

PS II 颗粒二聚体中类胡萝卜素向反应中心传能研究*

刘 晓^{1,2} 王水才² 贺俊芳² 彭菊芳^{3,2} 匡廷云⁴

(1 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

(2 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)

(3 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062))

(4 中国科学院植物研究所光合作用研究中心, 北京 100093)

摘 要 运用瞬态荧光光谱技术在 77 K 低温下对 PS II 颗粒复合物中类胡萝卜素(Car)分子的能量传递过程进行研究,通过不同激发波长 473 nm,481 nm,507 nm 选择性激发 PS II 颗粒复合物中色素分子,得到 PS II 颗粒二聚体中关于 Car 能量传递的三组时间组分:16.6 ps,130~183 ps,217~249 ps. 其中 16.6 ps 反映了 LHC II 中的 Car 分子将能量通过中间体 Cars、Chls 分子传递到 Chl⁶⁹⁹ 的过程;130~183 ps 为核心天线中的 β -Car 分子向 RC 的能量传递时间;217~249 ps 为 LHC II 中 Car₄₈₁ 通过中间 Chla 分子向 RC 的传能时间.

关键词 PS II 颗粒复合物;类胡萝卜素;能量传递

中图分类号 Q631 **文献标识码** A

0 引言

光合器官中除含叶绿素(Chl)分子外,还有辅助色素,辅助色素分子的存在是光合生物适应环境的一种方式.类胡萝卜素(Car)分子就是一类辅助色素分子,其在光合作用中主要有以下功能:辅助捕获光能,调节激发能的分配以及作为光保护剂使光合器官免受强光损伤.光系统 II 中类胡萝卜素主要存在于 LHC II 以及核心复合物中.Zhenfeng Liu 等人^[1]对菠菜 LHC II 0.272 nm 的晶体结构分析表明,每个 LHC II 单体中含 8 个 Chla,6 个 Chlb 以及 2 个叶黄素(Lut),1 个叶黄质(Neo),以及一些叶黄素循环中形成的混合物.LHC II 中的 Lut 和 Neo 作为有效的辅助天线,吸收蓝区光作为对吸收红区光 Chl 的补充.对 LHC II 结构的研究也证明了其淬灭三线态 Chls 分子以及单线态氧的光保护作用.在核心复合物中仅含 Car 中的 β -胡萝卜素(β -Car)分子.对 Car 传能的研究有助于更好的了解光合作用机理,而前人对于 Car 的能量传递研究多在 PS II 的各个亚光合单元中进行^[2-4],在 PS II 颗粒复合物这一整体中对 Car 的传能的研究尚不多见.本文采用瞬态荧光光谱法,结合同样条件下核心复合物的分析,对 PS II 颗粒中 Car 吸能、传能进行深入的研究,获得了最新结果.

1 材料和方法

1.1 样品制备

PSII 颗粒复合物及核心复合物由中国科学院植物研究所光合作用研究中心提供,依据改进的 Alfonso 等人的方法^[5]从菠菜中分离提纯获得.

1.2 瞬态荧光光谱

瞬态时间测量由 1 kHz 飞秒光谱装置获得.其装置由二极管泵浦的钕酸钇激光器(Millennia Xs, Spectra-physics)泵浦 Ti-sapphire oscillator 激光器(Tsunami, Spectra-physics),产生波长 800 nm,重复频率 82 MHz,脉宽 100 fs 的脉冲作为种子光进入由 Nd:YLF 激光器(Evolution, Spectra-physics)泵浦的再生放大系统(Spitfire, Spectra-physics),产生输出 800 nm,约 700 mW 的光脉冲进入光学参量放大系统(OPA-800C, spectra-physics),获得可调谐、脉宽小于 130 fs,能量在 3~75 μ J 的光脉冲.由于吸收动力学是激发强度的函数,激发强度小于 1×10^{13} 光子/cm²/脉冲必然不会发生光淬灭^[6].实验过程中保证输出光脉冲强度约 1.2×10^{12} 光子/脉冲以防止光淬灭发生.实验过程中使 OPA 分别输出 473、481、507 nm 光脉冲用于激发样品.

激发光入射进可控温样品室激发样品,样品室制冷系统为加液氮可调温低温保持器(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-PMT 光电倍增管(R3809U-50, HAMAMATSU)放大,

*国家基础研究发展规划(973)资助项目(编号:G1998010100)

Tel:029-88484245 Email:little-lx@sohu.com

收稿日期:2004-03-29

将放大后的信号输入寿命分析系统 (F900, Edinburgh Instruments Ltd.) 进行数据采集、分析. MCP-PMT 采用 4096 道计数, 每道时间道宽为 12 ps. 为尽量减少由于激光照射产生的热耗散, 实验在 77 K 的低温下进行, 这样得到的荧光信号能更贴近自然条件下光合作用过程.

1.3 数据处理

实验测得的原始数据通常需要经过数值分析以获得其内在的增长或衰减寿命参数. 指数形式的增长或衰退过程可以表示为: $R(t) = A + \sum_{i=1}^n B_i \exp \frac{-t}{\tau_i}$, 其中 B_i 为强度, 是与实验仪器系统及样品有关的参数, 其值可正可负, 当为正值时表示衰退过程, 为负值时表示增长过程. τ_i 为寿命, A 为附加背景. $R(t)$ 常常被称作衰退模型, 可作为荧光的数学表达. 但是, $R(t)$ 只是对增长或衰退过程的近似表达, 其不包含原始数据的两个重要特征, 即数据的统计学噪音和样品激发过程. 事实上, 许多寿命的测量并不是在极短、迅速上升后就开始衰退, 而是存在一个由激发光引起的有限上升沿, 这种情况下, 样品的响

应函数不能简单的用 $R(t)$ 来描述. 样品响应函数 $X(t)$ 和系统响应函数 $E(t)$ 以及样品衰退模型之间的数学关系为: $X(t) = \int_0^t E(t') R(t-t') dt'$, 经过解卷积获得实验材料的真实信号.

2 结果与讨论

用不同波长光选择性激发不同色素分子, 将有不同的能量传递途径. PSII 颗粒复合物, 包括 LHCII, 核心复合物 (CC). 而 LHC II 结合了约 50% 的 Chl 分子, 所以光激发 PS II 颗粒复合物, 大部分光能被 LHC II 中色素分子吸收. 473、481 nm 光主要激发 LHC II 中 Car 分子 (包括 Lut、Neo、Vio) 以及 Chlb 分子, 由于本实验样品中的 Vio 含量十分少, 我们可以认为 473、481 nm 主要选择性激发 Lut、Neo 以及 Chlb 分子, 而 507 nm 光主要被 LHC II 中 Lut 吸收.

结合相同条件下激发核心复合物得到的荧光谱时间拟和结果, 对 PS II 颗粒复合物进行比较分析. 在不同波长光激发下 PS II 颗粒和核心复合物荧光谱时间拟和结果见表 1, 2.

表 1 不同波长激发下 PS II 颗粒的荧光谱时间拟合结果

激发波长/nm	τ_1 /ps	τ_2 /ps	τ_3 /ps	τ_4	τ_5 /ns
473	16.6	130 ~ 183	284 ~ 347	610 ~ 737 ps	1.29 ~ 2.89
481	146	217 ~ 249	555 ~ 694	7.86 ~ 11.1 ns	
507	154 ~ 183	594 ~ 693			

表 2 不同波长激发下核心复合物荧光谱时间拟合结果

激发波长/nm	τ_1 /ps	τ_2 /ps	τ_3 /ps	τ_4	τ_5 /ns	τ_6 /ns
473	24 ~ 40	123 ~ 217	301 ~ 431	642 ~ 797 ps	1.03 ~ 2.64	6.17 ~ 18.13
481	16	152 ~ 201	400	0.925 ~ 1.21 ns	7.821	

由于 Chls 分子的传能比 Car 分子快得多, LHCII 中 Cha 分子可以在 20 ~ 25 ps 内将能量传递到反应中心^[7], 所以实验中得到的 ps、ns 量级的时间组分主要反应了以下过程: Car 分子的吸能、传能时间; 反应中心电荷重组时间以及色素分子从激发态退激回到基态的时间. 其中 >6 ns 的组分为反应中心的电荷重组时间, 0.9 ~ 3 ns 时间常量反映的是色素分子中未参与能量传递的部分, 从激发态退激回到基态 S_0 的时间组分. 以下对 Car 分子的能量传递过程进一步分析.

一般认为, Car 分子具有一个高能激发态 S_2 ($^1\text{Bu}^+$), 一个低能激发态 S_1 ($^2\text{Ag}^-$) 及三线态 T_1 . 大部分实验证明 Car 分子向 Chl 分子的能量传递从 S_2 态开始, 但有一小部分 (<20%) 可能从 S_1 态开始^[8]. 当 Car 分子吸收光能, 从基态 S_0 ($^1\text{Ag}^-$) 跃迁到高能激发态 S_2 , 处于 S_2 态的 Car 分子有几种退激途径: ①快速内转换 (IC) 到 S_1 态; ②直接发射荧光

回到基态; ③无辐射跃迁到基态. 由 S_2 态内转换到 S_1 态的电子一部分以荧光形式回到基态 S_0 , 一部分以系间串越方式内转换到三线态 T_1 ^[9]. Car 分子的 S_1 态可能与多种功能有关, 特别是与高等植物的叶黄素循环有关, 在此功能中, Car 依据环境条件调节流入反应中心的光能, IC 反应的循环包含三种 Car 分子, 玉米黄质 (Zeaxanthin)、花药黄质 (Antheraxanthin) 以及紫黄质 (Violaxanthin), 依据可利用的光能, 它们相互转换, 在高光能的情况下, Zeaxanthin 的浓度增加, 过多的能量被耗散出天线系统, 在低光能条件下, Violaxanthin 是主要的 Car 分子, 并且未观察到湮灭的现象发生. Car 以此实现对光能的调节^[10]. Car 分子 S_2 态的寿命在溶液中, 无能量传递发生时为 200 ± 100 fs, 而在蛋白质环境中, 由于扩散相互作用的影响, 导致 S_2 态能级向 S_1 靠近, 所以加速了内转换, Car 向 Chl 分子的能量传递将会更快, Car S_2 态向 Chl 能量传递在 <100 fs 内

发生^[11].

蓝区光(473、481、507 nm)将 Car 激发到 S_2 态, S_2 态的能量可以在 120~180 fs 内 IC 到 S_1 , 再衰退到 S_0 态, 或者将能量传递给 Chl 分子, 这两种过程相互竞争^[11-13].

473 nm 光激发 PS II 颗粒复合物, 得到了同样条件下激发 CC 所没有的 16.6 ps 的时间组分, 其可反映以下三个传能过程: ① LHC II 中 Car 分子间或 Car 分子向 Chls 分子传能的过程. Car 分子接受到光能后, 将能量主要以 Dexter 电子交换机制传递给相邻的 Car 分子或 Chls 分子后, 再以 Förster 共振传能机理通过 Chls 分子向相邻 Chls 分子单步传递^[7]. 其中 Lut 只向 Chla 分子传能, 而 Neo 几乎只向 Chlb 分子传能. ② LHC II 内 Car 分子的 S_1 态向基态的非辐射弛豫, 即 Car 分子吸收光能后未参与传能的部分能量从 S_1 态弛豫到 S_0 态. Claudiu 等人指出 Lut 分子的 S_1 内转换到 S_0 态时间为 14.6 ps, Neo 分子的为 35 ps^[11]. ③ 受激的 LHC II 中 Chlb 分子通过一系列中间传递体 Chla 分子以随机跃迁形式将能量传递到反应中心的过程.

用 473、481 nm 光激发得到 130~183 ps 的时间常数, 经吸收谱和发射谱综合分析, 可以认为反映的是核心天线中分别吸收 473 nm、481 nm 波长的 β -Car 分子各自将能量传递到 RC 所需的时间, 或反应中心中辅助 Chla 分子向 P680 的单步传能过程. Groot、Roelofs 等也得到在反应中心中辅助色素分子向 P680 传能时间约 120 ps 的结论, 并指出该时间因温度而异^[14,15]. 关于这个时间组分, 我们还提出一种解释, 即反应中心 P680 无法利用的光能回流到核心天线中被色素分子再次吸收的过程. 王水才等对核心天线到反应中心分子传能进行理论推断得出, 核心天线 Cp47 和 Cp43 中 β -Car 分子将能量传递到达反应中心分别需 139 ps 和 152 ps, 并在室温下实验测得传能时间分别为 150 ps 和 160 ps^[2]. 我们认为光能逆向流动的时间与正向流动时间有可能在一个量级.

在完整的光合系统中, Chla 分子接受光能成为激发态 $Chla^*$ 后将激发能传递给反应中心的 P680, 使之成为激发态 $P680^*$, $P680^*$ 与去镁叶绿素 (Pheo) 发生电荷分离, 形成 $P680^+$ 和 $Pheo^-$, 从而完成光电转化, 而 $Pheo^-$ 通过电子传递链将电子传递给质体醌 Q_A , Q_A 将电子继续沿着电子传递链传递给光系统 I (PS I). 而在提纯的 PS II 颗粒复合物中, 由于电子传递链中断, 使光能转换成电能的过程受阻, $P680^+$ 和 $Pheo^-$ 将会发生电荷重组. 实验中测到的 283~737 ps 的时间就反映了反应中心的部分

电荷重组过程^[15,16].

0.9~3 ns 的组分为色素分子从激发态向基态的退激过程. 而 >6 ns 的寿命为 RC 中电荷重组过程.

217~249 ps 的时间只在 481 nm 激发 PS II 颗粒时得到, 其反应的是 LHC II 中的 Car_{481} 分子吸收光能, 通过中间体 Chla 分子向反应中心传递所需时间. 王水才等在实验中测得捕光天线中 β -Car 将能量传递给邻近 β -Car 分子或 Chla 分子, 再进一步传递给 CP47 中 $Chla_{661}$, 由它将能量传递给反应中心共用 250 ps. Car 分子接受到光能后, 同样将能量主要以 Dexter 电子交换机制、Förster 共振传能机理经过一系列中间传递体后通过 Chls 分子向相邻 Chls 分子单步传递^[7].

将 507 nm 激发 PS II 颗粒复合物得到的时间组分与其荧光发射谱相结合进行分析, 荧光发射谱高斯解析结果见图 1. 用 473、481、507 nm 光激发得到与图 1 大致相同的积分谱. 高斯解析得到 7 组光谱组分: 639.43 nm, 681.44 nm, 690.91 nm, 703.58 nm, 714.29 nm, 734.73 nm, 757.71 nm. 结合吸收谱分析在 PS II 颗粒复合物中至少含以下 Chl 分子: $Chlb_{635}^{639}$, $Chla_{680}^{681}$, $Chla_{690}^{691}$. 大于 730 nm 的发射峰为叶绿素分子从较低激发态的最低振动支能级变为基态的振动支能级时所发射的荧光^[17].

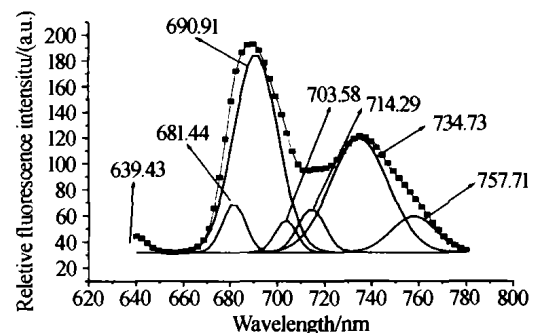


图 1 77 K, 507 nm 光激发 PS II 颗粒复合物荧光发射谱高斯解析

Fig. 1 Gauss-fitting curves of fluorescence emission spectra of PS II at 77 K excited with 507 nm

LHC II 中的 Lut 分子吸收 507 nm 光后被激发到 S_2 态, 继而很快弛豫到 S_1 态后将能量在 100~250 fs 时间内传递给 Chla 分子^[13], Claudiu 指出 Lut 的能量受体多为红区的 Chl a 分子 (667~680 nm)^[11], Chla 继续以最大效率将能量向反应中心输送. 154~183 ps 为核心天线中 β -car 通过中间体向 RC 的传能过程, 或反应中心中发生的慢能量捕获过程, 也可能是反应中心 P680 无法利用的光能回流到核心天线中 $Chla_{690}$ 分子的时间. 507 nm 光激发得到 594~693 ps 的组分为反应中心部分电荷重组时间.

3 结论

运用瞬态荧光光谱技术对 PS II 颗粒二聚体中 Car 分子进行选择激发,并结合在同等条件下核心复合物的荧光光谱进行分析. 得到几组 Car 分子能量传递寿命,并对各个时间组分进行解释. 其中 16.6 ps 为 LHC II 中 Car 分子承担的能量传递过程. 130 ~ 183 ps 为核心天线中吸收 473、481 nm 的 β -Car 分别通过中间体向 RC 的传能过程. 217 ~ 249 ps 反映 LHC II 中 Car₄₈₁ 分子向 RC 的传能. 283 ~ 737 为 RC 中部分电荷重组时间, >6 ns 的组分为 RC 的电荷重组时间, 0.9 ~ 3 ns 反应的是色素分子未参与传递的部分能量,从激发态退激回到基态的时间组分.

参考文献

- Liu Zhenfeng, Yan Hanchi, Wang Kebin, *et al.* Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 2004, **428**(3): 287 ~ 292
- 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
- 单际修, 王居硕, 李良壁, 等. 光系统 II 核心天线 Cp43, Cp47 中 β -Car 分子与 Chla 分子间的能量传递. 科学通报, 2000, **45**(2): 183 ~ 187
Shan J X, Wang J S, Li L B, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 2000, **45**(2): 183 ~ 187
- Roberta C, Gianfelice C, Alfred R, *et al.* The solet absorption properties of carotenoids and Chlorophylls in antenna complexes of higher plants. *Photosynthesis Research*, 2000, **64**: 221 ~ 231
- 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
- Connelly J P, Müller M G, Hucke M, *et al.* Ultrafast spectroscopy of trimeric light-harvesting complex II from higher plants. *J Phys Chem B*, 1997, **101**(10): 1902 ~ 1909
- 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 J F, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(6): 641 ~ 645
- Croce R, Müller M G, Bassi R, *et al.* Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major Light-Harvesting Complex (LHCII) of higher plants. I. femtosecond transient absorption measurements. *Biophys J*, 2001, **80**(2): 901 ~ 915
- 贺俊芳, 王水才, 张舒, 等. 内周天线 CP43、CP47 中 β -car 到 chla 分子的能量传递. 光子学报, 2001, **30**(4): 385 ~ 389
He J F, Wang S C, Zhang S, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2001, **30**(4): 385 ~ 389
- Polivka T, Herek J L, Zigmantas D, *et al.* Direct observation of the (forbidden) S₁ state in carotenoids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(4): 4914 ~ 4917
- Gradinaru C, van Stokkum I H M, Pasca Andy A L, *et al.* Identifying the pathway of energy transfer between carotenoids and chlorophylls in LHC II and CP29. a multicolor, femtosecond pump-probe study. *J Phys Chem B*, 2000, **104**: 9330 ~ 9342
- 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**(3): 38 ~ 43
- Thorsten R, Ana D, Klaus S, *et al.* Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynthesis Research*, 2000, **66**: 125 ~ 144
- Louise G M, van Mourik F, Camiel E, *et al.* Charge separation in the reaction center of photosystem II studied as a function of temperature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(4): 4389 ~ 4394
- Roelofs T A, kwa S L S, 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
- 叶彤, 崔岩, 侯建敏, 等. 高等植物光系统 II 反应中心的亚纳秒时间分辨荧光光谱测量. 光子学报, 1996, **25**(1): 451 ~ 459
Ye T, Cui Y, Hou J M, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 1996, **25**(1): 451 ~ 459
- P. S. 诺贝尔著. 生物物理的植物生理学导论. 科学出版社, 1984
Nobel P S. Introduction of biophysical plant physiology. Beijing: Science Press, 1984

Study on Energy Transfer from Carotenoid Moleculars to Reaction Centre in Photosystem II dimer

Liu Xiao^{1,2}, Wang Shuicai², He Junfang², Peng Junfang^{3,2}, Kuang Tingyun⁴

1 Life Science College of Northwest University, Xi'an 710069

2 State Key Laboratory of Transient Optics and Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, P. O. Box80, Xi'an 710068

3 Life Science College of Shaanxi normal university, Xi'an 710062

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

Received date:2004-03-29

Abstract To understanding the energy transfer from carotenoids molecular to reaction centre in PSII, PSII particle complex purified from spinach was investigated with ultrafast fluorescence spectroscopy in the case of selective excited carotenoid molecular with 473 nm, 481nm and 507 nm at 77 K. The data were analyzed by fluorescence decay time-fitting, and were compared with data of core complex got at the same condition. Three groups of time components about energy transfer of carotenoids were obtained: 16.6ps, 130 ~ 183 ps, 217 ~ 249 ps. The shortest lifetime component of 16.6 ps was the process of energy transfer from Car 473 molecular to Chl⁶³⁹ in LHCII. The 130 ~ 183 ps were lifetime associated with the process of β -car molecular transfer the energy to RC by a series of intermediates and 217 ~ 249 ps reflected the process of Car₄₈₁ in LHCII transfer it's energy to RC.

Keywords PS II ; Carotenoids; Energy transfer



Liu Xiao was born in Xingjian, China in 1975. 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.