

doi: 10.3788/gzxb20124106.0689

# 菠菜和苏州青类囊体溶液的光谱特性

卢礼萍<sup>1,2</sup>, 韩彩芹<sup>3</sup>, 魏良淑<sup>2</sup>, 骆晓森<sup>1</sup>, 倪晓武<sup>1</sup>

(1 南京理工大学 理学院, 南京 210094)

(2 南京农业大学 理学院, 南京 210095)

(3 徐州师范大学 物理与电子工程学院, 江苏 徐州 221116)

**摘 要:**通过分析不同波长光激发下菠菜(*Spinach*)和苏州青(*Suzhou Green*)类囊体溶液的发射光谱和荧光光谱,以及同一波长下磁场处理前后类囊体溶液的光谱变化,探讨了低强度稳恒磁场对类囊体溶液的作用机理.结果表明,类囊体溶液中形成了大量的氢键,磁场处理前菠菜和苏州青的氢键喇曼散射峰为 531 nm 和 533.2 nm,两者光系统 II(PSII)荧光分别在 689.8 nm 和 686 nm;磁场处理后两者的喇曼散射峰变为 532.8 nm 和 532.4 nm,PSII 荧光变为 686.8 nm 和 685.4 nm.磁场改变了两样品中氢键键能,使其趋于相等.

**关键词:**类囊体;磁场;荧光;氢键

**中图分类号:**O433.4;Q632

**文献标识码:**A

**文章编号:**1004-4213(2012)06-0689-6

## 0 引言

类囊体作为光合作用实体存在于叶绿体基质中,类囊体膜上含有光合色素和电子传递链组分<sup>[1-2]</sup>,环境因素如紫外辐射、盐胁迫等也可对光合过程产生影响<sup>[3-4]</sup>,而电磁对光合过程产生的影响研究较少,随着对 PSII 能量传递、电荷分离等研究<sup>[5-6]</sup>,使探讨外界因素影响光合过程的微观机制成为可能.电磁生物学在人类和动物方面研究比较广泛,在植物微生物方面的研究始于 20 世纪 70 年代,电磁场对自由基以及分子发光行为有一定的影响<sup>[7]</sup>,而目前尚未有从分子结构中氢键的角度来分析低磁场对色素分子的作用的报道,本文主要考察低磁场处理前后不同样品喇曼光谱和荧光光谱的变化规律,揭示低磁场对类囊体溶液的作用机理,为进一步探讨光合作用机理提供理论和实验依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菠菜(S)和苏州青(SZG)种子购于南京市素菜种子公司,大棚栽培,育苗期间常规管理,当两者第 7 片真叶展开,第 8 片真叶初现时,取第 6 和第 7 叶片,去中间叶脉,洗净放入冰箱遇冷.

### 1.2 叶绿素类囊体的制备

参照 Kuwabara 和 Murata 方法改进<sup>[8]</sup>,叶片按

300 mL/100 g 比例加入缓冲液 K(含 0.2 mol/L NaCl,0.1 mol/L 蔗糖的 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH7.4),快速捣碎,用两层白纱布过滤,滤液于 3 000×g 离心 5 min 得沉淀.再用 K 悬浮沉淀,经 500×g 离心 30 s,取上清液于 3 000×g 离心 5 min,所得沉淀为叶绿体类囊体,悬浮于 K 溶液中,并调制叶绿素浓度为 2~3 mg/mL.所有过程在室温下完成,离心则在 0℃下进行.把备制的 S、SZG 类囊体溶液各分 6 份,记为 S<sub>0</sub>、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>、S<sub>5</sub> 和 SGZ<sub>0</sub>、SGZ<sub>1</sub>、SGZ<sub>2</sub>、SGZ<sub>3</sub>、SGZ<sub>4</sub>、SGZ<sub>5</sub>.

### 1.3 类囊体溶液磁场处理

把样品 S<sub>1</sub>~S<sub>5</sub> 和 SGZ<sub>1</sub>~SGZ<sub>5</sub> 分别依次置于大小不同的恒定磁场中(磁场由  $n=1\ 200\ \text{m}^{-1}$  螺线管,电流由双路直流稳压电源供应,电流分别是 0.5A、1.0A、1.5A、2.0A、2.5A,磁场大小依次为 0.75 mT、1.50 mT、2.26 mT、3.01 mT、3.77 mT).5 min 后取出,置于室内半小时,整个过程在室温下完成.

### 1.4 样品溶液的室温的荧光发射谱

将 S<sub>0</sub>、SGZ<sub>0</sub>、K 以及经磁场处理后的 S<sub>1</sub>~S<sub>5</sub> 和 SGZ<sub>1</sub>~SGZ<sub>5</sub> 样品分别用荧光分光光度计(日立 F-4600)进行扫描获得光谱.激发狭缝和发射狭缝均为 10 nm,扫描速度为 240 nm/min.激发波长范围为 400~460 nm,扫描波长范围是 450~730 nm.

基金项目:南京农业大学青年科技创新基金(No. KJ2010028)资助

第一作者:卢礼萍(1977-),女,讲师,博士,主要研究方向为光生物学. Email: lplu0227@njau.edu.cn

导师(通讯作者):骆晓森(1959-),男,教授,主要研究方向为光生物医学. Email: nlgxls@163.com

收稿日期:2011-12-01;修回日期:2012-02-09

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 S<sub>0</sub> 和 SZG<sub>0</sub> 溶液在不同波长光激发下的发射谱

#### 2.1.1 缓冲液 K 的喇曼光谱

样品溶液的光谱性质与溶剂有着密切的关系, 由于溶剂与叶绿素分子间的相互作用, 导致了不同的溶剂分子中色素分子的能级差别, 因此通过对溶剂光谱的分析可分析样品中分子与溶剂的结合状况. 图 1 为 400~460 nm 范围内不同波长光激发下 K 溶液喇曼光谱. 喇曼光谱是由于光与物质之间的非弹性散射引起的, 当频率为  $\nu_0$  的单色光入射物质后, 散射光的频率为  $\nu_0 + \nu_q$ , 出现 Stokes 位移, 当入射光发生改变时, 喇曼散射峰也会发生移动, 如图 1 所示. 图中较高喇曼峰表示水的 O-H...O 中实线分子内振动, 此外溶液中还存在分子间虚线的氢键振动, 由于氢键的强度比分子内 O-H 键的强度弱,

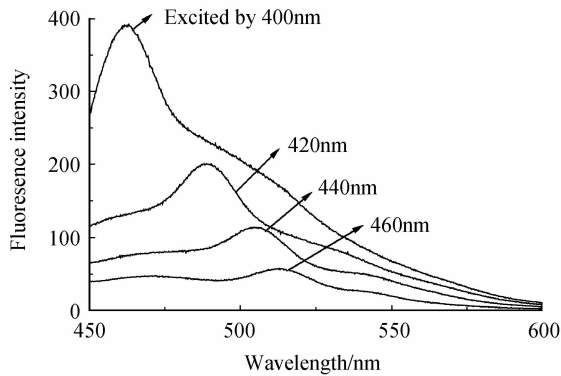


图 1 不同波长光激发下缓冲液 K<sub>0</sub> 的喇曼谱  
Fig. 1 The Raman spectra of K<sub>0</sub> solution excited by different light

因此氢键引起的散射要比分子内的 O-H 振动频率低, 又由于溶液中有其他离子的存在使得氢键的键长和键能有所不同, 氢键频谱加宽. 400 nm 光入射时, 氢键分子的喇曼峰位于 480~540 nm 较大范围, 460 nm 激发时喇曼光谱基本没有了. 频移是喇曼散射的特征量, 它与分子振动模式有关<sup>[9-10]</sup>, 定义为

$$\Delta\sigma = \frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{Raman}} \quad (1)$$

表 1 给出了 K 溶液、S<sub>0</sub> 和 SZG<sub>0</sub> 类囊体溶液的喇曼频移值, 其中 K 溶液频移的平均值为 0.334 5  $\mu\text{m}^{-1}$ , 为水的 O-H 实线拉伸振动<sup>[11]</sup>.

表 1 K、S<sub>0</sub> 和 SZG<sub>0</sub> 的喇曼频移

Table 1 The Raman shifts of the K<sub>0</sub>, S<sub>0</sub> and SZG<sub>0</sub>

$\lambda_{ex}/\text{nm}$	K solution $\Delta\sigma/\mu\text{m}^{-1}$	S <sub>0</sub> $\Delta\sigma/\mu\text{m}^{-1}$	SZG <sub>0</sub> $\Delta\sigma/\mu\text{m}^{-1}$
400	0.34	0.552	0.551
420	0.335	0.498	0.506
440	0.33	0.458	0.469
460	0.333	0.425	0.429

#### 2.1.2 S<sub>0</sub> 和 SZG<sub>0</sub> 类囊体溶液的喇曼散射谱

图 2(a)与图 2(b)是 S<sub>0</sub> 和 SZG<sub>0</sub> 溶液的喇曼散射谱, 除了由于大量光能被色素吸收而导致两者的强度降低之外, O-H 分子内振动喇曼谱几乎消失, 其原因是由 O-H 引起的这部分喇曼散射光刚好能被色素所吸收, 而氢键的散射谱都在 500~600 nm 之间, 色素吸收较小, 于是只出现了氢键的喇曼谱.

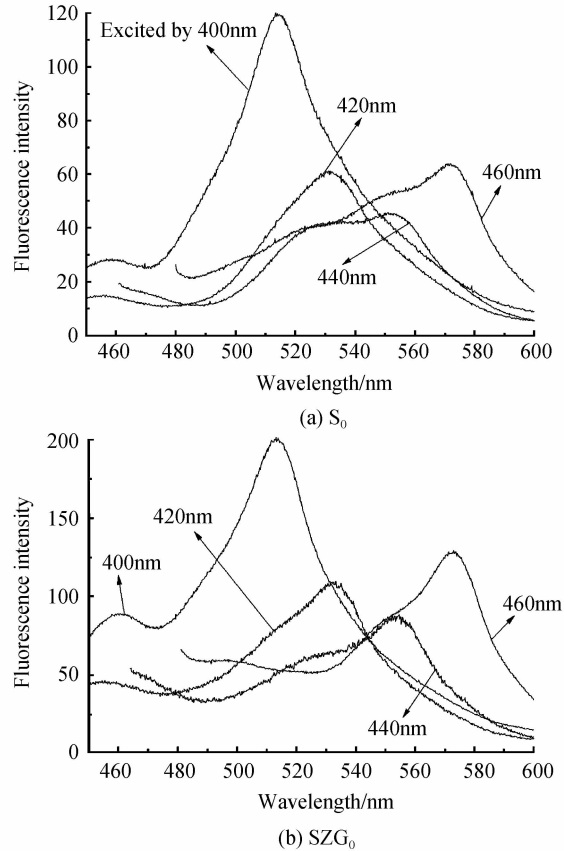


图 2 不同波长激发下类囊体溶液的喇曼散射  
Fig. 2 The raman spectra of thylakoid solution

420 nm、440 nm、460 nm 光激发下图 2(b)图中各峰位较图 2(a)图有几个纳米的红移, 样品中大量的水与类囊体膜中的亲水基团形成氢键, 使得氢键喇曼散射作用增强, 不同样品中氢键的结合能是有区别的, 由于多种氢键振动模式的存在, 使得不同激发光下频移不再是一个常量. 从表 1 可知 SZG<sub>0</sub> 类囊体溶液的平均氢键喇曼频移要大于 S<sub>0</sub>, 说明菠菜中氢键的平均结合能要大于青菜. 同时图 2 中在 460 nm 激发下, 峰值位置突然升高, 由此推断溶液中出现大量新的氢键, 这种氢键在图 1 中是没有出现, 它可能由水与膜蛋白之间结合形成的. 通过对溶剂的喇曼散射分析, 我们发现溶剂的散射波峰不影响类囊体的荧光, 只是色素分子吸收的光谱成分却不单一了.

#### 2.1.3 S<sub>0</sub> 和 SZG<sub>0</sub> 类囊体溶液荧光光谱

进行原初反应的实体是反应中心特殊的专一化

chl a 双分子体,PSII 中是  $P_{680}$ ,PSI(光系统 I)是  $P_{700}$ ,低温下两系统荧光都会出现,在室温下只出现 PSII 荧光.图 3 所示,在 400~460 nm 波长范围激发下, $S_0$  在 690 nm、SZG<sub>0</sub> 在 686 nm 左右出现了 PSII 荧光,所不同的是图 3(b)中荧光强度几乎不随入射光变化而变化,而图 3(a)中 400 nm 激发光产生的荧光最强.

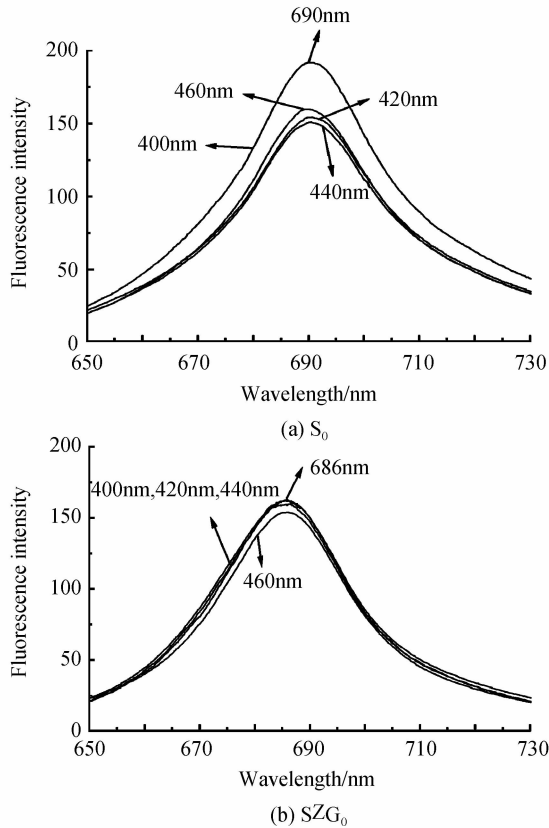


图 3 不同波长激发下类囊体 PSII 荧光谱  
Fig. 3 The PSII fluorescence spectra of the thylakoid with different excitation light

类囊体膜上有各种色素分子,捕光天线中也存在各状态的色素分子,可以吸收大部分波段的入射光,能量传递在各状态的色素之间按能量由高到低进行<sup>[12]</sup>,最后到达反应中心,不同色素团之间由于距离和相对结构的不同导致了能量传递效率有所不同.捕光天线色素中绝大部分为 chl a 和 chl b,他们的能级分布如图 4,chl a 具有较高的第二激发态和较低的第一激发态,chl b 分子被激发后,可把能量传递给 chl a 分子,按能量从高到低的方式,使 chl a 分子被激发到第一激发态.400 nm 激发时,无论是激发光还是散射光大部分被捕光基团中 chl a 吸收,而 420 nm 激发时,除了激发光可直接被 chl a 吸收外,溶剂喇曼散射光被 chl b 吸收,chl b 再传递给 chl a 分子,其中传递效率就决定了荧光强度,由图 3 可知  $S_0$  的捕光色素中 chl b→chl a 的传能效率较 SZG<sub>0</sub> 的要低.表 1 的分析告诉我们  $S_0$  溶液中平均

的氢键能量要比 SZG<sub>0</sub> 溶液中强,由此也可以判断,在捕光色素 chl b 和 chl a 之间不存在氢键的相互作用,其相互作用机理有待进一步研究.

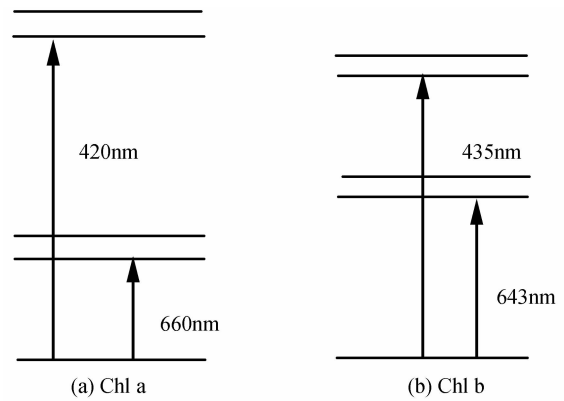


图 4 色素分子能级图  
Fig. 4 The energy level of pigment

## 2.2 同一波长光激发下 $S_1 \sim S_5$ 、SGZ<sub>1</sub>~SGZ<sub>5</sub> 的发射光谱

### 2.2.1 $S_1 \sim S_5$ 、SGZ<sub>1</sub>~SGZ<sub>5</sub> 的溶液喇曼谱

图 5(a)和图 5(b)是 420 nm 光激发不同磁场处理后的溶液的散射光谱,两图中散射光强均随着磁场的增加而增加,图 5(a)图散射峰有 1.8 nm 的红移,图 5(b)图则基本不变.磁场的出现改变了溶剂中氢键的组成,水中氢键的键能为 5.4~18.8 kJ/

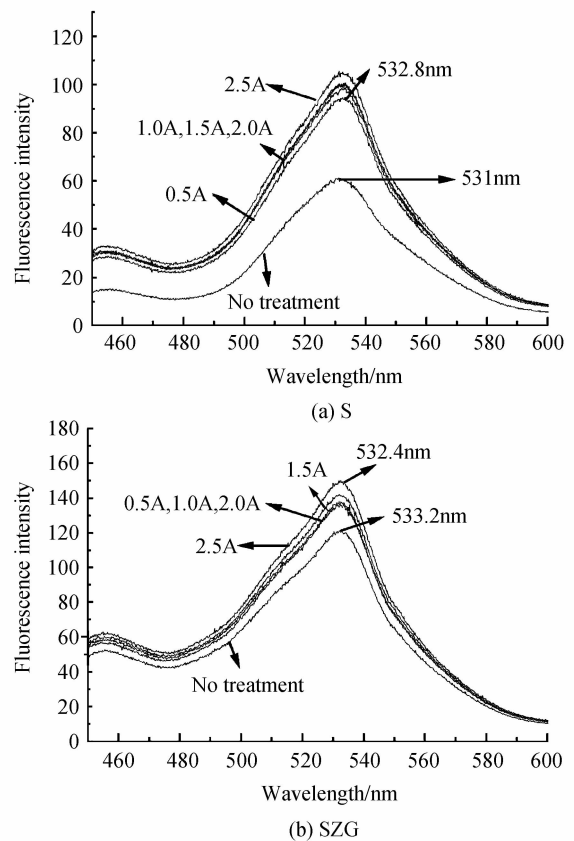


图 5 低磁场处理后类囊体溶液喇曼散射  
Fig. 5 The raman spectra of the thylakoid solution after low magnetic treatment

mol,介于共价键与范德华引力之间,它的结构参量如键长、键角和方向性具有一定的适应性和灵活性. 刚加磁场时由于原有的氢键从磁场中获得能量振动加强,氢键的断裂几率大于形成几率,随着时间的增加,水分子碰撞的机会增加,氢键的形成又大于断裂,于是生成最多的氢键来降低系统的能量<sup>[13]</sup>使得氢键喇曼散射增加.

磁场处理前的溶剂散射峰图 5(a)在 531 nm,图 5(b)在 533.2 nm,两者相差了 2.2 nm. 经过磁场处理后图 5(a)处在 532.8 nm,图 5(b)处在 532.4 nm,两者仅相差 0.4 nm. 也就是说开始时两者的喇曼散射峰有很大差别,这种差别是由于不同样品中氢键结合能的不同导致的,磁场处理过后使 S 样品中氢键结合能降低,而 SZG 样品中结合能略有提高,两者的喇曼峰值趋于相等,即磁场促使在不同类囊体溶液中形成大量能量相当的氢键.

2.2.2 S<sub>1</sub>~S<sub>5</sub>、SGZ<sub>1</sub>~SGZ<sub>5</sub> 的 PSII 荧光光谱

以上对溶剂散射光的分析也可从图 6(a)和图 6(b)中加以证实,图 6(a)中 S 类囊体荧光强度在磁场电流为 0.5A 时达到最大,随着磁场的增加有所减弱,这正是由于 S 样品中 chl b→chl a 传能效率较低引起的,而峰位有 3 nm 的蓝移. 图 6(b)中增加磁场后 SZG 的 PSII 荧光强度并无变化,峰值蓝移了 1.4 nm.

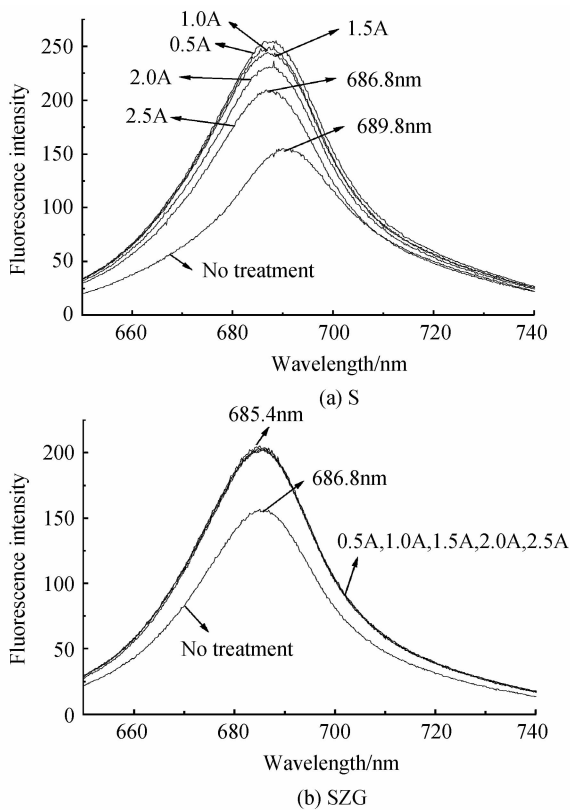


图 6 低磁场处理后类囊体荧光  
Fig. 6 The fluorescence spectra of the thylakoid after low magnetic treatment

PSII 荧光是由反应中心 chl a—chl a 双分子发出的,该双分子有很多模型,但是各模型都指出,两分子之间存在氢键的相互作用,其中 Shipman 提出模型较为合理,他指出 chl a 上一个 V 环上的 C=O 与 H 形成氢键,另一个 chl a 分子上的 Mg 与 X(O、N、S)形成氢键,通过两个分子链 C=O...H—X...Mg 把两个 chl a 分子组合,其中氢键的键长范围是 0.15~0.4 nm 甚至更长. 同一条件下不同物种的反应中心双分子之间的氢键参量会有所不同,导致了 PSII 荧光峰位的不同.

一般的溶剂中单体 chl a 分子的荧光在 669 nm 左右,而反应中心的 chl a 分子双聚体的荧光比单体红移了十几纳米,双聚体的结合能越大则红移越大. 图 6(a)中 S 样品的 PSII 荧光发生了 3 nm 的蓝移, SZG 蓝移了 1.4 nm,结合对类囊体溶剂的分析可知,一定强度磁场可使 S 光合反应中心的 chl a—chl a 双聚体之间的氢键结合能降低. S 溶液中氢键结合能要比 SZG 大,因此 S 样品蓝移程度要大于 SZG 溶液,并且两样品荧光峰位蓝移量要大于相应的散射光的红移量,由此可以判断,反应中心 chl a 双分子之间的氢键结合能要大于溶剂中的氢键结合能. 虽然这个过程机理还没有完全了解,但是这个现象却能给我们一些思考,一定强度的磁场正是通过改变氢键的键长、键角和键能等参量来改变样品中分子与分子之间的相对排列,从而改变其光学特性.

图 6(a)中不同磁场处理后荧光强度有所变化,正是由于 S 中 chl b→chl a 传能效率较低引起的. 另外原子物理的塞曼效应表明,原子在磁场中会产生能级分裂,由原子构成的分子在磁场的作用下,也会吸收能量,产生新的振动转动模式,在每个激发态上产生更多的振动转动能级,如图 7,这样每个激发态上能容纳的光子数增加了,荧光产量也跟着增加. 磁场通过改变氢键的参量对类囊体膜分子的构象和排列产生了影响,一定强度外磁场作用下可促进带电粒子的运动,调制膜蛋白的结构,增加类囊体膜中

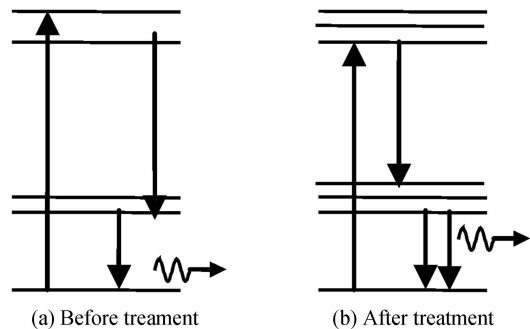


图 7 低磁场处理前后色素能级  
Fig. 7 The energy level of pigment before and after treatment

的色素蛋白分子的有序程度,促进能量吸收和提高传能效率,也是 PSII 荧光增加的一个原因。

### 3 结论

通过对不同波长光激发下菠菜和苏州青类囊体溶液光谱性质的分析,结合结构化学等相关理论<sup>[13]</sup>,可知类囊体溶液中存在大量的喇曼散射,包括 O-H...O 的分子内实线振动谱和分子间虚线振动谱.在 420 nm 光激发下,类囊体中外周捕光天线中的 chl a 可直接吸收激发光,溶剂的喇曼散射光可被 chl b 分子吸收,传递给 chl a 分子,再通过内周捕光天线传递给反应中心,不同的类囊体样品 PSII 荧光的强度就反应了色素之间能量传递效率,由图 3 可知苏州青的传能效率要高于菠菜.同时通过对图 2 和表 1 的分析还可知菠菜样品中的平均氢键结合能要大于青菜.当然这个过程中能量传递效率受到多种因素的控制<sup>[14]</sup>,各种因素最终都是会影响到光合系统中的分子。

两样品用低强度恒磁场处理后,在 420 nm 激发下再次分析两溶液的光谱性质发现,磁场使得溶液中氢键数大大增加,但是平均结合能有所改变,从图 5 可知,菠菜氢键结合能降低,而苏州青结合能略有增加,最终两样品的 O...H 的喇曼峰位基本相等.此外由于类囊体反应中心是 chl a—chl a 双分子结构,两 chl a 分子之间通过氢键结合,因此磁场也改变双分子之间的氢键,图 6 说明磁场使得反应中心双分子之间的氢键能降低,不同样品中降低程度不一样,最终的荧光峰位接近,即磁场能促使不同样品中的氢键键能参量趋于一常量。

#### 参考文献

- [1] ARO E M, VIRGIN I, ANDERSSON B. Photoinhibition of photosystem II: Inactivation protein damage and turnover[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1143**(2): 113-134.
- [2] BARBER J, ANDERSSON B. Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis[J]. *Trends in Biochem Sci*, 1992, **17**(2): 61-66.
- [3] ALBERT K R, MIKKELSEN T N, RO-POULSEN H, *et al.* Ambient UV-B radiation reduces PSII performance and net photosynthesis in high Arctic *Salix arctica* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, **72**(3): 439-447.
- [4] MAHA Z, NAJOUA M. Inhibition of photosystems I and II activities in salt stress-exposed Fenugreek [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2011, **10**(62): 13453-13460.
- [5] SPENCER D P, MICHAEL W R, GAEN B K, *et al.* Photocounting technique for rapid fluorescence-decay measurement [J]. *Optics Letters*, 1998, **23**(15): 1215-1217.
- [6] ITO T, HIRAMATSU M, HOSODA, M *et al.* Picosecond time-resolved absorption spectrometer using a streak camera [J]. *Rev Sci Instrum*, 1991, **31**(11): 1275-1279.
- [7] VINK C B, WOODWARD J R. Effect of a weak magnetic field on the reaction between neutral free radicals in isotropic solution [J]. *American Chem Society*, 2004, **126**(51): 16730-16731.
- [8] DU Lin-fang. Preparation and storage of PSII particles with high oxygen-evolution activity [J]. *Plant Physiol Comm*, 1995, **31**(3): 212-215.  
杜林方. 具有放氧活性的 PSII 颗粒的制备及保存 [J]. *植物生理学报*, 1995, **31**(3): 212-215.
- [9] WU Bin, LUO Xiao-sen, LU Jian. Determination of ethanol concentration of aqueous solution by using Raman stretching frequency shifts [J]. *Opt Precision Eng*, 2011, **19**(2): 392-395.  
吴斌, 骆晓森, 陆建. 用激光喇曼频移测定乙醇水溶液的浓度 [J]. *光学精密工程*, 2011, **19**(2): 392-395.
- [10] LEE K J, PARK Y, SHIN Y J. LIDAR measurement of water temperature by using frequency-shifted Raman scattering [J]. *J Korean Physical Society*, 2001, **38**(6): 659-665.
- [11] LI Hong-liang, ZHANG Jia-ling, TIAN Ruo-tao. Raman scattering of solvent in spectrofluorimetry [J]. *Chin J Health Lab Tech*, 2009, **9**(3): 478-480.  
李宏亮, 张加玲, 田若涛. 荧光分析中溶剂的喇曼散射 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, **9**(3): 478-480.
- [12] HE Jun-fang, WANG Shui-cai, REN Zhao-yu, *et al.* Energy transfer between pigment molecules of outer antenna [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(6): 668-671.  
贺俊芳, 王水才, 任兆玉, 等. 外周天线色素分子间的能量传递 [J]. *光子学报*, 2002, **31**(6): 668-671.
- [13] 周公度, 段连运. 结构化学基础 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2002, 23-224.
- [14] REN Zhao-yu, WANG Shui-cai, XIN Yue-yong, *et al.* The variety of excited energy transfer with temperature about core complex of spinach in photosystem II [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(12): 1462-1466.  
任兆玉, 王水才, 辛越勇, 等. 菠菜 PSII 核心复合物激发能传递与温度的关系 [J]. *光子学报*, 2002, **31**(12): 1462-1466.

## Spectral Properties of Thylakoid Solutions of *Spinach* and *Suzhou Green*

LU Li-ping<sup>1,2</sup>, HAN Cai-qin<sup>3</sup>, WEI Liang-shu<sup>2</sup>, LUO Xiao-sen<sup>1</sup>, NI Xiao-wu<sup>1</sup>

(1 *School of Sciences, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China*)

(2 *College of Science, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China*)

(3 *School of Physics & Electronic Engineering, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China*)

**Abstract:** The mechanism of the static low magnetic field action on thylakoid solutions was studied by analyzing the Raman spectra and PSII fluorescence of the spinach and Suzhou Green both excited by the light with different wavelength and to the changes in the spectra of the two samples treated by different magnetic fields with the same excitation wavelength. The results indicated that there were a larger number of Hydrogen bonds in the thylakoid solution. The Raman spectra were 531 nm and 532.2 nm and the PSII fluorescence were 689.8 and 686 nm for the spinach and Suzhou Green solution before the treatment by magnetic field. But the Raman spectra changed to 533.2 nm and 532.8 nm, and the PSII fluorescence were 686.8 nm and 685.4 nm for the two sample after the treatment. The static low magnetic field can change the Hydrogen bond energy to a constant value in the two solutions.

**Key words:** Thylakoid; Magnetic field; Fluorescence; Hydrogen bond