

蓝隐藻藻蓝蛋白结构与功能稳定性研究

李文军, 陈 敏

(烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 以蓝隐藻(*Chroomonas placiodea*)藻蓝蛋白 PC-645 为材料, 通过改变环境 pH 和尿素质量浓度, 监测其变性和复性过程中特征荧光光谱和吸收谱的动力学变化, 以期了解隐藻藻蓝蛋白的色基和蛋白结构稳定性及其与功能的关系。结果表明, PC-645 在很宽的 pH 范围和一定质量浓度的尿素中维持结构和功能的稳定, 空间结构具有很强的柔性。pH 诱导的 PC-645 蛋白构象与功能变化可分为 3 个不同的区段。(1)稳定区(pH 3.5~7): 吸收和荧光光谱都比较稳定, 显示蛋白质构象和功能在此区域都保持正常。(2)次稳定区(pH 7~10): 光吸收依然保持平稳, 亚基内部的色基的状态和疏水微环境都没有改变, 但荧光传递效率降低, 可能是由亚基表面局部构象变化、解离(四级结构变化)或者色素基团间的空间距离变化引起。(3)不稳定区(pH<3.5 和 pH>10), 吸光度和荧光强度都呈快速下降, 色基在近紫外和可见光区的吸收峰位变动, 蛋白构象处于快速崩溃期。PC-645 在酸性条件下的稳定性高于在碱性环境下, 是与隐藻藻蓝蛋白所处的特殊环境及生理功能相适应的。

关键词: 蓝隐藻(*Chroomonas placiodea*); 藻蓝蛋白; 吸收光谱; 荧光光谱; 构象稳定性

中图分类号: Q946.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)07-0033-08

藻胆蛋白是存在于蓝藻、红藻、部分隐藻和甲藻中的捕光色素蛋白复合物, 它们吸收 500~650 nm 的可见光, 并将吸收的光能传递给膜上的反应中心进行光合作用。由于藻胆蛋白在可见光区和近紫外区都有明显的特征吸收, 并且具有很高的荧光量子产率, 作为一个天然内标, 其色基与蛋白质之间的结合状态以及蛋白质所处的内部微环境的微小变化, 都可以在其光谱性质上呈现出很灵敏的反映, 因此是研究蛋白质结构与功能关系的难得材料。

隐藻是一类单细胞、结构较为复杂的双鞭毛藻类, 在淡水和海水中都有分布^[1]。每种隐藻只含有一种藻胆蛋白^[2], 或者藻蓝蛋白(PC)或者藻红蛋白(PE)。目前, 对于红、蓝藻中的藻胆蛋白, 无论结构、性质以及组装而成的藻胆体等, 都有相当透彻的研究, 但是对于隐藻藻胆蛋白却了解较少, 其蛋白亚基的性质、彼此之间的组装和连接方式, 以及与膜上反应中心的接触等情况, 目前都不完全确定^[3]。本文使用的蓝隐藻(*Chroomonas placiodea*)只含有一种藻蓝蛋白 PC-645。据报道, PC-645 含有 α_1 、 α_2 和 β 三种亚基, 通过半胱氨酸的硫醚键共价连接多个色素基团, 包括藻蓝胆素(phycocyanobilin, PCB), 藻紫胆素(phycobiliviolin, PXB)和在长波端 697 nm 有最大吸收的一种色素基团(mesobiliverdin, 也称 MBV)。色基吸收的光能从 PXB 经 PCB、MBV, 最终传递给膜

上的叶绿素^[4]。PC-645 亚基通过折叠形成球形的三级结构, 并以 $(\alpha_1\beta)(\alpha_2\beta)$ 异二聚体方式形成四级结构, 为色素基团提供了稳定的内环境, 并且使其相互靠近, 从而保证能量传递功能的实现^[5]。目前对藻胆蛋白结构、功能和重折叠的研究只限于红、蓝藻藻胆蛋白, 而对隐藻藻胆蛋白尚未有报道。由于隐藻藻胆蛋白是位于类囊体膜内侧或堆积在膜腔中^[6-7], 而不是伸展在叶绿体基质中, 伴随着光合作用过程中叶绿体内环境的变化, 其结构和构象的变化与位于基质中的红、蓝藻藻胆蛋白必然有所不同, 并可能导致其能量传递效率的改变。为此, 本文以蓝隐藻(*C.placiodea*)PC-645 为材料, 在不同 pH 和不同质量浓度尿素中, 通过对荧光光谱、吸收光谱的监测, 研究蓝隐藻 PC-645 蛋白的变性和复性动力学, 以及蛋白结构和能量传递功能的关系。

1 材料与amp;方法

1.1 PC-645 样品制备

蓝隐藻(*C. placiodea*)的培养和 PC-645 的制备、纯

收稿日期: 2013-01-11 修回日期: 2013-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(40976083)

作者简介: 李文军(1984-), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学, 电话: 13505350917, E-mail: liwenjun332@163.com; 陈敏, 通信作者: E-mail: chenmclm@163.com

化方法参照文献^[8]。纯化的 80%硫酸铵沉淀的 PC-645, 经 Pall 30kDa 超滤管浓缩, 并调整蛋白质量浓度为 50 g/L 待用。以下操作全部于室温、弱光下进行。

1.2 pH 变性及复性实验

采用 0.1 mol/L 的 HCL 或 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 0.2 mmol/L 的磷酸氢二钾缓冲液 pH, 经 HANNA PH211 台式酸度计检测, 配制成不同 pH 缓冲液。将浓缩后的 PC-645 用相应 pH 的缓冲液稀释至蛋白终质量浓度为 2 g/L 和 0.1g/L, 涡旋混匀后放置 10 min, 分别用于吸收和荧光光谱的测定^[9-10]。

1.3 极端 pH 下时间耐受性实验

如 1.2 操作, 在 pH3 条件下分别调节 PC-645 蛋白终质量浓度为 2 g/L 和 0.1g/L, 在 60 min 内间隔取样, 分别用于测定吸收和荧光光谱。

1.4 尿素变性及复性实验

高质量浓度尿素变性实验中, PC-645 被稀释至不同 pH 值的尿素溶液中, 尿素终质量浓度为 8 mol/L, 蛋白终质量浓度为 2 g/L; 尿素复性实验时, 蛋白质量浓度为 2 g/L 的 PC-645 在终质量浓度为 3 mol/L 的尿素 (含 50 mmol PBS) 缓冲液中变性 1h 后, 置于半透膜中对纯水透析除去尿素, 定时取样测定吸收光谱。

1.5 吸收光谱测定

采用 TU-1900 紫外-可见分光光度计检测, 扫描范围 250~750 nm, 蛋白终质量浓度为 2 g/L, 光径 1 cm, 步长 1 nm。

1.6 荧光光谱测定

用 PerkinElmer LS55 荧光分光光度计检测, 蛋白终质量浓度为 0.1 g/L, 光径 1 cm。

2 pH 耐受光谱动力学

2.1 吸收光谱

天然状态下的 PC-645 在可见光区有 582、625 和 645 nm 三个特征峰吸收峰^[11], 其中 582 nm 峰对应于 PXB 色基的吸收, 625 nm 吸收肩峰对应于 PCB, 两者以 1:1 关系存在于 β 亚基上; 而 645 nm 吸收对应于 MBV, 其吸收范围可跨越 640~695 nm, 为 α 亚基所仅有^[12]。随着环境中 pH 的降低, 藻蓝蛋白光吸收逐渐减弱(图 1A)。在 pH 低于 3 时, 吸光度下降非常快, 原 582 nm 和 650 nm 最大光吸收红移, 在 pH 低于 2.5 时, 吸收峰融合为一个 600~700 nm 的较宽吸

收峰, 可能是 α 亚基构象改变, MBV 色基暴露的结果。PC-645 的 α 亚基含有较多碱性氨基酸^[4, 13], 当外界 pH 环境较低时, α 亚基更易于受到影响, 所带负电荷减少, 亚基变性伸展, 结合在 Cys α 19 上的 MBV 色基暴露, 表现吸收峰红移。在碱性溶液中, 藻蓝蛋白吸收光谱在 pH 7~10 时较为稳定(图 1B), 而 pH 超过 10.25 时, 吸收光谱强度下降显著。与酸性环境中相同的是, 582 nm 最大光吸收处出现红移; 不同的是, 645 nm 处最大光吸收处出现了蓝移, 并且没有属于 MBV 的 670~700 nm 长波吸收峰显现; 显然 α 亚基在碱性条件下似乎相对稳定。另外, 伴随着 645 nm 处光吸收强度的快速下降, 582 nm 处峰位的吸收值的下降则要缓慢的多。这是由于 582 nm 处吸收峰来自于 PXB, 相比于 PCB, PXB 通过 β 50 和 β 61 两个半胱氨酸残基与 PC-645 连接, 而 PCB 仅靠一个半胱氨酸残基与 PC-645 β 82 相连, 所以 PXB 表现出更高的稳定性。当 pH 高于 10.75 时, 各个吸收峰相互融合为一个 550~640 nm 的峰, PC-645 的特征吸收峰消失, 表明藻胆色素基所处蛋白内部的微环境构象变化, 指示藻蓝蛋白亚基的三级结构已经解体^[14]。

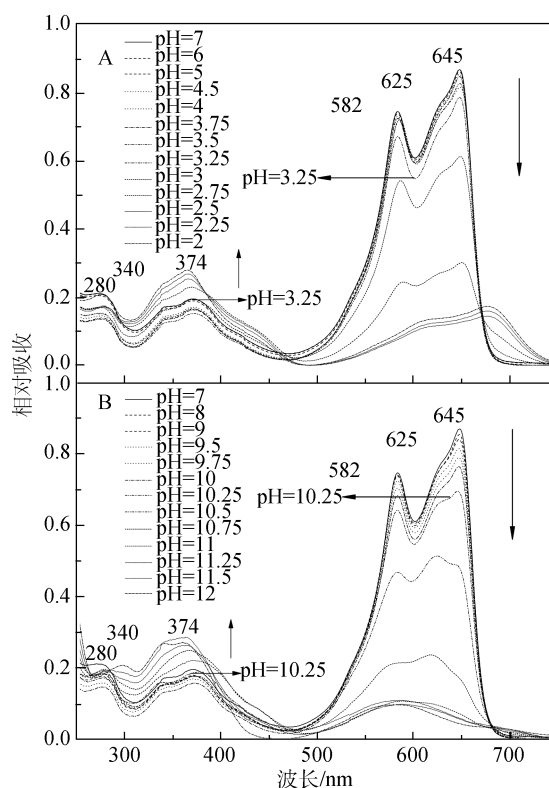


图 1 pH 对 PC-645 吸收光谱的影响

Fig.1 Effects of solvent pH on the absorption spectra of PC-645

A. pH 7-2; B. pH 7-12

近紫外区 374 nm 和 340 nm 是藻胆素特征吸收峰, 与色基本身的构象和状态有关。在 pH 3.25~7 和 pH 7~10.25 之间, 374 nm 和 340 nm 处的吸收值略有下降和浮动, 但变化幅度较小; 而到达 pH 3.25 以下或 pH 10.25 以上时, 两个峰的吸收值迅速升高。此结果说明, 藻胆素色基所处的蛋白环境在 pH 3.25~10.25 之间相对稳定, 因而色基状态变化有限。而当处于极酸和极碱的时候, 光吸收值的快速增高, 可能是因为 PC-645 亚基变性伸展, 处于结构内部的藻胆素逐渐暴露, 也可能是因为 pH 变化对藻胆素产生了不可逆的修饰。此外, 远紫外区属于芳香族氨基

酸的 280 nm 吸收峰也呈现类似的变化趋势, 由于疏水的芳香族氨基酸通常位于蛋白质内部疏水区, 因此其吸收变化也可提示蛋白构象变化的信息。

2.2 荧光光谱

选择 582, 625 和 645 nm 三个波长的激发光分别对 PC-645 进行激发。其中 582、625 nm 是位于β亚基上的 PXB 和 PCB 的最大吸收, 而 645 nm 被认为与α亚基上的 MBV 有关。在 PC-645 内部, 色基吸收的能量将沿着 PXB→PCB→MBV 方向传递, 最终产生 660~662 nm 的末端发射。如图 2 所示, 采用三个不

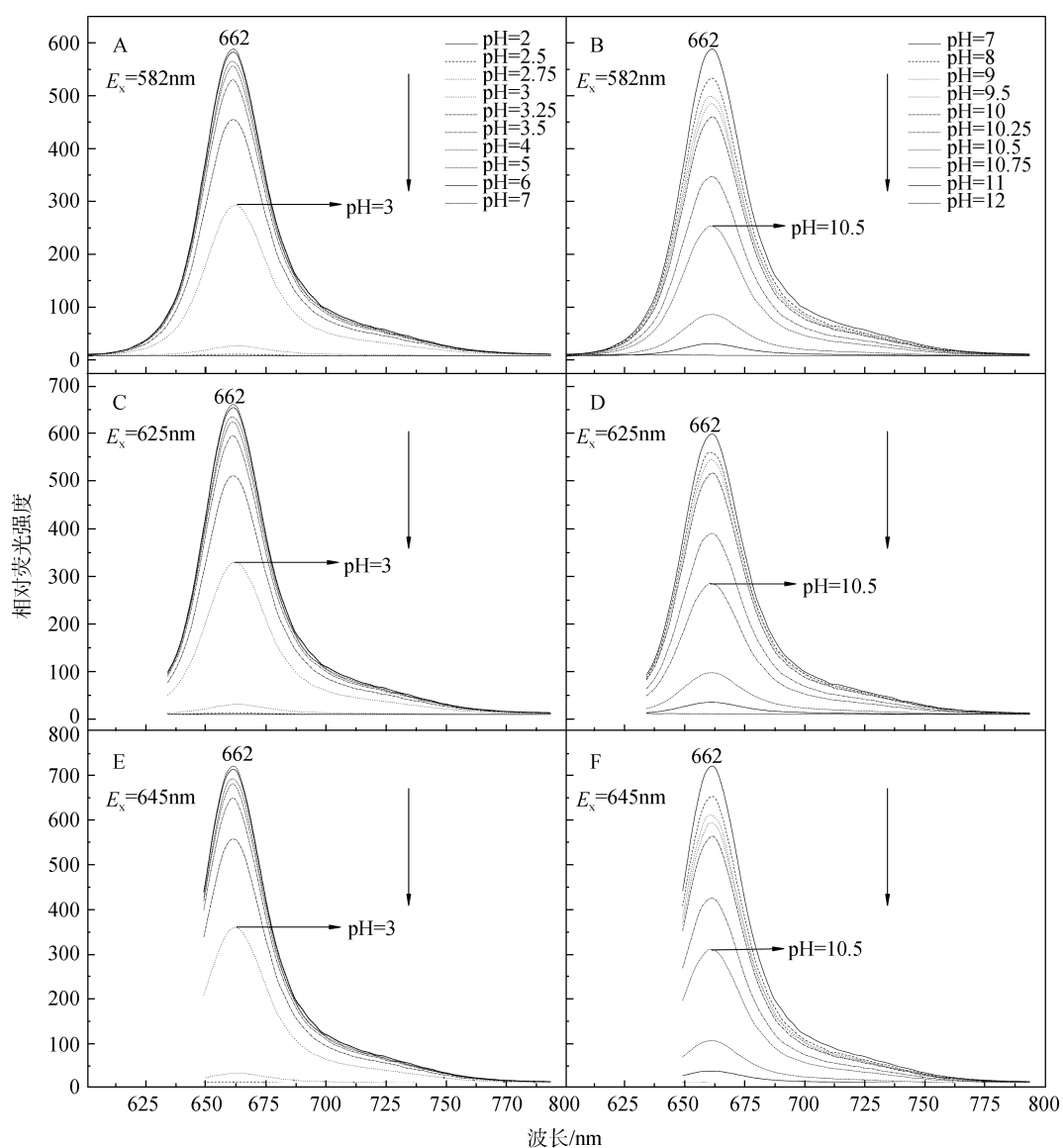


图 2 pH 对 PC-645 荧光发射谱的影响

Fig.2 Effect of pH on fluorescence emission spectra of PC-645

A, C, E 溶液为 pH 7~2; B, D, F 为 pH 7~12

A, C, E: pH 7~2; B, D, F: pH 7~12

同波长进行激发 PC-645 都只产生 662 nm 特征荧光, pH 条件变化, 仅影响发射的荧光强度, 不影响峰的位置。在 pH 3~7 范围内, 荧光发射峰强度都随 pH 的降低有所降低, 但幅度很小; 当 pH 降低到 3 时, PC 发射峰强度开始骤降; 而 pH 低于 2.5 时, 荧光发射峰几近消失。在碱性范围内, 当 pH 从 7 逐渐升到 10 的过程中, 荧光强度同样逐渐降低, 但下降速度明显快于酸性条件; 当 pH 升高到 10.5 时, 荧光强度可降至 pH7 时的 50% 以下。结合吸收光谱测定结果, 说明在 pH 3.5~10 之间时, PC-645 不仅结构相对稳定, 并且保持了较高的内部能量传递能力。

2.3 藻蓝蛋白在极端 pH 下时间耐受性实验

由于隐藻 PC-645 在 pH > 3 时变性缓慢, 而 pH < 3 时荧光光谱与吸收光谱都呈快速持续下降趋势, 因此选择 pH3 条件下, 观测 PC-645 的光谱随时间变化。如图 3 所示, 在此极端酸性条件下, PC-645 的荧光发射强度在 10 min 内迅速下降, 之后进入一个相对稳定的平台期, 而吸收峰值在 60 min 内则是呈持续下降趋势。这表明 PC-645 在 pH3 条件下, 其能量传递功能的消失和蛋白空间结构的变化并非同步过程, 能量传递功能的

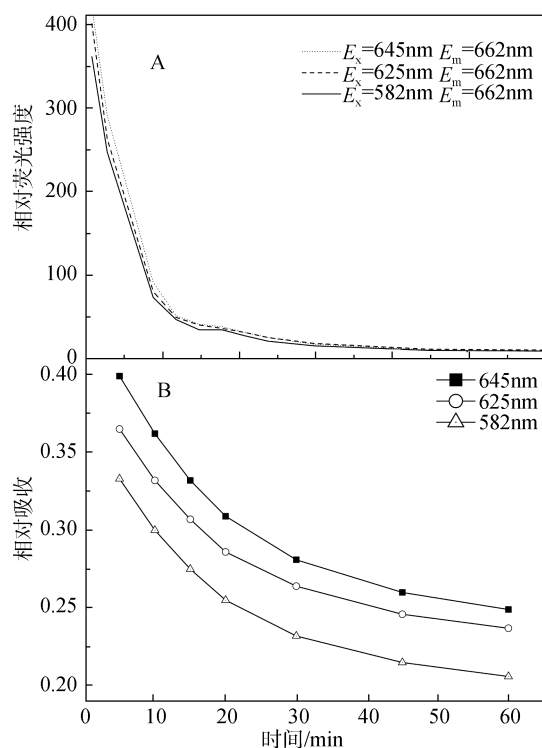


图3 pH3 时 PC-645 荧光强度(A)与吸收值(B)随时间的变化
Fig.3 Changes of the relative fluorescence intensity (A) and absorption value (B) of PC-645 with time at pH3

失去先于结构变化。因为亚基解离、三级或者二级结构解体、色基修饰等结构变化是一个复杂的动态过程, 过程中任何一步都可能影响到色基的相对距离和排布, 导致能量传递功能丧失。因此, 为了获得稳定、重复的光谱测定结果, 实验中变性时间严格控制为 10 min。

2.4 藻蓝蛋白在 pH 复性过程中的吸收光谱

将缓冲液从 pH 极端酸性或碱性逐渐调回中性, PC-645 吸收光谱的变化情况如图 4。结果显示, PC-645 在 pH 为 3 时尽管吸收强度下降, 但吸收峰形依然保持完整。将 pH 从 3 调整到 7 后, 吸收峰形并无改变(图 4B), 但是强度明显增加, 可以达到极高的复性效率。当 pH 降低到 2 后, 尽管复性后的吸收峰形可有一定程度的恢复(图 4A), 但强度增加有限, 并且出现了 675~700 nm 的一个长波吸收。说明 pH 为 3 时, PC-645 的大部分蛋白构象变化和色基状态改变依然是可逆的, 在酸性区可逆变性和不可逆变性的临界点可以达到 3 以下, 低于其他藻胆蛋白类型^[5]。而在碱性范围内, 从 pH11 或者 pH12 恢复到 pH7 时, PC-645 吸收峰的形状略有恢复, 但强度没有明显的恢复(图 4C、图 4D)。表明在极端碱性 pH 条件下, 仅有局部的蛋白会发生复性, 绝大部分蛋白的变性剧烈, 基本是不可逆的。

3 尿素光谱动力学

3.1 尿素与 pH 变性比较

通常认为, 高质量浓度的尿素可使蛋白质达到完全变性^[15]。如图 5 所示, 当用 pH 为 12 的碱性尿素变性时, 其效果与单纯使用碱性溶液时结果相似, 在 580~650 nm 范围的吸收大幅下降, 645、625 和 582 nm 吸收峰合并为一个 590~600 nm 的吸收单峰, 而 350~400 nm 属于色基的吸收明显增加, 并且 280 nm 芳香族氨基酸的吸收增加。但使用 pH2 的酸性尿素变性时, 发现藻蓝蛋白变性程度反而不及单纯的酸性条件时剧烈, 这可能因为尿素氨基的质子化消耗了部分氢质子, 延缓了 pH 降低的效应。在含 8mol/L 尿素、pH 为 7 的中性条件下, PC-645 在 10 min 内即可完全变性, 且变性的结果与碱变性所得的图谱更为近似。因此, 可见光区吸收值降低, 特征吸收峰形单峰化, 以及近紫外区色基吸收明显增加等光谱特征, 可以看作是藻蓝蛋白完全变性, 亚基构象破坏的标志。

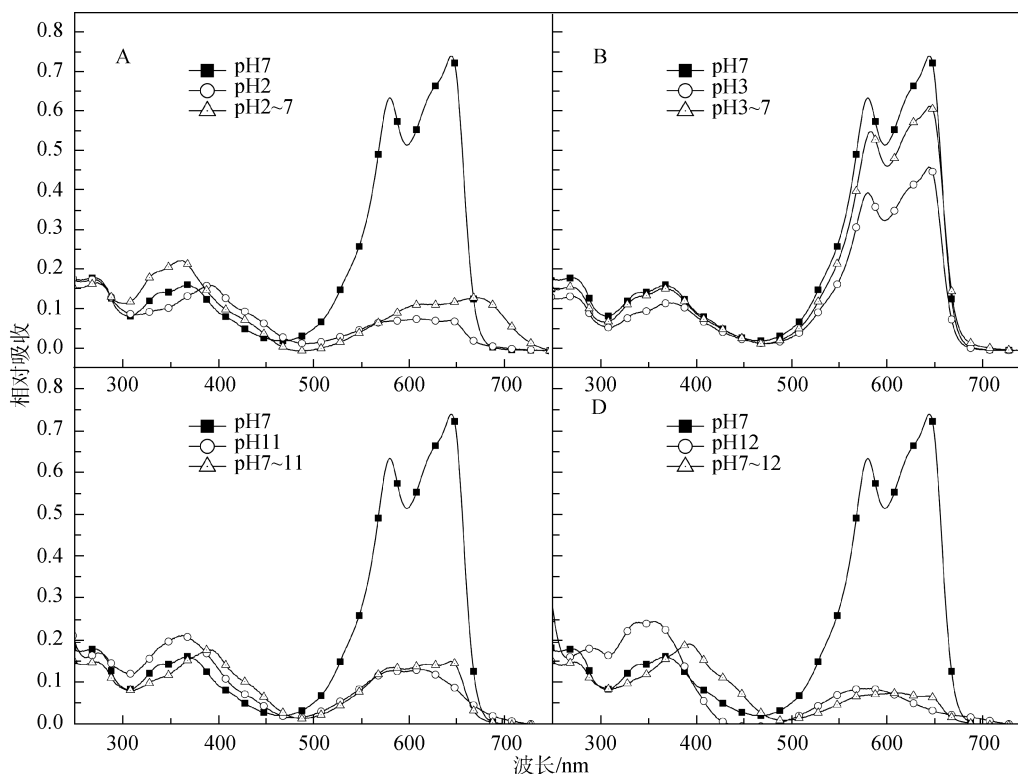


图4 pH 复性过程中 PC-645 的吸收光谱

Fig.4 Absorption spectra of PC-645 in protein refolding induced by pH adjustment

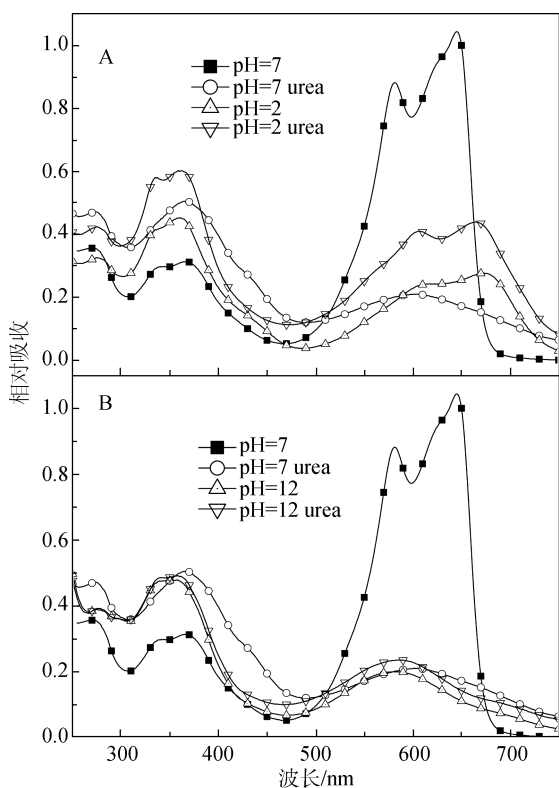


图5 尿素(8mol/L)在不同 pH 条件下对 PC-645 吸收光谱的影响
Fig.5 Influence of urea (8mol/L) on the absorption spectra of PC-645 at different pH

3.2 PC-645 的尿素复性过程中的吸收光谱

以往有报道, 尿素导致的蛋白质变性的动力学过程呈现 S 型, 质量浓度高于 4 mol/L 时, 蛋白变性速度极快^[16], 因此实验选择 3 mol/L 尿素处理 PC-645 并观测其变性过程的光谱变化。结果如图 6。

PC-645 在尿素中变性的结果, 只是导致 582、625 和 645 nm 特征吸收峰值下降和 350~400 nm 色基的吸收的小幅度增加, 但峰形基本不变, 即使变性时间长达 24 h, 也只有 645 nm 峰降低相对略快(图 6A)。说明低质量浓度尿素最初影响的只是 PC-645 的外部结构, 或者亚基的聚合状态, 而色基所处的内部蛋白环境没有被波及, 表现出一定的耐受性。透析除去尿素时, PC-645 在最初复性的 1h 内, 特征吸收峰吸收值逐渐增加, 峰形更为完整, 说明藻蓝蛋白活性可逐渐恢复。但时间更长以后, 由于透析袋内藻蓝蛋白样品被稀释, 表现吸收值反而下降。

4 讨论

PC-645 作为一种捕光色素蛋白, 其最重要的生理功能就是吸收和传递光能。光能的吸收由 PXB、PCB 和 MBV 三种藻胆素色基共同承担, 它们在可见

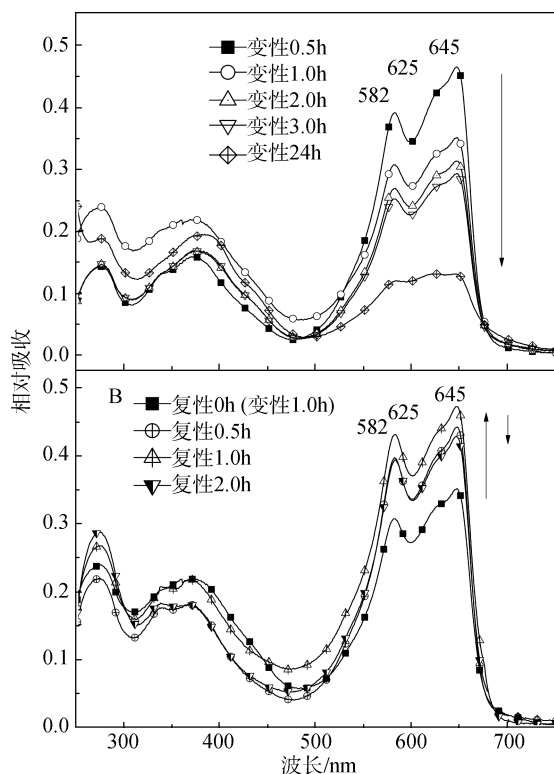


图 6 PC-645 在 3mol/L 尿素中的变性和复性过程吸收谱
Fig. 6 Absorption spectra of PC-645 in 3mol/L urea during denaturation and renaturation

光区和紫外区都呈现特征的吸收, 当色基所处的蛋白质微环境不同或者发生变化时, 相同的色基也可产生不同的吸收谱峰。因此吸收光谱的变化是色基所处蛋白质内环境变化的探针, 直接反映亚基二、三级空间结构状态。此外, PC-645 色基吸收的能量是次第传递的, PXB、PCB 和 MBV 任何一种色基激发后, PC-645 在缺少能量受体的情况下都可发射并且只发射来自 MBV 的 660~662nm 特征荧光(图 3), 说明在 PC-645 中 PXB 和 PCB 都是敏化基团, 只有 MBV 是发色基团, 此荧光强度的变化直接反应能量传递效率的高低。由于这些色基分别位于不同亚基上, 要保证能量传递功能的实现, 要求蛋白质亚基要具备完整的二、三级甚至四级结构。因此, 改变环境条件, 综合观测藻蓝蛋白吸收和荧光光谱, 可给出大量的结构与功能信息。

如图 7 所示, pH 诱导的 PC-645 蛋白构象与功能变化可分为三个不同的区段。(1)稳定区: 在 pH 3.5~7 区域, 吸收和荧光谱都比较稳定, 显示蛋白质构象和功能在此区域都保持正常。(2)次稳定区: 在 pH 在 7~10 时, 荧光强度缓步下降, 但光吸收依然保持平稳, 说明位于亚基内部的色素基团的状态、所处的疏

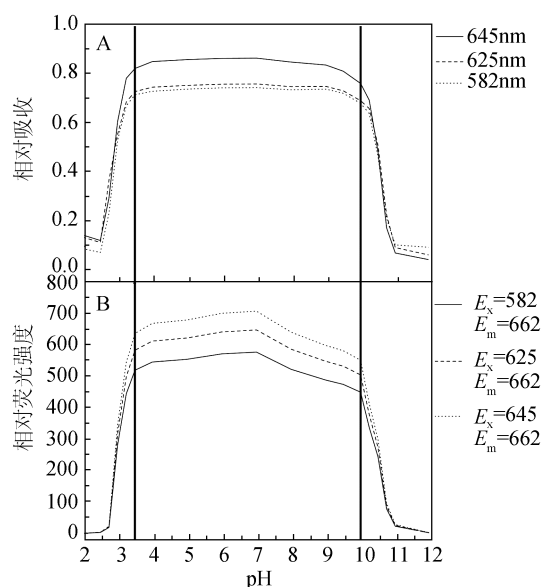


图 7 pH 对 PC-645 吸收光谱、荧光光谱的影响
Fig.7 Influence of pH on the traces of peak intensities of absorbance and fluorescence of PC-645

水微环境都没有改变, 二、三级结构大部分完好; 荧光传递效率的降低, 可能是亚基局部区域构象变化或者色素基团间的空间距离变化(如四级结构微扰)引起。(3)不稳定区: pH 在 2.75~3.5 和 pH 为 10~11 时, 吸光度和荧光强度都呈快速下降, 色基在近紫外和可见光区的吸收峰位变动, 蛋白构象处于快速崩溃期。

光谱分析结果说明, 蓝隐藻 PC-645 在酸性范围比在碱性范围内更稳定, 这一点在 pH 复性实验中再次得到证实(图 4)。这可能与隐藻藻胆蛋白所处的生理环境特殊有关。蓝藻藻胆蛋白附着在类囊体膜的表面与光合系统 II 相连接, 红藻藻胆蛋白附着在类囊体膜的外表面, 与叶绿体基质相接触, 而隐藻藻胆蛋白处于类囊体腔中。伴随着光合作用的进行, 光驱动电子传递的结果, 使叶绿体基质 pH 升高, 而类囊体腔则逐步酸化, 所以对于隐藻藻胆蛋白而言, 在酸性条件下维持结构和功能的稳定具有更为重要的生理意义。

隐藻 PC-645 在很宽的 pH 范围以及一定质量浓度的尿素中均保持稳定, 表现出构象与功能对环境变化的高度适应性。推测其亚基间可能存在一些关键位点, 在受到一定程度的 pH 环境干扰时, 这些位点能够比较稳定的维持蛋白的结构状态; 而在蛋白结构的一些非关键区域中, 肽链的结构则允许呈现一定的柔性变化而不影响功能的发挥^[17]。隐藻 PC-645 的两种 α 亚基均含有大量的碱性氨基酸, 其

中 α_1 亚基等电点大于 9^[18], 说明这些碱性残基大多位于蛋白质表面; 而 PC-645 的 β 亚基 PI 为 5.7~6.0, 偏于酸性。显然在隐藻 PC-645 两种亚基聚合或四级结构形成中, 除了疏水力之外, 静电相互作用可能扮演着重要角色。pH 变化可影响氨基酸残基的解离, 从而影响如盐键等静电相互作用而导致蛋白质变性; 而尿素则既可作为质子受体也可作为质子供体, 通过形成氢键使蛋白质肽链伸展^[15]。PC-645 能在广泛 pH 条件下保持能量传递功能稳定, 并且在低质量浓度尿素中维持吸收状态较长时间不变, 说明其亚基结构相当致密, 并且四级结构稳定。由于 PC-645 在酸性区变性的临界 pH 在 3~3.5 附近, 接近羧基侧链的解离区段, 推测酸性 β 亚基上的羧基侧链可能参与了亚基之间的关键作用, 当环境 pH 低于羧基的 pK 值时, 大部分羧基质子化而失去负电荷, 导致蛋白空间结构崩溃、解体。

参考文献:

- [1] Hoef-Emden K, Melkonian M. Revision of the genus cryptomonas (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism[J]. *Protist*. 2003, 154(3-4): 371-409.
- [2] Guard-Friar D, Eisenberg B L, Edwards M R, et al. Immunochemistry on cryptomonad biliproteins[J]. *Plant Physiol*. 1986, 80(1): 38-42.
- [3] Doust A B, Wilk K E, Curmi P M G, et al. The photophysics of cryptophyte light-harvesting[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, 184(1-2): 1-17.
- [4] Sidler W, Nutt H, Kumpf B, et al. The complete amino-acid sequence and the phylogenetic origin of phycocyanin-645 from the cryptophyten alga *Chroomonas sp*[J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1990, 371(7): 537-547.
- [5] Liu L N, Su H N, Yan S G, et al. Probing the pH sensitivity of R-phycoerythrin: investigations of active conformational and functional variation[J]. *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1787(7): 939-946.
- [6] Ludwig M, Gibbs S P. Localization of phycoerythrin at the lumenal surface of the thylakoid membrane in *Rhodomonas lens*[J]. *J Cell Biol*, 1989, 108(3): 875-884.
- [7] Lichtlé C, Duval J C, Lemoine Y. Comparative biochemical, functional and ultrastructural studies of photosystem particles from a Cryptophyceae: *Cryptomonas rufescens*; isolation of an active phycoerythrin particle[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1987, 894(1): 76-90.
- [8] 张允允, 陈敏. 蓝隐藻藻蓝蛋白的分离、纯化及性质研究[J]. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 2011, 24(4): 281-286.
- [9] 张少斌, 王瑾, 马镒, 等. 天然食用色素藻蓝蛋白的稳定性研究[J]. *食品科技*, 2007(6): 169-171.
- [10] 范刚, 陈德文, 潘思轶, 等. 葛仙米藻胆蛋白提取工艺及藻蓝蛋白稳定性研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(9): 215-218.
- [11] Morschel E, Wehrmeyer W. Cryptomonad biliprotein: phycocyanin-645 from a *Chroomonas* species[J]. *Arch Microbiol*, 1975, 105(2): 153-158.
- [12] Maccoll R, Guard-Friar D. Phycocyanin 645. The chromophore assay of phycocyanin 645 from the cryptomonad protozoa *Chroomonas* species[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(23): 14327-14329.
- [13] Glazer A N, Wedemayer G J. Cryptomonad biliproteins — an evolutionary perspective[J]. *Photosynthesis Research*, 1995, 46(1): 93.
- [14] 邵思蜜, 苏海楠, 张熙颖, 等. 光谱学方法对钝顶螺旋藻异藻蓝蛋白活性构象研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(6): 1643-1646.
- [15] Thoren K L, Connell K B, Robinson T E, et al. The free energy of dissociation of oligomeric structure in phycocyanin is not linear with denaturant[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(39): 12050-12059.
- [16] Maccoll R, Malak H, Cipollo J, et al. Studies on the dissociation of cryptomonad biliproteins[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(46): 27555-27561.
- [17] 苏海楠. 蓝藻与红藻中藻胆蛋白的活性构象研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [18] Zhang Y Y, Chen M, Cui H. Isolation and characterization of a new subunit of phycocyanin from *Chroomonas placoidea*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2011, 22(10): 1229-1232.

Structural and functional stability of phycocyanin from *Chroomonas placoidea*

LI Wen-jun, CHEN Min

(Institute of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Jan.,11,2013

Key words: *Chroomonas placoidea*; phycocyanin; absorption spectrum; fluorescence spectrum; conformational stability

Abstract: In this paper, we explored the structural stability of bilins as well as protein and functional variation of phycocyanin (PC) 645 from *Chroomonas placoidea* by means of monitoring the dynamic fluorescence and absorbance spectra during denaturation and renaturation with different pH or different concentrations of urea. The results showed that PC-645 exhibited both structural and functional stability in wide range of pH and certain concentration of urea, which indicated a strong flexibility of three-dimensional structure of this protein. The pH-induced conformational and functional dynamics could be divided into three regions: (1) Stable region (pH 3.5 ~ 7): in which both fluorescence and absorbance spectra were stable, presenting that the conformation together with the function of protein maintained normal. (2) Metastable region (pH 7~10): absorbance spectra were still stable, which implied that the state of bilins and hydrophobic micro-environment inside the subunits kept unchanged. But small amplitude of decrease of fluorescence transfer efficiency could be observed. This may be caused by local conformational changes on the surface of subunit, subunit dissociation or changes of distance among bilins. (3) Unstable region (pH < 3 or pH > 10): The fluorescent intensity and absorbance value decreased quickly, accompanied by absorption shifting of bilins at both near ultraviolet and visible region, which indicated rapid collapse of protein conformation. The result that PC-645 was more stable in acid condition than in alkali condition is in compliance with its distinct environment and physiological function.

(本文编辑: 梁德海)