

# 技术与方法

## 毫微秒荧光谱仪的自动数据处理系统\*

邢 蘊 芳    彭 程 航  
(中国科学院生物物理研究所,北京)

### 提 要

本文描述了时间相关单光子毫微秒荧光谱仪的自动数据处理系统,介绍了它的工作原理、设计特点及其应用。

**关键词** 毫微秒荧光谱仪,数据处理,荧光寿命,去卷积,矩方法

### 前 言

近年来,单光子技术用于测定发光过程有了广泛的应用。毫微秒时间范围的荧光衰减测量,已成为物理学、化学、生物学等学科中研究激发态以及它们与环境相互作用的重要手段。根据研究工作的需要,参考 ORTEC 9200 单光子计数系统(英国 Applied Photophysics Ltd)的 SP-7X 型毫微秒荧光谱仪,采用国内现有快电子学插道、FH 451 多道分析器以及 WDG 30 光栅单色仪,我们研制了时间相关单光子计数毫微秒荧光谱仪<sup>[1]</sup>。多道分析器能自动打印出测试数据,但要得到荧光衰减动力学参数,在数据处理上又要花费大量的时间和精力。为了解决这个问题,我们配备了 IBM PC/XT 微型计算机,设计了 FH 451 与 IBM PC/XT 的接口板,编制了一套应用软件,实现了自动数据采集与自动数据处理。

### 系 统 硬 件

毫微秒荧光谱仪利用时间相关单光子计数法测量样品的荧光寿命  $\tau$ 。

图 1 是毫微秒荧光谱仪的结构简图,主要由毫微秒脉冲光源、光学系统、检测系统三大部

分组成。测量时,装有样品的 1cm 荧光比色杯置于样品室内,激发光源为重复频率 50kHz 的自制充气闸控闪光灯,单色仪(1)使样品只接受特定波长的激发光。荧光用光电倍增管(2)探测,单色仪(2)使光电倍增管(2)只接受样品的发射光。光电倍增管(1)从闪光灯接受的光信号变成电信号,经放大器(1)、恒分甄别器(1)到时幅转换器作为起始信号,光电倍增管(2)的荧光脉冲信号经放大器(2)、恒分甄别器(2)送到时幅转换器作为终止信号,时幅转换器输出的幅度分布比例于样品荧光发射光子与激发光脉

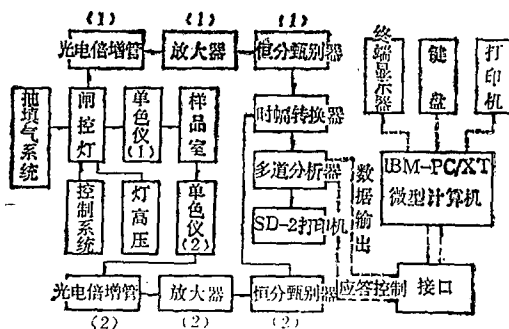


图 1 毫微秒荧光谱仪原理框图

实线为配备微机前的工作方式,虚线为配备微机后增加的部分

\* 获得中国科学院重大项目资助。

冲之间的时间间隔分布,经多道分析器分析和记录,由 SD-2 型打印机打印荧光强度衰减数据。

为了将原始数据送入计算机去卷积运算求荧光寿命  $\tau$ ,设计了多道分析器与 IBM PC/XT 微型计算机的接口板,其电路如图 2 所示。

接口中的三态八位 D 寄存器 SN74 LS374 利用多道分析器的输出触发脉冲 PC,将 20 位数值存入寄存器,并建立向微机送数据的指示电平,PC 机用查巡式发现后,通过地址译码器 SN74LS138,依次读取 20 位 BCD 码,并给多道分析器一个回答、复位指示电平,完成一道数据的传送,反复进行上述过程,直到全部数据传送完毕。

接口占用的地址空间是 278H-27FH

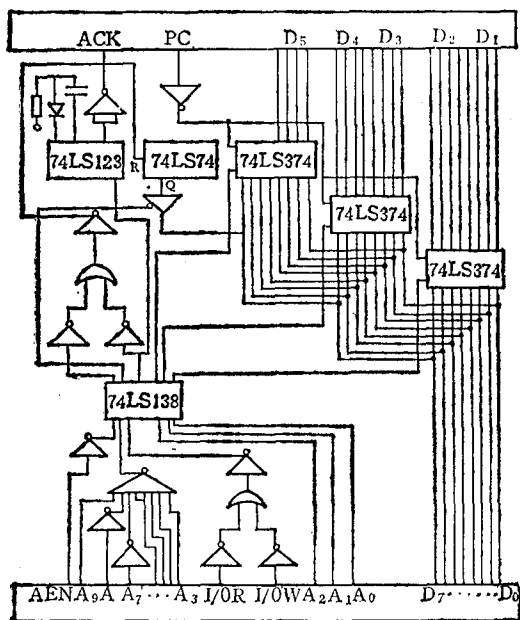


图 2 硬件接口电路图

## 数据处理及系统软件

在毫微秒数量级的荧光寿命测量中,由于激发光脉冲已经不能被看作是一个  $\delta$  函数光源,加之检测系统本身也有一定的响应时间,因此在荧光屏上观察到的波形不是荧光衰减的真实反映,而是激发光脉冲、仪器响应及样品荧光衰减的卷积,可用下式表示:

$$R(t) = L(t) * F(t) \quad (1)$$

式中  $F(t)$  是荧光样品的衰减函数,  $L(t)$  是仪器的响应函数,由仪器检测系统的频率响应和激发光脉冲函数决定,  $R(t)$  是和  $F(t)$  相对应的观察到的荧光衰减函数,必须求出  $F(t)$  才能得到真正的荧光衰减。由式(1)求  $F(t)$  的方法很多,本文采用比较简单的矩方法<sup>[2,3]</sup>。

为简化操作程序,在软件设计中力求简捷实用。用 BASIC 语言编写程序,程序采用模块式结构。整个软件由初始化、主控制、数据采集、矩阵运算、截尾拟合、去卷积求  $\tau$ 、曲线拟合、求残差值、打印曲线数据、谱图屏幕显示、打印机绘图和文件存贮等 12 个功能模块组成。参量和命令的输入采用人机对话方式。

测量时采样顺序由程序控制。系统启动后,首先运行的是初始化模块,对系统进行初始化以后,由初始化模块把主控制模块调入内存,这个模块的主要功能是控制采样顺序。它在屏幕上提示和等待用户输入参数,用户键入参数以后,程序提示:“测量仪器响应函数”,多道分析器在设定的时间内计数。计数完毕后,计算机接受其数字输出,并对采集到的仪器响应函数进行矩阵运算。运算完毕,程序在屏幕上提示荧光谱仪:“测量样品的荧光衰减函数”,多道分析器同样在设定的时间内计数。接口将采集到的荧光衰减数据送入计算机内存,然后,荧光衰减矩阵运算模块、截尾拟合模块等顺序从磁盘调入内存运行。

每个模块都有一些可选功能供用户选择,因而每一模块执行完后显示一些提示信息,程序踏步等待用户输入,然后再进行相应的操作。

为了方便日后对某些实验数据的查询,程序自动将原始数据及处理结果以数据文件形式存放到磁盘上,并自动在文件中加上文件生成日期和样品测试参数,便于以后参考。

## 结果与讨论

我们用自制的毫微秒荧光谱仪及自动数据处理系统,测试了 9, 10-Diphenyl Anthracene 乙醇溶液的荧光寿命。激发灯波长 357nm,脉

冲频率 50kHz, 电压 5kV, 样品浓度  $10^{-4}$ mol/L, 发射波长 435nm, 测量表明 9, 10-Diphenyl Anthracene 是单指数衰减, 用矩方法去卷积得到的寿命是 6.8ns, 这一结果与以前工作者得到的结果是一致的<sup>[4]</sup>。

图 3 是 9, 10-Diphenyl Anthracene 的荧光衰减曲线。L(t) 是仪器响应曲线, R(t) 是荧光衰减实验曲线, 为了检验拟合的质量, 由计

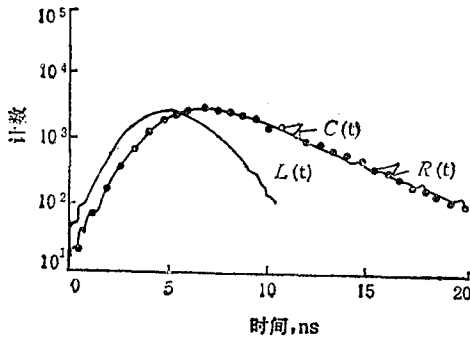


图 3 9,10-Diphenyl Anthracene 的  
荧光衰减曲线

算机解出的  $F(t)$  通过 (1) 式与  $L(t)$  卷积计算出拟合曲线  $C(t)$ , 用点线与实验曲线同时画在半对数坐标系上, 以便比较。

本工作通过 9,10-Diphenyl Anthracene 荧光寿命的测量为例子, 说明我们的系统对 ns 量级荧光寿命的测量与解算是可行的。由于配备了计算机, 所以一旦样品的毫微秒荧光谱记录完成, 就可以从计算机上求得样品的荧光寿命参数, 具有快速、准确的优点。这对生物样品间的比较测量是很方便的。

本系统研制中得到中国科学院生物物理所计算机组的帮助, 在此表示感谢。

### 参 考 文 献

- 1 彭程航等. 生物化学与生物物理进展, 1987; (2): 49
- 2 Isenberg I *et al.* *Biophys J.*, 1969; 9:1337
- 3 Ygurabide J. *Methods in Enzymology*, 1972; 26:496
- 4 Porter G. *Progress in Reaction Kinetics*, 1967; 4:289

[本文于 1988 年 12 月 16 日收到]

(上接第 59 页)

序贮入 MYSEQXXX.ASC 文件。在编辑状态下, 如操作 Alt + D 则进入删除状态, 只要告诉系统用户所需顺序片段的第一个碱基的序号及最后一个碱基的序号; 如操作 Alt + R 则退出编辑状态。

7. NASA (Nucleic Acid Sequence Analysis) 程序将另文发表<sup>[1]</sup>。

8. 退回到操作系统。

总的来说, 当用户试图使用本系统时, 应首先根据用户所掌握的有关顺序的信息——如顺序的作者名、顺序的生物来源或生物分类名等等, 从选择项 2、3、4 入手, 找出所要顺序的

顺序名 (即 locus name), 然后由选择项 1 找出该顺序, 再经选择项 6 编辑后贮入 C 盘中的 MYSEQXXX.ASC 文件中, 也可使用一下选择项 5。将该顺序打印出来, 这样, 余下的工作也许需要 NASA 系统帮忙了。

### 参 考 文 献

- 1 何东明, 陈农安. 生物物理学报, 1989; 5(1) (待发表)
- 2 桂建芳, 张奇亚. 生命的化学, 1984; 4(6), 9
- 3 夏志清, 陈农安. 生物化学与生物物理进展, 1983; 5:78
- 4 夏志清. 生物化学与生物物理进展, 1984; 5: 83
- 5 Savochkina L P *et al.* *Mol Gen Genet.*, 1983; 189: 142

[本文于 1988 年 10 月 4 日收到]