

多管藻中 R-藻蓝蛋白能量传递途径及动力学

张建平¹、谢洁¹、赵井泉¹、彭程航²、郑锡光³、赵福利³、张景民³、汪河洲³

(1.中国科学院化学研究所,北京 100101; 2.中国科学院生物物理研究所,北京 100101;

3.中山大学激光光谱学国家重点实验室,广东 广州 510275)

摘要:以蛋白亚基复性技术和皮秒级时间分辨荧光光谱,研究海洋红藻多管藻中 R-藻蓝蛋白(R-PC)单体和三聚体内能量传递过程。利用亚基复性技术对分离后的 β 亚基复性,以 R-藻蓝蛋白单体和 β 亚基之间的差谱获得 α 亚基的吸收光谱。皮秒级时间分辨三维谱图(时间、波长和强度)直观地显示出藻胆色素发色团向藻蓝胆色素发色团的能量传递;根据时间分辨测量结果的组份解析,对 R-藻蓝蛋白单体和三聚体内能量传递途径和相关传递参数进行了指认和讨论;对观察到的单体与三聚体能量传递组份特性的差别提出了解释。与 C-藻蓝蛋白光谱对比, R-藻蓝蛋白独特的色团组成使其更有效地捕获与传递光能。

关键词: R-藻蓝蛋白;亚基复性;稳态和时间分辨光谱;能量传递

中图分类号: Q632 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)04-0767-06

藻胆蛋白是蓝藻、红藻和隐藻光合作用捕光天线的主要功能团,根据发色团与蛋白调制作用的差别,形成 490nm-660nm 区间内不同的吸收光谱,它们的吸收谱恰好弥补了叶绿素无吸收或弱吸收的光谱区。藻类在几乎任何环境都能生存的独特性质主要归因于它们强大的天线系统。高等红藻多管藻是一种深海海洋红藻,为适应生存环境发展出完善的补色适应天线系统,使其在几乎遍及整个可见光区都有强吸收。多管藻天线系统含有高含量的 R-藻红蛋白;其独特的 R-藻蓝蛋白与同系 C-藻蓝蛋白(C-PC)和变藻蓝蛋白(APC)有很大差别。与 C-PC 相似, R-PC 的单体包含 α 和 β 两个亚基,其中 α 亚基带有一个藻蓝胆色素色团,而与 C-PC 的 β 亚基仅含两个藻蓝胆色素色团不同, R-PC 的 β 亚基上带有一个藻蓝胆色素色团和一个藻红胆色素色团。目前利用超快速时间分辨光谱研究低等蓝藻中 C-PC 的工作较多^[1-4],由于高等红藻 R-藻蓝蛋白含量较少,故也研究得较少。

另一方面,要清楚了解色团间能量传递的细节,需要知道各个发色团的吸收和荧光光谱。由于藻胆蛋白中各发色团光谱严重重叠,单个色团光谱并不总容易得到。众所周知,亚基分离是在蛋白变性的条件下实现的,但变性亚基不具备在活体蛋白内的光谱特征,因此,亚基复性是色团在活体内光谱性质的必要前提。本文利用蛋白亚基复性技术和计算机数据分析技术获得 R-PC 亚基的吸收和荧光光谱;利用皮秒级时间分辨光谱测量 R-PC 能量传递过程,比较清楚地反映了 R-藻蓝蛋白中不同发色团之间的能量传递动力学性质。

收稿日期:2001-05-25

基金项目:国家自然科学基金资助(39870222)

作者简介:张建平,1953年生,高级实验师,电话:64888149

通讯作者:彭程航,1940年生,研究员,电话:64888423, E-mail:pchh@sun5.ibp.ac.cn.

1 实验方法

1.1 R-PC 单体和活性亚基的分离

高等海洋红藻多管藻采集自青岛海滨, R-PC 的分离方法及稳态光谱测量方法详见文献[5]。亚基分离及复性方法见参考文献[6]。

1.2 时间分辨光谱

皮秒级时间分辨光谱测量是利用主动锁模的 Nd³⁺:YAG 激光器同步泵浦 R6G 染料激光器, 经腔倒空后产生 5-10ps、重复频率为 4Mhz 的脉冲光作为激光光源, 激发光强 5mW, 探测系统为条纹相机, 时间分辨率 2ps, 仪器响应函数(IRF)小于 30ps(FWHM), 激发波长选为 540nm, 时间衰减的检测波长范围是 550nm-700nm. 荧光衰减实验数据以 Semi-linear Marquardt 算法拟合, 拟合质量以 χ^2 判据评价。

2 结果与讨论

2.1 亚基的吸收光谱和荧光光谱

复性后 β 亚基的吸收光谱和荧光光谱由图 1(b) 和 (d) 所示, 单体的吸收光谱示于图 1(c)。根据亚基在单体内光谱特性不变的假设^[6], R-PC 单体吸收光谱和 β 亚基的吸收光谱的差谱为 α 亚基的吸收光谱[图 1(a)]。

由图 1 可见, β 亚基的吸收光谱在 546nm 和 614nm 有两个吸收峰, 当以 540nm 光激发后, 获得峰值在 644nm 的单峰荧光光谱, 这与 C-PC 中 β_{81} 色团发射光谱峰值完全一致, 说明藻红胆素色团吸收的光能以高效率传递到同一亚基内的藻蓝胆素色团。荧光光谱的单峰性也说明复性后的亚基恢复了原有结构和传递效率。

2.2 R-PC 单体吸收光谱和荧光光谱

图 2 为 R-PC 单体的稳态吸收光谱和荧光光谱, 单体荧光光谱峰值在 646nm, 比 β 亚基荧光光谱的峰值 644nm 略有红移。亚基形成单体后, 亚基之间相互作用使色团的环境会发生小的变化, 这可能是造成荧光光谱差别的原因。

根据 C-PC 晶体结构推测: β 亚基的红色团是 β_{155} 色团; 从同系的 C-PC 相应色团的

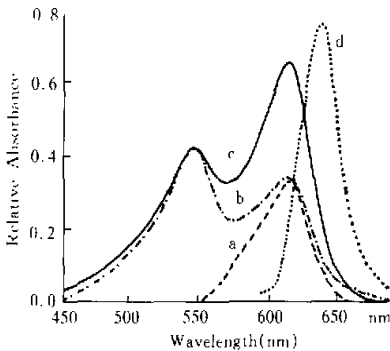


Fig.1 The absorption spectra of α subunit (a), β subunit (b) and the monomer (c) and the fluorescence spectrum of β subunit (d) of R-PC

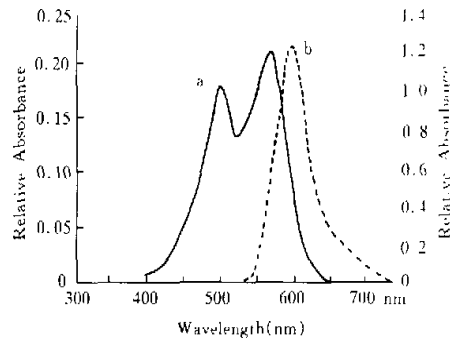


Fig.2 The absorption spectrum (a) and fluorescence spectrum (b) of the monomeric R-PC excited at 540 nm

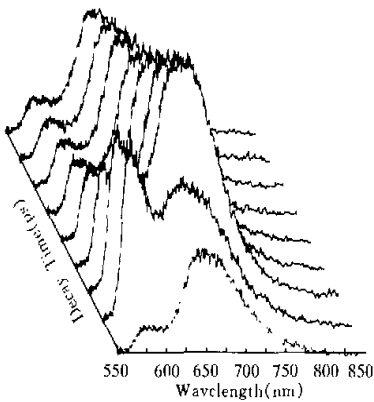


Fig. 3 Picosecond time resolved three-dimensional spectra for the monomeric R-PC

的变化示于图4。三个组份的时间常数分别约为：50ps、200ps和1100ps。图中曲线(a)为50ps组份，指前因子值的大小反映该组份衰减的份量，在580nm附近的最大值与藻红胆素的发射光谱峰值一致；而指前因子的负值则说明在相应波长下发射的色团获得能量，即作为能量受体。因此，可明确指认该组份为(亚基内的藻红胆素色团传递到相同亚基藻蓝胆素色团的过程。而曲线(b)为1100ps组份的指前因子随波长变化，该组份对应各类色团的荧光发射过程，其值的相对大小反映不同类色团发射荧光的份量，显然，荧光主要由能量终端受体 β_{84} 色团发射。曲线(c)给出200ps组份应为 α 和 β 两个亚基上藻蓝胆素色团之间正、逆能量传递的综合结果，而不能指认为单一方向的传递。Sauer等人对C-PC单体的测量结果与上相似，三个组份的时间常数分别为49ps、158ps和890ps^[9]。但他们把49ps的组份指认为 β_{155} 和 β_{84} 二色团之间正、逆向传递速率之逆；而本文则指认为 β_{155} 向 β_{84} 单向传递时间，因为在R-PC中 β_{155} 是藻红胆素色团，难以实现 β_{84} 发射光谱和 β_{155} 的吸收光谱之间的有效重叠，因此传递为近似单向的。单体内 α 和 β 两个亚基上蓝色团之间的传递与文献[9]有相同的意义。

2.4 R-PC三聚体内能量传递

R-PC三聚体稳态吸收和荧光光谱已在前文给出^[5]。由皮秒级时间分辨光谱解析出a、b和c三个组份，分别为45ps、165ps和920ps。需要指出的是：根据C-PC三聚体的晶体结构和飞秒级时间分辨光谱测量结果，三聚体内能量传递最快组份(发生在相邻单体 α_{84} 向 β_{84} 之间)约在1ps量级^[10]，不能由现在的皮秒级时间分辨光谱检测到。对如上三个时间常数的组份，在600-675nm范围内多波长下检测荧光发射，应用Global分析法获得各组份的指前因子随波长的变化，如图5所示。

图中a、b和c分别对应45ps、920ps和165ps的组份，其中a和b与单体时相似；而在约640nm以后基本为常数，说明在此波长之后仅能检测到终端受体的荧光。有趣的是图中曲线c与图4(c)有很大的差别；而与图5(a)相似，但在610nm附近有最大值和在640nm后变为负值，明确表示出由 α_{84} 向 β_{84} 色团的能量传递。根据C-PC三聚体的晶体结构数据推测，由于现在所用的技术不能检测到相邻单体上的 α_{84} 和 β_{84} 色团之间次皮秒传递过程，因此，这

消光系数^[7]也推测出藻红胆素色团应是 β_{155} 。图2中的荧光光谱表现出明显的单峰性和峰值的位置，可知激发红色团后能量以近100%的效率传递到蓝色团，并由后者发射荧光，这进一步证明单体保持了活体蛋白的光物理性质和传能功能。

2.3 R-PC单体皮秒级时间分辨荧光光谱

图3给出R-PC单体皮秒级时间分辨三维谱[时间(皮秒)、波长(纳米)、荧光强度]，从图3可以直观地看出激发能从藻红胆素色团传递到藻蓝胆素色团的过程。

根据Global组份解析规则^[8]：某一组份的时间常数在各个检测波长不变；而指前因子与检测波长而变化相关，获得指前因子随检测波长的

里曲线 c 所示只能是同一单体内 α_{84} 和 β_{84} 色团的传递。图 4(c) 所示的单体内 α_{84} 和 β_{84} 色团之间的能量传递则没有表现出这样明显的趋势, 因为, 根据 C-PC 结果推论, 在单体中这两个色团具有相似的荧光光谱, 因为它们之间的传递表现为近似可逆的^[11], 因此在指前因子的变化上反映不出明显的传递过程; 由以上 R-PC 三聚体的结果可推论: 在单体形成三聚体时, 相邻单体上 α_{84} 和 β_{84} 色团中心距离为 2nm, 而其中一个色团的中心距离另一色团的最近点则不足 1nm, 两个色团相互作用的结果使得原处于较高能级的 α_{84} 色团光谱蓝移, 增大两个色团的能级差, 这样, 三聚体内色团的光谱不同于单体内相应色团的光谱。这个推论与曲线 (c) 在 610nm 附近有极大值和明显的 α_{84} 向 β_{84} 色团的传递是一致的。Sauer 等人对 C-PC 三聚体测量到的三个时间常数分别为 1.4ps、49ps 和 46ps, 并分别指认为相邻单体间 α_{84} 和 β_{84} 间快传递、 β_{85} 和 β_{84} 间传递和 $\alpha_{84}^1\beta_{84}^2$ 、 $\alpha_{84}^1\beta_{84}^3$ 与 $\alpha_{84}^1\beta_{84}^2$ 三个快速对之间的传递^[12]。其中第一个组份不能由现在的皮秒级技术检测; 而第三个等同对之间的传递也不能用各向同性方法检测到, 因此与本文的指认不完全相同。

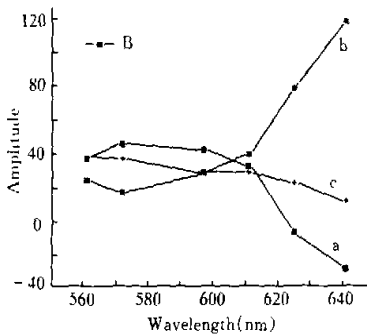


Fig.4 The amplitude changes of the three components detected at a series of wavelengths for the monomeric R-PC

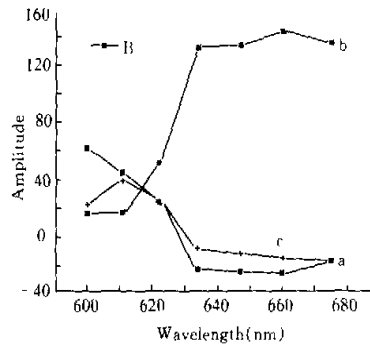


Fig.5 The amplitude changes of the three components detected at a series of wavelengths for the trimeric R-PC

3 结 论

R-藻蓝蛋白与C-藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白同系, 但它是高等红藻所特有的一种藻胆蛋白, 因而与其同系物之间既有共性, 也有明显的区别。其主要特点是 155 由 C-PC 的藻胆色素色团变化成为 R-PC 的藻红胆色素色团, 这样使高等深海洋红藻既具有更大的吸收光能截面, 又保持高效的传能功能。时间分辨光谱解析组份可分别归属为: 藻红胆色素色团 β_{85} 向同一亚基内的 β_{84} 能量传递时间常数约为 50ps, 三聚体时为 45ps; 单体时, α_{84} 和 β_{84} 之间能量传递表现时间常数^[1](正、逆向能量传递速率之和之逆)约 200ps; 三聚体时由于蛋白对色团的调制作用和蛋白之间相互作用, 使得同一单体内 α_{84} 向 β_{84} 的能量传递过程可以观察到, 时间常数约 165ps。而三聚体时相邻单体间 α_{84} 和 β_{84} 色团之间传递不能由现在的皮秒级时间分辨光谱测量到。

参考文献:

- [1] Debrecezy MP, Sauer K, Zhou J, Bryant DA. Comparison of Calculated and Experimentally Resolved Rate Constants for Excitation Energy Transfer in C-Phycocyanin. Part I. Monomers[J]. *J Phys Chem*, 1995, 99(20):8420-8431.
- [2] Xia Andong, Zhu Jinchang, Jiang Lijin, et al. Energy Transfer Kinetics in C-phycocyanin from cyanobacterium *Westloppia orolifica* studied by pumpprobe technique[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1991, 179:558-564.
- [3] Gillbro T, Sharkov AV, Kryukov IV, et al. Forster Energy Transfer Between Neighbouring Chromophores in C-phycocyanin Trimers[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1140:321-326.
- [4] Debrecezy MP, Sauer K. Monomeric C-phycocyanin at Room Temperature and 77K: Resolution of the Absorption and Fluorescence Spectra of the Individual Chromophores and Energy Transfer Rate Constants[J]. *J Phys Chem*, 1993, 97:9852.
- [5] 张建平, 张景民, 赵井泉, 蒋丽金. R-藻蓝蛋白的分离及其结构表征[J]. *生物物理学报*, 1997, 13(2):173-177.
- [6] Fuglistaller P, Mimuro M, Suter F, Zuber H. Allophycocyanin Complexes of the Phycobilisome from *Mastigocladus laminosus*: Influence of the Linker Polypeptide Lc8.9 on the Spectral Properties of the Phycobiliprotein Subunits[J]. *Biol. Chem.*, 1987, 368:353-367.
- [7] Sauer K, Scheer H, Sauer P. Forster Transfer Calculation Based on Crystal Structure Data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycocyanin[J]. *Photochem Photobiol*, 1987, 46:427-440.
- [8] Horzwarth AR, Bittermann E, Reuter W, et al. Studies on Chromophore Coupling in Isolated Phycobiliproteins. III. Picosecond Excited State Kinetics and Time-resolved Fluorescence Spectra of Different Allophycocyanins from *Mastigocladus laminosus*[J]. *Biophys. J.* 1990, 57:133-145.
- [9] Debrecezy MP, Sauer K. Comparison of Calculated and Experimentally Resolved Rate Constants for Excitation Energy Transfer in C-phycocyanin. 1. Monomers [J]. *J Phys Chem*, 1995, 99:8412-8419.
- [10] Gillbro T, Sharkov AV, Kryukov IV, et al. Forster Energy Transfer between Neighbouring Chromophores in C-phycocyanin Trimers[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1140:321.
- [11] Zhao Jingquan, Zhu Jinchang, Jiang Lijin. Computer Simulation on Kinetics of Primary Process in Photosynthesis - II. Energy Transfer in the β subunits and the monomers of C-phycocyanin[J]. *Science in China, Series B*, 1994, 37:1313-1320.
- [12] Debrecezy MP, Sauer K. Comparison of Calculated and Experimentally Resolved Rate Constants for Excitation Energy Transfer in C-phycocyanin. 2. Trimers[J]. *J Phys Chem*, 1995, 99:8420-8431.

STUDIES ON THE ENERGY TRANSFER PROCESSES AND DYNAMICS

IN R-PHYCOCYANIN FROM *Polysiphonia urceolata*ZHANG Jian-ping¹, XIE Jie¹, ZHAO Jing-quan¹, PENG Cheng-hang²,ZHENG Xi-guang³, ZHAO Fu-li¹, WANG He-zhou¹

(1. The Center for molecular Science, Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101, China; 2. Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China; 3. National Key Lab. For Laser spectra, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The energy transfer processes in the monomeric and trimeric R-phycocyanin (R-PC) from *Polysiphonia urceolata* were studied by the picosecond time-resolved spectra and renaturation technique of the protein subunit. The spectral data were obtained directly for the renaturated β subunit of the R-PC and those of the α subunit were considered to be the spectral differences between the spectra of the β subunit and those of R-PC. The three dimensional spectra (time, wavelength and intensity) clearly showed the energy transfer process between the phococerythrobilin (PEB) and phococyanobilin (PCB) chromophores in R-PC. Based on the componential analyses of the time-resolved spectra, the energy transfer pathways and the kinetic parameters, as well as the difference between the energy transfer features in monomers and the trimers, were discussed and explained in detail. Furthermore, it is indicated that the special chromophore composition is responsible for higher efficiency for light capture and energy transfer in R-PC than in C-PC.

Key Words: R-Phycocyanin; Subunit renature; Time-resolved; Fluorescence spectra; Energy transfer