

快速检测植物类囊体膜蛋白体内磷酸化的方法^{*}

李 炯 杜林方^{**}

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要 借助特异的磷酸蛋白探针, 建立了快速检测植物类囊体膜蛋白体内磷酸化的方法, 可以检测到光照处理的豌豆叶圆片类囊体膜中 8 条磷酸化蛋白带存在, 它们的分子质量分别为 65、45、36、33、30、29、20 和 10 ku. 进一步使用光系统 II 反应中心蛋白和捕光色素复合物 II (LHC II) 的特异抗体, 确定了上述磷酸化蛋白的归属, 分别是磷酸化 D1 和 (或) D2 的聚合体 (65 ku)、CP43 (45 ku)、D2 (36 ku)、D1 (33 ku), LHCB1 (30 ku), LHCB2 (29 ku) 和 *psbH* gene 产物 (10 ku), 20 ku 小肽尚不清楚其来源. 并与其他几种检测磷酸化蛋白的方法进行了比较.

关键词 蛋白质磷酸化, PS II 核心蛋白, 捕光色素复合物, 检测方法

学科分类号 Q946

磷酸化与去磷酸化是调节蛋白质功能最有效的方式之一, 参与了原核与真核生物的代谢调控、基因表达调控、对外界环境刺激的响应等过程^[1]. 光合作用是植物特有的生理功能, 研究表明, 叶绿体中进行光能吸收、传递和转化的类囊体膜蛋白可以磷酸化^[2,3]. 这些蛋白质是光系统 II (PS II) 的主要功能蛋白, 包括主要捕光色素复合物 II (LHC II) 和 PS II 反应中心组分的 D1、D2 蛋白、CP43 和 *psbH* gene 产物^[3,4]. 它们的磷酸化依赖于光, 可能通过质体醌或细胞色素 *b/f* 复合物的氧化还原状态来控制^{5,6]}. LHCII 在靠 N 端第 6 位的 Thr 残基上进行磷酸化, 从而调节激发能在两个光系统间的分配, 最有效地利用光能来进行光合作用^[7]. 而 D1 和 D2 蛋白, CP43 和 *psbH* gene 产物的磷酸化可能发生在 N 端的 Thr 残基上^[4], 迄今, 除 D1 蛋白磷酸化可能与其降解的调节相关外, 其他 PS II 核心蛋白磷酸化的作用尚不清楚^[3,8]. 因此, 类囊体膜蛋白磷酸化对植物光合作用的调节机理已成为国际上研究热点.

通常借助含同位素³²P 的正磷酸或 ATP 来标记底物蛋白, 但此法不适合于植物样品体内磷酸化研究. 用磷酸化苏氨酸抗体可检测到类囊体膜蛋白体内磷酸化, 但灵敏度一般, 特异性不强^[8]. 我们通过实验, 建立了一种用特异磷酸探针和光系统 II 蛋白抗体, 快速检测类囊体膜蛋白体内磷酸化的方法.

1 材料和方法

1.1 材料

新鲜豌豆叶购自市场; Acr 为 Sigma 公司产品; Bis 购自 Fluka 公司; 4-氯萘酚购自 Amersco 公司; 硝酸纤维素膜和 Protein A-辣根过氧化物酶 (HRP) 购自 Bio-Rad 公司; 磷酸蛋白探针 INDIATM 检测试剂盒购自 PIERCE 公司. 其他药品均为国产分析纯试剂. D1 蛋白抗体^[9]与 CP43 抗体^[10]为本实验室制得. D2 蛋白抗体由意大利 Giacometti 教授赠送, LHCII 抗体为美国 Staehelin 教授赠送^[11].

1.2 叶片的光处理

预先将成熟宽大的豌豆叶片暗置过夜, 再打孔得到孔径为 2~3 cm 的叶圆片, 然后浸泡在盛有蒸馏水的培养皿中, 于室温进行光照处理 1 h. 以金属-卤素灯为光源, 光照强度为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.3 类囊体膜的纯化分离

将未处理和光照处理后的叶圆片分别按 Rintamaki 等^[12]的方法提取类囊体膜, 并保存在液氮中, 整个过程避光、冷冻.

1.4 色素含量的测定

叶绿素含量的测定采用 Arnon^[13]的方法.

^{*} 国家自然科学基金 (39970068)、教育部跨世纪优秀人才基金、优秀青年教师基金、霍英东基金资助课题.

^{**} 通讯联系人.

Tel: 028-5412766, E-mail: dulinfang@yahoo.com

收稿日期: 2000-12-11, 接受日期: 2001-01-20

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析多肽组分

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 参照杜林方等^[14]的方法进行, 分离胶及浓缩胶浓度分别为 15% 和 5%, 分离胶含 6 mol/L 尿素. 电泳后的胶板一分为二, 用考马斯亮蓝 R-250 染色, 然后照相; 或者进行电转移到硝酸纤维膜进行蛋白质印迹, 用丽春红染色检测转移是否完全.

1.6 免疫印迹

参照参考文献 [15] 方法进行. 硝酸纤维膜经封闭后, 分别用一抗 (D1 抗体^[9]、CP43 抗体^[10]、LHCII 抗体^[11]、D2 抗体) 温育, 再与 Protein A-HRP 温育后, 以 4-氯萘酚为底物进行显色反应.

1.7 类囊体膜磷酸化蛋白的检测

参照 PIERCE 公司的实验操作手册, 并改进如下: a. SDS-PAGE 后转移蛋白质到硝酸纤维膜, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液封闭 2 h; b. 用含乙二胺的 MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid) 缓冲液于室温下洗 3 次硝酸纤维膜, 每次 5 min; c. 将膜与新鲜配置含一定量的 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 及乙二胺的 MES 溶液室温下温育反应一定的时间; d. 用含乙二胺的 MES 缓冲液于室温下洗 3 次硝酸纤维膜, 每次 5 min; e. 换用乙酸钠缓冲液于室温下洗 3 次硝酸纤维膜, 每次 5 min; f. 将膜与含 0.05% Tween 20 和 5 mg/L 的 INDIA™ Phospho Probe 的乙酸钠溶液于室温下温育 1 h; g. 再将硝酸纤维膜用含 0.05% Tween 20 的乙酸钠缓冲液于室温下洗 4 次, 每次 5 min; h. 以 4-氯萘酚为底物进行显色反应.

2 结 果

2.1 光照处理对类囊体蛋白多肽组分的影响

预先暗置过夜, 可使豌豆叶片中已有的磷酸化蛋白尽量地去磷酸化. 分离的类囊体膜体外磷酸化需要外加 ATP, 而叶片体内磷酸化只需将叶片光照处理. 处理时将叶圆片浸泡在盛有蒸馏水的培养皿中, 以避免温度的升高, 并用低于光抑制的光照强度 ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

利用 SDS-PAGE 分析提取的 2 种叶片类囊体膜蛋白组成. 图 1 的结果表明, 在相同叶绿素量时, 未处理豌豆叶的类囊体膜可分离出 30 多条蛋白质带; 而经光照处理叶片的类囊体膜, 也有相应的 30 多条蛋白质带, 且略有增多, 低分子质量区蛋白质带可能是光照处理时部分类囊体蛋白降解所

产生的片段.

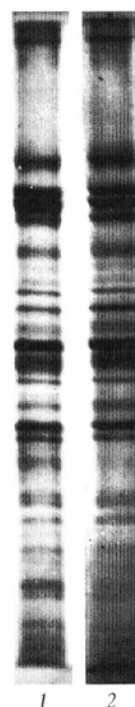


Fig.1 15% SDS-PAGE analysis of thylakoid membranes isolated from pea leaves

1: thylakoid isolated from dark-adapted leaves;
2: thylakoid isolated from leaves illuminated at
 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.2 利用特异探针检测类囊体蛋白磷酸化

用特异的磷酸蛋白探针来检测光照处理的豌豆叶类囊体膜中的磷酸化蛋白, 图 2a 的结果显示: 有 8 条磷酸化蛋白带存在, 根据相同条件下标准蛋白分子质量对数与电泳相对迁移率的关系, 查出磷酸化蛋白的分子质量分别为 65、45、36、33、30、29、20 和 10 ku. 与他人结果相比^[3,8], 我们可检测到较多的磷酸化蛋白带. 借助同位素 ^{32}P 的正磷酸或 ATP 标记可检测到除 65 和 20 ku 外的 6 条磷酸化蛋白带存在^[3], 而利用磷酸苏氨酸抗体并使用增强化学发光法 (ECL), 能检测到光照处理的南瓜叶类囊体膜中主要的 5 条磷酸化蛋白带存在^[8].

分别用 D1 蛋白抗体^[9]、CP43 抗体^[10]、LHCII 抗体^[11]和 D2 蛋白抗体检测类囊体膜蛋白. 免疫印迹 (图 2b~ e) 结果显示: PSII 反应中心 D1 蛋白抗体与类囊体膜蛋白有 2 条杂交带 (33 ku 和 31 ku), 磷酸化蛋白因多带了一个磷酸基团, 分子质量较大, 电泳中迁移较慢, 因此 33 ku 带为磷酸化的 D1 蛋白, 所处位置与检测到的 33 ku 磷酸化蛋白质相一致; 31 ku 的杂交带是非磷酸化的 D1 蛋白. 类似的是, CP43 抗体和 D2 蛋白抗体与光照处理后的豌豆类囊体膜蛋白也各自有 2 条杂交蛋白带, 它们的分子质量分别为 45、43 和 36、33 ku, 分别是 CP43、D2 蛋白处于磷酸化和非磷

酸化的状态, 依次为磷酸化 CP43、非磷酸化 CP43 和磷酸化 D2 蛋白、非磷酸化 D2 蛋白. LHCII 抗体与类囊体膜蛋白有 4 条杂交带 (30、29、28 和 27 ku), LHCII 由 LHCB1 和 LHCB2 蛋白组成, 且都能够被磷酸化, 因此, 30 ku 为 P-LHCB1, 29 ku 是 P-LHCB2, 而 28 ku 和 27 ku 杂交带依次为非磷酸化的 LHCB1 和 LHCB2. D1 蛋白抗体和 D2 蛋白抗体均能识别 65 ku 蛋白 (结果未显示), 它是磷酸化 D1 和 (或) D2 蛋白的聚合体. 至于 20 ku 磷酸蛋白, 尚不能确定其归属.

因此可以确定检测到的 7 条磷酸化蛋白带的归属: 65 ku 处是 P-D1/P-D2 聚合体, 45 ku 处的是 P-CP43, 36 ku 处的是 P-D2, 33 ku 处的是 P-D1, 30 ku 和 29 ku 处的分别是 P-LHCB1 和 P-LHCB2, 10 ku 处的为 *psbH* gene 产物.

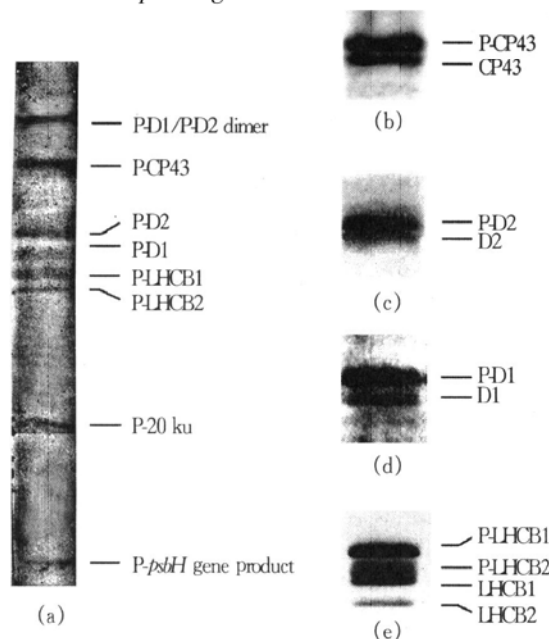


Fig 2 Detection of thylakoid phosphoprotein and Western blot

Thylakoids were isolated from illuminated pea leaves. (a) phosphorylated protein probe; (b) CP43 antibodies; (c) D2 antibodies; (d) D1 antibodies; (e) LHCII antibodies.

3 讨 论

蛋白质磷酸化具有重要的生物学功能, 研究磷酸化与去磷酸化对蛋白质结构与功能的影响十分重要. 体外磷酸化使用含同位素³²P 的正磷酸或 ATP 标记底物蛋白^[1,3]. 但是, 高等植物对放射性标记物的吸收不均匀, 且在标记前植物体内就有磷酸化蛋白存在, 也不能对磷酸化总量给出精确的描述^[8], 还受实验条件的限制, 因此放射性同位素

也不便于植物体内磷酸化研究.

用磷酸苏氨酸抗体可研究类囊体蛋白质的体内磷酸化^[8], 但是, 不同公司生产的抗体与同一种类囊体膜蛋白的免疫反应能力不同, 或者同一种抗体与不同种属的类囊体膜蛋白之间的免疫反应能力也不一样, 这就影响了这种方法的通用性^[8]; 即使用增强化学发光法 (ECL) 检测, 也需长时间曝光才能检测到 2 个小分子质量的磷酸化蛋白. 因而该法的灵敏度不高, 特异性不强.

本实验中使用的磷酸化蛋白探针 INDIATM 是一种 Fe³⁺ 活化的辣根过氧化物酶 (HRP) 衍生物, 可特异地结合磷酸盐、蛋白质分子中的羧基基团或磷酸基团. 用乙二醇和 EDC 与靶分子的羧基反应后, 就可以专一地与蛋白质分子中的磷酸基团结合, 成为通用的磷酸探针, 用来检测含磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸和磷酸酪氨酸的蛋白质. 实验的关键步骤是 EDC 和乙二醇封闭靶蛋白的羧基一步. EDC 浓度和处理时间需预先作优化试验, 如果 EDC 的浓度不够高或处理时间不够长, 都将会导致背景的加深和非磷酸蛋白带的出现. 也应注意所使用的缓冲液都不能含磷酸根.

应用本法可检测到光照处理的豌豆叶圆片类囊体膜中有 8 条磷酸化蛋白带, 分子质量分别为 65、45、36、33、30、29、20 和 10 ku. 使用光系统 II 反应中心蛋白和 LHCII 抗体, 进一步确定了其中 7 条分别是磷酸化的 D1 和 (或) D2 聚合体 (65ku)、CP43 (45 ku)、D2 (36 ku)、D1 (33 ku), LHCB1 (30 ku) 和 LHCB2 (29 ku) 和 *psbH* gene 产物 (10 ku). 同位素标记可检测到 6 条磷酸化蛋白带存在^[3], 而利用磷酸苏氨酸抗体并使用增强化学发光法 (ECL) 才能检测到光照处理的南瓜叶或菠菜叶类囊体膜中 5 条磷酸化蛋白带存在^[8]. 相比之下, 只用底物显色我们就能检测到 8 条磷酸化蛋白带, 如用 ECL 底物化学发光法, 灵敏度会更高; 所用探针识别磷酸化氨基酸残基, 对磷酸化蛋白质的结合能力不受植物材料的影响; 该法操作简单, 还避免了同位素的使用, 所得结果比其他方法更好, 可用于植物类囊体膜蛋白体内磷酸化的检测和研究工作.

致谢 感谢意大利 Giacometti 教授赠送 D2 蛋白抗体, 美国 Staehelin 教授赠送 LHCII 抗体.

参 考 文 献

- 1 Ranjeva R, Boudet A M. Phosphorylation of proteins in plants:

- Regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Annu Rev Plant Physiol*, 1987, **38**: 73~ 93
- 2 Bennett J. Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature*, 1977, **269** (22): 344~ 46
 - 3 Bennett J. Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, **42**: 281~ 311
 - 4 Michel H, Hunt D F, Shabanowitz J, *et al.* Tandem mass spectrometry reveals that three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain N-acetyl-O-phosphothreonine at their NH₂ termini. *J Biol Chem*, 1988, **263** (3): 1123~ 1130
 - 5 Gal A, Zer H, Ohad I. Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. *Physiol Plant*, 1997, **100** (14): 869~ 885
 - 6 Allen J F, Bennett J, Steinback K E, *et al.* Chloroplast protein phosphorylation couple plastoquinone redox states to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, 1981, **291** (7): 25~ 29
 - 7 Allen J F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1098** (3): 275~ 335
 - 8 Rintamaki E, Salonen M, Suoranta U-M, *et al.* Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core protein shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*: Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoprotein. *J Biol Chem*, 1997, **272** (48): 30476~ 30482
 - 9 李晓鹏, 杜林方, 梁厚果, 等. PS II 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, **48** (3): 703~ 734
 - 10 李小平, 杜林方, 梁厚果. 光系统 II 核心天线 CP43 的纯化及性质. *生物化学及生物物理学报*, 1997, **29** (5): 449~ 454
 - 11 Li X P, Du L F, Liang H G. *Acta Biochim Biophys Sinica*, 1997, **29** (5): 449~ 454
 - 12 Sgrist M, Staehelin L A. Identification of type 1 and type 2 light harvesting chlorophyll a/b-binding proteins using monospecific antibodies. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1098** (2): 191~ 200
 - 13 Rintamaki E, Kettunen R, Aro E-M. Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers: Dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1. *J Biol Chem*, 1997, **271** (25): 14870~ 14875
 - 14 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, **24** (1): 1~ 15
 - 15 杜林方, 唐晓松, 梁厚果. 具放氧功能的 PS II 反应中心复合物的分离及其特性. *植物生理学报*, 1992, **18** (1): 17~ 23
 - 16 DU L F, Tang X S, Liang H G. *Acta Phytophysiol Sinica*, 1992, **18** (1): 17~ 23
 - 17 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18.3~ 18.75

A New Approach to Detect Plant Thylakoid Phosphoprotein *in vivo**

LI Jiong, DU Lin Fang**

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract In order to detect plant thylakoid protein phosphorylation *in vivo* rapidly, a new approach was introduced by using INDIATM phosphorylated protein probe. Eight phosphoprotein bands were detected by this method in the thylakoid membranes isolated from pea leaf discs illuminated at 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. The molecular masses of those phosphoproteins were 65 ku, 45 ku, 36 ku, 33 ku, 30 ku, 29 ku, 20 ku and 10 ku. Respectively by using various polyclonal antibodies, those phosphoprotein bands were identified as phosphorylated D1/ phosphorylated D2 dimer, PS II core phosphoproteins, CP43 (45 ku), D2 (36 ku), D1 (33 ku) and *psbH* gene product (10 ku), and the light-harvesting complex (LHC II) phosphopolypeptides, LHCB1 (30 ku) and LHCB2 (29 ku). A comparison was made between this new approach with other methods of detecting phosphoprotein such as radiolabeling experiment or immunological blot using phosphothreonine antibody.

Key words phosphorylation, PS II core protein, light-harvesting complex II (LHC II), detection

* This research was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (39970068), the Ministry of Education of China for Trans-Century Talent Foundation, the Ministry of Education of China for Excellent Youth Teacher Foundation and the Ying-Dong Ho Education Foundation.

** Corresponding author. Tel: 86-28-5412766, E-mail: dulinfang@yahoo.com

Received: December 11, 2000 Accepted: January 20, 2001