

# 利用泵浦-探测方法研究 菌紫质光循环\*

姚保利 徐大纶 侯 洵

(中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态光学技术国家重点实验室, 西安 710068)

**摘 要** 用两套具有不同时间分辨率和激发方式的测量系统对菌紫质(BR)光循环动力学进行了泵浦-探测研究。一套是单次脉冲氙灯闪光诱导样品; 另一套采用重复调Q倍频YAG激光器周期性激发样品。检测光使用He-Ne激光器633 nm红光。用雪崩光电二极管和500 MHz数字示波器进行信号检测与波形处理。实验结果表明, 菌紫质光循环周期 $<15$  ms。中间体K $\rightarrow$ L的时间常数为 $2 \mu\text{s}$ , L $\rightarrow$ M的时间常数为 $50 \mu\text{s}$ , 在中间体K之前发现了一个可疑的成份。据此给出了菌紫质光循环在纳秒到毫秒时域模型。

**关键词** 泵浦-探测, 菌紫质, 光循环.

## 1 引 言

细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin 简称菌紫质或BR)与视觉细胞中作为光传感器的视紫红质(rhodopsin)有很多共同点, 在生物体内作为一种光驱动质子泵完成着光合作用的功能。这些特性与菌紫质光循环有着密切的关系<sup>[1]</sup>。当菌紫质受光照射被激发时, 首先在飞秒和皮秒时域产生发色团极其迅速的光异构化, 形成菌紫质光循环最早期光产物I、J、K, 随后发生一系列蛋白质构象变化, 在这些热弛豫过程中有数个不同的中间体成份依次出现(如L、M、N、O), 最后回到初态。光化学反应的速度为数毫秒, 其间一个质子从细胞质一侧被运送到菌体外。

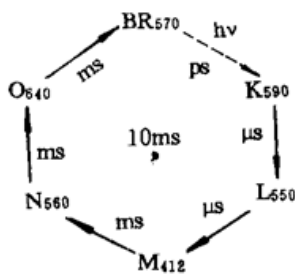


Fig. 1 A model of BR photocycle

通过对菌紫质光循环过程的研究, 可以了解光驱动质子泵的内部机制及菌紫质光致色变特性的分子机理, 这对人工利用菌紫质作为光能转换器和光学信息存储材料具有重要的意义。研究菌紫质光循环有多种方法<sup>[2]</sup>, 如时间分辨折射率变化法<sup>[3]</sup>、共振拉曼光谱学方法<sup>[4]</sup>、时间分辨介电损耗探测法<sup>[5]</sup>、电响应信号检测法<sup>[6]</sup>等。人们根据多种方法得到的数据, 建立了菌紫质光循环的理论模型。不过菌紫质光循环是一个相当复杂的动力学过程, 其中的许多细节过程至今仍不很清楚, 而且用不同方法得到的结果, 在某些方面不完全一

\* 瞬态光学技术国家重点实验室及中国科学院基础性研究九五预研基金资助。

收稿日期: 1995年5月1日; 收到修改稿日期: 1995年8月15日

致。图 1 是一种比较公认的菌紫质光循环模型。作者用泵浦-探测法在 633 nm 处对菌紫质光循环(在纳秒到毫秒时域)进行了研究。

## 2 材料与方方法

菌紫质样品从嗜盐菌品系 R<sub>1</sub>M<sub>1</sub> 中提取, 以紫膜悬浮液形式存在。紫膜悬浮液浓度 1.5 mg/ml, PH5.1, 在 570 nm 和 633 nm 处的光密度分别为 1.64 和 0.40。

采用泵浦-探测法研究菌紫质光循环动力学过程。先用一光脉冲将菌紫质激发到高能态, 同时用另一束光监测样品吸收特性的变化, 如果菌紫质受激发后产生了具有不同吸收特性的中间体, 那么检测光经过样品的透过率就会随时间发生变化, 通过分析检测光动力学曲线, 可获得菌紫质光循环的时间历程信息。

为了观察菌紫质光循环的全过程, 作者建立了两套具有不同时间分辨率和激发方式的测量系统。图 2(a)是以单次脉冲氙灯作为泵浦光源的闪光诱导紫膜悬浮液装置图。闪光脉冲上升时间 48  $\mu$ s, 下降时间 1.1 ms, 半峰宽度 465  $\mu$ s, 脉冲能量约 54 mJ。该系统获得了在亚毫秒到毫秒时域内的动力学曲线, 观察到了菌紫质光循环的整体过程, 但无法分辨光循环早期过程。图 2(b)系统采用重复调 Q 倍频 YAG 激光器 532 nm 单色光作为泵浦光源周期性激发样品。该激光器输出上升时间小于 75 ns, 半峰宽度 290 ns, 频率 545 Hz 的巨脉冲续列, 平均功率 30 mW, 对菌紫质光循环早期过程能较好地测量, 但对菌紫质光循环后期过程则看不到。实验用检测光为 He-Ne 激光器 633 nm 红光, 功率 0.7 mW。光电转换器为雪崩光电二极管, 上升时间 10 ns。信号测量系统用的是惠普公司 500 MHz 数字示波器, 具有信号平均、积累保持、波形存储, 数学处理等功能, 测量结果可直接用配套打印机输出。

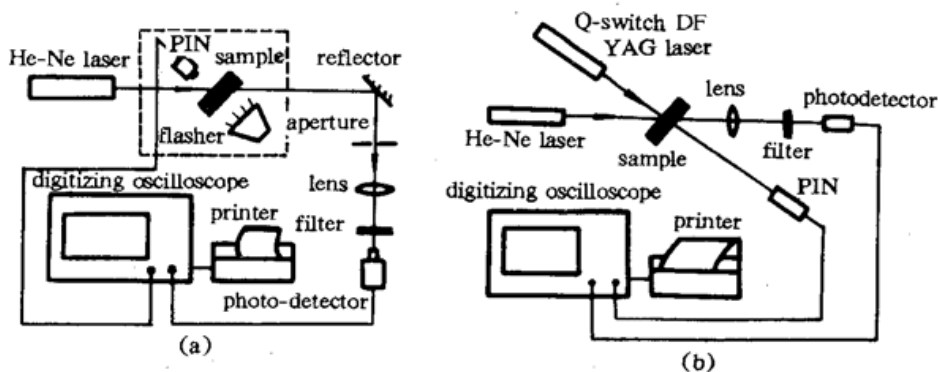


Fig. 2 Scheme of the pump-probe measuring systems for studying BR photocycle

(a) pump with a single-shot Xenon lamp flash

(b) pump with a series of pulses of a Q-switch double frequency YAG laser

## 3 结果与讨论

### 3.1 信号检测系统噪声及检测光源稳定性测量

虽然利用数字示波器多次信号平均功能可大大提高信噪比, 但这只适用于重复事件过程, 对于单次事件过程, 系统的噪声、背景噪声及检测光的波动对待测信号都是一种干扰, 因此必须尽量将它们抑制到最低水平。在示波器积累保持功能下连续监测了 3 分钟, 得到测量系统的噪声(包括背景噪声、光电转换器噪声、示波器噪声)不大于 14 mV; He-Ne 激光器输出不稳定性不超过  $\pm 6\%$ 。

### 3.2 单次闪光激发样品实验结果

为了减小脉冲氙灯闪光漏入光电探测器对测量信号产生影响,将样品盒与闪光灯罩在一个避光的箱体中,在光路中还设置了小孔光阑和 633 nm 干涉滤光片以减小杂散光。图 3 是实验结果。其中  $M_1$  为未扣除漏闪光探测到的总信号;  $M_2$  为漏闪光信号;  $M_3 = M_1 - M_2$ , 为实际紫膜悬浮液响应信号。从图 3(b)放大的动力学曲线测得正峰的形成时间为 342  $\mu\text{s}$ , 衰减时间为 1.42 ms; 负峰形成时间约 3.4 ms, 衰减时间 9.5 ms。根据文献[7]提供的有关菌紫质及其中间体吸收光谱数据,得到菌紫质及其中间体在 633 nm 波长下的摩尔吸收系数如表 1 所示。从这组数据可以把菌紫质对 633 nm 光的透过率动力学过程分为六步。BR $\rightarrow$ K 和 K $\rightarrow$ L 分别发生在皮秒和微秒时域,由于所用的激发光脉冲为亚毫秒量级,所以不可能观察到这两步过程的信号。M、N、O 中间体的出现发生在亚毫秒和毫秒时域内,所以后四步过程在实验中反映了出来(图 3(b))。这个实验结果表明菌紫质光循环周期 < 15 ms; M 中间体形成时间 < 340  $\mu\text{s}$ (从后面的实验结果可知,准确的时间为 50  $\mu\text{s}$ ); M $\rightarrow$ N 的过渡时间小于 1.42 ms; O 的形成时间不大于 3.4 ms; 从中间体 O 返回菌紫质的时间小于 9.5 ms。由于激发脉冲持续时间较长,产生积累效应,所以各成份弛豫时间测量值偏大。

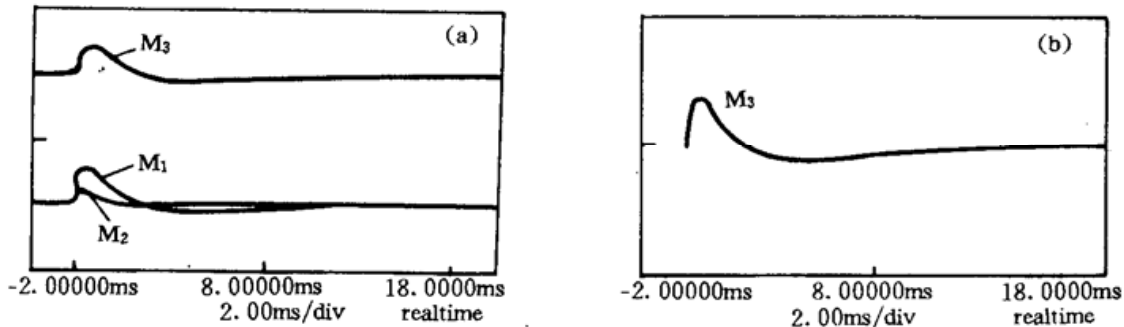


Fig. 3 Experimental results from the single-shot flash pumping system

$M_1$ : total signal;  $M_2$ : leaky flash;  $M_3$ : BR response signal ( $M_1 - M_2$ )

Table 1 Molar extinction of BR and its intermediates (Unit:  $\times 10^{-4} \text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

BR	K	L	M	N	O
1.42	4.00	0.92	0.046	1.31	3.14

### 3.3 周期性泵浦-探测样品实验结果

为了观察菌紫质光循环早期过程,必须缩短激发光脉冲时间。激发脉冲越短,越能接近菌紫质光循环原初过程,但系统最终的时间分辨率是由激发脉冲宽度、光电探测器响应时间、示波器频带三者共同决定的,单靠缩短激发脉宽是不够的。而且,在本实验中随着激发脉冲宽度的变窄,单个脉冲的能量急剧下降(比如单个脉冲氙灯闪光能量为 54 mJ,脉宽 465  $\mu\text{s}$ ;调 Q 倍频 YAG 激光器单脉冲宽度压缩到了 290 ns,但单脉冲能量却只有 60  $\mu\text{J}$ ),这意味着能跃迁到激发态参与光循环的菌紫质分子数大大减少,检测光能探测到的信号就变得很微弱,这对信号检测系统的信噪比提出了很高的要求。为了解决提高系统时间分辨率和提高信噪比的矛盾,采用了周期性短脉冲激发、多次信号平均测量技术。图 4 比较了采取不同平均次数时获得的信号波形,可见平均次数越多,信噪比越高,但测量时间也长。实验中采取了 2048 次平均。

图 5 为一组在不同时标下的测量结果。图 5(a)是周期性激发脉冲序列与检测到的样品响

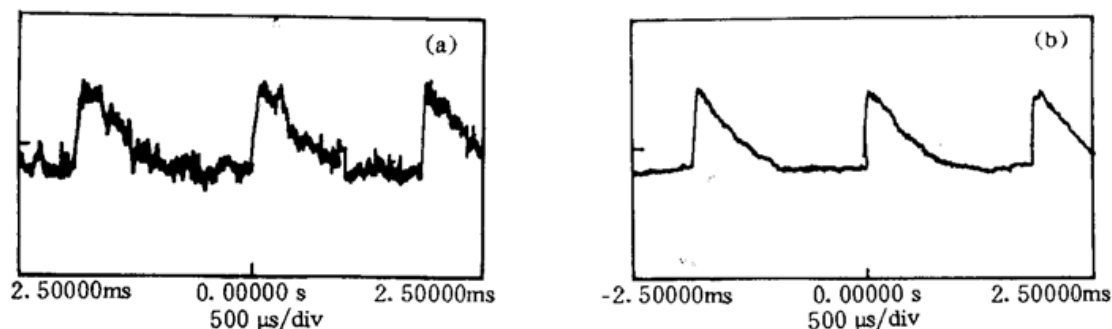


Fig. 4 Comparison of waveforms captured in different averaging times

(a) averaging 8; (b) averaging 128

应信号之间的对应关系, 其重复频率为 545 Hz, 光循环启动 2ms 后的过程不可见。图 5(b) 中, 正峰的出现对应 M 中间体的形成, 其上升时间为 50  $\mu$ s, 从吸收系数上看, 负尖峰表示 K 中间体成分, 从图 5(c) 放大的时标上可以更清楚地看到, K  $\rightarrow$  M 有两个指数衰减过程, 这说明二者之间还存在着另外一个中间体成份, 那就是 L。K  $\rightarrow$  L 的时间常数为 2  $\mu$ s, L  $\rightarrow$  M 的时间常数为 50  $\mu$ s。图 5(d) 是时标进一步放大得到的结果, 可以看到在中间体 K 之前又出现了一个正峰, 从现有的光循环模型和光谱数据上找不到一个与此正峰相关的成分。分析该正峰的出现可能与以下几个方面有关: 1) 测量系统引起的误差; 2) 其它物质产生的副作用; 3) 菌紫质本身具有的一种效应。究竟是哪种原因, 有待进一步研究。

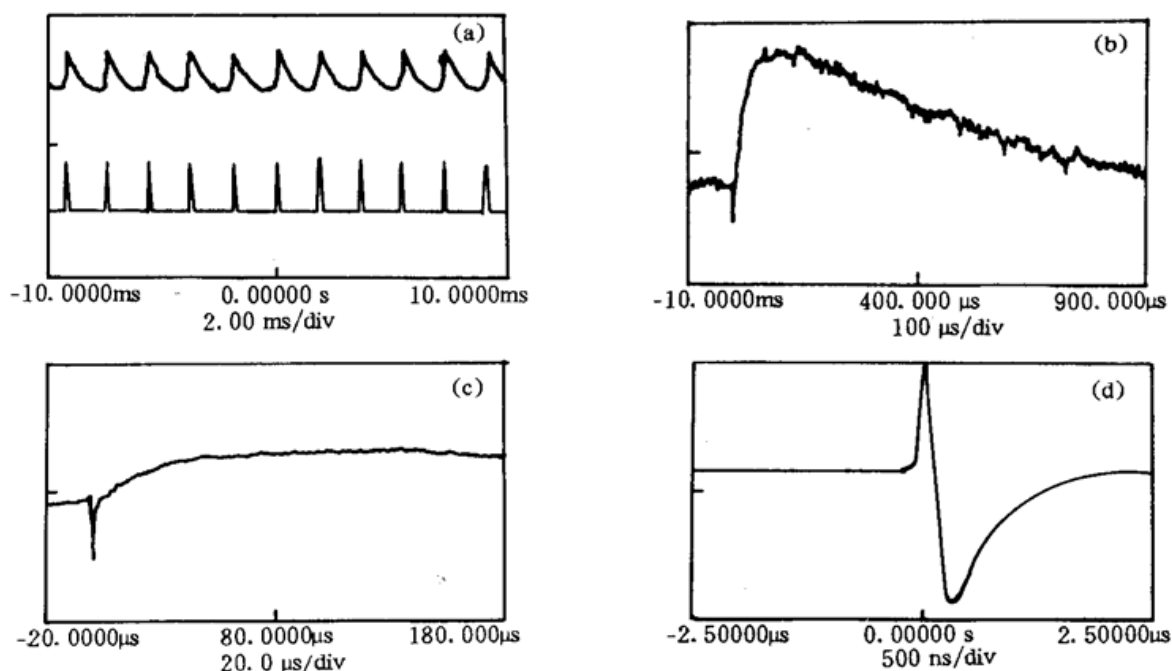


Fig. 5 Experimental results on different time scale from the Q-switch double frequency YAG laser pumping system

**结 论** 利用泵浦-探测方法研究菌紫质光循环得到的实验结果, 作者建议如下的菌紫质光循环动力学过程



中国科学院生物物理研究所胡坤生副研究员在菌紫质样品方面, 中国科学院西安光学精密机械研究所陈国夫研究员在激光系统方面给予大力帮助, 在此表示衷心感谢。

## 参 考 文 献

- [1] Stoerkenius W, Lozier-R. H., Bogomolni R. A., Bacteriorhodopsin and the purple membrane of Halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **505**(2): 215~278
- [2] 姚保利, 徐大纶, 菌紫质光生物分子器件及其超快过程. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22**(2): 117~121
- [3] Tkachenko N. V, Savransky V. V, Sharonov A. Yu., Time-resolved refractive index change during the bacteriorhodopsin photocycle. *Eur. Biophys. J.*, 1989, **17**(4): 131~136
- [4] Hsieh C. L, Nagumo M, Nico M *et al.*, Picosecond and nanosecond resonance Raman studies of bacteriorhodopsin. Do configurational changes of retinal occur in picoseconds? *J. Phys. Chem.*, 1981, **85**(12): 2714~2717
- [5] McIntosh A. R, Boucher F., Photochemically induced charge separation occurring in bacteriorhodopsin. Detection by time-resolved dielectric loss. *Biophys. J.*, 1991, **60**(7): 1~7
- [6] Groma G. I, Raksi F, Szabo G *et al.*, Picosecond and nanosecond components in bacteriorhodopsin light induced electric response signal. *Biophys. J.*, 1988, **54**(7): 77~80
- [7] Lanyi J. K., Proton transfer and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1992, **24**(2): 169~179

## Study of Bacteriorhodopsin Photocycle with Pump-Probe Method

Yao Baoli      Xu Dalun      Hou Xun

(State Key Laboratory of Transient Optics and Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics,  
Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710068)

(Received 1 May 1995; revised 15 August 1995)

**Abstract** With pump-probe method, the photocycle of bacteriorhodopsin is studied in two sets of measuring systems which have different time resolution and exciting mode. One is carried out by a single shot pulse Xenon lamp inducing the purple membrane suspension sample. The other is performed by a repetitive  $Q$ -switch double frequency Nd : YAG laser periodically exciting the sample. The testing beam for the two systems is a 633 nm He-Ne laser. An avalanche photodiode is used to detect the probing light passing through the sample when pumped by the actinic light. The picked up signal is coupled into a 500 MHz digitizing oscilloscope which measures and processes the BR's photocycle response signal. The experimental results indicate that the period of BR photocycle is less than 15 ms, the time constant from K to L is 2  $\mu$ s, the relaxation time from L to M is 50  $\mu$ s. A doubtable component is found occurring prior to K. Based on the measured data, a model of the bacteriorhodopsin photocycle in the time domain from nanosecond to millisecond is proposed.

**Key words** pump-probe, bacteriorhodopsin, photocycle.