

图4 充铷铯泡光电流信号强度的径向分布

我们测量了光电流信号强度随激光入射到泡的径向位置变化而有特别的径向分布。发现气体样品泡(氖)与蒸气样品泡(铷)光电流信号强度的径向分布是截然不同的。氖泡的光电流信号在泡中央处有一峰值,并沿泡的径向距离增大而下降,在泡壁处变得很弱。实验结果如图2中曲线(a)所示。铷泡光电流信号的径向分布则具有U字形的特殊分布,即光

电流信号在泡中央为最小值,随径向距离增大而上升,在泡壁附近达最大值,然后迅速下降,对纯铷泡和充铷铯泡的实验结果分别如图3及图4中曲线(a)所示。

纯铷泡光电流信号的径向分布有不同于充铷铯泡的特点,后者在泡中心处信号强度下降得更低,变化也陡峭得多。对于蒸汽样品放电泡光电流信号径向分布的进一步研究,可能提供一种测量放电泡中激发态原子密度的方法。

参 考 文 献

- 1 Goldsmith J E M, Law J E. *Contemp. Phys.*, 1981; **22**: 235
- 2 Miyaguki H, Scheiysaker H, Vidal C R. *Phys. Rev.*, 1983; **28**: 2229
- 3 Valentini H B. *Opt. Commun.*, 1985; **53**: 313
- 4 Zhong Xubin, Liu Jinting, Liu Bingmo. *Chinese Phys. Lett.*, 1986; **3**: 57
- 5 NBS of U. S., *Wavelength and Transition Probability for atoms and atomic ions*, n. p., U. S. Department of Commerce, 1980; 235

(收稿日期: 1987年3月3日)

双光子诱导蛋白质分子荧光的研究

徐英武 张晶如 邓玉妹 江寿平* 连少辉* 惠令凯

(中国科学院安徽光机所)

Study of two-photon absorption induced fluorescence from protein

Xu Yingwu, Zhang Jinru, Deng Yumei, Jiang Shoupin, Lian Shaohui, Hui Linkai

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

Abstract: At room temperature, the UV fluorescence due to the induced two-photon absorption from trypsin, thyroglobulin, hemoglobin and albumin have been observed when they are excited with the radiation of second harmonic of Q-switched Nd: YAG laser.

引 言

从光谱的角度看,双光子研究可以获得关于单光子禁戒态的特性,而这些禁戒态在生物上可能具有重要作用。如 β -胡萝卜素的最低禁戒激发态 $\sigma\sigma^*$

起着能量施主的作用^[1]。此外双光子方法还可以用来研究生物分子内部或分子之间的能量转移过程,获得关于分子的相互作用的有关信息。从生物医学应用的角度看,由于多光子手段可以实现选择作

* 中国科学院上海生物化学研究所。

用^[2], 就为医学提供了一条可能的选择损伤或切割特定病变部位的途径。

苏联对核糖核酸进行了两步激发研究^[3], 所用光源主要是锁模 Nd:YAG 激光。Berns 等在用染料调谐激光器研究作用光谱时^[4], 提出组蛋白中可能的双光子效应, 但没有作进一步的证实。Birge 等用 N₂ 分子泵浦染料激光^[5], 比较系统地研究过视觉染色体的双光子过程。其中有些实验是在低温下进行的, 主要测量的是双光子激发谱或吸收谱, 并假设双光子诱导的荧光辐射谱与单光子荧光辐射谱相同。

我们研究了在生命过程中起着重要作用的一类分子——蛋白质分子的双光子荧光辐射谱, 获得了一些有益的结果。

实 验

图 1 是实验装置示意图。所用光源是调 Q 的 Nd:YAG 激光, 基频 1.06 μm 输出为垂直线偏振光, 脉宽约 10 ns。经 KDP 倍频后的绿光(532 nm) 从上至下聚焦到样品池内, 焦斑直径约 0.8 mm。信号经侧向接收由 OSA (光学光谱分析仪) 显示并处理。由于信号较弱, 必须多次累加。利用 OSA 的记忆与运算功能, 扣除了背景噪声, 获得了无背景的属于样品的信号。用汞光谱灯进行标定, 并用标准白炽灯进行了光谱校正。

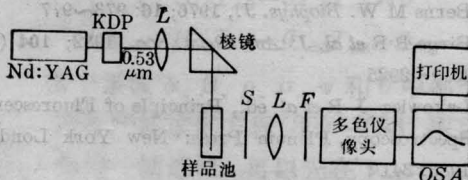


图 1 测量多光子荧光实验装置示意图

S—狭缝; L—透镜; F—滤光片

样品是上海生物化学研究所的产品, 所用溶剂是由去离子水加磷酸盐配制而成, 其浓度为 0.01 M, pH 值为 7 (接近生理条件)。配制的样品浓度为: 胰蛋白酶和白蛋白— 1×10^{-5} M, 甲状腺球蛋白— 0.5×10^{-5} M, 血红蛋白— 4×10^{-6} M, 色氨酸和酪氨酸— 6×10^{-4} M。实验在室温(27°C)下进行。

结果与分析

用 Nd:YAG 倍频 532 nm 光(能量 4.4 mJ)照射上述样品。观察到胰蛋白酶、甲状腺球蛋白、血红蛋白、白蛋白以及色氨酸的紫外荧光辐射。图 2 给出了它们的荧光包络。酪氨酸在该波段无荧光信号

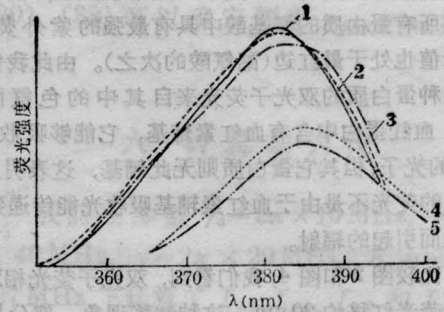


图 2 在 532 nm 激发下的双光子荧光谱

1—色氨酸; 2—白蛋白; 3—甲状腺球蛋白;
4—胰蛋白酶 5—血红蛋白

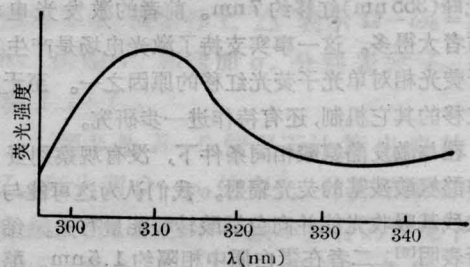


图 3 酪氨酸的双光子荧光谱, 激发波长 532 nm

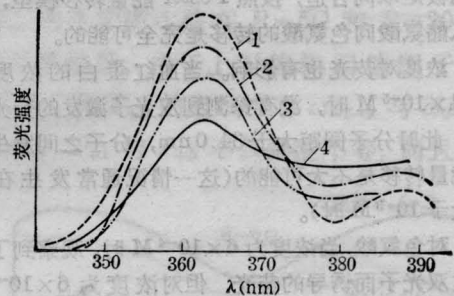


图 4 在 266 nm 激发下的单光子荧光谱

1—色氨酸; 2—白蛋白; 3—胰蛋白酶;
4—甲状腺球蛋白

(对浓度为 4×10^{-5} 和 2×10^{-5} M 的血红蛋白也未观察到信号)。酪氨酸的弱辐射见图 3, 但其它样品则无该波段的荧光

为进一步分析起见, 利用 Nd:YAG 的四倍频 266 nm 的紫光激发以上样品(其功率密度明显小于 532 nm 激发下的功率密度), 得到的单光子荧光辐射谱如图 4 所示。

从图 2 可见, 蛋白质和色氨酸的双光子荧光峰值位置基本在 380~385 nm 之间, 带宽约 20 nm。色氨酸的荧光轮廓与甲状腺球蛋白、白蛋白的类似, 而且酪氨酸在该波段无荧光信号。研究也表明^[6], 蛋

白质的紫外荧光均来自其中的氨基酸残基，而色氨酸在所有蛋白质的氨基酸中具有最强的紫外荧光，其峰值也处于最红边(酪氨酸的次之)。由此我们认为四种蛋白质的双光子荧光来自其中的色氨酸残基。血红蛋白中含有血红素辅基，它能够吸收 532 nm 的光子，但其它蛋白质则无此辅基，这表明血红蛋白的荧光不是由于血红素辅基吸收光能传递到色氨酸而引起的辐射。

比较图 2 和图 4, 我们看到, 双光子荧光相对单光子荧光红移约 20 nm。这种红移现象, 部分是由于激光电场使能级发生变化而引起的。

实验上用脉冲光源(266 nm)激发色氨酸的荧光峰值位于 362 nm, 比用 Xe 灯光源(265 nm)激发的荧光峰(355 nm)红移约 7 nm。前者的激发电场比后者大得多。这一事实支持了激光电场是产生双光子荧光相对单光子荧光红移的原因之一。至于产生红移的其它机制, 还有待作进一步研究。

在与激发酪氨酸相同条件下, 没有观察到蛋白质中酪氨酸残基的荧光辐射。我们认为这可能与酪氨酸残基吸收光能并向色氨酸转移能量有关。结构分析表明^[6], 二者在蛋白质中相隔约 1.5 nm。酪氨酸的紫外荧光光谱也与色氨酸的吸收谱重叠, 只要两者偶极矩取向合适, 按照 Förster 能量转移模型, 能量从酪氨酸向色氨酸的转移是完全可能的。

浓度对荧光也有影响。当血红蛋白的浓度为 $2 \sim 4 \times 10^{-5}$ M 时, 没有探测到双光子激发的荧光信号。此时分子间距大于 34.0 nm, 分子之间发生共振能量转移是不大可能的(这一情况通常发生在浓度大于 10^{-3} M 时)。

对色氨酸, 当浓度为 6×10^{-4} M 时, 观察到了它吸收双光子而诱导的荧光, 但对浓度为 6×10^{-8} M 的色氨酸则无此荧光信号。在后者情况下, 分子间距约 6.0 nm, 故激发的色氨酸向未激发的色氨酸发生共振能量转移是很容易产生的。这种通过碰撞而产生的能量转移淬灭或减弱了荧光信号, 结果实验上就难以探测。

为了对蛋白质分子的双光子吸收截面有个数量级的概念, 我们作了一些估算。在 $1.06 \mu\text{m}$ 激发下测量若丹明 6G 的双光子荧光积分强度为 I_{6G} , 在 532

nm 激发下测得生物样品的双光子荧光积分强度为 I , 激光功率记为 P 。利用公式^[7]

$$I \propto C \cdot \varphi \cdot \sigma \cdot P^2$$

即可算出双光子吸收截面 σ 。其中 φ 为荧光量子产额。

蛋白质的荧光量子产额 $\varphi \sim 10^{-2}$ ^[8]。若丹明 6G 的 $\varphi_{6G} \sim 10^{-1}$, 故取 $\varphi/\varphi_{6G} \sim 10^{-1}$ 。另外 OSA 接收系统在紫外区比可见区要灵敏约 10 倍。这样最后估算的几种样品的双光子吸收截面为:

色氨酸 $\sim 2G$ 胰蛋白酶 $\sim 10G$

酪氨酸 $\sim 0.3G$ 甲状腺球蛋白 $\sim 86G$

血红蛋白 $\sim 15G$

计算中用 $\sigma_{6G} \sim 5G$ ^[9], $1G = 10^{-50} \text{cm}^4 \cdot \text{s} (\text{分子} \cdot \text{光子})^{-1}$ 。

感谢吴存恺研究员的指导。OSA 组的同志在使用 OSA 方面提供了极大方便。

参 考 文 献

- 1 Thrash R J *et al.* *Photochem. Photobiol.* 1979; **29**: 1049~1050
- 2 Angelov D A *et al.* *Conf. "Lasers in Photobiology and Photomedicine"*, Florence, 1979
- 3 Nikogosyan D N *et al.* *Chem. Phys.*, 1985; **97**: 31~41
- 4 Berns M W. *Biophys. J.*, 1976; **16**: 973~977
- 5 Birge R R *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1982; **104** (9): 2519~2925
- 6 Lakowicz J R *et al.* ed., *Principle of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press: New York London, 1983: 341
- 7 Kligler D S ed., *Ultrasensitive Laser Spectroscopy*, Academic Press: New York and London, 1983: 149
- 8 Gao Yaojin. *Opt. Engineering*, 1983; **22** (5): 596~601
- 9 Rabin H, Tang C L eds., *Quantum Electronics: A Treatise*, New York: Academic Press, 1975; Vol. 1: 344

(收稿日期: 1987年3月20日)