

单分子的荧光特性及其在生物学上的应用*

周拥军¹ 陈德强¹ 夏安东^{1,2,1)} 黄文浩^{1,2}

(1 中国科学技术大学精密机械与精密仪器系 合肥 230026)

(2 中国科学技术大学理化中心选键化学实验室 合肥 230026)

摘要 近年来,单分子探测在许多学科领域的研究取得了显著的进展.它为科学家提供了一种新的手段来研究这些领域的前沿课题.光学和光谱技术是单分子探测最常用的方法之一.单个分子的荧光强度的涨落及其荧光的偏振特性是单分子荧光的重要特征.在单分子探测的广泛应用中,人们正是利用这种单个分子的重要特征来研究和推测生物大分子的结构和功能.文章简要介绍了单分子的荧光特点、探测方法及其在生物学中的应用.

关键词 单分子探测,单分子对荧光共振能量转移,单分子荧光偏振

**FLUORESCENCE PROPERTIES OF SINGLE MOLECULES AND
THEIR APPLICATIONS IN THE LIFE SCIENCES**

ZHOU Yong-Jun¹ CHEN De-Qiang¹ XIA An-Dong^{1,2} HUANG Wen-Hao^{1,2}

(1 Department of Precision Machinery and Instrumentation, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

(2 Laboratory for Bond Selective Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Recently, single molecule detection has made great progress in many science areas. This is a useful method for advanced research on many frontiers, with optical spectroscopy being one of the most powerful methods. The fluctuation of fluorescence intensity and polarization are important properties of single fluorescence molecules, which may be used for studying the structure and function of biomacromolecules. We describe the fluorescence properties of single molecules, various detection methods, and their applications in the life sciences.

Key words single molecule detection, single-pair fluorescence resonance energy transfer, single molecule fluorescence polarization

近年来,科学家在单分子探测(single molecule detection, SMD)和单分子操纵(single molecule manipulation)等方面的研究取得了显著的进展^[1-3].单分子探测在许多学科领域具有非常重要的意义,如分子生物学、化学、医学以及纳米材料的研究等.它为科学家提供了一种新的手段来研究这些领域的前沿课题.

在单分子探测技术发展之前,大多数的分子实验是探测分子的综合平均效应(ensemble averages),即探测大量由一种(或多种)对象组成的一个整体所表现出的平均响应和平均值.这一平均效应掩盖了许多特殊的信息.而这些特殊的信息有时是非常重要的,尤其是当我们在研究具有非均匀特性(inhomogeneous)的凝聚相物质和生物大分子结构的时候.相比之下,单分子探测可以逐个地对体系中的单

个分子进行研究,因为在给定的某一时刻,集团中的任何一个成员只能处于一种状态,通过时间相关的方法,可以得到某一分子特性的分布状况.这样,我们就可以研究分子的某些特殊的过程,如底物结合(bind)、水解(hydrolysis)以及催化过程等.这种与时间相关的过程的探测可以实时地了解生物大分子在生化反应过程中的构象态变化的信息.

光学和光谱技术是单分子探测最常用的方法,为我们提供了生物大分子的结构-功能的关系的大量信息,这些信息用传统的技术是无法获得的.由于在非常稀的溶液中透射的变化微乎其微,探测单个

* 国家自然科学基金和教育部留学归国人员科研启动基金资助项目
2000-04-20 收到初稿,2000-06-20 修回

1) 联系人, E-mail: adxia@ustc.edu.cn

分子的吸收光谱是非常困难的,而探测单个分子的荧光光谱则较为容易,这就是为什么近年来的单分子探测大多使用荧光探测的方法.本文简要介绍单分子荧光的主要特点及其在生命科学中的一些应用.

1 单分子的荧光特点及其探测方法

1.1 单分子的荧光特点

单个分子的荧光产生的原理如图1所示,它直观地给出了基态荧光分子吸收光子后分子激发态的一系列弛豫过程. S_0, S_1, S_2 分别为基态、第一激发单线态、第二激发单线态. T_1 为激发三线态. $0, 1, 2$ 表示电子态振动能级.分子吸收一个光子 $h\nu_A$ 后,被激发到较高的电子态 S_1 或 S_2 ,然后快速弛豫到 S_1 的最低振动能级,这一过程称作内转移.然后发射一个荧光光子 $h\nu_F$,同时使分子弛豫到 S_0 的较高振动能级,最后快速弛豫到 S_0 的最低振动能级.由于弛豫阶段而造成能量损失,因此荧光光谱产生红移(Stokes 红移).振动弛豫的发生时间($< 10^{-12}$ s)远小于吸收和激发态寿命(10^{-9} s).所以分子的荧光发射循环主要决定于吸收和发射过程^[4].在激发能量较低时,荧光强度随激发光的强度线性增加.在激发能量较高时,荧光主要决定于分子固有的激发态寿命,荧光发生饱和,此时,即使增加激发光强,荧光光强也不增强.同时,分子也可能从 S_1 无辐射跃迁到 T_1 ,即系间窜越(intersystem crossing, ISC)过程.由于自旋禁阻,其速度远低于从 S_1 到 S_0 的辐射跃迁时间.然后从三重态弛豫到基态并发射一个磷光(phosphorescence)光子.单重态向三重态的跃迁会降低分子的荧光量子产率和缩短分子的荧光寿命.当处于 S_1 态的电子弛豫到 T_1 态时,分子的荧光很弱,乃至没有荧光(暗态).一旦当电子从 T_1 态回到 S_0 态时,分子处于新一轮激发和发射的循环过

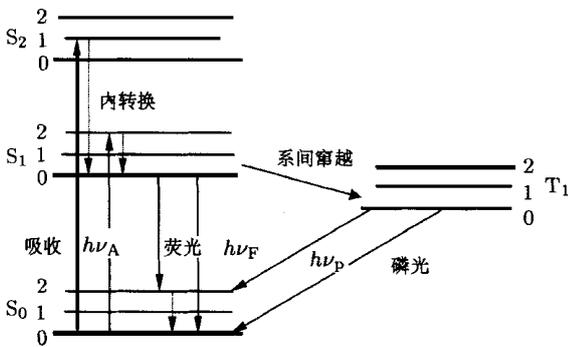


图1 分子的激发态弛豫过程示意图(Jablonski 图)

程.因而形成一个发射-暗态交替的量子跳跃(quantum jump)过程,这种量子跳跃过程是单分子荧光的主要特征之一^[5].这一重要特征导致了实验中观察到的单分子荧光光谱和荧光强度的涨落(fluctuation)现象,其主要取决于单分子的局域环境及其猝灭途径.因而测量这种单分子的荧光量子跳跃过程、荧光寿命和荧光量子产率可以提供很多关于单个荧光分子所在的局域环境的特性和变化情况的信息^[5].图2是典型的单个绿荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的荧光 on-off 现象, off 态主要来源于单个 GFP 分子的光化学诱导的长寿命的暗态^[5].

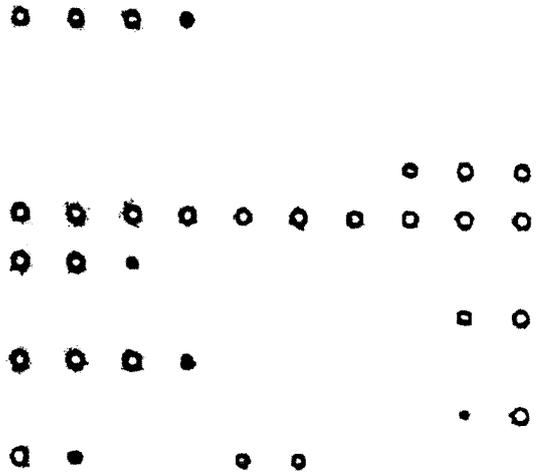


图2 单个绿荧光蛋白(GFP)分子的典型的荧光 on-off 现象
(曝光时间 100 ms/帧, 488 nm 激发)

单个荧光分子具有其唯一的固有荧光和吸收跃迁偶极矩,分子只吸收那些偏振方向与其吸收跃迁偶极矩方向一致的光子,并发出具有一定偏振方向的荧光.荧光的偏振特性是单分子的另一重要特征.

在单分子探测的广泛应用中,人们正是利用这种单个分子跃迁偶极矩的方向以及分子所处的环境的差异来研究和推测生物大分子的结构和功能的.

1.2 单分子荧光的探测技术

自从1976年 Hirschfeld 第一次尝试探测液体中的单个分子的荧光以来^[6],单分子探测(SMD)及其单分子光谱(single molecule spectroscopy, SMS)技术就一直在分析化学、生命科学等领域受到广泛注意.随着光学和探测技术的发展,直到1989年 Mörner 等人才成功地在低温下首次观察到分子晶体中掺杂的单个分子的荧光^[7].此后通过进一步改善荧光收集效率和探测器技术,室温下探测单个分子才成为现实^[1-7].

对单分子荧光的探测必须满足两个基本要求:
物理

(1) 在被照射的体积中只有一个分子与激光发生相互作用. 这一点可以很方便地通过调整研究体系的浓度(密度)来达到;(2) 确保单分子的信号大于背景干扰信号(background signal), 其中关键的问题是要有效减少拉曼散射、瑞利散射及其杂质荧光所造成的干扰. 一般来说, 背景的吸收截面与激发体积成正比^[4]. 因此, 要获得理想的信噪比需要将激发体积最小化. 近场光学扫描显微镜(near-field scanning optical microscopy, NSOM) 和共焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM) 是探测单分子荧光的两种主要方法, 显微镜物镜焦点的最小体积约 $1\mu\text{m}^3$, 近场扫描显微镜的焦点的最小激发体积小于 $10^{-2}\mu\text{m}^3$.

近场光学扫描显微镜是在扫描探针显微镜基础上与光学探测方法相结合而发展起来的^[8]. 探针通常是用一个单模光纤制成. 其制作方法是: 用激光加热光纤的中部并且缓慢地将其拉伸, 使其中部逐渐变细直至分开. 要求其尖端的小孔直径小于 100nm . 探针的周边镀铝以防漏光. 虽然近场扫描显微镜具有较高的分辨率, 在单分子探测的研究中发挥了很重要的作用, 但在扫描时需要通过复杂的控制系统来保持适当的样品与探针针尖之间的距离. 在实际应用时还受到了很多其他的限制, 比如: (1) 由于光纤及其尖部的限制, 使光子的输出率非常低(每 10^4 个入射光子中有一个光子从尖部输出), 而增加激光的强度又会使尖端发生熔化. 因此, 它的输出光的强度受到了限制($50-100\text{nm}$ 的尖端功率约为 50nW)^[9]; (2) 探针尖的再生率非常低, 因为探针尖的形状、收缩角(taper angle)及长度都有严格的要求; (3) 镀铝的探针尖对样品的探测会产生干扰^[10], 主要影响荧光的发射寿命和强度. 这是由于金属铝对分子的激发态有淬灭作用. 实验结果证明, 当分子位于探针尖的中心时荧光的寿命较长, 而当分子移向探针尖的边缘时荧光寿命减小^[11].

在生命科学的研究中, 由于 NSOM 探针的近场激发对所研究生物体系的微扰作用(尤其是在生理或活体条件下)给研究带来许多限制, 这就需要发展一种无损的单分子探测方法. 共焦激光扫描显微镜 CLSM 的发展给单分子探测技术带来了新的生机^[12]. 同时, 当我们研究的主要目的是探测单分子且不要求高于衍射极限的分辨率时, 共焦激光扫描荧光显微镜将是一个很好的选择. 在共焦激光扫描荧光显微镜的光学设计中, 激光光束经物镜聚焦到样品上形成一个接近衍射极限的光斑, 利用同一物

镜收集样品反射回的光(或荧光), 经一个共焦小孔(pinhole)后, 被探测器接受. 而非焦面的光则被共焦小孔过滤掉. 这样的光学设计保证了很好的光学收集效率和高的信噪比. 同时, 共焦激光扫描荧光显微镜的激发强度不受限制, 其光学设计及操作相对简单, 并且对样品没有侵害性.

探测器技术是单分子荧光探测的关键部分, 由于单个分子的荧光很弱, 这就要求荧光探测器具有较高的量子效率和很低的暗计数. 目前常用的超敏探测器是 ICCD(intensified CCD) 和单光子计数模式的雪崩光二极管(avalanche photodiode, APD)^[13]. 将超敏探测器与 NSOM 和 CLSM 及其相关的电子系统进行合理的组合, 人们可以进行多种形式的单分子荧光特性的研究^[13], 包括: 单分子荧光成像、单分子荧光光谱、时间分辨的单分子荧光寿命及其单分子对间的共振能量转移(single-pair fluorescence resonance energy transfer, spFRET)的研究.

2 单分子荧光探测在生物学中的应用

2.1 单分子对荧光共振能量转移(spFRET)

荧光共振能量转移(FRET)已被广泛地应用于生物化学和生物物理学研究. 随着单分子技术的发展, 单分子对间的荧光共振能量转移(spFRET)已成功应用于许多实验中^[14,15]. spFRET 方法在研究生物大分子催化、折叠等过程中构象变化的动力学过程时是相当有效的. 所谓单分子对荧光共振能量转移, 就是在一个生物大分子或两个相互作用的分子上标记两个不同的荧光基团(fluorescence fluorophore), 一个是在能量转移过程中提供能量, 即供体 D(donor). 另一个接受能量, 即受体 A(acceptor). 受体的吸收光谱与供体的发射光谱相重叠. 由于偶极-偶极相互作用(dipole-dipole interaction), 能量从供体传递到受体. 这样, 通过探测能量转移效率, 可确定两点间的距离, 并且通过监测能量转移效率随时间的变化来推测由生物大分子在生命活动中构象的变化所引起的两点间距离的变化. 在弱相互作用的范围内, FRET 的效率为 $E = 1/[1 + (R/R_0)^6]$, 其中 R 为供体与受体间的距离, R_0 是临界半径, 即传递效率为 50% 时 D-A 之间的距离. R_0 与供体和受体的光谱的重叠积分及它们之间的跃迁偶极矩(transition dipoles)的相对取向有关. Ha 和他的同事们分别用 TMR(tetramethylrhodamine) 荧光分子作为供体和 Texas Red 荧光分子作为受体来标

记相隔 10 到 20 个碱基对的 DNA 片段的两端^[16]. 利用近场显微镜观测位于硅烷化玻璃上的干 DNA 样品,用 514nm 的激光激发供体,得到了供体和受体的线性叠加的光谱.在一方光漂白后,得到纯供体或受体的光谱.由光漂白引起的能量转移的终止不仅证实了 spFRET 的存在,而且能够在单对供体-受体的基础上确定能量转移的效率.对于不同的 D-A 对,由于供体和受体的距离不同,光谱的重叠积分以及相对取向都不相同, E 的分布范围很广 (16%—85%).虽然由于相对取向和光谱重叠积分等不确定因素而不能准确确定绝对距离 R,但用这一方法可以在研究生物大分子的构象时,通过监测供体-受体相对距离的变化,来判断和推测生物大分子的构象的变化情况. Ha 等人同时还利用 spFRET 方法,探测均衡蛋白的结构涨落特性以及在催化过程中酶-底物相互作用时的构象状态以及溶液中单个底物和催化产物的亚布居态 (subpopulation).在利用 spFRET 方法对葡萄球菌核酸酶蛋白分子进行探测时,观察到了 FRET 效率的涨落特性.并结合单分子荧光偏振探测方法及其模拟实验,证实了 FRET 效率涨落是由于蛋白自身的构象的变化所造成的^[17].他们还通过单分子荧光的偏振特性和 spFRET 方法研究了蛋白-抑制剂 (protein-inhibitor) 的结合,并证实这些方法具有足够的精度来区分单个酶分子是否与抑制剂结合时酶的构象态^[16].图 3 是一典型的单对 D-A 体系标记的单个无抑制剂蛋白的能量转移的情形.它直观地给出了供体与受体之间的能量转移过程.供体的荧光有效地转移给受体,当受体发生光漂白时,能量转移被阻断,供体自身发出荧光.

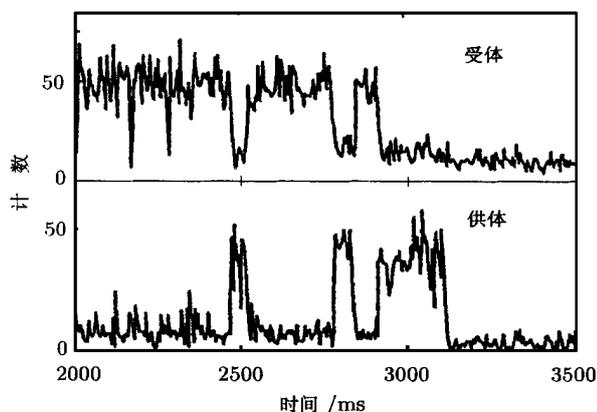


图 3 单对 D-A 体系标记的单个无抑制剂蛋白的能量转移过程

2.2 单分子的荧光偏振光谱

由于单个荧光分子具有唯一的固有吸收和发射

跃迁偶极矩,因而在线偏振激光的激发下,通过测量单个分子的吸收和荧光的偏振方向,可以完全确定单个荧光分子的空间取向.通过将荧光分子标记到生物大分子比如蛋白质、DNA 或酶分子的某一特定的位置,实时的分析单个荧光分子的偏振状态的变化,人们就可以了解生物大分子的构象的状态及其变化的动力学过程.图 4 为吸附在玻璃表面上的一个荧光分子 TMR (texas red) 在偏振方向作 0-90° 重复变化的激光的激发下荧光强度的变化^[17].分子只吸收那些偏振方向与其吸收跃迁偶极矩方向一致的光子,并发出具有一定偏振方向的荧光.从图中可以看出分子的荧光强度受到偏振方向连续变化的激发光的调制;反之,如果固定激发光的偏振方向,对于标记于生物大分子的某一特殊位置的荧光分子,其荧光强度就会随着生物大分子在生化反应过程中构象的涨落 (旋转、扩散等) 的变化而变化. Ha 等人利用此方法观察到了 TMR 标记的吸附在玻璃表面上的 S Nase 酶 (staphylococcal nuclease) 蛋白在反应过程中构象的涨落情况,证实了由于酶蛋白分子链的强的刚性结构导致了化学反应过程中的快的构象的涨落^[15-17].同时他们还观察了 TMR 分子标记的单个 S Nase 酶分子在具有不同粘度的脂环境中的扩散过程,通过分析大量单个荧光分子的荧光各向异性值分布的涨落特性,获得许多关于单个 S Nase 酶分子在生物化学反应过程中实时的构象态的信息,比如转动的自由度、折叠的方式等.

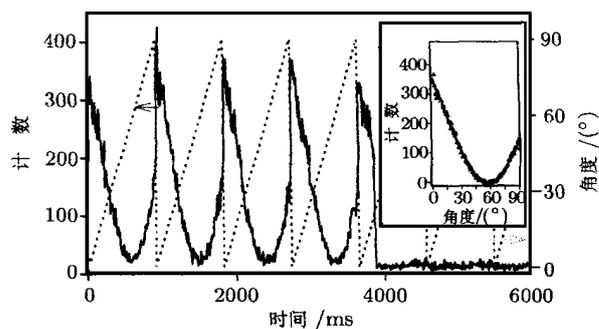


图 4 单个荧光分子 (实线) 在偏振方向作 0-90° 重复变化 (虚线) 的激光的激发下荧光强度的变化情形

2.3 单分子荧光动力学

正如上一节指出的那样,单分子的荧光寿命对它的局域环境非常敏感,因此可以通过荧光标记生物大分子的某一特殊位置,检测生物大分子构象的运动. Macklin J. J. 等人^[18]观察到了 PMMA 中掺杂的单个 diI (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine) 荧光分子的荧光寿命,发现单

物理

个 diI 荧光分子的寿命分布在平均寿命 2.67ns 附近的 2.0—3.6ns 的范围内.我们近来也利用远场共焦光学的方法观察到分散在载玻片上的单个 R6G 分子的荧光成像^[19],并进一步观察到单个 R6G 分子荧光寿命的变化情况,发现单个 R6G 荧光分子的寿命分布在平均寿命 3.7ns 附近的 3.0—4.3ns 的范围内.这种单个荧光分子荧光寿命的涨落与单个分子所处的局域环境有关.Edman 等人^[20,21]利用 TMR 分子标记了一个 18-mer DNA 测序引物,并研究了其寿命的变化情况.结果表明其宏观的荧光动力学曲线显示出其荧光寿命分别为 0.86 和 3.70ns 的一个等幅的双指数衰减过程.而对单个的荧光分子而言,测得的荧光衰减仍是双指数的,但其幅值随不同的分子而在 0—1 的范围内变化.这一观察结果表明在单荧光分子标记的 DNA 中存在两种构象,并在探测时间的范围内相互转化.长寿命现象表明荧光分子被水分子紧紧包围,短寿命现象表明荧光分子与 DNA 碱基发生了相互作用,鸟苷(guanosine)碱基猝灭了荧光分子的荧光.两种构象态的转化导致了荧光发射强度的涨落特性.这一涨落发生的时间范围与三重态的寿命(<1 ms)或扩散时间(250 ms)不一致,它来源于 DNA 分子本征的构象的变化.因此,可以借助荧光相关光谱的统计方法测得这种 DNA 分子构象的转化时间,结果约为(23±13) ns.同样,Jia 等人研究了在硅烷化玻璃表面上由 TMR 标记的 tRNA^{phe} 的构象,结果表明 TMR 分子同样表现出双指数衰减的过程,对应于在探测过程中两种构象的相互转换过程^[22].

单分子探测在生物学上还有许多应用,如基于单分子探测的快速 DNA 片段长度分析^[23],快速 DNA 分子测序(rapid DNA sequencing)^[24]等.总之,单分子的荧光探测技术是单分子探测技术中的最灵敏的方法之一.由于每次仅以一个分子作为研究对象,因而可以获得许多有别于分子聚集态的特殊现象,这些现象为人们研究单个分子的特殊局域环境、分子的涨落、生物大分子的柔性及其生物大分子的运动等提供了很有价值的信息.随着生命科学中的荧光标记技术的日益成熟,人们可以通过在生物大分子中单个标记的荧光分子来研究生命过程中的生物大分子(比如 DNA、RNA、ATPase 等)的结构和功能,为促进生命科学的发展起到了巨大的推动作用.同时,单分子实验技术的发展为单分子统计理

论的发展带来了新的机遇.近年来单分子探测的研究正以极快的速度向前发展,并在许多学科领域发挥着越来越大的作用.

参 考 文 献

- [1] Moerner W E, Orrit M. *Science*, 1999, 283 :1670
- [2] Weiss S. *Science*, 1999, 283 :1676
- [3] Lu H P, Xie X S. *Nature*, 1996, 385 :143
- [4] Nie S M, Zare R N. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1997, 26 :567
- [5] Moerner W E. *Science*, 1997, 277 :1059
- [6] Hirschfeld T. *Appl. Opt.*, 1976, 15 :2965
- [7] Moerner W E, Kador L. *Phys. Rev. Lett.*, 1989, 62 :2535
- [8] Betig E, Finn P L, Weiner J S. *Appl. Phys. Lett.*, 1992, 60 :2484
- [9] Harris T D, Grober R D, Trautman J K *et al.* *Appl. Spectrosc.*, 1994, 48 :14A
- [10] Ambrose W P, Goodwin P M, Martin J C *et al.* *Science*, 1994, 265 :364
- [11] Xie X S, Trautman J K. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1998, 49 :441
- [12] 陈德强,夏安东,王克逸等. *物理*, 2000, 29 :232 [CHEN De-Qiang, XIA An Dong, WANG Ke-Yi *et al.* *Wuli(Physics)*, 2000, 29 :232(in Chinese)]
- [13] Basche T, Moerner W E, Orrit M *et al.* *Single-molecule optical detection, imaging and spectroscopy*. Weinheim : VCH Publishers, 1997. 69—142
- [14] Ha T, Enderle T H, Ogletree D F *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 :6264
- [15] Ha T, Ting A Y, Liang J *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96 :893
- [16] Ha T, Ting A Y, Liang J *et al.* *Chem. Phys.*, 1999, 247 :107
- [17] Ha T, Laurence T A, Chemla D S *et al.* *J. Phys. Chem. (B)*, 1999, 103 :6839
- [18] Macklin J J, Trautman J K, Harris T D *et al.* *Science*, 1996, 272 :255
- [19] 夏安东,蒋诗平,黄文浩等. *中国学术期刊文摘*, 1999, 5 :1039 [XIA An Dong, JIANG Shi Ping, HUANG Wen Hao *et al.* *Chinese Science Abstract*, 1999, 5 :1039(in Chinese)]
- [20] Edman L, Mets U, Riger R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 :6710
- [21] Wenmal m S, Edman L, Rigler R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94 :10641
- [22] Jia Y, Sytnik A, Li L *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94 :7932
- [23] Castro A, Facrfield F R, Shera E B. *Anal. Chem.*, 1993, 65 :849
- [24] Tett J, Keller R A, Martin J C *et al.* *Biomol. Struct. Dyn.*, 1989, 7 :301