

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):500-505; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

固氮红细菌 (*Rhodobacter azotoformans*) 色素蛋白复合体的分离纯化与特性

赵良贵¹, 杨素萍^{1*}, 曲音波², 焦念志³

(¹ 华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021)

(² 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

(³ 厦门大学, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要:【目的】为揭示不产氧光合细菌产氢菌株色素蛋白复合体 (PPC) 色素组成和含量与光合放氢的关系奠定基础。【方法】以 PPC 特征光谱为检测指标, 采用硫酸铵分级分离、DEAE-纤维素层析、吸收光谱和 SDS-PAGE 等方法进行了固氮红细菌 (*Rhodobacter azotoformans*, *R. azotoformans*) R7 产氢菌株 PPC 的分离纯化、纯度分析和鉴定; 采用表面增强激光解吸电离离子飞行时间质谱、HPLC-MS 和荧光光谱法对其中一种 PPC 进行了组成分析和能量传递活性测定。【结果】从 R7 菌株获得了 3 种纯化的 PPC, 1 种为反应中心与中心捕光色素蛋白复合体 (RC-LH1), 2 种为外周捕光色素蛋白复合体 (LH2), 其中一种 LH2 的吸收光谱具有异常的 423 nm 强吸收峰, 其蛋白的两种亚基的分子量分别为 5356.8 Da 和 5697.8 Da, 类胡萝卜素属球形烯系, 分子量为 562 Da, 激发光能够从类胡萝卜素向细菌叶绿素以及细菌叶绿素向细菌叶绿素传递。【结论】固氮红细菌产氢菌株含有 2 种不同光谱特性的 LH2, 其中一种具有新光谱特性。

关键词: 色素蛋白复合体; 分离纯化; 固氮红细菌 (*Rhodobacter azotoformans*)

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0500-06

色素蛋白复合体 (pigment-protein complex, PPC) 是光合生物进行光合生长的最重要结构单元。在不产氧光合细菌 (anoxygenic phototrophic bacteria, 习惯称光合细菌) 中, 光合单元主要包括外周和中心捕光色素蛋白复合体 (LH2 和 LH1) 以及光反应中心 (RC), LH2 和 LH1 捕获太阳能并将之传递给 RC 产生光化学反应, 从而将太阳能转变为化学能。自 Deisenhofer 等首次解析了绿色绿芽菌 (*Blastochloris viridis*, *B. viridis*) RC 晶体结构以来^[1], 对来自不同种属 PPC 的分离纯化及其结构与功能研究一直是国际关注热点^[1-2]。相对于光合细菌现有物种数量而言, PPC 的研究仅局限在几个典

型种类, 而且 LH2 的研究远不如 RC 广泛而深入, 更缺乏特殊光谱学特性 PPC 的研究报道^[3-4], 也未见 PPC 与光合产氢关系的报道。我们前期研究表明, 固氮红细菌 R7 具有高光合放氢活性, 其光合放氢活性与类胡萝卜素 (carotenoid, Car) 的组成和含量相关^[5]。我们认为, 由于 Car 主要以 PPC 形式存在, 其色素组成的不同将影响 PPC 光能吸收与传递效率, 从而调控光合磷酸化水平, 进而影响依赖于 ATP 的固氮放氢活性。为验证这一观点, 首先需要系统地分离纯化其 PPC, 目前 PPC 分离纯化集中在使用超速离心与离子交换层析相结合的方法, 而盐析方法很少使用^[6]。鉴于此, 我们以 PPC 特征吸收

基金项目: 国家自然科学基金 (30970068); 国家科技基础条件平台建设项目 (2005DKA21209); 近海海洋环境科学国家重点实验室 (厦门大学) 高级访问学者基金 (MELRS0907)

* 通信作者。Tel: +86-592-6166178; E-mail: yangsuping@hqu.edu.cn

作者简介: 赵良贵 (1964-), 男, 河北新乐人, 博士, 研究方向为资源与环境微生物。E-mail: chungui@sxu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-30; **修回日期:** 2010-01-20

光谱为检测指标,采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,并结合离子交换层析、吸收光谱和凝胶电泳等方法,在产氢条件下,系统地进行了R7菌株PPC的分离纯化,获得3种电泳纯的PPC,其中一种PPC为光谱特性异常的LH2,为此,我们又采用HPLC-MS、飞行质谱以及荧光光谱法,进一步对这种LH2进行了组成和能量传递活性等特性研究,表明该LH2两种蛋白亚基的分子量分别为5356.8 Da和5697.8 Da, Car属球形烯类,分子量为562 Da,也具有能量传递活性,这为深入开展光合细菌PPC与光合产氢关系以及光合产氢机制研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:固氮红细菌(*R. azotoformans* R7),16S rDNA序列GenBank登录号EU604757,本实验室分离鉴定保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:LDAO(十二烷基二甲基胺氧化物,Fluka公司);溶菌酶(Amresco);DEAE-纤维素32(DEAE-32,Whatman)。高速冷冻离心机(CR22G,HITACHI);紫外-可见分光光度计(U-2010,HITACHI);ECONO 低压液相仪(Bio-Rad,USA);表面增强激光解吸电离离子飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS, CIPHERGEN Company, USA);HPLC-MS(HITACHI BRUKER ESQUIRE 4000,L-2450 DAD检测器);LS-55型荧光仪(Perkin Elmer,USA)。

1.2 培养基和培养条件

参照文献[5]进行操作。

1.3 色素蛋白复合体的分离纯化

离心收集7 d的光照厌氧培养物细胞,用pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl缓冲液洗涤细胞3次,按每g湿菌体10 mL缓冲液的比例悬浮细胞。细胞破碎按每g湿菌体2 mg的比例加入溶菌酶,37℃保温1 h,再超声波处理5 min(pulse 30 s, stop 10 s)。5000×g离心收集上清液,再加入终浓度为1% LDAO和0.1 mol/L NaCl 4℃过夜增溶膜蛋白,15000×g离心收集上清,以60%硫酸铵盐析,15000×g离心收集上清浮质并溶解,再经20%、40%和60%硫酸铵分级分离,各分离组份经透析、离心,在ECONO 低压液相仪上进行DEAE-纤维素32柱层析(25 cm×2 cm),用含有0.1% LDAO的pH 8.0 10 mmol/L Tris-HCl(TL)缓冲液进行NaCl

梯度洗脱,收集洗脱液并进行全波长吸收光谱测定。

1.4 色素蛋白复合体的分析

用吸收光谱检测分离纯化过程中Car和细菌叶绿素(bacteriochlorophylla, BChl)特征吸收峰的变化,分别以 OD_{280} 、 OD_{478} 和 OD_{800} 表示蛋白、Car和BChl组份的相对含量。利用吸收光谱法、SDS-PAGE、Tricine-SDS-PAGE和SELDI-TOF-MS等进行PPC纯度和蛋白组份分析。利用吸收光谱和HPLC-MS进行PPC中Car组份分析。利用荧光光谱分析能量传递活性。

1.5 光谱测定

在TL缓冲液中,用光程1 cm石英比色杯,于UV-2102PC分光光度计上室温测定样品的吸收光谱。将离心收集菌体洗涤后悬浮于60%蔗糖溶液中测定活细胞吸收光谱,扫描波长范围为200 nm - 1000 nm。在TL缓冲液中,用光程1 cm荧光杯,分别以Car和BChl特征性吸收峰波长为激发光,于LS-55型荧光仪上室温测定荧光光谱。

2 结果

2.1 菌体破壁及膜蛋白增溶

活细胞、细胞破壁处理以及LDAO增溶破壁细胞悬液上清液的吸收光谱见图1。结果表明:活细胞含有423、478、510、550、590、800、850和870 nm - 880 nm波长特征吸收峰的物质。破壁处理后,B850与B800比例明显升高,呈现379 nm吸收峰,其余峰位没有改变。而LDAO增溶后,423 nm吸收峰明显增强,477 nm、510 nm和870 nm特征峰不明显,B850与800比值接近1:1,且发生蓝移,表明LDAO已将PPC与光合膜分离^[7]。

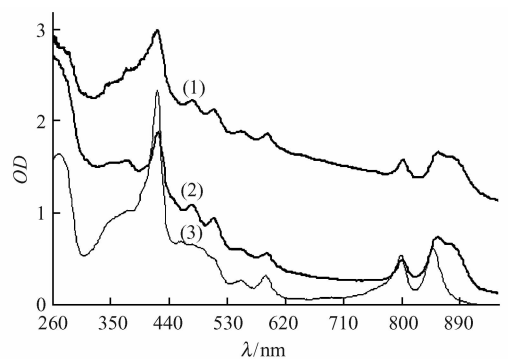


图1 活细胞(1)、溶菌酶处理的细胞(2)和LDAO增溶处理的细胞(3)的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of intact cells (1), lysozyme treated cells (2) and LDAO solubilization (3).

2.2 色素蛋白复合体的分离

经硫酸铵分级分离,获得3个盐析组份, OD_{800} 测定结果显示,20%、40%和60%盐析组份分别约占PPC总量的29.6%、55.7%和7.3%。60%硫酸铵分级分离组份中PPC含量较少,因此,针对40%和20%盐析组份进一步进行了纯化。

2.3 色素蛋白复合体的纯化和吸收光谱分析

经DEAE-纤维素32柱层析获得3种PPC,编号

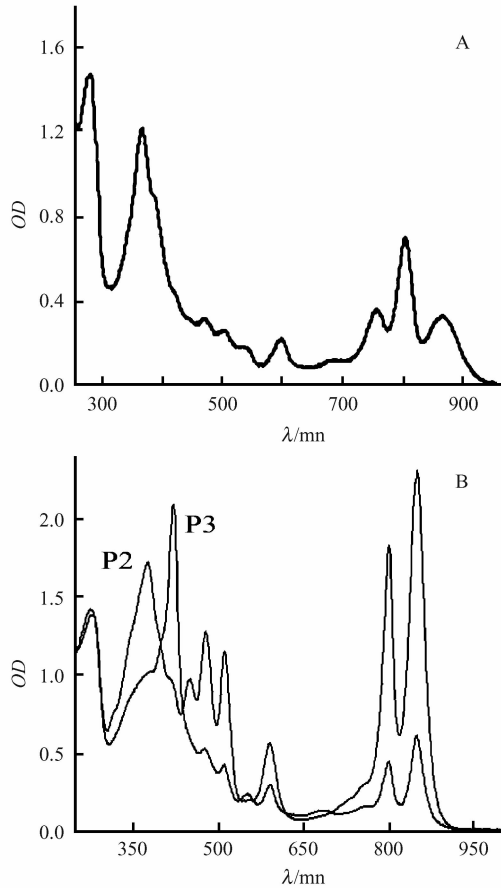


图2 纯化的3种色素蛋白复合体(P1、P2和P3)的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of three types of purified pigment-protein complexes. A: P1; B: P2, P3.

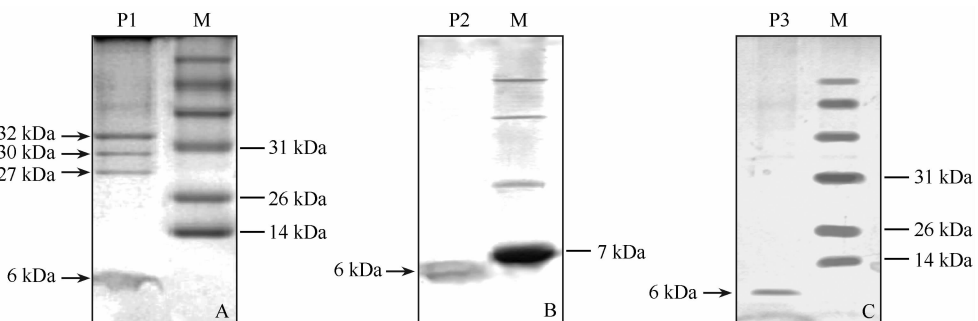


图3 三种纯化色素蛋白复合体的SDS-PAGE

Fig. 3 Electrophoresis patterns of proteins from three kinds of pigment-protein complexes. A: P1; B: P2; C: P3.

分别为P1、P2和P3,收集体积分别约为4 mL、18 mL和5 mL,其吸收光谱见图2。20%盐析组份在0.15 mol/L NaCl洗脱梯度得到P1,其近红外区758 nm、805 nm和868 nm呈现典型特征的三指峰,另外还有367 nm和590 nm BChl吸收峰,470 nm和504 nm和531 nm Car吸收峰,表明P1为LH1-RC复合体,但峰位与文献报道有细微差别^[8-9]。从40%盐析组份中,分别约在0.2 mol/L和0.15 mol/L NaCl梯度获得P2和P3两种光谱学特征明显不同的PPC。P2具有典型的BChl 376 nm Soret带、590 nm Qx带、800 nm和850 nm Qy带吸收峰,以及典型的450 nm、478 nm和510 nm球形烯系吸收峰,但峰位与文献有细微差别^[10]。P3不同于P2,其典型特征是看不到450 nm特征峰,376 nm、477 nm和510 nm特征峰很弱,但呈现423 nm强吸收峰和550 nm吸收峰,也与文献报道不同^[10]。P2和P3吸收光谱均具有LH2特征性的800 nm和850 nm Qy带吸收峰,表明P2和P3均为LH2,P3是一种具有新光谱特性的PPC。

2.4 PPC蛋白质分析

3种纯化PPC凝胶电泳见图3。图3-A和3-C分离胶浓度为12% SDS-PAGE,图3-B是分离胶浓度为16% Tricine-SDS-PAGE。结果表明:3种纯化PPC具有较高的纯度,其电泳条带分析与特征吸收光谱结果相吻合,P1为LH1-RC,P2和P3均为LH2。P1呈现典型的LH1和反应中心复合体(RC-LH1)的电泳图谱,如图3A,分子量约在27-32 kDa之间呈3条带,对应RC的M、L和H三个亚基,分子量14 kDa下方一个蛋白条带对应LH1分子量约为6 kDa的 α 和 β 两个亚基,与文献报道类似^[11-12]。P2呈现2条很接近的电泳条带,与LH2分子量约为6 kDa的 α 和 β 两个亚基相对应^[13],如图3B。P3呈现一条带,与分子量约为6 kDa的LH2的 α 和 β 两个亚基相对应,如图3-C。同时SELDI-TOF-MS分析表明,P3两种蛋白亚基的分子量分别为5356.8 Da和5697.8 Da(图4)。

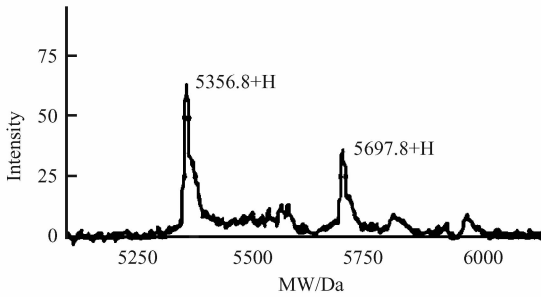


图4 纯化色素蛋白复合体 P3 SELDI-TOF-MS 图谱

Fig. 4 Surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry of purified P3.

2.5 LH2 类胡萝卜素分析

由于 P3 具有新光谱特性, Car 特征峰较弱, 450 nm 特征峰不明显, 因此对 P3 Car 进行了分析。提取 P3 色素后进行薄板层析, 刮取层析板上 Car 条带溶于色谱纯甲醇中, 过滤后用 HPLC-MS 检测。流动相为甲醇: 乙腈 = 90: 10 V/V, 流速 1.2 mL/min。结果表明, P3 Car 特征吸收峰为 426 nm、455 nm 和 484 nm, 属球形烯系^[10,14], 其分子量 (Mr) 为 562 Da (图 5)。

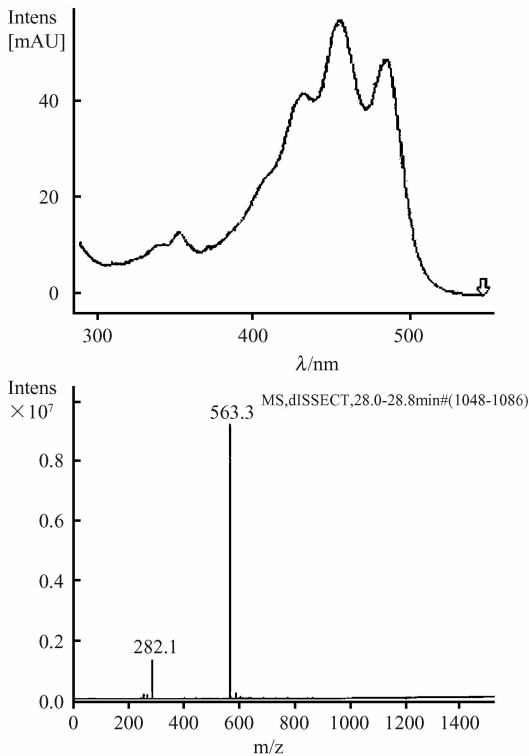


图5 纯化 P3 类胡萝卜素的 HPLC-MS 分析

Fig. 5 HPLC-MS spectrum of carotenoid in purified P3 complex. The left and right showed absorption spectrum and molecular weight of carotenoid in purified P3 complex.

2.6 LH2 复合体能量传递活性

荧光光谱是表征 PPC 能量传递过程的直接证

据, Car 和 BChl 是构成 LH2 的主要色素, 因此采用 Car 和 BChl 特征激发光激发 P3, 观察其荧光光谱。激发光波长 (λ_{ex}) 分别为 480 nm、510 nm 和 800 nm, P2 均能呈现较强的 850 nm 处荧光峰, 表明 P3 Car 能吸收能量并传递至 B850 BChl, 同时也能从 B800 BChl 传递到 B850 BChl (图 6)。因此, 纯化的 P3 LH2 具有吸收光能和传递光能的生物学活性。

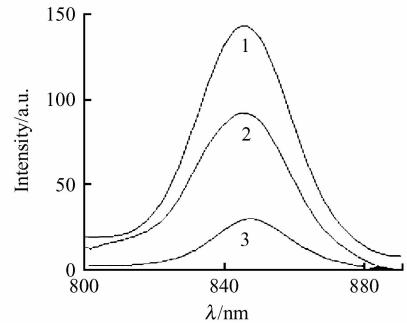


图6 纯化色素蛋白复合体 (P3) 的荧光光谱

Fig. 6 Fluorescence spectra of purified P3 complex. λ_{ex} : 480 nm, 510 nm and 800 nm from 1 to 3, respectively.

3 讨论

目前, 关于紫色非硫细菌 PPC 的研究是不产氧光合细菌中比较深入的一个类群, 球形红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*, *R. sphaeroides*) 便是典型菌株之一。与该菌株相比, *R. azotoformans* 在形态和生理代谢上更具有多样性^[15], 而对其色素蛋白复合体的研究则远不如 *R. sphaeroides* 深入 (Protein Data Bank, PDB)。从 20 世纪 70 年代, PPC 的分离与纯化主要采用蔗糖密度梯度超速离心与离子交换层析相结合的方法。(NH₄)₂SO₄ 盐析是蛋白质粗分离的经典方法, 早在 1972 年, Clayton 就已用于 PPC 组份的分离, 但这种方法在 PPC 分离中很少使用^[6]。随着技术的进步, 超速离心虽然使用越来越简单、省时, 但需要昂贵的离心设备, 与价格低廉的盐析法相比, 花费较高。为探求光合放氢活性与 PPC 色素组成和含量的关系, 我们在没有超速离心设备的条件下, 采用硫酸铵分级分离和 DEAE 离子交换层析相结合的方法, 从高放氢活性菌株 *R. azotoformans* R7 中获得了 3 种光谱学特征不同的 PPC, 而且在分离过程中, 蛋白质、Car 和 BChl 特征峰之间呈现良好的相关性。与超速离心方法相比, 硫酸铵分级分离费用低廉, 简单易行。

从 20% 硫酸铵盐析组份纯化获得一种 PPC (P1), 约在 758 nm、805 nm 和 868 nm 呈现典型特征的特指峰, 其光谱特征与文献相似^[8-9], 凝胶电泳

呈现 RC 的 M、L 和 H 三种亚基的 3 条带以及 LH1 蛋白亚基分子量约为 6 kDa 的条带,因此 P1 被鉴定为 RC-LH1。从 40% 硫酸铵盐析组份纯化获得 P2 和 P3 两种光谱学特征不同的 PPC,都具有 800 nm 和 850 nm BChl Qy 带特征峰,表明二者都含有 LH2 特征性 B800 和 B850 BChl,结合凝胶电泳分析,P2 和 P3 两种 PPC 均被鉴定为 LH2。P3 具有 423 nm 强吸收峰,与文献[10]比较,光谱特征不同,被认为是一种新光谱特性的 PPC。进一步分析表明:P3 含有两种蛋白亚基,分子量分别为 5356.8 Da 和 5697.8 Da,与 PDB 等数据库报道的 *R. sphaeroides* 相近;类胡萝卜素属球形烯系,分子量为 562 Da,与文献报道的分子量分别为 568、586 和 554 的球形烯、羟基球形烯和脱甲基球形烯有差异^[10,14];此外,P3 能将激发光从 Car 向 BChl 以及 BChl 向 BChl 传递。P3 LH2 Car 呈现 477 nm、510 nm 和 550 nm 特征峰,而典型 LH2 Car 呈现 450 nm、478 nm 和 510 nm 球形烯特征峰^[10],二者相比,P3 Car 特征峰发生红移,同时也表明 Car 组份并不是引起 423nm 强吸收峰的主要原因,其结构基础如何,能否确定为一种新型 LH2,还有待于进一步研究。

综上所述:采用硫酸铵分级分离和离子交换层析相结合的方法,从产氢菌株 *R. azotoformans* 中分离纯化获得 3 种不同的 PPC,一种为 LH1-RC,两种为 LH2,其中一种 LH2 不但具有捕获光能和传递光能活性,还具有 423nm 强吸收峰的新光谱特性,为深入开展其结构和功能关系研究,以及光合放氢活性与 PPC 色素组份和含量的关系研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Deisenhofer J, Epp O, Miki K, et al. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 1985, 318: 618-624.
- [2] 杨素萍, 岳慧英, 崔小华, 等. 不产氧光合细菌色素蛋白复合体研究进展. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (9): 17-22.
- [3] McLuskey K, Prince SM, Cogdell RJ, et al. The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodospseudomonas acidophila* strain 7050. *Biochemistry*, 2001, 40 (30): 8783-8789.
- [4] Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, et al. The purple phototrophic bacteria. 1st ed. Netherlands: Springer, 2009: 135-153.
- [5] 杨素萍, 赵春贵, 曲音波, 等. 铁和镍对光合细菌生长与产氢的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43 (2): 257-263.
- [6] Liu Y, Zhang W, Wu YQ, et al. Acquisition and characterization of a carotenoid mutant (GM309) of *Rhodobacter sphaeroides* 601. *Science in China (C)*, 2004, 47 (1): 52-58.
- [7] Hagemann GE, Gadon N, Garcia A, et al. The light-harvesting complex II (B800-850) of *Rhodobacter sulfidophilus*: characterization and formation under different growth conditions. *FEMS Microbiology Letter*, 1995, 126 (1): 7-11.
- [8] Reed DW. Isolation and composition of a photosynthetic reaction center complex from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244 (18): 4936-4941.
- [9] Qian P, Yagura T, Koyama Y, et al. Isolation and purification of the reaction center (RC) and the core (RC-LH1) complex from *Rhodobium marinum*: the LH1 ring of the detergent-solubilized core complex contains 32 bacteriochlorophylls. *Plant and Cell Physiology*, 2000, 41 (12): 1347-1353.
- [10] Alexei AY, Jesus M, Samuel K. Differential carotenoid composition of the B875 and B800-850 photosynthetic antenna complexes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Involvement of spheroidene and spheroidenone in adaptation to changes in light intensity and oxygen availability. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (20): 5877-5883.
- [11] Qian P, Hunter CN, Bullough PA. The 8.5 Å projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal Molecular Biology*, 2005, 49 (5): 948-960.
- [12] Simon S, Seguin J, Sergio M, et al. Nanodissection and high-resolution imaging of the *Rhodospseudomonas viridis* photosynthetic core complex in native membranes by AFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100 (4): 1690-1693.
- [13] Walz T, Jamieson SJ, Bower CM, et al. Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Å, LH1 and RC-LH1 at 25 Å. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 282: 833-845.
- [14] Scolnik PA, Walker MA, Marrs BL. Biosynthesis of carotenoids derived from neurosporene in *Rhodospseudomonas capsulata*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255 (6): 2427-2432.
- [15] Imhoff JF. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer, 2005: 161-167.

Isolation and characterization of pigment-protein complexes from *Rhodobacter azotoformans*

Gengui Zhao¹, Suping Yang^{1*}, Yinbo Qu², Nianzhi Jiao³

(¹Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

(²State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

(³State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: [**Objective**] In order to reveal the relationships of compositions and content of pigment in pigment-protein complexes (PPC) and hydrogen photoevolution from anoxygenic phototrophic bacteria. [**Methods**] We isolated and identified pigment-protein complexes using a separation strategy of subsequent fractionated ammonium-sulfate precipitation, ion exchange column chromatography, absorption spectra and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) from hydrogen-producing *Rhodobacter azotoformans* R7. We investigated the characterizations of the peripheral light-harvesting complex (LH2) with an unusual absorption spectrum by surface enhanced laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS), high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and fluorescence spectra. [**Results**] We acquired three types of PPC, the reaction center and core light-harvesting complex (RC-LH1) and two kinds of LH2, from strain R7 incubated anaerobically in the light. The two LH2 showed the different absorption spectra, one of them displayed unusual absorption spectrum with the maximum absorption band at 423 nm. The unusual LH2 consisted of two kinds of protein subunits with the molecular weight of 5556.8 Da and 5697.8 Da and carotenoid of spheroidene series with the molecular weight of 562 Da. It was also capable of transferring energy from carotenoid to bacterialchlorophyll and from B800 bacterialchlorophyll to B850 bacterialchlorophyll. [**Conclusions**] *Rhodobacter azotoformans* R7 with hydrogen-producing capacity could photosynthesize two types of LH2 under anaerobically in the light, one of them presented novel spectral property.

Keywords: pigment-protein complexes; isolation; *Rhodobacter azotoformans*

(本文责编:王晋芳)