

# PS II 颗粒复合物低温荧光光谱特性\*

刘 晓<sup>1</sup> 王水才<sup>1\*\*</sup> 贺俊芳<sup>1</sup> 蔡 霞<sup>1,2</sup> 彭菊芳<sup>1</sup> 匡廷云<sup>3</sup>

(1 中国科学院西安光机所瞬态光学技术国家重点实验室,西安 710068)

(2 西北大学,西安 710069)

(3 中国科学院植物研究所光合作用研究中心,北京 100039)

**摘 要** 为了获得低温下 PS II 颗粒复合物色素分子间的能量传递信息,运用荧光激发谱及荧光发射谱对 273 K 温度时不同波长光激发下菠菜的 PS II 颗粒复合物的荧光光谱特性进行了研究,分析得出荧光强度的大小与激发光的波长有关,在实验所采用的激发波长中,436 nm 的光激发产生的荧光强度最大,520 nm 的最小.在能量传递过程中 Chl *a* 分子的荧光效率最高,Chl *b* 分子次之.结合吸收谱分析还发现在 PS II 颗粒复合物中至少存在四种具特征吸收的 Chl 分子:Chl  $a_{660}^{661}$ , Chl  $a/b_{669,670}^{672}$ , Chl  $a_{680}^{682}$ , Chl  $a_{687}^{690}$ . 对 436 nm 光激发所得到的荧光发射谱进一步经高斯解析后得到五个光谱组分:661 nm,672 nm,682 nm,690 nm,730 nm,所占的比例分别为 4.75%,9.89%,43.18%,22.08%,20.10%.

**关键词** PS II 颗粒复合物;荧光激发谱;荧光发射谱;低温

**中图分类号** Q631 **文献标识码** A

## 0 引言

光合作用 (Photosynthesis) 由两个光系统协同完成,即光系统 I (photosystem I, 简称 PS I) 和光系统 II (photosystem II, 简称 PS II). 其中,PS II 是高等植物、藻类以及蓝细菌中位于类囊体膜上的膜蛋白复合物,它利用太阳能进行光合作用的原初反应:电荷分离,质体醌的还原以及氧化水生成氧气.由于 PS II 是光合作用中放氧的来源,又是光化学反应中电子传递链的开始,因此对 PS II 的研究很有意义.

PS II 包含有叶绿素 *a* (Chl *a*)、叶绿素 *b* (Chl *b*)、类胡萝卜素 (Car) 等大量的色素分子.依据色素分子所起的作用,可将 PS II 分为集光系统和反应中心.集光系统主要用来吸收光能,并将能量向反应中心传递,进行的是光物理反应;反应中心是用来陷获从集光系统传递来的能量,并进行电荷分离,将光能以化学能形式储存起来,进行的是光化学反应.集光系统又可分为距离反应中心相对较远的外周天线和紧贴反应中心的核心天线,外周天线又进一步分为主外周天线 LHC II *b* 和次外周天线 CP29、CP26、CP24.而核心天线则由 CP43 和 CP47 组成.LHC II 是由 8 个 Chl *a* 分子,6 个 Chl *b* 分子,2 个叶黄素 (Lut) 分子和 1 个叶黄质 (Neo) 分子组成<sup>[1]</sup>.在 CP43 色素蛋白复合物中含有 19~20 个 Chl *a* 分子,4~5 个  $\beta$ -

car 分子;而 CP47 色素蛋白复合物中含有 20~21 个 Chl *a* 分子,3~4 个  $\beta$ -car 分子;提纯的反应中心 D1-D2-Cytb559 复合物含有 6 个 Chl *a* 分子,2 个  $\beta$ -car 分子及 2 个去镁叶绿素 *a* 分子<sup>[2]</sup>.大自然的选择使得各类色素分子在生物蛋白膜中呈高度有序的排列,将吸收的光能高效的传递到反应中心,将能量储存起来,满足地球上一切生命活动的能量需要<sup>[3]</sup>.可见对光合作用过程中能量传递的研究显得至关重要.目前这方面的研究多侧重于分离的 PS II 各个功能亚单元内部的能量传递<sup>[2,4,7~10,12]</sup>,对 PS II 颗粒复合物这一整体的研究相对较少,本文运用稳态荧光光谱测量装置,结合荧光激发谱及发射谱对 PS II 颗粒复合物从光谱角度进行分析,以期获得其中的色素分子之间的能量传递信息.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验材料 PS II 颗粒复合物由中国科学院植物所提供,依据改进的 Alfonso 等人的方法<sup>[4]</sup>从菠菜中分离提纯获得.

### 1.2 实验方法

实验采用稳态荧光光谱测量装置.由氙灯 (Xe900, Edinburgh Instruments Ltd.) 输出的连续光作为激励光源,经双通道单色仪 (M300, Edinburgh Instruments Ltd.) 进行激发波长选择后进入可控温样品室激发样品,样品室制冷系统为加液氮可调温度低温保持器 (OptistatDN, Oxford Instruments),并由 ITC601 温度控制器 (Oxford Instruments) 进行温度控

\*国家基础研究发展规划 (973) 资助项目 (编号: G1998010)

Tel: 029-8484245 Email: wangshuicai @163.com

收稿日期: 2003-10-19

制. 样品所发射的荧光信号再次进入双通道单色仪进行输出波长选择后耦合入MCP光电倍增管(R3809u-50, HAMAMATSU)进行放大, 将放大后的信号输入时间寿命分析系统(F900)进行数据的采集、分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同波长光激发下荧光发射谱比较

PS II颗粒复合物受到光激发后, 首先由LHC II中的色素分子将吸收的能量经核心天线传递到达反应中心, 反应中心的P680接收能量成为激发态, 将光能转化成为电能向pheo进行电子传递. 由于提纯的PS II颗粒复合物所包含的反应中心只含有Chl *a*, Chl *b*,  $\beta$ -car及Pheo, 因此pheo无法将所接收到的能量进一步向后传递给QA, 造成大量的电荷重组, 反应中心被氧化, 能量传递过程受阻, 无法传递的能量以荧光的形式被释放出来. 加之反应中心所包含的色素分子数目是一定的, 其吸收能力有一定的饱和度, 若天线系统吸收到的能量过多, 反应中心无法利用, 也只能以热或荧光的形式将能量耗散. 所以探测荧光强度的强弱可以在一定程度上反映反应中心所接收到的能量多少. 又因整个探测过程是在保证激发光子数一致的情况下进行, 故不同激发波长下所得的荧光强度具有可比性. 本实验分别用436 nm, 480 nm, 489 nm, 507 nm, 520 nm的光激发PS II颗粒复合物, 探测其荧光发射谱, 结果见图1.

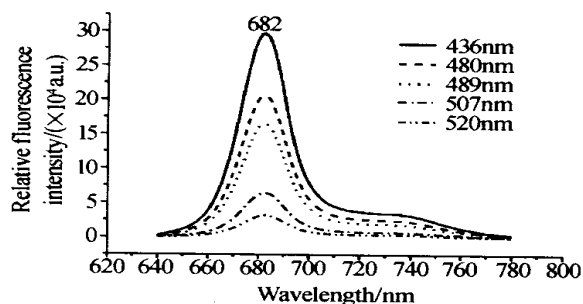


图1 273 K不同波长光激发下PS II颗粒复合物的荧光发射谱(由上到下激发波长分别为436 nm, 480 nm, 489 nm, 507 nm, 520 nm)

Fig. 1 Fluorescence emission spectrum of PS II at 273 K excited with various wavelengths (the excited wavelength from up to down are 436 nm, 480 nm, 489 nm, 507 nm, 520 nm)

测量结果显示, 不同波长光激发所得到的荧光强度的大小依次为436 nm > 480 nm > 489 nm > 507 nm > 520 nm. 436 nm光激发下的荧光强度最大, 而520 nm的光激发下的荧光强度最小. 由于吸收谱与激发谱之间存在镜像对称关系, 这种现象可以通过吸收激发光子的色素分子吸收特性解释. 激发PS II颗粒复合物的能量最先由LHC II接收, LHC II由Chl *a*分子, Chl *b*分子以及Lut分子和Neo分子组成. 各个

色素分子在soret区(400~550 nm)的吸收光谱显示<sup>[5]</sup>, 436 nm位于Chl *a*分子的最大吸收峰附近, 同时在此波长Chl *b*分子及Car分子也有吸收. 而480 nm是处于Chl *b*分子的最大吸收峰附近, 同时伴有Car分子的较强吸收. 489 nm为Car分子的最大吸收峰, 伴有部分的Chl *b*分子吸收. 而507 nm只有Car分子及极少量的Chl *b*分子的吸收. 至于吸收520 nm波长光的色素分子则微乎其微. 此外, PS II颗粒复合物包含的Chl *a*分子的数目最多, 其次是Chl *b*分子, Car分子数目最少. 相同条件下受到激发的色素分子的种类、数目愈多则LHC II接收到的能量愈多, 向后传递到达反应中心的能量就愈多. 且Chl分子的传能效率较Car分子要高许多, 故用436 nm光激发时被激发的色素分子种类及数目都最多, 传递到反应中心的能量最多, 所测到的荧光强度也就最大. 而520 nm光激发时被激发的色素分子种类及数目都最少, 传递到反应中心的能量最少, 所测得的荧光强度也就最小. 因此激发不同的色素分子, 受色素分子传能效率的影响, 传递到反应中心的能量不同. 但以上在不同波长光激发下所测得的最大荧光发射峰都位于682 nm处(以下将证明这是由反应中心P680所发射的荧光), 说明无论最先受到激发的是何种色素分子, 他们都将能量最大限度的向反应中心传递, 以保证光化学反应的正常进行.

### 2.2 荧光发射谱高斯解析

将436 nm光激发下的荧光发射谱进行高斯解析, 结果如图2及表1. 经过解析得到五个光谱组分, 分别是661 nm, 672 nm, 682 nm, 690 nm, 730 nm. 各个组分所占的比例分别为4.75%, 9.89%, 43.18%, 22.08%, 20.10%. 436 nm光激发PS II颗粒, 由LHC II中Chl分子及Car分子吸收光能, 并将能量经核心天线向反应中心传递, 此过程中伴有一些放热, 发射荧光等能量损失. 结合色素分子的吸收谱分析<sup>[6]</sup>发现PS II颗粒复合物中至少存在具以下特征吸收的Chl分子: Chl  $a_{660}^{661}$ , Chl  $a/b_{669,670}^{672}$ , Chl  $a_{680}^{682}$ , Chl  $a_{687}^{690}$  (Chl  $a/b_a^c$ : *a*代表吸收峰, *e*代表荧光发射峰). 由于PS II颗粒的构成较复杂, 所以要详细地讨论各个发射峰来自于PS II颗粒中哪一个亚光合单位中的色素分子比较困难. 由解析结果可以看出, 最大荧光发射峰为682 nm, 从682 nm的荧光组分所占的比例来看(43.18%), 其应当是反应中心的P680的吸收680 nm附近的Chl *a*分子所发射, 在到达反应中心P680之前的能量损失很小, 只有14%左右, 说明天线系统的能量传递效率是很高的, 绝大部分的能量被P680陷获. 而680 nm之后的波段,

能量损失增大,这是由于电子传递无法正常进行,造成反应中心被氧化,能量传递受阻,于是以荧光形式释放.672 nm的荧光组分可能来自于LHC II中的Chl *a*/*b*<sub>670</sub>,也可能来自于核心天线中的Chl *a*<sub>669</sub>分子在能量传递过程中的荧光损耗.661 nm的荧光发射同样有几个可能的来源:LHC II中 Chl *a*<sub>660</sub>分子或核心天线中 Chl *a*<sub>660</sub>分子在能量传递过程中的荧光损耗<sup>[7,8]</sup>.至于690 nm的荧光组分,依据文献[9]、[10]可以断定690 nm应来自于CP47中吸收687 nm波长光的Chl *a*分子.而730 nm的荧光发射峰来自于主发射峰的振动副带.

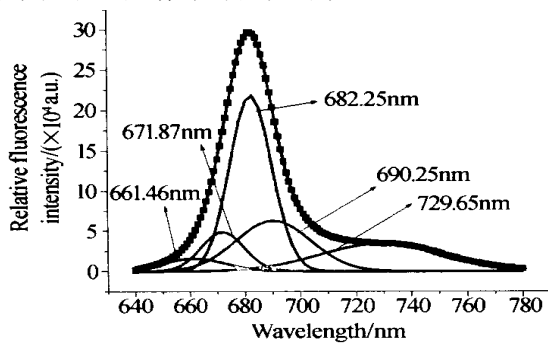


图2 273 K时 PS II颗粒复合物荧光发射谱的高斯解析曲线  
Fig. 2 Gauss-fitting curves of fluorescence emission spectrum of PS II at 273 K

表1 273 K时 PS II颗粒复合物荧光发射谱光谱组分中心波长及比率

中心波长/nm	661	672	682	690	730
比率 %	4.75	9.89	43.18	22.08	20.10

### 2.3 不同测量波长处荧光激发谱比较

激发谱表示某种荧光物质在不同波长的激发光作用下所测得的同一波长下荧光强度的变化<sup>[11]</sup>.将PS II颗粒复合物在400 nm - 600 nm范围的激发光作用下所测得的676 nm,682 nm,694 nm,700 nm及735 nm的波长下的荧光强度在同一坐标系中进行比较,如图3.从图3可以明显地看出,在682 nm处所得荧光强度最大,676 nm处的荧光强度相对682 nm的弱.676 nm的荧光形成的可能途径有两条,一是在天线系统向反应中心能量传递过程中以荧光形式损失的能量,二是由于电子传递链的中断

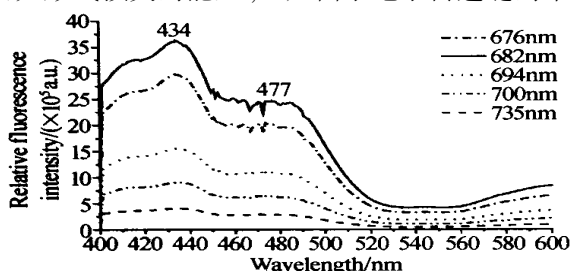


图3 不同波长处 PS II颗粒复合物荧光激发谱(测量波长由上至下分别为676 nm,682 nm,694 nm,700 nm,735 nm)

Fig. 3 Fluorescence excitation spectrum of PS II at different wavelength (the measure wavelength from up to down are 676 nm,682 nm,694 nm,700 nm,735 nm)

造成反应中心电荷重组,使到达反应中心 P680 的能量一部分以682 nm的荧光形式释放,另一部分未参与电荷分离的能量又返回到天线系统中,发出676 nm的荧光<sup>[11]</sup>.而694 nm,700 nm,735 nm处所测的荧光强度依次减弱,也证明了PSII中能量传递,由短波向长波转换的过程.

激发光谱还可以说明哪种激发光波长荧光效率最高,该激发光波长往往与该物质的吸收光谱中的峰位波长一致.从激发光谱的峰位波长可以推断样品中什么物质或基团吸收此波长而发荧光的<sup>[11]</sup>.由图3可以看出,在蓝区434 nm附近波长激发光的荧光强度最高,其次是477 nm.而434 nm位于Chl *a*分子的最大吸收峰处,477 nm位于Chl *b*分子的最大吸收峰附近<sup>[5]</sup>,证明PS II颗粒所包含的色素分子中Chl *a*分子具有最高的荧光效率,Chl *b*分子的次之.用电子显微技术,研究显示同一膜平面与不同膜平面中,Chl分子之间最短中心距离分别是0.9~1.4 nm和1.3~1.4 nm,呈现一种紧密下色素堆积结构,这正是色素分子之间强激子耦合的结构基础,并且Chl *a*分子的吸收光谱与Chl *b*分子的发射光谱重叠的非常好.使得Chl *b*向Chl *a*间存在迅速的激发能传递,具有高达90%以上的能量传递效率<sup>[12]</sup>.

### 3 结论

运用荧光激发谱和荧光发射谱对273 K温度下PS II颗粒复合物的稳态光谱特性进行分析发现:

1)用不同波长光激发PS II颗粒复合物所得到的荧光强度不同,其大小依次为436 nm > 480 nm > 489 nm > 507 nm > 520 nm.

2)对436 nm光激发下PS II颗粒复合物的荧光发射谱进行高斯解析,得到五个光谱组分,分别是:661.46 nm,671.87 nm,682.25 nm,690.25 nm,729.65 nm,其所占的比例相应为4.75%,9.89%,43.18%,22.08%,20.10%,可见在能量传递到达反应中心P680前,能量损耗很小,不足15%,但到达P680之后,向前的能量传递过程中损耗加大.

3)在PSII颗粒复合物中至少存在具以下特征吸收的Chl分子:Chl *a*<sub>660</sub><sup>661</sup>,Chl *a*/*b*<sub>669,670</sub><sup>672</sup>,Chl *a*<sub>680</sub><sup>682</sup>,Chl *a*<sub>687</sub><sup>690</sup>.

4)PS II颗粒复合物激发谱显示,Chl *a*分子的荧光效率最高,Chl *b*分子次之.

### 参考文献

- Roberto B, Bernard P, Paola D, et al. Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur J Biochem*, 1993, **212**: 297~303

- 2 王水才,蔡霞,贺俊芳,等.从捕光天线到反应中心分子传能研究.光子学报,2003,**32**(6):641-645  
Wang S C, Cai X, He J F, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(6):641~645
- 3 贺俊芳,王水才,蔡霞,等. PS II各功能单元间能量传递理论与实验研究.光子学报,2002,**31**(5):541~544  
He J F, Wang S C, Cai X, *et al.*, *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(5):541~544
- 4 Alfonso M, Montoya G, Cases R, *et al.* Core antenna complexes, CP43 and CP47, of high plant photosystem II spectral properties, pigment stoichiometry, and amino acid composition. *Biochemistry*, 1994, **33**(34):10494~10500
- 5 Roberta C, Garofalo C, Alfred R, *et al.* The soret absorption properties of carotenoids and Chlorophylls in antenna complexes of higher plants. *Photosynthesis Research*, 2000, **64**:221~231
- 6 王水才,蔡霞,贺俊芳,等. 光合作用 PS II Chl 分子传能超快光谱学.量子电子学报,2002,**19**(5):404~409  
Wang S C, He J F, Cai X, *et al.* *Chinese Journal of Quantum Electronics*, 2002, **19**(5):404~409
- 7 Eijkelhoff C, van Roon H, Groot M L, *et al.* Purification and spectroscopic characterization of photosystem II reaction center complex isolated with or without Triton X100. *Biochemistry*, 1996, **35**:12846~12872
- 8 Shan J X, Wang J S, Ruan X, *et al.* Changes of absorption spectra during heat-induced denaturation of photosystem II core complexes CP43 and CP47: revealing the binding states of chlorophyll molecules in these complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1504**:396~408
- 9 Chang H C, Jankowiak R, Morris H R, *et al.* Exciton level structure and dynamics in the CP47 antenna complex of photosystem II. *J Phys Chem*, 1994, **98**(31):7717~7724
- 10 Groot M L, Peterman E J, van Stokkum I H, *et al.* Triplet and fluorescing states of the CP47 antenna complex of photosystem II studied as a function of temperature. *Biophys J*, 1995, **68**(1):281~290
- 11 丘冠英,彭银祥主编.生物物理学.武汉:武汉大学出版社,2000.137~138  
Qiu G Y, Peng Y X *Biophysics*. Wuhan: Wuhan University Press, 2000. 137~138
- 12 任兆玉,贺俊芳,王水才,等.光系统 II捕光复合体飞秒时间分辨荧光特性的研究.植物学报,2001,**43**(12):1237~1242  
Ren Z Y, He J F, Wang S C, *et al.* *Acta Botanica Sinica*, 2001, **43**(12):1237~1242

## Fluorescence Spectra Properties of PS II Particle Complex at Low Temperature

Liu Xiao<sup>1</sup>, Wang Shuicai<sup>1</sup>, He Junfang<sup>1</sup>, Cai Xia<sup>1,2</sup>, Peng Jufang<sup>1</sup>, Kuang Tingyun<sup>3</sup>

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

2 Northwest University, Xi'an 710069, P. R. China

3 Photosynthesis Research Center, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences Beijing 100093, P. R. China

Received date: 2002-10-19

**Abstract** In order to understanding spectral information on energy transfer in PS II. PS II particle complex purified from spinach was investigated with steady-state fluorescence excitation and emission spectroscopy at 273 K. The data were analyzed by Gauss analysis. The results showed that the fluorescence intensity of PS II was different in the case of various wavelength excitation, the fluorescence intensity was maximum when excited with 436 nm, while excited with 520 nm got the minimum. In the process of energy transfer, Chl a had the highest energy transfer efficiency, and Chl b was in the next place. There are at least several characteristic Chl molecules existed in PS II particle complex, i. e. Chl  $a_{660}^{661}$ , Chl  $a/b_{669,670}^{672}$ , Chl  $a_{680}^{682}$ , Chl  $a_{687}^{690}$  (Chl  $a/b_a^e$ : a represents the peak of absorption, e represents the peak of emission). Moreover, five components were obtained with Gauss-fitting in the case of 436 nm excitation, they were 661.46 nm, 671.87 nm, 682.25 nm, 690.25 nm, 729.65 nm, and their proportions were 4.75%, 9.89%, 43.18%, 22.08%, 20.10%, respectively.

**Keywords** PS II; Fluorescence emission spectrum; Fluorescence excited spectrum; Low temperature



**Liu Xiao** was born in 1975, in Xinjiang, China. She graduated from biology department of Northwest University in 2001. At present, she is a Ph. D. degree candidate in the State Key Laboratory of Transient Optics and Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences. She is interested in ultrafast photobiological research.