

文章编号: 0529-6579 (1999) 02-0028-05

红藻藻胆体内部蛋白间的能量传递研究^{*}

II. 人工合成复合物 R-PE/R-PC 以及 R-PE/APC 内的能量传递

赵福利, 张景民, 郑锡光, 汪河洲, 余振新

(中山大学超快速激光光谱学国家重点实验室, 广东 广州510275)

摘 要: 研究了2种人工合成的二元藻胆体模拟复合物(R-PE/R-PC和R-PE/APC)的时间分辨荧光光谱并运用多指数拟合的方法对数据进行了详细的处理和分析, 研究结果证实了能量在R-PE和R-PC之间的传递时间与能量从R-PE传递到APC的时间几乎相等(50 ps); 此外, R-PE到APC还有2个能量传递的途径, 能量在这2个通道的传递时间分别为: 135 ps和436 ps, 而R-PE到R-PC的光谱解叠结果并未显示有上述的通道, 即: 能量可以从R-PE直接传递到APC同时也可以经过R-PC传递到APC, 在实际的体系中应该是二者竞争的机制。

关键词: 能量传递; 时间分辨激光光谱; 二元复合物; 藻胆体; 藻胆蛋白

中图分类号: O 434.54; Q 945.11 **文献标识码:** A

本文所研究的红藻藻胆体中的杆状天线含有2种藻胆蛋白: R-藻红蛋白(R-PE), R-藻蓝蛋白(R-PC)^[1], 从外向内部核状结构依次排列R-PE/R-PC; 核内含有变藻蓝蛋白(APC)^[2]. 在天然结构中, R-PE与APC不直接相连, 中间夹有R-PC, 不可能从活体中分离R-PE/APC复合物, 也不能直接地研究R-PE是否能够与APC进行能量传递. 由于活体中R-PE与APC的空间距离有限, 6~12 nm, 可能存在能量传递. 我们继研究人工模拟活体之后, 合成了R-PE/R-PC和R-PE/APC 2种二元复合物分子, 并以时间分辨荧光光谱技术从多方面对藻胆体内部的能量传递途径进行研究. 研究结果显示: 在二元分子体系R-PE/R-PC内能量从R-PE经过R-PC传递到的时间为55 ps左右, 而且只有此一个传递过程; 在二元分子体系R-PE/APC内能量从R-PE传递到APC的过程是复杂的、多途径的, 时间分别为50, 125和400 ps. 综合文[3, 4]可以预测能量可以从R-PE直接传递到APC而不经R-PC这一中间受体, 活体内应该是二者竞争的过程.

1 材料与方法

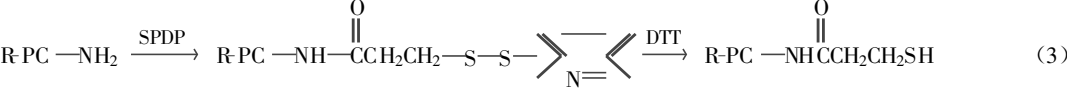
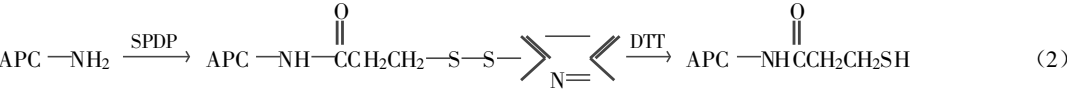
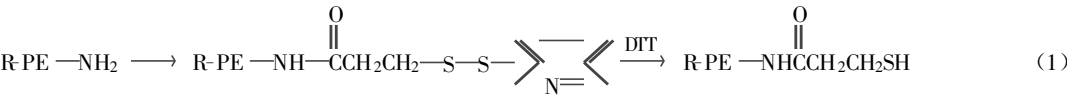
1.1 模型化合物的合成

复合物合成中所用的各种蛋白均自行提取. N-羟基琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯(SPDP)购自Sigma公司; 二硫苏糖醇(DTT)购自军事医学科学院放射医学

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29803010); 广东省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1998-04-10 作者简介: 赵福利, 女, 1969年生, 博士研究生.

研究所. 合成路线如下



复合物的结构已表征^[5,6], 认为其内部蛋白间以共价键连接, 可为藻胆体的模拟分子.

1.2 实验方法

时间分辨荧光光谱的测量采用主动锁模 Nd:YAG 激光器 (波长为 532 nm, 脉冲宽度为 60 ps) 及同步泵浦的腔倒空染料激光为激发源, 染料激光脉冲的波长选在 570 nm, 脉冲时间宽度为 6 ps. 本文采用多波长泵浦、探测技术, 泵浦波长为 532 nm 和 570 nm. 样品发射的荧光由与多色仪连接的同步扫描条纹照相机记录, 同步扫描条纹照相机的时间分辨率为 10 ps, 条纹照相机记录的数据直接传输到 IBM 计算机进行多指数拟合, 拟合采用 Monte Carlo 方法对最佳解进行搜索. 在实验中由于各种分离蛋白的荧光发射时间远大于能量传递时间, 所以忽略终端荧光发射速率对各个能量传递过程的影响, 可以近似地认为解叠所得的寿命除最长的复合物终端发射寿命以外都表示一种复合物内能量传递时间.

2 结 果

前文的研究结果可以看出对于分子内能量传递过程的研究, 低温光谱比较明了. 原因是低温情况下, 分子之间的热振动降低, 从而使研究更便于计算和讨论, 因此本文只讨论低温 (77 K) 下的瞬态荧光发射过程. 低温 77 K 下 2 种复合物的瞬态荧光光谱对时间的积分曲线列于图 1. 同步探测样品所发射的荧光 (λ_{ex}=532 nm), 探测到的荧光的强度-波长-时间相关三维谱图见图 2.

在 532 nm 绿光泵浦下, 激发光主要激发 R-PE 内的藻红胆素, 根据分离的藻胆蛋白研究结果, 能量被藻红蛋素 (PEB) 吸收后将传递到藻脲胆素 (PUB) 最终在 580 nm 处发射. 而 R-PE 的荧光发射谱与 R-PC 的

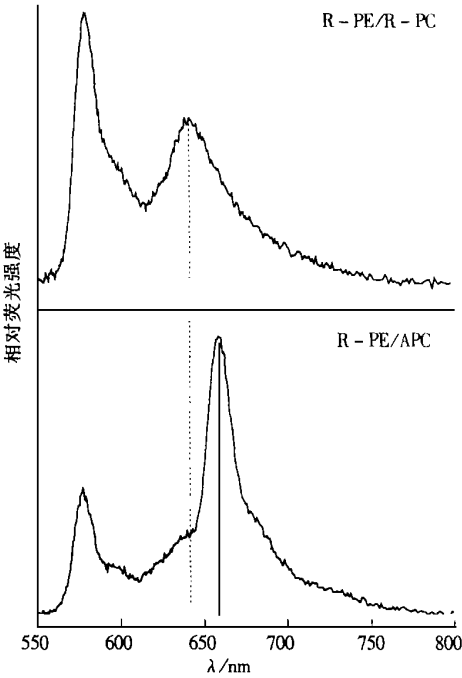


图 1 复合物瞬态荧光积分曲线
Fig. 1 Integral curves for time-resolved fluorescence of two complexes

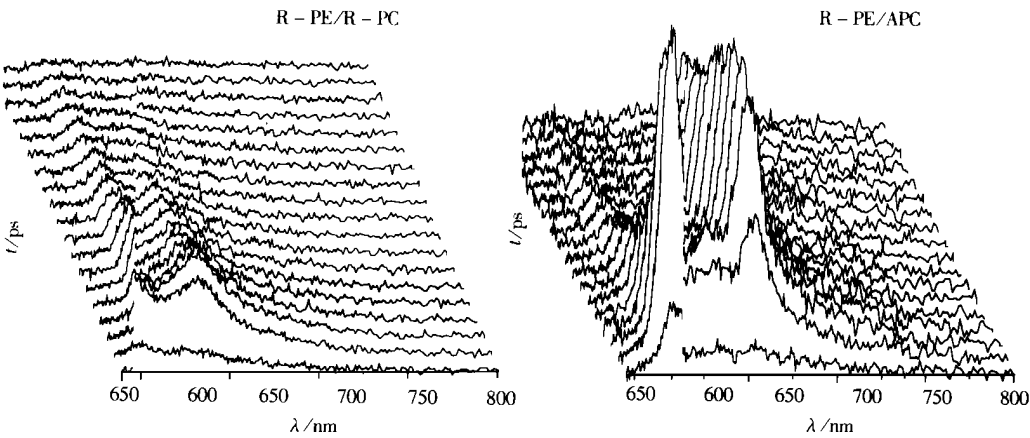


图 2 复合物的三维瞬态荧光积分曲线

Fig 2 Time-intensity-wavelength relations for two complexes

吸收谱重叠较大，能量传递到 R-PC 的几率也较大，R-PC 的终端发射峰在 640 nm，因此，对于复合物 R-PE/R-PC，探测波长选在 580 nm 和 640 nm 处；而对于复合物 R-PE/APC，由于 APC 的终端发射在 660 nm，因此探测波长选在 580 nm，660 nm 处。这也是实验上比较可行的选择，因为在其他波长处，荧光泄露相当小，探测的信噪比会很小，探测的结果不理想。

在 570 nm 的激光泵浦下，激光只能激发 APC 的发色团，R-PE 的成为盲区，即能量只可能被 APC 吸收，而不能逆行传递到 R-PE。因而，探测波长只需选在 640 nm 或 660 nm 即可，但是在这种情况下 2 个终端发射团 F_{640} 和 F_{660} 都有荧光发射，无法讨论 R-PE 与能量受体之间聚体的能量传递过程。所以本文的实验数据拟合只针对 532 nm 泵浦所得的实验结果进行。

采用多指数拟合的方法应用 Monte Carlo 技术对两种复合物所探测到的不同探测波长下的动态荧光衰减进行拟合，结果列于表 1 中，拟合曲线列于图 3 和图 4。

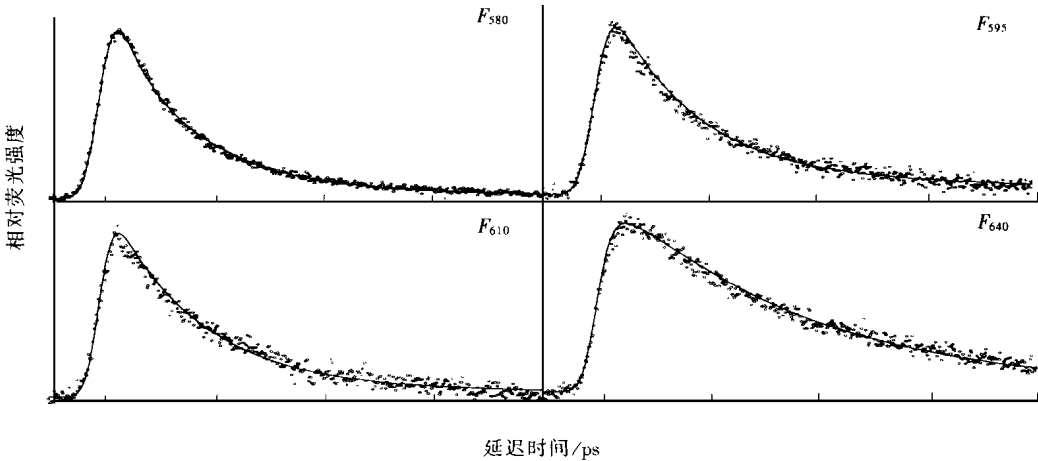


图 3 R-PE/ R-PC 荧光衰减曲线拟合结果

Fig 3 Fitting results for flourescence decays of R-PE/ R-PC complex

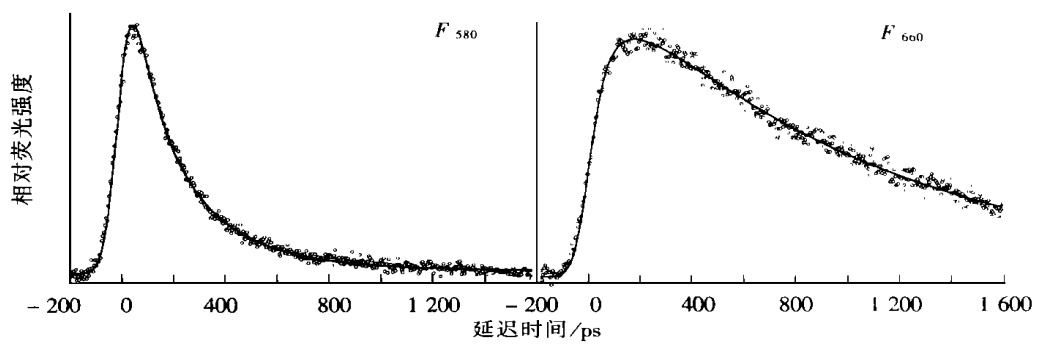


图4 R-PE/APC 荧光衰减曲线拟合结果

Fig. 4 Fitting results for flouorescence decays of R-PE/APC complex

表 1 不同探测波长复合物的动力学荧光光谱解叠结果

Fig 1 The deconvolution results of R-PE/APC complex at different detected wavelengths

复合物	λ_{ex}/nm	τ	ϵ	τ	ϵ	τ	ϵ	τ	ϵ
R-PE/ R-PC	580	51. 36	13. 96	111. 55	20. 94	335. 04	65. 10	—	—
	640	58. 94	—35. 42	118. 75	6. 78	395. 79	4. 60	723. 79	88. 62
	595	55. 44	—5. 83	102. 60	30. 73	432. 32	69. 27	—	—
	610	55. 96	—28. 82	99. 57	50. 85	458. 26	49. 15	—	—
R-PE/ APC	580	51. 96	18. 72	135. 64	53. 68	436. 91	27. 60	—	—
	660	57. 48	—46. 40	120. 79	—27. 34	366. 70	—13. 26	821. 58	100. 00

表 1 的结果表明，在 532 nm 的激发光泵浦情况下，复合物 R-PE/R-PC 的瞬态荧光在 580, 595, 610 nm 发射过程都可以用 3 个指数来拟合，3 个寿命分别为：(55±5)，(108±10)，和 (400±80) ps，而对于 640 nm 处则需要 4 个指数拟合，最长的时间为 723 ps，对应于终端恢复到基态的荧光发射；复合物 R-PE/ APC，580 nm 处的荧光可以采用 3 指数拟合，660 nm 的荧光衰减却应该用四个指数来拟合更为恰当，除了以上 3 个寿命以外还有 800 ps 的长寿命衰减，这个时间组分应该对应于终端藻胆蛋白 APC 的终端荧光发射. 两种复合物的各个探测波长的相同时间组分的含量因子可以看出：在复合物 R-PE/R-PC 中，当 F_{580} 处于下降的过程，同时在 595, 610 和 640 nm 处的荧光则处于上升的过程，这说明能量正在以 (53.5±3) ps 所对应的速率从 R-PE 传递至 R-PC，这个过程也可以在复合物 R-PE/APC 中发现，该过程同样存在于 R-PE/R-PC/APC 复合物中^[4]，而且无论泵浦波长选取在 532 nm 还是 570 nm，都会通过拟合解得这个过程参数. 这可以解释为是蛋白质整体的内部过程，只要能量被第一级捕光色团吸收，其它匹配的色团就集体响应，快速地将能量传递开来. 对于 (108±10) ps 和 (400±80) ps 2 个过程，复合物 R-PE/R-PC 中，所有探测波长均呈现下降过程，没有显示能量传递过程；而在复合物 R-PE/ APC 中， F_{660} 在 F_{580} 下降时，均呈现上升过程. 这说明能量可以在 R-PE/APC 之间以此时间常数进行能量传递，即 R-PE 与 APC 之间的能量通道是并行的. 在前文 [4] 中说明 110 ps 的时间组分时提出：没有证据表示能量可以在 R-PC 到 APC 之间以该速率传递，只有证据表示能量可以在 R-PE 到 APC 之间可以以该时间常数传递. 本文在 R-PE/APC 的二元复合物中证明了这一观点的正确性：因为在复合物 R-PE/R-PC 中 R-PE 和 R-PC 之间不存在 110 ps 的能量

传递传递过程在复合物 R-PE/APC 中却存在 110 ps 的能量传递过程. 至于 R-PC 与 APC 之间的能量传递过程的研究, 要在复合物 R-PC/APC 中具体讨论才更有说服力, 这方面的工作将另文发表. 本文的实验结果可以得出蛋白之间的能量传递通道是并行的. 反应了活体中能量传递途径的并行性^[3].

3 结 论

综上所述, 复合物 R-PE/R-PC 和复合物 R-PE/APC 的瞬态荧光的时间因子解叠结果显示能量在 R-PE 和 R-PC 之间的传递时间与能量从 R-PC 传递到 APC 的时间几乎相等 (50 ps); 此外, R-PE 到 APC 还有 2 种能量传递的通道, 能量在这 2 个通道的传递时间分别为: 110 ps 和 400 ps. 所以, 不同蛋白之间的能量传递通道是不同的, 在 R-PE/APC 之间是并行竞争的, 而在 R-PE/R-PC 之间则是单通道的.

参考文献:

- [1] GLAZER A N. Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for light energy transfer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 768: 29~51.
- [2] MOCCOLL R, FRIAR D G. Phycobiliproteins [M]. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1987. 45~91.
- [3] 赵福利, 郑锡光, 汪河洲, 等. 藻胆体杆核复合物的能量传递途径研究 [J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1997, 36 (6): 62~66.
- [4] 赵福利, 张景民, 郑锡光, 等. 红藻藻胆体内部蛋白间的能量传递研究 I [J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1998, 37 (5): 19~23.
- [5] GLAZER A N, STRYER L. Fluorescence tandem phycobillyprotein conjugates —— emission wavelength shifting by energy transfer [J]. *Biophys J*, 1983, 43: 363~386.
- [6] ZHAO J Q, ZHAO J Q, YANG Z X, et al. 藻胆体模型复合物的合成及其表征 [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1997, 42 (7): 1440~1443.

Energy Transfer among Proteins in the Phycobilisome of Red Algae

II. Energy Transfer in Synthesized Complex of R-PE/R-PC and R-PE/APC

ZHAO Fu-li^{*}, ZHANG Jing-min, ZHENG Xi-guang, WANG He-zhou, YU Zhen-xin

Abstract: Time-resolved fluorescence spectra of artificial synthesized complexes (R-PE/R-PC and R-PE/APC) for phycobilisome are studied by multi-exponential deconvolution technique. The results proved that the energy transfer rate between neighboring proteins is 50 ps. Furthermore, there are another two path-ways for energy transfer from R-PE to APC with time constants of 110 ps and 400 ps while in the complex of R-PE/R-PC there are no these kinds of paths. The results indicate that the path-ways for energy transfer in R-PE/APC are parallel while in R-PE/R-PC it is sequent.

Keywords: energy transfer; time-resolved laser spectroscopy; heterodimer; phycobilisome; phycobillyprotein

^{*} State Key Laboratory of Ultrafast Laser Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China