

教学园地 Teaching

引入稳定性碳同位素概念讲授光合碳代谢途径的尝试

易现峰* 孔祥生 史国安 黄华

河南科技大学农学院, 河南洛阳 471003

光合作用是植物生理学中比较重要的一个章节, 也是植物生命活动中的核心过程之一, 有 C_3 、 C_4 和景天酸(CAM) 3种不同类型碳代谢途径, 在许多植物生理学教科书中, 对此介绍得比较明白。我们在教学过程中感到, 尽管多次强调 C_3 、 C_4 和CAM 3种途径的主要异同点和相应植物类群的主要特征, 但绝大多数学生仍然对此缺少感性认识, 甚至有些迷茫。鉴于此, 我们在讲授植物不同光合途径的过程中, 引入稳定性碳同位素概念, 这不仅使学生在学习过程中掌握了一门与植物生理学相关的技术方法, 也增强了学生对3种碳代谢途径的理解。现介绍如下。

1 同位素

尽管“同位素”已经成为一个熟知的名词, 但对其结构特征, 学生中很少有人能正确完整地表述出来, 所以我们在讲解之前对此先加说明和讲解, 指出: 所谓同位素是指原子内具有相同质子数而中子数不同的一类元素的总称。为了给学生更为直观的印象, 我们以H同位素为例, 绘出原子结构(图1)。由此, 学生很容易理解自然界中H的3种同位素: 氕、氘和氚。氕不具有中子, 而氘和氚分别具有1个和2个中子, 但是它们的质子数都是1个(图1)。

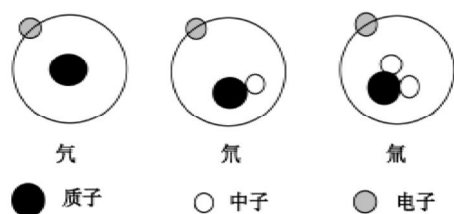


图1 自然界中氢的3种同位素

2 稳定性同位素

提到同位素, 很多学生一下子会想起放射性同位素, 而对稳定性同位素的概念却不一定明确。为了不让学生产生混淆, 我们在讲解过程

中, 特别提出稳定性同位素与放射性同位素在概念上的区别: 稳定性同位素是同位素中不具有放射性的一类元素。如氢同位素中的氕和氘即为稳定性同位素, 不具有放射衰变的特性, 而氚则具有很强的放射性。在自然界中碳元素具有3种同位素, 即 ^{12}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C 。 ^{12}C 和 ^{13}C 是稳定性的, 而 ^{14}C 具有放射性, 衰变后形成 ^{12}C , 并附带讲明这也是放射性碳同位素测年的理论依据。

3 稳定性碳同位素

接下来, 我们介绍与光合作用关系密切的同位素及与稳定性碳同位素相关的知识: 碳元素有两种中子数不同的稳定性同位素 ^{12}C 和 ^{13}C 。同时向学生传递这样一个信息: 绝对的同位素含量很难测定, 所以, 一般用 $^{13}C/^{12}C$ 的比率表示某种物质中这两种稳定性同位素的丰富度。由于这个比率在通常情况下非常小, 很难说明一些科学问题。比如对于大气来讲, 其中 ^{13}C 约占大气碳总量的1.1%, ^{12}C 占98.9%, 这一比值仅为0.011122。植物体内也存在天然的稳定性碳同位素 ^{12}C 和 ^{13}C , 二者的比值比大气中的还小^[1,2]。一般是将其与一国际标准物质进行比对后, 取相对值阐述科学中的问题。即:

$$\delta^{13}C (\%) = [(^{13}C / ^{12}C)_s / (^{13}C / ^{12}C)_{sta} - 1] \times 100$$

其中, $\delta^{13}C$ 为样品稳定性碳同位素比值, 以百分率(%)表示, 它是间接表示某物质中碳同位素组成或含量的一个指标。 $(^{13}C/^{12}C)_s$ 和 $(^{13}C/^{12}C)_{sta}$ 分别是样品和标准品中两种稳定性同位素含量的比值。目前, 国际上使用的标准品一般为PDB, 即美国南卡罗来那州的一种生物拟剑石^[3]。 $\delta^{13}C$ 值可以同位素质谱仪(IRMS)测定^[1,2]。

4 稳定性碳同位素与植物的光合途径

基于 C_3 、 C_4 和CAM植物结构和碳同化途径

收稿 2005-02-22 修定 2005-08-29

资助 河南科技大学人才引进基金(04018)。

*E-mail: yxfeng1975@126.com, Tel: 0379-64282340

的特点, 绝大多数学生可以从解剖学、酶学和光合特性等理解不同光合途径的基本概念。尽管稳定性碳同位素技术早就被用来作为判别不同光合途径的一种手段, 但大多数植物生理学的教材中很少提及, 即使有也多作为附加内容, 教师很少讲解, 学生也不一定看得明白。所以, 我们结合这些内容, 引入稳定性碳同位素技术。我们是这样讲解的: 首先提及Nier和Gulbransen^[4]是最早观察到植物对较重的碳同位素¹³C的利用比¹²C少的科学家(这里其实埋下了一个伏笔, 很多学生在此提出为什么植物吸收¹³C比¹²C少的问题)。以后, 随着3种不同的碳同化途径的相继发现, 科学家又发现3种不同碳同化途径的植物稳定性碳同位素也具有明显的差别: 典型的C₄植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值介于-1.7%~-1.1%之间, 平均值约为-1.3%; 而C₃植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在-3.4%~-2.5%之间, 平均值约为-2.7%; CAM植物则介于二者之间^[5~7]。这样, 学生马上就会意识到: 既然C₃、C₄和CAM 3类植物内碳同位素组成存在明显差异, 是不是可以作为鉴别不同光合途径植物的一种便利手段? 我们因势利导, 提出该部分的教学目的就是让学生明白, 稳定性碳同位素技术是一种方便、快捷、准确度较高的判别光合途径的方法, 而且目前有逐渐取代传统的形态解剖学和酶学方法区分3种途径的趋势^[1, 8~10]。

5 C₃、C₄和CAM植物稳定性碳同位素组成的差异

由于3类光合途径的植物具有显著不同的稳定性碳同位素比值, 大部分学生经过以上的讲解后可以理解为什么稳定性同位素技术可作为一种判别碳固定途径的手段。有部分学生对不同光合途径植物碳同位素组成差异的原因很有兴趣, 如有

的曾提出这样的问题: 为什么不同植物会出现稳定性碳同位素的明显差异? 对此, 我们告诉学生说: 这是由于两种稳定性碳同位素(¹²C和¹³C)的中子数不同而在质量上有微小差别, 从而引起它们的物理化学性质(如在气相中的传导速率、键能强度等)有细小差别造成的^[11, 12], 植物在吸收和同化CO₂的过程中就“偏爱”对较轻同位素¹²C的吸收, 而对较重同位素¹³C产生辨别效应(discrimination effect, $\Delta\delta$), 因此即会发生物质反应前后稳定性同位素在组成上的不同。这种现象称为同位素的分馏效应(fractionation effect)。不同光合途径植物碳同位素的差异主要是由于同位素分馏效应的强弱不同所致。

为了使学生进一步理解光合碳固定过程中稳定性同位素分馏的过程, 我们又引入以下内容: CO₂的扩散、吸收和由酶系参与的羧化反应是影响植物叶片同位素组成的过程^[6, 13, 14], 这些物理、化学以及生化反应可明显引发同位素分馏现象。为了便于学生理解和掌握, 我们将影响碳同位素分馏的主要物理、化学过程汇总于表1, 并作以下讲解:

光合作用在固定CO₂的过程中, 植物对较轻碳同位素的分馏主要发生于两个阶段(图2): CO₂的吸收与扩散阶段以及CO₂形成羧基的酶促羧化反应阶段^[14~20]。一般说来, 经过这样一个分馏过程, 植物合成的产物(葡萄糖)较原来所利用的底物(一般均为CO₂)的同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)要低得多。在此, 我们告诉学生: 造成这种差异的主要原因是植物偏于对轻同位素的吸收, 而排斥较重同位素的吸收。但是为什么C₃、C₄和CAM 3类植物稳定性碳同位素组成会出现如此大的差异呢? 这是

表1 光合作用过程中相关的稳定性碳同位素的分馏效应

过程		反应前后 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化*%
平衡态	CO ₂ 溶解于水	0.11
	CO ₂ 的水合作用	-0.09
	CO ₂ 的空气扩散	0.44
转运过程	CO ₂ 在水溶液中的扩散	0.07
	CO ₂ 自发的水合作用	0.69
	脱水酶催化的CO ₂ 水合作用	0.11
化学过程	由磷酸烯醇丙酮酸羧化酶催化的HCO ₃ ⁻ 与磷酸烯醇丙酮酸的反应	0.20
	由1,5-二磷酸核酮糖羧化酶催化的CO ₂ 与二磷酸核酮糖的反应	2.90

* 正值说明产物的 $\delta^{13}\text{C}$ 比反应物的小, 负值则相反。

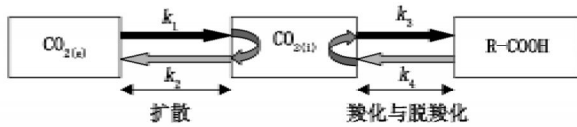


图2 CO₂固定过程中主要的同位素排斥阶段

黑色为同化反应；灰色为异化作用和其它逆过程； k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 为相应反应的速度常数。来自于大气的外源库中的CO₂(a)进入生物组织形成内部CO₂(i)到达光合作用部位，随后转化为由羧化反应酶促形成CO₂固定产物R—COOH。这样，在此过程中较轻的碳同位素遂可以在生物组织中大量积累。

学生急于知道的，也是我们要讲解的。对此，我们告诉学生：光合作用中CO₂扩散阶段的同位素效应较弱，接近于CO₂在空气中的扩散效应(约0.44%)，也就是说，大气CO₂在通过气孔进入气孔下腔直至叶肉细胞(或叶绿体)的过程，其 $\delta^{13}C$ 只降低0.44%左右。而随后的酶促羧化反应阶段是造成C₃、C₄和CAM 3类植物稳定性碳同位素组成差异的主要原因，这个过程可引起产物(糖)d¹³C的明显下降(2%~4%)。在这个过程中究竟是什么因素引发了同位素的剧烈下降？在此，我们强调核心内容：指出3种不同类型植物中不同光合羧化酶系统是“罪魁祸首”。我们又分别绘出C₃和C₄植物CO₂吸收和羧化过程示意图(图3、4)，这样讲解效果就更加好。我们首先向学生讲解C₃植物叶片 $\delta^{13}C$ 值的形成过程和机制：大气CO₂经过边界层和气孔转运至内部并溶解于细胞液中，进而扩散至叶绿体的过程，它引起的分馏很小(表1)，只能使大气CO₂的 $\delta^{13}C$ 值下降0.62%(0.11%+0.44%+0.07%)左右。而由1,5-二磷酸核酮糖的羧化酶/加氧酶羧化引起的分馏效应则很

大，也就是说，它极不“喜欢”较重的碳同位素¹³C，而“喜欢”羧化较多的轻同位素¹²C，这样，CO₂固定后 $\delta^{13}C$ 值即进一步下降2.9%左右(表1)。对此，有的学生可能要问：同样是C₃植物，为什么它们的 $\delta^{13}C$ 值差异那么大？我们作了这样的讲解：指出这是由于两个过程协同作用的结果。如果气孔扩散很迅速(即气孔阻力很小，这个过程的分馏效应也很弱)，1,5-二磷酸核酮糖的羧化酶/加氧酶的羧化反应又是起决定性作用的，则植物叶中 $\delta^{13}C$ 的值即为-3.7%(即大气CO₂的 $\delta^{13}C$ 减去分馏效应值2.9%，目前全球大气中CO₂的 $\delta^{13}C$ 平均值为-0.8%左右)；相反，如果扩散速度很慢(气孔阻力很大)，这时，对分馏效应起决定性作用的是CO₂本身，则植物叶中 $\delta^{13}C$ 的值为-1.2%[-(0.8+0.44)%]。还应强调的是，这两种极端条件在自然界中是不可能存在的，而是二者的共同作用，这样，植物叶中的 $\delta^{13}C$ 值应介于两个极端值之间(-3.6%~-1.2%)。讲到这里，我们还告诉学生：1,5-二磷酸核酮糖的羧化酶/加氧酶对CO₂羧化阻力要远远高于扩散阻力(表1)，因而，C₃植物吸收CO₂基本上是由RuBP羧化酶羧化速度而不是由扩散速度决定的。也就是说，C₃植物极端的 $\delta^{13}C$ 值(-1.2%)只能在理想状态下存在，所以，C₃植物的 $\delta^{13}C$ 值一般在-3.4%~-2.5%。

对于C₄植物，我们是这样讲解的：与C₃植物不同，C₄植物的光合作用包括两种酶的运作过程(图4)。CO₂最初通过气孔进入叶中，首先被C₄植物存在的碳脱水酶羧化形成HCO₃⁻(这个过程对CO₂的分馏效应为0.11%)，后在叶肉细胞(叶绿体)被磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化酶吸收。脱羧形成的CO₂被RuBP羧化酶所固定，以后的过程则和C₃途径基本上相同。因此，气孔扩散和PEP羧化酶的羧化过程对C₄植物 $\delta^{13}C$ 值的大小起决定性作用。正如分析C₃植物的 $\delta^{13}C$ 值一样，我们作了以下假定：如果气体的扩散和吸收很容易，而PEP羧化酶的羧化反应又是主要限制性因素(其对CO₂的分馏效应为0.2%)，则C₄植物的 $\delta^{13}C$ 值接近-1.1%[-(0.8+0.2+0.11)%]，0.11%是脱水酶羧化CO₂所产生的分馏；相反，如果扩散是限制性的，而羧化很容易，则C₄植物的 $\delta^{13}C$ 值接近-1.5%[-(0.8+0.44+0.11+0.07)%]，0.11%是CO₂溶解于水所产生

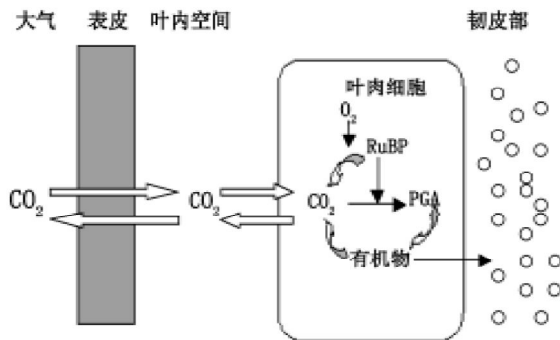


图3 C₃植物光合作用中的CO₂固定主要过程^[21]

箭头粗细代表不同阶段的相对流量(包括逆过程)；字母大小代表不同阶段CO₂的相对浓度。

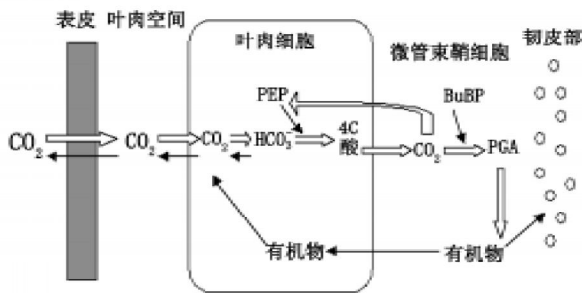


图4 C_4 植物光合作用中 CO_2 固定的主要过程^[21]

箭头粗细代表不同阶段的相对流量(包括逆过程); 字母大小代表不同阶段 CO_2 的相对浓度。

的分馏, 0.07% 是 CO_2 在水溶液中扩散所产生的分馏效应]。讲到这里, 有的学生会问: 既然 C_4 植物的 $\delta^{13}C$ 值在 $-1.1\% \sim -1.5\%$ 之间, 为什么还会出现 $\geq -1.7\%$ 的情况呢? 对此, 我们作了这样的解释: 参与羧化的PEP羧化酶的分馏效应很弱(对 ^{13}C 的排斥效应很弱), 但是由于RuBP羧化酶有较高的分馏效应(表1), 尽管这种分馏效应在 C_4 植物中不能明显表现出来, 但也可以引起 $\delta^{13}C$ 值的下降, 这样就可以解释为什么 C_4 植物的 $\delta^{13}C$ 值介于 $-1.7\% \sim -1.1\%$ 之间。在讲完 C_3 和 C_4 植物稳定性碳同位素的差异后, 我们还提及CAM途径, 指出: 具有CAM途径的肉质植物由于它可以同时利用1,5-二磷酸核酮糖的羧化酶/加氧酶和PEP羧化酶进行羧化反应, 所以, 它们的碳同位素组成介于 C_3 和 C_4 植物之间。

讲授到最后作小结: C_3 、 C_4 和CAM 3种不同类型植物稳定性碳同位素的差异, 主要是由其中酶系对较重碳同位素(^{13}C)的排斥力不同造成的。 C_3 植物中的1,5-二磷酸核酮糖羧化酶在羧化固定 CO_2 过程中, 对较重同位素 ^{13}C 具有很强的排斥效应, 植物组织(叶片)保留的 ^{12}C 就较多, 从而形成较低的 $\delta^{13}C$ 值; 而 C_4 植物的磷酸烯醇丙酮酸羧化酶对 ^{13}C 的排斥效应相对较弱, 吸收和整合的 ^{13}C 也较多, 因而 $\delta^{13}C$ 值较高; CAM途径的植物由于可以同时利用这两种酶, 其 $\delta^{13}C$ 值居于二者之间。因而, 测定植物稳定性碳同位素就可以判别不同光合途径。通过以上一系列的讲解, 学生既可以清楚地理解3种光合途径的概念以及它们之间的异同, 又能掌握以稳定性碳同位素技术作为鉴定光合途径的方法及其相关原理, 从而达到

了我们的教学目的。

参考文献

- 1 Yi XF, Yang YQ, Zhang XA et al. No C_4 plants found at the Haibei Alpine Meadow Ecosystem Research Station in Qinghai, China: Evidence from stable carbon isotope studies. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(11): 1291~1296
- 2 李明财, 易现峰, 李来兴等. 基于稳定碳同位素技术研究青藏高原东部高寒区植被的光合型. *西北植物学报*, 2004, 24: 1052~1056
- 3 Craig H. Isotope standards for carbon and oxygen and correlation factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta*, 1957, 12: 133~149
- 4 Neir AO, Gulbransen EA. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *J Am Chem Soc*, 1939, 61: 697~698
- 5 Bender MM. Variation in the $^{13}C/^{12}C$ ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochemistry*, 1971, 10: 1239~1244
- 6 Smith BN, Epstein S. Two categories of $^{13}C/^{12}C$ ratios for higher plants. *Plant Physiol*, 1971, 47: 380~384
- 7 Bender MM, Rouhani I, Vines HM et al. $^{13}C/^{12}C$ ratio changes in CAM. *Plant Physiol*, 1972, 52: 427~430
- 8 Waller SS, Lewis JK. Occurrence of C_3 and C_4 photosynthesis in North American grasses. *J Rang Manag*, 1979, 32: 12~28
- 9 Ziegler H, Batanouny KH, Sankhla N. The photosynthetic pathway types of some desert plants from India, Saudia Arabia, Egypt, and Iraq. *Oecologia*, 1981, 48: 93~99
- 10 Ehleringer JR, Lin ZF, Field CB. Leaf carbon isotope ratios of plants from a subtropical monsoon forest. *Oecologia*, 1987, 72: 109~114
- 11 Melander L, Saunders WH. *Reaction Rates of Isotopic Molecules*. New York: Wiley Interscience, 1980
- 12 Cleland WW. Use of isotope effects to elucidate enzyme mechanisms. *CRC Crit Rev Biochem*, 1982, 13: 385~428
- 13 Craig H. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochim Cosmochim Acta*, 1953, 3: 53~92
- 14 O'Leary MH. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 1981, 20: 553~567
- 15 O'Leary MH. Measurement of the isotope fractionation associated with diffusion of carbon dioxide in aqueous solution. *J Phys Chem*, 1984, 88: 823~825
- 16 Mook WG, Bommerson JC, Staverman WH. Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide. *Earth Planet Sci Lett*, 1974, 22: 169~175
- 17 Marlier JF, O'Leary MH. Carbon kinetic isotope effects on the hydration of carbon dioxide and the dehydration of bicarbonate ion. *J Am Chem Soc*, 1984, 106: 5054~5057
- 18 Paneth P, O'Leary MH. Carbon isotope effect on dehydration of bicarbonate ion catalyzed by carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 1985, 24: 5143~5147
- 19 Roeske CA, O'Leary MH. Carbon isotope effects on the enzyme-catalyzed carboxylation of ribulose bisphosphate. *Biochemistry*, 1984, 23: 6275~6284
- 20 Vogel JC. *Fractionation of the Carbon Isotopes During Photosynthesis*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1980
- 21 O'Leary MH. Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience*, 1988, 38: 328~336