

## 胍对蓝膜的影响

苏涛 张悦 扈建琦 罗志勇 胡坤生\*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 利用紫外可见吸收光谱和动力学光谱法研究了无水胍对蓝膜的影响, 研究表明: 无水胍可以使蓝膜转化为紫膜, 同时光循环也得到恢复, 但是光循环中间体  $M_{412}$  的衰减加快, 这与金属阳离子加入到蓝膜溶液中时的现象是完全不同的(这个过程中  $M_{412}$  的衰减是减慢的). 同时研究了 pH 和温度对无水胍与蓝膜之间相互作用的影响. 在无水胍加入到蓝膜溶液中时, 重组反应的灵敏度是 pH 和温度依赖的. 在 pH 4.8 到 pH 2 之间, 灵敏度随酸性的增加而降低. 在 20~40°C 之间, 无水胍与蓝膜溶液的反应灵敏度随着温度的升高而降低.

**关键词** 蓝膜(BM), 紫膜(PM), 无水胍, 光循环中间体( $M_{412}$ )

**学科分类号** Q6

紫膜 (PM) 是极端嗜盐菌 *Halobacterium halobium* 原生质膜的一部分. 紫膜中只含有唯一的一种蛋白质, 称为细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR), 它以三体形式二维六角形晶格排列在天然紫膜中<sup>[1]</sup>. 紫膜在光照下, 进行特定的光循环, 利用光能驱使质子跨膜转移, 形成电化学梯度, 细胞利用储存于梯度中的能量合成 ATP 和完成其他需要能量的生命功能<sup>[2-3]</sup>. 它是最典型的高效离子转运蛋白之一, 也是 7 个  $\alpha$  螺旋跨膜蛋白家族的基本原型, 其结构和功能研究对这类膜蛋白有借鉴和指导作用.

在低 pH、严格去离子、原位突变等方法下, 紫膜会转化为蓝膜(BM)<sup>[4]</sup>. 除颜色改变之外, 蓝膜不再以与紫膜相同的方式进行光循环, 并且完全失去了质子泵功能<sup>[5]</sup>. 过去的研究表明, 用相当多种类的其他金属离子, 甚至有机阳离子, 都可以使蓝膜恢复为紫膜, 并恢复紫膜原有的光循环和质子泵功能<sup>[6-8]</sup>. 有机阳离子与蓝膜的作用文献比较少, 而且胍对蓝膜的影响前人没有研究过.

无水胍本身不带阳离子, 但它溶于水后会发生如下水解反应:

$$2\text{H}_2\text{NNH}_2 + 3\text{H}_2\text{O} = [\text{H}_2\text{NNH}_3]^+ + [\text{H}_3\text{NNH}_3]^{2+} + 3\text{OH}^-$$

水解后能够产生一价和二价阳离子.

本文中我们研究了无水胍对蓝膜的影响, 无水胍可以使蓝膜恢复为紫膜, 并恢复原有的紫膜的光

循环方式. 同时研究了 pH 和温度对无水胍与蓝膜作用的影响.

### 1 材料与方法

紫膜从嗜盐菌(*Halobacterium halobium*) R1M1 菌种中按标准方法制备<sup>[9]</sup>, 纯化后样品溶解于去离子水中并保存于 4°C 冰箱中. 蓝膜通过阳离子交换 (Dowex 50W) 而获得去离子蓝膜, 样品溶解于双蒸水并保存在 4°C 冰箱中, 储存和使用过程中须特别小心, 避免其他物质的污染. 所有的样品都是光适应的. 蓝膜和紫膜的吸收光谱在 Hitachi U-2010 紫外/可见光谱仪上测得, 蓝膜和紫膜在对应的吸收峰分别为 603 nm 和 568 nm, 对应的消光系数分别为  $60\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $63\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ <sup>[10]</sup>. 蓝膜和紫膜的浓度均为  $5\ \mu\text{mol/L}$ , 它们的浓度均由相对应的光适应状态下最大吸收峰的峰值决定. 在吸收光谱中我们采用 630 nm 处吸光度的差值来作为衡量的参数, 因为在加入无水胍至蓝膜溶液中时这个波长的吸光度变化是最明显的. 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上监测 (激发光波长为 570 nm, 寿命为 100 ms, 检测波长为 412 nm)<sup>[11]</sup>. 无水胍由中国科学院生物物理研究所

\* 通讯联系人. Tel: 010-64888580, E-mail: huks@ibp.ac.cn

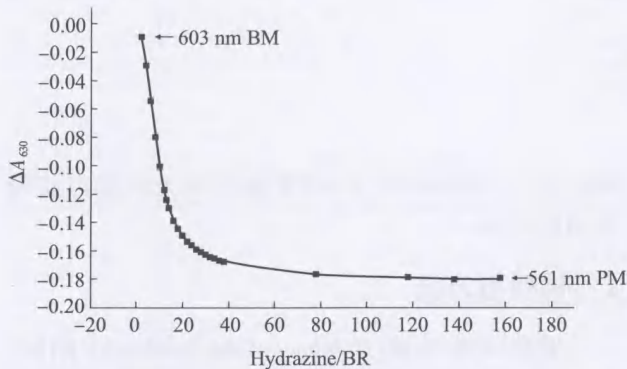
收稿日期: 2006-08-31, 接受日期: 2006-11-02

罗志勇研究员提供, 纯度为98%.

## 2 结 果

### 2.1 紫外可见吸收光谱结果

图 1 显示的是在  $5 \mu\text{mol/L}$  的蓝膜溶液中加入相应浓度的无水胍时,  $630 \text{ nm}$  处吸光度的差值(加入无水胍后样品的吸光度减去蓝膜溶液的吸光度), 随胍与蓝膜浓度比值变化的曲线. 蓝膜的最大吸收峰为  $603 \text{ nm}$ , 在加入无水胍后, 最大吸收峰明显蓝移, 当无水胍与 BR 的摩尔比大于 17 时, 样品溶液由蓝色变为紫色, 加入过量后, 最终特征吸收峰为  $561 \text{ nm}$ . 以上的吸收光谱实验说明, 在加入无水胍到蓝膜溶液中时, 视黄醛分子所处的微环境被明显扰动.

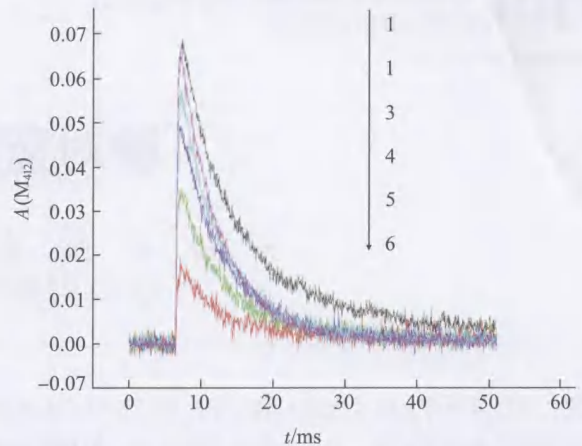


**Fig. 1 Absorbance difference of the blue membrane at  $630 \text{ nm}$ , as a function of added hydrazine per BR, showing the blue-to-purple conversion**

The BR concentration is  $5 \mu\text{mol/L}$ ; pH 4.8; temperature  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

### 2.2 闪光动力学光谱结果

图 2 显示的是天然紫膜, 以及加入无水胍到蓝膜时光循环中间体  $M_{412}$  的衰减动力学曲线. 蓝膜在光激发后, 不存在光循环中间体  $M_{412}$ , 数据显示, 蓝膜有少量的  $M_{412}$  (数据未列出), 是因为蓝膜中可能掺杂有少量的紫膜. 从图 2 中我们可以看出, 天然紫膜的光循环中间体  $M_{412}$  产率比较高, 而加入过量无水胍到蓝膜溶液时, 重组的紫膜光循环中间体  $M_{412}$  的产率与天然紫膜相近, 而衰减寿命明显缩短(例如: 天然紫膜的  $M_{412}$  中间体慢成分的半衰期寿命  $t_{1/2}^s$  为  $6.22 \text{ ms}$ , 快成分的半衰期寿命为  $4.05 \text{ ms}$ , 而当加入的无水胍与蓝膜的摩尔比为  $27:1$  时, 相应的慢成分和快成分的半衰期寿命分别为  $5.39 \text{ ms}$  和  $3.32 \text{ ms}$ ). 这说明加入无水胍到蓝膜溶液中时, 重组后的紫膜与天然紫膜一样具有光循环功能, 只是光循环中间体衰减的寿命加快.

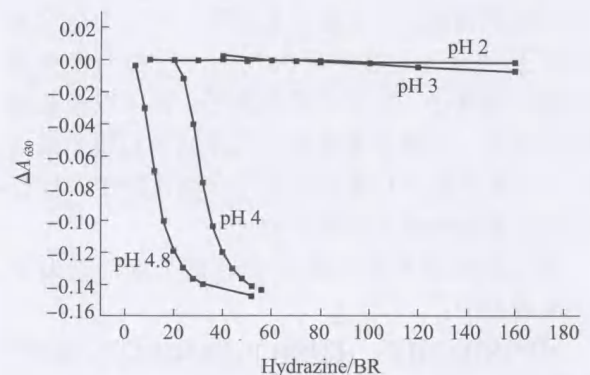


**Fig. 2 Flash-induced kinetics spectra of the intermediate  $M_{412}$  was monitored as hydrazine was added to blue membrane solution**

The BR concentration in natural purple membrane and blue membrane solution are both  $5 \mu\text{mol/L}$ ; temperature  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ . 1: Natural purple membrane; 2: 27/1 (hydrazine/BR); 3: 20/1 (hydrazine/BR); 4: 17/1 (hydrazine/BR); 5: 10/1 (hydrazine/BR); 6: 3/1 (hydrazine/BR).

### 2.3 蓝膜转化为紫膜的 pH 依赖关系

无水胍与蓝膜溶液的反应有着 pH 依赖关系. 图 3 显示的是制备的正常蓝膜 (pH 值为 4.8) 在 pH 减小时波长  $630 \text{ nm}$  处吸光度的差值 (加入无水胍后样品的吸光度减去蓝膜溶液的吸光度), 随胍与蓝膜浓度比值变化的曲线. 从图 3 中我们看到, pH 为 4.8 的蓝膜, 加入无水胍时, 使蓝膜的吸光度发生 50% 变化时, 胍与蓝膜的浓度比约为 12, 而 pH 为 4 时, 需要的无水胍与蓝膜的浓度比为 33, pH 为 3 和 2 时, 即便加入大量的无水胍, 吸光度均无很明显的变化. 由以上的实验结果说明, 在无水胍加入到蓝膜溶液中时, 重组反应的灵敏度是 pH 依



**Fig. 3 Absorbance difference of the purple membrane at  $630 \text{ nm}$  as a function of added hydrazine per BR as the pH shifted from 4.8 to 2**

The BR concentration is  $5 \mu\text{mol/L}$ ; temperature  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

赖的, 在 pH 4.8 到 pH 2 之间, 灵敏度随酸性的增加而明显降低。

#### 2.4 蓝膜转化为紫膜的温度依赖关系

图 4 显示的是蓝膜 (pH 值为 4.8) 在温度发生变化时波长 630 nm 处吸光度的差值 (加入无水胼后样品的吸光度减去蓝膜溶液的吸光度) 随胼与蓝膜浓度比值变化的曲线。同上面 pH 中的分析类似, 我们可以发现, 蓝膜溶液温度在 20~40℃ 之间, 无水胼与蓝膜溶液的反应灵敏度随着温度的升高而降低。

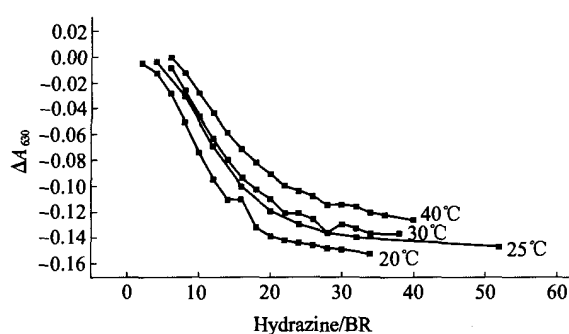


Fig. 4 Absorbance difference of the purple membrane at 630 nm as a function of added hydrazine per BR as the temperature shifted from 20 to 40℃  
The BR concentration is 5 μmol/L; pH 4.8.

### 3 讨 论

我们的研究结果证明, 如同一些金属阳离子一样, 无水胼水解后也能使蓝膜转变为紫膜, 同时紫膜的功能也得到恢复。在加入无水胼至蓝膜溶液的过程中, 一系列的光谱曲线在波长 578 nm 处存在一个等吸收点(数据未列出), 说明在转化过程中, 只存在 2 种含生色团的成分, 也即蓝膜和紫膜。在重组过程中, 颜色和功能虽然得到恢复, 但是光循环中间体  $M_{412}$  的衰减明显加快。在紫膜的光循环过程中,  $M_{412}$  态的衰减对应着质子从 Asp96 转移到希夫碱的过程, 而两者之间存在约 1 nm 的距离, 在两者之间是疏水性很强的区域, 在光循环的过程由于水分子进入这个区域形成氢键而促成了质子在两者之间的转移<sup>[2]</sup>。由于无水胼的分子尺度同水分子相近, 也同样具有很强的成氢键的能力, 类似一个小的表面活性剂分子, 因此我们可以设想, 在光循环过程中, 无水胼水解后产生的离子可能进入到 Asp96 与希夫碱之间的疏水区域, 它的进入无疑会增加疏水区域的亲水性, 甚至有可能亲自介入到质子传递的途径当中, 这样就有利于质子的传递, 从

而加快  $M_{412}$  态的衰减。而金属阳离子重组的紫膜与天然紫膜相比, 它的  $M_{412}$  态的衰减是减慢的。这与无水胼重组的紫膜是完全不同的。这说明, 无论是金属阳离子还是无水胼, 它们重组的紫膜虽然颜色和光循环均得到恢复, 但是重组的紫膜跟天然紫膜并非完全一样。

无水胼与蓝膜的作用存在着 pH 依赖关系(蓝膜在 pH 4.8 与 pH 2 范围内, 吸收曲线不变化), 在 pH 4.8 与 pH 2 范围内, 随着 pH 的降低, 反应的灵敏度明显降低, 虽然酸性更强的溶液有利于无水胼的水解, 但是这个作用在蓝膜转化为紫膜的过程中无疑显得效果甚微。由于紫膜从 pH 4.8 降至 pH 2 的过程中, 就伴随着紫膜至蓝膜的转化。因而在酸性很强的蓝膜溶液中, 即便加入无水胼可以使蓝膜转化为紫膜, 但是溶液的低 pH 也会使这个过程逆转, 因而我们会发现在低 pH 时加入无水胼, 反应的灵敏度很低。制备 pH 高于 4.8 的蓝膜有一定困难, 因为调节 pH 时需要加入带金属离子的碱性溶液, 而溶液中所带的金属阳离子会使蓝膜转化为紫膜, 因而在蓝膜溶液的 pH 值高于 4.8 时, 由于伴随这离子产生的蓝膜至紫膜的转化, 灵敏度已没有可比性。

无水胼与蓝膜的作用也存在着温度依赖关系, 在 20 至 40℃ 之间, 无水胼与蓝膜溶液的反应灵敏度随着温度的升高而降低。我们认为, 这个现象的原因主要是因为温度影响了无水胼的水解, 由于无水胼的水解反应为放热反应, 温度的升高导致了反应往反应物方向进行, 从而导致了溶液中能使蓝膜转化为紫膜的一价和二价的阳离子的减少, 这也就是为什么温度的升高降低了反应的灵敏度。在温度低于 20℃ 时, 反应的灵敏度也降低(数据未列出), 这可能是因为低温下, 离子在溶液中的扩散速度变低所造成的。因此综合无水胼的水解和离子的扩散, 20℃ 是无水胼与蓝膜反应的最佳灵敏度。

### 4 结 论

a. 无水胼水解后可以使蓝膜恢复为紫膜, 同时光循环得到恢复, 但是无水胼重组的紫膜与天然紫膜相比, 它的光循环中间体  $M_{412}$  的衰减加快, 这与金属阳离子重组的紫膜是完全不一样的。

b. 在无水胼加入到蓝膜溶液中时, 重组反应的灵敏度是 pH 依赖的。在 pH 4.8 到 pH 2 之间, 灵敏度随酸性的增加而降低。

c. 在无水胼加入到蓝膜溶液中时, 重组反应的

灵敏度是温度依赖的. 在 20 至 40°C 之间, 无水胼与蓝膜溶液的反应灵敏度随着温度的升高而降低.

### 参 考 文 献

- Oesterhelt D, Stoeckenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**: 2853~2857
- Lanyi J K. Proton translocation mechanism and energetics in the light-driven pump bacteriorhodopsin. *Biochem Biophys Acta*, 1993, **1183**: 241~261
- Stoeckenius W. The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in an archaeobacterium. *Trends Biochem Sci*, 1985, **10**: 483~486
- Birge R R, Gillespie N B, Izaguirre E W, *et al.* Biomolecular electronics: protein-based associative processors and volumetric memories. *J Phys Chem B*, 1999, **103** (47): 10746~10766
- Chang C H, Chen J G, Govindjee R, *et al.* Cation binding by bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 396~400
- Jonas R, Ebrey T G. Binding of a single divalent cation directly correlates with the blue-to-purple transition in bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 149~153
- El-sayed M A, Yang D, Yoo S -K, *et al.* The effect of different metal cation binding on the proton pumping in bacteriorhodopsin. *Isr J Chem*, 1995, **35**: 465~474
- Ariki M, Lanyi J K. Characterization of metal ion-binding sites in bacteriorhodopsin. *J Biol Chem*, 1986, **261**: 8167~8174
- Lanyi J K, Schobert B. Crystallographic structure of the retinal and the protein after deprotonation of the Schiff base: the switch in the bacteriorhodopsin photocycle. *J Mol Biol*, 2002, **321** (4): 727~737
- Fu X, Brossler S, Ottolenghi M, *et al.* Titration kinetics of Asp85 in bacteriorhodopsin: exclusion of retinal pocket as the color-controlling cation binding site. *FEBS Lett*, 1997, **416**: 167~170
- Szundi I, Stoeckenius W. Effect of lipid surface charges on the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 3681~3684
- Lanyi J K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochem Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2006, **1757**: 1012~1018

## The Effect of Hydrazine on Blue Membrane

SU Tao, ZHANG Yue, HU Jian-Qi, LUO Zhi-Yong, HU Kun-Sheng\*

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** The effect of hydrazine on blue membrane was investigated by the UV/VIS absorption spectrum technique and the flash photolysis technique, the results show that: hydrazine can convert blue membrane to purple membrane and the photocycle returns, but the rate of decay of photocycle intermediate ( $M_{412}$ ) quickens, this phenomenon is not seen when metal cations are added to blue membrane solution (the rate of decay of photocycle intermediate slows). At the same time, the effect of pH and temperature on the interaction between hydrazine and blue membrane was investigated. When hydrazine was added to blue membrane solution, the sensitivity of the reaction is pH and temperature dependent. Over the pH range (2~4.8), the sensitivity of the reaction lowers with the increase of the acidity. Over the temperature range (20~40°C), the sensitivity of the reaction lowers with the increase of the temperature.

**Key words** blue membrane(BM), purple membrane(PM), hydrazine, photocycle intermediate ( $M_{412}$ )

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

Received: August 31, 2006 Accepted: November 2, 2006