

研究简报

钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白分子的 STM 研究

张玉忠^{* 1,2} 时东霞¹ 周百成² 曾呈奎² 庞世瑾¹

(¹中国科学院北京真空物理实验室, 北京2724信箱, 北京100080)

(²中国科学院海洋研究所, 青岛266071)

关键词 钝顶螺旋藻; C-藻蓝蛋白; 扫描隧道显微镜

藻胆蛋白存在于红藻、蓝藻、隐藻和某些甲藻中, 它们是这些藻类在光合作用中的捕光色素。藻胆蛋白在光合生物的进化过程中占有极其重要的地位, 研究它的结构与功能, 对于了解藻类光能吸收与传递的机理具有重要的意义。过去用 X 射线衍射方法等手段对藻胆蛋白的三维结构进行了大量的研究, 到目前为止已得到六聚体的 C-PC^[1,2]、三聚体的藻红蓝蛋白 (PEC) 和六聚体的 B-藻红蛋白 (B-PE) 等高分辨 X 射线衍射结构, 但由于 X 射线衍射方法需要首先得到蛋白质晶体, 因此到目前为止, 种类繁多的藻胆蛋白仅有为数很少的几种得到了 X 射线衍射结果。扫描隧道显微镜 (STM) 和原子力显微镜 (AFM) 是80年代初刚发明的新兴的表面分析技术, 现已广泛用于生物学研究, 兴起了一门新的学科——纳米生物学 (Nanobiology)。在过去几年中, STM/AFM 已经用来观察高等植物叶绿体、光合细菌膜^[3]以及光合细菌反应中心^[4]的结构。我们首次将 STM 应用于藻胆蛋白的结构研究, 试图为藻胆蛋白的结构研究开辟新的途径。

1.1 供试材料

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室的研究人员自己分离和培养。用白炽灯照光, 光强 $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度 (30 ± 2) 。培养7~8天, 于对数生长期进行收集。

1.2 藻胆蛋白的分离和纯化

用改进的羟基磷灰石柱层析纯化钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白 (C-PC)。用 30 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0, 含 0.2 mol/L NaCl) 进行洗脱, 收集较浓的部分, 重复洗脱3次。用岛津 UV-240 分光光度计测定吸收光谱。

1.3 藻胆蛋白结构的 STM 观察

实验前将 C-PC 透析48小时, 实验时用 5 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 稀释到蛋白含量大约 $5 \mu\text{g/ml}$, 吸取 $5 \mu\text{l}$ 样品溶液滴于刚揭开的高定向石墨 (HOPG) 上, 吸附30~60 s, 多余的溶液用滤纸吸干。用 CSTM-9100型 STM, 电化学方法自制钨针尖, 采用

收稿日期: 1996-12-03; 接受日期: 1997-01-31。

* 联系人, 现在工作单位: 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100。

恒流模式, 在室温大气下进行观察。扫描时的隧道电流0.61 nA, 偏压235 mV。

1.4 C-藻蓝蛋白的分离与光谱特性

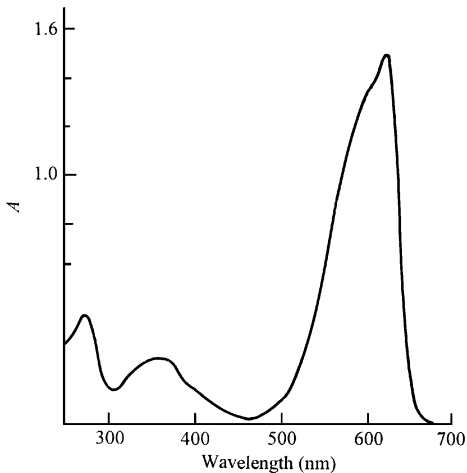


Fig 1 Absorption spectrum of C-PC in *Spirulina platensis*

从钝顶螺旋藻中, 我们用改进的羟基磷灰石柱层析简易方法得到纯化的C-藻蓝蛋白(C-PC), 图1是蓝藻钝顶螺旋藻C-PC的吸收光谱, C-PC的最大吸收峰在618 nm, 与文献报道一致。此峰值与278 nm处蛋白质本身的紫外吸收峰的比值接近4, 表明C-PC已经纯化。C-PC在低离子强度下以 $(\alpha\beta)_3$ 的形式存在, 并且其光谱类型也与文献中报道的 $(\alpha\beta)_3$ 的光谱类型一致。用这种简易方法可快速制备纯化的藻胆蛋白。

1.5 C-藻蓝蛋白在高定向石墨上的吸附与分散

由于生物样品的导电性能较差, 较柔软, 在基底上容易移动; 另外, 样品溶液中盐分的影响, 使得STM在观察生物样品时分辨率降低, 很难达到原子级分辨率。所以, 生物大分子需牢固地吸附在基底上, 只有这样才能得到高分辨率的STM图象。生物大分子在石墨基底上的分布主要取决于样品的浓度、样品本身的大小及样品在基底上的吸附时间。实验表明5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白浓度为C-PC STM实验的最佳浓度, 30~60 s为最佳的样品吸附时间。最后, 我们能够通过控制C-PC样品的浓度及其在石墨基底上的吸附时间, 使少数C-PC分子聚集在一起, 而大部分C-PC分子均匀地分布在石墨基底上(图2a)。因为样品在实验前经过透析, 溶液中仅含有5 mmol/L磷酸盐, 实验表明如此少量的盐分已不足以影响STM实验。在我们的实验中选用高定向石墨为基底, 因为石墨导电性能好, 并且有大范围的原子级平面。但是用石墨作基底也有不足之处, 主要是由于石墨表面容易出现一些类似于生物大分子, 特别是DNA分子的一些假象。由于石墨的STM图象在大范围改变扫描参数时仍比较稳定, 而生物样品的STM图象随着扫描参数的改变而变化较大。因此, 可以采用多次重复实验和改变STM的扫描参数(隧道电流和偏压)来区分基底的假象和吸附于基底上的生物大分子的真实图象。

1.6 C-藻蓝蛋白分子的STM图象

图2a是钝顶螺旋藻C-PC在石墨上的STM图象。由于扫描范围较大, 很难观察到C-PC分子的精细结构, 但可以看出C-PC分子为圆盘状, 圆盘的平均横向直径是24 nm。比X射线衍射结果大, 这主要是由于STM针尖引入的系统误差。缩小扫描范围, 可以较清楚地观察到C-PC分子圆盘状的分子形貌。C-PC分子圆盘的中央有一孔洞, 孔径11~14 nm, 亚基在四周呈圆环状排列(图2b)。该图象经过滤波处理, 除去其中的一些低频干扰信号, 可以观察到C-PC分子的更精细结构(图3a)。图3b是进一步放大的STM图象。从中可以清楚地观察到C-PC分子中央的孔洞及蛋白质链折叠。从其中的一个分子还可

以看出 C-PC 分子环状排列的亚基分成3块, 每一块呈“弯月”构象。根据 X 射线衍射结果^[1]可以推断每一块是一个 $(\alpha\beta)$ 单聚体, 但从图象中很难分辨出单个的 α 或 β 亚基及亚基上的色素基团。C-PC 分子与分子之间的大小和中央孔径存在差异是由于蛋白分子在石墨基底上吸附方式的不同和分子间本身存在的差异造成的。研究资料表明, C-PC 分子在低离子强度下是以 $(\alpha\beta)_3$ 的形式存在, 并且从本文得到的 C-PC 吸收光谱的特征与 C-PC $(\alpha\beta)_3$ 的特征相同, 因此, 可以断定本文得到的 C-PC 分子的 STM 图象是 $(\alpha\beta)_3$ 的表面形貌。

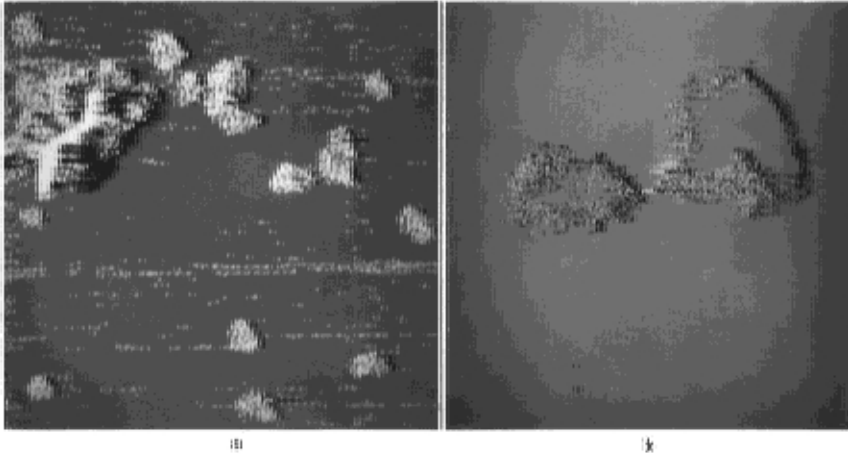


Fig 2 STM image of C-PC in *Spirulina platensis*
Scan area a, 350 nm \times 350 nm; b, 100 nm \times 100 nm.

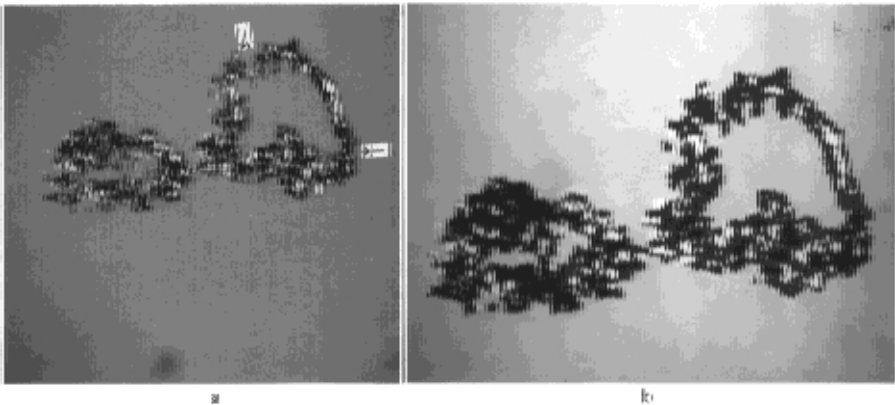


Fig 3 STM image of C-PC in *Spirulina platensis* with filter treatment

1.7 讨论

Schiemer 等^[1,2](1986, 1987年)根据 X 射线衍射结果推断出的 *A. quadruplicatum* C-PC $(\alpha\beta)_3$ 和 $(\alpha\beta)_6$ 的结构模型。该模型认为 C-PC $(\alpha\beta)_3$ 呈空心齿缘盘状构象, $(\alpha\beta)_6$ 呈厚缘盘状构象, 它是由两个 $(\alpha\beta)_3$ 面对面极性相互作用而成。本文首次将 STM 应用于藻胆蛋白的结构研究, 并从实际空间直接证实 C-PC 分子的齿缘盘状构象及中央空洞的存在。

X 射线衍射方法是目前研究藻胆蛋白及其他蛋白质晶体结构的有效手段, 并且分辨率很高。但这一方法首先必须要求得到蛋白质的晶体, 所以, 种类繁多的藻胆蛋白到目前为止仅有为数很少的几种得到 X 射线衍射结果。而藻胆蛋白的构象对它的功能影响很大, 具有功能的藻胆蛋白需要有一个特定的构象。本文结果表明用 STM 可以直接观察非晶体状态下的藻胆蛋白的结构。与 AFM 相比, STM 的分辨率较高, 用 STM 在高真空下观察到了 DNA 分子的原子特征, 与根据 X 射线衍射结果推出的 DNA 结构模型高度一致。C-PC ($\alpha\beta_3$) 只有 3 nm 的厚度, 本文结果表明对这样薄的生物样品, 用 STM 可以得到很高的分辨率。STM 要求样品必须导电, 而大多数生物样品的导电性较差, 如何提高生物样品的导电性是进一步拓宽 STM 在生物学研究中的主要问题。Lee 等^[5] (1995年) 将铂引入光合作用 PSI 反应中心, 并用 STM 成功地对其结构进行了观察。另外, 在光合作用研究方面, STM 具有 AFM 所无法替代的作用, 因为 STM 可以用来探测光合作用反应中心及其捕光色素蛋白复合体的光电转换特性。Facci 等^[4] (1994年) 用 STM 对光合细菌反应中心在光激发下的光电转换特性进行了研究。今后结合生物化学技术及快速时间分辨光谱技术, 可以用 STM 来直接观察藻胆蛋白构象变化对光能的吸收与传递功能的影响以及藻胆蛋白中色素基团与脱辅基蛋白质之间的相互作用, 为藻胆蛋白吸收与传递光能的机理的最终澄清提供直接证据。

参 考 文 献

- [1] Schimer T, Huber R, Schneider M. Crystal structure analysis and refinement at 2.5 Å of hexameric C-phycocyanin from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: the molecular model and its implication for light harvesting. *J Mol Biol*, 1986, **188**: 651- 676
- [2] Schimer T, Bode W, Hober R. Refined three dimensional structures of two cyanobacterial C-phycocyanin at 2.1 and 2.5 Å resolution: a common principle of phycobilin-protein interaction. *J Mol Biol*, 1987, **196**: 677- 695
- [3] Gollubok A O, Vinogradova S A, Tipsev S V *et al*. STM/STS study of photosynthetic bacterial membrane. *Ultramicroscopy*, 1992, **42-44**: 1228- 1235
- [4] Facci P, Eeokhin V, Nicolini C. Scanning tunneling microscopy of a monolayer of reaction centers. *Thin Solid Films*, 1994, **243**: 403- 406
- [5] Lee J W, Lee I, Lable P D *et al*. Chemical platinumization and its effect on excitation transfer dynamics and P700 photooxidation kinetics in isolated photosystem I. *Biophys J*, 1995, **69**: 652- 659

Study on the Structure of C-Phycocyanin in *Spirulina platensis* with Scanning Tunneling Microscope

ZHANG Yu-Zhong^{1,2}, SHI Dong-Xia¹, ZHOU Bai-Cheng²,

C. K. Tseng² (ZEN G Cheng-Kui) and PANG Shi-Jin¹

(¹ Beijing Laboratory of Vacuum Physics, Chinese Academy of Sciences, P. O. Box 2724, Beijing 100080, China)

(² Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT

The C-phycocyanin (C-PC) trimer was isolated from the blue-green alga *Spirulina platensis*, and scanning tunneling microscope (STM) was used to investigate its structure. High resolution STM images of C-PC were obtained. From the STM images, it could be observed that the C-PC molecules were disk-like in shape and the subunits of C-PC arranged in ring-like pattern with a channel in the center. After filter treatment, the folding of the polypeptide chains could be seen clearly. This is the first time to observe directly the topography of phycobiliprotein, and the results showed STM to be a powerful tool for the structural study of phycobiliproteins.

KEY WORDS: *Spirulina platensis*; C-phycocyanin; Scanning tunneling microscope (STM)