

不同聚集态捕光色素蛋白复合物的超快光谱特性研究^{*}

葛菁华, 陈海燕, 赵福利

(中山大学 物理科学与工程技术学院, 广东 广州 510275)

摘要: 不同聚集态的捕光色素蛋白复合物 LHCII (Light-harvesting Complex II) 在调节植物光能的吸收和传递上有重要意义。用蔗糖密度梯度离心方法从菠菜类囊体膜上分离出 LHCII 单体和三聚体, 采用超快时间分辨荧光光谱技术, 对这两种不同聚集形式的蛋白质复合物的光谱特性、时间特性及色素分子间能量传递的超快过程做研究, 并由此推测在植物体内, 通过捕光复合物不同聚集态的相互转换来实现光能的吸收传递, 从而适应外界光环境的变化。

关键词: LHCII; 超快荧光; 聚集态; 能量传递

中图分类号: O433.54 Q945.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) S2-0228-04

光合作用作为地球上最重要的化学反应, 其核心问题是光能的转化——即光合作用原初反应中光子、激子、电子、离子与光合膜之间的相互作用, 以及光能的吸收、传递和电荷分离等基本过程。在高等植物体内, 捕光色素蛋白复合体是一类捕获光能, 并将其迅速传至光合反应中心引起光化学反应的色素蛋白系统。其中 LHCII 占有类囊体膜中近 50% 的色素和约 1/3 的蛋白质, 生理功能复杂且易被大量分离和纯化而备受关注。在植物体内 LHCII 主要是以其三聚体的形式存在, 但涉及到 LHCI 单体组装、随机聚集成三聚体的过程中亦会不可避免其他聚集状态的形成。事实上, 迄今已有研究者观察到植物体内有单体和寡聚体形式的 LHCII 存在。这意味着, 这些聚集体在体内的相互作用对光能的吸收与传递可能产生重大的影响。我们运用飞秒时间分辨荧光光谱技术, 以不同波长选择性激发并在不同偏振方向收集对不同聚集态复合物进行研究, 以期获得其中的能量传递信息, 为阐明植物如何适应外界环境、调节光能的吸收及激发能的传递提供一定帮助。

1 材料和方法

本实验用 LHCII 植物捕光单体、三聚体复合物提取自菠菜, 由中国科学院植物研究所提供。制备过程如下: 采用磷脂酶消化纯菠菜 LHCII 异质三聚体, 通过酶和去垢剂处理消化膜脂, 然后借助于蔗糖密度梯度离心的方法得到单体和三聚体。在中山

大学超快光谱实验室进行这两种不同聚集态 LHCII 的有关光谱性质研究实验。

2 实验装置

为了探知物质结构和能级结构, 包括探测分子的转动、振动、及内部电子的能级传递, 光谱学提供了一个可靠且具广泛应用的方法。具有高空间分辨率的时间分辨光谱, 可以实时探测分子的动态行为, 稳态光谱探测已经逐渐被其所充实。伴随时间分辨光谱时间维度的扩展, 时间分辨激光光谱学方法提供了更高带宽的实时探测方法, 可以提供更多稳态光谱所未能提供的含时信息。瞬态荧光是处于电子激发态的分子发射随时间演变的荧光, 通过研究分子所发射的荧光的特征可以了解分子的能级结构以及监视分子之间的能量传递过程。该实验方法在研究光合作用能量传递起着重要的作用。

图 1 是时间分辨荧光光谱实验装置图。分束器将激光分成两束, 反射的一束作为同步探测的触发光源, 经过光电二极管和电延迟系统触发条纹相机, 一直向右边前进的第二束光可以直接激发样品。当样品被一个超短脉冲激发后, 某些分子能够被激发跃迁到电子激发态, 并在泵浦光的诱导下进行荧光辐射, 样品分子所发射的荧光经过聚焦透镜系统后被分光计将不同波长的发射光按照波长的长短散射开之后再输入到条纹照相机。同步触发信号使条纹管的时散与入射光同步, 经过时散系统将荧光的瞬态行为记录下来。由于记录下来的是整个波

^{*} 收稿日期: 2007-07-30

基金项目: 国家理科人才基地资助项目

作者简介: 葛菁华 (1985年生), 女, 本科生; 通讯联系人: 赵福利; E-mail: stszf@mail.sysu.edu.cn

长段的荧光发射的时间函数，因此可以进行一系列的时间分辨的光谱处理。采用数据接口把条纹相机摄取的光谱数据传递到计算机内进行进一步处理。

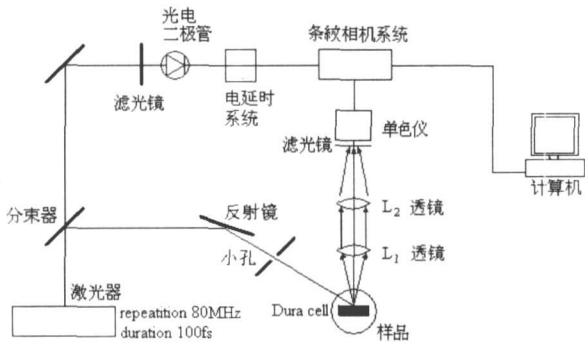


图 1 时间分辨荧光光谱实验装置图

Fig 1 Set up of time-resolved fluorescence spectroscopy

3 数据处理方法

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。一般情况下，增长或衰减过程为单指数或多指数形式 或者可用指数和的形式来模拟。数学中指数形式的增长或衰减过程可以表示为：

$$R(t) = A + \sum_{i=1}^n B_i \exp(-\frac{t}{\tau_i}) \tag{1}$$

其中 B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，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地用 R(t)来描述。样品的响应主要由系统的响应来决定。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：

$$X(t) = \int_0^t E(t-t') R(t-t') dt' \tag{2}$$

需要经过解卷积获得实验材料的真实信号。

在时间寿命组分中，第 i个时间组分 τ_i的荧光强度占总荧光强度的百分比表示如下：

$$\Phi_i = \frac{|B_i \tau_i|}{\sum_i |B_i \tau_i|} \times 100\% \tag{3}$$

整个衰退过程的平均时间可表示为：

$$\langle \tau \rangle = \frac{B_1 \tau_1^2 + B_2 \tau_2^2 + \dots + B_n \tau_n^2}{B_1 \tau_1 + B_2 \tau_2 + \dots + B_n \tau_n} \tag{4}$$

本文的实验结果分析主要是通过中山大学郑锡光博士的 Turbo Basic语言界面解迭程序进行有关数据处理。仪器响应函数还涉及整个光路的其它元器件，包括狭缝、条纹相机电压、分辨率等，故难以精确预测，但通过解迭程序寻找最佳化的 FWHM半高全宽 (Full Width Half Maximum)，可解决这个问题。本方法最大的优点在于无需预先知道与所测量的动力学数据相应的物理机制，因而指数过程的总数目不是先验确定的，避免了如参数拟合方法那样可能产生的任意性。

4 结果与讨论

4.1 稳态荧光光谱

分别用 675 nm的激发光激发不同聚集态的 LHCII 样品，并在水平和垂直偏振方向进行收集，分别得到如图 2 (A) 和 2 (B) 所示的荧光光谱。

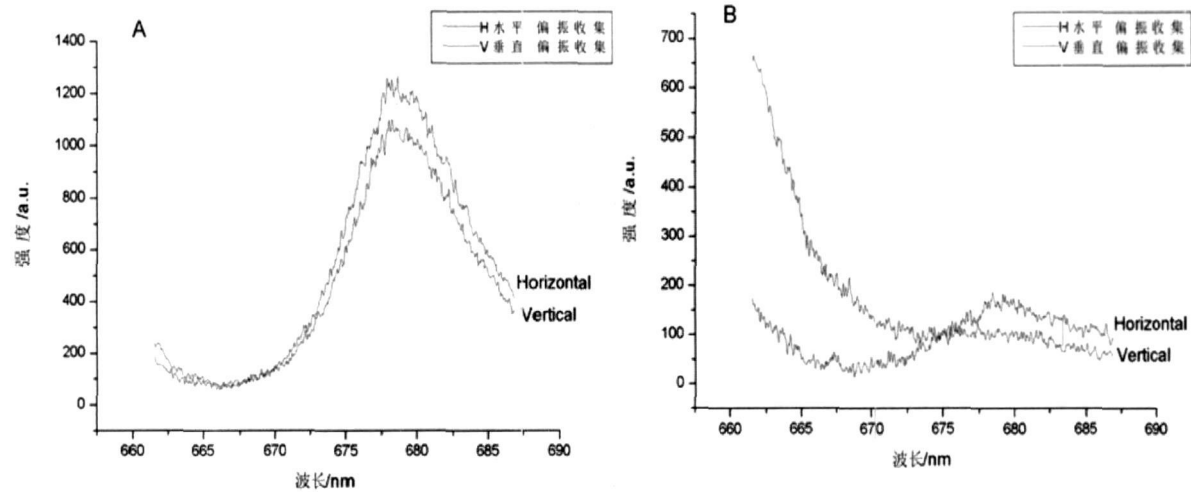


图 2 菠菜 LHCII在 675 nm激发下三聚体 (A) 和单体 (B) 的荧光发射光谱

Fig 2 The fluorescence spectrum of two spinach LHCII excited at 675 nm

从图 2 (A) 可以看出, 三聚体在水平和垂直偏振方向的荧光强度相差不大。图 2 (B) 中显示单体在两个方向的荧光强度相差极大, 而且与收集波长有关, 小于 675 nm 时垂直偏振方向的荧光强度明显大于水平偏振方向, 在 675 nm 二者几乎相等, 而大于 675 nm 后水平偏振方向荧光强度要稍大于垂直方向。三聚体和单体在不同偏振方向的荧光强度所表现出的差异也与二者在光学上的各向同性和各向异性的性质相一致。此外, 对比三聚体和单体水平偏振方向的荧光发射光谱可以看出, 前者的发射强度要明显大于后者。之前有研究已证明, 与三聚体相比 LHCI 单体结合的 5 种色素含量都明显减少, 尤其表现于 Chlb 和类胡萝卜素。色素组成和结构的变化必然会导致不同聚集态 LHCI 在光谱上的差异。由于 Chlb 和类胡萝卜素的减少, 使得类胡萝卜素到 Chlb 以及 Chl_a 到 Chl_b 的能量传递效率受到影响, 这些都造成 LHCI 中的几种能量传递途径都以三聚体中的效率较高。

4.2 超快时间分辨荧光光谱

图 2 是以中心波长为 650 nm 的脉冲激光激发

两种不同聚集形式的 LHCI 选取 675 nm、685 nm 波长下的荧光动力学衰减曲线。

采用 Monte-Carlo 方法对实验所获得的衰减曲线进行拟合, 所得的各种寿命列于表 1, 其中 τ 表示解迭的荧光寿命, A 是指前因子, 表示该寿命的相对发光强度。主要寿命组分为 110 ps、500—850 ps、2.5—4.5 ns, 这三个寿命组分反映了 LHCI 中色素分子的激发能传递过程。

通过探测荧光衰减谱, 结合组分光谱进行数据处理, 得到在 LHCI 单体和三聚体中激发能传递的 3 个寿命组分。经比较可以看出, 除 685 nm 探测波长下的单体以外, 两个收集方向的寿命组分基本上是一致的。因此, 寿命组分与偏振方向无关。而对应于同一探测波长, 单体与三聚体之间有较大差别。对于 675 nm、685 nm 这两种不同的探测波长, 都得到相同的结论: 对于单体, 在短的寿命占据相对较大的光强, 长寿命相对光强较小; 而三聚体则正好相反。这一结论也与两种聚集态的色素成分有关, 与三聚体的光能传递效率较高这一结论相符合。

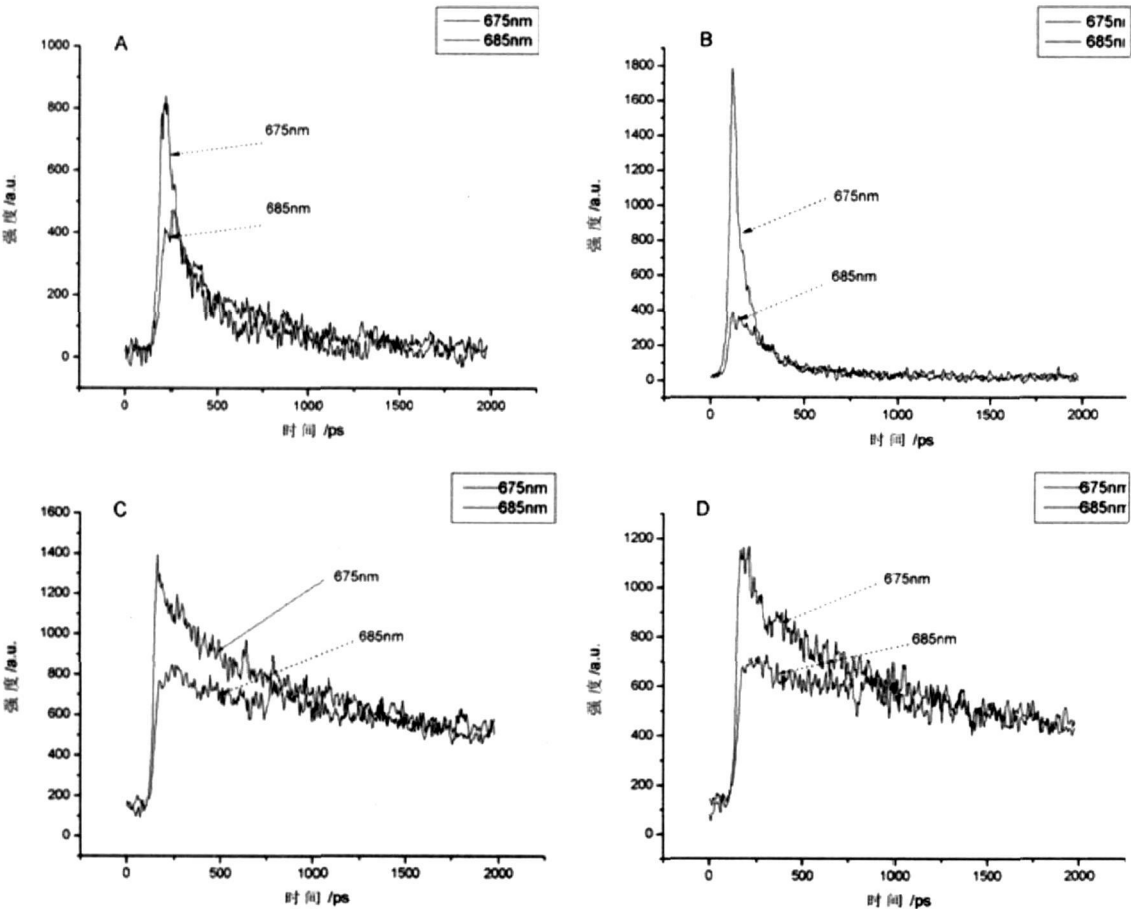


图 3 菠菜不同聚集态 LHCI 在 675 nm 激发下的瞬态衰减曲线
A 单体水平偏振 B 单体垂直偏振 C 三聚体水平偏振 D 三聚体垂直偏振

Fig 3 The fluorescence decays of two spinach LHCI excited at 675 nm

表 1 单体、三聚体在不同检测波长下的动力学荧光光谱解叠结果比较
Tab 1 The deconvolutions for the dynamic fluorescence of various complexes at different detected wavelengths

复合物	探测波长 nm	收集方向	τ_1 ps	$\frac{A_1}{\%}$	τ_2 ps	$\frac{A_2}{\%}$	τ_3 ps	$\frac{A_3}{\%}$
单体	675	水平	110.09	89.60	649.83	4.37	3065.35	6.03
		竖直	111.89	98.54	641.02	0.60	3264.97	0.86
	685	水平	109.85	64.22	647.83	23.85	2904.66	11.93
		竖直	110.62	58.84	620.46	39.78	3052.03	1.38
三聚体	675	水平	110.19	31.43	655.99	15.02	3116.27	53.55
		竖直	110.36	35.68	662.10	15.85	3297.83	48.48
	685	水平	112.11	7.61	663.00	9.26	3251.60	83.13
		竖直	112.20	6.51	658.84	10.54	3173.12	82.95

5 结 论

本文对菠菜 LHCI的单体和三聚体的荧光发射特性进行了系统的测量和分析，对飞秒荧光光谱数据采用 Monte— Carlo方法进行了多指数拟和。实验结果表明，在植物类囊体中不同聚集态 LHCI在不同偏振方向收集的光强、光能吸收传递效率等方面都不相同。这也表明，植物可能通过不同聚集态天线色素蛋白复合体的相互转换调节和控制光能的吸收及其向反应中心的传递，既可以保证反应中心有足够的激发能转化为化学能，形成足够的同化能力（ATP和 NADPH）供固定 CO₂ 所利用，又可避免过量激发能传至反应中心而引起反应中心的破坏。同时，这些问题也是值得深一步的研究和探讨，进而从理论上阐明光合作用原初过程高效吸收、传能和转能机理，从实践上通过控制相关膜脂和 Chlb的合成与代谢调节不同聚集态 LHCI的比例，最终提高光能转化和利用效率。

参考文献:

[1] 彭菊芳,王水才,贺俊芳,等. 捕光复合物 LHCI的荧光动力学特性[J]. 光子学报, 2004 33(2): 212— 215
[2] 赵福利. 光合作用原初能量传递过程研究, 1999年博士学位论文.
[3] DUM XIE X L, METSL, et al. Direct observation of ultra fast energy— transfer processes in light harvesting complex II[J]. Phys Chem, 1994, 98 (17): 4736— 4741.
[4] LU Z, YAN H, WANG K, et al. Crystal structure of spinach major light harvesting complex at 2. 72 Å resolution[J]. Nature, 2004, 428: 287— 292
[5] 彭菊芳,王水才,贺俊芳,等. 假根羽藻 LHCI的同质和异质三聚体的能量传递动力学研究[J]. 光子学报, 2005, 34(3): 395— 399
[6] 许春辉,赵福洪,王可玢,等. 光系统II 捕光叶绿素 a/b—蛋白复合物的分离及光谱特性的研究[J]. 植物学集刊, 1994 (7): 202— 207.

Study on Ultrafast Spectral Characteristics of Spinach Light harvesting ComplexII of Various Aggregations

GE Jing-hua, CHEN Hai-yan, ZHAO Fu-li
(School of Physics and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The function of assimilating and transferring light energy is fulfilled by the Light harvesting ComplexII. The LHCIIMonomer and Trimer can be separated from thylakoids of spinach. The technology of ultrafast time resolved fluorescence spectroscopy has been carried out to study the fluorescence spectral properties and energy transfer properties of them. And conversion between the aggregations makes green plants fit for the change of external light environment.
Key words: LHCI, ultrafast fluorescence spectroscopy, aggregations, energy assimilate and transfer