

时间相关单光子计数

孙 炳 荣

(中国科学院上海分院测试计算中心)

单光子计数技术是在核物理中应用的延迟符合方法基础上建立起来的。六十年代初, Bollinger、Bennett 和 Koechlin 三人^[1,2,3], 同时在不同实验室提出。这方法的优点是: 衰减曲线不产生畸变, 同时因为在检测时是对单个光子计数和累加, 灵敏度极高, 又由于光子计数是一种统计平均的方法, 因此不受脉冲光源起伏的影响。这方法还可以在若干个十进位峰强度范围上测定荧光衰减。正因为有这些优点, 已广泛应用于分子构型、酶-蛋白反应速度、ns(毫微秒)荧光衰减、偏振各向异性分子的结构、以及其他物理、化学研究中。近几年来, 激光锁模技术日趋成熟, 使这一技术又获得了进一步的发展和应用^[4,5], 时间分辨已达几十 ps(微微秒)。本文对它的测定原理、仪器结构、及数据处理作一详细介绍:

原 理^[6,7]

一、重复频率为 ν /秒的脉冲光源, 每个光

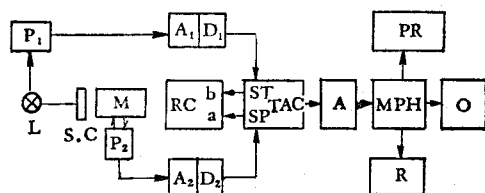


图1 时间校准单光子计数装置方框图

L——脉冲光源, SC——样品池, P——光电倍增管, D——甄别器, TAC——时-幅转换器, ST——“起始”输入, SP——“停止”输入, RC——比例计数器, A——放大器, MPH——多道分析器, PR——打字机和磁带穿孔单元, O——示波器, R——记录器。

脉冲打到样品后产生 $\bar{n}$ (平均值) 个光子到达光电倍增管的光阴极, 定义 P_n 为 n 个光子到达光

电倍增管光阴极的概率, P_{nx} 是 n 个光子到达光电倍增管光阴极后射出 x 个电子的概率。 P_n 和 P_{nx} 的计算分别由 Poisson 和二项式分布给出即:

$$P_n = \frac{\bar{n}^n e^{-\bar{n}}}{n!} \quad (1)$$

$$P_{nx} = \frac{1/n}{1/x \cdot 1/(n-x)} a^x (1-a)^{n-x} \quad (2)$$

这里 a 是光阴极的量子效率。

由 $\bar{n}$ 个光子产生的 x 个光电子的概率是

$$P_x = \sum_{n=x}^{\infty} P_n P_{nx} = \frac{(a\bar{n})^x e^{-a\bar{n}}}{x!} \quad (3)$$

如果 N 是单位时间内光电倍增管的脉冲数, 则:

$$N = \nu \sum_{x=1}^{\infty} P_x = \nu \left(\bar{n}a - \frac{(\bar{n}a)^2}{2} + \dots \right) \quad (4)$$

对于弱光信号, 也就是说当 $\frac{(\bar{n}a)^2}{2} \ll \bar{n}a$ 时

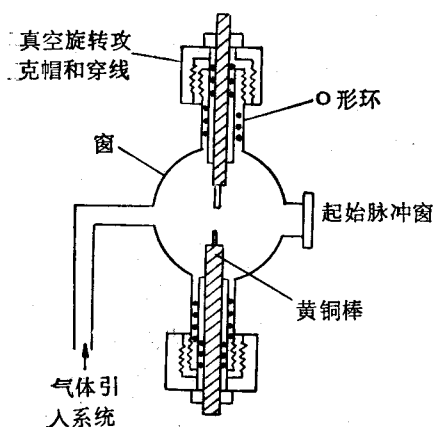
$$N = \nu \bar{n}a \quad (5)$$

这意味着, 光电倍增管的脉冲数, 直接与入射到光阴极上的光子数成正比, 因此, 只要用合适的电子系统 (详见“电子系统”) 将光电倍增管来的单个光电子进行计数, 得到的是带有时间标记的大量脉冲的累加, 直至达到所需要的统计精度, 这样即使当 $\bar{n}$ 很小时, 也能做到精确的测定。

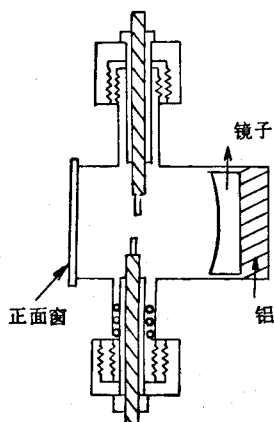
仪器结构和原理

单光子计数仪 (图1) 的组成, 分别叙述如下:

(i) 光源 要求具有一定重复频率 (几十千赫以上为佳), 光强 $\sim 10^8$ 光子/脉冲, 脉宽在 ns 或低于 ns 量级。目前用得最多的有 (1) 放



正视图



侧视图

图 2 放电闪光灯

电闪光灯, (2) 同步加速器光源, (3) 锁模激光器等。放电闪光灯, 在六十年代初开始就用于单光子计数仪器中, 至今仍在应用(图 2), 这灯的电极间隙可调, 灯内所充气体的种类, 压力可改变, 灯的点燃靠一触发电路(图 3), 重复频率可达 30kHz (有的高达 200kHz, 此时 FWHM 为 5—6 ns), 工作可连续几天, 由于灯的一侧装有聚焦镜, 因此得到一特强的光聚焦到单色仪的进口狭缝, 对弱吸收和弱发射材料极其有用。这种灯可充 N_2 、 H_2 、 D_2 或 O_2 空气。对于这些气体最佳运转条件为: 电极间隙 3mm, 气体压力 0.5 大气压, 工作电压在 6—9kV, 此时获得的脉冲宽度为 2—3ns (半宽), 这种灯的主要优点是: 结构简单、价格便宜, 但有一缺点, 即光脉冲拖着一长尾巴, 重复频率不能做得很高,

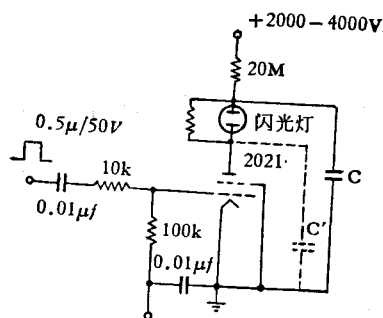


图 3 灯点燃电路

在单光子计数测试过程中, 产生的高频干扰较大。为了克服这些弱点, 有人^[8,9]曾用同步加速器光源作为脉冲激励源。这种光源是用磁力强制电子进行圆周运动产生加速场, 产生向心加速度获得同步加速器辐射的发射^[8]。这一发射通过集光镜, 将平行发射光引至离加速器窗口一定位置的分光器狭缝上, 进行分光后, 导入测定系统。这种脉冲光源是偏振光, 加上分光器后波长可以从 X 波段到近红区连续可调、经标定后是一种理想的标准光源, 辐射强度高, 可达 10^{14} 光子/秒·毫弧度以上(10% 带宽), 辐射强度较稳定, 辐射光是点光源, 光脉冲宽度~亚毫微秒, 重复频率也较高(10—400 MHz), 都是通常的脉冲光源所不及的, 其缺点是结构复杂, 体积庞大, 不能普遍地使用。目前, 用得更多的理想脉冲光源是锁模激光器(图 4), 它是一台用 Ar^+ 激光器泵的可调谐染料激光器, 可以在三种定时结构情况(声光锁模、腔倒空和腔倒空锁模)下工作。对于第一种结构来说, 声光器件作为损耗调制器产生锁模, 腔调制在 50MHz, 对于若丹明 B. 6G 和 110 染料, 得到输出的脉冲序列相隔 10ns 的亚毫微秒脉冲, 平均功率 20—100mW, 波长在 5400—6500 Å 范围内。当在腔倒空情况下工作时, 激光产生的整个脉冲持续时间为 20—60ns, 重复频率达 5 MHz, 激光器腔倒空元件是一个声学器件, 这一器件用 400MHz 声波脉冲, 采用布拉格衍射倒空 50% 的瞬时腔光能, 第三种结构是腔倒空锁模。这种结构的激光输出依赖于染料, 当使用若丹明 B. 6G. 110 时, 平均功率在 25—100mW, 倒空频率 5 MHz。以这三种结构的激光束, 代替脉

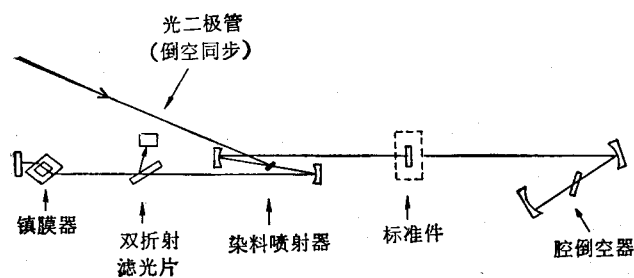


图4 声光锁模和腔倒空染料激光器

冲放电光源,可测定 50 PS- μ S 范围内气相和液相样品的指数衰减,并且成功地分析了双指数衰减,如溶液中重取向时形成的衰减与荧光寿命竞争。

(2) 光学系统 本技术所使用的光学系统较简单。经聚焦后的激励光,一般经去热滤光片后,通过一合适的干涉滤光片(若测定偏振荧光,则还要加上偏振元件)。控制所需要的照光面积入射到样品,样品产生的荧光由透镜聚焦后,到单色仪进口狭缝上(若测定偏振荧光,还要加检偏振器),随后由单色器出。狭缝入射到光电倍增管的光阴极。在有些情况下,单色器可用一块质量较高的干涉滤光片来代替。

(3) 光电倍增管 是单光子计数中的重要部件。从图 1 可看到,随在脉冲光源和样品后的是两个检测部件——光电倍增管(也可以用具有同样性能的光检测器)。其中管子 P_1 产生一个与激励源同步的脉冲,用来触发时间——幅度转换器(TAC)的“起动(ST)”,这一功能可以用阳极负载为 50Ω 的 RCA1p28(也可以用具有同样性能的光二极管)来实现,另一只光电倍增管是用于单光子计算通道,用放在它前面的单色器狭缝或衰减器,使样品反射荧光到达光电倍增管阴极表面仅是单光子的。由于这单光子的到达,在 TAC 单元中产生“停止”(SP)的信息,此时,在 TAC 单元中形成一个脉冲,其幅度与“起始”和“停止”间的时间间隔成正比。在单光子计数“停止”通道中,使用的光电倍增管有: Philips 56 DUVP、56DVP、XP-1023; RCA 31034、8850。700 45A, 以及 EMI9813 QKB、9816 QKB, 9558QA, HTV-R374 等,这些管子的上升时间差不多在 ns 量级,增益达

10^6-10^8 , 工作电压在 1500—2500 V 间(个别的可能更高),为了降低管子的暗计数(一般在几十 CPS),管子最好在低温下工作,图 5 是常用的一种结构。为避免外磁场干扰,可以在管子外壳围上一至二层镀膜合金(如图上标的屏蔽),对于光电倍增管管座的接线及阴极信号引出线也有较特殊的要求,图 6 是 RCA 31034 管座接线和前置放大器按装图,图上用的电阻是精密氧化物电阻($\frac{1}{2}$ W),所有引线

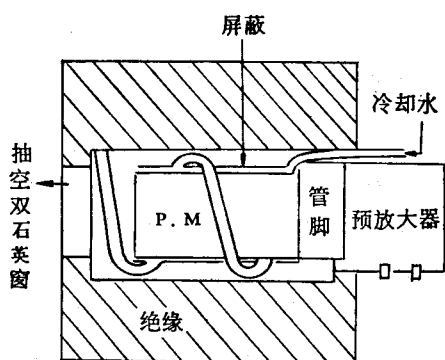


图5 光电倍增管冷却屏蔽室

要短,由阳极引出一接头通过一根 50Ω 的短同轴电缆与前置放大器连接。这样可以获得较满意的时间响应。

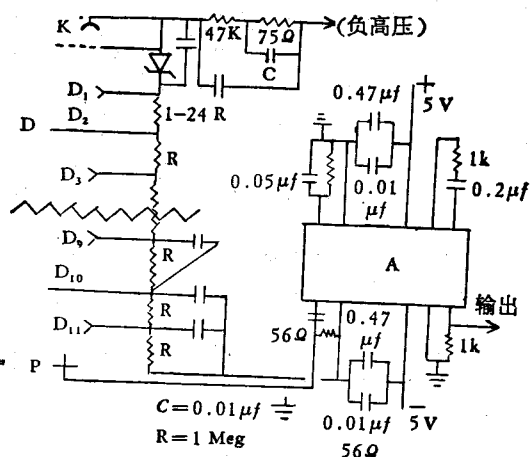


图6 光电倍增管管脚和前置放大器

(4) 电子系统 由“起始”和“停止”通道来的信号(图 1),通过放大器 A_1 、 A_2 和甄别器

D_1 、 D_2 后,分别接到比例计数器 RC , 调节“停止”通道中的单色器狭缝(或衰减器),使 RC 中计数比 $r = a/b = 0.05$ (a 是“ SP ”通道计数、 b 是“ ST ”通道计数)。在这一比例下,对于每入激励光脉冲,有不多于一个光子被光电倍增管检测,并且在激励光脉冲以后,在给定时间下,检测一个光子的几率,简单地正比于荧光强度。也就是在这个比例下,一个激励光脉冲的开始和一个发射光子检测之间的时间间隔,用时间幅度转换器 (TAC) 转换成与这时间间隔成正比的电压信号。这电压信号由 A 放大后进入多道分析器 (MPH) 的通道中,它记住在检测到一个光子时获得的每个 TAC 输出脉冲的地址。这样在收集大量的计数以后,在实际通道中的计数数分别表示对应时间下一个光子发射的几率。在荧光屏上看到的是接收到单个光子在每一瞬间的计数与对应的通道数关系。所以,只要用一标准可变延迟线来校准通道数与对应时间的关系,就可获得荧光随时间衰减的动力学曲线。现代的时间校准单光子计数装置,有关这部分的数据处理都有计算机来完成,大大提高了工作效率。

数 据 处 理

用超短脉冲光激励,由测定系统观察到的衰减曲线,因受激励脉冲持续时间及检测系统频率响应的限制而产生畸变。为了由实验结果抽提真正的样品荧光衰减函数 $i(t)$,必须解积分等式:

$$f(t) = \int_0^t I(t')i(t-t')dt' \quad (6)$$

函数 $I(t')$,由检测系统的频率响应和激励光脉冲的形式确定。在实验中, $I(t')$ 可以由相同于在观察 $f(t)$ 时的这种情况下所观察到的光脉冲来确定。由观察到的函数 $f(t)$ 和 $I(t')$,没有非常合适的方法来引出 $i(t)$,因此在数据处理时,只有试验 $f(t)$ 函数的合成,为此不是用数学积分,就是用一种计算机程序来进行。

当荧光响应函数是指数时(如果用“瞬时方法观察荧光”),三个函数 $f(t)$ 、 $I(t)$ 、 $i(t)$ 每一

个归一化,如

$$\int_0^\infty f(t)dt = 1 \quad (7)$$

第一个瞬间 (M_{1f}),和第二个瞬间 (M_{2f}) 分别定义为

$$\left. \begin{aligned} M_{1f} &= \int_0^\infty tf(t)dt \\ M_{2f} &= \int_0^\infty t^2f(t)dt \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

对于每个函数的旋转半径为 σ_f^2 ,并定义为

$$\sigma_f^2 = \int_0^\infty (t - M_{1f})^2 f(t)dt \quad (9)$$

它给出

$$\sigma_f^2 = M_{2f} - (M_{1f})^2 \quad (10)$$

对于 σ_f^2 和 σ_i^2 获得同样的表达式,这样由等式 (6)、(9)

$$\sigma_f^2 = \sigma_i^2 + \sigma_l^2 \quad (11)$$

由这表达式可得到荧光寿命 τ ,因为 σ_f 和 σ_l 可以由 $f(t)$ 和 $I(t)$ 计算,并且

$$\begin{aligned} i(t) &= \lambda e^{-\lambda t} \\ \sigma_i^2 &= \frac{1}{\lambda^2} = \tau^2 \end{aligned} \quad (12)$$

因为三个函数 $f(t)$ 、 $I(t)$ 、 $i(t)$ 都近似于指数函数,因此得到近似关系为:

$$\tau^2 = \tau_f^2 - \tau_l^2 \quad (13)$$

这里 τ_l 是仪器的响应时间,由此可知 τ 受 τ_l 限制。

应 用 举 例

图 7 是取样单光子计数装置,激励源是一

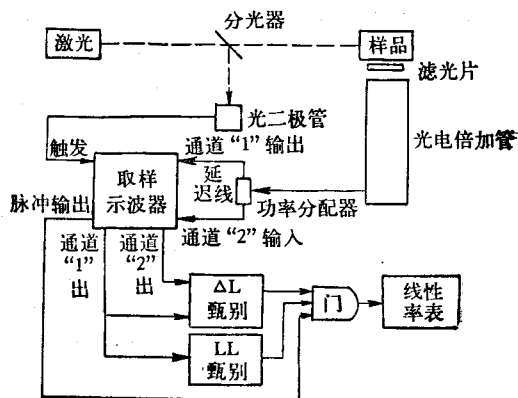


图 7 取样单光子计数装置

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 $4 \text{ ns} - 50 \text{ ps}$, 误差为 $\pm 6\%$, 图 8 是用这装置测定若丹明 6G ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$)

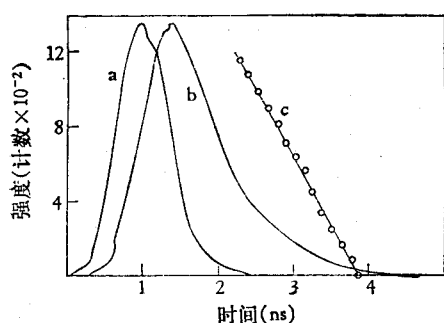


图 8 若丹明 6G ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) 和 0.15 M K_1 的荧光衰减曲线

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

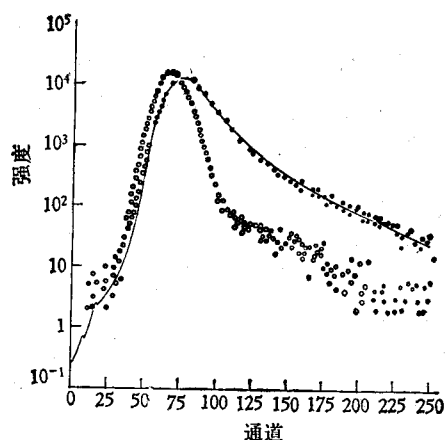


图 9 叶绿体发射荧光衰减曲线

(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谱等快速反应动力学研究。在放射生物学和