

阿秒光学技术在生命科学中的应用

张 策

(省部共建西部能源光子技术国家重点实验室,
西北大学光子学与光子技术研究所/物理学院, 710127)

1. 引言

人类科学技术的发展历程一直充满了对生命本身的好奇。人们努力探索生命体的基本组成和运动规律,但是生命的秘密却隐藏在一系列“超微”结构和“超快”过程中,因此人们无法直接通过肉眼观察到“眼见为实”的准确结果。由于人们的眼睛空间分辨力有限,因此无法直接观察细胞,直到1665年,Hooke通过显微镜首次观察到细胞,人们才开始认识到生物体是由细胞这个基本单元组成的,提高了观察的空间分辨能力,使我们对生命体的认识达到了新的层次。

类似地,由于人们的眼睛时间分辨力也有限,长期以来人们一直在争论马奔跑时四蹄是否同时腾空。直到1878年,Muybridge拍摄了一组赛马奔跑的照片,才清晰地表明在某个时刻,马的四蹄是全部离地的。这表明提高时间分辨能力同样可以提高我们对生命体的认识水平。

阿秒光学技术是一种新型的超短脉冲激光技术,其产生光脉冲的时间分辨率非常高,可以实现极快速、高分辨率的成像,因此可以应用于生命科学领域中许多方面的研究。

2. 阿秒光学技术

根据发光持续时间的长短,激光通常被分为连续激光和脉冲激光两类。连续激光能够在长时间

内持续输出激光,但功率通常较低。脉冲激光通过在间隔的小时间段内发射光脉冲的方式工作,其峰值功率很高。随着激光技术的不断发展,脉冲宽度不断缩短。在20世纪80年代,脉冲激光的单个脉冲宽度达到皮秒级别。1981年,贝尔实验室的Fork等人将脉冲宽度缩短至小于100飞秒^[1]。2001年,奥地利维也纳技术大学的Krausz课题组成功利用气体高次谐波产生了脉宽为650阿秒的单个光脉冲,使光脉冲宽度达到阿秒级别^[2]。2007年,Krausz课题组与Heinzmann课题组合作^[3],将阿秒光学技术应用到凝聚态物理领域。

阿秒光脉冲的宽度小于1飞秒。在描述时间尺度时,通常使用皮秒($1\text{ ps} = 10^{-12}$ 秒)、飞秒($1\text{ fs} = 10^{-15}$ 秒)和阿秒($1\text{ as} = 10^{-18}$ 秒)等单位。以直观的方式来理解,光在1秒内可以传播30万千米,而在1皮秒的时间内,光只能传播30厘米的距离;在1飞秒的时间内,光只能传播0.3微米,而在1阿秒的时间内,光只能传播0.3纳米。可以发现,当时间尺度达到阿秒级别时,我们的空间分辨率也可以达到原子级别(0.1纳米)和亚原子级别。这种时间和空间尺度的范围,可以研究生物、化学和物理学共同的本质问题:电子运动。

3. 阿秒光学技术在生物大分子结构研究中的应用

在生命科学中,光学显微成像是生物体结构

最直观的观察方式。光学显微镜极大地提高了显微样本成像的分辨率,使得人们可以直接观察细胞和细胞器的成像。然而,由于光学极限的限制,光学显微技术在理论上很难分辨小于 200 nm 的结构。令人遗憾的是,大多数关键的生物大分子都小于 200 nm,例如蛋白质和核酸等。即使这些大分子组成的基因大于 200 nm(例如染色体),也会因为无法分辨细节而无法解读相关的结构信息。目前已经有一些相关的超分辨成像技术,如受激发射损耗荧光成像(STED)等。然而,这些技术分辨力仍然不足,无法胜任对细胞代谢、跨膜传递、细胞通讯等重要的生命过程的研究。透射电子显微镜(TEM)等成像技术虽然足够高的分辨力,但是其会造成生物大分子的损伤,也无法进行活细胞层面的相关研究。阿秒光学技术原子尺度的超高空间分辨率将可能实现观察和控制原子内部电子的动力学行为^[4,5],将其应用于生命体的研究,有可能观测生物体中原子-亚原子层面现象。进而实现对生物大分子结构

上的精确解析。

利用阿秒光学技术可以观测蛋白质的电子结构和分子振动,进而推断出蛋白质的三维结构,研究蛋白质的结构和功能。Shelby 等人曾利用飞秒激光技术研究了肌红蛋白中的亚铁血红素与一氧化碳解离过程中结构的变化,研究表明局部结构变化引发了蛋白质体积膨胀^[6](图 1)。Tenboer 报道了阿秒激光与 X 射线衍射技术相结合的方法,用于研究蛋白质分子的结构动力学^[7]。在飞秒时间尺度内照射样品,获得了蛋白质分子在不同时间点的结构信息,分析了蛋白质分子的构象变化过程。Chapman 提出了阿秒激光与 X 射线衍射技术相结合的方法解析蛋白质结构^[8]。相比于传统的 X 射线晶体学技术,使用飞秒 X 射线技术可以更好地保护样品免受辐射损伤,并且可以在更短的时间内解析出高分辨率的结构(图 2)。该方法可以更好的研究蛋白质分子的构象。Kim 提出了一种基于阿秒激光和时间分辨 X 射线散射技术的方法研究蛋白质

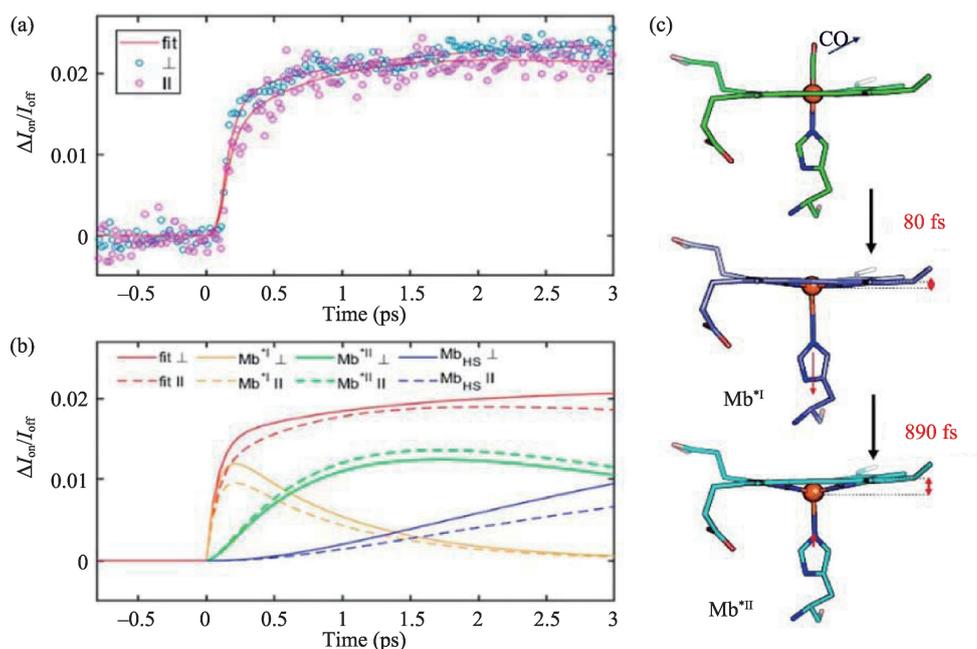


图 1 飞秒激光技术用于研究肌红蛋白中的亚铁血红素与一氧化碳解离过程中的结构变化过程。(a) 垂直(蓝色圆圈)和平行(红色圆圈)偏振的 X 射线吸收光谱在 7123 eV 处的动力学及其对应的利用三步顺序模型进行全局拟合的动力学曲线(实线);(b) 垂直(实线)和平行(虚线)偏振的每个物种的拟合分量的动力学曲线;(c) CO 光解后血红素松弛的超快结构变化。在 80 fs 时间尺度下 CO 离去,剩余部分分子发生系间窜越,Fe 向血红素平面外产生一个小位移,同时 Fe-NHis 键伸长。在 890 fs 时间尺度下 Fe-Np 键继续伸长、血红素拱起,并且 Fe 进一步向血红素平面外位移^[6]

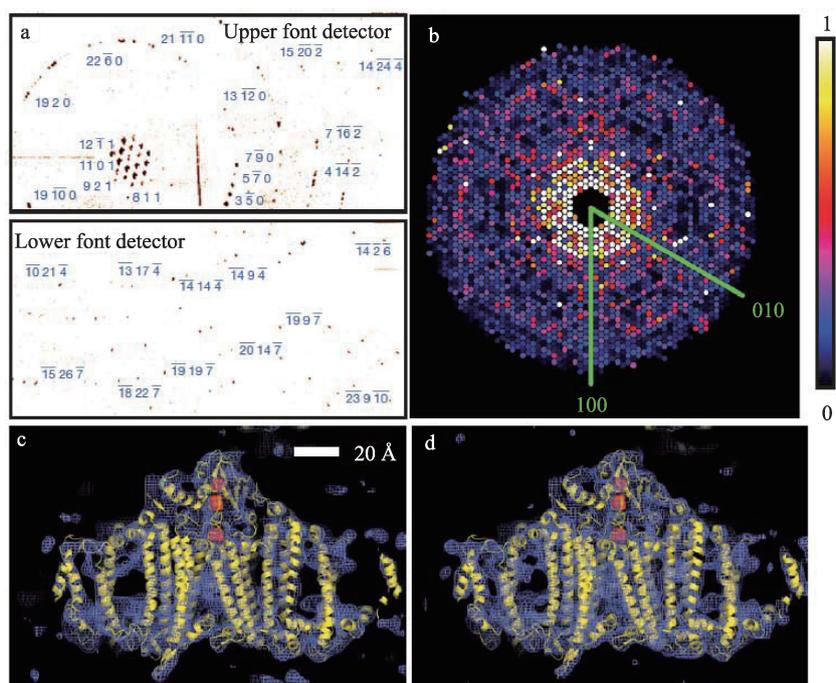


图2 光合作用-光系统 I 的衍射强度和电子密度图^[8]

溶液中的结构动力学^[9]。通过对样品进行短脉冲激光照射,可以观察到蛋白质分子在不同时间点的结构变化,包括蛋白质分子的构象转变和分子间相互作用的变化等。

除了在蛋白质结构和动力学变化的研究方面,阿秒光学技术还被应用于研究许多其他的生物分子。结合电子成像技术,该技术可以用于研究生物大分子中的电子动力学过程。阿秒光学技术可以提供极高的时间分辨率,可以捕捉到生物大分子中非常快速的电子过程,进而理解生物大分子的电子转移和化学反应机理。例如,将阿秒光学技术和超快红外光谱技术结合起来,可以探索 DNA 和 RNA 分子的结构动态变化,研究其结构变化同功能间的关系。

阿秒光学技术还有另一个优点:其光子可以覆盖包括“水窗”在内的重要光谱区域。在“水窗”区域,光子不会被水吸收,但是会被构成生物分子的碳原子、氮原子等强烈吸收。在这个光谱区域,阿秒光学技术可以观测活细胞中亚原子尺度的电子动力学过程,探测生命科学中的量子过程。这为复杂的生物分子的建模、理解和控制奠定了基础。

4. 阿秒光学技术在生物超快过程中的应用

生命科学传统上使用光学方法来观察生物体的结构、生化物质电子和振动跃迁等信息,这些方法依赖于光子频率和强度的变化。由于传统光学方法没有足够的时间分辨率,使其不能用于研究生命过程中许多涉及许多超快过程。飞秒激光技术为研究生物体中的超快光物理、光化学及光生物学过程提供了可能,使人们能够对生物体中的超快现象进行更为深入的研究,特别是生物体中存在的飞秒量级的能量传递、电荷转移等过程的研究。而随着阿秒光学技术的快速发展更是带来了前所未有的时间分辨探测能力。它的出现将会使我们有研究更快的过程以及由内层电子决定的物质性质。使人们能够对生物体中的超快现象进行更为深入的研究,帮助我们对生物超快过程的认识提高到一个新的水平。

将阿秒光学技术同时间分辨超快光谱技术的结合的泵浦-探测技术可以很好地在阿秒时间尺度

上研究生命过程中的超快动力学过程。该技术可将阿秒光脉冲分为两束,一束为泵浦光,用来激发生物样本;另一束为探测光,用来研究样本受激发后在极短时间内的响应。通过改变两束光脉冲的时间间隔,可以扫描得到样本从激发态回到基态的超快动力学时间分辨的全貌。和传统的显微成像技术不同,泵浦-探测技术是把随时间演化的动力学过程拍成了动态过程。

细胞色素C是人体中重要的电子传递蛋白,其C通过调节血红素铁与甲硫氨酸之间的结合,在电子传输和细胞凋亡中起着关键作用。细胞色素C中电子传递过程就是一个超快过程。Mara等人^[10]利用飞秒技术成功探测到光诱导下亚铁细胞色素C中Fe-S键在飞秒时间尺度的断裂和重组(图3a),发现了生物系统如何利用化学键的熵状态来调节其化学功能。Bacellar等人^[11]利用飞秒技术证实了三价铁细胞色素C的光循环完全是由于之间的级联铁离子的激发自旋状态,导致三价铁血红素发生拱起(图3b)。研究发现这种模式在三价铁血红蛋白中很常见,从而提示了此类蛋白质中结构变化同生物学功能的相关性问题。

尽管目前生命科学中超快过程的研究多采用飞

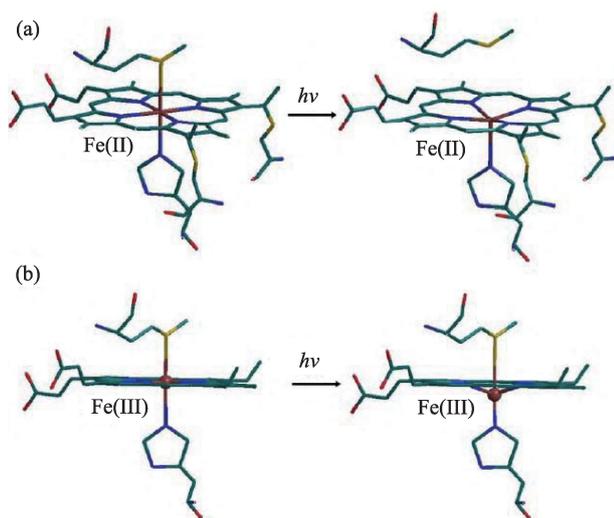


图3 细胞色素C光激发结构动力学。(a)亚铁细胞色素C光激发后会发生Fe-S键断裂并引起血红素构象变化;(b)三价铁细胞色素C光激发后血红素构象变化(Fe-S键不断裂),并通过热弛豫返回基态^[7-9]

秒技术,但随着阿秒技术的发展,其优势已经凸显出来,并且已经被应用于一些生物分子的超快过程研究^[12]。例如,Belshaw等人利用阿秒脉冲激发并研究了芳香族氨基酸-苯丙氨酸中的超快过程^[13],而Calegari等人则进一步检测了这个超快过程^[14,15]。实验装置如图4所示:电荷迁移是由一个脉冲为300阿秒的激光引发的,光子能量在15到35电子伏特之间,随后由一个4飞秒、波形控制的近红外激光探测。

5. 阿秒光学在生命科学中其他方面应用

阿秒光学技术还可应用于生物医学方面。其聚焦的阿秒光束可以将相互作用区域限制在非常小的空间内,从而实现纳米精度的操作,比如对组织和细胞进行操作、进行显微操作等。阿秒光学技术可以捕捉物质在极短时间尺度下的运动和变化,研究这些生物分子的时空变化规律有助于揭示这些相互作用对于生命活动的调控机制,以及寻找一些新的治疗靶点。例如,应用阿秒光学技术检测血液样品中的核酸体和蛋白质可以检测癌症的特征物质,进行早期癌症筛查及抗癌药物的疗效监测。

阿秒光学技术还可以通过调节生物大分子中的电荷分布,影响分子键形成和断裂,进而改变蛋白质分子的结构,调节细胞信号通路中的分子间相互作用,从而在分子层面对疾病进行治疗。例如,通过激发肿瘤周边环境中的免疫细胞应激因子(如炎症因子表面抗体等)来激活免疫信号通路,通过局部免疫系统应激反应来达到治疗的目的;在病灶区域破坏炎症和疾病相关分子(如Abeta多肽和TNF-alpha等蛋白质分子)直接进行治疗。

6. 展望

虽然,单个阿秒射线脉冲的产生已经揭开了阿秒现实应用的序幕,但是目前仍然有许多问题需要深入研究与改进,才能使阿秒光学技术在生命科学

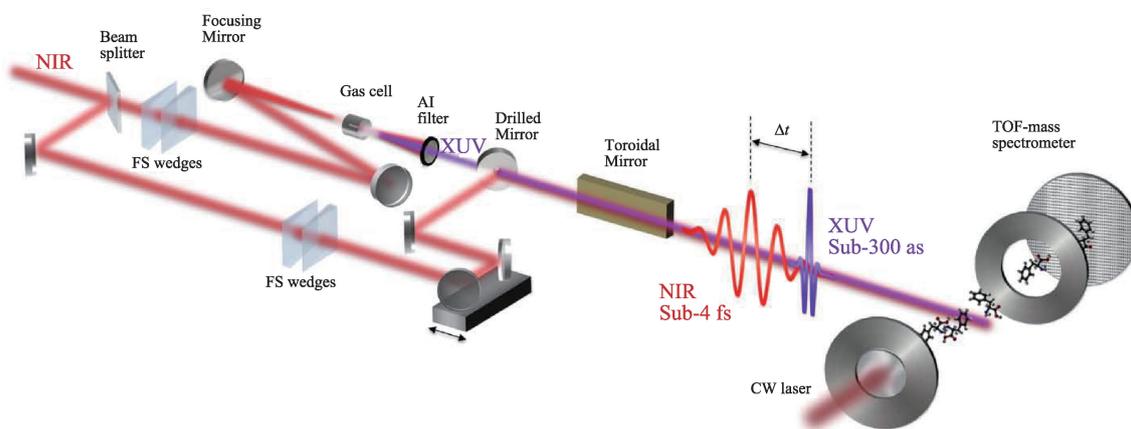


图4 用于激发和检测苯丙氨酸电子动力学的阿秒光学装置^[14,15]

领域真正迈入实用阶段。用于产生阿秒高次谐波的强驱动飞秒激光的特性需要的研究,如何控制强激光脉冲载波-包络相位,使每个飞秒脉冲的时间抖动在阿秒时间精度内也需要着重解决。阿秒科学已经来临,相关研究也会逐步进入研究原子内电子动力学的阿秒物理时代。随着阿秒技术的进一步发展,研究能直接应用于生命科学领域揭示并控制生命过程电子动力学过程的阿秒光学技术将是生命科学的一个前沿课题。

参考文献

- [1] Fork RL, Greene BI, Charles VS, Generation of optical pulses shorter than 0.1 picoseconds by colliding pulse mode-locking, *Applied Physics Letter*, 1981, 38: 671-672.
- [2] Hentschel M, Kienberger R, Spielmann C, et al. Attosecond metrology. *Nature*, 2001, 414: 509-513.
- [3] Cavalieri AL, Müller N, Uphues T, et al. Attosecond spectroscopy in condensed matter. *Nature*, 2007, 449: 1029-1032.
- [4] Li R X. Electron acceleration and its trajectory control in sub-atom regime and attosecond pulse generation. *Opt. Optoelectron Tech*, 2011, 9: 1-3.
- [5] Bucksbaum P H. Attophysics: ultrafast control. *Nature*, 2003, 421: 593-594.
- [6] Shelby ML, Wildman A, Hayes D, et al. Interplays of electron and nuclear motions along CO dissociation trajectory in myoglobin revealed by ultrafast X-rays and quantum dynamics calculations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: 1.
- [7] Tenboer J, Basu S, zatsepin N, et al. Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein. *Science*, 2014, 346(6214): 1242-12465 Dec 2014.
- [8] Chapman H N, Fromme P, Anton Barty A, Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature*, 2011, 470: 73-77.
- [9] Kim JG, Kim TW, Kim J, Identifying the major intermediate species by combining time-resolved X-ray solution scattering and X-ray absorption spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys*, 2015, 17: 23298.
- [10] Mara M W, Hadt R G, Reinhard M E, et al. Metalloprotein entatic control of ligand-metal bonds quantified by ultrafast X-ray spectroscopy. *Science*, 2017, 356: 1276-1280.
- [11] Bacellar C, Kinschel D, Mancini G F, et al. Spin cascade and doming in ferric hemes: Femtosecond X-ray absorption and X-ray emission studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 21914-21920.
- [12] 刘欣慰, 刘海广, 张文凯, X射线自由电子激光及其在超快结构动力学研究中的应用, *中国科学: 物理学、力学、天文学*, 2020, 52(7): 270013.
- [13] Belshaw L, Calegari F, Duffy MJ, et al. Observation of Ultrafast Charge Migration in an Amino Acid. *J. Phys. Chem. Lett*, 2012, 3: 3751.
- [14] Calegari F, Ayuso D, Trabattoni A, et al. Ultrafast electron dynamics in phenylalanine initiated by attosecond pulses, *Science*, 2014 346: 336-339.
- [15] Calegari F, Trabattoni A, Palacios A, et al. Charge migration induced by attosecond pulses in bio-relevant molecules, *Journal of Physics B Atomic Molecular and Optical Physics*, 2016, 49(14): 142001.