

PSII 核心复合物超快动力学研究

任兆玉¹, 贺俊芳^{1,2}, 王水才², 陈慰宗³, 白晋涛¹, 侯 洵^{1,2}

(1. 西北大学 光子技术与光子学研究所; 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, 陕西 西安 710068; 3. 西北大学 物理学系, 陕西 西安 710069)

摘要:应用时间分辨荧光光谱技术,研究了高等植物光系统 II(PSII)核心复合物中能量传递超快动力学。对实验测得的荧光衰减曲线,进行数据处理,解得荧光衰减的3个时间常数分别为 3.9, 20.4, 930.5 ps,各组分荧光占总荧光的百分比分别为 1.0%, 12.7%, 86.3%。对由全局分析得到的荧光强度随波长变化曲线运用高斯多峰解叠运算,解得3个峰值波长分别为 671.03, 684.74, 696.16 nm。通过分析,给出了激发能在 PSII 核心复合物中超快传递的动力学信息及相应的能级关系图。

关键词:飞秒激光脉冲; PSII 核心复合物; 能量传递; 时间常数; 光谱特性

中图分类号: Q631 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2002)01-0015-05

光合作用是自然界中最重要的作用过程之一。植物通过光合作用把太阳能转化成化学能并释放出氧气,其中的核心问题是光能转化机理,即光合作用原初反映中光子、激子、电子、离子与光合膜之间的相互作用中光能的吸收、传递和转化、电荷分离等基本过程的机理。因此,光合作用过程是生物超分子体内进行的复杂过程,其机理的揭示具有重大的理论意义和实践意义。国际上对光系统 II(PSII) 能量传递、电荷分离和电荷重组超快过程采用时间分辨荧光光谱及吸收光谱、共振拉曼光谱等多种光谱技术进行了大量研究,已取得一些有意义的结果^[1~3]。本实验采用飞秒时间分辨荧光光谱技术,以 400 nm 的飞秒激光,激发 PSII 核心复合物样品荧光,根据由数据处理得到的荧光衰变的时间及光谱特性,分析了激发能在 PS II 核心复合物的叶绿素中传递的超快过程。

1 材料和方法

1.1 样品制备

PSII 核心复合物样品由中科院植物所提供,分

离和纯化参见文献[4]的方法,样品保存于 50 mmol/L Mes, 400 mmol/L sucrose, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, pH6.0 的 Mes-NaOH 缓冲液中,存于液氮中备用。实验在黑暗中进行,实验时,样品浓度取为 10 μg/mL,用冰水混合物循环冷却。

1.2 实验方法

时间分辨荧光动力学实验装置参见文献[5]。以 Beamlok 2085-15 Ar⁺激光器为泵浦光源,全线工作,泵浦 TSUNAMI 钛宝石激光器,声光调制主动锁模,输出波长 720~860 nm,重复率 82 MHz,脉冲宽度 60~100 fs。BBO 晶体二次谐波,输出波长 360~430 nm,倍频后脉冲展宽为 120 fs。用 2~3 mW 的飞秒倍频激光激发样品。准直镜收集荧光后经单色仪色散分光,C31034A 型光电倍增管将接收到的荧光信号放大后送入 Boxcar 采集,计算机进行数据处理。

2 实验结果

测量时单色仪步长取为 5 nm,荧光测量范围为 640~725 nm。图 1 给出用 400 nm 激光激发 PSII

收稿日期:2001-05-25

基金项目:国家重点基础研究发展规划专项经费资助项目(G1998010100)

作者简介:任兆玉(1958-),女,陕西西安人,西北大学副教授,博士,从事光生物学中的超快过程研究。

核心复合物样品, 荧光波长为 680 nm 处, 通过数据处理^[3]得到的荧光强度随时间变化曲线。对用 Box-car 采集的荧光信号, 解卷积求得真实荧光信号, 如

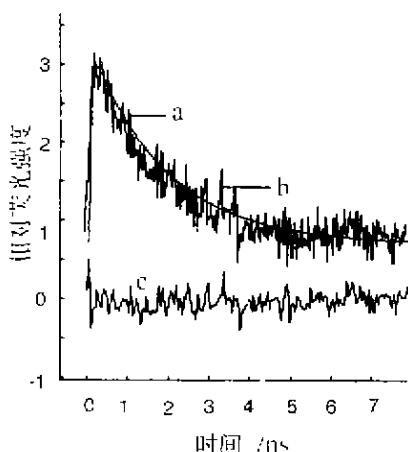


图 1 PSII 核心复合物荧光信号

Fig. 1 Fluorescence intensity-time curve of PSII core complex

图 1 中曲线 b, 采用非线性最小二乘法对真实信号进行多指数拟合, 结果如图 1 中曲线 a, 拟合残差为图中曲线 c。通过对 18 个波长点下所测量的真实荧光信号用全局分析得到了荧光强度随波长变化的曲线, 该曲线的高斯多峰解叠结果如图 2 所示(图中粗

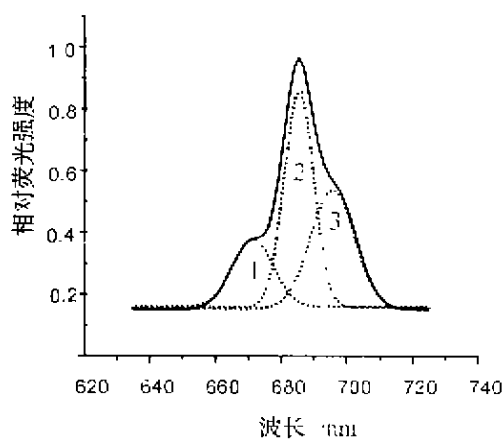


图 2 PSII 核心复合物荧光强度随波长变化曲线(实线)

Fig. 2 Fluorescence intensity wavelength curve of PSII core complex (solid curve)

实线为荧光-波长曲线, 虚线 1, 2, 3 分别为 3 个高斯曲线)。其拟合结果见表 1。

表 1 中 $F_i = C_i \times \tau_i / \sum C_i \times \tau_i$ 代表各组分荧光占总荧光的百分比^[3]。由表 1 所得结果, 能量传递的 3 个时间常数分别为 3.9, 20.4 和 930.5 ps。各组分荧光占总荧光的百分比分别为 1.0%, 12.7%, 86.3%。图 2 中 3 个高斯解叠的荧光光谱曲线峰值波长分别为 671.03, 684.74, 690.16 nm, 半高全宽

分别为 12.208, 90.13, 20 nm。

表 1 PSII 核心复合物 3 指数拟合结果

Tab. 1 Three-exponential curve fitting result of PSII core complex

组 分	C_i	τ_i/ps	$F_i/\%$
1	0.050 3	3.87	1.0
2	0.134 0	20.40	12.7
3	0.020 0	930.50	86.3

3 结果分析

3.1 PSII 核心复合物的结构功能及荧光发射

PSII 核心复合物是由 PSII 颗粒复合物中分离出外周天线(LHCH)后剩下的核心天线 CP43, CP47 和反应中心蛋白复合物 $D_1/D_2/\text{cyt. b559}$ 组成。CP43 和 CP47 主要功能是在外周天线 chl a/b 复合蛋白和反应中心叶绿素 Chl a 蛋白复合物(RC-II)之间传递激发能, 再在反应中心 $D_1/D_2/\text{cyt. b559}$ 中进行光化学反应。

1) 核心天线 CP43 和 CP47 是分别由 psb B 和 psb C 基因编码的 43 kDa 和 47 kDa 结合色素分子组成的色素蛋白复合物, 这些蛋白被认为是疏水性的。CP43 和 CP47 的二级模型结构非常相似, 具有 6 个跨膜的 α -螺旋和五段分别位于基质侧和囊腔侧的亲水环, 分居反应中心 $D_1/D_2/\text{cyt. b559}$ 两侧对称排列^[6,7], 并发挥相似的功能。每个 CP47 多肽链包含约 20~21 个 chl a 和 3~4 个 β -类胡萝卜素分子, 而每个 CP43 多肽链包含 19~20 个 Chl a 和 4~5 个 β -类胡萝卜素分子。两者还含有少量的叶黄素, 没有 Chl b 和 Pheo, 大多数 Chl a 分子的 Qx 极矩方向平行于膜的法线方向。CP43 和 CP47 的低温荧光峰分别位于 685 和 695 nm, 吸收峰位于 669 nm, 但 CP43 在 682 nm 也存在一个吸收峰。 β -类胡萝卜素在室温下的特征吸收区在 400~530 nm, 吸收峰为 430, 470, 491 nm^[7]。在 CP43 中的 β -类胡萝卜素吸收峰比在 CP47 中的蓝移 10~15 nm。构成核心天线的色素分子 Chl a 吸收 400 nm 的外来光子后, 由 S_0 (基态)跃迁到 S_2 (第二单线态)的 B 吸收带, 然后以非常快的速度无辐射退激发到 S_1 (第一单线态)的 Q 吸收带, 再从 S_1 态辐射跃迁到基态 S_0 发出荧光。因为荧光的 Stokes 红移(一般为 2~5nm), 其发射荧光光谱的峰值要比在 S_1 吸收带的吸收光谱峰值波长长的, 文献[8]给出 Chl a 荧光发射的高斯

解叠的 6 个光谱成分: P_{669}^{661} 、 P_{672}^{672} 、 P_{678}^{668} 、 P_{683}^{683} 、 P_{687}^{687} 、 P_{695}^{697} (P_{λ}^{λ} 表示吸收峰为 λ , 荧光发射峰为 E)。因此, 对实验所测得到的荧光峰值 671 nm 可看作 Chl a 分子吸收 400 nm 光子后无辐射跃迁到 Q 吸收带的 669 nm 而发出的。684.7 nm 荧光峰值可看作为 Chl a 吸收 400 nm 的光子后无辐射跃迁到 Q 吸收带的 Chl a 669 nm, 再将激发能传递给 Chl a (680 nm) 而发出的。696.2 nm 荧光峰值可看作为 Chl a 695 吸收由 Chl a 680 传递的激发能而发出的。

2) 1987 年由 Nanba 和 Satoh 在菠菜叶绿体中分离提纯了光化学反应中心蛋白复合物 $D_1/D_2/cyt. b559$ (RC-II), 其中 D_1 - D_2 多肽蛋白与紫色细菌反应中心的 L 及 M 亚基不仅在氨基酸顺序上有很大的同源性, 而且在分子结构上也很相似。实验表明^[9,10], 反应中心的氧化还原组分均位于两个跨膜蛋白 D_1 和 D_2 上, RC-II 包含 2 个去镁叶绿素 Pheo a, 2 个 β -类胡萝卜素和 6 个 Chl a。其中 2 个 Chl a 分子作为电荷分离的电子供体, 其特征吸收峰为 680 nm, 故称为 P_{680} , 2 个 Pheo a 中只有一个起着电子受体的作用, 位于 D_1 上, 另一个 Pheo a 位于 D_2 上。Pheo a 的电子受体为 Q_A , 次级受体为 Q_B , 这两个醌受体分别位于 D_1 和 D_2 上。 P^+680 的电子供体 Z 亦位于 D_1 上, 一个非血红素 Fe 位于 Q_A 和 Q_B 之间。在高等植物 RC-II 制备中, 因为多次洗涤提纯, 使大部分质醌分子 Q_A 和 Q_B 从它们的键位中被除去^[4], (在 PSII 核心复合物分离提纯过程中, 过多的洗净剂也可能使一部 Q_A 和 Q_B 脱离其键位, 但用合适的提纯方法可以保留较多 Q_A 和 Q_B 在其键位上^[11])。这意味着在 RC-II 中原初光化学过程不会超过电荷分离基对的形成, 即不可能形成完整的电子传递。RC-II 的原初电荷分离和后向反应的电荷重组过程可表示如下^[12] (不包含反应引起的热损失):

$$P_{680} \cdot \text{Pheo} + h\nu \rightarrow {}^1P_{680}^* \cdot \text{Pheo}, \text{ (P680 被激发过程),}$$

$${}^1P_{680}^* \cdot \text{Pheo} \rightarrow P_{680}^{+\cdot} \cdot \text{Pheo}^{-\cdot}, \text{ (电荷分离过程),}$$

$$P_{680}^{+\cdot} \cdot \text{Pheo}^{-\cdot} \rightarrow P_{680}^+ \cdot \text{Pheo}^-, \text{ (电荷重组反应),}$$

$${}^1P_{680}^* \cdot \text{Pheo} \rightarrow P_{680} \cdot \text{Pheo} + h\nu', \text{ (以荧光方式退激发)。}$$

RC-II 的稳态光谱实验表明^[9], P_{680} 的吸收光谱峰值在 679.5 和 681 nm, Pheo 的吸收峰在 676.5 和 680.1 nm, 其荧光峰是 684, 687 和 697 nm。我们

实验所得的第一个荧光峰值 671 nm 可看作主要是由 Chl a 669 所发出的荧光; 第二个荧光峰 684.7, 可看作为主要是由核心天线 Chl a 670 将激发能传递给核心天线内部 Chl a 680 以及传给 RC-II 中 Chl a 680, P_{680} 等色素发出的荧光; 第三个荧光峰 696.2 nm 看作主要是由核心天线和 RC-II 中 Chl a 695 接受由核心天线 Chl a 传来的激发能而发出的荧光, 以及反应中心由于失去一部分 Q_A 和 Q_B 而形成电荷重组后发出的荧光 $h\nu'$ (由于能量损耗, 该荧光的波长应比 P_{680} 的荧光波长长一些) 的和。

3.2 PSII 核心复合物能量传递动力学

由文献^[9,13]知, Chl a 分子之间的能量传递时间为 1~50 ps, 根据 Förster 能量传递机理, 由 PSII 核心内 $C_{670}^* \rightarrow P^*680$ 能量传递时间为 21 ps, 计算出了在 PSII 反应中心 670 与 Chl a 680 之间的距离为 3 nm。Dau^[9] 给出核心天线内部色素中能量传递时间不大于 5 ps。我们在 LHC II 的研究中也得到在 Chl a 中 4 ps 及 21 ps 能量的传递时间。

所以, 将 3.9 ps 看作为在 CP 43 及 CP 47 内部 Chl a 之间的能量传递时间。对 $D_1/D_2/cyt. b559$ 的 500 fs 时间分辨吸收光谱研究表明^[11], 初始电荷分离发生在反应中心色素 P_{680} 和去镁叶绿素 pheo a 之间, 形成离子对 $P_{680}^+ \text{Pheo}^-$ 的时间常数为 3 ps。但用 150 fs 的超短脉冲测量了从大豆叶绿体中获得的 $D_1/D_2/cyt. b559$ 时间分辨吸收光谱, 则认为电荷分离的时间为 21 ps, 他们认为 3 ps 是形成某中间态的时间^[12]。另一些 (如时间分辨荧光光谱和光谱烧孔实验^[13,14] 等) 似乎都支持 3 ps 的电荷分离时间。皮秒泵浦探测吸收结果还给出, PSII 核心具有 3 个寿命组分, 分别: 21 ps, 80~200 ps, 1~2 ns, 他们将长寿命组分 1~2 ns 归于原初官能团对激发态达到平衡时的重组时间, 21 ps 和另一中间的寿命组分被认为是能量捕获和传递过程的时间。可以看出, 这个结果与我们所测的结果很接近。从图 1.2 及表 1 实验结论, 以及上述 PS II 核心复合物的结构功能关系, 笔者认为: 20.4 ps 时间组分是能量由内周天线系统向反应中心传递的时间。未见有文献报道关于 930 ps 左右的能量传递时间。如果将该时间组分看作是原初官能团对激发态达到平衡时的电荷重组时间的话, 那么, 我们得到的 PSII 核心复合物样品在提纯的过程中, 有可能取掉了大部分 Pheo 的电子受体 Q_A , Q_B , 使得在反应中心不能形成完整的电子传递, 当在反应中心发生电荷分离形成离子基对 $P_{680}^+ \text{Pheo}^-$ 后, 由于外界因素的影响又发生电荷重

组反应,并以发出荧光 $h\nu'$ 的方式退化其激发能。那么,930 ps 可能为原初官能团对激发态达到平衡时电荷重组的时间。由实验结果以及上述几点分析,试

给出激发能在 PSII 核心复合物中传递的能级关系示意图(图 3)。

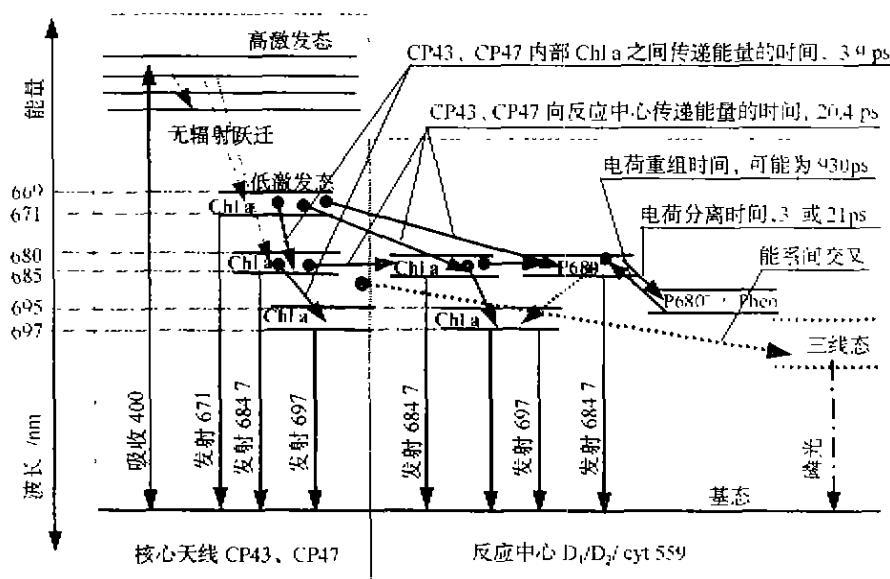


图 3 激发能在 PSII 核心复合物中传递的能级关系示意图

Fig. 3 The energy level diagram of energy transferred in PS II complex.

4 总 结

根据 PSII 核心复合物的结构功能、实验结果以及上述荧光光谱、能量传递动力学分析,可认为:第一个荧光峰值 671 nm 可看作主要是 Chl a 669 所发出的荧光;第二个荧光峰 684.7 nm,可看作主要是由核心天线 Chl a 670 将激发能传递给核心天线内部 Chl a 680,传给 RC-II 中 Chl a 680, P680 等色素分子发出的荧光;第三个荧光峰 696.2 nm 可看

作主要是由核心天线和 RC-II 中 Chl a 695 接受由核心天线 Chl a 传来的激发能而发出的荧光,以及反应中心电荷重组后发出的荧光 $h\nu'$ 。3.9 ps 看作为在 CP 43 及 CP 47 内部 Chl a 之间的能量传递时间,该组分荧光占总荧光的比分为 1.0%。20.4 ps 是能量由内周天线系统向反应中心传递的时间,该组分荧光的比分为 12.7%。930.5 ps 可能为 RC-II 从接受由 CP43, CP47 传来的激发能而发生电荷分离到原初官能团对激发态达到平衡时的重组时间,该组分荧光的比分为 86.3%。

参考文献:

- [1] VISSER H M, GROOT M L, MOURIK F-V, *et al.* Subpicosecond transient absorption difference spectroscopy on the reaction center of photosystem II: radical pair formation at 77 K[J]. *J Phys Chem*, 1995, 99(41): 15 304-15 309.
- [2] 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[J]. *植物学报*, 2001, 43(12): 1 237-1 242.
- [3] GOVINDJEE, VEN M V, PRESTON C, *et al.* Chlorophyll a fluorescence lifetime distributions in open and closed photosystem II reaction center preparation[J]. *Biochimic Biophysica Acta*, 1990, 1 015: 173-179.
- [4] GHANTAKIS D F, DEMETRIOU D M, YOCUM F F. Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center preparation and a 28 Kda Chl a-binding protein[J]. *Biochimic Biophysica Acta*, 1987, 891: 15-21.
- [5] 任兆玉, 贺俊芳, 王水才, 等. 光系统 II 捕光复合体中能量传递动力学研究[J]. *光子学报*, 2001, 30(5): 513-518.
- [6] ALFONSO M, MONTOYA G, CASES R, *et al.* Core antenna complexes, CP43 and CP47, of higher plant photosystem II, spectral properties, pigment stoichiometry, and amino acid composition[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(34): 10 494-10 500.
- [7] 单际修, 王居颖, 李良璧, 等. 光系统 II 核心天线 CP43, CP47 中 β -Car 与 Chl a 分子间的能量传递[J]. *科学通报*, 2000, 45

- (2);183-187.
- [8] DAU H, SAURE K. Exciton equilibration and photosystem II excitation dynamics—a fluorescence study on photosystem II membrane particles of spinach[J]. *Biochimic Biophysica Acta*,1996,1 273:175-190.
- [9] GRONDELLE R-V,DEKKER J P, GILLBRO T,*et al.* Energy transfer and trapping in photosynthesis[J]. *Biochimic Biophysica Acta*,1994,1 187(1):1-65.
- [10] VERMASS W. Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function[J]. *Annu Rev Physical Plant Mol Biol*,1993,44:457-481.
- [11] WASIELEWSKI M R, JOHNSA D G,SEIBERT M,*et al.* Determination of the primary charge separation rate in isolated photosystem II reaction centers with 500 fs time resolution[J]. *Proc Natl Sci USA*,1998,86:524-528.
- [12] HASTINGS G,DURRANT J R,BARBER J,*et al.* Observation of pheophytin reduction in photosystem two reaction centers using femtosecond transient absorption spectroscopy[J]. *Biochemistry*,1992,31(21):7 638-7 647.
- [13] SCHELVIS J P M, NOORT P I V, ARTSMA T J, *et al.* Energy transfer, charge separation and pigment arrangement in the reaction center of photosystem II [J]. *Biochim Biophys Acta*,1994,1 184:242-250.
- [14] TANG D,JANKOWIAK R,SEIBERT M,*et al.* Excited-state structure and energy transfer dynamics of two different preparation of the reaction center of photosystem II. A hole-burning study[J]. *J Phys Chem*,1990,94(19):6 519-6 522.

(编辑 曹大刚)

Ultrafast dynamics study of PSII core complex

REN Zhao-yu¹, HE Jun-fang^{1,2}, WANG Shui-cai²,

CHEN Wei-zong³, BAI Jin-tao¹, HOU Xun^{1,2}

(1. Institute of Photonics and Photon Technique, Northwest University; 2. State Key Laboratory of Transience Optics Technology, Xi'an Institute of Optics and Academy of Sciences, Xi'an 710068, China; 3. Physics Department, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Fluorescence spectroscopic and time properties of isolated core complex in green plant photosystem II (PS II) was investigated using the time-resolved fluorescence spectroscopy technique. Three life-time components were detected by multi-exponential and non-linear least-square curve fitting. Those components are 3.9, 20.4, 930.5 ps. The fluorescence ratio of each component to the whole is 1.0%, 12.7%, 86.3%, respectively. Using Global analyzing and Gauss three way fitting, the peak-wavelength of fluorescence spectroscopy curves are 671.03, 684.74, 696.16 nm.

Key words: femto-laser pulse; PSII complex; energy transfer; time constant; spectroscopy properties