

893~ 899

10 Hansma H G, Hoh J H. Biomolecular imaging with the atomic force microscope. *Ann Rev Biophys Biomol Struct*, 1994, **23**: 115~ 139

11 Bustamante C, Erie D A, Keller D. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 1994, **4** (5): 750~ 760

12 Spedding G, Chapter 1. Isolation and analysis of ribosomes from prokaryotes, eukaryotes, and organelles. In: Spedding G ed. *Ribosomes and protein synthesis: a practical approach*. Oxford: IRL press, 1990. 1~ 29

Secondary Structure of Rat Ribosomal RNAs Studied by Atomic Force Microscope. WU Xiaohua, LIU Wangyi (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*); XU Lei, LI Minqian (*Shanghai Institute of Nuclear Research, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China*).

Abstract Rat liver ribosomal RNAs on surfaces of mica were imaged by atomic force microscope

(AFM) under ambient condition. A number of images of 28S-5.8S、18S、5S rRNAs were obtained directly. The rRNAs were prepared by thawing the solution of low concentration of ribosomes repeatedly to crumble the ribosomes. The rRNAs were scattered on surface of mica very well. The rRNAs prepared by this method were always in three forms when they were scattered on surface of mica. The structures of the three forms of rRNAs were consistent with the established models by computer for 28S-5.8S、18S、5S rRNAs respectively. The result supports the models of the secondary structures of rRNAs considered by the thermodynamic principle. It is demonstrated that AFM could provide valuable three-dimensional information of rRNAs.

Key words ribosomal RNA, secondary structure, atomic force microscope

藻胆蛋白复合物的合成及其分子内能量传递*

赵继全 赵井泉 杨紫萱 张建平 蒋丽金¹⁾

(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101)

摘要 通过偶联剂 3- (2-吡啶联巯基) 丙酸 N-羧基琥珀亚胺酯 (SPDP) 及改变配料比, 合成了两个 R-藻红蛋白 (R-PE) 与 C-藻蓝蛋白 (C-PC) 的复合物 A 和 B. 利用吸收光谱确定了分子内 R-PE 与 C-PC 的摩尔比为 6: 1 和 2: 1. 通过荧光光谱, 观察到能量传递现象, 并计算出能量传递效率为 63% 和 88%. 证明分子内能量传递效率很高. 二硫苏糖醇 (DTT) 还原连接 R-PE 与 C-PC 的二硫桥键后, 能量传递被阻断. 这一现象进一步证明复合物中存在分子内能量传递.

关键词 藻胆蛋白, 藻红蛋白, 藻蓝蛋白, 能量传递, 蛋白复合物

藻胆蛋白是一组同源捕光色素蛋白, 它们都带有开链的四吡咯环. 它们是红藻和蓝藻的主要捕光组分, 在活体中构成藻胆体连结在光合作用膜上, 并将吸收的光能传递至 PS II 反应中心^[1]. 通常条件下存在以下几种不同光谱特征的藻胆蛋白: 藻红蛋白 ($\lambda_{\max}$ =

565 nm), 藻蓝蛋白 ($\lambda_{\max}$ = 620 nm)、变藻蓝蛋白 ($\lambda_{\max}$ = 650 nm). 能量传递由藻红蛋白 → 藻蓝蛋白 → 变藻蓝蛋白 → 反应中心. 这些藻

* 国家自然科学基金资助 (39670065).
¹⁾ 通讯联系人.
收稿日期: 1996-07-16, 修回日期: 1996-10-15

胆蛋白, 特别是由它们通过化学方法合成的新的复合物可用于荧光激活的细胞分类分析, 分子荧光探针, 荧光显微镜及荧光免疫检验技术^[2, 3]. 这是因为通过共价交联得到的复合物吸收和荧光光谱分离较远, 可得到较大的 Stokes 位移, 可避免分析应用中 Rayleigh 和 Raman 散射的干扰. 基于上述, 我们合成了两个 R-藻红与 G-藻蓝蛋白的共价复合物, 验证了能量由 R-藻红蛋白到 G-藻蓝蛋白的能量传递.

1 材料和方法

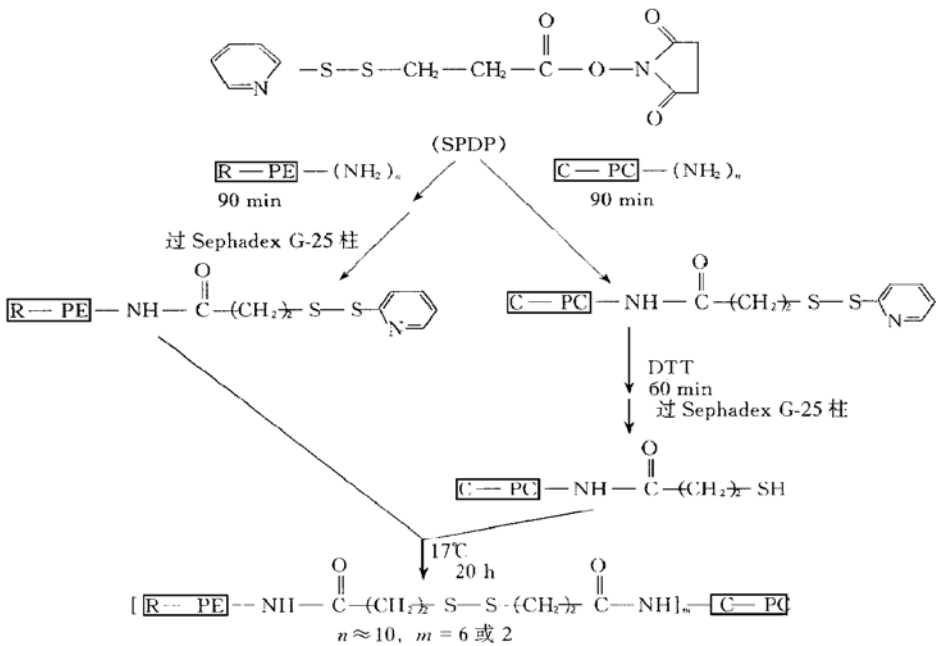
1.1 试剂

3- (2-吡啶联巯基) 丙酸 N-羟基琥珀亚胺

脂 (SPDP) 购自解放军第四军医大学; DTT 购自北京奥尼斯科技开发公司; Sephadex G-25 (Superfine, 10~ 40 μ) 及 Bio-Gel P-300 (100~ 200mesh) 凝胶购自 Bio-Rad Laboratories, U. S.. R-PE 按文献 [4] 自多管藻提取; G-PC 按文献 [5] 提自螺旋藻; 其他试剂均为分析纯. 吸收光谱用美国 Hewlett Packard 8451A 型双波长吸收光谱仪测定; 荧光光谱是用日立 850 荧光光谱仪测定的.

1.2 PE-PC 复合物的制备

1.2.1 复合物 PE-PC 的制备^[6]: 反应流程图如下:



反应液上事先用 0.005 mol/L, pH= 7 的磷酸盐缓冲液平衡的羟基磷灰石柱 (1.5 cm × 6 cm). 先用 0.010 mol/L, pH= 7 的磷酸盐缓冲液洗脱, 先流出的是未反应的 R-PE. 待洗至流出液几乎无色后, 改用 0.020 mol/L 的缓冲液洗出一个紫红色带, 用硫酸铵沉淀. 将透析液上用 0.050 mol/L 磷酸盐缓冲液平衡过的 Bio-Gel P-300 柱 (2 cm × 50 cm). 用相同的缓冲液洗脱, 先流下的为产物, 后流下的为少量的藻蓝蛋白. 按以上步骤, 以 R-PE: G-PC 分

别为 7: 1 和 2: 1 时, 合成了复合物 A 和 B. 测吸收光谱.

1.2.2 复合物中 R-PE 与 G-PC 的摩尔比: 通过复合物的吸收光谱, 可确定复合物中 R-PE 与 G-PC 的摩尔比. 根据朗伯-比尔定律, 样品的吸光度为所有组分在特定波长下吸光度的总和. 对于 R-PE 与 G-PC,

$$A_{496} = (\epsilon_{PE}^{496} \times n_{PE} \times l + \epsilon_{PC}^{496} \times n_{PC} \times l) / V \tag{1}$$

$$A_{618} = (\epsilon_{PE}^{618} \times n_{PE} \times l + \epsilon_{PC}^{618} \times n_{PC} \times l) / V \tag{2}$$

A_{496} 、 A_{618} 分别为复合物在波长496、618 nm的吸光度; ϵ_{PE}^{496} 、 ϵ_{PE}^{618} 、 ϵ_{PC}^{496} 及 ϵ_{PC}^{618} 是R-PE及G-PC在指定波长下的消光系数. 根据吸收光谱, $\epsilon_{PE}^{618} = 0$, $\epsilon_{PC}^{496} = 0$, 则两式相比 A_{496}/A_{618}

$= \epsilon_{PE}^{496} \times n_{PE} / \epsilon_{PC}^{618} \times n_{PC}$
 $n_{PE} / n_{PC} = A_{496} \times \epsilon_{PC}^{618} / A_{618} \times \epsilon_{PE}^{496}$ (3)
已知, $\epsilon_{PE}^{496} = 793\,600\,(\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7], $\epsilon_{PC}^{618} = 5.9 \times 10^5\,(\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$ [8]. 由(3)式求得复合物A: $n_{PE} : n_{PC} = 6 : 1$, 复合物B: $n_{PE} : n_{PC} = 2 : 1$.

1.3 PE-PC复合物中能量传递

1.3.1 DTT还原复合物二硫桥键: 取复合物A和B, 调496 nm处吸光度约0.1, 加DTT至浓度0.05 mol/L, 激发波长496 nm, 分别记录不同时间荧光光谱.

1.3.2 复合物分子内能量传递效率: 分别取藻红蛋白、复合物A和B, 配成溶液使496 nm处的吸光度为0.1. 从496 nm激发, 记录它们的荧光光谱图. 根据公式 $E = 1 - F_{da}/F_d$ 可确定能量传递效率[9]. 式中 E 为能量传递速率, F_{da} 和 F_d 为受体存在和不存在时给体的荧光峰强度.

2 结果与讨论

2.1 PE-PC复合物的制备

由于蛋白质在高温、剧烈搅拌时, 都有可能变性, 选择合适的条件是必要的. 因此在实验时我们选择反应温度15~17℃, 反应不搅拌, 为了反应物扩散均匀, 要时常振摇, 但时间不能太长. 通过比较图1中反应物与原料的吸收光谱, 反应前后主要吸收峰位置496、536和566 nm没有变化. 复合物A和B在566 nm的吸光度有所增强, 且产物B增加明显, 主要是藻红蛋白和藻蓝蛋白在566 nm处吸收光谱有交盖. 产物B的藻蓝蛋白含量高, 566 nm吸收峰增高也大. 反应后藻蓝蛋白的吸收峰仍为618 nm, 从另一侧面证明蛋白质保持了原来的

结构. 复合物的荧光光谱最大值在578 nm和644 nm也说明反应后复合物中藻红蛋白和藻蓝蛋白的结构没有变化(图2和3).

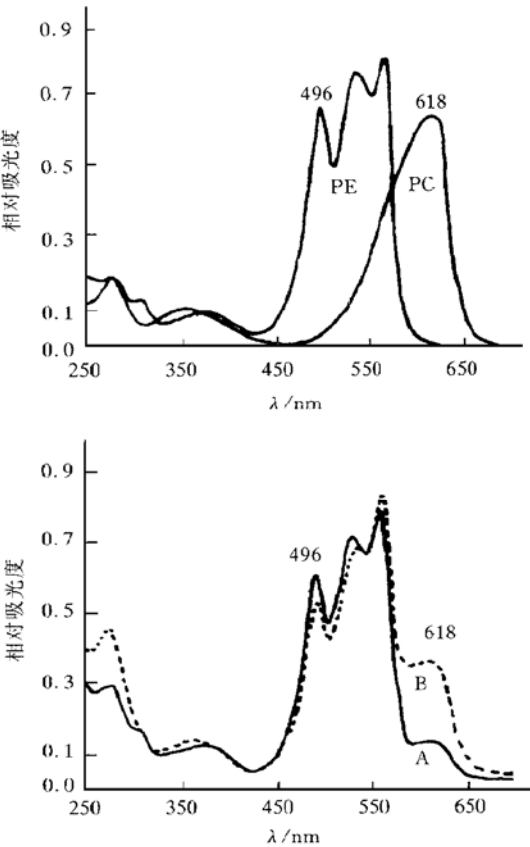


图1 R-PE、G-PC、复合物A和B的吸收光谱

缓冲液的pH值对反应能否进行至关重要. 实验中发现pH值小时, SPDP容易水解, 而太大时蛋白质结构发生变化. 所以, 反应自始至终选用pH值为7.4.

SPDP的量直接影响反应能否进行, 文献[6]及我们实验中发现, 只有SPDP与蛋白质摩尔比大于或等于10时, 反应收率高, 易于分离.

2.2 复合物中R-PE与G-PC的摩尔比

通过计算, 已知复合物中R-PE与G-PC的摩尔比为6:1和2:1. 合成复合物A的投料比为7:1, 得到的复合物中R-PE:G-PC为6:1. 说明一个G-PC只能与6个R-PE相连. 为

了证明此点, 我们提高比值到 10: 1, 得到的产

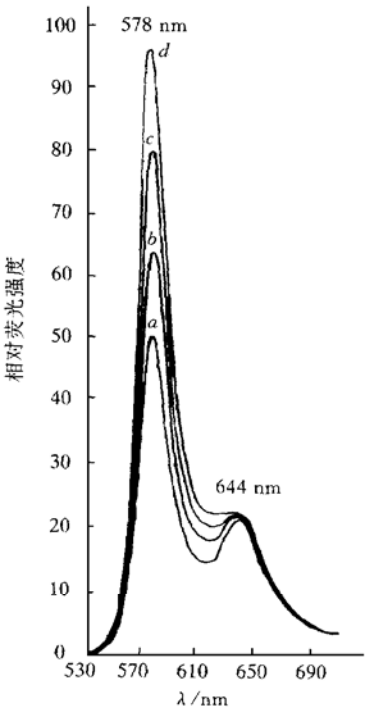


图 2 DTT 分解复合物 A 后 R-PE 荧光发射的增加
a : 0 min ; b : 5 min ; c : 15 min ; d : 30 min. 激发波长 496 nm.

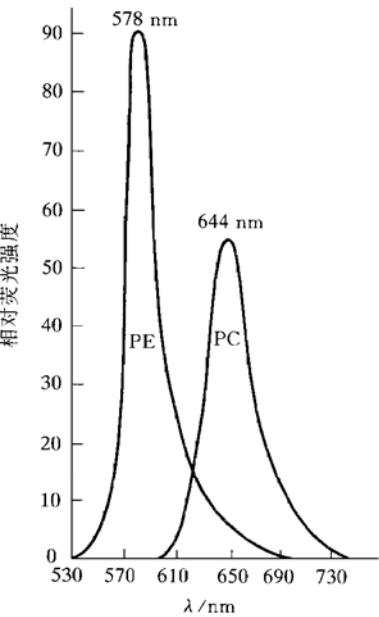


图 3 R-PE 和 C-PC 的荧光发射光谱

物与前者相同. 而投料比为 2: 1, 小于 6: 1 时, 产物中 R-PE: C-PC 等于投料比 2: 1. 由于藻红蛋白和藻蓝蛋白本身含有多个氨基, 因而有许多反应活性点. 每一个活性点都可以与 SPDP 反应, DTT 又将这些反应的活性点还原为巯基. 因此, 在一定范围内改变藻红蛋白和藻蓝蛋白的摩尔比, 可得到不同的目的产物, 这是非常重要的. 因为在应用中, 往往需要不同荧光特性的复合物, 根据以上结果在一定范围内, 就可以有目的地设计产物.

2.3 PE-PC 复合物的能量传递

2.3.1 复合物中分子内能量传递的证明: 图 2 是复合物 A 加入 DTT 后, 荧光光谱随时间的变化; 图 4 是复合物 B 加入 DTT 后荧光光谱

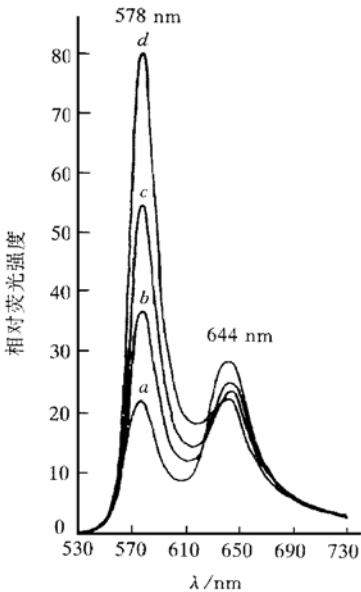


图 4 DTT 分解复合物 B 后 R-PE 荧光发射的增加
a : 0 min ; b : 10 min ; c : 30 min ; d : 90 min. 激发波长 496nm.

的变化. 图 2 中, 当加入 DTT 后, 随时间延长, 578 nm 处 R-PE 的荧光强度增加明显. 这主要是 DTT 将二硫桥键打断, 能量不再传递给 C-PC. 按理, 随着能量传递的阻断, C-PC 644 nm 处的荧光强度应该下降, 但表观上开始有所上升, 最后接近于常数. 这是由于 R-

PE 与 C-PC 的荧光峰在 644 nm 处有交盖 (图 3)。某一时间 644 nm 处荧光强度值由能量传递及 R-PE 本身对 644 nm 处贡献两部分组成。随着时间延长二硫键不断被打断, 能量传递值减小, 而 R-PE 本身荧光增强。此时, 能量传递的减小值小于 R-PE 荧光增强对 644 nm 处的贡献值。故表观上, 随着能量传递被阻断, 644 nm 处的荧光强度反而增强, 而不象 PE-APC 复合物中变藻蓝 670 nm 的荧光值下降^[10]。

在复合物 B 中, 随着二硫桥键断裂, 能量传递逐渐被阻断, 578 nm 的荧光强度增强, 644 nm 处荧光强度下降。并且 DTT 加入初期, 下降明显, 而后下降缓慢, 并接近一常数。此时, 图形接近于复合物 A 开始的荧光光谱。虽然表观上二者不同, 但实质是一样的。

2.3.2 复合物分子内能量传递的效率: 根据图 5 计算出复合物 A 的能量传递效率为 63%,

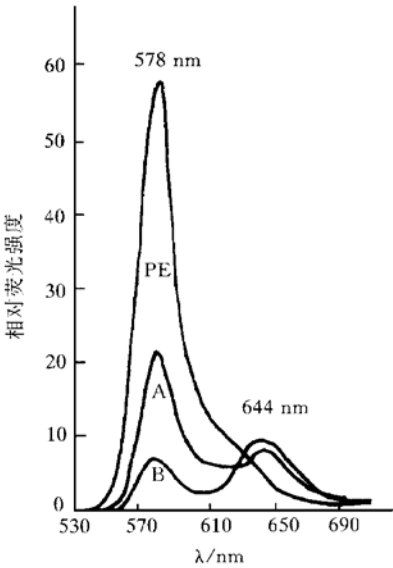


图 5 R-PE、C-PC、复合物 A 和 B 的荧光发射光谱

复合物 B 的能量传递效率为 88%。可以看出, 复合物分子内能量传递效率与 C-PC 含量有关, 即与能量传递受体含量有关。受体比例越高, 能量传递效率越高。这与藻胆体中能量传递

有所不同。在藻胆体中能量传递效率大于 95%, 而藻蓝蛋白含量很少^[11]。在藻胆体中藻红蛋白与藻蓝蛋白通过连结蛋白组成藻胆体的杆^[12]。在杆中, 藻红蛋白与藻蓝蛋白以盘状完全重叠堆积, 相同蛋白和不同蛋白之间充分接近, 能量按 Förster 机理高效传递。我们合成的复合物也是按 Förster 机理进行能量传递, 能量传递效率 $E \propto (R_0/R)^6$ ^[13], R_0 是给体与受体的临界距离, R 是二者的距离。所以, 我们合成的复合物中 R-PE 与 C-PC 的距离比藻胆体杆中二者距离大。根据统计规律, R-PE 与 C-PC 盘的中心远离。由此推断, 复合物不是以杆状存在, 而可能以图 6 形式存在。图 6a 中一个 C-PC 连接 6 个 R-PE, 三个在盘上, 三个在盘下, 产生空间阻碍, 藻红盘要相互远离。正是由于空间阻碍, 所以, 虽然投料比为 [R-PE] : [C-PC] 为 7: 1, 但只能得到 [R-PE] : [C-PC] 为 6: 1 的产物。说明上下各为三个 R-PE 盘是最大空间容许量, 无论如何增加配比, 都不会提高复合物中 R-PE 的量。图 6b 中一个 C-PC 盘连接两个 R-PE 盘, C-PC 盘在中间, R-PE 与 C-PC 盘之间有较大的重叠, 能量传递效率很高, 达 88%。以上图形只是可能的一种, 除了以上图形外, 还可能有 R-PE 与 C-PC 成一定角度, 呈花瓣形排列。但无论如何也达不到天然藻胆体杆中盘与盘完全重叠的排列状况。

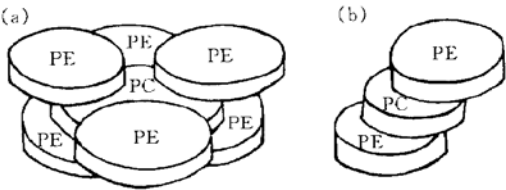


图 6 复合物 A 和 B 的模型示意图

参 考 文 献

1 Gantt E. Phycobilisomes. Light-harvesting pigment complexes. Bioscience, 1975, 25 (12): 781~ 788
2 Vernon T OI, Glazer A N, Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. J

Cell Biol, 1982, **93** (6): 981~ 986

3 Zeng Fanjie, Yang Zixuan, Liu Huiping *et al.* The studies of phycoerythrin in *porphyraezoensis* I, The physical and immunochemical properties of R-phycoerythrin. Scientia Sinica (series B), 1986, **29** (8): 824~ 831

4 蒋丽金, 马金石, 何慧珠等. R-藻红蛋白的某些特征研究. 海洋与湖沼, 1983, **14** (4): 315~ 323

5 Xia A D, Zhu J C, Jiang L J. Energy transfer kinetics in C-phycoerythrin from cyanobacterium *Westiellopsis prolifica* by pump-probe techniques. Biochem Biophys Res Commun, 1991, **179** (1): 558~ 564

6 Glazer A N, Stryer L. Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates. Emission wavelength Shifting by energy transfer. Biophys J, 1983, **43** (9): 383~ 386

7 喻玲华, 曾繁杰, 蒋丽金等. 海洋多管藻的 R-藻红蛋白的亚基组成和发色团含量. 生物化学与生物物理学报, 1990, **22** (3): 221~ 227

8 MacColl R, Guard-Friar D. Phycobiliproteins. Boca Raton, Florida: CRC press, 1987. 64~ 67

9 Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983. 305~ 337

10 何新安, 蒋丽金. 光动力复合藻胆蛋白及其分子内能量传递现象. 生物物理学报, 1995, **11** (3): 439~ 445

11 Canaani O, Lipschultz C A, Gantt E. Reassembly of phycobilisomes from allophycocyanin and a phycocyanin-phycoerythrin complex. FEBS Letters, 1980, **115** (2): 225~ 229

12 MacColl R, Guard-Friar D. Phycobiliproteins. Boca Raton, Florida: CRC press, 1987. 23~ 24

13 Turro N J 著, 姚绍明等译. 现代分子光化学. 北京: 科学出版社, 1987. 340~ 345

The Synthesis of Phycobiliprotein Conjugates

and Their Intramolecular Energy Transfer Phenomena. ZHAO Jiquan, ZHAO Jingquan, YANG Zixuan, ZHANG Jianping, JIANG Lijin (*Institute of Photographic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Two conjugates of R-phycoerythrin (R-PE) and C-phycoerythrin (C-PC) were synthesized through a coupling agent, N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate and the alternation of the ratio of R-PE to C-PC. Their ratio of R-PE to C-PC were determined by absorption spectra. One is 6: 1, the other is 2: 1. The phenomena of intramolecular energy transfer were characterized. The calculated results showed that the efficiency of energy transfer from R-PE to C-PC was 63% and 88% respectively. The efficiency of energy transfer is better. When the disulfide bridge between R-PE and C-PC was reduced by DTT, the energy transfer was stopped. The phenomena further verified the intramolecular energy transfer from R-PE to C-PC.

Key words phycobiliproteins, R-phycoerythrin, C-phycoerythrin, intramolecular energy transfer, protein conjugate

硝基精氨酸抑制巨噬细胞内一氧化氮合成的研究

牛宇欣 储 毅 杨典洱¹⁾ 李慧珠²⁾
(首都医科大学细胞遗传教研室, 北京 100054)

摘要 运用体外分离培养方法, 研究硝基精氨酸 (N^ω-nitro-L-arginine, L-NNA) 抑制巨噬细胞内诱生性一氧化氮合成. 发现 L-NNA 能抑制一氧化氮的合成, 而且在一定的范围内, 其抑制作用随 L-NNA 作用剂量的增大而增强; 在培养体系中加入 L-精氨酸能够逆转这种抑制作用. 说明 L-NNA 可能通过竞争性地与诱生型一氧化氮合成酶 (iNOS) 活性位点结合, 抑制巨噬细胞内的一氧化氮合成.

¹⁾首都医科大学生物化学教研室. ²⁾首都医科大学寄生虫学教研室.
收稿日期: 1996-07-22, 修回日期: 1996-11-28