

# 两种植物类囊体膜在纳米 ZnO 上的组装和光电性质

刘 双, 张攀辉, 邱 宇, 张 建, 于道永

(中国石油大学 化学化工学院生物工程与技术中心, 山东 青岛 266555)

**摘要:** 用水热合成法在掺氟氧化锡(SnO<sub>2</sub>: F, FTO)导电玻璃上合成了 ZnO 纳米线并用原子力显微镜(AFM)和扫描电镜(SEM)对其进行了表征。利用 LB 膜技术将高等植物菠菜(*Spinacia oleracea*)和海洋绿藻石莼(*Ulva lactuca*)的类囊体膜分别固定在纳米 ZnO 上组装成光电池, 用太阳能测试系统检测比较了其光电性质。研究表明, 由两种植物的类囊体膜 LB 膜组成的光电池都能产生光生电流; 蛋白 LB 膜的层数显著影响了光电池的光电转化效率, 随着层数的增加, 光电转化效率大大增加。此外, 石莼类囊体膜组装的光电池光电转化效率明显高于菠菜类囊体膜。

**关键词:** 石莼(*Ulva lactuca*); 菠菜(*Spinacia oleracea*); 类囊体膜; 纳米 ZnO; LB 膜

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)02-0050-06

类囊体膜是进行光合作用原初光能转化的场所, 包括四种重要的光合膜蛋白复合物: 光系统(PS)I、PSII、细胞色素 b<sub>6</sub>/f 和 ATP 合酶复合物, 在其中植物能够完成捕获光能并转化成化学能的过程<sup>[1]</sup>。利用光合膜蛋白进行电荷分离产生光电流的特性, 研究者将分离的类囊体膜<sup>[2]</sup>、PSI<sup>[3-4]</sup>、PSII 复合物<sup>[5]</sup>、细菌反应中心<sup>[6-7]</sup>等光合膜蛋白组装成光电器件, 为制备新型生物太阳能电池奠定了基础, 但这些光合膜蛋白器件的光电转化效率很低, 且稳定性也有待提高。

LB(Langmuir-Blodgett)膜技术是获得有序排列的光合膜蛋白单分子层的重要手段, 在单分子层上蛋白复合物高度有序的结构, 保证了色素分子之间能够进行有效的能量传递, 并有助于使复合物具有较高的光热稳定性<sup>[8]</sup>。何靳安等<sup>[9]</sup>将 R-藻红蛋白(R-PE)单分子膜通过 LB 技术制备在 SnO<sub>2</sub> 光学透明电极(OPE)上, 组成的光电池能够产生光生电流, 具有较好的光学稳定性。

石莼(*Ulva lactuca*)是一类常见的潮间带大型海洋绿藻, 已有研究表明石莼对光和温度等环境变动具有较强的耐受性<sup>[10-11]</sup>。此外, 本课题组的前期研究也表明, 与菠菜相比石莼的类囊体膜蛋白具有更高的热稳定性。本研究尝试用 LB 膜技术分别将菠菜和海洋绿藻石莼的类囊体膜固定在纳米 ZnO 上, 组装成光电池, 并且比较了其光电性质, 以期为开发稳定性和效率更高的生物光电器件提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菠菜和石莼类囊体膜的制备

菠菜类囊体膜的分离方法按照 Berthold 等<sup>[12]</sup>的方法加以改进。取新鲜菠菜叶片除去叶柄、叶脉, 清洗干净, 在 4℃ 下暗适应放置 5 h 以上。在含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 0.4 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA 的缓冲液中用捣碎机捣碎叶片, 并用纱布过滤, 所得滤液于 220 g 离心 2 min; 上清液于 1 500 g 离心 10 min; 沉淀加入含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 15 mmol/L NaCl 的缓冲液悬浮匀浆, 200 g 离心 2 min 去沉淀; 上清液 5 000 g 离心 15 min, 沉淀用含 20 mmol/L MES pH 6.5, 0.4 mol/L 蔗糖, 35 mmol/L NaCl 的保存缓冲液悬浮匀浆, 即为菠菜类囊体膜。

石莼采自青岛金沙滩, 将新鲜叶片清洗干净并用蒸馏水洗两遍, 加入含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 0.2 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA 的缓冲液用捣碎机破碎, 纱布过滤后所得滤液于 220 g 离心 2 min, 上清液于 10 000 g 离心 10 min; 沉淀用含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 的缓冲液悬浮匀浆, 250 g 离心 2 min 去沉淀; 上清液 12 000 g 离心

收稿日期: 2010-12-25; 修回日期: 2011-06-09

基金项目: 山东省自然科学基金资助 (ZR2009DQ010); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (10CX05003A)

作者简介: 刘双(1976-), 女, 山东东营人, 讲师, 博士, 主要从事光合膜蛋白结构和功能的研究, 电话: 0532-86981135, E-mail: liushuang@upc.edu.cn

15 min, 沉淀用含 20 mmol/L MES pH 6.5, 0.4 mol/L 蔗糖, 35 mmol/L NaCl 的保存缓冲液悬浮匀浆, 并注意将白色淀粉部分去除, 所得为石莼类囊体膜。

## 1.2 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析在 NuPAGE 4%~12% Bis-Tris Mini Gel 预制胶(Invitrogen, USA)上进行。在样品中加入 NuPAGE LDS sample Buffer 和 NuPAGE Reducing Agent(Invitrogen), 70 加热 10 min, 短暂离心后上样, 每孔道上样 20  $\mu$ L, 200 V 恒电压电泳。凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。

## 1.3 纳米 ZnO 的制备

把掺氟氧化锡( $\text{SnO}_2:\text{F}$ , FTO)导电玻璃(日本 NSG 株式会社)用超声清洗, 在玻璃上滴加 1 mmol/L  $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  乙醇溶液后用  $\text{N}_2$  吹干, 反复 5 次, 放入马弗炉中 350 加热 20 min, 再把处理好的 FTO 玻璃放入含 25 mmol/L  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$  和 25 mmol/L  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  的反应液中在 75 恒温振荡器中反应 9~12 h, 即可在 FTO 导电玻璃上合成 ZnO 纳米线。

## 1.4 纳米 ZnO 的原子力显微镜和扫描电镜表征

用 Nanoscope IVa 原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM)(Veeco/Digital Instruments, Santa Barbara, USA)和表征 ZnO 在 FTO 导电玻璃上的分布情况和均匀性。采用 Veeco TESP 型探针, 操作频率为 300~350 kHz, 弹性常数为 20~80 N/m。

用日立 S-4800 冷场扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)观察 ZnO 在 FTO 导电玻璃表面上的生长情况, 电压 5 kV。

## 1.5 类囊体膜 LB 膜的制备

参照 Li 等<sup>[13]</sup>的方法, 以 0.5 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 作为亚相, 3% (V/V) 乙醇-水溶液作为铺展剂, 把 60  $\mu$ L 浓度为 1.5 mg/mL 的类囊体膜缓慢均匀地滴入 Micro Trough X LB 膜仪(芬兰 Kibron)槽内的亚相表面, 待其在亚相表面扩散约 20 min 后, 压膜速率为 1 mm/min, 压缩单分子层膜至表面压为 30 mN/m, 保持 30 min 后, 用垂直提拉法将膜转移到纳米 ZnO 表面。在纳米 ZnO 上沉积 1、3、5 层的 LB 膜分别用来进行荧光发射光谱和光电性能检测。

## 1.6 荧光发射光谱的检测

样品在室温下用 FluoroMax-4 荧光光谱仪

(Horiba Jobin Yvon)检测, 436 nm 激发, 狭缝宽度 2 nm, 检测波长范围 625~750 nm。

## 1.7 光电池的组装及光电性能的检测

将类囊体膜 LB 膜的纳米 ZnO 导电玻璃膜面朝上放在洁净的水平基面上, 并把镀 Pt 的 FTO 玻璃(大连七色光太阳能科技开发有限公司)作为对电极放在上面, 将具有开口的热封膜(膜厚 60  $\mu$ m, 内孔尺寸 5 mm $\times$ 5 mm)置于两电极之间, 形成一定的空间, 便于滴加电解质。把两个玻璃片微微错开, 各自留出一定的导电部分, 以利于电池测试。用两个长尾夹把电池夹住, 再滴入少量电解质溶液, 由于毛细管原理, 电解质溶液很快在两个电极之间扩散均匀, 封孔后即可进行光电性能检测。在本实验中参照 Abe 等<sup>[14]</sup>和 Lemieux 等<sup>[15]</sup>的方法, 稍加改动, 以 pH 7.2 的 PBS 缓冲液作为电池中的电极缓冲液。

光电性能的检测在美国颐光科技有限公司(Crown Tech)太阳能电池 I-V 特性测试系统 IV Test Station 2000 上进行, 电压/电流控制和测量采用 Keithley Model 2400 SourceMeter, 在模拟太阳光 (AM 1.5, 100 mW/cm<sup>2</sup>) 照射下测定组装电池的 I-V 特征曲线。得出开路电压  $V_{oc}$ 、短路电流  $I_{sc}$ 、最大输出功率  $P_{out}$ , 利用公式(1)和(2)计算电池的填充因子 FF 和光电转换效率  $\eta$ 。

$$FF = \frac{V_{max} \times I_{max}}{V_{oc} \times I_{sc}} \quad (1)$$

$$\eta = \frac{V_{max} \times I_{max}}{P_{in}} \times 100\% \\ = \frac{V_{oc} \times I_{sc} \times FF}{P_{in}} \times 100\% \quad (2)$$

其中  $V_{max}$  和  $I_{max}$  为最大输出功率时对应的电压和电流,  $P_{in}$  为入射光强。

## 2 结果与讨论

### 2.1 类囊体膜的提取和多肽组成

与高等植物菠菜相比, 海洋绿藻石莼含多糖和淀粉较多, 叶绿体较小, 因此在类囊体膜的制备上略有不同, 收集石莼类囊体膜时所需的离心速度较高, 在匀浆时需要注意将白色沉淀去除。将提取的石莼和菠菜的类囊体膜进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 1 所示。石莼和菠菜类囊体膜的多肽组分相似, 都包括 PSI 的组分 PsaA/B 和 LHCI, 以及 PSII 的组分即 PSII 反应中心的 D1、D2 蛋白和内周天线蛋白 CP47、CP43 和外周天线蛋白 LHCII 等。

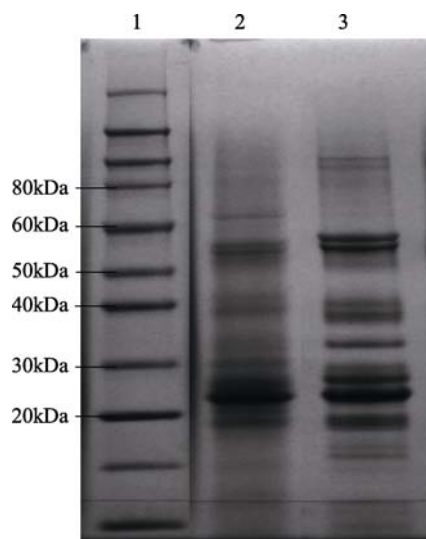


图 1 石莼和菠菜类囊体膜的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of thylakoid membranes isolated from *Ulva* and spinach

1. 标准分子质量蛋白质 Marker; 2. 石莼类囊体膜; 3. 菠菜类囊体膜  
 1. Molecular mass markers; 2. thylakoid membrane of *Ulva*; 3. thylakoid membrane of spinach

## 2.2 纳米 ZnO 的制备和表征

纳米 ZnO 是一种重要的光催化材料, 具有成本低廉、生物相容性较好和电子传递特性较高的优点, 因此在太阳能电池、传感器、光电器件等方面都有广泛应用。本实验采用水热合成法定向生长 ZnO 纳米线并用原子力显微镜(AFM)和扫描电镜(SEM)对其进行了表征, 结果如图 2 和图 3 所示。

ZnO 晶核在 FTO 导电玻璃表面的分布情况和分布的粒径范围对纳米线的生长及性能有重要的影响。图 2 显示 1 mmol/L 的  $Zn(Ac)_2$  乙醇溶液接种 5 次, 晶核在 FTO 导电玻璃表面分布比较均匀, 粒径的分布情况也较好, 一般在 20~40 nm。图 3 显示纳米 ZnO 纤维在 FTO 玻璃上的生长情况, 纳米 ZnO 纤维垂直 FTO 向上生长, 长度基本一致, 形成了均匀分布的纳米簇, 增加了与蛋白的接触面积, 减少了电流传递时的电阻, 从而可以提高光电池的光电转化效率。

## 2.3 类囊体膜在纳米 ZnO 上的吸附及光电性质

蛋白在固体界面上的吸附有很多形式, 如果蛋白在固体界面自由吸附, 往往会形成堆积或者分布不均匀, 使得在光电实验过程中得到的结果不稳定。

因此, 尝试用 LB 膜技术将类囊体膜组装在纳米 ZnO 上, 以得到有序排列的蛋白分子组装体系。

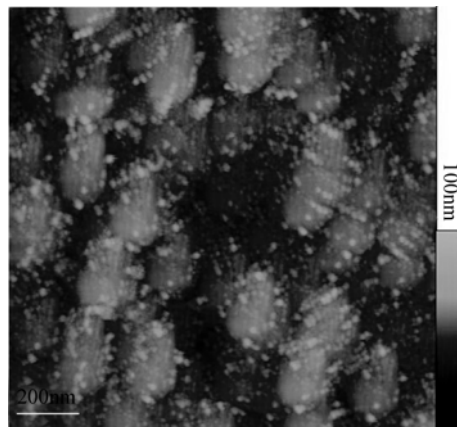


图 2 原子力显微镜观察在 FTO 上的纳米 ZnO

Fig. 2 Atomic Force Microscope (AFM) analysis of Nano-ZnO on FTO

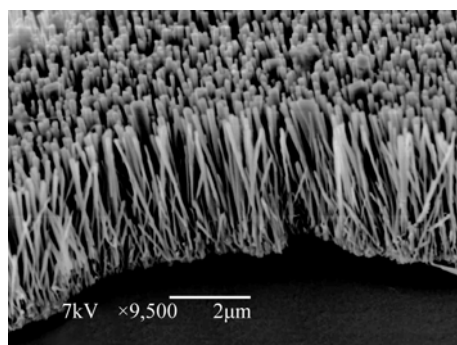


图 3 纳米 ZnO 的扫描电子显微镜照片, 45°侧视图

Fig. 3 Scanning electron microscope (SEM) images of the nano-ZnO, tilt 45°

图 4 是石莼类囊体膜 LB 膜在纳米 ZnO 上的室

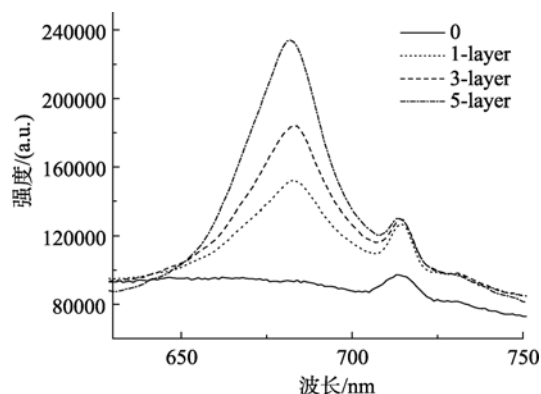


图 4 不同层石莼类囊体膜 LB 膜在纳米 ZnO 上的室温荧光发射光谱, 436 nm 激发

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of *Ulva* thylakoid membrane-LB film with different layers deposited on Nano-ZnO at room temperature, 436 nm excitation

表 1 不同层数类囊体膜 LB 膜组装成光电池的光电性能参数

Tab. 1 Photoelectric parameters of solar cells containing thylakoid membrane-LB film with different layers

类囊体膜	FF	$\eta(\%)$	$P_{in}(mW/cm^2)$
菠菜类囊体膜 1 层	0.06	0.76E-6	100
菠菜类囊体膜 3 层	0.23	0.13E-2	100
菠菜类囊体膜 5 层	0.35	0.11E-1	100
石莼类囊体膜 1 层	0.28	0.97E-2	100
石莼类囊体膜 3 层	0.23	0.49E-1	100
石莼类囊体膜 5 层	0.29	0.91E-1	100

温荧光发射光谱, 类囊体膜的最大荧光发射峰在 683 nm, 随着类囊体膜在 ZnO 上吸附层数的增加荧光发射强度增大。菠菜类囊体膜的荧光发射光谱表现出相同的趋势(结果未显示)。

已有报道可以将类囊体膜组装成不同的电化学器件, Abe 等<sup>[14]</sup>通过静电吸附将螺旋藻的类囊体膜和聚离子复合聚乙烯亚胺(PEI)组装在金电极表面, 具有光电化学活性, 并且能够被除草剂抑制。将类囊体膜包埋在白蛋白-戊二醛交联介质中组装成光电池, 与天然类囊体膜相比, 对高温、高 pH 和高光强胁迫条件具有更强的耐受性<sup>[15]</sup>。本实验结果表明用 LB 膜技术可以将类囊体膜组装到纳米 ZnO 上, 而且能够产生光电流。由不同层数的石莼和菠菜类囊体膜 LB 膜在 ZnO 上组装成光电池的 I/V 曲线如图 5、图 6 所示, 表 1 列出了各光电池的光电性能参数。类囊体膜 LB 膜的层数显著影响了光电池的光电转化效率  $\eta$  值, 随着层数的增加, 光电转化效率大大增加。Abe 等<sup>[14]</sup>的实验结果也表明, 用静电吸附法得到的类囊体膜电化学器件产生的光电流随着吸附层数的增加而增加。

此外, 海洋绿藻石莼类囊体膜组装的光电池光电转化效率明显高于菠菜类囊体膜。影响光电转化

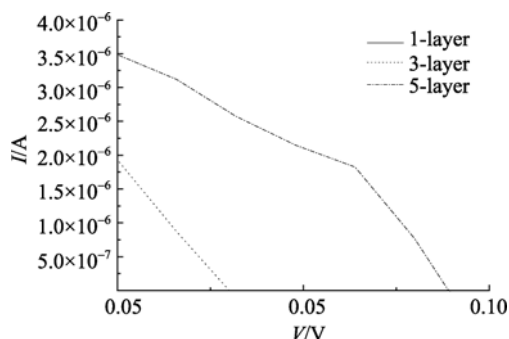


图 5 不同层数菠菜类囊体膜 LB 膜组装成光电池的 I-V 曲线

Fig. 5 Current-voltage curves of solar cells containing spinach thylakoid membrane-LB film with different layers

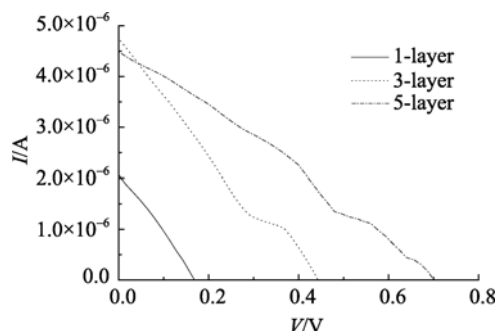


图 6 不同层数石莼类囊体膜 LB 膜组装成光电池的 I-V 曲线

Fig. 6 Current-voltage curves of solar cells containing *Ulva* thylakoid membrane-LB film with different layers

效率的因素有很多, 类囊体膜的光合电子传递活性、类囊体膜与氧化锌的吸附作用、电子从膜到工作电极的扩散等都可能影响光电流的产生速率。已有报道表明, 绿藻石莼具有与高等植物不同的荧光诱导特性<sup>[16]</sup>、色素组成、类囊体膜堆叠方式以及荧光发射特性<sup>[17-19]</sup>。石莼的最大荧光量子产额高于其他藻类, 其生长速度和产量也高于很多种属<sup>[20-21]</sup>。石莼类囊体膜组装的光电池光电转化效率较高与其类囊体膜的特性具有怎样的关系, 该机理还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 匡廷云 主编. 光合作用原初光能转化过程的原理与调控[M]// 李良璧, 匡廷云. 光合作用原初光能转化过程概述. 南京: 江苏科学技术出版社, 2003: 3-21.
- [2] Lemieux S, Carpentier R. Properties of immobilized thylakoid membranes in a photosynthetic photoelectrochemical cell [J]. Photochemistry and Photobiology, 1988, 48: 115-121.
- [3] Rupa D, Patrick J K, Michael S, et al. Integration of photosynthetic protein molecular complexes in

- solid-state electronic devices [J]. *Nano Letters*, 2004, 6: 1079-1083.
- [4] Yehezkeili O, Wilner O I, Tel-Vered R, et al. Generation of photocurrents by Bis-aniline-Cross-Linked Pt Nanoparticle/ Photosystem I Composites on Electrodes[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114: 14383-14388.
- [5] Terasaki N, Iwai M, Yamamoto N, et al. Photocurrent generation properties of Histag-photosystem II immobilized on nanostructured gold electrode [J]. *Thin Solid Films*, 2008, 516: 2553-2557.
- [6] Siebert M, Janzen A F, Kendall-Tobias M. Light-induced electron transport across semiconductor electrode reaction-center film/electrolyte interfaces [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1982, 35: 193-200.
- [7] Ham M H, Choi J H, Boghossian A A, et al. Photoelectrochemical complexes for solar energy conversion that chemically and autonomously regenerate [J]. *Nature Chemistry*, 2010, 2: 929-936.
- [8] Pepe I M, Nicolini C. Langmuir-Blodgett films of photosensitive proteins [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 1996, 33: 191-200.
- [9] 何新安, 蒋丽金, 毕只初, 等. 藻胆蛋白的 Langmuir-Blodgett 膜—II. R-藻红蛋白的光电化学性质研究 [J]. *中国科学*, 1996, 26: 221-230.
- [10] Carr H, Björk M. Parallel changes in non-photochemical quenching properties, photosynthesis and D1 levels at sudden, prolonged irradiance exposures in *Ulva fasciata* Delile [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2007, 87: 18-26.
- [11] Kakinuma M, Coury D A, Kuno Y, et al. Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) [J]. *Marine Biology*, 2006, 149: 97-106.
- [12] Berthold D A, Babcock G T, Yocum C F. A highly resolved, oxygen-evolving Photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes EPR and electron-transport properties [J]. *FEBS Letters*, 1981, 134: 231-234.
- [13] Li D H, Yang S Z, Li H, et al. Monolayer film of phycobilisome-thylakoid membrane complexes from *Spirulina platensis* [J]. *Photosynthetica*, 2004, 42: 365-370.
- [14] Abe K, Ishii A, Hirano M, et al. Photoactivity characteristics of a biodevice using primary photosynthetic reaction centers [J]. *Electroanalysis*, 2005, 24: 2266-2272.
- [15] Lemieux S, Carpentier R. Properties of immobilized thylakoid membranes in a photosynthetic photoelectrochemical cell [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1988, 48: 115-121.
- [16] Bruce D, Vidaver W, Colbow K, et al. Electron Transport-Dependent Chlorophyll-a Fluorescence Quenching by O<sub>2</sub> in Various Algae and Higher Plants [J]. *Plant Physiol*, 1983, 73: 886-888.
- [17] Yamazaki J, Suzuki T, Maruta E. The stoichiometry and antenna size of the two photosystems in marine green algae, *Bryopsis maxima* and *Ulva pertusa*, in relation to the light environment of their natural habitat [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 416: 1517-1523.
- [18] Yamazaki J, Kozu A, Fukunaga Y. Characterization of chlorophyll-protein complexes isolated from two marine green algae, *Bryopsis maxima* and *Ulva pertusa*, growing in the intertidal zone [J]. *Photosynthesis Research*, 2006, 89: 19-25.
- [19] Murakami S, Packer L. Light-induced changes in the conformation and configuration of the thylakoid membrane of *Ulva* and *Porphyra* chloroplasts in vivo [J]. *Plant Physiology*, 1970, 45: 289-299.
- [20] Littler M M, Littler D S. The evolution of thallus form and survival strategies in benthic marine macroalgae: field and laboratory tests of a functional form model [J]. *The American Naturalist*, 1980, 116: 25-44.
- [21] Chaloub R M, Reinert F, Nassar C A G, et al. Photosynthetic properties of three Brazilian seaweeds [J]. *Revista Brasileira De Botanica*, 2010, 33: 371-374.

# The photoelectrical properties of thylakoid membrane from two plants fabricated on Nano-ZnO

LIU Shuang, ZHANG Pan-hui, QIU Yu, ZHANG Jian, YU Dao-yong

(Center for Bioengineering and Biotechnology, College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum, Qingdao 266555, China)

**Received:** Dec.,25,2010

**Key words:** *Ulva lactuca*; *Spinacia oleracea*; thylakoid membrane; Nano-ZnO; LB film

**Abstract:** ZnO nanowires were synthesized on the FTO glass by hydrothermal method and characterized by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). Thylakoid membranes isolated from higher plant spinach and marine green alga *Ulva lactuca* were fabricated on the ZnO nanowires by using Langmuir Blodgett (LB) technique. The photoelectrical properties of these two resulting systems were assessed and compared by solar cell test system. Photocurrents were both observed the solar cells containing the LB films of the thylakoid membranes of these two plants. The photoelectric conversion efficiencies of solar cells were increased significantly with the numbers of LB film layer. In addition, the photoelectric conversion efficiency of cell containing *Ulva* thylakoid membrane was much higher than that of spinach.

(本文编辑:康亦兼)