

时间相关单光子计数法及其生物学应用前景

邢 蕴 芳

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

时间相关单光子计数技术是近年来发展起来的测量 ns 级短荧光寿命的新方法。它不仅时间分辨本领好,而且灵敏度高,测量精度高,动态范围大,输出数据数字化,便于计算机存贮和处理。本文简要地叙述了该方法的基本原理和主要技术指标,较详细地讨论了光电倍增管和 ns 灯等关键元器件的选用原则,并且介绍了一些比较有用的系统调整方法和性能检测方法。此技术在免疫分析和光生物学领域的应用前景,也略作介绍。

一、概 述

用光电倍增管(PMT)测光通常有两种方式:积分方式和光子计数方式。前者测量的是平均阳极电流,平均阳极电压或积分电荷量,即大量入射光子事件的时间平均。这种测量可以用直流方式,也可以用调制(交流)方式。直流测量简单,但有漂移,并受低频噪声干扰。当测量精度要求较高时,应采用交流测量,因为它没有上述缺点。

光子计数方法是直接计数入射到 PMT 光阴极的单个光子数目。此法的基本优点是:灵敏度高,信噪比高,时间分辨本领好,测量精度高,动态范围大,而且数据是数字化的,便于送计算机处理。但这种方法的技术要求较高,它要求整个系统有高的时间响应特性和快的脉冲处理能力。

对于一个光子计数系统,下列指标可以作为判断其性能的依据:分辨时间、噪声特性、暗计数、稳定性、线性及动态范围等。

分辨时间: 系统分辨两个人射光子的最小时间间隔。

噪声特性: 在理想情况下,噪声主要由光

子统计涨落引起,所以应该符合正态分布。

暗计数: PMT 光阴极热发射,它与光阴极材料、光阴极面积、环境温度有关。暗计数大小决定能测量的最弱光强的下限。

稳定性: 关系到恒定的人射光强是否得到恒定的计数率。

线性: 反映系统入射光强与计数率的正比关系。暗计数和漏记分别影响线性范围的下限和上限。

动态范围: 系统可测量的最弱光和最强光之间跨越的范围。

时间相关单光子计数技术尤其适用于荧光寿命的测量^[1],因为它需要高的时间分辨本领和高灵敏度。基本方法是用一个窄光脉冲激发样品,然后检测样品所发射的第一个荧光光子到达光信号接收器的时间,这一时间以激发脉冲开始作用的起始时刻为基准。在某一时间间隔内检测到光子的几率与荧光发射强度成正比,重复多次测量得到荧光强度衰变的规律,这就是时间相关单光子计数的基本原理。它的框图见图 1。

PMT 的光阴极接受入射光子,发射光电子经倍增后在阳极小负载电阻上(譬如 51Ω)产

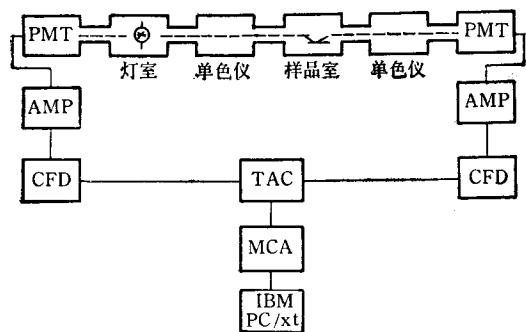


图1 时间相关单光子计数原理框图

生十几到几十毫伏的窄脉冲，半宽度几个到几十个 ns，脉冲上升沿 3—5ns，脉冲幅度主要由 PMT 总电流增益系数、工作电压、负载电阻决定。而上升时间与宽度主要受 PMT 渡越时间、输出电路时间常数的影响。PMT 输出经匹配电缆送到 ns 量级快放大器（AMP）线性放大，经 ns 量级恒比定时甄别器（CFD）甄别掉大部分噪声，两路信号先后到达时间-幅度转换器（TAC），输出信号的幅度正比于两路信号到达的时间差，经多道分析器（MCA）作幅度分析，送往计算机进行数据处理。

二、关键元器件

在光子计数方法中，最关键的器件是 PMT，其他重要部件还有 ns 灯，快 AMP，CFD，TAC 等。

1. PMT: 在光谱响应与荧光光谱相适应的前提下，选用电流增益系数（G）大的 PMT，作为光子计数用的 PMT。阳极负载电阻要小（一般小于 100Ω），输出信号幅度与阳极负载电阻，PMT 增益有正比例关系，在不得不采用小阳极电阻的条件下，必须选用高增益的 PMT，以保证 PMT 有一定的输出幅度。

选用噪声低、暗流小的管子，因为暗流小的管子暗计数也小。PMT 的噪声源有下面几种：光电子统计涨落噪声；PMT 光阴极热发射产生的暗流；漏电流噪声；后续脉冲噪声；G 的统计涨落噪声；负载和分压电阻热噪声。要选用对光谱红区不灵敏的管子，因为红区灵敏的管

子暗电流高；选用阴极面积小的管子，因为面积小暗电流也小。

选用渡越时间弥散小的、阳极分布电容也小的 PMT，因为它们直接影响输出脉冲的前沿和宽度。

国产的 GDB48，GDB53，英国的 EMI 9789QB，荷兰的 56DUVP，美国的 RCA8850，RCAL31000，法国的 XP2020Q，日本 HAM-AMATSU 的 R585，R928 都是单光子计数适用的 PMT。以 XP2020Q 为例，它的主要性能如下：光谱响应峰值 $400 \pm 30\text{nm}$ ， $G = 2 \times 10^7$ ，渡越时间弥散 0.25ns。

2. ns 灯: 时间相关单光子计数方法的基础是测量相对于任一时间零点的第一个荧光光子到达 PMT 的时间。通常以短持续时间激发灯点火的时刻作为时间零点。

作为一个理想的光源，它应具有从光谱的紫外光到可见光的强辐射。为了在短时间内获得较多的数据，灯应该控制在高重复频率（20—200KHz），短脉冲持续时间，短尾巴的工作状态。

氙、氢、氮气都适用于 ns 充气灯，氮气在 337, 296, 316, 358, 381nm 及 400nm 处提供有较强辐射的线状光谱，氙和氢的谱线从紫外到 400nm 以上连续激发。

3. 快 AMP: PMT 输出脉冲幅度十几毫伏，宽度几个 ns，要选用一个放大 10—100 倍、带宽 100MHz 以上的快 AMP。

4. CFD: CFD 是系统测试设备中的重要部分，它的定时性能直接影响系统的时间精度，要求信号幅度从几百毫伏到几伏变化时，时间移动小于几百 ps。

5. TAC: TAC 把起始脉冲到终止脉冲之间的时间间隔变成幅度。作为时间测量系统，要求线性好，时间离散性小，长时间工作漂移小。

6. MCA 与计算机: 将时幅转换器输出的电压信号送多道分析器进行幅度分析，通过接口电路将数据送往微处理机进一步处理，即是一个完整的时间分辨单光子计数系统。

三、调整与检验

1. 坪区测量和高压选择: 将甄别器的阈值放在一适中的位置, 给 PMT 加适当强度的光, 由低到高改变加到 PMT 上的高压 (HV), 测其对应的计数率 (N), 将 $\log N$ 与对应的高压值的关系绘出曲线 (图 2), 其中低斜率的区段 (A—B) 就是坪区, 坪区内的电压值可选作 PMT 的工作电压。

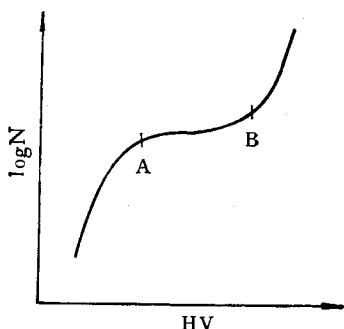


图 2 PMT 坪曲线

2. 甄别阈的选择: 甄别阈的选择宜根据探头的输出噪声谱而定。如图 3 所示, 应选在下凹处, 尽量去掉所有小幅度噪声, 又不丢失真正的人射光子事件。

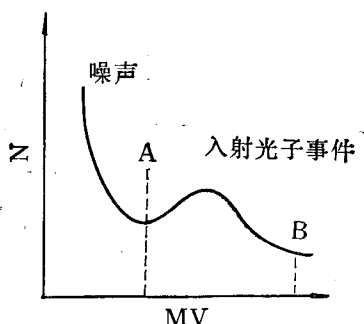


图 3 PMT 输出脉冲幅度分布

3. CFD 时间晃动的确定: 将几个 ns 宽的窄脉冲分两路 (图 4) 同时送到 CFD1 和 CFD2, CFD1 输出送到 TAC 起始端, CFD2 输出经延迟送到 TAC 终止端, 改变脉冲发生器输出幅度 (100mV—5V), 测量 MCA 峰位变化的道数, 可以推算出相应的时间晃动。

4. TAC 线性的确定: 将几个 ns 宽的窄脉冲通过 CFD 送到 TAC 的起始端, CFD 的输出经一可变延迟送到 TAC 的终止端 (图 5), 改

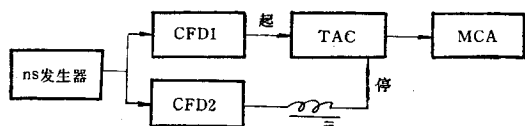


图 4 CFD 定时性能测量框图

变延迟时间, 由 TAC 把起、停脉冲间的时间间隔转变为幅度, 由 MCA 测量相应的幅度, 道址与延迟时间的函数关系应是一条直线。

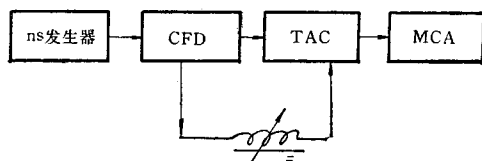


图 5 TAC 线性测量示意图

5. 系统时标的标定:

$$\text{系统时标} = \frac{\text{TAC 时间范围}}{\text{MCA 通道数 (ns/道)}}$$

6. 系统稳定性检验:

在调整良好的系统中, 主要噪声源是信号光子的统计涨落。测量结果是否只含有统计噪声, 可以通过对数据的分析来验证。

测试要求一个高稳定光源, 系统对恒定光源以等积分时间取数 1000 次, 则会得到一组数据 $n_1, n_2, n_3, \dots, n_{1000}$, 用这组数据得到系统的误差分布曲线 (图 6)。

横坐标是计数, 纵坐标是该计数出现的几率, 这曲线与正态分布曲线比较可确定噪声的性质。或者把数据点在“正态概率纸”上, 看偏离线性情况, 有明显偏离, 说明存在非统计涨落, 系统要重新调整。如果符合较好, 计算 $\bar{n}$ 和 σ^2

$$\bar{n} = \frac{1}{1000} \sum_{i=1}^{1000} n_i \quad (1)$$

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^{1000} (n_i - \bar{n})^2 / 1000 \quad (2)$$

若 $\sigma^2 \geq \bar{n}$, 系统处于理想情况; 若 $\sigma^2 \gg \bar{n}$, 说

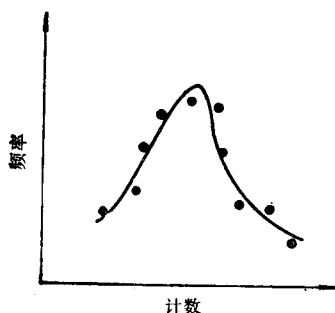


图6 系统稳定性分析

明除光子统计涨落引起的噪声外,还存在另外不可忽视的噪声源,系统应该重新调整。

四、应用前景和发展趋势

光子计数法特别适合于微弱信号的检测以及要求较高时间分辨本领的场合。它已深入到分子生物学,高分辨率光谱学,非线性光学,表面物理,化学,天文等学科中。

荧光衰减测量用于研究激发态及它们与环境的相互作用,从而给出分子内部和分子之间的能量交换过程,用于研究激发态络合物的形成,分子系统内和原子相互作用中无辐射过程,可以提供光化学反应中的基本数据,如量子产额,淬灭因子等。

光子计数法可以用于研究光生物学中的能量转换和原初过程,研究生物大分子如酶、多

肽和核酸的构象和动力学。通过测量卵磷脂中1-6二苯基各向异性的荧光发射,可以研究胆固醇在分子动力学方面的作用^[2]。

随着激发光源及PMT时间特性的改善,PS级脉冲技术和高速数字集成电路的发展,使光子计数技术达到PS区域,这使得研究紫膜蛋白质发色团的PS动力学成为可能^[3]。

在免疫分析中,采用镧系螯合物作为荧光标记物,用时间分辨光子计数法测其慢衰减荧光,其灵敏度超过已被广泛应用、灵敏度居各微量分析之首的放射免疫方法,并可避免放射性引起的各种麻烦^[4]。光子计数法将使免疫医学跨入超微量分析的新阶段。

光子计数技术本身还在不断发展,它在物理学,化学,尤其在生物学和医学领域将得到越来越广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] Imhof, R. E. et al.: *Reports on progress in physics*, vol. 40(1), 9, 1977.
- [2] Suguru, Kawato, et al.: *Biochemistry*, vol. 17(23), 5026, 1978.
- [3] Alfand, R. R. et al.: *Biophysical Journal*, vol. 16(5), 541, 1976.
- [4] Erkki, Soini, et al.: *Clinical chemistry*, vol. 29(1), 65, 1983.

[本文于1986年10月6日收到]

(上接第35页)

mun., 62, 1, 1975.

- [8] Adar, F. et al.: *FEBS LETT.*, 84, 214, 1977.
- [9] Blum, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 650, 1977.
- [10] Johnson, M. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 9806, 1981.
- [11] Johnson, M. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 2447, 1982.
- [12] Yachandra, V. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 105,

6455, 1983.

- [13] Yachandra, V. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6462, 1983.
- [14] Czernuszewicz, R. S. and Johnson, M. K.: *Applied Spectroscopy*, 37, 297, 1983.
- [15] Johnson, M. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6671, 1983.

[本文于1986年9月16日收到]