

菌紫质中视黄醛超快异构化反应的动态光谱分析

吴义室^{1,2}, 钟声³, 艾希成², 胡坤生³, 张建平²

(1. 中国科学院化学研究所, 北京分子科学国家实验室,
分子动态与稳态结构化学国家重点实验室, 北京 100080;

2. 中国人民大学理学院化学系, 北京 100872; 3. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 利用飞秒时间分辨吸收光谱方法研究了菌紫质(BR)光循环中视黄醛超快异构化反应过程. 发展了结合全局拟合的奇异值分解(SVD)分析方法, 建立了超快异构化反应动力学模型, 解析了几个重要的中间态 I_{460} , J_{625} 和 K_{590} 的物种相关差异光谱(SADS)和布居动力学, 确定了光致异构化反应过程. 同时明确了 700 nm 附近存在的受激荧光来自于弗兰克-康登跃迁态(H 中间态)的贡献, 其衰减寿命为 0.04 ps. 这些结果对深入认识 H 态在超快异构化反应过程中的作用具有参考价值.

关键词 菌紫质; 超快异构化; 奇异值分解; 受激发射

中图分类号 O644.12

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)01-0140-04

菌紫质(BR)是生长在盐湖中的极端嗜盐菌原生质膜上的一种蛋白^[1]. 分子量为 26000, 含有一个生色团视黄醛分子, 并通过席夫碱基与氨基酸长链相连接^[2,3], 菌紫质的一个生理学功能是在光循环过程中把光能转化成电势, 即实现质子从细胞内到细胞外的转运^[4]. 其中视黄醛分子的超快异构化过程(*all-trans*→*13-cis*)是光循环的起始步骤, 因此一直是备受关注的研究重点^[5,6]. 在视黄醛分子的超快异构化过程中, 光激发下全反式菌紫质激发产生 I_{460} 中间态, I 态中视黄醛仍然保持全反式构型^[7-10]; I 态再以约 500 fs 的时间常数转化到 J_{625} 态, J 态又以几个皮秒的时间常数转化到 K_{590} 态^[9,10]. 其中, I 态被认为是光循环的第一个中间态, 具有丰富的光谱信息. 其主要光谱特征不但包括 460 nm 左右的特征吸收带, 而且有近红外区的受激荧光发射带. 荧光转换结果表明, 菌紫质激发态荧光覆盖波段为 650 ~ 1000 nm, 并表现为三指数衰减, 荧光峰值波长位于 720 nm^[11]; 而飞秒受激荧光光谱观察到的荧光覆盖波段为 800 ~ 1000 nm, 峰值波长在 850 nm 以上^[12]. Anfinrud 等^[12] 和 Gai 等^[13] 研究了这一差异, 并提出在 780 nm 附近存在一个正的吸收带. 关于 BR 激发态荧光的多指数衰减行为和自发荧光与受激荧光的光谱差异, 至今仍没有形成统一认识. 本文利用菌紫质的飞秒时间分辨吸收光谱, 并结合全局拟合的奇异值分解(SVD)分析方法, 分析了菌紫质中视黄醛的超快异构化过程.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

菌紫质是从古细菌 *Halobacterium halobium* 的 R₁M₁ 菌株中利用文献[14]的方法获得的, 并悬浮于去离子水中. 锁模钛宝石激光器(Tsunami, Spectra Physics, Mountain View, USA); 再生放大器(Spitfire, Spectra Physics); 光学参量放大器(OPA-800 CF, Spectra Physics); 成像光谱仪(270M, SPEX); CCD 探测器(Spectrum-1, JY); 光学平移台(LTS-200, Σ -Koki).

1.2 实验过程

飞秒时间分辨吸收光谱实验在飞秒瞬态吸收光谱仪^[15]上进行. 以锁模钛宝石激光器输出为种子光, 经再生放大器放大后输出的光脉冲(800 nm, 120 fs, 800 μ J/Pulse)被分为两束, 其中, 一束经光学参量放大器后产生所需激发波长 570 nm 的泵浦光, 到达样品的能量约为 0.2 μ J, 另一束则经过一个 3

收稿日期: 2007-05-30.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20433010, 20673144)资助.

联系人简介: 张建平, 男, 博士, 教授, 从事物理化学方面的研究. E-mail: jpzhang@chem.ruc.edu.cn

mm 厚的宝石片产生的白光作为探测光. 可见区(460 ~ 790 nm)探测通过在探测光路上加一个带通滤光片(SPF-750, CVI)来实现. 泵浦光与探测光的偏振夹角为 54.7°, 通过非共振光学科尔效应得到泵浦和探测的时间分辨约为 150 fs. 所得到的时间分辨光谱均经过色散校正. 探测系统由成像光谱仪和液氮制冷的 CCD 探测器组成, 泵浦光和探测光之间的延时由泵浦光路上的可控光学平移台实现. 为保证每次激发的样品得到更新, 激光系统在 5 Hz 的低重复频率状态下运行, 同时, 样品池(光程 1 mm)在垂直平面上保持运动. 在实验前光适应 0.5 h 进行紫膜样品的处理, 实验过程中用 20 W 白炽灯照射以维持光适应状态. 所有光谱测试均在室温下进行. 时间分辨光谱解析在 Matlab5.3.1(Mathworks) 和 Mathcad2001i(MathSoft) 软件平台上进行.

2 结果与讨论

图 1 为细菌视紫红质在可见光区的时间分辨吸收光谱, 其中, 在 500 nm 以下的可见光区激发产生明显的正吸收带为 I_{460} 的特征吸收^[7~10]; 530 ~ 610 nm 处的谱带信号与 BR 稳态吸收谱基本对应, 为基态漂白信号; 600 nm 以上逐渐出现的正吸收信号为 J_{625} 和 K_{590} 态的特征吸收^[9,10]. 但是发生于短延时范围(< 0.5 ps)内长波侧(约 700 nm)的负信号仍没有确定的归属, 需要对图 1 中的时间分辨光谱进行动力学分析.

由于可见光区 J 态和 K 态吸收与基态漂白带重叠严重, 给分析带来一定的困难. 在这种情况下为实现时间分辨光谱解析, 需要建立动力学模型, 并同时实现多个波长的动力学模拟, 即全局拟合. 但随着动力学曲线个数的增加, 拟合参数线性增加, 使得计算工作量变得庞大. 奇异值分解是一种有效的数学方法, 能对全局拟合中的大量数据进行有效地简化, 确定主要成分, 去除次要成分, 通过成分分析得到主要瞬态物种的光谱和动力学, 在时间分辨光谱分析中获得了广泛应用^[16~18]. 用于 SVD 分析的时间

分辨光谱是三维矩阵 $A_{m,n}$ (n 列向量代表 n 个不同延时下观测到的光谱, m 行向量表示 m 个波长下的动力学). 矩阵 $A_{m,n}$ ($m \geq n$) 可按 $A_{m,n} = U_{m,n} S_{n,n} V_{n,n}^T$ 分解, 其中, $U_{m,n}$ 是一个正交矩阵, 每一列对应 SVD 组分中一个与延时无关的基谱; $S_{n,n}$ 是对角矩阵, 每一个对角矩阵元的大小 $S_{i,i}$ 值表示对应 SVD 组分的权重; $V_{n,n}^T$ 是一个正交矩阵, 每一行向量代表相应 SVD 组分的动力学. 每一个 SVD 组分对整个矩阵 A 的贡献取决于 S 值的大小, 一般只需考虑 S 权重较大的几个主要 SVD 组分.

选择的三维矩阵的时间区间为 $-0.2 \sim 8$ ps, 波长区间为 490 ~ 750 nm, 经过分析得到各 SVD 组分的奇异值见图 2(A). 考虑到在此时间区间内的光循环的中间态为 I_{460} , J_{625} 和 K_{590} , 同时, 在 700 nm 左右存在一个快速的负信号的衰减, 其衰减时间常数快于 I 态, 说明可能存在一个新的中间态, 并早于 I 态生成, 因此可预测存在 4 个中间态组分对光谱产生贡献, 根据已有的研究结果^[7~10] 确定图 2(B) 的动力学模型. 依据这一模型, 设定 $[H]_0 = 1$, 得到各中间态的速率方程表达式:

$$H = \exp(-at)$$

$$I = \frac{k_2}{b-a} \exp(-at) + \frac{k_2}{a-b} \exp(-bt)$$

$$J = \frac{k_2}{b-a} \times \frac{k_4}{c-a} \exp(-at) + \frac{k_2}{a-b} \times \frac{k_4}{c-b} \exp(-bt) + \frac{k_2}{a-c} \times \frac{k_4}{b-c} \exp(-ct)$$

$$K = \frac{k_2}{b-a} \times \frac{k_4}{c-a} \times \frac{k_6}{k_0-a} \exp(-at) + \frac{k_2}{a-b} \times \frac{k_4}{c-b} \times \frac{k_6}{k_0-b} \exp(-bt) +$$

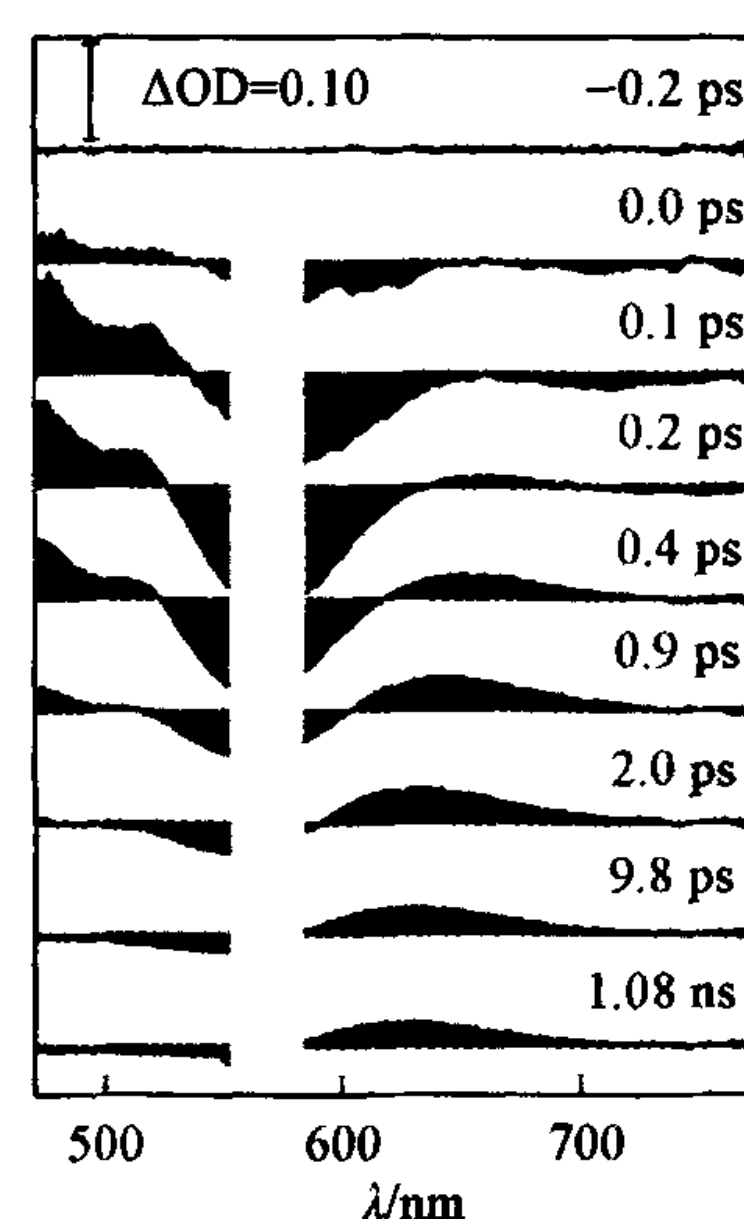


Fig. 1 Femtosecond time-resolved absorption spectra in visible spectral range at representative delay time

$$\frac{k_2}{a-c} \times \frac{k_4}{b-c} \times \frac{k_6}{k_0-c} \exp(-ct) + \frac{k_2}{a-k_0} \times \frac{k_4}{b-k_0} \times \frac{k_6}{c-k_0} \exp(-k_0t)$$

式中, $a = k_1 + k_2$, $b = k_3 + k_4$, $c = k_5 + k_6$. 考虑到采用的延时范围为 8 ps, 远短于 K 态衰减寿命(2 μ s), 故不必考虑 K 态衰减, 设定 k_0 为 0.

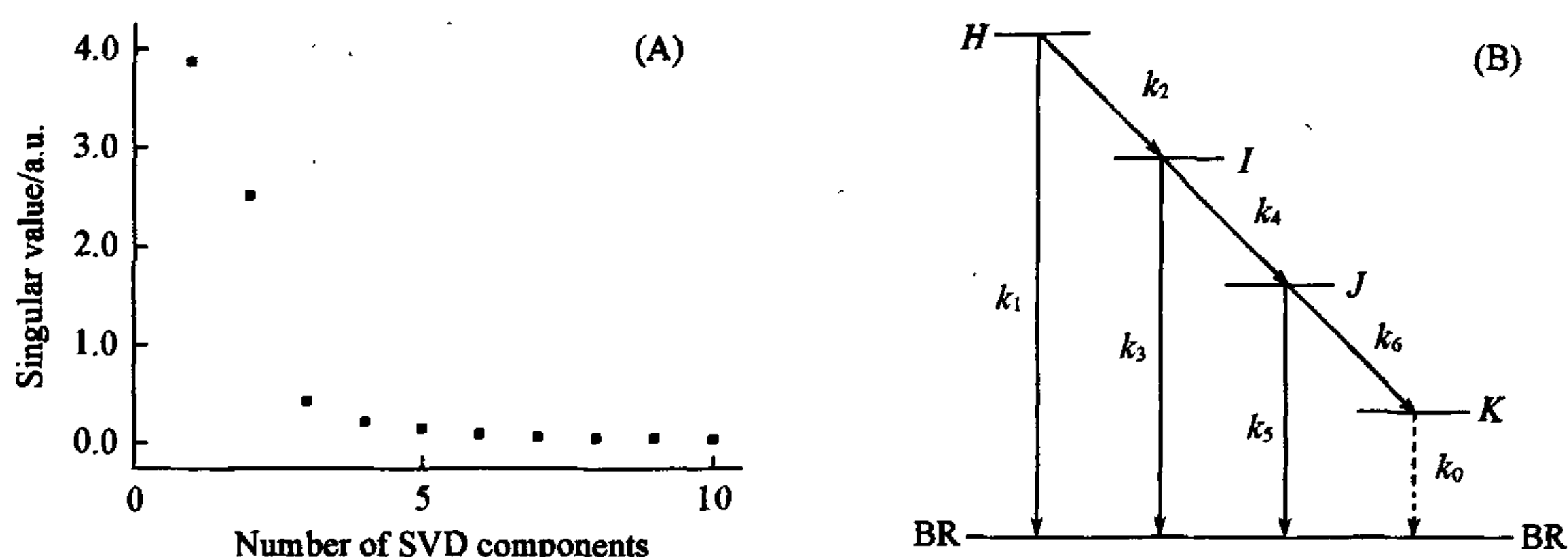


Fig. 2 Singular values obtained from the SVD analysis of the time-resolved spectra of BR (A) and proposed photoisomerization model (B)

对于独立的光谱组分, 动力学曲线矩阵 V 是各个 SVD 组分布居动力学曲线的线性组合. 将矩阵 V 乘以 S (相当于每个奇异值组分乘上自身的权重), 第 i 列就是第 i 个 SVD 组分动力学乘以它的待定系数 (C_i). 然后用下面的方程拟合 VS 中的每一列 $V_i S_i$:

$$V_i S_i = C_1(i) \times H + C_2(i) \times I + C_3(i) \times J + C_4(i) \times K$$

并对仪器响应函数解卷积, 得到各中间态的衰减时间常数 $\tau_1 = 0.04$ ps, $\tau_2 = 0.38$ ps 和 $\tau_3 = 1.4$ ps, 由系数矩阵 C 得出各个中间态的布居动力学和物种衰减差异光谱 (SADS) (见图 3).

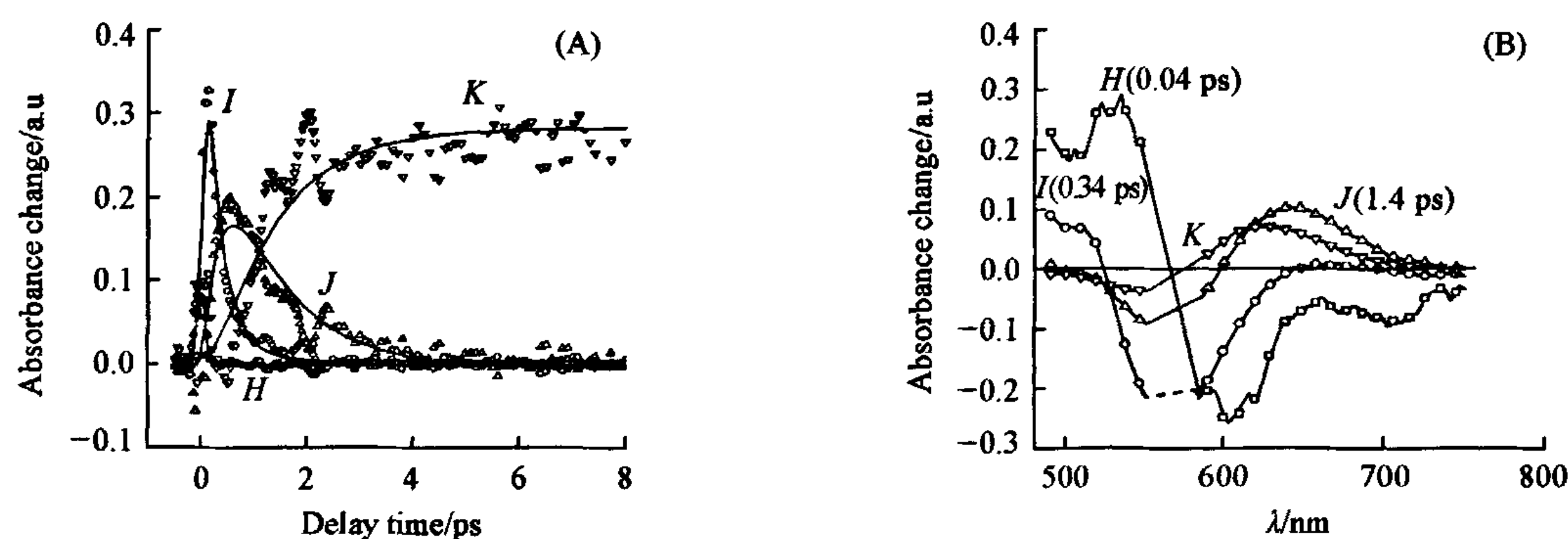


Fig. 3 Population dynamics (A) and species associated decay spectra (SADS) (B) of the four transient species derived from time-resolved spectra of BR

由分析结果可以看出, 第一组分寿命非常短, 只有 0.04 ps, 而且其 SADS 谱在 590 nm 以上是一个双峰结构的负信号, 而在 530 nm 左右有一个正信号. 同时, 其光谱特征与 I 中间态近似, 具有 500 nm 附近的吸收峰和长波区域的受激荧光峰. Zhong 等^[19] 利用飞秒时间分辨吸收研究天然菌紫质观察到, 在 460 nm I 态特征吸收带有一个形成过程, 其时间尺度约 30 fs. 据此可将观察到的第一组分归属为未发生构型变化的 S_1 激发态, 即弗兰克-康登跃迁态, 也称 H 中间态, 短波长的负信号是由于基态分子被部分激发所致, 而长波长位置 (峰值 710 nm) 的负信号则是由于受到 H 态的受激发射的影响. I 中间态的 SADS 谱具有小于 500 nm 的正吸收带以及 700 nm 以上的受激荧光信号, 其时间常数 0.34 ps 也与文献报道的结果比较接近. J_{625} 的 SADS 谱表现为一个明显的峰值 640 nm 的正吸收带, 时间常数为 1.4 ps. K_{590} 中间态的 SADS 谱正吸收带相对于 J_{625} 蓝移了约 25 nm, 且为长寿命成分. 由得到的各组分的 SADS 谱和布居动力学逆向进行光谱重建得到新矩阵, 并用原始矩阵减去新矩阵, 得到没有任何光谱特征的残差噪声矩阵, 这表明本文所采用的动力学模型是合理的.

通过 SVD 结合全局分析得到的 H 态的 SADS 谱显示, 可见区长波段由于受激发射引起了荧光负信号, 而这一信号通常因为受到 J 中间态的宽的特征吸收带的影响而很难观察到, H 态荧光信号的确认

有助于理解 BR 荧光的非指数性, 也有助于解释不同实验得到的 BR 自发荧光发射光谱和受激荧光发射谱的差别^[12,13,20]. Gai 等^[13]从 *I* 态的新吸收带的角度解释了这一差别, 而我们认为, 受激荧光是 *H* 态和 *I* 态两方面的共同贡献, 而并非 *I* 态单独的贡献; *H* 态受激荧光峰值约为 710 nm, *I* 态受激荧光峰值约 870 nm, 两者部分重叠; 800 nm 左右负信号的缺失是由于这段区域没有荧光发射信号, 而非是由于吸收的正信号被抵消. *H* 中间态的存在对于深入认识超快异构化反应历程具有重要的参考价值.

参 考 文 献

- [1] Oesterhelt D., Stoeckenius W.. Nature New Biol. [J], 1971, 233: 149—152
- [2] Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R. A., et al.. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1974, 71: 4462—4466
- [3] Katre N. V., Wolber P. K., Stoeckenius W., et al.. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1981, 78: 4068—4072
- [4] Racker E., Stoeckenius W.. J. Biol. Chem. [J], 1974, 249: 662—663
- [5] Pettei M. J., Yudd A. P., Nakanishi K., et al.. Biochemistry [J], 1977, 16: 1955—1959
- [6] Braiman M., Mathies R. A.. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1982, 79: 403—407
- [7] Mathies R. A., Cruz C. H. B., Pollard W. T., et al.. Science [J], 1988, 240: 777—779
- [8] Kobayashi T., Terauchi M., Kouyama T., et al.. Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. [J], 1991, 1403: 407—416
- [9] Nuss M. C., Zinth W., Kaiser W., et al.. Chem. Phys. Lett. [J], 1985, 117: 1—7
- [10] Kryukov P. G., Matveets Y. A., Sharkov A. V., et al.. Springer Ser. Opt. Sci. [J], 1980, 22: 200—206
- [11] Du M., Fleming G. R.. Biophys. Chem. [J], 1993, 48: 101—111
- [12] Hasson K. C., Gai F., Anfinrud P. A.. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1996, 93: 15124—15129
- [13] Gai F., Hasson K. C., McDonald J. C., et al.. J. Am. Chem. Soc. [J], 1997, 119: 6201—6202
- [14] Polland H. J., Franz M. A., Zinth W., et al.. Biophys. J. [J], 1986, 49: 651—662
- [15] Han R. M., Wu Y. S., Feng J., et al.. Photochem. Photobiol. [J], 2004, 80: 326—333
- [16] Yamaguchi S., Hamaguchi H.. J. Chem. Phys. [J], 1998, 109: 1397—1408
- [17] Zhang C. F., Farrens D. L., Björling S. C., et al.. J. Am. Chem. Soc. [J], 1992, 114: 4569—4580
- [18] Zhang J. P., Inaba T., Watanabe Y., et al.. Chem. Phys. Lett. [J], 2000, 331: 154—162
- [19] Zhong Q., Ruhman S., Ottolenghi M., et al.. J. Am. Chem. Soc. [J], 1996, 118: 12828—12829
- [20] Haran G., Wynne K., Xie A. H., et al.. Chem. Phys. Lett. [J], 1996, 261: 389—395

Time-Resolved Spectral Analysis of Ultrafast Isomerization Dynamics of Retinal in Bacteriorhodopsin

WU Yi-Shi^{1,2}, ZHONG Sheng³, AI Xi-Cheng², HU Kun-Sheng³, ZHANG Jian-Ping^{2*}

- (1. Beijing National Laboratory for Molecular Science (BNLMS), State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable and Stable Species, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;
- 2. Department of Chemistry, College of Science, Renmin University of China, Beijing 100872, China;
- 3. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The ultrafast photoisomerization process of retinal in Bacteriorhodopsin's (BR) photocycle was investigated *via* femtosecond time-resolved absorption spectroscopy. Singular value decomposition (SVD) combined with model-based global fitting was employed to analyze the time-resolved spectra, and the related difference spectra (SADS) and the population dynamics of I_{460} , J_{625} and K_{590} intermediates were derived on the basis of our proposed reaction scheme. The detailed photoisomerization pathways were discussed. Moreover, the SADS of Franck-Condon state (*H* intermediate), radiative transition of which accounts for the stimulated emission around 700 nm, was also detected, and its time constant was 0.04 ps. Our results prove the involvement of the *H*-intermediate in ultrafast photoisomerization process of retinal in BR.

Keywords Bacteriorhodopsin; Ultrafast isomerization; Singular value decomposition; Stimulated emission

(Ed.: S, I)