

一种具有光致变色特性的膜蛋白/聚合物复合膜*

马德旺¹ 明明¹ 洪洁² 吴佳¹ 李庆国³ 黄伟达² 丁建东^{1**}

(¹聚合物分子工程教育部重点实验室 复旦大学高分子科学系 上海 200433) (²复旦大学生命科学院生物化学系 上海 200433)

(³复旦大学生命科学院生理学与生物物理学系 上海 200433)

摘要 通过基因工程技术将古紫质4 (archaerhodopsin-4, AR4) 膜蛋白的基因转入本身不表达该蛋白质、也不表达玉红素的嗜盐菌株 L33 中, 去除了天然菌株 *xz515* 所获得的 AR4 膜蛋白脂环境中的玉红素, 优化了 AR4 的光致变色性能. 将重组古紫质4 包埋于聚乙烯醇中制成复合膜, 并通过提高体系的 pH 值, 延长了 M 态的寿命, 进一步实现了简单图案记录, 验证了该活性蛋白质与聚合物的复合材料具有光信息存储功能.

关键词 细菌视紫红质, 古紫质, 聚乙烯醇, 信息存储, 基因工程

信息功能材料的研究和开发具有十分重要的意义, 其中合成聚合物基信息材料以其良好的可加工性、广泛的可选择性等特点成为人们关注的热点^[1-5]. 与之相比, 一些天然的具有光学响应的生物大分子, 经过长期的自然选择和进化, 也可能加以利用, 有望成为新型的信息功能材料. 细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, bR) 便是其中的典型代表^[6-8]. 细菌视紫红质是一种生长在盐湖中的嗜盐菌上的含有视黄醛的膜蛋白, 光照下产生光循环, 包括一系列不同吸收峰值的光循环中间体, 同时将质子由胞内侧定向泵出到胞外侧, 具有光色响应和光电响应. 这种独特的性能使其有望应用在光信息存储(包括两维存储、三维存储和全息存储等)和光信息处理(包括光转换、光过滤和信号调节等)等方面^[6]. 有关知识产权的国际竞争也已经成为一个重要问题.

古紫质 (archaerhodopsin, AR) 是另一类光致变色蛋白, 与 bR 具有十分相似的结构和功能, 它们同属于菌紫质大家族^[9]. 古紫质 (AR) 一词由 Mukohata 等最先提出^[10], 用来描述在澳大利亚发现的两种同样含有视黄醛的光致变色蛋白, 分别被命名为古紫质1 (AR1) 和古紫质2 (AR2). AR 和 bR 被认为是菌紫质家族中不同的属. 第三种古紫质 (AR3) 由 Ihara 等描述^[11] 并被 Brown 命名^[12], 但这种古紫质虽然具有与 AR1 和 AR2 相似的序列却尚无直接证据表明其质子泵功能和光致变色的特性. 复旦大学研究组近年来从西藏盐湖中发现

了另一种嗜盐菌株 *xz515*, 从中分离出一种同样具有光循环特性的膜蛋白^[13], 并进行了初步研究^[14]. 其序列与 AR1 具有 87% 的相似性, 与 AR2 具有 97% 的相似性, 而与 bR 只有 57% 的相似性, 我们把它命名为古紫质4 (AR4). AR4 具有与大部分菌紫质家族成员相反的质子释放和获取的时间顺序^[13a], 有关机理已作出了初步探讨.

从光色响应看, AR4 与大部分菌紫质家族成员十分相似. 虽然已经有人尝试利用 bR 作为信息材料, 但是, 鲜见利用古紫质作为信息材料的相关报道; 而 AR4 的相关研究还有助于获取自主知识产权. 然而, 迄今为止发现的所有古紫质周围的脂环境中都含有一种玉红素, 而玉红素的特征吸收峰恰好掩盖了菌紫质的正常吸收峰, 并且不随菌紫质光循环变化而变化, 因而严重削弱了菌紫质光致变色的反差. 本文将利用基因工程技术得到不含玉红素的重组野生型 AR4, 报道了古紫质与聚合物的复合膜, 初步验证了该复合型功能高分子材料具有光致变色信息材料的基本特性.

我们将利用 Needleman 所构建的用于重组 bR 的载体技术^[15], 通过基因工程技术将 AR4 基因转入一种本身不合成菌紫质的嗜盐菌株 L33 中, 使其在 L33 的新的脂环境(不含玉红素)中表达, 从而去除了原菌株 *xz515* 脂环境中玉红素的影响, 使得 AR4 的光致变色性能进一步优化.

另外, 与 bR 蛋白类似, AR4 蛋白自身的成膜性很差, 为实现器件化, 可将 AR4 包埋于某些合

* 2005-08-26 收稿, 2005-11-08 修稿; 国家自然科学基金(基金号 20374015、20574013、50533010)、教育部科学技术研究重大项目(项目号 305004)、国家重点基础研究发展规划项目(973)(项目号 2005CB522700)、上海市科技发展基金(基金号 04JC14019、055207082)资助项目;

** 通讯联系人, E-mail: jdding1@fudan.edu.cn

适的聚合物基质中制成薄膜,而这些基质要求具有良好的成膜性、透光性和生物相容性,采用较多的是聚乙烯醇和明胶^[6,8,16]。文中在原有的 bR/聚乙烯醇(PVA)复合成膜方法^[16]的基础上经过改进,将重组 AR4 包埋于 PVA 中制成均匀平整、易于加工的信息存储复合膜,并在其基础上实现了简单的图案可视化记录,证明该蛋白质与聚合物的复合膜具有信息存储功能,有望成为一种新型的信息功能材料。

1 实验部分

1.1 转基因 AR4 的获得

利用 pXLNov-r-bop 质粒为模板,用 Taq DNA 聚合酶 PCR(聚合酶链反应)扩增细菌视紫红质基因的启动子区域,得到 363 bp 长度的启动子序列。PCR 扩增所用的引物为 5'-CGGGATCCGACGTGAAGATG-3'(引物 1)和 5'-GCAACAGTACTAACGAG-3'(引物 2),其中下划线的部分是新导入的 BamHI 限制性内切酶位点。PCR 扩增古紫质 4 基因的开放读码框,所用的引物为 5'-CTC-GTTAGGTAAGTGTTCATGGACCCGATAGCG-3'(引物 3)和 5'-GCGCAAGCTTCCCTTCACTCTCAAGTGCCG-3'(引物 4),下划线部分是新导入的 HindIII 限制性内切酶位点。将 PCR 扩增的细菌视紫红质基因启动子序列和古紫质 4 基因的开放读码框序列混合在一起,利用引物 1 和引物 4,并用 Pfu DNA 聚合酶进行第二轮 PCR,扩增得到一个两端分别带有 BamHI 和 HindIII 限制性内切酶位点的长度为 1.2 kb 的 DNA 片段,命名为 bp-AR4。将这个 PCR 扩增产物 bp-AR4 克隆到 pSK 质粒上进行 DNA 测序。测序结果表明其序列与古紫质 4 基因序列和目的启动子序列完全一致。将克隆在 pSK 质粒上并经过序列测定的 bp-AR4 基因以 BamHI 和 HindIII 这两个限制性内切酶位点转入嗜盐菌表达质粒 pXLNov-r 中,得到了长度为 789 bp 的古紫质 4 的克隆基因的表达质粒 pXLNov-bp-AR4。

根据文献方法^[15],将构建形成的 pXLNov-bp-AR4 质粒转入到嗜盐菌株(*H. salinarium*) L33 中。转化株在含有 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新生霉素(novobiocin)中培养两星期,然后取出 50 个克隆分别在 JL 培养液中(含 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新生霉素)37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡培养,其中 6 个克隆生长较好,显现出轻微的紫色。将其挑选出来经过逐级放大培养、分离、纯化(具体方法类似^[17]),最终得到基因工程表达的

不含玉红素的古紫质 4 蛋白。

1.2 AR4/PVA 复合膜的制备

3.3 g 聚乙烯醇(PVA,平均分子量为 8×10^4 ,醇解度为 98%,江苏启东精细化工二厂)加入至 30 mL 水中,加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌直至完全溶解,形成浓度 10 wt% 的透明澄清溶液,冷却至室温,pH ~ 7。取适量 PVA 分别加入适量 0.1 mol/L NaOH 溶液,得到 pH ~ 10 和 pH ~ 12 的 PVA 水溶液。

将适量野生 AR4 蛋白(获取方法^[13])和重组 AR4 蛋白经冷冻干燥后的固体粉末加入到上述 3 种不同 pH 值的 PVA 溶液中超声,静置片刻,使超声过程中产生的气泡上浮,得到颜色均匀混合液。小心从底部吸取约 0.2 mL 混合液滴到清洗干净的石英片上平铺,在一定温度和湿度下干燥,得到均匀平整,厚度为 50 ~ 150 μm 的 AR4/PVA 复合膜。

1.3 紫外可见光谱扫描

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。激发光源为卤钨灯,透过橙色截止滤色片 CB535 (> 535 nm)激发样品后立即将复合膜放入样品槽进行光谱扫描。

我们采用光激发被掩膜覆盖的重组 AR4/PVA 复合膜的方法,实现了简单图案存储,以数码相机记录。

2 结果与讨论

2.1 野生型 AR4 的光致变色性能

在 bR 的 7 个跨膜 α -螺旋内部,生色团视黄醛通过席夫碱基与第 216 位赖氨酸相连。吸收光能后,视黄醛发生异构化,由全反式变为 13-顺式,同时蛋白质构象发生变化,经过一系列具有不同吸收波长的中间体——K、L、M、N、O 等,最终恢复到基态^[6]。而伴随着这个光循环过程,一个质子由细胞内侧定向传输到胞外侧。首先视黄醛的席夫碱基将质子传递给第 85 位的天冬氨酸 Asp85,同时质子释放基团在胞外侧释放一个质子;随后席夫碱基从 Asp96 夺取一个质子重新质子化,去质子化的 Asp96 然后从胞内侧提取一个质子,最后 Asp85 传递一个质子给释放基团。从整体看,一个质子由胞内侧泵到胞外侧,即所谓的质子泵模型^[6]。

在菌株 xz515 中提取的野生型 AR4 具有与 bR 类似的功能基因,从而也具有质子泵功能和光循环特性。通过在水介质中的研究表明^[13],光激

发后 AR4 可吸收 568 nm 左右的光子,产生含有一系列中间态的光循环,其中较稳定的 M 态中间体最大吸收波长为 412 nm,与基态相比具有最大程度的蓝移,具有光致变色的特性.

野生型 AR4/PVA 复合膜受光激发前后的吸收光谱如图 1 所示.该图表明,在与聚合物复合以后,古紫质仍然保留了光致变色的生物学活性.复合膜在光激发后仍然存在玉红素的 480、508、544 nm 3 个特征吸收峰,并且激发后由于 AR4 由基态 (ground state) 转变为 M 态 (M state),570 nm 处的吸收降低,玉红素的吸收更为明显.由复合膜光激发后的曲线可见其在 410 nm 附近有一明显吸收峰,正是中间体 M 态的吸收.但由于玉红素的存在,野生型 AR4/PVA 复合膜激发前后分别为红色和淡红色,反差低.

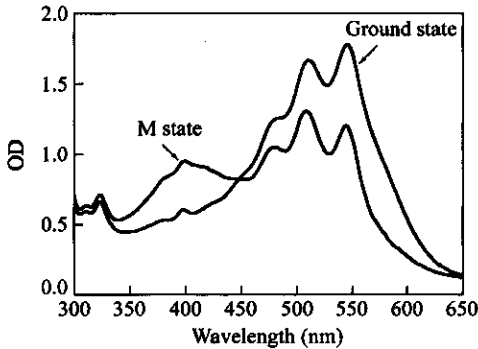


Fig. 1 Optical density (OD) versus wavelength of the ground state and M state of the wild-type AR4/PVA film

2.2 重组 AR4/PVA 复合膜的光致变色性能

通过恰当的基因工程技术获得重组 AR4,改变了 AR4 周围的脂质体环境.由重组 AR4/PVA 复合膜激发前吸收曲线 (图 2) 可见,其基态在 570 nm 处有一显著吸收峰,不存在玉红素的 3 个明显吸收峰,可见通过基因工程技术去除了玉红素 (表达菌株 L33 的细胞膜上不含玉红素),这与文献 [18] 所报道的采用柱层析法所得到紫膜蛋白一致.但采用柱层析方法是先用去垢剂 Triton X-100 和胆酸钠等溶解初步离心分离得到的膜蛋白,破坏蛋白质分子与周围的脂环境的相互作用,使得蛋白质与含有玉红素的周围脂环境分开,然后通过层析柱吸附蛋白质分子,使蛋白质与脂进行分离从而得到不含玉红素的蛋白;而采用基因工程方法则通过初步离心即可得到不含玉红素的膜蛋白.利用柱层析方法的缺点是所得到的蛋白与 PVA 复合容易向周围聚集,从而使复合膜均匀性

降低;而采用基因工程方法所得到的膜蛋白所制备的复合膜均匀性良好.

光激发后 570 nm 处吸收峰基本消失;而在 410 nm 处出现另一明显吸收峰,即 M 态吸收 (图 2).正是利用基态到 M 态的变化,理论上可实现信息的存储.

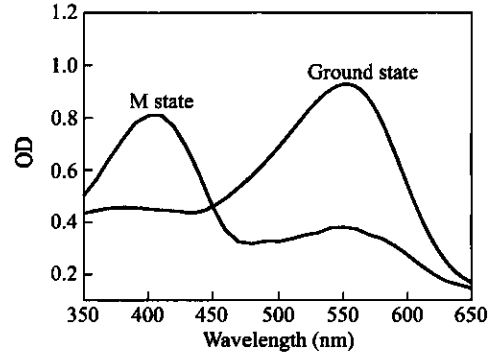


Fig. 2 Optical density (OD) versus wavelength of the ground state and M state of the recombinant AR4/PVA film

2.3 重组 AR4/PVA 复合膜的 M 态衰减动力学

考察了在不同 pH 值 PVA 溶液环境中得到的重组 AR4/PVA 复合膜的 M 态的动力学,如图 3 所示.可见,随着 pH 值的增加,M 态衰减逐渐变慢. PVA 的 pH 为 7 时,M 态半衰期约 10 s,当调节 PVA 的 pH 值为 12 时半衰期延长到了约 80 s. bR 由 M 中间态衰减为基态的过程,在分子内部的机制表现为其第 96 位的天冬氨酸从周围环境中获取质子^[19],而任何阻止这一过程的方法都可延长 M 态的寿命.我们通过调高 pH 值的方法,延长了重组 AR4/PVA 复合膜 M 态的寿命,说明 AR4 与 bR 在 M 态衰减中具有相似的机理.

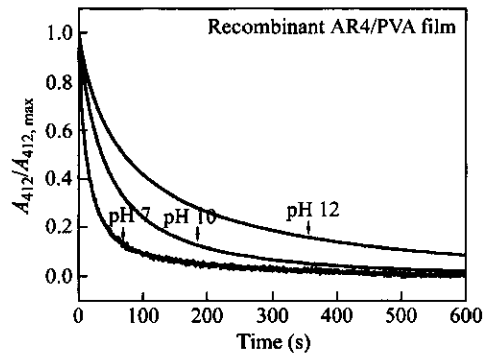


Fig. 3 Decay of M state in the recombinant AR4/PVA film at different pH's

2.4 对重组 AR4/PVA 复合膜进行简单图案记录

重组 AR4/PVA 复合膜本身呈均匀紫色,如图

4(a)所示.为在复合膜上记录可视化图案,我们制作了 16 mm × 16 mm 大小的带有“AR4”字样的 PET 涤纶片掩膜,利用激光打印机将掩膜中除“AR4”字样外的其余部分打印成黑色不透光区域,如图 4(b)所示.用附有橙色截止滤色片 CB535 (> 535 nm)的卤钨灯激发盖有掩膜的重组 AR4/PVA 复合膜.关闭钨灯并移去掩膜后,用普通数码相机即可拍摄记录有“AR4”字样的复合膜,如图 4

(c)所示.处于基态的重组 AR4 吸收峰在 570 nm 左右,故复合膜的颜色为紫色;光激发后 AR4 产生光循环并快速达到吸收峰为 412 nm 的 M 态,故,颜色变为浅黄色.采用非基因工程的野生型 AR4 则因反差小而难以用肉眼直接观察到图案.从图 1 和图 2 的比较也可以看出两者反差上的区别.

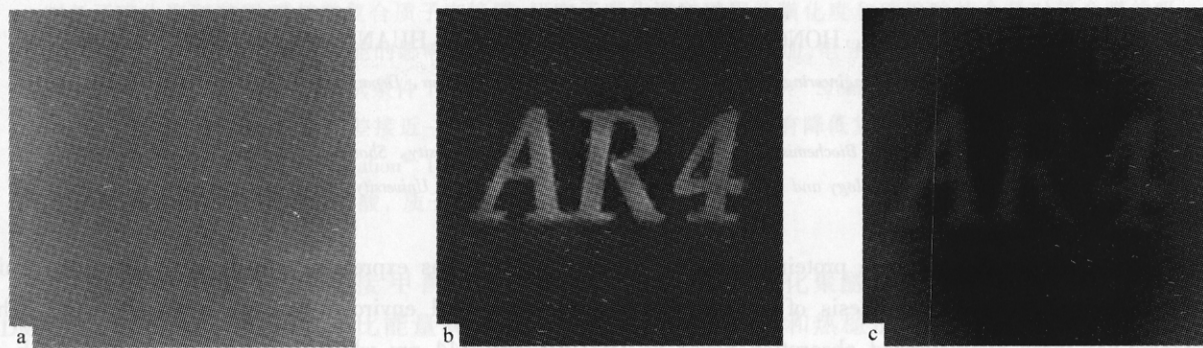


Fig. 4 Images of a recombinant AR4/PVA film and a visualized record of the pattern in a mask after illuminated
a) AR4/PVA film; b) PET mask; c) Film after illuminated

综上所述,通过基因工程技术去除了野生古紫质 4 蛋白质提取物中玉红素的影响,大大提高了其光致变色性能;另外通过提高体系 pH 值的方法延长了 M 态寿命.制备了 AR4 蛋白质与水溶

性聚合物的复合膜,表明蛋白质不仅仍然具有光学响应,而且实现了可视化图案记录,为这一新型聚合物基生物复合材料应用于信息材料领域打下了基础.

REFERENCES

- Zhou G, Cheng Y X, Wang L X, Jing X B, Wang F S. *Macromolecules*, 2005, 38(6): 2148 ~ 2153
- Wang Yong(王泳), Chen Hongzheng(陈红征), Wang Mang(汪茫). *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese(高等学校化学报)*, 2005, 26(1): 146 ~ 148
- Hou Qiong(侯琼), Niu Yuhua(牛于华), Yang Wei(杨伟), Yang Renqiang(阳仁强), Yuan Min(袁敏), Cao Yong(曹镛). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2003, (2): 161 ~ 166
- Zhang Junhua(张军华), Ding Xiaobin(丁小斌), Peng Yuhang(彭宇行), Wang Mang(汪茫). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2002, (3): 277 ~ 281
- Wu Qiuju(吴秋菊), Wu Lixin(吴立新), Qi Zongneng(漆宗能), Wang Fosong(王佛松). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2000, (2): 172 ~ 175
- Hampp N. *Chem Rev*, 2000, 100(5): 1755 ~ 1776
- Chen Deliang(陈德亮), Hu Kunsheng(胡坤生). *Acta Biophysica Sinica(生物物理学报)*, 2001, 17: 441 ~ 448
- Liang B, Li B F, Jiang L. *Chem Mater*, 2001, 13(9): 2746 ~ 2748
- Mukohata Y. *Biophys Chem*, 1994, 50(1-2): 191 ~ 201
- Mukohata Y, Sugiyama Y, Ihara K, Yoshida M. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 151: 1339 ~ 1345
- Ihara K, Umemura T, Katagiri I, Kitajima-Ihara T, Sugiyama Y, Kimura Y, Mukohata Y. *J Mol Biol*, 1999, 285(1): 163 ~ 174
- Brown L S. *Biochemistry-Moscow*, 2001, 66(11): 1249 ~ 1255
- a) Li Q G, Sun Q G, Zhao W, Wang H, Xu D Q. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1466(1-2): 260 ~ 266; b) Ming M, Lu M, Balashov S P, Ebrey T G, Li Q G, Ding J D. *Biophys J*, 2006, 90(9): 3322 ~ 3332
- Wu J, Huang L, Liu J, Ming M, Li Q G, Ding J D. *Chinese J Chem*, 2005, 23: 330 ~ 333
- Ni B, Chang M, Duschl A, Lanyi J, Needleman R. *Gene*, 1990, 90(1): 169 ~ 172
- Liu Jia(刘嘉), Ming Ming(明明), Huang Li(黄力), Li Qingguo(李庆国), Ding Jiandong(丁建东). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2002, 60

(12):2209 ~ 2213

17 Becher B M, Cassim J Y. *Prep Biochem*, 1975, 5: 161 ~ 178

18 Li Qingguo(李庆国), Wang Hui(王晖), Song Dajie(宋大杰), Zhao Wei(赵炜), Xu Deqiang(徐德强), Huang Weida(黄伟达). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 1997, 29(5): 517 ~ 520

19 Lanyi J K. *Annu Rev Physiol*, 2004, 66: 665 ~ 688

A MEMBRANE PROTEIN/POLYMER COMPOSITE FILM WITH PHOTOCHROMIC RESPONSE

MA Dewang¹, MING Ming¹, HONG Jie², WU Jia¹, LI Qingguo³, HUANG Weida², DING Jiandong¹

(¹ Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of Chinese Ministry of Education, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

(² Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

(³ Department of Physiology and Biophysics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract A gene of a membrane protein, Archaerhodopsin-4 (AR4), was expressed into an *H. salinarum* strain L133, which is negative for synthesis of *bacterio-opsin* and whose lipid environment is free of carotenoid. The carotenoid has three characterized absorption peaks at 480, 508 and 544 nm which cover the absorption peak of membrane protein AR4 at 5700 nm at the ground state. In contrast to the wide-type AR4 isolated from the conventional strain *H. sp. xz515*, the recombinant AR4 removed the binded carotenoid. The underlying photochromic properties of the recombinant AR4 was thus improved, and the contrast between M₄₁₀ intermediate and ground state was greatly enhanced. Composite films were further made by embedding the recombinant AR4 into poly(vinyl alcohol) (PVA). By enhancing its pH, the decay of the M intermediate was slowed down. A simple pattern recording as an optical information storage material was also realized by the composite films. During this process, light was illuminated into the composite covered with a mask, and the pattern in the mask was observed even after removing the mask. Hence, this paper demonstrates that the polymer technique and gene engineering could be combined to prepare information materials with both the biological activities of proteins and the good processing properties of polymers.

Key words Bacteriorhodopsin, Archaerhodopsin, Poly(vinyl alcohol), Information storage, Gene engineering