

牛间视紫红质 I 和间视紫红质 II 平衡关系的初步研究

陈云俊 章正廉 马顺福 谈曼琪

(中国科学院生物物理研究所)

目前对视紫红质光化反应的中间产物研究得较为清楚^[1]。在 0℃ 左右用橙色光照射视紫红质溶液时,主要光产物是间视紫红质 I 和 II^[2],该中间产物的动力学研究表明,视觉信号的产生是在间视紫红质 II 衰减之前^[3],而目前研究较多的视觉早期感受器电位和晚期感受器电位也与间视紫红质 I 到 II 的转变密切相关。因此,上述变化过程引起了人们较大的兴趣。

众所周知,二者总是处于一种热的平衡态,间视紫红质 I ($\lambda_{\max} 478\text{nm}$)

⇌ 间视紫红质 II ($\lambda_{\max} 380\text{nm}$)

可通过测定吸收光谱的方法确定其含量。本文着重研究了不同 pH 值、不同温度、不同离子浓度等条件下,间视紫红质 I 和 II 的反应平衡关系。

一、材料和方法

牛视杆外段膜的制备主要参照 McConnell, D. G^[4] 的方法。步骤如下:从屠宰场获得新鲜牛眼,储于避光的冰桶内。然后在暗红光下摘下网膜,储于 -20℃。制备时将 50 个网膜浸入到 50ml 45% (W/V) 的蔗糖液内(含有 0.01M Tris-乙酸缓冲液, pH 7.5),匀浆后,1100g 离心 15 分,仔细取上清液,将其重复离心,直至无沉淀为止。然后将此液用二倍体积的 pH 7.5, 0.01M Tris-乙酸缓冲液稀释,3000g 离心 15 分,再将所得粗制视杆外段沉淀悬浮于密度 1.10 的蔗糖液内(含有 Tris-乙酸缓冲液, pH 7.5),用玻璃匀浆器破碎液内的视杆外段后,再将其铺在含有连续密度梯度为 1.12—1.14 的蔗糖液的离心管上面,90000g 超速离心 60 分,取上面的红带,接着用 30 倍体积的 pH 7.0, 0.01M 磷酸钾缓冲液稀释,30000g 离心 30 分,取沉淀,然

后再以此磷酸钾缓冲液洗涤一至二次,所得沉淀即为较纯的视杆外段膜。

用洋地黄皂甙作去垢剂提取视紫红质。取 1 克洋地黄皂甙(杭州制药厂)溶于 40 ml 蒸馏水,煮沸成透明溶液后骤冷,然后加进 15ml pH 7.0, 0.01M 磷酸钾缓冲液。取此溶液 25ml 和上述视杆外段混合,磁力搅拌 3—4 小时,10000g 离心 30 分,丢弃沉淀。视紫红质溶液的纯度鉴定按光学纯度标准,一般采用 $E_{400}:E_{500}$ 或 $E_{278}:E_{500}$ (E 指光密度),比值愈小样品愈纯。

用日立 556 双波长、双光束分光光度计记录样品的吸收光谱,速度 4nm/秒,比色杯光程长 1 cm,测量槽温度的控温精度 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。pH 测定用上海雷磁仪器厂 25 型酸度计。光照用 100W 钨丝聚光灯加 OG₂ 滤片,即橙色光 ($\lambda > 550\text{nm}$)。

以上所有涉及样品的操作均在弱红光下进行。样品温度一般维持在 3—4℃。

二、结果和讨论

把待测视紫红质样品放在分光光度计的样品槽内冷却至 1℃ 左右,记录原始光谱之后(各图中的实线),用橙色光光照 6 分钟,然后立即记录吸收光谱。

1. pH 值对间视紫红质平衡的作用 视紫红质溶液用加入磷酸钾缓冲液的方法把 pH 值调至图 1 所示数值,磷酸钾的最后浓度均为 0.08M,从吸收曲线的峰位高低看出,在 pH 7.35 时,以间视紫红质 I_{478nm} 为主,间视紫红质 II_{380nm} 的吸收峰很低。随着 pH 值减少,380nm 处的吸收逐渐增加,在 pH 5.63 时已明显大于间视紫红质 I_{478nm} 处的吸收。可见随着酸度增加,反应平衡趋向于间视紫红质 II。

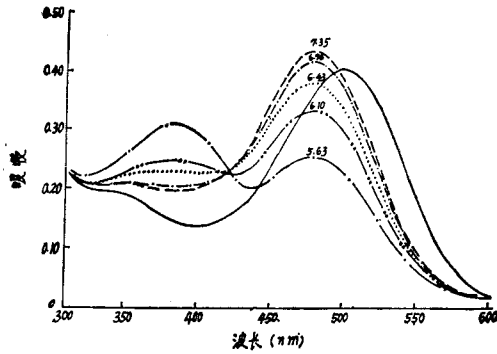


图1 pH对间视紫红质平衡的作用 1°C

——pH 7.35, - - - pH 6.90, pH 6.43,
- · - pH 6.10 - · - pH 5.63
(——样品未光照时的吸收光谱)

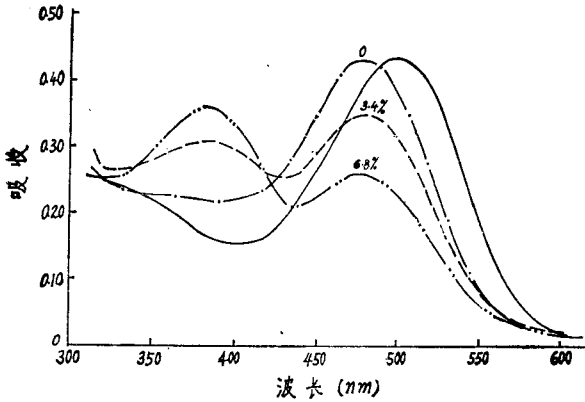


图2 离子浓度对间视紫红质的作用

pH 7.0, 1°C. NaCl 浓度(%):
——0, - - - 3.4, 6.8
(——样品未光照时的吸收光谱)

2. 中性盐 NaCl 对间视紫红质平衡的作用

用加入 NaCl 溶液的方法把样品的 NaCl 浓度分别调至 0, 3.4%, 6.8%。光照后的吸收光谱(图 2)。NaCl 浓度为 0 时, 间视紫红质 I_{478nm} 的吸收峰值较高, 而间视紫红质 II_{380nm} 的吸收较低。随着盐浓度的增加, 间视紫红质 I_{478nm} 吸收峰下降, 间视紫红质 II_{380nm} 吸收峰上升。因此, 随着溶液离子强度的增加, 反应平衡趋向于间视紫红质 II。

3. 甘油对间视紫红质平衡的作用 视紫红质溶液的甘油浓度 (V/V) 分别调至 0, 20%, 45%。光照后的吸收光谱(图 3)。随着甘油浓度增加, 反应平衡趋向于间视紫红质 II。

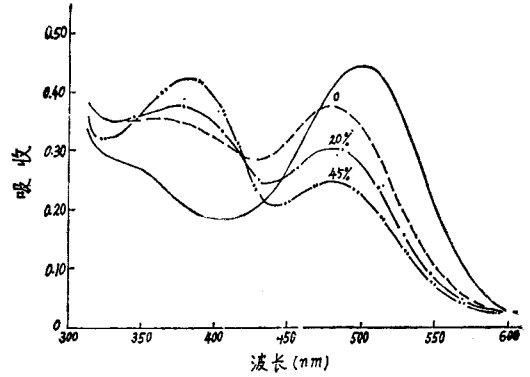


图3 甘油浓度对间视紫红质平衡的作用

pH 7.0, 1°C.
甘油浓度(V/V) ——0%, - - - 20%, 45%
(——样品未光照时的吸收光谱)

4. 温度对间视紫红质平衡的作用

用恒温水浴将样品槽温度分别控制于 0.5°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 测得光照后的吸收曲线(图 4)。随着温度的升高, 478 nm 处的吸收逐渐降低, 380 nm 处的吸收逐渐增加, 在 20°C 时光产物以间视紫红质 II_{380nm} 为主, 可见随着温度升高, 反应平衡趋向于间视紫红质 II。

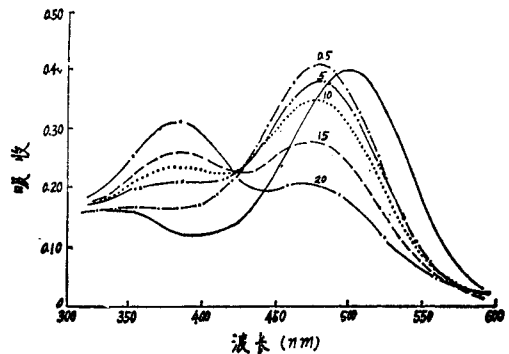


图4 温度对间视紫红质平衡的作用

pH 7.0 温度(°C)
..... 0.5, - - - 5, 10, - - - 15, ——20
(——样品未光照时的吸收光谱)

此外, 用不同波长的光 421 nm, 501 nm, 579 nm 等单色光光照视紫红质溶液时, 没有观察到对间视紫红质平衡的影响。

综上所述, 较高的温度或酸度、甘油、中性盐等都有利于间视紫红质 II。而光的波长则不影响它。

我们观察到, 间视紫红质 I 到 II 的变化伴

随着吸收光谱峰位的明显蓝移。已知这种色蛋白的颜色变化一方面可能与生色团本身有关,另一方面还取决于生色团和蛋白质之间的立体结构,即蛋白质的构象。最近, Doukas, A. G.^[3] 等人用共振拉曼光谱研究牛的间视紫红质 I 和 II 的分子特性,认为它们的生色团均为全视黄醛,在其转变过程中不涉及生色团的构象变化。因此,间视紫红质 I、II 的颜色变化有可能发生在视蛋白部分。我们可根据图 4 间视紫红质 I、II 吸收峰的光密度和克分子消光系数

$$\epsilon_{\text{间I}} = 45000 \text{ 升/克分子} \cdot \text{厘米},$$

$$\epsilon_{\text{间II}} = 42000 \text{ 升/克分子} \cdot \text{厘米}$$

计算其浓度和反应平衡常数 K , 并将 K 绘成温度函数 (图 5), 然后计算反应热 ΔH , 自由能 ΔF 和熵 ΔS ^[2]。

计算结果反应热 ΔH 约 8.8 千卡/克分子, 其余数据总结在表 1 (20℃ 的数据由于有水解反应的影响, 偏离较大, $\Delta S = 31.1$, 未列出), 结果和 Matthews, R. G. 等人^[2,5,6] 数据接近。数据结果表明在这个分子数不增加的反应中,

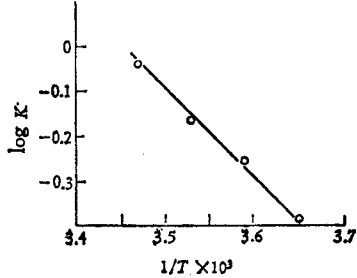


图 5 间视紫红质 I→II 的反应热

熵有很大增加, 并有较大的正反应热, 表明在此反应中, 蛋白质的氢键等弱键遭到破坏, 构象有较大变化。看来温度上升的作用是有利于打开蛋白质结构, 从而有利于间视紫红质 II。Ebrey, T. G.^[7] 测定快速光电压的方法和 Lamola, A. A.^[8] 测定体积变化的实验也都表明, 当间视紫红质 I 转变为间视紫红质 II 时, 视蛋白的构象有较大变化。

溶剂的影响也可认为来自视蛋白的构象变化, 中性盐, 甘油等均能影响蛋白质的三级结构。

目前, 对间视紫红质 I 到 II 的变化的分

表 1 牛间视紫红质平衡的热力学参数

$T(^{\circ}\text{C})$	K	$\Delta F(\text{卡/克分子})$	$\Delta S(\text{e.u})$
0.5	0.434	454	30.7
5	0.585	296	30.7
10	0.722	183	30.6
15	0.984	9.1	30.7

$$K = [\text{间视紫红质 II}] / [\text{间视紫红质 I}]$$

子过程尚不清楚。最近用共振拉曼光谱方法研究^[3], 表明间视紫红质 I 的生色团通过质子化的希夫碱键和视蛋白相连, 而间视紫红质 II 则通过非质子化的希夫碱键和视蛋白相连, 即在此转变中有一个释放质子的过程。显然, 此结果和本实验的酸度增加有利于间视紫红质 II 的结果相矛盾。但是, Cooper, A.^[6] 等用量热学方法研究了弱光照条件下, 视杆外段盘膜内的视紫红质的光化反应, 用氢离子解离热不同的缓冲液的实验表明, 在间视紫红质 I 转变为间视紫红质 II 的过程中, 从周围介质获得一个质子。因此根据上述事实可以假定, 在间视紫红质 I 转变为 II 时, 在希夫碱键释放一个质子的同时, 视蛋白获得二个质子, 一个来自希夫碱键, 另一个来自周围介质, 可能正是这后一获得质子的过程决定了酸度增加有利于间视紫红质 II。

此项工作先后承邹惠君, 史宝生, 孙纹琦, 胡坤生, 刘云鹤, 郭尧君, 房月华等同志大力协助, 特此感谢。

参 考 文 献

[1] Yoshizawa, T.: *Photochemistry of Vision*, 146, 1972.
 [2] Matthews, R. G. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 47, 213, 1963.
 [3] Doukas, A. G. et al.: *Biochemistry.*, 17, 2430, 1978.
 [4] Rafferty, C. N., McConnell, D. G. et al.: *Biophys. Struct. Mechanism.*, 2, 277, 1977.
 [5] Ostroy, S. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 112, 265, 1966.
 [6] Cooper, A. et al.: *Biochemistry.*, 15, 2970, 1976.
 [7] Ebrey, T. G.: *Vision Res.*, 8, 965, 1968.
 [8] Lamola, A. A. et al.: *Biochemistry*, N. Y., 13, 738, 1974.

[本文于 1980 年 10 月 7 日收到]