科 学 通 报
第 42 卷 第 5 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 3 月

【研究简报】

光系统Ⅱ反应中心电荷分离和能量传递的动力学研究

侯建敏[①] 匡廷云[①*] 叶 彤[②] 于振宝[①] 杨昆云[①] 崔 岩[②]
陈耀东[②] 唐崇钦[①] 王水才[②] 侯 洵[②] 汤佩松[①]

(①中国科学院植物研究所光合作用实验室，北京 100093；②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. *联系人)

关键词 光合作用 原初反应 光系统Ⅱ 超快光谱 电荷分离 能量传递

光合作用中最核心的步骤之一是在反应中心进行的原初反应，PSⅡ反应中心原初反应的机理研究已日益成为国际光合作用研究的焦点这一. 1987 年 Nanba 和 Satoh 首次分离纯化出 PSⅡ反应中心 D1/D2/Cyt b559 复合物以来，国际上对 PSⅡ反应中心的原初电荷分离(Charge separation)、电荷重组(Charge recombination)和能量传递过程的动力学性质采用时间分辨荧光光谱和吸收光谱及烧孔谱(Hole-burning Spectroscopy)等技术进行研究，已取得一些有意义的结果. 但是，由于 PSⅡ反应中心中色素分子的吸收光谱重叠严重，其吸收光谱在 675 nm处仅有一个吸收峰，无法选择性地激发原初电子供体 P680，实验得到的数据比较复杂，不同实验室得到的动力学数据以及对实验数据的解释，都存在较大差异，甚至完全相反[1].

本文以菠菜叶绿体中的 PSⅡ颗粒、PSⅡ核心复合物(CP47/CP43/D1/D2/Cyt b559)和 PSⅡ反应中心复合物(D1/D2/Cyt b559)为材料，用皮秒和飞秒激光技术对光系统Ⅱ反应中心电荷分离和能量传递的动力学进行研究，测定出光系统Ⅱ反应中心内部 β-胡萝卜素和原初电子供体 P680 之间的能量传递以及 PSⅡ反应中心原初电荷分离的时间常数，提出了可能的动力学模型.

1 材料和方法

1.1 PSⅡ颗粒，PSⅡ核心复合物和 PSⅡ反应中心复合物的制备

PSⅡ颗粒的分离纯化，参看 Kuwabara 和 Murata[2]的方法，样品溶液保存于含 30 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris，2 mmol Triton X-100 的 pH 7.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液中，存贮于液氮中备用.

2 Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood, 1993, 81: 2 844
3 Holyoake T L, Alcorn M J. CD34$^+$ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. Blood Reviews, 1994; 8: 113
4 Gordon M Y. Human haemopoietic stem cell assays. Blood Reviews, 1993, 7: 190
5 奚永志，张双喜，魏 文，等. 正常骨髓 CD34$^+$造血干/祖细胞的富集. 中华血液学杂志，1996，17:192
6 奚永志，张双喜，唐佩弦，等. 人造血干/祖细胞多态性研究Ⅲ. 骨髓 CD34$^+$造血干/祖细胞功能亚群的分析. 细胞生物学报，1996，29:49
7 李秀森，奚永志. 快速富集大量 CD34$^+$造血干/祖细胞的新途径. 解放军医学杂志，1995，20:402

(1996-01-18 收稿，1996-06-03 收修改稿)

PSⅡ反应中心复合物(D1/D2/Cyt b559)和 PSⅡ核心复合物(CP47/CP43/D1/D2/Cyt b559)的分离纯化,参看 Nanba 和 Satoh 的方法稍有改进,其中 PSⅡ反应中心复合物的色素组成为叶绿素 a(Chla):去镁叶绿素 a(Pheo):β-胡萝卜素(β-Car)=6:2:2[3],在梯度洗脱样品时,分步收集 PSⅡ核心复合物和 PSⅡ反应中心复合物. 随后将样品浓缩,并把样品中的去污剂 Triton X-100 用 β-十二烷基麦芽糖苷替换. 样品纯度用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和可见吸收光谱检测,存贮于液氮中备用. 实验均在 4℃和弱光下进行.

1.2 时间分辨光谱测定

亚纳秒时间分辨荧光光谱实验装置参见文献[4],激光光源为主动锁模 Ar^+ 激光器,其输出频率 82 MHz,脉宽小于 200 ps 的脉冲序列,输出波长 488 nm 和 514 nm 可调. Ar^+ 激光器的输出脉冲经过透镜 1 聚焦后照射在样品上,透镜 2 收集样品的荧光,并成像到 WDG30 型单色仪的入射狭缝上,经过单色仪分光,由 GDB56 型光电倍增管接收,4400 型 Boxcar 信号平均器对测定结果进行采集平均. Boxcar 的触发信号由 Ar^+ 激光器的锁模电源提供. 经过若丹明 6G 样品验证,系统的时间分辨率为 120 ps.

PSⅡ反应中心 D1/D2/Cyt b559 复合物浓度 5 μg/mL [Chla]. 样品中加入 5 mmol/L 葡萄糖,0.1 mg/mL 的葡萄糖氧化酶和 0.1 mg/mL 过氧化氢酶,反应 10～15 min 以除去溶解氧. 测量过程中采用冰水混合物以样品循环方式冷却,经吸收光谱测定,实验前后 PSⅡ反应中心红区吸收峰位移小于 1 nm,表明光化学活性降低小于 10%. 激发波长分别为 488 nm 和 514 nm,平均功率 200 mW,频率 82 MHz,检测波长 650～750 nm,分辨率 10 nm,每条曲线采样点为 320 次平均.

亚皮秒 pump-probe 差异吸收率测量实验装置[1],光源为 Ar^+ 激光器泵浦的掺钛蓝宝石激光器,其输出的飞秒脉冲经倍频器后产生倍频光及基频光两束光. 倍频光为 pump 脉冲,用于激发样品,而基频光作为 probe 脉冲,probe 光又被分为两束,即参考光(r)和测量光(p),这两束光经透镜同时聚焦于样品上,但位置不同,参考光经过的是未被激发的样品部分,而测量光经过的是被激发的样品部分. pump 光和 probe 光的波长范围分别为 360～420 nm,和 720～840 nm. pump 光和 probe 光脉冲之间的延时由光延时系统控制. 测量光和参考光经过样品后进入单色仪,经单色仪出射窗外透镜聚焦在检测器上. 检测器为 OMA 系统的多元探测器,检测器得到的信号经采集和数字化后,送计算机处理.

PSⅡ颗粒浓度 200 μg/mL 和 PSⅡ核心复合物浓度 150 μg/mL[Chla],除氧方法同前,测量过程中,样品盒不停旋转,每个样品点实际接收到 6.6×10^8 个脉冲. 激发脉冲的宽度约为 100 fs,频率为 82 MHz,激发波长为 410 nm,功率约为 20 mW,probe 波长为 820 nm,系统的时间分辨率为 470 fs.

采用 Nelder 和 Mead 的单纯形(Simplex)方法[5]对实验数据进行多指数拟合和解卷积,然后用 Global 分析得到 DAS 谱(Decay-associated spectra).

2 结果与讨论

2.1 PSⅡ反应中心原初电荷分离研究

光合作用 PSⅡ的光化学反应,最实质的一步就是发生在反应中心的原初电荷分离过程,

---

1) 叶　彤. 博士学位论文,中国科学院西安光学精密机械研究所,1994

到目前为止在这一过程的动力学参数测定上，仍很不一致．主要研究结论可分为两种观点．第一种观点是 Wasielewski 等人提出的 PSⅡ反应中心的电荷分离的时间常数为 3 ps，第二种观点是 Barber 等人提出的电荷分离时间常数为 21 ps[1]．

我们用 400 或 410 nm 波长激发样品，对 PSⅡ颗粒的飞秒差异吸收率进行测量，在 820 nm 处记录差异吸收值的动力学曲线，可以分辨出 3 个寿命组分 1.5 ps，3.0 ps，22 ps（见表 1），对于 PSⅡ核心复合物，只分辨出两个组分 1.6 ps，3.5 ps（见表 2）．这一结果说明 22 ps 组分只有在 PSⅡ颗粒中可观察到，当 PSⅡ颗粒去除外周天线 PSⅡ捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体（LHCⅡ）后，剩下 PSⅡ核心复合物，观察不到这一衰减组分，由此我们初步认为 PSⅡ反应中心的电荷分离时间为 3 ps 左右，而 22 ps 组分很可能属于能量传递过程．

表 1 PSⅡ颗粒的亚皮秒差异吸收率的衰减动力学分析结果

荧光组分	荧光寿命/ps	相对强度/%
1	1.5	2.0
2	3.0	17.0
3	22	22.0

表 2 PSⅡ核心复合物的亚皮秒差异吸收率的衰减动力学分析结果

荧光组分	荧光寿命/ps	相对强度/%
1	1.6	0.2
2	3.5	29.0

2.2 PSⅡ反应中心内部的能量传递和电荷重组过程研究

现已知 PSⅡ反应中心中含有 4～6 个 Chla，2 个 Pheo 和 1～2 个 β-Car 分子，我们的实验结果，表明其色素组成为 Chla∶Pheo∶β-Car＝6∶2∶2[3]．如果 P680 是由两个 Chla 组成，至少还有 2～4 辅助 Chla 分子和 1 个 Pheo 不参与原初电荷分离，加上反应中心内部的 β-Car 分子，这些辅助色素分子很可能与反应中心之间存在能量传递关系．

人们普遍观察到 100～500 ps 衰减组分，但是对于该衰减组分的解释很不一致，第一种认为是来源于反应中心内部较慢的能量传递过程，第二种认为是来源于反应中心的电荷重组过程，第三种解释认为是能量驰豫过程或核驰豫过程，第四种解释认为是由于样品的不均一性产生．但是，以上观点都属于推测，尚缺乏直接的实验证据．

我们的实验结果表明，改变不同的激发波长，观察到 100～500 ps 的组分的寿命随之发生变化（见表 3 和表 4）．不同的激发波长可以激发不同的色素分子，因而会引起与能量传递过程有关的组分发生变化．分离纯化的 PSⅡ反应中心复合物含有多种色素分子，研究表明其中 β-Car 的吸收峰为 460～490 nm 范围，而 Pheo 在 500～550 nm 范围有两个吸收峰，我们的实验中激发波长为 488 nm，激发的 β-Car 分子较多，Pheo 分子受激发的分子较少，分辨出 1 个 350 ps 的组分，改用 514 激发样品时，更多的激发的是 Pheo 分子，而 β-Car 分子激发较少，实验分辨出 100 ps 的组分．说明 350 ps 组分可能与 β-Car 分子相关，100 ps 与 Pheo 相关．

100 和 350 ps 衰减组分的 DAS 谱都只有 1 个荧光发射峰，波长在 680 nm 左右，说明这两

表 3 514 nm 激发时 PSⅡ反应中心荧光衰减动力学分析结果

荧光组分	荧光寿命/ns	相对强度/%
1	0.10	73.0
2	1.5	5.0
3	6.0	20.0
4	38	2.0

表 4 488 nm 激发时 PSⅡ反应中心荧光衰减动力学分析结果

荧光组分	荧光寿命/ns	相对强度/%
1	0.35	74.0
2	1.5	0.6
3	6.0	24.0
4	38	1.4

个衰减组分可能与 P680 有关. Roelofs 等人报道 Pheo 与 P680 之间的能量传递时间常数约 40～70 ps[6], 我们实验的系统分辨率为 120 ps, 实验中观察到 100 ps 可能反映了 Pheo 与 P680 之间的能量传递, 350 ps 则可能属于 β-Car 与 P680 之间的能量传递, 我们小组的研究结果表明, PSⅡ反应中心在有人工电子受体质体醌存在时会引起 β-Car 的破坏[7], 认为 β-Car 的破坏是被 $P680^+$ 氧化的结果, 这一实验表明 P680 与 β-Car 之间的距离很近, 完全有可能存在能量传递关系.

我们以下提出 PSⅡ反应中心内部的能量传递动力学模型, 示于图 1. PSⅡ反应中心内部 Pheo 和 β-Car 与 P680 之间都存在能量传递关系, 其中 Pheo 与 P680 的光谱相近, 能量传递较快, 时间常数小于 100 ps, β-Car 与 P680 之间的能量传递较慢, 时间常数约为 350 ps.

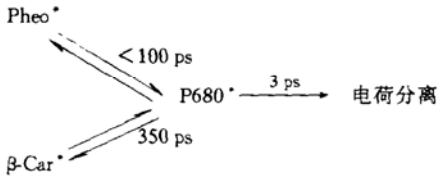


图 1　PSⅡ反应中心内部的可能的动力学模型

在分离纯化的 PSⅡ反应中心 D1/D2/Cyt b559 复合物中, 光诱导电荷分离产生的离子对 $P680^+ \cdot Pheo^-$, 由于没有醌电子受体使得电子无法继续传递, 而发生电荷重组, 重组过程的一部分能量以荧光的形式释放出来. 实验中得到的 38 ns 和 6.0 ns 的组分分别来源于电荷重组和与光化学反应无关的 Chla 荧光发射, 这与我们已有的实验结果和文献上的报道是相吻合的[3].

3　结论

以上用皮秒和飞秒激光技术对光系统Ⅱ反应中心电荷分离和能量传递的动力学进行研究, 通过时间分辨 pump-probe 差异吸收测量和荧光衰减动力学分析, 观察到光系统Ⅱ反应中心内部去镁叶绿素 a 和 β-胡萝卜素与原初电子供体 P680 之间都存在能量传递关系, 其中去镁叶绿素 a 与 P680 能量传递时间常数小于 100 ps, β-胡萝卜素与 P680 之间的能量传递时间常数约为 350 ps, 在原初电荷分离动力学研究方面, 初步结果表明 PSⅡ反应中心原初电荷分离时间常数可能是 3.0 ps 左右, 并提出了可能的动力学模型. 更深入的研究正在进行中.

致谢　本工作为国家"攀登"计划重大基础项目, 中国科学院重点项目和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基金资助项目.

参　考　文　献

1　Vacha F, Joseph D M, Durrant J R, et al. Photochemistry and spectroscopy of a five-chlorophyll reaction center of photosystem Ⅱ isolated by using a Cu affinity column. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:2 929～2 933

2　Kuwabara T, Murata N. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem Ⅱ particles of spinach chloroplasts, Plant Cell Physiol, 1982, 23:533～539

3　于振宝, 匡廷云, 唐崇钦, 等. 光系统Ⅱ反应中心 D1/D2/Cyt b-559 复合物的分离纯化及其性质研究. 植物学报, 1992, 34(8):580～595

4　叶　彤, 崔　岩, 侯建敏, 等. 高等植物光系统Ⅱ反应中心的亚纳秒时间分辨荧光光谱的测量. 光子学报, 1996, 25(1):1～6

5　Nelder J A, Mead B. A simplex method for function minimization. Computer J, 1965, 7:308～313

科 学 通 报
第 42 卷 第 5 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 3 月

【研究简报】

两种新的碳化硅长周期六方多型体 240H 和 294H

郭常霖
(中国科学院上海硅酸盐研究所,上海 200050)

关键词 碳化硅 长周期 新多型体

多型性是结构化学和晶体学的一个极重要的现象和研究领域. 许多密堆积或层状结构的无机化合物、页硅酸盐和矿物,例如 SiC, ZnS, CdI_2, PbI_2, 二硫族化合物、钙钛矿型结构化合物、粘土、云母,等等,都呈现广泛的多型性,可形成众多的结构变体或多型体. 某些化合物多型体的堆积周期可达数千埃. 出现如此巨大的结构周期确是结构化学领域中很值得研究的问题.

碳化硅是最典型的多型性化合物. 到目前为止,已发现有 157 种多型体. 其中,我们发现了共 84 种 SiC 的多型体[1~4],占总数的一半以上.

我们用倒易点阵点间关系法发现两种新的碳化硅长周期六方多型体 240H 和 294H.

1 实验结果

对 400 多个工业碳化硅晶体进行了 X 射线 Laue 法研究. 其中 10%左右的晶体含有除了碳化硅基本类型 6H, 15R, 21R, 4H 和 8H 以外的较高层的多型体. 对含有多型体的晶体用装有极细入射狭缝光阑的大直径(ø153 mm)圆筒形照相机摄取高分辨率的特殊 X 射线 Laue 照相. 鉴于碳化硅高层多型体与基本类型的共轴连生极为普遍,因而基于分析多型体与基本类型倒易点阵阵点之间关系的点间关系法是研究 SiC 多型性的最有效的方法. 利用此方法对这些碳化硅晶体进行研究,我们发现了两种新的 SiC 长周期六方多型体 240H 和 294H.

该两薄片状晶体的大小约为 3~4 mm,均为深蓝色. 两晶体的表面未发现生长蜷线.

X 射线照片上劳埃斑点的分布都呈六次对称. 显然,新多型属于六方晶系,属较高层多型体. 该两多型体均与碳化硅基本类型 6H 共轴连生. 根据我们提出的 xH 与 6H 之间的倒易点阵点间关系(参考文献[1]的表 4)及公式: $x = 12(w + 1) + z$, 可以确定多型体的层次类型. 公式中 z 为点间关系序号(即第 z 种关系), w 为基本类型 6H 两斑点之间的多型体斑点数 y 与表中对应常数 N 之差.

1.1 新多型体 240H

该晶体圆柱 Laue 照片如图 1 所示(仅示出 6H(h0l)晶带的(101)—(102)和(10$\bar{1}$)—(10$\bar{2}$)

6 Roelofs T A, Kwa S L S, Van Grondelle R, et al. Primary processes and structure of the photosystem II reaction center. II. Low temperature picosecond fluorescence kinetics of a D1 − D2 − cytochrom b559 reaction center complex isolated by short triton-exposure. Biochim Biophys Acta, 1993, 1143: 147~157
7 唐崇钦, 匡廷云, 于振宝, 等. 质体醌重组的 D1/D2/Cyt b-559 复合物的荧光衰减动力学和光破坏作用. 植物学报, 1994, 36(4): 257~264

(1995-11-28 收稿, 1996-02-12 收修改稿)