

化学交联处理对 PS II 放氧核心复合物荧光光谱的影响

朱晓峰, 杜林方, 张年辉

(四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064)

摘要: 选用 5 种交联剂 (EDC、DCC、HMDI、EGS 和 DTSP), 在不同浓度条件下交联处理 PS II 放氧核心复合物, 测定了交联样品的室温荧光发射光谱和荧光激发光谱。结果表明: 交联处理对 PS II 放氧核心复合物叶绿素荧光和蛋白质内源荧光都有影响, 引起 682 nm 处叶绿素荧光强度的降低、308 nm 或 328 nm 处蛋白质内源荧光强度的增大或减小, 并与处理时所用交联剂的浓度、交联剂的亲疏水性和交联臂长相关。亲水性 EDC 对 PS II 的蛋白质中 Tyr 和 Trp 残基所处微环境的影响较小; 而亲脂性 DCC、HMDI、EGS、DTSP 对 PS II 放氧核心复合物蛋白质中 Tyr、Trp 微环境和 682 nm 处叶绿素荧光影响大, 可能它们参与了 PS II 放氧核心复合物内部的蛋白疏水区域交联。

关键词: 化学交联; 放氧核心复合物; 叶绿素荧光; 蛋白质内源荧光

中图分类号: Q632

文献标识码: A

文章编号: 1000-6737(2002)03-0318-07

光系统 II (PS II) 是放氧生物光合膜上存在的多亚基蛋白复合体, 具有催化水裂解放氧和还原质醌的功能。迄今分离的最小 PS II 功能单位是放氧核心复合物^[1]。它含有 D1 和 D2 蛋白, Cyt b₅₅₉, psb I 基因产物, 33 ku 锰稳定蛋白以及核心天线 CP47、CP43 等蛋白组分^[2]。人们一直试图培养高等植物 PS II 放氧核心复合物的单晶, 进行 X 射线衍射结构分析, 以了解 PSII 放氧核心复合物中蛋白组分的结构及其连接方式、叶绿素等辅助因子的结合状态^[3]。利用二维电镜进行蓝藻和衣藻 PS II 复合物的三维结构分析, 可以得到这些蛋白中跨膜螺旋区的相对空间位置的信息^[3]。最近有 2 个实验室得到了分辨率为 3.8Å 的蓝藻和红藻 PS II 放氧核心复合物单晶 X 射线衍射结构分析的结果^[4,5]。

化学交联法曾被用于研究多亚基蛋白的结构^[6]。Enami 等^[7]用交联剂 EDC 处理 PS II 颗粒, 得到能分别与 CP47 抗体和 33 ku 蛋白抗体反应的 80 ku 交联蛋白带, 他们认为 CP47 与 33 ku 锰稳定蛋白相邻。Odom 等^[8]对交联前后差异肽谱的测序分析, 进一步确定了 CP47 与 33 ku 锰稳定蛋白相连的部位。但迄今未见化学交联处理对 PS II 荧光光谱影响的报道。蛋白质具有内源荧光, 这是来自蛋白质分子中的色氨酸 (Trp) 残基, 由于 Trp

的内源荧光对其周围的微环境十分敏感, 因此可以作为探针来研究蛋白质结构及构象的变化^[9]。此外, PS II 放氧核心复合物中蛋白亚基间的化学交联, 是否会影响叶绿素荧光也未知。为此, 我们选用了 5 种不同性质的交联剂, 分别对 PS II 放氧核心复合物进行处理, 测定叶绿素荧光和蛋白质内源荧光, 结果表明, 化学交联处理对 PS II 荧光光谱有影响, 脂溶性交联剂的影响大于水溶性交联剂。

1 材料和方法

1.1 材料

菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 购于市场。辛基葡萄糖苷(OG)、交联剂 1,6- 二异氰酸乙烷 (1,6-disocyanatohexane, HMDI)、双 (N- 羟基琥珀酰亚胺) 乙二酯 (ethylene glycol-bis[succinic

收稿日期: 2002-02-03

基金项目: 国家自然科学基金 (39770071)、霍英东青年教师基金、教育部跨世纪优秀人才基金、四川省青年科技基金资助课题

作者简介: 朱晓峰, 1976 年生, 硕士研究生, 电话: 028-5411459, E-mail: zhuxiaofengzch@sina.com.

通讯作者: 杜林方, E-mail: dulinf@mail.sc.cninfo.net.

acid N-hydroxysuccinimide] ester, EGS)和 3,3'-二硫双(丙氨酸 N-羟基琥珀酰亚胺) (3,3'-dithio-bis[propionic acid N-hydroxysuccinimide] ester, DTSP)均购自 sigma 公司。交联剂 1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺 (1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl] carbodiimide, EDC) 和 N,N'-二环乙基碳二亚胺 (N,N'-dicyclohexyl carbodiimide, DCC) 为 Pierce 产品。其他药品均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PS II 颗粒与 PS II 放氧核心复合物的制备

菠菜 PS II 颗粒采用 Kuwabara 等^[10]的方法制备。PS II 放氧核心复合物制备参照 Ghanotakis 方法^[2], 略作改进: PS II 颗粒经 OG 增溶, 离心除去 LHC II 后, 加入 20% (质量体积比) 聚乙二醇, 35000 g 离心沉淀核心复合物, 用 SMN 溶液 (0.4 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Mes-NaOH, pH 6.0) 悬浮, 液氮中冻存备用。

1.2.2 PS II 制剂的交联处理

等分数份的 20 μ l PS II 放氧核心复合物 (叶绿素浓度为 0.5 g/L), 分别加入不同浓度、新鲜配制的交联试剂 5 μ l, 在交联反应最适 pH 条件下室温反应 10 min 后, 加入 25 μ l 的 10% (质量体积比) 甘氨酸溶液终止反应。35 000 g 离心 10 min 沉淀 PS II 放氧核心复合物, 用 SMN 悬浮洗涤两次, 以去除残余交联剂。所用交联剂中, EDC 用 SMN 溶液配制, 其余用二甲亚砜配制。

1.2.3 室温荧光的测定

采用 Hitachi-4500 荧光分光光度计, 在室温 (20 $^{\circ}$ C) 下进行荧光发射光谱和激发光谱的测定。测量时光路狭缝为 5 nm, 激发光波长分别为 278 nm、295 nm 和 438 nm。检测光波长为 682 nm。叶绿素浓度为 5 mg/L。

2 结果

2.1 EDC 交联处理对 PS II 放氧核心复合物蛋白亚基内源荧光的影响

蛋白质具有内源荧光^[9]。278 nm 波长的光激发时, 蛋白质分子中的 Tyr (酪氨酸)、Trp (色氨酸) 和 Phe (苯丙氨酸) 等 3 种芳香族氨基酸残基受到激发, Tyr 和 Phe 残基可以将激发能传递给 Trp 残基, 这些受到激发的芳香族氨基酸残基以荧光的形式发射出来。295 nm 波长的光只能激发色

氨酸, 所产生的荧光强度和位置与蛋白质分子内 Trp 残基所处的微环境有关。通常暴露于蛋白质分子表面的 Trp 残基在 350 nm—353 nm 范围具有最大荧光发射峰, 包埋于蛋白质分子内部的 Trp 残基的最大荧光发射峰在 326 nm—332 nm 之间, 而处于非极性环境中的 Trp 残基所产生的最大荧光发射峰在 310 nm—324 nm 附近^[9,11]。

PS II 放氧核心复合物的蛋白亚基含有 Tyr、Trp 和 Phe 等氨基酸残基。用 278 nm 波长光激发时 PS II 放氧核心复合物具有 308 nm 的荧光发射峰, 用 295 nm 波长光激发时具有 328 nm 的荧光发射峰 (图 1), 这表明: PS II 放氧核心复合物所含 Trp 残基都处于蛋白质分子内部的疏水部位, 308 nm 的荧光发射峰主要来自 Tyr 和 Phe 残基 (278 nm 波长光激发时)。零臂长水溶性交联剂 EDC 处理对 PS II 放氧核心复合物 308 nm 荧光发射峰的位置和强度几乎无影响 (图 1A), 表明 EDC 交联并未引起 PS II 放氧核心复合物中 Tyr 和 Phe 残基的周围环境的变化。EDC 交联处理样品中 328 nm 荧光发射峰的位置不变, 而荧光强度随交联剂浓度的增高而略有增加 (图 1B), 表明样品中蛋白质交联可能使部分 Trp 残基的微环境发生了轻微变化, 更为疏水; 或 EDC 交联引起 PS II 放氧核

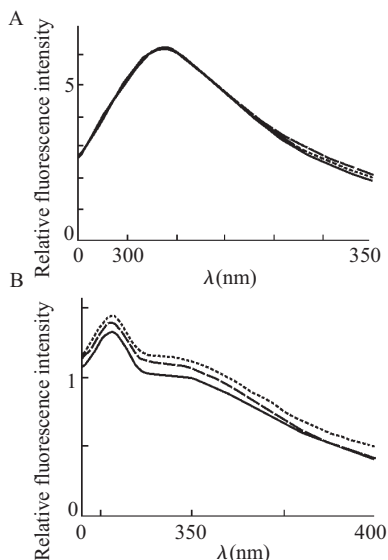


Fig.1 Effect of EDC crosslinking on intrinsic fluorescence emission spectra of oxygen-evolving PS II core complexes treated with EDC at the concentration of 0 (—), 3.0 (---), 6.0 (·····) mmol/L at room temperature with A. λ_{ex} 278nm; B. λ_{ex} 295 respectively

心复合物蛋白亚基某些区域结构更为紧密。

2.2 EDC 交联处理对 PS II 放氧核心复合物叶绿素荧光的影响

室温下, 以 438 nm 波长光激发叶绿素 a (Chl a) 时, PS II 放氧核心复合物具有 682 nm 荧光发射峰 (图 2A)。检测光波长为 682 nm 时 PS II 放氧核心复合物的荧光激发光谱如图 2B, 蓝光区具有 418 nm 和 438 nm 的峰, 红光区具有 627 nm 峰; 此外, 465 nm, 488 nm, 545 nm 和 589 nm 处有小峰。除 465、627 nm 峰来自 Chl b, 488 nm 肩峰来自自由 β -carotene 到叶绿素的单个激子的能量传递外, 其余都来自 Chl a。EDC 处理 PS II 放氧核心复合物中, 3.0 mmol/L 的 EDC 处理对样品的叶绿素荧光发射峰位置无影响, 但荧光强度略有减少, 682 nm 荧光发射峰降低了 1.3% 左右 (图 2A); 尽管样品激发光谱的形状无明显变化, 但来自 438 nm 的叶绿素 a 相对激发效率下降, 约减少 4.4% (图 2B)。增大 EDC 浓度为 6.0 mmol/L 时, 样品的荧光发射峰位置和强度以及激发光谱中来自 438 nm 的叶绿素 a 相对激发效率, 几乎与 3.0 mmol/L EDC 处理样品相同, 只是来自 627 nm 的叶绿素 b 相对激发效率略有下降。

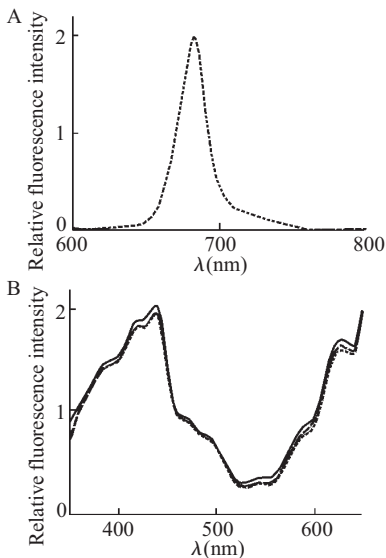


Fig.2 Effect of EDC crosslinking at room temperature on chlorophyll fluorescence spectra of oxygen-evolving PS II core complexes treated with EDC at the concentration of 0 (—), 3.0 (— —), 6.0 (·····) mmol/L, excited at 438 nm or detected at 682 nm, respectively. A. emission spectra; B. excitation spectra

2.3 DCC 交联处理对 PS II 放氧核心复合物蛋白亚基内源荧光的影响

零臂长脂溶性交联剂 DCC 处理的 PS II 放氧核心复合物中: 2.4 mmol/L DCC 的处理对 PS II 放氧核心复合物 308 nm 处来自 Tyr、Phe 残基的荧光发射峰几乎无影响, 而 4.8 mmol/L DCC 处理引起该荧光发射相对强度增加 6.5% (图 3A); 2.4 mmol/L DCC 的处理对 PS II 放氧核心复合物 328 nm 处来自 Trp 残基的荧光发射强度降低 2.9%, 处理的 DCC 浓度增加至 4.8 mmol/L 时, 荧光发射强度几乎不再继续变化 (图 3B), 表明 DCC 对 Tyr、Trp 残基周围微环境的影响不一样: 较低浓度的 DCC 交联使部分 Trp 残基的微环境发生了轻微变化, 较高浓度的 DCC 交联才能引起 PS II 放氧核心复合物中 Tyr、Phe 残基的微环境发生变化。虽然与 EDC 同为零臂长交联剂, 但 DCC 交联处理会影响 PS II 放氧核心复合物中 Tyr、Phe 和 Trp 残基周围微环境, 而 EDC 交联处理仅对 PS II 放氧核心复合物中 Trp 残基的微环境产生影响。

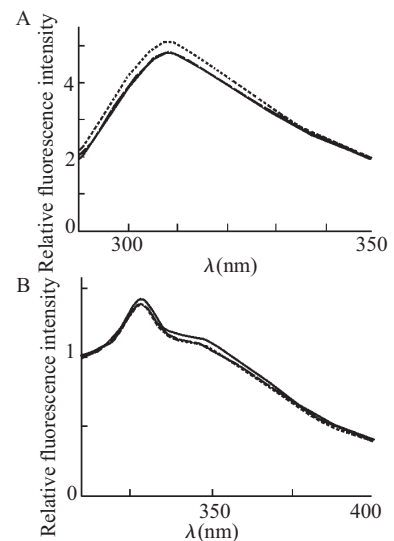


Fig.3 Effect of DCC crosslinking on intrinsic fluorescence spectra of oxygen-evolving PS II core complexes treated with DCC at the concentration of 0 (—), 2.4 (— —), 4.8 (·····) mmol/L, at room temperature A. excitation at 279 nm; B. 295 nm, respectively.

2.4 DCC 交联处理对 PS II 放氧核心复合物叶绿素荧光的影响

DCC 处理对 PS II 放氧核心复合物中叶绿素荧光的影响如图 4 所示。样品的荧光发射峰位置无变

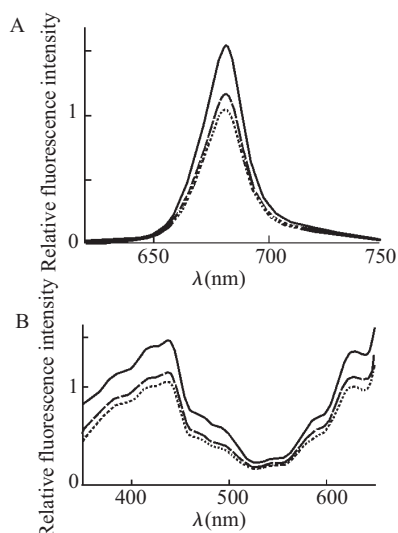


Fig.4 Effect of DCC crosslinking at room temperature on chlorophyll fluorescence spectra of oxygen-evolving PS II core complexes treated with DCC at the concentration of 0(—), 2.4(--), 4.8(.....) mmol/L, excited at 438 nm or detected at 682 nm, respectively. A. emission spectra; B. excitation spectra

化, 仍在 682 nm 处, 但荧光发射峰强度随处理时 DCC 浓度的升高而明显降低。其中, 用 2.4 mmol/L DCC 处理的下降 25.5%, 4.8 mmol/L DCC 处理的下降 31.9% (图 4A)。DCC 处理核心复合物的激发光谱也发生类似的变化, 438 nm 处来自叶绿素 a 的相对激发效率出现明显降低, 其中, 2.4 mmol/L DCC 处理的相对激发效率减少 24.2%; 4.8 mmol/L DCC 处理的相对激发效率减少 28.4% (图 4B)。这些结果表明 DCC 处理对核心复合物叶绿素荧光具有显著的影响。

2.5 不同臂长交联剂处理对 PS II 放氧核心复合物叶绿素荧光和内源荧光的影响

进一步选用 3 种具有较长的交联臂长的亲脂性交联剂, 进行 PS II 放氧核心复合物的交联处理, 并考察交联处理对叶绿素荧光和内源荧光的影响。本文所用的 5 种交联剂的性质见表 1。

表 2 显示的是这些交联剂处理对 PS II 放氧核心复合物叶绿素荧光和内源荧光影响的结果。HM-DI 或 EGS 交联处理对 PS II 放氧核心复合物荧光光谱都有相同的影响, 引起 PS II 放氧核心复合物 308 nm 或 328 nm 处的内源荧光强度的增加、682 nm 处的叶绿素荧光强度的下降。较低浓度

Table 1 Feature of the cross-linking reagents and their concentration applied here

	Water- soluble	Membrane- permeable	Target groups	pH buffer	Spacer arm length (Å)	Concentration applied here (mmol/L)
EDC	Yes	No	—COOH、 —NH ₂	6.0–6.5 (MES)	0	1.5–6.0
DCC	No	Yes	—COOH、 —NH ₂	6.0–6.5 (MES)	0	1.2–4.8
HMDI	No	Yes	—OH、—NH ₂ 、 —SH, etc	6.0–6.5 (MES)	12	1.2–4.8
EGS	No	Yes	—NH ₂	7.2 (HEPES)	16.1	0.7–2.8
DTSP	No	Yes	—NH ₂	7.2 (HEPES)	12	0.7–2.8

Note: the oxygen-evolving PS II core complexes were crosslinked at 20°C in dark for 10 min with the chlorophyll concentration of 0.5 g/l

Table 2 The impact of crosslinking on the relative fluorescence intensity of the oxygen-evolving PSII core complexes

Cross-linking reagents	Change of fluorescence intensity at 682 nm (%)	Change of fluorescence intensity at 437 nm (%)	Change of Intrinsic fluorescence intensity at 308 nm (%)	Change of Intrinsic fluorescence intensity at 328 nm (%)
EDC (6.0 mmol/L)	-1.3	-4.4	-0.6	8.6
DCC (4.8 mmol/L)	-31.9	-28.4	6.5	-2.9
HMDI (2.4 mmol/L)	-36.1	-31.6	6.1	1.7
EGS (2.8 mmol/L)	-5.6	-8.1	6.2	3.5
DTSP (2.8 mmol/L)	-10.3	-12.7	-50.1	-48.6

HMDI的处理(仅为DCC和EDC的50%),可引起PS II放氧核心复合物产生显著的叶绿素荧光光谱变化,如2.4 mmol/L HMDI处理可使PS II放氧核心复合物682 nm处的叶绿素荧光强度下降36.1%,438 nm处的激发峰位置蓝移2.2 nm,相对激发效率下降31.6%,表明HMDI交联对PS II放氧核心复合物的叶绿素荧光影响显著。2.8 mmol/L EGS交联处理对PS II放氧核心复合物叶绿素荧光的影响不如HMDI交联处理的那么明显。值得注意的是,2.8 mmol/L DTSP交联处理的PS II放氧核心复合物中,不仅叶绿素荧光强度剧烈减小、激发效率降低很大,而且蛋白内源荧光也明显降低(表2)。

3 讨 论

化学交联法是研究多亚基蛋白复合物结构的一种有效方法^[6-8]。本文选用了5种不同性质的交联剂,分别对PS II放氧核心复合物进行处理,分析了交联处理对叶绿素荧光和蛋白质内源荧光的变化情况。我们的结果表明,化学交联处理对PS II放氧核心复合物叶绿素荧光和内源荧光都有影响,引起682 nm处叶绿素荧光强度降低、308 nm或328 nm处蛋白质内源荧光强度增大或减小,并与处理时所用交联剂的浓度、交联剂的亲疏水性和交联臂长相关。

PS II放氧核心复合物的蛋白亚基大多数为嵌膜的色素蛋白,其中核心天线CP47、CP43具有6个跨膜螺旋区,通过His残基分别与10-15、10-12个叶绿素a相连,在H5-H6之间具有伸入类囊体囊腔的大的亲水环(E环)^[12];行使电子分离功能的反应中心D1、D2蛋白具有5个跨膜螺旋区,结合有4-5个叶绿素分子(包括特殊的Chl a对,P680)^[13]。Satoh认为PS II放氧核心复合物的荧光发射峰主要来自于CP43和CP47^[14]。化学交联处理影响PS II放氧核心复合物荧光光谱可能的原因是:化学交联处理使PS II放氧核心复合物中处于邻近的蛋白亚基间形成交联键,或者亚基内形成交联键,在一定程度上影响了色素蛋白的构象,表现为蛋白内源荧光的改变;或者影响结合在色素蛋白跨膜区的叶绿素a等色素分子的微环境,使色素分子吸收光能或传递激发能的能力受到影响,进而引起叶绿素荧光的改变。交联程度越大,对色素蛋白的构象影响就越大,表观上反映叶绿素

荧光变化也越大。

我们的结果还表明,脂溶性交联剂DCC的影响大于水溶性交联剂EDC。尽管EDC与DCC均为零臂长的交联剂,它们都可使在范德华力作用距离之内的一COOH、-NH₂之间形成交联键。EDC为亲水性交联剂,Odom和Bricker发现EDC可使CP47亲水E环中的³⁶⁴E-⁴⁴⁰D区域与水溶性的33 ku锰稳定蛋白的¹E-⁷⁶K区域交联^[9]。而DCC为亲脂性交联剂,即使在交联处理浓度小于EDC,它对PS II核心复合物叶绿素荧光强度的影响也大于EDC,这可能是DCC更易于进入PS II放氧核心复合物的疏水区域,可与较多蛋白亚基的跨膜区域附近的基团作用,或所形成的交联键对位于跨膜区的叶绿素a干扰大。尽管DCC交联对蛋白亚基构象的影响不明显,但对样品叶绿素吸收光能或进行能量传递有明显的影。

脂溶性交联剂HMDI与DTSP的交联臂长一样(12 Å),但HMDI交联处理对PS II放氧核心复合物叶绿素荧光的影响要比DTSP的大。这可能与蛋白质中参与交联反应的基团数目的多少相关:HMDI可在-OH、-NH₂或-SH基团间形成交联键,而DTSP只能在-NH₂间生成交联键。由于蛋白质N端的氨基很难被交联,而侧链基团中的氨基才有可能发生交联,因此DTSP最易与Lys残基的ε-氨基反应。与其他亲脂性交联剂不同的是,DTSP交联还引起复合物蛋白内源荧光的强烈降低,可能的解释是:DTSP含有一个二硫键,交联使PS II放氧核心复合物中某些Tyr、Trp残基处于DTSP交联所引入的二硫键附近,而出现明显的蛋白内源荧光淬灭,这并非交联反应引起蛋白的构象变化所致。因为二硫键的引入可使附近氨基酸残基的荧光生色团发生淬灭^[11]。Enami等^[15]曾认为,臂长在6-11 Å的NHS酯交联剂处理PS II样品所得交联产物的量,随交联臂长的增长而减少,臂长大于14 Å时几乎得不到交联产物。EGS的交联臂长为16.1 Å,距离为16.1 Å的底物基团也许并不多,我们的结果表明,EGS处理也会引起PS II放氧核心复合物叶绿素荧光的变化。

综上所述,不同亲疏水性、不同臂长的交联剂处理对PS II放氧核心复合物叶绿素荧光和蛋白内源荧光都有影响,亲水性交联剂EDC对PS II放氧核心复合物的化学修饰有限,对蛋白质中Tyr和Trp残基所处微环境的影响较小;而亲脂性交联剂DCC、HMDI、EGS、DTSP倾向于与PS II放氧核

心复合物内部的疏水区域作用,对蛋白质中 Tyr、Trp 微环境影响大,显著引起叶绿素荧光发射和激发光谱的改变。

参考文献:

- [1] Hankamer B, Barber J, Boekem EJ. Structure and membrane organisation of PS II in green plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997,48:641-671.
- [2] Ghanotakis DF, Demetriou DM, Yocum CF. Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa Chl_a-binding protein[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1987,891(1):15-21.
- [3] Nield J, Kruse O, Ruprecht J, et al. Three-dimensional structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechococcus elongatus* photosystem II complexes allows for comparison of their oxygen-evolving complex organization[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(36):27940-27946.
- [4] Shen J-R, Kamiya N. Crystallization and the crystal properties of the oxygen-evolving photosystem II from *Synechococcus vulcanus*[J]. *Biochem*, 2000,39(48):14739-14744.
- [5] Zouni A, Witt H-T, Kern J, et al. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution[J]. *Nature*, 2001,409:739-743.
- [6] 周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰[M].北京: 清华大学出版社, 1998.118-129.
- [7] Enami I, Kaneko M, Kitamura N, et al. Total immobilization of the extrinsic 33kDa protein in spinach Photosystem II membrane preparations. Protein stoichiometry and stabilization of oxygen evolution[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1060:224-232.
- [8] Odom WR, Bricker TM. Interaction of CPa-I with the Manganese-Stabilizing protein of photosystem II: identification of domain crosslinked by 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl] carbodiimide[J]. *Biochem*, 1992,31(24):5616-5620.
- [9] Lakowicz JR. Protein fluorescence[A]. In: Lakowicz J R. Principle of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983.341-381.
- [10] Kuwabara T, Murata N. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the PS II particles of spinach chloroplast[J]. *Plant Cell Physiol*, 1982,23:533-539.
- [11] Shutova T, Deikus G, Irrgang KD, et al. Origin and properties of fluorescence emission from the extrinsic 33 kDa manganese stabilizing protein of higher plant water oxidizing complex[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001,1504:371-378.
- [12] Barber J, Morris E, Büchel C. Revealing the structure of the Photosystem II chlorophyll binding proteins, CP43 and CP47[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000,1459:239-247.
- [13] Nanba O, Satoh K. Isolation of a Photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987,84: 109-112.
- [14] Satoh K. Chlorophyll-protein complexes [J]. *Photosyn Res*, 1986,10:181-187.
- [15] Enami I, Mochizuki Y, Takahashi S, et al. Evidence from crosslinking for nearest neighbor relationships among the three extrinsic proteins of spinach Photosystem II complexes that are associated with oxygen evolution [J]. *Plant Cell Physiol*, 1990,31:725-729.

EFFECTS OF CROSSLINKING ON THE FLUORESCENCE SPECTRA OF OXYGEN-EVOLVING PS II CORE COMPLEXES

ZHU Xiao-feng, DU Lin-fang, ZHANG Nian-hui

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Oxygen-evolving PS II core complexes were treated with five crosslinking agents at different concentration, then the chlorophyll fluorescence emission, excitation, and intrinsic fluorescence spectra of these samples were measured in order to know whether crosslinking reaction affect the fluorescence properties of the samples. The results showed that both chlorophyll fluorescence and intrinsic fluorescence of oxygen-evolving PS II core complexes were altered by the crosslinking reaction. The maximum chlorophyll fluorescence peak at 682 nm decreased and the intrinsic fluorescence emission intensity at 308 nm and 328 nm either increased or decreased. These changes were relevant to the concentration, the hydrophilic or hydrophobic nature and the length of arm spacers of crosslinker. Oxygen-evolving PS II core complexes treated with hydrophilic crosslinker EDC showed a slight change in the microenvironments of Tyr and Trp residues. However, Oxygen-evolving PS II core complexes treated with hydrophobic crosslinkers such as DCC, HMDI, EGS, and DTSP showed a distinctly change in both the microenvironments of Tyr and Trp residues and chlorophyll fluorescence spectra, since they could react with the interior target groups in the hydrophobic regions of oxygen-evolving PS II core complexes.

Key Words: Crosslinking; Oxygen-evolving PS II core complexes; Chlorophyll fluorescence; Intrinsic fluorescence