

# 红藻藻胆体内部蛋白间的能量传递研究

## I. 人工合成 R-PE/R-PC/APC 复合物内的能量传递<sup>\*</sup>

赵福利 张景民 郑锡光 汪河洲<sup>\*\*</sup> 余振新

(中山大学超快速激光光谱学国家重点实验室, 广州 510275)

**摘要** 研究了人工合成的藻胆体模拟复合物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, 结果表明能量在 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); 除此之外, R-PE 到 APC 还有两种能量传递的通道, 能量在这两个通道的传递时间分别为 110 ps 和 400 ps. 即: 蛋白之间的能量传递通道是并行的.

**关键词** 藻胆体, 时间分辨激光光谱, 能量传递, 合成, 藻胆蛋白

**分类号** O 434. 54, Q 945. 11

藻胆体是藻类植物的捕光器官, 由若干条杆状天线和一个半球体的核组成, 杆状天线是由若干面对面的盘状结构几乎共轴嵌连而成; 核结构则是由变藻蓝蛋白堆砌成三棱柱的形状, 每个棱又是 4 个变藻蓝蛋白三聚体盘同心叠合而成的柱状体<sup>[1]</sup>. 本文所研究的红藻藻胆体的杆状天线含有 R-藻红蛋白 (R-PE) 和 R-藻蓝蛋白 (R-PC) 两种藻胆蛋白. 核内含有变藻蓝蛋白 (APC)<sup>[2]</sup>. 每种蛋白的光谱特性由蛋白的色素集团化学构象和它们所处的蛋白质环境所影响<sup>[3]</sup>. R-PE, R-PC 和 APC 的稳态吸收光谱和荧光光谱数据见表 1<sup>[4]</sup>. 根据稳态光谱的光谱重叠情况可以得出, 能量在从 R-PE 经 R-PC 传递到 APC 的几率是相当大, 可以高达 95% 以上<sup>[5]</sup>. 在完整藻胆体中的能量传递途径研究中普遍认为能量是从 R-PE 经过 R-PC 传递到藻胆体的核状结构 APC, 也有结果显示能量传递的途径是并行的, 即可能有一部分能量直接从 R-PE 传递到藻胆体的核状结构 APC<sup>[6]</sup>. 本文合成了 R-PE/R-PC/APC 3 种蛋白的复合物分子, 并着重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.

## 1 材料和方法

藻胆蛋白的提取方法以及复合物的合成方法见文献<sup>[7]</sup>. 本文只研究 R-PE/R-PC/APC 复合物, 其它复合物的研究将另文报导. 复合物中不同蛋白之间以共价键连接, 通过控制投料比来控制 3 种蛋白在复合物分子内的含量, 达到人工模拟天然藻胆体进行捕光的反应

\* 国家自然科学基金 (19574077) 和广东省自然科学基金资助项目

\*\* 通讯联系人

收稿日期: 1998-01-16 赵福利, 女, 29 岁, 讲师, 在职博士

表 1 红藻藻胆蛋白的稳态吸收光谱和荧光光谱特性

Tab. 1 The steady-state absorption and fluorescence of phycobiliproteins of red alga

项 目	藻红蛋白 (R-PE)	藻蓝蛋白 (R-PC)	变藻蓝蛋白 (APC)
Abs $\lambda_{\max}$ /nm	498, 545	555, 617	598 <sup>1)</sup> , 650
Flu $\lambda_{em,max}$ /nm	578	636	680

1) shoulder of the corresponding curve

过程及其机理研究. 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) 同步泵浦的腔倒空染料激光为激发源, 染料激光脉冲的宽度为 6 ps. 针对样品的结构, 本文采用多波长泵浦、探测技术, 泵浦波长分别为 532和 570 nm, 激光脉冲的宽度分别为 60和 6 ps. 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. 实验室中实际探测到的荧光是样品所发射的荧光与仪器响应函数的卷积, 即

$$F_{ex}(t) = \int_0^{\infty} F_s(t-\nu)I(\nu) d\nu$$

其中,  $F_{ex}$ 和  $F_s$ 分别为实验室所探测到的荧光强度和样品所发射的荧光强度.  $I(\nu)$ 为测试系统的响应函数, 对于 6 ps 的激发光, 测试系统的响应函数宽度为 10 ps, 而对于 60 ps 的激发光, 仪器的响应函数可以忽略, 测试系统的响应函数宽度为 60 ps. 本文的多指数拟合过程是针对样品所发射的荧光进行拟合. 即:  $F_s(t) = \sum_{i=1}^n T_i e^{-t/\tau_i}$ , 其中,  $T_i$ 为第  $i$ 个荧光组分所占荧光总发射强度的百分比, 即称为指前因子,  $\tau_i$ 为第  $i$ 个组分的寿命. 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寿命为复合物终端发射寿命以外都表示复合物内能量传递时间.

## 2 结 果

### 2.1 光谱结果

人工合成藻胆蛋白复合物 (R-PE/R-PC/APC) 分别在室温和 77 K 下, 通过荧光动力学发射过程而摄得的荧光光谱, 见图 1. 从图 1 可以看出, 只是室温下频谱较 77 K 下的频谱宽度增宽, 谱带分开不十分明显, 这主要来源于温度效应. 实验分别采用 532 nm 绿光 (脉冲宽度为 60 ps) 和染料激光 (570 nm, 脉冲宽度为 6 ps) 激发样品, 同步探测样品所发射的荧光, 两种情况下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

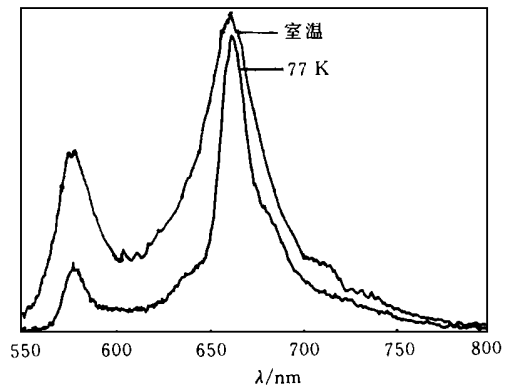


图 1 室温和 77 K 下瞬态荧光积分频谱曲线  
Fig. 1 Integral curves of temporal fluorescence at room temperature and 77 K respectively

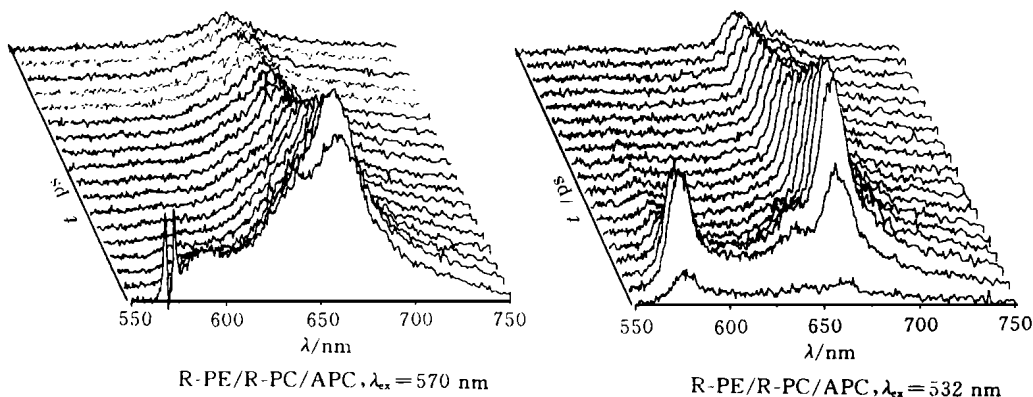


图 2 不同泵浦波长下荧光强度-波长-时间相关三维谱图

Fig. 2 Intensity-wavelength-time relations for fluorescence under different pump wavelengths

白研究结果,能量被藻红胆素 (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,类似地, R-PC 的能量传递到 APC 的几率也很大, APC 的终端发射在 660 nm.因此探测波长选在 580, 640 和 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,一方面, R-PE 的吸收波长比 570 nm 短,这使 R-PE 在这种情况下成为泵浦光的盲区,激发光只能激发 R-PC 的发色团,也即能量只可能被 R-PC 吸收进一步传递到 APC,而一般不可能逆行传递到 R-PE,因此在 580 nm 处是应该探测不到荧光发射的;另一方面,由于泵浦光就在 570 nm,为了避免激发光进入探测系统,在探测系统前面要加上滤光片,实验中很难找到只过滤 570 nm 的光而可以不过滤 580 nm 的滤光片.因此,探测波长只选在 640, 660 nm 处.

### 2.2 解叠结果

由于低温下探测的荧光具有较小的分子振动影响和溶剂效应,更接近能量传递理论模型的要求.基于以上考虑,本文只对 77 K 下所探测到的不同探测波长下的动态荧光衰减采用多指数拟合的方法,应用 Monte Carlo 技术进行拟合;532 和 570 nm 激发下探测所得的荧光结果拟合曲线见图 3.所有拟合结果列于表 2 中.

表 2 不同探测波长 R-PE/R-PC/APC 复合物的动力学荧光光谱解叠结果 (77 K)

Tab. 2 The deconvolution results of R-PE/R-PC/APC complex at different detected wavelengths

$E_{ex} / \text{nm}$	$E_{em} / \text{nm}$	1		2		3		4	
		$\bar{t} / \text{ps}$	$F$	$\bar{t} / \text{ps}$	$F$	$\bar{t} / \text{ps}$	$F$	$\bar{t} / \text{ps}$	$F$
	580	56.27	18.94	110.31	56.40	312.89	24.67	-	-
532	640	51.36	29.69	111.53	42.61	461.44	57.39	-	-
	660	53.64	52.84	111.23	17.80	410.80	9.46	731.64	100.00
570	640	52.84	5.82	106.92	41.00	-	-	652.36	53.18
	660	51.58	7.87	121.42	6.59	-	-	761.02	93.41

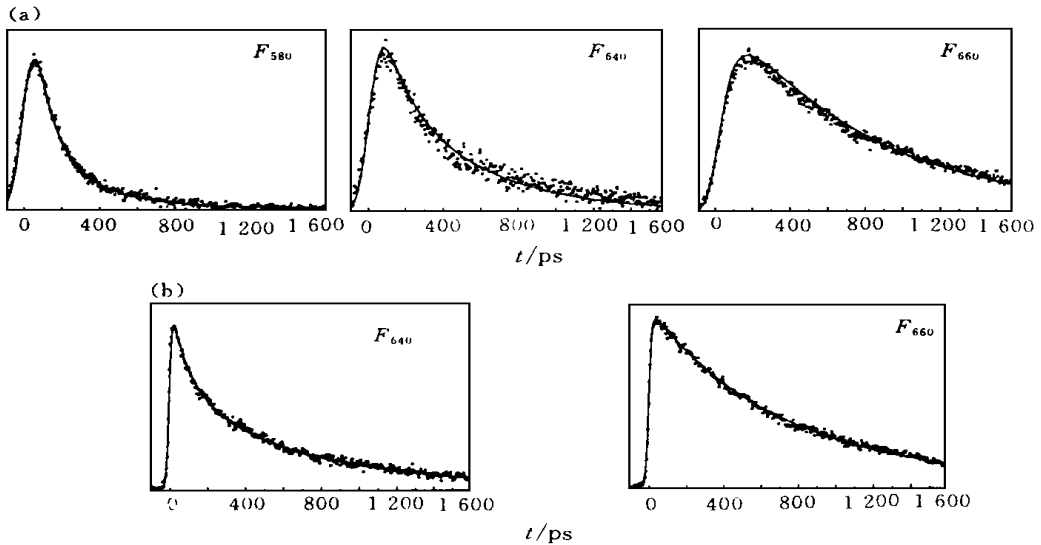


图 3 不同探测波长的荧光衰减拟合结果

Fig. 3 Fitting results for different detecting wavelengths with excitation

(a) 532 nm 激光激发; (b) 579 nm 激光泵浦

从表 2 的结果可以发现,在 532 nm 的激发光泵浦情况下,580 nm ( $F_{580}$ ) 和 640 nm ( $F_{640}$ ) 的荧光衰减都可以用 3 个指数来拟合,3 个寿命分别为:  $(53.5 \pm 3.0)$ ,  $(106 \pm 5)$  和  $(390 \pm 80)$  ps; 而 660 nm 的荧光衰减却应该用 4 个指数来拟合更为恰当,除了以上 3 个寿命以外还有一个 700 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. 研究各个探测波长的相同时间组分的含量因子可以看出: 在 580 nm 处,  $F_{580}$  处于下降的过程,同时  $F_{640}$  和  $F_{660}$  则处于上升的过程,这说明能量正在以  $(53.5 \pm 3.0)$  ps 所表示的速率从 R-PE 传递至 R-PC 和 APC. 这样的能量传递速率在蛋白之间是相当快的. 也可以解释为人工合成的复合物在空间精细结构上与天然的复合物有所不同. 而对于其他两个时间组分,从含量因子上只能判断, R-PE 将能量传递到 APC,却没有明显地显示能量可以从 R-PC 传递到 APC.

在 570 nm 的激发光泵浦情况下,从表 2 可以发现 R-PC 和 APC 的时间衰减只有 3 个时间组分: 50, 110 和 700 ps. 其中在 532 nm 泵浦情况下出现的 400 ps 的时间组分消失了. 这表示该组分与 R-PE 有关,而从在 532 nm 激光泵浦时可以看到: 当  $F_{580}$  处于下降时,  $F_{660}$  的含量因子为负数,表示  $F_{660}$  此刻处于上升阶段,这说明能量从 R-PE 到 APC 的传递有一条特殊的能量传递通道,能量在这个通道传递的时间为 400 ps,因而,该复合物中的 R-PE 和 APC 的空间取向因子可能与天然复合物中的取向因子不同,因为在天然复合物中不存在这个能量传递通道<sup>[6]</sup>. 类似地,对于 110 ps 的时间组分,没有证据表示能量可以在 R-PC 到 APC 之间传递,只有证据表示能量可以在 R-PE 到 APC 之间传递. 只有 50 ps 的组分明显地显示出能量可以从 R-PC 传递到 APC. 所以在复合物中,当 R-PE 将能量传递给 R-PC 和 APC 的同时, R-PC 也将能量传递给 APC. 因此, APC 的该时间组分的上升含量大于 R-PC 的该时间组分的上升含量.

从不同泵浦条件下所探测的荧光衰减曲线和解叠结果分析, 相邻的蛋白之间的能量传递的速率是相当快的, 约为 50 ps. R-PE/R-PC/APC复合物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; 除此之外, R-PE到 APC还有两种能量传递的通道, 能量在这两个通道的传递时间分别为: 110 ps和 400 ps. 由此可以证明: 蛋白之间的能量传递通道是并行的. 这从一个方面证实了活体种能量传递途径的并行性<sup>[6]</sup>.

## 参 考 文 献

- 1 Glazer A N. Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 768: 29~ 51
- 2 MoeColl R, Friar D G. Phycobiliproteins. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1987. 45~ 91
- 3 赵福利, 郑锡光, 汪河洲, 等. 别藻蓝蛋白聚集体中得色素耦合模型研究. *科学通报*, 1998 (9): 1
- 4 Holzwarth A R. Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae. *Physiol Plant*, 1991, 83: 518~ 528
- 5 Debreczeny M P, Sauer K, Zhou J, et al. Component of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycocyanin (1) - Monomer. *J Phys Chem*, 1995, 99: 8412~ 8419
- 6 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. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1997, 36 (6): 62~ 66
- 7 赵继全, 赵井泉, 杨紫萱, 等. 藻胆蛋白复合物的合成及其分子内能量传递. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24 (5): 435~ 440

## Energy Transfer among Proteins in the Phycobilisome of Red Algae

I. Energy Transfer in Synthesized Complex of R-PC/APC

Zhao Fuli\* Zhang Jingmin Zheng Xiguang Wang Hezhou Yu Zhenxin

**Abstract** Time-resolved fluorescence spectra of artificial synthesized model of phycobilisome are studied in detail by multi-exponential deconvolution technique. The results show that the energy transfer period between neighboring proteins is 50 ps, and there are another two path-ways for energy transfer from R-PE to APC with time constant of 110 ps and 400 ps. These energy transfer path-ways are parallel.

**Keywords** phycobilisome, time-resolved laser spectroscopy, energy transfer, synthesis, phycobiliprotein

\* State Key Laboratory of Ultrafast Laser Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China