

细菌视紫红质蛋白的光谱分析与光电特性应用

徐晓红, 吴敏*

(浙江大学 生命科学学院 生物技术系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 细菌视紫红质是一种具有光驱动质子泵功能的跨膜蛋白, 迄今为止已被当作光合作用、质子泵和七螺旋跨膜的受体模型进行研究。现代生物物理学的发展为研究细菌视紫红质的结构和功能提供了多种有效的方法和手段, 目前已采用了傅立叶红外光谱、共振拉曼光谱、核磁共振与实时振动光谱等多种分析方法来研究它的光电特性。细菌视紫红质具有较强的光敏感性, 能产生光电信号, 可进行快速的光化学反应等性质, 这些特性已在众多科学领域得到应用并取得了突破性进展。另外, 细菌视紫红质在光致色变、瞬态光电响应和非线性光学等性能上都具有良好的应用前景。

关键词: 细菌视紫红质; 光谱分析; 光电特性

中图分类号: Q 73; Q 937

文献标识码: A

文章编号: 1008-9497(2004)05-570-05

XU Xiao-hong, WU Min (Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Spectral analysis and application of photoelectric characteristics in bacteriorhodopsin Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2004, 31(5): 570~574

Abstract: The photon-driven proton translocator bacteriorhodopsin is considered to be the best understood membrane protein so far. It is nowadays regarded as a model system for photosynthesis, proton pumps and seven transmembrane receptors. The profound knowledge comes from the applicability of a variety of modern biophysical techniques which are being further developed for the research on bacteriorhodopsin and resulted in major contributions also to other areas. Most prominent examples are fourier transform infrared spectroscopy, resonance Raman spectroscopy, solid-state NMR spectroscopy and time-resolved vibrational spectroscopy. The achievement in spectral analysis results will strongly advance our understanding of the photoelectric characteristics of bacteriorhodopsin. And it will have application in light-induced color changing, instant photoelectricity response, nonlinear optical capability and so on.

Key words: bacteriorhodopsin; spectral analysis; photoelectric characteristic

近 30 年来, 细菌视紫红质 (Bacteriorhodopsin, BR) 越来越引起了科学家的关注。对于 BR 的研究, 无论是在生物学特性还是在光电特性的应用方面, 都取得了巨大成果。

BR 是一个简单的膜蛋白, 它可以作为研究细胞膜受体蛋白的模型, 有助于阐明药物与人体细胞靶受体以及信号传导途径中的受体与信号的相互作用机制^[1]; 它的光驱动质子泵功能可应用在光电转换器、信号储存和光学检测等方面; 随着生物化学、

生物物理学和光学等学科的发展, BR 的光致色变及光电响应特性在太阳能电池、人工视网膜、光信息存储、神经网络、生物芯片等领域具有广泛的应用前景^[2~4]。

目前, 针对 BR 的研究内容包括质子跨膜的时间流程、质子释放和吸收及视黄醛和蛋白构象变化的步骤等, 采用的光谱学方法主要有共振拉曼光谱 (resonance Raman)、快速和超快速激光光谱 (fast and ultrafast laser spectroscopy)、动态和静态傅立

收稿日期: 2003-09-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370029)。

作者简介: 徐晓红 (1978-), 女, 硕士, 主要从事嗜盐古生菌的研究

* 通讯作者: wumin@zju.edu.cn

叶红外光谱 (kinetic and static Fourier transform infrared, FTIR) 及核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 等, 这些方法为 BR 的研究提供了大量有用信息。

1 BR 简介

BR 分子是由 248 个氨基酸残基组成, 其分子量为 26 000 道尔顿。蛋白分子空间上折叠形成 7 条跨膜螺旋柱, N 端位于细胞膜外侧, C 端位于细胞膜内侧, 螺旋柱基本垂直于细胞膜, 每个 BR 蛋白在其细胞膜内侧 216 位的氨基酸残基上结合一个视黄醛生色团。这种晶格结构在生物膜中的排列很独特, 增加了膜结构的稳定性, 也有利于进行结构分析, 促使 BR 分子目前已成为生物膜结构研究中最清楚的膜蛋白之一。

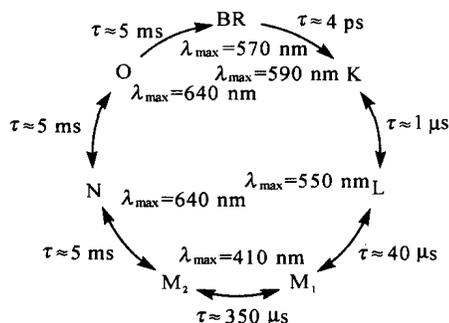


图 1 细菌视紫红质的光循环模型^[5]

Fig 1 Photocycle model in Bacteriorhodopsin

BR 是存在于 *Halobacterium salinarum* 中的一种膜上的蛋白质, 它能够依赖光的能量将质子泵出胞外。BR 在泵出质子的循环中会有 5 个不同的中间体: K、L、M、N、O (见图 1), 图中标示的生存时间 τ 是在室温下测定的。由于 BR 发光基团视黄醛的颜色变化, 这 5 种中间体很容易区分^[6-8]。

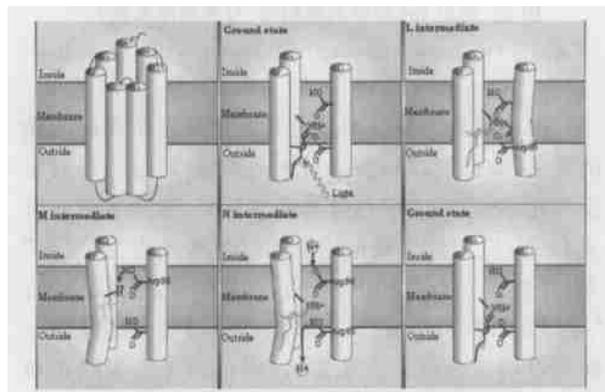


图 2 细菌视紫红质的质子泵机制^[9]

Fig 2 Molecular mechanism of proton (H^+) pumping in bacteriorhodopsin

BR 的 7 个跨膜螺旋环形排列形成质子通道 (见图 2), 视黄醛位于通道中央, 与 G 螺旋 216 位赖氨酸通过质子化席夫碱结合, 当视黄醛与光子发生碰撞后, 它将从全反式转变为 13-cis, 然后引起周围侧链的构象变化, 由于新环境的不稳定, 席夫碱的质子移至 C 螺旋 85 位的天冬氨酸 (Asp), 接着 C 螺旋 96 位 Asp 将席夫碱质子化, 这时质子通道的胞质入口扩大, 一个质子进入, 将 96 位 Asp 质子化, 85 位的质子于是通过氢键和水送至胞外, 视黄醛最终恢复全反式构象, 各螺旋回复起始位置, 开始新一轮循环^[10]。

2 BR 的光谱分析方法及其比较

2.1 傅立叶红外光谱 (FTIR)

红外光谱与紫外-可见光吸收光谱一样, 都是研究样品分子对光的吸收, 属于吸收光谱。紫外-可见光吸收光谱是通过样品分子对紫外-可见光的吸收得到有关样品分子电子能级的信息, 而红外光谱通过样品分子对红外光的吸收, 得到样品分子振动能级的信息, 属于振动光谱。通过傅立叶变换数学方法得到的 FTIR 又比普通的红外光谱得到的干涉图更加清晰, 容易分析。红外光谱可用于说明通过 BR 进行的质子传递过程中特殊氨基酸的作用。

FTIR 光谱分析可得到 BR 质子传递过程中 M_{12} 、 M_2 态蛋白结构的区别, 而且得到 M_N 态与 N 态蛋白结构除了在去质子化席夫碱上的区别外, 很相似^[12]。Colin D. Heyes 等利用 FTIR 研究了 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 及有机离子 ($(\text{Et})_3\text{N}^+\text{Bu}^{2+}$) 等^[13] 不同二价阳离子在 BR 热稳定性上的作用, 其结果为 BR 蛋白去离子化后的绑定机制的提出奠定了基础。

2.2 共振拉曼光谱

拉曼光谱得到的也是分子振动能级的信息, 但它得到的信息不是来自样品对光的吸收, 而是来自样品对光的散射。

红外光谱与拉曼光谱都属于分子振动光谱, 得到的是有关化学基团的信息, 从中又可进一步得到有关生物大分子的化学组分、结构、动力学等信息。Johannes Herbst 等^[14] 在瞬时红外吸收图谱中得到了 BR 的 C-C、C=C 和 C=NH 等基团的拉伸模式振幅, 发现所有的光产物模式都随着恒定时间常数 0.5 ps 增长, 从振动光谱角度为光异构化发生时间在 0.5 ps 内的说法提供了直接证据。振动光谱的优点^[15]: 对样品无破坏; 样品形态不限, 水溶液、悬浮

液、沉淀、膜、单晶、多晶均可; 样品用量少; 适于时间分辨测量。

与红外光谱相比, 拉曼光谱又有其自身的优点: 受水的干扰小; 生物样品中很多无红外活性的基团有较强的拉曼活性; 样品不必粉碎, 研磨, 不必透明, 更适用于测试生物样品。但是拉曼测量要避免荧光杂质和其他生色团的干扰, 其信号较弱, 仪器昂贵。

2.3 核磁共振(NMR)

NMR 方法可直接分析溶液样品, 不需制成单晶, 可方便地进行动态检测, 而且与振动光谱相比, NMR 对样品分子解析的空间分辨率较高, 对蛋白质空间构象的研究具有较大的应用价值。Heiko Patzelt 等^[16]利用 NMR 观察暗状态下 BR 的全反式和 13-cis, 15-syn 形式下视黄醛的结构, 发现在 M 中间态的 C12-C14 区域内, 13-cis, 15-syn 形式比 13-cis, 15-anti 形式下的视黄醛有微小的上倾, 这对研究 BR 的质子传递机制具有重大意义。

2.4 穆斯堡尔谱

迄今为止, 穆斯堡尔谱是能量分辨率最高的波谱学方法, 是物质微观结构研究的强有力的手段。BR 是一种膜束缚蛋白, 在活性的紫色形态起光驱动质子泵的作用, 酸化或去离子作用可使其变为无活性的蓝色形态, 而这蓝色形态又可以通过加阳离子及增加 pH 值而恢复活性, 现在还不清楚, 是通过膜电位与蛋白质的非特异相互作用, 还是通过色素本身最近邻特异相互作用简单地由阳离子影响其功能活性。研究表明, 这类蛋白质的功能活性与其动力学性质密切相关, 用⁵⁷Fe 离子恢复活性的 BR 分子非常适合于用穆斯堡尔效应进行研究^[15]。

除以上介绍的有关 BR 的光谱分析方法外, 还有荧光光谱法、光二极管阵列等技术, 可用于跟踪 BR 在去垢剂/脂微团中的折叠事件^[17, 18]。另外, Kobayashi T 等^[19]利用瞬态实时光谱可观测到 BR 的视黄醛生色团从全反式到顺式的光致异构化过程。通过光谱分析, 发现了 BR 独具的光电特性, 其中一些特殊的性质已经得到了广泛的应用。

3 BR 光电特性应用现状

BR 结构和功能的特点, 决定了 BR 可作为优良的光电生物材料。BR 的使用光谱范围宽(400~700 nm), 具有高的空间分辨率(5 000 lines/mm)、高感光灵敏度(30~80 mJ/cm²)、快的反应速度(50 μs)、高量子转化效率(65%), 这些特性是其它光致色变材料无法比拟的^[20]。目前, BR 已经在以下几个方面

得到应用。

3.1 数据存储器

基于 BR 的蛋白光学存储器可以被制成薄膜光致变色存储器、三维分支光循环存储器、全息二进制存储器或者傅立叶变换全息联想存储器。在整个光循环过程中, BR 经历几种不同的中间体过程(见图 1), 伴随相应的物质结构变化。如果 O 态由红光进行光活化, 则会发生视黄醛由全反式到 9-cis 的光化学反应^[11], 这种 9-cis 视黄醛在其绑定位置上的不稳定性引起席夫碱水解, 最终导致了 Q 态(λ_{max}=380 nm)的形成, 这种中间态相对比较稳定, 对于 BR 蛋白的应用更具有实际意义。人们通过调谐激光束, 将信息并行地写入 BR 立方体, 然后从立方体中读取信息, 建立了多波长菌紫质光学信息存储记录、读出和擦除系统(见图 3)。

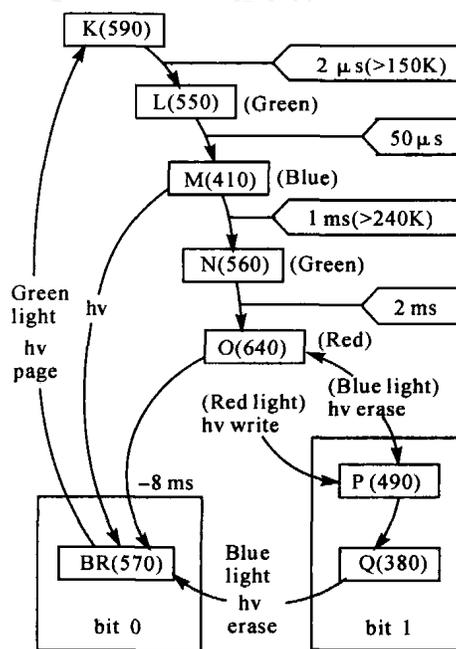


图 3 利用 BR 建立的数据读、写和擦除系统^[21]

Fig 3 The branching reactions used to write, read and erase data

图中括号内标注的颜色是激活此态所需的激光的颜色。数据读、写、擦除系统运作时, 通过一系列光镜和光学装置, 以绿色激光为参照光, 激活蛋白并形成 O 态, 以加载了数据信息的红色激光作为“写入”光, 将数据“写入”BR 蛋白数据存储态 Q(380); “读”数据时, 只需在“写”数据的所需装置的基础上连入电耦或电荷注入装置, 以绿色激光为参照光和适当强度的红色激光照射, 写入蛋白的数据便可读出; 若以蓝色激光照射, 数据即可被删除(整套装置的设计可见文献[21])。

3.2 逻辑门的制作

BR 具有良好的双光子吸收性能和非线性光学特性,这是由视黄醛分子的非线性极化率引起的.视黄醛周围的蛋白结构可以增强 π 电子的离域作用. Chandra Pal Singh 和 Sukhdev Roy 已经利用 BR 在多光束作用下 B、K、L、M、N、O 6 个中间态的转换特性和非线性光学性质,设计出光导“与”、“或”、“非”门以及“与非”、“或非”门^[22, 23],而且还利用 BR 研制模拟人脑联想能力的中心网络和联想式存储装置.

3.3 蛋白质处理器

一些利用蛋白质制成的三维数据存储、并行处理器及神经网络等器件已经在军事上得到了应用,俄罗斯的军用雷达上就使用了 BR 做处理器.由于所需的生物分子材料可利用基因技术通过细菌繁殖大量生产,其造价将比半导体元件计算机低很多.

4 BR 光电特性应用前景

BR 除了具有温度稳定性外,在失水状态及较宽的 pH 范围 (pH 3~10) 仍能保持活性,还可以耐受连续光照和高氧浓度;若与高分子聚合物通过特殊工艺进行混合,则可在光学均匀性、分子排列结构和物理强度等方面得到改善和加强;这些不同于其他生物材料的性质,决定了 BR 具有广泛的应用前景.

4.1 光电探测器

紫膜 (PM) 在光照下能够产生电信号,这是基于 BR 的质子泵功能 (见图 4).

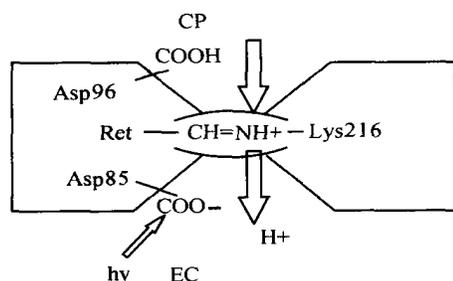


图 4 细菌视紫红质的质子泵功能

Fig. 4 Function of proton (H^+) pumping in bacteriorhodopsin

光驱动质子泵的功能可实现太阳能转换成化学能和电能,可制成光电探测器.利用 BR 对光敏感的特性,当它暴露在光下时会发射出质子,从而产生出可以检测的微小电信号,当在某个频率的光照射下,它发射出来的信号强度随介质的酸度增加而减弱,

而另一频率的光则可以使它对 Cl^- 的浓度敏感,利用这种性质可检测介质的酸度和 Cl^- 的浓度.

4.2 人工视网膜

利用 BR 的光敏感性,可制成仿视觉功能人工视网膜、人工感受野. BR 可经过改良应用到严重受损的视网膜上,能把讯号经由蛋白质传送到视觉神经.利用蛋白质原理制成的人工视网膜,在脑部形成的影像比利用半导体技术造成的影像要好得多.经改良的 BR 感受器,只会当影像出现变化时才把电流脉冲传送到大脑,这与人类视网膜对光的反应完全一致,也是脑部能更准确地解读讯号的重要因素.

4.3 光电计数器

光照引起分子内的电荷分离,其产生的光电特性可制成光电子器件,比如光电计数器.将 BR 材料与微弱信号检测技术和单片机技术结合,可制成在强背景光条件下,进行光电计数测量的装置.

BR 蛋白若要在生物学、物理学、化学等领域发挥出更大的潜能,还有一些问题亟待解决,例如:

(1) 在 BR 蛋白分子中,结合着几个 Mg^{2+} ,如果把这几个离子除去,紫膜就会变成蓝膜,同时失去质子泵功能,不能进行光循环.这几个离子是如何发挥作用的还有待探讨.

(2) 研究发现,单体 BR 分子已经具有质子泵和光循环功能,但是 BR 的天然状态却以三聚体存在,其中的原因目前还不清楚.

(3) 如能明确地定位所有水分子或更好地定位整个氢键网络,则 FTIR、NMR、EPR 等光谱学方法的优越性可在分析 BR 的功能/结构关系时更加充分地体现出来.

综上所述,目前对 BR 进行光谱分析方法很多,包括 FTIR、NMR、ERP、共振拉曼光谱、荧光光谱分析方法等等,不同的分析方法可以得到 BR 蛋白在结构、化学组分、动力学等多方面的信息.随着科学仪器及技术的进步,BR 更加精细的结构及质子泵作用过程中的微小变化都将被观察到. BR 这种具有广阔发展前景的生物材料,它独特的光学特性将会应用于制作更好的光电生物器件.另外,通过对 BR 蛋白进行基因改造,进而分析 BR 野生型和突变体在构象、功能、生命活动形式等方面的差异,会得到具有更好生物特性的材料.这需要科学家共同努力,探索 BR 更深层次的奥秘,并将已知的 BR 生物特性应用在各个领域,充分发挥 BR 的价值.

参考文献 (References):

[1] SR RAM S, RICHARD H. Molecular mechanism of

- vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin [J]. **Nature**, 2000, 406(6796): 653- 657.
- [2] BRGE R R. Photophysics and molecular electronic applications of the rhodopsins [J]. **Annu Rev Phys Chem**, 1990, 41: 683- 733
- [3] CHEN Z, BRGE R R. Protein based artificial retinas [J]. **Trends Biotechnol**, 1993, 11(7): 292- 300
- [4] GYORGY V. Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin [J]. **BBA-Bioenergetics**, 2000, 1460: 220- 229
- [5] RICHARD N, EVA P P, KARL E, et al. Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport [J]. **BBA-Biomembranes**, 2002, 1565: 144- 167.
- [6] KARL E, RICHARD N. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle [J]. **Nature**, 1999, 401(6755): 822- 826
- [7] WERNER K. Bacteriorhodopsin the movie [J]. **Nature**, 2000, 406(6796): 569- 570
- [8] ANTOINE R. Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photo cycle of bacteriorhodopsin [J]. **Nature**, 2000, 406(6796): 645 - 648
- [9] ROYANT A, EDMAN K, URSBY T, et al. Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin [J]. **Nature**, 2000, 406: 645- 648
- [10] HARTMUT L. Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution [J]. **Science**, 1999, 286(5438): 255 - 260
- [11] POPP A. Photochemical conversion of the O⁻ intermediate to 9-cis-retinal-containing products in bacteriorhodopsin films [J]. **Biophys J**, 1993, 65: 1449- 1459
- [12] ANDREY D K. Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle [J]. **BBA-Bioenergetics**, 2000, 1460: 204- 219
- [13] COLN D H, WANG J P, LAURIE S S, et al. Fourier transform infrared study of the effect of different cations on bacteriorhodopsin protein Thermal stability [J]. **Biophys J**, 2002, 82: 1598- 1606
- [14] JOHANNES H, KARSTEN H, ROLF D. Fem to second infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization [J]. **Science**, 2002, 297: 822- 825
- [15] 赵南明, 周海梦. 生物物理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 312- 398
ZHAO Nanming, ZHOU Haimeng. **Biophysics** [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. 312- 398
- [16] HEIKO P, BERND S, ANTONIUSTER L, et al. The structures of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy [J]. **PANS**, 2002, 99(15): 9765 - 9770
- [17] BOOTH P J. Intermediates in the folding of the membrane protein bacteriorhodopsin [J]. **Nat Struct Biol**, 1995, 2(2): 139- 143
- [18] RUDIGER M. Reconstitution of bacteriorhodopsin from the apoprotein and retinal studied by FTIR [J]. **Biochemistry**, 1997, 36(16): 4867- 4874
- [19] KOBAYASHI T, SAITO T, OHTANI H. Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization [J]. **Nature**, 2001, 29(414): 531- 534
- [20] 杨文正, 杨青, 陈烽, 等. 基于细菌视紫红质薄膜的空间光调制器实验研究 [J]. **物理学报**, 2003, 52(3): 761- 766
YANG Wen-zheng, YANG Qing, CHEN Feng, et al. A study on spatial light modulator of bacteriorhodopsin film [J]. **Acta Physica Sinica**, 2003, 52(3): 761- 766
- [21] WISE K, GILLESPIE N, STUART J, et al. Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic devices [J]. **Trends Biotechnol**, 2002, 20(9): 387 - 394
- [22] SINGH C P, ROY S. All-optical switching in bacteriorhodopsin based on M state dynamics and its application to photonic logic gates [J]. **Optics Communications**, 2003, 218: 55- 66
- [23] SINGH C P, ROY S. All-optical logic gates with bacteriorhodopsin [J]. **Current Applied Physics**, 2003, 3: 163- 169

(责任编辑 寿彩丽)