

# *Rhodobacter sphaeroides* 和 *Rhodovulum sulidophilum* LHII 的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的交叉作用关系

陈国平<sup>1</sup>, 李尽哲<sup>1</sup>, 胡宗利<sup>1</sup>, 王万能<sup>1,2</sup>, 潘 宇<sup>1</sup>

(1 重庆大学 生物工程学院, 中国重庆 400044 ; 2 重庆工学院 化学与生物工程学院, 中国重庆 400030)

**摘 要:** 类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)和嗜硫小红卵菌(*Rhodovulum sulidophilum*)为不同属的两种光合细菌, 前者的捕光系统 II 由 *pucB*、*pucA* 基因编码产生的  $\beta$  亚基和  $\alpha$  亚基组装形成, 后者的捕光系统 II 由 *pucsB*、*pucsA* 基因编码产生的  $\beta$  亚基和  $\alpha$  亚基组装形成. 将这两组基因交叉组合, 克隆到包含 *puc* 启动子的表达载体中, 得到两个表达质粒即 pRKpucsBpucA 和 pRKpucBpucsA, 然后通过接合转移方法分别转入 LHI<sup>-</sup>、LHII<sup>-</sup> 和 RC 缺陷型菌株 DD13 中, 两种接合转移菌株都可以形成捕光系统 II 并进入光合细菌膜系统.

**关键词:** 嗜硫小红卵菌(*Rhodovulum sulidophilum*); 类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*); 捕光系统 II; 交叉组合  
中图分类号: Q36 文献标识码: A 文章编号: 1007-7847(2009)03-0215-06

## Relations on Cross-combination of $\beta$ - and $\alpha$ -polypeptides of Light Harvesting Complexes II (LHII) Between *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodovulum sulidophilum*

CHEN Guo-ping<sup>1</sup>, LI Jin-zhe<sup>1</sup>, HU Zong-li<sup>1</sup>, WANG Wan-neng<sup>1,2</sup>, PAN Yu<sup>1</sup>

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

2. Department of Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodovulum sulidophilum* belong to different generas of photosynthetic bacteria.  $\beta$ - and  $\alpha$ -polypeptides of light harvesting complexes II (LHII) in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodovulum sulidophilum* are encoded respectively by two group of homologous genes, *pucB*, *pucA* and *pucsB*, *pucsA*. The two group of genes were connected crosswise to form two new permutations, *pucB-pucsA* and *pucsB-pucA*, then cloned into the expression vector controlled by *puc* promoter coming from *Rhodobacter sphaeroides*, respectively, to yield two plasmids, PRKpucApucsB and PRKpucsApucB, which were introduced into LHI<sup>-</sup>, LHII<sup>-</sup> and RC<sup>-</sup> mutation *Rhodobacter sphaeroides* (DD13). The result showed that both of the two transconjugant strains can synthesize LHII complexes and construct into membrane system subsequently.

**Key words:** *Rhodovulum sulidophilum*; *Rhodobacter sphaeroides*; light-harvesting II; cross-combination  
(Life Science Research 2009, 13(3) 215~220)

*Rhodobacter sphaeroides* 属于  $\alpha$ -3 型紫色无硫光合细菌. 在过去的几十年中, 人们以此菌为研

究对象, 围绕光合作用机理方面对其进行了广泛而深入的研究. 研究发现其光合机构主要由 3 个

收稿日期: 2008-12-20; 修回日期: 2009-03-20

基金项目: 国家科技部“863”计划项目(2006AA02Z138); 重庆市科委自然科学基金项目(CSTC, 2007BB1198, 2007BB0250)

作者简介: 陈国平(1959-), 男, 湖北省武汉市人, 主要从事果实成熟分子调控机理、植物激素信号转导、植物胁迫分子调控机理、蛋白质表达与纯化等领域的研究工作; E-mail: chenguoqing@cqu.edu.cn

色素蛋白复合体构成：捕光色素蛋白复合体 I (LHI)、捕光色素蛋白复合体 II(LHII)和光化学反应中心(RC)<sup>[1,2]</sup>。LHII 一般是由 8 或者 9(不同种类的光合细菌亚基对数有所不同)对  $\alpha/\beta$ -亚基组成的异质二聚体，每对  $\alpha/\beta$ -亚基非共价结合 3 个 BChl 分子和 1 个 Crt 分子，因此，LHII 在 800 nm 和 850 nm 有最大红外吸收峰<sup>[3,4]</sup>。光合作用时 LHII 吸收的光能通过 LHI 传递给 RC，在 RC 中进行光化学反应，产生 ATP<sup>[5-8]</sup>。

Hunter 等人研究发现，上述 3 个蛋白复合体主要由 *puf*(编码 LHI 和 RC)和 *puc*(编码 LHII)两个基因簇编码<sup>[9,10]</sup>。调控这些光合基因的调控因子也逐渐被发现，如：PpsR、Prr、FnrL 和 IHF 等<sup>[11-14]</sup>。除此之外，这两个基因簇也受环境因子的调控，如 *Rhodobacter sphaeroides* 在较低的氧分压或者较弱光照强度下，其光合相关基因会大量表达。但是在较高的氧分压或者较强的光照条件下，相关的光合基因几乎不表达<sup>[15-19]</sup>。

*Rhodovulum sulidophilum* 是一种嗜硫光合细菌，具有多元代谢生长途径。一方面，它表现出一系列典型的非硫紫细菌的特征，如：和 *Rhodobacter sphaeroides* 和 *Rhodobacter capsulatus* 相比，其 LHI、LHII 和 RC 的结构大致相同，LHI 和 LHII 分别在 875 nm、800 nm 和 850 nm 有吸收峰等，其对应的捕光蛋白分别由类似的基因编码等<sup>[20]</sup>。另一方面，与典型紫细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 相比，它的特性在于：1)在光照很强或者高氧分压的条件下，其光合相关基因也能够表达，而其他光合细菌的光合相关基因几乎不表达；2)在表面活性剂 LDAO(十二烷基二甲基氧化胺)存在的条件下，*Rhodovulum sulidophilum* 仍然能够生长，但其类胡萝卜素的合成途径在链孢红素这一步被阻断，其外周天线蛋白的  $\alpha$  亚基中甲硫氨酸的含量较高，而且在靠近 C 末端还有一个自由的羧基半胱氨酸残基<sup>[21]</sup>。

本研究将这两种表型特征相差较远的光合细菌的 LHII 的两个亚基基因交叉组合，并构建到表达载体上，转入 LHI-RC 和 LHII 缺陷型菌株 *Rhodobacter sphaeroides* DD13 中进行表达，它对研究 LHII 的功能有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌菌株和生长条件

*Rhodobacter sphaeroides* DD13 (基因组中删

除了编码 *pucBAC*、*pufBA* 和 *RC* 的基因，基因组中插入编码新霉素抗性的基因，由 Hunter 等 1992 年构建赠送)，在 34 °C 的 M22+液体培养基(添加 20 mg/L 新霉素)上，黑暗、半好氧或者好氧条件下生长。*Rhodovulum sulidophilum*(牛津大学赠送)，在添加了 0.5 mol/L NaCl 的 LB 液体培养基上，34 °C、250 r/min 振荡培养。*Escherichia coli* JM109、S17-1，在 LB 培养基上 37 °C 培养。

### 1.2 基因克隆

根据 GenBank 里的基因序列(登录号：U81968)设计引物对 F/R，上游引物 F 包含限制性内切酶位点 *Sac*，引物序列为 5'-TATAGAGCTGCAGACGACAATATGACTGACG-3'，下游引物 R 包含限制性内切酶位点 *BamH*，引物序列为 5'-TATAGGATCCTTAAGCTTCGAACGAGCCGCTGTAGTAG-3'。采用基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)的操作说明提取 *Rhodovulum sulidophilum* 基因组 DNA，并以之为模板，PCR 扩增出 *pucsBA* 基因片段(PCR 反应体系 94 °C 5 min；94 °C 30 s、56 °C 30 s、72 °C 30 s 35 cycles；72 °C 10 min；4 °C 保存)，基因片段的长度是 330 bp，经回收纯化后连接到 pMD18-T(Takara, 大连)中，形成重组质粒 pMD18-T-pucsBA，转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞，筛选阳性克隆子并测序验证。

### 1.3 载体的构建

利用上述质粒 pMD18-T-pucsBA 和本实验室构建的 pRKpuc2BpucA\*HHT 及 pRKpucBpuc2A-1 质粒构建目的重组质粒 pMD18-T-pucsBA、pRKpucApuc2B\*HHT、pRKpucBpuc2A-1 中相关基因的连接方式如图 1(A、B、C)所示。

用 *Sac* 和 *Xba* 分别双酶切质粒 pMD18-T-SBA 和 pRKpucApuc2B\*HHT，得到 *pucsB* 基因片段和 pRKpucA 载体片段，加入 T4-DNA 连接酶，16 °C 连接过夜得到表达载体 pRKpucsBpucA；用 *Xba* 和 *BamH* 双酶切质粒 pMD18-T-SBA，pRKpucBpuc2A-1，得到基因片段 *pucsA* 和载体片段 pRKpucB，用同样的方法连接得到表达载体 pRKpucBpucsA。

### 1.4 接合转移和诱导表达

首先把质粒 pRKpucsBpucA 和 pRKpucBpucsA 通过  $\text{CaCl}_2$  转化法转入大肠杆菌 S17-1 中，再通过接合转移的方法把质粒转入 *Rhodobacter*

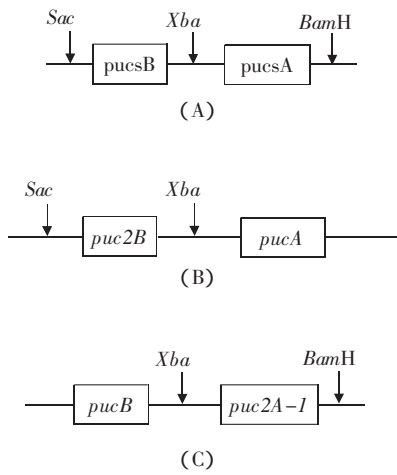


图 1 质粒 pMD18-T-pucsBA(A)、pRKpuc2BpucA\*HHT(B)、pRKpucBpuc2A-1(C)的主要基因连接图

(A) 质粒 pMD18-T-pucsBA; (B) 质粒 pRKpuc2BpucA\*HHT. *puc2B* 是 *Rhodobacter sphaeroides* 基因组中与 *pucB* 同源性很高的基因; (C) 质粒 pRKpucBpuc2A-1. *puc2A-1* 是 *Rhodobacter sphaeroides* 基因组中与 *pucA* 有一定同源性的基因.

Fig.1 The main gene on the three Plasmids: pMD18-T-pucsBA(A), pRKpuc2BpucA\*HHT(B), pRKpucBpuc2A-1(C)

(A) Plasmid pMD18-T-pucsBA; (B) Plasmid pRKpuc2BpucA\*HHT. *puc2B* has a high homology to *pucB* in genome of *Rhodobacter sphaeroides*; (C) Plasmid pRKpucBpuc2A-1. *puc2A-1* has some homology to *pucA* in genome of *Rhodobacter sphaeroides*.

划线于含有 20 mg/L 新霉素的 M22+培养基上, 34 °C, 黑暗, 倒置培养 3 d; 挑取单菌落接种于 10 mL 含有 20 mg/L 新霉素的 M22+培养液中, 34 °C, 250 r/min, 黑暗振荡培养过夜; 次日, 4 °C, 6 000 r/min, 离心 10 min 收集菌体, 1 mL LB 培养液重悬菌体; 刮取带目的质粒的 S17-1 转化菌单菌落加入 200  $\mu$ L LB 细菌重悬液中, 充分混匀, 然后滴到充分干燥的 LB 培养基上, 34 °C, 温育 6~8 h, 从 LB 培养基上刮取细菌, 1 mL M22+(只含 Vatanine) 重悬菌体, 取 100  $\mu$ L 重悬菌液涂布于 M22+培养基上 (含有四环素 4 mg/L, 新霉素: 20 mg/L), 34 °C, 黑暗培养 3~4 d 左右即可看到棕红色菌落出现, 挑取棕红色菌落进行 PCR 鉴定. 同时按照上述方法将质粒 PRK415 转入 DD13, 作为对照. 对阳性菌落的诱导表达方法为: 取 -80 °C 保藏的转化菌划线培养于 M22+培养基 (四环素: 5 mg/L, 新霉素: 20 mg/L) 上, 34 °C, 黑暗倒置培养 3 d; 挑取单菌落接种到 10 mL M22+培养液 (四环素: 4 mg/L, 新霉素 20 mg/L) 中, 34 °C, 250 r/min, 黑暗条件下振荡培养过

夜; 取过夜培养物按 1:100 接种到 M22+培养液中 (四环素: 4 mg/L, 新霉素: 20 mg/L, 培养基体积/容量瓶体积 = 20%), 34 °C, 250 r/min, 黑暗条件下振荡培养 20 h 左右; 将 180 mL 上述培养物倒入一 250 mL 三角瓶中并加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 34 °C, 150 r/min, 黑暗条件下诱导 5~8 h.

## 1.5 RT-PCR

设计了 5 对引物 puc1BF/puc1BR、puc1AF/puc1AR、*R.sulfiF* / pucsBR、pucsAF / *R.sulfiR*、ropZF / ropZR 分别扩增出 *pucB*、*pucA*、*pucsB*、*pucsA* 和 *ropZ* (对照<sup>[22]</sup>) 基因, 这 5 对引物的序列见表 1, 培养并诱导 DD13 / pRKpucsBpucA 和 DD13 / pRKpucBpucsA, 收集菌体用 RNAPure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (百泰克生物技术有限公司, 北京) 提取总 RNA, 并加入适量 DNaseI (宝生物工程大连有限公司) 去除基因组 DNA, 再用 DNaseI 终止液去除酶活性, 电泳检测质量和亮度, 分别以 puc1BR、*R.sulfiR* 和 ropZR 为后引物、以 DD13 / pRKpucBpucsA 菌的总 RNA 为模板进行 RT-PCR 操作, 同样以 pucsBR、puc1AR 和 ropZR 为后引物, 以 DD13 / pRKpucsBpucA 菌的总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 操作, 得到 6 种 cDNA 模板, 反转录程序如下: RNA 2  $\mu$ L、后引物 2  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L 混匀; 70 °C 5 min; 冰浴 5 min; 并加入 5X buffer 4  $\mu$ L、10X dNTP 2  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L 混匀; 37 °C 5 min; 向每个管中分别加入逆转录酶 RevertAid<sup>TM</sup>-MuLV RT (宝生物, 大连) 1  $\mu$ L 混匀; 42 °C 1 h; 72 °C 10 min; 4 °C 保存备用.

以这 6 个反转录产物为模板, 用这 5 对引物进行 (ropZF / R 用两次) PCR 扩增, 具体的反应程序如下: H<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L、PCR-Buffer 2.5  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L、dNTP 0.5  $\mu$ L、Taq 酶 0.25  $\mu$ L、前引物 1  $\mu$ L、后引物 1  $\mu$ L、反转录模板 1.5  $\mu$ L 混匀; 94 °C 5 min; 94 °C 30 s、56 °C 30 s、72 °C 30 s、29 cycles; 72 °C 10 min; 4 °C 保存, 得到的产物取 7.5  $\mu$ L 用 1.5% 的琼脂糖电泳检测分析.

## 1.6 提取膜蛋白

膜蛋白的提取方法如下: 1) 将诱导后的菌体加入 10 mL Binding buffer (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, 用 NaOH 调至 pH = 8.0), 含 1 mmol/L PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride, 蛋白酶抑制剂), 加入适量的溶

菌酶、DNase I, 置玻璃均浆器冰上均质 100 次, 细胞破碎率不小于 90%; 2) 将均浆液转移至冷的离心管中, 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀; 3) 取上清转移至新的冷离心管中, 于 4 °C, 14 000 r/min 离心 30 min, 上清转至新管中, 为

胞浆蛋白, 冷冻保存; 4) 取沉淀, 加入 5 mL Binding buffer(0.1% LDAO, lauryl dimethyl amine oxide, 去垢剂), 涡旋振荡混匀后, 4 °C 放置 5~10 min; 5) 4 °C, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液转移至新管中保存。

表 1 扩增基因的 5 对引物

Table 1 The five pairs of primers amplifying the related genes

Name of the primers	Sequence of the primers
puc1BF	AAGAGCTCCATATGACTGACGATCTGAACAAAG
puc1BR	TTTCTAGATCAGCCGAGCCACGGGGTTCGAGCGGGC
puc1AF	TTTCTAGACATGACCAACGGCAAAATCTGGCTCG
puc1AR	AAGGATCCTTACTCGCCGCGACCGCAGCCGAGCCTTG
R.sulf1F	TATAGAGCTGCAGACGACAATATGACTGACG
pucsBR	GCAGCCAGGAAGTGGGCCAAC
pucsAF	CACCGTTGGCATTCCGCTCTT
R.sulf1R	TATAGGATCCTTAAGCTTCGAACGAGCCGCTGTAGTAG
ropZF	ATCGCGGAAGAGACCCAGAG
ropZR	GAGCAGCGCCATCTGATCCT

## 1.7 近红外光谱分析

采用分光光度计 Lambda 900 UV/VIS/NIR Spectrometer (美国), 以 DD13/Prk415 膜蛋白提取液为参比, 在 700~900 nm 波长范围内扫描转化菌 DD13、DD13 / pRKpucsBpucA、DD13 / pRK-pucBpucsA 和 DD13 / pRKpucBpucA 相对应的膜蛋白提取液。

## 2 结果

### 2.1 基因和蛋白序列比对

通过 DNAMAN (生物分析软件) 对 *pucA*、*pucsA*、*pucB* 和 *pucsB* 进行了基因和蛋白序列比对, 发现 *pucsA* 和 *pucA* 的基因序列相似度较低, 只有 61.21%, 而 *pucsB* 和 *pucB* 的碱基数相等且基因序列相似度较高, 达到 77.01%。*pucsA* 和 *pucA* 的蛋白序列相似度更低, 只有 53.70%, 对蛋白中的各种氨基酸含量分析发现, *pucA* 和 *pucsA* 中均含有大量的 Ala(丙氨酸)和 Val(缬氨酸), 但是 *pucsA* 中含有大量的 Leu(亮氨酸), 而且含有多达 4 个 Met(甲硫氨酸 1, 6, 33, 40), 在其 C 端有一个羧基组, 在 23 位有一个罕见的 Cys(半胱氨酸); *pucB* 和 *pucsB* 序列相似度更高, 达到 83.25%, 二者中都含有大量的 Ala(丙氨酸)和 Leu(亮氨酸), 但是前者含有大量的 Gly(甘氨酸), 而后者含有大量的 Thr(苏氨酸); 这 4 个多肽中都含有保守的组氨酸残基, 离这个保守的组氨酸不远处都有 1~2 个芳香族氨基酸残基。

### 2.2 蛋白序列分析及二级结构预测

通过 CLC Protein Workbench 3 对 *pucA*、*pucsA*、*pucB* 和 *pucsB* 进行了氨基酸序列分析, 发现这 4 个短的多肽都具有典型的膜蛋白的特征, *pucA* 和 *pucsA* 两端部分亲水性较强, 中间部分疏水性较强; 而 *pucB* 和 *pucsB* 则刚好相反, 即两端疏水性较强, 而中间亲水性很强。用 PSIPRED 服务器(Position Specific Iterated PRED Server)对这 4 个多肽进行了二级结构预测, 发现这 *pucA* 和 *pucsA* 的二级结构几乎完全形同, 都形成  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠, 而且形成的位置也基本相同; 而 *pucB* 和 *pucsB* 结构稍微有点差异, 即, 在 *pucB* 第一个  $\alpha$  螺末端有个小的  $\beta$  折叠尾巴。如图 2 所示。

### 2.3 基因表达分析

从图 3 中, 我们可以发现, 相对于对照 *ropZ* 基因, 两个转化子中的基因都得到了较强的转录表达, 说明 pRK 载体上有一个比较强的启动子。

### 2.4 近红外光谱分析

通过光谱分析发现: DD13 的膜蛋白在 800 nm 和 850 nm 左右没有出现特征峰, 而转化菌 DD13/PRKpucsBpucA、DD13/PRKpucBpucsA 的膜蛋白在 800 nm 和 850 nm 左右出现了典型的吸收峰, 但是吸收峰发生了略微的蓝移, 而且相对于 DD13/pRKpucBpucA 来说, 两个含有杂合基因转化子的光合细菌的膜蛋白的特征吸收峰明显偏低。如图 4 所示。

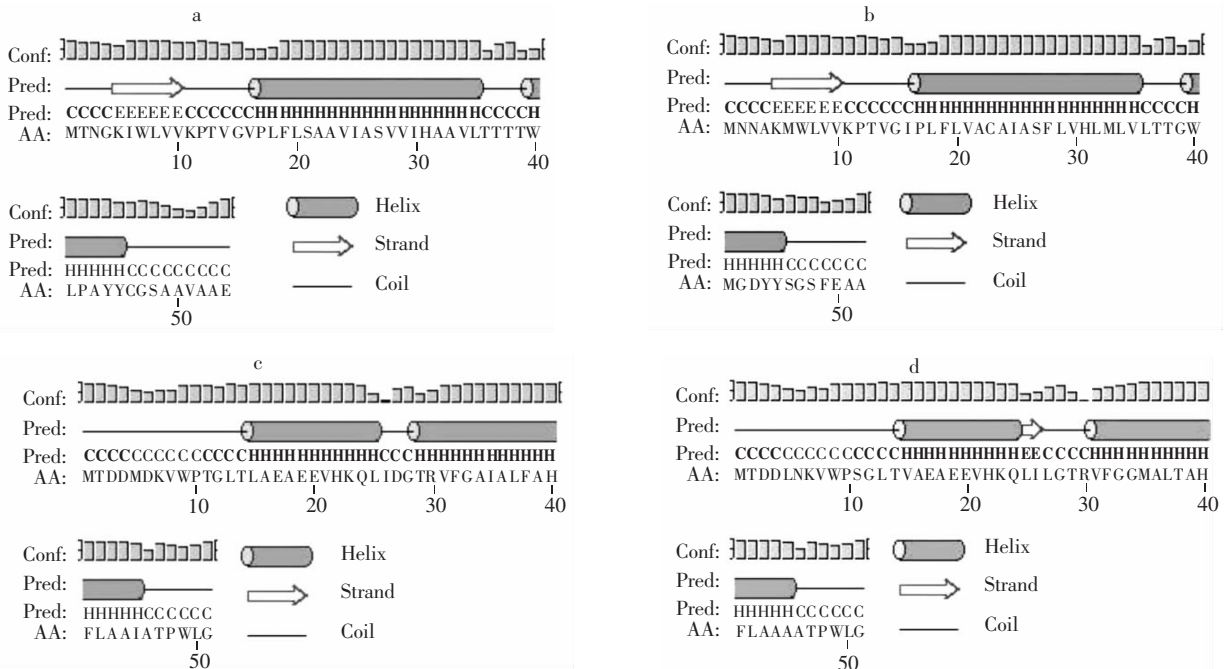


图2 *Rhodobacter sphaeroides* 的 *pucA*(a)、*pucB*(d) 和 *Rhodovulum sulidophilum* 的 *pucsA*(b)、*pucsB*(c) 的二级结构预测图  
 Fig.2 The prediction of secondary structure of *pucA*(a), *pucB*(d) in *Rhodobacter sphaeroides* and *pucsA*(b), *pucsB*(c) in *Rhodovulum sulidophilum*

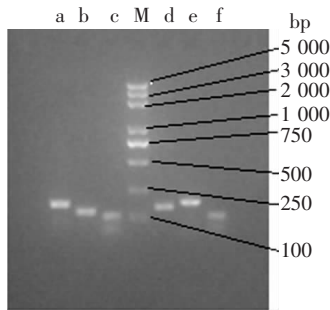


图 3 基因表达分析结果  
 (a) *pucB* 基因; (b) *pucsB* 基因; (c) *ropZ* 基因;  
 (d) *pucsB* 基因; (e) *pucA* 基因; (f) *ropZ* 基因;  
 M: DNA 标准分子大小 DL2000+ .  
 Fig.3 The results of RT-PCR  
 (a) *pucB* gene ;(b) *pucsB* gene ;(c) *ropZ* gene ;  
 (d) *pucsB* gene ;(e) *pucA* gene ;(f) *ropZ* gene ;  
 M : Marker DL2000+ .

### 3 讨论

1) 通过对其一级结构分析发现, 这 4 个氨基酸序列中都含有保守的组氨酸残基, 据研究发现它提供与细菌叶绿素中镁离子的配位点, 而距离保守组氨酸不远处的芳香族氨基酸, 有人认为它能够帮助这个色素蛋白复合物形成特定的结构, 最终出现特定的光谱学特征. 另外在 *pucsA* 的 C 端出现的羧基组和中间位置的半胱氨酸残基与捕光蛋白复合物的形成有很大关系<sup>[23]</sup>. 通过基因

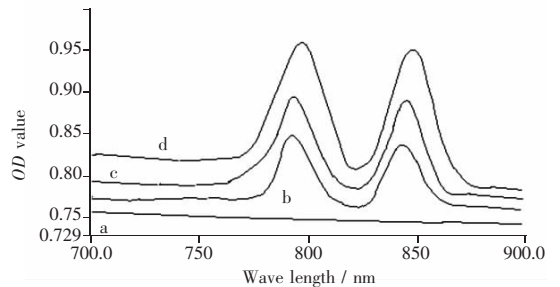


图 4 膜蛋白的光谱分析图  
 (a) DD13 膜蛋白; (b) DD13/pRKpucBpucsA 膜蛋白;  
 (c) DD13/pRKpucsBpucsA 膜蛋白; (d) DD13/pRKpucBpucsA.  
 Fig.4 The absorbance spectroscopy of the related membrane protein  
 (a) the membrane protein of DD13; (b) the membrane protein of DD13/pRKpucBpucsA; (c) the membrane protein of DD13/pRKpucsBpucsA; (d) the membrane protein of DD13/pRKpucBpucsA.

的交叉组合后, 这些特定的氨基酸残基组合后和细菌叶绿素结合, 很可能形成特定构想的色素蛋白复合物, 从而出现 B850 吸收峰的蓝移.

2) 通过蛋白结构预测工具预测两种光合细菌相对应亚基的二级结构, 发现其相似性较大, 预测其可以替代原来的亚基, 形成捕光蛋白复合物. 通过光谱分析证明杂合的捕光蛋白基因得到了表达, 形成了捕光蛋白复合物, 说明这两个表型性状差异较大光合细菌的捕光蛋白可以相互作用, 发挥相应的功能. 另外和含有菌本身捕光

蛋白基因(*pucBpucA*)菌株的膜蛋白特征吸收峰相比,含有杂合的捕光蛋白基因菌株的膜蛋白的特征峰偏低,说明杂合的捕光蛋白组装的捕光蛋白复合物相对较少。

3)在近红外光谱分析时 B850 吸收峰发生了蓝移。一般情况下捕光蛋白复合物发生蓝移通常由以下原因引起:用去垢剂处理捕光蛋白复合物、盐处理捕光蛋白复合物、对捕光蛋白的基因进行突变等,这些处理或者突变的结果导致捕光色素和捕光蛋白的局部构象发生变化,从而使二者的结合状态发生变化,形成的复合物的结构也随之发生变化<sup>[24,25]</sup>。本研究中吸收峰发生蓝移可能是在组装捕光蛋白复合物的时候,由于两种蛋白一级结构中某些氨基酸的丰度的不同,且二级结构中存在着差异,导致了捕光蛋白和叶绿素相互结合时氢键断裂<sup>[26]</sup>或者新的氢键的形成,从而使捕光蛋白复合体的特征吸收峰发生蓝移。

4)通过研究发现杂合的捕光蛋白亚基也可以和细菌叶绿素及类胡萝卜素结合形成捕光蛋白复合物,说明捕光蛋白复合物的形成对捕光蛋白亚基中氨基酸序列的变化不是很严格,只要这些蛋白亚基能够形成特定的结构就能和色素结合形成捕光蛋白复合物,但是吸收峰明显降低,说明杂合的捕光蛋白亚基结合色素的能力还是有所降低。下一步可以找一些与 *pucBA* 亲缘关系更远、序列相似性更低但二级结构相似的基因,把它连入表达载体,转入 DD13 中,看能否形成捕光蛋白复合物,同时还可以把编码 LHI-RC 的基因一起转入 DD13 中,看形成的杂合捕光蛋白复合物能否有效的捕获光能,并把它向下高效传递,进而产生 ATP。

5)随着对光合细菌捕光系统了解的深入,特别是弄清楚捕光蛋白之间及捕光蛋白与光合色素的相互作用关系,相信不久的将来我们能够在体外构建捕光作用元件,甚至再创造出新的更加高效的捕光作用元件,从而能够更加充分的利用光能。

#### 参考文献 (References):

[1] BACHMANN R C, TADROS M H, OELZE J, *et al.* Purification and characterization of the B875 light-harvesting complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*[J]. *Biochem Int*, 1983, 7 :629-634.  
 [2] ZUBER H. Structure and function of light-harvesting complexes and their polypeptides[J]. *Photochem Photobiol*, 1985, 42 :

821-825.

- [3] KLEINEKOFORT W, GERMERTH L, VANDER B, *et al.* The light-harvesting complex II (B800/850) from *Rhodospirillum molischianum* is an octamer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1140 : 102-104.  
 [4] KOEPKE J, XU X, MUNKE C, *et al.* The crystal structure of the light harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum Moloschianum*[J]. *Structure*, 1996, 4 : 581-597.  
 [5] WALZ T, JAMIESON S J, BOWERS C M, *et al.* Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores: LH2 at 6 angstrom LH1 and RC-LH1 at 25 angstrom[J]. *J Mol Biol*, 1998, 282 : 833-845.  
 [6] ROSZAK A, HOWARD T D, SOUTHALL J, *et al.* Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*[J]. *Science*, 2003, 302 : 1969-1972.  
 [7] ALLEN J P, FEHER G, YEATES T O, KOMIYA H, *et al.* Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the protein subunits [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 : 6162-6166.  
 [8] HERBERT L A, EDWARD C A, *et al.* X-ray structure determination of the cytochrome *c*<sub>2</sub>: reaction center electron transfer complex from *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Mol Biol*, 2002 319, 501-515.  
 [9] LANG H P, HUNTER C N. The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LHII complex in *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Biochem*, 1994, 298 : 197-205.  
 [10] ZURDO J C, FERNANDEZ C, RAMIREZ J M. A structure role of the carotenoid in the light-harvesting II protein of *Rhodobacter capsulatus*[J]. *Bio-chem*, 1998, 290 : 531-537.  
 [11] SOISING A S, ASTIER C, QUCHANE S. Regulation of photosynthesis genes in *Rubrivivax gelatinosus*: transcription factor PpsR is involved in both negative and positive control [J]. *J Bacteriol* 2004, 186(10) : 3133-3142.  
 [12] ERASO J M, KAPLAN S. Complex regulatory activity associated with the histidine kinase PrrB in expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1[J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(24) : 7037-7046.  
 [13] HE J L, RYALLS Z S, KAPLAN S, *et al.* Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *furL* gene[J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(22) : 6422-6431.  
 [14] OUCHANE S, PICAUD M, YHERIZOLES P, *et al.* Global regulation of photosynthesis and respiration by FnrL, the first two targets in the tetrapyrrole pathway[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(10) : 7690-7699.  
 [15] ERASO J M, KAPLAN S. Oxygen-insensitive synthesis of photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase[J]. *J Bacteriol*, 1995, 177 : 2695-2706.  
 [16] ERASO J M, KAPLAN S. PrrA, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *J Bacteriol*, 1994, 176 : 32-43.  
 [17] HAN Y, BRAATSCH S, OSTERLOH H, *et al.* A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1[J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2004, 101 : 12306-12311.

子探针在诱导后均有不同程度的表达增强现象, 但不同探针有一定的差异, 其增加的比例不同, 可能与所连接的基因不同和信号传递的通路不相关。

购买的转染试剂使用说明书提供了不同的转染比例, 通过实验证明, 所构建的探针转染动物细胞, 当 DNA/转染试剂为 1:3 时, 细胞对探针的表达效率最高。外源 DNA 和转染试剂特别是转染试剂对活细胞的损害比较大, 当 DNA 工作浓度达到 10 mg/L、DNA/转染试剂为 1:3 时, 细胞出现大量死亡, 所以不能一味地用提高 DNA 工作浓度的广泛来提高转染效率, 当用 DNA 10 mg/L 的工作浓度、DNA/转染试剂为 1:5 时, 细胞几乎全部死亡, 反而造成实验效果不佳。

由于所使用的细胞系均为温血动物的细胞, 所以构建的探针在细胞中表达的差异不明显。没有设计实验来验证用变温动物的细胞表达该探针是否与温血动物的细胞的表达有差异, 这需要进一步去验证。

虽然表达的荧光蛋白测定值在细胞的质和膜中的表达差异不明显, 但在荧光显微镜下观察的荧光强度明显不同, 细胞质中的表达比细胞膜

上的要好一些, 可能与细胞中表达能力和细胞的运输能力相关, 这需要进一步去证明。

由于细胞膜在细胞的周围, 所以定位于细胞膜表达的探针表达后其荧光照片是细胞的周围出现亮圈, 而定位于细胞质表达的单分子探针其荧光照片中的荧光在细胞中分布均匀, 这种差异是由于人的视觉和细胞形态所造成(见图 1 和图 2)。

#### 参考文献 (References):

- [1] VAN AELST L, D'SOUZA-SCHOREY C. Rho GTPases and signaling networks[J]. *Genes & Dev*, 1997, 11: 2295-2322.
- [2] TAKAI Y, SASAKI T, MATOZAKI T. Small GTP-binding proteins[J]. *Physiol Rev* 2001, 81: 153-208.
- [3] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Rho GTPases in cell biology[J]. *Nature*, 2002, 420: 629-635.
- [4] JAFFE A B, HALL A. Rho GTPases: biochemistry and biology[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 247-269.
- [5] SAHAI E, MARSHALL C J. Rho GTPases and cancer[J]. *Nature Reviews/Cancer*, 2002, 2: 133-142.
- [6] FRIEDL P, WOLF K. Tumour-cell and migration: diversity and escape mechanism[J]. *Nature Reviews/Cancer*, 2003, 3: 362-374.
- [7] REINA E toh, KAZOU Kurokawa. Activation of Rac and Cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probe in the membrane of living cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 9: 6582-6591.
- [18] JAUBERT M, ZAPPA S, FARDOUX J, *et al.* Light and redox control of photosynthesis gene expression in *Bradyrhizobium* dual role of two PpsR[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44407-44416.
- [19] PASTERNAK C, HABERZETTL K, KLUG G. Thioredoxin is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(1): 100-106.
- [20] GESINE E H, ELENI K. Gene cloning and regulation of gene expression of the puc operon from *Rhodovulum sulfidophilum* [J]. *Biochimica et Acta*, 1997, 1351: 341-358.
- [21] MARIA D R B, NORMAL L K. Effect of light and oxygen and adaptation to changing light condition in a photosynthetic mutant in which the LHII complex of *Rh. sulfidophilum* was heterologously expressed in a strain of *Rb. capsulatus* whose puc operon was deleted[J]. *Current Microbiology*, 2002, 45: 209-216.
- [22] JAGER A, BRAATSCH S, HABERZETTL K, *et al.* The AppA and PpsR proteins from *Rhodobacter sphaeroides* can establish a redox-dependent signal chain but fail to transmit blue-light signals in other bacteria[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(6): 2274-2282.
- [23] ZUBER H, DREWS G, DAWES E A. *Molecular Biology of Membrane-Bound Complexes in Phototrophic Bacteria*[M]. New York: Plenum Press, 1990. 161-192.
- [24] NTELE M S, SAWATZK J, DREWS G, *et al.* Bacteriochlorophyll-protein interaction in the light-harvesting complex B800-850 from *Rhodobacter sulfidophilus*: A Fourier-transform Raman spectroscopic investigation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1057: 367-372.
- [25] GARCIA A F, MERUYANDINI A, GARCIA F, *et al.* Phosphorylation of the  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptides of the light-harvesting complex I(B870) of the *Rhodobacter capsulatus* in an *in vitro* translation system[J]. *FEMS (microbiology letters)*, 1994, 124: 87-92.
- [26] SILBER M B, GABRIEL G. Fine tuning of the spectral properties of LH2 by single amino acid residues[J]. *Photosynth Res*, 2008, 96(2): 145-151.