

变温量子产率附件在植物叶片光合作用研究中的应用

前言：

植物叶片的荧光一直以来被用来作为光合作用研究的指标，荧光强度及光谱特性提供了在光照下，能量转移过程的相关信息。这些信息被用来研究在植物光化学过程中的环境因素的影响，如温度，光照等。

光合系统 I 和 II (PSI 和 PSII) 是处于叶绿体内的蛋白质复合物，主要作用是驱动光合作用中的电子传递链。光系统包含色素，通过光激发，可以开始一个自由基反应链，从而产生化学能。绿色植物中的主要光合色素是叶绿素和类胡萝卜素。类胡萝卜素是辅助色素，叶绿素是对光合作用链非常重要的光响应电子给体。作用原理图如下：

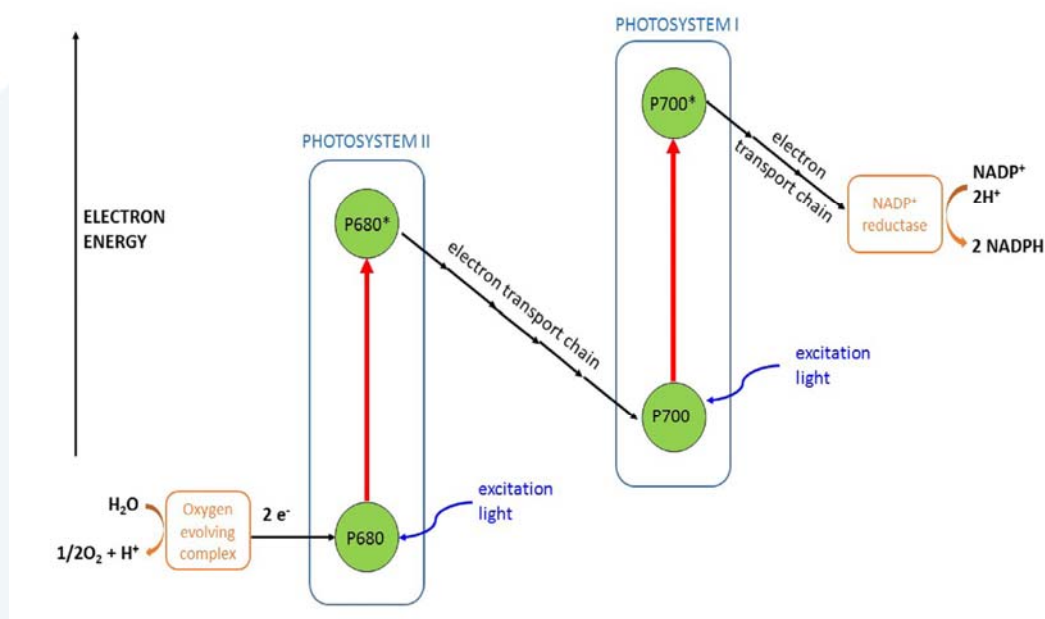


Figure 1: 简化的光合作用原理图

P680 和 P700 是光合系统 I 和 II 中的叶绿素中心

PSI 和 PSII 的吸收和荧光转换并不相同，尽管他们之间的光谱有很大部分的重叠。由于在叶子内部与基质相互作用，孤立的光合系统的发射光谱会发生改变。主

要的 PSII 的发射光谱在 685nm 和 740nm。PSI 过程在 720nm 显示出一个宽的发射谱带，且发射强度很低。室温下荧光的主要贡献来自 PSII 过程，也是目前被广泛研究的光合系统。尽管植物叶片的荧光通常用脉冲调制的方式测量，但荧光连续光谱分析是能够提供有效信息的简单方式之一。连续荧光也能被用来做量子产率的补充测量。

植物叶片比溶液中的叶绿素展现出更低的量子产率，在活体内，电子载体将激发光转化为光合作用或热产物。环境因素可以影响不同光合色素的相应吸收，以及光合作用、荧光或非光辐射猝灭。为了获知光合作用过程的全貌，获得除了荧光发射以外的叶片吸收信息也很重要。但吸收情况被研究的并不多，大部分研究者会使用吸收的假设值。此外，叶片的低温研究是研究电传递链猝灭影响的很好的方法。尤其是在 77K 和室温下的对比，但目前相关文献中并没有 77K-室温之间温度研究数据。

本篇应用研究了多年生植物叶片的变温量子产率，温度从 77K 变到 300K。稳态和量子产率数据通过 FLS1000 中耦合的变温积分球获取。爱丁堡仪器的变温积分球可以获取不同温度下的准确的量子产率，可以对不同温度下吸收光谱的变化进行考量。

实验：

选取两种多年生植物叶片，地中海荚迷（样品 1），冬青（样品 2）。将植物叶片剪成 1cm*1cm 的正方形，使用去离子水进行清洗，直接放入 FLS1000 进行测试。室温下的发射光谱使用前表面样品支架进行测试，使用 450W 连续氙灯作为激发光源。

量子产率使用爱丁堡仪器的低温积分球（Figure 2）进行测试。低温积分球包含一个闭循环的液氮低温恒温器。使用聚四氟乙烯 PTFE 作为参比，得到了样品的绝对量子产率。测试过程中，在激发侧加入了中性滤光片来防止激发光过强，使检测器饱和。

样品放入低温恒温器中，通入液氮前将真空抽到 10^{-5} mbar，通过 Fluoracel 直接控制温度变化。



Figure 2：变温样品支架（左）及爱丁堡变温积分球附件（右）

实验结果:

Figure3 是室温下样品的发射光谱。跟预期的一样，叶绿素的荧光在 650-850nm。680nm 的峰比 740nm 要弱，与之前测试的叶片荧光结果一致。这是由于 PSII 荧光的再吸收造成的：PSII 吸收带延伸到 740nm，因此在小于 740nm 以下，观察到的强度比预期要弱。此外，自吸收效应与测试时使用的样品支架有关，在低温积分球中，由于样品水平放置，样品的发光经过积分球反射后再次照射样品，也会是自吸收效应更加明显。将两条曲线在 740nm 处进行归一化后，该波段不收自吸收影响。

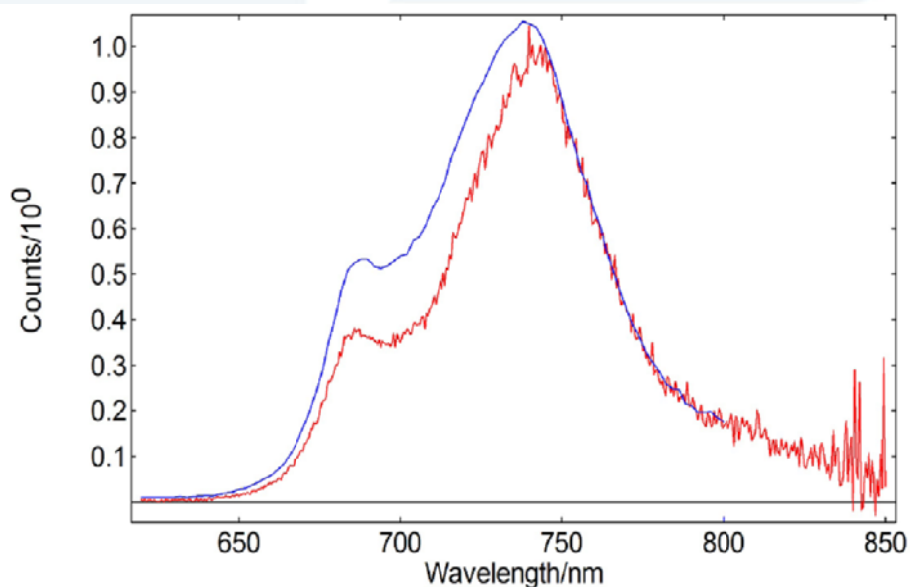


Figure 3: 样品 1 在室温下的发射光谱；使用前表面样品支架（蓝色）；低温积分球（红色，减去背景后的信号）；在 745nm 进行归一化；前表面样品支架测试条件： $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 2 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 2 \text{ nm}$, $\text{step size} = 2 \text{ nm}$, $\text{dwell time} = 0.1 \text{ s}$ 。低温

积分球测试条件： $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 7 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 4 \text{ nm}$, step size = 0.5 nm, dwell time = 1 s.

在 77K 下叶绿素的发射谱带形状发生变化，有 685nm 和 740nm 两个峰。Figure4 是样品 1 和样品 2 在 77K 下的发射光谱。所有清晰的峰都来自于 PSII，但是样品 1 在 696nm 出现了第三个峰。这个峰在室温下并没有发现，表明样品中的光合色素有不同的分配。

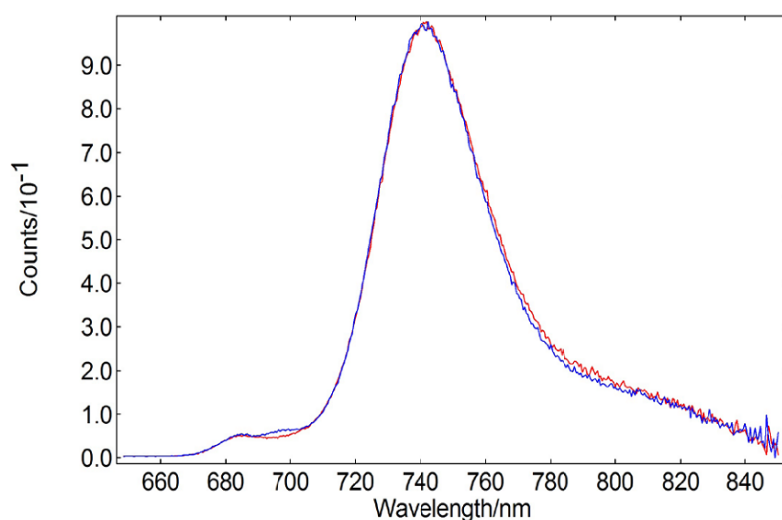


Figure 4：样品 1（蓝色）和样品 2（红色）在 77k 下的发射光谱进行归一化，测试使用低温积分球；测试条件： $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 7 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 4 \text{ nm}$, step size = 0.5 nm, dwell time = 1 s.

低温抑制了光合电子链，因此使得量子产率升高。该结果在 Figure5 中显示，图 5 是样品 2 在不同温度下的发射光谱。由于 684nm 峰位于自吸收有很大关系，因此没有表现出与温度的依赖关系。在低温积分球中测试发射光谱时，也同时记录了激发光的散射情况，可以通过 Fluoracle 软件包直接计算绝对量子产率。Figure6 是量子产率的测试结果，结果变化趋势与孤立反应中心研究吻合。

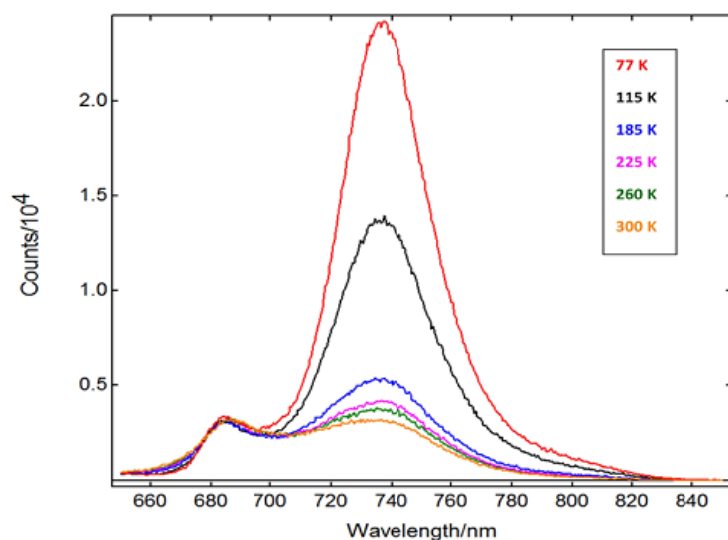


Figure 5 : 样品 2 的发射光谱，使用低温积分球改变温度进行测试；测试条件：
 $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{ex}} = 7 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 4 \text{ nm}$, step size = 0.5 nm, dwell time = 1 s

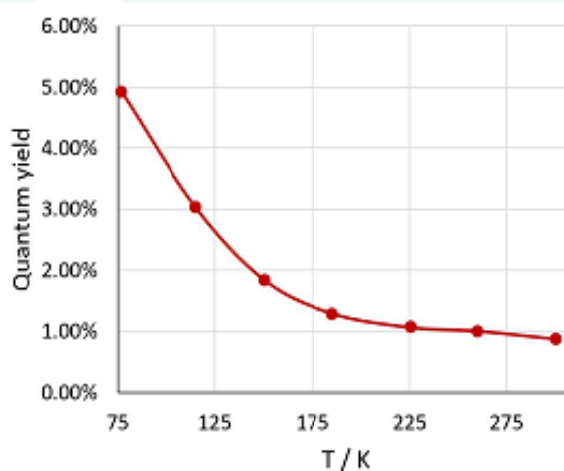


Figure 6 : 样品 2 的绝对光致发光量子产率；

结论：

植物叶片在低温下的荧光可以提供关于组成及光化学的信息，得益于 FLS1000 的高灵敏度，使得相对很低的量子产率也可以被测试出来当温度从 77K-300K 时，量子产率由 5%降低到 1%.这种降低趋势利用低温积分球很容易被测得。

参考文献：

- [1] F. Franck, P. Juneau, and R. Popovic. Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature, Biochim. Biophys. Acta 1556, 239-246 (2002)**
- [2] Govindjee. Sixty-three Years Since Kautsky: Chlorophyll a Fluorescence, Aust. J. Plant Physiol. 22, 131-60 (1995)**
- [3] W. W. Adams III, K. Winter, U. Schreiber, and P. Schramel. Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence Characteristics in Relationship to Changes in Pigment and Element Composition of Leaves of *Platanus occidentalis* L. during Autumnal Leaf Senescence, Plant Physiol. 92(4), 1184-1190 (1990)**
- [4] E. H. Murchie and T. Lawson. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications, J. Exp. Bot. 64, 3983–3998 (2013)**
- [5] S. B. Powles and O. Björkman. Photoinhibition of photosynthesis: effect on chlorophyll fluorescence at 77K in intact leaves and in chloroplast membranes of *Nerium oleander*, Planta 156, 97-107 (1982)**
- [6] E. Weis. Chlorophyll fluorescence at 77 K in intact leaves: Characterization of a technique to eliminate artifacts related to self-absorption. Photosynthesis Research 6, 73-86 (1985)**
- [7] E. G. Andrizhiyevskaya, A. Chojnicka, J. A. Bautista, B. A Diner, R. van Grondelle, and J. P. Dekker. Origin of the F685 and F695 fluorescence in Photosystem II, Photosynthesis Research 84, 173–180 (2005)**