

单分子的光学检测及应用

应立明

(北京大学化学与分子工程学院 100871)

谢晓亮

(Pacific Northwest National Laboratory, William R. Wiley Environmental
Molecular Sciences Laboratory, P.O. Box 999, K8-88, Richland, Washington 99352, USA)

摘要 介绍了单分子光学检测技术的基本原理、方法及其在化学和生命科学中的应用, 重点强调单分子动力学在酶反应和生物大分子构象变化研究中的独特作用, 对今后的发展作了展望。

1 前言

在化学教科书里, 分子的相互作用和化学反应通常以单个分子为基础来描述, 然而人们对分子的性质、相互作用和动态过程的知识则几乎完全来自于大量分子的系综平均。多年来, 科学家们不断致力于寻求可以探测单分子行为的方法, 其中有已经为科技界熟知的利用“Patch-clamp”技术记录单个离子通道和利用扫描隧道显微镜 (STM) 或原子力显微镜 (AFM) 观察单个原子或分子。近年来在光谱学和光学显微镜方面的进展, 不仅使得在表面和溶液中检测和成像单分子成为可能, 而且可以对单分子的光谱性质进行测量并实时监测其动态过程^[1,2]。光谱方法具有快速、无损、时间分辨等特点, 是研究单分子化学的一个重要手段。

由于单分子光学检测技术具有在凝聚相中探测识别单分子的能力, 在探索化学、分子生物学、分子药物学和纳米材料等方面具有无可比拟的优越性, 已经引起了美欧日科技决策当局和生物高技术行业的高度重视, 预期在超快速 DNA 序列测定、生物大分子构象以及酶反应动力学研究中发挥重要作用。

2 单分子光学探测的基本原理和方法

2.1 基本原理

单分子测量能否提供分子的新信息是人们关心的一个基本问题。在统计力学中各态遍历假设 (Ergodic hypothesis) 告诉我们, 某个系综个体物理量轨迹的时间平均等于该物理量在给定时间的系综平均。因此, 对于一个包含完全相同个体的系综, 如果测量时间足够长, 单分子测量与系综测量得到相同的结果。然而, 许多化学和生物体系不是均相的, 而且测量时间可能小于涨落时间; 对于非均相体系, 个体的轨迹平均也不再等于系综平均。单分子实验的重要性有两方面: 一方面, 对于非均相体系, 它能给出分子性质的分布信息; 另一方面, 对于均相和非均相体系, 单分子轨迹是分子性质涨落的直接记录, 蕴涵着丰富的动力学信息^[3]。

单分子的光学探测可由频率调制的吸收光谱和激光诱导荧光检测,因其背底低、信噪比高,激光诱导荧光成为单分子检测最常用的方法。在凝聚态,一个分子的荧光辐射通常以4个步骤循环发生:①电子基态向电子激发态的跃迁,其速率与激发光功率成线性关系;②电子激发态的内弛豫;③由电子激发态向电子基态的辐射或非辐射跃迁,其速率与激发态寿命有关;④电子基态的内弛豫。对于凝聚相中的小分子,振动和转动弛豫发生在皮秒量级上,而激发态的寿命和吸收时间在亚纳秒至纳秒量级,因而荧光周期主要由吸收和发射步骤决定。

光化学过程和系间穿越直接影响染料分子在激光激发下的行为,平均可辐射的光子数可简单地将荧光量子产率除以光破坏几率得到。在理想情况下,一个分子大约能辐射出 $10^5 \sim 10^6$ 个荧光光子。例如,Rhodamine 6G分子在乙醇溶液中可辐射 1.7×10^6 个光子,sulforhodamine 101分子在PMMA膜中可辐射 8.4×10^5 个光子。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),目前能接收到约5%的荧光光子,最好的能达到10%左右。因此,我们可从一个“表现”好的荧光分子中观测到5000到50000个光子,这一数目不仅足以探测到单个分子,而且足以进行光谱辨认和实时监测。上述估算适用于单个生色团分子如荧光素、罗丹明和花青等。对于生物大分子如蛋白质和核酸,可以用荧光分子标记来检测。

单分子检测的关键是消除拉曼和瑞利散射以及杂质荧光等背景的干扰,采用高效滤光片,利用共焦、近场和隐失场激发以减少激光照射体积,可有效地削弱背底,提高信噪比。

2.2 单分子测量方法

利用吸收截面很大的并五苯(pentacene)的零声子窄线,Mberner等人首次在低温下观测到单分子的光谱³,目前已发展了多种单分子检测方法,如液流中的单分子检测,微滴中的单分子检测,近场光学显微镜和远场共焦显微镜等。单分子检测技术仍在不断发展中,最新的进展包括利用双光子荧光和表面增强拉曼光谱检测研究单分子。另外,STM技术已发展到一个新高度,获得了单个乙炔分子的振动光谱。下面介绍几种常用的单分子检测方法:

(1) 液流中的单分子检测

在流动液体中检测和识别单分子在很大程度上类似于流动细胞仪。在毛细管中让稀液体样品流过激光焦点,在与激光束成 90° 或 180° 的方向上收集荧光信号,荧光光子的突然爆发对应于单分子通过了激光束。Dovich等人首先建议用这种方法检测单分子⁴,随后Keller等人成功地在液流中测到单个B phycoerythrin分子⁵。利用时间分辨荧光技术,可以区分混合染料溶液中的单个染料分子⁶。一些研究小组已把单分子检测技术与毛细管电泳技术结合起来⁷。

(2) 近场扫描光学显微镜(NSOM)

近场扫描光学显微镜被用来研究单分子形貌、光谱、动力学以及荧光共振能量传递^{8~10}。它的优点是具有小于衍射极限的较高的空间分辨率,能够同时获得样品的形貌信息。但是,NSOM有低功率输出、针尖制备的重复性较差以及镀膜针尖对辐射跃迁的影响等缺点。因此,如果仅仅检测单分子或研究其性质,远场共焦和隐失波激发是更好的选择。

(3) 远场共焦显微镜

在共焦显微镜中,利用高数值孔径油浸物镜把激光束聚成衍射极限大小的焦点,在像平面处放置一个直径为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的小针孔来阻挡焦点外的光。由于探测的体积只有 $0.5 \sim 1 \text{ fL}$,极大地抑制了背底。假设泊松分布,在非常稀(小于 10^{-9} mol/L)的溶液中,探测到的荧光时间事件以单分子事件为主。Rigler和他的研究小组率先使用这种方法检测单分子,利用荧光相关

光谱研究了荧光标记DNA分子的构象变化以及染料分子的单线态三线态系间跨越^[11,12]。当激发光功率增强时,由于“光钳”(optical tweezer)作用,单分子的扩散将偏离泊松统计,因此可用强激光捕获和操纵单个大分子如DNA。配合扫描方式,MacKlin等用远场方法研究了在分子-空气/液体界面的单分子^[13];Lu和Xie研究了室温下单分子的光谱扩散^[14]。这个方法特别适用于单点光谱和毫秒量级动力学的监测。

2.3 隐失波激发

在玻璃/液体界面的全反射产生指数衰减的隐失场,在界面薄层(100~300 nm)上的分子可被隐失波激发。这一方法已被用来观测荧光标记的肌球蛋白分子的运动和研究单个ATP(三磷酸腺苷)转化反应^[15,16]。Mberner^[17]和Yeung^[18]等利用图象强化CCD(阴极耦合器件)分别研究了染料分子在聚丙烯酰胺凝胶和溶液中的三维运动。隐失波法比投影照射为好,它的背景很低。

3 单分子光学检测技术的应用

3.1 单分子动力学

单分子光学探测技术在单分子动力学方面有很多应用,如光谱涨落、扩散运动、构象变化和能量传递等。

研究发现,单个染料分子的光谱在室温下随时间而变;类似地,荧光强度也随光谱的变化而涨落。这些固有的涨落包含着有关单分子和其周围环境之间丰富的动态信息,Lu和Xie对此作了深入研究^[14]。通过对光谱平均值自相关函数的分析,发现光谱的涨落含两个组份,快组份与激发速率无关,表明这是光谱扩散;而慢组份与激发速率成线性关系,表明这是光致的。因此,在PMMA中罗丹明染料分子的势能面上存在两种不同的势垒。

单分子探测具有确定分子取向的能力,因而能观测单分子的转动。Hb等人利用偏振调制发现了单生色团分子在表面上的转动跳跃^[19]。最近,Hb等人又提出了一种更巧妙的方法来观测自由和受阻的转动^[20]。激发光的偏振方向随时间转动,荧光通过一个偏振分束器后分成s和p方向,分别被两个APD接收。用一段碳链把DNA分子与Texas Red分子相连,作为研究体系。他们发现有的生色团不转动,有的自由地转动,更有一些从表面上跳起,然后在溶液里作受阻转动,最后回到表面。这个方法为研究大分子的构象变化提供了新的思路。

当大分子中的荧光标记物的寿命由非辐射弛豫决定时,它对局域环境比较敏感,可以用作大分子构象运动的探针。Edman等人研究了用六碳链与DNA片段连接的四甲基罗丹明(TMR)分子的荧光寿命^[11]。系综平均测量结果显示,荧光呈双指数衰减,寿命分别为0.86 ns和3.70 ns,且占相同比例。单分子测量结果仍为双指数,但各个分子两种寿命所占比例不同。这一现象表明,每个分子存在两种构象,并且能够在测量时间尺度内互相转化。寿命长的构象对应于生色团被水分子包围,而寿命短的构象对应于生色团与低聚核苷酸中鸟嘌呤核苷接触,从而引起荧光的淬灭。最近,Rigler等人又通过记录发射强度轨迹实时观测了构象的运动^[21]。类似地,Jia等人也发现了TMRtRNA加合物的两种构象^[22]。

荧光共振能量传递(FRET)广泛应用在生物化学和生物物理研究中。在弱相互作用领域,给体和受体之间的能量传递效率由给体与受体之间的距离和Förster半径决定,其中Förster半径与给体发射光谱和受体吸收光谱的重叠以及给体和受体偶极矩的相对取向有关。Weiss和他的研究小组研究了单个给体和受体间的荧光共振能量传递^[19],所用体系为两端分别接TMR

(给体)和Texas Red(受体)的含10个或20个碱基的DNA片段。用514nm激光优先激发给体,荧光光谱中通常是给体和受体光谱的线性组合。当受体光漂白后,得到纯给体的光谱。他们发现处在不同局域环境中的给体受体对能量传递的效率不同。这个方法可以用来研究溶液中生物大分子如蛋白质的构象变化,目前国际上已有一些单分子研究小组正在这个方向上努力。

当生色团之间的距离缩短相互作用增强时,激子离域或部分离域在生色团的聚集体中。Barbara小组对单个共轭高分子的荧光性质进行了测量^[23],在连续激发下发现有的分子的荧光发射在“开”和“关”两种状态下转换。荧光强度轨迹的统计分析表明,存在亮、暗和黑三种状态。Hochstrasser小组对单个光合作用光收集蛋白LH₂复合物的研究指出^[24],荧光强度的变化是寿命变化引起的。两个研究组都发现,荧光开通时间分布与激发光强度有关,表明光致产生激子阱,从而淬灭荧光;关闭时间分布与激发光强度无关,表明荧光状态能自发恢复。最近,Ying和Xe采用荧光光谱、寿命和偏振调制等手段研究了单个光收集蛋白藻蓝素(allophycocyanin)三聚体的激子动力学,该分子中六个生色团形成三个激子耦合对,实验证据表明光漂白基本上为阶梯过程,但三个激子对并不完全独立。由于生色团的光漂白形成激子阱,单个藻蓝素三聚体的荧光寿命起伏较大,分布平均值低于系综平均值。实验中还发现藻蓝素三聚体的光化学寿命与激发的方式有关。采用皮秒激光激发平均发出的光子数远小于采用连续激光激发,表明多个生色团被激发可产生单线态-单线态激子湮灭,同时高激发态处形成激子阱或发生光化学反应,降低荧光量子产率和三聚体的光化学寿命。

3.2 超灵敏分析和DNA序列测定

单分子检测代表着分析化学的最终目标,在生化分析中起着重要作用。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。利用单分子检测技术作DNA序列的快速测定是目前最富有挑战性的问题,该方法由Keller等人首先提出^[25],其原理如下:用不同荧光标记物标记好的4种核苷酸合成长达几千碱基对的DNA片段,把DNA分子与微珠连接,放在缓冲液流的中间。流体中含有的外切核酸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根据他们的荧光标记物被一个一个检测和识别。目前已有不少研究机构和生物高技术公司致力于在单分子DNA序列测定上有所突破,并取得了重要进展。例如,Sauer等利用短脉冲二极管激光激发和时间分辨荧光在溶液中识别出用不同染料标记的单核苷酸Cy₅dCTP, MR121dUTP和Bodipy dUTP,总有效率达到90%^[26]。

3.3 分子马达

分子马达是肌肉运动的分子基础。最近在体外游动分析方面的进展使人们可以测量单个分子马达的力和运动,但对力产生的分子机理即蛋白质结构的改变与力产生有何关系仍不清楚。用光学方法探测附着在马达蛋白质上的单个生色团为回答上述问题提供了强有力的工具,单分子马达水平上的荧光偏振测量和机械力测量可以监测单个肌球蛋白分子的构象随力的变化,从而使人们对蛋白质结构变化与机械力产生的关系的认识达到前所未有的深度。Yanagida等人首次报道了观测到单个荧光标记的肌球蛋白分子和单个ATP(三磷酸腺苷)转化反应^[13]。肌球蛋白分子片段S-1分子用Cy₅标记,栓在浸在溶液中的石英表面上,用全反射方式激发,CCD以视频速率记录荧光图象。Cy₃-ATP分子在溶液中自由扩散,只给出较低的背景荧光信号。当某个Cy₃-ATP分子与S-1分子结合,Cy₃-ATP分子的荧光就固定在Cy₅S-1分子的位置上,能够观测到较强的荧光。结合-ATP水解-分解过程可以从荧光的突现来监测。

实验中发现,结合过程是扩散控制的,分解时间与溶液中测定的ATP转化速率吻合,表明荧光突现确实反映了ATP的转化。最近,Yanagida等又直接观测了单个运动蛋白(kinesin)分子沿着微管移动¹⁹,Sase等利用偏振成像观测到滑动着的肌动蛋白细丝在轴向上的转动²⁷。

3.4 生物化学反应

单个酶分子化学活性的研究引起了广泛的兴趣。Xue和Yeung研究了乳酸脱氢酶LDH-1分子的反应活性²⁸,经过1小时的诱导,每个酶分子在毛细管的某个位置产生数千个NADH分子,用毛细管电泳法将这些分子洗脱,用激光诱导荧光法检测。研究发现,看起来相同的酶分子在反应活性上表现出不对称的宽分布,其原因是酶分子的构象不同。Lu和Xie选择黄素酶(flavoenzyme)为研究酶转化的对象³,该体系的优点是可直接观测到来自活性部位的荧光。胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase)是分子量为53000的一种黄素酶,其活性部位黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)在氧化态时发荧光,还原态时不发荧光。利用含99%水的琼脂糖凝胶固定酶分子,而底物小分子可在凝胶中自由扩散。当胆固醇和氧过量时,单个FAD的发射呈现“开”“关”现象,每一次“开”“关”循环对应一次酶转化。荧光的“开”“关”循环需要有底物存在且与激发速率无关,因而确实来源于自发的基态电子转移反应。由于蛋白质周围环境对FAD生色团的保护,在激光激发下酶分子能存活较长时间,可以记录到长达600次转化的轨迹。通过对这些长轨迹的统计分析,就能在单分子水平上研究化学动力学。对一级可逆反应,假设正反应和逆反应的速率常数分别为 k_f 和 k_b ,则荧光强度自相关函数 $C(t) = [\Delta I(0) \Delta I(t)]$ 呈指数衰减,速率常数 $k = k_f + k_b$ 。对基元反应(泊松过程),荧光发射的“开”“关”时间分布应为单指数分布,时间常数即为正逆反应速率常数的倒数。实验结果表明,荧光状态的时间分布不遵循单指数函数,证明该反应不是简单的基元反应,而与Michaelis-Menton机理有关。

4 总结与展望

室温环境下单分子检测、成像与光谱的诞生还不到十年,已经成为凝聚态物理化学研究的一个极优越工具,在许多方面取得了激动人心的新成果。人们对这个新兴领域不断增长的兴趣,不仅仅因为单分子方法在解决化学和生命科学中的很多基本问题上具有独到之处,还因为这个技术在实现和应用上只需相对较少的投入。单分子的激光诱导荧光检测已经发展得较为完善,使研究者可以把它应用到特定的目标问题上。高新技术的发展不会止步,UV荧光,Raman光谱²⁹和非线性光谱将扩展单分子检测的范围,微片或纳米片的自动分析、毛细管电泳以及组合化学与单分子光学检测的结合将为分析化学和药物设计带来一场新革命,高分辨成像技术和纳米操纵技术也将在单分子化学研究中占有一席之地。

参 考 文 献

- 1 Ne S, Zare R N. *Annu Rev Biophys Bond Struct*, 1997, 26, 567
- 2 Xie X S, Trautman J K. *Ann Rev Phys Chem*, 1998, 49, 441
- 3 Ambrose W P, Moerner W E. *Nature*, 1991, 349, 225
- 4 Dovichi N J, Martin J C, Jett J H, et al. *Science*, 1983, 219, 845
- 5 Nguyen D C, Keller R A, Jett J H, et al. *Anal Chem*, 1987, 59, 2158
- 6 Müller, et al. *Chem Phys Lett*, 1996, 262, 716
- 7 Chen D, Dovichi N J. *Anal Chem*, 1996, 68, 690
- 8 Bezig E, Chichester R J. *Science*, 1993, 262, 1422

- 9 Xie X S, Dunn R C. *Science*, 1994, 265;361
- 10 Ha T, Enderle Th, Ojeltree D F, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93;6264
- 11 Edman L, Mats U, Rigler R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93;6710
- 12 Wdengren J, Rigler R, Mats U. *J Phys Chem*, 1995, 99;13368
- 13 Mecklin J J, Trautman J K, Harris T D, et al. *Science*, 1996, 272;255
- 14 Lu H P, Xie X S. *Nature*, 1997, 385;143
- 15 Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, et al. *Nature*, 1995, 374;555
- 16 Vale R D, Funatsu T, Hecce D W, et al. *Nature*, 1996, 380;451
- 17 Dickson R M, Norris D J, Tzeng Y L, Mberner W E. *Science*, 1996, 274;966
- 18 Xu X H, Yeung E S. *Science*, 1997, 275;1106
- 19 Ha T, Enderle Th, Chenda D S, et al. *Phys Rev Lett*, 1996, 77;3979
- 20 Ha T, Glass J, Enderle Th, et al. *Phys Rev Lett*, 1998, 80;2093
- 21 Wemmml m S, Edman L, Rigler R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94;10641
- 22 Jia Y, Strynik A, Li L, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94;7932
- 23 Vanden Bout D A, Yip W T, Hu D, et al. *Science*, 1997, 277;1074
- 24 Bopp M A, Jia Y, Li L, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94;10630
- 25 Jett J H, Keller R A et al. *J Mol Struct Dyn*, 1989, 7;301
- 26 Sauer M, et al. *Biocmaging*, 1998, 6;14
- 27 Sase I, Myata H, Corrie J E T, et al. *Biophys J*, 1995, 69;323
- 28 Xue Q, Yeung E S. *Nature*, 1995, 373;681
- 29 Ne S, Emry S R. *Science*, 1997, 275;1102