

光系统Ⅱ捕光复合物中能量传递动力学研究^{*}

任兆玉^{1,2,3} 贺俊芳^{1,2} 王水才¹ 侯 洵¹ 匡廷云⁴
(1 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)
(2 西北大学光子技术与光子学研究所, 西安 71068)
(3 西北工业大学应用物理系, 西安 710072)
(4 中国科学院植物研究所光合作用研究中心, 北京 100039)

摘 要 采用时间分辨荧光光谱技术研究捕光色素复合体(LHCⅡ)荧光的时间光谱特性. 以脉宽为 120fs、重复率为 82MHz、波长为 360nm~420nm 激光激发 LHCⅡ样品荧光. 原始信号经过数据处理, 多指数拟合, 解得了能量在 LHCⅡ中传递的时间常量分别为 320±10fs、4.0±0.1ps、20.0±0.1ps. 相对应的各组分荧光占总荧光的百分比分别为 3.4%、50%、46.6%. 经过全局分析, 解得荧光强度随波长变化曲线, 其三个峰值波长分别为 652nm、673nm、692nm(以去离子水为悬浮液)和 658nm、687nm、700nm(以酒精为悬浮液). 根据 LHCⅡ结构以及荧光的时间、光谱特性分析, 认为 320±10fs 的时间组分属于一个单体内同一膜平面中 Chlb→Chla 的能量传递时间; 4.0±0.1ps 的时间组分属于同一单体中不同膜平面间 Chlb→Chla 和 Chla→Chla 的能量传递时间; 20.0±0.1ps 的时间组分属于不同单体之间、不同三聚体之间 Chla→Chla 的能量传递时间.

关键词 捕光复合物(LHCⅡ); 三聚体; 单体; 能量传递; 时间常量; 荧光特性; Chla/b

0 引言

在高等植物光合作用过程中, 太阳能首先被光系统Ⅱ(PSⅡ)捕光色素蛋白复合物(LHCⅡ—外周天线)吸收并在其中传递, 经由内周天线系统 CP43、CP47 色素蛋白复合物传输至具有光化学性能的反应中心色素蛋白复合物 D1/D2/cyt. b559 陷获, 并在其内部发生电荷分离、电子传递及光磷酸化等化学过程.

激发能在光合天线系统中的传输是一个长期研究的热点, 关于 LHCⅡ的结构、光谱和能量传递速率已被许多科学家通过电子检晶学¹、二向色性光谱学²、超快激光光谱学^{3,4}等方法分别在常温和低温下进行了大量的研究, 就其时间特性而言, 近几年的研究报道了能量在 LHCⅡ中的传递时间主要发生在 200~500fs, 2~4ps, 10~20ps 三个时间尺度. 就其结构而言, 该复合物的天然生

理状态主要是以三聚体的形式存在, LHCⅡb 是其主要复合物, 链接了大约 60% 的 PSⅡ叶绿素. 由多肽 LHCⅡb1(28kDa)、LHCⅡb2(27kDa)、LHCⅡb3(25kDa)组成. 较小的复合物有 LHCⅡa(CP29)、LHCⅡc(CP26)、LHCⅡd(CP24)是单体结构, 每一个仅链接了 5% 的 PSⅡ叶绿素. LHCⅡ中的每一个单体都包含了 3 个跨膜 α 螺旋, 由 7 个 Chla 和 5 个 Chlb、2 个类胡萝卜素、2 个叶黄素分子排成两层. 叶绿素分子垂直于膜表面排列在基质和细胞腔之间, 两个叶黄素镶嵌在复合体内, LHCⅡ相连的周围液体对每个复合体来说构成一个膜环境. 但其结构-功能关系中还有许多尚未解决的疑惑. 例如内部色素分子具体的空间位置和趋向, 复杂的光谱成分, 时间常量与其色素成分的对应关系等. 能量在天线系统中的

传输途径取决于分子间的距离、分子取向、空间结构、辐射损耗以及色素发射的荧光能量与用于光合作用能量的相互竞争机制⁵。本文采用飞秒时间分辨荧光光谱技术对 LHC II 中能量传递的超快过程及光谱特性进行了研究,给出了三个组分的时间常量及色素成分的对对应关系。

1 实验装置及测量结果

超快光谱技术已成为各种超快过程动力学研究必不可少的工具,通过对不同波长、不同时刻以及不同偏振方向荧光信号的测量,可以获得分子体系中各种瞬变中间态及其相互变化的动力学信息,较准确的测量方法有条纹照相法、脉冲取样时间相关测量法和光学选通法等。我们所建立的飞秒时间光谱装置采用脉冲取样技术对样品的荧光信号进行测量。实验装置如图 1 所示。

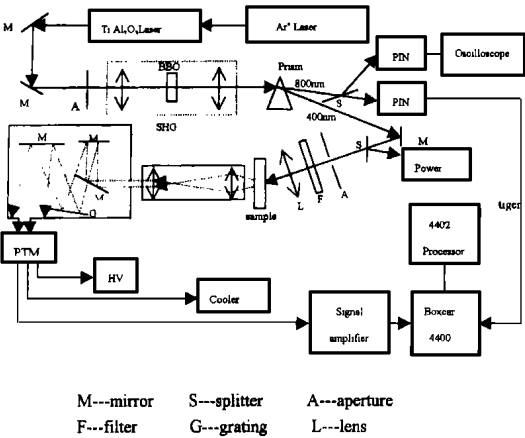


图 1 LHC II 飞秒时间分辨荧光光谱测量装置图
Fig.1 Experiment setup of femtosecond fluorescence spectroscope

1.1 实验装置

Beamlok 2085-15 型 Ar⁺ 激光器全线工作,垂直偏振泵浦下 TRUNAMI Ti:Al₂O₃ 锁模激光器。典型输出波长范围为 720nm~840nm,在色散补偿锁模状态下,输出脉宽最短可达 60fs,一般情况下为 100fs。重复频率为 82MHz,相邻脉冲间隔为 12.2ns。输出激光用小孔限束选基横模, BBO 晶体倍频后输出波长范围为 360nm~420nm,经三棱镜分光,将 800nm 基频光分为两束,一束经 PIN 管转换接示波器监视锁模状况,另一束转换后用于触发 Boxcar。400nm 的倍频光(用 405 型功率计测量倍频功率)经小孔限束,滤波片滤掉残余基频光后聚焦于 LHC II 样品上激发样品。再由准直镜收集到 1200g/mm 单色仪上进行色散,由 C31034A 型光电倍增管接收不同波

长下的荧光信号,经放大器放大后输入到 4420 型 Boxcar、4402 型信号处理器记录不同波长下的荧光强度随时间变化实测数据。

1.2 测量条件

光电倍增管工作电压为 -1450V,增益为 10⁶ 倍,放大器放大倍数为 8。Boxcar 设置为采样预平均方式,采样道数 1072,预平均开,采样扫描 10 次,门宽为 2ns,时基 50ns,细化时基 50ns,初始延时为 0。

1.3 样品储备

LHC II 样品由中国科学院植物所提供,存于液氮中备用。由于样品荧光的衰变规律与样品浓度有关,G·F·W·Searle 和 J·A·Altmann 等人⁶ 通过对 Chl 的荧光光谱测量及计算得知,在浓度较低时,荧光衰变服从指数规律。随着浓度的增大,荧光寿命减小,并且其衰变规律也发生了变化,由指数形式变为非指数形式,只有在较长时间后才变为指数规律。我们在实验时,为了比较,分别用去离子水(2000MΩ)、无水乙醇将样品稀释成低浓度进行测量。用去离子水做悬浮液时,样品浓度分别取 T=10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL、40μg/mL。用酒精做悬浮液时,样品浓度为 T=50μg/mL。测量在黑暗中进行,测量时样品用冰水混合物循环冷却。

1.4 测量结果

测量过程中,单色仪的光谱步长定为 5nm,测量荧光波长范围为 640nm~720nm。图 2 给出以去离子水做悬浮液,浓度为 10μg/mL,探测波长

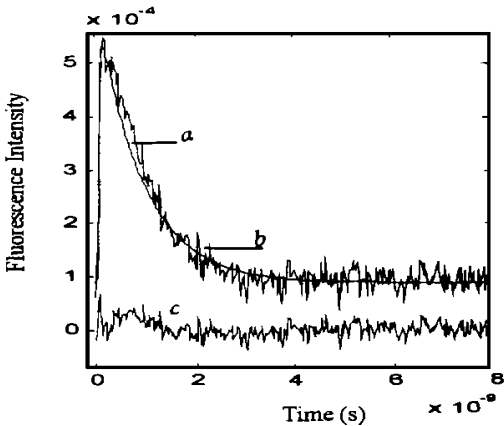


图 2 LHC II 以去离子水为悬浮液, T=10μg/mL 的荧光信号。a 为拟合曲线;b 为真实荧光信号;c 为拟合残差

Fig.2 LHC II (purified water as resolvent T=10μg/mL) Fluorescence curve. a. Fitting curve; b. Real fluorescence curve;c. Residual curve

为 675nm 时解得的真实荧光信号,图 3 给出以酒精做悬浮液,浓度为 50 μg/mL,探测波长为 675nm 时解得的真实荧光信号.图 4、图 5 分别给出与图 2、图 3 相对应的荧光光谱.

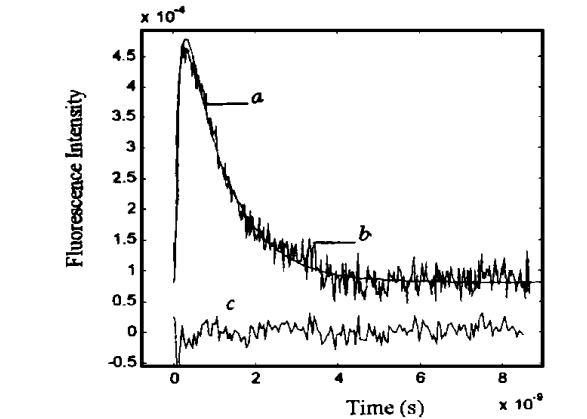


图 3 LHC II 以酒精为悬浮液, $T=50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的荧光信号.
 a 为拟合曲线; b 为真实荧光信号; c 为拟合残差
Fig.3 LHC II (alcohol as resolvent $T=50\text{ }\mu\text{g/mL}$) Fluorescence curve. a : Fitting curve; b : Real fluorescence curve; c : Residual curve

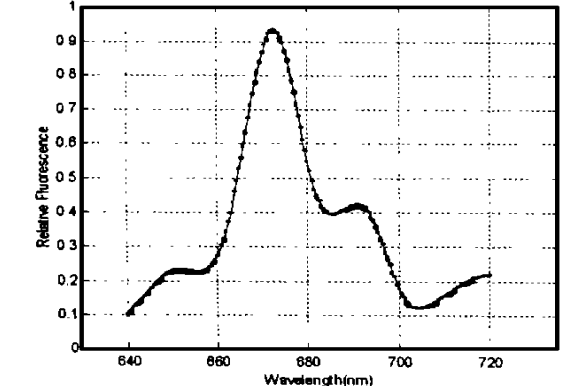


图 4 LHC II 以去离子水做悬浮液,浓度为 $T=10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 荧光强度随波长变化曲线
Fig.4 LHC II $T=10\text{ }\mu\text{g/mL}$ (purified water as resolvent) fluorescence-wavelength curve

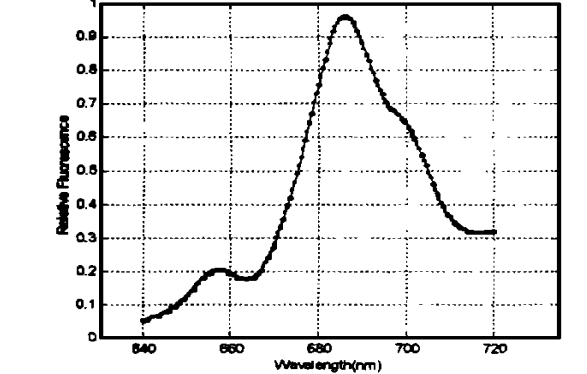


图 5 LHC II 以酒精做悬浮液,浓度为 $T=50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 荧光强度随波长变化曲线
Fig.5 LHC II $T=50\text{ }\mu\text{g/mL}$ (alcohol as resolvent) fluorescence-wavelength curve

2 数据处理及结果分析

2.1 数据处理

在时间分辨荧光光谱测量中可以得到大量的实验数据和荧光衰减曲线.通过建立数学模型,采用数据拟合的方法,可以获得一些我们想要了解的信息.在对超短脉冲激光激发下的荧光发射系统产生的荧光进行测量时,由于荧光信号要受到激发光脉冲持续时间和仪器响应特性的影响,实际测得的荧光衰减曲线并不是真实的荧光曲线,而是激发光波型、测量系统的响应函数与真实荧光衰减曲线三者卷积的结果⁷.因此必需在用数学模型的拟合时通过解卷积将真实的荧光曲线解析出来.

设激光信号为 $L(t)$,系统响应为 $R(t, \lambda)$,真实的荧光信号为 $S(t, \lambda)$,实验测得的荧光信号为 $F(t, \lambda)$,则

$$F(t, \lambda) = R(t, \lambda) * L(t) * S(t, \lambda)$$

令 $M(t, \lambda) = R(t, \lambda) * L(t)$ 为系统对激光脉冲的响应函数,则

$$F(t, \lambda) = M(t, \lambda) * S(t, \lambda)$$

所以真实信号 $S(t, \lambda)$ 可由实测荧光信号 $F(t, \lambda)$ 与系统对激光的响应信号 $M(t, \lambda)$ 的解卷积而获得.我们采用非线性最小二乘法, Nelder-Mead Simplex 方法及全局分析⁸ 优化搜索,并设拟合函数为

$$S(t, \lambda) = C_1 \exp(-t/\tau_1) + C_2 \exp(-t/\tau_2) + C_3 \exp(-t/\tau_3)$$

解得真实荧光信号如图 2、3 中曲线 b ,三指数拟合曲线如图 2、3 中 a 所示,拟合残差如图中曲线 c ,与两种样品相对应的荧光光谱如图 4、图 5 所示.拟合结果见表 1.

从表中可以看出能量在 LHC II 中的传递时间常量为 $320 \pm 10\text{ fs}$ 、 $4.0 \pm 0.1\text{ ps}$ 、 $20.0 \pm 0.1\text{ ps}$,

表 1 以去离子水及酒精做悬浮液时各浓度 LHC II 样品时间常量的拟合数据

组分及时间常量		组分 1				组分 2				组分 3			
		τ (fs)		比 (%)		τ (fs)		比 (%)		τ (fs)		比 (%)	
去离子水	$T=10\text{ }\mu\text{g/mL}$	322.1	3.4	3.95	50.0	19.96	46.6						
	$T=20\text{ }\mu\text{g/mL}$	322.3	3.5	3.94	50.0	19.74	46.5						
	$T=30\text{ }\mu\text{g/mL}$	323.1	3.4	3.96	50.0	19.90	46.4						
	$T=40\text{ }\mu\text{g/mL}$	325.1	3.4	3.97	50.0	20.10	46.6						
酒精	$T=50\text{ }\mu\text{g/mL}$	330.1	3.4	3.95	50.0	19.89	46.6						

相对应的各组分荧光占总荧光的百分比分别为：3.4%、50%、46.6%。

2.2 结果分析

由表 1 的拟合结果及图 2、图 3 拟合求解的曲线以及图 4、图 5 所示的荧光光谱曲线我们发现：

1) 各时间常量及其荧光占总荧光的百分比，a) 在我们所测浓度范围内与样品浓度无关，其荧光衰减都按多指数规律变化；b) 与实验所测得并经数据处理的 20 个波长点无关，这反映了荧光衰减的客观事实，即荧光的时间衰减仅与样品本身的微观结构及性质有关，而与荧光波长无关。

2) 各时间常量几乎与用于稀释的悬浮液无关，无论是去离子水还是酒精作悬浮液，都给出同样组分比的三个时间常量。

3) 光谱型状与不同的悬浮液有关，图 4 给出的去离子水做悬浮液， $T = 10 \mu\text{g/mL}$ 光谱图中有三个峰，波长分别为 652nm、673nm、692nm。图 5 给出的酒精做悬浮液， $T = 50 \mu\text{g/mL}$ 光谱图中两个峰和一个肩，波长分别为 658nm、687nm、700nm。可见酒精中的三个峰值波长分别比去离子水中的波长有所红移，我们分析认为原因有二：其一，是由于悬浮液的作用，以有机溶剂作悬浮液其样品的荧光峰值相对无机溶剂是会有个红移；其二，由于酒精中样品浓度高于去离子水中的浓度，当浓度较高时可能在 LHC II 样品中会形成高聚体（实际在用酒精配制样品时我们已经发现有肉眼可见的微小颗粒存在）而导致的荧光红移。

4) 由 LHC II 三维空间结构及光谱特性，构成每个亚单元（单体）的色素分子（Chla、Chlb、类胡萝卜素、叶黄素）都有多种光谱状态，Chla 及 Chlb 的吸收光谱分两个区： $S_0 \rightarrow S_1$ 跃迁的 Q 吸收带，波长在 620~720nm，他们的吸收峰为 Chla660、Chla670、Chla680、Chla685、Chla690、Chla700~720、Chlb640、Chlb650nm； $S_0 \rightarrow S_2$ 跃迁的 B 吸收带，波长在 370~470nm，吸收峰为 Chla425、Chlb435。类胡萝卜素只有一个吸收带，波长在 380~500nm，吸收峰为 420~425nm、440~450nm、470~480nm。根据激发能被天线色素分子吸收及在其中传递的机制，对于我们的实验，用 400nm 的激光激发样品，使样品中 Chla、Chlb 分子在吸收光能被激发后从 S_0 （基态）跃迁到 S_2 （第二单线态），然后以非常快的速度无辐射退激发到 S_1 （第一单线态），再从 S_1 态的吸收带辐射跃迁到

基态 S_0 发出荧光。因为荧光的 Stokes 红移，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大一些，所以我们试图做如下分析，将所测得的荧光峰值 652¹nm 和 655²nm（1 为以去离子水做悬浮液，2 为以酒精做悬浮液）可看作为 Chlb 吸收 400nm 的光子后无辐射跃迁到 Q 吸收带的 Chlb640nm 而发出的。673¹nm 和 687²nm 的荧光峰值可看作为 Chla 吸收 400nm 的光子后无辐射跃迁到 Q 吸收带 Chla660nm，或由 Chlb 将激发能（发射 652¹nm 和 655²nm 荧光）传递给 Chla（吸收 660nm）而发出的。692¹nm 和 700²nm 的荧光峰值可看作为 Chla 吸收由另一个 Chla（吸收由 Chlb，或 Chla 传递的激发能而发射 673¹nm 和 687²nm 荧光）传递的激发能而发出的。

5) 由 LHC II 的时间特性，因为所有的 Chlb 分子与 Chla 紧密相连，并且 Chla 分子的吸收光谱与 Chlb 的发射光谱重叠的非常好，使得 Chlb→Chla 存在迅速的激发能量传递⁹。在 LHC II 的单体中，同一膜平面中 Chla 与 Chlb 之间的中心距离为 0.83nm~1.05nm，叶绿素分子之间的平均距离为 0.9nm~1.4nm；不同膜平面叶绿素分子之间的平均距离为 1.2nm~1.4nm。叶绿素这种紧密的排列使得色素之间存在较强的激子耦合，而使得在三聚体的单体中能量传递是非定域的，对于单体之间或三聚体之间能量传递则是定域的跳跃式。因此能量传递的速度是极快的并且具有高达 90% 以上的能量传递效率¹⁰。Foske J. Kleima 等人¹¹在 77K 的低温下，采取泵浦探测技术研究了 LHC II 中的能量传递过程，测得 Chlb→Chla 有两个明显的时间组分：~200fs 和 3ps，Chla 分子之间有一个明晰的能量传递过程：18ps。证明在单体和三聚体中均存在从 Chlb→Chla 的快速传递（200fs）。在三聚体中，部分 Chlb→Chla 的传递发生在 600fs。而且从 Chlb→Chla 的传递只发生在单体的亚单元内部，不可能发生在不同的亚单元之间。Claudiu C Gradinaru¹²采用亚皮秒脉冲激励 640nm、650nm 多波长探测技术对 Chlb 分子的能量传递进行研究，认为吸收 640nm 的 Chlb 到 Chla 的时间常量 $350 \pm 100\text{fs}$ ，吸收 650nm 的 Chlb 到 Chla 的时间常量 $2.2 \pm 0.5\text{ps}$ 。根据前人的结论，结合我们实验所得的结果，我们设想 320fs 的组分属于一个单体中 Chlb 吸收 400nm 的激发光子无辐射跃迁到 640nm 而发射 652¹nm 或 655²nm 荧光到同一膜平面中吸

收 660 nm 而发射 673 nm 或 687 nm 荧光的 Chla 的能量传递时间, 该项的荧光仅占总荧光的 3.4%, 表明了能量在 Chlb $\rightarrow$ Chla 的高效传输. 4.0 ps 的组分属于同一单体中不同膜平面间 Chlb $\rightarrow$ Chla, Chla $\rightarrow$ Chla 的能量传递时间, 该项荧光占总荧光的 50%. 20.0 ps 的组分属于三聚体中不同单体之间, 不同三聚体之间 Chla $\rightarrow$ Chla 的能量传递时间, 荧光份额占总荧光的 46.6%.

3 结论

我们分别以去离子水及酒精做悬浮液配制不同浓度的 LHC II 样品, 采用时间分辨荧光光谱技术研究了其荧光的时间光谱特性. 以脉宽为 120 fs、重复率为 82 MHz、波长为 360 nm $\sim$ 420 nm 激光激发 LHC II 样品荧光. 光电倍增管探测, Boxcar 信号平均处理器记录的原始信号, 经过数

据处理, 多指数拟合, 解得了能量在 LHC II 中传递的三个组分的时间常量, 分别为 320 ± 10 fs、 4.0 ± 0.1 ps、 20.0 ± 0.1 ps. 相对应的各组分占总荧光的百分比分别为 3.4%、50%、46.6%. 根据 LHC II 空间结构以及荧光的时间、光谱特性分析认为, 320 ± 10 fs 的组分属于一个单体内同一膜平面中 Chlb $\rightarrow$ Chla 的能量传递时间. 4.0 ps 的组分属于同一单体中不同膜平面间 Chlb $\rightarrow$ Chla 和 Chla $\rightarrow$ Chla 的能量传递时间. 20.0 ps 的组分属于三聚体中不同单体之间、不同三聚体之间 Chla $\rightarrow$ Chla 的能量传递时间. 并且发现拟合的时间常量及荧光比与所测的荧光波长无关; 在低浓度范围内, 与样品的浓度无关; 与用于稀释样品的悬浮液无关. 光谱形状及荧光峰值与悬浮液有关, 有机溶剂(酒精)中样品的荧光峰值比无机溶剂(去离子水)中的有所红移.

参考文献

- 1 Kuhlbrandt W, Wang D N, Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 1994, 376: 614 $\sim$ 621
- 2 Hemelrijk P W, Kwa SLS, Grondelle R V, Dekker J P. Spectroscopic properties of LHC-II, the mainlight-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex from chloroplast. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1098(2): 156 $\sim$ 166
- 3 Kwa SLS, Van Amerongen H, Lin S, Struve W S. Ultrafast energy transfer in LHC-II trimers from the chl *a/b* light-harvesting antennna of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1102(2): 202 $\sim$ 212
- 4 Kwa SLS, Grondelle F G, Van Ameronger H, Lin S, Struve W S. Steady-state and time-resolved polarized light spectroscopy of the green plant light-harvesting complex II. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1101(2): 143 $\sim$ 146
- 5 Du Mei, Xie Xiaoling, Laurens Mets, Fleming G R. Direct observation of ultrafast energy transfer processes in light-harvesting complex II. *J Phys Chem*, 1994, 98(2): 437 $\sim$ 474
- 6 严国光, 周佩珍, 郭础, 戴云玲. 光合作用原初过程. 科学出版社, 1987: 83 $\sim$ 86, 42 $\sim$ 55
- 7 Wild U P, Holzwarth A R, Cood H P. Measurement and analysis of fluorescence decay curves. *Rev Sci Instrum*, 1977, 48(12): 1621 $\sim$ 1627
- 8 Van Stokkum I H M, Scherer T, Brouwer A M, Verhoeven J W. Conformational dynamics of flexibly and semirigidly bridged electron donor-acceptor system as reveal by spectrotemporal parameterization of fluoreacence. *J Phys Chem*, 1994, 98(4): 852 $\sim$ 866
- 9 Savikhin S, van Amerongan Hrebret, Stefan L S Kwa, et al. Low-temperature energy transfer in LHC-II trimers from the Chl *a/b* light-harvesting antennna of photosystem II. *Biophysical Journal*, 1994, 66(10): 1597 $\sim$ 1603
- 10 Jansson S. The light-harvesting Chlorophyll *a/b* binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1184(1): 1 $\sim$ 19
- 11 Keleima F J, Gradinaru C C, Calkoen F, et al. Energy transfer in LHC II monomers at 77K study by sub-picosecond transient absorption spectroscopy. *Biochemistry*, 1997, 36(49): 15262 $\sim$ 15268
- 12 Cradinaru C C, Pascal A A, Van Mourik F, et al. Ultrafast evolution of the excited states in the chlorophyll *a/b* complex CP29 from green plants studied by energy-selective pump-probe spectroscopy. *Biochemistry*, 1998, 37(4): 1143 $\sim$ 1149

DYNAMICS ON ENERGY TRANSFER IN LIGHT-HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II

Ren Zhaoyu^{1,2,3}, He Junfang^{1,2}, Wang Shuicai¹, Hou Xun¹, Kuang Tingyun⁴

¹ State Key Laboratory of Transience Optics Technology Xi'an Institute of
Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710068

² Institute of Laboratory Optics Technology and Photonics, Northwest University, Xi'an 710068

³ Applied Physics Department, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072

⁴ Laboratory Physics Photosynthesis Basic Research, Institute of Botany,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

Received date: 2000-10-26

Abstract Fluorescence spectroscopic and time properties of isolated light-harvesting complex in green plant photosystem II was investigated using the time-resolved fluorescence spectroscopy. Three life-time components were detected by multi-exponential curve fitting method. Those components were analyzed and discussed according to the structural and fluorescence spectroscopy property of LHC II. It is suggested that a) 320 ± 10 fs component is the energy transfer time attributed to Chlb $\rightarrow$ Chla in the same layer of one monomer. b) 4.0 ± 0.1 ps is the time of energy transfer attributed to Chlb $\rightarrow$ Chla and Chla $\rightarrow$ Chla in different layer of one monomer. c) 20.0 ± 0.1 ps is the time of energy transfer attributed to Chla $\rightarrow$ Chla between monomers and between trimers. The fluorescence ratio of each component to whole component is 3.4%, 50%, 46.6%, respectively.

Keywords Light-harvesting complex; Trimer monomer; Energy transfer; Time constant; Fluorescence properties; Chla/b



Ren Zhaoyu was born in Xi'an, Shaanxi Province. She was graduated from The Peking Normal University, Beijing, in 1982. Now she is a student for Ph.D in Northwest University, and an associate professor of Northwestern Poltechnical University, Shaanxi Province. Her major direction is transience optics and ultrafast photobiology and photochemistry processes research.