研究论文

多变鱼腥藻藻胆蛋白共价复合物的合成及其分子内能量传递*

赵继全 赵井泉 蒋丽金**
(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101)

摘 要

利用双功能基偶联剂3-(2-吡啶联巯基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)合成了两个藻胆蛋白复合物, 藻红蓝蛋白-变藻蓝蛋白复合物PEC-APC和藻红蓝蛋白-藻蓝蛋白复合物PEC-PC. 利用吸收光谱和荧光光谱证明了藻胆蛋白构型与构象在反应后得到保持. 通过荧光光谱观察到能量传递现象. 计算出复合物PEC-APC的分子内能量传递效率约为90%. 复合物PEC-PC中藻红蓝蛋白PEC的荧光寿命比PEC本身的寿命大大缩短, 证明存在分子内能量传递. 二硫苏糖醇(DTT)还原二硫桥键后能量传递被阻断. 这进一步证明复合物合成成功及分子内能量传递.

关键词 藻胆蛋白复合物, 藻红蓝蛋白, 藻蓝蛋白, 变藻蓝蛋白, 能量传递

藻类光合作用所需要的光能主要是通过超分子复合物藻胆体来实现的. 多变鱼腥藻的藻胆体由藻红蓝蛋白, C-藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白组成[1]. 这些蛋白是通过无色多肽连接蛋白连接的. 这些连接蛋白在分离过程中容易脱离, 使藻胆体分离成低级复合物, 最终分解成各个蛋白的混合物. 因而给研究藻胆体内能量传递机制带来不便, 有必要合成一些共价交联的模型物来研究能量传递机制[2]. 而且, 由于藻胆蛋白具有很高的摩尔消光系数, 高量子产率, 高水溶性及固态能储存相当长时间这些特点, 它们适合于荧光免疫分析. 合成的模型复合物具有大的Stokes位移, 可以消除荧光分析中的Rayleigh和Raman散射, 提高分析的灵敏度[3]. 藻胆蛋白的交联方法同样可用于藻胆蛋白与其它蛋

1997年10月15日收到初稿, 1998年1月14日收到修改稿.
* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 29773049)
** 通讯联系人

白的交联[4,5]. 因而, 藻胆蛋白共价复合物的合成在理论上及应用上都具有重要意义.

1 材料和方法

1.1 材料

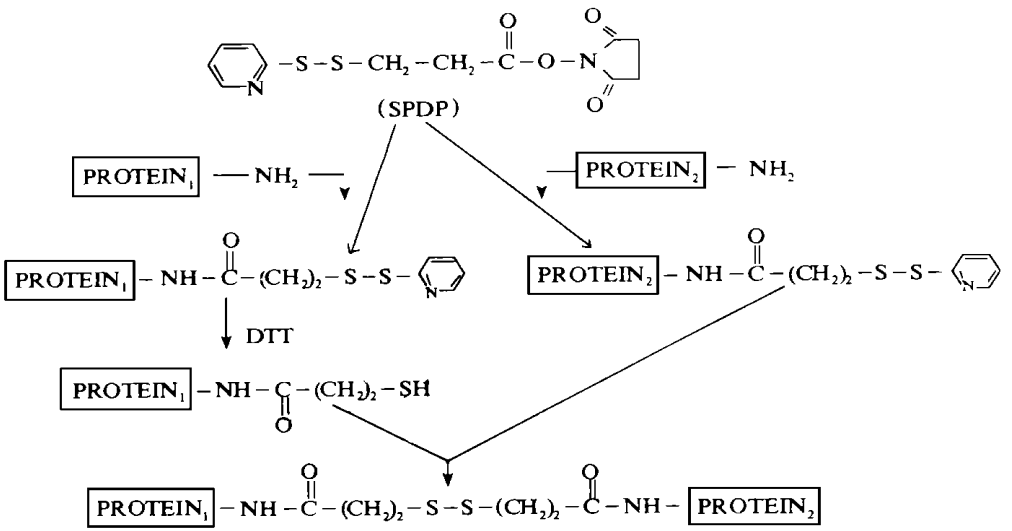
多变鱼腥藻藻种由中国科学院植物所路荣昭教授提供, Arnon 和 Allen 培基 30℃培养. 藻胆蛋白的分离按文献[1,6]方法进行. SPDP 和二硫苏糖醇(DTT) 购自 Sigma 公司.

1.2 光谱测量

吸收光谱在 Hewlett Packard 8511A 光谱仪上测得; 荧光光谱在 Hitachi 850 荧光光谱仪上测得. 荧光寿命测定用闸通管放电灯($N_2$337)作激发光源, 接收系统为 Model 7150 多道分析器和 Model SP-70/80 的单光子计数系统, 通过微机采集和拟合数据.

1.3 复合物的制备

1.3.1 合成路线图[7]



该合成路线图适合于所有含氨基蛋白质的交联.

1.3.2 复合物 PEC-APC 的制备

取 3.2×10^{-8} mol 的藻红蓝蛋白(PEC), 用 0.1 mol/L, pH= 7.4, NaCl 浓度 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液配成 1.5 mL 溶液, 向其中加入 10 μL (6.0×10^{-7} mol) 的 SPDP 无水乙醇溶液. 15℃反应 90 min 后, 将反应混合物上事先用相同缓冲液平衡过的 Sephadex G-25 柱(1.0×15 cm), 用相同缓冲液洗脱, 除去小分子化合物, 最后得 PEC 的吡啶基二硫化衍生物, 4℃保存备用. 取 3.3×10^{-8} mol 的 APC, 用 0.1 mol/L, pH= 7.4, NaCl 浓度 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液配成 1 mL 溶液加入 10 μL(5.0×10^{-7} mol/L) 的 SPDP 无水乙醇溶液, 15℃反应 90 min. 向反应混合物中加入 30 μL 1 mol/L 用相同缓冲液配制的 DTT 溶液. 反应 50 min 后上 Sephadex G-25 柱(1.0×15 cm), 用相同缓冲液洗脱, 得巯基化的 APC.

将 PEC 的吡啶基二硫化衍生物与巯基化的 APC 混合. 振摇均匀后避光放置 20 h. 用聚乙二醇-6000 浓缩后上 Bio-Gel P-300 柱(1.5×40 cm), 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液洗脱, 得复合物 PEC-APC.

1.3.3　复合物 PEC-PC 的制备

该复合物制备与 PEC-APC 的制备方法一致, 用 C-藻蓝蛋白 C-PC 代替 APC 即得复合物 PEC-PC.

2　结果与讨论

2.1　吸收光谱

图 1A 是 PEC, APC 及复合物 PEC-APC 的吸收光谱. 复合物的最大吸收峰既不在 APC 的最大吸收峰 650 nm, 也不在 PEC 的最大吸收峰 570 nm 处, 而在 598 nm 处. 该图形是 PEC 与 APC 吸收光谱的叠加结果. 图 1B 是 PEC, C-PC 及复合物 PEC-PC 的吸收光谱. 复合物的最大吸收峰在 596 nm, 而 PEC 和 C-PC 的最大吸收峰位置分别在 570 和 614 nm. 虽然吸收光谱发生了变化, 但这并不足以说明复合物是否合成成功. 因为将与复合物中相同摩尔比的藻胆蛋白机械混合得到与复合物相同的吸收光谱. 这从另一方面证明反应后藻胆蛋白没有发生变性. 利用图 1 及文献[8]中公式可计算复合物中藻胆蛋白的近似摩尔比. 其中:

$$C(\mathrm{PEC}) = 0.00499A_{650} - 0.0638A_{620} + 0.129A_{573} \quad (1)$$

$$C(\mathrm{C\text{-}PC}) = -0.0922A_{650} + 0.181A_{620} - 0.0291A_{573} \quad (2)$$

$$C(\mathrm{APC}) = 0.160A_{650} - 0.0423A_{620} + 0.00258A_{573} \quad (3)$$

由图 1 得到 A_{650}, A_{620}和 A_{573}值并代入公式(1), (2)及(3)中求得复合物 PEC-APC 中 n_{PEC} : n_{APC}= 1 : 1.6; 复合物 PEC-PC 中 n_{PEC} : n_{APC}= 1 : 2.4.

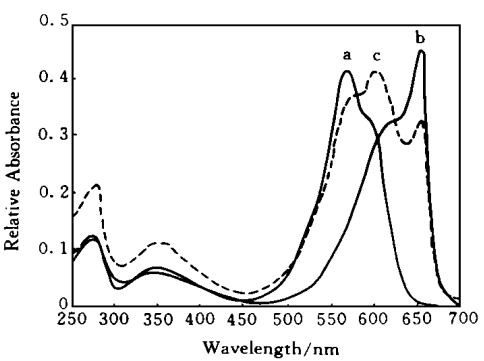


图 **1A**　PEC、APC 和 PEC-APC 的吸收光谱
The absorption spectra of PEC, APC, and PEC-APC
a: PEC; b: APC; c: PEC-APC

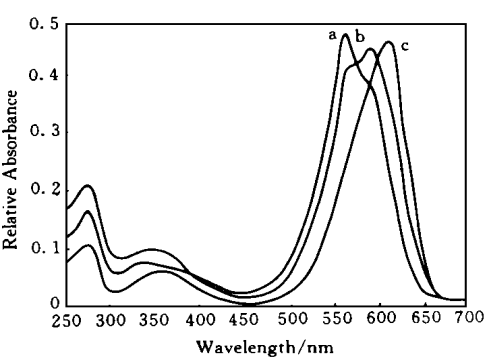


图 **1B**　PEC、C-PC 和 PEC-PC 的吸收光谱
The absorption spectra of PEC, C-PC, and PEC-PC
a: PEC; b: C-PC; c: PEC-PC

2.2 荧光光谱

图 **2**A 是 PEC、APC 及复合物 PEC-APC 的荧光光谱. 图中 a, b 分别是 PEC 及复合物 PEC-APC 的荧光光谱. 其最大发射峰分别在 **623** 和 **660** nm. c, d 分别是在 **510** 和 **600** nm 激发波长下 APC 的荧光光谱. c 说明在 **510** nm 激发下 APC 在 **660** nm 没有荧光发射. 表明 b 是由于激发复合物中 PEC 后, 能量由 PEC 传给 APC, 在 **660** nm 产生最大发射峰.

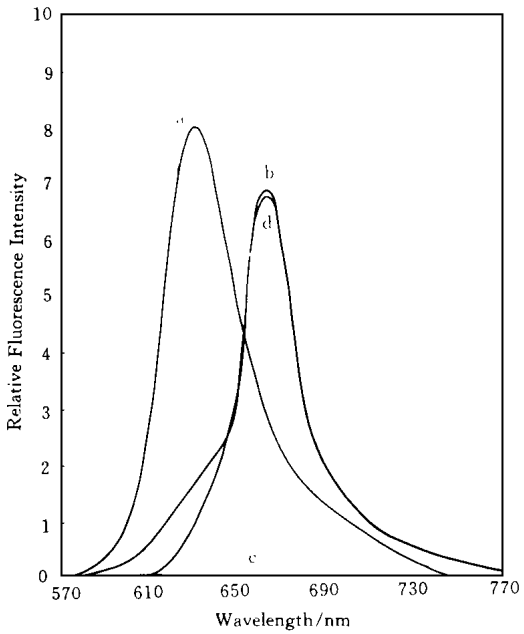


图 **2A** PEC、APC 和 PEC-APC 的荧光光谱

The fluorescence spectra of PEC, APC, and PEC-APC

a: PEC; b: PEC-APC; c: APC(Ex.: 510 nm); d: APC(Ex.: 600 nm)

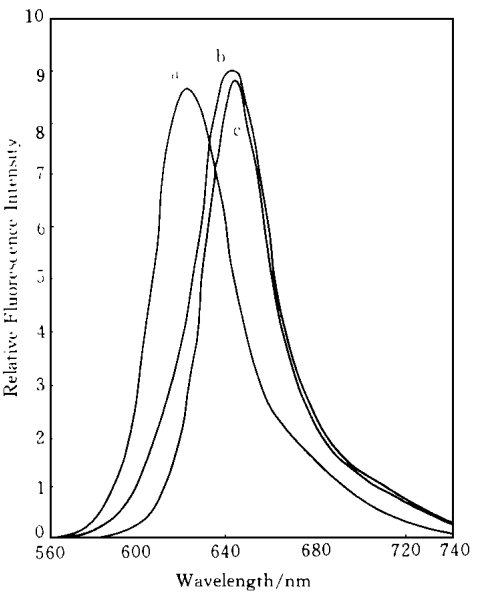


图 **2B** PEC、C-PC 和 PEC-PC 的荧光光谱

The fluorescence spectra of PEC, C-PC, and PEC-PC

a: PEC; b: PEC-PC; c: C-PC (Ex.: 510 nm)

图 2B 是 PEC、C-PC 和复合物 PEC-PC 的荧光光谱, 激发波长为 510 nm. 从图中看到, C-PC 和复合物的最大发射峰几乎相同, 分别在 644 和 643 nm. 但复合物的荧光峰比 C-PC 的半峰宽要宽. 这主要是在 510 nm 激发时除了激发 PEC 外, 还同时激发了 C-PC. 由于 PEC 和 C-PC 的吸收光谱重叠程度大, 找不到只激发 PEC 而不激发 C-PC 的波长. 实际上, 此时的荧光光谱是几个组份叠加结果. 能量不能百分之百从 PEC 传至 C-PC 也是其中原因之一.

2.3 **DTT** 还原二硫桥键

为了证明所合成复合物中确实存在分子内能量传递, 向复合物溶液中加入 DTT, 观察荧光光谱随时间的变化. DTT 具有还原二硫桥键的特性, 随着时间延长, 二硫桥键不断被还原, 能量传递逐渐被阻断. 因而, 图 3A 中 623 nm PEC 的荧光强度逐渐增强, 660 nm APC 的荧光强度逐渐减弱. 这是因为在复合物中 PEC 与 APC 通过二硫桥键连

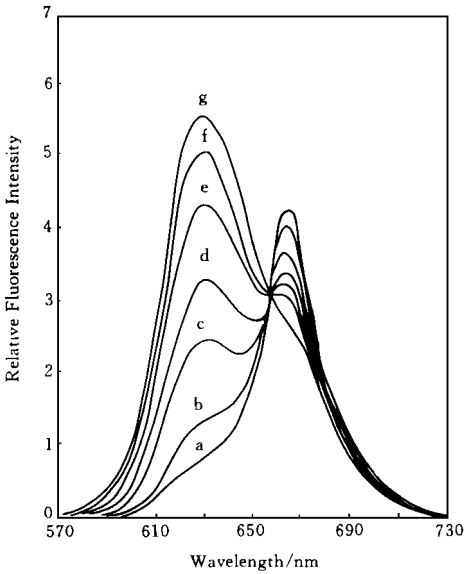


图 **3A**　DTT 分解 PEC-APC 导致 PEC 的荧光(623 nm)增强, APC 的荧光(660 nm)减弱
激发波长 510 nm; DTT 的浓度为 50 mmol/L
Cleavage of PEC-APC by DTT leads to an increase in the 623 nm PEC emission and a decrease in the 660 nm APC emission
the excitation wavelength: 510 nm;
the concentration of DTT: 50mmol/L;
a: 0 min; b: 5 min; c: 15 min; d: 30 min;
e: 45 min; f: 60 min; g: 90 min

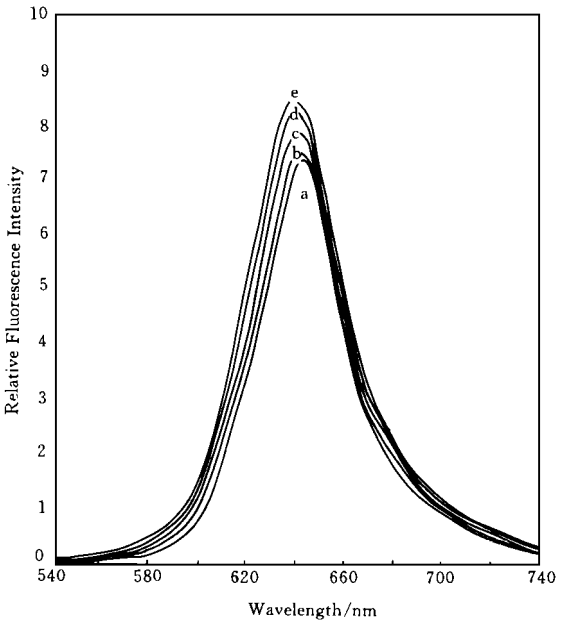


图 **3B**　DTT 分解 PEC-PC 导致最大发射峰蓝移
激发波长 510 nm; DTT 的浓度为 50 mmol/L
Cleavage of PEC-PC by DTT leads to the blue shift of maxima emission
the excitation wavelength: 510 nm
the concentration of DTT: 50 mmol/L;
a: 0 min; b: 5 min; c: 15 min;
d: 30 min; e: 45 min

接, 能量传递的给体与受体间距离小于 Förster 传递机制的极限距离 10 nm. 能量传递得于发生. 当二硫桥键被还原后, PEC 与 APC 互相远离, 二者靠碰撞才能接触. 由于实验中为防止荧光自猝灭, 蛋白浓度很低, PEC 与 APC 碰撞几率小. 所以, 能量传递不能进行. 利用图 4 可粗略计算复合物 PEC-APC 分子内能量传递效率. 方法是配制与复合物吸收光谱相同的混合物, 并调最大吸光度值为 0.1. 在 510 nm 激发, 测复合物与混合物荧光光谱(图 4). 根据 $E = 1 - F_{da}/F_a$, 求得 $E \approx 90\%$. 图 3B 是复合物 PEC-PC 溶液加入 DTT 后荧光光谱随时间的变化. 开始, 最大发射峰在 643 nm, 随着时间延长, 最大发射峰发生蓝移且强度增强. 这与复合物 PEC-APC 有所不同. 后者荧光光谱有明显的强度消长. 这是由于如前所述 510 nm 激发波长下可同时激发 PEC 和 C-PC, 并且二者的荧光光谱重叠程度大. 但从中仍能得到能量传递的信息. 因为最大发射峰的蓝移及强度增强是由于随着二硫桥键的断裂, 能量传递逐渐减少, PEC 对荧光光谱的贡献越来越大. 又因为 PEC 的量子产率比 C-PC 高, 故荧光强度越来越强. 文献[9]中含 PEC 的天然藻胆体解离过程也出现最大荧光发射蓝移现象. 由于 PEC 的荧光光谱与 C-PC 的吸收光谱有较

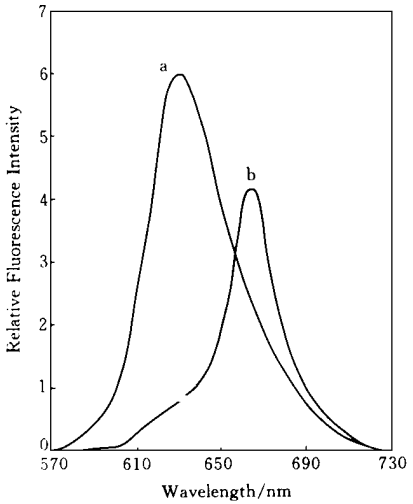


图 **4** 复合物 PEC-APC 及 PEC 与 APC 混合物的荧光光谱
a: 混合物; b: 复合物
Fluorescence spectra of the conjugate PEC-APC and the mixture of PEC and APC
a: mixture; b: conjugate:

大的重叠, 复合物 PEC-PC 应该有大的分子内能量传递效率. 但是, 由于二者的荧光光谱最大发射相差不大及前述原因, 通过稳态荧光光谱不易计算出传递效率.

2.4 复合物 PEC-PC 的荧光寿命

为了进一步证明 PEC-PC 中的分子内能量传递, 测定了 PEC 和复合物 PEC-PC 的荧光寿命. 检测波长为 PEC 的最大发射波长 623 nm (图 5). PEC 的荧光寿命为 1.59 ns, 而复合物中 PEC 的荧光寿命为 0.86. 复合物的荧光寿命短, 证明了分子内能量传递发生. 因为荧光寿命是分子处于激发态的平均时间, 是激发态分子总衰变率的倒数, 即 $\tau = 1/k$. 其中 $k = k_T + k_F + k_n$, 其中 k_T 为能量传递速率, k_F 为荧光发射速率, k_n 为无辐射衰减. 复合物中由于能量由 PEC 传给 C-PC, 复合物中 PEC 比单纯 PEC 的激发态增加了一个弛豫过程, 即增加了 k 值, 因而寿命明显缩短.

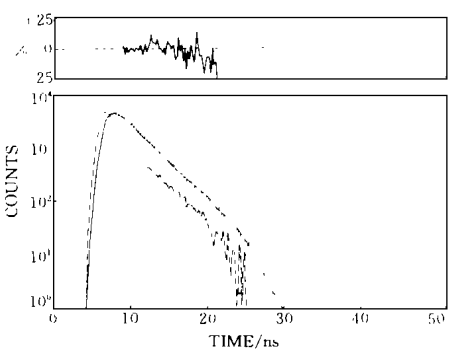


图 **5A** PEC 在 623 nm 处的荧光衰减曲线及拟合结果
Fluorescence decay curve and fitted curve of PEC(at 623 nm)

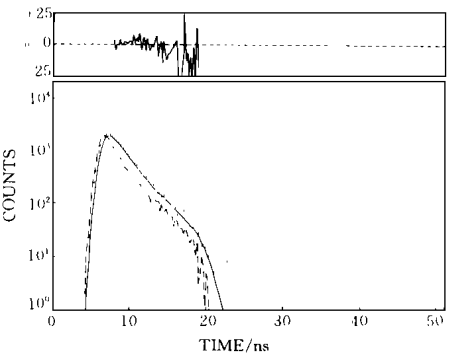


图 **5B** PEC-PC 在 623 nm 处的荧光衰减曲线及拟合结果
Fluorescence decay curve and fitted curve of PEC-PC(at 623 nm)

综上所述, 我们成功合成了两个藻胆蛋白复合物, 具有分子内能量传递现象. 这些复合物可用作藻胆体的模型物, 来研究藻胆体内能量传递的机制.

参 考 文 献

1 Bryrt D A, Glazer A N, Eiserling F A. Characterization and structural properties of the major biliproteins of Anabaena sp. *Arch. Microbiol.*, 1976, **110**: 61～75

2 王广策, 周百成, 曾呈奎. 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白和异藻蓝蛋白能量传达模型的建立. 科学通报, 1996, **40**: 741～743

3 Kronick M N, Grossman P D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *CLIN. CHEM.*, 1983, **29**: 1582～1586
4 Roederer M, Kantor A B, Pasks D R, *et al*. Cy7PE and Cy7APC: bright new probes for immunofluorescence. *Cytometry*, 1996, **24**: 191～197
5 Wilson K M, Morrison I E G, Smith P R, *et al*. Single particle tracking of cell-surface HLA-DR molecules using R-phycoerythrin labeled monoclonal antibodies and fluorescence digital imaging. *J. Cell. Sci.*, 1996, **109**: 2101～2109
6 张景民, 陈建新, 张建平, 等. 多变鱼腥藻中藻红蓝蛋白内能量传达机制的研究. 中国科学(B), 1997, **27**: 23～28
7 Carlsson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *Biochem. J.*, 1978, **173**: 723～737
8 MacColl R, Guard-Friar D. Phycobiliproteins. Boca Raton: CRC Press, 1987. 137
9 路荣昭, 李凤平, 顾天青, 等. 嗜热蓝藻层理鞭枝藻藻胆体在理解过程中荧光发射光谱和光能传递的研究. 生物物理学报, 1996, **12**: 494～498

THE SYNTHESIS OF CONJUGATES OF PHYCOBILIPROTEINS FROM A. VARIABILIS AND THEIR INTRAMOLECULAR ENERGY TRANSFER PHENOMENA

ZHAO Jiquan ZHAO Jingquan JIANG Lijin*
(*Institute of Photographic Chemistry, The Academy of Sciences, Beijing 100101, P. R. China*)

ABSTRACT

Two phycobiliprotein conjugates PEC-APC and PEC-PC were synthesized by a heterobifunctional coupling reagent, N-sccinimidly 3-(2-pyridyldithio) propionate. The phycobiliproteins are linked by disulfide bond. The absorption and fluorescence spectra indicate that the constructure and the conformation of the biliproteins were maintained after reaction. The energy transfer phenomenon was observed from fluorescence spectra. The energy transfer efficiency from PEC to APC calculated from the fluorescence spectra is about 90%. The excited state life time of PEC emission in conjugate PEC-PC was 0.86 ns, compared with 2.1 ns for free PEC, which indicated that energy transfer did occur from PEC to C-PC in conjugate PEC-PC. The energy transfer was stopped by the addition of dithiothreitol (DTT) to the solutions of the conjugates. These results further confirmed that there was energy transfer in the conjugates.

Key words phycobiliprotein conjugate, phycoerythrocyanin, C-phycocyanin, allophycocyanin, energy transfer

* To whom correspondence should be addressed.