

R-藻红蛋白的结构、功能及其应用

陈小强 史 锋 龚兴国*

(浙江大学生命科学院生物技术系, 杭州 310027)

摘要 R-藻红蛋白是最重要类型的藻红蛋白, 为许多藻类的前级捕光色素蛋白, 在光的激发下, 能发出桔红色荧光。现对R-藻红蛋白的三维结构与功能的关系、R-藻红蛋白离体的光学活性在肿瘤光动力学治疗(PDT)中作为光敏剂和荧光免疫检测等领域作为荧光探针分子的应用进行综述。

关键词 R-藻红蛋白; 结构与功能; 光动力学治疗; 荧光探针

藻红蛋白(phycoerythrin, PE)是许多海藻的重要的捕光色素蛋白。与藻蓝蛋白(phycocyanin, PC), 异藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)等藻胆蛋白组成棒状的藻胆体, 附着在类囊体膜的外表面上, 通过锚定蛋白与类囊体的光和膜相联, 构成藻类的捕光系统, 光能由位于藻胆体顶端的藻红蛋白捕集, 依次传递给藻胆体中的藻蓝蛋白、异藻蓝蛋白, 最后到达叶绿素 a, 在光系统 II 中将光能转变为化学能, 光能传递效率达 95% 以上^[1]。

最初依据其来源, PE 主要分为 R-PE(R-, Rhodophyceae, 红藻纲), B-PE(B-, Bangiophyceae, 红毛菜纲), C-PE(C-, Cyanophyceae, 蓝藻纲)等 3 种。而按其吸收光谱则可分为三峰吸收型和两峰一肩吸收型 R-PE。PE 中以 R-PE 最具代表性。R-PE 由脱辅基寡聚蛋白与开链的四吡咯发色团共价结合而成, 组成寡聚蛋白的亚基有 α 、 β 、 γ 等。极少种类的 R-PE 有不同亚基数目。*Gracilaria longa* 的 R-PE 由 α 、 β 、 γ 、 γ' 四种亚基组成^[2], 而构成单细胞红藻 *Rhodella reticulata* strain R6 R-PE 的只有 β 亚基和无色基的两条巨型连接多肽^[3]。结合在亚基的半胱氨酸残基上的色素分子有藻红胆素(phycoerythrobilin, PEB)和藻尿胆素(phycourobilin, PUB)。由于色素分子的存在, R-PE 在紫外可见光区 480~570 nm 波段有较强的吸收。本文主要介绍 R-PE 近年的理论和应用研究热点。

1 R-PE 的结构与功能

R-PE 位于棒状藻胆体的尖端, 藻胆体由“核”与“杆”两部分组成。“核”是盘形的异藻蓝蛋白

(APC)叠加形成, 附着在类囊体的基质膜上与叶绿素 a 相连, 盘形“核”的另一面附着很多辐射状的“杆”, “杆”也是由盘形的藻胆蛋白分子沿 C_3 对称轴共轴叠加而成, 尖端为藻红蛋白(PE), 根端为藻蓝蛋白(PC)。电镜观察显示, 藻胆体内藻胆蛋白分子的结构与晶胞内非常相似^[4], 所以藻胆蛋白分子晶体三维结构的解析使阐明藻类捕光系统光能传递机制成为可能, 并为其光反应中心的光合作用机制研究打下基础。

包括 R-PE, 已有多种藻胆蛋白晶体结构在高分辨率得到了解析, 如 *Mastigocladus laminosus*、*Agmenellum quadruplicatum*、*Fremyella diplosiphon* 的 C-藻蓝蛋白(C-PC), *Porphyridium sordidum* 的 B-藻红蛋白(B-PE), *Cyanobacterium* 的异藻蓝蛋白(APC)等, 研究表明这些藻胆蛋白具有相似的三维结构特征和亚基组成, 都是由 α 和 β 亚基组成 $(\alpha\beta)_3$ 或 $(\alpha\beta)_6$ 形式的多聚体, 而 B-PE 中则多一个 γ 亚基, 为 $(\alpha\beta)_6\gamma$ 。它们携带的色素分子的数目和种类不同, 因而造成其光谱特征的差异^[5]。

1.1 R-PE 的空间结构

R-PE 的三维晶体结构研究在国际上竞争激烈^[6], 两个科学小组率先报道了不同藻种 R-PE 的高分辨率精细结构(0.19 nm), 梁栋材课题组用多对同晶置换法系统报道了多管藻 R-PE 0.5 nm、0.28 nm、0.19 nm 分辨率下的晶体结构^[1,5,7,8]。Ritter 等^[9]则采用分子置换法研究了 *Griffithsia monilis* 的 R-PE 的 0.19 nm

收稿日期: 2003-12-30 接受日期: 2004-02-21

* 通讯作者。Tel: 0571-87953002, E-mail: gongxg@zju.edu.cn

分辨率下的晶体结构。并都对 R-PE 所携带的色素分子及与多肽链之间空间作用的关系, 能量传递途径进行了解析和探讨。

早期认为多管藻 R-PE 的分子亚基组成为 $(\alpha_2\beta)_3\gamma$ ^[7], 在 0.5 nm 分辨率的晶体结构中, 常文瑞等确定了多管藻 R-PE 的构成方式为 $(\alpha\beta)_6\gamma$, 认为其结构模式为 3 个 $(\alpha\beta)_2$ 二体单位围绕晶体学三次轴分布排布, $(\alpha\beta)$ 单体通过局部的二次轴与另一个 $(\alpha\beta)$ 单体相关联, 但此分辨率下并不能确定 γ 亚基的位置。

多管藻 0.28 nm 分辨率的晶体结构表明, R-PE 为一中央有空穴的“圆盘”分子(图 1), γ 亚基位于空穴中。“圆盘”则是由 3 个 $(\alpha\beta)$ 绕晶体学 3 次

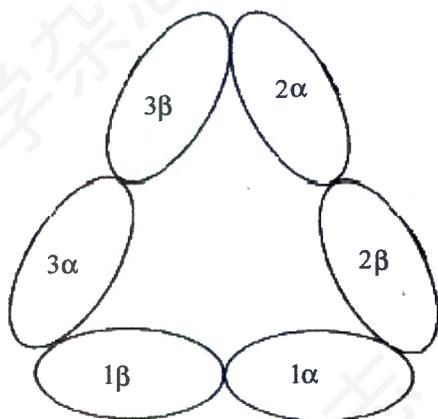


图 1 R-PE 的三聚体“盘片” $(\alpha\beta)_3$ 示意图(改自文献[1])

轴形成三聚体的“盘片”, 两个这样的“盘片”面对面叠加而成。“盘”高 6 nm, 直径 11 nm, 空穴直径 3 nm, α 、 β 亚基分别由 164 和 177 个氨基酸组成, 这与 Ritter 等^[9]报道的 *Griffithsia monilis* 的 R-PE 中 α 、 β 亚基氨基酸含量相同。R-PE 的 α 、 β 亚基折叠方式相似, 多管藻 R-PE 的 α 、 β 亚基多肽链由 9 段 α 螺旋(X, Y, A, B, E, F, F', G, H)和连接螺旋的松散肽链组成, 亚基上携带有共价结合的藻胆色素分子(图 2), *Griffithsia monilis* 中 R-PE 的 α 、 β 亚基 α 螺旋则是 8 段, 无 F', 含量分别为 79% 和 73%。另据 MacColl 等^[10]报道, R-PE 在低浓度的脲(3 mol/L)作用下, 利用圆二色谱检测到另一种溶液构象。

1.2 R-PE 的色素分子与能量传递

多管藻 R-PE 中每个 $(\alpha\beta)$ 单位上携带有 5 个色素分子, 分别是 α 亚基上的第 84 位、140 位氨基酸上的 $\alpha 84\text{PEB}$ 、 $\alpha 140\text{aPEB}$, β 亚基上第 84 位、155 位上的 $\beta 84\text{PEB}$ 、 $\beta 155\text{PEB}$, 及与 β 链上第 50 位、61 位双连接的 $\beta 50/61\text{PUB}$, 它们都结合在亚基的半胱氨酸残基上, 如图 2 所示。

多管藻 R-PE 与 *Porphyridium sordidum* 的 B-PE 氨基酸残基和色素分子数目相同, 不同的是 B-PE 的 $\beta 50/61$ 位上双连接的是 PEB 色素分子, 且 R-PE 的 γ 亚基上有 3 个 PUB 和一个 PEB 而 B-PE 的 γ 亚基上

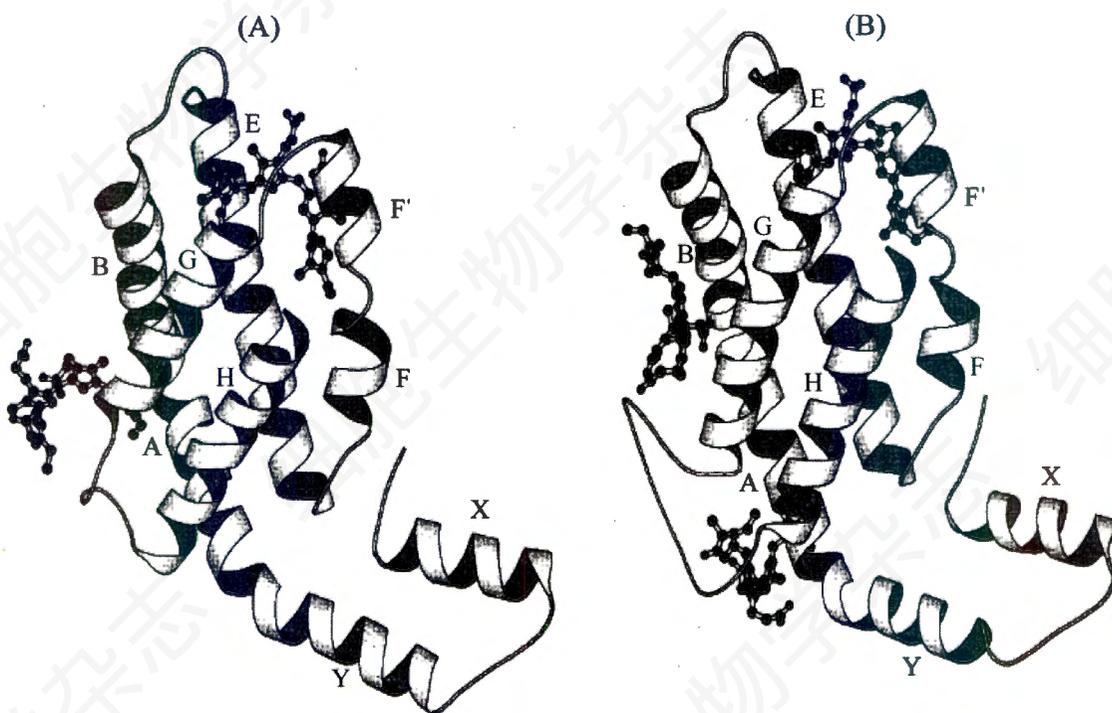


图 2 R-PE 的 α 亚基(A)和 β 亚基(B)及携带的色素分子示意图^[9]

是2个PUB和2个PEB分子。PUB吸收的能量高于PEB, R-PE中PUB含量高于B-PE, 被认为在进化意义上更高级。*Griffithsia monilis*的R-PE上的色素分子则是 $\alpha 82$ PEB、 $\alpha 139$ PEB、 $\beta 82$ PEB、 $\beta 158$ PEB及 $\beta 50/61$ PUB。R-PE的1.9 nm的高分辨率结构不仅能给出各亚基更为可靠的氨基酸序列, 还能提供色素分子的精细结构和微环境的信息, 揭示色素分子与肽链上的残基的相互作用关系, 从而阐明光谱特征和色素分子的能量传递功能。多对同晶置换法的技术路线在此方面似乎给出了更为详尽的解析。PEB和PUB的化学结构都是由a、b、c、d四个吡咯环构成, b、c环组成分子的刚性基本结构, 由于手性碳原子的存在, PEB的a环, PUB的a、d环具有韧性, 它们的空间结构存在差异, PEB的a、d环异侧分子形状为Z形, PUB的a、d环同侧分子形状为船形。色素分子的微环境影响其空间构象, 因而化学结构相同的色素分子也可能有不同的光谱特征, 几乎所有的b、c吡咯环上的N、O原子都与肽链中的Arg残基形成氢键, 而由于b、c环的刚性结构, 所以Arg对色素分子在亚基中的“定向”扮演重要角色, 另外, 肽链上的半胱氨酸对色素分子的构象也有重要影响。

藻胆体中光能的传递在藻胆蛋白色素分子间进行, 通过计算色素分子之间的距离, 提出了“盘片”($\alpha\beta$)₃内, “盘片”之间, R-PE分子之间及“杆”内R-PE与相邻PC之间的能量传递通路^[1,8]。认为在三聚体($\alpha\beta$)₃中, 能量由外表层的 $\beta 50/61$ PUB和 $\alpha 140$ aPEB传递到内表层的 $\alpha 84$ PEB, 然后到达“盘片”的能量终端受体 $\beta 84$ PEB。三聚体($\alpha\beta$)₃间的传递路径可能有以下3条: $1\alpha 84$ PEB \rightarrow $4\alpha 84$ PEB; $1\beta 155$ PEB \rightarrow $6\beta 155$ PEB; $1\alpha 140$ aPEB \rightarrow $6\beta 155$ PEB。R-PE分子间能量传递则是由 $\alpha 140$ aPEB传到 $\beta 155$ PEB, 而藻胆体内R-PE是通过 $\alpha 140$ aPEB将能量传给PC的藻蓝胆素 $\beta 155$ PCB的。

2 R-PE介导的肿瘤光动力学治疗

光动力学治疗(photodynamic therapy, PDT)是一种全新的治疗肿瘤方法。通过向肌体注射“光动力学治疗药物”即光敏剂, 然后用一定波长的光照射, 引起光敏剂的光化学反应, 由于肿瘤细胞对光敏剂吸收最多, 而正常细胞吸收极微, 从而选择性地杀伤肿瘤。对于早期的皮肤癌、口咽癌、食管癌、胃癌等肿瘤, 光动力学治疗可以达到根治的目

的。光敏剂的光敏反应产生的单线态氧 1O_2 及其他活性氧组分($O_2^{\cdot-}$, OH \cdot , H_2O_2)对肿瘤细胞具杀伤作用。目前应用的肿瘤光动力学治疗光敏剂毒副作用大, 价格昂贵, 如广泛使用的从人血红蛋白中提取的血卟啉衍生物光敏剂有较强的副作用, 如休克反应, 皮肤光毒性(患者进行治疗须避光3~4周)等, 因此有必要开发新型的光动力药物。He等^[11]证明了藻胆蛋白R-PE, C-PC和APC在大于470 nm的可见光照射下, 具有光敏现象, 产生了单线态氧及活性氧组分。研究已发现藻蓝蛋白对肿瘤细胞及小鼠移植瘤均具有光敏杀伤作用。藻红蛋白对肿瘤细胞也具显著的杀伤作用, 藻红蛋白由于其优良的光学活性, 成为开发藻胆蛋白光敏剂中研究的热点。

藻红蛋白作为光敏剂在经光照后, 处于基态的R-PE受激跃迁到更高能量的激发态, 激发态在回到基态的过程中, R-PE将能量传递给周围环境中的其他分子产生活性氧组分。其中将产生自由基($O_2^{\cdot-}$, OH \cdot , H_2O_2)的过程称为I型机制, 产生单线态氧 1O_2 的过程成为II型机制。若产生自由基的I型机制受阻, 如在R-PE的肿瘤细胞培养液中加入羟自由基的特异抑制剂二甲亚砜(DMSO), I型机制就会向II型机制转化, 产生更多的单线态氧, 可加强R-PE对肿瘤细胞的杀伤作用^[12]。

R-PE与肿瘤细胞具有亲和性, 在适合的PH和浓度条件下, R-PE可充满肿瘤细胞的胞膜、胞浆和胞核, 光动力作用下造成细胞内生物大分子如DNA、蛋白质的分解, 脂质过氧化, 以及细胞膜、细胞器的损伤, 将R-PE加入到S180小鼠腹水癌细胞培养基中, 488 nm的氩离子激光辐照, R-PE对该瘤细胞DNA合成具有抑制作用, 并杀伤瘤细胞。R-PE在光介导下能使质粒pUC18由超螺旋结构转化成带切口的环形结构。

诱导肿瘤细胞凋亡是发展肿瘤治疗的新趋势。R-PE光介导下能诱导某些肿瘤细胞的细胞凋亡。贴壁的肝脏7221细胞在R-PE的光动力杀伤过程中, 经历肿胀、变圆、漂浮等几个典型的凋亡形态学改变阶段, 并伴有特征性的DNA梯(ladders)出现^[13]。一般认为PDT诱导细胞凋亡是因为活性氧诱导了细胞凋亡信号传递给凋亡相关基因所致^[14]。但是, R-PE因其藻类来源, 且是分子量大的色素蛋白复合物, 目前需要深入研究的是它对人体的免疫原性。因此, 从R-PE等藻胆蛋白中获得分子量较小的具良好光敏性的色素多肽是解决途径之一。如用胃酶

降解 R-PE 获得了 6 种藻红蛋白的色基多肽, 分别对 HL60 人白血细胞光动力作用, 发现色基多肽的激光增敏作用要优于 R-PE 多聚体^[15]。通过体外培养的肿瘤细胞以及结合体内移植瘤实验, 筛选具有强光敏活性的藻胆蛋白和其色基多肽, 将为开发新型的光敏抗癌药物, 推广肿瘤光动力学治疗打下重要基础。

3 R-PE 作为荧光探针

R-PE 的摩尔消光系数可达 10^6 数量级(565 nm), 量子产率高(0.84); 吸收光谱区域宽, 而发射光谱窄, 有较广谱的 pH 适应范围, 这有助于选择合适的激发波长获得高效的荧光。特别是 R-PE 还有着较大的斯托克斯位移(stokes), 斯托克斯位移越大, 发射的荧光就越靠近红外端, 可排除非特异性荧光干扰如生化基质血清等的背景荧光, 增强探针荧光信号的特异性, 显著提高检测的灵敏度, 是一种性能优良的新型荧光探针, 广泛应用于荧光激活细胞分选、共聚焦激光显微镜、免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞测定等荧光免疫检测领域。

R-PE 可与抗体、亲和素等生物大分子偶联形成交联物。在异双功能试剂作用下, R-PE 与单克隆抗体形成 R-PE-MAb 荧光抗体, 一般作为二抗用于固相双抗体夹心体系, 要求交联物荧光强度高, 交联抗体活性损失很小。荧光抗体可用来检测相应的微生物抗原, 用 R-PE 和 R-PC 标记的抗体分别检测 *Entamoeba histolytica* 的 3 种株系, 在蓝光的照射下, 发现 R-PE 标记的抗体荧光信号更强。与传统的荧光染料相同, R-PE 等藻胆蛋白可与链霉亲和素(streptavidin)交联, 形成 streptavidin-R-PE。生物素(biotin)与之具有极高的亲和性, 利用这一点, 将特异性的配体如抗体、外源凝集素、激素、生长因子生物素化(biotinylated), 然后连接 streptavidin-R-PE 荧光探针, 可检测配体相关物质如抗原、细胞表面糖、细胞表面受体、基因芯片上的靶 DNA 片段等, 与传统的 streptavidin-Alexa Fluor 532 等荧光探针相比, 其检测灵敏度可提高 5~10 倍^[16]。图 3 是寡聚组氨酸标记的重组蛋白质的 R-PE 荧光免疫检测原理示意图。

利用 R-PE 的抗原性, 产生抗 R-PE 的抗体, 继而形成 streptavidin-R-PE-antiR-PE 交联体, 可更灵敏地检测生物素化的待测物质。分析比较 streptavidin-Alexa Fluor 546, streptavidin-R-PE,

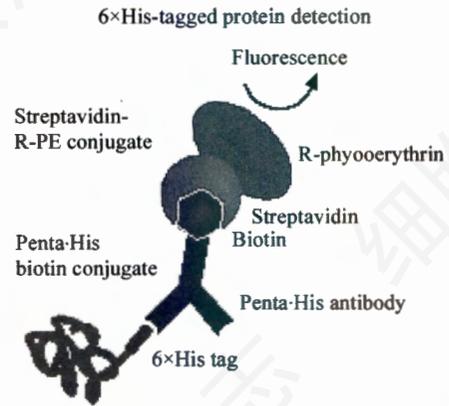


图 3 寡聚组氨酸标记的重组蛋白质荧光检测^[16]

streptavidin-fluospheres, Cy3-containing liposomes and streptavidin-R-PE-antiR-PE-Cy3(兔抗 R-PE 荧光多克隆抗体交联物)五种荧光探针, 将其分别作用于生物素化的鼠 IgG 的 Fc 片段微阵列平台(Fc-biotin)和生物素化的兔抗鼠 IgG 标记的鼠 IgG 微阵列平台。检测显示, R-PE 荧光多克隆抗体交联物的荧光信号最强烈, 在这两个平台上其强度分别高过次强分子 67% 和 150%^[17]。

流式细胞测定技术常用来获取细胞的结构和功能信息。细胞系统的结构和功能参量一般需要经过荧光标记方可测定, 才能取得细胞的化学组分、形态特征及细胞整体的理化和生物特性等信息。而一些细胞内含量极低的生物分子如细胞表面受体等, 经常“躲过”了传统荧光探针的检测, R-PE 由于高量子产率, 所以是目前高灵敏度低丰度检测的最佳荧光探针之一, 应用于流式细胞仪, 可检测到细胞表面少于 100 个特异受体的单个细胞^[16,18]。

R-PE 还可与稀土离子荧光探针如 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} , 其他藻胆蛋白如 PC、APC, 传统的荧光染料如 FITC、Cy 系列等相偶联构成能量转移试剂对(resonance energy transfer tandems, RETT), 使荧光发射波长红移, 斯托克斯位移更大, 可用于多色荧光检测。另外, B-PE 也是理想的配对试剂。

4 小结

藻红蛋白的分子生物学研究较多是关于原核蓝绿藻 cyanobacterial(C-PE)的亚基操纵子的基因结构与功能的探索, 如 $\beta\alpha$ 亚基操纵子转录水平的调节。针对真核红藻 R-PE 的分子生物学研究远远不够, 主要集中在 α 、 β 亚基作为光合藻类的进化标记, 比较不同藻种的 α 、 β 亚基的基因序列、氨

基酸序列从而探讨它们进化上的亲源关系, 以及环境因子(光、氮等)对转录水平上亚基合成的影响等。R-PE 的应用广泛, 除上述主要领域外, 它还可以用做食品、化妆品工业的天然色素添加剂; 电泳技术(蛋白质电泳、非变性电泳、等电聚焦)和凝胶排阻层析里的标准分子等^[19]。

参考文献 (References)

- [1] Jiang T *et al.* *Proteins*, 1999, **34**: 224
- [2] D'Agnolo E *et al.* *Phytochemistry*, 1994, **35**: 693
- [3] Thomas JC *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 2472
- [4] A Ducret *et al.* *Eur J Biochem*, 1996, **236**: 1010
- [5] Chang WR *et al.* *J Mol Biol*, 1996, **262**: 721
- [6] 梁栋材等。 *生命科学*, 1998, **10**: 207
- [7] 常文瑞等。 *自然科学进展*, 1995, **5**: 181
- [8] Chang WR *et al.* *构造生物*, 2000, **6**: 211
- [9] Ritter S *et al.* *J Struct Biol*, 1999, **126**: 86
- [10] MacColl R *et al.* *Biophysical Chemistry*, 1996, **61**: 161
- [11] Hè JA *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1320**: 165
- [12] 李冠武等。 *激光生物学报*, 2001, **10**: 116
- [13] 李冠武等。 *肿瘤防止杂志*, 2002, **9**: 144
- [14] Kessel D *et al.* *Cell Death Differ*, 1999, **6**: 28
- [15] 黄 蓓等。 *中国科学技术大学学报*, 2001, **31**: 241
- [16] QIAGEN Corp. *QIAGEN News Issue*, 2001, **5**: 3
- [17] Wiese R. *Luminescence*, 2003, **18**: 25
- [18] Bhalgat MK *et al.* *J of Immunol Methods*, 1998, **219**: 57
- [19] Fleurence J. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 2003, **1**: 63

The Construction, Function and Applications of R-phycoerythrin

Xiao-Qiang Chen, Feng SHI, Xing-Guo Gong*

(Department of Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract R-phycoerythrin, the most important type of phycoerythrin, is accessory light-harvesting protein-pigment complex of marine algae. It can emit the orange-red fluorescence excited by light. This paper summarizes several major areas of the study of R-phycoerythrin, including the relationship between its construction and function, the applications of its optical properties used as photosensitizer in photodynamic therapy and probe in fluorescent immunoassay etc..

Key words R-phycoerythrin; construction and function; photodynamic therapy; fluorescent probe

Received: December 30, 2003 Accepted: February 21, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-571-87953002, E-mail: gongxg@zju.edu.cn