

毫微秒荧光光谱仪光学机械系统的设计*

王丽华 卞和如 彭程航

(中国科学院生物物理研究所, 北京, 100080)

提 要

本文介绍我们研制的毫微秒荧光光谱仪中的光学机械系统, 重点介绍在灯室和样品室的设计中为提高仪器灵敏度和光收集效率而采取的措施以及安装调试方法。使用结果表明该系统设计合理、使用方便。

关键词 毫微秒荧光光谱仪, 光学系统, 光路调整, 灯室, 样品室

前 言

时间分辨荧光测量是近一、二十年发展起来的一种新的荧光分析技术^[1,2]。通过对荧光寿命、偏振特性和时间分辨谱的测定, 用以检测生物大分子的活性部位、构象及其变化; 跟踪光化学和光生物学的快速变化过程, 为荧光动力学提供重要信息; 根据荧光寿命的变化研究能量转换和原初过程等, 因而该技术在医学、生物学、化学等领域得到愈来愈广泛的应用。我组

已经研制成功国内首台带闸控毫微秒光源的时间相关单光子毫微秒荧光光谱仪^[3](图 1)。

该谱仪主要由光学系统、电子学线路和计算机数据处理三大部分组成。其中光学系统(图 1 虚线内)的准直与否对仪器的灵敏度影响很大; 各个光学部件使用的正确与否, 直接影响测量的精确度。光学机械系统主要包括灯室、激发单色器、样品室、发射单色器以及相应的灯室内毫微秒光源位置的调节机构和样品室的换样机构。

光学机械系统

一、谱仪的光路图

来自毫微秒闸控灯的光经灯室上下、左右调节和透镜 L_1 会聚后, 聚焦于激发单色器的入射狭缝 S_1 上, 由激发单色器分光后的单色光(即激发光)经透镜 L_2 会聚和反射镜反射后聚焦于样品池的中心。样品经激发光激发后产生荧光, 荧光再经透镜 L_3 会聚后, 聚焦于发射单色器的入射狭缝 S_2 上, 经发射单色器分光后的单色荧光信号照到光电倍增管的阴极中心上, 总光程约 2.5m。

二、各部分简介

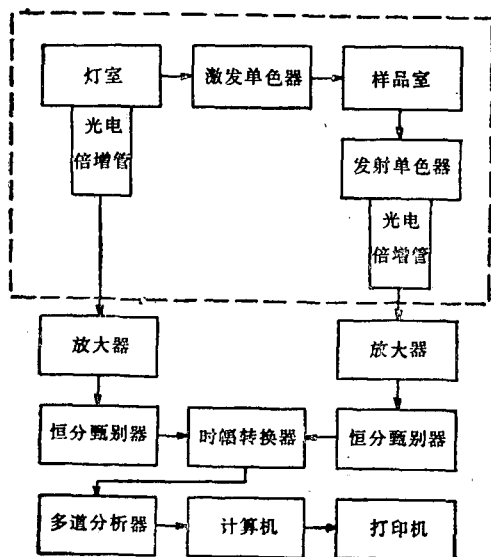


图 1 毫微秒荧光光谱仪框图

* 本课题得到中国科学院重大项目资助

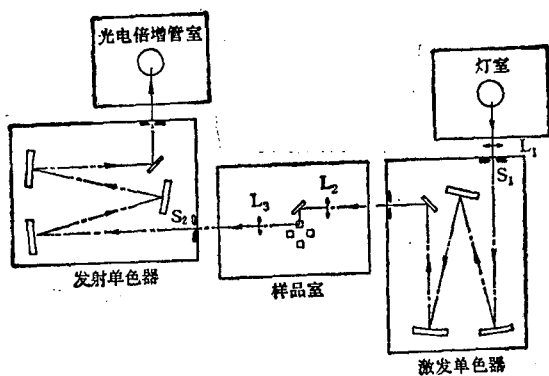


图2 毫微秒荧光光谱仪光路图

1. 灯室 灯室内光源发出的光与仪器的光轴是否重合以及能否聚焦到激发单色器的入射狭缝上,将会影响整个荧光光谱仪的测量灵敏度。为了精确地调整光路,除在安装时调整灯室的位置外,还要进行细调,为此,我们设计了灯室调节机构(图3)。

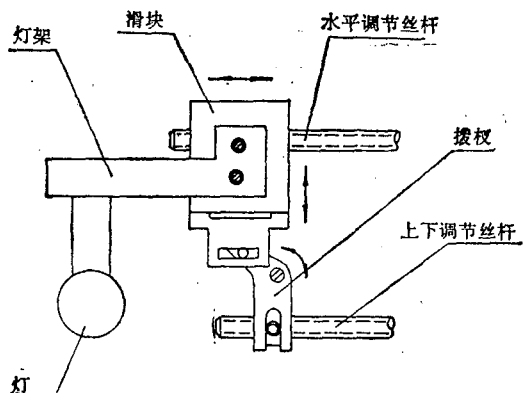


图3 灯室调节机构示意图

灯室前端的会聚透镜 L_1 是前后可调的,以使光源的光聚焦到单色器的入射狭缝上。同时设计了利用灯室外面的旋钮来上下、左右调节灯室内光源位置的机构。将灯固定在灯架上,滑块带动灯架做水平运动是通过旋转水平调节丝杆实现的。灯的上下调节是在旋转上下调节丝杆时带动了拨权,从而将水平调节变换成上下调节。实验表明调节作用对灯计数的影响是很明显的(图4),从而保证光源落在光学系统的光轴上。

2. 单色器 毫微秒荧光光谱仪中有两个单色

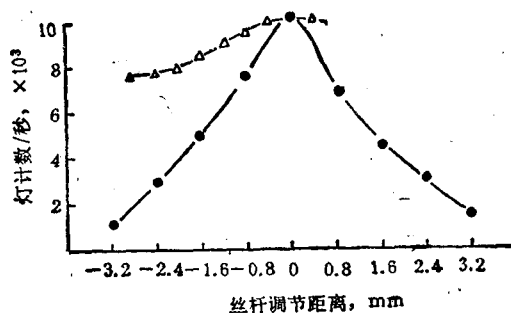


图4 灯室调节对计数的影响

—△—△—灯上下调节; —●—●—灯左右调节

器,即激发单色器和发射单色器,均采用WDG-30型光栅单色器。其焦距300mm,波长精度 $2\text{\AA}$,相对孔径 $F/5.3$,狭缝高度10mm,宽度0.01~3mm连续可调。

为了提高仪器的灵敏度,要求单色器有较大的相对孔径,即高光强;为了得到单色性好的单色光,在仪器灵敏度允许的条件下,尽量减小狭缝的宽度为宜。为了保证谱仪工作在单光子状态,一般选择样品计数为闸控灯重复频率的2~3%,例如,脉冲频率为50000 Hz时,样品计数控制在1000~1500计数/秒。

3. 样品室 包括样品的恒温和转换机构(图5)以及相应的光学附件。

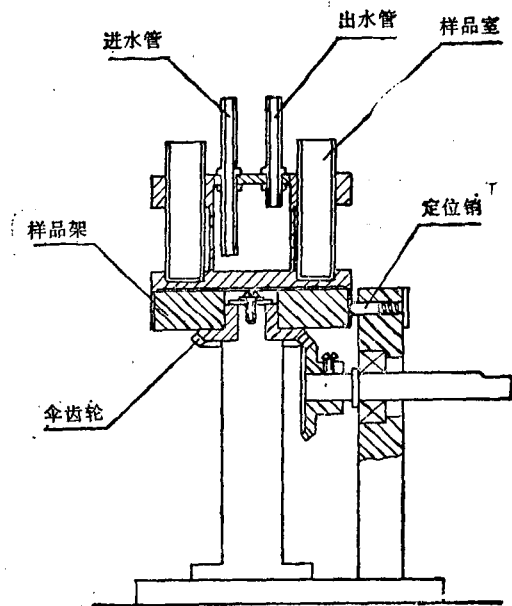


图5 样品恒温和转换机构示意图

样品池架可放置四个荧光样品池,为了方便,四个样品池可以一次放入,当更换样品池时,不要打开样品室盖,只要旋转伞齿轮即可换样测量。定位销及弹簧的作用是使样品池准确地定位,以保证测量重复性好。

使用恒温水浴维持样品的恒温。水浴中的水通过进水管和出水管不断循环,以维持温度恒定,恒温范围为0—60℃。

光学附件包括聚光装置和偏振装置。样品室光路设计是为了把来自激发单色器出射狭缝的单色光会聚于样品池的中心,同时又把样品发射的荧光会聚于发射单色器的入射狭缝上。为此,在样品室内装有透镜 L_2 和 L_3 ,其焦距为45mm,通光孔径为 $\phi 10\text{mm}$,已充分利用了单色器的相对孔径。另外,由于安装布局的需要,装有平面反射镜以改变光路。为了测量样品的荧光偏振,我们又设计了荧光偏振附件,它由起偏振器和检偏振器组成。它们被分别固定在可调节的金属支架上,拨动拉杆位置,在0—90°范围内连续可调。偏振片的透过率为30—35%,偏振度>99.5%。

安装与调试

通过调节底脚螺丝,将灯室、两个单色器、样品室、光电倍增管室的光路窗口调到同一水平高度,并用水平仪校准,然后用自己设计的光路接头将它们连接起来。

调试时首先用汞灯光源垂直入射并聚焦到激发单色器的入射狭缝上,左右微调各单元,将单色器的入射与出射狭缝、样品室的中心。聚

(上接第215页)

可较大量从血清中提纯IgG。与亲和层析方法相比既简便、又经济等。结果表明用本法自抗血清中提纯的IgG,其免疫活性与原血清非常接近,无失活现象,适用于免疫学中抗血清IgG的纯化。另外,与硫酸铵沉淀结合阴离子交换剂柱层析法相比,从羊血清提纯IgG的回收率也很接近。

以上结果都说明本法是一种简便可较大量提取血清中IgG的方法,有推广普及的价值。关于辛酸及DEAE-纤维素-52的用量,本文提

焦透镜均落在同一光轴上,把单色器、样品室和光电倍增管固定好。然后安上灯室,使灯大体安装在灯室的中心,即仪器的光轴上,光密封灯室后,点燃闸控灯,在样品室中放入散射样品或一小纸片,通过调节透镜和上下、左右调节灯在灯室内的位置,使得信号光电倍增管得到最高计数,也就是光路已经调好。

结果和讨论

我们研制的毫微秒荧光谱仪已经正常工作三年多,在该谱仪上测量了大量样品的荧光寿命,并发表了数篇科研论文。使用结果表明光学机械系统设计合理、使用方便,重复性好。由于在灯室处和样品室内安装了透镜,并设计了灯室调节机构,使得灯在灯室内的位置竖直、水平可调,并能紧固在底座上。这些措施使光路的收集效率提高了2个数量级以上,因此,使得整个谱仪具有灵敏度高、稳定性好的特点。

由于设计了恒温和偏振附件,该仪器可以测量样品的荧光寿命随温度的变化以及与偏振的关系,这就增加了仪器的功能,更有利于医学和生物学的研究。

参考文献

- 1 Badaea M G *et al. Methods in Enzymology*, 1979; 61:378—425
- 2 Laws W R *et al. Photochemistry and Photobiology*, 1986; 44(3):343—348
- 3 彭程航等:生物化学与生物物理进展,1987;(2): 49

[本文于1990年4月3日收到,

5月15日修回]

出大致的用量范围,在提纯不同动物血清IgG时,可根据实际情况适当地改变,选定最佳用量。

参考文献

- 1 Steinbuch M. *et al. Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969; 134:279
- 2 王寒正等.上海免疫学杂志,1984;5(4): 248
- 3 BD 哈密斯等.蛋白质的凝胶电泳实践方法,北京:科学出版社,1986: 18
- 4 宋家云等.中华医学检验杂志,1988;11(3): 166

[本文于1990年2月8日收到,

3月26日修回]