中文摘要

本论文共包括三部分，第一章是单个生物分子的检测，第二章是全内反射荧光法检测溶液中单个抗体分子，第三章是无标准溶液作参比的绝对单分子计数定量分析法。

第一章对单分子检测的研究现状进行了综述。介绍了单分子检测的意义、原理、主要研究内容以及所使用的荧光显微镜的构造和原理，从单分子的追踪、分子构象动力学 、马达蛋白的运动、离子通道、细胞信号转导、单分子酶学、特定序列核酸的单分子检测、单分子计数等方面介绍了单分子检测的现状、方法，本章共引用文献 81 篇。

第二章对全内反射荧光显微镜检测溶液中羊抗鼠 IgG（H+L）单分子的方法进行了研究。讨论了在单分子成像中，降低杂质荧光的方法和激光功率、曝光时间等条件的选择。选择激光功率为 2.4 kW，曝光时间为 100 ms，将缓冲溶液过滤后再进行光漂白、对盖玻片进行光漂白，有效地降低了杂质荧光。使用全内反射隐失场激发，减小激发体积，并使用适宜的滤波片，提高了检测的灵敏度，采用高灵敏度的检测器 ICCD 可对 PBS 溶液中的单个羊抗鼠 IgG（H+L）分子进行成像。使用两种方法对单分子进行了证明。在 1.0×10^{-10} mol/L-4.0×10^{-9} mol/L 的浓度范围内，检测到的单分子的数目与溶液浓度有良好的线性关系，这不但可作为单分子证明的依据，还可作为一种检测溶液浓度的方法。

第三章提出了一种新的检测溶液浓度的方法。将盖玻片使用环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷处理，在玻片表面生成环氧集团，将 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液滴在硅烷化的盖玻片上，静置 30 min 左右，待溶剂挥发后，溶液中的蛋白分子全都沉积在盖玻片表面，环氧集团可和蛋白分子中的氨基反应，从而将蛋白分子共价结合在盖玻片上。滴加蒸馏水，溶解掉结晶在盖玻片表面的无机盐，非常有效地去除了背景荧光，在此基础上利用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 对固定在盖玻片表面的蛋白分子成像并计数，可直接计算出溶液的浓度。检测范围为浓度 5.0×10^{-15} mol/L-5.0×10^{-14} mol/L。

关键词：单分子成像，单分子计数，全内反射，羊抗鼠 IgG（H+L）

Abstract

This thesis includes three parts: Detection of single biomolecules. Detection of single antibody molecules in solution by total internal reflection fluorescence microscopy. Determination of goat anti-rat IgG (H+L) by counting single molecules.

In the chapter one of this dissertation, the detail review of detection of single biomolecules was delivered. Significance, principle and basic content of single molecules detection and structure, principle of microscope in single molecules detection were introduced. Actuality, method of single molecules detection were introduced in aspect of tracing single molecules, single molecules enzymology, dynamics of molecular conformation, motion of motor protein, ion channels, cell signal conduction, detection of specific DNA sequences at the single-molecule level, counting of single molecules. In the chapter, 81 references have been referred.

In the chapter two, the method of detection single goat anti-rat IgG (H+L) molecules by total internal reflection fluorescence microscopy was investigated. Several parameters including laser power, exposure time was optimized for imaging of single goat anti-rat IgG (H+L) molecules. The following conditions were suitable for the imaging of single molecules: laser power, 2.4 kW; exposure time, 100 ms. Reduce background fluorescence by pre-photoblanching buffer after filtration, pre-photoblanching coverslip, reducing excited volume, making use of fitting cubes, increase detection sensitivity, then imaging single goat anti-rat IgG (H+L) molecules by ICCD. There are two evidences for proving single molecules. The molecular number is liner with goat anti-rat IgG (H+L) concentration in the range of 1.0×10^{-10} mol/L-4.0×10^{-9}mol/L, This is not only a potent evidence for single molecules, but also a method for determination of protein.

In the chapter three, A novel method for determination of protein was presented, coverlips were dealed with glycidoxypropyltrimethoxysilane and epoxy group was created on the surface of coverlips, Alexa488 goat anti-rat IgG (H+L) in phosphate-buffered saline (PBS) buffer were added on a coverslip, 30 minute later, protein molecules were deposited to the surface of coverslips by evaporation solvent,

distilled water was added to the surface of coverslips to dissolve the salt deposited to the surface of covesrlips, reduce background fluorescence efficiently, then imaging and counting single goat anti-rat IgG(H+L) molecules absorbed to the surface of a coverslip by total internal reflection fluorescence microscope and ICCD, calculate concentration directly. Determination range is 5.0×10^{-15} mol/L-5.0×10^{-14} mol/L.

Keywords: single molecules imaging, counting of single molecules, total internal reflection, goat anti-rat IgG (H+L).

原 创 性 声 明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：许光　　日　期：2005.5.28

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名：许光　导师签名：姜玮　日　期：2005.5.28

第一章 单个生物分子的检测

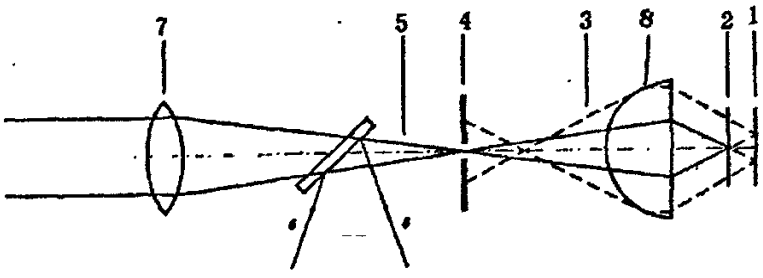
1.1 单分子检测的原理及意义

单分子检测（Single molecules detection，SMD）就是在单分子水平上对物质的性质进行检测，得到单个分子的信息。传统的化学实验都是以分子的聚合体为研究对象，得到的是物质的平均性质。而平均性质往往掩盖了许多特殊的重要信息。只有在单分子水平上进行实验，才能得到分子的性质分布，研究复杂体系中的个体。化学反应中，各个过程是不同步的，如果使用大量分子进行实验，会掩盖个别的反应途径。因此也只有使用单分子检测的方法，才能跟踪观测化学反应途径，并能检测到反应中间状态。过去十多年分子生物学和遗传学的发展留下了许多未知的问题。例如：蛋白质的结构和它们的功能有什么联系？生物分子之间是怎样反应的？蛋白质怎样折叠？要解决这些问题，单分子检测方法是一个非常有力的工具 [1]。单分子的检测方法主要有激光诱导荧光、拉曼光谱、扫描探针技术和质谱法等。其中激光诱导荧光方法以其高灵敏度成为单分子检测的重要方法，本综述也主要介绍激光诱导荧光方法在单个生物分子检测中的应用。

因为大多数生物分子是不发荧光的，所以利用激光诱导荧光方法对单个生物分子进行检测，需要在一个生物大分子（蛋白质分子或核酸分子）上标记一个或多个荧光染料分子，染料分子在激光的激发下发射出的荧光被检测器检测到。检测器可测得染料分子荧光的强度、波长、荧光寿命、荧光各向异性、荧光猝灭等参数。荧光有一个很重要的性质，就是非常容易受周围环境如：pH 值、离子浓度、电荷、氧化-还原状态等的影响，荧光强度等参数对周围微环境的变化是非常敏感的。周围微环境的变化会引起这些荧光参数的变化。因此，反过来，可以通过测得这些荧光参数以及它们的变化，来得到有关单个生物分子的信息，如分子运动、酶动力学、蛋白质的构像和功能、化学反应的过程、分子的性质等。现在有这样一种趋势，那就是尽可能多的同时获得这些参数，也就是所谓的多维检测方法 [2]。

在激光诱导荧光法单分子的检测中，为降低背景噪音，一般采用激发体积较小的激光扫描共聚焦显微镜和全内反射荧光显微镜。激光扫描共聚焦显微镜是近 10 多年来发展起来的一种新型高精度显微镜系统，辅以各类荧光探针或荧光染

料与被测物质特异性结合，不仅可观察固定的细胞、组织切片 [3,4]，还可对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态地观察和检测 [5]。激光扫描共聚焦显微镜具有非常小的检测体积（fL），因此具有很高的灵敏度。共聚焦的成像原理是采用点光源照射标本，在焦平面上形成了一个轮廓分明的小的光点，该点被照射后发出的荧光被物镜收集，并沿照射光路回送到由双向色镜构成的分光器。分光器将荧光直接送到探测器。光源和探测器前方都各有一个针孔，分别称为照明针孔和探测针孔，约为 0.1～0.2 μm，相对于焦平面上的光点。两者是共轭的，即光点通过一系列的透镜最终会同时聚焦于照明针孔和探测针孔（图 1-1）。全内反射荧光显微镜则是通过激光的逝波激发，只探测离界面 200 nm 以内的范围，因此也具有很高的灵敏度。



1.非焦面 2.共焦面 3.非焦面光线束 4.针孔 5.焦面光束 6.光源 7.目镜 8.物镜

图 1-1 共聚焦光路图

利用激光诱导荧光法检测单分子，最早是在 1976 年，Hirschfeld [6] 在一个抗体分子上结合 80 到 100 个荧光分子，在低温下第一次探测到液体中单个抗体分子的荧光，直到 1989 年，Moerner [7] 在低温下首次观测到分子晶体中掺杂的单个荧光分子的荧光。1990 年，Shera 等 [8] 首先在液体中检测到了单个荧光分子，检测率为 85%。Trautman 等人 [9] 到 1994 年利用近场显微镜首次在室温下检测到了单个分子。Macklin 等人 [10] 用远场显微镜检测到了单分子。现在，随着光学显微镜技术、探针技术的发展以及灵敏检测器的出现，单分子检测已成为人们检测分子性质的重要工具，在化学、生物学、医学以及物理学等领域发挥着重要的作用。

1.2 单个生物分子检测的主要内容

对单个生物分子的检测，主要是检测蛋白质分子和核酸分子，主要包括以下内容：单分子追踪、生物分子构象变化、酶动力学、核酸序列以及单分子计数等。

1.2.1 单分子扩散轨迹的检测

在细胞内，很多生物分子是在运动过程中完成其生理功能，如信号转导等。因此，研究分子在细胞内的运动方式，对了解它们的功能有很重要的作用。分子在细胞内部不同部位、不同结构区域内，扩散方式是不同的，观测细胞中单分子的扩散方式还有利于探测细胞结构。

检测单分子的运动轨迹，必须使用宽场的显微镜，如果观测分子膜或细胞膜上的单分子应使用全内反射荧光显微镜，而观测溶液中或细胞内的单分子应使用落射荧光显微镜，成像使用 ICCD。因为光的衍射作用，在 ICCD 上单分子的图像为一直径大约 250 nm 的点，而生物分子只有几个纳米或十几个纳米。因此要对单个分子的扩散轨迹进行检测，首先要对单分子进行定位。利用点传播函数（Point spread function，PSF）可对分子进行精确定位，精度有几十个纳米。对选定的某个运动中的分子，用 CCD 以一定的频率进行连续拍照，可得到这个分子的一系列的照片。对每祯照片中的分子精确定位，标出它的坐标（x，y）。分析相邻的两祯照片中分子的位置，计算出分子在这段时间内的位移 c。并根据公式计算出扩散系数（D）

$$c=\sqrt{(x_{n+1}-x_n)^2+(y_{n+1}-y_n)^2}$$

$$\langle \Delta x^2+\Delta y^2\rangle=4D\Delta t \qquad \Delta x=x_{n+1}-x_n,\ \Delta y=y_{n+1}-y_n$$

x_n、y_n 分别为追踪的单分子在某祯照片中的横坐标和纵坐标，x_{n+1}、y_{n+1} 为这个分子在 t 时间后所拍的照片中的横坐标和纵坐标。Δt 为拍摄相邻两张照片的时间间隔。

通过分析分子的扩散常数的大小、分布以及分子的扩散方向，可得出分子的扩散方式。如果分子的扩散常数分布窄，则分子为自由扩散，如果分子的扩散常数分布很宽，则分子为不规则扩散，如果分子在一段时间内扩散方向不变，说明分子在作定向运动。

单分子追踪的研究最初是研究缓冲溶液中 [11,12] 或双分子脂膜上 [13,14] 单个分子的运动轨迹，现在已发展到观测细胞内单分子的运动。与体外易于控制

的干净环境相比，细胞内有许多生物分子和荧光物质，象卟啉、四羟酮醇等，这种复杂的环境会产生很强的背景荧光，既所谓的自发荧光。细胞中的单分子检测最主要的就是在细胞内背景荧光的基础上检测出发自单分子的相对较弱的信号。Byassee 等 [15] 分别将 TMR 标记的铁传递蛋白、罗丹明 6G（R6G）、R6G 标记的寡核苷酸导入宫颈癌细胞中，在活细胞的细胞质中检测到了它们的单分子。这个实验说明虽然细胞内的背景荧光比缓冲溶液中的要高，但它是稳定的、连续的，不会对检测细胞内单分子的光子爆发产生太大的影响。但使用 ICCD 作检测器，对分子精确定位，须进一步提高检测的灵敏度。这可通过下方法实现：（1）、使用具有高的吸光系数和量子产率的荧光染料分子，如：藻红蛋白、量子点等。（2）、使用具有较长的吸收波长和发射波长的荧光染料分子，这样有利于与细胞中的自体荧光信号分离。（3）、多标记。就是一个蛋白分子上标记多个荧光分子，但这样可能会影响蛋白分子本身的性质，改变它的运动。（4）选择荧光背景较低的细胞，或选择细胞中荧光背景较低的位置进行单分子的观测，如：细胞核中。（5）、观测细胞膜上的单分子时，使用探测体积小的全内反射荧光显微镜。

Schutz 等 [16] 观测了标记了荧光分子的油脂分子在肌细胞膜上的运动。位置精度有 50 nm。Iino 等 [17] 用全内反射荧光显微镜观测了单个绿荧光蛋白分子在纤维原细胞膜上的运动。通过对荧光分子的追踪发现，绿荧光蛋白分子容易形成低聚物，形成低聚物后，扩散系数下降了 10%到 40%。Goulian 等人 [18] 将藻红蛋白分子注射到非洲绿猴肾表皮细胞中，观测了单个蛋白分子在细胞质、细胞核中的扩散，记录下了分子的二维运动轨迹（对应分子三维运动轨迹在焦平面上的投影），计算出分子的扩散系数，并对扩散系数的分布进行了统计。他们发现扩散系数的分布比在甘油溶液中的扩散和简单扩散的理论分布要宽很多，这说明不能用简单扩散特定系数的模式来说明分子在细胞内的运动。Kues 等 [19] 将单个 P4K 分子标记上 4-6 个 Alexa 荧光分子，观测了单个 P4K 分子在 3T3 细胞核内的扩散。他们发现有的分子在细胞核内扩散运动，有的分子固定在某一位置不动（图 1-2），这同以前荧光漂白后恢复实验的结果是一致的。但他们还发现，在细胞核内扩散的分子也可分为两部分，一部分扩散距离较远，而另一部分在一个相对很小的区域内运动，这可能是因为一些结合-分离的反应造成的。他们还检测了单个富含鸟苷酸的核蛋白颗粒（UsnRNP）在 3T3 细胞核内的运动 [20]，

发现 UsnRNP 在细胞核内至少有三种不同的扩散动力学，对应着高、中、低三种不同的扩散系数。

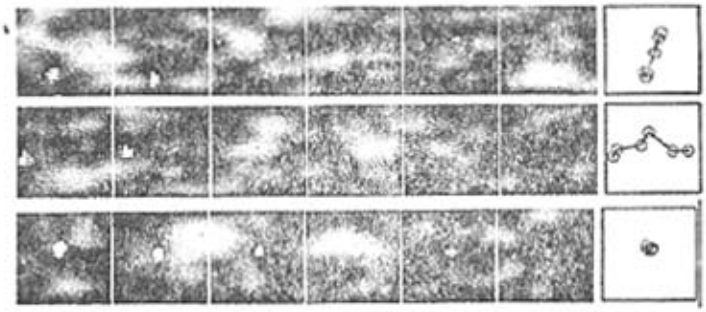


图 1-2 P4K 分子在 3T3 细胞核内的扩散轨迹图 [19]。

Seisenberger 等人 [21] 用单分子追踪技术研究了单个病毒对细胞的感染过程。他们在腺体联合病毒上只标记了一个荧光分子 Cy5，发现病毒运动到细胞膜表面的过程为自由扩散，对细胞膜撞击几次后，有大约 15%的病毒分子进入细胞，进入细胞的过程在 60 ms 内完成，比预想的要快。通过对细胞内单分子运动轨迹的观测以及扩散系数的计算，他们发现有的病毒在细胞质和细胞核内运动较慢，这可能是因为它们包含在内涵体中；有的病毒作自由扩散，运动较快；还有大约 10%的病毒是通过马达蛋白或管状结构物质作定向运动。单病毒追踪技术对于人们认识病毒对细胞的感染过程有很大的作用。Lakadamyail 等人 [22] 用荧光显微镜研究了单个流感病毒对细胞的感染以及与内涵体融合的过程，实验发现，流感病毒的运动明显分为三个阶段：首先是在细胞外周由肌动蛋白介导的运动，其次是动力蛋白控制的快速运动到达细胞核周围，最后是在细胞核周围区域在微管上的运动。这个发现证实了以前病毒内吞过程的假设，说明内涵体的成熟、酸化主要是在细胞核周围进行的。

1.2.2 分子构象动力学

分子的性质和构象是密切相关的。研究分子的构象对了解它的功能至关重要。分子的构象变化主要包括分子折叠和分子旋转。

分子的折叠 分子的折叠指的是分子的一部分相对于另一部分的距离发生变化。 迄今为止，测蛋白质总体折叠-展开的实验已经进行了许多,但是由于分子的

折叠反应是不同步的，因此，这些实验不能得到详细的动力学信息。只有在单分子水平上对分子的构象变化进行检测，才能检测到分子构象变化的中间状态,并检测到分子构象变化的不同途径。荧光共振能量转移（FRET）是一种非常有效的测定距离的方法。它一般用来测量 2-8 nm 的距离，因为它可提供分子两点之间距离变化的信息，因此成为研究分子折叠的主要方法 [23]。在这种方法中，在分子的两个特定位置分别标记上荧光共振能量转移的供体（D）和受体（A）（图 1-3），当分子处于折叠状态，供体和受体之间距离近，能量转移效率大，供体的荧光强度小，而受体的荧光强度大。分子处于展开状态时，供体和受体间距离变大，能量转移效率低，供体的荧光强度大，而受体的荧光强度小。能量转移效率 $E=1/[1+(R+R_0)^6]$，R 为供体和受体分子之间的距离，R_0 为能量转移 50% 时供体和受体分子之间的距离，它与荧光染料分子的性质有关。因此，我们可以根据供体和受体荧光强度的变化和能量转移效率的变化来推断分子折叠状态的变化。

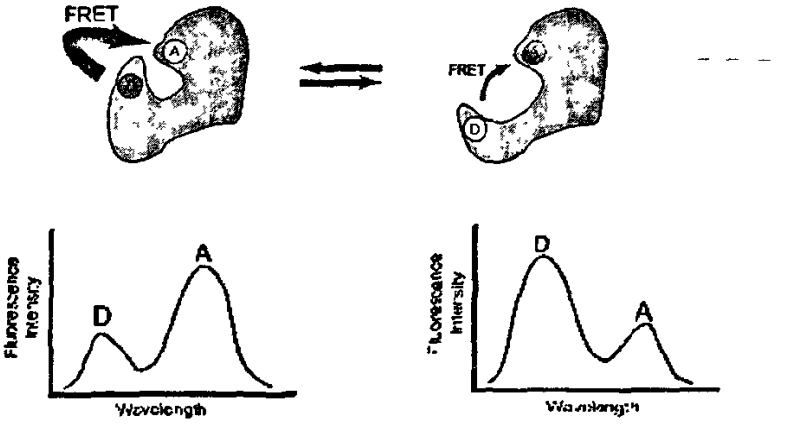


图 1-3　利用 FRET 检测分子构象变化示意图。

利用 FRET 检测分子折叠，一般使用激光共聚焦扫描显微镜，用两个 APD 做检测器。它们在两个通道上分别检测供体和受体分子的光子爆发。检测溶液中的单分子和检测表面固定的单分子的方法并不完全相同。通过吸附或共价结合将分子固定在玻片表面，然后用激光共聚焦扫描显微镜或全内反射荧光显微镜对分子进行长时间的检测，检测时间长度取决于分子的光漂白，一般有几秒的时间。这种方法的优点是能得到分子性质的时间轨迹曲线（图 1-4 上图），但分子的表

面固定容易对分子的性质形成干扰。对溶液中的单分子进行检测时，激光激发溶液内部一个区域，激光激发的体积很小（fL），当溶液浓度足够稀时（nmoL/L），可保证激发区域只有一个分子，在大多数时间内，激发区域内没有分子，因此检测不到信号，当有分子通过激发区域时，会检测到光子，这种现象叫做光子爆发，通过对光子爆发的强度、持续时间等进行检测，就可以分析分子性质。这种方法的优点是不会因为分子与玻片的接触而影响分子性质，但因为分子通过激光激发区域的时间很短（ns），不能得到分子的时间轨迹曲线，只能得到分子的性质分布（图 1-4 下图）[2]。

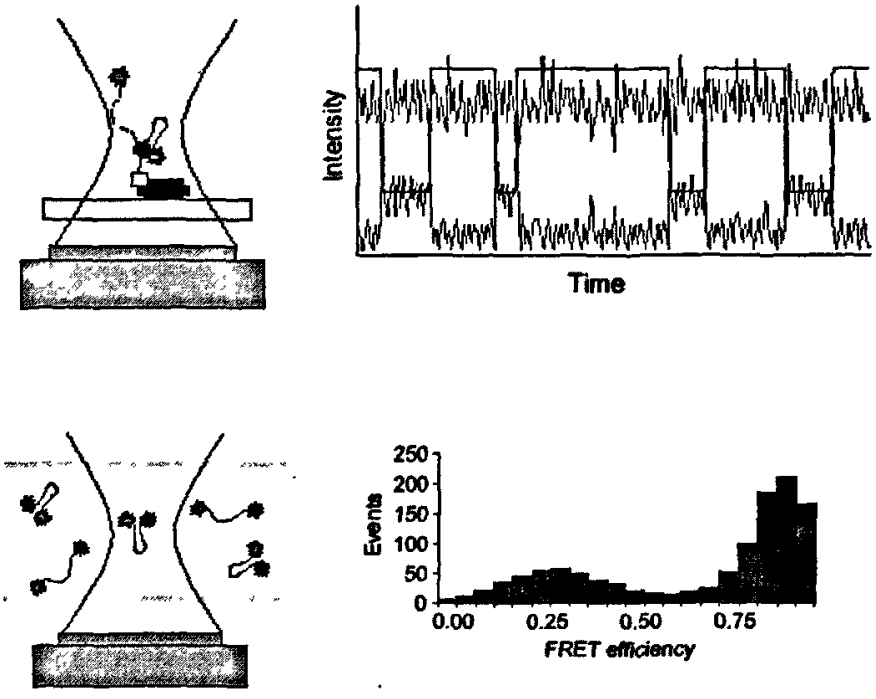


图 1-4 检测不同位置分子构象示意图。上图为检测固定的分子，可得到荧光强度的时间轨迹。下图为检测溶液中作扩散运动的分子，可得到能量转移效率的分布。

Jia 等 [24] 用 spFRET 研究了酵母转录因子（GCN4）的折叠和展开。他们将 GCN4 分子固定在玻璃片表面上，因为尿素能使蛋白酵母转录因子变性，他们观察了在不同浓度尿素的作用下，单个分子折叠与展开的反应。这个实验说明了可以使用 FRET 在单分子水平上研究蛋白分子的折叠。Jia 等人 [25] 使用 FRET 进一步研究了 GCN4 的分子折叠，他们得到了单个分子在不同浓度的尿素溶液

中，供体和受体分子的荧光强度时间轨迹曲线，通过对供体和受体分子信号进行相关分析，揭示了蛋白分子在 1-100 nm 的时间范围内性质的波动，并说明性质波动是由于结构的波动造成的。为了避免表面固定给分子折叠性质造成干扰，Deniz 等 [26] 研究了溶液中自由扩散的单个胰蛋白酶抑制剂分子 2（CI2）的折叠反应，在缓冲溶液中，加了不同浓度的氯化胍，使蛋白质变性，然后比较了它们的折叠反应。通过鉴别不同氯化胍浓度下能量转移效率的柱状图，就可直接观察折叠状态和变性状态的亚分布。因为每个分子在激发光柱内停留时间很短（大约为 1 微秒），所以不能得到分子的时间轨迹曲线。Schuler 等人 [27] 也使用 FRET 研究了在不同浓度的变性溶液中，自由扩散的蛋白分子的折叠反应，通过对能量转移效率柱状图的分析，得出了蛋白分子在折叠过程中要经过一个能垒，能垒包括活化能，这与蛋白折叠的理论统计结果是一致的。最近 Boukobza 等人 [28,29] 将单个腺苷酸激酶的分子放入表面固定的脂质小泡中，小泡体积足够大，可使蛋白质分子在其内部自由扩散，避免了表面固定给分子性质造成的干扰，而小泡又固定在玻璃表面上（图 1-5），所以蛋白质分子在激发光柱内停留较长时间，有利于长时间地观察它的折叠反应。他们得到了各种条件下能量转移效率的分布图，也得到了单个分子时间轨迹曲线。

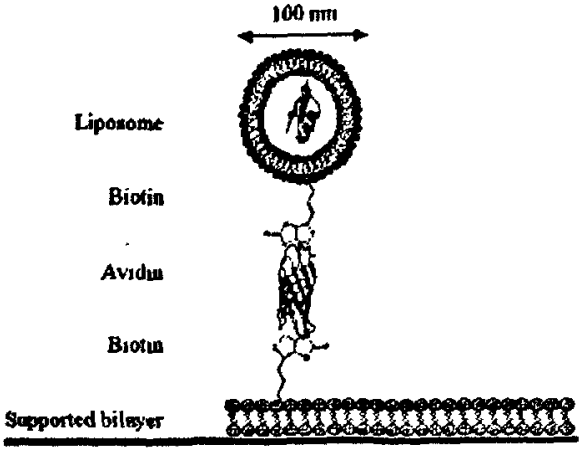


图 1-5 脂泡与盖玻片连接示意图 [28]。

利用荧光共振能量转移对分子折叠的研究除应用于蛋白质分子外，还可应用于 RNA 分子。Ha 等人 [30] 用这种方法研究了 RNA 分子在结合核糖体蛋白 S15

和 Mg^{2+}以后的构象变化，在实验中观察到 RNA 的构象分布很宽，说明不同的 RNA 分子的折叠能力是不一样的。在改变 Mg^{2+}浓度时，得到的荧光共振能量转移效率分布也随 Mg^{2+}的浓度改变而改变，因此可用单个 RNA 分子在 20 ms 的时间分辨上检测瞬时的 Mg^{2+}浓度。Zhuang 等人 [31] 用这种方法研究了单个四膜虫核糖酶分子的构象动力学，核糖酶是一种含有约 400 个核苷、具有催化作用的 RNA，它的催化活性受构象状态的影响。他们在核糖酶分子的特定部位上标记上荧光供体和受体分子，进行表面固定，然后观测了 FRET 的时间轨迹。FRET 时间轨迹很清楚地显示出这种 RNA 分子的折叠动力学。在折叠的起始阶段，荧光共振能量转移效率逐渐增加，在达到折叠状态的水平之前，在一个中间水平上停留短暂的时间，这说明存在一个中间折叠状态。由多次荧光共振能量转移效率的时间轨迹统计，得出两个不同的折叠速率常数，其中快的折叠方式，在以前的研究中没有发现，说明发现了 RNA 分子有一种新的折叠途径。Bartley 等人 [32] 进一步研究了单个四膜虫核糖酶分子的折叠动力学，他们发现折叠有几个途径，不同途径之间的转换须克服能量，这样就阻止了不同途径之间的转换。Zhuang [33] 还利用这种方法研究了另外一种 RNA 酶，发夹核糖酶的折叠动力学和功能之间的关系。他们发现配合物分子有四种不同的折叠状态，这四种折叠状态的稳定性各不相同，而核酸酶分子具有记忆功能，每个分子在展开后，趋向于再折叠回原来的状态。

对单分子折叠构象的研究，除了利用荧光共振能量转移方法外，还可以利用荧光的自猝灭、电子转移猝灭、荧光成像、荧光寿命等方法来研究蛋白质的折叠反应。Zhuang 等 [34] 利用荧光的自猝灭研究了单个 Titin 分子的折叠反应。当两个特定的荧光分子靠近时，由于分子间的相互反应而使荧光猝灭，增加它们的距离，就会减弱它们的反应，使荧光强度增加。将两个荧光分子标记在同一个分子的不同的两个部位，就可以观测它们的构象变化。由于在自猝灭实验中，只需要一种荧光染料分子，荧光分子的标记过程要比 FRET 简单。1997 年，Jia 和合作者 [35] 将 tRNA 进行荧光标记，通过观测荧光的衰减来研究 RNA 的构象动力学。他们在实验中发现，荧光的衰减是非指数形式，这是因为 RNA 分子的构象在两种状态之间波动，其中一种构象状态对荧光探针分子有猝灭作用。说明 tRNA 分子经历了两个不同荧光寿命的构象状态。将电子转移荧光猝灭应用于研

究单分子 DNA 的构象实验在 1996 年首次被报导。Edman 等 [36] 在单分子水平上将四甲基罗丹明（TMR）分子标记在 DNA 分子上，利用共聚焦显微镜检测到有两种不同荧光寿命的 TMR 分子，说明有两种不同构象状态的 DNA 分子。1998 年，Eggeling 等 [37] 利用电子转移荧光猝灭研究了 DNA 分子的构象变化，他们在 DNA 分子的一条链的一端标记了荧光染料 TMR，当 DNA 分子处于折叠状态，荧光分子 TMR 与 DNA 链上的鸟苷酸靠近，发生从 TMR 到鸟苷酸的电子转移，使 TMR 的荧光被猝灭，这时荧光分子 TMR 的荧光强度弱，荧光寿命短。当 DNA 分子处于展开状态时，荧光分子 TMR 与 DNA 链上的鸟苷酸分开，荧光分子 TMR 的荧光强度强，荧光寿命长。他们第一次在单分子水平上同时测得了荧光强度和荧光寿命，检测出了 TMR 标记的 DNA 分子有三种构象状态。（图 1-6）

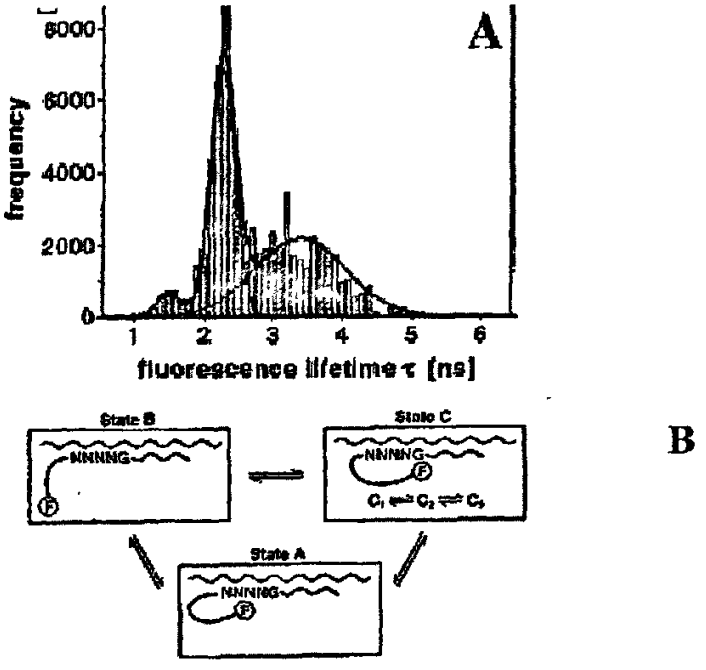


图 1-6 利用电子转移猝灭检测 DNA 分子构象示意图 [37]。

A.荧光寿命的分布图；B.三种不同的荧光寿命所对应的三种构象。

分子的旋转 分子旋转是指整个分子或分子的一部分相对于另一部分做旋转运动。对于获得方向变化的动力学信息来说，单分子荧光偏振（smFPA）是一种很有效的方法。由于单个荧光分子具有唯一的固有吸收和发射偶极距，可以通

过使用偏振激发光或通过测荧光的偏振或将两者相结合，来确定单个荧光分子的空间取向。将荧光分子标记在生物大分子的某一特定部位，实时地分析单个荧光分子的偏振状态的变化，就可以了解生物大分子的构象状态及其变化的动力学过程。在 smFPA 中，荧光分子的标记主要有两种方式 [38]：一是将荧光分子紧密的标定在生物大分子上，这种标记可通过使用蛋白质内的疏水囊、在核酸内嵌入染料分子、或同时在两个部位用共价键连接来实现。由于荧光分子紧密的固定在生物大分子上，它将随生物分子的某一部位一起旋转，因此通过测荧光偏振，就可得出有关生物分子方向变化的信息。还有一种标记方式是“系留标记”，将荧光分子“系”在生物分子上，这时候荧光分子旋转运动的自由程度受周围微环境的影响，因此我们可以通过观测荧光分子旋转运动的自由程度的变化来研究生物分子的性质。

在这方面研究比较多的分子是肌动蛋白丝和 ATP 酶。Sase 等 [39] 首次将 smFPA 应用于生物系统。他们研究了肌动球蛋白马达分子中肌动蛋白分子沿着固定于玻璃表面的肌球蛋白的轴向转动。肌动蛋白用四甲基罗丹明荧光分子标记，记录垂直与水平偏振荧光的像来分析每个发光点的发射偏振。结果显示肌动蛋白的旋转比它本身的螺旋要快得多，因此说明肌球蛋白不是沿着肌动蛋白“走动”而是“跳动”前进。很多人 [40,41]用 smFPA 研究了 ATP 水解酶的分子旋转运动。Adachi 等人 [42] 用两种方法检测了 ATP 水解酶的分子旋转运动。

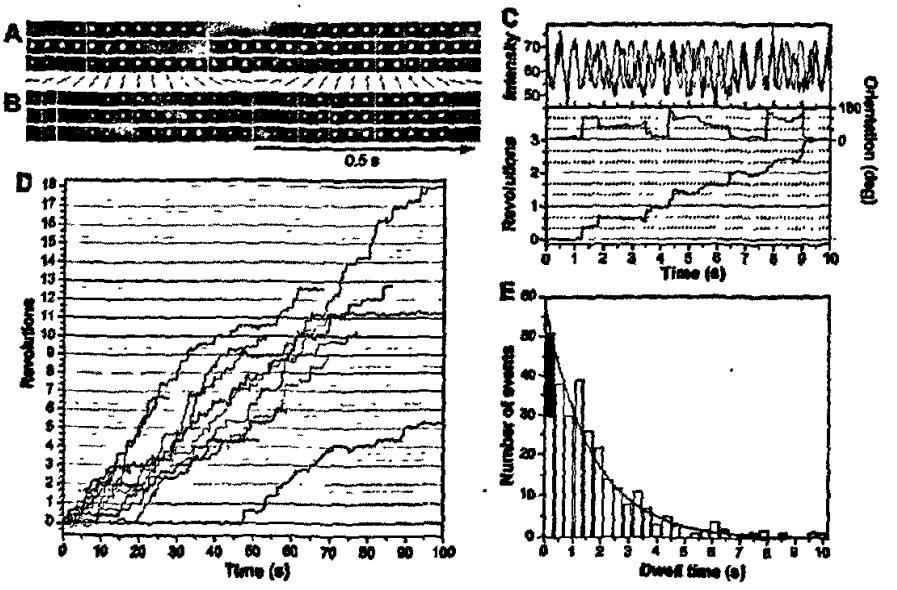


图 1-7 A.旋转分子荧光图象的时间轨迹；B.标记在无活性的γ亚基上的分子荧光图象的时间轨迹；C.荧光强度的时间轨迹和计算出来的荧光分子的角度；D.分步旋转的时间过程。E.两步间停留时间的分布图 [42]。

他们在 ATP 合成酶的旋转亚基（γ亚基）上紧密地标记上一 Cy3 荧光分子。荧光探针分子的旋转代表着γ亚基的旋转。单个探针分子的旋转，可使用两个方法测定：（1）基于吸光效率的偏振（2）基于发射荧光的偏振。在第一种方法中，激发光偶极在样品平面内连续旋转，荧光探针分子的发射偶极和激发偶极平行时，分子发出荧光。从图 1-7A 可明显地看到荧光分子的旋转。根据图 1-7A 计算出荧光强度、分子角度随时间的变化（图 1-7），通过许多时间轨迹曲线，得出两步旋转之间停留时间的柱状图。这些结果有力地说明了 ATP 合成酶γ亚基旋转是 120° 一步的。在第二种方法中，荧光被分解为垂直光（V）和水平光（H），并且同时测量。从图 4A 可看出γ亚基的旋转。根据荧光强度的记录可计算出荧光偏振（[V-H]/[V+H]），荧光偏振显示三个水平 a、b 和 c（图 1-8），说明旋转方向被 120° 分开，再一次说明了γ亚基的旋转是每一步旋转 120°。

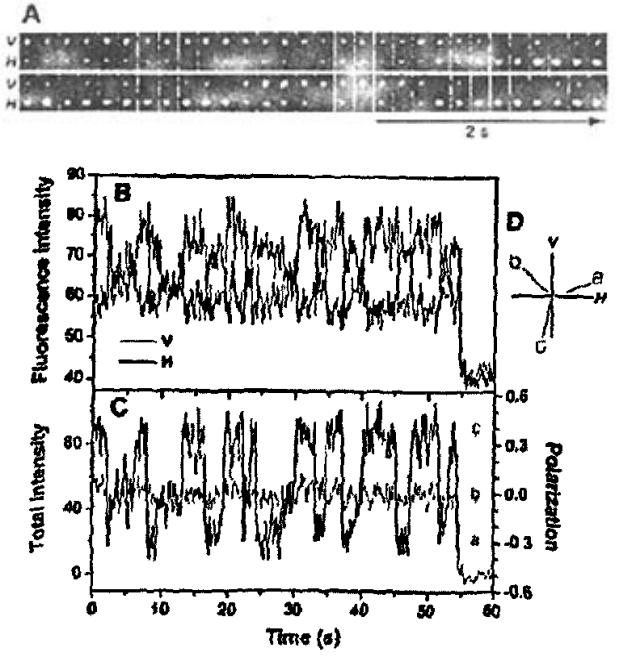


图 1-8 A.荧光分子的荧光图象；B.垂直偏振光和水平偏振光强度的时间曲线。C.总荧光强度（V+H）和荧光偏振的时间曲线；D.a、b 和 c 表示的方向示意图 [42]。

1.2.3 酶动力学

对于单个分子催化过程的研究被称为单分子酶学。按荧光物质的不同，可将单分子酶实验分为四种方法 [43]：

（1）测底物的荧光。小的底物分子在溶液中扩散停留在激发光体积内的时间大约为 10μs-1ms。如果具有荧光特性的底物分子能和酶结合较长时间，就能被检测。Yanagida 小组 [44] 用具有荧光特性的 ATP 衍生物观测了单个肌动蛋白分子上的 ATP 水解酶。这种方法的缺点是为抑制噪声，必须保持较低的底物浓度（~nM），这样就限制了转化率。

（2）测产物荧光的组合。

Xue 和 Yeung [45] 研究了毛细管中的单个乳酸脱氢酶分子，乳酸脱氢酶是一种能将肝脏和心脏内的乳酸盐转变为丙酮酸盐的酶，在这个催化过程中伴随着有从 NAD^+到 NADH 的反应，NADH 是能发荧光的，这样就可以很容易地检测它的形成。实验发现不同的酶分子催化效率也不相同。Craig 等人 [46] 用同样的方法检测了碱性磷酸酶。他们将单个碱性磷酸酶分子置于毛细管中，毛细管中充满反应底物，底物在酶的催化作用下生产能发荧光的产物，通过对产物荧光强度的检测，就能检测出对应的单个碱性磷酸酶分子的催化活性。实验证明，在相同的孵育温度下，不同的酶分子活性是不同的，活性最强的分子是活性最弱分子活性的 10 倍。Edman 等 [47] 通过测产物的荧光检测了单个辣根过氧化物酶分子。他们将单个辣根过氧化物酶分子固定在玻片表面，加入底物二氢罗丹明 6G，底物在辣根过氧化物酶的催化下，被氧化为罗丹明 6G，然后使用 CLSM 结合 APD 检测产物罗丹明 6G 的荧光。实验证明，在不同位置，罗丹明 6G 的荧光强度是不同的，这说明不同的酶分子催化效率是不同的，这是因为它们的构象不同造成的。很多酶的反应受产物释放的限制，不能用这种方法来检测。这种方法的优点是不须考虑光漂白，因为可以产生荧光的产物分子不断生成，并且不断扩散到激发光体积以外。

（3）测酶的荧光。Lu 等 [48] 在 1998 年第一次研究了酶自身的荧光，通过检测胆固醇氧化酶中发荧光的活性部位（FAD）发出荧光的变化，研究了酶的反应。胆固醇氧化酶（E）包括一个活性部位 FAD，FAD 在它的还原态不发荧光，但在它的氧化态发荧光，在催化反应中，FAD 首先被胆固醇还原为 $FADH_2$，然

后又被 O_2 氧化，产生 H_2O_2。通过实时检测单个酶分子发出的荧光变化，就可监测酶的催化反应速率（图 1-9）。实验发现了酶分子的记忆现象，即酶分子的翻转与前一次的翻转是有联系的，这是因为蛋白分子构象的缓慢波动造成的。Xie 研究的为酶活性的动力学混乱提供了有力的证据。

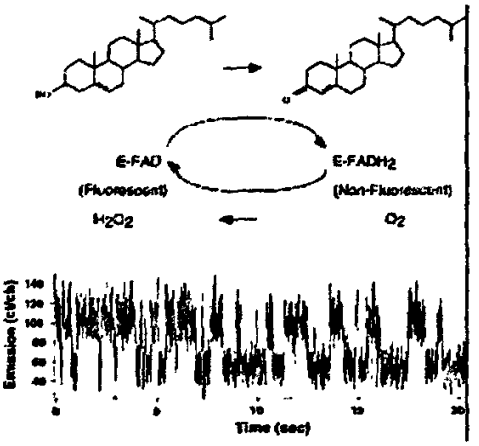


图 1-9 胆固醇氧化酶催化反应以及单个酶分子荧光强度随时间的变化图 [48]。

（4）因为生物分子一般不发荧光，所以在大多数酶的催化反应中，底物分子、酶分子和产物分子都是不发荧光的，以上方法受到很大限制。这就需要对生物分子进行荧光标记。而分子间的荧光共振能量转移特别适合用来研究酶分子和底物的结合和分离。和分子内的 FRET 不同，分子间的 FRET 是将荧光共振能量转移对的供体和受体标记在两个不同的分子上，当两个荧光标记的分子结合时，供体和受体之间距离近，能量转移效率大，供体荧光强度小，受体荧光强度大。当两个荧光标记的分子分离时，供体和受体之间距离变大，能量转移效率小，供体荧光强度大，而受体荧光强度小。因此，通过监测供体和受体荧光强度的变化，就可推知催化反应的状态及酶的催化机理。Ha 等 [49] 用分子间 spFRET 研究了葡萄球菌核酶（SNase）的催化。SNase 是一种催化 DNA 或 RNA 水解成单核苷酸或二核苷酸的酶。他们将 SNase 的衍生物 D40G 标记上 TMR。底物 DNA 标记上 Cy5，然后固定在玻璃表面上。酶和底物结合时，能量转移效率大，供体荧光强度小，受体荧光强度大。酶和底物分离时，供体荧光强度大，受体荧光强度小。通过监测能量转移效率的变化就可直接观测到酶和底物结合、分离的时间轨道曲

线。受体持续发光的时间，或者结合时间用 τ_{assoc} 表示。将 Cy5 分别标记在 5′端和 3′端。在多次 spFRET 事件中得出 τ_{assoc} 的柱状图，计算出 τ_{assoc} 的平均值分别为 257 微秒和 110 微秒。用 SNase 的衍生物 D21Y 作同样的时间，则对于 5′-Cy5DNA 和 3′-Cy5DNA 来说，τ_{assoc} 的平均值相差极小，分别为 169 微秒和 162 微秒。因为 D21Y 对 DNA 的水解不起催化作用，说明 5′-Cy5DNA 和 3′-Cy5DNA 与酶的结合时间不同，是因为酶在催化过程中从 3′到 5′的方向将 DNA 劈开的。

在对 DNA 解螺旋酶的研究中，可将荧光共振能量转移对的供体和受体分别标记在 DNA 分子的两条链上 [50]，当 DNA 解螺旋酶进行催化作用时，DAN 两条链解旋，供体和受体分离，能量转移效率降低，供体荧光强度大，而受体荧光强度小。当 DNA 解螺旋酶没有催化功能时，供体和受体距离近，能量转移效率高，供体荧光强度小，而受体荧光强度大。因此，通过监测荧光能量转移效率的变化，就可推断酶的催化状态。实验证明，当酶分子浓度低时，荧光能量转移效率高，说明酶不起催化作用。增大酶的浓度，荧光能量转移效率降低，酶起催化作用。这说明当酶的浓度增大时，酶单体再要与其它的酶单体分子结合，酶的构象发生了变化，酶的功能也发生了变化，由原来的不具催化作用变为具有催化作用。

FRET 虽然在研究酶动力学中发挥重要作用，但是也有缺点：在选择荧光染料分子时，荧光染料分子不能干扰酶的反应；染料分子的光漂白也限制了时间轨迹的长度。

1.2.4 特定序列核酸的单分子检测

DNA 序列的检测在基因工程、法医学、药物研究等领域有非常重要的作用，为了提高检测的灵敏度，常在检测前利用聚合酶链反应（PCR）将目标物质浓度增大，但是这种方法会因为引入杂质、放大效率的变化和其它一些原因造成检测结果的不准确 [51]。近年来，单分子检测技术的发展为核酸的序列鉴定提供了一种有力的手段。在单分子水平上对特定序列的核酸进行检测，一般是将被检测的核酸标记上一种荧光染料分子，而用与特定序列的核酸互补的、标记了另外一种波长的荧光染料的寡核苷酸作探针，当被检测的核酸有要检测特定序列时，被

检测核酸和探针分子结合，两种不同波长的荧光染料分子就会在同一位置被检测到，或同时被检测到。特定序列核酸的单分子检测主要有以下几种检测方法。

1.被检测核酸标记上一种荧光染料，固定在玻片表面，然后加入荧光探针，探针分子中有与特定序列互补的序列，如果被检测核酸中有要检测的特定序列，探针分子和被检测核酸分子结合，用 CCD 成像时，两种不同波长的荧光染料分子回出现在同一位置。Trabesinger 等人 [52] 用这种方法检测特定序列的 DNA，证明这种方法有很好的识别率。他们将目标 DNA 标记上 TMR，固定在玻片表面，然后加入 Cy5 标记的探针分子，分别用波长为 514 nm 和 630 nm 的激光激发，在 514 nm 激光激发下，在 ICCD 上对 TMR 单分子成像，再在 630 nm 的激光激发下，在 ICCD 上对 Cy5 单分子成像，如果两个检测渠道的单分子图像出现在同一个位置，证明探针分子和被检测核酸结合，被检测核酸中有要检测的特定序列。

2.对溶液中的 DNA 分子进行检测，可选用两种寡核苷酸作探针分子[53,54]。这两种探针分子在不同的位置与目标 DNA 的特定序列互补，它们分别标记上不同波长的荧光染料分子。当将这两种探针分子与含有目标 DNA 的样品混合时，它们分别在自己的结合位置和同一个目标 DNA 分子结合，然后用两种不同波长的激光同时激发，用两个 APD 在两个不同波长的检测通道上同时检测。因为两种标有不同波长荧光染料分子的探针结合在同一个目标 DNA 分子上，所以它们的信号是同时出现的。如果样品中没有目标 DNA，得到的游离的两种不同波长的信号之间是不相关的（图 1-10）。

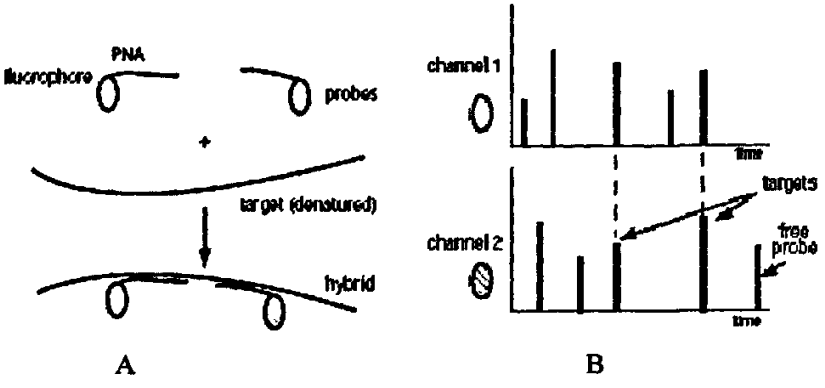


图 1-10 A.双探针检测溶液中核酸序列示意图;B.光子爆发示意图 [54]。

虚线上下的光子爆发是在两个检测通道上同时进行的，表明有待测序列核酸。

3. 电子转移荧光猝灭。Tyagi 等 [55] 介绍了一种通过使荧光强度增强而说明有特定序列核酸的探针，这种探针是一种具有茎环结构的单链 DNA，其中环的结构是一段和目标 DNA 的特定序列互补的核苷酸，茎是由两段互补的寡核苷酸结合而成，茎的核苷酸序列与目标 DNA 的特定序列无关。茎的一条链的端部为鸟苷酸，另一条链的端部标记上荧光分子 JA242，当茎的两条链结合时，鸟苷酸和 JA242 之间距离近，发生从 JA242 到鸟苷酸的电子转移，使 JA242 发生电子转移荧光猝灭。当探针的环部与目标 DNA 分子的特定序列结合时，环状结构被迫打开，JA242 和鸟苷酸分离，不再发生从 JA242 到鸟苷酸的电子转移，因此，JA242 的荧光强度增大，荧光寿命延长。Knemeyer 等人 [56] 利用电子转移荧光猝灭法在单分子水平上对特定的 DNA 序列进行了检测。在实验中，通过检测荧光分子 JA242 的光子爆发强度、爆发时间及荧光寿命，可判断探针分子是否和具有特定序列的 DNA 分子结合。

4.在检测核酸序列时，缩氨酸核酸（PNA）经常替代 DNA 做为探针分子使用 [57]。和 DNA 相比，在 PNA 中，DNA 分子中的脱氧核糖磷酸盐被同样结构的氨基乙酸骨架所代替(图 1-11 左图)，PNA 与目标 DNA 的结合更紧密。Carlsson [58] 利用 PNA 作探针分子检测了单核苷酸。

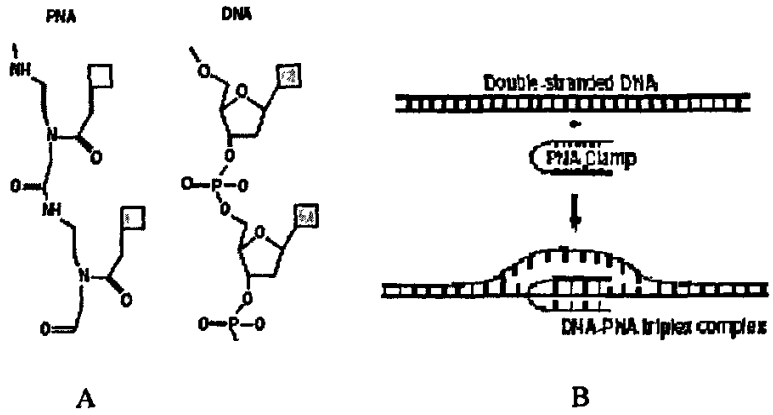


图 1-11 A.PNA 和 DNA 结构的比较图; B.发夹形的 PNA 分子和 DNA 分子形成三聚物的示意图 [59]。

Castro 等 [59] 使用发夹形的 PNA 分子标记上荧光染料做探针，与含有特定序列的目标 DNA 分子结合，形成三聚物（图 1-11 右图）。在目标 DNA 分子上内嵌

另外波长的荧光染料。在激光激发下，双通道检测，如果两个通道的光子爆发是同时的，说明探针分子和被检测 DNA 分子结合。这种方法还有两个优点，一是 PNA 可直接和双链 DNA 结合，不需要将 DNA 变性，使检测时间缩短。再就是内嵌染料荧光强度和 DNA 分子的长度成正比 [60]，还可以对 DNA 进行定量检测。

5.将含有和目标 DNA 的特定序列互补的序列的一小段寡核苷酸做引物，同时在溶液中加入聚合酶和荧光标记的游离的核苷酸，引物和目标 DNA 结合后，在聚合酶的催化作用下，荧光标记的游离的核苷酸和被检测的 DNA 单链结合形成双链的 DNA 分子，而生成的 DNA 分子上带有大量的荧光染料分子，它的光子爆发强度比游离的核苷酸的光子爆发强度大得多。因此，强的光子爆发代表着样品中的 DNA 分子有要检测的特定序列（图 1-12）。

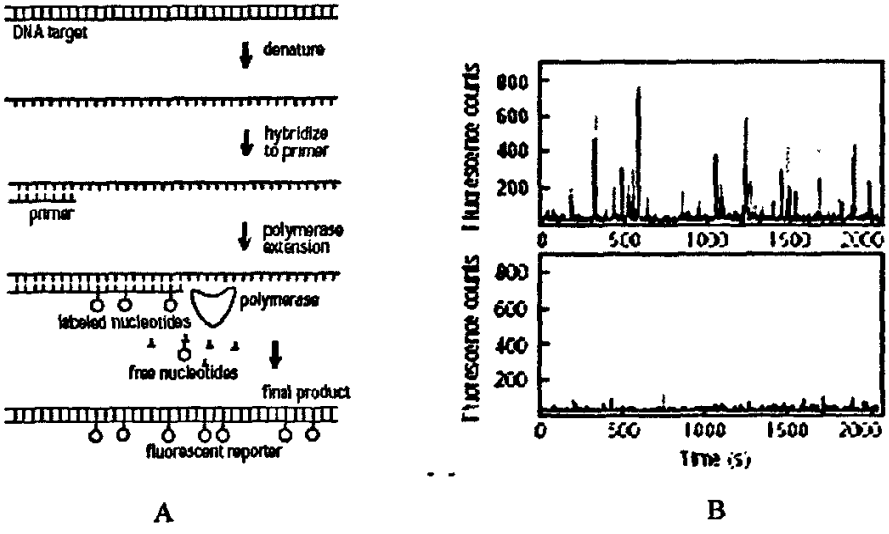


图 1-12 A.样品的准备过程; B.光子爆发。

上图中强的光子爆发说明有被检测的序列通过激发区域。下图说明没有被检测的序列 [59]。

1.2.5 马达蛋白的运动

Kinesin 是一种马达蛋白，它沿微管传送不同的细胞器官。用单分子荧光研究肌肉马达蛋白的主要是 Yanagida 小组 [61]。他们在 Kinesin 蛋白的尾部进行无损荧光标记后加到微管上，微管在 ATP 存在下吸附到玻璃片表面上，用全内反射荧光显微镜观测了单个 Kinesin 分子沿微管的运动。

肌浆球蛋白负责肌肉收缩运动，也已在单分子水平上进行了研究。对这种马达蛋白的研究也其始于 Yanagida 小组 [62]，他们用玻璃微针测量了单个肌浆球蛋白分子在肌动蛋白细丝上的运动。

1.2.6 离子通道

离子通道控制离子通过细胞膜，产生离子梯度，这种离子梯度是神经和肌肉产生兴奋的原因。在离子通道标记上一个荧光强度与离子流量有关的探针分子，就可以对离子通道成像，并监测离子的流量。1995 年，Yanagida 小组 [63] 用这种方法在人工双分子膜上同时得到离子通道的荧光图像和离子的流量变化，并测出了离子通道的布朗运动（图 1-13）。2001 年，Harms 等人 [64] 在单分子水平上观测了活细胞上 L 型 Ca^{2+}通道。他们将黄荧光蛋白融合并在人细胞的离子通道上表达，通过荧光强度的变化，对细胞膜上 L 型 Ca^{2+}通道成像，并对离子通道埋入细胞膜的位置进行了定位，他们还观测到 L 型 Ca^{2+}通道在细胞膜上运动，易于形成大的聚合体。2000 年，Schutz 等 [65] 将 Cy5 标记的 $HgTX_1$ 连接到淋巴细胞的 K^+通道上，在活细胞中测到了单个离子通道的三维图象。离子通道在三维方向的定位精度都达到了 40 nm。他们通过对离子通道的成像计算出了细胞膜上离子通道的密度，并观测到了它的运动。人们希望能用 FRET 研究离子通道的构象变化，同时用第三个荧光探针分子来监测离子的流量，这比较困难。因为直角标记两个荧光探针分子就很困难，第三个荧光探针分子的引入需要蛋白质化学的进一步发展。

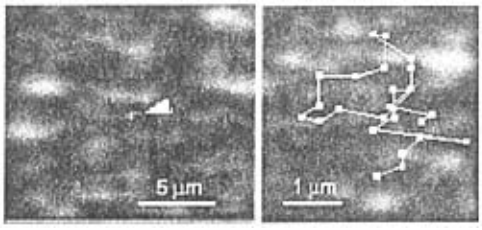


图 1-13 离子通道的荧光图象（左）和它的布朗运动 [63]。

1.2.7 细胞信号转导

在人体内部，各种功能的运行，都离不开细胞与细胞间的信号联系，在大多

数情况下，这种联系是依赖化学分子即胞间信号分子来实现的。这种通过化学信号分子而实现对细胞的调节及其作用过程称为细胞信号转导。Sako 等 [66] 用 TIRFM 检测了 A431 癌细胞细胞膜上表皮生长因子（EGF）和受体（EGFR）的二聚反应。在 EGF 分子上标记 Cy3 荧光分子，观测了单个 EGF-Cy3 分子的荧光点在细胞膜表面的扩散，少数情况下，两个点在细胞膜上运动到一起，多数情况下，是一个荧光点的强度突然增大一倍，然后分两步减弱，这表明 EGRR 的二聚是在结合第二个 EGF 分子之前进行的。并且通过加入 EGF- Cy3 和 EGF- Cy5 的混合物，用 spFRET 研究了在细胞膜上单个 EGF - EGFR 分子的构象变化，还研究了 EGF - EGFR 分子的自磷酸化反应。后来，他们又检测了细胞膜上神经生长因子（NGF）和受体（NGFR）的二聚反应 [67]。神经生长因子和细胞膜表面的受体的结合导致神经突长出。这个结果对认识二聚机理以及神经生长因子受体的活化作用非常重要。Lidke 等 [68] 用激光扫描共聚焦显微镜和细胞流式仪研究了在跨膜受体酪氨酸激酶家族的介导作用下，上表皮生长因子（EGF）的内吞。酪氨酸激酶家族包括 erbB1、erbB2、erbB3 和 erbB4。这些跨膜蛋白发动了很多细胞信号的转导。将酪氨酸激酶与荧光蛋白融合，上表皮生长因子标记上单个量子点，对酪氨酸激酶介导的信号成像，发现了以前未报导的内吞机制，EGF 与 erbB1 结合后是倒退进入细胞。Ueda 等 [69] 在单分子水平上检测了细胞中的趋药性信号。他们在一磷酸腺苷上标记一个 Cy3 分子，然后和它们的细胞膜表面受体结合，实验发现受体在细胞膜表面分布均匀，并且运动很快。Nie [70] 将转铁蛋白分子标记上量子点，转铁蛋白分子和细胞表面的受体结合，通过内吞进入细胞内部，观测了转铁蛋白在细胞内的分布。

1.2.8 单分子计数

单分子计数是通过对单位体积溶液中的分子数目进行清点、统计，来检测溶液浓度。迄今为止，单分子计数主要是在毛细管中进行，利用毛细管电泳使被检测分子分离，当分子通过激光激发区域时，分子信号被检测器检测到，在一段时间内，对检测到的分子进行统计，分子数目与溶液浓度成正比，可作出分子数目与溶液浓度的标准曲线，从而对溶液浓度进行检测。Anazawa 等 [71] 通过毛细管电泳结合 CCD 成像检测了 β -肌动蛋白 DNA 溶液。将 β -肌动蛋白 DNA 标上

YOYO-1 荧光分子，然后使溶液通过一个方形的毛细管，使用落射荧光显微镜对溶液进行检测。激光通过两个透镜后形成一个水平的薄层，激光在溶液中形成一长、宽均为 75 μm，高为 10 μm 的检测区域（图 1-14 左图），DNA 分子通过激发区域，发出荧光，使用 CCD 对分子成像。实验证明，溶液中产生荧光的杂质移动速率分布较宽，而 β-肌动蛋白 DNA 的电泳速率主要分布在 32-42 像素/祯之间，只对这一速率间的分子计数，消除了杂质荧光的干扰。对溶液检测了 10 min，得 3500 张照片，统计到的分子数目与溶液浓度有良好的线形关系（图 1-14 右图）。检测范围达 4 个数量级，检测浓度最低为 3×10^{15} mol/L。

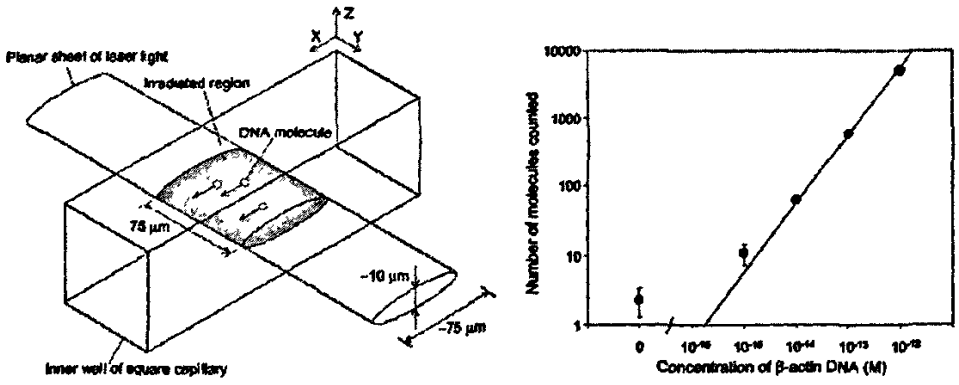
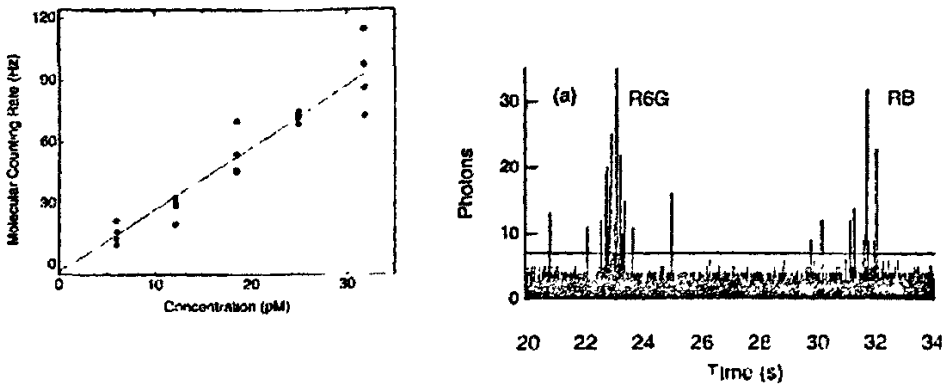


图 1-14 A.毛细管电泳检测 β-肌动蛋白 DNA 溶液的装置示意图。B.检测 β-肌动蛋白 DNA 溶液所得的标准曲线 [71]。

.Fister 等 [72] 利用芯片和激光扫描共聚焦显微镜检测罗丹明 6G 的溶液，当罗丹明 6G 分子进入激光激发区域时，用 APD 检测单个罗丹明 6G 分子的光子爆发。使用不同浓度的溶液，统计一秒内经过激发区域的分子数目，得到分子数随溶液浓度的变化曲线，它们有良好的线性关系（图 1-15 左图）。因为芯片有很高的分离效率，他们还实验了对两种分子的分离和计数。将罗丹明 6G 分子和罗丹明 B 分子同时加入溶液，因为这两种分子的迁移速率不同，可利用芯片将它们分离，并对两种分子分别计数（图 1-15 右图）。



A B

图 1-15 A.利用芯片检测罗丹明 6G 的溶液的工作曲线；B.检测罗丹明 6G 和罗丹明 B 的混合溶液的光子爆发 [72]。

Chen 等人 [73] 用激光诱导荧光结合毛细管电泳检测了藻红蛋白溶液。通过向毛细管中注入不同数量的分子，检测单个分子的光子爆发并对单分子计数，计算出检测效率为 50%。对检测结果的误差进行了分析，说明检测分子数目的误差主要是由分子波动噪音造成的。因为在样品中只含有很少量的分子，对 y mol 的分子的分析总是有很低的精确度。分子数目的波动是造成分析误差的基本原因，只有增加分析的分子数目，才能减少这种误差。他们还用同样方法检测了碱性磷酸酶[74]，溶液体积较大但浓度很小，实验结果表明检测仍受到分子波动噪音的影响。

单分子计数除了在毛细管中进行外，还可以将溶液形成薄膜，然后利用激光共聚焦扫描显微镜或全内反射荧光显微镜对薄膜上的分子计数。Loscher 等人 [75] 将抗原分子固定在盖玻片表面，检测了抗原的浓度。他们先利用 Langmuir-Blodgett 技术在盖玻片上形成肉桂酸-三甲基甲硅烷乙醚纤维素（CTMSC）的薄膜，再用 Lemieux 氧化法将表面的 CTMSC 的肉桂酸集团转变为羰基集团，通过氨基反应产生的亚氨基将抗体共价结合。准备好的薄层用来捕获抗原并特异结合上荧光标记的二级抗体。通过形成夹心复合物的方法在玻片表面固定上结合了荧光分子的抗原分子。利用激光扫描共聚焦显微镜对玻片表面的抗原分子进行扫描，并使用 APD 收集光子爆发的信号。实验结果表明，当抗原浓度大于 10^{-15} mol/L 时，光子爆发的强度与溶液浓度成正比，可以通过对光子计

数来检测溶液的浓度。当抗原浓度小于或等于 10^{-15} mol/L 时，光子爆发的强度与溶液浓度没有关系，这说明在浓度较小时，光子爆发是由单个分子产生的。这时，可通过对单分子计数来检测溶液浓度，最低可检测到溶液的浓度为 10^{-17} mol/L，在这个浓度下，找到一个分子需 2 分钟。Hanley 等 [76] 利用基底退出技术将罗丹明 6G 的溶液在石英基底形成薄膜，使用落射荧光显微镜和 CCD 对薄膜上的单个罗丹明 6G 分子成像，并对荧光点计数。根据溶剂的表面张力、基底退出的速率等可计算出膜的厚度，再根据膜的厚度和溶液浓度和计算出膜上单分子密度的理论值，浓度较低时，检测到的荧光点数目和理论推导的结果基本一致。溶液浓度较高时，会发生分子的重叠现象，使检测到的荧光点的数目偏少，在这种情况下，可通过泊松分布统计模型进行校正。实验结果表明，这种方法具有很高的检测率（96%）。Schultz [77] 利用 PRPs 在单分子水平上进行了免疫分析。PRPs 是一种能发荧光的微粒，大小为纳米级别。他们在玻片上加生物素连接的 BSA 来捕获抗体分子，然后加入各种浓度的 GAB 抗体溶液，最后在加标记了 PRPs 的 RAG 溶液，RAG 与 GAB 结合后，通过清点 PRPs 的总数，来检测 GAB 溶液的浓度，实验结果表明，PRPs 的数目与 GAB 溶液的浓度有良好的线性关系，线性范围有 4 个数量级（图 1-16）。

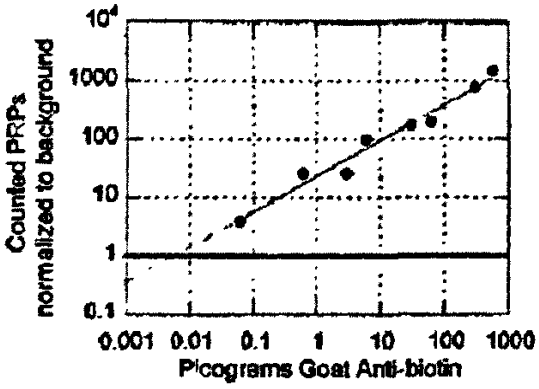


图 1-16 通过清点 PRPs 数目检测 GAB 溶液的浓度的工作曲线 [77]。

Fang 等 [78] 利用光纤的隐失波探测了罗丹明 6G 的溶液。荧光信号用 ICCD 收集，他们检测到了单个罗丹明 6G 分子，并发现检测到的单分子的数目与溶液浓度有良好的线性关系。将溶液中被检测的分子上同时标记上两种不同波长的荧光染料分子，当被检测分子进入激光激发区域，荧光分子被激发时。可在两个不

光染料分子，当被检测分子进入激光激发区域，荧光分子被激发时。可在两个不同的检测通道上同时检测到两种不同波长的荧光染料分子的信号。因此，如果在不同的检测通道上同时检测到两种不同波长的光子爆发，说明有一个被检测分子通过激发区域。可通过对单分子在两个不同的检测通道上同时产生的光子爆发进行计数，来检测溶液的浓度。这种检测一般使用激光扫描共聚焦显微镜，检测器为 APD。这种方法的优点是将分子标记后，不须将游离的荧光染料分子进行分离，即可对溶液进行检测。因为激光激发体积很小，当溶液浓度很小时，两个分子同时进入激光激发区域的机会非常小，如果同时检测到不同波长的光子爆发，只能是标记了两种不同波长的荧光染料分子的被检测分子进入了检测区域，而不是两个不同波长的荧光染料分子同时进入.检测区域。Li 等人 [79] 利用这种方法检测了 DNA 的溶液。在一个 DNA 分子上同时标记了一个罗丹明 G 分子（最大发射波长为 532 nm）和一个 Alexa 647 分子（最大发射波长为 666 nm），用波长为 488 nm 的氩离子激光和波长为 633 nm 的氦氖激光同时激发，用两个 APD 在两个检测通道同时检测光子爆发。图为 50 pM 的 DNA 溶液的光子爆发，两个通道同时产生的光子爆发用星号标出。通过对不同浓度的 DNA 溶液进行检测，对它们在不同的检测通道上同时产生的光子爆发进行计数，可看出同时产生的光子爆发数目与溶液浓度有良好的线形关系，检测范围有 3 个数量级。用这种方法检测的 DNA 溶液的浓度可低达 50 fM。实验说明了双标记检测法有很高的灵敏度，并且特别适于对生物分子的聚合物的检测。2004 年，他们又用这种方法检测了 G 蛋白溶液和 HSV1 病毒溶液 [80]。通过 G 蛋白与 IgG 的结合，在一个 G 蛋白分子上同时标记上 Alexa 488 和 Alexa 647 两种荧光染料分子，通过对不同的检测通道上同时产生的光子爆发进行计数，可检测 G 蛋白溶液的浓度。对于 HSV1 病毒溶液，是通过 HSV1 病毒和单克隆抗体 LP2 的结合，在一个 HSV1 病毒上同时标记上 Alexa 488 和 Alexa 647 两种荧光染料分子，检测方法与检测 G 蛋白溶液的方法相同（图 1-17）。

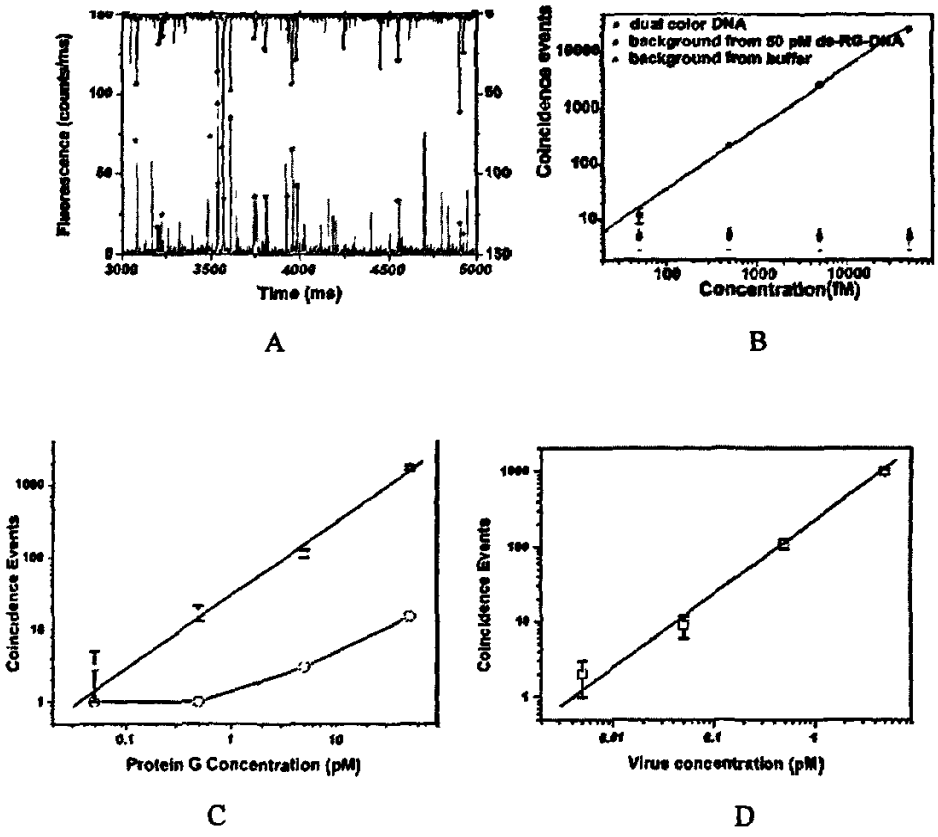


图 1-17 A.双标记双通道检测溶液的示意图; B.DNA 溶液的工作曲线;C.G 蛋白溶液的工作曲线;D. HSV1 病毒溶液的工作曲线 [80]。

1.3 展望

近十多年来，单分子检测技术进展十分迅速，但由于其历史较短，目前仍有许多问题需要进一步发展。在仪器方面需要高量子产率、低噪声、快速读数的检测器。在检测时间上向微秒以至纳秒甚至皮秒延伸，了解更加快速的过程。进一步发展构像化学，能够进行多个荧光探针的特定部位的标记。还应该发展新型的荧光探针分子 [81]，如半导体纳晶或半导体量子点，与传统荧光团（有机染料）相比，它们具有窄的、可调的、对称的发射光谱，高的发光亮度和光化学稳定性。对生命过程的研究应向细胞质甚至细胞核内延伸。现在，单分子检测的研究正以很快的速度向前发展，并在许多学科领域发挥着越来越大的作用。

1.4 [参考文献]

[1] Wallace, M., Hall, T. A study of DNA conformational dynamics using single-molecule. **2001**, 1-208.

[2] Schwile, P., Kettling, U. Analyzing single protein molecules using optical methods. *Cruuent Opinion in Biotechnology,* **2001**, 12, 382-386.

[3] Rowland, R. E., Nickless, E. M. Confocal microscopy opens the door to 3-dimensional analysis of cells. *Bioscene*, **2000**, 26, 3-7.

[4] Davin, MS., Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. J *Cell Science,* **1989**, 94, 175-182.

[5]. Williams, D. A. Quantitative intracellular calcium imaging with laser - scanning confocal microscopy. *Cell calcium,* **1990**, 11, 63 ~ 73.

[6] Hirschfeld, T., Optical microscopic observation of single small molecules. *Appl. Opt.,* **1976**, 15, 2965-2966.

[7] Moerner, W. E., Horne, E., Kador, L., Optical detection and probing of single dopant molecules of pentacene in a p-terphenyl host crystal by means of absorption spectroscopy. *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 1237-1248.

[8] Shera, E. B., Seitzinger, N. K., Davis, L., Keller, R., Soper, A. Detection of single fluorescent molecules. *Chem .Phys. Lett.*, **1990**, 174, 553-557.

[9] Trautman, K., Macklin, J. J., Brus, L., Betzig, E. Near-field spectroscopy of single molecules at room temperature. *Nature*, **1994**, 369, 40-42.

[10] Macklin, J. J., Trautman, J. K., Harris, T. D., BrusImaging, L. E., Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface. *Science*, **1996**, 272, 255-258.

[11] Kubischeck, U., Kuckmann, O., Kues, T., Peter, R. Imaging and Tracking of Single GFP Molecules in Solution. *Biophys. J.*, **2000**, 78, 2170-2179.

[12] Rober, M., Dickson, D. J., Norris,T., Moerner, W. E. Three-Dimensional Imaging of Single Molecules Solvated in Pores of Poly(acrylamide) Gels. *Science*, **1996**, 274, 966-968.

[13] Schmidt, T., Schutz, G. J., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schindler, H. Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy . *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 17662-17668.

[14] Schutz, G. J., Schindler, H., Schmit, T. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys. J.*, **1997**, 73, 1073-1083.

[15] Byassee,T. A.,Chan, W., Nie, S., Probing Single Molecules in Single Living Cells. *Anal. Chem.*, **2000**, *72, 5606-5611.*

[16] Schutz, G. J., Kada, G., Pastushenko, V.P., Schindler, H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.*, **2000**, 19, 892-901.

[17] Iino, R., Koyama, I., Kusumi, A. Single Molecule Imaging of Green Fluorescent Proteins in Living Cells: E-Cadherin Forms Oligomers on the Free Cell Surface. *Biophys. J.*, **2001**, 80, 2667-2677.

[18] Goulian, M., Simon, S. M. Tracking Single Proteins within Cells. *Biophys. J.*, **2000**, 79, 2188-2198.

[19] Kues, T., Peters, R., Kuvitscheck, U. Visualization and tracking of single protein molecules in the cell nucleus. *Biophys. J.*, **2001**, 80, 2954-2967.

[20] Kues, T., Dickmanns, A., Lührmann, R., Peters, R., Kubitscheck, U. High intranuclear mobility and dynamic clustering of the splicing factor U1 snRNP observed by single particle tracking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2001**, 98, 12021-12026.

[21] Seisenberger, G., Ried, M. U., Endress,T., Buning, H., Hallek, M., Brauchle, C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science.* **2001**, 294, 1929-1932.

[22] Lakadamyail, M., Rust, M., Babcock, H.P., Zhuang, X. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2003**, 100, 9280-9285.

[23] Selvin, PR. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer, *Na.t Struct. Biol.*, **2000**, 7 , 730-734.

[24] Jia,Y., Talaga, D. S.,.Lau,W., Lu, H .S., Degrado, W. F., Hochstrasser, R. M. Folding dynamics of single GCN-4 peptides by fluorescence resonant energy transfer confocal microscopy. *Chem. Phys.*, **1999**, 247, 69-83.

[25] Jia,Y., Talaga, D.S., Lau, W., Lu, H.S.M., Degrado, W. F., Hochstrasser, R. M. Dynamics and folding of single two-stranded coiled-coil peptides studied by fluorescent energy transfer confocal microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 13021-13026.

[26] Deniz, A.A., Laurence, T. A., Beligere, G. S., Dahan, M., Martin, A.B., Chemla, D.S., Dawson, P.E., Schultz, P.G., Weiss ,S., Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA* , **2000**, 97, 5179-5184.

[27] Schuler, B., Lipman, E. A., Eaton, W. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, **2002**, 419, 743-747.

[28] Boukobza, E., Sonnenfeld, A., Haran, G. Immobilization in Surface-Tethered Lipid Vesicles as a New Tool for Single Biomolecule Spectroscopy. *J. Phys. Chem.B*, **2001**, 105, 12165-12170.

[29] Rhoades, E., Gussakovsky, E., Haran, G. Watching proteins fold one molecule at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2003**, 100, 3197-3202.

[30] Ha, T., Zhuang, X., Kim, H.D., Orr, J.W., Chu, S. Ligand-induced conformational changes observed in single RNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **1999**, 96, 9077-9082.

[31] Zhuang, X., Bartley, L.E., Babcock, H.P., Russell, R., Ha, T., Herschlag, D., Chu, S. A Single-Molecule Study of RNA Catalysis and Folding. *Science*, **2000**, 288, 2048-2051.

[32] Bartley, L.E., Zhuang, X., Babcock, H.P., Russell, R., Ha, T., Herschlag, D., Chu, S. A Exploring the folding landscape of a structured RNA. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA*, **2002** 99, 155-160.

[33] Zhuang, X., Kim, H., Pereira, M., Babcock, H., Chu, S., Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science*, **2002**, 296,1473-1476.

[34] Zhuang, X. W., Ha, T., Kim, H. D., Centner, T., Labeit, S., Chu, S. Fluorescence quenchaing: a tool for single-molecule protein-folding study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2000**, 97, 14241-14244.

[35] Jia, Y.W., Sytnik, A., Viadimirov, S., Cooperman, S., Robin, M.H., Nonexponential kinetics of a single $tRNA^{Phe}$ molecule under physiological conditions. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 7932-7936.

[36] Edman, L., Mets, U., Rigler,R. Conformational transitions monitored for single molecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **1996**, 93, 6710-6715.

[37] Eggeling, C., Fries, J. R., Brand, L., Günther, R., Seidel, C. Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy . *Proc .Natl. Acad. Sci.*

USA, **1998**, 95, 1556-1561.

[38] Weiss, S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, **1999**, 283, 1676-1683.

[39] Sase, L., Miyata, H., Ishiwata, S. Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 5646-5650.

[40] Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., Futai, M. Mechanical Rotation of the c Subunit Oligomer in ATP Synthase (F_0F_1): Direct Observation. *Science*, **1999**, 286, 1722-1724.

[41] Hasler, K., Engelbrecht, S. Three-stepped rotation of subunits γ and in single molecules of F-ATPase as revealed by polarized, confocal fluorometry. *FEBS Lett*. **1998**, 426, 301-304.

[42] Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh,H., Harada, Y., Yoshida, M., Kinosita, K. Stepping rotation of F_1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging *Proc .Natl. Acad. Sci.*, **2000**, 97, 7243-7247.

[43] Xie, S. Single molecule approach to enzymology. *Single Mol.* **2001**, 4, 229-236.

[44] Funatsu,T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., Yanagida ,T. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*, **1995**, 374, 555-559.

[45] Xue, Q. F., Yeung, E. S. Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme. *Nature*, **1995**, 373, 681-683.

[46] Craig, D.B., Arriaga, E. A., Wong, J., Lu, H.,Dovichi, J. Studies on Single Alkaline Phosphatase Molecules: Reaction Rate and Activation Energy of a Reaction Catalyzed by a Single Molecule and the Effect of Thermal Denaturations-The Death of an Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 5245-5253.

[47] Edman, L., Folds-Papp, Z., Wennmalm, S., Rigier, R. The fluctuating enzyme: a single molecule approach. *Chem. Phys.*, **1999**, 247, 11-22.

[48] Lu, H., Xun, L., Xie, X. Single-Molecule Enzymatic Dynamics. *Science*, **1998**, 282, 1877-1882.

[49] Ha, T., Ting, A. Y., Liang, J., Caldwell, W. B., Deniz, A. A., Chemla, D. S.,Schultz, P. G., Weiss, S. Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, 96, 893-898.

[50] Ha, T., Rasnik, I.,Cheng, W.,Babcock, H., Gauss, G.H.,Lohman, T.M.,Chu, S., Initiation

and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coil rep helicase. *Nature*, **2002**, 419, 638-641.

[51] Peccoud, J., Jacob, C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys. J.*, **1996**, 71, 101-108.

[52] Trabesinger, W., Schutz, G. J., Gruber, H. J., Schindler, H., Schmidt, T.Detection of Individual Oligonucleotide Pairing by Single-Molecule Microscopy *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 279-283.

[53] Castro, A., Williams, G.K. Single-Molecule Detection of Specific Nucleic Acid Sequences in Unamplified Genomic DNA. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3915-3920.

[54] Castro, A., Okinaka, T.R. Ultrasensitive, direct detection of a specific DNA sequence of Bacillus anthracis in solution. *Analyst*, **2000**, 9-11.

[55] Tyagi, S., Libchaber, A., Kramer, F., Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, 96, 6171-6176.

[56] Knemeyer, J., Marme, N., Sauer, M. Probes for Detection of Specific DNA Sequences at the Single-Molecule Level. *Anal. Chem.*,**2000**, 72, 3717-3724.

[57] Orum, H., Nielsen, P., Jorgensen, M., Larsson, C., Stanley, C.,Koch, T. Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *Biotech.*, **1995**, 19, 472-480.

[58] Carlsson, C., Jonsson, M., Norden, B., Zare, R. Screening for genetic mutations. *Nature*, **1996**, 380, 207-211.

[59] Castro, A., Bennett, L., Cortes, R., K.Lamia, L., Paz, K., Tripp, B. *Physics Division Progress Report 1999-2000*, 64-74.

[60] Rye, H., Yue, S., Wemmer, D., Quesada, M., Haugland, R., Glazer, A. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis- intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications *Nucleic Acid Res.*, **1992**, 20, 2803-2812.

[61] Vale R D, Funatsu T, Pierce. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature*, **1996**, 380, 451-453.

[62] Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K. Iwane, AH., Yanagida, T. Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 235, 47–53.

[63] Ide, T., Yanagida,T. An Artificial Lipid Bilayer Formed on an Agarose-Coated Glass for Simultaneous Electrical and Optical Measurement of Single Ion Channels *Biochem.Biophys. Res .Commun* **1999**, 265, 595-599.

[64] Harms, G. S., Cognet, L., Lommerse, P. H. M., Blab, G. A., Kahr, H., Gamsjager, R., Spaink, H. P., Soldatov, N. M., Romanin, C., Schmidt, T. Single-molecule imaging of L-type Ca^{2+} channels in live cells. *Biophys. J,* **2001**, 81, 2639–2646.

[65] Schutz, J.G., Pastushenko, V.P., Gruber, H.J., Knaus, H., Prag, B., Schindler, H. 3D Imaging of Individual Ion Channels in Live Cells at 40 nm Resolution. *Single Mol.* ,**2000**, 1 ,25-31.

[66] Sako, Y., Minoguchi, S., Yanagida, T. Single-molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nature. Cell. Biol.*, **2000**, 2, 168-172.

[67] Sako, Y. Single-Molecule Imaging of Signaling Molecules in Living Cells. *Single Mol.*, **2000**, 2, 159-163.

[68] Lidke, D., Nagy, P., Heintzmann, R., Post, J., Grecco, H., Jovin, T. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nature Biotech.*, **2004**, 22, 198-203.

[69] Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P., Yanagida, T. Single-Molecule Analysis of Chemotactic Signaling in *Dictyostelium* Cells. *Science,* **2001**, 294, 864-867.

[70] Nie, S.M., Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science,* **1998**, 281, 2016-2018.

[71] Anazawa, T., Matsunaga, H., Yeung, E. Electrophoretic quantitation of nucleic acids without amplification by single-molecule imaging. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 5033-5038.

[72] Fister, C., Jacobson, S., Davis, M., Ramsey, J.M. Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and sepearations on microchip devices. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 431-437.

[73] Chen, D., Dovichi, J. Single-molecule detection in capillary electrophoresis:molecular shot noise as a fundamental limit to chemical analysis. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 690-696.

[74] Craig, B., Wong, C.Y., Dovichi, J. Detection of attomolar concentrations by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Anal .Chem.*, **1996**, 68, 697-700.

[75] Loscher, F., Martin, J., Seeger, S. Counting of single protein molecules at interfaces and application of this technique in early-stage diagnosis. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3202-3205.

[76] Hanley, D., Harris, J. Quantitative dosing of surfaces with fluorescent molecules:characterization of fractional monolayer coverages by counting single molecules. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5030-5037.

[77] Schultz, S., Smith, D.R., Mock, J., Schultz, D.A. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2000**, 97, 996-1001.

[78] Fang, X., Tan, W. Imaging single fluorscent molecules at the interface of an optical fiber probe by evanescent wave excitation. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 3101-3105.

[79] Li, H.,Ying, L.,Green, J.,Balasubramanian, S.,Klenerman, D. Ultrasensitive coincidence fluorescence detection of single DNA molecules.*Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1664-1670.

[80] Li, H., Zhou, D., Browne, H., Balasubramanian, S., Klenerman, D. Molecule by molecule direct and quantitative counting of antibody-protein complexes in solution. *Anal .Chem.*, **2004**, 76, 4446-4451.

[81] 刘彦明， 刘二保， 程介克，检测溶液中的单分子 *分析化学* **2002**，30, 1000-1004.

第二章 全内反射单分子荧光法检测溶液中的抗体

2.1 引言

全内反射荧光显微术是当今世界上最具前途的新型生物光学显微技术之一，利用全内反射产生的隐失场来照射样品，使在百纳米级厚的光学薄层内的荧光团受到激发，而范围外的荧光团不受影响。所以全内反射荧光显微术具有其他成像方法无法比拟的高的信噪比，并且细胞的光损伤和光漂白也很小 [1]。全内反射的成像原理是光在折射率较大的介质中传输，如果它以大于临界角的角度入射到另一个折射率较小的介质上，光就会发生全反射。临界角依赖两种介质的相对折射率。细胞在玻璃盖玻片上或高折射率的介质上生长，激光光束由棱镜或物镜耦合进盖玻片。如果光束以大于临界角的角度入射到液体介质中，光束会全部反射回玻璃中。根据经典几何光学原理，光发生全反射，光会在玻璃界面上完全反射而不进入液体溶液中，那么，它不会对细胞进行照明。而实际上，光具有波粒二相性，由于波动效应，仍然会有一小部分能量穿透到液体介质中，这就是所谓的隐失波（evanescent wave），在“近场”情况下，光沿平行界面传播。这种“遂穿效应”可以通过绝缘介质表面的电磁场麦克斯韦方程组来解出。隐失波的光强度 I_z 在光疏介质中随界面距离 z 按（2-1）式以指数关系衰减。

$$I_z = I_0 \exp[-z/d_p] \qquad (2\text{-}1)$$

$$d_p = \lambda/4\pi n_1 \sqrt{\sin^2\theta_1 - (n_2/n_1)^2} \qquad (2\text{-}2)$$

式中 I_0 为逝波在界面的入射光强度，I_0，I_z 与 θ_1 有关。λ 是入射光的波长，d_p为透射深度，它等于界面处光强度衰减到 I_0/e 时离界面的距离，以（2-2）式表示。d_p 随λ、θ_1及 n_2/n_1 值的增加而增大。d_p一般小于200 nm，对于可见光约为100 nm。

全内反射荧光显微术正以其独特的优势成为研究细胞表面科学最有前途的光学成像技术。这一技术已被广泛用于实时观察单个肌球蛋白分子的运动 [2]、单个蛋白分子对之间的荧光共振能量转移（FRET） [3]，ATP酶的翻转 [4]，聚合物中单个分子的结构变化及等离子体膜附近的神经分泌的颗粒运动 [5] 等方面。但是TIRFM 不可能做到深度层析成像。它可以和其它的显微术，例如明场

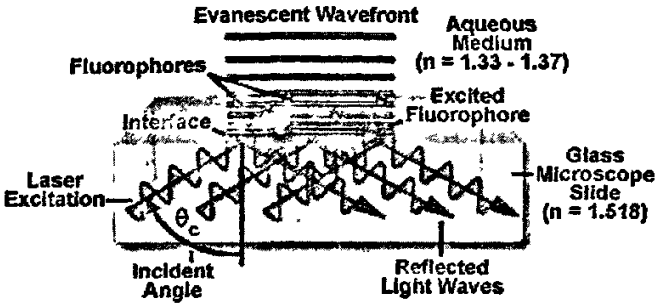


图 2-1 全内反射荧光原理

显微术、荧光显微术、共聚焦显微术、原子力显微术和荧光寿命成像显微术等结合起来，达到特殊要求的成像效果。

本文使用全内反射荧光显微镜对单个羊抗鼠 IgG（H+L）分子成像，具有非常高的灵敏度，通过单分子计数，可对 1×10^{-11} mol/L~4×10^{-10}mol/L 之间的溶液浓度进行测定，比文献中类似方法的检测减少了 2 个数量级 [6]。

2.2 实验部分

2.2.1 仪器

全内反射荧光显微镜系统（Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo， Japan)，主要包括倒置荧光显微镜（OlympusIX81)，卤素灯（Olympus LG-PS2)，倒置荧光显微镜控制单元（OlympusIX2-UCB)，multi-Ar 激光器 (Melles Griot，America)，ICCD（Image-intensified charge-coupled device，Cascade，512B, America)；精密净化交流稳压电源（中川电气科技有限公司，上海)；精密光学隔振平台（上海亿奥信息光学科技有限公司，上海)；超声清洗机（Branson200 型，中美合资必能信超有限公司，上海)。

2.2.2 材料与试剂

Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L)(Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG (H+L)，2 mg/mL，分子量，148000。)（Molecular probe，Eugene，OR，USA)；丙酮（分析纯，天津市富宇精细化工有限公司，天津)；乙醇（分析纯，天津市鑫达医药

化工试剂有限公司，天津）；NaCl（分析纯，天津市塘沽化学试剂厂，天津）；$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$（分析纯，汕头市化学试剂厂，汕头）；$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$（分析纯，西安化学试剂厂，西安）；混合纤维素酯微孔滤膜（孔径 0.22 μm，上海兴亚净化材料厂，上海），盖玻片（厚度 0.17 mm，Cole-parmer，Vernon Hills，Ill.，USA）。

PBS （pH=7.4,含 0.15 mol/L 的 NaCl，7.6×10^{-3} mol/L 的 Na_2HPO_4，2.4×10^{-3} mol/L 的 NaH_2PO_4）：称取 NaCl 1.70 g ，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.516 g ，$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.087 g 溶于水中，然后定容于 200 ml 的容量瓶中，现用现配。

除注明外，溶液均用亚沸蒸馏水配制

2.2.3 实验方法

2.2.3.1 盖玻片的洗涤方法

将盖玻片依次在 30%洗涤液中 1 h，蒸馏水中 5 min，丙酮中 15 min，蒸馏水中 5 min，1 mol/L KOH 中 15 min，乙醇中 15 min，1 mol/L KOH 中 15 min，蒸馏水中 15 min 进行超声处理，每两步间都要用蒸馏水冲洗。

2.2.3.2 全内反射检测单分子

在物镜上面滴加一滴镜油，将盖玻片放在物镜上面，使盖玻片未进行光漂白部分正对物镜中心，打开 ICCD，根据盖玻片在 ICCD 上的成像调焦。焦距调好后，移动盖玻片，使盖玻片进行光漂白部分正对物镜中心，然后往盖玻片上滴加溶液，利用溶液在 ICCD 上的成像精确调好焦距。旋动手柄，调节激光入射角度，达到全反射状态。

2.2.3.3 全反射状态的调节

在滤波片和物镜之间放一张半透明的纸，入射光和反射光在纸上形成两个光斑，分别为光斑 1 和光斑 2。当激光未达到全反射状态时，折射光和反射光的强度和等于入射光的强度。因为这时反射光的强度还比较弱，所以光斑 2 亮度也比较小（图 2-2A 图）。当达到全反射状态时，激光完全被反射回来，这时，光斑 2 亮度最强，两个光斑之间的距离最远（图 2-2B 图）。在实验中，调节激光的入

射角度，当观测到光斑 2 亮度最强时，即达到了全反射状态。

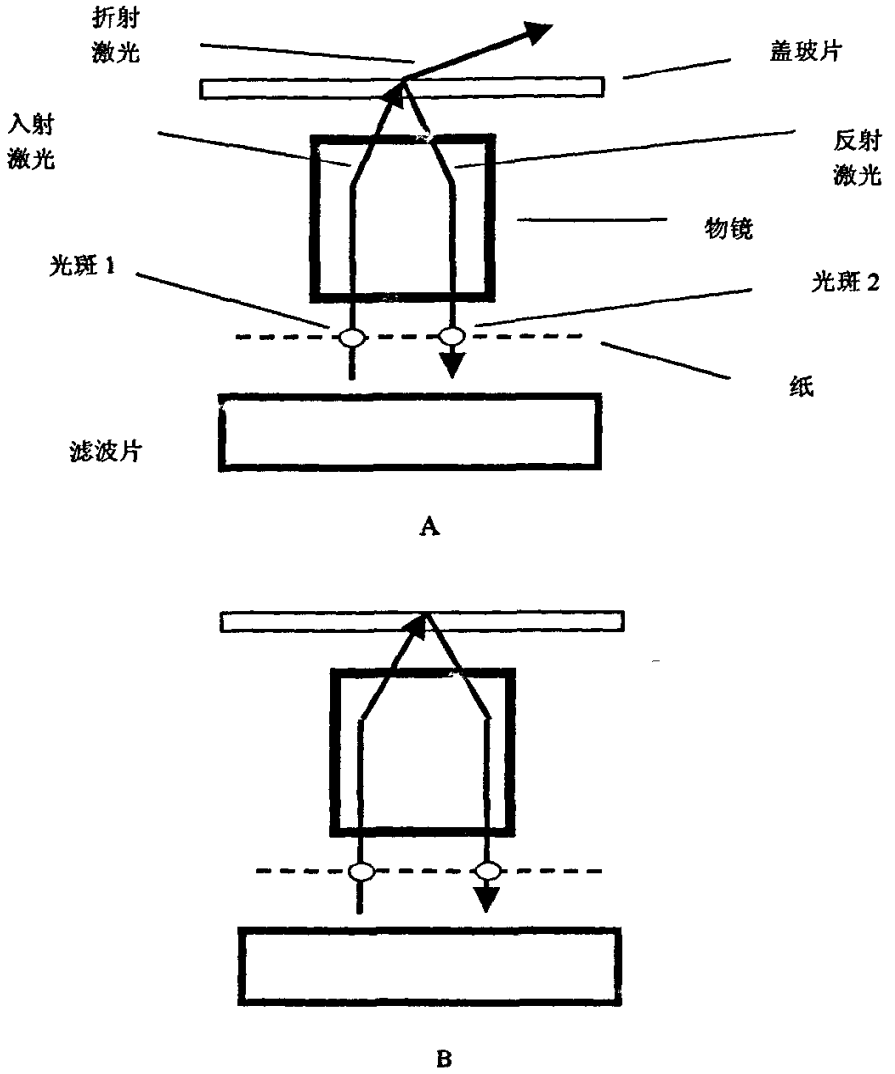


图 2-2 判断全反射状态的示意图

A 图为未达到全反射状态；B 图为全反射状态。

2.3 结果和讨论

2.3.1 背景荧光的去除

2.3.1.1 单分子信号与杂质荧光的区分方法

要检测到单个分子，就是在一定的背景之上检测到单分子的信号。检测单分子的关键，与其说是要提高单分子信号的强度，不如说是要尽可能减小背景噪声。在单分子检测中，噪声主要来自于激光的瑞利、拉曼散射，杂质荧光，光学元件荧光和检测器噪声等。

杂质荧光的主要来源是缓冲溶液和盖玻片，在激光的激发下，缓冲溶液和盖玻片除了能产生一定强度的荧光外，还会产生一些光斑。这些光斑主要是由盖玻片表面的颗粒杂质、缓冲溶液中不溶的杂质以及蛋白试剂中的杂质造成的。用不同波长的激光激发，使用不同的滤波片对盖玻片成像，证明了盖玻片的荧光光谱范围很宽。用波长为 488 nm 的激光激发，在发射波长为 510-550 nm 之间收集荧光，用落射荧光显微镜结合 ICCD 对盖玻片成像(图 2-3A)。然后保持检测区域不变，再使用波长为 543 nm 的激光激发，收集发射波长大于 580 nm 的荧光，用落射荧光显微镜结合 ICCD 对盖玻片成像(图 2-3B)。将 2 μL 的 PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，待水挥发后，缓冲溶液中的杂质沉积在盖玻片表面。杂质的沉积区域为一半径大约为 1 mm 的圆形，使用波长为 488 nm 的激光激发，在发射波长为 510-550 nm 之间收集荧光，用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 成像(图 2-3C)。然后保持检测区域不变，再使用波长为 543 nm 的激光激发，收集发射波长大于 580 nm 的荧光，用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 成像(图 2-3D)。从以上四图可以看出，对于缓冲溶液和盖玻片，使用不同波长激光激发，在不同的发射波长范围内收集荧光，均可得到它们的图像，都能检测到背景荧光。将 2 μL 浓度为 1×10^{-11} mol/L Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG (H+L)的 PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，使用波长为 488 nm 的激光激发，在发射波长为 510-550 nm 之间收集荧光，用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 成像,得到了单个蛋白分子的图像(图 2-3E)。然后保持检测区域不变，再使用波长为 543 nm 的激光激发，收集发射波长大于 580 nm 的荧光，用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 成像，没有得到蛋白分子图像(图 2-3F)。以上实验表明，大多数杂质荧光的荧光光谱范围较宽，使用不同波长的激光激发，在波长很宽的光谱范围内都能检测到杂质产生的荧光。而荧光染料分子的荧光光谱范围很窄(Alex 488 的荧光光谱见图 2-4)。它们的荧光只能在适宜的波长激光的激发下，在适宜的波长范围内检测到。这是区分单分子信号与杂质荧光的重要手段。

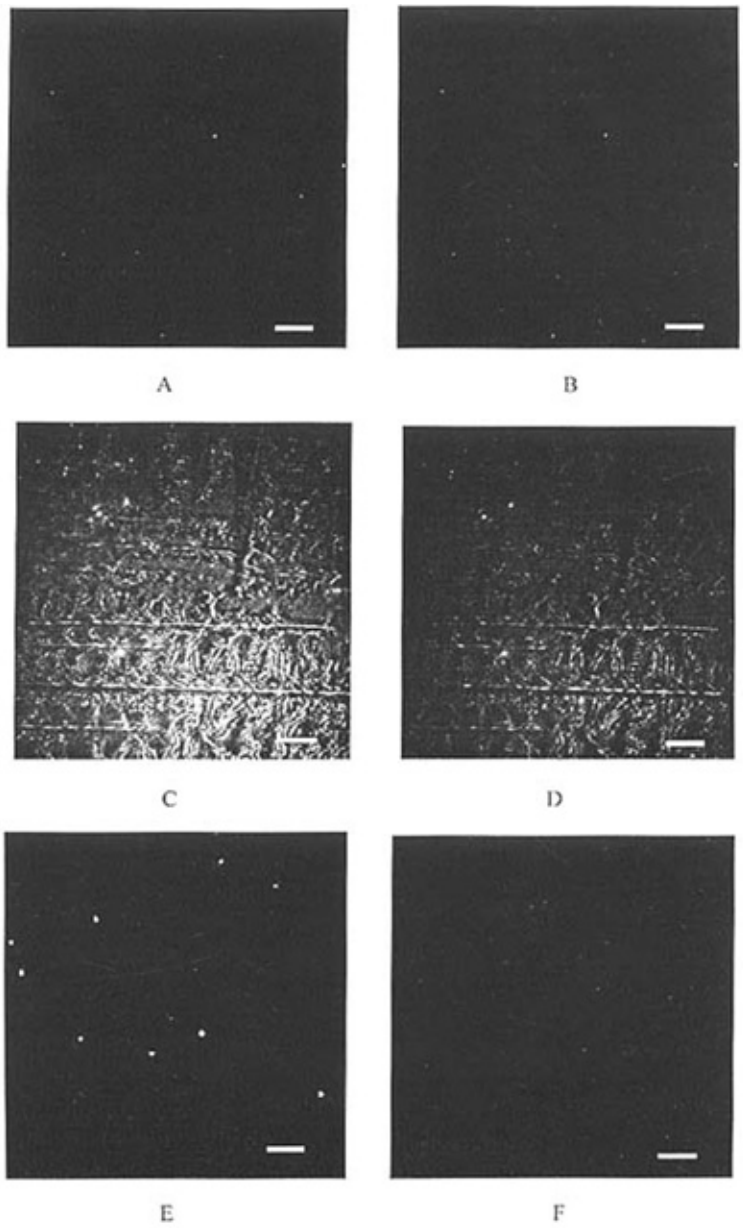


图 2-3 缓冲溶液、盖玻片和羊抗鼠 IgG (H+L)分子用不同波长激光和滤波片的成像(标尺，20 μm)

A. 盖玻片落射图像。激光波长为 488 nm，功率为 4 mW，使用 60×物镜，分光镜 505，发射滤波片 BA510-550，像素为 512×512，ICCD 曝光时间为 100 ms，阈值为 680—1050；

B. 盖玻片落射图像。激光波长为 543 nm，功率为 1 mW，分光镜 565，发射滤波片 BA580IF，

其它条件同图 2-3A；C. 2 μL 缓冲溶液挥发后全内反射图像。激光功率为 2.4 mW，其它条件同图 2-3A；D. 2 μL 缓冲溶液挥发后全内反射图像。条件同图 2-3B；E. 2 μL Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG (H+L)的 PBS 缓冲溶液全内反射图像，条件同图 2-3C；F. 2 μL Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG (H+L)的 PBS 缓冲溶液全内反射图像，条件同图 2-3D。

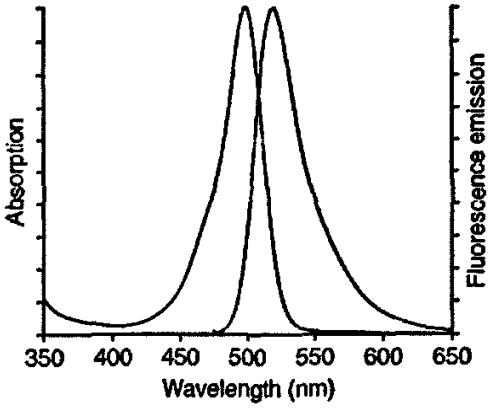
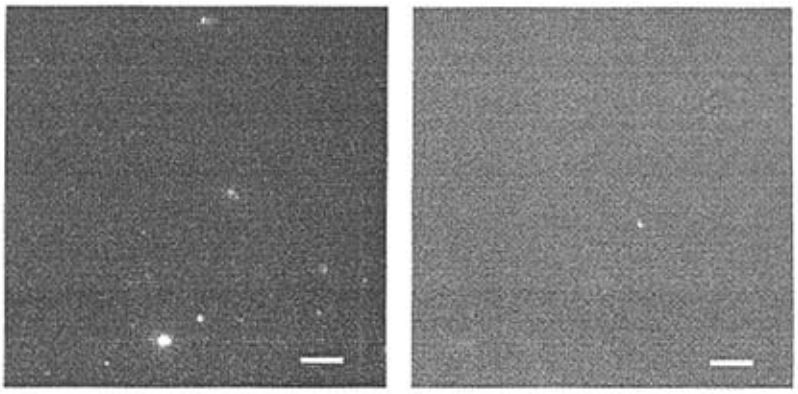


图 2-4 Alexa 488 的荧光光谱图

2.3.1.2 缓冲溶液的过滤

将 3 μL 缓冲溶液滴在盖玻片上，用波长为 488 nm 的激光激发，并使用全内反射荧光显微镜对缓冲溶液成像（图 2-5 A）。从图 2-5 A 可以看出，缓冲溶液中的杂质颗粒荧光为点状，会给单分子的成像形成干扰。为降低这些颗粒杂质产生的背景荧光，将缓冲溶液过滤。使用孔径为 0.22 μm 混合纤维素酯微孔滤膜过滤两遍，将过滤后的缓冲溶液再用以上方法成像（图 2-5B）。由图 2-5 可看出，缓冲溶液过滤后所产生的点状背景荧光明显减少。我们还对过滤前后的缓冲溶液的荧光强度进行了测量，结果见表 2-1。过滤后，缓冲溶液的平均荧光强度和最大荧光强度分别从 682、978 下降到 493、759，分别降低 12.5%和 22%。所以，对缓冲溶液进行过滤，是降低背景噪声的一个重要手段。在以后蛋白溶液的配制中，对于缓冲溶液均过滤两遍后再进行使用。



A　　B

图 2-5 缓冲溶液过滤前后图像比较。(标尺，20 μm)

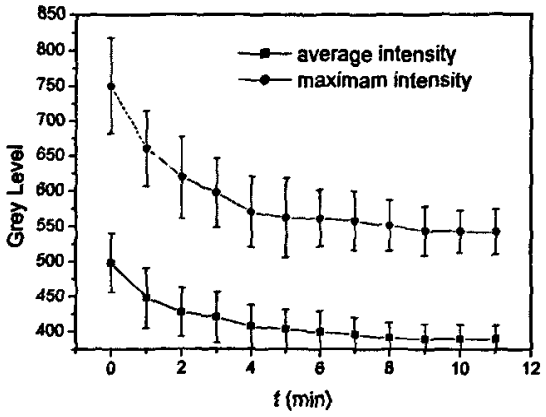
A. 过滤前缓冲溶液全内反射图像；B. 过滤后缓冲溶液全内反射图像。条件同图 2-3C。

表 2-1 缓冲溶液过滤前后荧光强度的变化表。

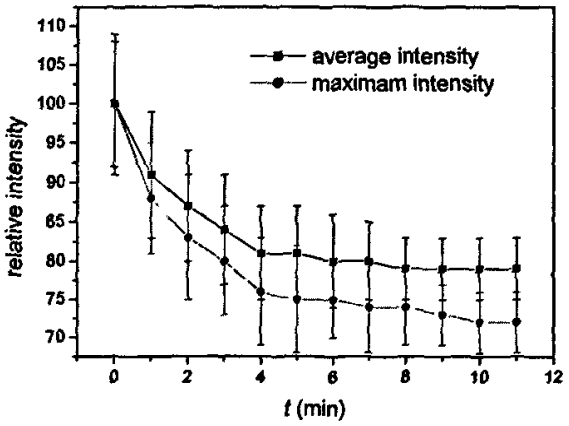
次数	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	平均
过滤前荧光强度（最大荧光强度）	636 (1055)	741 (998)	707 (923)	649 (1002)	677 (915)	682 (978)
过滤后荧光强度（最大荧光强度）	496 (731)	542 (805)	511 (780)	438 (714)	502 (766)	497 (759)

2.3.1.3 缓冲溶液的预漂白

用作激发光的强紫外光辐射，有时甚至是可见光辐射，可引起某些荧光化合物发生光化学变化而受到破坏，结果使得荧光强度的测量信号随着光照的时间而逐渐下降 [7]，这种现象叫做光漂白。预漂白是降低背景荧光的重要手段，在配制溶液前，将缓冲溶液预先用强激光照射，使其中的荧光物质发生光漂白，可大大降低溶液的背景噪声。将缓冲溶液用 4 mW 的激光照射，每隔一分钟测一次缓冲溶液的荧光强度，得到缓冲溶液的荧光强度在强激光照射下随时间的变化曲线（图 2-6）。由图 2-6 可知，缓冲溶液漂白 8 分钟后，平均荧光强度下降 21%，并随时间延长基本不再变化。漂白 10 分钟后，最大荧光强度下降 27%，并随时间延长基本不再变化。在以后的实验中，我们将缓冲溶液漂白 10 分钟后再用来配制溶液。



A



B

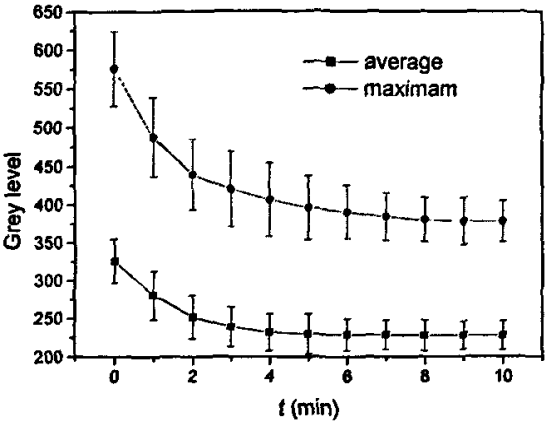
图 2-6 缓冲溶液漂白曲线。

A. 缓冲溶液荧光强度随时间的变化曲线；B. 缓冲溶液相对荧光强度随时间的变化曲线。使用 10×物镜，激光波长为 488 nm，功率为 4 mW。(n=5)

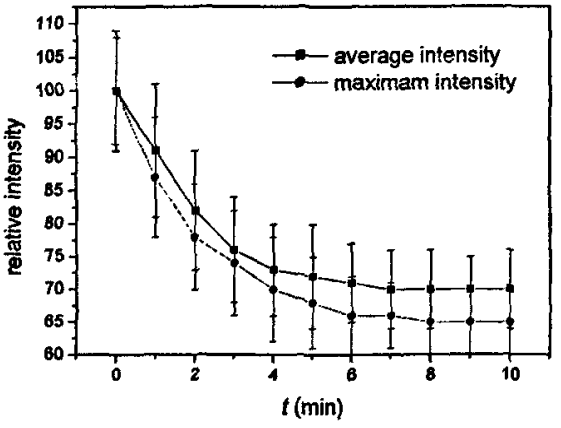
2.3.1.4 盖玻片的预漂白

在向盖玻片上滴加溶液之前，将盖玻片用强激光照射一段时间，可使盖玻片造成的背景荧光明显降低。盖玻片在 4 mW 的激光照射下，荧光强度的变化见图 2-7。从图 2-7 可以看出，漂白 7 分钟时，盖玻片的平均荧光强度下降 30%，漂

白 8 分钟时，盖玻片的最大荧光强度下降 35%。图 2-8 为盖玻片漂白前后的荧光



A



B

图 2-7 盖玻片漂白曲线。

A. 盖玻片荧光强度随时间的变化曲线；B. 盖玻片相对荧光强度随时间的变化曲线。实验条件同图 2-6。

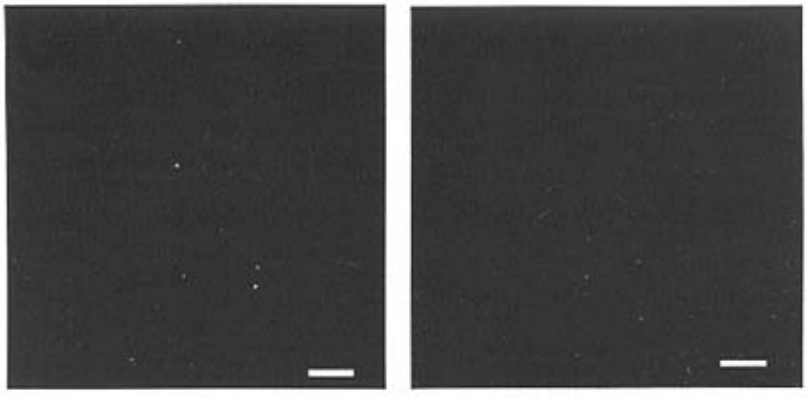


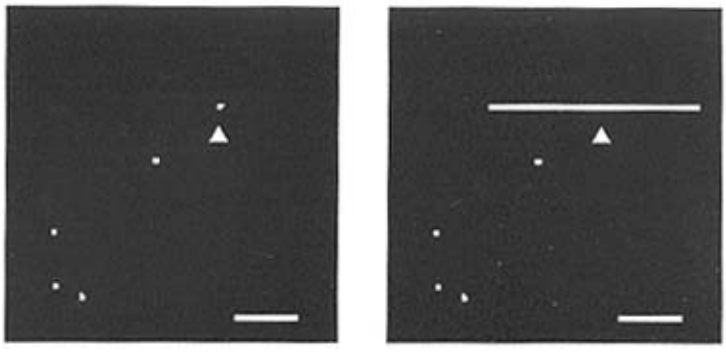
图 2-8 盖玻片漂白前后图像，实验条件同图 2-3A。(标尺，20 μm)

成像，两图的阈值范围相同，由图可看出在漂白前，盖玻片上存在荧光点，漂白 8 分钟以后，盖玻片上的荧光点全部漂白。在实验中，我们用 10×物镜将盖玻片漂白 8 分钟后，再在漂白处滴加溶液。

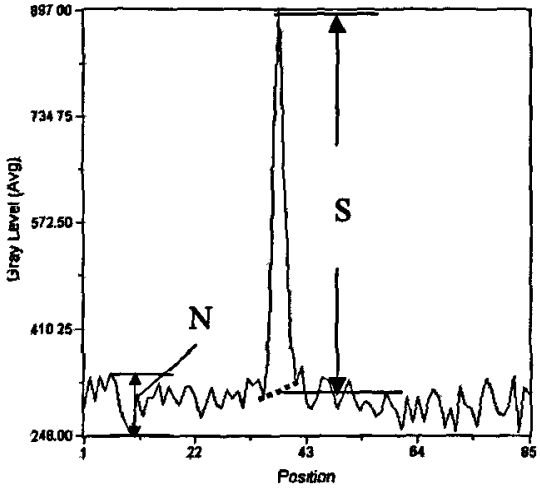
2.3.2 全内反射单分子成像

2.3.2.1 单分子检测中信噪比的计算方法

单分子检测是要在一定强度的背景之上能检测到单分子的信号，关键是提高检测灵敏度。在单分子成像中，通过选择最佳条件来获得高的信噪比。在单分子检测中，信噪比的计算方法如下：对于一个像素为 a×b 的分子，选取宽度为 a×b 个像素的长方形，延长为长度是 100 个像素的直线区域，使该分子位于直线上，并使直线上只有这一个分子。例如对于图 2-9A 中箭头所指分子，它所占的像素为 2×2，选取宽度为 2 个像素、长 100 个像素的直线区域（图 2-9B），然后用软件 MetaMorph 做出这条直线的荧光分布图（图 2-9C）。由图 2-9C 可以计算出分子的强度为 675，噪音为 90，从而求出信噪比为 7.5。用同样的方法可计算出其它分子的信噪比。



A B



C

图 2-9 单分子检测中计算信噪比的方法。(标尺，10 μm)

2.3.2.2 激光功率的选择

荧光染料分子的荧光强度随着激光功率的增大而增大，同时，随着激光功率的增大，激发光造成的瑞利散射等噪音也会变大。通过实验选择了适宜的激光功率。将 2 μL 5×10^{-15} mol/L 的羊抗鼠 IgG（H+L）溶液滴在盖玻片上，待溶剂挥发后，蛋白分子吸附在盖玻片表面，然后再在滴加蛋白溶液处滴加 2 μL 二次蒸馏水，溶解掉缓冲溶液中结晶出的无机盐，使用不同功率的激光激发，用全内反射对吸附在盖玻片表面的单个羊抗鼠 IgG（H+L）分子成像，并测量了 5 个羊抗鼠 IgG（H+L）分子的荧光强度。单个羊抗鼠 IgG（H+L）分子的荧光强度随激光功率的变化曲线见图 2-10，由图 2-10 可以看出，当激光功率较小时，随着激

光功率的增大，单个分子的平均荧光强度增长幅度较大，当激光功率大于 60%时，随着激光功率的增大，单个分子的平均荧光强度变化不大。激光功率从 60%增大到 100%时，单个分子的平均荧光强度从 545 增大到 587，只增加了 7.7%。在以后的单分子检测中，我们选择 60%的激光功率，即 2.4 kW ，这样既可以使分子有较大的荧光强度，而且信噪比也比较大。

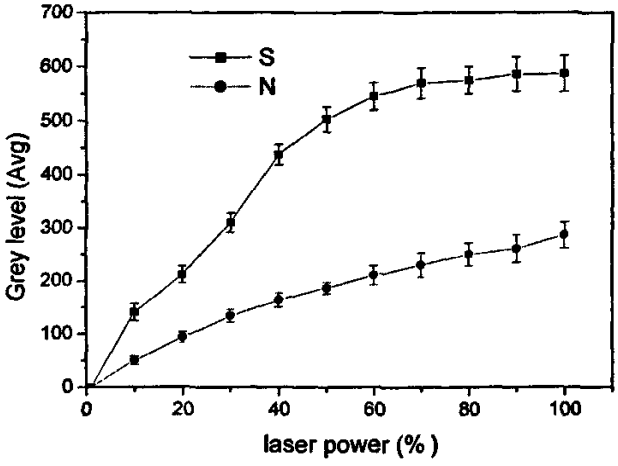


图 2-10 羊抗鼠 IgG（H+L）分子的荧光强度和噪音随激光功率的变化曲线图。激光功率为 0.04 至 4 kW，其它实验条件同图 2-3E。（n=5）

2.3.2.3 曝光时间的选择

将 2 μL 浓度为 5×10^{-15} mol/L 的羊抗鼠 IgG 的 PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，待溶剂挥发后，蛋白分子吸附在盖玻片表面，然后再在滴加蛋白溶液处滴加 2 μL 二次蒸馏水，溶解掉缓冲溶液中结晶出的无机盐，用全内反射对吸附在盖玻片表面的单个羊抗鼠 IgG 分子成像。曝光时间选择 10 至 800 ms。所得图像见图 2-11。再求出每祯照片的分子的荧光强度和信噪比。重复 5 次以上实验，做出分子荧光强度,噪音以及信噪比随曝光时间的变化曲线（图 2-12）。由图 2-12 可以看出，随着曝光时间的延长，蛋白分子的荧光强度越来越大，但噪音也越来越大。由图 2-11 可以看出，曝光时间为 10 ms 时，只检测到了 3 个分子，信号较弱的分子还没有被检测到，所以为了能得到单分子的荧光信号，应选择长的曝光时间，但随着曝光时间的延长，信噪比基本是越来越小。所以为了能使单分子信号同背景噪

音区分开，提高检测的灵敏度，应选择信噪比最大时的 50 ms。曝光时间为 50 ms 时，随着曝光时间的延长，检测到的分子数目 5 个不再增加。但是在曝光时间 50 ms 时，荧光点较暗，而曝光时间 100 ms 时，既有较大的信噪比，又有较强的荧光分子的信号，因此在以后的实验中，为了保证所有的分子都能被检测到，并且有较高的灵敏度，单分子成像的曝光时间均选择为 100 ms。

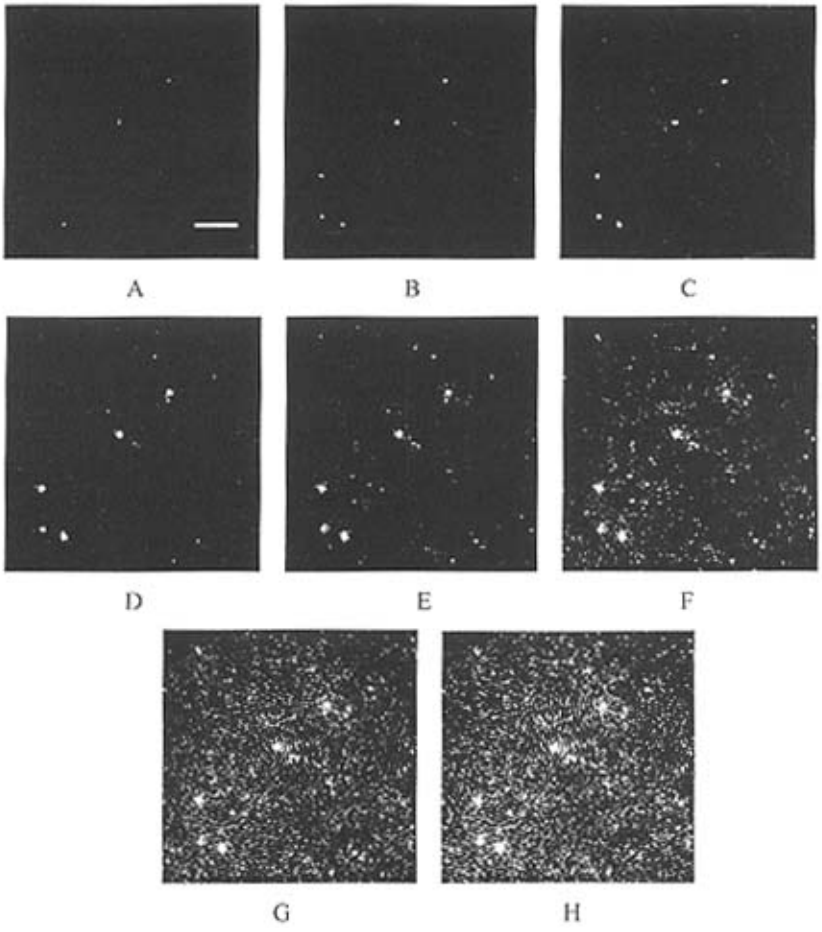
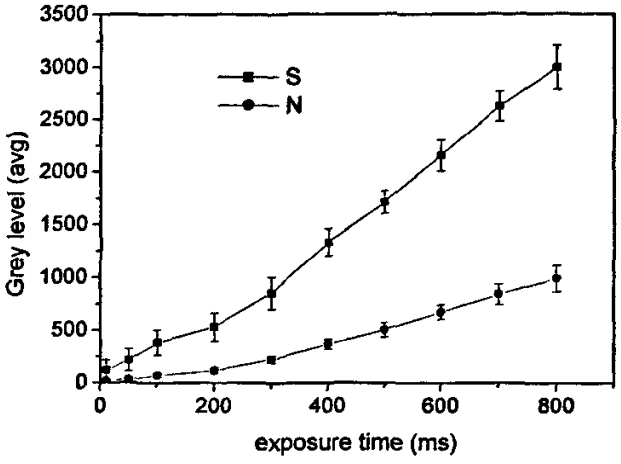
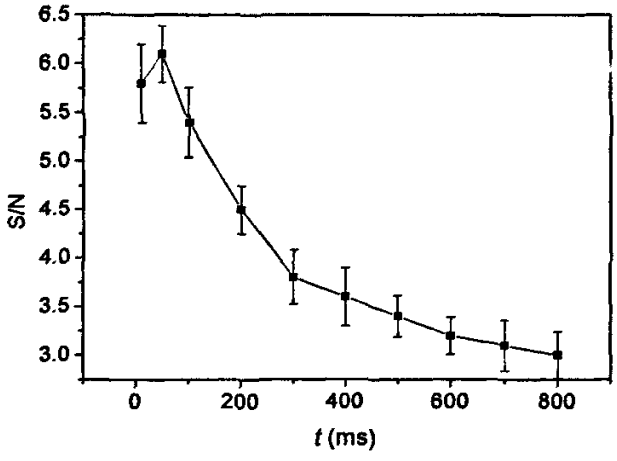


图 2-11　Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG(H+L)分子在不同曝光时间条件下的图像。

曝光时间（ms），A，10；B，50；C，100；D，200；E，300；F，400；G，600；H，800；像素为 150×150，其它条件同图 2-3E。(标尺，10 μm)



A



B

图 2-12 A. 荧光强度随曝光时间的变化图；B. 信噪比随曝光时间的变化图。

（n=5）

2.3.2.4 单分子成像

对于单分子成像，选择的最佳条件是使用全内反射荧光显微镜，60×物镜，激光波长为 488nm，功率为 2.4 kW，分光镜 505，发射滤波片 BA510-550，像

素为 150×150，ICCD 曝光时间为 100 ms。在此条件下，将 2 μL 的 PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，对缓冲溶液成像（图 2-13A），缓冲溶液和盖玻片的背景荧光非常低。图 2-13B 是在最佳条件下，1×10^{-10} mol/L 的溶液中单个羊抗鼠 IgG 分子成像。从单分子图像中可以看出，每个单分子的亮度并不是相同的。对 139 个分子的荧光强度进行统计，得到单分子荧光强度分布图（图 2-14）。

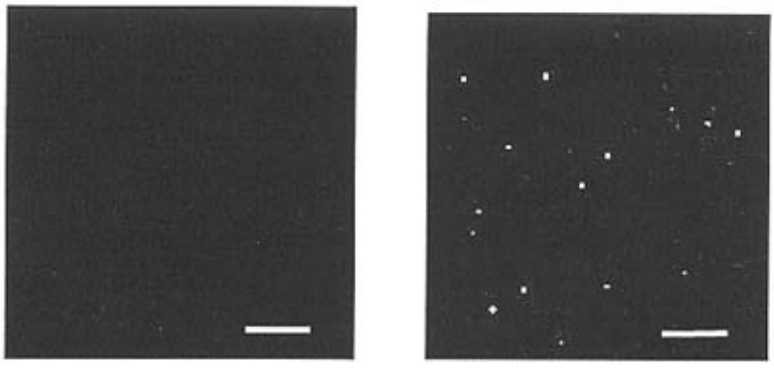


图 2-13 A. 缓冲溶液全内反射图像；B.单个羊抗鼠 IgG（H+L）分子的全内反射图像。像素为 150×150，其它实验条件同图 2-3E。(标尺，10 μm)

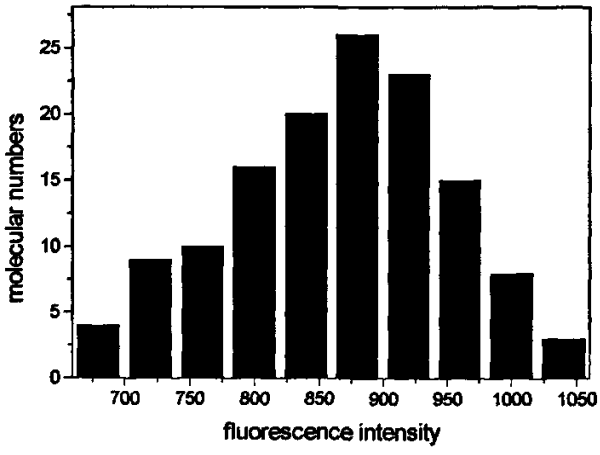
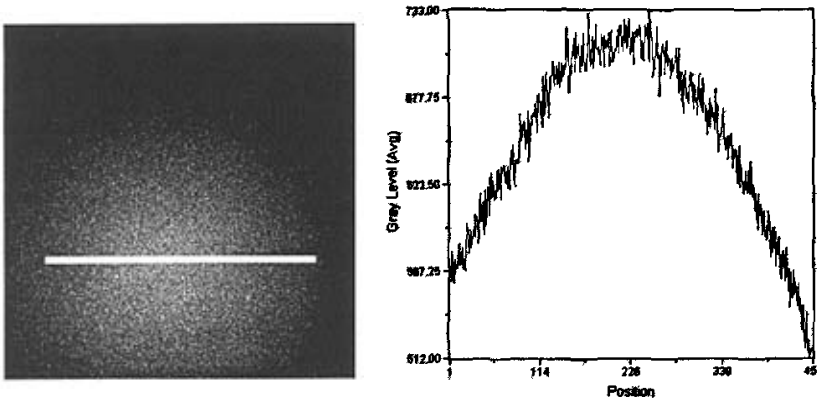


图 2-14 单分子荧光强度分布图。

从图 2-14 中可以看出，分子的荧光强度分布较宽，荧光强度从 680 到 1040。造成分子之间荧光强度不同的原因主要有以下几个：1、所用蛋白分子上标记的荧

光染料分子数目是不同的，每个蛋白分子上标记了 2-8 个荧光染料分子，平均每个蛋白分子上有 6 个荧光染料分子。2、激光强度是不均匀的，造成不同位置的激发光强度不同，不同位置的分子的荧光强度也不相同。图 2-15A 是 PBS 缓冲溶液的图像，从图中可以看出，荧光强度从中心向四周逐渐变弱。B 图是直线上的荧光分布图，由此图也能看出荧光强度分布是不均匀的。



A　　B

图 2-15 A. PBS 缓冲溶液的图像；　B. A 图中直线上的荧光分布图。

实验条件同图 2-13。

2.3.2.5 单分子的证明

首先证明了图像中的亮点是要观测的蛋白分子而不是背景荧光。证明方法见本篇论文 2.3.1.1 部分，即荧光染料分子只有在 488 nm 波长的激光激发下，用适宜的滤波片成像，而背景荧光不仅在 488 nm 波长的激光激发下，用适宜的滤波片成像，还可在 543 nm 波长的激光激发下，使用其它的滤波片均成像。然后再用两种方法可证明图像中的亮点为单个 IgG （H+L）分子，而非多个分子聚合体。第一种方法，用泊松方程（2-3 式）计算出两个以上分子同时出现在检测体积中的的几率非常小 [8]。

$$P(r,\lambda)=\frac{\lambda^{r}e^{-\lambda}}{r!} \qquad (2\text{-}3)$$

式中 P(r, λ)为在给定的范围内检测到 r 个分子的几率，λ 为理论上在给定范围内分子的平均数目。根据实验结果统计，单个分子占据最大的像素为 6，证明在 6×6 像素中最多只有一个分子。使用台微尺定标，测出 60×物镜时，每个像素

尺寸大约为 0.33 μm，则计算出每个像素的面积为 0.11 μm^2，全内反射隐失场的渗透深度大约为 100 nm [9]，每个像素面积上的检测体积为 1.1×10^{-17} L。使用浓度为 1×10^{-10}mol/L 的溶液时，在 6×6 像素中平均含有分子的个数为 $1.1\times10^{-17}\times6\times6\times1\times10^{-10}\times6.02\times10^{23}$=0.025 个。在 6×6 像素中同时存在 2 个分子的几率为 0.000，在此浓度下，绝大多数像素中没有分子。根据泊松方程计算出在不同浓度下，多个分子重合的几率。结果列于表 2—2。从表 2—2 可看出，在检测所使用的浓度（1×10^{-11} mol/L—4×10^{-10}mol/L）下，两个分子重合的几率非常小，几乎为 0，可保证在此浓度下，检测到的一个光点为单个羊抗鼠 IgG（H+L）分子。浓度继续增大，2 个分析同时出现在检测体积中的几率变大，不能再保证每个亮点为单个分子。

表 2—2 不同浓度溶液中，检测体积中同时出现不同分子数目的几率。

浓度（10^{-11} mol/L）	检测体积中含 0 个分子的几率	检测体积中含 1 个分子的几率	检测体积中含 2 个分子的几率	检测体积中含 3 个分子的几率
1	0.995	0.002	0.000	0.000
10	0.975	0.024	0.000	0.000
100	0.778	0.195	0.022	0.002

第二种方法，检测到的单个亮点的数目与溶液浓度成正比，进一步说明每个亮点为一个分子 [6]。检测结果见本论文 2.3.3 部分。

2.3.3 全内反射单分子计数检测溶液浓度

因为在一定浓度范围内，用全内反射检测到的单分子的数目与溶液浓度成正比，我们可以用这种方法检测溶液浓度。将 3 μL 浓度为 1×10^{-11} mol/L 的 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，用全内反射荧光显微镜对溶液中的羊抗鼠 IgG （H+L）单分子成像，任意选择 10 个位置照相（图 2-16），使用软件 MetaMorph 对每张照片的单分子数目进行统计，然后计算出平均值为 6 个。这个数值就是在这个浓度下，在选取的检测区域中所检测到的单分子的平均数目。在相同的条件下，用同样的方法分别对浓度为 1×10^{-10}

mol/L，2×10^{-10}mol/L 以及 4×10^{-10}mol/L 的 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液成像，通过每个浓度的溶液任取十个位置照像（图 2-17）。

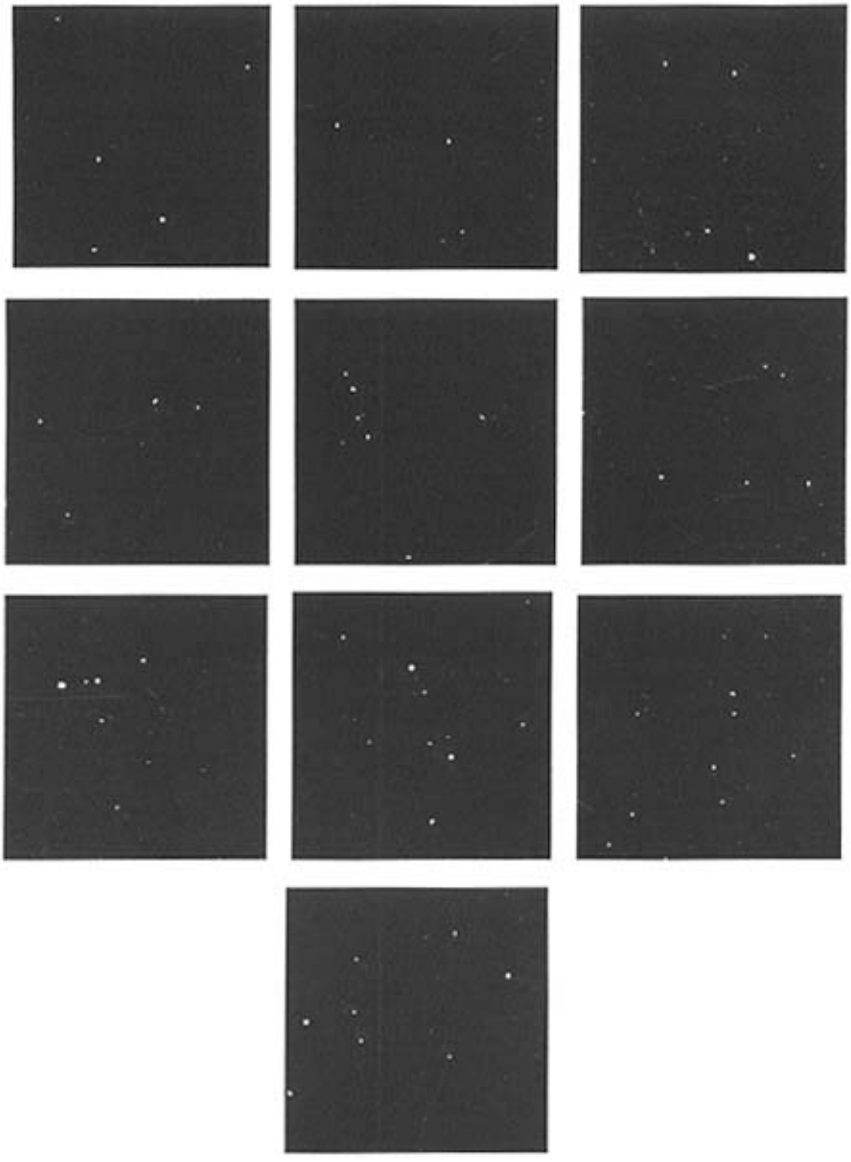
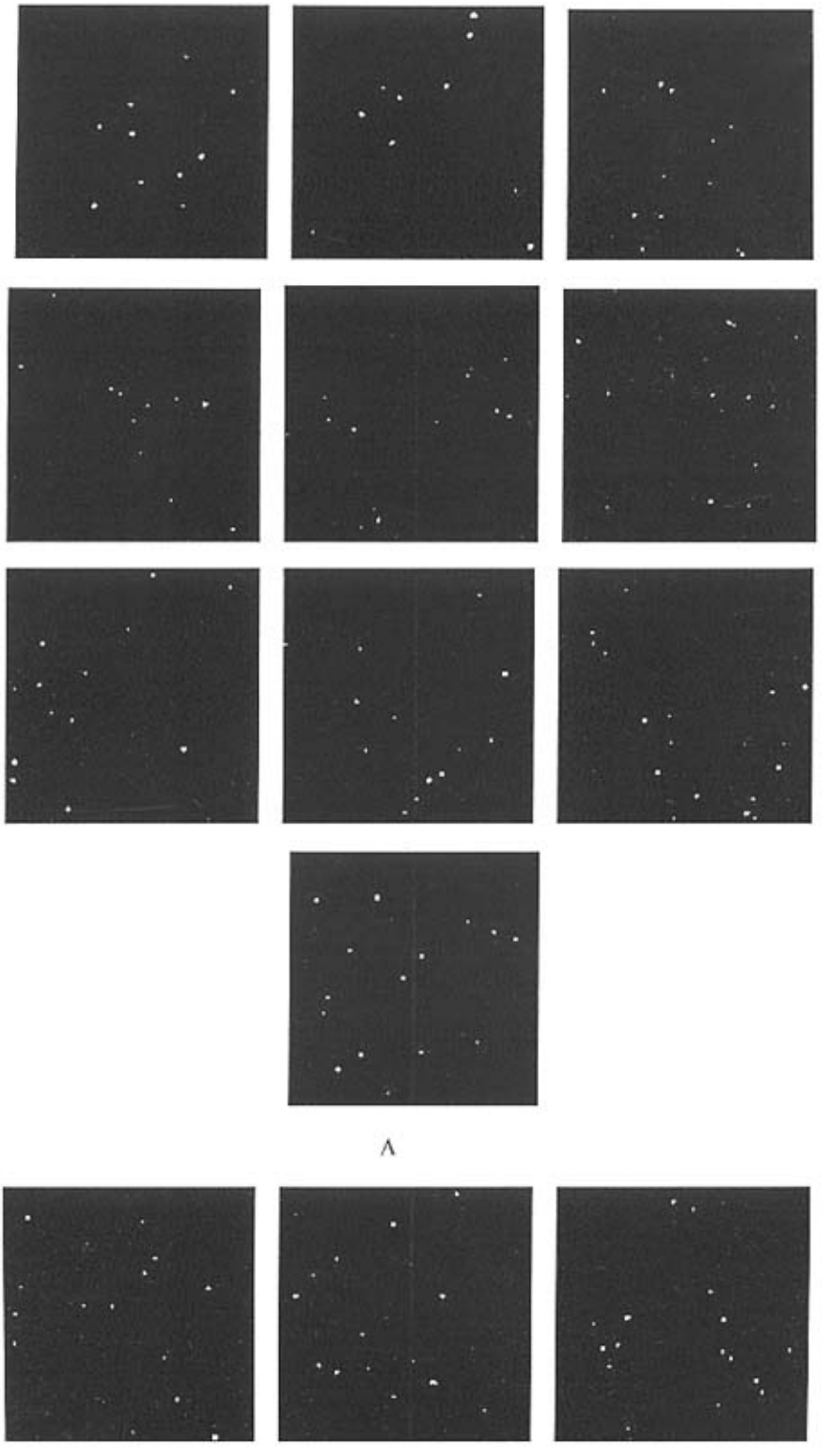
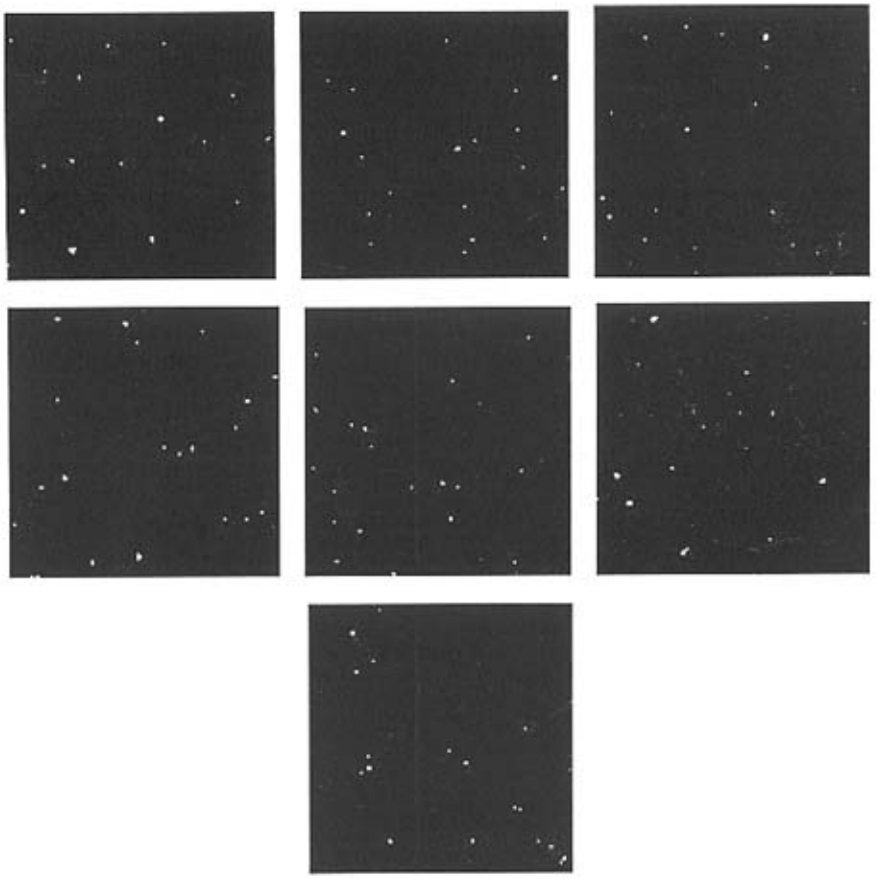


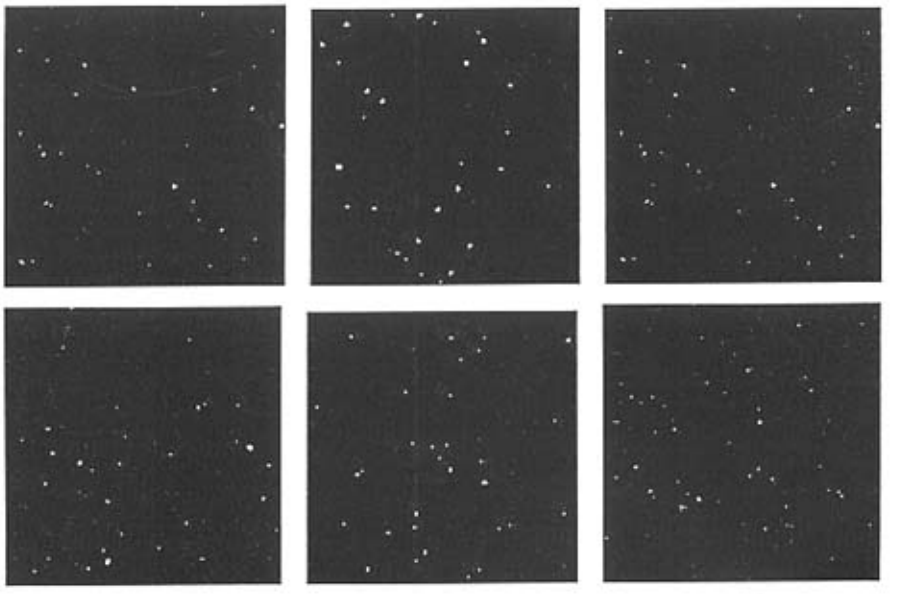
图 2-16 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的分子图像。

浓度为 1×10^{-11}mol/L。实验条件同图 2-13。（n=10）





B



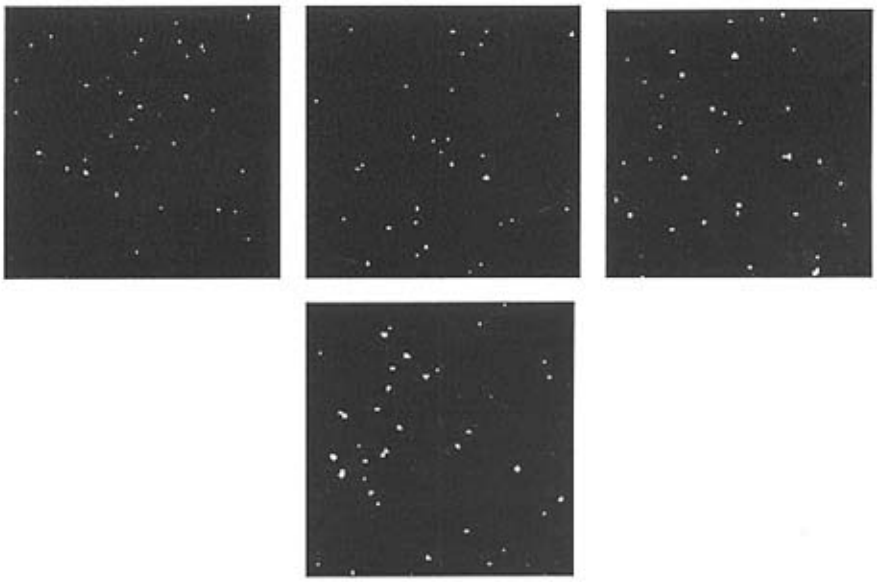


图 2-17 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的分子图像。

浓度($\times 10^{-10}$ mol/L),A,1.0; B,2.0; C,4.0。其它实验条件同图 2-13。(n=10)

对于每个浓度的溶液，均计算出每张照片所含的分子数目。在选取的检测区域中所检测到的单分子的平均数目分别为 12 个、16 个和 32 个。每个浓度下测得的分子数目，相对标准偏差以及理论相对标准偏差列于表 2-3。从不同浓度的溶液获取的图像的单分子平均数目与溶液浓度有良好的线性关系（图 2-18）。线性范围为 1×10^{-11} mol/L~4×10^{-10}mol/L。相关系数为 0.995。

表 2-3 单分子计数的相对标准偏差和理论相对标准偏差的比较

浓度（mol/L）	测量值	平均值	相对标准偏差	理论相对标准偏差 *
1×10^{-11}	4, 3, 4, 5, 6, 5, 7, 7, 6, 8	6	27%	13%
1×10^{-10}	9, 10, 12, 11, 12, 13, 15, 13, 12, 14	12	14%	9.1%
2×10^{-10}	16, 14, 17, 17,19, 18, 18, 13, 20, 13	16.	14%	7.8%
4×10^{-10}	31, 27, 30, 28, 29,36, 33, 32, 34, 35	32	9.3%	5.6%

* 根据文献 [10] 算出。

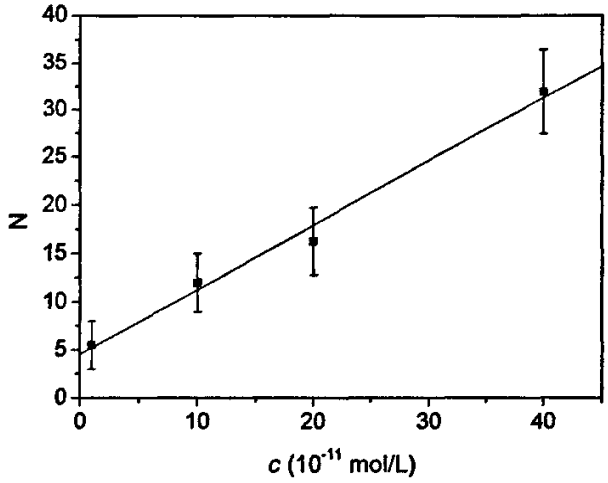


图 2-18 羊抗鼠 IgG（H+L）溶液的标准曲线图

2.4 结论

通过小心地去除缓冲溶液、盖玻片等造成的荧光背景，采用全内反射的隐失场激发，减小激发体积，可对 Alexa 488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的缓冲溶液中的单分子成像。在一定浓度范围内，检测到的单分子的数目与溶液浓度有良好的线性关系，这不但可作为单分子证明的依据，还可作为一种检测溶液浓度的方法。

2.5 参考文献

[1] 王琛，王桂英，徐至展．全内反射荧光显微术．*物理学进展*．**2002, 22, 406-415.**

[2] Kitamura, K., Tokunaga, M., Yanagida, T. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5-3nanometres. *Nature.* **1999, 397, 129-134.**

[3] Harada, Y., Funatsu, T., Murakami, K., Nonoyama, Y., Yanagida,T. Single molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time. *Biophys. J.* **1999, 76, 709-715.**

[4] Amann, K. J. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microsocopy. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA,* **2001, 98, 15009-15013.**

[5] Steyer, J. A., Horstmann, H., Almers, W. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature*. 1997, 388, 474-478.

[6] Fang, X., Tan, W. Imaging single fluorscent molecules at the interface of an optical fiber probe by evanescent wave excitation. *Anal. Chem.*, 1999, 71, 3101-3105.

[7] 陈国珍，*荧光分析法*，科学出版社，1990，p98.

[8] Lee, Y. Maus, R., Smith, B., Winefordner, J. Laser induced fluorescence detection of a single molecule in a capillary. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 4142-4149.

[9] 王琛，王桂英，徐至展，*物理学进展*，2002，22，406-414。

[10] Chen, D., Dovichi, J. Single-molecule detection in capillary electrophoresis:molecular shot noise as a fundamental limit to chemical analysis. *Anal. Chem.* 1996, 68, 690-696.

第三章 无标准溶液作参比的绝对单分子计数定量分析法

3.1 引言

因为溶液浓度表示的是单位体积内分子数目的多少，所以通过对单位体积溶液中分子数目的计数，可直接检测溶液的浓度。但是因为荧光显微镜的检测体积较小，很难将一定体积溶液中分子全都检测到。迄今为止，单分子计数都是将溶质分子标记上荧光染料分子，然后对检测体积内的分子进行计数，检测到的分子越多，溶液浓度也越大。对于单分子的计数，大多是在毛细管中进行的，单分子计数方法达到分析灵敏度的极限。被检测分子在毛细管中通过检测区域时，利用激光共聚焦扫描显微镜和 APD 对分子进行检测，对一段时间内通过检测区域的分子进行统计，分子的数目与溶液浓度是成正比的。做出分子数目与溶液浓度的标准曲线，从而对溶液浓度进行检测。Anazawa 等 [1] 通过毛细管电泳结合 CCD 成像检测了 β-肌动蛋白 DNA 溶液。Fister 等 [2] 利用芯片和激光扫描共聚焦显微镜检测罗丹明 6G 的溶液，Chen 和 Dovichi [3] 用激光诱导荧光结合毛细管电泳检测了藻红蛋白溶液。Loscher 等 [4] 和 Schultz 等 [5] 分别利用免疫反应将蛋白分子固定，然后对吸附在盖玻片表面的单个蛋白分子检测并计数。Li 等人 [6，7] 利用双波长激发，双通道检测，直接对溶液中的 DNA 分子进行计数。以上方法都是对一定体积溶液中所检测到的一部分分子进行计数，通过测出分子数目与溶液浓度的标准曲线，对溶液浓度进行测定。Hanley 等 [8] 建立了一种新的测定方法，他们检测范围在将溶液制成薄膜，然后利用落射荧光显微镜对薄膜上的分子成像并计数。根据溶剂的表面张力、基底退出的速率等可计算出膜的厚度，再根据膜的厚度和膜上单分子的密度计算出溶液浓度。检测范围在 2.0×10^{-11} 到 4.0×10^{-10} mol/L 之间。本文提出了另一种无标准溶液作参比的绝对单分子计数法测定溶液中分子的浓度，这种方法的原理示意于图 3-1。先将盖玻片硅烷化，在盖玻片表面形成环氧基团（图 3-1B），把小池粘在盖玻片上（图 3-1C），将抗体溶液滴加在小池内（图 3-1D），水挥发后，溶液中的蛋白分子与环氧基团共价结合，全都固定在盖玻片表面，无机盐也在盖玻片表面结晶出来（图 3-1E），在检测之前向检测区域滴加蒸馏水，溶液掉盖玻片表面的无机盐，降低了背景荧光（图 3-1F）。这样就能够检测出到检测面积内所有的蛋白分子。然后根据检测面

积和溶液横截面积的比值，就可计算出一定体积溶液内所含有的分子数目，直接计算出溶液的浓度。这种方法直接对溶液中的分子计数，更加简便。检测的灵敏度比较高，检测范围浓度更低（5×10^{-15} mol/L~6×10^{-14} mol/L）。

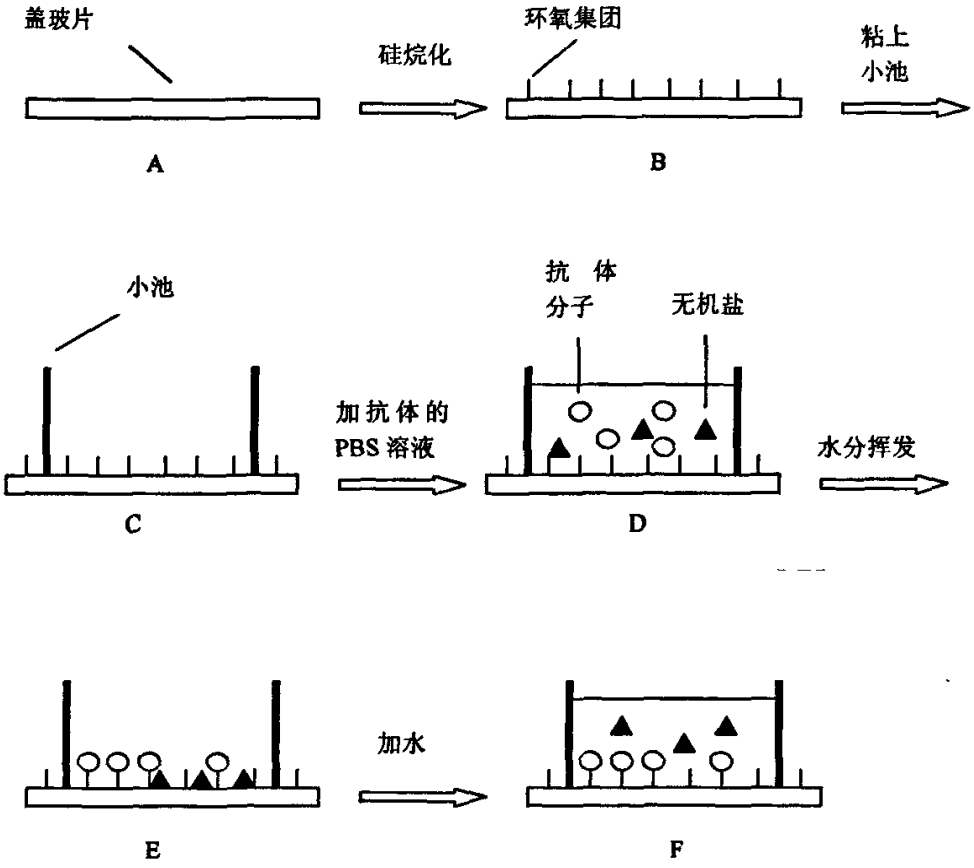


图 3-1 检测固定在盖玻片表面的羊抗鼠 IgG（H+L）分子的流程示意图

3.2 实验部分

3.2.1 仪器

激光共聚焦检测系统(Olympus Optical Co. Ltd，Tokyo，Japan)，主要包括 multi-Ar 激光器(Melles Griot，America)，卤素灯（Olympus LG-PS2），倒置荧光显微镜（OlympusIX81），倒置荧光显微镜控制单元（OlympusIX2-UCB）；数显电热恒温干燥箱（上海阳光实验仪器有限公司，上海）。

其它仪器同 2.2.1。

3.2.2 材料与试剂

环氧树脂胶（JC-311 型，江西省宜春市化工二厂，宜春）；甲苯（分析纯，天津市富宇精细化工有限公司，天津）；3-环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷（3-glycidoxypropyltrimethoxysilane）(Sigma-Aldrich, Louis，MO，USA)。其它材料与试剂同 2.2.2。

3.2.3 实验方法

3.2.3.1 小池的制作

打开环氧树脂胶的 A、B 两管，取出同等体积胶的混合均匀。将 Eppendorf 枪头(1)的上半部分切下一个内径约 1 mm、高 5 mm 的圆环（2），切口要齐，绕(2)的底部均匀的涂上一层混合好的粘胶剂，将其粘到盖玻片（3）上，如图 3-2 所示，室温下固化 24 小时。

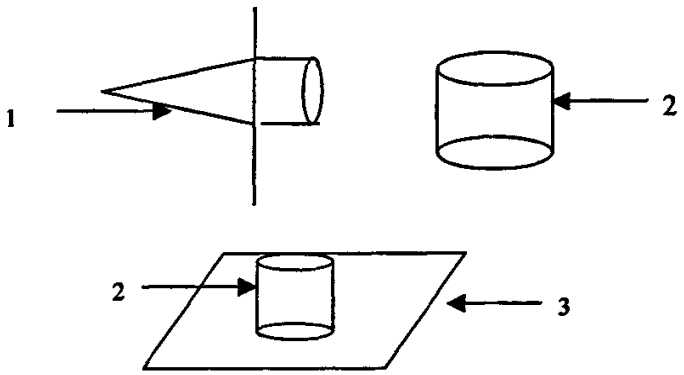


图 3-2 小池的制作

1 Eppendorf 枪头；2 切下的圆环部分；3 盖玻片

3.2.3.2 盖玻片的硅烷化

将盖玻片放在 10%（v/v）环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷的甲苯溶液中孵育 24 小时，然后在烘箱中 110℃下烘焙 3-4 个小时。

3.2.3.3 对固定在盖玻片表面的单个蛋白分子成像

取 2 μL Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液，注入小池中，调好焦距和全反射状态，然后静置 30 min 左右，待溶剂挥发后，向小池中加入 2 μL 蒸馏水，立即使用 ICCD 对蛋白分子成像。移动载物台至另外一个位置，再立即对这个位置的蛋白分子成像。

3.3 结果和讨论

3.3.1 无机盐背景荧光的产生及消除

对一定体积溶液中的分子进行统计，然后计算溶液浓度，关键是要提高检测效率，即要把这一定体积溶液中所有蛋白分子产生的信号全都检测到。因为全内反射荧光显微镜只能检测到离界面大约 100 nm 以内的物质 [9]，所以要想将溶液中的蛋白分子全部检测到，必须将溶液中的蛋白分子全部沉积在盖玻片表面，这可通过将水全部挥发的方法来实现。将 2 μL 浓度为 5×10^{-15} mol/L 的 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，得到一直径大约为 2 mm，厚度为 0.5 mm 液滴，静置 30 min 左右，待水挥发后，溶液中的蛋白分子全都沉积在盖玻片表面，再使用波长为 488 nm 的激光激发，用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 对吸附在盖玻片表面的蛋白分子成像（图 3-3）。由图 3-3 可看出，水挥发后，会造成背景荧光的增大，背景荧光的图像主要是呈现

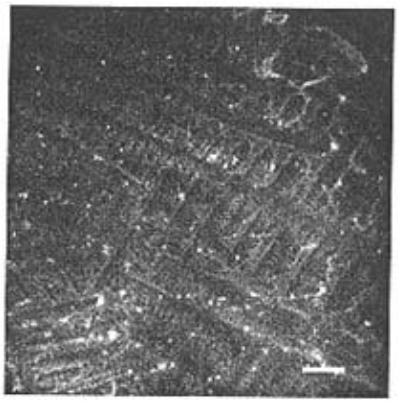
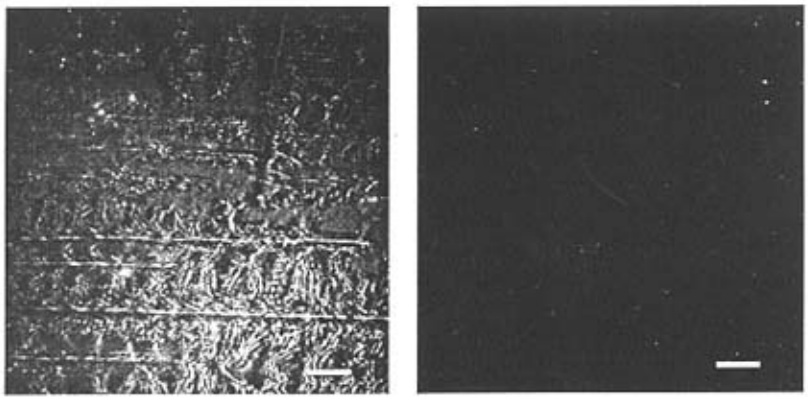


图 3-3 沉积在盖玻片上羊抗鼠 IgG（H+L）的单分子图像。

激光波长为 488 nm，功率为 2.4 mW，使用 60×物镜，分光镜 505，发射滤波片 BA510-550，像素为 512×512，ICCD 曝光时间为 100 ms。（标尺，20 μm）

有规则的形状，所以推测这主要来由水挥发后结晶出的无机盐造成的。另外，还

有一些亮度比较大的光斑，这可能是因为溶液表面吸附的灰尘杂质在水挥发后也会沉积在盖玻片表面。这些背景荧光对单分子的检测造成极大的干扰。为消除这些因素造成的荧光背景，拟采用以下方法：将溶液滴加在盖玻片上，待水挥发后，在检测蛋白分子之前，先在盖玻片的检测区域滴加 2 μL 蒸馏水，溶解掉盖玻片表面的无机盐，并使可能沉积下来的灰尘杂质重新浮起。为检验这种方法的可靠性，进行以下实验：将 2 μL PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，静置 30 min 左右，待水挥发后，缓冲溶液中的无机盐结晶析出，使用波长为 488 nm 的激光激发，用 ICCD 对吸附在盖玻片表面的物质成像(图 3-4A)。然后再在滴加溶液处滴加 2 μL 蒸馏水，再用 ICCD 对吸附在盖玻片表面的物质成像（图 3-4B）。由以上两图的比较可以看出，加水后，无机盐的图像消失，荧光背景明显降低。对加水前后的荧光强度进行了测量，加水前平均荧光强度和最大荧光强度分别为 752 和 2487，而加水后平均荧光强度和最大荧光强度分别为 544 和 794，所以，当水在盖玻片挥发后，在检测之前加水，将杂质溶解或解吸，是去除杂质荧光的一个很有力的手段。



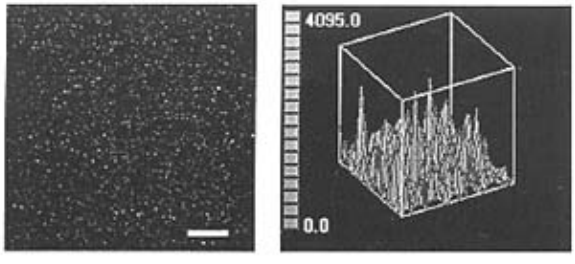
A　　B

图 3-4 加 PBS 到盖玻片上，水挥发后的全内反射图像。

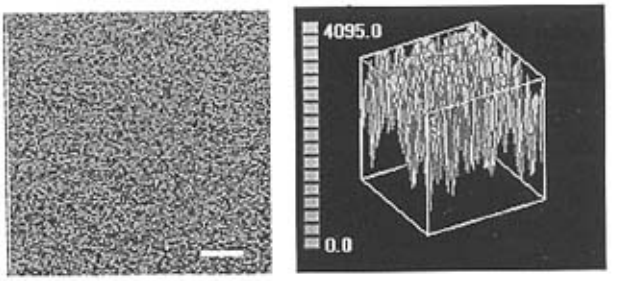
A.水挥发后，直接对吸附在盖玻片表面的物质全内反射成像；B.摄取 A 图像后在同一位置加蒸馏水后的全内反射图像。实验条件同图 3-3。（标尺，20 μm）

将蛋白溶液滴加在盖玻片表面，水挥发后，在检测之前加水，将杂质溶解或解吸，也有可能会使吸附在盖玻片表面的蛋白分子解吸。为了证明蛋白分子是否还会全部吸附在盖玻片表面，用激光共聚焦扫描显微镜进行以下实验。将 2 μL

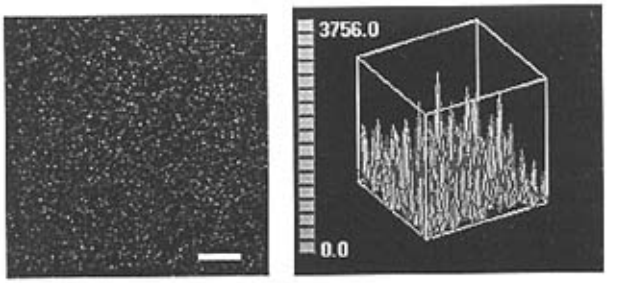
PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，立即对溶液中盖玻片以上 100 μm 部分进行扫描。利用软件 Fluoview (Olympus Optical Co. Ltd，Tokyo，Japan)对图像进行分析，得出平均荧光强度为 317（图 3-5A）。将 2 μL 浓度为 1×10^{-10} mol/L 的 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液滴在盖玻片上，立即对溶液中盖玻片以上 100 μm 部分进行扫描，利用软件 Fluoview 对图像进行分析，得出平均荧光强度为 3107（图 3-5B）。静置 30 min 左右，待水挥发后，再在滴加溶液处滴加 2 μL 蒸馏水，然后立即对溶液中相同位置进行扫描，并每隔 1 分钟扫描一次，共扫描 3 次。荧光强度分别为 498、1126 和 1610（图 3-5C-E）。荧光强度依次增加，说明加水后，蛋白分子不断进入溶液中。为将蛋白分子紧密固定在盖玻片表面，采用将盖玻片硅烷化的方法，盖玻片使用环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷处理后，在玻片表面生成环氧基团，室温下，环氧基团可和蛋白分子中的氨基反应，从而将蛋白分子共价结合在盖玻片上 [9]。将 2 μL 浓度为 1×10^{-10} mol/L 的 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液滴在硅烷化的盖玻片上，立即对溶液中盖玻片以上 100 μm 部分进行扫描，得出溶液的平均荧光强度为 3362（图 3-5F）。静置 30 min 左右，待水挥发后，再在滴加溶液处滴加 2 μL 蒸馏水，然后立即在同样位置进行扫描，并每隔 1 分钟扫描一次，共扫描 3 次。溶液的平均荧光强度分别为 331,343 和 312（图 3-5G-I）。溶液的荧光强度基本不变，且与不存在抗体分子的缓冲溶液的荧光强度相差不大。说明将玻片硅烷化以后，可将蛋白分子牢固地结合在盖玻片上。再向盖玻片上滴加蒸馏水，蛋白分子不会进入水中，因此荧光强度较小。



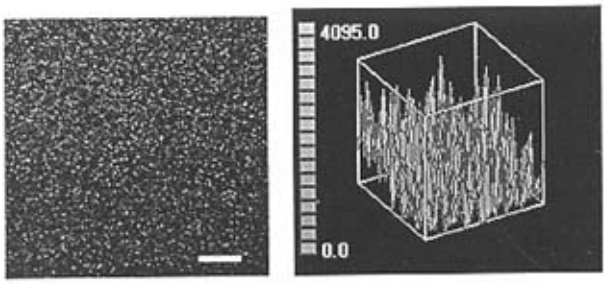
A



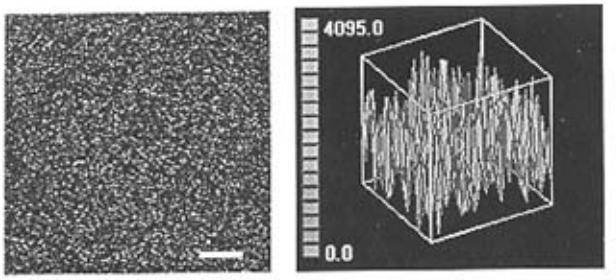
B



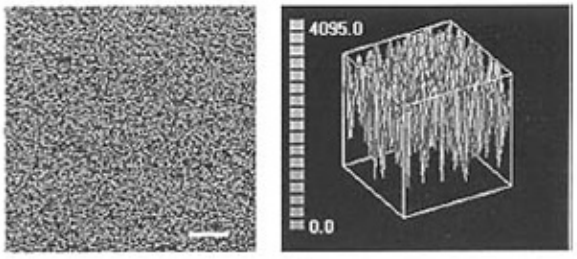
C



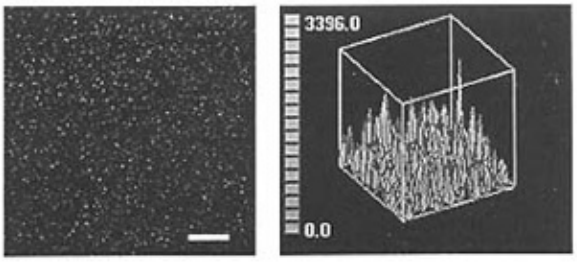
D



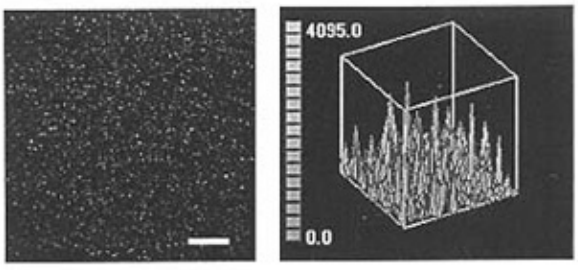
E



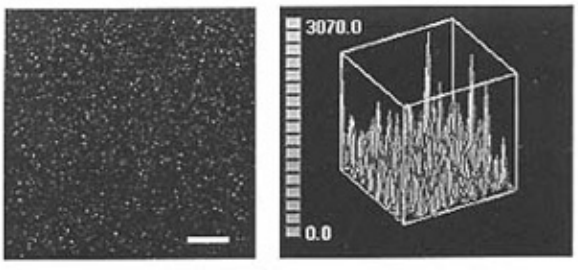
F



G



H



I

图 3-5 缓冲溶液及羊抗鼠 IgG（H+L）溶液的共聚焦图像以及它们的荧光分析图像。

A.缓冲溶液；B. 羊抗鼠 IgG（H+L）溶液；C.D.E.在未硅烷化盖玻片上水蒸干后再加水后三次扫描；F. 羊抗鼠 IgG（H+L）溶液；G.H.I. 在硅烷化盖玻片上水蒸干后再加水后三次扫描。物镜，40×；激光波长，488 nm；功率，2.4 mW；电压，740；增益，2.5，针孔直径，80 μm。（标尺，20 μm）

将 Alex a488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）溶液滴在硅烷化的盖玻片上，水挥发后，向盖玻片上加水，溶解掉结晶在盖玻片表面的无机盐，分别对加水前后固定在盖玻片表面的羊抗鼠 IgG（H+L）单分子成像并进行了对比，进一步验证这种方法的可靠性。将 2 μL 浓度为 5×10^{-15} mol/L Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液滴在硅烷化的盖玻片上，静置 30 min 左右，待水挥发后，溶液中的蛋白分子全都沉积在盖玻片表面，再使用波长为 488 nm 的激光激发，用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 对吸附在盖玻片表面的蛋白分子成像（图 3-6A）。由图 3-6A 可以看出背景荧光较大。保持检测位置不变，用波长为 543 nm 的激光激发，得到图像（图 3-6B），由图 3-6B 可以看出条纹状的荧光为背景。然后在检测位置滴加蒸馏水，溶解掉结晶在盖玻片表面的无机盐后，再分别使用波长为 488 nm 和 543 nm 的激光激发，用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 对吸附在盖玻片表面的蛋白分子成像（图 3-6C 和 D）。由图 3-6C 和 D 可以看出，在蛋白分子沉积处滴加蒸馏水后，无机盐造成的条纹状图像消失，这样就可非常有效地去除背景荧光。在以后的实验中，将 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）溶液滴在硅烷化后的盖玻片上，溶剂挥发后再在滴加溶液处滴加蒸馏水，蛋白分子不会进入溶液，可以对固定在盖玻片表面的蛋白分子进行检测。

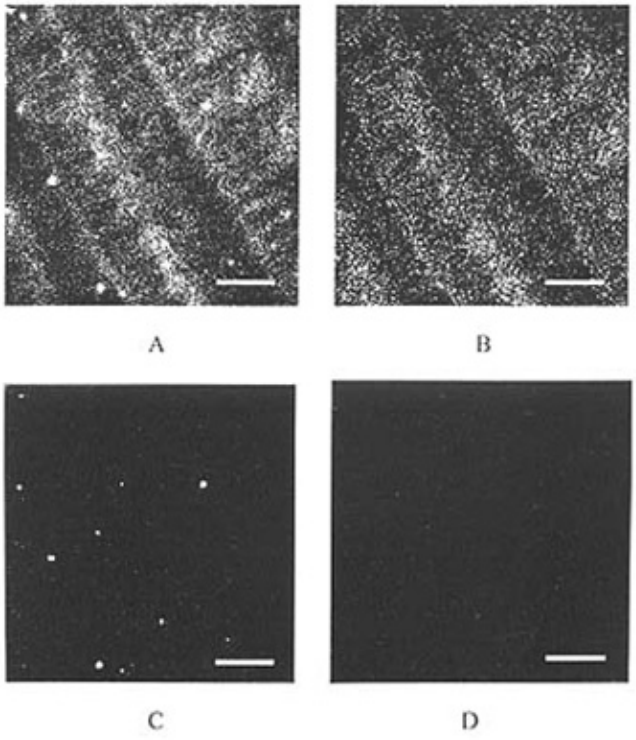
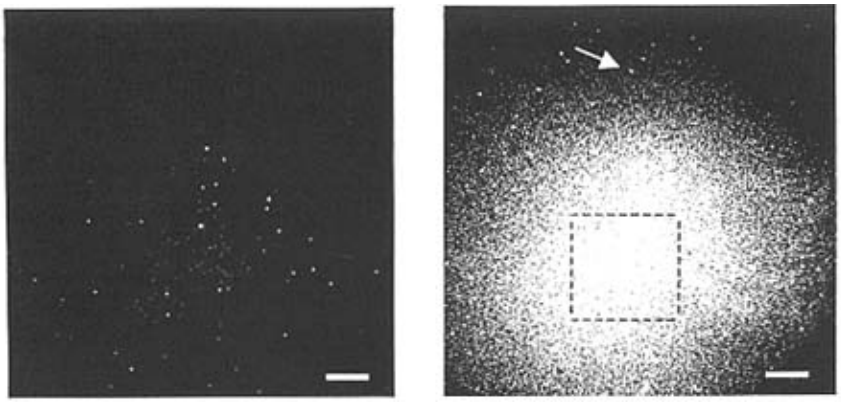


图 3-6 水挥发后吸附在硅烷化盖玻片上羊抗鼠 IgG（H+L）的全内反射图像。

A，B.水挥发后直接对羊抗鼠 IgG（H+L）分子成像；C，D. 摄取 A，B 图像后在同一位置加蒸馏水后的全内反射图像。像素为 150×150，A，C 其它条件同图 3-3；B，D.激光波长为 543 nm，功率为 1 mW，分光镜 565，发射滤波片 BA580IF。（标尺，10 μm）

3.3.2 像素大小的选择

因为激光的激发是不均匀的，在 512×512 像素范围内，不同位置荧光强度相差很大，从照片的中心向四周逐渐变弱（图 2-14 所示）。图 3-7 中的 A 图和 B 图是同一张吸附在硅烷化盖玻片上 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的全内反射图像，它们所选的阈值范围不同。在图 3-7 B 中画一条通过箭头所指分子的竖直的直线，用软件 MetaMorph 做出这条直线的荧光分布图（图 3-8），由图 3-8 可以看出，箭头所指分子处于激光激发较弱的区域，它的荧光强度还要小于中心背景荧光的强度。要使中心位置的蛋白分子与背景区分开来时，必须选取较大的阈值范围，但这样因为四周的激光强度较弱，蛋白分子的荧光强度较小，就不能成像（图 3-7 A 所示）。当选取较小的阈值范围使四周荧光强度较弱的蛋白分子能够成像时，中心位置的蛋白分子不能和背景区分开来（图 3-7 B 所示）。造成这种现象的原因就是激光激发不均匀，四周的蛋白分子的荧光强度要小于中心背景荧光的强度。因此，在对分子进行计数时，图像必须选取一定数目的像素，在所选取的一定面积的图像上，激光的不均匀程度较小，这样在一定的阈值范围内，可使照片上不同位置的分子全都被检测到。我们在选择像素时，使激光激发的不均匀程度小于 5%。如图 3-8 所示，中心位置背景荧光的平均值为 651，要使激光激发的不均匀程度小于 5%，照片边缘位置背景荧光的平均值要大于 612，背景荧光的平均值大于 612 的位置对应着从第 158 个像素到第 336 个像素，长度为 178 个像素。所以选择图 3-7B 中方框内 150×150 个像素可以确保激光激发的不均匀程度小于 5%。在以后的单分子图像中，以灰度值最大处为中心，选择像素 150×150。



A　　B

图 3-7 固定在盖玻片表面的羊抗鼠 IgG（H+L）单分子图像。

浓度为 2×10^{-14} mol/L，像素为 512×512，其它条件同图 3-6C。阈值范围，A，808-842，B，483-699。（标尺，20 μm）

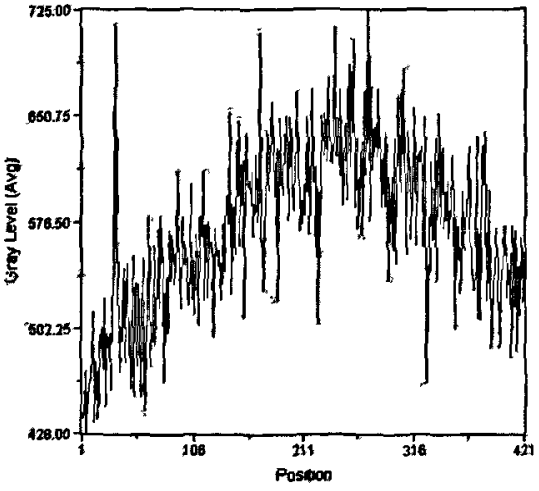


图 3-8 荧光分布图。

所选区域为图 3-7 B 中通过箭头所指分子的竖直的直线。

3.3.3 单分子计数

首先利用泊松方程对单分子进行了证明。对于固定在盖玻片表面的羊抗鼠 IgG（H+L）溶液，根据泊松方程计算出在不同浓度下，多个分子重合的几率。结果列于表 3－1。从表 3－1 可看出，在检测所使用的浓度（5×10^{-15} mol/L－6

$\times 10^{-14}$mol/L）下，两个分子重合的几率非常小，几乎为 0，可保证在此浓度下，检测到的一个光点为单个羊抗鼠 IgG（H+L）分子。

表 3－1 不同浓度溶液中，检测体积中同时出现不同分子数目的几率。

浓度（10^{-15} mol/L）	检测体积中含 0 个分子的几率	检测体积中含 1 个分子的几率	检测体积中含 2 个分子的几率	检测体积中含 3 个分子的几率
1	0.998	0.002	0.000	0.000
10	0.980	0.020	0.000	0.000
100	0.818	0.161	0.020	0.001

取 2 μL 浓度为 5×10^{-15} mol/L Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）的 PBS 缓冲溶液，注入小池中，蛋白分子中的氨基与硅烷化的盖玻片表面的环氧基共价结合，使羊抗鼠 IgG（H+L）分子固定在盖玻片表面，静置 30 min，待水挥发后，然后再向小池中加 2 μL 蒸馏水，溶解掉结晶在盖玻片表面的无机盐，立即使用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 对吸附在盖玻片表面的蛋白分子成像。然后移动载物台至下一个位置，再对这个位置的蛋白分子成像。对于这个浓度的溶液，任意换取 10 个位置，得到十张蛋白分子的照片（图 3-9）。使用 MetaMorph 软件，统计每张照片上单分子的数目，求出它们的平均值为 5。所以对于浓度为 5×10^{-15} mol/L 的溶液，在 150×150 像素的检测面积上，平均含有 5 个蛋白分子。下面再计算出理论上检测面积内所含有的蛋白分子的数目。2 μL 浓度为 5×10^{-15} mol/L 的蛋白溶液中含有的蛋白分子数目为 $2\times10^{-6}\times5\times10^{-15}\times6.02\times10^{23}=6.0\times10^{3}$ 个。小池的半径为 1 mm，截面积为 $\pi r^2=3.14\times10^6$ μm^2。每个像素的面积为 0.11 μm^2，像素取 150×150 时，检测面积为 2.47×10^3 μm^2。理论上检测面积内所含有的蛋白分子的数目为 $6.0\times10^3\times(2.47\times10^3/3.14\times10^6)=4.7$ 个。实验结果和计算的理论结果基本吻合，相对误差为 6.4%。使用同样的方法测定了浓度分别为 2，3，5，6×10^{-14} mol/L 的 Alexa488 标记的羊抗鼠 IgG（H+L）溶液，所得照片见图 3-10。在 150×150 像素的检测面积上的分子数，理论上单分子的数目，标准偏差，理论相对标准偏差以及相对误差列于表 3-2 中。

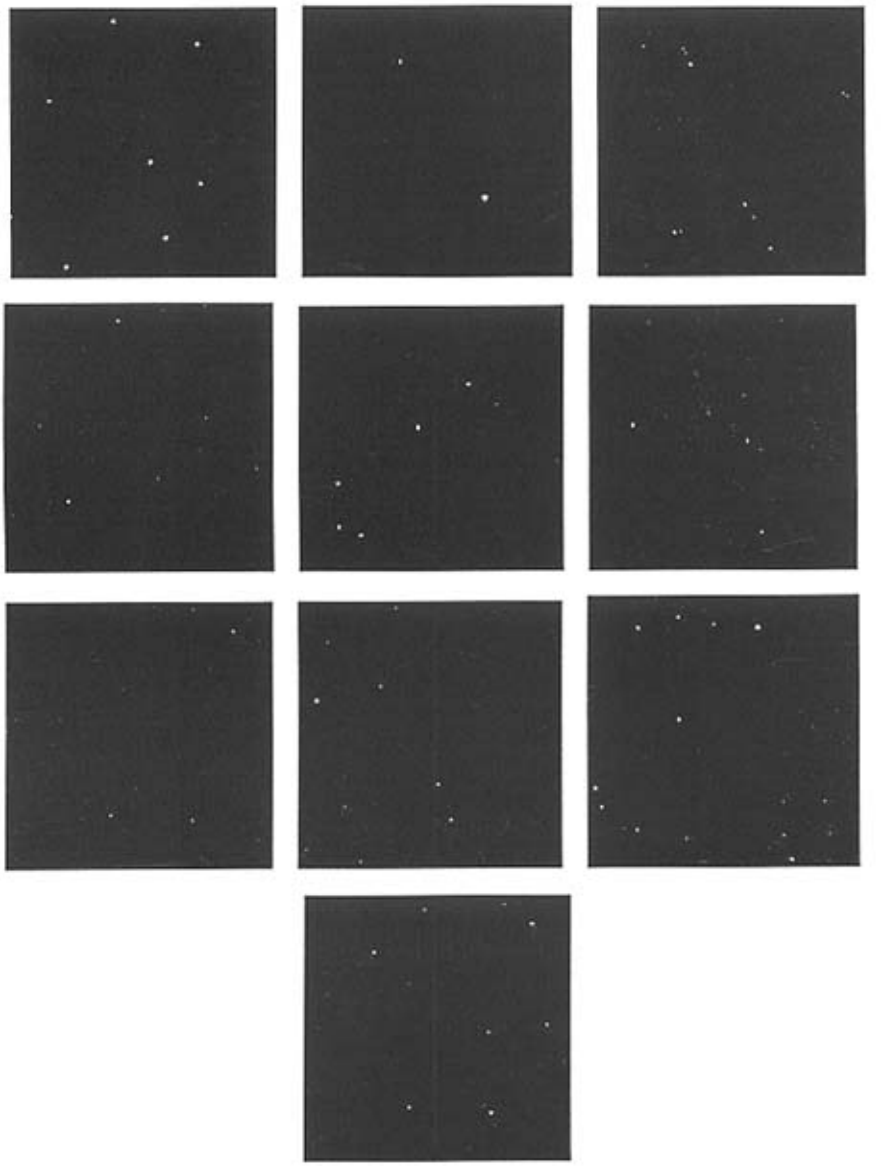
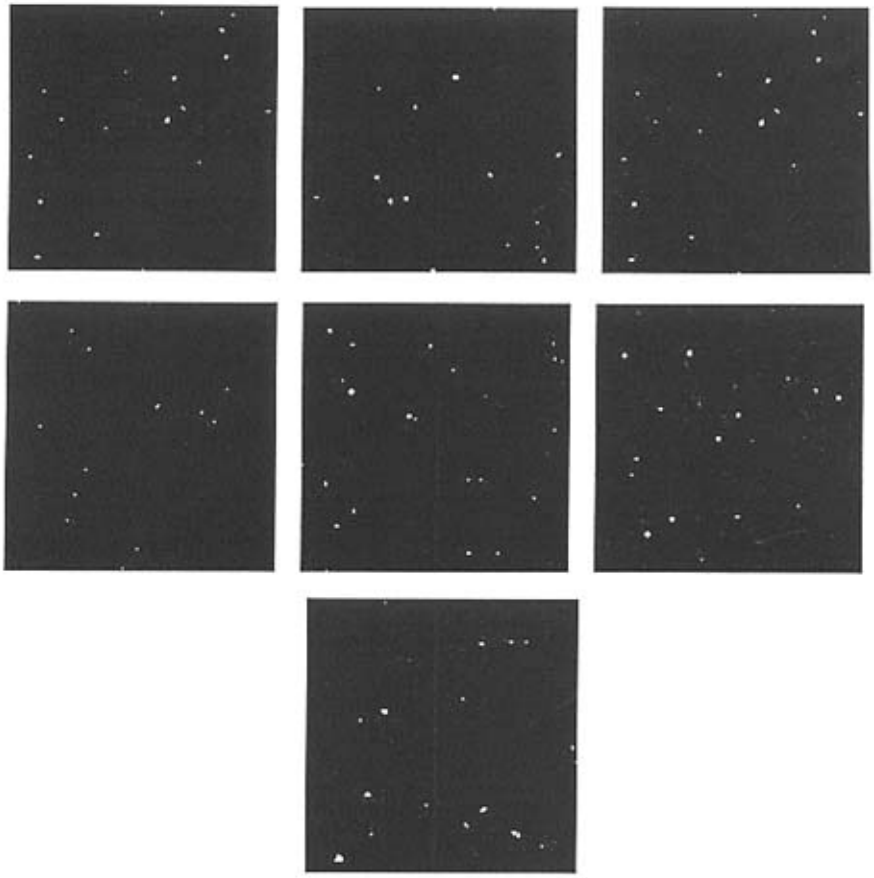
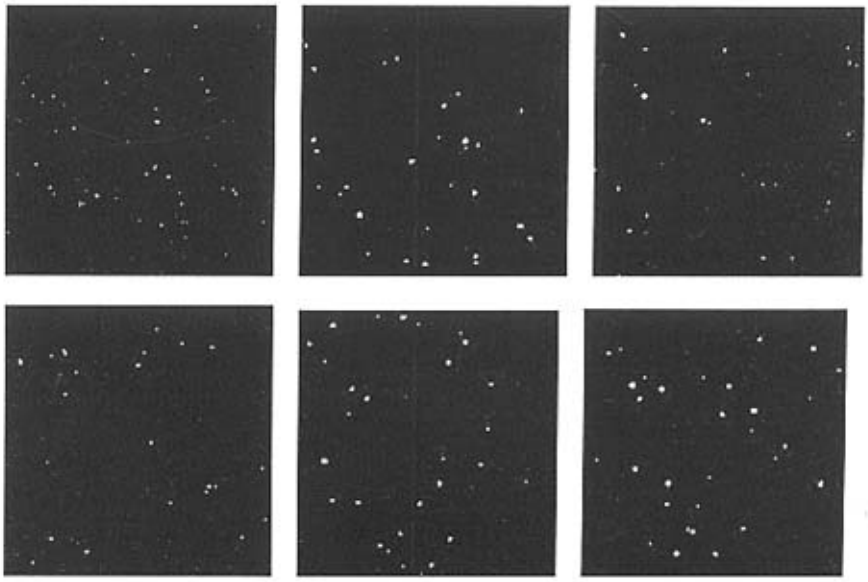


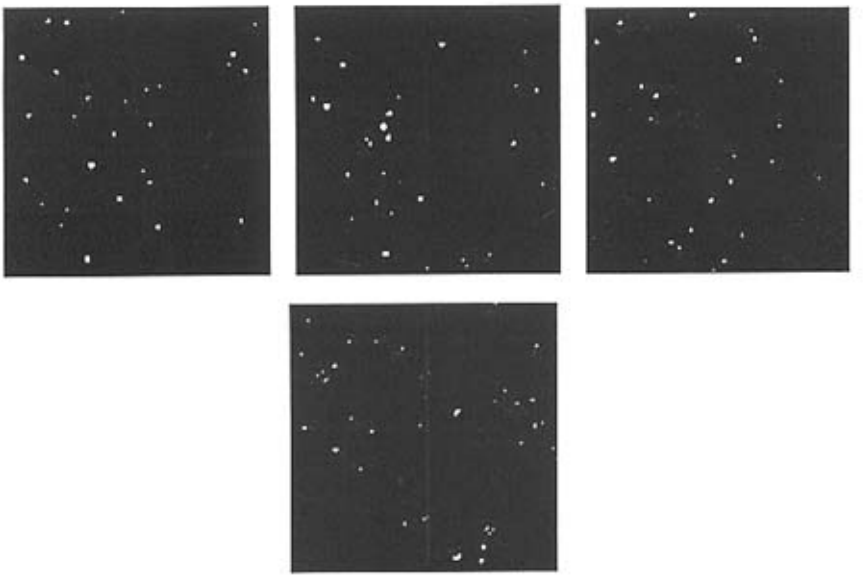
图 3-9 固定在盖玻片表面的羊抗鼠 IgG（H+L）单分子图像。

浓度为 5×10^{-15} mol/L，实验条件同图 3-6C。（n=10）

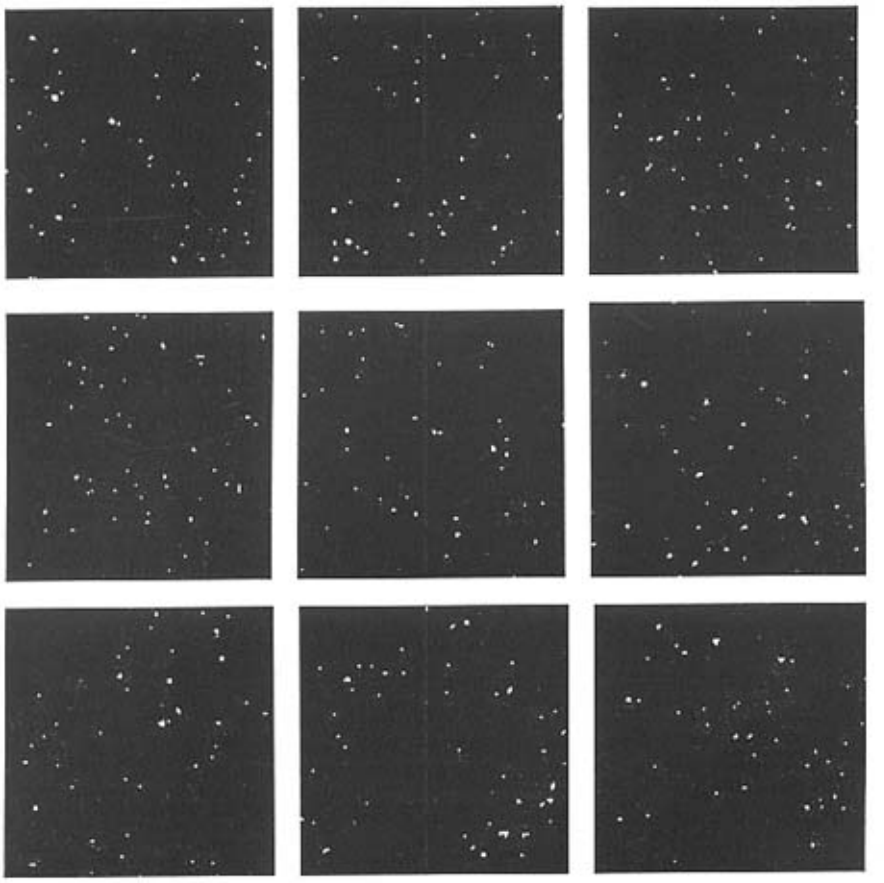


A

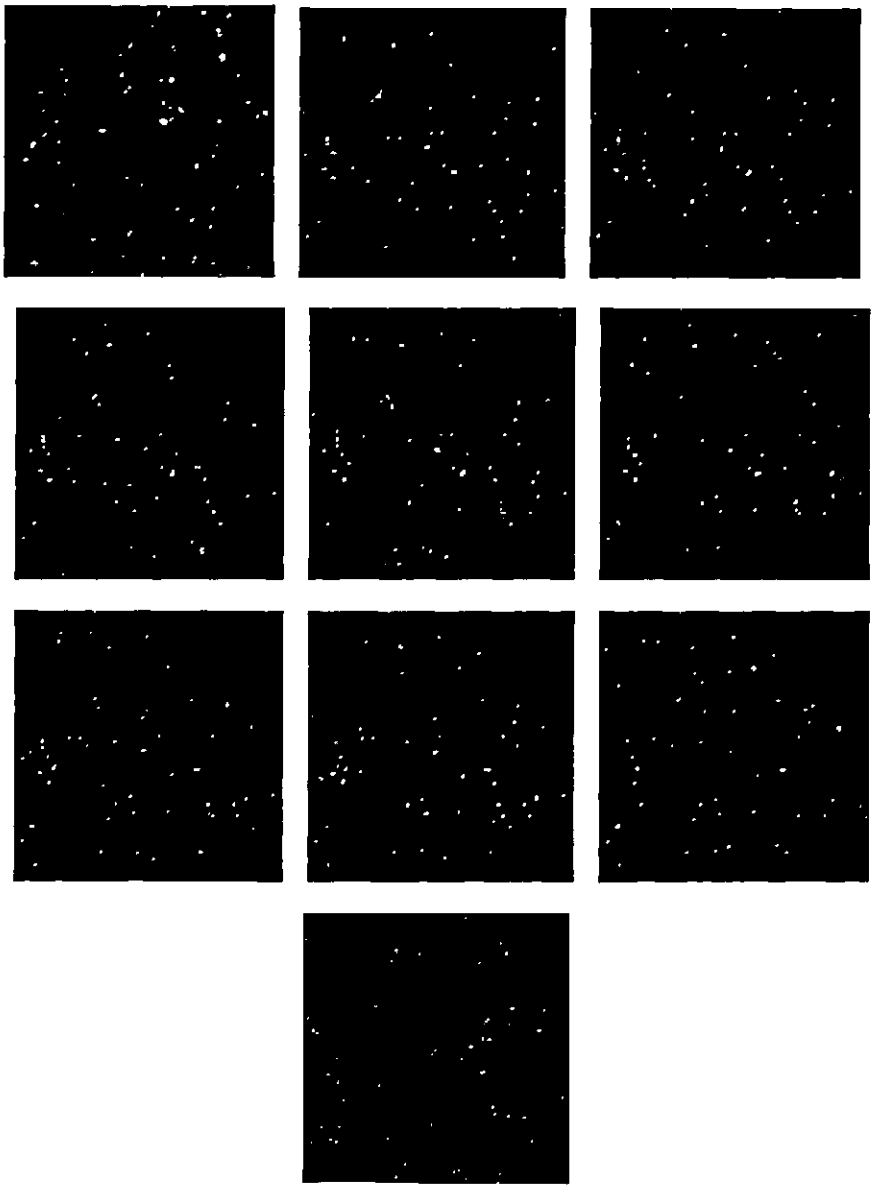




B



C



D

图 3-10 固定在盖玻片表面的羊抗鼠 IgG（H+L）单分子全内反射图像。

浓度（$\times 10^{-15}$ mol/L），A，20；B，30；C，50；D，60。其它实验条件同图 3-6C。（n=10）

表 3-2 单分子计数检测结果和理论值的比较。

浓度（fmol/L）	测定值	平均值	相对标准偏差(%)	理论相对标准偏差(%) *	理论分子数目	相对误差(%)
5.0	6, 2, 8, 5, 5, 4, 3, 7, 4, 6	5	28	14	4.7	6.4
20	16, 20, 20, 17, 17, 19 ,13, 18, 14, 16	17	14	7.7	18.9	10
30	27, 27, 23, 25, 29, 28, 29, 26, 24, 24	26	8.4	6.0	28.4	6.5
50	48, 44, 47, 45, 41, 40, 41, 43, 40, 38	43	7.4	4.8	47.3	9.8
60	55, 51, 47, 43, 47, 49, 48, 45, 42, 48	48	7.4	4.6	56.7	16

* 根据文献 [3] 算出。

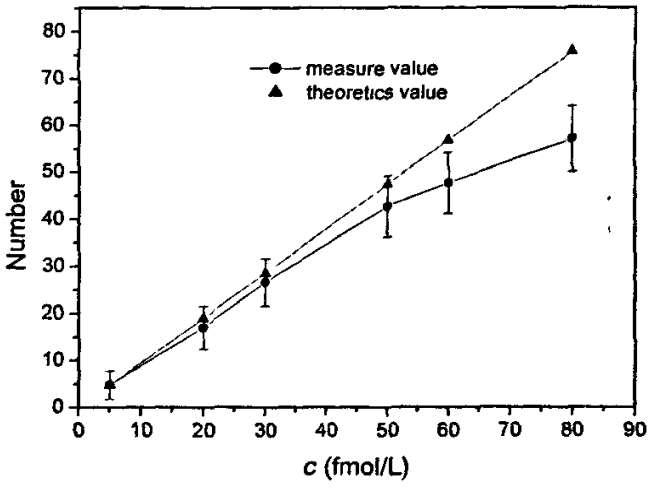


图 3-11 单分子计数法检测到的分子数目和理论数目和溶液浓度的关系曲线

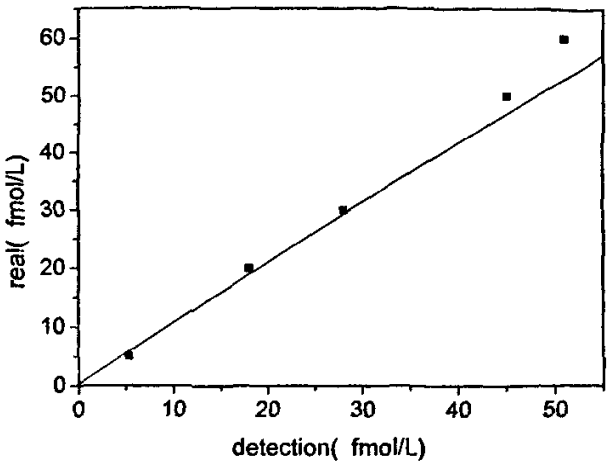


图 3-12 单分子计数测定溶液浓度中测定浓度和理论浓度的关系图。

图 3-11 是检测浓度和分子数的曲线图。根据检测到的分子数目计算出测定浓度，做出测定浓度和理论浓度的关系图（图 3-12），图 3-12 中直线为测定浓度和理论浓度相等时的直线。由图 3-11 和图 3-12 可以看出，在浓度 5×10^{-15} mol/L~6×10^{-14} mol/L 之间，检测结果和理论值基本符合，证明这种单分子计数法可作为检测溶液浓度的一种方法。

3.4 结论

将盖玻片硅烷基化，向盖玻片上滴加蛋白溶液，待溶剂挥发后，再在蛋白沉积处滴加蒸馏水，溶解掉结晶在盖玻片表面的无机盐，非常有效地去除了背景荧光，在此基础上利用全内反射荧光显微镜结合 ICCD 对固定在盖玻片表面的蛋白分子成像并计数，可直接计算出溶液的浓度。这种方法不需要做工作曲线，非常简便，在一定浓度范围内误差较小，具有较高的精确度。

3.5 参考文献

[1] Anazawa, T., Matsunaga, H., Yeung, E. Electrophoretic quantitation of nucleic acids without amplification by single-molecule imaging. *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5033-5038.

[2] Fister, C., Jacobson, S., Davis, M., Ramsey, J.M. Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 431-437.

[3] Chen, D., Dovichi, J. Single-molecule detection in capillary electrophoresis:molecular shot noise as a fundamental limit to chemical analysis. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 690-696.

[4] Loscher, F., Martin, J., Seeger, S. Counting of single protein molecules at interfaces and application of this technique in early-stage diagnosis. *Anal. Chem* , **1998**, 70, 3202-3205.

[5] Schultz, S., Smith, D.R., Mock, J., Schultz, D A. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA,,* **2000**, 97, 996-1001.

[6] Li, H., Zhou, D., Browne, H., Balasubramanian, S., Klenerman, D. Molecule by molecule direct and quantitative counting of antibody-protein complexes in solution. *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 4446-4451.

[7] Li, H.,Ying, L.,Green, J.,Balasubramanian, S.,Klenerman, D. Ultrasensitive coincidence fluorescence detection of single DNA. molecules.*Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1664-1670.

[8] Hanley, D Harris, J. Quantitative dosing of surfaces with fluorescent molecules:characterization of fractional monolayer coverages by counting single molecules. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5030-5037.

[9] Edman, L., Folds-Papp, Z., Wennmalm, S., Rigier, R. The fluctuating enzyme: a single molecule approach. *Chem. Phys.*, **1999**, 247, 11-22.

致 谢

本论文是在姜玮教授的精心指导和教诲下完成的，所有实验结果都凝聚着姜老师的心血和智慧，三年来姜老师悉心教诲，严格要求，使我在专业知识的深度和知识面的广度方面都有了长足的进步。姜老师不仅在学业上对我精心指导，而且在其它方面也给予了细心的关怀和照顾，在此向姜老师致以崇高的敬意和深深的谢意。

在本论文完成过程中，金文睿老师提出了许多建设性的意见。金老师富于创新的学术思想，渊博的学识，严谨的治学态度，开放的思维以及对科学的求真务实和刻苦奉献的精神给我留下了深刻的印象，使我终身受益，在此向金老师表示衷心的感谢。

在论文完成过程中，得到了司芝坤老师、张晓丽老师的热心指导和大力帮助，在此表示衷心的感谢。

怀其勇老师、王磊老师以及高宁、夏方诠、李建业、刘静、彭学伟、贾文志、赵明辉、朱兰兰、王玉江、曲绍风、马莹等同学在工作中都给予了我极大的帮助，在此向他们表示真诚的感谢。

感谢其他所有给予我关心和帮助的老师、同学和朋友。

本论文是在国家自然科学基金委，山东自然科学基金委的资助下完成的，特此表示感谢。

感谢我的家人在我论文完成期间所给予大力支持和无私的帮助。

许光

2005 年 5 月