

是一个构建大分子环状质粒DNA的有效方法.

参 考 文 献

1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1. 25~ 1. 107

2 Baker S J, Markowitz S, Fearon E R *et al.* Suppression of human colorectas carcinoma cell growth by wild-type p53. Science, 1990, **249**: 912~ 915

3 孟 玲, 谭德勇, 王焕校. CaCl<sub>2</sub> 法质粒转化最佳条件的探讨. 云南大学学报 (自然科学版), 1996, **16** (2): 106~ 108

4 谭德勇, 邓双胜. 不用接头进行异末端 DNA 重组的方法. 云南大学学报 (自然科学版), 1996, **16** (2): 103 ~ 105

**Improving the Recombination Efficiency of Larger Plasmid DNA by Two-ligation.** TAN Deyong, DENG Shuangsheng, MENG Ling,

ZAN Ruiguang ( *Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China* ).

**Abstract** A method of improving the recombination efficiency of larger plasmid DNA is introduced. The major manipulation of this method is that the ligation reaction between insertor and vector is separated from cycle reaction of ligation, and they carry out in different reaction condition. Using this method, the efficiency of the recombination between 7.65 kb vector and 1.47 kb insertor is improved obviously. It is a good method for recombination of larger plasmid DNA.

**Key words** plasmid DNA, recombinatin efficiency, two-ligation

# PS II 反应中心 D1 蛋白的小肽抗体的制备和鉴定\*

李晓鹏 杜林方<sup>1)</sup> 梁厚果 吴宛菀  
(四川联合大学生物系, 成都 610064)

**摘要** 用人工合成的 PS II 反应中心 D1 蛋白中 (229~ 240) 的 12 肽, 与牛血清白蛋白偶联后做为抗原免疫家兔, 获得抗菠菜 D1 蛋白抗体. 免疫双扩散法测得其具有较高的效价, 蛋白印迹检测结果显示该抗体仅与 D1 蛋白有免疫亲和反应. 表明此抗体可作为检测 D1 蛋白及其光抑制时降解产物的探针.

**关键词** D1 蛋白 (229~ 240) 12 肽, PS II 反应中心, 抗 D1 蛋白多克隆抗体, 蛋白质印迹

光系统 II 反应中心 (PS II RC) 负责光能的转换、电子和质子的产生以及分子氧的释放这一过程的启动. 1987 年, Nanba 和 Satoh<sup>[1]</sup> 首次分离得到 D1-D2-Cyt b559 反应中心复合物, 证实由叶绿体 psbA 和 psbD 基因编码的 D1 和 D2 多肽是 PS II RC 的主要功能蛋白. 它们结合着 P680, 脱镁叶绿素 a (Pheo a) 和 β-胡萝卜素 (β-Car)<sup>[2]</sup>, 并且含有 PS II 电子传递链中最重要的组分 Z 和 D<sup>[3]</sup>, 还为与水裂解相关的锰簇提供结合位点<sup>[4,5]</sup>. 其中的 D1 蛋白

又称 Q<sub>B</sub> 结合蛋白或除草剂结合蛋白, 在光照下快速周转代谢, 半衰期 (与所照光的光强相关) 仅约 30 或 60 min<sup>[6]</sup>, 而强光下发生的光抑制现象也与 D1 蛋白的降解相关<sup>[7]</sup>. 为了研究光对 D1 蛋白快速周转代谢的调控, 分析光抑制时 D1 蛋白降解的产物, 弄清 PS II 反应中心各亚基间的相对空间位置和组织结构, 我们

\* 国家自然科学基金资助项目 (39400009).  
<sup>1)</sup> 通讯联系人.  
收稿日期: 1996-06-12, 修回日期: 1996-10-03

改进了 Sayre 等<sup>[8]</sup>的方法, 利用多肽固相合成法合成了 D1 蛋白上连接第 IV 和第 V 跨膜螺旋区之间的一段亲水肽段, 将其与 BSA 偶联后免疫家兔, 制备得特异性抗血清, 并进行了鉴定.

## 1 材料与方法

### 1.1 D1 蛋白的 12 肽的合成及纯化

根据菠菜 psbA 基因的核苷酸序列而推出 D1 蛋白的氨基酸序列, 参考 Sayre 等<sup>[8]</sup>对 D1 蛋白拓扑结构分析结果, 选择位于类囊体膜外侧、连接第 IV 和第 V 跨膜螺旋区之间、富含 Glu 和 Ser 的亲水肽段中、由第 229 位至第 240 位氨基酸残基所构成的 12 肽: 谷-天冬酰-谷-丝-丙-天冬酰-谷-甘-酪-精-苯-丙-甘 (简写 ENESANEGRFG), 用固相法合成, 过 Sephadex G-15 柱, 并用 HPLC 纯化, 冻干即得纯化的 D1 蛋白 (229~240) 12 肽.

### 1.2 D1 12 肽与 BSA 复合物的制备

将 10 mg D1 蛋白 12 肽和 36 mg BSA 溶于 8 ml PBS (0.1 mol/L, pH 7.2) 中, 冰浴条件 (0~4℃) 缓慢滴加新配的含 0.2% 戊二醛的 PBS (2 ml), 室温下搅拌反应 1 h, 然后加入 2.5 ml 含 1 mol/L 甘氨酸的 PBS. 室温下继续搅拌反应 1 h 进行封闭, 对 PBS 充分透析后于 -20℃ 冰箱中保存.

### 1.3 抗体制备

取 0.5 ml 蛋白-肽偶联产物作抗原, 与等体积完全福氏佐剂混合, 充分乳化后, 多点皮下注射家兔. 以后每隔 2 周用不完全福氏佐剂与蛋白-肽乳化后进行免疫. 4 次免疫后的第 7 天耳静脉采血, 用免疫双扩法测定其效价达到要求后, 立即颈动脉放血, 分离血清, 小管分装并于 -20℃ 保存.

### 1.4 PS II RC 复合物的制备

按照 Nanba 和 Satoh<sup>[1]</sup>的方法, PS II 颗粒悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 用 4% Triton X-100 处理, 离心后上清液经 DEAE-Toyopearl 650 S 柱层析分离制备得 PS II RC (D1-D2-Cyt b559) 复合物.

### 1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

按前文<sup>[9]</sup>的方法, 但分离胶改用 13.75% 的均匀胶, 电泳后胶板从中间一分为二, 或用考马斯亮蓝 R-250 染色, 或进行蛋白质印迹.

### 1.6 蛋白质印迹

PS II 反应中心复合物经 SDS-PAGE 分离后转移到硝酸纤维薄膜上, 与适量的制备抗血清保温, 再与 1:3 000 稀释度的用辣根过氧化物酶 (HRP) 共价偶联的山羊抗兔子免疫球蛋白 IgG 的第二抗体温育, 用 DAB 染色<sup>[10]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 合成 D1 蛋白 12 肽的纯度鉴定

用固相法合成的 D1 蛋白 12 肽 (229~240), 经 Sephadex G-15 分子筛层析和 G-18 柱反相高效液相层析纯化后, 经氨基酸组成分析, 表明合成的 D1 蛋白 12 肽的氨基酸组成与预设的理论值基本相符, 反相 HPLC 分析样品的纯度达 98%, 是符合做免疫实验要求的<sup>[11]</sup>.

由于 D1 蛋白分子中 Glu 229~Gly 240 的保守性较高, 是 Q<sub>B</sub> 结合与 DCMU 作用的部位, 胰蛋白酶于 Arg 238 位点切割后 PS II 就失去 DCMU 的敏感性, 而外加钙具有对抗酶的水解的作用<sup>[12]</sup>, 我们曾用上述合成的 D1 蛋白 12 肽研究证实, 钙的确可与此合成肽结合并引起其构象发生改变<sup>[11]</sup>, 表明合成是成功的.

### 2.2 特异性抗血清的制备与鉴定

合成的 D1 蛋白 12 肽的分子质量为 1 569 u, 属小分子肽段, 一般称为半抗原, 免疫原性较弱, 需偶联到一种蛋白质载体上以提高其免疫原性. 经与牛血清白蛋白偶联后, 免疫家兔而制得抗血清, 以双向免疫扩散方法测得其滴度为 1:256 (图 1).

按 Nanba 和 Satoh<sup>[1]</sup>的方法制备的菠菜 PS II 反应中心 D1-D2-Cyt b559 复合物的 SDS-PAGE 图谱如图 2a 所示, 复合物含 D2 (32 ku)、D1 (30 ku) 和 Cyt b559 (9 ku 和 4 ku). 电泳胶片上的区带转移到硝酸纤维膜上之后, 与制备的抗 D1 蛋白 12 肽抗血清保

温, 然后与二抗保温、染色. 所得结果如图 2b 所示, 在 30 ku 处有明显的免疫亲和反应, 表明制备的抗血清能专一地识别 PS II 反应中心复合物中的 D1 蛋白, 在 60 ku 附近也有免疫带, 是 D1 的二聚体<sup>[1]</sup>或 D1-D2 的异二聚体.

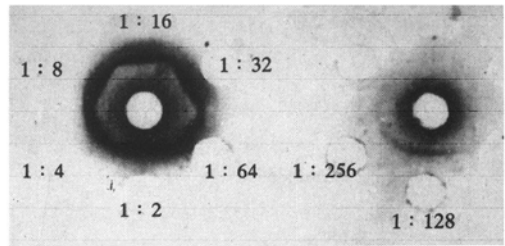


图 1 双向免疫扩散测定抗血清的效价

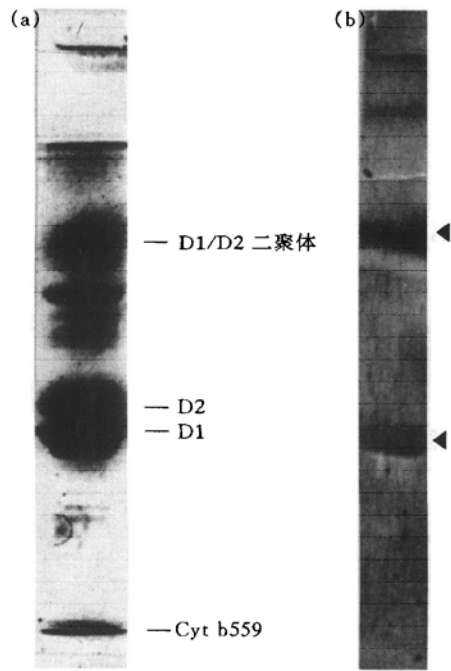


图 2 PS II 反应中心复合物的 SDS PAGE  
(a) 电泳图谱; (b) 免疫印迹图谱.

由于 D1 蛋白是膜蛋白, 难于提纯来制备抗体, 因而选择 D1 蛋白分子中亲水值较高的片段 (水溶性好的才具有良好的免疫原性), 采用化学合成法加以制备, 再免疫动物, 容易得到专一性强的抗体. 采用此方法, Sayre 等<sup>[8]</sup>制得抗 D1 蛋白的 8 种抗体, 研究了 D1 蛋白的拓扑结构, 揭示 D1 蛋白只有 5 个跨膜螺

旋区, 且 N 端位于间质 (stroma) 侧; Besford 等<sup>[13]</sup>制得抗 D1 蛋白 (332~ 345) 14 肽的单克隆抗体, 并证实成熟的 D1 蛋白含 Asn 335~ Ala 344 序列, 证明 D1 蛋白前体 (含 353 个氨基酸残基) 在 C 端加工时只有 8 个氨基酸残基被切去. 本文中, 我们采用 BSA 替代国外使用的、价格较高的匙孔噬血蓝蛋白作载体蛋白, 制备得抗 D1 蛋白 (229~ 240) 12 肽抗体, 除可用于研究光对 D1 蛋白快速代谢的调控机理外, 还可用于经双功能交联剂处理的反应中心复合物中交联产物的鉴定, 以便进一步分析 PS II 反应中心复合物中各蛋白亚基间的相对位置. 此外, 由于光抑制时 D1 蛋白降解的首要断裂位点在 Phe 239 处, 不同条件下 (供体侧光抑制或受体侧光抑制) 可得到几种不同的降解产物<sup>[7]</sup>, 而抗 D1 (229~ 240) 12 肽抗体具很强的特异性, 故可用于光抑制时 D1 蛋白降解产物的归属研究.

致谢 兰州大学生物系胡晓愚教授合成 D1 蛋白小肽.

参 考 文 献

- 1 Nanba O, Satoh K. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptide and cytochrome b-559. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 109~ 112
- 2 Tang X-S, Fushimi K, Satoh K. D1-D2 complex of the photosystem II reaction center from spinach. Isolation and partial characterization. *FEBS Lett*, 1990, **273**: 257~ 260
- 3 Vermass W F J, Rutherford A W, Hanssons O. Site directed mutagenesis in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: donor D is a tyrosine residue in the D2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 8477~ 8484
- 4 Debus J R. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1102**: 269~ 352
- 5 Tang X-S, Diner B A, Larse B S *et al*. Identification of histidine at the catalytic site of the photosynthetic oxygen evolving complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 704 ~ 708
- 6 Prasilo O, Adir, Ohad I. In Barber J ed. *Topics in photosynthesis*, 11. Elsevier: Amsterdam, 1992. 295~ 305

(下转第 288 页, Continued on page 288)

调控区结合从而调节此基因的表达<sup>[3,4]</sup>。以前的研究已确定能和 ETS1 结合的 DNA 序列。这里利用 BIAcore, Fisher 博士等<sup>[5]</sup>揭示了 ETS1 蛋白和偶联在传感片上含 ETS1 结合序列 DNA 的结合,并用合成的含 37 氨基酸的多肽(从蛋白质序列 364~ 400 共 37 个氨基酸)证明了 ETS1 蛋白的结合区域(图 4, 5)。

### 参 考 文 献

- 1 Bourret R B, Borkovich K A, Simon M A. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, 1991, **60**: 401~ 441
- 2 Schuster S C, Swanson R V, Alex L A *et al.* Formation of a quaternary signal transduction complex. *Nature*, 1993, **365**: 343~ 346
- 3 Gunther C V, Nye J A, Bryner R S *et al.* Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ETS-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev*, 1990, **4**: 667~ 679

- 4 Ho I C, Bhat N K, Gottschalk L R *et al.* Sequence-specific binding of human ETS-1 to the T-cell receptor alpha gene enhancer. *Science*, 1990, **250**: 814~ 818
- 5 Fisher R J, Baxevasis A D, Mavrothalassitis G *et al.* The interaction between the nuclear oncoprotein ETS1 derived peptide with specific and mutant DNA studied with BIA. *BIA symposium*, 1992, **2**: 44~ 46

**Research Application Using Biomolecular Interaction Analysis Technology: Study of Multiple Complex Formation and Transcription Factor.** SHEN Ping (*Pharmacia Biotech (China) Ltd. Beijing 100080, China*).

**Abstract** BIA Technology has been used to study the mechanism of signal transduction in *E. coli* and the formation of transduction complex. BIA also been used widely in molecular biology research to study the interaction between transcription factor and its operon (DNA).

**Key words** signal transduction, multicomplex, phosphorylation, transcription factor, operon

(上接第 285 页, Continued from page 285)

- 7 Aro E M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1143**: 113~ 134
- 8 Sayre R T, Andersson B, Bogorad L. The topology of a membrane protein: the orientation of the 32 kD Q<sub>10</sub>-binding chloroplast thylakoid membrane protein. *Cell*, 1986, **47**: 601~ 608
- 9 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**: 17~ 23
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18. 3~ 18. 86
- 11 Wang J, Zhang L-X, Liu Z-L *et al.* A possible calcium binding site in D1 protein: a fluorescence and FTIR study of the interaction between lanthanides and a synthetic peptide. *Photosyn Res*, 1995, **44**: 297~ 302
- 12 Renger G, Fromme R, Hagemann R. The modification of atrazine binding by redox state of the endogenous high-spin iron binding specific proteolytic enzymes in photosystem II membrane fragments and intact thylakoid. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **935**: 173~ 183
- 13 Besford R T, Thomas B, Huskisson N S *et al.* Characterization of conformers of D1 of photosystem II using site-directed antibodies. *Z Naturforsch*, 1990, **45c**: 621~ 626

**Preparation and Identification of Antidodecapeptide of Polypeptide D1 of Photosystem II Reaction Center.** LI Xiaopeng, DU Linfang,

LIANG Houguo, WU Wansun (*Department of Biology, Sichuan Union University, Chengdu 610064, China*).

**Abstract** The dodecapeptide which is located in the hydrophilic loop connecting helix IV and V of polypeptide D1 of spinach, was synthesized and covalently linked to BSA. Then the complex was injected into a rabbit. Nine weeks later, the specific antiserum was obtained, which showed high titer (1: 256) in immunodiffusion. Western blotting showed that there was an immunoaffinity reaction between the antibody and D1 band of PS II reaction center D1-D2-Cyt b559 complex from spinach chloroplasts. Therefore, this antibody can be used as a probe to detect D1 protein and its degraded fragment during photoinhibition.

**Key words** dodecapeptide (229 ~ 240) of polypeptide D1, photosystem II reaction center, polyclonal antibody for D1, Western blotting