

光系统Ⅱ 荧光特性快速扫描成象光谱技术研究^{*}

张 舒^{1,2} 贺俊芳¹ 贺锋涛^{1,2} 王水才¹ 侯 洵^{1,2} 陈耀东³ 匡延云³

(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 西北大学光子学与光子技术研究所,西安 710069)
(3 中国科学院植物研究所,北京 100039)

摘 要 本文以菠菜(*Spinica oleracea* L.) 叶绿体中的 PS Ⅱ 颗粒复合物、CP47、CP43 和 LHC Ⅱ 为材料,对其结构和功能关系进行了分析,用扫描成象光谱技术对这四种样品的光谱特性进行了研究,并通过对其荧光发射光谱图象的处理,得到它们的荧光发射光谱曲线. 分析结果表明,PS Ⅱ 颗粒复合物的荧光发射光谱中心波长在 680. 1nm,波段的范围较宽;CP43 荧光光谱的中心波长位于 680nm,并在近红外区观察到振动小峰;CP47 荧光光谱的中心波长在 691. 3nm 处;CP47 和 CP43 在短波长区 640nm 和长波长区 720nm 附近分别出现肩峰,推测可能是样品中游离的叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 分子引起;LCH Ⅱ 荧光发射光谱的峰值位于 678nm,光谱范围为 576nm~780nm.

关键词 PS Ⅱ 颗粒复合物;CP47;CP43;LHC Ⅱ ;快速扫描成象光谱技术

0 引言

光合作用是维持地球上生命活动的最根本的反应,它利用自然界的二氧化碳和水,把太阳能转变成化学能,把无机物合成有机物,并放出氧气,是生命科学中最基本,最重要的问题之一. 光合作用中一个非常关键的过程就是天线系统吸收太阳能,并将激发能传递到光化学反应中心的过程¹,反应中心利用这部分能量从水中提取电子并放出氧气,同时,此过程所产生的电化学势又为固定二氧化碳和合成有机分子提供动力². 这个天然的光物理、光化学反应具有高达 90% 甚至更高的量子产额,使得光合组织以极低的消耗高效地利用太阳能. 对光合作用天线系统高效传能、转能微观机理的研究,将为我们进一步调节、控制、提高农作物的光能转化效率,人工模拟捕光生物电子元件,开辟太阳能利用的新途径提供重要的理论和技术依据.

1 PS 的结构功能关系

高等植物光系统Ⅱ(PS Ⅱ)位于类囊体膜的

基粒层中²,由捕光色素蛋白复合物(LHC Ⅱ)和反应中心核心复合物组成,其中反应中心核心又可分为内周天线系统(CP47, CP43)和 *D1/D2/Cyt b559* 蛋白复合物两部分^{3~5}. PS Ⅱ 是光合电子传递链的开始,并负责水的氧化和质体醌的还原,因此,PS Ⅱ 在光合作用中占有很重要的地位^{3,6}. PS Ⅱ 颗粒复合物包括外周天线,内周天线和反应中心,成分较为复杂,包含大小在 4~50kDa 范围内的至少 12 个多肽⁴.

光系统Ⅱ的核心天线 CP43 和 CP47,是分别由 *pabB* 和 *psbC* 基因编码的 43kDa 和 47kDa 多肽链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,形成 6 个跨膜螺旋⁷,它们是最靠近反应中心的天线色素. 对其氨基酸排列的分析表明,菠菜的 CP47 和 CP43 蛋白分别由 508 和 473 个氨基酸组成. 每个 CP47 多肽链包

含约 20~21 个叶绿素 *a* 分子和 3~4 个 β 类胡萝卜素分子,而每个 CP43 多肽链包含约 19~20 个

叶绿素 a 分子和 4~5 个 β 类胡萝卜素分子⁸。还有结果显示,除 β 类胡萝卜素之外,CP47、CP43 还含有少量的叶黄素⁹。内周天线的主要功能在于,它能在外周天线和反应中心之间传递激发能⁸。近来的研究结果显示,CP47 还参与 33kD 锰稳定蛋白的结合,其部分区域对稳定水裂解酶和组成 PS II 核心复合物很重要;CP43 可能具有蛋白酶的作用,它的丢失会影响 QA 与 PS II 核心复合物的电荷重组。

LHC II 是目前研究得最多的捕光色素,它结合了绿色植物近 50% 的叶绿素分子。在高等植物中,LHC II 的天然生理状态主要是以三聚体的形式存在的¹⁰,在植物转绿过程中,首先形成的是单体,然后再形成三聚体⁶。Kühlbrandt 等已于 1994 年成功地获得豌豆的 LHC II 的二维晶体,并用分辨率为 0.34nm 的电子显微术对其结构进行分析¹¹。他们的研究表明,每个单体包含约 7 个叶绿素 a 分子、5 个叶绿素 b 分子、2 个类胡萝卜素分子和 2 个叶黄素分子。从有关参量可以看出所有的叶绿素 b 分子与叶绿素 a 分子,以及叶绿素 a 分子与类胡萝卜素分子之间都存在紧密的连接,这种结构正是叶绿素 b 到叶绿素 a ,叶绿素 a 到类胡萝卜素分子之间高效传递激发能的结构基础。

2 材料和方法

2.1 样品

PS II 颗粒复合物的分离和纯化,参见 Kuwabara 和 Murata 的方法⁸,样品溶液保存于 30mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris, 2mmol/L Triton X-100 的 pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,存储于液氮中备用。实验时,将样品稀释至 100 μ g/mL,放入 1mm 厚的循环样品池中。CP47、CP43 的制备和纯化参见 Alfonso 和中科院植物所单际修等的方法^{7,12,13}。LHC II 的制备方法参见文献^{14,15}。实验在室温和弱光下进行。本研究采用的所有样品由中科院植物所提供。

2.2 扫描成像光谱技术

ICCD 扫描成像光谱装置如图 1 所示。激发光源为 Spectra-Physics 公司 Beamlok 2085-15 型主动锁模 Ar 激光器,输出的锁模脉冲功率为 82MHz,脉宽 120ps,波长可调。本实验中采用的激发光脉冲波长为 514.5nm,Ar⁺激光器的输出脉冲照射在样品上,经一个聚光系统收集样品发出来的

荧光,并准直后成象于 SPEX-270M 型快速扫描成像光谱仪的入射狭缝上,光谱仪的控制通过 GMI 图形界面控制软件进行,经过光谱仪分光,出口处信号经象增强器放大,由型号为 TEA/CCD-1242-E 的 CCD (Princeton Instruments) 接收光谱并快速成象。对 CCD 的控制通过计算机接口进行,采用连续触发方式。样品注入厚度为 1mm 的循环样品盒,用蠕动泵对样品进行循环,样品采用冰水混合物冷却,以减小强光源长时间照射对样品所发出的微弱荧光信号,时间分辨率能达到纳秒级。它最大的优点是能实时地减掉背景图象的分析通过 WinView 和 WinSpec 软件进行。

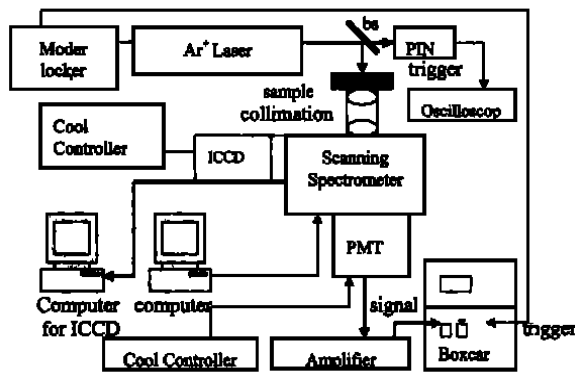


图 1 ICCD 快速扫描成像光谱装置

Fig. 1 Setup figure of ICCD ultrafast scanning image spectroscopy

3 实验结果

激发光波长为 514.5nm, 频率 82MHz, 测得菠菜 PS II 颗粒复合物、CP47、CP43、LHC II 在 273K 的荧光发射光谱。

3.1 PS 颗粒复合物的荧光发射光谱

此光谱中心波长 680.1nm 处,波段的范围非常宽,从 630nm 到近 770nm 都有光谱分布。从文献⁶上可知反应中心的荧光发射光谱只限于 650~750nm 范围,也就是我们测得的 PS II 光谱中的一部分,而其他波谱成分应该是由天线系统的复合物成分产生,可见这个很宽的谱带与 PS II 颗粒复合物极为复杂的组成相一致,可认为是由不同的组分产生的光谱叠加而成 Hodges 和 Moyas¹⁸ 曾采用单光子计数光谱技术测得辐射最大值出现在 685nm 处,并分辨出三个指数形式的时间常数,分别是 40~50ps, 175~200ps 和 380~450ps。他们将快时间组分 40~50ps 和 175~200ps 分别归因于 PS II 核心捕获能量和重新激发 PS II 核心的过程,而认为慢时间组分 380~450ps 代表再激

发 LHC II 的过程。由于受仪器时间分辨率的限制,我们正在改进仪器的时间特性,将采用飞秒荧光光谱技术进行样品时间特性的研究。

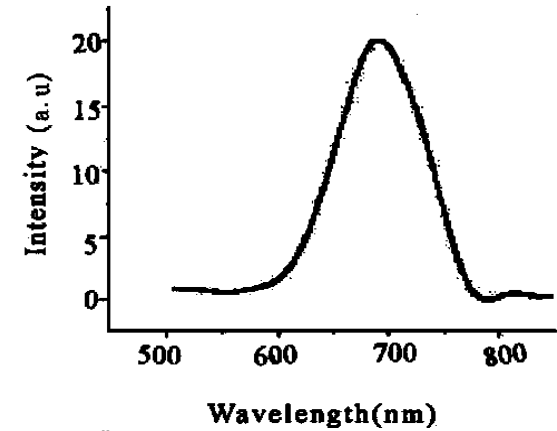


图 2 PS II 颗粒复合物荧光发射光谱
Fig. 2 PS II particle complex fluorescence emission spectrum

3.2 CP47、CP43 的荧光发射光谱

CP43 荧光发射光谱的中心波长位于 680nm 处,并在近红外区观察到振动小峰。相比较 CP47

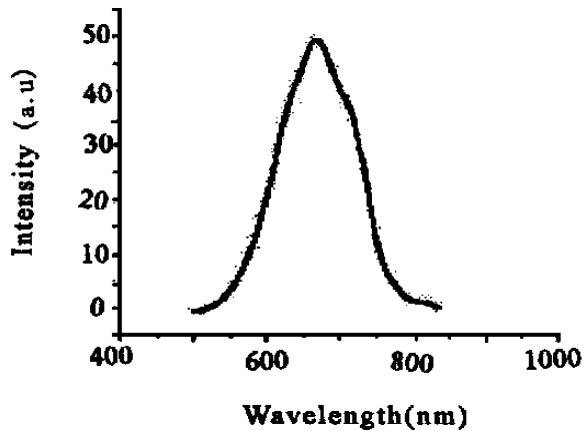


图 3 CP43 的荧光发射光谱
Fig. 3 CP43 fluorescence emission spectrum

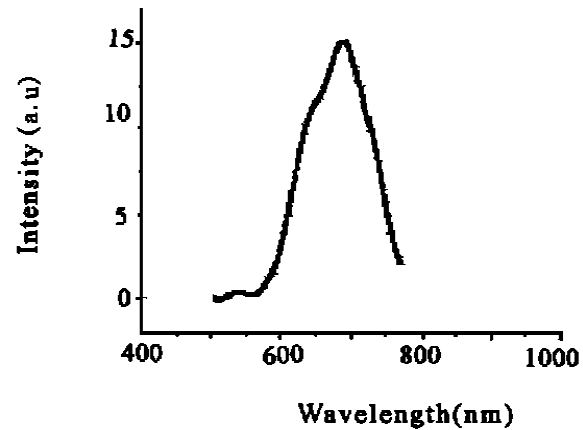


图 4 CP47 的荧光发射光谱
Fig. 4 CP47 fluorescence emission spectrum

和外周天线 LHC II 来说,对 CP43 的研究较少。据文献 19 的低温 (77K) 荧光发射光谱研究结果的报道,其峰值出现在 683nm,731nm 处出现振动副带。Alfonso 等⁷报道的 CP43 的 77K 荧光光谱峰值也出现在 683nm,并通过比较其荧光和吸收光谱发现了高的能量传递效率。另外,此实验结果显著不同于其他关于 CP43 的荧光光谱的报道的是,在 640nm 和 715nm 附近可观察到肩峰,推测是分别由于样品中游离的叶绿素 a 和叶绿素 b 分子产生。

CP47 荧光发射光谱的中心波长位于 691.3nm 处,这个结果与文献 19 的低温 (77K) 荧光发射光谱峰 693nm 较为接近,但此实验结果并未出现其所测得的位于 756nm 的振动副带。同 CP43 的测量结果相似,在 645nm 和 728nm 附近观察到肩峰,推测也是分别由于样品中游离的叶绿素 a 和叶绿素 b 分子产生。Alfonso 等⁷报道的 CP47 的 77K 荧光光谱峰值出现在 685nm,比较其荧光和吸收光谱也发现了高的能量传递效率。

3.3 LCH 的荧光发射光谱

273K 下 LCH II 的荧光发射光谱的峰值波长位于 678nm,光谱范围在 576nm~780nm 内。Hemelrijk, P. W. 等¹⁴测得 77K 天然状态的 LHC II 三聚体的荧光光谱峰值位于 680~681nm,并且在 700nm 附近存在肩峰,推测是由一些 LHC II 集合体引起。进一步测得合成的 LHC II 单体和三聚体在 77K 的荧光光谱,其峰值波长分别是 679 和 680nm。但其光谱范围较窄,约在 660nm~900nm 间。另外,文献 14 在室温和 77K 下测到的荧光光谱峰值分别位于 679nm 和 680nm,光谱范围从 660nm 左右开始,在近红外区还有许多

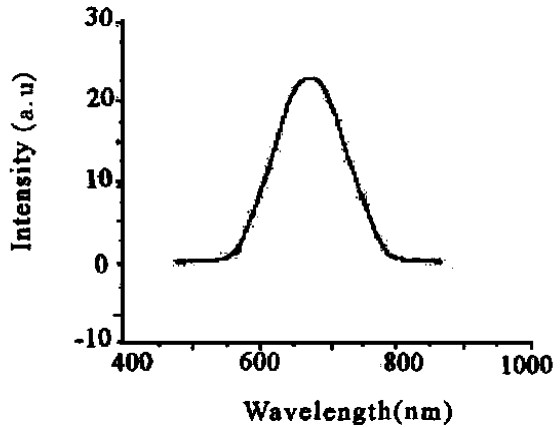


图 5 LHC II 的荧光发射光谱
Fig. 5 LHC II fluorescence emission spectrum

振动小峰。这一特征在文献 20、21 中也提到, 4K 和 77K 的发射光谱峰值分别在 681nm 和 680nm 处, 并在 725nm 后的长波长范围内有振动小峰。可以看出, 我们的测量结果与已有的报道大致相符。另一值得注意的问题是我们测得的光谱范围比报道的结果要宽, 估计这可能与 LHC II 提纯过程中样品中混入某些杂质有关。

4 讨论

本文用扫描成像光谱技术对 PS II 颗粒复合物、CP47、CP43、LHC II 进行了荧光光谱的研究。PS II 颗粒复合物荧光发射光谱具有很宽的光谱

范围, 与 PS II 颗粒复合物极为复杂的组成相一致, 可认为是由不同的成分产生的光谱叠加而成。CP43 的荧光峰值 680nm 处, 并在近红外区观察到振动小峰, CP47 荧光发射光谱的中心波长位于 691.3nm 处, 这些实验结果于其他有关报道都能较好的吻合。但可能由于样品纯度的问题, 在短波长区 640nm 和长波长区 720nm 附近分别出现肩峰, 推测可能是由样品中游离的叶绿素 a 和叶绿素 b 分子引起。LCH II 的荧光发射光谱的峰值波长位于 678nm, 光谱范围在 576nm ~ 780nm 内, 与有关报道相符。

参考文献

- 1 杨昆云, 唐崇钦, 林伟等 · 光系统 II 反应中心复合物的磁圆二色性研究 · 科学通报, 1997, 42(7) : 747~750
- 2 Rhee K H, Morris E P, Zheleva D, Hankamer B, Kühlbrandt W, Barber J · Two-dimensional structure of plant photosystem II at 8-Å resolution · Nature, 1997, 389(2) : 522~526
- 3 Anderson J M, Anderson B · The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion · Trends Biochem Sci, 1998, 13(2) : 351~355
- 4 Horton P, Ruban A V, Walters R G · Regulation of light harvesting in green plants · Annu Rev Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47(3) : 655~684
- 5 Hozenburgh A, Bewley M C, Wilson F H, Nicholson W V, Ford R C · Three - dimensional structure of photosystem II · Nature, 1993, 363(2) : 470~472
- 6 Vermass W · Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function · Annu Rev Physiol Plant Mol Biol, 1993, 44(2) : 457~481
- 7 Alffonso M, Montoy G, et al · Core antenna complexes, CP43 and CP47, of high plant photosystem II spectral properties, pigment stoichiometry, and amino acid composition · Biochemistry, 1994, 33: 10494~105005
- 8 Bricker T M · The structure and function of Cpa-1 and Cpa-2 in photosystem II · Photosyn Res, 1990, 24(1) : 1~13
- 9 Bassi R, Pineau B, Dainese P, Marquardt J · Carotenoid-binding proteins of photosystem II · Eur J Biochem, 1993, 212(2) : 297~303
- 10 Kühlbrandt W, Wang D N · Three-dimension structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography · Nature, 1991, 350(1) : 130~134
- 11 Kühlbrandt W, Wang D N · Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography · Nature, 1991, 350(3) : 614~621
- 12 单际修, 王居硕, 刘玉龙等 · 纯化光系统 II (PS II) 核心天线复合物 CP43 和 CP47 的共振拉曼光谱 · 植物学报, 1994, 41(3) : 280~284
- 13 单际修, 王居硕, 匡延云等 · 光系统 II 核心天 CP43 和 CP47 的分离纯化及光谱性质研究 · 生物物学报 1999, 15(1) : 142~151
- 14 Hemelrijk P W, Kwa S L S, Van Grondelle R, Dekker J P · Spectroscopic properties of LHC-II, the main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from chloroplast membranes · Biochem Biophys Acta, 1992, 1098(1) : 159~166
- 15 Kehrberg G, Voigt J, Schrotter T, Renger G · Exciton equilibration in the light-harvesting complex of Photosystem II of higher plants · Biochem Biophys Acta, 1995, 1231(1) : 147~156
- 16 Peterman E J G, Dukker F M, Van Grondelle R, Van Amerongen H · Biophys J, 1995, 69(9) : 2670~2678
- 17 Govindjee M, Van de V, Preston C, Seibert M, Gratton E · Chlorophyll a fluorescence lifetime distributions open and closed photosystem II reaction center preparations · Biochem Biophys Acta, 1990, 1015(2) : 173~179
- 18 Hodges M, Moya I · Modification of room-temperature picosecond chlorophyll fluorescence kinetics in Photosystem-

II-enriched particles by photochemistry · Biochem Biophys Acta, 1987, 892(1): 42~47

- 19 单际修 · 光系统 II 核心天复合物 CP43 和 CP47 的分离纯化及其光谱学特性的研究[博士论文] · 中国科学院植物研究所, 1999 年 2 月
- 20 Peterman E J G, Hobe S, Calkonen F, Van Grondelle R, Paulsen H, Van Amerongen H · Low-temperature spectroscopy of monomeric and trimeric forms of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex · Biochem Biophys Acta · 1996, 1273(1): 171~174
- 21 Kwa S L S, Groeneveld F G, Dekker J P, R van Grondelle, H · van Amerongen, Lin S, Struve W S · Steady-state and time-resolved polarized light spectroscopy of the green plant light-harvesting complex II · Biochem Biophys Acta · 1992, 1101(1): 143~146

FLUORESCENCE CHARACTERISTICS OF PS II USING ULTRAFAST SCANNING IMAGE SPECTROSCOPY

Zhang Shu^{1,2}, He Junfang¹, He Fengtao^{1,2}, Wang Shuicai¹,
Hou Xun^{1,2}, Chen Yaodong³, Kuang Tingyun³

¹National Key Laboratory of Transient Optics Technology Laboratory, Xi'an Institute of Optical
and Precision Mechanics, Academia Sinica, Xi'an 710068

²Institute of Photonics and Photon-Technology, Northwestern University, Xi'an 710069

³Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100039

Received date: 2000-03-16

Abstract An ICCD scanning image spectroscopy is established in this article to acquire the fluorescence emission spectra of four biological samples extracted from spinach (*Spinica oleracea L.*), including PS II particle complex, CP43, CP47 and LHC II. Their structure-function relations are also discussed. Through processing on their emission fluorescence spectrum image, the spectral characteristics are analyzed, and the fluorescence spectral curves are obtained. The results show that the peak of the fluorescence spectra of PS II particle complex, CP43, CP47 and LHC II lies in 680.1 nm, 680 nm, 691.3 nm and 678 nm, respectively. It is found that PS II particle complex has a wide spectral range, corresponding to its complex components. Some little vibration peaks are observed in the near-infrared range of CP43's fluorescence spectrum. There are two shoulder peak near 640 nm and 720 nm in the spectrum of CP47, CP43, respectively, it is deduced to be caused by the free chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in sample. The spectral range of LHC II is 576 nm ~ 780 nm.

Keywords PS II particle complex; CP47; CP43; LHC II; Scanning image spectroscopy



Zhang Shu was born on Apr. 14, 1977, in Shaanxi Province, P. R. China. she graduated from physics department of Northwest University and got B.S degree in 1998. Since then, she is a postgraduate student in Institute of Photonics and Photon-Technology, Northwestern University, majoring in Optics. Now, she is working towards her M.S. degree in National Key Laboratory of Transient Optics Technology Laboratory, Xi'an Institute of Optical and Precision Mechanics, Academia Sinica. Her research interests lies in ps, fs spectroscopy, ultrafast phenomena and biophysics.