



## P700氧化还原动力学的测量方法及原理

张春艳\*

中国科学院植物研究所, 中国科学院光生物学重点实验室, 北京 100093

**摘要** P700氧化还原动力学技术可快速且无损地检测植物光系统I (PSI)的活性, 是光合研究领域广泛使用的一种技术。该文系统归纳了P700氧化还原动力学的主要测量方法, 详细阐述其原理并探讨该技术的局限性, 旨在为深入研究光合作用机理提供技术支持。

**关键词** P700氧化还原动力学技术, PSI功能

张春艳 (2020). P700氧化还原动力学的测量方法及原理. 植物学报 55, 740–748.

光合作用是地球上进行的最大规模的化学反应。放氧光合生物吸收太阳能并裂解水分子, 释放出地球上绝大多数生命活动所需的氧气, 同时固定大气或水中的CO<sub>2</sub>并合成有机物, 为新陈代谢提供能量。在高等植物和真核藻类中, 叶绿体是光合作用的场所。叶绿体的类囊体膜上排布着4个膜蛋白复合物: 光系统II (PSII)、细胞色素 $b_6f$  (Cyt $b_6f$ )、光系统I (PSI)和腺苷三磷酸合酶(ATP synthase)。它们紧密协作, 共同完成光能吸收、电子传递和能量转化, 最终合成腺苷三磷酸(ATP)和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶II) (NADPH)。其中, PSI主要参与光合电子传递的最终步骤, 即氧化类囊体囊腔侧的质体蓝素(PC), 还原基质侧的铁氧还蛋白(Fd) (Brettel and Leibl, 2001)。PSI由核心复合物(即反应中心)及其周围的捕光天线复合物(light-harvesting complex I, LHCI)组成, 核心复合物负责电荷分离和电子传递, 而外周捕光天线复合物负责捕获和传递光能, 并进行光保护(郁飞等, 2001)。目前, 豌豆(*Pisum sativum*)和绿藻(假根羽藻(*Bryopsis corticulans*)) PSI-LHCI、红藻(*Cyanidioschyzon merolae*) PSI-LHCR、蓝细菌(*Synechococcus elongatus*) PSI三聚体以及蓝细菌(*Synechococcus* 7942) PSI-IsiA和PSI-IsiA-Fld超级复合物的晶体结构已得到解析, 为深入研究PSI捕获光能以及电子传递和光能转化奠定了结构基础

(Jordan et al., 2001; Amunts et al., 2007; Amunts and Nelson, 2009; Qin et al., 2015, 2019; Pi et al., 2018; Cao et al., 2020)。此外, 人们对PSI组装的分子机制(Liu et al., 2012; Yang et al., 2015, 2017)以及LHCI的功能也进行了相关研究(Mozzo et al., 2010)。

PSI的反应中心有1个具有光化学反应性的叶绿素a分子二聚体, 即P700 (Kok, 1957)。P700在300–830 nm光谱范围内有广泛的吸收, 其中在430和700 nm处有吸收负峰, 最大吸收负峰在700 nm处, 而在800 nm左右有吸收正带(Ke, 1973)。此外, P700可被不同波段的光(又称活化光)激发, 转变为具有高能电子的激发态分子P700\*, P700\*射出电子后变成P700<sup>+</sup>, P700<sup>+</sup>从还原的PC捕获电子重新变成P700(沈同等, 1991)。对于P700而言, 可见光范围内的光和720 nm的远红光都可作为活化光, 其中红光既可激发PSII, 使PSII反应中心进行电荷分离产生电子, 又可以使一部分P700将电子传递给PSI的电子受体, 从而变成P700<sup>+</sup>, 而远红光仅激发PSI。P700的氧化与还原不仅反映流经和围绕PSI的电子传递, 还反映PSI甚至PSII的功能。

P700的氧化与还原可通过700 nm (最大吸收负峰)的光吸收变化来检测, 但对叶片来说, 其光散射比较严重, 加之叶绿素荧光的干扰, 所以在700 nm处的光吸收非常复杂, 难以表征P700的氧化与还原

收稿日期: 2020-04-20; 接受日期: 2020-08-26

基金项目: 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(No.2018g0048)

\* E-mail: zhangchunyan@ibcas.ac.cn

(Schreiber et al., 1988)。Weis等(1987)发现, 用820 nm处的近红外光吸收变化可以很好地测量稳态光照下活体叶片P700的氧化状态, 而且820 nm处的光不会被PSII吸收, 因此也不会有叶绿素荧光的干扰。Schreiber等(1988)通过测量单一波长820 nm处的光吸收变化检测P700的氧化还原, 该方法适合叶绿体、单细胞藻类和活体叶片。但是离体叶绿体以及藻类悬浮液存在的光散射以及PC在800–900 nm范围内的光吸收等干扰因素都会影响P700的检测, 从而导致P700检测信号弱、信噪比低及信号漂移等问题。Klughammer和Schreiber (1998)利用双波长差示吸收技术检测P700的光吸收变化(810–860 nm), 很好地降低了由单一波长测量导致的影响。此外, Klughammer和Schreiber (1994)利用饱和脉冲技术检测P700在830 nm处的光吸收变化, 区分出了有活性的、具有开放受体侧的PSI反应中心以及具有还原受体侧、关闭的PSI反应中心, 从而估算PSI的光化学量子产量。Klughammer和Schreiber (2008)利用饱和脉冲技术, 通过检测P700在近红外(830–875 nm)的差示吸收变化计算PSI的能量转化。

P700氧化还原动力学技术可实现快速、无损、原位和活体检测。目前, 检测P700氧化还原动力学的仪器主要有LED激发-探测光谱仪(JTS-10, Bio-Logic SAS, France)、调制叶绿素荧光仪(PAM-101, Walz, Germany)、双通道调制叶绿素荧光仪(DUAL-PAM-100, Walz, Germany)和四通道动态LED阵列近红外光谱仪(DUAL-KLAS-NIR, Walz, Germany)等, 上述4种仪器检测的时间分辨率分别为10、10、30和35微秒。LED激发-探测光谱仪可分别检测P700在705–730/740 nm和810–880 nm的光吸收变化, 活化光可选择绿光、橙光、红光或远红光等。该仪器信噪比高, 尤其适合测量较低浓度的藻类悬浮液样品, 且软件可校正漂移的基线、在线比较样品间P700氧还能力及氧还速率的差异等。其它3种设备由德国Walz公司研发, 可分别检测P700在810–870 nm、830–875 nm和820–870 nm的光吸收变化, 活化光均可选择蓝光、红光或远红光。这3种仪器非常适合测量高等植物叶片的P700氧化还原变化, 尤其是双通道调制叶绿素荧光仪和四通道动态LED阵列近红外光谱仪可将所需的光源进行整合, 不再需要更换滤光片和检测模块等配件, 且软件既可运行固定程序又可进行手动

操作, 灵活性强。目前, 上述仪器常用的活化光光源是LED、氙灯或激光, 活化光的光强可根据需要灵活选择。下面介绍4种主要的P700氧化还原动力学的测量方法和原理。

## 1 活化光诱导的P700氧化还原动力学

活化光诱导的P700氧化还原动力学是将暗适应的藻类或高等植物进行光-暗诱导, 以此确定P700<sup>+</sup>的氧化程度、P700的氧化速率和P700<sup>+</sup>再还原速率(Harbinson and Hedley, 1993)。活化光可选择仅激发PSI的远红光, 也可选择激发PSII和PSI的红光、橙光和绿光等。测量过程如图1所示。将暗适应的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)放在LED激发-探测光谱仪的样品池内, 检测P700在705 nm处的光吸收变化, 活化光是620 nm的红光。莱茵衣藻经过活化光激发后, P700在705 nm处的光吸收迅速增加, P700开始氧化并将电子传递给铁氧还蛋白(Fd)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)等PSI的电子受体。随着光照时间的延长, 逐渐形成稳定的P700<sup>+</sup>库(姚正菊等, 2002)。根据样品的不同, P700<sup>+</sup>在几秒到几分钟内缓慢增加至稳态的P700<sup>+</sup>库(Andreeva and Tikhonov, 1983; Harbinson and Woodward, 1987)。活化光的光强会影响P700的氧化速率以及稳态P700<sup>+</sup>库的量(图1)(Alric et al., 2010)。活化光关闭后, 光下积累的电子(包括来源于线式和环式电子传递链)经过光合链上的电子递体质体醌(PQ)和Cytb<sub>6/f</sub>复合体传递给P700<sup>+</sup>, P700在705 nm处的吸收也逐渐降至活化光打开前的稳定状态, 此时P700<sup>+</sup>还原为P700(姚正菊等, 2002)。体外(Haehnel, 1984)和体内(Maxwell and Biggins, 1976; Harbinson and Hedley, 1989)实验表明, 稳态的P700<sup>+</sup>再还原到P700的t<sub>1/2</sub>时间是微秒级。为减少非特异性光吸收的影响, P700在705 nm处的光吸收要减去其在730 nm或740 nm处的光吸收变化(Iwai et al., 2010; Takahashi et al., 2013)。

根据活化光打开后P700达到2/3稳定氧化态时的时间倒数可计算PSI的天线大小, 在不同生长光强下培养的莱茵衣藻, 其PSI的天线大小并未发生变化(Bonente et al., 2012)。体外分离的PSI核心蛋白以及外周天线复合物(Ballottari et al., 2014; Cao et al.,

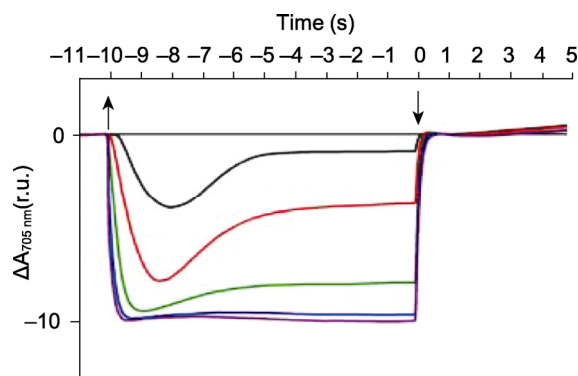


图1 活化光诱导的P700氧化还原动力学(改自Alric et al., 2010)

620 nm的红光光强为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (黑色)、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (红色)、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (绿色)、 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (蓝色)、 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (紫色)。莱茵衣藻野生型加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氯苯基二甲脲(DCMU)和 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 羟胺(HA)。

**Figure 1** The curves of P700 redox kinetics induced by actinic lights (modified from Alric et al., 2010)

The red light intensity (620 nm) is approximately  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (black),  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (red),  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (green),  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (blue),  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (purple). Wild type algae is incubated with  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) and  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  hydroxylamine (HA).

2020)或者类囊体膜样品在加入电子供体(如抗坏血酸)和电子受体(如甲基紫精)后也可检测PSI的天线大小。根据活化光关闭后稳态 $\text{P700}^+$ 库的再还原速率等于流经PSI的电子传递速率(包括线式和环式),在加入线式电子传递阻断剂后,可判断围绕PSI的环式电子传递活性(Joliot and Joliot, 2005; Iwai et al., 2010; 高坤山, 2014)。二溴百里香醌(DBMIB,  $\text{Cytb}_6/f$ 抑制剂)和二氯苯基二甲脲(DCMU, PSII抑制剂)是常用的研究环式电子传递活性的抑制剂,可极大降低或阻断来自PSI上游的线式电子,从而导致P700氧化速率变快,稳态的 $\text{P700}^+$ 库增多(Alric et al., 2010)。将莱茵衣藻厌氧处理35分钟后,其环式电子传递速率比有氧条件下明显提高(Takahashi et al., 2013)。根据远红光照光后稳态 $\text{P700}^+$ 库的大小可判断PSI的光合功能是否受到损伤(Liu et al., 2012; Fristedt et al., 2014; Zhou et al., 2017)。此外, Nguyen等(2017)通过分析嗜热蓝藻(*Thermosynechococcus elongatus*) PSI三体与其电子供体-细胞色素 $\text{C}_6$ 组合体的P700氧化还原动力学,发现P700氧化与还原受很多因素的

影响,如检测温度、pH值和离子浓度,且不同的活化光源会造成结果的差异性,改变活化光的光强和持续时间可消除此影响。该方法的缺点是,由于环式电子流的存在,活化光很难将P700完全氧化。

## 2 饱和脉冲法计算PSI的光化学量子产量

饱和脉冲(saturation pulse, SP)是一种特殊的活化光,光强可达 $40\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,持续时间一般在1–800毫秒,这个时间可使一个PSII反应中心发生多次电荷分离,产生的电子足以将PSII次级电子受体PQ完全还原,PSII反应中心完全关闭。同样,SP也可暂时阻断流经PSI的电子传递。SP关闭后,电子传递又会在极短的时间内恢复运转,而不会对样品造成破坏,因此SP是P700氧化还原动力学研究中常用的一种光。PSI吸收光能后用于光化学反应的能量可以用光化学量子产量表示,它反映了PSI的光合功能,其测量过程如图2所示。将暗适应20分钟的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶片剪下,放置在有镜面的比色杯内,使用PAM-101双波长检测单元ED-P700DW (810–870 nm) (Walz, Germany)进行P700氧化还原动力学测定。630 nm的活化光(约 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,持续30秒)可将一小部分P700氧化,该活化光开关引起P700在820 nm处光吸收的变化(即 $\Delta A$ )。之后720 nm的远红光(约 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,持续30秒)会再次诱导P700的氧化。在远红光照光期间施加饱和脉冲(约 $3\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,持续800毫秒),P700在820 nm处的光吸收瞬间达到峰值,P700被完全氧化。随后饱和脉冲诱导产生的大量电子使 $\text{P700}^+$ 瞬间还原,达到完全还原状态。饱和脉冲开关引起P700在820 nm处的光吸收的变化(即 $\Delta A_{\text{max}}$ )。Klughammer和Schreiber (1994)认为,样品经活化光照光后处于还原状态的PSI反应中心(即 $\Delta A_{\text{max}} - \Delta A$ )都是开放且有活性的,依此可以估算PSI的光化学量子产量 $(\Delta A_{\text{max}} - \Delta A) / \Delta A_{\text{max}}$ 。该方法的缺点是无法区分出由于PSI受体侧受限制导致的处于关闭状态的PSI反应中心。需要特别指出的是,有研究将 $\Delta A_{\text{max}}$ 定义为远红光开关引起的P700光吸收的变化(Meurer et al., 1996; Varotto et al., 2000)。

根据P700氧化还原动力学并结合叶绿素荧光参数可判断PSI功能是否受到影响,并区分这些影响是

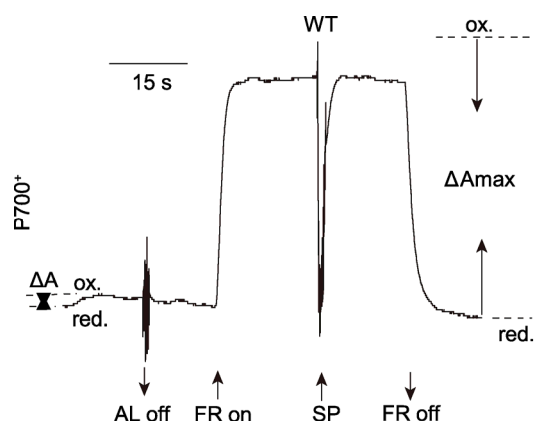


图2 饱和脉冲法计算PSI光化学量子产量Y(I) (改自Yang et al., 2017)

AL: 活化光 ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); FR: 远红光 ( $720 \text{ nm}$ ,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); SP: 饱和脉冲 ( $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ );  $\Delta A$ : 活化光诱导的部分氧化的P700;  $\Delta A_{\text{max}}$ : 最大光氧化的P700; ox.: 氧化状态的P700; red.: 还原状态的P700

Figure 2 The saturation pulse method for determination of Y(I) (modified from Yang et al., 2017)

AL: Actinic light ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); FR: Far-red light ( $720 \text{ nm}$ ,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); SP: Saturation pulse ( $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ );  $\Delta A$ : Partial photo-oxidizable P700 induced by AL;  $\Delta A_{\text{max}}$ : Maximum photo-oxidizable P700; ox.: P700 oxidation; red.: P700 reduction

来自PSI本身、电子传递链上游的PSII、还是电子传递链间的电子递体。例如, 拟南芥*ppd1*突变体在 $820 \text{ nm}$ 处检测不到任何光吸收(Liu et al., 2012), 或者仅有很少的光吸收(*pyg7*突变体) (Yang et al., 2017), 表明突变体PSI功能完全丧失或严重受损, 且导致上游PSII功能受到影响, 表现出强荧光。拟南芥*hcf107*突变体的P700氧化还原动力学表现出较高的 $\Delta A$ 值和较低的 $\Delta A_{\text{max}}$ 值, 而且在远红光照光过程中施加饱和脉冲光, P700完全没有被还原, 且检测不到叶绿素荧光参数可变荧光 $F_v$ , 表明PSII功能完全缺失, PSI接收不到任何来自上游PSII的电子, PSI功能也因此受到损伤。如果饱和脉冲能够还原P700, 但并没有将其完全还原, 叶绿素荧光参数 $F_v/F_m$ 在0.5以上, 表明PSII与PSI之间的电子传递可能受阻, 从而导致异常的P700氧化还原动力学(*hcf118*突变体) (Meurer et al., 1996)。

### 3 饱和脉冲法计算PSI的能量转化

该方法可区分开放的PSI反应中心P700 A (b)和受体

侧受限制导致的关闭PSI反应中心P700 A<sup>-</sup> (c) (图3A)。当样品处于持续的活化光照光时, 活化光会使一部分P700氧化, 引起一部分PSI反应中心关闭, 从而产生PSI电子供体侧受限制的状态, 这部分PSI反应中心为P700<sup>+</sup> A (a)。活化光关闭, 同时施加强饱和脉冲( $10\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )时则可以使全部有活性的、开放的PSI反应中心P700 A (b)完全氧化, 变成P700<sup>+</sup> A<sup>-</sup>。随着电子不断传递给下游开放状态的PSI受体侧, P700<sup>+</sup> A<sup>-</sup>很快转变成P700<sup>+</sup> A。由于强饱和脉冲使得PSI供体侧各电子递体完全氧化, 因此被氧化的P700<sup>+</sup>不会被还原, 而且在施加强饱和脉冲后的几微秒内, PSI的下游电子受体不会累积电子, 所以P700<sup>+</sup> A<sup>-</sup>不太可能转变成P700 A<sup>-</sup> (Klughammer and Schreiber, 1994)。饱和脉冲关闭后, 样品处于黑暗状态, P700回到完全还原状态。远红光打开后, P700逐渐形成稳定的P700<sup>+</sup>库, 远红光关闭时施加强饱和脉冲( $10\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 持续200毫秒), P700在几微秒内就已达到完全氧化状态, 在此期间来自PSII的电子尚未到达PSI (Klughammer and Schreiber, 2008)。饱和脉冲法将P700的反应中心分成3部分: 由于供体侧受限制导致的关闭的PSI反应中心P700<sup>+</sup> A (a)、有活性且开放的PSI反应中心P700 A (b)和由于受体侧受限制导致的关闭的PSI反应中心P700 A<sup>-</sup> (c)。因此, 有活性的、开放的PSI反应中心的光化学量子产量是 $Y(I)=b/(a+b+c)=(P_m-P)/(P_m-P_o)$ , 由于PSI电子供体侧受限制引起的非光化学量子产量是 $Y(ND)=a/(a+b+c)=(P-P_o)/(P_m-P_o)$ , 由于PSI电子受体侧受限制引起的非光化学量子产量是 $Y(NA)=c/(a+b+c)=(P_m-P_m')/(P_m-P_o)$ , 而且 $Y(I)+Y(ND)+Y(NA)=1$  (Klughammer and Schreiber, 2008)。

用饱和脉冲法计算PSI能量转化的具体测量过程如图3B所示。将暗适应20分钟的拟南芥叶片剪下并放置在叶室内, 利用饱和脉冲法进行P700氧化还原动力学测定(DUAL-PAM-100, Walz, Germany)。测量开始时打开测量光( $830\text{--}875 \text{ nm}$ ), 待基线平稳后, 打开远红光, P700逐渐形成稳定的P700<sup>+</sup>库, 远红光(约 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )持续10秒后关闭, 同时打开强饱和脉冲( $10\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 持续200毫秒), P700达到完全氧化状态( $P_m$ )。饱和脉冲关闭后, P700的光吸收迅速下降并且达到平稳, 此时P700处于完全还原状态( $P_o$ )。约40秒后, 打开 $630 \text{ nm}$ 的活化光



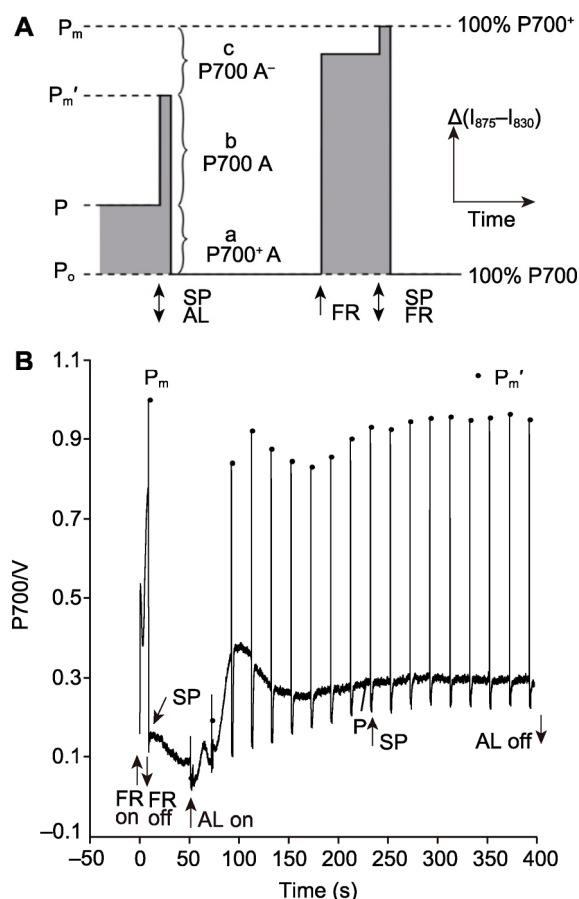


图3 利用饱和脉冲法计算PSI能量转化

(A)利用饱和脉冲法计算PSI能量转化的原理示意图(改编自 Klughammer and Schreiber, 2008); (B) 利用饱和脉冲法计算PSI能量转化的测量曲线。AL: 活化光; SP: 饱和脉冲 ( $10000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); FR: 远红光(720 nm);  $P_0$ : 远红光和饱和脉冲关闭后, 全部PSI反应中心处于完全还原状态, 此时P700信号是0;  $P$ : 活化光照过程中, 部分PSI反应中心被氧化的P700信号;  $P_m'$ : 活化光关闭, 具有开放、有活性的PSI反应中心被饱和脉冲完全氧化的P700信号;  $P_m$ : 远红光关闭, 全部PSI反应中心被饱和脉冲完全氧化的P700信号; a P700<sup>+</sup> A: 由于PSI电子供体侧限制导致的关闭的PSI反应中心; A: PSI的下游电子受体; b P700 A: 开放的PSI反应中心; c P700 A<sup>-</sup>: 由于PSI电子受体侧限制导致的关闭的PSI反应中心; a、b、c是PSI反应中心的3个部分, b是开放的、有活性的, 其光化学量子产量定义为1, 而a和c是关闭的、没有活性的, 其光化学量子产量定义为0。

Figure 3 The saturation pulse method for determination of efficiency of energy conversion in PSI

(A) Principle of saturation pulse method for determination of efficiency of energy conversion in PSI (modified from Klughammer and Schreiber, 2008); (B) Curve of saturation pulse method for determination of efficiency of energy conversion in PSI. AL: Actinic light; SP: Saturation pulse

( $10000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); FR: Far-red light (720 nm);  $P_0$ : Complete reduction is induced after the cessation of SP and far-red light with the zero P700 signal;  $P$ : In the presence of AL, a part of the PSI centers are oxidized by the AL resulting in an intermediate P700 signal;  $P_m'$ : A part of the PSI centers are oxidized completely by the SP with the maximal P700 signal after the AL is turned off;  $P_m$ : All the PSI centers are oxidized completely by the SP with the maximal P700 signal after FR pre-illumination; a P700<sup>+</sup> A: Donor-side limited closed centers; A: The effective ensemble of PSI acceptors, the same as below; b P700 A: Open centers P700A; c P700 A<sup>-</sup>: Acceptor-side limited closed centers. a, b, c are the three parts of all PSI centers, b is open and active, and the photochemical quantum yield is unity, while a and c are closed and inactive, and the photochemical quantum yield is 0.

(约  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 一部分P700开始被氧化, 活化光打开1秒后再打开强饱和脉冲, 有活性的、开放的PSI反应中心被完全氧化( $P_m'$ ), 之后每隔20秒打开强饱和脉冲(饱和脉冲的间隔时间可根据样品和饱和脉冲的光强等调整), 直至 $P_m'$ 达到稳定。根据 $P_0$ 、 $P$ 、 $P_m'$ 和 $P_m$ 计算PSI的能量转化。可靠的 $P_m$ 测定是正确计算PSI能量转化的前提, 因此饱和脉冲的光强设置和持续时间非常关键。藻类和苔藓等样品饱和脉冲光强一般在  $6000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  左右, 高等植物饱和脉冲光强一般在  $10000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  左右。当测定P700氧化还原动力学时出现 $P_m'$ 大于 $P_m$ 时, 说明饱和脉冲的光强不够高, P700没有达到最大氧化态。此外, 在饱和脉冲持续时间内, 根据样品有无达到稳定的氧化状态可判断饱和脉冲的持续时间是否合适。对于高等植物样品, 饱和脉冲的持续时间一般为200毫秒左右, 藻类等悬浮液样品的饱和脉冲持续时间一般在50–200毫秒。

当PSI功能受损时,  $Y(I)$ 会降低, 而 $Y(ND)$ 和 $Y(NA)$ 也会发生相应的变化。拟南芥 *vte6* 是特异影响PSI功能的突变体, 该突变体中PSI的第2个电子受体——叶绿醌( $A_1$ )含量极低。用饱和脉冲法检测该突变体的PSI能量转化时发现突变体 $Y(I)$ 比野生型低, 而 $Y(NA)$ 与野生型相比则处于较高的水平, 说明在 *vte6* 突变体中, 由于 $A_1$ 的缺失导致 $A_0$ 到 $F_x$ 的电子传递受阻, PSI反应中心P700不能被有效地氧化, 从而产生大量的能量耗散。在 *vte6* 突变体中,  $Y(ND)$ 很小, 说明PSI反应中心P700可有效接收PSII传来的电子, 并完全被还原(Wang et al., 2017)。拟南芥 *pyg7* 突变体RNAi系表现出与 *vte6* 突变体相似的PSI量子产量变化

(Yang et al., 2017)。在照光条件下, 缺乏叶绿素**b**的大麦(*Hordeum vulgare*)突变体, 其PSII天线小, 吸光差, PSII的电荷分离低, 从而导致PSI供体侧受限制的能量耗散Y(ND)比野生型高3倍; 而在黑暗条件下, 大麦突变体的Y(NA)却比野生型高2倍多, 可能是其PSI受体库库容较小所致(Pfündel et al., 2008)。

#### 4 P700氧化还原动力学检测光系统间的电子载体库

P700氧化还原动力学不仅可以检测PSI的光合功能, 还可以检测光系统间电子载体库的大小, 其测量过程是在远红光诱导P700氧化还原动力学的基础上施加单周转饱和脉冲(single turnover flash, ST)和多周转饱和脉冲(multiple turnover flash, MT) (图4)。ST光照强度很高(约200 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 与仪器配置相关), 持续时间一般在5–50微秒, 这个时间可使每个PSI反应中心发生多次电荷分离; 而PSII反应中心仅发生1次电荷分离, PSII产生的1个电子经过光系统间各电子递体被迅速传递给PSI (约几毫秒), 使得氧化态的P700快速还原。由于远红光的持续照光, P700又快速达到原来的稳定氧化状态。MT (光照强度约

20 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )持续时间一般在1–800毫秒, 这个时间可使每个PSII反应中心发生多次电荷分离且产生大量电子。MT会诱导P700瞬间达到最大氧化态, 然后被流经PSI的大量电子完全还原。远红光持续照光会使P700再次氧化, 同时还有足够多来自PSII的电子又使氧化态的P700不断还原, 故此时P700的再氧化速度明显低于ST关闭后的再氧化速度。MT和ST引起的曲线下降与水平线(稳定P700<sup>+</sup>库)之间的面积称为P700氧化还原动力学面积, 两者的面积之比可衡量光系统间电子载体库的大小(Schreiber et al., 1988; Asada et al., 1992)。比值的大小与植物物种以及生长的光环境相关(Schreiber et al., 1988)。由ST引起的P700氧化还原动力学面积可以反映活性PSII的相对含量(Losciale et al., 2008; Kou et al., 2012)。

#### 5 P700氧化还原动力学技术的局限性

P700氧化还原动力学技术的局限性主要集中在2个方面: 检测设备的灵敏性和检测过程的干扰因素。目前, 检测P700氧化还原动力学的设备, 其最高时间分辨率是10微秒。在光合电子传递链中, PC被PSI氧化大约需要10微秒, 而PSI被光激发后, 产生的电子依次传递给叶绿素分子(A<sub>0</sub>)、A<sub>1</sub>, 以及铁硫簇反应中心的F<sub>X</sub>、F<sub>A</sub>和F<sub>B</sub>, 最后传递给Fd, 整个过程在皮秒到纳秒内完成(Hiyama and Ke, 1971; Vassiliev et al., 1998; Díaz-Quintana et al., 1998)。P700的氧化与还原可在极短的时间内完成, 因此提高检测设备的时间分辨率很关键。

在测量过程中有诸多因素会干扰测量结果的准确性。PC是含铜的水溶性蛋白质, 位于类囊体囊腔侧, 穿梭在细胞色素**b<sub>6</sub>f**复合体与PSI之间转运电子。当在820 nm处检测P700的吸收变化时, PC的吸收变化约占总变化的23% (Joliot and Johnson, 2011), 而且当P700处于完全还原状态时, 会同时存在约30%–50%的氧化态PC (Schreiber, 2017), 因此PC是检测P700的氧化还原时较大的影响因素。Fd是可溶性铁硫蛋白, 位于类囊体基质侧, 通过4个半胱氨酸残基与PSI结合, 可将电子传递给铁氧还蛋白(Fd)或黄素蛋白(Sétif, 2001)。Fd的氧化与还原可以引起其在可见光和近红外光少量的吸收, 该吸收变化与

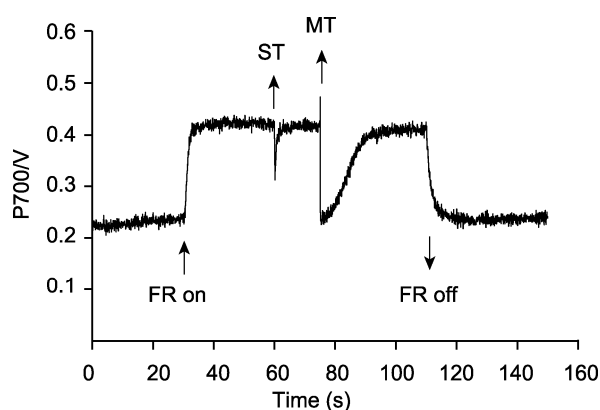


图4 光系统间的电子载体库

FR: 远红光(720 nm, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); ST: 单周转饱和脉冲(200000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); MT: 多周转饱和脉冲(20000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

Figure 4 The capacity of the intersystem electron carrier pool

FR: Far-red light (720 nm, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); ST: Single turnover flash (200000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); MT: Multiple turnover flash (20000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

P700的吸收变化有部分重叠。此外,PSI反应中心发生电荷分离后,如果缺少氧化态的Fd,或者缺少外源电子受体,该电子传递过程中各个电子载体会在100毫秒内发生电荷重组(Brettel, 1997; Kadota et al., 2019),导致100% P700<sup>+</sup>信号被低估(图3A),最终导致Y(I)被高估。

对于悬浮样品,尤其是绿藻,其P700氧化还原动力学信号较弱。为增强P700信号,可适当增加藻细胞浓度(20–50 µg·mL<sup>-1</sup>),但是单纯增加悬浮液浓度,会导致其偏离比尔定律,造成测量结果不准确。为防止细胞沉降,可加入10%–20%聚蔗糖,增加溶液的黏稠度。

**致谢** 感谢中国科学院植物研究所温晓刚研究员、田利金研究员和中国科学院分子植物科学卓越创新中心(植物生理生态研究所)米华玲研究员在文章撰写过程中提出的宝贵意见以及对文章内容的修改。

## 参考文献

- 高坤山 (2014). 藻类固碳: 理论、进展与方法. 北京: 科学出版社. pp. 426–427.
- 沈同, 王镜岩, 赵邦悌, 李建武, 徐长法, 朱圣庚, 俞梅敏, 杨端, 杨福愉 (1991). 生物化学(第2版). 北京: 高等教育出版社. pp. 139.
- 姚正菊, 米华玲, 叶济宇 (2002). 光诱导叶片P-700氧化还原的测量. 植物生理学通讯 **38**, 54–56.
- 郁飞, 唐崇钦, 辛越勇, 彭德川, 许亦农, 李良璧, 匡廷云 (2001). 光系统I (PSI)的结构与功能研究进展. 植物学通报 **18**, 266–275.
- Alric J, Lavergne J, Rappaport F (2010). Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* (l) aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 44–51.
- Amunts A, Drory O, Nelson N (2007). The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* **447**, 58–63.
- Amunts A, Nelson N (2009). Plant photosystem I design in the light of evolution. *Structure* **17**, 637–650.
- Andreeva A, Tikhonov AN (1983). Comparative study on the kinetics of electron transport and the slow chlorophyll fluorescence in bean leaves. *Photobiochem Photobiophys* **6**, 261–266.
- Asada K, Heber U, Schreiber U (1992). Pool size of electrons that can be donated to P700<sup>+</sup> as determined in intact leaves: donation to P700<sup>+</sup> from stromal components via the intersystem chain. *Plant Cell Physiol* **33**, 927–932.
- Ballottari M, Alcocer MJP, D'Andrea C, Viola D, Ahn TK, Petrozza A, Polli D, Fleming GR, Cerullo G, Bassi R (2014). Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E2431–E2438.
- Bonente G, Pippa S, Castellano S, Bassi R, Ballottari M (2012). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *J Biol Chem* **287**, 5833–5847.
- Brettel K (1997). Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **1318**, 322–373.
- Brettel K, Leibl W (2001). Electron transfer in photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **1507**, 100–114.
- Cao P, Cao DF, Si L, Su XD, Tian LJ, Chang WR, Liu ZF, Zhang XZ, Li M (2020). Structural basis for energy and electron transfer of the photosystem I-IsiA-flavodoxin supercomplex. *Nat Plants* **6**, 167–176.
- Diaz-Quintana A, Leibl W, Bottin H, Sétif P (1998). Electron transfer in photosystem I reaction centers follows a linear pathway in which iron-sulfur cluster F<sub>B</sub> is the immediate electron donor to soluble ferredoxin. *Biochemistry* **37**, 3429–3439.
- Fristedt R, Williams-Carrier R, Merchant SS, Barkan A (2014). A thylakoid membrane protein harboring a DnaJ-type zinc finger domain is required for photosystem I accumulation in plants. *J Biol Chem* **289**, 30657–30667.
- Haehnel W (1984). Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **35**, 659–693.
- Harbinson J, Hedley CL (1989). The kinetics of P-700<sup>+</sup> reduction in leaves: a novel *in situ* probe of thylakoid functioning. *Plant Cell Environ* **12**, 357–369.
- Harbinson J, Hedley CL (1993). Changes in P-700 oxidation during the early stages of the induction of photosynthesis. *Plant Physiol* **103**, 649–660.
- Harbinson J, Woodward FI (1987). The use of light-induced absorbance changes at 820 nm to monitor the oxidation state of P-700 in leaves. *Plant Cell Environ* **10**, 131–140.
- Hiyama T, Ke B (1971). A new photosynthetic pigment, "P430": its possible role as the primary electron acceptor of Photosystem I. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**, 1010–1013.
- Iwai M, Takizawa K, Tokutsu R, Okamuro A, Takahashi Y, Minagawa J (2010). Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* **464**, 1210–1213.
- Joliot P, Johnson GN (2011). Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13317–13322.
- Joliot P, Joliot A (2005). Quantification of cyclic and linear

- flows in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 4913–4918.
- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauß N (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**, 909–917.
- Kadota K, Furutani R, Makino A, Suzuki Y, Wada S, Miyake C (2019). Oxidation of P700 induces alternative electron flow in photosystem I in wheat leaves. *Plants (Basel)* **8**, 152.
- Ke B (1973). The primary electron acceptor of photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **301**, 1–33.
- Klughammer C, Schreiber U (1994). An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700<sup>+</sup>-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**, 261–268.
- Klughammer C, Schreiber U (1998). Measuring P700 absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system. In: Garab G, ed. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Dordrecht: Springer. pp. 4357–4360.
- Klughammer C, Schreiber U (2008). Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Appl Notes* **1**, 11–14.
- Kok B (1957). Light induced absorption changes in photosynthetic organisms. *Acta Bot Neerl* **6**, 316–336.
- Kou JC, Oguchi R, Fan DY, Chow WS (2012). The time course of photoinactivation of photosystem II in leaves revisited. *Photosynth Res* **113**, 157–164.
- Liu J, Yang HY, Lu QT, Wen XG, Chen F, Peng LW, Zhang LX, Lu CM (2012). PsbP-domain protein1, a nuclear-encoded thylakoid lumenal protein, is essential for photosystem I assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 4992–5006.
- Losciale P, Oguchi R, Hendrickson L, Hope AB, Corelli-Grappadelli L, Chow WS (2008). A rapid, whole-tissue determination of the functional fraction of PSII after photoinhibition of leaves based on flash-induced P700 redox kinetics. *Physiol Plant* **132**, 23–32.
- Maxwell PC, Biggins J (1976). Role of cyclic electron transport in photosynthesis as measured by the photoinduced turnover of P700 *in vivo*. *Biochemistry* **15**, 3975–3981.
- Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P (1996). Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. *Planta* **198**, 385–396.
- Mozzo M, Mantelli M, Passarini F, Caffarri S, Croce R, Bassi R (2010). Functional analysis of Photosystem I light-harvesting complexes (Lhca) gene products of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 212–221.
- Nguyen K, Vaughn M, Frymier P, Bruce BD (2017). *In vitro* kinetics of P700<sup>+</sup> reduction of *Thermosynechococcus elongatus* trimeric Photosystem I complexes by recombinant cytochrome *c<sub>6</sub>* using a Joliot-type LED spectrophotometer. *Photosynth Res* **131**, 79–91.
- Pfündel E, Klughammer C, Schreiber U (2008). Monitoring the effects of reduced PSII antenna size on quantum yields of photosystems I and II using the Dual-PAM-100 measuring system. *PAM Appl Notes* **1**, 21–24.
- Pi X, Tian LR, Dai HE, Qin XC, Cheng LP, Kuang TY, Sui SF, Shen JR (2018). Unique organization of photosystem I-light-harvesting supercomplex revealed by cryo-EM from a red alga. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, 4423–4428.
- Qin XC, Pi X, Wang WD, Han GY, Zhu LX, Liu MM, Cheng LP, Shen JR, Kuang TY, Sui SF (2019). Structure of a green algal photosystem I in complex with a large number of light-harvesting complex I subunits. *Nat Plants* **5**, 263–272.
- Qin XC, Suga M, Kuang TY, Shen JR (2015). Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* **348**, 989–995.
- Schreiber U (2017). Redox changes of ferredoxin, P700, and plastocyanin measured simultaneously in intact leaves. *Photosynth Res* **134**, 343–360.
- Schreiber U, Klughammer C, Neubauer C (1988). Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Z Naturforsch C* **43**, 686–698.
- Sétif P (2001). Ferredoxin and flavodoxin reduction by photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **1507**, 161–179.
- Takahashi H, Clowez S, Wollman FA, Vallon O, Rappaport F (2013). Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition. *Nat Commun* **4**, 1954.
- Varotto C, Pesaresi P, Meurer J, Oelmüller R, Steiner-Lange S, Salamini F, Leister D (2000). Disruption of the *Arabidopsis* photosystem I gene *psaE1* affects photosynthesis and impairs growth. *Plant J* **22**, 115–124.
- Vassiliev IR, Jung YS, Yang F, Golbeck JH (1998). Psac subunit of photosystem I is oriented with iron-sulfur cluster F<sub>B</sub> as the immediate electron donor to ferredoxin and flavodoxin. *Biophys J* **74**, 2029–2035.
- Wang L, Li QW, Zhang AH, Zhou W, Jang R, Yang ZP, Yang HX, Qin XC, Ding SH, Lu QT, Wen XG, Lu CM (2017). The phytol phosphorylation pathway is essential for the biosynthesis of phyloquinone, which is required for photosystem I stability in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **10**, 183–196.
- Weis E, Ball JT, Berry J (1987). Photosynthetic control of electron transport in leaves of *Phaseolus vulgaris*: evidence for regulation of photosystem 2 by the proton gradient. In: Biggins J, ed. *Progress in Photosynthesis Research*. Dordrecht: Springer. pp. 553–556.
- Yang HX, Liu J, Wen XG, Lu CM (2015). Molecular mechanism of photosystem I assembly in oxygenic organisms. *Biochim Biophys Acta* **1847**, 838–848.
- Yang HY, Li P, Zhang AH, Wen XG, Zhang LX, Lu CM (2017). Tetratricopeptide repeat protein Pyg7 is essential for photo-



system I assembly by interacting with PsaC in *Arabidopsis*.  
*Plant J* **91**, 950–961.

Zhou W, Lu QT, Li QW, Wang L, Ding SH, Zhang AH, Wen

XG, Zhang LX, Lu CM (2017). PPR-SMR protein SOT1 has  
RNA endonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**,  
E1554–E1563.

## The Measurement Methods and Principles of P700 Redox Kinetics

Chunyan Zhang<sup>\*</sup>

*Key Laboratory of Photobiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*

**Abstract** P700 redox technique is referred to examine plant photosystem I (PSI) function quickly and non-intrusively, and widely used in the field of photosynthesis research. In this paper, we summarize the main measurement methods of the P700 redox kinetics systematically, expound its principles, and discuss the limitations. The aim is to provide a technical support for in-depth study of photosynthesis mechanisms.

**Key words** P700 redox kinetics technique, PSI function

Zhang CY (2020). The measurement methods and principles of P700 redox kinetics. *Chin Bull Bot* **55**, 740–748.

---

<sup>\*</sup> E-mail: zhangchunyan@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)