

不同价金属离子介导的蓝膜到紫膜转换的光谱分析

徐兵^{1*}, 韩金多¹, 余桴², 张勇¹, 胡坤生^{3*}

1. 上饶师范学院生命科学系, 江西 上饶 334001
2. 吉林大学物理学院, 吉林 长春 130012
3. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

摘要 研究了 Na^+ , Mg^{2+} 和 Tb^{3+} 三种不同价金属离子介导的蓝膜到紫膜转换的可见差光谱, M_{412} 产率和 M_{412} 衰减寿命。结果表明, 他们的转换能力有很大差别, 三种不同离子介导的吸收变化的中间点的浓度比 $\text{Na}^+ : \text{Mg}^{2+} : \text{Tb}^{3+}$ 为 1: 2.5: 650, 同时, 在蓝膜到紫膜转换中, 其 540 nm 的吸收变化的曲线与 M_{412} 产率变化的曲线相符合。当更多的 Tb^{3+} 加入时, Tb^{3+} 介导的重组紫膜的 M_{412} 衰减寿命有明显延长。而对另两种离子, 加入更多时不延长 M_{412} 衰减寿命。这些结果表明, 不同价金属离子与紫膜有不同结合方式。

关键词 紫膜; 蓝膜; 金属离子; 光谱分析

中图分类号: Q632 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)05-1388-05

引言

细菌视紫红质(bR)是菌种 *Halobacterium halobium* 紫膜(pM)中唯一的-种视黄醛蛋白质, 其功能是光驱动的质子泵, 提供在缺氧条件下 ATP 合成的能量供给^[1]。光激发时, bR 分子进行光循环并伴随着质子从原生质边到紫膜外侧的质子转运^[2,3]。

天然 pM 通常含有 1 mol 的钙和 4 mol 的镁于 1 mol 的 bR 中^[4], 移走 75% 的内源脂分子导致从紫色(568 nm)到蓝色(603 nm)的颜色转变^[5], bR 的光化学循环改变, 失去质子泵功能和产生 M_{412} 光循环中间体^[6]。因为在蓝膜(bM)中 ASP-85 处于质子化, bM 的希夫碱基不可能在光照时产生去质子化, 所以质子的转运不能发生^[7]。有不少方式可以促使紫膜转变成蓝膜, 如酸化^[8-10], 去离子^[11], 电渗析, 高温, 定点基因突变^[12], 用去离子水清洗干净^[4], 加入疏水阴离子和特定金属离子^[13,14]。去离子的 bM 也能通过加入不同种阳离子, 甚至疏水有机离子能重组成 pM^[15]。

离子结合的精确位置以及他们是如何在 pM 的结构和功能中起重要作用的, 这是人们特别感兴趣的问题。X 衍射(从 3.5 Å 到 1.43 Å)没有给出这些离子的位点^[16-18]。目前, 有两种观点试图定位金属离子的结合位点: 特异性与非特异性结合模型。前者认为: 高亲合位点和低亲合位点存在于蓝膜

至紫膜的转换中, 仅仅位于视黄醛口袋附近的高亲合位点与颜色的位移有关^[19,21]。后者认为, 金属离子是自由散布方式结合在紫膜表面双层, 从而改变表面电位和局部质子浓度, 进而影响 ASP-85 的质子状态, 促使蓝膜至紫膜的转变^[15, 22]。

在本文章中, 我们研究了不同价金属离子对蓝膜转变成紫膜的作用, 分析了 bM 到 pM 转变过程中的可见差谱, M_{412} 产率和 M_{412} 衰减寿命。研究结果表明, 不同价金属离子与 pM 中的 bR 有不同的结合方式, 单价的 Na^+ 自由散布在膜表面, 可以很好的用 Guoy-Chapman 理论的双电层解释, 二价 Mg^{2+} 离子和三价 Tb^{3+} 定点结合在 pM, Mg^{2+} 至少有一个内部的特定结合位点; Tb^{3+} 仅仅结合于膜的表面, 特异地结合于膜磷脂分子头部基团或 bR 表面的羧基部。

1 材料和方法

紫膜按参考文献[23]从 *Halobacterium Salinarium* R₁M₁ 分离和提纯。在 Hitachi U-3000 光谱仪上测定吸收光谱, pM 中光适应态 bR 的浓度由 568 nm 的吸收光谱测定, 消光系数 $\epsilon = 63\,000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。蓝膜的浓度由 603 nm 吸收测定, 消光系数 $\epsilon = 60\,000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[24]。

去离子蓝膜由紫膜通过阳离子交换树脂 Dowex AG-50W 柱制备。制备好的蓝膜保存在干净的塑料制品中, 避免

收稿日期: 2010-04-14, 修订日期: 2010-07-26

基金项目: 江西省自然科学基金项目(0630106)和科技部“973”项目(2007CB935703)资助

作者简介: 徐兵, 1969年生, 上饶师范学院生命科学系副教授 e-mail: xubng@126.com

* 通讯联系人 e-mail: huks@sun5.ibp.ac.cn

金属离子的污染。蓝膜样品的 pH 是 5.5 ± 0.1 , Na^+ , Mg^{2+} 和 Tb^{3+} 的化合物为氯化物。

闪光解动力学光谱是在本实验室自制的仪器上测定的^[25], 实验数据根据 Govindjee 的方法来分析^[26]。光适应 bR 通过脉冲光激发, 最后的曲线是由 8 次脉冲激发得到的曲线平均后得出。10 s 时间内完成数据的收集。所有实验是在室温下进行(15 ± 1) °C 的。

2 实验结果

2.1 不同价的金属离子对蓝膜转变成紫膜过程中的可见光谱的分析

bM 转变成 pM 是由 540 nm 的差光谱的相对值来表示的, 图 1 表示了不同价金属离子在蓝膜转变成紫膜过程的差光谱, 每个 bR 需 650 个 Na^+ 才能到达吸收变化的中点, 即一半蓝膜转变为紫膜[图 1(a), (b)]。当每个 bR 加入 6 400 个 Na^+ 时, 吸收不再变化。对于 Mg^{2+} , 2 5 个 Mg^{2+} 可达变化中点, 8 5 个 Mg^{2+} 不再变化[图 1(c), (d)], 1 个 Tb^{3+} 可达变化中点, 3 5 个 Tb^{3+} 不再变化[图 1(e), (f)]。

上述结果表明, 这些不同价金属离子均能把蓝膜转变为紫膜。但对于不同价离子转变成一半紫膜所需的离子的比率是 1: 2.5: 650。他们的转换能力有很大差别, 先前发表的文献也指出, 一价 Na^+ 和 K^+ 的转换能力远不如二价 Mg^{2+} , Ca^{2+} 及三价离子高^[4, 27]。

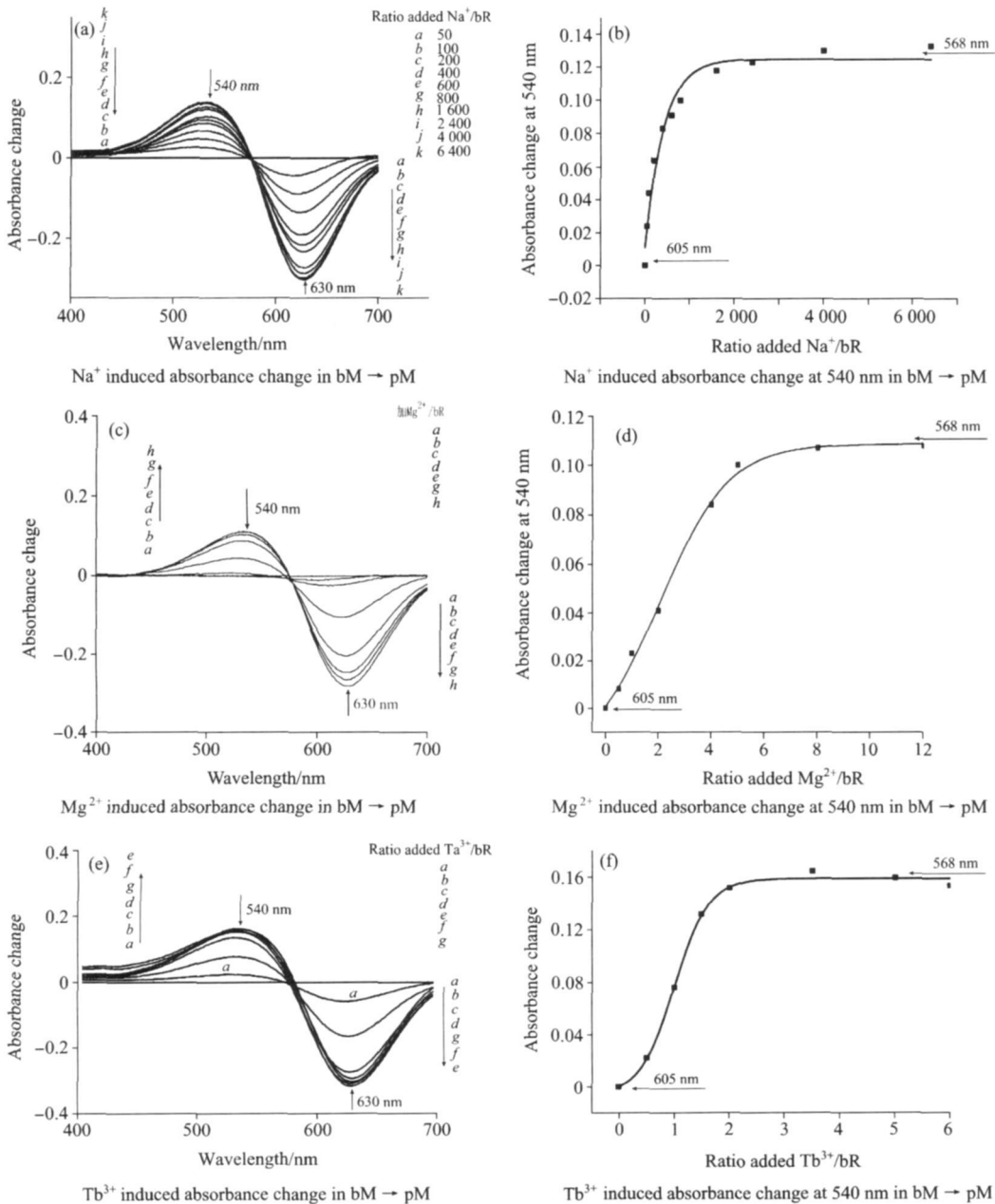


Fig 1 Difference spectra analysis of blue to purple transition upon Na^+ , Mg^{2+} , Tb^{3+} addition

2.2 不同价金属离子对蓝膜转变为紫膜过程中的 M_{412} 产率和衰减寿命的影响

在蓝膜转变成紫膜开始前, 大约有通常紫膜的 1/30 的紫膜存在于蓝膜之中, 衰减寿命为 23 ms, 有两种可能存在, 第一种可能是蓝膜制备过程中, 仍有少量紫膜残留在样品中, 所以能测量到光循环中 M 态中间体的微小信号。第二种可能是, 当红光激发时, bM 产生不同于 pM 的光循环, 伴随着一个长寿命的 9 顺中间体出现, 其吸收峰值是 490 nm^[28], 当光激发时, 在 412 nm 处会有 9 顺中间体的微弱吸收信号。由于 9 顺中间体的低量子效率, 小的消光系数和长寿命, 所以第一种可能, 即残留紫膜的可能性会更大些。

当 Na^+ 与 bR 分子比为 600 时, 蓝膜转变成紫膜后的

M_{412} 产率达到最后全部转换成紫膜是的产率的一半[图 2(a)]。当 Na^{2+} 与 bR 分子比小于 700 时, M_{412} 衰减寿命快速变化[图 2(b)], 当 Mg^{2+} 与 bR 分子比为 2.6 时, 蓝膜转换成一半紫膜[图 2(c)], 当 Mg^{2+} 与 bR 分子比小于 3.5 时, M_{412} 衰减寿命快速变化[图 2(d)], 当更多加入 Mg^{2+} 时, M_{412} 衰减寿命不再明显变化, 最终寿命也是 10.5 ms。当 Tb^{3+} 与 bR 分子比为 1.2 时, 蓝膜转换成一半紫膜[图 2(e)], 当 Tb^{3+} 与 bR 分子比为 4 时, 其产率达正常紫膜的值, 当比值小于 1 时, M_{412} 衰减寿命迅速变化[图 2(f)], 但是当 Tb^{3+} 浓度进一步增加时, 衰减寿命明显延长。当比率为 3.5 时, 寿命延长了 69%, 当比率为 7 时, 寿命延长 85%。

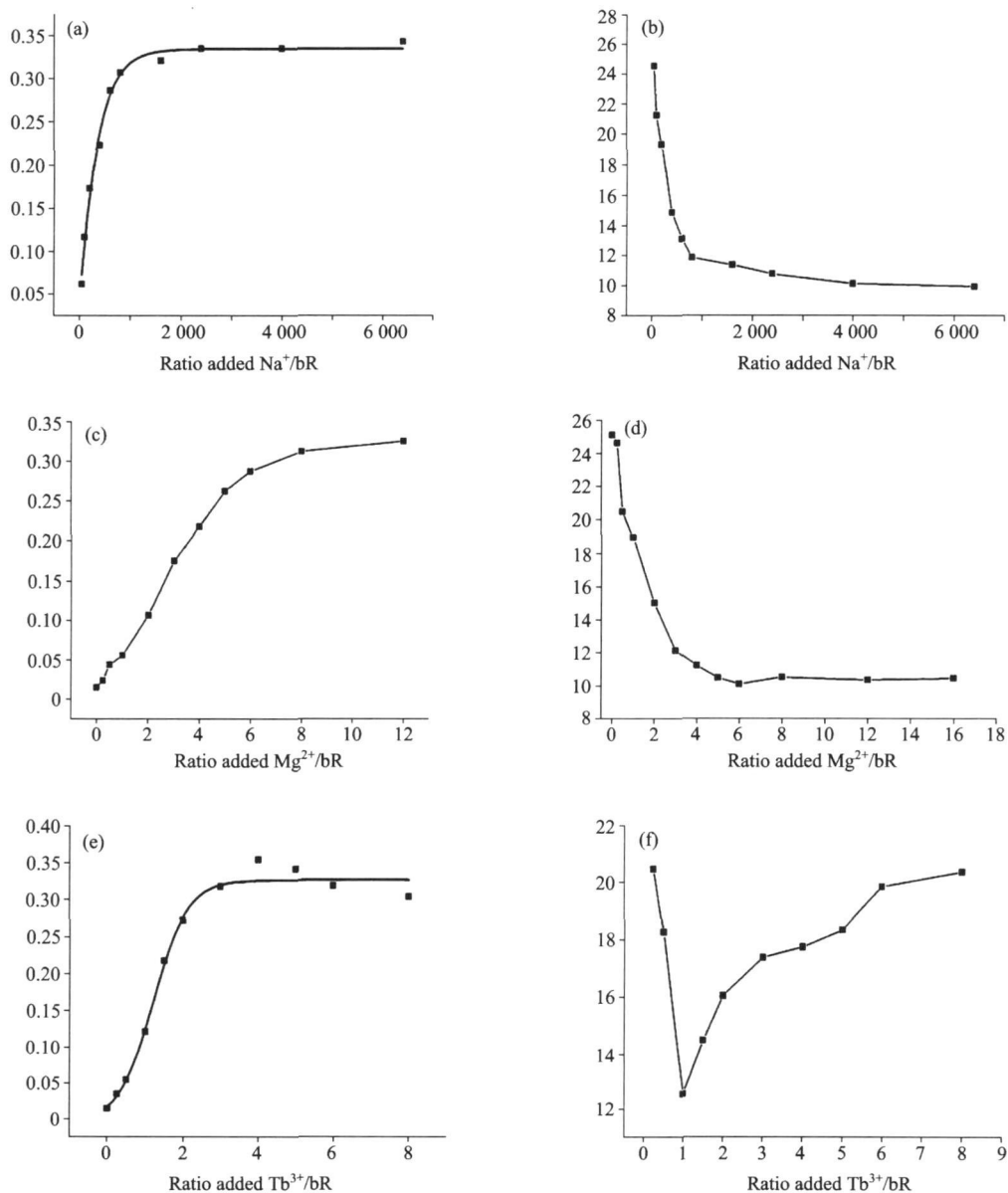


Fig 2 Changes of M_{412} yield and M_{412} decay lifetime in blue to purple transition induced by metal ions

3 讨论

图 1(a, c, e) 反映的是 540 nm 的吸收变化曲线, 这与图 2(a, c, e) 反映的 M_{412} 产率变化的曲线相一致。在 bM 转变成 pM 中, bR 吸收峰 568 nm 的出现, 也伴随着 M_{412} 中间体的产生, 这说明 bR 分子的结构和功能是相对应的。

有意义的是图 1(d), (f) 和图 2(c), (e) 的曲线是 S 形状的, 而图 1(b) 和图 2(a) 则不是 S 形状的。S 形曲线表明结合不是非特异性的, 包含有特异性结合位点。这说明不同价离子在 pM 中存在着不同的结合机理。

当加入金属离子时, 膜表面的 pH 值是缓慢上升的, 表面膜 pH 则控制 Asp-85 的离子状态, 表面膜 pH 的 S 型变化很好解释了上面所述的 S 型曲线^[21]。去离子膜的表面 pH 低于 Asp-85 的 PK_a 值, 大概处于 1 和 1.5 之间^[29], 随着表面 pH 增加, Asp-85 的去质子化增加, 则其曲线是 S 型的。同时, 由于 M_{412} 的活性与 Asp-85 去质子化相一致, M_{412} 产率变化的曲线也是 S 型的, 它与 540 nm 吸收变化的 S 型相一致。

离子的有效静电位($Z^+ \cdot r^{-1}$) 可用负膜表面的亲和力表示, 静电位越高, 离子结合到负的膜表面越强。 Na^+ , Mg^{2+} 和 Tb^{3+} 的相对静电位比是 1.02, 5.73 和 8.26。根据这些比值, 单价和二价, 三价离子的重组能力不会有很大差别, 所以仅仅用静电位是很难解释他们之间的明显重组能力的差别的。相反, 根据 Gouy-chapman 理论^[30], 重组能力是主要与金属离子的价态有关的, 三价、二价、一价离子对于表面膜电荷的相对屏蔽能力比是 $9.633\sigma^2: 85\sigma: 1\sigma$ (σ 是表面膜的电荷密度, 单位 $C \cdot m^{-2}$; 温度 22 °C)。本文中, Tb^{3+} , Mg^{2+} 和 Na^+ 对于蓝膜到紫膜的重组能力之比是 1: 2.5: 650。这也很难解释他们之间的重组能力之间的差别。这表明, 不同价离子存在不同重组的机理。

单价 Na^+ 有一种不同于 Mg^{2+} 和 Tb^{3+} 的重组机理。 Na^+ 是非特异性地结合于膜表面, 不是依据 Guoy-Chapman 理论的定点特异结合。 Na^+ 作为扩散离子自由移动在膜表面, 被膜静电位控制。同时 Na^+ 是完全水合的, Na^+ 的静电位不够强, 所以只能作为扩散离子自由的结合到膜表面。随着 Na^+ 浓度增加, 负的膜表面电荷密度下降, 表面 pH 则增加。最

后这变化导致质子化的 Asp-85(bM) 变成去质子化, 并发生颜色的转变。 Mg^{2+} 和 Tb^{3+} 也导致 Asp-85 的去质子化, 但与 Na^+ 不同, 他们仅仅影响表面 pH。

Mg^{2+} 和 Tb^{3+} 使 bM 重组成 pM 的量远远少于 Na^+ 。可能因为这些离子是定点结合于紫膜或 bR 分子的配体上, 而不是自由地结合于膜表面。离子与配体相互作用的强度足够部分或完全置换结合水, 这样定点结合离子可以部分或完全脱水。 Tb^{3+} 结合到 bR 时, 失去 4 个水分子^[31]。

一些研究也指出, Mg^{2+} , Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 在 bR 中存在着高的和低的亲和位点^[19, 26, 32, 33], 最近 ^{13}C -NMR 研究认为, 二价离子的一个位点是位于 Ala-196 附近的 F-G 螺旋段上^[34]。二价离子能够结合到 bR 的内部, 导致 Asp-85 的去质子化, 从而改变颜色。某些 Mg^{2+} 也可能结合到 pM 的特定表面位点, 如特定的羧基基团。

Tb^{3+} 具有很强的重组能力, 还能明显延长 M_{412} 的衰减寿命, 这不同于 Na^+ 和 Mg^{2+} 。 Tb^{3+} 具有不同于 Na^+ 和 Mg^{2+} 的特异性结合的机理, 具有比 Mg^{2+} 更强的结合于磷脂头部的亲和力。研究表面 Tb^{3+} 可以和 PO_4^{2-} 头部基团形成二合复合体, 而 Ca^{2+} 则不能形成复合体^[35]。FTIR 和 NIR 研究 Yb^{3+} VSB 光谱表明镧系离子也可结合于膜脂的部位, 对其蛋白和脂的影响要比 Ca^{2+} 更大。M^L-ssbauer 光谱研究表明, Fe^{3+} 直接结合与 pM 的磷脂或蛋白部位, Fe^{2+} 则结合 bR 的羧基基团。 Fe^{3+} 重组的 pM 其 M_{412} 衰减寿命延长一个量级, 而 Fe^{2+} 则不延长寿命。这表明, Fe^{3+} 结合于 Asp-96 附近, 这是质子从胞内摄取的部位^[36] 另外二价离子倾向结合于蛋白外螺旋部位或 Asp 和 Glu 位于的内螺旋部分和 COO^- 基团结合^[37, 38]。 Tb^{3+} 加入到 pM 时, Tb^{3+} 本身的荧光没有变化, 说明 Tb^{3+} 没有进入 bR 的内部, 我们认为, Tb^{3+} 可与膜表面的磷脂的氧原子或氨基酸残基的羧基结合, 导致了 bR 构象变化。而 Na^+ 和 Mg^{2+} 则不可能产生这变化。同时 Tb^{3+} 可使质子化的 Asp-96 变成去质子化状态。质子化的 Asp-96 的缺失将导致 M_{412} 寿命的延长, 因 Asp-96 从胞内摄取质子, 并把质子传给去质子化的希夫碱基。研究表面 Asn 取代的 Asp-96 定点突变将导致 M_{412} 衰减寿命的延长, 因此 Asp-96 是质子摄取通道上的重要基团^[39]。

References

- [1] Stoeckenius W, Lozier R H, Bolgomolni R A. 1979, 505: 215.
- [2] Oesterhelt D. Curr. Opin. Struct. Biol., 1998, 8(4): 489.
- [3] Lanyi J K, Hartmut Luecke. Curr. Opin. Struct. Biol., 2001, 11: 415.
- [4] Chang Chung-ho, Chen Jiang-guo, Govindjee R, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82: 396.
- [5] Griffiths J A, King J, Browner R F, et al. J. Chem. Phys., 1996, 100: 929.
- [6] Kimura Y, Ikegami A, Stoeckenius W. Photochem. Photobiol., 1984, 40: 641.
- [7] Moltke S, Heyn M P. Biophys. J., 1995, 69: 2066.
- [8] Mowery P C, Lozier R H, Chae Q, et al. Biochemistry, 1979, 18: 4100.
- [9] Tsuji K, Rosenheck K. FEBS Lett., 1979, 98: 368.
- [10] Kobayashi T, Ohtani H, Iwai J I, et al. FEBS Lett., 1983, 162: 197.
- [11] Kolodner P, Lukashev E P, Ching Y C, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93(21): 11618.
- [12] Jang D, MA, El-Sayed, Stern L J, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 4103.

- [13] Dunach M, Seigneur M, Rigaud J L, et al. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 17378.
- [14] Wang G, Hu K S. *J. Photochem Photobiol. B*, 2001, 60(2-3): 97.
- [15] Fu X, Bressler S, Ottolenghi M, et al. *FEBS Lett.*, 1997, 416: 167.
- [16] Grigorieff N, Ceska T A, Downing K H, et al. *J. Mol. Biol.*, 1996, 259(3): 393.
- [17] Luecke H, Schobert B, Richter H-T, et al. *J. Mol. Biol.*, 1999, 291(4): 899.
- [18] Lanyi J, Schobert B. *J. Mol. Biol.*, 2002, 321(4): 727.
- [19] Zhang Y N, Sweetman L L, Awad E S, et al. *Biophys. J.*, 1992, 61: 1201.
- [20] Yang D, El-Sayed M A. *Biophys. J.*, 1995, 69: 2056.
- [21] Jonas R, Ebrey T G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88(1): 149.
- [22] Gyorgy Varo, Leonid S, Lanyi J K. *Biophys. J.*, 1999, 76: 3219.
- [23] Xu Bing, Chen De-liang, Hu Kun-sheng. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2002, 29(5): 827.
- [24] Rehorek M, Heyn M P. *Biochemistry*, 1979, 18: 4977.
- [25] Jiang Q X, Hu K S, Shi H. *Photochem. Photobiol.*, 1994, 60: 175.
- [26] Govindjee R, Ebrey T G, Crofts A R. *Biophys. J.*, 1980, 30: 231.
- [27] Ariki M, Lanyi J. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(18): 8167.
- [28] Pande C, Callender R H, Chang G-H, et al. *Biophys. J.*, 1986, 50: 545.
- [29] Szundi I, Stoeckenius W. *Biophys. J.*, 1989, 56: 369.
- [30] McLaughlin S. *Curr. Top. Membr. Trans.*, 1977, 9: 71.
- [31] Ariki M, Magde D, Lanyi J K. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(11): 4947.
- [32] Yoo S K, Awad E S, El-Sayed M A. *J. Phys. Chem.*, 1995, 99: 11600.
- [33] Eliash T, Weiner L, Ottolenghi M, et al. *Biophys. J.*, 2001, 81: 1155.
- [34] Tuzi S, Yamaguchi S, Tanio M, et al. *Biophys. J.*, 1999, 76: 1523.
- [35] Petersheim M, Halladay H N, Blodnieks J. *Biophys. J.*, 1989, 56(3): 551.
- [36] Engelhard M, Kohl K D, Miller K H, et al. *Eur. Biophys. J.*, 1990, 19: 11.
- [37] Wang J, El-Sayed M. *Photochem. Photobiol.*, 2001, 73(5): 564.
- [38] Roselli C, Boussac A, Mattioli T A, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 14333.
- [39] Butt H J, Fendler K, Bamberg E, et al. *Embo. J.*, 1989, 8: 1657.

Spectrum Analysis of Blue to Purple Membrane Transition Induced by Diverse Valent Cations

XU Bing^{1*}, HAN Jintao¹, YU Peng², ZHANG Yong¹, HU Kunsheng^{3*}

1. Department of Life Science, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China

2. College of Physics, Jilin University, Changchun 130012, China

3. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract The visible difference spectra, M_{412} yield and M_{412} decay lifetime in blue membrane (bM) to purple membrane (pM) transition induced by Na^+ , Mg^{2+} and Tb^{3+} metal ions were characterized. The transition ability from bM to pM induced by Tb^{3+} , Mg^{2+} and Na^+ has distinguished difference, their concentration ratio at the midpoint of ion-induced absorbance changes is 1: 2.5: 650. Meanwhile, the curve of absorbance changes at 540 nm is similar to that of M_{412} yield changes in bM to pM transition. The M_{412} decay lifetime of regenerative pM induced by Tb^{3+} was prolonged remarkably when more Tb^{3+} was added. However, for the other two ions, additional ions have no effects on its lifetime. These results suggest that diverse valence metal ions exist in different binding ways from pM.

Keywords Purple membrane; Blue membrane; Metal ions; Spectrum analysis

(Received Apr. 14, 2010; accepted Jul. 26, 2010)

* Corresponding author