

四种别藻蓝蛋白三聚体的时间分辨 荧光光谱研究*

赵福利 郑锡光 汪河洲 余振新 高兆兰
(中山大学激光与光谱学研究所 广州 510275)

王 慧 赵井泉 蒋丽金
(中国科学院感光化学研究所 北京 100101)

提要 研究了从 *Anabana varibilis* 中提取的 4 种别藻蓝蛋白 APCI, APCII, APCIII 及 APCB 三聚体的稳态光谱和皮秒荧光光谱。采用 Monte-Carlo 方法对瞬态荧光光谱进行拟合, 实验结果表明: APCI 荧光有两个带, 其中第一个带位于 662 nm, 有两个时间组分: 35.8 ps 和 1.67 ns; 第二个带位于 680 nm, 有两个时间组分: 34.2 ps 和 1.64 ns; APCII 瞬态荧光位于 660 nm, 有两个时间组分: 20.4 ps 和 1.64 ns; APCIII 瞬态荧光位于 660 nm, 有两个时间组分: 23.8 ps 和 1.76 ns; APCB 瞬态荧光有两个带, 其中第一个带位于 662 nm, 有两个时间组分: 36.6 ps 和 1.45 ns; 第二个带位于 680 nm, 有两个时间组分: 25.8 ps 和 1.62 ns。实验结果一方面说明了藻胆体核内 4 种别藻蓝蛋白形成能量传递的两条途径; 另一方面瞬态荧光解叠结果揭示了 APCI 和 APCB 三聚体内能量传递的超快过程。

关键词 别藻蓝蛋白, 瞬态荧光光谱, 衰减寿命, 吸收光谱, 偶极-偶极相互作用

1 引 言

藻胆蛋白是藻类植物进行光合作用的捕光物质, 它分为三大类: 藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(PC)和别藻蓝蛋白(APC)。其中藻蓝蛋白的结构和光物理信息已有较深入的研究^[1,2]; 藻红蛋白的研究也已较广泛展开。目前, 研究热点已集中在别藻蓝蛋白^[3~5]。在结构方面, Katjusa[√]等人于 1995 年在 0.23 nm 的分辨率下, 得到了从 *Spirulina platensis* 分离出来的别藻蓝蛋白结构^[6]。最近对 APC 飞秒吸收光谱研究及飞秒偏振光谱^[7,8]的研究已经对分子间激子的存在提供了实验证据。然而对于不同蛋白间的能量传递机制的研究还欠深入。我们从 *Anabana varibilis* 中分离出 4 种结构相似的蛋白 APC: APC⁺, APC⁻, APC⁰ 和 APCB, 它们都位于藻胆体的核内, 并以三聚体形式存在。藻胆体的核是由三个圆柱毗邻相连组成, 具有三度旋转对称, 每个圆柱均是别藻蓝蛋白十二聚体^[1,2], 其中靠近类囊体膜的两个圆柱结构如图 1 所示。本文采用稳态光谱和时间分辨荧光光谱方法研究 4 种 APC 的光谱特性, 并由光谱实验结果分析其能量传递途径。

2 材料和方法

实验采用的是将经硫氨沉淀的固体样品在摄氏 4℃ 下透析 12 h 而得到的^[9]。它们的亚基结构

* 国家自然科学基金(19574077)和广东省自然科学基金(950004)资助项目。

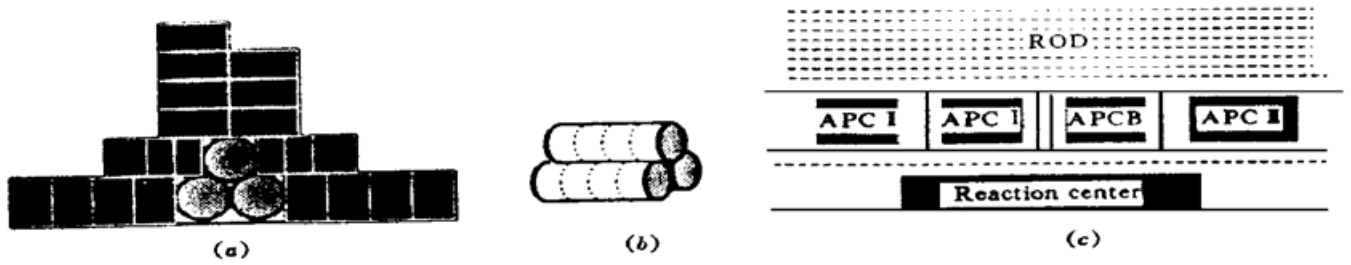


图1 藻胆体核的结构示意图

(a) 藻胆体整体; (b) 藻胆体核; (c) 在类囊体膜上 APC 的排列

Fig. 1 Structure of core of phycobilisome

(a) The structure of phycobilisome; (b) The structure of core of PBS; (c) The structure of two APCs binding on TM

式分别为



4 种藻胆蛋白的瞬态荧光光谱实验装置如图 2 所示。瞬态荧光光谱的测量是采用主动锁模 Nd:YAG 激光器同步泵浦的腔倒空染料激光器为激发源, 染料激光脉宽为 5 ps。样品所发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 计算机中。由于实验中条纹照相机所探测的时间分辨荧光包含了激发脉冲宽度和仪器响应函数, 本文联立(1), (2) 两式采用 Monte-Carlo 方法对最佳解进行搜索的方法, 实现解卷积处理和对荧光信号作多指数拟合。

$$F(t) = \sum f_i \exp(-t_i/\tau_i) \quad (1)$$

其中, $F(t)$ 由下式解得

$$F_m(t) = \int E_x(t) * F(t - t') dt' \quad (2)$$

其中 $E_x(t)$ 为仪器对激发脉冲的时间响应函数; $F(t - t')$ 为样品所发的荧光时间函数; $F_m(t)$ 为实验室探测到的荧光信号的时间函数。

图 2 的实验装置除可以提供瞬态荧光光谱结果外, 还可以提供稳态荧光光谱结果。4 种别藻蓝蛋白的稳态吸收光谱由 UV240 分光光度计测量。

3 结果和讨论

3.1 稳态光谱

图 3 为 4 种别藻蓝蛋白的吸收光谱。图 4 为 4 种别藻蓝蛋白的稳态荧光光谱。

3.2 瞬态荧光光谱及其时间解叠结果

实验获得的 4 种 APC 的荧光衰减曲线列入图 5, 采用 Monte-Carlo 方法对实验所获得的衰减曲线进行拟合所得各种 APC 的寿命列于表 1, 其中 τ 表示解迭的荧光寿命, A 是指前因子, 表示该寿命的相对发光强度, 正的指前因子表示衰减过程, 负的指前因子表示上升过程。

3.3 讨论

从图 4 可以看出 APC I 瞬态荧光有两个带, 其中第一个带位于 662 nm, 该谱带荧光衰减过程经 Monte-Carlo 方法进行逼近搜索获得的最佳结果显示该荧光衰减过程有两个组分, 分别

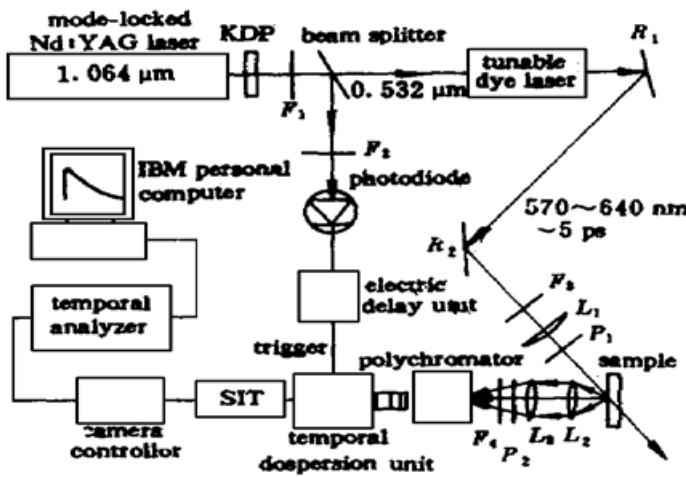


图2 仪器装置图

$F_1 \sim F_4$: 滤光片; R_1, R_2 : 反光镜; $L_1 \sim L_3$: 透镜; P_1, P_2 : 偏振器

Fig. 2 Diagram of set-up

$F_1 \sim F_4$: filters; R_1 and R_2 : beam reflectors;

$L_1 \sim L_3$: lens; P_1 and P_2 : polarizers

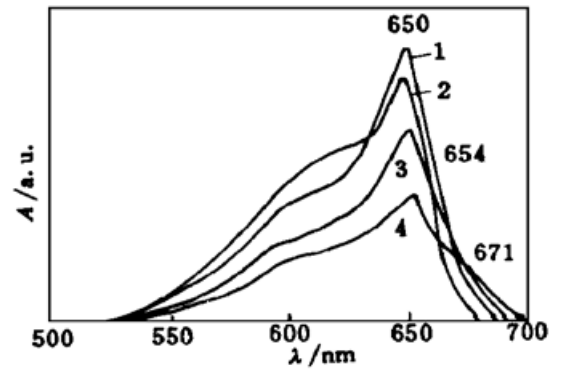


图3 4种APC的吸收光谱

Fig. 3 The absorption spectra of four kinds of APCs

1: APC⁻; 2: APC⁻; 3: APC⁻; 4: APCB

表1 4种APC的寿命解叠结果

Table 1 The deconvolution results of APC life-times

phycobili protein	peak/nm	τ /ps	A /%	τ /ns	A /%	χ
APC ⁻	662	35.8	45.0	1.67	55.0	0.0024
APCB	662	36.6	29.2	1.45	70.8	0.0024
APC ⁻	680	34.2	- 12.1	1.64	112.1	0.0020
APCB	680	25.8	- 9.6	1.62	109.6	0.0020
APC ⁻	660	20.4	- 22.3	1.64	122.3	0.0018
APC ⁻	660	23.8	- 11.7	1.76	111.7	0.0017

注: τ_i 为荧光衰减寿命, A_i 为解叠所得的指前因子, χ 为相对标准偏差的平方。

Where τ_i is the lifetime of the i -th fluorescence component, A_i is the amplitude of the i -th component, χ is the square of relative standard deviation.

为 35.8 ps 和 1.67 ns, 指前因子分别为 0.45, 0.55, 即所有的荧光组分处于衰减过程; 第二个带位于 680 nm, 有两个时间组分: 34.2 ps 和 1.64 ns, 指前因子分别为 - 0.121 和 1.121; 其中短的组分处于上升过程, 这可以解释为 APCI 的 F660 的能量传递到了 F680, 能量传递的时间约为 35 ps 左右, 是一个较快的分子内能量传递过程。

类似地, APCB 瞬态荧光也有两个带, 其中第一个带位于 662 nm, 有两个时间组分: 36.6 ps 和 1.45 ns, 指前因子分别为 0.292 和 0.708; 第二个带位于 680 nm, 有两个时间组分: 25.8 ps 和 1.62 ns, 指前因子分别为 - 0.096 和 1.096, 其中寿命为 25.8 ps 的组分的指前因子为负, 表明能量从 APCB 的 F660 传递到了 F680, 能量传递时间为 30 ps 左右。

从 APCI 的稳态吸收光谱(图3)和 APCII 的稳态荧光光谱(图4)可以看出, 其光谱的重叠系数很大, 满足能量高效传递的条件。

另外, 从吸收谱来看, APCII 和 APCIII 的吸收最大在 650 nm 处, 与 C-PC 的荧光光谱重叠系数很大, 即能量可以从 C-PC 传递到 APC⁻ 和 APC⁻; APC⁻ 及 APCB 的吸收最大值分别在

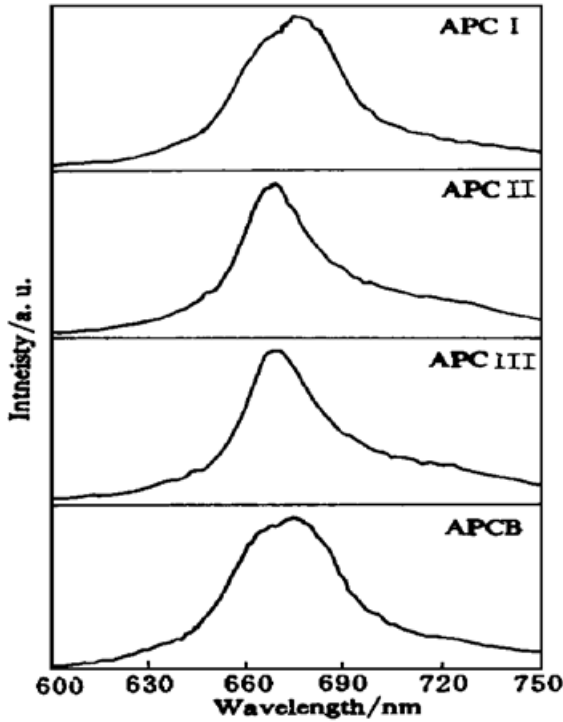
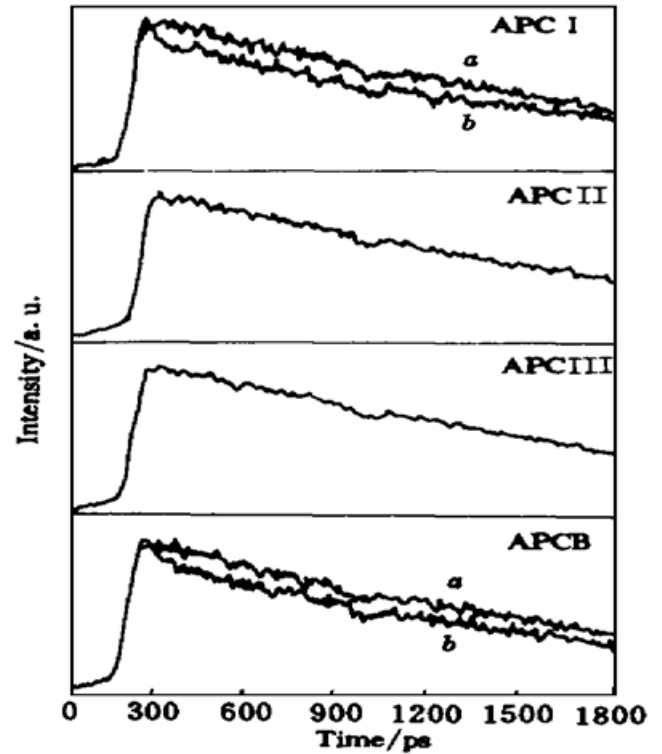


图 4 4 种 APC 的荧光光谱

Fig. 4 The fluorescence spectra of four APCs

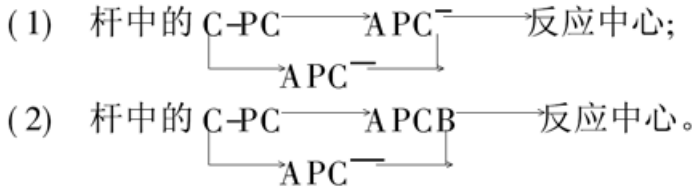
图 5 4 种 APC 的瞬态衰减曲线, *a* 表示 662 nm 处的衰减; *b* 表示 680 nm 处的衰减Fig. 5 The transient decays of four APCs. Curve *a* is for the decay at 662 nm while *b* for 680 nm

654 nm 和 655 nm^[9], 与 C-PC 的荧光发射谱重叠也相当大, 依照 Forster 偶极-偶极相互作用理论, 能量从 C-PC 传递到 APC⁻及 APCB 的几率也是不可忽视的。由于藻胆体的杆状结构通过连接蛋白紧密地连接在核上, C-PC 杆与 APC 杆相互垂直, 所以能量由 C-PC 传递至 APC⁻和 APCB 是可几的、有效的。这样, 藻胆体中能量传递即是从藻红蛋白经藻蓝蛋白将能量传递给别藻蓝蛋白 APC⁻和 APC⁻, 再由这两种蛋白将能量传递给 APC⁻和 APCB; 同时还应有一部分能量直接由 C-PC 传递给 APC⁻或 APCB。我们对藻胆体的杆核复合物的瞬态光谱研究得到与此一致的结论, 即杆核复合物瞬态光谱也说明藻胆体核中能量传递有两个途径和两个终端^[10]。在核中, APC⁻和 APC⁻是核中能量传递的中间受体, APC⁻和 APCB 是藻胆体的能量传递过程的终端受体。终端受体的能量有两个来源: 一个是 C-PC 将能量传递给 APC⁻和 APC⁻, 再经过 APC⁻与 APC⁻及 APC⁻与 APCB 的相互作用分别传递至 APC⁻和 APCB; 另一个是 C-PC 直接与 APC⁻和 APCB 发生作用将能量传递给 APC⁻和 APCB。APC⁻和 APCB 接受能量以后即成为进一步能量传递过程的给体, 它们分别将能量经过类囊体膜传递给光合反应中心。

4 结 论

本文对螺旋藻的 4 种别藻蓝蛋白的荧光发射特性进行了系统的测量和分析, 对皮秒荧光光谱数据采用 Monte-Carlo 方法进行了多指数拟合, 拟合结果表明 4 种 APC 的荧光组分都含有一个短时间组分, 且在 APC⁻和 APCB 内分别存在分子内不同发色基的能量传递过程; 结合稳态光谱研究得出 C-PC 与 APC⁻及 C-PC 与 APCB 的能量传递也是可几的, 并给出了藻胆体

核中的能量传递路径如下:



参 考 文 献

- 1 Alexander N. Glazer. Light Guides. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**(1) : 1~ 4
- 2 Alfred R. Holzwarth. Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliproteins antennae. *Physiol. Plant*, 1991, **83** : 518~ 528
- 3 Warren F. Beck, Kenneth Sauer. Energy-transfer and exciton-state relaxation process in allophycocyanin. *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**(11) : 4658
- 4 A. V. Sharkov, I. V. Kryukov, E. V. Khoroshilov *et al.*. Femtosecond energy transfer between chromophores in allophycocyanin trimers. *Chem. Phys. Lett.*, 1992, **191**(6) : 633~ 638
- 5 Andrei V. Sharkov, Igor V. Kryukov, Eugeny V. Khoroshilov *et al.*. Femtosecond spectral and anisotropy study of excitation energy transfer between neighbouring α -80 and β -81 chromophores of allophycocyanin trimers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **1188** : 349~ 356
- 6 Katjusa Brejc, Ralf Ficner, Robert Huber *et al.*. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium spirulina platensis at 0.23 nm resolution. *J. Mol. Biol.*, 1995, **249** : 424~ 440
- 7 Maurice D. Edington, Ruth E. Riter, Warren F. Beck. Interexciton-state relaxation and exciton localization in allophycocyanin trimers. *J. Phys. Chem.*, 1996, **100** : 14206~ 14217
- 8 Maurice D. Edington, Ruth E. Riter, Warren F. Beck. Evidence for coherent energy transfer in allophycocyanin trimers. *J. Phys. Chem.*, 1995, **99** : 15699~ 15704
- 9 Wang Hui, Zhao Jingquan, Zhang Jianping *et al.*. Structure-function relationship and energy transfer in allophycocyanin core of spirulina platensis. *Acta Biophysica Sinica* (生物物理学报), 1996, **12**(3) : 394~ 400 (in Chinese)
- 10 Zhao Fuli, Zheng Xiguang, Wang Hezhou *et al.*. Studies on the paths of energy transfer in the rod-core complex of phycobilisome. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatschi* (中山大学学报-自然科学版), 1997, **36**(6) : 62~ 66 (in Chinese)

Study on the Time-resolved Fluorescence Spectroscopy of Four Kinds of Allophycocyanin Trimers

Zhao Fuli Zheng Xiguang Wang Hezhou Yu Zhenxin Gao Zhaolan
(Institute for Laser and Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Wang Hui Zhao Jingquan Jiang Lijin

(Institute of Photochemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract The time-resolved fluorescence spectra and steady-state spectra of four kinds of APCs have been studied. The data have been analyzed in terms of a sum of exponentials by Monte-Carlo method. The results show that two bands appear in API and APB fluorescence spectra at 662 nm and 680 nm with different lifetimes (662 nm APC $^{-}$: 35.8 ps, 1.67 ns; APB: 36.6 ps, 1.45 ns; 680 nm APC $^{-}$: 34.2 ps, 1.64 ns, and APB: 25.8 ps, 1.62 ns); while for APC $^{-}$ and APC $^{-}$, only one peak exists at 660 nm with different lifetimes (APCII: 20.4 ps, 1.64 ns; APC $^{-}$: 23.8 ps, 1.76 ns). The results indicate that there are two paths of energy transfer in core of PBS and imply the ultrafast energy transfer processes of the APCI and APCB trimers.

Key words PBS (phycobilisome), APC (Allophycocyanin) transient-fluorescence, life-time, absorption spectroscopy, dipole-dipole interaction