

捕光复合物 LHC II 的荧光动力学特性*

彭菊芳¹ 王水才^{1**} 贺俊芳¹ 蔡霞^{1,2} 刘晓¹ 匡廷云³

(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 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

(3 中国科学院植物研究所光合作用中心, 北京 100093)

摘要 采用时间分辨荧光光谱技术, 在 273 K 下用波长为 507 nm 的光激发对菠菜光系统 II 捕光天线 LHC II 的光谱特性和时间特性作了研究. 将获得的荧光光谱进行高斯解析, 得到 6 个光谱组分, 反映了光谱特性: $\text{Chl } a_{662/661}$ 、 $\text{Chl } a/b_{670/671}$ 、 $\text{Chl } a_{683.5/680/681}$ 和 $\text{Chl } a_{699.9/695.0}$, 而中心波长为 738.6 nm、761.0 nm 的光谱组分则可能对应着主发射峰的振动副带. 通过对荧光衰减曲线进行三指数时间拟合, 得到激发能在 LHC II 中传递的时间常数: 8.8 ps、500 ps、1.6 ns, 并分析得出了时间常数与光谱组分的对应关系.

关键词 捕光复合物 LHC II; 荧光光谱特性; 时间特性; Chl a; Chl b; 类胡萝卜素

中图分类号 Q631 **文献标识码** A

0 引言

所有绿色植物光系统 II 完成光合功能的能量全部来自于捕光复合物 LHC II 收集的太阳光能. 传能途径是由捕光复合物 LHC II 高效吸收太阳能, 并将激发能传递给核心天线色素蛋白复合物 CP47 和 CP43, 然后再由 CP47 和 CP43 分别直接传递到反应中心 D_1 - D_2 -Cyt b559. 作为位于光系统 II 中最外周、含量最丰富的天线系统, LHC II 结合了叶绿体中近 50% 的叶绿素分子和几乎所有的辅助色素分子^[1,2]. LHC II 包括主外周天线 LHC II *b* 和辅助外周天线 LHC II *a* (CP29)、LHC II *c* (CP26)、LHC II *d* (CP24), LHC II *b* 是主要的三聚体复合物, CP29、CP26、CP24 则以单体形式存在^[3]. 目前普遍认为三聚体形式是 LHC II 在叶绿体中的功能组成单位. Kühlbrandt^[2] 和他的同事们用电子衍射法推导出分辨率为 0.34 nm 的 LHC II 三聚体和单体单元的结构模型. 每个单体亚单元由三个跨膜 α 螺旋构成, 主要由 26KDa 的蛋白质和 12 个叶绿素 (Chl) 分子 (7 个 Chl *a* 分子, 5 个 Chl *b* 分子, 2 个类胡萝卜素分子) 所组成, 这些叶绿素分子排成两层, 它们的噻啉环与膜面几乎垂直且靠近膜表面排列. 最近的 Chl 分子之间、类胡萝卜素分子与 Chl 分子之间的最短距离约为 40 ~ 50 nm, 这表明很快的时间组分极有可能是 Chl *b* 向 Chl *a*、类胡萝卜素分子向 Chl *a* 进行能量传递的, 这样就有可能通过 Dexter 电子交换机

制来防止三线态 Chl 的形成. 本文采用时间分辨荧光光谱技术, 对 LHC II 的光谱特性、时间特性及色素分子间能量传递的超快过程作了研究.

1 材料和方法

1.1 实验材料

采用由中国科学院植物研究所光合作用研究中心从菠菜中分离纯化的捕光复合物 LHC II, 提纯的样品保存在液氮中备用. 实验时, 样品中叶绿素浓度保持在 10 $\mu\text{g/ml}$ 左右.

1.2 实验方法

本实验采用的装置是美国和英国两家公司集成组建的超宽调谐飞秒激光瞬态光谱仪. 由 Millennia Xs-740 钕镱泵浦 Tsunami 钛宝石飞秒激光器, 输出中心波长 800 nm, 重复频率 82 MHz, 脉宽在 100 fs 左右的光脉冲作为种子光源, 经 Spitfire-TSA 再生放大器放大, 再通过 OPA-800C 光学参量放大器, 选择输出中心波长为 507 nm, 重复频率 1 KHz 的飞秒光脉冲作为激励光源, 光强为 1.3×10^{12} 个光子/脉冲. 激光进入密闭的 UC920 样品室, 打在 LHC II 样品上, 通过 ITC601 温度控制仪在其周围加入液氮来控制温度. 考虑到 LHC II 为生物样品, 持续较强光作用其上, 有可能造成局部温度上升过高, 致使样品漂白, 蛋白变性, 为保持其生物活性, 将环境温度设为 273 K. 发出的荧光通过 M300 单色仪色散后由 R3809U-50MCP-PMT 探测器接收荧光信号, 经超高频放大器放大后输送到信息处理器中, 进行数据处理. 测量过程由计算机操纵. 单色仪的光谱步长为 1 nm, 荧光光谱测量范围为 640 ~ 780 nm, 将得到的荧光光谱采用高斯解析方法分解得出光谱组分, 见

*国家重点基础研究发展 (G1998010100) 资助项目

**通信联系人 Tel: 029-88484245

Email: wangshuicai@163.com

收稿日期: 2003-03-24

图 1. 图 2 是在 685 nm 波长的探测光下, 经解卷积得到的时间拟合曲线.

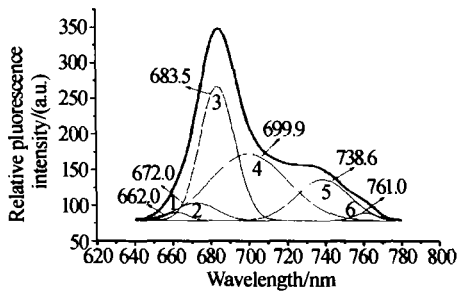


图 1 LHC II 的荧光光谱
Fig. 1 The fluorescence spectrum of LHC II

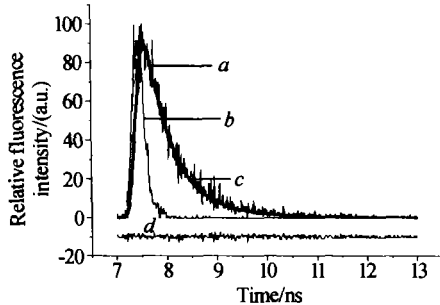


图 2 685 nm 波长下 LHC II 的荧光衰减曲线
Fig. 2 The fluorescence decay curve of LHC II at 685 nm
a, fluorescence decay curve; b, system responding function curve; c, triexponential fitting curve; d, fitting residual curve

2 结果与分析

图 1 给出 507 nm 波长光激励下得到的 LHC II 荧光积分谱及其高斯解析组分谱. 从图中看到, 荧光谱范围在 640 ~ 780 nm 之间, 它们主要是由低能态的色素分子所发射. 在捕光天线 LHC II 里, 色素蛋白的含量最为丰富, 大约结合了 230 ~ 250 个色素分子^[3], 有 Chl *a*、Chl *b* 以及类胡萝卜素等分子, 507 nm 激励下首先受到激发的主要是类胡萝卜素分子, 它们随后迅速将能量传递给相邻短波长高能态的类胡萝卜素分子或 Chl *a* 分子, 然后按能级递减向长波长低能态的色素分子传递能量, 根据吸收谱和发射谱的镜像关系对称性, 荧光不可能由类胡萝卜素分子发出的, 只能是叶绿素分子.

对荧光光谱进行高斯解析, 结果见表 1.

表 1 LHC II 荧光光谱的高斯解析谱参量

序号	峰值波长/nm	半高全宽/nm	积分面积	相对强度/%
1'	662.0	11.855	169.69	2.93
2'	672.0	20.951	661.94	6.47
3'	683.5	18.278	4339.9	48.63
4'	699.7	40.119	4722.4	24.11
5'	738.6	27.632	2011.5	14.91
6'	761.0	11.801	163.55	2.95

光谱解析出 6 个谱带: 662.0 nm、672.0 nm、

683.5 nm、699.7 nm、738.6 nm 和 761 nm, 它们分别所占比例为 1.4%、5.4%、36.7%、38.8%、16.4%、1.3%. Hemerijk^[4] 等人采用 CD、LD 和荧光光谱技术在 77 k 下对 LHC II 三聚体进行研究分析, 得到 6 ~ 9 个光谱成分, 分别是 640 ~ 645、648 ~ 652、657、662、671 ~ 668、676 nm, 其中 676 nm 成分包含了约 40 ~ 50% 的 Chl *a* 光谱带的谐振强度. Holger Dau^[5] 等人认为在 LHC II 中 Chl 分子具有吸收谱带 648、660、669、678、684 及 695 nm. Trinkunas^[6] 等人对高等植物 LHC II 三聚体吸收光谱分析, 在 635 ~ 700 nm 光谱范围内得到 12 条叶绿素吸收谱带. 吸收谱带多, 充分表明 LHC II 能在宽频谱范围吸收光能, 有高效吸收光能和传递光能的特点. G Zucchelli^[7] 等人认为 LHC II 中 Chl 分子吸收和发射谱带有这样的关系: Chl_{648.5}^{652.9}、Chl_{660.4}^{663.0}、Chl_{669.7}^{671.6}、Chl_{677.8}^{680.2}、Chl_{684.0}^{686.8}、Chl_{694.9}^{697.3} (Chl_{*a*}, *a* 代表吸收峰, *e* 代表发射峰). 王水才^[8] 等人利用 ICCD 飞秒扫描成像和飞秒时间分辨光谱研究认为, 在 LHC II 三聚体中至少存在 7 种 Chl 分子光谱特性, 分别是 Chl *b*_{653/656}^{658.7}、Chl *a*_{662.0}^{665.2}、Chl *a*/*b*_{670/671}^{671.1}、Chl *a*_{675.0}^{677.1}、Chl *b*_{680/681}^{682.9}、Chl *a*_{685.0}^{689.1} 和 Chl *a*_{695.0}^{695.6}. 结合吸收光谱通过分析比较, 我们认为, 本实验荧光光谱体现出以下特性: Chl *a*_{660/661}⁶⁶²、Chl *a*/*b*_{670/671}⁶⁷²、Chl *a*_{680/681}^{683.5} 和 Chl *a*_{695.0}^{699.9}, 而中心波长为 738.6 nm、761.0 nm 的光谱组分则可能对应着主发射峰的振动副带. 从各组分所占比例可以看到, Chl *a*_{660/661}⁶⁶² 只占 1.4%, Chl *b*_{670/671}⁶⁷² 只占 5.4%, 表明 Chl *a*_{660/661}⁶⁶² 和 Chl *b*_{670/671}⁶⁷² 传递能量的效率极高, 几乎把所有的能量都传递给了长波长的 Chl 分子; Chl *a*_{680/681}^{683.5} 和 Chl *a*_{695.0}^{699.9} 所占比例很大, 有 75.5%, 这主要是因为 LHC II 是一个被分离纯化出来的超分子体系, 没有内周天线 CP43、CP47 接收能量输送到反应中心, 它无法完成将能量传递下去的任务, 最后只能以热量辐射或荧光发射损失掉能量; 738.6 nm 和 761.0 nm 所占比例较小, 由于 LHC II 接收能量较多, 在 700 nm 以后仍有少量荧光发射, 但大部分被激发分子都已损失掉能量回到基态.

研究超快光谱一般要求尽量避免单线态 - 三线态湮灭的发生. 通常采用降低光强的方法, 使单线态 - 单线态湮灭降低至一个可接受的水平, 但是信噪比不能太低. 根据实验及他人^[9] 经验, 将激励光强定为 1.3×10^{12} 个光子/脉冲. 从图 2 的荧光衰减曲线可以看到, 尽管在低发射强度下, 信噪比还是很高的. 对衰减曲线进行时间拟合, 得到三个时间常数, 分别为: 8.8 ps、500 ps、1.6 ns. 结果见表 2.

表 2 LHC II 荧光衰减曲线时间常数拟合数据

	组分 1	组分 2	组分 3
时间	8.8 ps	500 ps	1.6 ns
所占比例	9.9%	78.2%	11.9%

捕光天线色素分子接收太阳能,并把激发能通过核心天线传递到反应中心.激发能传递机理在一定程度上与两分子间距离、分子取向、激发态和基态电子云重叠程度及分子结构功能有关^[10].目前,LHC II 中尽管 Chl 结合位点已经找到^[11],但 Chl *a* 和 Chl *b* 还不能分清,对 Chl 分子相互排列方式、分子取向等仍没有完整的解释,这些对 LHC II 功能很重要.现在在天线内部确定以无辐射能量转移的能量传递机制有库仑相互作用 Förster 共振转移机理、Dexter 电子交换机理以及激子传递机理^[10].LHC II 的能量传递动力学和猝灭机制研究报道很多.Connelly^[9]等采用超快荧光技术,得到三个时间组分,他认为 5 ps 组分是某个 Chl *b* 分子向 Chl *a* 分子传递的,3.6 ns 是激发态 Chl *a* 分子向基态跃迁的组分,170 ps 则反映了激发能在 Chl *a* 分子间的平衡,他们还采用瞬态吸收光谱技术得到 175 fs、625 fs、5 ps 和 790 ps 等 4 个时间组分.王水才^[12]等以超快光谱技术得到 210 fs、520 fs、5.2 ps、36.7 ps、1.8 ns 和 2.0 ns 6 个组分.Kwa^[13]等通过单色和双色泵浦探测技术分别得到 3~4 ps 和 5~8 ps 的时间组分.结合我们荧光光谱解析结果及激发能传递机理,认为 8.8 ps 时间组分反映了 Chl $a_{660/661}^{662}$ 吸收光能后,由于偶极子间相互作用产生光谱红移,向 Chl $a/b_{670/671}^{672}$ 或 Chl $a_{680/681}^{683.5}$ 传递能量的过程;500 ps 时间组分反映了 Chl $a_{660/661}^{662}$ 或 Chl $a/b_{670/671}^{672}$ 通过中间体向发射荧光波长为 738.6 nm 或 761.0 nm 的 Chl *a* 分子传递能量的过程;1.6 ns 时间组分则反映了 Chl $a/b_{670/671}^{672}$ 把能量传递给 Chl $a_{680/681}^{683.5}$ 或 Chl $a_{695.0}^{699.9}$,但由于 LHC II 没有能量捕获中心,只能通过辐射荧光返回基态的过程.虽然在测得的荧光光谱中解析出 6 个光谱组分,相对应时间拟合也应该得到 6 个以上的组分,而实验只拟合出 3 个,一些光谱和时间特性没有体现出来,这主要是因为一次一种方案的实验不可能得到所有需要的数据,这有待多次实验补充完成.

3 结论

在 273 k 下用波长为 507 nm 的光激发,对捕光天线 LHC II 的荧光光谱特性和时间特性作了研究.将获得的荧光光谱进行高斯解析,得到 6 个光谱组分,它们反映了光谱特性:Chl $a_{660/661}^{662}$ 、Chl $a/b_{670/671}^{672}$ 、Chl $a_{680/681}^{683.5}$ 和 Chl $a_{695.0}^{699.9}$,而中心波长为 738.6 nm、

761.0 nm 的光谱组分则可能对应着主发射峰的振动副带,它们分别所占比例为 1.4%、5.4%、36.7%、38.8%、16.4% 和 1.3%.通过对荧光衰减曲线进行三指数时间拟合,得到激发能在 LHC II 中传递的时间常数:8.8 ps、500 ps、1.6 ns;经分析认为,8.8 ps 时间组分反映了 Chl $a_{660/661}^{662}$ 吸收光能后,由于偶极子间相互作用产生光谱红移,向 Chl $a/b_{670/671}^{672}$ 或 Chl $a_{680/681}^{683.5}$ 传递能量的过程;500 ps 时间组分反映了 Chl $a_{660/661}^{662}$ 或 Chl $a/b_{670/671}^{672}$ 通过中间体向发射荧光波长为 738.6 nm 或 761.0 nm 的 Chl *a* 分子传递能量的过程;1.6 ns 时间组分则反映了 Chl $a/b_{670/671}^{672}$ 把能量传递给 Chl $a_{680/681}^{683.5}$ 或 Chl $a_{695.0}^{699.9}$,但由于 LHC II 没有能量捕获中心,只能通过辐射荧光返回基态的过程.

参考文献

- 1 Mei Du, Xiao Liang xie, Laurens Mets, *et al.* Direct observation of ultrafast energy-transfer processes in light harvesting complex II. *J Phys Chem*, 1994, **98**(17): 4736 ~ 4741
- 2 Kühlbrandt W, Wang D N, Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 1994, **367**(2): 614 ~ 621
- 3 Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochem Biophys Acta*, 1991, **1058**: 87 ~ 106
- 4 Hemelrijk P W, Kwa S L S, Grondelle R V, *et al.* Spectroscopic properties of LHC-II, the main light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex from chloplast membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1098**(1): 159 ~ 166
- 5 Dau H, Sauer K. Exciton equilibration and photosystem II excitation dynamics- α fluorescence study on photosystem II membrane particles of spinach. *Biophys Acta*, 1996, **1273**(1): 175 ~ 190
- 6 Trinkunas G, Connelly J P, Müller M G, *et al.* Model for the excitation dynamics in the light-harvesting complex II from high plants. *J Phys Chem (B)*, 1997, **101**: 7313 ~ 7320
- 7 Zucchelli G, Jennings R C, Garlaschi F M. Independent fluorescence emission of chlorophyll spectral forms in higher plant photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, **1099**(1): 163 ~ 169
- 8 王水才,贺俊芳,蔡霞,等.光系统 II Chl 分子能量传递超快光谱动力学.光子学报,2002,**31**(4): 389 ~ 393
Wang S C, He J F, Cai X, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(4): 389 ~ 393
- 9 Connelly J P, Müller M G, Hücke M, *et al.* Ultrafast spectroscopy of trimeric light-harvesting complex II from higher plants. *J Phys Chem (B)*, 1997, **101**: 1902 ~ 1909
- 10 王水才,蔡霞,贺俊芳,等.从捕光天线到反应中心分子能量传递研究.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
- 11 Remelly R, Varotto C, Sandona D, *et al.* Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. *J Biol Chem*, 1999, **274**:33510 ~ 33521
- 12 王水才, 贺俊芳, 蔡霞, 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
- 13 Wang S C, He J F, Cai X, *et al.* *Chinese Journal of Quantum Electronics*, 2002, **19**(5):404 ~ 409
- 13 Kwa S L S, H van Amerongen, Lin S, *et al.* Ultrafast energy transfer in LHC-II trimers from the Chl a/b light-harvesting antenna of Photosystem II. *Biochem Biophys Acta*, 1992b, **894**:59 ~ 68

The Fluorescence Kinetic Properties of the Light-harvesting Complex II

Peng Jufang¹, Wang Shuicai¹, He Junfang¹, Cai Xia^{1,2}, Liu Xiao¹, Kuang Tingyun³

¹ State Key Laboratory of Transient Optics and Technology Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, P. O. Box 80, Xi'an, China 710068

² Institute of Life Science in Northwest University, Xi'an, China 710069

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

Received date: 2003-03-24

Abstract Time-resolved fluorescence spectrum technology was carried out at 273 K to study the fluorescence spectral properties and time properties of the light-harvesting complex II of photosystem II prepared from spinach. The sample was excited at 507 nm. Six spectral components were obtained from LHC II, and reflected the spectral properties, which were Chl $a_{660/661}^{662}$, Chl $a/b_{670/671}^{672}$, Chl $a_{680/681}^{683.5}$ and Chl $a_{695.0}^{699.9}$, and the residual longest components at 738.6 nm and 761.0 nm were probably corresponding to vibrant sub-band of main emission peak. The fluorescence ratios of each component to that of all the components were 1.4%, 5.4%, 36.7%, 38.8%, 16.4% and 1.3%. Triexponential time fitting for the fluorescence decay curve detected at 685 nm yielded 3 components lifetimes of 8.8 ps, 500 ps, 1.6 ns, and obtained the corresponding relation between time constants and spectral components.

Keywords Light-harvesting complex II; Fluorescence spectral properties; Time properties; Chl a; Chl b; Carotenoid

Peng Jufang was born in 1976. She graduated from biology department of Shanxi Normal University in 1998. She got M. S. degree in Northwest University in 2001, and now is candidate for Ph. D. in Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy Sciences. Her research interests are the fields of ultrafast photobiology and photosynthesis mechanism.

