

叶绿体不同浓度下光诱导延迟荧光光谱研究*

王成龙 钱 隆 范多旺 王锦辉

(兰州交通大学光电技术与智能控制教育部重点实验室, 兰州 730070)

摘 要 针对《光子学报》文献[1]中实验结果与已有报道相关光谱特征的显著差异, 利用多种光谱学手段对不同浓度下叶绿体延迟荧光进行了研究. 实验结果表明: PS I 反应中心叶绿素 P700 对 PS II 所发 685 nm 成份的吸收随叶绿体浓度的增加而增强, 从而导致 PS I 发出的 730 nm 成份增强, 而使得延迟荧光光谱中 730 nm 成为主峰, 甚至 685 nm 成份的消失. 该研究结果表明: 叶绿体延迟荧光光谱中 730 nm 成份, 是由 PS I 作用中心叶绿素 P700 对 PS II 中所发 685 nm 成份延迟荧光的重吸收, 产生激发态所发出的荧光. 该结论有助于延迟荧光光谱中各成份产生机理的进一步研究.

关键词 光诱导延迟荧光; 光谱; 叶绿体; PS II; PS I; 重吸收

中图分类号 Q632 **文献标识码** A

0 引言

植物光诱导延迟发光就是植物光合器官在停止光照后的发光现象^[2]. 因为与植物叶绿体荧光有相同的波形且比荧光要迟, 所以也叫延迟荧光(DF). 因为光诱导延迟荧光在发光时间上比荧光晚, 而且 DF 本身也是在光合作用电子传递链中产生, 所以较叶绿素荧光更有利于研究植物光合作用^[3,5]. 延迟荧光是在 P680 处电荷分离效率的内在荧光探针, 也是能够区分光合作用过程发生在线粒体还是电子传递链中的有用的工具^[6], 因此在研究植物光合能力中得到广泛应用. 本人在利用延迟荧光快速检测植物光合效率的问题中进行了较为深入的研究, 取得了一定的进展^[7,8]. 延迟荧光的发射谱、激发谱能够有效的反映植物光合过程中电子传递的微观机制, 因此人们进行了大量的研究^[9~16]. 谭石慈等利用以高灵敏度背向照明 CCD 和像增强器为核心的探测系统, 对植物叶片和叶绿体光诱导的超微弱发光(延迟荧光)光谱进行探测^[1]. 研究结果表明: 叶片和叶绿体的延迟荧光光谱很一致, 二者在 485、560~590、650、685、725~735 nm 附近都有发射峰. 并且, 730 nm 处的强度要比 685 nm 处强. 该研究结果与已有相关文献^[2,13]所报道延迟荧光光谱的特征有明显差异.

本文利用光谱学手段对不同浓度下植物叶绿体的延迟荧光光谱进行了研究, 同时结合探测系统的

异同, 分析讨论了产生上述差异的原因, 并对延迟荧光光谱中 730 nm 成份的产生机理进行了讨论.

1 材料与方法

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^[17]. 调节所提取叶绿体的浓度为 1 mg/ml 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. 在实验过程中, 将叶绿体母液的浓度作为 1, 依次稀释 1 倍, 浓度依次为 1、1/2、1/4、……1/512. 在数据处理的过程中, 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下. 测量叶绿体的吸收光谱时用美国 Perkin Elmer 公司的 Lambda 35 UV/VIS Spectrometer 测量.

2 结果与分析

图 1 给出了同一浓度 ($\log_2 C = 2, 7.8 \mu\text{g/ml}$) 下叶绿体的荧光光谱和延迟 1 s 的延迟荧光光谱. 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, 选择设置了适当的参数 (gatetime: 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, 该结果与文献^[2,13]报道的结果一致. 主峰 685 nm 成份对应于 PS II 中的激发态叶绿素 a 分子, 730 nm 成份对应于光系统 I 中的激发态叶绿素 a 分子^[18]. 叶绿体荧光和延迟荧光光谱的相似性说明都有激发态的 P680*

*甘肃省科技攻关计划项目 (2GS045-B52-013) 和光电技术与智能控制教育部重点实验室 (兰州交通大学) 开放课题 (K04108) 资助项目
Tel: 0931-4956032 Email: chlwang@mail.lzjtu.cn
收稿日期: 2004-11-26

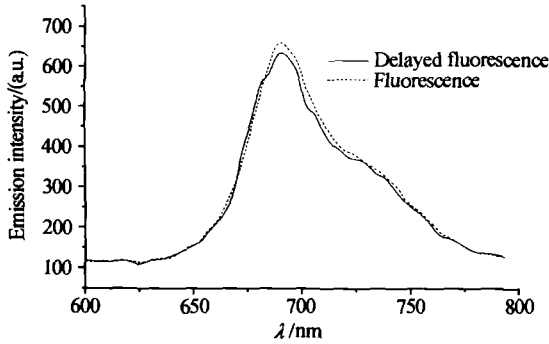


图 1 同一浓度下(7.8 μg/ml)叶绿体荧光和延迟荧光(延迟:1000 ms)光谱(激发波长:438 nm)

Fig. 1 The fluorescence spectrum and delayed fluorescence spectrum of isolated chloroplasts, (EX=438 nm)

产生。P680* 的产生对于荧光,则由光激发直接产生,对于延迟荧光 P680* 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化学发应产生了激发态的叶绿素 a 分子。该结果与文献[1]中的研究结果:无论是叶片还是叶绿体的延迟发光光谱中 730 nm 处与 685 nm 处有近乎相同的强度,甚至 730 nm 处的强度要比 685 nm 处发光强,有显著差异。

叶绿体在不同浓度下的延迟荧光光谱如图 2 (a),光谱在主峰 685 nm 和 730 nm 次峰处的强度值如图 2(b)。由图可见,初始随叶绿体浓度的增加(Log₂C: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 Log₂C 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 Log₂C 为 4 时,该浓度下延迟荧光在 730 nm 处的强度达最大,强于浓度 Log₂C 为 2 时(685 nm 处强度最大时)730 nm 处的强度(图 2c),此时 685 nm 处的强度已经明显下降。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 成份下降的较 730 nm 要快。当 Log₂C=5 时,光谱在 685 nm 和 730 nm 出有近乎相同的强度,与文献[1]的结果极为相似。从浓度 Log₂C 为 6 开始,延迟荧光光谱中的主峰为 730 nm,685 nm 成份的强度接近于本底强度(图 2d)。在光照过程中产生的 P680⁺ 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 chl[chl*]。因此延迟荧光在任意时刻的强度与作用中心 P680⁺ Q⁻ 的相对浓度成比例。叶绿体浓度 Log₂C 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 P680⁺ 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随叶绿体浓度的增加而增加。浓度继续增加,出现 685 nm 成份强度下降,而 730 nm 成份强度继续上升(Log₂C 从 2 到 4)。考虑到浓度对荧光的淬灭,在相同浓度条件下,测量了叶绿体的吸收光谱,吸收光谱在 685 nm 和 730 nm 处的吸收值(数据未给出)随浓度逐渐增加,但其比值 A₆₈₅/A₇₃₀ 接近一常数,随浓度几乎没有变化。因此可以认为延迟荧光在 685 nm 处强度的下降,除与浓度

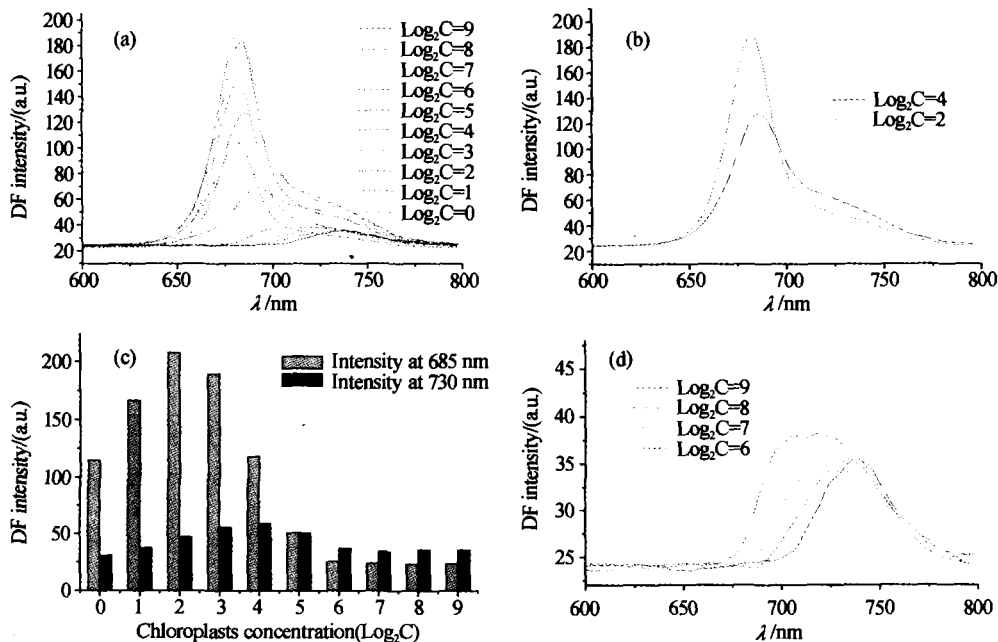


图 2 (a)不同浓度下叶绿体延迟 1 s 的延迟荧光光谱(激发光:438 nm)(b)延迟荧光在 685 nm,730 nm 处的强度值(c)浓度为 Log₂C=2,4 时的延迟荧光光谱(d)叶绿体在较高浓度(Log₂C=6,7,8,9)时的延迟荧光光谱

Fig. 2 (a) Effects of chloroplast concentration on delayed fluorescence spectra of isolated chloroplasts. EX=438 nm). (b) The value of DF intensity at 685/730 nm. (c) The delayed fluorescence spectra of isolated chloroplasts at Log₂C=2 and 4, (d) The delayed fluorescence spectra when the concentration is high (Log₂C=6, 7, 8 and 9) C: concentration

的淬灭有关外,主要是由于 PS I 中心光合色素 P700 对 PS II 发出的 685 nm 成份的吸收增强所致. 延迟荧光在 730 nm 处强度的增加,则是由于 PS I 对 PS II 发射的 685 nm 成份的重吸收,激发 PS I 反应中心的叶绿素分子 P700 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 成份强度增强. 为了验证这一假设,首先用 LS-55 Luminescence Spectrometer 测量了叶绿体(7.8 $\mu\text{g/ml}$)的 730 nm 荧光的激发光谱,结果如图 3. 由图可见,685 nm 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 nm~800 nm 的荧光光谱,如图 4. 可以看出 685 nm 激发叶绿体能够产生 730 nm 的荧光. 同时做了同一浓度叶绿体光激发后延迟不

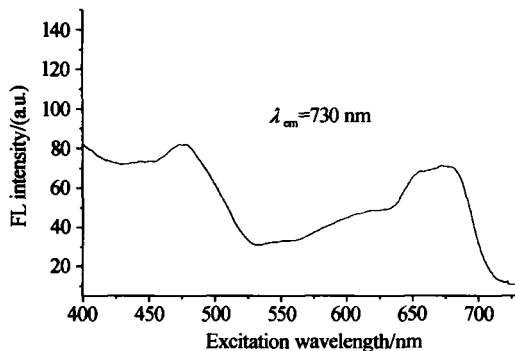


图 3 叶绿体荧光光谱的中 730 nm 成份的激发光谱
Fig. 3 The fluorescence excitation spectrum of spinach chloroplasts for 730 nm

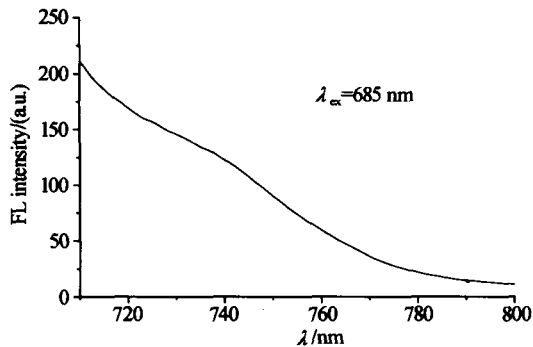


图 4 叶绿体在 685 nm 激发下的荧光光谱
Fig. 4 The fluorescence emission spectrum of spinach chloroplasts, excited by 685 nm, slits: EX=5 nm, EM=10 nm

同时间的延迟荧光光谱. 结果表明:延迟荧光强度随延迟时间的延长逐渐下降,但光谱特征不变,685 nm 处主峰 730 nm 次峰,并且两成份强度随时间以近乎相同的速率衰减. 综上所述实验结果可以得出:PS II 作用中心色素 P680 由电子复合产生激发态退激发产生的 685 nm 延迟荧光被 PS I 的天线色素吸收捕获,发生电荷分离,天线将所获得的电能以诱导共振的方式传递到作用中心,将中心色素 P700 激发,激发态 P700 退激发发出的 730 nm 荧光就是

延迟荧光光谱中的 730 nm 成份.

3 讨论

为什么参考文献[1]的研究结果与上述实验结果中的低浓度下的光谱有着显著的差异($\text{Log}_2 C < 4$),而与 $\text{Log}_2 C = 5$ 时的光谱极为相似? 根据对上述不同浓度下延迟荧光光谱研究结果的分析,我们知道这是由于 PS I 作用中心叶绿素 P700 对 PS II 发出的 685 nm 延迟荧光的重吸收所致. 分析参考文献[1]中的实验装置,可以得出以下原因:第一,延迟荧光实验探测装置不同. 文献[1]中所用的探测仪器是以高灵敏度背向照明 CCD 和像增强器为核心的探测系统,由于该系统灵敏度的限制,要求被测光较强,从而样品中叶绿体浓度较高,因此,PS I 作用中心叶绿素 P700 对 PS II 所发 685 nm 成份延迟荧光的重吸收较强;其次该系统探测时激发光源和探测器位于样品同侧,因此探测器探测到的只是被激发样品表面的发光,因此发光成份中既包括由于电子逆转回流复合产生的 685 nm 成份同还有重吸收产生的 730 nm 成份. 而对于本文中用仪器 (LS-55 Luminescence Spectrometer) 的探测光路则是激发光路与发射光路成 90° ,当叶绿体浓度极低时,PS I 作用中心叶绿素 P700 的重吸收很弱,因此波形如图 1 所示:685 nm 主峰,730 nm 次峰. 随着叶绿体浓度的增加,吸收逐渐增强,730 nm 成份相对 685 nm 逐渐增强,以至出现两成份有相当强度 ($\text{Log}_2 C = 5$ 时). 当浓度增加到一定程度 ($\text{Log}_2 C = 6, 7, 8, 9$) 后,原始激发光(438 nm)无法穿透样品激发探测面上的叶绿体,因此接收不到 685 nm 发光,但是由于被激发面处样品发出的 685 nm 延迟荧光被叶绿体重吸收二次激发探测器正对面叶绿体,从而能探测到 730 nm 成份(图 2d). 综上所述,参考文献[1]中所述研究结果则是由于实验系统自身因素的限制,进而要求实验材料的浓度等因素所致,该结果报道的叶绿体延迟荧光光谱是在特定浓度条件下的特例,对进一步研究延迟荧光光谱中 730 nm 成份产生的机理有重要意义.

致谢光谱实验中,华南师范大学邢达教授在光谱分析方面给予了有益的指导,特此致谢.

参考文献

- 1 谭石慈,邢达,唐永红,等. 植物叶片超微弱发光光谱研究. 光子学报,2000,29(11): 961~965
Tan S C, Xing D, Tang Y H, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2000,29(11): 961~965
- 2 Strehler B, Arnold W. Light production by green plants. *J Gen Physiol*, 1951,34(1): 809~820
- 3 Chaerle L, Dominique, Van D S. Seeing is believing;

- imaging to monitor plant health. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2001, **1519**(1):153~166
- 4 Misra A N, Biswal U C. Effect of phytohormone of chlorophyll degradation of chloroplast in vivo and in vitro. *Protoplasma*, 1980, **105**(3): 1~8
 - 5 Misra A N, Biswal U C. Differential changes in electron transport properties of chloroplasts during aging of attached and detached leaves and of isolated chloroplasts. *Plant Cell Env*, 1982, **5**(1): 27~30
 - 6 Marek Godlewski, Rajfur Z, Stawinski J, et al. Spectra of the formaldehyde-induced ultraweak luminescence from yeast cells. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1993, **21**(1): 29~35
 - 7 Wang C L, Xing D, Chen Q. A novel method for photosynthesis measuring using chloroplast's delayed fluorescence. *Biosens Bioelectron*, 2004, **20**(3): 454~459
 - 8 邢达, 王成龙. 可见光诱导延迟发光的光合速率快速测量方法与装置. 中国专利, ZL:02115395.7. 2004-9~29
Xing D, Wang C L. Method and equipment for measuring photosynthesis rate using delayed fluorescence induced by visible light. China patent, ZL:02115395.7. 2004-9-29
 - 9 Guo Z Y, Zhu Y B, Ma J F, et al. The spectra distribution properties of ultraweak photon emission from biological system and biophoton coherence. *Acta Photonica Sinica*, 2000, **29**(10): 890~893
 - 10 李韶山, 朱延彬, 刘颂豪等. 萌发花生种子超弱发光的研究. 光子学报, 2000, **29**(11):966~969
Li S S, Zhu Y B, Liu S H, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2000, **29**(11): 966~969
 - 11 Gerhardt V, Bodemer U. Delayed fluorescence excitation spectroscopy: a method for determining phytoplankton composition. *Archiv für Hydrobiologie Special Issues Advances in Limnology*, 2000, **55**(3): 101~120
 - 12 Bodemer U. DF excitation spectroscopy of phytoplankton: relationship between dynamics of algal populations and discharge. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 1998, **115**(2): 125~138
 - 13 Eva Hideg, Scott R Q, Inaba H, et al. Spectral resolution of long term delayed fluorescence from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **285**(2): 371~372
 - 14 蔡霞, 王水才, 贺俊芳, 等. 温度对 PS II CP47/D1/D2/Cyt b559 复合物荧光光谱特性的影响. 光子学报, 2003, **32**(7):853~855
Cai X, Wang S C, He J F, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(7):853~855
 - 15 王水才, 蔡霞, 贺俊芳, 等. 从捕光天线到反应中心分子能量传递研究. 光子学报, 2003, **32**(6):641~645
Wang S C, Cai X, He J F, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(6):641~645
 - 16 蔡霞, 贺俊芳, 王水才, 等. 光系统 II 核心天线 CP47 热稳定性的荧光动力学. 光子学报, 2003, **32**(3):257~260
Cai X, He J F, Wang S C, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(3):257~260
 - 17 Ye J Y, Li D Y, Shen Y G. Effect of hypotonic swelling on photosynthesis in spinach intact chloroplasts. *Acta Phytophysiologia Sinica*, 1995, **21**(1): 73~79
 - 18 Biswal A K, Dilnawaz F, David K A, et al. Increase in the intensity of thermoluminescence Q-band during leaf aging is due to a block in the electron transfer from QA to QB. *Luminescence*, 2001, **16**(1): 309~313

Spectral Research on Delayed Fluorescence of Chloroplasts at Different Concentration

Wang Chenglong, Qian Long, Fan Duowang, Wang Jinhui

Lanzhou Jiaotong University Key Laboratory of Opto-electronic Technology and Intelligent Control ,
Ministry of Education , Lanzhou 730070

Received date: 2004-11-26

Abstract Delayed fluorescence (DF) spectrum is an efficient method in study transportation of electron in photosynthesis. In the light of the great difference of spectrum characteristic between the experimental results in reference [1] and what have been reported, in this paper the spectrum of DF of chloroplast at different concentrations was studied by using different spectral analysis methods. Experimental results show that the chlorophyll P700 in PS I absorbs the 685 nm component emitted from PS II is increasing as the chloroplast concentration increases, which results in the peak value at 730 nm and nearly disappearance of apex at 685 nm in DF spectrum. Experimental results indicate that the 730 nm component of DF spectrum is the result of re-absorption DF spectrum of 685 nm component, which emitted from PS II as the PS I acts on chlorophyll P700. The results in this paper will be of benefit for us for understanding and further study of the mechanism of different components in delayed fluorescence.

Keywords Delayed fluorescence; Spectrum; Chloroplast; PSI I; PS I ; Re-absorption



Wang Chenglong was born in 1978, in Gansu Province. He received his M. S. Degree at Institute of Laser Life Science, South China Normal University. Now he is a lecturer and Ph. D. candidate in Lanzhou Jiaotong University, and he is engaged in the field of NIR, Biophoto-electron and its application.