

钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白分子内不同基团间能量传递的研究*

王广策 曾呈奎

(中国科学院实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

提要 于 1996 年 8—12 月,从钝顶螺旋藻中分离纯化 C-藻蓝蛋白,并用荧光光谱法对 C-藻蓝蛋白分子内不同基团间的能量传递进行研究。结果表明,C-藻蓝蛋白分子内芳香族氨基酸残基能将能量传至与脱辅基蛋白共价结合的色基,从而使色基产生相应的荧光;C-藻蓝蛋白分子 240—245nm 的荧光激发峰产生于二硫键,它也能将吸收的能量传至色基;同时还发现,溶液状态下的 C-藻蓝蛋白分子内,色氨酸残基可能位于分子内部的疏水区,而二硫键则位于分子表面的非荷电区域。这些均可作为开展 C-藻蓝蛋白分子天然构象研究的结构表征。

关键词 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白 二硫键 芳香族氨基酸残基 荧光光谱

学科分类号 S917.4

藻胆蛋白存在于蓝藻、红藻、隐藻和一些甲藻细胞中,它是光合作用反应中心的捕光色素蛋白。开展藻胆蛋白的研究对深入探讨光合作用过程中色基间能量传递以及与脱辅基蛋白构象之间的关系具有重要的意义(Glazer, 1980)。C-藻蓝蛋白是主要存在于蓝藻中的一类藻胆蛋白。在钝顶螺旋藻中,C-藻蓝蛋白与异藻蓝蛋白通过联结蛋白形成藻胆体(刘其芳等,1988)。C-藻蓝蛋白是由 α 和 β 亚基组成的。Schirmer 等(1985, 1986, 1987)已对六聚体($\alpha\beta$)₆的晶体结构进行了研究,但在溶液状态下 C-藻蓝蛋白的构象研究尚未见报道。本文报告钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白在溶液状态下不同基团间的能量传递以及这些基团在分子中的可能空间位置,为深入开展溶液中 C-藻蓝蛋白的构象研究提供新的结构表征。

1 材料与方法

于 1996 年 8 月进行钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)培养实验。用简化的 Zarrouk 培养基(Zarrouk, 1966)¹⁾、自然光照、室温通气培养。10d 后以 2 500r / min 转速(Beckman, JA-20 转子)离心 10min,收集藻体,蒸馏水洗涤藻体两次后,加入少量蒸馏水反复冻融。然

* 国家自然科学基金资助项目,39700010号。王广策,男,出生于1966年12月,博士,副研究员, E-mail: gcwang-@ms. qdio. ac. cn

1) Zarrouk C, 1966. Contribution à l'étude Dune Cyanophycée—Influence de Divers Facteurs Physique et Chimiques Sur La Croissance et al Photosyn-these de Spirulina maxima Geitler. Ph. D. Thesis, University of Paris, 4—5

收稿日期: 1997-10-01, 收修改稿日期: 1998-04-12

后,以 3 500r / min 转速 (Beckman, JA-20 转子) 离心 10min 去残渣; 上清液滴加至经过 1 mmol / L 磷酸盐缓冲液 (pH = 6.8) 平衡过的羟基磷灰石柱上, 洗脱过程中不断增加离子强度, 收集有颜色的组分, 其中最先被洗脱下来的深蓝色组分即为 C-藻蓝蛋白 (C-phycocyanin CPC), 随后被洗脱下来的为异藻蓝蛋白 (王广策等, 1996)。将收集的较纯的 CPC 经 Sephadex G-200 凝胶柱 (2.5cm × 50cm) 层析进一步纯化, 平衡洗脱液为 pH = 6.8, 100mmol / L 磷酸盐缓冲液。

羟基磷灰石为自制, Sephadex G-200 为 Pharmacia 公司进口分装, 其它化学试剂均为国产分析纯。

吸收光谱采用岛津 UV-240型紫外分光光度计测定, 吸收池光径为 1cm。室温荧光光谱用日立-850型荧光分光光度计测定, 激发光和发射光的带宽均为 5nm。

2 结果与讨论

2.1 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的纯度

经过羟基磷灰石柱和 Sephadex G-200 凝胶柱层析后, CPC 的纯度 (A_{620} / A_{280}) 为 5, 在可见光区的最大吸收峰为 620nm, 室温荧光发射峰在 650nm 处 (图 1)。一般认为, CPC 的 A_{620} / A_{280} 大于 4 即达到高纯度的要求 (Glazer, 1980), 因此, 本研究所分离的 CPC 纯度极高。

2.2 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白分子内基团间的能量传递

2.2.1 芳香族氨基酸残基与色基间的能量传递

在藻胆蛋白溶液的吸收光谱中, 280nm 的吸收峰被认为是酪氨酸残基或色氨酸残基的吸收 (Carra *et al*, 1976)。由于酪氨酸残基能将吸收的能量

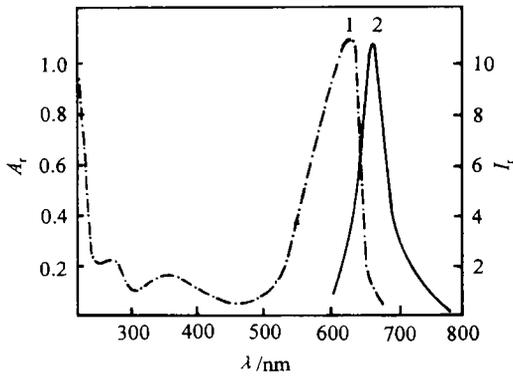


图 1 钝顶螺旋藻 CPC 吸收光谱 (1) 和荧光发射光谱 (2) (A_r , 相对吸收; I_r , 相对荧光强度)

Fig.1 The absorption (1) and fluorescence emission (2) spectra of *S. platensis* C-phycocyanin (CPC)

传至色氨酸残基, 使色氨酸残基产生相应的荧光, 所以, 用 280nm 的紫外光激发 CPC 溶液时, 应该产生的是色氨酸残基的荧光, 然而从图 2a 的 1 中可见在天然态 CPC 时有 355nm 和 650nm 处的两个荧光发射峰。显然, 前一个荧光发射峰来源于色氨酸残基, 而后者则来源于四吡咯结构的色基, 二者相对荧光强度之比为 1:13, 说明色氨酸残基的相对荧光强度极弱。将 CPC 用盐酸胍彻底变性 (盐酸胍的终浓度为 5mol / L), 然后再用 280nm 的紫外光激发此变性的 CPC, 从图 2b 的 3 中可以发现其荧光发射光谱中有三个发射峰, 分别位于 315nm, 380nm 和 650nm; 三者的相对荧光强度比为: 30:37:11。315nm 的荧光发射峰主要来源于 CPC 的酪氨酸残基, 380nm 的发射峰主要来源于色氨酸残基, 650nm 则是色基的发射峰。在溶液中, CPC 浓度在变性前后是相同的, 然而变性前后色氨酸残基的相对荧光强度之比为 1:9, 亦即 CPC 变性后色氨酸残基的荧光强度大幅度升高。以上的结果说明, 天然态 CPC 的芳香族氨基酸残基能将吸收的能量传给开链四吡咯结构的色基并使其产生相应的荧光。当用盐酸胍使 CPC 彻底变性时, 由于此时肽链处于伸展状态, 芳香族氨基酸残

基与色基间的能量传递被解除,同时酪氨酸残基和色氨酸残基间的能量偶联也被解除。所以,尽管用 280nm 激发天然态的 CPC 并不产生 315nm 的酪氨酸残基的荧光发射峰,但变性后则出现此峰。

从图 2a 的 3 和图 2b 的 3 中还可发现,变性前的 CPC 色氨酸残基的荧光发射峰位于 355nm 处,但变性后则红移至 380nm。由于蛋白质中色氨酸残基由非极性环境转移至极性环境时,其荧光发射峰的位置要红移(陶慰孙等,1995),所以,这个结果表明天然态的 CPC 的色氨酸残基大部分位于 CPC 分子的内部疏水区域,CPC 变性后这些色氨酸残基则处于极性的水环境中。

2.2.2 二硫键与色基间的能量传递 从图 2a 中可见天然态 CPC 的荧光激发光谱(1)的紫外区中存在有 240—245nm 的荧光激发峰。用 240nm 的紫外光激发天然态 CPC 时,也产生了 355nm 和 650nm 两个发射峰(图 2a 中的 2),且后者与前者的相对荧光强度之比为 16:1。当在 CPC 溶液中加入二硫苏糖醇(DTT)并使其终浓度为 100mmol/L 时,再用 240nm 的紫外光激发 CPC,发现 355nm 和 650nm 的荧光发射峰全部消失(图 2c 中的 2),但用 280nm 激发时,荧光发射峰的位置以及相对荧光强度均未发生任何变化(图 2c 中的 3)。同时在 CPC 的荧光激发光谱中,240nm 的荧光激发峰也消失,其它的荧光激发峰与未加 DTT 的 CPC 相同(图 2c 中的 1)。

过量的 DTT 主要是使蛋白质的二硫键被还原而断开。所以 CPC 的 240nm 之荧光激发峰主要来源于二硫键,并且二硫键也能将吸收的能量传至色基使色基产生相应的荧光。Konev(郭尧君,1983)在研究天然 γ -球蛋白时发现其存在有 240—245nm 的荧光激发峰,将此蛋白水解为单个氨基酸后,则此激发峰消失,因此,他推测此激发峰来源于蛋白质的肽键。事实上,Konev 在将蛋白水解后,相应的二硫键也被破坏,因此 240—245nm 的荧光激发峰自然也就消失。一般情况下,如果蛋白质分子的二硫键位于分子的内部,则必须先变性让肽链处于伸展状态以使二硫键暴露出来,才能被 DTT 还原断裂。但 CPC 分子不需变

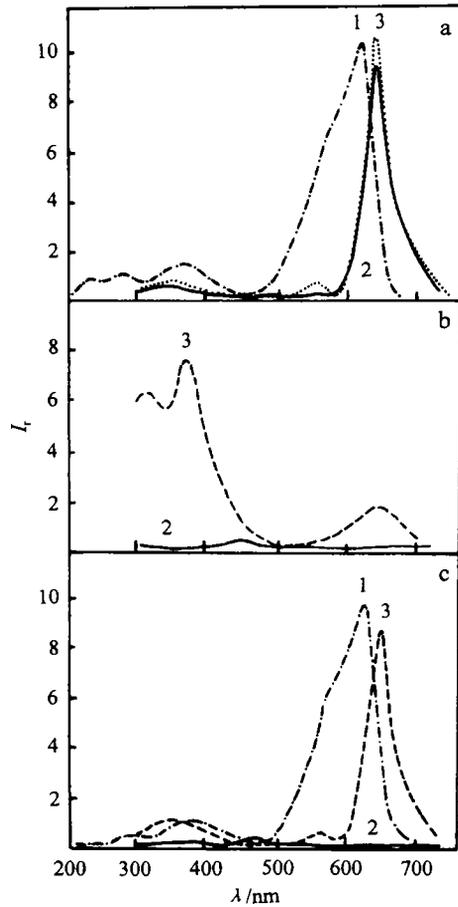


图 2 钝顶螺旋藻 CPC 荧光激发(1)和荧光发射光谱(2,3)

Fig. 2 The fluorescence excitation (1) and emission spectra (2,3) of *S. platensis* C-phycoerythrin (CPC)

a. 天然态 CPC 的荧光激发光谱(1)和荧光发射光谱(2,3); b. 变性后的 CPC 溶液的荧光发射光谱(2,3); c. 含 100mmol/L DTT 的 CPC 溶液的荧光激发光谱(1)和荧光发射光谱(2,3)

1. 发射波长: 650nm; 2. 激发波长: 240nm;
3. 激发波长: 280nm

性,二硫键就可以被 DTT 断裂,而且加入 DTT 后,CPC 的色氨酸残基和色基间二硫键的能量偶联也被解除。这些均表明,二硫键全部分布在 CPC 分子的表面。

从图 2b 可以发现,CPC 被盐酸胍变性后,用 240nm 的紫外光激发不能产生 355nm 和 650nm 的荧光发射峰。这说明天然态 CPC 的二硫键能将吸收的能量传至色氨酸残基以及色基,一旦 CPC 变性后,肽链处于伸展状态,则这种能量的偶联亦被解除。

2.2.3 二硫键在分子中的空间位置分析 为进一步确定 CPC 分子二硫键的位置,分别选用三种荧光淬灭剂 KI, CsCl 和丙烯酰胺加入到 CPC 溶液中,通过它们对二硫键与色基间能量传递的影响来更进一步确定 CPC 分子中二硫键的位置。研究表明,低浓度的 I^- (20mmol / L), Cs^+ (0.47mol / L) 和丙烯酰胺 (50mmol / L) 即可阻滞二硫键与色基间的能量传递。这说明, I^- , Cs^+ 以及丙烯酰胺均可容易地与二硫键发生碰撞,从而使二硫键受 240nm 紫外光激发而产生的激发态被淬灭。同时也表明,CPC 的二硫键是分布在分子表面的非荷电区域,因为只有在此区, I^- , Cs^+ 以及丙烯酰胺才能接近。

2.2.4 不同基团间能量传递的机理 一般认为,在光合作用过程中,色基间的能量传递主要是按 Forster 的无辐射共振传能的方式进行。这种传能方式要求供体色基与受体色基间的空间距离在 100\AA 以内,同时要求供体的荧光光谱与受体色基的吸收光谱有部分重叠(郭尧君,1983)。但最近发现,在藻胆蛋白分子内还存在另外一种传能方式即激子偶联(excitation coupling)(Holzwarth,1991)。根据 CPC 的 X-射线晶体结构分析结果,当 CPC 寡聚体绕三重对称轴排列,使色基间的空间距离缩短到 20\AA 以内,才出现这种激子偶联传能方式(Holzwarth, 1991)。

在本研究中,CPC 分子的色氨酸残基与色基间的能量传递可能是 Forster 的共振传能方式,因为色氨酸残基的 355nm 的荧光发射峰正好与色基 360nm 的吸收峰重叠。当 CPC 分子变性后肽链处于伸展状态时,由于色氨酸残基与色基间的距离增大,使二者的能量传递在一定程度上受阻。二硫键本身并不能产生荧光,所以二硫键与色基间的能量传递机制不可能是 Forster 的无辐射共振传能,而更可能是激子偶联传能方式,因此,一旦 CPC 肽链完全伸展,二硫键与色基间的能量传递则彻底消失。

3 结论

在钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白分子中,芳香族氨基酸残基尤其是色氨酸残基与色基-藻蓝胆素间存在着激发能传递现象,这种能量传递的机制可能是 Forster 无辐射共振传能。C-藻蓝蛋白 240—245nm 的荧光激发峰来源于二硫键,而不是过去认为的是来源于肽键,它与色基藻蓝胆素间也存在着激发能传递现象,而且这种传能机制更可能是激子偶联。这些实验结果均可作为开展溶液中 C-藻蓝蛋白天然构象研究的新的结构表征。

参 考 文 献

王广策 周百成 曾呈奎, 1996. 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白和多管藻 R-藻红蛋白的分离纯化及摩尔消光系数的测定. 海洋科学, 1: 52—55

刘其芳 王后乐 张宪孔, 1988. 盐泽螺旋藻藻胆蛋白的分离和特性研究. 水生生物学报, 14(2): 113—116

郭尧君, 1983. 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用. 北京: 科学出版社. 134—151

陶慰孙 李惟 姜涌明, 1995. 蛋白质分子基础. 北京: 高等教育出版社. 260—263

Carra P O, Ecocha C O, 1976. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment. New York: Academic Press.

344—346

Glazer A N, 1980. The Biochemistry of Plant. New York: Academic Press. 8: 51—96

Holzwarth A R, 1991. Structure—function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae. *Physiol Plant*, 83: 518—528

Schirmer T, Bode W, Huber R, 1985. X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycoyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures. *J Mol Biol*, 148: 257—277

Schirmer T, Huber R, Schneider M *et al*, 1986. Crystal structure analysis and refinement at 2.5Å of hexameric C-phycoyanin from cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*: the molecular model and its implications for light-harvesting. *J Mol Biol*, 188: 651—676

Schirmer T, Bode W, Huber R, 1987. Refined three-dimensional structures of two cyanobacterium C-phycoyanin at 2.1 and 2.5Å resolution: a common principle of phycobilin-protein interaction. *J Mol Biol*, 196: 677—695

STUDIES ON ENERGY TRANSFER BETWEEN DIFFERENT GROUPS IN *SPIRUNINA PLATENSIS* C-PHYCOCYANIN

WANG Guang-ce, ZENG Cheng-kui (C. K. Tseng)

(*Experimental Marine Biological Laboratory, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract From August to December of 1996, C-phycoyanin was purified from *Spirulina platensis*, and energy transfer between different groups in C-phycoyanin was studied in terms of its fluorescence spectra. The purification of the C-phycoyanin was based upon the use of a hydroxylapatite chromatography and the purity was 5 (A_{620} / A_{280}). The C-phycoyanin showed two fluorescence peaks at 355 nm and 650nm at the excitation wavelength of 280nm, which is attributed to the absorption of aromatic amino acid residues in apoprotein of the C-phycoyanin; this is also the case for the C-phycoyanin when excited at 240nm. If the C-phycoyanin was denatured, then the fluorescence peak at 650nm decreased greatly, whilst the fluorescence peak at 355nm was shifted to 380nm and the relative fluorescence intensity increased. However, if the C-phycoyanin was denatured or DTT was added to the C-phycoyanin solution, then all fluorescence peaks disappeared at the excitation wavelength of 240nm. The results show that the energy which is absorbed by the aromatic amino acid residues can be transferred from the aromatic amino acid residues to the chromophore which is conjugated to apoprotein in C-phycoyanin in solution to make it produce fluorescence; it is found that the fluorescence excitation peak at 240—245nm results from disulfide bonds in C-phycoyanin and the energy can also be transferred from disulfide bonds to chromophore of C-phycoyanin. With the help of some quenchers, the location of the tryptophan residues of the C-phycoyanin was found in the hydrophobic region of the inner molecules and that of disulfide bonds in the nonelectrostatic part of the C-phycoyanin molecule surface. The mechanism of energy transfer between the aromatic amino acid residues in apoprotein of

C-phycoyanin and the chromophore of C-phycoyanin may be associated with the Förster dipole-dipole resonance because of the overlap of fluorescence emission peak of tryptophan residues at 355nm with the absorption peak of the chromophores of C-phycoyanin, which are called phycocyanobilin, at 360nm. On the other hand, the mechanism of energy transfer between the disulfide bonds of the apoprotein of C-phycoyanin and the chromophore of C-phycoyanin may be related to excitation coupling because the disulfide bonds in apoprotein do not produce fluorescence. Thus, the energy transfer between different groups can serve as structure characters in phycobiliproteins.

Key words *Spirulina platensis* C-phycoyanin Disulfide bond Aromatic amino acid residues Fluorescence spectra

Subject classification number S917.4

《海洋与湖沼》学报历年获奖目录

1988年	山东省科协优秀科技期刊	一等奖
1990年	中国科学院优秀自然科学期刊	二等奖
1991年	山东省科委、山东省新闻出版局、山东省科协优秀科技期刊 (总分第一名)	一等奖
1992年	中国科学院优秀科技期刊	二等奖
1992年	中国科协优秀科技期刊	一等奖
1992年	国家科委、中宣部、国家新闻出版总署优秀科技期刊	二等奖
1993年	华东区优秀科技期刊	一等奖
1997年	全国优秀科技期刊	三等奖
1997年	中国科协优秀科技期刊	二等奖

本刊编辑部

Editorial Office, Oceanologia et Limnologia Sinica