

高温胁迫对菠菜类囊体膜蛋白亚基 和光谱特征的影响

周 峰¹, 华 春¹, 周泉澄¹, 王仁雷²

(1. 南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 江苏 南京 211171)

(2. 江苏食品职业技术学院, 江苏 淮安 223003)

[摘要] 研究了高温处理对菠菜类囊体膜蛋白亚基和光谱特征的影响. 结果显示, 高温处理后, 内周天线 CP43 放氧外周蛋白 33 000 降解明显, 而外周天线 LHCII 发生聚集; 随着处理温度的增高, 菠菜类囊体膜的吸收光谱和荧光发射光谱明显下降, 而且峰位发生蓝移, 这说明高温处理破坏了类囊体膜的结构, 影响到对光能的吸收. 而 35℃ 高温处理下, 随着处理时间的延长, 吸收光谱和荧光光谱也呈现下降趋势, 但与不同温度处理相比, 下降程度略缓, 这说明类囊体膜在 35℃ 长时间处理表现出的耐受性比在高温短时间处理条件强.

[关键词] 类囊体膜, 高温, 光谱

[中图分类号] Q 945 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010) 01-0098-04

Effect of High Temperature Stress on Protein Subunit and Spectra Characteristic of Thylakoid of Spinach

Zhou Feng¹, Hua Chun¹, Zhou Quancheng¹, Wang Renlei²

(1. School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China)

(2. Jiangsu Food Science College, Huai'an 223003, China)

Abstract The effect of high temperature on protein subunit and spectra characteristic of thylakoid of spinach was studied in this paper. The result showed that CP43 subunit, extrinsic oxygen evolution subunit 33 000 degraded markedly but LHCII aggregated under high temperature treatment. The absorption spectra and fluorescence spectra decreased significantly, and the peak position blue shifted. It demonstrated that the structure of thylakoid and light absorption were destroyed with increase of temperature. The absorption spectra and fluorescence spectra also decreased under 35℃ treatment with prolongation of treating time. In contrast, the decrease extent of absorption spectra and fluorescence spectra was smaller than that of under different high temperature treatment. It indicated that the tolerance ability of thylakoid under long time treatment at 35℃ was higher than that of under short time treatment at high temperature.

Key words thylakoid, high temperature, reconstitution

已有的研究表明, 在高温胁迫引起的众多生理变化中, 光合作用是最敏感的, 进一步研究证实, 叶绿体高温处理后导致光合反应的热失活是在不耐热的类囊体膜上^[1-3]. 类囊体膜的稳定性对高温逆境中植物的光合效率有直接作用, 它的稳定性在很大程度上影响着其他生物膜的稳定性, 具有高温逆境信号的放大作用. 因此类囊体膜的稳定性可能与高温伤害密切相关. 植物类囊体膜上的光系统 II 复合物 (photosystem II complexes, PSII) 和光系统 I 复合物 (photosystem I complexes, PSI) 是进行光合作用的重要场所. PSII 的主要功能是吸收光能, 进行光诱导的电荷分离、电子传递和催化水的光解. PSI 吸收的光能诱导电子从膜内侧的质体蓝蛋白传递至基质侧的铁氧还蛋白, 还原的铁氧还蛋白可被 Fd-NADP⁺ 氧化还原酶所利用而生成 NADPH. 菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 为耐寒性蔬菜, 温度高于 25℃ 时生长受阻, 它是研究光合作用的模式植物. 高温对蔬菜等作物的影响已有很多报道^[4-6], 但对菠菜的类囊体膜蛋白亚基和光谱特征报道不

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究面上项目 (07KJD180126 和 05KJD180118)、南京晓庄学院生态学重点学科项目.

通讯联系人: 华 春, 女, 教授, 研究方向: 植物生理学. E-mail: hc3501988@163.com

多. 作者对高温胁迫下菠菜类囊体膜 PSII和 PSI的蛋白亚基和光谱特征进行了研究, 初步探讨高温对菠菜的伤害机理.

1 材料和方法

1.1 材料

材料为菠菜 (*Spinacia oleracea* L.), 购自南京本地市场. 参照笔者^[7,8]的方法, 制备具光化学活性的类囊体膜. 高温胁迫处理方法参照 Tang等^[9]的方法.

1.2 SDS-PAGE

按照 Shan等^[10]的方法, 分离胶和浓缩胶的浓度分别为 15% 和 4%. 分离胶中加入 6mmol/L 尿素以提高分辨率, 先用 80 V 稳压电泳, 溴酚兰进入分离胶后再改用 120 V 稳压.

1.3 光谱测定

吸收光谱用天津港东 UV4501分光光度计进行检测, 扫描速率为 100 nm/min, 分辨率为 0.5 nm; 样品中 Chl浓度调至 10 μg/mL 荧光光谱用天津港东 WGY-10荧光分光光度计检测, 样品中 Chl浓度调至 10 μg/mL 激发光波长为 436 nm, 激发狭缝和发射狭缝分别是 10和 5 nm.

2 结果与分析

2.1 不同温度处理的类囊体膜蛋白亚基组成

由图 1可以看出, 类囊体膜复合物的主要多肽包括 PSI反应中心蛋白质亚基 PsaA 和 PsaB; PSII中相对分子量分别为 47 000、43 000和 28 000的内周天线蛋白 CP47、CP43和外周天线蛋白 LHCII 32 000的 D2蛋白, 此外, 还包括相对分子量分别为 33 000、23 000和 17 000的 3个放氧外周蛋白, 这与前人的研究结果一致^[11]. 随着温度的升高, 放氧外周蛋白 33 000降解明显, 这可能是导致高温处理后类囊体膜蛋白质复合体放氧活性丧失的主要原因^[12]; 此外, 45℃外周天线 LHCII含量增加, 这可能与高温处理后的外周天线聚集有关^[9]; 但高温处理后的内周天线 CP43消失.

2.2 不同温度处理和不同时间处理的类囊体膜吸收光谱

从图 2可以看出, 25℃处理后的类囊体膜吸收光谱主要有 3个吸收峰: 436 nm、470 nm 和 675 nm. 436 nm和 675 nm主要是 Chl a的吸收峰; 470 nm 主要是 Chl b和胡萝卜素类的吸收峰^[13]. 从图上还可看出, 类囊体膜吸收峰的面积随处理温度的增加表现出下降趋势, 红区最大吸收峰发生蓝移, 这说明高温处理破坏了类囊体膜的结构, 影响到对光能的吸收.

从图 3可以看出, 35℃条件下, 与处理 15 min相比, 在处理 30 min后的类囊体膜吸收峰的面积略有下降; 随着处理时间的进一步延长, 吸收峰的面积下降明显, 但峰位没有变化. 这说明, 35℃处理下, 随着处理时间的延长, 尤其是 45 min后, 类囊体膜的捕光能力明显下降; 但峰位没有变化, 这说明类囊体膜在 35℃长时间处理表现出的耐受性比在高温短时间处理条件强.

2.3 不同温度处理和不同时间处理的类囊体膜荧光发射光谱

从图 4可以看出, 25℃处理后的类囊体膜的荧光发射光谱主要有 2个荧光发射峰, 685 nm 和 750 nm. 685 nm 是类囊体膜 PSII的荧光发射峰; 750 nm 是类囊体膜 PSI的荧光发射峰. 温度的升高, 685 nm 的荧光发射峰明显降低, 并发生蓝移; 这说明, 类囊体膜 PSII的荧光发射光谱对高温非常敏感, 尤其是 45℃后, 荧光发射峰更是显著降低. 685 nm 表示了内周天线 CP43、CP47和 PSII反应中心色素之间达到单线激发态平衡的荧光^[14], 其明显降低可能与内周天线 CP43在高温条件下受到破坏有关(图 1). 而 PSI的荧光发射

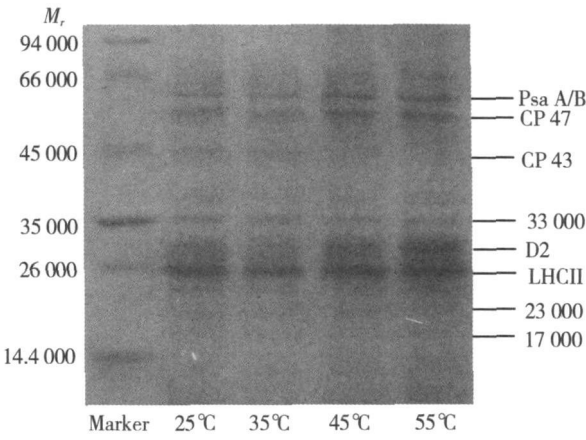


图 1 不同温度处理 5 min 后的类囊体膜蛋白复合体的 SDS-PAGE

Fig 1 SDS-PAGE of thylakoid complexes after treating with different temperature for 5 min

峰略有下降,这说明 PSI对高温的耐受性比 PSII强.从图 5 可以看出, 35℃处理条件下,随着处理时间的延长,类囊体膜蛋白复合体的 PSII荧光发射峰也呈现下降趋势,但与不同温度处理相比,下降程度略缓,这说明类囊体膜 PSII在 35℃长时间处理表现出的耐受性比在高温短时间处理条件强.但高温短时间处理下,类囊体膜的 PSI荧光发射峰基本没有变化.

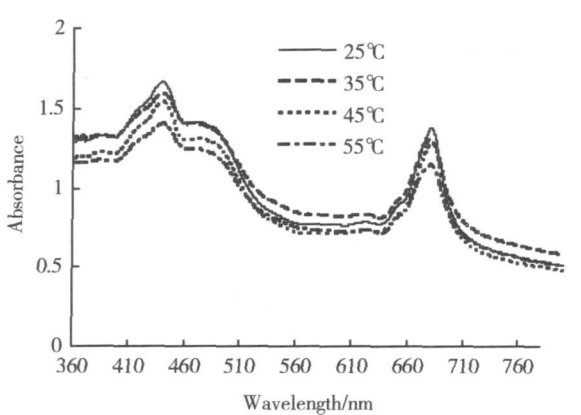


图 2 不同温度处理 5 min 后的类囊体膜蛋白复合体的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of thylakoid complexes after treating with different temperature for 5 minutes

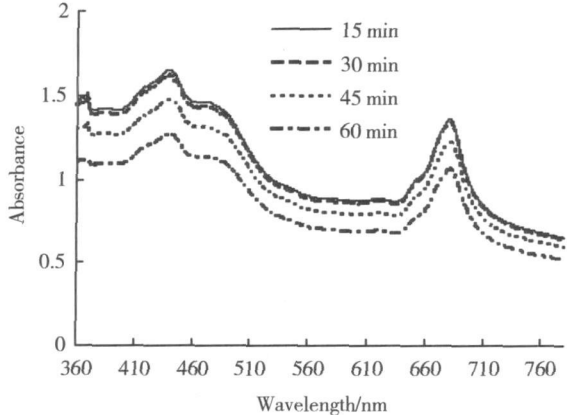


图 3 35℃处理不同时间后的类囊体膜蛋白复合体的吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectra of of thylakoid complexes after treating with different time at 35℃

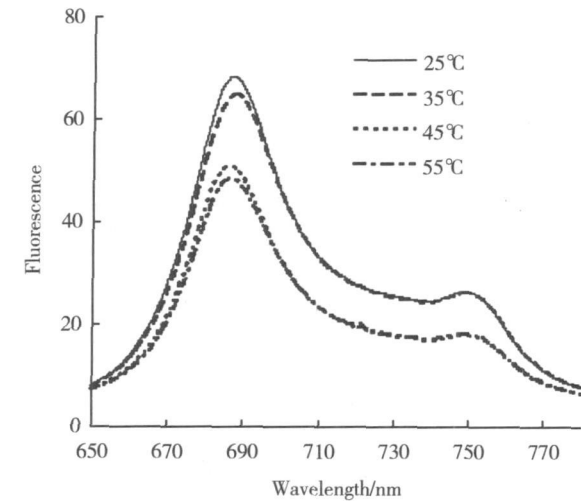


图 4 不同温度处理 5 min 后的类囊体膜蛋白复合体的荧光发射光谱 (436 nm 激发)

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of thylakoid complexes after treating with different temperature for 5 minutes (excited at 436 nm)

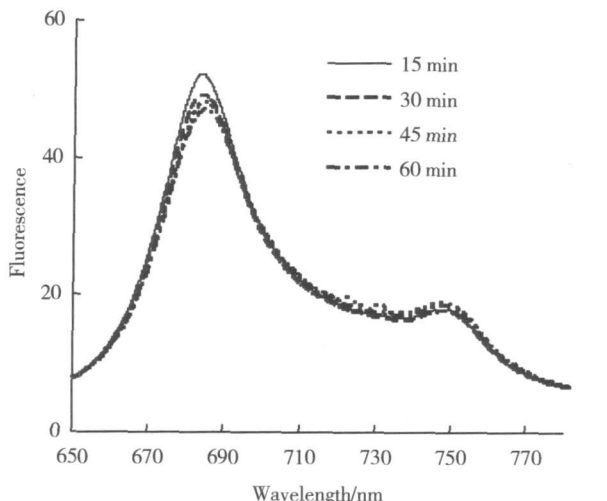


图 5 35℃处理不同时间后的类囊体膜蛋白复合体的荧光发射光谱 (436 nm 激发)

Fig. 5 Fluorescence emission spectra of of thylakoid complexes after treating with different time at 35℃ (excited at 436 nm)

3 讨论

本文的研究结果表明,菠菜类囊体膜对高温变化比较敏感,尤其是高温 45℃处理后,PSII荧光发射峰明显降低,685 nm 表示了内周天线 CP43、CP47和 PSII反应中心色素之间达到单线激发态平衡的荧光^[14],其明显降低可能与内周天线 CP43在高温条件下受到破坏有关(图 1).从图 1还可看出,LHCII蛋白随温度处理的升高,含量增加.这可能是在高温胁迫下 LHCII通过聚集实现热耗散的一种保护方式,这与 Tang^[7]的研究结果一致.从荧光发射光谱(图 4和 5)可以看出,PSI对高温的耐受性比 PSII强;电泳结果也表明,高温处理下,PSI反应中心蛋白质亚基 PsaA 和 PsaB并没有发生降解,其耐热能力较强.此外,从

荧光发射光谱可看出,在 35℃条件下,菠菜类囊体膜对处理时间的延长表现出的耐受性比温度变化强.这可能与在一定高温范围内,类囊体膜脂对类囊体膜蛋白复合体的保护有关.在高等植物中,膜脂也是植物细胞中重要的组成部分,关于通过脂质体模拟膜蛋白所在的膜脂环境,研究膜脂和膜蛋白在高温胁迫下的交互作用,目前正在研究中.

[参考文献]

- [1] Thebud R, Santarius K. Effect of high temperature stress on various biomembranes of leaf cells in situ and in vitro[J]. Plant Physiology, 1982, 70: 200-205
- [2] Chaisompongpan N, Li P H, Davis D R, et al. Photosynthetic response to heat stress in common bean genotypes differing in heat acclimation potential[J]. Crop Science, 1990, 30: 100-104
- [3] Martin M S. Alteration of gene expression during environmental stress in plants[J]. Annual Review Plant Physiology, 1988, 37: 363-376
- [4] 马德华, 庞金安, 李淑菊, 等. 温度逆境锻炼对高温下黄瓜幼苗生理的影响[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 350-355
- [5] 陈伟, 阳振乐, 李良璧, 等. Triton X-100对 70℃处理后光系统 I颗粒耗氧速率的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(3): 298-304
- [6] 李敏, 王维华, 王然, 等. 高温胁迫对菠菜叶片保护酶活性和膜透性的影响[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 99-100
- [7] Zhou F, Liu S, Hu ZH, et al. Effect of monogalactosyl diacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids[J]. Photosynthesis Research, 2009, 99: 185-193
- [8] Wang R L, Hua C, Zhou F, et al. Effects of NaCl stress on photochemical activity and thylakoid membrane polypeptide composition of a salt tolerant and a salt sensitive rice cultivar[J]. Photosynthetica, 2009, 47(1): 125-127
- [9] Tang Y L, Wen X G, Lu Q T, et al. Heat stress induces an aggregation of the light harvesting complex of photosystem II in spinach plants[J]. Plant Physiology, 2007, 143: 629-638
- [10] Shan J X, Wang J S, Ruan X, et al. Changes of absorption spectra during heat induced denaturation of photosystem I core antenna complexes CP43 and CP47: revealing the binding states of chlorophyll molecules in these two complexes[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1504: 396-408
- [11] Eshaghi S, Andersson B, Barber J. Isolation of a highly active PSII/LHC II supercomplex from thylakoid membranes by a direct method[J]. FEBS Lett, 1999, 446: 23-26
- [12] 阳振乐, 李良璧, 匡廷云. 双半乳糖甘油存在下光系统核心复合物放氧反应的热变性[J]. 科学通报, 2002, 47(22): 1714-1717
- [13] 孙磊, 陈国祥, 程嘉翎, 等. 低聚壳聚糖处理对低温胁迫下水稻幼苗类囊体膜特性的影响[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2009, 32(2): 93-97
- [14] Andrizhievskaya E G, Chojnicka A, Bautista J A, et al. Origin of the F685 and F695 fluorescence in photosystem II[J]. Photosynth Research, 2005, 84: 173-180

[责任编辑: 孙德泉]