

荧光光谱校正的原理和方法(下)

李 治 湘

(中国科学院生物物理研究所)

四、校正曲线的探测方法

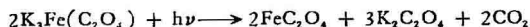
(一) 激发光谱校正曲线(激发光强度-波长曲线)

1. 温差电偶

由于温差电偶在一定波段内不存在光谱特性,可在荧光分光光度计样品室中放置一个很灵敏的、具有石英窗口的热电偶,热电偶的后面连接一个灵敏检流计,当改变激发光单色器波长时,检流计上面读数的变化便是光源-激发光单色器组合体的强度-波长曲线。然后将表观激发光谱每一波长上的读数乘以激发光强度-波长曲线同一波长上的数值,以所得的数值对波长作图,便可得到真实的荧光激发光谱。但利用热电偶的探测方法,只有在光通量较强时才是可以的。因热电偶的电输出信号微弱。容易受各种外界因素干扰。

2. 化学露光计

用化学露光计探测激发光强度-波长曲线,常采用正铁草酸钾化学露光计。正铁草酸钾中的铁是三价的。在受到 10—15 分钟光照射后,产生还原作用,还原出草酸铁,草酸铁中的铁是二价的。通过化学滴定,对草酸铁进行定量分析,还原的草酸铁愈多,表示照射的光量子愈多。从草酸铁的含量可以测得激发光强度-波长曲线。正铁草酸钾化学露光计的还原式为:



用化学露光计的方法虽然简单,但很费时间,全部工作都必须在良好的暗室中操作。此外,测试的波长范围有限,只有在 2500 埃—3500 埃波段内才是精确的,在可见光区很难得到正确的结果。

3. 已标定过的光电倍增管

改变激发单色器的波长,照射到光电倍增管光阴极上的光量子数随着改变,因已标定过的光电倍增管灵敏度曲线为已知,只要测出每一个不同波长的灵敏度曲线对应于已标定光电倍增管灵敏度曲线在同一波长上的相对变化,然后,以每一波长上的相对变化对波长作图便可得到激发光强度-波长曲线。

(二) 发射光谱校正曲线

1. 标准光源

以标准光源为黑体来求得发射光谱校正曲线是最

简便、最准确的方法。但由于目前尚无紫外区的标准光源,所以不能用这种方法求得紫区和紫外区的校正曲线。下面介绍用标准钨灯作黑体求得可见区校正曲线的方法。

用标准钨灯探测发射光谱校正曲线的方法是,在发射光单色器的入射狭缝前装置一个色温一定的、强度-波长曲线为已知的一个标准钨灯,在这钨灯的光照下,每隔 5—10 毫微米改变一次发射单色器波长,便读取光电倍增管输出读数一次,将各波长下光电倍增管输出读数除以钨灯的强度-波长曲线上同一波长对应的数值,便可得到该发射单色器-探测器组合体的校正曲线。

由于给定的标准钨灯强度-波长曲线是每单位波长间隔内的能量,即, $dE/d\lambda$, 而 $S(\nu)$ 是相对光量子/秒。为了将能量换算为光量子,式(7)应变换为:

$$S(\nu) = \frac{A(\nu)}{\frac{dE}{d\lambda} \cdot \lambda^3} \quad (10)$$

2. 量子计数器

用量子计数器的方法探测发射光谱校正曲线的方框图示于图 2。

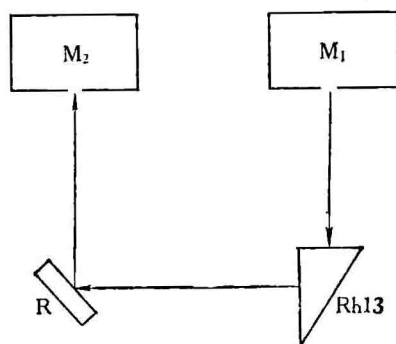


图 2 用量子计数器探测发射校正曲线方框图

从激发单色器 M_1 来的激发光,照射在盛有若丹明 B (rhodamine B) 的三角形吸收池组成的量子计数器上,若丹明 B 被激发产生荧光,经反射镜 R 进入发射单色器 M_2 。若丹明 B 的荧光经过 M_2 分光后,由光电倍增管接收。光电倍增管前有块黄色滤片,以滤除

500—600 毫微米以短的杂散光。

校正曲线按下式计算：

$$S(\lambda) = \frac{R(\lambda)B(\lambda)W(\lambda)}{Q(\lambda)M(\lambda)} \quad (11)$$

式中： $Q(\lambda)$ ——激发光的光量子分布；

$R(\lambda)$ ——光电倍增管和发射单色器对荧光的响应；

$B(\lambda)$ ——发射单色器出光狭缝谱带宽度；

$M(\lambda)$ ——量子计数器石英的透射比；

$W(\lambda)$ ——反射镜 R 的反射系数。

在求 $Q(\lambda)$ 时，为减小量子计数器中荧光的重吸收而引起的误差（见图 3(B)）， M_2 固定在 640 毫微米位置，让 M_1 扫描，这时从光电倍增管读到的数值就是各个波长的 $Q(\lambda)$ 。

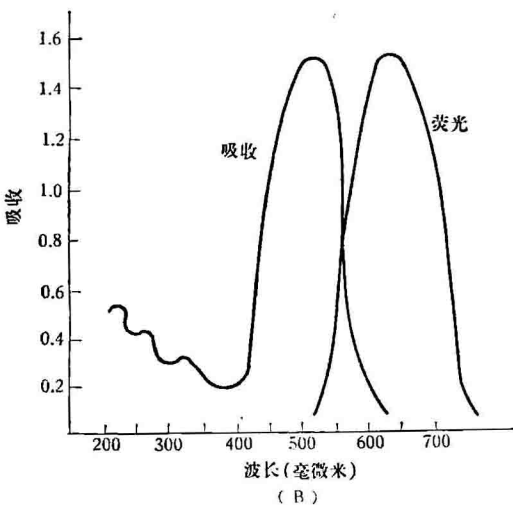
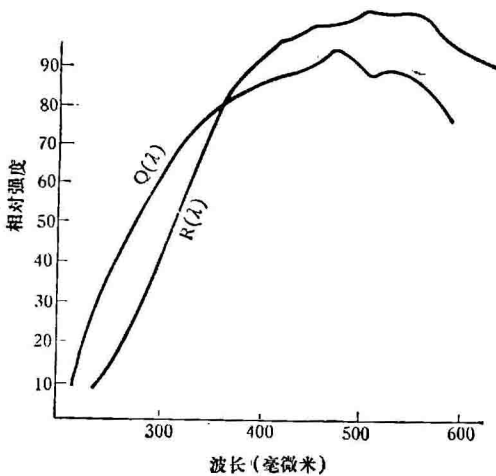


图 3 (A) 发射校正曲线和 (B) 若丹明 B 的吸收与荧光光谱

求 $R(\lambda)$ 时，将 M_1 的狭缝调节至适当的宽度，在 M_1 的每一个设定波长上，对 M_2 作扫描，于是记录的曲线峰值就是相应于 M_1 每一个设定波长的 $R(\lambda)$ 。峰值

半谱带宽度就是所对应的 $B(\lambda)$ ，测出 M_1 不同波长的 $R(\lambda)$ ，组成一条曲线，就是 $R(\lambda)$ 对 λ 的曲线。至于光栅型单色器，正如前面分析， $B(\lambda)$ 是一个常数，当狭缝宽度一定时， $B(\lambda)$ 也就一定。 $M(\lambda)$ ， $W(\lambda)$ 可由紫外分光光度计测得，或由文献查到。

测得的 $R(\lambda)$ ， $Q(\lambda)$ 可绘成图 3(A) 的曲线，根据式 (9) 便可求得各波长对应的 $S(\lambda)$ 。将 $S(\lambda)$ 对波长 λ 作图便是单色器-光电倍增管的校正曲线。

五、荧光光谱的校正

上面介绍的校正曲线的探测方法是在获得了校正曲线后，用仪器扫描出表观光谱，然后在每一波长上，将表观光谱的读数除以同一波长上校正曲线的读数，而得到真实光谱。这样，手续非常复杂繁琐。近年来的商品仪器中，仪器自身已经过校正，使用者可不必作出校正曲线，就能直接测出样品的真实光谱。下面介绍这种仪器校正的原理和方法。

(一) 激发光谱的校正——量子计数器方法

作为量子计数器的若丹明 B，在浓度 (3—8) 克/毫升的乙二醇溶液中，受激发光照射时，在 240 毫微米—600 毫微米波长范围内具有吸收恒定、量子产率不随波长而变、产生的荧光和荧光光谱都稳定的特点。

激发光谱校正的原理方框图示于图 4。

从激发单色器来的激发光被光束分裂镜分为两路，一路反射入量子计数器 1，激发量子计数器发出荧光，由透镜聚焦后照射监测光电倍增管。另一路穿透光束分裂镜，照射在样品上，样品发出的荧光进入发射单色器，分光后，射在测试光电倍增管上。输出信号经放大送入记录仪。激发单色器在 240—600 毫微米波段内扫描。发射单色器置于某一固定波长。滤光片 1 滤除 600 毫微米以短波长的散射光，消除了对测试的干扰。光谱的校正通过打拿极负反馈电子线路，自动调节两个光电倍增管负高压来实现。假定量子计数器 1 产生的荧光强度为 F_s ，被测样品产生的荧光强度为 F_t ，光电倍增管高压为 U_p ，测试光电倍增管信号电压为 U_t 。当 U_p 增加时， U_t 增加。当 F_t 增强时， U_t 也增加。打拿极负反馈电子线路这样设计，以使得量子计数器 1 的荧光 F_s 增强时，负高压相应降低。于是 F_s 增强， U_t 下降。 $U_t \propto F_s/F_s$ 。由于 $F_s = 2.303\phi(\lambda)\epsilon(\lambda)I(\lambda)$ ，如果制备高浓度的若丹明 B 在乙二醇中的溶液 (8 克/升)，使 240—600 毫微米范围内量子产率 $\phi(\lambda)$ 不随入射光波长变化。这样，由于量子产率 $\phi(\lambda)$ 及消光系数 $\epsilon(\lambda)$ 都与激发波长无关，因而， $F_s \propto I(\lambda)$ ，也就是若丹明 B 的荧光强度仅由激发光强度决定。量子计数器的荧光正比于激发光强度，反映了氙灯-单色器的强度-波长变化。 F_t 是被测样品的表观光谱，所以，光电倍增管的输出也就是被测样品的真实光谱。

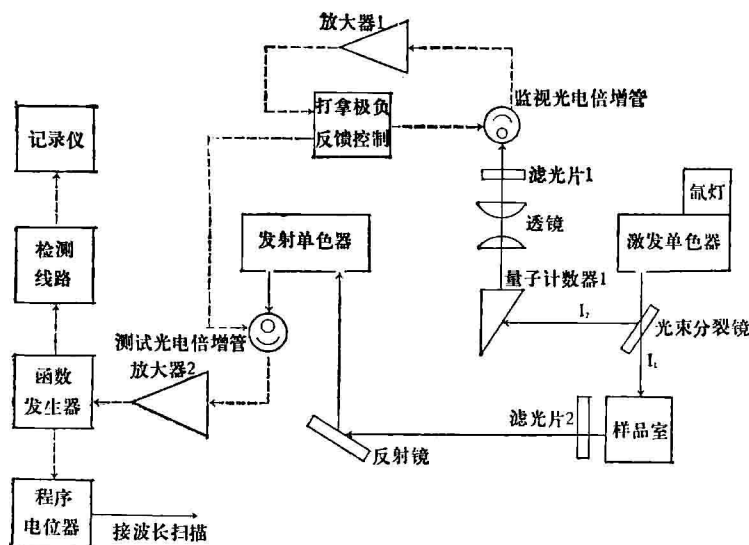


图4 荧光光谱校正方框图

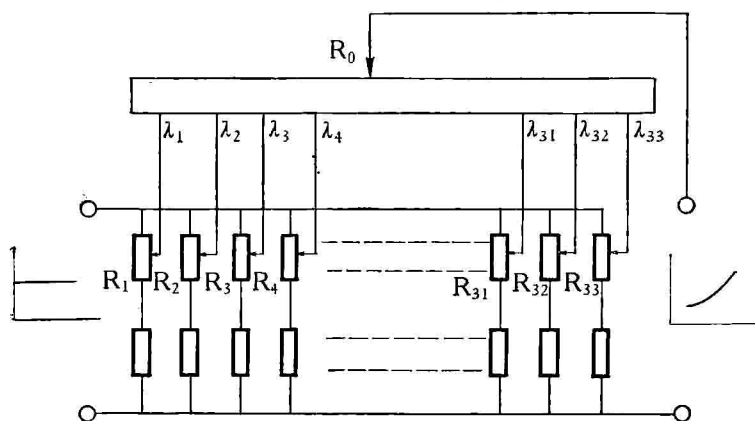


图5 函数发生器电路原理图

由于光束分裂镜的光谱特性，反射光 I_2 与透射光 I_1 略有不同，实际上还需对反射镜的这种反射率与透过率之差进行补偿，否则会有很多误差。补偿的方法如图4所示，将样品取走，更换一个与量子计数器1完全相同的另一块量子计数器2。量子计数器2产生的荧光经测试光电倍增管和放大器放大后，送入一个与程序电位器连接的函数发生器。程序电位器的滑臂由波长马达带动，与波长的扫描同步。图5是程序电位器与函数发生器的原理电路图。函数发生器由33个电位器组成，调节这33个电位器，可使每一个电位器的滑臂电位不同，程序电位器 R_0 各抽头上电位分布也就不同，程序电位器滑臂与单色器波长扫描连动，设各电位器滑臂与程序电位器的连接点对应的波长分别为 $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{33}$ 。让 $\lambda_1 - \lambda_{33}$ 均匀分布在240—600毫微米波段范围内，当单色器在此波段范围内扫描时，只要依次适当调节这33个电位器的阻值，输出信号便可得

到任意一个函数。图4中滤光片2的作用与滤光片1相同，两个量子计数器又完全一样。细心调节33个电位器使产生的函数正好等于石英光束分裂镜在各波长上反射率与透过率之差，则从记录仪100%线上可以得到一条平滑的直线。然后取走量子计数器2与滤光片2，换上待测样品，由记录仪记录的光谱曲线便是该样品的真实激发光谱。

(二) 发射光谱的校正

1. 标准钨灯

标准钨灯校正的原理示于图

6。

当钨灯的工作温度一定时，其辐射能量是可以标定的。钨灯发射的光束经斩光器调制，使变为交流信号。石英扩散板将光散射，使进入单色器入射狭缝上的光线亮度分布同荧光的亮度分布一样，否则将由于钨灯灯丝成像在入射狭缝上，以致造成钨灯光谱特性与实际校正的光谱存在较大差别。反射镜则使用荧光单色器自身的反射镜。经发射单色器分光后，由测试光电倍增管接收，经放大器放大后，送入函数发生器，函数发生器中的程序电位器与波长扫描同步，因经放大后的信号是与函数发生器所产生的函数相乘，放大后的信号是表现光谱。函数发生器输出的信号真实反映标准钨灯的能量分布，所以函数发生器

所产生的函数应是单色器-光电倍增管组合体校正曲线的倒数。记录仪所记录的曲线正好是钨灯能量-波长曲线。然后取走钨灯、斩光器和石英扩散板，换上待测样品，由记录仪描绘的就是该样品的真实光谱。发射光谱校正时，光电倍增管的电压调在某一固定值。

由于标准钨灯的有效波长范围只能是400—750毫微米。对于400毫微米以下的短波长，则需用下面两种方法校正。

2. 量子计数器

根据前述用量子计数器探测发射校正曲线的方法，当测出发射单色器-光电倍增管组合体的校正曲线后，精心调节电子线路中函数发生器的各个电位器，使其发生的电压-波长函数与发射单色器-光电倍增管的组合校正曲线完全吻合，那么，由记录仪描绘出的样品光谱，便是已校正的真实发射光谱曲线。

由于受量子计数器中若丹明B的限制，以这种方

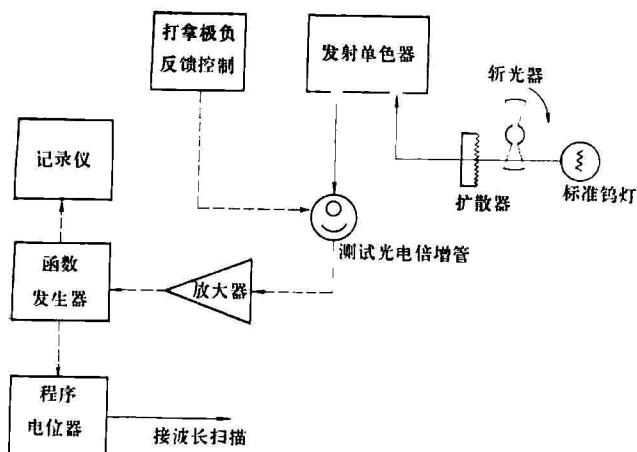


图6 标准钨灯校正发射光谱原理图

法校正的有限光谱范围只是240—610毫微米。

因校正曲线的获得需经过数学运算，而量子计数器石英的透射比 $M(\lambda)$ 以及反射镜的反射系数 $W(\lambda)$ 均先用紫外分光光度计测试，而紫外分光光度计光谱的校正本身存在误差，这样，造成校正曲线误差的增大。

3. 将已校正的激发光引入发射单色器

将已校正的激发光引入发射单色器是目前广泛使用的方法。既然用标准钨灯可校正发射光谱，当然，将强度分布已知的激发光引入发射单色器，以对发射光谱进行校正也应当是可行的。不过强度分布已知的激发光必须是经过校正的。

图4中，通过量子计数器与打拿极负反馈的作用所测定的激发光 I_1 是经过校正的激发光。首先在记录

光谱。

用已校正的激发光引入发射单色器校正发射光谱，其测试误差为2%左右。由于若丹明B量子产率的恒定性受波长所限，发射光谱校正的有效范围是250—600毫微米。

参 考 文 献

- [1] 陈国珍：《荧光分析法》，科学出版社，1975年。
- [2] C. A. Parker et al.: *Analyst*, **85**, 587, 1960.
- [3] W. H. Melnurnal: *J. Optic. Soc. Amer.* **52**, 587, 1962.
- [4] J. Yguerufide: *Rev. Sci. Inst.*, **39**, 1048, 1968.
- [5] G. G. Guilbault: *«Practical fluorescence, theory methods and techniques»*, New York, 1974.

[本文于1977年4月20日收到]

小 资 料

1933—1975分子生物学方面

荣获诺贝尔生理或医学奖项目的演讲

- 1933 《遗传学与生理学和医学的关系》 Thomas H. Morgan.
- 1946 《突变的产生》 Hermann J. Muller.
- 1958 《链孢霉菌的基因和化学反应》 George W. Beadle.
- 《生物学研究中一个实例的历史》 Edward L. Tatum.
- 《遗传学的一种观点》 Joshua Lederberg.
- 1959 《核糖核酸的酶促合成》 Severo Ochoa.
- 《脱氧核糖核酸的生物合成》 Arthur Koruberg.
- 1962 《核酸分子的构型》 Maurice H. F. Wilkins.
- 《蛋白质合成中涉及的RNA》 James D. Watson.
- 《关于遗传密码》 Francis H. C. Crick
- 1965 《细菌细胞的遗传学》 François Jacob
- 《病毒、细胞和机体间的相互作用》 André Lwoff.

《从酶促适应到别构转变》 Jacques Monod.

- 1968 《丙氨酸转移RNA》 Robert W. Holley
- 《遗传密码研究中的核酸合成》 H. Gobind Khorana.
- 《遗传密码》 Marshall Nirenberg
- 1969 《一个物理学家在20年后对生物学的新看法》 M. Delbrück.
- 《DNA结构的特异性》 A. D. Hershey.
- 《噬菌体、大肠杆菌素和宏观调节现象》 S. E. Luria.
- 1972 《控制蛋白质链折叠原理的研究》 Christian B. Anfinsen.
- 《胰脏RNase和DNase的化学结构》 Stanford Moore 和 William H. Stein.
- 《抗体结构和分子免疫学》 Gerald M Edelman.
- 《免疫球蛋白的结构研究》 R. R. Porter.
- 1975 《从致癌DNA病毒的分子生物学到癌症》 Renato Dulbecco
- 《病毒、聚合酶和癌》 David Baltimore.
- 《DNA前病毒假说》 Howard M. Temin.