

# 激光诱导血红蛋白分子的多光子荧光

张晶如 徐英武 邓玉妹 吴存恺

(中国科学院安徽光学精密机械研究所)

江寿平 连少辉

(中国科学院上海生物化学研究所)

## 提 要

本文首次报道了血红蛋白吸收二个和四个  $1.06 \mu\text{m}$  的光子后所发射的荧光特性,并分析了其产生的原因。

关键词: 生物分子光谱;多光子荧光;血卟啉衍生物;血红蛋白。

## 一、引 言

目前,对生物分子的双光子光谱的实验和初步的理论探讨,国内外已均有报道。主要的研究对象是一些有机分子,如:卟啉、视紫红质、视觉生色团、维生素 A 等<sup>[2,3]</sup>。关于蛋白质的双光子工作仅见一篇报道。这是关于血红蛋白、白蛋白、溶菌酶在  $0.53 \mu\text{m}$  激光作用下的双光子荧光研究<sup>[4]</sup>。大多数工作是在低温下进行的(77 K),这与生物分子的实际环境温度相差太远。而且因为生物分子的双光子荧光较弱,大多数研究偏重于其吸收谱的测量,或测其双光子荧光的积分强度。且一般认为生物分子吸收双光子后新辐射的荧光发射谱与其相应的单光子荧光发射谱相同。而真正探测过生物分子的荧光发射谱的仅见一篇报道,他们是用滤光片分波段测量荧光积分强度而得到的。至于生物分子的多光子荧光发射谱的研究,就我们所知,还未见报道。

本工作是在室温下,用调 Q Nd:YAG 激光器,脉宽约 10 ns 的  $1.06 \mu\text{m}$  激光激发血红蛋白等生物样品,第一次观察到血红蛋白在 641 nm 和 712 nm 附近吸收两个  $1.06 \mu\text{m}$  光子后所发射的两个红色荧光带,带宽约 25 nm;在 392 nm 附近吸收四个  $1.06 \mu\text{m}$  光子后所发射的荧光带,带宽约 25 nm。经实验分析认为,血红蛋白的两个双光子红色荧光带来自其中的血红素基团;血红蛋白在 392 nm 处的辐射来自其中的色氨酸基团。

## 二、实 验

实验装置如图 1 所示。调 Q Nd:YAG 激光器输出的  $1.06 \mu\text{m}$  垂直线偏振激光,脉冲宽度约 10 ns,通过转直棱镜、石英聚焦镜,自上往下紧贴透光窗内面射入石英样品池内。侧向接收样品发射的荧光信号,光收集系统由  $f=50 \text{ mm}$  与  $f=100 \text{ mm}$  的两块石英透镜和一

块滤光片组成。将收集到的光信号送入光学多道分析仪(OSA)的多色仪(内含 600 lines/mm 紫外全息光栅)。

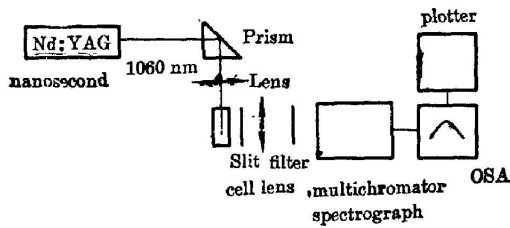


Fig. 1 Experimental setup for measuring multiphoton fluorescence

OSA 显示屏一次可以显示约 6000 Å 的光谱宽度。每次获取有样品的光信号后,立即取同样多次累加的无样品背景噪声信号,再利用 OSA 的附设微机系统处理得到纯样品信号。用同样方法取溶剂的谱加以对照。累加次数一般在 10~30 次不等(OSA 扫描 30~240 次),激光重复率由手动控制,一般不超过每秒一次。

实验所用的溶剂是 PAS, pH 值为 7, 是由磷酸盐加去离子水配制而成。生物样品均由上海生化所提供。配制的几种样品的浓度是: 白蛋白为  $1 \times 10^{-5}$  M, 胰蛋白酶为  $1 \times 10^{-5}$  M, 色氨酸  $6 \times 10^{-4}$  M,  $6 \times 10^{-3}$  M, 酪氨酸  $6 \times 10^{-4}$  M。

### 三、结 果

#### 1. 1.06 μm 激光诱导的血红蛋白(Hb)的双光子荧光。

用 1.06 μm 激光照射到血红蛋白样品上, OSA 多色仪鼓轮分别处在 640 nm 和 690 nm 时, 观察到 Hb 所发射的两个红色荧光带, 其峰值位置分别在 641 nm 和 712 nm 附近, 带宽约 25 nm (见图 2(a))。显然这应是 Hb 吸收两个 1.06 μm 光子后产生的双光子荧光。

改变照射到样品的激光能量(由一组已知透过率的衰减片完成。)测出了 712 nm 荧光带的相对积分强度随激光能量变化的关系。所得数据见表 1, 相应的曲线  $I_f \sim E^2$ 。见图 3。这些曲线表明, 在一定的激光功率密度范围内  $I_f \propto E^2$ , 即血红蛋白的红色荧光带是在吸收了二个 1.06 μm 光子后产生的。

为进一步阐明血红蛋白的双光子荧光机制, 在相同条件下测量了血卟啉衍生物(HpD)

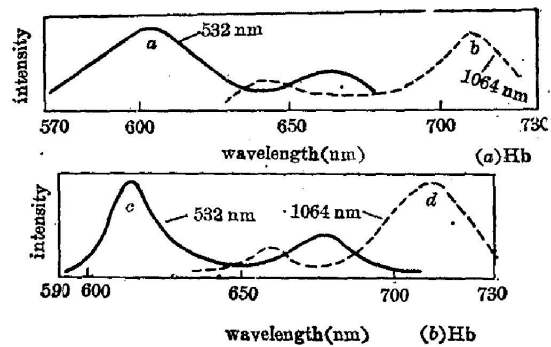


Fig. 2 Comparing of two kinds of fluorescence spectra of Hb and HpD

Table 1 The quantitative relations between the integral intensities of 710 nm and laser energy  $E$  for Hb and HpD. Where  $E=10$  is equal to 130 mJ

Sample	Hemoglobin				Hematoporphyrin				
	$I_f$	$E^2$	$I_f/E^2$						
$I_f$	504	637	453	236	588	536	514	294	214
$E^2$	100	81	60	42	100	38	33.6	20.7	13.7
$I_f/E^2$	5.0	79	7.6	5.6	5.9	14.1	15.3	14.2	15.2

的  $1.06 \mu\text{m}$  双光子荧光。结果在  $660 \text{ nm}$  和  $713 \text{ nm}$  处也观察到了两个红色荧光带, 带宽约  $25 \text{ nm}$ (见图 2(b)), 与 Hb 类似, 且在较低能量时, 所测得的  $713 \text{ nm}$  带的荧光积分强度  $I_f$  对泵浦激光能量  $E$  的变化亦符合  $I_f \propto E^2$  关系, (见表 1 和图 3)。在高激光能量  $E$  (即高激光功率密度) 时, 荧光强度  $I_f$  不按  $E^2$  关系增加。这一现象在血红蛋白中也观察到了(见表 1 和图 3)。

为了估算血红蛋白在  $1.06 \mu\text{m}$  泵浦时的双光子吸收截面量级, 在相同条件下(但激光能量不同), 测量了 Rh6G 吸收两个  $1.06 \mu\text{m}$  光子所发射的积分荧光强度  $I_{6G}$ , 同时测量 Hb 和 HpD 的  $710 \text{ nm}$  荧光带的积分荧光强度。

据文献报道<sup>[11, 12]</sup>, 蛋白质分子的荧光量子产额在  $10^{-2}$  量级, Rh6G 的荧光量子产额  $\phi_{6G} \sim 10^{-1}$ , 而 HpD 的荧光量子产额是介于上述二者之间的。为此假定  $\phi_{\text{Hb}}/\phi_{6G} \doteq 0.1$ ,  $\phi_{\text{HpD}}/\phi_{6G} \doteq 0.5$ 。利用荧光强度公式:  $I \propto c\phi P^2\sigma$  (这里  $c$ -浓度,  $p$ -功率  $\propto E$  能量), 即可估算 Hb 的双光子吸收截面  $\sigma$ 。

本实验中所用的样品浓度是:  $c_{\text{Hb}} = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $D_{\text{HpD}} = 3.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $c_{6G} = 10^{-3} \text{ M}$ 。

使用的激光能量  $E$  和测得的荧光强度  $I$  分别为:  $E_{\text{Hb}} = 130 \text{ mJ}$ ,  $E_{\text{HpD}} = 130 \text{ mJ}$ ,  $E_{6G} = 32 \text{ mJ}$ ,  $I_{\text{Hb}} = 8912/240$ ,  $I_{\text{HpD}} = 9266/90$ ,  $I_{6G} = 13800/9$ 。已知  $\sigma_{6G} \doteq 5 \text{ G}^{[12]}$ , ( $1\text{G} = 10^{-50}$  厘米<sup>4</sup>·秒/分子·光子) 则  $\sigma_{\text{Hb}} \doteq 2 \text{ G}$ ,  $\sigma_{\text{HpD}} \doteq 1 \text{ G}$ 。

粗略计入短波荧光带(即  $630 \text{ nm}$  荧光带)的贡献, 则  $\sigma_{\text{Hb}} \doteq 3 \text{ G}$ ,  $\sigma_{\text{HpD}} \doteq 1.5 \text{ G}$ 。

关于蛋白质分子的双光子吸收截面还未见报道, 但有文献报道<sup>[6]</sup> Hp 的  $1.06 \mu\text{m}$  双光子吸收截面为  $10 \text{ G}$ , 比本文估算的略大些。

## 2. $1.06 \mu\text{m}$ 激光诱导的 Hb 的四光子荧光。

$1.06 \mu\text{m}$  激光经短聚焦透镜 ( $f = 90 \text{ mm}$ ) 聚焦后, 射入到样品池内。多色仪中心鼓轮在  $370 \text{ nm}$  时观察到血红蛋白的荧光峰值位置在  $392 \text{ nm}$ , 带宽约  $25 \text{ nm}$ (见图 4)。

Fig. 4 The UV fluorescence emission of Hb. The maximum is at  $392 \text{ nm}$ . The concentration is  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ . The wavelength of exciting laser is  $1064 \text{ nm}$

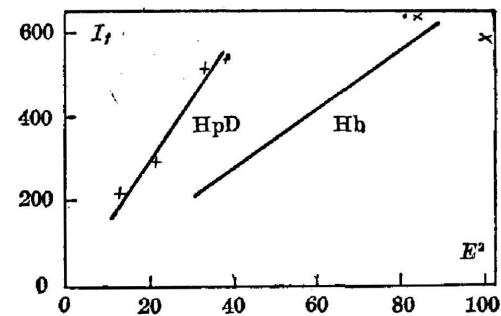
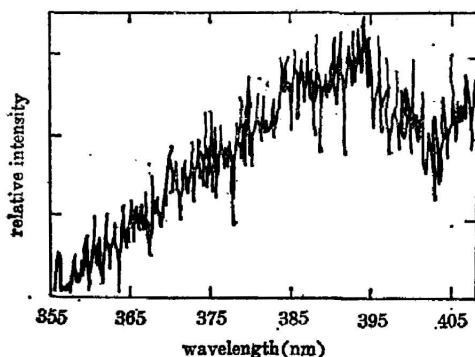


Fig. 3 The curves of  $I_f \sim E^2$

在相同条件下, 没有观察到 HpD、色氨酸胰蛋白酶等生物样品于此波段的上述荧光带。

## 四、分析与讨论

血红蛋白携带氧的功能是由血红素基团完成的。血红素具有卟啉环结构, 且环中央带有铁离子的生物分子, 与 HpD 很类似(HpD 是具空心卟啉环的血卟啉衍生物)。都具有吸

收带: Soret 带、(近紫外)、 $\alpha$  带和  $\beta$  带(可见区)。研究它们的分子结构与电子跃迁表明: Soret 带是卟啉环的  $\pi \sim \pi^*$  电子跃迁所引起,  $\alpha$  和  $\beta$  带的光谱特点是与卟啉环的配位场和第六配位体上原子的特性有关。

由图 2 可以看到, Hb 与 HpD 均有二个红色荧光带, 峰值位置也较接近(712 与 713 nm, 640 与 660 nm), 荧光带宽基本相同, 荧光带的轮廓比较相似。而在相同条件下探测不含血红素基团的胰蛋白酶, 未接收到上述荧光信号。因为血红素与 HpD 的骨架结构基本相同, 由此认为, 血红蛋白的双光子荧光来自其中血红素基团的卟啉环结构。

由图 2 示出的血红蛋白和 HpD 在  $1.06 \mu\text{m}$  激光激发下的双光子荧光发射谱带和在同样浓度下,  $0.53 \mu\text{m}$  激光激发的单光子荧光发射谱带的包络可以看出, 这两种样品的双光子荧光谱带与单光子荧光谱带成一近乎“镜像”关系。且两种样品的双光子荧光谱带相对单光子荧光谱均红移约  $40 \sim 50 \text{ nm}$ 。

关于“红移”现象的机制至今不明。但是血红蛋白在  $0.53 \mu\text{m}$  激光激发下的双光子荧光发射谱相对  $266 \text{ nm}$  激光激发的单光子荧光发射谱带的红移现象已不止一次地在实验中观测到了<sup>[3,6]</sup>。这种现象在一些有机分子的双光子过程中也观察到了<sup>[3]</sup>。至今还未见双光子荧光谱相对单光子荧光谱“兰移”的报道。生物大分子能级密集, 各个特征谱带相互重叠, 极易发生能量转移。许多实验表明<sup>[9]</sup>, 生物分子发色团的荧光寿命为  $10^{-9} \text{ sec}$  量级; 又本实验中的  $1.06 \mu\text{m}$  激光脉宽为  $10 \text{ ns}$ , 均远大于生物大分子的能量驰豫时间  $10^{-12} \sim 10^{-13} \text{ sec}$ 。据此估计, 本实验中这种红移现象很可能是由两个  $1.06 \mu\text{m}$  光子两步激发, 而其中间态同时发生了能量转移造成的。

我们经实验证明, HpD 在  $0.53 \mu\text{m}$  激光激发下产生的单光子两个荧光谱带的峰值位置和相对强度与 HpD 存在于溶剂中的状态紧密相关。即溶剂不同, 浓度不同, 二谱带的峰值位置及相对强度就明显不同。甚至可以得到相反的相对强度比。由此认为, 血红蛋白单光子的两个荧光谱带的相对强度比与血红蛋白在 PAS 中的状态有关。

在较高功率密度 ( $0.4 \text{ MW/cm}^2$ ) 时, Hb 与 HpD 的双光子荧光强度并没按平方关系增加, 这与文献[2]报道类似。在[2]中激光功率达  $5 \text{ MW/cm}^2$  时平方关系破坏, 并认为这是由于第一跃迁达到饱和引起的。我们认为很可能存在另一种可能性, 即激发态的再吸收: 被激发的粒子尚未发出荧光, 就被进一步激发到更高的能态。在高功率密度下, 基态粒子数耗尽与激发态的再吸收都可能发生。特别是 HpD 的荧光寿命为几十 ns<sup>[8]</sup>, 比激光脉宽  $10 \text{ ns}$  还要大, 激发态的再吸收更容易发生。

血红蛋白的四光子过程还未见报道过。但有人研究了在染色体和细胞核里的  $0.53 \mu\text{m}$  四光子过程<sup>[2]</sup>。经计算, 在我们实验中焦点处的光子数密度约  $10^{20} \text{ photo/cm}^2 \cdot \text{sec}$ 。在这样高的功率密度下产生四光子过程是可能的。

在蛋白质分子所含有的近 20 种氨基酸中, 以色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸为荧光生色团。其它氨基酸都是非荧光性的。这三种氨基酸的紫外荧光峰值位置一般依次为 350、303、282 nm 且以色氨酸的荧光为最强。由此认为血红蛋白在 392 nm 处的荧光辐射可能来自其中的色氨酸残基。

而在相同的实验条件下没有观察到 HpD(只具卟啉环结构, 不含色氨酸残基), 色氨酸(不含卟啉环结构)、胰蛋白酶(即不含卟啉成份、又不含色氨酸残基)等在该波段的辐射; 却

在 710 nm 处观测到血红蛋白和 HpD 的弱辐射。Szabo 等<sup>[9]</sup> 在研究血红蛋白的衰减规律时指出, 血红蛋白中的血红素与色氨酸在结构上靠得很近, 二者之间发生能量转移完全可能。所以我们认为血红蛋白的四光子荧光过程可能与血红素吸收 1.06  $\mu\text{m}$  激光的四光子并向色氨酸的能量转移有关。

### 参 考 文 献

- [1] P. C. Patrick, M. W. Berns; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, No. 12 (Dec), 7197.
- [2] A. Andreoni *et al.*; *Chem. Phys. Lett.*, 1982, **88**, No. 1 (Apr), 37.
- [3] R. R. Birge *et al.*; *J. Am. Chem. Phys.*, 1978, **100**, No. 5 (Mar), 1533.
- [4] S. P. Jiang *et al.*; *Quantum Electronics*, 1984, **1**, No. 1 (Mar), 37.
- [5] B. M. Pierce *et al.*; *J. Chem. Phys.*, 1982, **77**, No. 12 (Dec), 6343.
- [6] N. N. Vsevolodov *et al.*; *Biofizika*, 1973, **18**, No. 4755.
- [7] Y. W. Xu, J. R. Zhang *et al.*; (to be published).
- [8] J. R. Zhang *et al.*; *Quantum Electronics*, 1984, **1**, No. 2 (Jul), 107.
- [9] A. G. Szabo *et al.*; *Chem. Phys. Lett.*, 1984, **108**, No. 2 (Jun), 145.
- [10] H. L. Li; *The Development and Prospects for the Biomolecular Laser Spectroscopy*, (the National Laser Spectroscopy Conference, 1983, 10), 17.
- [11] Gao Yaojin; *Opt. Eng.*, 1983, **22**, No. 5 (Sep), 596.
- [12] J. R. Lakowicz; *Principle of Fluorescence Spectroscopy*, (Plenum Press, New York and London, 1983), **9**.
- [13] D. J. Bradley *et al.*; *Proc. Roy. Soc. (A)*, (London), 1972, **328**, No. 2 (Feb), 97.

## Laser-induced multiphoton fluorescence of hemoglobin

ZHANG JINGRU, XU YINGWU, DENG YUMEI AND WU CUNKAI  
(Laboratory of Laser Spectroscopy, Anhui Institute of Optics and Fine  
Mechanics, Academia Sinica, Hefei)

JIANG SHOUPING AND LIAN SHAOHUI  
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

(Received 8 December 1986)

### Abstract

Hemoglobin and other samples were irradiated by the 1064 nm light of a nanosecond pulse Nd:YAG laser. At room temperature, we first observed two red fluorescence bands which result from absorbing two 1064 nm photons in hemoglobin (Hb), and we measured the fluorescence emission spectra at red region for Hb and hemotoporphyrin derivative (HpD). Both Hb and HpD have two fluorescence emission maxima. A red shift in wavelength and a mirror image in the intensity of fluorescence emissions by two-photon excitation relative to that by one-photon (532-nm) excitation were observed. The experimental analysis showed that the fluorescence of Hb originates from the porphyrin ring of the heme group, just as that of HpD from the porphyrin ring. Besides, we also observed the fluorescence emission at UV 392-nm for Hb, which may come from the tryptophans in Hb.

**Key Words:** biomolecular spectroscopy; multiple photon fluorescence; hemotoporphyrin derivative; hemoglobin.