

光照与温度对拟南芥 *tak* 基因表达与 LHC 磷酸化的影响 *

蒋佳宏¹⁾ 王东¹⁾ 胡源¹⁾ 高秀¹⁾ 杜林方^{1,2)**}

(¹⁾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;

(²⁾四川大学纳米生物医学技术与膜生物学研究所, 成都 610041)

摘要 TAK1 和 TAK2 是拟南芥核基因编码的蛋白激酶, TAK1 可能参与植物状态转换中 LHC II 蛋白磷酸化的调控. 根据 TAK1 蛋白序列, 合成了一段含 12 个氨基酸残基的亲水短肽, 与牛血清白蛋白(BSA)偶联并免疫家兔得到 TAK1 抗体. 经免疫双扩散和蛋白质印迹检测, 该多肽抗体效价和特异性较高. 借助 TAK1 抗体以及磷酸化抗体进行杂交试验, 结合特异引物进行半定量 PCR, 研究了光照与温度对拟南芥 *tak1* 和 *tak2* 基因表达的影响. 结果表明, 光强与温度调节 LHC II 蛋白磷酸化, 也会在转录水平和蛋白质水平上影响 *tak1* 和 *tak2* 基因表达. LHC II 蛋白磷酸化对光响应趋势与 TAK1 蛋白水平变化相同. 此外, 低光照促进 *tak2* 基因表达, *tak2* 基因转录表达受温度的影响较小. *tak1* 和 *tak2* 基因表达调控方式不同, 可能与启动子响应元件的不同相关.

关键词 TAK1, TAK2, LHC II 磷酸化, 合成多肽, 基因表达, 光照与温度影响

学科分类号 Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00090

植物的生长发育受外界环境的影响, 特别是温度和光照的影响. 状态转换(state transitions)是植物调节激发能在两个光系统之间分配的一种快速机制, 以响应短期光照条件的变化^[1]. 状态转换与主要捕光天线色素蛋白复合体 LHC II 的磷酸化紧密相关. TAK (thylakoid associated kinase)是从拟南芥类囊体膜上分离得到的激酶^[2], 具有使 LHC II 磷酸化的活性, 反义 RNA 技术得到 TAK1 减少拟南芥植株仅有少量的 LHC II 发生磷酸化^[3], TAK 家族包含 TAK1、TAK2 和 TAK3^[3]. 新近发现, 拟南芥类囊体膜结合激酶 STN7 也参与了 LHC II 磷酸化与状态转换^[4], 但是 STN7 与 TAK 间的关系不清楚, 它们编码基因表达调控的机理未知.

环境温度是影响植物光合作用的另一个主要因素. 逆境温度对植物产生胁迫, 低温及高温处理都损害植物的光合机构^[5,6], 低温条件下次要天线蛋白 CP29 发生磷酸化, 可能是光系统对胁迫的响应^[7]. 我们的研究表明, 温度对拟南芥类囊体膜 STN7 蛋白稳态水平有影响^[8], 但是迄今, 温度和光照对激酶 TAK1 的影响尚缺乏研究. TAK1 属于酪氨酸激酶家族, 分析显示可有跨膜结构存在^[2], 我们选择一段亲水肽段为抗原表位, 合成多肽后偶

联牛血清蛋白(BSA)免疫家兔得到 TAK1 多肽抗体, 研究光照与温度对拟南芥 TAK1 蛋白含量的影响, 同时设计特异引物用以研究 *tak1* 和 *tak2* 基因在转录水平上的变化, 发现温度和光照对基因表达有明显的影响.

1 材料与方法

1.1 TAK1 多肽设计和抗体制备

激酶序列信息由 NCBI 收录: TAK1(NP_192172), TAK2(NP_171661). 首先进行疏水性与跨膜区预测, 以此为基础构建 TAK 保守活性区域三维结构, 因为在 PDB 中序列相似度超过 30%的酪氨酸序列很多, 因此选用准确度最高的同源建模. 抗原决定簇分析采用哈佛大学 Antigenic Peptides 程序, 结合酶活中心位置判断, 通过分析比较, 最终选取了亲水性和抗原性较好的一段膜外区域为抗原表位, 设计了含 12 个氨基酸残基的多肽:

* 国家自然科学基金资助项目(30870181).

** 通讯联系人.

Tel: 028-85415008, E-mail: dulinfang@scu.edu.cn

收稿日期: 2009-02-18, 接受日期: 2009-05-22

RRKTNVNESEDE. 委托北京赛百盛公司合成并纯化, HPLC 检测其纯度为 96%. 结合四川大学生命科学学院制备 D1 等蛋白多肽抗体的经验^[8~10], 将多肽与载体蛋白 BSA 连接, 以 BSA 多肽抗原偶联物乳化福氏佐剂多点皮下注射免疫家兔. 经免疫双扩散法测定效价达标, 心脏取血, 经过灭活等后续步骤得到抗血清, -20°C 分装保存.

1.2 材料培养和叶片处理

野生型拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) 温室条件培养(22°C , 10 h/14 h, 昼/夜, 光照强度为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). 将拟南芥整株暗置过夜, 选取发育较好的成熟叶片, 漂浮于 MY 液体培养基表面, 分别在低温(6°C , LT)、生长温度(22°C , GT)和高温(35°C , HT)下白色光源光照处理 2 h, 处理时光照强度分别为弱光($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, LL)、中光($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ML) 和强光($500\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, HL).

1.3 拟南芥类囊体膜提取及叶绿素含量测定

参照 Wei 等^[11]的方法从处理后的叶片中提取类囊体膜, 操作过程低温避光, 类囊体膜液氮速冻再储存于 -80°C 冰箱, 叶绿素 a 和 b 含量用 Porra 等^[12]方法测定.

1.4 RNA 提取与 RT-PCR

处理过的叶片在液氮中快速研磨为粉末状, 采用 TIANGEN 的试剂盒提取 RNA, 以 DEPC 水溶解后冻存于 -80°C . RT-PCR 使用两步法, 所得 cDNA 分装冷藏, 设计的 *tak1* 引物为 FP 5' ATGGCGGATTCTCACTCA 3', RP 5' TTGTTGCTTCGTCGGTAA 3', 得到 155 bp 扩增片段. 设计的 *tak2* 引物为 FP 5' ACGACGCTGCTTTCCTTA 3', RP 5' GCACTCGCTGTTCTCTAC 3' 得到 340 bp 扩增片段, 内参 *actin* 引物参考文献[13], FP 5' TGCGACAATGGAAGTGAATG 3', RP 5' GGATAGCATGTGGAAGTGCATACC 3' 得到 499 bp 扩增片段. PCR 结束之后, 浓度 1.3% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物状况.

1.5 Urea-SDS-PAGE 与 Western blot

Urea-SDS-PAGE 参照 Du 等^[14]的方法进行, 使用 13.75% 分离胶(6 mol/L 尿素)和 5% 浓缩胶, 每泳道上样类囊体膜蛋白样品均含 $5\ \mu\text{g}$ 叶绿素. 类囊体膜蛋白组分经变性缓冲液充分处理后经 SDS-PAGE (尿素胶)分离, 考马斯亮蓝 R-250 染色或电转至 PVDF 膜进行 Western blot 免疫检测反应. LHC II 磷酸化检测用磷酸化苏氨酸抗体(购于

Zymed 公司), 使用制备的 TAK1 多肽抗体检测 TAK1 蛋白表达水平. Western blot 采用 Millipore 公司发光系统 (ECL Western Blotting Detection System), 在 BioRad Chemi Doc XRS 凝胶成像系统检测. 杂交与半定量结果使用 BioRad 公司图像分析软件 (Quantity One 1-D Analysis Software) 进行^[11].

2 结 果

2.1 TAK1 多肽抗体制备与鉴定

TAK1 含 492 个氨基酸残基, 而 TAK2 有 472 个氨基酸残基, 两者相似度达到 90%, 而 TAK3 在 C 端比 TAK1 少 42 个氨基酸残基^[3], 生物信息学分析显示, TAKs 属于酪氨酸激酶家族, 具有相似的保守活性区, 可以在 PDB 找到不少相似度高的酪氨酸激酶家族成员序列, 以便对 TAK1 进行同源建模(结果未显示). 通过对多肽的亲水性和抗原性、位置和特异性与合成要求等综合考虑, 最终选择了 TAK1 位于 C 端膜外的一段亲水肽段为抗原表位, 合成此十二肽并与载体蛋白 BSA 偶联, 免疫新西兰家兔, 经多次注射强化免疫后, 免疫双扩散检测发现, TAK 抗血清效价超过了 1:128, 能够进行后续实验.

为了检测 TAK1 多肽抗体的特异性, 将拟南芥类囊体膜处理后进行 SDS-PAGE(尿素), 电转移至 PVDF 膜, 用制备的 TAK1 抗血清进行 Western blot (图 1), 约 56 ku 及 55 ku 位置有 2 条蛋白质杂交条带出现, 与理论上 TAK1 激酶分子质量相同.

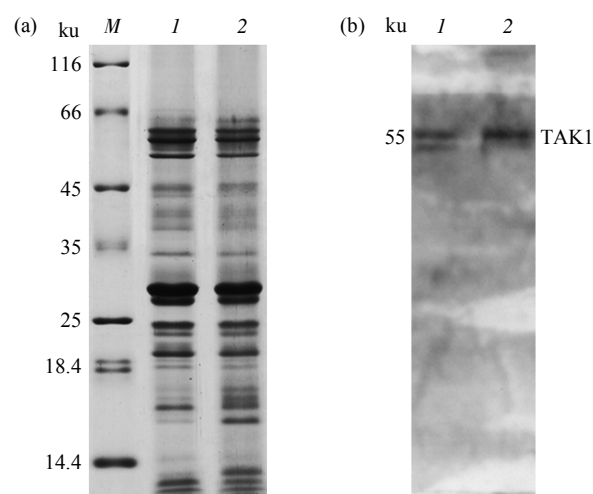


Fig. 1 Identification of anti-peptide antibody against TAK1

(a) Thylakoid membrane proteins were fractionated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie Blue R-250 staining. (b) Western blot analysis with polyclonal antibody against TAK1. 1: Dark adapted; 2: Illumination treated at $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 2 h.

2.2 不同温度和光照处理引起类囊体膜 LHC II 蛋白磷酸化的影响

为了考察光照强度变化时, LHC II 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℃、22℃和35℃)条件下分别进行3种强度(20、100和500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)的光照处理2 h. 变性尿素胶电泳分离类囊体膜蛋白组分后, 进行考马斯亮蓝染色, 同时用磷酸化苏氨酸抗体进行蛋白质杂交分析.

磷酸化苏氨酸抗体进行蛋白质杂交分析显示, 未光照处理时, 拟南芥类囊体膜可以检测到较少的 LHC II 磷酸化, 生长温度条件下光照使 LHC II 磷酸化程度增加, 并与光照强度相关, 生长光强时最大, 而高光强时次之(图2).

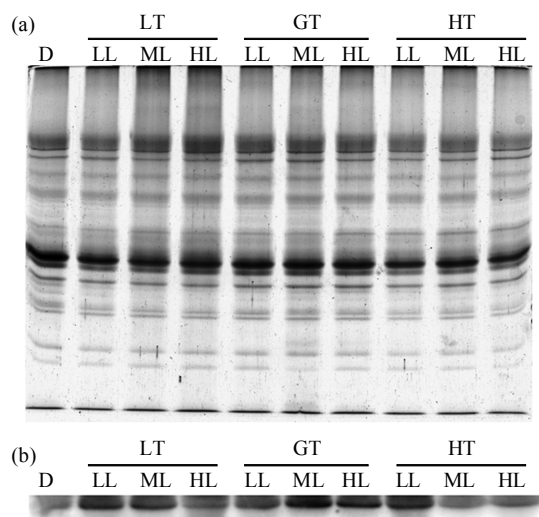


Fig. 2 LHC II phosphorylation responses to light density under different temperature

Leaves after dark-adapted, were illuminated under low light density (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, LL), growth light density (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ML) and high light density (500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, HL) at low temperature (6°C, LT), growth temperature (22°C, GT) and high temperature (35°C, HT) or keep in dark (D) for 2 h, respectively, after which the thylakoid membranes were isolated. 5 μg Chl of thylakoid membrane was loaded onto the gel for each sample. Phosphothreonine antibody was diluted at 1 : 500.

2.3 不同温度和光照处理对类囊体膜 TAK1 蛋白含量的影响

由于 TAK1 激酶参与了 LHC II 蛋白的磷酸化^[2,3], 借助制备的多肽抗体, 我们考察了温度变化和光照对 TAK1 激酶表达的影响. 图3显示, 与未光照处理相比, 拟南芥类囊体膜 TAK1 蛋白含量与温度和光照强度相关; 生长温度条件下, 弱光照处理叶片类囊体膜 TAK1 激酶含量仅有部分减少, 而强光照处理时叶片类囊体膜 TAK1 激酶含量明显

降低; 在相同弱光条件下, 低温或高温处理, 均引起叶片类囊体膜 TAK1 激酶含量增加, 但是在强光处理时, TAK1 蛋白含量几乎不受温度的影响.



Fig. 3 Protein content of TAK1 under different illumination and temperature conditions

Low temperature (6°C, LT), growth temperature (22°C, GT) and high temperature (35°C, HT), low light density (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, LL) moderate light density (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ML) and high light density (500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, HL) in 13.7% SDS-PAGE(urea), membrane proteins equivalent to 5 μg of Chl were subjected per lane. TAK1 antibody was diluted at 1 : 1 000. D: Dark.

TAK1 激酶显示 56 ku 及 55 ku 2 条蛋白质杂交条带, 前文证实 TAK1 蛋白可以磷酸化^[2], 由于不同温度和光照条件下, 这 2 条蛋白质杂交条带的相对含量也在变化, 至于蛋白质磷酸化对 TAK1 激酶活性是否有影响, 有待于进一步研究.

2.4 生长温度光照对拟南芥 *tak1* 和 *tak2* 基因转录水平的影响

室温放置于暗处未光照处理的叶片中, *tak1* 和 *tak2* 都有相当的转录量(图4). 光照处理叶片 *tak1* 基因转录水平明显降低, 低光强和高光强下 *tak1*

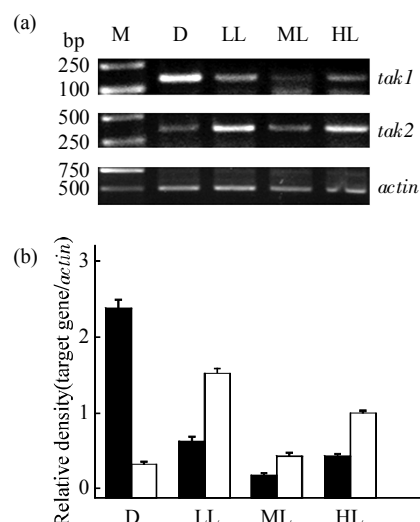


Fig. 4 Transcription of *tak1* and *tak2* under growth temperature

(a) RT-PCR, *actin* was internal standard. (b) mRNA relative quantity. Data were mean values for three independent experiments and were analyzed by a simple one-way analysis of variance. ■: *tak1*; □: *tak2*. D: Dark; LL: Low light density; ML: Growth light density; HL: High light density; M: molecular mass marker.

的转录水平较低,约为未光照处理时的一半.生长光强下 *tak1* 的转录水平最低,约为未光照处理时的 1/4.值得注意的是,放置暗处未光照处理的叶片中 *tak2* 的转录水平最低,生长光强下 *tak2* 基因转录水平略有增加,而低光强和高光强下 *tak2* 转录水平较高,约为未光照处理时的 2 倍.

2.5 低温条件下光照对拟南芥 *tak1* 和 *tak2* 基因转录的影响

低温(6℃)暗处未光照处理叶片中, *tak1* 和 *tak2* 都有较高的转录量(图 5).光照处理叶片 *tak1* 基因转录水平明显降低.生长光强下 *tak1* 的转录水平高于低光强处理,约为未光照处理时的一半.高光强下 *tak1* 的转录水平最低,约为未光照处理时的 1/4.值得注意的是,低光强处理叶片中 *tak2* 的转录水平明显高于未光照处理叶片,生长光强下 *tak2* 转录水平最低,仅为峰值的 1/7,而高光强下 *tak2* 转录水平,约为峰值的 1/3.

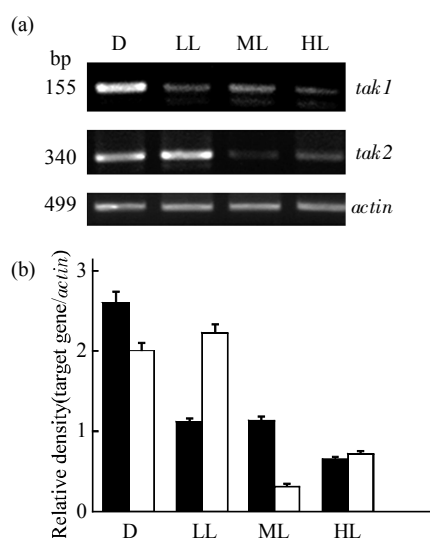


Fig. 5 Transcription of *tak1* and *tak2* under low temperature

(a) RT-PCR, *actin* was internal standard. (b) mRNA relative quantity. Data were mean values for three independent experiments and were analyzed by a simple one-way analysis of variance. ■: *tak1*; □: *tak2*. D: Dark; LL: Low light density; ML: Growth light density; HL: High light density

2.6 高温条件下光照对拟南芥 *tak1* 和 *tak2* 基因转录的影响

高温(35℃)处理时,暗处未光照处理的叶片 *tak1* 基因具有较高的转录量(图 6),强光照叶片 *tak1* 也有较高的表达,而弱光和生长光强下 *tak1* 基因表达明显减少.而 *tak2* 受光照影响而表达增强,在弱光照时表达有明显增加.

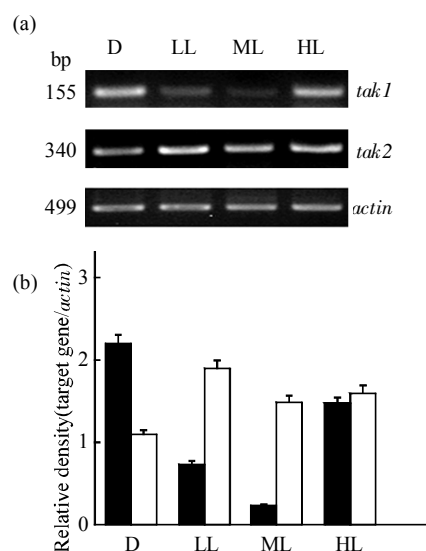


Fig. 6 Transcription of *tak1* and *tak2* under high temperature

(a) RT-PCR, *actin* was internal standard. (b) mRNA relative quantity. Data were mean values for three independent experiments and were analyzed by a simple one-way analysis of variance. ■: *tak1*; □: *tak2*. D: Dark; LL: Low light density; ML: Growth light density; HL: High light density

3 讨 论

TAK 家族可能包含 TAK1、TAK2 和 TAK3^[3],人们对它们的研究较少,迄今,仅有一个实验室的 2 篇论文报道 TAK1 功能研究结果^[2,3].新近发现,拟南芥类囊体膜结合激酶 STN7 参与了 LHC II 磷酸化与状态转换^[4],但是 TAK 与 STN7 间的关系不清楚,编码基因表达调控的机理未知.

酶活性的调节包括酶量的调节与现有酶的活性大小的调节.基因表达主要影响酶蛋白相对含量.真核基因的表达主要是转录、翻译等水平上调控的.我们的研究表明, *tak1* 的基因表达不需要光,但温度和光均影响 *tak1* 的基因表达,在不同温度条件下, *tak1* 的基因表达对光响应的趋势不同(图 3~6).生长温度 22℃ 时,随光照强度的增大, *tak1* 基因表达的转录本 mRNA 水平相对降低(图 4),表明光照抑制了 *tak1* 基因的转录.此外,类囊体膜结合的 TAK1 激酶蛋白含量也相应减少(图 3).在低温 6℃ 或高温 35℃ 时,光照也影响 *tak1* 基因的表达,转录产物明显减少(图 5, 6),而弱光对类囊体膜结合的 TAK1 激酶蛋白含量几乎无影响,生长光强和强光下 TAK1 激酶蛋白含量也明显较少.上述结果表明, *tak1* 基因表达主要是转录水平调控的,光照抑制了 *tak1* 基因的转录.

tak2 的基因表达也受温度和光照的影响, 在不同温度条件下对光响应的趋势不同(图 3~6). 生长温度 22℃ 时, 避光叶片仅有少量的 *tak2* mRNA 存在, 光照诱导 *tak2* 基因转录本 mRNA 水平相对增加(图 4), 表明光照促进了 *tak2* 基因的转录. 低温 6℃ 显著诱导 *tak2* 基因的转录, 弱光照促进 *tak1* 基因的表达, 转录产物明显较多, 而生长光强和强光照照射却抑制 *tak2* 基因表达(图 5). 高温 35℃ 时, *tak2* 基因表达也明显增加, 光照会进一步促进转录, 但随光强变化的差异不显著. 对 *tak1* 和 *tak2* 基因启动子初步分析显示, 它们具有不同的响应元件(结果未显示), 因此, 受温度和光照影响 *tak1* 和 *tak2* 基因表达具有明显差异, 极可能与它们启动子响应元件的不同密切相关.

自发现 LHC II 蛋白磷酸化现象以来^[15], 状态转移与天线蛋白 LHC II 磷酸化关系的研究一直是热点. 体外实验表明, LHC II 蛋白的可逆磷酸化还受到多种因素的影响, 如质体醌还原水平调控^[16, 17]、叶绿体中硫醇氧化还原状态的作用^[18]等. *lhc* 基因表达受光的调控, 温度也影响 LHC II 蛋白的磷酸化^[9], 我们的研究表明, 温度和光均影响 LHC II 蛋白的磷酸化(图 2), 在不同温度条件下 LHC II 磷酸化对光响应趋势不同. 生长温度 22℃ 时, LHC II 的磷酸化程度随光照强度的增大而增加, 而在低温 6℃ 或高温 35℃ 时, 弱光处理 LHC II 的磷酸化程度就达到最大程度. 研究发现, TAK1 激酶蛋白含量也受温度与光的影响. 由于 TAK1 参与 LHC II 磷酸化^[2, 3], 而新近发现的 STN7 也参与了 LHC II 的磷酸化与状态转换^[9], 但其不受质体醌还原水平调控、以及叶绿体中硫醇氧化还原状态的影响^[4, 13], 与 LHC II 磷酸化的多种影响因素不吻合, 此外, TAK1 激酶可以磷酸化^[2], 这对其激酶活性是否有影响也未知. 因此, TAK1 与 STN7 在 LHC II 磷酸化中怎样发挥作用有待于进一步研究.

参 考 文 献

- Allen J F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1098**(3): 275~335
- Snyders S, Kohorn B D. TAKs, thylakoid membrane protein kinase associated with energy transduction. *J Biol Chem*, 1999, **274**(14): 9137~9140
- Snyders S, Kohorn B D. Disruption of thylakoid-associated kinase 1 leads to alteration of light harvesting in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2001, **276**(34): 32169~32176
- Bellafore S, Barneche F, Peltier G, *et al.* State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 2005, **433**(7028): 892~895
- Allen D J, Ort D R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Science*, 2001, **6**(1): 36~42
- 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**(3): 281~289
- Bergantino E, Dainese P, Cerovic Z, *et al.* A post-translational modification of the photosystem II subunit CP29 protects maize from cold stress. *J Biol Chem*, 1995, **270**(15): 8474~8481
- Hu Y, Gao X, Jiang J H, *et al.* Effects of temperature on the expression of STN7 and phosphorylation of LHC II proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Sci Bull*, 2008, **53**(17): 2646~2651
- 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, **24**(3): 283~285
- Li X P, Du L F, Liang H G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 1997, **24**(3): 283~285
- Li C J, Liang H G, Du L F, *et al.* Studies on the relationship between cyanide-resistant respiration and expression of alternative oxidase in mung bean using antibodies prepared by synthetic polypeptide. *Science in China (C)*, 2001, **44**(1): 66~72
- Wei H M, Guo J W, Zhang S, *et al.* The presence of phosphorylation form of D1 protein in its cross-linked aggregates in high light treated spinach leaves *in vivo*. *Chin Sci Bull*, 2006, **51**(1): 69~74
- 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
- Bonardi V, Pesaresi P, Becker T, *et al.* Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature*, 2005, **437**(7062): 1179~1182
- Du L F, Sun X, Pan Y H, *et al.* Influence of calcium ion on photosystem II oxygen evolution. *Science in China (B)*, 1995, **38**(12): 1439~1447
- Bennett J. Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, **42**: 281~311
- Verner A V, van Kan P J M, Rich P R, *et al.* Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *b6/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**(4): 1585~1590
- Finazzi G, Zito F, Barbagallo R P, *et al.* Contrasted effects of inhibitors of cytochrome *b6/f* complex on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*: the role of Qo site occupancy in LHC II kinase activation. *J Biol Chem*, 2001, **276**(13): 9770~9774
- Hazra A, DasGupta M. Phosphorylation-dephosphorylation of light-harvesting complex II as a response to variation in irradiance is thiol sensitive and thylakoid sufficient: Modulation of the sensitivity of the phenomenon by a peripheral component. *J Biol Chem*, 2003, **278**(50): 14868~14876

Effects of Light and Temperature on The Expression of *tak* Gene and Phosphorylation of LHC in *Arabidopsis thaliana* *

JIANG Jia-Hong¹⁾, WANG Dong¹⁾, HU Yuan¹⁾, GAO Xiu¹⁾, DU Lin-Fang^{1,2)**}

(¹⁾ Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment (Ministry of Education), College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

(²⁾ Institute for Nanobiomedical Technology and Membrane Biology, Sichuan University, Chengdu 610061, China)

Abstract TAK1 and TAK2 are both nuclear-encoded kinases. TAK1 may be involved in the phosphorylation of LHC II in state transitions. After the analysis of conservative activity regions on TAK1 and TAK2 sequences, a segment of hydrophilic polypeptide consisting of 12 amino acid residues was devised and linked to bovine serum albumin (BSA) before injection to the rabbit. The polyclonal antibody against TAK1 raised was examined by agar gel immunodiffusion (AGID) test and Western blot analysis. then it was used to study the expression of *tak1* and *tak2* influenced by the change of light and temperature in RT-PCR with specific primers and the possible regulation relationship between TAK1 and LHC II phosphorylation especially by using TAK1 serum and P-Thr antibody. The result indicated that light and temperature regulated the phosphorylation of LHC II and took effect on the transcription and translation level of *tak1* and *tak2*, but the response of LHC II phosphorylation to light did not coincided with the quantity of TAK1 protein. Furthermore, low light density could enhance the expression of *tak2*, but temperature impacted *tak2* little. The different regulation pattern of *tak1* and *tak2* may derive from the different elements of promoter.

Key words TAK1, TAK2, LHC II phosphorylation, synthetic peptides, gene expression, influence of light and temperature

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00090

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30870181).

**Corresponding author.

Tel: 86-28-85415008, E-mail: dulinfang@yahoo.com

Received: February 18, 2009 Accepted: May 22, 2009