

光谱技术及其在光合膜蛋白研究中的应用

薛 超¹, 周 峰²

(1. 南京晓庄学院 行知学院, 江苏 南京 211171; 2. 南京晓庄学院 生物化工与环境工程学院, 江苏 南京 211171)

摘 要:介绍各种光谱技术的基本原理和特点, 以及在光合膜蛋白结构与功能上的应用例子。

关键词:光谱; 光合膜蛋白

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0198-03

光谱是复色光经过色散系统分光后, 被色散开的单色光按波长(或频率)大小而依次排列的图案, 全称为光学频谱。由于每种原子都有自己的特征谱线, 因此可以根据光谱来鉴别物质和确定它的化学组成, 这种方法叫做光谱分析。因此, 按波长区域不同, 光谱可分为红外光谱、可见光谱和紫外光谱; 按产生的本质不同, 可分为原子光谱、分子光谱; 按产生的方式不同, 可分为发射光谱、吸收光谱和散射光谱; 按光谱表现形态不同, 可分为线光谱、带光谱和连续光谱^[1]。植物类囊体膜上最主要的光合膜蛋白复合体有 4 种: 光系统 II(PSII)复合体、光系统 I(PSI)复合体、细胞色素 b_6f (Cyt b_6f)复合体和 ATP 合酶复合体。PSII 和 PSI 都含有各自的捕光天线蛋白复合体(LHCII 和 LHCI)。近年来, 随着各种光谱及其解析技术的发展, 进一步加深了人们对光合膜蛋白结构和功能的认识。这对于了解色素蛋白复合体在类囊体膜上的组装与排列, 以及对光系统最终实现光能的吸收、传递和转化等光合作用机制具有重要的意义^[2]。

1 紫外吸收光谱

紫外可见吸收光谱(UV)法是利用某些物质的分子吸收 10~800 nm 光谱区的辐射来进行分析测定的方法, 这种分子吸收光谱产生于价电子和分子轨道上的电子在电子能级间的跃迁。研究表明, PSII 的红区最大吸收峰 675.5 nm, 在蓝区有 1 个 436 nm 的主峰和 417 nm 的肩峰, 分别是 Chl a 和 Pheo 的吸收峰^[3]。PSI 在蓝区

的最大吸收峰在 441 nm, 红区的最大吸收峰在 682 nm^[4]。

2 分子荧光光谱

分子荧光光谱是利用某些物质分子受光照射时发生荧光的特性和强度, 进行物质的定性分析或定量分析的方法。物体经过较短波长的光照, 把能量储存起来, 然后缓慢放出较长波长的光, 放出的这种光就叫荧光。荧光光谱包括激发光谱和发射光谱两种谱。激发光谱是荧光物质在不同波长的激发光作用下测得的某一波长处的荧光强度的变化情况, 也就是不同波长的激发光的相对效率; 发射光谱则是在一固定波长的激发光作用下荧光强度在不同波长处的分布情况, 也就是荧光中不同波长的光成分的相对强度。若是冷却至 77 K, 可获得高度分辨的低温荧光光谱, 更有利于鉴别。利用分子荧光光谱研究光合膜蛋白发现, PSII 的 77K 荧光发射光谱均有 2 个特征峰, 1 个在 685 nm 左右, 一个在 695 nm 左右^[5]。PSI 颗粒的发射光谱中, 436 nm 光激发的荧光发射峰位于 729 nm。PSII 的荧光发射光谱在 440 nm 左右有 1 个峰, 属于 Chl a; 在 470~485 nm 之间的峰属于 Chl b 和类胡萝卜素分子的复合峰。在 PSI 77K 激发光谱中, 当发射波长为 729 nm 时, 激发峰在 440 nm 和 473 nm, 分别为 Chl a 和 Chl b 的最大激发光波长^[4]。

3 原子荧光光谱

原子荧光光谱(AFS)分析法是利用原子荧光谱线的波长和强度进行物质的定性及定量分析方法。它的基本原理是原子蒸气吸收特征波长的光辐射之后, 原子被激发至高能级, 在跃迁至低能级的过程中, 原子所发射的光辐射称为原子荧光。

分子荧光和原子荧光都是光致发光, 二者都是价电子跃迁, 但前者伴随有振动能级和转动能级的跃迁, 是连续发射光谱, 而后者是分立的线发射光谱; 前者分析物一般是处于溶液状态, 后者需要转化成气态原子。目

第一作者简介:薛超(1989-), 男, 在读本科, 现从事生物技术方向研究工作。

通讯作者:周峰(1978-), 男, 山东淄博人, 博士, 讲师, 现从事植物生理生化研究工作。E-mail: zfibcas@163.com。

基金项目:江苏省“青蓝工程”优秀青年骨干教师培养资助项目(2010); 江苏省植物生理学精品课程建设资助项目(2010); 南京晓庄学院科研项目(2010KYYB15)。

收稿日期:2010-11-26

前此种方法主要用于与光合作用有关的元素含量测定。

4 原子吸收光谱

原子吸收光谱(AAS)法是利用气态原子可以吸收一定波长的光辐射,使原子中外层的电子从基态跃迁到激发态的现象而建立的。由于各种原子中电子的能级不同,将有选择性地共振吸收一定波长的辐射光,这个共振吸收波长恰好等于该原子受激发后发射光谱的波长,由此可作为元素定性的依据,而吸收辐射的强度可作为定量的依据。原子吸收光谱现已成为无机元素定量分析应用最广泛的一种分析方法,主要用于与光合作用有关的元素含量测定。

原子吸收和原子荧光虽然都是分析仪器,但其分析方法的原理差别非常大,原子吸收是以测定光源照射到原子气体中其能量被吸收的相对量,而原子荧光是测定光源照射到原子气体中后激发产生荧光产生的绝对量。

5 红外光谱

分子振动光谱包括红外光谱与拉曼光谱,得到的是有关样品分子振动能级的信息。红外光谱与紫外可见吸收光谱一样,都是研究样品分子对光的吸收,因此它们都是吸收光谱。紫外可见吸收光谱是通过样品分子对紫外可见光的吸收,得到有关样品分子电子能级的信息。红外光谱通过样品分子对红外光的吸收,得到样品分子振动能级的信息。样品分子吸收紫外可见光,引起的是电子能级之间的跃迁,因此紫外可见吸收光谱属于电子光谱;而样品分子吸收红外光引起的是振动能级之间的跃迁,因此红外光谱是振动光谱。红外光谱技术是研究蛋白二级结构的主要工具,已经经常被用来确定光合膜蛋白的二级结构。

PSII 红外光谱中,1 600~1 700 cm^{-1} 处的振动带是蛋白的酰胺 I 带,构成酰胺 I 带的几个子峰与蛋白的二级结构有如下对应关系:1 657 cm^{-1} 处的吸收峰对应 α 螺旋,1 651 cm^{-1} 肩峰是无规卷曲的振动吸收带;1 620~1 640 cm^{-1} 间的吸收峰归属于 β 折叠;大于 1 660 cm^{-1} 的吸收峰归属于 β 转角结构。通过程序计算表明,PSII 中 cytb-559 的二级结构中 α 螺旋约占 55%, β 折叠约占 35%,无规卷曲约占 10%。PSI 的红外吸收光谱中 1 780~1 710 cm^{-1} 处的吸收峰是 PSI 中脂、色素的 C=O 的伸缩振动峰^[6];1 700~1 600 cm^{-1} 是蛋白质的酰胺 I 带;1 600~1 500 cm^{-1} 范围的振动带为蛋白质的酰胺 II 带。此外,大约 1 516 cm^{-1} 的地方有 1 弱的肩峰,被认为是属于蛋白质酪氨酸残基的吸收峰,主要来自于酪氨酸基团中苯环的伸缩振动和弯曲振动^[7]。

6 拉曼光谱

拉曼光谱所得到的也是分子振动能级的信息,但拉

曼光谱所得到的振动能级的信息不是来自样品对光的吸收,而是来自样品对光的散射。

因此,拉曼光谱是散射光谱而不是吸收光谱。拉曼光谱常被用于研究 Cyt b₆f 复合体类胡萝卜素分子的构型和构象,其 V₂ 区(1 400~1 100 cm^{-1})被称为多烯烃链振动光谱的指纹区,对烯烃链的尾部基型非常敏感,其谱带特征最能反映类胡萝卜素分子的构型变化。室温下,488 nm 激光激发的光合膜蛋白 Cyt b₆f 复合体得到的共振拉曼光谱中,在 1 400~1 100 cm^{-1} 具有 1 个 1 156 cm^{-1} 的强振动峰和 3 个分别位于 1 215、1 192 和 1 136 cm^{-1} 的明显的弱振动峰^[8]。

7 圆二色光谱

圆二色(CD)光谱是左旋偏振光和右旋偏振光通过样品后的差谱,能够灵敏地报道生色团的微环境变化。红区的 CD 光谱是一种非常灵敏的检测色素位置和取向的光谱手段,能灵敏地反应出色素之间以及色素和蛋白之间相互作用的改变,即对于色素在蛋白质中所处的微环境是非常敏感的,故红区的 CD 光谱被广泛地用来分析光合膜色素蛋白复合物。紫外区 CD 光谱是一种很方便的测定溶液体系中蛋白质二级结构含量的手段,一些特征的 CD 信号能较灵敏地反映某些有序二级结构的信息。紫外区的 CD 光谱进行解析来得到蛋白质中各种二级结构如 α -螺旋的含量^[9]。

PSII 中 Cytb-559 在吸收的仪区的 CD 谱具有 1 对正负峰,正峰的位置在 545 nm,负峰的位置在 567 nm。在 400~500 nm 范围内还有一些小峰,其中在 430 nm 处有 1 个小的负峰。PSI 颗粒的 CD 光谱中红区的 1 对反向谱带,正峰为 668 nm,负峰为 684 nm,一般认为这 1 对正负峰是 Chla 激子相互作用的结果。448 nm 处的正峰同样是 Chl a 的特征峰;在 684 nm 负峰的右边,有 1 个约 689 nm 的肩峰,Haworth^[10] 研究表明,此肩峰是由 LHCI 所贡献。

8 时间分辨光谱

一种能观察物理和化学的瞬态过程并能分辨其时间的光谱。有人把时间分辨率在 1 s 以上的光谱技术可以称为瞬态光谱,时间分辨率在 10^{-12} 以上的光谱技术则称为超快光谱。时间分辨吸收光谱技术是研究超快现象的重要手段之一,它尤其适用于研究那些并不产生荧光或荧光发射难以测量的超快过程。这种技术能够提供超快过程内部分子状态的快速变化信息,因而可用于研究分子间的能量传递、电荷转移和分子取向的变化等微观过程的机理和动力学规律,并解释分子结构和微观环境等影响过程的各种因素及其相互作用的本质。因此,综合运用时间分辨吸收光谱与稳态荧光光谱可以

对某些分子反应过程进行更加深入系统地研究。研究表明,捕光天线内的能量传递过程发生在几百飞秒至几个皮秒时域;而在反应中心中,在几种色素间的电荷分离以及电子传递过程也仅为皮秒量级。LHCII 复合体中类胡萝卜素与叶绿素之间的单线态能量传递的时间在 100~250 fs。LHCII Chl b 到 Chl a 的激发能传递时间为 210 fs, Chl a 到 Chl a 的激发能传递时间为 520 fs^[11-12]。

9 太赫兹光谱

太赫兹辐射是指频率在 0.1~10 THz(波长在 30~300 μm)之间的电磁波,其波段位于微波和红外光之间,正好填补了电磁波谱的毫米波与红外波谱间的空白。每种分子都有特定的振动和转动能级,能够对 THz 波产生特定的吸收。生物分子的骨架振动以及构型弯曲等集体振动模与生物分子的结构和构象高度有关。因此,THz 光谱技术成为研究生物大分子的构型、构象一种有效的工具。

CP43 和 CP47 的时域信号和参考信号相比都有时间延迟,这是由于 THz 波在 CP43 和 CP47 样品中的折射率大于在空气中的折射率所致。和 CP47 相比,CP43 被延迟的程度要大,说明 THz 波在 CP43 样品中的折射率要大于在 CP47 中的折射率。CP43 和 CP47 的频域光谱和吸收光谱都不相同,说明尽管 CP43 和 CP47 的二级结构非常相似,但 THz 光谱所反映的集体振动模是不一样的^[13]。

参考文献

- [1] 赵南明,周海梦.生物物理学[M].北京:高等教育出版社,2000:275-411.
- [2] 周峰.光合膜蛋白晶体的结构与功能[J].生命的化学,2007,27(5):370-372.

- [3] Zehetner A, Scheer H, Siffel P, et al. Photosystem II reaction center with altered pigment-composition: reconstitution of a complex containing five chlorophyll a per two pheophytin a with modified chlorophylls[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1556: 21-28.
- [4] Hu Z H, Xu Y N, Gong Y D, et al. Effects of heat treatment on the protein secondary structure and pigment microenvironment in photosystem I complex[J]. *Photosynthetica*, 43(4): 529-534.
- [5] Zhou F, Liu S, Hu Z H, et al. Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids[J]. *Photosynthesis Research*, 2009, 99(3): 185-193.
- [6] Yang Z L, Li L B, Xu Y N, et al. Effect of Phosphatidylglycerol on conformation and microenvironment of tyrosyl residue in photosystem II[J]. *Science in China (Series C)*, 2000, 30: 330-336.
- [7] He W Z, Newell W R, Haris P I, et al. Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction center and conformational changes studied by Fourier transformation infrared spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 1992, 31: 9848-9853.
- [8] Li B Y, Mao D Z, Liu Y Z, et al. Characterisation of the cytochrome b6f complex from marine green alga *Bryopsis corticulans*[J]. *Photosynthesis Research*, 2005(83): 297-305.
- [9] Kelly S M, Price N C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1338: 161-185.
- [10] Haworth P, Wastson J L, Arntzen C J. The detection, isolation and characterization of a light-harvesting complex which is specifically associated with photosystem I *Biochim[J]. Biophys. Acta*, 1983, 724: 151-158.
- [11] Connolly J P, Müller M G, Bassi R, et al. Femtosecond transient absorption study of carotenoid to chlorophyll energy transfer in the light-harvesting complex II of photosystem II[J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 281-287.
- [12] Kleima F J, Gradinaru C C, Calkoen F, et al. Energy transfer in LHCII monomers at 77K studied by sub-picosecond transient absorption spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 15262-15268.
- [13] Qu Y G, Chen H, Qin X C, et al. The guanidine hydrochloride-induced denaturation of CP43 and CP47 studied by terahertz time-domain spectroscopy[J]. *Science in China (Series C)*, 2007, 50(3): 350-355.

Application and Introduction of Different Spectroscopy in Research of Photosynthetic Membrane Protein

XUE Chao¹, ZHOU Feng²

(1. School of Xingzhi, Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171; 2. School of Biochemical and Environmental Engineering, Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract: The basic principle and characteristics of different spectroscopy were introduced in this paper. The application of spectroscopy in research of structure and function of photosynthetic membrane protein were also discussed present.

Key words: spectroscopy; photosynthetic membrane protein