钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的能量传递动力学

王肖肖^{1,2†}, 李文军^{2†}, 谢明远^{3*}, 赵福利³, 杨革¹, 刘琪^{2,4}, 秦松^{2*}

1. 曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165;

2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003;

3. 中山大学物理学院, 广州 510275;

4. 烟台大学药学院, 烟台 264005

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: xiemy5@mail.sysu.edu.cn; cpra_yic@sina.com

2017-12-19 收稿, 2018-01-08 修回, 2018-01-10 接受, 2018-02-27 网络版发表

国家重点研发项目(2016YFB0601001)资助

摘要 结合超快速时间分辨荧光光谱, 对钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)C-PC六聚体内能量传递过程机制进行了研究. 通过不同探测波长下荧光衰减曲线的拟合, 对六聚体内能量传递途径和相关传递参数进行了指认, 从实验上证实C-藻蓝蛋白六聚体能量传递具有4个时间常数, 分别为6, 22, 280, 1470 ps, 并对各时间组分进行了指认和讨论. 结果反映了部分C-PC中不同发色团之间的能量传递动力学性质, 为了解藻胆蛋白的结构和功能的关系提供了重要的实验数据, 同时对于理解光合作用的原初过程也有重要的参考价值.

关键词 C-藻蓝蛋白六聚体, 时间分辨光谱, 能量传递

藻胆蛋白是蓝藻(*Cyanobacteria*)、红藻(*Rhodophyta*)和部分隐藻捕光天线的主要组成蛋白功能团^[1], 根据发色团与蛋白之间的调制作用, 在450~650 nm区间内具有广泛的吸收谱, 弥补了叶绿素无吸收或弱吸收的空白区. 根据藻胆蛋白的结构和光谱特性, 藻胆蛋白分别为藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)、藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)等^[2].

按照所存在的藻种类不同, PC有R-PC (R-phycocyanin)和C-PC (C-phycocyanin)之分. 随着C-PC的晶体结构的解析, 人们对C-PC的动力学了解日渐丰富. C-PC的单体及聚集体的荧光动力学研究普遍得到2个时间常数: 一个为皮秒量级的过程, 认为是敏化发色团到荧光发射团的能量传递过程, 其中敏化发色团为 β_{155} -PCB, 荧光发色团为 α_{84} -PCB; 另一个为几个纳秒的过程, 认为是体系的能量传递终端发

射寿命^[3]. Sauer等人^[4,5]根据C-PC的晶体结构应用Förster的偶极-偶极相互作用机制计算了C-PC三聚体内部的能量传递速率, 但是计算结果与实验结果相差较大. Debreczeny等人^[6-8]通过研究C-PC的时间分辨荧光光谱结果和理论计算结果, 发现两者吻合得较好, 认为在C-PC单体内, 能量从 β_{155} -PCB传递到 β_{84} -PCB的时间为52 ps, 能量从 α_{84} -PCB传递到 β_{84} -PCB的时间为149 ps, 能量从 β_{155} -PCB传递到 α_{84} -PCB的时间为500 ps; 在三聚体内, 由于空间结构的复杂化, 能量传递途径有所增加, 出现2条新的能量传递途径, 从 $1\alpha_{84}$ -PCB到 $2\beta_{84}$ -PCB的能量传递时间为1 ps, 在3个 β_{84} -PCB之间的能量传递时间为40 ps. 另外在途径竞争的情况下, 能量从 β_{155} -PCB传递到 β_{84} -PCB的几率减少, 成为次要的能量传递途径. Zhao等人^[9-12]采用概率型计算机模拟计算了C-PC单体、三聚体以及六聚体内部的能量传递过程, 认为在

引用格式: 王肖肖, 李文军, 谢明远, 等. 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的能量传递动力学. 科学通报, 2018, 63: 641-648

Wang X X, Li W J, Xie M Y, et al. The energy transfer dynamics in C-phycocyanin hexamer from *Spirulina platensis* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 641-648, doi: 10.1360/N972017-01026

单体内存在2条重要的能量传递途径；在三聚体内存在6条重要的能量传递途径，其中3条为快速能量传递对；在六聚体内，快速能量传递对增加到9对。Matala等人^[13]结合实验数据和PM3计算发色团间的偶极距，得到PC结构中发色团对之间的传递常数，结果表明，在PC六聚体之间存在15条能量传递，在六聚体内存在6条优先的能量传递途径。Schneider等人^[14]利用瞬态时间分辨吸收光谱，研究了天然PC三聚体内的能量传递过程，结果表明， β_{155} -PCB到 α_{84} -PCB和 β_{84} -PCB的表现能量传递时间在20~50 ps变化，且 α_{84} -PCB和 β_{84} -PCB之间存在强激子耦合作用。赵井泉等人^[15]利用计算机随机模拟(Monte Carlo)技术证明同一个六聚体盘内两个三聚体之间 α_{84}^2 - α_{84}^5 (α_{84}^3 - α_{84}^6 和 α_{84}^1 - α_{84}^4)和 β_{155}^1 - β_{155}^6 (β_{155}^2 - β_{155}^5 和 β_{155}^3 - β_{155}^4)这两条途径的能量传递时间分别为8和15 ps，之后该团队的张景民等人^[16]利用皮秒级各向同性光谱技术从实验上证实多变鱼腥藻(*Anabaena*) C-PC六聚体中存在56 ps左右的时间组分，该时间组分指认为六聚体内同一单体中 β_{155} -PCB和 α_{84} -PCB两个发色团之间的能量传递。针对前人的研究，对C-PC六聚体的能量传递的主要途径进行总结，如图1所示^[8,13,15,17]。

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)捕光天线中藻胆蛋白含量较高的是藻蓝蛋白，属于C-PC类型，在天然状态下自聚集为六聚体： $(\alpha\beta)_6$ ，每个C-PC六聚体是由2个三聚体- $(\alpha\beta)_3$ 面对面相接而成，三维结构与PE十分相似，都是建立在球蛋白折叠的9个 α 螺旋。C-PC六聚体的三维结构模型如图2所示^[18]，由3D max软件绘制。其中 α 亚基含有1个藻蓝胆素(phycocyanobilin, PCB)发色团PCB，位于氨基酸的第84位残基上，即 α_{84} -PCB；在 β 亚基含有2个藻蓝胆素发色团PCB，分别位于氨基酸的第84位残基和第155个残基上，即 β_{84} -PCB和 β_{155} -PCB^[19]，这样C-PC六聚体共有18个发色团，理论上能量传递途径共有306条^[15]。

由于赵井泉等人^[15]和张景民等人^[16]前期的研究受条纹相机时间分辨率影响，低于10 ps的时间组分无法获得，加之实验技术和数据处理方法的局限性，获得各发色团间传递过程的信息较少。在上述的研究背景下，本实验通过提高仪器分辨率，获取低于10 ps以下的时间组分，进而研究钝顶螺旋藻C-PC的光谱特性及其内部发色团之间能量传递过程行为，力求探究其能量传递途径，为以后人工调控发色团的距离、周边环境来模拟光合作用，使研究更加接近

图1 C-PC六聚体能量传递的主要途径^[8,13,15,17]

Figure 1 The main pathways of energy transfer from C-PC hexamer^[8,13,15,17]

图2 C-PC六聚体的三维结构图^[18]。1~6为亚基编号； α 、 β 为 α 亚基和 β 亚基

Figure 2 Three-dimensional structure of C-PC hexamer. 1~6: number of subunit; α , β : α -subunit, β -subunit

光合作用的实际，为今后人工合成高速、高效光电转换装置和生物荧光探针技术提供理论指导^[20]。

1 材料与方法

(i) 实验材料。钝顶螺旋藻(本课题组保存)采用Zarrouk培养基^[21]，30℃培养，2000 lux连续光照，光周期16 h，暗周期8 h，通气培养2周后，8000 r/min，4℃离心10 min收获藻体，-20℃冰箱保存。

(ii) C-PC六聚体样品制备。样品制备参照文献^[16,21]，将收获的藻体按1:15的比例加入pH 7.0，0.002 mol/L磷酸盐缓冲液(含0.004 mol/L叠氮钠)，搅拌均匀，放入液氮至完全冻结后，放于4℃解冻，反复3次，20000 r/min，4℃离心10 min，取上清液。向上层清液中加入终浓度为1.25 mol/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，混

匀后, 放置4℃静置12 h, 离心后取上层清液, 此时所得上层清液为PC的粗提液. 用上述磷酸盐缓冲液平衡Macro-Prep Methyl疏水层析柱, 然后将粗提液上柱, 分别用含有1.25, 0.9, 0.5和0.2 mol/L的(NH₄)₂SO₄的磷酸盐缓冲液进行梯度洗脱, 收集纯度(A₆₂₀/A₂₈₀)大于4.0的洗脱液, 用30 kD的超滤管进行脱盐浓缩后, 4℃保存备用. 将C-PC溶解于600 mmol/L pH 8.0的磷酸盐缓冲液中, 上线性蔗糖密度梯度为0.2 ~ 0.5 mol/L (600 mmol/L磷酸盐缓冲液, pH 8.0)的离心管中, 在超速离心机Beckman Coulter L-100XP上离心16 h (43000 r/min, 4℃, 美国), 选取沉降系数S_{20,w}约为11的快速迁移组分即为C-藻蓝蛋白六聚体.

(iii) 光谱特性测定. 吸收光谱由Nano Drop 2000c微量紫外可见分光光度计(Thermo, 美国)测定, 样品进行450~750 nm全波长进行扫描, 室温荧光光谱由FL-4500荧光分光光度计(Hitachi, 日本)测定. 77 K稳态荧光光谱由FL-4600 (Hitachi, 日本)测定, 室温荧光光谱和77 K稳态荧光光谱激发波长均为570 nm, 激发狭缝10 nm, 发射狭缝5 nm.

(iv) 皮秒时间分辨光谱测定和拟合. 将样品放入比色皿, 比色皿放入装有液氮的杜瓦瓶(带通光口)内, 皮秒时间分辨光谱的测量采用泵浦锁模的钛宝石激光光源, 激光脉冲波长选在570 nm, 脉冲时间宽度700 fs, 激光经过聚焦进入比色皿激发样品发光, 所激发的荧光由多色仪记录.

条纹照相机记录的数据直接传输到计算机进行多指数拟合, 拟合采用Monte Carlo方法对最佳解进行搜索. 实验室中实际探测到的荧光是样品所发射的荧光与仪器响应函数的卷积, 即

$$F_{\text{ex}}(t) = \int_0^{\infty} F_s(t-v)I(v)dv, \quad (1)$$

其中, F_{ex} 和 F_s 分别为实验室所探测到的荧光强度和样品所发射的荧光强度, $I(v)$ 为测试系统的响应函数, 对于700 fs的激发光, 测试系统的响应函数宽度为1 ps, 本文的多指数拟合过程是针对样品所发射的荧光进行拟合, 即

$$F_s(t) = \sum_{i=1}^n T_i \exp[-t/\tau_i], \quad (2)$$

其中, T_i 为第*i*个荧光组分所占荧光总发射强度的百分比, 即称为指前因子, τ_i 为第*i*个组分的寿命. 特别注意时间的上升和下降沿以便探测出能量的传递时间, 拟合结果通过 χ^2 判据评价, 以小于2.0为标准.

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱和荧光光谱

如图3所示, 钝顶螺旋藻C-PC六聚体吸收光谱和荧光光谱, 样品纯度A₆₂₀/A₂₈₀=4.49. 室温下最大吸收峰和荧光发射最大峰分别位于618和644 nm附近, 来源于PCB发色团的吸收和发射, 与文献报道的吸收峰(620 nm)和发射峰(643 nm)基本吻合^[11]; 低温77 K下, 最大荧光发射峰红移约14 nm, 位于658 nm, 导致光谱发生红移的原因可能是由于低温使蛋白的活性构象发生改变, 导致发色团的电子态发生变化, 从而使C-PC六聚体在pH 7.0, 0.002 mol/L磷酸盐缓冲液(含0.004 mol/L叠氮钠)中更稳定^[22].

2.2 时间分辨光谱

如图4所示, 77 K时C-PC六聚体时间分辨荧光光谱

图3 C-PC六聚体的吸收光谱和荧光光谱

Figure 3 Absorption spectra and fluorescence spectra of C-PC hexamer

图4 C-PC六聚体时间分辨荧光光谱(77 K)

Figure 4 Time-resolved fluorescence spectra from C-PC hexamer (77 K)

谱(荧光强度-时间-波长关系), 时间轴从上至下递增, 时间范围为0~800 ps, 其中相邻的两条频谱曲线的时间间隔为 $\Delta t=40$ ps, 从三维图谱上可直观地看出各时间段荧光光谱的变化情况. 采用570 nm的激光泵浦, 探测范围为600~750 nm. 在开始探测的280 ps以内, 主要荧光发射强度集中在650 nm附近, 直到探测为280 ps以后, 发射峰集中在660 nm.

2.3 能量传递过程分析

由于在77 K下探测的荧光具有较小的分子振动影响和溶剂效应, 更接近能量传递理论模型的要求. 基于以上考虑, 只对77 K下所探测的不同波长下的

动态荧光衰减采用多指数拟合的方法, 应用Monte Carlo拟合曲线列于图5, 结果列于表1中. 在所得的时间常数中, 除了最长的一个终端荧光发射以外, 其他的都可以认为是能量传递的时间常数的函数. 表1中所示是在570 nm激发下探测所得的动力学荧光光谱解叠结果, 具有负指前因子的组分对应于能量注入的过程, 具有正指前因子的组分则对应于荧光的发射过程. 应用Global分析法^[23], 得出C-PC六聚体的时间分辨荧光含有4个特征时间常数: 6, 22, 280和1470 ps.

基于表1的结果, 对C-PC六聚体时间分辨荧光光谱解叠结果作延迟-幅值相关图谱, 如图6所示. 其中

图5 (网络版彩色)不同探测波长的荧光衰减拟合结果. (a)~(f) 630, 640, 650, 660, 670, 680 nm的荧光衰减曲线(圆圈)和拟合结果

Figure 5 (Color online) Fluorescence decay fitting results of different probe wavelengths. (a)~(f) Fluorescence decay curve (circle) and fitting results from 630, 640, 650, 660, 670, 680 nm

表 1 C-PC六聚体在不同探测波长下的动力学荧光光谱解叠结果

Table 1 The deconvolution results of C-PC hexamer at different detected wavelengths

E_{ex} (nm)	E_{em} (nm)	τ_1 (ps)	A_1 (%)	τ_2 (ps)	A_2 (%)	τ_3 (ps)	A_3 (%)	τ_4 (ps)	A_4 (%)
570	630	8.1	30.6	13.5	53.7	171.8	13.1	1622.3	2.56
	640	6.7	30.0	17.7	49.9	270.2	17.4	1513.4	2.64
	650	7.9	-36.9	21.9	62.5	416.4	26.6	1549.3	10.9
	660	4.4	-14.8	12.0	-6.9	466.5	32.50	1522.5	67.5
	670	7.0	-12.9	23.5	-4.1	278.4	34.7	1625.2	65.3
	680	5.5	-15.0	28.4	-4.0	245.2	31.7	1234.6	68.3
	690	6.0	-13.5	35.7	-2.0	132.7	52.3	1230.9	47.7
		6.0		22.0		280.0		1470.0

图 6 C-PC六聚体时间分辨荧光光谱解叠结果的延迟-幅值相关图谱
Figure 6 Delay-amplitude correlation pattern of C-PC hexamer time-resolved fluorescence spectra

6 ps左右的时间常数在630 nm左右呈最强发射,随着探测波长的增加,到645 nm处呈现负的发射幅值,即荧光强度增长过程,并且在660 nm处呈现负的幅值最大值,这说明能量在以630 nm为特征发射的发色团传递到以660 nm为特征发射的发色团,从幅值的绝对值分析,此时间组分的能量传递的相对效率较高且高于22 ps时间常数;22 ps左右的时间常数荧光发射幅值在630 nm处发射强度最大,到654 nm左右呈现负的发射幅值直至667 nm处呈现负的幅值最大值,表示在该波长处的吸收行为,因此可以认为能量从以630 nm为特征发射的发色团传递到以667 nm为特征发射的发色团。对于280 ps时间常数,根据指前因子的变化反映不出明显的能量传递过程,可能是由于在同一单体内 $\alpha_{84}^1-\beta_{84}^1$ 发色团对具有相似的荧光光谱,它们之间表现为近似可逆的传递过程^[24]。作为终端发射的1470 ps时间常数在670 nm处达到最大,

则近似认为是PCB发色团的平均荧光衰减寿命。每一个C-PC六聚体是由2个三聚体面对面相接而成,具有 C_3 对称性,集中在宽~35 Å的中央空腔^[25],在下面的叙述和指认过程中,将忽略括号内对称性相同的发色团,即等价的传递途径。在C-PC三聚体中, $\alpha_{84}^1-\beta_{84}^2$ ($\alpha_{84}^2-\beta_{84}^3$ 和 $\alpha_{84}^3-\beta_{84}^1$)之间有最短的距离和适宜的取向,使得这3对传递对具有最短的时间常数(<1 ps),称为快速传递对,传递次数达288次,成为三聚体内主要的能量传递途径,传能时间(<1 ps)超出本实验仪器的测量范围(时间分辨率1 ps);其次能量传递途径为 $\beta_{84}^1-\beta_{84}^2$ ($\beta_{84}^2-\beta_{84}^3$ 和 $\beta_{84}^3-\beta_{84}^1$)与 $\beta_{155}^1-\beta_{84}^1$ ($\beta_{155}^2-\beta_{84}^1$ 和 $\beta_{155}^3-\beta_{84}^1$),Debreczeny等人^[8]对C-PC三聚体计算和测量得到的 $\beta_{84}^1-\beta_{84}^2$ 时间常数分别为46和40 ps,而 $\beta_{155}^1-\beta_{84}^1$ 时间常数分别为49和50 ps。本文所得到的时间常数不能指认为上述3个能量传递途径。而在同一个六聚体盘内两个三聚体之间的能量传递途径主要通过以 $\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$ ($\alpha_{84}^3-\alpha_{84}^6$ 和 $\alpha_{84}^1-\alpha_{84}^4$)和 $\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$ ($\beta_{155}^2-\beta_{155}^3$ 和 $\beta_{155}^3-\beta_{155}^4$)为代表的两条途径来完成,赵井泉等人^[15]利用Monte Carlo技术证明了这两条途径的能量传递时间分别为8和15 ps,其中途径一承担三聚体间能量传递的80%~90%^[17],所以在C-PC六聚体中,以 $\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$ 为代表的传递途径远比 $\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$ 为代表的传递更有效^[26]。Kenneth等人^[3]及Sauer和Scheer^[4]通过Förster偶极-偶极作用机制的计算结果表明,在六聚体内2个C-PC三聚体之间的确存在能量传递时间为10~20 ps的能量传递过程。本文所得6和22 ps的时间常数,指认为 $\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$ ($\alpha_{84}^3-\alpha_{84}^6$ 和 $\alpha_{84}^1-\alpha_{84}^4$)和 $\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$ ($\beta_{155}^2-\beta_{155}^3$ 和 $\beta_{155}^3-\beta_{155}^4$)这两条传递途径是合理的。根据前人研究,结合此次实验探测、理论分析和讨论,C-PC六聚体内各发色团对的距离、能量传递的主要

表 2 C-PC六聚体内典型的发色团对间的距离和传递时间常数

Table 2 The distance between the typical chromophore pairs and the transfer time constant in the C-PC hexamer

Type	Pair	Distance (~Å)	Type	Pair	Distance (~Å)	Type	Pair	Distance (~Å)
1	$\alpha_{84}^1-\beta_{84}^2$	20.6	2	$\beta_{84}^1-\beta_{155}^1$	37.5	3	$\alpha_{84}^1-\beta_{84}^5$	24.0
	$\alpha_{84}^2-\beta_{84}^3$			$\beta_{84}^2-\beta_{155}^2$		4	$\alpha_{84}^3-\beta_{155}^3$	33.5
	$\alpha_{84}^3-\beta_{84}^4$			$\beta_{84}^3-\beta_{155}^3$		5	$\alpha_{84}^2-\beta_{84}^2$	50.1
	$\alpha_{84}^4-\beta_{84}^5$			$\beta_{84}^4-\beta_{155}^4$		6	$\beta_{155}^3-\beta_{155}^5$	58.6
	$\alpha_{84}^5-\beta_{84}^6$			$\beta_{84}^5-\beta_{155}^5$				
	$\alpha_{84}^6-\beta_{84}^1$			$\beta_{84}^6-\beta_{155}^6$				
7	$\alpha_{84}^1-\alpha_{84}^4$	26.3	8	$\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$	27.9	9	$\beta_{84}^1-\beta_{84}^2$	31.3
	$\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$			$\beta_{155}^2-\beta_{155}^5$			$\beta_{84}^2-\beta_{84}^3$	
	$\alpha_{84}^3-\alpha_{84}^6$			$\beta_{155}^3-\beta_{155}^4$			$\beta_{84}^3-\beta_{84}^1$	

途径和传递时间见表2和图7^[8,13,15,17].

3 结论

通过超快速时间分辨光谱,从实验上证实C-PC六聚体能量传递具有4个时间组分: 6, 22, 280和1470 ps, 4个时间组分的归属分别为: $\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$ 为代表的发色团对之间的能量传递时间常数、 $\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$ 为代表的发色团对之间的能量传递时间常数、单体内 $\alpha_{84}^1-\beta_{84}^1$ 发色团对之间能量传递表观时间常数和PCB发色团的平均荧光衰减寿命. 虽然 $\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$ 和 $\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$ 两条能量传递途径,在时间上与赵井泉等人^[15]通过理论模拟所得出的结果存在2~7 ps的差别,但理论模拟是一种理想化的模型,可能会与色基实际的能量传递途径有所差别. 通过分辨率为1 ps的瞬态荧光探测和多指数拟合的方法证实了以 $\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$ 为代表的发色团对具有相同的能量传递时间6 ps. 此外,由于 $\alpha_{84}^1-\beta_{84}^2$ 之间的能量传递过程时间小于1 ps,受到仪器的时间分辨率的限制,该过程尚无法探测.

图 7 C-PC六聚体能量传递的主要途径. 蓝色为已报道结果^[8,13,15,17], 红色为本实验测得

Figure 7 The main pathways of energy transfer from C-PC hexamer. Blue: reported results; red: measured results in this experiment

今后若能继续改进条纹相机,使其分辨率达到飞秒或亚皮秒,不仅可从实验上对已有的藻胆蛋白能量传递结果进行验证,还可能发现更多的能量传递途径及细节,从而有望在藻胆蛋白超快速、超高效能量传递机制方面做出突破性成果.

参考文献

1 Shao S M, Su H N, Zhang X Y, et al. The active conformation of allophycocyanin from *Spirulina platensis* studied with spectroscopic analysis. *Spectrosc Spect Anal*, 2010, 30: 1643–1646

2 Su H N. Study on the active conformations of phycobiliproteins from *Cyanobacteria* and red algae (in Chinese). Doctor Dissertation. Jinan: Shandong University, 2010 [苏海楠. 蓝藻与红藻中藻胆蛋白的活性构象研究. 博士学位论文. 济南: 山东大学, 2010]

3 Kenneth S, Hugo S, Peter S. Förster transfer calculations based on crystal structure data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycocyanin. *Photochem Photobiol*, 2010, 46: 427–440

4 Sauer K, Scheer H. Excitation transfer in C-phycocyanin. Förster transfer rate and exciton calculations based on new crystal structure data for C-phycocyanins from *Agmenellum quadruplicatum* and *Mastigocladus laminosus*. *BBA-Bioenergetics*, 1988, 936: 157–170

5 Sauer K, Scheer H, Sauer P. Förster calculation based on crystal structure data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycocyanin. *Photochem Photobiol*, 1987, 46: 427–440

6 Debreczeny M P. Comparison of the rate constants for energy transfer in the light-harvesting protein, C-phycocyanin, calculated from Förster's theory and experimentally measured by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem*, 1994, 99: 1–168

- 7 Debrecezeny M P, Sauer K. Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycoerythrin. 1. Monomers. J Phys Chem, 1995, 99: 8412–8419
- 8 Debrecezeny M P, Sauer K, Zhou J, et al. Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycoerythrin. 2. Trimers. J Phys Chem, 1994, 99: 8420–8431
- 9 Zhao J Q, Zhu J C, Jiang L J. Computer simulation on kinetics of primary process in photosynthesis of algae (V)—Excitation energy transfer in phycoerythrocyanins. Sci China Ser B, 1996, 39: 519–526
- 10 Zhao J Q, Zhu J C, Jiang L J. Computer simulation on kinetics of primary process in photosynthesis (III). Energy transfer in the trimers and hexamers of C-phycoerythrocyanins. Sci China Ser B, 1994, 37: 1313–1320
- 11 Zhao J Q, Zhu J C, Jiang L J. Study on the energy transfer processes in phycobilisomes from blue-green algae by the use of stochastic simulation approach. BBA- Bioenergetics, 1995, 1229: 39–48
- 12 Zhao J Q, Zhu J C, Jiang L J. Computer simulation on kinetics of primary processes in photosynthesis I—Mechanism of exciton annihilation of excited state decay in phycobiliproteins. Sci China Ser B, 1993, 36: 1186–1197
- 13 Matamala A R, Almonacid D E, Figueroa M F, et al. A semiempirical approach to the intra-phycoerythrin and inter-phycoerythrin fluorescence resonance energy-transfer pathways in phycobilisomes. J Comput Chem, 2007, 28: 1200–1207
- 14 Schneider S, Geiselhart P, Siebzehnrübl S, et al. Energy transfer within trimers of *Mastigocladus laminosus* studied by picosecond time-resolved transient absorption spectroscopy. Z Naturforsch C, 2014, 43: 55–62
- 15 Zhao J Q, Zhu J C, Jiang L J. Computer simulation of the initial process of algae photosynthesis-III. Energy transfer in C-phycoerythrin trimer and hexamer (in Chinese). Sci China Ser B, 1994, 24: 232–238 [赵井泉, 朱晋昌, 蒋丽金. 藻类光合原初过程的计算机模拟-III. C-藻蓝蛋白三聚体及六聚体中的能量传递. 中国科学(B 辑), 1994, 24: 232–238]
- 16 Zhang J M, Zhao J Q. Energy transfer pathways and mechanisms in C-phycoerythrin hexamer (in Chinese). Sci China Ser B, 1998, 28: 445–452 [张景明, 赵继全. C-藻蓝蛋白六聚体内能量传递途径及其机制. 中国科学(B 辑), 1998, 28: 445–452]
- 17 Zhao J Q, Zhu J C, Jiang L J. Computer simulation of the initial process of algae photosynthesis-IV. Energy transfer in phycobilisomes from *Cyanobacteria* (in Chinese). Sci China Ser B, 1994, 24: 469–477 [赵井泉, 朱晋昌, 蒋丽金. 藻类光合原初过程的计算机模拟-IV. 蓝藻藻胆体中的能量传递. 中国科学(B 辑), 1994, 24: 469–477]
- 18 Ma S Y. Construction of B-phycoerythrin-R-phycoerythrin conjugate and comparative study on properties of the conjugate and natural phycobilisome from *Porphyridium cruentum* (in Chinese). Master Dissertation. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2001 [马圣媛. 紫球藻藻红蛋白和藻蓝蛋白共价交联物的构建及其与天然藻胆体特性的比较研究. 硕士学位论文. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2001]
- 19 Padyana A K, Bhat V B, Madyastha K M, et al. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. Biochem Bioph Res Co, 2001, 282: 893–898
- 20 Yan S G, Chen X L, Zhang X Y, et al. Spectral changes of C-phycoerythrin with different molar ratios of SPDP. Spectrosc Spect Anal, 2008, 28: 1115–1117 [颜世政, 陈秀兰, 张熙颖, 等. 异型双功能交联剂 SPDP 对 C-藻蓝蛋白的光谱影响. 光谱学与光谱分析, 2008, 28: 1115–1117]
- 21 Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et *Spirulina maxima*. Doctor Dissertation. Paris: Université de Paris, 1966
- 22 Xia A D, Zhang X Y, Hong Q, et al. Spectroscopic characteristics and energy transfer process of C-phycoerythrin in *Westiellopsis prolifica* (in Chinese). Sci China Ser B, 1992, 22: 46–54 [夏安东, 张新夷, 洪强, 等. 蓝菌(*Westiellopsis prolifica*)中 C-藻蓝蛋白的光谱学特性及其能量传递过程. 中国科学(B 辑), 1992, 22: 46–54]
- 23 Horzwarth A R, Bittermann E, Reuter W, et al. Studies on chromophore coupling in isolated phycobiliproteins. III. Picosecond excited state kinetics and time-resolved fluorescence spectra of different allophycoerythrin from *Mastigocladus laminosus*. Biophys J, 1990, 57: 133–145
- 24 Zhang J P, Xie J, Zhao J Q, et al. Studies on the energy transfer processes and dynamics in R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* (in Chinese). Acta Biophys Sin, 2001, 17: 767–772 [张建平, 谢洁, 赵井泉, 等. 多管藻中 R-藻蓝蛋白能量传递途径及动力学. 生物物理学报, 2001, 17: 767–772]
- 25 Pizarro S A, Sauer K. Spectroscopic study of the light-harvesting protein C-phycoerythrin associated with colorless linker peptides. Photochem Photobiol, 2001, 73: 556–563
- 26 Zhao J Q, Zhu J C, Jiang L J. Computer simulation of the initial process of photosynthesis-V. Energy transfer in phycoerythrin (in Chinese). Sci China Ser B, 1996, 26: 156–163 [赵井泉, 朱晋昌, 蒋丽金. 光合原初过程的计算机模拟研究-V. 藻红蓝蛋白中的能量传递. 中国科学(B 辑), 1996, 26: 156–163]

Summary for “钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白的能量传递动力学”

The energy transfer dynamics in C-phycocyanin hexamer from *Spirulina platensis*

Xiaoxiao Wang^{1,2†}, Wenjun Li^{2†}, Mingyuan Xie^{3*}, Fuli Zhao³, Ge Yang¹, Qi Liu^{2,4} & Song Qin^{2*}¹ College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China;² Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;³ School of Physics, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;⁴ School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: xiemy5@mail.sysu.edu.cn; cpay_yic@sina.com

Photosynthesis is an ancient and important conversion of solar light to biological energy in photosynthetic organisms. Phycobilisome (PBS) system in cyanobacteria and red algae is one of two major light-harvesting systems of photosynthetic oxygen organisms. PBS is aggregation of water-soluble phycobiliproteins (PBPs) which are distinctively colored group of disk-shaped macromolecular proteins bearing covalently attached open-chain tetrapyrroles known as phycobilins. PBPs are capable to absorb solar light and transfer energy to the chlorophyll of photosynthetic reaction center with a high efficiency. Light energy absorbed by phycobilins is transmitted between the subunits, and then transmitted between different PBPs, finally to the photoreaction center located on the thylakoid membrane. The energy transfer between PBPs is very fast and high efficiency. Because energy can be transferred in different chromophores and there are a large number of chromophores in PBPs, the energy transfer path of PBPs is complex and diverse. In the past 20 years, energy transfer process of PBPs have been analyzed by time-resolved fluorescence spectroscopy because a large shift of the fluorescence peaks can be clearly observed. For example, Zhang et al. estimated the time constant for energy transfer from PC (rod) to APC (core) as 18 ps and 55 ps based on PBPs crystal structures and time-resolved fluorescence spectra of the rod-core complex. However, due to the technical bottleneck of theoretical simulation and spectral experimental detection, the research on the physical mechanism of photosynthetic energy transfer is relatively slow. In recent years, the ultrafast spectrum time resolution has been continuously improved, which provides the conditions for studying the energy transfer of PBPs. In this paper, the mechanism of energy transfer in C-phycocyanin hexamer from *Spirulina platensis* was studied by ultrafast time-resolved fluorescence spectroscopy. The energy transfer pathway and the related transfer parameters in the C-phycocyanin hexamer were identified by the fitting of the fluorescence decay curve at different detection wavelengths. It was proved that the energy transfer of C-phycocyanin hexamer had four time components from the experiment, which are 6, 22, 280 and 1470 ps, respectively, then the time components were identified and discussed. This study reflects the energy transfer kinetics between different chromophores in C-phycocyanin and provides important experimental data for solving the relationship between the structure and function of PBPs. At the same time, our study has important value for the understanding of the primary process of photosynthesis. In the future, if the resolution of a streak camera can be raised to femtoseconds, it is possible to find more energy transfer paths, and thus it is expected to make a breakthrough in the ultrafast and ultra-efficient energy transfer mechanism of PBPs.

C-phycocyanin hexamer, time-resolved spectroscopy, energy transfer

doi: 10.1360/N972017-01026