

藻胆体杆核复合物的能量传递途径研究*

赵福利 郑锡光 汪河洲

张景民 赵井泉

(中山大学超快速激光光谱学国家重点实验室, 广州 510275) (中国科学院感光化学研究所)

摘要 研究了藻胆体杆核复合物在低温 (77 K) 下时间分辨荧光光谱, 讨论了激发能量传递过程以及途径. 实验结果说明低温下藻胆体的能量传递途径有 2 条, 1 条经过核中的中间受体, 另 1 条不经过核中的中间受体.

关键词 藻胆体, 时间分辨光谱, 能量传递

分类号 O 433. 54, Q 945. 11

藻胆体 (Phycobilisome, PBS) 是藻类植物光合作用的捕光器官, 位于类囊体膜上, 其功能是将吸收的光能快速、高效地传递到光合作用反应中心. 藻胆体是进行光合作用原初过程的主要载体^[1]. 它含有若干条联接在核上的杆状的天线和位于中心的核, 杆中所含的藻胆蛋白为藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE)、藻红蓝蛋白 (Phycocyanin, PC) 和藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC), 其中藻红蓝蛋白和藻红蛋白的含量依光照条件而定. 核中含有 2 条与杆垂直且彼此平行堆成上下 2 层的棱柱体, 下面连接于类囊体膜, 每条杆都由别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 组成^[2].

本文所研究的藻胆体杆核复合物的杆中含有 1 个 PEC 六聚体, 1 个 PC 六聚体; 核中含有的 APC 有 4 种, 分别为 APDI, APDII, APDIII 和 APCB, 它们在每个柱内的排列顺序为 I, II, III, B^[3]. 分离的各种蛋白的稳态吸收和荧光光谱特性列于表 1. 藻胆体的内部蛋白分子较多, 而且蛋白之间传能的速度和效率都很高, 目前应用皮秒荧光探测技术对藻胆蛋白的研究多采用以实验曲线直观地说明藻胆体的传能过程而忽略了泵浦脉冲宽度对荧光探测的影响^[4,5]. 这些研究结果给出的传能途径还欠清晰. 本文报导了藻胆体时间分辨荧光光谱并应用计算机解选技术分析实验结果, 结果说明藻胆体内部传能有 2 条途径, 1 条经过核中的中间受体, 另 1 条不经过核中的中间受体.

表 1 各种蛋白的稳态吸收和荧光光谱特性^[6]

Tab. 1 The steady-state absorption and fluorescence of phycobiliproteins

项 目	PEC	C-PC	APCII	APDIII	APCB	APDI
UV λ_{\max} /nm	570	620	650	650	662	660
Flu $\lambda_{\text{em, max}}$ /nm	620	652	660	662	680	678

* 国家自然科学基金 (19574077) 和广东省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1997-03-31 赵福利, 女, 28岁, 讲师

1 材料和方法

藻胆体的提取方法同文献 [4]. 取新鲜的藻细胞用 1 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ (pH=7.0) 的缓冲液冲洗, 并将其悬浮于同样的缓冲液中, 加入去垢剂 Triton-X 100 (1%), 2 h 后, 在冰水浴中超声破碎 20 min, 然后将其放在 20°C 以下 40 000 g 的速度离心 1 h, 取上清液为粗制的藻胆体, 将粗制品溶液用蔗糖梯度离心, 2 h 后取出 0.75 mol/L 梯度层的蓝色溶液即为纯的藻胆体. 整个复合物中各个部分的终端发色团 PEC, C-PC, APCII & APCIII, APDI & APCB 的 λ_{em} 分别为 625, 652, 660 和 680 nm. 瞬态荧光光谱的测量是采用主动锁模 Nd: YAG 激光器同步泵浦的腔倒空染料激光为激发源, 染料激光脉宽为 6 ps. 样品所发荧光由与多色仪连接的同步扫描条纹照相机记录, 同步扫描条纹照相机的时间分辨率为 10 ps, 条纹照相机记录的数据直接传输到 IBM 微型计算机中, 联立公式 (1) 和 (2) 对实验数据进行多指数拟合, 拟合中采用 Monte-Carlo 方法对最佳解进行搜索.

事实上实验室所探测到的荧光是样品所发的荧光和激发脉冲的卷积, 如 (2) 式所示. 只有解卷积后得出的 $F(t)$ 才能够按照 (1) 式进行多指数拟合.

$$F(t) = \sum f_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1)$$

其中, $F(t)$ 由下式解得

$$G(t) = \int E(t') F(t-t') dt' \quad (2)$$

其中, $E(t)$ 为激发脉冲的仪器时间响应函数, $F(t)$ 为样品所发荧光的时间函数, $G(t)$ 为实验室探测到的荧光信号的时间函数.

2 结果

2.1 时间分辨荧光光谱结果

图 1 是藻胆体杆核复合物的低温荧光光谱的三维图. 从图 1a 中可以看到在 $\lambda_{em} = 620$

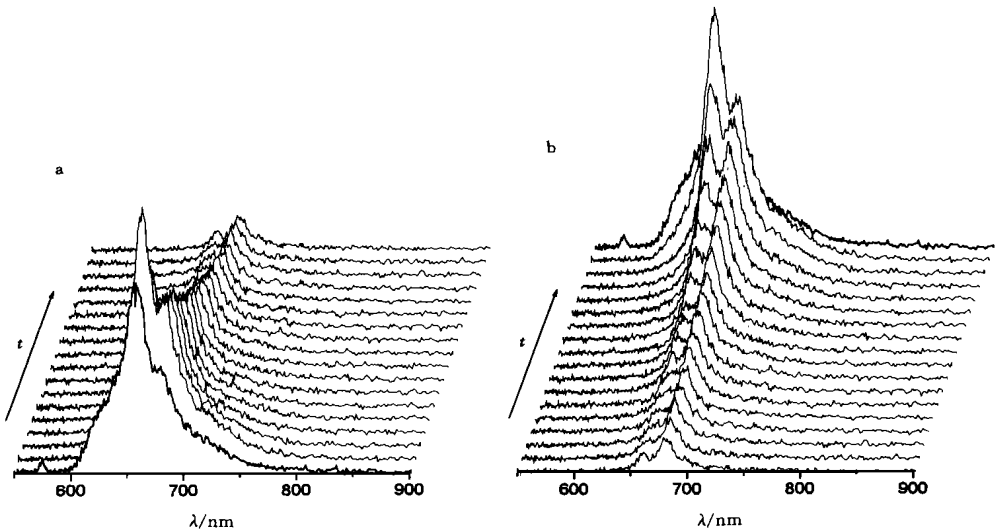


图 1 藻胆体杆核复合物低温荧光光谱三维图

Fig. 1 The three dimensional spectra of rod-core complexes from PBS at 77 K

nm 处有 1 个相当快的衰减,同时在 640~ 660 nm 以及 680 nm 附近呈现上升沿.从正向图中可以看出,最后长寿命荧光大部分集中在 λ_{em} 680 nm 处,而且在发光的后期荧光强度 F_{680} 超过 F_{660} ,这显示 λ_{em} 680 nm 处是该复合物的终端发射体.根据藻胆体的结构, C-PC 连接在 PEC 和 APC 之间, C-PC 的 λ_{em} 位于 645~ 650 nm,然而,在图 1a 及图 1b 上 650 nm 处的发射未呈现出明显的峰值,这说明能量高效地从 PEC 经过 C-PC 传递到 APC,因而 C-PC 只有少部分荧光发射,即对应于 C-PC 终端发射的 λ_{em} 645~ 650 nm 处并不呈现明显的荧光峰值,也即连接在复合物上的杆的结构是完好的,与所述的结构相吻合.另外,光谱图象的发光积分结果(见图 2)显示大部分能量集中于 660 nm 和 680 nm 处以长寿命荧光发射,说明该复合物有 2 个终端发射结构.观察不同波段的荧光衰减曲线(见图 3),发现 λ_{em} 620 nm 处的下降很快(寿命 τ 约 100 ps),而 645, 660 和 680 nm 的上升 τ 也正好为 100 ps,即能量是从 λ_{em} 620 nm 处经过 645 nm 传递到 660 和 680 nm 处.另外从图 1 上可以看出 λ_{em} 680 nm 上升较 660 和 652 nm 迟,而且长寿命荧光成分较大,此结果表示能量从 λ_{em} 660 nm 传递到 680 nm 也是一个通道.

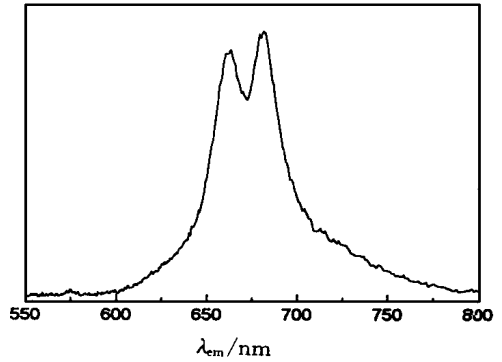


图 2 时间分辨荧光光谱的时间积分结果
 Fig. 2 Integral result of time-resolved fluorescence

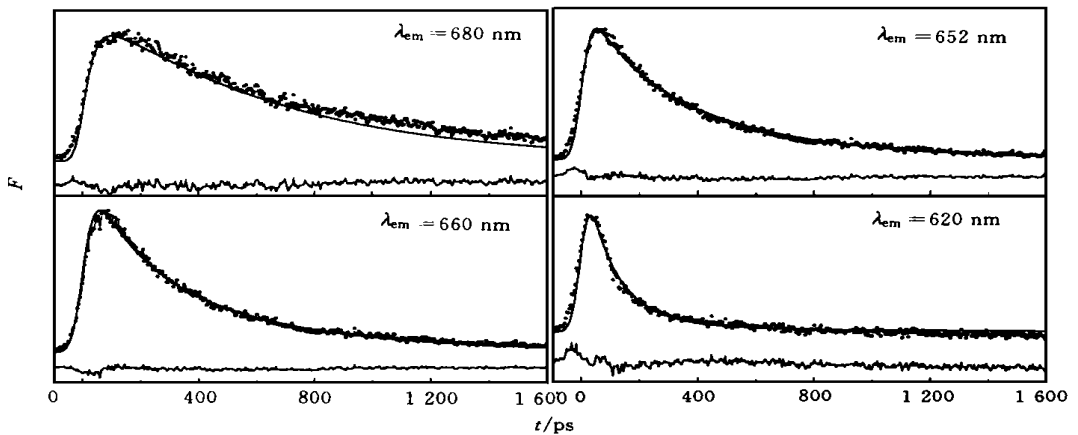


图 3 不同波长处的荧光衰减及其拟合曲线
 Fig. 3 The experimental and fitting results with different wavelengths

2.2 光谱解迭结果

应用 Monte-Carlo 方法对荧光曲线进行了拟合.拟合结果列于表 2 实验拟合曲线及误差曲线见图 3,拟合的标准偏差不大于 0.5%.

如表所列,在 λ_{em} 620 nm 处,有 1 个约 28 ps 的快衰减过程,同时在 652, 660 及 680 nm 处分别出现 25.3, 23.6 和 29.1 ps 的上升过程,这说明能量已经从 PEC 传递到 652, 660

表 2 藻胆体杆核复合物瞬态荧光多指数拟合结果

Tab. 2 Multi-exponential fitting results of time-resolved fluorescence of rod-core complexes from PBS

λ_{em} / nm	终端发色团	组分 1		组分 2		组分 3	
		f / ps	指前因子 %	f / ps	指前因子 %	f / ps	指前因子 %
620	PEC	28	24.4	115	72.1	851	3.5
652	c-PC	25.5	-26.4	138.5	89.9	474	36.5
660	APCI & APCII	23.6	-17.8	122.9	38.5	467	79.2
680	APCI & APCB	29.1	-93.1	126.3	-32.4	644	223.7

指前因子为该寿命的荧光组分荧光强度的百分比,负号代表上升组分。

和 680 nm 处.其次,当 λ_{em} 为 660 和 652 nm 时,分别以 138.5 和 122.9 ps 下降,680 nm 以 126.3 ps 上升,这说明了不但从 660~680 nm 处有一条能量通道,在结构上对应于 APCII 到 APC I 的能量传递或者由 APCII 到 APCB 的能量传递;而且由 652~680 nm 处也有一条能量通道,在结构上对应于 C-PC 到 APCI 或者 APCB 的能量传递。

最后,分离的复合物的发光积分谱显示在 660 nm 处的发光占荧光总强度相当大的比例,似乎这与藻胆体的高效传能相矛盾.其实这是由于时间分辨光谱的积分所取的时间区间很短 ($< 2 \text{ ns}$) 的缘故.在此,本文对 λ_{em} 660 及 680 nm 的衰减曲线取长时间段进行取对数再进行线性拟合.结果表明 λ_{em} 660 nm 处的长衰减时间为 500 ps,而 680 nm 处的长衰减时间为 1.0 ns,即当 660 nm 处的长寿命组分已经衰减到 0 时,680 nm 处才刚刚衰减到峰值的 1/2.在整幅图象上, λ_{em} 660 nm 处已经衰减到 0,而 λ_{em} 680 nm 处的荧光还有一部分未被探测.可见由于时间分辨光谱所取的时间积分段很短,从而导致了以上的误解.再研究不同时刻的荧光频谱曲线,取 $t = 50, 800, 1600 \text{ ps}$ 观察荧光的频谱分布(见图 4).随时间的增长, F_{660} 下降而 F_{680} 虽逐渐下降但下降得慢,当 $t = 1600 \text{ ps}$ 时, F_{660} 已经趋于 0, F_{680} 大于 0.与 $t = 50 \text{ ps}$ 相比 ($F_{660} > F_{680}$),可以认为能量确实从 λ_{em} 660 nm 处传递到了 λ_{em} 680 nm 处。

3 结 论

综上所述,能量在藻胆体中的传递过程是:当 $\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$ 的激光激发 PEC 敏化色团,能量在 PEC 中由敏感色团经中间色团传递到荧光色团 ($\lambda_{em} 620 \text{ nm}$),一小部分以荧光发射;由于 $\lambda_{em} 620 \text{ nm}$ 处恰好在 C-PC 的强吸收范围,大部分能量传递至 C-PC 的敏化色团,经过蛋白内能量传递到达 C-PC 的发射色团 ($\lambda_{em} = 652 \text{ nm}$),C-PC 位于藻胆体的杆末端,经过

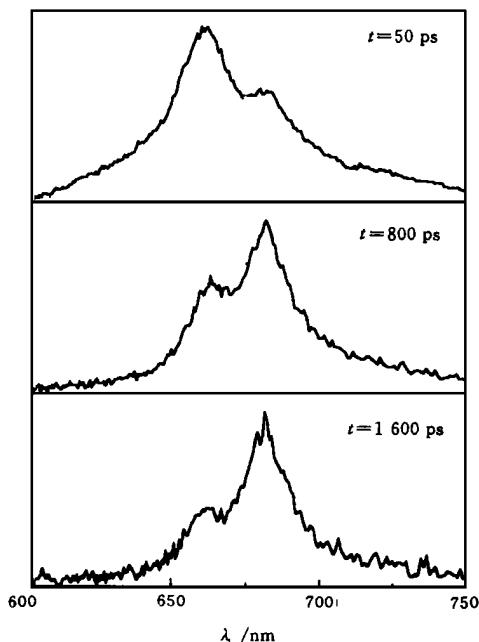


图 4 不同时刻的荧光频谱曲线

Fig. 4 The fluorescence spectra various instant

连接肽与藻胆体的核相连,藻胆体核的 APC 柱与 C-PC 杆垂直,而且所有 APC 的吸收都覆盖 $\lambda_{em} 650 \text{ nm}$, 能量由 C-PC 的荧光色团传递到核中的各种蛋白;其中 APDI 和 APDII 将吸收的能量经荧光色团再分别传递给 APQ 和 APCB, 由 APQ 和 APCB 经类囊体膜传递到反应中心 (图 5).

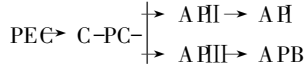


图 5 能量在藻胆中的传递途径示意图

Fig. 5 Schematic of energy transfer pathways in the rod-core complexes from PBS

参 考 文 献

- 1 Jiang L J, Zhao JQ. Progress in the study on structure and function of the antenna of algae. Chinese Science Bulletin, 1997, 42 (1): 1~7
- 2 Glazer A N. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. Biochim Biophys Acta, 1984, 768 29~51
- 3 Isono T, Katoh T. Cylindrical phycobiliproteins from a blue-green alga *Anabaena variabilis*. Plant Cell Physiol, 1982, 23 (8): 1347~1355
- 4 夏安东, 朱晋昌, 蒋丽金, 等. 藻胆体低温下 (77 K) 时间分辨的能量传递过程. 中国科学 (B 辑), 1995, 25 (3): 277~282
- 5 Mimuro M, Yamazaki I, Tamai N, et al. Excitation energy transfer in phycobilisomes at -196°C isolated from the cyanobacterium *Anabaena variabilis* (M-3): evidence for the plural transfer pathways to the terminal emitters. BiochimBiophys Acta, 1989, 973 153~162
- 6 McColl R, Filar D G. Phycobiliproteins. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1987. 45~91

Studies on the Paths of Energy Transfer in the Rod-Core Complex of Phycobilisome

Zhao Fuli* Zheng Xiguang Wang Hezhou Zhang Jingmin Zhao Jingquan

Abstract The time-resolved fluorescence spectroscopy about the rod-core complex of phycobilisome has been studied at 77 K and the paths and processed of excitation energy transfer have been discussed. The results show that there are two paths of energy transfer at low temperature, one through the terminal acceptor of the core, while the other not.

Keywords phycobilisome (PBS), time-resolved spectroscopy, energy transfer

* State Key Laboratory of Ultrafast Laser Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou 510275