

别藻蓝蛋白藻蓝胆素发色团分子构象研究

夏安东 朱晋昌 蒋丽金*

(中国科学院感光化学所, 北京 100101)

张新夷 孔祥贵

(中国科学院长春物理所激发态过程开放实验室, 长春 130021)

提 要

主要研究了蓝绿藻污棕席藻 (*Phormidium luridum*) 别藻蓝蛋白在不同 pH 值条件下的吸收光谱和共振拉曼光谱。发现低聚化的结果导致了三聚体别藻蓝蛋白 650nm 特征吸收峰的消失和一些共振拉曼带强度和位置的移动。结果表明在低 pH 值作用下的低聚化的别藻蓝蛋白中藻蓝胆素发色团分子的构象和自由胆素分子类似, 比三聚体的别藻蓝蛋白的发色团分子更趋于卷曲, 折叠的构象态。而三聚体的别藻蓝蛋白, 主要的拉曼带 1645cm^{-1} 是其发色团分子构象处于更线性延展的标志, 其光谱行为和吸收光谱 A_{680}/A_{650} 所表征的发色团分子构象的结果相一致。

关键词 别藻蓝蛋白, 共振拉曼光谱

在蓝绿藻和红藻的藻胆蛋白中, 藻蓝胆素发色团——开链线性延展的四吡咯结构与不同的脱辅基蛋白相连, 就表现出不同的光谱学行为, 而且与分子结构类似的自由胆素(环形)的光谱性质不同^[1]。X-光结构进一步表明蛋白质和发色团的相互作用决定了藻胆蛋白中藻蓝胆素发色团分子的对称性^[2], 因而对发色团的电子态有较大的影响。要了解具有相同发色团结构而光谱行为不同的藻胆蛋白在藻类光合系统中的作用, 首先要了解它们的发色团的构象。共振拉曼光谱是一个很有效的用以研究光合系统中色素构象的工具^[3]。

本文中我们利用共振拉曼光谱和吸收光谱研究了光谱行为对变性作用最为明显的蓝绿藻污棕席藻 (*Phormidium luridum*) 别藻蓝蛋白 (allophycocyanin 简称 APC) 的藻蓝胆素发色团分子的构象。图 1 是藻蓝胆素发色团的分子结构。通过对 APC 发色团构象的研究, 我们发现由蛋白质调制的藻蓝胆素发色团分子的构象对别藻蓝蛋白 650nm 特征吸收峰的产生

有重要作用。

1 材料和方法

蓝绿藻污棕席藻 APC 三聚体由印度尼西亚鲁大学生命科学系 M.Sudha 博士提供, 其 $A_{680}/A_{650} > 4.3$, $A_{620}/A_{650} = 0.55$, 分子量为 78000。

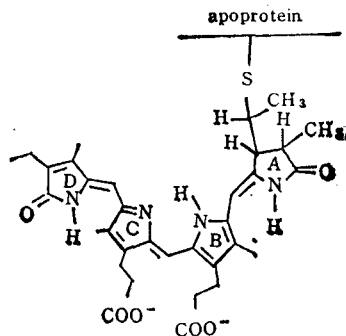


图 1 延展的藻蓝胆素的分子结构^[2]

Fig. 1 Chemical structure of phycocyanobilin with extended geometry^[2]

* “八五”重大项目和长春物理所激发态过程研究开放实验室资助项目。

收稿日期: 1991-12-11 修回日期: 1992-03-30

我们按文献[4],使三聚体 APC 在 pH3.9 的 100mmol/L 的 K_2HPO_4/KH_2PO_4 缓冲液中透析 12h, 可获 APC 单体, 其 $A_{615}/A_{280} > 3.5$. 在 pH4.7 的同样缓冲液中透析 12h 得 APC 单体和三聚体的混合物.

吸收光谱的测试在岛津 UV-3000 双光束分光光度计上进行. 共振拉曼光谱是在 Jobin Yvon T800 (三联单色器) 拉曼光谱仪上进行的. 以 RCA 31034 光电倍增管和 1140 型光子计数器为探测系统. 狭缝宽 $160\mu m$, 时间常数 1s, 分辨率 $0.25cm^{-1}$ ($6328\text{\AA}$ 处). 测试时样品是在二头开口, 直径约为 1mm, 长为 6cm 的毛细石英管中进行, 样品在自身重力作用下缓慢下移以避免激光对样品的光敏化作用. 我们选择位于 APC 吸收光谱高能边的 $4880\text{\AA}$ (氩离子激光器, Spectra Physics 171) 作为激发光, 光强为 20mW, 扫描速度 $20cm^{-1}/min$, 扫描次数 1 次. 光谱线的识别是和 $5145\text{\AA}$ 激发下的光谱线相对照, 选出相同位置上出现的谱线, 谱线误差为 $\pm 2cm^{-1}$. 所有实验都是在室温下进行.

2 结果与讨论

图 2 是三聚体 APC 在不同 pH 值作用下的吸收光谱. 结果表明在 pH7.0, 100mmol/L 的 $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ 溶液中的 APC 在 651nm

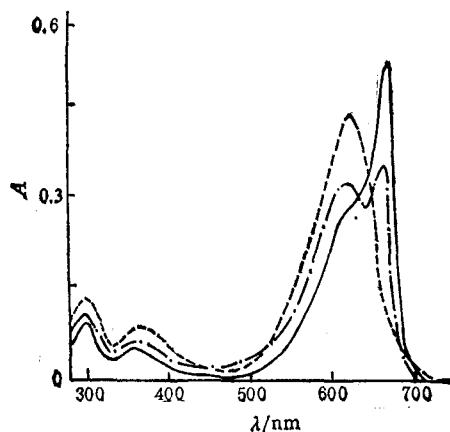


图 2 APC 的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of allophyocyanin

— pH7.0, - - - pH4.7, - · - pH3.9

附近有一明显的吸收尖峰, 在 620nm 附近有肩峰. 随着 pH 值的降低, 651nm 吸收峰强度下降, 620nm 附近的肩峰强度上升, 直至 pH3.9 时, 651nm 的吸收峰消失, 出现了类似于 C-藻蓝蛋白的吸收峰 (615nm 附近), 此时三聚体的 APC 已显然解聚为单体^[4]. 一般地在研究藻胆蛋白的光谱特性与发色团构象的关系时常以 A_{vis}/A_{uv} 的值来表征藻胆蛋白的四吡咯发色团分子构象的卷曲特性^[5]. 从图 2 可以看出三聚体 APC (pH7.0 时) $A_{650}/A_{350} = 6.5$, 而单体 APC (pH3.9 时) $A_{615}/A_{350} = 4$, 这表明在高聚态的 APC 中, 其四吡咯发色团由于受与之相连的脱辅基蛋白的作用, 发色团的构象更趋于线性延展的状态. 它们的共振拉曼光谱可提供更多的关于发色团构象的信息.

图 3 为 $4880\text{\AA}$ 激发下的 APC 在不同 pH 值条件下的共振拉曼光谱. 比较图 3a, b, c, 我们发现: a. 在受蛋白质的作用较为敏感的指纹区 $1200-1300cm^{-1}$. 拉曼带 $1248cm^{-1}$ 在三聚体 APC (pH7.0 时) 中较强, 在单体 APC (pH3.9) 时消失, 而在 $1275cm^{-1}$ 处出现一新峰, 从图 3b 可以看出 $1248cm^{-1}$ 的消失和 1275

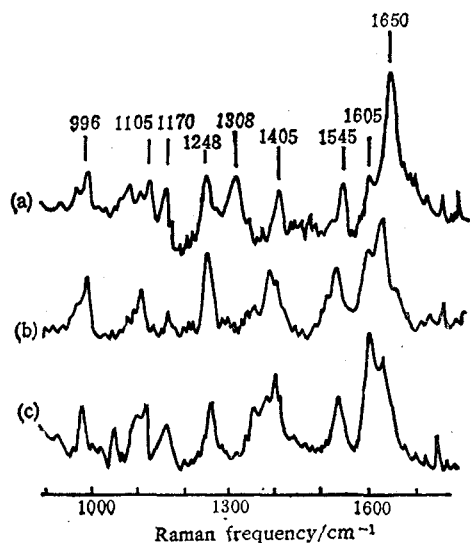


图 3 APC 的共振拉曼光谱

Fig. 3 Resonance Raman spectra of allophyocyanin

$\lambda_{ex} = 4880\text{\AA}$, 20mW.

(a) pH7.0 (b) pH4.7 (c) pH3.9

cm^{-1} 的产生是一个随 pH 值下降而渐变的过程,此振动模(即 1275cm^{-1} 和 1248cm^{-1} 的振动模)为甲川桥 C—D 和 B—C 中 C—H 键的摇摆振动 (rocking)^[6], 且对溶剂的影响较为敏感。因此在溶液从 pH 7.0 降为 pH 3.9 时, APC 发生部分变性,蛋白质与发色团相互作用减弱,四吡咯发色团发生卷曲。b. 三聚体 APC 中 1405cm^{-1} 的拉曼带在单体 APC 中蓝移至 1412cm^{-1} 。此振动模(即 1405cm^{-1} 和 1412cm^{-1}) 为吡咯环 C 的环振动模 ν_4 ^[6]。由于此振动模对环的对称性要求较高,因而 APC 在从三聚体解聚为单体时,发色团构象的变化导致了其共振 Raman 峰的蓝移。c. 在 $1580\text{—}1650\text{cm}^{-1}$ 的区域,拉曼光谱的变化最为明显。肩峰 $1595\text{—}1605\text{cm}^{-1}$ 在单体 APC 中高,在三聚体 APC 中低。而拉曼峰 $1645\text{—}1650\text{cm}^{-1}$ 在三聚体 APC 中强,单体中低,且红移至 1630cm^{-1} 左右。这个区域的振动模为四吡咯发色团中甲川桥 C—D 和 A—B 桥中 C=C 双键的拉伸振动^[6]。即 $1645\text{—}1650\text{cm}^{-1}$ 是线性延展程度大的四吡咯发色团中的 C=C 双键振动模,而 1630cm^{-1} 则是环状的卷曲的四吡咯结构中的 C=C 双键振动模^[7]。其光谱的变化表明 APC 三聚体中的四吡咯发色团比在单体中的发色团线性延展程度大。这与吸收光谱 A_{vis}/A_{uv} 所表征的结果相一致。藻胆蛋白的光谱学特性主要是由与脱辅基蛋白共价相连的四吡咯藻蓝胆素发色团分子的共轭 π 键所引起。四吡咯发色

团分子线性延展程度越大,发色团分子 π 电子的离域性就越高,发色团之间的 π 电子的交迭就越大,相互作用就越强,从而使三聚体 APC 产生了 650nm 的特征吸收峰。因此蛋白质的作用对于维持发色团构象的线性延展程度是非常重要的。而正是由于蛋白质的合理调控,才使具有相同分子结构的藻蓝胆素发色团的各藻胆蛋白吸收各自不同范围的光能,保证了光合系统最大限度地利用光能的功能。

参 考 文 献

- 1 Gantt E. Phycobilisomes. *Annu Rev Plant Physiol*, 1981; 32: 327
- 2 Farrens D L, Holt R E, Rospendowski B N *et al.* Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy applied to phytochrome and its model compounds. 2. phytochrome and phycocyanin chromophores. *J Am Chem Soc*, 1989; 111: 9162
- 3 Schirmer D L, Bode W, Huber R *et al.* Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å resolutions. A common principle of phycobilin-protein interaction. *J Mol Biol*. 1987; 196: 677
- 4 MacColl R, Csatorday K, Berns D S *et al.* Chromophore interactions in allophycocyanin. *Biochemistry*, 1980; 19: 2817
- 5 Kufer W, Scheer H. Chemical modification of biliprotein chromophores. *Z Naturforsch*, 1979; 34c: 776
- 6 夏安东,张新夷, Sudha M *et al.* 蓝菌 *Westiellopsis prolifica* 藻胆体,藻胆蛋白的共振 Raman 光谱,科学通报,1992;37(6): 550
- 7 Margulies L, Toporowicz M, Resonance Raman study of model compounds of the phytochrome chromophore. 2¹. Biliverdin dimethyl ester. *J Am Chem. Soc*, 1984; 106: 7331

A Study of Phycocyanobilin Chromophore Conformations in Allophycocyanin

Xia Andong Zhu Jinchang Jiang Lijin

(Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101)

Zhang Xinyi Kong Xianggui

(Laboratory of Excited State Processes, Changchun Institute of Physics, Academia Sinica, Changchun 130021)

ABSTRACT

The UV absorption and resonance Raman spectra were recorded from the trimer allophycocyanin and pH-induced monomer allophycocyanin from blue-green alga *Phormidium*

luridum. Monomerization mostly results in the disappearance of characteristic absorption peak 650nm, and in the changes in relative intensities and positions of Raman bands of phycocyanobilin chromophores. As a result, in the monomeric allophycocyanin, the chromophores adopt cyclohelical conformations, which close to these of free chromophores *in vitro*; and in the trimeric allophycocyanin, fully extended conformations of the chromophores can be marked by the main Raman peak around 1645 cm^{-1} , the behaviour of which is in good agreement with the $A_{\text{vis}}/A_{\text{uv}}$ absorption ratio.

Key words allophycocyanin, resonance Raman spectrum

破伤风毒素 B 片段在人工膜上形成单离子通道的特性

雷 殿 良

杉本央 松田守弘

(中国药品生物制品检定所,北京 100050)

(大阪大学微生物病研究所,日本)

提 要

用高效蛋白层析柱纯化破伤风毒素的 B 片段,用膜片箝(patch clamp)技术证明纯化的 B 片段于人工磷脂膜上能够形成离子通道。在中性和酸性 pH 时形成离子通道的几率很小,在有 pH 梯度存在的情况下却较容易测到通道活性。形成的离子通道的电导系数为 2.3pS。B 片段形成的离子通道允许 K^+ 双向通过。离子通道打开的持续时间一般在 20—120ms 之间,多为 20—40ms 和 100—120ms; 闭合持续时间一般在 20—40ms 间,多为 20ms。表明通道的开和闭非常频繁。

关键词 破伤风毒素, B 片段, 单离子通道

近年来关于破伤风毒素的研究集中在毒素的作用原理,即毒素是如何进入靶细胞内和如何作用于靶细胞而抑制神经递质的释放。毒素的 BC 和 C 片段可以与受体结合,并可将毒素逆向转移到中枢神经系统^[1]。A 片段能够抑制牛 chromafin 细胞的儿茶酚胺的释放,表明 A 片段是毒素的活性片段^[2]。最近我们从毒素中分离出了 B 片段,并证明它可以形成离子通道^[3]。然而无论是毒素还是其片段均未发现有任何酶活性^[4]。尽管大部分人认为中枢神经系统是破伤风毒素的作用部位^[5],然而其分子水平的作用机制还有待进一步去研究。毒素可以在人工磷脂膜上形成离子通道^[3,6-9]。在酸性 pH 的情况下,可以增加毒素插入到磷脂膜中的几率^[6-9]。此结果与肉毒毒素和白喉毒素导入到细胞内的原理极为相似^[3]。

破伤风毒素是由 A, B, C 三部分组成的,

其片段 A, B, C 以及 AB 和 BC 均得到了分离纯化^[3,10]。本文应用膜片箝技术(patch clamp)于人工磷脂膜上测定 B 片段形成离子通道的活性,并对形成的单一离子通道进行了分析。

1 材料和方法

1.1 毒素及 AB 片段的纯化

按我们以前报道的方法制备纯化的毒素及 AB 片段^[10,11]。

1.2 B 片段的纯化

按前次报道的方法提纯 B 片段^[3,12]。将纯化的 AB 片段用 DTT 还原并用尿素处理,用高效蛋白层析系统(FPLC)的 Mono Q 柱,浓度梯度为 0—0.5mol/L 的 NaCl 洗脱制备 B 片段。

1.3 离子通道活性的测定

应用膜片箝技术测定 B 片段在人工磷脂膜