植物学通报 2005, 22 (3): 313~319
Chinese Bulletin of Botany

研 究 论 文

小麦 Rubisco 活化酶基因的克隆和表达特性①

张 国 李 滨 邹 琦②

(山东农业大学生命科学学院植物系 泰安 271018)

摘要 Rubisco活化酶是广泛存在于光合生物中调节Rubisco活性的酶, 我们利用PCR技术, 从小麦(*Triticum aestivum*)叶片cDNA文库中克隆得到Rubisco活化酶基因cDNA片段, 该片段长度为850 bp, 编码201个氨基酸。Northern blot表明, 小麦叶片在暗诱导衰老的条件下, 叶片中活化酶基因表达水平逐渐下降; 同时, 小麦叶片的光合特性、叶绿素含量和Rubisco活性呈现下降趋势。这些结果表明, 衰老时小麦叶片Rubisco活化酶基因表达水平下降与光合速率下降密切相关。

关键词 Rubisco活化酶, 小麦, 衰老

Cloning and Expression of Rubisco Activase Gene in Wheat

ZHANG Guo LI Bin ZOU Qi②

(*Department of Botany, College of Life Science, Shandong Agricultural University*, Tai'an 271018)

Abstract Rubisco activase is an ubiquitous enzyme for the activation of Rubisco in photosynthetic autotrophs. A cDNA fragment of Rubisco activase gene was cloned from wheat (*Triticum aestivum*). Northern blot showed that expression of the gene was down-regulated in dark-induced senescence leaves, where photosynthetic rate, chlorophyll content and Rubisco activity also showed obvious decline. The results suggest that the decreased expression level of the gene was related to the decline in photosynthetic rate.

Key words Rubisco activase, Wheat, Senescence

Rubisco是光合生物进行光合碳同化关键的双功能酶, 它催化RuBP的羧化-加氧反应, 但效率很低。因为加氧反应除了消耗能量, 还损失了羧化反应中固定的25%的有机碳; 同时, 各种磷酸糖类能抑制Rubisco的活性, 如: 底物RuBP本身就是Rubisco的强烈抑制剂, 且活化态Rubisco易于脱氨甲酰化而失活, 这些因素使Rubisco成为光合速率的限制因子, 因而也成为提高作物光合效率的研究目标。

Salvucci等(1985)发现了Rubisco活化酶(Rubisco activase, RCA), 它能够活化Rubisco, 同时具有ATPase活性; 也有人认为RCA是一种分子伴侣(Spreitzer and Salvucci, 2002)。植物中Rubisco的活化状态实际是Rubisco的失活速率和RCA活化Rubisco速率间的平衡状态(Crafts-Brandner and Salvucci, 2000)。人

①国家重点基础研究发展规划项目(G1998010100)资助。
②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: zouqi@sdau.edu.cn
收稿日期: 2004-02-17 接受日期: 2004-09-20 责任编辑: 孙冬花

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-015

们利用RCA抗体研究发现，RCA普遍存在于高等植物(包括 C_3 和 C_4 植物)、绿藻、部分蓝细菌和古细菌等光合生物中。

衰老是植物发育过程中的一个阶段(Smart, 1994),在衰老过程中最明显的一个变化是植物光合能力的下降(Correia *et al.*, 1998)。高辉远研究大豆的生长发育后认为,衰老时光合暗反应能力的衰退是光合能力衰退的决定因素①。对于小麦来说,旗叶衰老时,叶绿素下降包括缓降期和速降期,而光合速率经历高值持续期后开始下降(张荣铣和程在全, 1992)。但小麦衰老时光合衰退与RCA的关系尚未见报道,因此本文主要研究连续黑暗处理小麦叶片诱导衰老时,小麦光合特性、Rubisco 活性、叶绿素含量和RCA mRNA水平的变化规律,探讨衰老时光合衰退的内在因素,分析RCA在小麦叶片衰老期间的作用。

1 材料与方法

1.1 小麦叶片Rubisco活化酶基因片段的克隆

参照构建小麦(*Triticum aestivum*)叶片cDNA文库所用pBK-CMV 噬菌粒载体序列,设计特异性引物T7: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3' 和 T3: 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3', 筛选小麦叶片cDNA 文库。

1.2 净光合速率(*Pn*)、羧化效率(CE)和光化学效率(*Fv*/*Fm*)的测定

小麦幼苗在自然光照条件下,在Hoagland培养液中培养15天,从第16天开始分成两组:对照组(CR)光照条件不变,诱导组(DI)进行连续黑暗培养;同时从第16天开始(包括第16天)每隔1天在上午8:30~9:30,用CIRAS-1便携式光合系统(英国 PP-Systems 公司)测定完全伸展的第 2 片叶的 *Pn* 和 CE; 用 FMS2 脉冲调制式荧光仪(Hansatech公司)测定叶片在自然光照下光系统 II 的 *Fv*/*Fm*; 之后取下完全伸展的第2片叶置液氮中冷冻,保存于 -80 ℃超低温冰箱,用于提取叶绿素、小麦叶片总 RNA 和制备 Rubisco 粗提液,试验过程共持续 10 天,取样 6 次。

1.3 叶绿素含量的测定

将取好的叶片置于冰冷的研钵中,加入STN提取液(400 mmol·L^{-1}蔗糖, 50 mmol·L^{-1} pH7.2 Tris-HCl, 10 mmol·L^{-1} NaCl)约2 mL·g^{-1} FW,研磨成匀浆,用网孔36 μm尼龙膜过滤,滤液以 5 500*g* 离心 5 分钟,沉淀用 STN 漂洗后再离心 1 次。沉淀(叶绿体)用 20 mmol·L^{-1} pH7.5 HEPES (内含6 mmol·L^{-1} $MgCl_2$)悬浮,冰浴30分钟, 20 200*g*离心10分钟,沉淀(类囊体)再用 HEPES 悬浮使叶绿素含量保持在 0.8~2 mg·L^{-1}。取0.1 mL悬浮液加入4.9 mL 80%丙酮摇匀, 5 000*g*离心2分钟,用UV-120分光光度计(日本岛津)测定652 nm OD值: 叶绿素含量(mg·L^{-1})＝(A_{652} × 5)/(34.5 × 0.1)=A_{652} × 1.449 (Bugos *et al.*, 1999)。

1.4 Rubisco活性的测定

Rubisco活性测定参见李立人等(1986)的 ^{14}C 同位素测定方法。将已取好的叶片定量 0.1 g, 加入 1.9 mL 预冷提取液[50mmol·L^{-1} pH7.5 Tris-HCl, 1 mmol·L^{-1} EDTA, 10 mmol·L^{-1} $MgCl_2$, 12.5% (V/V) 甘油, 10 mmol·L^{-1} β-巯基乙醇, 1% PVP]和石英砂,低温(4 ℃)研磨成匀浆, 15 000*g*离心10分钟,上清液用于Rubisco活性测定(李卫芳等, 2001)。计算酶活力公式见括号内[基于鲜重的 CO_2 量, μmol/(g · s) = Δ dpm × V × 10 × 1.5/(x × t × V' × 60)]其中: Δ dpm 为样品 dpm 减去本底 dpm, V 为提取液总体积(μL), x 为1.0 mol $NaH^{14}CO_3$的dpm, t 为反应时间(s), V' 为加入的酶液体积(μL)(翁晓燕等, 2001)。

1.5 探针的制备和Northern杂交

① 高辉远 (1999) 大豆生长发育过程中光合作用及光合效率的调节. 博士学位论文, 山东农业大学, 泰安, 8-30

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-015

用CTAB法提取小麦叶片总RNA, 1.2%甲醛变性凝胶电泳分离(溴化乙锭染色), RNA(20 μg)在胶上分离后转移到尼龙膜。利用从小麦叶片cDNA文库得到的*RCA*基因片段, 设计引物5'-CCGTGATGGTCGTATGGAGA和5'-CAGCAAGAGATGGTGGGTGT, 利用PCR方法得到片段的3' 端作为 northern-blot 探针的模板。利用α-[^{32}P]dCTP标记纯化的50 ng的PCR 产物。在 42 ℃下将转移到尼龙膜的RNA 与制备的探针预杂交 12 小时, 然后在 42 ℃下杂交48小时, 洗膜后在 - 70 ℃放射自显影(Sambrook *et al*., 1989), 放射自显影的胶片使用GDS8000凝胶图像分析系统进行灰度扫描分析。

2 结果

2.1 小麦RCA的 cDNA 部分序列

现在人们已经克隆了一些高等植物的RCA基因, 例如拟南芥(注册号为BT000613, 下同)、菠菜(J03610)、玉米(AY110044)、烟草(U35111)、棉花(AP329934)、水稻(U74321)和大麦(M55447) 等。

我们从小麦叶片构成的cDNA文库中获得RCA基因的部分序列, 包含1 054 bp。测序结果表明, 它的阅读框架有201个氨基酸序列, 与其他高等植物的RCA序列具有很高的同源性(图 1), 其中与大麦、水稻、棉花和拟南芥的同源性分别为97%、84%、80%和78%。此片段已在GenBank注册, 注册号为 AY602372。

植物RCA(除了烟草和玉米等)一般都含a和b两种亚基, 正常条件下它们具活性, 但只有a亚基受硫氧还蛋白f(Trx-f)的调节, 原因是其C-末端具有2个Cys残基而b亚基没有, 这是Rubisco 受光调节的最终原因(Zhang *et al*., 2002)。我们所获得的小麦RCA氨基酸序列C末端也具有对应于拟南芥的2个Cys残基(图1箭头所指), 这说明它是小麦RCA 的a亚基氨基酸序列。

2.2 小麦叶片暗诱导衰老过程中*P*n、*F*v/*F*m、叶绿素含量、CE和Rubisco总活性的变化

从图2的结果可以看出, 在10天的试验过程中, 对照组小麦光合速率和羧化效率略有上升; 而暗诱导衰老小麦随着诱导天数的增加, 叶片逐渐变黄, 各种指标都下降, 但下降幅度和出现急剧下降的时间不同。暗诱导 2 天后, Rubisco总活性和羧化效率下降幅度比其他指标下降幅度大, Rubisco 活性从第 4 天开始就急剧下降, 到第 6 天降到开始时活性的 41%; 羧化效率到第6天降到开始时的54%, 诱导8天后活性已很低, 基本不能进行羧化。第 10 天时Rubisco活性和羧化效率均接近于0。类囊体中叶绿素含量从诱导开始即持续减少, 但在整个诱导过程中, 减少趋势平缓, 几乎与时间成线性关系, 第6天时含量是开始的55%, 8天后叶片已完全变黄; 而光合速率在诱导开始时下降平缓, 6天后为速降期, 第10天净光合速率已接近于 0。与碳同化的各项指标相反, 反映 PS Ⅱ功能的指标——PS Ⅱ最大 *F*v/*F*m 降低的十分缓慢, 开始几天几乎不变, 至6天后才显著降低。

2.3 小麦叶片RCA基因在暗诱导叶片中的表达特性

暗诱导小麦叶片不同时间后(图 3), 对RCA 的表达进行Northern 分析。结果表明, 对照(D0)的RCA mRNA表达水平最高, 随着诱导时间的增长, RCA表达量(D1~D5)呈现出由高到低、逐渐减少的趋势, 诱导 6 天后表达量已经很低, 在8天时mRNA几乎已不存在。

3 讨论

通过以上实验结果可以看到, 经过暗诱导衰老, 小麦叶片中Rubisco活性和羧化效率无论从下降时间还是下降幅度, 都比叶绿素含

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-015

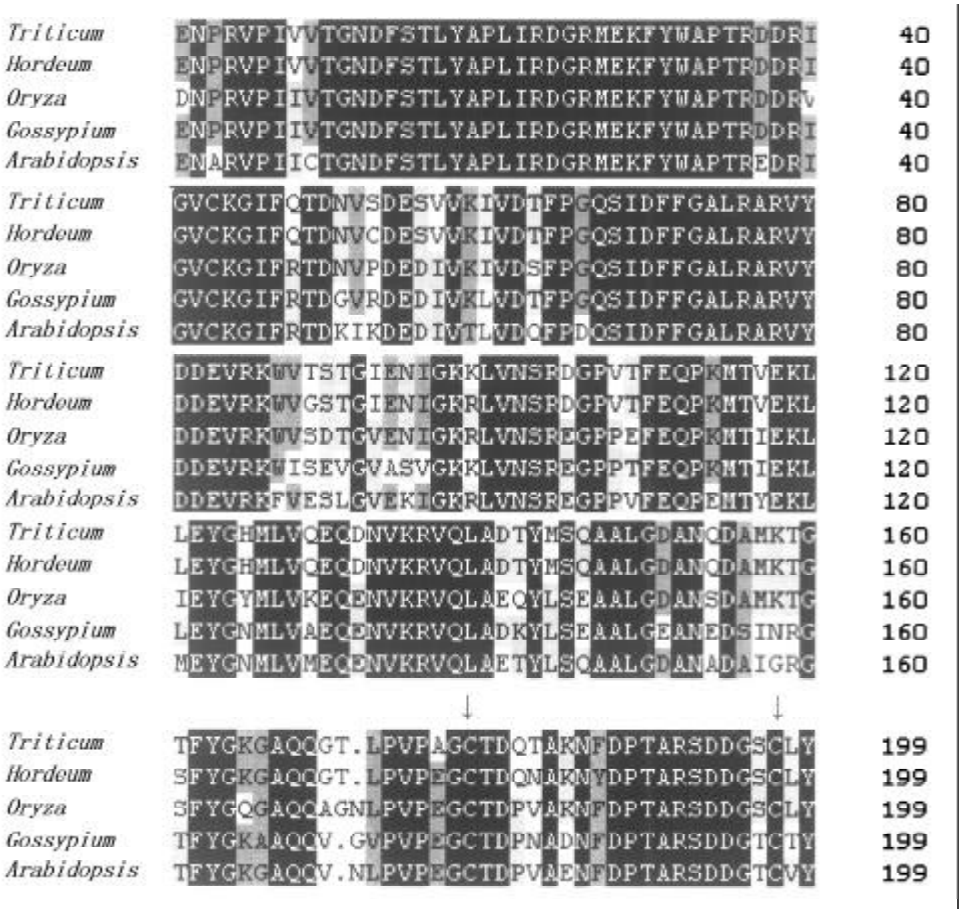


图 1 5 种高等植物 Rubisco 活化酶基因的部分氨基酸序列的比较(↓代表 2 个保守 Cys)
Fig. 1 Alignment of predicted amino acid sequences of RCA from *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* L, *Oryza sativa*, *Gossypium hirsutum* and *Arabidopsis thaliana* (↓ represent conserved 2 Cys)

量、*P*n 和 *F*v/*F*m 要早要大, 特别是 *P*n 的下降时间与叶绿素含量的下降时间相差不多, 但趋势不一致。在大豆自然衰老情况下, *P*n 下降的比叶绿素含量快①, 估计是黑暗影响小麦叶绿素的合成; *F*v/*F*m的下降要迟于*P*n, 这说明叶绿素含量和*F*v/*F*m的下降都不是光合衰退的原因。因此, 在衰老过程中首先下降的是Rubisco活性和羧化效率等与CO_2同化有关的过程, 而与光能吸收和转换有关的过程, 是对暗反应的下降过程作出响应后才与其一起降低的。综上所述, 小麦在整个衰老过程中, 决定光合能力高低的关键因素始终是光合作用的暗反应。

Rubisco 的活性下降是衰老的标志(Jiang and Xu, 1995)。衰老期间光合衰退的直接原因是Rubisco活性下降, 致使小麦碳同化能力降低, 不能有效地消耗光反应产生的同化力, 在较低光强下, 就会产生过剩光能, 叶片将较多的光能用于热耗散, 表现较严重的光抑制, 同时导致叶绿体内活性氧增加, 这也是加速小麦衰老的原因之一(沈文飚等, 1997)。

王熹等(1996)报道了小麦光合日变化过程中 Rubisco 活性的变化规律, 并推测 Rubisco

① 高辉远 (1999) 大豆生长发育过程中光合作用及光合效率的调节. 博士学位论文, 山东农业大学, 泰安, 8-30

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-015

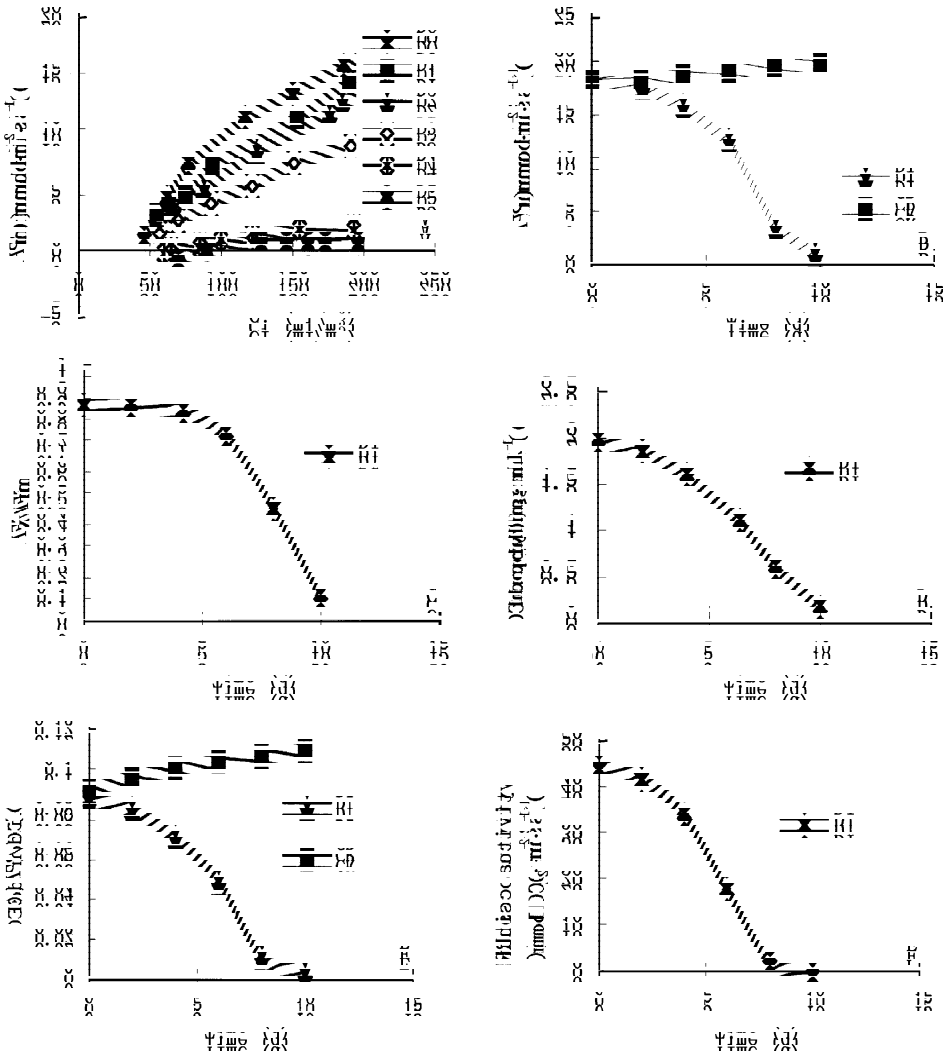


图 2 小麦暗诱导衰老时光合特性的变化

A. **小麦暗诱导衰老叶片** *P*n **对不同细胞间隙** CO_2 **浓度**(Ci)**的响应**; B. **小麦暗诱导衰老和对照生长不同时间叶片** *P*n **的变化**; C. **小麦暗诱导衰老叶片最大** *F*v/*F*m **的变化**; D. **小麦暗诱导衰老叶片叶绿素含量的变化**; E. **小麦暗诱导和对照生长不同时间叶片** CE **的变化**; F. **小麦暗诱导衰老叶片** Rubisco **总活性的变化**(D0~D5 **分别代表暗诱导** 0, 2, 4, 6, 8 **和** 10 **天的叶片**; C0~C5 **分别对应于** D0~D5 **的对照小麦叶片**); DI. **暗诱导小麦材料**; CR. **对照小麦材料**

Fig. 2 Changes in photosynthesis characteristics in dark-induced aging plants

A. Changes in photosynthesis (*P*n) under different intercellular CO_2 concentration (Ci) in dark-induced aging plants; B. Changes in *P*n in dark-induced aging plants and control plants; C. Changes in the maximamum quantum yield of photosystem Ⅱ photochemistry (*F*v/*F*m) in dark-induced aging plants; D. Changes in chlorophyll content in dark-induced aging plants; E. Changes in carboxylation efficiency (CE) of dark-induced aging and control plants; F. Changes in Rubisco total activity of dark-induced aging plants(D0 - D5 represent the leaves of dark-induced days respectively: 0, 2, 4, 6, 8, and 10 days; C0 - C5 represent the control leaves response to D0 - D5); DI. Dark-induced wheat; CR. Control wheat

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-015

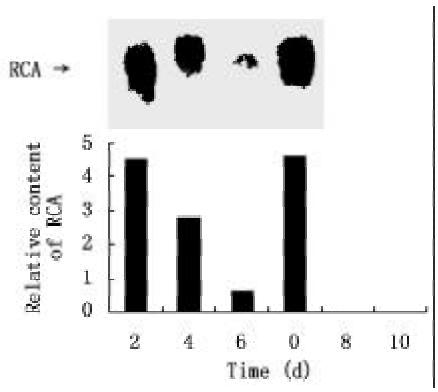


图3 暗诱导衰老不同时间后*RCA*基因在小麦叶片中的表达结果 (*RCA*表达量通过灰度扫描分析)
Fig. 3 Northern analysis of Rubisco activase gene expression of wheat in control plants and dark-induced aging plants (expression levels for *RCA* are quantified by densitometric analysis)

活性下降与RCA有关。Jiang等(2000)认为水稻叶片Rubisco初始羧化活性与RCA含量和活性之间成正相关。这些说明植株体内RCA的存在, 能有效地保证Rubisco在体内生理条件下处于高度的活化状态。但随着暗诱导衰老时间的延长, RCA和Rubisco含量减少, RCA含量的减少归结于转录水平的降低, 依次导致Rubisco活性下降, 叶片羧化效率下降, 无法保持正常羧化反应, 因此暗反应成为衰老早期的限制因子, 随衰老的加重, 由于同化力过剩, 光抑制加重, 活性氧的产生速度和清除速度严重失调, 最终对光合机构产生不可逆的破坏作用, 致使光化学效率降低。

参 考 文 献

李立人, 王维光, 韩祺 (1986) 苜蓿二磷酸核酮糖(RuBP)羧化酶体内活化作用的调节. 植物生理学报, **12:** 33-39

李卫芳, 姚晓群, 王忠 (2001) 小麦Rubisco的纯化、鉴定及其活性测定. 安徽农业科学, **29:** 146-148

沈文飚, 叶茂炳, 徐朗莱, 张荣铣 (1997) 小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化. 植物学报, **39:** 634-640

王焘, 郑国生, 邹琦 (1996) 小麦光合午休过程中Rubisco活性的变化. 植物生理学通讯, **32:** 257-260

翁晓燕, 陆庆, 蒋德安 (2001) 水稻Rubisco活化酶在调节Rubisco活性和光合日变化中的作用. 中国水稻科学, **15:** 35-40

张荣铣, 程在全 (1992) 小麦叶片光合速率高值持续期的研究. 南京师范大学学报, **15(Supplement):** 76-86

Bugos RC, Chang SH, Yamamoto HY (1999) Developmental expression of violaxanthin de-epoxidase in leaves of tobacco growing under high and low light. *Plant Biology*, **93:** 6320-6325

Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO_2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **97:** 13430-13435

Correia MJ, Coelho D, Barrote I, David MM (1998) Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Functional Plant Biology*, **25:** 299-306

Jiang DA, Lu Q, Weng XY, Zhen BS, Xi HF (2000) Regulation of Rubisco carboxylation activity and photosynthetic rate by Rubisco activase during leaf senescence in rice. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)*, **26:** 119-124

Jiang DA, Xu YF (1995) Internal dominant factors for declination of photosynthesis during rice leaf senescence. *Journal of Zhejiang Agriculture University*, **21:** 533-538

Salvucci ME, Portis AR Jr, Ogren WL (1985) A soluble

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-015

chloroplast protein catalyzes ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activation *in vivo*. *Photosynthesis Research*, **7:** 193-201

Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Smart CM (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, **126:** 419-448

Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) Rubisco: interactions, associations and the possibilities of a better enzyme. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **53:** 449-475

Zhang N, Kallis RP, Ewy RG, Portis AR Jr (2002) Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **99:** 3330-3334

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-015