

双光子技术及其在生物医药分析中的应用

许佳丽^{①②}, 熊祖洪^{①③}, 黄承志^{①④*}

① 发光与实时分析教育部重点实验室(西南大学), 重庆 400715;

② 西南大学化学化工学院, 重庆 400715;

③ 西南大学物理科学与技术学院, 重庆 400715;

④ 西南大学药学院, 重庆 400715

* 联系人, E-mail: chengzhi@swu.edu.cn

2010-10-18 收稿, 2010-12-06 接受

国家自然科学基金重大研究计划(90813019)和中央高校基本科研业务费专项基金(XDJK2009A001)资助

摘要 作为近 20 年来迅速发展的一门新技术, 双光子技术已被广泛应用于三维数据存储材料、医药、军事、生物以及生命科学等领域, 并随学科交叉与融合, 在揭示生命活动基本规律和起源的研究中发挥越来越重要的作用, 为生物医学提供了更多、更为有效的手段. 本文从常用的双光子材料以及双光子激光扫描荧光显微镜成像原理等方面, 结合双光子技术在生物医学研究中的应用, 探讨了这一新兴技术在生物医药分析领域的前景.

关键词

双光子技术
双光子材料
双光子激光扫描荧光显微镜
荧光共振能量转移
双光子超瑞利散射
双色激发荧光显微术
生物医药分析

1 双光子技术

1.1 双光子吸收过程

双光子激发概念是相对于单光子激发而言的. 众所周知, 单光子激发过程是处于基态的荧光分子受到单个高能光子激发而跃迁到较高能级的激发态, 并经过短暂弛豫后返回到基态的过程^[1], 其结果是释放出一个较低能量的光子, 使得荧光分子在光谱图上表现斯托克斯位移. 单光子激发所产生的荧光强度与激发光强度成正比, 是线性过程. 相比之下, 双光子激发则是在强光激发下, 荧光分子从基态向激发态跃迁过程中同时吸收两个较低能量的光子(波长通常位于近红外区). 所吸收的两个光子能量并不要求相同, 但被吸收的时间间隔不能长于 1 fs. 双光子吸收的特征之一是双光子跃迁概率与发射光强度成正比, 而前者和激发光强度平方成正比, 因而发射光强度也和入射光强度平方成正比, 即双光子跃

迁是一个非线性过程.

荧光分子对光子吸收强弱通常用吸收截面来表示, 其大小反映了荧光分子吸收光子的能力^[2]. 一般地, 单光子吸收截面为 $10^{32} \sim 10^{33}$ GM ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s/photon}$), 对光密度要求小, 因而弱激发光也可被吸收; 而双光子的吸收截面一般为 $1 \sim 10^4$ GM^[3], 普通分子发生双光子吸收的概率很小, 而且只有在光束聚焦的焦点处才可能同时吸收两个光子. 所以, 即使是使用大功率激发光, 双光子发射也需要使用特殊的材料才能实现.

1.2 常见的双光子吸收材料

目前常见的双光子材料包括金属纳米粒子(如金纳米棒)、荧光共聚物、量子点、卟啉分子及其衍生物、配位化合物和有机金属化合物, 以及根据人们要求合成的新型有机分子.

(1) 纳米棒双光子材料. 金纳米棒的双光子吸

英文引用格式: Xu J L, Xiong Z H, Huang C Z. Two-photon techniques and their applications in biomedical and pharmaceutical analysis (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2011, 56: 361–369, doi: 10.1360/972010-1263

收截面可达 2000 GM, 其双光子发光信号比单个罗丹明分子强 58 倍^[4]. 由于制备相对简单、成熟, 同时有较好的生物相容性、较小的生物毒性, 且可用于活体细胞和组织的光热治疗, 因而近年来金纳米棒受到广泛关注. Durr 等人^[5]研究深度为 75 μm 的癌细胞组织时, 发现用金纳米棒标记细胞的双光子发光比不标记的强 3 个数量级. 2009 年, Tong 等人^[6]在金纳米棒表面修饰了不同结构的聚乙二醇(PEG), 并将得到的纳米材料结合双光子技术用于小鼠活体成像, 结果显示具有分支结构 PEG 修饰的金纳米棒比用线性结构 PEG 修饰的金纳米棒在体内滞留时间更长, 并发现金纳米棒主要汇聚在肝脏和脾的巨噬细胞中. 2010 年, Zhou 等人^[7]将小鼠的嗜碱性白细胞与金纳米棒共孵育, 在双光子荧光显微镜中能得到比共聚焦显微镜背景噪音低、分辨率高的图像.

(2) 荧光共轭聚合物双光子材料. 荧光共聚物具有高的吸光系数和荧光效率, 是很好的光学新材料^[8,9]. 早在 10 年前, Albota^[10]和 Rumi^[11]等人就将烷基基团作为分子侧链引入共轭聚合物结构中, 有效增大其双光子吸收截面, 证明了有供体- π -受体结构的共轭聚合物作为双光子材料有更明显的优势. 进一步研究表明, 非线性结构荧光共聚物的双光子吸收截面可达 $2.0 \times 10^5 \text{ GM}^{[12]}$. 与无机半导体纳米材料不同, 共轭聚合物的粒径大小不仅不影响其吸收和发射, 反而增大其光学截面^[13,14].

(3) 纳米晶双光子材料. 纳米晶(即量子点)由于其宽激发、窄发射、较大的斯托克斯位移、发光性能稳定和发射波长可调等特点^[15,16], 在理论研究中得到广泛应用. 量子点作为双光子材料有很多其他材料不可替代的优点: ① 双光子吸收截面大, 并且可通过改变粒径大小进行调节. Blanton 等人^[17]发现, 理论计算 CdSe 量子点的双光子吸收截面面积可达 $5.0 \times 10^4 \text{ GM}$, 在实际实验中可达 $4.7 \times 10^4 \text{ GM}$; Larson 等人^[18]通过荧光成像观察老鼠皮下 100 μm 的脉管系统, 发现当 FITC-右旋糖酐的浓度、激发光源强度分别为水溶性量子点的 40 倍和 5 倍条件下, 用 FITC-右旋糖酐复合物的实验只能看到十分模糊的图像, 而使用水溶性量子点却能得到很清晰的成像; 同时, 他们也证明, 即使使用较小功率的激发光源, 水溶性量子点的双光子吸收截面也比荧光素大 3 个数量级. Pu 等人^[19]证明, 随量子点粒径增大, CdSe 和

CdTe 量子点的双光子吸收截面也呈线性增长. ② 量子点的发光性能受水溶性修饰的影响很小. Larson 等人^[18]用两性分子对油溶性量子点的改性几乎不会影响其发光性能, 且改性后的水溶性量子点能在 9 个月甚至更长的时间内保持稳定. ③ 体积很小, 可方便用于血管造影术^[20]; 而比表面积大, 可较好地与靶物分子进行结合, 用于检测^[21]. 不过, 量子点的单颗粒光眨眼现象、生物毒性大等不可忽视的问题^[22], 在很大程度上限制了它们在活体细胞和组织成像方面的应用. 随着这两方面问题的解决^[23-30], 相信量子点双光子材料有很好的应用前景.

(4) 卟啉双光子材料. 单纯的卟啉分子就具有双光子吸收的性质, 但因其单体带有 18 个 π 电子的芳香性使其双光子吸收截面面积较小($<100 \text{ GM}$)^[31], 应用受限. 但对卟啉进行修饰或使用其聚集体^[32,33], 不仅双光子吸收截面较大, 并且在普通有机溶剂中的溶解度也得到提高. Drobizhev 等人^[32]在卟啉分子上连接了多个吸电子基团, 增大了卟啉分子的双光子吸收截面. Ray 等人^[34]证明, 发生 J-型聚集的锌离子卟啉相对于其单体有更大的双光子吸收截面, 而金属离子能促使卟啉分子间的自组装, 使聚集体的双光子吸收截面增大^[35,36]. 实验证明, 通过扩大卟啉的 π -电子共轭大环, 可将双光子吸收截面增大至 $1.0 \times 10^4 \text{ GM}^{[37]}$. Raymond 等人^[38]用苄基的衍生物连接锌卟啉得到二聚体, 通过自聚集形成高分子单体, 再经闭环转换反应得到双光子吸收截面达 $1.0 \times 10^6 \text{ GM}$ 的卟啉高分子大环. 而改变卟啉分子的中心金属离子、配体也能增大其双光子吸收截面.

(5) 新型双光子有机分子材料. 虽然有机分子具有合成步骤繁琐、条件苛刻、产率较低等缺点, 作为双光子材料还有抗光伤差、保存时间短等问题, 但也有其他材料无法比拟的优越性^[39]: ① 有机材料是电子极化, 响应时间短; ② 具有可剪裁性, 可根据具体实验要求选择不同的反应对分子加以修饰^[40], 使分子的双光子吸收截面、最大吸收波长等性质与实验要求达到最好匹配; ③ 所处环境的改变可使激光波长在较大范围内的调节得以实现; ④ 可与高分子材料进行掺杂, 做成薄膜、凝胶等其他形式, 以克服溶液状态在实际应用中的不便; ⑤ 利用合适的有机反应将双光子材料与功能性材料进行链接, 既能改善功能性材料的应用条件、保留其应用功能, 还可

以显著扩大双光子吸收化合物的应用范围. 2010 年, Wang 等人^[41]以苋和聚乙二醇(PEG)分子为本体, 合成了一种水溶性双光子荧光探针, 可高度定位于溶酶体, 实现了细胞中的溶酶体成像.

1.3 上转换发光

上转换发光(up-conversion lasing, UCL)是基于稀土元素 4f 电子间的跃迁. 由于外层电子对 4f 电子的屏蔽作用, 原子核对 4f 电子态之间的跃迁影响很小, 因此, 稀土元素的亚稳态能级就会吸收多个长波长的低能光子, 经多个光子加合后发射出较高能级的短波长光子, 从而表现出长波长激发短波长发射的情况^[42,43]. 产生上转换荧光有激发态吸收(excited state absorption, ESA)、能量转移(energy transfer, ET)、光子雪崩(photon avalanche, PA)和多光子同时吸收(multi-photon absorption, MPA)等机理^[43,44]. 同时, 当稀土离子间的距离或晶体结构发生变化时, 其发生上转换的机理也可能发生变化^[45~47]; 另外, 根据能量转移方式又分为连续能量转移(successive energy transfer, SET)、交叉弛豫(cross relaxation, CR)和协同上转换(cooperative up-conversion, CU)等三种形式^[43], 所以双光子吸收是荧光上转换中的一种, 但二者还有区别. 它们最大的不同在于激发方式, 荧光上转换发光是连续的, 其激发光可以是连续光, 也可以是脉冲光; 而双光子激发要求分子同时吸收两个光子, 所以其激发光必须是脉冲光, 而且荧光上转换需要的激发光源能量大于双光子激发的光源能量; 另外, 相比于双光子吸收材料, 荧光上转换材料还有一定的缺陷: (1) 当与生物大分子发生作用时, 会发生非特异性结合和吸附作用; (2) 需对上转换材料分子表面进行修饰, 以保证上转换材料-生物大分子共轭体的稳定性; (3) 若体系中有荧光能量转移过程, 还可能发生分子对转移能量的重吸收^[48~50]. 稀土元素的荧光性质具有峰型尖锐、斯托克斯位移大、对氧不敏感以及荧光寿命长等特点, 常被用来进行有机金属化合物等方面的研究^[51].

1.4 双光子激光扫描荧光显微镜

双光子激光扫描荧光显微镜依靠高数值孔径的物镜将超快脉冲激光的光子聚焦, 使焦点处产生足

够的光密度达到产生双光子吸收的密度条件^[52], 所以无需光学滤波器(共焦针孔)就将光化学过程局限在焦点附近极小的区域, 缩小光漂白的范围^[53,54], 避免组织自发荧光的干扰^[55]. 由于荧光波长小于激发光波长, 因而瑞利散射产生的背景噪声只有单光子激发时的 1/16, 大大降低了散射干扰, 得到空间分辨率高、对比度强、荧光效率高^[56]的成像图片. 使用可见或近红外光为激发光源, 对活体细胞、组织的光损伤小且穿透能力强^[54,56], 成像深度可达 1000 μm ^[57], 约为共焦成像的 20 倍^[58]. 根据许多染料荧光探针的多光子激发光谱要比单光子激发光谱宽的特点^[3], 还可利用单一波长激发光同时激发多种染料得到同一生命现象中的不同信息, 适合多标记复合测量^[56]; 还可利用双光子跃迁的高选择激发性, 实现对生物组织中特殊物质的成像研究. 另外, 由于激发光与发射荧光的波长差值加大以及自发的三维滤波效果, 用可见光的光学元件就可获得紫外光区的衍射分辨率, 而且光路收集系统的要求比共聚焦显微镜低得多^[56].

当然, 双光子激光扫描荧光显微镜也存在一定的局限: (1) 无法实现暗场成像; (2) 激发时极高的光子密度使焦点处产生更快的光漂白现象^[53,56]; (3) 用红外和近红外区光激发, 可能会导致样品的热损伤^[7]; (4) 受昂贵的超快脉冲激光器的限制, 成本较高^[56]. 这些缺点都在一定程度上限制了双光子技术在物理、化学、生物以及医学等领域的应用.

2 双光子荧光共振能量转移技术

Förest 荧光共振能量转移(FRET)技术已获得广泛应用. 由于双光子技术多数采用近红外、红外波段的光源作为激发光源, 能有效避免组织自发荧光干扰, 获得较强的样品荧光. 所以, 在 FRET 研究中, 人们引入双光子技术, 建立了双光子荧光共振能量转移技术(two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer, TPE-FRET). 2007 年, Kim 等人^[59]将奈尔红(Nile red)与合成的绿色荧光物质 BDSAO 同时包入有机修饰的硅纳米颗粒中, 并与 HeLa 细胞共孵育 1 h 后, 用 800 nm 的光对细胞中的 BDSAO 进行双光子激发, 通过颗粒内部的能量转移机制激发奈尔红发光, 能观察到奈尔红明亮的红色荧光, 而供体分子 BDSAO 的绿色荧光很弱. 在后续研究中, 他

们使用 543 nm 激光反复扫描以达到对能量受体奈尔红进行光漂白的目的(BDSAO 对该波长的光吸收很少, 所以荧光强度不会受到影响, 且进行光漂白的实验条件对细胞活性的毒性很小), 发现在奈尔红发生光裂解过程中, 供体分子 BDSAO 的绿色荧光逐渐增强. 随后, Liu 等人^[60]将亲和素修饰、可用双光子激发的荧光分子 DMAHAS 和生物素修饰荧光猝灭剂 DABS-Cl(biotin-D)连接起来, 经 FRET 过程猝灭 DMAHAS 的荧光, 当加入单独的亲和素后, biotin-D 与游离的亲和素结合, 与 DMAHAS 分离, 荧光恢复, 达到检测亲和素的目的. 同年, 该课题组^[48]在牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)分子上分别连接上可用双光子激发、发射位于 540 nm 的荧光有机小分子和荧光猝灭基团, 当向体系中加入 BSA 的抗体之后, 发生抗原-抗体分子间的特异性识别作用. 此时, 在同一个抗体分子上的荧光有机小分子和荧光猝灭基团之间的距离被抗原-抗体分子的桥连作用拉近, 利于荧光能量转移的发生, 即使用 800 nm 双光子激发也无法观察到荧光, 从而达到检测 BSA 抗体的目的. 作者进一步对比了单光子激发和双光子激发时的体系背景荧光, 发现当抗体浓度较大时(10 nmol/L), 单光子激发光谱图中会出现 540 nm 的背景荧光峰, 且随着抗体浓度增大, 该处的背景荧光信号呈线性增强, 影响抗体检测的灵敏度; 而相比之下, 采用 800 nm 的近红外光源进行双光子激发就不会有背景荧光随着抗体浓度增大而增强的干扰, 大大地提高了检测的灵敏度(0.05 nmol/L). 2010 年, 该课题组^[61]结合上述两种思路, 在链霉亲和素上修饰荧光分子 TP-COOH, 在两段部分互补的 DNA 上分别修饰生物素和荧光猝灭剂, 由于链霉亲和素和生物素的特异性作用, 拉近 TP-COOH 与猝灭剂的距离, 荧光猝灭; 而当加入可与生物素修饰的 DNA 完全互补的靶 DNA 后, 荧光猝灭剂被竞争下来脱离链霉亲和素-荧光分子偶连体, TP-COOH 荧光恢复, 实现高灵敏检测 DNA 的目的, 同时由于是利用荧光分子上的羧基来结合蛋白, 避免了前一个实验使用戊二醛可能会造成蛋白自身聚集的弊端. 2007 年, Clapp 等人^[62]用麦芽糖绑定的蛋白将量子点与 Cy3 进行偶联后, 偶联物中量子点的荧光寿命比偶联前缩短, 而 Cy3 的荧光寿命得以延长, 而这种情况无论是否采用双光子激发都是一致的. 另外, Dichtel 等

人^[63]在卟啉分子上共价连上 8 个大的双光子吸收截面的荧光能量供体, 当这些供体分子在强光照射下经双光子激发跃迁到激发态之后, 将能量经荧光共振能量转移传递给中心, 能高效产生单线态氧的卟啉分子, 为设计高效单线态氧双光子敏化剂分子提供了新思路. 值得一提的是, 双光子材料与能量转移结合所产生的单线态氧可用于光动力学进行疾病的治疗^[64].

3 双光子超瑞利散射技术

当电子与一个光子相互作用后, 电子受到反冲, 同时散射出两个光子的现象叫双光子散射(two-photon scattering, TPS)^[65]. 当分子受到高强度光照射时, 能够在散射光中检测到以入射光频率为基频的高次谐波光子(散射光的频率正好是入射光的两倍), 即超瑞利散射(hyper-Rayleigh scattering, HRS)^[66~68]. 这是溶液或气体分子中的非相干二次或高次非线性散射, 产生原因是介质中分子的浓度涨落、取向涨落或热涨落等因素改变了分子局部环境的宏观对称性和谐波的相干性而引起散射现象^[69]. 单光子散射或瑞利散射的强度与物质分子的浓度、入射光的强度呈线性关系, 并且与二次线性的极化率有关; 而双光子散射或超瑞利散射是由分子的转动能级引起的对称振动产生, 由二次谐波引起. 在近期双光子瑞利散射研究中, 常使用金纳米材料作为散射媒介. Ray 课题组^[70~72]使用二盐酸脒胺通过金硫键在金纳米颗粒或金纳米棒表面连上氨基, 然后将细菌或蛋白质的抗体连在金纳米材料表面. 当介质中存在待检测物质时, 由于抗原-抗体之间的特异性作用使得金纳米材料在这些物质表面聚集, 采用双光子激发时, 得到很强的超瑞利散射信号. 也正是因为这种特异性作用, 其他共存物几乎不会造成任何干扰, 从而达到了快速、高灵敏度、高选择性检测细菌或者蛋白的目的.

4 双色双光子技术

正如前述, 荧光分子从基态向激发态跃迁时两个光子可以是相同波长的, 也可以是不同波长的. 因此, 如果使用的是单激发光源, 所吸收的两个光子是具有相同波长的就称为双光子激发荧光显微术; 如果两个光子具有不同波长, 则称为双色激发荧光

显微术(two-color two-photon, 2C2P).

早在 20 世纪 60 和 70 年代, 人们就使用两种不同波长的激光进行双光子吸收实验^[73-76]. 不过, 当时把脉冲红宝石激光器或钕离子激光器和一个同步弧光灯作为光源, 其研究目的是探讨物质内部电子状态的对称性. 在 1971 年, McClain^[77]对双色双光子吸收进行了理论研究. 到 1996 年, Lakowicz 等人^[78]将 375 和 750 nm 的脉冲光进行交迭, 研究了环己胺中的对-三联苯的荧光光谱. 实验证明, 如果仅仅使用 750 或 375 nm 的脉冲光作为激发光源, 几乎观察不到对-三联苯在 340 nm 的荧光, 而同时使用这两种波长的光源进行双色双光子激发, 则可以明显地看到 340 nm 的荧光, 其强度是两种波长光分别激发时的 1000 倍(以 750 nm 波长激发)和 100 倍(以 375 nm 波长激发). 由此可知, 双色激发荧光显微术是在双光子激发荧光显微术基础上发展起来的一门新技术. 由于双光子激发光源常为锁模式超短脉冲钛-蓝宝石激光器(mode-locked femto-second Ti: sapphire laser), 其激发波长为 700~1000 nm, 采用双光子激发荧光显微术时, 有效的激发波长就局限在 350~500 nm. 然而, 使用双色激发荧光显微术就可以将激发波长扩展到 230~330 nm^[79]. 为了减少活体细胞和组织对短波长的光散射较强的影响, 双色激发荧光显微术在操作过程中调节两种光源的功率, 使较长波长的光源功率较大、短波长光源功率较小. 例如, 可固定激发波长为 800 nm 的光源功率为 15 mW, 400 nm 光源功率为 0.4 mW.

双色激发荧光显微术具有显著的优点, 表现在: ① 两种不同波长的光交迭导致信号空间区域化, 可与背景形成对比; ② 因为荧光强度与入射光强度的平方成正比, 所以两束光单独激发的信号不可能超出原来的四倍, 但两束光同时激发却可以使信号增强 1000 倍^[78-80], 即小目标物经过较大散射媒质后更容易观察; ③ 与双光子激发比较, 双色激发在焦点内荧光散射增加, 而干扰背景荧光只有很小增加.

双色激发荧光显微术自产生就引起了生物医药界的巨大兴趣. 在以往的工作中, 为了采用荧光法研究活体细胞或组织中的生命现象必须引入一些荧光物质, 不仅成本高昂、操作繁琐, 需要付出大量的人力物力, 而且这些荧光物质的介入很可能会对活体细胞和组织的活性、新陈代谢甚至生长造成负面

影响. 由于双色激发荧光显微术将激发波长扩展到了 230~330 nm, 正好将色氨酸的吸收波长包括在内, 它是人体必需的 20 种氨基酸中蛋白质荧光的最主要来源^[81]. 同时, 由于色氨酸的荧光寿命不仅与其所处环境有很大关系, 而且对化学变化或蛋白质的构象变化十分敏感^[82], 如果将色氨酸和双色激发荧光显微术结合起来, 就可以利用它和双色激发荧光显微术在免标记的情况下研究氨基酸或者蛋白质的反应以及蛋白质的构象变化^[83,84]. 2009 年, Quentmeier 等人^[79]研究 MIN6 细胞核内和细胞质中的色氨酸, 发现细胞质中的色氨酸荧光寿命长于细胞核内的色氨酸; 他们进一步以色氨酸为媒介, 研究了枯草杆菌蛋白酶水解 BSA 时蛋白构象的变化^[85], 为蛋白质研究提供了很好的借鉴. 这二者的结合也无疑为生物医学的研究开辟了一个新的途径. 例如, 不加入其他荧光物质, 利用生物细胞中广泛存在的色氨酸作为荧光显色物质, 就可以在完全不干扰细胞生存介质的前提下探索生命的奥妙.

5 结论

虽然双光子技术的系统研究只有 20 年的历史, 但其应用范围却在不断扩大, 在生物医学研究中, 双光子技术所使用的激发波长避开了会对生命体系造成光损伤的紫外光, 而采用生物光学窗口(600~900 nm)范围内的光波段. 同时, 生物组织和细胞对这一波段光线的吸收与瑞利散射均相对较小, 从而使得它在生命科学研究领域有着无可比拟的优越性, 成为获取生物结构与化学资讯方面极为有力的技术, 促进了生命、医学以及自然科学等学科快速发展, 若再通过光学科技与材料科学的进步与改良, 双光子技术在生物医学、生化分析等学科方面的运用将得到更好的发展.

由于双光子技术有前述如此多的优点, 人们自然会联想到多光子技术(multi-photon absorption technique, MPA), 期待在生物医学领域中发挥得更充分、甚至克服双光子的一些缺陷. 但是, 在一味追求高分辨率、更深的穿透能力等方面优势的同时, 也需要考虑其带来的负面影响. 例如, 多光子技术的发展首先要以多光子材料的发展为基础, 但是就目前双光子材料研究状况来看, 要求更大吸收截面的多光子材料可能会受到相对更多的限制. 同时, 在

激发过程中,并不一定是越长的激发波长越好,虽然相比紫外光和可见光,红外或近红外波段的光线在活体细胞和生物组织中有更强的穿透能力。但是,若使用多光子激发技术,就需要使用波长更长的光

线,然而这些波段将水的振动吸收和黑色素的吸收包括其中,反而会对成像效果造成负面影响,所以,深层次成像选用的激发波长还是在 700~1200 nm 较为适宜^[86,87]。

参考文献

- 1 许金钩,王尊本. 荧光分析法. 第3版. 北京: 科学出版社, 2006
- 2 苏燕. 分子双光子特性的理论研究. 硕士学位论文. 济南: 山东师范大学, 2003. 52
- 3 Xu C, Zipfel W, Shear J B, et al. Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10763–10768
- 4 Wang H, Huff T B, Zweifel D A, et al. *In vitro* and *in vivo* two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 15752–15756
- 5 Durr N J, Larson T, Smith D K, et al. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Lett*, 2007, 7: 941–945
- 6 Tong L, He W, Zhang Y, et al. Visualizing systemic clearance and cellular level biodistribution of gold nanorods by intrinsic two-photon luminescence. *Langmuir*, 2009, 25: 12454–12459
- 7 Zhou Y, Wu X, Wang T, et al. A comparison study of detecting gold nanorods in living cells with confocal reflectance microscopy and two-photon fluorescence microscopy. *J Microsc*, 2010, 237: 200–207
- 8 Yu G, Gao J, Hummelen J C, et al. Polymer photovoltaic cells: Enhanced efficiencies via a network of internal donor-acceptor heterojunctions. *Science*, 1995, 270: 1789–1791
- 9 Friend R H, Gymer R W, Holmes A B, et al. Electroluminescence in conjugated polymers. *Nature*, 1999, 397: 121–128
- 10 Albota M, Beljonne D, Brédas J L, et al. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*, 1998, 281: 1653–1656
- 11 Rumi M, Ehrlich J E, Heikal A A, et al. Structure-property relationships for two-photon absorbing chromophores: Bis-donor diphenylpolyene and bis(styryl)benzene derivatives. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 9500–9510
- 12 Wu C, Szymanski C, Cain Z, et al. Conjugated polymer dots for multiphoton fluorescence imaging. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 12904–12905
- 13 Wu C, Szymanski C, McNeill J. Preparation and encapsulation of highly fluorescent conjugated polymer nanoparticles. *Langmuir*, 2006, 22: 2956–2960
- 14 Wu C, Peng H, Jiang Y, et al. Energy transfer mediated fluorescence from blended conjugated polymer nanoparticles. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 14148–14154
- 15 Fulton T A, Dolan G J. Observation of single-electron charging effects in small tunnel junctions. *Phys Rev Lett*, 1987, 59: 109
- 16 宋国利, 杨幼桐, 孙凯霞, 等. 量子点的电子结构及量子效应. 黑龙江大学自然科学学报, 2002, 19: 80–83
- 17 Blanton S A, Dehestani A, Lin P C, et al. Photoluminescence of single semiconductor nanocrystallites by two-photon excitation microscopy. *Chem Phys Lett*, 1994, 229: 317–322
- 18 Larson D R, Zipfel W R, Williams R M, et al. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*. *Science*, 2003, 300: 1434–1436
- 19 Pu S C, Yang M J, Hsu C C, et al. The empirical correlation between size and two-photon absorption cross section of CdSe and CdTe quantum dots. *Small*, 2006, 2: 1308–1313
- 20 Yoder E J, Kleinfeld D. Cortical imaging through the intact mouse skull using two-photon excitation laser scanning microscopy. *Microsc Res Techniq*, 2002, 56: 304–305
- 21 Nasongkla N, Bey E, Ren J, et al. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett*, 2006, 6: 2427–2430
- 22 Yao J, Larson D R, Vishwasrao H D, et al. Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14284–14289
- 23 Wang X, Ren X, Kahen K, et al. Non-blinking semiconductor nanocrystals. *Nature*, 2009, 459: 686–689
- 24 Hoshino A, Fujioka K, Oku T, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett*, 2004, 4: 2163–2169

- 25 Guo G N, Liu W, Liang J G, et al. Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification. *Mater Lett*, 2007, 61: 1641–1644
- 26 Selvan S T, Tan T T, Ying J Y. Robust, non-cytotoxic, silica-coated CdSe quantum dots with efficient photoluminescence. *Adv Mater*, 2005, 17: 1620–1625
- 27 Fu T, Qin H Y, Hu H J, et al. Aqueous synthesis and fluorescence-imaging application of CdTe/ZnSe core/shell quantum dots with high stability and low cytotoxicity. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10: 1741–1746
- 28 Chang S Q, Dai Y D, Kang B, et al. Gamma-radiation synthesis of silk fibroin coated CdSe quantum dots and their biocompatibility and photostability in living cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9: 5693–5700
- 29 Spinicelli P, Mahler B, Buil S, et al. Non-blinking semiconductor colloidal quantum dots for biology, optoelectronics and quantum optics. *Chemphyschem*, 2009, 10: 879–882
- 30 Tu C, Ma X, Pantazis P, et al. Paramagnetic, silicon quantum dots for magnetic resonance and two-photon imaging of macrophages. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 2016–2023
- 31 Aratani N, Kim D, Osuka A. π -conjugation enlargement toward the creation of multi-porphyrinic systems with large two-photon absorption properties. *Chem-Asian J*, 2009, 4: 1172–1182
- 32 Drobizhev M, Karotki A, Kruk M, et al. Drastic enhancement of two-photon absorption in porphyrins associated with symmetrical electron-accepting substitution. *Chem Phys Lett*, 2002, 361: 504–512
- 33 Karotki A, Drobizhev M, Kruk M, et al. Enhancement of two-photon absorption in tetrapyrrolic compounds. *J Opt Soc Am B*, 2003, 20: 321–332
- 34 Ray P C, Sainudeen Z. Very large infrared two-photon absorption cross section of asymmetric zinc porphyrin aggregates: Role of intermolecular interaction and donor-acceptor strengths. *J Phys Chem A*, 2006, 110: 12342–12347
- 35 Kim K S, Lim J M, Osuka A, et al. Various strategies for highly-efficient two-photon absorption in porphyrin arrays. *J Photoch Photobio C*, 2008, 9: 13–28
- 36 Senge M O, Fazekas M, Notaras E G A, et al. Nonlinear optical properties of porphyrins. *Adv Mater*, 2007, 19: 2737–2774
- 37 Lim J M, Yoon Z S, Shin J Y, et al. The photophysical properties of expanded porphyrins: Relationships between aromaticity, molecular geometry and non-linear optical properties. *Chem Commun*, 2008, 261–273
- 38 Raymond J E, Bhaskar A, Goodson T, et al. Synthesis and two-photon absorption enhancement of porphyrin macrocycles. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 17212–17213
- 39 张献. 新型双光子材料的设计、合成、表征及在光聚合和生物荧光探针中的应用. 博士学位论文. 济南: 山东大学, 2006. 162
- 40 Terenziani F, Parthasarathy V, Pla-Quintana A, et al. Cooperative two-photon absorption enhancement by through-space interactions in multichromophoric compounds. *Angew Chem*, 2009, 121: 8847–8850
- 41 Wang X, Nguyen D M, Yanez C O, et al. High-fidelity hydrophilic probe for two-photon fluorescence lysosomal imaging. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 12237–12239
- 42 Wang W, Qu W, Yang K, et al. Up-conversion properties of oxy-fluoride glasses co-doped with Ho^{3+} and Yb^{3+} . *J Rare Earth*, 2006, 24: 187–190
- 43 沈毅, 王少艳. 上转换发光材料研究进展与应用. *河北理工大学学报(自然科学版)*, 2009, 31: 76–79
- 44 陈晓波, 宋增福. $\text{Pr}(\text{O.5})\text{Yb}(3):\text{ZBLAN}$ 双频激发上转换的研究. *中国科学 G 辑: 物理学 力学 天文学*, 2006, 36: 164–171
- 45 Dong B, Sun M, Feng Z Q, et al. Effects of Yb^{3+} codoping on visible and near infrared emissions of $\text{Er}^{3+}\text{-Yb}^{3+}$ codoped Al_2O_3 powders by the sol-gel method. *Chinese Sci Bull*, 2008, 53: 1967–1971
- 46 韩建儒, 周广勇, 张树君, 等. Ba_2ErCl_7 晶体的生长、结构和激光上转换机制. *科学通报*, 1999, 44: 2268–2272
- 47 Dong B, Gao Y C, Xu X S, et al. Near-infrared to visible up-conversion emissions of Er^{3+} doped Al_2O_3 powders derived from the sol-gel method. *Chinese Sci Bull*, 2007, 52: 2626–2629
- 48 Liu L, Shao M, Dong X, et al. Homogeneous immunoassay based on two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer. *Anal Chem*, 2008, 80: 7735–7741
- 49 Kuningas K, Ukonaho T, Pakkila H, et al. Upconversion fluorescence resonance energy transfer in a homogeneous immunoassay for estradiol. *Anal Chem*, 2006, 78: 4690–4696
- 50 Heer S, Kompe K, Gudel H, et al. Highly efficient multicolour upconversion emission in transparent colloids of lanthanide-doped NaYF_4 nanocrystals. *Adv Mater*, 2004, 16: 2102–2105
- 51 Picot A, D'Aleo A, Baldeck P L, et al. Long-lived two-photon excited luminescence of water-soluble europium complex: Applications in biological imaging using two-photon scanning microscopy. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 1532–1533
- 52 唐志列, 杨初平, 裴红津, 等. 双光子共焦电子显微镜的三维成像理论及其分辨率的改善. *中国科学 A 辑*, 2002, 32: 538–548

- 53 Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, 248: 73–76
- 54 Zhou W, Liu X L, Lu X H, et al. Monitor and control of neuronal activities with femtosecond pulse laser. *Chinese Sci Bull*, 2008, 53: 687–694
- 55 Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotech*, 2003, 21: 1369–1377
- 56 王盛满. 双光子荧光显微镜的研究. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2006. 64
- 57 Theer P, Hasan M T, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ regenerative amplifier. *Opt Lett*, 2003, 28: 1022–1024
- 58 Cahalan M D, Parker I, Wei S H, et al. Two-photon tissue imaging: Seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 872–880
- 59 Kim S, Huang H, Pudavar H E, et al. Intraparticle energy transfer and fluorescence photoconversion in nanoparticles: An optical highlighter nanoprobe for two-photon bioimaging. *Chem Mater*, 2007, 19: 5650–5656
- 60 Liu L, Wei G, Liu Z, et al. Two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer with small organic molecule as energy donor for bioassay. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 574–579
- 61 Liu L, Dong X, Lian W, et al. Homogeneous competitive hybridization assay based on two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer. *Anal Chem*, 2010, 82: 1381–1388
- 62 Clapp A, Pons T, Medintz I, et al. Two-photon excitation of quantum-dot-based fluorescence resonance energy transfer and its applications. *Adv Mater*, 2007, 19: 1921–1926
- 63 Dichtel W R, Serin J M, Edder C, et al. Singlet oxygen generation via two-photon excited FRET. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 5380–5381
- 64 Bhawalkar J D, Kumar N D, Zhao C F, et al. Two-photon photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*, 1997, 15: 201–204
- 65 罗光, 周上祺, 肖广渝, 等. 二次康普顿散射和产生双光子的康普顿散射. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 21: 1–4
- 66 汪听, 崔一平. 研究分子非线性光学特性的新技术——超瑞利散射技术. *中国激光*, 1999, 26: 15–20
- 67 张宇, 汪听, 付德刚, 等. 纳米离子的超瑞利散射研究. 第一届全国纳米技术与应用学术会议论文集, 2000. 294–297
- 68 张宇, 汪听, 马明, 等. 无机纳米粒子的二阶光学非线性研究进展. *无机化学学报*, 2002, 18: 1177–1184
- 69 孟维伟, 刘忠芳, 刘绍璞, 等. 钡(II)-盐酸吗啡肟螯合物与卤代荧光素染料相互作用的超瑞利散射光谱及其分析应用研究. *西南大学学报(自然科学版)*, 2009, 31: 49–53
- 70 Lu W, Arumugam S R, Senapati D, et al. Multifunctional oval-shaped gold-nanoparticle-based selective detection of breast cancer cells using simple colorimetric and highly sensitive two-photon scattering assay. *ACS Nano*, 2010, 4: 1739–1749
- 71 Neely A, Perry C, Varisli B, et al. Ultrasensitive and highly selective detection of Alzheimer's disease biomarker using two-photon rayleigh scattering properties of gold nanoparticle. *ACS Nano*, 2009, 3: 2834–2840
- 72 Singh A K, Senapati D, Wang S, et al. Gold nanorod based selective identification of escherichia coli bacteria using two-photon rayleigh scattering spectroscopy. *ACS Nano*, 2009, 3: 1906–1912
- 73 Dowley M W, Eisenthal K B, Peticolas W L. Two-photon laser excitation of polycyclic aromatic molecules. *J Phys Chem*, 1967, 47: 1609–1619
- 74 Monson P R, McClain W M. Polarization dependence of the two-photon absorption of tumbling molecules with application to liquid 1-chloronaphthalene and benzene. *J Phys Chem*, 1970, 53: 29–37
- 75 Monson P R, McClain W M. Complete polarization study of the two-photon absorption of liquid 1-chloronaphthalene. *J Phys Chem*, 1972, 56: 4817–4825
- 76 Frölich D, Mahr H. Two-photon spectroscopy in anthracene. *Phys Rev Lett*, 1966, 16: 895
- 77 McClain W M. Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids. *J Phys Chem*, 1971, 55: 2789–2796
- 78 Lakowicz J R, Gryczynski I, Malak H, et al. Two-color two-photon excitation of fluorescence. *Photochem Photobiol*, 1996, 64: 632–635
- 79 Quentmeier S, Denicke S, Gericke K H. Two-color two-photon fluorescence laser scanning microscopy. *J Fluoresc*, 2009, 19: 1037–1043
- 80 Quentmeier S, Denicke S, Ehlers J E, et al. Two-color two-photon excitation using femtosecond laser pulses. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 5768–5773
- 81 Hames B D, Hooper N M. *Biochemistry*. 北京: 科学出版社, 2003
- 82 Joshi N V, Joshi V O D, Contreras S, et al. Fluorescence lifetime measurements of native and glycated human serum albumin and bovine serum albumin. *Proc SPIE*, 1999, 3602: 124–131
- 83 Yves E. The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins. *Spectrochim Acta A*, 2001, 57: 2255–2270
- 84 Kurzban G P, Gitlin G, Bayer E A, et al. Biotin binding changes the conformation and decreases tryptophan accessibility of streptavidin. *J Protein Chem*, 1990, 9: 673–682

- 85 Quentmeier S, Quentmeier C C, Walla P J, et al. Two-color two-photon excitation of intrinsic protein fluorescence: Label-free observation of proteolytic digestion of bovine serum albumin. *ChemPhysChem*, 2009, 10: 1607–1613
- 86 Kim S, Lim Y T, Soltész E G, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 93–97
- 87 Sevick-Muraca E M, Houston J P, Gurfinkel M. Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents. *Curr Opin Chem Bio*, 2002, 6: 642–650

Two-photon techniques and their applications in biomedical and pharmaceutical analysis

XU JiaLi^{1,2}, XIONG ZuHong^{1,3} & HUANG ChengZhi^{1,4}

¹ Education Ministry Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, Southwest University, Chongqing 400715, China;

² College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;

³ School of Physical Science and Technology & School of Electronics and Information Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;

⁴ College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Two-photon techniques, which have undergone rapid development during the last two decades, have attracted a great deal of attention from scientists and researchers in many fields. This has led to a wide range of applications in three-dimensional data storage, medicine, defense, biology, and life sciences. At the same time, there has been increased integration and cooperation among various disciplines. Two-photon techniques have increasingly important roles in revealing the basic principles and origins of life activities, and provide a much more effective means for developing biological and medical imaging. Combining the history of the two-photon technique with its applications in the life sciences, this mini-review provides a simple introduction to these emerging technologies. It focuses on the development of two-photon techniques, two-photon materials used in scientific research and their applications in optical and medical research, and the imaging principles of the two-photon laser scanning fluorescent microscope.

two-photon technique, two-photon materials, two-photon laser scanning fluorescence microscope, fluorescence resonance energy transfer, two-photon hyper-Rayleigh scattering, two-color two-photon, biomedical analysis

doi: 10.1360/972010-1263