

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407015



多拷贝 *pucBA* 基因在沼泽红假单胞菌 光合生长中的作用

林若欣, 赵晓岚, 赵春贵, 杨素萍

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 选择沼泽红假单胞菌 CGA009 菌株, 采用基因敲除方法, 依次对菌株中的 5 对 *pucBA* 基因进行敲除, 以探求不同 *pucBA* 基因对菌株光合生长、光谱表型和光合色素质量浓度的影响。结果表明: 不同 *pucBA* 基因的表达量与菌株光合生长速率和光合色素合成量呈正相关关系; 高光下 *pucBA_b* 和 *pucBA_s* 基因对菌株生长发挥主要作用, 低光下 *pucBA_b*, *pucBA_d* 和 *pucBA_s* 基因对菌株生长起主要作用; 敲除 *pucBA_d* 基因可致 *pucBA_b* 基因高效表达, 敲除 *pucBA_c* 基因可致 LH1-RC 合成量提高, 表明某个 *pucBA* 基因的敲除对其他光合基因表达具有补偿作用。

关键词: 紫细菌; 沼泽红假单胞菌; 外周捕光复合体(LH2); 基因敲除

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0610-08

Role of Multiple Copy *pucBA* Genes in Phototrophic Growth of *Rhodopseudomonas palustris*

LIN Ruoxin, ZHAO Xiaolan, ZHAO Chungui, YANG Suping

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Selecting *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 strain, gene knockout method was used to sequentially knock out five pairs of *pucBA* genes in the strain in order to explore the effects of different *pucBA* genes on photosynthetic growth, spectral phenotype and photosynthetic pigment mass concentration of the strain. The results showed that the expression levels of different *pucBA* genes were positively correlated with the photosynthetic growth rate and photosynthetic pigment synthesis of the strain. The *pucBA_b* and *pucBA_s* genes played a major role in strain growth under high light conditions, while the *pucBA_b*, *pucBA_d* and *pucBA_s* genes played a major role in strain growth under low light conditions. Knocking out the *pucBA_d* gene could lead to efficient expression of *pucBA_b* gene, while knocking out the *pucBA_c* gene could increase LH1-RC synthesis, indicating that the knockout of a certain *pucBA* gene had a compensatory effect on the expression of other photosynthetic genes.

Keywords: purple bacteria; *Rhodopseudomonas palustris*; peripheral light-harvesting complex (LH2); gene knockout

不产氧光合细菌(APB)因其光合单元简单, 常作为光合作用机制研究的模型生物^[1-2]。由于自然光的不连续性, APB 形成了 2 种机制应对光环境的变化。一种是调控光合单元中外周捕光复合体(LH2)

收稿日期: 2024-07-15

通信作者: 杨素萍(1966-), 女, 教授, 博士, 主要从事资源微生物的挖掘与利用的研究。E-mail: yangsuping@hqu.edu.cn.

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

和核心捕光复合体-反应中心复合物(LH1-RC)的数量以适应光变化,通常 LH1 与 RC 形成 1 : 1 的复合体^[3-4],随着光照强度升高,LH2/LH1-RC 的比例降低^[5-6]。另一种是随着光照强度变化,LH2 光谱类型也随之变化^[5-6],高光时菌株形成典型光谱 LH2(T-LH2),又称 B800-850 LH2,低光时形成异常光谱 LH2(U-LH2),主要包括 LH3(B800-820 LH2),LH4(B800-only 或 B800-low-850 LH2)和 LH2'(B800-840 LH2)等^[7-9]。

目前,研究已阐明了不同光谱类型 LH2 的形成机制及随光变化机制,其原因是菌株拥有多拷贝编码 LH2 $\alpha\beta$ 肽的 *pucBA* 基因,在不同光环境中多拷贝 *pucBA* 的表达量不同,由于不同 *pucBA* 基因编码的 $\alpha\beta$ 肽氨基酸残基的差异,导致不同 $\alpha\beta$ 肽与细菌叶绿素(BChl) *a* 结合位点和配位方式不同,从而形成不同的特征光谱 LH2^[9-11]。基因组和系统发育分析显示,多拷贝 *pucBA* 基因在隶属于 APB 的紫细菌中广泛存在,尤其在红假单胞菌属菌株中的拷贝数可高达 5~7 对^[5,9]。由于多拷贝 *pucBA* 基因同时表达,导致菌株中不同的 LH2 难以彼此分离,即使是高度纯化的 LH2,也是不同 LH2 的混合物^[10-13]。针对该问题, Southall 等^[2] 和 Qian 等^[1] 分别以沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*, *Rps. palustris*) CGA009 和 2.1.6 为研究对象,采用基因敲除的方法得到仅剩 1 对 *pucBA* 基因的菌株,纯化得到单一基因型的 LH2,不仅证明 LH4 均为 B800-noly LH2^[1-2],而且高分辨地解析了 4 种 LH2 的晶体结构^[1],但并没有报道这 4 种单一基因型 LH2 的光能传递活性^[1]。

LH2 功能活性评价通常采用 Cogdell 建立的检测光能传递效率的方法,目前研究仅在固氮红细菌(*Rhodobacter azotiformans*) 134K20、嗜温紫色硫光养细菌(*Allochromatium vinosum*) 和 *Rps. palustris* CGA009 等极少数菌株中比较了高、低光下纯化 LH2 的光能传递效率^[5,14],但该法依赖于 LH2 的分离纯化,而 LH2 彼此间难以纯化,所提供的数据往往是菌株同时表达不同 LH2 的综合结果^[5]。归根结底,LH2 的作用主要是推动菌株进行光合作用、促进生长,但目前还没有足够的数据来评估 LH2 在菌株光合作用代谢过程中的功能活性。Zhao 等^[5]采用 Cogdell 法比较研究了 *Rps. palustris* CGA009 菌株在高、低光下 U-LH2(LH4)和 T-LH2 的能量传递活性,进一步敲除菌株中的 *pucBA_d* 基因(编码 LH4 的 $\alpha\beta$ 肽),探求 LH4 在菌株光合生长中的作用。基于此,本文采用遗传解剖的策略,在前期敲除 *pucBA_d* 基因基础上,依次敲除菌株的 *pucBA_a*, *pucBA_b*, *pucBA_c* 和 *pucBA_e* 基因,分别在高、低光下,考察基因缺失对菌株光合生长、光谱表型和光合色素质量浓度的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

Rps. palustris CGA009(野生株 WT),购自美国 ATCC 公司。*Rps. palustris* CGA009 *pucBA_d* 基因敲除株简称 Δd ,克隆菌株大肠杆菌(*E. coli*) JM109,由实验室保存。二氨基庚二酸(DAP)营养缺陷型 *E. coli* WM3064,由中国科学院水生生物研究所邱东茹研究员馈赠。质粒 pJQ200SK(携带硫酸庆大霉素抗性基因 Gm 和蔗糖筛选标记基因 *sacB*),购自武汉淼灵生物公司。

1.2 主要试剂

基因组 DNA 提取试剂盒,购自北京全式金生物技术有限公司。质粒提取试剂盒和通用型 DNA 纯化回收试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司。PrimerSTAR[®] HS DNA Polymerase、限制性内切酶(*Pst* I, *Xba* I 和 *Xho* I)和 T4 DNA 连接酶等,均购自日本 Takara 公司。甲醇、丙酮、异丙醇等为色谱纯试剂,其余试剂为分析纯试剂,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基和培养条件

采用改良 Ormerod 液体培养基和 18# 固体培养基^[5]。改良 Ormerod 液体培养基培养容器为螺口蓝盖瓶,接种后用培养基充满 140 mL 蓝盖瓶,在 30 ℃,白炽灯光源 2 000 lx(高光)和 200 lx(低光)条件下,厌氧培养 *Rps. palustris* CGA009 菌株的基因缺失菌株。*E. coli* 采用 LB 培养基,37 ℃ 培养,根据需要添加 DAP, Gm 和蔗糖。

1.4 基因敲除和验证

在巢式聚合酶链式反应(PCR)验证 *pucBA_d* 敲除株(Δd)基因缺失正确的基础上,以 Δd 菌株作为

出发株,依次敲除菌株中的 $pucBA_a$, $pucBA_b$, $pucBA_c$ 和 $pucBA_e$ 基因,得到 $pucBA_{da}$, $pucBA_{dab}$, $pucBA_{dabe}$ 和 $pucBA_{dabec}$ 基因缺失突变株,分别简称为 Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 菌株。 $pucBA_d$, $pucBA_a$, $pucBA_b$, $pucBA_c$ 和 $pucBA_e$ 基因敲除片段的长度分别为 381,408,412,584 和 404 bp。

采用环状质粒介导的双交换同源重组法进行基因敲除^[5]。以 CGA009 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 法分别扩增敲除目的基因上游(U)和下游(D)DNA 片段,采用 PCR 法拼接上、下游 DNA 片段,构建重组质粒 pJQ200SK-UD,转化 *E. coli* DH5 α ,涂布 LB 抗性(Gm)平板,筛选重组子,并进行 PCR 验证。提取重组质粒 pJQ200SK-UD,转化 *E. coli* WM3064,经 Gm 抗性筛选和 PCR 验证,得到重组菌株 *E. coli* WM3064(pJQ200SK-UD)。采用双亲交配的方法^[5],通过 *E. coli* WM3064 将质粒 pJQ200SK-UD 接合转移至受体菌,将接合转移的菌悬液涂布在 18# 固体培养基(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Gm,不含 DAP)上,培养 5~7 d,挑选菌落,在含体积分数为 10%蔗糖的 18# 固体培养基平板上划线,挑选菌落,分别用不同引物,通过巢式 PCR 筛选和验证目的基因缺失突变株。

使用的引物序列、酶切位点和扩增产物,如表 1 所示。表 1 中:F,R 分别为 $pucBA$ 基因的正向、反向引物;UF,UR 分别为 $pucBA$ 基因上游片段的正向、反向引物;DF,DR 分别为 $pucBA$ 基因下游片段的正向、反向引物;下标 a,b,c,e 分别为 $pucBA$ 基因编号;CTGCAG 为 *Pst* I 酶切位点,CTCGAG 为 *Xho* I 酶切位点,TCTAGA 为 *Xba* I 酶切位点;双下划线序列为 PCR 拼接互补序列。

表 1 引物序列、酶切位点和扩增产物
Tab. 1 Primer sequences, enzyme cleavage sites and amplification products

名称	引物序列(5'-3')	扩增产物(片段大小)
UF _a	CTAG CTGCAGGCACCTCGCCTTCGCCCGCA	$pucBA_a$ -U(947 bp)
UR _a	CCCCAAACGAAAACCCCTCATAATGGGGTTTCT	
DF _a	AACCCCATTTATGAGGGTTTTTCGTTTGGGGGC	$pucBA_a$ -D(939 bp)
DR _a	CTAG CTCGAGGGTTTGGCTCGTTGATGGCG	
F _a ,R _a	TCAAAATGGCTGACAAG;AGAAGAGCAGTATTGAT	$pucBA_a$ (374 bp)
UF _b	CTAG CTGCAGCCAGCCGATTCTTGATTG	$pucBA_b$ -U(908 bp)
UR _b	AAATACAAAACACCCCTCAATGCGTGCTGTTCG	
DF _b	AACAGCACGCATTGAGCGGGTGTTTTGTATTT	$pucBA_b$ -D(926 bp)
DR _b	CTAG CTCGAGTGACGGTGTTTGGTGAGGGA	
F _b ,R _b	ATCCGAACAAGGTCTGG;CGGGGCGGCGACGGTGG	$pucBA_b$ (322 bp)
UF _c	CTAG CTCGAGCTGAGCGGCAGGATGTA	$pucBA_c$ -U(978 bp)
UR _c	GGAGGACAGAGGCGTTAGATGACCCTCTTGTT	
DF _c	CAAGAGGGTCATCTAACGGCTCTGTCTCTCTG	$pucBA_c$ -D(918 bp)
DR _c	CTAG TCTAGACGAGGTGGTGCTGTTGCGA	
F _c ,R _c	CACACAGCCCCGTAAGCC;GAGCGGATTTGTAGACGA	$pucBA_c$ (815 bp)
UF _e	CTAG TCTAGACAGCCTGTGTTCGGGGGAG	$pucBA_e$ -U(962 bp)
UR _e	TGTCCGCACCCCGCTGGATGCTTCCAGCCCTC	
DF _e	GGGCTGGAAGCATCCAGCGGGGTGCGGACATTT	$pucBA_e$ -D(919 bp)
DR _e	CTAG CTCGAGGCGTTCGACCTTGAATAAA	
F _e ,R _e	TAGTCTTACAATCACTCGGA;AGGACCAGACTTTCATCAT	$pucBA_e$ (833 bp)

1.5 光合生长、吸收光谱和光合色素质量浓度的测定

离心收集低光培养 3 d 的 $pucBA$ 基因缺失株菌体,调整菌悬液吸光度 $D(660)$ 为 1.50,按体积分数为 3%的接种量接种至改良 Ormerod 液体培养基中。分别设置光照强度为 2 000 lx 和 200 lx,以 WT 为对照,进行 3 组重复实验。培养过程中取样测定菌体生物量和吸收光谱。生物量以 $D(660)$ 表示,绘制生长曲线。通过分析活细胞吸收光谱的特征峰的波长和吸光度的变化,表征 $pucAB$ 基因敲除对菌株 LH2 合成能力的影响。使用基准线法计算特征光谱的吸光度值(D),其计算公式为

$$D = D_T - D_{RL}。$$

上式中: D_T 与 D_{RL} 分别为特征光谱的总吸光值和参考线(RL)的吸光值。

用 D_{WT} 表示野生型菌株的吸光度值,通过公式 $R = D / D_{WT} \times 100\%$ 计算敲除菌株和野生型菌株间的相对生长速率。用 ΔR 表示相对变化量,即 $pucAB$ 基因敲除后与敲除前相对生长速率的差值。

采用超声法提取菌体光合色素。按质量体积比(g : mL)为 1 : 12 向菌体中加入色素提取液(丙酮-甲醇按照体积比 7 : 2 配制而成)提取光合色素,将 3 次提取液合并定容至 10 mL,取样测定其吸收光谱。Bchl *a* 和 Car 的最大吸收波长分别为 770,476 nm,Bchl *a* 和 Car 的质量浓度(ρ)计算公式为

$$\rho = DVf/(aL)。$$

上式中: a 为摩尔消光系数,Car 和 Bchl *a* 摩尔消光系数分别为 160,76 L · mol⁻¹ · cm⁻¹[14-15]; L 为光程; D , V 和 f 分别表示样品的吸光度、体积和稀释因子。

2 实验结果与分析

2.1 基因敲除和突变株验证

以 UF/DR 为引物,基因敲除前、后菌株 PCR 扩增的目标条带大小,如图 1(a)所示。由图 1(a)可知:扩增条带与预期大小吻合;与基因敲除前菌株相比,*pucBA* 基因缺失株未检测到相应大小的 DNA 条带,检测到相对分子质量较小的 DNA 条带,与缺失基因片段基本吻合,表明基因敲除菌株靶基因片段缺失。以 F/R 为引物,基因敲除前、后菌株 PCR 扩增目标条带的大小,如图 1(b)所示。由图 1(b)可知:扩增条带与预期片段大小相吻合,与敲除前相比,基因敲除后的菌株未检测到相应大小的 DNA 条带,表明基因敲除菌株靶基因被敲除。由此表明,WT(CGA009)敲除 *pucBA_d* 基因菌株(Δd)的基因缺失正确,以 Δd 菌株作为出发株,依次敲除菌株中的 *pucBA_a*,*pucBA_b*,*pucBA_c* 和 *pucBA_e* 基因,相继获得了 Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 菌株。

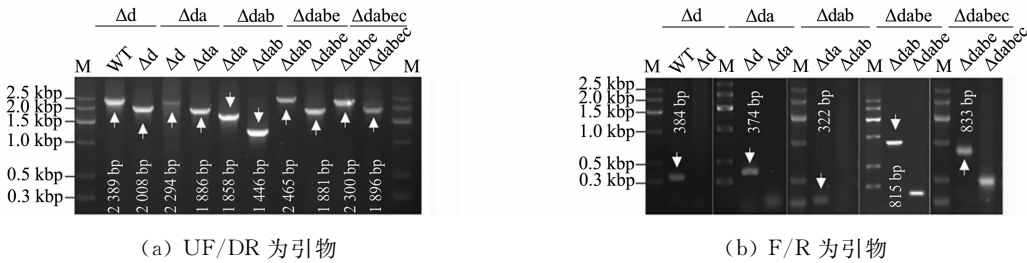


图 1 *pucBA* 基因敲除株 Δd , Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 的巢式 PCR 检测结果

Fig. 1 Nested PCR detection results of *pucBA* gene knockout strains of Δd , Δda , Δdab , $\Delta dabe$ and $\Delta dabec$

2.2 基因缺失对菌株吸收光谱的影响

由于 LH2 具有特征近红外(NIR)吸收光谱,常常用活细胞 NIR 光谱反映 LH2 特征和表达量的变化。*pucBA* 基因敲除株在高光 and 低光下的 NIR 特征光谱,如图 2 所示。图 2 中: λ 为波长。低光下 *pucBA* 基因敲除对菌株 NIR 特征光谱的影响,如表 2 所示。表 2 中: λ_{P1} , λ_{P2} 分别为特征峰 P1,P2 对应的波长; D_{max} 为吸光度峰值。

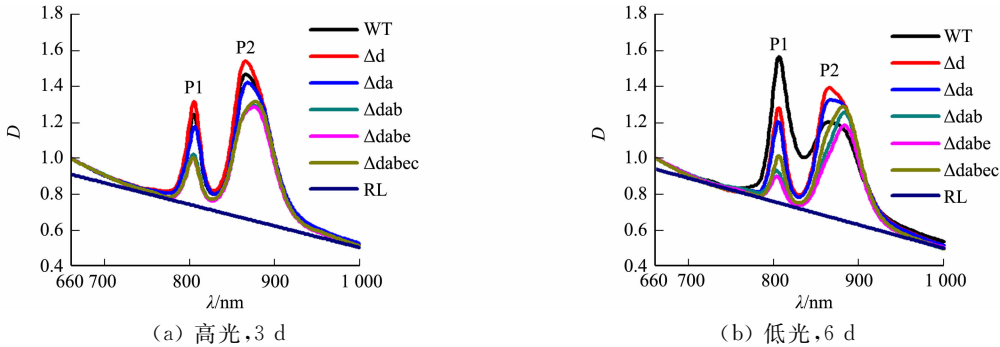


图 2 *pucBA* 基因敲除株在高光 and 低光下的 NIR 特征光谱

Fig. 2 NIR characteristic spectra of *pucBA* genes knockout strain under high and low light conditions

由图 2(b),表 2 可知:低光时,WT 菌株呈现 P1(805 nm)和 P2(864 nm)2 个 NIR 特征峰,且特征峰 P1 吸光度(D_{P1})>特征峰 P2 吸光度(D_{P2});随着 5 对 *pucBA* 基因的依次敲除,缺失株的 P1 最大波长(λ_{max})在 803~805 nm 范围内变化, D_{max} 呈逐渐降低(Δd , Δda , Δdab 和 $\Delta dabe$)、再升高($\Delta dabec$)现象;P2 峰的最大波长明显红移,从 864~865 nm(Δd , Δda 和 Δdab)红移至 881~883 nm($\Delta dabe$, $\Delta dabec$),

D_{\max} 呈现先升高(Δd)、后逐渐降低($\Delta da, \Delta dab$ 和 $\Delta dabe$)、再升高($\Delta dabec$)的现象。但不同敲除株的 P1 和 P2 特征峰吸光度峰值(D_{\max})的降低或升高的幅度(ΔR)不同。

表 2 低光下 *pucBA* 基因敲除对菌株 NIR 特征光谱的影响

Tab. 2 Effects of *pucBA* gene knockout under low light conditions on NIR characteristic spectra of strains

菌株	特征峰 P1				特征峰 P2				
	λ_{P1}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$	$D(866)$	λ_{P2}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$
WT	805	0.817	100.0	—	0.528	864	0.528	100.0	—
Δd	805	0.531	65.0	−35.0	0.721	865	0.720	135.9	35.9
Δda	805	0.455	55.7	−9.3	0.653	865	0.652	122.7	−13.2
Δdab	803	0.180	22.0	−33.7	0.603	881	0.603	74.7	−48.0
$\Delta dabe$	803	0.146	17.9	−4.2	0.533	883	0.533	64.9	−9.8
$\Delta dabec$	805	0.265	32.4	14.6	0.637	881	0.637	92.4	27.6

由于 T-LH2, U-LH2(LH4) 和 LH1-RC 分别呈现 B800-850, B800-only 和 B800-875 特征峰, 它们的光谱发生相互叠加, 从而形成菌体的 P1 和 P2 特征峰, *pucBA* 基因敲除前后特征峰变化可反映 *pucBA* 基因的表达情况。由表 2 可知: 与相应基因缺失前的菌株相比, $\Delta d, \Delta da, \Delta dab, \Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 缺失株 P1 峰吸光度的相对变化(ΔR)分别为 −35.0%, −9.3%, −33.7%, −4.2% 和 14.6%, P2 峰吸光度的 ΔR 分别为 35.9%, −13.2%, −48.0%, −9.8% 和 27.6%。

由此可知以下 3 点结论: 1) 在低光环境中, *pucBA_d*, *pucBA_b* 和 *pucBA_a* 是主要表达合成 LH2 的基因, 表达量高低顺序为 *pucBA_b* > *pucBA_d* > *pucBA_a*, *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 表达量则更低; 2) 由于 Δda 敲除株的 P2 峰吸光度高于 WT 菌株, 表明敲除 *pucBA_d* 有利于 *pucBA_b* 基因的高效表达, 由于 *pucBA_b* 表达 b-LH2 合成量升高, 导致 P1 特征峰将升高, 从而低估了 Δd 菌株 P1 特征峰降低的程度; 3) 与 $\Delta dabe$ 菌株相比, 由于 $\Delta dabec$ 菌株的 $D(805)$ 和 $D(881)$ 升高, 由此说明尽管已有研究表明 *pucBA_e* 是伪基因, 不能合成 LH2^[9], 但敲除该基因有利于菌株中 LH1-RC 合成量升高, 表明 *pucBA_e* 对 LH1-RC 基因的表达具有抑制作用。

由图 2(a) 和表 3 可知: 高光时 *pucBA_d* 基因表达 d-LH2 合成量很低^[5,9], WT 菌株呈现 805 nm (P1) 和 866 nm (P2) 特征峰, 且 D_{P2} 高于 D_{P1} , 与文献结果一致^[5]; 随着 *pucBA* 基因的依次敲除, P1 峰位变化范围在 804~805 nm, P2 峰则从 866~867 nm (Δd 和 Δda) 红移至 876~878 nm ($\Delta dab, \Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$), 其中, Δdab 红移幅度最大, 从 867 nm 红移至 876 nm; 与相应的未敲除株相比, Δd 和 $\Delta dabec$ 敲除株的 $D_{P1}, D_{P2}, D(866)$ 升高, 而 $\Delta da, \Delta dab$ 和 $\Delta dabe$ 敲除株降低, 降低幅度(ΔR)为 $\Delta dab > \Delta da > \Delta dabe$ 。由此表明: 在高光条件下, 菌株主要表达的基因是 *pucBA_a* 和 *pucBA_b*, 且 *pucBA_b* 表达量高, 次要表达基因是 *pucBA_e*, 未检测到 *pucBA_d* 和 *pucBA_c* 基因的表达。虽然 *pucBA_d* 基因表达量很低, 但敲除该基因促进了菌体中其他 *pucBA* 的 LH2 合成。敲除 *pucBA_e* 则有利于 LH1-RC 表达。

表 3 高光下 *pucBA* 基因敲除对菌株 NIR 特征光谱的影响

Tab. 3 Effects of *pucBA* gene knockout under high light conditions on NIR characteristic spectra of strains

菌株	特征峰 P1				特征峰 P2				
	λ_{P1}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$	$D(866)$	λ_{P2}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$
WT	805	0.508	100.0	—	0.805	866	0.804	100.0	—
Δd	805	0.580	114.2	14.2	0.879	866	0.878	109.2	9.2
Δda	805	0.434	85.4	−28.7	0.751	867	0.758	93.4	−15.8
Δdab	804	0.284	55.9	−29.5	0.601	876	0.644	74.6	−18.7
$\Delta dabe$	804	0.264	52.0	−3.9	0.591	876	0.634	73.4	−1.2
$\Delta dabec$	804	0.266	52.4	0.4	0.603	878	0.685	74.9	1.5

2.3 基因缺失对菌株光合生长的影响

pucBA 敲除株在高光和低光下的生长曲线, 如图 3 所示。由图 3 可知: 高光条件下, 随培养时间的延长, 各敲除株光合生长速率有所不同, 但稳定期的生物量差异较小; 与高光条件相比, 低光下各敲除株的光合生长速率和最大生物量都有所不同。

pucBA 敲除株在高光和低光下的相对生长速率(R), 如图 4 所示。图 4 中: 字母 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ 表示

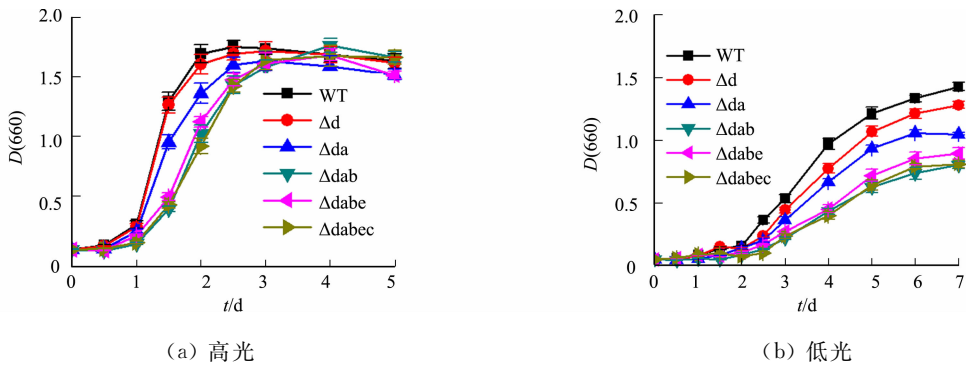


图 3 *pucBA* 敲除株在高光和低光下的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *pucBA* knockout strain under high and low light conditions

显著性差异分析,不同字母间的差异具有统计学意义($P<0.05$);“—”表示与未敲除株相比,敲除株生长速率升高。由图 4 可知:高光 and 低光条件下, $\Delta dabec$ 菌株的相对生长速率(R)分别为 29.4%和 41.0%,即 5 对 *pucBA* 完全敲除使生长速率降低了 70.6%和 59.0%,表明 *pucBA* 基因在菌株光合生长过程中发挥重要的作用;随着 5 对 *pucBA* 依次敲除,在高光条件下,与相应的未敲除株相比, Δd , Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 缺失株相对生长速率分别降低了 2.1%(Δd), 22.9%(Δda), 43.1%(Δdab), -3.3%($\Delta dabe$), 5.8%($\Delta dabec$),在低光条件下,分别降低了 20.1%, 11.3%, 24.1%, -4.0%和 7.5%。

由此可见,高光时 *pucBA_a* 和 *pucBA_b* 对菌株的光合生长发挥主要作用,且 *pucBA_b* > *pucBA_a*, 而 *pucBA_d*, *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 的作用较小;低光时 *pucBA_d*, *pucBA_a* 和 *pucBA_b* 对菌株生长发挥主要作用,且 *pucBA_b* > *pucBA_d* > *pucBA_a*, *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 的作用较小。 $\Delta dabe$ 菌株在高光 and 低光下生长速率反而有所升高,但差异无统计学意义($P>0.05$);*pucBA_c* 是伪基因^[9],但敲除该基因对生长有明显抑制作用。由此表明,敲除 *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 仍影响菌株的生长和代谢,但总体上对生长影响较小。与菌株特征光谱结果相比可知,敲除 *pucBA* 基因对菌株生长的抑制作用与特征光谱吸光度降低的程度呈正相关关系,即敲除表达量高的 *pucBA* 基因对生长的抑制作用大,反之则小;光谱分析表明,敲除 *pucBA_d*, Δd 菌株 LH2 表达量升高,但高光时菌株的生长速率并没有升高,反而有降低的趋势,其原因可能是高光时高表达量的 LH2 对菌株光损伤作用较大。

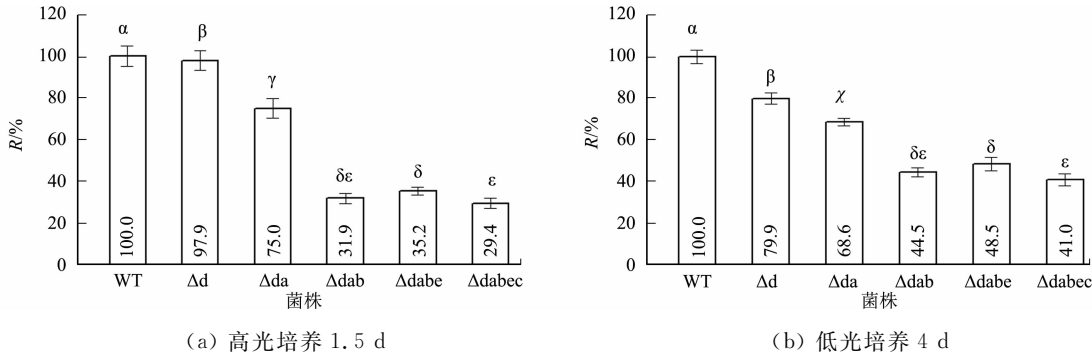


图 4 *pucBA* 敲除株在高光 and 低光下的相对生长速率

Fig. 4 Relative growth rate of *pucBA* knockout strain under high and low light conditions

2.4 基因缺失对菌株光合色素的影响

敲除 *pucBA* 基因对菌体 BChl *a* 和 Car 质量浓度(ρ)的影响,如图 5 所示。由图 5 可知:与基因敲除前菌株相比,高光下, Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 菌株的 BChl *a* 和 Car 的质量浓度均显著降低($P<0.05$),降低幅度为 $\Delta dab>\Delta da>\Delta dabe$, Δd 和 $\Delta dabec$ 菌株 BChl *a* 和 Car 的质量浓度虽然升高,但差异无统计学意义;低光下, Δd , Δda , Δdab 菌株的 BChl *a* 和 Car 的质量浓度均显著降低($P<0.05$),降低幅度为 $\Delta dab>\Delta d>\Delta da$, $\Delta dabe$ 菌株的 BChl *a* 和 Car 质量浓度未显著降低, $\Delta dabec$ 菌株 BChl *a* 的质量浓度有所升高,但差异无统计学意义,而 Car 质量浓度显著升高。由此可见,敲除表达量高的 *pucBA* 基因,菌株光合色素的质量浓度降低幅度大。这与敲除株光合生长和 NIR 光谱测定的 LH2 表达量的结果基本

吻合,也与光合色素主要定位在 LH2 和 LH1-RC 上的报道结果相吻合^[16]。但敲除 *pucBA_d* 和 *pucBA_c* 基因,菌体积累的光合色素质量浓度升高,这与基因敲除导致菌株中其他 *pucBA* 或 LH1-RC 表达量升高的结果相吻合。

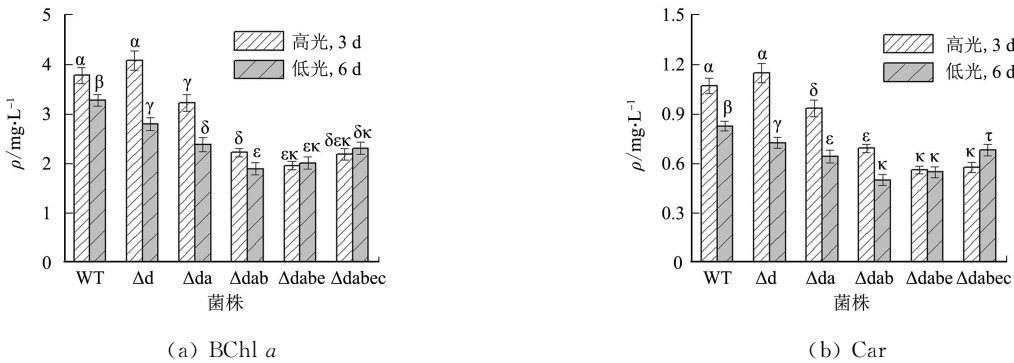


图 5 敲除 *pucBA* 基因对菌体 Bchl *a* 和 Car 质量浓度的影响

Fig. 5 Effect of knocking out *pucBA* gene on mass concentration of bacterial Bchl *a* and Car

3 结论

目前研究主要从转录水平上揭示高低光与菌株多拷贝 *pucBA* 基因表达的关系^[9],尚缺乏转录表达产物(LH2)合成和功能活性的证据。采用遗传解剖策略,依次敲除多拷贝 *pucBA* 基因,通过光合生长、LH2 特征光谱和光合色素合成量等指标综合评价,分析多拷贝 *pucBA* 基因对菌株生存的贡献。

研究结果显示:敲除不同的 *pucBA* 基因对菌株生长的影响程度不同,基因的表达量与菌株光合生长和光合色素合成量呈正相关关系,即主要功能基因被敲除,严重制约菌株的生长、LH2 合成和光合色素积累,敲除次要功能基因则影响较小。高光时,*pucBA_a* 和 *pucBA_b* 基因是主要功能基因,对生长的贡献率大小为 *pucBA_b* > *pucBA_a*;低光时,*pucBA_d*, *pucBA_a* 和 *pucBA_b* 是主要功能基因,贡献率大小为 *pucBA_b* > *pucBA_d* > *pucBA_a*;无论高光还是低光, *pucBA_b* 对菌株光合生长的贡献最大,文中结果与转录组文献报道的结果相矛盾^[9]。特征光谱显示,敲除 *pucBA_d* 基因,LH2 相对含量不但不降低,反而升高,光合色素的质量浓度同样有升高趋势,由此表明,敲除该基因有利于菌株中其他 *pucBA* 的高效表达,对 LH2 合成具有补偿作用,这与本课题组前期研究结果一致^[5]。但研究结果进一步显示,在低光条件下,敲除 *pucBA_d* 基因有利于 *pucBA_b* 基因高效表达。转录组文献结果显示,CGA009 菌株在高光和低光条件下 *pucBA_b* 基因为次要表达的功能基因^[9],而文中结果显示, *pucBA_b* 基因对菌体光合生长贡献最大,由此明确,无论高光和低光,敲除 *pucBA_d* 基因都能诱导 *pucBA_b* 基因高效表达,这也是文中结果与转录组研究结果相矛盾的原因。另外,高光条件下 *pucBA_d* 基因转录表达量极低^[9],但敲除 *pucBA_d* 基因,LH2 合成量升高,菌株生长速率没有升高,反而有所降低的原因可能是高光下,LH2 表达量高,光能吸收和传递活性高,对菌株的光损伤也增大,从而导致菌株生长速率没有升高。敲除 *pucBA_c* 基因促进 LH1-RC 合成量升高,表明 *pucBA_c* 基因对 LH1-RC 合成具有抑制,其抑制机制有待深入研究。由此可见,多拷贝 *pucBA* 有利于菌株适应不同的光环境,不同光环境中不同的 *pucBA* 表达,其表达产物的功能势必与其环境相适应,因此,多拷贝 *pucBA* 表达调控的机制还有待深入研究。

通过遗传解剖策略,依次敲除 CGA009 菌株中的 5 对拷贝 *pucAB* 基因,阐明了多拷贝 *pucBA* 基因的缺失与菌株光合生长、光谱表型和光合色素合成的关系和规律,评价了 5 对 *pucBA* 在 CGA009 菌株中的功能和作用,即 *pucBA_a*, *pucBA_b* 和 *pucBA_d* 对该菌株的光合生长发挥主要作用,其中, *pucBA_d* 主要在低光时发挥作用。研究发现,敲除 *pucBA_d* 诱导 *pucBA_b* 的高效表达,敲除 *pucBA_c* 诱导 LH1-RC 合成量升高。研究为多拷贝 *pucBA* 功能和活性评价提供一种思路和方法。

参考文献:

[1] QIAN Pu, NGUYEN-PHAN C T, GARDINER A T, *et al.* Cryo-EM structures of light-harvesting 2 complexes from *Rhodospseudomonas palustris* reveal the molecular origin of absorption tuning[J]. Proceedings of the National Acad-

- emy of Sciences of the United States of America,2022,119(43);e2210109119. DOI:10.1073/pnas.2210109119.
- [2] SOUTHALL J,HENRY S L,GARDINER A T,*et al.* Characterization of a *pucBA* deletion mutant from *Rhodospseudomonas palustris* lacking all but the *pucBA_d* genes[J]. Photosynthesis Research,2018,135(1/2/3):9-21. DOI:10.1007/s11120-017-0386-7.
- [3] LIU Luning,BRACUN L,LI Mei. Structural diversity and modularity of photosynthetic RC-LH1 complexes[J]. Trends in Microbiology,2024,32(1):38-52. DOI:10.1016/j.tim.2023.06.002.
- [4] GARDINER A T,NGUYEN-PHAN T C,COGDELL R J. A comparative look at structural variation among RC-LH1 ‘core’ complexes present in anoxygenic phototrophic bacteria[J]. Photosynthesis Research,2020,145(2):83-96. DOI:10.1007/s11120-020-00758-3.
- [5] ZHAO Xiaolan,ZHAO Chungui,YANG Suping,*et al.* 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. DOI:10.1111/php.13134.
- [6] GARDINER A T,NIEDZWIEDZKI D M,COGDELL R J. 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. DOI:10.1039/c7fd00191f.
- [7] SERDYUK O P,SMOLYGINA L D,ASHIKHMIN A A. 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. DOI:10.1134/S160767292002012X.
- [8] SERDYUK O P,ABDULLATYPOV A V,SMOLYGINA L D,*et al.* 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. DOI:10.7717/peerj.14769.
- [9] FIXEN K R,ODA Y,HARWOOD C S. Clades of photosynthetic bacteria belonging to the genus *Rhodospseudomonas* show marked diversity in light-harvesting antenna complex gene composition and expression[J]. Msystems,2016,1(1):e00006-e000015. DOI:10.1128/msystems.00006-15.
- [10] HARTIGAN N,THARIA H A,SWEENEY F,*et al.* 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. DOI:10.1016/S0006-3495(02)75456-8.
- [11] BRODOSUDARMO T H P,COLLINS A M,GALL A,*et al.* 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. DOI:10.1042/BJ20110575.
- [12] TADROS M H,KATSIU E,HOON M A,*et al.* 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. DOI:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18315.x.
- [13] THARIA H A,NIGHTINGALE T D,PAPIZ M Z,*et al.* Characterisation of hydrophobic peptides by RP-HPLC from different spectral forms of LH2 isolated from *Rps. palustris*[J]. Photosynthesis Research,1999,61(2):157-167. DOI:10.1023/A:1006281532327.
- [14] BRITTON G. General carotenoid methods[J]. Methods in Enzymology,1985,111:113-149. DOI:10.1016/s0076-6879(85)11007-4.
- [15] 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. DOI:10.2116/analsci.32.801.
- [16] KAKITANI Y,FUJJI R,HAYAKAWA Y,*et al.* 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. DOI:10.1021/bi602485x.

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:刘源岗)