

植物脱镁叶绿素替代 RS601 反应中心中的 细菌脱镁叶绿素的研究^{*}

曾小华 吴永强 沈允钢 徐春和^{**}

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 在一定的温度和丙酮的协同作用下, 植物脱镁叶绿素 a 可置换紫细菌 RS601 光合反应中心的细菌脱镁叶绿素而形成含有植物脱镁叶绿素的紫细菌光合反应中心(简称 Phe a RC). 当协同作用 15 和 60 min 时, 反应中心的细菌脱镁叶绿素分别被替代了 50% 和 71%. 在 Phe a RC 中, 细菌脱镁叶绿素的 Q_X (537 nm) 和 Q_Y (758 nm) 特征峰显著下降, 而出现植物脱镁叶绿素的 Q_X (509/542 nm) 和 Q_Y (674 nm) 特征峰. 排除温度和丙酮的影响, 替代时间为 15 或 60 min 的 Phe a RC 的光化学活性分别为对照的 78% 或 71%, 其电化学特性也有所变化.

关键词 紫细菌光合反应中心 脱镁叶绿素 色素取代 光化学活性

80 年代中期以来, 细菌光合作用的研究取得了令人瞩目的进步^[1~4]. 这些进步与紫细菌光合作用反应中心的研究是分不开的. 紫细菌光合作用反应中心是一种膜结合的色素蛋白复合物, 它通过一系列的快速电子传递步骤将光能转化成化学能. 紫细菌 *Rb. sphaeroides* 的光合反应中心包含 3 种多肽(L, M, H 亚基), 4 个细菌叶绿素 a 分子, 2 个细菌脱镁叶绿素 a 分子(Bphe a), 2 个泛醌分子和 1 个非血红素铁. 所有的色素都和 L, M 亚基结合, 并左右对称排列成 A, B 两分支, 但只有 A 分支具有光化学活性. 细菌叶绿素双分子 P870 经光激发后, 产生电荷分离, 在 3 ps 内将电子传递给 A 分支的 Bphe a(H_A), 形成 $P_{870}^+H_A^-$. 然而关于原初光化学反应的更具体的分子机制, 比如辅助细菌叶绿素分子 B_A 是否为电子传递中间体. 至今尚在探索之中^[5].

基因定点突变, 泛醌分子和非血红素铁的置换在了解光合反应中心的结构和功能中发挥了重要的作用^[6]. 近年来, 有实验室报道在类胡萝卜素缺陷型的 *Rb. sphaeroides* R-26 光合反应中心中用体外游离的其他色素替代光合反应中心的相关色素^[7], 这又提供了一种新的研究光合反应中心结构功能关系的途径. 根据反应中心的晶体结构和氨基酸序列分析发现紫细菌 L, M 亚基与 PS II 的 D1, D2 亚基存在序列同源性, 它们的三维结构也有高度相似性^[8], 如果采用植物脱镁叶绿素替代紫细菌反应中心中的细菌脱镁叶绿素, 对于反应中心的结构和功

1999-01-19 收稿, 1999-04-22 收修改稿

^{*}国家自然科学基金(批准号: 39870161)及国家重点基础研究专项经费(批准号: G1998010100)资助项目

^{**}联系人(E-mail: xch@iris.sipp.ac.cn)

能及其进化的研究将具有重要的意义. 本文成功地完成用植物脱镁叶绿素置换紫细菌 *Rb. sphaeroides* 601 光合反应中心细菌脱镁叶绿素, 并分析了与此有关的光化学活性.

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

DEAE-52(O-(二乙氨基乙基)纤维素)为 Whatman 公司产品, LDAO(十二烷基二甲基胺氧化物)为 Calbiochem-Novabiochem 公司(上海华顺公司代理)产品.

1.2 RS601 细菌细胞的培养

紫细菌 RS601 细胞的培养见文献[9].

1.3 SDS-PAGE

参照文献[10]的方法. 分离胶的浓度为 15%, 浓缩胶采用 2.5%, 凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色.

1.4 植物叶绿素和脱镁叶绿素的制备

以菠菜作为材料, 按照文献[11]的方法获得植物叶绿素粗提液, 在 4℃条件下, 进行 DEAE-Sephacrose CL-6B 柱(柱径 1 cm, 柱高 5 cm)层析. 先用约 100 mL 石油醚清洗, 然后用含 0.5% 正丙醇的石油醚将植物色素依次洗脱下来, 弃去先洗脱下来的类胡萝卜素, 收集接着洗脱下来的植物叶绿素 a, 在 N₂ 中干燥, 然后将部分植物叶绿素 a 溶于丙酮, 用于含量的测定; 大部分植物叶绿素 a 溶于吡啶溶液中, 暗中 4℃下保存.

取 10 mL 稀释的植物叶绿素吡啶溶液(0.1 mmol/L), 于 N₂ 中干燥, 加 0.5 mL 冰醋酸, 样品的颜色立即变为粉红色. 此时, 植物叶绿素已完全转变成植物脱镁叶绿素^[11]. 在 N₂ 中干燥后, 溶于 10 mL 的丙酮, 暗中 4℃保存.

1.5 RS601 反应中心中叶绿素和脱镁叶绿素含量的测定

1.5.1 细菌叶绿素的测定 在岛津 UV-3000 双光路双波长分光光度计上测定反应中心的光吸收值 $A_{800\text{ nm}}$ 和 $A_{870\text{ nm}}$, 根据两者的摩尔消光系数分别为 2.88×10^5 和 $1.28 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[12], 计算反应中心中细菌叶绿素双分子 P870 部分和辅助叶绿素 B800 部分的细菌叶绿素含量 C_{P870} 和 C_{B800} .

1.5.2 细菌脱镁叶绿素的测定 取一定体积的反应中心溶液, 经稀释后, 加入 3 倍体积的丙酮/甲醇(7:2, 体积比)溶液, 室温下放置 15 min, 经 $4\,000 \times g$ 离心 5 min 后, 取上清液, 测定细菌脱镁叶绿素特征吸收峰 752 nm 的光吸收值 $A_{752\text{ nm}}$. 细菌叶绿素的特征吸收峰在 768 nm, 计算细菌脱镁叶绿素的浓度时必须扣除细菌叶绿素在 752 nm 的光吸收值, 因此反应中心中细菌脱镁叶绿素的浓度可由以下公式计算:

$$C_{\text{Bphe a}} = [4A_{752\text{ nm}} - \alpha(C_{\text{P870}} + C_{\text{B800}})\epsilon_{768\text{ nm}}] / \epsilon_{752\text{ nm}} \quad (1)$$

其中 α 为丙酮/甲醇(7:2, 体积比)溶液中细菌脱镁叶绿素在 752 和 768 nm 光吸收之比, 等于 0.55; $\epsilon_{768\text{ nm}}$, $\epsilon_{752\text{ nm}}$ 分别为细菌叶绿素和细菌脱镁叶绿素的摩尔消光系数, 为 0.76×10^5 和 $1.54 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 4 为加入丙酮/甲醇溶液后的调整因子.

1.5.3 植物脱镁叶绿素的测定 取 0.1 mL 样品溶于 4.9 mL 丙酮中, 测定 667 nm 的吸光值, 根据 667 nm 处摩尔消光系数 $\epsilon_{667\text{ nm}}$ 为 $5.3 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[13], 计算植物脱镁叶绿素的含量.

1.6 RS601 反应中心吸收光谱的测定

吸收光谱的测定用岛津 UV-3000 双光路双波长分光光度计. 扫描范围为 400~900 nm.

1.7 蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定采用 Folin 酚法^[14]. 样品在含 0.01% LDAO 的 Tris-HCl 缓冲液(0.01 mol/L, pH 8.0)中透析 3 次后进行测定.

1.8 紫细菌 RS601 光合反应中心光化学活性的测定

光合反应中心光化学活性在岛津 UV-3000 上测定. 用 700 nm 以上的锐截止滤光片(上海海光光学元件厂)透过测量光, 用 450 nm 锐选透滤光片(上海海光光学元件厂)透过作用光. 在波长 870 nm 处测定反应中心光诱导下的光吸收值的变化($\Delta A_{870\text{ nm}}$).

2 结果

2.1 RS601 光合反应中心的分离纯化

Feher 等人^[12] 分别用 Triton-100 和 LDAO 提纯了类胡萝卜素缺陷型紫细菌 *Rb. sphaeroides* R-26 的光合反应中心, 而野生型 *Rb. sphaeroides* 反应中心则报道较少^[13]. 根据文献[12]和[16]的方法稍做修改, 我们纯化了含类胡萝卜素的野生型 *Rb. sphaeroides* 601 菌株的光合反应中心.

收集培养的细菌细胞, 按 1:3(g/mL)的比例溶解于 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中. 用 CSF-1A 超声发生器(上海超声波仪器厂)破碎细胞, 12 000×g 离心 30 min, 去除胞壁残渣. 收集上清液, 加入 LDAO 和 NaCl, 使其最终浓度分别为 1% (质量体积比)和 0.1 mol/L. 4℃下保温 1 h 后, 260 000×g 离心 1 h, 上清液即为粗提反应中心. 在粗提液中加入 (NH₄)₂SO₄, 最终浓度为 35% 饱和度. 搅拌后 10 000 r/min 离心 10 min, 收集附在管壁上的浮质, 重新溶解于相同体积的 TL 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% (质量体积比) LDAO), 平衡 6 h, 使沉淀充分溶解. 继续徐徐加入 (NH₄)₂SO₄, 收集饱和度为 15%~30% 间的附在管壁上的浮质, 溶于相同体积的 TL 缓冲液, 平衡 6 h 后, 加样于 DEAE-纤维素层析柱上, 用 500 mL 含 0.06 mol/L NaCl 的 TL 溶液清洗 1 遍, 而后用含 0.12 mol/L NaCl 的 TL 溶液将反应中心洗脱下来. 如 $A_{280\text{ nm}}/A_{800\text{ nm}} > 1.24$, 则重新层析一次. 图 1 为 SDS-PAGE 显示的细菌反应中心的组成, 它含有 3 个亚基, 其分子量分别为 26.6, 30.7, 33.1 ku. 从生化组成上表明我们已获得纯净的紫细菌 RS601 光合反应中心^[15].

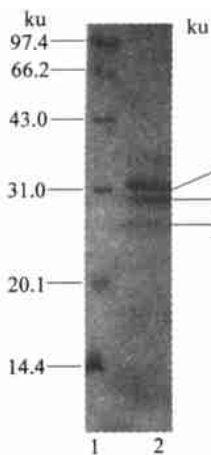


图 1 紫细菌 RS601 光合反应中心制剂的 SDS-PAGE 图谱
1 为标准蛋白, 2 为反应中心多肽

图 2(a)为 *Rb. sphaeroides* 601 光合反应中心 400~900 nm 的吸收光谱. 870 和 800 nm 分别为相对光合反应中心细菌叶绿素 a 双分子 P870 和辅助细菌叶绿素 B800 电子跃迁矩 Q_Y 的特征吸收峰, 595 nm 则为相对于细菌叶绿素 a P870 和 B800 电子跃迁矩 Q_X 的特征吸收峰; 537, 758 nm 分别为细菌脱镁叶绿素 a 不同电子跃迁矩 Q_X, Q_Y 的特征吸收峰. 870 nm 的吸收在作用光诱导下完全消失(数据从略), 表明 P870 由还原态转向氧化态. 所以, RS601 光合反应中心的光化学活性可由光诱导下的 $\Delta A_{870\text{ nm}}$ 表示.

2.2 植物脱镁叶绿素替换 RS601 光合反应中心中的细菌脱镁叶绿素

Rb. sphaeroides 光合反应中心的三维结构显示, 细菌叶绿素和细菌脱镁叶绿素镶嵌在反应中心的 L 和 M 蛋白亚基中. 细菌叶绿素、细菌脱镁叶绿素和蛋白亚基的这种结合状态在温度升高到一定程度时会出现松动, 此时, 若系统中存在其他色素, 它们则能够结合上去, 从而替代相应的细菌(脱镁)叶绿素. 人们利用这个原理已经成功地用人工合成的色素替代了 *Rb. sphaeroides* R-26 光合反应中心中的辅助细菌叶绿素和细菌脱镁叶绿素^[7], 其中细菌脱镁叶绿素的替代率较高.

我们根据文献[7]的方法作适当的变更, 用菠菜脱镁叶绿素置换 RS601 光合反应中心内细菌脱镁叶绿素. 取 5 mL 光合反应中心悬浮液, 加入 0.55 mL 丙酮溶解的脱镁叶绿素, 搅拌混匀后, 在 43.5℃ 下共保温相应时间后, 在 DEAE-纤维素(DE-52)层析

柱上用 600 mL 含 0.09 mol/L NaCl 的 TL 缓冲液洗去游离的叶绿素, 再用含 0.15 mol/L NaCl 的 TL 缓冲液将修饰的光合反应中心洗脱下来, 一般 100~200 mL 即可洗下. 再将洗脱液浓缩 5 倍, 取 5 mL 浓缩液铺在体积为 33.5 mL 10%~40% 的蔗糖梯度上, 4℃ 下 260 000×g 离心 16 h, 从上至下取第 2 层淡黄色上清液, 即得到纯化的替代光合反应中心 Phe a RC.

经过不同共保温时间后取样, 可对反应中心细菌脱镁叶绿素被植物脱镁叶绿素替换的动力学过程进行分析. 取一定体积的反应中心溶液, 加入含 85 μmol/L Phe a 的 10% (体积比) 丙酮溶液, 在 43.5℃ 下共保温, 分别在 0, 1, 2, 3, 5, 8, 15, 20, 30, 60 min 时取样, 测定 870 nm 处的光暗吸收差示变化 ($\Delta A_{870\text{ nm}}$), 结果如图 3 所示. 当共保温到 5 min 时, 光合反应中心的光化学活力明显下降, 这种下降趋势一直保持到共保温 20 min, 以后的活力下降趋于缓慢.

以图 2(a) 为对照, 取 3 组处理体系, 一组是反应中心的 TL 缓冲液; 一组在反应中心的 TL 缓冲液中加入 10% (体积比) 丙酮的混合液 (简称 RC-丙酮混合液); 一组将反应中心的 TL 缓冲液和含 85 μmol/L 脱镁叶绿素的 10% (体积比) 丙酮溶液 (简称 RC-Phe a 混合液) 混合. 每一组分 3 份, 分别在共保温 15, 60 min 后取样, 共保温 15 或 60 min 时的样品代表活力急剧下降和下降趋稳定两个阶段, 经 12 000×g 离心 30 min 去除变性蛋白沉淀. 测定 3 组体系的吸收光谱, 依据光谱的变化, 我们可分析色素替代过程中的相关信息.

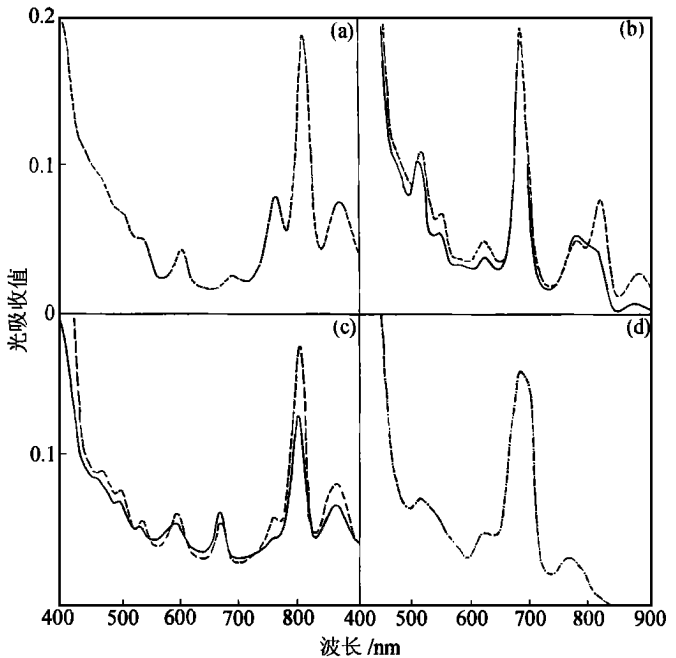


图2 紫细菌 RS601 光合反应中心脱镁叶绿素替代前后的吸收光谱变化

(a) 对照紫细菌光合反应中心(RC), (b) 43.5℃保温处理的 RC 和含 85 μmol/L Phe a 的 10% (体积比) 丙酮的混合液, (c) 保温和含 85 μmol/L Phe a 的 10% (体积比) 丙酮溶液处理后经层析提纯的 Phe a RC, (d) 处理过程中分离的游离成分. ——保温 15 min, ——保温 60 min. 反应液中 RC 的蛋白浓度为 0.34 mg/mL; 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1% LDA0

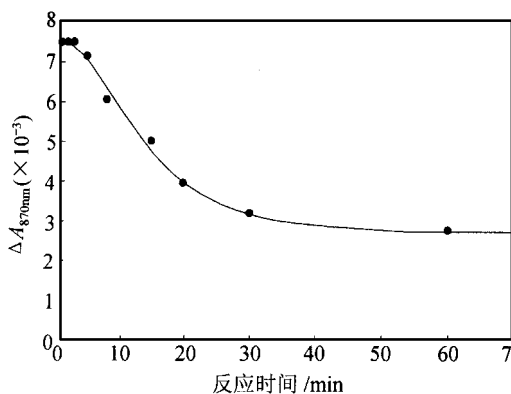


图 3 保温加植物脱镁叶绿素的丙酮溶液处理

RS601 反应中心时的光化学活性的变化历程

反应液中光合反应中心的蛋白浓度为 0.34 mg/mL, 植物脱镁叶绿素的浓度为 $85 \mu\text{mol/L}$, 10% (体积比) 丙酮, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1% LDAO, 保温温度为 43.5°C

由于纯化的反应中心在近红外区具有典型的特征光谱, 即 870, 800, 758 nm 3 个吸收峰, 分别为 P870, B800 和 Bphe 的 Q_Y 特征吸收峰, 在对照中 (见图 2(a)), $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 约为 1 : 2 : 1, 该比值通常被用来显示反应中心中 P870, B800 和 Bphe 含量的变化. 反应中心受高温或有机溶剂影响时, P870 和 B800 的特征吸收峰 Q_Y 将逐渐蓝移至 768 nm, 而 Bphe 的吸收峰将蓝移至 752 nm, 从而显著影响 $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ [7, 12].

用第 1 种处理体系 43.5°C 保温 15 min, $A_{870\text{ nm}}$

$A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 2.36 : 1.30; 保温 60 min, $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 2.62 : 1.90 (图略). 说明保温过程中, 细菌叶绿素 P870, B800 和细菌脱镁叶绿素与多肽的结合产生了松动, 导致了 800 和 758 nm 处的相对光吸收值明显升高. 在第 2

种处理体系中 (图略), 保温 15 min, $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 2.90 : 3.00; 保温 60 min, $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 5.56 : 10.00. 800 和 758 nm 处的光吸收值大幅度上升说明细菌叶绿素 P870, B800 及细菌脱镁叶绿素和反应中心多肽结合的松动加剧. 在第 3 种处理体系中 (图 2(b)), 保温 15 min, $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 2.54 : 1.70; 保温 60 min, $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 4.00 : 4.80. 该比值的幅度小于与丙酮共保温的反应中心的相应值.

通过 DEAE-纤维柱层析和超速离心等方法, 利用第 3 种处理体系将色素替代后的反应中心和游离的叶绿素分离, 其吸收光谱如图 2(c), (d) 所示. 图 2(c) 为替代反应中心 Phe a RC 的吸收光谱. 保温 15 min, $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 2.00 : 0.64, 和对照 (图 2(a)) 相比, 细菌脱镁叶绿素的含量下降. 509, 542 和 674 nm 处出现 3 个分别代表植物脱镁叶绿素不同电子跃迁矩 Q_X , Q_Y 的吸收峰, 其中 509 和 542 nm 为植物脱镁叶绿素 Q_X 的特征吸收峰, 674 nm 为植物脱镁叶绿素 Q_Y 的特征吸收峰. 保温 60 min, $A_{870\text{ nm}} : A_{800\text{ nm}} : A_{758\text{ nm}}$ 为 1 : 2.00 : 0.56, 细菌脱镁叶绿素的相对含量从 0.64 降到 0.56, 植物脱镁叶绿素 Q_X , Q_Y 的特征吸收峰 (674, 509, 542 nm) 明显增加. 结果表明植物脱镁叶绿素在处理过程中能够进入细菌脱镁叶绿素的位置并取而代之. 分离得到的游离成分的吸收光谱如图 2(d), 768 nm 的宽吸收峰为细菌叶绿素 Q_Y 的特征吸收峰 (768 nm) 和细菌脱镁叶绿素 Q_Y 的特征吸收峰 (752 nm) 的叠加, 668 nm 处的吸收峰为植物脱镁叶绿素 Q_Y 的特征吸收峰, 没有检测到任何蛋白存在.

进一步通过公式 (1) 计算紫细菌反应中心脱镁叶绿素替代前后色素含量的变化 (如表 1 所示). 结果表明, 无论在保温还是丙酮 + 保温处理的反应中心中, 共保温后反应中心的色素相对含量均无变化, 而丙酮 + 保温 + Phe a 处理的反应中心中, 细菌脱镁叶绿素的含量分别下降为 1.00 或 0.58 mol/mol RC, 植物脱镁叶绿素分别上升到 1.10 或 1.52 mol/mol RC. 结果说明在第 3 种处理体系中成功地获得了替代反应中心.

表 1 紫细菌 RS601 光合反应中心脱镁叶绿素替代前后色素含量的变化
(单位: mol BChl 或(B)phe a/ mol RC)

处理样品		保温时间		
		对照	15 min	60 min
保温	BChl a	4. 00±0. 19	4. 06±0. 21	3. 99±0. 22
	Bphe a	1. 98±0. 13	2. 05±0. 14	2. 12±0. 17
丙酮+ 保温	BChl a	4. 03±0. 23	3. 95±0. 38	3. 93±0. 28
	Bphe a	1. 91±0. 11	2. 00±0. 15	1. 98±0. 17
丙酮+ 保温+ Phe a	BChl a	4. 03±0. 27	3. 97±0. 26	3. 94±0. 24
	Bphe a	1. 95±0. 08	1. 00±0. 10	0. 58±0. 13
	Phe a	0	1. 10±0. 15	1. 52±0. 15

实验测定了细菌脱镁叶绿素被植物脱镁叶绿素替代后的反应中心光化学活性的变化. 表 2 分别为每摩尔丙酮加保温处理后和替代后的光合反应中心的光化学活性. R15 和 R60 为丙酮加保温处理后(保温时间分别为 15 和 60 min), 经层析和超速离心分离后的反应中心. P15 和 P60 则为相同温度和相同体积的含植物脱镁叶绿素的丙酮溶液处理后分离到的反应中心(Phe a RC), 两反应中心中部分细菌脱镁叶绿素被植物脱镁叶绿素所取代. P15 为共保温时间为 15 min 后的 Phe a RC, P60 为共保温时间为 60 min 后的 Phe a RC. 两者活性分别下降到约为未处理反应中心活性的 51.9%和 39.7%, 但如果分别以 R15 和 R60 作为对照, P15(细菌脱镁叶绿素只剩 50%)和 P60(细菌脱镁叶绿素只剩 29%)的光化学活性分别为原来活性的 78%和 71%.

表 2 植物脱镁叶绿素替代前后光合反应中心光化学活性的变化
(单位: Δmol P870/ mol RC)

反应中心	未处理反应中心	保温加丙酮处理后反应中心		替代后反应中心	
		R15	R60	P15	P60
光化学活性	0. 189±0. 018	0. 125±0. 011	0. 105±0. 009	0. 098±0. 010	0. 075±0. 008

以上结果表明, RS601 反应中心细菌脱镁叶绿素被植物脱镁叶绿素替换后, 其光化学活性明显下降, 但细菌脱镁叶绿素基本被替换后, 反应中心依然还保持一定的光化学活性.

3 讨论

实验结果的分析表明用植物脱镁叶绿素替代紫细菌反应中心的细菌脱镁叶绿素是成功的. 替代反应过程中出现的光谱变化一部分是由于蛋白质变性导致的叶绿素和蛋白质之间的结合出现异常所引起的(图 2(b)), 通过高速离心可以去除(图 2(c), (d)). 通过超速离心和 DEAE-纤维素层析等多种方法的结合纯化得到的 Phe a RC 的特征吸收光谱显示, 细菌脱镁叶绿素被植物脱镁叶绿素替代的同时, 细菌叶绿素双分子 P870 和辅助叶绿素 B800 的相对含量保持不变, 说明植物脱镁叶绿素的替代具有位置选择性.

RS601 光合反应中心细菌叶绿素被植物脱镁叶绿素替代后的一个明显变化是替代光合反应中心具有一定的光化学活性, 但相对较低; 同时其电化学性质也发生了变化.

反应中心中的细菌脱镁叶绿素全部被替换后,其光化学活性明显下降.但是,RS601 光合反应中心在替代过程中,温度和丙酮的作用也将导致其光化学活性明显下降.排除温度和丙酮等因素的影响后,反应中心的细菌脱镁叶绿素被植物脱镁叶绿素替代后的光化学活性出现下降,但仍然保持了原来光化学活性的 70%左右的水平.

细菌脱镁叶绿素被植物脱镁叶绿素替代后的 RS601 光合反应中心的光化学活性变化的原因在于两个方面:(1)细菌脱镁叶绿素和植物脱镁叶绿素与反应中心蛋白多肽的结合状态不同;(2)细菌脱镁叶绿素和植物脱镁叶绿素的分子结构不同:(i) C-3 部位的取代基不同.细菌脱镁叶绿素为乙酰基,而植物脱镁叶绿素则为乙烯基.(ii) 环 II 的饱和度不同.细菌脱镁叶绿素环 II 的一个双键被打开成单键,而植物脱镁叶绿素环 II 相应的键为不饱和键(双键)(图 4),说明结构的不同不甚妨碍植物脱镁叶绿素和紫细菌 RS601 反应中心的结合.但其光化学活性受哪方面原因的影响,尚需进一步的工作加以区分.

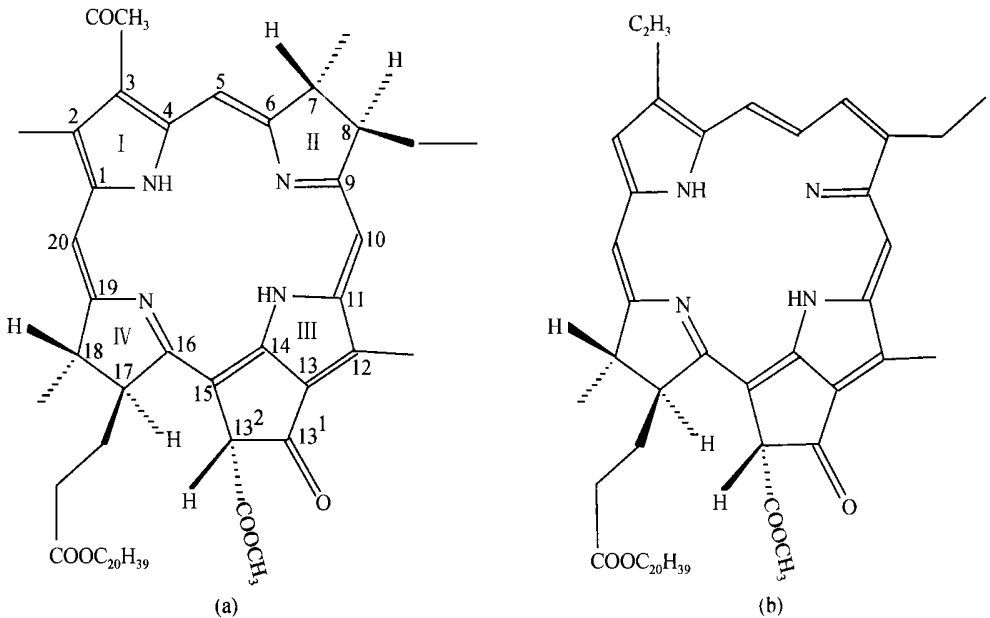


图 4 细菌脱镁叶绿素(a)和高等植物脱镁叶绿素(b)的分子结构式

RS601 光合反应中心在 DEAE-纤维素层析柱上的洗脱浓度为 0.06 ~ 0.12 mol/L 的离子浓度,而 Phe a RC 的洗脱浓度提高到 0.09 ~ 0.15 mol/L 的离子浓度,由于 DEAE-纤维为阴离子交换剂,因此这种洗脱浓度的提高说明替代后反应中心 Phe a RC 的负电性更强,即 Phe a RC 的表观电化学势更低.这种电化学特性的变化与光化学动力的降低具有何种联系,我们将在今后电化学和皮秒荧光动力学的实验中进一步阐明.

致谢 感谢杨善元先生提供植物叶绿素.

参 考 文 献

- 1 Deisenhofer J E D, Epp O, Miki K, et al. X-ray structure analysis of a membrane protein complex; electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophore of the photosynthetic reaction center from *Rs. viridis*. *J Mol Biol*, 1984, 180: 385~398
- 2 Marcus R A. Electron transfer reactions in chemistry: theory & experiment (Nobel lecture). *Angewandte Chemie*, 1993, 32: 1 111~1 222
- 3 Stone M H B, Mcphil lips T M, Rees D C, et al. Light induced structural changes and the mechanism of electron/proton transfer in the photosynthetic reaction center. *Science*, 1997, 276: 812~816
- 4 Abrensch E C, Paddock M L, Stowell M H B, et al. Identification of proton transfer pathways in the X-ray crystal structure of the bacterial reaction center from *Rb. sphaeroides*. *Photosyn Res*, 1998(55): 119
- 5 Morse C C, Keske J M, Warneke K, et al. Electron transfer mechanisms in reaction centers; engineering guidelines. In: Deisenhofer J, Norris J R, eds. *The Photosynthetic Reaction Center*. New York and London: Academic Press, 1993. 1~19
- 6 Struck A, Scheer H. Modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R26; exchange of monomeric bacteriochlorophyll with 13²-hydroxy-bacteriochlorophyll. *FEBS Lett*, 1990, 261(2): 385~388
- 7 Scheer H, Struck A. Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrole chromophores. In: Deisenhofer J, Norris J R, eds. *The Photosynthetic Reaction Center*. New York and London: Academic Press, 1993. 157~192
- 8 Michel H, Deisenhofer J. Relevance of the photosynthetic reaction centers from purple bacteria to photosystem II. *Biochemistry*, 1988, 27: 1~7
- 9 曾小华. 紫细菌 RS601 DCPIPH₂→MV 电子传递的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1997, 29(1): 46~52
- 10 Hanes B D, Rickwood D. *Gel Electrophoresis of Proteins; A Practical Approach*. Portland: IRL Press Limited, 1981. 18~45
- 11 Strain H H, Svec W A. Extraction, separation, estimation, and isolation of the chlorophylls. In: Vernon L P, Seely G R, eds. *The Chlorophylls*. New York and London: Academic Press, 1966. 21~61
- 12 Fehér G, Okamura Y. Chemical composition and properties of reaction centers. In: Clayton R K, Sistrom W R, eds. *The Photosynthetic Bacteria*. New York: Plenum Press, 1978. 349~382
- 13 Bacon M F. Separation of chlorophyll a and b and related compounds by thin-layer chromatography on cellulose. *J Chromatog*, 1965, 17: 322~326
- 14 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 265~275
- 15 Parson W W. Reaction centers. In: Scheer H, ed. *Chlorophylls*. Boca Raton: CRC Press, 1991. 1 153~1 179
- 16 Tiede D M, Vazquez J. Time resolved electrochromism associated with the formation of quinone anions in the *Rhodobacter Sphaeroides* R26 reaction center. *Biochemistry*, 1996, 35: 10 763~10 775