

研究工作

猪眼视紫红质膜液晶态结构特征

张 淑 辉

(复旦大学生物系, 上海)

光敏色素视紫红质 (Rhodopsin) 是一种以生色团为辅基的色素蛋白。近年来的研究表明视紫红质分子是在脊椎动物视网膜光感受器的片层膜内或膜上^[1], 它在光—电转换机能中起着重要作用。光感受器膜类似于一般生物膜, 也处于有序、多变的液晶态。

在自我有序的液晶相—片层结构中, 分子的长轴基本平行, 形成分子层。这种表面可用于简单的有机反应, 如异构化、酶的氧化、还原以及脱氢作用等。这些结构对能量的变化也很容易发生反应。因此研究视紫红质在片层膜上的液晶态结构, 对进一步探索光感受器功能是有重要意义。

文献中已有关于牛、蛙等视紫红质结构研究的报道^[2]。我们对猪眼视紫红质膜液晶态结构特征进行了研究。兹将结果报道如下:

实验方法和结果

一、样品的制备

1. 猪眼视杆外段的分离 由于视紫红质只局限在光感受器—视杆外段膜中, 故首先需将视杆外段从视网膜中分离出来。我们将新鲜猪眼在暗红光下摘下视网膜, 浸入 45% (W/V) 的蔗糖液内 (含 0.01 M Tris-乙酸缓冲液、pH 7.5), 用玻璃匀浆器匀浆后, 参照 D. G. McConnell 的方法^[3,4]用超速离心技术从视网膜中分离出视杆外段。分离浓缩的视杆外段, 呈微桔红色的凝胶状, 易漂白。在偏光显微镜 (olympus BHSP 型) 下观察, 视杆外段呈双折射 (图 1), 流动中定向排列时显示强的双折射 (图 2)。

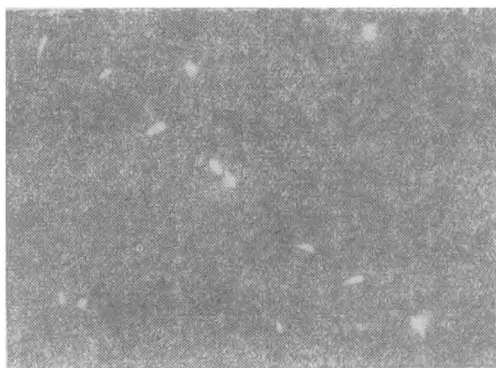


图 1 正交偏光下, 猪眼视杆外段 ($\times 400$)

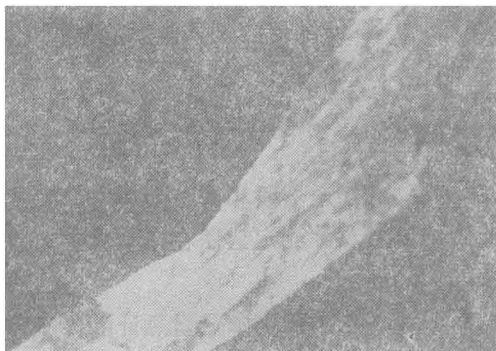


图 2 正交偏光下, 流动取向排列的猪眼视杆外段显示强的双折射 ($\times 200$)

我们对制备出的视杆外段, 还用 X 射线衍射进行了测定: 将分离提纯的视杆外段液, 置于测试板——一个平板形的玻璃凹槽中, 在液氮中冷冻真空干燥 2 小时, 视杆外段呈疏松的颗粒状、桔红色, 此时在强光下也不易漂白。用 X 射线衍射仪 (日本理字电机公司制造的 D/MAX-IIA 型), 采用粉末法进行测定。其结果如图 3 所示: 有二种峰, 大的“馒头”峰可能为非晶态的散射造成, 另一个尖锐的峰 ($4.22 \text{ \AA}$) 表

明有晶态物质存在,可能为视杆外段的液晶相衍射。

2. 猪眼视紫红质的提取 由于视紫红质不溶于水,故需用表面活性剂才能将该色素从外段中提取出来。我们用毛地黄皂苷(digitonin)作为提取剂,从分离出来的视杆外段中提取视紫红质。具体方法为:取1克毛地黄皂苷溶于40ml蒸馏水中,煮沸成透明溶液后在冷水中骤

冷,然后加进 pH 7.0, 0.01M 磷酸钾缓冲液 15ml; 取该溶液 25ml, 与从 200 只视网膜中所提取出来的视杆外段混合;磁力搅拌 3—4 小时 10,000g 离心 30 分钟;弃去沉淀,即得视紫红质液(整个操作皆在暗红光下进行)。视紫红质液有粘性,呈微紫色,见光易漂白。

将提取的视紫红质液用 1.8% 毛地黄皂苷稀释,在 751-分光光度计上进行测定,其结果

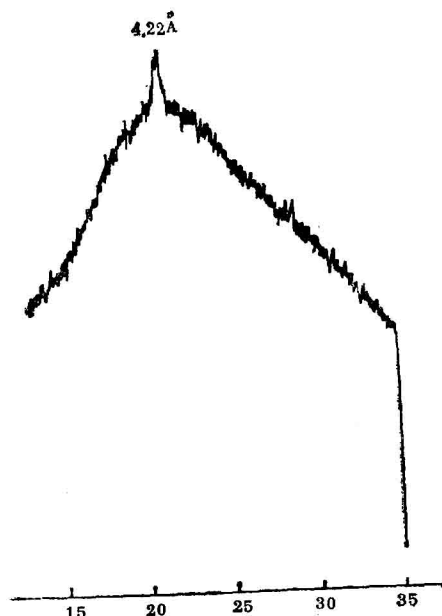


图3 猪眼视杆外段 X 射线衍射图
(靶: Cu 管电压: 35 千伏 管电流: 30 毫安)

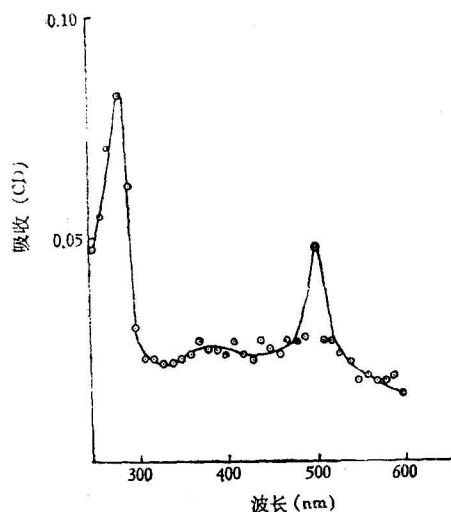


图4 猪眼视紫红质吸收光谱
在 1.8% 毛地黄皂苷中提取

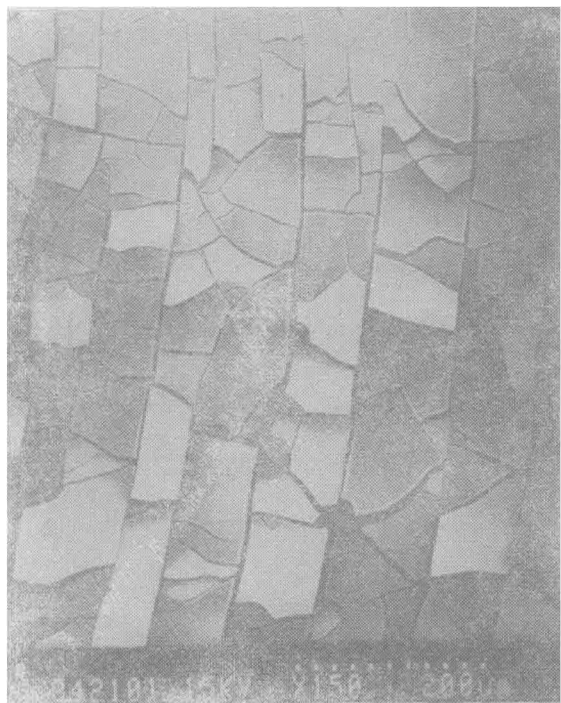


图 5

- a 单偏振光下,视紫红质膜的层状图像($\times 200$)
- b 单偏振光下,视紫红质膜的显微图像($\times 200$)
- c 正交偏振光下,视紫红质膜显示强的双折射($\times 200$)

猪眼视紫红质的吸收光谱，与一般脊椎动物的基本相同，由三个吸收带所组成。 α 吸收带的峰值为 500nm。 β 吸收带的峰值不明显。这两个吸收带是与视紫红质的生色团-视黄醛有关。 γ 带的峰值为 280nm，是由视蛋白形成^[5]。

一滴猪眼视紫红质溶液放在显微镜载玻片上蒸发时,在偏光显微镜下观察,视紫红质-毛地黄皂苷膜呈现一种片层的规则图像(图 5a,



呈淡黄色,能引起颜色淬灭。如进一步提纯脱色,可能有利于提高探测效率。

参考文献

- b) 和强的双折射(图 5c),这是一种有序的液晶结构。

毛地黄皂苷是一种非离子型的表面活性剂,对染料分子有强烈的亲和力。在提取过程中,毛地黄皂苷打开了视色素-蛋白-脂类的联结,从而与视色素结合。视紫红质-毛地黄皂苷的片层规则图像显示的双折射性质,表明该复合分子有一个有序的排列,类似于液晶结构。液晶分子的有序性排列,使从不同方向透过不同速度的光波,即双折射,在光学上表现的这种各向异性,是液晶的重要特征。

扫描电镜下观察,结果更清楚地显示了这种有规则的层状结构,各层间有一定的间隙(图6)。

偏光显微镜和电镜的观察结果表明:猪眼视紫红质膜是由有规则的片层组成,分子的有序排列似液晶结构。猪眼视紫红质-毛地黄皂苷的这种非活体的液晶结构,为光感受器的光-电转换机理提供了一种参考模型。

- [1] Brown, G. H., Wolken, J. J.: *Liquid Crystals and Biological Structures*, 141, 1979.
- [2] Luzzati, V., et al.: *Nature* (London), **218**, 1031, 1968.
- [3] Rafferty, C. N., McConnel, D. G.: *Biophys. Struct. Mechanism*, **2**, 277, 1977.
- [4] 陈学俊等:《生物化学与生物物理学进展》, 1981年, 第5期, 第45页。
- [5] Brown, G. H., Wolken, J. J.: *Liquid Crystals and Biological Structures*, 138, 1979.

子与探测技术», Vol 1, 18, 1981。

- [本文于 1985 年 4 月 17 日收到]