

研究报告

体外组装类胡萝卜素对外周捕光复合体(LH2)能量传递活性的影响

岳慧英 赵春贵* 李凯 杨素萍*

(华侨大学 生物工程与技术系 福建 厦门 361021)

摘要:【目的】探求不产氧光合细菌(APB)外周捕光复合体(LH2)中类胡萝卜素(Car)结构和能量传递效率的关系和规律。【方法】通过二苯胺(DPA)抑制 Car 合成的方法从固氮红细菌 134K20 中获得部分缺失 Car 的 LH2 (LC-LH2); 采用 TLC 和 HPLC 法从 3 种 APB 中制备球形烯(SE)、玫红品(RP)和奥氏酮(OK) 3 种 Car; 在含 0.1%十二烷基二甲基胺氧化物(LDAO)的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中采用超声孵育法分别将这 3 种 Car 与 LC-LH2 体外组装, 采用吸收光谱法、拉曼光谱法和荧光光谱法对组装 LH2 进行结构与功能分析。【结果】制备的部分缺失 Car 的 LH2 中, SE 缺失率约为 64.7%。这 3 种共轭长度、取代基的极性不同的 Car 均能与这种部分缺失 SE 的 LH2 自组装, Car 组装率约在 24.0%–29.4%之间, 其中 SE 和 OK 的组装率高于 RP。与部分缺失 Car LH2 中原有 SE 构象一致, 重组的 Car 在 LH2 中也呈现较为伸展的平面构象。LH2 中重组 Car 到细菌叶绿素(BChl)的能量传递效率由高到低的顺序依次为 SE-LH2>RP-LH2>OK-LH2, 与 Car 共轭体系大小的关系一致, 而与 Car 极性大小没有明显的关系。【结论】在组装的 LH2 中 Car 采用平面构象与脱辅基蛋白结合, Car 共轭长度仍是决定和影响 LH2 中 Car-BChl 能量传递效率的主要因素, 而 Car 的取代基和极性影响较小。

关键词: 固氮红细菌, 类胡萝卜素, 外周捕光复合体, 能量传递

Reconstitution of carotenoids into peripheral light
harvesting complex 2 of *Rhodobacter azotoformans* in vitro
and its effects on energy transfer

YUE Hui-Ying ZHAO Chun-Gui* LI Kai YANG Su-Ping*

(Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: [Objective] To explore the relationships between carotenoid (Car) structure and energy transfer efficiency in peripheral light-harvesting complex 2 (LH2) from anoxygenic phototrophic bacteria (APB). [Methods] Partially carotenoid-deficient LH2 (LC-LH2) was obtained from

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070054, 31270106); 国家海洋公益性行业科研专项项目(No. 201505026); 福建省自然科学基金项目(No. 2015J01137)

*通讯作者: Tel: 86-592-6166178

✉: 杨素萍: yangsuping@hqu.edu.cn; 赵春贵: chungui@hqu.edu.cn

收稿日期: 2015-04-10; 接受日期: 2015-05-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-05

Rhodobacter azotoformans 134K20 by diphenylamine (DPA) inhibition. Three Cars including spheroidene (SE), rhodopin (RP) and okenone (OK) were obtained from three species of APB by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. The reconstitutions of different Cars into LC-LH2 were performed by using ultrasonic procedures in 10 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1% LDAO. The structure and function of reconstituted LH2 (*N*-LH2) were studied by using UV-VIS spectra, Raman spectra and fluorescence spectroscopy. **[Results]** The deficiency of SE in LC-LH2 was about 64.7%. Three Cars with different conjugation length, substituent and polarity could be reconstituted into the partially SE-deficient LC-LH2, and the reconstitution efficiency was in the range from 24.0% to 29.4%, and the reconstitution efficiencies of SE and OK were higher than that of RP. Compared to the intrinsic planner conformation of SE in LC-LH2, the incorporated Cars also adopted a planner conformation in *N*-LH2. The Car to bacteriochlorophyll (BChl) energy transfer efficiency in different *N*-LH2 changed in the order of SE-LH2>RP-LH2>OK-LH2. The energy transfer efficiency in *N*-LH2 had a negative correlation with the conjugated length of Cars, whereas independent of the polarity of Cars. **[Conclusion]** In *N*-LH2, Cars bind to the apoproteins with a planner conformation, the conjugated length of Cars still plays a dominant role in controlling the Car to BChl energy transfer efficiency; however, the substituent and polarity of Cars have negligible effects on energy transfer efficiency.

Keywords: *Rhodobacter azotoformans*, Carotenoid, Peripheral light harvesting complex, Energy transfer

自 Deisenhofer 等首次解析了不产氧光合细菌 (APB) 绿色绿芽菌 (*Blastochloris viridis*) 的光反应中心 (RC) 晶体结构以来^[1], 光合作用机理研究取得重大突破, APB 光合机构 (色素蛋白复合体, PPC) 的环境适应性调控机制也成为光合作用研究的热点。APB 的光合机构主要包括光反应中心 (RC)、中心捕光复合体 (LH1) 和外周捕光复合体 (LH2), 其中 LH2 主要执行光能的捕获和传递, RC-LH1 主要进行光能的转化。在细胞中 RC-LH1 具有较恒定的化学计量比, 而 LH2 数量和分布呈现多样性, 与细菌的环境适应性密切相关。LH2 是由跨膜脱辅基蛋白、细菌叶绿素 (BChl) 和类胡萝卜素 (Car) 组成的超分子复合物, 其中 Car 具有光保护、捕获和传递光能功能, 在维系光合机构的稳定性方面也发挥重要作用^[2], Car 与邻近 BChl 保持优化的相对取向和分子构型, 有利于 Car 和 BChl 之间的 Förster 和 Dexter 能量传递^[3]。PPC 中 Car 的组成和含量依菌种 (株) 和环境因素的变化而呈现高度多样性, 深入研究 PPC 中 Car 种类与光能吸收与传递的关系和规律, 对于诠释光合作用能量传递机制以及 APB 环境适应性机制具有重要意义。

LH2 中 Car 介导的能量传递效率不仅与 Car 构象有关, 也与 Car 共轭长度 (共轭双键数目, *N*) 有关^[2,4-6]。例如, Papagiannakis 等^[6]、Kakitani 等^[7]与 Hayashi 等^[8]研究表明, LH2 中 Car 介导的能量传递效率与 Car 构象有关, LH2 中 Car 可以呈平面构象, 也可以是扭曲构象, 这与 LH2 的脱辅基蛋白结构有关, 脱辅基蛋白在决定 Car-BChl 单线态能量传递效率中起重要作用, 平面构象的 Car 有利于能量在 Car-BChl 之间传递, 比 Car 扭曲构象的 LH2 具有更高的能量传递效率。Kosumi 等^[5]、Papagiannakis 等^[6]、Koyama 等^[9]、Polívka 等^[10]、Frank 等^[11]和 Desamero 等^[12]研究表明, LH2 中 Car 介导的能量传递效率与 Car 共轭长度有关, 共轭长度短的 Car 主要用于捕光和能量传递, 共轭长度长的 Car 主要作用是维持结构稳定和光保护, 即能量传递效率与 Car 共轭长度呈负相关关系。我们知道, 不同物种的 LH2 中, 除了脱辅基蛋白存在差异外, Car 种类多种多样, 不仅共轭长度的不同, 取代基也不同, 如 -OH、-OCH₃、-C=O 等, 使 Car 的极性也具有明显的差异。LH2 中具有不同取代基、不同极性和不同共轭长度 Car 与能量传递效率关系目前还不明

确, 仍需要进行深入研究。

固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*, *Rba. azotoformans*)能量代谢方式灵活多样, 本课题组前期研究表明, 该菌株在光照厌氧条件下 LH2 中 Car 成分 95%以上为球形烯^[13]。基于此, 本文选用 *Rba. azotoformans* 134K20 菌株为材料, 获得了主要含一种 Car 的 LH2, 通过在培养基中添加二苯胺(DPA), 获得了缺失部分 Car 的 LH2, 将源自 3 种 APB 的具有不同共轭长度、极性和取代基的 3 种 Car 分别与缺失部分 Car 的 LH2 重组, 分析了 Car 的组装率、构象以及 3 种 Car 对重组 LH2 能量传递效率的影响。这对于揭示 Car 在光能传递中的控制作用和 PPC 环境适应性机制具有重要参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*) 134K20、沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*, 缩写 *Rps. palustris*) CQV97 和海洋着色菌(*Marichromatium* sp.) 283-1, GenBank 登录号分别为 EU883587、EU882154 和 EU057602, 本实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 主要仪器和试剂: UV-3200PCS 紫外可见分光光度计, MAPADA 公司; 5417R 台式高速离心机, Eppendorf 公司; JY92-I 超声细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技公司; ÄKTA purifier 100 自动蛋白核酸纯化仪, GE Healthcare; InVia 共聚焦拉曼光谱仪, Renishaw; FLS920 稳态瞬态荧光仪, Edinburgh。DPA (二苯胺), 分析纯, 购于上海南翔试剂有限公司; LDAO (十二烷基二甲基胺氧化物), 购于 Fluka 公司; DEAE-52 (DEAE-纤维素 52)、Tris (三羟基氨基甲烷) 购于 Whatman 公司; 甲醇、丙酮、乙腈为色谱纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 培养基和培养条件

134K20 和 CQV97 菌株的培养采用改良的 Ormerod 培养基^[14], 以 2.46 g/L 乙酸钠作碳源, 氮源分别 1.0 g/L 谷氨酸钠(134K20)和 1.32 g/L 硫酸铵

(CQV97)。283-1 菌株的培养采用紫色硫细菌无机选择性培养基^[15]。培养条件均为 3 000 lx, 30 °C。

1.3 类胡萝卜素的制备

本文采用 TLC 法^[16]和 HPLC^[13]分别从 134K20、CQV97 和 283-1 中纯化获得了球形烯(Spheroidene, SE)、玫红品(Rhodopin, RP)和奥氏酮(Okenone, OK) 3 种 Car^[16-18]。

1.4 缺失部分 Car LH2 制备

以乙醇为溶剂, 配制 5.0 mmol/L DPA 储备液, 然后添加至培养基中, 使其终浓度为 100 μmol/L, 同时以乙醇溶剂为对照。按 1.0%接种 134K20 菌种后, 于 3 000 lx、30 °C 条件下光照厌氧培养 7 d。LH2 的分离纯化采用硫酸铵分级分离结合阴离子交换层析法^[19], 收集层析洗脱样品并扫描吸收光谱。

1.5 Car 与缺失部分 Car LH2 的组装

Car 和缺失部分 Car LH2 (LC-LH2)的组装参照文献[11-12]并稍作修改: 室温条件下, 取 1 mL OD_{850} 约为 1.0 的 LC-LH2 溶液, 加入 50 μL Car 乙醚溶液, 使其轻铺于 LC-LH2 溶液表面, 用氮气轻吹溶液表面, 使乙醚溶剂挥发, 混合液在黑暗冰浴条件下超声处理 10 min, 8 000 ×g 离心 10 min, 测定组装体系的吸收光谱。上述组装过程重复 5 次, 同时设置乙醚溶剂对照。

参照文献[20-21]采用荧光激发光谱的方法测定 Car 组装率: 固定发射光谱波长为 860 nm, 扫描激发光谱, 用 480 nm (Car)和 590 nm (BChl)激发光谱强度的比值(I_{480}/I_{590})表示具有能量传递活性 Car 的含量, 以野生型 LH2 Car 含量为 100%, 计算组装 LH2 (N-LH2)和 LC-LH2 中 Car 相对含量, N-LH2 和 LC-LH2 中 Car 相对含量的差值, 即为 Car 的组装率。

1.6 Car-BChl 能量传递效率计算

参考文献[22]通过离子交换层析除去混合液中未与 LH2 结合的 Car, 测定重组 LH2 吸收光谱和荧光光谱, 将 OD_{850} 约为 0.6 的 LH2 的荧光激发光谱

和吸收光谱在 BChl Qx 吸收峰 590 nm 处归一。采用 Cogdell 等估算 LH2 中 Car 到 BChl 能量传递效率的方法^[4,21], 计算 Car 3 个特征峰吸光度和激发光谱强度的比例, 这 3 个比值的平均值即为 LH2 中单线态 Car 到 BChl 的能量传递效率。

1.7 光谱测定

0.1% LDAO、pH 8.0 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中测定 LH2 的吸收光谱、共聚焦拉曼光谱和荧光激发光谱。吸收光谱测定: 使用光程为 1 cm 石英比色杯, 于紫外可见分光光度计进行波长扫描。共聚焦拉曼光谱测定: 取 OD_{850} 约为 1.0 的 LH2 于石英比色杯中, 置于载物台物镜视野下, 调节焦距, 激光聚焦于液体表面。激光光源为 Nd:YAG 激光器, 光栅为 2 400 L/min, 激发波长为 532 nm, 输出功率 50 mW, 使用 50% 激发功率, 步长为 1 cm^{-1} , 精密度为 1 cm^{-1} 。采用紫外增强 CCD 探测器, 扫描范围在 $855\text{--}1\,993\text{ cm}^{-1}$, 曝光时间为 10 s, 累积次数为 3。荧光激发光谱的测定: 取 OD_{850} 约为 0.6 的 LH2 溶液于光程 1 cm 荧光比色杯中, 激发光和发射光狭缝均为 5.0 nm, 以 860 nm 为发射波长, 扫描激发光谱。

2 结果与分析

2.1 缺失部分 Car LH2 制备

分别从未添加和添加 100 $\mu\text{mol/L}$ DPA 培养的 134K20 细胞中分离纯化 LH2, 将制备的 LH2 浓度调整至 OD_{850} 约为 0.5, 测定吸收光谱, 如图 1 所示。这 2 种 LH2 中 BChl 800 nm 和 850 nm Qy 带、590 nm Qx 带以及 374 nm Soret 带吸光度没有明确的变化, 表明这 2 种 LH2 均为结构完整的 LH2^[23], 添加 DPA 处理后, 纯化的 LH2 仍然具有明显的 Car 特征吸收峰, 但吸光度明显降低, 表明这种 LH2 中 Car 含量明显降低。因此, 获得了缺失部分 Car 的 LH2 (简称 LC-LH2)。

2.2 类胡萝卜素的制备

前期研究表明, 134K20、CQV97 和 283-1 菌株主要积累的 Car 分别为球形烯(SE)、玫红品(RP)和

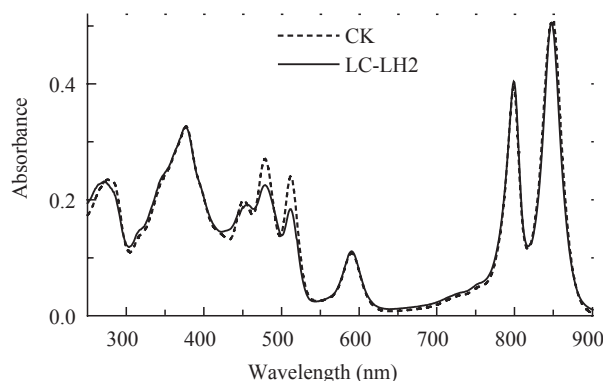


图 1 纯化的 2 种 LH2 的吸收光谱

Figure 1 Absorption spectra of 2 types of purified LH2

Note: CK: The LH2 purified from strain 134K20 supplied without DPA; LC-LH2: The LH2 purified from strain 134K20 supplied with 100 $\mu\text{mol/L}$ DPA.

奥氏酮(OK)^[13,16,24], 这 3 种 Car 共轭双键数目(N)分别为 10、11 和 12, 取代基分别为 $-\text{OCH}_3$ (SE)、 $-\text{OH}$ (RP)、苯环和 $-\text{C}=\text{O}$ (OK), 极性由高到低的顺序依次为 RP、OK 和 SE。图 2 显示了 134K20、CQV97 和 283-1 3 个菌株光合色素的 TLC 图谱(A1、B1、C1)、纯化获得的球形烯(SE)、玫红品(RP)、奥氏酮(OK) 3 种 Car 的吸收图谱(A2、B2、C2)和 HPLC 分析结果(A3、B3、C3)。SE 特征峰位于 345、430、452 和 483 nm 处, RP 特征峰位于 360、447、473 和 502 nm 处, OK 特征峰位于 309、377、457、483 和 511 nm 处, 与文献报道^[17-18,25]相吻合。HPLC 分析, 这 3 种 Car 均呈单一的色谱峰, 表明制备的 3 种 Car 纯度较高。

2.3 Car 与 LC-LH2 的组装

随着 LC-LH2 溶液中加入 Car 次数增加, Car 区 400–550 nm 的吸收峰逐渐升高, 添加至第 5 次时, Car 特征吸收峰强度不再继续升高, 表明组装反应达到平衡, 如图 3 所示。Car 区吸收峰升高, 并不能说明 Car 完全结合到 LH2 上活性结合位点, 可能还存在着没有能量传递活性的结合态 Car^[12], 因此, 进一步采用荧光激发光谱估算了重组 LH2 中具有能量传递活性的 Car 的组装率, 结果见表 1。以未添加 DPA (对照)提取的 LH2 中的 Car 为 100%,

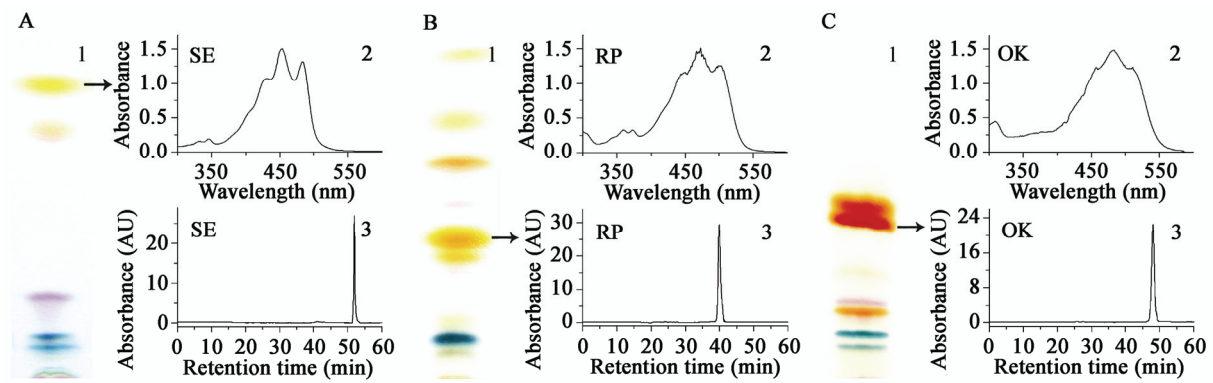


图 2 3 个菌株光合色素 TLC 图谱, SE、RP 和 OK 3 种 Car 的吸收光谱及其 HPLC 分析
Figure 2 Profiles of pigment fingerprints on TLC from 134K20, CQV97 and 283-1 (A1, B1, C1), absorption spectra (A2, B2, C2) and HPCL analysis (A3, B3, C3) of SE, RP and OK

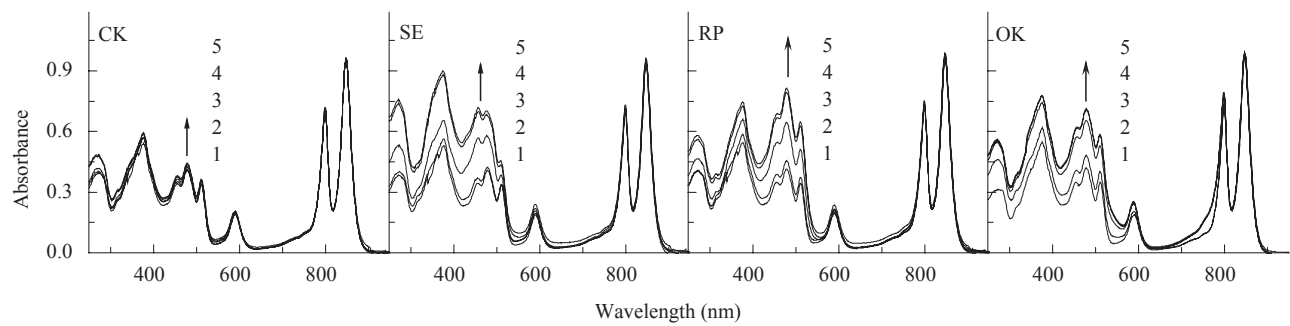


图 3 SE、RP 和 OK 与 LC-LH2 组装过程的吸收光谱
Figure 3 Absorption spectra of reconstruction between LC-LH2 and the Cars of SE, RP and OK
Note: CK: No Car added; 1–5: The total number of times Car added.

表 1 LC-LH2 与 Car 组装分析			
Table 1 Assemble analysis of LC-LH2 and different Cars			
LH2 type	I_{480}/I_{590}	Car relative contents (%)	Extent of Car incorporation (%)
WT	2.0±0.1	100.0	—
LC	0.7±0.04	35.3±4.2	—
N-LH2	SE	64.7±5.0	29.4±1.0
	RP	59.3±5.1	24.0±2.0
	OK	64.7±6.2	29.4±3.0

注: WT: 培养体系中未添加 DPA 提取的 LH2; LC: 培养体系中添加 100 μmol/L DPA 提取的 LH2; N-LH2: 组装 Car 的 LH2; I_{480}/I_{590} : 480 nm 和 590 nm 荧光激发光谱强度的比值。
Note: WT: The LH2 purified from strain 134K20 supplied without DPA; LC: The LH2 purified from strain 134K20 supplied with 100 μmol/L DPA; N-LH2: The LH2 incorporating different Cars; I_{480}/I_{590} : the ratio of excitation peak at 480 nm versus 590 nm.

经过添加 DPA 处理, LH2 中 Car 含量降低, 与对照 LH2 相比, Car 降低了 64.7%。SE、RP 和 OK 与 LC-LH2 组装, 它们的组装率分别为 29.4%、24.0% 和 29.4%。结果表明, Car 能够组装到 LH2 中, 不同的 Car 组装率有一定的差异。

2.4 组装 LH2 的拉曼光谱分析

色素蛋白复合体中的 Car 分子可以产生强的拉曼信号, 这些拉曼信号的变化可反映出 LH2 复合体中 Car 分子结构和构象的变化^[6]。在室温下, 复合体中 Car 的共振拉曼光谱一般可分为 4 个区域: 约 $1\,520\text{ cm}^{-1}$ (v1 模式)、 $1\,160\text{ cm}^{-1}$ (v2 模式)、 $1\,010\text{ cm}^{-1}$ (v3 模式) 和 950 cm^{-1} (v4 模式), 分别归因于 Car 分子中 C=C 共轭双键的伸缩振动、C-C 键的伸展振动、C-CH₃ 弯曲振动和 C-H 振动^[2,6]。与对照 LH2 相比(图 4), 组装外源 Car 后, 组装 LH2 中 v2、v3 和 v4 域处的拉曼峰没有明显变化, 而 v1 域处的拉曼峰发生不同程度的位移。当组装 Car 为 SE (N=10)

时, $1\,515\text{ cm}^{-1}$ (v1 区) 处拉曼信号未见明显变化, 与 LC-LH2 中 Car 相同; 随着组装 Car 共轭长度的增加, v1 拉曼峰左移约 5 cm^{-1} , OK 左移幅度大于 RP, 表明主要是 Car 分子中 C=C 数量增多的缘故, 这与文献报道相吻合^[12]。所有组装 LH2 在 956 cm^{-1} (v4 区) 处均产生较弱的拉曼峰, 该峰值较弱表明 Car 中 C-H 键在一个平面上, 是采取平面构象方式结合在 LC-LH2 上, 而不是呈扭曲构象。由于这些 Car 均采用同样构象方式结合在 LH2 上, 因此, 在下面研究不同 Car 对组装 N-LH2 能量传递效率影响时, 可以忽略 Car 构象的影响。

2.5 N-LH2 能量传递效率分析

组装 LH2 在 590 nm 处归一化处理的吸收光谱和荧光激发光谱如图 5 所示。参照 Cogdell 方法^[4,21] 计算了组装 LH2 中总 Car 到 BChl 的能量传递效率, 组装 LH2 (N-LH2) 与缺失部分 Car LH2 (LC-LH2) 中 Car 能量传递效率的差值即为重组 Car 能量传递效

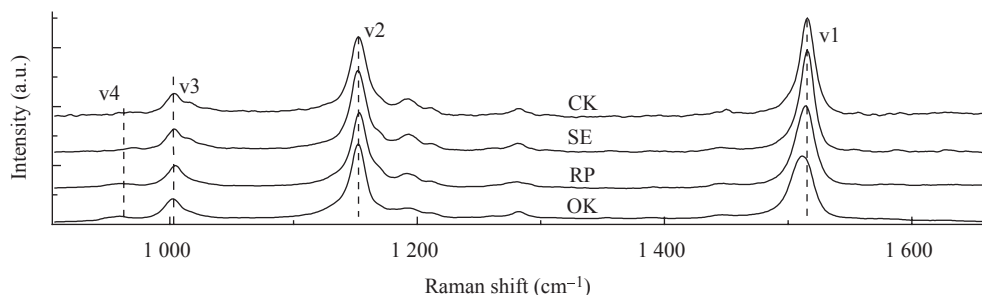


图 4 组装 LH2 和对照组 LH2 的共振拉曼光谱

Figure 4 Resonance Raman spectra of LC-LH2 (CK) and the LC-LH2 with SE, RP and OK incorporated

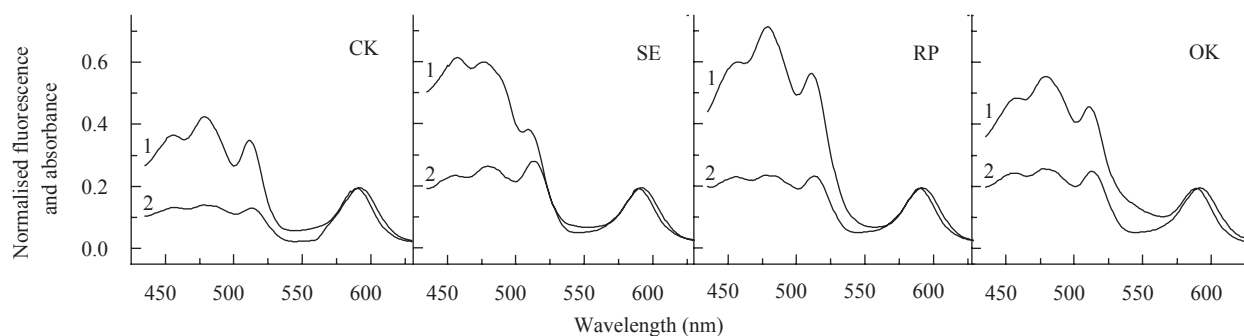


图 5 组装 LH2 中 Car 到 BChl 的能量传递效率分析

Figure 5 Analysis of Car-BChl energy transfer in LC-LH2 (CK) and the LC-LH2 with SE, RP and OK incorporated

Note: The fluorescence excitation spectra (2) were normalized to the absorption spectra (1) at the 590 nm.

表 2 结合不同 Car 的 LH2 中 Car 到 BChl 单线态能量传递效率
Table 2 Car to bacteriochlorophyll singlet-singlet energy-transfer efficiencies (ETE) in the LH2 with SE, RP and OK incorporated

LH2 type	Total ETE (%)	Recombinant Car ETE (%)	Single recombinant Car ETE (%)
WT	78.7±4.1	—	—
LC	35.3±2.3	—	—
SE	59.1±2.0	23.8±3.2	0.8±0.05
N-LH2	52.5±3.2	17.2±2.0	0.7±0.02
OK	50.1±2.1	14.8±1.3	0.5±0.03

注: WT: 培养体系中未添加 DPA 提取的 LH2; LC: 培养体系中添加 100 μmol/L DPA 提取的 LH2; N-LH2: 组装 Car 的 LH2; SE: 球形烯; RP: 玫红品; OK: 奥氏酮。

Note: WT: The LH2 purified from strain 134K20 supplied without DPA; LC: The LH2 purified from strain 134K20 supplied with 100 μmol/L DPA; N-LH2: The LH2 incorporating different Cars; SE: Spheroidene; RP: Rhodopin; OK: Okenone.

率; 重组 Car 能量传递效率与重组 Car 相对含量的比值, 即为单位重组 Car 能量传递效率。组装 LH2 中总 Car、重组 Car 和单位重组 Car 能量传递效率如表 2 所示。结果表明, 与缺失部分 Car LH2 相比, 由于组装 LH2 中 Car 含量升高, 能量传递效率明显升高, 但组装 LH2 的能量传递效率明显低于未缺失 Car 的 LH2, 其原因可能是由于组装 LH2 中 Car 含量仍然低于未缺失 Car LH2 中的 Car。由于 Car 含量不同, Car 在 LH2 中的能量传递效率也不同, 因此, 采用了单位 Car 含量(1.0%)来比较重组 Car 能量传递效率。组装 LH2 中单位 Car 能量传递效率由高到低的顺序依次为 SE、RP 和 OK, 这 3 种 Car 共轭体系的大小关系依次为 SE (11)、RP (12)和 OK (13), 极性由高到低的顺序是 RP (含羟基基团)、OK (含酮基基团)和 SE (含甲氧基基团)。由此可见, 随着共轭体系增大, 这 3 种 Car 能量传递效率依次降低, 这与文献报道的 LH2 中 Car 到 BChl 能量传递效率与 Car 共轭长度呈负相关的结论一致^[12]。随着极性的升高, 能量传递效率不呈规律性的变化, 表明 Car 取代基和极性的不同, 对能量传递的影响较小, 能量传递效率主要与 Car 共轭体系的大小有关。

3 结论

3.1 部分缺失 Car LH2 和 Car 的体外组装

在体外很难将 Car 从 LH2 中拆分出来^[26], 目前

主要通过敲除 Car 合成酶基因^[12]或使用 DPA 抑制 Car 合成^[8,27-28]这两种途径获得 Car 缺失的 LH2。目前研究表明, 尽管 Car 在维系 LH2 结构稳定中发挥重要作用, 但在抑制 Car 合成条件下, 一些菌株(如 *Allochromatium minutissimum*^[28]、*Ectothiorhodospira haloalkaliphila*^[27]、*Chromatiurn vinosurn*^[8]等)仍能够合成 Car 缺失 LH2。1989 年, Hayashi 等^[8]在培养基中添加 DPA 抑制 *Chromatiurn vinosurn* Car 合成, 获得了 Car 缺失 LH2, 采用超声孵育法将来自 *Rba. sphaeroides* 2.4.1 (野生型)的 SE 掺入到 *Chromatiurn vinosurn* 的 Car 缺失 LH2 中, 分析了 SE 构象变化及与能量传递效率的关系。而在另外一些菌种(如 *Rps. palustris* 和 *Rps. acidophilus*)中, 培养基中添加 DPA 抑制 Car 合成, 明显地抑制了 LH2 的合成, 虽然也在这些菌种中获得了 Car 部分缺失的 LH2^[29], 但未见将外源 Car 体外重组到这种部分缺失 Car LH2 中的报道。本研究通过 100 μmol/L DPA 抑制 134K20 菌株 Car 合成, 得到了 Car 部分缺失 LH2。其 Car 含量约为正常 LH2 的 35.3%。该 LH2 仍呈现 LH2 典型的近红外特征吸收光谱。进一步采用超声孵育条件, 将来自不同菌株的 SE、RP 和 OK 3 种 Car 重组到这种 Car 部分缺失 LH2 中。这 3 种 Car 的重组率在 24.0%–29.4%之间。本研究通过 Car 与部分缺失 Car LH2 重组的方法, 比较研究了这 3 种 Car 在重组 LH2 中的能量传递效率。

3.2 重组 Car 构象对能量传递效率的影响

现有研究表明, LH2 中 Car 构象与分子内 Car-BChl 能量传递效率有关^[6,8], 在 LH2 中 Car 呈现平面构象时能量传递效率较高, 而呈现扭曲构象时传递效率较低。这一结论主要来自两方面实验证据: (1) 来自于不同菌株中某些 Car 占绝对优势(95%) LH2 的比较。例如, *Rba. sphaeroides* LH2 中 Car 呈现伸展的平面构象, 而 *Chromatium vinosum* 和 *Rps. palustris* LH2 中 Car 呈现扭曲构象, 前者的能量传递效率(75%–100%)^[21]明显高于后者(30%–60%)^[8]。(2) 来自于单一 Car 的体外重组 LH2 的比较。例如, Hayashi 等^[8]将来自于 *Rba. sphaeroides* 的 SE 组装到来自于 *Chromatium vinosum* 的 Car 缺失 LH2 中, 与 *Rba. sphaeroides* LH2 中 Car 呈现伸展的构象不同, 重组 SE 在 *Chromatium vinosum* LH2 呈现扭曲的构象, 二者相比, 这种 SE 重组的 LH2 能量传递效率明显降低。本研究表明: Car 部分缺失 LC-LH2 中, 原有的 SE (Car) 呈平面构象, SE、RP 和 OK 3 种重组的 LH2 中, 重组的这 3 种 Car 也呈现较为伸展的平面构象。这一研究结果与文献报道一致^[6,8], 也即相同的 LH2 蛋白亚基, 掺入异源 Car 的构象也相同。鉴于这 3 种 Car 共轭体系、取代基和极性均不相同, 而且在重组 LH2 中均呈现平面构象, 因此, 在重组的 LH2 中进一步比较了这 3 种 Car 到 BChl 的能量传递效率。

3.3 LH2 中 Car 能量传递活性

Car 共轭长度对 LH2 能量传递效率影响的研究已有很多报道。Desamero 等^[12]和 Frank 等^[11]将来自 *Rba. sphaeroides* 2.4.1 的 SE ($N=10$) 以及合成共轭长度不同取代基团相同的 6 种 SE 类似物($N=7$ 、8、9、11、12、13), 通过超声孵育法组装到 Car 缺失的 *Rba. sphaeroides* R-26.1 的 LH2 中, 与 2.4.1 菌株的 LH2 相比, 重组 Car 的 LH2 能量传递效率均降低, 其中共轭长度(N)为 9 时, Car 能量传递效率最高, 当 $N>9$ 时, Car 能量传递效率与共轭长度呈负相关, 而当 $N<9$ 时, Car 能量传递效率与共轭长度呈正相关。Polivka 等^[30]研究表明, LH2 中 Car 为 SE

($N=10$) 时, 其能量传递效率约为 90%, 而替换为含有酮基的球形烯酮 Car (SO) 时, 能量传递效率降低至 80%。这提示: 与 SE 相比, SO 羰基基团的引入, 共轭长度的增加, 其能量传递效率降低, 但 SO 极性也增大。Car 极性是否影响 Car 传递效率尚不明确。2014 年, Kosumi 等^[15]将来自于 *Rba. sphaeroides* 2.4.1 (含 SE, $N=10$)、*Rps. acidophila* 10050 (含糖苷-玫红品, $N=11$) 和 *Roseospira goensis* (含 3,4-双脱氢玫红品, $N=12$) 的 LH2 进行了能量传递分析, 其结果显示, 随着 Car 共轭长度的增加, 能量传递效率降低。从极性分析, 这 3 种 Car 极性由高到低的顺序依次为糖苷-玫红品>3,4-双脱氢玫红品>球形烯, 随着 Car 极性的减小, LH2 能量传递效率规律是先降低后升高, 没有呈现一致的变化规律。本研究选择了共轭长度分别为 11、12 和 13 且极性(取代基)明显不同的 3 种 Car 进行体外组装研究, 研究结果与文献报道的 LH2 中 Car 到 BChl 能量传递效率与 Car 共轭长度($N>9$ 时)呈负相关关系的规律一致, 但随着极性的变化, 能量传递效率规律也没有呈现一致的变化。由此可见, Car 取代基和极性的不同, 对能量传递活性的影响较小, 能量传递活性主要取决于 Car 共轭长度。

综上所述, 将共轭体系、取代基和极性不同的 3 种 Car 体外组装到 *Rba. azotoformans* 134K20 部分缺失 Car LH2 中, 组装的 Car 均呈平面构象。Car 共轭长度是决定组装 LH2 中 Car-BChl 能量传递效率的主要因素, 即 Car-BChl 能量传递效率和 Car 共轭长度成负相关关系, 而取代基和极性影响较小。本研究为阐明不同 Car 对 LH2 中 Car-BChl 能量传递的控制作用以及 Car 的环境适应性调控机制提供借鉴。

参 考 文 献

- [1] Deisenhofer J, Epp O, Miki K, et al. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution[J]. *Nature*, 1985, 318(6047): 618-624
- [2] Gall A, Berera R, Alexandre MT, et al. Molecular adaptation of photoprotection: triplet states in light-harvesting proteins[J]. *Biophysical Journal*, 2011, 101(4): 934-942
- [3] Feng J, Ai XC, Zhang XK, et al. Triplet excitation transfer between carotenoids in the LH2 complex from photosynthetic

- bacterium *Rhodospseudomonas palustris*[J]. Science in China (Series B), 2003, 33(5): 385-396 (in Chinese)
- 冯娟, 艾希成, 张兴康, 等. 光合细菌 *Rhodospseudomonas palustris* 捕光天线 LH2 中类胡萝卜素分子间三重态能量传递的光谱学证据[J]. 中国科学: B 辑, 2003, 33(5): 385-396
- [4] Chi SC, Mothersole DJ, Dilbeck P, et al. Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1847(2): 189-201
- [5] Kosumi D, Maruta S, Fujii R, et al. A regulation of energy flow in purple bacterial photosynthetic antennae[J]. International Conference on Ultrafast Phenomena, 2014, 7(1): 12-13
- [6] Papagiannakis E, Das SK, Gall A, et al. Light harvesting by carotenoids incorporated into the B850 light-harvesting complex from *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1: excited-state relaxation, ultrafast triplet formation, and energy transfer to bacteriochlorophyll[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2003, 107(23): 5642-5649
- [7] Kakitani Y, Fujii R, Hayakawa Y, et al. Selective binding of carotenoids with a shorter conjugated chain to the LH2 antenna complex and those with a longer conjugated chain to the reaction center from *Rubrivivax gelatinosus*[J]. Biochemistry, 2007, 46(24): 7302-7313
- [8] Hayashi H, Noguchi T, Tasumi M. Studies on the interrelationship among the intensity of a Raman marker band of carotenoids, polyene chain structure, and efficiency of the energy transfer from carotenoids to bacteriochlorophyll in photosynthetic bacteria[J]. Photochemistry and Photobiology, 1989, 49(3): 337-343
- [9] Koyama Y, Kakitani Y. Mechanisms of carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer in the light harvesting antenna complexes 1 and 2: dependence on the conjugation length of carotenoids[A]//Grimm B, Porra RJ, Rüdiger W, et al. Chlorophylls and Bacteriochlorophylls[M]. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2006: 431-443
- [10] Polívka T, Niedzwiedzki D, Fuciman M, et al. Role of B800 in carotenoid-bacteriochlorophyll energy and electron transfer in LH2 complexes from the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2007, 111(25): 7422-7431
- [11] Frank HA, Farhoosh R, Aldema ML, et al. Carotenoid-to-bacteriochlorophyll singlet energy transfer in carotenoid-incorporated B850 light-harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1[J]. Photochemistry and Photobiology, 1993, 57(1): 49-55
- [12] Desamero RZB, Chynwat V, van der Hoef I, et al. Mechanism of energy transfer from carotenoids to bacteriochlorophyll: light-harvesting by carotenoids having different extents of π -electron conjugation incorporated into the B850 antenna complex from the carotenoidless bacterium *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 1998, 102(42): 8151-8162
- [13] Yue HY, Zhao CG, Li K, et al. Absorption spectral change of peripheral-light harvesting complexes 2 induced by magnesium protoporphyrin IX monomethyl ester association[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015, 137: 1153-1157
- [14] Ormerod JG, Ormerod KS, Gest H. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961, 94(3): 449-463
- [15] Pfennig N, Trüper HG. The Prokaryotes[M]. 2nd Edition. New York: Springer, 1992: 3203-3205
- [16] Zhuo MQ, Zhao CG, Cheng QR, et al. Fingerprinting analysis of photopigments in purple bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 760-768 (in Chinese)
- 卓民权, 赵春贵, 程茜茹, 等. 紫细菌光合色素指纹图谱的建立与色素分析[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 760-768
- [17] Takaichi S, Jung DO, Madigan MT. Accumulation of unusual carotenoids in the spheroidene pathway, demethylspheroidene and demethylspheroidenone, in an alkaliphilic purple nonsulfur bacterium *Rhodobaca bogoriensis*[J]. Photosynthesis Research, 2001, 67(3): 207-214
- [18] Fujii R, Chen CH, Mizoguchi T, et al. ¹H NMR, electronic-absorption and resonance-Raman spectra of isomeric okenone as compared with those of isomeric β -carotene, canthaxanthin, β -apo-8'-carotenal and spheroidene[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1998, 54(5): 727-743
- [19] Zhao GG, Yang SP, Qu YB, et al. Isolation and characterization of pigment-protein complexes from *Rhodobacter azotoformans* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(4): 500-505 (in Chinese)
- 赵良贵, 杨素萍, 曲音波, 等. 固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*)色素蛋白复合体的分离纯化与特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(4): 500-505
- [20] Farhoosh R, Chynwat V, Gebhard R, et al. Triplet energy transfer between bacteriochlorophyll and carotenoids in B850 light-harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1[J]. Photosynthesis Research, 1994, 42(2): 157-166
- [21] Cogdell RJ, Hipkins MF, MacDonald W, et al. Energy transfer between the carotenoid and the bacteriochlorophyll within the B800-850 light-harvesting pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1981, 634: 191-202
- [22] Akahane J, Rondonuwu FS, Fiedor L, et al. Dependence of singlet-energy transfer on the conjugation length of carotenoids reconstituted into the LH1 complex from *Rhodospirillum rubrum* G9[J]. Chemical Physics Letters, 2004, 393(1/3): 184-191
- [23] Cogdell RJ, Isaacs NW, Freer AA, et al. The structure and function of the LH2 (B800-850) complex from the purple photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1997, 68(1): 1-27
- [24] Jia YQ, Hong X, Yao P, et al. Effects of growth inhibitors on photopigment biosynthesis in halophilic *Marichromatium* sp. 283-1[J]. Journal of Shanxi University (Natural Science Edition), 2014, 37(4): 637-642 (in Chinese)
- 贾雅琼, 洪璇, 姚鹏, 等. 三种生长抑制剂对嗜盐海洋着色菌光合色素合成的影响[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2014, 37(4): 637-642
- [25] Zhao CG, Zhuo MQ, Yang SP. Quantification of carotenoids of spirilloxanthin series from anoxygenic phototrophic bacteria by substitute reference standard calibration function method[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(2): 218-228 (in Chinese)
- 赵春贵, 卓民权, 杨素萍. 替代标准品校正函数法定量分析不产氧光合细菌螺菌黄质素类胡萝卜素[J]. 微生物学报, 2014, 54(2): 218-228
- [26] Lang HP, Hunter CN. The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. The Biochemical Journal, 1994, 298(Pt1): 197-205
- [27] Ashikhmin A, Makhneva Z, Moskalenko A. The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis[J]. Photosynthesis Research, 2014, 119(3): 291-303
- [28] Moskalenko AA, Makhneva ZK. Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochromatium minutissimum* assembled without carotenoids[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology, 2012, 108: 1-7
- [29] Gall A, Henry S, Takaichi S, et al. Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions[J]. Photosynthesis Research, 2005, 86(1/2): 25-35
- [30] Polívka T, Frank HA. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids[J]. Accounts of Chemical Research, 2010, 43(8): 1125-1134