

钝顶螺旋藻中一种新的模型藻胆体

张玉忠 · 陈秀兰 周百成 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071; 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

刘洁 时东霞 庞世瑾

(中国科学院北京真空物理实验室, 北京 2724 信箱 100080)

摘要 以钝顶螺旋藻为材料, 分离得到完整的藻胆体, 然后用扫描隧道显微镜 (STM) 对其结构进行研究. 结果表明钝顶螺旋藻藻胆体的结构与传统的半圆盘状结构模型不同, 藻胆体的杆不是排列在同一平面内, 而是呈放射状向空间的各个方向伸展, 藻胆体的直径为 70nm 左右, 杆的长度为 50nm 左右, 并且可清楚地观察到藻胆体的杆中圆盘状的藻胆蛋白面对面的聚集在一起. 从藻胆体 LB 膜的 STM 图像中也观察到了相同的结果. 藻胆体解离之后, STM 图像中没有完整藻胆体的结构特征, 进一步证实前面得到的是完整藻胆体的 STM 图像. Chang 等人用计算机模拟方法构建了这种放射状结构的藻胆体的理论模型, 首次用扫描隧道显微镜从三维实空间直接观察到钝顶螺旋藻中这种结构模型的藻胆体的存在, 并对这种放射状模型的藻胆体的功能进行了讨论.

关键词 钝顶螺旋藻 藻胆体 扫描隧道显微镜

藻胆蛋白是红藻和蓝藻中特有的集光色素蛋白复合体, 在体内与少数连结蛋白一起构成藻胆体, 具有吸收和传递光能的功能. 过去已用生物物理、生物化学和电子显微学的方法对其进行了深入的研究, 到目前为止已发现了 4 种类型的藻胆体, 它们是维管束状 (bundle-shaped)^[1]、半圆盘状 (hemi-discoidal)^[2,3]、半椭球状 (hemi-ellipsoidal)^[4,5] 和块状 (block-shaped)^[6]. 其中研究的最清楚的是半圆盘状类型的藻胆体, 这种类型的藻胆体是由异藻蓝蛋白 (APC) 组成的核和由藻红蛋白 (PE) 或藻红蓝蛋白 (PEC) 和藻蓝蛋白 (PC) 组成的杆两部分构成, 核附着在内囊体膜上, 将光能传递给 Chla; 杆在核的周围呈半圆盘状排列在同一个平面内^[7].

到目前为止, 透射电子显微镜是研究藻胆体结构最有效的手段, 但是电子显微镜只能提供二维信息, 尽管可以根据样品在铜网上的不同偏斜角度经图像重构得到三维图像, 但其在纵向的分辨率较低^[8]. 扫描探针显微镜 (SPM) 是近年来新兴的表面分析技术, 其中最重要的包括扫描隧道显微镜 (STM) 和原子力显微镜 (AFM), 其特点是制样简单, 分辨率高, 特别具有很高的纵向分辨率, 能够从实空间 (from the real space) 提供样品的三维结构信息, 现已广泛应用于纳米生物学研究. 我们首次将 STM 应用于藻胆蛋白的结构研究, 得到了钝顶螺旋藻 C-藻蓝

蛋白分子高分辨率的单分子 STM 图像^[9]. 本文进一步将 STM 应用于钝顶螺旋藻藻胆体的结构研究,从三维空间对钝顶螺旋藻藻胆体的结构进行了解析,发现钝顶螺旋藻藻胆体的结构与传统的半圆盘状藻胆体结构模型不同,其藻胆体的杆不是排列在同一个平面内,而是向空间的各个方向伸展.

1 材料和方法

1.1 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. 实验时将螺旋藻培养在 3 000 mL 锥形瓶中,通气 15 min 间隔 30 min. 用白炽灯照光,光强 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$,温度 $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$. 培养 7~8 d,于对数生长期进行收集.

1.2 藻胆体的分离及光谱测定

藻胆体的分离按照 Gannt 和 Lipshulz^[10]的方法进行了改进. 77K 荧光光谱用 MPF-4 荧光分光光度计测定. 用岛津 UV-240 分光光度计测定吸收光谱,根据最大吸收峰的 A 值计算藻胆蛋白的含量^[11].

1.3 藻胆体结构的 STM 观察

将藻胆体在含 0.3% (质量体积比) 戊二醛的 0.75 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0, 0.2 mol/L NaCl) 中进行前固定 10 min,蛋白含量为 $10 \mu\text{g/mL}$ 左右,将 5 μL 经过前固定的藻胆体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. 然后将 3 滴含 1% (质量体积比) 的磷酸缓冲液 (pH 7.0, 0.2 mol/L NaCl) 滴于 HOPG 上停留 10 min,最后用蒸馏水将 HOPG 表面的盐分冲洗干净,用滤纸吸去剩余的水,空气中干燥,然后进行 STM 观察.

STM 实验在 CSIM-9100 型 STM 上进行,电化学方法自制钨针尖,采用恒流模式,在室温大气下进行. 扫描时的隧道电流和偏压见图 2 中说明.

1.4 藻胆体 LB 膜的制备及 STM 观察

藻胆体的 LB 膜在吉林大学制造的四星 LB 膜仪上进行,以在石英蒸馏器中重蒸 2 次的去离子水为亚相,膜压为 30mN m^{-1} ,用垂直提拉法将一层藻胆体膜转移到刚揭开的云母片上,然后用真空蒸镀的方法在转移后云母片上喷一层金,控制厚度,使其表面导电但不影响观察藻胆体 LB 膜的结构,然后进行 STM 观察.

1.5 藻胆体的解离及 STM 观察

部分藻胆体溶液在 5 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中透析 48 h,使藻胆体完全解离,将 5 μL 解离的藻胆体溶液 (蛋白含量 $20 \mu\text{g/mL}$ 左右) 滴于刚揭开的 HOPG 表面上,停留 30~60 s,用滤纸吸去多余的溶液,然后进行 STM 观察.

2 结果与分析

2.1 钝顶螺旋藻藻胆体的光谱特性

图 1 是钝顶螺旋藻藻胆体的 77K 荧光光谱,最大荧光发射峰在 685 nm,这是完整藻胆体典型的荧光发射峰^[11]. E_m685 荧光激发光谱有 2 个峰,主峰位于 617 nm,在 650 nm 处有一肩峰,分别代表 CPC 和 APC 的最大吸收峰. 从而表明分离得到的藻胆体是完整的.

2.2 完整藻胆体的 STM 图像

图 2 是钝顶螺旋藻藻胆体的 STM 图像,从中可以看出藻胆体均匀的分布在 HOPG 的表面,藻胆体的核吸附在 HOPG 的表面,藻胆体的杆向外伸展,并且图像具有很好的重复性. 从 STM 图像中可以观察到钝顶螺旋藻藻胆体的杆不像半圆盘状藻胆体结构模型那样,杆呈半圆盘状排列在同一个平面内,而是呈放射状排列状,向空间的各个方向伸展(图 2(a)). 对 STM 图像进行放大,可以清楚地观察到钝顶螺旋藻藻胆体这种放射状结构(图 2(b)). 藻胆体的直径为 70 nm 左右,有 6 个杆,杆的长度为 50 nm,并且可清晰地观察到杆中圆盘状的藻胆蛋白面对面的排列在一起. 由于是从表面观察的,因此,很难观察到藻胆体核的结构.

2.3 藻胆体 LB 膜的 STM 图像

为了进一步证实钝顶螺旋藻藻胆体的这种放射状结构,我们通过 LB 膜技术对钝顶螺旋藻完整藻胆体进行了二维有序排列,结果表明钝顶螺旋藻完整藻胆体在空气-水亚相表面具有很好的成膜性能(结果将另文发表). 用垂直提拉法将藻胆体 LB 膜转移到刚刚揭开的云母基底上,然后用真

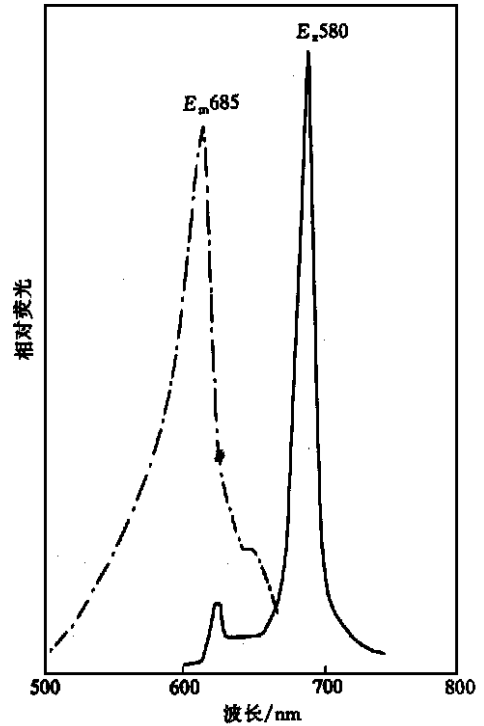


图 1 钝顶螺旋藻藻胆体的 77K 荧光发射光谱和荧光激发光谱

$E_{m,580}$ 为荧光发射光谱, $E_{m,685}$ 为荧光激发光谱

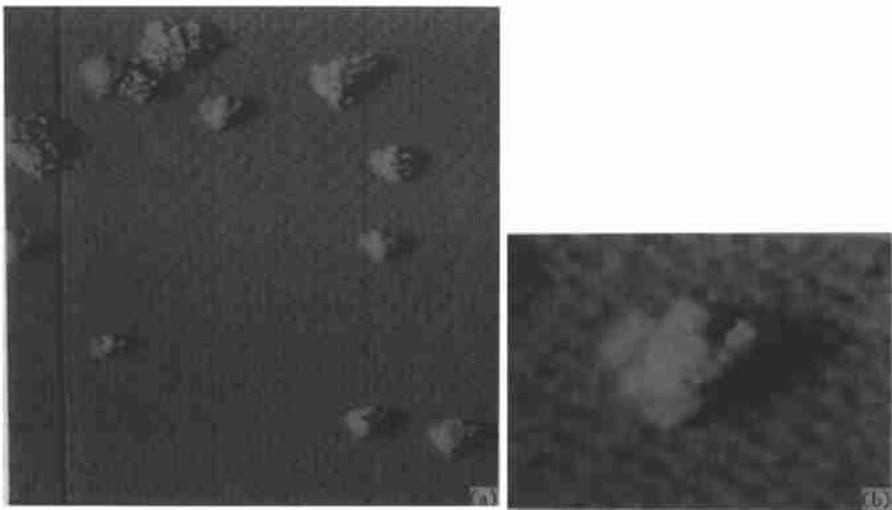


图 2 钝顶螺旋藻完整藻胆体的 STM 图像

扫描范围: (a) 840nm \times 840nm, (b) 150nm \times 180nm. $I_t = 0.50\text{nA}$, $V_{\text{bias}} = -240\text{mV}$

空蒸镀的方法在 LB 膜的表面喷一层金,控制厚度,使其导电,但不影响藻胆体 LB 膜的结构. 图 3(a)是藻胆体单层 LB 膜的 STM 图像. 藻胆体在 LB 膜中一列列规则地排列在一起,藻胆体的核吸附在基底的表面,藻胆体的杆向外伸展,这与藻胆体在细胞内类囊体膜上的排列方式相同. 从图中同样可以观察到藻胆体的杆呈放射状排列,而不是排列在同一个平面内. 从图 3(a)放大的 STM 图像中可以更清楚地观察到这一结构(图 3(b)).

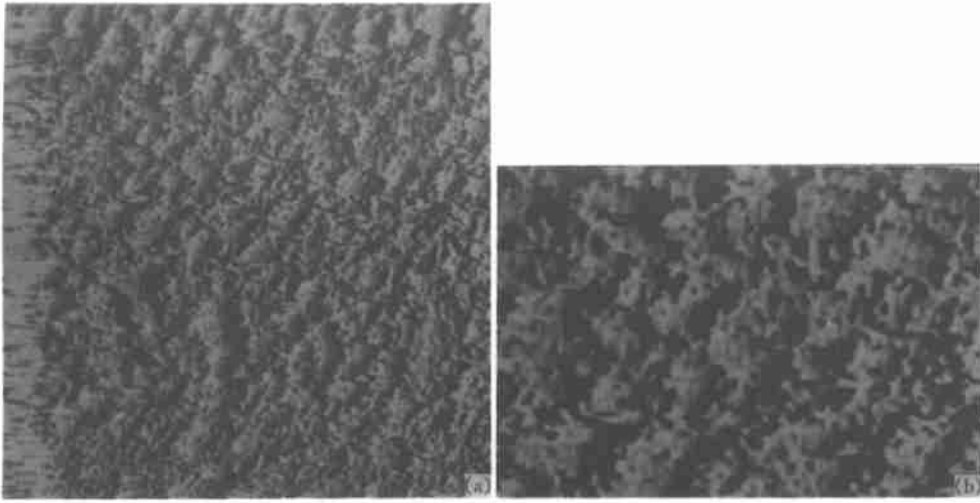


图 3 钝顶螺旋藻完整藻胆体单层 LB 膜的 STM 图像

扫描范围:(a) 960nm \times 960nm, (b) 200nm \times 250nm. $I_t = 0.50\text{nA}$, $V_{\text{bias}} = -490\text{mV}$

2.4 解离藻胆体的 STM 图像

藻胆体只有在较高浓度的盐溶液(0.75 ~ 1.0 mol/L)中才能保持其完整性,降低溶液的离子强度(0.5 mol/L),藻胆体就解离成游离的藻胆蛋白. 图 4 是解离的藻胆体吸附于 HOPG 表面上的 STM 图像,图像中观察的样品已没有完整藻胆体的结构特征,相反,解离后的藻胆蛋白在 HOPG 表面能够重新聚集,形成类似于藻胆体杆的结构,在有些区域可清晰地观察到杆中圆盘状的藻胆蛋白面对面的聚集在一起. 这些杆状结构,再进一步聚合在一起,形成更大的聚合物或形成蛋白膜. 藻胆体的解离实验更进一步证实图 2(a)、(b)中观察到的图像是完整藻胆体的 STM 图像. 解离后的藻胆体 HOPG 表面聚集时易于形成类似于藻胆体的杆状结构,可能与解离溶液中含有各种连接蛋白有关.



图 4 钝顶螺旋藻藻胆体解离后的 STM 图像

扫描范围:600nm \times 600nm. $I_t = 0.50\text{nA}$, $V_{\text{bias}} = -240\text{mV}$

3 讨论

根据 TEM 观察结果而提出的半圆盘状结构模型中,6 个藻胆体的杆从藻胆体的核呈半圆盘状排列,也就是说,藻胆体的 6 个杆排列在同一个平面内^[2]。研究结果表明,在细胞内内囊体膜的表面上,藻胆体一列列排列在一起,如果藻胆体的杆排列在同一平面内,藻胆体与藻胆体之间就会相互遮挡入射的光线,从而不利于藻胆体对光能的高效吸收,相反,如果藻胆体的杆呈放射状向空间的各个方向伸展,这就会大大提高藻胆体对光能的吸收效率。Chang 等人^[12]根据藻胆体的组成用计算机模拟构建了 *Fremyella diplosiphon*, *Tolypothrix tenuis* 和 *Porphyridium persicinum* 的藻胆体理论模型,该模型认为,构成藻胆体的杆不是排列在同一平面内,而是呈放射状充满整个空间,这样最有利于光能的吸收,本文用 STM 观察到钝顶螺旋藻藻胆体的结构与该计算机模拟的理论模型类似,在上述 3 种藻类中,根据电镜观察结果,*F. diplosiphon* 和 *T. tenuis* 藻胆体为半圆盘状模型的藻胆体,*P. persicinum* 为半椭球状模型的藻胆体,但根据 Chang 等人的计算机模拟结果,上述 3 种藻类的藻胆体均为放射状模型的藻胆体,*F. diplosiphon* 和 *T. Tenuis* 的藻胆体由 6 个杆,*P. Persicinum* 的藻胆体由 8 个杆。但是这种结构模型的藻胆体只是用计算机模拟的理论模型,至今还没有证实这种结构模型的藻胆体的存在。本文应用新的物理学技术——STM 观察到钝顶螺旋藻藻胆体的 6 个杆呈放射状排列,表明钝顶螺旋藻中存在一种新的模型的藻胆体,从三维实空间和纳米尺度水平上直接观察到这种放射状模型的藻胆体的存在尚属首次,从而证实自然界的红藻和蓝藻中确实存在这种新的模型的藻胆体。藻胆体是具有三维空间结构的超分子复合物,上述研究结果启示我们,应从三维空间构建藻胆体的结构模型,才能更准确地反映藻胆体的结构信息。

到目前为止,TEM 仍然是用于藻胆体结构研究的有效工具。STM 是 80 年代刚兴起的表面分析技术,与 TEM 相比,STM 在观察生物样品的结构方面具有其独特的优越性。第一,STM 可以在室温大气环境下对含有水分的样品进行观察,甚至可以在溶液状态下进行观察,从而使样品处于接近天然的状态;第二,在合适的操作条件下,STM 技术对生物样品的损伤较 TEM 小,因为 TEM 需要用高能量的电子束对样品进行轰击;第三,STM 能够提供生物样品的三维信息,特别是具有很高的纵向分辨率。而 TEM 只能提供样品的二维信息,尽管可以根据样品的倾斜度对样品的三维结构进行重构,但其纵向分辨率较差。另外,TEM 制样比较繁琐,需对样品进行干燥、固定等各种处理,在制样过程中,样品容易变形。因此,在根据 TEM 观察到的二维结构信息来重构样品的三维结构模型时,应特别注意因样品扭曲变形而引入的假象。本文首次将 STM 应用钝顶螺旋藻藻胆体的结构研究,从三维空间对藻胆体的结构进行了研究,结果表明组成藻胆体的杆不是像传统的半圆盘状藻胆体模型描述的那样排列在同一平面内,而是呈放射状向空间的各个方向伸展,这与 Chang 等人构建的 *F. diplosiphon*, *T. Tenuis* 和 *P. Persicinum* 的三维空间的理论模型相吻合,初步显示了 STM 在观察藻胆体的三维空间结构方面所具有的独特优势。

但是,本文研究还只是很初步的,根据电镜观察结果已报道的半圆盘状和半椭球状的藻胆体是否都具有这种放射状的三维空间结构,这种放射状结构模型的藻胆体在红藻和蓝藻中是否普遍存在,它在藻胆体的结构、功能与进化中占有什么样的位置,这些问题的解决将有待于对多种不同进化类型的红藻和蓝藻的藻胆体的三维结构进行深入而系统的研究。

参 考 文 献

- 1 Guglielmi G, Cohen-Bazire G, Bryant D A. The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes. *Arch Microbiol*, 1981, 129: 181 ~ 189
- 2 Bryant D A, Guglielmi G, Tandan de Marsac N, et al. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch Microbiol*, 1979, 123: 113 ~ 127
- 3 Gazer A N. Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for energy transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 768: 29 ~ 51
- 4 Gantt E. Structure and function of phycobilisomes: Light harvesting pigment complexes in red algae and blue-green algae. *Int Rev Cytol*, 1980, 60: 45 ~ 80
- 5 Lange W, Wilhelm C, Wehrmeyer W, et al. The supermolecular structure of photosystem I-phycobilisome-complexes of *Porphyridium cruentum*. *Bot Acta*, 1990, 103: 250 ~ 257
- 6 Gantt E, Lipschultz C A. Structure and phycobiliprotein composition of phycobilisomes from *Griffithsia pacifica* (Rhodophyceae). *J Phycol*, 1980, 16: 394 ~ 398
- 7 Reuter W, Nickel-Reuter C. Molecular assembly of the phycobilisomes from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J Photobiol Photochem, B*, 1993, 18: 51 ~ 66
- 8 Wiesendanger R. Scanning Probe Microscope and Spectroscopy: methods and Applications. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 525 ~ 536
- 9 Zhang Y Z, Ma Z L, Zhou B C, et al. Investigation of C-phycocyanin from blue-green alga *Spirulina platensis* with scanning tunneling microscope. *J Vac Sci Technol*, 1994, B12(3): 1 497 ~ 1 499
- 10 Gantt E, Lipschultz C A. Phycobilisomes of *Porphyridium*: I. isolation. *J Cell Biol*, 1972, 54: 313 ~ 324
- 11 Rowan K S (ed), *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 167 ~ 188
- 12 Chang S S, Kycia J H, Ledbeter M C, et al. Cyanobacterial phycobilisomes stoichiometry and morphology. In: *Molecular Biology of Photosynthetic Apparatus*, New York: Cold Spring Laboratory Academic Press, 1985. 241 ~ 247