

技术与方法

植物叶片的相位解析光声光谱和光声相位谱

杜浩 方健文 郑金菊

(浙江师范大学物理系, 金华 321004)

摘要 用相位解析法获得的未损伤植物叶片叶肉组织的光声光谱, 与叶片的光声相位谱进行了比较. 发现植物叶片的光声相位谱与叶绿体光吸收带之间呈现互补关系. 叶片表皮的光声相位谱存在特有的波谷结构. 不同调制频率的光声相位谱有较大的差异. 这些现象表明光声相位谱与光声光谱一样, 也可对未损伤的层状生物样品作深度剖面分析.

关键词 相位解析光声光谱, 光声相位谱, 相位解析法, 未损伤植物叶片, 深度剖面分析

利用光声光谱 (photoacoustic spectroscopy, PAS) 对层状样品进行深度剖面分析, 越来越受人们的重视. 它的机理是样品吸收光能后, 在某一深度产生的热以有限时间扩散到表面, 引起声讯号. 这个推迟时间使得声讯号相位滞后. 声讯号和它的相位都是样品热学参数和光吸收系数等参量的函数. 光声讯号对光吸收层深度的依赖关系, 已有若干文献进行了讨论^[1-5]. 实验上深度剖面分析目前有两种方法可获得, 一是通常采用的改变入射光调制频率, 测量光声光谱, 即测量不同热扩散长度的 PAS. 另一种是相位解析光声光谱 (phase-resolved photoacoustic spectroscopy, PRPAS), 是测量同一调制频率不同相位角度的 PAS. PRPAS 最早是 Mackeathum 等用来测量龙虾壳色素分布^[6]. 随后 Cesar 等用来测量粘贴在铝箔上的磁带的磁响应^[7], 并进行了理论计算. Farringer 等用 PRPAS 分析组织栽培植物的叶片的色素变化和变异^[8]. Nery 等用来检测除莠剂作用下叶片中发生的短暂变化^[9]. Lima 等用 PRPAS 研究固体的无辐射弛豫时间等^[10].

本文先利用 PRPAS 对菠菜叶的色素分布进行分析, 然后将 PRPAS 与菠菜叶的光声相

位谱 (photoacoustic phase spectrum, PAPS) 进行比较. 发现未损伤植物叶片的 PAPS 和叶绿体的光吸收带之间有一些对应关系和特征. 比较不同调制频率的 PAPS 的差异, 表明 PAPS 对未损伤层状生物样品作深度剖面分析也同样适用.

1 实验方法

实验装置与文献[11]基本相同. 不同的是光源用 750W 氙灯. 微音器型号为 CH13, 灵敏度 50mV/Pa, 光声池为黄铜结构, 容积为 0.6cm³, 光谱扫描范围 350—800nm, 扫描速度为 160nm/min.

将新鲜菠菜 (*Spinacia cleracea*) 叶用水冲洗干净, 风扇吹干或滤纸吸干表面水分. 切下中间的一小圆片 (直径为 8mm) 放入光声池中.

2 结果和讨论

2.1 叶片的相位解析光声光谱 (PRPAS)

经相位解析法 (phase-resolved method, PRM) 获得的光声光谱称相位解析光声光谱. 它通常用于双层结构的样品. 例如未损伤的植物叶片, 在通常的调制频率下可视为表皮组织

和叶肉组织构成. 叶片的光声讯号 (S) 是叶肉光讯号 (S_m , 包括周期性光合作用引起的周期性放氧讯号^[12])和表皮光声讯号(S_c)的矢量和. S 的相位 Φ 表示光声讯号相对于入射调制单色光 (即输入锁相放大器的参考讯号) 的相移. Φ 是入射光波长 (λ) 及调制频率 (ω) 等参量的函数. 若用 OR 表示输入锁相放大器的参考讯号矢量. 参见图 1. 以 ψ 表示锁相放大器 (简称锁相) 的内部坐标轴相对于参考讯号的相位角.

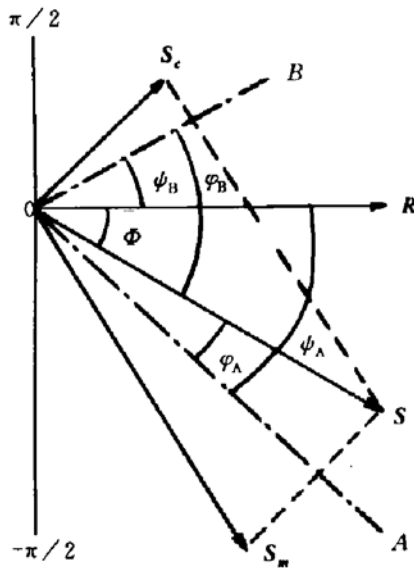


图 1 S, S_m, S_c 矢量图

ψ 即锁相面板上的参考移相角度. OA, OB 就表示锁相内部坐标轴在不同 ψ 时的位置. OA 的 ψ 为负值, OB 的 ψ 为正值, 分别表示锁相内部坐标轴的相位滞后和超前参考讯号. 锁相的相位输出 φ 是输入讯号相对于锁相内部坐标轴的相位角. φ 的正和负值分别表示输入讯号相位超前和滞后内部坐标轴. 因此输入光声讯号相对于参考讯号的相位角 Φ 为:

$$\Phi = \psi + \varphi \dots\dots\dots (1)$$

Φ 的正和负值分别表示输入讯号超前和滞后参考讯号. 如果改变 ψ 使 $OA \perp S_c$, 则锁相的 x 输出 ($x = S \cos \varphi$) 与 S_m 在 OA 上的投影 (记为 S_m') 相等. S_c 在 OA 上投影为 0. x 输出获得的 PAS 主要显示了 S_m 的光吸收特性. 当改变 ψ 到 OB 位置, $OB \perp S_m$, 则锁相的 x 输出与 S_c 在 OB 上的投影 (记为 S_c') 相等. S_m 的投影为

0. 此时 x 输出获得的 PAS 主要显示 S_c 的光吸收特征. 这就是 PRM 的基本原理. 因此 PRPAS 是通过改变锁相放大器的参考移相角, 来获得主要显示某一层样品的光吸收特征的 PAS, 而另一层的光声讯号, 由于相移而受到很大限制. 本文利用 PRPAS, 而不是 PAS 来分析, 原因是, 在未损伤的情况下, 尽量减少表面层光声讯号的影响, 更准确地从亚表面层的光声讯号中, 获得亚表面层的光学, 热学参量, 以进行理论分析.

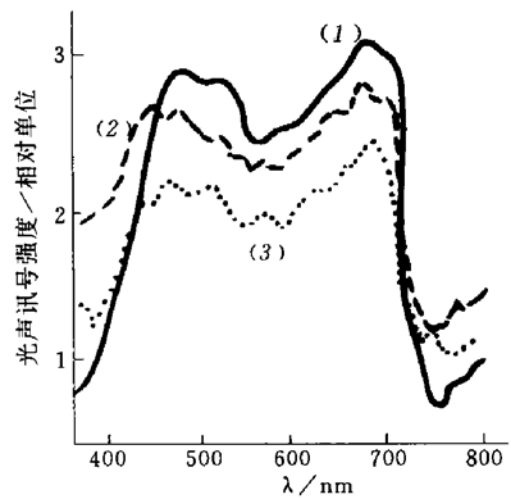


图 2 不同移相角的 S_m' 图

(1) -45° (2) -50° (3) -35° .

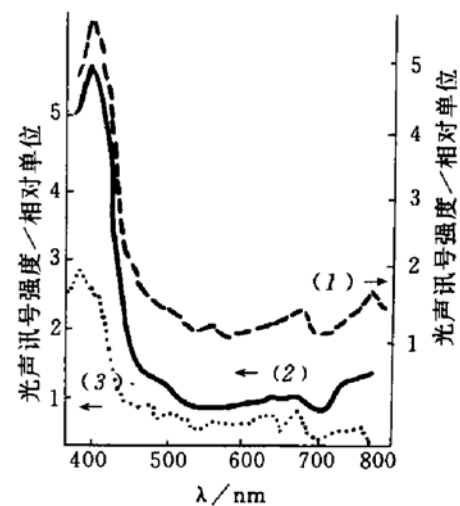


图 3 不同移相角的 S_c' 图

(1) 33° (2) 30° (3) 27° .

图 2 是锁相参考移相角分别为 $-50^\circ, -45^\circ, -35^\circ$ 的 PRPAS (调制频率为 70Hz). 即

S_m 的投影谱 S_m' .

图 3 是锁相参考移相角分别为 33° , 30° 和 27° PRPAS, 即 S_c 的投影谱 S_c' . 从图 2 可见, -45° 的曲线, 叶绿体光吸收特征最明显, 420nm 为 Soret 带, $450\text{--}550\text{nm}$, $600\text{--}700\text{nm}$ 分别为类胡萝卜素和叶绿素的强吸收带. 从图 3 可见, 30° 的曲线表皮组织光吸收特征最明显. 紫外强吸收, 可见光弱吸收, 红外稍强吸收. 而且叶绿体 680nm 强吸收峰最不明显. 由于 OA 位于 -45° , $S_c \perp OA$, 因此 S_c 位于 45° . 而 OB 位于 30° , $S_m \perp OB$, 因此 S_m 位于 -60° . 故 S_c 和 S_m 夹角为 105° , 它们的矢量和为 S . 参见图 1.

2.2 叶片的光声相位谱 (PAPS) 分析

样品的光学和热学性质信息, 可从光声讯号振幅中, 也可从相位中获得. 层状样品的光学和热学性质的变化. 相位比振幅响应更灵敏. 对于确定的样品, 当调制频率一定时, 样品的热学参数是确定的. 此时相位 Φ 应是光吸收系数 $\beta(\lambda)$ 的函数, 因而也是波长 λ 的函数. $\Phi(\lambda)$ 就构成了光声相位谱.

图 4 是调制频率为 70Hz 的光声相位谱 $\Phi(\lambda)$ 与图 2 中 -45° 的 S_m' 比较图. 可见 $\Phi(\lambda)$

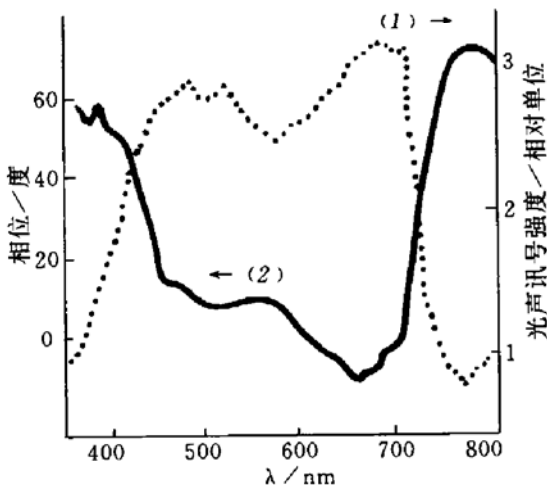


图 4 ω 为 70Hz 的 PAPS 和 -45° 的 S_m' 比较图
(1) -45° 的 S_m' (2) PAPS.

曲线的谷正好是叶肉 S_m 的强吸收带和表皮 S_c 的弱吸收带. $\Phi(\lambda)$ 曲线的峰正好是叶肉的弱吸

收带或 S_c 的强吸收带. 位置正好对准. 例如 $550\text{--}750\text{nm}$ 波段, 表皮 S_c 是弱吸收, 叶肉从较弱吸收逐渐增强到叶绿体 680nm 的强吸收峰, 然后迅速下降. 相应的 Φ 值从中间的小峰顶逐渐下降至最小值, 然后迅速上升到最大值. 这种互补 (反相关) 现象, 从图 1 可得到解释. 当 S_m 增大 (或 S_c 减小) 时 S 向 S_m 靠拢, Φ 值减小 (负得更大). 相反当 S_m 减小 (或 S_c 增大) 时, S 向 S_c 靠拢, Φ 值增大 (成为正值).

当频率不太高时, 植物叶片可视为热学上是薄的和光学上接近透明的样品. 从 R-G 理论可以推导得到^[13], 叶绿体吸收系数 $\beta(\lambda)$ 和相位角有如下关系:

$$\Phi = \text{tg}^{-1} \frac{1 - \beta^2/2a^2}{1 + \beta^2/2a^2} \dots\dots\dots (2)$$

其中 a 是叶肉组织的热扩散系数, 它是 ω 的函数. (2) 式中 β/a , 可以从 -45° 的 PRPAS 中指数拟合得到. 由 (2) 式计算得到的理论值与实验值符合得很好.

2.3 不同调制频率的光声相位谱的差异

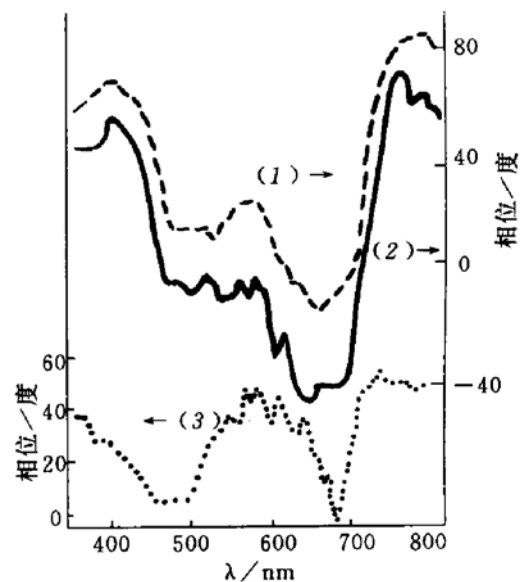


图 5 不同 ω 的 PAPS 图
(1) 120Hz (2) 140Hz (3) 210Hz .

图 5 是 ω 分别为 120 , 140 和 210Hz 的 PAPS. 从图 5 可见, 210Hz 的 PAPS, 整个比较平坦. 也即随 ω 的增大, 光声相位谱逐渐趋于平坦, 但是 $450\text{--}490\text{nm}$ 和 $670\text{--}695\text{nm}$ 的

谷仍清晰可见. 这可能与植物叶片表皮气孔附近的保卫细胞中所含叶绿体有关. 因为随着 ω 增大, 表皮的光吸收特征在 PAS 中显示越来越明显. 而叶肉组织的吸收特征逐渐消失. 这从 210Hz 的 PAS 图 (未给出) 可看到. 因此这两个谷有可能是未损伤植物叶片表皮的光声讯号相位特征. 我们陆续做了水稻, 茶叶, 青菜等多种叶片, 均有类似情况.

从图 5 还可看到, ω 为 120Hz 的 PAS 与图 4 中 70Hz 的 PAPS 非常相似. 而 140Hz 的 PAPS 变化较大, 它介于 120Hz 和 210Hz 的 PAPS 之间. 再从相应 ω 的 PAS 中可看到 (未给出). 叶绿体在 680nm 的特征峰, 在 120Hz 时仍可见, 而 140Hz 时已不明显. 也即存在临界频率 ω_0 . 当 $\omega > \omega_0$ 时 PAS 几乎不显现叶绿体的光吸收特征, 而 $\omega < \omega_0$ 时就比较明显. 同样, PAPS 在 $\omega > \omega_0$ 和 $\omega < \omega_0$ 时, 也存在非常明显的变化. 而且在 650—740nm 波段, Φ 值从最小值迅速上升到最大值, 不同 ω 的上升幅度 $\Delta\Phi$ 不同. 表 1 列出不同 ω 的 $\Delta\Phi$ 值. 从表 1 可见, $\Delta\Phi$ 随 ω 增大而增大, 当 ω 大于 140Hz 时, $\Delta\Phi$ 又下降. $\Delta\Phi$ 在临界频率附近有极大值. 我们做了几种植物叶片的 PAPS, 也都有类似情况出现. 其中的机理, 仍有待探讨.

表 1 不同 ω 时的 $\Delta\Phi$ 值

ω/Hz	30	70	90	120	140	210
$\Delta\Phi/\text{度}$	60.5	83.6	87.6	95.2	107.7	61.5

3 结 论

我们已对未损伤植物叶片的 PAPS 进行了

初步分析. 从中清楚看到, 植物叶片的表面和亚表面层吸收光能量的强弱变化, 对光声相位的影响. PAPS 的两个谷对应于叶绿体的类胡萝卜素和叶绿素强吸收带. 它的峰对应于叶绿体的弱吸收带. 叶片表皮 PAPS 存在尖锐的特有的波谷. 不同 ω 的 PAPS 有较大差异. 尤其在临界频率附近. 这些都表明 PAPS 有可能比 PAS 更适宜用来对未损伤层状生物样品作深度剖面分析. 然而 PAPS 仍有一些问题有待深入探讨.

参 考 文 献

- Mandelis A, Royce B S H. *J Appl Phys*, 1979; **50**: 4330
- Fernelius N C. *J Appl Phys*, 1980; **51**: 650
- Helander P, Lundstrom I, Mcqueen D. *J Appl Phys*, 1981; **52**: 1146
- Fujii Y, Moritani A, Nakai J. *Jpn J Appl Phys*, 1981; **20**: 361
- Opsal J, Rosencwaig A. *J Appl Phys*, 1982; **53**: 4240
- Mackeathum M L, Tom R O, Moore T A. *Nature*, 1979; **229**: 265
- Cesar C I, Vargas H, Pezl J *et al.* *J Phys D*, 1985; **18**: 599
- Farringer E L, Ohara E P, Moore T A. *Photochem Photobiol*, 1985; **41**: 417
- Nery J W, Pessoa O, Vargas H. *Analyst*, 1987; **112**: 1487
- Lima G A R, Baesso M L, Arguello Z P *et al.* *Phys Rev B*, 1987; **36**: 9812
- 杜 浩, 方健文. *生物化学与生物物理进展*, 1991; **18** (1): 53
- Poulet P, Cahen B, Malkin S. *Biochem Biophys Acta*, 1983; **724**: 433
- Rosencwaig A 著, 王耀俊等译. *光声学和光声谱学*. 北京: 科学出版社, 1986: 95—108

food industry.

Key words superoxide dismutase, chemical modification, enzyme engineering, cosmetics

Phase-Resolved Photoacoustic Spectroscopy and Photoacoustic Phase Spectrum of the Intact Leaf. Du Hao, Fang Jianwen, Zheng Jinju. (*Dept. of Phys., Zhejiang Normal University, Jinhua 321004*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 158

The phase-resolved photoacoustic spectroscopy has been used to analyse the pigmental distribution in intact plant leaves and has been compared with the photoacoustic phase spectrum of the leaves. The inverse correlation between the photoacoustic phase spectrum and absorption bands of chloroplasts has been observed. The characteristic valley exists in the photoacoustic phase spectrum of the leaf cuticle. In addition, there are some differences in the photoacoustic phase spectra obtained at different modulation frequency. The phenomena show that photoacoustic phase spectra can also be used for the nondestructive depth-profile analyses of biological sample as good as photoacoustic spectroscopy.

Key words phase-resolved photoacoustic spectroscopy, photoacoustic phase spectrum, phase-resolved method, intact plant leaf, depth-profile analysis

A New HPLC Separation for PTC Derivatives of Amino Acids by Ethanol Elution. Zhu Shudong, Zhao Huiren, Zhao Shenghao. (*Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 162

Analysis of phenylthiocarbonyl (PTC) amino acids with ethanol as organic eluent is described. Compared with acetonitrile elution

system, ethanol is less toxic, easier to obtain and much cheaper. Under optimized chromatographic conditions, the resolution, sensitivity and accuracy are excellent.

Key words ethanol, PTC amino acid, HPLC

Simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells. Zhang Hongquan, Wang Huixin, Zhou Tingchong, Wang Yunling. (*Inst. Bas. Med. Sci, Acad. Mil. Med. Sci. Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 165

A protocol by using 4 mol/L LiCl phasing the DNA and RNA could lead to simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells. Comparing with other methods, this protocol shows rapid, easy and economic, and can be used in many aspects especially in the studies of mammalian cell gene expression and regulation.

Key words total cytoplasmic RNA, genomic DNA, gene expression and regulation

The Method of PCR Direct Sequencing and It's Application in Cancer Research. Li Huachuan, Lu Shixin. (*Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 167

PCR direct sequencing is a method which combined PCR amplification with nucleic acid sequencing technique. According to this technique, direct sequencing DNA strand of PCR amplification using PCR primer, α -³⁵S dATP and Taq DNA polymerase. The experiment showed that it is simple, rapid and stable. This method was used to analyze the tumor