

细菌视紫红质/ 聚乙烯醇复合膜的制备及相关功能研究

刘 嘉^a 明 明^a 刘 坚^a 黄 力^a 李庆国^b 丁建东^{*, a}

(^a 复旦大学高分子科学系 聚合物分子工程教育部重点实验室 ^b 生命科学院生理学与生物物理学系 上海 200433)

摘要 细菌视紫红质(bR)是一种独特的光敏蛋白,具有光致变色和光驱质子泵功能.将 bR 蛋白包埋于聚乙烯醇(PVA)基质中,制备了 bR/PVA 复合膜.利用紫外-可见分光光度计和自制的毫秒级动力学光谱仪,检测了样品的吸收光谱和光循环 M 中间体在脉冲光激发下随时间的变化;同时,利用凝胶扫描成像仪及相关分析软件考察了样品成膜后的均匀程度.实验表明:bR/PVA 复合膜具有良好的均匀性、透明性和力学性能,而且 bR 蛋白保持了原有的生物活性和光学性质,bR 与 M 中间体之间能达到一种光可控制的双稳态,M 中间体的寿命也得到了显著的延长,证实了 bR 可以提供一个用于信息存储的模型材料.

关键词 细菌视紫红质,光循环,光驱质子泵,聚合物复合膜,信息材料

Preparation and Study of Bacteriorhodopsin/ Poly(Vinyl Alcohol) Composite Films

LIU, Jia^a MING, Ming^a LIU, Jian^a HUANG, Li^a
LI, Qing-Guo^b DING, Jian-Dong^{*, a}

(^a Department of Macromolecular Science, Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of Education Ministry,

^b School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Bacteriorhodopsin (bR) is a photosensitive protein, which acts as a photochromic material as well as a light-driven proton pump. A bR was embedded in polyvinyl alcohol to prepare for optical films. The absorption spectrum and the decay of M intermediate in the photocycle of bR were measured. The uniformity of the samples was detected. The bR/PVA films exhibit high uniformity, transparency and strength, while bR in films maintains its biologic activities and optic response. In addition, the measurements support a bistable-state model between the native state and M intermediate. In comparison with the case of bR in aqueous suspension, the decay of M intermediate is prolonged obviously for bR in PVA films, which might be beneficial for information storage applications.

Key words bacteriorhodopsin, photocycle, light-driven proton pump, polymeric composite films, information materials

细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin,简称 bR)是存在于嗜盐菌(*Halobacterium salinarum*)中紫膜(purple membrane,简称 PM)上的跨膜蛋白^[1].bR 由 248 个氨基酸组成,分子量约为 26800,属于 G 蛋白偶联的 7

个螺旋跨膜受体蛋白家族.一个 bR 分子中含有一个生色团——视黄醛,通过质子化的 Schiff 碱基与第 216 位的赖氨酸相连^[1~4].

bR 是一种独特的光敏蛋白.当 bR 受到光照,视

* E-mail: jddingl@fudan.edu.cn

Received July 12, 2002; revised August 26, 2002; accepted September 26, 2002.

国家自然科学基金(Nos. 29825109, 20174006)、教育部高等学校优秀青年教师教学和科研奖励基金、国家 863 项目和 973 项目资助.

黄醛分子发生异构化——由 all-*trans* 变为 13-*cis*^[5], 并引发一系列热反应, 经过 J, K, L, M, N, O 等一系列中间态, 在约几十毫秒内又回复到基态, 从而形成一个光循环^[5~17].

伴随着光循环过程, 由于蛋白分子发生了构象变化, 调节了不同基团的 pK_a 值, 在 N 端释放一个质子, 在 C 端接受一个质子, 即相当于将一个质子由细胞质传输到细胞外, 在膜的两边产生质子梯度. 而质子 ATP 酶能利用所形成的电化学梯度合成细胞内的能量“货币”——ATP. 这就是所谓的光驱质子泵功能^[12,13].

为了将来能够实现器件化和产品化, 应当设法将 bR 制成薄膜样品. 但由于蛋白质自身的成膜性较差, 所以解决该难题的方法之一是将 bR 包埋于某种合适的聚合物基质当中. 其中, 聚乙烯醇 (PVA) 是一种合适的基质^[14~17]. 这是基于以下几方面的因素得出的: 第一, PVA 膜具有显著的均一性、透明性和力学强度; 第二, PVA 是水溶性聚合物, 可避免使用某些可能使蛋白质变性的有机溶剂; 第三, PVA 材料具有较好的生物相容性, 能使蛋白质保持其生物活性; 第四, PVA 薄膜的制备技术相对成熟, 工艺简单可行.

1 实验方法

1.1 材料及试剂

bR 蛋白是按照经典方法从嗜盐菌株 R1M1 中提取分离出的; 聚乙烯醇平均分子量为 80000, 醇解度为 98%, 颗粒状 (江苏启东精细化工二厂制); 生物缓冲剂 HEPES [N-(2-羟乙基) 哌嗪-N-2 乙烷磺酸, 缓冲范围 pH 6.8~8.2, 中国医药集团上海化学试剂公司].

1.2 bR/PVA 复合膜的制备

称取 3 g PVA 颗粒, 加入 40 mL 蒸馏水, 再加入 0.48 g HEPES, 在强力搅拌下油浴加热, 使之呈微沸状态, 大约 35 min 后 PVA 全部溶解, 得到澄清透明、粘性较大的溶液, 且冷却后溶液稳定, 不发生溶胀. 此时得到的溶液中 PVA 的质量百分含量为 7%, HEPES 浓度为 50 mmol/L. 经检测介质 pH 为中性.

将厚 1 mm 的普通载玻片切割成大小为 60 mm × 16 mm 的小块, 用乙醇洗净, 干燥备用. 量取 250 μ L 浓度为 0.224 mmol/L 的 bR 水溶液和 1 mL, 质量分数为 7% 的 PVA 水溶液, 二者混合后用细玻璃棒沿容器壁轻微搅拌, 避免产生大量气泡, 然后置于 SCQ25-6 型超声仪中超声 6 min 以脱除气泡. 静置片

刻后铺展于载玻片上, 室温下干燥 24 h. 得到的 bR/PVA 膜透明、均匀、易于剥离, 且具有良好的力学强度. 其厚度经千分尺估测通常为 20~60 μ m.

1.3 仪器及测试方法

样品的 UV-vis 吸收光谱由 UV-260 型紫外-可见分光光度计测定.

M 产物随时间的衰减过程由自制的毫秒级动力学光谱仪跟踪记录. 在文献[18]的基础上稍作改进, 其基本构造如图 1 所示, 用脉冲光使被研究的样品产生光化学反应, 并进行实时记录. M 中间体的形成时间小于 0.1 ms, 而衰减时间一般是几十毫秒. 在本装置中采用了照相闪光灯, 其脉冲半宽稍小于 1 ms, 因此本仪器的时间分辨本领在毫秒级, 只能记录 M 中间体衰减的全过程. 分析光与作用光不能有较大的重叠. 从原理上讲, 激发光的波长应选择在 bR 的特征吸收峰 568 nm 左右, 而测量光的波长应在 M 中间体的吸收峰 412 nm 左右. 实验中, 激发光路中选择了透射波长大于 530 nm 的截断滤色片 CB535, 测量光路中选择了波长 400 nm 的滤色片 ZB1. 由于闪光灯光强在每次闪光时可能有所波动, 因此用该方法作半定量以上的分析时应多次闪光取平均. 对于薄片或膜状样品, 应与检测光成 45° 夹角放入动力学光谱仪的样品槽中, 以便能同时受到相互垂直的脉冲激发光和持续测量光的照射.

测量光透过样品后进入单色仪, 经光电倍增管接收并放大信号后送至波形存贮器中. 波形存贮器是本装置的关键设备. 在触发下对输入信号进行采样. 每 2 个采样点的间隔时间可在 2 μ s 至 100 ms 间设定, 每一次触发, 它就按设定的速率采集 1024 个数据. 这些数据存贮后, 显现于示波器上, 并可送至计算机中. 定时器控制触发时间, 使波形存贮器能够先记录下未发生光化学反应前的信号以作比较 (在计算机上通过一个自行设计的软件, 读取波形存贮器中的采样数据, 并以后缀名 wsv 将数据以 ASCII 码存盘, 可用数据处理软件如 Origin 直接导入).

复合膜的均匀程度由凝胶扫描成像仪和凝胶分析软件 Gel Works™ 1D Software 观察.

2 结果与讨论

2.1 bR/PVA 复合膜的紫外-可见吸收光谱

为了探测蛋白质在聚合物基质中是否仍保持其生物活性以及在聚合物膜中 bR 的某些光学性质是否发生改变, 本实验首先测量了 bR/PVA 复合膜的

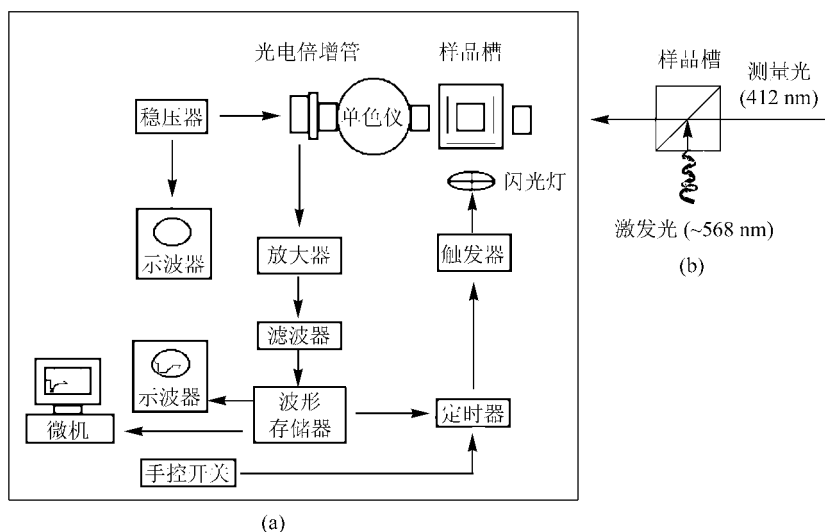


图 1 自制动力学光谱仪示意图
(a) 装置图; (b) 激发光和测量光示意图

Figure 1 Schematic presentation of self-made kinetic spectrophotometer
(a) Spectrophotometer; (b) specific presentation of sample slot

紫外 - 可见吸收光谱,并与 bR 在中性水介质中的光谱作了比较.

图 2 中的谱线分别为 bR 蛋白在水溶液、干膜 (即 bR 水溶液在玻璃片上经干燥后形成的薄膜) 和 PVA 复合膜中的紫外 - 可见吸收光谱,三者在可见光区的最大吸收都在 568 nm 左右,在紫外区也会产生由芳香族氨基酸引起的吸收峰 (280 nm). 由此图可以看出,用上述方法制得的 bR/PVA 复合膜依然保留了 bR 蛋白的特征吸收峰.

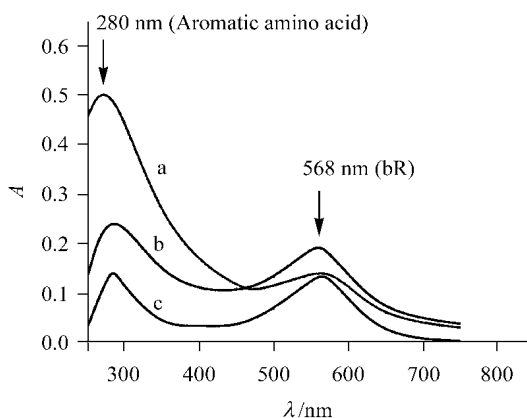


图 2 不同介质中 bR 紫外 - 可见吸收光谱比较
a—bR 水溶液; b—bR 干膜; c—bR/PVA 复合膜

Figure 2 The UV-vis absorption spectrum of bR in different media
a—bR Aqueous suspension; b—bR dried film; c—bR/PVA film

2.2 bR/PVA 复合膜的光化学性质

本实验还进一步比较了 bR 在水溶液中和在复

合膜中的光化学性质. 图 3 中的曲线分别为 bR 蛋白在水溶液、PVA 复合膜和干膜中的光循环产物 M_{412} 的衰减曲线. 在 bR/PVA 复合膜和 bR 干膜中, M 中间体的寿命得到了显著的延长,这对于将来利用 bR $\rightarrow M$ 双稳态模型制作信息存储材料是十分必要的.

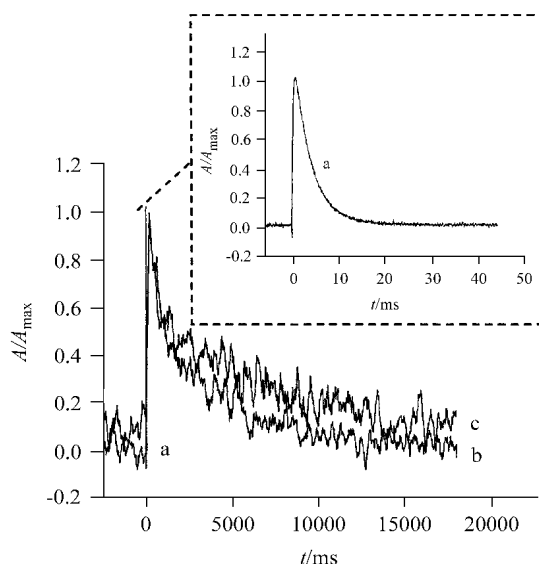


图 3 不同介质中 M 中间体衰减过程的比较

a—bR 水溶液 ($t_{1/2} = 4$ ms); b—bR/PVA 复合膜 ($t_{1/2} = 1130$ ms) 和 c—bR 干膜 ($t_{1/2} = 1550$ ms). 插图: bR 水溶液中 M 中间体随时间的衰减过程

Figure 3 Decay process of M intermediate of bR in different media
a—bR Aqueous suspension ($t_{1/2} = 4$ ms); b—bR/PVA film ($t_{1/2} = 1130$ ms); c—bR dried film ($t_{1/2} = 1550$ ms). Inset: decay process of (a) in millisecond time scale

同时,上图也表明,在水溶液、PVA 复合膜和干膜中, bR 蛋白均保持了它特有的生物活性和光学特性,证实了这种蛋白质良好的离体稳定性^[19].

2.3 双脉冲激发下 bR \leftrightarrow M 的可逆转变

在 bR 的光循环过程中,存在一个蓝光效应,即在通过橙色脉冲光将 bR 激发到中间体 M 后,再用蓝紫色脉冲光照射又能回到 bR 初态,这样, bR 与 M 中间体之间就能达到一种光可控制的双稳态. 理论上,通过两种稳定分立状态之间的相互转变即可实现信息的存储与擦除,从而为构建蛋白质存储器提供了一个良好的模型^[20,21].

为了探究 bR 在 PVA 复合膜中是否仍然存在蓝光效应,我们设计了如下实验:在由图 1 所描述的试验装置中略加改进,采用两个闪光灯提供双脉冲触发光源. 第一个闪光灯透过橙色截止滤色片 CB535 ($> 530\text{ nm}$) 照射到样品上,激发 bR 产生光循环;在光循环结束之前,用另一个闪光灯透过蓝紫色滤色片 ZB1 ($350 \sim 450\text{ nm}$) 再次照射样品. 检测光波长同样是 412 nm ,可以记录下 M 中间体在受蓝紫光辐照后的变化,如图 4 所示. 实验结果表明,第二束脉冲光确实将 M 产物泵回了 bR 基态,可见在 PVA 复合膜中, bR 依然保持了其独特的蓝光效应.

2.4 bR/PVA 复合膜的均匀性

利用 PVA 作为基质制作薄膜的一个很大的优势就是其均匀性. 我们通过凝胶扫描成像仪以及相关的凝胶分析软件可以方便地观察到复合膜的均匀程度,见图 5 所示.

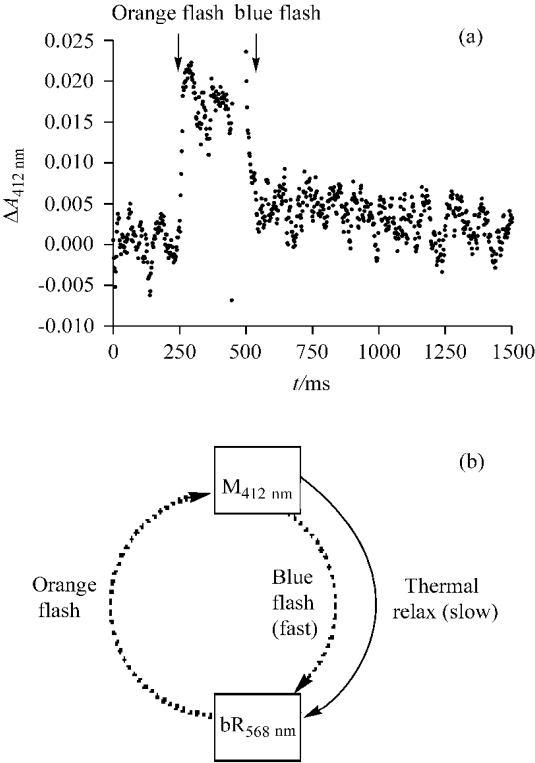


图 4 (a) bR/PVA 复合膜的双脉冲激发实验结果与 (b) bR \leftrightarrow M 双稳态示意图

Figure 4 (a) Two-pulsed-light experiment in bR/PVA film and (b) simplified model of bR \leftrightarrow M bistable state

我们将 bR/PVA 复合膜在暗室内紫外光照下的 CCD 成像照片人为地划分为三个区域,在每个区域分别按纵向连续取点,而后对每个点的灰度进

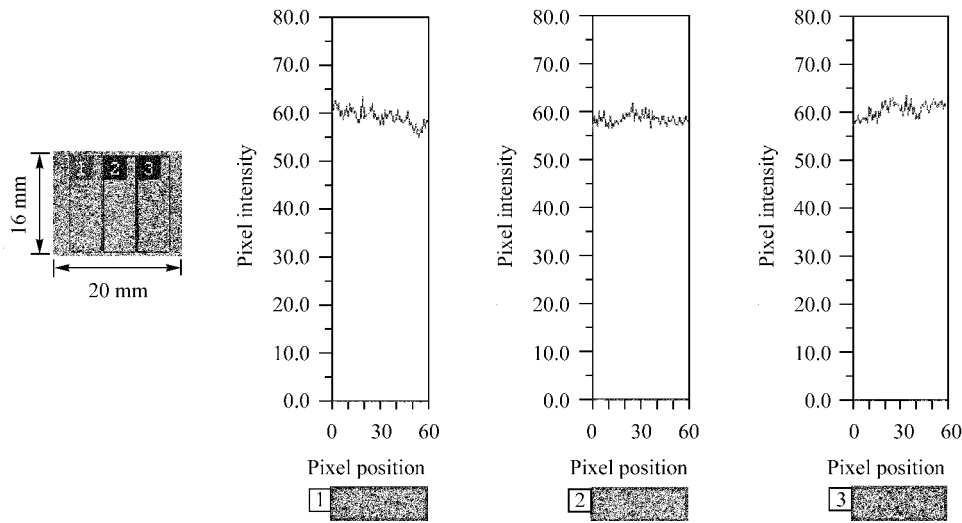


图 5 bR/PVA 复合膜均匀性的测试结果

Figure 5 Image of bR/PVA film and detection of its uniformity

行分析,并绘制成图线(纵坐标为各点的灰度值,范围从 0~255;横坐标为各点的相对位置).从图 5 中可以看出,三个区域中各点的灰度值基本保持在一条直线上,也就是说 bR 在复合膜中各处的分布大致上是均一的,从而体现了 bR/PVA 复合膜的良好均匀性.

3 结论

各项检测结果表明,利用文中所述方法制备的 bR/PVA 复合膜,能很好地保持 bR 蛋白原有的生物活性和独特的光学性能,所用的材料、试剂及整个制备过程均不会导致蛋白质失活.而且,在聚合物基质中,bR 的光循环产物 M 中间体的寿命得到了显著的延长,bR \leftrightarrow M 的双稳态模型也有十分明显的体现,这对于未来在光信息存储方面的应用是有利的.同时,bR/PVA 复合膜在均匀性、透明性和力学强度等方面也具有明显的优势.相信利用 PVA 制备 bR 薄膜样品的方法,将会为与 bR 相关的基础研究以及产品开发提供一条有效的途径.

References

- Oesterhelt, D.; Stoeckenius, W. *Nature New Biol.* **1971**, 233, 149.
- Henderson, R.; Unwin P. N. *Nature* **1975**, 257, 28.
- Henderson, R.; Baldwin, J. M.; Ceska, T. A.; Zemlin, F.; Beckmann, E.; Downing, K. H. *J. Mol. Biol.* **1990**, 213, 899.
- Luecke, H.; Schobert, B.; Richter, H. T.; Cartailler, J. P.; Lanyi, J. K. *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, 899.
- Kobayashi, T.; Saito, T.; Ohtani, H. *Nature* **2001**, 414, 531.
- V á ó, G.; Lanyi, J. *Biochemistry* **1990**, 29, 6858.
- Steinhoff, H. J.; Mollaaghababa, R.; Altenbach, C.; Hideg, K.; Krebs, M.; Khorana, H. G.; Hubbell, W. L. *Science* **1994**, 266, 105.
- Lanyi, J. K.; V á ó, G. *Israel J. Chem.* **1995**, 35, 365.
- Gong, Q.-G.; Zhao, Y.-Y.; Huang, Y.-H.; Cheng, L.-B.; Li, F.-M.; Liu, J.; Ding, J.-D.; Li, Q.-G. *Acta Biophys. Sinica* **1999**, 15, 137 (in Chinese).
(龚勤敢, 赵有源, 黄玉华, 陈凌冰, 李富铭, 刘坚, 丁建东, 李庆国, 生物物理学报, **1999**, 15, 137.)
- Huang, Y.-H.; Gong, Q.-G.; Zhao, Y.-Y.; Cheng, L.-B.; Li, F.-M.; Liu, J.; Ding, J.-D.; Li, Q.-G. *Acta Opt. Sinica* **1999**, 19, 1469 (in Chinese).
(黄玉华, 龚勤敢, 赵有源, 陈凌冰, 李富铭, 刘坚, 丁建东, 李庆国, 光学学报, **1999**, 19, 1469.)
- Huang, Y.-H.; Zhao, Y.-Y.; Zhang, Z.-B.; Ouyang, X.-P.; Gong, Q.-G.; Yang, Q.; Cheng, L.-B.; Li, F.-M.; Liu, J.; Ding, J.-D.; Li, Q.-G. *Chin. Phys. Lett.* **2000**, 17, 301.
- Kuhlbrandt, W. *Nature* **2000**, 406, 569.
- Subramaniam, S.; Henderson, R. *Nature* **2000**, 406, 653.
- Chen, Z.; Lewis, A.; Takei, H.; Nebenzahl, I. *Appl. Opt.* **1991**, 30, 5188.
- Song, Q.-W.; Zhang, C.-P.; Gross, R.; Birge, R. *Opt. Lett.* **1993**, 18, 775.
- Wang, F.; Liu, L.-R.; Li, Q.-G. *Opt. Lett.* **1996**, 21, 1697.
- Liang, B.; Li, B.-F.; Zhang, J.-P.; Jiang, L. *New J. Chem.* **2002**, 26, 1049.
- Wang, N.; Li, Q.-G. *Acta Biophys. Sinica* **1986**, 2, 32 (in Chinese).
(王能, 李庆国, 生物物理学报, **1986**, 2, 32.)
- Oesterhelt, D.; Brauchle, C.; Hampp, N. *Quart. Rev. Biophys.* **1991**, 24, 425.
- Birge, R. R. *Computer* **1992**, 25, 56.
- Birge, R. R. *American Scientist* **1994**, 82, 348.

(A0207128 SHEN, H.; FAN, Y. Y.)