

ClpP2 蛋白失活对集胞藻 PCC6803 生长、光合作用和蛋白质组的影响

王雅琦^{1,2}, 张宇萌^{1,2}, 林小煌^{1,2}, 杨明坤¹, 葛峰^{*1}

1 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072

2 中国科学院大学, 北京 100049

王雅琦, 张宇萌, 林小煌, 杨明坤, 葛峰. ClpP2 蛋白失活对集胞藻 PCC6803 生长、光合作用和蛋白质组的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1205-1219.

WANG Yaqi, ZHANG Yumeng, LIN Xiaohuang, YANG Mingkun, GE Feng. Effects of ClpP2 protein inactivation on growth, photosynthesis, and proteome of *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1205-1219.

摘要:【背景】蛋白酶能够降解细胞中错误折叠或是无功能的蛋白, Clp 家族蛋白就是一类重要的蛋白酶复合物。Clp 蛋白酶复合物的水解核心是 ClpP, 集胞藻 PCC6803 中存在 4 种不同的 ClpP 蛋白, 分别为 ClpP1–ClpP4。作为重要的蛋白水解复合物的功能组分, 目前对集胞藻 ClpP 的研究十分有限, 对其生理功能与调控底物的研究甚少。【目的】选择集胞藻为研究对象探究 ClpP2 蛋白的功能, 鉴定其潜在底物, 为集胞藻 ClpP2 作用机制提供实验支撑。【方法】构建集胞藻 ClpP2 突变株(Δ ClpP2), 进行其生长实验和光合生理功能研究。通过标记定量蛋白质组学技术(isobaric tag for relative absolute quantitation, iTRAQ)鉴定 ClpP2 调控的靶标蛋白, 生物信息学分析底物蛋白参与的代谢通路, 最后利用平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)技术对部分定量数据进行验证。【结果】 Δ ClpP2 可以在自然条件下光合自养生长至对数生长期, 但高光或高温胁迫下则无法正常生长。相较于野生型, Δ ClpP2 有着显著降低的 PS II 电子传递效率及 PS I 环式电子传递活性。通过 iTRAQ 定量蛋白质组学手段, Δ ClpP2 相对于 WT 共鉴定到 206 个差异表达蛋白, 其中 131 个上调、75 个下调, 为 ClpP2 蛋白酶提供了丰富的潜在底物库。基因本体论(gene ontology, GO)分析发现 ClpP2 主要参与各种物质的转运, 其中 ABC 蛋白转运途径显著被富集。利用 PRM 技术对 34 个差异表达的蛋白进行了验证。【结论】ClpP2 蛋白不是集胞藻生长所必需, 但在高温或者高光胁迫下是必不可少的, 其失活会降低集胞藻光合系统活性。ClpP2 可能通过调控离子转运进而影响光合系统。ClpP2 很可能与 ClpX 结合形成蛋白酶复合物。

关键词: ClpP2; iTRAQ; 集胞藻 PCC6803; 蛋白质组学

资助项目: 国家自然科学基金(31870756)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31870756).

*Corresponding author. E-mail: gefeng@ihb.ac.cn

Received: 2022-07-09; Accepted: 2022-08-26; Published online: 2022-11-16

Effects of ClpP2 protein inactivation on growth, photosynthesis, and proteome of *Synechocystis* sp. PCC6803

WANG Yaqi^{1,2}, ZHANG Yumeng^{1,2}, LIN Xiaohuang^{1,2}, YANG Mingkun¹, GE Feng^{*1}

1 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Proteases can degrade the misfolded or nonfunctional proteins in cells. Clp family protein is one of the important protease complexes. ClpP is the core of proteolysis of Clp protease complex. According to genomic data, there are four different ClpP proteins in *Synechocystis* sp. PCC6803, namely ClpP1–ClpP4. As a vital functional component of proteolytic complex, ClpP in *Synechocystis* is currently poorly studied. The study on its physiological function and substrate regulation is limited. [Objective] To explore the functions of ClpP2 in *Synechocystis* and identify potential substrate clusters, thereby providing experimental support for the mechanism research of ClpP2. [Methods] The ClpP2 mutant strain (Δ ClpP2) was constructed, and the growth experiment and photosynthetic system characteristic experiment were carried out. Target proteins regulated by Δ ClpP2 were identified by isobaric tag for relative absolute quantitation (iTRAQ), and the metabolic pathways involved in the substrate proteins were analyzed via bioinformatics. Finally, parallel reaction monitoring (PRM) was used to verify part of the quantitative data. [Results] Δ ClpP2 grew into the logarithmic phase through photoautotrophy under natural conditions, but did not grow normally when met high-light or high-temperature stress. Compared with the wild-type (WT), Δ ClpP2 showed significantly reduced photosystem II (PS II) electron transport efficiency and circle electron transport activity of photosystem I (PS I). A total of 206 differentially expressed proteins in Δ ClpP2 were identified by iTRAQ quantitative proteomics. Among them, 131 were up-regulated and 74 were down-regulated, which provided a rich substrate library. Gene Ontology (GO) analysis showed that ClpP2 was mainly involved in the transport of various substances, and ABC transporter pathway was enriched notably. Thirty-four differentially expressed proteins were successfully verified by PRM technology. [Conclusion] ClpP2 is not necessary for the growth of *Synechocystis*, but is essential when *Synechocystis* meets high-temperature or high-light stress. ClpP2 inactivation reduces the activity of the photosynthetic system in *Synechocystis*. ClpP2 might affect the photosynthetic system by regulating ion transport. ClpP2 is likely to bind with ClpX to form a protease complex.

Keywords: ClpP2; iTRAQ; *Synechocystis* sp. PCC6803; proteomics

蛋白质降解是维持细胞正常生理活动的重要环节^[1]。在原核生物中,超过 80%的待降解蛋白质通过蛋白酶体系统介导水解^[2-3],酪蛋白裂解酶(Clp)复合物是其中重要的一类蛋白酶

体系统。Clp 复合物高度保守且广泛存在^[4-5],最先在大肠杆菌中被鉴定,之后陆续在蓝细菌、高等植物叶绿体、哺乳动物线粒体中被发现。Clp 复合物由蛋白酶和分子伴侣两部分组

成, ClpP 蛋白酶作为水解核心, 并与 Clp 分子伴侣蛋白组装成多聚体如 ClpC、ClpX 等。通常, Clp 分子伴侣蛋白识别并对底物进行去折叠化, 将预处理后的底物转移到 ClpP 的蛋白水解室进行水解^[6]。

作为水解核心的 ClpP 蛋白酶是一类典型的 ATP 依赖型丝氨酸蛋白酶, 一般不是细菌生长必需蛋白质, 但参与重要的细胞代谢活动, 同时也是细菌适应环境胁迫必不可少的蛋白质。现有对光合自养生物原核生物的研究发现蓝细菌中存在复杂多样的 ClpP 蛋白, 在集胞藻 PCC 6803 中已知 4 种 ClpP 蛋白酶, 分别是 ClpP1–ClpP4; 此外, 集胞藻中除了 ClpX 还有 ClpC 作为 ClpP 分子伴侣^[7-8]。截至目前, 对蓝细菌 ClpP 蛋白的研究较为浅显, 相关的研究报道较少, 对 ClpP 的底物、分子伴侣、功能等尚未明确。

越来越多的研究利用转录组、蛋白质组、代谢组学的方法对细菌中 ClpP 蛋白进行探究来了解其底物与分子机制, 目前对蓝细菌 ClpP 蛋白相关的组学信息非常有限。为探究 ClpP2 蛋白对集胞藻的生长并揭示其功能和底物, 本研究构建 ClpP2 蛋白失活的集胞藻突变株, 进行生长实验并检测光合参数, 结合相对和绝对定量同位素标记(isobaric tag for relative absolute quantitation, iTRAQ)与液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术, 筛选并分析在 ClpP2 失活的影响下表达异常的蛋白质, 利用平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)技术验证部分 iTRAQ 实验结果, 初步探究集胞藻 ClpP2 功能, 并为 ClpP2 蛋白酶底物探究提供可靠底物簇。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用集胞藻 PCC6803 来自中国科学院

淡水藻种库, 菌株接种在 BG-11 培养基^[7], 放置在 30 °C 培养箱中接受白炽灯光照强度为 40 μ E, 并充气培养。用于质粒克隆的菌为接种在 LB 培养基^[9]中的大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 放置在 37 °C 恒温培养箱中培养。实验所用质粒均为本实验室保存。

主要试剂和仪器: 硫酸卡那霉素, Aladdin; 二氯苯基二甲基 [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, DCMU], 奥默生物技术(上海)有限公司; 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)和乙腈, Acrosorganics; iTRAQs 6-Plex 试剂盒, Sigma-Aldrich (上海)贸易有限公司。双通道调制叶绿素荧光仪, WALZ 公司; LC 色谱仪, Shimadzu 公司; C18 柱, Waters 公司; 色谱仪、质谱仪、色谱柱和 RSLC C18 柱, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 突变株的构建与菌株培养

本研究使用集胞藻野生型(WT)与 ClpP 突变株(Δ ClpP2)两种菌株进行实验。 Δ ClpP2 的构建采用基因靶向诱变方法: 在集胞藻基因组中定向插入卡那霉素抗性基因序列, 使编码 ClpP2 的基因(*slh0534*)发生靶向诱变。通过固体抗性培养基筛选培养, 获得 Δ ClpP2 单克隆后通过 PCR 与测序进行验证。其中固体抗性培养基为加入终浓度为 12.5 μ g/mL 硫酸卡那霉素的 BG-11 固体培养基。

菌株挑取单克隆放入含 150 mL 液体 BG-11 培养基的 250 mL 规格锥形瓶中生长, 瓶中匀速泵入过滤除菌的空气。其中 Δ ClpP2 培养瓶中加入终浓度为 25 μ g/mL 的硫酸卡那霉素。本研究所有实验均采用对数生长期菌种, 即控制所用菌种液的光密度 OD_{730} 为 0.8 ± 0.05 。

正常培养条件(normal condition, NC)设置: 温度设置为 30 °C, 白炽灯光强为 40。胁迫处理: 强光(high light condition, HL)设置光强

为 200 μE , 高温(high temperature condition, HT) 设置温度为 42 $^{\circ}\text{C}$ ^[9], 其他同正常条件。测定生长曲线时, 将对数生长期菌株稀释至 OD_{730} 为 0.01, 分别在 NC、HT 或 HL 条件下培养 5 d, 每 12 h 测量一次 OD_{730} 。倍增时间通过对数生长期的菌株增长率进行计算。

1.3 叶绿素荧光参数分析

为监测 WT 和 ΔClpP2 之间的光合生理变化, 用双通道调制叶绿素荧光仪按照使用手册的指导测定叶绿素荧光和 P700 氧化还原动力学曲线^[10]。菌株培养到对数期(OD_{730} 约为 0.8–1.0)后收集, 需要胁迫处理的则在收集前将对数期菌株放在 HT 或 HL 环境中 1 h。

取收集到的菌液 4 mL 暗适应 15 min 后导入 Dual-PAM-100 配套的石英玻璃皿中, 将玻璃皿插入 PAM 荧光计中。测定叶绿素荧光诱导曲线, 饱和脉冲设置为 10 000 μE , 打开光化光, 荧光信号出现峰值后打开测量光, 每 30 s 给予一次饱和脉冲, 当荧光曲线稳定后关闭光化光, 同时对光照后关闭光化光后的叶绿素荧光瞬态进行监测并获得 Post-illumination 曲线^[11–12]。光化学效率根据 PS II 的最大光合效率(F_v/F_m)确定, 公式为^[13]: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ 。

测定快速光曲线, 每 10 s 给予逐步增加的饱和脉冲, 饱和脉冲 PAR 从 11–693 μE 呈对数递增。荧光电子转移速率[rRealelectron transport rate of PS II, ETR(II)]和光化光下有效 PS II 产率[actual photosynthetic quantum yield of PS II, Y(II)]的快速光曲线(rapid light curves, RLC)被软件自动记录生成文档。

为测量 P700 氧化还原动力学曲线, 将菌液 OD_{730} 调整为 2.0 ± 0.05 , 在 15 min 暗适应前加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的电子阻断剂 DCMU。双通道调制叶绿素荧光仪操作遵循 Klughammer 等^[14]的方法并进行适当修改以适应集胞藻。

吸光度范围为 820–860 nm。打开测量灯, 远红光持续 30 s。测量光终止后得到曲线, 曲线进行归一化处理, 根据曲线拟合衰减函数计算半衰期^[10]。

1.4 总蛋白的提取和酶解

取 200 mL 对数生长期的 WT 和 ΔClpP2 菌液按照参考文献[15]的方法, 直接提取菌株总蛋白并进行酶解。WT 和 ΔClpP2 设置 3 个生物重复, 共 6 组样品。酶解结束后加入 0.1%的 TFA 终止反应, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 500 $\times g$ 条件下离心 10 min, 保留上清液, 放入真空干燥浓缩仪干燥, 获得肽段样品, 放入 -80°C 保存。

1.5 iTRAQ 标记与肽段分离

肽样品用 TEAB 和 ddH_2O 各 15 μL 复溶, 采用 iTRAQs 6-Plex 试剂盒按照操作手册进行标记。6 组样品在室温孵育 2 h 后合并^[16]。将样品通过上样器上样, 使用梯度为 2%–80%的缓冲液 B (80%乙腈, 5 mmol/L NH_4OH) 在色谱仪中以 1 mL/min 流速洗脱 90 min, 温度设置为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。按时间间隔收集 90 组样本, 最后合并为 12 组。3.5 m \times 4.6 mm \times 250 mm XBridge Shield C_{18} 柱用缓冲液 A (H_2O , 5 mol/L NH_4OH) 洗涤后装入预分离的肽段进行除盐处理, 真空离心干燥后用 0.1%的 TFA 溶解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、11 000 $\times g$ 条件下离心 5 min, 保留上清液用于 LC-MS/MS 分析。

1.6 LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析结合色谱仪和 Q 质谱仪, 质谱(MS)数据用数据依赖获取(data dependent acquisition, DDA)模式采集。2 μm \times 75 μm \times 20 mm 规格的色谱柱用 95%的缓冲液 A (0.1%甲酸水溶液)平衡, 除盐的肽段样品用 2%–80%的缓冲液 B (80%乙腈, 0.1%甲酸), 流速为 250 $\mu\text{L}/\text{min}$, 洗脱梯度: 0、20% B; 20% B, 1 min; 40% B, 8 min; 80% B, 9 min; 80% B, 11 min;

20% B, 11.1 min; 20% B, 14 min。洗脱后将样品装入 2 μm ×75 μm ×20 mm C18 柱中, 喷入质谱仪进行波普扫描。参数设置与实验室之前的研究^[15]一致。

1.7 蛋白鉴定与定量分析

将所有鉴定的质谱结果导入已有集胞藻蛋白质数据库的 MaxQuant (version 1.3.0.5) 软件进行蛋白质鉴定, 注释信息从资源网站 Cyanobase *Synechocystis* sp. PCC 6803 2015.10.16 (http://genome.microbedb.jp/cyanobase/GCA_00131838.5.1) 下载。软件参数设置为: parent ion error 为 10 PPM, secondary ion error reference 值为 0.05 Da, trypsin omission site 选择 2, 数据集的错误发现率(false discovery rate)小于 0.01。

所注释到的蛋白质通过基因本体论(gene ontology, GO, <http://www.geneontology.org/>) 与京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) 通路分析进行数据处理。

1.8 PRM 验证差异表达蛋白

为消除生物误差, 选取 iTRAQ 实验同一批样品的肽段进行 PRM 验证实验。肽段样品从 -80 °C 取出后用 0.1% TFA 复溶。采用色谱仪联用质谱仪对肽样品进行 LC-MS/MS 分析。MS 数据采集采用 DDA 方式。用 8%–95% 缓冲液 B (90% 乙腈, 0.1% 甲酸水溶液) 以 350 nL/min 的流速洗脱肽, 洗脱时间设置为 130 min。洗脱梯度设置为: 0–91 min, 8%–25% B; 92–117 min, 25%–45% B; 118–119 min, 45%–90% B; 120–130 min, 90% B。洗脱后的样品喷入质谱仪进行扫描。结果用 Skyline (3.5.1.9942) 软件进行分析, 定量结果归一化作为标准参考。根据 iTRAQ 的数据结果, 选择 45 个蛋白进行 PRM 定量验证分析。

1.9 统计分析

所有实验独立重复 3 次。所有实验数据均

使用 Origin 2021 软件进行处理。数据采用 *t* 检验(单尾), 并以标准差(SD)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 ΔClpP2 的生长与应对胁迫情况

2.1.1 ΔClpP2 构建成功并能光合自养

根据拟南芥同源基因, 在集胞藻中预测出 4 个 Clp 蛋白酶亚基, 分别为 ClpP2 (*sll0534*)、ClpP1 (*slr0542*)、Clp4/R (*slr0164*) 和 ClpP3 (*slr0165*)^[17]。本研究通过同源重组原理将卡那霉素抗性基因序列(Km^r)替换部分野生型集胞藻(WT) *clpP1* (*slr0542*)、*clpP2* (*sll0534*) 序列, 尝试构建 ClpP1 和 ClpP2 突变株^[7], 最终 ClpP2 突变株(ΔClpP2)成功构建并存活, 利用 *clpP2* 两端引物确认 Km^r 片段替换成功(图 1B), 并进行测序验证, 所用引物见表 1; ClpP1 突变株无法获得单克隆(数据未显示), 构建失败。

2.1.2 ΔClpP2 在高光与高温胁迫下无法生长

将 WT 和 ΔClpP2 菌株接种到 BG-11 液体培养基中, 分别置于正常(NC)、高光(HL)、高温(HT)条件下进行全日照振荡光合自养培养, 每隔 12 h 测光密度 OD_{730} , 进行 120 h 并绘制生长曲线。在正常条件下, 经过 120 h 光合自养生长 WT 和 ΔClpP2 先后到达对数生长期(图 2A)。WT 的 OD_{730} 从 0.01 生长至 2.26 ± 0.015 , 24–96 h 的倍增时间为 18.17 h; ΔClpP2 的 OD_{730} 到达 1.82 ± 0.014 , 倍增时间为 20.90 h。当面对高光或高温环境胁迫时, WT 生长速度显著放缓, OD_{730} 从 0.05 分别增至 0.73 ± 0.46 和 0.51 ± 0.00077 ; ΔClpP2 在这两种条件胁迫下 OD_{730} 均未超过 0.1, 无法正常生长(图 2B、2C)。

2.2 ClpP2 蛋白失活导致光系统活性明显下降

2.2.1 ΔClpP2 的 PS II 受损

PS II 的最大光合效率(F_v/F_m)可以量化 PS II

反应中心的最大光化学效率和 PS II 电子转移情况, 是 PS II 光抑制或其他损伤的指标^[18-19]。 F_v/F_m 测定值如图 3A 所示, WT 为 0.63 ± 0.0072 , 显著高于 $\Delta ClpP2$ 的 0.58 ± 0.016 。ETR(II) 指在蓝细菌的稀释悬浮液中 PS II 的电子传递速率^[20];

Y(II) 代表光化学反应吸收的能量部分, 正常情况下范围是 $0-F_v/F_m$ ^[14]。快速光曲线结果如图 3B、3C 所示, WT 的 ETR(II) 和 Y(II) 的快速光曲线始终在 $\Delta ClpP2$ 上方, 与 F_v/F_m 结果有一致性, 说明 $\Delta ClpP2$ 菌株中 PS II 受损, 活性下降。

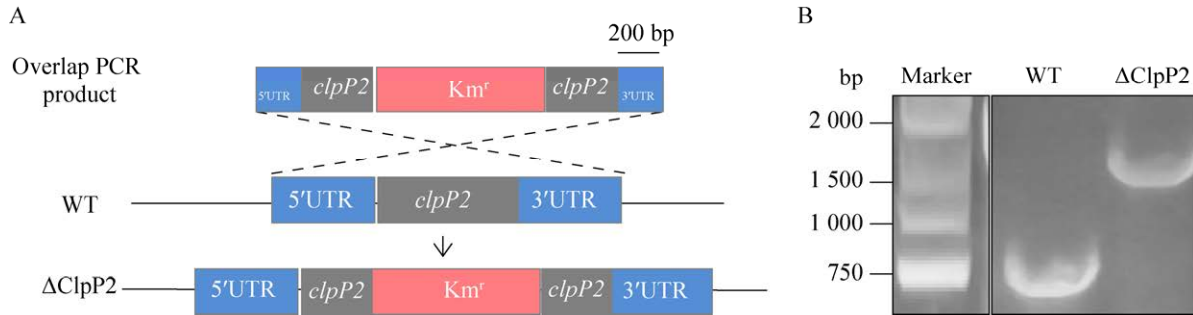


图 1 $ClpP2$ 敲除突变体的构建与验证 A: 突变体构建示意图. B: $\Delta ClpP2$ 的 PCR 验证

Figure 1 The construction schematic and verification. A: Diagram of mutants construction. B: The verification of $\Delta ClpP2$ by PCR.

表 1 构建 $\Delta ClpP2$ 所用的引物表

Table 1 The primers for the construction of $\Delta ClpP2$

Primers name	Sequence (5'→3')
Ha1-sllr0534-F	CAAATTACCCTTGGGGTGTC
Ha1-sll0534-R	GACTCTAGAGGATCCAAAATAGTAGCTGGGCCACA
Kana-F	GGATCCTCTAGAGTCGACCT
Kana-R	GATCTGATCCTTCAACTCA
Ha2-sll0534-F	TTGAAGGATCAGATCTGGACGCAGAGGACCCGGAA
Ha2-sll0534-R	CAGATGGGAGTCGTATTGG

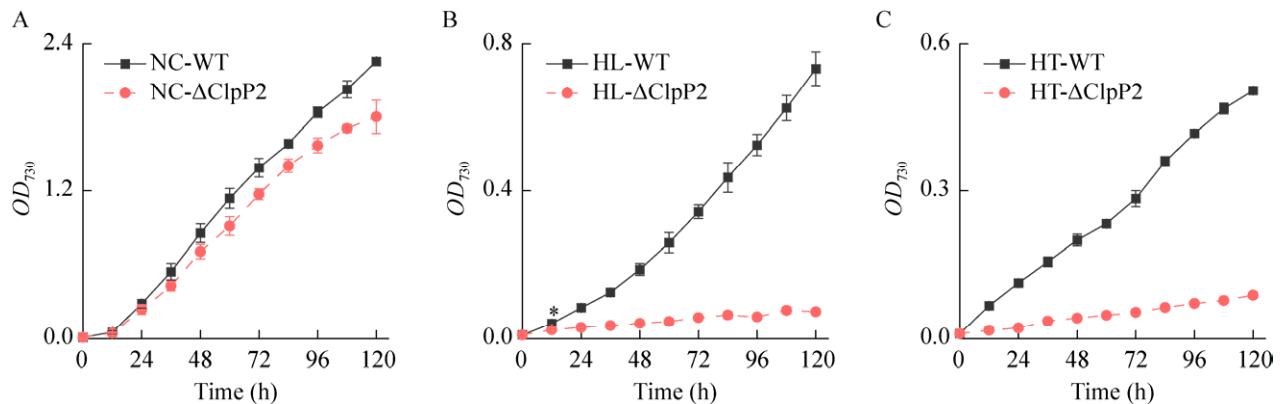


图 2 菌株在正常、高光和高温胁迫下的生长曲线 A: 30 °C, 40 μE . B: 30 °C, 200 μE . C: 42 °C, 40 μE

Figure 2 The growth curves under normal condition, high light stress and high temperature stress. A: 30 °C, 40 μE . B: 30 °C, 200 μE . C: 42 °C, 40 μE .

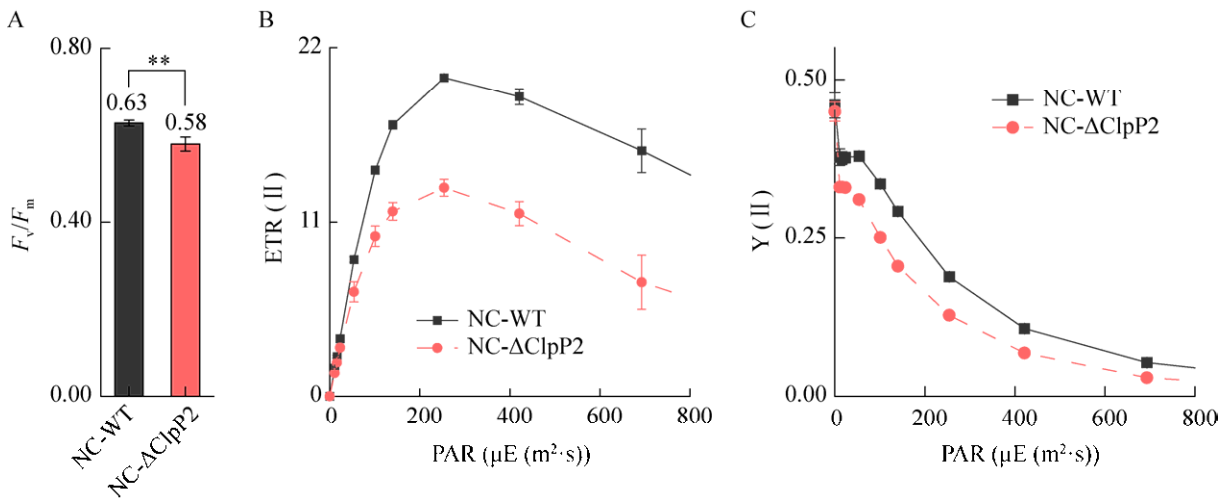


图3 菌株的 F_v/F_m 与快速光曲线 A: PS II 最大光化学量子产量(F_v/F_m), **: $P < 0.01$. B: PS II 真实电子传递速率[ETR(II)]的快速光曲线. C: PS II 实际光合效率[Y(II)]的快速光曲线

Figure 3 F_v/F_m and rapid light curves of the strains. A: PS II maximum photochemical quantum yield (F_v/F_m), **: $P < 0.01$. B: Rapid light curves of light-intensity dependence of the PS II-mediated electron transport rate [ETR(II)]. C: Rapid light curves of most measurements including quantum yield of PS II [Y(II)].

2.2.2 Δ ClpP2 的 PS I 环式电子转移速率下降

诱导动力学和光照后瞬态的典型叶绿素荧光轨迹, 也称 Post-illumination 曲线如图 4A 所示。在 WT 中光化光熄灭后荧光信号立即下降, 经过约 10 s 荧光信号上升形成鼓包(图 4A WT-box), 该过程中质体醌池在黑暗环境下发生氧化还原^[12], PS I 中产生了光还原剂, 光照后的这种荧光波动反映了 NDH-依赖性活性, 鼓包大小可以在一定程度上通过 PS II 荧光反映围绕 PS I 的环式电子传递^[21-22]。在 Δ ClpP2 中鼓包幅度减弱说明其环式电子传递受到影响但未完全消失(图 4A)。

P700 是 PS I 的反应中心, 光照下通过细胞色素 b6f 复合物(Cytb6f)流向 P700 的电子流主要来自 PS II^[23-24], 作为一种 PS II 抑制剂, DCMU 抑制电子从 PS II 上的醌向次级电子受体质醌的传递, 将导致次级电子受体 QA 减少, 可以切断蓝细菌中电子流向呼吸、流向环式电子传递途径^[25]。DCMU 存在时 P700 还

原的电子主要来自 NADH 脱氢酶和 PS I 周围的循环电子流^[26-28]。在远红光诱导下 P700 会失去电子被瞬间氧化并稳定, 关闭远红光 P700 开始被电子链上的电子还原, 荧光信号逐渐降低, 如图 4B 所示。 Δ ClpP2 的 P700 还原曲线比 WT 的下降更平缓。取还原曲线初始 5 s 信号进行衰减拟合, 残差图显示拟合结果良好, 见图 4C、4D。根据拟合结果计算 P700 还原半衰期, WT 为(66.55±2.47) ms, Δ ClpP2 显著延长至(146.23±20.65) ms, 是 WT 的 2.20 倍。Post-illumination 曲线与 P700 还原曲线也具有有一致性, 表明 ClpP2 蛋白影响蓝细菌 PS I 的环式电子转移速率。

2.3 ClpP2 蛋白失活造成丰富的蛋白质表达变化

借助 iTRAQ 方法可以监测蛋白质表达变化, 工作流程如图 5 所示。通过筛选(unique peptide≥1), 最终 6 个实验组共有 2 612 个蛋白质被成功鉴定, 这些蛋白约占集胞藻总基因组

3 508 个预测蛋白的 74.46% (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000011627>), 组学数据有较高的覆盖度。对所有蛋白信息进行主成分分析(principal components analysis, PCA), 以检验生物学重复的重现性并初步了解样本之间的差异。PCA 结果显示 WT 与 ΔClpP2 菌株的组别分别聚成两簇(图 6A), 结果表明生物学重复良好, ΔClpP2 中蛋白质表达情况发生了丰富的变化。

定义 $|\log_2[\text{fold change}(\Delta\text{ClpP2}/\text{WT})]| > 0.263$ 且 $P < 0.05$ 为差异表达蛋白, 共筛选出 206 个以 WT 为参考 ΔClpP2 菌株的差异表达蛋白, 其中 131 个蛋白上调、75 个下调, 数据可视化火山图, 详见图 6B。上调的差异表达蛋白是下调的 1.5 倍, 说明 ClpP2 蛋白异常导致更多的蛋白质在细胞中积累。这些上调差异表达蛋白是 ClpP2 蛋白的潜在底物群。表 2 中选择性地列出一些已有注释的差异表达蛋白。

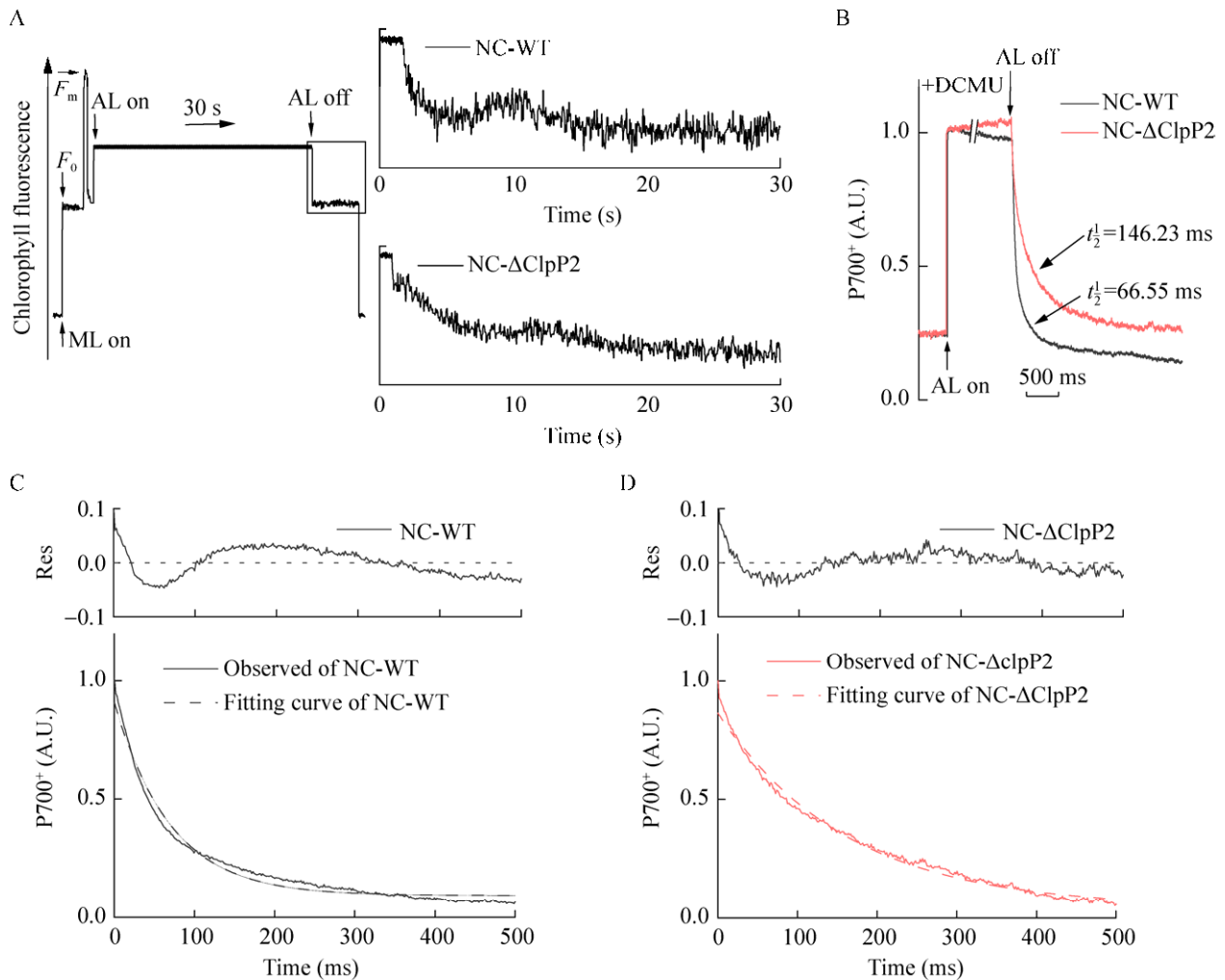


图 4 菌株的 Post-illumination 曲线与 P700 氧化还原动力曲线 A: Post-illumination 曲线. B: P700 氧化还原动力曲线. C: WT 的 P700 还原曲线. D: ΔClpP2 的 P700 还原曲线

Figure 4 The Post-illumination curves and P700 redox curves of strains. A: The curves of Post-illumination. The transient increase in chlorophyll fluorescence after termination of actinic light. B: Full redox curve of P700 of ΔClpP2 and WT. C: Reduction curve of P700 of WT. D: Reduction curve of P700 of ΔClpP2 .

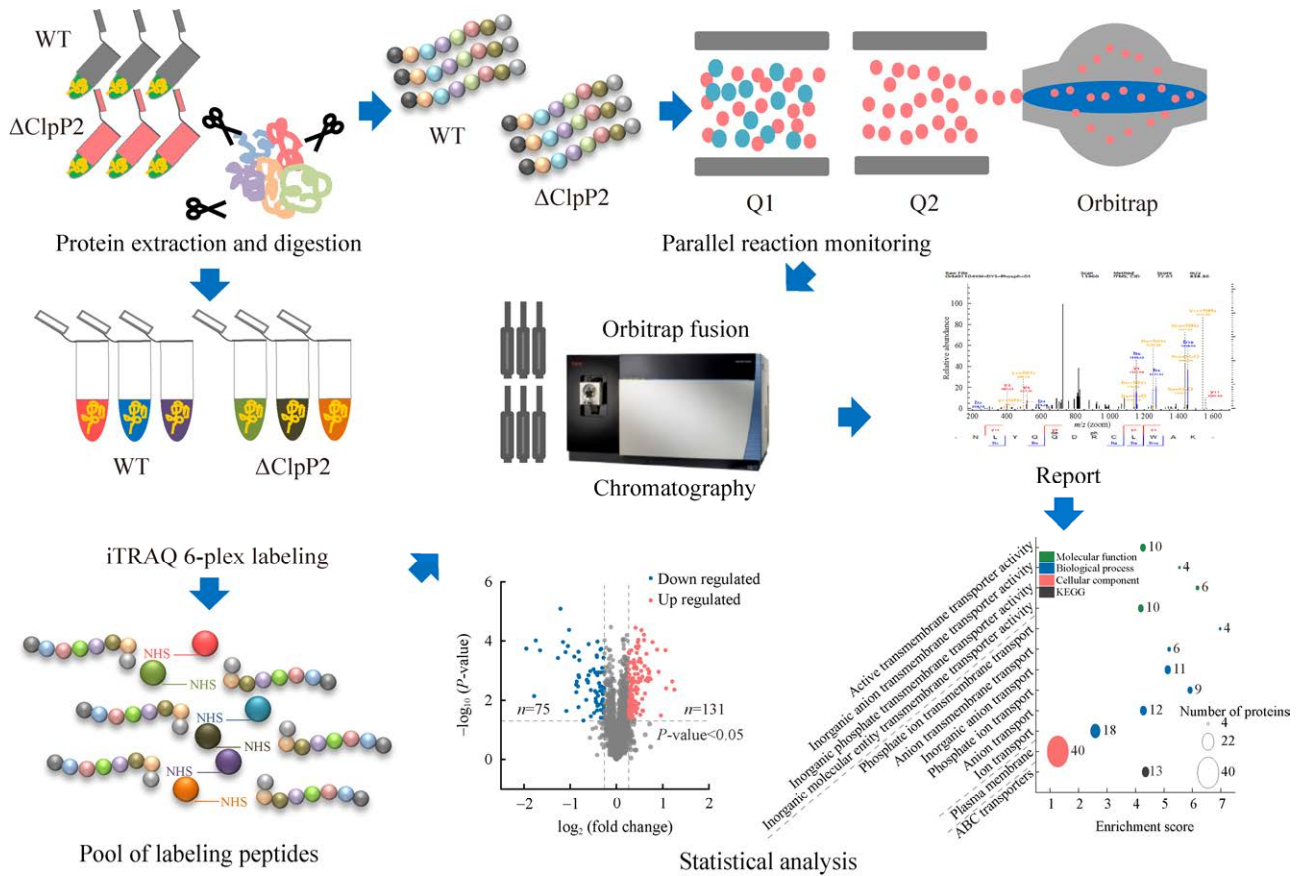


图 5 iTRAQ 与 PRM 定量蛋白质组实验流程图

Figure 5 Proteomics experimental workflow.

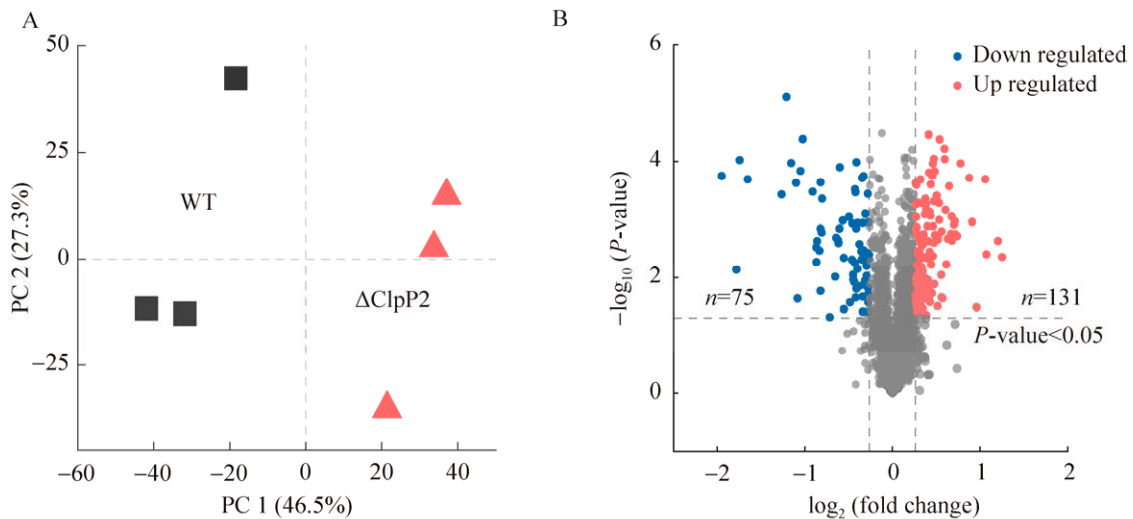


图 6 iTRAQ 数据评估 A: 鉴定蛋白质的 PCA 分析. B: 鉴定蛋白质的火山图

Figure 6 Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) data evaluation and subcellular localization. A: Principal components analysis (PCA) analysis of iTRAQ data. B: Volcano diagram of identified proteins.

表 2 部分差异表达蛋白的表达情况

Table 2 Partial fold changes of differentially expressed protein

Gene ID	Gene names	Fold change		Description
		iTRAQ-based	PRM	
<i>sll0247</i>	<i>isiA</i>	0.653	0.001	Iron-stress chlorophyll-binding protein, homologous to <i>psbC</i> (CP43)
<i>sll0681</i>	<i>pstC</i>	0.548	0.017	Phosphate transport system permease protein PstC homolog
<i>sll0534</i>	<i>clpP2</i>	0.466	0.020	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2
<i>sll0683</i>	<i>pstB1</i>	0.299	0.021	Phosphate transport ATP-binding protein PstB homolog
<i>slr1250</i>	<i>pstB3</i>	0.748	0.150	Phosphate transport ATP-binding protein PstB homolog
<i>sll0684</i>	<i>pstB2</i>	0.416	0.158	Phosphate transport ATP-binding protein PstB homolog
<i>slr1672</i>	<i>glpK</i>	0.551	0.264	Glycerol kinase
<i>sll0680</i>	<i>pstS</i>	0.449	0.327	Phosphate-binding periplasmic protein precursor (PBP)
<i>sll0535</i>	<i>clpX</i>	0.782	0.391	ATP-dependent Clp protease ATPase subunit
<i>slr1247</i>	<i>pstS</i>	0.492	0.560	Phosphate-binding periplasmic protein precursor (PBP)
<i>sll0290</i>	<i>ppk</i>	0.810	0.623	Polyphosphate kinase
<i>slr1853</i>	<i>slr1853</i>	0.658	0.789	Carboxymuconolactone decarboxylase
<i>slr0384</i>	<i>slr0384</i>	1.345	1.462	Sulfoquinovosyldiacylglycerol biosynthesis protein SqdX
<i>slr0549</i>	<i>asd</i>	1.308	1.529	Aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase
<i>sll0495</i>	<i>asnS</i>	1.388	1.683	Asparaginyl-tRNA synthetase
<i>sll0900</i>	<i>hisG</i>	1.243	1.734	ATP phosphoribosyltransferase
<i>sll1807</i>	<i>rplX</i>	1.436	1.764	50S ribosomal protein L24
<i>sll0899</i>	<i>glmU</i>	1.419	1.846	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase
<i>sll0086</i>	<i>sll0086</i>	1.202	1.859	Putative arsenical pump-driving ATPase
<i>sll0502</i>	<i>argS</i>	1.378	2.023	Arginyl-tRNA-synthetase
<i>sll0902</i>	<i>argF</i>	1.345	2.209	Ornithine carbamoyltransferase
<i>sll0901</i>	<i>purE</i>	1.319	2.209	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
<i>slr0546</i>	<i>trpC</i>	1.453	2.296	Indole-3-glycerol phosphate synthase
<i>slr1608</i>	<i>slr1608</i>	1.315	2.298	Putative glucose dehydrogenase-B, periplasmic protein
<i>sll1679</i>	<i>hhoA</i>	1.248	2.407	Periplasmic protease HhoA
<i>sll0533</i>	<i>tig</i>	1.257	2.728	Trigger factor
<i>slr0793</i>	<i>slr0793</i>	2.381	2.770	Cation efflux system protein involved in nickel and cobalt tolerance
<i>slr1331</i>	<i>ymxG</i>	1.248	3.001	Periplasmic processing protease
<i>slr0544</i>	<i>slr0544</i>	1.270	3.050	ATP-binding protein of ABC transporter
<i>sll0897</i>	<i>dnaJ1</i>	1.627	3.273	DnaJ protein, heat shock protein 40, molecular chaperone

2.4 差异表达蛋白的 GO 分类与注释

2.4.1 差异表达蛋白的 GO 分类

按照变化趋势分别对 131 个上调和 75 个下调差异表达蛋白进行 GO 分类, 按照生物过程、细胞组分和分子功能注释成功, 结果如图 7A 所示。上调的差异表达蛋白具有结合(28.24%)、催化(28.24%)、转运(9.16%)活性, 主要参与细胞的生理活动(28.24%)和代谢进程(20.61%),

此外还参与细胞的应激反应、响应其他有机体、防御应答病毒等过程。在细胞的应激反应条目中有 *dfa4*、*isiA*、*tig*、*ruvC*、*ftsI*、*hslO*、*spoT* 蛋白, 这些蛋白因 ClpP2 活性的缺失而堆积在细胞中, 为 ClpP2 的潜在底物。 Δ ClpP2 中 PS II 的亚基 *psbY*、*psbL*、*psbH* 以及 NADH 脱氢酶的亚基 *ndhA*、*ndhB*、*ndhG* 也因 ClpP2 功能异常表达有所升高。

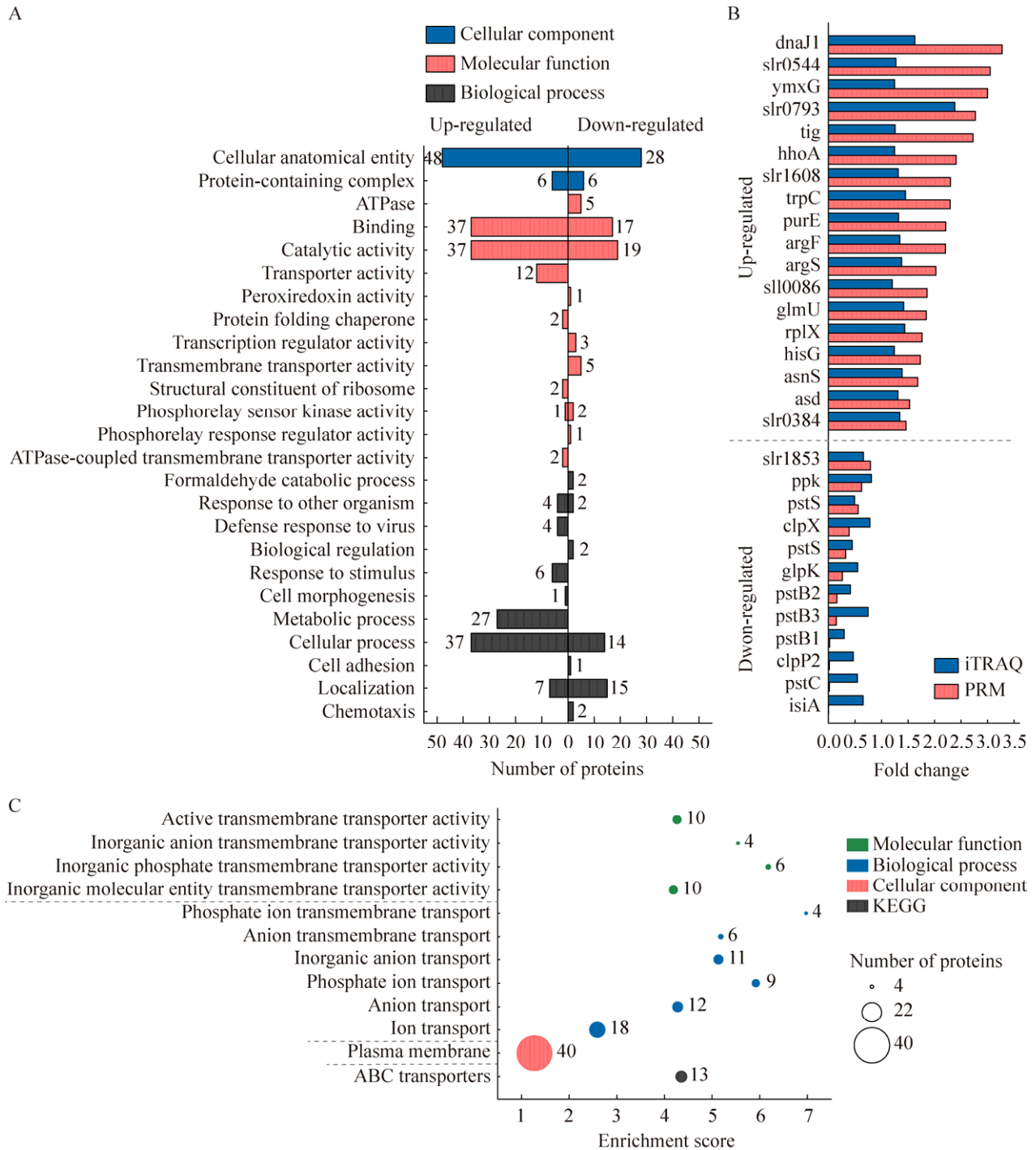


图 7 差异表达蛋白的功能分析与富集和 PRM 结果 A: GO 分析细胞成分、分子功能和生物过程。B: GO 和 KEGG 通路富集。C: 将 PRM 的验证结果与 iTRAQ 进行对比

Figure 7 Functional analysis and enrichment for differentially expressed protein and the PRM results. A: GO analysis for cellular component, molecular functions, and biological processes. B: GO and KEGG pathway enrichment. C: The verification results of parallel reaction monitoring (PRM) compared with iTRAQ.

下调的差异表达蛋白除了具有催化(25.33%)、结合(22.67%)活性,还与 ATP 酶活性相关(6.7%),这些蛋白帮助细胞成分定位(20%)、参与细胞的生理活动(18.67%),也在生物调节、响应其他有机体、甲醛分解等过程中发挥作用。其中 *isiA* 蛋白参与铁离子的转运, *ziaA* 蛋白与金属铜、锌、镉的转运密切相关^[29-30]。

2.4.2 差异表达蛋白中的 Clp 家族蛋白

尽管 Δ ClpP2 菌株中 ClpP2 蛋白失活,在 PRM 和 iTRAQ 结果中仍能监测到降低表达的 ClpP2 信号,说明异常 ClpP2 蛋白肽段在突变株中有少量表达,但无法正常行使 ClpP2 蛋白功能(图 7C)。在 iTRAQ 数据中检测到 Δ ClpP2 中显著降低表达的 ClpX (*sll0535*)蛋白(图 7C),同时鉴定到其他 Clp 家族蛋白 ClpP1 (*sll0542*)、ClpP3 (*sll0165*)和 ClpC (*sll0020*)蛋白正常表达。

2.4.3 GO 富集与 KEGG 富集分析

206 个差异表达蛋白的 GO 和 KEGG 富集分析在 STRING 11.5 (<https://cn.string-db.org/>)的“Proteins with Values/Ranks”模块下进行,该模块的 FDR stringency 设置为 5%。这一结果可以直接指出所有差异表达蛋白整体功能富集特征,并且根据富集结果重点关注高富集分数的条目所涉及到的蛋白及其注释生物功能。如图 7C 所示,差异表达蛋白在各种跨膜转运蛋白活性密切相关的 4 项功能中显著富集,得分最高的是无机磷酸盐跨膜转运蛋白活性条目(6.18);有 7 项富集条目与各种分子和离子转运的生物进程相关,磷酸盐离子跨膜转运(6.97)得分最高。这些蛋白显著富集在质膜上,包含 40 个蛋白。差异表达蛋白的 KEGG 富集分析显著指向 ABC 转运途径,富集分数为 4.35,包含 Pst1 系统中的 *pstS* (*sll0680*)、*pstC* (*sll0681*)、*pstB1*、*pstB2* 蛋白和 Pst2 系统中的 *pstS* (*slr1247*)、*pstC* (*slr1248*)、*pstB3* 蛋白。

2.5 PRM 验证差异表达蛋白

利用 PRM 技术进一步评估 iTRAQ 的定量数据,选择 unique peptide>1 的差异表达蛋白进行验证,最终有 34 个差异表达蛋白验证成功($P<0.01$)。就结果而言,我们在 iTRAQ 和 PRM 中并未得出完全一致的结论:有 4 个蛋白在 iTRAQ 和 PRM 表现出不同的表达变化趋势,分别是 *slr1485*、*sll0654*、*ssl2559* 和 *slr1512*;余下 30 个蛋白表达趋势一致,占总鉴定成功蛋白的 88.24%,其中 12 个蛋白下调、18 个蛋白上调。鉴定出的表达变化趋势相同的蛋白中,PRM 定量结果相较于 iTRAQ 显示出更为剧烈的蛋白表达水平波动,详见图 7C。总体而言 PRM 验证结果表明 iTRAQ 定量结果可信度较高。

3 讨论与结论

对于大部分细菌而言,ClpP 蛋白不是生长必需蛋白质^[31-32],如大肠杆菌中 *clpP* 的丢失不会产生明显的表型变化;枯草芽孢杆菌会因 *clpP* 的缺失而形态改变;在聚球藻 PCC 7002 中,ClpP1 蛋白的失活会拉长细胞形态,同时明显降低菌株的生长速度。集胞藻 Δ ClpP2 的成功构建(图 1B)同样证明在集胞藻中 ClpP2 蛋白质不是生长必需,在本研究中 Δ ClpP2 可以光合自养至对数期,生长速度稍有减缓(图 1C),这与聚球藻 PCC 7002 的 ClpP2 突变株生长情况^[33]相同。在面对高光或高温胁迫时 WT 的生长显著减缓说明集胞藻具有响应胁迫的机制(图 2), Δ ClpP2 无法正常生长则表明 ClpP2 蛋白在应对环境胁迫时不可或缺。Sokolenko 等^[7]研究指出 ClpP2 蛋白异常后集胞藻无法光合自养,必须依赖外部提供碳源,分析认为本研究与 Sokolenko 研究的差异是 *clpP2* 基因被替换序

列不同所致。另外,集胞藻 ClpP1 敲除株构建失败与 Panichkin 等^[17]的研究结果一致,提示 ClpP1 蛋白在集胞藻的生长过程中起不可或缺的作用。

集胞藻中存在两个 Pst 系统,当磷离子充足时 Pst1 系统蛋白表达量升高,同时增强细胞对磷离子的吸收;在磷离子缺陷条件下 Pst2 系统蛋白将显著上调以缓解磷胁迫^[34]。ΔClpP2 的 Pst1 与 Pst2 系统蛋白表达降低,说明因 ClpP2 蛋白异常菌株对磷离子的吸收和转运能力下降,进而影响集胞藻的各项生理活动。通过 PRM 验证检测到 isiA 蛋白表达量几乎为零(图 7C), isiA 蛋白可以向 PS I 光合反应中心传递光能,其下调将降低光合系统活性^[35]; ABC 转运蛋白通路被显著富集,这些结果指向 ClpP2 蛋白的失活对光合系统带来的负面影响。结合表型实验,ΔClpP2 的光合系统虽然受到损伤,但仍然可以完成光合作用并通过光合自养满足自身的生长,进一步说明 ClpP2 蛋白对集胞藻生长的影响是有限的。我们提出 ClpP2 蛋白通过影响物质的转运,特别是磷离子、铁离子、镉离子等的转运影响光合系统。另外,psbH 可以稳定 PS II 复合物中电子转移过程^[36],ndhB 在应对光抑制稳定 PS I 循环电子传递速率上发挥重要作用^[37],提示 PS II 和 NADH 脱氢酶的部分亚基上调是抵御 ClpP2 蛋白失活带来的光损伤,这一猜测可以佐证 Panichkin 等^[17]提出的 ClpP2 蛋白参与保护集胞藻光抑制的观点。

在念株菌 PCC7942 的 Clp 蛋白复合物中存在 2 个不同的 Clp 蛋白水解核心,即 ClpP1 与 ClpP2 形成多聚体再同 ClpX 结合形成蛋白酶复合物^[8]。结合两种组学数据结果,ΔClpP2 中 ClpX 蛋白表达显著降低,ClpP1 蛋白表达无异常,我们认为 ClpP2 蛋白酶的分子伴侣是 ClpX 蛋白而非 ClpC 蛋白,即集胞藻中存在 ClpXP2

复合物。ΔClpP2 中 ClpP1 蛋白的表达不受 ClpP2 失活的影响,初步认为集胞藻中不存在多核心的 ClpXP1/P2 复合物,但仍需进一步验证。

我们探究了 ClpP2 蛋白的失活对集胞藻带来的生长和光合作用的变化,并用蛋白质组学的方法获得差异表达蛋白,并通过结合生理表型数分析 ClpP2 蛋白直接影响集胞藻的离子转运,很可能因此影响其光合系统。下一步的工作将针对底物群与 ClpP2 进行相互作用筛选 ClpP2 蛋白的底物,并探索 ClpP2 蛋白调控的分子机制。

本研究筛选了 WT 和 ΔClpP2 的差异表达蛋白并进行了 GO、KEGG 分析,结合生长实验、光合参数阐述了 ClpP2 蛋白对集胞藻生长、光合系统的影响,揭示了 ClpP2 的分子伴侣和潜在生物学功能并提供了底物群。本研究填补了集胞藻中 ClpP2 蛋白研究的空白,为 ClpP 蛋白的研究提供了新的视角和强有力的数据支持,也为 ClpP2 蛋白的进一步功能研究和分子机制研究提供了重要基础。

REFERENCES

- [1] NISHIMURA K, van WIJK KJ. Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1847(9): 915-930.
- [2] REI LIAO, van WIJK KJ. Discovery of AAA+ protease substrates through trapping approaches[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2019, 44(6): 528-545.
- [3] SAUER RT, BAKER TA. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80: 587-612.
- [4] BOUCHNAK I, van WIJK KJ. Structure, function, and substrates of Clp AAA+ protease systems in cyanobacteria, plastids, and apicoplasts: a comparative analysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100338.
- [5] MABANGLO MF, HOURY WA. Recent structural insights into the mechanism of ClpP protease regulation by AAA+ chaperones and small molecules[J]. *Journal of*

- Biological Chemistry, 2022, 298(5): 101781.
- [6] KIM S, ZUROMSKI KL, BELL TA, SAUER RT. ClpAP proteolysis does not require rotation of the ClpA unfoldase relative to ClpP[J]. *eLife*, 2020, 9.
- [7] SOKOLENKO A, POJIDAEVA E, ZINCHENKO V, PANICHKIN V, GLASER VM, HERRMANN RG, SHESTAKOV SV. The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts[J]. *Current Genetics*, 2002, 41(5): 291-310.
- [8] STANNE TM, POJIDAEVA E, ANDERSSON FI, CLARKE AK. Distinctive types of ATP-dependent Clp proteases in cyanobacteria[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(19): 14394-14402.
- [9] HAVAUX M, GUEDENEY G, HAGEMANN M, YEREMENKON, MATTHIJS HCP, JEANJEAN R. The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(11): 2289-2293.
- [10] 程建峰, 陈根云, 沈允钢. 植物叶片特征与光合性能的关系[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(4): 466-473.
CHENG JF, CHEN GY, SHEN YG. Relational analysis of leaf characteristics and photosynthetic capacities of plants [J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(4): 466-473.
- [11] SHIKANAI T, ENDO T, HASHIMOTO T, YAMADA Y, ASADA K, YOKOTA A. Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(16): 9705-9709.
- [12] GOTOH E, MATSUMOTO M, OGAWA K, KOBAYASHI Y, TSUYAMA M. A qualitative analysis of the regulation of cyclic electron flow around photosystem I from the post-illumination chlorophyll fluorescence transient in *Arabidopsis*: a new platform for the *in vivo* investigation of the chloroplast redox state[J]. *Photosynthesis Research*, 2010, 103(2): 111-123.
- [13] GENTY B, BRIANTAIS JM, BAKER NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, 990(1): 87-92.
- [14] KLUGHAMMER C, SCHREIBER U. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method[J]. *PAM Application Notes*, 2008.
- [15] LIN XH, YANG MK, LIU X, CHENG ZY, GE F. Characterization of lysine monomethylome and methyltransferase in model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2020, 18(3): 289-304.
- [16] YANG MK, YANG YH, CHEN Z, ZHANG J, LIN Y, WANG Y, XIONG Q, LI T, GE F, BRYANT DA, ZHAO JD. Proteogenomic analysis and global discovery of posttranslational modifications in prokaryotes[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(52): E5633-E5642.
- [17] PANICHKIN VB, GLAZER VM, ZINCHENKO VV, SOKOLENKO A, HERRMANN RG, SHESTAKOV SV. *clpP2* gene encoding peptidase in cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 controls the sensitivity of cells to photoinhibition[J]. *Izvestia Akademii Nauk Serii Biologicheskaja*, 2001(3): 312-317.
- [18] BJÖRKMANN O, DEMMIG B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins[J]. *Planta*, 1987, 170(4): 489-504.
- [19] ROHÁČEK K, SOUKUPOVÁ J, BARTÁK M. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress[J]. *Plant Cell Compartments-Selected Topics*, 2008: 41-104.
- [20] SCHREIBER U, KLUGHAMMER C, KOLBOWSKI J. High-end chlorophyll fluorescence analysis with the MULTI-COLOR-PAM. I. Various light qualities and their applications[J]. *PAM Application Notes*, 2011, 1: 1-21.
- [21] DENG Y, YE JY, MI HL. Effects of low CO₂ on NAD(P)H dehydrogenase, a mediator of cyclic electron transport around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803[J]. *Plant Cell Physiology*, 2003, 44(5): 534-540.
- [22] XU M, LÜ J, FU PC, MI HL. Oscillation kinetics of post-illumination increase in chl fluorescence in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 108.
- [23] YU L, ZHAO J, MUHLENHOFF U, GOLBECK JH. PsaE is required for *in vivo* cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(1): 171-180.
- [24] HUANG CH, YUAN XL, ZHAO JD, BRYANT DA. Kinetic analyses of state transitions of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 and its mutant strains impaired in electron transport[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1607(2): 121-130.

- [25] FEILKE K, AJLANI G, KRIEGER-LISZKAY A. Overexpression of plastid terminal oxidase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 alters cellular redox state[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2017, 372(1730).
- [26] HOLLAND SC, ARTIER J, MILLER NT, CANO M, YU JP, GHIRARDI ML, BURNAPA RL. Impacts of genetically engineered alterations in carbon sink pathways on photosynthetic performance[J]. Algal Research, 2016, 20: 87-99.
- [27] MUNEKAGE Y, HASHIMOTO M, MIYAKE C, TOMIZAWA KI, ENDO T, TASAKA M, SHIKANAI T. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis[J]. Nature, 2004, 429(6991): 579-582.
- [28] KUSAMA S, MIYAKE C, NAKANISHI S, SHIMAKAWA G. Dissection of respiratory and cyclic electron transport in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Journal of Plant Research, 2022, 135(4): 555-564.
- [29] BADARAU A, DENNISON C. Thermodynamics of copper and zinc distribution in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803[J]. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(32): 13007-13012.
- [30] TOTTEY S, PATTERSON CJ, BANCI L, BERTINI I, FELLI IC, PAVELKOVA A, DAINY SJ, PERNIL R, WALDRON KJ, FOSTER AW, ROBINSON NJ. Cyanobacterial metallochaperone inhibits deleterious side reactions of copper[J]. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(1): 95-100.
- [31] TRENTINI DB, SUSKIEWICZ MJ, HEUCK A, KURZBAUER R, DESZCZ L, MECHTLER K, CLAUSEN T. Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease[J]. Nature, 2016, 539(7627): 48-53.
- [32] KIRSCH VC, FETZER C, SIEBER SA. Global inventory of ClpP- and ClpX-regulated proteins in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Proteome Research, 2021, 20(1): 867-879.
- [33] IMAI K, KITAYAMA Y, KONDO T. Elucidation of the role of clp protease components in circadian rhythm by genetic deletion and overexpression in cyanobacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(19): 4517-4526.
- [34] BURUT-ARCHANAI S, EATON-RYE JJ, INCHAROENSAKDI A. Na⁺-stimulated phosphate uptake system in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with Pst1 as a main transporter[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 225.
- [35] ANDRIZHIYEVSKAYA EG, SCHWABE TME, GERMANO M, D'HAENE S, KRUIP J, van GRONDELLE R, DEKKER JP. Spectroscopic properties of PSI-IsiA super complexes from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1556(2/3): 265-272.
- [36] KOMENDA J, LUPÍNKOVÁ L, KOPECKÝ J. Absence of the psbH gene product destabilizes photosystem II complex and bicarbonate binding on its acceptor side in *Synechocystis* PCC 6803[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(2): 610-619.
- [37] THOMAS DJ, THOMAS J, YOUNDERIAN PA, HERBERT SK. Photoinhibition and light-induced cyclic electron transport in *ndhB*⁻ and *psaE*⁻ mutants of *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(8): 803-812.