

〔意〕奥·西费利 郝水

张传群 付 萍 郑易之 李治晓等译

叶绿体分子 遗传学

YELÜTIFENZI
YICHUANXUE



叶绿体分子 遗传学

郝 水 张传善 傅 萍 郑易之 牛怡聪编著

374083

湖南科学技术出版社

叶绿体分子遗传学

[意] 奥·西费利

郝水 张传善 付萍 编著
郑易之 牛怡聪

责任编辑：贺晓兴

湖南科学技术出版社出版

(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华书店发行 湖南省新华印刷二厂印刷

*

1987年2月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：5.75 插页：4 字数：148,000

印数：1—1,200

ISBN 7-5357-0025-X/Q·2

统一书号：13204·149 定价：2.30元

湘科86-7

前 言

1984年8月,国际植物分子生物学会现任主席、意大利帕维亚大学(Pavia University)遗传和微生物学系欧·西费利(O. Ciferri)教授应邀来我校讲学,比较系统地讲授了叶绿体分子生物学的一些专题。当时我们举办了一个学习班,除我校生物系有关教师和研究生外,国内一些兄弟院校和研究机构的同志也参加了这个学习班。本书是根据西费利教授的讲授内容和西费利教授留下的文献资料整理而成的。讲授是由中国科学院植物研究所荆玉祥同志和遗传研究所黄斌同志担任翻译。本书是由我系遗传教研室和细胞遗传研究室的傅萍、郑易之和牛怡聪三位同志根据讲课录音和西费利教授提供的文献资料分工整理成初稿,并由张传善同志对全书进行校阅和统稿。做为预备知识我写了《叶绿体的结构与功能概观》一章,放在本书的前边。目的是方便读者进行以后几章的阅读。

由于我们的水平有限,本书难免有缺点、错误,希望读者批评指正。

郝 水

于长春东北师范大学生物系

1986年3月27日

目 录

1 叶绿体的结构与功能概观	(1)
§ 1.1 叶绿体的结构	(1)
§ 1.2 叶绿体的功能	(3)
1. 光合作用	(4)
2. 叶绿体的DNA	(13)
3. 叶绿体的DNA合成	(15)
4. 叶绿体的蛋白质合成	(17)
§ 1.3 叶绿体的发育和增殖	(19)
§ 1.4 叶绿体的起源	(21)
2 叶绿体DNA分子的理化特性	(26)
§ 2.1 叶绿体DNA的发现	(26)
§ 2.2 叶绿体DNA的分析复杂性	(29)
§ 2.3 叶绿体DNA的分离	(30)
§ 2.4 叶绿体DNA的动力学复杂性	(35)
§ 2.5 叶绿体的环状DNA分子及其大小	(38)
§ 2.6 叶绿体DNA的分子数目与分布	(42)

§ 2.7	叶绿体DNA的精细结构	(44)
1.	无组蛋白与甲基化胞嘧啶	(44)
2.	核糖核酸的存在	(45)
3.	叶绿体DNA分子内碱基组成的不均一性	(45)
§ 2.8	叶绿体 DNA 中的反向重复顺序	(47)
3	叶绿体tRNA和氨基酰 tRNA 合成酶	(53)
§ 3.1	叶绿体tRNA的种类	(53)
1.	叶绿体氨基酰tRNA合成酶	(56)
2.	叶绿体tRNA基因	(58)
3.	叶绿体tRNA基因数目和基因定位	(62)
§ 3.2	叶绿体tRNA基因的内含子	(64)
§ 3.3	编码叶绿体氨基酰tRNA合成酶的位置	(68)
4	叶绿体的核糖体	(69)
§ 4.1	叶绿体核糖体的蛋白质	(71)
§ 4.2	编码叶绿体核糖体蛋白质的位置	(72)
§ 4.3	叶绿体DNA中的rRNA基因	(75)
1.	叶绿体中定位rRNA基因的方法	(76)
2.	叶绿体rRNA基因的转录	(84)
5	叶绿体蛋白质合成系统的检查方法	(89)
§ 5.1	延长因子和起始因子	(92)
§ 5.2	检查叶绿体内合成的蛋白质的方法	(98)
6	叶绿体DNA内编码蛋白质的基因定位及其调节	(110)
§ 6.1	1.5—二磷酸—核酮糖羧化酶 (RuBP羧化酶)大亚基的基因(rbc L)	(113)
1.	rbc L位于叶绿体DNA的Bam 9 片段内	(115)
2.	rbc L在叶绿体DNA的Bam 9 内的精确定位	(115)
3.	2.2 KB基因中的1.4KB在Bam 9 上的位置	(118)

4. rbc L在转录水平上的调节	(119)
5. RuBP羧化酶大、小亚基的组装	(125)
§ 6.2 P—32000基因或光基因	(127)
1. P—32000蛋白质的特性	(128)
2. 光基因在叶绿体DNA Bam8片段上的定位	(128)
3. 光对P—32000代谢的调节	(130)
4. P—32000蛋白质与除草剂	(135)
§ 6.3 叶绿体蛋白质延长因子的基因(EF)	(140)
§ 6.4 叶绿体ATP酶偶联因子的基因(atpA、 atpB和atpE)	(142)
7 蛋白质的转运及其机制	(144)
§ 7.1 信号多肽假说	(146)
§ 7.2 膜——载体假说	(149)

1

叶绿体的结构与功能概观

生物能量的主要来源是太阳能。绿色植物和一些有光合能力的细菌经过光合作用把太阳能转化为化学能。植物细胞的光合作用是在叶绿体中进行的。叶绿体是质体(Plastids)的一种。质体是植物细胞所特有的。它可分为具有色素和不具色素的两种类型。具有色素的质体有叶绿体(Chloroplasts)和有色体(Chromoplasts)。无色素的质体称白色体(leucoplasts)。白色体、叶绿体和有色体在发育上有密切关系,可以互相转化。

一个细胞中的叶绿体数目因植物种类而有很大差别。有些藻类细胞(例如衣藻、小球藻)只有一个叶绿体,而在高等植物一个细胞中可能有十多个,数十个乃至100个以上叶绿体。

§ 1.1 叶绿体的结构

在藻类植物中,叶绿体的形状因植物种类不同可有很大变化,它们可以是带状、板状、环状、或星状。但在藓类、蕨类和种子植

物中叶绿体一般为扁平的椭圆形，直径约为5—10微米，厚约2—3微米。

叶绿体的周围被有两层光滑的单位膜。两层膜间被一个电子密度低的较亮的空间隔开。这两层单位膜称为叶绿体膜(Chloroplast membrane)或外被(outer envelope)。叶绿体膜内充满流动状态的基质(stroma)，基质中有许多片层(lamella)结构(图1—1)。

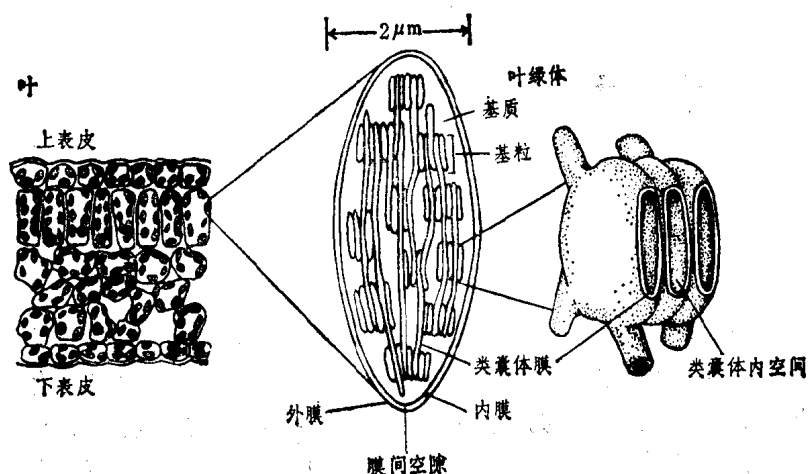


图1—1 叶绿体超微结构模式图(仿Alberts, B.等,1983)

每个片层是由周围闭合的两层膜组成,呈扁囊状,称为类囊体(thylakoid)。类囊体内是水溶液。小类囊体互相堆叠在一起形成基粒(grana),这样的类囊体称为基粒类囊体(granum thylakoid)。组成基粒的片层称为基粒片层(grana lamella)。大的类囊体横贯在基质(stroma)中,贯穿于两个或两个以上的基粒之间。这样的片层称为基质片层(stromalamella),这样的类囊体称基质类囊体(stroma thylakoid)。基粒的直径为0.3—2微米,组成基粒的类囊体数目依不同植物或同一植物的不同部位的细胞而有很大变化,例如烟草叶绿体的基粒有10—15个类囊体,而玉米的叶绿体则有15—50个类囊体,冬小麦基粒类囊体数目,随叶位上升而增多,旗叶最多。

在叶绿体的基质中有较大的颗粒——油滴和较小的核糖体颗粒。基质中存在着DNA纤维，各种可溶性蛋白(酶)，以及其他代谢活跃物质(图1—2)。

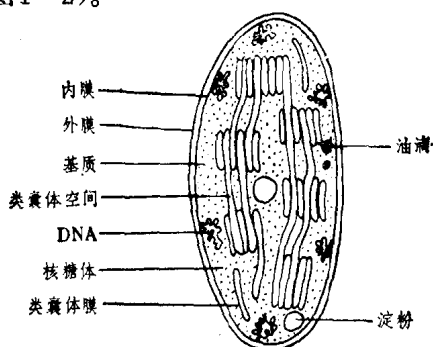


图1—2 叶绿体基质内各种结构成分的示意图

现在知道，光合作用过程中光能向化学能的转化是在类囊体膜上进行的，因此类囊体膜亦称光合膜(photosynthetic membrane)。如上所述，高等植物叶绿体的类囊体组成基粒。但下等藻类细胞其叶绿体的类囊体并不组成基粒，而是单独存在。在真核藻类不同门类的代表中，可以看到类囊体由单独存在到组成基粒的各种过渡类型。例如，在红藻的叶绿体中类囊体是单独存在的，内部的类囊体与叶绿体的长轴平行，贯通于其中。在黄褐藻的叶绿体中可看到类囊体二枚或三枚相叠在一起。在褐藻和眼虫的叶绿体中也可看到类囊体三枚以上相叠合。最后，在有些绿藻的叶绿体中可以看到类囊体堆叠成基粒。

蓝藻和光合细菌等原核生物都没有叶绿体，蓝藻有类囊体，分布在细胞内，特别是分散在细胞的周边部位。光合细菌的光合作用是在含有光合色素的细胞内膜进行的。这种内膜呈小泡状或扁囊状，分布于细胞周围，称为载色体(chromatophore)。

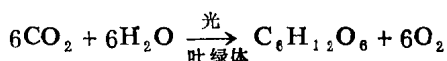
§ 1.2 叶绿体的功能

叶绿体的主要功能是光合作用，同时在叶绿体中也合成DNA、

RAN和各种蛋白质等。

1. 光合作用

光合作用是叶绿素吸收光能，使之转变为化学能，同时利用二氧化碳和水制造有机物并释放氧的过程。这一过程可用下列化学方程式表示：



这个方程式只是光合作用的总反应式。其中包括很多复杂的步骤。一般把它分成光反应(light reaction)和暗反应(dark reaction)两大阶段(图1—3)。

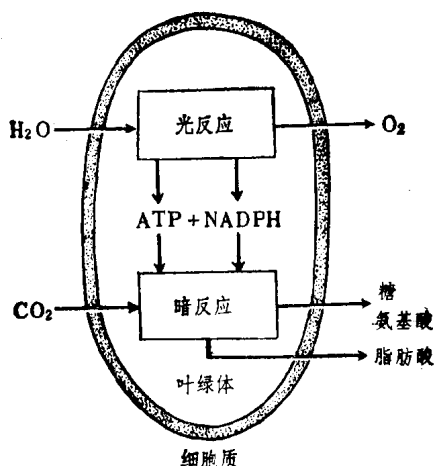


图1—3 叶绿体光合作用的光反应和暗反应关系示意图
(仿Alberts, B.等1983)

①光反应：这是叶绿素等色素分子吸收，传递光能，将光能转换为化学能，形成ATP和NADPH的过程。在此过程中水分子被分解，放出氧来。

这个过程是由光系统I(photosystem I,简称PSI)和光系统II(photosystem II,简称PSII)两个光系统联合完成的。在它们之间连接有电子传递系统，与电子传递系统偶联着磷酸化过程。

光合作用的原初反应发生在两个光系统中，是在所谓光合作

用单位(photosynthetic unit)中进行的。一个光合作用单位是由200以上聚光色素分子和一个作用中心组成。聚光色素(light harvesting pigment)没有光化学活性,只把吸收的光能以极快的速度传递给作用中心。叶绿体中的绝大多数色素(大部分叶绿素a和全部叶绿素b,胡萝卜素、叶黄素等)都属于聚光色素。作用中心色素(reaction center pigment)至少包括一个光能转换色素分子,一个原初电子受体和一个原初电子供体(图1—4)。聚光色素

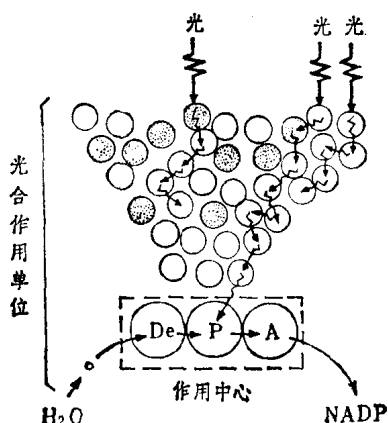


图1—4 光合作用原初反应的能量吸收传递与转换的图解

粗的波线箭头是光能的吸收,细的波浪箭头是能量的传递,直线箭头是电子传递。空心圆圈代表聚光性叶绿素分子,有黑点圆圈代表类胡萝卜素等辅助色素。P是作用中心色素分子,D是原初电子供体,A是原初电子受体,e是电子。

分子将光能传递到作用中心后,使中心色素P(光能转换色素)激发而成激发态(P^*),并放出电子给原初电子受体(A)。这样,色素分子P被氧化,带正电荷,成为 P^+ ,而原初电子受体被还原,带负电荷,成为(A^-)。氧化的色素分子 P^+ 从原初电子供体(D)得到电子而恢复原来状态(P),同时原初的电子供体却被氧化(D^+)。这样不断地氧化还原(电离)而把电子送给原初电子受体。光合作用的最终电子供体是水,最终电子受体是NADP。

光系统I的作用中心色素是P700(它是叶绿素a的一种,其光能吸收高峰在700纳米)。聚光色素分子把光能传给P700,使它吸收

光能而被激发，放出电子，给原初电子受体Z(Z是尚未判明真相的电子受体，有时亦用“x”表示)，同时这个电子上升到较高的能水平〔即由氧化还原电位(E_0) + 0.4V 上升到 -0.6V，相差1.0Vb。这种电位上升所用能量是来自光能〕。结果产生一个弱氧化剂 $P700^+$ (+0.43V) 和一个强还原剂 Z^- (-0.6V)。光系统I形成的强还原剂(Z^-)用来还原铁氧还蛋白(ferredoxin，简称Fd)。在NADP还原酶的参与下，Fd把NADP还原为NADPH，NADPH用于暗反应中的 CO_2 还原。

$P700^+$ 需要电子供体给它提供电子，方能恢复成 $P700$ ，继续工作。这种电子来自光系统II。

光系统II的作用中心色素据认为是叶绿素a的一种P682(即光能吸收的高峰在波长682纳米左右)，由聚光色素传来的光子使P682激发，放出电子给原初电子受体Q[Q是一种尚未判明的电子受体，可能是一种醌(Quinone)，故用Q代表]，使Q还原成弱还原剂 Q^- 。氧化的P682从原初电子供体Y接受电子而Y成为强氧化剂 Y^+ 。Y是一种尚未鉴定的电子供体，它的电子最终是由水转移来的。但关于水的氧化而形成电子、质子和分子氧的机制还不清楚(第7页图1—5)。

光系统II的Q和光系统I的 $P700^+$ 之间通过一个电子传递链相连接。这个电子传递链中有质体醌(plastoquinon，简称PQ)、细胞色素(Cyt) b559、细胞色素f和质体蓝素(plastocyanin，简称PC)等。它们具有不同的氧化还原电位，负值越大代表还原势越强，正值越大代表氧化势越强。电子通过它们传给 $P700^+$ 时释放出能量。利用这种能量把无机磷和ADP转化成ATP，即发生光合磷酸化(photophosphorylation)过程。在这种情况下电子传递通路是开放的，即不是循环的。故称这种磷酸化为非循环式光合磷酸化(noncyclic photophosphorylation)。

在光系统I，当NADPH/NADP $^+$ 的比值大时，铁氧还蛋白的电子经细胞色素b₆、细胞色素f、质体蓝素传回给 $P700^+$ 。在这种情况下电子的传递是循环式的。由铁氧还蛋白把电子传回 $P700$ 时，

电子能位降低，释放出能量，被用来合成ATP。这种光合磷酸化，称循环式光合磷酸化(cyclic photophosphorylation)。

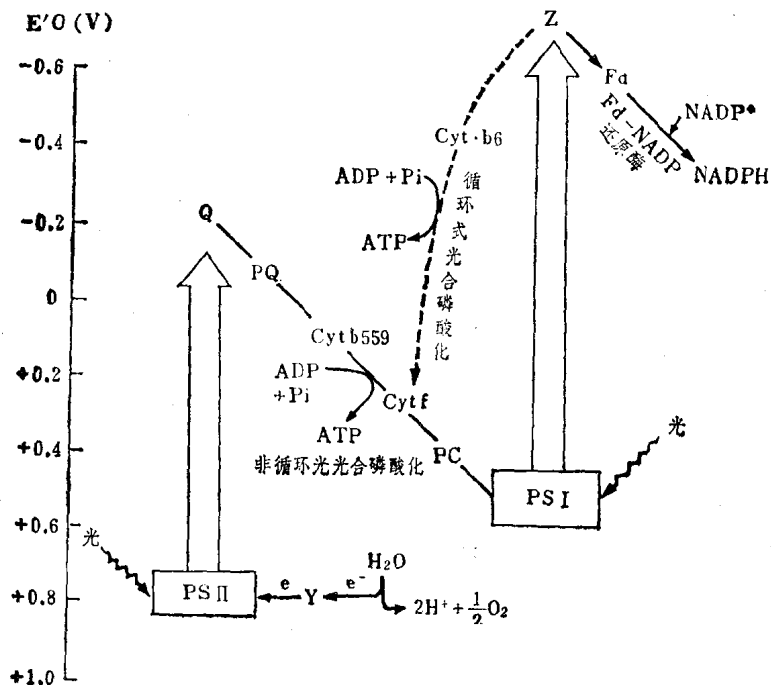


图1—5 光合作用的光反应主要过程图示

光合磷酸化过程必须有偶联因子(ATP_{ase})参加。这种偶联因子是结合于类囊体膜表面的一种颗粒蛋白，直径为100埃。用低浓度乙二胺四乙酸(EDTA)溶液从类囊体膜上把偶联因子洗去，则残膜解偶联，失去合成ATP能力。如将含有偶联因子的提取溶液回加于残膜，则光合磷酸化能力可部分恢复。

经过上述光系统I和光系统II的协调作用和同时发生的与电子传递链偶联的光合磷酸化过程，使光能转换成化学能，贮存在ATP和 $NADPH_2$ 中，水被光解而产生分子氧。

②暗反应：光合作用的下一步骤是在暗处(也可在光下)进行的。它是利用光反应形成的ATP提供能量，由 $NADPH_2$ 还原 CO_2 固定形成的中间产物，制造葡萄糖等碳水化合物的过程。通过这

一过程将ATP和NADPH₂中的活跃化学能转换成贮存在碳水化合物中的稳定的化学能。它也称二氧化碳同化或碳同化过程。这是一个有许多种酶参与反应的过程。在高等植物的光合作用中二氧化碳的同化有三种途径，即卡尔文循环、C₄途径和景天科酸代谢。其中卡尔文循环是最基本和普遍的，并且只有这一途径具备合成淀粉等产物的能力。

在四十年代和五十年代期间由于卡尔文 (M. Calvin) 等人利用放射性同位素 (¹⁴CO₂) 示踪等方法所进行的系统研究，终于阐明二氧化碳同化的循环途径，故称卡尔文循环 (Calvin cycle)。这个循环的二氧化碳固定中间产物是一种三碳化合物，故此同化途径又称C₃途径。

在卡尔文循环中首先由核酮糖—1，5—二磷酸接受CO₂，在核酮糖二磷酸羧化酶作用下形成两个分子的3—磷酸甘油酸。后者被光反应提供的ATP磷酸化形成1，3—二磷酸甘油酸，然后被光反应提供的NADPH₂还原成甘油醛—3—磷酸。这两个过程分别

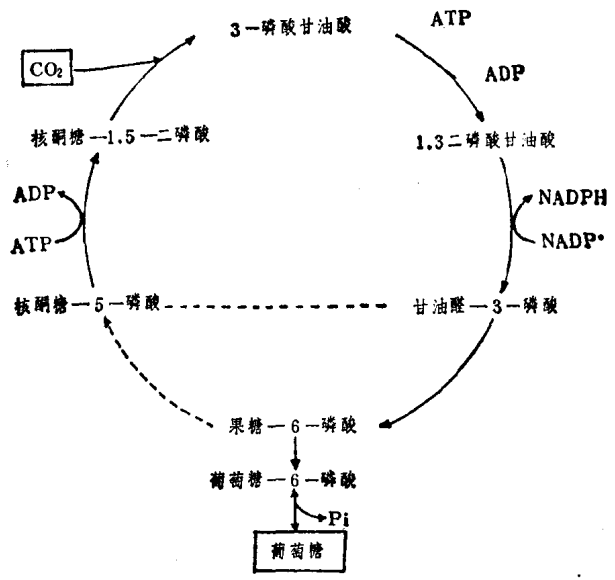


图1—6 通过卡尔文循环使CO₂还原，生成葡萄糖的主要步骤

有3-磷酸甘油酸激酶和NADP-3-甘油醛磷酸脱氢酶参与。甘油醛-3-磷酸合成果糖-6-磷酸然后转变为葡萄糖-6-磷酸，进一步形成葡萄糖、淀粉和蔗糖(图1-6)。一部分甘油醛-3-磷酸经过复杂的反应途径又变成核酮糖-1, 5-二磷酸，重新开始循环。整个循环靠光反应贮存于ADP和NADPH₂中的能量所推动。每循环一次只能固定一个CO₂分子，循环6次才能把6个CO₂分子同化成一个己糖分子。

C₄途径见于热带、亚热带，以及干旱环境中的某些植物，如甘蔗、玉米等。它们的光合作用的暗反应部分和卡尔文循环不同。其光合作用的最初产物不是三碳化合物磷酸甘油酸、而是两个四碳化合物(草酰乙酸和苹果酸)；二氧化碳的受体不是二磷酸戊糖而是磷酸烯醇式丙酮酸。这种同化二氧化碳的最初产物是通过四碳的二羧酸的二氧化碳固定途径，简称四碳途径或C₄途径。在

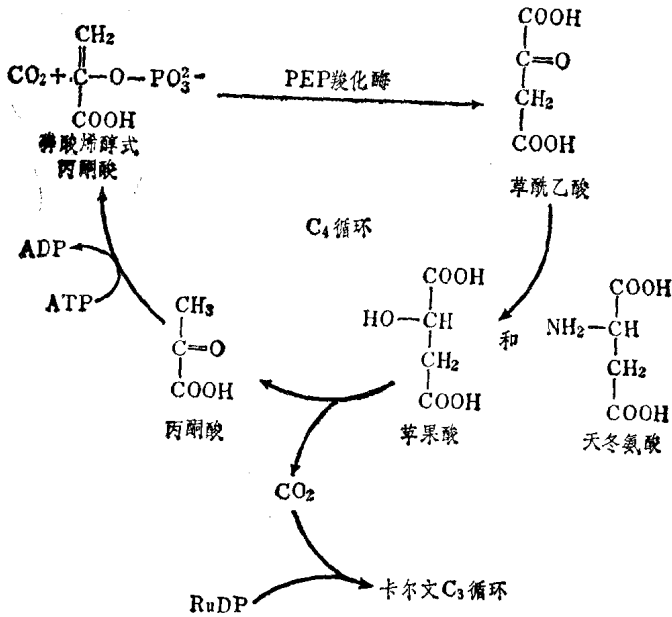


图1-7 光合作用暗反应C₄循环的主要步骤及其与C₃循环的关系 (仿Avers, Ch, J. 1976)

叶肉细胞中经 C_4 途径固定二氧化碳后形成的四碳化合物（苹果酸）转运到维管束鞘细胞。在这里它分解成一个分子的 CO_2 和一个分子的三碳化合物（丙酮酸）。后者返回叶肉细胞，重新开始按 C_4 途径固定 CO_2 。前者在维管束鞘细胞中经过卡尔文循环（ C_3 途径）进行还原，形成糖类（图1—7，图1—8）。因此在甘蔗、玉米等植物中，只有维管束鞘的细胞形成淀粉粒，而叶肉细胞中没有淀粉。

由于叶肉细胞通过 C_4 途径不断给维管束鞘细胞的卡尔文循环提供 CO_2 ，因此人们把 C_4 途径说成是一种“ CO_2 泵”。

按四碳途径进行光合作用暗反应的植物称四碳植物（ C_4 植物）。按三碳途径同化二氧化碳的植物称三碳植物（ C_3 植物），如小

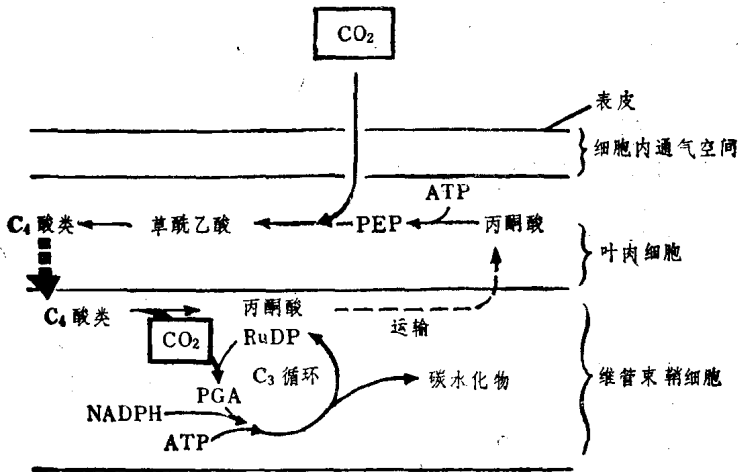


图1—8 C_4 植物的光合作用暗反应 C_4 和 C_3 循环发生的部位示意图

麦、水稻、大豆、棉花等。 C_4 途径比 C_3 途径对二氧化碳的固定更为有效，当周围环境中的 CO_2 浓度在50ppm以下时， C_3 植物便不能利用，而 C_4 植物对于10ppm以下的 CO_2 ，甚至1—2ppm的 CO_2 都能加以利用。这种对 CO_2 固定能力的差异是一种适应的表现。在高温或干燥环境下生长的 C_4 植物，为了防止叶部细胞水分的向外扩散，气孔经常是关闭或部分关闭的。这样外部的 CO_2 也必然很