

试,但数量甚少,也未见有系统的形态学方面的研究报道。同时这一类组织要获得高质量的,冷冻连续切片也比较困难,因为切片的平滑和连续性在很大程度上决定于组织块的塑性。一般讲,如果样品内蛋白质成分多,则塑性好,切片也比较容易,切片的质量也高。相反,如果水分多,则在冷冻切片的情况下,就是一个不利的因素,切片连续性差,易碎,不易切好,虽然用蔗糖等对组织块进行浸透可以有所调整。冷冻切片技术由于发展历史短,所以从方法上讲,尚未很好定型,要获得大量的高质量切片不太容易。这也可从已发表的资料中看出,绝大部分照片所取的区域都比较小,说明薄的、质量高的切片区不多或者不大,这主要是因为冷冻切片比较厚,一般在800—1000埃左右,最薄也在500埃左右。所以观察时,在可能条件下,电镜的高压要比观察普通切片稍高,但即使这样,似

乎还存在有部分“盲片”,即电子束不能通过的厚切片。冷冻超薄切片技术在切片操作时比较麻烦,要求熟练程度也高一些。由于这一技术发展历史较短,目前尚在不断改进和提高之中,所以有些问题相信在实践中可以不断予以解决。

参 考 文 献

- [1] Bernhard, W. J. et al.: *J. Cell. Biol.*, **49**, p. 731, 1971.
- [2] Tokuyasu, K. T.: *J. Cell. Biol.*, **57**, 551, 1973.
- [3] Tokio, Nei: *J. Microscopy*, **99**, Pt. 2, 1973.
- [4] Tokuyasu, K. T.: *8th Intern. Congr. on EM.*, **2**, 34, 1974.
- [5] Sjöström, M. et al.: *Science Tools.*, **22**, No. 1, 1975.
- [6] Painter, R. G. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, No. 6, 1973.
- [7] Appleton, T. C.: *J. Microscopy*, **100**, Pt. 1, 1974.

[本文于1977年6月3日收到]

荧光量子产率的测定

郭 尧 君 雷 克 健

(中国科学院生物物理研究所)

荧光量子产率(亦可称量子效率)是表示一个物质荧光特性的重要参数。它表示物质发射荧光的本领。通常用 ϕ 表示。其定义为物质发射荧光的总能量与吸收能量之比,也就是处在电子激发态的分子发射荧光的几率。根据这个定义,量子产率只能小于或等于1。

$$\phi = \frac{\text{发射量子数}}{\text{吸收量子数}}$$

量子产率的测定方法大致有相对法和绝对法两种,在50年代前后,大多用绝对法来测定量子产率^[1]。绝对法是将待测样品与一个不损失激发光的全反射或全漫射的标准进行比较。标准可采用一个涂以氧化镁的平面屏。但是以荧光溶液代替漫射屏测量时,辐射的空间分布有差异,所以测定有很大的不可靠性。以后利用肝糖元溶液的单色光的偶极散射强度作为单位

量子产率的标准,与在激发波长具有同样表现光密度的溶液的荧光进行比较。如果散射和荧光是纯的偶极发射,在与激发方向成直角辐射的线偏振光就可以确定辐射的空间分布。这种空间分布与两个溶液在同一方向的发射强度的比较可以用于确定两者的总的发射,由此就可以求得试样的量子产率。

绝对量子产率测定法由于方法繁琐,容易引入误差,所以现在很少采用,而大多采用相对量子产率测定法^[2]。

溶液稀时,荧光强度与激发光强度以及荧光量子产率之间有如下的关系:

$$F = KI_0c\epsilon\phi \quad (1)$$

这里 F ——荧光强度; K ——仪器常数; I_0 ——激发光强度; c ——样品浓度; l ——吸

收池光径； ϵ ——样品的吸收系数； ϕ ——量子产率。这里的 $cl\epsilon$ 可用光密度 A 来表示，代入公式 (1) 可写作：

$$F = KI_0A\phi \tag{2}$$

如果我们比较两个溶液的荧光强度，则它们有如下的关系：

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{K_1I_{01}A_1\phi_1}{K_2I_{02}A_2\phi_2} \tag{3}$$

若两者使用相同的装置及相同的测定条件，那么 $K_1 = K_2$, $I_{01} = I_{02}$ 。则：

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{A_1\phi_1}{A_2\phi_2} \tag{4}$$

也就是

$$\frac{\phi_1}{\phi_2} = \frac{F_1A_2}{F_2A_1} \tag{5}$$

如果我们把一种已知量子产率的物质作为测定标准，再分别用荧光分光光度计和紫外分光光度计，测定标准和试样的真实发射光谱的面积和在激发波长的光密度，那么就可以用这个公式计算得出试样的量子产率了。但要考虑以下问题：

1. 选择合适的荧光标准

在过去的很多工作中大多采用硫酸奎宁作为标准，并把 Melhuish^[3] 测定的硫酸奎宁的量子产率值 0.55 用在计算中。这是因为硫酸奎宁的量子产率较高，化合物稳定，且吸收谱和发射谱重叠很小。但是 Chen^[4] 证明奎宁是一种比较异常的荧光化合物。它的发射光谱随激发波长而变化，量子产率也随激发波长而异。并认为造成这一现象的原因可能是它的荧光能从多于一个单线激发态发生，因此如果用它作为标准的话，必须对它的这一性质加以考虑。Berman^[5] 建议用 9,10-二苯蒽作为标准。因为它的量子产率更高，接近于 1.0。而且在环己烷中溶解度好，而硫酸奎宁在环己烷中不稳定。但很多荧光物质需采用环己烷作溶剂，如硫酸奎宁仍用水溶液作溶剂，标准与试样又有折射的差别，所以此时最好使用 9,10-二苯蒽。

我们认为在选择标准时，最好使标准与试样有相似的激发光谱，且激发和发射谱不要重叠。在所用的溶剂中有良好的溶解度和稳定性。

如选择的标准与待测的样品有比较相近的性质，那就更好了。如测定蛋白质时，可用色氨酸作为标准(量子产率是 0.14)。

表 1 列出了一些物质的量子产率测定值以供参考：

表 1 一些物质的量子产率测定值

化 合 物	溶 剂	量子产率
吖啶黄 蒽	水	0.54
	苯	0.29
	正己烷	0.33
9,10-二苯蒽	乙醇	0.29
	正乙烷	0.54
	乙醇	0.58
叶绿素 a	苯、乙醚、二噁烷	0.32
	丙酮、环己烷	0.30
	苯	0.18
叶绿素 b	苯	0.11
	乙醚	0.12
	丙酮	0.09
曙红(四溴荧光素)	甲醇	0.10
	0.1N NaOH	0.19
	乙醇	0.53
荧光素	正己烷	0.54
	0.1N NaOH	0.92
	水 pH 7	0.65
吖啶	水	0.45
	乙醇	0.12
	正己烷	0.10
1-氨基萘-3,6,8-磺酸盐	水	0.15
1-二甲氨基萘-4-磺酸盐	水	0.48
1-二甲氨基萘-7-磺酸盐	水	0.75
2-萘酚	0.05M 硼酸盐 pH10	0.21
菲	乙醇	0.10
酚	水	0.22
脱镁叶绿素 a	苯	0.18
吡哆醛	0.05M 磷酸盐 pH 7	0.048
吡哆胺	0.05M 磷酸盐 pH 7	0.11
硫酸奎宁	1N H ₂ SO ₄	0.55
核黄素	水 pH 7	0.26
3-甲基吖啶	水	0.42

2. 校正发射光谱，并准确地测定标准和试样的发射光谱面积

在公式 (3) 中， F 是指溶液发射的总荧光量，亦即校正后的发射光谱的面积。

我们都知道，包括仪器的单色器和光电倍增管光谱特性影响的物质的发射光谱称为表观光谱。由于表观光谱中包括着非样品的仪器特

性的影响,因此必须对此加以校正,近年来,荧光分光光度计都带有激发和发射光谱的校正装置,因此要得到校正后的发射光谱并不困难。但是也有一些早期的荧光分光光度计不具有校正装置,这时可以采用比较简单的标准光源法来进行校正。具体办法是在发射单色器的人射狭缝前装一个色温一定、且已知强度-波长特性曲线的标准钨灯。选择合适的狭缝宽度和光电倍增管电压,然后经扫描得出标准灯的表现能谱。将这个表现能谱曲线上各波长值除标准钨灯特性曲线上的相应波长值,即得到该仪器在各波长的校正值,见图 1。

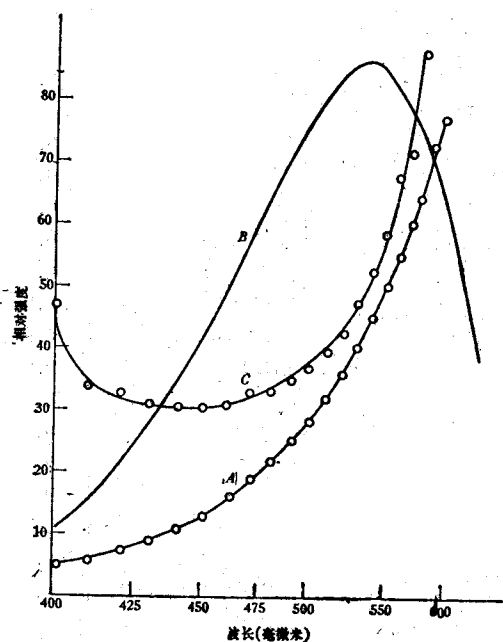


图 1 用标准钨灯测定仪器的校正曲线示意图

- A——标准钨灯的已知特性曲线(单位为相对量子数/秒)
B——标准钨灯在该仪器上的表现光谱
C——该仪器的校正曲线

将仪器在各波长的校正值乘以样品表现光谱在相应波长的值,即得到样品在各波长的真实值。将此真实值对波长作图,就为样品的真实光谱(即不包括单色器和光电倍增管光谱特性影响的校正后的发射光谱),见图 2。

得到标准和样品的真实光谱后,可用称重的办法或用求积仪积分的办法得到发射谱面积(即发射的总荧光量)。如果采用前者的办法,

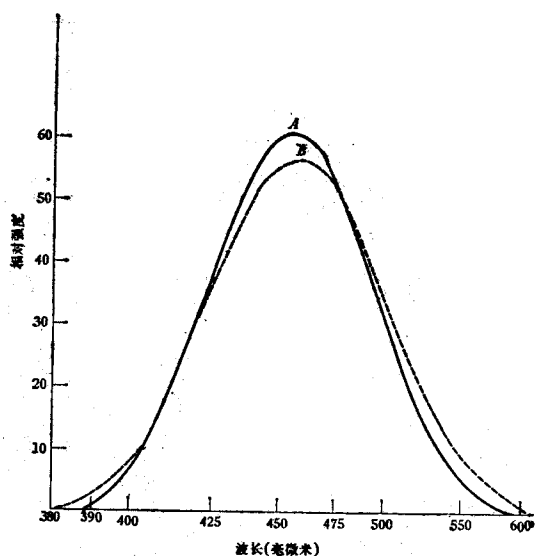


图 2 奎宁表现发射光谱的校正

- A——未校正谱(表现光谱)
B——校正谱(真实光谱)

要注意记录纸的均匀。如采用后者的办法,要多次平均,以保证其准确性。

3. 浓度的影响

一般来说,在稀溶液中样品浓度对荧光量子产率没有影响。但是如果浓度比较大,就必须考虑自吸收引起的内滤光效应。同时应注意有些物质如荧光素、硫堇、叶绿素等在浓度比较大时形成二聚体,这些二聚体的吸收光谱不同于原来化合物单体的吸收光谱,当然其量子产率就会有变化了。通常被测定的溶液在激发波长的光密度读数是很大的(如 TNS 和 NAS 读数在 0.07 以下,硫酸奎宁在 0.06 以下^[6]),这样可以不必考虑内滤光的影响。由于用来测定量子产率的溶液光密度很小,所以最好使用带有量程扩展的紫外分光光度计来读数,以保证其测定的准确性。

4. 激发波长的影响

一般来说,化合物的量子产率是与激发波长无关的^[7]。但是有些化合物其吸收光谱与发射光谱不重叠,化合物的发射谱随激发波长而变化(不是由于化合物不纯而引起的变化),量子产率当然也就随着激发波长而变化。如奎宁和 6-甲氧基喹啉就是其中二例^[4]。奎宁量子产率随激发波长的变化见表 2。

表2 奎宁(在0.1NH₂SO₄中,25℃)量子产率与激发波长的关系

λ_{ex} (毫微米)	相对关系*
250	1.02
313	1.00
345	0.98
348	0.99
366	1.09
380	1.20
390	1.23

* 在313毫微米激发时的量子产率取作1.00

对于这类化合物必须注意在测定时所用的激发波长,特别是作为标准时更是这样。如果标准和试样需要用不同的激发波长,则公式(3)中的 I_0 不能消掉,就应用下述公式:

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{A_1 I_{01} \phi_1}{A_2 I_{02} \phi_2}$$

这里 I_0 为光源在一定激发波长的相对光子输出。

对于与激发波长无关的化合物,其量子产率测定时,激发波长可选择在标准和试样的光谱交叉点上。当然正如前面说到的,在选择标准时,应考虑其最大激发波长应与试样的最大激发波长比较相近为好。

5. 温度的影响

由于温度对荧光是一个明显的影响因素,又由于温度对溶液的吸收和荧光发射强度的影响程度有差别,因此必然影响荧光量子产率的测定。如Chen^[4]发现维生素B₆化合物与温度的关系如图3所示。

6. 溶剂的选择

正如荧光测定的一般技术一样,还须注意溶剂的选择。溶剂本身在欲测范围内应无吸收,且要纯。如果溶剂有荧光本底,在积分发射谱面积时,必须扣除其面积。如果本底太高,则不宜采用,否则即使扣除也会引入较大的误差。

同时还需考虑标准与试样的溶剂折射,二者折射率最好要相近,否则需用下式校正^[8]:

$$\phi_c = \phi_u \times \frac{n_1^2}{n_2^2}$$

这里 ϕ_c 和 ϕ_u 分别是校正过的和未校正过的量子产率。 n_1 和 n_2 是样品和标准各自的折射率。

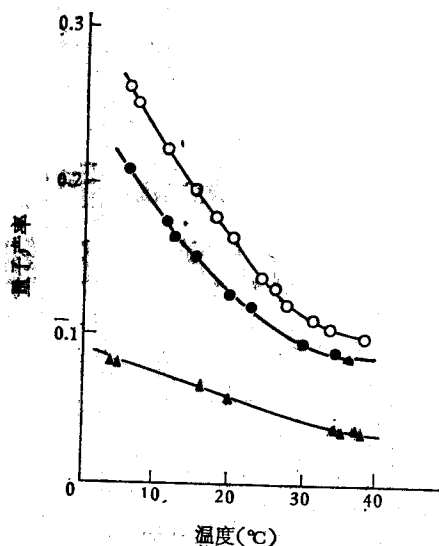


图3 维生素B₆化合物的量子产率与温度的关系
▲吡哆醛; ●吡哆胺; ○吡哆胺磷酸盐

除了上述的一些问题外,对测定溶液还要防止光分解、荧光污染、淬灭、散射等影响,因为这些因素都会影响荧光量子产率测定的准确性。

以上几个问题是我们^[9]在测定荧光量子产率的基础上总结的一些体会。但这方面的工作我们还是开始着手,所以提出来和大家讨论。当然量子产率测定的方法很多,随着荧光技术的发展,量子产率的测定也会有新方法,如脉冲法^[10]就是一例。但目前对我们普遍适用而又较简便的方法还是上面谈到的相对量子产率测定法。

主要参考文献

- [1] Weber, G.: *Trans. Faraday Soc.* 53, 646, 1957.
- [2] Parker, C. A. et al.: *Analyst* 85, 587, 1960.
- [3] Melhuish, W. H.: *J. Phys. Chem.* 65, 229, 1961.
- [4] Chen, R. F.: *Analytical Biochemistry* 19, 374, 1967.
- [5] Berlman, I. B.: *Handbook of Fluorescence spectra of aromatic molecules*.
- [6] McClure, W. O. et al.: *Biochemistry* 5, 1908, 1966.
- [7] Teale, F. W.: *Biochem. J.* 65, 476, 1957.
- [8] Steiner, R. F.: *Excitation states of Protein and Nucleic acids*.
- [9] 中国科学院生物物理所六室溶构组等:《中国科学》, 1976年第4期。
- [10] Brunori, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3141, 1973.

[本文于1977年9月21日收到]