

Femtosecond Fluorescence Spectroscopy and Its Applications in Life Science*

Zhandong Tao, Menghui Jia, Jingxin Ding, Sanjun Zhang, Haifeng Pan[#], Jianhua Xu

State Key Laboratory of Precision Spectroscopy, East China Normal University, Shanghai
Email: [#]hfpan@phy.ecnu.edu.cn

Received: Oct. 11th, 2013; revised: Oct. 20th, 2013; accepted: Nov. 6th, 2013

Copyright © 2013 Zhandong Tao et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Frequency upconversion fluorescence spectroscopy can be widely used to study biological macromolecules' structures and dynamics which may be linked to their functions. With the developments of ultrafast laser technology and the updates of related optoelectronic devices, the presence of femtosecond laser especially makes the time resolution of frequency upconversion down to femtosecond, which provides new opportunities to the studies in biology, chemistry and medicine science. In this paper, the basic principle of upconversion technique is briefly reviewed. On the basis of a self-constructed femtosecond upconversion fluorescence spectroscopy experimental system, the key design features of the total system are discussed. Finally, a few applications of the upconversion technique in life science, especially the fluorescence dynamics of proteins and DNA, are demonstrated.

Keywords: Optical Frequency Upconversion; Time Resolved Fluorescence Spectroscopy; Biological Macromolecules; Femtosecond Dynamics of Fluorescence

飞秒荧光光谱技术及其在生命科学中的应用*

陶占东, 贾梦辉, 丁晶新, 张三军, 潘海峰[#], 徐建华

华东师范大学精密光谱科学与技术国家重点实验室, 上海
Email: [#]hfpan@phy.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2013年10月11日; 修回日期: 2013年10月20日; 录用日期: 2013年11月6日

摘要: 频率上转换荧光光谱技术在生物大分子的结构、功能以及动力学研究方面具有广泛的应用。近年来, 随着超快激光技术的发展以及相关光电子设备的升级和更新, 尤其是飞秒激光的出现, 频率上转换技术的时间分辨率达到了飞秒量级, 为生物、化学和医学等领域的研究带来了新的发展契机。本文介绍和回顾了频率上转换荧光光谱技术的基本原理, 在自行组建的一套频率上转换飞秒荧光光谱实验系统基础上, 重点分析了整体系统的关键设计因素。介绍了频率上转换飞秒荧光光谱技术在生命科学领域, 尤其是蛋白质、DNA 动力学研究中的一些应用。

关键词: 光学频率上转换; 时间分辨荧光光谱; 生物大分子; 飞秒荧光动力学

1. 引言

荧光光谱学被广泛应用于研究生物大分子的结

构及功能, 特别是蛋白质与水环境、蛋白质与蛋白质之间相互作用的动力学等等^[1,2]。蛋白质生色团(尤其是色氨酸分子)的荧光发射特性对蛋白质分子周围的环境十分敏感, 环境中微小的变化都会给荧光性质带

*资助信息: 上海市教育委员会及教育发展基金会晨光项目(11CG24), 以及中央高校基本科研业务费专项资金。

[#]通讯作者。

来影响^[3],所以荧光光谱(主要是荧光寿命)的改变能反映出蛋白质分子由于环境变化引起的动力学特性。通常情况下,蛋白质生色团荧光寿命在几十个皮秒(ps, 10^{-12} s)到几十个纳秒(ns, 10^{-9} s)。因此,探测荧光寿命,即时间分辨荧光光谱(time resolved fluorescence spectroscopy),需要借助于超快时间响应的光电设备或光电技术。一直以来,相关领域的科学家不断探索时间分辨荧光的探测方法。直接采用高时间分辨率的光电探测器,如 MCPPMT 和 PIN 管^[4]等,或者采用各种先进技术,如 TCSPC^[5]、Streak Camera^[6]以及 Optical Kerr Shutter^[7]等,均取得了皮秒乃至亚皮秒的时间分辨率。非线性光学频率上转换技术为提高探测荧光的时间分辨率提供了新的思路和方法。这项技术由 Mahr 和 Hirsch 在 1975 年首次使用^[8],其时间分辨率在原理上取决于激光脉冲的宽度。近年来,脉冲激光(尤其是钛宝石激光)的脉宽已经达到飞秒量级,频率上转换技术的时间分辨也随之突破了皮秒,达到飞秒量级。

频率上转换又称和频产生(sum frequency generation),是非线性光学混频(optical mixing)的一种。Halliday 和 Topp 在 1997 年首次报道了频率上转换荧光光谱技术在生物化学研究方面的应用^[9],而 1988 年 Kahlow 的一篇文章则全面地概括和介绍了频率上转换荧光光谱技术^[10]。光学频率上转换不仅具有飞秒级的时间分辨率,而且实验所需的超快激光及相关的设备的发展已经相当成熟,因此,已经有很多研究人员将该技术应用在各自领域的研究当中^[11,12]。特别地,在生命科学领域(如生物物理、生物化学等),将频率上转换技术应用于时间分辨荧光光谱探测已经成为研究生物大分子的结构、功能及动力学的重要手段。

2. 光学频率上转换

2.1. 频率上转换的光谱分辨

只有满足相位匹配的波长才能发生频率上转换,如果两束光没有达到良好的相位匹配,那么不同的荧光波长 λ_F 所得到的 Δk 不为零。频率上转换的量子效率随着 Δk 绝对值的增加而下降,如下式:

$$\eta(\Delta k) = \eta(0) \frac{\sin^2(\Delta k L)}{(\Delta k L)^2} \quad (1)$$

通常以量子效率下降到 $\eta(0)$ 的 50% 对应的谱宽 $\Delta\lambda$ 来衡量频率上转换的光谱响应,即特定相位匹配角能

实现频率上转换的光谱宽度^[13]。实验中所使用的 BBO 晶体有一定的厚度 L ,这必然会带来一定程度的荧光和探测光之间的角度扩张,即 BBO 的厚度增加了两束光的交叉范围,从而导致光谱分辨增宽。如下:

$$\Delta(\hbar\nu_F)(meV) = \frac{3.66 \times 10^{-12}}{L(cm) [\gamma_S(s/cm) - \gamma_F(s/cm)]} \quad (2)$$

其中,

$$\begin{aligned} \gamma_S &= \frac{1}{c} \left| n_S(\theta) - \lambda_S \frac{\partial n_S(\theta)}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=\lambda_S}, \\ \gamma_F &= \frac{1}{c} \left| n_{o,F} - \lambda_F \frac{\partial n_{o,F}}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=\lambda_F}. \end{aligned} \quad (3)$$

以 800 nm 探测光与色氨酸荧光(发射峰波长通常在 350 nm 左右)的频率上转换为例,由(10)式可以算出,采用 0.2 mm BBO 晶体的光谱分辨带宽约为 0.4 nm,而用 1 mm 晶体则为 0.8 nm。显然,频率上转换是一项高光谱分辨率的光谱学技术。

这里有一个矛盾,BBO 晶体越厚,频率上转换的量子产率越高,但频率上转换光谱的分辨率反而会降低,有效接收角也会变得更窄。对此,常常需要根据具体情况来选择合适的 BBO 厚度。

2.2. 频率上转换荧光光谱信号的探测

和频产生具有严格的时间同步性,只有当两束光同时到达非线性晶体才有和频产生。延迟可调的探测光就像一道“门”,只有当它照射到晶体上并与荧光混合才会有和频光产生,和频光的脉宽就被“限制”在探测光的脉宽之内,这正是频率上转换技术具有高时间分辨率的原因。为了得到精细完整的荧光衰减曲线,不仅要利用超短脉冲,还要精密调控探测光的延迟。如图 1 所示,在时间 $t=0$ 时刻,超快激光的二次或三次谐波(频率为 ω_p)激发样品产生荧光,通过逐步改变探测光的延迟 τ_m ($m=1,2,\dots,n$)实现对荧光在短域内衰减情况的跟踪扫描。由于给定延迟 τ 时刻的上转换信号的强度是正比于荧光和探测光强度的相关函数^[13],所以通过对不同延迟的上转换信号进行整合,所得到的和频光的衰减与荧光是完全一致的。

3. 光学频率上转换荧光光谱实验系统

根据频率上转换的基本原理,以飞秒脉冲激光及

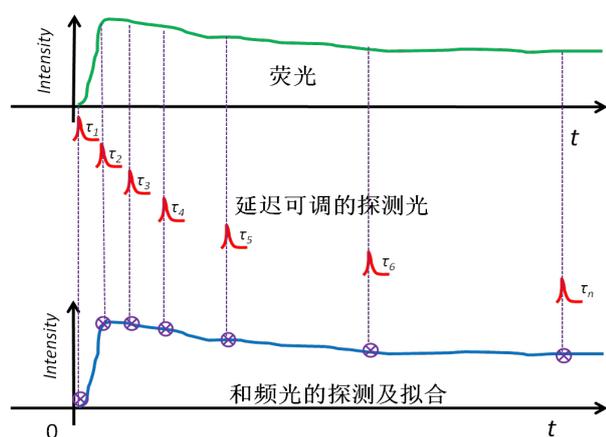


Figure 1. Principle of fluorescence frequency upconversion technique

图 1. 频率上转换荧光光谱探测原理图

相关的光学器件为基础，结合光学实验的相关技术，尤其是泵浦-探测原理及技术，我们自行搭建了一套专门用于研究生物大分子荧光动力学的频率上转换时间分辨荧光光谱实验系统，如图 2 所示。

3.1. 频率上转换荧光光谱系统光路设计

在这套频率上转换荧光探测系统中，再生放大器 (Spitfire Pro, Spectra Physics) 输出中心波长为 800 nm, 平均功率为 2 W, 重复频率为 1 kHz 的飞秒激光脉冲, 其脉宽在 40 fs 左右。根据实验要求, 采用分束镜将激光分为两路: 一路经光学延迟线(对应的时间延迟为 100 ps/15mm)作为探测光; 另一路经光学参量放大器 (TOPAS, Spectra Physics) 转换为特定波长的光作为激发光。除了输出选定波长的激发光以外, TOPAS 通常还伴随发射一些其他波长的杂散光, 这些杂散光会对上转换探测造成严重影响, 大大降低探测的灵敏度, 因此需要在激发光路中加入滤光片以筛选出激发光, 必要时还可采用棱镜对或光栅对搭建色散滤波器, 降低杂散光对频率上转换荧光探测系统灵敏度的影响。激发光镜聚焦到 1 mm 厚的环形样品池上, 使待测样品产生荧光, 然后利用抛物面镜对样品荧光进行收集。为了避免脉冲展宽, 我们采用凹面反射镜将探测光聚焦在 BBO 晶体上, 荧光经过抛物面镜聚焦到 BBO 晶体上。实验中采用探测光与荧光非共线入射的方式, 主要是为了使上转换信号与探测光及未转换的荧光在空间上分离。经过光学延迟线调节, 使得当探测光与荧光以一定的角度同步到达 BBO 晶体发生和

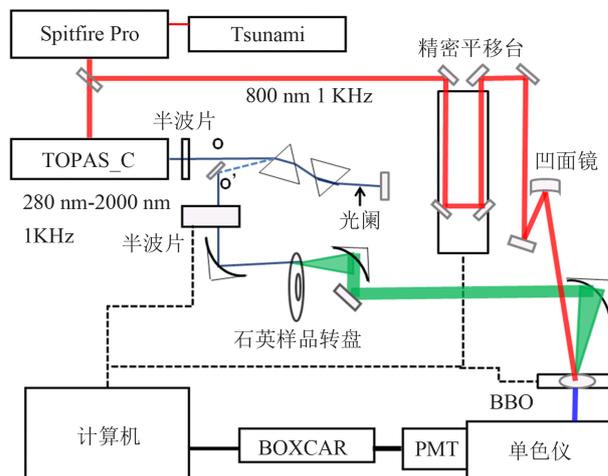


Figure 2. Schematic diagram of the time-resolved fluorescence frequency upconversion experimental system (O and O' are different in height)

图 2. 飞秒超快荧光上转换系统装置图(图中 O 与 O' 点表示在空间竖直方向的高度不同)

频上转换相互作用。和频光通过用一对平凸透镜将收集并聚焦到单色仪入射狭缝进行光谱探测。

需要特别指出的是, 光学频率上转换非线性相互作用实质上也是对光偏振方向的选择过程。在我们的光路设计中, 由再生放大器 Spitfire 出射光是水平偏振的, 探测光可用光束转折器(Beam Steerers)将其转为竖直偏振。而对于激发光, 为了探测不同偏振方向的荧光寿命, 通常是采用一块很薄的零级半波片来改变其偏振方向。例如, 当探测光与 BBO 所要求的偏振方向一致(竖直方向)时, 通常将激发光的偏振方向设置为与竖直方向呈 54.7 度, 这个特殊的角度被称为 magic angle^[14,15], 在此条件下, 探测到的物质荧光寿命是消除了物质各向异性的平均寿命。

此外, 实验中我们采用旋转电机带动石英转盘构造一种流动的样品池, 并用可调衰减片仔细调整转盘前激发光的强度, 有效地避免了产生光降解、“孔烧”和其他一些不希望出现的光化学效应^[16]。

3.2. 频率上转换荧光光谱系统探测设计

和频光经单色仪(Omni2078, Zolix)进行光谱辨识和筛选, 采用只对和频光所在的偏紫外光谱带响应的日盲型 PMT(Hamamatsu R2078 & R7154)进行光电转换和信号增强, 然后利用前置放大器(Preamplifier SR445A, Stanford Instrument)和快速门采样积分器(fast gated integrator)(BOXCAR SR250, Stanford In-

strument)或者是门控的光子计数器(gated photon counter)对信号进行采样处理。门控的光子计数器^[17,18]和快门采样积分器^[19]是两种常见的脉冲信号探测设备。大多数上转换荧光探测系统使用的是光子计数器,因为通常来说光子计数器具有更好的时间分辨率、更稳定的基线以及更高的信噪比,但是需要避免脉冲堆积效应^[20]。然而,在探测低频脉冲信号时,往往需要甄别能力更强的探测器,因此在低重复频率工作下快门采样积分器要比光子计数器更有优势。在我们的系统中,激光频率为1 kHz,属低频脉冲信号,快速采样门积分器是最佳选择。

3.3. 频率上转换荧光光谱系统仪器响应函数及系统测试

利用频率上转换荧光光谱系统直接探测并获取理想的荧光衰减曲线是十分困难的。这是因为系统实际探测的光子分布或上转换信号通常是荧光衰减函数和仪器响应函数(IRF)^[21]的卷积,而测量仪器响应函数是后续进行去卷积操作的前提。通常可以测量探测光和紫外激发的拉曼散射光^[22]之间的互相关信号来标定频率上转换荧光光谱系统的仪器响应函数。例如,激发波长为295 nm时的水拉曼信号波长在328 nm(纯水拉曼位移常数为 -3400 cm^{-1}),328 nm拉曼信号与800 nm探测光作用后的信号波长在232.6 nm,采用高斯分布拟合水拉曼得到仪器响应函数大概是330 fs(FWHM),如图3所示。通常来说,系统仪器响应函数越接近探测光脉宽,频率上转换的时间分辨率就越高。

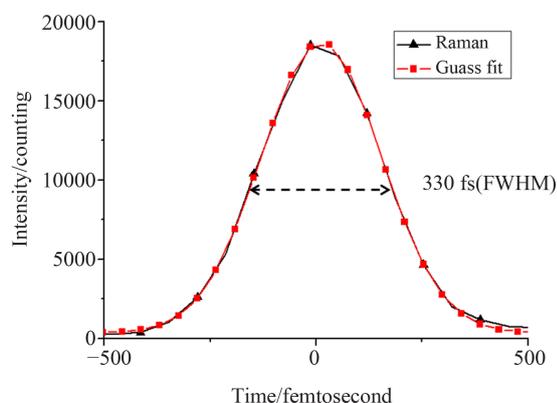


Figure 3. Cross-correlation between the Raman scattering from water and the probe light
图3. 水拉曼与探测光的互相关信号

此外,为了保证良好的探测效果,实验前测试延迟线平行度以及系统偏振纯度(system polarization purity)是必不可少的。Knutson提出了使用线性荧光体对三联苯(*p*-terphenyl)来进行系统测试的方法^[23]。对三联苯在环己烷(cyclohexane)溶液有0.4 ps的初始各向异性和41 ps的单一相关时间,如果系统测试该荧光体的衰减特性的结果与理论一致(在可接受的误差范围之内),则说明这方面的系统优化已经完成。

4. 光学频率上转换探测在生命科学领域中的应用

飞秒频率上转换技术的出现,将时间分辨荧光的探测精度提高到了飞秒量级,引起了生命科学领域研究人员的普遍关注。荧光基团(如色氨酸)在极性溶剂或极性环境中的溶剂弛豫(solvent relaxation)^[23-25]、激发态的能量转移(energy transfer, ET)^[26,27]以及其他与荧光发光相关的动力学往往反映了荧光基团所处环境的情况。这些过程大多数都在很短的时间内完成(飞秒至皮秒),对荧光的影响一般只出现在荧光起始端很窄的时域内,超出了一般的时间分辨荧光技术(如TCSPC)的分辨极限。因此,飞秒分辨频率上转换技术常常用于研究超快荧光动力学。

4.1. 水溶液中色氨酸的溶剂弛豫

自然界中有二十种基本氨基酸,色氨酸(tryptophan, Trp)、酪氨酸、苯丙氨酸等是为数不多的能发荧光的氨基酸。其中,色氨酸荧光具有较长的寿命、较强的发射峰值、可观的量子产率和明显的旋转各向异性,同时色氨酸的吸收波段很宽,其荧光发射光谱有明显的斯托克斯位移,因此色氨酸及其衍生物常被用在荧光探究性实验中^[28]。水是天然的溶剂,几乎所有的生物大分子,如蛋白质、DNA等,离开水都会失去活性。很多研究小组,如Zhong和Knutson,利用飞秒分辨频率上转换荧光光谱系统分别研究了色氨酸在水溶液中的动力学。

在Knutson的实验^[29]中探测了色氨酸荧光在400~25 ps内一系列发射光谱成分随时间的衰减特性,给出了从短波到长波四条典型的荧光衰减曲线。仔细观察荧光发射的初始端,可以发现一个现象——短波长的荧光快速衰减,长波长荧光快速上升,这说明色氨酸

的激发态经历了一个快速的变化过程。荧光通常以单指数或加权的多指数形式衰减^[28,30]，色氨酸荧光也不例外。通过数据拟合得出，无论是快速衰减还是快速上升给出的寿命成分基本一致，约为 1.2 ps，这表明色氨酸激发态经历了一段约为 1.2 ps 时间的变化过程。

为了更加直观的显示荧光瞬态光谱的变化，通常由不同波长荧光衰减整合推导出荧光的时间分辨发射光谱(time resolved emission spectra, TRES)和衰减相关光谱(decay associated spectra, DAS)。研究表明，许多带有色氨酸残基的多肽和蛋白质的荧光都呈现出与波长相关的多指数衰减形式，并且每个指数项的 DAS 是不同的^[28,30]。从色氨酸荧光的衰减相关光谱看到，1.2 ps 寿命成分的 DAS 呈现出“短波为正、长波为负”的状况，如图 4(b)所示。经计算机模拟研究证实，1.2 ps 寿命成分的动力机制并非内转换(internal conversion, 通常小于 100 fs)，对此最直接的解释就是溶剂弛豫。

事实上，处在激发态上的色氨酸具有特定的偶极矩，其方向通常与激发光偏振方向一致，而大部分溶剂(包括水)也有一定的极性，因此，色氨酸周围的极性分子会朝着激发态偶极矩方向旋转，如图 4(a)所示。水分子旋转或平移运动吸收了色氨酸激发态的部分能量，从而导致了激发态能级整体降低，这个过程就是溶剂弛豫^[26]。溶剂弛豫的时间因溶剂而异，大概在几个到几十个皮秒之间，其结果导致了荧光时间分辨发射光谱随时间的红移以及某一寿命成分 DAS 在长波方向为负值，如图 4(b)所示。

4.2. 蛋白质动力学研究

得益于定点突变技术(site-directed mutagenesis)^[31]，色氨酸等荧光基团已经被广泛用作研究蛋白质等生物大分子结构和功能的荧光探针，极大地拓展了荧光光谱学的应用范畴。利用飞秒频率上转换荧光系统探测蛋白质(带有荧光探针)的时间分辨荧光，可以获取蛋白质不同位点上的环境特征。通过对不同位点或不同状态下的蛋白荧光进行综合比较，可以研究蛋白质的结构和功能。很多实验小组，例如 Zhong、Knutson、Peon 和 Zewail 等，已经在飞秒分辨蛋白质荧光方面取得了成果^[32]。

Knutson 利用飞秒时间分辨频率上转换荧光系统探究了晶状体蛋白(Crystalline)的超快动力学^[33]。他们将单个色氨酸残基(探针)植入 *H_γD*-Crystalline 和 *H_γS*-Crystalline 制成四种突变体: *H_γD*-Trp68、*H_γD*-Trp156、*H_γS*-Trp72 和 *H_γS*-Trp162。通过测量四种突变体 300~100 ps 的上转换时间分辨荧光发现，四者均含有一个大约 50~65 ps 的寿命成分，且该寿命的 DAS 在全波段均为正值，这说明存在一个快速的淬灭机制导致了量子产生的缺陷。后续研究表明这是准静态自淬灭(quasi-static self-quenching, QSSQ)^[34]，晶状体蛋白的准静态自淬灭特性可能与其自我避光保护的功能有关。

一般来说，在蛋白质周围存在两种形式的水分子——自由水和吸附在蛋白表面的结合水。前面我们已经提到色氨酸在水溶液中的荧光光谱产生斯托克斯位移与水分子的旋转和平移运动有关。基于此，Peon 和 Zewail 在莫内林(Monellin)表面植入单个色氨酸残

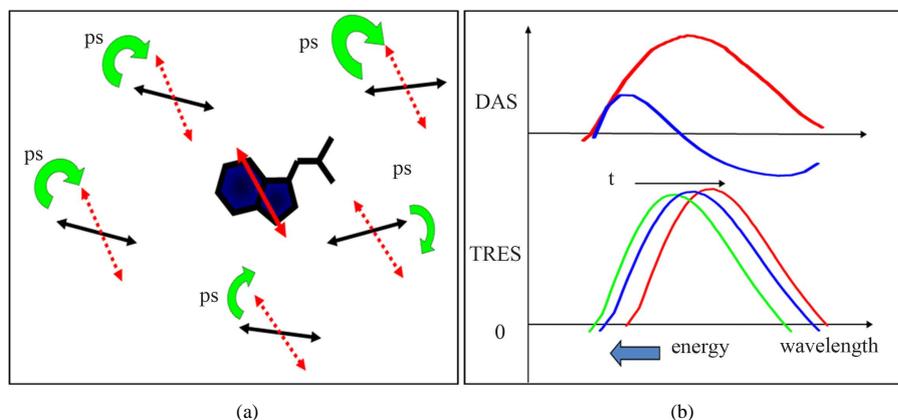


Figure 4. (a) Solvent relaxation of tryptophan in water; (b) DAS and TRES of fluorescence for tryptophan in water
图 4. 色氨酸水溶液的溶剂弛豫示意图; (b)色氨酸水溶液荧光的 DAS 和 TRES 示意图

基作为荧光探针,以飞秒时间分辨频率上转换荧光系统探究了蛋白表面的水合作用动力学^[24]。

实验发现,天然莫内林的荧光寿命有两个成分, $\tau_1 = 1.3 \text{ ps}$ 和 $\tau_2 = 16 \text{ ps}$, 其中 τ_1 为色氨酸在自由水中的溶剂弛豫时间, τ_2 则是色氨酸在莫内林表面结合水层中的溶剂弛豫时间。这间接说明莫内林表面以水合作用形成结合水层。为了作进一步验证,他们将莫内林置于盐酸胍(GndHCl)溶液中使其变性(denature),探测其飞秒时间分辨荧光并与相同的盐酸胍溶液中的色氨酸作对比,发现二者的荧光寿命成分基本一致。这就表明变性的莫内林表面不再具有水合作用,结合水层遭到了破坏。

4.3. DNA 的动力学

DNA 动力学也可以利用频率上转换荧光光谱技术来探测,尤其是在频率上转换的飞秒时间分辨下,精确地获取 DNA 的超快动力学特征将有助于更进一步地研究 DNA 的结构及功能^[35]。Zewail 和 Trantakis 分别研究了 DNA 的一些动力学特点。

Zewail 利用飞秒时间分辨频率上转换荧光系统来研究 2-氨基嘌呤(Aminopurine, AP)与核酸的复合物(一种修饰过的 DNA 基地)的电荷转移(charge transfer)动力学^[36]。AP 是腺嘌呤的同分异构体,具有荧光特性,常常被用作 DNA 动力学及以 DNA 为媒介的电荷转移动力学的荧光探针。在他的实验中,探测了水溶液和一系列缓冲液中的几种 2-氨基嘌呤与单核苷酸的复合物的荧光衰减,包括脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)和脱氧胸苷三磷酸(dTTP)等。实验结果发现,这些复合物的荧光寿命满足双指数形式,并且均含有大约几十个皮秒的寿命成分。进一步研究表明,这几十皮秒的衰减与复合物的电荷转移动力学有关。

Trantakis 和他的研究小组报道了关于荧光染料 Sybr Green I (SG)接合到 DNA 上所形成复合物的飞秒荧光动力学研究^[37],其飞秒时间分辨是利用频率上转换荧光光谱的方法来实现的。在他们的系统中,钛宝石锁模激光器的出射激光波长为 760 nm,脉宽为 80 fs,其中的一部分直接用作上转换的探测光,另一部分的二次谐波 380 nm 用作样品激发光。激发光的偏振方向在整个实验过程中一直处在 54.7 度。他们分别测量了自由态 SG 及其与 DNA 的三种复合物

Table 1. Lifetime components for SG and its complexes with DNA at the wavelength of 520 nm^[37]
表 1. SG 及其与 DNA 复合物荧光在 520 nm 波长的寿命成分^[37]

Sample	τ_1/ps	τ_2/ps	τ_3/ps	τ_4/ps
SG	0.22 ± 0.02	1.3 ± 0.08	-	-
SG/ssDNA	0.30 ± 0.06	3.2 ± 0.3	31 ± 6	460 ± 50
SG/dsDNA	0.6 ± 0.1	10 ± 1	36 ± 7	720 ± 60
SG/tsDNA	1.0 ± 0.3	11 ± 3	33 ± 3	730 ± 30

SG/ssDNA (single-stranded DNA)、SG/dsDNA (double-stranded DNA)和 SG/tsDNA (triple-stranded DNA)的上转换时间分辨荧光。测量结果如表 1 所示,自由态 SG 的荧光有两个超快寿命成分: 0.15~0.4 ps 和 1.3~2.1 ps, 而 SG 与 DNA 的三种复合物均有四个寿命成分。研究者把两个超快衰减归因于染料分子的振动和转动,并认为复合物荧光衰减的变慢与染料的内部运动受到限制有关,因为 DNA 为染料提供了较为严格的环境。

5. 总结及展望

本文总结和回顾了非线性光学频率上转换荧光光谱技术的基本原理、探测系统的关键设计因素及其在生命科学领域中的一些应用。作为一项高时间分辨率的测量技术,非线性光学频率上转换技术日益成熟,受到了广泛的关注。事实上,频率上转换荧光光谱技术的原理并不复杂,但所涉及领域甚广,包括激光技术、非线性光学技术、泵浦探测技术、光谱测量与分析技术以及蛋白质样品制备、定点突变技术等。此外,频率上转换荧光光谱实验系统是庞大而复杂的,只有认真细致地调整和优化系统的各个环节,才能获取良好的探测效果,这往往需要研究者耗费大量的时间和精力。尽管如此,随着人类对物质世界认知的不断深入以及各种技术手段的不断发展成熟,目前已经达到飞秒时间分辨的频率上转换荧光光谱技术为生物、化学、医学等领域的研究提供了有力的技术支持和广阔的发展前景。

6. 致谢

感谢上海市教育委员会及教育发展基金会晨光项目(11CG24),以及中央高校基本科研业务费专项资金对本工作的资助。

参考文献 (References)

- [1] Frauenfelder, H., et al. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, **254**, 1598-1603.
- [2] Yang, J., et al. (2012) Femtosecond conical intersection dynamics of tryptophan in proteins and validation of slowdown of hydration layer dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 16460-16463.
- [3] Kao, Y.T., et al. (2012) Ultrafast dynamics of nonequilibrium electron transfer in photoinduced redox cycle: Solvent mediation and conformation flexibility. *Journal of Physical Chemistry B*, **116**, 9130-9140.
- [4] Kleemann, H., et al. (2012) Organic pin-diodes approaching ultra-high-frequencies. *Organic Electronics*, **13**, 1114-1120.
- [5] Lin, L.L., et al. (2011) Time-correlated single photon counting for simultaneous monitoring of zinc oxide nanoparticles and NAD(P)H in intact and barrier-disrupted volunteer skin. *Pharmaceutical Research*, **28**, 2920-2930.
- [6] Kawaguchi, H. and Ito, Y. (2012) Numerical analysis of sampling streak camera for higher temporal resolution operation. *IEEE Transactions on Magnetics*, **48**, 411-414.
- [7] Smith, R.J. (2010) Imaging of the magnetic field structure in megagauss plasmas by combining pulsed polarimetry with an optical Kerr effect shutter technique. *Review of Scientific Instruments*, **81**, Article ID: 10D530.
- [8] Mahr, H. and Hirsch, M.D. (1975) Optical up-conversion light gate with picoseconds resolution. *Optical Community*, **13**, 96.
- [9] Halliday, L., and Topp, M. (1977). Picosecond luminescence detection using type-2 phasematched frequency-conversion. *Chemical Physics Letters*, **46**, 8.
- [10] Kahlow, M.A., Jarzaba, W., Dubruil, T.P. and Barbara, P.F. (1988) Ultrafast emission spectroscopy in the ultraviolet by time-gated upconversion. *Review of Scientific Instruments*, **59**, 1098.
- [11] Xu, J.H. and Knutson, J.R. (2008) Ultrafast fluorescence spectroscopy via upconversion, applications to biophysics. *Fluorescence Spectroscopy*, **450**, 159-183.
- [12] Rosales, T., et al. (2008) Molecular dynamics simulations of perylene and tetracene librations, Comparison with femtosecond upconversion data. *Journal of Physical Chemistry A*, **112**, 5593-5597.
- [13] Shen, Y.R. (2003) The principles of nonlinear optics.
- [14] Raffael, K., et al. (2008) Time-dependent photoionization of azulene: Optically induced anisotropy on the femtosecond scale. *Chemical Physics Letters*, **460**, 59-63.
- [15] Fisz, J.J. (2007) Another look at magic-angle-detected fluorescence and emission anisotropy decays in fluorescence microscopy. *Journal of Physical Chemistry A*, **111**, 12867-12870.
- [16] Xu, J.H., et al. (2006) Ultrafast fluorescence dynamics of tryptophan in the proteins monellin and IIA(Glc). *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 1214-1221.
- [17] Baek, B., et al. (2010) Single-photon detection timing jitter in a visible light photon counter. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **46**, 991-995.
- [18] Moon, S. and Kim, D.Y. (2008) Analog single-photon counter for high-speed scanning microscopy. *Optics Express*, **16**, 13990-14003.
- [19] Wee, K.R., et al. (2010) New technique for measuring carrier mobility using a modified boxcar integrator. *Review of Scientific Instruments*, **81**, Article ID: 096106.
- [20] Nikitin, A.V., et al. (1998) The effect of pulse pile-up on threshold crossing rates in a system with a known impulse response. *Nuclear Instruments and Methods A*, **411**, 159-71.
- [21] Luchowski, R., et al. (2010) Self-quenching of uranin: Instrument response function for color sensitive photo-detectors. *Journal of Luminescence*, **130**, 2446-2451.
- [22] Fadeev, V.V., et al. (2009) Raman scattering and fluorescence spectra of water from the sea surface microlayer. *Oceanology*, **49**, 205-210.
- [23] Akimoto, S., et al. (2008) Solvent effects on excitation relaxation dynamics of a keto-carotenoid, siphonaxanthin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **7**, 1206-1209.
- [24] Peon, J., et al. (2002) Hydration at the surface of the protein Monellin: Dynamics with femtosecond resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 10964-10969.
- [25] Pal, S.K., et al. (2002) Biological water: Femtosecond dynamics of macromolecular hydration. *Journal of Physical Chemistry B*, **106**, 12376-12395.
- [26] Stevens, J.A., et al. (2012) Ultrafast dynamics of nonequilibrium resonance energy transfer and probing globular protein flexibility of myoglobin. *Journal of Physical Chemistry A*, **116**, 2610-2619.
- [27] Fiebig, T., et al. (2002) Femtosecond charge transfer dynamics of a modified DNA base: 2-aminopurine in complexes with nucleotides. *ChemPhysChem*, **3**, 781-788.
- [28] Beechem, J.M. and Brand, L. (1985) Time-resolved fluorescence of proteins. *Annual Review of Biochemistry*, **54**, 43-71.
- [29] Shen, X.H. and Knutson, J.R. (2001) Subpicosecond fluorescence spectra of tryptophan in water. *Journal of Physical Chemistry B*, **105**, 6260-6265.
- [30] Lakowicz, J.R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy.
- [31] Wojciechowska, A.M. and Sazanov, L.A. (2012) Site-directed mutagenesis of residues involved in proton translocation by Escherichia coli complex I. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1817**, S63-S63.
- [32] Zhang, L.Y., et al. (2007) Mapping hydration dynamics around a protein surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 18461-18466.
- [33] Xu, J., et al. (2009) Femtosecond fluorescence spectra of tryptophan in human gamma-crystallin mutants: Site-dependent ultrafast quenching. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 16751-16757.
- [34] Chen, R.F., et al. (1991) Fluorescence of tryptophan dipeptides: Correlations with the rotamer model. *Biochemistry*, **30**, 5184-5195.
- [35] Zhong, D.P., et al. (2012) Reply to Brettel and Byrdin: On the efficiency of DNA repair by photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E1463-E1463.
- [36] Fiebig, T., et al. (2002) Femtosecond charge transfer dynamics of a modified DNA base: 2-aminopurine in complexes with nucleotides. *ChemPhysChem*, **3**, 781-788.
- [37] Trantakis, I.A., et al. (2010) Ultrafast fluorescence dynamics of Sybr Green I/DNA complexes. *Chemical Physics Letters*, **485**, 187-190.