科学通报 2017 年 第 62 卷 第 16 期: 1699 ~ 1713
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

重组别藻蓝蛋白三聚体结构与功能

李文军[1,3†], 蒲洋[2†], 牛壮[2], 薛春岭[2], 秦松[1*]

1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003;
2. 鲁东大学农学院, 烟台 264025;
3. 中国科学院大学, 北京 100049

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: cpra_yic@sina.com

2016-12-26 收稿, 2017-03-13 修回, 2017-03-13 接受, 2017-05-02 网络版发表

中国科学院科技服务网络计划(STS 计划)(KFJ-EW-STS-074)、中国科学院战略先导专项(B 类)(XDB03030100)、国家自然科学基金重大项目(41190081)和“第三极环境(TPE)”国际计划资助

摘要 以基因重组别藻蓝蛋白三聚体为材料, 利用原子力显微镜观察到了单分子重组别藻蓝蛋白三聚体的纳米级分辨率的三维图像(短轴约为1.5 nm, 长轴约为15 nm的盘状颗粒), 与通过透射电子显微镜和X射线晶体衍射得到的天然APC三聚体的圆盘状结构的尺寸十分接近. 通过测量荧光发射光谱、吸光光谱和圆二色光谱, 对自组装重组别藻蓝蛋白三聚体的正确组装进行了证实. 获得了较宽pH范围内的紫外光区(190~250 nm)和可见光区(450~750 nm)圆二色谱数据, 通过紫外光区圆二色谱解析, 确定了α螺旋是重组别藻蓝蛋白三聚体二级结构的主要组成部分. 可见光区圆二色谱解析为别藻蓝蛋白三聚体中存在藻蓝胆素激子耦合对, 以及耦合体内以激子分裂进行能量传递提供了证据. 本文结果进一步证实, 与天然别藻蓝蛋白三聚体相比较, 基因重组别藻蓝蛋白三聚体有正确的能量传递功能.

关键词 重组别藻蓝蛋白三聚体, 激子耦合对, 吸收光谱, 荧光光谱, 圆二色谱, 构象稳定性

太阳能是最丰富的可持续能源. 亿万年以来, 大自然一直致力于开发和优化绿色植物、藻类、光合细菌和蓝藻参与的光合作用. 经过亿万年的进化, 蓝藻和红藻中的藻胆蛋白体系(即藻胆体)是两大主要的太阳能捕获体系之一. 藻胆体主要由核心部分和外周部分组成, 其中核心部分包括核膜连接蛋白(Lcm), 别藻蓝蛋白B(allophycocyanin-B, AP-B)及别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC), 外周部分则包括藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)等[1]. APC三聚体作为藻胆体核的主要组成部分和能量传递基本功能单元, 在藻胆体能量传递过程中起到承上启下的作用, 是高效的光子传递通路, 在藻类光合作用中处于非常重要的位置. 虽然APC, PC, PE序列之间只存在大约25%~30%的序列一致性, 但是它们的三维结构高度相似, 但在自然条件下, 相对于PC和PE, APC的含量非常少. 来自于X射线晶体学研究结果和电子显微镜观察获得的高分辨率图像, 揭示了4种来源于蓝藻的天然APC三聚体的结构细节[2]. 对*Synechocystis* sp. PCC 6803的电子显微镜直接观察揭示了单个APC三聚体分子的结构细节. 与之前所观察到的其他种类蓝藻APC三聚体相似, 此结构为一个约12 nm长轴和3 nm短轴, 并且有一个约3 nm直径中心孔的扁平盘状结构[3]. 早期的实验表明, 在APC三聚体内部, 能量转移可能是以Förster能量共振机制从作为供体的αPCB^{84}传递到作为受体的βPCB^{84}. 但是, 近年来原子尺度的高分辨率APC三聚体晶体

引用格式: 李文军, 蒲洋, 牛壮, 等. 重组别藻蓝蛋白三聚体结构与功能. 科学通报, 2017, 62: 1699–1713
Li W J, Pu Y, Niu Z, et al. Structural and functional investigation of allophycocyanin trimer (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 1699–1713, doi: 10.1360/N972016-01416

© 2017《中国科学》杂志社

结构分析表明, 一些PCB色素对可能引起激子分裂和激发离域现象; 而距离为34 Å以上的PCB色素对之间可能会形成偶极-偶极相互作用. 因此, 短距离的激子耦合理论和作用距离较长的Förster能量共振传递理论两种非辐射能量传递理论, 都被用来解释APC内部的能量传递[4,5]. 而皮秒级和飞秒级时间分辨光谱以及结构生物学计算机模拟研究表明, APC三聚体的的分子间存在激子, 光子的能量在飞秒时间尺度上, 以令人难以置信的效率, 在色基对之间多次快速往返传递[6].

2010年, Liu等人[7]将来源于*Synechocystis* sp. PCC 6803的α亚基、β亚基的全长氨基酸、色基序列和整个APC的生物合成途径转化到大肠杆菌中表达, 获得了高度可溶、带有N末端组氨酸标签的基因重组别藻蓝蛋白(recombinant allophycocyanin, rAPC)三聚体, 并通过荧光量子产率以及水解多肽的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析推测, 通过大肠杆菌表达得到的rAPC三聚体具有与天然APC三聚体结构特性相似的藻胆蛋白高级结构. 这是在大肠杆菌体内重组APC α和β亚基并自组装成具有天然APC结构特性和光谱学特性三聚体的首次报道, 为进一步合成藻胆体迈出了关键一步, 但是由于没有获得rAPC三聚体晶体, 未能对其结构进行深入分析. 2014年, Peng等人[8]报道了来源于*Synechocystis* sp. PCC 6803的基因重组别藻蓝蛋白B(AP-B)三聚体1.75 Å晶体结构. AP-B和APC都位于藻胆体的核心部分, AP-B是藻胆体的能量终端发射团之一, 将捕获的光能最终传递给光反应中心. AP-B与APC结构和组成成分相似, 唯一不同的是AP-B中的α亚基Apc A由其同源蛋白Apc D代替, 而Apc D结合红移的PCB, 导致AP-B的吸收和荧光光谱较的红移[9], 这为rAPC的结构解析提供了良好的基础.

天然APC三聚体稳定的蛋白和色基结构及正确折叠是其执行各种生物功能的基础. 大量的前期研究结果表明, 疏水相互作用力、二硫键及氢键对维持蛋白质结构的稳定至关重要, 而稳定的蛋白微环境决定了色基的稳定和功能的正确. 圆二色谱(circular dichroism, CD)法可以研究不同条件下蛋白质二级结构的变化, 能够进一步探讨蛋白结构表面的氨基酸在蛋白质结构稳定性中发挥的作用. 1984年Csatorday等人[10]通过解叠合法得到天然APC三聚体的CD谱带是包括两个正峰和两个负峰的组合谱带, 与预期的频谱激子分裂谱带相似, Csatorday推测中等强度的偶极-偶极相互作用是造成复杂APC三聚体CD谱带的原因. 1990年, Holzwarth等人[11]获得带有连接蛋白的APC三聚体CD谱带, 其认为强耦合极限内的激子机制与弱耦合极限内的偶极-偶极相互作用可能同时在APC三聚体中存在. 21世纪初, Maccoll[3]和Eisele等人[12]也通过CD谱等光谱数据建立了新的APC的能量传递模型. 故CD光谱学的方法是研究rAPC三聚体结构、亚基和色基之间关系、氨基酸残基与色基之间相互作用以及能量传递途径的手段之一.

自从1986年Binnig等人[13]在扫描隧道显微镜的基础上发明了原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM), AFM提供了研究生物标本的新途径. 由于能够提供吸附在基质表面的核酸, 蛋白质单分子、脂膜、2D蛋白质晶体和活细胞等生物系统的纳米级分辨率三维图像, 同时还可以观察空气中的干燥样品或者在水溶液中进行操作, 观察生理条件下的生物样品, AFM被广泛用于从活细胞到单个生物大分子的种类繁多的生物标本研究[14~16]. 近年来, AFM也被证明可以作为研究光合作用分子结构的良好技术, 利用AFM技术对紫细菌和高等植物的光合膜结构进行的研究已有较多报道[17], 但对藻类光合分子的研究则较少. Liu等人[18]、Zhao等人[19]曾用AFM对紫球藻*Porphyridium cruentum*的光合膜超分子结构进行研究, 表明AFM也可以为分析重组别藻蓝蛋白三聚体的结构和功能提供显微镜观察证据.

本文首先对吸附在云母片上的rAPC三聚体, 尤其是单分子rAPC三聚体, 进行一系列AFM观测; 然后再通过CD谱、荧光光谱和吸收光谱, 结合pH介导的rAPC三聚体二级结构动态构象改变和藻蓝胆素(phycocyanobilin, PCB)色基的空间构象变化, 对其在溶液中的柔性构象和光谱特性进行了研究, 从多个角度对rAPC三聚体的正确组装进行相互交叉验证, 同时得到关于rAPC三聚体的结构信息, 探讨了三聚体装配过程中保守的酪氨酸(Tyr)残基与色基的相互作用对rAPC三聚体吸收光谱的影响; 最后, 通过分析rAPC三聚体CD谱数据, 对其内部的能量传递途径进行了探讨, 为已报道的天然APC能量传递模型提供进一步证据.

1 材料与方法

(ⅰ) rAPC三聚体的制备. 蓝藻别藻蓝蛋白三聚

体在大肠杆菌体内的合成和组装、分离纯化方法参照文献[7,20]. 首先将别藻蓝蛋白α亚基脱辅基蛋白基因与藻胆素生物合成酶基因*ho1*和*pcyA*克隆到一个表达载体中; 其次将别藻蓝蛋白β亚基脱辅基蛋白基因与色基裂合酶基因*cpcS*和*cpcU*克隆到另一个载体上, 将两个表达载体同时转化大肠杆菌, 筛选出同时表达上述基因的工程菌. 取工程菌100 μL接种于5 mL液体LB培养基, 37℃震荡培养12 h, 然后转接于含200 mL液体LB培养基的三角瓶, 37℃震荡培养4 h. 按照体积比2%进行接种, 在5 L自动发酵罐中进行发酵. 将所得发酵液离心, 获得菌体沉淀, 然后按照每升pH 7.4磷酸缓冲液加入湿菌体80 g的比例将菌体重悬, 超声破碎细菌20 min, 15000×*g* 离心, 收集上清液, 上样于Ni^{2+}亲和色谱柱, 进行分离纯化, 所得的蓝色流出液为即纯化后别藻蓝蛋白. 利用灭菌后的超纯水配制浓度为0.6, 0.8, 1.0和1.5 mol L^{-1}的蔗糖溶液, 然后在12 mL容积薄壁开口管中制好蔗糖梯度, 用滴管滴加1 mL收集的重组APC三聚体蛋白浓缩液; 4℃, 190000×*g*, 离心19 h. 离心后所得rAPC条带, 用注射器取出. 最后后加入pH 7.0的50 mmol L^{-1}磷酸钠缓冲液, 经30 kD的Pall超滤离心管除去高浓度的蔗糖, 获得蓝藻别藻蓝蛋白三聚体溶液.

(ⅱ) rAPC三聚体单分子AFM表征. 在pH 7.0的50 mmol L^{-1}磷酸钠缓冲液中, 调节重组APC三聚体的浓度约为10 μg mL^{-1}. 取2 μL样品溶液均匀涂抹于云母片表面使之铺展开, 吹氮气干燥. 云母片表面具有原子级别的平整度, 可以作为制备样品的基底. 云母片被固定在直径约为1 cm的圆形铁质底片上并置于MultiMode Ⅷ型主系统和Nanoscope Ⅴ型控制器(Veeco Metrology Group, 美国)样品台上, 使用美国云母片和氮化硅探针(Veeco Probes, 美国), 应用ScanAsyst-air操作模式调节不同的放大倍数和分辨率进行观察.

(ⅲ) rAPC三聚体荧光光谱和吸收光谱性质测定. 用LS55荧光分光光度计(PerkinElmer, 美国)在室温下检测基因重组APC三聚体的荧光光谱, 蛋白终浓度为0.01 mg mL^{-1}, 光径1 cm; 采用TU-1900紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器公司, 中国)检测吸收光谱, 扫描范围400~750 nm, 蛋白终浓度为2 mg mL^{-1}, 光径1 cm, 步长1 nm; 用J-180圆二色谱仪(JASCO Corporation, 日本)检测CD光谱, 光径0.1 cm; 使用origin软件的Gauss公式对荧光发射峰和吸收光谱进行了解叠.

(ⅳ) pH变化与基因重组APC三聚体光谱变化的相关性. 采用0.1 mol L^{-1}的HCL或0.1 mol L^{-1}的NaOH溶液调节0.2 mmol L^{-1}磷酸氢二钠缓冲液的pH, 经HANNA PH211台式酸度计(HANNA, 意大利)检测, 配制成不同pH的缓冲液. 将浓缩后的重组APC三聚体用相应pH的缓冲液稀释至蛋白终浓度为0.2 mg mL^{-1}, 涡旋混匀后放置10 min, 分别用于吸收光谱和CD谱的测定.

2 结果与分析

2.1 rAPC三聚体的制备

为了得到纯度更高的重组APC三聚体, 经过金属亲和色谱柱分离和超滤离心管脱盐处理后, 采用蔗糖密度梯度超速离心方法, 去除未能分离的杂蛋白和不能重新结合成三聚体的多余的或不是1:1成对等比例的亚基. 如图1(a)所示, 经过超速离心后, 有两条主要的蓝色条带, 而在两条主带周围有浅蓝色弥散带, 这有可能是解离的PCB色基. 在离心管上方有一条颜色较浅的蓝色条带(带1), 位于0.6~0.8 mol L^{-1}蔗糖梯度的交界处, 说明该条带的蛋白分子量较小, 应为解离的重组APC亚基或单体; 颜色较深的蓝色条带表明大部分蛋白分布于下方0.8~1.0 mol L^{-1}蔗糖梯度交界面(带2), 说明该条带蛋白分子量较大, 因此应为重组APC三聚体的条带. 针管取样并除去蔗糖后, 扫描紫外-可见光吸收光谱(图1(b)). 上层样品得到最高峰在615~620 nm的光谱谱图, 与APC三聚体的α亚基, β亚基以及单体的谱图一致. 下层蛋白测得典型的三聚体吸收光谱谱图, A_{650}:A_{620}=0.79:0.587=1.346, 接近于高纯度天然APC三聚体1.3~1.5的结果. 将带2的样品进行SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色(图1(c)). 泳道1中经过超速离心进一步纯化的三聚体样品没有了其他杂蛋白条带, 可以确定得到了高纯度重组APC三聚体.

2.2 rAPC三聚体单分子AFM表征

通过AFM表征了云母片基底上的rAPC三聚体样品, 得到了1 mm×1 mm, 500 nm×500 nm, 200 nm×200 nm 3个扫描面积内不同分辨率的图像以及检测数据, 分别如图2(a)和(d)、图2(b)和(e)、图2(c)和(f)所示.

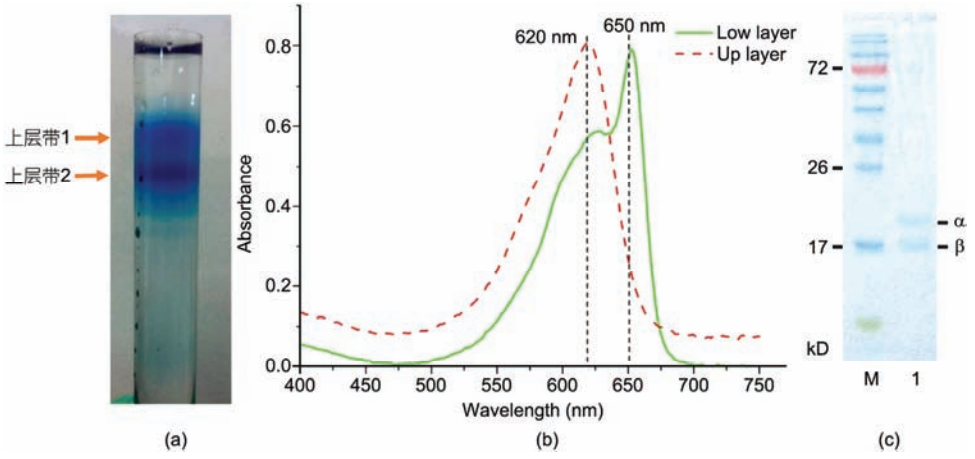


图 1 (网络版彩色)rAPC三聚体密度梯度超速离心后的分层图(a)、上层和下层蛋白吸光光谱(b)和下层蛋白电泳图(c)

Figure 1 (Color online) Layered density gradient centrifugation of recombinant APC trimer (a), absorbance spectrum of up layer and low layer (b), and electrophoresis images of the low layer protein (c)

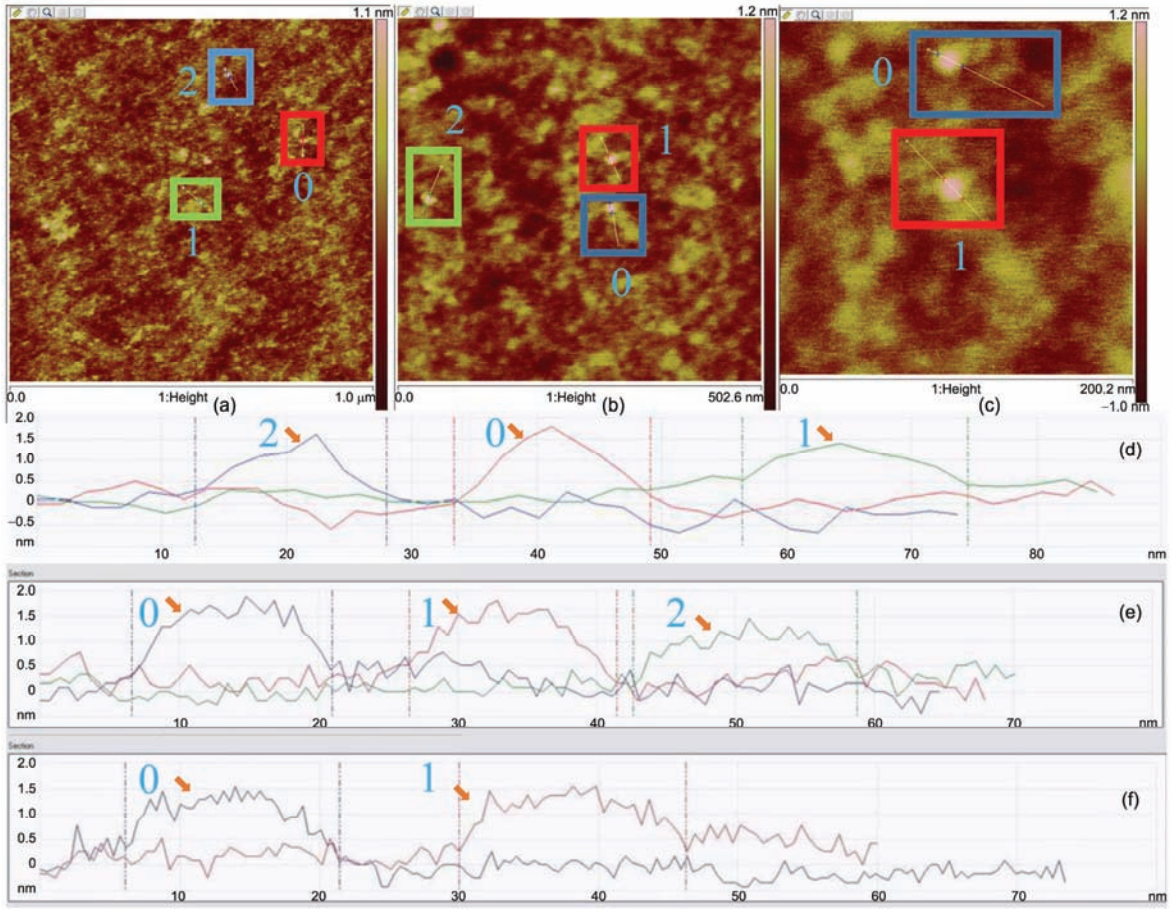


图 2 (网络版彩色)扫描面积为 1 μm×1 μm ((a) and (d)), 500 nm×500 nm ((b) and (e)), 200 nm×200 nm ((c) and (f))的Height图和数据分析图

Figure 2 (Color online) Height image on an area and analysis of 1 μm×1 μm ((a) and (d)), 500 nm×500 nm ((b) and (e)), 200 nm×200 nm ((c) and (f))

在图2(a)中可以看到有大片分散的小颗粒存在，局部蛋白有一些轻微凝聚，这在AFM表征单分子蛋白的实验中是经常出现的现象[21]. 这一现象由两种可能的原因造成，其一是由于蛋白不均匀分散造成

局部浓度过大，进而导致局部聚集无法完全分散开；另外一个原因可能是分子间的相互作用，导致了蛋白分子间的聚集现象. 本文选取其中的3个颗粒进行三维尺寸测量，数据分析所得结果见图2(d). 所选取的0, 1, 2 3个不同点距离云母片基底的高度约为1.5 nm；直径分别为0.016，0.016和0.018 μm. 与已有报道的通过透射电子显微镜和X射线晶体衍射观测到的圆盘状结构APC三聚体尺寸相似[2,4]，只是颗粒高度低于3 nm，而直径大于12 nm.

本课题组又对同样的3个点在500 nm×500 nm扫描面积上进行了更精细的测量，如图2(b)和(e)所示. 图2(b)可以更加清晰地看到存在单个小颗粒. 选取其中3个颗粒进行三维尺寸测量，数据分析所得结果见图2(e). 所选取的0，1，2 3个点距离云母片基底的高度也是约为1.5 nm；它们的直径分别为14.021, 15.044和16.311 nm. 得到与上述实验相似的结果.

最终选取了上述0和1两个APC三聚体的颗粒进行了200 nm×200 nm扫描面积的更精细测量(图2(c)和(f)). 图2(f)表明，所选取的0和1两个个颗粒距离云母片基底高度也是约为1.5 nm；它们的直径分别为15.334和16.400 nm. 同样获得了上述实验相似的结果.

以上一系列AFM观测所得到的单颗粒三维尺寸与天然APC三聚体在结晶状态下的晶体解析结果和经过负染色后电子显微镜观察到的结果基本一致，特别是最重要的颗粒直径尺寸数据相差并不显著. 除了单颗粒三维尺寸基本一致，结合圆盘状的三维形态，观测到的2个颗粒应该是单分子rAPC三聚体；氮气吹干后rAPC三聚体失水或者吸附在云母片上形态的变化可能是导致颗粒三维尺寸上存在细微差别的原因.

2.3 rAPC三聚体的吸收光谱和荧光光谱

吸收光谱和荧光光谱能够反映rAPC三聚体内部能量传递的特性. 首先对rAPC三聚体的吸收光谱进行检测，然后采用300~700 nm 进行连续激发，测量665 nm处的荧光发射值，获得荧光激发光谱；随后采用600 nm激发波长进行激发，获得荧光发射光谱. 图3的吸收光谱表明，rAPC具有620和650 nm两个吸收峰；发射光谱表明，rAPC在660 nm处有最大荧光发射峰，同时在640 nm处有一个肩峰；激发光谱表明rAPC在620和650 nm处有峰值，这与天然APC三聚体对应的谱图特性相吻合[22,23].

rAPC三聚体的荧光发射光谱与吸收光谱相比，肩峰位置由620 nm红移至640 nm，最高峰位置由650 nm红移至660 nm，分别红移了10~20 nm. 这是由于激发可以使PCB色基处于较高的激发态能级，但是荧光发射是源自最低的电子激发态向基态的跃迁，导致了吸收光谱到荧光光谱峰位的红移，这是藻胆蛋白能量传递功能的基础，与天然藻胆蛋白的相关研究结果也是相符的[24].

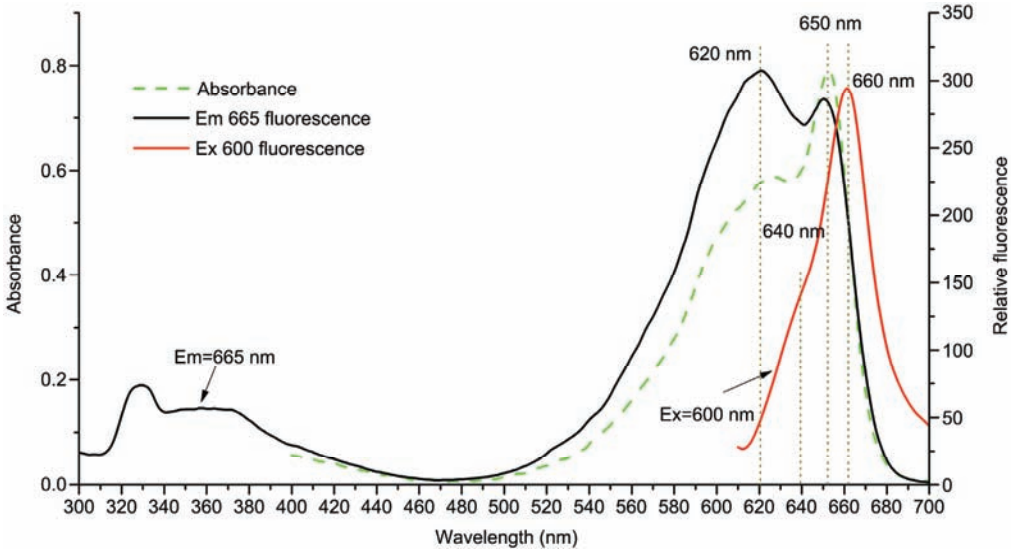


图 3 (网络版彩色)重组APC三聚体的吸收光谱和荧光发射光谱

Figure 3 (Color online) Absorbance spectrum and fluorescence emission spectrum of the rAPC trimer

2.4 pH为7时rAPC三聚体的圆二色谱

在190~250 nm的远紫外光区肽链是主要生色基团, 反映肽键的圆二色性, 蛋白质主链构象信息包含在这一波长范围的CD谱中. 因为蛋白质或多肽不同的二级结构而产生位置、吸收强弱都不同的一系列独特CD谱带能够给出蛋白质或多肽链二级结构的详细信息. 与小于208 nm波长的区域相比, 208~240 nm作为被选择区域, α螺旋、β折叠、无规卷曲3种基本结构CD谱对非发色团侧链和溶剂的变化似乎不太敏感, 另外发色团在这一地区的影响也较小[24,25]. α螺旋结构主导的CD谱表现出位于209和222 nm处的两个负峰, 并且由一个215 nm处的明显缺口分开, 同时在192 nm处有一个正峰; β折叠结构主导的CD谱表现出在216 nm有一个负峰, 在185~200 nm处有一个正峰的CD谱带[26,27].

如图4(a)所示, 在pH 7条件下, rAPC的紫外光区CD谱具有209和222 nm两个负峰, 以及215 nm处的一个明显缺口清晰可辨. 这是α螺旋占主导的典型CD谱图, 计算得到的rAPC三聚体二级结构的含量分别为72.0%的α螺旋、0.0%的β折叠、0.0%的转角、28.0%的无规则卷曲, RMS:为8.205. 目前通过X射线晶体衍射得到的结构表明, APC亚基由9个α螺旋(x-y-a-b-e-f-f'-g-h)通过不规则的卷曲结构连接; 其中7个α螺旋(x-y-a-b-e-f-f'-g-h)组成与球蛋白家族其他成员相似的羧基末端球状结构域, 成为中心结构; 位于N末端的两个反平行短α螺旋(x和y), 延伸出球状结构域之外作为单体和更高级结构组装的接触面[5,28]. 紫外光区CD谱结果与目前通过X射线晶体衍射得到的结果高度吻合.

在波长大于450 nm的可见光区域, 对CD谱的主要贡献来自生色团, 可见光区CD谱图反映的是色基处于特定空间构象的吸收光谱. CD谱能够很好地检测发色团吸收光谱中相互重叠的部分, 同时能够灵敏反映APC三聚体的聚集状态. 目前已有报道中, 通过解叠法得到的APC三聚体可见光区CD谱是包括两个正峰(625, 658 nm)和两个负峰(589, 645 nm)的组合谱带, 体现了APC三聚体CD谱的复杂性[10,29].

如图4(b)所示, 在pH 7条件下, rAPC三聚体的可见光区CD谱尽管存在较强的背景噪音, 但是清晰显示了3个明显的峰位: 约660 nm处正峰、620 nm处的正峰和645 nm处的负峰. 与天然APC三聚体特征峰位中的658 nm正峰、625 nm正峰和643 nm负峰位置基本相同, 而且645 nm处的负峰非常明显. 在约650 nm处是正负峰的交点, 与重组APC三聚体吸收光谱的最大吸收峰位于同一个波长处. rAPC三聚体可见光区CD谱反映了其高级结构与天然APC三聚体基本相同.

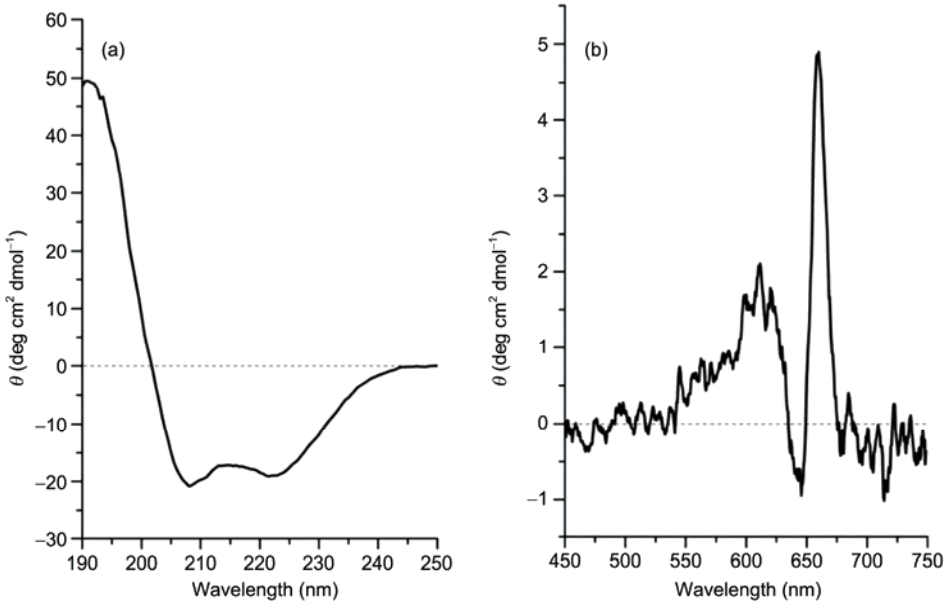


图 4 pH为 7 条件下的rAPC三聚体紫外区(a)和可见光区(b) CD谱

Figure 4 CD spectrum of the rAPC trimer on UV range (a) and visible range (b) at pH 7

2.5 pH变化与rAPC三聚体紫外区CD谱变化的相关性

在190~250 nm的远紫外CD谱带能够表征蛋白质二级结构的变化. 用不同pH的缓冲液处理rAPC三聚体, 检测其CD谱, 将得到pH变化对二级结构影响的信息.

图5为pH 2~12条件下的CD谱, 虽然195 nm处的正峰在pH为2~3, 10~12的条件下非常明显, 但是在pH为4~9的条件下, 却严重的红移到200 nm处并且峰值很低. 这是因为, 紫外光区较可见光区灵敏度高, 检测上限较低, 在做全光谱CD谱扫描时, 为了保证可见光区能够检出, 检测样本的蛋白浓度较高, 导致紫外光区的检测被干扰, 不能正确显示195 nm处的正峰. 此外, 试验中紫外光区的监测电压数值升高, 也证实了以上的推测. 在此以两个能够清晰分辨的209和222 nm处的两个负峰作为检验点, 定性说明pH 2~12范围变化的溶液对rAPC三聚体聚集状态的影响.

由图5可知, 从中性pH开始, 向极酸和极碱变化所引起的紫外光区CD谱的变化很相似. 209和222 nm处两个负峰的绝对值不断减小, 表明α螺旋的含量开始减少. 在pH从7向2变化过程中, 当pH从7到4变化时, CD谱的变化并不明显, 表明rAPC的二级结构还是比较稳定的, 即使rAPC三聚体结构已经开始解聚, 但是两种亚基结构没有解体, α螺旋的量变化不大. pH从4到3再从3到2的过程中, 变化显著, 表明在较低的pH条件下, rAPC三聚体的α螺旋开始减少. pH从7向12变化过程中, 与酸性条件下相比, CD谱的变化缓慢而持续; 但是pH从9~10改变的过程中CD谱发生了突然变化, 表明rAPC三聚体的α螺旋随pH的增加而不断减少.

因此紫外光区CD谱结果表明, rAPC三聚体主要由 螺旋结构构成, 组氨酸标签对其二级结构的组装影响不大, 在二级结构这一层面上能够正确组装. 并且在4~9的pH范围内重组APC三聚体以α螺旋为主的二级结构能够保持相对稳定, 但是相对于酸性溶液, 碱性溶液对rAPC三聚体有较强的破坏作用.

2.6 pH变化与rAPC三聚体可见光区CD谱变化的相关性

可见光区CD谱能够精确地反映色基分子的不对称性或者空间构象的不对称性, 可以通过不同pH条件下的动态CD谱和吸收光谱, 来研究rAPC三聚体的高级构象, 加深对其结构、组装和功能的理解.

在pH 2~12的变化范围内, 对rAPC三聚体的可见

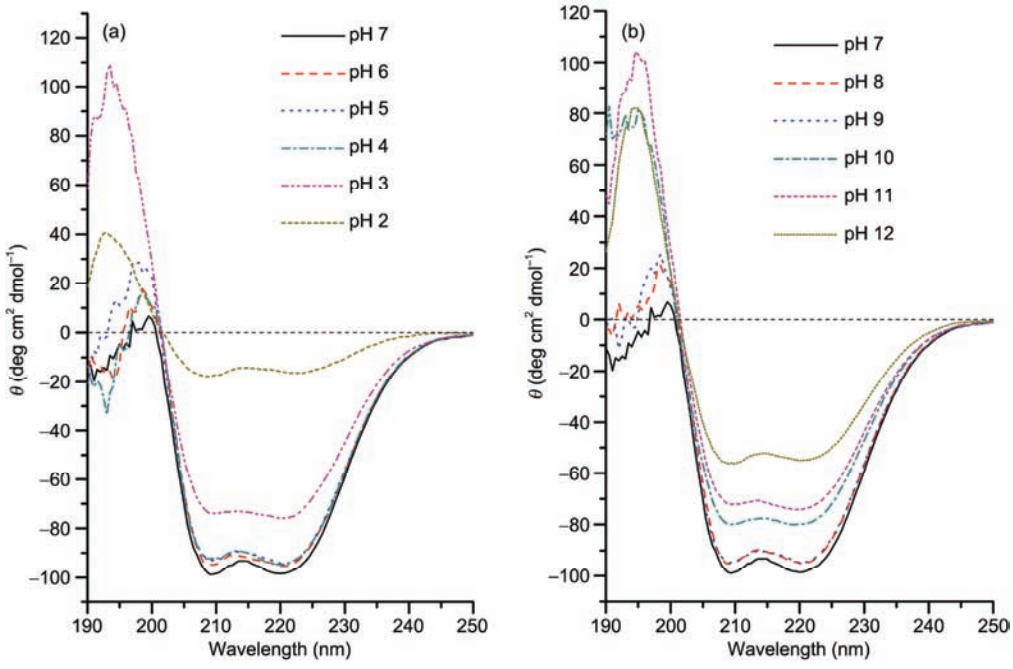


图 5 (网络版彩色)pH 2~12 对rAPC三聚体紫外光区CD谱的影响. (a) pH 2~7; (b) pH 7~12

Figure 5 (Color online) Influences of CD spectrum of the rAPC trimer at pH 2–12. (a) pH 2–7; (b) pH 7–12

光区CD谱和吸收光谱进行检测(图6). 以较强背景噪音干扰下, 能够清晰分辨的660 nm正峰和645 nm负峰作为检验点, 随着pH从7向2或12变化, CD谱在660 nm正峰值逐渐减小, 而645 nm处负峰值逐渐趋近于0. 与图5中pH变化引起的紫外光区CD谱变化很相似: pH从4到3再从3到2的过程中, 660 nm正峰有2个较大的突然变化; 而pH从9到10, 从10到11, 再从11到12的过程中, 660 nm正峰有3个较大的突然变化. 而CD谱对应的吸收光谱也表现出了相同变化规律. 这表明在4~9的pH范围内rAPC能够保持三聚体的聚集状态, 但是相对于酸性溶液, 碱性溶液对rAPC三聚体有较强的破坏作用. 据报道, APC单体的CD光谱只显示阳性谱峰, 并且在rAPC三聚体不断解聚为单体的过程中643 nm处的负峰逐渐减小, 当完全解聚为单体后643 nm处的负峰完全消失[29]. 因此在pH为2的极酸和pH为12的极碱条件下, rAPC三聚体几乎完全解聚, 与天然APC解聚对应的CD谱变化相似[3,22,29]. 相对于APC三聚体解叠得到的包含两个正峰和两个负峰的谱图, 随着643 nm处负峰的消失, 单体CD光谱将解叠得到两个正带, 这个结果在一定程度上表明单体中没有任何强于Förster共振能量转移所需的色基之间相互作用, 即单体之间不存在短距离的激子耦合能量传递过程; 这是发色团相距足够远, 不存在rAPC三聚体聚合状态下的间距小于20 Å的两个单体(单体1的αPCB^{84}和单体2的βPCB^{84})形成的色基对所对应的预期结果[3,10]. 同时这一结果也从能量传递方式, 也是功能正确的角度佐证了rAPC三聚体组装的正确性.

3 讨论

3.1 rAPC三聚体荧光和吸收光谱分析

蓝藻*Synechocystis* sp. PCC 6803藻胆体内的能量传递是沿着PC→APC的方向, 最终在APC三聚体组成的藻胆体核心通过连接的末端能量受体传递到反应中心叶绿素. 在藻胆体内藻胆蛋白的吸收峰从

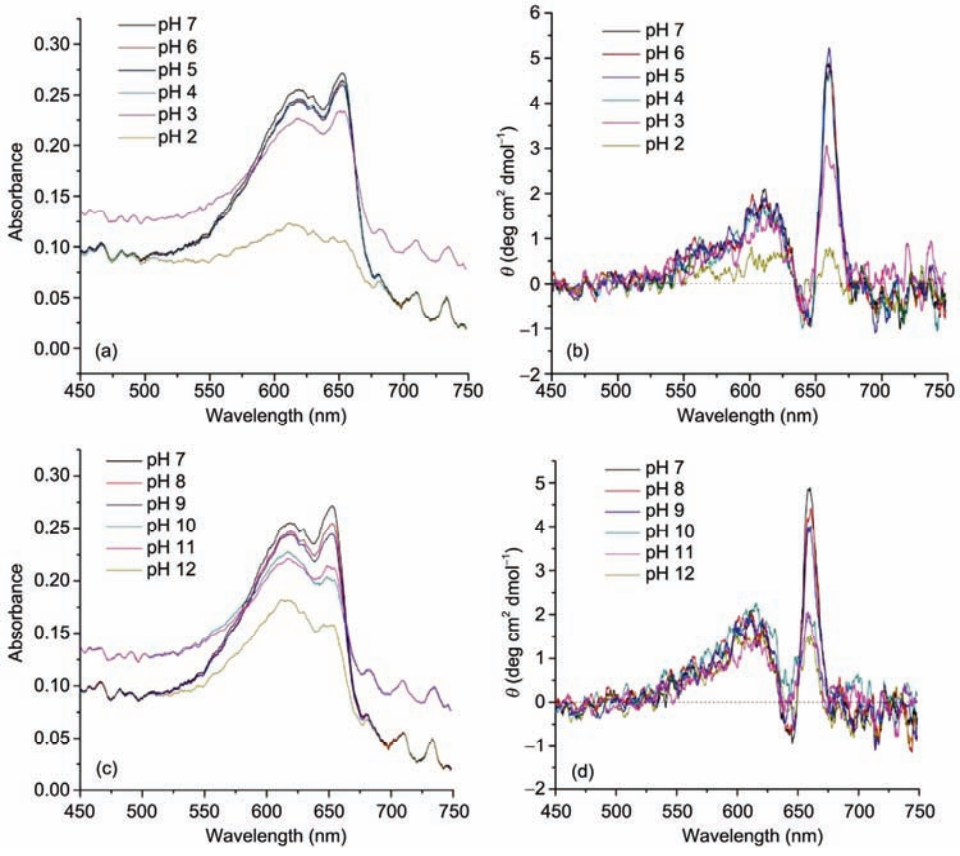


图 6 pH 2~12 对rAPC三聚体可见光区吸收光谱((a)和(c))和CD((b)和(d))的影响

Figure 6 Influences of absorbance spectrum ((a) and (c)) and CD spectrum ((b) and (d)) of the rAPC trimer on visible range at pH 2–12

617 nm增加到670 nm, 通过这种最大吸收峰波长逐级红移来与上一级藻胆蛋白的荧光发射谱实现重叠, 每一种藻胆蛋白都能够吸收来自上一级的能量, 从而完成光子能量的传递[3,23,30~33].

在APC三聚体中, α和β亚基自组装成一个APC单体(αβ), 每个APC单体两个亚基的Cys^{84}位点都共价结合一个PCB色基; 3个单体(αβ)自组装为APC三聚体$(\alpha\beta)_3$. 由于激发光光子传递到α PCB^{84}或β PCB^{84}色基的能量不能向下游受体传递, 色基中的电子从激发态跃迁回基态而产生发射荧光并释放能量. 色基的量子态能级差决定了荧光发射光子的频率, 而色基的量子态具有很强的特异性, 这就决定了其荧光发射也同样具有很强的特异性. X射线晶体衍射数据解析表明, APC三聚体中3个相同β亚基上的β PCB^{84}色基自身分子构象相同, 所处的蛋白微环境相似, 靠近三聚体的中央腔; 而3个相同α亚基上的3个α PCB^{84}色基自身分子构象也相同, 所处的蛋白微环境也相似, 但是接近三聚体的外周[3,4]. 在APC单体中, PCB有614 nm处的最大吸收, 荧光发射峰在640 nm左右; 但在三聚体中, 则显示在650 nm处的一个最大吸收峰和620 nm左右处的一个肩峰, 最大荧光发射波长为660 nm左右[3,7,34].

图3中, rAPC三聚体可见光区扫描激发所得到的两个荧光发射峰与吸收光谱中的肩峰和最大吸收峰的波长吻合. 这是由于与其他激发波长相比, 620和650 nm的两个激发波长, 对应吸收光谱中肩峰和最大吸收峰, 在这两个波长下重组APC三聚体能够吸收相对高的能量, 所以当吸收的能量释放时能够得到较高荧光发射峰. 这两个光谱曲线最大峰值的符合进一步说明了重组APC三聚体能够正确完成能量传递的功能. 在吸收光谱中650 nm处的吸收要高于620 nm处的吸收, 而在荧光发射光谱中650 nm处的峰值却低于620 nm处的峰值. 这可能是由两个原因造成: (ⅰ) 因为荧光强度与激发光的波长有关, 650 nm波长激发的荧光强度低于620 nm波长激发时的荧光强度. (ⅱ) 620 nm波长激发时, rAPC三聚体中由于微环境导致构象改变的两个不同最大吸收峰的色基α PCB^{84}, β PCB^{84}都能够吸收激发光子, 再进行能量传递最终释放荧光; 而650 nm波长激发时, rAPC三聚体中α PCB^{84}, β PCB^{84}中只有一个色基能够吸收激发光子, 再进行能量传递最终释放荧光, 因吸收的能量比620 nm波长激发时少, 从而释放时得到较低荧光发射强度. 之前关于天然APC的报道普遍认为, APC单体中的一个PCB色基(有可能为β PCB^{84})由于与三聚体结构中的脱辅基蛋白相互作用而改变, 导致其构象或所处环境改变, 产生了650 nm的最大吸收峰, 而另外的α PCB^{84}色基保留了其在单体中的原有构象产生了620 nm的肩峰, 从而形成了天然APC三聚体的吸光光谱. 应该是同样的原因造成了rAPC三聚体荧光发射光谱中650 nm处的峰值低于620 nm处的峰值这一结果[22,23]. 而在紫外光区310~400 nm区间的扫描激发, 所得到的荧光发射强度较弱. 这部分由紫外区的光子激发并能够在可见光区检测到的较弱荧光发射, 有可能是构成APC三聚体的芳香族氨基酸吸收了紫外区的激发光, 然后将能量传递到了PCB色基, 然后由色基在可见光区发出荧光. 这与苏海楠[22]曾提出的藻胆蛋白中可能存在芳香族氨基酸向藻胆色素的能量传递途径——通过藻胆蛋白α和β亚基中含有的大量芳香族氨基酸的芳香环与临近PCB色基的紧密联系, 使芳香族氨基酸可以直接向藻蓝胆素传递能量; 藻蓝胆素能够接收被激发的芳香族氨基酸传递来能量, 并且在可见光区发射出荧光[23].

rAPC三聚体与天然APC三聚体所测得的光谱谱图相似, 表明两者有相似的荧光光谱特性. 荧光光谱反映的是藻胆蛋白内部能量转移的能力, 以及可以用来识别分子的强特异性的色基分子量子态. 相似的荧光性质表明, 重组APC三聚体能够正确完成能量传递功能, 由于结构对功能的决定作用, 这一结果能够反向证明色基组装正确, 并且色基所处的是相似蛋白微环境; 同时表明rAPC三聚体与天然APC三聚体的量子态结构几乎相同. 进一步证明了重组APC三聚体高级结构组装的正确性.

从单体组装成三聚体的结构转变中, 吸收光谱的变化可能是由于单体中的一个PCB, 有可能为β PCB^{84}, 与三聚体结构中的脱辅基蛋白相互作用, 导致其构象或蛋白微环境改变, 产生了红移到650 nm的最大吸收峰; 而α PCB^{84}保留了其在单体中的原有构象产生了620 nm附近的肩峰[23]. 使用origin软件的Gauss公式对图3中的吸收光谱和荧光发射光谱进行解叠(图7). 图7(a)表明, rAPC三聚体的吸收光谱解叠后得到两个峰: 一个是在吸收光谱的肩峰处, 最大峰位在616 nm; 另外一个在吸收光谱的最大峰值处, 最大峰位在652 nm处; Gauss解叠得到的R^2为0.98814, 解叠结果与吸收光谱曲线很好地吻合.

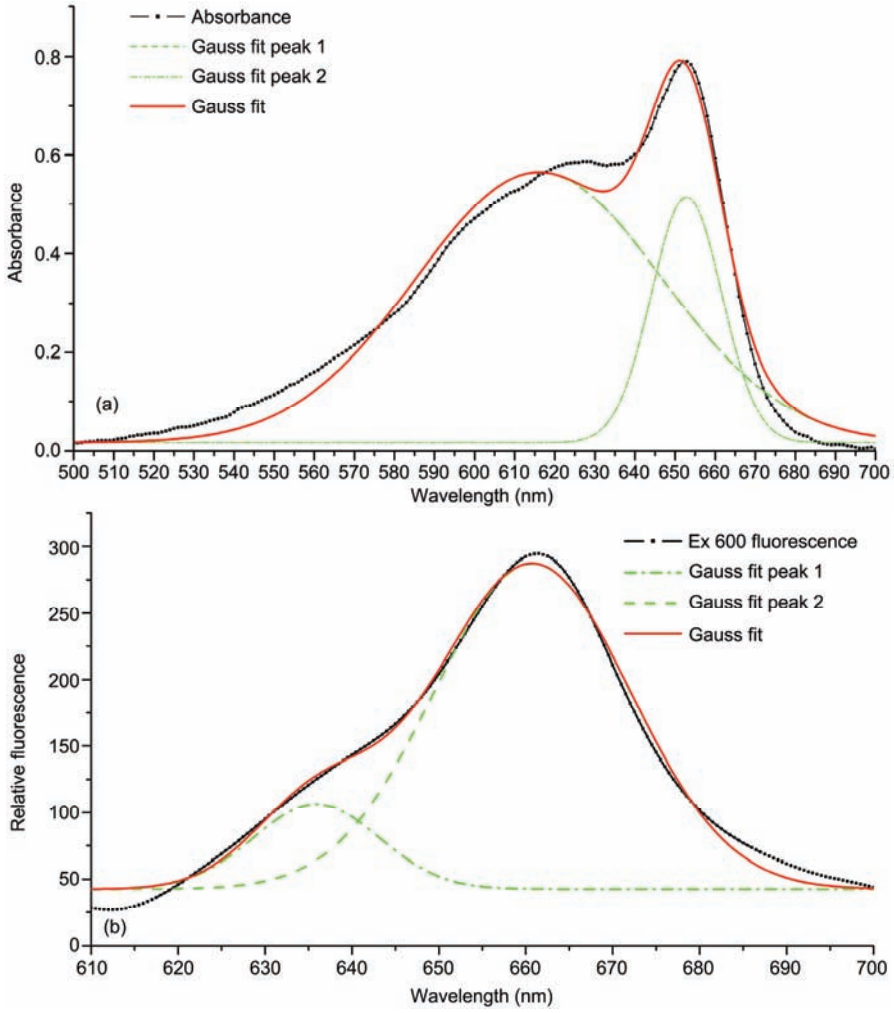


图 7 (网络版彩色)重组APC三聚体吸收光谱(a)和荧光发射光谱(b)解叠结果

Figure 7 (Color online) Deconvolution of absorbance spectrum (a) and fluorescence emission spectrum (b) of the rAPC trimer

当采用600 nm波长激发光，激发重组APC三聚体产生的荧光发射图谱解叠结果见图7(b). 600 nm波长激发得到的图谱进行峰形解叠后得到两个峰: (ⅰ)在荧光发射图谱的肩峰处，最大峰位在636 nm; (ⅱ)在荧光发射图谱的最大峰值处，最大峰位在661 nm; Gauss解叠得到的R^2为0.99328，解叠结果与荧光发射光谱曲线能够很好地吻合. 在已发表的论文中，苏海楠对天然APC三聚体荧光发射光谱的解叠得到了两个峰值分别位于640和660 nm的光谱组分; 且认为这两种自身构象不同的PCB形成了两个不同荧光发射源, αPCB^{84}发射出了单体的640 nm荧光，而构象改变的βPCB^{84}发射出了红移到660 nm的荧光. 图7(b)所显示的rAPC三聚体的荧光发射光谱解叠结果与之相似[22].

由于电子激发态和电子基态有相似的振动能级分布，基态与激发态之间的跃迁概率很相近，荧光发射光强又与跃迁概率成正比，因此吸收光谱与荧光光谱形成左右对称，推测APC单体和三聚体的荧光发射光谱差异也应该是相似原因造成的. 苏海楠对螺旋藻天然APC三聚体晶体结构数据的分析和荧光发射光谱的解叠结果表明, β PCB^{84}周围有3个距离较近的Tyr，其中有两个相距4 Å以内, α PCB^{84}的4个吡咯环大致处于同一平面; β PCB^{84}周围有4个距离较近的Tyr，全部相距4 Å以内，并且与单体所不同的是α PCB^{84}的4个吡咯环并不处于同一平面，其中D吡咯环有一个明显的空间扭转. 荧光发射光谱的解叠得到了2个峰值分别位于640和660 nm的光谱组分. 这两种自身构象不同的PCB形成了两个不同荧光发射源,

α PCB^{84}发射出了单体的640 nm荧光，而构象改变的β PCB^{84}发射出了红移到660 nm的荧光[22]. 目前对于APC的光谱理论模型研究表明，色基的吸收光谱和荧光光谱主峰来自于4个吡咯环的电子激发. PCB色基被质子化后色素分子中单双键区分更不明显，表现出明显的离域效应，或是处于更延展的构象形式使得PCB共轭吡咯环上π-π*性质的电子激发态能量降低，从而导致吸收光谱和激发光谱最大吸收峰位发生红移[35,36]. 再结合天然APC三聚体晶体结构中，β PCB^{84}周围有4个距离较近的Tyr且全部相距4 Å以内. 可能是形成APC三聚体后，其中一个Tyr羧基上原本与氧原子成键的质子转移到了β PCB^{84}吡咯环的氮原子上，使这个Tyr与β PCB^{84}形成氢键，导致β PCB^{84}的质子化和D吡咯环的一个明显扭转. 当然也可能存在其他PCB与周围蛋白质环境的长程或短程相互作用，但氢键的形成应该是一个主要原因，然而具体是哪一个Tyr与β PCB^{84}相互作用还不是很清楚. 然而这种扭转会减小色基体系的共轭性导致最大吸收峰蓝移，但是在色基内部不同的电子离域程度和单双键的综合影响下，最终相比于APC单体，APC三聚体的吸光光谱和荧光发射光谱的最大峰出现了明显的红移. 结合以上证据再联系APC三聚体中的3个β PCB^{84}色基靠近三聚体中央腔；而3个α PCB^{84}色基接近三聚体外周，β PCB^{84}色基构象变化造成的最大吸收峰红移正好可以使能量流从α PCB^{84}传递到β PCB^{84}，从而形成从圆盘最外侧向内侧中心的高效能量收集器. 这与APC三聚体所应具有的能量单向传递功能是完全一致的.

3.2 rAPC三聚体CD光谱分析

当两个或两个以上发色团相互靠近且产生相互作用时，发色团吸收的能量会转变为高能态和低能态两种状态，在CD谱中常表现为相邻的正峰和负峰. 在正负峰相交处有很大的可能存在色基对，因此根据此实验的结果可知在约650 nm处很可能存在PCB色基对. 原子尺度的高分辨率APC三聚体晶体结构数据分析表明了一些可能PCB色基对的存在，例如，两个相邻单体1上的α PCB^{84}和单体2上的β PCB^{84}之间的距离小于20 Å；两个相邻单体1的β PCB^{84}和单体2的β PCB^{84}；两个相邻单体2的α PCB^{84}和单体2的β PCB^{84}为相距34 Å以上的PCB色素对[3~5,31]. 相距小于20 Å的PCB色基对，在强耦合极限内发生相互作用，这可能引起激子分裂和激发离域现象，使得光子的激发能在色基对之间多次往返传递形成准平衡分布；所得到的CD谱将分成高能带和低能带，两个CD谱峰中的一个是负峰，另外一个是正峰[6,37,38].

图8表明，在可见光区间扫描激发的Em 665曲线，在约650 nm激发波长处得到的强荧光发射峰，因为在rAPC三聚体溶液这一孤立体系中发射荧光是激发能的最主要消耗途径，这正好与rAPC三聚体的吸收光谱中的最大吸收峰的值吻合；同时在pH为7的可见光区CD谱中650 nm这个波长处正好对应660 nm正峰和645 nm负峰形成的正负峰相交点上. 根据CD谱的测定原理，当存在正、负峰相交时就很可能存在色基对，结合重组APC三聚体吸收光谱中650 nm处的尖锐吸收峰符合一些激子分裂谱带的特征这一证据，推测在660 nm处的正峰和645 nm处的负峰应该对应间距小于20 Å的两个PCB(单体1的α PCB^{84}和单体2的β PCB^{84})形成的色基对. 重组APC三聚体CD谱与晶体解析数据相符，并且重组三聚体被正确组装，各个色基处于与天然三聚体相似的位置. 之前有文献报道，APC三聚体吸收光谱中650 nm处的吸收峰很尖锐，符合一些激子分裂谱带的特征，可能是由于激子分裂产生的[3].

3.3 pH变化与rAPC三聚体可见光区CD谱变化的相关性

组装成APC三聚体后，PCB色基分别位于不同亚基上，为了保证能量传递功能的实现，亚基除了要具备正确的二级结构，蛋白三级和四级结构的正确性也是必不可少的. 当PCB色基所处蛋白质微环境发生变化时，相同色基产生的吸收谱峰也不同，因此吸收光谱的变化可以直接反映亚基二、三级空间结构状态和色基所处的蛋白质内环境变化；加之CD谱对于色基空间构象的高敏感性，因此改变环境条件，综合观测重组APC三聚体可见光区的吸收光谱和CD谱的变化，可给出大量与结构和功能相关的信息. 在此对不同pH下吸收光谱中的A_{650}, A_{620}和CD谱中的660 nm正峰和645 nm负峰进行综合分析，得出pH诱导的重组APC三聚体构象与功能变化可分为3个不同的区段(图9).

(ⅰ) 较稳定区. 在pH 4~7区间变化时，重组APC三聚体的吸收光谱峰值和可见光区CD光谱峰值都比较稳定，相同pH下A_{650}的值大于A_{620}，表明蛋白

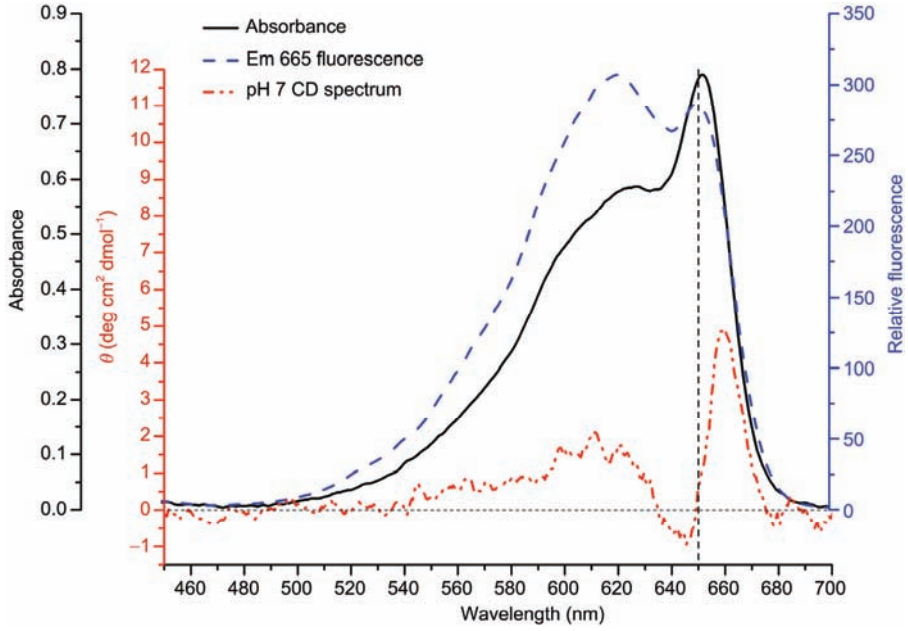


图 8 (网络版彩色)rAPC三聚体的可见光区CD谱、吸收光谱和荧光发射光谱

Figure 8 (Color online) CD spectrum on visible range, absorbance spectrum and fluorescence emission spectrum of the rAPC trimer

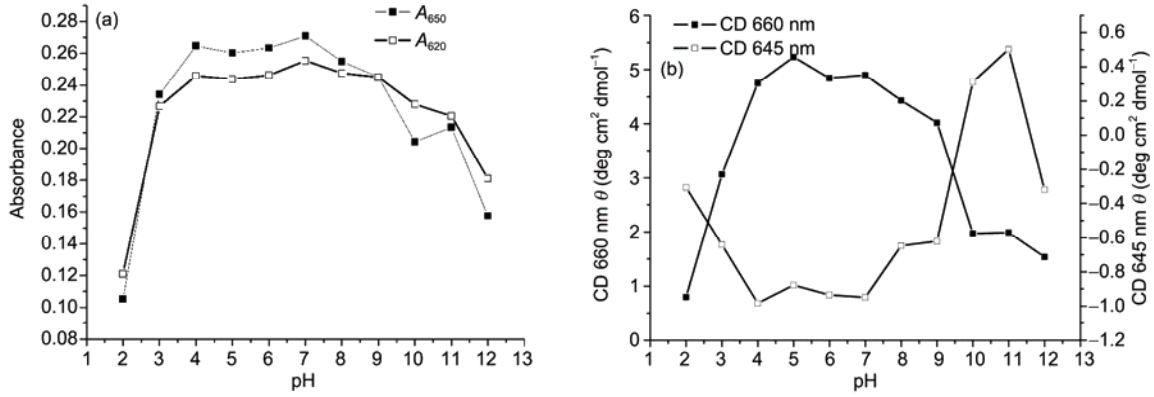


图 9 pH在 2~12 范围内重组APC三聚体的吸收光谱(a)和CD(b)光谱的变化

Figure 9 Differences of absorbance spectrum (a) and CD spectrum (b) of the recombinant APC trimer at pH 2–12

和色基的构象及功能在此区域都保持正常.

(ⅱ) 次级稳定区. 在pH 7~9区间变化时, 吸收光谱峰值缓步下降, 虽然相同pH下A_{650}的值依然大于A_{620}, 但逐渐趋近并最终相交; 可见光区CD谱峰值的绝对值也在缓步下降; 说明虽然蛋白和色基的构象及功能在缓慢改变, 但是还能够基本上保持稳定, 局部区域构象变化或者色素基团间的空间距离、方向等可能发生了较小变化.

(ⅲ) 不稳定区. pH在2~4区间和9~12区间变化时, 吸收光谱峰值和可见光区CD光谱峰值强度都呈快速下降或不规则变化, 尤其是pH在9~12区间变化时相同pH下A_{620}值大于A_{650}, 表明蛋白和色基的构象及功能在此区域处于快速崩溃期, 重组APC三聚体完全解聚[29].

重组APC三聚体在很宽的pH范围内均能够保持构象的稳定性, 且表现出与天然APC三聚体相似的动态变化特征[22]. 由于构象稳定性与功能稳定性是一致的, 这表明重组APC三聚体与天然APC三聚体有相似的色基空间状态. 同时动态变化特征形似, 说明两者在空间结构的关键连接区域, 即为应对环境

改变，产生柔性构象变化从而维护其进行正确能量传递的区域(一般为非α螺旋的二级结构区)是相似的. 这进一步证明了重组APC三聚体在蛋白质三级或四级的高级结构层次和色基的空间状态上与天然APC三聚体相似，是正确组装的.

4 结论

本文利用原子力显微镜成功观察到了单分子重组APC三聚体颗粒. 通过分析CD谱，荧光发射光谱和吸收光谱数据，从蛋白质二级结构，三级和四级空间结构状态，色基空间状态，关键的柔性连接区域，以及能量传递路径等方面，从正确结构完成正确功能出发，多层次多角度相互交叉验证了rAPC三聚体的正确组装. 同时结合光谱数据，为rAPC三聚体中存在产生激子分裂的PCB色基对，并且在其内部存在短距离激子耦合能量传递过程提供了一定的实验证据.

参考文献

1 Ducret A, Muller S A, Goldie K N, et al. Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. J Mol Biol, 1998, 278: 369–388

2 Arteni A A, Ajlani G, Boekema E J. Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 and their interaction with the membrane. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787: 272–279

3 Maccoll R. Allophycocyanin and energy transfer. Biochim Biophys Acta, 2004, 1657: 73–81

4 Mcgregor A, Klartag M, David L, et al. Allophycocyanin trimer stability and functionality are primarily due to polar enhanced hydrophobicity of the phycocyanobilin binding pocket. J Mol Biol, 2008, 384: 406–421

5 Liu J Y, Jiang T, Zhang J P, et al. Crystal structure of allophycocyanin from red algae *Porphyra yezoensis* at 2.2-angstrom resolution. J Biol Chem, 1999, 274: 16945–16952

6 Edington M D, Riter R E, Beck W F. Evidence for coherent energy-transfer in allophycocyanin trimers. J Biol Chem, 1995, 99: 15699–15704

7 Liu S, Chen Y, Lu Y, et al. Biosynthesis of fluorescent cyanobacterial allophycocyanin trimer in *Escherichia coli*. Photosynth Res, 2010, 105: 135–142

8 Peng P P, Dong L L, Sun Y F, et al. The structure of allophycocyanin B from *Synechocystis* PCC 6803 reveals the structural basis for the extreme redshift of the terminal emitter in phycobilisomes. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, 70: 2558–2569

9 Dong L L. Study on the function and structure of Slr0280 and redshift of ApcD in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 [董亮亮. *Synechocystis* sp. PCC 6803 中 Slr0280 的功能、结构研究及 ApcD 光谱红移探究. 博士学位论文. 武汉：华中农业大学, 2015]

10 Csatorday K, Maccoll R, Csizmadia V, et al. Exciton interaction in allophycocyanin. Biochemistry, 1984, 23: 6466–6470

11 Holzwarth A R, Bittersmann E, Reuter W, et al. Studies on chromophore coupling in isolated phycobiliproteins: III. Picosecond excited state kinetics and time-resolved fluorescence spectra of different allophycocyanins from *Mastigocladus laminosus*. Biophys J, 1990, 57: 133–145

12 Eisele L E, Bakhru S H, Liu X, et al. Studies on C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium*, a eukaryote at the extremes of habitat. Biochim Biophys Acta, 2000, 1456: 99–107

13 Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. Phys Rev Lett, 1986, 56: 930–933

14 Dufrene Y F. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: From reconstituted cell surface layers to living cells. Micron, 2001, 32: 153–166

15 El K K, Burton I, Dupres V, et al. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. J Microsc, 2005, 218: 199–207

16 Lyubchenko Y L, Shlyakhtenko L S. AFM for analysis of structure and dynamics of DNA and protein-DNA complexes. Methods, 2009, 47: 206–213

17 Liu L N, Scheuring S. Investigation of photosynthetic membrane structure using atomic force microscopy. Trends Plant Sci, 2013, 18: 277–286

18 Liu L N, Aartsma T J, Thomas J C, et al. Watching the native supramolecular architecture of photosynthetic membrane in red algae: Topography of phycobilisomes and their crowding, diverse distribution patterns. J Biol Chem, 2008, 283: 34946–34953

19 Zhao L S, Su H N, Li K, et al. Supramolecular architecture of photosynthetic membrane in red algae in response to nitrogen starvation. Biochim Biophys Acta, 2016, 1857: 1751–1758

20 Pu Y. Structure determination and sensitization property study of recombinant allophycocyanin trimer (in Chinese). Doctor Dissertation. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013 [蒲洋. 重组别藻蓝蛋白三聚体结构鉴定及敏化特性的研究. 博士学位论文. 北京：中国科学院大学, 2013]

21 Ge C, Du J, Zhao L, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 16968–16973

22 Su H N. Study on the active conformations of phycobiliproteins from cyanobacteria and red algae (in Chinese). Doctor Dissertation. Jinan: Shandong University, 2010 [苏海楠. 蓝藻与红藻中藻胆蛋白的活性构象研究. 博士学位论文. 济南: 山东大学, 2010]

23 Maccoll R. Cyanobacterial phycobilisomes. J Struct Biol, 1998, 124: 311–334

24 Greenfield N, Davidson B, Fasman G D. Use of computed optical rotatory dispersion curves for evaluation of protein conformation. Biochemistry, 1967, 6: 1630–1637

25 Greenfield N, Fasman G D. Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation. Biochemistry, 1969, 8: 4108–4116

26 Tomimatsu Y, Vitello L, Gaffield W. Effect of aggregation on optical rotatory dispersion of poly (alpha,l-glutamic acid). Biopolymers, 1966, 4: 653–662

27 Adler A J, Hoving R, Potter J, et al. Circular dichroism of polypeptides. Poly (hydroxyethyl-l-glutamine) compared to poly(l-glutamic acid). J Am Chem Soc, 1968, 90: 4736–4738

28 Schirmer T, Huber R, Schneider M, et al. Crystal-structure analysis and refinement at 2.5-a of hexameric c-phycocyanin from the cyanobacterium *agmenellum-quadruplicatum*—the molecular-model and its implications for light-harvesting. J Mol Biol, 1986, 188: 651–676

29 Maccoll R, Eisele L E, Menikh A. Allophycocyanin: Trimers, monomers, subunits, and homodimers. Biopolymers, 2003, 72: 352–365

30 Tandeau D M N. Phycobiliproteins and phycobilisomes: The early observations. Photosynth Res, 2003, 76: 193–205

31 Eberhard S, Finazzi G, Wollman F A. The dynamics of photosynthesis. Annu Rev Genet, 2008, 42: 463–515

32 Gao X, Wei T D, Zhang N, et al. Molecular insights into the terminal energy acceptor in cyanobacterial phycobilisome. Mol Microbiol, 2012, 85: 907–915

33 Houmard J, Capuano V, Colombano M V, et al. Molecular characterization of the terminal energy acceptor of cyanobacterial phycobilisomes. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 2152–2156

34 Murakami A, Mimuro M, Ohki K, et al. Absorption spectrum of allophycocyanin isolated from *Anabaena cylindrica*: Variation of the absorption spectrum induced by changes of the physico-chemical environment. J Biochem, 1981, 89: 79–86

35 Ren Y L. A theoretical study of the electron excitation spectra of bio-chromophores of interest (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuhan: Central China Normal University, 2007 [任彦亮. 几种生物光合色素分子体系电子激发光谱的理论研究. 博士学位论文. 武汉: 华中师范大学, 2007]

36 Kikuchi H, Sugimoto T, Mimuro M. An electronic state of the chromophore, phycocyanobilin, and its interaction with the protein moiety in C-phycocyanin: Protonation of the chromophore. Chem Phys Lett, 1997, 274: 460–465

37 Edington M D, Riter R E, Beck W F. Interexciton-state relaxation and exciton localization in allophycocyanin trimers. J Phys Chem C, 1996, 100: 14206–14217

38 Zhao J Q, Jiang L J. Computational simulation of the energy transfer processes in allophycocyanin (in Chinese). Sci China Ser B, 1998, 28: 324–346 [赵井泉, 蒋丽金. 变藻蓝蛋白中能量传递过程的计算机模拟. 中国科学(B 辑), 1998, 28: 342–346]

Summary for “重组别藻蓝蛋白三聚体结构与功能”

Structural and functional investigation of allophycocyanin trimer

LI WenJun[1,3†], PU Yang[2†], NIU Zhuang[2], XUE ChunLing[2] & QIN Song[1*]

[1] *Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;*
[2] *School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China;*
[3] *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*
† Equally contributed to this work
* Corresponding author, E-mail: cpra_yic@sina.com

Nature has been developing and optimizing photosynthesis billions years, including green plants, algae, photosynthetic bacteria and cyanobacteria. Phycobiliproteins system, as the phycobilisomes, in cyanobacteria and red algae is the one of two major light-harvesting systems, after evolution in billions years. Allophycocyanin (APC) trimer is a primary composition of phycobilisomes core for efficient lower-energy photons funneling pathway. In 2009, Liu et al. have firstly assembled the highly soluble self-assembled recombinant APC trimer with N-terminus polyhistidine, which the entire biosynthesis pathway of APC trimer was reconstituted in *Escherichia coli* strain with the full-length genes of apoprotein α subunit and β subunit from *Synechocystis* sp. PCC 6803. The recombinant APC trimer was used to be the subject in this research. An optimum protocol with immobilized metal-ion affinity chromatography with chelating transition metal ion (Ni^{2+}) was used to purify the recombinant protein. Then, the second purification was performed to obtain APC trimer with a higher purity (A_{650}/A_{620}=1.346), using density gradient centrifugation. Single molecules of recombinant APC trimers were investigated with atomic force microscopy. Three-dimensional images with resolution at nanoscale indicated that the recombinant allophycocyanin trimers were approximately 1.5 nm in short axis, and 15 nm in long axis, which were in accordance with the sizes of natural allophycocyanin trimer measured by transmission electron microscopy or X-ray crystallography. Moreover, the correct conformation of recombinant allophycocyanin trimer was confirmed by fluorescence spectra (studied energy transfer ability), absorption spectra (studied the light-harvesting ability), and circular dichroism (CD) spectra (studied changes of secondary structure and aggregation state). The CD spectra of recombinant allophycocyanin induced by a wide range of pH were analyzed both at wavelengths in ultraviolet range (190–250 nm) and visible range (450–750 nm). The α-helices were the dominant secondary structure in recombinant allophycocyanin trimer by analysis of CD spectra in ultraviolet range, while the analysis of CD spectra in visible range suggested the existence of exciton-coupled pairs of phycocyanobilins, in which the energy transfer was mainly in the form of exciton splitting. By studying its spectra property variations in response to pH changes, we found that recombinant APC trimer showed good absorbance and fluorescence stability at varying pH. The conformation of chromophores in recombinant APC trimer was relatively stable, between the range of pH 4–9, which was revealed by the stable absorption and fluorescence spectra properties of recombinant APC trimer. The trimeric structure of recombinant APC was maintained while local variations of protein peptides were also shown in response to the environmental disturbance. Beyond this pH range, secondary structure as well as overall conformation of recombinant APC dramatically changed, and the energy absorption and transfer ability were also disrupted. This work demonstrated that correct function in energy transfer was retained in the recombinant allophycocyanin trimer compared with nature allophycocyanin trimer.

recombinant allophycocyanin trimer, exciton-coupled pairs, absorption spectrum, fluorescence spectrum, circular dichroism spectra, conformational stability

doi: 10.1360/N972016-01416