

研究报告

三种藻胆蛋白在复合累积 LB 膜中的能量传递*

何靳安 蒋丽金¹⁾ 赵井泉 毕只初 江 龙

(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101)

摘要 制备了 R-藻红蛋白 (R-PE)、C-藻蓝蛋白 (C-PC) 及变藻蓝蛋白 (APC) 的单组分累积 LB 膜及三组分复合累积 LB 膜. 吸收及荧光光谱测定表明三种蛋白的 LB 膜的光谱重叠性质与它们在水溶液中的性质相同. 结构测定表明, 三种蛋白在其 LB 膜中排列有序, 且由它们组装的复合累积 LB 膜结构类似于藻类植物中的藻胆体结构. 通过稳态荧光光谱及其光谱解叠, 观察到了三种蛋白在复合累积 LB 膜中的激发能量传递现象. 根据给体荧光峰的猝灭, 计算出在复合累积 LB 膜中从给体 R-PE 经 C-PC 到受体 APC 的能量传递效率为 51%.

关键词 藻胆蛋白, LB 膜, 激发能量传递

藻胆蛋白, 包括藻红蛋白 (PE), 藻红蓝蛋白 (PEC), 藻蓝蛋白 (PC) 和变藻蓝蛋白 (APC), 它们在藻类植物中按一定的有序排列与相应的连结蛋白组成超分子功能复合单位——藻胆体 (PBS) 而完成捕光传能的功能. 捕获的光能最终传递给光系统 II 反应中心以使藻类进行光合作用. 由于藻胆体是一种结构有序的超分子功能单位, 使藻类植物捕光传能的效率达 90% 以上^[1,2]. 在藻胆体中, 能量被 PE 捕获并按 PE (PEC) → PC → APC → PS II 的方向传递, 这一过程的机理是 Forster 能量传递机制^[3]. 为了模拟这一能量传递过程我们通过 LB 膜技术, 制备了 R-PE、C-PC 及 APC 的复合累积 LB 膜, 并研究了其中的能量传递现象.

1 材料与方法

1.1 藻胆蛋白的分离和纯化

我们从干条斑紫菜中依据文献 [4] 的方法提取并纯化了 R-PE, C-PC 及 APC, 三种蛋白提纯后冰冻干燥成干粉置于干燥器中, 于 -20℃ 下保存备用. 三种蛋白水溶液的吸收及荧光光谱与文献 [5] 一致. 它们的相对分子质量分别是 M_r (R-PE) = 229 000^[6], M_r (C-

PC) = 160 000^[7], M_r (APC) = 134 000^[8].

1.2 藻胆蛋白 LB 膜的制备

在吉林大学生产的四星 LB 膜仪上进行. 以在石英蒸馏器中重蒸两次的去离子水为亚相. 铺展溶液为含蛋白质约 0.03% (质量比) 的 2% (体积比) 的乙醇水溶液. 成膜条件参见文献 [9]. 所用固体载片为经过疏水处理的石英片.

1.3 藻胆蛋白 LB 膜的吸收和荧光光谱测定

制备于石英载片上的三种蛋白的 LB 膜 (层数为 50 层) 用于光谱测定, 吸收光谱在 Hitachi 557 分光光度计上测定, 以干净的石英载片为参比; 荧光光谱在 Perkin-Elmer LS-5 荧光光谱仪上测定, 蛋白质的光谱是带有 LB 膜样品的光谱与干净石英片的差谱. 激发波长对 R-PE、C-PC 和 APC 分别为 490、570 和 590 nm.

1.4 藻胆蛋白 LB 膜厚度及电子显微镜测定

在 Rudolph Research/Auto EL 椭圆偏振仪上测定三种蛋白单分子膜的厚度; 透射电子显

* 国家自然科学基金资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1995-11-13, 修回日期: 1996-03-05

显微镜 (TEM) 测定在 Hitachi H-800 电子显微镜上进行, 三种蛋白质的单分子膜在表面压为 5 mN/m 下水平转移至疏水铜网上负染色后测定 TEM 图象. 实验详细步骤依据文献 [9].

1.5 复合累积 LB 膜的荧光光谱及其解叠

在疏水石英片上首先转移 5 层 R-PE 的 LB 膜, 其上再依次转移 5 层 C-PC 及 10 层 APC LB 膜, 这一样品用于观察在三种蛋白 LB 膜中从 R-PE 到 APC 的层间能量传递. 为便于比较, 同时制备一片 5 层 R-PE LB 膜的样品. 由于样品非常薄, 为了检测到这两种样品的荧光光谱, 我们在灵敏度更高的 RTI 30 型激光拉曼分光光度计上测定 5 层 R-PE LB 膜及 R-PE (5 层) $\rightarrow$ C-PC (5 层) $\rightarrow$ APC (10 层) LB 膜的荧光光谱. 用 Ar^+ 激光的 488 nm 线作为激发波长. 测定时, 以不覆盖蛋白质的一面面对入射光源, 且为了便于定量比较, 测定两个样品时仪器的参数设置 (如狭缝宽度、激光器功率、扫描速度等) 均相同, 样品放置位置也保持一样, 保持入射光与载片平面的法线成 45° .

测得的荧光光谱的解叠在计算机上用自编的非线性优化法解卷积程序进行拟合, 每个子带都被假设为高斯曲线, 通过改变半高宽、峰位置和峰强度去逼近实验曲线. 拟合质量由均方根误差 RMS 判断, $\text{RMS} < 0.01$ 为止.

2 结 果

2.1 三种蛋白成膜性能的特征和取向分析

R-PE, C-PC 和 APC 均是水溶性的蛋白质, 它们在气/液界面形成单分子膜是比较困难的, 由于它们是生物大分子化合物, 体积大约是直径为 12 nm, 厚 3 nm (APC 和 C-PC) 或 6 nm (R-PE); 且由于蛋白质本身含有非极性氨基酸残基形成的疏水区, 因此, 通过适当的方法将它们铺展在气/液界面可以形成单分子膜^[10]. 图 1 是三种蛋白质在纯水亚相上的 $\pi-A$ 等温线. 由图 1 可见, 三种蛋白质在气/液界面上均能形成单分子膜; 当它们铺展于水面时, 随着膜表面积的减小, 表面压显著

升高, 极限值可达表面压 40 mN/m 左右, 这说明三种蛋白质单分子膜在压缩过程中形成了紧密的单分子膜. 由 $\pi-A$ 等温线外推至 $\pi = 0$ mN/m 时, 得到的单分子占有面积: APC 为 115 nm^2 , R-PE 为 140 nm^2 , C-PC 为 160 nm^2 , 这些值与蛋白的盘面积基本符合. 说明它们是以盘平面平行于气/液界面的取向铺展于水面上的.

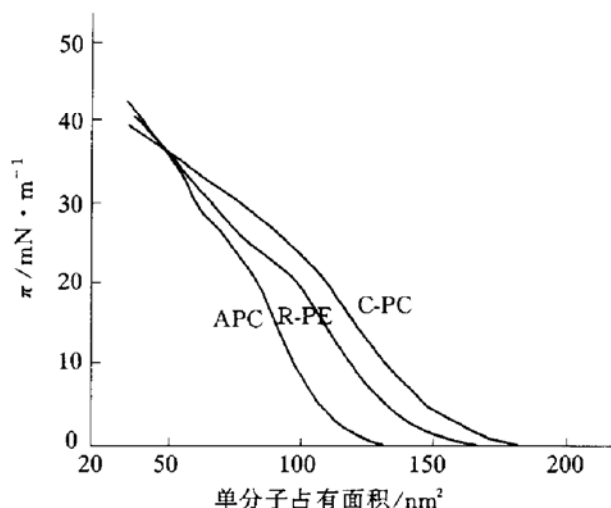


图 1 R-PE, C-PC 和 APC 单分子膜的表面压-面积 ($\pi-A$) 等温线

亚相为两次重蒸的去离子水, pH 5.6, 室温.

分别将三种蛋白质的单分子膜压缩至表面压为 30 mN/m 后, 用垂直提拉法转移至抛光

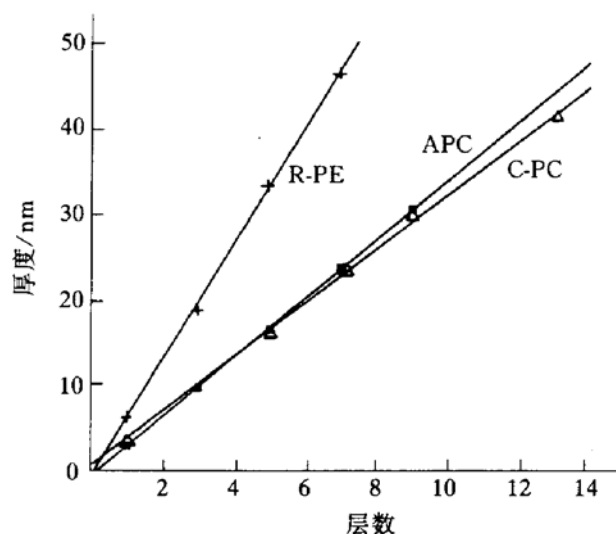


图 2 椭圆偏振法测定膜厚度随层数的变化

直线的斜率即为蛋白单分子层的厚度. +——+: R-PE; $\triangle$ —— $\triangle$: C-PC; $\blacksquare$ —— $\blacksquare$: APC. 横坐标为蛋白单分子膜的层数, 纵坐标为蛋白 LB 膜的厚度.

的硅片上, 我们用反射椭圆偏振法测定了蛋白单分子层的厚度. 由图 2 可见, 随着层数的增加, 蛋白膜厚度也线性地增加. 直线的斜率即为蛋白单分子层的厚度^[11]. 从图 2 中求得直线的斜率即三种蛋白的单分子层厚度 R-PE 为 6.4 nm, APC 为 3.1 nm, C-PC 为 3.0 nm; 这说明三种蛋白质是以盘平面平行于气/液界面的取向沉积于固体载片上的. 为了更直接地观察蛋白单分子膜的取向, 我们将处于气/液界面的三种蛋白质的单分子膜 ($\pi = 5$ mN/m) 通过水平转移法将它们分别转移至疏水铜网上, 观察了它们的 TEM 图象 (图 3), 由图 3

可见蛋白单分子膜中蛋白质分布基本有序, 且单个蛋白分子呈圆盘状. 通过计算, 估计圆盘直径约为 15 nm, 考虑到 TEM 的分辨率的限制, 认为这一结果与蛋白的圆盘直径 (12 nm) 是相吻合的. 因此 TEM 图象更直观地证明了我们上述的结论, 即蛋白质的取向是以盘平面平行于固体载片. 这些蛋白质在 LB 膜中的取向与藻胆体中 PE、PC 的取向是很接近的. 因此研究这种藻胆蛋白复合累积 LB 膜的能量传递性质并与藻胆体中的相应过程进行比较是很有意义的.

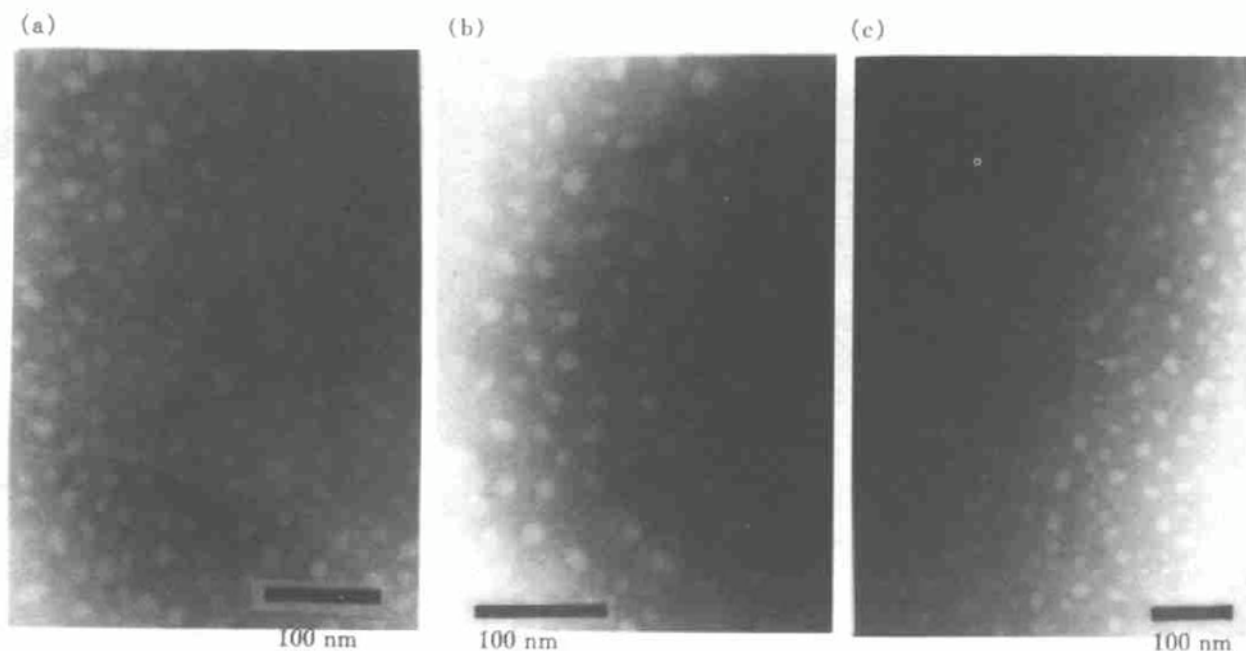


图 3 R-PE、C-PC 和 APC 单分子膜的 TEM 图象

(a) R-PE; (b) C-PC; (c) APC. 水平转移法, 表面压为 5 mN/m.

2.2 蛋白复合累积 LB 膜与藻胆体的结构比较

在红藻和蓝绿藻中存在捕光传能的超分子功能单位——藻胆体 (PBS). 它在植物体内吸收传递日光的效率达 90% 以上. PBS 的结构示意图如图 4a 所示. 2~3 个盘状的 PE、PC 蛋白形成长为 18~27 nm 的 PC-PE 杆呈辐射状分布在 APC 核周围. 在 PE-PE、PE-PC、PC-PC、PC-APC 及 APC-APC 间存在不同分子质量的连结蛋白 (在图 4a 中分别以 ●, ■, ◆, ⊥, ⊙ 表示), 它们的功能是调制藻胆蛋白

盘的吸收和荧光光谱, 使得激发能由外向内定向地传递, 从而保证在 PBS 中光能的高效传递^[12]. 日光被 PC-PE 杆吸收并传递给 APC, 并通过终端蛋白最终传递给类囊体膜内的光系统 II. 在 PBS 中光能传递效率很高是其非常典型的特征, 这一特征与其中藻胆蛋白的有序排列及藻胆蛋白间存在的连结蛋白关系密切.

我们通过 LB 技术制备的三种藻胆蛋白的复合累积 LB 膜结构, 类似于这些蛋白质在 PBS 中的排列状况, 这种复合累积 LB 膜的结构通过了椭圆偏振及 TEM 的证实, 其结构示

意图为图 4b. 通过在固体载片上依次沉积 R-PE、C-PC 及 APC 单分子膜, 我们就可以研究这种物理模型中蛋白间能量传递的效率.

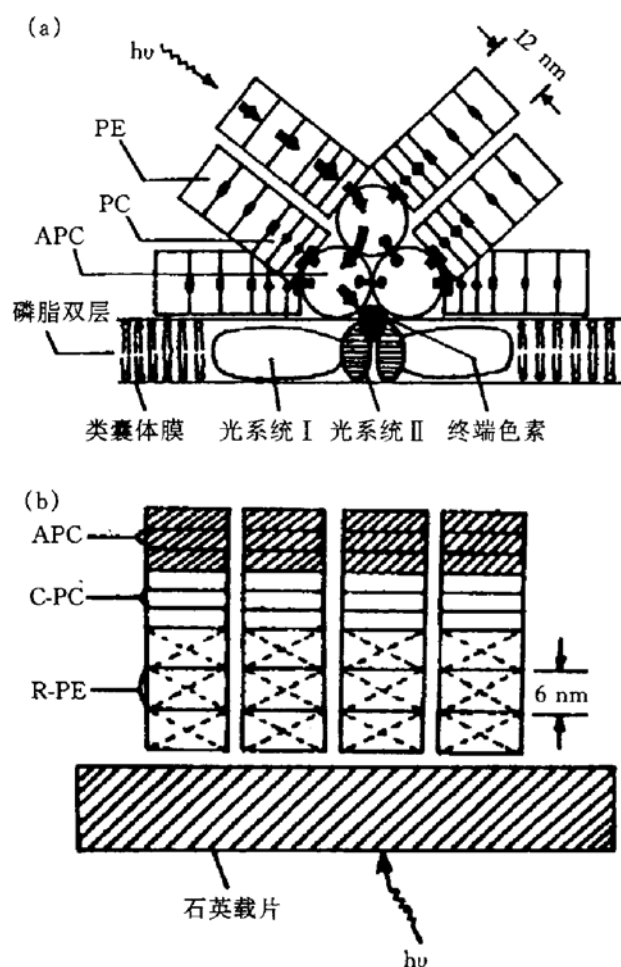


图 4 藻胆体 (a) 及人造的 R-PE→C-PC→APC 复合累积 LB 膜 (b) 的有序结构示意图

在 PBS 中光能通过 Forster 机理从外层表面传递到内层 (如箭头表示).

三种蛋白质 LB 膜的吸收和荧光光谱如图 5a、b 所示. 特征峰位置见表 1. 由图 5 可见

三种蛋白 LB 膜的吸收和荧光光谱很好的相互重叠, 这为研究它们的复合累积 LB 膜的能量传递提供了基础. 根据三种蛋白 LB 膜的光谱特性, 我们可以通过表 1 反映在它们的复合累积 LB 膜中能量传递的途径. 表中箭头表示了光能的传递次序.

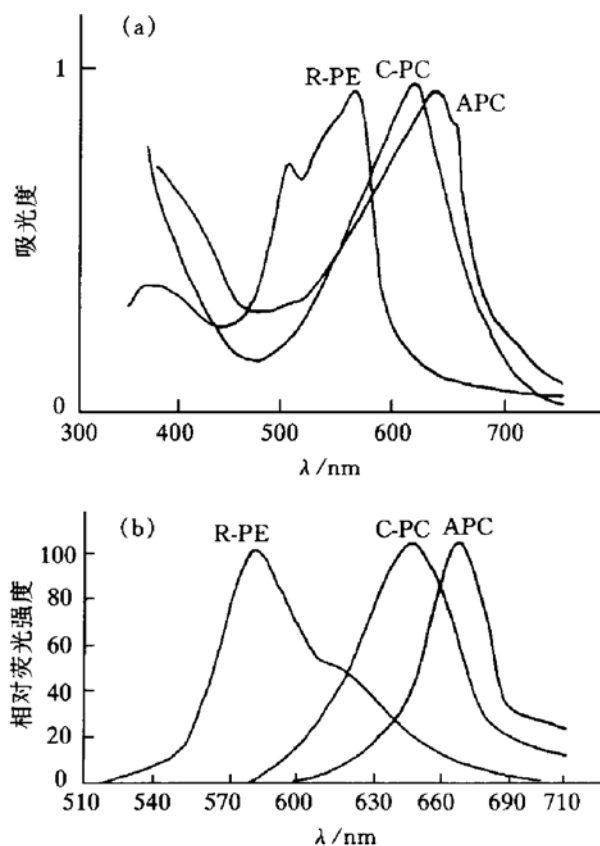


图 5 三种藻胆蛋白 LB 膜的吸收 (a) 和荧光发射光谱 (b)

激发波长: R-PE, 490 nm; C-PC, 570 nm; APC, 590 nm.

2.3 复合累积 LB 膜中 R-PE→APC 的能量传递

通过稳态荧光光谱, 我们观察到了 R-PE→C-PC→APC LB 膜样品的能量传递现象. 用 488 nm 光激发 R-PE (5 层)→C-PC (5 层)→APC (10 层) 复合累积 LB 膜和 5 层 R-PE LB 膜样品, 我们测得了这两种样品的荧光发射光谱, 由图 6 可见对于只有给体 R-PE 时的样品 (曲线 a), 荧光峰出现在 580 nm 及 620 nm (肩峰), 当在 5 层 R-PE LB 膜上再依次沉积 5 层 C-PC 及 10 层 APC 单分子膜后,

表 1 在 R-PE, C-PC 和 APC 组成的复合累积 LB 膜中能量传递过程

藻胆蛋白 LB 膜	λ (吸收峰) /nm	λ (荧光发射峰) /nm
R-PE	494 (肩), 562	580, 620 (肩)
C-PC	612	645
APC	630, 650 (肩)	665

这时样品在 580 nm 和 620 nm 的荧光峰的强度下降, 且在 665 nm 处出现受体 APC 的荧光峰 (曲线 *b*), 这说明在复合累积 LB 膜中发生了能量传递, 即光能被 R-PE 吸收后经 C-PC 传递给了 APC. 为了更清楚地分析在复合累积 LB 膜中这一能量传递过程, 我们对图 6

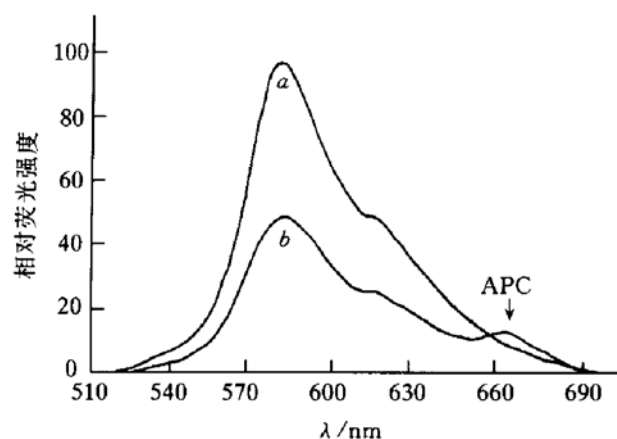


图 6 R-PE LB 膜和复合累积 LB 膜荧光发射光谱
a: 5 层 R-PE LB 膜; *b*: R-PE (5 层) → C-PC (5 层) → APC (10 层) 的复合累积 LB 膜. 激发波长为 488 nm.

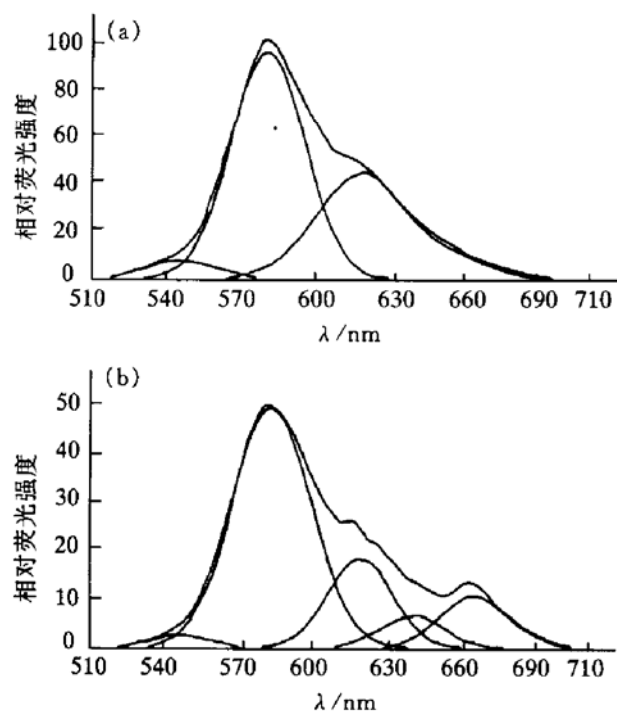


图 7 R-PE LB 膜和复合累积 LB 膜荧光光谱解叠结果

(*a*) 5 层 R-PE LB 膜; (*b*) R-PE (5 层) → C-PC (5 层) → APC (10 层) 的复合累积 LB 膜.

中的稳态荧光光谱进行解叠, 得到三种蛋白所对应的特征荧光峰 (图 7), 图 7a 为 R-PE LB 膜的解叠结果. R-PE 的谱形不是标准的高斯函数, 解叠得到三个子带; 图 7b 为 R-PE (5 层) → C-PC (5 层) → APC (10 层) 复合累积 LB 膜的解叠结果. 由图 7 可见, 除了 R-PE 解叠的三个子带外, 在 645 nm 和 665 nm 还出现了两个新的子带, 它们分别对应于 C-PC 和 APC 的荧光峰, 为了比较各组分的相对比例, 我们将解叠的参数列于表 2.

表 2 5 层 R-PE LB 膜和 R-PE (5 层) → C-PC (5 层) → APC (10 层) 复合累积 LB 膜的稳态荧光光谱的解叠结果

样品	峰强	半高宽/nm	峰位置/nm
R-PE	7.4	34	546
LB 膜	100	34	580
	46.3	44	620
	2.5	29	546
R-PE → C-PC	49	36	580
→ APC	18.3	30	620
LB 膜	6.4	30	645
	10.9	32	665

通过对光谱的解叠, 我们更加清楚地看到了在三种蛋白的复合累积 LB 膜中的能量传递现象. 能量传递效率定义为 $E = (1 - F_{da})/F_d$, 式中 F_{da} 为受体存在时给体的荧光峰强度, F_d 为无受体时给体的荧光峰强度. 由表 2 可得在复合累积 LB 膜中从 R-PE → APC 的能量传递效率为 $E = 51\%$, 这一效率比生物体本身的传递效率要低很多. 我们认为这主要是由于在 LB 膜体系中缺少连结蛋白所致.

3 讨 论

在光合作用的原初过程中, 光能的捕获是后面一切过程的能源基础, 在生物体中正是这一步的高效率才使得后面的光化学反应得以顺利进行, 因此研究这一能量捕获及传递的机理

对最终实现人工模拟光合作用意义重大。很多科学家用具有光谱重叠性质的有机染料来模拟这一过程并取得了不少有益的结果^[13,14]。但要运用这些有机染料来实现光能的高效转换存在着一些困难,如染料的易光降解及光能转换的低效率等。

用从 PBS 中提取的捕光蛋白通过 LB 技术研究这一过程具有比有机染料显著的优点。首先,由于这类色素蛋白中发色团受蛋白质中多肽的保护,使这些发色团具有很好的光学稳定性;其次,这类蛋白质在生物体内完成捕光传能过程的效率是很高的,这样的蛋白质经分离组装后形成的人工模拟体系能够接近或达到它们在生物体内的功能。因此研究这类蛋白质间的能量传递性质具有非常重要的意义。

从我们的实验结果可见,通过 LB 技术组装的三种藻胆蛋白的复合累积 LB 膜结构与藻类植物中的 PBS 相近,且这种物理模型中发生能量传递的效率也较高。但应该看到,这种人造的模型与 PBS 还存在着差别,如 APC 的排列方式及模型中缺少色素蛋白间的连结蛋白,这些差别就是造成人工模型与 PBS 能量传递效率不同的原因。

参 考 文 献

- 1 Scheer H. Angew Chem Int Ed Engl, 1981; **20**: 241
- 2 Zilinskas B A, Greenwald L S. Photosynthesis Research, 1986; **10**: 7
- 3 Holzwarth A R. Physiol Plant, 1991; **83**: 518
- 4 Zeng F J, Yang Z X, Liu H P *et al.* Scientia Sinica (series B), 1986; **29**: 824
- 5 何靳安, 蒋丽金, 朱晋昌. 中国科学 (B 辑), 1995; **25** (5): 480
- 6 伍华菊, 张建平, 蒋丽金等. 生物化学与生物物理学报, 1994; **5**: 491
- 7 林启山, 曾繁杰, 蒋丽金等. 科学通报, 1992; **11**: 869
- 8 林启山, 曾繁杰, 蒋丽金等. 植物生理学报, 1992; **18** (3): 253
- 9 何靳安, 蒋丽金, 江 龙等. 中国科学 (化学), 1996; **26** (2): 111
- 10 MacRitchie F. Advances in Colloid Interface Sci, 1986; **25**: 341
- 11 Lukes P J, Ivanov G R, Petty M C *et al.* Langmuir, 1994; **10**: 1877
- 12 Glazer A N. Biochim Biophys Acta, 1984; **768**: 29
- 13 Leitner A, Lippitsch M N, Draxler S *et al.* Thin Solid Films, 1985; **132**: 55
- 14 Yamazaki I, Tamai N, Yamazaki T *et al.* J Phys Chem, 1988; **92**: 5035

Study of Energy Transfer Among Three Kinds of Biliproteins in Their Stacking Langmuir-Blodgett Multilayers. He Jinan, Jiang Lijin, Zhao Jinqun, Bi Zhichu, Jiang Long (*Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101, China*)

Abstract Single components and multicomponent of R-phycoerythrin (R-PE), C-phyocyanin (C-PC) and allophycocyanin (APC) LB multilayers were prepared. The three phycobiliproteins in the LB films were orderly oriented as in the natural phycobilisomes. The absorption and fluorescence spectra remained similarly to these in their aqueous solutions. The phenomenon of excitation energy transfer among R-PE, C-PC and APC in their stacking LB multilayers were observed through steady-state fluorescence spectral measurements and spectral deconvolutions. From the quenching degree of R-PE fluorescence, the efficiency of energy transfer from R-PE through C-PC to APC in their stacking LB multilayers was calculated to be 51 %.

Key words phycobiliproteins, LB films, excitation energy transfer