

# 紫细菌 *Rb. Sphaeroides* 601 外周捕光天线 (LH2) B800 吸收带的超快动力学研究<sup>\*</sup>

刘伟民<sup>1)</sup> 刘 源<sup>2)</sup> 徐春和<sup>2)</sup> 钱士雄<sup>1)†</sup>

1) 复旦大学物理系, 上海 200433)

2) 中国科学院植物生态生理研究所, 上海 200032)

(2006 年 1 月 9 日收到, 2006 年 2 月 21 日收到修改稿)

利用从紫细菌 *Rb. sphaeroides* 601 所提取出的外周捕光天线 LH2 以及其不同 pH 值酸化样品(部分和全部去除 B800 分子 LH2) 并采用不同波长下的飞秒单色抽运探测技术详细研究了 LH2 中 B800 吸收带内的激发态动力学过程。通过对野生型与部分/完全去 B800 分子 LH2 的比较研究, 分析了 B800 吸收带激发后所表现出的丰富变化的动力学过程, 研究结果表明激发 B800 带的动力学过程中包含着 B850 上激子带的直接激发而产生的对激发态动力学的贡献。

关键词: 紫细菌外周捕光天线 LH2, 部分和全部去除 B800 分子 LH2, 激发态动力学的演变, 飞秒抽运探测

PACC: 0660J, 3580B, 8725B, 4280W

## 1. 引 言

紫细菌外周捕光天线(light harvesting 2, LH2)是细菌光合作用功能体中非常重要的捕光系统之一, 吸收光能后 LH2 将能量快速有效地传递给周边的捕光天线, 最终能量被反应中心(reaction center)捕获, 在反应中心里产生光能向化学能的转换。解析嗜酸红假单胞菌(*Rps. Acidophila*)外周天线 LH2 的晶体结构发现(如图 1 所示), 在 LH2 中有两层环状排列的细菌叶绿素分子(bacteriochlorophyll, BChl), 根据吸收峰位置分别被称为 B800(800nm)和 B850(850nm)。在 LH2 的类胡萝卜素分子(carotenoid)可能具有两种排列, 第一种跨膜排列于 B800 环中, 类胡萝卜素头部接近蛋白质亚基的 N 末端; 另一种在晶体机构中只得到了部分解析, 类胡萝卜素头部接近于 B850 分子。研究表明紫细菌 *Rb. Sphaeroides* 的结构与 *Rps. Acidophila* 的结构非常相似<sup>[1]</sup>, 紫细菌 *Rb. Sphaeroides* 中的外周捕光天线 LH2 是一种非常理想的捕光系统用来研究捕光天线 LH2 中能量传递的物理机理<sup>[1-3]</sup>。

在 LH2 体系中, 从类胡萝卜素到细菌叶绿素、以及 BChl 分子之间的能量传递过程大都发生在几百个飞秒(fs)时域, 而在 B850 分子之间的激发能平衡过程则可能更快, 甚至短于 100 fs<sup>[4]</sup>。B800 到 B850 之间的能量传递是人们研究得比较多的过程, 瞬态光谱研究表明, 对于大多紫细菌的 LH2 体系, 这种传递过程室温下发生在 0.7—0.8 皮秒(ps)的时间范围, 而在低温下, 由于 B800 的发射谱与 B850 的吸收谱重叠减小, 从而降低了这一能量传递的速率, 该传递过程则发生在 1.2—2 ps 时间尺度<sup>[5-7]</sup>。

目前, 有关 B800→B850 之间的能量传递过程仍然是人们讨论的焦点, 利用 Förster 耦合理论研究 B800 与 B850 之间的能量传递过程不能很好地与实验结果相符合<sup>[7,8]</sup>, 由此假设在能量传递过程中, 有可能还包含着另外一些传递机理。Scholes 和 Fleming 的理论研究发现<sup>[9]</sup>, 当在 Förster 耦合理论中考虑到 B850 激子带的能量无序性后, 理论计算所得 B800→B850 的能量传递速率有明显地增加, 这也就是说, 虽然 B850 的上激子带具有很小的跃迁偶极矩(对于理想的环状结构, B850 上激子带的跃迁是禁止的), 但是 B800 的激发能量仍然可以以较高的速率传递

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金(批准号: 10274013)资助的课题。

<sup>†</sup> 通讯联系人, E-mail: sxqian@fudan.ac.cn

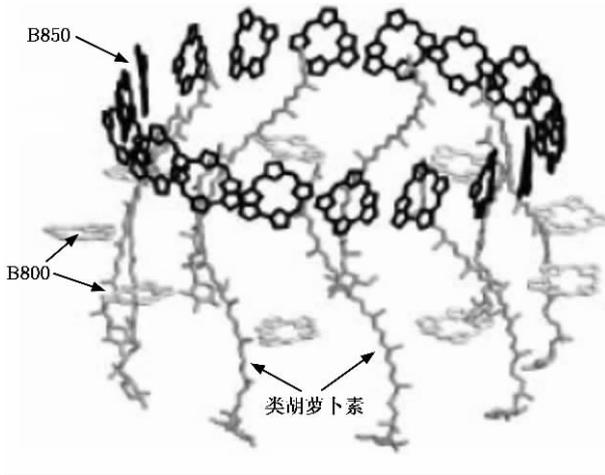


图1 紫细菌外周捕光天线(LH2)的结构示意图

到这些激子带中.实验和理论研究还发现 B850 上激子带的态密度主要分布在 B800 吸收带的蓝侧,特别是在 780nm 附近 B850 上激子带对这一波长范围内的吸收贡献最大<sup>[10,11]</sup>.因此,在 B800 吸收带所测得的实验结果其中一个解释可能是在 B800 带蓝侧 B850 上激子带与 B800 产生了较强的耦合(耦合强度约为  $30\text{ cm}^{-1}$ )形成了一种混合的 B800-B850 态<sup>[5,12]</sup>.在这种强的相互作用下 B800 向 B850 上激子带的能量传递速率有所增加.而另一种可能性,由于在 B800 吸收带内仍然包含着 B850 上激子带的贡献,而 B850 上激子带隐藏在 B800 的  $Q_y$  吸收带内可以延伸到 780nm 附近.当激发 B800 时动力学过程可能包含着 B850 上激子带的直接激发,它的激发态动力学过程直接表现在激发 B800 动力学过程之中<sup>[8,9,13]</sup>.

本文利用从紫细菌 *Rb. sphaeroides* 601 所提取出的外周捕光天线 LH2 以及其不同 pH 值酸化样品(部分和全部去除 B800 分子)采用不同波长下的飞秒单色抽运探测技术研究了 LH2 中 B800 吸收带内的激发态动力学过程.通过对野生型与部分/完全去 B800 分子 LH2 的比较研究,发现激发 B800 带的动力学过程中包含着 B850 上激子带直接激发产生的激发态动力学贡献.

## 2. 材料制备与实验方法

完全/部分去除 B800 分子 LH2 的制备方法:将野生型 LH2 样品首先利用浓缩将悬浊物从 TL 缓冲液中转入 LM 缓冲液(0.01 mol/L Tris-HCl, 0.9% n-

dodecyl- $\beta$ -maltosid, pH8.0).然后包含抗坏血酸的 TM 缓冲液利用乙酸进一步进行不同 pH 值的酸化.在 30℃ 下 30 min 后 B800 分子开始剥离. LH2 中游离的细菌叶绿素分子利用 DEAE-Cellulose 52 离子交换层析过率清除.最后利用 NaOH 将样品的 pH 值调整到 pH 8.0.这样分别在 pH 值为 3.6, 5.2 的酸化条件下得到了完全去除 B800 分子 LH2(简称 B850-p)和不同程度去除 B800 分子 LH2 样品(简称 B850-a).

单色飞秒抽运探测采用美国 Spectra Physics 公司 Ti:Sapphire 激光器系统中振荡级输出激光脉冲,飞秒激光的调谐范围为 750—880 nm,脉冲光的光谱宽度约 10 nm,激光脉冲持续时间 80—120 fs.为了保证不同激发波长下激发功率的一致性,每个波长的输出功率都保持在 500 mW,样品前抽运光的功率约为 40 mW,而探测光的功率约为 5 mW,抽运光和探测光的光强比为 8:1.

## 3. 实验结果与讨论

野生型与部分/完全去除 B800 分子 LH2 的稳态吸收谱如图 2 所示.对于野生型 LH2(图 2 曲线 a),位于 591 nm 处的吸收带则来源于 BChl (B800 和 B850)分子的  $Q_x$  跃迁,430—510 nm 范围的吸收带为类胡萝卜素的吸收,位于 800 nm 附近的吸收带归属于 B800 环中的 BChl 分子,这些 BChl 分子更多表现为单体的性质.而 850 nm 处的吸收则来源于 B850 环中的 BChl 分子,这些分子之间存在有较强的相互作用.作为单体形式的细菌叶绿素分子其  $Q_y$  带的吸收峰在 780nm 附近,而 B800 和 B850 环中包含着相同种类的细菌叶绿素分子,正是由于构型上的差异导致 B800 和 B850 中细菌叶绿素分子的吸收峰分别红移至 800nm 和 850nm<sup>[14]</sup>.图 2 曲线 b 和 c 所示

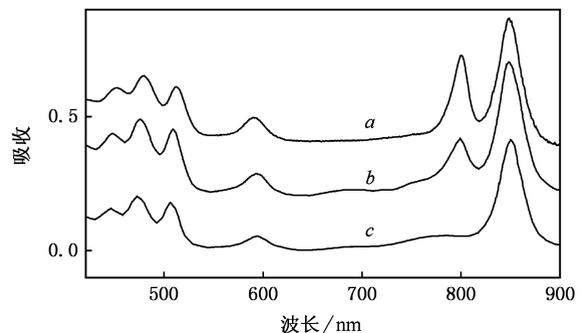


图2 曲线 a 为野生型, b 为部分和 c 为完全去除 B800 分子外周捕光天线 LH2 的稳态吸收谱

为部分/完全去除 B800 分子 LH2 的稳态吸收谱. 对于部分去除 B800 分子 LH2 样品, LH2 中 800 nm 处 B800 的  $Q_y$  带吸收峰值明显减小, 但是其他特征吸收峰, 如类胡萝卜素、细菌叶绿素  $Q_x$  带和 B850  $Q_y$  带吸收峰的峰位及其相对强度都未发生变化. 而对于完全去 B800 分子样品 B850-p, 吸收谱上不仅可以看出现在 800 nm 处 B800 的特征吸收峰完全消失, 同时还伴随着 B850  $Q_y$  带吸收峰约 2 nm 的红移<sup>[12]</sup>, 红移的影响主要来自于 B800 分子的完全去除, 有可能使得 B850 与周边蛋白骨架的相互作用发生了微小的改变, 而这种影响并未引起 B850 分子结构的变化<sup>[15]</sup>.

图 3 显示了野生型 LH2 分别在 775 nm, 780 nm, 785 nm 和 795 nm 激发下的单色抽运探测动力学结果. 这几个波长激发下的动力学过程首先表现出一个光漂白 (photobleaching) 的快速建立和弛豫过程, 随后信号又会出现一个慢的光吸收 (photoabsorption) 回复过程. 通过双指数拟合, 分别得到不同波长下漂白弛豫的时间常数, 以及一个 100 ps 的吸收回复过程. 这里动力学过程中表现出的漂白弛豫过程主要反映的是 B800 向 B850 的能量传递过程, 而慢的光吸收恢复过程则来自于 B850 的激发态吸收过程. 值得注意的是, 随着激发波长的蓝移漂白过程的弛豫时间常数表现出递减的趋势, 从 795 nm 到 775 nm 漂白的拟合结果分别为 0.55 ps, 0.38 ps, 0.34 ps, 0.25 ps, 另外光吸收过程在信号中所占的比重也在逐渐增加. 实验结果与 Ma 等人所作结果基本一致, 当激发波长分别采用 800 nm, 790 nm 和 784 nm 激发样品时, 其漂白弛豫时间分别为 0.75 ps, 0.54 ps 和 0.3 ps<sup>[16]</sup>.

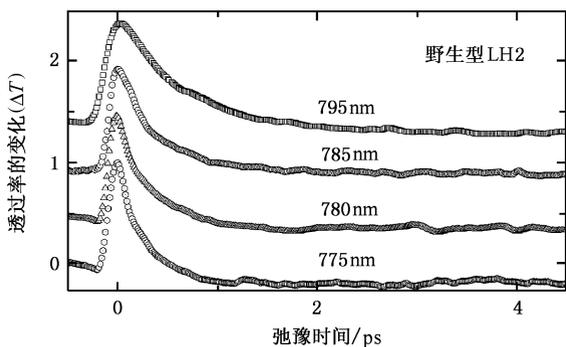


图 3 野生型外周捕光天线 LH2 分别在 775 nm, 780 nm, 785 nm 和 795 nm 飞秒抽运探测的动力学结果

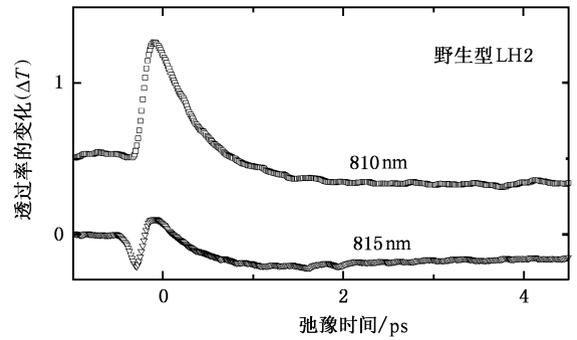


图 4 野生型外周捕光天线 LH2 分别在 810 nm 和 815 nm 飞秒抽运探测的动力学结果

的野生型 LH2 的激发态动力学. 对 B800 吸收峰红侧的这两个波长激发的动力学过程拟合分别得到 810 nm 的 0.53 ps 和 815 nm 的 0.5 ps 的漂白弛豫过程. 随着激发波长的红移, 这两个波长激发下的动力学过程也发生着非常显著的变化, 首先, 可以看出随着波长的红移, 整个动力学过程中的漂白弛豫过程与光吸收的回复过程在整个信号中所占的比率发生显著的改变, 红移使得光吸收过程对信号的贡献越来越大, 特别是在 815 nm 激发时, 动力学过程中光吸收过程已经占到了主导地位. 其次, 从 810 nm 开始, 在漂白信号的最前端出现了一个非常小的快速的光吸收信号, 随着波长的红移, 这个吸收信号也变得越来越明显. 对于信号最开始出现的快速吸收有一部分贡献可能来自于抽运光和探测光在信号最初产生的相干假象<sup>[17]</sup>, 而另一部分贡献主要来自于 B850 上激子带的直接激发. Hess 等在研究紫细菌 *Rb. Sphaeroides* 中突变体 LH2 时发现, 随着 B850 吸收峰的蓝移, 当用 800 nm 激发 B800 时, 在信号的最初出现快速的吸收过程, 而且这一过程随着 B850 吸收峰蓝移的程度增加而越来越明显, 这个快速吸收过程反映的是 B850 分子直接受到光激发而产生的激发态动力学过程, 由于 B850 吸收峰的蓝移使得 B800 和 B850 之间光谱叠加程度加强, 因此当激发 B800 带时 B850 激发态的过程也会明显出现在动力学过程中<sup>[18]</sup>.

当激发 B800 吸收带在蓝侧和红侧时我们都发现了快速漂白的弛豫速率和吸收回复过程在信号中所占的比重都随着激发波长的蓝/红移而增加的现象. 由于在 B800 吸收带中仍然包含着约 20% 的 B850 激子带的吸收贡献, 而在 B800 两侧激发时由于 B800 吸收的贡献越来越小, 因此导致 B850 激子

图 4 所示为激发波长分别为 810 nm 和 815 nm

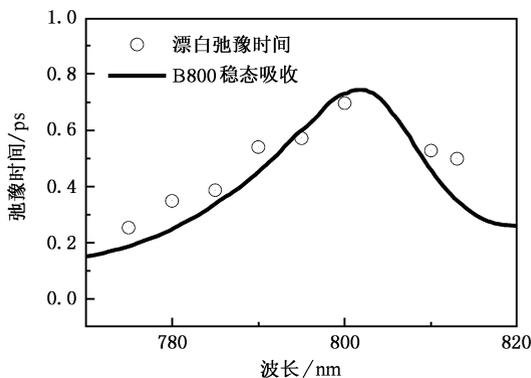


图 5 野生型外周捕光天线 LH2 单色飞秒抽运探测激发 B800 带时漂白弛豫时间常数随激发波长的变化( 实线表示为 B800 的稳态吸收谱 )

带激发对信号的贡献逐渐明显起来,而所有这些动力学过程都表现为 B800 和 B850 同时被激发产生的动力学过程(两种动力学信号的叠加)。图 5 给出了不同激发波长激发 B800 吸收带时快速漂白的弛豫过程随激发波长的变化情况。可以明显地看出随着激发波长的红/蓝移漂白过程的弛豫时间逐渐加快。而这一漂白过程并不是单纯地反映出了 B800 向 B850 能量传递的传递速率,这一漂白速率变化有可能是由于信号中叠加了一个 B850 激子带直接激发而产生的激发态动力学信号。

利用酸化处理所得到的部分或完全去除 B800 分子 LH2 我们研究了在不同波长下的激发动力学过程,众所周知 B850 分子为 18 个细菌叶绿素分子组成的紧密排列的环状结构,细菌叶绿素分子之间的距离约为 0.9nm。由于强的电子耦合作用使得这 18 个色素分子产生强的相互作用,其能级生成劈裂的 18 个激子带<sup>[19]</sup>,B850 能带中高的激子带的吸收可以延伸到 B800 吸收带内,并且对 B800 吸收带产生约 20% 的吸收贡献。然而对于野生型的 LH2 来说,B850 在 800nm 附近的激发态吸收过程往往被掩盖在 B800 分子的激发态动力学过程当中,采用这两种突变的 LH2( B850-a, B850-p )样品,可以有效地排除 B800 分子在 800nm 附近的动力学影响,清楚地观察到 B850 上激子带的超快动力学特性。

图 6 所示为激发波长为 795 nm 时, B850-a 和 B850-p 的动力学过程的比较。B850-a 的动力学过程由于样品中仍然还包含着部分 B800 分子,所以激发态动力学信号基本与野生型保持一致。对于 B850-p 样品,原有的在野生样品中出现的漂白过程已经完全的消失了,这一过程反映的是 B800 分子向 B850

分子的能量传递过程,而对于 B850-p 样品却表现出了一个纯的激发态吸收过程。利用完全去除 B800 的 LH2 样品,研究其 CD 谱发现在 780nm 处存在着一个弱的吸收信号,这个信号归属于 B850 上激子带贡献<sup>[20]</sup>。同样,Leupold 等在研究非线性吸收时发现,796nm 激发对于野生型 LH2 随着激发光子流密度的增加表现为一个漂白的过程,而对于完全去 B800 的 LH2 却表现出一个很弱的光吸收过程,这个吸收反映的是 B850 在 796nm 处激子带的粒子数布居<sup>[4]</sup>。因此我们可以推断,在实验中样品 B850-p 在 795nm 激发时所表现的激发态吸收过程来自于 B850 上激子带激发态动力学过程。

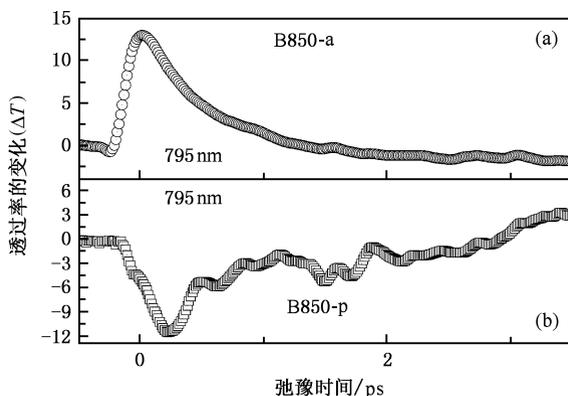


图 6 部分和完全去除 B800 分子外周捕光线 LH2 在 795 nm 激发的动力学结果

图 7 所示为当激发波长调谐至 B800 吸收带红侧时( 810 nm ), B850-a 和 B850-p 样品的动力学过程。对于 B850-a 样品,与野生型 LH2 相比发生了明显的区别,信号中光吸收过程在信号中所占的比重有所增加。而对于 B850-p 样品仍然表现出较强的激

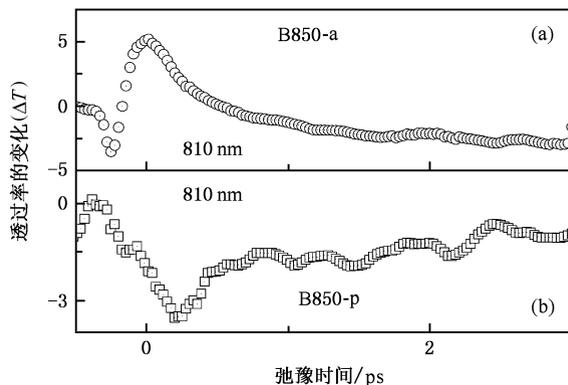


图 7 部分和完全去除 B800 分子外周捕光天线 LH2 在 810 nm 激发的动力学结果

发态吸收信号. 对于野生型 LH2 中激发 B800 红侧时, 其激发态动力学过程中也包含着 B850 较高激子带直接激发的动力学信号, 利用 B850-p 样品激发所表现的吸收过程也正是直接反应出 B850 较高激子带的激发态信号.

## 4. 结 论

本文利用从紫细菌 *Rb. Sphaeroides* 601 所提取出的外周捕光天线 LH2 以及其酸化处理样品(部分和全部去除 B800 分子)采用不同波长下的飞秒单色

抽运探测技术研究了 LH2 中 B800 吸收带附近的动力学演变过程. 研究表明当激发 LH2 中 B800 吸收带的蓝侧和红侧时都发现了快速漂白的弛豫速率和光吸收回复过程在信号中所占的比重都随着激发波长的蓝/红移而增加的现象. 由于在 B800 吸收带中仍然包含着约 20% 的 B850 激子带的吸收贡献, 而在 B800 两侧激发时由于 B800 吸收的贡献越来越小, 因此导致 B850 激子带激发对信号的贡献逐渐明显起来, 而所有这些动力学过程都表现为 B800 和 B850 同时被激发而产生的动力学过程.

- [ 1 ] Papiz M Z, Prince S M, Howard T, Cogdell R J, Isaacs N W 2003 *J. Mol. Biol.* **326** 1523
- [ 2 ] Walz T, Jamieson S J, Bowers C M, Bullough P A, Hunter C N 1998 *J. Mol. Biol.* **282** 833
- [ 3 ] Herek J L, Wohlleben W, Cogdell R J, Zeidler D, Motzkus M 2002 *Nature*. **417** 533
- [ 4 ] Leupold D, Stiel H, Ehlert J, Nowak F, Teuchner K, Voigt B, Bandilla M, Ücker B, Scheer H 1999 *Chem. Phys. Lett.* **301** 537
- [ 5 ] Wu H M, Savikhin S, Reddy N R S, Jankowiak R, Cogdell R J, Struve W S, Small G J J 1996 *Phys. Chem.* **100** 12022
- [ 6 ] Fraser N J, Dominy P J, Ucker B, Simonin I, Scheer H, Cogdell R J 1999 *Biochemistry*. **38** 9684
- [ 7 ] Herek J L, Fraser N J, Pullerits T, Martinsson P, Polivka T, Scheer H, Cogdell R J, Sundstrom V 2000 *Biophys. J.* **78** 2590
- [ 8 ] Pullerits T, Hess S, Herek J L, Sundstrom V 1997 *J. Phys. Chem. B* **101** 10560
- [ 9 ] Scholes G D, Fleming G R 2000 *J. Phys. Chem. B* **104** 1854
- [ 10 ] Koolhaas M H, Frese R N, Fowler G J S, Bibby T S, Georgakopoulou S, va de Zwan G, Hunter C N, van Grondelle R 1998 *Biochemistry* **37** 4693
- [ 11 ] Georgakopoulou S, Frese R N, Johnson E, Koolhaas R J 2002 *Biophys. J.* **82** 2184
- [ 12 ] Matsuzaki S, Zazubovich V, Fraser N J, Cogdell R J, Small G J 2001 *J. Phys. Chem. B* **105** 7049
- [ 13 ] Sundström V, Pullerits T, van Grondelle R 1999 *J. Phys. Chem. B* **103** 2327
- [ 14 ] Cogdell R J, Howard T D, Isaacs N W, Mcluskey K, Gardiner A T 2002 *Photosynth. Res.* **74** 135
- [ 15 ] Gall A, Cogdell R J, Robert B 2003 *Biochemistry* **42** 7252
- [ 16 ] Ma Y Z, Cogdell R J, Gillbro T 1998 *J. Phys. Chem. B* **102** 881
- [ 17 ] Monshouwer R, Ortiz de Zarate I, van Mourik F, van Grondelle R 1995 *Chem. Phys. Lett.* **246** 341
- [ 18 ] Hess S, Visscher K J, Pullerits T, Sundström V, Fowler G J S, Hunter C N 1994 *Biochemistry* **33** 8300
- [ 19 ] Yang G C, Wang L, Yang G Z 2003 *Chin. Phys.* **12** 48
- [ 20 ] Koolhaas M H, Frese R N, Fowler G J S, Bibby T S, Georgakopoulou S, va de Zwan G, Hunter C N, van Grondelle R 1998 *Biochemistry*. **37** 4693

# Observation of ultrafast excited-state dynamical evolution in B800 absorption band of light harvesting 2 ( LH2 ) extracted from *Rb. Sphaeroides* 601<sup>\*</sup>

Liu Wei-Min<sup>1)</sup> Liu Yuan<sup>2)</sup> Xu Chun-He<sup>2)</sup> Qian Shi-Xiong<sup>1)†</sup>

<sup>1)</sup> ( Physics Department , Fudan University , Shanghai 200433 , China )

<sup>2)</sup> ( Shanghai Institute of Plant Physiology & Ecology , Shanghai institute for Biological Sciences , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China

( Received 9 January 2006 ; revised manuscript received 21 February 2006 )

## Abstract

Photodynamics of two kinds of peripheral antenna complexes light harvesting 2 ( LH2 ) of *Rb. Sphaeroides* 601 , namely the native LH2 and B800-released LH2 , where B800-BChls were partially or completely removed with different pH treatments , were studied using femtosecond pump-probe technique at different laser wavelengths . The obtained results for these samples demonstrate that under the excitation around B800 absorption band , the photoabsorption and photobleaching dynamics are caused by the direct excitation of upper excitonic levels of B850 and excited state of B800 pigments , respectively .

**Keywords** : peripheral light harvesting complexes ( LH2 ) from *Rb. Sphaeroides* 601 , B800 partially or completely released LH2 , excited-state dynamical evolution , femtosecond pump-probe

**PACC** : 0660J , 3580B , 8725B , 4280W

<sup>\*</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( Nrant No. 10274013 ) .

<sup>†</sup> Corresponding author . E-mail : sxqian@fudan . ac . cn