

Structure and Function of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A and Its Recombinant Toxin.

Du Shiyu (Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, China).

Abstract *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (PE) contains three structure function domains. The amino-terminal domain I is involved in binding to target cell-surface receptors through the active site Lys57. The central domain II is responsible for the translocation of PE across membranes. Arg276 and Arg279 are the active key positions of the domain II. The protease cleaves PE between Arg279 and Gly280 into 28 000 and 37 000

fragments. The carboxyl-terminal domain III is located in 37 000 fragment which is directed by the REDLK sequence at the carboxyl end of domain III to the endoplasmic reticulum and translocated to the cytosol, and then ADP-ribosylates the EF-2 (elongation factor 2) by binding NAD^+ through the key site Glu553 to result in the inhibition of cell protein synthesis and death of target cells. It is a practical prospect that the recombinant immunotoxins are made by fusing DNA fragments encoding recognition proteins to the modified PE genes.

Key words *pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, immunotoxin, recombinant toxin

菌紫质光生物分子器件及其超快过程*

姚保利 徐大纶

(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)

摘要 菌紫质是嗜盐菌紫膜中的一种光能转换蛋白. 它具有光致色变和光驱动质子泵功能, 其原初光异构化过程极其迅速, 可在 430fs 内完成. 由于菌紫质具有一系列独特的光电和光学特性, 如对光强的微分响应, 高的空间分辨率, 高的光灵敏度, 高循环次数等, 使得它在光电探测, 仿视觉系统, 人工神经网络, 非线性光学及光学信息记录和处理方面有很多重要应用. 利用超短脉冲激光技术, 高时间分辨光谱学技术及高速取样探测技术, 对菌紫质的光循环, 原初光异构化, 激发态动力学, 质子泵机制等方面的研究已取得了许多有意义的结果.

关键词 菌紫质, 生物分子器件, 超快过程

本世纪 60 年代末发现了一种在结构上与动物视网膜上的视色素——视紫红质 (rhodopsin) 非常相似的光敏蛋白——细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, bR) 或称菌紫质. 它存在于嗜盐菌 (*Halobacterium halobium*) 紫膜 (purple membrane) 中. 由于 bR 具有光驱动质子泵功能, 能直接利用光能实现质子跨膜运输, 形成重要的质子电化学梯度, 其原初光异构化过程极其迅速, 可在 430fs 内完成. 它

又具有高空间分辨率 ($>5000\text{lines/mm}$) 和光灵敏度 (10^{-3}J/cm^2) 及高循环次数 ($>10^5$ 次), 再加上它性能比较稳定, 利用先进的基因工程与生化手段, 可获得性能优良的 bR 变种. 因而近年来对菌紫质光生物分子器件及其超快过程的研究, 取得了许多重要的成果, 本文就是这方面国内外研究的一个综述和分析.

*瞬态光学技术国家重点实验室基金资助项目.

收稿日期: 1994-04-06, 修回日期: 1994-07-04

1 菌紫质的结构与性能

菌紫质 (bR) 分子是嗜盐菌紫膜中的唯一蛋白质分子, 其分子量为 26 000. 紫膜是嗜盐菌细胞膜上的一部分. 在天然状态下, 紫膜碎片为椭圆形, 直径大约 $0.5\mu\text{m}$, 碎片的厚度约为 $50\text{\AA}$. 菌紫质在紫膜中以三个分子为单位组成三聚体, 并以二维六角形晶体结构排列. bR 多肽链含 248 个氨基酸, 在空间上形成 7 个跨膜的 α 螺旋结构, 并按环形方式排列, 且大体上垂直于膜面. 生色团视黄醛分子通过质子化希夫碱基连接到蛋白链第 216 号赖氨酸上. 视黄醛分子离膜外表面的平均距离为 $11\pm 3\text{\AA}$, 其长轴相对于膜表面的平均倾斜角约 21° ^[1].

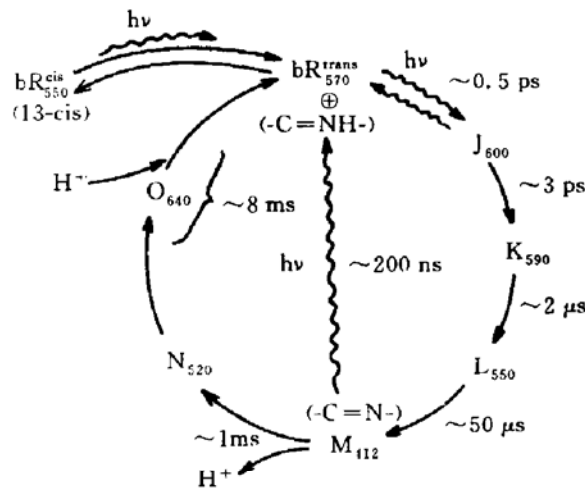


图 1 bR 分子的光循环模型

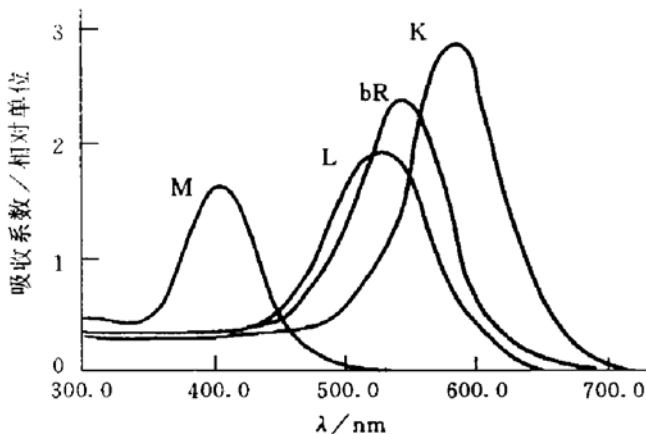


图 2 bR 分子光循环过程中几个中间体的吸收光谱

当 bR 分子受光照并吸收光子后, 经历一系列中间体 J、K、L、M、N、O 回到原始态而完成一个光循环, 图 1 是 bR 光循环的一个模型, 图 2 是 bR 和几个中间体的吸收光谱. 在自然条件下, 大多数跃迁是热弛豫过程, 通过改变温度、相对湿度与 pH 值等环境条件, 可以明显地改变某些光产物的寿命. 例如中间体 K 在温度 90K 下是稳定的, 而中间体 M 则在 208K 下稳定. 这说明在特定温度下, bR 分子存在着两种稳态, 利用这种双稳态特性, 可以制作生物分子数值器件. 这些中间体的另一个重要特性是, 在其对应的吸收峰值波长光的激发下可以通过光化学反应直接返回 bR 基态, 这一性质使得 bR 非常适合作为可擦写的光学存储材料.

2 菌紫质光驱动质子泵机理

光驱动质子泵是 bR 特有的功能, 它与 bR 的光循环过程密切相关. 对 bR 光驱动质子泵外部特性的研究比较容易, 已取得了很多结果, 如温度、离子、膜电位对质子泵活性的影响等. 有关 bR 质子泵的分子机制则一直是个有争议的问题, 虽然提出了不少设想, 但都未能用实验直接验证. 在 1990 年于意大利召开的“化学中的激光”会议上, 美国加利福尼亚大学的 R. A. Mathies^[2]报道了他用共振拉曼光谱和飞秒动力学吸收光谱方法研究 bR 原初光化学过程和光循环过程中生色团结构的结果, 根据实验结果, 他建立了一个 bR 质子泵模型. 同一所大学的 J. K. Lanyi^[3]提出 bR 光循环过程为 $bR \rightarrow K \rightleftharpoons L \rightleftharpoons M_1 \rightarrow M_2 \rightleftharpoons N \rightleftharpoons O \rightarrow bR$, 其中质子驱动力与 $M_1 \rightarrow M_2$ 这一步密切相关. 质子化希夫碱基在 $L \rightarrow M_1$ 过程中去质子化, 在 $M_1 \rightarrow M_2$ 过程中从膜外侧到膜内侧重新定向, 在 $M_2 \rightarrow N$ 过程中再质子化. 波士顿大学的 K. J. Rothschild^[4]则建议用富里叶变换红外 (FTIR) 差分光谱的方法 (包括时间分辨 FTIR, 偏振 FTIR) 来研究 bR 光循环中结构的变化、活性氨基酸结构标记的识别及蛋白质二级结构变化的探测, 通过这些信息获得 bR 质子泵机制的

细致图象。一般认为 M 中间体的形成与质子泵密切相关, 但 K. Tsuji 和 B. Hess^[5]用电场诱导紫膜 pH 变化的方法对原紫色 bR, 去阳离子蓝色 bR 和加入 Mg 离子重新变紫的 bR 三种样品进行电光实验, 他们提出 M 中间体的出现与质子泵没有必然的关系。因此关于 bR 光驱动质子泵的分子机制至今仍没有统一的说法, 有待于用更先进、更精确的方法来研究。目前中国科学院生物物理研究所在 bR 光驱动质子泵外部特性方面已作了些研究^[6], 但对质子泵内部机制的研究国内还未见报道。

3 菌紫质超快过程及其测量方法

目前研究 bR 光反应循环的主要方法是时间分辨光谱学方法和电响应信号检测法。无论采用哪种方法, 样品的超快激发和响应的快速检测都是关键的技术。超短激光脉冲产生与诊断技术和弱信号检测技术的发展为研究 bR 超快光化学反应动力学和激发态动力学提供了有力的工具。这方面的研究相当活跃, 使用的方法和技术手段也日益先进、多样化。在 1991 年于德国召开的超快过程光谱学国际会议上, 日本的 M. Taiji^[7]报道了他们对 14 氟 bR 的飞秒吸收光谱实验, 其目的是研究 bR 原初光异构化过程动力学与电子能级结构的关系。对暗适应状态和光适应状态的实验结果表明, 反-顺异构化的驱动力是蛋白质与生色团之间的相互作用。同一个会议上美国的 G. H. Atkinson^[8]报道了他们用皮秒时间分辨共振相干反斯托克斯拉曼光谱 (CARS) 对 bR 原初光化学反应过程中视黄醛异构化的研究。他们还研究了 bR 原初光产物 K 的皮秒时间分辨荧光光谱, 及用皮秒时间分辨共振拉曼散射对 bR 视黄醛生色团振动激发态的研究。N. V. Tkachenko 等人^[9]则把 bR 的折射率作为检测光学参量, 用泵浦-探测技术进行了 bR 光循环的时间分辨折射率变化测量, 发现了一个新的光中间产物。在 bR 光化学循环量子效率研究方面, 一般认为其值在 0.25 到 0.79, R. Govindjee 等人^[10]研究 bR 光转换的量子效率为 0.64, M

形成的量子产额为 0.65, bR 循环的最大量为 47%。A. Xie^[11]在 110K 低温下测量了 11 个不同激发光的吸收光谱, 得出 bR→K 和 K→bR 光转换量子效率之比为 0.55。V. Bazhenov 等^[12]用纳秒激光中断 bR 光循环过程, 使 K 直接返回 bR 基态, 测出 K→bR 的量子效率约等于 1。

除了光谱学方法外, 研究 bR 光循环的另一种方法是电响应信号检测法。因为 bR 原初光异构化过程中伴随着质子化希夫碱基与带负电荷平衡离子间的快速电荷分离产生的电荷位移及随后希夫碱基的去质子化和再质子化过程中的质子运动, 这些电荷运动可以作为电信号检测出来。这种方法要求 bR 样品必须定向排列。以前国外对电场定向紫膜悬浮液的光诱导电响应特性进行了测量, 获得了毫秒至微秒时域的响应特性; 也对电泳法定向的干膜进行了纳秒和皮秒的电信号测量。不久前, R. Simmeth 和 G. W. Rayfield^[13]用 3ps 的超短激光脉冲激发定向的 bR 膜, 用高速数字取样示波器测量光电压的上升时间, 得出 bR 原初光诱导电荷分离发生在 5ps 的结论。A. R. McIntosh 等人^[14]使用时间分辨介电损耗 (TRDL) 的方法研究 bR 的光诱导电荷分离, 他们采用的是多层紫膜对微波能吸收探测的办法, 其优点是对定向或不定向紫膜的电荷分离非常敏感。I. Groma 等^[15]则想出了一种办法把 bR 的光诱导电荷分离进行了视觉可见化。他们对干燥定向的紫膜样品进行连续光照, 在膜内诱导出稳态的电荷分离, 然后对膜表面产生的静电场用复印机中的有机着色剂进行显示, 在弱光与强光下看到了不同的图样。

4 菌紫质的应用

以下简述 bR 在光电探测、神经网络、仿视觉系统、非线性光学、光学信息存贮与处理方面的应用。

在光电元器件研制方面, 由于 bR 原初光异构的过程在 430fs 内完成, 从而有可能将它作成极为快速的光电探测器。H. -W. Trissl

等人^[16]将定向的 bR 样品直接与 6G 数字示波器的取样头耦联, 在 30ps 光脉冲作用下, 测得了 20ps 的上升时间, 并用实验证明了这种器件具有光驱动顺反开关的功能. F. T. Hong 等人^[17]用位置直接诱导突变(site-directed mutagenesis)的基因方法修饰 bR 的特性, 试制出了具有独特光电特性的生物分子电子器件.

微分响应是 bR 特有的性质, 其特点是一旦被光照, 即产生一个正的瞬时脉冲电流, 然后迅速降至一稳定值, 而停止光照时, 则产生一个负的脉冲电流. 这是对照射光照度变化作出的反应, 而不是对光强本身的反应. 这一特征对视觉仿生非常有用, 因为一些动物(如青蛙)正是利用这种微分响应来跟踪移动的目标. 最近, 日本富士感光胶片公司的宫坂力和小山行一^[18]利用 Langmuir-Blodgett 技术把 bR 定向制作到 SnO_2 导电涂层上, 作成了 $\text{SnO}_2/\text{bR}/$ 电解质/金电极夹层结构的光电池, 并把这种光电池组成的 256 个素网用于图象传感器, 建成了一套视觉感觉和处理系统, 模拟了视网膜的基本功能, 如运动探测、边缘增强. 中国科学院感光化学研究所的王建平等人^[19]也成功地利用 Langmuir-Blodgett 技术制成了一个 ITO/bR/电解质/Pt 电极光电池, 测量了其微分响应特性, 并用它作了一个光感报警器.

根据神经生物学原理提出的并行计算是目前人们很感兴趣的一个领域, 它涉及到大脑的工作机制及神经网络的模拟. 作为神经网络的基本元件都应具有产生兴奋和抑制响应的功能. 用半导体材料模拟这种兴奋和抑制特性需要大量集成在大面积芯片上的差分放大器, 而 bR 分子固有的光电响应特性从材料水平上就能实现对兴奋与抑制特性的模拟, 因此 bR 很适合作为神经网络材料. C. Mobarry 等人^[20]利用这一性质作出了以光敏二极管结构为基础的定向 bR 膜网络, 实现了 Hopfield 模型, 这种网络与电子系统所不同的是初始化由光完成并能进行光编程. H. Takei 等^[21]则利用干燥 bR 薄膜实现了对视网膜中感受野的模拟.

bR 的非线性光学特性, 近年来也引起了

人们的兴趣, 在二次谐波的产生、光学双稳态方面已有了应用. 采用双光子光谱技术对 bR 二阶电极化率的研究表明 bR 大的二阶非线性主要是由于偶极矩的大跃迁引起的. E. Ya. Korchemskaya 等人^[22]分析了 bR 膜与悬浮液的光学特性, 对 bR 的光诱导各向异性机制进行了讨论, 对 bR 用于非线性滤波、偏振控制的实验结果给予了描述. 另外, O. Werner 等人^[23]还发现在近红外区 bR 膜由于激光束引起的空间自相位调制效应, 出现了强烈的光束自散焦效应. G. R. Kumar^[24]则观察到了 bR 膜的激光诱导瞬时光栅现象.

由于 bR 具有高空间分辨率 ($>5000\text{lines/mm}$)、高光灵敏度 (10^{-3}J/cm^2)、高循环次数 ($>10^5$ 次) 及独特的光致色变特性, 使得它在光学信息存贮与处理方面得到很多应用. 如 bR 用于全息存贮、实时干涉计量、空间光调制器与光学滤波、相位共轭、模式识别、相关记忆存贮等方面, 已经取得了很大的进展^[25]. 对信息存贮与处理应用来说, K 和 M 中间体是两个非常重要的态. 利用 K 态与 bR 光转换的优点是, 开关速度快(几个皮秒), 对于快速光信息处理非常适合, 但 K 态的稳定温度低 (90K), 且吸收光谱与 bR 有很大的重叠, 这降低了图象的对比度. 利用 M 态与 bR 光转换, 实现光学信息存贮与读出的优点是, M 态的稳定温度比 K 态高的多 (208K), 而且在光谱上与 bR 完全分开, 可以实现 bR 到 M 态的完全开关, 而且降低了完成光开关的光功率. bR 适合作为光学材料还因为它有以下几个优点: 一是 bR 有较大的吸收截面 (在 570nm 处的摩尔吸收系数为 $63\,000\text{ (mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1})$); 二是紫膜特殊的结晶结构使得它非常牢固稳定, 对光与环境具有很强的抗退化能力, 不需要特殊保存; 三是 bR 可以用生物技术与基因工程的办法进行生色团与氨基酸的修饰, 产生光学性质更加优良的 bR 变种.

参 考 文 献

- 1 Kouyama T, Kinoshita K J, Ikegami A. Adv Biophys,

- 1988; 24: 123
- 2 Mathies R A. Proc Indian Acad Sci Chem Sci, 1991; 103: 283
- 3 Lanyi J K. J Bioenerg Biomembr, 1992; 24: 169
- 4 Rothschild K J. J Bioenerg Biomembr, 1992; 24: 147
- 5 Tsuji K, Hess B. Eur Biophys J, 1990; 18: 63
- 6 胡坤生, 孙 英, 王敖金. 生物物理学报, 1993; 9: 163
- 7 Taiji M, Bryl K, Sekiya N *et al.* Proceedings of the Seventh International Symposium. Ultrafast Processes in Spectroscopy 1991, Bayreuth, Germany, 1991, Bristol, UK: IOP, 1992: 595
- 8 Atkinson G H, Ujj L. Proceedings of the Seventh International Symposium. Ultrafast Processes in Spectroscopy 1991, Bayreuth, Germany, 1991, Bristol, UK: IOP, 1992: 599
- 9 Tkachenko N V, Savransky V V, Sharonov A Yu. Eur Biophys J, 1989; 17: 131
- 10 Govindjee R, Balashov S P, Ebrey T T. Biophys J, 1990; 58: 597
- 11 Xie A. Biophys J, 1990; 58: 1127
- 12 Bazhenov V, Schmidt P, Atkinson G H. Biophys J, 1992; 61: 1630
- 13 Simmeth R, Rayfield G W. Biophys J, 1990; 57: 1099
- 14 McIntosh A R, Boucher F. Biophys J, 1991; 60: 1
- 15 Groma G I, Varo G, Keszthelyi L. J Mol Electron, 1991; 7: 75
- 16 Trissl H-W, Gartner W. Chem Phys Lett, 1989; 158: 515
- 17 Hong F T, Hong F H, Needleman R B *et al.* AIP Conf Proc (USA), 1992; 262: 204
- 18 宫坂力, 小山行一. 应用物理 (日本), 1992; 61: 1053
- 19 王建平, 李津如, 陶培德等. 中国科学 (B 辑), 1993; 23: 936
- 20 Mobarry C, Lewis A. SPIE International Optical Computing Conference, 1986; 700: 304
- 21 Takei H, Lewis A, Chen Z *et al.* Appl Opt, 1991; 30: 500
- 22 Korchemskaya E Ya, Soskin M S, Taranenko V B. Proc SPIE-Int Soc Opt Eng, 1990; 1280: 308
- 23 Werner O, Fischer B, Lewis A. Opt Lett, 1992; 17: 241
- 24 Kumar G R, Wategaonkar S J, Roy M. Opt Commun, 1993; 98: 127

- 25 Hampp N, Brauchle C, Oesterhelt D. Biophys J, 1990; 58: 83

Bacteriorhodopsin Photo-biomolecular Device and Its Ultrafast Process. Yao Baoli, Xu Dalun (*State Key Laboratory of Transient Optics and Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Academia Sinica, Xi'an 710068, China*).

Abstract Bacteriorhodopsin is a kind of photo-energy conversion protein existing in the purple membrane of *halobacterium halobium*. It serves the function of photochromic materials and light-driven proton pumps, with an extremely fast primary photo-isomeric process occurring within 430ps. On account of the fact that bacteriorhodopsin has a series of unique photoelectrical and optical properties such as differential responsivity to light intensity, high spatial resolution, high photosensitivity, high cycling, etc., it has found many important applications in photoelectrical detection, visual simulation system, artificial neural network, nonlinear optics and optical information recording and processing. Depended on the techniques of ultrafast pulse laser, highly time-resolved spectroscopy and high speed sampling detection, studies on bacteriorhodopsin's photocycle, primary photo-isomerization, excited state dynamics, light-driven proton pump mechanism and other aspects have been successfully developed with many significant results.

Key words bacteriorhodopsin, biomolecular device, ultrafast process