

# 细菌视紫红质多重突变体结构变化 及其中间态的寿命

金卫华<sup>1</sup>, 曹军卫<sup>1</sup>, 王友亮<sup>1</sup>, 熊贵光<sup>2</sup>, 姚保利<sup>3</sup>, 雷 铭<sup>3</sup>

(1. 武汉大学生命科学学院, 2. 物理科学与技术学院, 武汉 430072;  
3. 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 710086)

**摘要** 采用基因定点突变的方法, 构建了细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin, BR)的3种突变体蛋白, 即单突变体 BR<sub>E194Q</sub>、三突变体 BR<sub>I119T/T121S/A126T</sub> 和四突变体 BR<sub>I119T/T121S/A126T/E194Q</sub>。测定了突变体和野生型 BR 在水溶液和聚乙烯醇(PVA)膜中的紫外-可见吸收光谱和拉曼光谱, 采用显微视频录像技术记录了 PVA 膜中野生型和3个突变体样品的 M 态寿命。与野生型 BR 相比较, 在水溶液中, 单突变体的可见吸收光谱的最大吸收峰发生了轻微红移, 三突变体和四突变体的最大吸收峰则分别发生了 11.0 和 12.0 nm 的明显蓝移。在 PVA 膜中, 3个突变体 BR 的可见吸收光谱的最大吸收峰均发生蓝移, 四突变体 BR 的最大吸收峰为 557 nm, 蓝移达 15.0 nm。四突变体 BR 在水溶液中的共振拉曼光谱不仅表现有与 M 态特征相关的 1567 和 1573 cm<sup>-1</sup> 谱带, 还有 L 态特征带 1334 cm<sup>-1</sup> 及 N 态特征带 1200, 1328, 1530 和 1549 cm<sup>-1</sup>。在 PVA 膜中的样品与在水溶液中的比较, 四突变体共振拉曼光谱的 1334 和 1549 cm<sup>-1</sup> 带消失, 同时 1187 cm<sup>-1</sup> 带的强度下降。显微视频录像技术记录的 PVA 膜中样品的 M 态寿命表明, 野生型 BR 的 M 态寿命最短, 单突变体的 M 态寿命小于 1.0 s, 三突变体的寿命为 3.0 s, 四突变体的寿命为 2.0 s。

**关键词** 细菌视紫红质; 突变体; 共振拉曼光谱; 聚乙烯醇

**中图分类号** O62; Q632

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2007)12-2321-06

细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)是盐沼盐杆菌(*Halobacterium salinarium*)产生的一种细胞膜蛋白, 由 248 个氨基酸残基和一个生色团视黄醛分子组成, 其肽链组成 7 个跨膜的  $\alpha$  螺旋(A, B, C, D, E, F 和 G)和分布于质膜两侧的环状结构, 视黄醛分子通过 Schiff 碱基与 BR 蛋白的第 216 位 Lys 的  $\epsilon$  氨基共价结合。BR 吸收光能后, 将质子泵出细胞外, 形成膜内外的质子梯度, 从而把光能转化为化学能。同时, BR 在经过一系列中间态 K<sub>610</sub>→L<sub>550</sub>→M<sub>410</sub>→N<sub>560</sub>→O<sub>640</sub>后, 重新回到基态 BR<sub>570</sub>, 发色团则经历了从全反式→13-顺式→全反式的构型变化<sup>[1]</sup>。此外, 也可以从 O<sub>640</sub> 态进入分支光循环, 经过 P<sub>490</sub>→Q<sub>380</sub> 态返回到基态 BR<sub>570</sub>。

近年来, BR 的分支光循环过程受到了广泛的关注。在室温下无蓝光的环境中, Q 态非常稳定, 存储在 Q 态的资料可保存数年<sup>[2]</sup>, 所以, 利用 BR 的分支光循环于立体信息存储中, 具有无可比拟的优势。但是, 将 BR 的分支光循环特性应用于 3D 信息的存储中, 还存在一些问题, 如希望 O 态有短的形成时间和长的衰退时间; 在 O→P 态转变过程中具有较高的量子效率、高的 P→Q 态转化效率及长的 Q 态寿命等<sup>[2]</sup>。因此需要从分子水平上对 BR 的结构进行改造, 如基因的定点突变等, 以期改进其功能。

在 BR 的质子通道内分布着多个重要的氨基酸残基, 其中 E194 在 D 螺旋上, 因为将它突变为非羧基性氨基酸残基后, 减慢了质子的释放, 所以认为它是一个非常重要的质子释放基团。有研究表明, 质子从 D85 传递给 E194, 是发生在光循环中间体 O<sub>640</sub> 态向基态 BR<sub>570</sub> 转变的过程中, 而 E194 对 D85 的 pK<sub>a</sub> 值有很大影响; 相比之下, 和 E194 处于同一位置的 E204(同为质子释放基团)对 D85 的作用却很弱<sup>[3]</sup>, 所以 E194 对 BR 的分支光循环中质子的传递和中间态寿命是极其重要的。此外, 还有研究证明

BR 单突变体 E194Q 比野生型 BR(WT-BR) 具有更高的 O 态寿命和量子效率. Wise 等<sup>[2]</sup> 采用半随机诱变的方法得到 BR 三突变体 H19T/T121S/A126T, 其 Q 值比其它突变体最高的 Q 值还高 50%.

由于分支光循环中间态寿命极短, 难以测量; 而 M 态寿命较长, 并且 M 态可以直接回到基态, 也可以经 N 和 O 态后进入分支光循环, 所以 M 态特征的改变必然会影响到分支光循环各中间态的寿命. 因此 M 态的寿命可以作为分支光循环的一个参考指标.

基于以上考虑, 为了得到性能更适合于作为 3D 存储器材料的 BR 蛋白, 本研究通过基因的定点突变, 构建了 BR 的 3 个突变体: 单突变体 (BR<sub>E194Q</sub>)、三突变体 (BR<sub>H19T/T121S/A126T</sub>) 和四突变体 (BR<sub>H19T/T121S/A126T/E194Q</sub>), 测定并分析比较了野生型 BR 和 3 个突变体在水溶液和 PVA 薄膜中的紫外-可见吸收光谱和共振拉曼光谱, 并测量了野生型和突变体 BR 在 PVA 膜中的 M 态寿命, 为进一步研究其对分支光循环的影响奠定了基础.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

盐沼盐杆菌液体生长培养基(HB)、再生半固体培养基、再生固体培养基、大肠杆菌固体培养基和液体培养基、盐沼盐杆菌原生质体形成液和稀释液的配制, 均参照 Cline 等<sup>[4]</sup> 的方法进行.

T<sub>4</sub>DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、PyrDNA 聚合酶、DNA 酶 I、RNA 酶、限制性内切酶 *Bam*H 和 *Hind*、DNA 和蛋白质的分子量标记均购于 TaKaRa 公司; 四环素购于上海生物工程技术服务公司; PEG-600 和新生霉素购于 Sigma 公司; DNA 回收试剂盒购于 MBI 公司; 聚乙烯醇(PVA)购于重庆化学试剂玻璃仪器公司; HEPES(*N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸)为 Sigma 公司产品; 普通载玻片购于中国机械进出口公司上海分公司, 规格 25.4 mm × 76.2 mm, 厚度 1.0 mm; 其它试剂和药品均为国产分析纯.

*bop* 基因、盐沼盐杆菌(*H. salinarium*) S<sub>9</sub> 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH<sub>5α</sub> 为本实验室保存; 盐沼盐杆菌(*H. salinarium*) L<sub>33</sub> 为浙江大学吴敏教授惠赠; 嗜盐菌和大肠杆菌的穿梭质粒表达载体 pXL-NovR 为 Richard Needleman 教授(Wayne State Univ. USA)惠赠.

采用 Hitachi-2010 型紫外-可见分光光度计进行紫外-可见吸收光谱测定; 在 RM 1000 型 Laser Confocal Raman Microspectroscopy(英国, Renishaw 公司)上测定共振拉曼光谱; 用自行研制的显微视频系统测量 M 态寿命.

### 1.2 *bop* 基因的定点突变

采用重叠延伸 PCR<sup>[5]</sup> 的方法进行 *bop* 基因的定点突变. PCR 反应使用的引物如下:

*bop* 基因上游引物 R: 5'CCGG GGATCC GACGTGAAGATGGGGCT3' (框内为 *Bam*H 酶切位点);  
*bop* 基因下游引物 F: 5'TC AAGCTT GTGCGATCAGTCGCTGGTC3' (框内为 *Hind* 酶切位点); *bop*<sub>G580C</sub> 突变下游引物 FM1: 5'GCACCTT G GCTGCCGATCAGCCACACG3' (框内为突变位点); *bop*<sub>G580C</sub> 突变上游引物 RM1: 5'CGTGTGGCTGATCGGCAGC C AAGGTGC 3' (框内为突变位点); *bop*<sub>T395C/A400T/G415A</sub> 突变下游引物 FM2: 5'GTG T GCCGACCAGGCCGG A CCCG G TCA3' (框内为突变位点); *bop*<sub>T395C/A400T/G415A</sub> 突变上游引物 RM2: 5'TGA C CGGG T CCGGCCTGGTCGGC A CAC3' (框内为突变位点).

首先通过重叠延伸 PCR 在 *bop* 基因上分别引入三联突变 T395C/A400T/G415A 和单突变 G580C, 然后在三联突变的基础上, 引入单突变 G580C 形成四突变体 T395C/A400T/G415A/G580C. 其中 PCR1 和 PCR2 的产物为突变后的 *bop* 基因上下游片段, PCR3 的产物为突变后 *bop* 基因. PCR1 和 PCR2 反应条件相同: 95 °C, 5 min; 94 °C, 50 s; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 30 个循环; 72 °C 保温 5 min. PCR3 反应条件: 95 °C, 5 min; 94 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 80 s; 30 个循环; 72 °C 保温 10 min. PCR 诱变过程中使用高保真 *Pyr*DNA 聚合酶.

### 1.3 重组质粒载体的构建和突变 *bop* 基因的检测

将突变的 *bop* 基因和穿梭质粒载体 pXL-NovR 分别经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 用 T<sub>4</sub>DNA 连接

酶连接, 转化大肠杆菌 DH<sub>5</sub> $\alpha$ , 在四环素(质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 固体培养基平板上筛选阳性转化子, 经过 PCR 和双酶切鉴定后由北京三博远志公司测序. 提取测序正确的重组质粒, 转化盐沼盐杆菌 L<sub>33</sub>, 转化方法参考文献[4,6]. 在含有新生霉素(0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 HB 固体培养基平板上筛选 L<sub>33</sub> 阳性转化子, 参考文献[7]的方法提取嗜盐菌质粒, 并经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后, 由北京三博远志公司测序.

#### 1.4 盐沼盐杆菌 L<sub>33</sub> 转化子的培养和紫膜的提取

盐沼盐杆菌 L<sub>33</sub> 转化子采用改进的 Oesterhelt 等<sup>[8]</sup>的方法培养, 紫膜参考 Xu 等<sup>[9]</sup>的方法提取.

#### 1.5 BR 水溶液及 BR/PVA 复合膜的制备

将野生型 BR(WT-BR)及其突变体 BR 干粉溶于去离子水中, 终质量浓度为 22 mg/mL, pH 为 7.0; BR/PVA 复合膜参考文献[10]的方法制备.

#### 1.6 光谱测定

紫外-可见吸收光谱和共振拉曼光谱均在室温条件下测定, 共振拉曼光谱测定采用 Ar<sup>+</sup> 激光器, 激发光波长为 514.5 nm, 狭缝宽度为 50  $\mu\text{m}$ , 扫描范围为 200 ~ 3200  $\text{cm}^{-1}$ , 输出功率为 4.8 mW. 在室温下连续扫描 5 次后取平均值.

#### 1.7 M 态寿命测定

先用 650 nm 的激光通过显微物镜聚焦到 BR 薄膜上来激发样品, 经过约 1 min, 可在激光作用点处产生稳定的 M 态, 其颜色与 B 态明显不同, 形成一个记录光斑. 然后关掉激光, 开始录像记录光斑随时间的衰减过程, 分析记录光斑强度衰减到起始强度的 1/e 的时间, 即为该样品的 M 态寿命. 实验中激发光波长为 650 nm, 是因为本测量系统的半导体激光器的波长是 650 nm 红光. BR 在 650 nm 处有吸收, 可以激发 BR 光循环, 产生 M 态.

## 2 结果与讨论

### 2.1 *bop* 基因的定点突变、重组质粒载体及突变体的鉴定

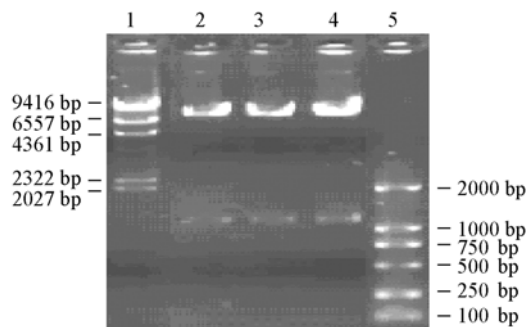
按上述方法构建重组质粒载体并转化盐沼盐杆菌 L<sub>33</sub>, 提取 L<sub>33</sub> 转化子的质粒后, 用 *Bam*H I, *Hind* III 双酶切, 电泳鉴定如图 1 所示, 均得到约 1200 bp 的带, 这与 WT-BR 的分子量相符. 同时, *bop* 基因突变体的测序结果表明, 与突变目的一致.

### 2.2 紫外-可见吸收光谱

用 BR 水溶液样品测定吸收光谱. 与 WT-BR 比较, 单突变体的最大特征吸收峰在 574 nm 处, 发生了轻微红移(2 nm), 这与其水溶液带较深的蓝色是相符的; 三突变体和四突变体的最大吸收峰则分别发生了 11 和 12 nm 的蓝移, 说明突变以后, BR 的三级结构发生了变化, 视黄醛分子的微环境受到了干扰. 突变体 BR 的 PVA 复合膜的紫外-可见吸收光谱与野生型样品的相比, 3 种突变体蛋白的最大特征吸收峰均发生了不同程度的蓝移, 其中四突变体的吸收峰为 557 nm, 蓝移程度最大, 达到 13 nm. 这是由于在干燥的 BR/PVA 复合膜中, 水分子减少, 使蛋白质的活动空间和视黄醛的构型变化受到限制, 从而影响了 Schiff 碱基的活动<sup>[11]</sup>.

### 2.3 BR 水溶液的共振拉曼光谱

WT-BR 及 3 种突变体水溶液的共振拉曼光谱如图 2 所示. 其中 WT-BR 的共振拉曼光谱与文献[12,13]报道的 BR<sub>570</sub> 共振拉曼光谱基本相符, 具有典型的 BR 拉曼谱带, 由于共振拉曼光谱是在暗环



**Fig. 1** Agarose gel electrophoresis of endonucleases-digested plasmid pXLNovR-*bop*<sub>G580C</sub>, pXLNovR-*bop*<sub>T395C/A400T/G415A</sub> and pXLNovR-*bop*<sub>T395C/A400T/G415A/G580</sub>

Lane 1: DNA marker,  $\lambda$ -*Hind* III digest; lane 2: pXLNovR-*bop*<sub>G580C</sub>/*Bam*H I + *Hind* III; lane 3: pXLNovR-*bop*<sub>T395C/A400T/G415A</sub>/*Bam*H I + *Hind* III; lane 4: pXLNovR-*bop*<sub>T395C/A400T/G415A/G580</sub>/*Bam*H I + *Hind* III; lane 5: DNA marker, DL2000.

境中测定的, 因此, BR 既有光适应型又有暗适应型, 所以基态和各中间态的指纹会同时出现. 与 WT-BR 相比, 3 个突变体均出现了明显的 1187 和 1564  $\text{cm}^{-1}$  带.

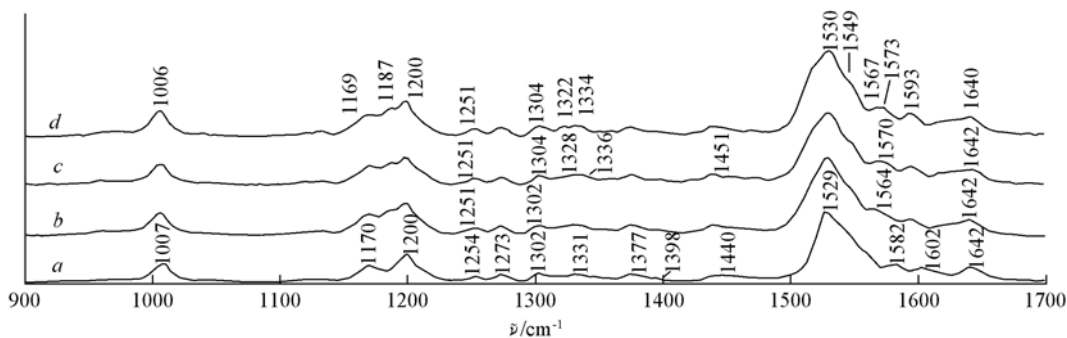


Fig. 2 Resonance Raman spectra of WT-BR and BR mutants in solution

a. WT-BR; b. BR<sub>E194Q</sub>; c. BR<sub>H119T/T121S/A126T</sub>; d. BR<sub>H119T/T121S/A126T/E194Q</sub>.

Marcus 等<sup>[13]</sup>在测定暗适应的 BR<sub>500</sub> 时, 能够清楚地分辨出 1187  $\text{cm}^{-1}$  带, 而在光适应光谱中却很难分辨出来. 此带为 N 态的典型特征带<sup>[14]</sup>. 而在本研究中的 3 个突变体的光适应光谱中, 此带均表现得更加明显. 说明突变后, 使生色团 C13 的微环境发生了变化, 推测导致了 N 态的积累明显增加. 此外, 三突变 BR<sub>H119T/T121S/A126T</sub> 和四突变体 BR<sub>H119T/T121S/A126T/E194Q</sub> 的 1549  $\text{cm}^{-1}$  带明显, 而野生型与单突变体 BR<sub>E194Q</sub> 在此处没有发现明显的带, 此带为 N 态中双烯键的伸缩振动<sup>[13]</sup>. 另外, 1328 和 1530  $\text{cm}^{-1}$  都是 N 态特征带, 这些带的出现, 说明突变体有比野生型稳定的 N 态. 在典型的 N 态中, 三突变体和四突变体与单突变体和 WT-BR 还有一个非常不同之处, 就是在单突变体光谱中有 1331  $\text{cm}^{-1}$  带, 而在三、四突变体中分别有 1328 和 1322  $\text{cm}^{-1}$  带. 在四突变体和三突变体中还分别发现了 1336 和 1334  $\text{cm}^{-1}$  带, 这两条带对应为 L 态特征带<sup>[15]</sup>, 而在野生型与单突变体 BR<sub>E194Q</sub> 中均未发现这些特征带.

1564  $\text{cm}^{-1}$  为 M 态特征带<sup>[13]</sup>, 在 WT-BR 的光谱中未测出此带, 而在突变体的光谱中均测出此带, 说明在这种测试环境中, 突变体的 M 态较稳定. 但尽管这 3 种突变体在此处都有特征带, 它们之间也有很大区别, 单突变体为单一的 1564  $\text{cm}^{-1}$  带, 三突变体红移至 1570  $\text{cm}^{-1}$ , 四突变体在此处为明显的 1567 和 1573  $\text{cm}^{-1}$  带. 推测 1567 和 1573  $\text{cm}^{-1}$  为 M 态的两种不同组分 M1 和 M2 的 C=C 伸缩振动, 在以前的研究中均无类似的发现.

在 3 个突变体的拉曼光谱中, 均未发现 1582 和 1602  $\text{cm}^{-1}$  带, 但出现了 1593  $\text{cm}^{-1}$  带. 与 WT-BR 的 1642  $\text{cm}^{-1}$  带相对应的四突变体出现了 1640  $\text{cm}^{-1}$  带, 但其频率明显降低, 此带为 Schiff 碱 C=N<sup>+</sup>H 的拉伸振动, 其频率的降低, 说明 Schiff 碱基处于质子化状态<sup>[16]</sup>. 此外, 突变体的拉曼光谱中未发现 1582  $\text{cm}^{-1}$  带, 而 1602  $\text{cm}^{-1}$  带则移至 1593  $\text{cm}^{-1}$  带. 相对应于 WT-BR 的 1302  $\text{cm}^{-1}$  带, 在四突变体中变化为 1304  $\text{cm}^{-1}$  带. 1100 ~ 1400  $\text{cm}^{-1}$  区域为拉曼光谱的指纹区域受 BR 结构变化的影响最为敏感. 以上结果表明, 突变后的 BR 蛋白及其视黄醛构型上的变化引起了某些中间态的变化. 综合比较水溶液中 4 个样品的拉曼光谱可以发现, 四突变体 BR<sub>H119T/T121S/A126T/E194Q</sub> 除了有 M 态的累积外, 还有 L 态及 N 态的累积.

## 2.4 BR 在 PVA 膜中的拉曼光谱

图 3 为 WT-BR 及 3 种突变体 BR 在 PVA 薄膜中的共振拉曼光谱. 从图 3 可以看出, 各种突变体和 WT-BR 在指纹区的光谱图带型没有发生明显变化, 但与图 2 相比, 都出现了较弱的 1187  $\text{cm}^{-1}$  和较强的 1564  $\text{cm}^{-1}$  带, 且四突变体的 1564  $\text{cm}^{-1}$  带的拉曼强度明显高于其它 3 种. 由此可见, 在 PVA 中, 确实使 M 态寿命延长. 此外, 四突变体在 1448  $\text{cm}^{-1}$  处的强度则明显降低, 相对略有红移; 4 种蛋白的拉曼光谱上均出现了 1582, 1600, 1620 和 1642  $\text{cm}^{-1}$  带, 其中 1582 和 1600  $\text{cm}^{-1}$  带在不同的样品之间有相对较小的变化, 而 1620  $\text{cm}^{-1}$  带在四突变体中的强度有所增加, 此带为 C=N 未质子化的伸缩振动, 而在图 2 中, 各谱带中均未出现该带. 说明在 PVA 膜中, 水分子的减少, 使与 Schiff 碱基共价结合的质子数减少, 视黄醛的构型也随之发生了改变<sup>[11]</sup>.

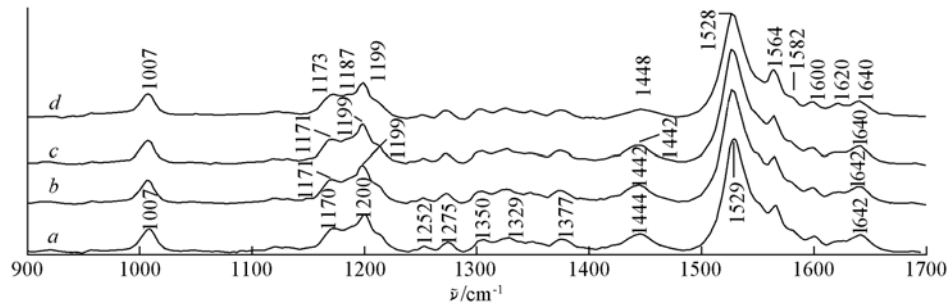


Fig. 3 Resonance Raman spectra of WT-BR and BR mutants in PVA films

a. WT-BR; b. BR<sub>E194Q</sub>; c. BR<sub>H119T/T121S/A126T</sub>; d. BR<sub>H119T/T121S/A126T/E194Q</sub>.

## 2.5 M 态寿命

为了方便使用视频显微系统测量 BR 的寿命, 选用了不改变 BR 光学性质、并能使其 M 态寿命延长的 PVA 作为载体介质<sup>[17]</sup>, 制成 BR 薄膜. 图 4 为光激发前后样品的变色照片, 其中 WT-BR 的 M 态寿命很短, 观察不到光致变色现象, 激光作用前后, 样品的颜色几乎没有发生变化, 说明 WT-BR 在 PVA 膜中的寿命很短, 视频显微系统无法观测到这样快的过程, 单突变 E194Q 的 M 态寿命小于 1.0 s, 三突变体的 M 态寿命为 3.0 s, 四突变体的 M 态寿命为 2.0 s.

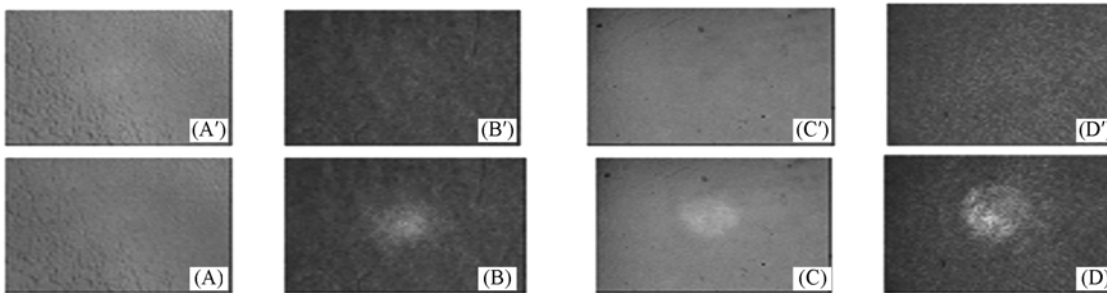


Fig. 4 Photochromic films of WT-BR and BR mutants

(A'), (B'), (C') and (D') were photos of WT-BR, BR<sub>E194Q</sub>, BR<sub>H119T/T121S/A126T</sub> and BR<sub>H119T/T121S/A126T/E194Q</sub> in PVA films before laser excited, respectively; (A), (B), (C) and (D) were photos after laser excited correspondingly.

在 PVA 薄膜中, 虽然 4 种蛋白的浓度相同, 四突变体 BR 的 1564  $\text{cm}^{-1}$  带的强度却明显高于其它 3 个样品, 但显微视频记录表明, 四突变体的 M 态寿命反而比三突变体的短. 由此可见, 四突变体的 M 态寿命并不是在单突变体和三突变体的基础上的简单累积, 其中必然涉及到 N 态、O 态以及分支光循环中的 P 态和 Q 态的寿命或量子效率的改变, 因为只有这些中间态发生变化后, 才会影响从 M 态衰减至基态的时间. 曾有研究发现, 单突变体 BR<sub>E194Q</sub> 对 BR 的 M 态累积作用的影响是很小的<sup>[2]</sup>, 这与水溶液中 BR<sub>E194Q</sub> 突变体与 WT-BR 的拉曼光谱变化一致. 在 E194Q 突变体中出现了强度较弱的 1564  $\text{cm}^{-1}$  带, 而 WT-BR 中无此带. 另外, 已有三突变体 BR<sub>H119T/T121S/A126T</sub> 的 M 态寿命比 WT-BR 长的报道<sup>[16]</sup>.

比较四突变体 BR<sub>H119T/T121S/A126T/E194Q</sub> 在水溶液和 PVA 膜中的共振拉曼光谱发现, 在 PVA 膜中, 指纹区的 1334 和 1332  $\text{cm}^{-1}$  带消失, 说明在 PVA 膜中 L 态不稳定. 另外, BR/PVA 复合膜的 1549  $\text{cm}^{-1}$  带几乎消失, 说明在 PVA 膜中, N 态中双烯键振动减小, 从而影响视黄醛的异构化, 进而影响 O 态的形成时间和寿命. 有研究结果表明, 单突变体 BR<sub>E194Q</sub> 可以显著增加 O 态的累积, 三突变体 BR<sub>H119T/T121S/A126T</sub> 具有比 WT-BR 更长的 O 态寿命<sup>[3]</sup>, 从拉曼光谱可以看出, 4 个样品在 PVA 膜中相对结构变化不大, 推测在 PVA 膜中, 由于 N 态的不稳定性, 可能有 O 态形成量的增加和寿命的改变.

本实验中构建的 3 个突变体 BR 与野生型 BR 在结构上有明显的差异. BR 蛋白在水溶液中的共振拉曼光谱与在 PVA 膜中显然不同, PVA 能影响 BR 的光化学循环中间体 L, M 和 N 态的寿命. 能否影响分支光循环的中间态 O, P 及 Q 态寿命和量子效率, 以及四突变体 (BR<sub>H119T/T121S/A126T/E194Q</sub>) 的分支光循环中某些特性, 在单突变体 E194Q 和三突变体 (BR<sub>H119T/T121S/A126T</sub>) 基础上有无累积效应, 还需要进一步通过实验证实.

## 参 考 文 献

- [1] Rouhani S., Cartailier J. P., Facciotti M. T., *et al.*. J. Mol. Biol. [J], 2001, **313**: 615—628
- [2] Wise K. J., Gillespie N. B., Stuart J. A., *et al.*. Trends Biotech. [J], 2002, **20**(9): 387—394
- [3] Lazarova T., Sanz C., Querol E., *et al.*. Biophys. J. [J], 2000, **78**: 2022—2030
- [4] Cline S. W., Lam W. L., Charlebois R. L., *et al.*. Can. J. Microbiol. [J], 1989, **35**: 148—152
- [5] Sambrook J., Russel D. W.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆实验指南)[M], Translated by HUANG Pei-Tang(黄培堂), Beijing: Science Press, 2002: 1109—1113
- [6] Cline S. W., Frod Doolittle W.. J. Bact. [J], 1987, **169**(3): 1341—1344
- [7] Birnboim H. C.. Methods Enzymol. [J], 1983, **100**: 243—255
- [8] Oesterhelt D., Stoerkenius W.. Methods Enzymol. [J], 1974, **31**: 667—678
- [9] XU Bing(徐兵), CHEN De-Liang(陈德亮), HU Kun-Sheng(胡坤生). Prog. Biochem. Biophys. (生物化学与生物物理进展)[J], 2002, **29**(5): 827
- [10] Lensu L., Frydrych M., Parkkinen J., *et al.*. Opt. Mater. [J], 2004, **27**: 57—62
- [11] Hildebrandt P., Stockburger M.. Biochem. [J], 1984, **23**: 5539—5548
- [12] Mendelsohn R.. Nature [J], 1973, **243**: 22—24
- [13] Marcus M. A., Lewis A.. Biochem. [J], 1978, **22**: 4722—4735
- [14] Coleman M., Nilsson A., Russell T. S., *et al.*. Biochem. [J], 1995, **34**: 15559—15606
- [15] Sonar S., Martin T., Rath P., *et al.*. J. Biochem. [J], 1994, **269**: 28851—28858
- [16] SONG Jing-Jiao(宋景娇), ZHONG Sheng(钟声), ZHANG Yue(张悦), *et al.*. Prog. Biochem. Biophys. (生物化学与生物物理进展)[J], 2005, **32**(6): 529—534
- [17] Gross R., Izgi K. C., Birge R. R.. SPIE[J], 1992, **1662**: 186—196

## Structure Change and Intermediate's Lifetime of Bacteriorhodopsin and Its Multipoint Mutants

JIN Wei-Hua<sup>1</sup>, CAO Jun-Wei<sup>1\*</sup>, WANG You-Liang<sup>1</sup>, XIONG Gui-Guang<sup>2</sup>, YAO Bao-Li<sup>3</sup>, LEI Ming<sup>3</sup>

(1. College of Life Sciences, 2. School of Physics and Technology, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

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

**Abstract** The site-specific residue replacements E194Q, I119T/T121S/A126T and I119T/T121S/A126T/E194Q were introduced into *bop* gene and expressed in *halobacterium salinarium* L<sub>33</sub> with the vector pXL-NovR, respectively. The photoreaction of three mutants BR<sub>E194Q</sub>, BR<sub>I119T/T121S/A126T</sub> and BR<sub>I119T/T121S/A126T/E194Q</sub> (the quadruple mutant) of bacteriorhodopsin(BR) and WT-BR(wild type BR) was investigated in solution and in PVA films at pH = 7.0 by UV-Vis absorption spectrum and Resonance Raman spectra. The lifetime of M intermediate of the three mutants in PVA films were recorded by employing photomicrography. In distilled water, the visible absorption maximum of BR<sub>I119T/T121S/A126T</sub> and BR<sub>I119T/T121S/A126T/E194Q</sub> mutants were blue shifted notably by 11 and 12 nm respectively and the BR<sub>E194Q</sub>'s was weakly red shifted in comparison with WT-BR. In PVA film, BR<sub>I119T/T121S/A126T/E194Q</sub> mutant caused a blue shift of the visible absorption spectrum from 568 to 557 nm. The characteristic bands of Resonance Raman spectra of BR<sub>I119T/T121S/A126T/E194Q</sub> mutant were observed at 1334 cm<sup>-1</sup> of the L intermediate, 1200, 1328, 1530 and 1549 cm<sup>-1</sup> of the N intermediate and 1567 and 1573 cm<sup>-1</sup> of M intermediate in solution. However, the 1334 and 1549 cm<sup>-1</sup> bands of the quadruple mutant disappeared and the intensity of 1187 cm<sup>-1</sup> band decreased in PVA film. The lifetime of M intermediate of BR<sub>E194Q</sub> was less than 1.0 s by photomicrography. The lifetime of M intermediates of BR<sub>I119T/T121S/A126T</sub> and BR<sub>I119T/T121S/A126T/E194Q</sub> were 3.0 s and 2.0 s, respectively.

**Keywords** Bacteriorhodopsin(BR); Mutant; Resonance Raman spectrum; PVA (Ed.: H, J, Z)