

闪光光解偏振法测膜蛋白旋转扩散运动

胡 坤 生

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

自 1970 年 Frye 和 Edidin 首先用细胞融合方法证实膜蛋白的扩散运动以来^[1], 有关测定膜蛋白侧向扩散运动和旋转扩散运动的各种技术已有详细报道^[2]。影响蛋白质在膜中运动的因素很多, 如: 温度、pH; 细胞膜内其它组分与蛋白质的相互作用; 细胞内的微丝、微管等。所有因这些影响而出现的运动都是蛋白质在膜中的自由扩散运动。另有一些现象则是受

新陈代谢影响的复杂过程(如带帽现象等)。

本文只讨论膜蛋白的旋转扩散运动的闪光光解偏振测定法。

一、测量方法和原理

闪光光解测量膜蛋白旋转扩散运动的装置示意图如图 1。

样品池中的样品由激光闪光偏振激发, 每

氨基酸上的正电荷与五价磷上的处于赤道面上的氧的负电荷耦合的结果, 这一相互作用稳定了过渡态, 并使酶与过渡态的结合很强。所以, 41 位赖氨酸的运动性在核糖核酸酶有效催化过程中起了关键性的作用。同时发现, 底物磷原子在催化过程中也移动了几乎 $2 \text{ \AA}$, 这是在底物络合物和生成环式磷酸盐中间介质期间所观察到的最大变化。由于磷原子的移动, 造成了磷酸盐上的几个氧原子的移动, 从而得以通过两个组氨酸的微小的单键旋转来跟踪这种运动。酶-产物络合物的结构与酶-底物络合物的结构很相似, 特别有趣的是 41 位赖氨酸, 在这两个阶段之间有一个无序变有序再变成无序的过程。在整个反应期间, 7 位赖氨酸的位置始终未发生任何改变, 而且与底物原子保持在 $6 \text{ \AA}$ 以上的距离, 所以排除了 7 位赖氨酸是活性位的可能。

参与的离子相互作用所提供的过渡态的最佳稳定。

众所周知, 早期的晶体学研究也揭示了诸如溶菌酶等各种酶的水解机理, 但那时只有酶和酶与产物类似物络合物的晶体学数据, 中间过程是通过模型法推出来的。上述的例子则不同, 每一步都有晶体学数据, 即人们在原子水平上直接观察到了酶的动力学过程。

参 考 文 献

- [1] Frauenfelder, H. et al.: *Nature*, 280, 558, 1979.
- [2] Tainer, J. A. et al.: *ibid.*, 312, 127, 1984.
- [3] Huber, R. et al.: *Biopolymers*, 22(1), 261, 1983.
- [4] Douzou, P. et al.: *Adv. Protein Chemistry*, 36, 246, 1984.
- [5] Noble, D. et al. (Editors): *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 42, 21, 1983.
- [6] Levitt, M.: *J. Mol. Biol.*, 168(3), 595, 1983.
- [7] Hélène, Claude (Editor): *Structure, Dynamics Interactions and Evolution of Biological Macromolecules*, 1982.
- [8] Huber, R. et al.: *CRC Critical Review in Biochemistry* 15(4), 291, 1984.
- [9] Wüthrich, K. and Gerhard Wagner: *Trends in Biochem. Sci.*, 9(4), 152, 1984.

[本文于 1985 年 11 月 30 日收到]

总起来看, 在催化期间酶没有发生大的构象变化。下述的几个明显的步骤可以做为核糖核酸酶催化的特征: 酶与底物的一个拉紧构型紧密的专一结合, 由 12 位和 119 位组氨酸参与的一个普通的酸-碱催化, 一个由 41 位赖氨酸

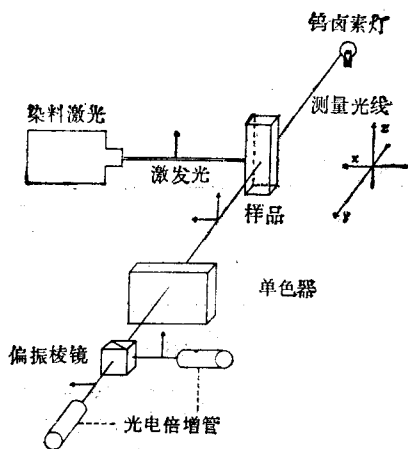


图1 闪光光解装置示意图

(引自 Cherry; R. J.: *Biophysical Journal*, Volume 36, p. 258, 1981.)

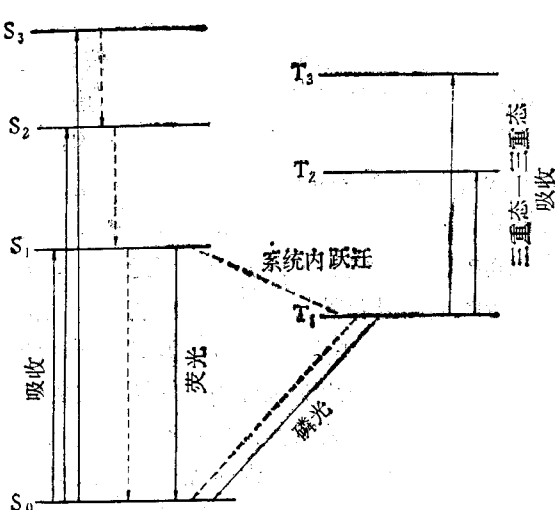


图2 电子能级示意图

——辐射跃迁， ----非辐射跃迁

$$A_2 = (3/10) \sin^2 \theta$$

$$A_3 = (1/10)(3 \cos^2 \theta - 1)^2$$

θ 是跃迁偶极矩与膜法线之间的夹角。 $\phi_{\parallel}$ 是弛豫时间。 τ_0 是实验得到的时间为 0 时的各向异性值。

有机分子电子跃迁能级图如图 2。

吸收光谱是由于单重态之间的跃迁，如

$$S_0 \rightarrow S_1, S_0 \rightarrow S_2$$

等产生的。一般来说，处于高的激发态 T_1 、 T_2 的分子可以通过非辐射过程先跃迁到基态 S_1 ，再通过发射荧光跳回基态，或者通过系统内跃迁到三重态 T_1 ，再发射磷光跳回基态。直接吸收不可能产生足够多的三重态 T_1 、 T_2 ，或 T_3 ，除非用三重态探针标记分子。由于 $T_1 \rightarrow S_0$ 跃迁是自旋禁止的，所以最低的三重态 T_1 的寿命可以大于 10^{-3} 秒，比激发态 S_1 的寿命（一般在 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ 秒）要长得多。值得注意的是氧引起的猝灭会大大缩短所观察的三重态寿命。

测量旋转运动的光谱方法取决于光吸收的选择性。对于分子跃迁偶极矩的吸收矢量平行于激发光的电矢量的那些分子，优先被激发，它们之间夹角很小的分子也容易被激发。吸收矢量垂直于激发光电矢量的分子则不被激发。被激发的分子处于激发态 S_1 或三重态 T_1 ，其跃迁偶极矩方向并不是随机分布的，而是与激发

次闪光的时间为 1 至 2 微秒。闪光激发后立即测定。测量光源为 100W 的钨卤素灯，光源要求很稳定。由单色器调节到所需波长，如测量菌紫质分子时，调节到 570 nm。四溴荧光素标记的红血细胞带 3 蛋白的测量时，调节到 515 nm。样品的蛋白浓度选择在 0.5 mg/ml 左右，太稀则信号太弱，太浓又因产生严重的光散射而影响测量结果。测量光进入二个光电倍增管前被偏振棱镜分成两束，分别平行于和垂直于原激发光偏振方向的光。二个光电倍增管同时测出二者的吸收随时间的变化，信号通过放大和平均。通常情况下，每个信号是 516 次闪光激发得到的吸收信号平均值。信号通过计算机处理，得出吸收的变化 $\Delta A_{\parallel}(t)$ 和 $\Delta A_{\perp}(t)$ 以及各向异性参数 $r(t)$ 。

$$r(t) = \frac{\Delta A_{\parallel}(t) - \Delta A_{\perp}(t)}{\Delta A_{\parallel}(t) + 2\Delta A_{\perp}(t)} \dots\dots (1)$$

$r(t)$ 取决于旋转运动的形式和种类。目前得到的膜蛋白运动的可能模型是：膜蛋白仅能绕着膜的法线作旋转运动。这种情况下，各向异性参数 $r(t)$ 可表示为：

$$r(t) = \left[\frac{\tau_0}{A_1 + A_2 + A_3} \right] [A_1 \exp(-t/\phi_{\parallel}) + A_2 \exp(-4t/\phi_{\parallel}) + A_3] \dots\dots (2)$$

这里 A_1 、 A_2 、 A_3 是取决于跃迁偶极矩的常数，它们分别为：

$$A_1 = (6/5) \sin^2 \theta \cos^2 \theta$$

光的偏振方向是一致的或二者之间的夹角很小。当他们跳回基态时,其发射信号是偏振的。留在基态的分子的跃迁偶极矩方向也不是随机分布的,而是与激发光的偏振方向垂直的或夹角很大,测量它们的吸收时,其吸收信号是二向色性的,即它们对于垂直于和平行于激发光偏振方向的吸收不同。如果分子不能运动,则发射信号的偏振以及吸收信号的二向色性一直保持不变。事实上,由于分子的运动,分子跃迁偶极矩的方向再次变为随机分布。它使得发射信号不再是偏振的,其吸收信号也不再是二向色性的,也就是说偏振和二向色性随时间逐渐衰减和消失,这过程与分子的运动密切相关,从衰减的速率可测量分子的旋转弛豫时间 ϕ_{II} 。

旋转扩散运动的测定可通过二种方式进行。(1) 激发之后可产生寿命较长而且稳定的中间态的蛋白分子。例如: 视紫红质分子, 菌紫质分子和细胞色素 C 氧化酶。这类分子的激发分子停留在较长寿命的中间态而不马上跳回基态, 基态分子的吸收信号就不会被跳回基态的激发分子所干扰, 这就可以通过测量基态的耗尽 (depletion) 信号来测量蛋白的旋转扩散运动。(2) 如果蛋白分子本身不可能产生寿命较长和稳定的中间产物, 可用三重态探针四溴荧光素标记蛋白分子, 当偏振闪光激发时, 分子在三重态上有一定数量的分布, 由于光选择的结果, 瞬间的吸收变化是二向色性的, 二向色性与时间的依赖关系可用来测量蛋白分子的旋转扩散运动。例如: 红血细胞带 3 蛋白, Ca^{++} -ATPase, 仙台病毒糖蛋白等属于这类分子。由于三重态的长寿命, 它可用来测量毫秒数量级的旋转扩散运动。最常用的三重态探针是四溴荧光素和它的衍生物。

二、菌紫质分子的旋转扩散运动

菌紫质分子含有一个内在生色团视黄醛。光适应状态下为全反视黄醛形式。受光激发时, 菌紫质通过一系列光循环中间体如 K_{610} , L_{550} , M_{412} , O_{640} 等, 最后又恢复到原来的形式。因为 M_{412} 的吸收峰与原来菌紫质分子 (BR_{578})

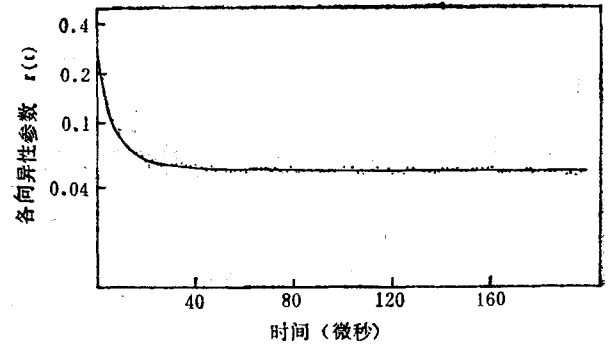


图3 DMPC 脂质囊泡中的菌紫质分子的各向异性衰减曲线
脂质与蛋白之比为 220, 测量温度 28°C, 直线是用方程式
(2) 计算值对实验点的逼近。 $r_0 = 0.28$ $\phi_{II} = 12.6 \mu s$,
 $\theta = 77^\circ$

(引自 Cherry, R. J.: *Membranes and Transport*,
Vol. 1, p147, 1982.)

的吸收峰相距很大, 并且 M_{412} 是个较稳定、寿命又较长的中间产物, 所以可观察 570 nm 的基态耗尽信号的瞬间二向色性来测定菌紫质分子在膜中的旋转扩散运动。

天然的紫膜中, 菌紫质分子不可能自由地旋转运动, 因为它在膜中是以晶格排列的, 这一点也得到测量结果的证实。当菌紫质分子重组到脂质囊泡 (Vesicles) 中之后, 即可测出菌紫质分子在膜中的旋转扩散运动^[3]。这种理想的系统可用于检查理论模型的正确性。

图 3 表示重组于 DMPC 脂质囊泡中的菌紫质分子各向异性衰减曲线。

若用方程式(2)的计算值来逼近实验点, 从图中可看到直线与实验点符合得很好。只要脂质与蛋白的比例高于 100 (Mol/Mol), 测量温度高于脂质的相变温度, DMPC 和 DPPC 脂质囊泡中的菌紫质分子各向异性衰减曲线都可与理论模型相符得很好。在 DMPC 脂质囊泡中, 当温度高于 25°C, 脂质与蛋白的比例大于 140 时, 其弛豫时间为 15 ± 5 微秒。

很多因素可影响菌紫质分子在重组膜中的旋转扩散运动, 如温度^[3]、脂质与蛋白的相互作用^[4], 蛋白与蛋白的相互作用^[5]等等。

三、红血细胞带 3 蛋白的旋转扩散运动

带 3 蛋白在人红血细胞膜中的作用是运输

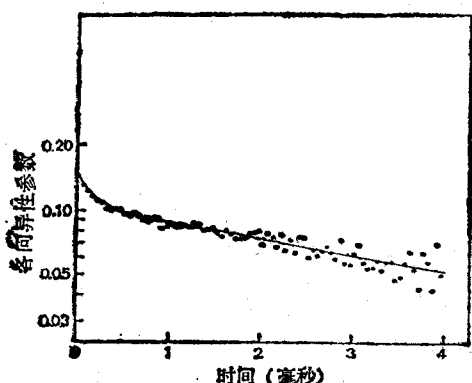


图4 四溴荧光素-MA标记的血细胞膜带3蛋白的各向异性衰减曲线^[2]

测量温度 37℃, 血影膜悬浮于 5m M 磷酸缓冲液中, pH 7.4

阴离子。红血细胞膜中带3蛋白不存在天然的生色团,能够产生稳定和寿命较长的中间产物。为测量带3蛋白的旋转扩散运动必须用四溴荧光素来标记,然后利用这三重态探针进行测量。

图4表示用四溴荧光素标记的红血细胞血影膜中带3蛋白在37℃时的各向异性衰减曲线。它与方程式(2)的符合程度不象菌紫质分子那么好。这是因为大约40%的带3蛋白的旋转运动受到红血细胞细胞骨架的影响,使得膜中存在不同旋转扩散运动种类的带3蛋白所造成的^[6]。若用低浓度的胰蛋白酶水解带3蛋白大约40,000道尔顿片断,在45℃测量其剩余部分的旋转运动时,其结果与菌紫质分子在脂质囊泡中相似,若用方程式(2)的计算值去逼近它,其弛豫时间为130微秒左右。

降低温度可观察到带3蛋白的旋转扩散运动受到影响;低于20℃时,大部分带3蛋白在膜中无旋转扩散运动。这可能是由于温度降低后带3蛋白之间产生了凝聚作用。当抗体及流感病毒颗粒(它们与血型糖蛋白A特异地结合)与带3蛋白发生作用时,同样观察到旋转扩散运动的丧失。由此可以推断:在红血细胞膜中,带3蛋白是与血型糖蛋白A形成一个复合体。在笔者实验中还观察了封闭血影膜中带3蛋白的旋转扩散运动,它与一般的血影膜没有明显的差别。在封闭好的血影膜上加一个电场,带3蛋白的旋转扩散运动随电场的极性和

电场的大小而变化(待发表)。

四、肌浆质网中 Ca^{2+} -ATP 酶的旋转扩散运动

用四溴荧光素标记的肌浆质网中 Ca^{2+} -ATP 酶的瞬间二向色性的测定结果与其它膜蛋白不同。在生理温度情况下,各向异性衰减曲线的 $r(t)$ 值很小,温度下降时, $r(t)$ 的值反而增加^[7]。旋转扩散运动加快并非由于温度降低。在生理温度条件下,其运动速度比实验可分辨时间(20微秒)要快,测量结果不表示实际的旋转扩散速度。而是因为温度下降时,旋转速度下降到仪器测量分辨时间的范围内,所以可看到其较快速的运动。类似的现象我们在菌紫质分子的测量过程中也发现过。当脂质与蛋白的比例超过160(MoL/MoL),测量温度高于30℃,DMPC脂质囊泡中菌紫质分子的旋转扩散运动的 $r(t)$ 值较小,当温度下降时, $r(t)$ 值反而增大。解决的办法是提高仪器的测量灵敏度,缩短仪器的最小可分辨时间。测量 Ca^{2+} -ATP 酶的旋转运动;必须考虑到测到的可能只是蛋白分子中的一个片断,这个片断正好是荧光探针所标记的。Garland等人用改进的仪器测量了这种快速运动,它们的确来自蛋白分子本身。Hoffman等人也研究了 Ca^{2+} -ATP 酶的旋转运动,观察到它随温度变化。他们还观察了ATP酶的活性变化与旋转运动之间有一定的相互关系^[8] Ca^{2+} -ATP 酶重组于DPPC脂质体中,温度低于相变温度时,蛋白质的旋转扩散运动受到很大影响,这与菌紫质分子在膜中的旋转运动的结果完全一致。当温度降低到相变温度以下,脂质与蛋白之间发生相分离引起膜蛋白之间的凝聚,导致了旋转扩散运动的降低。

五、细胞色素氧化酶的旋转扩散运动

细胞色素氧化酶中的血红素 a_3 -CO 复合物的光分离作用为测量蛋白分子旋转运动提供了必要的长寿命光谱变化。Junge等研究了线粒体膜中的细胞色素C氧化酶的旋转扩散运

动^[9], 激发波长 585 nm, 测量 445 nm 的吸收变化, 没有观察到各向异性衰减, 表明细胞色素氧化酶在膜中不可能存在旋转运动, 或血红素 a_3 的排列是平行于膜的平面。后来 Erecinska 等人证实血红素 a_3 平面与膜的平面垂直, 所以唯一可能是细胞色素氧化酶在膜中不能运动。重组于脂质囊泡中的细胞色素氧化酶的旋转扩散运动测量结果与菌紫质分子的结果十分相似。 r_{∞}/r_0 的实验结果为 0.28 ± 0.02 , 与理论值 (0.25) 十分符合。在脂质与蛋白高比例的情况下, 重组系统中的细胞色素氧化酶分子在 2 毫秒时间范围内作自由旋转扩散运动。当脂质与蛋白的比例下降时, 观察到细胞色素氧化酶的凝聚作用, 旋转扩散运动减慢及多种不同大小的凝聚体的产生, 旋转扩散运动存在不同扩散时间常数。

六、一些其它膜蛋白质的旋转扩散运动的测量

蛋白质分子在膜中的旋转扩散运动的首次测量是 Cone 在分离盘膜视杆外段中的视紫红质分子上进行的, 偏振光激发生色团视黄醛后立即测量平行和垂直于偏振激发方向上的吸收变化, 通过计算得到了弛豫时间为 20 微秒, 测量温度为 20°C ^[10]。

LO 等人用标记的方法测量了电鳐 (Torpedo) 电器官膜乙酰胆碱受体的旋转扩散运动, 通过磷光去偏振测量, 证明膜中蛋白与蛋白分子之间有强烈作用, 受体蛋白在膜中不能进行旋转扩散运动^[11]。

辅酶 A 结合到 Friend 细胞上, 用四溴荧光素标记, 再进行磷光发射的各向异性衰减的测量, 测量范围从 1 微秒到 4 毫秒, 观察到了快

速的旋转扩散运动。

Wagner 等人用四溴荧光素标记耦合因子 CF_1 , 再重组到没有 CF_1 的叶绿体上, 进行瞬间二向色性的测量, 照射并加入 ADP 与无机磷时, CF_1 的旋转扩散运动就增加^[12]。

Stranbini 等人测量了水溶性蛋白白色氨酸残基的磷光去偏振, 并可应用到重组系统的选择膜蛋白的旋转扩散运动测量中^[13]。

如果能够把三重态探针的旋转扩散运动测量与时间分辨的荧光去偏振结合起来^[14], 就可测量从微微秒到毫秒范围里的旋转扩散运动, 从中可得到给定系统中各种不同运动的综合图形。

参 考 文 献

- [1] Frye, L. D. and Edidin, M.: *J. cell. Sci.*, 7, 319, 1970.
- [2] Cherry, R. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 289, 1979.
- [3] Cherry, R. J., et al.: *J. Mol. Biol.*, 121, 283, 1978.
- [4] Cherry, R. J., et al.: *FEBS Letters*, 80, 465, 1977.
- [5] Hu kun-sheng, et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 816, 358, 1985.
- [6] Nigg, E. A., and Cherry, R. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4702, 1980.
- [7] Bürkli, A., and Cherry, R. J.: *Biochemistry*, 20, 138, 1981.
- [8] Hoffman, W., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3860, 1979.
- [9] Junge, W., and Devault, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 408, 200, 1975.
- [10] Cone, R. A.: *Nat. New Biol.*, 236, 39, 1972.
- [11] Lo, M. M. S. et al.: *FEBS Letters*, 111, 407, 1980.
- [12] Wagner, T., and Junge, W.: *FEBS Letters*, 114, 327, 1980.
- [13] Strambini, G. B., and Galley, W. C.: *Biopolymers*, 19, 383, 1980.
- [14] Cherry, R. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5899, 1980.

[本文于 1985 年 9 月 18 日收到]

(上接第 38 页)
325—329, 1982.

- [17] Hue, L.: *Biochem. J.*, 224, 779—786, 1984.
- [18] El-Maghrabi, M. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 315—319, 1982.
- [19] LaLoux, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 148, 155—159, 1985.
- [20] Van Schaftingen, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3483—3486, 1981.
- [21] Pilakis, S. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 3619—

3622, 1981.

- [22] Hers, H. G. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 617—653, 1983.
- [23] Pilakis, S. J. et al.: *J. Biol. Chem.* 259, 949—958, 1984.
- [24] Cseke, C. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 9, 533—535, 1984.

[本文于 1985 年 11 月 16 日收到]