

Merocyanine 540 对亚线粒体能量化过程膜电位变化的吸收光谱响应的 on-off 机制*

姚军兰 张过江

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

关键词 Merocyanine 540、亚线粒体、膜电位、质子

Merocyanine 540 是一种多用途的荧光染料, 可反映膜脂的堆集程度^[1], 作细胞染色^[2], 进行光敏反应^[3], 还可测定膜电位. carbocyanine 阳离子型和 oxonol 阴离子型两类最常用的膜电位探针, 但它们对线粒体的氧化磷酸化抑制较大^[4], Rhodamine 123 常用于测定线粒体膜电位, 但较亲水, 不易通过膜, 因而不能对膜电位变化作出快速可逆的反应^[5], 而 Merocyanine 540 对线粒体抑制作用很小^[6], 而且反应快、信噪比大^[6], 因此宜用于测定线粒体和亚线粒体的膜电位.

本文结合 Merocyanine 540 的吸收光谱受自身浓度以及生物膜作用的影响而改变的特征, 探讨了亚线粒体能量化过程的膜电位变化引起其吸收谱响应的 on-off 机制.

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Merocyanine 540 (简称 M540), Hepes, Carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone (简称 CCCP) 和 NaN_3 为 Sigma 试剂; 3, 3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (简称 diS-C₃(5)) 购自 Molecular Probes 公司; 其他均为国产分析纯试剂.

1.2 亚线粒体制备

参照文献[7]. 制备大白鼠肝亚线粒体, 用 0.25 mol/L (pH7.5) 的蔗糖悬浮. 蛋白含量用双缩脲方法测定.

1.3 亚线粒体转运 H^+ 的测定

参照文献[8], 以 492 nm 吸收的减小来反映由 ATP 启动 $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ 的 H^+ 转运.

1.4 亚线粒体膜电位的测定

参照文献[9, 10], 测定 diS-C₃(5) 在亚线粒体 H^+ 转运过程中的荧光强度 (λ_{ex} 622 nm, λ_{em} 670 nm) 变化; 基于 M540 测定膜电位的 on-off 机制^[11], 测定 $\Delta A_{504-610}$, $\Delta A_{534-610}$ 和 $\Delta A_{568-610}$ 的差吸收谱, 以说明膜电位对 M540 在溶液与膜之间分配及分子状态的影响, 另用 $\Delta A_{568-610}$ 反映膜电位变化.

1.5 仪器

用日立 U-3200 分光光度计测定光吸收, 荧光强度和差吸收的测定分别使用日立 850 型荧

1994-04-06 收稿, 1994-07-25 收修改稿.

* 中国科学院生物物理研究所所长择优课题基金资助项目.

光谱仪和 557 型分光光度计。

2 结果与讨论

2.1 M540 的吸收光谱特性

M540 是一种双亲的阴离子型探针,其疏水部分易与膜的疏水区结合,极性基团 $-\text{SO}_3^-$ 伸向膜外水相使其难以通过生物膜^[11, 12]。因其 $-\text{SO}_3^-$ 可受膜电位的作用,故影响其与膜的结合(on)或脱离(off)。

M540 的水溶液里单体和二聚体以 $7.7 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的解离常数并存^[12],吸收波长分别为 534 nm 和 504 nm,当[M540]增大时,两者的浓度都增大但相对含量改变,图 1(a) 和 (b) 表明随[M540]增加,二聚体增加相对较大,单体增加相对较小,即 M540 随浓度增大易发生聚合。

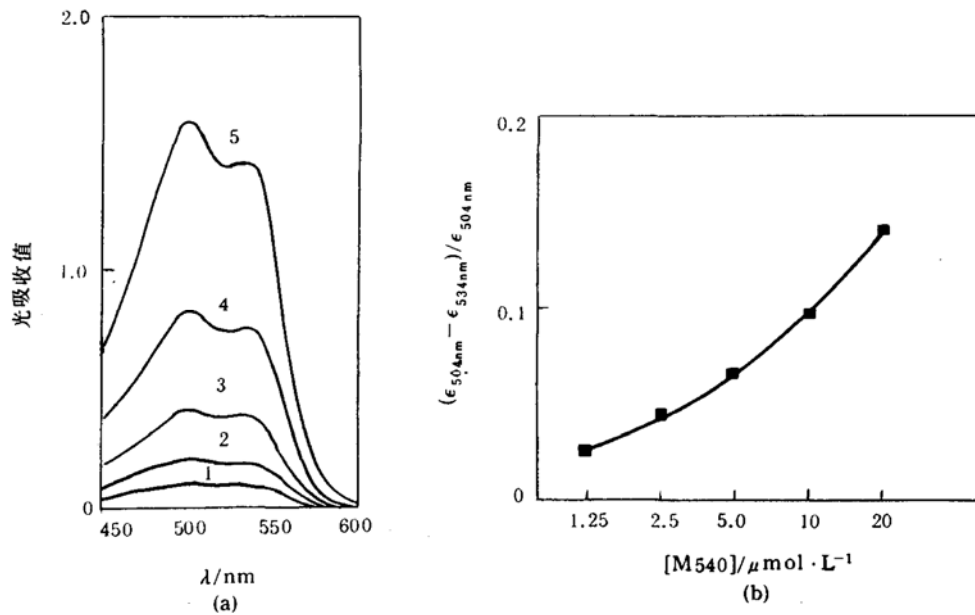


图 1 M540 的吸收光谱对浓度的依赖性

(a) 1—5 均为 M540 水溶液,浓度依次为 1.25, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$; (b) M540 水溶液中, 504 nm 与 534 nm 的摩尔消光系数之差相对于 504 nm 消光系数的变化对 M540 浓度的依赖性。各数据均为 3 次实验的平均值

M540 的吸收谱除受其浓度影响,溶剂极性也有影响。溶剂的介电常数减小,其吸收峰红移,最大吸收值加大^[12]。由于生物膜里的疏水区介电常数小,从而使与膜结合的 M540 分子的吸收谱发生明显变化。由图 2 可见,加入亚线粒体后,在 568 nm 出现一个新的由膜结合的单体分子所形成的吸收峰,说明 M540 分子与膜结合后吸收红移。从图 2 尚可见,随亚线粒体量增加,568 nm 吸收不断增强,504 nm 吸收逐渐减弱,表明膜上单体在增加而水中二聚体在减少,至于 534 nm 的吸收无明显减小,可能是由于水中的二聚体解聚补充了与膜结合而减少的水中单体,同时膜上单体也会形成二聚体,其吸收也在 534 nm 左右^[11]。

2.2 亚线粒体能量化过程中膜电位的变化

亚线粒体上的 $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ 可利用外源性 ATP 的能量将 H^+ 由外向内转运。图 3 中用吡

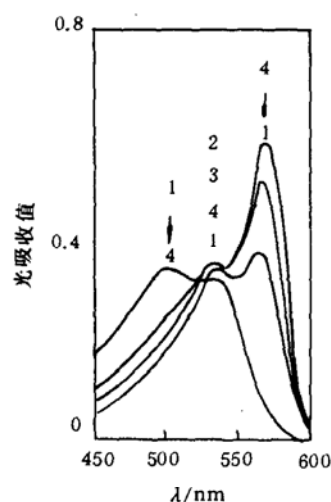


图2 亚线粒体对M540吸收光谱的影响
1—4为M540水溶液,浓度均为 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$.亚线粒体的蛋白含量依次为0, 0.16, 0.31, 0.47 mg/mL

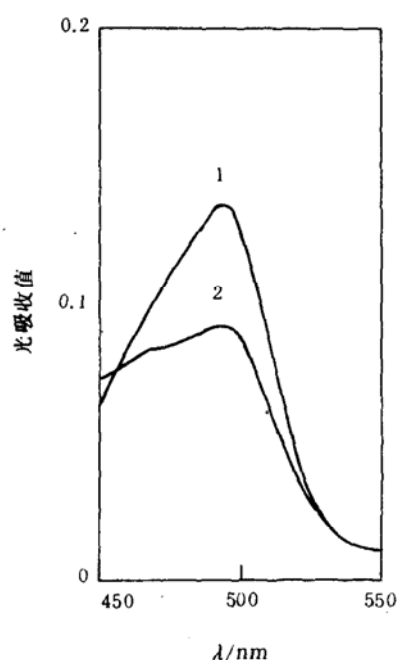


图3 吡啶橙的吸收谱在亚线粒体 F_0F_1 -ATPase转运 H^+ 中的变化

1为测定体系含 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Hepes (pH7.5), AO $2.5\text{ }\mu\text{mol/L}$, 亚线粒体蛋白含量 0.39 mg/mL ; 2为在线1体系中加入 1 mmol/L ATP, 2 min后描谱

吡啶橙对其 H^+ 转运进行了测定,由图可见,在用ATP启动亚线粒体 F_0F_1 -ATPase 2 min后,492 nm的吸收明显减小,表明了向内的 H^+ 转运。

由于 H^+ 向内转运,亚线粒体膜内侧电位会升高,图4是用 $diS-C_3(5)$ 对该膜电位变化进行的测定。根据 $diS-C_3(5)$ 的测定原理^[9,10],其受到外正内负的膜电位作用,可通过膜进入细胞或细胞器内,荧光遭到猝灭,当膜内侧电位升高,其荧光会得到一定恢复。图4曲线1显示由ATP启动的 H^+ 转运使 $diS-C_3(5)$ 的荧光增强,说明膜内侧电位升高,加入 H^+ 载体CCCP, H^+ 要向外扩散,形成外正内负的 H^+ 扩散电位使膜内侧电位又降低,故其荧光又遭猝灭。为了证明上述膜电位变化由 H^+ 转运所造成,曲线2使用 F_0F_1 -ATPase的抑制剂 NaN_3 ,结果比线1荧光增强的程度明显减小。

2.3 M540对亚线粒体能量化过程的吸收谱响应

图5显示了M540对亚线粒体转运 H^+ 过程中膜电位变化的光谱响应。为消除浊度效应,均以610 nm为参比波长。结果表明,当ATP启动 H^+ 转运后, $\Delta A_{588-610}$ 增强,说明膜上M540单体增加,由于该差吸收表现出快速增加和随后的缓慢增加,快反应相代表

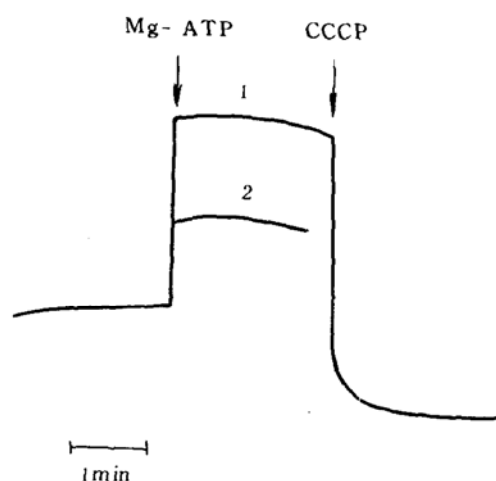


图4 $diS-C_3(5)$ 测定亚线粒体膜电位的荧光谱

1为测定体系为 10 mmol/L 的Hepes, pH7.5,内含 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ $diS-C_3(5)$, 0.04 mg/mL 蛋白量的亚线粒体; 2为在上述体系内尚含 10 mmol/L NaN_3 ,测定时在标示时刻分别加入 1 mmol/L ATP, 10 mmol/L $MgSO_4$, $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ CCCP. 记录 λ_{ex} 622 nm, λ_{em} 670 nm的荧光时间谱

溶液中 M540 在膜电位作用下迅速结合到膜表面,慢反应相可能是膜表面探针分子向膜内部电泳,而使膜上结合的 M540 缓慢增加^[1]。图 4 说明 H^+ 转运使膜内侧电位升高,因而吸引带负电的 M540 分子结合到膜上,CCCP 使膜内侧电位降低,故将膜上部分 M540 分子推回到溶液中,因此反映膜上 M540 单体分子的 $\Delta A_{568-610}$ 发生相应变化。由于向膜上结合,溶液中 M540 单体减少,这将促使二聚体解聚以形成新的平衡,因此反映二聚体的 $\Delta A_{504-610}$ 随 H^+ 转运而减小。 $\Delta A_{534-610}$ 的变化较难解释,因为溶液单体和膜上二聚体的光吸收均在 534 nm 左右,难以区分。用 ATP 启动 H^+ 转运后 $\Delta A_{534-610}$ 的快速减小,可能与 $\Delta A_{568-610}$ 的快反应相有关,即溶液单体分子快速向膜上结合而迅速减少;然后又略为增大,可能因溶液二聚体解聚,使减少的溶液单体有所增加,另外膜上单体的增加可能促成膜上二聚体的形成^[1]。

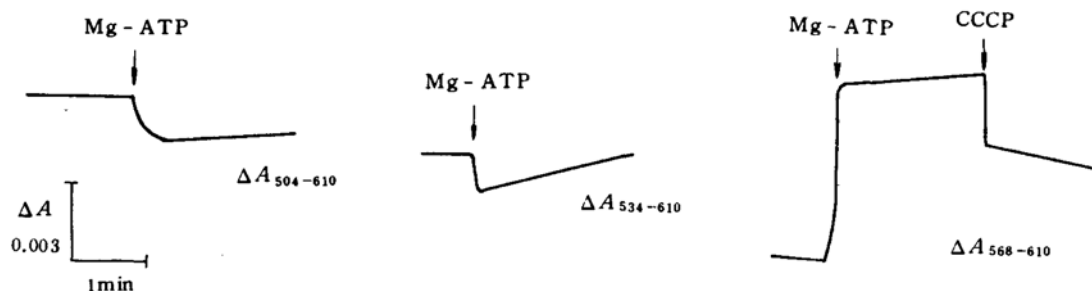


图 5 M540 的差吸收谱对亚线粒体能量化过程膜电位变化的响应

测定体系均为含 $5 \mu\text{mol/L}$ M540, 10 mmol/L Hepes, $\text{pH}7.5$ 的水溶液亚线粒体蛋白量均为 0.39 mg/mL 。在标示时刻分别加入 1 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgSO_4 , $10 \mu\text{mol/L}$ CCCP 分别测定 $\Delta A_{504-610}$, $\Delta A_{534-610}$ 和 $\Delta A_{568-610}$ 的差吸收谱

综上所述, M540 吸收谱对亚线粒体膜电位变化作出响应的本质是 on-off 机制。

参 考 文 献

- [1] Williamson, P. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 732: 387—393.
- [2] Easton, T. G. et al., *Cell*, 1978, 13: 475—486.
- [3] Sieber, F., *Photochem. Photobiol.*, 1987, 46(6): 1035—1042.
- [4] Kinnally, K. W. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 503: 380—388.
- [5] Loew, L. M., *Spectroscopic Membrane Probes* (eds. Loew, L. M. et al.), Vol. II, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1988, 140—151.
- [6] Lavie, E. et al., *FEBS Lett.*, 1980, 111(2): 281—284.
- [7] Gregg, C. T., *Meth. Enzymol.*, 1967, 10: 181—185.
- [8] 张过江等, 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(6): 539—543.
- [9] Harikumar, P. et al., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258(17): 10403—10410.
- [10] Eddy, A. A., Freedman, J. C., *Meth. Enzymol.*, 1989, 172: 95—122.
- [11] Kalenak, A. et al., *J. Membrane Biol.*, 1991, 123: 23—31.
- [12] Lelkes, P. I. et al., *J. Membrane Biol.*, 1980, 52: 1—15.