衣藻细胞色素 b_{559} α 亚基Ser²⁴残基定点突变影响PS 光合放氧活性

马晶晶 李良璧 荆玉祥 匡廷云 *

(中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093; 中国科学院研究生院, 北京 100049. * 联系人, E-mail: kuangty@ibcas.ac.cn)

摘要 为研究细胞色素 b_{559} (Cyt b_{559}) 在光合系统中的功能, 采用大引物定点突变技术, 将衣藻叶绿体 Cyt b_{559} α 亚基(*psbE*基因编码)中与组氨酸(His²³)相邻的氨基酸残基丝氨酸(Ser²⁴)定点突变为苯丙氨酸(Phe), 获得突变体S24F. 对突变体的生理生化分析表明, S24F既能进行光合自养也能进行光合异养, 但是在自养和异养条件下, 其生长速率比对照慢; S24F的PS 放氧活性约为野生衣藻细胞的 71%, S24F的光系统 (PS)光化学效率 F_v/F_m 比野生型对照低约 0.23. 此外, 相比野生型对照, 突变体S24F对强光更加敏感; SDS-PAGE和Western杂交的结果表明, 对Cyt b_{559} α 亚基中Ser²⁴的定点突变影响了Cyt b_{559} α 亚基及其他膜蛋白, 如LHC 和PsbO等的表达. 上述结果说明, 虽然Ser²⁴残基并不参与血红素配位, 但其对维持PS 的活性具有重要作用.

关键词 Cyt b_{559} 定点突变 PS 叶绿体转化 衣藻

光系统 (PS)是存在于高等植物、藻类和蓝细菌类囊体膜上的一种色素蛋白复合体, 是进行水氧化、质体醌还原的重要场所^[1], 也是光合电子传递链的重要组成部分^[2,3]. PS 核心是反应中心复合蛋白, 它由D1, D2, Psb 以及一个跨膜 b 型色素蛋白, 即细胞色素 b_{559} (Cyt b_{559})组成^[4].

Cyt b_{559} 是一个血红素蛋白, 存在于所有放氧光合生物的PS 反应中心(PS -RC)复合物中, 由 α 亚基(9.3 kD)和 β 亚基(4.4 kD)两个多肽以及一个血红素组成. 两个亚基的化学计量为 1 : 1, 各含有一个跨膜 α 螺旋. α 和 β 亚基氨基酸残基分别为 83 和 49 个(其中各含一个组氨酸残基), 分别由叶绿体基因组中的*psbE*和*psbF*编码^[5]. 综合亲水性分析和遗传学及光谱学分析的结果, 推测血红素分别与 α 和 β 亚基的His残基交联, 所处的平面与膜平面垂直. Cyt b_{559} 在PS 中的位置靠近D1/D2^[6]. Zouni 等人^[7]对嗜热蓝细菌*Synechococcus elongates* PS 晶体结构的研究, 进一步明确了Cyt b_{559} 卟啉铁在PS 中, 处在距离Chl zD_2 蛋白 2.7 nm, 距离膜质侧约 0.8 nm的空间位置.

在过去的 20 多年中, 对Cyt b_{559} 在PS 中的功能研究取得了很大进展. 对高等植物中分离纯化的PS -RC蛋白复合物的研究表明, 要使PS 维持光

合活性, Cyt b_{559} 的存在是必不可少的. 研究者推测, Cyt b_{559} 可能具有以下几个功能: Cyt b_{559} 具有对PS 的光保护作用, 通过Cyt b_{559} 的环式电子流耗散PS 中的多余激发能而参与其受体侧及供体侧光抑制的防御^[8,9]; Cyt b_{559} 是组成稳定的PS 的必需组分^[10,11]; 此外, Cyt b_{559} 还参与了水的氧化还原^[12], 近年还有报道称Cyt b_{559} 能够提供电子给质体醌^[13]. 然而由于Cyt b_{559} 的复杂特性以及相关Cyt b_{559} 突变体往往缺乏高活性PS , 其许多功能至今仍不清楚^[11].

以往对Cyt b_{559} 的研究重点主要在Cyt b_{559} 中与血红素连接的His残基上^[10,11,14,15], 其他氨基酸残基对Cyt b_{559} 功能影响的研究很少. 到目前为止, 仅有Bondarava等人^[13]用筛选到的烟草突变株, 分析了Cyt b_{559} β 链紧中靠近组氨酸的苯丙氨酸(Phe)被丝氨酸(Ser)取代后光合特性及PS 活性的变化. 本研究采用定点突变技术, 以衣藻为实验材料, 将Cyt b_{559} α 亚基中His²³下游相邻的氨基酸Ser²⁴用Phe取代, 获得衣藻突变体S24F. 研究结果显示, 靠近血红素配位环境的氨基酸Ser²⁴, 对维持Cyt b_{559} 的正常功能, 组装有活性的PS 有重要作用.

1 材料与方法

() 衣藻及其培养. 衣藻(*Chlamydomonas re-*

2006-11-03 收稿, 2007-01-28 接受

国家重点基础研究发展计划 (批准号: G1998010100)和国家自然科学基金重大项目(批准号: 088121A)资助

inhadtii)野生型CC-125 mt⁺, 美国杜克大学衣藻基因中心Harris教授(CGC, Department of Botany, Duke University, Durham, NC)馈赠. 野生型衣藻在温度 20~25 °C, 光照 50~100 μmol·m⁻²·s⁻¹的条件下于TAP (Tris-acetate-phosphate)或HSM (high salt minimal)液体培养基中生长, 每天光照时间为 8 h^[16].

() 利用大引物突变法进行定点突变. (1) 质粒. 质粒p78 和p423 由Harris教授馈赠. 质粒p78 中含有衣藻叶绿体基因组的 *Pst* -4 片段(15.1 kb, 包含 *psbE* 基因及其上下游序列), 质粒p423 含有 *aadA* 表达框, 可以提供壮观霉素(spectinomycin)抗性筛选标记. 质粒pE3 克隆有 *psbE* 基因和 *aadA* 表达框, 在质粒p78 和p423 的基础上构建而成^[17]. (2) 定点突变. 定点突变的方法如Landt等人^[18]所述, 具体步骤见图 1. 所用引物为 P1 (5'-TTACGATGTGCCAGAAA-3') 和 P2 (5'-TTTAATTTGAAGCTTGAGCTACCGCTTC-TTACGAC-3'), 突变引物MS24F序列为 5'-AAGC-AGGTACCGTAATAAAGTGAATAACCC-3'(下画线示新构建的限制性内切酶 *Kpn* 的酶切位点, 斜体为 Phe 的密码子). PCR 反应在 MJ PTC-200 (Bio-Rad Laboratories, Inc, Waltham, MA) 上进行, 高保真 *Pfu* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司(上海生工). 约 1.6 kb 的 PCR 终产物用 *Sac* 和 *Acc* 双酶切, 回收 0.8 kb 片段并与 *Sac* / *Acc* 双酶切质粒pE3 后回收的大片段相连接, 构建叶绿体同源重组质粒(命名为pS24F). pS24F 送上海生工测序确认突变位点.

() 衣藻叶绿体遗传转化和转基因衣藻的筛选. 采用基因枪转化法对衣藻叶绿体进行遗传转化, 具体操作参照Boynton和Gillham^[19]的方法进行. 使用BioRad Biolistic PDS-1000/He 基因枪将带有突变位点的质粒pS24F 转化到衣藻叶绿体中. 由于转化质粒pE3 的阳性对照与野生型衣藻对照在生理特性上基本没有区别^[11], 因此在本研究中直接以野生型衣藻作为对照. 转基因衣藻在选择培养基(TAP+壮观霉素(100 μg/ml))上筛选 4 代后进行叶绿

体同质化鉴定.

() 转基因衣藻的同质化鉴定. 按照Lee等人^[20]所描述的方法分别提取野生型衣藻和转基因衣藻的叶绿体基因组 DNA. 以此为模板, 用 P3 (5'-ATAGATGGTTTGAAAAGG-3') 和 P4 (5'-TTG-TTTCATGGGGCATTTA-3') 引物进行PCR扩增. 1% 琼脂糖电泳鉴定扩增产物. PCR-Southern杂交按照地高辛标记试剂盒 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 的使用指南进行.

() 衣藻生长速率及吸收值的测定. 衣藻生长速率的测定参照沈萍等人^[21]的方法. 用紫外/可见分光光度计(model MPS-8500, Shimadzu, Kyoto, Japan) 在 750 nm 处测定光吸收值.

() 衣藻放氧速率的测定. 具体方法参照 Leong^[22]的方法进行. 用Clark-type 氧电极(Hansatech, King's Lynn, UK) 在 25 °C, 饱和光强(1000 μmol·m⁻²·s⁻¹) 下测量衣藻细胞的光合放氧率.

() 衣藻荧光动力学参数的测定. 参照Gent等人^[23]的方法, 略有改动. 衣藻细胞在TAP的液体培养

图 1 转化载体 pS24F 的构建

aadA 表达框和 *psbE* 的方向用箭头表示, 相关的定点突变的位置用黑体标出

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-4-404>

基中培养至 A_{750} 为0.6~0.8. 取出部分细胞, 暗适应5 min后, 室温下用脉冲调制式荧光仪(PAM-101, Walz, Germany)非常弱的测量光(光强为 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 左右)测定叶绿素的最小荧光(F_0); 然后用饱和脉冲光($1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射0.8 s, 测定最大荧光(F_m), 计算PS 光化学效率 $F_v/F_m [(F_m-F_0)/F_0]$ 值. 每个样品重复5~10次.

() 衣藻细胞对强光的敏感性测定. 将 A_{750} 值为0.6~0.8的衣藻细胞分别放置在光强为200和 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光源下, 每10 min取3 mL样品在饱和光强($1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下测细胞的放氧速率, 直到持续光照30 min为止.

() 类囊体膜蛋白多肽组分 SDS-PAGE 电泳、Western杂交和吸收光谱的测定. 衣藻类囊体膜蛋白多肽组分的提取依照Ruffle等人^[24]的方法进行. 提取的类囊体膜蛋白多肽组分进行SDS-PAGE电泳, 一半胶用于考马斯亮蓝R250染色, 一半胶用于Western杂交分析. 蛋白质的SDS-PAGE电泳、Western杂交按照Sambrook等人^[25]的方法进行, 所用抗体分别是Cyt b_{559} α 链单克隆抗体(Barber教授馈赠, Department of Biochemistry, Imperial College of Science, Technology, and Medicine, London, United Kingdom)、LHC 及 PsbO单克隆抗体(中国科学院植物研究所张立新研究员馈赠). 每个Western杂交条带的相对量用Labworks软件(Ultra-Violet Products Ltd, America)进行测定(设3次重复). 常温下, 采用UVKON-943双光束分光光度计在避光条件下进行类囊体膜蛋白多肽组分吸收光谱测定. 所用扫描速度100 nm/min, 分辨率0.5 nm. 样品浓度调至 $10 \mu\text{g Chl/mL}$.

2 结果与分析

2.1 叶绿体同源重组质粒 pS24F 的构建

质粒 pS24F 的构建过程如下: 将1.6 kb带有突变位点的PCR产物用限制性内切酶 *Sac* , *Acc* 双酶切, 将其中800 bp大小的酶切片段回收后克隆至质粒pE3的 *Sac* /*Acc* 位点, 得到带有突变位点的质粒pS24F. 质粒pS24F的 *psbE* 基因为Cyt b_{559} α 多肽链在衣藻中的编码基因, *aadA* 表达框为壮观霉素抗性筛选标记. 将质粒送上海生工测序, 测序结果表明在预定位点发生了突变.

2.2 转基因衣藻的筛选和同质化鉴定

基因枪法转化后的衣藻(命名为 S24F)在含有壮观霉素的选择培养基上筛选4代后, 分别提取野生型衣藻和 S24F 的叶绿体基因组 DNA, 以 P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增, 结果如图2(a)所示. 引物 P3 和 P4 分别位于 *psbE* 基因表达框的上、下游, 以野生型衣藻的叶绿体 DNA 为模板的 PCR 扩增产物为0.75 kb大小的片段(图2(a), 泳道2); 以衣藻突变株 S24F 的叶绿体基因组 DNA 为模板 PCR 扩增产物的大小为2.6 kb左右(图2(a), 泳道3), 说明外源基因 *aadA* 表达框(大小为1.9 kb)已经整合到 S24F 的叶绿体基因组中. 图2(a)中泳道3的结果显示, 除了约2.6 kb的片段外, 扩增产物中没有0.75 kb大小的片段, 说明 S24F 的叶绿体基因组是纯合的, 基本不含有未转化的叶绿体基因组. *Kpn* 酶切上述的 PCR 产物, 结果显示只有在转基因藻的酶切产物中有0.2和0.4 kb大小的片段, 与预期的突变位点相符(图2(a)泳道4和5). 为了更加明确 PCR 扩增片段的特异性, 将图2(a)

图2 引物 P3 和 P4 对衣藻野生型和 S24F 叶绿体 DNA 的 PCR 和 PCR-Southern 杂交分析

(a) PCR 产物的电泳图谱: 1, DNA Ladder; 2 和 3, 野生型衣藻和 S24F PCR 产物; 4 和 5, *Kpn* 分别酶切野生型衣藻和 S24F PCR 产物; 6, 200 bp DNA Ladder. (b) PCR-Southern 杂交分析: 1, 1 kb DNA ladder; 2 和 3, S24F 和野生型衣藻 PCR 扩增产物 *Kpn* 酶切后与 *psbE* 探针杂交的结果

泳道 4 和 5 中的产物转到尼龙膜上, 与标记的 *psbE* 基因探针杂交. PCR-Southern 杂交的结果(图 2(b), 泳道 2 和 3)与电泳结果完全符合. 上述结果表明含突变位点的 *psbE* 基因已整合到突变体的叶绿体基因组中, 且突变体叶绿体的同质化程度很高, 基本不含未转化的叶绿体.

2.3 突变株 S24F 的生长和光合作用特性

衣藻突变株 S24F 既能进行光合自养, 又能光合异养, 但是生长速度相比野生型衣藻缓慢(表 1). 突变株到达生长平台期的时间在自养和异养条件下, 分别比野生型衣藻慢 4 和 8 d. S24F 的 PS 光化学效率 F_v/F_m 比野生型低约 0.23, 其 PS 放氧活性约为野生型的 71%.

2.4 衣藻突变株 S24F 对强光的敏感性

在中强度光($200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射细胞时, 突变

株 S24F 的放氧活性迅速下降, 到 30 min 时, 其放氧活性仅为未处理时放氧活性的 68% (表 2); 当用高强度光($1000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射细胞 10 min 后, 突变株 S24F 放氧活性降为 0, 而野生型衣藻在强光照射 30 min 后还保留 35% 的放氧活性. 这说明相比野生型衣藻, 突变株 S24F 对强光表现更加敏感.

2.5 S24F 类囊体膜蛋白多肽组分分析

S24F 突变株与野生型对照的类囊体膜蛋白多肽组分的吸收图谱相似, 有 3 个吸收峰, 分别位于 440, 460 和 678 nm 处(图 3(b)和(c)). S24F 类囊体膜蛋白多肽组分的 SDS-PAGE 结果(图 3(a))及 Western 杂交结果(图 4)表明, 突变株 S24F 的类囊体膜蛋白各个多肽组分都有表达, 但是 Cyt $b_{559}\ \alpha$ 亚基、PsbO 和 LHC 蛋白的表达量相比对照都有下降, 其中 PsbO 和 Cyt $b_{559}\ \alpha$ 亚基的表达量仅为野生型的 80% 左右.

表 1 衣藻野生型和突变株 S24F 生长和光合特性

株系	到达平台期的天数/d		F_0	F_m	F_v/F_m	放氧率/ $\mu\text{molO}_2\cdot\text{mg}^{-1}\text{Chl}\cdot\text{h}^{-1}$
	HSM	TAP				
CC-125	4	8	0.257 ± 0.048	0.908 ± 0.270	0.706 ± 0.045	150 ± 8.3
S24F	8	16	0.264 ± 0.068	0.514 ± 0.125	0.475 ± 0.071	106 ± 10.2

表 2 突变株 S24F 对中强度光和高强度光的敏感性测定

光照时间/min	中强度光 ($200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		高强度光 ($1000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	
	CC-125	S24F	CC-125	S24F
0	150 ± 8.3	106 ± 10.2	150 ± 8.3	106 ± 10.2
10	147 ± 7.7	77 ± 8.9	137 ± 4.26	0
20	143 ± 12.3	68 ± 11.2	123 ± 7.56	0
30	128 ± 12.8	53 ± 11.3	99 ± 6.63	0

图 3 衣藻野生型和突变体 S24F 类囊体膜蛋白多肽组分 SDS-PAGE 分析和吸收光谱

(a) 衣藻野生型和 S24F 类囊体膜蛋白多肽组分的 SDS-PAGE 分析; (b) 和 (c): 衣藻野生型和 S24F 类囊体膜蛋白多肽组分的吸收光谱图

图4 衣藻野生型和S24F的PsbO, LHC II及Cyt b_{559} α 亚基Western杂交的结果(a)及Western杂交条带相对量分析(b)
每个样品的上样量相当于 3 μ g Chl

3 讨论

衣藻是一种单细胞绿色藻类,其生活周期短,既能进行自养生长又能进行异养生长,易于高效地进行叶绿体基因组转化和核基因组转化的特性,使它成为研究真核生物生长发育分子机理的模式材料,特别是在一些不能用酵母作为材料进行研究的领域,如光合作用领域和叶绿体生物学研究领域等^[16]。此外,在高等植物叶绿体和蓝藻中,编码Cyt b_{559} α 和 β 链的基因 $psbE$ 和 $psbF$ 与基因 $psbL$ 和 $psbJ$ 组成一个操纵子。但在衣藻中,这4个基因位于染色体的不同位置,并且编码方向相反^[26],因此对衣藻 $psbE$ 基因的突变不会影响另外3个基因,这对构建其相关突变体提供了良好的条件。为此,本研究采用衣藻作为实验材料构建Cyt b_{559} 突变体。

Cyt b_{559} 是存在于所有放氧光合生物PS II中的一个血红素蛋白,类囊体膜中没有Cyt b_{559} 就不能组成稳定的PS II。为了研究Cyt b_{559} 的结构和功能,人们构建了许多突变体。例如,将蓝藻中 $psbE$ 和 $psbF$ 分别用 Km^r 基因取代^[14,27];在衣藻 $psbE$ 中插入 $aadA$ 基因^[10];用亮氨酸(Leu)分别或同时取代蓝藻Cyt b_{559} α 和 β 亚基的His²²^[15]以及用甲硫氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)和谷氨酸取代衣藻Cyt b_{559} α 亚基的His²³等^[11]。然而

这些突变体往往严重影响组成PS II蛋白的表达及PS II活性,甚至PS II活性完全丧失。由于缺乏有高活性PS II的Cyt b_{559} 突变体,使得Cyt b_{559} 许多功能仍不清楚^[11]。

此外,上述Cyt b_{559} 突变体的定点突变研究也主要侧重于与血红素相连的His残基,Cyt b_{559} 中其他氨基酸残基对Cyt b_{559} 功能的影响报道很少,仅Bondarava等曾报道在烟草中Cyt b_{559} β 亚基紧靠His的Phe²⁶被Ser取代后,PS II活性约为对照的40%^[13]。为此,本研究通过大引物法定点突变技术,用Phe取代Cyt b_{559} α 亚基中紧靠His²³的Ser²⁴残基,构建了Cyt b_{559} 突变体S24F。突变体的生长和光合特性分析表明(表1),该突变体既能光合自养,也能光合异养,但其生长速度仅为野生型衣藻的一半左右;此外,PS II放氧活性和光化学效率 F_v/F_m 都比野生型细胞低,说明对Ser²⁴的突变影响了突变体细胞的光合作用。S24F对强光的敏感性测定结果表明(表2),相比对照,突变体对强光表现更加敏感。S24F的生长和光合作用特性及对强光的敏感性与突变His²³后得到结果类似^[11],但是其PS II活性与烟草Phe突变体的PS II活性比其他Cyt b_{559} 突变体的PS II活性更高,说明对Ser²⁴突变的影响比对His²³突变弱,这可能跟His²³直接与卟啉环相连相关。

Cyt b_{559} 的缺失突变以及对 α 或 β 链中的His的突变都会严重影响组成PS II的多个蛋白组分,如D1, D2, CP47, PsbO, Cyt b_{559} α 和 β 亚基等的表达,PS II不能组装或者PS II活性很低,如Pakrasi等人^[10,11,14,15,27]用Leu分别或同时取代蓝藻Cyt b_{559} 中 α 和 β 链中的His²²,发现突变体中的D1, D2, CP43和CP47降解,Cyt b_{559} α 亚基比野生型的小1.5 kD(单点突变时);当衣藻中的Cyt b_{559} α 链中的His²³被氨基酸Met和Tyr取代后,D1, D2蛋白和Cyt b_{559} α 及 β 链的表达量分别仅为野生型的10%~25%。此外,Cyt b_{559} β 链Phe²⁶的突变也减少了CP47和Cyt b_{559} α 和 β 链的表达量,并导致PS II在类囊体膜上的组装数量下降^[13]。SDS-PAGE和Western杂交的结果表明(图3和4),对Ser²⁴的突变也有类似的现象,如LHC II表达量降低,PsbO和Cyt b_{559} α 亚基的表达量仅为野生型的80%左右等。但结果也表明,对Ser²⁴和 β 链中Phe²⁶的突变影响PS II蛋白组分的程度小于对His突变造成的影响。

总之,所有结果表明,不与血红素直接相连的Ser²⁴是Cyt b_{559} 的行使功能所不可缺少的,对于维

持PS 的活性也非常重要. 此外, 在后续工作中, 对
有较强PS 活性的S24F的光氧化、光还原过程中的
电子传递反应、动力学特征做深入的研究, 也有助于
进一步了解 Cyt *b*₅₅₉在PS 中的结构和功能.

致谢 感谢Imperial College of Science, Technology, and
Medicine的Barber教授提供Cyt *b*₅₅₉ α 亚基和中国科学院植
物研究所张立新研究员提供LHC 及PsbO单克隆抗体.

参 考 文 献

- Hankamer B, Barber J, Boekema E J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 641—671[DOI]
- Aro E M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of Photosystem II: Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1143: 113—134[DOI]
- Barber J, Andersson B. Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci*, 1992, 17: 61—66[DOI]
- Satoh K. The Photosynthetic Reaction Centers. Orlando, FL: Academic Press, 1993. 289—318
- Herrmann R G, Alt J, Schiller B, et al. Nucleotide sequence of the gene for apocytochrome b-559 on the spinach plastid chromosome: Implications for the structure of the membrane protein. *FEBS Lett*, 1984, 176: 239—244[DOI]
- Nanba O, Satoh K. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and Cytochrome b-559. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 109—112[DOI]
- Zouni A, Witt H T, Kern J, et al. Crystal structure of photosystem II from *Synchococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 2001, 409: 739—743[DOI]
- Heber U, Kirk M R, Boardman N K. Photoreactions of cytochrome b-559 and cyclic electron flow in Photosystem II of intact chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 546: 292—306
- Thompson L K, Brudvig G W. Cytochrome b-559 may function to protect Photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*, 1988, 27: 6653—6658[DOI]
- Morais F, Barber J, Nixon P J. The chloroplast-encoded α subunit of cytochrome b-559 is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 1998, 273: 29315—29320[DOI]
- Morais F, Barber J, Nixon P J. Photosynthetic water oxidation in cytochrome b₅₅₉ mutants containing a disrupted heme-binding pocket. *J Biol Chem*, 2001, 276: 31986—31993[DOI]
- Fiege R, Shuvalov V A. Correlated behavior of the EPR signal of cytochrome b-559 heme Fe() ligated by OH⁻ and the multiline signal of the Mn cluster in PS-II membrane fragments. *FEBS Lett*, 1996, 387: 33—35[DOI]
- Bondarava N, Pascalis L D, Al-Babili S, et al. Evidence that cytochrome b559 mediates the oxidation of reduced plastoquinone in the dark. *J Biol Chem*, 2003, 278: 13554—13560[DOI]
- Pakarasi H B, Diner B A, Williams J G K, et al. Deletion mutagenesis of the cytochrome b-559 protein inactivates the reaction center of photosystem II. *Plant Cell*, 1989, 1: 591—597[DOI]
- Pakrasi H B, Ciechi P D, Whitmarsh J. Site directed mutagenesis of the heme axial ligands of cytochrome b-559 affects the stability of the Photosystem II complex. *EMBO J*, 1991, 10: 1619—1627
- Harris E H. The *Chlamydomonas* Sourcebook. San Diego: Academic, 1989. 780
- Ma J J. Site-directed mutagenesis of residue Arg18 and Ser24 in Cyt b-559 α subunit and effects on PS II activity. Doctor Dissertation. Beijing: The Institute of Botany, CAS, 2006. 46—49
- Landt O, Grunert H P, Hahn U. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1990, 96: 125—128[DOI]
- Boynton J E, Gillham N W. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol*, 1993, 217, 510—536
- Lee H, Bingham S E, Webber A N. Specific Mutagenesis of reaction center proteins by chloroplast transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Enzymol*, 1998, 297: 310—337.
- 沈萍, 范秀容, 李广武, 主编. 微生物学实验(第3版). 北京: 高等教育出版社, 1999
- Leong A. Adaption of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. II. Regulation of electron transport capacities, electron carriers, coupling factor (CF1) activity and rates of photosynthesis. *Photosynth Res*, 1984, 5: 117—128[DOI]
- Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biophys Acta*, 1989, 990: 87—92
- Ruffle S V, Wang J, Johnston H G. Photosystem II peripheral accessory chlorophyll mutants in *Chlamydomonas reinhardtii* biochemical characterization and sensitivity to photo-inhibition. *Plant Physiol*, 2001, 127: 633—644[DOI]
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 672—733
- Tsafir S M, Itzhak O, Joseph H, et al. An unusual organization of the gene encoding cytochrome b₅₅₉ in *Chlamydomonas reinhardtii*: psbE and psbF genes are separately transcribed from different regions of the plastid chromosome. *Mol Genet*, 1995, 246: 600—604[DOI]
- Pakrasi H B, Williams J G K, Arntzen C J. Targeted mutagenesis of the *psbE* and *psbF* genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a function role of cytochrome b₅₅₉ in photosystem II. *EMBO J*, 1988, 7: 325—332