不同状态菌紫质分子的光电响应及其与 pH 的关系

胡坤生　沈莉莉　孙纹琦　谈曼琪

（中国科学院生物物理研究所，北京）

菌紫质分子是嗜盐菌紫膜中分子量为 26,000 的唯一蛋白质成分，它在天然紫膜中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．菌紫质分子的功能为光驱动质子泵，在膜两边形成质子梯度，嗜盐菌则可利用此电化学梯度合成 ATP．有人把天然紫膜碎片装到人工板膜上，光照后可以测量到光电响应信号[1]．有人认为，若把菌紫质分子的光化学循环、质子泵以及光电响应联系在一起，光化学循环过程中泵出质子，而这质子流就产生光电响应信号[2,3]．菌紫质分子六角形二维晶格的三聚体特殊的凝聚态结构与光循环过程，质子泵功能以及光电响应有何关系？ 单体状态下的菌紫质分子能否具有功能？ 对于一些膜的运输蛋白来说，一般认为只有特殊的凝聚态才具有功能．本实验测量结果表明，处于单体状态的菌紫质分子也具有光电响应．我们也观察到内池pH等于 8.0；外池 pH 等于 6.2 时，单体菌紫质分子的光电响应信号出现极性变化．

一、材料和方法

实验装置及测量方法在其它文章中有详细介绍[4]．内外池均为 pH 6.2 的 0.1 mol/l KCl 溶液．平板膜的形成液为提纯的大豆磷脂的癸烷液，浓度为 100 mg/ml．嗜盐菌 R_1M_1 的培养及紫膜的分离按 Oesterhelt 的方法进行[5]．

1. 菌紫质脂质体（liposome）的制备　提纯的大豆磷脂溶于甲醛氯仿溶液中，使其浓度为 100 mg/ml 作为贮存液（甲醛与氯仿之比为 1:4）．取 1ml 贮存液用氮气吹到溶剂完全挥发掉，再用 3ml 无水酒精清洗，同样用氮气吹干，在容器底部形成大豆磷脂薄层．然后，加入含 0.5mg 分离紫膜碎片的 0.15 mol/l KCl 溶液 1ml，摇匀，进行超声处理（幅度为 4μm），每次 15s，间隔 45s，共 60 次，从冰冻刻蚀电镜照片中可见已形成直径为 0.2μm 左右的脂质体．

2. 单体菌紫质脂质囊泡（vesicles）的制备　单体菌紫质脂质囊泡制备方法参考 Cherry 的方法[6]．12mg 紫膜碎片悬浮于 48ml 醋酸钠缓冲液中（100mmol/l，pH 5.0），缓冲液含 0.02% 叠氮化钠和 48mg 三硝基甲苯．室温下完全避光放置 24h，通过离心把没有溶解的三聚体紫膜移走，根据所需的类脂和蛋白比例加 DMPC 于已溶解成紫膜单体的悬浮液中，在 4℃ 下透析一周形成单体菌紫质分子的脂质囊泡，再通法蔗糖梯度离心（15—40%），把没重组的脂质和蛋白移走．在冰冻刻蚀电镜照片中可见已形成为直径约 0.6μm 的脂质囊泡．蛋白的浓度用 Lowry 的方法测定[7]，脂质的浓度用 Chen 的方法测定[8]，从蛋白和脂的浓度可计

本文 1986 年 11 月 5 日收到．

算出实际脂质与蛋白的比例. 本实验脂与蛋白克分子比为 115，实验温度为 25℃ 保证了菌紫质分子以单体状态存在[6].

人工平板膜的形成液分别与分离得到的紫膜碎片，菌紫质脂质体以及单体菌紫质脂质囊泡混合制成含三种不同状态的菌紫质的平板脂膜. 用 300W 卤素灯光照菌紫质分子的平板脂膜，用甘汞电极引出它们的电信号，用 HCl 及 NaOH 溶液调节内池 pH 值，在搅拌条件下，用小型 pH 电极监测内池 pH 值.

在重复试验中，所形成的膜与膜之间存在着差别，使光诱导电响应的幅度、波形以及方向因膜的差异而发生一些变化，所以定量地比较不同膜之间的幅度及波形是有一定困难. 因此，我们在测量 pH 的影响中尽可能在相同条件的同一个膜上进行. 通常情况下，内池一边的电信号相对外池一边为负值.

二、结果和讨论

在完全相同于菌紫质分子大豆磷脂膜光电响应测量条件下测量了不含菌紫质分子的大豆磷脂的光电响应，没有观察到电信号，说明光电响应来自菌紫质分子. 羟胺存在下的强光漂白以及用离心的方法除去生色团后再观察去生色团蛋白部分的光电响应，也没有明显观察到光照引起的光电响应. 因此，光电响应仅与生色团视黄醛有关.

表 1　三种不同状态菌紫质平板脂膜的电性质

电性质 / 膜样品	平均膜电阻 (Ω)	平均击穿电压 (mV)	平均膜电容 μF/cm²
大豆磷脂膜	2.1×10^{10}	340	0.46
含 0.47×10^{-4} mol/l 蛋白浓度的紫膜碎片的大豆磷脂膜	3.10×10^{9}	190	—
含 0.63×10^{-3} mol/l 蛋白浓度的脂质体的大豆磷脂膜	0.62×10^{9}	200	—
含 0.93×10^{-3} mol/l 蛋白浓度的脂质囊泡的大豆磷脂膜	0.77×10^{9}	150	—

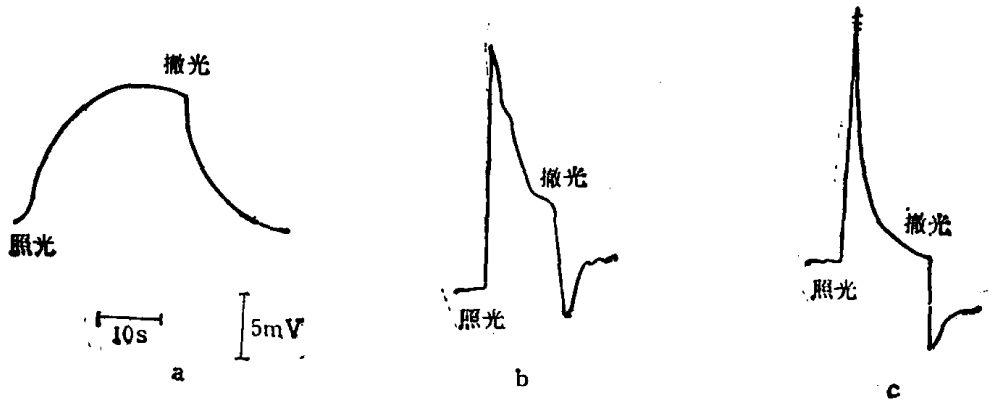

图 1　三种不同状态菌紫质分子平板膜的光电响应

a. 紫膜碎片平板膜；b. 菌紫质脂质体平板膜；c. 单体菌紫质脂质囊泡平板膜

在测量光电响应前，首先测量了三种不同状态菌紫质平板脂膜的电性质，其结果如表1所示。

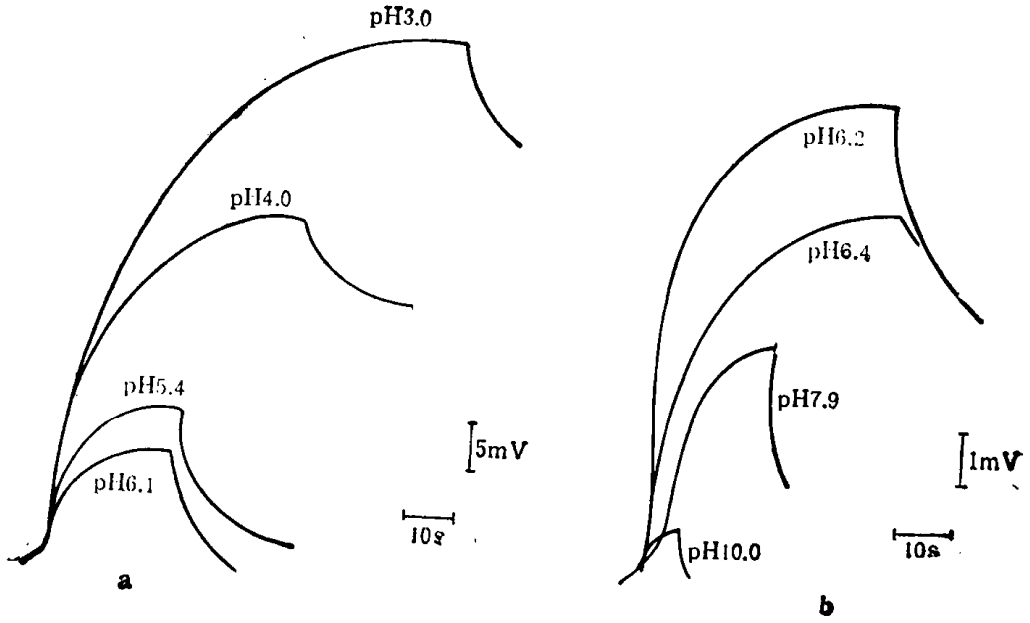

图2　不同 pH 对紫膜碎片平板膜光电响应的影响

a. 外池 pH 为6.1，内池 pH 见图所示；
b. 外池 pH 为6.2，内池 pH 见图所示

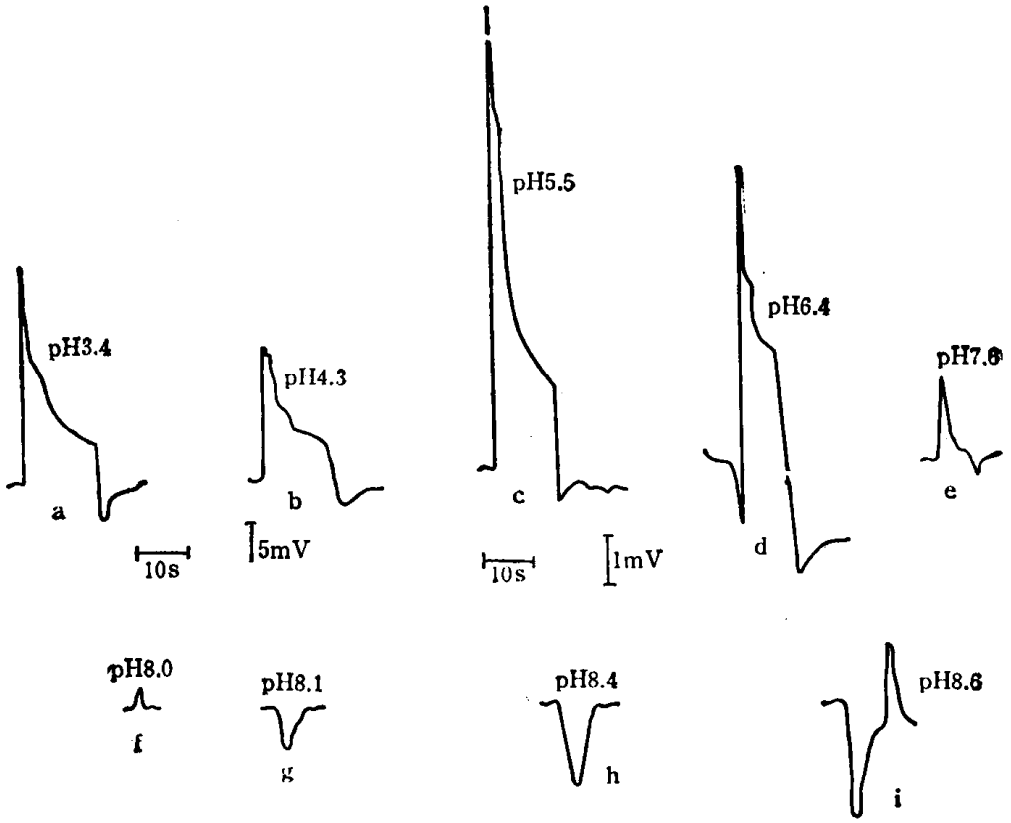

图3　不同 pH 对单体菌紫质脂质囊泡平板膜光电响应的影响

外池 pH 为6.2，内池 pH 见图所示，幅度标尺
中除 a，b 为 5mV 外，其它均为 1mV

测量菌紫质分子的光电响应时，我们在溶液中没加入任何电子供体和电子受体，说明蛋白质分子具有功能活性。

在25℃温度下，分别光照三种不同状态菌紫质分子的脂平板膜，均观察到光电响应，其结果如图1所示。

因为膜与膜之间有差异，由图1中观察到的三种不同状态的菌紫质分子平板膜的光电响应的幅度和波形有一定代表性的。据报道连续光照下产生的光电位是由菌紫质分子的质子泵所产生的[2,3]，即质子流在平板膜上引起的电压降。若光电响应与质子泵有关，则平板膜两侧溶液 pH 的变化会直接影响光电响应。我们测量了25℃时不同 ΔpH 对于光电响应的影响。ΔpH 对于紫膜碎片以及单体菌紫质脂质囊泡平板膜的光电响应的影响如图2、图3所示。

由图2及图3中可见，当内池 pH 低于外池的 pH 时，光电位增加，但波形不变。当内池的 pH 高于外池的 pH 时，光电位下降，对于紫膜碎片，波形不变，但单体菌紫质脂质囊泡平板膜时，当内池 pH 增加到8.0以上，其光电位从开始的正信号变为负信号，在撤光时，有时观察到从负信号变为正信号，其极性正好相反。

紫膜碎片厚度为50Å，直径为0.5μm，菌紫质分子以天然状态存在，光电位表示了天然菌紫质分子的质子泵功能。菌紫质分子在脂质体中仍处于三聚体状态，但处于人工膜环境中。在单体菌紫质脂质囊泡膜中，菌紫质分子不再以三聚体状态存在，而以单个分子存在于人工膜系统中。从图1中可知，天然紫膜的六角形晶格结构以及分子的三聚态不是光电响应的必要条件，即单体菌紫质分子仍有质子泵功能。

平板膜对于 H^+ 是不易通透的，在膜未破时，膜两边的 ΔpH 可以保持。图2及图3所得结果中，我们认为，当平板膜二边由 ΔpH 产生的质子梯度，与质子泵的方向相一致时，这时的质子梯度有利于加强质子泵的功能，所以光电位增大，相反则光电位降低。令人深思的是对于单体菌紫质脂质囊泡的平板膜光电响应测量中，当内池 pH 增加到8.0以上时，出现了极性变化，在紫膜碎片光电响应测量中则没有发现这种现象。这很可能是由于 pH 变化引起了单体蛋白分子构象的变化或者排列方向上的变化，使质子泵的方向发生了变化。也可能光照引起膜对质子通透性变化产生的质子流。对此应作进一步研究。

参 考 文 献

[1] Drachev, L. A. et al., *J. Biol. Chem.*, 251(1976), 7059—7065.
[2] Herrmann, T. R. and Rayfield, G. W., *Biophys. J.*, 21(1978), 111—125.
[3] Drachev, L. A. et al., *FEBS Lett.*, 178(1984), 331—335.
[4] 胡坤生、王必前、谈曼琪，生物化学与生物物理学报，17(1985)，42—49。
[5] Oesterhelt, D. et al., *Meth. Enzymol.*, 31(1974), 667—678.
[6] Cherry, R. J. et al., *J. Mol. Biol.*, 121(1978), 283.
[7] Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem.*, 193(1951), 265.
[8] Chen, P. S. et al., *Anal. Chem.*, 28(1956), 1756.