

荧光发射强度影响因素及荧光猝灭实验研究

鄢志丹^{1,2}, 孙立东², 胡春光³, 胡小唐³, Peter Zeppenfeld²

1. 中国石油大学(华东)信息与控制工程学院, 山东 青岛 266555

2. 林茨大学实验物理研究所原子与表面科学系, 奥地利 A-4040

3. 天津大学精密测试技术及仪器国家重点实验室, 天津 300072

摘要 荧光发射强度在荧光显微术科学观测中至关重要。理论分析了三大影响荧光发射强度的重要因素: 分子吸收激发光光子的能力、荧光量子产量及其荧光饱和与荧光猝灭, 指出选择具有大光吸收截面和高量子产量的荧光分子, 能有效保证荧光发射强度; 确定合理的激发光强度范围, 可避免不必要的荧光饱和现象。进一步实验研究了超高真空和大气环境下的荧光猝灭现象, 得出超高真空时荧光分子的荧光猝灭现象极不明显, 而大气环境可造成荧光光强指数递减的结论。

关键词 荧光发射强度; 荧光饱和; 荧光猝灭; 荧光光谱

中图分类号: O43 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)10-2718-04

引言

荧光显微术不仅可以像普通的反射式或透射式光学显微镜一样来评价样品形貌、探索宏观光学特性, 观测集团分子的运动状况等, 更由于分子荧光的特有发射机理, 高灵敏度和高空间分辨率的特点, 通过高信噪比图像可研究诸如分子荧光寿命、荧光各向异性、荧光共振能量转移、荧光相关光谱分析和分子扩散迁移等^[1-5]。利用荧光显微术进行相关研究时, 经常遇到实验分子发射荧光逐渐变弱的现象, 这会对荧光图像、荧光光谱数据的后期分析造成不小的困难, 甚至会出现结论上的差错。基于此, 深入分析了影响分子荧光发射强度的诸多内外因素, 认为一般情况下, 荧光猝灭是造成分子荧光发射强度逐渐变弱的主要原因, 并通过自行搭建的实验设备, 以生长在云母衬底表面的联六苯(para-sexiphenyl, p-6P)分子为研究对象, 实验研究了真空与大气环境下的荧光猝灭现象。

1 分子荧光发射强度影响因素

依据光子发射路径和激发态电子排布的不同, 光致发光可分为荧光和磷光。荧光是分子吸收光能后被激发, 从第一激发单线态的最低振动能级立即返回至基态能级时而出射的

光^[6]。影响分子荧光发射强度的因素包含三个重要的方面: ①分子吸收激发光光子的能力; ②荧光量子产量; ③外部因素引起的荧光饱和与荧光猝灭现象。

1.1 荧光分子吸收激发光光子的能力

要发射一定数量的荧光, 其先决条件是分子对激发光光子的吸收。分子吸收的激发光光子越多, 则越有可能发射出更多的荧光光子。通常用光吸收截面 σ_{cs} 这一指标来衡量分子吸收激发光光子能力^[6]

$$\sigma_{cs} = 2\pi(\lambda/2\pi)^2(\gamma_r/\Gamma_{tot}) \quad (1)$$

式中, Γ_{tot} , γ_r 和 λ 分别表示总吸收频率宽、自发辐射荧光率和激发光波长。 σ_{cs} 是与入射光波长相联系的重要指标, 同时与分子的电偶极方向密切相关。一般而言, 不同波长激发光下分子的荧光发射能力会有所不同。

1.2 荧光量子产量

分子的荧光量子产量即荧光发射光子数($N_{Fluorescence}$)与其所吸收的激发光总光子数($N_{Absorption}$)之比。记做 ϕ_F

$$\phi_F = N_{Fluorescence}/N_{Absorption} \quad (2)$$

进一步地, ϕ_F 也可用荧光寿命和辐射寿命之比表示, 其取决于辐射和非辐射的跃迁过程(如系间穿越、内转移和振动弛豫等)的相对速率, 见式(3)

$$\phi_F = \tau_F/\tau_{rad} = k_{rad}/(k_{rad} + k_{nonrad}) \quad (3)$$

式中, τ_F , τ_{rad} , k_{rad} 和 k_{nonrad} 分别表示分子的荧光寿命、辐射寿命、荧光辐射速率、非辐射速率。 ϕ_F 值的大小表明荧光转

收稿日期: 2012-02-09, 修订日期: 2012-04-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(11104354), 中国奥地利国际合作项目(WTZ-VII. VB. 18, 2008DFA71610), 青岛市科技发展计划项目(12-1-4-7-(5)-Jch)和天津大学精密测试技术及仪器国家重点实验室开放课题资助

作者简介: 鄢志丹, 1983年生, 中国石油大学(华东)信息与控制工程学院讲师 e-mail: zhidanyan@upc.edu.cn; zhidanyan@tju.edu.cn

化效率的强弱, 由于在荧光发射过程中, 部分吸收光能总会或多或少地以热能等其他形式释放, 所以 ϕ_F 恒小于 1。

1.3 荧光饱和与荧光猝灭

影响荧光分子发射强度的外部因素主要有: ①激发光强度; ②荧光猝灭物质。它们有可能分别会造成荧光饱和与荧光猝灭现象^[6-9]。

1.3.1 荧光饱和

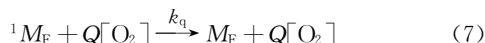
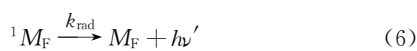
一般而言, 荧光发射强度与激发光强度成正比。但当激发光光强 I 超过某一临界值 I_s 后, 如持续增加激发光强, 不但不会提高荧光发射强度, 反而会使荧光发射强度减弱, 这种现象称之为荧光饱和。这是由于较强的激发光造成分子的光吸收截面减小, 从而降低了分子捕获激发光光子的能力, 即

$$\sigma'_{cs} = \sigma_{cs} / (1 + I/I_s) \quad (4)$$

式中, σ'_{cs} 表示为分子实际的光吸收截面。当激发光光强持续增强, 则会有部分处于激发态的荧光分子不能快速地返回至基态, 其光吸收能力进一步减弱甚至消退, 产生光漂白现象。

1.3.2 荧光猝灭

荧光猝灭是指荧光分子与某些分子相互作用后引起荧光强度减弱甚至消退的现象。荧光猝灭分为静态猝灭和动态猝灭, 无论静态还是动态猝灭都需要荧光分子与引起荧光猝灭的物质, 即猝灭剂产生相互作用。静态猝灭又称组成化合物猝灭, 这是由于荧光分子与猝灭剂分子形成了不发荧光的化合物, 因而静态猝灭改变了原荧光分子的化学结构。而动态猝灭是指当荧光分子处于激发态时, 猝灭剂与荧光分子相互接触, 使其不发射荧光光子而直接返回至基态。对于高纯度的荧光物质而言, 光氧化是造成动态荧光猝灭现象的重要原因, 即



式(5)表示某一荧光分子 M_F 吸收激发光光子能量 $h\nu$ 后跃迁至第一激发单线态 1M_F , 原来应发射出能量为 $h\nu'$ 的荧光光子后迅速返回至基态[式(6)], 但由于猝灭剂氧气 $Q[O_2]$ 的存在, 处在激发态的部分分子会与其相互作用, 造成荧光猝灭 (k_q 为猝灭速率) 而不再出射荧光光子[式(7)]。

从实验科学角度出发, 选择大 σ_{cs} 和高 ϕ_F 的荧光分子, 能有效降低荧光采集难度; 确定合理的激发光强度范围, 就可以避免不必要的荧光饱和甚至光漂白现象。通常情况下, 对于高纯度的荧光物质, 其光氧化荧光猝灭是造成分子荧光发射强度逐渐变弱的主要原因。下面就超高真空和大气环境下的荧光猝灭现象进行实验研究。

2 实验部分

结合对荧光猝灭的理论分析, 以生长在云母衬底表面的 p-6P 分子为研究对象, 分别在真空和大气环境下, 进行长达 5 h 的荧光激发实验, 以此来分析两种环境下的荧光猝灭特

点。图 1 为实验装置的示意图, 系统以 NIKON 90i 荧光显微镜为主体; 当光路开关打开时, 从光源发出的光, 通过荧光滤镜组(由激发滤镜、分色滤镜和发射滤镜组成)后出射为一定波长的激发光, 经聚焦后激发置于真空腔内样品台上的荧光分子样品, 其产生的荧光被同一物镜采集, 再次经过荧光滤镜组后被光谱仪 HR4000 接收。真空腔内外的激发光与荧光的光路耦合由位于腔体上的 CF40 的蓝宝石法兰接口来实现。另外, 实验时保证适中的激发光强, 以保证较好的数据信噪比并防止造成不必要的荧光饱和。

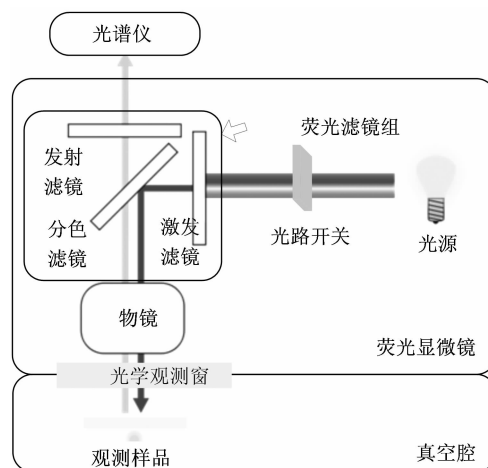


Fig. 1 Schematic diagram of experimental setup

当腔内真空度达到 2×10^{-8} Pa 时首先进行真空荧光猝灭实验, 为便于数据间的比较, 将首次所采集荧光光谱中的最大光强设置为 1, 线性缩小其他数值, 如图 2 所示。

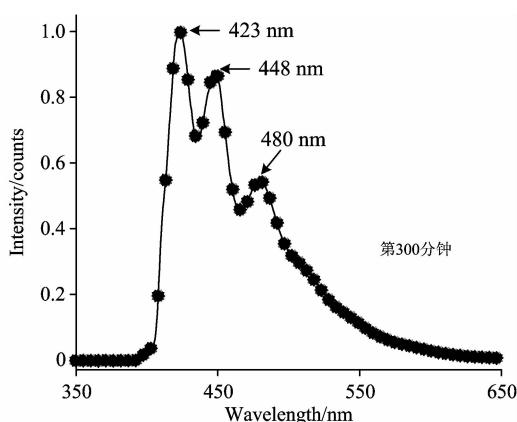


Fig. 2 Continuous fluorescence spectrum of p-6P in ultra-high vacuum

由于在超高真空环境下, 氧气的含量可以忽略不计, 因而分子的荧光猝灭现象极不明显, 在连续 5 h 的紫外光激发下, 除了因测量系统造成的可忽略不计的误差外, 荧光光谱光强几乎没有发生什么变化。而与此形成鲜明对比的是, 大气环境下(真空腔与外部大气连通)的 p-6P 分子荧光光谱的光强却不断减小, 发生了较为严重的荧光猝灭, 如图 3 所示。p-6P 分子荧光光谱的三个特征峰值(423, 448 和 480 nm)光

强分别从最初的 1.000, 0.793 和 0.541 降至 0.334, 0.290 和 0.197, 降幅分别达 66.6%, 63.4% 和 63.5%。

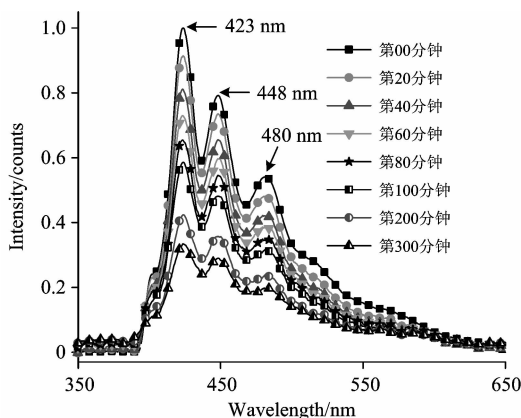


Fig. 3 Fluorescence quenching of p-6P in the atmosphere

为深入分析大气环境下 p-6P 分子的荧光猝灭现象, 图 4 给出了三个特征峰光强随激发时间的变化关系。可以看出, 其随激发时间的递减规律, 经曲线拟合算法后, 进一步发现其遵从负指数下降曲线, 分别为:

423 nm

$$N \approx 0.740 \times \exp(-t/123.3) + 0.271 \quad (8)$$

448 nm

$$N = 0.574 \times \exp(-t/131.3) + 0.230 \quad (8)$$

480 nm

$$N = 0.361 \times \exp(-t/104.2) + 0.180 \quad (10)$$

式(10)一式(12)中, N 和 t 分别表示为光强和激发时间。

综上所述, 可以得出: (1)对于高纯度的荧光物质, 由于超高真空环境下氧含量极其微小, 荧光猝灭现象极不明显; 而在大气环境下, 存在较为剧烈的猝灭现象; (2)p-6P 分子荧光光谱在 400~500 nm 范围内存在 3 个明显的特征峰, 分

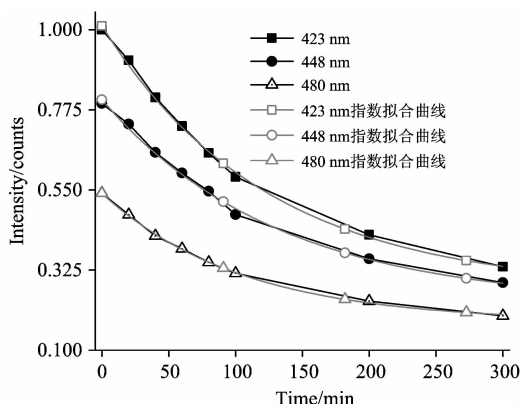


Fig. 4 Exponential decline of light intensity for the three characteristic peaks in p-6P fluorescence spectrum

别为 423, 448 和 480; (3)p-6P 分子荧光猝灭直观地表现为特征峰光强与激发光照射时间成指数递减关系, 同时, 这可为相关荧光实验的光强能量补偿提供指导意义。

4 结论

分子吸收激发光光子的能力、荧光量子产量及其荧光饱和与荧光猝灭现象是影响分子荧光发射强度的重要因素, 前两个因素与荧光分子本身的分子结构、化学成分紧密相关, 为选用适当的实验用荧光物质提供依据; 而荧光饱和与荧光猝灭现象的产生机理可为已选定荧光物质的实验研究提供积极指导。选择具有大光吸收截面和高荧光量子产量的荧光物质, 能有效保证荧光信息强度; 确定适中的激发光强度范围, 可避免不必要的荧光饱和现象; 特别是, 在超高真空环境下进行荧光观测具有极大的优势, 可以忽略不计的氧气含量, 使得分子的荧光猝灭现象极不明显, 而与此相对的大气环境, 则会导致较为严重的荧光猝灭。

References

- [1] Nadeau J L, Perreault N N, Niederberger T D, et al. *Astrobiology*, 2008, 8(4): 859.
- [2] Levitt J A, Matthews D R, Ameer-Beg S M, et al. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(1): 28.
- [3] Clapp A R, Medintz I L, Mauro J M, et al. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(1): 301.
- [4] Wennmalm S, Widengren J. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(13): 5646.
- [5] Kusumi A, Shirai Y M, Koyama-Honda I, et al. *Febs Letters*, 2010, 584(9): 1814.
- [6] Moerner W E, Fromm D P. *Rev. Sci. Instrum.*, 2003, 74(8): 3597.
- [7] Petersen B R, Ghandhi J B, Koch J D. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 2008, 93(2-3): 639.
- [8] Maurice R E, Camillo A G. *Anal. Biochem.*, 1981, 114: 199.
- [9] Mote U S, Bhattar S L, Patil S R, et al. *Luminescence*, 2010, 25(1): 1.

Factors Influencing the Ability of Fluorescence Emission and Fluorescence Quenching Experimental Research

YAN Zhi-dan^{1,2}, SUN Li-dong², HU Chun-guang³, HU Xiao-tang³, Peter Zeppenfeld²

1. College of Information & Control Engineering, China University of Petroleum(East China), Qingdao 266555, China

2. Institute für Experimentalphysik, Johannes Kepler Universität Linz, Linz A-4040, Austria

3. State Key Laboratory of Precision Measuring Technology and Instruments, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract The fluorescence emission intensity is vital to scientific observation using fluorescence microscopy. Three important factors influencing the intensity of fluorescence emission were theoretical analyzed, including the absorption ability of excitation photons, fluorescence quantum yield, and fluorescence saturation & fluorescence quenching. The authors pointed out that fluorescence molecules with large optical absorption cross section and high quantum yield can effectively guarantee the fluorescence emission intensity, and one also can avoid unnecessary fluorescence saturation if excitation intensity was determined in a reasonable range. Furthermore, fluorescence quenching experiments were studied in ultra-high vacuum (UHV) and atmospheric environment, respectively. We found that fluorescence quenching in UHV was imperceptible, while the fluorescence intensity in the atmosphere decreased exponentially.

Keywords Fluorescence intensity; Fluorescence saturation; Fluorescence quenching; Fluorescence spectrum

(Received Feb. 9, 2012; accepted Apr. 10, 2012)