

基因突变细菌视紫红质薄膜的长寿命 M 态光存储*

姚保利**

(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 李兴长

(中国科学院化学研究所分子科学中心, 北京 100101)

N. HAMPP

(Institute for Physical Chemistry, University of Marburg, D-35032 Marburg, Germany)

摘要 实验研究了 D96N 型基因突变细菌视紫红质薄膜的光存储性能, 实现了用 670 nm 激光在 BR 膜上记录光学图像, 用 560 nm 弱光读出图像, 用 488 nm 激光擦除图像的读写擦操作. M 态寿命在室温下延长到了 3 min, 比溶液状态下的野生细菌视紫红质 M 态寿命延长了 5 个数量级.

关键词 细菌视紫红质, 基因突变, 光存储

学科分类号 Q682

细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, BR) 是嗜盐菌 (*Halobacterium salinarum*) 紫膜中唯一存在的一种光敏蛋白质, 具有二维结晶膜结构和光驱动质子泵功能, 是自然界中为数不多的几种研究得比较清楚的膜蛋白之一^[1]. 随着对 BR 分子结构和功能了解的加深, 对其结构和性能已经可以进行人工调控. 目前 BR 在光学数据存储和光学信息处理^[2,3]以及光电探测^[4]等技术领域已经得到了应用, 并显示出这种生物分子材料特有的一些优点, 如光转换量子效率高 (64%), 重复擦写次数多 (> 100 万次), 极限空间分辨率高 (5 000 lines/mm) 等. 但是野生的 BR, 其 M 态寿命在室温下通常只有几个毫秒, 这对许多应用 (如光学数据存储) 显得太短. 因此如何延长 M 态的寿命成为 BR 应用的一个关键问题. 目前解决的办法主要有三种: 一是采用低温. M 态在 -30℃ 时可以稳定. 二是生物化学修饰, 包括对 BR 中金属阳离子取代; 选择适当的成膜基质或添加剂以改变水分子在 BR 光循环和质子泵中的作用; 以及通过酰化、生物素或某些氮氧自由基的修饰来改变 BR 的特性. 三是基因突变. 希夫碱基两侧的两个天门冬氨酸 Asp96 (质子给体) 和 Asp85 (质子受体) 对质子转运和 M 态寿命起关键作用. 采用基因工程手段对视黄醛口袋和质子泵通道中的主要氨基酸进行定点突变制备 BR 的变异体, 可以使光循环和质子泵功能部分受阻, 延长 M 态的寿命. 目前定点突变的主要是, 用天门冬酰胺 (Asn) 替换 Asp96 产生 D96N 变异体, 或用

Asn 替换 Asp85 产生 D85N 变异体, 或二者同时突变. 本文报道了我们用 D96N 型 BR 膜实现长寿命 M 态的光学图像记录、读出和擦除, M 态寿命在室温下延长到了 3 min, 比野生 BR 溶液延长了 5 个数量级.

1 材料和方法

实验用 D96N BR 薄膜由德国 Marburg 大学制备. 其制备方法是: 从基因定点突变的嗜盐菌中提取紫膜, 经纯化、破碎, 以一定的浓度掺杂到高分子聚合物中 (如聚乙炔, 聚乙烯醇等), 然后将该聚合物密封到两片平行的光学玻璃中间, 形成均匀透明的聚合物薄膜. 薄膜的厚度约 50 μm, 直径 19 mm, 光学玻璃的厚度为 3 mm, 薄膜在 570 nm 处的光密度为 2.2.

被记录的光学图像制作在透明胶片上, 由 670 nm 波长的半导体激光器 (美国 Preliminary 公司生产, SDL-07470-P5 型) 照明, 经透镜成像到 BR 薄膜上. BR 在光照下发生光致变色效应, 被光照射的部分, BR 分子从基态跃迁到 M 态, 由于 M 态的吸收峰 (412 nm) 与基态的吸收峰 (570 nm) 相差很大, 所以被光照射部分和未被光

* 国家自然科学基金 (60007009) 和中国科学院院长基金 (40007059) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 029-8498711, E-mail: yaobl@optics.opt.ac.cn

收稿日期: 2001-04-02, 接受日期: 2001-05-17

照射部分的 BR 膜的光吸收特性产生差异, 在 BR 膜上形成潜像. 图像被记录后, 其读出由 560 nm 波长的黄绿光再现, 因为 BR 基态和 M 态对 560 nm 光的吸收有几乎最大的差异, 所以用较弱的 560 nm 光即可获得较高对比度的图像. 该黄绿光由一个 300 W 卤钨灯加一个 560 nm 干涉滤光片产生, 均匀照明 BR 膜, 经透镜成像到 CCD 光敏面上 (台湾敏通公司生产, 1288-1 型), 在监视器上观察图像或由图像采集卡将图像存储到计算机中. 图像擦除时, 利用 M 态在蓝光照射下可以直接返回 BR 基态, 将 BR 膜放到氩离子激光器 488 nm 激光下照射几秒钟即可快速将记录的图像全部擦掉. BR 膜的静态吸收光谱及其被 670 nm 光激发后吸收光谱随时间的变化光谱, 在日本 Shimadzu MPC-3100 型分光光度计上测量.

2 结果和讨论

D96N BR 薄膜的静态吸收光谱如图 1 中

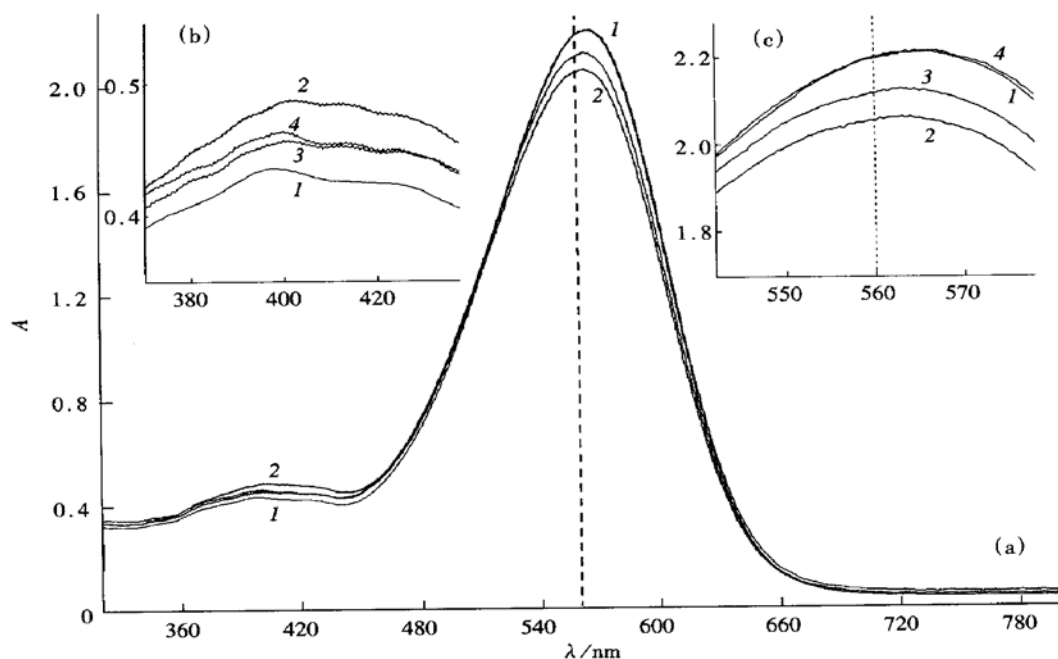


Fig. 1 Time dependent absorption spectra of the D96N BR film after it is illuminated by 670 nm laser with intensity 100 mW/cm^2 for 15 min

(a) original figure; (b) and (c) magnified figures around the peak 400 nm and 560 nm. 1: BR spectrum without stimulation; 2: the spectrum at 1 min; 3: the spectrum at 3 min; 4: the spectrum at 10 min.

图 2 是在我们的图像记录和读出系统上记录和还原的一幅简单图案. 图 2a 是制作在透明胶片上的同心圆环图案, 用光强为 150 mW/cm^2 的 670 nm 光照射 10 min, 经成像透镜, 图像被记录到 D96N BR 薄膜上. 670 nm 光照结束后 2 min,

曲线 1 所示. 与野生 BR (吸收峰值在 568 nm) 相比, 其吸收峰值移到了 566 nm. 这可能与 Asn 替换 Asp96 引起氨基酸链结构的微小变化有关, 或者是高分子聚合物环境对其造成的影响. 我们用光强为 100 mW/cm^2 的 670 nm 激光对 BR 膜连续照射了 15 min, 使其产生一定的 M 态分子数, 然后将 BR 膜放到分光光度计上, 每隔一定时间测量一次它的吸收光谱. 图 1 中曲线 2、3、4 分别是 670 nm 光照结束后 1 min、3 min 和 10 min 时的吸收光谱. 可以看到, 10 min 时 BR 膜的吸收光谱基本上已经恢复到了光照前的吸收光谱; 3 min 时, BR 膜的吸收光谱在 566 nm 处与光照前的吸收光谱仍有 0.1 的光密度之差, 该差别足以产生肉眼可分辨的对比度. 从该测量光谱可以判断 M 态的寿命应该在 3 min 左右. 从图 1 还可看到, 在 BR 吸收峰处的光密度值改变最大, 利用该波长读出图像可以产生最大的对比度, 所以我们选择了接近峰值的 560 nm 波长作为读出光.

用光强为 2 mW/cm^2 的 560 nm 光照射 BR 薄膜, 将记录在其上的图像再现出来, 图 2b 是从 CCD 监视器上拍摄下来的照片, 图像在记录后 2 min 仍保持较好的对比度.

上述两个实验证明基因突变 D96N BR 膜的 M

态寿命延长到了 3 min 左右, 比溶液状态下野生 BR 的 M 态寿命 (几毫秒) 延长了 5 个数量级. 这对于利用 BR 膜作为光学图像记录介质, 光学数据缓存, 图像显示等应用提供了有利的条件. Hampp^[5] 已利用这种 D96N BR 膜的长寿命 M 态和其高空间分辨率, 制作出了第一台以 BR 膜作为全息记录介质的全息干涉计量仪. 但是作为长时间光存储材料 (如可擦重写的光盘材料), 3 min 寿

命的 M 态仍显得太短, 还需要继续延长 M 态的寿命, 这方面的工作是目前研究的一个重点. 另一方面, 自从 BR 的分支光循环和室温下更稳定的 P 态和 Q 态发现之后^[6], 对这两个中间态的研究越来越感兴趣, 但是由于产生这两个态的量子效率很低 ($\sim 0.02\%$), 离实用仍有一定距离. 如何制造出室温下更加稳定的 M 态或量子效率高的 P 态和 Q 态是 BR 是否能真正走向实用的关键.

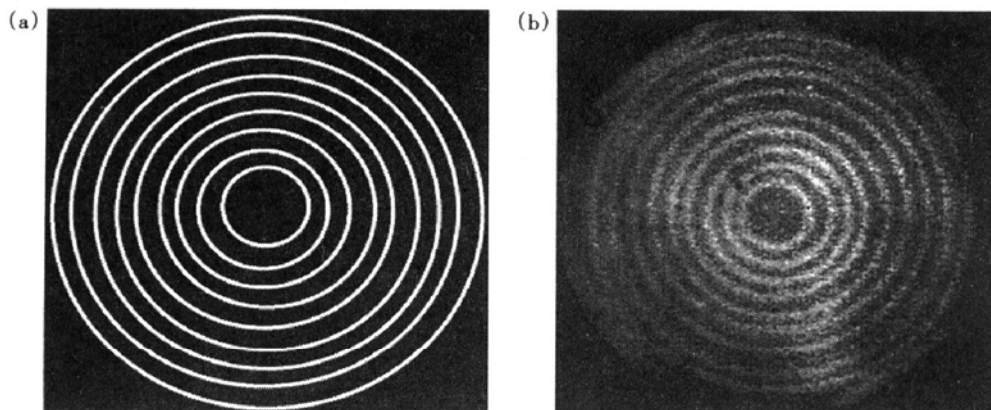


Fig. 2 Patterns of object and image recorded on BR film

(a) The object pattern on a transparent; (b) The image of the object recorded on the D96N BR film. The image is readout at 2 min after the recording with 560 nm, 2 mW/cm² light. The recording light is 670 nm laser, 150 mW/cm², recording 10 min.

参 考 文 献

- 1 Luecke H, Richter H, Lanyi J K. Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science*, 1998, **280** (6): 1934~ 1937
- 2 Hampp N. Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories. *Chem Rev*, 2000, **100** (5): 1755~ 1776
- 3 Birge R R, Gillespie N B, Izaguirre E W, *et al.* Biomolecular electronics: protein-based associative processors and volumetric memories. *J Phys Chem B*, 1999, **103** (49): 10746~ 10766
- 4 Miyasaka T, Koyama K, Itoh I. Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor. *Science*, 1992, **255** (1): 342~ 344
- 5 Hampp N, Juchem T, Anderle K. Holographic system for non-destructive testing, vibration analysis and size measurement using bacteriorhodopsin films as optical memory media. *Proc SPIE*, 1999, **3939**: 86~ 93
- 6 Downie J D, Timucin D A, Smith D T, *et al.* Long holographic lifetimes in bacteriorhodopsin films. *Opt Lett*, 1998, **23** (9): 730 ~ 732

Long Lifetime M State Optical Storage in Genetic Mutant Bacteriorhodopsin Film*

YAO Bao-Li**

(State Key Laboratory of Transient Optics Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710068, China)

LI Bao-Fang, LI Xing-Chang

(Center of Molecule Science, Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

N. HAMPP

(Institute for Physical Chemistry, University of Marburg, D-35032 Marburg, Germany)

Abstract The optical storage characteristic of the D96N genetic mutant bacteriorhodopsin film is experimentally studied, where the optical image is recorded on the BR film with 670 nm laser, the readout of the image is

carried out by a weak 560 nm light, and the erase of the image is completed with the illumination of 488 nm laser. The lifetime of the M state is measured to be extended to 3 minute at room temperature, which is five-order magnification longer than that of the wild type bacteriorhodopsin in the solution.

Key words bacteriorhodopsin, genetic mutant, optical storage

* This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (60007009) and the President Foundation of Chinese Academy of Sciences (40007059).

** Corresponding author. Tel: 86-29-8498711, E-mail: yaobl@optics.opt.ac.cn

Received: April 2, 2001 Accepted: May 17, 2001

第二类肽链释放因子

孙泉红 梁爱华

(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

生物体内蛋白质合成过程中, 当核糖体遇到 mRNA 上的终止密码时, 新合成的多肽链从肽酰-tRNA 上释放出来, 释放因子在这个过程中起着重要的作用. 释放因子有两类, 第一类为密码子特异性因子, 原核生物有 RF1 和 RF2 两种, RF1 识别 UAA/UAG, RF2 识别 UAA/UGA 终止密码子; 真核生物中 eRF1 识别三个终止密码子. 第二类释放因子为密码子非特异性因子, 原核生物中为 RF3, 真核生物中为 eRF3. 第一类释放因子识别终止密码子, 并促进肽酰-tRNA 酯键的水解, 但要使这个反应进行得更有效, 并使 GTP 水解, 还需要第二类释放因子的作用.

第二类释放因子由占全长 2/3 的 C 端保守区和 1/3 的 N 端非保守区构成. C 端区域是细胞活性和翻译终止必需的区域, 包括与 eRF1 结合的 C 区与 GTP 结合的 G 区两部分. 对人 eRF1 和 eRF3 的相互作用研究表明: eRF3 中的第 478~530 个和第 628~637 个氨基酸两个区域是与 eRF1 相互结合的关键.

在哺乳动物蛋白质合成的最后一步中, 肽链从肽酰-tRNA 上释放是一个依赖 GTP 的过程. 然而第一类释放因子 eRF1 家族并无 GTP 结合位点, 所以, 整个终止反应对 GTP 的需求是另外一种具 GTP 结合位点的蛋白质, 即第二类释放因子 eRF3 赋予的. 研究不同生物的 eRF3 表明, 这些蛋白质 C 区结构域高度保守, 都有 4 个 GTP 结合位点, 与其他 G 蛋白相似, 尤其是与延伸因子 EF-Tu 和原核生物 RF3 相似.

占全长 1/3 的 N 端区域是非保守区, 但也是细胞活性所必需的. *S. cerevisiae* eRF3 N 端含有 4 个串联的九肽重复序列 (PQGGYQQYN), 与哺乳动物中的朊病毒序列相似, 并以类朊病毒的特征影响蛋白质的终止. 而 *S. pombe* 的 eRF3 不含有任何已知的类朊病毒的多肽重复序列, 却含

有富集 Ala、Pro、Ser 和 Thr 的未知功能的多肽重复序列.

由于第二类释放因子具有一个同源于延伸因子的 C 端区域、四个保守的 GTP 结合区域及一个独特的 N 端区域, 决定了这类因子是一个多功能的蛋白质.

RF3 作为一个 EF-Tu 类似因子, 在翻译终止时, RF3 携带 RF1/2 (或 eRF1) 到达核糖体的 A 位点上, RF1/2 (或 eRF1) 正确识别终止密码子后, 水解肽酰-tRNA 酯键, 释放出新生肽链. GTP 在 RF3 的作用下, 水解为 GDP, 使肽链释放因子从核糖体上解离下来, 继续参与下一个肽链的终止反应.

另一个关于 (e) RF3 作用的假设是建立在蛋白质与转位因子 EF-G 或 eEF2 的相似性上, 认为终止就是最后一个延伸循环. 这种情况下, 对于原核生物 RF1 (或 RF2) 结合到被终止密码子占领的 A 位点, 将导致肽链释放, 随之由 RF3 引起转位, 就象 EF-G 一样把 RF1/2 从 A 位点移至 P 位点或者将它们从核糖体上释放, 释放出 P 位点结合的 tRNA, 减弱了 mRNA-核糖体的结合.

哺乳动物 GTP 结合蛋白 (GSPT) 在肽链终止时作为 eRF3 与 eRF1 结合, 研究表明 GSPT/eRF3 不仅是在翻译终止时作为 eRF1 的促进子, 而且还可能作为 mRNA 降解的启动子.

在人工培养的人类细胞中, 过量表达 eRF3, 而不是 eRF1, 会引起一个 cat 基因转录的抑制. 另据报道, 酵母 GST1 基因编码的 GTP 结合蛋白可以调控 G1 到 S 期的过渡, GST1 的人类同源物 GSPT1 也具有这个功能. 这样 eRF3 在细胞周期调控中也起重要的作用.

由此可见, 第二类释放因子功能是多样化的. 第二类释放因子结构与功能的研究是当前生物化学与分子生物学研究领域的热点之一.