



研究报告

固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*) 423 nm 特征吸收峰成因与定位岳慧英¹ 赵春贵^{*2} 杨素萍^{*2}

1 山西中医药大学基础医学院 山西 晋中 030619

2 华侨大学生物工程与技术系 福建 厦门 361021

摘要:【背景】在不产氧光合细菌中,因 420–425 nm 特征峰位于类胡萝卜素(Carotenoid, Car)吸收区域,通常被认为是由 Car 积累引起,但固氮红细菌 R7 菌株呈现的 423 nm 特征峰不具备 Car 三指峰特征。【目的】阐明 R7 菌株 423 nm 特征吸收峰形成的物质基础及胞内定位。【方法】采用吸收光谱、薄层层析、高效液相色谱、质谱、超速离心和离子交换层析等方法阐明 423 nm 吸收峰形成原因。【结果】谷氨酸钠明显促进 R7 菌株活细胞呈现 423 nm 特征峰,色素提取液中该峰蓝移至 415 nm,但其生长、细菌叶绿素(Bacteriochlorophyll, BChl)和 Car 含量大幅度降低,而添加酵母提取物则反之。色素组成分析表明,在检测到的色素成分中,只有镁卟啉单甲基酯 IX (Magnesium Protoporphyrin IX Monomethylester, MPE)呈现 415 nm 特征吸收峰。MPE 可定位于光合膜上并呈现出 423 nm 特征峰。对色素蛋白复合物(Pigment Protein Complex, PPC)的研究显示,添加谷氨酸和酵母提取物的菌体细胞虽然都检测到 3 种 PPC 组分[2 个外周捕光复合物(Peripheral Light Harvesting Complex 2, LH2)和 1 个光反应中心(Reaction Center, RC)],但源自谷氨酸菌体细胞的 RC 和 1 个 LH2 则呈现 423 nm 特征吸收峰,表明 R7 菌株可产生 2 种不同类型的 LH2,且 MPE 可定位于一种 LH2 和 RC。【结论】R7 菌株所呈现的 423 nm 特征峰不是由 Car 积累所致,而是由 MPE 积累所形成,且能与 LH2 和 RC 结合定位于光合膜上。MPE 是 BChl 合成的中间产物,其合成受严格调控,不容易获得。MPE 代谢调控的深入研究可为光合作用光氧化损伤与保护机理增添新内容。

关键词: 固氮红细菌, 镁卟啉单甲基酯 IX, 色素蛋白复合物, 类胡萝卜素

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31070054); Technological Innovation Ability Cultivation Plan of Shanxi University of Chinese Medicine (2020PY-JC-04)

***Corresponding authors:** Tel: 86-592-6166178

E-mail: ZHAO Chungui: chungui@hqu.edu.cn; YANG Suping: yangsuping@hqu.edu.cn

Received: 28-12-2020; **Accepted:** 22-02-2021; **Published online:** 19-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31070054); 山西中医药大学科技创新能力培育计划(2020PY-JC-04)

***通信作者:** Tel: 0592-6166178

E-mail: 赵春贵: chungui@hqu.edu.cn; 杨素萍: yangsuping@hqu.edu.cn

收稿日期: 2020-12-28; **接受日期:** 2021-02-22; **网络首发日期:** 2021-03-19

Formation origination of characteristic absorption peaks at 423 nm in *Rhodobacter azotoformans*

YUE Huiying¹ ZHAO Chungui^{*2} YANG Suping^{*2}

¹ College of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China

² Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China

Abstract: [Background] The characteristic peak at 420–425 nm was frequently observed in anoxygenic phototrophic bacteria and often assigned to carotenoid component(s). However, the absorption peak at 423 nm in *Rhodobacter azotoformans* R7 did not exhibit the characteristic absorption of carotenoid(s). **[Objective]** To elucidate the formation mechanism of the 423 nm absorption peak in strain R7. **[Methods]** Analyses by UV-VIS spectrophotometry, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, ultracentrifugation and ion exchange chromatography were conducted to investigate the formation origin of the 423 nm peak. **[Results]** A characteristic absorption maximum at approximately 423 nm was displayed in the *in vivo* absorption spectrum of strain R7 cultured in glutamate medium, while it was shifted to approximately 415 nm in the absorption spectrum of pigment extract. However, the cell growth and the amounts of bacteriochlorophyll (BChl) and carotenoid (Car) of strain R7 were significantly reduced by addition of glutamate, compared to those with the supplement of yeast. Pigment composition analysis showed that the 415 nm peak was only characterized by magnesium protoporphyrin IX monomethylester (MPE). MPE could locate on the intracytoplasmic membrane with an absorption peak at 423 nm. These results indicated that the 423 nm absorption peak was caused by MPE accumulation. The analyses of pigment protein complex (PPC) showed that three components of PPCs were detected in both yeast and glutamate cultures, however, only the absorption spectra of peripheral light harvesting complex 2 (LH2) and the reaction center (RC) of glutamate cultures gave the 423 nm characteristic peak. Collectively, strain R7 was capable of produce two different types of LH2; MPE locating on either LH2 or RC could form the characteristic peak of 423 nm. **[Conclusion]** The characteristic peak at 423 nm in strain R7 originated from MPE accumulation rather than carotenoid. The accumulated MPE inside cells could bind to LH2 and RC and locate inside the intracytoplasmic membrane. It is difficult to obtain a large amount of MPEs as it is a biosynthetic intermediate of BChl. Strain R7 was capable of accumulating MPE, therefore, the further study for biosynthesis regulation of MPE contributes to elucidate the novel mechanism of photooxidation and photoprotection in photosynthesis.

Keywords: *Rhodobacter azotoformans*, magnesium protoporphyrin IX monomethylester, pigment protein complex, carotenoid

不产氧光合细菌含有丰富的类胡萝卜素 (Carotenoid, Car) 和细菌叶绿素 (Bacteriochlorophyll, BChl), 这些光合色素与脱辅基蛋白相互作用形成多种类型的色素蛋白复合体 (Pigment Protein Complex, PPC), 如外周捕光天线 (Peripheral Light Harvesting Complex 2, LH2)、核心捕光天线 (Core Light Harvesting Complex 1, LH1) 和光反应中心 (Reaction Center, RC) 等, 这些色素蛋白复合体在光合膜上有序组装成光合单元以执行光合作用, 从而实现光能的利用和转换。目前, 不同

种属不产氧光合细菌的色素蛋白复合体结构解析以及结构与功能关系已有较深入研究^[1-2], 光合单元之间的能量传递分子机制与原初反应动力学等已取得了重大进展^[3-4], 光合色素代谢调控以及色素蛋白复合体的环境适应性机制等也一直备受关注^[5]。光合膜色素蛋白复合体中的 Car 和 BChl 光谱特征丰富多样^[6], 尤其是活细胞吸收光谱, 不仅是不产氧光合细菌分类鉴定的重要表型特性, 也是反映光合色素代谢调控和色素蛋白复合体环境适应性的重要指征^[7]。

本课题组前期研究显示, 固氮红细菌 *Rhodobacter (Rba.) azotoformans* R7 在以乙酸钠或琥珀酸钠为碳源、谷氨酸钠为氮源时, 活细胞吸收光谱在 Car 区出现~423 nm 特征峰, 340–450 nm 吸收带异常升高, 而色素提取液呈现~415 nm 特征峰, 而在以乙酸钠为碳源、NH₄Cl 或酵母提取物为氮源的培养基中, 423 nm 特征峰很低或消失。经研究发现, 许多菌株均能呈现 420–425 nm 特征吸收峰, 一些菌株的纯化光合膜和色素蛋白复合体也呈现该特征峰, 例如: *Rhodopseudomonas (Rps.) palustris*^[8]、*Rps. sp. Rit* 菌株^[9]和 *Rhodoblastus (Rbl.) acidophilus*^[10] 的活细胞、*Rubrivivax (Rbx.) gelatinosus* Car 突变株^[11]的光合膜、*Rba. sphaeroides* 的 RC-LH1-PufX^[12]、二苯胺 (Diphenylamine, DPA) Car 合成抑制剂调控下的 *Rps. palustris* 和 *Rbl. acidophilus* 的 LH2 和 RC-LH1^[13]等。尽管不同种(株)均呈现该特征吸收峰, 但其产生原因目前尚无完整统一认识, 还缺乏足够实验证据。目前普遍认为, 该特征峰是由 Car 形成, 因为其位于 Car 吸收区(400–550 nm)。Dönmez 等^[8]、Kempfer 等^[10]和 Ouchane 等^[11]研究表明, 该吸收峰是由链孢红素 Car 所引起, 其证据是由于链孢红素在丙酮:甲醇为 7:2 (体积比)溶液中呈现 418、442 和 470 nm 特征吸收峰, Car 与胞内蛋白结合, 418 nm 吸收峰红移至~420 nm。Zhao 等^[14]研究发现, *Rps. palustris* CQV97 在谷氨酸钠-乙酸钠培养基中也呈现~421 nm 特征光谱, 表明该特征峰并不是由 Car 所形成, 而是细胞积累镁卟啉单甲基酯 IX (Magnesium Protoporphyrin IX Monomethylester, MPE)所致, 也由此提出, 活细胞 Car 区呈现 420–425 nm 特征峰不仅有 Car 的贡献, 也有 BChl 合成前体——MPE 的贡献。但关于 MPE 与 420–425 nm 特征峰关系的相关研究鲜有报道, 仍有待于进一步深入研究。

BChl *a* 是执行光合作用的重要功能色素, MPE 是 BChl *a* 合成前体物——卟啉化合物中的一种。早期通过阻断 BChl *a* 合成实验表明, *Rba.*

sphaeroides 突变株胞内积累大量的卟啉类化合物, 这些卟啉类化合物可以分泌到胞外, 也有一部分通过被称之为载体肽的物质将其固定在细胞膜^[15]。*Rbx. gelatinosus* MPE 环化酶基因(*bchE*)缺失突变株的细胞膜呈现异常强的 416 nm 吸收峰, 进一步分析显示是 MPE 积累所致^[16]。*Rba. azotoformans* R7 中的 LH2 中的 423 nm 吸收峰也证明是 MPE 所形成^[17-18]。目前除有少数明确证据外, 许多菌株和 LH2 吸收光谱中的 420–425 nm 特征峰是由 Car 引起、还是由 MPE 形成、或是由其他色素形成, 尚不明确。另外, 不同菌株和细胞膜中积累 MPE 的特征峰为何差异较大(416 nm 和 421–423 nm), MPE 定位在光合膜和 LH2 或色素蛋白复合体上^[17], 其意义何在, 对光合作用效率有怎样的影响, 也缺乏足够认识。再者, MPE 是叶绿素和 BChl 合成中间产物, 有研究表明其生物合成受到严格调控, 烟草会通过持续积累大量 MPE 来增强植株的抗光氧化损伤, 然而在不产氧光合细菌中尚无相关报道^[19]。基于此, 本研究在前期碳氮代谢研究基础上, 以未明显呈现 423 nm 特征峰的培养物为对照, 通过色素含量和组成分析, 阐明 *Rba. azotoformans* R7 菌株中 423 nm 特征吸收峰形成的物质基础, 并定性研究了其在光合膜和色素蛋白复合体中的定位, 以期为进一步地阐明 MPE 积累对细菌光合生长的调控作用及其定位在色素蛋白复合体中的作用和意义提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

硅胶 G 板, 青岛海洋化工有限公司; L-谷氨酸钠, Amresco 公司; 酵母提取物, Oxoid 公司; 甲醇、丙酮和乙酸乙酯等, 国药集团化学试剂有限公司。紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 液相色谱-质谱系统(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), Agilent Technology 公司; 高效液相色谱仪(High Performance Liquid Chromatography, HPLC), Shimadzu 公司; 立式高

速冷冻离心机, Hitachi 公司; 台式高速离心机, Eppendorf 公司; 超声细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 旋转蒸发仪, 巩义市予华仪器有限责任公司; ÄKTA Purifier 100 蛋白质纯化仪, GE Healthcare 公司; 细胞压力破碎仪, Constant System 公司。

1.2 菌株及培养条件

Rba. azotoformans R7 的 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为 EU604757, 本实验室保存。Ormerod 培养基^[20]中的苹果酸钠和硫酸铵用 2.44 g/L 琥珀酸钠和 1.0 g/L L-谷氨酸钠替代即为 SG 培养基; 用 2.46 g/L 无水乙酸钠和 2.0 g/L 酵母提取物替代即为 AY 培养基。培养容器为 500 mL 蓝盖瓶。 OD_{660} 为 1.5 的菌悬液按 5% 接种量接种。培养条件为 30 °C、3 000 lx 光照厌氧培养, 设置 3 个重复。

1.3 菌体生长和吸收光谱测定

菌体生物量测定: 采用比浊法, 将样品置于光程为 1 cm 的比色杯中, 于分光光度计上测定波长 660 nm 处的光密度值(OD_{660})。菌体湿重测定: 培养液经 8 000×g 离心 10 min 收集菌体, 生理盐水洗涤 3 次。菌液 pH 测定: 用 pH 计测定。活细胞吸收光谱测定: 生理盐水洗涤的菌体, 60% 蔗糖溶液悬浮后在光程为 1 cm 的石英比色杯中进行波长扫描。

1.4 光合色素含量和组分分析

收集培养 8 d 的湿菌体, 以丙酮: 甲醇为 7:2 (体积比) 为色素提取剂, 采用辅助超声方法, 提取菌体光合色素成分^[21], 于光程为 1 cm 石英比色杯中测定提取液的吸收光谱, 按照 Beer-Lambert-Bouguer 定律和 Jessen 公式分别计算 BChl 和 Car 含量^[22]。采用紫外可见吸收法、薄层层析(Thin Layer Chromatography, TLC)^[21]、HPLC^[22] 和 LC-MS^[22] 方法进行光合色素组成分析和分子量测定。HPLC 测定采用反向 C18 柱(Shim-Pack VP-ODS, 150 mm×4.6 mm, Shimadzu), DAD 检测器测定吸收光谱(SPD-M10Avp), 柱温 25 °C, 检测波长设定 415、480 和 770 nm。流动相 A 为甲醇

和水(95:5, 体积比), 流动相 B 为乙酸乙酯, 梯度洗脱程序为 0–5 min, 0% B; 5–25 min, 0%–30% B; 25–40 min, 30%–45% B; 40%–60 min, 45–60% B。流速为 0.7 mL/min。采用 TLC 法制备色素样品^[22]用于分子量和吸收光谱的测定, 采用 LC/MS 法, 选择正离子模式测定分子量^[22], 毛细管电压 5 500 eV, 干燥气流速 12 L/min, 干燥气温度 350 °C, 雾化器压力 206 850 Pa, 扫描范围 200–1 200 m/z , 根据 m/z 得到色素组分的分子量。利用 HPLC 色素分析的数据, 按公式 $c_{(MPE)}/c_{(BChl\ a)} = A_{(MPE)}/A_{(BChl\ a)}$ ^[9] 计算 MPE 与 BChl a 的摩尔比, 其中 A 和 c 分别为色谱峰吸光度和物质的量浓度, MPE(ϵ_{419}) 和 BChl a(ϵ_{771}) 的摩尔消光系数为 308 L/(mmol·cm)^[23] 和 65.3 L/(mmol·cm)^[24]。

1.5 光合膜制备及吸收光谱测定

采用超速离心法制备菌体的光合膜^[16]: 取培养 8 d 的菌体, 用 Tris-HCl (10 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液洗涤 2 次再悬浮, 细胞压力破碎仪破碎细胞 2 次, 压力为 17 238 Pa。10 000×g 离心 30 min 取上清液, 经 100 000×g 离心 1 h 收集沉淀, 缓冲液洗涤 2 次, 收集沉淀, 即得光合膜, 将其溶于 pH 8.0、10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, 在光程为 1 cm 的石英比色杯中测定吸收光谱。根据光合膜上各色素蛋白复合体的特征吸收光谱, 采用光谱去卷积方法消除 LH1 和 LH2 之间的光谱重叠, 计算得 LH2/LH1 的摩尔比^[25], 其中 LH1 在 875 nm 的消光系数为 $\epsilon_{875}(B875)=117$ L/(mmol·cm); LH1 在 850 nm 的消光系数 $\epsilon_{850}(B875)=63.6$ L/(mmol·cm); LH2 在 850 nm 的消光系数 $\epsilon_{850}(B800-850)=132$ L/(mmol·cm); LH2 在 875 nm 的消光系数 $\epsilon_{875}(B800-850)=19$ L/(mmol·cm)。

1.6 菌体色素蛋白复合体的色谱分析

采用十二烷基二甲基胺氧化物 (N,N-Dimethyldodecylamine-N-Oxide, LDAO) 增溶法制备色素蛋白复合体溶液^[6]: 取细胞破碎液, 经过 1% LDAO 增溶处理, 通过 80% 饱和度硫酸铵盐析, 收集浮质, 用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0,

0.1% LDAO)溶解, 透析脱盐。色素蛋白复合体色谱分析: 采用 ÄKTA Purifier 100 蛋白质纯化仪, DEAE-32 纤维素层析柱, 用含有 NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 0.1% LDAO)溶液进行盐度梯度洗脱^[17], 检测波长设置为 280 nm, 电导检测器测定盐度曲线。层析过程中收集洗脱峰样品, 用光程 1 cm 石英比色杯于紫外可见分光光度计上测定洗脱峰样品的吸收光谱, 根据近红外特征吸收峰判定色素蛋白复合体的类型。

2 结果与分析

2.1 菌体生长特征

R7 菌株在 SG 和 AY 培养基中的生长和体系 pH 变化如图 1A、1B 所示, 随时间延长, 菌体生物量和体系 pH 升高。与 AY 培养物相比, SG 培养物生长速率和 pH 升高的速率明显降低。活细胞吸收光

谱显示(图 1C、1D), AY 培养物(3 d)呈现 375 (Soret)、590 (Qx)和 801 (Qy)和 854 nm (Qy) BChl *a* 特征吸收峰, 447、479 和 510 nm 球形烯系 Car 特征吸收峰(典型的三指峰); 随时间延长, 各峰位无明显变化, 相对峰高略有升高(图 1C), 与 Swainsbury 等^[26]报道的特征峰位相一致。与 AY 培养物相比, SG 培养物(8 d)除了 590、801 和 854 nm 峰位无明显变化外, 其他特征峰均发生了明显变化; BChl *a* Soret 带红移至 395 nm, 特别是 Car 吸收区呈现出 1 个 423 nm 特征性吸收峰, 而其他 Car 特征峰不明显; 虽然 850 nm 特征峰位没有明显变化, 但峰形变宽, ~870 nm 处呈现出肩峰; 5 d 时呈现明显的 BChl *a* Soret (380 nm)、Qx 带和 Qy 带和 423 nm 特征峰, 随着培养时间延长, Qx 带和 Qy 带峰位没有明显变化, 相对峰高有所升高, 850 nm

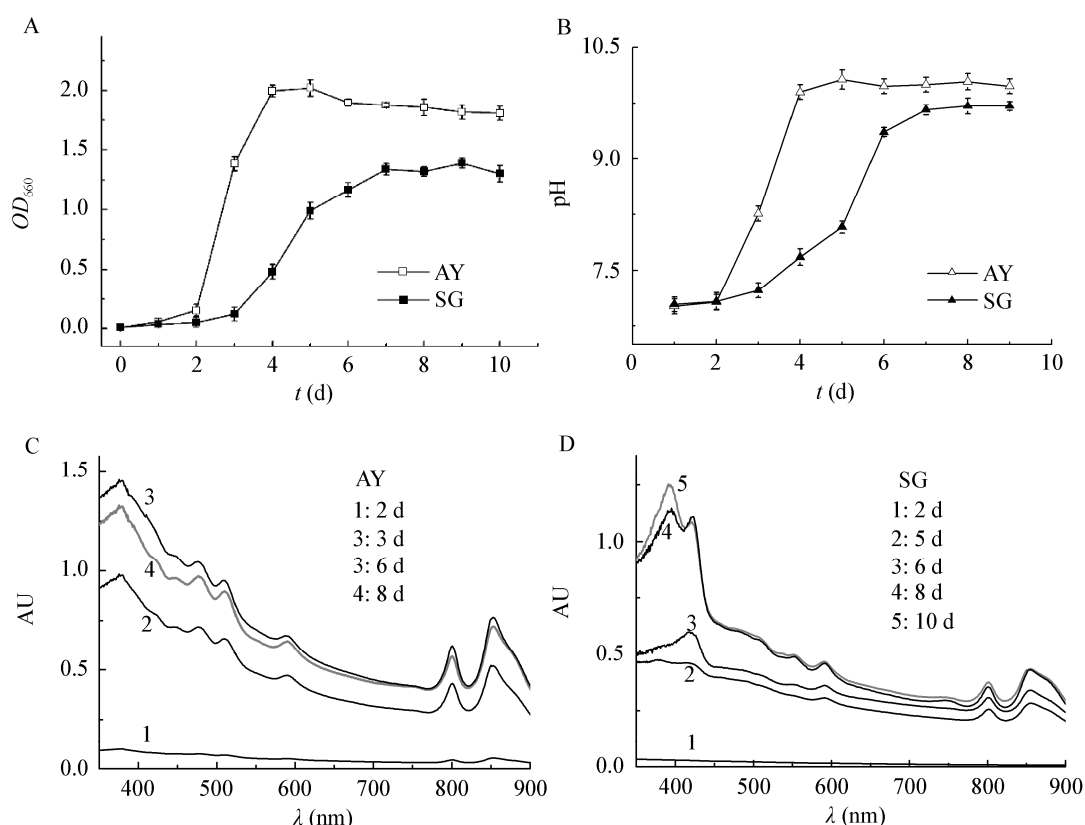


图 1 R7 菌株生长曲线(A)、培养液 pH 变化(B)、活细胞吸收光谱(C、D)

Figure 1 Growth curve (A), pH change (B) and absorption spectra (C & D) of strain R7

注: AY: 乙酸钠-酵母培养基; SG: 琥珀酸钠-谷氨酸钠培养基

Note: AY: Acetate-yeast medium; SG: Succinate-glutamate medium

特征峰变宽, 呈现 870 nm 肩峰, Soret 带与 423 nm 吸收峰的相对高度呈现先降低再升高的现象, 其峰位由 380 nm 红移至 395 nm (图 1D)。BChl *a* Soret 带峰位呈现红移可能是产生 423 nm 特征峰所致。

鉴于活细胞吸收光谱能够反映菌体中光合色素的积累和存在方式, 由此可知, 与 AY 培养物相比, SG 培养物中 BChl *a* 和 Car 特征吸收峰的吸光度降低, 尤其是 Car 特征峰不明显, 表明 SG 培养基抑制了 R7 菌株的 BChl *a* 和 Car 的合成。除了 423 nm 特征峰外, 其他特征峰归属明确, 鉴于此, 进一步对其色素组成和存在方式进行了研究, 以期解释 423 nm 特征峰的成因。

2.2 色素含量和组分的分析

培养 8 d 时菌体光合色素提取液吸收光谱如图 2A 所示, AY 培养物呈现 364、600 和 768 nm 吸收峰, 其分别为 BChl *a* Soret、Qx 和 Qy 带, 434、456 和 487 nm 吸收峰属于球形烯系 Car 特征峰。与 AY 相比, SG 培养物 434 nm 特征峰消失, 456 nm 和 487 nm 吸收峰的相对峰高发生明显变化, 尤其是呈现 415 nm 吸收峰。由此可见, R7 菌株在这 2 种培养基中积累的 Car 组成存在差异, 色素提取液中的 415 nm 吸收峰应该与活细胞吸收光谱中的

423 nm 特征峰色素相对应。AY 培养物 BChl *a* 和 Car 含量分别为 2.6 ± 0.1 mg/g 和 0.950 ± 0.015 mg/g, SG 培养物含量为 0.72 ± 0.02 mg/g 和 0.18 ± 0.01 mg/g。由此可见, SG 培养基极显著 ($P < 0.01$) 抑制菌体 BChl *a* 和 Car 合成, 尤其是积累了 415 nm 吸收峰的物质。

HPLC 分析显示, 菌体色素提取液主要呈现 4 个洗脱峰, 编号为 H1–H4 (图 2B)。采用 TLC 方法制备这 4 个色素组分样品(图 2C), 其吸收光谱和 HPLC/MS 分析结果如图 3 所示。通过吸收光谱、分子量和文献中光合色素代谢途径各产物的相关数据比对, H1–H4 依次为 MPE、BChl *a*_P、球形烯酮(Spheroidenone)和球形烯(Spheroidene), 依次与 TLC 薄层板 T0、T1、T5 和 T6 对应(表 1)。TLC 薄层板还显示 3 个色素条带 T2、T3 和 T4, 它们与 BChl *a*、细菌脱镁叶绿素(Bacteriopheophytins *a*, Bphe *a*)和羟基球形烯的吸收光谱相一致, 这 3 个色素组分均没有约 415 nm 特征峰, 未进行质谱分析。在所分析的色素组分中, 仅 MPE 呈现约 415 nm 特征峰, 由此推断, R7 菌株呈现 423 nm 特征峰是由 MPE 积累形成, 由于菌体中积累的 Car 均没有 416–425 nm 吸收峰, 因而不是由 Car 引起的。

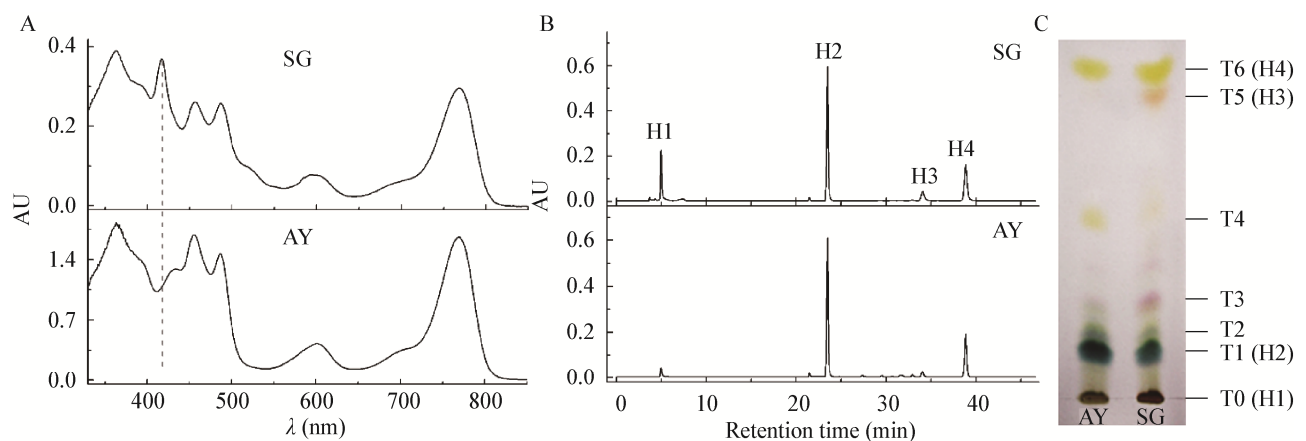


图 2 色素提取液的吸收光谱(A)、HPLC 分析(B)和 TLC 分析(C)

Figure 2 Absorption spectra (A), HPLC elution profiles (B) and thin layer chromatograph (C) of pigment extract

注: AY: 乙酸钠-酵母培养基; SG: 琥珀酸钠-谷氨酸钠培养基; H1 洗脱组分的检测波长为 415 nm; H2 洗脱组分的检测波长是 770 nm; H3 和 H4 洗脱组分的检测波长是 480 nm

Note: AY: Acetate-yeast medium; SG: Succinate-glutamate medium; The detection wavelengths in HPLC elution profiles were set at 415 nm (H1), 480 nm (H3 and H4) and 770 nm (H2), respectively

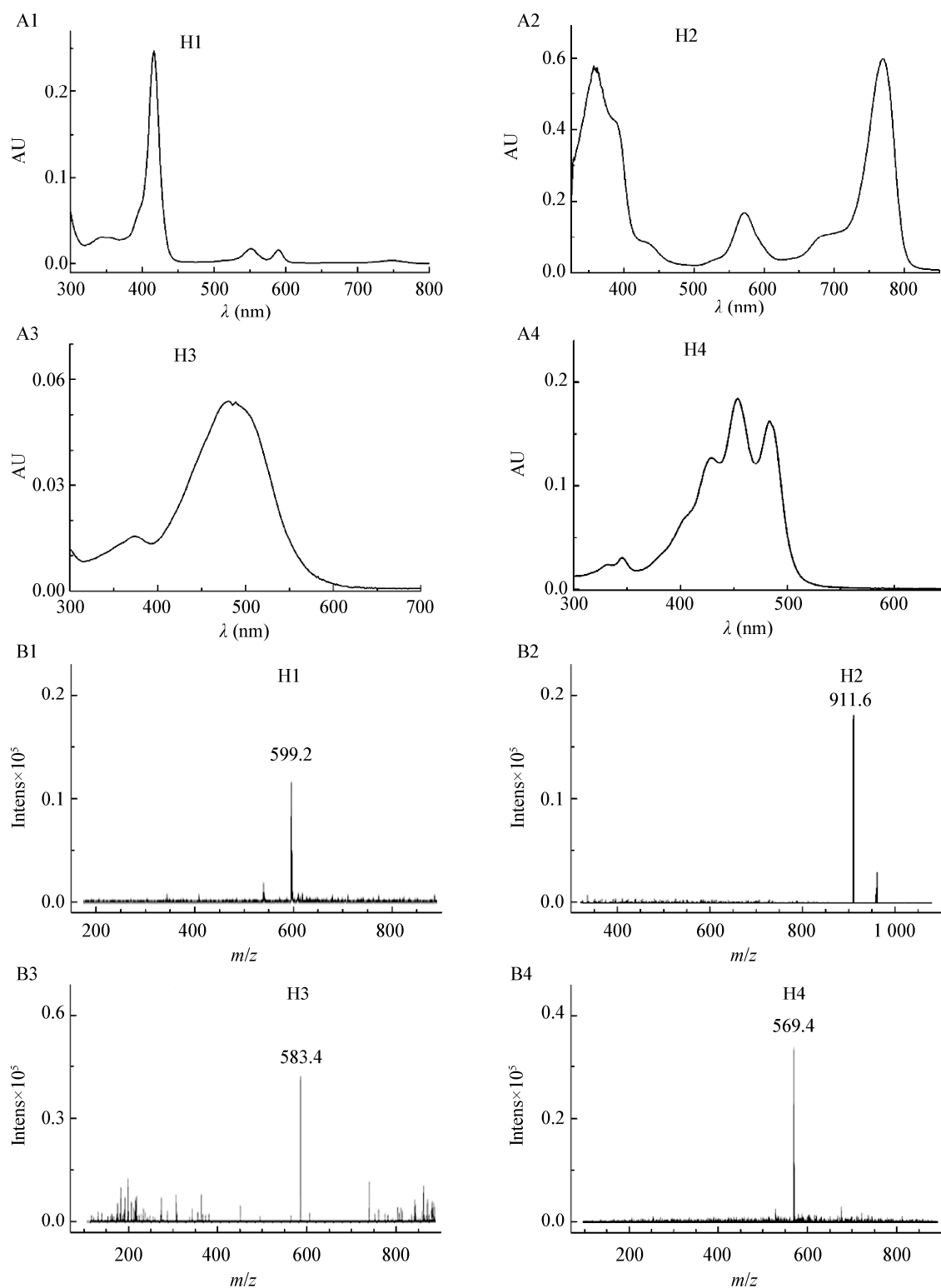


图3 各色素组分的吸收光谱(A)和质谱分析(B)

Figure 3 Absorption spectra (A) and mass spectra analysis (B) of elutents in HPLC profile

注: H1、H2、H3 和 H4 代表图 2B 中的高效液相色谱洗脱组分

Note: H1–H4 represent each eluent fraction in HPLC analysis as shown in figure 2B

表 1 TLC 与 HPLC 主要色素组分的对应关系和及其分子量测定

Table 1 Relationships of the pigment components analyzed by TLC, HPLC and molecular weight determination						
薄层层析	高效液相色谱层析	保留时间	特征吸收光谱	分子量	化合物	参考文献
TLC	HPLC	Retention time (min)	Characteristic absorption (nm)	Molecular ion [MH] ⁺	Compounds	References
T0	H1	5.01	415, 550, 590	599.2	MPE	[14]
T1	H2	23.46	364, 572, 770	911.6	BChl <i>a</i> _P	[27]
T5	H3	34.08	481	583.4	Spheroidenone	[28]
T6	H4	38.87	429, 453, 482	569.4	Spheroidene	[28]

HPLC 结果显示, SG 和 AY 培养物主要积累 H1、H2、H3 和 H4 这 4 种色素。SG 和 AY 培养物中 H1 与 H2 的摩尔比分别为 0.08 和 0.01。与 SG 培养物相比, AY 培养物中 MPE 相对含量大幅度降低, 具有极显著差异($P<0.01$), 因而没有显示明显 423 nm 特征峰。另外, Car 组分 H3 和 H4 比例也发生了变化, H3 其特征峰在 481 nm, SG 培养物中 H3 相对含量升高, 是色素提取液的吸收光谱中 Car 第三指特征峰升高的原因(图 2A), 观察不到 Car 第一指峰, 其原因是与 MPE 特征峰重叠。

2.3 光合膜制备和色素蛋白复合体相对含量分析

光合膜的吸收光谱能够反映光合色素及其色素蛋白复合体在膜上的分布特征。为了明确 MPE 能否定位于光合膜上, 因此测定了光合膜的吸收光谱, 结果如图 4A 所示。与活细胞吸收光谱相比

(图 1C、1D), 光合膜的吸收光谱更加精细, SG 和 AY 培养物均能呈现清晰的 BChl *a* Soret (378 nm)、Q_x (590 nm)和 Q_y (800 nm 和 854 nm)带, 以及 450、476 和 509 nm 球形烯系 Car 特征峰。与 AY 相比, SG 培养物呈现 423 nm 特征峰, 表明 MPE 能够定位在细胞膜上; 因为 MPE 的积累, SG 培养物光合膜中 350–450 nm 吸收带升高。采用光谱去卷积方法^[25]消除 LH1 和 LH2 之间的光谱重叠, 计算得光合膜 LH2/LH1 的摩尔比, 结果如图 4B 所示。与 AY 相比, SG 培养物 LH2/LH1 的摩尔比极显著降低($P<0.01$), 主要负责捕获光能的 LH2 的相对含量较少。

2.4 色素蛋白复合体离子交换层析

为了明确 MPE 是否在色素蛋白复合体上定位, 采用离子交换色谱分离了菌体中的色素蛋白复合体, 结果如图 5A 所示。依据洗脱组分特征吸

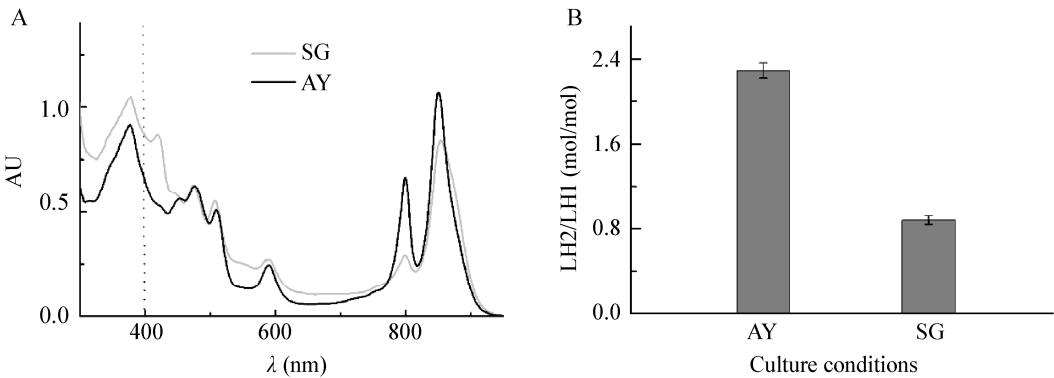


图 4 光合膜的吸收光谱(A)和 LH2/LH1 摩尔比(B)

Figure 4 Absorption spectra (A) and LH2/LH1 molar ratio (B) of intracytoplasmic membrane

注: AY: 乙酸钠-酵母培养基; SG: 琥珀酸钠谷氨酸钠培养基。LH2: 外周捕光色素蛋白复合体; LH1: 核心捕光色素蛋白复合体
Note: AY: Acetate-yeast medium; SG: Succinate-glutamate medium. LH2: Peripheral light harvesting complex 2; LH1: Core light harvesting complex 1

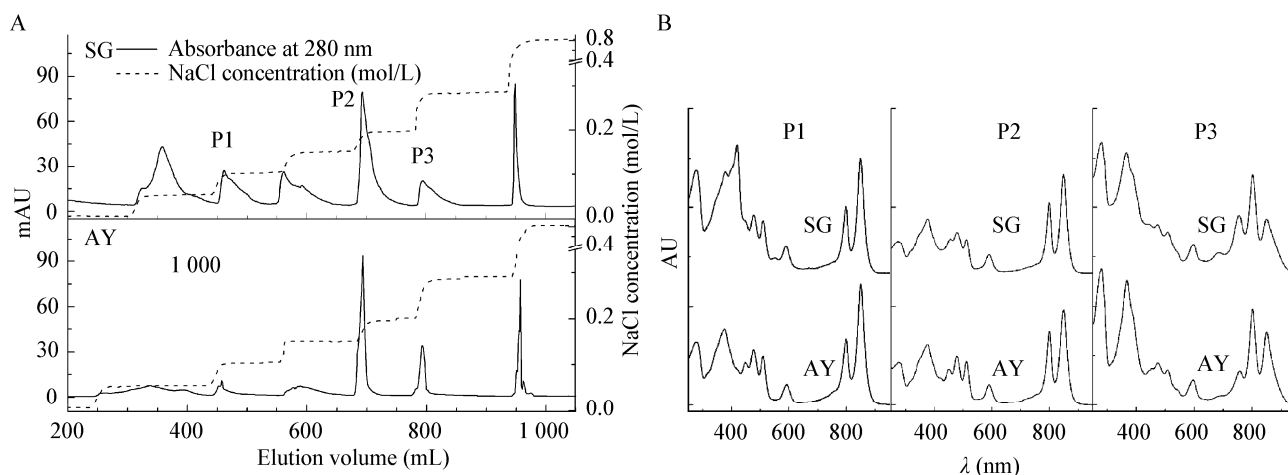


图5 DEAE 阴离子交换层析的不连续梯度 NaCl 洗脱曲线(A)和洗脱峰的吸收光谱(B)

Figure 5 DEAE ion-exchange chromatography (A) and absorption spectra (B) of pigment protein complexes

注: AY: 乙酸钠-酵母培养基; SG: 琥珀酸钠谷氨酸钠培养基; P1、P2 和 P3 为阴离子交换层析洗脱组分

Note: AY: Acetate-yeast medium; SG: Succinate-glutamate medium; P1–P3: Number of each elution fractions from DEAE ion-exchange chromatography

收光谱(图 5B), SG 和 AY 培养物均得到 3 个色素蛋白复合体组分, 编号分别为 P1、P2 和 P3, 其梯度洗脱 NaCl 浓度(mol/L)范围分别是 0.05–0.10、0.15–0.20 和 0.20–0.25。P1 和 P2 与 LH2 近红外特征光谱(约 800 nm 和 850 nm)相吻合, A_{800}/A_{850} 比值不同, 分别是 0.56 和 0.70, 由此表明该 R7 能产生 2 种 LH2, 其中 P2 是菌体主要表达的 LH2 类型。P3 与 RC 的近红外特征光谱(约 760、800 和 865 nm)相吻合。色谱分析未检测到 LH1 组分, 其原因是 LH1 稳定性较差, 本文使用 1% LDAO 进行增溶, LH1 被破坏, 若要获得 LH1 需要使用更低浓度的 LDAO 或者较温和的表面活性剂处理^[29]。AY 培养物的色素蛋白复合体色谱峰对称性较好, 色素蛋白复合体未呈现约 423 nm 特征吸收峰。与 AY 相比, SG 培养物色素蛋白复合体分离的色谱峰对称性差, 出现拖尾, 尤其是 P1 和 P3 拖尾严重, 且 P1 和 P3 吸收光谱呈现 423 nm 特征峰, 使其 Car 三指特征峰的第一峰升高, P2 则未呈现这种现象。由此可见, MPE 能够定位于 LH2 和 RC 上, 形成 423 nm 特征峰, R7 菌株能产生 2 种 LH2, MPE 主要定位于其中一种 LH2 上, 与 P3 相比, P1 中 423 nm 吸收峰较强, 表明 P1 与 MPE 的结合力强, MPE 更容

易结合到 LH2 上。离子交换色谱峰出现拖尾, 其原因是 MPE 与色素蛋白复合体结合, 理化性质有所改变, 色谱分离组分中含有与 MPE 结合和未结合 2 种分子, 色谱为将这 2 种分子分离, 因而导致拖尾。AY 培养物的 P2 色谱峰也有拖尾现象, 表明 MPE 与该 LH2 结合的程度较低, 未呈现其特征光谱。

3 讨论与结论

不产氧光合细菌活细胞吸收光谱是菌体内积累光合色素及其存在方式的综合体现, 其不仅是不产氧光合细菌分类中判别光合色素类型的指标, 同时在光合色素代谢调控和色素蛋白复合体环境适应性研究中也发挥着重要的作用, 因此识别活细胞的特征吸收光谱与色素之间的对应关系具有重要的意义。在不产氧光合细菌紫细菌类群中, 活细胞吸收光谱 400–550 nm 特征吸收归因于 Car^[10], 位于 360–380、~590 和 800–880 nm 特征吸收反映 BChl *a* 的 Soret、Qx 和 Qy 吸收带^[6]。特征吸收峰的相对高低和峰位的变化, 反映细胞内 Car、BChl 和色素蛋白复合体组成和含量的差异, 尤其是 BChl *a* 近红外特征吸收光谱(Qy 带)常用于色素蛋白复合体组成和含量快速检测^[3,7]。例如,

依据光谱特征, 色素蛋白复合体可分为 LH1 (B800–875)、RC (B760–800–865) 和 LH2, LH2 可以分为典型光谱 LH2 (B800–850) 和异常光谱 LH2 (U-LH2), U-LH2 包括 LH3 (B800–820)、LH4 (Only B800) 和 LH2' (B800–840) 等, 其中 B800–850 等表示色素蛋白复合体中结合的 BChl *a* 呈现约 800 nm 和 850 nm 特征吸收峰, 因菌株不同, B800–850 BChl *a* 特征吸收峰会发生几个纳米的位移。基于此, 许多研究者开展了不产氧光合细菌光合色素和色素蛋白复合体合成对环境因子的适应性变化规律, 以及光强调控 LH2 与 LH4 含量消长变化的过程^[6,30]; 尤其是 Sturgis 等^[25]建立了利用光合膜吸收光谱直接估算细胞中合成的 LH1 和 LH2 的相对含量的方法和经验公式, 并且该公式在后续的研究中得到了广泛的使用^[7]。再者, 通过 Car 特征吸收光谱可直观判定, *Rps. palustris*、*Rbl. acidophilus* 和 *Rhodospirillum rubrum* 等隶属于螺菌黄质系 Car, *Rba. capsulatus*、*Rba. azotoformans* 和 *Rba. sphaeroides* 隶属于球形烯系 Car; 依据 Car 三指特征吸收光谱相对高低判定环境对菌体 Car 组成和共轭体系的大小相对变化关系, 例如光强较低时, *Rps. palustris* NBRC100419 Car 三指特征峰红移, HPLC 分析表明积累长共轭双键的 Car, 尤其是螺菌黄质含量增加^[31]。由此可见, 阐明菌体合成色素和光谱之间的关系, 可直观地用于环境因素对色素及其存在方式的调控研究。

已报道的许多菌株的菌体均能呈现 420–425 nm 特征吸收峰^[8–11], 在一些菌株中分离纯化的光合膜和色素蛋白复合体也呈现该特征峰^[12–13], 并将其归因于 Car^[8–11]。其证据是由于链孢红素体外呈现 418、442 和 470 nm 特征吸收峰, 其与胞内蛋白结合, 418 nm 吸收峰红移至~420 nm。通过光谱观察, 链孢红素的衍生物 CH₃O-链孢红素和 OH-链孢红素, 与链孢红素具有较为一致的吸收光谱, 由此判定, 若它们在细胞中积累也能产生该特征峰。Zhao 等研究表明, *Rps. palustris* CQV97 呈

现~421 nm 特征光谱^[14], *Rbx. gelatinosus* MPE 环化酶基因(*bchE*)缺失突变株的细胞膜呈现异常强的 415 nm 吸收峰^[16]是由 MPE 积累形成的, 以及 *Rba. azotoformans* R7 菌体没有明显的~423 特征峰, 却分离纯化到呈现 423 nm 吸收峰 LH2, 经验证该特征峰是 MPE 引起的^[17–18]。本研究发现 *Rba. azotoformans* R7 在 SG 培养基中能形成 423 nm 吸收峰, 340–450 nm 光吸收升高, 该 423 nm 特征峰是由 MPE 积累形成的, MPE 在丙酮甲醇溶液中呈 415 nm, 与细胞内蛋白结合形成 423 nm 特征峰。该结果与 *Rps. palustris* CQV97 和 *Rbx. gelatinosus* MPE 环化酶基因(*bchE*)缺失突变株分别呈现~421 nm 和 416 nm^[16]特征峰不同, 其原因可能是由于 MPE 与蛋白质结合后微环境差异, 导致~421 nm 和~423 nm 之间的差异; *Rbx. gelatinosus* 中 MPE 与蛋白结合后仍呈现 416 nm 特征峰, 与丙酮甲醇抽提液中特征峰一致, 表明该 MPE 环化酶基因(*bchE*)缺失突变株大量积累 MPE, 大部分以游离状态存在。MPE 是 BChl 合成过程中的一种中间产物, 若环境因素影响, 导致代谢过程不平衡, 使 MPE 积累, 其菌体将呈现 416–423 nm 特征峰, 因此, MPE 形成该特征峰是一种普遍存在的现象。另外通过该特征峰的变化, 可以估算 MPE 相对含量变化的情况, 例如本研究的图 1D, 可以通过 375 nm 和 423 nm 特征峰的相对高度的比例估算 MPE 积累随时间的变化关系。但值得注意的是, Car 也能产生 420–425 nm 特征峰, 也可能是 MPE 和 Car 共同形成。

研究表明, LH2 特征光谱和性质的差异主要与 $\alpha\beta$ 异二聚体及其结合的色素相关^[6,26]。在许多菌种(株)中(如 *Rps. palustris*、*Allochrochromatium vinosum* 和 *Phaeospirillum molischianum* 等), 存在多对 *pucBA* 基因, 它们表达 LH2 $\alpha\beta$ 多肽亚基, 由于 $\alpha\beta$ 多肽亚基不同, 可形成典型光谱 LH2 和异常光谱 LH2 (LH3、LH4 和 LH2')^[6,32–33]。本研究表明, MPE 不但能定位在细胞膜上, 也能定位在 LH2 和 RC 上, 形成 423 nm 特征吸收峰, 与其他蛋白是否能形成 423 nm 特征峰需要进一步研究。通过色谱

分离, R7 菌株可检测到 2 种洗脱盐度不同的 LH2, 这 2 种 LH2 A_{800}/A_{850} 的比值不同, 而且 MPE 能和洗脱盐度较低的一种 LH2 结合。表明这 2 种 LH2 合成应该是该菌株基因组中拥有 2 对 *pucBA* 表达形成的, 这与文献报道的同属的 *Rba. sphaeroides* NCIB 8253 基因组中具有 2 对 *pucBA*^[7] 的结果一致。MPE 能定位在色素蛋白复合体上, 是通过哪些方式结合到色素蛋白复合体上, 有何生物学意义, 还不明确。众所周知, MPE 是 BChl *a* 合成途径中的一种中间代谢产物, 在生长过程中很少积累, 例如: 本研究的 R7 菌株在 AY 培养基中培养时, 以及文献[6,28]中报道的活细胞光谱中未见 420–425 nm 特征吸收峰。从理论上分析, 胞内 MPE 积累至少包括 2 种情况: 若环境因子有利于催化 MPE 合成的上游的酶(如 BchM)活性提高, MPE 积累, 其作为下游转化酶的底物, 底物升高, 终产物合成量也将提高, 将有利于菌体生长; 若环境因子抑制催化 MPE 进一步转化的下游酶(如 BchE)活性, 导致 MPE 积累, 将不利于终产物合成和菌体生长。在本研究中, 与 AY 相比, R7 在 SG 培养基中生长速率明显降低, 其细胞合成的 Car 和 BChl *a* 含量降低, MPE 明显积累, 具体是生长不良导致 MPE 积累还是 MPE 积累阻碍了生长, 目前尚不清楚。细胞积累的 MPE 能定位在 RC 和 LH2 上, 研究表明 MPE 的结合导致 LH2 四级结构对抗酸性 pH 的稳定性下降, 同时, 也导致 LH2 中 Car 到 BChl 的能量传递效率下降^[18]。MPE 结合对 RC 的结构和功能的影响尚未见报道。因此, 针对这种 BChl 前体积累对光合单元的结构和功能的影响还有待于进一步研究。

综上所述, *Rba. azotoformans* R7 在 AY 培养基中生长良好, 而在 SG 培养基中生长受到抑制, 活细胞呈现异常的 423 nm 特征光谱, 该特征峰形成的原因是细胞内积累 MPE。MPE 能定位在细胞膜、LH2 和 RC 上, 形成具有 423 nm 特征光谱的 LH2 和 RC。R7 能产生洗脱盐度不同的 2 种 LH2, MPE 与洗脱盐度较低的 LH2 结合。

REFERENCES

- [1] Niedzwiedzki DM, Swainsbury DJK, Canniffe DP, Hunter CN, Hitchcock A. A photosynthetic antenna complex foregoes unity: carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection[J]. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2020, 117(12): 6502-6508
- [2] Thyrrhaug E, Lincoln CN, Branchi F, Cerullo G, Perlik V, Šanda F, Lokstein H, Hauer J. Carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer through vibronic coupling in LH2 from *Phaeosprillum molischianum*[J]. *Photosynthesis Research*, 2018, 135(1/3): 45-54
- [3] Tong AL, Fiebig OC, Nairat M, Harris D, Giansily M, Chenu A, Sturgis JN, Schlau-Cohen GS. Comparison of the energy-transfer rates in structural and spectral variants of the B800-850 complex from purple bacteria[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2020, 124(8): 1460-1469
- [4] Laible PD, Hanson DK, Buhrmaster JC, Tira GA, Faries KM, Holtén D, Kirmaier C. Switching sides-Reengineered primary charge separation in the bacterial photosynthetic reaction center[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(2): 865-871
- [5] Licht MK, Nuss AM, Volk M, Konzer A, Beckstette M, Berghoff BA, Klug G. Adaptation to photooxidative stress: Common and special strategies of the alphaproteobacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 283
- [6] Brotsudarmo THP, Collins AM, Gall A, Roszak AW, Gardiner AT, Blankenship RE, Cogdell RJ. The light intensity under which cells are grown controls the type of peripheral light-harvesting complexes that are assembled in a purple photosynthetic bacterium[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 440(1): 51-61
- [7] Woronowicz K, Olubanjo OB, Sung HC, Lamphey JL, Niederman RA. Differential assembly of polypeptides of the light-harvesting 2 complex encoded by distinct operons during acclimation of *Rhodobacter sphaeroides* to low light intensity[J]. *Photosynthesis Research*, 2012, 111(2/3): 125-138
- [8] Dönmez GC, Ozturk A, Cakmakci L. Properties of the *Rhodospseudomonas palustris* strains isolated from an alkaline lake in Turkey[J]. *Turkish Journal of Biology*, 1999, 23(4): 457-464
- [9] Harada J, Mizoguchi T, Yoshida S, Isaji M, Oh-Oka H, Tamiaki H. Composition and localization of bacteriochlorophyll *a* intermediates in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas* sp. Rits[J]. *Photosynthesis Research*, 2008, 95(2/3): 213-221
- [10] Kempher ML, Madigan MT. Phylogeny and photoheterotrophy in the acidophilic phototrophic purple bacterium *Rhodoblastus acidophilus*[J]. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(7): 567-574
- [11] Ouchane S, Picaud M, Vernotte C, Astier C. Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*[J]. *The*

- EMBO Journal, 1997, 16(15): 4777-4787
- [12] Slouf V, Chabera P, Olsen JD, Martin EC, Qian P, Hunter CN, Polivka T. Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependent alteration of carotenoid excited-state properties[J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2012, 109(22): 8570-8575
- [13] Gall A, Henry S, Takaichi S, Robert B, Cogdell RJ. 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
- [14] Zhao CG, Yue HY, Cheng QR, Chen SC, Yang SP. What caused the formation of the absorption maximum at 421 nm *in vivo* spectra of *Rhodospseudomonas palustris*[J]. Photochemistry and Photobiology, 2014, 90(6): 1287-1292
- [15] Lascelles J. The accumulation of bacteriochlorophyll precursors by mutant and wild-type strains of *Rhodospseudomonas sphaeroides*[J]. The Biochemical Journal, 1966, 100(1): 175-183
- [16] Ouchane S, Steunou AS, Picaud M, Astier C. Aerobic and anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria: a strategy adopted to bypass the repressive oxygen control system[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(8): 6385-6394
- [17] Zhao GG, Yang SP, Qu YB, Jiao NZ. 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, 焦立志. 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
- [18] Yue HY, Zhao CG, Li K, Yang SP. 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
- [19] Peter E, Rothbart M, Oelze ML, Shalygo N, Dietz KJ, Grimm B. Mg protoporphyrin monomethylester cyclase deficiency and effects on tetrapyrrole metabolism in different light conditions[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(7): 1229-1241
- [20] 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
- [21] Yue HY, Huang X, Zhao CG, Yang SP, Qu YB. Regulation mechanism of photopigments biosynthesis via light and oxygen in *Rhodobacter azotoformans* 134K20[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(3): 331-336 (in Chinese)
岳慧英, 黄潇, 赵春贵, 杨素萍, 曲音波. 不产氧光合细菌光合色素的光氧调控机制[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 331-336
- [22] Zhuo MQ, Zhao CG, Cheng QR, Yang SP, Qu YB. 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, 杨素萍, 曲音波. 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
- [23] Rebeiz CA, Haidar MA, Yaghi M, Castelfranco PA. Porphyrin biosynthesis in cell-free homogenates from higher plants[J]. Plant Physiology, 1970, 46(4): 543-549
- [24] Namsaraev ZB. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls[J]. Microbiology, 2009, 78(6): 794-797
- [25] Sturgis JN, Hunter CN, Niederman RA. Spectra and extinction coefficients of near-infrared absorption bands in membranes of *Rhodobacter sphaeroides* mutants lacking light-harvesting and reaction center complexes[J]. Photochemistry and Photobiology, 1988, 48(2): 243-247
- [26] Swainsbury DJK, Faries KM, Niedzwiedzki DM, Martin EC, Flinders AJ, Canniffe DP, Shen GZ, Bryant DA, Kirmaier C, Holten D, et al. Engineering of B800 bacteriochlorophyll binding site specificity in the *Rhodobacter sphaeroides* LH2 antenna[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Bioenergetics, 2019, 1860(3): 209-223
- [27] Harada J, Mizoguchi T, Tsukatani Y, Yokono M, Tanaka A, Tamiaki H. Chlorophyllide a oxidoreductase works as one of the divinyl reductases specifically involved in bacteriochlorophyll a biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(18): 12716-12726
- [28] Chi SC, Mothersole DJ, Dilbeck P, Niedzwiedzki DM, Zhang H, Qian P, Vasilev C, Grayson KJ, Jackson PJ, Martin EC, et al. Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Bioenergetics, 2015, 1847(2): 189-201
- [29] Odahara T. Stability and solubility of integral membrane proteins from photosynthetic bacteria solubilized in different detergents[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Biomembranes, 2004, 1660(1/2): 80-92
- [30] Zhao XL, Zhao CG, Yang SP, Luo JF. The growth-promoting mechanism of unusual spectroscopic form of LH2 (LH4) from *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 in low light[J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(6): 1369-1375
- [31] Mizoguchi T, Isaji M, Harada J, Tamiaki H. Identification of 3,4-didehydrohodopin as major carotenoid in *Rhodospseudomonas* species[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2008, 7(4): 492-497
- [32] Carey AM, Hacking K, Picken N, Honkanen S, Kelly S, Niedzwiedzki DM, Blankenship RE, Shimizu Y, Wang-Otomo ZY, Cogdell RJ. Characterisation of the LH2 spectral variants produced by the photosynthetic purple sulphur bacterium *Allochrocatium vinosum*[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Bioenergetics, 2014, 1837(11): 1849-1860
- [33] Anda A, Hansen T, De Vico L. Qy and Qx absorption bands for bacteriochlorophyll a molecules from LH2 and LH3[J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2019, 123(25): 5283-5292