

文章编号 : 0258-7025(2001)010-0896-05

用脉冲激光研究细菌视紫红质的瞬态光 吸收和光电压*

杨 群¹ 赵有源² 李富铭² 刘 坚³

(¹ 云南省楚雄师范专科学校物理系 楚雄 675000 ;
² 复旦大学² 光科学系三束材料改性国家重点实验室³ 高分子科学系 上海 200433)

提要 用自行装配的染料脉冲激光器,在室温下研究了细菌视紫红质膜蛋白(BR)对 5 种不同光波的瞬态光吸收和 3 种光波的光电压的关系。实验发现,BR 对同一种光波的光电压和光吸收并不完全相关,影响其光电转换的因素除了与 BR 所吸收的光能多少有关之外,还有其他复杂的原因。在 3 种脉冲半宽为 110 ns 的染料激光中,617 nm 激光对 BR 产生光电压最为有利。

关键词 细菌视紫红质膜蛋白 瞬态光吸收 光电压

中图分类号 TN 249,TP 333 **文献标识码** A

Study of the Relation between Instantaneous Optical Absorption and Photovoltage in Bacteriorhodopsin by Dye Pulse Laser

YANG Qun¹ ZHAO You-yuan² LI Fu-ming² LIU Jian³

(¹ Department of Physics, Chuxiong Teacher's College, Chuxiong 675000
² State Key Lab. for Materials Modification by Laser, Ion & Electron Beams, Department of
Optical Science, ³ Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract A study of the relation between instantaneous optical absorption and photovoltage in bacteriorhodopsin in room temperature by dye pulse laser with different wavelenghtes indicates that : the photovoltage and optical absorption of the BR are not necessarily correlated, besides the amount of optical absorption there are other factors influcing photovoltaic conversion ; and the photovoltage of BR at 617 nm is greater than that at 597 nm and 577 nm.

Key words bacteriorhodopsin, instantaneous optica absorption, photovoltage

1 引 言

光电探测与信号处理是现代传感技术的重要组成部分,其作用是把光信号转换为电信号并进行信息加工和处理。近年来,人们开始研究和开发有机光电子功能材料。细菌视紫红质(BR)是一种光信息存储和能量转换的生物膜蛋白质分子。在光作用下,BR 被光从基态(BR 态)激发到 J 中间态,产生极为迅速的电荷分离和生成光电响应信号,质子被抽运出膜外。被激

发到高能态的原初异构体通过热弛豫,历经 K, L, M, N, O 等中间产物后再回到基态,完成一次光循环,各中间产物的吸收谱如图 1 所示^[1]。对此,许多人已经作了大量的研究,且多用能量为 mJ 级的脉冲激光做实验。我们则利用自行调制的较弱的染料激光(能量约 μJ 级),同时研究了 BR 的瞬态光吸收和光电压信号的有关规律,着重找出在不同波长、不同强度的染料脉冲光的激发下,BR 的光电压信号和光吸收信号的关系,探究影响 BR 光电转换的因素。

2 样品与实验方法

嗜盐菌紫膜系从嗜盐菌 *H. halobium* R. M. 中按常

* 国家自然科学基金(编号:69888001,19834030 及 39730150)资助课题。

收稿日期 2000-05-30;收到修改稿日期 2000-08-09

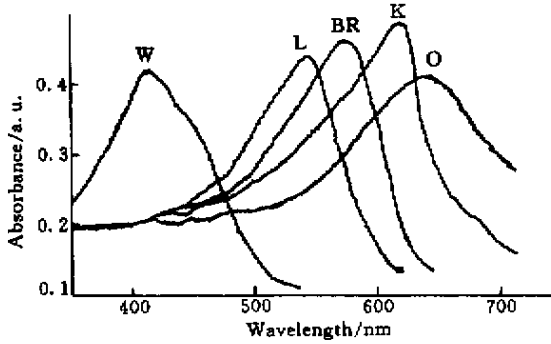


图 1 BR 中间产物吸收谱图

Fig.1 Curve BR, K, L, M, N, O are the absorption spectra of BR, K, L, M, N, O states, respectively

规方法得到^[2]。它以紫膜水悬浮液形式存在。用吸管从紫膜水悬浮液中吸取少量紫膜液,将它滴到硅玻璃板上,干后用于实验。样品的厚度约为 0.2 mm。实验温度 20℃ 左右(室温),pH 值在 6~7 之间(基本为中性)样品中基本无杂质离子。

对极化 BR 样品的制作,按文献[3]所说方法进行。在干燥的紫膜层上,用真空镀膜的方法喷镀一层半透明的铝,并覆盖在半透明的导电玻璃板上,引出导线,形成紫膜电池样元件。

先采用图 2 所示的装置测量 BR 样品对染料脉冲光的瞬态光吸收特性。再用图 3 的装置研究极化 BR 样品对染料脉冲光的电响应特性。染料脉冲激光输出脉冲宽度为 110 ns,能量约为 300 μJ,重复频率 5 Hz,光斑直径约为 2 mm。所用 TD380 型数字示波器,带宽 400 MHz,数字化水平为 8 bit,实现了示波器和计算机的通讯联系。

采用“脉冲抽运光+连续抽运探测光”实验系统,研究 BR 的光瞬态吸收动力学特性。利用自行装配调制的 5 种染料激光(波长为 577 nm,587 nm,597 nm,617 nm 和 627 nm)作“脉冲抽运光”,每个激光脉冲半宽度约 110 ns,强度约为 μJ 级。先用一脉冲光使 BR 激发,同时用 λ = 637.5 nm 的连续光探测其吸收特性的变化。实验着重研究这种生物分子各态特别是 O 态对不同强度、不同波长脉冲光的瞬态光吸收特性。随后又研究了 3 种染料激光(波长为 577 nm,597 nm 和 617 nm,激光脉冲半宽度、强度同前)作激发光时,对极化 BR 样品产生的瞬态光电压特性。测试内容:1)当每一种脉冲的波长不变,而光强变化时的光电压响应信号;2)保持相同照射光强的条件下,BR 对不同波长的激发光所产生的瞬态光电压信号。

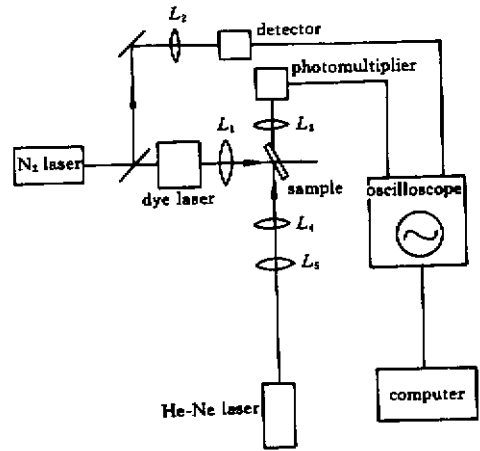


图 2 测量光吸收的实验装置图

Fig.2 Measuring setup for kinetic process of optical absorption

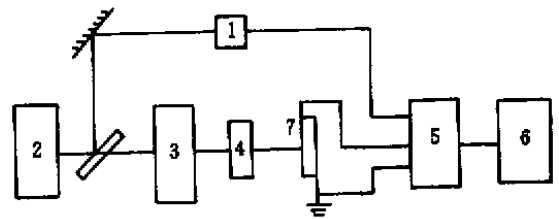


图 3 测量光电压的实验装置图

1: 探测器; 2: N₂ 激光器; 3: 染料激光器;
4: 衰减器; 5: 示波器; 6: 计算机; 7: 样品

Fig.3 Setup for measuring the photoelectric signals
1: detector; 2: N₂ laser; 3: dye laser;
4: attenuator; 5: oscilloscope; 6: computer; 7: sample

3 实验结果

通过对比分析 BR 的瞬态光吸收和瞬态光电压两个实验结果,发现有如下规律:

3.1 BR 样品瞬态光吸收信号与瞬态光电压信号的共同点

1) 5 种染料激光的瞬态光吸收信号与瞬态光电压响应信号都表现为脉冲形式,在图 4,图 5 中给出了其中几种波长的信号。

2) 5 种抽运光的光吸收信号均随抽运光强的增大而增大,3 种染料激光的光电压信号幅值,同样也随照射光强的增加而增加。图 4(a)(b)给出了抽运光与照射光波长都为 587 nm 时的光吸收和光电压信号幅值随光强变化的情况,由于其他波长的情况均与之相

同 , 这里就不再给出。

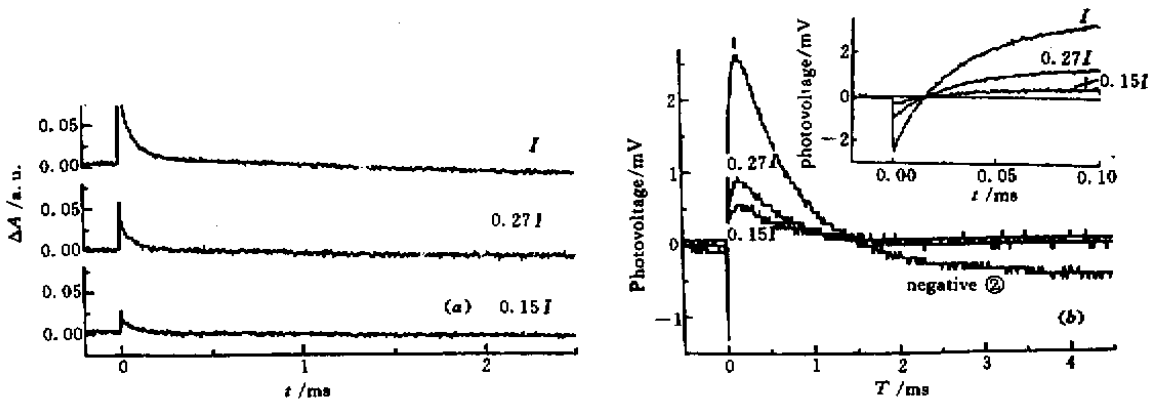


图 4 脉冲抽运光($\lambda = 587 \text{ nm}$)光强 I 改变时的光吸收信号的变化 (a) 和光电压信号的变化 (b)

Fig.4 (a) Kinetic absorption with different pump light intensity (I) ;
(b) Photoelectric signals of different illumination intensity I ($\lambda = 587 \text{ nm}$)

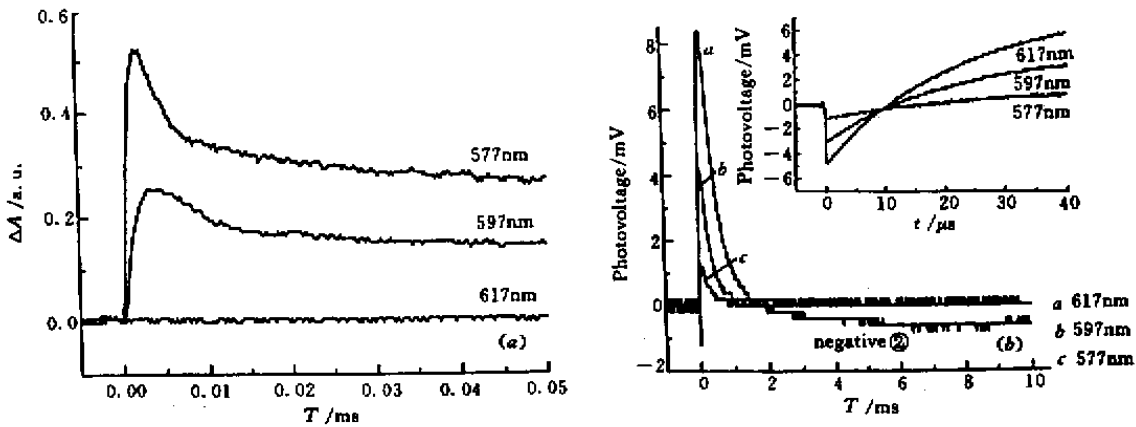


图 5 (a) 光吸收信号随抽运光波长变化而变化 (b) 照射光强度相同波长不同的光电压信号

Fig.5 (a) Kinetic absorption at different wavelength ;
(b) Photovoltage at different wavelength with same illumination intensity

3) 当入射光波长改变时 , 这两种信号的幅值及寿命也随之改变 , 见图 5(a) (b)。

3.2 BR 样品瞬态光吸收和光电压信号的不同点

1) 光电压信号多是双极性的 , 具有正、负两种信号 , 少数还有第三种成分 (见图 4(b), 图 5(b) 中标有 negative② 的曲线部分 , 这部分曲线位于横轴下方) , 即第二个负信号。而光吸收信号的成分则比较复杂 , 可以从只有一个负信号到具有多个正负信号。其中多数具有三种成分 : 即负信号 1、正信号和负信号 2 , 见图 6。

2) 光吸收信号的寿命不仅与入射光的波长有关 , 还与其强度有关 , 而光电压信号的寿命只与脉冲光的波长有关 , 与其强度无关。见图 4(a) (b)。

3) 对同一种入射光波 , BR 光电压信号幅值的大小与光吸收信号幅值的大小之间并不完全相关。3 种波长的抽运光在相同强度下所产生的光吸收正信号幅值按从大到小排列的次序是 577 nm , 597 nm 和 617 nm (图 5(a) 中 , 在相应强度下 , 样品对 617 nm 的吸收太小 , 以致反映不出来 , 若再加大抽运光的强度 , 就可得到 617 nm 的吸收曲线。) ; 而按所产生光电压幅值大小排列的顺序是 617 nm , 597 nm 和 577 nm , 见图 5(a) , (b) 。由图可知 , 在 3 种光波中 , BR 对 577 nm 的光波吸收得最多 , 产生的光电压信号却最小 ; 而对 617 nm 的光波吸收最少 , 但产生的光电信号却最大。

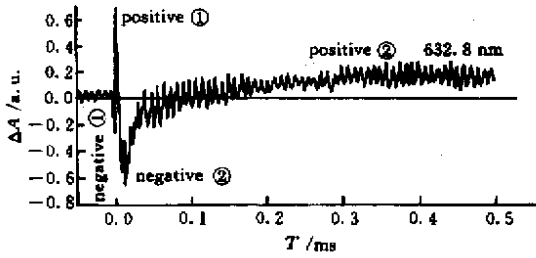


图6 抽运光波长 $\lambda = 597 \text{ nm}$ 探测光波长 $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ 时有多个正负光吸收信号

Fig.6 Kinetic absorptions of detection light (632.8 nm) with pulse pump light (597 nm)

4 分析与讨论

采用“脉冲抽运光 + 连续抽运探测光”实验系统,研究 BR 的光吸收动力学过程,当用一染料脉冲光将 BR 激发到高能态时,同时用另一束连续光探测样品光吸收特性的变化。如果 BR 受激后产生了具有不同吸收特性的中间体,那么探测光通过样品后的透射率就会随时间发生变化,通过分析探测光的吸收曲线,便可以获得 BR 的光吸收变化规律。

当样品受到连续抽运探测光 ($\lambda = 637.5 \text{ nm}$) 激发后,此时样品对强度一定的连续光的吸收是一个恒定值,这一恒定值可用光吸收曲线中的 Y 轴的基线表示(即恒定值为零)。再经某一脉冲光抽运后,吸收增加对应 Y 轴的正值,称为“正吸收”,吸收减少对应着 Y 轴的负值,称为“负吸收”。我们在 BR 的光吸收实验中所采用的抽运光主要有 3 种 ($\lambda = 577 \text{ nm}$, 597 nm 和 617 nm)。由于采用的探测光主要处于 BR 的 K 态和 O 态的吸收范围,所以 637.5 nm 探测光更能反映 BR 中 K 和 O 态相对于基态吸收值的变化情况。

对 3.1 所给出的实验结果解释如下:

1) 由于入射的抽运光越强,被激发到高能态的粒子数越多,相继产生的 K, L, M, N, O 中间体越多,探测光的吸收值变化越大,光吸收信号的幅值也越大。光电压信号的产生主要与光循环中 M 中间体的去质子化有关,同样的被激发到高能态的粒子数越多,产生的 M 中间体越多,抽运出的质子也就越多,产生的正光电压也越大。所以当同一种波长的脉冲光照射 BR 样品时,光吸收信号或光电压信号的幅值都随着激发光强的增大而增大。

2) 在 BR 的光吸收或光电压实验中,当强度相同、而波长不同的激发光入射时,从图 1 BR 各产物的吸收

谱图上可以看出,基态 BR 对各种光波的吸收情况并不相同,其中对 577 nm 的吸收最大,对 617 nm 的吸收最小,对 597 nm 的吸收居中,也即基态 BR 的被激发情况与激发波长密切相关。由于基态 BR 的被激发情况关系到在光循环中所产生的 M 中间体的数目,从而影响到光抽运质子的多少,因而 BR 的光吸收、光电压信号的幅值和寿命均随激发光波长而改变。对具体的变化规律后面再作解释。

对 3.2 的结果解释如下:

1) 光电压信号是由于产生电荷分离后的正、负电荷的运动形成的,故至少为双极性。而光吸收的正负变化与光循环中各个中间产物的形成情况及探测光都有关,所以它的极性、数目比较复杂。

2) 光吸收信号的寿命除与激发光波长有关外,还与激发光强有关,而光电压信号的寿命则与入射光强无关,这是因为激发光的强弱直接影响了 BR 样品的光循环时间。激发光越强,受激发的 BR 粒子数就越多。参与光循环的粒子数越多,由于各个粒子光循环的起始时间不同,因而整个 BR 样品的光循环持续时间也越长,整个 BR 样品光吸收信号的持续寿命也越长。而光电压的产生主要决定于 BR 希夫碱基的去质子化过程以及质子的移动情况,这些特性只与样品本身的特性有关,所以光电压信号的寿命与照射光强无关。

3) 由 3.2 第三点可知,当光强相同时,在 3 种抽运光波中,BR 对 577 nm 的光波吸收得最多,产生的光电压信号却最小;而对 617 nm 的光波吸收最少,但产生的光电信号却最大。也即 BR 样品产生的光电压信号的大小,与光吸收的多少并不完全相关,这一点表明在 M 态形成过程中产生的电荷并非全体都对形成光电压有贡献,它意味着影响光电压大小的因素,除开光抽运质子数目的多少之外,还有更复杂的因素。对此,我们试着提出两种下面可能的解释。第一种,据文献 [4],认为在 M 态的衰减过程中,可能存在有电荷沿膜平面的运动,这一类电荷对 M 产物是有贡献的,但对光电压并无贡献。这就是说,电荷分离产生的质子如果沿膜面运动,它将不可能被抽运出膜外,因而对光电压的产生并无贡献。我们假设由于 3 种光波激发 BR 时所形成的 M 态的两种成分(快成分 M_1 和慢成分 M_2) 的比例不相同,因而影响了沿膜面运动的质子数目。其中 577 nm 光波产生的沿膜平面运动的质子的比重最大,虽然 BR 对它吸收最多,但是它所产生的质子却对光电压的形成贡献不大。相反,由于 617 nm 的

光波照射后所产生的质子,没有沿膜平面运动的成分,它们都对光电压的形成有贡献,所以 BR 对 617 nm 光的吸收最小,产生的光电压却最大。这种解释意味着,617nm 激发光更有利于 BR 膜中的质子抽运出膜外,产生光电压。第二种解释是,617 nm 的光波能对 BR 产生更多高能态的质子。当脉冲光照射样品时,BR 分子上的生色团——视黄醛产生快速的全反-13 顺型异构化,质子化希夫碱基失去质子,M 态中间体形成,质子从细胞膜内经质子通道被抽运到膜外。在 BR 分子完成一个光循环的后期,菌紫质又从介质中吸收一个质子使其构像恢复,完成一个光循环。抽运出膜外的质子在样品的一侧形成宏观集聚,而在另一侧由于质子缔合作用形成负电荷集聚,两侧之间即形成电位差,这就是光电压效应。在光循环过程中,只有 M 态中间体是去质子化的,其余各态都是质子化的。而初步假设是:由于染料激光器的脉冲半宽度约 110 ns(这比 YAG 倍频激光脉宽 8 ns 大许多),一般 BR 从基态激发到激发态,在 ns 级内便可完成,在一次循环中,从 K 态到 L 态弛豫时间约为 10 ns,因而抽运光不仅可使基态粒子激发到 J, K 态,而且还能使 K, L 态上的粒子进一步得到激发,跃至更高能态,也即 BR 分子可以把更多的光能以不同的分子构像存储,然后又通过 M 态中间体,以抽运出具有更高动能质子的方式释放出去。又因为 K 态在 617 nm 处的吸收截面比在 577 nm 处的大^[5],所以 610 nm 照射能产生更多的高能量质子,而高能量质子则容易克服膜壁阻力,抽运出膜外,形成光电压信号,将光能转变为电能。

5 结 论

1) 细菌视紫红质的光吸收和光电压信号都和照射光的波长和强度有关; 2) 正光电压的形成时间(约为 1 ms)远小于一次光循环的时间(10 ms); 3) 光电压的大小并不完全取决于光吸收的多少,在光电转换过程中还有更复杂的因素需进一步探讨; 4) 617 nm 光波可能是 BR 在被激发过程中产生光电压的最佳波长值。

本文用染料激光对人工 BR 膜的光电压和光吸收之间的关系进行了初步的研究探讨,所得结果为将来研究开发细菌视紫红质膜蛋白,在快速光电探测和快速高密度光信息存储器件的应用方面打下了一定的基础。

参 考 文 献

- 1 Robert R. Birge. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1990, **1016** 293 ~ 327
- 2 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** 667 ~ 668
- 3 P. Ormos, L. Reinisch, L. Keszthelyi. Fast electric response signals in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochimical and Biophysical Acta*, 1983, **722** 471 ~ 479
- 4 Li Qinguo, Zhang Shuhui, Cheng Jiji *et al.*. A relation between photovoltage in the beamed bacteriorhodopsin film and its light illumination intensity. *Biochimical and Biophysical Acta* (生物物理学报), 1987, **2**: 197 ~ 203 (in Chinese)
- 5 GONG Qi-gan. A study of optical absorption characteristic in organic and optical-biologic function materials. *Master Degree Paper of Fudan University*, 1999. 20 (in Chinese)