

PS II 颗粒复合物飞秒分辨低温荧光动力学研究*

刘 晓¹ 王水才^{1**} 贺俊芳¹ 蔡 霞^{1,2} 彭菊芳¹ 匡廷云³

(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 采用飞秒时间分辨荧光光谱学对 PS II 颗粒复合物在 83 K, 160 K, 273 K 下进行研究, 实验表明随温度升高, 光谱加宽. 并且发现在 PS II 颗粒复合物中至少存在以下几种特征 Chl 分子: Chl b_{639}^{640} , Chl b_{640}^{645} , Chl a_{660}^{663} , Chl a_{667}^{668} , Chl a_{673}^{676} , Chl a_{680}^{681} , Chl $a_{680/681}^{682}$, Chl $a_{684,685}^{688/689}$, Chl a_{688}^{698} . 在不同的温度下, 参与能量传递的色素分子传能途径各不相同, 但都有一个共同点: 在到达反应中心之前能量传递高效进行, 绝大多数能量传递到了反应中心, 而在 680 nm 之后的波段, 能量损耗明显增大, 这是由于电子传能受阻, 能量绝大多数以荧光形式耗散. 对荧光衰减曲线进行时间拟合, 得到四组时间常数: 30 ~ 40 ps, 260 ps, 550 ~ 670 ps, 1 ~ 8 ns. 几个 ns 的长寿命组分, 反映了两个能量传递过程, 即与基对态 P680⁺ pheo⁻, 以及能量传递过程中 Chl a 分子由激发态辐射荧光衰退到基态以辐射荧光形式丢失能量的过程有关. 550 ~ 670 ps 的时间组分, 反映的是部分电荷重组的过程. 260 ps 的组分只在 83 K 出现, 应归于 LHC II 中的 Car 分子经中间传递体传能到 Chl b_{639} 分子后继续将能量传递到反应中心 P680 的时间. 30 ~ 40 ps 的时间组分为 LHC II 中的 Chl 分子吸收光能后通过一系列中间体将能量传递到反应中心, Chl $a_{680/681}$ 分子的能量传递过程.

关键词 PS II 颗粒复合物; 能量传递; 飞秒分辨荧光光谱; 低温

中图分类号 Q631 **文献标识码** A

0 引言

光系统 II (PS II) 是高等植物、藻类以及蓝色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 的研究意义重大. 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, 外周天线又可分为主外周天线 LHC II b 和次外周天线 CP29、CP26、CP24. 核心天线由 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^[1]. 在 CP43 色素蛋白复合物中含有 19 ~ 20 个 Chl a 分子, 4-5 个 β -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 β -car 分子; 提纯的反应中心 D₁-D₂-Cyt b_{559} 复合物含有 6 个 Chl a 分子, 2 个 β -car 分子及 2 个去镁叶绿素 a 分子^[2]. 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储存起来, 满足地球上一切生命活动的能量需要^[3]. 所以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 的各个功能亚单元内部的能量传递^[2,4,5,7,10,14,15], 关于完整的 PS II 颗粒复合物动力学机制的报道并不是很多, Chen Y D 等运用飞秒吸收光谱法^[10], He J F 等对不同光强下 PS II 各功能亚单元间能量传递^[3] 以及 Wang S H 等运用荧光发射谱^[8,13] 曾对 PS II 颗粒复合物进行过研究. 由于荧光光谱实验是获得分子间能量传递机理及动力学规律的最直观方法之一, 本文运用飞秒分辨荧光光谱测量方法, 将荧光发射谱与荧光衰退时间相结合, 就不同温度下 PS II 颗粒复合物的飞秒时间分辨荧光发射进行分析, 以期获得 PS II 中的色素分子之间的能量传递途径随温度变化的动力学信息.

*国家基础研究发展规划 (973) 资助项目 (编号: G1998010100)

**通信联系人 Tel: 029-88484245

Email: wangshuicai@163.com

收稿日期: 2003-04-14

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^[4]从菠菜中分离提纯获得.

1.2 实验方法

实验采用飞秒分辨荧光光谱测量装置.由 Ti : sapphire 激光器 (Spectra physics lasers) 输出 800 nm,100 ~ 120 fs,82 MHz 的光脉冲作为种子光注入 Spitfire 再生放大系统 (Spectra physics lasers) 将脉冲放大,并降频为 1 KHz 后注入 OPA (Spectra physics lasers) 进行波长转换,选 507 nm 激光作为激励光源,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 (Optistat DN, Oxford Instruments) 并由 ITC601 温度控制器 (Oxford Instruments) 进行温度控制. 样品所发射的荧光信号进入双通道单色仪 (M300, Edinburgh Instruments Ltd.) 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 不同温度下归一化荧光发射谱比较

将三种不同温度下所测定的 PS II 颗粒复合物荧光发射谱以最大荧光发射峰值进行归一化后比

较,结果见如图 1. 可以看出,随温度升高光谱逐渐变宽. Groot 等人对 Cp47 (4 ~ 270 K) 及 Cp43 (5 ~ 293 K) 的荧光发射谱研究也得到了同样的结果. 他

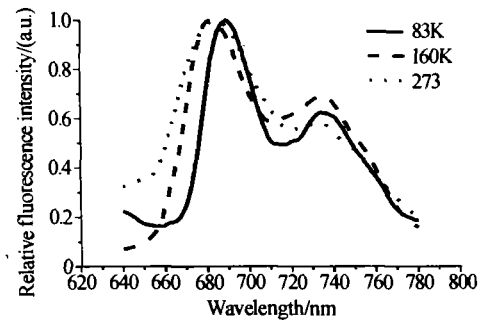


图 1 不同温度下 PS II 颗粒复合物荧光发射谱
Fig. 1 Fluorescence emission spectrum of PS II at 83K,160K and 273K

认为在两个电子态间的非辐射跃迁与温度有关^[5,6]. 在不同温度处理下,最大荧光发射峰及荧光发射次峰的波长发生了变化,分别为 689 nm 和 734 nm (83 K); 681 nm 和 734 nm (160 K); 683 nm 和 732 nm (273 K),说明在不同温度下 PS II 颗粒复合物的传能途径不同. 这是由于在不同的温度下, PS II 中色素分子与脱辅基蛋白的结合方位、距离等不同,对激子相互作用的影响不同,从而引起能量传递途径的不同. 并且在 83 K 时短波长部分的荧光增强,说明在该温度下吸收短波长的 Chl 分子的能量耗散相对较大.

2.2 不同温度下荧光发射谱高斯解析

将不同处理温度下测得的 PS II 颗粒复合物的荧光发射谱进行高斯解析,结果如图 2 及表 1.

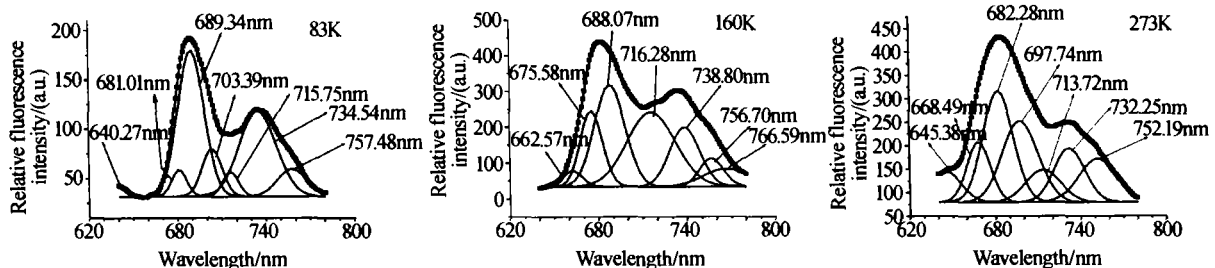


图 2 83K,160K,273K 温度下 PS II 颗粒复合物荧光发射谱高斯解析
Fig. 2 Gauss-fitting curves of PS II at 83K,160K,273K

表 1 83K,160K,273K 温度下 PS II 颗粒复合物荧光发射谱高斯解析

温度/K	中心波长/nm	640.27	681.01	689.34	703.39	715.74	734.54	757.48
83K	比率/%	1.53	4.07	39.69	9.84	4.09	32.59	8.19
160K	中心波长/nm	662.57	675.58	688.07	716.28	738.80	756.70	766.59
160K	比率/%	2.55	14.08	26.04	30.16	14.82	5.63	6.69
273K	中心波长/nm	645.38	668.49	682.28	697.74	713.72	732.25	752.19
273K	比率/%	7.17	10.83	25.72	22.27	8.685	12.74	12.59

依据吸收谱与发射谱的镜像对称关系,可以推断在 PS II 颗粒复合物中至少存在以下几种特征 Chl 分子: Chl b_{639}^{640} , Chl b_{640}^{645} , Chl a_{660}^{663} , Chl a_{667}^{668} , Chl a_{673}^{676} , Chl a_{680}^{681} , Chl $a_{680/681}^{682}$, Chl $a_{684,685}^{688/689}$, Chl a_{688}^{698} [7 ~ 10] (Chl $a/$

b_0^* : a 代表吸收峰, e 代表荧光发射峰). 而波长大于 700 nm 的荧光发射光谱组分是由光子从 chl 分子的第一单线激发态向基态的振转能级跃迁发出的. 对于不同温度下的能量传递途径,分析如下:(1)83 K

时,507 nm 的光作用于 PS II 颗粒复合物,首先由 LHC II 中的 Car 分子吸收光能,被激发到 $1B_u^-$ 态^[11],将激发能在 Car 分子及 Chl 分子间进行高效的能量传递,进而向核心天线系统传递,此过程中只有 Chl b_{639}^{640} 分子有少许的能量以荧光发射的方式耗散,由所占积分面积的比例来看(1.53%),该条带至多由一个 Chl 分子所发射^[5]. 核心天线又将能量高效的向反应中心传递,而此过程中能量损失也非常小,传递到 RC 的能量一部分被 RC 中的 Chl $a_{684/685}$ 分子接收,其在能量传递过程中以 689.34 nm 的荧光形式损耗,另有部分能量由 P680 向后传递时有 4.07% 的能量以 681.01 nm 的荧光发射,大多数光能被用于 P680 与 pheo 进行的光化学反应,而由于提纯的 PS II 颗粒复合物中的电子传递链不完整,使电子传递无法正常进行, $P680^+$ 与 $pheo^-$ 发生电荷重组. (2) 160 K 时,同样由 LHC II 中 Car 分子吸收 507 nm 的光能,在 Car 分子及 Chl 分子间进行高效的能量传递后,向核心天线传递,这个过程中仅有 Chl a_{660} 及 Chl a_{673} 分子分别发出 662.57 nm 和 675.58 nm 的荧光耗散(占总损耗的 17%). 核心天线将能量传递到 RC, RC 中 Chl $a_{684/685}$ 分子有部分能

量以 Chl $a_{688.07}$ 的荧光发射,另一部分能量传递 P680, P680 与 pheo 发生光化学反应之后的 + 能量传递途径与 83 K 相似. (3) 273 K 时,同样,由 Car 分子经 Chl a 分子将能量高效的传递到达反应中心的过程中天线系统中 Chl b_{640} , Chl a_{667} 及 Chl a_{688} 分子有 645.38 nm, 668.49 nm, 697.74 nm 的能量损耗^[9]. 其余的能量被传递到了反应中心的 P680, 一部分能量被用于与 pheo 的电荷分离,部分未被 P680 利用的能量以 682.28 nm 的荧光发射. 可以看出,不同的温度下,参与能量传递的色素分子不同,传能途径也各不相同,但各个温度下的传能有一个共同点:在到达反应中心之前能量损失较少,不足 20%, 能量传递是高效进行的,绝大多数能量传递到了反应中心,而在 680 nm 之后的波段,能量损耗明显增大,特别是由 Chl 分子第一单线激发态跃迁到基态的能量约占到了 40% 能量损耗. 这是由于电子传递受阻,反应中心所接收到的能量绝大多数返回到基态,以荧光形式耗散.

2.3 不同温度下传能时间比较

将不同温度下所测荧光衰减曲线用 F900 系统进行时间拟合,结果如表 2.

表 2 不同温度下 PS II 颗粒复合物荧光衰减曲线时间拟合结果

	τ_1/ns	τ_2/ns	τ_3/ns	τ_4/ns
83K(比率)	0.260(45.58%)	0.660(42.64%)	2.19(11.77%)	
160K(比率)	0.040(6.34%)	0.550(25.70%)	1.41(56.47%)	7.33(11.49%)
273K(比率)	0.03(1.22%)	0.670(95.84%)	4.95(2.94%)	

PS II 颗粒复合物的天线色素吸收的光能经过色素间一系列的中间传递步骤汇集到反应中心,传递必须尽量满足最大吸收的原则,激发能在传递时会少量的以热能的形式丢失,并产生激发波长向长波方向迁移,所以说,光能被色素系统吸收后可能有几种命运:用于光化学反应;辐射成荧光;丢失于其它过程,以热辐射等形式消失^[12]. 在本实验中,用 507 nm 光激发 PS II 颗粒复合物, LHC II 中 Car 分子首先吸收光能,跃迁到激发态,通过 Förster 共振, Dexter 电子交换,激子转移等无辐射能量转移方式将激发能通过中间体传递到反应中心,用于光化学反应. 王水才等人对 PS II 进行了理论推导及实验研究,得到 LHC II 中 Car 分子接收到光能后经过一系列中间体传能到反应中心的时间为 250 ps(理论值为 267 ps), LHC II 中 Chl 分子传能到反应中心用 25 ps(理论值 29.7 ps),并得到了 520 fs(及 210 fs)的 LHC II 中 Chl a 分子(Chl b 分子)向相邻的 Chl a 分子的传能时间^[13]. 陈耀东等人得到了 160 fs, 2.8 ps, 8.6 ps, 20.9 ps, 38.8 ps 的时间常数,并指出 160 fs, 2.8 ps, 20.9 ps 为能量在 LHC II 中的传递过

程, 8.6 ps 为由 LHC II 向核心天线和 RC 的能量传递过程. 本文的实验得到四组时间常数: 30 ~ 40 ps, 260 ps, 550 ~ 670 ps, 1 ~ 8 ns. 结合光谱解析,通过对各组分所占的比例及在各个波长下所占的强度(数据未显示)进行分析,结果如下:(1)几个 ns 的长寿命组分,反映了两个能量传递过程,①与基态 $P680^+ pheo^-$ 有关,这个态曾被报道在低温下可达到几十个 ns, 本文的实验结果与文献[14]的相符. ②反映了能量传递过程中 Chl a 分子由激发态衰退到基态以辐射荧光形式丢失能量的过程. (2) 550 ~ 670 ps 的时间组分在所有温度都出现,反映的是部分电荷重组的过程. 因为在提纯的 PS II 颗粒复合物中, Q_A, Q_B 丢失, $pheo^-$ 无法将电荷传递给 Q_A , 一部分 $pheo^-$ 与 $P680^+$ 发生电荷重组,本实验的结果与 Roelofs 等得到的 300 ~ 800 ps 的结果相一致^[15]. (3) 260 ps 的组分只在 83 K 出现,认为其与吸收短波长的色素分子有关. 应归于 LHC II 中的 Car 分子经中间传递体传能到 Chl b_{639} 分子后继续将能量传递到反应中心 P680 的时间. (4) 30 ~ 40 ps 的时间组分应为 LHC II 中的 Chl 分子吸收光能后通过一系

列中间体将能量传递到反应中心 Chl $a_{680/681}$ 分子的过程.

3 结论

运用飞秒时间分辨荧光光谱方法对 PS II 颗粒复合物在 83 K, 160 K, 273 K 温度下研究, 经分析发现 ① PS II 中至少存在以下几种特征 Chl 分子: Chl b_{639}^{640} , Chl b_{640}^{645} , Chl a_{660}^{663} , Chl a_{667}^{668} , Chl a_{673}^{676} , Chl a_{680}^{681} , Chl $a_{680/681}^{682}$, Chl $a_{684,685}^{688,689}$, Chl a_{688}^{698} . ② 1 ~ 8 ns 时间组分与基态 $P680^+ pheo^-$ 以及能量传递过程中 Chl a 分子由激发态到基态以辐射荧光形式丢失能量的过程有关. ③ 550 ~ 670 ps 的时间组分反映了部分电荷重组的过程. ④ 260 ps 的组分为 LHC II 中的 Car 分子经中间传递体传能到 Chl b_{639} 分子后继续将能量传递到反应中心 P680 的时间. ⑤ 30 ~ 40 ps 的时间组分为 LHC II 中的 Chl 分子吸收光能后通过一系列中间体将能量传递到反应中心 Chl $a_{680/681}$ 分子的能量传递过程.

参考文献

- 1 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. 从核心天线到反应中心分子传能研究. *光子学报*, 2003, 32(7): 848 ~ 852
Wang S C, Cai X, He J F, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2003, 32(7): 848 ~ 852
- 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, Gases 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 Groot M L, Frese R N, de Weerd F L, *et al.* Spectroscopic properties of the CP43 core antenna protein of photosystem II. *Biophysical Journal*, 1999, 77(6): 3328 ~ 3340
- 6 Groot M L, Peterman E J G, Van Stokkum I H M, *et*

- al.* Triplet and fluorescing states of the Cp47 antenna complex of photosystem II studied as a function of temperature. *Biophysical Journal*, 1995, 68(1): 281 ~ 290
- 7 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
- 8 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
- 9 Vasil'ev S, Orth P, Zouni A, *et al.* Excited-state dynamic in photosystem II: insight from the X-ray crystal structure. *PNAS*, 2001, 98(15): 8602 ~ 8607
- 10 Chen Y D, Chen J X, Hou J M, *et al.* Dynamic studies on primary reaction of PS II particles and core complex by femtosecond absorption spectroscopy. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(7): 700 ~ 705
- 11 de Weerd F L, Van Stokkum I H M, Van Grondelle R. Subpicosecond dynamics in the excited state absorption of all-trans- β -carotene. *Chemical Physics Letter*, 2002, 345(5): 38 ~ 43
- 12 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1998. 192 ~ 194
Yu S W, Tang Z C. Beijing: Science Press, 1998. 192 ~ 194
- 13 王水才, 蔡霞, 贺俊芳, 等. 从捕光天线到反应中心能量传递研究. *光子学报*, 2003, 32(6): 641 ~ 645
Wang S C, Cai X, He L F, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2003, 32(6): 641 ~ 645
- 14 Groot M L, Van Mourik F, Eijkelhoff C, *et al.* Charge separation in the reaction center of photosystem II studied as a function of temperature. *PNAS*, 1997, 94(4): 4389 ~ 4394
- 15 Theo A Roelofs, Stefan L S kwa, Van Grondelle R, *et al.* Primary processes and structure of the photosystem II reaction center II low-temperature picosecond fluorescence kinetics of a D₁-D₂-Cyt-b-559. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1143: 147 ~ 157

Studies on Femtosecond Fluorescence Dynamics of Photosystem II Particle Complex at Low Temperature

Liu Xiao¹, Wang Shuicai¹, He Junfang¹, Cai Xia^{1,2}, Peng Junfang¹, 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 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: 2003-04-14

Abstract In order to understanding the diversity of energy transfer in PS II at different temperatures, PS II particle complex purified from spinach was investigated with femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy in the case of excitation 507 nm at 83 K, 160 K, 273 K. The data were analyzed by Gauss analysis and fluorescence decay time-fitting. Some results were achieved. ① Increase of the temperature results in a broadening of the fluorescence emission spectra due to the temperature-dependent expressions for non-radiative transitions between two electronic states. ② There are at least several characteristic Chl molecules exist in PS II particle complex, i. e. Chl b_{639}^{640} , Chl b_{640}^{645} , Chl a_{660}^{663} , Chl a_{667}^{668} , Chl a_{673}^{676} , Chl a_{680}^{681} , Chl $a_{680/681}^{682}$, Chl $a_{684,685}^{688/689}$, Chl a_{688}^{698} (Chl a/b : a represents the peak of absorption, e represents the peak of emission). ③ Though the pathways of energy transfer are variable at different temperatures, there is a common property at all temperature: The energy transfer from pigments with absorption at short wavelength to reaction center pigments P680 is efficient, but from P680 to other pigments, the energy-loss becomes larger as a result of abruptness of electron transfer. ④ Four time constants 30 ~ 40 ps, 260 ps, 550 ~ 670 ps and 1 ~ 8 ns are obtained by the method of fitting the fluorescence decay curves. The long-life time constant of 1 ~ 8 ns is related to radical pair state $P680^+ pheo^-$ and the process of excited state decaying to ground state. A component in the range of 550 ~ 670 ps refers to partial charge recombination process. 260 ps appears only at 83 K, is attributed to the progress of energy transfer from Car in LHC II to Chl b_{639} molecule and then to P680 by a series of intermediates. The shortest lifetime of 30 ~ 40 ps is ascribed to an energy transfer from Chl in LHC II to Chl $a_{680/681}$ molecule in reaction center by intermediates.

Keywords PS II particle complex; Energy transfer; Femtosecond fluorescence spectroscopy; 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. 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.