

叶绿体延迟荧光中 730 nm 成分产生机理的光谱学研究

王成龙, 邢达*, 曾礼漳

华南师范大学激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631

摘要 叶绿体 685 nm 延迟荧光成分被认为源于 PS 作用中心的电荷复合。利用多种光谱学测量手段研究了叶绿体延迟荧光光谱中 730 nm 峰的产生机制。不同浓度下叶绿体延迟荧光光谱实验结果表明: 初始随浓度的增加, 延迟荧光光谱中 685 和 730 nm 成分强度均增强; 当浓度增加到 $7.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 685 nm 成分强度达最大, 730 nm 成分强度继续上升; 当浓度增加到 $31.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 延迟荧光光谱中 730 nm 成分强度达最大, 而 685 nm 成分已明显下降。吸收光谱实验结果表明: A_{685}/A_{730} 在叶绿体浓度增加的过程中几乎不变。叶绿体 730 nm 荧光成分的激发光谱实验结果表明: 685 nm 光对 730 nm 荧光有较高的激发效率。上述实验结果表明叶绿体延迟荧光光谱中 730 nm 峰是由 PS 所发 685 nm 成分激发 PS 所产生的荧光。同一浓度下叶绿体延迟荧光光谱波形随延迟时间(1~9 s)的不变性进一步证明了这一结论。

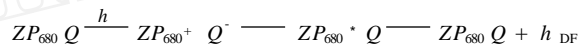
关键词 叶绿体; 延迟荧光; PS; PS; 重吸收

中图分类号: Q947 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)01-0006-05

引言

延迟荧光 (DF) 是植物光合器官在停止光照后的发光现象^[1]。因为它与荧光有相同的波形且比荧光要迟, 所以也叫延迟发光。它能够从 ns 持续到几分钟。因为光诱导延迟荧光在发光时间上比荧光慢, 而且 DF 本身也是在光合作用电子链中产生, 所以较叶绿素荧光有利于研究光合作用^[2-6]。

无论是荧光还是延迟荧光, 都是由激发态叶绿素分子 P_{680}^* 向基态跃迁产生。对于延迟荧光的产生现有多种理论^[7]: 电荷重结合理论, 三重态-三重态湮灭, 电子-空穴理论等, 现在普遍接受的理论是电荷复合理论。根据该理论, 对于延迟荧光 P_{680}^* 则是由光合作用原初光化学反应过程中产生的电荷复合产生。现在公认的观点是在放氧组织中的延迟荧光来自于光系统 (PS) ^[8]。延迟荧光的光谱学研究结果表明延迟荧光光谱中包括 685 nm 的主峰和 730 nm 的次峰^[9]。对于 685 nm 成分主要来源于植物 PS 中的光化逆反应产生的激发态叶绿素分子退激发产生^[8]。产生的机理可简述如下: 在光照过程中 PS 反应中心产生的氧化还原产物, 由于突然停止光照而发生逆转反应, 即处于氧化态的 P_{680}^+ 与还原态的原初电子受体 Q^- 所带电荷复合而产生激发态的 P_{680}^* , 而 P_{680}^* 退激发产生 685 nm 延迟荧光。反应可表示如下



式中 P_{680}^+ 与 P_{680}^* 分别为 PS 反应中心的 Chla (P_{680}) 处于氧化态与单线激发态; Q^- 是原初电子受体; Z 是反应中心的第一电子供体。因为两光系统的结构完全不同, 因而人们推断 730 nm 成分延迟荧光的产生不同于 685 nm, 但就具体的机理研究则未见文献报道。

本文利用多种光谱学测量技术研究了叶绿体延迟荧光光谱中 730 nm 峰的产生机制。实验结果表明, 叶绿体延迟荧光光谱中 730 nm 峰是由 PS 所发 685 nm 成分激发 PS 反应中心叶绿素 P_{700} 所产生的荧光。同一浓度下叶绿体延迟荧光光谱波形随延迟时间(1~9 s)的不变性进一步证明了这一结论。

1 试验部分

实验中所用试剂均为分析纯, 未经进一步纯化而直接使用。叶绿体的提取方法参考文献^[10]。在晴天上午 10 时左右, 选取健康的菠菜叶, 洗净, 擦干, 去叶柄及主脉, 称取 10 g 鲜样于冰浴研钵中。研磨时加入冰浴 Tricine 缓冲液 (Tricine 30 mmol \cdot L⁻¹, pH 7.8, NaCl 0.8 mol \cdot L⁻¹ 和 EDTA 1 mmol \cdot L⁻¹)。研磨成匀浆后, 用 8 层纱布过滤, 取 500 g 滤液, 离心 5 min。沉淀的叶绿体颗粒用 MOPS 0.2 mol \cdot L⁻¹ (0.2 mol \cdot L⁻¹ 蔗糖, 20 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, pH 7.4) 洗涤。最后将叶绿

收稿日期: 2004-08-20, 修订日期: 2005-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(60378034; 30470494), 广东省自然科学基金项目(015012; 04010394)及广东省科技计划项目(2004B10401011)资助

作者简介: 王成龙, 1978 年生, 华南师范大学激光生命科学研究所博士研究生 *通讯联系人

体制成悬浮液(悬浮在包括 MOPS 20 mol L^{-1} (pH 7.2), NaCl 30 mmol L^{-1} 和 BSA 0.2 mg 的介质中)。调节叶绿体的浓度为 1 mg mL^{-1} 作为母液。实验时将母液用 MOPS 介质稀释, 制成不同浓度的叶绿体溶液。浓度依次为 1, 1/2, 1/4, ……1/512。在数据处理过程中, 将浓度扩大 512 倍后取 2 的对数。实验用美国 Perkin-Elmer 公司装配有 R-928 光电倍增管 (Model R-928, Hamamatsu Photonics K.K., Japan) 的 LS-55 Luminescence Spectrometer 测量叶绿体的荧光光谱、延迟荧光光谱、激发光谱, 测量延迟荧光时在磷光模式之下。叶绿体的吸收光谱用美国 Perkin-Elmer 公司的 Lambda 35 UV/Vis Spectrometer 测量。

2 结果与讨论

2.1 叶绿体的延迟荧光和荧光光谱

同一浓度 ($\log_2 c = 2, 7.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) 下叶绿体的荧光光谱和延迟 1 s 的延迟荧光光谱如图 1 所示。为了便于比较两光谱波形, 在磷光模式下测量延迟荧光光谱时, 选择适当的参数 (Gate time: 10 ms, slits: Ex = Em = 10 nm), 使得两光谱具有相当的强度。从图中可以看出, 两光谱有相同的特征: 主峰在 685 nm, 次峰在 730 nm 左右处。主峰 685 nm 成分对应于 PS 中的激发态叶绿素 a 分子, 730 nm 成分对应于 PS 中的激发态叶绿素 a 分子^[10]。叶绿体荧光和延迟荧光光谱的相似性说明都有激发态的 P_{680}^* 产生。对于荧光 P_{680}^* 是由光激发直接产生, 而对延迟荧光, P_{680}^* 则由原初反应过程中产生的电荷复合产生。因此延迟荧光反应了在光合作用的原初过程中某些逆转化学反应产生了激发态的叶绿素 a 分子。

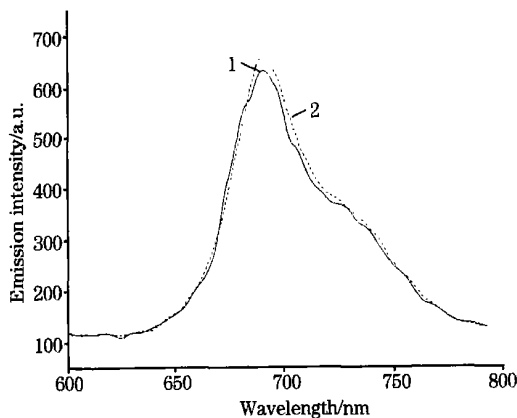


Fig. 1 The fluorescence spectrum and delayed fluorescence spectrum of isolated chloroplasts: Excited by blue light (438 nm), slits: Ex = Em = 10 nm, at PHOS model, gate time: 10 ms, delay time for delayed fluorescence spectrum is 1 000 ms, cycle time: 1 020 ms. $\log_2 c = 2$ ($7.8 \mu\text{g mL}^{-1}$), c : Concentration

1, Delayed fluorescence; 2, Fluorescence

2.2 叶绿体在不同浓度下的延迟荧光光谱

叶绿体在不同浓度下的延迟荧光光谱如图 2(a) 所示, 光

谱在主峰 685 nm 和次峰 730 nm 处的强度值如图 2(b) 所示。从图中可以看到, 随叶绿体浓度的增加 ($\log_2 c$: 从 0 到 2) 延迟荧光强度无论在 685 nm 还是在 730 nm 处均增强。当 $\log_2 c$ 为 2 时, 延迟荧光在 685 nm 处的强度达到最大。当浓度继续增加, 延迟荧光在 685 nm 处的强度开始下降, 而 730 nm 处的强度继续上升。当浓度 $\log_2 c$ 为 4 时, 该浓度下延迟荧光在 730 nm 处的强度达最大值, 强于浓度 $\log_2 c$ 为 2 时 (685 nm 处强度最大时) 的 730 nm 处的强度, 出现“翻转”现象, 光谱波形如图 2(c) 所示。浓度继续增加, 延迟荧光在两峰值位置的强度均下降, 但是 685 nm 成分下降的较 730 nm 要快, 从浓度 $\log_2 c$ 为 6 开始, 延迟荧光光谱中的主峰为 730, 685 nm 成分的强度接近于本底强度如图 2(d) 所示。

在光照过程中产生的 $P_{680}^+ Q^-$ 对延迟荧光有主要的贡献, 它们的复合产生激发态的叶绿素分子 $\text{chl}[\text{chl}^*]$ 。因此延迟荧光在任意时刻的强度与作用中心 $P_{680}^+ Q^-$ 的相对浓度成比例。叶绿体浓度 $\log_2 c$ 从 0 到 2 增加的过程中, 延迟荧光强度增加, 这是因为此时叶绿体浓度很低, 光激发产生的 $P_{680}^+ Q^-$ 的数量主要由叶绿体中叶绿素的浓度决定。因此低浓度下叶绿体延迟荧光强度主要由叶绿体浓度决定, 随浓度的增加, 延迟荧光强度增加。浓度继续增加, 此时出现 685 nm 成分强度下降, 而 730 nm 成分强度继续上升 ($\log_2 c$ 从 2 到 4)。考虑到浓度对荧光的猝灭, 在相同浓度条件下, 用 Lambda 35 UV/Vis Spectrometer 测量了叶绿体的吸收光谱, 吸收光谱在 685 和 730 nm 处的吸收值 (数据未给出) 随浓度逐渐增加, 但其比值 A_{685}/A_{730} 接近一常数, 随浓度几乎没有变化 (见图 3)。因此可以认为延迟荧光在 685 nm 处强度的下降, 除与浓度的猝灭有关外, 主要是由于 PS 中光合色素对 PS

发出的 685 nm 成分的吸收增强所致。延迟荧光在 730 nm 处强度的增加, 则是由于 PS 对 PS 发射的 685 nm 成分的重吸收, 激发 PS 反应中心的叶绿素分子 P_{700} 发射出 730 nm 的荧光, 该荧光强于随浓度的增加叶绿体对 730 nm 发光的吸收, 因此使得延迟荧光中 730 nm 成分强度增强。为了验证这一假设, 首先用 LS-55 Luminescence Spectrometer 测量了叶绿体 ($7.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) 的 730 nm 荧光的激发光谱, 结果如图 4 所示。从图 4 可以看出 685 对 730 nm 荧光具有较高激发效率。用 685 nm 激发叶绿体, 测量了叶绿体 700 ~ 800 nm 的荧光光谱, 如图 5 所示。可以看出 685 激发叶绿体能够产生 730 nm 荧光。为了进一步验证由于 PS 对 685 nm 延迟荧光的吸收而使得 730 nm 成分增强, 在同一浓度下, 测量了停止光激发后, 延迟不同时间的延迟荧光光谱, 如图 6 所示。

从图中可以看到停止光激发后延迟不同时间 (1 ~ 9 s) 的延迟荧光光谱都有相同的特征: 685 nm 处的主峰, 730 nm 处的次峰。取 685 和 730 nm 处的强度值, 分别对应不同的延迟时间作衰减曲线, 拟合得到衰减速率 (数据未给出), 结果表明两成分以相同的速率衰减, 这就说明在 1 ~ 9 s 的延迟时间里, 在任意时刻两成分强度成比例, 考虑到两光系统的结构和功能的差异, 可以认定延迟荧光光谱中的 730 nm 成分是由 PS 发出的 685 nm 激发而产生。因此由于 PS 对 PS 所发 685 nm 成分吸收的增强而使 730 nm 处的发光增强。

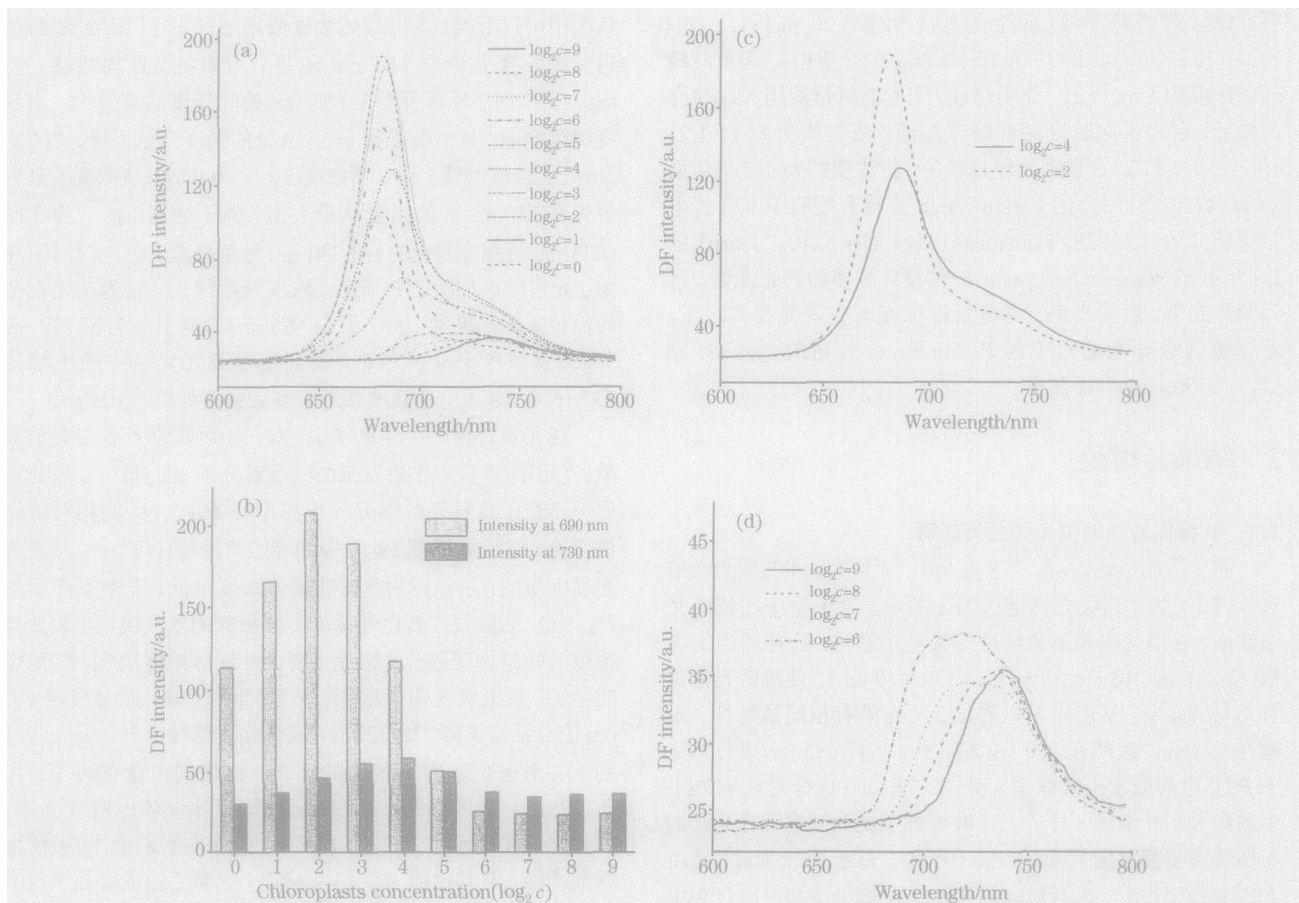


Fig. 2 (a) Effects of chloroplast concentration on delayed fluorescence spectra of isolated chloroplasts. (Excited by monochrome light (438 nm), slits: $E_x = E_m = 5$ nm, gate time = 1 ms) from bottom to top the chloroplast concentrations are in turn 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 till 1/512 () measured 1 s after the cessation of the excitation; (b) The value of DF intensity at 685/730 nm; (c) The delayed fluorescence spectra of isolated chloroplasts at $\log_2 c = 2$ and 4; (d) It showed the delayed fluorescence spectra when the concentration is continually increased.

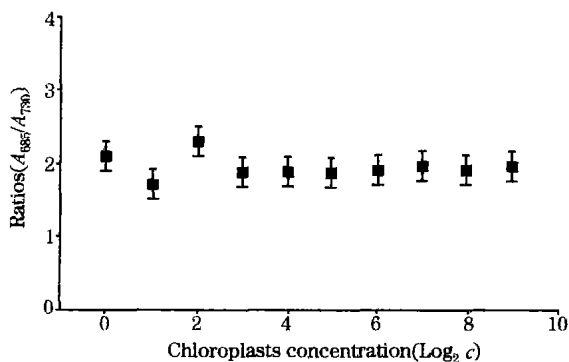


Fig. 3 The ratios of A_{685} to A_{730} at different concentration chloroplasts

浓度由 $\log_2 c$ 从 4 开始继续增加, 延迟荧光无论在 685 还是 730 nm 处的强度均下降, 这是因为随浓度的增加, 叶绿体对两成分的吸收增强的缘故。但由于始终存在 685 nm 被 PS 重吸收, 激发 PS 发射出 730 nm 的荧光, 因此出现随浓度的增加, 730 nm 的成分强度强于 685 nm 成分的现象, 甚至最后

685 nm 处主峰消失, 730 nm 处仍有一定强度[见图 2(d)]。

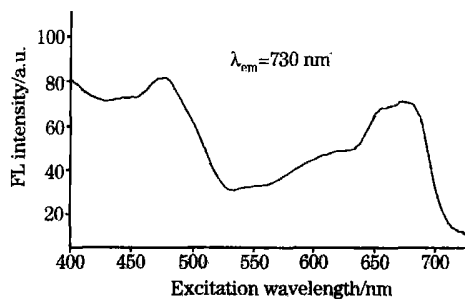


Fig. 4 The fluorescence excitation spectrum of spinach chloroplasts for 730 nm

3 结论

利用多种光谱学测量技术研究了叶绿体延迟荧光光谱中 730 nm 峰的产生机制。不同浓度下叶绿体延迟荧光光谱实验结果表明: 初始随浓度的增加, 延迟荧光光谱中 685 和

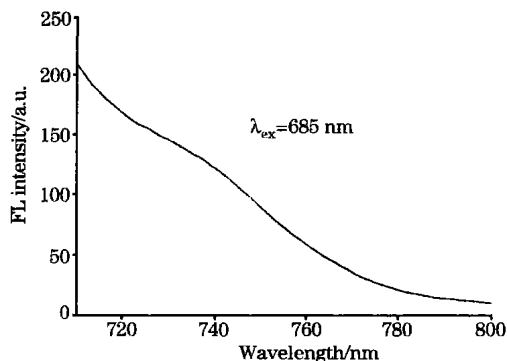


Fig. 5 The fluorescence emission spectrum of spinach chloroplasts, excited by 685 nm, Ex = 5 nm, Em = 10 nm

730 nm 成分强度均增强; 当浓度增加到 $7.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 685 nm 成分强度达最大, 730 nm 成分强度继续上升; 当浓度增加到 $31.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 延迟荧光光谱中 730 nm 成分强度达最大, 而 685 nm 成分已明显下降。吸收光谱实验结果表明: A_{685}/A_{730} 在叶绿体浓度增加的过程中几乎不变。叶绿体 730 nm 荧光成分的激发光谱实验结果表明: 685 nm 光对 730 nm 荧光有较高的激发效率。上述实验结果表明叶绿体延迟荧光光谱中 730 nm 峰是由 PS 所发 685 nm 成分激发 PS 所产生的荧光。同一浓度下叶绿体延迟荧光光谱波形随延迟时间 (1~9 s) 的不变性进一步证明了这一结论。Christen^[11] 等人的研究结果表明: 高等植物的类囊体 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),

光系统 的聚光复合物 LHC ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 蛋白色素复合体 D1/D2/Cytb-55 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在 100 ns ~ 5 μs 内的延迟荧光光谱在 685 nm 处有相同的强度, 而在 720 ~ 740 nm 范围内, 类囊体有强于聚光复合物和蛋白色素复合体的发射。这一现象也能够说明 PS 对 685 nm 的重吸收造成了类囊体在 720 ~ 740 nm 范围内延迟荧光的发射。

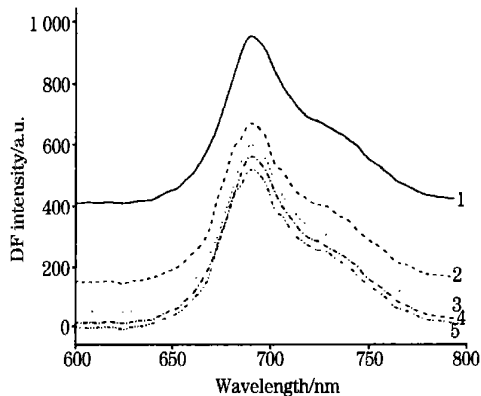


Fig. 6 Emission spectra of delayed fluorescence from isolated spinach chloroplasts ($\log_2 c = 2$, about $7.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) measured at various times after the cessation of the excitation. (Excited by monochrome light (475 nm), slits: Ex = Em = 10 nm) from the top to bottom, the spectra measured after 1, 3, 5, 7 and 9 s, respectively
1, delayed 1 s; 2, delayed 3 s; 3, delayed 5 s;
4, delayed 7 s; 5, delayed 9 s

参 考 文 献

- [1] Strehler B, Arnold W. J. *Gen. Physiol.*, 1951, 34: 809.
- [2] Edwards G E, Walker D A. C3, C4, Mechanisms, Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983. 205.
- [3] Laury C, Dominique V D. *Srwaeten. Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1519: 153.
- [4] Biswal A K, Dilnawaz F, David K A, et al. *Luminescence*, 2001, 16: 309.
- [5] ZHU Yan-bin, WU Yan-yan, CONG Wei-sui, LI Shao-shan (朱延彬, 吴燕燕, 龚为穗, 李韶山). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 1995, 15(1): 5.
- [6] ZHANG Qian-qian, LEI Shu-he, WANG Xiu-lin, WANG Lei, YU Ping (张前前, 类淑河, 王修林, 王磊, 于萍). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(10): 1227.
- [7] CHENG Ji-ji (程极济著). *Optic Biophysics (光生物物理学)*. Beijing: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 1987. 370.
- [8] Margulies M M, Stresa G, Avron M, et al. *The Hague: W. Junk N. V.*, 1971.
- [9] Hideg E, Scott R Q, Inaba H. *Archives Biochemistry Biophysics*, 1991, 285(2): 371.
- [10] YE Ji-ju, LI De-yao, SHEN Yun-gang. *Acta Phytophysiologia Sinica*, 1995, 21(1): 73.
- [11] Christen G R, Steffen G. *Renger. FEBS Letters*, 2000, 475: 103.

Spectroscopic Research on the Mechanism for 730 nm Component in Delayed Fluorescence of Chloroplast

WANG Cheng-long, XING Da*, ZENG Li-zhang

MOE Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract Charge recombination in reaction center of photosystem (PS) is regarded as the origination of delayed fluorescence (DF). The mechanism for 730 nm component appearing in the DF spectrum of chloroplast was studied with different spectral analysis methods. Experimental results of the delayed fluorescence spectrum at different chloroplast concentration showed that the apexes at 685 and 730 nm ascend when the concentration is relative low; the peak value at 685 nm reaches a maximum when the concentration is $7.8 \mu\text{g mL}^{-1}$, however, the apex at 730 nm is still increasing. The peak value at 730 nm finally reaches a maximum at chloroplast concentration of $31.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, while the apex at 685 nm has apparently decreased. The results of absorption spectrum showed that the ratios of A_{685} to A_{730} are almost a constant during the process of increasing chloroplast concentration. Furthermore, the excitation spectrum for 730 nm fluorescence shows that the 685 nm light has a high excitation efficiency. Above experimental results indicated that the 730 nm component of DF spectrum is the fluorescence of chlorophyll a in PS reaction center excited by 685 nm DF. Meanwhile, this conclusion was further verified by the invariability of DF spectrum at different delay time (1-9 s).

Keywords Chloroplast; Delayed fluorescence; PS; PS; Reabsorption

(Received Aug. 20, 2004; accepted Jan. 20, 2005)

* Corresponding author