



不同失水状态发菜类囊体膜蛋白的分离及鉴定

张亚萍, 杨 佳, 石 晶, 毛桂莲, 吴诗杰, 雷晓婷, 梁文裕*

(宁夏大学 生命科学学院, 银川 750021)

摘 要: 采用液氮研磨与超声波破碎相结合的方法, 破碎不同失水状态的发菜藻体和细胞, 用差速离心法制备发菜类囊体膜粗制品, 蔗糖密度梯度高速离心纯化类囊体膜, SDS-PAGE 电泳分离类囊体膜蛋白, 并对膜蛋白进行了 MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析和鉴定。结果表明: (1) 充分吸胀 4 h 后失水 6 h 的发菜(含水量 51.2%) 和失水 24 h 的发菜(含水量 14.9%), 经过多步差速离心后再进行蔗糖密度梯度高速离心, 可得到纯化的类囊体膜。(2) 发菜类囊体膜蛋白 SDS-PAGE 电泳分离到 14 个条带, 共鉴定出 8 种蛋白, 根据其功能可分为 4 类——光合作用相关蛋白(光系统 II 锰稳定蛋白 PsbO, F_1F_0 ATP 合成酶 α 亚基和 β 亚基)、结构域蛋白、选择性通道蛋白 OprB、未知蛋白(hypothetical protein Npun_R1321、Npun_R3785、N9414_02186), 它们在发菜的光合作用中具有重要作用。

关键词: 发菜; 类囊体膜; 膜蛋白; 分离

中图分类号: Q503

文献标志码: A

Separation and Identification of Thylakoid Membrane Proteins in *Nostoc flagelliforme* on Dehydration

ZHANG Yaping, YANG Jia, SHI Jing, MAO Guilian, WU Shijie, LEI Xiaoting, LIANG Wenyu*

(School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The method of liquid nitrogen grinding and ultrasonic were applied to crush *Nostoc flagelliforme* colonies and cells. The crudes were isolated by differential centrifugation; thylakoid membranes were purified by high speed centrifugation with gradient density sucrose; the thylakoid membrane proteins were extracted and separated by SDS-PAGE. The results suggested that: (1) Thylakoid membrane of colonies on dehydration for 6 h (water contenting 51.2%) and on dehydration for 24 h (water contenting 14.9%) were purified by many times differential centrifugation and then by high speed centrifugation with gradient density sucrose. (2) 14 bands of thylakoid membrane protein were separated by SDS-PAGE, their mass weight mainly ranged from 25 kD to 60 kD. 8 kinds of protein were identified by MALDI-TOF-TOF/MS and database searching. According to their biological functions, these thylakoid membrane proteins were divided into 4 categories, including photosynthesis proteins (photosystem II manganese-stabilizing protein PsbO, F_1F_0 ATP synthase subunit α , F_1F_0 ATP synthase subunit β), binding domain protein (hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein), carbohydrate-selective porin (carbohydrate-selective porin OprB), unknown proteins (hypothetical protein Npun_R1321, Npun_R3785 and N9414_02186). They might play an important role in photosynthesis of *N. flagelliforme*.

Key words: *Nostoc flagelliforme*; thylakoid membrane; membrane proteins; separation

收稿日期: 2014-03-05; 修改稿收到日期: 2014-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(31360054, 31060038)

作者简介: 张亚萍(1986—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事资源植物学方面的研究。E-mail: wayk123456@163.com

* 通信作者: 梁文裕, 博士, 教授, 主要从事植物资源及植物分子生物学研究。E-mail: liangwy2009@163.com

高等植物类囊体膜主要存在于叶绿体中的类囊体上,蓝藻等原核生物虽然没有叶绿体等细胞器,但类囊体膜主要分布在细胞周质中,而且类囊体膜上有完整的蛋白色素复合体,并具有 PS I 和 PS II^[1-4]和光捕获复合体(LHC)^[5]。蓝藻类囊体蛋白复合物的种类及其色素、蛋白组成要比高等植物变化多样,代表着不同的进化层次,因而对这一类群进行深入的研究,将揭示出更多有关光系统结构进化以蓝藻类囊体膜的重要生物学功能。此外,蓝藻类囊体膜由于直接分布于细胞质中,而且与光合放氧密切相关,因而成为研究蓝藻光合作用的重要领域。

发菜(*Nostoc flagelliforme* Born. et Flah.)属于蓝藻门念珠藻科念珠藻属,又称发状念珠藻,是一种世界性分布的陆生固氮蓝藻。在长期的进化过程中,发菜进化出一套有别于陆生植物的耐旱、耐高光强能力,其中光合作用的适应与调节是重要特性之一^[6]。类囊体是发菜进行光合作用的主要亚细胞结构,虽然王梅等^[7]对发菜类囊体膜色素蛋白复合物进行了初步分离,但重要膜蛋白的分子信息及不同失水状态发菜类囊体膜和类囊体膜蛋白的分离、鉴定及其生物学功能并未明确。此外,对发菜在干旱、高光强等逆境中的适应和保护机制的认识尚缺乏光合膜和膜蛋白的基础性研究。因此,探索发菜类囊体膜的分离纯化,对类囊体膜蛋白进行鉴定并分析其生物学功能,不仅对认识发菜适应干旱等逆境及由水生到陆生的进化机理有重要意义,而且为深入研究发菜光合机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

野生新鲜发菜采自宁夏香山发菜自然生长地。在温度 25℃、持续光照、光照强度 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、无持续风速、相对空气湿度 30% 条件下,对发菜藻体进行处理:充分吸胀 4 h 的发菜(含水量 1194.9%);充分吸胀 4 h 后再失水 6 h 的发菜(含水量 51.2%);充分吸胀 4 h 后再失水 24 h 的发菜(含水量 14.9%)。

1.2 发菜类囊体膜的分离

1.2.1 类囊体膜粗提 称取处理好的发菜样品 5 g,避光条件下放置研钵中液氮反复研磨,随后加入预冷的类囊体膜提取液 150 mL (50 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris, 5 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA, 1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 氯化锰, 1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 氯化镁, 2 mmol $\cdot$ L⁻¹ 硝酸钠, 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ 蔗糖, 0.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸氢二钾, pH 7.8),

用预冷的 8 层纱布低温避光过滤,滤液冷藏,残渣置研钵中,避光条件冰浴研磨约 1 h,然后将冷藏滤液加入研钵中,匀浆后再加入 250 mL 类囊体膜提取液,低温避光超声波破碎 60 min (60 W, 间隔 8 s)。匀浆 4℃、1 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液。上清液在 4℃、5 000 r $\cdot$ min⁻¹ 下离心 1 min,收集上清液,在 4℃、10 000 r $\cdot$ min⁻¹ 下再离心 30 min,沉淀即为类囊体膜粗提物。

1.2.2 类囊体膜粗提物的纯化 在发菜类囊体膜的粗提物中加入不含蔗糖的类囊体膜提取液,低温避光冰浴条件下,充分研磨,将发菜类囊体膜粗提物轻置于不同密度梯度的蔗糖溶液上(60% : 50% : 40% : 30% : 20% = 1 : 1 : 1 : 1 : 1), 4℃、27 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 4 h。用吸管在低温条件下快速收集离心管中不同颜色的条带,并将收集的样品用不含蔗糖的提取缓冲液低温避光条件下透析 24 h 以除去样品中的蔗糖。

1.3 吸收光谱测定

用紫外分光光度计测定分离出的各条色素带的 400~700 nm 吸收光谱。

1.4 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳在高政权等^[8]的基础上做了进一步的修改。先用 4% 的 SDS 对经不同密度梯度蔗糖溶液离心后得到的色素带低温避光条件下进行二次增溶 30 min,再用 9 倍体积的冷丙酮在 -20℃ 条件下抽提样品 2 次。4℃、12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,取沉淀溶解于上样缓冲液(0.25 mol $\cdot$ L⁻¹ Tris, 5% 甘油, 1% SDS, 0.025% β -巯基乙醇, pH 6.8)中。分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。考马斯亮蓝 G₂₅₀ 染色 2 h,脱色液脱色 2 h。

1.5 蛋白质胶内酶切、质谱分析、数据库查询及蛋白质鉴定

从 SDS-PAGE 凝胶上切取蛋白条带,置于 1.5 mL 的离心管中,加入 50% 胰蛋白酶溶液(100 mmol $\cdot$ L⁻¹ 碳酸氢铵溶液配制)振荡脱色,重复数次直至条带无色。加入适量 100% 胰蛋白酶溶液振荡,脱水,弃上清,重复 2 次。37℃ 烘箱中胶条完全干燥,加入 10 μ L 浓度为 12.5 ng $\cdot$ μ L⁻¹ 胰蛋白酶溶液,4℃ 静置 45 min,后转移至 37℃ 烘箱中孵育 12 h。冷却至室温后,6 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心,弃上清,置于 200 μ L PCR 管中保存。加入 0.1% TFA(三氟乙酸,50% 胰蛋白酶水溶液配制),充分振荡,室温静置 5 min,6 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心,弃上清,重复 2~3 次,沉淀在 N₂ 流下吹干浓缩。

将完全干燥的沉淀重新溶解于 $0.7 \mu\text{L } 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CHCA 溶液(α -氰基-4-羟基肉桂酸)中,并将其全部点到 MALDI 靶板上,在室温下自然干燥,采用 4700 串联飞行时间质谱仪[4700 Proteomics Analyzer(TOF/TOFTM) (Applied Biosystems, USA)]进行质谱分析。激光源为 Nd: YAG laser, 波长 355 nm, 加速电压 20 kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。MALDI-TOF 数据去除杂峰后, 所得结果用 GPS (Applied Biosystems, USA)、MASCOT v. 1. 9 (Matrix Science, London, UK) 数据库检索。在 Matrixscience 网站上 MASCOT MS/MS ions Searchy 页面下进行检索。数据库为 NCBI nr, 种属为 all, 数据检索的方式为 combined, 最大允许漏切位点为 1, 酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置: PMF 0. 01%, MS/MS 0. 6 Da。在数据库检索时胰蛋白酶自降解峰和污染物质的峰手工剔除。

2 结果与分析

2.1 不同失水发菜类囊体膜的收集和纯化

采用一次差速离心制备发菜类囊体膜粗提物, 然后经蔗糖密度梯度超高速离心。结果表明, 吸水 4 h 发菜(含水量 1194. 9%) 样品出现 3 条条带, 分别为 A_1 、 A_2 、 A_3 (图 1, A); 吸水 4 h 后再失水 6 h 的发菜(含水量 51. 2%) 样品和吸水 4 h 后再失水 24 h 的发菜(含水量 14. 9%) 样品各出现 5 条不同颜色条带, 分别为 B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 、 B_5 (图 1, B) 和 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 (图 1, C)。 A_1 、 B_1 、 C_1 条带颜色呈蓝色, 而且 C_1 条带的颜色最深; A_2 颜色呈灰绿色, B_2 、 C_2 颜色呈橘黄色; A_3 颜色呈深绿色, B_3 、 C_3 颜色呈黄绿色, 颜色最深的为 C_3 ; B_4 、 C_4 颜色呈棕绿色, 颜色最深的为 C_4 ; B_5 、 C_5 颜色呈淡棕绿色, C_5 颜色最深。

采用分步差速离心法制备发菜类囊体膜粗提物, 然后经蔗糖密度梯度超高速离心。结果表明, 吸水 4 h 发菜(含水量 1194. 9%) 样品出现 3 条条带, 分别为 a_1 、 a_2 、 a_3 (图 1, a); 吸水 4 h 后再失水 6 h 的发菜(含水量 51. 2%) 和吸水 4 h 后再失水 24 h 的发菜(含水量 14. 9%) 各出现 5 条不同颜色条带, 分别为 b_1 、 b_2 、 b_3 、 b_4 、 b_5 (图 1, b) 和 c_1 、 c_2 、 c_3 、 c_4 、 c_5 (图 1, c)。 a_1 、 b_1 、 c_1 颜色呈蓝色, c_1 的颜色最深; a_2 颜色呈灰绿色, b_2 、 c_2 颜色呈橘黄色; a_3 、 b_3 、 c_3 颜色呈黄绿色, 颜色最深的为 c_3 ; b_4 、 c_4 颜色呈棕绿色, 颜色最深的为 c_4 ; b_5 、 c_5 颜色呈淡棕绿色, c_5 颜色最深。

上述结果表明, 分步差速离心法比一次差速离

心法制备的类囊体膜粗制品经蔗糖密度梯度离心后沉淀和杂质较少, 各条带颜色较深, 层次分明。因此, 用分步差速离心法制备发菜类囊体粗提物优于一次差速离心法。

2.2 不同失水发菜类囊体膜提取液的吸收峰

各样品经密度梯度离心后收集的色素层进行 400~700 nm 光谱扫描。结果(图 1)表明, I 样品的 A_1 和 a_1 层在 676 nm 有吸收峰; A_2 和 a_2 层在 417、440 和 680 nm 有 3 个主峰, 在 412 nm 有吸收肩峰; A_3 和 a_3 层在 677 nm 有主峰。II 样品的 B_1 和 b_1 层无明显吸收峰; B_2 和 b_2 层在 421 nm 和 680 nm 有 2 个吸收峰; B_3 和 b_3 层在 440 nm 和 677 nm 有 2 个主峰, 在 420 nm 有吸收肩峰; B_4 和 b_4 层在 440 nm 和 679 nm 有 2 个主峰, 在 419 nm 有个吸收肩峰; B_5 和 b_5 层在 437 nm 和 677 nm 有 2 个主峰, 在 415 nm 和 486 nm 有 2 个吸收肩峰。III 样品的 C_1 和 c_1 、 C_2 和 c_2 层无明显吸收峰; C_3 和 c_3 层在 420 nm 和 675 nm 有 2 个主峰, 在 440 nm 和 480 nm 有吸收肩峰; C_4 和 c_4 层在 425 nm 和 675 nm 有 2 个主峰, 在 405 nm 有吸收肩峰; C_5 和 c_5 层在 675 nm 有主峰(图 2~4)。

由特征吸收峰可知, A_3 、 B_4 、 C_4 、 B_5 、 C_5 和 a_3 、 b_4 、 c_4 、 b_5 、 c_5 为类囊体膜分布层。从密度梯度离心后各层颜色判断, A_1 、 B_1 、 C_1 和 a_1 、 b_1 、 c_1 可能为藻蓝素, B_2 、 C_2 和 b_2 、 c_2 为藻红素。此外, 430~438 nm 和 675 nm 左右为叶绿素 a 的特征吸收峰, 415 nm 和 420 nm 处为脱镁叶绿素的特征吸收峰, 且大部分样品中脱镁叶绿素的吸收峰明显高于叶绿素 a 的吸收峰值, 说明样品中的脱镁叶绿素浓度高于叶绿素 a 的浓度。475 nm 左右处为辅助色素的吸收峰, 可能为类胡萝卜素。

2.3 发菜类囊体膜蛋白的 SDS-PAGE 电泳及 MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析

取吸水 4 h 后再失水 6 h 的发菜(含水量 51. 2%) b_4 层进行电泳, 凝胶图谱显示均出现 14 个条带, 各条带大小主要集中在 25~60 kD 之间(图 5)。分别对 14 个蛋白条带进行 MALDI-TOF-TOF/MS 分析, 得到肽质量指纹图谱, 通过 MASCOT 数据库搜索, 蛋白质得分大于 80 分可以确认蛋白种类, 成功鉴定出 8 个蛋白(表 1), 鉴定率为 57. 14%。这些鉴定的蛋白根据功能可分为 4 类: 光合作用相关蛋白[photosystem II manganese-stabilizing protein PsbO(条带 11)、 F_1F_0 ATP synthase subunit alpha(条带 6)、 F_1F_0 ATP synthase subunit beta(条带 8)]、

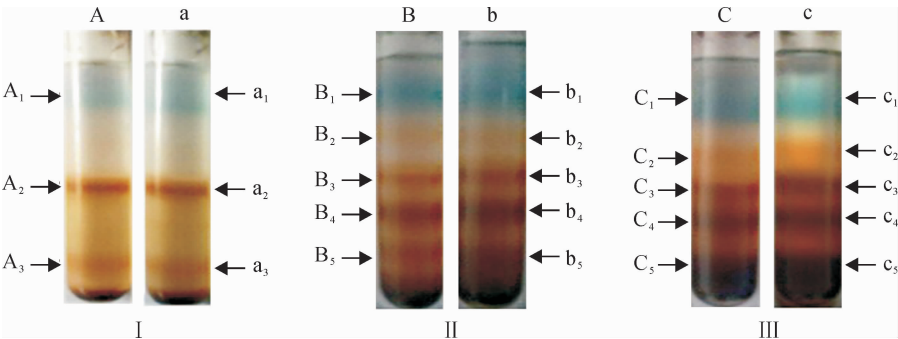


图 1 不同差速离心和密度梯度离心后发菜类囊体膜提取物色带分步图
I. 含水量为 1 194.9%发菜; II. 含水量为 51.2%发菜; III. 含水量为 14.9%发菜; A~C. 一次差速离心和密度梯度离心后色带分布图; a~c. 分步差速和密度梯度离心后色带分布图

Fig. 1 The image of pigment sections of *N. flagelliforme* by differential centrifugation and high speed centrifugation with sucrose gradient density

I. Colonies containing water 1 194.9%; II. Colonies containing water 51.2%; III. Colonies containing water 14.9%;
A~C. One-time differential centrifugation and high speed centrifugation with sucrose gradient density;
a~c. Step-by-step differential centrifugation and high speed centrifugation with sucrose gradient density

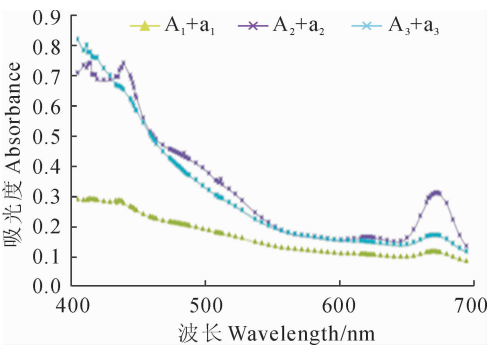


图 2 含水量 1 194.9%发菜各色素层的吸收光谱
Fig. 2 Absorption spectra of pigment section of *N. flagelliforme* containing water 1 194.9%

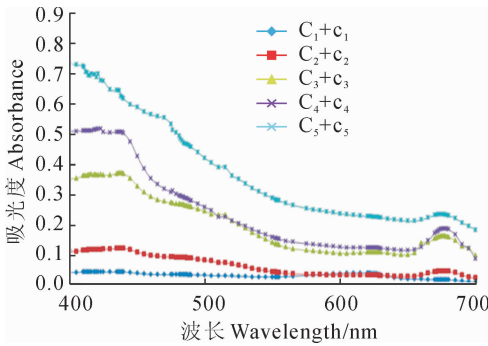


图 4 含水量 14.9%的发菜各色素层的吸收光谱
Fig. 4 Absorption spectra of pigment section of *N. flagelliforme* containing water 14.9%

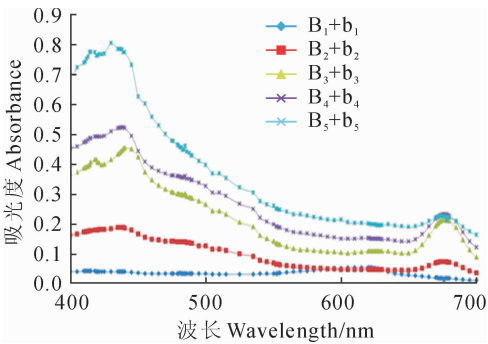


图 3 含水量 51.2%发菜各色素层的吸收光谱
Fig. 3 Absorption spectra of pigment section of *N. flagelliforme* containing water 51.2%

结构域蛋白[hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein(条带 9)]、选择性通道蛋白[carbohydrate-selective porin OprB(条带 4)]、未

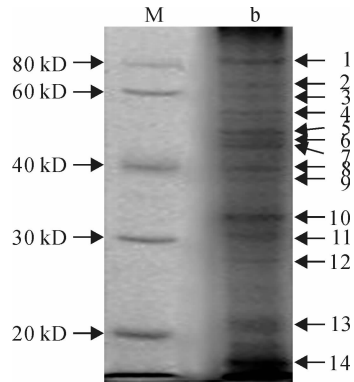


图 5 发菜类囊体膜蛋白 SDS-PAGE
M. Marker; b. 含水量 51.2%发菜类囊体膜蛋白条带;
1~14. 蛋白电泳条带编号
Fig. 5 SDS-PAGE of thylakoid membrane proteins of *N. flagelliforme*
M. Marker; b. Thylakoid membrane protein bands of colonies containing water 51.2%; 1~14. The code of protein by SDS-PAGE

表 1 发菜类囊体膜蛋白 MALDI-TOF-TOF/MS 鉴定和数据库检索

Table 1 Thylakoid membrane protein MALD-TOF-TOF/MS identification and database searching in *N. flagelliforme*

a	b	c	d	e	f	g
1	gi 186681784	未知蛋白 (hypothetical protein Npun_R1321) 点形念珠藻 (<i>N. punctiforme</i> PCC 73102)	IAQEFV(762, 40); EIVQDLQR(999, 53); SELNPDAIR(1 013, 51); DQFVEQVR(1 019, 50); AYLEEYLR(1 055, 53); DTLVQLLSQR(1 171, 66); QELNPEGQR(1 182, 60); DLQLLHDPVR(1 218, 67); LLEDPAQAGISSIR(1 397, 75); DVIYDPAADPGIVR(1 499, 76); LGLPTSPQSPYR(1 524, 83); KLEDDPAQAGISSIR(1 525, 85); SDFENLLNDPQLK(1 531, 75); FDRDRTLVLQSLQR(1 589, 85); AVNNQVAVATAEAAAAYR(1 724, 92); IRSDFENLLNDPQLK(1 800, 94); LGELMDLYKSPAGQSK, T+Oxidation(1 850, 94); NYLNSLRPELNYDSIK(2 053, 01); EGYDSVIT-TIADYLRNTGK(2 174, 05); NYLNSLRPELNYDSIKR(2 209, 11); AAPGPQSSIQQAALSALTATVLGR(2 349, 30); GLAEQAQYQAETLWLVNVEYLK(2 581, 28)	22	298/1038	87/81
2	gi 186683917	未知蛋白 (hypothetical protein Npun_R3785) 点形念珠藻 (<i>N. punctiforme</i> PCC 73102)	FGQFDR(768, 35); AIAFVLR(834, 45); HDQEAAR(1 027, 56); ARELQEQAK(1 071, 56); STIVALLISQR(1 086, 63); DLQLLSPPR(1 140, 65); ETLVQLVLSQR(1 171, 65); ETLVQLVLSQR(1 246, 66); DTFVQLLQQR(1 395, 68); KNPTQVINLLK(1 463, 70); NTNLEEDPEGR(1 498, 72); STGKEELNPEGIER(1 557, 76); LVDEPAQAGFEDLSR(1 662, 77); VFDDPQAGFEALR(1 734, 83); LSQFDRDTLVQLLSQR(1 918, 02); VNLSNDVNTKITTLQLOK(1 927, 07); TAQQALDFEANLEEYLR(2 009/96); QDFAKVDDPQAGFEALR(2 052, 99); ADVEDYILNSPWFHNR(2 121, 99); ELEENQEFYFTNLLNQR(2 152, 06); QDLSEEQVNLQDQIEAVR(2 227, 11)	21	181/1033	383/81
4	gi 186684663	碳水化合物选择性孔蛋白 OprB (carbohydrate-selective porin OprB) 点形念珠藻(<i>N. punctiforme</i> PCC73102)	GRVDSLEAR(1 001, 52); LDLQTSFTGR(1 136, 58); VRLLDQTSFTGR(1 391, 75); LQEEFSAELATILR(1 505, 77); YGCIAGYPNATYRGNR(1 774, 83)	5	59/568	128/81
6	gi 186684957	F ₁ F ₀ ATP 合成酶 α 亚基(F ₁ F ₀ ATP synthase subunit alpha) 点形念珠藻(<i>N. punctiforme</i> PCC 73102)	QAQAYR(735, 36); TQYAEVR(922, 45); LIESPAGIAR(1 235, 72); VVDALGRPDIGK(1 238, 69); IAQIPV-GEALIGR(1 335, 78); EAYPGDVFIHSR(1 552, 73); VANNVGTVLQYGDGIAR(1 567, 86); ATLVIYDDL-SKQAQAYR(1 954, 01); SVHEPMQTGITAIDSMPIGR(2 252, 12); SVHEPMQTGITAIDSMPIGR, G+Oxidation(2 268, 12); SVHEPMQTGITAIDSMPIGR, G+2 Oxidation(2 284, 11); SISIRDEISSIQQIEYDQEVK(2 954, 49)	12	184/506	98/81
8	gi 186684534	F ₁ F ₀ ATP 合成酶 β 亚基(F ₁ F ₀ ATP synthase subunit beta) 点形念珠藻(<i>N. punctiforme</i> PCC 73102)	VVDLLTPYR(1 074, 60); VVDLLTPYRR(1 230, 70); GPVNAEASLPHR(1 359, 72); IFNVLPVPDNR(1 371, 71); VGLS-GLTVAEYFR(1 410, 75); FVQAGSEVSALLGR(1 432, 70); QDVLLFDINFR(1 491, 80); IALVYGMNPPGAR(1 614, 81); IALVYGMNPPGAR, M+Oxidation(1 630, 81); FTDLETKPSVEFTGK(1 810, 93); IALVYGMNPPGAR, V+Oxide-tion(1 917, 95); DVNKQDVLLFDINFR(1 984, 04); ELQDIALGLDELSEDR(2 170, 10); MFSAVGYQTGLTDVGEQER(2 247, 08); MFSAVGYQTGLTDVGEQER, I+Oxidation(2 263, 07); YKELQDIALGLDELSEDR(2 461, 25); IFNV-LGEPVDNRGPVNAEASLPHR(2 713, 42); TVIMMELINIAHQHGYSVFAVGVR(2 842, 44); TVAMSTEGLVRGFE-VTDGAPITVPVGK, A+Oxidation(2 934, 50); IGVTNESQENITVEVQQLIGNQVR(2 952, 51); TREGNDLYNEMIES-GVINENLNESK(2 981, 36); GIYPADVPLGSTLMLQPNVIGDEHYNTAR, A+Oxidation(3 231, 55)	22	384/482	550/81
9	gi 186681449	血紫蛋白 HHE 阳离子结合 结构域蛋白(hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein) 点形念珠藻(<i>N. punctiforme</i> PCC73102)	GILEILGVYR(968, 60); SDLNIQDVIR(1 171, 61); QEESTMFAAIR(1 281, 57); IQEYFGQYVK(1 288, 56); EFT-GQDADQGIWAR(1 592, 65); NNLSDDQSEQLATEFK(1 810, 77); DLTAAHAEFEVYVYR(1 828, 80); VNTLIF-TELLSDNPQK(1 845, 85); NNLSDDQSEQLATEFKAAK(2 079, 98); YGADVLLAIGPLNTINFNENR(2 125, 07); VR-PFYGQDNTQELDFEQAEKMR(2 716, 19); VQDAMAAVSGVVGSAVTQTSDKSDLNQDVIR(3 273, 61); VQ-DAMAAVSGVVGSAVTQTSDKSDLNQDVIR, L+Oxidation(3 289, 60)	15	227/350	188/81
11	gi 186684906	光系统 II 锰稳定蛋白(photosystem II manganese-stabilizing protein PsbO) 点形念珠藻(<i>N. punctiforme</i> PCC 73102)	GLFFAR(709, 39); VPFLFTIK(963, 57); CPQLAETSR(1 003, 47); DVLTYDQIR(1 121, 52); VPSYRGAFLDPK(1 419, 75); GVVSGYDVAALPAQADDELTR(1 420, 67)	6	68/277	244/81
13	gi 119513594	未知蛋白(hypothetical protein N9414_02186) 胞沫节球藻(<i>Nodularia spumigena</i> CCY9414)	R, MQNHLENVDK, D+Oxidation(M)(1 242, 5663); LEWGEPATLTLDVR(1 644, 85); LEWGEPATLTLDVRDR(1 915, 97); DTNPLNAIPSPQPIEPQSDVYALK(2 719, 40)	3	65/151	87/81
3, 5, 7, 10, 12, 14		未鉴定成功 Unidentified				

注: a. SDS-PAGE 电泳条带编号; b. 蛋白登录号; c. 同源蛋白名称和同源物种名称(NCBI 数据库截止时时间: 2012.08.31); d. 匹配肽段的氨基酸序列和质荷比; e. 匹配肽段的氨基酸序列覆盖率; f. 氨基酸序列覆盖率; g. MOWSE 蛋白质得分/认定鉴定成功的蛋白质分值。

Note: a. Number of each protein band of SDS-PAGE, as indicated in Fig. 5; b. Accession number was recorded as a reference for the identification in NCBI database and species from homologous protein as in NCBI database(release date; 2012.08.31); d. The sequences of all the identified peptides with the corresponding m/z ratio in brackets; e. Number of matched peptides; f. Percentage of predicated protein sequence covered by matched sequence; g. MOWSE score probability(protein score) for the entire protein/protein score threshold.

知蛋白[hypothetical protein Npun_R1321(条带 1)、hypothetical protein Npun_R3785(条带 2)、hypothetical protein N9414_02186(条带 13)]。

3 讨 论

3.1 发菜类囊体膜的分离

类囊体膜的分离纯化是探知类囊体膜蛋白的关键。目前对于类囊体膜的分离主要集中在电泳条件的改进和增溶剂优化上,最根本的目的是为了获得高纯度、无干扰杂质的类囊体膜色素蛋白。由于发菜富含多糖、色素、胶质等物质^[9],发菜类囊体膜的分离和纯化受到严重干扰。本研究采用研磨和超声波破碎两种方式相结合充分破碎发菜细胞,经过多次差速离心制备类囊体膜粗制品,再进行不同密度梯度蔗糖溶液高速离心,得到纯化后的类囊体膜。这样不仅去除了多糖、色素、胶质和核酸等物质的干扰,而且因全过程都处于低温避光条件下,减少了部分色素蛋白复合物的裂解。此外,差速离心得到的类囊体粗制品杂质较少,经不同蔗糖密度梯度离心后各条带层分层清晰。因此利用密度梯度离心方法制备发菜类囊体膜是理想的选择。此外,不同含水量的发菜藻体,经过同样程序的处理后,其色素条带差异明显,且其 SDS-PAGE 条带呈现出明显的差异性,分析认为由于发菜藻体含水量的不同,尤其是含水量达 1194.95% 时,样品的结构和所含水分对缓冲液造成了极大的影响,干扰了类囊体膜的分离和膜蛋白的纯化。因此,在发菜类囊体膜蛋白的分离及研究过程中,应充分考虑藻体含水量对分离效果的影响。

3.2 发菜类囊体膜蛋白功能探讨

发菜是一种生长在干旱-半干旱荒漠草原地区的陆生固氮蓝藻。为了揭示发菜类囊体膜的光合作用特性及膜蛋白在逆境条件下的差异性表达规律,本研究制备了发菜较完整的类囊体膜,进行了膜蛋白的质谱鉴定,获得了 8 种发菜类囊体膜蛋白的生物学信息,它们在发菜的光合作用及在极端环境中的光适应性中可能具有重要作用。

(1)碳水化合物选择性孔蛋白 OprB。碳水化合物选择性孔蛋白是一种基于选择性信号通道的糖蛋白家族,可促进葡萄糖转运并横跨于细胞膜中,并有助于促进各种不同化合物的扩散。Adewoye 等^[10]研究绿脓杆菌的碳水化合物的选择性 OprB 孔蛋白的表达时,发现当细胞外葡萄糖浓度降低,会引起铜绿假单胞菌外膜碳水化合物的选择性 OprB 的孔蛋

白的表达,并推测温度、培养基中水杨酸盐的浓度和碳水化合物源的 pH 等因素会影响 OprB 孔蛋白基因表达。Wylie 等^[11]发现碳水化合物的选择性 OprB 孔蛋白表达量的增加或减少可以明显影响菌株对葡萄糖摄取,但过度的 OprB 表达会影响菌株对糖类的摄取,并抑制碳水化合物运输。因此, OprB 不能被确定为严格意义上的葡萄糖选择性的外膜蛋白,而是作为碳水化合物运输的一个重要组成部分。但目前还没有对蓝藻碳水化合物的选择性孔蛋白功能的报道。本研究分离到的碳水化合物的选择性孔蛋白 OprB,推测其作为发菜类囊体膜上的通道蛋白,可能帮助葡萄糖等碳水化合物的摄取和转运,对于光合作用的正常进行具有重要作用。

(2) F_1F_0 ATP 合成酶。 F_1F_0 ATP 合成酶广泛存在于细菌的质膜、叶绿体的类囊体膜和线粒体的内膜上^[12-13],主要参与氧化磷酸化与光合磷酸化的反应,是能量代谢的关键酶之一。到目前为止,已经知道在细菌和叶绿体中的 ATP 合成酶分别由 8 和 9 种亚基组成,其主要区别是亚基的数量和在 ATP 合成酶结构中的位置^[14]。本研究鉴定的 F_1F_0 -ATP 合成酶 α 和 β 亚基,是发菜类囊体膜上重要的参与光合磷酸化反应的结构蛋白,对发菜生长发育和抗逆反应具有重要的作用,但其结构还需进一步研究。

(3)光系统 II 锰稳定蛋白。光合放氧是植物 PS II 的重要功能之一,而 PS II 的放氧反应主要是由 PS II 中的 4 个锰原子依次连接与 PS II 的 D1 蛋白的氨基酸残基上进行催化的。锰簇在类囊体膜的囊腔侧结合若干个外周蛋白,从而对放氧反应起作用。一般 PS II 具有 3 个外周蛋白 PsbO、PsbP、PsbQ 分别与锰簇结合,位于 PS II 囊腔侧,维持 PS II 的放氧活性,其中 PsbO 起到稳定和保护锰簇的作用,因而被称为锰稳定蛋白(MSP),受到胁迫时 PsbO 首先释放,然后锰原子释放,放氧活性随之丧失。在嗜热蓝藻中发现只存在 PsbO 蛋白而没有 PsbP 和 PsbQ 蛋白,取而代之的是细胞色素 c-550 和一种分子量为 9~12 kD 的蛋白^[15]。Bricker 等^[16-17]证明将 PsbP、PsbQ 外周蛋白洗脱后会引起 PS II 放氧功能的部分丢失。而将 PsbO 洗脱而不洗脱锰簇,在有 Ca^{2+} 和 Cl^{-} 存在时,PS II 仍可保持一定的放氧活力,证明放氧活性与锰簇的存在及 Ca^{2+} 和 Cl^{-} 离子存在有关。本研究鉴定的 PS II 锰稳定蛋白,可能与 PS II 颗粒的组合有关,参与发菜光合放氧过程,而且推测发菜的 PS II 锰稳定蛋白不仅与 PS II 颗粒中锰簇的稳定有关,还可辅助另外 2 个外周蛋白与 PS II 颗

粒的结合。虽然目前对于发菜外周蛋白在放氧功能中的作用不明,但作为 PS II 完成放氧功能的必要成分,需进一步进行探讨。

(4)未知功能蛋白。本研究获得了 14 条发菜类囊体膜蛋白条带,35.71%的蛋白条带确定了其蛋白名称和功能,另有 21.43%的蛋白,虽然质谱鉴定成功,并且获得了部分匹配的氨基酸序列,明确了蛋白名称,数据库中也有其 ID 及特性描述,但由于目前尚缺乏足够的生物学信息,因此无法判断其生物学

功能。还有 42.85%的蛋白点没有鉴定成功,尚不了解其生物学信息,而这些蛋白可能在发菜光合作用或碳同化过程中具有重要的生物学功能。此外,部分低丰度蛋白往往是一些关键性的调节蛋白或结构蛋白,但由于没有分离到或表达量很低而无法对其进行鉴定和分析。因此,还需要进一步利用其他相关技术分离鉴定发菜类囊体膜蛋白,从而获得对内囊体膜及其膜蛋白在光合作用中的生物学功能的全面认识。

参考文献:

- [1] AMANDA C C, JESSICA L J, IOANNA N, *et al.* Novel bronsted acidic ionic liquid and their use as dual solvent-catalysts[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**(21): 5 962—5 963.
- [2] MULLINEAUX C W. Exeitation energy transfer from Phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, **110**(3): 285—292.
- [3] BIBBY T S, MARY I, NIELD J, *et al.* Low-light-adapted prochlorococcus species possess specific antennae for each photosystem[J]. *Nature*, 2003, **424**(6 952): 1 051—1 054.
- [4] HU F(胡 锋), HUANG J L(黄俊丽), QIN F(秦 峰), *et al.* Progress in chloroplast thylakoid membrane and membrane proteins[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*(生命科学), 2011, **23**(3): 291—297(in Chinese).
- [5] KASHINO Y, LAUBER W M, CARROLL J A, *et al.* Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides[J]. *Biochemistry*, 2002, **41**(1): 8 004—8 012.
- [6] LIANG W Y, ZHOU Y W, WANG L X, *et al.* Ultrastructural, physiological and proteomic analysis of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration and rehydration[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, **75**: 5 604—5 627.
- [7] WANG M(王 梅), ZHONG Z P(钟泽璞), WANG K F(王可玢), *et al.* Isolation of chlorophyll protein complexes from the thylakoid membrane in *Nostoc flagelliforme* and their spectroscopic characterization[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*(植物学报), 2000, **42**(7): 684—688(in Chinese).
- [8] GAO Z Q, WANG G C, TSENG C K. An improved method for isolation of photosystem II from marine alga *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2005, **42**: 41—47.
- [9] LIANG W Y(梁文裕), NISHIFUJI T K. Purification and characterization of C-phyocyanin from *Nostoc flagelliforme*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2008, **28**(2): 303—309.
- [10] ADEWOYE L O, WOROBEK E A. Multiple environmental factors regulate the expression of the carbohydrate-selective OprB porin of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1999, **45**(12): 1 033—1 042.
- [11] WYLIE J L, WOROBEK E A. The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(11): 3 021—3 026.
- [12] LEFEBVRE-LEGENDRE L, VAILLIER J, BENABDELHAK H, *et al.* Identification of a nuclear gene(FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F1-ATPase in heat stress conditions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**: 6 789—6 796.
- [13] ZHANG X X(张欣欣), LIU SH K(柳参奎). Identification and characterization of mitochondrial ATP synthase small subunit gene in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), 2003, **1**(5/6): 605—612(in Chinese).
- [14] CAPALIDI R A, AGGELER R, WILKENS S, *et al.* Structural changes in the γ and ϵ subunits of the *Escherichia coli*. F₁F₀-type ATPase during energy coupling[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1996, **28**: 397—401.
- [15] SHEN J R, INOUE Y. Binding and function of two new extrinsic components, cytochrome c-550 and a 12 kD protein in cyanobacterial photosystem II [J]. *Biochemistry*, 1993, **32**: 1 825—1 832.
- [16] BRICKER T M. Oxygen evolution in the absence of the 33 kD manganese-stabilizing protein[J]. *Biochemistry*, 1992, **31**: 4 623—4 628.
- [17] BRICKER T M, FRANKEL L K. The structure and function of 33 kD extrinsic protein of photosystem II : A critical assessment[J]. *Photosynthesis Research*, 1998, **56**: 157—173.