

假根羽藻 LHC II 的同质和异质三聚体的能量传递动力学研究*

彭菊芳^{1,2} 王水才^{2,**} 贺俊芳² 蔡霞^{2,3} 刘晓^{2,3} 陈晖⁴ 李良璧⁴

(1 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062)

(2 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)

(3 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

(4 中国科学院植物研究所光合作用中心, 北京 100093)

摘要 采用飞秒时间分辨荧光光谱技术在室温下用波长为 495nm 的光激发, 研究了假根羽藻 LHC II 的同质三聚体和异质三聚体这两种不同聚集形式蛋白复合物的光谱特性和传能特性. 将实验获得的两样品的荧光光谱分别进行高斯解析, 各得到 5 条亚谱带, 并分析得出同质三聚体的四种特征 Chl 分子的光谱特性和异质三聚体的五种特征 Chl 分子光谱特性, 另外还对两蛋白复合物的荧光光谱作了比较. 利用 Global 优化处理方法, 建立多指数拟合联立方程对荧光衰减曲线进行拟合处理, 得到同质三聚体 Chl 分子传能的寿命: 165 ± 8.5 fs、 2.2 ± 0.6 ps、 5.1 ± 0.1 ns; 异质三聚体 Chl 分子传能的寿命: 255 ± 6.3 fs、 4 ± 0.8 ps 和 3.8 ± 0.1 ns; 并且将这些时间常数作出归属. 将其分析比较, 快组分同质三聚体的传能速率较高, 推断组成同质三聚体的同种脱辅基蛋白间的结合程度较组成异质三聚体的不同脱辅基蛋白间的更紧密, 使其上结合的 Chl 分子空间位置更近, 更有利于能量的迅速传递; 而慢组分同质三聚体的偏大, 可能是由于其经历的传能途径较长, 传能机制上也和异质三聚体不同所致.

关键词 同质三聚体; 异质三聚体; LHC II; 光谱特性; 传能特性; 能量传递

中图分类号 TN249 **文献标识码** A

0 引言

光合作用是维持地球上生命活动的最根本的反应, 其核心问题之一, 是光能的有效吸收、传递和转换的机理. 所有绿色植物完成光合功能的能量全部来自于捕光色素蛋白复合物收集的太阳光能. 作为位于光系统 II 中最外周且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^[1~3]. 目前普遍认为 LHC II 最先形成的是单体, 然后由单体聚集成三聚体, 而三聚体形式是 LHC II 在叶绿体中的主要功能组成单位. 现在研究人员已经分离出许多不同聚集形式的 LHC II^[4,6]. 还有研究表明, 在活体内部也存在着生理特性差异很大的不同聚集形式的 LHC II^[7], 但是迄今为止国内外仅有一例报道在康乃馨的 PS II 中分离出 LHC II 的同质三聚体^[5], 所以几乎所有的报道都集中在异质三聚体的结构和功能上, 对同质三聚体的研究非常少. 陈晖等利用液相色谱层析技术和蔗糖密度梯度分级分离技术直接从假根羽藻类囊体膜上同时分离出了 LHC II

的单体、同质和异质三聚体以及寡聚体, 为进一步研究不同聚集形式 LHC II 的分子结构和生理功能奠定了基础. 本文采用飞秒时间分辨荧光光谱技术, 对假根羽藻 LHC II 的同质和异质三聚体这两种不同聚集形式的蛋白复合物的光谱特性、时间特性及色素分子间能量传递的超快过程作了研究, 以期对其结构功能做出一些揭示.

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假根羽藻中分离纯化的捕光复合物 LHC II 的同质三聚体和异质三聚体, 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 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右.

1.2 实验方法

采用超快荧光光谱测量装置. 由 Millennia Xs-740 钕酸铷泵浦 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 495 nm, 重复频率 1 KHz 的飞秒光脉冲作为激励光源, 为避免样品发生湮灭, 光强定为

* 国家重点基础研究发展(G1998010100)、国家自然科学基金(60308004)资助项目

** Tel: 029-88484245 Email: wangshuicai@163.com

收稿日期: 2004-01-07

1.3 × 10¹² 个光子/脉冲. 激光进入样品室激发 LHC II 样品, 发出的荧光经准直后输入至 SPEX270M 单色仪中进行色散, 单色仪步长为 2 nm, 而后, 原始荧光信号被放大器放大, 经光电倍增管进行光电转换后输送到信息处理 Boxcar 系统, 进行记录处理. 实验在室温下、黑暗中进行.

2 结果与讨论

2.1 同质和异质三聚体中 Chl 分子的荧光光谱分析

天线系统里捕光天线 LHC II 色素蛋白的含量最为丰富, 种类也最多, 有 Chl a、Chl b 以及类胡萝卜素等分子. 495 nm 波长光激励下最先受到激发的主要是 Chl b 分子, 也有少量类胡萝卜素分子, 它们随后迅速将能量传递给相邻较低能态的色素分子, 然后按能级递减原则向长波长更低能态的叶绿素分子传递能量. 图 1 和表 1 分别给出 495 nm 波长光激励下假根羽藻 LHC II 同质三聚体的荧光积分谱及其高斯解析组分谱和谱参量. 图 1 中显示, 荧光光谱范围在 646 ~ 740 nm 之间, 可以看出荧光主要是由低能态的色素分子所发射. 按照吸收谱和发射谱的镜像对称关系, 荧光只能是叶绿素分子发出的, 而不可能是类胡萝卜素分子.

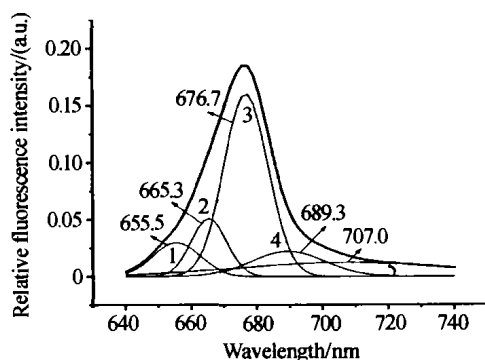


图 1 LHC II 同质三聚体的荧光光谱及解析组分谱
Fig. 1 The fluorescence spectrum of Homotrimer

表 1 同质三聚体荧光光谱的解析谱参量

序号	峰值波长/nm	半高全宽/nm	积分能量	相对强度/%
1	655.5	14.34	0.535	10.80
2	665.3	10.79	0.688	18.45
3	676.7	13.45	2.705	58.20
4	689.3	22.23	0.618	8.05
5	707	65.55	1.020	4.50

Hemerijk^[8] 等人在 77 k 下对 LHC II 三聚体进行研究, 得到 6-9 个光谱成分, 分别是 640-645、648-652、657、662、671-668、676 nm. Giuseppe Zucchelli^[9] 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^e, a 代表吸收峰, e 代表发射峰). 本实验室曾得到过 LHC II 三聚体中 662、672、683.5、699.9 nm

的光谱成分^[10]. 同质三聚体荧光光谱经高斯解析解出 5 条亚谱带, 其峰值波长分别为: 655.5 nm、665.3 nm、676.7 nm、689.3 nm 和 707 nm, 它们所占积分能量比例各为 9.61%、11.10%、48.60%、11.10% 和 18.33%. 根据发射光谱与吸收光谱之间的镜像对称关系通过分析比较, 认为它们分别体现出四种特征 Chl 分子的光谱特性: Chl b₆₅₃^{655.5}、Chl a₆₆₂^{665.3}、Chl a₆₇₅^{676.7} 和 Chl a₆₈₅^{689.3}, 而中心波长为 707 nm 的光谱组分则可能对应着 Chl a 分子主发射峰的振动副带.

图 2 和表 2 给出了 495 nm 波长光激励下假根羽藻 LHC II 异质三聚体的荧光积分谱及其高斯解析组分谱和谱参量, 荧光光谱范围在 648 ~ 710 nm 之间. 光谱经高斯解析也解出 5 条亚谱带, 其峰值波长分别为: 659.8 nm、668.1 nm、674.5 nm、681.1 nm 和 687.9 nm, 它们所占积分能量比例各自为 1.19%、10.68%、39.24%、42.06% 和 6.82%, 经分析我们认为它们反映了五种特征 Chl 分子的光谱特性: Chl b₆₆₆^{659.8}、Chl a₆₆₂^{668.1}、Chl a/b_{670/671}^{674.5}、Chl a₆₈₀^{681.1} 和 Chl a₆₈₅^{687.9}.

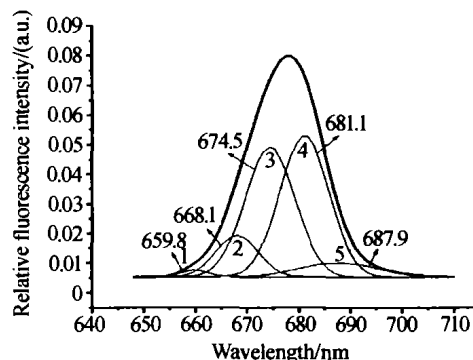


图 2 LHC II 异质三聚体的荧光光谱及解析组分谱
Fig. 2 The fluorescence spectrum of Heterotrimer

表 2 异质三聚体荧光光谱的解析谱参量

序号	峰值波长/nm	半高全宽/nm	积分能量	相对强度/%
1	659.8	5.56	0.016	2.04
2	668.1	8.24	0.144	12.34
3	674.5	9.61	0.529	38.95
4	681.1	9.45	0.567	42.44
5	687.9	15.43	0.092	4.24

捕光天线复合物 LHC II 的同质三聚体和异质三聚体在多肽组成和色素组成上都有所不同. 同质三聚体只有一种多肽组分, 而异质三聚体有 2-3 种, 它们虽都含有 Chl a、Chl b 和类胡萝卜素分子, 但含量不等, 这反映在它们的蛋白质多肽的空间排列上就会出现较大差异, 使得它们的生理特性和功能特性会有所不同. 从图 1 和图 2 可以看出, 在同样强度激光的激励下, 相同 Chl 分子浓度的同质三聚体发射的荧光强度较异质三聚体的高, 荧光量子产额大, 体现出 495 nm 光激励下, 同质三聚体被激发的色素分子较多, 激发能吸收多, 损耗也多, 发射的荧光就强; 而同质三聚体的荧光光谱范围也较异质三聚

体宽, 荧光谱峰值较异质三聚体稍蓝移, 我们分析这主要是由两者具有不同的色素分子团所致, 同质三聚体较短波长的色素分子团波长比异质三聚体更短, 而较长波长的色素分子团的波长比异质三聚体更长, 而这些都是由它们结构上的差异造成的。

2.2 在同质和异质三聚体中 Chl 分子的传能特性比较

实验中实测信号为 $P(t)$, 测量系统的响应函数为 $R(t)$, 真实信号为 $S(t)$, 则有

$$P(t) = R(t) * S(t) \quad (1)$$

式中, “*” 代表卷积, 通过 $P(t)$ 对 $R(t)$ 的解卷积就可以获得真实信号 $S(t)$. 为进一步得到真实信号 $S(t)$ 中包含的荧光寿命, 我们建立了多指数方程进行拟合运算, 设某波长 (i) 下真实信号的多指数拟合函数为 $y(i)$, 那么

$$y(i) = y_0(i) + \sum_{j=1}^N A_j \times \exp(-t/\tau_j) \quad (2)$$

y_0 为偏移量, j 为拟合项数, A 为幅度. 对同样的样品, 在相同条件下测量的荧光强度随时间变化的曲线具有内在的相关性, 得到的荧光寿命反映在不同波长下应该是相同的, 因此在数据处理时如果只对单个曲线拟合, 结果就会具有片面性. 这里我们采用 Global 优化处理方法, 借助计算机建立同时解多个波长下的多指数拟合联立方程得到荧光寿命时间常数列于表 3. 从表 3 中可以看到, 同质三聚体拟合出三个时间寿命组分: 165 ± 8.5 fs、 2.2 ± 0.6 ps、 5.1 ± 0.1 ns, 异质三聚体也拟合得到三个时间寿命组分: 255 ± 6.3 fs、 4 ± 0.8 ps 和 3.8 ± 0.1 ns.

表 3 同质三聚体和异质三聚体的荧光时间拟合常数

LHC II 亚复合物	τ_1 /fs	τ_2 /ps	τ_3 /ns
同质三聚体	165 ± 8.5	2.2 ± 0.6	5.1 ± 0.1
异质三聚体	255 ± 6.3	4 ± 0.8	3.8 ± 0.1

Connelly^[11] 等以双色瞬态吸收技术研究了菠菜 LHC II 中的能量传递过程, 得到时间组分: 175 fs、625 fs、5 ps 以及一个长寿命组分 790 ps, 并认为前三个组分反映了 Chl b 分子向 Chl a 分子的能量传递表现. Kleima^[12] 等采用泵浦探测技术对 LHC II 研究, 测得 Chl b 分子向 Chl a 分子有两个明显的能量传递过程: 200 fs 和 3 ps, Chl a 分子之间有 ~ 18 ps 的传能时间, 并指出单体和三聚体中都存在从 Chl b 分子到 Chl a 分子的快速传递 (~ 200 fs), 三聚体中有的 Chl b 分子向 Chl a 分子的传递发生在 600 fs. 虽然绿藻在捕光色素蛋白复合物组成上具有自身进化的一些独特性, 但它们在光谱特性和色素组成等方面都与高等植物相似^[13]. 可以看出, 假根羽藻 LHC II 的同质和异质三聚体荧光寿命中的 165 ± 8.5 fs 和 255 ± 6.3 fs 与前人得到的飞秒量级的时

间常数表达同一类的能量传递. 按照对菠菜 LHC II 的 Chl 分子能量传递研究^[14] 以及理论计算, 我们认为在假根羽藻中拟合得到的 165 ± 8.5 fs 及 255 ± 6.3 fs 是 Chl b 分子通过 Förster 共振传能机理以随机跃迁方式向 Chl a 分子进行能量传递的体现. 而 2.2 ± 0.6 ps 和 4 ± 0.8 ps 属于 Chl b 分子向 Chl a 分子或两个 Chl a 分子间用激子机制或 Förster 机制以单步跃迁方式传递能量的时间常数, 两个长的时间常数 5.1 ± 0.1 ns 和 3.8 ± 0.1 ns 则表现了单独分离出的 LHC II 体系由于最终没有能量受体只能以荧光辐射的方式耗散掉能量而回到基态的过程. 对同质和异质三聚体的荧光寿命时间组分进行比较, 我们看到, 就皮秒和飞秒组分来说, 同质三聚体的比异质三聚体的要小, 也就是同质三聚体对激发能的传递速率较高, 由此不难推断出, 组成同质三聚体的同种脱辅基蛋白间的结合程度较组成异质三聚体的不同脱辅基蛋白间的结合要更紧密, 使其上结合的 Chl 分子间空间位置更近, 更有利于能量的迅速传递; 而对于长寿命组分, 同质三聚体偏大, 可能是由于其经历的传能途径较长, 传能机制上也和异质三聚体不同所致.

图 3 是同质三聚体的 DAS 谱, 它是各时间常数组分在不同波长下荧光强度变化的曲线. 从图中可以看到, 时间常数 165 ± 8.5 fs 的波谱在 676 nm 处有一高峰, 另外在 643 ~ 666 nm 间还有一小峰; 2.2 ± 0.6 ps 的波谱在 660 ~ 684 nm 间有一峰; 5.1 ± 0.1 ns 的曲线基本平缓, 但在 680 nm 以后有微弱的隆起. 结合该图谱以及荧光光谱和前面对时间常数的分析, 认为寿命组分 165 ± 8.5 fs 可能反映了 Chl $b_{653}^{655.5}$ 分子将激发能传递给 Chl $a_{675}^{676.7}$ 分子的过程; 2.2 ± 0.6 ps 组分可能是某个短波长 Chl a 分子传递能量给 Chl $a_{662}^{665.3}$ 分子的时间常数; 寿命组分 5.1 ± 0.1 ns 则可能反映了 Chl $a_{685}^{689.3}$ 分子接收能量后, 由于偶极子间相互作用产生光谱红移, 向发射 707 nm 荧光的 Chl a 分子传能, 最终因为没有能量终端受体只能辐

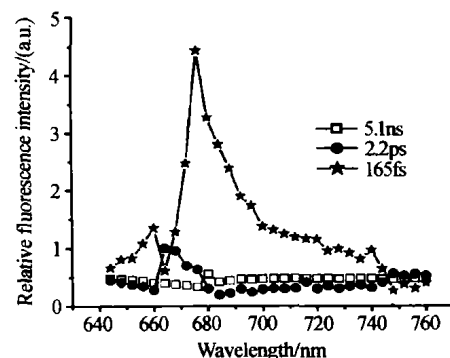


图 3 同质三聚体的 DAS 谱

Fig. 3 The Decay-associated fluorescence spectrum of Homotrimer

射荧光回到基态的过程。

图4为异质三聚体的DAS谱。图中显示组分 255 ± 6.3 fs的波谱在676 nm处有一高峰,在654~666 nm间有一小峰;时间常数 4 ± 0.8 ps的曲线在674~688 nm间出现峰值;3.8 ns的波谱在686 nm后出现缓坡。由此推断,寿命组分 255 ± 6.3 fs可能是激发态的Chl $b_{656}^{659.8}$ 分子向Chl $a/b_{670/671}^{674.5}$ 传递能量的体现; 4 ± 0.8 ps组分可能反映了某个较短波长的Chl a 分子将激发能传递给Chl $a_{680}^{681.1}$ 分子的过程;时间常数 3.8 ± 0.1 ns则可能体现了激发态的Chl $a_{687.9}$ 分子因无能量捕获体只能辐射荧光返回基态的过程。

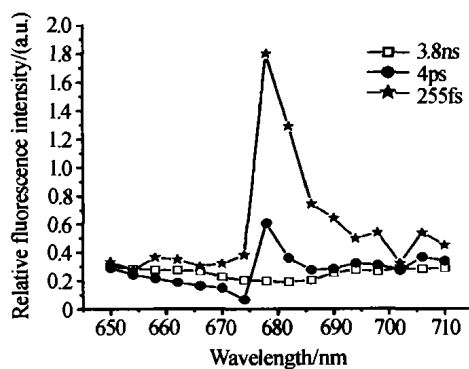


图4 异质三聚体的DAS谱

Fig. 4 The Decay-associated fluorescence spectrum of Heterotrimer

3 结论

在室温下,利用飞秒时间分辨荧光光谱技术以495 nm波长的光激发,对假根羽藻LHC II的同质三聚体和异质三聚体的光谱特性和传能特性进行了研究比较,获得以下结论:

1) 得出同质三聚体有四种特征Chl分子的光谱特性:Chl $b_{653}^{655.5}$ 、Chl $a_{662}^{665.3}$ 、Chl $a_{675}^{676.7}$ 和Chl $a_{685}^{689.3}$,异质三聚体五种特征Chl分子的光谱特性:Chl $b_{656}^{659.8}$ 、Chl $a_{662}^{668.1}$ 、Chl $a/b_{670/671}^{674.5}$ 、Chl $a_{680}^{681.1}$ 和Chl $a_{685}^{687.9}$;并对两样品的荧光光谱进行了比较。

2) 采用Global优化处理方法,对衰减曲线拟合处理,获得同质三聚体Chl分子传能的寿命: 165 ± 8.5 fs、 2.2 ± 0.6 ps、 5.1 ± 0.1 ns;异质三聚体Chl分子传能的寿命: 255 ± 6.3 fs、 4 ± 0.8 ps和 3.8 ± 0.1 ns;并结合DAS谱、荧光谱等分析将这些时间常数作出归属。从快组分上可看出,同质三聚体的传能速率较高,推断组成同质三聚体的同种脱辅基蛋白间的结合程度较组成异质三聚体的不同脱辅基蛋白间的更紧密,更有利于能量的迅速传递;而相较于慢组分,同质三聚体偏大,可能是由于其经历的传能途径较长,传能机制上也和异质三聚体不同所致。

参考文献

- Du M, Xie X L, Mets L, et al. Direct observation of ultrafast energy-transfer processes in light harvesting complex II. *J Phys Chem*, 1994, **98**(17): 4736~4741
- Kühlbrandt W, Wang D N, Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 1994, **367**(2): 614~621
- 贺俊芳, 王水才, 张舒, 等. 外周天线LHC II的荧光光谱特性. *光子学报*, 2002, **31**(1): 6~9
He J F, Wang S C, Zhang S, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(1): 6~9
- Spangfort M, Andersson B. Subpopulations of the main Chlorophyll a/b light-harvesting complex of Photosystem II-isolation and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **977**: 163~170
- Jackowski G, Janson S. Characterization of Photosystem II antenna complexes separated by non-denaturing isoelectric focusing. *Z Naturforsch*, 1998, **53C**: 841~848
- Jackowski G, Przymusiński R. The resolution and biochemical characterization of subcomplexes of the main light-harvesting Chlorophyll a/b-protein complexes of Photosystem II. *Photosynth Res*, 1995, **43**: 41~48
- Bassi R, Dieneses P. A Supramolecular light-harvesting complex from chloroplast Photosystem-II membrane. *Eur J Biochem*, 1992, **204**: 317~326
- 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 chloroplast membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1098**(1): 159~166
- 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
- 彭菊芳, 王水才, 贺俊芳, 等. 捕光复合物LHC II的荧光动力学特性. *光子学报*, 2004, **33**(2): 212~215
Peng J F, Wang S C, He J F, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(2): 212~215
- Connelly J P, Muller M G, Hucke M, et al. Ultrafast spectroscopy of trimeric light-harvesting complex II from higher plants. *J Phys Chem B*, 1997, **101**: 1902~1909
- Kleima F J, Gradinaru C C, Calkoen F, et al. Energy transfer in LHC II monomers at 77 K study by sub-picosecond transient absorption spectroscopy. *Biochemistry*, 1997, **36**: 15262~15268
- 李爱芬, 陈敏, 周百成, 等. 光合生物色素-蛋白质复合物的多样性. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**(2): 154~157
Li A F, Chen M, Zhou B C, et al. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, **27**(2): 154~157
- 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

Study on Energy Transfer Kinetics of Homotrimer and Heterotrimer of the Light-harvesting Complex II from *Bryopsis Corticulans*

Peng Jufang^{1,2}, Wang Shuicai², He Junfang², Cai Xia^{2,3}, Liu Xiao^{2,3}, Chen Hui⁴, Li Liangbi⁴

1 Institute of Life Science in Shaanxi Normal University, Xi'an 710062

2 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

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

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

Received date: 2004-01-07

Abstract Femtosecond-time-resolved fluorescence spectroscopy technology has been carried out to study the fluorescence spectral properties and energy transfer properties in homotrimer and heterotrimer of the light-harvesting complex II prepared from *Bryopsis corticulans*, which is excited at 495 nm and room temperature. Both homotrimer and heterotrimer have obtained five spectral components by Gauss analysis, and each of which reflects different spectral properties. Furthermore, the fluorescence spectra of the two complexes have been analyzed and compared. In addition, Triexponential time fitting for the fluorescence decay curve of homotrimer yields 3 components lifetimes of 165 ± 8.5 fs, 2.2 ± 0.6 ps and 5.1 ± 0.1 ns, of heterotrimer receives 3 components lifetimes of 255 ± 6.3 fs, 4 ± 0.8 ps and 3.8 ± 0.1 ns, and all of which have been given ascription. Here, the two shorter time components of homotrimer are faster than those of heterotrimer. Which shows that the protein binding of homotrimer is more compact than that of heterotrimer, and causes the distances between the pigments of homotrimer can be shorter, and energy transfer between them be faster.

Keywords Homotrimer; Heterotrimer; LHC II; Fluorescence spectral properties; Energy transfer properties; Energy transfer

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 a candidate for Ph. D. in Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences. Her research interests are the fields of ultrafast photobiology and photosynthesis mechanism.