

细菌视紫红质的原型研究 与生物芯片

中国科学院生物物理研究所
理论生物物理研究室译

中国生物物理学会

一九八八年十月

细菌视紫红质的原型研究
与生物芯片

生物物理学会

内 容 简 介

自六十年代末期美国Stockenius等开始探索嗜盐菌的紫膜以来,这一领域一直是膜生物学与分子生物学的热门话题之一。紫膜是一个重要的光能转换器,能直接利用光能实现质子跨膜运输,形成质子电化学梯度,提供生命过程的能源。由于其原初光异构化过程的快速及其性能稳定、可重复使用等优点,近年来将其用于生物芯片,神经网络计算机的呼声颇高。为跟踪国际上这一重要的发展动向,并促进我国尽快形成一支开拓这一研究领域的力量,我们组织国内从事该领域研究的专家编译了本书。

本书包括细菌视紫红质的光化学循环及光电效应的原型研究,紫膜薄膜技术,若干现代实验技术在细菌视紫红质研究中取得的研究成果,细菌视紫红质在生物芯片、神经网络计算机中应用的前景等四个方面的内容。本书共有17篇译文,反映了国际上这一领域中较权威的实验室取得的最新成果。全书共20万字,参考文献近千。

本书对于从事或有志于从事这一领域研究或教学的生物学、物理学、化学工作者是一本较好的手册和参考书,对于研究生和科研组织管理工作也有较高的参考价值。

细菌视紫红质的原型研究 与生物芯片

中国科学院生物物理研究所
理论生物物理研究室译

责任编辑 朱晓敏

编 者 的 话

细菌视紫红质具有光驱动质子泵功能,其原初光异构化过程在0.75PS内完成,是一个极为快速的光能转换效应器。有鉴于此及其稳定、易制取并可反复使用之特点,国际科技界对其应用于生物芯片的热切期望与日俱增,对其原型研究也愈加深入。为了向国内读者介绍国际这一重要研究领域的情况。激励国内学术界重视并参与这一领域的角逐,我们在开展细菌视紫红质研究工作的同时,选编了这本译丛。由于这方面的年发表论文数以千计,且举行多次有关国际会议,我们只能从中选择较有代表性者,力争使本译丛反映国际上一些较权威的实验室的研究成果。

本译丛全书约20万字,包括细菌视紫红质的光化学反应及光电效应的原型研究;紫膜薄膜技术;若干现代技术在细菌视紫红质研究中的近期研究成果;以及细菌视紫红质在生物芯片、神经网络计算机中应用前景等四个方面。

本译丛的译校工作由本室部分从事细菌视紫红质研究的同志完成。为了保证译文的忠实、准确、通顺,又组织本室较有经验的同志进行二校、终审,尽管如此,疏漏之处恐或有之,欢迎批评指正。

中国科学院生物物理研究所

理论生物物理研究室

一九八八年五月

前 言

自六十年代末期美国Stoeckenius等开始探索嗜盐菌的紫膜以来,这一领域一直是一个研究‘热点’。紫膜中仅含有一种与视紫红质(Rhodopsin)很相似的蛋白质称为细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin,简称菌紫质)。它是一个重要的光能转换器,能直接利用光能驱使质子跨膜运送而形成质子电化学梯度。细胞可利用这种能量储存形式来合成能源物质ATP和完成其它需要能量的生命过程。

菌紫质的研究已经积累了大量的资料,并取得了一系列重要的成果。这方面的研究仍在不断深入中,尤其是美国Khorana等将DNA重组技术引进这一研究领域以来,人们有理由期待,菌紫质结构与功能的研究将更上一层楼。

与此同时,菌紫质的研究已引向高技术领域。菌紫质分子是一个光驱动质子泵,具有顺一反开关功能,将它重建于人工膜后可实际应用于存贮和开关器件。为了克服已有的硅集成电路的局限,科学家试图应用菌紫质等生物分子作为计算机元件(即生物芯片)的研究已经开始,这是一个对令人十分向往前景的追求。

中国科学院生物物理研究所理论生物物理研究室,对嗜盐菌紫膜已进行了不少研究。为了向这一十分重要的领域进军,他们通过调研选译了一批具有代表性的论文和著作并出版了此译文丛。读者可从这些译文中获得从菌紫质结构与功能研究概况到生物芯片模型发展现状,从菌紫质的光循环和质子转移到各项研究新技术(如超薄膜的制备,DNA重组方法,共振拉曼光谱,付里叶变换红外光谱,高场固态核磁共振波谱等等)的应用等大量信息。因此,这本译著不仅对从事这一领域研究和教学的科教人员,而且对担任科研组织管理的同志都有一定的参考价值。

最后,我衷心希望这一译丛的出版将有可能对我国开展菌紫质和生物芯片的研究起到一定的促进作用。

杨 福 愉

1988年6月15日

目 录

前言.....	杨福愉
一、嗜盐菌的细菌视紫红质与紫膜	
W. Stoeckenius, R. H. Lozier, R. A. Bogomolni	(1)
二、细菌视紫红质光循环过程中在微微秒所发生的变化	
H. -J. Polland, M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, D. Oesterhelt.....	(53)
三、用重组DNA方法研究细菌视紫红质	
H. G. Khorana, M. S. Braiman, B. H. Chao, T. Doi, S. Flitsch, M. A. Gilles-Gonzalez, N. R. Hackett, S. Jones, S. S. Karnik, K. -M. Lo, T. Mogi, M. M. Nassal, L. J. Stern.....	(72)
四、细菌视紫红质的折叠	
D. M. Engelman.....	(87)
五、细菌视紫红质分子在脂双层中侧向和旋转扩散Saffman-Delbrück方程的实验验证	
Peiner Peters, Richard J. Cherry.....	(92)
六、用测量位移电流的方法检测细菌视紫红质蛋白中质子的运动	
Lajos Keszthelyi.....	(101)
七、薄层中的取向和光循环分析	
Benno Hess, Rafi Korenstein.....	(107)
八、紫膜及紫膜—磷脂Langmuir—Blodgett膜	
Jay Schildkraut, Aaron Lewis.....	(116)
九、质子主动运输泵的付里叶变换红外光谱研究	
Kenneth J. Rothschild	(127)
十、研究在细菌视紫红质中质子转移的共振拉曼方法	
Mark S. Braiman.....	(135)
十一、化学修饰和自旋标记膜生物能学力的研究	
Lester packer, Rolf J. Mehlhorn	(142)
十二、高场固态核磁共振波谱学研究细菌视紫红质动态结构的新进展	
Eric Oldfield, Robert A. Kinsey, Augustin Kintanar.....	(154)
十三、细菌视紫红质的光循环过程中间产物的时间分辨的蛋白质荧光的测量	
William D. Hopewell, Joseph M. Fukumoto.....	(165)
十四、作为分子计算元件原型的细菌视紫红质模型膜系统	
Felix T. Hong.....	(169)
十五、生物芯片模型发展现状	
Isao Karube.....	(181)
十六、应用光活化生物传导材料实现神经网络	
Clark Mobarry, Aaron Lewis.....	(185)

嗜盐菌的细菌视紫红质与紫膜*

W. Stoeckenius, R. H. Lozier and R. A. Bogomolni

University of California, San Francisco,

Cardiovascular Research Institute

Department of Biochemistry and Biophysics,

Calif. 94143 U. S. A.

Biochimica et Biophysica Acta 505 215-278 1979

内 容

- 一、引言
- 二、嗜盐菌：生理与生化
- 三、紫膜的分离、组分及色素的一般性质
- 四、紫膜的结构
- 五、紫膜的功能
- 六、细菌视紫红质的光化学
- 七、生色团的解离、重组与修饰
- 八、模型系统
- 九、细胞生理
 - A. 外膜囊泡制样的研究
 - B. 处于稳定态的全细胞
 - C. 质子转移与磷酸化
 - D. 氨基酸的运输
 - E. 趋光性反应
 - F. 紫膜的生物合成
- 十、讨论与展望

*本综述发表于1979年，近十年来紫膜的研究已取得了很大的进展，又发表了多篇有关的综述。然而，相比之下均不如本文全面，详尽，国际上有关紫膜研究工作者言必引用此文，故本译丛采用此文。但本文中有些部分，特别是有结构与光化学中的结论与新进展的结果不符。读者可根据本译丛中其它有关最近发表的文章，参阅更正本综述不确之处。

一、引言

紫膜是一种新奇的光能转换膜,它是嗜盐菌*Halobacterium halobium* (1-7)及其他嗜盐生物(8)质膜的一部分。紫膜仅含有一种与视紫红质类似的蛋白质,它利用光能驱使质子跨膜转移,从而形成重要的电化学梯度。细胞应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。早期对嗜盐菌的研究,对其所存在的光合系统并未引起注意。最初只认识到紫膜是嗜盐菌(*H. halobium*)中的一个形态学实体,只是当紫膜的特异组分、结构及其在细胞中的位置被确定之后,才促进了对其功能的研究(9)。现已肯定紫膜的作用为光能转换器,并与其色素—细菌视紫红质(简称菌紫质BR或bR)的光反应循环相关联。自从这一系统发现以后,对它的兴趣迅速增长,许多实验室正从事这一研究,或将其作为一种便利工具,用于研究生物能量转换的其他问题。

业已发表若干简短综述,强调这一问题的不同方面,大部分见之于学术讨论会上(10-12)。本综述试图概括1977年底以前的工作。最近几年这一领域的工作迅速发展,取得了一致的结果,在这之后将可能出现这样的时刻,即对质子转移及其与细胞生物能力学相关机制的进一步探讨将大大减慢,并产生更多的分歧意见,因此,现在正需要一个较为全面的综述。

嗜盐菌生物学的研究是不均衡的,一些方面较强,但却并不说明它对于生物学及生物能力学的重要程度,这一点在本综述的文章结构中亦有所反映。一些内容较窄的题目用单独的章节讨论,而其他同等重要的内容却放在一起,只是因为后者的信息太少。第五节关于膜功能总结的一些内容在后面的章节中还将进行详细的讨论,尽管有些重复,但我们认为读者在阅读以后各章前有一个简要的了解也是十分必要的。

二、嗜盐菌:生理学和生物化学

嗜盐菌属于极端嗜盐微生物,因为它们需要高浓度的NaCl和镁盐才能生长和维持其结构。它们天然地生存在盐湖和盐田的结晶盐中。因为发现当用未消毒的日光晒制盐去制腌鱼和皮革时,嗜盐菌起破坏作用,因而它首先引起了微生物学家的注意。

嗜盐菌对盐有依赖性的最有力的证据是,当盐浓度减少到低于2M NaCl和20mM MgCl(15)时,细胞和细胞成分就发生解聚。发生溶菌作用的临界盐浓度因所研究的嗜盐菌种类而异。这种解聚不是一种渗透现象,但若把细胞悬浮液迅速稀释,渗透力会引起细胞解聚(16、17)。低盐浓度可以产生溶菌作用,这已成为广泛地分离细胞组成(例如紫膜)的简便技术。关于嗜盐菌的解剖学、生理学、生物化学已有多篇综述(16-21)。现已在实验室中确定了在复合的(22、23)和特定的(24-26)培养基中嗜盐菌的生长条件。

以下关于嗜盐菌的结构和组成的介绍主要来自*H. halobium*, *Halobacterium salinarum* and *Halobacterium cutirubium*的资料。这些嗜盐菌依靠氨基酸作为它们主要的碳的来源,它们生长缓慢、中度嗜热。典型的增殖时间在39℃时为7—8小时。

细胞通常为杆状,直径为0.5μm、长度为4—10μm;许多菌株有极端鞭毛束可以游动;嗜盐菌的形态学比其它大多数的细菌更富有变异性。在最适浓度以下的培养条件,特别是Mg²⁺浓度低的时候,常常可以看到它们呈圆形、椭圆形或棍棒形。

嗜盐菌细胞外膜囊的组成明显地不同于原核细胞。它们没有肽聚糖 (peptidoglycan)、胞壁酸 (muramic) 或二氨基庚二酸 (diaminopimelic acid)、 α -氨基酸或磷壁酸质 (teichoic acid) (1, 2, 27-31)。细胞壁由仅含10—12%碳水化合物、分子量为20万, 的单一糖蛋白组成 (32, 33), 形成有规则的六角形晶格, 被细胞外的间隙把它与细胞膜分开 (1, 2, 34)。细胞膜基本上包含全部细胞脂, M. Kates及其同事广泛地研究了脂的结构和合成。细胞膜的蛋白质组成是复杂的, 还没有加以详细地分析 (35)。全部膜脂都是异戊二烯 (isoprene) 的衍生物, 60%是磷脂, 主要是磷脂酰甘油脂的二乙醚的类似物; 剩下的极性脂的大多数是糖脂, 也有硫代一和硫酸糖脂; 全部极性脂中的碳氢化物成份是二氢植烷醇 (dihydrophytanol) (21, 36)。

极端嗜盐微生物都具有很深的颜色, 不仅在培养中明显可见, 在盐滩上也常常可以看到它们有明显的红色。这些色素是类胡萝卜素, 显然该色素可以使机体免于受自然环境中强蓝光和近紫外线的辐射 (37, 38)。细胞具有异常有效的光反应系统, 现已查明该系统是由色素吸收的光所激活的 (39)。细胞膜上的类胡萝卜素和其它非极性脂占总脂量的7—10%, 该百分比取决于生长条件; 主要的色素是 C_{40} 类胡萝卜素—细菌玉红素 (bacterioruberin) (40-42)。现已检出几个 C_{40} 类胡萝卜素, 其中包括番茄红素 (lycopene) 和 β -胡萝卜素。角鲨烯 (三十碳六烯, squalenes) 的浓度也较大 (8, 43)。关于这些化合物生物合成的途径已有介绍 (8, 11, 41)。色素含量因生长条件的不同而有很大差异 (44), 至少也发现维生素 K_1 、维生素 K_2 和几个角鲨烯 (8, 45)。

细胞膜也包含具有b-和c-型细胞色素和细胞色素氧化酶的呼吸链, 对o-型细胞色素的鉴定仍有争论 (46-52)。参考文献 [53] 是一个有关这方面的综述。现在已经对呼吸链的脱氢酶组份, 主要是关于其组份对盐的需求进行了研究 (47, 54-60)。一个未知其功能的 $2Fe-2S$ -铁氧化还原蛋白质已经以可溶性形式大量地分离了出来; 它更类似于植物和兰-绿藻的铁氧化还原蛋白, 而且与Nostoc叶绿体的铁氧化还原蛋白有某些序列的同源性 (61), 但它的中点电位相当高, 约为 $-350mV$ (61-64)。

在DNA的碱基组成和基因组的大小方面, 极端嗜盐微生物与其它的原核生物没有显著差异; 然而在所有研究的为数不多的品系中, 在密度梯度中看到大的卫星带, 这些带的出现不能归因于一种质粒的多重复制 (65-67)。现已提纯和鉴定了两个依赖于DNA的RNA多聚酶 (68-71), 但关于细胞的RNA种类及其功能的必要条件则知道得很少。现已从核糖体中分离出了5-S、16-S、23-SRNA (72), Bayley概述了一些近来的证据, 表明嗜盐微生物转移RNA没有异常的特性。然而起始因子tRNA在结构上类似相应的真核细胞的tRNA, 并含有非甲酰基的蛋氨酸。此种tRNA在从而包酵母得到的无细胞系统中可以被负载 (73)。密码子的分配 (assignment) 与在其它的原核生物中所发现的没有区别 (74-77)。

在嗜盐菌的总的蛋白质抽提物中二羧酸氨基酸有相当高的含量 (17, 28, 78-81)。除了紫膜和气泡膜以外, 大多数的细胞组成部分的蛋白质中也是如此 (文献2)。这两种膜和鞭毛是既大又结构很好确定的细胞成分, 它们在低盐浓度中不解体。在整个盐浓度范围内, 即从饱和盐浓度到蒸馏水, 它们都是稳定的, 至少紫膜的功能是完整的。大多数所研究过的可溶性酶 [文献55、82、83, 文献84是Lanyi写的综述] 都是在窄的盐浓度范围内才具有功能, 其中许多酶的最佳盐浓度约为2M。Lanyi (84) 对这种功能与盐的关系进行了综述和评论性的讨论。虽然在蛋白质上电荷的屏蔽起作用, 但在低于0.2M的NaCl的情况下, 这种作用实质

上是被饱和了。在较高的盐浓度下,水的活性降低,显然它决定蛋白质的三级结构并且对保持它们的功能构型也是必须的。

嗜盐菌的核糖体除了需要相当高的单价盐浓度特别是KCl以及稍高浓度的 Mg^{2+} 以维持它们功能和结构的完整性以外,与其它细菌的核糖体是相似的〔85—88〕。在来自非嗜盐微生物核糖体蛋白质的50-S亚单位蛋白质HL20的胰蛋白酶分解形成的肽段之间检测出了32种蛋白质,它们都是酸性蛋白质。在*H. cutirubrum*的50-S亚单位蛋白HL20的胰蛋白酶分解形成的肽和大肠杆菌(*Escherichia coli*)50-S亚单位的L7/L12羧基末端之间有重要的同源性,而且HL20的N-末端区域与L7/L12的中心区域也显示同源性〔89、90〕。然而HL20和L7/12的C-和N-端的序列之间没有同源性。令人惊讶的是, Bayley〔73〕引用了近来尚未发表的工作,证明Baker's酵母和盐水虾的HL20的N-端和L12的N-端之间有显著的同源性。现在已经广泛地研究了*H. cutirubrum*的蛋白质合成体系, Bayley〔77〕综述了该体系的组成和功能要求。

细胞蛋白质对高浓度盐的需要或至少对盐有耐受力,这一点对它们的功能是十分重要的,与其它适应于浓盐溶液的原核和真核生物不同,嗜盐菌保持细胞内的盐浓度等于或高于其生长介质中的盐浓度;其主要的内在阳离子是 K^+ ,当外面的 K^+ 浓度为0.5—3.0mM时,一般发现细胞内的 K^+ 离子浓度约为3M或更高些〔91—93〕。细胞内 Na^+ 离子浓度在0.5—2.3M之间变动,这取决于生长条件和菌体的年令。即使在饥饿的细胞中,内部的高 K^+ 离子浓度也可以保持数天〔94—96〕。一些观察者报导,细胞对 K^+ 、 Na^+ 和 Cl^- 离子是自由渗透的,因此得出结论:大部分细胞内的 K^+ 离子一部分结合到细胞的有机成分的固定的阴离子基团上,一部分则作为KCl存在于“结合”水中〔96〕。这个结论与以下的实验结果不相吻合, K^{39} 的NMR研究表明大部分的 K^+ 在溶液中是游离的;观察到机械打破的细胞立刻将全部的 K^+ 释放到溶液中〔95〕;发现即使分离出的实际上丧失全部胞浆成分的细胞外膜囊也可以积累和保持高 K^+ 离子浓度若干小时;一些近来的结果表明,比较低的 K^+ 离子的通透性以及 K^+ 离子的摄取是受膜电位所驱动的。

膜电位是由光或呼吸作用驱使质子从细胞内释放出来而产生的。通过观察光驱动ATP的合成和氧化磷酸化、使 Na^+ 泵出的 Na^+/H^+ 交换泵以及使这些细胞中氨基酸得以积累的 Na^+ /氨基酸协同运输系统,可以知道细胞膜对离子有低而且被动的通透性。所有这些强有力地说明能量转换的化学渗透机制。有关细节将在下面详述(看九部分)。对这些细胞中电解质的平衡以及它们的主动和被动的通透性目前仍了解不足,需要进一步研究。然而,至今不需要祈求用任何在别的机体中没有发现的异常性质去解释目前对溶质交换和能量转换所观察到的情况。

嗜盐菌(*H. halobium*)的野生型菌株(不是在紫膜的大多数研究工作中所使用的突变体)含有气泡。这些细胞器被厚度为20 Å的膜所束缚,此膜仅由蛋白质组成且具有规则的晶格结构〔2、98〕。当气泡化达到最大程度时,细胞会浮在培养液的表面,气泡甚至可使细胞选择在悬浮介质中的最佳深度以求最合适的氧浓度和光强度之间的平衡。兰—绿藻中非常类似的气泡至少也提供了此种功能的证据〔99〕。

现在关于嗜盐菌的代谢途径阐明得很少。通常认为被人们感兴趣的菌株不能利用碳水化合物也不能从厌氧过程衍生能量。氨基酸是呼吸作用的主要底物〔100〕,然而还没有发表详细的报导。似乎在早期的研究中所使用的分离条件,对有发酵能力的机体来说是不适宜的。近

来分离出了可利用碳水化物的菌株〔101〕, 在8种有此功能的菌株中我们未能检出任何紫膜(未发表的材料)。一些菌株包括*H. halobium*, 可还原硝酸盐〔102〕, 但不知道这种细胞是否能从这个反应中衍生出能量来。显然这些菌株也可还原亚硝酸盐, 但是至今我们还不能只提提供硝酸盐而在缺氧的条件下培养细菌(Danon and Stoeckenius, 未发表)。

在嗜盐菌中没有发现叶绿素或有关的色素。从美国俄勒冈州南部的盐湖中分离出一种可进行光合成作用的含有叶绿素的原核生物-*Ectothiorhodospira halophila*。因而产生了几有趣的问题。例如, 当嗜盐菌与其它的使用明显有效得多的基于叶绿体的光合作用的原核生物占据同一环境时, 为什么基于紫膜的光合作用在进化中能够幸存下来?

至此, 我们必须得出结论, 嗜盐菌除了有高的内部盐浓度和基于紫膜的功能外, 与其它的原核生物无大的区别, 而且具有真核生物的某些特征, 只是它们的基础结构的化学是很特殊的。这些特点与它们占据的独特环境有关。然而在同一或相似的环境里存在着中度或兼性嗜盐微生物和耐盐生物, 以及嗜盐的藻类(例如*Dunaliella*), 它们没有嗜盐菌所特有的那种异常的化学和生理学的特点〔104—106〕。对嗜盐菌的生态学和进化的调查将会对一些问题, 例如嗜盐菌的特征是如何产生以及它们为什么能持续下来得出有意义的回答。

三、紫膜的分离, 紫膜的成分及色素的一般性质

最广泛使用的品系是*H. halobium* R_1 和 R_1 的突变种。 R_1 是*H. halobium* NRC34020的自发突变种, 由R. Rowen在Rockefeller大学分离得到的。 R_1 没有形成空泡的能力, 这使紫膜分离变得容易〔2〕。使用诱变剂可得到一些品系, 它们缺少类胡萝卜素, 呈现无色或紫色。一些品系如 R_1L_2 (还未发表的结果)和 R_1M_1 〔107〕很不稳定, 必须经常重分离。 R_1S_2 从 R_1 通过亚硝基胍诱变得来(Lily Jan未发表) R_1S_2 更稳定, 紫膜的产率通常也高。这些品系有利于完整细胞和外膜囊的光谱学研究(应当指出, 类胡萝卜素的颜色是其它细胞膜污染程度的有用指示剂, 因为它在紫膜中的含量很少)。苏联一研究组使用他们地区分离的品系〔108〕, 此品系还未进一步鉴定。由不同来源得到的紫膜中, 还没有发现明显的差别, 但发表的工作只对*H. halobium*和*H. Cutirubrum*进行了比较〔109〕。

有关紫膜的分离, 在其它地方已有详细描述〔2, 110〕。基于紫膜对蒸馏水的抗性, 它使细胞膜破碎成小碎片和溶解蛋白部分〔111〕。将蒸馏水中胞溶的细胞做级差离心可得到相当清洁的样品, 再通过密度梯度进一步纯化, 可使其它表面膜的污染小于0.5%。我们得到的制样产率为每10升培养液得到0.2—0.6g紫膜。在静止相培养液胞溶的蔗糖密度梯度里, 紫膜形成一深紫色带, 浮料密度为1.18g/cm³, 表面膜的其它小碎片形成一个红带, 浮料密度为1.16g/cm³称它为“红膜”。最近报导了一种做了改进的分离技术〔112〕, 此技术可得到更清洁的样品, 但没有报导其产率如何。

分离的紫膜含大约25%的类脂和75%的蛋白质(指重量比)。类脂成分与其它细胞膜中的类脂很类似〔2, 5, 109〕。缺乏主要的类胡萝卜素; 测到的非恒定的少量可能来自红膜残基的污染。所有的细胞类脂中, 紫膜特有的是磷脂酰硫酸甘油和糖脂硫酸, 其量占总类脂的15%。其它类脂与在红膜中的比例基本相同〔113〕。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳只呈现一个蛋白质带。正如Bridgman和Walker所证明, 此技术不能确定蛋白质分子量〔114〕。由氨基酸和多肽分析得到的分子量是25,000—26,000〔5, 14, 114, Bradshaw, R.私人通信〕, 这结果与TritonX-

表1 bR的氨基酸组份

	^a		^b		^c		^d		^e	
	残基数	整数值	残基数	最近整数值	残基数	整数值	残基数 Hhalobium	整数值	残基数	整数值
赖氨酸	6.3	6	12.1	12	7.073	7	7.5	8	8.3(5.0)	6 (5)
组氨酸	0.4	0	1.5	1	2.038	2	0.8	1	0.96(0.68)	1 (1)
精氨酸	7.1(7.5)	7	14.3	14	6.662	7	8.6	9	8.04(5.3)	8 (5)
色氨酸	4.0(6.6)	4	—	—	4.2	4	4.0	4	— (3.8)	— (4)
天冬氨酸	12.7	13	13.8	14	15.067	15	15.9	16	16.8(12.4)	17(12)
苏氨酸	18.9(18.0)	19	16.5	17	17.838	18	17.2	18	21.2(22.1)	21(22)
丝氨酸	13.8	14	12.1	12	13.10	13	12.8	14	14.8(13.6)	15(14)
谷氨酸	14.5	14	—	—	16.049	16	16.5	17	18.4(14.3)	18(14)
脯氨酸	10.4(11.0)	10	15.8	16	11.004	11	10.8	11	14.1(9.7)	14(10)
甘氨酸	24.8	25	23.3	23	25.702	26	23.8	24	26.7(25.9)	27(26)
丙氨酸	29.9(29.0)	30	28.6	29	28.029	28	27.0	28	25.0(29.9)	25(30)
半胱氨酸	0.0	0	—	—	—	—	—	—	0 (0)	0 (0)
缬氨酸	21.0(18.6)	21	17.7	18	20.340	20	19.0	19	19.3(18.0)	19(18)
蛋氨酸	8.0	8	9.9	10	8.039	8	7.6	8	8.0(8.9)	8(9)
异亮氨酸	13.2	13	13.6	14	13.885	14	11.6	12	13.0(13.0)	13(13)
亮氨酸	33.2	33	31.9	32	30.012	30	29.4	30	30.3(30.2)	30(30)
酪氨酸	9.8	10	9.0	9	10.874	11	9.5	10	8.56(8.84)	9 (9)
苯基丙氨酸	12.0	12	11.1	11	13.250	13	12.6	13	10.4(11.3)	10(11)
葡萄糖胺	1.6	2	—	—	—	—	—	—	—	—
半乳糖胺	0.7	1	—	—	—	—	—	—	—	—
胱氨酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a. 数据来自Keefer和Bradshaw (116) HCl水解, 甲苯磺酸得到的不同值用括号中数值给出 b. 数据来自Soeckenius和Kunau (2), 分子量为25,000进行重新计算的值
c. 数据来自Bridgen Walker (114) d. 数据来自Oesterhelt Soeckenius (5)
e. 数据来自H. Cutirabrum (292), 代替了Kushwaha等人的数据 (113) 括号中的数值是由新的薄层色谱技术得到的。

100〔115〕中的分析超速离心以及下面讨论的结晶图结果相一致。

一些实验室得到氨基酸的分析结果〔2, 5, 113, 114, 116, 292〕他们的结果基本相符, 疏水氨基酸残基的浓度高, 不存在半胱氨酸。报导的组氨酸成分不一致, 每个分子中有0个, 1个或2个组氨酸不等(见表1)。蛋白质中有视黄醛。根据变性后视黄醛提取的量以及蛋白质分子量为26,000计算可得视黄醛与蛋白质的克分子比为1.0〔5〕。也有人报导, 在*H. Cutirubrum*中, 每克分子bR有0.5克分子视黄醛〔113〕。最近, 他们组重新测量后, 也得到接近1.0的比例(Kates, M. 和Smallbone, B. 私人通信)蛋白质可能是磷酸化的, 但不是糖基化的〔113〕。

视黄醛通过质子化的希夫碱基结合到赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团上。象视紫红质一样, 此结论基于用氢硼化物还原色素, 随后用碱性水解蛋白和视黄醛赖氨酸的分离〔5, 114, 117〕。在还原和耐热菌蛋白酶消化后, Bridgen和Walker从bR中得到一个视黄醛多肽, 序列为Val-Ser-Asp-Pro-Asp-Lys-Lys, 视黄醛残基很可能连结在最后一个赖氨酸上。共振拉曼光谱确认完整蛋白的希夫碱基链。开始认为是个非质子化的希夫碱基〔118〕, 后来更正为质子化的希夫碱基, 并得到公认〔119-121〕。但关于希夫碱基链的位点以及性质仍不太清楚。C=N拉曼带弱, 与用作参考的模型化合物相比要移动大约10个波数, 这可能与它处的蛋白质中的特殊环境有关。不能排除在还原之前出现传递的可能性, 特别是当希夫碱基与水溶性小分子, 如羟胺和氢硼化物反应时, 在希夫碱基被还原前bR必须受光、去垢剂或溶剂处理(看下边)。

视黄醛的结合使紫膜呈深紫色。除典型的280nm附近的蛋白质吸收外, 紫膜在570nm附近有个宽的吸收峰, 在400nm左右还有个小的吸收带。当生色团与蛋白的相互作用受到破坏时, 可见光的带消失。强去垢剂引起的蛋白变性使570nm吸收带移到370nm〔2〕, 这正好去质子化的视黄醛希夫碱基的吸收峰。在碱性条件下, 视黄醛从蛋白很慢地释放视黄醛, 在酸性pH下则很快释放。天然蛋白可稳定质子化的希夫碱基(模型质子化的希夫碱基在440nm附近有吸收)由于蛋白与视黄醛之间的非共价键相互作用, 进一步的红移发生。很多动物的视色素中也发现相同或类似的现象, 动物视色素中也有视黄醛的质子化希夫碱基, 也有相同大小的红移。有关大的红移已有多种解释, 但没有足够的证据去肯定其中一个并否定其它解释〔122〕。因为与动物光感受器的膜结合的色素有相似性, 我们把紫膜的这种色团蛋白称为细菌视紫红质(中文简称为菌紫质)。由于发现动物视紫红质和bR光循环之间的相似性而进一步证明这名称是有道理的(看第六节)。

紫膜的圆二向色性光谱(CD)表明: 在可见吸收范围里具有不对称的正带和负带, 正带峰值接近538nm, 负带峰值在602nm附近, 交叉点在574nm左右。没有发现与400nm吸收带相应的CD带。570nm附近的带通常解释为处在生色团吸收最大值中心的正带和由于激子分裂引起的重叠的对称正-负带〔123-126〕, 虽然其它解释也有可能。在290nm和370nm间发现一个强的负带, 在芳香族氨基酸吸收范围里出现几个带。远紫外CD谱为典型的高 α -螺旋含量的蛋白的CD谱。

除含色氨酸和含酪氨酸蛋白的典型荧光外, 当视黄醛生色团激发时, 紫膜有微弱的荧光〔130-132〕, 在650nm和800nm之间, 其寿命为微微秒。至于准确的寿命、光谱的细节以及各种发射特性等方面仍不一致。

菌紫质不以与动物视紫红质同样的方式被光漂白, 由光转到暗时, 只发生小的光谱变化(看第六节)。在有羟胺或氢硼化钠时光照膜悬浮液, 可产生慢的漂白。这时可得到在近紫

外有吸收峰值的强荧光产物，这问题以后将更详细地讨论（看第七节）。经胺存在下，570nm的吸收带被视黄醛的360nm的吸收带取代，视黄醛存在于膜中，但可用有机溶剂提取出来〔133〕。Oesterhelt定义漂白的膜为“去色团膜（apomembrane）”。这种去掉生色团的蛋白，与视色素分子相类比，称它为去色团细菌视紫红质蛋白。

加视黄醛可使去色团膜中的去色团视紫红质蛋白转变回bR〔134〕。通过测量570nm吸收峰的恢复可知数分钟内就可重组，假设视黄醛蛋白复合体的克分子比为1，须要加稍过量的视黄醛（看图5A）。只有13-顺和全反视黄醛才能有效地重组bR；反应产物不同，它们能相互转化。它们慢慢达到热平衡，生成暗适应的bR。光照下，13-顺复合物迅速地转变成全反型复合物〔134〕（第6节）。在紫膜提取中只有全反和13-顺视黄醛两种异构体〔107, 135, 136, 86〕。存在11-顺异构体的早期报导可能不对〔137〕。11-顺异构物可通过加过量的提取视黄醛与牛去色团视蛋白重组来鉴别；也可能出现一些其它异构化。

四、紫膜的结构

紫膜是嗜盐菌细胞膜中分化的功能单元。它与表面膜的其余部分红膜共面，且有相同的厚度。用冰冻破碎法很容易鉴别紫膜，因破碎面的结构与其周围红膜的明显不同〔4〕（图1）。细胞质一侧的破碎面比环绕的红膜平滑，并显示出bR有规律的排列，外侧的破碎面则完全平滑，只是当用小角阴影法及有较好的分辨率时，才能使其晶格可见。任意一侧的电镜照片闪光衍射图均能清晰地显现这种晶格。关于紫膜的冰冻破碎法及冰冻蚀刻成像的详细讨论见Fisher与Stoeckenius〔138〕。



图1 *H. halobium*冰冻破碎细胞的电镜照片。左下部为“半个”细胞质一侧的破碎面（PF，凸面）。紫膜补片比红膜破碎面平滑，显示有规律的结构。细胞的右上部为“半个”膜外侧的破碎面（EF，凹面）。穿过紫膜补片的破碎面显得平滑，而且大都缺乏具有红膜特征的颗粒。少数几个大颗粒可能是由于污染。放大倍数为57400。

分离与完整细胞中的紫膜具有相同的形态特点。与通常膜中观察到的现象不同，紫膜碎片不卷曲，也不形成囊泡，为圆形或椭圆形平板，50-60 Å 厚，直径约为0.5 μm。从含有高浓度紫膜（占总表面膜的50%或更多）的细胞中分离出来的膜有较为复杂的形状。干燥时，紫膜在其外表面，沿着晶胞线常常出现裂隙。分离膜的细胞质一侧表面常有凹陷。以小角阴影法及负染色法制备的样品，晶格可以清晰辨认，但表面轮廓线不够清楚〔139〕。

从普通电镜照片很容易看出紫膜的特点，这些特点在分离膜的 X-线衍射图中表现的更为显著。一个好的膜悬浮液的衍射图在大约3.5 Å 处有一系列清晰的反射点，它表明紫膜碎片具有有序排列的六角形晶格〔4〕。这种晶格与很低分辨率下观察到的冰冻破碎电镜图中的晶格是一样的。细胞外膜囊或完整细胞的 X-线衍射图仅在低分辨时可以看到晶格，因为样品必须保持在高盐浓度下，而在高盐浓度下，扩散散射增大，对比度降低〔111〕。

在定向排列分离紫膜试样的衍射图中，除了清晰的衍射环以外，还有扩散带，所有衍射环归因于膜平面的晶格，而扩散带则主要是由于边缘衍射，在4.6 Å Bragg间距的强扩散带可能反映脂双层烃链的侧向间距。还反映沿整链，差不多同样距离上有规律分布的甲基的贡献。

电子密度图的计算肯定了脂双层排列，因为有两个明显的峰，距离为40 Å，很类似于从 *H. halobium* 中抽提出的脂形成的脂双层中磷脂头部引起的峰。轮廓计算当然是属于普通的相位问题，这种计算可以消除所有轮廓，仅保留两个〔140〕。这两轮廓图很类似（图2）。其中中心谷区比嗜盐菌脂双层的要高很多，峰形也略不对称。

整个膜中蛋白质浓度较高，干样品中这种结构实际上不变，膜以49 Å 的距离重复推算。如果剖面间发生联锁或穿插现象，这个距离可能小于膜的厚度。膜的真正厚度为55-60 Å，说明一些膜的组分可能越过膜双层。根据含水及空气中干燥试样的电镜照片的光衍射图及X-线衍射图计算出晶胞为63 Å。分析晶格参数，膜密度，已知脂蛋白比及蛋白分子量，每晶胞单元含有三个蛋白分子和大约12-14个脂分子〔4〕。实际计算的蛋白含量值为3.3-3.6。当然，难以理解的是为什么有规律的六角形晶格的晶胞单元含有的蛋白质分子数不是整数。

仔细分析X-线衍射图还可以得到蛋白质中有高α-螺旋含量的信息。α-螺旋约40 Å 长，其长轴几乎垂直于膜平面〔141, 98〕，所以蛋白质必然在疏水区延伸，这与计算出的此区域的电子密度相吻合。膜悬浮液的紫外圆二色性表明α-螺旋含量可高达70-80%〔123, 128〕。

Unwin Hendersen〔142〕将小电子束用于未染色的分辨膜补片（或其他小晶体），得到很不清楚的电镜照片，作者用精细的技术从中得

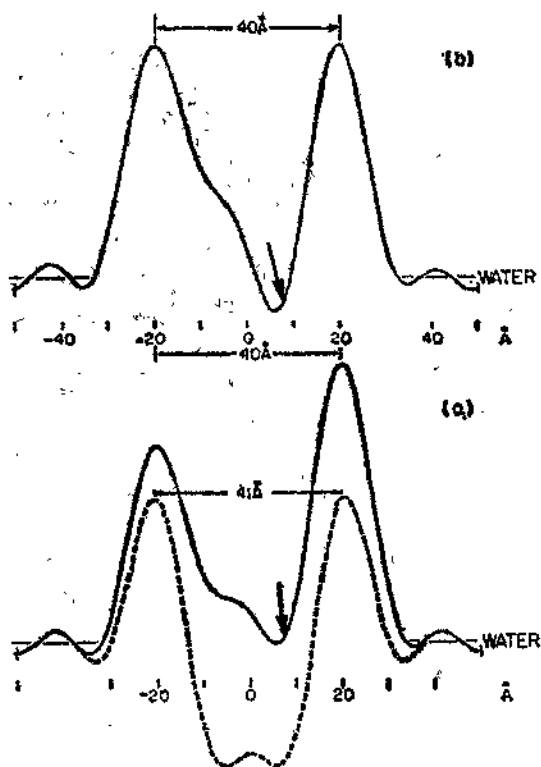


图2 根据 X-线衍射计算的紫膜电子密度图。两图中实线与数据一致，说明膜中有相似的脂-蛋白分布。虚线为抽提出脂形成的双层的计算图形。箭头标记用中子衍射确定的视黄醛紫罗酮环的可能位点〔140〕

到晶胞结构的信息。他们从葡萄糖溶液中得到干燥膜，这种方法可以防止碎裂，但也降低了未染色膜已经很低的对比度。在这样的照片已难以用肉眼看见膜补片，但是，通过光衍射或计算机处理却可以显示出分离膜补片还保持其单晶结构，而且，由于强度低及曝光时间短，电子束对晶格的破坏可以大大降低。

计算所得的晶胞图分辨率为 $7\text{ \AA}$ ，此图为晶胞单元在细胞膜平面上的投影。可以用倾斜样品的电镜照片做膜晶胞的三维重建〔143〕。最好如图3所示，在晶胞的一角，从围绕三重轴的密度分布来讨论结构。直径为 $10\text{ \AA}$ 的三个高密度柱状体排成三行绕轴分布，它们显然相应于与膜平面成 90° 的蛋白质 α -螺旋。在这三行以外，并平行于它们的是另外三个高密度区，约 $10\text{ \AA}$ 宽，每一个含有四段 α -螺旋，成小角倾斜，所以它们的轮廓与在膜平面上的投影重叠。一个蛋白质分子含有七个 α -螺旋段，它们在膜的疏水区内延伸。

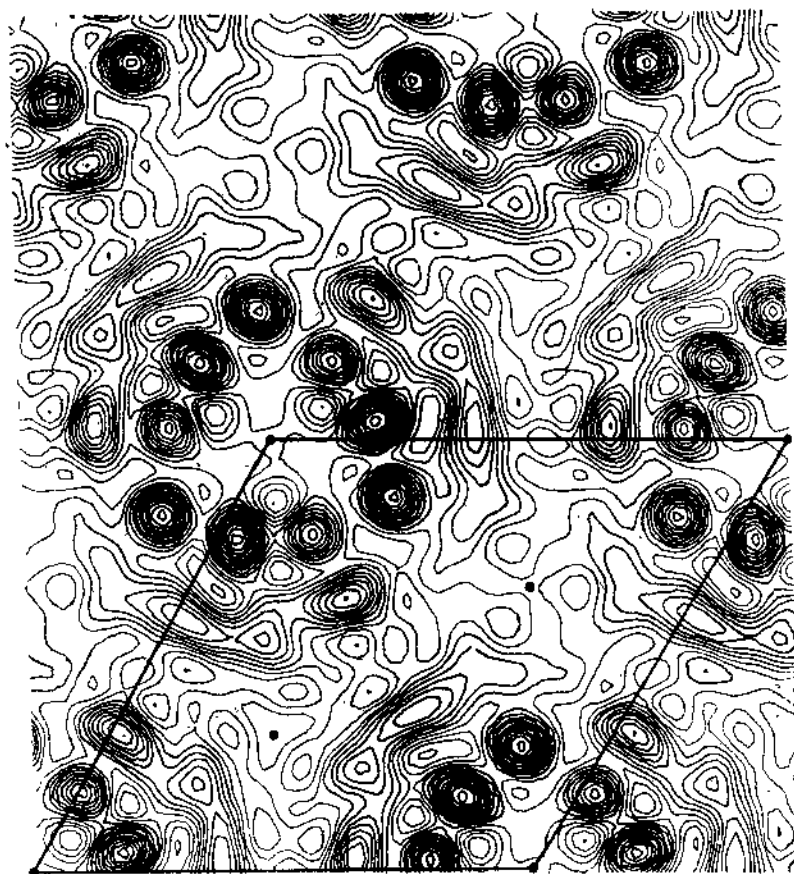


图3. $7\text{ \AA}$ 分辨率紫膜的散射密度图（投影于膜平面）〔142〕用直线圈出晶胞，黑点为对称轴。

若bR的分子量为26000，其余的非螺旋部分必须大于足以用来在膜的两侧表面连接这些 α -螺旋。水解蛋白酶可以使包括C末端的短肽链裂解（在完整的细胞中亦能做到），而羧肽酶A则顺序地释放出丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和丙氨酸〔144〕。因为上述现象在重组的脂质囊泡中也可以发生，囊泡中紫膜的定向是“内侧外翻”型的，因此C末端显然应在膜的细胞质一侧。又因为多肽链七次穿过膜，N末端一定在外表面。Ovchinnikov小组也得到类似的结果〔29〕。连接 α -螺旋的序列显然可部分地接触外环境，对它们的选择性裂解不抑制bR的质

子泵功能。

bR分子围绕三重轴之一形成三聚体,脂双层充满三体之间及三体中蛋白分子之间。这是用这样的高分辨率得到的第一个膜蛋白结构。 $7\text{ \AA}$ 分辨率的密度图与氨基酸序列分析(预期很快即可得到)一起将对质子转移的机理提供重要启示。也许有可能把分辨率提高到 $3.5\text{ \AA}$,因为这一水平的电子衍射图表明存在有序性,但是还需要进一步提高分辨率。现在还不知道模型的哪一边代表紫膜的内表面,哪一边是外表面,但是可以用铁胍标记或其他技术把这两个表面区别开,与电镜及X-线衍射配合起来应当能够回答在细胞中模型如何取向的问题*。

遗憾的是不论是电镜或X-线衍射均未给出任何信息,证明视黄醛的位置。定向紫膜样品二向色性的粗略测量表明色团的跃迁矩几乎与膜平面平行〔4〕,至少在游离视黄醛中生色团的跃迁矩相应于分子长轴。如果CD带在可见波长的最大吸收是由于激子分裂〔123-125, 145〕,则跃迁矩必然略有倾斜,位于平面之外。若跃迁矩准确地位于膜平面内就不产生激子分裂。人们试图通过在有激子或无激子相互作用条件下,吸收带与CD谱的区别来确定跃迁矩的取向及色团的距离〔146, 147〕。我们测量了沉积在玻璃表面上多层定向紫膜的线二色性来计算倾斜角,得到角度为 20° 〔148〕。因小角X-线衍射确定的多层取向的偏差约为 4° 光适应型bR

(bR_{570}^{LA})与暗适应型bR(bR_{560}^{DA})的倾斜角分别为 $23^\circ \pm 0.6$ 及 $22^\circ \pm 0.6$,膜的折射率为1.35。

在合理范围内选择不同折射率,可以改变的绝对值约为4。基于定向多层膜(单轴定向吸收)与水悬浮液(各向同性吸收)吸收光谱的不同,用另一方法计算 bR_{570} 的倾角为 $24^\circ \pm 4$ 〔148〕。我们还在稳定的光照下测量线二色性,估算光反应循环中间物 M_{412} 的取向(见

下面)。用减去残留的bR(bR_{570}^{LA})谱的方法校正用平行及垂直偏振光测量记录的 M_{412} 谱,此 M_{412} 谱与 bR_{570} 的无显著区别,这些结果说明,在光过程中发生的倾斜角的可能变化在我们的测量分辨能力以下。锥体表面内运动用绕三重轴跃迁矩的转动来描述。用上述方法还不能检测到这种运动,也不能排除它。

另一个确定膜中视黄醛位置的方法是将紫膜中 ^1H -视黄醛用 ^2H -视黄醛取代,研究其中子衍射图的不同。由于有限的分辨能力,仅可以得到高质子浓度的 β -紫罗酮环的信息〔294〕。结果表明此环位于离膜表面 $17\text{ \AA}$ (图2)。遗憾的是视黄醛的侧链方向及膜平面上环的位置尚不能毫无疑义地确定下来。但是我们的数据与用光学方法得到的色团间有 $9-12\text{ \AA}$ 的距离的结果是不能兼容的〔146, 147〕。由于实验和理论上的困难,所有这些测量均是初步的。

把 β -紫罗酮环放在离膜表面 $17\text{ \AA}$ 的深度,并假设视黄醛长轴与膜平面的角度为 20° ,这就要求希夫碱的键要在膜表面以下,因为视黄醛最大长度为 $15\text{ \AA}$ 。 $7\text{ \AA}$ 分辨率的蛋白质结构表明, α -螺旋之间的连接部分在膜表面,目前已知的氨基酸系列显示,希夫碱在非螺旋段上,此非螺旋段有七个氨基酸残基长,在螺旋系列的旁侧〔114, 144, 293〕。这就要求希夫碱基靠近一表面,但是,散射密度图现已达到的分辨能力并不排除在 α 螺旋区内有短程非螺旋片段。

Ovchinnikov等的序列数据证明,视黄醛一赖氨酸希夫碱基在非螺旋环中,此环位于多肽链自N端算起,第二个跨膜段的端点前1.5圈螺旋处*。因为有七个 α -螺旋穿过膜,还由于Gerber等〔144〕证明,C端在细胞质一侧,这样希夫碱基就靠近紫膜外表面。这与我们关于

*最近已经证明,〔143〕文中图5所示的bR分子的细胞质一侧位于顶部。

β -紫罗酮环位置及生色团倾角的结果一致(图4)。当然这是一个有极大尝试性的推论,多肽链构型稍有改变可以使希夫碱基跨膜移动一个很大的距离。在任何情况下,只要进一步精化确定结构的几种方法,就可能很快得到一个bR分子内排列的一致图形(见文后附加说明)。

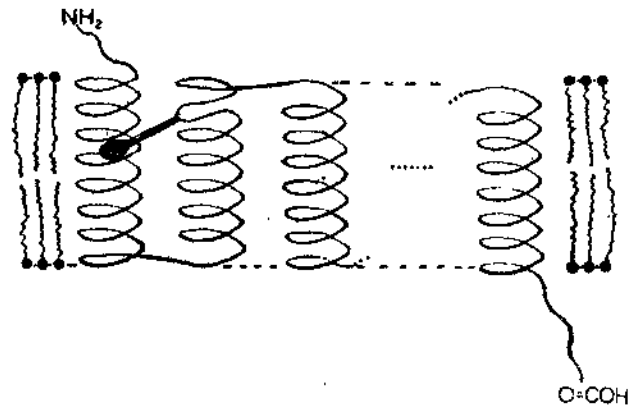


图4, 紫膜中bR取向的截面示意图。螺旋跨越膜双层膜, 此二维图仅画出七个链中之四个。已知膜平面上螺旋的排列图, 尚不知其连接顺序。图中视黄醛的超接点及倾角与已有的数据相应, 在膜平面中的取向尚属未知。

膜中蛋白晶格是刚性的; bR在其中运动性受限制的程度比其他所见膜中的要大得多〔149, 150〕。脂成分亦复如是。自旋标记的脂在29℃时有一弱相变〔151〕。光反应循环动力学的改变亦归因于这种相变(见第八节)。但是灵敏的差示扫描量热法, 在80℃以下, 却未见到任何相变, 所测之在80℃的相变是由于蛋白质晶格的解离(Jakobson与Sturtevant, 个人通讯)。

五、紫膜的功能

最初分离紫膜时, 并无迹象表明其存在。但无论其功能还是其特征组分的存在都不曾成为问题。因为细胞膜通过控制介质离子强度很易被破碎, 显然, *Halobacterium halobium*是个方便的菌种来验证细胞膜的假说—基于通用的结构原则, 膜具有特殊功能位点的镶嵌结构。特殊的膜成分可以插入和组装进去, 修饰一些基本结构能使其具有一些特需的功能。除紫膜外, 特殊底物运输系统, 受体复合体和细胞连接都是一些具有这种特殊功能位点的例子。很明显, 这些功能位点的成份不会象整个膜的组份那样复杂, 而且会是一种独特结构。这种预见由紫膜的分离以及随后其它膜中一些特殊功能位点, 如间隙连结〔152〕, 电鳗电器官的乙酰胆碱受体膜〔153〕的分离而得到证实。紫膜的独特性质易于分析和确认这种“功能位点”的结构和成份。一旦这样做了, 也就研究了紫膜的功能。

紫膜的明显颜色和bR分子与视色素分子的化学相似性表明, 光吸收对其功能起关键作用, *H. halobium*的趋光反应(见第九节E部分)在紫膜化学成份确认之前就已发现(Stoeckenius未发表)。它对紫膜的功能问题未给出满意回答, 因为它不能说明为什么细胞要合成如此大量的这种色素。其它生物只使用相当少量的感受色素, 除非它需要特别高的灵敏性。但*H. halobium*趋光反应的灵敏性并不很高。有这种可能, 即*H. halobium*的确用吸收的光能驱动