

技术与方法

植物叶片的光声光谱

杜 浩 方 健 文

(浙江师范大学物理系, 金华 321004)

提 要

本文应用光声光谱在可见光范围内, 对未损伤的完整青菜叶片进行初步研究, 获得了在体情况下叶肉组织和表皮组织的光学资料。表明光声技术在研究生物样品中所显示的潜力。

关键词 光声光谱, 未损伤的青菜叶, 可见光, 表皮组织, 叶肉组织

引 言

光声光谱(photoacoustic spectroscopy)是在近几年得到迅速发展的一种新技术。它基于光声效应(photoacoustic effect), 所谓光声效应就是物质吸收了强度经调制的光能后, 通过无辐射去激励方式, 将吸收的光能转化为热能, 热能又传递给周围的气体, 使其产生周期性压力变化而成为声能(即光声讯号)。通过检测光声讯号, 可获得物质的光声谱及其它一些光学、热学等方面的信息。光声讯号不仅依赖于所吸收的光能量, 也依赖于荧光发射、光化学转移、磷光现象和热去激励等。如果荧光、光化学转移和磷光只是总吸收光的一小部分或恒定部分, 则光声谱与吸收光谱将非常类似。

光声光谱最有希望的应用之一是研究生物体系, 它能够提供完整无损的生物组织的光学资料^[1,2]。近年来国外对植物样品已做了一些工作^[3-5], 而国内在这方面的研究甚少。本文试图利用我们组建的光声光谱仪对青菜叶片进行一些研究, 以获得菜叶的深度剖面情况以及各组织在体情况下的光学性质。

实 验 方 法

图 1 为实验装置示意图。本装置采用美国 Stanford Research Systems 的 SR 530 双相精密锁相放大器、SR 540 机械斩波器和 SR 550 前置放大器。长城 GW 0520 C-H 计算机用作数据采集和数据处理。单色仪为 WDG-1A 强光单色仪, 狭缝取 2 mm 宽, 波长扫描范围 420—800 nm, 扫描速度为 100 nm/min。锁相放大器的时间常数取 1 s, 测叶片时的灵敏度取 200 μ V。光声池为铝结构, 容积约 1 cm³, 微音器为 CRZ9 型, 灵敏度 15 mV/Pa。本装置为单光路。在 1 mm 厚的石英玻璃片上用松香烟熏

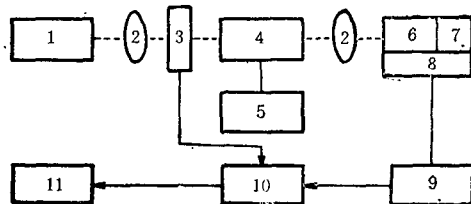


图 1 光声光谱仪示意图

1. 300W 锡灯 2. 透镜 3. 斩波器 4. 单色仪 5. 波长扫描控制器 6. 光声池 7. 样品 8. 微音器 9. 前置放大器 10. 锁相放大器 11. 计算机

方法制作标准样品炭黑, 炭黑光声谱先内存计算机。计算机在采集样品数据后进行归一化处理并打印成图。

将新鲜青菜 (*brassica chinensis*) 叶用水冲洗干净, 风扇下吹干或滤纸吸干菜叶表面的水。切下靠中间的一小片 (约 0.3cm^2) 作样品, 直接放入光声池中。

结果与讨论

1. 图 2 是同一菜叶的正、反面和撕去表皮的反面, 70 Hz 斩波频率时的光声谱。图 3 是 140 Hz 斩波频率时, 同一菜叶的正、反面和从反面撕下的表皮作样品的光声谱。两图比较可见, 无论是正面还是反面, 不同的斩波频率其光声谱完全不同。根据 RG 理论^[1], 不同的斩波频率可以获得样品内部不同深度处的光声讯号 (在样品的热扩散长度之内)。较高斩波频率下的光声讯号来自样品表面附近, 而较低斩波频率下的光声讯号来自表面下某深度处。由此可见, 光声技术是对生物样品进行深度剖面无损

分析的一种有效方法。

2. 从图 2 可见, 70 Hz 的光声谱清楚地显示了在体情况下叶绿体的吸收特征峰, 如 420 nm 的 Soret 谱带, 620—700 nm 的叶绿素谱带结构等。因此 70 Hz 光声讯号来自表皮下的叶肉组织, 因叶肉内含有大量叶绿体。另外, 正反面的光声谱基本一致, 表明正反两表皮下的叶肉组织基本相同。

从图 2 中还可以看出, 未损伤的完整青菜叶的叶绿素光声谱与有机溶剂提取的叶绿素吸收光谱相比较, 存在一定的红移现象。这是由于叶绿素分子与蛋白质形成复合物所引起的^[6]。利用光声技术测得的吸收特征峰更能反映生物体系原来的光学特征。另外, 由于光声技术所具有的高灵敏性, 图 2 的谱带结构比其它一般的吸收光谱技术的分辨率高。

从图 2 比较同片菜叶撕去和未撕去表皮的反面光声谱, 各峰位置基本一致, 且撕去表皮的比未撕表皮的光声讯号要强得多, 各小峰也分辨得更清楚。这表明表皮阻碍了叶肉组织吸光后向周围气体的热扩散。这种“热阻层效应”造成了光声讯号的差别。根据 RG 理论^[1], 对于顶层是“薄”的非吸收层的简单双层样品, 若第二层在光学上和热学上都是“薄”的, 则光声讯号由下式表示:

$$q \approx \frac{\beta_2 I_0}{\rho_1 c_1 \mu_1 \omega} e^{-x/\mu_1} \cos \left(\omega t - \frac{x}{\mu_1} - \frac{\pi}{4} \right) \quad (1)$$

式中下角标 1、2 分别表示顶层和底层的参量。密度 ρ , 比热 c , 热扩散长度 μ , 光吸收系数 β , 入射单色光通量 I_0 , 斩波频率 ω , 顶层厚度 x 。由于表皮对可见光的吸收很弱, 因而从 (1) 式可见, 表皮的存在会使光声讯号减弱, 即表皮的热阻效应。在样品及斩波频率一定的情况下, 光声讯号的大小与第二层 (叶肉) 的光吸收系数 β_2 成正比。光声讯号随入射光波长的变化反映的是第二层物质的光学特性。另外, 顶层的存在也会引起相位滞后:

$$\phi = \frac{x}{\mu_1} \quad (2)$$

可通过测定 ϕ 而求得顶层厚度 x 。

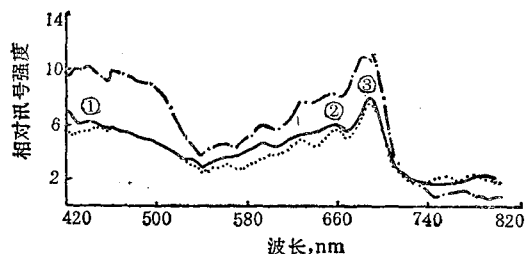


图 2 斩波频率为 70 Hz 时, 未损伤的青菜叶片正面 (—) 和反面 (.....) 的光声谱, 反面撕去表皮后的叶肉光声谱 (-.-)

①峰位置为 440 nm ②峰为 660 nm ③峰为 680 nm

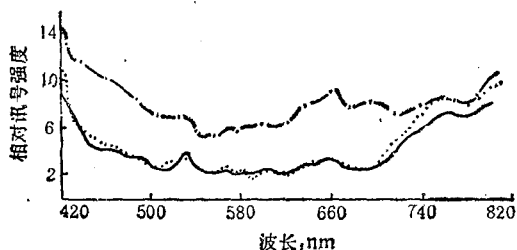


图 3 斩波频率为 140 Hz 时, 未损伤的青菜叶片正面 (—) 和反面 (.....) 的光声谱, 从反面撕下的表皮的光声谱 (-.-)

近年来国外研究表明^[3-5],植物叶片的光声讯号可由两种不同的贡献构成。一种是光声效应引起的声压,另一种是叶片在调制光激励下进行周期性光合作用,引起周期性放氧,直接产生的声压。尤其在低调制频率(低于100 Hz)下,放氧对光声讯号的贡献不可忽视。这种贡献随着调制频率的提高而减弱。

3. 从图3可见,140 Hz 斩波频率的叶片正、反面光声谱基本一致,光声讯号都来自叶片的表皮组织。光声谱表明,表皮对紫、红外光有强吸收,而对可见光的吸收很弱。因此表皮组织能透过可见光,从而使叶肉内的叶绿体充分地进行光合作用。表皮组织同时又强烈地吸收阳光中的紫、红外光,以保护叶肉内的组织免受其损害。

从图3还可看出,表皮组织光声谱在可见光范围有许多小峰,这些小峰与叶肉组织光声谱的峰位置相吻合,尤其是660nm处的峰。这可能表明,表皮组织中含有少量叶绿体。由于表皮组织主要由表皮细胞构成,表皮细胞不含叶绿体。但表皮上气孔周围的保卫细胞含有叶绿体。这些叶绿体的光合作用可导致气孔的关闭^[7]。由图3比较从叶片背面撕下的表皮光声谱和未损伤叶片的光声谱(两样品取自同片菜叶相邻近部位),两样品的光声谱基本一致。但在叶肉组织有强吸收的波段内存在明显的强度差别,撕下的表皮的光声讯号强度大于在体表

皮的光声讯号。这可能是由于背衬材料的不同所引起的。因为实验过程中,撕下的表皮直接放在光声池中,背衬材料是经抛光的池壁(金属铝)。铝对光有强反射。入射的可见光经表皮弱吸收后又经铝反射,再次被表皮样品吸收,而引起光声讯号增强。而在体表皮的背衬材料是叶肉,它是可见光的强吸收体。

由以上的结果可见,用锡灯作光源,在可见光范围内对植物系统进行研究是可行的。但由于锡灯的紫外和红外光强较弱,一般较难在这些范围开展工作。若将光源改成可调谐激光器或高功率氙灯,则能获得较满意的结果。

参 考 文 献

- 1 Rosencwaig A 著,王耀俊等译. 光声学和光声谱学. 北京: 科学出版社, 1986: 211—277
- 2 Vargas H, Miranda L C M. *Phys Reports*, 1988; 161 (2): 43
- 3 Poulet P, Cahen D, Malkin S. *Biochim Biophys Acta*, 1983; 724: 433
- 4 Havaux M, Canaani O, Malkin S. *Plant Physiol*, 1986; 82: 827
- 5 Havaux M, Lorrain L, Leblanc R M. *FEBS Letters*, 1989; 250 (2): 395
- 6 Sybesma C 著,沈淑敏等译. 生物物理学引论. 北京: 科学出版社, 1979: 125—129
- 7 Bidwell R G S 著,刘富林译. 植物生理学,上册. 北京: 高教出版社, 1983: 270—273

【本文于1989年12月26日收到,

1990年4月14日修回】

(上接第51页)

电泳鉴定上述五种RNA样品,发现经天花粉蛋白处理、苯胺作用后的样品与经蓖麻蛋白A链处理、苯胺作用后的样品在相同位置上出现了一个新的、约500核苷酸长的RNA条带,其它样品都无此带。这两种样品的28S rRNA带也稍快于其它样品,其它rRNA带无显著差别。这些结果说明天花粉蛋白与蓖麻蛋白A链一样水解28S rRNA的一个糖苷键,再经苯胺作用导致28S rRNA断链,3'端片段产生约

500核苷酸长的RNA条带,5'端片段产生稍快于28S rRNA的条带。我们将进一步确定天花粉蛋白的作用位点,鉴定其释放的碱基种类。

参 考 文 献

- 1 Endo Y et al. *J Biol Chem*, 1987; 262: 5908
- 2 Endo Y, Tsurugi K. *J Biol Chem*, 1987; 262: 8128
- 3 董稿,刘望夷. 细胞生物学杂志, 1990; 12: 58
- 4 王喜萍等. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17: 461

【本文于1990年9月25日收到,11月14日修回】