

文章编号:1004-4213(2011)10-1500-5

# 基于紫外光诱导血浆的三维同步荧光光谱共振能量转移及能量再吸收的分析

葛立新<sup>1</sup>,高淑梅<sup>2</sup>,吕思斌<sup>1</sup>

(1 蚌埠学院 数学与物理系,安徽 蚌埠 233000)

(2 江南大学 理学院,江苏 无锡 214122)

**摘 要:**利用三维同步荧光光谱技术研究了不同浓度的血浆溶液在紫外光波段的同步荧光光谱. 实验结果表明:血浆蛋白的主要的激发峰主要有三个,分别在 257 nm、274 nm 和 280 nm 附近,同步荧光光谱峰值大小随着血浆的浓度的变化而有所不同. 通过改变  $\Delta\lambda$  值而获得的同步荧光光谱,表明血浆存在三个同步荧光峰,其  $\Delta\lambda$  值分别为 90 nm、72 nm 和 44 nm,根据实验数据计算,表明血浆的各个内源荧光团之间存在着荧光共振能量转移以及二次光吸收现象.

**关键词:**血浆;紫外同步荧光光谱;共振能量转移

中图分类号:O433.1

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20114010.1500

## 0 引言

血浆在人体中起着运送营养和激素物质、代谢废物、保持渗透压平衡、凝血等诸多重要作用,是联系生物组织和细胞的枢纽. 血浆蛋白是血浆生理功能的主要承担者,生物体发生病变大多数都会改变血浆蛋白的结构和数量,这种改变对于疾病的诊断和疗效的检测有着重要的意义. 文献研究表明,血浆蛋白中的酪氨酸(*Tyr*)、色氨酸(*Trp*)和苯丙氨酸(*Phe*)是能发荧光的三种芳香族氨基酸,他们的荧光峰主要集中在紫外光区<sup>[1-3]</sup>. 通过检测血浆内源荧光光谱可以准确地反映血浆蛋白的结构和数量,利用它们其光谱的特征,可以作为是诊断生物体疾病的一个有力的依据<sup>[4-6]</sup>.

同步荧光光谱技术具有灵敏度高、选择性好、光谱简化、谱带窄及可减少散射光对光谱的影响等优点,自 1971 年被提出以来,广泛应用于多组分的同时测量以及生物分子的研究中. 在生物物理、生物化学及医学诊断等方面,运用样品的各种荧光光谱获取样品分子结构信息的研究已经成为该领域的一个热点,特别是在生物医学领域<sup>[7-10]</sup>. 荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)技术广泛应用于探测分子间纳米数量级尺度间距离、相互作用灵敏度等<sup>[11-12]</sup>. 国内外有很多学

者对血液及其成分之间的荧光光谱做了相关研究,如同步荧光法测定生物样品中的蛋白质含量<sup>[13-14]</sup>. 在进行同步荧光光谱实验时,一般是以经验设定固定的  $\Delta\lambda$  值,不利于了解  $\Delta\lambda$  值对荧光光谱的影响结果;文献[15]指出,蛋白质中 *Trp*、*Tyr* 和 *Phe*,它们的相对荧光强度为 100:9:0.5,在 pH7 水溶液中,所发荧光波长分别在 348 nm、303 nm 和 282 nm,由 *Trp* 发出的荧光占统治地位. 笔者认为血浆蛋白之间存在着较强的共振能量转移,由于 *Trp* 为 *Tyr* 和 *Phe* 的受体,所以 *Trp* 才表现出较强的荧光,本文得出的一些数据为以后血浆的系统研究提供一定的实验依据.

## 1 实验材料和方法

实验在 11 °C 的室温下进行,所用样品均取自健康的小白鼠,经眼眶取血,加 0.9% 肝素抗凝剂,然后经 8 000 rpm 的转速,离心 15 min. 取出上清液(即血浆),用生理盐水配置成浓度为 5%、2.5%、1%、0.5%、0.25%、0.1% 的溶液,放入石英比色皿中待测. 实验表明,石英比色皿和肝素都不发荧光.

实验所用的光谱仪是 Edinburgh Instruments Inc 生产的 FLS920 系统(Combined Fluorescence Lifetime & Steady State Spectrometer)多功能光谱仪,结构如图 1. 光源为氙灯,电压为 450 V,仪器所

基金项目:安徽省教育厅项目(No. KJ2010B101)和安徽省青年基金(No. 2010SQRL114)资助

第一作者:葛立新(1971-),男,讲师,硕士研究生,主要研究方向为理论物理. Email:gelxbbjy@163.com

导师(通讯作者):高淑梅(1961-),女,教授,主要研究方向为光子生物医学和激光全息. Email:gaosm@126.com

收稿日期:2011-05-05;修回日期:2011-08-30

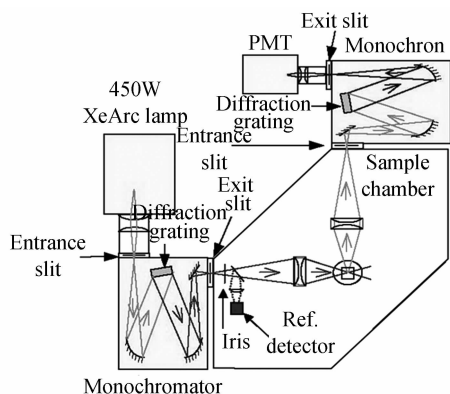


图1 FLS920 光谱仪的光路结构

Fig.1 Experimental sketch for fluorescence spectral measurements

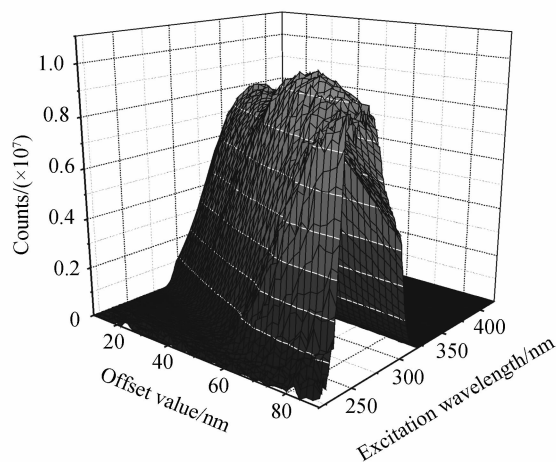
用的单色仪均为 1800 刻线的分光光栅,激发光和发射光狭缝都选择 1 nm.

同步荧光光谱的荧光光谱波长范围是 240~420 nm,激发谱的范围是 200~320 nm.为了更好地找到荧光光谱的规律,采用测量一定浓度的血浆同步荧光的叠加图方法,即选取激发光和发射光波长差  $\Delta\lambda = 10 \sim 90$  nm ( $\Delta\lambda$  即图中的 offset),  $\Delta\lambda$  的间隔

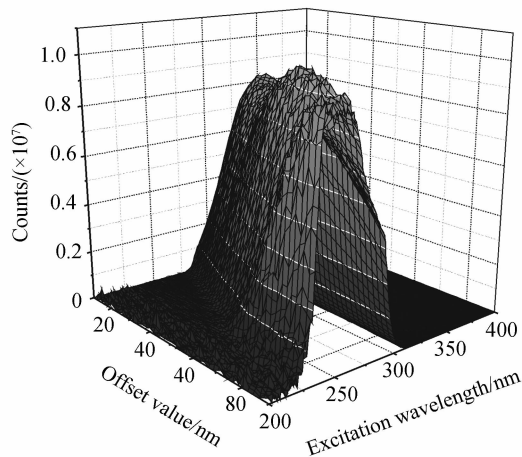
为 2 nm,即  $\Delta\lambda$  从 10 nm、12 nm、……,一直增大到 90 nm.扫描获得的三维同步荧光光谱叠加图如图 2.通过三维同步荧光图可以找到最强的同步谱峰对应的最佳  $\Delta\lambda$  值及其对应的荧光发射基团.

## 2 实验结果

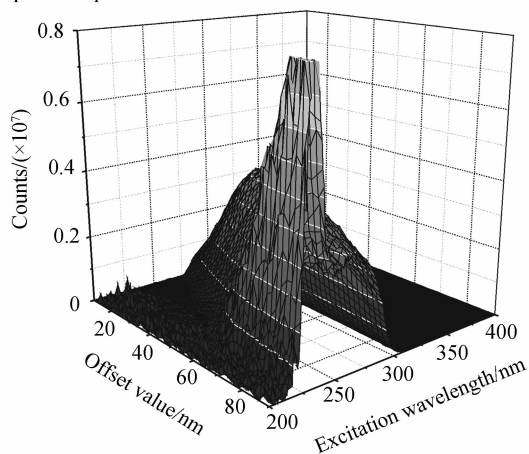
图 2(a)~(f)是用波长从 200~320 nm 的激发光激发浓度分别为 0.1%、0.25%、0.5%、1%、2.5%、5% 的血浆溶液得到的三维同步荧光光谱叠加图.图 3 是为了进一步研究浓度对  $\Delta\lambda$  与荧光发射强度间的关系而作的不同浓度的合成图.它的三个坐标轴分别表示 offset 值(即  $\Delta\lambda$ )、激发光波长和光子数.根据谱图可以看到不同浓度溶液的同步峰大致有三个,其位置大约为 257 nm、274 nm 和 280 nm,文献[1-3]表明,这三个荧光峰对应着血浆蛋白 Tyr、Phe 和 Trp 发出的荧光.由图 2(a)~(c)中各图可以看出,血浆浓度对其同步荧光光谱有一定的影响,使得  $\Delta\lambda$  和激发峰的位置均发生变化,从而导致其叠加图形有较大的区别.



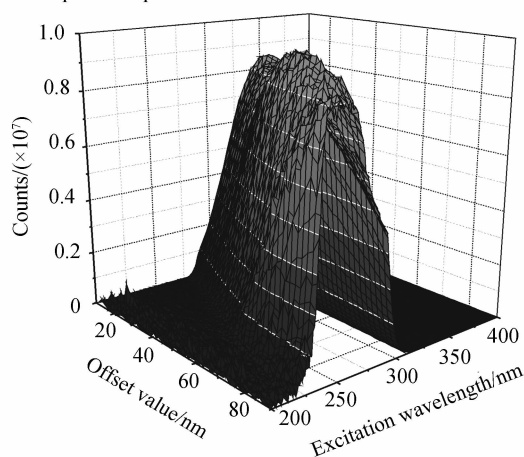
(a) The three-dimensional UV fluorescence excitation and emission spectra of plasma with the concentration of 1%



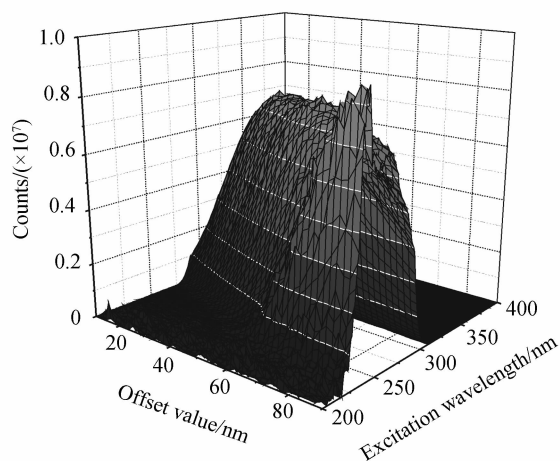
(b) The three-dimensional UV fluorescence excitation and emission spectra of plasma with the concentration of 0.25%



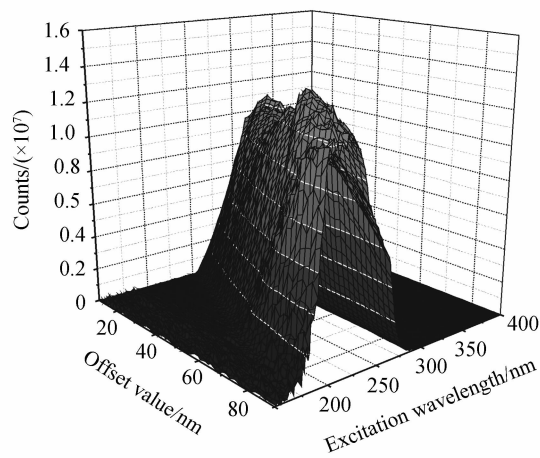
(c) The three-dimensional UV fluorescence excitation and emission spectra of plasma with the concentration of 0.5%



(d) The three-dimensional UV fluorescence excitation and emission spectra of plasma with the concentration of 1%



(e) The three-dimensional UV fluorescence excitation and emission spectra of plasma with the concentration of 2.5%



(f) The three-dimensional UV fluorescence excitation and emission spectra of plasma with the concentration of 5%

图2 不同浓度血浆溶液的紫外荧光发射与激发光谱三维图

Fig. 2 The three-dimensional UV fluorescence excitation and emission spectra of plasma with several concentrations

将图2中的各种浓度的血浆对应的 $\Delta\lambda$ 、激发峰的波长和荧光量子数列于表1中。

表1 不同浓度血浆同步荧光激发峰所对应的光子数目及 $\Delta\lambda$ 值

Table 1 Different concentrations plasma stimulation of the peaks, counts number and values

Concentration	$\Delta\lambda/\text{nm}$	Exciting peaks		Counts( $\times 10^6$ )
		$\Delta\lambda/\text{nm}$	$\Delta\lambda/\text{nm}$	
0.1%	46	289		9.25
	74	261		10.38
	90	240		9.507
0.25%	44	289		9.365
	76	261		10.29
	90	241		9.637
0.5%	50	280		4.435
	72	262		3.825
	88	232		9.763
1%	44	289		9.336
	72	263		10
	82	255		9.583
2.5%	48	282		8.204
	68	265		8.476
	90	240		9.314
5%	42	289		12.51
	72	260		14.03
	90	243		12.39

### 3 结果分析

#### 3.1 $\Delta\lambda$ 取值不同对同步光谱的影响

1)由图2可知,血浆在 $\Delta\lambda$ 取值从30~50 nm时,右侧波峰位置在310 nm基本不变,激发谱位置不断向短波方向移动增宽,峰值也不断增大.这说明:激发光波长大于310 nm时很难激发出荧光,血浆的荧光团缺少对应的吸收能级.实验结果表明:血

浆溶液内部可能存在着能量传递,即不同荧光团吸收激发光后将能量传递给了共同的荧光团发出荧光.在 $\Delta\lambda$ 增大时,激发谱在不断增宽,说明在血浆中存在大量的能吸收波长小于310 nm的能级的荧光团.在这些吸收能级中,以290 nm附近的激发光对应分吸收能级最强.

2) $\Delta\lambda$ 取值范围在66~80 nm时的同步荧光叠加图的特点

以激发峰262 nm为中心,两边各有一个肩峰,波长分别在289 nm和241 nm附近.不同 $\Delta\lambda$ 的谱线在262 nm激发峰的荧光光子数大小差别不是太大.而取不同的 $\Delta\lambda$ 时,激发波长241 nm和289 nm的荧光光子数差别很大,且荧光峰不是很明显.由于这三个峰的叠加,使得激发峰很宽.

3) $\Delta\lambda$ 取值范围在82~90 nm时的同步荧光叠加图的特点

激发峰在240 nm左右, $\Delta\lambda$ 取90 nm处是一个尖锐的激发峰,这个激发峰和血浆的浓度关系很大.浓度是0.5%和2.5%时,峰很明显,在其它浓度时荧光峰不是很明显,甚至和右边的荧光峰叠在一起.

#### 3.2 血浆荧光团之间的 FRET 分析以及能量的再吸收

由图3得到,对应289 nm、263 nm和236 nm三个激发峰存在三个相应的 $\Delta\lambda$ 峰:44 nm、72 nm和90 nm.他们并不随样品浓度的变化而改变,而只是随着荧光强度有所变化,但差值不大.因此可以认为290 nm激发峰是Trp所为;282 nm激发峰主要是Tyr产生的;236 nm附近的发射峰是由Phe和其他荧光团共同作用的结果.这三种芳香族氨基酸在中性水中的吸收和发射参量如表2<sup>[1-3]</sup>.

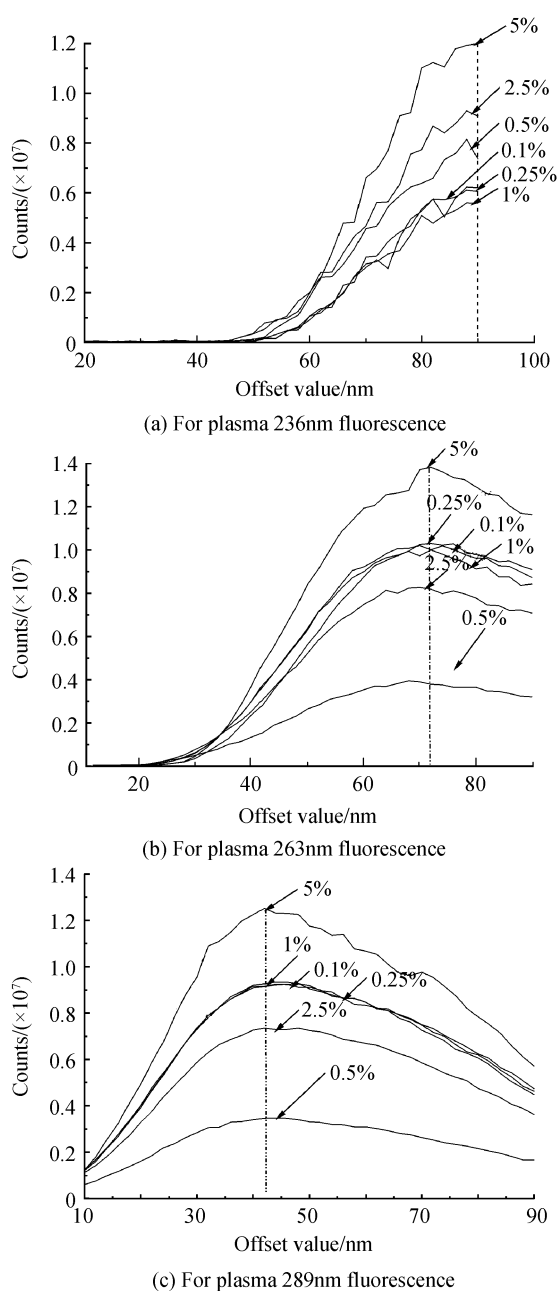


图3 不同浓度血浆溶液的激发光峰值所对应的 offset 的数值

Fig. 3 Different offset values excitatal peaks in different concentrations of plasma fluorescence intensity

表2 氨基酸在中性水中的吸收和发射光波长

Table 2 Aromatic amino acids in a neutral water absorption and emission wavelengths

Wavelength Amino acid	Excitation wavelength $\lambda_i$ /nm	Fluorescence peak $\lambda_f$ /nm	$\Delta\lambda' = \lambda_f - \lambda_i$ /nm
<i>Trp</i>	280	348	68
<i>Tyr</i>	274	303	29
<i>Phe</i>	257	282	25

表2中的 $\Delta\lambda'$ 值是发射光波长和激发光波长之差,根据荧光产生的原理,分子的一定结构吸收相应的激发光光子,从基态跃迁到激发态,通过一定形式

的弛豫,释放一定能量,然后以发出荧光的形式释放能量,从激发态的最低能级回到基态各个能级.在此过程中,荧光的波长和激发光的波长之差,称为斯托克斯位移 $\Delta\lambda'$ ,从表2中可以得到三种氨基酸的 $\Delta\lambda'$ 值.

从图3得出的 offset 值和 $\Delta\lambda'$ 并不相等,说明荧光团 *Phe*、*Trp* 和 *Tyr* 所发出的荧光并不是由于荧光团本身受到激发后发出的荧光.通过观察:*Phe* 的激发光波长和 *Trp* 的荧光峰波长之差为: $\Delta\lambda_1 = 348 - 257 = 91$  nm, *Trp* 的荧光峰的波长和 *Tyr* 的激发峰波长之差为: $\Delta\lambda_2 = 348 - 274 = 74$  nm, *Trp* 的荧光峰与 *Tyr* 的荧光峰波长之差为: $\Delta\lambda_3 = 348 - 303 = 45$  nm,这些和实验数据非常接近.同时,图2显示,在紫外光范围内,这三种荧光团重叠很光谱很宽,有很大范围重叠部分,满足能量共振能量传递的条件,使得荧光团之间的能量共振能量传递成为可能.

以上的实验数据可以解释为: $\Delta\lambda_1 = 91$  nm 的产生机制是荧光团 *Phe* 吸收 257 nm 的激发光后,发射荧光的波长为 282 nm,此波长的光在溶液中作为激发光被荧光团 *Trp* 吸收释放出波长为 348 nm 的荧光, $\Delta\lambda_2 = 74$  nm 的形成是荧光团 *Tyr* 吸收 274 nm 的激发光,通过弛豫后将能量共振传递给荧光团 *Trp*,然后以 348 nm 的荧光发射出去,同时, $\Delta\lambda_3 = 44$  nm 的产生则主要是 *Tyr* 的荧光峰和荧光团 *Trp* 的激发峰有着部分重叠,*Tyr* 发出的荧光峰又被荧光团 *Trp* 重新吸收.

本文认为,荧光团 *Trp* 的发射荧光强度远远大于 *Phe* 和 *Tyr*,可能是 *Trp* 吸收了几乎 *Phe* 发出的大部分荧光和 *Tyr* 发出的部分荧光,同时, *Trp* 又通过能量共振传递吸收了 *Trp* 的部分能量.

通过以上分析可以看出,对于血浆蛋白质荧光团 *Trp* 和 *Phe* 之间有着非常强的二次吸收现象,,荧光团 *Trp* 和 *Tyr* 之间的能级之间有着部分的重叠,存在着能量共振传递现象,当溶液浓度合适时,发荧光的能量供体和受体之间的距离在 7~10 nm 之间,不同荧光团之间的偶极子-偶极子间产生相互作用,因而发生了能量的转移.而且,血浆荧光的产生不仅是三种氨基酸本身吸收激发光所产生荧光,可能还存在别的氨基酸传递给它的能量产生的.

## 4 结论

血浆中的主要荧光团有 *Phe*、*Trp* 和 *Tyr*,它们的激发光波长分别为 257 nm、280 nm 和 274 nm,发射光波长为 282 nm、348 nm 和 303 nm.

荧光团 *Tyr* 的激发峰波长和 *Trp* 的之间吸收

光谱有足够的重叠,这使得它们之间满足 FRET 的条件,其中的 *Trp* 起着能量受体的角色. 荧光团 *Phe* 和 *Trp*、*Tyr* 和 *Trp* 之间还存在着荧光的二次吸收的现象. *Tyr* 和 *Trp* 之间的共振能量传递, *Phe* 和 *Trp* 以及 *Tyr* 和 *Trp* 之间存在着二次吸收,能量都传递给了 *Trp*,共同的效应均使得 *Tyr* 的荧光的强度显著增强,这使得 *Trp* 能够发出较强的荧光. 这些分子动力学现象可能会为进一步了解分子之间的相互作用,分子间的距离及分子的结构和空间构象提供了一定的思路.

#### 参考文献

- [1] JIANG Shan-shan, LIU Zhong-fang, HU Xiao-li, *et al.* Fluorescence quenching method for the determination of colchicine with some aromatic amino acids as probes[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2010, **68**(22): 2325-2330.  
江珊珊, 刘忠芳, 胡小莉, 等. 某些芳香族氨基酸作探针荧光猝灭法测定秋水仙碱[J]. *化学学报*, 2010, **68**(22): 2325-2330.
- [2] KATHRTY M S, GUIPEUN K, BEIJING W, *et al.* Tryptophan-Lipid interactions in membrane protein folding probed by ultraviolet resonance raman and fluorescence spectroscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2011, **100**(22): 2121-2130.
- [3] ROGERS J M G, LISA G L, FENG G, *et al.* Non-natural amino acid fluorophores for one- and two-step fluorescence resonance energy transfer applications [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, **400**(4): 878-888.
- [4] LU Jun, GAO Shu-mei, XIONG Jie, *et al.* Characteristics and mechanical for fluorescence spectroscopy of female urine[J]. *Laser Technology*, 2010, **34**(1): 45-47.  
陆建, 高淑梅, 熊婕, 等. 女性尿液荧光光谱学特性及机理分析[J]. *激光技术*, 2010, **34**(1): 45-47.
- [5] WU Qiu-hua, WANG Chun, ZHANG Zhi-heng, *et al.* Study on the interaction of Genistein and human serum albumin by spectroscopic method [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, **29**(4): 1060-1063.  
吴秋华, 王春, 张志恒, 等. 光谱法研究染料木素与人血清白蛋白的相互作用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, **29**(4): 1060-1063.
- [6] GAO Shu-mei, GE Li-xin, XU Zhen-feng, *et al.* Characteristic and mechanical for three dimension UV-fluorescence spectroscopy of plasma [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, **37**(9): 1865-1867.  
高淑梅, 葛立新, 徐振峰, 等. 三维紫外血浆荧光光谱学特性及机理分析[J]. *光子学报*, 2008, **37**(9): 1865-1867.
- [7] JIA Yan-hua, XU Xiao-xuan, YANG Ren-jie, *et al.* Spectra study on the quality change of deep frying edible oils by synchronous scan fluorescence spectra [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(11): 103-106.  
贾艳华, 徐晓轩, 杨仁杰, 等. 煎炸食用油质量变化的同步荧光光谱研究[J]. *光子学报*, 2006, **35**(11): 103-106.
- [8] LI Rong-qing, LIU Ying, GE Li-xin, *et al.* Study on blood cells disintegration by laser included fluorescence spectrometry [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(3): 398-401.  
李荣青, 刘莹, 葛立新, 等. 激光诱导荧光光谱法研究血细胞衰变规律[J]. *光子学报*, 2006, **35**(3): 398-401.
- [9] MOHIE K S E, FAWZIA A I, MANAL I E, *et al.* First and second derivative synchronous fluorescence and spectrophotometric spectroscopy for the simultaneous determination of fexofenadine hydrochloride in presence of its degradation products. application to stability studies[J]. *Acta Chim Slov*, 2011, **58**(5): 278-287.
- [10] NGUYEN N H, DURRIEU C, TRAN M C. Synchronous scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, **72**(2): 316-320.
- [11] UCHEOR B C, PAVEL S, MARIJA V, *et al.* Single-molecule FRET-derived model of the synaptotagmin 1 - SNARE fusion complex[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(3): 318-324.
- [12] PAUL R SELVIN. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer[J]. *Nature Structural Biology*, 2000, **7**(9): 730-734.
- [13] ZHANG Feng, LIU Ying, YANG Cheng-fang, *et al.* Decay and damage mechanism of blood irradiated by laser[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(4): 675-679.  
张枫, 刘莹, 杨成方, 等. 激光照射血细胞的衰变规律和损伤机制研究[J]. *光子学报*, 2010, **39**(4): 675-679.
- [14] WU Qiu-hua, WANG Chun, ZHANG Zhi-heng, *et al.* Study on the interaction of genistein and human serum albumin by spectroscopic method [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, **29**(4): 1060-1063.  
吴秋华, 王春, 张志恒, 等. 光谱法研究染料木素与人血清白蛋白的相互作用 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, **29**(4): 1060-1063.
- [15] 越南明, 周海梦. 生物物理学[M]. 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 施普林格出版社, 2000: 294-304.

## Three-dimensional UV-induced Plasma Synchronous Fluorescence Spectrum Resonance Energy Transfer and Energy Analysis of Resorption

GE Li-xin<sup>1</sup>, GAO Shu-mei<sup>2</sup>, LÜ Si-bin<sup>1</sup>

(1 Department of Mathematics and Physics, Bengbu College, Bengbu, Anhui 233000, China)

(2 School of Science, Southern of Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** Synchronous fluorescence spectra of different plasma solution concentrations in the UV wavelength are investigated using three-dimensional synchronous fluorescence spectroscopy. The results show that there are three main excitation peaks of plasma proteins (near 257 nm, 274 nm and 280 nm), and the peak values change with different plasma solution concentrations. By changing the offset (that is  $\Delta\lambda$ ) value of the synchronous fluorescence spectra obtained, there are three synchronous fluorescence peaks of plasma, of which the values are 90 nm, 72 nm and 44 nm. According to the experimental data, it shows that the intrinsic fluorescence of the plasma in all groups exists the fluorescence resonance energy transfer and the second light absorption.

**Key words:** Plasma; UV synchronous fluorescence spectrum; Resonance energy transfer