

# 海洋红藻 R-藻胆蛋白的扫描隧道显微镜研究

张玉忠<sup>1\*</sup> 周百成<sup>1</sup> 曾呈奎<sup>1</sup> 刘宁<sup>2</sup> 庞世瑾<sup>2</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(2. 中国科学院北京真空物理实验室, 北京 100080)

## 摘要

R-藻红蛋白(R-PE)从海洋红藻多管藻中分离获得,然后用扫描隧道显微镜对其结构进行了研究。结果表明当R-PE在基底高定向石墨(HOPG)上吸附时,大部分蛋白分子聚集在一起,少数单个的蛋白分子分布于HOPG的表面。进一步缩小扫描范围,可以清楚地观察到R-PE分子为圆盘状结构,但分子中央的孔洞不象C-藻蓝蛋白那样清晰,这是由于 $\gamma$ 亚基位于分子的中央孔洞内。

关键词 扫描隧道显微镜 海洋红藻 R-藻红蛋白

藻胆蛋白是红藻、蓝藻、隐藻和某些甲藻中光合作用中的捕光色素。到目前发现的藻胆蛋白有四大类,分别是藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(PC)、异藻蓝蛋白(A PC)和藻红蓝蛋白(PEC),其中每一大类又根据其性质的不同分成不同的类型,如藻红蛋白分成R-藻红蛋白、C-藻红蛋白、B-藻红蛋白和b-藻红蛋白。藻胆蛋白在光合生物的进化过程中占有极其重要的位置,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。加之藻胆蛋白含量丰富,易于分离,在常温下非常稳定,藻胆蛋白是目前研究的最清楚的光合色素<sup>[1]</sup>。过去用电子显微镜、X-射线衍射等手段对藻胆蛋白的结构进行了大量的研究,到目前为止,已得到六聚体的C-PC<sup>[2-4]</sup>,三聚体的PEC<sup>[5]</sup>和六聚体的B-PE<sup>[6]</sup>的高分辨X-射线衍射结构,但由于电子显微镜分辨率较低,而X-射线衍射需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)是八十年代初刚发明的新兴的表面分析技术,已广泛用于生物学研究<sup>[7]</sup>。我们首次将STM应用于藻胆蛋白的结构研究,已得到了螺旋C-藻蓝蛋白分子高分辨率的STM图像<sup>[8]</sup>,本文报道多管藻R-藻红蛋白的STM研究结果。

海洋红藻多管藻(*Polysiphonia urceolata*)采自青岛汇泉湾畔。将藻体浸在蒸馏水中让其自溶解,过滤得到藻胆蛋白的粗提液,然后用羟基磷灰石柱层析纯化藻胆蛋白。R-藻红蛋白(R-PE)用20mM的磷酸缓冲液(pH7.0, 0.2M NaCl)洗脱,重复洗脱四次,即得到纯化的R-PE。用岛津UV-240分光光度计测定吸收光谱。根据最大吸收峰的OD值计算藻胆蛋白的含量。

在STM实验之前将藻胆蛋白对5mM(pH7.0)的磷酸缓冲液透析48小时,除去溶液中的NaCl,实验时将透析液稀释到大约5 $\mu$ l/ml,吸取5 $\mu$ l样品溶液滴于刚揭开的高定向石墨(HOPG)上,吸附30s,多余的溶液用滤纸轻轻吸干。STM实验用中国科学院化学研究所生产的CSTM-9100型STM在室温大气下进行,采用恒流模式,用电化学方法自制钨针尖。扫描时隧道电流为0.70nA,偏压为256mV。文章中的所有STM图像都是原始图像。

图1是多管藻R-藻红蛋白的吸收光谱,多管藻的R-PE有三个吸收峰,分别为498nm, 545nm和565nm,最大吸收峰565nm处的峰值与278nm处蛋白本身的吸收值之比为3.82,说明这R-PE已经纯化。

\* 现在通讯地址: 山东大学生命科学院微生物研究所, 济南 250100

图2是多管藻R-PE的STM图像,多个R-PE分子面对面聚集在一起形成类似于藻胆体杆的结构,说明纯化的R-藻红蛋白也倾向于以聚合体的形式存在,这也是生物大分子的共同特性。聚集态的形成主要取决于R-PE在溶液中的浓度及在HOPG上的吸附时间。在聚集体的边缘,分布着数个单个的R-PE分子,分子与分子间的微小差异是由于蛋白分子在HOPG表面上不同的吸附方式所致。

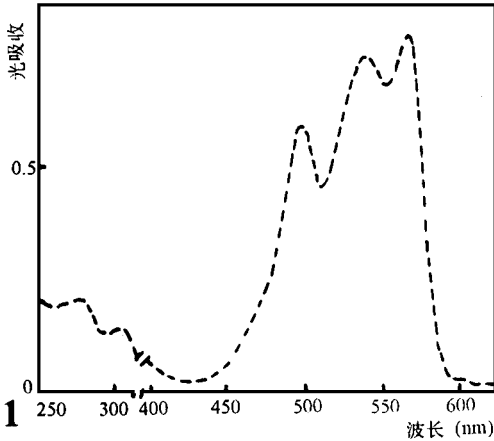


图1 多管藻R-PE的吸收光谱

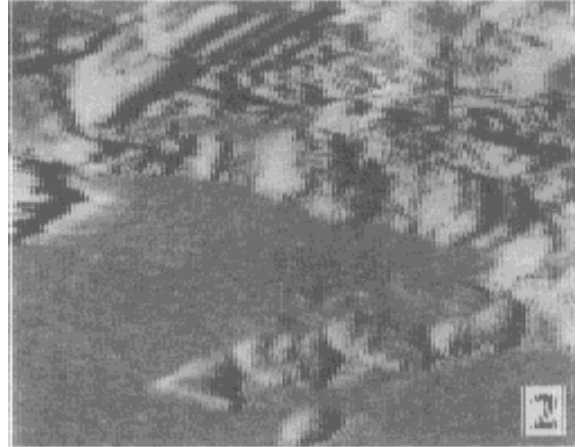
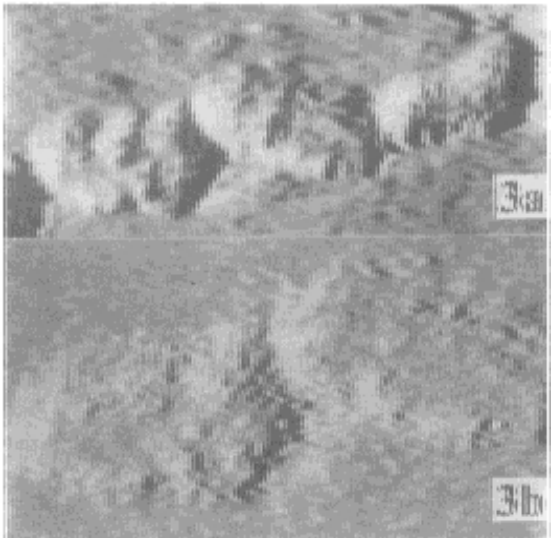


图2 多管藻R-PE的STM图像(128nm × 128nm)

进一步缩小扫描范围,可以得到更清晰的R-PE单个分子STM图像(图3)。从中可以看出R-PE分子为椭圆盘状结构,长径18-20nm,短径11-13nm,盘状分子的中央没有类似于C-PC<sup>[8]</sup>分子的孔洞,常万瑞等(1995)<sup>[9]</sup>根据X-射线衍射结果推断出多管藻R-PE为圆盘状结构,晶胞参数 $a = b = 18.99\text{nm}$ ,与STM结果有点差异,可能由于R-PE分子在HOPG表面吸附时蛋白分子发生扭曲,加之,在STM扫描过程中由于针尖与样品间的相互作用,蛋白分子有时会变形。另外,值得注意的是蛋白质在晶体状态的构象与在溶液中的构象是否完全一致,还有待于进一步的研究。R-PE的分子聚集态是 $(\alpha\beta)_6$ , $\gamma$ , $\gamma$ 亚基位于 $(\alpha\beta)_6$ 的中央孔洞里<sup>[9]</sup>,使得中央的孔洞不清楚,此外由于R-PE的分子量较大,外形较厚,导致分子的导电性能差,针尖与样品的相互作用加强,使得分辨率降低,今后用STM研究藻胆蛋白时需进一步改进制样方法,提高STM图像的分辨率,以便更好地发挥STM的优势。



(a) 40nm × 70nm (b) 25nm × 40nm

图3 多管藻R-PE的STM图像

STM和AFM的最大特点是分辨率高,能够实时实空地直接观察生物大分子(DNA,蛋白质等)的结构,可以在空气、溶液或低温下进行,使生物大分子保持近似天然的状态,使我们能够在纳米尺度上把生物大分子的结构与功能直接联系起来<sup>[7]</sup>。我们首次将STM应用于藻胆蛋白的结构研究,进一步证实了STM的独特优势。今后结合蛋白质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在光能的吸收与快速传递过程中色素基团与蛋白质之间的相互作用, 为藻胆蛋白的结构、功能与进化的研究开辟新的途径。

### 参 考 文 献

- [1] Rowan K S. Photosynthetic pigments of algae. Cambridge University Press, 1989. pp 167-185  
 [2] Schimer T et al. J. Mol Biol, 1986, 188: 651-676  
 [3] Schimer T et al. J. Mol Biol, 1987, 196: 677-695  
 [4] Duerring M et al. J. Mol Biol, 1991, 217: 577-592  
 [5] Duerring M et al. J. Mol Biol, 1990, 211: 633-644  
 [6] Ficner R et al. J. Mol Biol, 1993, 228: 935-950  
 [7] Wiesendanger R. Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and applications. Cambridge University Press, 1994, P525-536  
 [8] Zhang et al. J. Vac Sci Tech, 1994, B12: 1497-1499  
 [9] 常万瑞等. 中国科学(B), 1995, 25: 49-53

## Study on The Structure of R-Phycoerythrin in Marine Red Alga *Polysiphonia urceolata* with Scanning Tunneling Microscope

Zhang Yuzhong Zhou Baicheng Zeng Chengkui(C. K. Tseng)  
 Liu Ning\*\* Pang Shijin\*\*

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

(\* Beijing Laboratory of Vacuum Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

### Abstract

R-PE was isolated from marine red alga *Polysiphonia urceolata*, and STM was used to investigate its topography. It was shown that most of the R-phycoerythrin molecules assembled together while absorbing on the highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) surface; at the meantime, a few of single molecules distributed on HOPG surface. With higher resolution, the topography of the R-PE molecules were observed clearly, which were disc-like in shape. Otherwise, no obvious channel in the centre of the disc like that in C-phycoerythrin was seen, which was due to the effect of the  $\gamma$ sununit in the channel.

**Keywords** scanning tunneling microscope marine red alga R-phycoerythrin