

菠菜光系统 II CP47&RC 激发能传递与温度的关系

任兆玉¹, 王水才², 辛越勇³, 贺俊芳², 蔡霞², 侯洵^{1,2}

(1. 西北大学 光子学与光子技术研究所, 陕西 西安 710069; 2. 中国科学院 西安光学精密仪器研究所瞬态光学研究室, 陕西 西安 710068; 3. 中国科学院 植物研究所光合作用研究室, 北京 100093)

摘要: 采用基于延时分次扫描单光子计数器为探测装置的皮秒时间分辨荧光光谱测试系统研究了菠菜光系统(PS II)CP47&RC 蛋白复合物光能传递与温度的关系。分别对 CP47&RC 样品在 20, 42, 48 ℃ 下做温度处理后, 以脉宽为 120 ps, 重复率为 4 MHz, 波长为 514 nm 的 Ar⁺ 激光作为光源分别激发处理后的样品, 对比研究了菠菜 CP47&RC 激发能传递速度与温度的关系, 发现同一波长, 不同温度下能量传递速度不同, 48 ℃ 时能量传递的速度总体变慢; CP47&RC 在 42 ℃ 温浴处理的情况比较特别。

关键词: CP47&RC; 光谱特性; 时间特性; 高斯多峰拟合; 激发能传递; 温浴处理

中图分类号: Q 631 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274X(2002)05-0473-04

研究光合作用能量传递超快过程最直接有效的手段之一就是超快光谱技术。国内外对光系统 II (PS II) 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的研究, 已取得一些有意义的结果^[1-4]。但是, 对 PS II 中各种可分离的蛋白复合物样品做各种温度处理后的超快过程的比较研究还未见有报道。根据 PS II 蛋白复合物中 chl a 结合的生理特点, 我们分别选用 20, 42, 48 ℃ 对 PS II 中外周天线和反应中心蛋白复合物 CP47&RC 样品做温浴 5 min 处理, 用基于延时分次扫描单光子计数器为探测装置的皮秒时间分辨荧光光谱测试系统^[5]对其进行荧光的时间测量和光谱测量, 对比研究了菠菜 CP47&RC 光能传递与温度的关系。

1 实验方法

CP47&RC 样品由中国科学院植物研究所提供, 样品保存于 pH 6.0 的 Mes-NaOH 缓冲液中, 放在液氮中备用。实验在黑暗中进行, 实验时, 样品浓度为 30 μg/mL。先将准备好的样品放置在 20, 42,

48 ℃ 水中温浴 5 min, 取出后放入样品池, 再置于恒温室, 温度保持在 1~2 ℃。用波长为 514 nm、重复率 4 MHz, 脉宽为 100~120 ps 的 Ar⁺ 激光激发样品。用单光子计数器延时分次扫描测量^[6], 测量时单色仪步长取 2 nm, 荧光测量范围为 640~780 nm。为了避免强光对样品引起的不可逆损伤以及导致荧光猝灭, 根据我们所做关于确定激发光强与荧光强度关系的实验结果, 当光强达到每个脉冲 2.3×10^9 光子数时荧光趋于饱和, 我们选激发光强为 2~3 mW (每个脉冲约 $1.5 \sim 2.0 \times 10^9$ 光子数)。

2 实验结果及分析

2.1 实验结果

分别在 20, 42, 48 ℃ 下做温浴 5 min 处理的 CP47&RC 样品实测数据 5 点光滑的荧光光谱曲线以及对其进行高斯多峰解叠拟合曲线分别见图 1、2、3 中; 680 nm 处得到的真实荧光强度随时间变化曲线见图 4, 图 4 为样品在 3 种温度情况下, 波长为 680 nm 处实测信号与系统响应函数采用 3 指数模型, 非线性最小二乘法解卷积^[6]拟合得到的真实

收稿日期: 2002-02-26

基金项目: 国家基础研究发展规划专项经费资助项目(G1998010100); 西北大学科研基金资助项目

作者简介: 任兆玉(1958-), 女, 陕西西安人, 西北大学副教授, 博士, 从事生物光学、超快过程研究。

荧光强度随时间变化曲线, 拟合结果列于表 1 中。为了便于比较, 将 CP47&RC 样品在 3 种温度处理下实测数据归一化荧光光谱曲线置于图 5 中。3 种温度情况下, 波长为 680 nm 处实测信号与系统响应

函数采用 3 指数模型, 非线性最小二乘法解卷积^[6]拟合结果列于表 1 中。为了便于比较, 将 CP47&RC 样品在 3 种温度处理下实测数据归一化荧光光谱曲线置于图 4 中。

表 1 CP47&RC 分别在 20, 42 和 48 温浴 5 min 荧光光谱 3 指数拟合结果

Fig 1 The results of three-exponent fitting of CP47&RC at 20, 42 and 48 treatment respectively

波长/nm	组分 1		组分 2		组分 3	
	$\tau_1/\mu s$	$F_1/\%$	$\tau_2/\mu s$	$F_2/\%$	$\tau_3/\mu s$	$F_3/\%$
20 -680	187.9	19.3	210.4	22.8	850.7	57.9
42 -680	165.0	30.1	223.9	22.8	584.1	47.1
48 -680	540.1	23.1	609.3	49.8	692.3	27.1

2.2 光谱特性分析

1) 从图 1 高斯多峰拟合结果看, 在 20 温浴处理情况下, PS II CP47&RC 中解得了 5 个子波荧光光谱曲线。给出了 chl a 在 CP47&RC 中的 5 种结合状态, 其峰值波长分别为: 657.70 nm, 675.43 nm, 681.54 nm, 691.17 nm, 706.87 nm; 半高全宽分别为: 22.508 nm, 11.951 nm, 12.354 nm, 13.338 nm, 12.669 nm; 峰值波长为 675.43 nm 和 681.54 nm 的子波的相对荧光强度较大, 表明具有该荧光成分的 chl a 所占的比例较大。

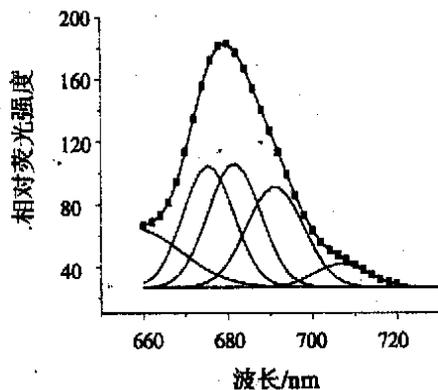


图 1 CP47&RC 在 20 温浴处理情形的荧光光谱实测数据 (点)、高斯 5 峰解叠曲线 (细实线) 以及拟合曲线 (过点实线)

Fig 1 Fluorescence wavelength curve of CP47&RC treated with 20. (Dots are measurement data, the curve crossing dots is fitting curve and five small are decomposing curve)

2) 从图 2 高斯多峰拟合结果看, 在 42 温浴处理下的 CP47&RC 样品中解得了 6 个子荧光光谱曲线。这 6 个解叠的荧光曲线代表了 chl a 在该蛋白复合物中的 6 种不同的结合状态, 其峰值波长分别为: 667.38 nm, 681.33 nm, 700.48 nm, 713.28 nm, 733.24 nm, 750.37 nm; 半高全宽分别为: 14.802

nm, 17.694 nm, 13.453 nm, 10.321 nm, 11.039 nm, 9.5812 nm; 波长为 681.33 nm 的子波的相对荧光强度最大, 表明具有该荧光成分的 chl a 所占的比例最大。

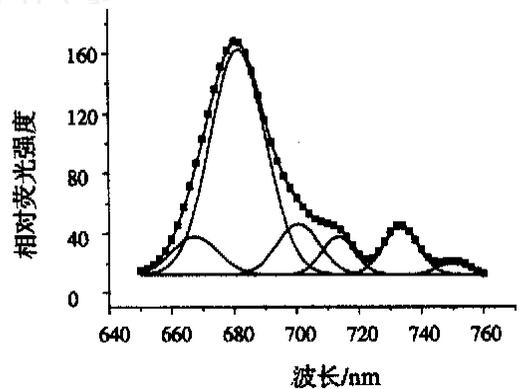


图 2 CP47&RC 在 42 温浴处理情形的荧光光谱实测数据 (点)、高斯 6 峰解叠曲线 (细实线) 以及拟合曲线 (过点实线)

Fig 2 Fluorescence wavelength curve of CP47&RC treated with 42. (Dots are measurement data, the curve crossing dots is fitting curve and six small are decomposing curve)

3) 从图 3 高斯多峰拟合结果看, 我们从在 48 温浴处理下的 PS II CP47&R 在 650 nm ~ 700 nm 的范围内解得了 4 个子荧光光谱曲线。其峰值波长分别为: 670.00 nm, 677.51 nm, 683.86 nm, 690.02 nm; 半高全宽分别为: 17.581 nm, 10.917 nm, 2184 nm, 8.4115 nm; 波长为 677.51 nm 的子波的相对荧光强度较大, 表明具有该荧光成分的 chl a 所占的比例较大。

2.3 时间特性分析

由图 4 的曲线和表 1 的结果看: 20 处理的样品在 680 nm 处的时间常数 τ 分别为: 187.9, 210.4, 850.7 ps; 同一波长点下各组分荧光色素占

总荧光色素的百分比 F_i (计算方法参见文献 [7]) 分别为: 19.3%, 22.8%, 57.9%。表明慢组分 (组分 3) 色素所占的百分比最大, 即慢组分时间常数的色素含量最高。42 处理的样品在 680 nm 波长处的时间常数 τ_i 分别为: 165.0, 223.9, 584.1 ps; F_i 分别为: 30.1%, 22.8%, 47.1%。仍然是慢组分时间常数的色素含量最高。48 处理的样品在 680 nm 波长处的时间常数 τ_i 分别为: 540.1, 609.3, 692.3 ps; F_i 分别为: 23%, 49.8%, 27.1%。表明 609 ps 的色素含量最高。

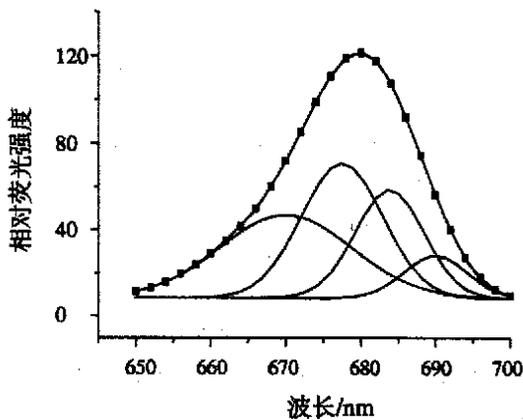


图 3 CP47&RC 在 48 温浴处理情形的荧光光谱实测数据 (点)、高斯 4 峰解叠曲线 (细实线) 以及拟合曲线 (过点实线)

Fig 3 Fluorescence-wavelength curve of CP47&RC treated with 48. (Dots are measurement data, the curve crossing dots is fitting curve and four small are decomposing curve)

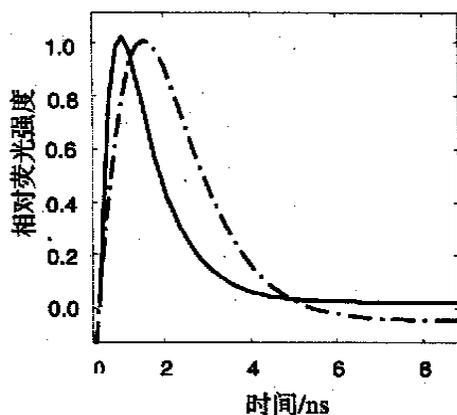


图 4 CP47&RC 在 680 nm 处采用三指数模型解卷积拟合得到的真实荧光强度随时间变化曲线 (实线、虚线和点划线分别为 20, 42, 48 处理下的曲线)

Fig 4 Real curve of fluorescence-time of CP47&RC at 686nm by three-exponent fitting (solid line, dashed and lineation are the curves at 20, 42 and 48 treatment, respectively)

从处于不同温度状况下的时间常数来看, 在波长为 680 nm 处, 组分 1 和组分 2 在 20 和 42 时的时间常数差异不大, 激发能传递速度几乎没变, 第 2 个组分的荧光色素占总荧光色素的比也没变, 第 1 个组分的色素比却变大了。然而, 在 48 时 1, 2 组分的时间常数都比前两种温度下的变慢很多, 差不多是原来的 3 倍; 组分 3 的时间常数变化也较大。组分 3 的荧光色素比在 20 时最大, 时间也最慢, 也就是说, 慢组分的激发能传递度在温度最低时占的荧光色素比最大, 随着温度的升高, 依次变小。总之, 48 时激发能传递的速度总体变慢。

2.4 三条光谱曲线比较

CP47&RC 在不同温度处理的样品所发的荧光强度不同, 相对而言, 48 时的荧光强度最弱, 并且荧光谱线的范围也最小。42 时长波长的荧光副带 (其中心波长为: 733.24 nm 和 750.37 nm) 非常明显。在 20 和 48 的荧光曲线中没有测到长波长的荧光副带。

从归一化光谱图 4 看出: 三条谱线的中心波长几乎没变, 均在 680 处; 42 时谱线的荧光强度在波长为 688~692 nm 范围内急剧下降, 表明荧光在此波长范围内猝灭的很严重; 在 650~690 nm 范围内, 42 和 48 曲线走势完全一致, 665~695 nm 范围内 20 和 42 的曲线走势基本一致;

由于荧光谱线宽度不同, 解叠出的子峰数目也就不同。

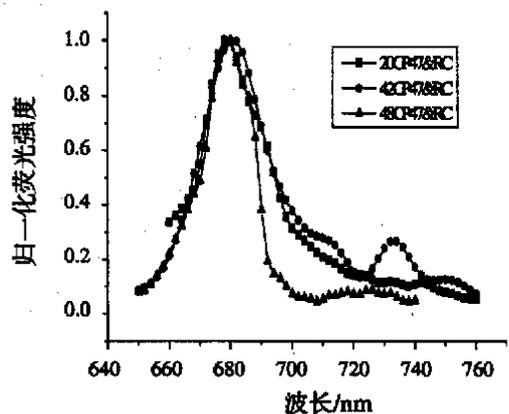


图 5 PS II-CP47&RC 三种温度处理下实测数据归一化荧光光谱曲线

Fig 5 The normal Fluorescence-wavelength curves of CP47&RC treated with the temperature of 20, 42 and 48

从 3 条曲线解叠的结果比较, 第一个峰值波长随温度升高依次分别为: 657.7, 667.38, 670 nm, 向长波长方向移动; 第二个峰值波长依次分别为:

675.43, 681.33, 677.51 nm; 第三个峰值波长依次分别为: 681.54, 700.48, 683.86 nm; 第四个荧光峰值波长: 691.17, 713.28, 690.02 nm; 最后一组荧光峰值波长分别为 706.87, 733.24 nm; 比较发现从解叠曲线的第二峰到第五峰, 在 42 时均出现红移。对 42 情况还有第六个峰值, 即 750.37 nm。

3 结 论

1) 同一波长, 不同温度下能量传递速度不同,

不同组分的色素含量也不同, 48 时能量传递的速度总体变慢。

2) 由于荧光谱线宽度不同, 解叠出的子峰数目也就不同。解叠的中心波长也不同, 表明色素的结合状态与温度有关。比较还发现从解叠曲线的第二峰到第五在 42 时均出现红移。对 42 情况还有第六个峰值, 即 750.37nm。这表明 CP47&RC 在 42 温浴处理的情况比较特别。

参考文献:

[1] SPENCER D P, MICHAEL W R, GAEN B K, *et al* Photo-counting technique for rapid fluorescence-decay measurement[J] Optics Letters, 1998, 23(15): 1 215-1 217.

[2] ITO T, HRAMATSU M, HOSODAM, *et al* Pico-second time-resolved absorption spectrometer using a streak camera [J] Rev Sci Instrum, 1991, 31: 1 275-1 279

[3] HACKE S, TAYLOR R A, BAR-JOSEPH I, *et al* Improving the signal-to-noise ratio of femto-second luminescence up-conversion by multi-channel detection[J] J Opt Soc Am, B, 1998, 15(4): 1 410-1 417.

[4] 任兆玉, 贺俊芳, 王水才, 等. PS II 核心复合物超快动力学研究[J] 西北大学学报(自然科学版), 2002, 32(1): 15-19

[5] 任兆玉, 贺俊芳, 王水才, 等. 皮秒分辨荧光光谱测量延时分幅扫描单光子计数技术[J] 激光杂志, 2002, 23(2): 42-44

[6] 任兆玉, 贺俊芳, 王水才, 等. 光系统 II 捕光复合物中能量传递动力学研究[J] 光子学报, 2001, 30(5): 513-518

[7] GOVINDJEE, VEN M V, PRESTON C, *et al* Chlorophyll a fluorescence lifetime distributions in open and closed photo system II reaction center preparation[J] Biochim Biophys Acta, 1990, 1 015: 173-179

(编 辑 曹大刚)

The variety of light energy transfer with temperature about CP47&RC of spinach in photosystem II

REN Zhao-yu¹, WANG Shui-cai², XN Yue-yong³,
HE Jun-fang^{1,2}, CAIXia², HOU Xun^{1,2}

(1. The Laboratory of Photonics and Photon Technique Northwest University, Xi'an 710068, China; 2. State Key Laboratory of Transience Optics Technology Xi'an Institute of Optics and Academy of Sciences, Xi'an 710068, China; 3. Laboratory of Photosynthesis Basic Research, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Fluorescence spectroscopic and time properties of isolated CP47&RC of spinach in photosystem II, which was treated with temperature at 20、42、48 five minutes, was investigated using picosecond-resolving of fluorescence spectrum measurement with delay-frame-scanning single photon counting technique. The samples was excited by Ar⁺ laser with 514 nm (wavelength), 120 ps (width of pulse) and 4 MHz (pulse repetition). The variety of light energy transfer with temperature it was compared in detail.

Key words: CP47&RC; gaussian multi-peaks fitting; time constant; energy transfer; spectroscopic properties; treated with temperament