

# 纳米光学和生物单分子探测\*

白永强 刘丹 朱星<sup>†</sup>

(北京大学物理学院 人工微结构和介观物理国家重点实验室 北京 100871)

**摘要** 纳米光学技术展示了纳米级探测本领,同时生物单分子探测所需要分辨尺度也是纳米数量级的,因此在生物单分子探测过程中,纳米光学发挥了巨大的作用.文章介绍了与生物单分子探测技术相关的纳米光学技术,包括量子近场光学探针技术、近场光学成像技术(包括扫描近场光学显微术及全内反射荧光显微术)和激光光钳测控技术及它们在生物单分子探测上的进展,从而在染色、成像、测控三个方面展示了纳米光学技术在生物方面的应用,并对其未来的发展方向进行了展望.

**关键词** 纳米光学,单分子探测,量子点,近场光学显微术,全内反射荧光显微术,激光光钳

## Nanooptics and the detection of biological single molecules

BAI Yong-Qiang LIU Dan ZHU Xing<sup>†</sup>

(School of Physics, Peking University, State Key Laboratory for Artificial Microstructure and Mesoscopic Physics Beijing 100871, China)

**Abstract** Optics on the nanometer scale is particularly suitable for the detection of biological single molecules and may be expected to play a very significant role. Quantum near-field luminescent probe technology, near-field optics imaging technology (including scanning near-field optical microscopy and total internal reflection fluorescence microscopy), and optical tweezers detection and control technology are reviewed. The application and prospects of nanooptics technology in probing, imaging, and detection and control of biological single molecules are discussed.

**Key words** nanooptics, single molecule detection, quantum dots, scanning near-field optical microscopy, total internal reflection fluorescence microscopy, optical tweezers

## 1 引言

科学的发展已经让人们可以在单分子水平上研究生物世界,尤其是为了充分了解生命活动的本质,就必须在单分子层面上对生命活动进行研究.单分子探测(single molecular detection, SMD)就是这样一门技术.它是指在单分子水平上研究生命科学中的单个分子在非人为因素下的运动、分布、以及与其他分子的相互作用.直接观测单个分子的性质可以揭示被大量分子系综平均而抹去的隐蔽信息,有时这正是生命活动的本质.

生物探测技术的发明与发展和光学技术的发展密切相关,但是由于生物体内高散射环境和普通光

学显微镜分辨本领的限制,纳米尺度的单分子生物光学探测是很困难的.然而,近些年来与纳米光学相关的发光量子点(quantum dots, QD)探针技术,扫描近场光学显微技术(scanning near-field optical microscopy, SNOM)及与近场相关的全内反射荧光显微技术(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)和激光光钳(optical tweezers)测控技术的快速发展和应用,使得生物单分子探测取得了瞩目的研究成果.

## 2 纳米光学探针技术——量子光学

\* 国家自然科学基金(批准号:19890380-2)资助项目

2004-05-20 收到初稿 2004-08-13 修回

<sup>†</sup> 通讯联系人. E-mail: zhuxing@pku.edu.cn

## 探针

在单分子水平上研究生物世界,首要的问题是如何使研究对象能够被探测器观察到。由于多数生物样品的透明特性,因此用染色剂附着在样品上、利用染色剂发出的荧光来观察生物样品成为目前在单分子水平上研究生物学问题的一个重要手段。传统染色剂发出的光波长范围比较宽,光谱展宽明显。这样就很难同时使用多种染色剂给不同生物分子着色,而用尺度为纳米量级的发光量子点作为光学探针就可以解决这一问题。

当体材料中载流子的运动被局域在很小的空间范围内时(尺度小于德布罗意波长),它的能量将完全分裂,形成一个个独立的能级,这样就形成了量子点。不但如此,量子点分立能级间的距离由其空间尺度决定。在光或电的激发下,量子点中的载流子由低能级跃迁到高能级,但是为了维持体系能量最低、最稳定,它又会自发地跃迁回低能级,同时将多余的能量以光子的形式释放出来。光子的能量由发生跃迁的两个能级间的能量差决定。由于不同能级之间的能量间隔依赖于量子点的空间尺度,因此,我们可以通过控制它的空间尺度使其发出不同颜色的光。此外,传统染色剂的另一个缺点是它们只能由唯一波长的光激发,这同样限制了可以同时使用的染色剂的种类。为了看到不同染色剂的荧光,则必然同时用多种不同波长的激光来激发传统染色剂,这样累积起来的能量很可能使脆弱的生物样品受到伤害。而量子点可以被任何波长小于其荧光波长的光所激发,这意味着不同颜色的量子点可以被同一光波激发,对样品的伤害自然少了很多。再次,量子点非常稳定,可以经受反复多次激发,连续使用几个小时。而传统染色剂只能持续几秒钟或稍长时间,发光强度衰减很快。因此,量子点染色使活体生物样品的长时间显色记录优势非常明显。

从量子点的概念提出开始,量子点的应用主要集中在电子学和光学方面。20世纪80年代起,生物学家对量子点产生浓厚兴趣,但由于制备上的困难以及荧光量子效率很低等原因,使其无法真正应用于生物学研究。1997年以来,随着量子点制备技术的不断提高,它已经越来越可能应用于生物学研究。1998年,Alivisatos等<sup>[1]</sup>报道可以通过静电力、氢键作用或特异的配体——受体相互作用,将生物分子结合在量子点表面。他们采用两种大小不同的量子点标记小鼠的成纤维细胞(3T3),一种发射绿色荧

光,一种发射红色荧光,将发射绿色荧光的量子点表面用一种尿素的衍生物和乙酸基团包被,使之与细胞核具有高亲和力,将发射红色荧光的量子点用生物素标记,使之能够识别被亲和素特异标记的细胞质内的微丝系统,这样可以同时在细胞中观察到红色和绿色的荧光。同年,Nie等<sup>[2]</sup>实现了通过巯基乙酸中的巯基与量子点表面的Zn原子结合,使得游离的羟基一方面使量子点具有可溶性,另一方面可与不同的生物分子共价结合。他们还将转铁蛋白与量子点共价结合,把量子点置入HeLa细胞中,说明附着有量子点的转铁蛋白仍然具有生物活性。2001年,仍是Nie和他的同事<sup>[3]</sup>将不同数量、不同荧光特性的量子点组合进内部镂空的高分子小球,从而形成具有不同光谱特征和亮度特征的可标记到生物大分子上的微粒。他们发现,只需要5—6种颜色以及6种不同发光强度的量子点进行不同组合得到的量子点微粒就可以形成10000—40000个可识别的编码。如果有10种不同发光强度的量子点,就可以提供100万个可识别的编码,理论上可以对100万个不同的DNA或蛋白质进行编码标记。事实上,如要达到精确的检测,并且不带有任何光谱交叠,可编码的量子点微粒不难达到1万到4万。根据前不久完成的人类基因组测序草图,人类具有的基因不超过4万个,该技术可对所有这些基因进行编码,由此可以推想出量子点染色对于生命科学的意义。随着量子点与生物大分子耦合技术的提高,量子点探针在药品检测、生物成像等领域会有更为广阔的应用。

## 3 纳米光学成像技术——扫描近场光学显微术和全内反射荧光显微术

1590年由荷兰的Janssen叔侄共同研制了世界上第一台显微镜,使人们能够观察到肉眼不能直接观察到的物体。随后的几百年间,经过物理学家的不断努力,显微镜的性能有了极大的提高。但是人们一直也没有很好地解决生物显微中几个重要的问题,一是显微图像的信噪比率不高,二是光源对生物样品照射的损害,三是光学衍射所导致的分辨极限(约为半个波长)。而这三个问题恰恰是生物单分子探测中亟待解决的问题。纳米光学成像技术的发展较好地解决了上述问题。从20世纪80年代开始,基于近场光学技术发展起来的扫描近场光学显微术和全内反射荧光显微术将人们带入了一个动态的单分

子生物世界.

### 3.1 扫描近场光学显微术

显微镜的放大本领来源于光的波动性,而正是光的波动性使人们不能无限地增加放大倍数.这一规律早在 1873 年就由德国科学家 Abbe E 根据衍射理论推得.对于可见光而言,光学显微镜最好的分辨率也只有 200—300nm,这对于生物单分子探测来讲是远远不够的,因为许多生命活动的特征尺寸都在纳米量级.近场光学显微技术的出现为解决上面的难点带来了希望.

与常规光学显微镜的二维同时成像不同,这一新技术采用距样品表面仅几个纳米的探针逐点扫描成像的方法,可以在几十纳米的分辨率下同时得到样品微区的形貌和光学信息.扫描近场光学显微镜已经成为生物学家研究纳米生物世界一种有力工具,这种技术可以用来在生物化学的自然环境或接近自然条件下研究分子水平的荧光以及光的吸收、散射和偏振的光学信息.图 1 显示了近场光学显微镜所成的图像与普通荧光显微镜的明显分辨区别<sup>[4]</sup>.

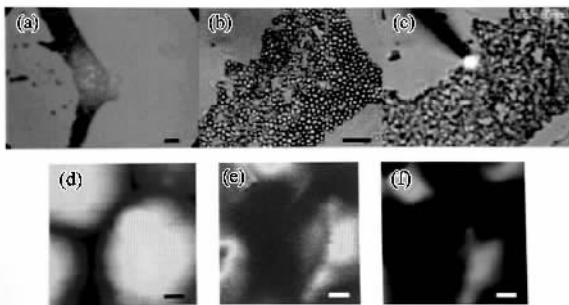


图 1 近场与远场光学成像比较 (a) — (c) 分别是使用 10 倍、20 倍和 50 倍的物镜得到的结果,标尺为 50 μm [(d) — (f) 分别是近场光学显微镜得到的形貌像、荧光像和透射像,标尺为 1 μm<sup>[4]</sup>]

自从近场光学显微镜第一次由 Eric Betzig<sup>[5]</sup>在 1992 年实现实用化以来,它就被应用于生物单分子探测的研究. Betzig 首先得到了 PMMA 膜上的染料分子探针 DiIC 的单分子近场光学像,分辨率可达 5—15nm.在此基础上,可将荧光染料用荧光原位杂交染色方法标记于类似 DNA 等生物大分子上以辨别大分子的结构.用扫描近场光学显微镜观察到的图像分辨率可提高 10—100 倍. Moers<sup>[6]</sup>等在 1995 年用此方法研究了染色体.在更大的尺度上,比如在细胞或细胞器的精细结构的特征研究上,虽然其光学信息和表面形貌信息耦合在一起,而且光学

信号会在大尺度生物体内发生散射,但是,将其用于研究细胞或细胞器表面及附近的光学特性还是可能的<sup>[7-9]</sup>.由以上分析可见,扫描近场光学显微镜在生物单分子探测上,无论是探测单个分子还是探测细胞或细胞器中的单分子都是可行的,而且初见成效.但是由于扫描近场光学显微镜适应活体生物的水溶液环境的限制以及其扫描特性,使之在较软的生物体上达到高的光学分辨率和快速跟踪生物活动比较困难.但是随着样品与针尖距离控制技术的探索<sup>[10]</sup>及快速扫描技术的发展,并且结合其他光学成像技术,扫描近场光学显微镜必将在生物单分子探测上有着更广泛的应用.

### 3.2 全内反射荧光显微术

全内反射现象是生活中一种常见现象,如钻石的色彩斑斓和光纤的光线传播等.如图 2 所示,当光线在两介质界面发生全反射时,通过电磁场理论计算可知在较低折射率介质中存在沿界面平行传播的隐失波.它的透过强度和传播深度分别由 (1) 式、(2) 式表示:

$$I_z = I_0 \exp^{-z/d_p}, \quad (1)$$

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}}, \quad (2)$$

其中  $I_z$  为隐失波在  $n_2$  介质中的强度分布,  $I_0$  为界面处隐失波强度,  $z$  为介质中距表面的距离,  $d_p$  为隐失波透射深度.对于可见光而言,隐失波大约透过界面小于 100nm 左右,这正是激发界面处荧光分子的良好光源.

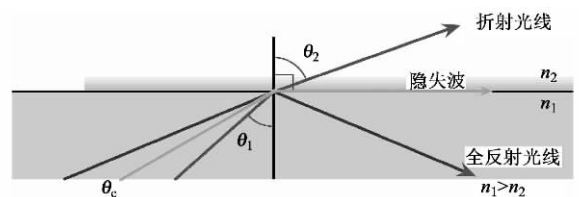


图 2 全内反射原理  $\theta_1$ : 入射角  $\theta_c$ : 临界角

目前,全内反射荧光显微镜的实现形式大致有两种:棱镜式和物镜式.如图 3 所示<sup>[11]</sup>,激光透过棱镜或物镜后以一定角度照射到盖玻片上表面,形成全反射,隐失波激发生物样品的荧光分子,荧光分子所发射的光经过物镜成像到照相机或 CCD 上,实现对生物样品的记录.两种形式的显微镜各有优缺点,对于棱镜式而言,实现起来相对简单.同时它的缺点也很明显:由于要达到较高光学分辨,要求接收荧光的物镜工作距离较短,这样留给生物样品和物镜之间的空间较小,所以在此仪器上安装一些诸如原子

力显微镜、近场光学显微镜等其他探测仪器非常困难,并且由于荧光的接收必须经过图3(a)所示的被观察的样品的上部,这样荧光必然会有散射、衰减及其他光信号的干扰,使观察的效果有所下降.而对物镜式而言,则可以克服以上缺点.如图3(b)所示,激光聚焦到物镜后焦面并经过物镜边缘入射,物镜出射光为平行光并斜入射至盖玻片上,调节激光入射位置和斜入射的角度,即可达到全内反射要求,从而实现隐失波照明.隐失波所激发的荧光仍旧经过物镜接收,通过双色镜滤掉除荧光以外的其他波长的光,成像在物镜后方的照相机或 CCD 上,实现对生物样品的荧光纪录.由图3(b)可以看出样品上方空间完全空出,并且所接收的荧光也没有被样品干扰.目前大多数生物学家采用物镜式的全内反射荧光显微镜.

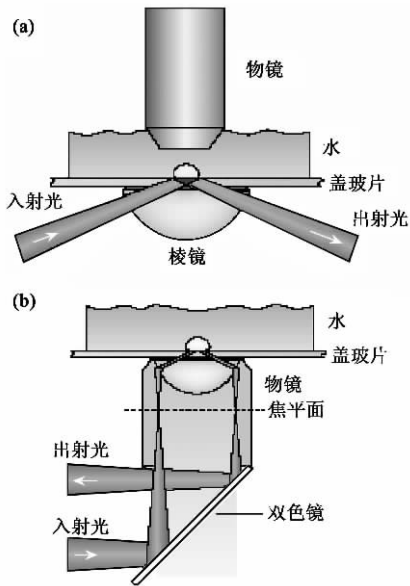


图3 两种形式的全内反射荧光显微镜的工作模式(a)棱镜式(b)物镜式<sup>[11]</sup>

可以说,全内反射荧光显微镜所有优点都归结为其隐失波来照明特性.首先,对于图像信噪比而言,隐失波只能照射距离盖玻片上表面约100nm的深度,因此其他区域的荧光分子将不会被激发,这相对于优秀的扫描共焦显微镜约500—800nm的照射范围,信噪比明显增加,相对于普通荧光显微镜,背景噪声将减少2000倍<sup>[12,13]</sup>.其次,对于成像速度而言,扫描共焦显微镜每秒钟只能成几幅图像,而全内反射荧光显微镜依靠高质量的CCD成像每秒钟高达几十幅至几百幅,这样为生命活动的纪录提供了快速的记录手段<sup>[12,13]</sup>.最后,对于生物样品损害程

度而言,由于隐失波能量较小,基本对样品没有损害作用,而扫描共焦显微镜和分辨率更高的电子显微镜,由于较强的光束或电子束的聚焦照射,其对样品都有不同程度的损害,这使它们能够观察的活体生物样品受到限制.图4为落射荧光(epifluorescence)显微镜与全内反射荧光显微镜同部位成像图,可以看出它们之间的差别<sup>[14]</sup>.

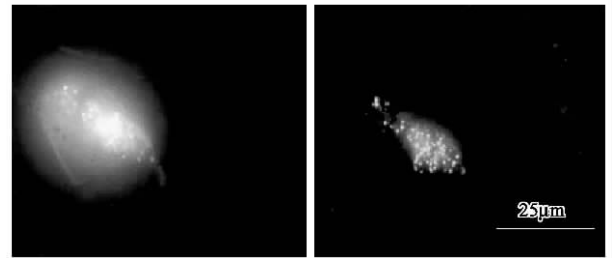


图4 落射荧光显微镜(左)与全内反射荧光镜(右)观察牛的嗜铬细胞分泌的颗粒,分泌的颗粒由绿色荧光蛋白染色<sup>[14]</sup>

虽然20世纪80年代就已经发明棱镜式的全内反射荧光显微镜<sup>[15]</sup>,但是由于没有适用于活体细胞的荧光染料,它在生物学研究领域并没有被广泛应用.那时,从分辨的角度来讲,电子显微镜是进行生物学研究理想的仪器.1994年人们从一种水母身上分离出了适用于活体细胞的荧光染料——绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)及相关的青、黄、红色荧光蛋白,活体细胞中的单分子探测开始了长足的进展.尤其全内反射荧光显微镜的介入,使人们对细胞及细胞中发生的一些运动变化有了新的认识.

单分子探测的主要活动之一就是观察和测量单分子的运动,全内反射荧光显微镜在这一方面发挥了重要作用,很多没有被其他观测手段探测到的现象被全内反射荧光显微镜探测到,尤其是构成分子马达的各种马达蛋白的运动观测.图5<sup>[16]</sup>为Pierce等人观测到的驱动蛋白沿组成细胞骨架的微管运动的记录.Kitamura等人也用此方法观测到了肌球蛋白沿肌动蛋白丝的移动,通过全内反射荧光显微镜与微探针的配合可以测量其移动步伐约为5.3nm<sup>[17]</sup>.Seitz<sup>[18]</sup>、Cappello<sup>[19]</sup>等诸多科研小组也用全内反射荧光显微镜研究了马达蛋白的运动特性,得出了一些重要的统计结果和经验公式.

另外,全内反射荧光显微镜动态观察单分子集体活动有很强的优势,单分子的聚合与解离过程是细胞当中时刻发生的活动,比如细胞的移动,细胞中各种信号的传递,细胞有丝分裂中染色体的移动等

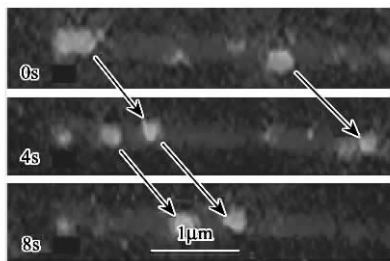


图5 绿色荧光蛋白染色的驱动蛋白(浅灰色)沿微管(深灰色)移动<sup>[16]</sup>

生命活动现象都是和单分子的聚合与解离分不开的.图6为全内反射荧光显微镜观测到的肌动蛋白的聚合及解离过程<sup>[20]</sup>.图6(a)、(b)分别为肌动蛋白单体溶液放置6min钟与34min后的全内反射荧光显微镜的图像,可以明显看出其生长过程.仔细记录某一根肌动蛋白丝的生长,发现在整个生长过程中,肌动蛋白丝一端在聚合(B端),而另一端在解离(P端)[图6(c)].一定时间后,聚合与解离过程平衡,肌动蛋白丝的长度不再变化.同样,Sako等人<sup>[21]</sup>用全内反射荧光显微镜研究了表皮生长因子与受体融合的过程,并通过光强的变化判断出表皮生长因子受体为一个二聚体.Michael等人<sup>[22]</sup>也阐述了用全内反射荧光显微镜在观察细胞有丝分裂中,带动染色体分离的微管的聚合与解离的优势.

全内反射荧光显微镜不但能对单个生物分子进行探测,而且动态观察细胞或细胞器受到外界的刺激产生的反应也有很强的优势,比如细胞膜上离子通道在电刺激下结构重排过程<sup>[23]</sup>、细胞趋药特性<sup>[24]</sup>等等.而且还可以通过大量分子的集体行为来判断细胞的整体活动.图7<sup>[25]</sup>显示了细胞的一个吞噬过程.图7(a)为落射荧光显微镜的图像,因为其荧光强度不会随囊泡的运动而变化,所以看不到与质膜垂直的吞噬过程,对于全内反射荧光显微镜,由于隐失场的e指数衰减传播特性,可以观察到吞噬过程[图7(b)].58s时,Epi荧光变暗是因为可被染色的成笼蛋白(clathrin)分解了.通过右图荧光强度的变化,由(1)、(2)式可以计算出吞噬速度约为4nm/s.

由以上的分析我们可以看出,全内反射荧光显微镜的性能非常优异,尤其是其高信噪比,快速、无损伤的观察特点是别的仪器所难以比拟的.当然,其弱点也很明显,由于是用隐失场来照明,所以用它不能观察细胞或培养液深层的单分子分布和运动,因此将全内反射荧光显微镜与其他显微系统联合使用将给单分子探测技术的发展产生更大的推动.

## 4 纳米光学操纵探测技术——激光光钳

目前,激光光钳是探测活体生物单分子纳米量级的运动幅度和皮牛量级的相互作用最有力的仪器.早在17世纪,开普勒就用太阳光的辐射压力来解释彗星的彗尾反向太阳的方向这一天文现象.随后几百年间,人们从理论上逐渐认清了光是可以对物体产生一定的作用力的.但是由于它产生的作用力非常小,人们没有更多对它加以利用,直到20世纪60年代激光被发明后,人们找到了较大能量的光源,并且人们的观测技术已达到了一定的水平,激光光钳才被应用起来.Ashkin<sup>[26]</sup>第一次将光钳应用于生物学,实现了对烟草病毒的无损操控.从此激光光钳以其灵巧精细的探测和操控功能在生物单分子探测上发挥了巨大的作用.

一束被聚焦的激光就可以束缚一定大小的粒子.如果被束缚的粒子大小远大于所用的激光波长,则束缚力可用几何光学解释.按照光的波粒二象性原理,光既可以看成波也可以看成粒子,当光的传播方向改变时,组成其粒子动量也将发生改变,这就给改变其方向的物体以一定的冲量,从而对此物体产生作用力,如图8.对被束缚的粒子直径远小于激光波长的情况,用瑞利散射理论可以解释束缚力.按照瑞利散射理论,对如图8(a)这种小球横向偏离激光焦点情况,小球所受到激光的作用力为 $F = \frac{\alpha}{2} \nabla E^2$ <sup>[27]</sup>,其中 $\alpha$ 为与小球及周围介质折射率有关的系数, $E$ 为激光电磁场强度.由分析可知,此力也是朝向激光焦点方向的.对于如图8(b)、(c)情况,小球所受到激光的作用力为 $F = n_m \frac{S \sigma}{c}$ <sup>[27]</sup>,其中 $n_m$ 为小球周围介质折射率, $S$ 为玻印廷矢量, $\sigma$ 为与小球折射率、周围介质折射率及小球半径有关的量, $c$ 为光速.同样此力方向也是朝向激光焦点方向的.因此,对于较小粒子,激光也能将其束缚在焦点.对于粒子大小同激光波长相近的情况,解释起来较复杂一点,但是人们<sup>[28]</sup>通过电磁场理论还是可以把它求解出来.

需要强调的一点是,为了避免激光能量的损失,所要使用的激光波长应当不被吸收或者使用非导电介质小球.这两点指引着激光光钳使用者进行实验,比如Ashkin第一次将其用于生物样品时,就是使用不被生物体吸收的红外激光<sup>[26]</sup>.现在,探测和操控作为生物单分子手柄的与生物单分子相联的非导电

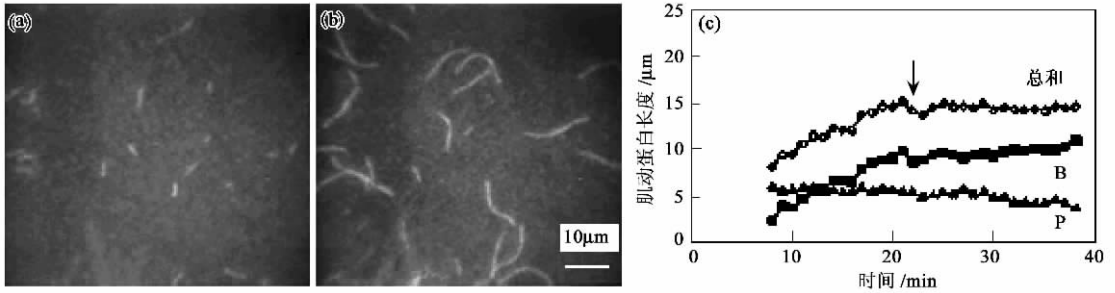


图 6 肌动蛋白聚合与解离图像 ( a, b ) 及数据分析图 ( c )<sup>[20]</sup>

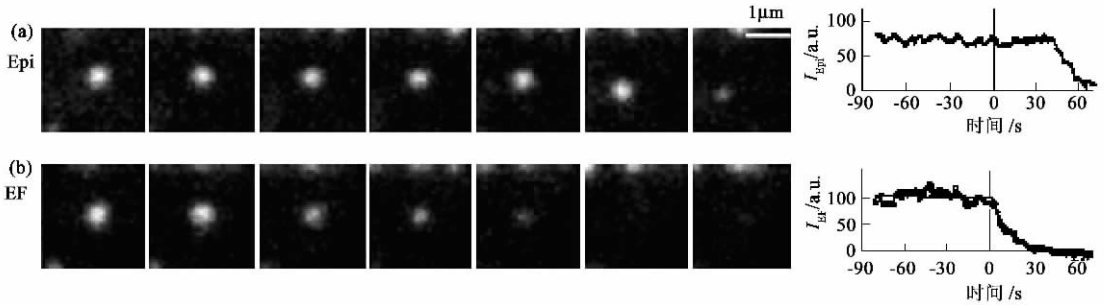


图 7 细胞吞噬过程落射荧光显微镜图像 ( a ) 与全内反射荧光显微镜图像 ( b ) 比较图及光强比较图 ( c )<sup>[25]</sup> ( Epi 为落射荧光显微镜图像 , EF 为全内反向荧光显微镜图像 ,  $I$  为荧光强度 )

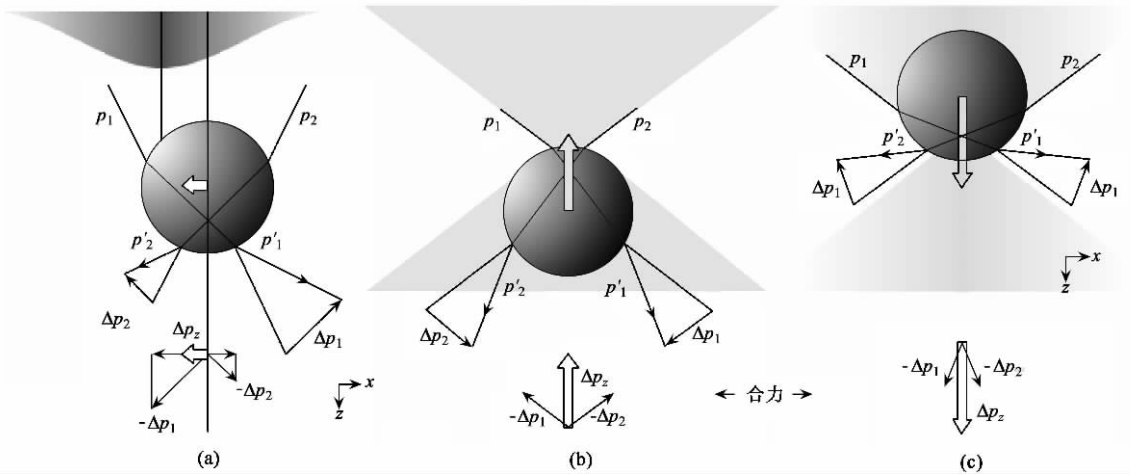


图 8 激光动量的改变使小球受力 ( a ) 小球水平偏离激光焦点受力示意 ( b ), ( c ) 小球上下偏离激光焦点受力示意

介质小球 , 成为一种通用的探测方法.

激光光钳操控探测生物单分子优点非常明显. 首先 , 利用红外激光器以及利用手柄的探测方法 , 使激光光钳对所探测和操控的生物单分子没有任何伤害 , 这样它就可以用于活体生物 , 实时观测生物单分子的活动. 其次 , 其皮牛量级的作用力及纳米量级的探测灵敏度正是生物单分子之间的相互作用和活动范围 , 非常适用于生物大分子的探测与操控. 最后 , 它作用于与波长相当的小球的力所产生的加速度大

约有  $10^5 g$ <sup>[29]</sup> , 因此它可以快速灵敏地捕获所要探测的粒子. 由图 9 可以看出激光光钳技术是多么的灵敏和精细<sup>[30]</sup>. 自从将激光光钳技术用于生物探测的近二十年来 , 人们在生物领域有了许多令人瞩目的新发现.

多年来 , 细胞中或细胞外的单个生物分子是如何运动的 , 这已成为生命科学研究的主要课题之一. 光钳的发明使人们能够清楚地测定生物单分子之间的相互作用力和相对运动的距离 , 尤其是在单分子



图9 激光光钳操纵 DNA 链,使之打结,图中细线为打结过程示意<sup>[30]</sup>

马达的动力学特性和 DNA 的力学特性探测等方面有了很重要的发现. 一般来讲激光光钳探测单分子马达运动的方式有两种:一是如图 10(a)所示<sup>[31]</sup>,直接探测与单分子相联的非导电介质小球的运动;二是如图 10(b)所示<sup>[32]</sup>,将单分子运动的载体用激光光钳固定,当单分子在其上运动时就会给牵引载体的小球以一定的作用力,这样通过此小球的运动也可间接判断单分子的运动特性. 肌肉收缩的滑移学说早已被人们证实,但是组成肌球蛋白头部的两个重链究竟是交替领先行走(hand-over-hand model,即交替模型)还是像尺蠖一样只有一个一直领先行走(inchworm model,即尺蠖模型),始终没有在实验上被证实<sup>[33]</sup>. 然而,激光光钳应用到肌球蛋白的运动探测,得到了其运动的一般规律<sup>[31,32]</sup>. Yildiz 利用激光光钳观察染色分子的技术证实肌球蛋白的移动步伐为 37nm,并且通过观察某一重链上的荧光分子的运动得出结论,肌球蛋白是以两条重链交替领先行走的<sup>[33]</sup>. 图 11(a)示意了两种模型染色分子的不同运动规律,图 11(b)为观测的结果. 由图 11(b)纪录的大小交替步长可分析出肌球蛋白是按交替模型来行走的. 另外利用激光光钳研究 DNA 的动力学特性是目前激光光钳在单分子探测中的另一个主要用途. Smith 首先利用激光光钳和微探针结合,通过探测 DNA 弹性来区别单链 DNA 和双链 DNA<sup>[34]</sup>. 从此这种方法被广泛用于 DNA 的力学特性测定. 这种探测方法示意图如图 12<sup>[35]</sup>. 生物素和亲和素将 DNA 牢固固定在充当手柄的小球上,通过移动微探针的位置来改变被激光光钳捕获的小球的位置,从而可以改变 DNA 所受到的力的大小. Benink 等人就是通过这种方法测量了 DNA 在不同缓冲液下的弹性,揭示了什么样的作用力下 DNA 的结构发生了改变<sup>[35]</sup>. Yasuharu 等通过激光光钳将 DNA 打结,然后拉伸 DNA,发现首先是从结处断开,由此详细研究了 DNA 的弯曲特性<sup>[30]</sup>.

## 5 展望

生物单分子探测技术在近些年来有了飞速的发展,纳米光学技术从中发挥了巨大的作用,虽然是这

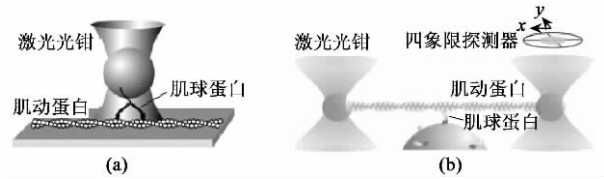


图 10 (a)直接测量单分子的运动示意图 (b)间接测量单分子运动示意图

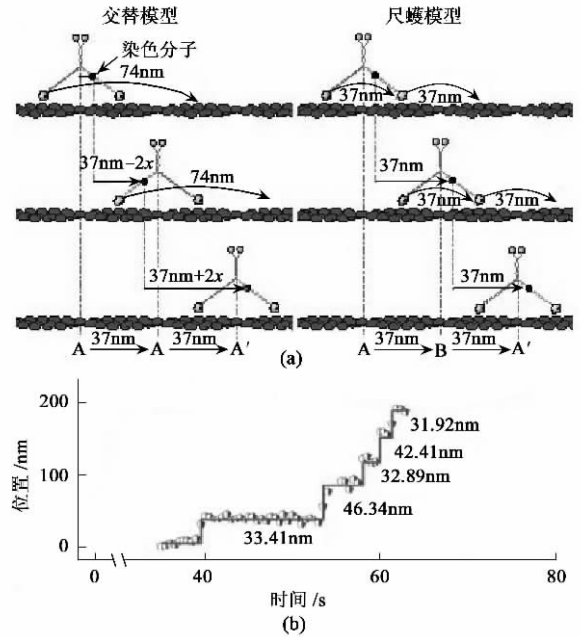


图 11 (a)两种运动模型染色分子运动规律的不同 (b)实际观察到的现象

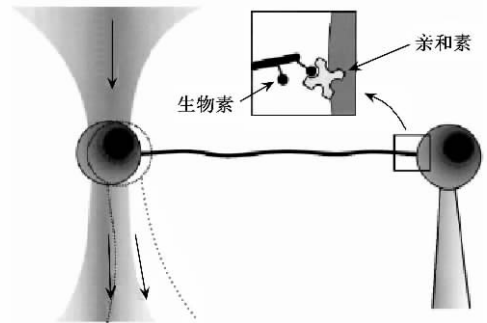


图 12 激光光钳研究 DNA 动力学特性示意图

样,纳米光学技术还有很大的发展空间. 对于量子点光学探针方面,不同发光量子点标记不同单分子和制备更小尺寸的发光量子点以及如何更好地使量子点与被标记的单分子融合而不影响生物活性,这些都是其发展的主要方向. 2003 年的量子点生物染色技术的飞快发展证实了这一点<sup>[36-38]</sup>. 对于纳米光学成像技术而言,全内反射荧光显微镜和扫描近场光

学显微镜相结合,将会得到广泛应用,因为一个是近场激发荧光分子,一个是近场接受荧光,这样将会达到空前的生物单分子光学分辨图像.另一方面,多种荧光分子对不同单分子染色而同时成像,也是将来全内反射荧光显微镜的一个发展方向,比如本文阐述的量子点探针在全内反射荧光显微镜上的应用.再者是改变成像所需光源的特性,来使荧光分子运动特性充分展示,这也是人们非常关心的研究课题<sup>[39]</sup>.对于激光光钳而言,也需要同其他显微系统联合使用,让测控过程和测控数据同时纪录下来.比如如何更好地与全内反射荧光显微镜及其他荧光显微镜的结合,都是值得研究的课题.而且如何精确地在三维上利用激光光钳操控单分子也是人们需要解决的问题.相信在各个领域的科学家们的共同努力下,纳米光学单分子探测技术必将在成像、纪录、测控三个层面有更大的综合的飞跃.

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bruchez M , Moronne M , Gin P *et al.* Science ,1998 281 2013  
 [ 2 ] Chan W , Nie S M . Science ,1998 281 2016  
 [ 3 ] Han M Y , Gao X H , Su J Z *et al.* Nature Biotechnology , 2001 19 631  
 [ 4 ] Lewis A , Taha H , Strinkovski A *et al.* Nature Biotechnology , 2003 21 1378  
 [ 5 ] Betzig E , Chichester R J . Science ,1993 262 1422  
 [ 6 ] Moers M H P , Ruiter A G T , Jalocha A *et al.* Ultramicroscopy ,1995 61 279  
 [ 7 ] Enderie Th ,Ha T ,Chemla D S *et al.* Ultramicroscopy ,1998 71 303  
 [ 8 ] Muramatsu H ,Chiba N ,Homma K *et al.* Appl. Phys. Lett . ,1995 66 3245  
 [ 9 ] Maheswari R U ,Tatsumi H ,Katayama Y *et al.* Optics Communications ,1995 120 325  
 [ 10 ] Mannelquist A , Iwamoto H , Szabo G *et al.* Appl. Phys. Lett. ,2001 78 2076  
 [ 11 ] Steyer J A , Almers W. Nature Molecular Cell Biology ,2001 , 2 268  
 [ 12 ] Toomre D , Manstein D J. Trends in Cell Biology ,2001 ,11 : 298  
 [ 13 ] Ishijima A , Yanagida T. Trends in Biochemical Sciences , 2001 6 438  
 [ 14 ] Axelrod D. Traffic 2001 2 764  
 [ 15 ] Axelrod D J . Cell Biology ,1981 89 :141  
 [ 16 ] Pierce D W ,Hom-Booher N ,Vale R D. Nature ,1997 388 24  
 [ 17 ] Zenisek D ,Steyer J A , Almers W. Nature 2000 406 849  
 [ 18 ] Seitz A , Kojima H , Oiwa K *et al.* The EMBO Journal ,2002 , 21 4896  
 [ 19 ] Cappello G , Badoual M , Ott A *et al.* Phys. Rev. E ,2003 68 : 021907  
 [ 20 ] Fujiwara I ,Takahashi S ,Tadakuma H *et al.* Nature Cell Biology 2002 4 666  
 [ 21 ] Sako Y ,Minoguchi S ,Yanagida T. Nature Cell Biology 2000 , 2 168  
 [ 22 ] Michael P , Stuurman Y N , Ronald D. PNAS ,2003 ,100 : 11424  
 [ 23 ] Sonleitner A , Mannuzzu L M , Terakawa S *et al.* PNAS 2002 , 99 12759  
 [ 24 ] Ueda M , Sako Y , Tanaka T *et al.* Science 2001 294 864  
 [ 25 ] Merrifield C J , Feldman M E , Wan L *et al.* Nature Cell Biology 2002 4 691  
 [ 26 ] Ashkin A , Dziedzic J M. Science ,1987 235 1517  
 [ 27 ] Bradley A , Brown , Brown P R. American Laboratory , 2001 ( NOV ) :13  
 [ 28 ] Tlusty T , Meller A , Bar - Ziv R. Phys. Rev. Lett. ,1998 81 : 1738  
 [ 29 ] Ashkin A. PNAS ,1997 94 4853  
 [ 30 ] Yasuharu A , Yasuda R , Harada K *et al.* Nature ,1999 399 : 446  
 [ 31 ] Rief M , Rock R S , Mehta A D *et al.* PNAS ,2000 97 9482  
 [ 32 ] Veigel C , Molloy J E , Schmitz S *et al.* Nature Cell Biology , 2003 5 980  
 [ 33 ] Yildiz A , Forkey J N , McKinney S A *et al.* Science ,2003 , 300 2061  
 [ 34 ] Smith S B , Cui Y J , Bustamante C. Science ,1996 271 795  
 [ 35 ] Bennink M L , Scharer O D , Kanaar R *et al.* Cytometry ,1999 , 36 200  
 [ 36 ] Larson D R , Zipfel W R , Williams R M. Science ,2003 300 : 1434  
 [ 37 ] Wu X Y , Liu H J , Liu J Q *et al.* Nature Biotechnology ,2003 , 21 41  
 [ 38 ] Jaiswal J K , Mattoussic H , Mauro J M *et al.* Nature Biotechnology 2003 21 47  
 [ 39 ] Nishizaka T , Oiwa K , Noji H *et al.* Nature Structural & Molecular Biology 2004 11 142

## 封 面 说 明

离散孤子的发现标志着从线性到非线性,从连续到非连续,从相干到非相干,人们对孤子认识的一个飞跃.在非线性光学介质中利用人工制备或光学诱导波导阵列或光子晶格的方法来演示这种孤子态已成为一个便捷的方法.近期,陈志刚等人在二维光致光子晶格结构中空间离散光孤子的研究中,发现了基模离散孤子,类矢量离散孤子,离散偶极孤子,离散涡旋孤子,和离散孤子串等多种新颖的光离散行为(将在2005年第1期《物理》杂志发表).我们期待这些结果将对其它离散非线性系统如生物分子链,固体物理中电子波所遇的晶格结构,以及玻色爱因斯坦凝聚的研究有所启发,并且在量子光学、信息等相关领域有所应用.

(南开大学泰达应用物理学院 许京军)