

光磁共振及其在生物学上的应用

邢如连

(中国科学院生物物理研究所)

分子生物物理学是近代生物学的一个重要分支,它用物理学的概念、理论与技术从分子水平研究生命物质与生命过程。因此,许多物理学中的实验技术都已被用来研究生物大分子,如核磁共振、电子自旋共振(电子顺磁共振)、荧光、圆二色性及X射线衍射技术等等。然而采用上述某种实验技术往往还得不到满意的结果,常常需要许多种技术互相配合。光磁共振不但具有高灵敏度和高分辨率的特点,而且还是一项比较理想的综合技术。它能把磁共振技术与荧光、磷光、圆二色性及闪光光解等实验技术有机地结合起来,成为研究生物大分子(分子量从几千到几百万)的能态、结构与过程的有力手段。近十几年光磁共振的发展十分迅速,几乎涉及分子生物学的各个领域。

一、光磁共振的物理基础

1. 塞曼分裂与磁共振

若把自旋磁矩不等于零的物质放到静磁场 H 中,由于磁场 H 与自旋磁矩的相互作用,使原子能级产生分裂,这种分裂称为塞曼(Zeeman)分裂。分裂后两相邻磁(次)能级间的能量差 ΔE 与磁场强度 H 成正比。在塞曼磁能级之间产生的受激跃迁称为磁共振。由于自旋磁矩的来源不同,磁共振又分电子自旋共振(ESR)或电子顺磁共振(EPR)和核磁共振(NMR)两大类。ESR的能级分裂 ΔE 是未偶电子的自旋磁矩与磁场 H 相互作用产生的。它们之间的关系为

$$\Delta E = g\beta H,$$

其中 g 是个没有量纲的因子,称为“ g 因子”。对自由电子, $g = 2.0023$, β 是玻尔磁子。

NMR的能级分裂 ΔE_n 是原子核本身的净自旋磁矩与磁场 H 相互作用的结果。

$$\Delta E_n = g_n \beta_n H,$$

g_n 为核的 g 因子, β_n 是核磁子。

在ESR中,若以磁分量与 H 垂直、频率为 ν 的射频场激发样品,当射频场的能量 $h\nu$ 恰好等于两相邻磁能级间的能量差 ΔE 时,电子吸收射频能量后,从低能级跃迁至高能级。这就是电子自旋共振或顺磁共振。关系式

$$h\nu = g\beta H.$$

称为磁共振条件,其中 h 为普朗克常数。检测吸收能量 ΔE 是各种磁共振波谱仪的基本手段。

2. 光磁共振(ODMR)

若在ESR实验中,我们不是检测样品吸收的射频能量,而是在整个ESR共振过程中监视样品分子或原子体系的吸收或发射光束,并记录下这束光强度的变化,这样用光能量的变化来检测和研究ESR现象的技术叫光检测磁共振(optically detected magnetic resonance)或光磁共振,简称为ODMR。应当强调指出:第一,在ODMR中处于磁场中的样品上有两个辐照频率——光频和射频,后者一般是X波段的微波,频率约为 $9.5 \times 10^9 \text{ Hz}$ 。从样品被双频辐照的意义上讲,光磁共振也叫光-磁双共振(optical double magnetic resonance)。第二,塞曼磁能级间产生的光跃迁都是偏振的。

二、光磁共振的检测原理

光磁共振的检测按能态可分为基态、激发态、单线态与三线态检测。按检测光的性质则可分为荧光、磷光、吸收光检测等。下面我们在

忽略弛豫过程的理想情况下,对它们进行讨论。

1. 基态检测

在图 1(a) 中,采用只能引起 $\Delta M_J = -1$ 跃迁的 σ^- 偏振光作激发光源,把电子从基态 $^2S_{1/2}$ 的 $M_J = +\frac{1}{2}$ 的能级上抽运到激发态 $^2P_{1/2}$ 的 $M_J = -\frac{1}{2}$ 能级上,如图中虚线箭头所示。这些电子只能在激发态上停留很短的时间(约 10^{-8} s),然后以等几率返回到基态 $^2S_{1/2}$ 的两个磁能级 $M_J = \pm\frac{1}{2}$ 上。其中辐射出 π 偏振光后回到 $M_J = -\frac{1}{2}$ 能级上的电子,由于不满足跃迁选择定则 $\Delta M_J = -1$ 而不能再跃迁。辐射出 σ^- 光后回到 $M_J = +\frac{1}{2}$ 能级上的电子则仍可吸收光能再跃迁。经过一段时间 τ (光泵时间)后,电子必然富集在基态 $M_J = -\frac{1}{2}$ 的能级上。这种利用光能使电子沿某一自旋取向的现象称作“自旋记忆”或“光学取向”。电子获得自旋记忆后,对激发光的吸收降至最低。若此时加入磁分量与 H 垂直的微波场,当频率 ν 满足电子自旋共振条件 $h\nu = g\beta H$ 时,在基态 $^2S_{1/2}$ 的两个磁能级之间就会产生塞曼跃迁,电子从 $-\frac{1}{2}$ 态跃迁至 $+\frac{1}{2}$ 态。这时样品对激发光的吸收又增强了。这就是通过样品吸收光强度的变化来检测电子自旋共振的光磁共振。它的灵敏度比一般 ESR 高得多。这

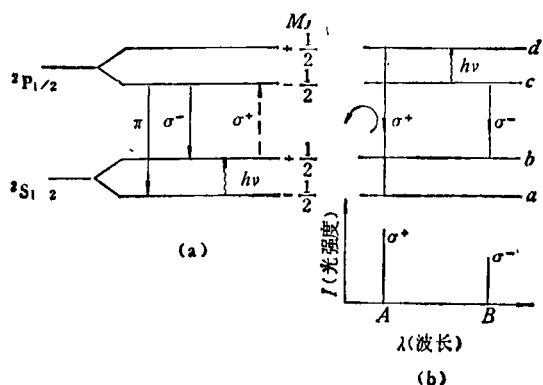


图 1 检测原理示意图
(a) 基态检测; (b) 激发态检测

是因为:首先,ESR 信号强度正比于两磁能级上的电子差数,若基态 $^2S_{1/2}$ 上的总电子数 2×10^4 按玻耳兹曼分布,在室温下两磁能级上的电子差数就仅为 16! 因此 ESR 信号很微弱。而在 ODMR 中,由于电子获得了自旋记忆,几乎全部处在最低磁能级上。其次是检测频率高,一般可见光的频率为 10^{14} Hz,而常规 X 波段的微波频率约为 9.5×10^9 Hz。显然,检测光能的变化要比检测微波能量的变化容易得多! 仅此一项灵敏度就可提高 4—5 个量级。

2. 激发态检测^[1]

在光生物和光化学过程中,有许多与激发态相关的持续时间很短(10^{-6} — 10^{-13} s)、反应速度很快的中间产物或化学反应。研究这些快速反应与中间产物对理解光生物过程(如光合作用、视觉传递、光损伤及光复活等)有极重要的意义。激发态不但具有能量、结构和动态学上的特征,而且它的化学活性往往也完全不同于对应的基态。然而在室温和低温下电子并不占据激发态。因此,既具有光激发条件又能把待研究体系的重要参数(如不稳定中间产物的瞬态浓度、量子产额、 g 因子、激发态寿命等)记录下来脉冲 ODMR 技术,被认为是七十年代最有意义的新技术。对激发态 ODMR 有三种基本检测方法。

(1) 高分辨检测

如图 1(b) 所示, a, b 和 c, d 分别代表图 1(a) 中基态 $^2S_{1/2}$ 和激发态 $^2P_{1/2}$ 的两个磁能级。若样品经光激发后,可发射出双线 σ^+ 和 σ^- , 并假设激发态的电子分布在产生 ESR 以前遵从玻耳兹曼分布,则当两个磁能级 c 和 d 之间产生 ESR 共振跃迁时(如图 1(b) 曲线箭头所示),必然引起这两个能级上的电子数发生变化,即 c 能级上的电子数减少, d 能级上的增加。于是 σ^+ 的光强增加, σ^- 的光强减弱。所以当两束光 σ^+ 和 σ^- 的强度 I 发生上述变化时,就说明在激发态的两个磁能级之间产生了磁共振。当然,只有在样品发光十分好的情况下,才能利用高分辨检测把光分解成与磁场对应的塞曼谱线。

(2) 圆偏振检测

沿磁场方向观察时,图 1(b) 所示的两个发光分量 σ^- 和 σ^+ 分别是左、右旋圆偏振光。所以,只要用圆偏振分析器代替单色仪来检测这两束光就可以了。当然检测结果应该与高分辨检测完全一致,即在激发态两磁能级间产生 ESR 跃迁时,右旋偏振光 (σ^+) 增加,左旋偏振光 (σ^-) 减小。图 1(b) 的下方示出了共振条件下两束光强度发生变化的情况。圆偏振检测的优点是不需要分辨样品发光的塞曼谱,故常用于宽带检测。

(3) 自(内)吸收检测

当样品的吸收谱和发射谱有重叠时,可用自吸收方法进行检测。这种方法检测的是总发光量,不必对光束作光谱分辨和偏振分解。仍以图 1(b) 为例,在前面的两种检测方法中不存在自(内)吸收现象,共振时 σ^+ 增强, σ^- 减弱,而总发光量 $\sigma^+ + \sigma^-$ 不变。若样品存在自吸收现象,而且基态电子遵从玻耳兹曼分布,即 a 能级上的电子数大于 b 能级上的电子数。显然对 σ^+ 的吸收要比对 σ^- 的吸收大。发生共振时虽然 σ^+ 的发光增强,然而对它的吸收也大,故总发光量减少了。

3. 单线态与三线态

分子态的多重性用 $2S + 1$ 来表示, S 是电子的总自旋。一般多原子分子,在基态时通常具有多对自旋配对的电子。配对的两个电子自旋是反平行的,即一个是 $+\frac{1}{2}$, 一个是 $-\frac{1}{2}$ 。

这时总自旋 $S = 0$, 态的多重性 $2S + 1 = 1$, 这就叫单线态。若一个电子从基态跃迁到激发态,电子自旋方向保持不变,即仍与基态上的另一电子自旋相反,这时总自旋仍为零。分子的这种状态称为单线激发态。从最低单线激发态跃迁到基态的过程产生荧光。有时电子激发后会发生自旋反转,并与基态上的另一电子处于自旋平行状态。这时总自旋 $S = 1$, 态的多重性 $2S + 1 = 3$, 这就叫三线(重)态。由最低三线态跃迁到基态的过程产生磷光。

众所周知,电子自旋共振只适用于具有未

配对(未偶)电子的 $S \neq 0$ 的体系,对 $S = 0$ 的单线态是无能为力的。而光磁共振却能适用于单线态。因为单线基态上的两个配对电子,经光激发后分别成为基态和激发态上的未偶电子,即形成辐射诱发顺磁中心。因而突破了 ESR 对样品的局限性,这是 ODMR 不同于 ESR 的重要特性。用单线激发态的吸收谱或非荧光发射谱来检测磁共振的方法称作单线态(singlet)光检测磁共振,简称 SDMR。若以样品受激后产生的荧光为检测手段,则称为荧光(fluorescence)检测磁共振,记作 FDMR。SDMR 与 FDMR 的检测原理与前面描述的几种方法基本相同,不再赘述。

同样,对三线态检测也有磷光(phosphorescence)检测磁共振(PDMR)和三线态(triplet)吸收检测磁共振(TDMR)两大类。我们以最简单的三线态为例(见图 2),来讨论 PDMR 和 TDMR 检测原理。

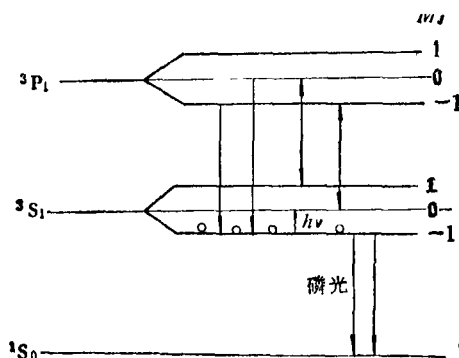


图 2 三线态检测原理图

用 $^3S_1 \rightarrow ^3P_1$ 的偏振光 ($\Delta M_J = -1$) 使亚稳态(三线态) 3S_1 上的电子受激跃迁,其中只有在 $M_J = -1$ 上的电子不满足跃迁选择定则 $\Delta M_J = -1$, 故不能吸收此偏振光跃迁到 3P_1 的任何一个次能级上。而 3S_1 的其他两个次能级上的电子都按 $\Delta M_J = -1$ 跃迁到相应的 3P_1 次能级上。经过大约 10^{-8} s 后,电子又以等几率回到亚稳态 3S_1 的各个次能级上,当然也包括 $M_J = -1$ 的次能级。经过光泵时间 τ 后,亚稳态 3S_1 上的电子全部富集在 $M_J = -1$ 的次能级上,即获得了自旋记忆。此时样品对激发

光的吸收降至最低,辐射磷光却最强。若在这时加入频率为 ν 的微波场,使亚稳态 3S_1 的两个次能级 $M_J = -1$ 和 $M_J = 0$ 之间产生 ESR 跃迁,则样品对激发光的吸收又增大,辐射磷光强度也降低。

三线态的生物样品常用 PDMR 方法来检测。A. H. Maki^[2]和他的同事们在 PDMR 方法应用于生物学研究方面作了大量的工作。然而并不是所有三线态都能用磷光检测。原因之一一是磷光的寿命长(典型范围是 10^{-4} — $10s$ 之间)。所以,某些样品在除去激发光源或微波源后,磷光还可能持续一段时间。显然这种磷光已不能反映电子在磁能级之间的共振跃迁,故不能作检测光。原因之二是磷光的产生涉及不同电子自旋状态之间的跃迁,这是几率很低的禁戒跃迁。某些物质的三线态十分稳定,产生磷光的几率极低。显然,这类样品也不宜使用 PDMR 方法。所以,有时三线态还要用非磷光的三线态-三线态吸收检测磁共振 TDMR 来检测。R. H. Clarke^[3]等人最先用 TDMR 对喹啉(quinoline)分子进行了研究。

三、光磁共振谱仪

1. ODMR 谱仪的基本结构

ODMR 谱仪一般由五个基本部分组成:光源系统,微波系统,电磁铁及其扫描系统,信号检测与记录系统,低温系统。若常温下样品有足够的量子产额,也可不使用低温系统。图 3 是最简单的光磁共振谱仪方框图。

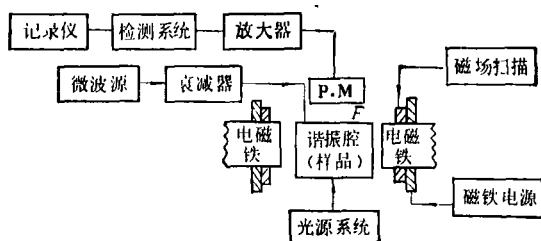


图 3 简单光磁共振谱仪方框图

光源系统把光通过微波谐振腔底部(或前盖板)的光窗口射到待测样品上,样品受激发后

出的光经滤光片 F(或单色仪)后由光电倍增管 PM 接收,再经放大、检测后被记录下来。这种谱仪可给出以下两种形式的图谱:

(1) 固定检测波长进行磁场扫描时,可得到检测光强 I 与磁场 H 相关的图谱。

(2) 把磁场 H 按 $h\nu = g\beta H$ 的条件固定在共振点上,遍及整个发光区扫描单色仪,就可以得到共振吸收或共振发射光强与波长相关的光磁共振谱。

在当前生物大分子的反应过程和活泼的中间产物的研究中,观察的时间标度是起限制作用的因素。使用了激光和大型快速积分设备的脉冲 ODMR 技术,极大地缩短了这种时间标度。目前的脉冲 ODMR 已可用于研究动态范围在 $10^{-8}s$ ($\sim 10ns$)以内的反应,并可给出波谱随时间快速变化的时间谱。

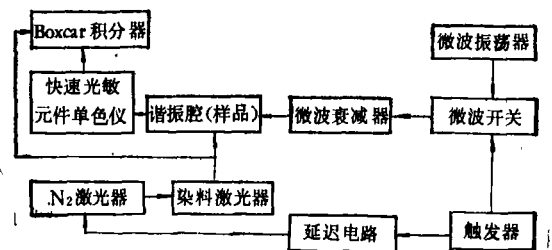


图 4 脉冲 ODMR 谱仪框图

图 4 是最简单的脉冲光磁共振谱仪框图。这种谱仪常用可选择波长的调谐激光器(如染料激光器)作激发光源,以便有选择地激发某些激发态。氮分子激光器是染料激光器的泵浦源。激光与微波用脉冲宽度约为 $5ns$ 、重复频率为 $30Hz$ 的激光脉冲同步触发。实验必须在磁共振条件下进行,微波谐振腔处于磁场中,为保证微波辐射先于激光辐射而给泵浦源加了一个延迟电路,通过调整延迟时间可以任意选定反应的启动时间。微波谐振腔中的样品发光经单色仪和快速光敏元件后进入一 Boxcar 快速信号平均器(也叫单点平均器或选通积分器),它的主要作用是对快速信号作出响应和通过信号平均改善信噪比,并给出时间分辨的光磁共振谱。

四、ODMR 在生物学研究中的应用

ODMR 的生物学研究中的应用主要集中在以下五个方面:

1. 卟啉类的研究

生物学上使用光磁共振技术研究的第一个分子就是蛋白质的卟啉部分。卟啉是一种非常安定的色素,在生物体内能催化各种反应。对高等动物来说,它存在于氧的输送者——血红蛋白中。血红素就是卟啉的铁络合物。对植物而言,卟啉是光合作用中起重要作用的分子,叶绿素就是卟啉的镁络合物。七十年代以前是卟啉分子三线态研究的初期,那时还没有直接来自三线态能级间的信息。1975年 R. H. Clarke^[3] 等人首先用 ODMR 确定了锌代卟啉和四苯卟啉的三线态电子结构。

2. 光合作用

光合作用是植物和某些细菌把光能转变为化学能的过程。可以说地球上所有现代的有生命的物质从根本上都要依赖这一过程。因此活细胞内发生的这类能量转换——光合作用一直是科学家们瞩目的课题,从生物换能器的角度来讲它更是当前分子生物学研究的前沿课题。ODMR 及其变型 PDMR 和 FDMR 是研究光合作用的最新技术。科学家们认为它是阐明光能转化中原发电子和施主结构的最有希望的手段。光磁共振能对活体叶绿素和试管叶绿素结构作出比较。人们还用 ODMR 对光合作用下色素的形成进行了探讨。Schaafsma^[2] 等人用 ODMR 证明了细菌叶绿素三线态具有明显偏振的特性。

3. 确定多肽和蛋白质的二级结构

蛋白质在所有活性物质中含量最高、功能最多,它由各种不同的氨基酸聚合而成(活细胞蛋白质中共有二十种氨基酸),分子量为 10^4 — 10^7 。生物体内的代谢、再生、分化等过程都包含着许许多多生物大分子的相互作用和化学反应。这些相互作用和化学反应不仅和生物大分子的化学组成、化学结构有关,而且还和参与

这些反应和作用的生物大分子的形状、大小、分子量及其空间结构有着密切的关系。例如,蛋白质变性前后化学结构和组成并没有发生变化,而是蛋白质的空间结构发生了变化。可见生物大分子的多种功能决定于大分子的空间结构,因而确定生物大分子的空间结构具有十分重要的意义。维持分子空间结构的是分子内与分子间的各种作用力。例如,蛋白质的多肽链由一些较强的力联系在一起(一级结构)。由多肽链盘旋而成的 α 螺旋构型(二级结构),是依靠相邻二圈之间形成的氢键。用 ODMR 的圆偏振检测技术,可以研究蛋白质分子的这些氢键破坏或改变之后的分子的旋光性和圆二色性,以及它们与磁共振的关系。旋光性是由左、右旋圆偏振光与大分子中的不对称生色团发生不同的相互作用产生的。圆二色性则是由于对左、右旋圆偏振光的吸收不同引起的。ODMR 具有极高的灵敏度。利用其高分辨与圆偏振检测的特性,可以确定很小的能量分裂,鉴别细微的不对称性。目前国外有许多单位用它来确定多肽和蛋白质的二级结构。

4. 核酸及其络合物的研究

核酸是核苷酸的多聚物,由于核糖的结构不同分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两大类。动物和植物细胞都含有这两种类型的核酸,DNA 主要存在于细胞核中,而细胞质中却富含 RNA。目前,大多是从分子结构与解释功能两个方面采用各种技术手段来研究核酸,ODMR 也不例外。已能用 ODMR 技术辨认几种不同功能类型的 RNA 及某些特殊的 DNA。天然核酸中还含有多种金属离子,它们与周围的配位原子构成各种各样的络合物。在用 ODMR 技术确定 Mn, Mg, Co, Na 等正离子在络合物中的结合部位方面已作了大量工作。应当强调指出,一些闭壳层重金属正离子络合物的研究是在有了 ODMR 技术之后才开始的, A. H. Maki^[2] 等人对天然 DNA, RNA 中的 Ag, Hg, Pt 等正离子的零场分裂和在配位体静电场中的能级分裂进行了研究。K. F. S. Luk^[2] 在其博士论文中,用 ODMR

技术对一系列合成 DNA 及 RNA 中的 Ag 离子进行了研究,并给出了它们的 ODMR 谱。此外还利用 ODMR 技术对弱电荷转移络合物进行了研究,因为这类络合物在基态时电荷转移量很少,仅在吸收光能后才有特征的电荷转移吸收带。

5. DNA 与致癌物质的相互作用

现在人们已充分的认识到,有一大批化学物质会诱发一个正常细胞转化为癌细胞。除了一些直接作用的致癌物质外,大多数分子是在成为真正的致癌物质之前,经“活化”后才形成有活性的致癌物质。现在一般认为这种活性致癌物与 DNA 的相互作用,会使细胞的遗传信息失常而导致癌变。研究它们之间的有效作用方式也是分子生物学的重要课题。利用 ODMR 的内(自)吸收法可研究致癌物与 DNA 的共价内吸收。这对阐明致癌机理,合理地设计化学治疗剂,合成具有正确空间结构与电子效应的药物等都是十分有益的。

ODMR 技术应用于生物学研究只有十几年的历史(1969 年发表第一篇论文)。它具有高灵敏度、高分辨率和多功能的优点,还可以通过选取不同的激发光,把自旋体系富集在我们感兴趣的待测能级上。由于它把分子生物学常用的两种手段——光谱学和波谱学有机地结合起

来,给出许多综合信息而受到普遍重视。用光来检测电子-核双共振(ENDOR)的技术称为三共振技术。用三共振技术来研究电子与核自旋的空间耦合机制,即电子-核超精细相互作用,简称为 ODENDOR^[4]。有意义的是,由于存在自旋偶极-偶极相互作用和自旋轨道相互作用引起的零场分裂,还允许上述三共振实验在没有外磁场的情况下进行。此外,三共振技术应用用于生物学研究的领域中,也可用光来检测基态和激发态间 NMR 共振跃迁。在此基础上,又发展了光检测核四极矩共振(ODNQR),用以研究核四极矩相互作用。尽管目前国外 ODMR 谱仪尚无商品,但 ODMR 方法发展十分迅速,内容也极为广泛。然而,ODMR 技术在我国分子生物学研究中还是一个尚待开拓的领域。

参 考 文 献

- [1] Michael D. Lumb, *Luminescens Spectroscopy*, Academic Press, (1978), 315.
- [2] Richard H. Clarke, *Triplet State ODMR Spectroscopy*, A Wiley-Interscience Publication, (1982).
- [3] R. H. Clarke and R. E. Connors, *J. Chem. Phys.*, 62 (1975), 1600.
- [4] Charles P. Pool, *Electron Spin Resonance*, A Wiley-Interscience Publication, (1982).

国际量子液体与固体会议在加拿大举行

几年一度的国际量子液体与固体会议于 1986 年 10 月 13 日至 17 日在加拿大旅游圣地班夫(Banff)举行。来自美国、加拿大、英国、苏联、日本、中国、芬兰及荷兰等国的 160 多名代表出席了会议。著名的美国物理学家派因斯(Pines)在会上回顾了朗道、费因曼对量子粒子理论的贡献,并着重介绍了他本人及其同事在多体理论方面的新发现。几个实力雄厚的低温实验室的代表分别报告了他们新的超低温实验技术与数据,引起了与会的理论工作者的极大兴趣。此外,还有四十多位物理学家就当前的研究方向作了专题报告。主要内容有:固体氦的磁性质;常流 He³;超流氦的

A, B 相变;超流 He⁴;氦界面问题, He³, He⁴ 混合液;固体氦上的电子运动;固态氢。目前新的实验手段为中子散射、核磁共振与旋转超低温制冷机等。多体问题的重要计算方法有蒙特卡罗法等。会议共发表了近 90 篇科研论文。几位中国学者也在会上分别就 He³, He⁴ 薄膜中的超流相变, He³A 相中的声波衰减等课题作了介绍。代表们普遍认为本届会议是历届会议中最富有成果的一次,它将对今后这方面的科研工作产生深远的影响。

(王兴五)