

细菌视紫红质膜的光抽运质子(电荷)转移的光学动态吸收特性研究*

黄玉华¹ 赵有源¹ 龚勤敢¹ 陈凌冰¹ 李富铭¹ 刘 坚² 丁建东² 李庆国³

(复旦大学¹ 物理系三束材料改性重点实验室;

² 高分子科学系聚合物分子工程教育部重点实验室; ³ 生物与生物物理学系 上海 200433)

提要 用自行设计的“连续抽运-探测光+脉冲抽运光”的实验系统,在不同波长的连续和脉冲光作用下,研究了细菌视紫红质(BR)膜的瞬态光吸收性质,并着重以 632.8 nm 的激光为连续抽运-探测光研究了 BR 的质子电荷光循环过程中,各能态的光吸收动力学过程及其瞬态光吸收特性与连续抽运-探测光强和脉冲抽运光强的关系。

关键词 细菌视紫红质,瞬态光吸收,动力学过程

1 引 言

嗜盐菌紫膜蛋白细菌视紫红质(BR)是一种新奇的光能转换分子,具有光驱质子抽运的功能,利用光能驱使带有电荷的质子从胞内抽运至胞外,从而形成重要的电化梯度。伴随光子质子抽运过程,BR 经历了一系列迅速的结构改变,这些改变是循环的^[1],称为光循环,其过程如图 1 所示。首先 BR 被光从基态(称为 *Br* 态)激发至 *J* 中间态,然后通过热弛豫,历经 *K, L, M, N, O* 等中间态再回到基态 *Br*。在光循环过程中,对应各个态的产物,其光吸收谱会发生明显的变化,尤其寿命较长的 *M* 产物的形成会对 BR 的吸收谱产生大的变化(*Br* 态的吸收峰在 570 nm, *M* 态的吸收峰在 412 nm)。各中间态也可以吸收光子直接弛豫回到基态,比如,处在 *M* 态分子再吸收 412 nm 附近的光后会直接回到基态 *Br*^[1]。通过研究 BR 的光瞬态吸收动力学过程,不但可以直观地看到它的光循环过程,而且可以更清楚地了解 BR 的光循环和质子转移的内在联系和物理机制。这对于将来充分开发利用 BR 作光学信息贮存和处理材料^[2~4]及快速光电探测器具有重要意义。

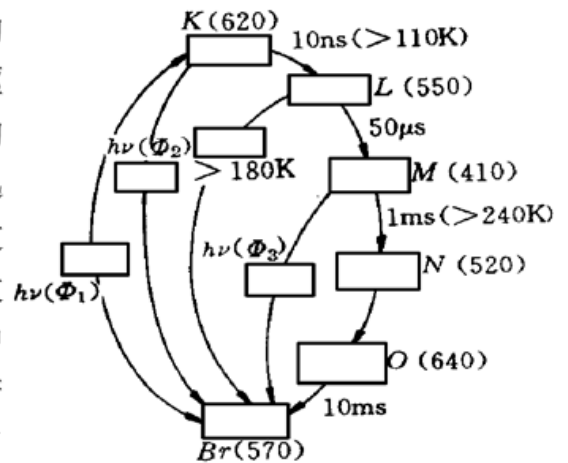


图 1 光适应细菌视紫红质膜的光循环

Fig. 1 Photocycle of light-adapted bacteriorhodopsin

* 国家自然科学基金(编号: 19834030 及 39730150)资助项目。

收稿日期: 1998-08-14; 收到修改稿日期: 1998-10-26

S. Y. Liu 等^[5]研究了取向的 BR 在光诱导下 L - M 的跃迁, M. C. Nuss 等^[6]研究了 BR 光循环过程中最初事件的飞秒谱。本文用 532 nm 的脉冲激光作为“脉冲抽运光”,利用不同波长的连续光源作为“连续抽运-探测光”,研究了这种生物分子对不同波长的光吸收动力学过程,所谓“连续抽运-探测光”,就是连续波长的光束不仅用作探测光束,而且在一定强度下,它又具有连续抽运光的作用。本文着重用 632.8 nm 波长的光作连续抽运-探测光,研究材料的光吸收动力学过程受探测光强和抽运光强的影响,从而研究其基态及激发态的动态吸收特性。

2 样品和实验装置

嗜盐菌紫膜是从嗜盐菌 *H. halobium* R₁ M₁ 中按常规方法分离得到的^[7],它以紫膜水悬浮液的形式存在。用吸管从紫膜水悬浮液中吸取少量紫膜液,并将它滴到硅玻璃板上,为了使所制的样品均匀,待其干后再加上一些紫膜液滴,如此反复 3~4 次,干后用于实验。样品的厚度约为 0.2 mm。

采用图 2 所示装置测量它的瞬态吸收,抽运光源是 Quantel 调 Q Nd:YAG 激光器(输出波长为 532 nm,脉冲宽度为 10 ns,重复频率为 10 Hz),光脉冲被分束器分成两路,一路用作存贮示波器的外触发信号。此示波器带宽为 175 MHz,转换精度为 8 bit A/D。另一路照射到样品上作为抽运光源。连续抽运-探测光源用 He-Ne 激光器或 250 W 的卤钨灯经过单色仪,获得所需波长的单色光。照射到样品上,在样品后用一光电倍增管接收透射信号并送到示波器。通过该实验装置用脉冲抽运光加连续抽运-探测

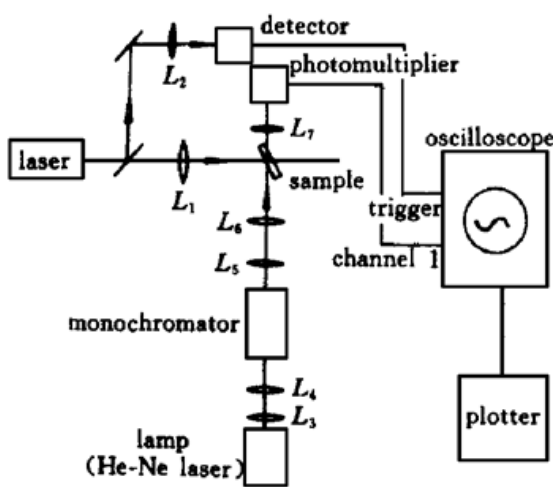


图 2 测量紫菌膜瞬态光吸收的实验装置

Fig. 2 Setup for measuring the optical kinetic absorption in bacteriorhodopsin

光来研究 BR 在两束光作用下所产生的光吸收瞬态的变化过程。

3 实验结果

1) 首先测量了样品的吸收光谱,用一白光光源照射样品,通过单色仪分析而得。结果如图 3 中曲线 1 所示。可以看出,它主要由两个吸收峰组成,一个峰的峰值在 570 nm 附近,其吸收谱线范围宽,吸收率大,另一个峰的峰值在 412 nm 附近,其吸收范围相对较窄且吸收率小。

2) 为了研究被光激发后 BR 光循环过程中(参看图 1)基态(吸收峰为 570 nm), M 态(吸收峰为 412 nm)和 O 态(吸收峰为 640 nm)的光吸收动力学过程,我们用卤钨灯作抽运-探测光源,通过单色仪后得到 570 nm, 632.8 nm 和 412 nm 三个波长的光束,并通过样品,然后分别测量 BR 在 532 nm 脉冲光作用后对它们产生吸收的变化情况。图 4 是 570nm, 632.8 nm, 412 nm 波长的瞬时吸收变化动力学曲线。未经脉冲抽运光照射之前,样品已受连续抽运-探测光激发,使光循环中的各个过渡态处于稳定态,即样品对强度一定的连续光的吸收是一个恒定值。将这一恒定值作为 y 轴的基线(表示为 0),经过脉冲光抽运后,吸收增加对应着 y 轴的正值,吸收减少对应着 y 轴的负值。为了叙述方便,规定脉冲光作用会引起吸收的变化,如果此变

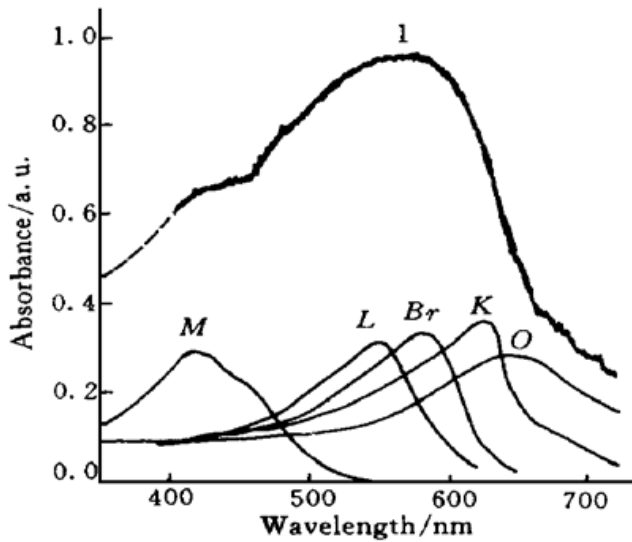


图3 紫菌膜对连续光的吸收谱及其各中间态的光吸收谱
曲线 *Br, K, L, M, O* 分别为 *Br, K, L, M, O* 等中间态的光吸收谱

Fig. 3 Absorption spectra of BR illuminated by CW light and different interediate states
Curve 1 is the experimental result when BR is illuminated by CW light, curve *Br, K, L, M, O* is the absorption spectra of *Br, K, L, M, O* respectively

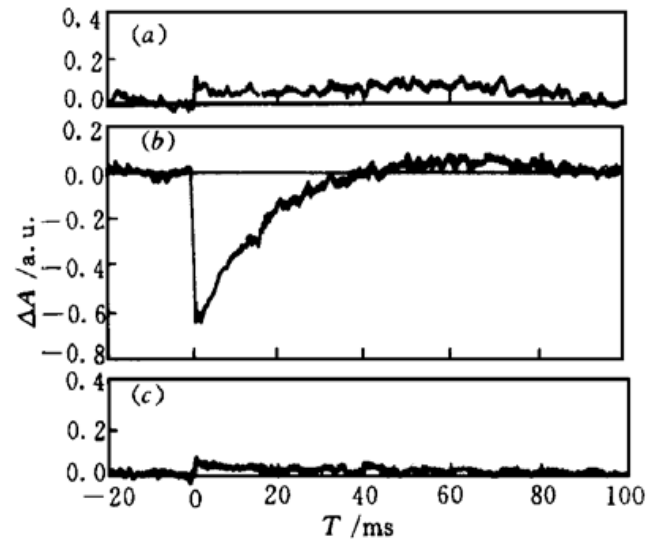


图4 在 532 nm 脉冲光抽运作用下,紫菌膜对不同波长的光吸收的动力学过程
其中 *a: λ = 632.8 nm, b: λ = 570 nm, c: λ = 412 nm.*
 ΔA 为光吸收变化

Fig. 4 The kinetic process of absorption in BR for different wavelength when pumped by 532 nm pulse laser
a: λ = 632.8 nm, b: λ = 570 nm, c: λ = 412 nm.
In this paper, ΔA represents the variations of optical absorption

化值是正值,我们称之为“正吸收”,如果变化值是负值,则称之为“负吸收”。注意这里的“正”“负”吸收只不过表明吸收的变化趋势。从图4可以看出它们具有以下特点:(1) *a, c* 曲线很快先负,后正,其中曲线 *a* 负得较大,时间很短;(2) 曲线 *b* 负的幅值更大,而且时间很长,经过 40 ms 后才出现正值。

3) 为了研究抽运光强对 BR 瞬态吸收的影响,先后固定连续抽运-探测光于两个不同光强值,光束经聚焦后照射到样品上的光斑面积约为 0.02 mm²,然后测量了样品的瞬态吸收随脉冲抽运光强变化的结果,如图5所示。图5(a)的连续抽运-探测光强为 16.03 mW/mm²,图5(b)的连续抽运-探测光强为 2.67 mW/mm²。从图上可以看出:(1) 脉冲抽运光只影响吸收变化的幅值,不影响正负特性;(2) 连续抽运-探测光影响吸收的正负性质;(3) 二组都含有正吸收(在几个毫秒时间内)。

4 分析与讨论

下面对上述结果分别进行分析讨论。

1) 图3中曲线1实际上是样品在连续光照射激发下,经历光循环各态的吸收总的叠加结果。因为一般来讲,如图1所示,BR受光激发后只需 10 ms 多些时间便可完成一个光循环过程,而在实验过程中,样品一直受到白光的照射,这意味着样品一直受到光激发,处于光循环过程中,并且光循环中各个态已处于稳定态。此时吸收光谱反映样品吸收连续抽运-探测光后各态的叠加情况,即此时样品的粒子数按一定比例分布在光循环的各个态上。文献[1]曾给出各

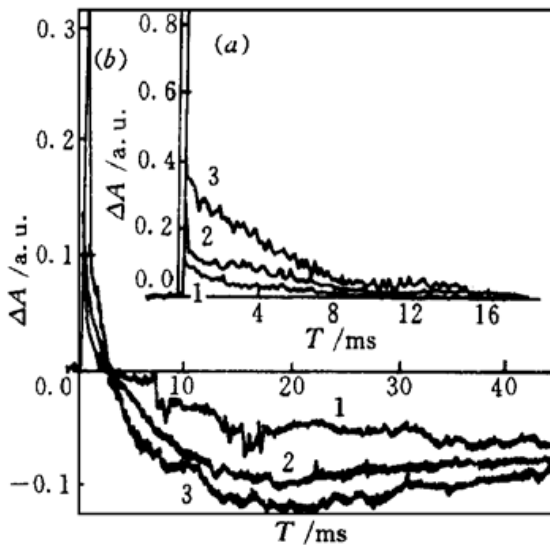


图5 保持连续探测光 632.8 nm 的光强不变, 改变 532 nm 脉冲抽运光的光强, 紫菌膜对 632.8 nm 光的吸收动力学过程

Fig. 5 The kinetic process of absorption in BR with the same probing intensity when pumped by 532 nm pulse laser with different intensity

$a: I_{632.8 \text{ nm}} = 16.03 \text{ mW/mm}^2$, $b: I_{632.8 \text{ nm}} = 2.67 \text{ mW/mm}^2$. Curve 1: $E_{532 \text{ nm}} = 10 \text{ mJ}$, curve 2: $E_{532 \text{ nm}} = 2.5 \text{ mJ}$, curve 3: $E_{532 \text{ nm}} = 1 \text{ mJ}$

粒子数迅速减少, 使吸收迅速下降(漂白), 致使吸收比未经脉冲抽运光作用之前的吸收小, 形成“负吸收”。经几毫秒后, 基态粒子逐渐增加, 其吸收也相应逐渐增加, 从而使其负吸收幅值逐渐减小, 且粒子数逐步恢复(这是光循环结果)。在 40~80 ms 内看到吸收变化值 ΔA 是正值, 这部分反映出 O 态产物的吸收, 我们认为, 根据图 1, 激发态的粒子在光循环中, 2 ms 后将逐渐弛豫到 O 态, O 态的粒子数增加, 由于 O 态的寿命较长且有连续抽运光的不断作用, 它可持续很长时间仍有较多粒子数, 从而使吸收增加。但 40 ms 前的这段时间内, 由于基态 Br 的粒子减少形成的负吸收远大于 O 态的正吸收数值, 因而它们吸收的差值还是表现为负吸收。直到 40 ms 后, 由于 Br 基态上的粒子进一步增加, 这时 O 态的粒子数增加引起的正吸收幅度超过了基态负吸收的幅度, 吸收曲线显示出 ΔA 为正值。60 ms 左右达到正吸收的峰值, 90 ms 左右基本完成, 吸收变化率趋于 0。(3) 当用 632.8 nm 和 412 nm 波长的光作连续抽运-探测光时, 参看图 4 曲线 a 和 c , 由于脉冲抽运光和连续抽运-探测光的波长不同, 经脉冲抽运光作用后, Br 态粒子大量受激光迅速漂白, 因而可探测到一个强的负峰。此负峰很窄, 不象曲线 b 很宽, 主要是因为探测光的波长在 412 nm 或 632.8 nm, 它们对 Br 态的吸收探测不甚敏感, 而更能分别探测出 M 态和 K, O 态的产物的吸收。因而在负脉冲后很快探测出激发态和其弛豫的产物吸收。在 K 态粒子在很短时间开始弛豫后的较长时间内, 此时连续抽运-探测光的抽运作用不可再被忽略, 使这些态由于粒子数增加而维持较长时间内的吸收正值。其中 412 nm 的探测曲线(图 4(c)) 在 30 ms 内更能反映出 M 态的产物吸收的变化。632.8 nm 的探测曲线(图 4(a)) 更能反映 K, L, O 态的吸收结果。又因为 K, L 态在循环过程中在 M 态之前, 因而曲线 a 中 30 ms 后

态的吸收曲线, 它们如图 3 中的 Br, K, L, M, O 曲线。如果把这些吸收曲线叠加起来, 会得到如图 3 曲线 1 所示的测量结果。因而我们看出, 曲线 1 实际上是样品在连续光照射下经历光循环总的吸收结果。

2) 当用不同波长的光作连续抽运-探测光时, 经同一波长和强度的脉冲抽运光作用后可得到图 4 的结果。这可以从以下几方面来进行分析: (1) 未有脉冲抽运光时, 连续抽运-探测光虽弱, 但仍有抽运作用, 各态都有一定的粒子数分布(一定的产物), 且是稳定的。它们构成对连续抽运-探测光一个总的连续恒定的吸收(图中标出的“0”处)。(2) 从图 3 可知, Br 态的吸收峰在 570 nm 附近, M 态吸收峰在 412 nm 附近, O 态的吸收峰在 640 nm 附近。脉冲抽运光波长 532 nm 落在 Br 态的吸收范围内, 且抽运光很强, 在脉冲光瞬态激发阶段, 其连续光抽运作用可忽略。

我们先分析探测光为 570 nm 的情况, 它接近抽运光波长, 所以主要探测出抽运光的影响, 即主要探测出 Br 态的吸收变化情况, 参看图 4(b)。当然在 Br 态激发主要的变化完成后, 可探测其他态的影响。脉冲抽运光作用后, Br 态粒子迅速被激发到激发态, 粒

的部分主要反映 O 态产物的变化。

3) 实验结果 3 首先表明:

(1) 当保持 632.8 nm 连续抽运-探测光强不变, 只改变抽运光强时, 不管 a 曲线组还是 b 曲线组, 都显示 BR 对光吸收的幅值随脉冲抽运光增强而增大, 而其正负变化的趋势不变。这说明抽运光强对它的光吸收动力学过程没有实质性的影响。这是因为抽运光波长靠近 Br 态的吸收峰, 抽运光的作用是将基态粒子激发到激发态上, 脉冲抽运光越强, 从 K 到 L 等过渡态的粒子数就越多, 探测光探测的这些受激过渡态的吸收就增加。因而它不改变吸收变化的趋势而只增加其幅值。

(2) 分析图 5 中的 b 组曲线, 即连续抽运-探测光较弱的情况。从图 5 可以看出, 在脉冲抽运激发后的 2 ms 内, 探测出的吸收变化率总是正的, 它对应 K, L (包括 M) 态的粒子数增加, 而在这段时间后, 曲线反映的是 N, O 态的变化。在图 1 的光循环图中可看出, 在循环过程中, K, L, M 态的粒子不仅可向 N, O 态弛豫, 还可将一部分粒子直接弛豫回基态, 我们形象地称它为“短路”, 且连续光的存在会激发这部分的直接弛豫增强。当连续抽运-探测光很弱时, 它的抽运作用很小, 这时由脉冲抽运光激发后的粒子数, 经光循环中这一系列“短路”情况可到达 O 态的粒子数相对不多了, 此时探测光探测到的 O 态正吸收量变化值小于此时探测到的 Br 态负吸收量变化值(尽管 O 态对探测光的吸收率大于 Br 态的, 但吸收与吸收率与粒子数之积有关)。因而图 5 中的曲线 b 在 2 ms 后的吸收变化率是负值。但它们还是如(1)中分析, 随着脉冲抽运光强度增强而向正值方向变化。

(3) 在图 5 a 组曲线内, 虽然脉冲抽运光强度同 b 组一样, 但连续抽运光对基态 Br 和过渡态中亚稳态继续存在抽运激发作用, 使 O 态在较长时间内保持较多的粒子数, 因而使整个曲线处在 ΔA 的正值范围内。

综上分析, 570 nm 波长的探测光主要反映 Br 态和部分 O 态的瞬态吸收变化情况; 而 632.8 nm 波长的探测光则更能反映 K 和 O 态相对于基态吸收值的变化情况; 412 nm 探测光则主要反映 M 态的吸收变化。在脉冲抽运光激发后的 2 ms 内, 样品对应着强的正吸收变化, 表明 K 态, L 态的粒子积聚和弛豫的变化, 数毫秒后的较长时间内, 主要显示了 N, O 态的相对于基态吸收的变化情况, 而在这段时间内, 连续抽运光的抽运作用不可忽略。对应连续抽运-探测光强的吸收变化率 ΔA 处于正值范围, 反之, 在较弱的连续抽运-探测光作用下, 其吸收变化率 ΔA 则处于负值范围。

参 考 文 献

- 1 Robert R. Birge. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1990, **1016**(3): 293~ 327
- 2 R. Thoma, N. Hampp, C. Brauchle *et al.*. Bacteriorhodopsin films as spatial light modulators for nonlinear-optical filtering. *Opt. Lett.*, 1991, **16**(9): 651~ 653
- 3 R. Thoma, N. Hampp. Real-time holographic correlation of two video signals by using bacteriorhodopsin films. *Opt. Lett.*, 1992, **17**(16): 1158~ 1160
- 4 Ofer Werner, Baruch Fischer. Saturable absorption, wave mixing, and phase conjugation with bacteriorhodopsin. *Opt. Lett.*, 1990, **15**(20): 1117~ 1119
- 5 S. Y. Liu. Light-induced currents from oriented purple membrane. Correlation of the microsecond component (B2) with the L-M photocycle transition. *Biophys. J. Biophysical Society*, 1990, **57**(5): 943 ~ 950

- 6 M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser *et al.*. Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin. *Chemical Physics Letters*, 1985, **117**(1): 1~ 7
- 7 D. Oesterhelt, W. Stoeckl. Isolation of the cell membrane of *H. halobium* and its fractionation into red and purple membrane. Optical Absorption Nonlinearity in Bacteriorhodopsin. *Methods in Enzymol.*, 1974, **31**(7): 667~ 678

Optical Kinetic Absorption of the Proton (Charge) Transfer Pumped by Light in Bacteriorhodopsin

Huang Yuhua¹ Zhao Youyuan¹ Gong Qingan¹ Chen Linbing¹

Li Fuming¹ Liu Jian² Ding Jiandong² Li Qingguo³

(¹State Key Lab for Materials Modification by Laser Ion & Electron Beams, Physics Department, ²Department of Macromolecular Science, ³Biology and Biophysics Department, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract The characteristics of instantaneous optical absorption in bacteriorhodopsin(BR) pumped by different wavelength cw and pulsed light were studied with the experimental system of “cw optical pump-probe + pulse laser pump” designed by ourselves. Especially, a 632.8 nm laser was used as the cw pump-probe light to study the correlation between the optic-absorption kinetic characteristics of BR’s every state during the optical cycle process of proton charge together with its instantaneous optical absorption and the intensity of cw pump-probe or pulsed pump laser.

Key words bacteriorhodopsin, instantaneous optical absorption, kinetic process