

荧光实验技术及其在 分子生物学中的应用

郭尧君 编著

科学出版社

荧光实验技术
及其在分子生物学中的应用

郭尧君 编著

科学出版社

1979

内 容 简 介

荧光分析是当前普遍使用,并有发展前途的一种光谱技术。

本书系作者参考国内外资料,结合自己的工作经验编写成的。全书共分十章。前二章简要地介绍了有关荧光的基本概念,包括产生荧光的机制及其与化学结构的关系、荧光分析的特点、方法以及荧光参数的定义和使用。中间三章用较多的篇幅介绍了荧光实验技术,其中仪器技术方面包括仪器结构、种类、维护、各种校正方法及最新进展。样品技术方面着重分析实验中常遇到的一些问题。后五章为荧光分析在胺、氨基酸、蛋白质、核酸、酶、维生素等方面的应用,其中着重介绍了荧光探针、荧光偏振、能量转移及分子内(间)、基团之间的测距等新技术的基本原理及其在蛋白质分析中的应用。

本书可供生物、化学、医学、环保、冶金、地质等科技工作者和有关大专院校师生参考。

荧光实验技术 及其在分子生物学中的应用

郭尧君 编著

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1979年11月第一版 开本:787×1092 1/32

1979年11月第一次印刷 印张:6

印数:0001—7,930 字数:135,000

统一书号:13031·1107

本社书号:1557·13—10

定价: 0.75 元

前 言

荧光分析法具有灵敏度高、选择性强、试样量少和方法简便等优点,所以已被广泛的应用于各种工作中。它不但在基础理论研究中是一种有效的工具,而且在工、农、医、环保等生产实践中也正在发挥重大的作用。所以它是一种有生命力的,有发展前途的技术。特别是七十年代以后,我国荧光分析技术发展很快,已经从无到有建立了一支技术队伍,并在各方面做了不少工作,取得了可喜的成果。但是,现有的水平还有待于进一步的提高和深入。为了和大家进行广泛的交流,把一些文献资料和工作中的体会总结成这本小册子。在编写过程中,杨福愉、余其泰等同志曾给以指导和帮助,在此表示感谢。同时,特别感谢林克椿老师在百忙之中审阅了全文,并作了认真的修改。

由于我的水平有限,缺点和错误在所难免,热诚地欢迎读者批评指正。

作 者

1978年3月19日

目 录

第一章 基本概念	1
一、引言	1
二、荧光的产生	2
三、荧光和分子结构的关系	7
四、荧光分析的特点及常用的方法	7
第二章 荧光参数	1
一、激发光谱	21
二、发射光谱	22
三、斯托克斯位移	24
四、荧光强度与总荧光量	25
五、峰位和谱带宽度	27
六、量子产率	27
七、荧光偏振与退偏振	33
八、荧光寿命	37
第三章 仪器	48
一、荧光仪器的基本结构	48
二、几种类型的荧光测定装置	6
三、仪器的维护	78
第四章 仪器技术	81
一、光源和波长位置的校正	81
二、激发光谱和发射光谱的校正	81
三、最佳测定条件的选择	92
四、日常测定的标准化	96

五章 实验考虑	97
一、溶剂和化学试剂	97
二、荧光污染	100
三、稀溶液分析中的干扰	102
四、内滤光效应和自吸收现象	104
五、温度对荧光的影响	106
六、溶液 pH 的影响	108
七、溶液粘度的影响	111
八、荧光淬灭	111
九、光散射	114
第六章 胺和氨基酸的荧光分析	118
一、胺	118
二、氨基酸	123
第七章 蛋白质的荧光分析	134
一、蛋白质的内源荧光	134
二、荧光探针(蛋白质的外源荧光)	137
三、荧光偏振	143
四、能量转移	147
第八章 酶和辅酶的荧光分析	156
一、酶	156
二、辅酶	168
第九章 核酸的荧光分析	175
一、嘌呤及衍生物	175
二、嘧啶及衍生物	176
三、核酸	176
第十章 维生素的荧光分析	179
一、维生素 A	179
二、维生素 B 族	180

三、维生素C	182
四、维生素D	183
五、维生素E	184
六、维生素K	185

第一章 基本概念

一、引言

发光现象通常被分为荧光、磷光、化学发光、摩擦发光和电发光等。

当用一种波长的光(如紫外光)照射某种物质时,这个物质会在极短的时间内,发射出较照射波长为长的光(如可见光),这种光就称为荧光。如果这种物质在较长的时间内,发出比荧光波长更长的波长的光,即为磷光。化学发光除了激发能是来自化学反应以外,其余与荧光相同。如果化学发光在生命系统中产生(例如萤火虫和含磷的真菌)就称为生物发光。摩擦发光是由于一些晶体,例如硝酸双氧铀和蔗糖被破坏时,释放能量而引起的。电发光则是把一个电流直接加到一个物质上而产生的荧光和磷光。除此以外,还有阴极发光和热致发光等等。

早在 16 世纪,人们就开始注意观察荧光。以后,特别在植物抽提液和矿物中,越来越多地观察到荧光的发射。1852 年 Stokes^[1] 阐明了荧光发射的机制。认为荧光是由于物质吸收了光能而重新发出的不同波长的光线,而不是由于光的漫射作用所引起的。并从一种能发荧光的矿物——荧石(fluospar),而定名荧光。

早在 15 世纪,人们就观察到在强烈的阳光照射下,从矿物重晶石(barite)发出的光,并把这种光定名为磷光。

20 世纪以来,对荧光现象进行了广泛而深入地研究。研

究得比较多的是物质吸收紫外光后，发出波长较长的紫外荧光或可见荧光，以及吸收波长较短的可见光后，发出波长较长的可见荧光。除此以外，还有物质吸收了波长较短的X光后，发出比所吸收的X光的波长稍长的X光荧光。以及有些物质吸收了红外光后，发出波长比所吸收的红外光要长的红外荧光等等。

在常温下，溶液的荧光波长比吸收波长要长。但在某些气体中，或在高温下，情况也可能完全相反。由于篇幅所限，本书仅讨论一般情况下的紫外荧光和可见荧光。

二、荧光的产生

光是一种电磁波。它的频率和波长的关系可以用下式表示：

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (1-1)$$

式中 ν 是频率，即电磁波每秒钟振动的次数，单位是赫 (Hz)。 λ 是波长，即电磁波每振动一次所走的距离。不同的波段，常用不同的单位表示，紫外—可见波段常用毫微米 (nm) 和埃 (Å) 表示(现在多用 nm 表示， $1\text{nm} = 10\text{Å}$)，红外波段用微米 (μm) 表示。式中 c 是光速，其值为 3×10^{10} 厘米/秒。

当光进入某种物质以后，可以有两种情况发生：一种是进入物质后，能量几乎不被吸收；另一种是能量被全部或被部分吸收。在后一种情况下，在吸收光的过程中，光能被转移给分子。但是，吸收本身是一种高度专一的现象，即一定结构的分子只吸收一定能量的辐射。根据量子理论，分子从光波中吸收能量必定是以不连续的、整份单位的形式发生，这些不连续的微小能量单位被称为量子。这也就是说频率为 ν 的单色光

的能量必定是 $h\nu$ 的整数倍。每个量子的能量

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\omega \quad (1-2)$$

这里 h 是普朗克常数—— 6.62×10^{-27} 尔格·秒。 ω 是波数, 即 1 厘米长度中电磁波的数目。从公式中可以看出, 能量 E 与波长 λ 成反比, 波长越长, 能量越小。

每个分子具有一系列严格分立的能级, 处于基态的分子吸收了特征频率的能量以后, 可以从低能级跃迁到高能级。被吸收的光量子的能量正好等于两个能级之差(见图 1-1)。

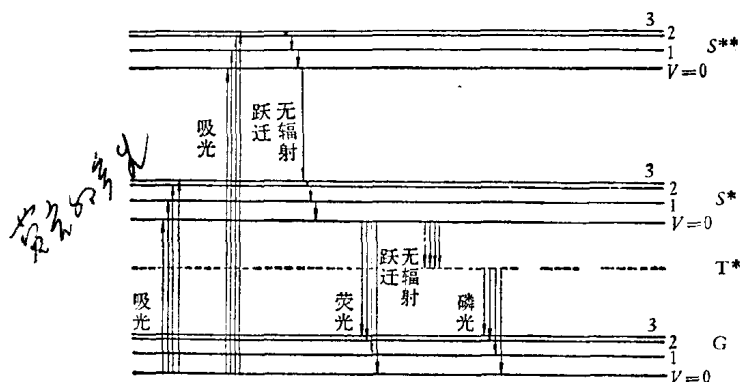


图 1-1 吸收光谱和荧光光谱能级跃迁示意图

图 1-1 表示一个分子的各种能级。基态用 G 表示, 第一电子单线激发态用 S^* 表示, 第二电子单线激发态用 S^{**} 表示, 第一电子三线激发态用 T^* 表示。基态和激发态都有几个不同的振动能级, 图中用 $V = 0, 1, 2, 3$ 表示。

单线态和三线态之间的不同在于电子自旋 s 的差别。电子围绕着通过它本身的轴旋转, 称为自旋。用来表示自旋的箭头方向($\uparrow \downarrow$)常用右手法则规定。如果右手手指顺着电子自旋的方向, 那么拇指的指向就是箭头的方向。自旋大小用自旋

量子数 s 表示, s 可为 $+\frac{1}{2}$ 或 $-\frac{1}{2}$ 。

正常的多原子分子, 在基态时通常具有多对自旋配对的电子。配对电子中, 一个 $s = +\frac{1}{2}$, 另一个 $s = -\frac{1}{2}$, 所以自旋总和是零。多重性 M 用来表示所处状态的轨道角动量。它与自旋有关, 可用公式 (1-3) 表示:

$$M = 2S + 1 \quad (1-3)$$

当所有的电子都配对时, $S = 0$

$$\left(s = +\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0\right),$$

这时多重性等于 1 ($M = 2S + 1 = 2 \times 0 + 1 = 1$), 这被叫做单线电子激发态。如果通过一些内部的能量转移, 其中一个电子的自旋方向被倒转, 就变成不配对电子, 即 $s = 1$

$$\left(s = +\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1\right)。$$

多重性 $M = 2 \times 1 + 1 = 3$, 这种电子激发态叫做三线电子激发态。

当光量子打到分子上时, 大约在 10^{-15} 秒内被吸收, 同时电子就跃迁到比较高的单线电子激发态 S^* 或 S^{**} 等。这种辐射的吸收是高度专一的, 一定的结构只吸收一定的能量辐射, 并且吸收的光量子的能量必定正好等于两个能级之差, 这种从基态到单线态的跃迁相应于分子的紫外—可见吸收光谱。跃迁以后, 能量较大的激发态分子, 通过内转换过程把部分能量转移给周围分子 (如溶剂分子), 自己回到最低电子激发态的最低振动能级。处于最低电子激发态的最低振动能级的分子的平均寿命大约为 10^{-8} 秒左右。如果这时它不通过内转换的方式来消耗能量, 回到基态, 而通过发射出相应的光量子来释放能量, 回到基态的各个不同振动能级时, 就发射荧

光。因为在发射荧光以前有一部分能量已被消耗，所以发射的荧光能量要比吸收的能量小，也就是荧光的特征波长比吸收的特征波长要来得长(见图 1-1)。

磷光现象涉及到单线态到三线态的系间跨越，即电子自旋方向发生了变化。从基态到三线态的跃迁是一种禁戒跃迁，但从单线态到三线态的转换是可能的。因为第一电子三线激发态的最低振动能级的能量比第一电子单线激发态的最低振动能级的能量低，所以如果处在第一电子单线激发态最低振动能级的分子不直接降落至基态，而是通过无辐射跃迁(系间跨越)，降至一个中间的亚稳能级——三线态后，再放出光量子回到基态各振动能级时，就发出磷光。磷光的寿命可为 10^{-4} 秒到数秒，所以，除去激发光源后，荧光立即熄灭，但磷光还可能持续一段时间。因为由三线态降落到基态所放出的能量较

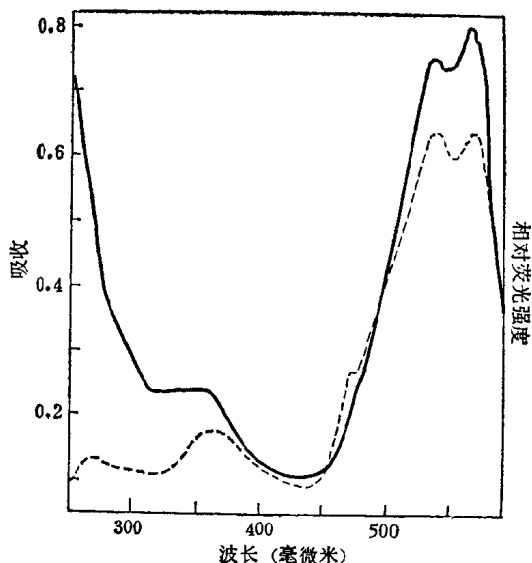


图 1-2 PBBR-铝螯合物(在 95% 乙醇中)的吸收光谱(实线)和激发光谱(未校正)(虚线)

由第一单线激发态的最低振动能级降落至基态所放出的能量要小,所以磷光的波长要比荧光的波长稍为长些。

由以上荧光产生的机制及图 1-1, 可以看出:

(1) 激发光谱的形状和吸收光谱的形状极为相似(见图 1-2), 这是因为物质分子吸收能量的过程就是它的激发过程。当然在激发光谱未进行校正时, 与吸收光谱可能有差别。

(2) 发射光谱的形状和激发光的波长无关(个别化合物例外), 这是因为荧光的产生, 是由第一电子单线激发态的最低振动能级开始的, 而和荧光物质分子原来被激发到哪一个能级无关。所以, 利用这一特性, 可以检查化合物的纯度。

(3) 荧光光谱的形状和吸收光谱极为相似, 且呈镜像对称关系(见图 1-3), 因为吸收光谱中第一吸收带的形成, 是由于该物质分子由基态被激发至第一电子激发态中各个不同能级所致, 所以其形状决定于第一电子激发态中能级的分布情况; 荧光光谱的形成, 是由于激发分子从第一电子激发态中最低振动能级降落至基态中各个不同能级所致, 所以其形状决

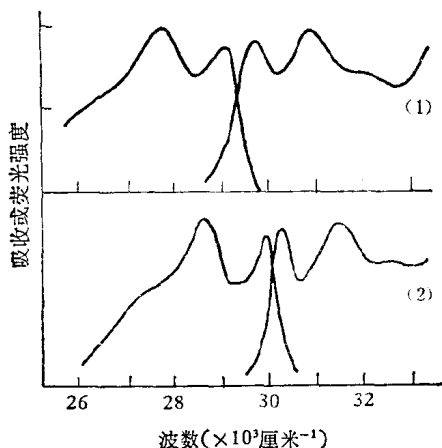


图 1-3 咖啡在正丁醇 (1) 和正己烷 (2) 中的吸收光谱和荧光光谱

定于基态中能级的分布情况。由于基态中能级的分布和第一电子激发态中能级的分布情况相类似，因此荧光光谱的形状与吸收光谱极为相似。而且，因为在相应于由基态中最低振动能级跃迁到第一电子激发态各个振动能级而显示的吸收峰中，所在的第一电子激发态的振动能级越高，则两个能级的能量差就越大，亦即吸收峰的波长越短。与此相反，在相应于由第一电子激发态的最低振动能级，降落至基态的各个振动能级而显示的荧光峰中，基态的振动能级越高，则两个能级的能量差就越小，亦即荧光峰的波长越长。所以前后两者不但形状相似，且呈镜象对称关系。但这种镜象对称关系是表现为频率或波数对称而不是波长对称。

此外，经常可以看到，大多数荧光物质的荧光光谱只有一个荧光带，不象吸收光谱具有几个吸收带。这是由于吸收光时，分子可由基态跃迁至几个不同的电子激发态，因而吸收光谱中常可呈现几个吸收带；而发射荧光时，仅由第一电子激发态的最低振动能级降落至基态，所以荧光光谱通常只呈现一个荧光带。

三、荧光和分子结构的关系

荧光和分子结构的关系是个比较重要的问题。因为弄清它们的关系，可以预示分子能否发荧光、在什么条件下发荧光、以及发出的荧光将具有什么特性。这对荧光分析的应用是很需要的信息。但是由于迄今为止，对激发态分子的性质还了解不深，所以对它们的关系还不是十分清楚。

1880年 Lieberman 最早提出了关于荧光和化学结构关系的经验法则。以后，一些研究工作者在这方面做了许多有益的工作，积累了很多资料，这里略述如下：

产生荧光的首要条件是物质分子必须具有吸收的结构，即生色团(分子中具有吸收特征频率的光能的基团)。其次该物质必须具有一定的量子产率和适宜的环境。我们把分子中能发射荧光的基团，称为荧光团。虽然可以说荧光团一定是生色团，但生色团未必一定是荧光团。因为，如果它的量子产率等于零，就不能发射出荧光。这是由于处于电子激发态的分子，可以由许多方式(如热、碰撞等)把激发能释放出来，而发射荧光只是其中的一种方式。

此外，一种物质吸收光的能力及量子产率又与物质所处的环境紧密相关。因为环境条件常常影响分子对能量的吸收和消耗。所以，环境(如溶剂、pH、温度等)常常是物质量子产率高低，甚至能否产生荧光的重要因素。

判断化合物能否产生荧光，一般可以从以下几个方面来分析：

(一) 碳原子骨架

荧光通常发生于具有共轭双键体系的分子。这种体系中的 π 电子共轭度越大，则非定域 π 电子越易被激发，荧光也就越易产生，而且荧光光谱将向长波移动。所以绝大多数能产生荧光的物质含有芳香环或杂环。

任何有利于提高 π 电子共轭度的结构改变，都将提高荧

表 1-1 对-苯基化和间-苯基化作用对荧光效率以及荧光波长的影响

化合物(在环己烷中)	荧 光 效 率	荧光波长(毫微米)
苯	0.07	283
联苯	0.18	316
对-联三苯	0.93	342
对-联四苯	0.89	366
1, 3, 5-三苯基苯	0.27	355

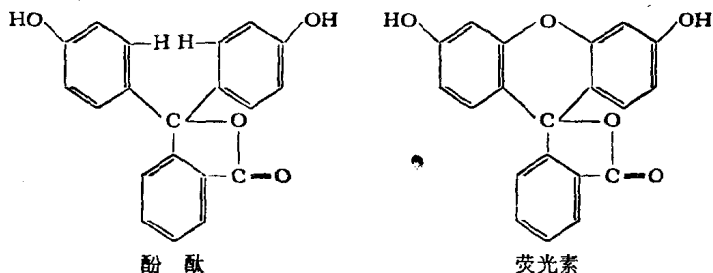
光效率;或使荧光波长向长波方向移动。例如对-苯基化,间-苯基化以及乙烯化作用都将增加苯的荧光强度,并使荧光光谱红向移动(见表 1-1 和表 1-2)^[2]。

表 1-2 乙烯化作用对荧光效率以及荧光波长的影响

化 合 物	荧 光 效 率	荧光波长(毫微米)
联苯	0.18	316
4-乙烯基联苯	0.61	333
蒽	0.36	402
9-乙烯基蒽	0.76	432

(二) 分子的几何排布

具有强烈荧光的有机分子,多数具有刚性的平面结构。如果一个有机分子具有共轭双键的非刚性链,并且存在重叠的原子轨函,而使其分子处于非平面构型,那么这样的有机分子大多不会发射荧光。如荧光素具有平面构型,所以是一个强荧光物质,但与其有相似结构的酚酞,由于没有氧桥,不易保持平面型,所以是非荧光物质。



如果一种有机分子本来不发荧光,但与金属离子形成络合物时,使分子变为平面构型,就可能出现荧光。如水杨叉苯胺等七种化合物与铝的络合物发荧光的实验事实就证明了这一点。又如 8-羟基喹啉是弱荧光物质,但与 $Mg(II)$ 形成螯合物以后,分子的刚性增加,荧光就增强。

(三) 取代基的类型和位置

在芳香化合物的芳香环上,进行不同基团的取代,对该化合物的荧光强度和荧光光谱都将产生很大的影响。取代基可以分为三类:

1、加强荧光的如: $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OC}_2\text{H}_5$ 。

2、减弱荧光的如: $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NO}$, $-\text{SH}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$ 。

3. 影响不明显的如: $-\text{R}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_3^+$ 。

所以,苯胺和苯酚的荧光较苯强 50 倍;而硝基苯,苯甲酸和溴苯则是非荧光物质。

卤化作用对芳香化合物的荧光效率有很大的影响。一卤化苯的荧光效率随着卤素的电负性的增大而增大。氟苯为 0.16, 氯苯为 0.05, 溴苯为 0.01, 碘苯为 0.00^[3]。

双取代和多取代物对非定域 π 电子激发的影响较难预测。取代基之间如果能形成氢键,并从而增加分子的平面性,则荧光加强。

当然,分子所处的环境,如溶剂、温度、pH 等都会影响分子的结构及立体构象,从而也就会影响分子的荧光。如硫酸奎宁溶解在 0.1 N 硫酸中,能发强荧光。但当溶解在 0.1 N 盐酸中时,就无荧光。又如苯胺在 pH 7—12 的溶液中,会发蓝色荧光。但在 $\text{pH} < 2$ 和在 $\text{pH} > 13$ 的溶液中,都不发射荧光。这说明发生荧光的是苯胺分子,而苯胺离子却是不发生荧光的。这个例子表明未离解的分子和它们的离子的

