

力,与膜蛋白的巯基形成稳定的硫醇盐,并可与Fe, Cu等过渡金属元素竞争性地和巯基结合,保护它抵制氧化成二硫键^[8]. 本文应用核分析技术直接测得细胞发生脂质过氧化作用时Fe, Zn在细胞内含量和比值变化,结合MDA和SH基含量变化,为确认这一推论提供了有力的实验依据. 本实验在细胞培养基中引入的羟自由基是通过FeSO₄-EDTA体系在有氧环境中形成. FeSO₄和EDTA按1:1配制溶液,EDTA和Fe²⁺络合成EDTA-Fe²⁺外,溶液中必然还存在少量的游离Fe²⁺,参入细胞后,不仅在羟自由基引发的链式反应中起着催化作用,并与Zn竞争与膜上SH基结合并将其氧化为二硫化物,致使Zn从膜上的结合部位脱落,造成细胞Fe含量增高,Zn含量降低. 当在培养基中补充Zn后,对脂质过氧化反应表现出明显的抑制作用,和损伤组相比,细胞Fe/Zn比值降低,表明外加的Zn可参入细胞结构成分,细胞Zn含量提高,增加了Fe与SH基的结合,即SH基量增加,从而减少Fe与SH基所产生

的催化反应,表现为MDA量明显减少. 这一实验结果提示,Zn对细胞的保护作用途径之一是与Fe竞争性的与膜蛋白的SH基结合,阻止和抵制被Fe所催化的脂质过氧化反应.

参 考 文 献

- 1 Per O Seglen. In: Prescott D M ed, Methods in cell biology, New York: Academic Press, 1976: 29
- 2 Ohkawa H. Anal Biochem, 1979; **95**: 351
- 3 Jozef sedlak, Raymond H L. Anal Biochem, 1968; **25**: 192
- 4 William J B, Boyd L O' Dell. Life Science, 1981; **28**: 1425
- 5 Uif Lindh. Nucl Instr and Meth in Phys Res, 1991; B54: 160
- 6 Keith W jomes, Barry M G. Anal Chem, 1989; **61** (5): 341 A
- 7 Tammy M B, William F B. Free Rad Biol Medi, 1990; **8**: 281
- 8 Boyd L, O' Dell. In: Grawthorne J M *et al.* eds, Trace element metabolism in man and animals, Australia: Griffin press, 1981: 319

酰化菌紫质的动力学光谱及光电特性研究*

胡坤生 施 桦 黄 莹¹⁾ 余 滔²⁾

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用人工双分子膜(BLM)技术及动力学光谱研究了赖氨酸残基在紫膜的结构和功能中所起的作用. 酰化基团与菌紫质(bR)分子中的赖氨酸残基的ε氨基作用,使光照后bR的跨膜质子迁移信号及膜的充放电速度变慢,光循环中间产物M412的产量下降,半衰期延长. 但UV/Vis吸收光谱表明酰化并未破坏bR中视黄醛的构象环境. 在高pH或高盐浓度下,酰化的影响降低. 这些结果表明:赖氨酸残基并不是泵出质子的提供者,没有直接参与质子的跨膜运输,而是通过表面电位来影响bR的质子泵功能.

关键词 菌紫质, 光电响应, 酰化, 人工双层脂膜

菌紫质(bR)是嗜盐菌(Halobacterium halobium)紫膜中的唯一蛋白质,其分子量为26 000,有248个氨基酸残基,视黄醛通过质子化的Schiff碱基与第216位赖氨酸的ε氨基

相连. 吸收光子后,bR发生一毫秒级的光化

*国家自然科学基金及浙江省自然科学基金资助.

¹⁾现在青岛医学院工作.

²⁾浙江大学光学实验仪器工程系.

收稿日期: 1993-02-16, 修回日期: 1993-07-01

循环反应 (bR568→K610→L550→M412→N550→O640→bR568). 在这个过程中, 质子被从膜内泵到膜外, 产生跨膜电化学梯度, 用于合成生命活动所必需的 ATP^[1].

紫膜的质子泵的精确机制还不清楚. 但现在普遍认为质子的跨膜迁移不可能只通过生色团的异构化来完成. 许多实验证实了在质子跨膜过程中存在着一些氨基酸侧链基团解离度 (pK 值) 的变化. 因此一般认为在 bR 内存在着由视黄醛及一些氨基酸侧链构成的质子传递链 (质子通道), 即形成一个有利于质子传递的局部构象环境. bR 的内表面从介质吸收质子, 并通过这条链将其传递到膜外^[2].

bR 中有 7 个赖氨酸残基, 除与视黄醛相连的 Lys216 外, 其余 6 个都带有正电荷, 且分布在膜表面附近 (5 个在内表面). 早期的研究曾认为它们很可能是质子迁移的直接参加者, 但随后的一些实验结果基本上否定了这个看法^[3]. 这样, 长期以来人们对赖氨酸残基特别是它的正电荷在质子泵机制中的作用还有很多争论. 本文正是通过采用具有高度专一性的蛋白质化学修饰方法——酰化来修饰 bR 中的赖氨酸残基的 ε 氨基, 并把其嵌入磷脂人工双分子膜 (BLM) 中, 观察光电响应信号特别是毫秒级的快速光电响应信号的变化; 同时还研究了与其相应的反映光循环中间产物 M412 的动力学光谱. 结果表明: 赖氨酸主要是通过其 ε 氨基上的正电荷对紫膜表面电位的贡献来影响质子泵功能的.

1 材料与方 法

1.1 样品的制备与提纯

嗜盐菌选用品系 R1M1, 按常规方法^[4]培养分离得到紫膜碎片悬浮液, 酰化是根据 Riordan 和 Vallee 的方法^[5]: 将等体积的紫膜悬浮液 ($A_{568}=13.296$) 与饱和醋酸钠溶液混合, 每隔 5min 加入 5μL 的醋酸酐并充分搅拌, 反应过程中用 1mol/L 的 NaOH 将溶液的 pH 值控制在 8.0 左右, 反应温度控制在 1℃ 左右, 100min 后加入冰水中止反应, 用重蒸水离心

洗涤 3 次. 酰化的程度可用 Fields 的方法^[6]进行测定, 结果表明用上述方法处理的样品的酰化的程度可达 90%.

紫膜样品直接与大豆磷脂癸烷溶液 (100mg/mL) 混合, 并涂敷在 Teflon 小孔上形成人工 BLM. 介质的 pH 值由 1mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节. 测量温度控制在 23 ± 1 ℃.

1.2 测量装置

光循环中间产物 M412 的动力学光谱是在自制的闪光动力学光谱仪^[7]进行测量的. 激发光源为国产 BY-18 电子闪光灯 (脉冲半宽为 0.2ms), 经 OG4 滤光片滤掉波长为 540nm 以下的光; 测量光源为 20V 200W 卤钨灯, 经单色仪调至波长为 412nm.

连续光照下的光电响应信号的测量装置详见文献^[8], 瞬态光电响应信号的测量装置与其有所不同 (见图 1): 信号经放大器放大后, 由波形存储器进行存储, 再由计算机进行处理, 整个测量过程由计算机进行控制.

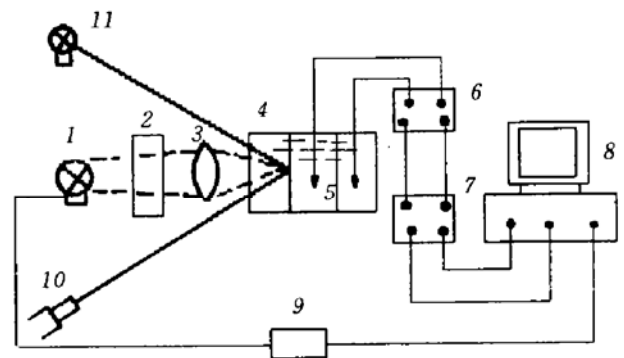


图 1 人工双分子脂膜瞬态光电响应信号 (毫秒级) 测量装置

1. 闪光灯 2. 饱和硫酸铜溶液 3. 聚光透镜
4. BLM 形成池 5. 电极 6. 放大器 7. 波形存储器
8. 计算机 9. 闪光触发器 10. 显微镜
11. 观察光源.

2 结果与讨论

2.1 酰化 bR 的 UV/Vis 吸收光谱及 M412 动力学光谱

图 2 所示的是正常和酰化 bR 的 UV/Vis

吸收光谱,可以看出二者在 570nm 附近的吸收峰相差不大,表明酰化并未严重破坏 bR 中视黄醛周围的构象环境. 光循环中间产物 M412 的动力学光谱(图 3)表明酰化使 bR 的光循环受到了较大抑制,表现在 M412 的产量减少,半衰期增长. 这说明 bR 的光循环过程中的构象变化可能受到了一些表面氨基酸残基(如赖氨酸)的调控.

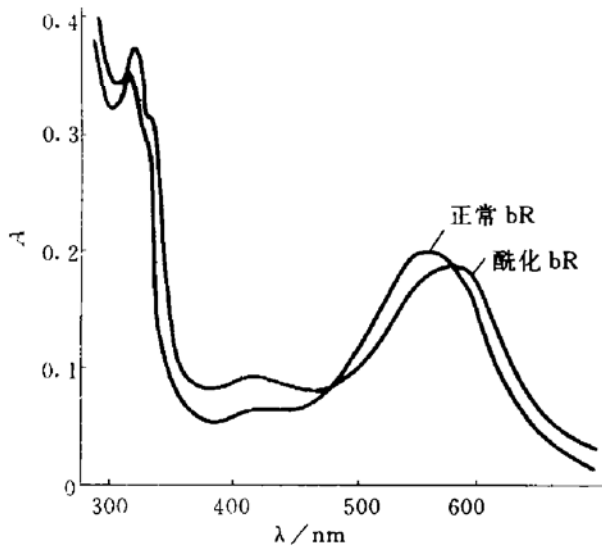


图 2 正常及酰化 bR 的 UV/Vis 吸收光谱
室温, pH=6.5

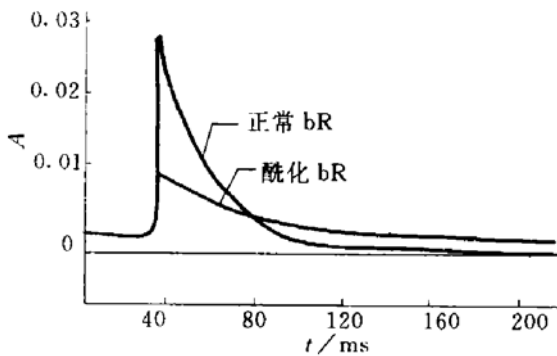


图 3 照光后 412nm 处正常和酰化 bR 的吸收值随时间的变化

2.2 连续光照下的光电响应

将连续光(150W 氙灯)照射到紫膜-BLM 样品上,可得到响应速度很慢(秒的数量级)的光电位信号,它主要反映出紫膜本身的主动的充放电过程,由 bR 的状态、膜电阻及电容所决定. 酰化后, bR 的光电位略有减小,光电响应

速度明显减慢;当把介质由重蒸水换成 0.1mol/L KCl 溶液后,发现光电响应速度又有所加快(图 4). 经测量酰化并未改变紫膜-BLM 系统的膜电阻. 由于酰化基团取代了 bR 中的赖氨酸残基上的 ε 氨基的正电荷,从而使膜的表面电荷密度降低,因此可以认为膜电容相应增大(充放电时间常数 RC 增大). 这也许是光电响应速度减慢的原因之一;同样,介质离子强度的增加可使膜表面的电荷密度增大,降低了膜电容. 另一方面,从 2.1 的结果得知,酰化抑制了 bR 的光循环,因此可以设想它同时抑制了质子的跨膜迁移,而这种抑制也导致了光电响应速度的减慢. 介质离子强度的增大也可能会通过影响膜的表面电位来间接影响 bR 的质子泵功能.

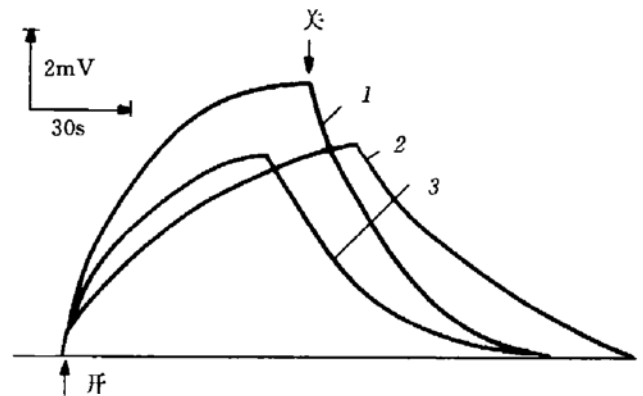


图 4 嵌入紫膜碎片的人工双分子脂膜的
充电与放电信号

1. 正常 bR; 2. 酰化 bR; 3. 酰化 bR (0.1mol/L KCl).

2.3 瞬态光电位信号

bR 的光循环是毫秒量级的,其质子的跨膜迁移也在几毫秒内完成. 其时间范围与膜上的充放电过程(秒)相差三个数量级,因此在闪光光照下毫秒级的光电位信号只与 bR 的状态有关,而不反映膜电阻与电容^[9]. 从图 5 可以看出:酰化后 bR 的瞬态光电位的响应时间(达到光电位最大值的时间)明显增加,光电位的幅值变化不大. 当介质的 pH 值增加到 9 时,酰化 bR 的光电位响应速度却显著加快;当介

质 pH 值增大到 11 时, 其光电位响应速度依然很快, 但其光电位急剧减小。

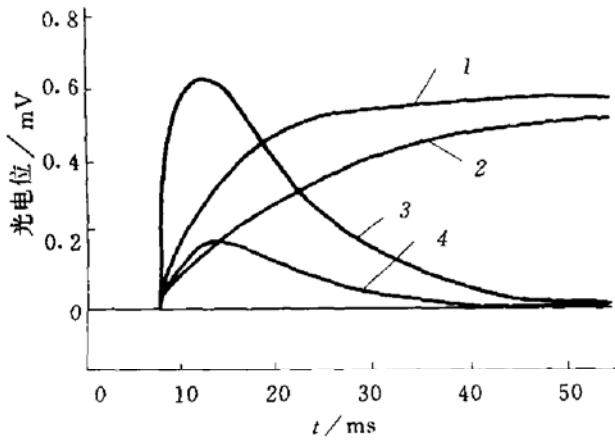


图 5 不同 pH 介质中酰化 bR 的瞬态光电位信号

1. 对照, 正常 bR, pH=6.5; 2. 酰化 bR, pH=6.5; 3. 酰化 bR, pH=9.0; 4. 酰化 bR, pH=11.0.

2.4 讨论

酰化后 bR 的光电位的响应时间增加, 表明质子跨膜迁移的速度减慢, 但此时跨膜质子的数量并没有明显的减小, 说明酰化试剂的确抑制了 bR 的质子泵功能, 但并没有阻断质子跨膜通道, 进一步来说就是: 酰化所修饰的基团并不直接参与质子的跨膜传递, 它不是膜内的质子给体. 当介质 pH 值为碱性时, 将会影响 bR 氨基酸侧链中带正电荷基团 (赖氨酸和精氨酸) 的解离状态; 另外, 介质 pH 的变化还会影响到 bR 表面离子 (特别是 H^+) 的分布. 在酰化 bR 中, 赖氨酸的正电基团 (ϵ 氨基) 被酰化试剂所屏蔽, 所以介质 pH 的变化主要影响精氨酸的正电基团的 pK 值. 因此可以认为在介质 pH=9 时 bR 光电响应速度的加快主要

是由精氨酸侧链正电荷的解离度和分布的变化引起的。

介质 pH 值的升高, 将引起 bR 中带正电荷的氨基酸残基的 pK 值的下降, 这样在暗条件下这些基团已经部分去极化了. 这时光照后光电响应速度的加快可能表明精氨酸残基的去极化有利于 bR 光驱动质子泵过程的构象变化. 而赖氨酸残基的去极化 (如酰化后) 则不利于这种构象变化.

当介质中的盐浓度较大时, 带电离子对紫膜表面电荷有很大的屏蔽作用; 介质中的离子在紫膜表面形成一个缓冲区, 使膜表面的电荷密度高于介质, 从而部分抵消了酰化的影响, 表现在光电响应速度的提高. 这又从另一个侧面反映出 bR 中的赖氨酸残基主要是通过其表面电荷来影响质子的跨膜传递.

参 考 文 献

- 1 Stoeckenius W, Lozier R H. *Biochim Biophys Acta*, 1979; **505**: 215
- 2 Nagle J F, Morowitz H J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; **75**: 298
- 3 Herz J M, Packer L. *FEBS Lett*, 1981; **131**: 158
- 4 Oesterhelt D, Stoeckenius W. *Methods in Enzymology*, 1974; **31**: 667
- 5 Riordan J F, Vallee B L. *Methods in Enzymology*, 1972; **25**: 494
- 6 Feilds R. *Methods in Enzymology*, 1972; **25**: 464
- 7 董宝中, 顾向明, 生文君等. *生物化学与生物物理进展*, 1991; **18**: 78
- 8 胡坤生, 王必前, 谈曼琪等. *生物化学与生物物理学报*, 1985; **17**: 42
- 9 Drachev I A, Kaulen A D, Khitrina L V *et al.* *Eur J Biochem*, 1981; **117**: 461

(CA)

Study on the Mechanism of Protective Effect of Zinc to Cells. Zhang Jingxia, Huang Ping, Xu Shiwen, An Lizhi, Yao Huiying, Xiao Yanan, Pan Juxiang, Chao Zhiyu, Zhu Jieqing, Wu Xiankang. (*Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (2): 147

On analyzing the distribution and composition of element in single cell with scanning proton microprobe (SPM) and synchrotron radiation X-Ray fluorescence microprobe (SR-XMF) it shows that zinc is a constituent of cell plasma. The levels of cellular zinc and iron were detected by above nuclear technique and the contents of MDA, SH group were estimated respectively by biochemical method for both normal and injured cell induced an peroxidation damage by hydroxyl-free radical. It was found that MDA content increased, SH group decreased, as well as Fe/Zn ratio raised during lipoperoxidation. By supplementation of zinc to culture medium, the inhibitory effect of zinc on lipoperoxidation was obvious from following experiment results that MDA content decreased, SH group content increased as well as Fe/Zn ratio reduced. The results suggest that zinc plays a role in maintaining the integrity of the cell and protects SH group of membrane protein thus preventing catalytic peroxidation reaction of iron.

Key words scanning proton microprobe (SPM), synchrotron radiation X-ray fluorescence microprobe (SR-XME), lipoperoxidation, zinc, protect

Studies on the Photoelectric and Kinetic Spectroscopic Properties of Acetylation Bacteriorhodopsin. Hu Kunsheng, Shi Hua, Huang

Ying, Yu Bi. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (2): 150
The role of lysine residues in the structure and function of bacteriorhodopsin (bR) was studied by the chemical modification method—acetylation. After acetylation, the photoreponse signals and the decay of photocycle intermediate M412 were slowed down while the yields of M412 were decreased. But UV/VIS absorption spectra did not show that the conformation around retinal chromophore was disturbed by acetylation. The effect of acetylation was weakened by high pH or salt media. The results imply that lysine residues do not directly participate in the proton translocation, instead, they affect this process by their contribution to the surface potentials.

Key words bacteriorhodopsin, photoreponse, acetylation, lipid bilayer

Studies on Preparation and Properties of Lauric Acid-Modified Superoxide Dismutase. Yan Jiaqi, Xie Wenzheng. (*Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450045*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 154

Superoxide dismutase is modified with lauric acid to improve its stability. Activated lauric acid was reacted with bovine Cu, Zn-superoxide dismutase at 40°C for 1h and it was further purified by a Sephacryl S-200 column. There are 93% recovery of enzyme activity from the resulting lauric acid-superoxide dismutase conjugate. The specific activity of this enzyme product was 6000U/mg. The modified enzyme showed enhanced stability, substantially free from immunogenicity and prolonged its half-life in blood. As a consequence, it can beneficially be used as an enzyme for cosmetics and