

文章编号: 0253-2239(2001)01-0106-05

细菌视紫红质膜的光电荷转移 动力学过程的研究*

黄玉华 赵有源 欧阳晓平 龚勤敢 杨 群 陈凌冰 李富铭

(复旦大学物理系·光科学与工程系三束材料改性国家重点实验室, 上海 200433)

张忠宾

(西北工业大学声学工程研究所, 西安 710072)

刘 坚 丁建东

(复旦大学高分子科学系, 上海 200433)

李庆国

(复旦大学生物与生物物理学系, 上海 200433)

摘要: 实验测量了细菌视紫红质(bR)分别经波长为 1064 nm、532 nm 和 355 nm, 脉冲宽度为 10 ns 的三种不同的脉冲激光照射后产生的不同的光电压信号, 着重用 532 nm 脉冲光激发样品, 从变化的测量回路的阻抗所得到的不同光电信号情况, 研究并分析了细菌视紫红质的光电荷的产生和转移的微观机制。结果表明, 其正负脉冲光电压信号是正负两种电荷移动的结果, 而正电荷的产生比负电荷的产生需要克服更高的能量, 同时, 正负电荷既具有各自的转移特性又相互影响, 如正电荷移动速度慢, 负电荷移动速度快, 负电荷对正电荷有牵引作用等, 这些特性与电极和样品之间形成的界面效应有关, 它使得细菌视紫红质的光电压信号的幅值和宽度对外接电阻的关系具有与其他光电响应器件所不同的特性。

关键词: 细菌视紫红质; 光电压信号; 电荷转移

中图分类号: Q631 文献标识码: A

1 引 言

细菌视紫红质(bR)是一种光信息存储与能量转换的生物膜蛋白质分子。在光的刺激下, 视黄醛产生快速的全反-13 顺异构化, 希夫碱基与其平衡离子的化学键被打开, 形成快速的光电信号, 在一定的条件下, 还会有质子的泵出^[1]。人们对它的光电信号作了许多测量, 力求揭示其内在的规律和机理^[3~6], 但各人说法不一, 矛盾甚多。例如, Keszthelyi 为了解释光照后形成的负、正光电信号, 曾设想一个类似“拉弓箭”的模型^[4], 认为光激发后, 被束缚在弓上的质子先被拉回, 形成负脉冲, 然后被迅速弹出, 形成正脉冲。但实验结果中发现的许多现象不是拉弓箭模型所能解释的。现今还未有

一个确认的理论模型。其原因之一就是忽略了测量系统的阻抗对细菌视紫红质本身内在的光电荷转移过程的影响, 使得各种分析只停留在表面现象, 未深入其实质。事实上, 测量回路的形式及阻抗对所测得的光电压信号有很大的影响。例如, 当测量系统的输入阻抗为 50 Ω 时, 所测得的光电压信号一般只有一快速负脉冲光电压信号^[8], 而当测量系统的输入阻抗较大时, 所测得的光电压信号既有一快速负脉冲光电压信号也有缓慢变化的正脉冲光电压信号^[9]。现有的光电探测器还未曾出现过这种现象。我们不能将这种现象简单地说是测量过程中阻抗不匹配的问题, 其实它与光泵质子这一独特的细菌视紫红质分子特性有着密切的内在联系。

为了弄清这种现象所联系的内在微观物理机制, 本文报道用 1064 nm、532 nm 和 355 nm 3 种不同波长的脉冲光照射样品, 研究了它产生的光电压信号; 并着重用 532 nm 脉冲光激发样品, 通过改变

* 国家自然科学基金(19834030 和 69888001)资助项目。

收稿日期: 1999-05-20; 收到修改稿日期: 1999-09-10

测量回路的总阻抗和探测仪器的输入阻抗, 测量了其光电压信号, 并对其变化规律进行了分析和研究。

2 样品与实验测试方法

嗜盐菌紫膜系从嗜盐菌中按常规方法提取得到^[2]。它以紫膜水悬浮液的形式存在。紫膜薄片两面带有不同极性的电荷, 对外显示固有的电偶极性, 但未极化前, 紫膜薄片间的电偶极性是无序的。为了使紫膜薄片间的电偶极性定向排列, 我们按文献[1]所说的方法对其进行取向。在室温下将紫膜层干燥后, 喷镀一层半透明的铝, 并覆盖在透明导电玻璃板上, 引出导线, 如图 1 所示。

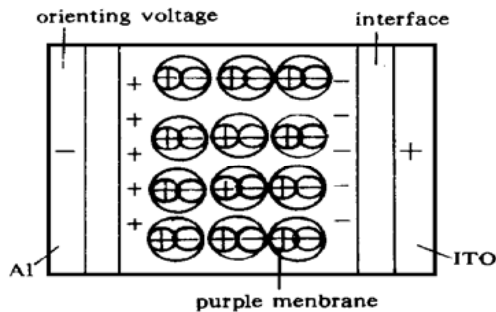


Fig. 1 The inside structure of dried oriented bR

采用图 2 所示装置测量它的动态光电压信号, 脉冲光源是 Quantel 调 Q Nd: YAG 激光器(脉宽为 10 ns, 重复率为 10 Hz)。将光脉冲直接照射到样品上, 样品产生的光电信号输入到 TDS684B 型数字示波器(带宽为 1 GHz, A/D 转换精度为 16 bit)的输入端。 R_1 、 R_2 分别为测量回路中的相对于测试示波器的串联电阻和并联电阻, 通过改变外串电阻 R_1 来改变外界回路的导电能力, 通过在示波器的输入端外并联不同阻值的电阻 R_2 来改变示波器的输入阻抗, 系统地测量了细菌视紫红质的光电压信号, 从而揭示其光泵质子产生、转移过程的内在机理。

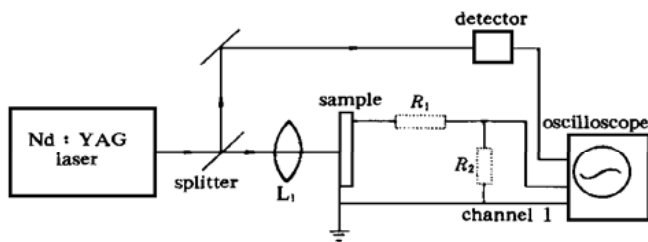


Fig. 2 Setup for measuring the photoelectric signals in bacteriorhodopsin

3 实验结果

在图 2 所示的装置中, 选择示波器的输入阻抗

为 $1 \text{ M}\Omega$, 串联电阻 R_1 为 0Ω , 测得样品经 1064 nm、532 nm 和 355 nm 不同波长的脉冲光激发所产生的光电信号, 如图 3 所示。为了保证照射到样品上的 3 个不同波长的光强一致, 所用的 1064 nm 的能量约为 10 mJ, 532 nm 和 355 nm 的光强均约 2.5 mJ, 光斑面积约为 100 mm^2 。从图上可以看出, 当测量系统的输入阻抗为 $1 \text{ M}\Omega$ 时, 样品经 1064 nm(曲线 a) 脉冲光作用, 只有一快速的负脉冲光电压信号, 而经 532 nm(曲线 b) 和 355 nm(曲线 c) 脉冲光的作用, 先有一快速的负脉冲光电压信号, 然后还有一缓慢变化的正脉冲光电压信号。图中插图显示 $20 \mu\text{s}$ 内负脉冲信号的细节。

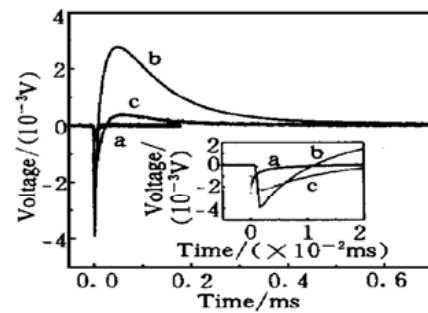


Fig. 3 The photoelectric signals when bR is illuminated by different wavelength pulsed laser. Curve a is the signals illuminated by 1064 nm, curve b by 532 nm and curve c by 355 nm pulsed laser

当保持串联电阻 R_1 于恒值 0Ω 时, 图 4 是样品在光能量为 3 mJ 的 532 nm 脉冲光作用下, 通过改变示波器的输入端并接不同阻值的电阻所测得的光电压信号。

从图上可看出当保持激发脉冲光的光功率密度不变时, 光电压信号的幅值和脉冲宽度都随测量系统的输入阻抗的增大而增大, 且负脉冲光电信号大于正脉冲光电信号的幅值。尤其当示波器的输入阻抗小于 324Ω 时, 光电压信号只有一快速的负脉冲信号, 没有缓慢变化的正脉冲光电压信号。

保持示波器的输入阻抗为 $1 \text{ M}\Omega$ 不变, 在样品和示波器所形成的回路上串联不同阻值的 R_1 , 样品经 532 nm 脉冲光激发后所测到的光电信号如图 5 所示。

可以看出所测到的光电压信号的幅值都随外串电阻的增大而减小, 正负脉冲宽度则随外串电阻的增大而增大, 当外串电阻大到一定的程度时, 如曲线 a、b、c, 其负脉冲电压信号的幅值反而小于正脉冲电压信号的幅值。当输入阻抗为 50Ω 时, 看到仅有负脉冲信号, 信号随 R_1 的增大而减小。

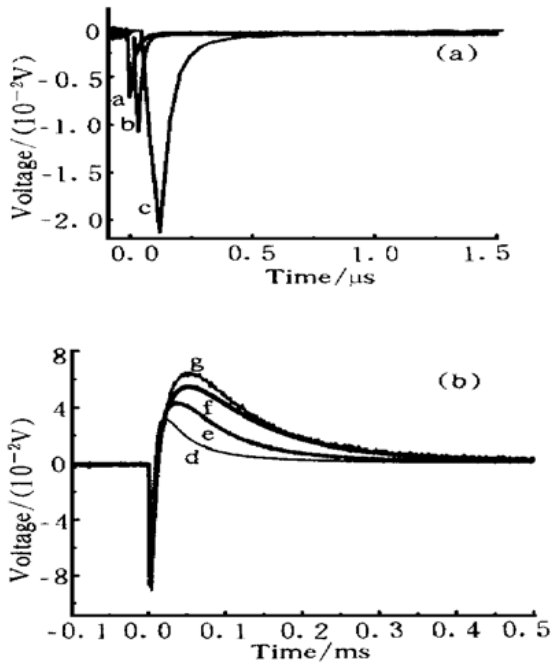


Fig. 4 The photoelectric signals in bR excited by 532 nm pulsed laser is measured with different impedance of oscilloscope. Curve a is the signals with 50Ω , curve b with 324Ω , curve c with $1.1 k\Omega$, curve d with $166 k\Omega$, curve e with $514 k\Omega$, curve f with $896 k\Omega$, curve g with $1 M\Omega$

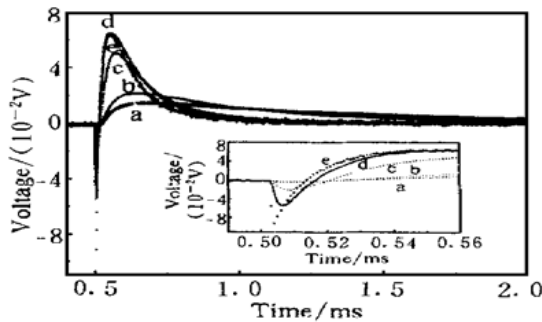


Fig. 5 The photoelectric signals in bR excited by 532 nm pulsed laser is measured with same $1 M\Omega$ impedance of oscilloscope but different series resistance. Curve a with $17.5 M\Omega$ series resistance, curve b with $8.74 M\Omega$, curve c with $1.06 M\Omega$, curve d with $200 k\Omega$, curve e with 0 series resistance

4 分析讨论

现在,分析产生上述现象及由这些现象所联系的电荷的转移机制。

1) 图3充分表明了3个事实: i) 用532 nm和355 nm所得到的正负脉冲光电压信号实质上是带电极性完全相反的粒子的运动过程的体现,即正、负电荷的运动过程,其中负脉冲光电压信号主要是由负电荷的移动所形成的,正脉冲光电压信号则是

由正电荷的移动所形成的。ii) 通过对正负脉冲信号进行积分计算,可得出这一结论:所泵出的正电荷数大于电荷分离所得到的负电荷数,iii) 有负电荷的移动未必会有正电荷的移动过程。下面,从细菌视紫红质的微观结构来分析这种现象。

已经知道经电极化沉积到阳极上的紫膜碎片的电偶极性呈有序的定向排列,且其电偶负极指向极化时的阳极(导电玻璃端)。细菌视紫红质在光的刺激下,其内含的视黄醛产生快速的全反-13顺异构化,希夫碱基与其平衡离子的化学键被打开。我们认为,当化学键打开后,产生正负电荷分离,形成的负电荷朝电偶极矩正极端方向迅速移动,此时质子仍被束缚在细胞质内。负电荷的移动,在外回路上诱导出一个快速负脉冲电流信号,在示波器的输入阻抗上形成一快速的负脉冲电压。光致异构化过程完成后,如果激发光的光子能量足够高,使细菌视紫红质产生异构化所取得的能量足以克服希夫碱基上N-H键对氢粒子的束缚(其束缚能量阈值约为 $12 \text{ kcal/mol}^{[1]}$)时,质子被泵出细胞质外,并在异构化所存储的能量的推动下,沿着负电荷移动的方向作定向的运动,正电荷在样品内的定向运动同样在外回路诱导出一位移电流,其方向与电荷分离形成的电流方向相反,即形成正脉冲光电信号。

由此可见,只有在具有足够高的光子能量的激发光作用下,才能使细菌视紫红质既产生负光电荷又产生正光电荷。这就是用1064 nm脉冲光激发样品没有正脉冲光电信号,只有负脉冲光电信号,而用532 nm和355 nm脉冲光激发样品既有负脉冲又有正脉冲光电信号的原因。另外,虽然355 nm的能量最高,但测得的信号却没有532 nm的大,这是由于细菌视紫红质对355 nm的吸收比对532 nm的吸收要小得多^[1]。大量实验表明,细菌视紫红质每一光循环中不止一个质子参与运转,而是有许多个质子参与运转^[7],因而参与运转的质子数多于电荷分离所得到的负电荷数。

2) 从上面的分析,可知在532 nm脉冲光作用下,细菌视紫红质内既存在光致异构所引起的电荷分离形成的瞬时负电荷的运动也瞬时正电荷(质子)的运动。对于一个既有负电荷又有正电荷运动的回路,无论测量回路的阻抗为多少,一般的探测器都应既测到负信号又测到正信号,且它们一般是与回路电阻成正比关系。然而,本实验对细菌视紫红质的测量中,图4却呈现了这样一个情况:当测量系统的输入阻抗小于 324Ω 时,只能测到一快速的负

脉冲光电压信号,没有正脉冲光电压信号;只有当输入阻抗大于 324Ω 时,才既有快速的负脉冲又有正脉冲光电压信号。且随着输入阻抗的增大,正脉冲光电压信号幅值比负脉冲幅值增大得快。在图 5 中,信号的幅值随着回路串联阻抗的增大而减小,但负脉冲光电压信号幅值比正脉冲幅值减小得快;当串联电阻大到一定程度时,负脉冲信号幅值反而小于正脉冲的幅值。要解释这些现象,必须深入分析它产生的正负光电荷转移的微观物理过程。

我们知道细菌视紫红质所产生的正、负电荷中,负电荷(电子)质量小,移动速度快,在运动过程中受介质的作用力小。带正电荷的质子则不一样,它不但比负电荷重得多,且受介质内部粒子的作用力也大,不能自由运动,而是在细菌视紫红质异构化所贮存的足够能量的推动下作定向移动,其速度比电子的运动慢得多。

另外,电极与紫膜不是同一种材料,它们相接触的地方必定会形成一种界面,当细菌视紫红质产生的电荷移动到样品表面时,会因界面的存在而停留在样品表面上,并形成部分积聚,在样品内形成一内电场 $E'(t)$;同时诱导外回路的电荷在电极表面上积聚,在样品内形成一附加电场 $E''(t)$,其方向与在介质内的电场 $E'(t)$ 相反,因而样品内的电场 E 实际上是二者之和,即

$$E(t) = E'(t) - E''(t). \quad (1)$$

可见外回路被诱导的电流反过来又影响样品内的场强,二者相关又互相影响。当被激发的样品经光循环从一个结合位热驰豫到另一结合位,最后回到基态时,停留在样品表面上的电荷会由少增多又逐渐减少。同时,因诱导而积聚在电极上的电荷会由少增多,最后通过外回路释放掉。外回路的导电能力将会影响回路诱导电荷的移动速度,即电荷在电极上积聚的速度和释放速度。当外接电阻小到一定程度时,如 $50 \Omega \sim 300 \Omega$ 内,此时,回路导电能力增强,负电荷能迅速地流过外回路,单位时间流过的负电荷数的是很多的。在这种情况下,由于被诱导的负电荷能迅速地流经外回路而积聚在电极上,使得电极上诱导的附加电场 $E''(t)$ 能迅速跟上 $E'(t)$ 的变化,其结果是样品内的实际场强 $E(t)$ 很小,因而对正电荷的牵引作用很小。正电荷质子只能在异构化贮存的能量的推动下作定向移动,从一个结合位移向另一个结合位,其速度比负电荷慢得多,单位时间流过的正电荷数远比负电荷数少。又由于电压和电流之间有如下关系:

$$U(t) = I(t)R, \quad (2)$$

其中电流是单位时间内流经的电荷数,即

$$I(t) = dQ/dt. \quad (3)$$

Q 是诱导电荷数,可见电压值是由电阻和单位时间内流经它的诱导电荷数所决定的。因而,此时在输入电阻上所形成的瞬时正压降也远比负压降小,以致无法测到正脉冲的光电压信号而只能测到负脉冲的光电压信号。

随着外接回路电阻的增大,回路中诱导的负电荷的移动速度逐渐变慢,流动的时间相应变长,这不但降低了负脉冲瞬时电流值,增宽了负脉冲宽度(见图 5 中插图);同时,也使得电极上负电荷的积聚速度变慢,附加电场 $E''(t)$ 不能迅速随 $E'(t)$ 而变,使得样品内的电场 $E(t)$ 相应增大,这会阻碍后面的负电荷的朝前运动速度,但它却更能有效地牵引质子朝着它移动的方向运动,从而加速正电荷的移动速度,使得单位时间流过的正电荷数(即正电流)增加,正脉冲瞬时电流和电阻的同时增加使得其瞬时电压迅速增大,所以实验结果(图 5)显示出正脉冲光电压的幅值比负脉冲的幅值增加得快。因而当外接电阻增大到一定值(约 324Ω) 时,便既可以测到其负脉冲光电压,也可以测到其正脉冲光电压。同时也使得当外接电阻大到一定值时,正脉冲光电压的幅值比负脉冲的幅值要大,如图 5 中的曲线 c、d 所示。可见,要测到正脉冲光电压信号,则要求测量系统有足够大的输入阻抗,否则即使有正光电荷的移动,也会因其压降太小而不能被仪器测量到,而只得到负脉冲的光电压信号。

结论 本文实验测量了细菌视紫红质的动态光电响应受激发光波长和外接阻抗的影响。经研究和分析表明: 1) 其正负脉冲光电压信号是正负两种电荷移动的结果。2) 正电荷的产生需要克服一定的能量,只有当激发光的光子能量足够高,使细菌视紫红质经光照后产生异构化所存储的能量足以克服阻碍质子跑出细胞质的束缚能量阈值时,才能将质子泵出细胞质外,形成正脉冲光电信号,否则只有电荷分离所形成的负脉冲光电信号。3) 负电荷总是早于正电荷开始转移,其移动速度较正电荷的移动速度快,因而负脉冲信号总是在正脉冲的前面,且负脉宽比正脉宽窄。4) 正负电荷既具有各自的转移特性又相互影响,如正电荷移动速度慢,负电荷移动速度快,负电荷对正电荷有牵引作用等,而这些特性与电极和样品之间形成的界面效应密切相关,并使得细

菌视紫红质的光电压信号幅值和宽度对外接电阻具有其他光电响应器件所不同的依赖关系。因而从它的光电压信号来分析它的中间态及其寿命必须仔细考虑测量系统的输入阻抗和外界回路的阻抗的影响。这为将来利用细菌视紫红质来研制和开发新型的快速生物分子光电探测器提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Birge R R. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1990, **1016**(3): 293~ 327
- [2] Racker E, Stoerkenius W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven photo uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biological Chemistry*, 1974, **249**(2): 662~ 663
- [3] Holz M, Lindau M, Heyn M P. Distributed kinetics of the charge movements in bacteriorhodopsin: Evidence for conformational substates. *Biophys. J.*, 1998, **53**(4): 623 ~ 633
- [4] Keszthelyi L. Intramolecular charge shifts during the photoreaction cycle of bacteriorhodopsin. *Information and Energy Transduction in Biological Membranes*. 1984, (1): 51~ 71
- [5] Liu S Y, Ebrey T G. Photocurrent measurements of the purple membrane oriented in a polyacrylamide gel. *Biophys. J.*, 1988, **54**(2): 321~ 329
- [6] Hong F T, Montal M. Bacteriorhodopsin in model membranes: A new component of the displacement photocurrent in the microsecond time scale. *Biophys. J.*, 1979, **25**(3): 465~ 472
- [7] 佐贝 G 主编. 生物化学. 曹凯鸣, 詹树萱 等译. 上海: 复旦大学出版社, 1992, 433
- [8] Groma G I, Szabó G, Varo G. Direct measurement of picosecond charge separation in bacteriorhodopsin. *Nature*, 1984, **308**(5): 557~ 558
- [9] Ormos P, Reinisch L, Keszthelyi L. Fast electric response signals in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1983, **722**(2): 471~ 479

The Kinetics of Photo-Charge Transferring in Bacteriorhodopsin

Huang Yuhua Zhao Youyuan Ouyang Xiaoping Gong Qingan

Yang Qun Cheng Linbing Li Fuming

(State Key Laboratory for Materials Modification by Laser Ion and Electron Beams,

Physics Department, Optical Science and Engineering Department, Fudan University, Shanghai 200433)

Zhang Zhongbin

(Institute of Acoustics Engineering, Northwest Polytechnic University, Xi'an 710072)

Liu Jian Ding Jiandong

(Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Li Qingguo

(Biology and Biophysics Department, Fudan University, Shanghai 200433)

(Received 20 May 1999; revised 10 September 1999)

Abstract: The different photoelectric signals in bacteriorhodopsin are experimentally measured when it is excited by 10 ns pulsed lasers at 1064 nm, 532 nm and 355 nm. 532 nm pulse laser is used mostly as pumping light to measure the photoelectric signals affected by the impedance of the measuring circuit. The mechanism that bacteriorhodopsin generates photo-charges and the photo-charges transfer in it was studied and analyzed. The results show that the positive and negative photoelectric signals are produced by the shift of the positive and negative charges respectively, and more energy is needed to produce positive charges than negative ones. At the same time, the positive and negative charges not only have their own transferring characteristics, but also affect each other, such as, positive charges move slowly, and negative ones fast, moreover, the negative can pull the positive to move forward, which, together with the interface between the sample and electrodes, cause the magnitude and width of the pulse photo-voltage having special dependence different from other photo-electronic devices on the linked resistance.

Key words: bacteriorhodopsin; photoelectric signals; photo-charges transfer