

12

66-70

# PS II 中蛋白二级结构的 FTIR 光谱研究\*

陆卫<sup>1)</sup> 徐春和<sup>1,2)</sup> 李荣<sup>2)</sup> 陈张海<sup>1)</sup> 刘普霖<sup>1)</sup> 沈学础<sup>1)</sup> 沈允钢<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院上海技术物理研究所, 红外物理国家重点实验室, 上海, 200083;

<sup>2)</sup>中国科学院上海植物生理研究所, 上海, 200032)

陆红

(复旦大学生物系, 上海, 200433)

Q510.1

**摘要** 利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)方法研究了光系统 I (PS I) 膜颗粒中蛋白二级结构。结果表明光系统 I 二级结构的红外光谱在 300K 和 77K 温度下是有区别的, 且主要反应在  $\beta$  折叠与转角结构相应红外吸收之间的相互转化。

**关键词** 光系统 I 蛋白二级结构, FTIR.

PSII 系统 膜颗粒 植物

## 引言

通过对紫色光细菌(*Rhodospseudomonas viridis*) 作用中心形成晶体的 X 光分析已在原子分辨率上给出了各种蛋白基因和色素分子的配位和分布<sup>[1]</sup>. 但至今人们尚不能给出高等植物(如菠菜)中光系统的大基因分子的精确结构, 这是由于这类功能基团要形成一种可供 X 光进行结构分析的晶体极其困难. 人们对高等植物 PS I 系统的认识仍停留在紫色光细菌作用中心模型上, 应用红外光谱方法去具体地分析高等植物中 PS I 蛋白二级结构<sup>[2,3,4]</sup>是十分有意义的. 本文报道对 PS I 膜颗粒在 300K 和 77K 条件下的蛋白二级结构红外吸收光谱及其区别.

## 1 实验与结果

本文研究的样品是高等植物菠菜中提取的光系统 I (PS I) 膜颗粒, 它们具有生物活性的 PS I, 主要由反应中心蛋白 D1 和 D2、细胞膜色素 b559、叶绿素结合蛋白 CP47 和 CP43、分子量分别为 17、23 和 33ku 的外周蛋白以及光能转换所需的辅助因子组成. 我们采用文献 [3] 的方法从新鲜菠菜中获得了具有生物活性的 PS I 膜颗粒. 为了保证这些膜颗粒的活性, 将它们保存在 SMN 缓冲液中, 并使叶绿素浓度为 2mg/ml, 置液氮中保存待用. 对 PS I 膜颗粒样品进行了室温和液氮温度下的光谱测量, 在测量前我们将低温保存的样品在室温下融化, 均匀地涂在 ZnSe 晶片上, 再进行快速真空干燥去除水分, 在 Bruker IFS 113V 型傅里

\* 国家自然科学基金(编号 19374060)资助项目  
稿件收到日期 1997-05-30, 修改稿收到日期 1997-09-11

叶变换红外光谱仪上进行检测. 为消除光路中的水汽与  $\text{CO}_2$  气体的影响, 整个光路处于真空环境, 测量分辨率为  $2\text{cm}^{-1}$ .

典型的实验光谱如图 1 所示, 光谱表现出明显的酰胺吸收带结构. 由于我们主要是关注 PS I 膜颗粒样品中蛋白二级结构的情况, 所以我们将重点围绕位于  $1660\text{cm}^{-1}$  附近的酰胺 I 吸收带. 用洛仑兹线型对酰胺 I 吸收带进行拟合计算可得如图 2 所示的结果. 在具体计算中我们进行了光谱的基线校正, 详细方法将另文报道. 由于红外光谱描述的是蛋白大分子中的一些化学键的振动, 这类振动谱通常可用洛仑兹线型描述. 所以类似于 Swreuciz 采用对原始红外光谱拟合的方法<sup>[3,6]</sup>, 本文在拟合中采用的洛仑兹线型吸收公式为

$$A = \sum_{i=1}^3 \frac{\gamma_i^2 S_i}{4(\omega^2 - \omega_i^2) + 2\omega\gamma_i}$$

其中  $A$  是表征吸收强度的正比于吸收系数的量,  $\omega$  是光谱中的波数,  $\omega_i$  是吸收峰对应的波数,  $S_i$  为吸收强度,  $\gamma_i$  为峰的半高宽. 仅取 3 个吸收峰作实验光谱拟合, 3 个峰分别代表了  $\beta$  折叠,  $\alpha$  螺旋和转角 3 个二级结构. 由于人们更关注 3 种二级结构所占的百分比, 所以表征 3 种结构的 3 个峰是合适的. 另外原始光谱也仅显示出吸收带有不对称性, 即除位于约  $1657\text{cm}^{-1}$  处主峰外, 在  $\approx 1630\text{cm}^{-1}$  和  $\approx 1680\text{cm}^{-1}$  处有 2 个可分辨的拐点. 所以从光谱分析角度看取为 3 个峰的叠加较为合适. 从不同初始值进行的拟合计算表明拟合结果具有唯一性. 如果取 4 个以上子峰作拟合, 导致拟合计算中参量的不唯一性. 在对酰胺带吸收光谱处理中, 人们亦常用反卷积或二次微分的方法处理<sup>[2]</sup>, 但这样较难直接地较精确地获得各吸收

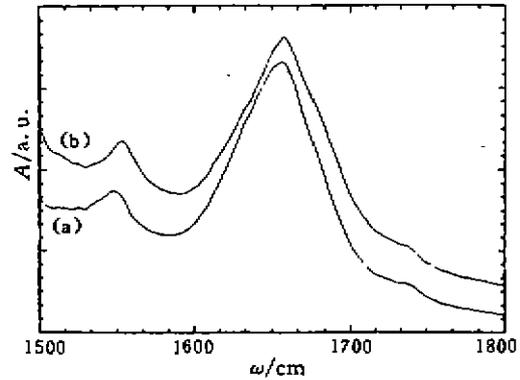


图 1 300K(a)与 77K(b)温度下的 PS I 红外吸收光谱

Fig. 1 The infrared absorption spectra of PS I at 300K (a) and 77K (b)

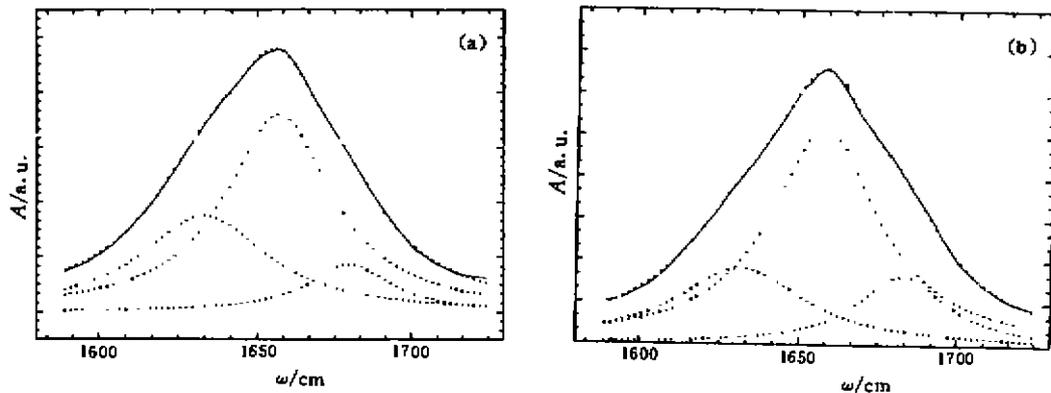


图 2 300K(a)与 77K(b)温度下 PS I 样品的酰胺 I 吸收带光谱

Fig. 2 The amide I band of PS I at 300K (a) and 77K (b)

峰原始的强度与线宽参量,采用直接拟合的方法,相对而言可较准确地反映酰胺 I 带中相应吸收峰的峰位,及强度与线宽这些重要物理参量.因此本文采用的是原始实验光谱的直接拟合方法,拟合获得了组成酰胺 I 吸收带 3 个子峰的频率线宽与强度(强度参量用占吸收峰总强度的比例来表示)等参量,如表 1 所列.拟合曲线如图 2 所示,其中实线是实验光谱,与实线相重合的点线为拟合的理论谱线,另外 3 条点线表示的峰为理论上拟合中分解出的三结构峰.

表 1 酰胺吸收带各子峰参量  
Table 1 The fitting parameters of amide I band

温度 (K)	$\alpha$ 螺旋			$\beta$ 折叠			转角结构		
	频率 ( $\text{cm}^{-1}$ )	强度 (%)	线宽 ( $\text{cm}^{-1}$ )	频率 ( $\text{cm}^{-1}$ )	强度 (%)	线宽 ( $\text{cm}^{-1}$ )	频率 ( $\text{cm}^{-1}$ )	强度 (%)	线宽 ( $\text{cm}^{-1}$ )
300	1657.0	58	41.7	1633.1	28	48.4	1679.8	14	33.0
77	1657.6	60	41.7	1631.6	21	49.1	1682.8	19	34.8

## 2 讨论

从表 1 所列的光谱分析结果可见,对于室温下测得的光谱  $\alpha$  螺旋峰强度约为  $\beta$  折叠和转角结构二者相应吸收峰强度之和的 1.3 倍.与紫色光细菌反应中心相比<sup>[4]</sup>,表现出相似强度的  $\alpha$  螺旋二级结构峰.另外在光谱的线宽上,与  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠相关的吸收峰线宽 ( $> 40\text{cm}^{-1}$ ) 明显大于转角结构相应的吸收峰线宽 ( $\approx 30\text{cm}^{-1}$ ).这一点可能起源于在  $\beta$  折叠峰内存在着 2 个相距约  $10\text{cm}^{-1}$  的来自  $\beta$  折叠结构的吸收峰<sup>[2]</sup>.与  $\alpha$  螺旋峰相交叠的还有无序结构引起的吸收,这些因素导致了这两类峰的线宽较宽,相对而言,转角结构导致的吸收峰为单一峰,所以线宽窄一些.本文观察到的与  $\beta$  折叠相关的吸收峰位 ( $1633\text{cm}^{-1}$ ),与  $\alpha$  螺旋相关的吸收峰位 ( $1657\text{cm}^{-1}$ ) 和与转角相关的吸收峰位 ( $1680\text{cm}^{-1}$ ),与文献[2]中指出的 3 种峰的峰位 ( $\beta$  折叠 ( $1628\text{cm}^{-1}$  与  $1638\text{cm}^{-1}$ ),  $\alpha$  螺旋 ( $1657\text{cm}^{-1}$ ) 和转角结构 ( $1678\text{cm}^{-1}$ )) 基本一致.从本文光谱看,在  $\beta$  折叠结构处仅可分辨出 1 个峰.为了保证拟合参量的唯一性,我们用 1 个峰代替  $\beta$  折叠中可能存在的 2 个峰<sup>[2]</sup> ( $1628\text{cm}^{-1}$  与  $1638\text{cm}^{-1}$ ).我们的结果与这 2 个峰的平均值  $1633\text{cm}^{-1}$  相一致,另外,该峰线宽接近  $50\text{cm}^{-1}$ ,远大于  $\beta$  折叠 2 个峰位差  $10\text{cm}^{-1}$ ,所以用 1 个峰代替是可行的,而这一近似并不会较大地影响  $\beta$  折叠峰在整个吸收带中含量的估计.

当测量温度降到液氮温度时,我们观察到酰胺 I 吸收带整体上略有变化.具体表现在表征 3 种二级结构的峰上有一些值得注意的特性,随温度下降  $\beta$  折叠峰频率红移 ( $1.5\text{cm}^{-1}$ ),而  $\alpha$  螺旋与转角结构的峰均呈现蓝移,分别有  $0.6\text{cm}^{-1}$  和  $3\text{cm}^{-1}$ .每个二级结构相应的红外吸收峰所占百分比上亦有一定的变化,主要表现为  $\beta$  折叠的含量减少了 7%,但  $\alpha$  螺旋与转角结构的含量分别上升了 2% 和 5%.线宽方面相对变化不大.由上述实验分析结果可见, $\alpha$  螺旋结构在温度降低后变化相对较小,而  $\beta$  折叠与转角结构则呈现出向相反方面变化的趋势,即频率上一个红移一个蓝移,强度上一个减小,一个增加.我们知道,当温度下降时,任何结构中分子振动诱导的结构无序度都要下降,即结构趋向有序化.文献[2]表明,光 PS I 蛋白的无序度上升时, $\beta$  折叠的含量将增加.本文观察到了降温引起蛋白无序度下降进而  $\beta$  折

叠含量下降与文献[2]的结果相一致。

另外,在一般固体结构中,当温度下降时,由于原子间的间距有所减小,从而导致相互作用力上升。酰胺 I 带表征着一种平面内 C=O 伸缩振动,且与 C—N 伸缩振动和平面内 N—H 弯曲振动有一定的耦合。所以作为一种振动模式,可以预计酰胺 I 带表示的振动频率应随温度下降而蓝移。这一预测与  $\alpha$  螺旋和转角结构中的振动模的行为是一致的,但与  $\beta$  折叠结构中的振动模行为不一致。 $\beta$  折叠结构中的振动模强度在温度下降时减小,这一实验现象可能表现了  $\beta$  折叠与转角这两种蛋白二级结构中振动模在低温下的相互调整,从而使  $\beta$  折叠中振动模极性一定程度上转移到了转角二结构上。然而为何会引起这样的振子强度转移,还需要更深入的研究工作。

### 3 结论

在 300K 与 77K 温度下,通过 FTIR 光谱对 PS II 膜颗粒样品蛋白二级结构特征峰酰胺 I 带的测量与分析,表明采用 3 个峰结构,可以较好地从中获得蛋白二级结构的信息,同时表明,77K 温度下的测量是一种较好的不破坏膜颗粒活性的研究二级结构温度效应的方法。

### REFERENCES

- 1 Desienhofer J, Epp O, Miki M, *et al.* *Nature*, 1985, **318**: 618
- 2 He W Z, Newell W R, Haris P I, *et al.* *Biochem.*, 1991, **30**: 4552
- 3 Xu C, Li R, Shen Y, *et al.* *Naturwissenschaften*, 1995, **82**: 477; Li R, *et al.* *Chinese Science Bulletin* (李荣等, *科学通报*) 1997, **4**: 89
- 4 Allen J P, Feher G, Yeates T O. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U. S. A 1987, **84**: 6162
- 5 Surewicz W K, Moscarello M A, Mantsch H H. *J. Biochem.*, 1987, **262**: 8598
- 6 Surewicz W K, Szabo A, Mantsch H H. *Eur. J. Biochem.*, 1987, **167**: 519

## PROTEIN SECONDARY STRUCTURE OF PHOTOSYSTEM I REACTION CENTER STUDIED BY FTIR SPECTROSCOPY\*

LU Wei<sup>1)</sup> XU Chun-He<sup>1,2)</sup> LI Rong<sup>2)</sup> CHEN Zhan-Hai<sup>1)</sup> LIU Pu-Lin<sup>1)</sup>  
SHEN Xue-Chu<sup>1)</sup> SHEN Yun-Gang<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> National Laboratory for Infrared Physics, Shanghai Institute of Technical Physics,  
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200083, China;

<sup>2)</sup> Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

LU Hong

(Department of Biology, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** The secondary structure of the isolated photosystem I (PS I) reaction center was characterized by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The recorded spectra show some difference between results of 300K and 77K for the amide I band, which is related with the secondary structure of PS I. The main phenomenon is the transfer of infrared absorption between the  $\beta$ -sheets and turns related absorption bands.

**Key words** photosystem I, protein secondary structure, FTIR.

---

\* The project supported by the National Natural Science Foundation of China  
Received 1997-05-30, revised 1997-09-11