

台锁模脉冲氩离子激光器, 在 $5154\text{ \AA}$ 下工作, 光脉冲宽度低于 0.3 ns , 重复频率 88 MHz , 在一系列的空间滤波去掉杂散光后, 反射光束照射到样品池, 样品荧光用透镜聚焦通过滤光片到光电倍增管阴极, 由光电倍增管阳极产生的电流, 用 50Ω 电阻匹配的功率分配器, 分成两个相同部分。再用二根不同长度的同轴电缆输入取样示波器, 这时通道 1 相对于通道 2 延迟 2 ns 。通道 1 和通道 2 信号, 由取样示波器输出送到甄别器, 由甄别器出来的信号送入门电路, 门电路触发信号由取样示波器的垂直通道引出, 图中线性率表用来监视甄别器电流输出, 线性率表输出到 X-Y 记录器记录。这装置结构简单, 可测定荧光寿命范围在 4 ns — 50 ps , 误差为 $\pm 6\%$, 图 8 是用这装置测定若丹明 6G ($1 \times 10^{-6}\text{ M}$)

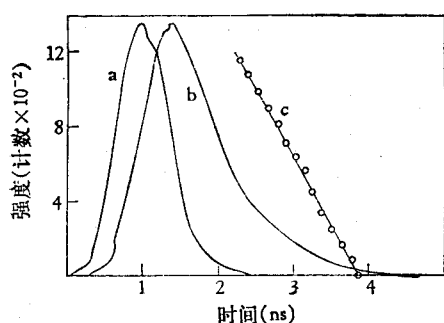


图 8 若丹明 6G ($1 \times 10^{-6}\text{ M}$) 和 0.15 MK_1 的荧光衰减曲线

a——激光散射图形 b——荧光发射强度曲线
c——荧光发射强度的对数作图。

10^{-6} M) 荧光衰减时获得的结果, 寿命 $\tau = 0.69 \pm 0.01\text{ ns}$ 。图 9 是叶绿体悬浮液的荧光发射衰减曲线。这是用一台锁模氩离子激光器同步泵浦的若丹明 6G 染料激光(半宽低于 10 ps , 作为

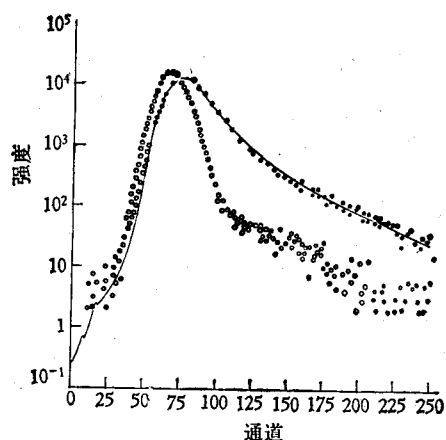


图 9 叶绿体发射荧光衰减曲线

(时标: 32.9 ps/通道)

激励源的时间校准单光子计数装置获得的。由图看出叶绿体荧光衰减是双相的, 短组分为 41.3 ps , 长组分为 1.5 ns , 这为了解光合作用中激励能的转移提供了第一手精确有用的数据。

参 考 文 献

- [1] Bollinger, L. M. and Thomas, G. E.: *Rev. Sci. Instr.*, **32**, 1044, 1961.
- [2] Bennett, W. R.: *Advanced Quantum Electronic*, 1961.
- [3] Koechlin, Y.: *Acad. Sci. Paris Compt. Rend.*, **252**, 391, 1961.
- [4] Beddard, G. S. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **545**, 165, 1979.
- [5] Ygnerabide, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **51**, 573, 1970.
- [6] Birks, J. B. and Munro, I. H.: *Progress in Reaction Kinetics*, **4**, 239, 1967.
- [7] Lopez-Delgado, R. et al.: *Chemical Physics*, **5**, 72, 1974.
- [8] Rowe, E. M. and Weacer, T. H.: *Sci. Am.*, **236** (6), 32, 1977.

[本文于 1980 年 4 月 21 日收到]

动力学分光光度计的光学系统

聂玉生 沈 恂

(中国科学院生物物理研究所)

动力学分光光度计是测量瞬态吸收光谱和瞬态产物的光密度随时间变化的、具有时间分

辨本领的光谱仪。它广泛用于脉冲射解和闪光光解等快速反应动力学研究。在放射生物学和

辐射化学中,用它观察电离辐射在生物大分子水溶液中在 10^{-11} — 10^{-3} 秒内产生的原初过程,如水化电子的形成、离子-分子反应,辐射引起的各种自由基的化学反应。在光生物学和光化学中,用它观察分子的激发态、特别是激发态的能量传递和激发三线态的化学反应,时间分辨率最高可达 10^{-13} 秒。在光合作用的研究中,用它观察给体-反应中心-受体之间的电子传递过程。总之,动力学分光光度计已经成为现代生物学和现代化学研究中的重要手段。本文将结合我们在微秒级动力学闪光光解装置研制中的体会,介绍动力学分光光度计的光学系统的结构设计和主要考虑。

一、动力学分光光度计的一般结构

典型的微秒或毫微秒级的动力学分光光度计的原理如图 1。触发控制线路首先把快门打

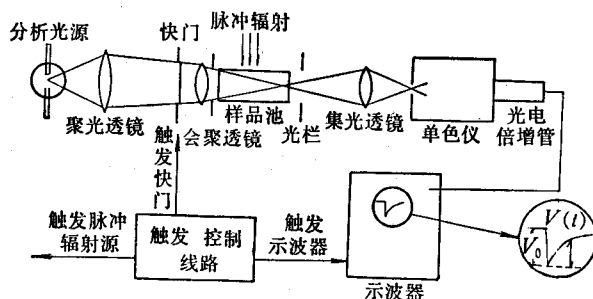


图 1 动力学分光光度计的原理图

开,使分析光源的光经会聚透镜通过样品池,并经集光透镜把光源的像成在单色仪的入射狭缝上,入射光经单色仪分光,从出射狭缝射出的单色光被光电检测器(一般为光电倍增管)接收,转换成电压信号送至示波器;这个电压信号 V_0 正比于穿过样品池的透射光强度 I_0 。随后触发控制线路触发示波器扫描,扫描光迹的垂直距离正比于 I_0 。示波器扫描很短暂的时间(几十毫微秒或几微秒、取决于分光光度计的时间分辨率)后触发脉冲辐射源(闪光、脉冲激光或脉冲电子束),样品在脉冲辐射的作用下产生待观察的瞬态产物,由于它们的电子轨道受到扰动,往往很容易吸收光子而发生光学的跃迁。

因此,脉冲辐射作用后穿过样品的透射光强度骤然下降,然后经过一段衰变过程又回到某一个稳定数值。脉冲辐射后的透射光强度随时间的变化 $I(t)$ 完全以脉冲后示波器荧光屏上的光迹 $V(t)$ 所代表;把光迹拍摄下来,即可得到瞬态产物的光密度随时间变化的函数:

$$O.D.(t) = \lg \frac{I_0}{I(t)} = \lg \frac{V_0}{V(t)}$$

动力学分光光度计与一般分光光度计的一个重要区别在于它是自身对照的。脉冲辐射前的样品是参考样品,脉冲辐射后的样品即为待测样品。它不仅能测量一定波长上瞬态产物吸收光密度随时间的变化;如果拍摄不同波长上示波器扫描光迹的照片,它还可以得到任何时刻样品的瞬态吸收光谱。

二、光学系统设计的主要考虑—提高信噪比

无论是辐射化学还是光化学,用动力学分光光度计观察的瞬态吸收都是很小的^[1],以水化电子的观测为例,若瞬时浓度为 $10^{-7}M$,消光系数 $1.5 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$,样品池的光程为 1 厘米,则瞬态吸收的 $O.D$ 值为 1.5×10^{-3} ,通过样品池的透射光强度只有 0.35% 的变化。尽管我们可采用适当的电子学补偿线路,使示波器只显示光强度的变化量,并尽可能将它放大,但这种放大受到光本身涨落的限制。

分析光源发出的光,通过透镜,样品池等经单色仪分光后,照射到光电倍增管的光阴极上,产生的光电子流 I_e 为:

$$I_e = \frac{\rho \cdot \lambda \cdot e \cdot Q(\lambda) \times 10^{-9}}{h \cdot c} \text{ (安培)} \quad (1)$$

式中, ρ 为入射光的功率(焦耳/秒), λ 为入射光的波长(毫微米),电子电荷 $e = 1.6 \times 10^{-19}$ 库仑, h 为普朗克常数 (6.63×10^{-34} 焦耳·秒), c 为光速 (3×10^8 米/秒), $Q(\lambda)$ 为光阴极的量子效率。

入射光束中单位时间内到达光阴极的光子数是随机的,因此产生的光电子数是统计涨落的。这种涨落叫作“发射噪声”。在瞬态吸收变

化很快(几十微秒甚至几十毫微秒)的情况下,光电倍增管输出电流的测量系统(包括示波器内装的放大器)的响应时间必须很短,这时发射噪声是对检测灵敏度的主要限制。光阴极电流统计涨落的均方根值 Δi 为:

$$\Delta i = \sqrt{2eI_c\Delta f} \quad (\text{安培}) \quad (2)$$

式中 Δf 是测量系统的带宽;带宽与测量系统上升时间 t_r 的关系为 $\Delta f = \frac{1.1}{\pi} \cdot \frac{1}{t_r}$ 。于是得出信噪比 $(S/N)^{[2]}$:

$$\begin{aligned} S/N &= \frac{I_c}{\Delta i} = \sqrt{I_c/2e\Delta f} \\ &= \sqrt{\frac{\pi}{2.2} t_r I_c / e} \end{aligned} \quad (3)$$

从上述分析可以看出,要提高检测灵敏度,必须尽可能提高射在光电倍增管光阴极上的光强度和增加测量系统的上升时间。但是上升时间的增加无论如何不能大于观察瞬态吸收的扫描时间的1%,否则将引起测量信号的畸变。因此,光学系统设计的最重要的考虑是提高入射光的强度,办法是采用高亮度的分析光源,提高光路系统的集光效率,采用大孔径的单色仪。

如果考虑到吸收变化的大小,把样品池的光程因素考虑在内,Keene 对信噪比给出一个更为直观的定义^[3]: 信号(光吸收的变化) $S = 2.3\epsilon \cdot c \cdot l \cdot n$ (电子数/秒),发射噪声近似为 $(n/t_r)^{1/2}$ 电子数/秒,信噪比为:

$$S/N = 2.3\epsilon \cdot c \cdot l \cdot (nt_r)^{1/2} \quad (4)$$

式中, c 为瞬态吸收产物的浓度(M), ϵ 为消光系数, l 为样品池光程, n 为光电倍增管光阴极发射的光电子数/秒。从(4)式可见,为了提高探测灵敏度,还应该采用足够长的样品池。

三、光路的设计

动力学分光光度计的典型光路(以二透镜系统光路为例)如图2。这是一个二维空间的示意图。分析光源(高 h_s)经透镜 L_1 (有效直径 D_1)成像 h 在样品池内,像 h 再经透镜 L_2 (有效直径 D_2)在单色仪入射狭缝处成像 h_e , Q_s 为

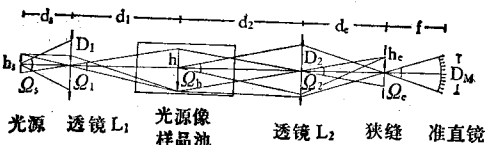


图2 二透镜系统光路图

透镜 L_1 对光源中心的张角, Q_1 为像 h 对 L_1 中心的张角,余类推。根据 Helmholtz-Lagrange 不变性原理^[4],对于傍轴光如果忽略光在每个光学元件上的损失,则有:

$$\begin{aligned} h_s \cdot Q_s &= D_1 \cdot Q_1 = h \cdot Q_h \\ &= D_2 \cdot Q_2 = h_e \cdot Q_e \end{aligned} \quad (5)$$

如果分析光源及其像 h 与透镜 L_1 的距离分别为 d_s 和 d_1 ,像 h 及单色仪入射狭缝与透镜 L_2 的距离分别为 d_2 和 d_e ,则(5)式可以改成:

$$\begin{aligned} h_s \cdot \frac{D_1}{d_s} &= D_1 \cdot \frac{h}{d_1} = h \cdot \frac{D_2}{d_2} \\ &= D_2 \cdot \frac{h_e}{d_e} = h_e \cdot \frac{D_M}{f} \end{aligned} \quad (6)$$

(6) 式是动力学分光光度计光路设计中十分重要的关系式,它给出分析光源的大小(h_s),透镜直径(D_1 、 D_2)等参量与单色仪的狭缝高度(h_e)和相对孔径(D_M/f)之间的关系。再结合其它几何成像公式,就可计算出装置中各光学元件的大小及其相互位置。

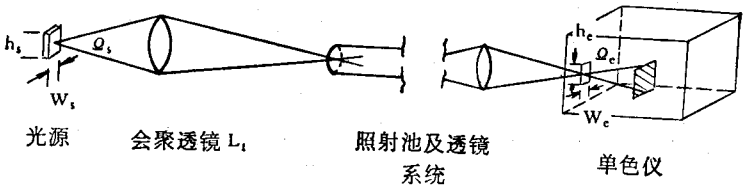


图3 三维空间中光源与单色仪的几何关系

Hunt 等人^[5]讨论了动力学分光光度计中三维空间的几何光学问题。在图 3 中, 会聚透镜 L_1 从光源收集的光通量是 $F_s = B_s \cdot W_s \cdot h_s \cdot \Omega_s$, 这里, B_s 是分析光源的亮度, W_s, h_s 分别是光源发光面的宽和高, Ω_s 是会聚透镜 L_1 对光源所张的立体角。同样, 通过单色仪入射狭缝的光通量是 $F_e = B_e \cdot W_e \cdot h_e \cdot \Omega_e$, B_e 是入射狭缝处的亮度, W_e, h_e 分别是入射狭缝的宽和高, Ω_e 是单色仪第一准直物镜有效面积对入射狭缝中心所张的立体角。如果不考虑光传输过程中的损失, 则进入单色仪的光通量应与会聚透镜从光源收集的光通量相等, 即 $F_e = F_s$, $B_e = B_s$, 则

$$\Omega_s = \Omega_e \cdot W_e \cdot h_e / W_s \cdot h_s$$

实际上, 在传输过程中, 光在透镜的每个表面要损失 5—10%^[2], 所以, 为使单色仪获得足够的光通量, 在实际的光学系统中应使

$$\Omega_s > \Omega_e \cdot W_e \cdot h_e / W_s \cdot h_s$$

提高通过样品池的分析光通量, 大致有四种办法^[5](图 4)。(a) 平行光通过样品池, 但由

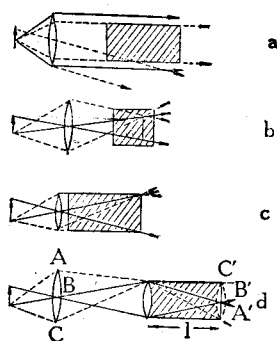


图 4 分析光通过样品池的几种方式

于分析光源不是点光源, 光源大部分发光面发出的光经过透镜变成偏轴光束而不能穿过样品池, 因此这种方式的集光效率很低, 一般不为动力学分光光度计所采纳。(b) 光源经透镜成像在样品池内, 这种方式可以得到较高的集光效率。但是如果样品池很长(例如大于 10 厘米), 透镜的焦距就必须较大, 而光源又必须放在透镜的焦点之外, 这样立体角 Ω_s 将减小, 限制了集光效率的提高, 因此不适于长样品池情形。

(c) 这是方式(b)的改进。在靠近样品池的前表面放置一短焦距透镜, 使光源的像成在样品池后表面上, 由于透镜的焦距短, 可使光源靠近透镜, 增大了立体角 Ω_s 。(d) 在样品池的前表面, 再增加一块透镜作场镜, 进一步会聚经过会聚透镜的光线, 而把光源的像成在样品池后表面, 这样可使光源更加靠近会聚透镜的焦点, 从而得到更大的 Ω_s 。这一方式较理想。

在动力学分光光度计的光路中, 上述后三种方式都可选用, 选择那种, 应视具体情况(如单色仪的孔径, 样品池的尺寸等)而定。

综上所述, 光路系统的设计要使尽可能多的光从分析光源经样品池传输到光检测器, 同时又要尽量防止未经过样品池的杂散光被光检测器接收。集光效率, 即(6)式中的各项 $h_s \cdot \frac{D_1}{d_s}$,

…要尽可能的大, 这是光路设计应考虑的主要因素, 而对成像的质量可以要求不高。在样品池不太长, 其端窗不作为限制光阑时, 整个光学系统集光效率的最大值一般由单色仪的相对孔径决定, 即(6)式末项 $h_s \cdot \frac{D_M}{f}$ 决定了系统所能达到的最大集光效率。

四、动力学分光光度计光学系统的主要元件

光源 通常应选用亮度高和发光面积小的光源。前已述及、分光光度计的检测灵敏度与射在光检测器光阴极上的光的功率的平方根成正比, 因此, 光源亮度提高 100 倍, 检测灵敏度即可提高一个数量级。发光面积不宜过大, 因为光学系统通常难于接受发光面直径大于 2—3 毫米的光源较外部分发出的光。在闪光光解和脉冲射解装置中, 多采用 200—400 瓦的高压氙灯, 其发光面积通常为 1×2 毫米², 发射光谱是连续的 (190—1400 毫微米) 适于大多数生物和化学样品的观测。它的缺点是长时间稳定性差。这是因为电弧发光, 放电电弧在电极隙内容易从一个位置跳到另一个位置。为了减小这种发光强度的波动带来的低频噪声, 必须使用

高稳定度的直流稳流电源并用水冷方式散热。如果观察大于几毫秒的瞬态吸收变化,最好采用卤素钨灯或低压氙弧灯,因为它们的长时间稳定性较好。

样品池 根据(4)式,采用长的样品池,可提高装置的信噪比,当瞬态产物的产额很低,尤其是分析气态样品时,保证样品池有足够的长度 l 是很重要的。但也不能过长,因为样品池的光通量 $\phi \propto \frac{1}{l^2}$ ^[6],当样品池过长时,反而限制

了到达单色仪的光通量,降低了装置的灵敏度。同时池子过长,也易造成瞬态产物浓度的不均匀,影响反应速率常数的测定^[7]。此外,长样品池容积大,会造成昂贵样品的浪费。

样品池一般以高纯熔融石英为材料。这种材料透光范围很宽(0.2—4微米),而且光传播各向同性好。样品池的两个端窗要保证光学平行。

为了增加样品池的光程,可采用多次反射式样品池或全内反射式样品池。

单色仪和滤光片 单色仪的狭缝宽度与分辨率成反向关系。在动力学吸收光谱法实验中,因对单色仪的分辨率一般要求不高,可尽量把狭缝加宽,使更多的光被光检测器接收,提高仪器的信噪比。但过宽,分辨率太差将使吸收光谱的形状失真。光栅单色仪的分辨率比棱镜单色仪高,而且其色散率随波长变化不大,这是它的优点。但因非光学平面等因素造成的散射,在光栅单色仪中较棱镜单色仪严重,这在紫外区更加明显。在350毫微米以下,棱镜单色仪一般比光栅单色仪好。因为在这种波长下大多数光源输出很弱,传输中的损失又很大。随着波长进入紫外区,散射光的数量迅速增加,因此在这紫外区,常需要使用双光栅单色仪或棱镜—光栅单色仪,以减少散射光。当在190—230毫微米区工作时,还需要用适当的滤光片,改善光的纯度。

单色仪主要用在吸收光谱的测定。当研究瞬态产物在特定的一、二个波长下的动力学过程时,可以采用干涉滤光片或截止滤光片,代替

单色仪,这样可得到较强的分析光。

光检测器 用作光检测器的主要是光电倍增管和光电二极管。前者因为有电子倍增功能,输出信号大;后者的输出电流一般还要再经过放大。在动力学分光光度计中选择光电倍增管主要考虑四点:(1)光谱灵敏度,即光电倍增管对之敏感的光谱特性。例如常用的EMI9558光电倍增管的S-20型光阴极的光谱响应可以从160—850毫微米,适用于绝大多数光化学的工作。另一种常用的光电倍增管是RCAIP28,它的光谱响应曲线为S-5型,光谱响应范围为200—650毫微米。(2)响应时间。对毫秒级的动力学分光光度计,光电倍增管必须有足够快的响应时间,例如RCAIP28型的响应时间为2毫微秒左右,EMI9558为10毫微秒左右。(3)线性范围。在全部探测时间内,必须保证光电倍增管的阳极电流都与所接受的光强成严格的线性关系。当阳极电流很大,尤其在最后几级,如果引起的打拿极电流达到与打拿极链电流同一数量级时,光电倍增管的阳极电流与所接受的光强就失去了线性关系。Porter给出了适于动力学光谱法的光电倍增管连续工作时阴极电流的额定值^[2]。在闪光光解和脉冲射解技术中,由于光脉冲很窄(毫秒级或毫秒级以下),可以容许更高的阳极电流。Hunt在其脉冲射解实验中^[8],IP28光电倍增管的阳极电流达25毫安,仍可保持线性关系。(4)光阴极量子效率。提高光阴极的量子效率有利于减小发射噪声,以提高检测灵敏度(见式(1)和(3))。

一般的光电倍增管对红光和红外线不敏感,不能满足某些实验的要求,这时可以改用半导体光电二极管作检测器。它们的主要优点是峰值灵敏度在红外区,而且量子效率高,可达80%,并能通过非常大的峰值电流,而光电倍增管的量子效率一般不到10%。因此,在动力学分光光度计中,特别是毫秒级的,已越来越多地使用光电二极管作为光检测器。

遮光器 指光阑和快门。光阑的主要作用是降低散射光水平。在照射池前后及光学系统其它适当部位都应放置适宜口径的光阑。

高强度分析光长时间的照射将引起光电倍增管的疲劳和样品被分析光光解而影响观测结果。如果在样品池前安装一个与显示记录系统联动的快门,在激发闪光前很短时刻(毫秒量级)打开快门,当瞬态过程完成后立即闭合,可避免它在非观测时间内仍继续照射光电倍增管和样品,防止了光电倍增管的疲劳和样品被分析光光解。

参 考 文 献

[1] Hart, E. J. et al.: *The Hydrated Electron*, 1970.

- [2] Porter, G. et al.: *Techniques of Chemistry*, Vol. 6, pt. 2, Ed. by Hammes, G. G., New York, 1974.
- [3] Keene, J. P.: *Pulse Radiolysis*, (Ed. Ebert, M. et al.) Academic Press, London, New York, 1965.
- [4] James, J. F. et al.: *Design of Optical Spectrometers*, Chapman and Hall, London, 1969.
- [5] Hunt, J. W. et al.: *Int. J. Radiat Phys. Chem.*, 4, 1, 1972.
- [6] Schurek, K. et al.: *J. Sci. Instrum.*, 44, 952—953, 1967.
- [7] Boag, J. W.: *Trans. Faraday Soc.*, 64, 677—685, 1968.
- [8] Hunt, J. W. et al.: *Radiat. Res.*, 32, 149, 1967.

[本文于1980年8月21日收到]

用较简便的双向纸电泳装置分离蓖麻 蚕后部丝腺小分子 RNA 酶解片段

李文琴 曹功杰 吴仁龙 祁国荣

(中国科学院上海生物化学研究所二室)

Sanger 等人^[1]最先采用双向纸电泳方法(通常称作指纹图谱法)测定全标记 RNA 的顺序,其后同实验室 Brownlee 等人^[2]又发展了该方法,采用电泳一同系层析技术。近几年来,核酸顺序研究的技术发展很快,特别是凝胶直读法能快速测定核酸顺序。但对于确定 RNA 中的修饰成分,指纹图谱法仍是最准确的,因此目前很多实验室仍旧利用这一方法,并结合凝胶直读法测定 tRNA 的顺序^[3,4,5]。我们在研究蓖麻蚕后部丝腺小分子 RNA 的结构中也采用了指纹图谱法,并在电泳装置方面做了一些改变,它比 Sanger 等人设计的装置较为简便。本文介绍这一装置及其在分离小分子 RNA 酶解片段中的应用。

材 料 和 方 法

1. 材料 (1)³²P-全标记蓖麻蚕后部丝腺 tRNA^{Gly} 和 5S RNA 的制备方法见(6)。RNA 用 RNase T₁ 全酶解条件:反应体积为 40 微升,含有 10 mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA-

Na₂, 100 单位 RNase T₁/1A₂₅₀ ³²P-RNA。37℃ 保温十五小时。RNA 用 RNaseA 全酶解条件:反应体积为 40 微升,含有 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA-Na₂, 20 微克 RNaseA/1A₂₅₀ ³²P-RNA。37℃ 保温十五小时。RNase T₁ 系 Merck 公司产品, RNaseA 系上海生化所东风厂产品。

(2) 醋酸纤维素纸使用上海市湖南街道加工厂产品或英国 OXOID 产品。规格 25×3 厘米。

(3) DEAE 纤维素纸是 Whatman 产品,规格为 55×20 厘米。

2. 电泳装置 我们用于第二向的电泳装置如图 1 右所示。装置长 50 厘米,宽 20 厘米,高 30 厘米的平放有机玻璃槽。槽内两端各有一只放电极缓冲液的小槽,横接两小槽为一块有机玻璃板,平板上放一个“波浪式”的玻璃支架(图 2),电泳纸放在上面。槽内盛放 200 号溶剂汽油,盖没电泳纸。槽内四周有可以通自来水冷却的管道。和 Sanger 等人的装置相比,本