

# 集胞藻核亚基 ApcD 及其复合物功能研究

彭盼盼<sup>1</sup> 彭丹丹<sup>2</sup> 曹园<sup>1</sup> 牛楠楠<sup>3</sup>

(1. 新乡职业技术学院, 河南 新乡 453003;

2. 开封高级中学, 河南 开封 475003;

3. 华中农业大学微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** ApcD 作为藻胆体的终端能量发射器之一, 其与 ApcA、ApcB 有序紧密的结合在一起, 参与藻胆体核的组成, 在将藻胆体捕获的光能高效传递至光反应中心的过程中起着关键的作用。由于 ApcD 是低丰度蛋白, 在集胞藻中表达量极低, 目前大都是从大肠杆菌中提取 ApcD 重组蛋白, 但研究表明在大肠杆菌中很难实现 ApcD、ApcA、ApcB 复合物的共表达。本研究运用基因工程和分子生物学等技术, 首次分离纯化得到 ApcD、ApcB 与 ApcA 的天然复合物, 实现了天然藻胆体核复合物的分离纯化, 并分析了该天然复合物的生物化学特性。

**关键词:** ApcD, ApcA, ApcB, 藻胆体核亚基复合物

## Study on the function of ApcD nuclear subunit complex in *Synechocystis* sp.PCC 6803

PENG P P1 PENG D D2 CAO Y1 NIU N N3

(1.Xinxiang Vocational and Technical College, Xinxiang 453003;

2.Kaifeng High School, Kaifeng 475003;

3.State key laboratory of microbiology, huazhong agricultural university, Wuhan 430070)

**Abstract:** ApcD as one of the terminal energy emitters in phycobilisomes (PBS), is closely integrated with ApcA and ApcB in an orderly manner and participates in the composition of the nucleus, playing a key role in funneling excitation energy from the hundreds of chromophores of the extra-membraneous phycobilisome to the reaction centers within the photosynthetic membrane. In PBS, ApcD is in very low abundance. Current research shows that it is difficult to realize co-expression of ApcD, ApcA and ApcB in *E. coli*. We now obtained the natural complex from *synechocystis* sp.PCC 6803 by using genetic engineering and molecular biology technique, and analyzed its biochemical activity.

**Keywords:** ApcD, ApcA, ApcB, phycobilisome nucleic complex

集胞藻 PCC 6803 的藻胆体核 (core) 是由 3 个圆柱筒 (cylinder) 组成, 每个圆柱筒由 4 个圆盘组成, 每个圆盘又是由别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的三聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> 与核连接蛋白 (core-linker protein, LC) 紧密有序的连接组装而成。其中, APC 三聚体是组成藻胆体核 (core) 的一个圆盘的基本单元, 在 *Synechocystis* sp.PCC 6803 中, 天然 APC 的三聚体有 4 种存在形式, 大部分是  $\alpha$  亚基 ApcA ( $\alpha$  AP) 与  $\beta$  亚基 ApcB ( $\beta$  AP) 以 ( $\alpha$  AP $\beta$  AP)<sub>3</sub> 或者 ( $\alpha$  AP $\beta$  AP)<sub>3</sub>LC 形式存在, 主要吸收 650nm 的红光; 但 APC 中有三个很特别的亚基: ApcD ( $\alpha$  AP-B)、ApcE (LCM) 和 ApcF ( $\beta$  18.3), 它们在藻胆体中天然的存在形式分别是 ( $\alpha$  AP-B $\alpha$  AP $2\beta$  AP<sub>3</sub>) LC 和 ( $\alpha$  AP $\beta$  AP)<sub>2</sub> $\beta$  18.3LCM, 主要吸收 670nm 的红光。其中 ApcD 是 AP-B (别藻蓝蛋白 B)

的  $\alpha$  亚基, 由 apcD 基因编码, 有着很红移的吸收和荧光, 可以将藻胆体所捕获的能量高效的传递给光反应中心。因此, 藻胆体核亚基 ApcD 复合物光谱性质的研究, 对研究藻类终端能量传递机制具有十分重要的意义。

已有研究表明, APC 单体 ( $\alpha$  AP $\beta$  AP) 的吸收在 615nm, 三聚体 ( $\alpha$  AP $\beta$  AP)<sub>3</sub> 的吸收和荧光分别在 652nm 和 660nm; 而 AP-B 单体 ( $\alpha$  AP-B $\beta$  AP) 的吸收在 621-648nm, 三聚体 ( $\alpha$  AP-B $\beta$  AP)<sub>3</sub> 的吸收和荧光分别在 670nm 和 675nm。本研究得到的 ApcD、ApcB 与 ApcA 的天然复合物吸收峰在 620nm、656nm 和 668nm, 荧光峰在 674nm。

### 一、材料与方法

#### (一) 材料与试剂

耐葡萄糖型 *Synechocystis* sp.PCC 6803 购自中国科学院武

汉水生生物研究所；大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 由华中农业大学微生物国家重点实验室制备并保存；pBluescriptKS (+) 购自 Stratagene，简称 pBlue；分子克隆实验中用到的 pfu DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶以及各种限制性内切酶都是购自 Fermentas 公司；回收 DNA 片段的试剂盒是购自康为世纪生物科技有限公司；引物合成和 DNA 测序均有南京金斯瑞生物科技有限公司完成；质粒提取试剂盒是购自康为世纪生物科技有限公司；蛋白胨和酵母粉等购自 Oxoid 公司；DNA 电泳所用琼脂糖购自 Promega 公司；丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、Tris 和甘氨酸购自 Amesco 公司；卡那霉素、考马斯亮蓝购自 Amesco 公司；蛋白纯化过程中用到的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaCl 和咪唑等其它化学试剂均为国产试剂；亲和层析介质 Superose-6、Superdex-200 预装柱 (30 × 1.0cm) 都是购自 GE Healthcare 公司；双向电泳：尿素 (Urea)、硫脲 (Thiourea)、二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺 (IAA)、3-[ (3-胆酰胺丙基) - 二乙胺 ]- 丙磺酸 (CHAPS)、IPG Buffer (pH4-7)、IPG 干胶条 (18cm, pH4-7 Linear)、矿物油和除盐试剂盒 (2D clean-up) 等购自 Amersham- GEhealthcare 公司。

## (二) 载体的构建、克隆与转化

以 *Synechocystis* sp.PCC 6803 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增，P1 和 P2 引物用来扩增羧基端带有 6 个组氨酸标签的 *apcDHis6* 基因片段，构建 pBlue-*apcDHis6* 质粒。引物 P1: 5' - GGC GCC CTC GAG ATG AGT GTA GTT AGT CAA GTT ATT TTG CA -3'；引物 P2: 5' -ATA GAA TTC TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG GGA CAT AAA CTG AAT GAT GTA A-3'。将扩增好的 *apcDHis6* 基因片段用 EcoRI 和 XhoI 限制性内切酶后，与经过同样酶切后的 pBluescriptKS (+) 载体连接，然后转化于 BL21 (DE3) 中，用含有氨苄霉素的 LB 培养平板进行筛选，根据质粒酶切图谱初步鉴定阳性克隆。

P3 和 P4 引物用来扩增 *apcD* 下游 817bp 的基因片段 (downstream)，构建 pBlue-*apcDHis6*-downstream 质粒。引物 P3: 5' - CTG GAA TTC TTT GTT TTG GCA CGA AGA TTA A -3'；引物 P4: 5' - CAG TCT AGA GGA AGC CAT AGA AAA GGG GAA A -3'。将上述扩增好的下游片段用 EcoRI 和 XbaI 限制性内切酶后，与经过同样酶切后的 pBlue-*apcDHis6* 载体连接，然后转化于 BL21 (DE3) 中，用含有氨苄霉素的 LB 培养平板进行筛选。根据质粒酶切图谱初步鉴定阳性克隆，然后将初步鉴定正确的克隆送去测序。

KmR 是用 EcoRV 从 pCOLADuet-1 载体上酶切而来。pBlue-*apcDHis6*-downstream 用 EcoRI 单切，然后用 Klenow 将其粘性末端补为平末端，与 KmR 连接，转化于 BL21 (DE3) 中，用含有氨苄霉素和卡那霉素的双抗 LB 培养平板进行筛选，构建 pBlue-*apcDHis6*-KmR-downstream 质粒，根据质粒酶切图谱鉴定阳性克隆。

## (三) 目的菌株的筛选

将构建好的 pBlue-*apcDHis6*-KmR-downstream 质粒转化于纯化过的 *Synechocystis* sp.PCC 6803 野生藻 (Wildtype) 中。具体操作方法如下：首先将混合有 pBlue-*apcDHis6*-KmR-downstream 质粒的藻细胞液放置于光照摇床 30℃，130r/min，孵育 8~12h；接着将离心管中的藻细胞液均匀涂布于铺有孔径为 1.2 μm 的醋酸纤维素膜 (经高压灭菌) 的无抗 BG11 琼脂皿上，正置放在光照培养箱中于 30℃ 培养 12~24h；然后将该醋酸纤维素膜转至带有 Kan 抗性 (终浓度 40 μg/mL) 的 BG11 琼脂平板上，置于光照培养箱中，培养温度是 30℃，14d 左右会有单克隆出现；挑取单克隆进行扩大培养，然后抽提该藻种的基因组 DNA，用 PCR 检测其是否为阳性克隆。

## (四) 蛋白的表达与纯化

将 *apcDHis6* 藻种的单菌落接种于 100mL 含有卡那霉素抗性的 BG11 中，放置于光照摇床于 30℃，130r/min 培养；待 OD<sub>730nm</sub> 约为 1.0 时，将其转接于 2L 的装于 1L 含有卡那霉素抗性的 BG11 培养基的培养瓶中，放置在磁力搅拌器上 250r/min，30℃，光强为 20 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>，及 CO<sub>2</sub> 通入量为 0.03% 的条件下进行培养；待 OD<sub>730nm</sub> 约为 1.0 时，将其转接于 5L 的装于 4L 的含有卡那霉素抗性的 BG11 培养基的培养瓶中，培养条件同上；待 OD<sub>730nm</sub> 为 1.0 时，离心 5min (6500r/min)，收集藻细胞，蒸馏水洗涤 1 次，-20℃ 保存。

将冻存的 1L 藻细胞重悬于 10mL 柱平衡洗脱液 (20mmol/L KPB, 300mmol/L NaCl, pH7.2) 中，压力破碎 6 次 (压力 1500Pa)，离心 1h (12000r/min, 4℃)，取上清。上清液用镍离子亲和层析柱进行初步纯化。杂蛋白洗脱采用含有 50mmol/L 咪唑的柱平衡洗脱液，色素蛋白收集采用含有 300mmol/L 咪唑的柱平衡洗脱液。过柱收集的产物用透析液 (20mmol/L KPB, 100mmol/L NaCl, pH 7.2) 透析 (4℃ 避光，过夜)，除去咪唑和小分子杂质。将透析产物浓缩至 1mL，使用 Superose 6 分子筛预装柱进一步纯化，洗脱缓冲液采用透析液，流速 0.5mL/min。

## (五) SDS-PAGE 与色素蛋白锌电泳

取 10 μL 纯化产物，加入终浓度为 10% 的三氯乙酸，于 -20℃ 放置 15min，离心。沉淀用丙酮洗涤 3 次，晾干后加入上样缓冲液和巯基乙醇 (9:1)，100℃ 煮沸 5min，离心，取上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。电泳结束后，于室温下将电泳凝胶用 1.5mol/L 醋酸锌溶液浸泡 3min，用超纯水漂洗两次，用化学发光凝胶成像系统 (Carestream 2200 PRO) 检测并拍照保存。然后将凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色液进行染色，脱色后进行扫描。

(六) 双向电泳 (Two dimensional electrophoresis) 与蛋白质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)

按照 GE 公司提供的 2D clean-up 试剂盒说明对纯化产物

进行除盐,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。取  $100\mu\text{g}$  蛋白样品, 补加硫脲水化液 ( $2\text{mol/L}$  硫脲,  $7\text{mol/L}$  尿素,  $40\text{mmol/L}$  DTT,  $0.5\% [\text{v/v}]$  IPG 缓冲液,  $0.002\% [\text{w/v}]$  溴酚蓝,  $2\% [\text{w/v}]$  CHAPS) 至  $350\mu\text{L}$ , 混合均匀。用  $\text{pH}4-7$ , 长  $18\text{cm}$  的 IPG 胶条上样, 使用 GE Ettan IPGphor 3 等电聚焦仪进行一向等电聚焦电泳。程序运行温度为  $20^{\circ}\text{C}$ , 最大电流是  $0.05\text{mA/IPG strip}$ , 程序运行  $1\text{h}$  后, 胶条槽中需加入  $500\mu\text{L}$  Immobiline DryStrip 矿物质油。

等电聚焦结束后, 用含有  $40\text{mmol/L}$  固体二硫苏糖醇 (DTT) 的平衡缓冲液 ( $6\text{mol/L}$  尿素,  $75\text{mmol/L}$  Tris-Cl [ $\text{pH} 8.8$ ],  $30\% [\text{w/v}]$  甘油,  $2\% [\text{w/v}]$  SDS,  $0.002\% [\text{w/v}]$  溴酚蓝) 轻轻振荡孵育  $15\text{min}$ ; 然后用含有  $25\text{mg/mL}$  固体碘乙酰胺 (IAA) 的平衡缓冲液轻轻振荡孵育  $15\text{min}$ 。胶条平衡完毕后, 使用 GE Ettan DALTsix 垂直电泳槽胶条进行第二向 SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 电泳结束后, 分别进行醋酸锌染色和考马斯亮蓝染色, 方法同 1.5。凝胶经考马斯亮蓝染色和脱色后, 将凝胶上的目的蛋白点分别挖出, 送至中国科学院上海生命科学研究院, 使用 4800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer (AB SCIEX) 蛋白质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪对样品进行检测。

#### (七) 光谱的测定与尿素变性

对提纯产物进行吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱 (Circular dichroism, CD) 测定, 取部分产物用酸性尿素 ( $8\text{mol/L}$ ,  $\text{pH}2.0$ ) 变性, 变性后测吸收、荧光和圆二色光谱 (CD)。

吸收光谱用日立 U-2900 型紫外-可见光谱仪测定, 测定参数设置如下: 扫描范围  $200-800\text{nm}$ , 扫描速度  $800\text{nm/min}$ , 狭缝宽度  $1.0\text{nm}$ 。荧光光谱用 Perkin-Elmer LS-55 型荧光光谱仪测定, 测定参数设置如下: 激发波长  $600\text{nm}$ , 扫描速度  $1200\text{nm/min}$ , 狭缝宽度  $10.0\text{nm}$ 。

CD 用 MOS500 型 CD 光谱仪 (BioLogic) 测定, 为了避免咪唑对 CD 测定的影响, 测定样品需透析 3 次, 以最终透析后的透析液作为参照, 测定样品在可见光部分的 CD (Via-CD)。测定参数设置如下: 扫描范围  $300-800\text{nm}$ , Acq duration =  $0.5\text{sec}$ , Fentes band width =  $5.0\text{nm}$ 。

#### (八) 摩尔消光系数 ( $\epsilon$ ) 和荧光量子产率 ( $\Phi\text{F}$ ) 的计算

根据荧光量子产率的定义 ( $\Phi\text{F} = \text{F}/\text{I}$ ) 和朗伯-比尔定律 (Beer-Lambert) 可推导出公式:  $\Phi\text{F}1 = (\text{F}1/\text{F}2) \times (\text{A}2/\text{A}1) \times \Phi\text{F}2$ , 已知 PCC 7120 中天然 CPC 的荧光量子产率 ( $\Phi\text{F}2$ ) 是  $0.27$ , 据此可计算出提纯产物的  $\Phi\text{F}1$ 。根据色素蛋白在酸性尿素 ( $8\text{mol/L}$ ,  $\text{pH}2.0$ ) 中色素的摩尔消光系数  $\epsilon_{662\text{nm}}$  为  $35500\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  可计算出提纯产物的摩尔消光系数 ( $\epsilon$ )。

#### (九) 蛋白质聚集态的分析

不同聚集态的蛋白具有不同的光谱特性, 蛋白质分子量测定常用的方法之一是分子筛过滤层析。根据已知大小的标准蛋

白的洗脱体积  $V_e$  和 Blue Dextran 的洗脱体积  $V_0$ , 绘制出标准曲线, 即可求出提纯产物的分子量。本研究中选择的标准蛋白的分子量分别是:  $669\text{kD}$ 、 $443\text{kD}$ 、 $200\text{kD}$ 、 $150\text{kD}$ 、 $66\text{kD}$  和  $29\text{kD}$ , 柱子空隙体积用 Blue Dextran 2000 确定, 选择 Superose 6 分子筛预装柱 ( $V_t=24\text{mL}$ ) 进行洗脱, 流速为  $0.5\text{mL/min}$ , 柱洗脱缓冲液用透析液。

## 二、结果

### (一) 色素蛋白复合物 SDS-PAGE 与锌电泳结果

将提纯产物进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色与锌染色结果一致, 有两条蛋白质条带, 表明提纯产物至少是 2 种蛋白组成的复合物。其中  $18.4\text{kD}$  处有清晰的蛋白条带, 而 ApcD 的分子量是  $18.7\text{kD}$ , 蛋白分子量与预期结果一致, 由此我们初步认为提纯得到了 ApcD 蛋白, 如图 1 所示。这一结果初步证明了可以实现从蓝藻体内分离纯化具有天然活性的藻胆体核复合物。

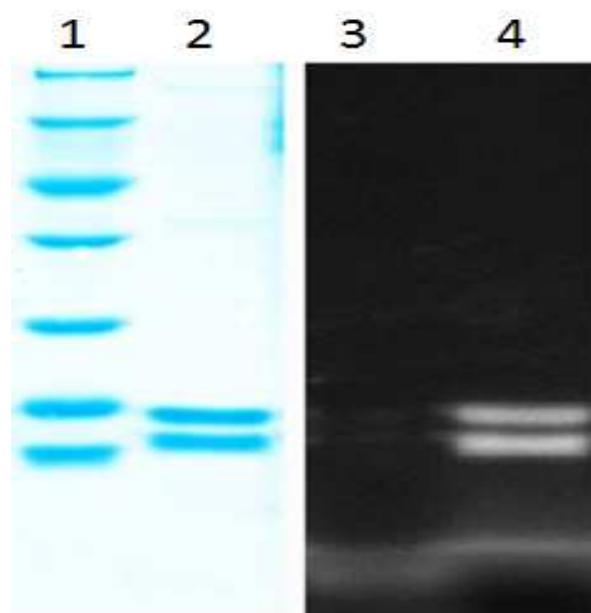


图 1 目的蛋白的聚丙烯凝胶电泳图。

考染色 (泳道 1 和 2), 锌染色 (泳道 3 和 4), 其中泳道 1 和 3 是标准蛋白, 泳道 2 和 4 是蛋白样品  
泳道 1 中标准蛋白的分子量从上到下依次是  $116$ 、 $66.2$ 、 $45$ 、 $35$ 、 $25$ 、 $18.4$  和  $14.4\text{kDa}$

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis of aim proteins. SDS-PAGE of the sample (lanes 2, 4) and standard proteins (lanes 1, 3). Lanes 1, 2 were stained with Coomassie brilliant blue. Lanes 3, 4 showed the zinc induced fluorescence of the same gel. Molecular marker (lane 1, from top to bottom):  $116$ ,  $66.2$ ,  $45$ ,  $35$ ,  $25$ ,  $18.4$ ,  $14.4\text{kDa}$

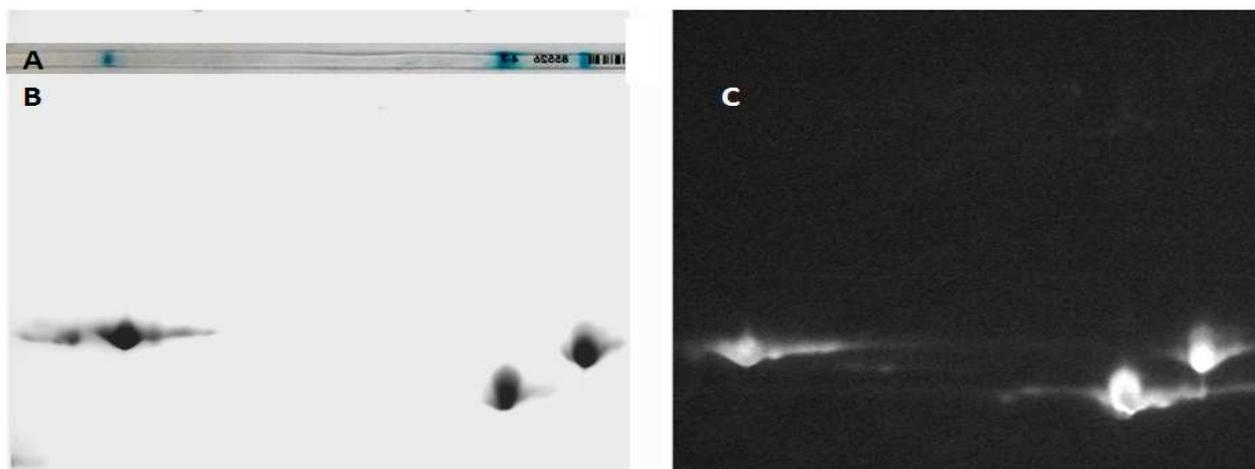


图2 目的蛋白的双向电泳分析

A图是一向，B图是考染色结果，C图是锌染色结果

Fig.2 2D electrophoresis

A: IEF of the first dimension. B: 2D gel, stained with Coomassie brilliant blue. C: Zinc induced fluorescence of the same gel

## (二) 色素蛋白复合物双向电泳结果

已知 ApcA 单体蛋白的实际分子量是 17.4kD，ApcB 单体蛋白的实际分子量是 17.2kD，由于集胞藻 PCC 6803 中 APC 的分子量比较接近，从 SDS-PAGE 结果中不能确定 ApcD 复合物具体的物质组成，因此我们进行了双向电泳实验。

双向电泳实验中考马斯亮蓝染色结果（图 2-B）、醋酸锌染色结果（图 2-C）与一向等电聚焦结果（图 2-A）一致，均显示提纯产物包括 3 个蛋白组分。从图 2-A 中我们可以清晰的看到 3 个蓝色的蛋白质点，说明提纯产物中至少存在 3 种不同的蛋白组分。本实验中所用的一向等电聚焦的胶条是线性梯度，长度为 18cm，我们根据一向等电聚焦结果（图 2-A）初步分析了目的蛋白的等电点，具体分析方法如下：从左至右 3 个蛋白点分别分布在胶条 3.7cm、11.3cm 和 12.8cm 附近位置，相互对应的 pH 分别约是 6.38、5.12 和 4.87。而已知的 ApcD、ApcB 和 ApcA 等电点分别是 6.37、5.43 和 4.86。根据这一结果，我们推测图 2-A 中从左至右 3 个蛋白质点分别对应于 ApcD、ApcB 和 ApcA。利用 Photoshop 软件对醋酸锌染色结果中 ApcA、ApcB 和 ApcD 亚基进行了初步定量分析，其组分含量比约为 2: 3: 0.7。为了进一步验证我们得到的蛋白质复合物中确实是由 ApcA、ApcB 和 ApcD 组成，我们分别将图 2-B 中的考马斯亮蓝染色后的蛋白质点挖出，进行蛋白基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析（MALDI-TOF-MS），质谱分析结果与预期一致，证实了目的蛋白是 ApcA、ApcB 和 ApcD 组成的复合物。

## (三) 色素蛋白复合物光谱检测结果

如图 3-A 所示，藻胆体核复合物 ApcD、ApcA 与 ApcB 有

3 个吸收峰：620nm、656nm 和 668nm，在样品不断稀释的过程中，多聚体 656nm 和 668nm 吸收峰值相对于单体 620nm 的吸收峰值会不断降低。这一结果表明随着复合物样品的不断稀释，多聚体的浓度逐渐降低。

该复合物中加入终浓度 0.5M 尿素时，如图 3-B 所示，其多聚体 656nm 和 668nm 吸收峰值明显降低。当加入终浓度 1M 尿素时，656nm 和 668nm 吸收峰值变的更低。而当加入终浓度 2M 尿素时，多聚体 656nm 和 668nm 吸收峰完全消失，只有 620nm 的单体吸收峰，与加入终浓度 3M 和 4M 尿素时情况一样，说明在 2M 尿素（终浓度）存在的情况下，该复合物完全解聚，变为了单体。

荧光光谱（图 3-C）结果显示，0M 尿素时，荧光峰在 674nm。当加入终浓度 1M 尿素时，荧光峰在 650nm，相对于 0M 尿素的荧光峰蓝移 24nm。而在终浓度 2M 尿素存在的情况下，荧光峰在 638nm，相对于 0M 尿素的荧光峰蓝移 36nm。

藻胆体核复合物 ApcD、ApcA 与 ApcB 圆二色光谱图（3-D）显示其有三个特征峰，分别是 +363nm、+629nm 和 -665nm，证实其二级结构为  $\alpha$  螺旋。

## (四) 色素蛋白复合物解离动力学分析

由于色素蛋白复合物三聚体的吸收峰在终浓度为 2M 尿素的透析液中会完全消失，因此，我们可以在该复合物中加入 4M 尿素（1: 1, v/v），用 stopped-flow 装置监测其 668nm 和 656 nm 吸收峰的具体变化情况。结果如表 1 所示，668nm 吸收峰处显示有 2 种组分，组成比例为 42.7% 和 57.3%，其分别在 1.42 秒和 7.75 秒内解聚完毕。656nm 吸收峰处显示有 2 种组分，组成比例为 53.9% 和 46.1%，其分别在 1.37 秒和 8.05 秒内解

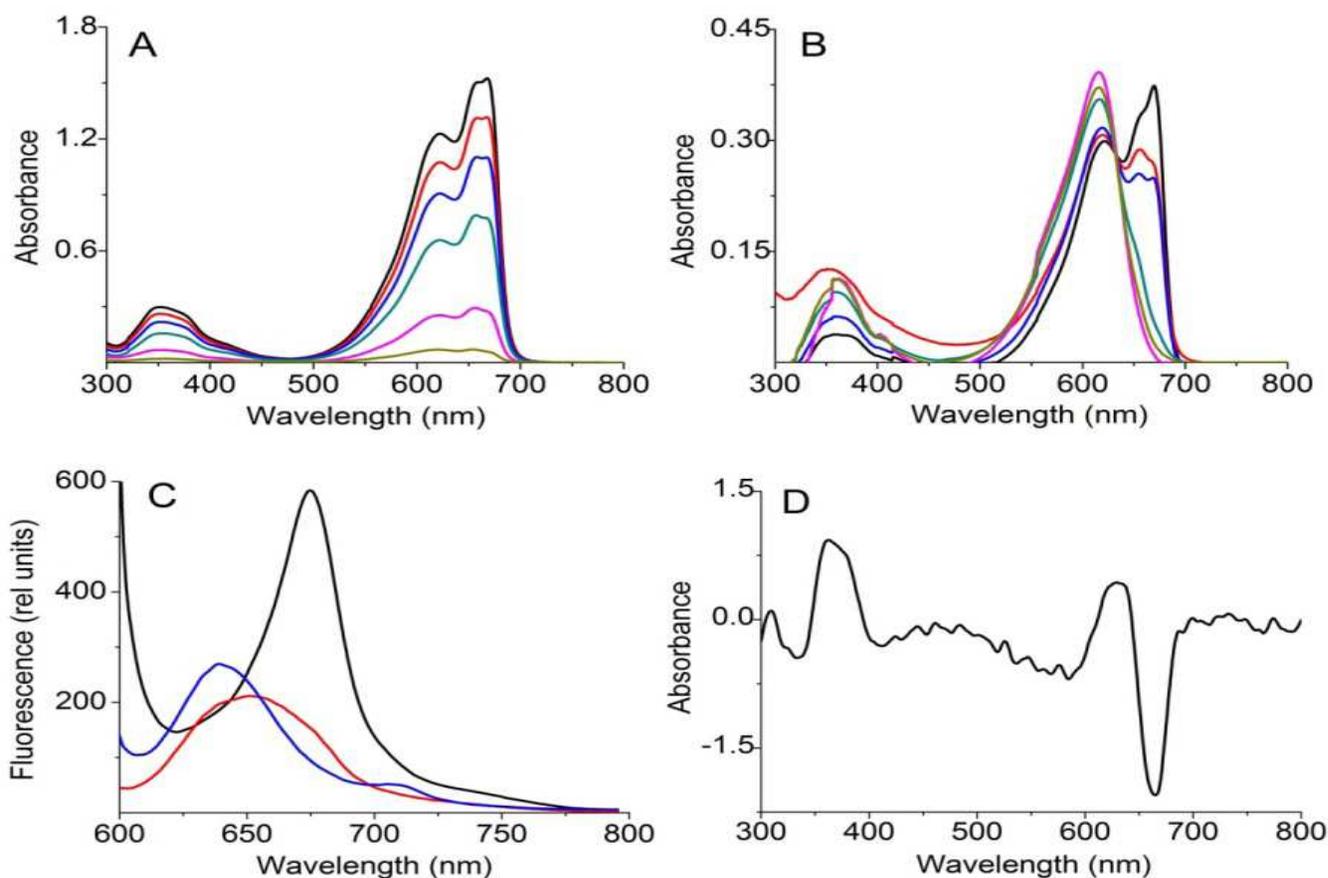


图 3 ApcD 及 ApcA 与 ApcB 复合物的吸收、荧光和圆二色光谱分析

A 图是用透析缓冲液不断稀释样品的吸收光谱图，多聚体的浓度分别是  $2.5 \mu\text{M}$ （黑色）， $2.2 \mu\text{M}$ （红色）， $1.8 \mu\text{M}$ （蓝色）， $1.3 \mu\text{M}$ （绿色）， $0.5 \mu\text{M}$ （洋红色）和  $0.1 \mu\text{M}$ （黑黄色）。B 图是尿素对吸收光谱的影响，尿素浓度分别是  $0\text{M}$ （黑色）， $0.5\text{M}$ （红色）， $1\text{M}$ （蓝色）， $2\text{M}$ （洋红色）， $3\text{M}$ （黑黄色）和  $4\text{M}$ （绿色），光谱是  $632\text{nm}$  归一化。C 图是尿素对荧光光谱的影响，尿素浓度分别是  $0\text{M}$ （黑色）， $1\text{M}$ （红色）和  $2\text{M}$ （蓝色）。D 图是圆二色光谱图。

Fig.3 Absorption, fluorescence and circular dichroism (CD) spectral changes of the aggregates of ApcD, ApcA and ApcB which induced by dilution or addition of urea.

A: Absorption changes induced by dilution with KPB (20 mM, pH 7.2) containing NaCl (0.1 M). Multimer concentrations are 2.5 (black), 2.2 (red), 1.8 (blue), 1.3 (green), 0.5 (pink) and  $0.1 \mu\text{M}$  (dark yellow). The two red-most absorptions around 656 nm and 668 nm decreased with decreasing concentration. B: Absorption changes induced by addition of urea: 0 M (black), 0.5 M (red), 1 M (blue), 2 M (pink), 3 M (dark yellow) and 4 M (green). Spectra were normalized to the isosbestic point at 632 nm. The red-shifted trimer absorption nearly disappeared already at 2 M urea. C: Fluorescence changes induced by addition of urea: 0 M (black), 1 M (red) and 2 M (blue). D: Circular dichroism (CD) spectrum.

聚完毕。

Table 1: The denaturation of AP-B under urea fitted with the 2-exponential events.

The red-shifted trimer absorptions (668 and 656 nm) nearly disappeared at 2 M urea (Fig.S4), so AP-B in KPB (20 mM, pH 7.2) containing NaCl (0.1M) was mixed with 4 M urea in

the same buffer (1: 1, v/v) and monitored by absorption at 668 or 656 nm under stopped-flow.

Monitor [nm]	T1 [s]	A1 [%]	T2 [s]	A2 [%]	R
668	1.42	42.7	7.75	57.3	0.9993
656	1.37	53.9	8.05	46.1	0.9910

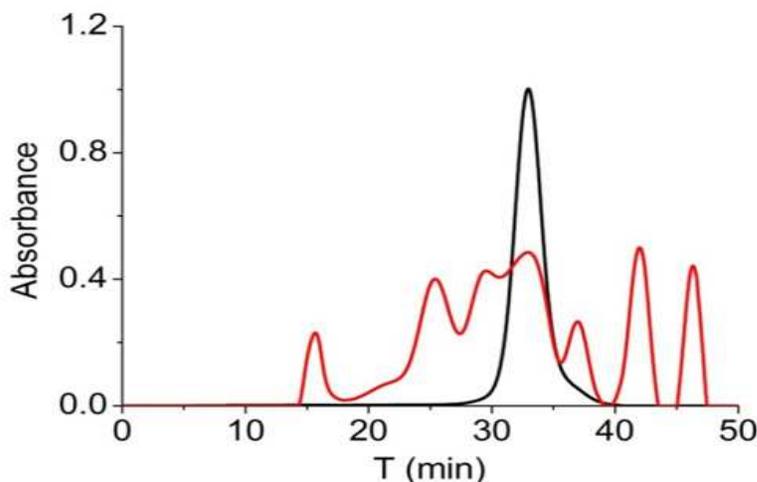


图 4 ApcD 及 ApcA 与 ApcB 复合物聚集态的分析

此图是用 superose 6 分子筛层析柱分离纯化，图中黑色线是样品，红色线是标准蛋白。标准蛋白的大小分别是 2000, 669, 443, 200, 150, 66 和 29kD (从左至右)

Fig.4 Gel filtration of the native sample ( black ) and a protein standard ( red ) on Superose 6 in KPB ( 20 mM, pH 7.2 ) containing NaCl ( 0.1 M )

The main peak of native sample eluting at 32.9 min corresponds to the MW of 200 kDa. The molecular markers ( peaks from left to right of the red-labeled chromatogram ) have masses of 2, 000, 669, 443, 200, 150, 66 and 29 kD

(五) 色素蛋白复合物聚集态的分析

用分子筛来确定蛋白质的分子量时，必须保证样品和标准蛋白的条件一致，这样才能获得更准确的结果。如图 4 所示，目的样品的出峰时间是 32.9min，而标准蛋白 200kD 的出峰时间是 32.95min，很直观的可以看出目的蛋白的分子量约为 200kD。根据 ApcA, ApcB 和 ApcD 单体的分子量以及图 2 中

计算出的每个亚基的含量比，我们推测目的蛋白复合物的组成可能是 (ApcA2ApcD1ApcB3) 2，对应的分子量是 216kD。

(六) 色素蛋白复合物摩尔消光系数 (ε) 和荧光量子产率 (ΦF) 的计算结果

向藻胆体核亚基 ApcD、ApcA 与 ApcB 复合物中加入终浓度为 8mol/L, pH2.0 的尿素，分别设置 3 组重复。测定该 3 组

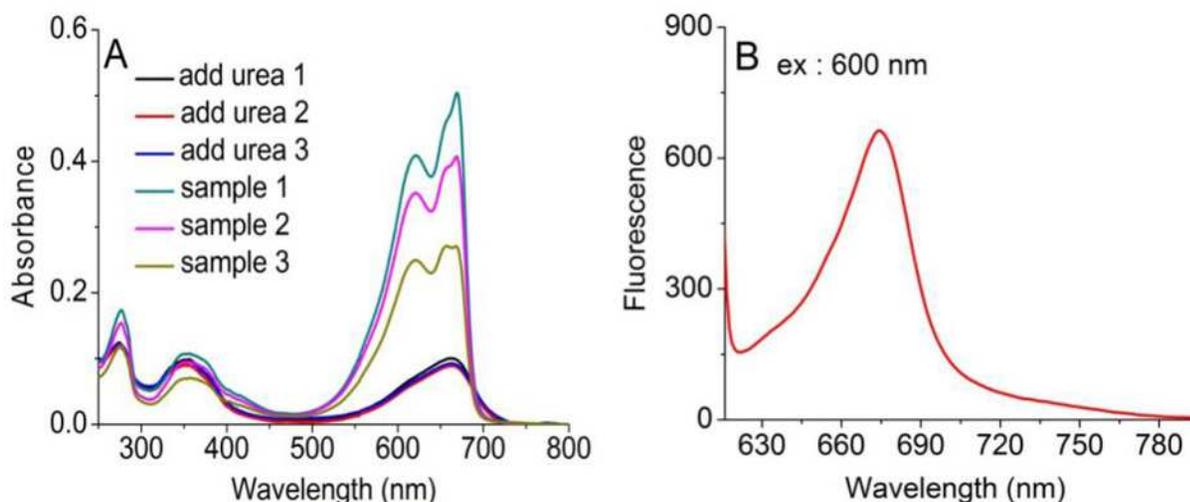


图 5 计算样品摩尔消光系数的吸收图 (A) 和计算样品的荧光量子产率的荧光图 (B)。

Fig.5 The absorption to calculate the ε constant ( A ) and the fluorescence to calculate the fluorescence quantum yield ( B ) of the sample.

复合物变性前在 669nm 处的吸收峰平均值是 0.3906。变性后在 663nm 处吸收峰平均值是 0.097。计算该复合物 669nm 处的  $\epsilon$  常数是  $96295\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

计算样品的荧光量子产率时,在测样品的荧光之前,需要测定样品的吸收。测定该复合物在激发波长处的吸收值  $A_{600\text{nm}}$  为 0.0544,其激发波长的荧光强度  $F_{600\text{nm}}$  为 69302.50195。从而求得 ApcD、ApcA 与 ApcB 复合物的荧光量子产率  $\phi$  是 0.67。

### 三、结论与展望

本研究中,通过蓝细菌同源交换,成功从蓝细菌体内提取到天然藻胆体核亚基 ApcD、ApcA 与 ApcB 复合物。分析该复合物的吸收和荧光光谱,发现该天然复合物随着其浓度的降低会逐渐的解聚。通过对该复合物聚集态的分析,推测其可能是以 APC ( $\alpha\text{AP}-\beta\text{AP}2\beta\text{AP}3$ )<sub>2</sub> 的形式存在,符合藻胆体核一个圆盘的基本组成结构模式。该复合物的发现对未来模拟人工光合作用反应器的研制提供了帮助。

#### 参考文献:

[1]BRYANT D A, GUGLIELMI G, MARSAC N T D, et al.The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model [J]. Archives of Microbiology, 1979, 123 (2) : 113-128.

[2]YI Z W, HUANG H, KUANG T Y, et al.Three-dimensional architecture of phycobilisomes from Nostoc flagelliforme revealed by single particle electron microscopy [J].Febs Letters, 2005, 579 (17) : 3569-3573.

[3]BREJC K, FICNER R, HUBER R, et al.Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium Spirulina platensis at 2.3 Å resolution [J].Journal of Molecular Biology, 1995, 249 (2) : 424-440.

[4]BRYANT D A.CHAPTER 7? - ?Cyanobacterial Phycobilisomes: Progress toward Complete Structural and Functional Analysis via Molecular Genetics [M].Photosynthetic Apparatus Molecular Biology & Operation.Netherlands: Elsevier Inc, 1991: 257-300.

[5]SIDLER W A.Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures [M].Molecular Biology of Cyanobacteria.Springer Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994, 1 (2) : 139-216.

[6]DUCRET A, MÜLLER 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].Journal of Molecular Biology, 1998, 278 (2) : 369.

[7]MAI W, IKEUCHI M.Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex [J].Photosynthesis Research, 2013, 116 (2-3) : 265-276.

[8]LUNDELL D J, GLAZER A N.Molecular architecture of a light-harvesting antenna.Core substructure in Synechococcus 6301 phycobilisomes: two new allophycocyanin and allophycocyanin B complexes [J].Journal of Biological Chemistry, 1983, 258 (2) : 902.

[9]MCGREGOR A, KLARTAG M L, ADIR N.Allophycocyanin trimer stability and functionality are primarily due to polar enhanced hydrophobicity of the phycocyanobilin binding pocket [J].Journal of Molecular Biology, 2008, 384 (2) : 406-421.

[10]MARX A, DAVID L, ADIR N.Piecing Together the Phycobilisome [M].The Structural Basis of Biological Energy Generation.Dordrecht: Springer, 2014: 59-76.

[11]LUNDELL D J, GLAZER A N.Allophycocyanin B.A common beta subunit in Synechococcus allophycocyanin B ( $\lambda_{\text{max}} 670\text{ nm}$ ) and allophycocyanin ( $\lambda_{\text{max}} 650\text{ nm}$ ) [J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256 (23) : 12600.

[12]LIU S F, CHEN Y J, LU Y D, et al.Biosynthesis of fluorescent cyanobacterial allophycocyanin trimer in Escherichia coli [J].Photosynthesis Research, 2010, 105 (2) : 135.

[13]ZHAO K F, SU P, LI J, et al.Chromophore attachment to phycobiliprotein beta-subunits: phycocyanobilin: cysteine-beta84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from Anabaena Sp.PCC7120 [J].Journal of Biological Chemistry, 2006, 281 (13) : 8573-8581.

