

# 细菌视紫红质的光电响应特性和机制

姚保利\* 王英利 胡坤生<sup>1</sup> 陈德亮<sup>1</sup> 郑媛 雷铭

(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; <sup>1</sup>中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 在 ITO 导电玻璃上制备定向细菌视紫红质(BR)电泳沉积膜或 LB 膜组成光电池系统, 在短脉冲激光照射下, 测定其脉冲响应光电电压; 在间断光照射下, 测定其对光强变化产生的微分响应信号。对脉冲光电响应和微分响应的机理及其关系进行理论分析和解释, 认为脉冲响应是 BR 分子内部生色团快速光极化引起的电荷分离和希夫碱及其周围氨基酸去质子化和再质子化过程引起的质子定向运输产生的位移电流, 是一个快反应过程, 是微分响应的早期反应和基础。微分响应则是由于菌紫质的光驱动质子泵产生的连续质子流在光开和光关瞬间引起光电池系统充放电以及测量电路的耦合特性引起的, 是一个慢变化过程。

**关键词** 细菌视紫红质; 光驱动质子泵; 脉冲响应; 微分响应

细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)属于视蛋白家族(视紫红质, 盐视紫红质, 传感视紫红质等)的一员, 在分子组成上都是由一个生色团——视黄醛(retinal)和一条七次折叠的 $\alpha$ 螺旋氨基酸链组成, 但由于其特殊的空间构象方式使其具有光驱动质子泵功能。BR 在光作用下能产生电信号, 这一现象在早期研究 BR 光驱动质子泵特性时就已发现。当 BR 引入人工膜, 并施以稳定连续光照时, 将产生跨膜质子流。由于膜周围磷脂双层较好的绝缘性, 质子梯度不会很快通过浓度扩散而消失, 于是在膜两侧产生了电势。这种直流光电效应是紫膜光合成过程的主要步骤<sup>[1]</sup>。若用一个瞬间光脉冲照射于 BR 膜上, 则可引起一个快速瞬时光电响应信号<sup>[2,3]</sup>。对于间断光的照射, BR 还可以表现出对光强变化的微分响应特性<sup>[4,5]</sup>。BR 的上述光电效应已有大量的研究报道, 对脉冲响应的理论分析基本比较清楚, 认为是 BR 分子内快速电荷分离及质子运动产生的位移电流, 并且认为这种电荷运动与 BR 的光循环过程密切相关<sup>[3]</sup>。对微分响应的理论解释则一直存在争议或不足之处, 相比之下这方面的实验乃至应用研究却比较多<sup>[6,7]</sup>。Hong<sup>[4]</sup>提出的 BR 膜等效电路模型可以解释 BR 的微分响应, 但其等效电路很复杂, 其中的许多电路参数也难以确定。Wang<sup>[5]</sup>研究了不同定向的 BR 膜对脉冲光和间断光的响应特性, 认为微分响应与脉冲响应是相关的, 微分响应是由脉冲响应中的慢变化成分引起的, 但

对这种慢变化成分的来源和确定因素没有说明。本文在 BR 膜光电池器件对脉冲光和间断光的光电响应实验基础上, 结合前人的部分理论结果, 对 BR 的光电响应机理进行了探讨, 提出了新的理论模型, 对脉冲光电响应和微分响应给出了一种新的解释。

## 1 材料和方法(Materials and Methods)

BR 从嗜盐菌(*Halobacterium salinarium*)品系 R<sub>1</sub>M<sub>1</sub> 中按常规方法制备。分别采用了电泳沉积和 Langmuir-Blodgett(LB)拉膜法, 在 ITO 导电玻璃上沉积定向 BR 薄膜, 其制备过程参见文献[8,9]。两种 BR 膜在 ITO 导电玻璃上的定向均为 ITO/CP-EC 型, 即紫膜的胞质面与 ITO 导电面接触。分别将电泳沉积紫膜和 LB 膜的 ITO 导电玻璃与另一电极(对电极)组成夹电解质结构光电池, 器件结构如图 1 所示。电泳沉积膜的对电极仍为 ITO 导电玻璃, 聚四氟乙烯隔圈中的电解质为 1 mol/L KCl 配制的 0.6% 琼脂糖凝胶, pH 7。BR-LB 膜器件的对电极为镀金的铜印刷电路板, 电解质为 1 mol/L KCl 溶液, pH 7。整个夹层结构用胶密封, 固定在铜盒中电磁屏蔽。器件的有效光照尺寸为  $\Phi 5$  mm, 输出信号直接接入示波器, 沉积 BR 膜的 ITO 电极接地, 对电极接正极。



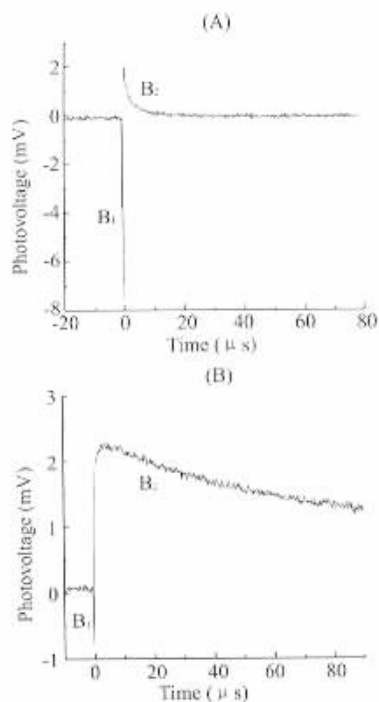
Fig.1 Structure of oriented BR film photocell

1, ITO conductive glass; 2, oriented BR film; 3, electrolyte; 4, teflon spacer; 5, counter electrode.

收稿日期: 2001-01-08 接受日期: 2001-02-19

国家自然科学基金(No. 60007009)和中国科学院院长基金(No. 40007059)资助项目

\* 联系人: Tel: 029-8498711; Fax: 029-8498711; e-mail, yaobl@optics.opt.ac.cn



**Fig. 2 Bipolar photoelectric response signals of BR photocells to pulsed laser**

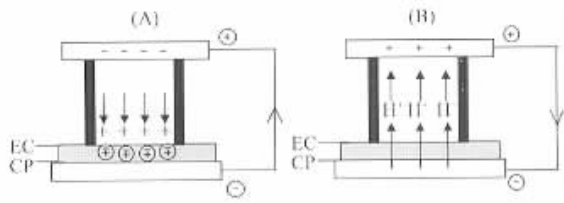
(A) (ITO-BR film-gelose gel-ITO) photocell ; (B) (ITO-BR LB film-KCl solution-Au) photocell.

脉冲激光由调 Q 倍频 Nd:YLF 激光器 (Photonics Industries International Inc., USA, GSD-20-527L 型) 产生, 波长 527 nm, 脉宽 100 ns, 重复频率 1 kHz, 平均功率 530 mW。间断光由连续卤钨灯照射, 经透镜组汇聚到 BR 上, 用挡扳手动斩光, 光功率约为 200 mW。BR 光电池产生的电信号直接由 1 GHz 数字示波器 (Tektronix Inc., USA, TDS680B 型) 测量。函数发生器 (上海无线电仪器厂, S101 型) 可以产生周期可变的方波信号, 用于模拟微分响应信号的产生和说明示波器 DC 与 AC 耦合对测量波形的影响。

## 2 结果和讨论 (Results and Discussion)

### 2.1 BR 对脉冲光的响应

用脉冲激光照射 BR 所产生的光电响应信号是一个双极性信号 (一个较快的负信号  $B_1$  和一个较慢的正信号  $B_2$ ), 如图 2 所示。这种特性是由 BR 的结构决定的。BR 的表面结合有二价金属阳离子、带电的氨基酸和极性磷脂, 构成了膜表面电荷的不对称分布。由这种电荷不对称分布产生的偶极矩从胞质指向胞外。光照时, 视黄醛发生快速的全反到 13 顺光学异构化, 视黄醛内电子云迅速极化引起电荷分离, 电荷分离方向如图 3(A) 所示。这种快速的偶极



**Fig. 3 Explanation to the pulse response characteristics of bacteriorhodopsin**

(A) Laser induced ultrafast charge separation of retinal to generate fast component  $B_1$ ; (B) Proton translocation in BR to produce slow component  $B_2$ .

矩变化使膜胞质面 (CP) 相对于胞外面 (EC) 具有正电势, 于是形成电池内部从正极流向负极, 外电路为负极到正极的位移电流, 即形成负信号  $B_1$ 。随后, 质子泵启动, 质子从希夫碱传递给质子受体  $Asp^{85}$ , 由质子释放基团泵出胞外; 质子供体  $Asp^{96}$  则将一个质子传递给希夫碱,  $Asp^{96}$  从胞外吸入一个质子。最终的结果是将质子从胞内泵向胞外, 如图 3(B) 所示, 在电池内部正电荷从负极流向正极, 外电路从正极流向负极, 形成正信号  $B_2$ 。

### 2.2 BR 对间断光的响应

BR 膜光电池对间断光的响应情况比较复杂, 是否出现微分响应不仅与器件的构成有关, 而且还与测量的方法有关。实验中发现, 电泳沉积 BR 膜器件没有微分响应; BR-LB 膜器件有微分响应, 但与示波器采用的耦合方式有关, 图 4(A) 和图 4(B) 分别为用示波器 DC 耦合与 AC 耦合所测的波形, 在 AC 耦合条件下测到了微分响应。由于测量时的其他条件均相同, 仅是示波器的耦合方式不同, 因此这可能是同样的光电响应波形 (方波) 由于测量条件不同产生的变形。为了验证这个猜想, 我们做了如下的实验: 用 S101 型函数发生器产生一个序列方波信号, 周期 1 s, 分别用示波器 DC 和 AC 耦合测量其波形, 结果如图 5 所示。可以看到, 方波信号经示波器 DC 耦合测量得到的基本上还是个方波; 而用 AC 耦合测得的则是方波信号的微分信号。实际上, 在示波器内部, AC 耦合不同于 DC 耦合的差别是在信号输入端串接了一个高通滤波电容器, 它对直流和慢变信号有阻隔作用, 从而可以使快变信号通过。DC 耦合则可以使低频和低频信号都能通过。因此根据图 4 的测量结果, 我们推测在间断光的照射下, BR 光电池的原始响应应该是接近光强变化波形的近似方波。这种响应过程实际上就是光驱动质子泵的开启和关闭过程, 只是开启和关闭的速度不够快, 其中包含着 BR 光电池器件内部的一些弛豫过程 (见 2.3 节)。任何光电器件只要对间断变化光强有方波响应, 在其输出端串联一个高通滤波电容器就可以产生微分响应。

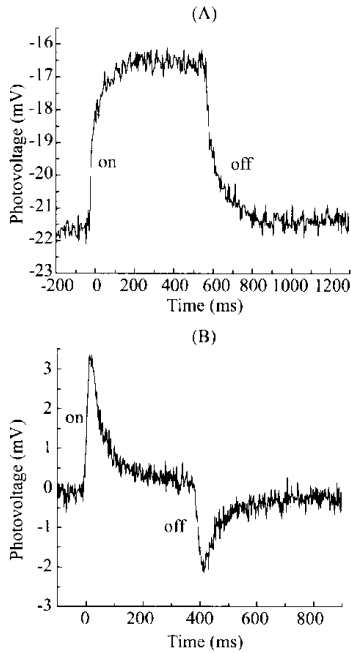


Fig. 4 Photoelectric response waveforms of the BR photocell to interval light

(A) DC couple of oscilloscope ; (B) AC couple of oscilloscope.

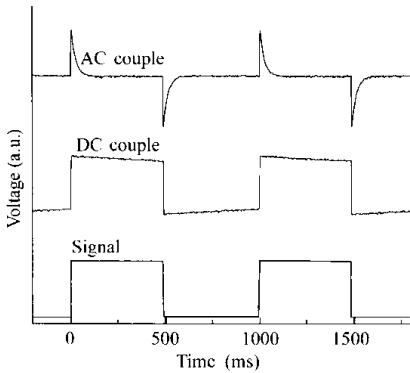


Fig. 5 Waveforms of standard rectangular signal measured respectively with AC and DC couple of the oscilloscope

### 2.3 微分响应与脉冲响应的关系

对不同 BR 膜光电池器件的光电响应波形比较发现,  $B_1$  组分的波形基本不变, 与激发光脉冲的时间相当; 而  $B_2$  组分的波形会有很大的差异, 这种差异是造成器件是否有微分响应的原因。从图 2 可以看到, 电泳沉积 BR 膜器件的  $B_2$  组分相对小而衰减得快, 而 BR-LB 膜器件的  $B_2$  组分相对大而且衰减得缓慢。这造成了前者无微分响应而后者有。这说明微分响应与  $B_2$  波形直接有关。Hong<sup>[4]</sup>和

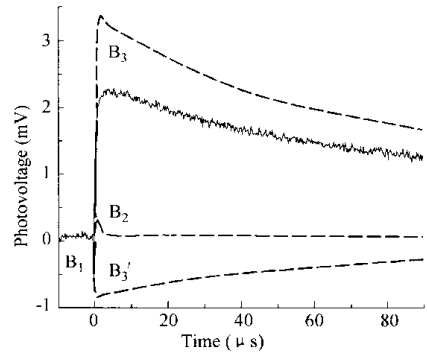


Fig. 6 Decomposition of the pulse response signal of the BR photocell

Wang<sup>[5]</sup>对  $B_2$  组分进行了仔细的研究, 认为  $B_2$  组分实际上是由一个较快的成分  $B_2$  (仍用  $B_2$  表示) 和两个慢成分  $B_3$ 、 $B_3'$  组成的。引用他们的结果, 在我们的模型中可以对这三个成分进行很好的解释。 $B_2$  成分是光照射 BR 后产生的快速质子位移电流, 它发生在膜内和膜表面附近, 是一个正信号。它与  $B_1$  成分相似, 只与 BR 分子的属性有关, 也就是说, 对所有的 BR 膜器件,  $B_1$  和  $B_2$  的极性和组成比例是一定的, 差别在于  $B_3$  和  $B_3'$ 。 $B_3$  的形成我们认为就是光电池的充电过程, 即光驱动质子泵形成的质子传导电流从负极向正极流动, 对光电池充电。光电电压的上升沿或微分响应的正脉冲即由  $B_3$  决定, 它也是个正极性信号。 $B_3'$  的存在我们认为就是光驱动质子泵在膜两侧建立的质子梯度通过浓度差扩散形成的反向电流, 由于紫膜的高阻, 所以它是一个很慢的负极性信号。当光照去掉时, 光电池放电, 其中一路从正极通过外电路向负极放电, 另一路则是通过  $B_3'$  成分放电, 所以光电电压的下降沿或微分响应的负脉冲与  $B_3'$  有关。根据上述分析, 可以将 BR-LB 膜器件的脉冲响应信号分解为图 6 所示的几个成分。对电泳沉积 BR 膜器件, 其  $B_3$  和  $B_3'$  成分非常小, 所以没有测到微分响应信号。

$B_3$  和  $B_3'$  与什么有关? 从本实验中可以看到它可能与电解质和对电极有关。BR-LB 膜器件用的是液体电解质和金电极; 而电泳沉积 BR 膜器件用的是胶体电解质和 ITO 电极。但比较我们以前的结果<sup>[10, 11]</sup>, 可以排除是电解质形式的影响。因为如果把对电极用铜电极代替, 我们在电泳沉积 BR 膜器件上同样可以测到微分响应信号。所以  $B_3$  和  $B_3'$  与对电极有关。

基于定向 BR 膜的光电池是一个比较复杂的光电响应系统, 其光电响应特性不仅与 BR 分子的属性有关, 还与 BR 所处的环境以及电极材料等因素

有关。BR 分子本身的特性是在受光激发后,视黄醛发生快速电荷分离产生负极性位移电流信号并触发 BR 光驱动质子泵功能;希夫碱及其周围氨基酸经过一系列的去质子化和再质子化过程引起质子从膜内侧向膜外侧运输产生质子位移电流,这是一个快速的光反应过程,在 BR 膜内完成。随后发生的过程是光驱动质子泵产生的连续质子传导电流通过电解质对光电池充电,以及光作用消失后光电池通过外电路和内部的放电过程,这是慢变化过程。这两个过程是 BR 膜光电池器件在连续光照射下产生直流电流以及在光强变化产生微分响应的原因。我们从实验上证明,测量电路的耦合特性以及对电极材料的属性对是否能测量到微分响应信号也有直接的影响。BR 的脉冲响应与微分响应机理既有区别又相互关联,脉冲响应是微分响应的早期反应和基础,脉冲响应信号中  $B_3$  和  $B_3'$  成分是否出现决定了器件是否有微分响应特性。 $B_3$  和  $B_3'$  成分除了和电解质特性、pH 值等 BR 膜所处的环境因素有关外,还与对电极材料有直接的关系。

### References

- Racker E, Stoekenius W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J Biol Chem*, 1974, **249**: 662—663
- Trissl H W, Montal M. Electrical demonstration of rapid light-induced conformational changes in bacteriorhodopsin. *Nature*, 1977, **266**: 655—657
- Ormos P, Reinisch L, Keszthelyi L. Fast electric response signals in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim Biophys Acta*, 1983, **722**: 471—479
- Hong F T. Interfacial photochemistry of retinal proteins. *Prog Surf Sci*, 1999, **62**: 1—237
- Wang J P, Yoo S Y, Song L, El-Sayed M A. Molecular mechanism of the differential photoelectric response of bacteriorhodopsin. *J Phys Chem B*, 1997, **101**: 3420—3423
- Miyasaka T, Koyama K, Itoh I. Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor. *Science*, 1992, **255**: 342—344
- Fukuzawa K. Motion-sensitive position sensor using bacteriorhodopsin. *Appl Opt*, 1994, **33**(31): 7489—7495
- Varo G, Keszthelyi L. Photoelectric signals from dried oriented purple membranes of *Halobacterium halobium*. *Biophys J*, 1983, **43**: 47—51
- Wang J P, Li J R, Tao P D, Li X C, Jiang L. Photoelectric properties of bacteriorhodopsin LB film on ITO electrode. *Science in China (Series B)*, 1993, **23**(9): 936—939 (引自:中国科学 B 辑)
- Yao B L, Xu D L, Hou X. Bacteriorhodopsin biomembrane photodetector. *Acta Optica Sinica*, 1997, **17**(12): 1747—1751 (引自:光学学报)
- Yao B L, Xu D L, Hou X, Hu K S, Wang A J. Properties of bacteriorhodopsin's response to modulated light. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1997, **24**(5): 427—430 (引自:生物化学与生物物理进展)

## Characteristics and the Mechanism of Bacteriorhodopsin Photoelectric Response

YAO Bao-Li<sup>\*</sup>, WANG Ying-Li, HU Kun-Sheng<sup>1</sup>, CHEN De-Liang<sup>1</sup>, ZHENG Yuan, LEI Ming

(State Key Laboratory of Transient Optics Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, the Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710068, China; <sup>1</sup>Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Oriented bacteriorhodopsin films were prepared on ITO conductive glass by using electrophoretic or Langmuir-Blodgett methods to construct photocells. Pulse response photovoltages under stimulation of pulsed laser and differential response signals under irradiation of discontinued light were respectively measured, and the origins of the two responses and their correlation are analyzed. The pulse response photovoltage initiated from the ultrafast charge separation of the retinal and the proton translocation, followed by the deprotonation and reprotonation of the Schiff base and its surrounding amino acids. This was a quick response and was the preceding reaction of the differential response. The differential response was caused by the charging and discharging of the continuous proton current of the BR light-driven proton pump at the light-on and light-off, as well as the coupling mode of the measuring circuit, which was a slow process.

**Key words** bacteriorhodopsin; light-driven proton pump; pulse response; differential response

Received: January 8, 2001 Accepted: February 19, 2001

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 60007009) and the President Foundation of the Chinese Academy of Sciences (No. 40007059)

\* Corresponding author: Tel, 86-29-8498711; Fax, 86-29-8498711; e-mail, yaobl@optics.opt.ac.cn