没有被逐出, 而是被更深入地包结, 邻甲苯硒基修饰 β-环糊精的构型最适合正庚醇客体分子的进入, 可能产生强的 C—H/π超共轭效应, 给出最有力的包结和最高的分子选择性, 对于正庚醇/正戊醇的分子选择性高达 287. 这些结果表明, 主客体间的几何互补和诱导楔合对于超分子体系的稳定性起着关键作用.

致谢 本工作为国家杰出青年科学基金(批准号: 29625203)、国家教委跨世纪优秀人才基金(教技司[1995]4号)、国家自然科学基金和天津市自然科学基金(批准号: 29672021 和 973602211)资助项目.

参 考 文 献

1 Rekharsky M Y, Goldberg R N, Schwarz F P, et al. Thermodynamic and nuclear magnetic resonance study of the interactions of α_ and β_cyclodextrin with model substances: phenethylamine, ephedrines, and related substances. J Am Chem Soc, 1995, 117(34): 8 830
2 Matsui K A, Mortellaro M A, Sweger R W, et al. Preassociating α-nucleophiles based on β-cyclodextrin. Their synthesis and reactivity. J Am Chem Soc, 1995, 117(34): 10 443
3 Liu Y, Li B, Han B-H, et al. Enantioselective recognition of amino acids by β-cyclodextrin_6_O-monophosphates. J Chem Soc, Perkin Trans, 2, 1997(7): 1 273
4 Liu Y, Zhang Y M, Qi A D, et al. Molecular recognition study on supramolecular system. 10. inclusion complexation of modified β-cyclodextrins with amino acids: enhanced enantioselectivity for L/D-Leucine. J Org Chem, 1997, 62(6): 1 826
5 Matsui Y, Nochida, K. Binding forces contributing to the association of cyclodextrin with alcohol in aqueous solution. Bull Chem Soc Jpn, 1979, 52(10): 2 808
6 Liu Y, Han B H, Li B, et al. Molecular recognition study on supramolecular system. 14. synthesis of modified cyclodextrins and their inclusion complexation thermodynamics with L_tryptophan and some naphthalene derivatives: verified enthalpy_entropy compensation effect. J Org Chem, 1997
7 Ikeda H, Nakamara M, Ise N, et al. Fluorescent cyclodextrins for molecule sensing: fluorescent properties, NMR characterization, and inclusion phenomena of *N*-dansylleucine-modified cyclodextrins. J Am Chem Soc, 1996, 118(35): 10 980

(1997-07-29 收稿, 1997-12-20 收修改稿)

多变鱼腥藻胆体模型复合物结构与功能的研究

王 慧* 赵井泉 蒋丽金
(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101. * 现地址: 清华大学环境工程系水污染控制国家重点试验室, 北京 100084)

摘要 利用多变鱼腥藻藻胆体中的藻红蓝蛋白、藻蓝蛋白、变藻蓝蛋白及其相关的连接多肽重组成具有捕光、唯一发射终端和完整的能量传递的藻胆体模型复合物 PEC/PC/APC, 此三元复合物的最大吸收为 602 nm, 在室温和 – 196 ℃下的荧光发射峰分别在 668 和 680 nm 处(λ_{ex} = 530 nm), 分子量为 700 000 u, 激发能在复合物内进行了完整而高效的传递, 并且通过对复合物的解离和重组过程的研究讨论了结构与能量传递的关系.

关键词 **多变鱼腥藻 藻胆体模型 PEC/PC/APC 复合物 能量传递**

藻类和高等植物的光合器很相似, 都具有能量转换和物质转换的功能. 然而, 在大多数红

藻和蓝藻的类囊体膜上附着了一种由藻胆蛋白构成的超分子复合物——藻胆体(PBS),藻胆体的吸收几乎遍及整个可见光谱范围,恰好可以弥补叶绿素 a 吸收光谱的空白,并能将能量以极高的效率(> 90%)传递给光合反应中心.

目前大多数的藻胆蛋白和连接蛋白在 PBS 中的位置与作用已经通过基因诱变的方法得到证实,连接蛋白的存在也可以通过藻胆蛋白_连接蛋白复合物的分离、重组以及对与之相连藻胆蛋白光谱特性的影响来探明[1]. 但是,对于具有完整的捕光和终端发射功能的超分子复合物的分离重组以及能量传递的模式的研究至今尚未见报道. 利用超快速时间分辨荧光光谱研究 PBS 内的能量传递过程发现两个终端发射基团可能对应于两条能量传递途径[2],但这两条传能途径之间的相互关系,各组分间以及终端基团之间是否存在能量的水平传递还不清楚. 本文用多变鱼腥藻 PBS 中分离出的藻红蓝(PEC)、藻蓝(PC)和变藻蓝蛋白(APC)及其连接多肽重组成具有完整的捕光和终端发射基团及完整的能量传递功能的超分子复合物 PEC/PC/APC,使研究 PBS 内杆与核的连接方式、传能方式以及激发能在 PBS 内各组分之间的传递关系成为可能.

1 材料

多变鱼腥藻(*A. vriabilis*)的培养以及 PBS 的制备按文献[3]所述的方法. 将洗净的藻细胞悬浮在 KH_2PO_4_K_2HPO_4 缓冲液中(除特别指明,本文所用的缓冲液均含 1 mmol/L NaN_3; 1 mmol/L PMSF; 2 mmol/L EDTA; pH = 7.0),加入 Triton_100, 20℃搅拌 4 h,离心(21 000 r/min BeckmanTi_70rootor) 30 min,取上清液再离心(43 000r/min) 2.5 h,得到蓝色沉淀为 PBS.

(1) PEC/PC/APC 复合物的制备. 将 PBS 对 5 mmol/L 缓冲液透析 4 h 后上 DEAE_Cellulose 52 层析柱上(2.5 × 40 cm, 5 mmol/L 缓冲液平衡),用 5~ 200 mmol/L 缓冲液梯度洗脱,洗脱速度为 30 mL/h 收集到 5 个组分,其中第一、二组分分别含有 $(\alpha\beta)_6^{PEC}$, $L_R^{34.5}$, $L_C^{8.9}$ 和 PC, APC, L^{29}, $L_C^{8.9}$[4]. 将上面的两个组分浓缩后对 650 mmol/L 缓冲液透析, pH= 7.5, 然后上 Sepharose fast flow(650)层析柱(2.7 × 120 cm, 650 mmol/L 平衡)纯化,将得到的第二个组分 20℃下在 0.5~ 1.0 mmol/L 的不连续蔗糖溶液中离心(37 500 r/min) 18 h,收集 0.8~ 1.0 mol/L 一层的蓝带备用.

(2) PEC/PC/APC 复合物的相对组成. 采用分子排阻色谱法将重组得到的复合物在 Sephadex_G 200 柱(1.6 × 90 cm)上进行分子量测定. 用 650 mmol/L 的缓冲液洗脱,流速 9mL/h,用 Pharmacia 成套的凝胶层析分子量标准蛋白标记.

为了确定复合物的组成成分,我们将复合物对 5 mmol/L 的缓冲液透析 8 h 后先测定其解离后的光谱,然后将解离产物 DEAE_Cellulose 52 分离柱进行分离,对得到的几种组分进行光谱测定,对照文献[4]的光谱数据确定复合物的相对组成.

2 方法

所有的吸收光谱是在岛津 UV_1600 分光光度计上测定,样品的吸光度调至 0.8 左右,荧光光谱在日立 F_4000 荧光分光光度计上测定,样品的吸光度为 0.1,激发和发射部分的狭缝为 4 nm.

3 实验结果

3.1 PEC/PC/APC 的光谱特性

为了比较重组复合物与自然态 PBS 结构特性的不同, 我们测量了两者的吸收光谱及其二阶导数光谱. 从新鲜的多变鱼腥藻中分离出完整的 PBS 在 620 nm 处有最大吸收, 在580 nm 有一肩峰. 它的二阶导数谱在 576 nm (PEC), 610, 635 nm (PC) 和 594, 654 nm (APC) 出现肩峰 (图略), 复合物 PEC/PC/APC 的最大吸收在 602 nm, 并在 652 nm 处有一肩峰, 其二阶导数谱在 582, 617, 635, 594, 652 和 678 nm 有肩峰(图 1(a)), 617 和 635 nm 的肩峰是六聚态的 PC 与三聚态的 APC(带有连接蛋白 $L^{8.9}$) 通过 L^{29} 相连即: $(\alpha^{PC}\beta^{PC})_6L^{29}(\alpha^{AP}\beta^{AP})_3L^{8.9}$ 的特征峰[4], 678 nm 的肩峰表明此复合物含有终端发射 APB, 峰高和峰位置上的不同表明同样的 3 种蛋白在 PBS 和 PEC/PC/APC 内的结构和相互关系发生了变化, 但这并不影响激发能在藻胆蛋白之间的传递, 在常温下以 530 nm 的光激发 PEC, 得到 668 nm 的较宽的荧光峰, 在 – 196 ℃时测定, 荧光峰红移到680 nm处且极为尖锐(图 1(b)), 这不仅说明了复合物含有终端 APB, 同时也说明激发能已经以极高的效率从 PEC 传递给 PC, 再传递给 APB, 这说明复合物各部分组成匹配完美, 几乎可以与自然状态相媲美, 否则一般的混合物或连接不适当就不会有如此高的传能效率. 与 PBS 相比它在 650~ 660 nm 处的肩峰相对要高一些, 可能是少量的 APC 未与终端发射基团相连的原故.

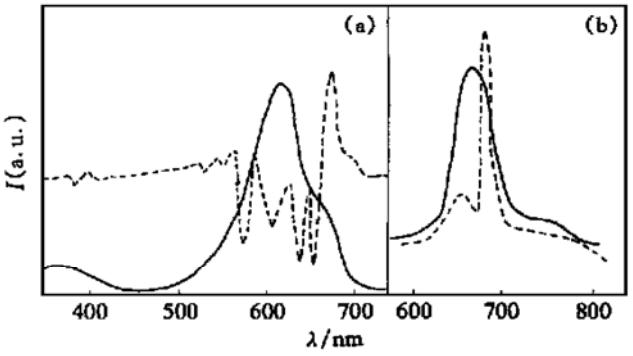

图 1

(a) 复合物 PEC/PC/APC 的吸收光谱(——)和二阶导数谱(– – –); (b) 荧光发射光谱: 室温(– – –), – 196 ℃(——)

3.2 PEC/PC/APC 的相对组成

根据公式 $K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o$, 用 Sephadex G_200 凝胶柱层析分子量标准蛋白和 PEC/PC/APC 复合物, 通过分子量标准蛋白的 K_{av} 值与分子量对数关系的标准曲线计算出复合物分子量为 700 000 u.

复合物在 4 ℃下保存一个月左右光谱没有变化, 用蒸馏水稀释, 其吸收和荧光光谱随时间的变化而变化(图 2). 随着透析时间的延长, 复合物解离程度加大, 各组分(PEC, PC 和 APC) 独自的光谱特征表现出来, 荧光峰也向短波方向移动. 图 3_1~ 3 是解离后的 PEC/PC/APC 上 DEAE_Cellulose 52 柱洗脱下来的各组分经纯化分离得到的 3 种复合物的光谱,

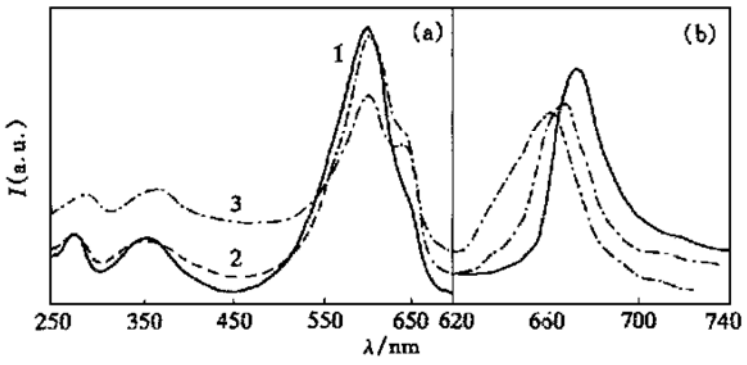

图 2 复合物在不同浓度条件下解聚后的吸收光谱(a)和荧光光谱(b)

1——0.5 h, 2——2 h, 3——4 h

图 3_1 的最大吸收和荧光峰分别在 582 和 634 nm, 它的成分是$(\alpha^{PEC}\beta^{PEC})_3$和连接多肽 $L^{34.5}$[4], 图 3_2 的最大吸收在 635 nm, 荧光发射峰位于 648 nm, 与文献[4]的$(\alpha^{PC}\beta^{PC})_3L^{29}$的吸收光谱一致. 图 3_3 的最大吸收在 650 nm, 在 620 nm 处有一肩峰, $A_{650}/A_{620} > 2.0$, 因此可能是$(\alpha^{PC}\beta^{PC})_3L^{8.9}$[3], 但室温下它的荧光发射峰达到 670 nm, 说明是一混合物, – 196 ℃下的荧光二阶导数谱在 662 和 678.5 nm 处有两个尖峰, 因此可以判断: 此复合物含有终端发射基团 APB. 我们选择这几种组分的目的就是为了组成具有独立结构和完整传能过程与功能的 PBS 模型复合物. 根据公式 $A = \varepsilon lc$, 我们可以得到上述几种组分的相对组成: PEC∶ PC∶ APC= 1∶ 1∶ 1.

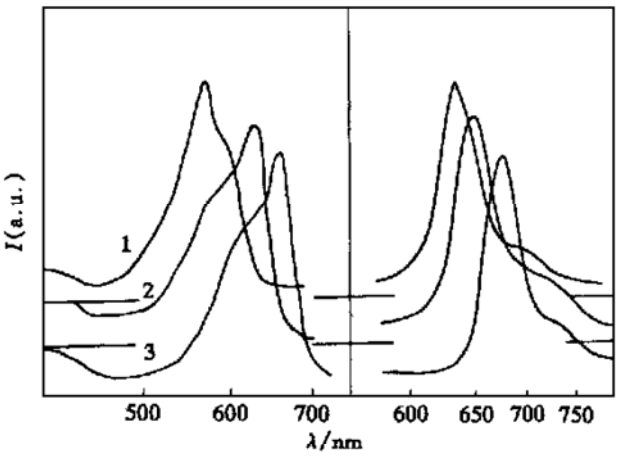

图 3　从 DEAE Cellulose_52 层析柱上洗脱下来的 3 种组分的吸收光谱和荧光光谱

1 ——$(\alpha\beta)_3^{PEC}L^{34.5}$, 2 ——$(\alpha\beta)_3^{PC}L^{29}$, 3 ——$(\alpha\beta)_3^{APC}L^{8.9}$

3.3　结构模型及其能量传递模式

目前, 能量在一 PBS 内部各组分间的传递模式仍然是个值得深入研究的问题. 利用 PS 级超快速时间分辨荧光光谱对 PBS 内能量传递的研究[5]已经发现 PBS 内有两条传能途径:

(1) $F_{650} \rightarrow F_{660} \rightarrow F_{673} \rightarrow F_{685}$;

(2) 另一条是 $F_{650} \rightarrow F_{664} \rightarrow F_{680}$. 我们得到的复合物是位于 PBS 的外端组分[6], 其可能的结构模型如图 4, 能量传递过程可能与两条传能途径均有关系, 而第二条路线则可能由 C_PC 的三聚体和 6 个 APC 三聚体两两面对面组成的 PC_AP_{CM} 来承担, AP_{CM} 的结构被确定为 $(\alpha^{*AP}\ \alpha_2^{AP}\beta_2^{*AP})_6\beta^{19.5AP}(L_{CM})_2$[6]. $L_C^{8.9}$ 在重组中出现表明它对 PBS 的稳定性有影响. 由 $L_C^{8.9}$连接的这两条传能途径之间的相互关系如何? 分属于两条路线的各种组分之间是否还有能量传递还不清楚. 超快速光谱对低温下(77K) PBS 内能量传递动力学的研究结果表明, 这两条传能途径都具有一定完整性, 两个终端发射基团之间是相对独立的[5]. Mimuro 等人的研究认为 L_{CM} 与 PS ㊦有紧密匹配关系[2], 那么, AP_{CM} 可能将激发能传递给 PS ㊦反应中心, 而且这将是 PBS 内能量传递的主要途径. 但最近 Reuter 等人在 AP_{CM} 的研究[6]中认为: 杆与核的最佳连接方式可能是由 C_PC 与 AP_{CM} 相连, 并将能量由 AP_{CM} 向 APC 核心的其他色团传递, 如果有足够的能量传递给处于 PBS 核外围的 APB 和 AP_{664}, AP_{CM} 与 APB 和 AP_{664}之间就可能发生能量的水平方向传递, 能量在两条传能途径以及两个终端发射之间将重

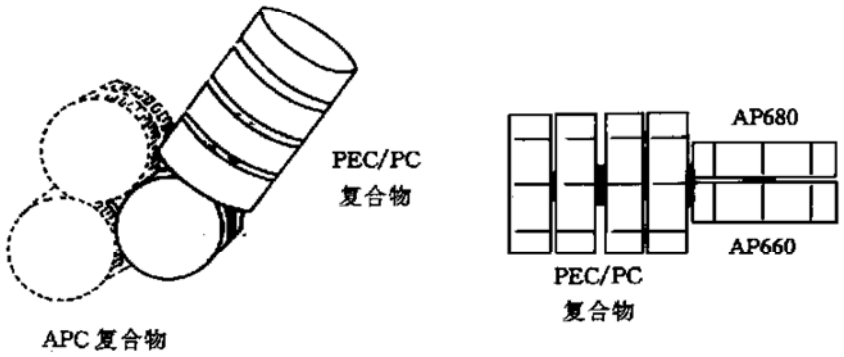

图 4　复合物 PEC/ PC/ APC 的结构示意图

新分配. 对于这些问题稳态光谱或者瞬态光谱对整体 PBS 传能的实时探测都是很难解释清楚的. 我们得到的复合物具有很高的稳定性和极高的传能效率, 从我们已经完成的复合物 ps 瞬态光谱可以形象地看到, 激发能在此复合物内传递的情况: 在 625 和 650 nm 得到两条极短的寿命正是激发能由杆(PEC 和 PC) 向核(APC) 高效传递的证明, 而在 680 nm 处的一个长寿命表明能量最终被 APB 以荧光的形式发射出去, 也说明这一复合物在结构和功能上都具有很高的合理性和完美的匹配性, 同时也说明杆与核的连接方式不是单一的, C_PC 直接与 AP_{664} 和与 AP_{CM} 相连在结构和功能上都是可能存在的. 在此结构的基础上利用超快速时间分辨光谱对复合物内各组分间传能过程与完整 PBS 内两条传能途径进行比较, 就可能使我们真正弄清 PBS 内能量的传递模式.

4 结论

本文利用多变鱼腥藻 PBS 中的 PEC, C_PC 和 APC 重组成具有捕光和唯一终端发射基团以及完整的能量传递的藻胆体模型复合物 PEC/ PC/ APC, 这一三元复合物的最大吸收峰在 602 nm. 在室温和 – 196 ℃的条件下用 530 nm 的荧光激发藻红蓝蛋白, 分别得到 668 和 680 nm的荧光发射峰, 激发能在这种结构特殊的复合物内进行了完整而高效的传递. 复合物的分子量为 700 000 u. 并讨论了复合物的结构特性和能量传递过程, 使研究 PBS 内杆与核的连接方式以及激发能在 PBS 内各组分之间的传递模式成为可能.

致谢 国家自然科学基金(批准号: 39670065) 资助项目.

参 考 文 献

1 Gottschalk L, Fischer R, Lottspeich F, et al. Origin of the red shifted absorption in phycocyanin 632 from Mastigoladus laminosus. Photochemistry and Photobiology, 1991, 54(2): 283~ 288

2 Mimuro M, Lipschultz C, Gantt E. Energy flow in the phycobilisome core of Nostoc sp. (MAC): two independent terminal pigments. Biochim Biophys Acta, 1988, 852: 126~ 132

3 王 慧, 赵井泉, 张建平, 等. 螺旋藻藻胆体核心复合物结构和功能的研究: 四种不同变藻蓝蛋白的分离及光谱表征. 生物物理学报, 1996, 12(3): 394~ 399

4 Glauzer M, Sidler W, Zuber H. Isolation, characterization and reconstitution of phycobiliprotein rod_core linker polipeptide complexes from the phycobilisome of Mastigocladus laminosus. Photochemistry and Photobiology, 1993, 57(2): 344~ 351

5 Mimuro M, Yamazaki I, Tamail N, et al. Excitation energy transfer in phycobilisomes at – 196 ℃ isolated from the Cyanobacterium Anabaena variabilis (M_3): evidence for the plural transfer pathways to the terminal emitters. Biochimica Biophysica Acta, 1989, 937: 153~ 162

6 Reuter W, Wehrmeyer W. Core substructure in Mastigocladus laminosus phycobilisomes ㊀ The central part of the tricylindrical core_AP_{CM}_contains the "anchor" polypeptide and no allophycocyanin B. Arch Microbiology, 1990, 153: 111~ 117

(1997-03-27 收稿, 1997-10-15 收修改稿)