

R-藻红蛋白的光谱分析*

杨苍珍 马金石 蒋丽金

(中国科学院感光化学研究所, 北京)

提 要

R-藻红蛋白在不同 pH 条件下的光谱研究表明, 在 pH5~8 范围内, R-藻红蛋白的结构特征变化不大。能量传递是从藻尿胆素传给敏化-藻红胆素, 再传递到荧光-藻红胆素, 而不在 α , β 亚单位间进行。敏化-藻红胆素易受 pH 的影响, 在 pH6 时有最强的 Cotton 效应, 当 pH 小于或大于 6 时, 它的 Cotton 效应变得很弱。荧光-藻红胆素受 pH 影响小。

藻胆蛋白是红藻、蓝绿藻光合作用中的辅助色素, 吸收光能以后, 通过开链卟啉发色团, 将激发能量传递给光合作用光反应系统 II。藻胆蛋白按其光谱特性可分为: 藻红蛋白 (Phycocyanin)、藻蓝蛋白 (Phycocyanin) 和变藻蓝蛋白 (Allophycocyanin)。红色的藻红蛋白依其光谱特征又分为 R-, C-, B-和 b-等^[1]。在 R-藻红蛋白中, 与脱辅蛋白相连的发色团有藻红胆素和藻尿胆素, 由于蛋白与发色团之间的相互作用, 使发色团形成稳定的特殊构象, 吸收太阳光后可以发出很强的荧光, 进行能量传递。藻尿胆素产生 490—500nm 之间的吸收, 藻红胆素产生 540—570nm 之间的两个吸收, 因此 R-藻红蛋白是藻红蛋白中结构最复杂的一种^[2]。本文通过在不同 pH 条件下的吸收光谱、荧光光谱、荧光偏振光谱和圆二色光谱, 首先对从条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 分离提取的 R-藻红蛋白进行结构分析。

材 料 和 方 法

R-藻红蛋白自条斑紫菜中提取和纯化^[2], 冰冻干燥后贮存于低温冰箱中。各种光谱均在室温下测量。分析纯化学试剂未经进一步提纯。

吸收光谱用 Hitachi 340 分光光度计测量,

圆二色光谱使用法国 Dichrographe III, 荧光激发和发射光谱使用日立 MPF-4 荧光分光光度计。荧光偏振光谱在日立 MPF-4 荧光分光光度计上加荧光偏振附件测量, 偏振度的计算依照 $P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$ 。

pH5~8 的 R-藻红蛋白溶液为每毫升 0.1 克分子浓度的磷酸缓冲液中含 0.5 毫克 R-藻红蛋白。盐酸和氢氧化钠的水溶液用来调节溶液的 pH 至 3 或 10, 13.2。

荧光量子产率以罗丹明 B 的乙醇溶液为标准, 在乙醇溶液中 $\phi = 0.94$ 。

结 果 和 讨 论

早期的研究指出在 C-藻红蛋白中存在两种形式藻红胆素的发色团, 一种为吸收处于长波位置的荧光 (f)-发色团, 另一种为吸收处于稍短波长位置的敏化 (s)-发色团^[3], 由 s-发色团吸收的能量以高效率传递给 f-发色团。C-藻红蛋白的吸收光谱比较简单, 在可见区只有 $\lambda_{\max}$ 555nm 一个吸收峰, 它的 α -亚单位存在两个吸收峰, 545 nm 和 565 nm, β -亚单位存在

* 国家自然科学基金委员会资助项目。

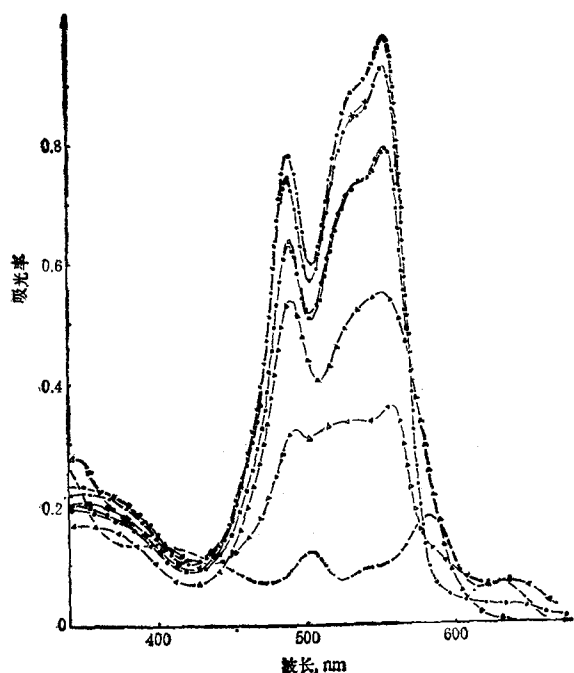


图1 不同 pH 下 R-藻红蛋白溶液的吸收光谱
 —●— pH6, —○— pH5, —X— pH6.8,
 —■— pH7.5, —□— pH8, —▲— pH3,
 —△— pH10, ---- pH13.2。

555nm 的最大吸收峰和一个在 520nm 的肩峰。这说明有存在于不同蛋白环境和具有不同构象的藻红胆素发色团。R-藻红蛋白比 C-藻红蛋白复杂得多,在天然状态下在可见光谱区存在三个吸收峰,除 490—500nm 的藻尿胆素吸收峰外,还有 540 和 560nm 两个吸收峰(图 1)。当用 pH 3 的 8 克分子浓度尿素溶液使它变性以后,这两个吸收峰变成一个位于 555nm 的吸收峰,说明这两个吸收峰都是由藻红胆素引起的。由于蛋白环境和发色团构象的不同,使它们具有不同的吸收特征。这两种发色团是否具有不同的功能呢?单从在不同 pH 条件的吸收光谱变化,还看不出这两种发色团在功能上的差别。

在 pH5~8 的范围内,R-藻红蛋白都可以给出约 578nm 的强荧光,激发光谱也相似(图 2)。但从荧光偏振光谱(图 3)可以看出,在短波长的 490nm、540nm 处,荧光偏振度低于 560nm 处。这种非线性的关系说明在这个波长范围内能量是从一种类型的发色团向另一种传

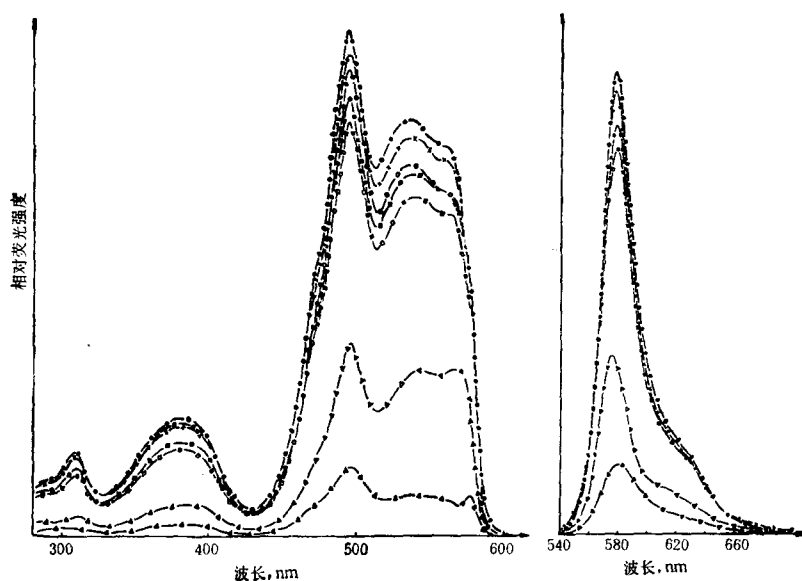


图2 在不同 pH 条件下 R-藻红蛋白在 0.1 克分子浓度磷酸缓冲液中的荧光发射光谱 (右图, $\lambda_{ex} = 490nm$) 和激发光谱 (左图, $\lambda_{em} = 578nm$)

—●— pH6, —○— pH5, —X— pH6.8, —■— pH7.5, —□— pH8,
 —▲— pH3, —△— pH10。

表 1 在不同激发波长下 R-藻红蛋白 (1 毫克/1 毫升, 在 pH6 的 0.01 克分子浓度磷酸缓冲液中) 的荧光量子产率

激发波长 nm	506	510	516	520	526	530	536	540	544
量子产率 ϕ	0.78	0.80	0.77	0.76	0.73	0.75	0.74	0.72	0.74

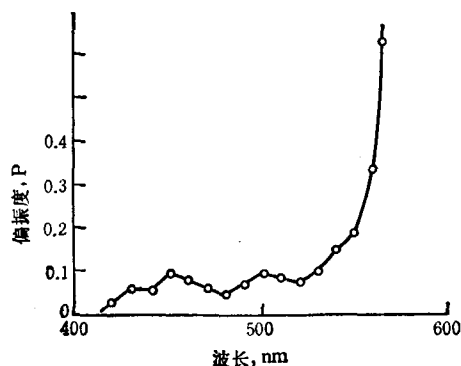


图 3 荧光激发光谱

递^[4], 即从具有 490nm 吸收的藻尿蛋白传递给具有 540nm 吸收的 s-藻红蛋白, 再传递给具有 560nm 吸收的 f-藻红蛋白, 产生约 578nm 的荧光。

当用不同波长激发时, 产生荧光的量子产率基本一致 (表 1), 平均量子产率为 0.76 ± 0.04 说明能量可以从短波长向长波长高效率地传递。

从吸收光谱、圆二色光谱、荧光激发和发射光谱看, 在 pH5—8 范围内, 光谱仅有微小的变化, 在 pH6 表现出最强的吸收和 Cotton 效

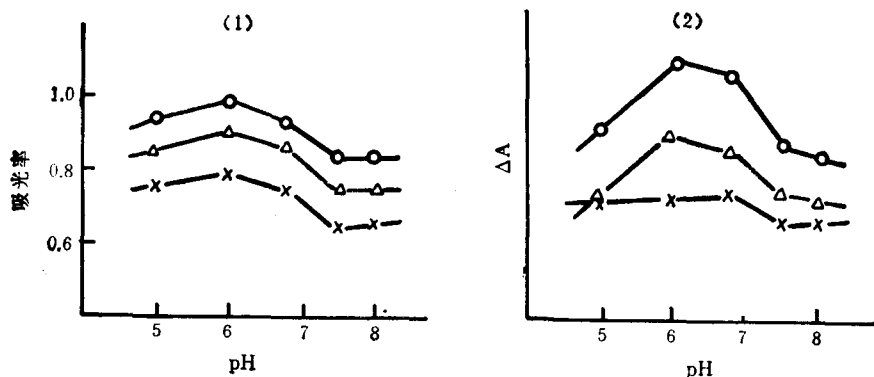


图 4 R-藻红蛋白在可见光谱区的三个吸收峰在不同 pH 下的变化

(1) 吸收光谱, (2) 圆二色光谱。490nm(O), 540nm(Δ), 560nm($\times$)。

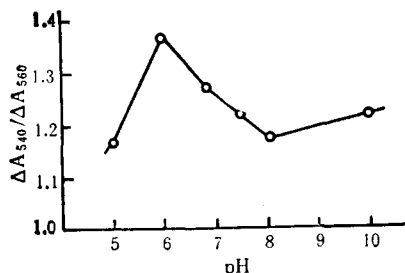


图 5 圆二色光谱中, 540nm 处的 ΔA 值与 560nm 处的 ΔA 值之比 (即 $\Delta A_{540}/\Delta A_{560}$) 同 pH 的关系

应 (图 4), 说明在这个范围内发色团在蛋白中的构象没有大的变化。

当 pH 改变时, 在可见区的几个吸收峰, 490nm (藻尿胆素), 540nm 和 560nm (藻红胆素) 变化的程度各不相同, 如在圆二色光谱中, 540nm 的变化较 560nm 要大一些 (图 5)。藻红胆素是胆二烯 a, b 类的开链卟啉化合物, 合成证明 C-16 和 C-2 均是 R-构型的不对称碳原子^[5], C-2 的构型对圆二色光谱的影响不大, C-16 的构型决定着发色团的圆二色光谱性质。

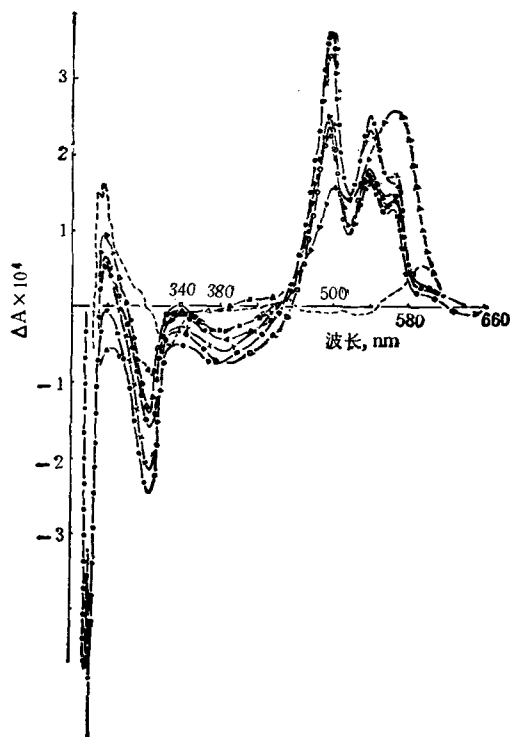


图 6 R-藻红蛋白在不同 pH 下的圆二色光谱

—●— pH6, —○— pH5, —×— pH6.8,
—■— pH7.5, —□— pH8, —▲— pH3,
—△— pH10, ---- pH13.2。

在 pH 7 左右吸收峰的变化说明发色团同蛋白之间微环境的变化使发色团的整体结构,如不对称性或螺旋性(或称扭曲的程度)产生变化。它不仅影响着圆二色光谱,也影响着荧光激发光谱。从 R-藻红蛋白在不同 pH 下的圆二色光谱(图 4 和图 5)可以看出,具有 560nm 吸收峰的发色团较 540 nm 发色团的不对称性小一些,或螺旋程度(扭曲程度)小一些,平面性大一些。当 pH 变化时,540nm 的发色团受影响大

(上接第 239 页)

的研究仍然是本次会议的重点课题,主要是应用微量透析探针植入脑内或应用离体细胞培养法动态地探测递质代谢物,以及加入各种药物的影响等。还可从脑提纯的囊泡制备克隆化抗体或微量超融合技术研究递质的代谢规律等。但是有突破性的成就还未见到。

六、其 他

还有关于微量胺类、心房钠素(ANF)、脑肽类、视网膜的化学信息、神经发生学的分子观、神经毒作为研

一些,在 pH6 时,它的 $[\theta]$ 值最大,说明它在结构上和微环境上易受 pH 的影响。当 pH 为 6 时,不对称性最强,或者说以某种形式形成的螺旋性此时最强。藻尿胆素在中性 pH 左右,490 nm 可以给出很强的 Cotton 效应,说明它的不对称性比较强,一旦变性后, Cotton 效应变得很弱(图 6),说明不对称性降低了,而平面性增加了。变性后藻红胆素成为大螺环型^[6],分子的不对称性不受影响,所以 Cotton 效应不会减弱(图 6)。

从上述分析可以看出, R-藻红蛋白的能量传递是从藻尿胆素传递给敏化-藻红胆素(540 nm 型),再传到荧光-藻红胆素(560nm 型),而不在 α 和 β 亚单位之间进行。由于不同立体结构和微环境造成不同的吸收。敏化-藻红胆素的立体结构更易受 pH 的影响。当 pH 小于和大于 pH 6 时,它的不对称性会降低,平面性增大。荧光-藻红胆素的立体结构的不对称性较敏化-藻红胆素要小,平面性要大,它与蛋白之间的相互作用力较大,受 pH 的影响较小。

参 考 文 献

- [1] O'Carra, P. et al.: in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Goodwin, T. W. ed.), Academic Press, New York, 1976, p. 328.
- [2] 蒋丽金等:《海洋与湖泊》, 1983, 14(4), 315.
- [3] Zickendraht-Wendelstadt, B. et al.: *Photochem. and Photobiol.*, 1980, 31, 367.
- [4] Teal, F. W. J. et al.: *Biochem. J.*, 1970, 116, 161.
- [5] Gossauer, A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 100, 5928.
- [6] MacColl, R. et al.: *Arch. Microbiol.*, 1983, 135, 194.

[本文于 1987 年 6 月 4 日收到]

究神经化学的工具,星形细胞的病理生化和各种遗传代谢病、脱髓鞘病、癫痫、老年痴呆等疾病的生化机制,都召开了卫星会议。新技术方面,有广泛应用的活体灌注和微量透析(用透析电极和离子敏感性微电极植入脑中),活体脑中葡萄糖、ATP、CrP 局部代谢测定法等。会议期间还召开 ISN 全体会员大会和六种神经化学杂志的编委会,决定下届会议将于 1989 年 4 月 23—29 日在葡萄牙举行。

[北京友谊医院神经生化室 薛启冀]