外, 还可以检测到分子量分别为

70, 65, 60 和 41 kD的杂交带. 这 4 条带为D1 蛋白的聚合交联物. 1000 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照处理的样品中, 还出现一条 20 kD的杂交带, 其信号随着样品处理时光照强度的增加而增大, 是D1 蛋白的降解片段^[23]. D1 蛋白的 70, 65 和 60 kD聚合物的含量随样品处理时光照强度的增加而增多; 而 41 kD聚合物在 1000 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时最多, 光照强度继续增大时却有所减少.

2.2 70, 65, 60 和 41 kD 的 D1 蛋白聚合物的鉴定

PS 复合物中D1 蛋白与Cyt b_{559} α 亚基, D2, CP43, CP47 和PsbO蛋白^[21]相邻近. D1 蛋白的 70, 65, 60 和 41 kD聚合物可能是它与这些蛋白交联的产物. 为了鉴定这 4 种聚合物, 我们用Cyt b_{559} α 亚基抗体、D2 抗体、CP43 抗体、CP47 抗体和PsbO抗体分别对强光照处理叶片的类囊体膜进行了Western blot分析. 结果显示, CP43 抗体与 70 kD的D1 蛋白聚合物发生杂交反应(图 2(b)), 表明 70 kD聚合物是D1 与CP43 蛋白交联的产物(D1/CP43); 65 和 60 kD聚合物同时与D2 蛋白抗体发生杂交反应(图 2(c)), 表明它们是D1 与D2 蛋白交联的两种产物(D1/D2); Cyt b_{559} α 亚基抗体与 41 kD聚合物起反应(图 2(d)), 表明 41 kD聚合物是D1 与Cyt b_{559} α 亚基交联的产物(D1/Cyt b_{559}). 强光照照射的PS 颗粒^[13~15]、类囊体和叶绿体^[14]中也曾检测到D1/CP43, 60 kD的D1/D2 和D1/Cyt b_{559} 聚合物. 但未检测到 65 kD的D1/D2 聚合物.

图1 菠菜叶片强光照处理产生 D1 蛋白交联聚合物

(a) 考马斯亮蓝 R-250 染色; (b) 用 D1 蛋白抗体进行 Western blot 分析. 1~5 依次为 400, 800, 1000, 1500 和 2500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照处理 3 h 的菠菜叶片类囊体膜. M: 标准分子量. SDS-PAGE 时每孔上样量为 5 μg Chl

图 2 70, 65, 60 和 41 kD 的 D1 蛋白聚合物的鉴定

菠菜叶片 25 下低光 400 (LL)或强光 2500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL)照射 3 h. 提取光处理叶片的类囊体膜, SDS-PAGE 后用 D1 抗体(a)、CP43 抗体(b)、D2 抗体(c)和 Cyt b_{559} α 亚基抗体(d)进行 Western blot 分析

2.3 D1 蛋白聚合物中检测到磷酸化蛋白

PS 中D1, D2和CP43等核心蛋白在强光照射下发生磷酸化^[6,7]. D1 蛋白聚合物可能存在磷酸化蛋白. 为此, 我们进一步采用磷酸化苏氨酸抗体(Thr (P)), 对低光(400 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 和强光(2500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)处理菠菜叶片的类囊体膜进行磷酸化蛋白的检测. 结果如图 3(a)所示. 低光照处理叶片的类囊体膜中检测到 4 种杂交带, 它们分别为磷酸化 CP43, 磷酸化 D2, 磷酸化 D1 和磷酸化 LHC (P-CP43, P-D2, P-D1 和 P-LHC), 这与先前报道相似^[6]. 强光照处理叶片的类囊体膜中, 除以上 4 种磷酸化蛋白外, 还检测到分子量分别为 70 和 41 kD 的 2 条杂交带. 70 和 41 kD 杂交带的位置分别与 D1/CP43 和 D1/Cyt b_{559} 聚合物的位置一致(图 3(b)), 暗示 D1/CP43 和 D1/Cyt b_{559} 聚合物中的蛋白具有磷酸化形式. Thr (P)抗体不与 65 和 60 kD 的 D1/D2 聚合物起杂交反应, 表明两种 D1/D2 聚合物的蛋白不具有磷酸化形式.

如果 D1/CP43 和 D1/Cyt b_{559} 聚合物具有磷酸化蛋白, 那么磷酸酯酶处理将使这两种聚合物与 Thr (P) 抗体杂交反应的信号减弱甚至消失. 为此, 我们进行了体外去磷酸化试验. 强光照处理菠菜叶片的类囊体膜中加入纯化的磷酸酯酶^[18], 暗处 25 处理 2 h. Western blot 分析的结果显示, 磷酸酯酶处理后, D1/CP43 和 D1/Cyt b_{559} 聚合物的量并无明显减少(图 3(c)和(e)); 但是 D1/CP43 和 D1/Cyt b_{559} 聚合物与 Thr (P) 抗体的杂交信号明显减弱(图 3(d)和(e)). 1.8 U/mL 的磷酸酯酶处理后, 70 和 41 kD 杂交带的杂交信号分

别下降至未处理样品的 5% 和 10%. 进一步证实, D1/CP43 和 D1/Cyt b_{559} 聚合物存在磷酸化的蛋白.

由于 Cyt b_{559} α 亚基不会发生磷酸化^[24], 所以磷酸化的 D1/Cyt b_{559} 聚合物中含有磷酸化 D1 蛋白. 而 CP43 蛋白也会发生磷酸化. 因此, 磷酸化的 D1/CP43 聚合物可能含有磷酸化的 D1 蛋白或/和磷酸化的 CP43 蛋白. 2 种 D1/D2 聚合物不具有磷酸化蛋白, 可以认为它们不含磷酸化的 D1 蛋白和磷酸化的 D2 蛋白.

3 讨论

已有的体外实验结果表明, PS 反应中心^[11,12]、PS 颗粒^[13~15]、类囊体和叶绿体^[14]强光照处理时会发生 D1 蛋白与 Cyt b_{559} 的 α 亚基、D2 和 CP43 等蛋白交联聚合的现象. 本研究借助 SDS-PAGE 和 Western blot, 在强光照处理的菠菜叶片中检测到 D1 蛋白的交联聚合物, 证明在自然条件下也发生 D1 蛋白的交联聚合(图 1). 但与先前报道^[14~16]相比, 我们观察到的 D1 交联聚合现象有所不同: 首先, 除体外实验中发现的 D1/CP43, 60 kD 的 D1/D2 和 D1/Cyt b_{559} 3 种聚合物外^[14], 还检测到 65 kD 的 D1/D2 聚合物(图 1); 其次, 800 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 以上光照强度处理菠菜叶片 3 h 时, 才能同时产生 4 种 D1 蛋白交联聚合物(图 1), 而 PS 颗粒光照处理时, 500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照条件下就会产生 D1/Cyt b_{559} 和 D1/D2 聚合物, 而 D1/CP43 聚合物的产生需要更高的光强^[16]; 再次, 1000 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照处理的菠菜叶片生成 D1/Cyt b_{559} 聚合物最多, 光强再增加时含量下降(图 1), 而 PS 颗粒光照处理时, D1/Cyt b_{559} 聚合物的量随光强增大至 4000 $\mu\text{mol pho}$

图3 磷酸化的D1蛋白聚合物的检测

低光照 $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LL)或强光照 $2500 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL)处理菠菜叶片所提取类囊体膜的 Western blot 分析。(a)和(c) Thr (P)抗体杂交; (b)和(d) D1 抗体杂交; (e) Bio Imaging System 系统定量分析。1~3 依次为强光照(HL)处理叶片的类囊体膜中加入浓度为 0, 1.6 和 1.8 U/mL 磷酸酯酶。以未加入磷酸酯酶样品(1)中相对应的蛋白量为 100%, 数值为 3 次所测的平均值

$\text{tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 而增多^[15]。

我们用 Thr (P)抗体在强光照处理菠菜叶片的类囊体膜中检测到了磷酸化的D1/Cyt b_{559} 和D1/CP43 聚合物。体外去磷酸化实验也证实磷酸化的D1/Cyt b_{559} 和D1/CP43 聚合物的存在(图 3)。前人曾在强光照处理的菠菜叶片中检测到一种约为 41 kD的磷酸化蛋白^[6], 但还未被鉴定。我们检测到的磷酸化D1/Cyt b_{559} 聚合物很可能是这种未知的磷酸化蛋白。至于 65 和 60 kD的D1/D2 聚合物不具有磷酸化形式, 说明并不是所有的D1 蛋白聚合物都发生了磷酸化。这暗示, 在周转代谢中, D1 蛋白的交联聚合可能发生在磷酸化之前。

PS 反应中心D1 蛋白的周转代谢一直是人们研究的热点^[3]。强光下D1 蛋白可以发生磷酸化^[6,7]。只有去磷酸化后D1 蛋白才能被降解^[8,9]。因此, 可逆磷酸化被认为是调控D1 蛋白周转代谢的一种方式之一^[7]。本研究证实D1 蛋白聚合物中部分D1 蛋白处于磷酸化状态, 为进一步研究D1 蛋白交联聚合的生理

意义提供线索。强光照处理产生D1 蛋白聚合物可能是光损伤造成的^[11~16]。因为光照处理产生的单线态氧分子和 P680^+ , $\text{Tyr}^{\text{Z}+}$ 等阳离子自由基可以氧化D1 蛋白的氨基酸残基, 导致它与邻近的PS 亚基发生共价交联^[16]。D1 蛋白聚合物的磷酸化可能阻止光损伤D1 蛋白的降解, 以便新合成D1 蛋白进行替换, 重新组装PS 复合物, 从而调节了D1 蛋白的周转代谢。

致谢 感谢意大利 Piemonte Orientale 大学 Roberto Barbato 教授提供 Cyt b_{559} 的 α 亚基抗体、D2 抗体、CP43 抗体和 CP47 抗体。本工作受国家自然科学基金(批准号: 30270124, 39970068)、高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20020610094)和四川大学 985 项目资助。

参 考 文 献

- Barber J, Nield J, Morris E P, et al. The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol Plant*, 1997, 100 (4): 817~827[DOI]
- Aro E M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys*

- Acta, 1993, 1143 (2): 113~134
- 3 Aro E M. Photodamage and D1 protein turnover in photosystem . In: Aro E M, Andersson B, eds. Regulation of Photosynthesis. Dordrecht: Kluwer, 2001. 377~393
- 4 Zhang L X, Aro E M. Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem . FEBS Lett, 2002, 512(1-3): 13~18[DOI]
- 5 Mattoo A K, Hoffman-Falk H, Marder J B, et al. Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 81 (5): 1380~1384
- 6 Rintamäki 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 (48): 30476~30482[DOI]
- 7 Pursiheimo S, Martinsuo E, Rintamäki E, et al. Photosystem protein phosphorylation follows four distinctly different regulatory patterns induced by environmental cues. Plant Cell Environ, 2003, 26 (12): 1995~2003[DOI]
- 8 Andersson B, Aro E M. Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts, Physiol Plant, 1997, 100(4): 780~793[DOI]
- 9 Rintamäki E, Kettunen R, Aro E M. Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem centers. J Biol Chem, 1996, 271 (25): 14870~14875[DOI]
- 10 Koivuniemi A, Aro E M, Andersson B. Degradation of the D1- and D2-proteins of photosystem in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. Biochemistry, 1995, 34(49): 16022~16029[DOI]
- 11 Barbato R, Friso G, Rigoni F, et al. Characterization of a 41 kD photoinhibition adduct in isolated photosystem reaction centers. FEBS Lett, 1992, 309 (2): 165~169[DOI]
- 12 Barbato R, Friso G, Ponticos M, et al. Characterization of the light-induced cross-linking of the α -subunit of cytochrome b_{559} and the D1 protein in isolated photosystem reaction centers. J Biol Chem, 1995, 270(41): 24032~24037[DOI]
- 13 Yamamoto Y, Akasaka T. Degradation of antenna chlorophyll-binding protein CP43 during photoinhibition of photosystem . Biochemistry, 1995, 43 (28): 9038~9045[DOI]
- 14 Ishikawa Y, Nakatani E, Henmi T, et al. Turnover of the aggregates and cross-linked products of the D1 protein generated by acceptor-side photoinhibition of photosystem . Biochim Biophys Acta, 1999, 1413(3): 147~158
- 15 Henmi T, Yamasaki H, Sakuma S, et al. Dynamic interaction between the D1 Protein, CP43 and OEC33 at the luminal side of photosystem in spinach chloroplasts: Evidence from light-induced cross-linking of the proteins in the donor-side photoinhibition. Plant Cell Physiol, 2003, 44 (4): 451~456[DOI]
- 16 Yamamoto Y. Quality control of photosystem . Plant Cell Physiol, 2001, 42 (2): 121~128[DOI]
- 17 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol, 1949, 24 (1): 1~15
- 18 刘映秋, 杜林方. 蔬菜类囊体膜磷酸酯酶的分离纯化和部分性质. 应用与环境生物学报, 2003, 9(3): 239~242
- 19 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(2): 144~150
- 20 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 (3): 283~285
- 21 李世崇, 杜林方. Mr 33000 锰稳定蛋白的分离及其抗血清的制备. 植物生理学通讯, 1996, 32 (6): 439~441
- 22 李炯, 杜林方. 快速检测植物类囊体膜蛋白体内磷酸化的方法. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (5): 740~743
- 23 Kettunen R, Tyystjärvi E, Aro E M. Degradation pattern of photosystem reaction center protein D1 in intact leaves. Plant Physiol, 1996, 111 (4): 1183~1190[DOI]
- 24 Rintamäki E, Aro E M. Phosphorylation of photosystem proteins. In: Aro E M, Andersson B, eds. Regulation of Photosynthesis. Dordrecht: Kluwer, 2001. 395~418

(2005-09-28 收稿, 2005-11-08 收修改稿)