

研究物质结构与功能的重要工具 ——同步辐射毫微秒荧光谱仪简介

王丽华* 林波海*

目前北京正负电子对撞机,同步辐射实验室和中国科技大学的专用同步辐射装置均已建成并调试出光,为我国研究与应用同步辐射光创造了极好的条件。人们在实验室中安装各种相应的仪器设备,开展物理学、化学、生物学等各种学科的研究工作。其中,用同步辐射光做光源的毫微秒荧光谱仪,则是同步辐射实验室中不可缺少的仪器。

毫微秒荧光谱仪,是近年来发展起来的一种时间分辨的荧光分析仪器。可用它测定毫微秒级(ns)的荧光衰减曲线和荧光寿命,测定毫微秒时间分辨荧光发射谱和荧光发射各向异性的衰变数据。从这些曲线和数据的测定与分析中,人们可以更好地了解大分子的激发态及其能量传递过程,研究生物大分子的结构、功能及其相互间的复杂关系,从而获得有关蛋白质(包括酶)、核酸、生物膜和其它物质的各种信息。它是目前一个特别活跃的、有着广阔发展前景的新领域。

一、仪器的原理和结构

毫微秒荧光谱仪主要被用来测定物质的荧光衰减曲线和荧光寿命。用适当波长的激发光激发待测样品,样品中处于基态的分子受激发,吸收了一定的能量后,跃迁到较高的能级,过了若干个毫微秒之后,分子又回到它的基态,在此过程中,它能发射荧光。当去掉激发光后,荧光强度随时间(毫微秒数量级)而逐渐衰减。分子的荧光强度衰减到最大荧光强度的 $1/e$ 所需要的时间称为荧光寿命。在最简单的情况下,样品的荧光衰减可以用单指数来表示,有时为双指数曲线或多指数曲线。目前的电子学技术还很难再现单光子毫微秒时间刻度的荧光强度衰减过程,我们只能用以下的仪器来检测并算出其荧光寿命。

图1是同步辐射毫微秒荧光谱仪的原理图。它主要由同步辐射光源、激发单色器、样品室发射单色器,电子学线路和计算机等组成。来自同步辐射光源的光被分成两路,一路通过激发单色器分光后照到样品上,样品被激发而产生荧光,荧光经发射单色器分光后,由光电倍增管接收,由其转换成电信号,经放大和定时甄别后送到时幅转换器(TAC),这一信号做为停止脉冲,对应于荧光光子发射的时刻。而另一路同步辐射光则不经过样品而直接由光电二极管接收,经放大和定时甄别后送到TAC,这个信号被用作起始脉冲,它代表激发样品的时刻,即所谓检测零时刻。该起始脉冲产

生一个与毫微秒时间刻度成线性关系的斜坡电压,该斜坡电压被上述样品荧光光子所产生的停止脉冲停止,所以此时TAC上保持一个信号,其信号幅度对应于从起始时刻到终止时刻所经历的时间差,在单光

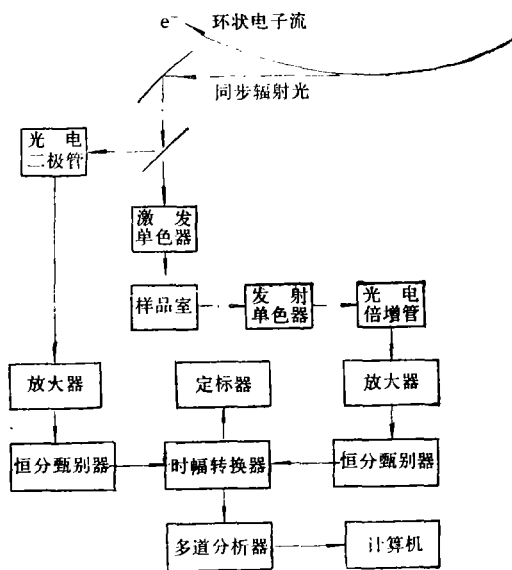


图1 同步辐射毫微秒荧光谱仪原理图

子计数条件下,这个时间差与样品的荧光寿命值相关。TAC上的这个信号经多道分析器和计算机的分析计算后,就得到了荧光光子数对脉冲幅度(时间)图谱上的一个点。经过很多次脉冲照射以及荧光光子的收集、计算和存贮,就可以得到足够的数积累,从而获得具有一定计数的荧光光子数对脉冲幅度(时间)的直方图,即荧光衰减曲线,这样就得到了我们所需要的毫微秒荧光的时间信息。

二、同步辐射毫微秒荧光谱仪的特点及其在生物学中的应用

1. 重复频率高。同步辐射光的重复频率可达几十兆赫,比一般闪光灯高2—3个数量级,也就是说,用同步辐射光源每秒钟收集的数据比一般的闪光灯高2—3个数量级,这样可以大大缩短实验时间,更快地得到

* 两位作者系中国科学院生物物理研究所科研人员。

荧光衰减曲线。用普通光源几十分钟才能测定一个样品,而在同步辐射上只要几分钟就能完成。这对于研究不稳定的生物样品特别有利,如有的生物样品不能长时间照射,否则容易发生变化乃至变性死亡,用同步辐射则可解决这一问题。

2.同步辐射光的光强比一般闪光灯强得多,这很适合于测定低量子产额的样品。在生物样品中,经常碰到计数率很低的情况,例如,在研究藻类蛋白中的C-藻兰样品时,每秒钟计数只有100左右,要达到一定的统计学精度,使其荧光衰减曲线的峰值计数积累到 $4 \times 10^3 \sim 10^4$ 时,测量一个样品需要几十分钟,若完成一组生物样品实验,往往要一两天时间,而用同步辐射光源,则可大大节省时间。

3.同步辐射光的波长范围宽。对于毫微秒荧光谱仪常用的真空紫外、紫外和可见光波段,同步辐射光源能提供很强的连续光谱,这个特性对于研究许多上在该区域内发荧光的样品是非常重要的,这是普通光源,从各种闪光灯到激光器所无法比拟的,如一般闪光灯的波长范围在300—700nm比较好用,这就使其应用具有局限性。

4.同步辐射光具有优良的时间结构。其光脉冲的半宽度可小至0.1毫微秒,这对于研究荧光寿命短的样品特别有利。一般说来,为了提高测量精度,激发光脉冲半宽度至少应比荧光寿命短1—2倍。而在普通毫微秒荧光谱仪中,闪光灯光谱的半宽度约3—8毫微秒,当测量寿命短的样品时,误差就较大。如popop乙醇溶液样品,其寿命为1.3ns C-藻兰样品为1.8ns左右,若应用同步辐射光源可大大提高测量精度。

图2中曲线A为二核苷酸DA-DA的毫微秒荧光衰减谱,曲线B为同步辐射光脉冲谱。其激发光脉冲的半宽度约1ns,荧光寿命约3.5ns。另外,从图中可以看出同步辐射光脉冲的形状好,几乎呈高斯分布,没有

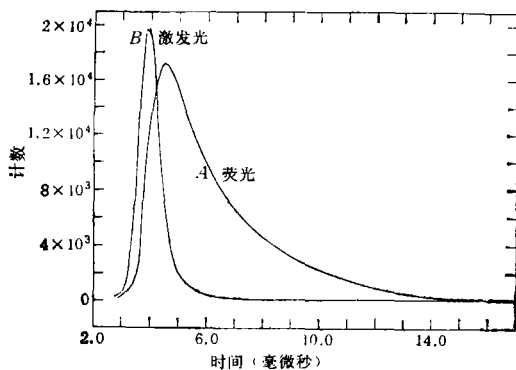


图2 二核苷酸 DA-DA 的荧光衰减谱

拖尾现象。

同步辐射光还具有光斑小,容易聚焦,束流寿命长,光脉冲幅度稳定以及偏振性能好等优点。

由于同步辐射毫微秒荧光谱仪具有上述许多优点,使其成为研究物质结构与功能的重要工具。它被用于研究大分子的结构,测定大分子在溶液中的大小、形状及其运动情况;用于研究大分子的活性位置,研究大分子的构象及其变化;用于研究给体与受体或基团与基团之间能量转移的速率,测定它们相互间的距离;用于研究极快过程,如研究反应速率,辐射动力学过程,跟踪毫微秒级的光化学和光生物学的变化过程等。

在某些情况下,由于应用了同步辐射光,将使仪器和实验方法的灵敏度和时间分辨率得到很大的提高,所以说同步辐射毫微秒荧光谱仪除了能做普通毫微秒荧光谱仪能做的工作外,它还可以完成许多普通毫微秒荧光谱仪不能完成的工作。可以预料,随着同步辐射研究的开展,它在生物学等领域上的应用,将显示出更大的优越性。

北京正负电子对撞机已通过国家验收

(本刊讯)北京正负电子对撞机(BEPC)工程于1990年7月21日正式通过了国家验收。BEPC工程于1984年10月开工,1988年实现了每秒125万次的正负电子对撞,1989年开始运行,能够满足对撞实验和专用同步辐射两种工作模式。它是国内目前用于基础学科、应用研究的最大实验装置。整个工程包括正负电子对撞机、北京谱仪和北京同步辐射装置,整体性能达到八十年代国际先进水平。国家验收委员会认为:北京正负电子对撞机的建成,是我国科学技术研究水平的一个里程碑。

欢迎订阅《铁道知识》杂志

《铁道知识》是我国唯一的铁道专业科普杂志,国内外发行。它以通俗的文章,生动、形象地介绍世界现代铁道科学技术知识和我国铁路建设新成就,帮助读者开阔眼界,增长知识,促进铁道科技事业的发展。

《铁道知识》辟有“祖国铁路新貌”、“港台铁路近讯”、“新技术与铁路”、“世界铁路博览”、“铁路史话”、“科技精英”、“知识长廊”、“沿线导游”、“科技集锦”等栏目。采用先进印刷技术,电子扫描分色,激光照排,滚筒胶印。图片清晰,印刷精良,图文并茂,深受国内外读者的喜爱。

国内订户可到各地邮局订阅,刊号2—166。国外由中国国际图书贸易总公司总发行,刊号BM-325。编辑部地址:北京复兴路10号铁道部内。邮政编码:100844。电话:路电,45861,45811;市电,8645811。