

pH 梯度对平板膜中单体菌紫质分子光电响应的影响*

胡坤生 王大辉 谈曼琪

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

提 要

利用重组技术把单体 bR 包入 DMPC 脂质囊泡中, 通过吸收光谱和圆二色谱的测定, 证明 bR 在囊泡中仍以单体存在。同时测定了外界 pH 梯度对单体 bR 脂质囊泡 BLM 光电响应的影响, 观察到 pH 值当内池大于外池其差值超过 2 时就可产生光电响应信号极性的反转, 并对此结果作了一定的讨论。

关键词 嗜盐菌, 菌紫质 (bR), 单体 bR 脂质囊泡, 平板脂双层膜 (BLM), 光电响应

菌紫质 (bR) 是嗜盐菌紫膜中分子量为 26000 的唯一蛋白质成分。它的 248 个氨基酸残基七次横跨膜, 在天然紫膜状态下, N 端朝向膜外, C 端在膜内。光照时, bR 可产生 J, K, L, M, O 等一系列中间体, 最后又回到 bR 的原始状态。伴随着这种光化学循环, 质子从紫膜外侧面释放出来, 再从膜的原生质侧面摄取质子, 即在天然紫膜状态下, N 端释放质子, C 端摄取质子, 光能可转换成膜两边的电化学质子梯度, 再用此质子梯度合成 ATP^[1]。在天然紫膜中, bR 以六角形二维晶格结构排列, 并以三个分子为单位组成三聚体。考虑到结构与功能的关系, 是否这种三体结构是质子泵功能所必要的, 从我们的实验结果看到: 包入二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 的单体 bR 脂质囊泡仍有光电响应, 即具有质子泵功能^[2]。为了证明脂质囊泡中的 bR 是否仍处于单体状态, 我们测量了单体 bR 脂质囊泡的吸收光谱和圆二色谱, 结果表明: 在本实验条件下, 脂质囊泡膜中的 bR 仍处于单体状态。我们也研究了 pH 对 bR 光电响应的影响^[3], 在 pH 大于 9.4 时会出现光电响应信号极性反转。有人也观察到 pH 对质子的摄取和释放的影响^[4]。本实验进一步观察了在

平板膜 (BLM) 上 pH 梯度对单体 bR 光电响应的影响。

材 料 和 方 法

1. 单体 bR 脂质囊泡的制备

嗜盐菌(品系 R_1M_1) 经培养后分离紫膜, 紫膜以碎片形式存在, bR 以三体状态存在于紫膜碎片中, 为了得到单体的 bR, 12mg bR 的紫膜碎片悬浮于 48ml 醋酸钠缓冲溶液中 (100mol/L, pH5.0), 缓冲溶液中含有 0.02% 叠氮化钠和 48mg 三硝基甲苯。样品在室温下完全避光放置 24 小时, 通过多次离心把没有溶解的紫膜移走, 用 Folin 法测量已溶解成单体的菌紫质蛋白的含量。为了把单体 bR 包入脂质囊泡中, 取一定量的 DMPC 溶于氯仿中, 用旋转蒸发器使氯仿挥发, DMPC 在容器中成均匀的薄层。加单体 bR 的悬浮液于 DMPC 中, 轻轻摇动容器使 DMPC 溶解。把 DMPC 和单体 bR 的悬浮液装入透析带中透析一周 (4℃), 在透析过程中, 三硝基甲苯被移走, 并且形成了比较均匀的重组的 bR 脂质囊泡, 再通过蔗糖

* 国家自然科学基金资助课题。

(15%—40%) 梯度离心把没有重组的脂质和蛋白质移走,最后通过脂质和蛋白质的浓度测定可知:单体 bR 脂质囊泡中实际脂与蛋白克分子比为 115:1。从冰冻刻蚀电镜照片观察到的单体 bR 分子脂质囊泡直径为 $0.8\mu\text{m}$ 左右,蛋白颗粒均匀地分布在脂质囊泡中。

2. 光电响应的测量

人工板形膜 (BLM) 系统的实验装置在其它文章中已有详细介绍^[5]。BLM 形成池外盒为有机玻璃制成的方盒,内池为聚四氟乙烯制成的圆柱形杯,杯壁上有个直径为 1.7mm 的小圆孔。0.1mol/L KCl 溶液灌注到 BLM 形成池的内外池中,使液面稍微高于小圆孔,用 HCl 或 NaOH 调节内外池溶液的 pH 值。BLM 形成液是 100mg/ml 的大豆磷脂癸烷液和单体 bR 分子悬浮液的混合物,形成液中,单体 bR 脂质囊泡中的蛋白浓度为 $0.6 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 。用微量注射器吸取膜的形成液,使 BLM 形成在聚四氟乙烯杯的小孔上。BLM 形成池和电极应注意屏蔽,使其不受外界电信号的干扰。BLM 形成池放在磁力搅拌器上不断搅拌。一对甘汞电极插入到膜的形成池内外溶液中,电极与输入阻抗大于 $10^{13}\Omega$ 的前置放大器相连,放大器放大倍数为 10,输出端分别与数字电压表和 X-Y 记录仪相连,输出并记录光电响应信号。

光源为 150W 直流氙灯,用厚度为 10.5cm 的硫酸铜溶液滤热,再通过透镜系统把光聚焦于形成膜小孔上。另一光路用于观察 BLM 的形成过程。

结果与讨论

1. 单体 bR 脂质囊泡的测定

用三硝基甲苯处理溶解后的紫膜碎片得到单体 bR。在加入 DMPC 重组成的单体 bR 脂质囊泡中,bR 以什么状态存在? 在我们的实验条件:温度 24°C ,脂质囊泡中脂与蛋白质克分子比为 115:1 时,从吸收光谱测量结果看到:以三体状态存在的(如天然紫膜) bR 的可见吸收峰值(明适应状态)为 568nm。而用三硝基甲苯处理的明适应单体 bR 的可见吸收峰值明显

蓝移^[6]。我们测量了 bR 脂质囊泡的吸收光谱(图 1)。

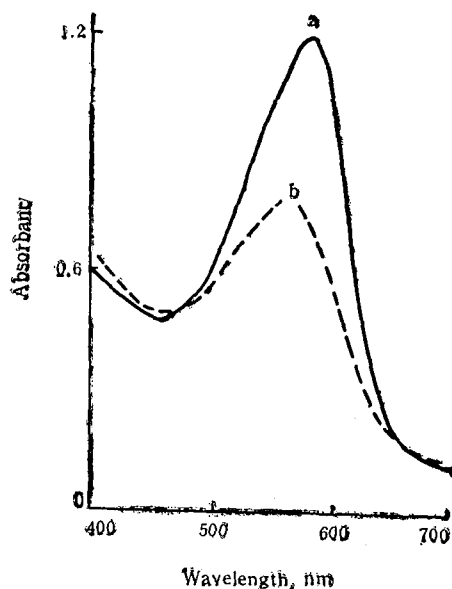


图 1 单体 bR 脂质囊泡的吸收光谱
Fig. 1 Absorption spectrum of monomeric bR DMPC vesicles.

a. fragment b. monomeric bR DMPC vesicles

由于生色团之间的相互作用,天然紫膜 bR 的可见圆二色谱上除表征紫膜蛋白的特征峰值 530nm 左右的正带外,还存在 600nm 附近的负带,称为激子带。因为单体 bR 之间的距离远比三聚体分子之间的距离要大,生色团之间的作用很弱,圆二色谱上只存在正带不存在负带。我们测量了单体 bR 脂质囊泡的圆二色谱,结果如图 2 所示。

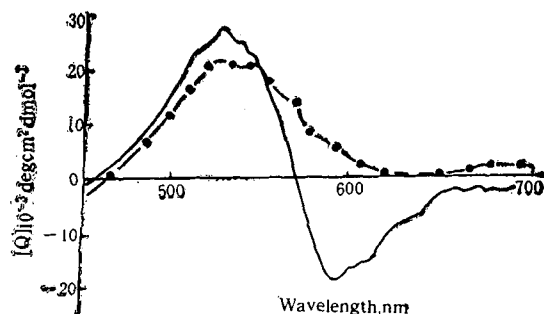


图 2 单体 bR 脂质囊泡的圆二色谱
Fig. 2 Circular dichroism of monomeric bR DMPC vesicles

a. native b. monomeric bR DMPC vesicles

从吸收光谱和圆二色谱结果可以看到: 单体 bR 脂质囊泡的吸收峰值为 550nm, 圆二色谱上负带已经消失, 所以在本实验条件下, 脂质囊泡中的 bR 仍以单体状态存在。

2. pH 梯度对单体 bR 脂质囊泡 BLM 光电响应的影响

前文^[2]已报道了单体 bR 有光电响应信号, 并且当外池 pH 为 6.2, 内池 pH 为 8.1 时, 单体 bR 脂质囊泡 BLM 的光电响应信号发生极性变化。在没有光照的条件下, 当 pH 梯度加到单体 bR 脂质囊泡 BLM 上, 在实验测量时间内, BLM 膜可以基本保持膜两边的 pH 梯度, 质子不能自由通过。若保持 pH 梯度, 虽有光照, 对于不存在单体 bR 脂质囊泡的 BLM 也没有观察到质子流产生, 说明光照不可能引起 BLM 质子通道而产生质子流, 上述两个事实表明, 单体 bR 脂质囊泡 BLM 的光电响应信号不是由于 pH 梯度本身产生, 它仍是 bR 质子泵产生的。另一个问题是: 光电响应信号的变化依赖于 pH 值, 还是由于 pH 梯度所产生的。我们首先观察了 pH 对于光电响应的影响, 发现 pH 低于 9.4 时, 虽然对光电响应有一定影响, 但不发生光电响应信号的极性反转。为了进一步观察 pH 梯度对光电响应信号极性反转的影响, 我们在低于 pH 9.4 的情况下测量了不同 pH 值下的 pH 梯度与光电响应之间的关系。在基本相同的 pH 梯度情况下的单体 bR 脂质囊泡 BLM 的光电响应如图 3 所示。

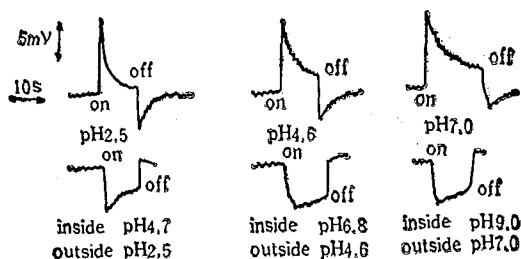


图 3 外加 pH 梯度对单体 bR 脂质囊泡 BLM 光电响应的影响

Fig. 3 The effect of external pH gradient on photoelectric response of monomeric bR DMPC vesicles BLM
experimental temperature 25°C.

从图 3 中可见: 只要 pH 值内池大于外

池, 其差值超过 2 就可能产生光电响应极性的反转。紫膜碎片 BLM 光电响应测量中没有观察到这种现象。

单体 bR 包到脂质囊泡中, 很可能又回到天然紫膜一样的三体状态的二维六角形晶格结构。有人对此作过初步研究认为, 只要温度高于脂质囊泡所用脂 (本实验为 DMPC) 的相变温度, 当蛋白质与脂的克分子比小于 1/100 时, bR 就以单体状态存在于脂质囊泡中^[7]。本实验进一步用吸收光谱和圆二色谱实际证实了当温度为 24°C (DMPC 的相变温度为 23°C 左右), 脂与蛋白质的克分子比为 115 时, bR 在脂质囊泡中的确以单体状态存在。

pH 梯度对单体 bR 脂质囊泡 BLM 光电响应的影响中, 除 pH 本身的作用外, 另外两个作用应该考虑: 1. 当内池 pH 值大于外池时, 即外池的 H^+ 要通过 BLM 流入内池, 由于 BLM 的隔离作用不能流入内池。光照产生的质子流是从内池流到外池, 它与 pH 梯度的质子流方向相反, 因此光照时的光电响应信号要受到相反的质子流的影响, 不利于质子流引起的光电响应的产生。2. 当内池的 pH 值大于外池时, 相当于内池为正, 外池为负的一个附加电场的作用, 这使 bR 在脂质囊泡中受到一种力的作用, 它可能影响到 bR 在膜中的排列方向以及分子的结构、构象、表面电荷, 这些作用也是产生光电响应极性反转的可能原因。

参 考 文 献

- 1 Oesterhelt D, Stoekenius W. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1973; 70: 2853
- 2 胡坤生, 沈莉莉, 孙纹琦, 谈曼琪. 科学通报, 1987; 32(24): 1895
- 3 胡坤生, 王大辉, 谈曼琪等. 生物物理学报, 1988; 4(3): 221
- 4 Qingguo Li, Govindjee R, Ebrey T G. *Photochem Photobiol*, 1986; 44: 515
- 5 胡坤生, 王必前, 谈曼琪. 生物化学与生物物理学报, 1985; 17(1): 42
- 6 Stoekenius W, Bogomolni R. *Ann Rev Biochem*, 1982; 51: 587
- 7 Heyn M, Cherry R J, Dencher N A. *Biochemistry*, 1981; 20: 840

[本文于 1989 年 8 月 29 日收到]

THE EFFECT OF pH GRADIENT ON PHOTOELECTRIC RESPONSE OF MONOMERIC bR BLM

Hu Kunsheng Wang Dahui Tan Manqi
(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

ABSTRACT

Monomeric bR was reconstituted into DMPC vesicles. Absorption spectrum and CD spectrum show bR molecules in DMPC vesicles were in monomeric state. We have measured the effect of pH gradient on photoelectric response of monomeric bR BLM. When the pH in inside container was higher than the pH in outside container and the difference of pH was more than 2, we have observed the change of polarity from positive to negative. Also we have discussed the reason of the change of polarity of photoelectric response.

Key words Halobacteria halobium, Bacteriorhodopsin (bR), monomeric bR vesicles, planar lipid membrane (BLM), photoelectric response

经验交流

一种用于浓缩微量大分子样品的装置

韩 刚 毅

(济南军区军事医学研究所, 济南 250014)

关键词 生物大分子, 样品浓缩装置

本实验室为解决微量蛋白质样品浓缩的需要, 制作了一套简便浓缩装置。该装置是利用两个有机玻璃框板夹着一张透析膜, 两外侧分别夹上档板, 固定成两排被透析膜平行分隔开的槽。框板上吸收剂槽的底部平齐, 而样品槽的底部较深, 呈V形。各板之间以及透析膜的接触面上都涂一层均匀的凡士林封闭层, 以防止渗漏。

使用时将稀样品液加入底部呈V形的槽中, 另

槽内加入吸收剂。当溶液被浓缩至V形底部时, 浓缩过程自行中止, 故可将溶液浓缩至一定体积。

本实验室采用30%聚乙二醇6000作为吸收剂, 按照吸收剂: 样品液为1:3的比例(V/V), 在2小时内即可将3ml稀蛋白质溶液浓缩30—40倍。蛋白质回收率可达70—90%。

[本文于1989年8月14日收到]