

# 激光双光子诱导血红蛋白等生物 分子荧光特性的研究

惠令凯\* 立 群 张 拯 潘成明

(中国科学院上海光机所)

江寿平 连少辉 陈立群 阮康成 黄天钦

(中国科学院上海生化所)

刘 颂 豪

(中国科学院安徽光机所)

**提要:** 采用调 Q 重复频率 Nd:YAG 激光器, 研究了牛高铁血红蛋白、珠蛋白(脱辅基血红蛋白)、色氨酸和酪氨酸等生物分子在激光双光子作用下诱导的荧光特性和非线性效应。证明产生双光子吸收的生色团主要是样品中的色氨酸。色氨酸和酪氨酸荧光强度的明显差别, 是因为它们的双光子吸收截面不同所致, 这将为选择性激发指出一种新的途径。

## Study of two-photon induced fluorescence of protein

*Hui Lingkai, Li Qun, Zhang Zheng, Pan Chengming*

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica)

*Jiang Shouping, Lian Shaohui, Chen Liqun, Ruan Kangcheng, Huang Tianqin*

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

*Liu Songhao*

(Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica)

**Abstract:** Using a Q-switched Nd:YAG laser the two photon induced fluorescence on bovine high sidero-hemoglobin, globulin, tryptophane and tyrosine and their nonlinear effects

收稿日期: 1983年8月18日。

\* 已调到中国科学院安徽光机所。

have been studied. The two-photon absorption chromophore in bovine high sidero-hemoglobin, bovine serum albumin and globulin are mainly due to the presence of tryptophan. The obvious difference between fluorescence intensities of tryptophan and tyrosine are caused by their different cross sections. It may be a new approach for selective excitation.

## 一、序

1979年苏联光谱研究所 P. G. Kryukov 和苏联分子生物研究所 E. I. Budowsky 等人合作<sup>[1]</sup>, 在研究水溶液中核酸络合物的多光子光化反应时, 观察到 266 毫微米和 530 毫微米两个光子同时被吸收的现象, 并给出了双光子吸收的特征曲线, 但在试图得到 530 毫微米的两个光子吸收时, 却没有观察到。在 1982 年第 12 届国际量子电子学会议上苏联光谱研究所 V. S. Letokhov 和意大利人 A. Andreoni 分别报告了生物分子等的紫外双光子吸收和抗癌药物 HPD 中的双光子吸收, 后者还指出这可能是激光诊、治癌症的新机理。

我们在研究蛋白质衍生物分子的光解实验中<sup>[2]</sup>发现, 单纯用 530 毫微米的激光照射样品时, 其荧光发射谱峰值处在 340 毫微米附近, 谱带的宽度接近 40 毫微米。我们确认, 它的激发波长不可能是 530 毫微米的激光, 因为原则上荧光波长不可能比激发荧光的波长短。为了弄清这个问题, 我们采用调 Q Nd:YAG 激光器的二次谐波( $\lambda=532$ 毫微米)对牛高铁血红蛋白、珠蛋白、牛血清白蛋白、色氨酸和酪氨酸的双光子吸收的非线性效应和双光子诱导荧光特性进行了详细研究。通过对荧光强度、荧光发射谱和双光子非线性特征曲线的分析、比较, 确认双光子吸收是存在的, 而且判明了吸收双光子的生色团。实验还发现, 这两种残基的单光子和双光子荧光强度迥然相反, 暗示着它们的单光子和双光子吸收截面是很不相同的, 而和理论分析结果一致。

## 二、实验装置

实验装置如图 1 所示。

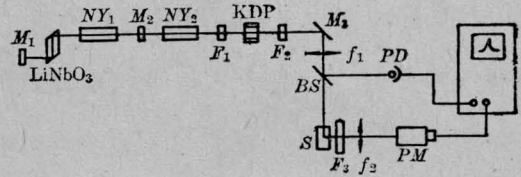


图 1 研究蛋白质分子双光子非线性特征的实验装置

整个装置分为两个部分: 激光光源和荧光检测。激光光源包括振荡器和放大器, 工作物质都是 Nd:YAG。调 Q 采用双 45°LiNbO<sub>3</sub> 晶体电光调 Q 方式。M<sub>1</sub> 为全反射镜, M<sub>2</sub> 的反射率为 50%。输出的 1.06 微米激光经衰减滤光片 F<sub>1</sub> 后, 通过 KDP 晶体倍频, 得到 532 毫微米的绿光。F<sub>2</sub> 滤光片滤去 1.06 微米的余光。经双色滤光片 M<sub>3</sub> 和透镜 f<sub>1</sub> (焦距为 1200 毫米), 将 532 毫微米的激光聚焦到样品盒 S 上。分束板 BS 分出的 532 毫微米激光进入快响应光电二极管 PD, 再将电信号送入示波器, 用来监视激光能量。样品被感应的荧光经过滤光片组 F<sub>3</sub>, 再通过光学聚焦系统 f<sub>2</sub> 成像到光电倍增管 PM 的阴极面上, 信号由示波器显示。

滤光片组 F<sub>3</sub> 由若干紫外滤光片组成, 用来抑制 532 毫微米的散射光。滤光片组 F<sub>3</sub> 还含有干涉滤光片, 干涉滤光片共使用八片, 其中心波长分别为: 310、316、329、341、349、358、369、383 毫微米用来测量荧光谱。这里没有采用单色仪, 因为损耗太大。

进入样品盒的 532 毫微米激光脉冲, 能量为 0.2 毫焦耳, 脉宽为 12 毫微秒, 偏振度

为 98%，激光线宽为  $0.16 \text{ \AA}$ ，聚焦样品盒上的光斑直径为 3 毫米。

光电倍增管采用 56 AVP，工作电压(负高压)2400 伏，最高灵敏度能探测到 5 个光子，时间响应为  $1.9 \pm 0.2$  毫微秒，光电倍增管对波长的响应已做了标定。用示波器显示。

### 三、实验结果

实验用的样品有：牛高铁血红蛋白( $1 \times 10^{-5} M$ )、珠蛋白(脱辅基血红蛋白, 从牛血红蛋白制取( $2 \times 10^{-5} M$ ))、牛血清白蛋白( $1 \times 10^{-5} M$ )、色氨酸( $6 \times 10^{-4} M$ )和酪氨酸( $6 \times$

$10^{-4} M$ )。

以上样品均为双蒸去离子水溶液，pH 6.8， $0.1 M \text{ KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$  缓冲液，实验时样品的环境温度为  $27 \sim 28^\circ\text{C}$ 。

实验结果如下：

1. 测得 532 毫微米激光的双光子激发的荧光发射谱。

实验数据多次重复，并考虑了滤光片组  $F_3$  各紫外滤光片及干涉滤光片的透射率曲线进行归一化处理，得到牛高铁血红蛋白、珠蛋白、牛血清白蛋白和色氨酸的双光子吸收产生的荧光光谱，见图 2。

在本实验条件下，没有探测到酪氨酸的双光子吸收激发的荧光。这一点和理论分析

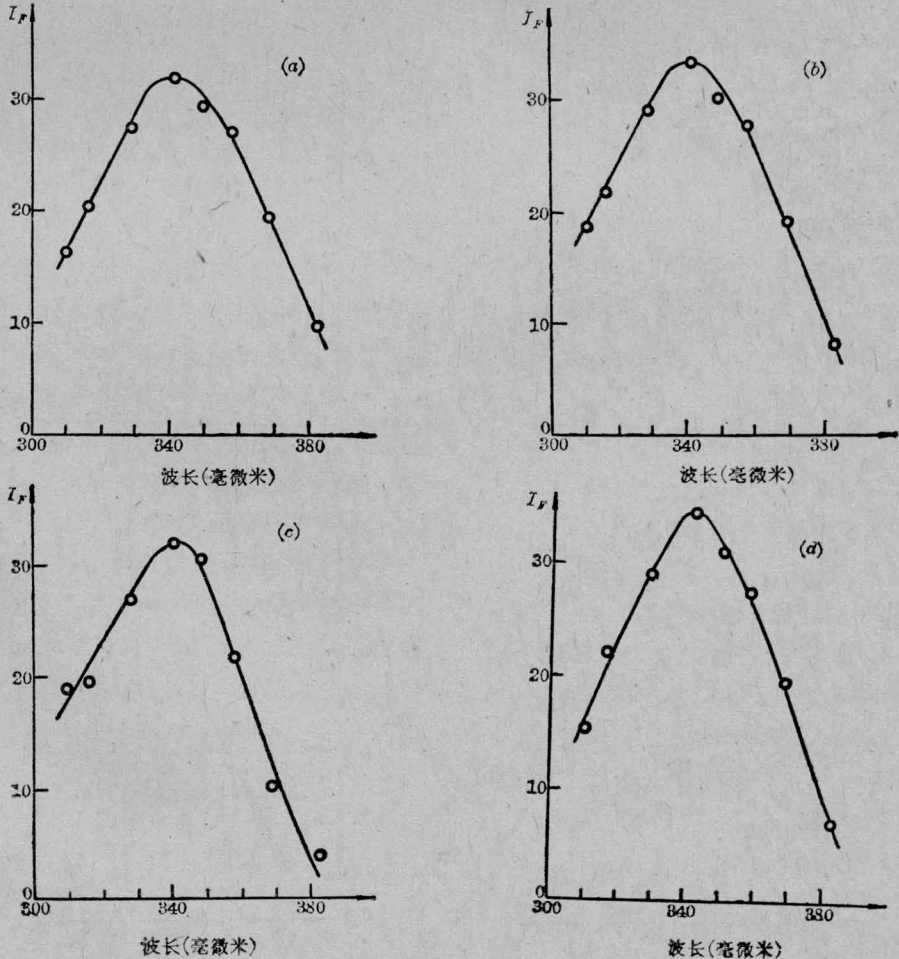


图 2 激光双光子诱导的荧光发射谱

(a) 色氨酸; (b) 牛高铁血红蛋白; (c) 珠蛋白; (d) 牛血清白蛋白



结果<sup>[9]</sup>一致,理论分析表明,色氨酸双光子跃迁是容许的,而酪氨酸是禁戒的。

2. 测量了牛高铁血红蛋白、珠蛋白、牛血清白蛋白和色氨酸的双光子吸收产生的荧光强度  $I_F$  随 532 毫微米波长激光强度  $I_L$  的变化关系,如图 3 所示。从图 3 可知  $I_F$  随  $I_L^2$  的变化呈很好的线性关系(对数坐标),斜率均为 2,即  $I_F \propto I_L^2$ ,这正是双光子吸收的非线性特征的明显表示。

#### 四、讨 论

##### 1. 关于双光子吸收的非线性特征

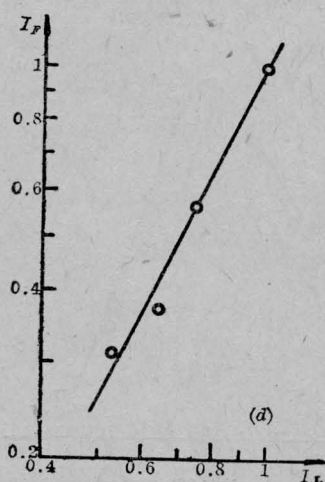
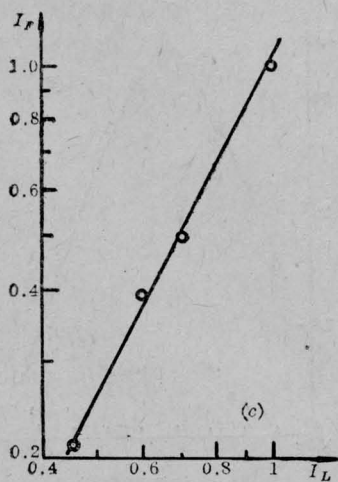
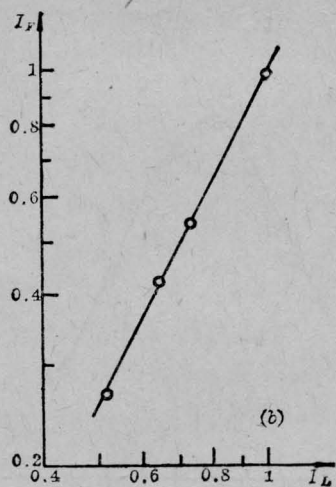
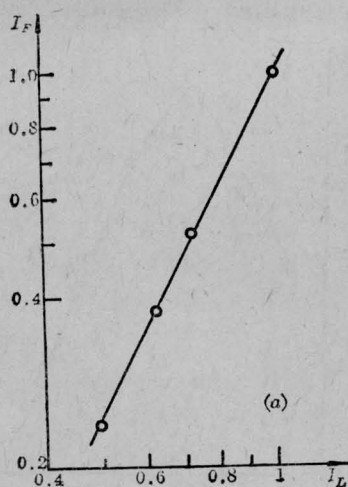


图 3 激光双光子诱导荧光强度同泵浦光(532 毫微米)强度的关系  
(a) 色氨酸; (b) 牛高铁血红蛋白; (c) 珠蛋白; (d) 牛血清白蛋白

根据近共振双光子吸收跃迁几率的理论<sup>[3]</sup>有

$$A_{if} \propto \frac{\nu_{if}}{\left\{ \left[ \omega_{if} - \omega_1 - \omega_2 - V \right]^2 + (\nu_{if}/2)^2 \right\}} \times \left| \sum_K \frac{R_{iK} \cdot e_1 \cdot R_{Kf} \cdot e_2}{(\omega_{Kf} - \omega_1 - K_1 V)} + \frac{R_{iK} \cdot e_2 \cdot R_{Kf} \cdot e_1}{(\omega_{Kf} - \omega - K_2 V)} \right|^2 \cdot I_1 I_2$$

其中,光子  $\hbar\omega_1$  和  $\hbar\omega_2$  的波矢分别为  $K_1$  和  $K_2$ , 偏振矢量分别为  $e_1$  和  $e_2$ , 光束强度分别为  $I_1$  和  $I_2$ 。  $\nu_{if}$  为  $E_i$  到  $E_f$  单光子跃迁时的均匀线宽。  $V$  为运动分子的速度矢量。  $A_{if}$  为双光子跃迁几率。

在我们的实验条件下,即单一激光束的情况下有:

$$A_{if} \propto I^2$$

由此可知,双光子吸收产生的荧光强度  $I_F$  和激发光(532毫微米)强度  $I_L$  的关系是

$$I_F = \beta I_L^2$$

取对数坐标,则有:

$$\log I_F = 2 \log I_L + C \quad (C \text{ 是常数})$$

因此,在用对数坐标表示的  $I_F-I_L$  关系曲线上,应是斜率为2的一条直线。图3很好地符合这一非线性双光子吸收的特征。这就证明了双光子吸收是存在的,这和原来预想的结果<sup>[2]</sup>完全一致。

### 2. 双光子荧光的衰减特性

根据已有的文献报导,我们在下面表1中给出几种样品的荧光寿命  $\tau_F$  和单光子荧光的量子产额  $Q_F$ <sup>[4]</sup>。

表 1

样 品	溶剂	pH	$Q_F$	$\tau_F$ (毫微秒)(温度)
色 氨 酸	H <sub>2</sub> O	7	0.19	2.6 (23°C)
酪 氨 酸	H <sub>2</sub> O	7	0.21	2.6 (23°C)
高铁血红蛋白	H <sub>2</sub> O	7		3.5 (3°C) 2.4 (25°C)
珠 蛋 白	H <sub>2</sub> O	7		4.3 (3°C)

从表1可以看出它们的荧光寿命  $\tau_F$  很短,约2~5毫微秒。我们的测量比这个值大,其偏差主要来自我们实验中的激光脉宽较宽,从而无法分辨和测量它们的荧光寿命。因此示波器上显示出来的双光子荧光时间衰减特性,是受到脉冲波形的影响的。

### 3. 选择性激发的新途径

选择性激发已被用于生物分子的选择性分离和选择性探测生物分子等重大课题,其意义十分重要。本实验结果预示着选择性激发新的可能途径,即通过双光子吸收截面和单光子吸收截面不同来实现。为了说明这个问题,我们在下面表2中给出芳香族氨基酸残基的含量<sup>[7]</sup>。

表 2

样 品	分子量	氨基酸成分(重量百分比)		
		苯丙氨酸	酪氨酸	色氨酸
牛血清白蛋白	67000	6.2	5.49	0.58

已知色氨酸和酪氨酸的分子结构以及它们的吸收峰波长和跃迁性质,如图4和表3。

一般来说,①牛高铁血红蛋白和血清白蛋白分子中都含有酪氨酸残基和色氨酸残

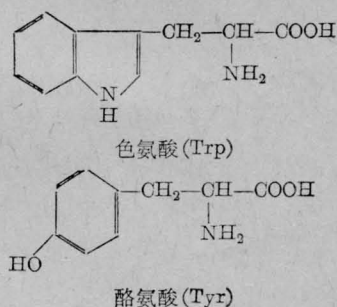


图 4 色氨酸和酪氨酸分子的化学结构

表 3

生色基团	所属残基	吸收峰波长(毫微米)	跃 迁
酚 基	Tyr OH	193	$\pi \rightarrow \pi^*$
		222	$\pi \rightarrow \pi^*$
		270	$\pi \rightarrow \pi^*$
酚 基	Tyr O <sup>-</sup>	235	$\pi \rightarrow \pi^*$
		287	$\pi \rightarrow \pi^*$
吲 哚	Trp	195	$\pi \rightarrow \pi^*$
		220	$\pi \rightarrow \pi^*$
		280	$\pi \rightarrow \pi^*$
		286	$\pi \rightarrow \pi^*$

基;②从含量百分比看,酪氨酸比色氨酸含量高;③从吸收峰波长看,酪氨酸比色氨酸更接近266毫微米,例如表2和表3。事实上,当用波长266毫微米的单光子激发它们时,前者比后者荧光量子产额稍高(见表1),同时,在实验中所用样品的浓度下,它们不同的克分子消光系数对荧光强度的贡献是同数量级的。我们用荧光光谱仪 HITACHA 650-6C

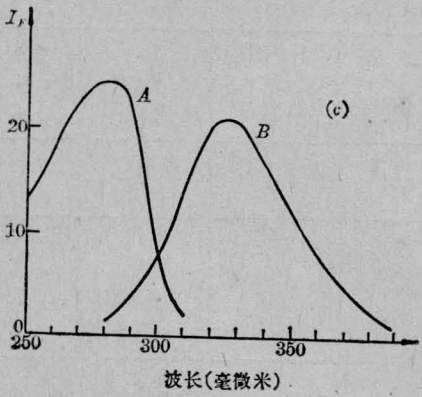
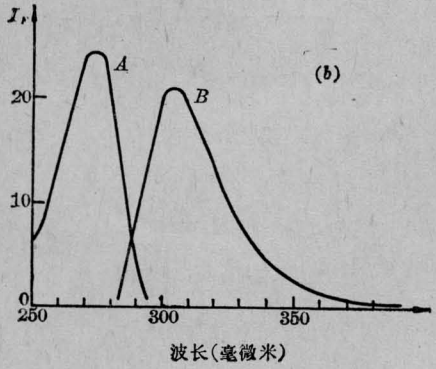
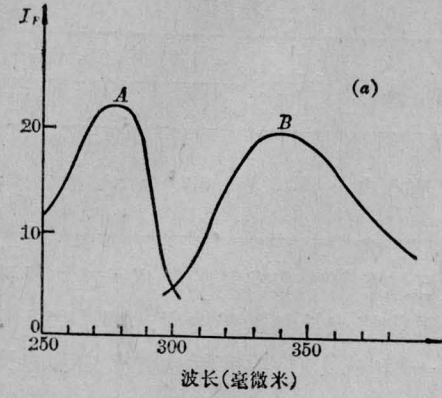


图5 单光子(266毫微米)的荧光激发谱(A)和荧光发射谱(B)  
 (a) 色氨酸; (b) 酪氨酸; (c) 牛高铁血红蛋白

测得了色氨酸、酪氨酸、牛高铁血红蛋白的单光子吸收荧光光谱和荧光激发谱, 如图5所示。图5表明: ① 它们的荧光峰值强度相近, 酪氨酸的峰值强度不小于色氨酸的峰值强度; ② 用266毫微米波长的单光子激发的荧光谱, 对酪氨酸而言, 峰值在305毫微米, 对色氨酸而言, 峰值在340毫微米; ③ 血红蛋白的荧光峰在325毫微米附近, 反映出色氨酸和酪氨酸的联合贡献。

但是, 当我们用532毫微米的激光激发样品时, 产生了双光子吸收。如果样品的双光子吸收截面和它们的单光子吸收截面相近或相同, 则不言而喻, 我们会得到同样的荧光强度。但是, 我们的实验出现了非常有趣的现象: ① 牛高铁血红蛋白、珠蛋白和牛血清白蛋白的荧光峰值所处波长是340毫微米, 显示出色氨酸的荧光特性; ② 在我们的实验条件下, 探测不出酪氨酸的双光子激发的荧光。一种可能的解释是, 它们的单光子和双光子吸收截面相差很大, 从而预示着选择激发的一种新的可能途径。

### 参 考 文 献

- [1] P. G. Kryukov *et al.*; *Chem. Phys. Lett.*, 1979, **61**, 375.
- [2] 连少辉, 惠令凯等;《分子科学与化学研究》, 1982, No. 3.
- [3] W. Demtroder; *Laser Spectroscopy, Springer Series in Chemical Physics*, **5**, 436.
- [4] 沈同等编著;“生物化学”, 北京人民教育出版社, 1980.
- [5] V. S. Letokhov; *Springer Series in Opt. Sci.*, 1976, **3**, 122.
- [6] A. Andreoni *et al.*; *Springer Series in Opt. Sci.*, 1980, **22**, 216.
- [7] 刘思帜等编著;“蛋白质的生物化学”,
- [8] 惠令凯;《激光科学与技术》, 1982, No. 3, 1.
- [9] 张拯等;《中国激光》, 待发表。