

激光诱导菌紫质 LB 膜快速光电动力学研究*

姚保利 徐大纶 侯 洵

(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)

李宝芳 江 龙

(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101)

摘要 在 ITO 导电玻璃上拉制了 10 层定向菌紫质 LB 膜, 组成了 ITO 电极/菌紫质 LB 膜/KCl 溶液/铜电极结构的湿光电池. 用调 Q 倍频 Nd:YAG 激光器输出的 10Hz, 8 ns 巨脉冲序列作用于菌紫质 LB 膜, 在 300 MHz 数字示波器上直接得到了薄膜的快速光电动力学曲线. 理论上建立了菌紫质光电动力学方程. 通过对不同时基下采集到的实验曲线的非线性最小二乘拟合, 综合出了理论模型的实验公式, 并计算出了菌紫质光循环过程中各步的电位移参数和衰减时间常数.

关键词 菌紫质 LB 膜 光电动力学

细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin, 简称菌紫质或 BR)是一种存在于嗜盐菌紫膜(Purple Membrane)中的光敏蛋白质. 它可把光能以不同的分子构象方式加以存储, 并以化学能和电能形式释放. 在生物体内, 它起着类似植物叶绿素光合作用的功能; 在生物体外, 由于它易于培养提取, 且有极好的稳定性, 因而已成为一种重要的生物分子光存储材料和光电功能材料, 在光学信息记录和实时处理方面^[1]; 人工神经网络构造方面^[2]; 视觉系统模拟^[3]等方面的应用都取得了可喜的进展.

利用导电玻璃上淀积的 BR 薄膜, 可以研究 BR 分子的光电特征, 这对上述应用具有理论和实践指导意义. 本文利用 Langmuir-Blodgett 技术, 在 ITO 导电玻璃上淀积出定向菌紫质 LB 膜, 并组成 ITO/BR/电解质/Cu 电极结构光电池. 在波长 532 nm, 脉宽约 8 ns 的激光脉冲激发下, 得到了光电池的快速响应曲线. 通过对 BR 和测量系统的快速光电动力学分析及对实验曲线的拟合处理, 得到了 BR 光电动力学方程, 并计算出了 BR 光循环过程中各步的电位移参数和衰减时间常数.

1 材料与方 法

菌紫质 LB 膜的制备用的是日本 Kaimenkagaku 公司制造的 HBM-SS 型 LB 膜槽. 先将紫膜加在铺展溶剂中形成铺展溶液. 取一定量的铺展溶液铺在 1×10^{-3} mol/L 的 CdCl_2 亚相表

1996-07-03 收稿, 1997-01-16 收修改稿

* 瞬态光学技术国家重点实验室及中国科学院基础性研究“九五”预研基金资助项目

面上,形成二维膜,静置约 0.5 h. 待溶剂全部挥发后,将其压缩至所需要的表面压($\pi = 20 \sim 40$ mN/m). 用垂直提拉法将 BR 单分子薄膜逐层转移到 ITO 导电玻片上(共 10 层). 将淀积有菌紫质 LB 膜的 ITO 电极与铜电极组成一个湿光电池. 电解质溶液为 1 mol/L 的 KCl, pH 8.5. 两平行板电极间距 1 cm, 面积为 25×10 mm².

激发光源为 Spectra-Physics 公司的 Quanta-Ray DCR-3 型调 Q 倍频 Nd:YAG 激光器. 波长 532 nm, 单脉冲宽度约 8 ns, 能量约几 mJ, 重复频率 10 Hz. 信号检测用的是 Hewlett Packard 公司生产的 HP54505B 数字示波器. 其频带宽度 300 MHz, 最大采样速率 500 MSa/s, 具有 8bit A/D 转换精度. 通过 IEEE-488 接口卡, 我们实现了示波器与 PC486 微机的通讯, 利用我们编制的软件可对示波器实时控制, 将采集到的数据存入计算机, 进行曲线拟合, 绘图等工作.

2 结果与讨论

2.1 菌紫质光电作用的动力学理论

从 BR 光循环理论知道, BR 分子吸收光子后, 在数个皮秒内发生全反到 13 顺的生色团异构化, 形成光谱红移产物 K. 该异构体存储了光子能量, 并以此能量推动光循环的后续过程, 在这些热弛豫过程中, 伴随着蛋白质分子内质子移位, 依次又出现了其他光谱可分辨中间体, 如 L, M, N, O, 最后回到初态. BR 的光电作用与上述原初光异构化及质子移位密切相关.

BR 光电池在电路上可等效为一个光控的位移电流源, 如图 1 所示. R_s , C_s 分别为器件的内阻和电容.

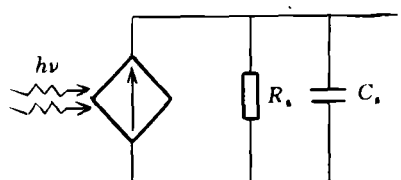


图 1 BR 光电池等效电路图

设电量为 Q , 速度为 v 的一个质子在距离为 D 的两电极间运动, 则它在外电路中产生的位移电流为

$$i = \frac{Q}{D}v. \quad (1)$$

由于 v 是质子从一个结合位到另一个结合位的跃迁, 它非常大. 因此对(1)式积分, 可求出它在电极上的诱导电荷为

$$Q_{\text{ind}} = \int i dt = \frac{Qd_i}{D}, \quad (2)$$

其中 $d_i = \int v dt$, 是质子从第 i 个结合位到第 $i+1$ 个结合位的电荷位移. 该诱导电荷在 RC 测量电路负载电阻上产生的电压为

$$V_i(t) = \frac{Qd_i}{DC}e^{-t/RC}, \quad (3)$$

(3)式是单个质子从 BR 第 i 态到第 $i+1$ 态弛豫中在外电路产生的电压. 闪光引起大量 BR 分子被激发, 有大量质子参与定向移动. 设 BR 光循环有 5 个中间体 K, L, M, N, O, 为了方便, 把它们分别记作 1, 2, 3, 4, 5, 并把激发过程中的

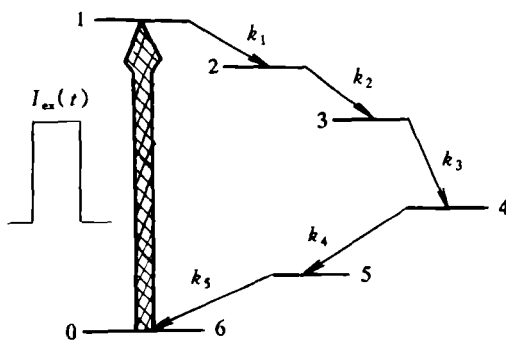


图 2 BR 光循环能级图

BR 基态记作 0, 光循环恢复的 BR 记作 6. 图 2 给出了 BR 光循环能级图. $I_{\text{ex}}(t)$ 是激发光脉冲的光强, 为了简化推导, 我们把光脉冲等效为一个矩形函数, 即

$$I_{\text{ex}}(t) = \begin{cases} I_0, & 0 < t < \tau, \\ 0, & t \geq \tau. \end{cases} \quad (4)$$

式中 τ 是脉冲持续时间. 设 $N_i (i=0 \sim 6)$ 表示各能级的粒子数, 并令

$$\gamma = \eta\sigma/h\nu, \quad (5)$$

其中 $h\nu$ 是激发光子能量, η, σ 分别为 BR 基态的量子跃迁效率和吸收交叉截面. 我们可以得到如下 BR 光循环粒子数速率方程组

$$\begin{cases} \dot{N}_0 = -\gamma I_{\text{ex}}(t)N_0, & \dot{N}_1 = \gamma I_{\text{ex}}(t)N_0 - k_1N_1, \\ \dot{N}_2 = k_1N_1 - k_2N_2, & \dot{N}_3 = k_2N_2 - k_3N_3, \\ \dot{N}_4 = k_3N_3 - k_4N_4, & \dot{N}_5 = k_4N_4 - k_5N_5, \\ \dot{N}_6 = k_5N_5. \end{cases} \quad (6)$$

若令 $k_0 = \gamma I_0$, 则方程组(6)可简写为

$$\dot{N}_0 = \begin{cases} -k_0N_0, & 0 < t < \tau \\ 0, & t \geq \tau. \end{cases} \quad (7)$$

$$\dot{N}_{i+1} = k_iN_i - k_{i+1}N_{i+1} \quad (i = 0 \sim 5; k_6 = 0), \quad (8)$$

由(3)和(7)、(8)式可得, 闪光在测量电路中引起的电压波形为

$$\begin{aligned} V_N(t) &= \sum_{i=0}^5 V_i(t) \otimes \dot{N}_{i+1} = \frac{Q}{DC} e^{-t/RC} \otimes \sum_{i=0}^5 d_i (k_i N_i - k_{i+1} N_{i+1}) = \\ &= \frac{Q}{DC} \left[d_0 k_0 e^{-t/RC} \otimes N_0(t) + \sum_{i=1}^5 (d_i - d_{i-1}) k_i e^{-t/RC} \otimes N_i(t) \right], \end{aligned} \quad (9)$$

式中 $\otimes$ 表示卷积. $V_N(t)$ 表达式中的第 1 项表示的是光激发过程, 其余项为热弛豫过程.

在光激发期间 ($0 < t < \tau$), 由(7)式可得

$$N_0(t) = N e^{-k_0 t}, \quad (10)$$

N 是 BR 基态的初始粒子数. 所以, 光电压快过程部分为

$$V_N(t)_F = \frac{Q}{DC} d_0 k_0 e^{-t/RC} \otimes N_0(t) = \frac{NQRd_0 k_0}{D(1 - k_0 RC)} (e^{-k_0 t} - e^{-t/RC}). \quad (11)$$

考虑到激发之后, K 态的总粒子数

$$N_i \approx N(1 - e^{-k_0 \tau}), \quad (12)$$

设

$$\theta = 1 - e^{-k_0 \tau}, \quad (13)$$

则(11)式可表示为

$$V_N(t)_F = \frac{N_i QRd_0 k_0}{\theta D(1 - k_0 RC)} (e^{-k_0 t} - e^{-t/RC}), \quad (14)$$

对慢弛豫部分, 由于有近似

$$k_{i+1} \gg k_i (i = 1 \sim 4) \text{ 和 } \frac{1}{RC} \gg k_i (i = 1 \sim 5). \quad (15)$$

所以

$$N_i(t) \approx N_i e^{-k_i t} \quad (i = 1 \sim 5), \quad (16)$$

$$V_N(t)s = \frac{Q}{DC} \sum_{i=1}^5 (d_i - d_{i-1}) k_i e^{-t/RC} \otimes N_i(t) \approx \frac{N_i QR}{D} \sum_{i=1}^5 (d_i - d_{i-1}) k_i e^{-k_i t}, \quad (17)$$

最后, 由(14)和(17)式可得 BR 的光电动力学方程为

$$V_N(t) = \frac{N_i QR}{D} \left[\frac{k_0 d_0}{\theta(1 - k_0 RC)} (e^{k_0 t} - e^{-t/RC}) + \sum_{i=1}^5 (d_i - d_{i-1}) k_i e^{-k_i t} \right], \quad (18)$$

这是一个 7 指数衰减函数, 具有如下形式

$$V_N(t) = a_0 (e^{k_0 t} - e^{-t/RC}) + \sum_{i=1}^5 a_i e^{-k_i t}. \quad (19)$$

2.2 实验结果与数据处理

图3是一组不同时基下采集到的光电响应信号. 每条曲线由500个点组成. 在无光照

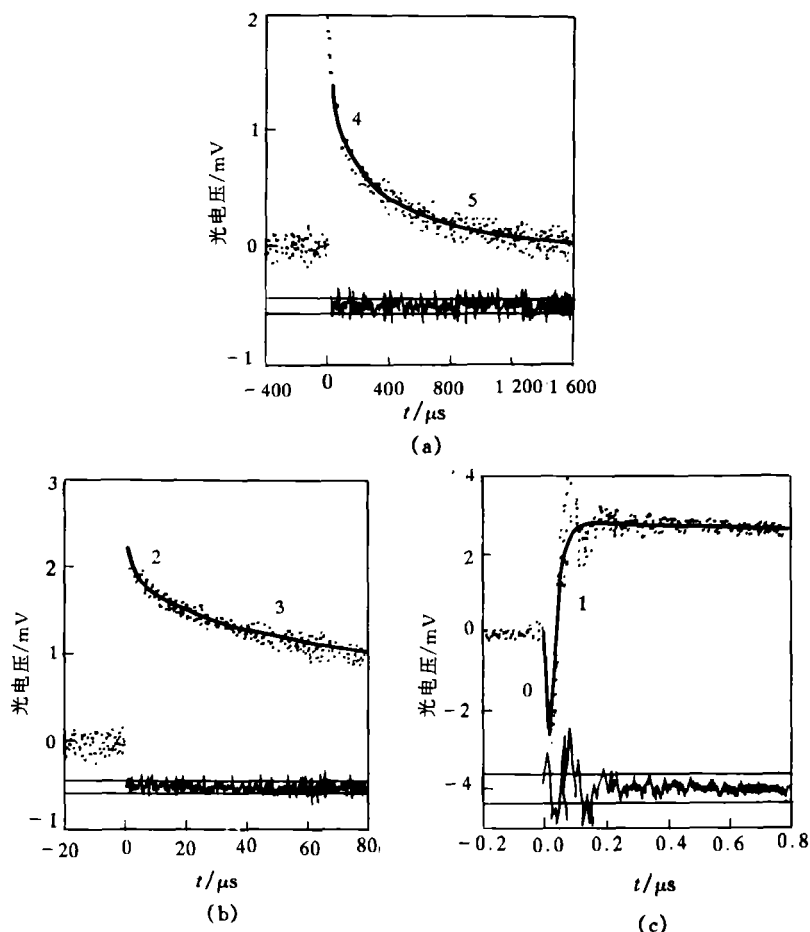


图3 在不同时间标度上的 BR 光电响应信号
点表示实验数据, 粗线为拟合曲线, 下面的细线是拟合残差,
曲线旁的数字代表指数衰减成分

时, BR 光电池有 1 个约 -145 mV 的暗电势, 该暗电势是由光电池内的电化学反应产生的. 为消除它对光电信号的影响, 示波器采取交流耦合. 由于 BR 膜只有 10 层, 光电信号较弱, 为此示波器以重复采集方式工作, 平均 128 次, 这样可以有效地平滑噪声与干扰, 提高信噪比.

用 Marquardt 非线性最小二乘法对上面 3 条曲线分别进行两指数拟合. 首先对慢时基图 3(a) 曲线双指数拟合, 确定出成分 4 和 5 的衰减速率常数 k_4, k_5 和幅值 a_4, a_5 . 对图 3(b) 曲线的拟合要考虑成分 4 和 5 的影响, 拟合公式中要加入成分 4 和 5 的衰减项. 同理, 在图 3(c) 曲线拟合公式中也要加入前面确定的成分 2 和 3 的衰减项, 而成分 4 和 5 的贡献可用其幅值代替. 另外, 为保证 $t=0$ 时刻光电压为零, 在拟合图 3(c) 曲线时必须附加约束条件, 即拟合公式中各项幅值之和等于零. 用上述方法我们最后确定出相应于理论式(18)的实验式为

$$V_N(t) = 124.3e^{-70.4t} - 126.7e^{-64.9t} + 0.30e^{-1.41t} + 0.36e^{-0.154t} + 0.80e^{-0.0161t} + 0.94e^{-0.00195t}, \quad (20)$$

式中所有速率常数的单位为 μs^{-1} ; 所有指数项幅值的单位为 mV .

为了验证(20)式的正确性, 我们把由该式计算出的曲线与其它时基下采集到的信号进行比较, 如图 4 所示, 可见公式预言了实验.

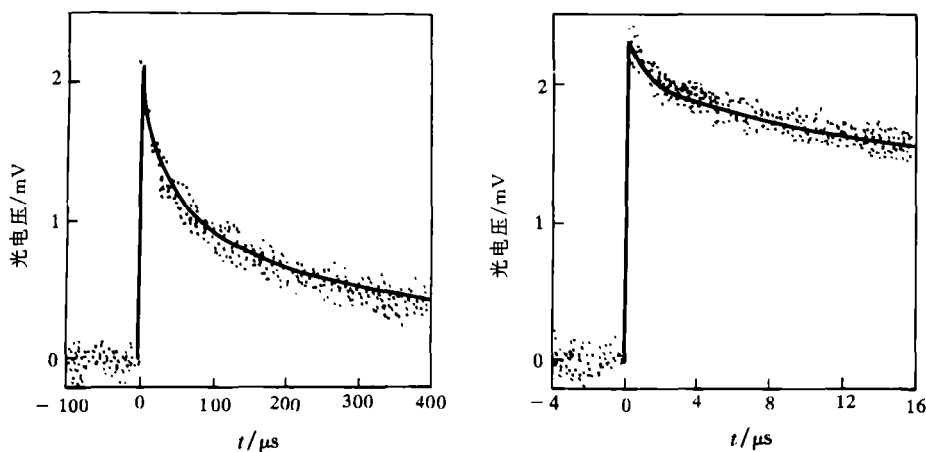


图 4 拟合公式计算曲线与实验信号的比较

图中点为实时测量信号, 线表示由拟合公式(20)式计算曲线

2.3 讨论

比较理论公式(18)与实验拟合(20)式, 我们可以估算出光循环各步的电位移参数. 为此我们先估算参与光循环的 BR 分子数. 已知每层 BR LB 膜是由一片片直径约 $1 \mu\text{m}$, 包含约 10^5 BR 分子的紫膜碎片组成^[4]. 在我们实验中, 有效光照区域直径约 2 mm , 由此可算出 10 层 BR 膜在光照区域内所含的 BR 分子数为 $N \approx 4 \times 10^{12}$. 由式(12)和(13), 设 $\tau = 8 \text{ ns}$, $k_0 = 70.4 \mu\text{s}^{-1}$, 可计算出 $\theta \approx 0.43$, $N_1 \approx 1.72 \times 10^{12}$. 表 1 列出了所有计算中要用到的实验数据. 表 2 是计算结果.

从表 2 可以看出, BR 内电荷运动分 6 步. 第 1 步 $\text{BR} \rightarrow \text{K}$, 发生在视黄醛吸收光子引起的全反到 13 顺异构化. 该过程利用光能打开希夫碱基与其平衡离子的化学键, 造成分子内电子云密度重分布, 其偶极矩方向与质子泵方向相反. 原初电荷分离只发生在色素分子内, 蛋白质

表 1 计算中要用的实验数据

RC/ns	$k_0/\mu\text{s}^{-1}$	$k_1/\mu\text{s}^{-1}$	$k_2/\mu\text{s}^{-1}$	$k_3/\mu\text{s}^{-1}$	$k_4/\mu\text{s}^{-1}$	$k_5/\mu\text{s}^{-1}$	a_0/mV	a_1/mV
15.4	70.4	64.9	1.41	0.154	0.016 1	0.001 95	124.3	-2.4
a_2/mV	a_3/mV	a_4/mV	a_5/mV	N_i	θ	$R/\text{k}\Omega$	D/cm	Q/C
0.30	0.36	0.80	0.94	1.72×10^{12}	0.43	10	1	1.6×10^{-19}

表 2 计算结果

跃 迁	电位移/nm	衰减时间常数/us
1. BR→K	-0.23	5ps ^[4]
2. K→L	-0.36	0.015 4
3. L→M	0.41	0.71
4. M→N	8.9	6.5
5. N→O	189	62
6. O→BR	1940	514

构象还来不及变化,已证明该过程在 5ps 内完成^[4]. 接着发生的暗反应是蛋白质的构象变化,蛋白链上可能有几个质子参与了移位运动,每步电荷位移在逐步增大,这可能是造成 BR 光驱动质子泵功能的原因. 实验和理论都说明了 BR 光循环是一个 6 步过程, BR→K→L→M→N→O→BR, 这与光谱分析方法得到的模型一致.

致谢 陕西师范大学物理系的李祥生、李永放、李孟副教授在激光器方面给予了大力支持,在此表示衷心感谢.

参 考 文 献

- 1 Thoma R, Hamp N. Real-time holographic correlation of two video signal by using bacteriorhodopsin films. *Opt Lett*, 1992, 17(16):1 158~1 160
- 2 Haronian D, Lewis A. Elements of a unique bacteriorhodopsin neural network architecture. *Appl Opt*, 1991, 30(5):597~608
- 3 Miyasaka T, Koyama K, Itoh I. Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor. *Science*, 1992, 255(1):342~344
- 4 Simmeth R, Rayfield G W. Evidence that the photoelectric response of bacteriorhodopsin occurs in less than 5 picoseconds. *Biophys J*, 1990, 57(5):1 099~1 101