

# 沼泽红假单胞菌重组 LH2 表达体系的构建及功能评价

黄晓萍, 罗家福, 林若欣, 赵春贵, 杨素萍\*

华侨大学 生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

黄晓萍, 罗家福, 林若欣, 赵春贵, 杨素萍. 沼泽红假单胞菌重组 LH2 表达体系的构建及功能评价[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5063-5077.

HUANG Xiaoping, LUO Jiafu, LIN Ruoxin, ZHAO Chungui, YANG Suping. Expression system construction and activity evaluation of reconstituted LH2 of *Rhodopseudomonas palustris*[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5063-5077.

**摘要:**【背景】外周捕光色素蛋白复合体(peripheral light-harvesting complex, LH2)在光合作用中执行光能捕获和传递功能,对于不产氧光合细菌(anoxxygenic phototrophic bacteria, APB)的光合生长至关重要。在 APB 中, LH2 的  $\alpha\beta$  亚基通常是由多拷贝 *pucBA* 基因编码,尤其是红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)菌株,可高达 5–7 拷贝。由于不同 *pucBA* 基因合成的异质性 LH2 彼此之间难以分离纯化,极大限制了 LH2 结构与功能的深入研究。【目的】构建以沼泽红假单胞菌为宿主菌的重组 LH2 表达体系,利用该重组表达体系在体内和体外评价 LH2 的光能传递活性。【方法】以 5 对 *pucBA* 基因全部缺失的沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) CGA009 ( $\Delta pucBA$ )为宿主菌,采用基因重组方法,以 *pucBA*d 和 *mrfp* (红色荧光蛋白基因)基因共表达产物为检测指标,对表达载体进行遗传改造和启动子筛选;采用光谱法测定重组菌的生物量和基因表达产物光谱特征,以及纯化 LH2 的光谱特征、光合色素分析和能量传递活性。【结果】T7 启动子( $P_{T7}$ )和 T7 RNA 聚合酶基因联合使用,可使 *pucBA*d 和 *mrfp* 在  $\Delta pucBA$  宿主菌中共表达。用启动子  $P_{badR}$ 、 $P_{pckA}$  和  $P_{ars}$  替换  $P_{T7}$ , 启动子活性从高到低依次为  $P_{pckA}$ 、 $P_{ars}$ 、 $P_{badR}$  和  $P_{T7}$ , 并与重组菌 *mrfp* 基因表达量、*pucBA*d 表达产物(d-LH2)合成量和光合生长速率呈正相关关系,其中以  $P_{pckA}$  启动子构建的重组 LH2 表达体系  $\Delta pucBA(pucBAd)表达活性最高。在此基础上,以 CGA009 菌株的 *pucBA*a 基因(编码 a-LH2)替换  $\Delta pucBA(pucBAd)菌株的 *pucBA*d 基因,获得  $\Delta pucBA(pucBAa)重组菌。相较于  $\Delta pucBA(pucBAa)重组菌,低光时  $\Delta pucBA(pucBAd)重组菌生长速率显著升高,高光时有升高趋势,但未呈显著差异。纯化的 d-LH2 和 a-LH2 分别呈现典型的 B800-only 和 B800-850 特征光谱, d-LH2 产生~863 nm 荧光的量子效率高于 a-LH2, 但采用经典法测定的类胡萝卜素(carotenoids, Car)到细菌叶绿素(bacteriochlorophylls, BChl)的光能传递效率却低于 a-LH2, 2 种结果不一致的原因是“经典法”未考$$$$$

资助项目: 国家自然科学基金(31070054, 30970068); 国家海洋公益性行业科研专项(201505026)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31070054, 30970068) and the National Marine Public Industry Research of China (201505026).

\*Corresponding author. E-mail: yangsuping@hqu.edu.cn

Received: 2024-06-25; Accepted: 2024-08-19; Published online: 2024-09-23

虑不同光谱类型 LH2 对~863 nm 光子吸收的差异。【结论】构建沼泽红假单胞菌的重组 LH2 表达系统,从基因纯 LH2 水平和重组菌光合生长水平评价了多拷贝 *pucBA* 基因菌株中 2 种不同光谱类型的 LH2 能量传递活性,证明异常光谱 LH2 (d-LH2)能量传递活性高于典型光谱 LH2 (a-LH2),本研究为多拷贝 *pucBA* 菌株光适应过程中 LH2 形成和组装的分子调控机制的全面理解奠定了基础。  
关键词: 不产氧光合细菌; 沼泽红假单胞菌; 重组 LH2; 光能传递; 量子效率

## Expression system construction and activity evaluation of reconstituted LH2 of *Rhodopseudomonas palustris*

HUANG Xiaoping, LUO Jiafu, LIN Ruoxin, ZHAO Chungui, YANG Suping\*

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

**Abstract: [Background]** The peripheral light-harvesting complex (LH2) performs the function of light energy capture and transfer in photosynthesis and is essential for the phototrophic growth of anoxygenic phototrophic bacteria (APB). The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of LH2 are usually encoded by multiple copies of *pucBA* genes, which reach 5–7 copies in *Rhodopseudomonas*. As a result, the heterogeneous synthesis of LH2 by multiple genes makes LH2 difficult to be separated from each other, which greatly limits the full understanding about the contributions of different *pucBA* genes to the structures and physiological roles of LH2. **[Objective]** To develop an expression system and evaluate the light energy transfer activity *in vivo* and *in vitro* for the reconstituted LH2 of *R. palustris*. **[Methods]** Using *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 ( $\Delta pucBA$ ) with all five *pucBA* genes deleted as the host bacterium and the co-expression products of *pucBA<sub>d</sub>* and *mrfp* (red fluorescent protein gene) as the markers, we conducted genetic modification of the expression vector and promoter screening. The spectroscopic method was employed to determine the biomass of recombinant bacteria, the spectral characteristics of gene expression products, and the spectral characteristics, photosynthetic pigments and light energy transfer activity of purified LH2. **[Results]** The T7 promoter ( $P_{T7}$ ) combined with T7 RNA polymerase gene promoted the co-expression of *pucBA<sub>d</sub>* and *mrfp* in  $\Delta pucBA$ . We replaced  $P_{T7}$  with  $P_{badR}$ ,  $P_{pckA}$ , and  $P_{ars}$ , respectively, and the activities of the promoters followed a descending order of  $P_{pckA}$ ,  $P_{ars}$ ,  $P_{badR}$ , and  $P_{T7}$ . This strategy increased the *mrfp* gene expression, the synthesis product of *pucBA<sub>d</sub>* (d-LH2), and the phototrophic growth rate in the host bacteria. The expression system  $\Delta pucBA(pucBA<sub>d</sub>)$  harboring  $P_{pckA}$  promoter had the highest expression activity of reconstituted LH2. Then, we used *pucBA<sub>a</sub>* from strain CGA009 to replace *pucBA<sub>d</sub>* in  $\Delta pucBA(pucBA<sub>d</sub>)$  and successfully obtained the recombinant strain  $\Delta pucBA(pucBA<sub>a</sub>)$ . Compared with the *pucBA<sub>a</sub>* construct, the recombinant strain with *pucBA<sub>d</sub>* showed significantly accelerated growth under low light and slightly accelerated growth under high light. The purified d-LH2 and a-LH2 showed typical characteristic spectra of B800-only and B800-850, respectively. The fluorescence quantum efficiency of d-LH2 at ~863 nm was higher than that of a-LH2. However, the light energy transfer efficiency from carotenoids

(Car) to bacteriochlorophylls (BChl) of d-LH2 measured by the classical method was lower than that of a-LH2. The inconsistency between the two results was due to the fact that the classical method did not consider the photon absorption difference at ~863 nm by different spectral types of LH2. **[Conclusion]** The reconstituted LH2 expression system of *R. palustris* was successfully constructed. The light energy transfer activities of two different spectral types of LH2 in strains with multiple copies of *pucBA* were evaluated on the levels of gene-pure LH2 and photosynthetic growth rate of the recombinant bacteria. The results showed that the energy transfer activity of abnormal spectral LH2 (d-LH2) was higher than that of typical spectral LH2 (a-LH2). The present work laid a foundation for comprehensively understanding the molecular regulatory mechanisms of the formation and assembly of LH2 in the bacteria with multiple copies of *pucBA*.

**Keywords:** anoxygenic phototrophic bacteria; *Rhodospseudomonas palustris*; reconstituted LH2; light energy transfer; quantum efficiency

紫细菌隶属于不产氧光合细菌(anoxygenic phototrophic bacteria, APB), 因其光能转换系统比蓝细菌或绿色植物简单, 常作为光合作用机制研究的模式生物<sup>[1-2]</sup>。紫细菌光合作用单元主要由外周捕光复合体(peripheral light-harvesting complex, LH2)、反应中心(reaction center, RC)和中心捕光复合体(core light-harvesting complex, LH1)组成。LH2 吸收光能并将光能传递给 LH1-RC 复合体, 在 RC 复合体上完成光合作用的原初反应, 进而将光能转换成化学能。通常 LH1 与 RC 形成化学计量比为 1:1 的“核心”复合体(RC-LH1)<sup>[3-4]</sup>, LH2 环绕在 RC-LH1 的周围。随着光强变化, 菌株不但调控 LH2 数量变化, 还调控 LH2 光谱类型变化<sup>[5-6]</sup>。已有研究阐明了 LH2 不同光谱形成机制和光谱变化规律, 其主要原因是菌株具有“多拷贝 *pucBA* 基因”, 其编码  $\alpha\beta$ -脱辅基蛋白关键氨基酸存在差异; 在不同光强下, 不同 *pucBA* 基因表达的  $\alpha\beta$  肽与菌体内光合色素组装形成不同光谱类型的 LH2<sup>[5,7-9]</sup>。随着环境光强的改变, 菌株 LH2 光谱变化的一般规律是: 高光(high light, HL)下, 典型光谱类型的 LH2 (B800-850 LH2, T-LH2)的合成占优势, 而低光(low light, LL)下主要合成异常光谱 LH2 (U-LH2), 例如 LH3 和/或 LH4 等<sup>[7,9-13]</sup>。在进化

过程中, 紫细菌为何选择 U-LH2 适应低光环境, 目前观点认为 U-LH2 具有更高的类胡萝卜素(carotenoid, Car)到细菌叶绿素(bacteriochlorophyll, BChl)光能传递效率<sup>[5,14]</sup>, 但也有报道显示低光下合成的 LH2, 其光能传递效率并未升高<sup>[5,13]</sup>。由于 LH2 活性与 APB 菌株的光合生长息息相关, 但同一菌株中不同 LH2 活性评价尚缺乏菌体光合生长数据的支撑<sup>[5]</sup>。

高纯度 LH2 的获得是深入研究其结构、功能和活性的基础。由于多拷贝 *pucBA* 基因在 APB 普遍存在, 尤其是红假单胞菌属(*Rhodospseudomonas*)菌株的拷贝数(3-7 拷贝)最多, 多数菌株达 5 拷贝<sup>[9]</sup>。除极个别菌株(如 *Rps. palustris* Bis)外, 菌株中多拷贝的 *pucBA* 可同时表达合成基因型不同的 LH2<sup>[9-13]</sup>, 导致同一菌株中不同基因型的 LH2 彼此难以分离纯化, 已成为深入研究 LH2 结构和功能关系的技术瓶颈<sup>[1-2]</sup>。例如, LH2 多肽分析报道显示, 即使是高度纯化的 *Rps. palustris* le5、2.1.6、CGA009 等菌株的 LH2, 其多肽组成都含有不同 *pucBA* 表达的  $\alpha\beta$  肽, 即使是同一菌株, LH2 多肽组成和含量随光强变化而不同<sup>[7,10-13]</sup>, 导致纯化 LH2 特征光谱不尽相同, 也是导致 LH2 晶体解析分辨率(4.5-7.5 Å)<sup>[10-11]</sup>较低的重要原因<sup>[1-2]</sup>。针对这一

难题, Southall 等采用基因敲除方法得到仅保留 *pucBA*d 的 CGA009 基因缺失株, 纯化得到基因纯的 LH4, 其近红外(NIR)光谱仅呈现 803 nm 特征峰, 由此证明 LH4 为 B800-noly LH2, B800-low-850 LH2 不是单一基因型 LH2, 而是不同光谱类型 LH2 的混合物, 但未能得到 LH4 高分辨率晶体结构解析结果(7.5 Å)<sup>[2]</sup>。随后 Qian 等通过基因敲除, 分别得到了 *Rps. palustris* 2.1.6 菌株只含单一 *pucBA*a、*pucBA*b、*pucBA*d 和 *pucBA*e 基因的 4 个缺失突变株, 进一步从基因纯水平高分辨(2.7–3.6 Å)地解析了这 4 种 LH2 的晶体结构, 明确了这 4 种 LH2 光谱特征<sup>[1]</sup>, 但未对这 4 种 LH2 的能量传递活性进行评价。由于菌株中每个 *pucBA* 基因表达量不同, 即使得到单一 *pucBA* 基因缺失突变株, 也不能通过这些突变株的光合生长特性评价不同 LH2 活性。

尽管通过基因敲除法能够得到仅保留单一 *pucBA* 基因缺失突变株, 但该法烦琐耗时。与之相比, 基因重组技术则相对简单。目前利用紫细菌表达系统已经表达了多种外源可溶性蛋白和膜蛋白, 但用于 LH2 重组表达的宿主菌单一, 主要集中在类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 不同缺失突变株, 如: 编码 LH2 多肽基因缺失菌株 DBCΩ、DBCΩ/G1、DBCΩ/G5 和 CQU68, 编码 LH2-LH1-RC 多肽基因缺失株 DD13、DD13/G1、DD13/W1。以这些突变株作为宿主菌, 研究了菌株自身 LH2 的表达和宿主菌光合色素突变株对 LH2 组装的影响<sup>[15-19]</sup>, 以及外源菌株荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)、沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*)、嗜酸芽生红菌 (*Rhodoblastus acidophila*)、胶状红长命菌 (*Rubrivivax gelatinosus*)、嗜硫小红卵菌 (*Rhodovulum sulfidophilum*) 等 *pucBA* 基因的表达<sup>[19-22]</sup>。然而已有研究表明, LH2 合成对菌株中的 Car 具有选择性<sup>[23]</sup>, 由于宿主菌 *Rba. sphaeroides*

具有球形烯系 Car, 而 *Rps. palustris* 具有螺菌黄质系 Car, 导致一些外源菌株的 LH2 不能在该宿主菌组装, 或者组装的 LH2 结构和功能活性与原菌株的不同。例如重组 *Rps. palustris* 2.1.6 的 *pucBA*d 基因不能合成 LH4, 尽管重组 *pucBA*a 能表达合成 LH2<sup>[20]</sup>, 但其光合色素和光谱特征与原菌株不同<sup>[1]</sup>。虽然已有多个菌株 *pucBA* 基因被重组表达, 但主要通过活细胞吸收光谱或细胞膜吸收光谱观察了 LH2 是否表达, 并未对重组 LH2 的光能传递活性进行测定。

由于穿梭表达载体 pBBRMCS-2 及其 Lac 启动子能够在 *Rps. palustris* CGA009 宿主菌中高效表达红色荧光蛋白 (*mrfp*)<sup>[24]</sup>, 本课题组利用该载体在 CGA009 的 5 对 *pucBA* 基因全部缺失菌株 ( $\Delta pucBA$ ) 表达其野生株的 *pucBA*d 时, 活细胞吸收光谱未呈现明显重组 LH2 光谱特征; 基于此, 本文采用目的基因 (*pucBA*d) 和报告基因 (*mrfp*) 共表达方式, 对该 pBBRMCS-2 表达载体进行改造和启动子优化, 构建适合于 *Rps. palustris* 的重组 LH2 表达体系; 再利用该体系重组表达 CGA009 菌株在高低光强下优势合成的 2 种 LH2, 在体内和体外评价重组 LH2 的光能传递活性以期多拷贝 *pucBA* 沼泽菌属菌株获得单一基因型 LH2 提供表达系统, 并从光合生长水平评价 LH2 功能活性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

*Rps. palustris* CGA009 (CGA009 或 WT) 购自 ATCC (BAA-98); 5 对 *pucBA* 基因缺失 *Rps. palustris* CGA009, 简称 CGA009 ( $\Delta pucBA$ ) 或  $\Delta pucBA$ , 本实验室构建保存; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21(DE3) 和重组 *E. coli* W3110 (pUC19-*P<sub>ars</sub>-egfp-arsR-P<sub>T7</sub>-mrfp*) 菌株, 本实验室保存。广宿主组成型表达质粒 pBBR1MCS-2 (5 144 bp,

Km<sup>r</sup>, pBBR1 replicon, mob<sup>+</sup>), 武汉森灵生物公司。

## 1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 感受态细胞制备试剂盒、DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase 和限制性内切酶(QuickCut™ *Xho* I、*Eco*R I、*Xma* I、*Sac* I、*Bam*H I、*Spe* I、*Xba* I、*Apa* I、*Sac* II 和 *Sse*8387 I), 宝生物工程(大连)有限公司; Trans2K<sup>®</sup> Plus DNA Marker 和 Trans15K DNA Marker, 北京全式金生物技术有限公司; 核酸染料、硫酸卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨和大豆蛋白胨, Oxoid 公司。冷冻离心机, Eppendorf 公司; 热循环仪(PCR 仪), Bio-Rad 公司; 恒温混匀仪, 杭州米欧仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 荧光光谱仪, 株式会社日立制作所; 电泳仪, 北京市六一仪器厂。

## 1.3 培养基和培养条件

*E. coli* 菌株及其转化子利用 LB 固体和液体培养基, 在 37 °C、200 r/min 培养, 根据需要添加卡那霉素其终浓度为 20 μg/mL。CGA009、Δ*pucBA* 及其重组子液体培养使用改良的 Ormerod 培养基<sup>[5]</sup>, 平板培养使用 18# 固体培养基<sup>[5]</sup>, 根据需要添加卡那霉素, 终浓度为 100 μg/mL。光照厌氧培养设置 30 °C, 高低光强分别设置为 2 000 lx 和 200 lx。

## 1.4 P<sub>T7</sub> 启动子 LH2 表达体系构建

采用 PCR 方法获得目的基因, 按文献[5]方

法以 *E. coli* DH5α (pUC19-P<sub>ars</sub>-*mgfp*-*arsR*-P<sub>T7</sub>-*rfp*) 质粒 DNA 为模板, 扩增 T3、T7 终止子和 *mrpf* 基因; 以 *E. coli* BL21(DE3)基因组为模板扩增 T7 RNA 聚合酶基因; 以 CGA009 基因组为模板扩增编码 LH2 αβ 肽的 *pucBA*d 和 *pucBA*a 基因。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增片段, DNA 纯化回收试剂盒回收 DNA 片段。

*pucBA*d 和 *mrpf* 共表达重组载体基因元件排列顺序、方向和酶切位点见图 1。以 *E. coli* DH5α 为宿主菌, 依次将 *pucBA*d、*mrpf*、*pol*<sub>T7</sub>、T<sub>T3</sub> 和 T<sub>T7</sub> 通过酶切、连接和转化方法重组到质粒 pBBR1MCS-2 中, 得到 4 个重组 DH5α 菌株, 分别为 P<sub>T7</sub>-*pucBA*d-*mrpf*-P<sub>Lac</sub> (pS1)、P<sub>T7</sub>-*pucBA*d-*mrpf*-*pol*<sub>T7</sub>-P<sub>Lac</sub> (pS2)、P<sub>T7</sub>-*pucBA*d-*mrpf*-T<sub>T3</sub>-*pol*<sub>T7</sub>-P<sub>Lac</sub> (pS3) 和 P<sub>T7</sub>-*pucBA*d-*mrpf*-T<sub>T7</sub>-T<sub>T3</sub>-*pol*<sub>T7</sub>-P<sub>Lac</sub> (pS4), 分别定义为 DH5α(pS1)、DH5α(pS2)、DH5α(pS3) 和 DH5α(pS4) 菌株。通过 PCR 或者双酶切方法对重组子进行验证<sup>[5]</sup>, 通过荧光检测报告基因的表达。选择荧光信号最高重组菌株 DH5α(pS4), 提取其质粒, 通过电转化方法将质粒转入 CGA009 (Δ*pucBA*) 菌株, 筛选得到重组菌株, 标记为 Δ*pucBA*(pS4)。通过荧光法检测报告基因的表达情况, 近红外吸收光谱分析 *pucBA*d 表达情况。其中 P<sub>T7</sub> 和 P<sub>Lac</sub> 分别为 T7 和 Lac 启动子, *pucBA*d 为编码 LH4(d-LH2)αβ 肽的基因(目的基因), *mrpf* 为红色荧光蛋白基因(报告基因), *pol*<sub>T7</sub> 为 T7 RNA 聚合酶基因。T<sub>T7</sub> 和 T<sub>T3</sub> 分别指 T7 和 T3 终止子。

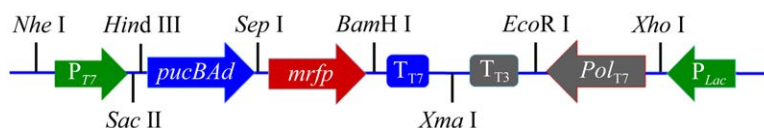


图 1 *pucBA* 基因重组载体各基因元件设计和酶切位点示意图

Figure 1 Schematic diagram of gene element organizations and enzyme restriction sites of *pucBA* gene recombinant vectors.

## 1.5 启动子的选择和重组 *pucBAa* 菌株的构建

采用 PCR 方法<sup>[5]</sup>, 以试剂盒提取的 *Rps. palustris* CGA009 基因组 DNA 为模板<sup>[5]</sup>, 分别扩增启动子  $P_{pckA}$  和  $P_{badR}$ ; 以 *E. coli* BL21 为模板扩增启动子  $P_{ars}$ 。通过酶切(*Nhe* I 和 *Sac* II) 和 T4 连接酶连接, 用这 3 个启动子替换重组质粒 pS4 的  $P_{T7}$ , 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 经过荧光活性筛选和目的基因双酶切验证, 获得启动子分别为  $P_{pckA}$ 、 $P_{badR}$  和  $P_{ars}$  的重组菌株, 分别标记为 DH5 $\alpha$ ( $P_{pckA}$ )、DH5 $\alpha$ ( $P_{badR}$ ) 和 DH5 $\alpha$ ( $P_{ars}$ )。将这 3 个 DH5 $\alpha$  重组菌培养 12 h, 取样, 通过荧光光谱法测定 *mrfp* 基因表达量, 以 DH5 $\alpha$ (pS4) 为对照。从 DH5 $\alpha$  重组菌中提取质粒, 转化  $\Delta pucBA$  菌株, 经过抗性筛选、双酶切验证得到 3 个重组菌, 分别定义为  $\Delta pucBA(P_{pckA})$ 、 $\Delta pucBA(P_{badR})$  和  $\Delta pucBA(P_{ars})$ 。以  $\Delta pucBA(pS4)$  为对照菌株, 测定重组菌的荧光活性、光合生长和光谱特征, 比较不同启动子对 *mrfp* 和 *pucBA* 基因表达活性的影响。为便于描述, 将 DH5 $\alpha$ (pS4) 和  $\Delta pucBA(pS4)$  称为 DH5 $\alpha$ ( $P_{T7}$ ) 和  $\Delta pucBA(P_{T7})$ 。选择在  $\Delta pucBA$  宿主菌中高效表达 *pucBA* 基因的启动子菌株, 将其标记为  $\Delta pucBA(pucBA)$  菌株, 其表达产物称为 LH4 或 d-LH2。用 CGA009 菌株的 *pucBAa* 替换  $\Delta pucBA(pucBA)$  菌株的 *pucBA* 基因, 构建重组菌  $\Delta pucBA(pucBAa)$ , 其表达产物称为 a-LH2。

## 1.6 LH2 分离纯化和光谱特征

取 50 mL  $\Delta pucBA$  及其重组子菌悬液, 4 °C、8 000×g 离心 15 min 收集菌体, 用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤 2 次, 超声波工作 5.0 s、间隔 15.0 s 共处理 20 min 破碎细胞, 蛋白质粗提液经硫酸铵分级盐析、DEAE-纤维素 52 阴离子交换层析分离纯化 LH2, 取样测定 LH2 的吸收光谱、Tricine-SDS-PAGE、荧光光谱和光合

色素含量<sup>[5]</sup>。

## 1.7 光合色素含量的测定

取纯化 LH2 浓缩液 200  $\mu$ L, 加入 10 倍体积的丙酮甲醇提取液静置 3 h, 4 °C、8 000×g 离心 10 min, 取上清测定波长 475 nm 和 770 nm 处 Car 和 BChl 的 *OD* 值。根据公式  $C=(DVf)/(aL)$  计算 LH2 中 Car 和 BChl 含量, 再计算 BChl 与 Car 摩尔比(mol/mol)。其中 *a* 为摩尔消光系数, *L* 为光程(cm), *D*、*V* 和 *f* 分别为测定样品的 *OD*、体积和稀释因子, Car 平均消光系数和 BChl 摩尔消光系数分别为 160、76 L/(mmol·cm)<sup>[25-26]</sup>。

## 1.8 菌体生物量和光谱的测定

在光程为 1 cm 石英比色杯中, 测定样品的吸收光谱。菌体生物量以测定波长 660 nm 处的 *OD*<sub>660</sub> 表示。荧光光谱测定是在光程为 1 cm 荧光杯中, 将菌悬液样品稀释至 *OD*<sub>660</sub> 为 0.10, 设置激发光谱( $\lambda_{Ex}$ )为 564 nm, 在 580–680 nm 范围, 扫描重组菌 *mrfp* 基因表达 RFP 的荧光发射光谱或记录 612 nm 处的荧光强度( $F_{612}$ )。设置  $\lambda_{Ex}$  为 494 nm, 扫描 LH2 样品荧光发射光谱; 设置  $\lambda_{Em}$  为 863 nm, 扫描荧光激发光谱。

## 1.9 能量传递效率分析

根据经典的 Cogdell 方法<sup>[14]</sup>, 计算 LH2 分子内 Car 到 BChl 的光能传递效率(EET%)。将 LH2 的激发光谱与吸收光谱在 Qx 带(590 nm)进行归一化处理, 通过计算 Car 特征性三指峰激发光谱与特征性吸收光谱峰值比率的平均值, 代表 LH2 分子内 Car 到 BChl 的光能传递效率<sup>[14]</sup>, Car 三指特征峰波长为 466、494 和 525 nm。

LH2 荧光量子效率比值的计算<sup>[5]</sup>: 由于  $F=KI_0\Phi A$ , 其中 *F* 为荧光峰面积, *K*、*I*<sub>0</sub>、 $\Phi$  和 *A* 分别为仪器常数、激发光强度、量子效率和样品的吸光度。由于仪器测定条件固定, *K* 和 *I*<sub>0</sub> 均为常数, 则 2 种 LH2 量子效率的比值为:  $\Phi_1/\Phi_2=(F_1\times A_2)/(F_2\times A_1)$ , 其中 *A* 表示 *OD*<sub>494</sub>, *F* 为



863 nm 荧光峰(850–900 nm)的面积, 下标 1 和 2 表示两种待测 LH2 样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 $P_{T7}$ 启动子 LH2 表达体系构建

如图 2A 和 2B 所示, DH5 $\alpha$  重组菌培养 12 h 时检测, 由于克隆菌株中没有  $pol_{T7}$  基因, 未检测到重组菌株 DH5 $\alpha$ (pS1)明显的荧光信号, 表明  $P_{T7}$  不能启动基因表达; DH5 $\alpha$ (pS2)呈现~612 nm 特征荧光( $F_{612}$ ), 表明重组  $Pol_{T7}$  能有效提高  $P_{T7}$  对  $mrfp$  基因的表达。DH5 $\alpha$ (pS3)和 DH5 $\alpha$ (pS4) 荧光强度进一步提高, 表明在 Lac 操纵子末端插入  $T_{T3}$  终止子, 重组菌株转录活性进一步提高 ( $P<0.05$ ), 在  $P_{T7}$  操纵子末端再插入  $T_{T7}$  终止子, 重组菌株转录活性继续升高, 但未呈显著差异。由于 DH5 $\alpha$ (pS4)菌  $mrfp$  基因表达活性最高, 将质粒 pS4 转化到宿主菌  $\Delta pucBA$  中, 得到重组菌  $\Delta pucBA$ (pS4), 培养 3 d 时检测, 该重组菌可产生  $F_{612}$  (164.8)荧光, 由于  $pucBA$ d 和  $mrfp$  基因共表达且  $mrfp$  在  $pucBA$ d 下游, 由此表明,

$P_{T7}$  能在  $\Delta pucBA$  菌株中启动  $pucBA$ d 和  $mrfp$  基因表达, 但其  $F_{612}$  明显低于 DH5 $\alpha$ (pS4)菌株。

$\Delta pucBA$ (pS4)菌株  $OD_{875}$  (高光)和  $OD_{881}$  (低光)归一化的吸收光谱如图 2C 和 2D 所示。对照菌株呈现 2 个 NIR 特征峰 P1 和 P2, 高光 (2 000 lx)时 P1 和 P2 位于~804 nm 和~875 nm, 低光(200 lx, 6 d)时峰位位于~804 nm 和~881 nm。由于  $pucBA$ d 基因表达合成的产物为 LH4, 其 NIR 光谱仅呈现~800 nm 特征峰<sup>[1-2]</sup>。从归一化 NIR 光谱可直观地看到  $\Delta pucBA$ (pS4)在高光和低光培养时  $OD_{804}$  均高于对照菌株, 表明  $P_{T7}$  能够在  $\Delta pucBA$ (pS4)重组菌株中启动  $pucBA$ d 基因表达, 但 LH4 合成量并不高, 有待进一步提高。

### 2.2 不同启动子重组菌生长特征

#### 2.2.1 重组基因表达

为了选择高活性的启动子, 用启动子  $P_{badR}$ 、 $P_{pckA}$  和  $P_{ars}$  替换 pS4 质粒中的  $P_{T7}$ , 分别转化 DH5 $\alpha$  和  $\Delta pucBA$  菌株, 重组菌的荧光检测如图 3A 和图 3B 所示。在 DH5 $\alpha$  宿主菌中, 4 个启动子重组菌株  $mrfp$  基因表达量( $F_{612}$ )高低顺序为

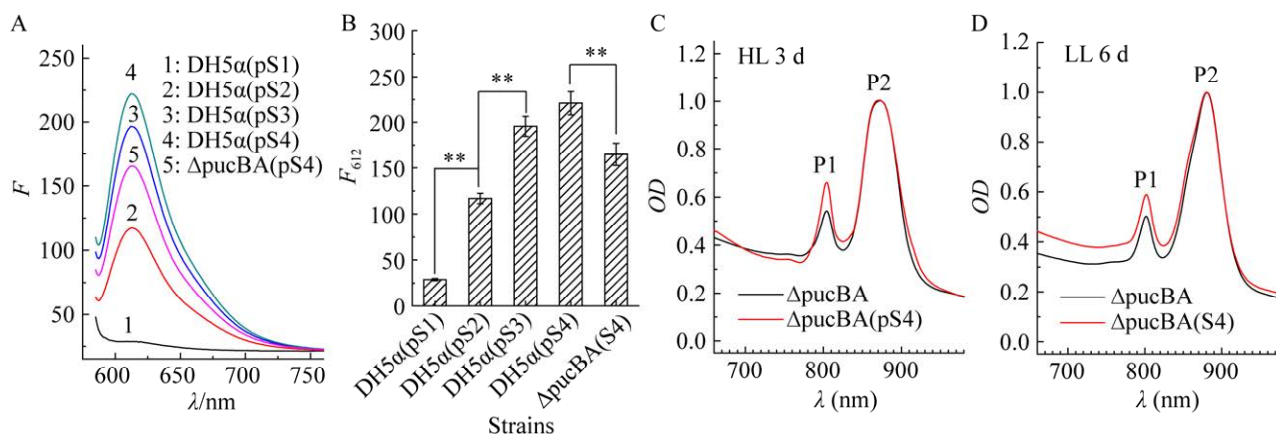


图 2 重组菌  $mrfp$  和  $pucBA$ d 基因表达的检测 A 和 B:  $mrfp$  基因产物的荧光检测. C 和 D:  $pucBA$ d 基因产物的吸收光谱. HL: 高光; LL: 低光. \*\*:  $P<0.01$

Figure 2 Detection of  $mrfp$  and  $pucBA$ d gene expression in recombinant bacteria. A and B: Fluorescence detection of  $mrfp$  gene products. C and D: NIR spectra of  $pucBA$ d gene products. HL: High light; LL: Low light. \*\*:  $P<0.01$ .

$P_{pckA} > P_{ars} > P_{badR} > P_{T7}$  (图 3A)。在  $\Delta pucBA$  宿主菌中, 4 个启动子表达 RFP 的高低顺序与 DH5 $\alpha$  一致(图 3B), 但表达量降低, 这可能是宿主差异所致。在高光和低光条件下, 不同启动子重组  $\Delta pucBA$  菌株归一化( $OD_{875}$  和  $OD_{881}$ )的 NIR 吸收光谱如图 3C 和 3D 所示, 由于 *pucBAD* 表达合成的 LH4 具有~800 nm 特征光谱<sup>[2]</sup>, P2 特征峰归一, P1 特征峰越高, 表明菌株 LH4 合成能力越高。由此可知, 重组菌 LH4 合成量由高到低启动子顺序依次为  $P_{pckA}$ 、 $P_{ars}$ 、 $P_{badR}$  和  $P_{T7}$ , 与荧光检测表达 RFP 的启动子顺序一致; 进而表明, 重组菌共表达的 *pucBAD* 基因与报告基因 (*mrfp*) 的表达量呈正相关关系。

### 2.2.2 重组菌的光合生长

不同启动子对宿主菌为  $\Delta pucBA$  重组菌光合生长的影响如图 4 所示。高光(HL)下菌株的生长曲线和培养 2 d 时的生物量( $OD_{660}$ )结果显示, 不同重组菌生长速率由高到低的顺序依次为  $P_{pckA} > P_{ars} \approx P_{badR} > P_{T7} > CK$  (图 4A 和 4C)。低光(LL)下菌株生长曲线和培养 5 d 时生物量( $OD_{660}$ )的结果显示, 重组菌生长速率由高到低的顺序

为  $P_{pckA} > P_{ars} \approx P_{badR} \approx P_{T7} > CK$ ,  $P_{ars}$  和  $P_{T7}$  之间有显著差异( $P < 0.05$ ) (图 4B 和 4D)。高光和低光条件下, 重组菌株生长速率高低子的启动顺序一致, 但显著性不同。高光强时  $P_{ars}$  和  $P_{badR}$  之间无显著差异, 低光强时  $P_{ars}$  与  $P_{badR}$ 、 $P_{badR}$  与  $P_{T7}$  之间无显著差异。重组菌生长速率的高低顺序, 与 *mrfp* 和 *pucBAD* 基因产物表达量的启动子顺序一致(图 3), 但不同方法测定结果的显著性差异不同。由此可见, 在选择的光照条件下, 启动子活性高, 有利于目的基因的表达, 促进菌体的光合生长。其原因是 LH4 具有光吸收和光传递作用, 启动子活性高, 重组菌 *pucBAD* 表达 LH4 合成量升高, 提高了菌株的光合作用效率。

### 2.3 不同 *pucBA* 基因重组菌的生长特征

由于  $\Delta pucBA(P_{pckA})$  重组菌的 *pucBAD* 和 *mrfp* 基因表达量最高, 进一步将  $\Delta pucBA(P_{pckA})$  的 *pucBAD* 基因替换成 *pucBAa* 基因, 构建重组菌  $\Delta pucBA(pucBAa)$ , 或称 *pucBAa* 菌株。为了便于描述, 将  $\Delta pucBA(P_{pckA})$  称为  $\Delta pucBA(pucBAD)$ , 或 *pucBAD* 菌株。在 2 000 lx 培养 3 d, 筛选的 *pucBAa* 菌株 *mrfp* 表达量( $F_{612}$ )为  $702.3 \pm 14.8$ ,

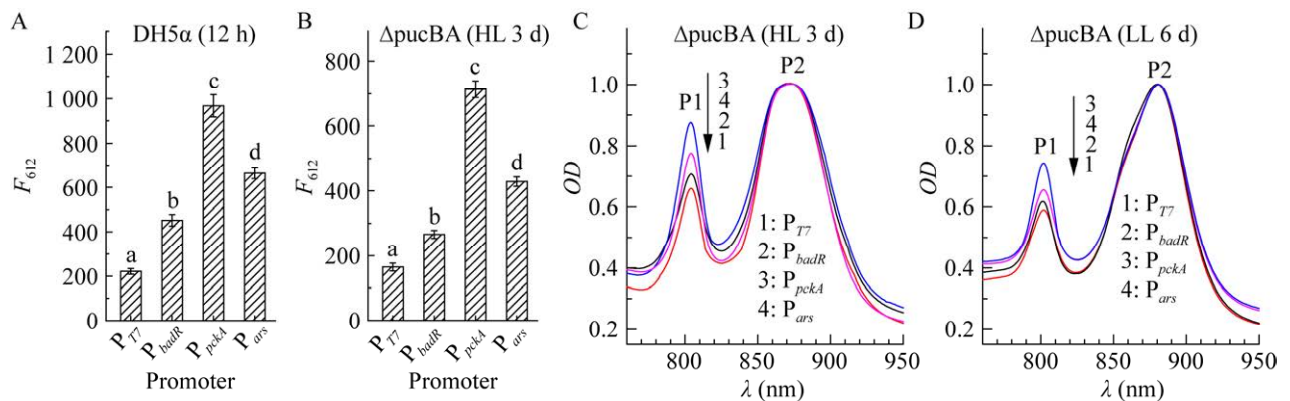


图 3 启动子对重组菌 *mrfp* 和 *pucBAD* 基因表达的影响 A 和 B: *mrfp* 基因产物的荧光检测. C 和 D: *pucBAD* 基因产物的吸收光谱. a、b、c、d 字母间有显著性差异( $P < 0.05$ )

Figure 3 Effects of promoters on expression of recombinant *mrfp* and *pucBAD* genes. A and B: Fluorescence detection of *mrfp* gene products. C and D: NIR spectra of *pucBAD* gene products. a, b, c and d represent significance differences ( $P < 0.05$ ) among different letters.



*pucBA*d 菌株为  $713.6 \pm 25.1$ , 表明在重组菌生长过程中 *pucBA*a 和 *pucBA*d 基因转录表达量没有显著差异。图 5A 结果显示:在高光强下,*pucBA*d 菌株的生长速率高于 *pucBA*a 菌株,但二者无显著差异( $P < 0.05$ );在低光时, *pucBA*d 菌株 4 d 和 5 d 时的生物量( $OD_{660}$ )显著高于 *pucBA*a 菌株

( $P < 0.05$ )。由此说明, *pucBA*d 基因编码的 LH2 (d-LH2)比 *pucBA*a 基因编码的 LH2 (a-LH2)光能吸收和光能传递活性高,由于 d-LH2 光能吸收和光能传递活性高,高光时对菌体光损伤作用较大,对菌体生长有抑制作用,这可能是 *pucBA*d 菌株生长速率在低光时能显著提高,而

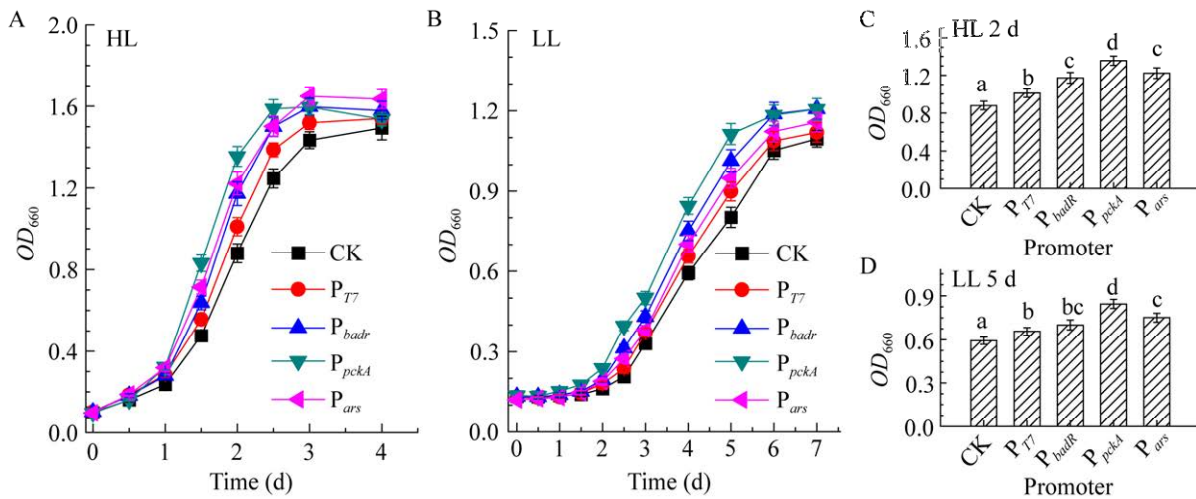


图 4 启动子对  $\Delta pucBA$  重组菌生长的影响 A 和 C: 高光(HL). B 和 D: 低光(LL). a、b、c、d 字母间有显著性差异( $P < 0.05$ )

Figure 4 Effects of promoters on growth of  $\Delta pucBA$  recombinant bacteria. Under high light (A and C) and low light (B and D); a, b, c and d represent significant differences among different letters ( $P < 0.05$ ).

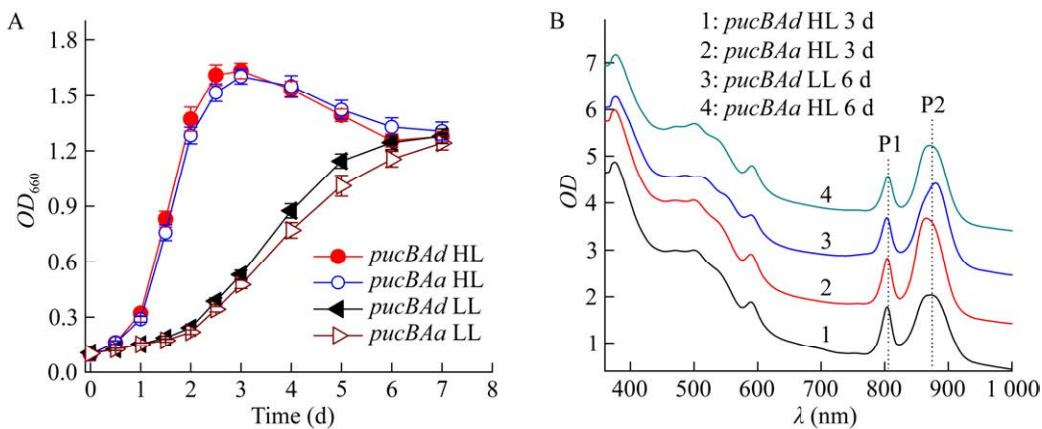


图 5 高光(HL)和低光(LL)下 $\Delta pucBA(pucBA$ d)和 $\Delta pucBA(pucBA$ a)菌株的生长曲线(A)和  $OD_{660}$  归一化处理的活细胞吸收光谱(B) 光谱曲线依次平移 1 个单位

Figure 5 Growth curves (A) and living cell absorption spectra at  $OD_{660}$  normalized (B) of  $\Delta pucBA(pucBA$ d) and  $\Delta pucBA(pucBA$ a) recombinants under high light (HL) and low light (LL). Spectral curves shifted upward by 1 unit in turn.

在高光时未能显著升高的原因。图 5B 结果显示：由于 a-LH2 呈现~800 nm 和~850 nm NIR 特征峰<sup>[1]</sup>，宿主菌表达的 LH2 与 LH1-RC 吸收光谱叠加，导致宿主菌 P2 特征光谱紫移。与 *pucBA*d 菌株相比，高光时 *pucBA*a 菌株 P2 特征峰由~875 nm 紫移至~865 nm，低光时由 881 nm 紫移至~867 nm；表明重组菌中 *pucBA*a 基因能够表达组装形成 LH2，但光谱特征难以反映 d-LH2 和 a-LH2 相对含量的高低，其原因是这 2 种 LH2 具有不同的特征光谱。

#### 2.4 LH2 分离纯化与光谱特征

纯化 LH2 吸收光谱和荧光光谱如图 6 所示。*pucBA* 基因表达的  $\alpha\beta$  肽与宿主菌光合色素组装成具有特征光谱的 LH2，野生株 LH2 (WT-LH2) 呈现 374、590、804 和 855 nm BChl a 的特征吸收光谱，以及~466、~494 和~525 nm Car 特征吸收光谱(图 6A)。除了 NIR 光谱区 855 nm 特征峰缺失，呈现 804 nm 强吸收峰外，纯化的 d-LH2 其他特征峰与 WT-LH2 一致(图 6A)，这与文献报道的基因敲除只保留 *pucBA*d 基因的 *Rps. palustris* CGA009 菌株和 2.1.6 菌株纯化 LH4 呈现 B800-only 的特征光谱一致<sup>[1-2]</sup>，但不同特征峰之间的比值略有差异；纯化的 a-LH2 与 WT-LH2 特征峰一致(图 6A)，呈现 T-LH2 的特征，与文献<sup>[1]</sup>报道的基因敲除仅保留 *pucBA*a 基因的 *Rps. palustris* 2.1.6 菌株纯化的 LH2 特征光谱一致，但各个特征峰之间的比值有所不同。LH2  $\alpha$  肽分子量~6.3 kDa， $\beta$  肽~5.7 kDa， $\gamma$  肽~8.2 kDa，其中  $\gamma$  肽并非 LH2 必需成分，有的文献纯化 LH2 电泳结果显示  $\gamma$  肽条带<sup>[2]</sup>，有的则不显示<sup>[5]</sup>。Tricine-SDS-PAGE 结果如图 6B 显示：纯化的 3 种 LH2 均在 4.2–8.0 kDa 之间呈现一条较明亮条带，与 LH2  $\alpha\beta$  肽重叠相吻合，>8 kDa 呈现一条微弱的条带，与 LH2  $\gamma$  肽分子量相吻合，与文献<sup>[2,5]</sup>报道结果基本一致。

用 494 nm 光激发，WT-LH2 和 a-LH2 均能产生~863 nm 特征荧光光谱，d-LH2 产生~865 nm 特征荧光光谱(图 6C)，表明 LH2 具有分子内 Car 到 BChl 能量传递。用 863 nm 作为发射光谱，LH2 的荧光激发光谱如图 6D 所示，其特征光谱与吸收光谱的特征峰一致，表明这 3 种 LH2 均能将其吸收的光谱产生 863 nm 的荧光。光合色素含量测定结果显示，纯化 WT-LH2、d-LH2 和 a-LH2 的 BChl 与 Car 摩尔比分别为  $(2.89\pm 0.03):1$ 、 $(2.96\pm 0.04):1$  和  $(3.15\pm 0.03):1$ ，与理论值 3:1 比例和文献报道相吻合<sup>[2]</sup>，表明重组 LH2 与原菌株 LH2 结构和特征光谱一致。

#### 2.5 LH2 光能传递活性

经典的 LH2 (T-LH2) 分子内 Car 到 BChl 光能传递效率，通常通过归一化(590 nm)的吸收光谱和激发光谱的数据计算 LH2 光能传递效率，如图 7 所示。经过测定和计算 WT-LH2、a-LH2 和 d-LH2 分子内 Car 到 BChl 光能传递效率分别为  $(47.3\pm 0.8)\%$ 、 $(45.6\pm 0.6)\%$  和  $(44.2\pm 0.5)\%$ ，光能传递效率由高到低的顺序为 WT-LH2>a-LH2>d-LH2。由此可见，U-LH2 (d-LH2) 的 Car 到 BChl 光能传递效率低于 T-LH2 (a-LH2 和 WT-LH2)，这与 *pucBA*a 和 *pucBA*d 重组菌在低光生长速率结果(图 5)相矛盾。说明这种方法可反映 LH2 分子内 Car 到 BChl 光能传递活性，但不能反映将光能传递到~863 nm 被 LH1-RC 吸收的活性。

依据图 6B 数据计算了不同 LH2 发射到~863 nm 量子效率( $\Phi$ )的比值，d-LH2 与 a-LH2 量子效率的比值( $\Phi_{d-LH2}/\Phi_{a-LH2}$ )为 1.21、 $\Phi_{d-LH2}/\Phi_{WT-LH2}$  为 1.16，U-LH2 (d-LH2) 的量子效率高于 T-LH2 (a-LH2 和 WT-LH2)，这与 *pucBA*d 和 *pucBA*a 重组菌在低光强生长速率的结果(图 5A)一致。由此表明，相较于 T-LH，U-LH2 能够将更多的光子传递至 LH1-RC，更有利于菌体适应低光环境生长。

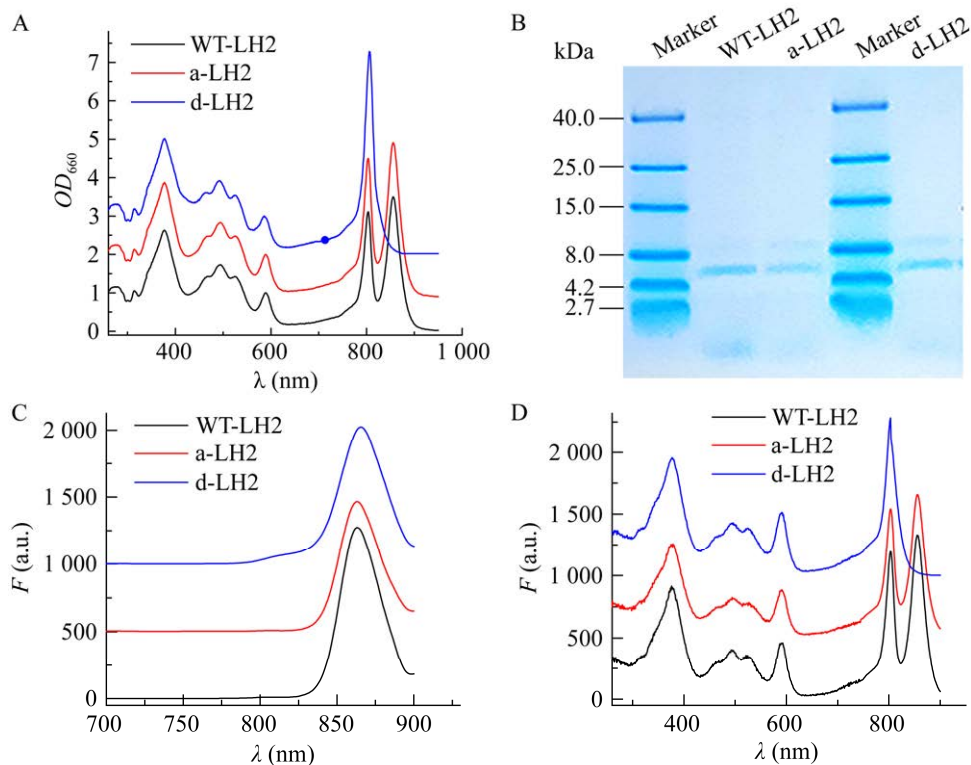


图 6 不同菌株纯化 LH2 的光谱特征和电泳检测 A: 吸收光谱( $OD_{590}$  归一). B: Tricine-SDS-PAGE. C: 荧光发射光谱( $\lambda_{Ex}$ : 494 nm). D: 荧光激发光谱( $\lambda_{Em}$ : 863 nm). 吸收光谱曲线依次平移 1 单位, 荧光光谱曲线平移 500 个单位

Figure 6 Spectral characteristics and electrophoretic detection of purified LH2 from different strains. A: Absorption spectra ( $OD_{590}$  normalized). B: Tricine-SDS-PAGE. C: Fluorescence emission spectra ( $\lambda_{Ex}=494$  nm). D: Fluorescence excitation spectra ( $\lambda_{Em}=863$  nm). Absorption spectra were shifted by 1 unit in turn, and fluorescence spectra were shifted by 500 units.

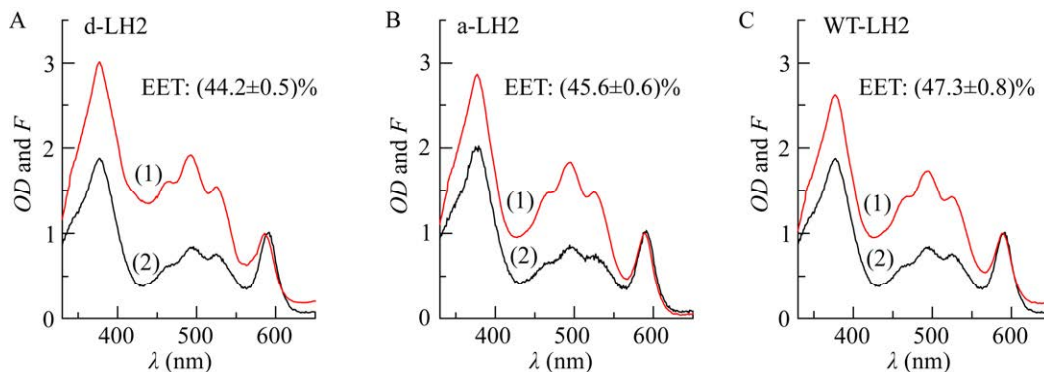


图 7 LH2 光能传递效率的测定 A: d-LH2. B: a-LH2. C: WT-LH2. 吸收光谱(1)和荧光激发光谱(2)在 590 nm 归一

Figure 7 Determination of LH2 light transfer efficiency. A: d-LH2. B: a-LH2. C: WT-LH2. Absorption spectra (1) and fluorescence excitation spectra (2) were normalized at 590 nm.

## 3 讨论

### 3.1 LH2 克隆表达系统宿主菌的适用性

目前用于 LH2 表达的宿主菌单一,集中于 *Rba. sphaeroides* 的不同突变株。由于 LH2 是由 *pucBA* 基因表达的  $\alpha\beta$  肽与光合色素(Car 和 BChl)组装形成, Kakitani 等<sup>[23]</sup>研究表明,由于  $\alpha\beta$  肽一级结构不同,其对光合色素的识别组装具有高度的选择性。如 *Rvi. gelatinosus* 菌株同时具有球形烯系和螺菌黄质系 Car 合成途径, LH2 的合成选择共轭链较短的球形烯系 Car, 而共轭链较长的螺菌黄质系 Car 选择性地与 RC 结合。在 *Rba. sphaeroides* DD13 中克隆表达 *Rps. palustris* 2.1.6 的 *pucBA<sub>d</sub>* 基因,不能合成 LH4, 虽然 *pucBA<sub>a</sub>* 能合成 LH2<sup>[23]</sup>, 但其 Car 特征性三指峰不同,其  $A_{800}/A_{850}$  比值明显偏低,表明重组表达 LH2 的结构特征与原菌株不同<sup>[1]</sup>。其原因是 *Rba. sphaeroides* 具有球形烯系 Car 和 BChl *a*, 而 *Rps. palustris* 具有螺菌黄质系 Car 和 BChl, 二者 Car 共轭链长度不同,其特征光谱明显不同。由此可见,因为不同种(株)的光合色素不尽相同, *pucBA* 基因编码的  $\alpha\beta$  肽氨基酸序列同源一致性也各异,一种宿主菌难以适用于外源含有不同光合色素菌株 LH2 的合成,尽管有些不同菌株的光合色素能够在 *Rba. sphaeroides* 中合成并表达 LH2, 但其结构和功能与原菌株不同,不能用于原菌株 LH2 结构和功能的分析。

红假单胞菌属具有高达 5-7 拷贝 *pucBA* 基因,但迄今未报道以红假单胞菌属菌株为宿主菌的 LH2 表达系统,目前主要靠基因敲除仅保留其中一个 *pucBA* 基因的方法,纯化获得单一基因型 LH2,用于其结构和功能的研究,这种制备单一基因型 LH2 方法不但烦琐费时,而且不同突变株之间不能用于不同 LH2 活性的比较

测定。鉴于此,本文以 *Rps. palustris* CGA009 菌株 5 对 *pucBA* 基因全部缺失的菌株作为宿主菌,保留菌株中的 LH1-RC 的相关基因,通过对表达载体的改造和启动子筛选,建立了适合于红假单胞菌属菌株多拷贝 LH2 克隆与表达系统。其特点是 *pucBA* 基因和 *mrfp* 基因共表达, *mrfp* 荧光信号便于重组子筛选,也可反映 *pucBA* 基因表达量;该表达系统不但能分离纯化得到单一基因型 LH2,用于其结构和性质的研究,也能够通过比较重组菌的光合生长速率来体现不同 LH2 光能传递活性的差异。

### 3.2 LH2 光能传递活性的评价体系

目前的观点认为 U-LH2 更有利于菌株适应低光环境进行光合生长,其证据主要是同一菌株中 U-LH2 具有更高的 Car 到 BChl 光能传递效率;但目前仅有固氮红细菌(*Rba. azotoformans*) 134K20 和酒色别样着色菌(*Allochromatium vinosum*)等极个别菌株的证据支持这一观点,即在低光强下纯化的 U-LH2 中的 Car 到 BChl 光能传递效率高于高光强下纯化的 T-LH2<sup>[5,14]</sup>。本课题组前期研究发现,低光条件下从 CGA009 菌株纯化的 LH4,其 Car 到 BChl 光能传递效率低于高光强下纯化的 T-LH2<sup>[5]</sup>,但 LH4 将 Car 激发光产生 863 nm 荧光的量子效率( $\Phi$ )却高于高光 T-LH2,由此我们建立了一种通过 2 种 LH2 量子效率比值评估 LH2 光能传递效率的方法,并且解释了尽管 LH4 Car 到 BChl 光能传递效率低,却具有高量子效率原因。其原因是 LH4 只有~800 nm 特征峰,而没有~850 nm 强吸收峰,而 T-LH2 却具有~850 nm 强吸收峰,与 863 nm 荧光峰有重叠,将导致 863 nm 特征荧光量子效率低,因此传递到 LH1-RC 光子数量减少<sup>[5]</sup>。虽然这些研究结果能够明确菌株中 U-LH2 的能量传递高于 T-LH2,但目前文献报道的纯化的 LH2 往往是多对 *pucBA* 基因编码 LH2 的混合

物, 如纯化的 LH4 基本上呈现 B800-low-850 LH2 特征光谱<sup>[5]</sup>, 不是 B800-only, 显然不纯, 而高光下纯化的 LH2 也可能是多种 LH2 混合物<sup>[5,9]</sup>。由此可见, 同一菌株中多拷贝 *pucBA* 评价的并不是单一基因纯的 LH2 的光能传递活性。另外, LH2 与菌株的光合生长息息相关, 理论上推测 LH2 能量传递活性高, 有利于菌株适应低光环境生长, 但尚未检索到 LH2 活性的高低与菌株光合生长关系的证据。

由于 CGA009 菌株在高光环境中主要合成 *pucBAa* 基因编码 LH2 (a-LH2), 低光强主要合成 *pucBA d* 基因编码的 LH4 (d-LH2)<sup>[9]</sup>。本文通过基因重组方法获得了单一 *pucBA* 基因重组菌, 采用体内和体外方法比较了这 2 种 LH2 的光能传递活性。在体内通过菌株光合生长速率的方法评价 LH2 活性应该是最根本的方法, 但迄今未见报道。本文测定结果显示, 在低光 (200 lx) 环境中, d-LH2 重组菌的生长速率显著高于 a-LH2 菌株 ( $P < 0.05$ ), 由此表明 d-LH2 光能传递活性高于 a-LH2; 但在高光条件下, d-LH2 菌株生长速率呈现升高的趋势, 却未呈现显著差异 ( $P > 0.05$ ); 其可能的原因是由于菌株在高光环境中, 菌株的生长速率是菌体光合生长和光损伤的综合体现, 由于 d-LH2 光能传递活性高, 则光损伤作用也大, 这可能是 APB 在进化上选择在低光环境表达 U-LH2, 在高光环境选择表达 T-LH2 的理由, 但这一观点是否具有普遍性, 还需要更多菌株 LH2 活性的证据。本文首次在菌株体内比较了同一菌株不同光谱类型 LH2 的活性, 为 LH2 活性评价提供了光合生长方面的证据。

本文纯化 LH2 的结果显示, 经典方法测定的 d-LH2 从 Car 到 BChl 的光能传递效率小于 a-LH2, 但荧光量子效率却大于 a-LH2。经典方法与菌株光合生长速率评价结果不一致, 表明

该方法只反映了 Car 到 BChl 光能传递效率, 而未能反映 LH2 Car 将吸收的光谱转移至 LH1-RC (~863 nm) 光能的效率。后者与菌株光合生长的生长速率评价结果一致, 是以 LH2 Car 将吸收的光能直接传递到 LH1-RC (~863 nm) 荧光量子效率作为评价指标, 该法更适合不同光谱型 LH2 活性的评价, 其优势是不需要测定 LH2 绝对浓度, 从理论上分析非色素蛋白复合体的杂蛋白不影响 LH2 量子效率比值的测定, 但不足之处是由于 LH2 难以绝对定量, 测定的结果是 2 种 LH2 量子效率的比值。CGA009 菌株中具有 5 对 *pucBA* 基因, 其他 3 对编码 LH2 的活性有待进一步评价。

## 4 结论

本文以 *Rps. palustris* CGA009 的 5 对 *pucBA* 基因全部缺失突变株为宿主菌, pBBRMCS-2 为表达载体, 构建了适合于沼泽红假单胞菌属的 LH2 重组表达系统, 纯化的 LH2 特征光谱与基因敲除法结果一致; 重组表达了 CGA009 野生菌在高低光下分别优势表达的 *pucBAa* 和 *pucBA d* 基因编码的 LH2, 通过 3 种方法比较了这 2 种重组 LH2 的光能传递活性, 进一步证明低光环境中表达的 U-LH2 的光能传递活性高于高光下表达 T-LH2 的活性。本文首次通过菌株的光合生长特征评价了 LH2 光能传递活性, 为 APB 在进化上选择在低光环境中表达 U-LH2 提供了依据。

## REFERENCES

- [1] QIAN P, NGUYEN-PHAN CT, GARDINER AT, CROLL TI, ROSZAK AW, SOUTHALL J, JACKSON PJ, VASILEV C, CASTRO-HARTMANN P, SADER K, HUNTER CN, COGDELL RJ. Cryo-EM structures of light-harvesting 2 complexes from *Rhodospseudomonas palustris* reveal the molecular origin of absorption

- tuning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(43): e2210109119.
- [2] SOUTHALL J, HENRY SL, GARDINER AT, ROSZAK AW, MULLEN W, CAREY AM, KELLY SM, de PERCIN NORTHUMBERLAND CO, COGDELL RJ. Characterisation of a *pucBA* deletion mutant from *Rhodospseudomonas palustris* lacking all but the *pucBA<sub>d</sub>* genes[J]. Photosynthesis Research, 2018, 135(1/2/3): 9-21.
- [3] LIU LN, BRACUN L, LI M. Structural diversity and modularity of photosynthetic RC-LH1 complexes[J]. Trends in Microbiology, 2024, 32(1): 38-52.
- [4] GARDINER AT, NGUYEN-PHAN TC, COGDELL RJ. A comparative look at structural variation among RC-LH1 'Core' complexes present in anoxygenic phototrophic bacteria[J]. Photosynthesis Research, 2020, 145(2): 83-96.
- [5] 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.
- [6] GARDINER AT, NIEDZWIEDZKI DM, COGDELL RJ. Adaptation of *Rhodospseudomonas acidophila* strain 7050 to growth at different light intensities: what are the benefits to changing the type of LH2?[J]. Faraday Discussions, 2018, 207: 471-489.
- [7] KOTECHA A, GEORGIU T, PAPIZ MZ. Evolution of low-light adapted peripheral light-harvesting complexes in strains of *Rhodospseudomonas palustris*[J]. Photosynthesis Research, 2013, 114(3): 155-164.
- [8] McLUSKEY K, PRINCE SM, COGDELL RJ, ISAACS NW. The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodospseudomonas acidophila* strain 7050[J]. Biochemistry, 2001, 40(30): 8783-8789.
- [9] FIXEN KR, ODA Y, HARWOOD CS. Clades of photosynthetic bacteria belonging to the genus *Rhodospseudomonas* show marked diversity in light-harvesting antenna complex gene composition and expression[J]. mSystems, 2015, 1(1): e00006-15.
- [10] HARTIGAN N, THARIA HA, SWEENEY F, LAWLESS AM, PAPIZ MZ. The 7.5-Å electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodospseudomonas palustris*[J]. Biophysical Journal, 2002, 82(2): 963-977.
- [11] BRODOSUDARMO 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]. The Biochemical Journal, 2011, 440(1): 51-61.
- [12] SERDYUK OP, SMOLYGINA LD, ASHIKHMIN AA. A new type of light-harvesting complex detected when growing *Rhodospseudomonas palustris* under low light intensity conditions[J]. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2020, 491(1): 101-104.
- [13] SERDYUK OP, ABDULLATYPOV AV, SMOLYGINA LD, ASHIKHMIN AA, BOLSHAKOV MA. Simultaneous functioning of different light-harvesting complexes-a strategy of adaptation of purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris* to low illumination conditions[J]. PeerJ, 2023, 11: e14769.
- [14] LI K, ZHAO CG, YUE HY, YANG SP. A unique low light adaptation mechanism in *Rhodobacter azotoformans*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(12): 1350-1357.
- [15] JONES MR, FOWLER GJS, GIBSON LCD, GRIEF GG, OLSEN JD, CRIELAARD W, HUNTER CN. Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-centre, LH1, and LH2 genes[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(9): 1173-1184.
- [16] ZENG XH, CHOUDHARY M, KAPLAN S. A second and unusual *pucBA* operon of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: genetics and function of the encoded polypeptides[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(20): 6171-6184.
- [17] WANG WN, HU ZL, LI JZ, CHEN GP. Expression characterization and actual function of the second *pucBA* in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Bioscience Reports, 2009, 29(3): 165-172.
- [18] ZHAO ZP, HU ZL, LIANG Y, HU TZ, TU Y, CHEN GP. One-step purification of functional light-harvesting 2 complex from *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Protein and Peptide Letters, 2010, 17(4): 444-448.
- [19] TADROS MH, KATSIU E, HOON MA, YURKOVA N, RAMJI DP. Cloning of a new antenna gene cluster and expression analysis of the antenna gene family of *Rhodospseudomonas palustris*[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 217(3): 867-875.
- [20] WANG WN, HU ZL, CHEN XQ, ZHAO ZP, LI JZ, CHEN GP. Heterologous synthesis and assembly of



- functional LHII antenna complexes from *Rhodovulum sulfidophilum* in *Rhodobacter sphaeroides* mutant[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(7): 1695-1702.
- [21] FOWLER GJS, HUNTER CN. The synthesis and assembly of functional high and low light LH2 antenna complexes from *Rhodopseudomonas palustris* in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(23): 13356-13361.
- [22] ZHAO ZP, HU ZL, NIE X, CHENG LJ, DING GL, LUO M, PAN Y, LIANG Y, CHEN GP. A novel *Rhodobacter sphaeroides* expression system for real-time evaluation of heterologous protein expression levels[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2011, 18(6): 568-572.
- [23] KAKITANI Y, FUJII R, HAYAKAWA Y, KURAHASHI M, KOYAMA Y, HARADA J, SHIMADA K. 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.
- [24] IMMETHUN CM, KATHOL M, CHANGA T, SAHA R. Synthetic biology tool development advances predictable gene expression in the metabolically versatile soil bacterium *Rhodopseudomonas palustris*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 800734.
- [25] BRITTON G. General carotenoid methods[J]. *Methods in Enzymology*, 1985, 111: 113-149.
- [26] SAGA Y, HIROTA K. Determination of the molar extinction coefficients of the B800 and B850 absorption bands in light-harvesting complexes 2 derived from three purple photosynthetic bacteria *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodobacter sphaeroides*, and *Phaeospirillum molischianum* by extraction of bacteriochlorophyll *a*[J]. *Analytical Sciences*, 2016, 32(7): 801-804.