

单分子荧光检测在生命科学中的应用*

曲鹏 赵新生[†]

(北京大学化学学院化学生物学系 北京 100871)

摘要 文章对单分子荧光检测在分子马达、离子通道、信号分子、蛋白折叠、蛋白构象变化动力学、酶活性反应、细胞过程实时观察等生命科学领域中的应用进行了介绍。这些研究结果表明,单分子荧光检测在研究生物大分子的活动规律与机制方面不但有着无法替代的优越性,而且有着广阔的发展空间。

关键词 单分子荧光检测,生命科学,荧光共振能量传递,蛋白质,细胞

Applications of single molecule fluorescence detection in life science

QU Peng ZHAO Xin-Sheng[†]

(Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract The important developments and applications of single molecule fluorescence detection (SMFD) are discussed, covering applications in molecular motors, ion channels, signal molecules, protein folding, dynamics of protein conformational change and enzyme reaction, and real-time observation of cell processes. These results illustrate the unique advantages of SMFD and its bright future in life science research.

Keywords single molecule fluorescence detection, life science, fluorescence resonance energy transfer, protein, cell

经过二十多年的发展,单分子检测为揭示物理学、化学、特别是生命运动的规律提供了重要的手段,成为人们日益关注的现代科学研究技术。事实上,自上世纪初爱因斯坦解释布朗运动起,单个分子的行为就引起了科学家们的注意。但直到1959年,单个原子或分子操纵与检测的概念才由费曼提出,有逸闻说他还为此提供了两笔1000美元的奖金。真正意义上的单分子检测是在1976年,Neher和Sakmann^[1]成功地检测到单个离子通道的电信号并开创了膜片钳技术,从而获得了1991年的诺贝尔生理和医学奖。另一方面,赫施费尔德也在1976年用全内反射光学的方法观察到标记了80到100个荧光素的单个抗体分子^[2],开启了单分子光学研究的大门。早期的单分子检测主要集中在低温条件下,主要原因是在液氮温度下背景干扰小,并可对单个分子进行长时间观察,获得高分辨荧光光谱。1993年,Betzig和Chichester^[3]率先在室温下用近场光学手

段观察到单个分子,为单分子光学检测进入生物领域奠定了基础。《物理》曾于2000年发表过介绍单分子光学检测的文章^[4],本实验室也曾于1999年和2005年两次在《大学化学》上撰文对单分子光学检测予以介绍^[5,6]。到目前为止,单分子光学检测应用于生命科学的文献已经非常浩繁,本文拟择要介绍一些单分子荧光检测方法在生命科学中应用的进展,并不再重复上面谈到的三篇文章中已经讨论过的基础知识。

1 单分子荧光检测技术

基于低背景和高信噪比,激光诱导荧光已成为

* 国家自然科学基金(批准号20333010,30490172)和国家重点基础研究发展计划(批准号2006CB910300)资助项目
2007-07-02收到

[†] 通讯联系人, Email zhaoxs@pku.edu.cn

单分子光学检测中最广泛应用的手段。一般荧光分子激发态的寿命在纳秒量级,在激光激发下,分子可以反复吸收、发射光子,直到发生各种原因造成的光漂白。在理想情况下,一个稳定的分子在光漂白前大约能发出 10^5 — 10^6 个荧光光子,利用高数值孔径物镜和高效单光子计数雪崩光电二极管(APD),能接收到约 5%—10% 的荧光光子。这样,从一个“表现”好的荧光分子上可以收集到 5000 到 50000 个光子,这一数目足以让人们进行单个分子的探测、光谱辨认和对反应的实时监测。对于生物大分子如蛋白质和核酸,可以用荧光分子标记来达到单个分子检测的目的。常见的荧光分子主要包括有机染料小分子、荧光蛋白、共轭高分子等。近年来,人们还发展出一些新的荧光物种,如量子点、树枝状高分子、小肽片段等。

根据单分子荧光检测的原理和提高信噪比的要求,人们发展出了各种单分子荧光检测的方法和数据分析手段。单分子荧光检测方法主要可以分为共聚焦和宽场两种方式,如图 1 所示。

基于共聚焦检测(如图 1(a)(b))的数据分析手段是以荧光涨落谱(FCS)和光子频率统计(PCH)为代表。荧光涨落谱是一个相对古老的技术,早在上世纪初,Perrin 小组^[8]在研究布朗运动时就应用了荧光涨落谱的方法。但由于当时实验技术落后,没得到广泛应用。上世纪 70 年代,Elson, Magde, Webb^[9-11]在没有体系扰动的前提下,以荧光涨落信号为对象,研究了溴化乙啶和双链 DNA 之间的化学反应,第一次将这一技术应用于化学反应动力学信息的提取。1993 年,Rigler 和他的同事们将荧光涨落谱技术与共聚焦显微镜相结合,应用于单分子检测^[12,13],为二者同时带来了新的契机。从荧光涨落谱衍生出来的技术还有荧光互相关光谱(FCCS)、共聚双光子激发、时间相关单光子计数(TCSPC)、扫描荧光涨落谱(或称图像相关谱)、全内反射荧光涨落谱等。相对于荧光涨落谱,荧光强度分布分析(FIDA)和光子频率统计(PCH)是近几年发展起来的技术,它们弥补了荧光涨落谱丢失涨落高低信息的缺陷,二者的结合可以给出复杂体系中的大量统计信息。

宽场检测采用的检测器是阵列电荷耦合器件(CCD),可以同时收集所有像素的信息,适用于以成像的方式检测生物及化学反应过程,是研究活细胞物质行为的一种常用方法,但时间分辨率主要受读出时间限制。其中一种重要照明方式是全内反射

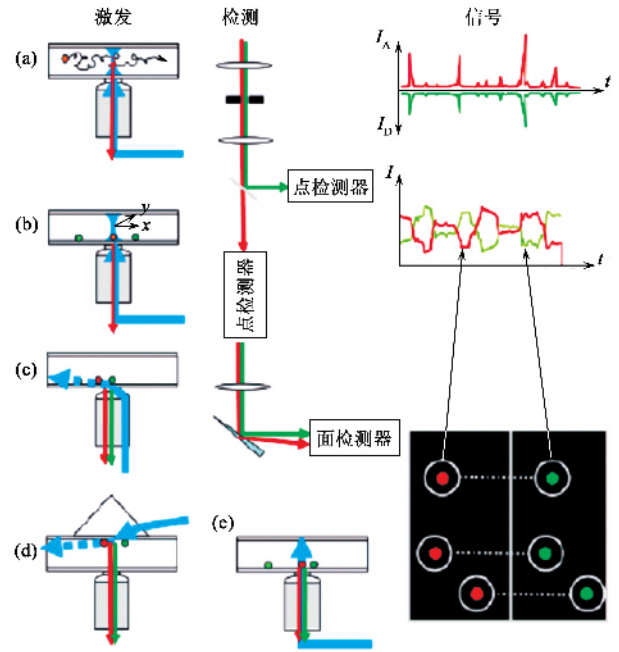


图 1 常见单分子荧光检测方法^[7]。在共聚焦检测中(图(a)和图(b)),激光经过一个高数值孔径的物镜后聚焦于样品中一个衍射极限的体积内。聚焦体积内样品发出的荧光被同一个物镜收集后,经过双色镜、透镜、滤光片,被一个或几个点检测器(APD)检测。自由扩散的分子(图(a))会产生如图 1 右上所示的不同高度的脉冲信号,固定在表面的分子(图(b))产生的信号如图 1 右中所示,可采用扫描的方式获得光学成像。宽场检测方式(图(c)至图(e))可以分为两种:全内反射(图(c)和图(d))和宽场落射(图(e))。在全内反射检测中,激光聚焦于玻片和溶液的交界面,发生全内反射,光强随着距离迅速衰减(如虚线所示),以隐失场的方式照明距界面几百个纳米的距离。这种照明方式背景低,可以通过物镜(图(c))或棱镜(图(d))实现。在宽场落射检测中,激光聚焦于物镜的后焦平面,通过面检测器(阵列电荷耦合器件)可以平行记录几个单个分子的信号,也可以对单个分子进行轨迹追踪。图 1 右下图是利用双色宽场落射检测得到的成像示意图

照明。如图 1 中(c)(d)所示,光线从光密介质射入光疏介质,当入射角大于布儒斯特角时形成全反射,可以通过隐失场的方式对样品进行激发。激发光的强度随距离指数衰减,特征距离大约为半波长。这种照明方式激发体积小,集中于分界面,背景低,可以显著提高信噪比,很适合进行细胞膜及其他表面上的单分子研究。

2 单分子荧光检测在生命科学中的应用

2.1 生化分析

以液流中的单分子检测作为分子分选器,可以分析复杂溶液中浓度极低的目标分子,也可以利用

荧光相关分析获得极稀溶液的浓度. 例如, Keller 等人^[14]首先提出利用单分子检测技术进行 DNA 序列的快速测定, 其原理为: 用不同荧光标记物标记好的 4 种核苷酸, 合成长达几千个碱基对的 DNA 片段, 把 DNA 分子与微珠连接, 放在缓冲液流的中间. 流体中含有核酸外切酶, 每隔一定时间消除一个核苷酸, 剪切下的核苷酸分子流经激光束时就会根据它们的荧光标记物被一个一个检测和识别.

2.2 骨架运输蛋白的工作原理

细胞需要对大的生物分子或复合体进行快速、定向的运输. 其中微丝和微管作为细胞的骨架同时起到导轨的作用, 以引导运输蛋白的运动. 骨架运输蛋白主要有三类: 驱动蛋白、动力蛋白和肌球蛋白. 人们通过单分子荧光检测对这些重要的分子马达进行了一系列研究, 发现它们都是以步进方式运动的.

人们通过传统手段了解到, 驱动蛋白沿着微管运送物质, 但对于驱动蛋白在微管上的运动模式, 一直存在着交臂和蠕动两种模型之间的争论. 1996 年, Funatsu 等人^[15]用全内反射的光学方法直接观测到单个驱动蛋白沿微管的移动. 2004 年, Yildiz 等人^[16]用 Cy3 染料标记单头的驱动蛋白, 通过准确定位, 确定驱动蛋白在微管上移动的步长为 17.3 nm, 其结果支持了交臂模式(图 2).

肌球蛋白与细胞中许多重要的功能活动有关, 如肌肉收缩、变形运动、胞质分裂和细胞信号传递等. 它沿着微丝行走, 运动速度比沿微管行走的驱动蛋白和动力蛋白慢. 1995 年, Funatsu 等人^[17]首次观测到单个荧光标记的肌球蛋白分子和单个三磷酸腺苷(ATP)转化反应. 同年, Sase 等^[18]利用荧光偏振成像观测到滑动着的肌动蛋白细丝在轴向上的转动. 体外单分子研究表明, 肌球蛋白沿微丝的运动也是步进式的. 2003 年, Yildiz 等人^[19]在全内反射的激发下, 用荧光成像获得精确到 1.5 nm 的步长统计, 发现肌球蛋白 V 的步长为 37 nm, 并且也是遵循交臂运动模型^[20].

肾上腺素受体(AR)属于 G 蛋白偶联受体(GPCRs)家族, 因为直接参与交感-儿茶酚胺系统对心血管的功能调控而引起广泛关注. 梁璋仪等利用宽场落射显微镜, 在活的 HEK293A 细胞内, 利用单分子技术观测 α_{1A} -AR 和 α_{1B} -AR 两种亚型在活细胞内的运输情况^[21-22], 发现在受到激动剂刺激后, α_1 -AR 发生内化, 首先通过微丝运输. 他们也观察到运输过程中的步进模式, 其步长、停留时间与

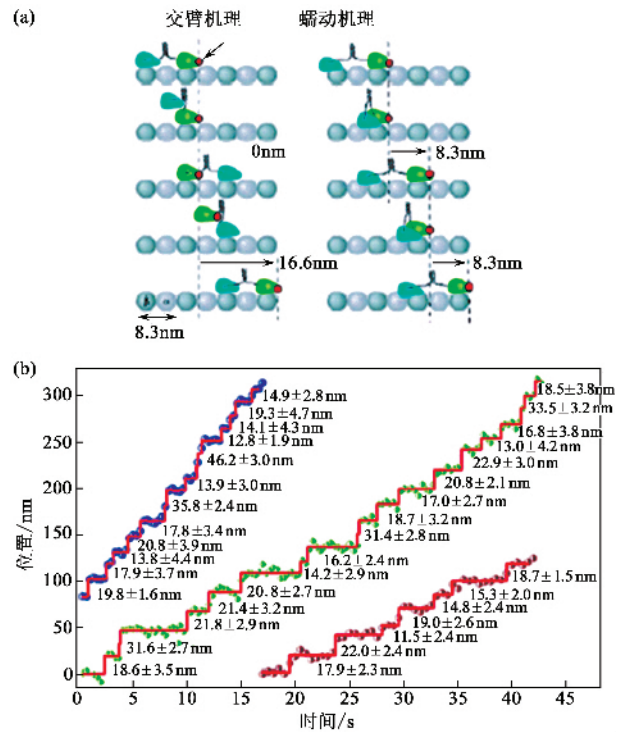


图2 驱动蛋白的运动^[16] (a) 驱动蛋白前进运动的两个机理, 其中交臂机理表示在驱动蛋白头部的染料分子会以 16.6 nm 和 16.6 nm 相互转换地一步一步前进, 蠕动机理表示驱动蛋白会以不变的 8.3 nm 步子前进 (b) 实验获得的驱动蛋白二聚体运动的位置-时间图. 数值为步长的大小

细胞外实验一致, 为交臂模式, 结果如图 3 所示.

2.3 其他分子马达的研究

利用单分子荧光偏振成像的方法, Nogi 等人^[23]将荧光标记的肌动蛋白和 F1-ATP 酶的 γ 亚基结合, 结果表明, 当有 ATP 时, 标记物会沿逆时针方向转动 100 次以上. Kinosita 等人^[24-25]又详细地分析了单个荧光基团 Cy3 标记下 F1-ATP 酶的运动轨迹, 进一步说明这种旋转是分步进行的, 每步转动 120°. 2005 年, Abbondanzieri 等人^[26]利用光镊技术测定出 RNA 聚合酶的移动步长为 $3.7 \pm 0.6 \text{ \AA}$.

2.4 离子通道

2000 年, Schütz 等人^[27]将与 Kv1.3 通道有高亲和力的 Hongotoxin 标记, 在宽场照明下进行单分子成像, 沿 z 轴连续移动焦点, 通过基于高斯分布的点扩散方程(PSF)拟合, 得到 40 nm 的定位精度, 从而得到了 Kv1.3 通道的三维图像.

2001 年, Harms 等人^[28]将增强黄色荧光蛋白转染到离子通道, 在宽场照明下, 实现了单个 L 类型钙离子通道在活细胞内的成像, 通过光强的计算和

比较,推断出 L 类型钙离子可能在细胞膜上形成可以移动的较大聚集体,并用相关函数拟合出其扩散系数。

Sonnleitner 等人^[29]在活细胞内用四甲基罗丹明标记单个压控钾离子通道,研究荧光强度随膜电压的改变,观察到了离子通道的重排。Ide 等人^[30]设计出可以同时观察单离子通道电流和其单分子成像的方法,但这个工作是在人工脂质膜上进行的。

2.5 膜上信号分子受体研究

这类研究中最具代表性的是对表皮生长因子受体(EGFR)的研究。2000 年,Sako 等人^[31]在全内反射照明下,用 Cy3、Cy5、四甲基罗丹明分别标记表皮生长因子(EGF),观察到 EGFR 在细胞膜表面的二聚化行为。Sako 还用类似的方法,对神经生长因子受体、环单三磷酸腺苷(cAMP)、Rho 家族 G 蛋白(Ras, Rac, Cdc42)等一系列重要的信号分子,成功地进行了单分子荧光成像^[32]。在此基础上,2001 年,Ueda, Sako 等人^[33]用全内反射显微镜对进行趋化运动的细胞进行单分子成像,并对 cAMP 的解离事件进行统计,结果表明 cAMP 的结合解离循环在细胞的头部较快,暗示着 cAMP 受体可以感受 cAMP 的梯度进行极化。2002 年,Itoh 等人^[34]利用两种荧光蛋白分别标记 Rac 和 Cdc42,通过荧光共振能量传递(FRET)现象观测二者的活性,发现二者的分布与细胞的运动方向密切相关。2004 年,Murakoshi 等人^[35]用有机染料 bodipy 标记三磷酸鸟苷,与构建的黄色荧光蛋白——Ras 蛋白构成荧光共振能量传递对,利用全内反射显微镜观察 Ras 蛋白的活化作用。他们发现,在活化状态下,Ras 的扩散被大幅度抑制,这一现象支持形成更大的有活性的 Ras 信号复合物这一假设。

2.6 生物大分子构象变化

DNA 的复制、转录、翻译,蛋白的折叠、聚集、活化,DNA-蛋白和蛋白-蛋白相互作用等,几乎每一

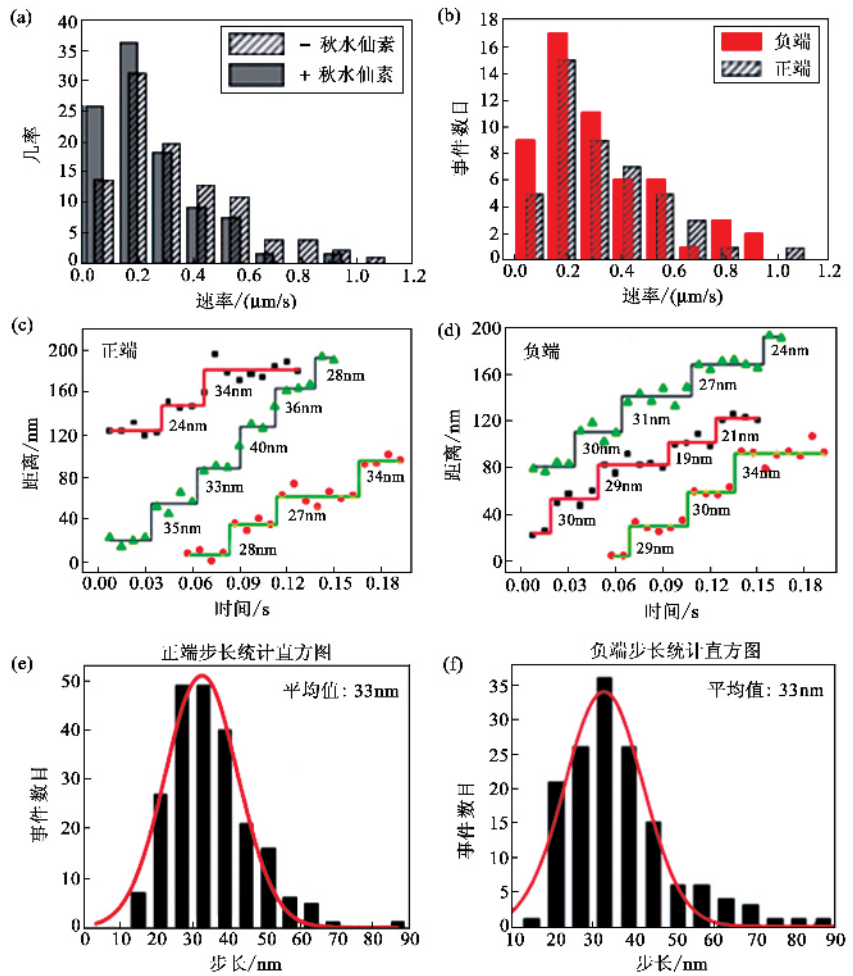


图3 α_{1A} -AR 在细胞内运输的情况^[22] (a)灰色表示微管阻断剂秋水仙素处理前后,肾上腺素受体激动剂刺激带来的 α_{1A} -AR 运动速率分布。二者相近,主峰均为 $0.2 \mu\text{m/s}$ (b)朝向微丝正端与朝向微丝负端的 α_{1A} -AR 运动速率分布。二者相近,主峰均为 $0.2 \mu\text{m/s}$ 。(c)-(f):朝向微丝正端与朝向微丝负端的 α_{1A} -AR 沿微丝运动均表现为步进式的模式,其中(c)和(d)为两个方向的时间-位置图(e)和(f)为步长统计

个重要过程都与生物分子本身的构象变化有关,利用单分子荧光检测为进一步了解这些过程提供了有力的手段。近年来,在这些方面也取得了较大的进展,现列举一些有代表性的例子。

Ha 等人^[36,37]在共焦显微镜下结合 FRET 和偏振检测的技术,对葡萄球菌核酸酶(SNase)进行了研究,发现 FRET 效率的涨落来自于蛋白自身的构象变化。他们还利用 FRET 技术研究了 RNA 三链结合体的构象变化^[38]。

热休克蛋白具有分子伴侣的功能,能防止蛋白的错误折叠。关英华等利用 FRET 技术,在宽场下对小热休克蛋白 MjHSP16.5 进行了单粒子追踪,给出了 MjHSP16.5 裂分和高温下亚单元交换的机理^[39]。结果表明,蛋白裂开的过程是分多步的,并以偶数

产物为主,如图 4(a)和 4(b)所示. 通过热力学、动力学分析发现,在温度较低的区间(75 °C 以下),亚单元之间的交换决速步为单个蛋白分子的裂解;当温度升高以后,蛋白逐渐以解离的状态存在,温度继续升高的结果是二聚体之间发生交换,即单体交换.

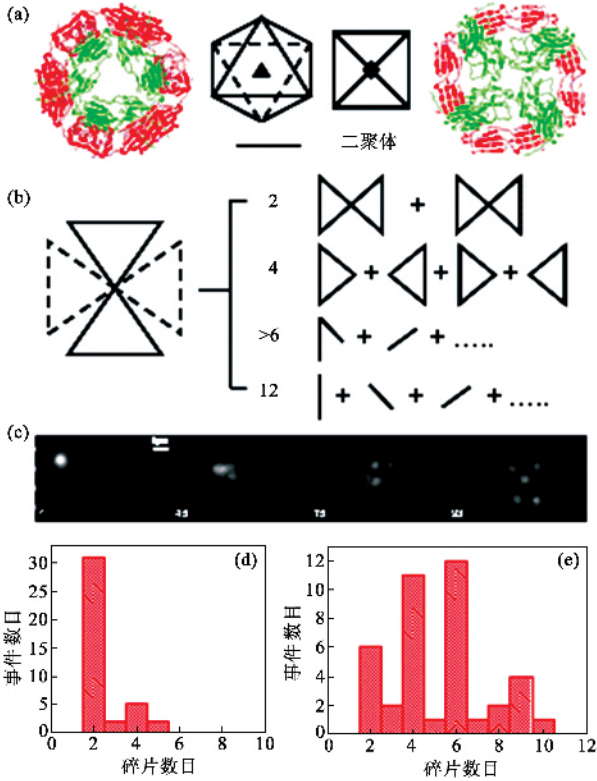


图 4 小热休克蛋白 MjHSP16.5 裂解的机理^[39] (a)和 (b)为 MjHSP16.5 蛋白分子的裂解示意图,其中 (a)为三重轴和四重轴结构示意图 (b)为裂解过程的推测 (c) (d) (e)为 MjHSP16.5 蛋白分子的裂解过程及碎片数目统计,其中 (c)为 Cy3 染料标记的单个 MjHSP16.5 蛋白分子裂解轨迹迹图. 图中比例尺为 1 μm,数字为收图的帧数,每张图的曝光时间为 50ms (d)为裂解第一步的碎片数统计,以两个碎片为主 (e)为最终的碎片数统计,以偶数产物为主

2.7 蛋白质折叠

蛋白折叠是蛋白维持自身生存、履行生物功能的重要行为,一直受到人们的广泛关注. 单分子荧光方法在这个领域显示出了巨大的优势,并取得了很大的进展. 其中胰凝乳蛋白酶抑制剂 2(CI2)和冷休克蛋白(csp)是两个典型蛋白,下面以这两个蛋白的研究情况为例进行简要介绍.

Deniz 等人^[40]利用共焦显微镜,通过统计不同变性剂浓度下 FRET 效率,得到了 CI2 两态的分布信息. 2004 年, Kapanidis 等人^[41]发展出转换激光激发(ALEX)的方法,可以精确得到 FRET 效率,对 CI2 进行了更细致的研究. Schuler 等人^[42]将 csp 的

N 端和 C 端突变为半胱氨酸,特异性标记上两种可以发生 FRET 的荧光染料,得到不同变性剂浓度下的 FRET 效率分布. 与 CI2 不同的是,他们还观察到了蛋白坍塌的过程,如图 5 所示. 在后来一系列的研究中,他们使用囊泡包裹 csp 进行长时间观察,对 csp 构象变化的动力学进行了描述^[43,44].

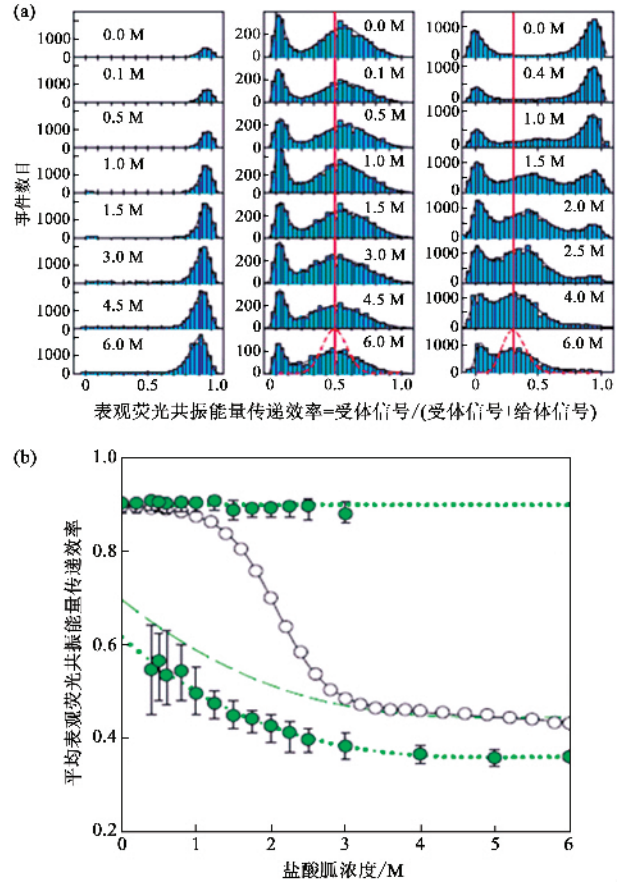


图 5 冷休克蛋白 csp 的去折叠过程^[42] (a)脯氨酸 6(左)脯氨酸 20(中),Csp(右)在不同变性剂浓度下的 FRET 效率分布统计 (b)Csp 的 FRET 效率平均值对变性剂浓度的依赖性. 上方的实心点对应不同变性剂浓度下高 FRET 效率峰(天然状态),下方的实心点对应不同变性剂浓度下低 FRET 峰(变性状态). 空心点是从系综实验得到的表观 FRET 效率. Csp 低 FRET 效率(变性状态)随变性剂浓度的位移反映了多肽链的坍塌过程

最近,霍夫曼等人^[45]将发生 FRET 的染料标记在整个肽链的不同位置,在单分子水平上研究了不同变性剂浓度下不同位点之间的距离分布,结果表明,蛋白质的疏水塌缩分布于整个肽链中. 他们还用高斯链模型较好地拟合了平均 FRET 效率随标记位点距离变化的关系,得到一个衡量链刚性的参数 L_p . 在不同变性剂浓度下,不同标记点之间链断的 L_p 值相同,说明蛋白在折叠过程中处于各向同性的无规线团状态.

2.8 生物分子构象动力学

生物分子在生命体内经历着各种时间尺度的运动,了解这些过程的动力学对于了解生命体至关重要.单分子荧光检测在动力学研究方面显示出卓越的优势,这方面的工作一般基于共聚焦显微镜,结合荧光涨落谱或荧光强度分布分析等数据分析手段进行.

1996年,Rigler和他的同事们将荧光涨落谱方法与共聚焦显微镜结合,研究了DNA单链和杂交体系^[46],得到了相应的动力学参数.随后,Bonnet等人^[47]结合荧光涨落谱和FRET技术,在DNA解链行为上进行了重要的工作.2000年,Zhuang等人^[48]成功地利用FRET技术研究了四膜虫里的核酶与底物之间可逆的动力学行为.2004年,Tan等人^[49]研究了被激活的Cdc42作用的下游蛋白WASP,通过荧光涨落谱数据进行动力学分析,表明蛋白-蛋白相互作用的复合体存在结合和松散结合两种状态,二者之间互相转换.2003年,Klenerman小组发展了一种单分子水平上的双色符合检测(TCCD)技术,将其应用于人体调聚物RNA的二聚体分子间反应动力学研究^[50].2007年,Mukhopadhyay等人^[51]利用这种方法对蛋白进行定位,并用荧光涨落谱方法对其动力学参数进行了拟合.

2.9 酶活性反应

在生物体系中,几乎所有过程的发生都有酶的参与.单分子荧光方法可以对酶反应过程有更加准确的描述,因此单个酶分子化学活性的研究在单分子领域引起了广泛的关注.1961年,Rothman^[52]第一个在微滴中研究了单个酶分子活性.经不断的深入研究,科学家们发现,酶在催化反应过程中会呈现不同构象,一直以来被奉为经典的米氏方程^[53]也需要在单分子条件下进行进一步的考证.谢晓亮小组^[54,55]在单分子研究酶反应中做了重要的工作.1998年,他们选择黄素酶(flavoenzyme)作为研究酶转化的对象,结果表明,荧光状态的时间分布不是单指数函数,证明该反应不是简单的基元反应^[54].2003年,他们利用黄素与酪氨酸之间的光致电子转移,得到了单个黄素酶在Å尺度上的结构变化,结果表明,在催化过程中,有多个中间构象体存在^[55].2006年,他们将β-半乳糖固定在玻片上,巧妙地让底物不断地流过焦点,实现了长时间的观察.结果表明,米氏方程不能直接进行单分子浓度下的推导,需要通过分布进行修正,他们还发现酶活性具有记

忆效应,这是在系综条件下无法发现的现象^[56].

2.10 对细胞内生命过程的直接观察

利用单分子荧光检测对病毒入侵细胞的全过程进行观察,为了解病毒与细胞相互作用提供了最直接的资料.两个成功的例子是:Seisenberger等人^[57]在2001年利用多色宽场激发与荧光相关谱联用,第一次观测到病毒入侵细胞的过程,并得到相应的扩散系数;Lakadamyali等人^[58]于2003年在宽场显微镜下用pH敏感的染料标记流感病毒,对病毒从细胞膜至细胞核的过程进行了跟踪.

同时,利用单分子技术人们也成功地观察到了细胞本身的生命活动.2000年,Tsuji等人^[59]将c2fosmRNA转染入Cos7细胞,以微注射的方式将有染料标记的DNA注入细胞,通过FRET观察细胞内DNA与mRNA的杂交过程.2003年,Rieder等人^[60]对活细胞有丝分裂进行了实时观察.他们观察绿色荧光蛋白标记的α微管蛋白在有丝分裂过程中的变化,在56min内记录了一个细胞分裂的全过程,为研究活细胞生命活动复杂过程提供了清晰的图像.2006年,Lakadamyali等人^[61]利用单个粒子追踪技术,定量刻画了早期内涵体的不同运动状态及循环通路;Yu等人^[62]实时定量地观测了单个蛋白在活细胞中的产生;Yao等人^[63]利用多光子显微镜方法进行活细胞成像,结合荧光漂白恢复、荧光涨落谱等技术,研究了在复制过程中DNA与热休克因子的结合.

3 结束语

单分子荧光检测在生命科学各个领域取得了可喜的研究成果,为人们提供了新的思路和方法,甚至启发人们对细胞生物学乃至生命过程进行重新认识.传统分子生物学、细胞生物学的发展使得在生命体系中用于单分子研究的对象更易获得,加上X射线衍射、核磁共振等方法被广泛应用于蛋白结构测定,这些都为生物单分子研究提供了有利的条件.然而,单分子荧光检测在生命科学研究中的应用仍有待进一步的发展.例如,如何同时满足高时间分辨率和高空间分辨率的要求,如何对细胞进行无损标记,从而达到真正意义上的生命体系检测,如何开发单分子荧光检测的新功能、新方法,这些都已经成为人们越来越关注的问题.另外,除荧光检测手段之外,原子力显微镜(AFM)、光镊、相干反Stokes拉曼散

射(CARS),非线性光谱等等也被越来越广泛地应用于单分子检测领域。微流路、纳米注射技术等多种新技术的结合也将为单分子检测带来新的契机。不同学科与方法的发展与融合将使单分子荧光检测在未来的道路上充满挑战和希望。有理由相信,单分子荧光检测将会登上更高的台阶。

参 考 文 献

- [1] <http://nobelprize.org/index.html>
- [2] Hirschfeld T. *Appl. Opt.*, 1976, 15 :2965
- [3] Betzig E, Chichester R J. *Science*, 1993, 262 :1422
- [4] 周拥军 陈德强 夏安东等. *物理* 2000 29 :657 [Zhou Y J, Chen D Q, Xia A D *et al.* *Wuli (Physics)*, 2000, 29 :657(in Chinese)]
- [5] 应立明 谢晓亮. *大学化学*, 1999, 14(5) :1 [Ying L M, Xie X L. *University Chemistry*, 1999, 14(5) :1(in Chinese)]
- [6] 梁璋仪 赵新生. *大学化学*, 2005, 20(2) :1 [Liang Z Y, Zhao X S. *University Chemistry*, 2005, 20(2) :1(in Chinese)]
- [7] Michalet X, Weiss S, Jager U *et al.* *Chem. Rev.*, 2006, 106 :1785
- [8] Perrin J. *The Atoms*; Leipzig : Lottemoser, 1914
- [9] Magde D, Elson E, Webb W W. *Phys. Rev. Lett.*, 1972, 29 :705
- [10] Elson E L, Magde D. *Biopolymers*, 1974, 13 :1
- [11] Magde D, Elson E, Webb W W. *Biopolymers*, 1974, 13 :29
- [12] Rigler R, Mets U, Widengren J *et al.* *Eur. Biophys. J.*, 1993, 22 :169
- [13] Eigen M, Rigler R. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1994, 91 :5740
- [14] Jett J H, Keller R A, Martin J C *et al.* *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1989, 7 :301
- [15] Vale R D, Funatsu T, Pierce D W *et al.* *Nature*, 1996, 380 :451
- [16] Yildiz A, Tomishige M, Vale R D *et al.* *Science*, 2004, 303 :676
- [17] Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M *et al.* *Nature*, 1995, 374 :555
- [18] Sase I, Miyata H, Corrie J E T *et al.* *Biophys. J.*, 1995, 69 :323
- [19] Yildiz A, Forkey J N, McKinney S A *et al.* *Science*, 2003, 300 :2061
- [20] Mehta A D, Rock R S, Rief M *et al.* *Nature*, 1999, 400 :590
- [21] Xu M, Guan Y H, Xu N *et al.* *Solid. State Phenomena*, 2007, 121 - 123 :771
- [22] Liang Z Y, Xu N, Guan Y H *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2007, 353 :231
- [23] Noji H, Yasuda R, Yoshida M *et al.* *Nature*, 1997, 386 :299
- [24] Kinoshita J K, Yasuda R, Noji H *et al.* *Cell*, 1998, 93 :21
- [25] Yasuda R, Noji H, Kinoshita *et al.* *Cell*, 1998, 93 :1117
- [26] Abbondanzieri E A, Greenleaf W J, Shaevitz J W *et al.* *Nature*, 2005, 438 :460
- [27] Schütz G J, Hesse J, Freudenthaler G *et al.* *Single Mol.*, 2000, 2 :153
- [28] Harms G S, Cognet L, Lommerse P H M *et al.* *Biophys J* 2001, 81 :2639
- [29] Sonnleitner A, Mannuzzo L M, Terakawa S *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2002, 99 :12759
- [30] Ide T, Takeuchi Y, Yanagida T. *Single Mol.*, 2002, 3 :33
- [31] Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. *Nature Cell Biology*, 2000, 2 :168
- [32] Sako Y, Hibino K, Miyauchi T *et al.* *Single Mol.*, 2000, 1 :159
- [33] Ueda M, Sako Y, Tanaka T *et al.* *Science*, 2001, 294 :864
- [34] Itoh R E, Kurokawa K, Ohba Y *et al.* *Mol. Cell. Biology*, 2002, 22 :6582
- [35] Murakoshi H, Lino R, Kobayashi T *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2004, 101 :7317
- [36] Ha T, Enderle T, Ogletree D F *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1996, 93 :6264
- [37] Ha T, Ting A Y, Liang J *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1999, 96 :893
- [38] Ha T, Zhuang X, Kim H D *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1999, 96 :9077
- [39] Guan Y, Wang Z, Cao A *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 128 :7203
- [40] Deniz A A, Laurence T A, Beligere G S *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2000, 97 :5179
- [41] Kapanidis A N, Lee N K, Laurence T A *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2004, 101 :8936
- [42] Schuler B, Lipman E A, Eaton W A. *Nature*, 2002, 419 :743
- [43] Schuler B, Lipman E A, Eaton W A. *Nature*, 2003, 421 :94
- [44] Schuler B, Lipman E A, Steinbach P J *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2005, 102 :2754
- [45] Hoffmann A, Kane A, Nettels D *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2007, 104 :105
- [46] Edman L, Mets U, Rigler R. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1996, 91 :5740
- [47] Bonnet G, Krichevsky O, Libchaber A. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1998, 95 :8602
- [48] Zhuang X, Bartley L E, Babcock H P *et al.* *Science*, 2000, 288 :2048
- [49] Tan X, Nalbant P, Touthkine A *et al.* *J. Phy. Chem. B*, 2004, 108 :737
- [50] Li H T, Ren X J, Ying L M *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004, 101 :14425
- [51] Mukhopadhyay S, Krishnan R, Lemke E A *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2007, 104 :2649
- [52] Rotman B. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1961, 47 :1981
- [53] Yang H, Xie X. S. *J. Chem. Phys.*, 2002, 117 :11024
- [54] Xie X S, Trautman J K, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1998, 49 :441
- [55] Yang H, Luo G, Karnchanaphanurach P *et al.* *Science*, 2003, 302 :262
- [56] English B P, Min W, Oijen A M *et al.* *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2 :87
- [57] Seisenberger G, Ried M U, Endre T *et al.* *Science*, 2001, 294 :1929
- [58] Lakadamyali M, Rust M J, Babcock H P *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2003, 100 :9280
- [59] Tsuji A, Koshimoto H, Sato Y *et al.* *Biophys. J.*, 2000, 78 :3260
- [60] Rieder C L, Khodjakov A. *Science*, 2003, 300 :91
- [61] Lakadamyali M, Rust M J, Zhuang X. *Cell*, 2006, 124 :997
- [62] Yu J, Xiao J, Ren X *et al.* *Science*, 2006, 311 :5767
- [63] Yao J, Munson K M, Webb W W *et al.* *Nature*, 2006, 442 :1050