

(XIV)

碳酐酶低的多,但是却观察到了碳酐酶的活性是由环糊精的疏水环境和束缚到咪唑上的二价锌离子所提供的。若再引入另外的碱,则可提高催化反应活性。

五、结 束 语

酶催化的化学模拟,一直是一个重要研究课题,但至今尚未取得显著进展,其主要困难在于生物催化的选择性和活性主要和酶的蛋白质部分有关,不能简单地用一个低分子的辅酶或具有催化活性的化合物来模拟,而应当从酶分子对底物的包接和催化两个方面联系起来进行模拟。因此,有关包接作用对有机反应的影响,广义地说都可以看成是酶的模拟研究。

在具有包接复合作用的化合物中,环糊精结构简单,更接近于酶分子的微环境,因此受到人们的重视。通过向环糊精分子中引入不同的

基团,改变环糊精的性能,正在为一些生物体内的反应在实验室中重现提供一条重要的途径。环糊精不但可以包接许多有机和无机分子,还可以包接体内近六分之一的酶,利用它有可能实现人工肝或人工肾的代谢机能;如果在环糊精分子上引入合适的官能团,提高它对某些酶的特异捕获能力,很可能使它在人造血液的工作中发挥作用。总之,随着环糊精化学的进展,必将在关于酶的理论和实践的研究中有更多的发现。

参 考 文 献

- [1] Bender, M. L., Komiyama M.: *Cyclodextrin Chemistry*, 1978.
- [2] Breslow, R., et al.: *J. Amer. chem. Soc.*, **102**, 762, 1980.
- [3] Emert, J., Breslow, R.: *ibid.*, **97**, 670, 1975.
- [4] Beuder, M. L. et al.: *ibid.*, **88**, 2318, 1966.
- [5] Breslow, R., Campbell, P.: *ibid.*, **91**, 3085, 1969.
- [6] Cramer, F. Dietche, W.: *Chem. Ber.*, **92**, 1739, 1959.
- [7] 田伏, 下川, 藤田: 日化第36年会 (1977), II, p.820
- [8] Walch, C.: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, 1979.
- [9] Iwakura, Y. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 4432, 1975.
- [10] Findlay, et al.: *Biochem. J.*, **85**, 152, 1962.
- [11] Breslow, R., et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 3227, 1978.
- [12] Breslow, R., et al.: *ibid.*, **102**, 2112, 1980.
- [13] Breslow, R., et al.: *ibid.*, **102**, 421, 1980.
- [14] Tabushi, I., et al.: *ibid.*, **102**, 1152, 1980.

[本文于1981年10月7日收到]

细菌光合作用的原初过程

梅 镇 安

(北京大学生物系)

开展光合作用原初过程研究的一、二十年里,以光合细菌方面进展较快,其主要原因是成功地提纯了作用中心。

光合作用原初过程的二个主要组成部分是光物理过程与光化学过程。虽然现在已有了微秒光谱技术,但是光物理过程方面的知识比

较贫乏。从叶绿素吸收光能后,到电荷分离,从电荷分离再形成跨膜电位,这方面的情况依然很模糊,即使在光合细菌方面也是如此。近几年的工作主要在光化学反应。这是一系列的氧化还原反应。对这些反应,人们的兴趣是探讨供体与受体的物理化学本质。现将近几年来光

合细菌方面的研究情况介绍于下:

一、作用中心——原初电子供体

Reed 与 Clayton (1968) 首先用缺少胡萝卜素的变异品种 R-26, *R. sphaeroides*, 采取 Triton 处理与部分分离法, 得到了提纯的作用中心 (RC 制剂), 以后再经过其他人的改进, 使

RC 制剂达到很高的纯度, 而且确定了它的组份。最近 Lin 与 Thornber (1975) 分离了 *Chromatium* 的作用中心。1977 年 Trosper 等人又分离了含细菌叶绿素 b 的 *Rhodospseudomonas* 的 RC。后二种作用中心含有完整膜的 C 类型的细胞色素。现在已经能够分离各种不同色素组份的光合细菌的作用中心。

表 1 各种光合细菌作用中心的组成

组成的分子数 \ 各种光合细菌	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>Chromatium rubrum</i>
细菌叶绿素	4	4	未测定
去镁细菌叶绿素	2	2	未测定
铁	1	1	1
U-醌	1—2	1—2	<0.1
menaquinone (Vit K ₂)	—	—	1

从上表可见 RC 中有四个细菌叶绿素 (BCh1) 分子与二个去镁叶绿素分子。现在只知道其中二个 BCh1 分子的功能, 它们与 P_{870} 的光氧化有关, 是原初供体。最近几年 Bacon Ke 等人正在这方面进行工作, 但尚未见报道。两个去镁叶绿素分子的吸收峰是: 542 nm 与 532 nm。前者可能是中间电子受体, 普遍以 I 表示; 另一个分子可能与二个 BCh1 分子相结合, 它们的功能还在探索之中。作用中心的两个 Q 分子, 一个是原初 Q, 与作用中心结合得很紧, 不易被提取; 另一个是次级 Q, 结合较疏松, 易被提取。最近了解到 I 与原初 Q 之间亦有一定的相互关系。这些作用中心成员功能的研究正是目前原初反应研究工作的一个重要方面。

要了解这些成员的功能与原初反应的进程, 最主要的手段是测定作用中心的氧还差异光谱或光暗差异光谱, 从差异光谱中可以看到: 在 600, 803 及 865nm 附近的吸收属于 BCh1; 532 与 757 nm 是去镁叶绿素所吸收的峰值。365nm 附近不能分辨的峰值是二者共有的, 在光氧化过程中 865nm 处的吸收带退色最多。而在 800nm 与 375 nm 的吸收带稍有兰移。600nm 只有部分退色。其他峰值均向短波段偏移。在

被氧化的 RC 中去镁细菌叶绿素的吸收带移向红区。在氧化过程中 430 与 1250 nm 处出现新带。因此常以 P_{870} 来表示 RC 所含的 BCh1。它的光氧化短于 10^{-11} 秒, 量子效率接近于 100%。因为原初电子传递能够在 1°K 下进行, 所以它们不需要活化能, 而且量子效率很高。他们测定的数值是: R-26 *Rhodospseudomonas sphaeroides* 的 RC 的原初反应的量子产值是 1.02 ± 0.04 电子/光子; Barskii 等人用完全不同方法, 不同的材料 (*Rhodospirillum rubrum*) 得到的数值是 0.97 ± 0.03 电子/光子, 它们的效率几乎达到 96—100%。

RC 中细菌叶绿素 P_{870}/P_{870}^{+} 的中点电势在 *R. sphaeroides* 是 +0.45V, 在 *Chromatium* 是 0.49V。

原初电子供体的氧还电位是 300—500 mV, 而去镁叶绿素的氧还电位约为 -420mV。差不多同时, 苏联 Shuvalov 等人亦进行了这方面的测定, 结果是一 620mV, 二者相差很大。一直到 1977 年他们还互不承认。据说最近英国人得到较可靠的数值, 并且得到了苏联人的承认。

原初反应中另一种重要的数据是 EPR 讯

号。RC 细菌叶绿素光氧化作用产生自由基。它的 EPR 讯号的 g 值为 2.0025。从讯号的线宽认为 BCh1 以双分子体存在,因而在氧化态的不成对电子定域于 2 个叶绿素分子。电核双共振 (ENDOR) 光谱亦支持双分子体的设想 (Feher 等 1975)。

圆型二色散方面的数据与最近 1977 年 Vermeglio 与 Clayton 的线型二色散的研究结果,都支持双分子体的设想。偏振光的实验证明差异光谱中 870nm 与 810nm 吸收的下降是由于细菌叶绿素双分子体的漂白作用所引起。而 790nm 的新峰是双分子体的氧化态(BCh1₂)⁺。

二、原初电子受体

在光合细菌中,光诱导产生紫外光段吸收的变化,因而人们怀疑,这些变化是属于 U 醌的,并进而推断 U 醌可能是光合细菌的原初电子受体。为了肯定这一推论,七十年代许多人试图将 U 醌提取出来,研究它对光合细菌原初光化学反应的影响。当除去 U 醌后,原初供体 P₈₇₀⁺ 的光氧化作用依然可以正常进行,因而否定了这个推论。但是,另一方面,从 EPR 与化学光谱的鉴定, Slooten 等人观察到照光的 *R. sphaeroides* RC 颗粒,所产生的差异光谱,在 270 nm 有明显的下降,在 320 与 450nm 处上升。这个差异光谱与半 U 醌—10 阴离子的差异光谱非常相似 (Bensasson and Land 1973)。Loach 等人 (Loach and Hall 1972) 从缺铁的 *Rhodospirillum rubrum* 制得的亚载体碎片,照光后形成半 U 醌的 EPR 讯号,他们以这个事实支持 U 醌参与原初光化学反应。Feher 等 (1972) 用 SDS 处理 *Rhodospseudomonas sphaeroides* 的 RC 颗粒,除去 Fe 后, EPR 谱线的 g 值与线宽均表现为一个半醌基团。Bolton 与 Cost (1973) 在室温下测量未处理的 *R. sphaeroides* RC 的 EPR 讯号,亦有半 U 醌的属性。用有机溶剂提取 U 醌后,或用邻-菲罗林堵塞反应途径,研究 EPR 动力学,更进一步加强了 U 醌作为原初受体的可能性。

1974 年有三个实验室的工作提出了光合

细菌的原初电子受体可能是 U 醌与 Fe 的复合体。Feher 报道,用锰部分代替铁时, *R. sphaeroides* RC 的光化学活性不受影响。他们又报道用 Mössbauer 谱的研究证明不论 RC 的氧化状态如何,铁原子总是以二价状态存在。这两个报道充分说明单独的铁原子不能参与原初光化学反应。

Leigh 与 Dutton (1972) 观察到 *R. sphaeroides* RC 的 EPR 讯号在 $g = 1.68, 1.82$ 与 2.00, 显示有过渡金属离子参与原初反应。在这样的环境下,只有铁离子是符合这些要求的。例如细胞色素(含铁化合物)的氧化作用被阻止时,光诱导的 Fe-EPR 讯号的衰减动力学与 P₈₇₀⁺ 的情况相吻合。当细胞色素发生氧化作用时,Fe 的 EPR 讯号变成不可逆。当作用中心被连二亚硫酸盐还原时,很可能原初电子受体已被化学还原,就不能观察到光诱导的 EPR 讯号 ($g = 1.68$ 与 1.82)。在这种条件下,照光过程中产生细菌叶绿素的三线态,并获得它的 EPR 讯号。

上述例证,足以说明有含铁的物质参与光合细菌的原初光化学反应。

Cogdell 等人 (1974) 认为 UQ 既是原初电子受体,又是次级电子受体。他们有选择地提取结合得紧的与结合得较松的 UQ 分子。用异辛烷提取 U 醌后,RC 制品的光诱导 P₈₇₀⁺ 吸收变化的衰减动力学比未处理的要快得多,这就表明次级电子受体 UQ 结合得较松,先被提取,仍然存在结合得紧的原初电子受体,它被还原后,又与 P₈₇₀⁺ 直接再组合。如果再用含有 0.1—0.3% 甲醇的异辛烷为溶剂,进一步提取以后,RC 的光化学活性完全消失。将 UQ(U 醌)提取液加回被提取的 RC 颗粒,几乎可以完全恢复原来的活性。

更出色的工作是 Okamura 等人 (1975) 完成的。他们将 UQ 逐步提取完,再逐步加回去,同时观察各个过程的光谱变化,令人信服地证实了 UQ 是原初电子受体,而成功地得到重组。

他们用去污剂 LDAO (laurel dimethylamine

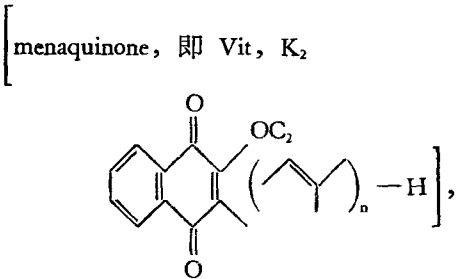
oxide) 与邻-菲罗林除去 UQ,除去 UQ 的量取决于 RC 蛋白质、去污剂、邻-菲罗林等的浓度之比与保温时间的长短。发现每一个 RC 有一个 UQ 分子很易被除去(开始时一般每一个 RC 含有 2 个 UQ 分子)。这易被除去的 UQ 可能是次级电子受体。这里同时亦说明了邻-菲罗林对原初电子受体与次级电子受体之间的电子传递的抑制作用在于除去 UQ (Parson 与 Case 1970), 亦可能是由于邻-菲罗林影响 Fe^{+2} 在 UQ 中的螯合能力。亦说明原初电子受体与次级电子受体 UQ 与 Fe 在 RC 中的位置是很接近的。要除去结合得较紧的 UQ, 条件要严格一些, 而且要处理两次, 最后只能达到 0.5 UQ/RC 与 1 Fe/RC, 这些颗粒就被认为是完全除去 UQ 的颗粒。

重建 UQ 需要在 4℃下, 保温 10 小时, 而且加入的 UQ 的量要比所需重组的量 5—10 倍之多。

他们更进一步采用两种方法, 测量了低温下 (80°K) 光化学活性与除去 UQ 的定量关系, 一是将 RC 颗粒中所含 UQ 定量地逐渐提取净。另一种是将 RC 颗粒先彻底除尽 UQ, 然后再分次定量地加回 UQ。

从 UQ 存在与否及其定量关系, 因而引起的低温吸收光谱的改变与 EPR 的信号, 都表明 UQ 在 *R. sphaeroides* 作用中心的原初光化学反应中有不可替代的功能。这些结果亦使早期工作中的矛盾现象统一起来。早期提取 UQ 的

条件是适用于除去结合较松的 UQ。Okamura 等人(1976)应用新的提取方法于载色体与作用中心, 重新检查 *Chromatium* 的原初受体的问题, 发现提取过的制剂, 依然保持致冻温度下的光化学活性, 每一个作用中心含有一个萘醌



而 UQ 的含量少于 0.1 个分子, 因此认为 *Chromatium* 的原初电子受体可能是萘醌与铁的复合体。而且这些有光化学活性的制剂的 EPR 讯号的 g 值为 1.8, 类似于在 *R. sphaeroides* 中所发现的。

从目前已有的事例可以推测铁可能是原初与次级 UQ 分子的电子传递途径的桥梁。

原初光化学反应是光氧化反应。因此要确定原初电子受体的位置, 它们的氧还电位是一个重要的参数。目前对许多原初电子受体的化学属性还不明确, 所以测定它们的氧还电位的方法都是间接的。因此常由于所用方法不同得到的数值就可能有出入。Dutton 等人 (1973) 以 EPR 谱线 $g = 1.82$ 指示还原的 $Fe \cdot UQ$ 复合体的出现, 完成了氧还电位的直接滴定。他们进行了 7 种光合细菌的测定, 连同最近其他

表 2 各种光合细菌的氧还电位

各种光合细菌	E_m pH = 7mV	还原态 PK	E_m 未质子化的 mV		EPR 性质 g 值
含 BChla 的品种					
<i>Rps. sphaeroides</i>	-15	9.8	-180	1.82	1.86
<i>Rps. capsulata</i>	-25				
<i>Rps. gelatinosa</i>	-140			1.82	1.65
<i>R. rubrum</i>	-100	8.8	-200	1.87	
<i>C. vinosum</i>	-100	8.0	-160	1.82	1.62
<i>C. limicola</i> (<i>thiosulfatophilum</i>)			-540	1.90	
含 BChlb 的品种					
<i>Rps. viridis</i>	-110	7.8	-150	1.82	1.67
<i>T. pfennigil</i>	-130	6.5	-130	1.82	1.62

人获得的数值列于表 2。

从表 2 可以看出各种光合细菌的中点电势不同,测定的 pH 在 7—8 之间, E_m 是从 -20 mV 到 -160mV。最近 Prince 与 Dutton(1976) 在更广的 pH 范围内 (4.3 到 11.0) 测量原初电子受体的氧化电位。

三、中间电子受体

最近几年,在细菌原初过程的研究中,最重要的发现是原初光化学反应中的中间电子受体。Dutton 等人(1973),将原初电子受体预先还原,然后用闪光激发作用中心,产生细菌叶绿素三线态的 EPR 讯号。Parson 等人(1975)在类似的条件下,测量闪光诱导的吸收变化,当作用中心平衡于低电势时,观察到形成二个不同过渡状态 (P^F 与 P^R); 它们有不同的光谱性质与不同的动力学。 P^R 状态的差异光谱与离体细菌叶绿素三线态的相类似,但是,光谱中尚包含有去镁叶绿素吸收区的变化。

Kaufmann 等(1975, 1976)与 Rockely 等(1975)用微微秒闪光,激发原初电子受体已被还原的作用中心,亦产生了过渡状态的类似光谱。这些结果提供了更多的事例,说明细菌叶绿素与去镁细菌叶绿素在激发态中起了一定的作用。过渡状态的弛豫时间是 100—200 微微秒。该弛豫时间被解释为原初电子受体 X 或 $Fe \cdot UQ$ 的还原时间,Dutton 等人(1975)亦用微微秒闪光激发,并调制在 1250nm 处的吸收变化。这个波长专一于 $(BChl)_2^+$ 氧化态,发现氧化态的双分子体的形成短于 10 微微秒。预先还原 $X (= Fe \cdot UQ)$ 或将 UQ 提取掉,均不影响这个形成时间。所以表明 $(BChl)_2^+$ 是过渡状态不可分割的一部分。

Fajer 等(1975)研究了细菌叶绿素与去镁细菌叶绿素在溶液中的电化学性质与光谱性质,结合这二者的结果,能将 P^F 状态的吸收变化, P_{870} 光氧化作用和过渡的电子受体去镁叶绿素的还原作用三者有关的原初光化学反应的吸收变化等同起来。计算二个差异光谱(一个是 P_{870} 的光氧化作用,即 $P_{870}^+ - P_{870}$ 的差异光

谱,另一个是去镁叶绿素的光还原成为阴离子,即 $Bph^- - Bph$ 的差异光谱),并进行了比较。在 350—1300nm 之间所得到的数据最大值与最小值,与计算所得非常一致。

现在细菌作用中心的原初光化学反应的各个成员基本上都已肯定。为了讨论方便起见,可以用 $C[B_2 \cdot I]X$ 来表示作用中心,其中 X 表示原初电子受体或 $Fe \cdot UQ$ 复合体, I 是中间电子受体,是细菌去镁叶绿素 Bph ; B_2 是细菌叶绿素双分子体 $(BChl)_2$; C 是 C 类型的细胞色素(在 *Chromatium* 载染色体中是 $Cyt C_{552}$, 亦可能以还原态 Cyt^{2+} 或以氧化态 Cyt^{3+} 存在)。按此缩写, *R. sphaeroides* 的 RC 可以用 $[B_2 \cdot I]X$ 表示,以 $[B_2^+ \cdot I]X$ 表示双基团状态,它的形成短于 10 psec (微微秒)。如果不存在次级电子供体 Cyt^{2+} , 或 Cyt^{2+} 已被化学氧化成 Cyt^{3+} 时,原初电子受体在 298°K 下,在 100—200 psec 中被还原成为 $[B_2^+ \cdot I]X^-$, 电子再从 X^- 回到 B_2^+ , 需要 20 毫秒。

发现中间电子受体 I 以后,人们希望研究它的光谱性质与 EPR 讯号。现有二个实验室的工作者设法将 I 保持在还原态,然后进行光谱与 EPR 的研究。

苏联的 Shuvalov 与 Klimov (1976)用化学手段使它们保持还原态,即 $C^{2+}[B_2 \cdot I]X^-$, 而形成过渡的 $C^{2+}[B_2^+ \cdot I^-]X^-$, 很快在 10 微微秒中完成。这个过渡状态有二条途径弛豫: B_2^+ 与 I^- 的重组。在 10 毫微微秒内完成,或者在 1 微秒内从 C^{2+} 供给一个电子给 B_2^+ 。很显然如果在一个很负的环境(-250到-530mV)能够使得细胞色素保持在还原状态,这样 $C^{2+}[B_2 \cdot I^-]X^-$ 能在光谱上被分离出来,因为从 C^{2+} 给 B_2^+ 一个电子可以用光推动。本来 B_2^+ 与 I^- 很快重组,可是,现在情况变了, C^{2+} 在还原态, X 在还原态即 $Fe \cdot UQ$ 中的 Fe 在还原态。例如在 -440mV 与 200°K 时,在恒定的光照下,细胞色素就被氧化了,形成了 $C^{3+}[B_2 \cdot I^-]X^-$ 从 $C^{3+}[B_2 \cdot I^-]X^-$ 减去 $C^{2+}[B_2 \cdot I^-]X^-$, 得到 I^- 的光谱。 I^- 被分离出来了,这里还需要除去 Cyt^{2+} 氧化成 Cyt^{3+} 的光谱影响,这一点是很容易做到

的。Tiede 等人 1976 年用了个很有天才的方法,取得还原的中间电子受体的净差异光谱。

用二种不同的方法测得的光暗差异光谱,完全相同。

Shuvalov 与 Klimov(1976)找到了 Bphe 与细胞色素变化的定量关系。Bphe 还原作用的动力学相当于细胞色素氧化的动力学, Bphe⁻再氧化的动力学相当于细胞色素在 293°K 再还原的动力学。在 77°K 时,这个反应基本是不可逆的。

这个差异光谱显示了许多特性。它们定性地相似于离体细菌去镁叶绿素光还原的光谱变化 (Fajer 等 1975): 在 360 与 396nm 的双峰,在 430 与 650nm 有宽幅增加,以及在 543 与 760nm 的退色等。但是,在 800nm 附近有兰移,同时伴有在 595nm 的明显变化。后面的变化不能认为仅仅是 Bphe 的,其中亦杂有细菌叶绿素的变化,所以,细菌叶绿素在 800nm 吸收很可能有一部分是中间受体 I⁻ 所吸收,也许 I 是复合物。另一个解释认为这些变化是受 Bphe 电场变化的影响所致。近来这方面的工作稍有进展,但还没有真正解决。用电场来解释比较适当,至少这个可能性是存在的。

同时亦进行了固定的 I⁻ EPR 谱线测定, Shuvalov 与 Klimov (1976) 将 *Chromatium* 亚载体体碎片平衡于 -430mV, 在室温下,测定固定的 I⁻ 光诱导 EPR 讯号。色素阳离子的讯号是: $g = 2.0025$, 线宽 12.5 高斯, 光诱导 EPR 讯号的动力学与形成 I⁻ 于波长 680nm 处监控的光谱变化相对应; EPR 谱线的宽度表示电子定域偏移于去镁细菌叶绿素分子的单体。

Tiede 等人用测定差异光谱的条件下,进行 EPR 谱线的研究, EPR 讯号是在 -400mV 环境下测得, 此时, 细胞色素 C₅₅₂ 与 X 全被还原了。光暗差异的 EPR 谱线很显然由 $g = 2.0023$ 自由基讯号组成, 分裂形成双讯号 ($g = 2.034$ 与 1.976), 两峰宽 60 高斯, 加上位于中心的自由基讯号 ($g = 2.003$), 线宽约为 15 高斯。双峰可能来源于 I⁻ 与 X 中 Fe 原子的相互作用。双峰对温度非常敏感, 不易被微波功率饱和。

$g = 2.003$ 的峰对温度不太敏感, 但容易饱和于微波功率。双峰的宽度与两个分子相互作用有关, 在 *R. Viridis* 中, 可宽达 100 高斯。

当 X 被预先还原, 或 Fe · UQ 中的部分 UQ 被提去时, [B₂⁺ · I⁻] 依然能在短于 10 微微秒中形成, 但是将 I⁻ 的电子传回给 B₂⁺ 代替了上面的正常传递。这个电子传递在 10—30 毫微微秒 (Parson 等 1975) 完成, 如果降低温度, 例如到 8°K, 通过自旋偏振的三线态或双基团 (B⁺ B⁻) 用 B₂⁺ 的不成对的电子使 I⁻ 回到自旋对 (Dutton 等人 1975)。在作用中心存在类胡萝卜素时, 细菌叶绿素的三线态, 通过将能量传递给类胡萝卜素, 促使类胡萝卜素达到三线态, 而细菌叶绿素的三线态很快衰减。

有人发现 *R. viridis* 中 I/I⁻ 的中点电势是 -400 ± 25mV。Klimov 等人 (1976) 从 I 的光还原的吸收光谱在 680nm 的增加, 推测 I/I⁻ 的中点电势应该小于或等于 -620mV。

四、微微秒光谱的研究

前面讲到由于获得了较理想的作用中心制剂, 使得原初光化学方面的工作深入了。微微秒光谱所能取得成果亦在于此。

从 1956 年到 1973 年, 人们逐渐认识到, 当作用中心的 BChl 丢失一个电子时, BChl 的吸收光谱在 435 nm、600nm、800—890 nm 与 1250nm 等区域发生变化。同时根据荧光产量的计算, 估计作用中心 BChl 的最低激发单线态的寿命只有 5—10 微微秒。这些作用中心必须处于中等的氧还电势 (不是很负, 亦不是很正) 的环境中。长期以来, 人们认为原初光化学反应是作用中心 BChl 的氧化作用, 这个氧化作用, 由于被激发的 BChl 分子传递一个电子后完成, 并引起吸收的变化。这个变化必须发生于 5—10 微微秒的范围。最早进行光合细菌作用中心微微秒光谱研究的是 Netzel 等人 (1973), 他们用 10 微微秒闪光脉冲作用于 530 nm (是 Bph 吸收范围), 在 7 ± 2 微微秒内引起 865nm BChl 吸收带退色。

当时利用微微秒光谱计算所得光化学的量

子效率只有 0.7,而后真正测定的值是 1.02 ± 0.04 。对这两个数值的矛盾,人们推测在 X 之前,必定还有中间电子受体。此外,在低温下测得的 ESR 数值指出,在低电势下形成了与作用中心 BCh1 有关的三线态 (Dutton 等人 1973)。Wright 等人证明该三线态量子产量与作用中心 BCh1 的光氧化作用的量子产量相等。这个结果是在 $<20^\circ\text{K}$ 时测定 ESR 时得到的。这个工作引起了过去认为光合作用中有三线态的工作者们的兴趣。人们进一步研究,发现在电子传递过程中不只是与一个作用中心 BCh1 有关。于形成作用中心三线态中被观察到离体的 Ch1 (Leigh 与 Dutton, 1974)或 BCh1 (Uphaus 等 1974) 有更低的零场分裂参数 (Zero-field Splitting Parameters)。根据这个事实,发现作用中心三线态是两个 BCh1 分子所共有。这些与早期的 ESR (McElvoy 等人, 1972)与电核双共振 (ENDOR) (Norris 等人 1973, Feher 等人 1973)的研究结果相一致的,并且证明 BCh1 阳离子基团亦定域于二个 BCh1 分子。最后 Parson 等(1975)与 Cogdell 等(1975)观察到在 420nm 与 540nm 区域有作用中心的过渡状态,称之为 P^{F} 。在低电势下,电子不能传给受体时,才能观察到这个过渡状态,而且测得量子产值为 1。由于 P^{F} 的衰减半时间是 10 毫微秒, Parson 等人推断 P^{F} 不可能在作用中心 BCh1 的最低单线激发态,但认为它可能是电子传递给 X 以前的中间受体。

Kaufmann 等(1975)与 Rockley 等(1975)的重要的微微秒研究确立了 1975 年早期知识的简单草图。二个实验室报道用 8 到 10 微微秒 530nm 的光脉冲激发 *R. Sphaeroides* R-26 作用中心制剂,在 X 预先被氧化的条件下,发现有过渡的吸收变化,该过渡状态在 13—20 微微秒内出现,并以指数衰减。衰减时间约为 150 微微秒在 540 nm 与 640 nm (Kaufmann 等人 1975) 或者 246 ± 10 微微秒在 680nm (Rockley 等人 1975)。在激发后 13—20 微微秒,伴随形成过渡状态,形成光谱的变化。在 500 与 680nm 附近吸收增加; 540、600、760 与 870 nm 吸收

下降;在 800nm 区域有蓝移。如果在激发后 240—250 微微秒,观察光谱变化,在 540、680 与 760nm 没有明显的变化,完全显现出慢速测定所获得的氧化的作用中心 BCh1 的光谱特性,在低的氧还势下, X 已经被还原,电子就不能传给 X。在激发后 13 微微秒所观察到的吸收变化与在较高氧还势下所观察到的一样 (Kaufmann 等人 1975)。在 250 微微秒以后,这种光谱亦发生变化 (Kaufmann 等人 1975),而且发现与 P^{F} 的光谱等同 (Rockley 等人 1975)。

所有这些事例都证实过渡状态是从作用中心 BCh1 传递电子给 X 的过程中的中间受体。Kononenko 等人(1976)研究微微秒荧光,结果符合于从作用中心 BCh1 单线态过渡的中间体的快速形成及其衰变。他们以 694nm 光为作用光,观察到二个 RC 的荧光组份:一个寿命为 15 ± 8 微微秒(890—950nm);另一个寿命为 250 微微秒(710—950nm)。这些寿命相应于过渡中间体的出现与衰减 (Paschenko 等人 1977)。

这个过渡中间体的性质问题,成为微微秒光谱研究工作的重点。正如上面指出的荧光产值与动力学的研究否定了它作为作用中心 BCh1 单线态。此外,它亦不是三线态,因为三线态 (Parson 称之为 P^{R}) 很可能是从过渡中间体形成的 (Thurnauer 等 1975)。540 与 760nm 区域的退色在 20 个微微秒内迅速完成,但在另一方面,涉及到 Bph 的复杂性。不论怎样,在 870nm 的吸收下降,使得人们不得不认为过渡中间体是含有 Bph 与 BCh1 作用中心复合体的一种状态。早期 ESR 与 ENDOR 的研究工作都认为可能有 BCh1 双分子体的参与。最后,800nm 带的兰移的发生比 X 的还原作用要快得多,这就意味着过渡中间体的形成是与电子传递有关 (Rockley 等人 1975)。Dutton 等将这些混乱的情况澄清了。他们报道 1250nm 吸收带专一于被氧化的作用中心 BCh1 双分子体,它们形成在激发后的 20 微微秒以内,用化学还原受体亦不能阻止该带的形成。

综观上述,可以认为过渡中间体是由一个

被氧化的 BCh1 双基团 ($\text{BCh1}^{+} \cdot \text{BCh1}^{-}$) 与一个被还原的成员 (称为 I 的) 组成, I 是双分子体与 X 之间的电子传递体, 并且参与原初光化学反应。基于 540 与 760nm 光谱的变化, 它的中点电位较低, 以及在 1000nm 缺少微微秒吸收改变等现象, 可以认为 I 是 Bph [Shuvalov 与 Klimov (1976)]。最后这个现象是与 Bph^{-} 相统一, 而不与 BCh1^{-} 相一致。此外, 有人证实长波方面吸收的 Bph (在 542nm 吸收) 在形成 $[\text{BCh1}^{+}-\text{BCh1Bph}^{-}]\text{X}$ 的状态中被还原。

虽然有上面许多有利的证据, 但亦有部分事实不能以简单的 Bph 来解释。因此, 工作还有待深入。

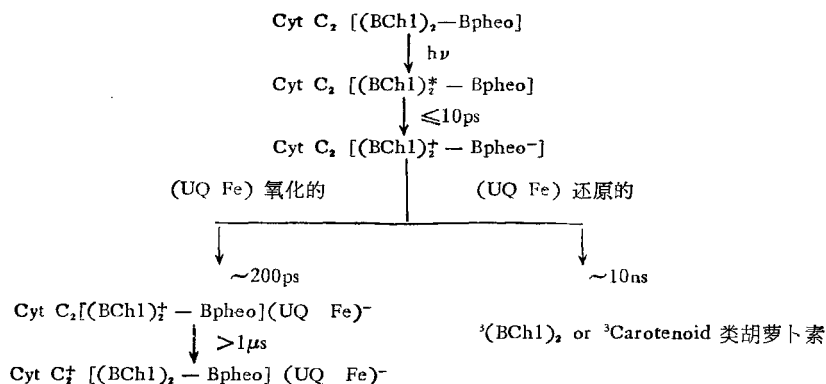
下面介绍一些 Ke Bacon 实验室尚未发表的最新工作。他们用微微秒闪光激发作用中心, 在闪光后适当的时间, 观察光谱的变化。在 20 微微秒后有 $[\text{BCh1}^{+}-\text{BCh1Bph}^{-}]$ (即 P^{+}I^{-}) 光谱变化出现, 若时间长得多, 在闪光后 2 毫微微秒, 电子传过去了, 没有 Bph^{-} 而是 $[\text{BCh1}^{+}-\text{BCh1 Bph}]\text{X}^{-}$ (即 $\text{P}^{+}\text{IQ}_{\text{A}}^{-}$), 由此可见在照光以后不同时间所看到的光谱是不同的。

Shuvalov 等人用 25 微微秒闪光激光作激

发光, 测量光亦是同样的激光。使两个闪光不完全同步, 只有很少一部分激发光与测量光同时被光电倍增管接受, 因此工作比较困难, 但是, 可以得到短达几个微微秒内的变化。他们的结果是: 在 540 nm 处 600nm 与 800nm 处有变化。这证明 BCh1 的电子先交给第 2 个 BCh1。然后再交给 Bph。他们亦测量了第二个 BCh1 的变化, 而 Bph 吸收的地方变化很小, 这间接证明 Bph 变化在后, 第二个 BCh1 变化在前。

Shuvalov 最近用 1 个微微秒的闪光, 进行实验, 用很多闪光二极管, 在闪光后不同时间 (0.3, 3ps, 6.6ps, 9.9ps) 观察所得吸收变化, 差不多到 9.9ps 后才稳定。如果 Bph 是第一个受体, 不应该到差不多 10ps (9.9 ps) 才变化完全, 电子从 BCh1 开始, 亦许还要经过另一个 BCh1 作受体, 更前于 Bph。再从第二个 BCh1 传到 Bph 需要 10 ps。根据推算从 BCh1 (第一个) $\rightarrow$ BCh1 (第二个) 大概要 4ps。所以第一步大概 1ps, 另一步约 4ps。

根据现有的资料, 可以将细菌光合作用的原初光化学反应归纳如下:



参 考 文 献*

- [1] Lin, L. and Thornber, J. P.: *Photochem. Photobiol.*, **22**, 34, 1975.
- [2] Trosper, T. L. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 318, 1977.
- [3] Feher, G. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **244**, 239, 1975.
- [4] Okamura, M. Y. et al.: *Biophys. J.*, **16**, 223, 1976.
- [5] Dutton, P. L. et al.: *Brookhaven Symp. Biol.*, **28**, 213, 1976.

- [6] Parson, W. W. and Cogdell, R. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 105, 1975.
- [7] Kaufmann, K. J. et al.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 839, 1976.
- [8] Kaufmann, K. J. et al.: *Science*, **188**, 1301, 1975.
- [9] Rockley, M. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 2251, 1975.
- [10] Fajer, J. et al.: *ibid.*, **72**, 4956, 1975.
- [11] Dutton, P. L. et al.: *FEBS Lett.*, **60**, 275, 1975.
- [12] Shuvalov, V. A. and Klimov, V. V.: *Biochim.*

*1975年以前的有关文献从略

- Biophys. Acta*, **440**, 587, 1976.
- [13] Tiede, D. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 447, 1976.
- [14] Coydell, R. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **408**, 189, 1975.
- [15] Prince, R. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 622, 1976.

- [16] Kononenko, A. A. et al.: *Stud. Biophys.*, **55**, 183, 1976.
- [17] Pashenko, V. Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **461**, 403, 1977.
- [18] Thurnauer, M. C. et al.: *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 3270, 1975.

[本文于1982年2月2日收到]

多胺在生物大分子合成中的作用

张 玉 瑛

(中国科学院生物物理研究所二室)

多胺是天然产生的多价阳离子,是在原核和真核细胞中合成的脂肪族胺类。最常使用的多胺是[1, 4]-丁二胺、精脒、精胺。

多胺的生理作用是通过影响核酸的构象而影响生物大分子的合成。最近研究指出,多胺的另一个重要功能是增加信息传递的忠实性。在体外,生理浓度的多胺促进 DNA 复制、转录和 mRNA 的翻译。在体内,细胞内多胺的浓度与细胞的增殖速度密切相关。迅速生长的细胞比不增殖的细胞有较高含量的多胺和较高的鸟氨酸脱羧酶的活性,后者是多胺生物合成中的关键酶。这一系列的变化是细胞对若干生长刺激的反应。生长刺激导致多胺, DNA 和 RNA 的量平行的增加。最近一些研究找到了多胺作用分子机制的一些线索,现归纳如下:

1. 多胺与核酸的结合

细胞内大多数多胺与核糖体和细胞核结合,并且已经从分裂的细胞中分离了多胺化合物。生物体内合成多胺的证据来自于病毒颗粒的研究。在 *E. coli* 噬菌体 T₄ 中约 40% 的阳离子是多胺。在生理 pH 值时,多胺的氮原子上携带一个净正电荷,具有多价阳离子的作用。许多研究表明,在体外,多胺与核酸(DNA 和 RNA)和类核酸结构的物质相互作用,其中也包括它与磷酸基团上负电荷的中和。多胺的连接使核酸稳定化,增加了核酸的抗变性,抗切割性和抗放射性,并使芳香物质不易插入。

多胺中带正电荷的氮原子的空间适于稳定核酸的双链区域^[1],多胺的分子结构式表明,它的次丁基部分可以跨过核酸的螺旋浅沟,把相对的链连接在一起。多胺的次丙基部分可以把相同链上相邻的磷酸基团连接起来。但是在核酸构象没有发生明显的变化时(即指重排重叠的构象变化),多胺不能中和核酸中全部的磷酸基团,这是由于正电荷之间的距离所致。现已发现,只有在精胺存在时,才可以获得高分辨率的不同晶型的酵母 tRNA 结晶。从 *E. coli* 细胞分离完整的核仁也需要有多胺。现在有越来越多的证据表明,多胺影响核酸的构象,在生物大分子合成过程中起重要作用。

2. 多胺对转录的影响

在体外,生理浓度的多胺,在原核、真核 RNA 聚合酶存在下具有刺激转录的作用^[2,3]。这个刺激作用,仅限在很窄范围的多胺浓度,而且刺激的效果与试验条件有关。在体外,刺激 RNA 合成的多胺浓度由双链 DNA 决定,抑制 RNA 合成的多胺浓度由单链 DNA 决定^[4]。由于 RNA 聚合酶的天然模板是双链 DNA,多胺也可能促进体内转录。由此可见,多胺不会影响 RNA 聚合酶,而可能是通过改变模板、或模板和产物的构象而起作用。由于核糖体 RNA 合成过程中,包括了依赖多胺的核仁蛋白的磷酸化,因此可以推测,多胺也可以通过其它机制刺激转录。