

单波长荧光交叉相关光谱 单分子检测系统

谢超, 董朝青, 任吉存

(上海交通大学化学化工学院, 上海 200240)

摘要 基于激光共焦构型建立了一套单波长荧光交叉相关光谱检测系统, 并对检测系统进行了优化, 阐述了荧光交叉(相关)光谱基本理论. 以荧光量子点和有机染料为标记探针, 以人免疫球蛋白与羊抗人免疫球蛋白的结合反应为研究对象, 利用该系统成功地实现了在单分子水平上对免疫结合产物的分子数、浓度、特征扩散时间和动力学半径等参数的表征.

关键词 荧光交叉相关光谱; 单分子检测; 单波长激发; 量子点

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)05-0897-05

随着生命科学的迅猛发展, 人们希望从单分子水平上研究生物大分子的折叠、构象以及这些结构属性与其功能的关系^[1]. 其中分子间的相互作用过程更是该领域的研究热点之一^[2,3].

荧光交叉相关光谱亦称为荧光互关联光谱(Fluorescence cross-correlation spectroscopy, FCCS). 由于其具有检测灵敏度高及分析速度快等优点, 已经成为单分子检测的主要手段之一, 被成功地用于核酸和蛋白质构象的变化^[4~6]、核酸的杂交^[7]、蛋白质的相互作用^[8,9]及酶动力学^[10,11]等热门研究领域, 甚至在对细胞内的物质相互作用研究中也有一些应用^[12,13]. 最近一些综述文章^[14,15]详细地介绍了 FCCS 的基本原理和研究进展.

目前 FCCS 基本上采用双激光系统^[16]或双光子激发系统. 这些系统结构复杂, 需要调节系统的双焦点重合或需要昂贵的双光子激光器. 本文基于激光共焦构型建立了一套单波长荧光交叉相关光谱检测系统. 基于该系统, 以荧光量子点和有机染料为标记探针, 以人免疫球蛋白与羊抗人免疫球蛋白的结合反应为研究模型, 在单分子水平上对其结合产物的某些参数进行了表征.

1 荧光交叉相关光谱的理论背景

FCCS 方法是在荧光自相关光谱^[17~19](Fluorescence Autocorrelation Spectroscopy, FCS)基础上发展起来的. 它在保留了 FCS 的高灵敏度等优点的同时, 克服了 FCS 在区分粒子时需要粒子的质量相差 4~8 倍以上的局限性^[11]. 我们曾经介绍过 FCS 的工作原理^[20]及其某些应用^[21~24]. 这里重点讨论 FCCS 的理论背景^[7,11].

在 FCCS 模式中, 由于存在两个互不干扰的荧光通道(分别用 1, 2 表示), 用归一化自相关函数 $G(\tau)$ 对两个通道的荧光涨落信号进行相关分析, FCCS 的基本函数式表示如下:

$$G_{12}(\tau) = \frac{\langle \delta F_1(t) \delta F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle} \quad (1)$$

式中, $\delta F_1(t)$ 表示在任一时间 t 内通道 1 荧光的涨落, $\delta F_2(t + \tau)$ 表示经过迟延时间 τ 后通道 2 荧光的涨落. 将激光的强度、激光照射体积和荧光分子的扩散系数等因素进行综合考虑, 经过一系列的公式推导^[8], 式(1)可演化为

收稿日期: 2007-11-06.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20675052, 20727005)资助.

联系人简介: 任吉存, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事单分子检测和微分离方法研究. E-mail: jicunren@sjtu.edu.cn

$$G_{12}(\tau) = G_{12}(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,12}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\omega_0^2 \tau}{Z_0^2 \tau_{D,12}}\right)^{-1/2} \quad (2)$$

式中, $\tau_{D,12}$ 表示双色标记的荧光分子的特征扩散时间. 与 FCS 相同, 它定义为 $G_{12}(\tau)$ 下降到 $G_{12}(\tau)/2$ 时的 τ 值. 激光照射体为椭球体, ω_0 和 Z_0 分别表示激光照射体积的横向和纵向半径(定义为激光强度下降到 $1/e^2$ 时的距离). 根据上述的两个定义, 分子扩散系数可表示为 $D = \omega_0^2/4\tau_{D,12}$. 根据 Stokes-Einstein 公式, $R_h = k \cdot T/(6\pi \cdot \eta \cdot D)$, 求得双色标记荧光分子的动力学半径 R_h . 其中, D 为扩散系数, k 是玻尔兹曼常数($1.38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T 为溶液温度, η 为溶液粘度, R_h 为分子的动力学半径.

实验中, 分别对通道 1 和通道 2 进行自相关处理, 通过公式对两通道的自相关函数进行拟合, 分别得出通道 1 和通道 2 的分子数 N_{11} 和 N_{22} ; 通过公式(2)对两通道的交叉相关函数进行拟合, 得到 $G_{12}(0)$; 根据公式

$$N_{12} = 1/[G_{12}(0) \cdot N_{11} \cdot N_{22}]$$

则可求得具有双色标记的分子数 N_{12} . 已知分子数和微区体积(由 ω_0 和 Z_0 决定), 可以求得微区内荧光分子浓度 c_{12} .

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

自组装的 FCCS 系统如图 1 所示. YVO4 激光器(上海埃恩激光技术有限公司, 波长 532 nm)产生的激光经中性衰减片(沈阳汇博光学技术有限公司)衰减, 通过扩束镜扩束 5 倍后, 照射到双色镜(550DRLP, 美国 Omega Optical 公司)上, 经双色镜反射进入荧光倒置显微镜(IX71, 日本 Olympus 公司)的物镜(UplanApo 60 \times 1.2, 日本 Olympus 公司), 聚焦于盖玻片(厚度 0.13 ~ 0.16 mm, 美国 Sigma-Aldrich 公司)上的样品溶液中. 样品被激发后产生的荧光经同一物镜收集后穿过双色镜, 再经透镜聚焦, 然后被另一块双色镜(610DRLP, 美国 Omega Optical 公司)分成两路. 短波长的光被双色镜反射后, 经激发滤光片(565WB20, 美国 Omega Optical 公司)滤光, 穿过置于焦点处的针孔(30 μm)进入单光子计数器(雪崩二极管 APD, SPCM-AQR-14, 加拿大 Perkin-Elmer 公司)检测; 长波长的光透过双色镜, 被激发滤光片(700ALP, 美国 Omega Optical 公司)滤光, 穿过置于焦点处的针孔(70 μm)进入另一单光子计数器检测. 两个 APD 产生的信号由相关器(ALV25000/EPP, 德国 ALV 公司)关联. 相关曲线采用 Levenberg-Marquardt 非线性最小二乘法拟合得到.

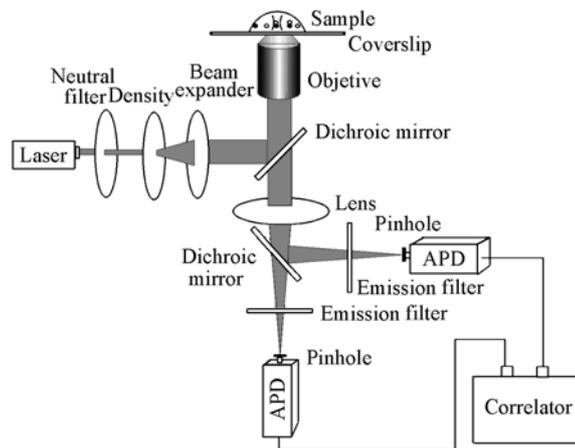


Fig. 1 FCCS setup with single wavelength laser

配制 1 mg/mL 罗丹明 6G(Molecular Probes 公司, Eugene, OR)和罗丹明 B 异硫氰酸酯(美国 Sigma-Aldrich 公司)溶液并保存, 使用时按要求适当稀释. 人免疫球蛋白 IgG 和羊抗人 IgG(鼎国生物有限公司)用灭菌水溶解, 定容至 1 mg/mL, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存. 荧光量子点(Quantum dot, 发射波长 745 nm, 记为 QD745)由本实验室合成^[25]. 其它试剂均为分析纯. 溶液均用 18.2 M Ω 的超纯水(美国 Millipore 公司)配制.

2.2 实验方法

实验采用罗丹明 B 异硫氰酸酯标记人 IgG, 反应在碳酸盐缓冲溶液(0.2 mmol/L, pH = 9.16)中进行. 在染料大大过量(染料浓度约大于人 IgG 浓度 50 倍)的条件下, 于室温避光反应 3 ~ 5 h. 产物用超滤膜(NMWL 50000, Millipore, 美国 Millipore 公司)离心超滤(8000 r/min)3 次. 毛细管电泳结果表明, 这样处理可基本除去游离未反应的染料. 采用 QD745 标记羊抗人 IgG, 羊抗人 IgG 能被 QD745 直接吸

附. 在 QD745 大大过量(QD745 浓度约大于羊抗人 IgG 浓度的 50 倍)的条件下, 于室温避光反应 3 ~ 5 h. 产物用超滤膜(NMWL 100000, 美国 Millipore 公司)离心超滤(8000 r/min)3 次, 以除去游离未反应的 QD745. 标记好的抗体随用随配.

测量时, 开启激光后, 调节光路得到最强信号, 即可采样测量. 将标记好的抗体按不同配比混合, 抗体间迅速发生免疫反应. 取 30 μL 混合溶液滴加到盖玻片上, 然后进行信号采集, 采样时间根据具体情况而定, 一般约为 10 ~ 30 s.

3 结果与讨论

3.1 检测系统

在 FCCS 中, 两个通道的光经常会发生互窜, 即一个通道的光在另一通道也能检测到, 这就是通常所指的交叉干扰效应(Cross-Talk), 这种干扰会影响实验数据的可靠性. 因此染料和滤光片的合理选择显得十分重要. 为了减少 Cross-Talk 现象, 应该选择发射波长相差很大的染料. 但在常见的有机染料中, 能被同一激光激发, 发射波长又相差足够大的染料是非常少见的. 通常的做法是采用两束不同波长的激光聚焦到同一焦点后, 分别激发不同的荧光染料. 但将两束激光聚焦到同一焦点, 这无疑增加了实验的难度.

本实验采用 532 nm 的 YVO4 激光器为激发光源, 以罗丹明 B(发射波长 580 nm)和 QD745(发射波长 745 nm)为荧光标记物, 成功地实现了单激光激发的 FCCS. 这是由于荧光量子点是一种非常优异的荧光染料, 它具有宽激发、窄发射的优点. QD745 能很好地被 532 nm 的激光激发, 其最大发射波长在 745 nm 处. 波长 532 nm 激发下的罗丹明 B 和 QD745 光谱如图 2 中谱线 *a*, *b* 所示. 分光装置的选择如图 2 中谱线 *c* ~ *e* 所示, 采用波长为 610 nm 的二色镜, 两个通道的发射滤光片分别为中心波长 565 nm, 带宽 20 nm 的带通滤光片和起始波长 700 nm 的长通滤光片. 该设计很好地将罗丹明 B 和 QD745 的发射峰进行了分离, 使 Cross-Talk 现象降到了可以忽略的程度. 实验发现, 罗丹明 B 的信号在通道 2 的信号强度约为在通道 1 强度的 1/12; QD745 在通道 1 的信号强度约为通道 2 强度的 1/80.

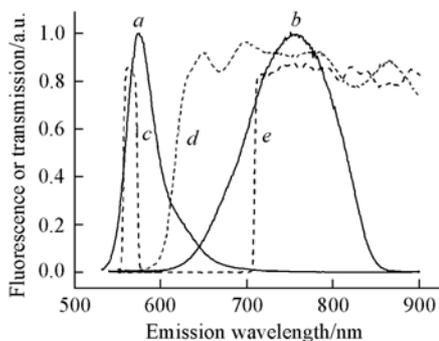


Fig. 2 Emission spectra of Rhodamine B and QD745

a. Emission spectra of Rhodamine B; *b*. emission spectra of QD745; *c*. emission filter for channel 1; *d*. dichroic mirror; *e*. emission filter for channel 2.

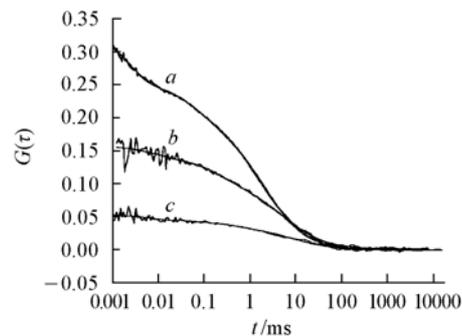


Fig. 3 FCS curves in channels 1 for Rhodamine (*a*), 2 for QD745 (*b*) and FCCS curve of channels 1 and 2 (*c*)

图 3 为结合产物荧光交叉相关函数谱图, 它由 3 条曲线组成. 其中曲线 *a* 为罗丹明 B 在通道 1 中典型的荧光自相关函数曲线, QD745 在通道 1 中无荧光自相关信号; 曲线 *b* 为 QD745 在通道 2 中典型的荧光自相关函数曲线, 罗丹明 B 在通道 2 中无荧光自相关信号; 曲线 *c* 为结合产物在两通道的荧光交叉相关函数曲线.

3.2 检测体积

能否得到微小的检测体积是荧光相关光谱能否成功的关键因素之一, 也是求出分子浓度的前提, 所以在实验前必须对实验仪器的检测体积进行测定. 通常用已知扩散系数的分子来测定仪器的结构参数, 计算检测体积. 实验采用罗丹明 6G 测定通道 1 的结构参数, 已知罗丹明 6G 的扩散系数为 $2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. 用该仪器对 10^{-8} mol/L 的罗丹明 6G 平行测量 11 次. 采样时间为 30 s. 得到的实验数据

用式(2)进行拟合,求得 $\omega_0 = 0.26 \mu\text{m}$ 和 $Z_0 = 1.89 \mu\text{m}$,RSD分别为0.8%和5.6%($n = 11$).根据公式 $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} \omega_0^2 z_0$ ^[7]求得通道1的照射体积约为0.7 fL.

由于很难找到能被532 nm激光激发,同时发射光又能被700 nm长通检测的有机染料,所以不能采用上述的方法对通道2的体积进行测定,故采用“比较法”对通道2的体积进行测定.具体操作如下:首先选用590 nm的长通滤光片(590ALP,美国Omega Optical公司),用罗丹明B对在这一实验条件下的体积参数进行测定,测定方法与通道1的体积参数测定相同.然后换上QD745样品,在相同的条件下测量,记录检测体积内的分子个数.用700 nm的长通滤光片换下590 nm的长通滤光片,测定同一QD745样品,记录检测体积内的分子个数.根据两次测得的分子数目的比值,就可以间接地求得通道2的体积.测定结果为1.5 fL.

交叉相关的体积参数由这两个通道的交集来确定,由于光路是同轴的,所以交叉相关的体积可近似认为由两个通道中较小的体积决定,约为0.7 fL.

3.3 系统的重现性

将标记并纯化好的一抗和二抗等体积混合,根据具体情况稀释后测量,然后分别进行FCCS分析.对产物浓度重复测量7次,以考察方法的重现性.产物浓度根据公式 $c_{12} = N_{12}/(V \cdot N_A)$ 求得,式中 V 为交叉关联体积, N_A 为阿伏加德罗常数.实验结果表明,系统重现性良好,产物浓度的RSD在8.2%以内.

3.4 系统有效性

将一抗和二抗反应后的溶液稀释不同倍数,逐一测量.结果见图4(A).实验结果显示,随着结合产物分子浓度的增大, $G_{12}(0)$ 增大,将 N_{12} 对稀释倍数作图[图4(B)]可见,分子数与稀释的倍数具有

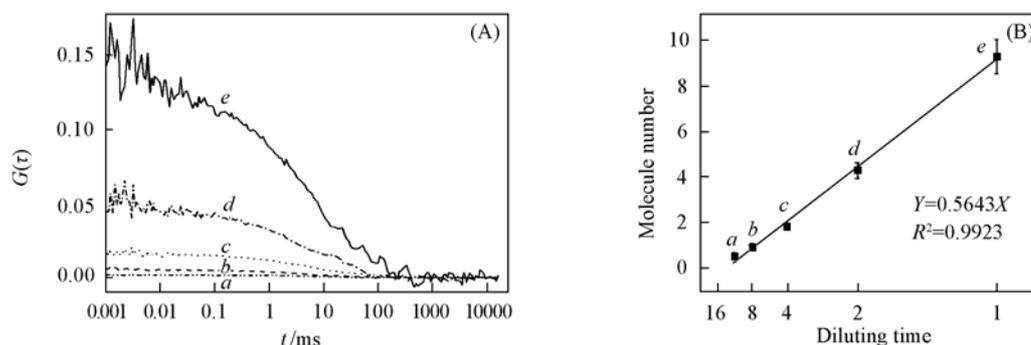


Fig. 4 FCCS curves of reaction products(A) and relationship between molecular number and diluting times of the solution after the binding reaction (B)

Concentration of reaction product/($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): a. 1.14×10^{-9} ; b. 2.07×10^{-9} ; c. 4.27×10^{-9} ; d. 1.02×10^{-8} ; e. 2.21×10^{-8} .

非常好的线性关系, $R^2 = 0.992$.实验条件下,检测体积内的分子数在0.4~10之间.实验证明本系统非常适合单分子研究.

图4中的各条曲线经过归一化处理得到图5.从图5中可以看出,不同浓度的产物的特征扩散时间[$\tau_{D,12}$,对应于 $G(0)/2$ 的 τ 值]基本一致, $\tau_{D,12} = (4.138 \pm 0.019)$ ms.证明在不同条件下产物结构未发生改变.求得它的分子特征扩散系数约为 $4.08 \times 10^{-12} \text{m}^2/\text{s}$,它的动力学半径约为54 nm.

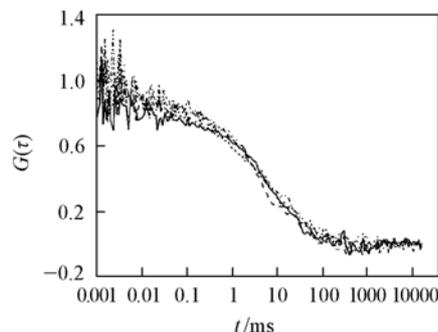


Fig. 5 Normalized FCCS curves

4 结 论

本文成功地构建了一套单波长FCCS系统,对该系统的参数性能进行了表征,并将该系统应用于免疫分析中.准确地测定了结合产物的分子数和浓度以及产物的特征扩散时间与动力学半径.采用量

子点这种新型的荧光染料, 实现了单激光激发 FCCS, 成功地克服了 Cross-Talk 效应.

参 考 文 献

- [1] SHAO Chen(邵琛), HU Dong-Hua(胡冬华), SUN Hai-Zhu(孙海珠), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(8): 1512—1516
- [2] ZHAO Jian-Wei(赵建伟), WANG Nan(王楠). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(4): 745—753
- [3] NIE Song(聂松), CHEN Ping(陈平), LIANG Song-Ping(梁宋平). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(1): 68—72
- [4] Heikal A. A., Hess S. T., Baird G. S., *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 2000, **97**: 11996—12001
- [5] Torres T., Levitus M. J.. J. Phys. Chem. B[J], 2007, **111**: 7392—7400
- [6] Wennmalm S., Edman L., Rigler R.. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1997, **94**: 10641—10646
- [7] Schwille P., Meyer-Almes F. J., Rigler R.. Biophys. J. [J], 1997, **72**: 1878—1886
- [8] Larson D. R., Gosse J. A., Holowka D. A., *et al.*. J. Cell Biol. [J], 2005, **171**: 527—536
- [9] Oyama R., Takashima H., Yonezawa M., *et al.*. Nucleic Acids Res. [J], 2006, **34**: e102
- [10] Kettling U., Koltermann A., Schwille P., *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1998, **95**: 1416—1420
- [11] Rarbach M., Kettling U., Koltermann A., *et al.*. Methods[J], 2001, **24**: 104—116
- [12] Bacia K., Schwille P.. Methods[J], 2003, **29**: 74—85
- [13] Bacia K., Kim S. A., Schwille P.. Nat. Methods[J], 2006, **3**: 83—89
- [14] Kim S. A., Heinze K. G., Waxham M. N., *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 2004, **101**: 105—110
- [15] Wohland T., Ling C. H.. Cell Biochem. Biophys. [J], 2007, **49**: 1—13
- [16] Magde D., Elson E. L., Webb W. W.. Phys. Rev. Lett. [J], 1972, **29**: 705—708
- [17] Rigler R., Mets U., Widengren J., *et al.*. Eur. Biophys. J. [J], 1993, **22**: 169—175
- [18] Rigler R., Mets U.. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng. [J], 1992, **1921**: 239—248
- [19] Eigen M., Rigler R.. Proc. Natl. Acad. Sci. [J], 1994, **91**: 5740—5747
- [20] ZHANG Pu-Dun(张普敦), REN Ji-Cun(任吉存). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2005, **33**: 875—880
- [21] Dong C. Q., Qian H. F., Fang N. F., *et al.*. J. Phys. Chem. B[J] 2006, **110**: 1069—1075
- [22] Dong C. Q., Bi R., Qian H. F., *et al.*. Small[J], 2006, **2**: 534—538
- [23] Dong C. Q., Ren J. C.. J. Phys. Chem. C[J], 2007, **111**: 7918—7923
- [24] Dong C. Q., Zhang P. D., Bi R., *et al.*. Talanta[J], 2007, **70**: 1192—1197
- [25] Qian H. F., Dong C. Q., Peng J. L., *et al.*. J. Phys. Chem. C[J], 2007, **111**: 16852—16857

Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy Using Single Wavelength Laser Excitation

XIE Chao, DONG Chao-Qing, REN Ji-Cun*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract The basic principle of fluorescence cross-correlation spectroscopy were introduced in this article. A setup of fluorescence cross-correlation spectroscopy(FCCS) was established with single wavelength laser. After the optimization of the setup, the detection volume is about 0.7 fL. This home-built setup was successfully applied for study of the binding reaction of human immunoglobulin G with goat anti-human immunoglobulin G. With quantum dots(745 nm) and Rhodamine B(580 nm) as probes and 532 nm laser beam as excitation source, the cross-talk effect was near completely suppressed. The molecule numbers in a highly focused volume, concentration, diffusion time and hydrodynamic radius of the reaction product can be determined by FCCS system.

Keywords Fluorescence cross-correlation spectroscopy; Single-molecule detection; Single wavelength laser excitation; Quantum dot

(Ed.: A, G)