科 学 通 报
第42卷 第5期 Chinese Science Bulletin 1997年3月

【研究简报】

光系统Ⅱ反应中心的LB膜的形成及其圆二色性光谱的研究

杜玉扣① 唐季安① 江 龙① 唐崇钦② 匡廷云②
(①中国科学院感光化学研究所,北京 101001; ②中国科学院植物研究所,北京 100093)

关键词 光系统Ⅱ 反应中心 D1/D2/cyt-559 圆二色性(CD)

由D1、D2及细胞色素b-559(cyt-559)3个多肽及其内部镶嵌的大约4～6个che a, 2个pheo a和1～2个β胡罗卜素组成的高等植物光系统Ⅱ(PSⅡ)反应中心属于膜蛋白,因其难于结晶,人们至今还无法利用X射线技术获得该蛋白的精确解. 近年来,利用膜蛋白二维晶体通过电子显微镜与象重构技术获得三维结构信息的方法有很大的进展[1,2],而有序二维晶体的获得是关键的一步. 本工作的目的是试图利用单分子膜技术形成保持与自然状态光谱性质类似的PSⅡ反应中心的Langmuir-Blodgett(LB)膜,为进一步利用该技术形成二维晶体并研究其结构打下基础. 并采用圆二色性对其构象进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料

PSⅡ反应中心D1/D2/cyt-559复合物的分离纯化参照Nanba和Satoh的方法[3],从第一个TSKDeAE-650(S)离子交换柱收集得到的反应中心样品再经过另一个较小的离子交换柱,以便使样品的去污剂Triton X-100交换成β-十二烷麦芽糖苷[4]. Fractogel TSK DeAE-650(S)离子交换树脂为Merck公司产品,其他均为国产分析纯试剂.

1.2 π-A曲线的测量及拉膜

π-A曲线的测量及拉膜使用日本Face LB films装置,HBM型LB槽,采用Wilhelmy吊片

7 Conroy G C, Vannier M W. Noninvasive three-dimensional computer imaging of matrix-filled fossil skulls by high-resolution computed tomography. Science, 1984, 226: 456～458
8 Conroy G C. Vannier M W. Endocranial volume determination of matrix-filled fossil skulls using high-resolution computed tomography. In Hominid Evolution: Past, Present and Future. Taung Diamond Jubilee International Symposium, Johannesburg, 1985, 419～426
9 Haubitz B, Prokop M, Döhring W, et al. Computed tomography of *Archaeopteryx*. Paleobiology, 1988, 14(2): 206～213
10 McGowan C. Computed tomography confirms that *Eurhinosaurus* (Reptilia: Ichthyosauria) does have a tailbend. Can J Earth Sci, 1990, 27: 1 541～1 545
11 Currie P J, Zhao X-J. A new troodontid (Dinosauria, Theropoda) braincae from the Dinosaur Park Formation (Campanian) of Alberta. Canadian Journal of Earth Sciences, 1993, 30: 2 231～2 247
12 张法奎,杜湘珂,罗德馨,等. CT观察杨氏中国尖齿兽(*Sinoconodon youngi*)头骨化石标本的鼻部. 古脊椎动物学报, 1994, 32(3): 195～199
13 杨钟健. 乌尔禾翼龙类. 见:中国科学院古脊椎动物与古人类研究所,甲种专刊,第11号. 新疆古生物考察报告(二),乌尔禾翼龙动物群. 北京:科学出版社,1973. 18～35

(1996-01-23收稿,1996-10-28收修改稿)

法测表面压. 以含有 3×10^{-3}mol/L $CdCl_2$ 的 2 次重蒸水作为亚相,以正己烷为铺展剂,将单分子膜转移到石英片上时,以 0.5 cm^2/s 速度压至表面压为 20 mN/m,然后稳定 30 min 开始拉膜,用垂直提拉法转移,载片向上、向下提拉的速度皆为 5 mm/min,第一层蛋白干燥 20 min,以确保蛋白与载片的牢固附着,以保证后面蛋白膜的转移,后面每层干燥时间为 15 min,转移的蛋白膜是 Z 型膜. 实验全过程都在 10℃ 左右,且在黑暗中进行.

1.3 吸收光谱和 CD 光谱的测量

光系统Ⅱ反应中心 D1/D2/cyt-559 复合物的 LB 膜(十层)吸收光谱使用 HP8541A 光谱仪测量;CD 光谱测量在 Jasco J-720 光谱仪上进行,将 PSⅡ反应中心 D1/D2/cyt-559 样品用含有 50 mmol/L Tris, 30 mmol/L NaCl, 2 mmol/L β-十二烷基麦芽糖苷、pH 7.2 的 Tris-HCL 缓冲液,稀释至 chl a 和 pheo a 的总浓度为 36 μg/mL,于 0.2 cm 光径的比色池中测定远紫外区的 CD 光谱,测量温度为 20℃ 左右. 与此对比测量铺于石英载片上的 D1/D2/cyt-559 复合物 LB 膜(十层).

2 结果与讨论

2.1 光系统Ⅱ反应 D1/D2-cyt-559 复合物 LB 膜的形成

光系统Ⅱ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物是膜蛋白,水溶性很不好,通常所用的含少量酒精(2%左右)的水溶液作铺展剂[5],其效果不好,容易引起蛋白质变性. 通过实验我们发现选用正己烷效果比较理想,同时,要用含有 3×10^{-3}mol/L $CdCl_2$ 水溶液作为亚相,图 1 示出了不同亚相时 π-A 曲线的情况,因为不知道它的分子量,无法算出每个蛋白分子所占的面积. 从图 1 中可以看出,用 $CdCl_2$ 溶液作亚相再辅以正己烷作铺展剂,最大的表面压可达 38 mN/m,说明能形成很好的单分子膜.

2.2 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物 LB 膜的吸收光谱

光破坏可导致 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物在红区的吸光度值的下降且峰位发生蓝移[6],从图 2 可以看出,由于实验中控制了适当的条件,所得到的 PSⅡ反应中心 D1/D1-

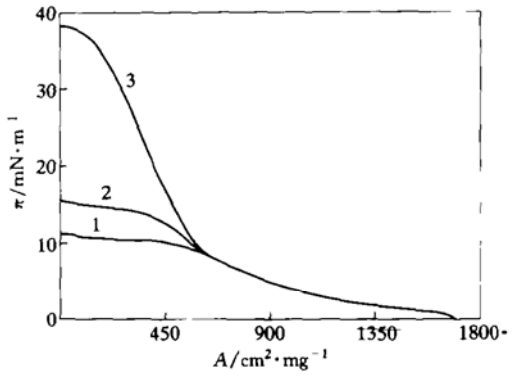


图 1 D1/D2-cyt-559 复合物在不同亚相的 π-A 曲线
1 示纯 2 次水;2 示 0.000 3 mol/L $CdCl_2$ 溶液;3 示 0.003 mol/L $CdCl_2$ 溶液

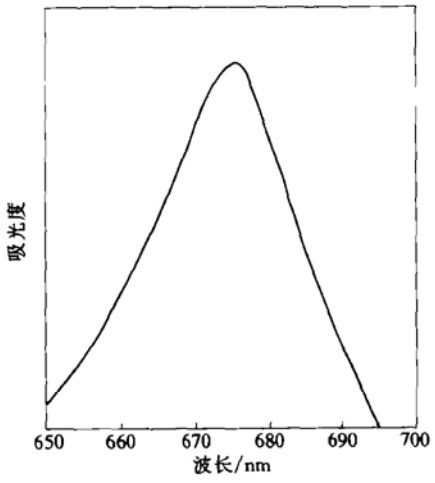


图 2 D1/D2-cyt b-559 复合物的 LB 膜(十层)的吸收光谱

cyt-559 复合物 LB 膜的吸收峰峰值为 676 nm 并未发生蓝移，这与文献[4,7]中缓冲溶液中的情形是一致的．这说明在形成 LB 膜过程中复合物并未遭受光破坏，原初电子供体 P680 未受到破坏．

2.3　PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物 LB 膜紫外区的 CD 光谱

我们用 CD 光谱作为 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物在缓冲溶液中及界面上构象变化的检测手段，蛋白质的 CD 光谱与其二级结构有紧密关系．图 3 是 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物在缓冲溶液中的 CD 光谱，从图中可以看出在 209 和 222 nm 有负 Cotton 峰，蛋白结构中 α-螺旋的结构占相当比例，图 4 是用上述方法获得的十层 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物 LB 膜的 CD 光谱．从图谱上可以看出 α-螺旋特征峰 209 nm 和 222 nm 峰有所下降，说明在气液界面上该蛋白的二级结构发生了变化．利用 4 种标准结构(α-螺旋、β-折叠、β-转角、无规卷曲)的图谱进行拟合．在缓冲溶液中，α-螺旋：37.6%，β-折叠：0%，β-转角：27.7%，无规卷曲：34.7%；在 LB 膜中，α-螺旋：33.3%，β-折叠：0%，β-转角：34.1%，无规卷曲：32.6%．结果表明，α-螺旋成分下降，β-转角增加，其他成分基本不变，和大多数可溶性蛋白相似，在气液界面有一定程度的展开．

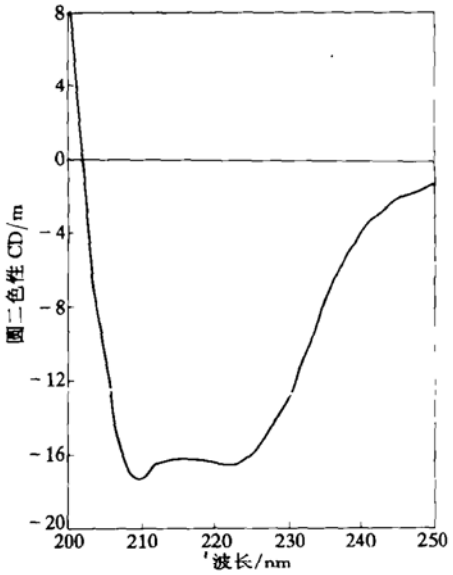


图 3　D1/D2-cyt b-559 复合物在紫外区的 CD 光谱

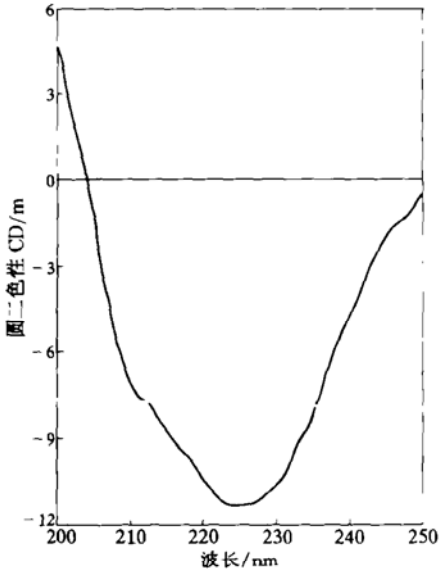


图 4　D1/D2-cyt b-559 复合物的 LB 膜(十层)在紫外区的 CD 光谱

3　结论

找到了形成 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物 LB 膜的较理想的条件，得到了与自然状态光谱性质相似的 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物 LB 膜，为应用该技术获得有序二维晶体提供了可能性；通过 CD 光谱的研究发现，在 LB 膜中 PSⅡ反应中心 D1/D2-cyt-559 复合物有一定的伸展，但这种伸展并不破坏反应中心电子给体 P680，同时增加了蛋白质的表面活性．

科 学 通 报
第 42 卷 第 5 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 3 月

【研究简报】

高压对牛奶中细菌的生理活性的影响

池元斌① 崔 田① 崔启良① 金曾孙① 韩 杰① 马小凡②
(①吉林大学超硬材料国家重点实验室，长春 130023；②吉林大学环境科学系，长春 130023)

关键词 细菌 大肠菌群 生理活性 压力抑制

细菌的生命过程和它的生活环境有极为密切的关系，环境因素极大地影响着细菌的生长、繁殖和代谢. 温度和压力是影响细菌生命活动的两大物理因素. 由于细菌生存的温度多在50℃以下，此温度在实验中非常容易实现. 长久以来人们相当注重研究温度对细菌生命过程的影响：各种细菌最适宜的生长温度、最高生长温度，最低生长温度以及为什么不同种类的细菌对温度有不同的敏感性都已经相当清楚. 然而，压力对细菌生命过程的作用及作用机制很少有人研究. 尤其是数十个 MPa 以上极端高压环境下细菌的生命活动的研究几乎无人问津. 这是细菌生命活动研究方面的一大缺陷. 研究压力对细菌生长、繁殖、死亡及其他生命活动的影响是全面深入地了解认识微生物，促进有益微生物生长，控制有害微生物生长，造福于人类所不可缺少的. 随着高压科学和技术的进步，现在在较大腔体内产生几个 GPa 以下的高压力已经不是很困难的事情. 近年来一些人相继开展了高压下微生物的研究，得到了一些很有意义的结果. 例如，Tamura[1]等人发现在 30 MPa 压力下培养的大肠杆菌，每个细胞的细胞长度都是常压下大肠杆菌细胞长度的 6～7 倍，当压力恢复到常压时，大肠杆菌也恢复正常长度.

致谢 对中国科学院生物物理研究所大分子重点实验室在 CD 光谱测量过程中所给予的帮助，特表谢意. 本工作为中国科学院重大基础研究项目和国家自然科学基金(批准号：29573139)资助项目.

参 考 文 献

1 Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A. A model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron crystallography. J Mol Biol, 1990, 213: 899～929
2 Kuhlbrandt W. Structure of light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from plant photosynthetic membranes at 7Å resolution in projection. J Mol Biol, 1988, 202: 849～864
3 Nanba O, Satoh K. Isolation of a photosystem Ⅱ reaction center containing D1 and D2 polypeptides and cytochrome b-559. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 109～112
4 于振宝，匡廷云，唐崇钦，等. 光系统Ⅱ反应中心 D1/D2/cyt b559 的分离及性质研究. 植物学报，1992，34：588～598
5 MacRitchie F. Spread monolayers of proteins. Advances in Colloid Interface Sci, 1986, 25: 341～385
6 卢荣禾，匡廷云，于振宝，等. 光系统Ⅱ反应中心 D1/D2/cyt b559 复合物光破坏作用的多步反应. 生物物理学报，1993，9(2)：294～297
7 Seibert M, Picorel R, Rubin A B, et al. Spectral, photophysical and stability properties of isolation photosystem Ⅱ reaction center complex. Plant Physiol, 1988, 87: 303～306

(1995-12-28 收稿，1996-08-18 收修改稿)