

细菌视紫红质光循环中间体 M_{412} 的动力学初探*

陈德亮¹⁾ 王英利²⁾ 姚保利²⁾ 胡坤生^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾中国科学院西安光学精密机械研究所, 西安 710068)

摘要 采用紫外可见吸收光谱技术和闪光光解技术, 初步观察了细菌视紫红质 (BR) 分子在宽 pH 范围 (2.1~12.3) 内的特征吸收峰以及 M_{412} 的相对浓度和 M_{412} 的慢成分半衰期的变化, 并对其结构和光循环功能进行了讨论. 紫外可见吸收光谱实验结果显示: pH=5.0~10.0 时, BR 最大特征吸收峰值约为 568 nm; pH<5.0 时, BR 最大特征吸收峰发生红移; pH>10.0 时, BR 最大特征吸收峰发生蓝移. 闪光动力学光谱结果显示: pH 为 7.3~9.5 时, M_{412} 的相对浓度 (M_0) 基本稳定在 0.038 左右; pH<7.3 时, M_0 逐渐减小; pH>9.5 时, M_0 明显上升, 在 pH=11.8 时达到最大值 0.1355, 随后又快速下降. pH 为 2.1~7.3 时, M_{412} 的慢成分半衰期 ($t_{1/2}^s$) 值在 (4.1±1.1) ms 左右; pH>7.3 时, $t_{1/2}^s$ 值急剧延长到 40 677.4 ms. 推测在高 pH 条件下, BR 分子的光循环有新的路径和机理.

关键词 细菌视紫红质, pH, 动力学, 光循环

学科分类号 Q632

细菌视紫红质 (BR) 是嗜盐菌紫膜中的唯一蛋白质, 由 248 个氨基酸组成, 并通过 7 个 α 螺旋结构跨膜整合在细胞膜中^[1]. BR 的 216 位 Lys 以希夫碱基和生色团视黄醛相连, 在可见光照射下, 伴随着 BR 的构象等变化, 视黄醛可发生异构化现象, 利用希夫碱基的质子化, 去质子化过程, 将细胞内的质子运输到细胞外; 同时, BR 分子经历一系列的构象中间体——J、K、L、M、N、O, 最终返回基态, 完成光化学循环^[2].

在紫膜中, 细菌视紫红质以三体形式构成六角型的二维晶格体系, 具有独特的光化学性质和高度稳定的特点. 大多数蛋白质在 pH>10, pH<4 的环境下易失活, 但 BR 可以在广泛的 pH (3.0~12.0) 下^[3]、失水干燥^[4]以及环境温度高达 140℃^[5]等极端条件下, 依旧具有生物活性. 因此, BR 可以作为十分稳定的生物活性材料应用于光电转换、光信息存储以及非线性光学等领域. 同时, 在基础研究方面, BR 分子的光循环和质子传递的 pH 依赖性, 一直都是紫膜生物物理学领域的研究热点之一. Stoeckenius 等^[6]和 Varo 等^[7]曾对 BR 在不同 pH 下的光谱性质和动力学特性进行了系统的研究, 讨论了 BR 分子的光循环机理, 并且认为在酸性条件和碱性条件下的光循环路径和机制可能并不尽相同. 本文主要利用闪光光解技术, 表征了 BR 在不同 pH 条件下的光循环中间体 M 态的相对浓度和寿命, 并初步探讨了可能的机制.

1 材料与方法

紫膜的培养和纯化沿用传统方法^[8], 纯化后的样品溶解于去离子水中并保存于 4℃ 冰箱中. 酸碱滴定实验中, 紫膜中的 BR 为光适应样品 (200 W 卤钨灯, 照射距离 10 cm, 照射时间 1 h), 将紫膜溶解于 50 mmol/L 的 K_2SO_4 溶液, 配成终浓度为 10 μ mol/L 的 BR 蛋白溶液, 用 H_2SO_4 和 KOH 溶液进行酸碱滴定, 以达到所需的 pH 值, 并保证滴定所需的酸碱体积小于紫膜溶液总体积的 1/100.

紫膜样品的特征吸收光谱在 HITACHI U3200 分光光度计上测定. 闪光光解动力学光谱在实验室自行研制的瞬态吸收光谱仪^[9] (μ s~ms 级) 上监测 (激发光为 570 nm, 寿命 100 ms, 测量光为 412 nm). 所有的操作均在室温下进行.

2 结果

2.1 紫外可见吸收光谱结果

紫膜中的 BR 分子在中性 pH 环境下, 可进行正常的光循环并完成质子的跨膜传递. 在极端 pH 条件下, BR 分子仍然具有光循环的功能, 但其分

* 国家自然科学基金资助项目 (60007009).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888580, E-mail: huks1401@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-09-29, 接受日期: 2001-11-21

子构象会因此改变, 生色团视黄醛所在的微环境也相应变化, 这反映在紫膜的最大特征吸收峰发生位移.

图 1 显示的是在不同 pH 条件下, BR 分子最大特征吸收峰波长值的变化. 当 BR 分子处于中性 pH 范围附近时 (5.0~10.0), 其最大吸收峰值基本位于 (568 ± 3) nm. 这说明此时的视黄醛分子所在的微环境并没有受到 pH 变化的明显扰动, 因此推测 BR 分子的构象也没有发生大的变化. 随环境酸性的增加 (pH < 5.0), BR 分子的最大吸收峰值开始明显的红移, 当 pH 达到 2.0 附近时, 其特征吸收峰值为 605 nm, 样品由紫色转变为蓝色. 而随着环境碱性的增加 (pH > 10.0), BR 分子的最大吸收峰值开始明显的蓝移, 当 pH 达到 12.1 附近时, 其特征吸收峰值为 540 nm, 样品由紫色转变为红色. 以上吸收光谱实验说明, 在极端酸碱条件下, 视黄醛分子的微环境被明显扰动, BR 分子的构象也发生明显的变化.

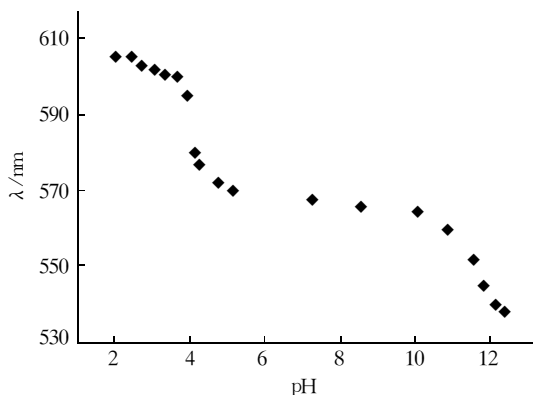


Fig.1 The changes of the wavelength of characteristic absorption peak of bacteriorhodopsin as the pH shifted from 2.1 to 12.3

2.2 闪光动力学光谱结果

当 BR 分子的结构发生改变时, 相应的光循环的功能上也产生变化. 通过闪光光解法监测波长 412 nm 处的瞬态吸收的变化, 表征 BR 分子的中间体 M_{412} 的动力学参数, 从而分析在不同 pH 环境下 BR 分子功能的改变.

图 2 和图 3 (都只选取了部分 pH 下的动力学曲线) 分别显示的是 BR 分子光循环中间体 M_{412} 的衰减动力学曲线. 图 2 中, M_{412} 中间体的相对浓度 (吸收变化的幅度) 在酸性条件下 (pH 为 7.3~2.5), 随着 pH 的减小而降低, 但其衰减的寿命 (半衰期) 没有明显的变化. 而图 3 中, M_{412} 中间

体的相对浓度在微碱的条件下 (pH 为 7.6~9.5), 伴随 pH 的升高并没有明显的变化, 但其衰减的寿命则逐渐延长.

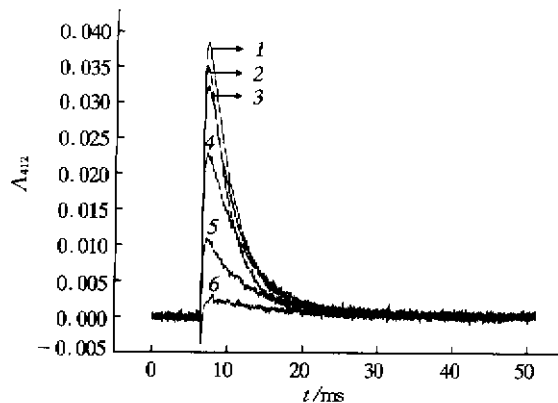


Fig.2 Flash-induced kinetics spectra of the intermediate M_{412} was monitored as the pH shifted from 7.3 to 2.5
1 : pH 7.3 ; 2 : pH 5.9 ; 3 : pH 5.0 ; 4 : pH 3.6 ; 5 : pH 3.0 ; 6 : pH 2.5.

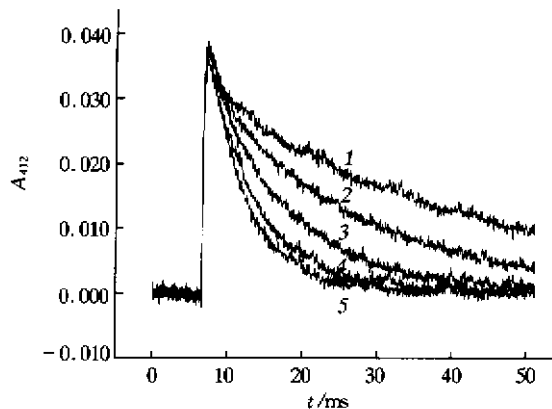


Fig.3 Flash-induced kinetics spectra of the intermediate M_{412} was monitored as the pH shifted from 7.6 to 9.5
1 : pH 9.5 ; 2 : pH 9.1 ; 3 : pH 8.6 ; 4 : pH 8.1 ; 5 : pH 7.6.

所有的动力学曲线 (pH 为 2.1~12.3) 通过双指数拟合^[10], 所得的 M_0 (M_{412} 中间体的相对浓度) 和 $t_{1/2}^s$ (M_{412} 中间体的慢成分的半衰期寿命). 由于 M_{412} 中间体的快成分与质子泵无关, 所以实验中主要分析的是 pH 对 $t_{1/2}^s$ 的影响.

从表 1 可看出, M_0 的变化: a. pH 在 2.1 至 7.3 的范围下, M_0 随着酸性的增加而明显减小, 从 0.0382 降至 0.0021, 当 pH 小于 2.1 时, 光循环 M 态中间体消失. 这说明, BR 分子在经典的酸诱导的紫膜转变为蓝膜的过程中, 进入光循环的分子数量逐渐减少, 直至最终停止进入光循环. b. pH 在 7.3 至 9.5 的范围下, M_0 在这个中性及

微碱性的条件下没有明显变化。这说明,在生理环境中,BR 分子可稳定地进行光循环并传递质子。c. pH 在 9.5 至 12.3 的范围下,随着碱性的增强, M_0 值明显上升,当 pH 为 11.8 时, M_0 达到最大值 0.1355;随着碱性继续增强, M_0 值急剧减小,当 pH 大于 12.3 时,光循环 M 态中间体消失。这种奇特的现象暗示:在高碱性环境里,BR 分子很可能有新的光循环路径和质子传递机制。

$t_{1/2}^s$ 的变化(表 1): a. pH 在 2.1 至 7.3 的范围下, $t_{1/2}^s$ 值在 (4.1 ± 1.1) ms 内,没有随酸性的

Table 1 The changes of M_0 (relative concentration of M_{412}) and $t_{1/2}^s$ (halftime of slow component of M_{412}) as the pH shifted from 2.1 to 12.3

pH	M_0	$t_{1/2}^s$ /ms
2.1	0.0021	4.9
2.5	0.0027	5.1
3.0	0.0116	5.2
3.3	0.0150	4.0
3.6	0.0225	4.9
4.4	0.0295	4.7
5.0	0.0325	3.8
5.9	0.0350	3.1
6.5	0.0367	3.1
7.3	0.0382	3.6
7.6	0.0375	4.8
8.1	0.0372	6.2
8.6	0.0376	8.7
9.1	0.0382	14.9
9.5	0.0386	31.1
10.0	0.0422	68.6
10.4	0.0525	153.5
10.8	0.0718	297.1
11.0	0.0800	463.4
11.6	0.1035	2 477.3
11.8	0.1355	6 527.7
12.0	0.1250	22 589.7
12.2	0.0451	20 323.1
12.3	0.0166	40 677.4

增强而明显变化。这说明,虽然 BR 分子的光循环在低 pH 下被抑制,但其主要中间体 M_{412} 的衰减性质没有明显改变。这暗示,BR 分子在高 H^+ 的环境中,只是进入光循环的分子数量发生变化,但其光循环的性质和路径可能没有改变。b. pH 在 7.3 至 12.3 的范围下, $t_{1/2}^s$ 值由 3.6 ms 急剧延长到 40 677.4 ms,中间体 M_{412} 的衰减性质发生明显变化。这点也暗示,在碱性条件下的 BR 分子的光循环很可能有着不同于生理中性条件下的性质和

路径。

3 讨 论

紫膜中的 BR 分子在酸性条件下发生的红移现象已有许多相关报道^[11,12]。由于 BR 的 Asp85 的 pK_a 为 3.8 (光适应)^[13],所以随着酸性的增加,Asp85 的羧基质子化逐渐形成。质子化的 Asp85 不能再作为希夫碱基上的质子受体,因而正常的质子传递被阻断,光循环功能丧失。这就表现在 BR 动力学曲线上的 M_{412} 的相对浓度随 pH 的减小而明显下降。但在这一过程中, M_{412} 中间体的慢成分的半衰期寿命没有明显变化。由于 M_{412} 中间体的慢成分与质子泵功能直接联系,我们因此推测,酸性条件下 H^+ 浓度的改变,并不影响光循环中质子传递的速率和光循环的路径。目前,对低 pH 下 BR 的光循环机制的研究并不深入,我们的假设也有待进一步的实验证实。

紫膜中 BR 分子在碱性条件下发生的蓝移现象也有相关报道^[3],但针对在高 pH (9.5~11.8) 下的 M_{412} 相对浓度的大幅度上升,却未见有详细的报道和充分的解释。我们提出三个可能的机制: a. 高 pH 下,13-*cis*-BR 可能发生构型转变,形成 all-*trans*-BR,后者进入光循环并产生 M 态中间体,这导致了 M_{412} 相对浓度的上升。b. 处于基态的 all-*trans*-BR 进入光循环,首先要吸收一定的能量,从而跃迁到高能级的 BR* 态(激发态),然后发生构象弛豫,生成各个中间体并最终返回基态。因此可能是高浓度的 OH^- 诱导了更多基态的 BR 分子进入了激发态,从而提高了 M_{412} 的相对浓度。c. 光循环后半程的产物在高 pH 条件下,可逆地转变成 M 态,导致 M 态的累积,从而提高了 M_{412} 的相对浓度^[14]。结合在碱性条件下中间体 M_{412} 的衰减寿命的显著延长,我们推测:不同于生理中性条件下的 BR 分子的光循环模型(分支模型^[15]和可逆模型^[16]),在碱性条件下,BR 分子很可能有着新的光循环路径和质子传递机制。所有的假设有待于进一步的研究来验证。

参 考 文 献

- Oesterhelt D, Stoecknius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. Nat New Biol, 1971, **233** (2): 149~152
- Luecke H, Richter H T, Lanyi J K. Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. Science, 1998, **280** (5371): 1934~1937
- Muccio D D, Cassim J Y. Interpretations of the effects of pH on

- the spectra of purple membrane. *J Mol Biol* , 1979 , **135** (5371) : 595~609
- 4 Ikonen M , Sharonov A Y , Tkachenko N V , *et al.* The kinetics of charges in dry bacteriorhodopsin langmuir-blodgett films-an analysis and comparison of electrical and optical signals. *Adv Mater Opt Electr* , 1993 , **2** (1) : 211~220
 - 5 Shen Y , Safinya C R , Liang K S , *et al.* Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140°C in two dimensional films. *Nature* , 1993 , **366** (6450) : 48~50
 - 6 Groma G I , Bogomolni R A , Stoerkenius W. The photocycle of bacteriorhodopsin at high pH and ionic strength I . Effects of pH and buffer on the absorption kinetics. *Biochim Biophys Acta* , 1997 , **1319** (1) : 59~68
 - 7 Ludmann K , Gergely C , Varo G. Kinetic and thermodynamic study of the bacteriorhodopsin photocycle over a wide pH range. *Biophys J* , 1998 , **75** (6) : 3110~3119
 - 8 Oesterhelt D , Stoerkenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol* , 1974 , **31** (1) : 667~670
 - 9 Jiang Q X , Hu K S , Shi H. Interactions of both melittin and its site-specific mutants with bacteriorhodopsin of *Halobacterium halobium* : sites of electrostatic interaction on melittin. *Photochem Photobiol* , 1994 , **60** (2) : 175~178
 - 10 施 桦 , 孙 英 , 谈曼琪 , 等. 离子强度、湿度及表面活性剂 Triton X-100 对紫膜质子泵效率的影响. *生物物理学报* , 1992 , **8** (2) : 221~225
 - Shi H , Sun Y , Tan M Q , *et al.* *Acta Biophys Sinica* , 1992 , **8** (2) : 221~225
 - 11 Renthall R , Wallace B. Carbodiimides inhibit the acid-induced purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta* , 1980 , **592** (3) : 621~625
 - 12 Subramaniam S , Marti T , Khorana H G. Protonation state of Asp (Glu)85 regulates the purple-to-blue transition in bacteriorhodopsin mutants Arg-82-Ala and Asp-85-Glu : the blue form is inactive in proton translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1990 , **87** (3) : 1013~1017
 - 13 Balashov S P , Imasheva E S , Govindjee G , *et al.* Evidence that aspartate85 has a higher pK (a) in all-*trans* than in 13-*cis* , bacteriorhodopsin. *Biophys J* , 1996 , **71** (4) : 1973~1984
 - 14 Varo G , Lanyi J K. Pathways of the rise and decay of the M photointermediate (s) of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* , 1990 , **29** (9) : 2241~2250
 - 15 Luchian T , Tokaji Z , Dancshazy Z. Actinic light density dependence of the O intermediate of the photocycle of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett* , 1996 , **386** (1) : 55~59
 - 16 Hessling Z , Souvignier G , Gerwert K. A model-independent approach to assigning bacteriorhodopsin ' s intramolecular reactions to photocycle intermediates. *Biophys J* , 1993 , **65** (5) : 1929~1941

The Primary Research on The Kinetics of The Intermediate M_{412} in The Photocycle of Bacteriorhodopsin *

CHEN De-Liang¹⁾ , WANG Ying-Li²⁾ , YAO Bao-Li²⁾ , HU Kun-Sheng^{2)**}

¹⁾*Institute of Biophysics , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China ;*

²⁾*Institute of Optics and Precision Mechanics , The Chinese Academy of Sciences , Xi'an 710068 , China)*

Abstract The changes of bacteriorhodopsin's structure and function were monitored by the UV/VIS absorption spectrum technique and the flash photolysis technique over the wide pH range (2.1~12.3). The results of the UV/VIS absorption spectra showed that : 1) the wavelength of the characteristic absorption peak was about 568 nm (pH=5.0~10.0) , 2) the red shift of the absorption spectra was observed (pH<5.0) and 3) the blue shift of the absorption spectra was observed (pH>10.0). The results of the flash-induced kinetics spectra indicated that : a) M_0 (relative concentration of M_{412}) kept around 0.038 constantly (pH = 7.3~9.5) ; b) M_0 decreased gradually as pH was below 7.3 ; c) when pH was above 9.5 , M_0 increased obviously and reached the maximum 0.1355 (pH = 11.8) then dropped down sharply ; d) $t_{1/2}^s$ (halftime of the slow component of M_{412}) was (4.1 ± 1.1) ms approximately (pH=2.1~7.3) and e) $t_{1/2}^s$ was prolonged to 40 677.4ms sharply (pH>7.3). It can be concluded that under the condition of high pH , the novel pathway and mechanism of bacteriorhodopsin's photocycle may exist.

Key words bacteriorhodopsin , pH , kinetics , photocycle

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (60007009).

** Corresponding author. Tel : 86-10-64888580 , E-mail : huks1401@sun5. ibp. ac. cn