



光照引起的叶绿素a和 β -胡萝卜素在太赫兹和可见区的光谱变化研究

张帅¹, 曲元刚^{1,2*}, 廉玉姬¹, 匡廷云²

1. 临沂大学生命科学学院, 临沂 276000;

2. 中国科学院植物研究所光生物学重点实验室, 北京 100093

* 联系人, E-mail: quyuangang@lyu.edu.cn

收稿日期: 2016-11-20; 接受日期: 2016-12-18; 网络版发表日期: 2017-02-06

山东省自然科学基金(批准号: ZR2012CM020)和国家级大学生创新创业训练计划项目(批准号: 201410452012)资助

摘要 叶绿素a和 β -胡萝卜素对植物叶片捕获光能有重要作用, 捕获的光能被用于进行光合作用. 在本研究中, 探究了叶绿素a和 β -胡萝卜素的太赫兹光谱和可见光谱以及它们在光胁迫下的变化. 结果表明, 在光胁迫下叶绿素a和 β -胡萝卜素的透射光谱和吸收光谱都发生了变化, 并且在光照15 min时变化最大, 这意味着此时的集体振动模变化最大. 在光胁迫下, 叶绿素a在可见区的吸收强度也下降, 这意味着叶绿素a分子发生了降解. 从上述结果可以看出, 太赫兹光谱对生物分子集体振动模的变化非常敏感, 尽管这些分子的构型没有发生变化. 太赫兹光谱可用来检测生物大分子的分解过程, 而可见光谱只能用来检测生物大分子的分解程度.

关键词 叶绿素a, β -胡萝卜素, 光, 太赫兹光谱

植物的叶绿体类囊体膜中含有色素, 包括叶绿素a、叶绿素b和 β -胡萝卜素等, 这些色素捕获的光能被用来进行光合作用. 叶绿素是植物叶片中含量最多的色素, 在光能吸收中具有最重要的作用. 对微管植物来说, 叶绿素a的含量远高于叶绿素b. 叶绿素的四吡咯环, 即卟啉环, 类似于亚铁血红素, 只是血红素含有 Fe^{2+} 而叶绿素含有 Mg^{2+} . 叶绿素的卟啉环是亲水的, 含有能吸收光能的共轭双键结构, 而叶绿素的叶绿醇侧链则是疏水的(图1A). 叶绿素a和叶绿素b都能吸收电磁波谱中蓝紫区(400~500 nm)和橙红区(650~700 nm)的光能, 而对绿光则吸收极少, 因此叶绿素呈现绿色^[1]. 和叶绿素一样, β -胡萝卜素也含有一系列的共轭双键,

这些双键的存在使 β -胡萝卜素也能吸收光能(图1B). β -胡萝卜素和叶绿素的吸收峰基本是互补的, 这样就拓宽了光能自养生物的光能利用范围^[2]. 叶绿素b和 β -胡萝卜素吸收的光能传给叶绿素a, 所有捕光色素吸收的光能最终都传给一对存在于光系统II (photosystem II, PS II)反应中心的特殊叶绿素a分子, 然后用来驱动光化学反应的进行^[3,4].

虽然太阳光是植物生长所必不可少的, 但它又是一种环境胁迫因素. 太强的光可以引起叶绿素的分解(“漂白”), 也能使叶绿素分子处于一种特殊的激发态. 处于激发态的叶绿素分子释放出的能量能够传到分子氧, 使其变成有高度氧化活性的活性氧, 活性氧能

引用格式: 张帅, 曲元刚, 廉玉姬, 等. 光照引起的叶绿素a和 β -胡萝卜素在太赫兹和可见区的光谱变化研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 230–235, doi: 10.1360/N052016-00319

英文版见: Zhang S, Qu Y G, Lian Y J, et al. Function of terahertz spectra in monitoring the decomposing process of biological macromolecules and in investigating the causes of photoinhibition. Sci China Life Sci, 2017, 60, doi: 10.1007/s11427-016-0057-9n

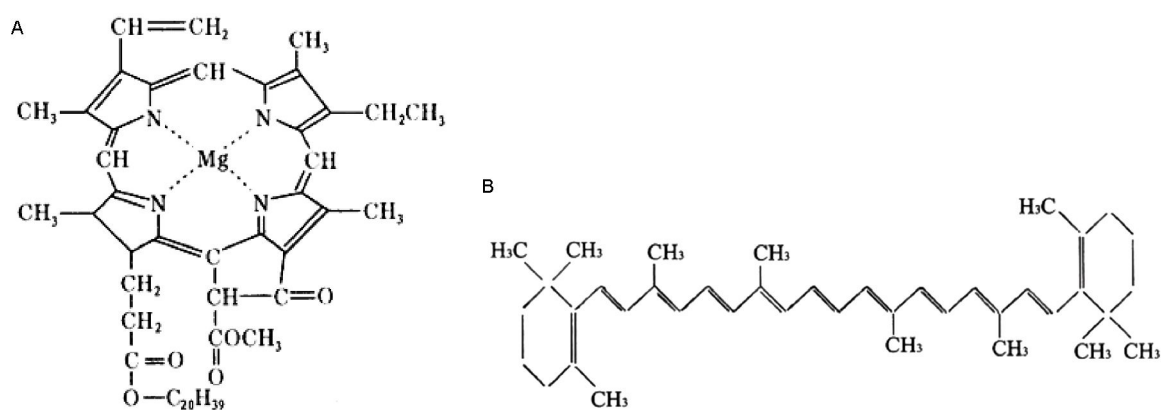


图1 叶绿素a (A)和β-胡萝卜素(B)分子的结构

够漂白叶绿素^[5]. 当然, 这种叶绿素漂白的直接机制目前还不十分清楚.

太赫兹时域光谱技术在研究生物大分子构象柔性及构型变化上已得到初步运用, 这些运用引起了人们极大的兴趣^[6-8]. 许多生物大分子的构象动力学变化发生在皮秒级别, 大规模的构象转变能引起集体振动模的变化, 而集体振动模的变化可以在远红外或太赫兹(tera hertz, THz)频率范围内被检测到^[6,9]. 太赫兹时域光谱技术已被运用到区分不同的分子种类、不同的突变种类和生物大分子的构象变化上^[7,10].

作为生物大分子, 光合色素集体振动模的变化也能反应其构象的变化, 而构象变化又能反应色素对能量的吸收和色素间能量的传递. 因此, 色素集体振动模的研究和光合作用的研究直接相关. 在本研究中, 运用太赫兹时域光谱技术测定了叶绿素a和β-胡萝卜素的集体振动模在光胁迫下的变化, 目的是探索植物光抑制的机理以及太赫兹时域光谱技术在光合作用研究中的应用. 叶绿素b具有和叶绿素a相似的结构, 所以本研究中只用到叶绿素a的实验数据. 实验结果发现, 太赫兹光谱对分子集体振动模的变化非常敏感, 尽管这些分子的构型没有变化. 太赫兹光谱能够用来检测生物大分子的分解过程, 而可见吸收光谱只能用来检测生物大分子的分解程度. 当植物暴露在强光胁迫下时, 经常会发生光抑制现象, 其机理还不是很清楚. 在本研究中, 发现叶绿素a和β-胡萝卜素的集体振动模在光胁迫下都发生了变化. 这些变化影响到了色素分子的热耗散和能量传递过程, 因此被认为是光抑制的原因之一.

1 材料与方法

1.1 材料

叶绿素a和β-胡萝卜素由Sigma公司(美国)购得, 叶绿素a和β-胡萝卜素分别溶解在80%的丙酮和正己烷中.

1.2 白光照射方式

用卤素灯照射放置于样品池中的叶绿素a和β-胡萝卜素溶液, 样品池表面的白光强度是1000 μE m⁻² s⁻¹, 样品色素浓度为0.2 mg/mL. 光处理是在室温下进行的, 样品池通过循环冷水来进行温度控制. 光照过程中, 用磁力搅拌器不断地对样品进行搅拌混合.

1.3 可见吸收光谱的测定

在室温下, 用UV-3000分光光度计(HITACHI, 日本)测定可见区域的吸收光谱.

1.4 太赫兹时域光谱的测定

实验前, 先把叶绿素a和β-胡萝卜素溶液与聚乙烯(polyethylene, PE)粉末混合, 形成混合物. 因为PE在THz波段几乎是透明的, 所以在测定THz光谱时, 它是一种很好的支持材料. 在每一次测定中, 先把50 μL样品溶液和88 mg PE粉末放在一个PE材料的圆盘上, 然后用一根细金属棒进行混合, 直到混合均匀, 再用吹风机将其吹干. 最后, 样品被压成直径10 mm、厚度0.5 mm的圆片. 实验是在一个真空箱内进行的, 这样避免了水蒸气的影响, 保证样品始终处于干燥状态. 每一次样品的测定, 都要同时测定一个参比样品(由

PE制成)的波谱.

实验采用的是标准的THz时域光谱测量装置. THz辐射由[100]取向的InAs基片产生, 激光器采用光谱物理公司的Hurricane掺钛蓝宝石飞秒激光器(美国), 中心波长在800 nm, 脉宽为100 fs. THz辐射通过一对抛物镜面被收集、调整并聚焦到样品上. THz辐射透过样品后, 又被重新调整并通过光电效应被[110]取向的ZnTe晶体检测到. 所有得到的参考和样品的实验波形通过傅里叶变换得到 $E_s(\omega)$ 和 $E_r(\omega)$, 样品在THz波段的透射谱可以表示为 $E_s(\omega)/E_r(\omega)$. 这样, 可以除去系统响应对实验数据的影响. 在实验中, 剪除了实验波形的反射信号, 从而避免了样品的多层反射以及由标准距效应产生的干涉现象对实验数据的影响.

2 结果

2.1 光照引起的叶绿素a和β-胡萝卜素太赫兹时域光谱的变化

图2表示光照处理($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)和没处理过的叶绿素a和β-胡萝卜素的太赫兹时域光谱. 光谱表明, 叶绿素a和β-胡萝卜素的反应时间都比介质PE的有所延迟. 光胁迫下, β-胡萝卜素在反应时间上的变化程度比叶绿素a大.

2.2 光照引起的叶绿素a和β-胡萝卜素透射光谱的变化

图2中的时域光谱通过快速傅里叶变换形成

了图3中的频域透射谱图. 图3A和B表明, 在光照($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 5 min时, 叶绿素a的透射光谱向低频方向移动, 而在10 min时, 又恢复到初始状态(0 min时). 10 min后, 光谱又重新向低频方向移动, 而在15 min时移动幅度最大. 图3C和D显示, β-胡萝卜素的透射光谱在光照胁迫下也向低频方向移动, 并且最大移动幅度也发生在光照15 min时. 15 min后, 光谱又重新向高频方向移动. 太赫兹透射光谱的变化意味着叶绿素a和β-胡萝卜素的集体振动模发生了变化.

2.3 光照引起的叶绿素a和β-胡萝卜素太赫兹吸收光谱的变化

样品的吸收可表示为:

$$E_s(\omega) / E_r(\omega) = T(\omega) \exp[-\alpha d + i(n\omega d / c)],$$

其中, $T(\omega)$ 是反应因子, 它和发生在样品与PE窗口片之间界面上的反应有关, d 是样品厚度, α 是吸收系数, n 是样品折射率, c 是真空中光速. 图4A表示叶绿素a在0.25~2 THz范围内的太赫兹吸收光谱. 和对照相比, 光照($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 5 min时谱线的斜率降低了, 光照10 min时又恢复到初始水平. 光照10 min后, 谱线斜率又开始下降. 到光照15 min时, 谱线基本变平. 另外, 光照30和50 min时的谱线十分相近. 图4B显示了β-胡萝卜素在0.25~2 THz范围内的太赫兹吸收光谱. 光照15 min前, 谱线没有表现出很大变化. 光照15 min时, 谱线斜率上升. 光照30 min时, 谱线斜率又恢复到初始状态. 太赫兹吸收光谱的变化也表明了叶绿素a和β-胡萝卜素的集体振动模发生了变化.

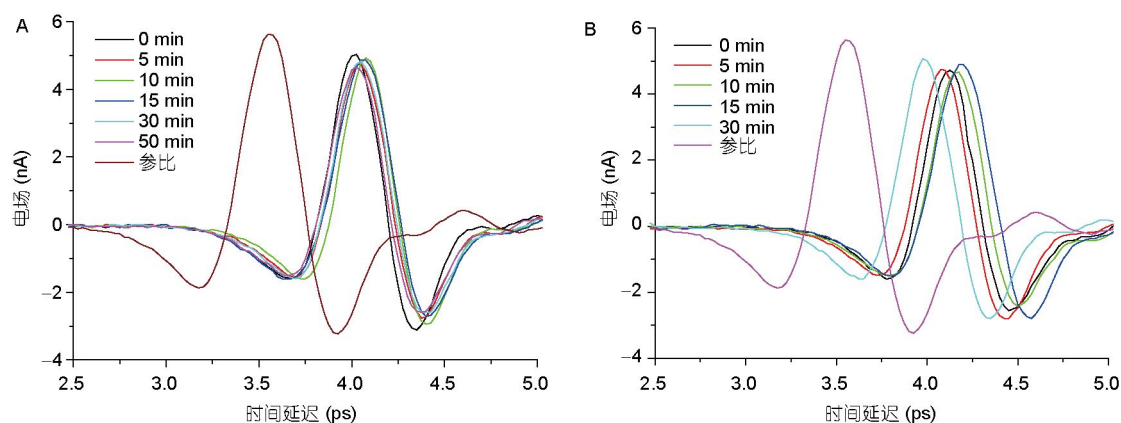


图2 叶绿素a (A)和β-胡萝卜素(B)的太赫兹时域光谱

光照强度为 $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 光照时间分别为0, 5, 10, 15, 30, 50 min. 参考曲线来自于PE

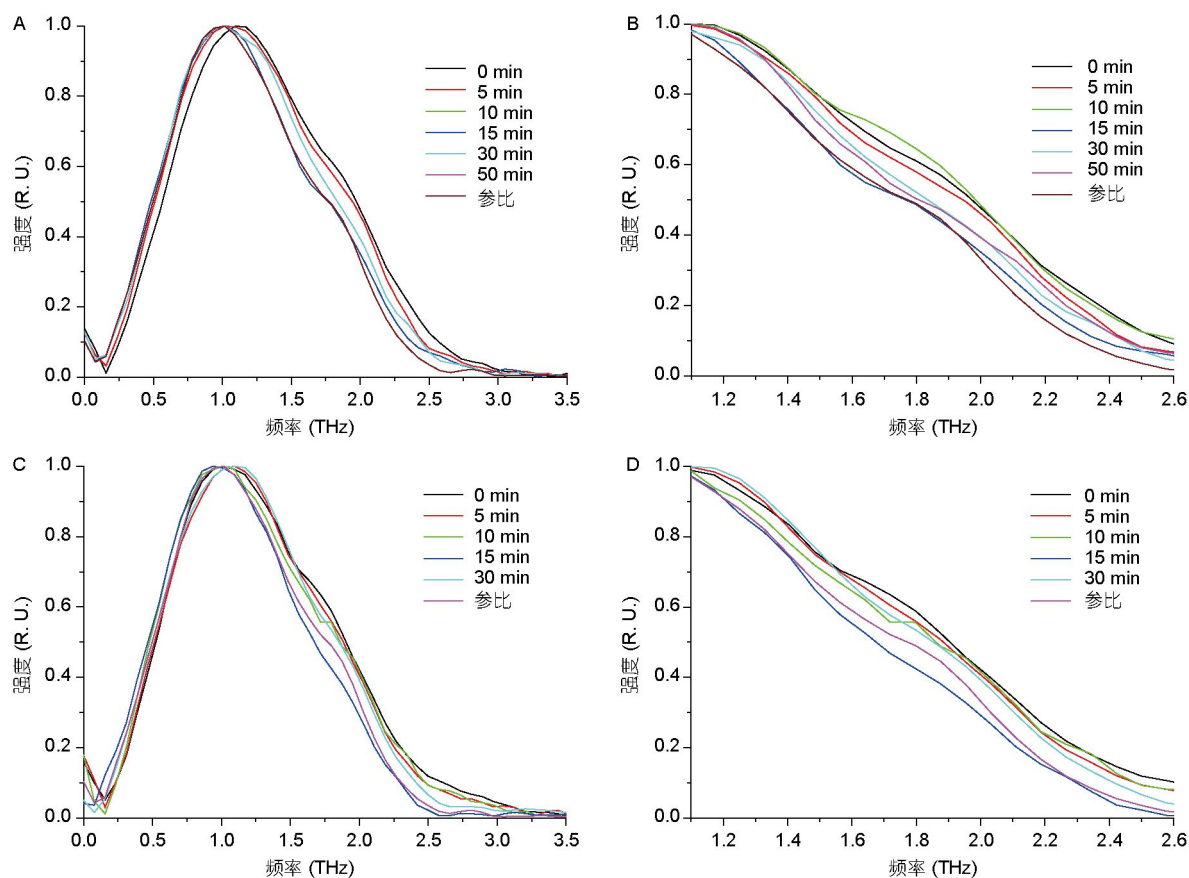


图3 叶绿素a (A, B)和 β -胡萝卜素(C, D)的傅里叶转换透射光谱

(B)和(D)分别是(A)和(C)的部分放大. 光强度为 $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 叶绿素a的光照时间分别为0, 5, 10, 15, 30, 50 min. β -胡萝卜素的光照时间分别为0, 5, 10, 15, 30 min. 参考曲线来自于PE. 所有曲线都以参考曲线的峰值为标准进行归一化

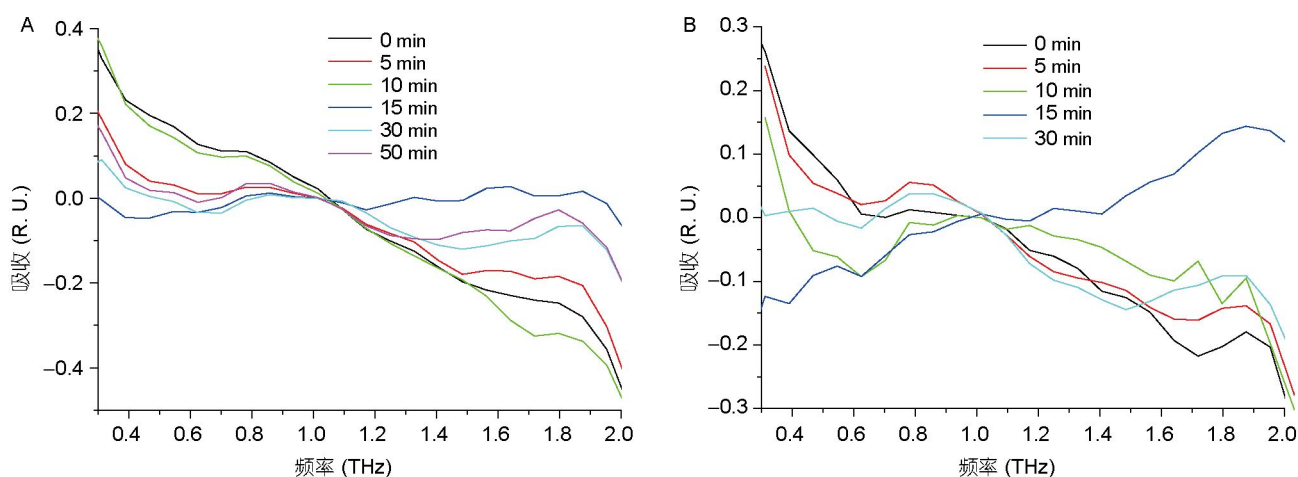


图4 叶绿素a (A)和 β -胡萝卜素(B)在0.25~2 THz范围内的太赫兹吸收光谱

光强度为 $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 光照时间分别为0, 5, 10, 15, 30, 50 min

2.4 光照引起的叶绿素a可见区吸收光谱的变化

图5显示叶绿素a在可见区的吸收光谱有两个吸收峰, 峰位分别是432和660 nm. 在光照($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)处理下, 这2个峰的峰值都下降了. 当光照处理0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60 min时, 叶绿素a在660 nm处的峰值分别下降了11%, 26%, 40%, 48%, 55%, 65%和85%. 另外, 光照下叶绿素a的绿色也逐渐消失(图6). 叶绿素a分子中吸收光的部位是其四吡咯环, 也就是分子的头部. 因此, 上述结果表明光照下叶绿素a分子的头部被逐渐分解了.

3 讨论

光照下叶绿素a的分解(图5和6)说明可见吸收光

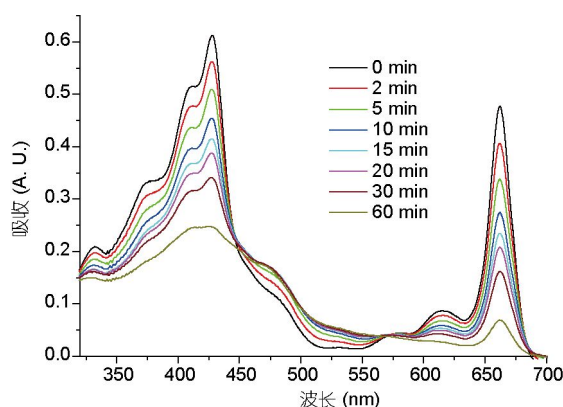


图5 $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的强光照射下, 叶绿素a可见区吸收光谱的变化

光谱曲线从上到下分别对应着光照0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60 min时的样品

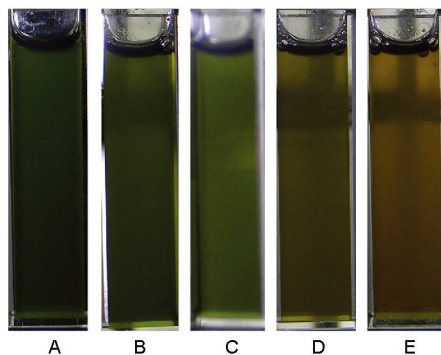


图6 $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的强光照射下, 叶绿素a颜色的变化
A, B, C, D, E分别表示光照0, 5, 15, 30, 60 min时的样品颜色

谱能检测生物大分子的分解程度.

根据以前的报道^[11,12]和基础物理原理分析可知, 对相同结构的一类分子来说, 分子量越小其振动频率也就越高. 图3A和B表明, 叶绿素a在接受光照时, 其透射光谱向低频方向移动. 这意味着叶绿素a分子被分解成了不同的分子, 而不仅是其侧链被缩短. Hörtensteiner^[13]曾经发现, 在强光照射下, 叶绿素a被分解成了叶绿素a酸酯、脱镁叶绿素甲酯酸a、红色叶绿素降解物(red chlorophyll catabolite, RCC)、原初荧光叶绿素降解产物(primary fluorescent chlorophyll catabolite, pFCC)、非荧光叶绿素降解物和四吡咯降解物. 图3中, 不同的透射谱线应由不同的降解产物所产生. 光照10 min时的分解产物可能和叶绿素a分子具有相似的透射谱, 因此谱线恢复到没接受光照时的状态. 这些结果说明, 太赫兹透射谱能用来检测生物大分子的分解过程, 尤其是检测新分子的形成, 即使不知道此种分子的结构. 事实上, 从图4A可看出, 太赫兹区域的吸收光谱也具有这种检测功能, 而可见区的吸收光谱则没有这种功能.

β-胡萝卜素是较为稳定的色素分子之一^[14]. 在本研究的实验条件下, β-胡萝卜素在可见区的吸收光谱没有变化(没有显示数据), 这表明β-胡萝卜素的共轭双键没有断裂, 构型没有发生变化. 从图3C, D和图4B可看出, β-胡萝卜素在太赫兹区域的透射和吸收光谱都发生了变化. 这说明在光照条件下, β-胡萝卜素的集体振动模发生了变化. 上述结果也意味着太赫兹光谱对分子集体振动模的变化十分敏感, 尽管它们的构型没有发生变化.

当光照强度超过植物叶片光合作用所能利用的水平时, 往往会产生光合强度下降或光合器官被破坏的现象, 这种强光效应被称作光抑制^[15,16]. 一些实验证明, 低强度的光照也可能引起光抑制^[17]. 光抑制主要发生在光系统II, 但其产生的机制现在还不是很清楚. 光系统II的天线色素分子吸收的光能以多种形式耗散, 如以荧光的形式耗散、以非辐射的热能形式耗散、传递给光系统I或通过光系统II的光化学反应散失^[18]. 有证据表明, 叶绿体类囊体膜上天线或反应中心激发态叶绿素的热耗散增加, 可能会导致光抑制^[19]. 本研究结果表明, 在光处理下, 分子的振动模发生了变化. 从热力学的角度来看, 分子振动模的变

化与分子热能的变化相对应,而不是与荧光或其他因素相对应.因此,这些都证明光抑制的产生确实与光照下色素的热耗散增加有关.这种效应是一种上调还是下调作用,有待于进一步研究.

“Förster”共振能量传递(Förster resonance energy transfer, FRET)机制阐述了在两个光敏感分子(生色

团)之间的能量传递方式.处于电子激发态作为供体的生色团,可以通过非辐射的偶极-偶极耦合将能量传递给受体生色团^[20].这种能量传递机制涉及分子内和分子间的振动^[21].在强光照射时,叶绿素a和 β -胡萝卜素集体振动模都发生了变化,这意味着高光强能影响色素间的能量传递,这应是光抑制的原因之一.

参考文献

- Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Photosynthetic pigments in diatoms. *Mar Drugs*, 2015, 13: 5847–5881
- Domonkos I, Kis M, Gombos Z, et al. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Prog Lipid Res*, 2013, 52: 539–561
- Barber J. Photosystem two. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1365: 269–277
- Zhang W T, Nie J Y, Tu Shan. Study on identification methods in the detection of transgenic material based on terahertz time domain spectroscopy. *Opt Quant Electron*, 2015, 47: 3533–3543
- Kingsley R S, Shelley J, James E B. photosynthesis. In: Kingsley R S, Shelley J, James E B, eds. *Introductory Plant Biology*. New York: McGraw-Hill Companies, 2003. 172–186
- Markelz A, Whitmire S, Hillebrecht J, et al. THz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes. *Phys Med Biol*, 2002, 47: 3797–3805
- Whitmire S E, Wolpert D, Markelz A G, et al. Protein flexibility and conformational state: a comparison of collective vibrational modes of wild-type and D96N bacteriorhodopsin. *Biophys J*, 2003, 85: 1269–1277
- Wilmink G J, Grundt J E. Invited review article: current state of research on biological effects of terahertz radiation. *J Infrared Milli Terahz Waves*, 2011, 32: 1074–1122
- Xie L, Yao Y, Ying Y. The application of terahertz spectroscopy to protein detection: a review. *Appl Spectrosc Rev*, 2014, 49: 448–461
- Zhang C X. The first artificial Mn4Ca-cluster mimicking the oxygen-evolving center in photosystem II. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 816–817
- Walther M, Plochocka P, Fischer B, et al. Collective vibrational modes in biological molecules investigated by terahertz time-domain spectroscopy. *Biopolymers*, 2002, 67: 310–313
- Korter T M, Balu R, Campbell M B, et al. Terahertz spectroscopy of solid serine and cysteine. *Chem Phys Lett*, 2006, 418: 65–70
- Hörtensteiner S. Chlorophyll degradation during senescence. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 55–77
- Zhang L W, Zuo J, Zhang C L. Observation of terahertz spectra of all-trans β -Carotene. *Spectrosc Spect Anal*, 2014, 34: 405–406
- Allahverdieva Y, Aro E M. Photosynthetic responses of plants to excess light: mechanisms and conditions for photoinhibition, excess energy dissipation and repair. In: Eaton-Rye J J, Tripathy B C, Sharkey T D, eds. *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht: Springer, 2012. 275–297
- Ohad I, Berg A, Berkowicz S M, et al. Photoinactivation of photosystem II: is there more than one way to skin a cat? *Physiol Plant*, 2011, 142: 79–86
- Tyystjärvi E. Photoinhibition of photosystem II. *Int Rev Cel Mol Bio*, 2013, 300: 243–302
- Björkman O. High-irradiance stress in higher plants and interaction with other stress factors. In: Biggins J, eds. *Progress in Photosynthesis Research*. Dordrecht: Springer, 1987. 11–18
- Öquist G. Stress and adaptation in photosynthesis. In: Douglas R H, Moan J, Acqua F D, eds. *Light in Biology and Medicine*. New York: Plenum Press, 1988. 433–440
- Cheng P C. The Contrast formation in optical microscopy. In: James B P. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York: Springer, 2006. 162–206
- May V, Kühn O. *Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2011