

生命科学中皮秒光脉冲的测量*

刘天夫^{1 †} 胡桂林²

(1 中国计量学院信息工程系 杭州 310034)(2 浙江大学热能工程研究所 杭州 310027)

摘要 利用时间相关单光子计数系统测量和比较了正常细胞和癌细胞的荧光光谱和荧光寿命特性,并利用同样的方法测量了单一细胞内不同部位的荧光寿命特性,其结果可作为癌症诊断的重要依据。

关键词 荧光光谱测量,荧光寿命测量,时间相关单光子计数,超短光脉冲

MEASUREMENT OF ULTRASHORT LASER PULSES IN LIFE SCIENCE

LIU Tian-Fu^{1 †} HU Gui-Lin²

(1 Department of Information Engineering, China Institute of Metrology, Hangzhou 310034, China)

(2 Institute for Power Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract The fluorescence spectra and decay characteristics of normal and cancerous cells are measured and compared using a time-correlated single-photon counting system. Furthermore, the measurement of fluorescence decay characteristics at different locations inside the cells is performed by the same method. The results obtained can be used as an important basis for cancer diagnosis.

Key words fluorescence spectra measurement, fluorescence decay measurement, time-correlated single-photon counting, ultrashort light pulses

1 引言

在生命科学研究领域中,由于生物样品的发光或荧光现象不仅十分微弱,而且弛豫过程大多是在 10^{-9} — 10^{-15} s 范围内.利用皮秒(10^{-12} s)至飞秒(10^{-15} s)范围的激光脉冲抽运生物样品,采用超快时间分辨激光光谱技术,研究生物基因、蛋白质等有机物大分子的结构与信息传递或能量变化关系,以及生物化学动力学过程的研究等,是方便而有效的研究手段.随着超短激光技术的飞速发展,时间、波长高分辨率光谱技术在生命科学研究领域中的应用也越来越广泛^[1].

本文讨论了一种利用时间相关单光子计数系统,该测量系统不仅能够直接检测皮秒量级的极其微弱的光脉冲信号,而且它同时具备高信噪比的特点.在实验中,我们配合使用生物显微镜,成功地观测到血卟啉(HPD)生物样品的皮秒荧光寿命曲线,并进行了人体胸腺细胞内部的分时光谱特性曲线的测量工作.由此可见,采用皮秒分辨率的时间相关单光子计数系

统,对生命科学研究领域中的超短光脉冲进行直接观测,是方便而有效的测量手段之一.

2 检测方法及原理

实验中,我们采用美国光谱物理公司 171 型主动锁膜 Ar⁺ 激光器,产生 100ps、 $\lambda = 488.0$ nm、45MW、82MHz 激光,抽运经培养处理的正常与癌病变活体的细胞样品,并利用皮秒量级分辨率的时间相关单光子计数系统(time-correlated single-photon counting method)进行检测.观测到癌细胞与正常细胞的荧光光谱与荧光寿命迥然不同,而且荧光寿命的快成分均为皮秒量级.

检测装置如图 1 所示.它的主要特点是:该系统不但可以像普通光子计数器那样,允许长时间数字化积累以提高检测灵敏度.同时,还可以像取样积分

* 国家质量技术监督局科学基金(批准号 99-A01-06)资助项目
2001-09-27 收到初稿,2002-03-06 修回

† 通讯联系人, E-mail: tf-Liu@mail.bz.zj.cn

器那样,能方便地选择采样点数,精确地记录被测周期信号的波形。

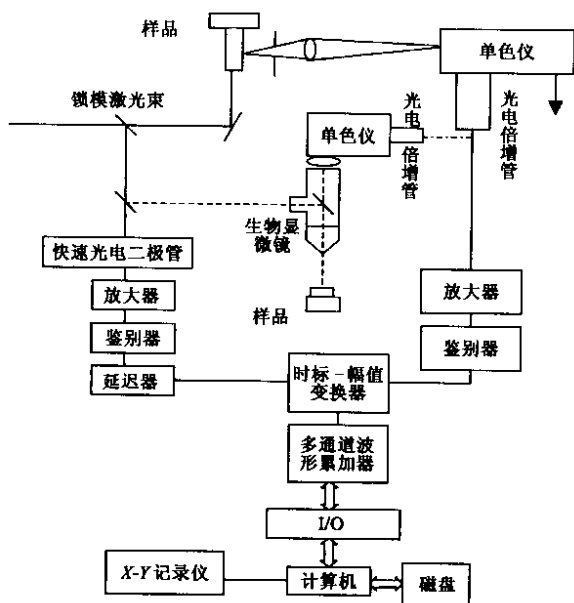


图1 生物荧光特性检测实验装置示意图

时间相关单光子计数系统的工作原理是:对应被测周期信号的某一位相点所测到的单个光子,经检测系统的精确控制,对信号通道进行高度重复的计数积累,由计算机解析后,可以精确地再现被测光信号的波形。该系统主要由三部分组成:第一部分是由高速光电二极管及触发延时电路产生时间波幅变换器(TAC)的计时零点;第二部分是连接光电倍增管的放大器和鉴别器电路系统,它能按照分区采样的时间顺序,将单个光子在光电倍增管中产生的脉冲作为终止信号送入TAC;第三部分是将TAC的输出脉冲信号正比于终止脉冲信号,并对TAC触发脉冲之间的时间间隔进行A/D变换,同时送入具有多通道存储、累加功能的多通道波形累加器(MCA)。最后,信号经由MCA输入到计算机进行解析,恢复被测信号的波形。

另一方面,为了保证检测系统的皮秒分辨率本领,除了采用高速光电二极管产生同步信号外,主要是对光电倍增管的渡越时间特性提出严格要求^[2]。为此,我们采用了日本滨松光电公司生产的R1564U型光电倍增管,它带有高工作电压微通道板(MCP)阳极结构,其光电子渡越时间为50ps^[3],从而保证了检测系统的皮秒分辨率。

3 测量结果与讨论

实验中,我们利用图1的装置,对活体癌细胞和

人体正常细胞的荧光光谱及荧光寿命进行了测量与比较。癌细胞样品,选用人淋巴性白血病源T细胞系(MOLT-4),正常细胞选用相同T细胞系的胸腺淋巴细胞。将其分别置入相同浓度($10^{-5}M$)的HP水溶液中(Hematoporphyrin-HP),在37℃下培养4h。然后,使用离心泵将细胞以外的HP清洗滤除后,对两种活体样品进行荧光光谱特性检测。

3.1 正常细胞和癌细胞的荧光光谱特性比较

首先,利用图1的装置,使用488.0nm波长的激光抽运样品。我们分别测量了癌细胞和正常细胞两种样品的荧光光谱特性,其结果如图2所示。从测量结果可以清楚地看出,癌变细胞和正常细胞的荧光光谱特性有显著的区别。尤其是在 $15500cm^{-1}$ 处,癌细胞样品具有特有的光谱谱峰,它明显地区别于正常细胞的荧光光谱特性,这也是利用荧光光谱法诊断癌症病变的重要依据之一。

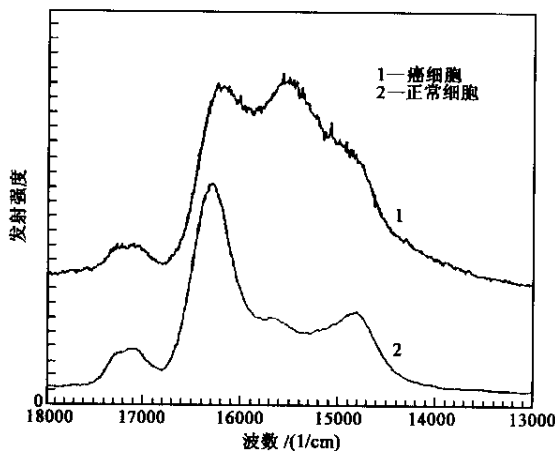


图2 正常细胞和癌细胞的荧光光谱特性曲线

3.2 正常细胞和癌细胞荧光寿命的比较

利用图1的装置,在645nm波长测试条件下,我们分别对两种样品的荧光寿命进行了测量,其结果如图3所示。

在图3中,下面一条曲线是癌细胞的荧光寿命特性曲线,它的快成分大约为150ps,慢成分大约为1200ps。图3中,上面一条曲线是正常胸腺淋巴球细胞的荧光寿命特性曲线,它的快成分大约为300ps,慢成分大约为2500ps。

由此可见,正常细胞与癌细胞的荧光寿命,其快成分均为皮秒量级。但是,它们相差十分明显,这也是荧光光谱法诊断癌症的另一个重要的依据之一。

3.3 细胞内不同部位的荧光寿命特性测量

为了进一步观测细胞内部不同部位的荧光光谱特性,我们利用生物显微镜,采用488.0nm波长激光

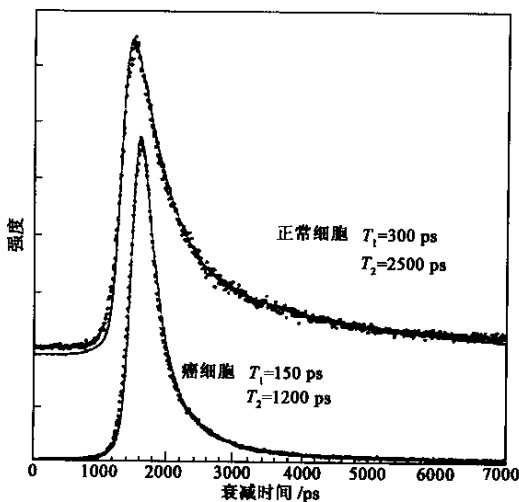


图3 正常细胞和癌细胞的荧光寿命特性曲线

做为抽运光源,对正常胸腺淋巴球细胞样品进行了测量.具体方法是:将抽运激光光束聚焦到 $0.8\mu\text{m}$,借助生物显微镜的观察,控制抽运光束的光斑,并对单个细胞内部各点逐次进行了荧光寿命的测量.具体实验装置只需增加如图1所示的虚线部分即可.在显微镜下调节微动样品台水平位置,当抽运光斑从细胞左侧 a 点,逐次移到 f 点时,其 645nm 波长的荧光寿命的测量结果如图4所示.

从实验结果可以看出,细胞中心部位 c, d 处,荧光寿命的快成分十分显著,而且均为 300ps 左右.但细胞边缘 a, f 部位,其荧光寿命慢成分占主要地位,大约为 2500ps 以上.

4 结语

在生物医学研究领域,为了从分子水平上研究生物样品的结构特性及其能量吸收、能量传递等主要的物理过程,都需要借助高分辨率的光谱技术^[4],而利用时间相关单光子计数系统,对生物样品的微弱的超短光脉冲进行测量是高分辨光谱技术的重要组成部分.它的最高分辨率为皮秒量级.实验结果证实,它对大多数生物样品的超短光脉冲的直接观测,是一种十分方便而有效的检测方法.

参 考 文 献

- [1] Jung D *et al.* Opt. Lett. ,1997 22 :1009
- [2] Liu T F *et al.* Rev. Laser Eng. ,1986 ,RTM-86-22 :1
- [3] Kinoshita S *et al.* J. Lumin. ,1998 40/41 581
- [4] Service R F. Science ,1999 667 286

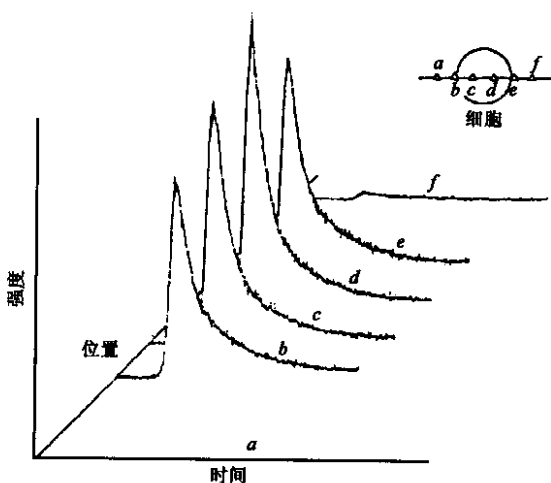


图4 单个细胞内部不同部位的 645nm 波长荧光寿命特性曲线

·物理新闻·

大气污染会受周围的无规涨落影响吗？

(Can Random Environmental Fluctuations Increase Air Pollution Levels)

最近美国亚利桑那大学以 Zonghua Liu 博士为首的科学小组正在作一个大气流动方面的模拟实验.他们考虑在一个二维气流中存在着大量的碳氢化合物与氧化氮成分,并模拟它们的化学反应,其目的是探索有关城市上空的臭氧层问题.事实上臭氧的产生是需要几十种不同的化学成分和一个在阳光激发下的化学反应链.

为了简单起见,他们的工作只是考虑两种成分的化学反应,着重研究在一个二维气流实验中哪一些因素会对反应率的大小产生影响.选取二维气流系统作模拟研究是为了能与距地面约 15km 的对流层的状态相接近,因为大气的污染主要是发生在这个区域.在对流层气流中常会产生一种“拉格朗日混沌(Lagrangian chaos)”现象,这种现象的特征是整个气流是正常的,并具有确定性,但气流中粒子的运动是混沌的,具有不确定性.

在模拟中考虑了白天与黑夜的周期特点,为了能掌握影响化学反应率大小的因素,他们在模拟中增加了一些涨落因素,如风速的变化、温度的涨落等.计算显示,噪声的增加反而使气流中粒子的时空行为变得更有规律,同时化学反应率提高到二倍以上.这个结果表明无规涨落对空气污染起着重要的作用,同时它也是自然界中存在着的随机共振的最新实例,即一个微弱的过程可以被存在于背景中的适量的无规涨落进行放大.这些成果将对我们了解发生大气污染的过程有新的启示.

(云中客摘自 Chaos, June 2002)