

BR_{D96N} 光调制吸收增强现象的实验研究^{*}

杨文正¹⁾ 侯 洵¹⁾²⁾ 陈 烽²⁾ 杨 青¹⁾

¹⁾ (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)

²⁾ (西安交通大学电子科学与技术系, 西安 710049)

(2003 年 1 月 3 日收到 2003 年 5 月 8 日收到修改稿)

通过光谱响应特性实验和记录/读出图像实验,研究了基因变异型细菌视紫红质(BR_{D96N})分子膜对单色光的光调制特性.发现 BR_{D96N} 分子膜在 550nm—600nm 范围内对调制光有吸收增强的现象,且对此范围内不同波长的单色光其调制程度有差异.利用曲线拟和方法发现 550nm—600nm 吸收增强的变化过程分为快过程和慢过程,其对应的时间常数分别为 30s 和 5min.利用强度调制器的吸收强度与图像灰度之间的关系,分析了 560nm—600nm 范围内出现图像反转的实验现象.

关键词: 细菌视紫红质 D96N 分子膜, 光谱响应, 吸收增强现象, 图像反转现象

PACC: 7865, 8170

1. 引 言

目前人们发现嗜盐菌的细胞膜上有一种光敏蛋白质分子-细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR),它由 248 个氨基酸和 1 个生色团-视黄醛组成,具有光驱动质子泵功能^[1,2].当受光照时,分子中的生色团-视黄醛在光刺激下产生快速的从全反到 13 顺的光异构化,然后通过热弛豫,历经 K, L, M, N, O 等中间态再回到基态 B,完成一次光循环.室温下一个光循环约十几个毫秒完成,在此光循环过程中,先后形成的一系列中间产物,也称为中间态.它们都有不同的吸收光谱、寿命及独特的热稳定性,并且部分中间态在其对应的吸收峰波长的光激励下能可逆地通过光化学反应直接返回到基态,例如 M 态分子在 412nm 光作用下可以直接返回到基态.如图 1 所示为常用的一个 BR 光循环模型.生物分子通常被认为是非常脆弱且化学性质不稳定,然而 BR 分子却是一个例外,即使在 140℃ 的高温、失水状态以及 pH 很低的环境下仍具有光活性和生物活性.而且它的使用光谱范围宽(400—700nm)、具有高的空间分辨率(~5000lines/mm)、高感光灵敏度(30—80mJ/cm²)、快的反应速度(~50μs)、高量子转化效率(~65%)、热和化学稳定性

好、使用寿命长等特点^[2,3].而通过基因工程,将 BR 分子进行生物改性,使 BR 材料在光信息处理领域中的应用发挥更大的潜力.例如利用定位基因突变法制备的 BR-D85N, BR-D96N 等基因变异体相对野生的 BR 材料(BR-WT)在信息记录方面具有优异的特性^[4,5].

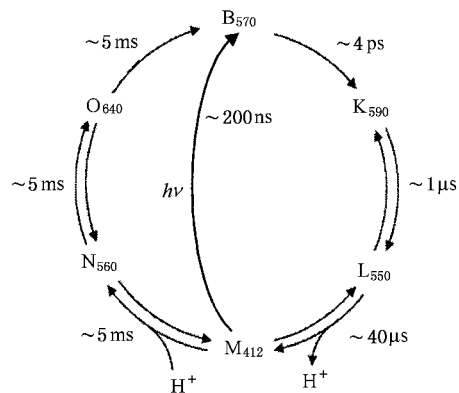


图 1 BR 分子光循环

BR 分子膜在光诱导下,其折射率系数 $\Delta n(\lambda, t)$ 和吸收变化量 $\Delta A(\lambda, t)$ 是反映 BR 材料的信息记录介质特性的两个重要的参数^[4].BR 分子膜在受激发光作用前后,对不同波长的单色光表现出不同程度的吸收,相当于一个强度调制器件^[6].当输入光进入 BR 调制元件时,由于输入光频率、强度、振幅等自身的因

^{*} 国家自然科学基金(批准号 69907006)和中国科学院创新方向性项目(批准号 KGCX2-401)资助的课题.

素而改变了 BR 调制元件的特性(BR 分子分布的改变使 BR 膜呈现不同的光学特性),从而实现自调制形成输出光束,其输入光强和输出光强之间呈现非线性关系^[6].这种良好的非线性光学特性使得 BR 膜可以用作一种光调制器件.本文着重讨论 BR 分子膜在受光调制下,其吸收变化量 $\Delta A(\lambda, t)$ 与记录图像之间的关系.

2. 理论分析

在不考虑外界杂散光作用下,根据比尔-朗伯吸收定律,吸收变化量为

$$\Delta A(\lambda) = -\log_{10}(I_{\lambda}/I_{0\lambda}), \tag{1}$$

其中 $I_{0\lambda}$ 与 I_{λ} 分别为激发光作用前后,某波长单色光经过 BR 光调制后的输出光强度.由于 BR 分子膜在受到激发光的激励后,伴随着弛豫过程,BR 分子在中间态上的分布会发生变化,对作用在其上的不同波长的调制光将存在吸收的差异.据此通过测试 $\Delta A(\lambda)$ 可以得到 BR 分子膜受光激励前后,在调制光作用下的光谱变化情况.

对于振幅或强度调制器,其图像的灰度值可定义为

$$D = -\log_{10} T, \tag{2}$$

D 为灰度,是透射率的另一种表述方式.透射率也可以定义为

$$T(\lambda) = I_{\lambda}/I_{0\lambda}, \tag{3}$$

因此在空间均匀的入射光信号 I_0 条件下,调制器件某区域读出图像的灰度值 D 可用吸收变化量 $\Delta A(\lambda)$ 表示.

因此对同一波长的吸收强度的差异可表现为 BR 分子膜对该波长单色光的强度调制作用.从读出图像的角度上说,调制光相当于图像的读出光,BR 分子膜对不同波长读出光的调制强度的差异,使得记录在 BR 分子膜上的图像的不同像素表现为不同的灰度值,图像具有不同的对比度.若认为 BR 分子膜对光吸收强的区域,读出图像表现为高的灰度值,而对光吸收弱的区域,读出图像表现为低的灰度值.为方便讨论,如果仅用二值化的“ $D_{\max} = 1$ ”和“ $D_{\min} = 0$ ”两个灰度值表示,则 BR 分子膜不同像素对某波长读出光的吸收强弱的差异就表现为二值化“1”和“0”的灰度图像.

若对某波长调制光,在经过 t_1 和 t_2 的两个时刻,BR 分子膜的某区域的吸收变化量 ΔA 和灰度值 D 之间的关系存在以下三种情况: $\Delta A(t_1) < \Delta A(t_2)$, $D(t_1) < D(t_2)$; $\Delta A(t_1) \approx \Delta A(t_2)$, $D(t_1) \approx D(t_2)$; $\Delta A(t_1) > \Delta A(t_2)$, $D(t_1) > D(t_2)$.说明此调制光波长下,BR 分子膜的记录图像随时间($0 \rightarrow t_1 \rightarrow t_2 \rightarrow t$)有一个图像反转的过程.

3. 实验内容

由于从 BR 分子膜的吸收光谱的变化上可以反映记录图像灰度的变化趋势.首先进行光谱响应测试实验,然后通过图像记录实验验证 BR 分子膜的光谱响应特性.实验采用的样品为经基因修饰的高分子聚合的细菌视紫红质膜 BR_{D96N},分子膜厚度 $d = 30\mu\text{m}$,夹在两层石英玻璃中间,样品基态(B 态)最大吸收波长为 558nm,对应的光密度为 1.79.实验装置如图 2.

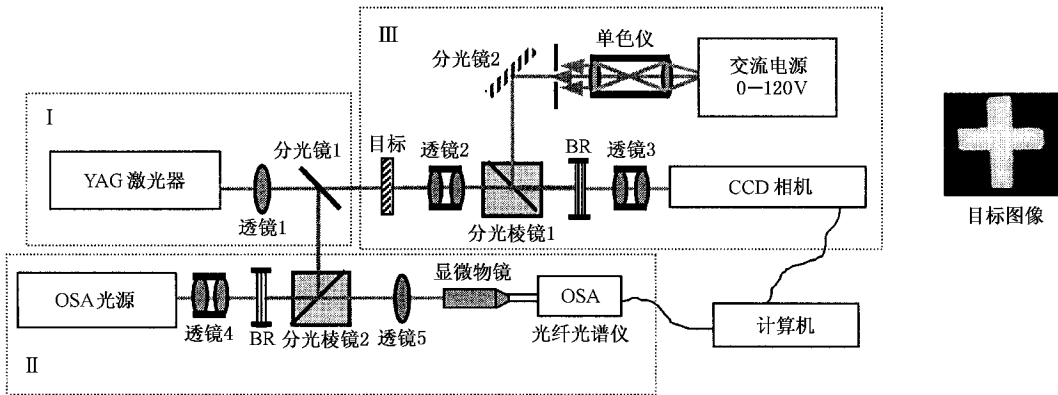


图 2 实验装置图与记录图像实验中采用的目标图像

实验装置分为三部分：Ⅰ. 激发或图像写入光源：采用 YAG 激光器经二倍频、准直后出射的 532nm 绿光,照射到样品上的平均功率密度为 $21.9\text{mW}/\text{cm}^2$.Ⅱ. 光谱响应测试装置：调制光源选用美国 Analytical Instrument Systems 公司 Model DT1000CE UV/VIS Light Source,光谱范围 370nm—700nm,平均功率密度为 $19\mu\text{W}/\text{cm}^2$.光谱测试仪器采用 Oceanoptics 公司的 USB2000 Miniature Fiber 型光纤光谱分析仪 OSA(波长范围 190nm—950nm)实时监测样品的吸收光谱变化.显微物镜耦合调制光进入光谱仪光纤头.Ⅲ. 图像记录装置：用一有黑白两个灰度值的二阶灰度图像(‘+’形图案)的透明胶片作为目标图像.规定十字图案的白色区域代表最小灰度值(用‘ $D_{\min}=0$ ’表示),十字图案外的黑色区域代表最大灰度值(用‘ $D_{\max}=1$ ’表示),若读出图像与目标图像灰度分布一致则表示读出图像为正像.用卤钨灯经单色仪、平行光管选出的准直单色光作为读出光,图像的读出模式为非破坏性读出.通过分别控制写入光和读出光,来控制图像的记录、读出、和采集的非实时性.单色光波长每隔 10nm 通过 CCD 采集一幅图像.

装置Ⅰ和装置Ⅱ组合可进行光谱响应实验内容,装置Ⅰ和装置Ⅲ组合可进行图像记录实验内容.

4. 实验结果

以未经光照作用的样品对调制光的绝对吸收量为参考基准值(在相对吸收模式下,表现为一条 0 基准线),测试样品经激发光充分作用后,激发区域对调制光的相对吸收变化量.分两步采集样品的光谱特性曲线.首先关闭激发光而保留调制光,采集一组光谱曲线(定义为 A 组)然后观察光谱的相对吸收幅值变化趋于饱和时,关闭调制光,每相隔 60s 采集一次光谱曲线(定义为 B 组).结果如图 3 所示.

图 3 中,曲线在‘0 基线’以下部分,表示对调制光呈现‘相对负吸收’,即绝对吸收量减少,其绝对值越大则绝对吸收量减少的越多.相反,曲线‘0 基线’以上部分,表示对调制光呈现‘相对正吸收’,即绝对吸收量增加,其绝对值越大则绝对吸收量增加的越多.图 4 为 550nm,560nm,570nm,580nm 波长的相对吸收变化值随时间的变化的实验值与拟和曲线,拟和参数见表 1.

选取双指数递增拟和公式

$$A = A_0 + A_1(1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2(1 - e^{-t/\tau_2}).$$

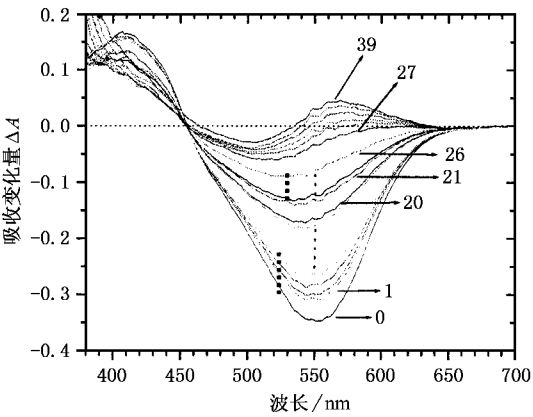


图 3 激发光关闭后,BR 分子弛豫光谱特性曲线(曲线 0 为激发光为功率密度 $21.9\text{mW}/\text{cm}^2$,作用 90s 的吸收变化光谱,曲线 1—20 与曲线 21—26 分别为相隔 3s 和相隔 10s 采集一次的 A 组吸收变化光谱;曲线 27—39 为每相隔 60s 采集一次的 B 组吸收变化光谱)

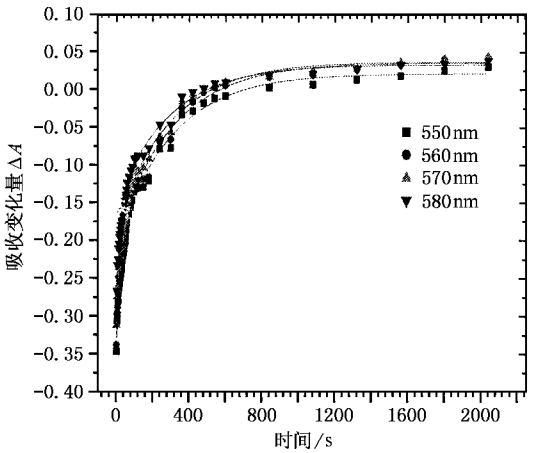


图 4 关闭激发光后,550nm,560nm,570nm,580nm 探测光波长处,相对吸收变化值随时间的变化曲线

表 1 拟和参数

波长 λ/nm	A_0	A_1	τ_1	A_2	τ_2
550	-0.34493	0.13819	29.73209	0.22812	299.45838
560	-0.33854	0.14032	27.90743	0.23387	303.92861
570	-0.31028	0.1342	29.15254	0.21324	302.32957
580	-0.26502	0.11486	29.31331	0.18305	292.59626

根据光谱特性曲线的变化趋势,选取具有代表性的调制光波长研究 BR 分子膜记录图像与读出时间和不同调制光波长之间的关系.图 5 为调制光波长分别为 415nm(M 态),560nm(B 态),580nm,600nm 时,记录图像在关闭激发光后 1min,5min,10min,30min,60min,120min 时间点采集的图像.

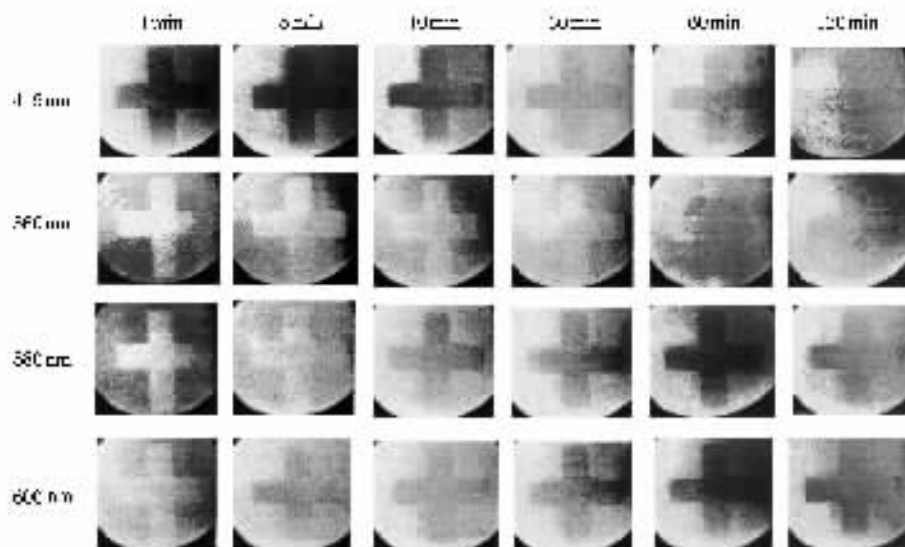


图5 实验采用的目标图像及关闭激发光后,读出光波长为 415nm,560nm,580nm,600nm 时在 1min,5min,10min,30min,60min,120min 时间点采集的 BR 分子膜上记录的图像

5. 结果分析

通过对上述两部分实验结果的分析可得到以下结论.

1. 由图3中曲线0—27的相对吸收值变化趋势可以看出,经过激发光作用后2min内,在390nm—440nm波长范围内出现了正吸收现象,其最大吸收峰为415nm;在460nm—650nm波长范围内出现负吸收现象,其最大吸收峰为555nm.根据经基因修饰的BR分子的光循环特性可知,前者对应经激发光激励后的激发态M态分子吸收带,后者对应基态B态分子的吸收带.当基态与激发态之间的变化达到平衡状态时,关闭激发光但保留调制光,随着测试时间的延长,BR分子膜对调制光的相对吸收变化量,在390nm—440nm波长范围内呈减小趋势但减小幅度不大,说明M态有一定的寿命.在460nm—630nm范围呈增大趋势并且主吸收峰向短波长方向漂移.如在图3中460nm—630nm范围内,曲线0对应 $\lambda_{\max} = 555\text{nm}$,2min后的曲线27对应 $\lambda_{\max} = 515\text{nm}$.

2. 在排除调制光的干扰后,在550nm—600nm范围内,出现了BR分子膜对调制光的吸收超过了“0基线”现象(图3中曲线28—39),说明有绝对吸收量的增加($\Delta A_{\max} \approx 0.05\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$),并且主吸收峰随着关闭调制光的时间延长而由600nm漂移到570nm波长处.同时也说明BR分子膜对光非常敏感, $19\mu\text{W}/\text{cm}^2$

强度的调制光对BR分子仍有一定的作用.由拟和参数表可以看出,550nm—600nm吸收增强的变化过程分为快过程和慢过程,其对应的时间常数分别为30s和5min,即约5min此过程变化将趋于稳定.通过读出图像的灰度变化也反映和验证了在550nm—600nm波长范围有稳定的吸收增强的现象.在刚关闭激发光时,BR分子膜在此波段为相对负吸收,因此在图像上表现为正像(与目标图像的灰度分布一致,“+”字图案的灰度值为 $D_{\min} = 0$)在大约1min后,在600nm波长处出现图像反转现象(既正像消失,负像出现,与目标图像的灰度分布相反,“+”字图案的灰度值为 $D_{\max} = 1$)在大约5min后,在580nm—600nm波长范围内均出现图像反转现象;10min后,在560nm—600nm波长范围内均出现图像反转现象.在此后2h的观察时间内,图像质量比较稳定.

3. 在390nm—440nm波长的相对正吸收范围内,M态的吸收带内,一直出现的是负像.且在415nm波长处可获得最佳的图像质量及图像对比度.在450nm—550nm波长的相对负吸收范围内,一直出现的是正像.且在刚关闭激发光时,550nm波长处图像质量及图像对比度最佳.随着读出时间的延长,10min后,最佳的图像质量及图像对比度出现在510nm波长处.

从光谱上体现的吸收变化量 $\Delta A(\lambda, t)$ 的变化和图像记录中读出图像的灰度分布变化和稳定性反映了经基因修饰的D96N样品,其M态的寿命相对野生

的 BR 材料从数毫秒可延长到数分钟甚至数小时. 在 550nm—600nm 波长范围出现吸收增强的现象、图像随时间出现从正像到负像的反转现象以及 2h 的图像记录寿命. 但其作用机理还需进一步研究, 弄清这个过程出现的机理对进一步研究 BR 分子材料在信息处理领域中的应用有很大的意义.

[1]

Wang C H, Bacon M, Kar A K *et al* 1997 *J. Opt. Soc. Am. B* **14** 2304

[2]

Hamp N, Silber A 1996 *Pure & Appl. Chem.* **68** 1361

[3]

Butt H J 1990 *European Biophysics Journal* **19** 31

[4]

Zeisel D and Hamp N 1992 *J. Phys. Chem.* **96** 7788

[5]

Timucin D A and Downie J D 2000 *J. Opt. Soc. Am. B* **17** 202

[6]

Yang W Z *et al* 2003 *Acta Phys. Sin.* **52** 761 (in Chinese) [杨文正等 2003 物理学报 **52** 761]

Experimental study of enhancement of the light-modulated absorption of bacteriorhodopsin-D96N films^{*}

Yang Wen-Zheng¹⁾ Hou Xun¹⁾²⁾ Chen Feng²⁾ Yang Qing¹⁾

¹⁾ (State Key Laboratory of Transient Optics and Technology, Xi'an Institute of Optics & Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710068, China)

²⁾ (Department of Electronic Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

(Received 3 January 2003 ; revised manuscript received 8 May 2003)

Abstract

In this paper, the light-modulated characteristics of the gene-variant bacteriorhodopsin-D96N molecule film are studied by spectrum response experiment. The absorption enhancement phenomena of BR_{D96N} films at 550—600nm modulated light wavelength are gained, and there are different absorption changes at different monochromatic wavelengths. Using curve-fitting method, it is found that the process of the absorption change includes fast and slow responses with time constants of 30 s and 5 min respectively. Applying the relations between the absorption change and gray-scale image to the write-readout image experiment, the reverse image phenomena in a wavelength range of 550—600nm are analyzed.

Keywords : bacteriorhodopsin-D96N(BR_{D96N}) molecule film, spectrum responding, absorption enhancement phenomena, reverse image phenomena

PACC : 7865, 8170

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.69907006) and the Knowledge Innovation Major Program Foundation of Chinese Academy of Sciences(Grant No.KGCX2-401).