研究快报

高碱性 pH 诱导紫膜片层表面结构变化的原子力显微镜直接观测*

陈德亮[1] 李 辉[2] 韩宝善[2] 徐 兵[1] 胡坤生[1]**

([1]中国科学院生物物理研究所，北京 100101；[2]中国科学院物理研究所，北京 100080)

摘要 报道了在高碱性 pH 下，紫膜中细菌视紫红质（BR）表面结构变化的直观信息. 紫外可见光谱实验发现，当 pH 上升到 12.6，BR 分子上的生色团视黄醛脱落，分子完全变性；原子力显微镜实验观测到在此 pH 下，紫膜片层的晶格结构瓦解，BR 分子在紫膜上无规则聚集，同时出现非特征“岛屿”结构和特征“岛屿”结构.

关键词 细菌视紫红质，紫膜，pH，“岛屿”结构，原子力显微镜

学科分类号 Q6-33

细菌视紫红质（bacteriorhodopsin，BR）是嗜盐菌（*Halobacterium halobium*）质膜上发现的一种光驱动的质子传递蛋白[1]. BR 含有 248 个氨基酸残基，其基本结构是 7 个 α 螺旋，C 端在细胞膜内侧，N 端在细胞膜外侧[2]，生色团视黄醛通过希夫碱基和 216 位的赖氨酸残基相连[3]. 在天然状态下，每三个 BR 分子会在细菌质膜上形成一个结构单元，从而构建成六角型的晶格片层体系，称为紫膜[4]. 在紫膜中的 BR 分子十分稳定，耐酸碱、高温等极端条件，加上其独特的结构功能，使 BR 在光电转换、光信息存储以及非线性光学等领域有广泛的应用.

BR 分子的生理功能是跨膜传递质子. 在这一过程中，质子扮演了双重身份：一方面，它作为被 BR 蛋白传递的物质，十分类似于酶促反应中的底物角色；另一方面，它又可作为环境因子，调节 BR 的功能，改变 BR 的结构. 到目前为止，人们在功能研究方面已经知道了 pH 可以调节 BR 分子中视黄醛构型的转变[5]，质子传递通道内部质子受体的状态[6]，以及 BR 光循环各中间体的性质[7]等等. 而作为 BR 领域的两个重要实验室 Stoeckenius[8] 和 György[9] 小组，系统地报道了在不同 pH 条件下 BR 的光循环性质和动力学特性，并且认为在碱性条件下光循环的路径和机制可能与经典的模型并不一致. 至于在结构研究方面，人们一直并不清楚在碱性环境下，BR 变性过程中结构变化的具体信息.

本实验主要采用原子力显微镜，对高碱性 pH 诱导的紫膜片层上 BR 分子的表面结构变化进行直接观测，得到了“岛屿”结构的表面特征形貌.

1 材料与方法

紫膜的培养和纯化沿用传统方法[10]，纯化后的样品溶解于去离子水中并保存于 4℃冰箱中.

紫外可见吸收实验中的 BR 样品溶液（含有 100 mmol/L KCl，10 mmol/L 甘氨酸），通过加入 KOH 溶液来调节 pH 值，KOH 溶液体积要小于样品总体积的 1/100，准备好的样品要在 4℃冰箱中平衡至少 12 h. 其特征吸收光谱在 Hitachi U-2010 分光光度计上测定.

原子力显微镜实验中，先将紫膜溶解于中性 KCl-甘氨酸缓冲液中，浓度一般在 1～5 μmol/L 左右. 取适量（5～10 μl）的紫膜溶液，滴于新解离云母上. 静置 10 min 左右，让紫膜膜片吸附在云母表面，然后用不同 pH 的缓冲液冲洗若干次，并且平衡 2 h 以上，再进行原子力显微镜实验.

仪器为原子力显微镜（NanoScope Ⅲa，MM-AFM，DI），我们使用液体池下的 contact 模式. 使用 Si_3N_4 制成的 NP-S 短窄针，弹性系数 $k = 0.36$ N/m. 使用中没有用“O”形密封圈. 通过参量设置，使扫描时针尖对样品的作用力尽可能地小；通过力曲线，可以测得针尖对样品的作用力. 在我们的实验中，针尖的施力可以控制到0.3 nN 以下，以得到 BR 清晰的周期性结构形貌图.

* 国家自然科学基金资助项目（30170235），中国科学院重大项目（KJ CX1-SW）和国家重点基础研究发展规划资助项目（973）（G199801-0102）.

** 通讯联系人.

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

收稿日期：2003-07-28，接受日期：2003-08-05

所有实验操作若无特殊说明均在室温下进行.

2 结　果

2.1 紫外可见吸收光谱实验

在碱滴定过程中，BR 的特征吸收发生了蓝移. 图 1 中可以看到，随着 pH 的升高（6.16～11.93），BR 特征吸收峰的波长从 570 nm 红移到 566 nm，吸收值也逐渐下降，当 pH 为 12.30 时，特征吸收值进一步下降，值得注意的是在360 nm 处开始出现了新的吸收峰. 当 pH 大于 12.6 的时候，BR 在 500～600 nm 区域的特征峰完全消失，而在 360 nm 处出现了十分明显的吸收峰. 说明此时 BR 的结构发生了巨大的变化，视黄醛和 216 位赖氨酸连接位置的希夫碱基被水解（500～600 nm 吸收消失），从而释放出视黄醛分子（游离的视黄醛分子在 360 nm 处有特征吸收）.

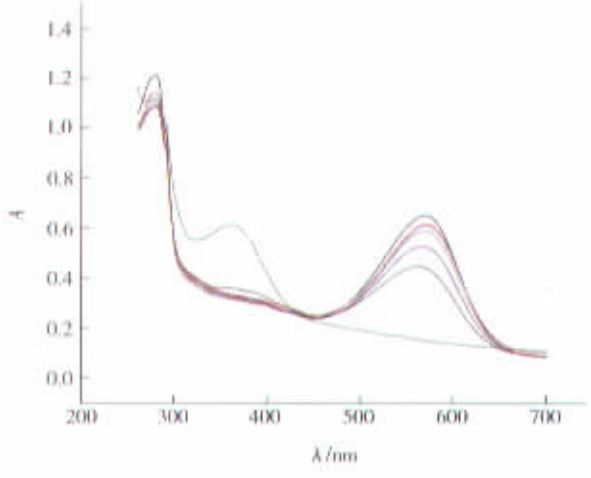

Fig.1 Absorption spectra of BR in purple membrane under different pH values

—:pH6.16; —:pH8.59; —:pH10.01; —:pH11.16; —:pH11.93; —:pH12.30; —:pH12.64.

2.2 原子力显微镜实验

天然紫膜中性 pH 条件下原子力显微镜的实验结果已经有了多篇报道[11,12]. 我们的结果和他们的相同，可以清晰地看到平均直径在 0.5 μm 呈椭圆或长圆型紫膜片层的整体形貌结构（图 2），大尺度 5 μm 下的膜平面显得十分平整，在小尺度 100 nm 下的紫膜平面上，组成二维六角型晶格结构的 BR 三体单元清晰可见（图 3）. 当缓冲液 pH 上升为 12.0 时，紫膜的整体形貌以及精细结构都和图 2 及图 3 的结果相似，这里不再给出.

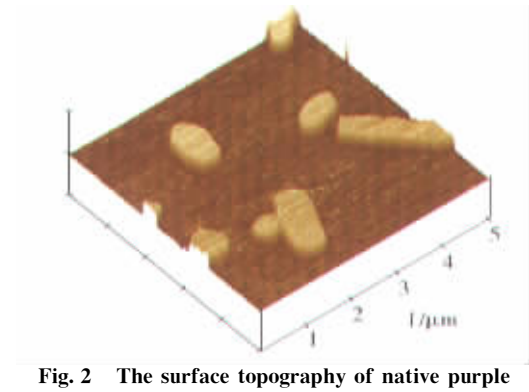

Fig. 2 The surface topography of native purple membrane under the neutral pH

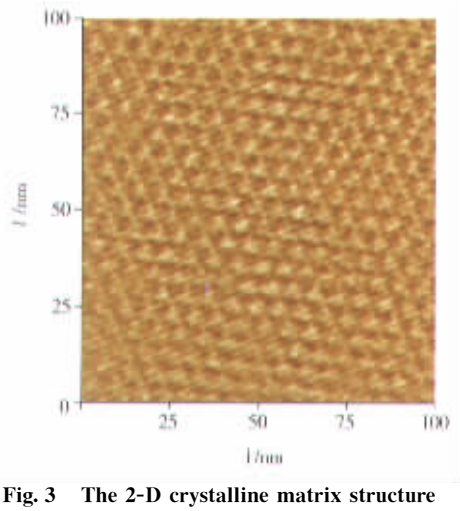

Fig. 3 The 2-D crystalline matrix structure of natitve purple membrane under 100 nm scale

当注入 pH 为 12.6 的缓冲液并且平衡后发现，紫膜片层的结构发生了巨大的变化. 从图 4 中可以看到紫膜的整体形貌并没有改变，但膜上出现了新的结构变化. 有的区域膜平面依旧平整，但更多的区域出现了凹凸不平的膜平面结构. 取图 4 中上部

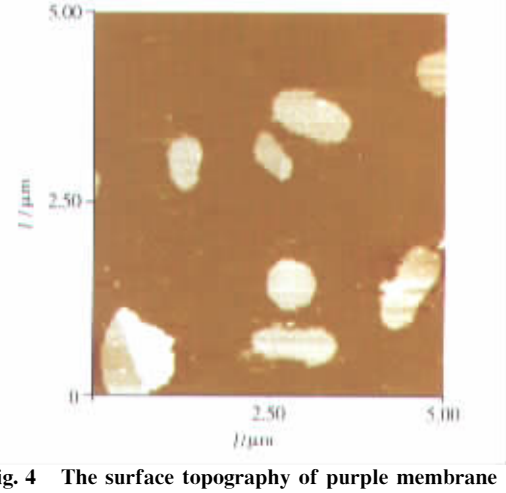

Fig. 4 The surface topography of purple membrane under pH 12.6

5 μm scale.

的一个紫膜片层进行放大观测，在 800 nm 尺度下（图 5）可以清晰地看到：这种特殊凹凸不平的现象其实是 BR 蛋白在紫膜片层上形成了无规则不定型的聚集体，我们称之为脂双层上的“岛屿”结构. 在 300 nm 尺度下的结果显示紫膜的特征二维晶格体系已经消失，BR 分子的确是以一种无规则方式发生了聚集.

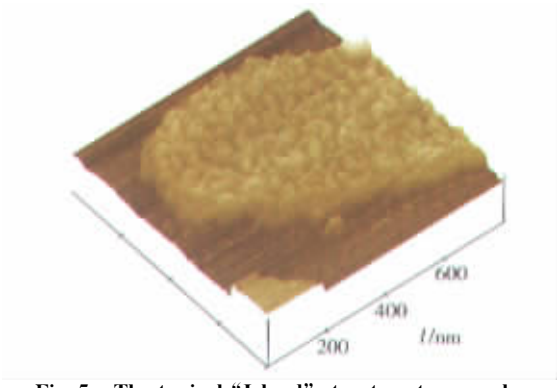

Fig. 5 The typical “Island” structure topography of purple membrane under pH 12.6
800 nm scale.

但当我们对图 4 中表面平坦的紫膜样品进行观测，结果显示：这部分样品虽然在大尺度下没有形成明显的特征“岛屿”结构，但在高分辨尺度下可以看到二维六角型的晶格体系消失，BR 分子同样在脂双层上无规则地聚集（图6）. 因为这种聚集的面积尺度远小于特征“岛屿”结构中的聚集尺度，所以我们称之为非特征“岛屿”结构.

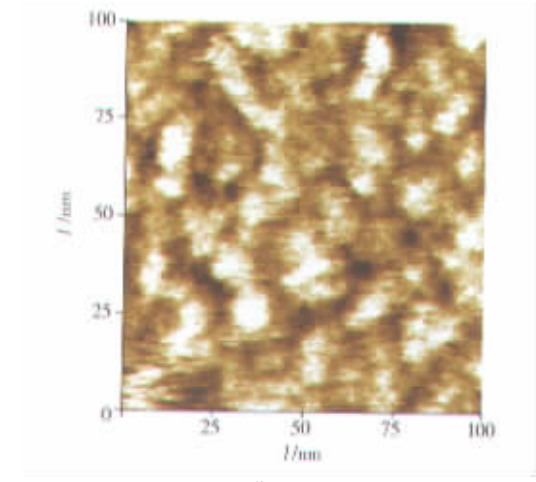

Fig. 6 The non-typical “Island” structure topography of purple membrane under pH 12.6
100 nm scale.

3 讨 论

随 pH 的上升，BR 的光循环以及质子传递会被抑制. 而在结构方面，Muller 小组[13]已经证实：视黄醛的脱落和 BR 分子进入变性态，是伴随着紫膜晶格体系的瓦解而协同进行的. 图 1 说明当 pH 大于 12.3，BR 开始进入变性态，此时视黄醛开始脱落；而 pH 达到 12.6 时，BR 就完全变性，特征吸收峰完全消失. 虽然人们曾推测在极端 pH 条件下，BR 分子会发生聚集效应，但我们利用原子力显微镜，首次直观地观测到这种聚集现象存在两种不同的结构形式. a. 特征“岛屿”结构：紫膜中的二维六角型晶格完全瓦解，BR 分子在膜上无规则聚集形成“岛屿”结构，“岛屿”的突起高度约为 2.5 nm 左右（图 5 中未给出），聚集面积大而显著，在大尺度分辨率（5 μm）下都可观察到. b. 非特征“岛屿”结构：紫膜中的晶格也完全破坏，BR 分子无规则排列并且也发生聚集，由于这种聚集的突起高度仅为 0.9 nm 左右，接近天然紫膜上 BR 的突起高度，所以在一般尺度上观察不出和天然紫膜的差别，同时这种聚集的面积很小（平均直径约小于 20 nm），所以称之为非“特征”岛屿结构.

然而，我们并不清楚：为什么高碱性 pH 会诱导紫膜上的 BR 发生聚集而形成两种不同的结构形式. 比较两者的结构特点并结合 Muller 的观点，我们推测：高碱性 pH 可能先导致连接视黄醛希夫碱基的水解，释放出视黄醛分子，从而破坏紫膜上 BR 和脂分子共同形成的二维晶格体系，此时无规则排列的 BR 分子很容易和相邻的几个 BR 发生聚集，从而先形成非特征“岛屿”结构. 而这些小面积的聚集体之间可能会发生进一步的融合，不仅在突起高度还是聚集面积上都会发生明显的提高，从而形成特征“岛屿”结构.

实验中还发现：在有的紫膜片层上，非特征“岛屿”结构和特征“岛屿”结构是同时共存的. 我们今后的工作将进一步研究为什么两种结构会共存于同一个紫膜上，又是什么因子促使非“特征”岛屿结构向特征“岛屿”结构的转变等问题.

参 考 文 献

1 Oesterhelt D, Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Nat New Biol, 1971, **233** (39): 149～152

2 Luecke H, Schobert B, Richter H T, *et al*. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. J Mol Biol, 1999, **291** (4): 899～911

3 Rothschild K J, Argade P V, Earnest T N, *et al*. The site of attachment of retinal in Bacteriorhodopsin: A resonance Raman study. J Biol Chem, 1982, **257**: 8592～8595

4 Grigorieff N, Ceska T A, Downing K H, *et al*. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. J Mol Biol, 1996, **259** (3): 393～421

5 Balashov S P, Imasheva E S, Govindjee R, *et al*. Evidence that aspartate-85 has a higher p*K*(a) in all-*trans* than in 13-*cis*-bacteriorhodopsin. Biophys J, 1996, **71**: 1973～1984

6 Metz G, Siebert F, Engelhard M. Asp85 is the only internal aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of Bacteriorhodopsin: A solid-state 13C CP-MAS NMR investigation. FEBS Lett, 1992, **303** (2～3): 237～241

7 Balashov S P. Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin. Biochim Biophys Acta, 2000, **1460** (1): 75～94

8 Groma G I, Bogomolni R A, Stoeckenius W. The photocycle of bacteriorhodopsin at high pH and ionic strength. Ⅱ. Time-dependent anisotropy studied by partially saturating photoselection. Biochim Biophys Acta, 1997, **1319** (1): 69～85

9 Krisztina L, Csilla G, György V. Kinetic and thermodynamic study of the bacteriorhodopsin photocycle over a wide pH range. Biophys J, 1998, **75**: 3110～3119

10 Oesterhelt D, Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. Methods Enzymol, 1974, **31** (Pt A): 667～678

11 Muller D J, Schabert F A, Buldt G, *et al*. Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. Biophys J, 1995, **68**: 1681～1686

12 Muller D J, Sass H J, Muller S A, *et al*. Surface structures of native bacteriorhodopsin depend on the molecular packing arrangement in the membrane. J Mol Biol, 1999, **285** (5): 1903～1909

13 Muller C, Buldt G, Dencher N A, *et al*. Reversible loss of crystallinity on photobleaching purple membrane in the presence of hydroxylamine. J Mol Biol, 2000, **301** (4): 869～879

The Direct Observation on The Surface Structure Change of Purple Membrane Induced by High pH Using Atom Force Microscope*

Chen De-Liang[1], Li Hui[2], Han Bao-Shan[2], Xu Bing[1], Hu Kun-Sheng[1]**

([1] *Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, China;

[2] *Institute of Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, China)

Abstract The direct information of the surface structure change of purple membrane under high pH was obtained. The UV-VIS spectra showed that BR was totally denatured and lost its retinal under the pH 12.6. It was found by atom force microscope that the crystalline lattice of purple membrane was broken down at this pH. The typical and non-typical "Island" structures emerged as the BR molecules assemble irregularly in purple membrane.

Key words bacteriorhodopsin, purple membrane, pH, "Island" structure, atom force microscope

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30170235), The Key Program from The Chinese Academy of Science (KJCX1-SW) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (G199801-0102).

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

Received: July 28, 2003 Accepted: August 5, 2003