科 学 通 报
第42卷 第9期 Chinese Science Bulletin 1997年5月

【研究简报】

多变鱼腥藻藻胆体内杆-核复合物的分离与表征

张景民 赵井泉 谢 洁 张建平 蒋丽金*
(中国科学院感光化学研究所,北京 100101. * 联系人)

关键词 多变鱼腥藻 杆-核复合物 模型 能量传递

与其他大多数蓝藻(Cyancbacteria)一样,多变鱼腥藻内藻胆体的形状也呈半圆盘型. 构成藻胆体的藻胆蛋白(Phycobiliproteins)为藻红蓝蛋白(PEC)、C-藻蓝蛋白(C-PC)和变藻蓝蛋白(APC),其能量传递按 PEC→C-PC→APC 的顺序进行[1]. 尽管已利用各种光谱技术对藻胆蛋白、藻胆体和活藻进行了比较详细 的研究,而且,C-PC,PEC 和 APC 的高分辨率晶体结构也已确定[2~4],但两种蛋白之间的联系仍不清楚,特别是能量如何由杆的末端传递进核成为目前研究中的关键问题,因为关于藻胆体的关键结构部分,即杆-核复合物的结构,即尚未得知,所以,本研究工作对完善藻胆体工作模型具有重大意义. 我们利用柱层析技术分离得到杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$,通过光谱技术、电泳方法对之进行表征,并提出该复合物的结构模型,为进一步研究其功能奠定了物质基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

多变鱼腥藻(*A. variabilis*)(自养);DEAE-cellulose DE 52(Whatman); Sephadex G-200 (200~400 mesh)(Sweden); 羟基磷灰石(自己合成);对-甲基苯磺酰氟(PMSF)(Merck); Pharmacia 成套的凝胶过滤高分子量标准蛋白和成套电泳低分子量标准蛋白;其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$的分离

为了分离该复合物,首先根据 Maruthi Sai 等人[5]报道的方法从 *A. variabilis* 藻分离出完整的藻胆体,然后将其置于 5 mmol/LK_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液(pH=7.0)(含 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L EDTA 和 1 mmol/LNaN_3)透析 24 h(4℃)使之解离,解离后的藻胆体上 DEAE-Cellulose DE 52 柱(3.0 cm×34 cm),用线性梯度(5~205 mmol/L)磷酸盐缓冲液(pH=7.0)进行淋洗(流速 1 mL/min). 将第三个流份(含 C-PC, APC, L_{RC}^{27}和 $L_C^{8.9}$)于 700 mmol/L磷酸盐缓冲液中(pH=7.0)透析,用 Sephadex G-150 柱(3.0cm×120 cm)纯化,其中第二个流份即为纯$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$复合物.

1.3 分子量的测定方法

1.3.1 凝胶色谱法 我们利用凝胶 Sephadex G-200(1.2 cm×100 cm)柱层析的方法对所分离的杆-核复合物的分子量进行测定. 取该复合物 0.5 mL(2 mg/mL)上 G-200 柱,用 700 mmol/LK_2HPO_4-NaH_2PO_4(pH=7.2)缓冲液进行淋洗(流速 6 mL/h),再用成套凝胶过滤高分子量标准蛋白(Pharmacia)定标.

1.3.2 SDS-凝胶电泳法 用改进的 Laemmli 方法和低分子量标准蛋白进行 SDS-PAGE 测定. 样品(杆-核复合物、C-PC 和 APC 蛋白)用 0.2% SDS 的样品液处理并将其在 100℃的水

中煮 10 min. 用岛津 CS-900 薄层色谱扫描仪(λ_{600})对经考马斯亮蓝染色后的样品进行扫描，从而可以求出他们的分子量和相对组成.

1.4 杆-核复合物的光谱表征方法

吸收光谱是在岛津 UV-1600 分光光度计(日本岛津公司)仪器上测定，荧光发射谱是在日立 F-4000 荧光分光光度计上测定，测量时样品的吸光度(最大吸收)调至 0.1 左右，以避免荧光再吸收.

2 结果与讨论

2.1 杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$的组成表征

为了证实该物质是杆-核复合物而不是其他，将所分离的该复合物再置于 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)透析使之解离，上羟基磷灰石柱(1.0 cm×3.0 cm)进行分离，结果分离出两个组分，前一个组分的最大吸收峰和最大发射峰均与 Yu 等人[6]分离出的$(\alpha\beta)_3^{PC}L_{RC}^{27}$光谱相同，表明该杆-核复合物含有$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}$成分；第二个组分的最大吸收峰和最大发射峰变藻蓝复合物$(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$的光谱相一致(见光谱表征部分). 这说明我们分离得到的复合物包含C-PC和 APC 两种藻胆蛋白. 为了进一步证实核杆-核复合物的组成，我们又将从羟基磷灰石上流出的两个组分等量地混和在一起并置于 700 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=8.0)透析，使之重新组合成杆-核复合物，用超速离心机进行蔗糖密度梯度(3% ~ 13%)离心(Backmen rotor Ti-70 35 000 r/min)发现在离心管的下部又形成了一种蓝绿带该物质的吸收峰和发射峰均与从 Sephadex G-200 柱上的第二个流分一致，这说明我们得到的复合物是杆-核复合物.

2.2 杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$光谱表征

杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$和组成该复合物的$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}$、$(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$的吸收光谱和发射光谱见图 1. 从图 1 可知，杆-核复合物的最大峰吸收位于 640 nm，荧光发射最大峰在 658 nm(见图 1)，该复合物的吸收光谱与荧光发射谱比 Glauser 等人[7]从 *M. laminosus* 藻所分离的杆-核复合物的光谱均红移几个纳米，这可能是由于组成 *A. variabilis* 藻藻胆体杆-核复合物的 C-藻蓝复合物(杆复合物)$(\alpha\beta)_3^{PC}L_{RC}^{27}$吸收光谱和发射光谱比 *M. laminosus* 藻藻胆体的杆复合物$(\alpha\beta)_3{}^{PC}L_{RC}{}^{29.5}$的光谱($\lambda_{max}^{A}=634$ nm；$\lambda_{max}^{F}=648$ nm)均长几个纳米的缘故，因为组成两种藻藻胆体杆-核复合物的变藻蓝蛋白的结构和光谱均相同，所以造成两种藻的杆-核复合物光谱差异只能是由于组成杆复合物的连接蛋白不同所造成的. 从图 1中还可以得知，在 675～680 nm 波长范围内没有荧光发射峰出现，表明该复合物内不存在变藻蓝蛋白 API 和 APB 两个终端发射组分. 值得提及的是，由于连接蛋白 L_{RC}^{27}的存在使得 C-PC 三聚体$(\alpha\beta)_3$和六聚体$(\alpha\beta)_6$内的 β 亚基上的 β_{84}-PCB 发色团的 D-环与其残基(芳香)发生相互作用，使得复合物$(\alpha\beta)_3{}^{PC}L_{RC}^{27}$的光谱比无连结蛋白 C-PC 的三聚体$(\alpha\beta)_3$或六聚体$(\alpha\beta)_6$($\lambda_{max}^{A}=618$nm；$\lambda_{max}^{F}=643$ nm)发生较大红移，从而有利于能量由 C-PC 向 APC 传递[6].

2.3 杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$分子量的测定

我们用两种分子量测定方法对杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8.9}$进行分子量测定，用常规的 Sephadex G-200 凝胶过滤法(Pharmacia 成套高分子量标准蛋白作标志)测得其分子量为 335 ku(见图 2)；用不连续的 SDS-聚丙烯酰胺(15%)电泳(Pharmacia 成套低分子量电泳标准蛋白作标志)测得该复合物的分子量为 320 ku，且各组分含量比为$(\alpha^{PC}+\beta^{PC}):L_{RC}^{27}:(\alpha^{APC}+$

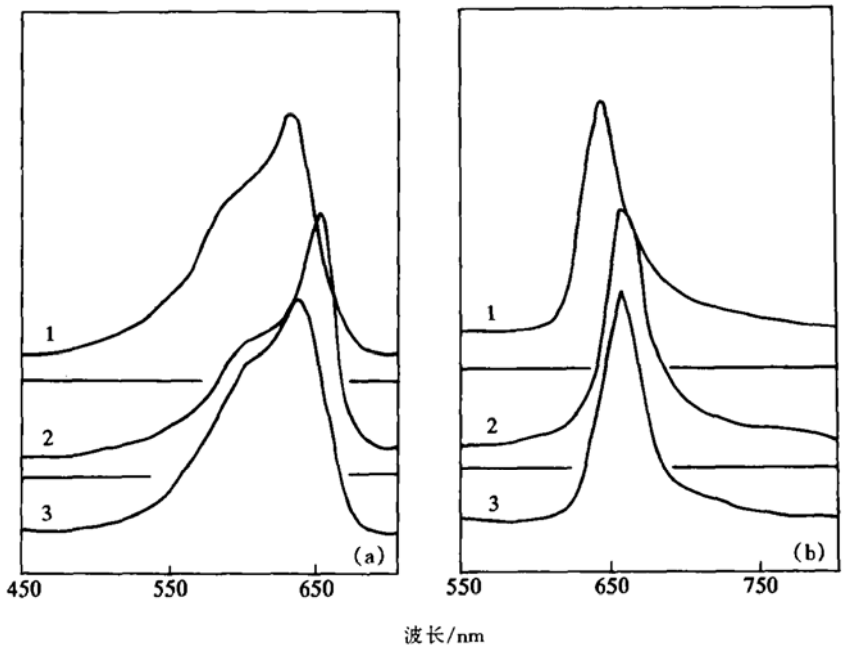


图 1　杆-核复合物及其 2 种亚复合物的吸收光谱与荧光发射谱

(a)吸收光谱；(b)荧光发射谱．1——$(\alpha\beta)_3^{PC}L_{RC}^{27}$，2——$(\alpha\beta)_3^{AP}L_C^{8,9}$，3——$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{AP}L_C^{8,9}$

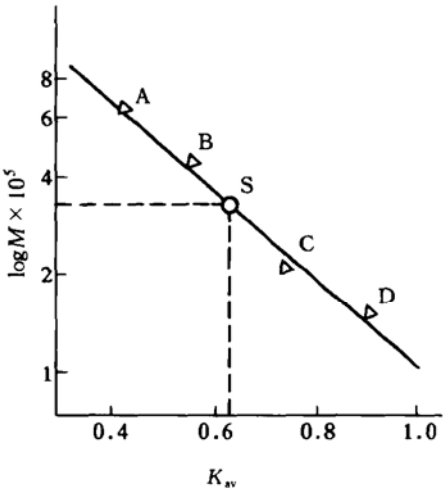


图 2　Sephadex G-200 凝胶过滤法测定分子量标准曲线

A——甲状腺球蛋白，B——马脾铁蛋白，C——过氧化氢酶，D——醛缩酶，S——杆-核复合物

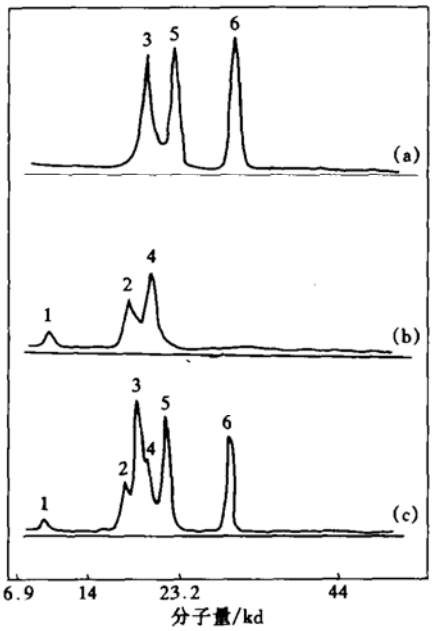


图 3　SDS-凝胶电泳(15%)薄层扫描图(经考马斯亮蓝染色，600 nm 波长扫描结果)

1——$L_C^{8,9}$，2——β^{AP}，3——α^{PC}，4——α^{AP}，5——β^{PC}，6——L_{RC}^{27}；(a)$(\alpha\beta)_3^{PC}L_{RC}^{27}$；(b)$(\alpha\beta)_3^{AP}L_C^{8,9}$；(c)$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{AP}L_C^{8,9}$

β^{APC})：$L_C^{8,9}$ = 6.4：1：2.9：0.9(见图 3)，这也证实我们得到的复合物的组成为$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}$ $(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8,9}$. 两种方法所测得分子量差异可能是由于测量方法的不同引起的，但总起来讲，所测得 *A. variabilis* 藻中 PBS 的杆-核复合物的分子量比 *M. laminosus* 藻的要低，这大概是由于杆与核之间的连接蛋白不同所致.

2.4 杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8,9}$的结构模型

根据大多数蓝藻的藻胆体(PBS)结构模型和 18-S 的结构模型及 C-PC 和 APC 的 X 射线晶体结构和光谱数据可以推断出杆-核复合物$(\alpha\beta)_6^{PC}L_{RC}^{27}(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8,9}$的结构模型(见图 4). 从图中可以看出 C-PC 盘$(\alpha\beta)_6$的中心与 APC 三聚体$(\alpha\beta)_3$的边缘进行连接的，根据计算机的模拟结果和时间分辨光谱测量的结果[8,9]，认为在该杆-核复合物中，激发能由 C-PC 向 APC 传递主要是通过 C-PC 盘$(\alpha\beta)_6$中的$4\beta_{84}$，$5\beta_{84}$和$6\beta_{84}$3 个 PCB 发色团来承担的，从光谱数据上来讲，该 3 个 PCB 发色团的荧光发射谱(λ_{max}^{F} = 651 nm)与 APC 复合物$(\alpha\beta)_3^{APC}L_C^{8,9}$的吸收光谱有着较大的重叠，满足于能量传递进行的条件；从结构上看，该 3 个 PCB 发色团位于 C-PC 盘$(\alpha\beta)_6$的底端(靠近 APC 三聚体)，从而在结构上有利于能量传递的进行. 基于上述讨论，则有可能通过利用时间分辨光谱技术来测定能量由 C-PC 的β_{84}-PCB 发色团向 APC 内α_{84}-PCB 发色团的时间常数，并有可能为进一步了解能量在 PBS 内传递机理提供可靠的实验基础.

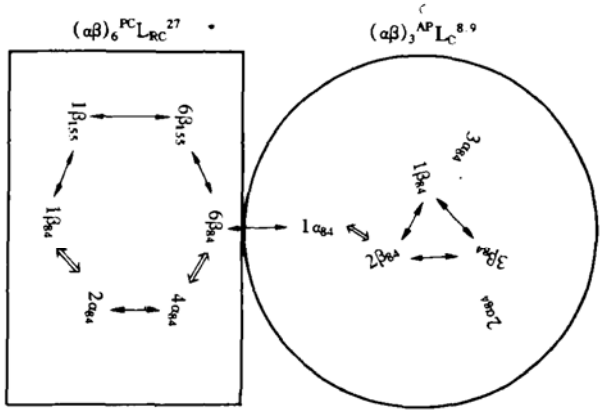


图 4 杆-核复合物结构与工作模型

↔：ps，⇔：fs

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号：39670056)资助项目.

参 考 文 献

1 Glazer A N. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. J Biol Chem, 1989, 264: 1～4

2 Schirmer T, Bode W, Huber H. Refined three-dimensional structure of two cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 Å and 2.5 Å resolution. J Mol Biol, 1987, 196: 677～695

3 Duerring M, Huber H, Bode W, et al. Refined three-dimensional structure of phycc rythrocyanin from the cyanobacterium masigocladus laminosus at 2.7 Å. J Mol Biol, 1990, 211: 633～644

4 Brejc K, Ficner R, Huber H, et al. Isolation, crystallization, crystal structure analysis a ' refinement of allophycocyanin from the cyanobaterium spirulina platensis at 2.3 Å resolution. J Mol Biol, 1995, 249: 424～440

5 Maruthi Sai P S, Siebzehnrubl S, Mahajan S, et al. Phycoerythrocyanins from westiellopsid prolifica and notroc rigulare: characterization of the phycoviolobilin chromophore in both states. Photochem Photobiol, 1992, 55: 119～124

6 Yu M H, Glazer A N, Williams R C. Cyanobacterial phycobilisome: phycocyanin assembly in the rod substructure of anabaena variabilis phycobilisome. J Biol Chem, 1981, 256: 13 130～13 136

7 Glauser M, Sidler W, Zuber H. Isolation, characterization and reconstitution of phycobiliprotein rod-core linker polypeptide complex from the phycobilisome of mastigcladus laminosus. Photochem and Photobiol, 1993, 57: 344～351

8 Sandstrom A, Gillbro T, Sandstrom V, et al. Picosecond study of energy transfer within 18-S particles of AN 112 (a mutant

科 学 通 报
第 42 卷 第 9 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 5 月

【研究简报】

甲基亚硝基哌嗪第二活性区与 DNA 碱基烷化反应机理的 MNDO 研究

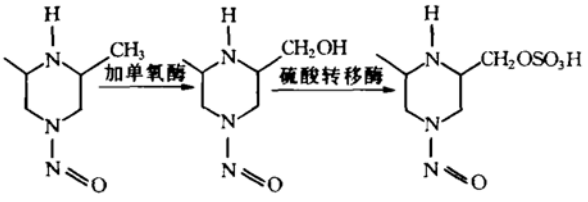
钟儒刚 戴乾圜
(北京工业大学癌化学与生物工程中心，北京 100022)

关键词 亚硝基 嗪哌烷化反应机理 双区理论 MNDO

N-亚硝基化合物(NNC)在 α-羟基化后生成重氮化物而与 DNA 结合发挥致癌作用是一已经被普遍接受的概念. 但是仅用 α-位的活性却在定性和定量两个方面均解释不了 NNC 的复杂的结构与致癌活性关系[1]. 越来越多的试验证据表明非 α-位的代谢活化在 NNC 致癌机理中具有不可忽视的作用[2]. 我们曾对 153 种 NNC 的结构与致癌活性关系进行了定量模式辨认研究，结果表明：在 NNC 分子上经代谢产生两个亲电活性中心是形成最终致癌物的必要条件；并且，在 α-位的第一活性中心与非 α-位的第二活性中心之间的最适作用距离约为 280 pm；从而证明了 NNC 致癌作用符合于“双区理论”[3]. 根据双区理论，我们还探讨了 N-亚硝基化合物中 N-N 键旋转能障与其致癌性的关系[4]. 对于甲基取代的亚硝基哌嗪及有类似结构的化合物比其母体化合物的致癌性有显著增强的现象，我们提出了：环上杂原子的邻基参与作用提高了甲基代谢产物的活性，形成第二亲电活性中心是重要影响因素的观点；这一观点在分析结构参数时发挥了巨大作用. 由于确定这一邻基参与作用的机制对于深入探讨 NNC 致癌机理具有重要意义，本文采用 MNDO 方法对具代表性的化合物，3,5-二甲基亚硝基哌嗪的甲基代谢活化产物与 DNA 碱基的反应机理进行了研究.

1 计算

3,5′-甲基-N-亚硝基哌嗪(Ⅰ)的甲基碳原子在加单氧酶作用后，再经第二相生物转化反应形成葡萄糖醛酸苷或硫酸酯等，见图 1. 因为硫酸根是电负性较强的离去集团. 因此硫酸酯化后该甲基成为一个亲电活性中心. 我们以硫酸酯(Ⅱ)为模型研究在该活性中心上发生的对 DNA 碱基的烷化反应机理. 因为硫酸根是好的离去集团，所以我们除了计算(Ⅱ)与碱基作用的 S_N2 历程和邻基参与历程的活化能以外，也考虑了(Ⅱ)经 S_N1 历程与碱基作



(Ⅰ) (Ⅱ)

图 1 3,5′-二甲基-N-亚硝基哌嗪上甲基硫酸酯化代谢过程

of synechococcus 6301) phycobilisomes. BBA, 1988, 933: 54～64
9 Zhao Jingquan, Zhu Jinchang, Jiang Lijin. Study on the energy transfer processes in phycobilisome from blue-green algae by the use of stochastic simulation approach. BBA, 1995, 1229: 39～48

(1996-09-03 收稿，1997-01-07 收修改稿)