

文章编号: 0253-2239(2003)08-0902-04

# 细菌视紫红质能化态时表面电位的非线性光学机制\*

黄燕萍<sup>1</sup> 沈珊雄<sup>1</sup> 李琳<sup>1</sup> 李珊珊<sup>1</sup> 黄立<sup>2</sup> 李庆国<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 华东师范大学物理系光谱学和波谱学教育部重点实验室, 上海 200062)  
(<sup>2</sup> 复旦大学生物物理系, 上海 200433)

**摘要:** 用荧光标记物 1,8-ANS 与细菌视紫红质结合,测得紫膜细菌视紫红质在能化态时的表面电位远大于非能化态时的对应值。在细菌视紫红质分子的激光四波混频实验中,应用激子表象理论,获得了紫膜能化态时的激子饱和密度和激子长度,说明在 bR-ANS 络合物中,细菌视紫红质中色氨酸残基对 ANS 的激发能量转移效率提高,能化态时表面电荷密度增加,从而使非辐射共振转移变为激子转移,也证明了紫膜能化态时表面电位的非线性光学机制。

**关键词:** 非线性光学; 细菌视紫红质; 能化态; 表面电位

中图分类号: Q63 文献标识码: A

## 1 引 言

生物膜因磷脂、蛋白质和糖类的离子化而具有表面电荷和表面电位,构成了膜的相应的生物学功能。细菌视紫红质(bR)是一种位于嗜盐菌的紫膜上的蛋白质分子,表面有很高密度的电荷分布,造成很高的表面电位。紫膜的生物学功能与它的表面电位有很大关系。有研究者<sup>[1]</sup>认为,紫膜质子抽运效率与盐浓度的关系应与紫膜表面电位有关。也有学者用顺磁方法测量了紫膜表面电位随 pH 值的变化规律。Sheng 等<sup>[2]</sup>研究了能化态和非能化态时紫膜表面电位与 pH 值的关系。我们用荧光标记物 1-Anilino-naphthalene-8-sulfonate(简称 1,8-ANS)与紫膜结合,测得了紫膜在能化态和非能化态时的表面电位,并对细菌视紫红质分子作了激光前向立体简并四波混频实验,获得了三阶光学极化率、激子饱和密度和激子长度,并对紫膜能化态时表面电位的变化赋以非线性光学机制。

## 2 实 验

紫膜从嗜盐菌 *Halobium R<sub>1</sub>M<sub>1</sub>* 中用常规方法<sup>[3]</sup>分离提纯。样品浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$ 。在实验室温度时

pH 值在 6~7 之间,基本呈中性。1,8-ANS 荧光探针由 Sigma Aldrich Co 提供。其它化学品都是试剂级商品。ANS 与紫膜结合物的吸收峰在 370 nm, 荧光发射波长为 470 nm。荧光在 UV-754 型荧光分光光度计上测量。光源为钨灯,经 370 nm 干涉滤光片后作 bR-ANS 的激发光,在 470 nm 波长处检测发射荧光。在作能化态实验时,用 532 nm 光波激发细菌视紫红质分子,形成激发能非共振激子转移。

1) 设膜表面电位或表面电荷不起作用时的荧光强度为  $I_0$ ,用零点盐滴定法测  $I_0$ 。样品介质 3 ml 中含细菌视紫红质 0.05 mg/ml 和 ANS 10  $\mu\text{mol/l}$ 。在已加和未加 0.25 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  的情况下,分别作荧光强度随 KCl(mmol/l)含量变化的测量。测量结果如图 1 所示,曲线 1 为加  $\text{CaCl}_2$  后的结果。图 1 说明

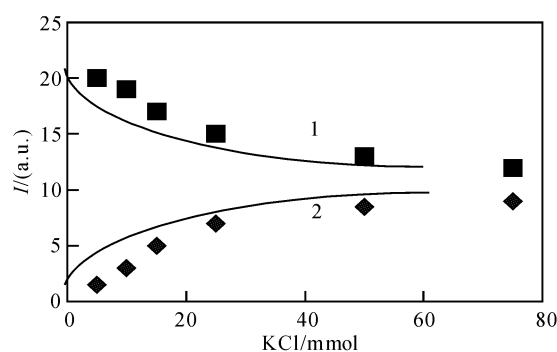


Fig. 1 KCl (mmol) null point salt titration for  $\phi_0$  determination. bR-ANS suspensions were titrated with KCl before (the lower curve) or after (the upper curve) addition of 0.25 mmol/l  $\text{CaCl}_2$

\* 上海市自然科学基金(01ZF14017)、上海市重点学科资助课题。

E-mail: samshen@online.sh.cn

收稿日期:2002-06-17; 收到修改稿日期:2002-07-29

细菌视紫红质开始时可以结合钙离子,使 ANS 荧光有很大增高,但随 KCl 的加入而相继减低。所以图 1 中两条曲线的渐近线代表膜电位为零时的荧光强度。

2) 在非能态下测量 bR-ANS 溶液(内含 0.05 mg/ml 细菌视紫红质)中结合 ANS 的荧光强度  $I$  与 ANS 浓度的关系曲线。在线性范围(0~100  $\mu\text{mol/l}$ )内测得数据如图 2 中的下一条曲线所示。在 532 nm 光波激发下,细菌视紫红质分子从基态跃迁到激发态。测量能化态下 ANS 浓度与 bR-ANS 溶液荧光强度  $I$  关系,如图 2 中的上一条曲线所示。

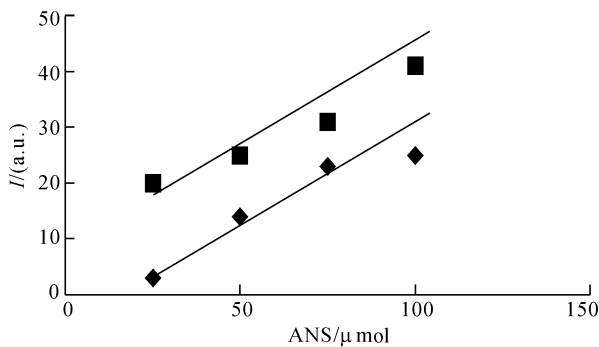


Fig. 2 Fluorescence of bR-ANS solutions was determined as a function of ANS concentration in nonenergized (the lower curve) and energized (the upper curve) bR

3) 将溶解于蒸馏水中的细菌视紫红质样品倒入厚度为 0.5 cm 的石英比色皿,在 UV-754 型荧光分光光度计上测得在 532 nm 光激发下的荧光谱。用脉冲宽度 35 ps、重复频率 10 Hz 的 Nd:YAG 激光器的倍频光(532 nm),测量细菌视紫红质分子在前向简并四波混频中产生的共轭信号光。图 3 为简并四波混频实验的光路示意图<sup>[4]</sup>。其中激光经小孔准直后被分光镜分成光强比近似为 1:1:1 的 3 束光  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ , 其强度约为输入激光 1.3 mJ 的十分之一。经透镜聚焦后入射到细菌视紫红质样品上,功率密度约为 2  $\text{GW}/\text{cm}^2$ 。这三束光所产生的混频光由  $k_4$  所示。 $k_1, k_2, k_3$  相对于透镜光轴的夹角约为  $2^\circ$ 。调节光路,使  $k_1, k_2$  和  $k_3$  入射光脉冲同时到达样品,在  $k_4$  方向上接收共轭光信号。该信号光强  $I_4$  经光阑消除杂散光后由光二极管接收,并送入计算机进行处理。在同样的实验条件下,测量参考样品  $\text{CS}_2$ <sup>[5]</sup> 所产生的共轭光信号光强  $I_{4r}$ ,其中  $\text{CS}_2$  的三阶非线性光学极化率  $\chi_r^{(3)} = 6.8 \times 10^{-10}$  esu, 折射率  $n_r = 1.61$ , 则由下列对比法公式可得到细菌视紫红质分子样品的  $\chi^{(3)}$  值<sup>[6]</sup>:

$$\chi^{(3)} = \left( \frac{I_4}{I_{4r}} \right)^{1/2} \frac{L_r}{L} \left( \frac{n}{n_r} \right)^2 \frac{\alpha L \exp(\alpha L/2)}{1 - \exp(-\alpha L)} \chi_r^{(3)}, \quad (1)$$

式中  $\alpha$  为样品的线性吸收系数,  $n$  为折射率,  $L$  为样品厚度。上式各物理量的下标  $r$  代表  $\text{CS}_2$ 。用此法求得的细菌视紫红质的  $\chi^{(3)}$  为  $0.6 \times 10^{-9}$  esu<sup>[7]</sup>, 光强依赖型折射率为  $1.7 \times 10^{-8}$  esu。在简并四波混频实验中,信号光强与入射光强之比为反射率  $R$ 。改变入射光功率,获得一系列与之对应的  $R$  值,如图 4 所示。表明在入射光功率密度小于  $4 \text{ GW}/\text{cm}^2$  时,  $R$  在 0.05~0.17 之间线性增加。当入射光功率密度再增加时,  $R$  趋于饱和值 0.20。

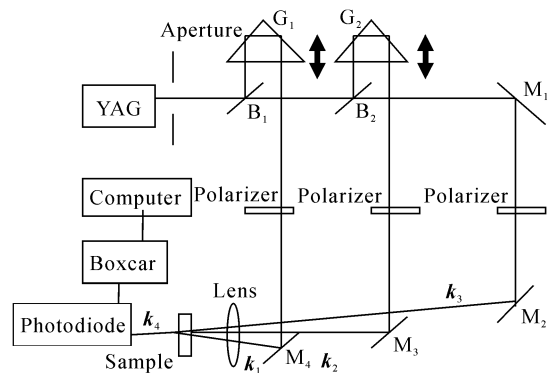


Fig. 3 Scheme of phase-matched three-dimensional forward degenerate four-wave mixing (3-D FWM)

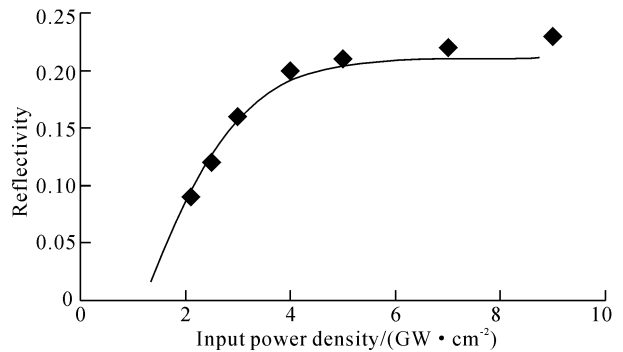


Fig. 4 Reflectivity as a function of input power density

### 3 结果与讨论

1) 零电位  $\phi_0$  的确定。ANS 对细菌视紫红质膜的结合力  $b$  取决于配体对结合基点的亲和力,也与膜双层中由表面电位决定的配体浓度  $c$  有关。如细菌视紫红质膜层中 ANS 的离解常数为  $K_d$ , 则 bR-ANS 溶液中 ANS 的实际浓度应为  $K_d + c$ , 故有

$$b \propto \frac{c}{K_d + c} \quad \text{or} \quad b = \frac{n_0 c}{K_d + c}, \quad (2)$$

其中  $n_0$  为比例系数,也是结合基点数。当  $K_d \gg c$  时, (2) 式变为

$$b = n_0 [c] / K_d \quad (3)$$

ANS 的荧光强度  $I$  与结合力  $b$  成正比,因而与离解常数  $K_d$  成反比。当 bR-ANS 溶液中有高盐浓度时,屏蔽作用使表面电荷或表面电位不再起作用。在相同的 ANS 浓度下,测量有表面电位和无表面电位时的荧光强度,则有

$$IK_d = I_0 K_d', \quad (4)$$

其中  $I_0$  和  $K_d'$  分别为无表面电位时的荧光强度和离解常数。从零点盐滴定法测  $I_0$  的实验结果(图 1 曲线 2), 可以看到,在未加  $\text{CaCl}_2$  情况下,  $\text{KCl}$  浓度在  $0 \sim 50 \text{ mmol/l}$  范围内增加时,由于阳离子而 ANS 的荧光增强,随着  $\text{KCl}$  浓度进一步增加,净正电荷在高离子浓度下被屏蔽,于是降低了荧光增量,使荧光强度趋于饱和。图 1 中曲线 1 为加  $\text{CaCl}_2$  后的结果。当细菌视紫红质表面上有阳离子结合时,表面电荷可以变成正的。由于净正电荷在高离子强度下也被屏蔽,故 ANS 荧光从开始时很高,相继随盐浓度增加而减小。所以图 1 中两条曲线的渐近线  $I_0 = 10$  代表膜电位为零的荧光强度。

2) 能化态时的表面电位。结合在膜上的 ANS 的荧光强度的变化反映了膜表面电位的改变。图 2 中曲线分别为细菌视紫红质能化态和非能化态下 ANS 荧光的变化。在 ANS 浓度为  $80 \mu\text{mol/l}$  时,图 2 中非能化态时荧光强度  $I_n = 21$ ,能化态时  $I_e = 36$ 。由离子离解反应的吉布斯自由能可以求出表面电位与荧光强度的关系式<sup>[8]</sup>:

$$\psi - \psi_0 = (RT/ZF) \ln(K_d/K_d') - (RT/ZF) \ln(I/I_0), \quad (5)$$

式中  $Z$  为离子电荷数,  $F$  为法拉第常数,  $R$  为气体常数,  $T$  为绝对温度。当  $I_n = 21$  时,表面电位  $\psi_n = -18.5 \text{ mV}$ ; 当  $I_e = 36$  时,表面电位  $\psi_e = -32.1 \text{ mV}$ 。

3) 能化态时表面电荷密度。表面电位  $\psi$  对表面电荷密度  $\sigma$  和介质离子成份的依赖关系由 Guoy-Chapman 理论<sup>[9]</sup> 阐明。对于负的高表面电位,该理论可表示为

$$4A^2 \sigma^2 / C = \exp(-ZF\psi/RT), \quad (6)$$

式中  $C$  为介质中盐浓度,  $A$  为与温度有关的常数,在文献<sup>[9]</sup> 中已列出不同温度下的  $A$  值。在本文中  $A = 135.8$ ,  $C_{\text{KCl}} = 0.04 \text{ mol/l}$ 。表面电位  $\psi$  取单位  $\text{mV}$  时,  $\sigma$  取  $10^{-16}$  电荷数面密度,单位为  $\text{cm}^{-2}$ 。从(6)式可求出非能化态时表面电荷密度  $\sigma_n = 1.174 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ ,能化态时表面电荷密度  $\sigma_e = 1.607 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ 。 $\sigma_e$  与  $\sigma_n$  相比较,能化态时表面电荷密度增加了 30%。

4) 非线性光学机制。在细菌视紫红质分子的

光循环中,原始态  $B_{568}$  ( $568 \text{ nm}$  为该态的吸收峰)吸收光子能量后,跃迁到激发态  $B^*$ ,在皮秒时间量级内,视黄醛分子的质子化席夫(Shiff)碱基实现从全反式到 13-顺式的光致分子构型变化,分子最大吸收峰从  $B$  态的  $568 \text{ nm}$  红移到  $K$  态的  $603 \text{ nm}$ 。 $K$  态不稳定,可通过一连串中间态回到  $B$  基态。在  $532 \text{ nm}$  激发下测得的荧光谱上,荧光峰值在  $675 \text{ nm}$  处,并在短波长  $590 \text{ nm}$  处有一个荧光截止位置。这表明,细菌视紫红质分子在原始态  $B$  吸取光子能量激发到激发态,然后发射荧光衰变到基态。我们用简化的三能级模型( $B^* - K_{603} - B_{568}$ )来计算四波混频实验。设分子基态的数密度为  $N_0$ ,激发态的数密度为  $N$ ,激发光的光子流为  $\varphi$ ,基态吸收截面为  $S_0$ ,激发态分子弛豫时间为  $\tau$ 。假定有  $N_s$  个分子被激发时就形成饱和,则可得粒子数方程

$$dN/dt = \varphi S_0 N_0 (1 - N/N_s) - N/\tau, \quad (7)$$

用激子表象的相位空间充满理论<sup>[10,11]</sup> 对测得的反射率  $R$  的饱和曲线(图 4)进行拟合,其中光子流  $\varphi = 7.64 \times 10^{25} \text{ s}^{-1}$ ,分子数密度  $N_0 = 3.94 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ ,吸收截面  $S_0 = 2.5 \times 10^{-14} \text{ cm}^2$ ,激发态分子弛豫时间  $\tau = 20 \text{ ps}$ 。拟合获得激子饱和密度为基态粒子数密度的 50%,激子长度为  $3 \times 10^{-6} \text{ cm}$ 。当细菌视紫红质处于非能化态时,在波长  $370 \text{ nm}$  的光激发下,细菌视紫红质分子中酪氨酸或色氨酸中任何一方吸收光子能量,向结合 ANS 进行非辐射共振转移,在  $470 \text{ nm}$  波长处发射荧光。这与 Stryer<sup>[12]</sup> 的研究结果一致,该研究表明,脱辅血红蛋白在  $280 \text{ nm}$  光激发下在  $338 \text{ nm}$  处有色氨酸的荧光峰值。加入 ANS 后,减弱了色氨酸发射,减少量与 ANS 结合基点数相符。说明芳香属氨基酸向结合 ANS 进行高效率的能量转移。也说明酪氨酸或色氨酸中任何一方吸收一个光子,与 ANS 直接吸收一个光子,对产生 ANS 荧光的效果是一样的。当细菌视紫红质处于能化态时,激子饱和数密度的形成使能量转移效率增大。而激子长度比非能化态时配体受体间的平均距离大一个数量级,因为视杆细胞外段圆盘膜中视紫质分子的有效半径为  $2 \times 10^{-7} \text{ cm}$ ,从而使非辐射共振转移变成激子转移。Brown<sup>[13]</sup> 用傅里叶变换拉曼光谱,研究细菌视紫红质在改变 pH 值时 D85N 变异体的结构变化时,认为细菌视紫红质分子中大尺度蛋白质构象跃变的直接原因是局域静电场改变。本文认为激子是束缚的电子-空穴对,激子的几何尺寸对应于电子和空穴之间的平均距离。当有半数基态粒子数密度被激励成激子饱和数密度时,就

使膜表面电荷密度增加,从而使局域静电场改变,促使细菌视紫红质分子发生大尺度构象跃变。在本文的实验情况中,这都是由于外加光场使样品介质中的电子电荷发生畸变,从而因构象变化而产生三阶光学非线性电极化率。因此,紫膜能化态时表面电位的变化具有非线性光学机制。

### 参 考 文 献

- 1 Li Qingguo, Ni Yajun, Huang Boyui *et al.*. The relation between surface potential and proton pumping efficiency of purple membrane. *Acta Biophysica Sinica* (生物物理学报), 1989, **5**(4):360~367 (in Chinese)
- 2 Sheng Wenjun, Tan Manqi, Zhang Hengtao *et al.*. pH-dependence of surface potential of purple membrane studied by a fluorochrome probe. *Acta Biophysica Sinica* (生物物理学报), 1991, **7**(1):14~17 (in Chinese)
- 3 Oesterhelt D, Stoeknius W. Isolation of the cell membrane of *H. Halobium* and its fraction into red and purple membrane. *Meth. in Enzymol.*, 1974, **31**:667~678
- 4 Huang Yanping, Wang Shenyi, Sun Zhenrong *et al.*. Study on third-order nonlinearity of azobenzene derivatives by four-wave mixing. *Acta Optica Sinica* (光学学报), 1998, **18**(10):1290~1294 (in Chinese)
- 5 Daniel J M, Siegman A E, Wallraff G M *et al.*. Resolution of the nuclear and electronic contributions to the optical nonlinearity in polysilanes. *Appl. Phys. Lett.*, 1989, **54**(18):1713~1715
- 6 Singh B P, Samoc M, Nalwa H S *et al.*. Resonant third-order nonlinear optical properties of poly (3-dodecylthiophene). *J. Chem. Phys.*, 1990, **92**(5):2756~2761
- 7 Huang Y P, Wang L Y, Chen S D *et al.*. The 3rd-order nonlinearity of bacteriorhodopsin by four-wave mixing. *Chinese Science Bulletin*, 2000, **45**(19):1752~1755
- 8 Robertson Dan E, Rottenberg H. Membrane potential and surface potential in mitochondria. *J. Biolog. Chem.*, 1983, **258**(18):11039~11048
- 9 Aveyrad R, Haydon D A. *An Introduction to the Principle of Surface Chemistry*. London: Cambridge University Press, 1973. 70~74
- 10 Greene B I, Orenstein J, Millard R R. Nonlinear optical response of excitons to one dimension. *Phys. Rev. Lett.*, 1987, **58**(26):2750~2753
- 11 Huang Yanping, Chen Shude, Wang Zugeng. Study on saturation density and length of excitons in bacteriorhodopsin. *Chin. J. Lasers* (中国激光), 2001, **A28**(3):269~271 (in Chinese)
- 12 Stryer L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. *J. Mol. Biolog.*, 1965, **13**:482~495
- 13 Brown L S, Kamikobo H, Zamanyi L *et al.*. A local electrostatic change is the cause of the large-scale protein conformation shift in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**(5):5040~5044

## Study on Nonlinear Optical Mechanism of Surface Potential in Energized Bacteriorhodopsin

Huang Yanping<sup>1</sup> Shen Shanxiong<sup>1</sup> Li Lin<sup>1</sup> Li Shanshan<sup>1</sup>  
Huang Li<sup>2</sup> Li Qingguo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory for Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062  
<sup>2</sup> Biophysics Department, Fudan University, Shanghai 200433

(Received 17 June 2002; revised 29 July 2002)

**Abstract:** The effects of surface potential on the binding and fluorescence of 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) in suspensions of bacteriorhodopsin are investigated. The ANS binding depends on the surface potential which modulates the apparent binding constant of ANS on the bR membrane. The surface potential of the binding ANS measured in energized is larger than in nonenergized bR membrane. In the laser four-wave mixing experiment, the saturation density and the length of excitons are obtained under the one-dimensional exciton phase space filling model. The values result in improving the highly efficient energy transfer from the aromatic amino acids of bR to the bound ANS and in raising the density of the surface charge of the energized bR so that the non-radiation resonant transfer is made to be exciton transfer, and the surface potential of energized bR has its nonlinear optical mechanism.

**Key words:** nonlinear optics; bacteriorhodopsin; energized state; surface potential