

活细胞内单分子实时显示的光学途径探索

王 琛 王桂英 徐至展*

(中国科学院上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室, 上海 201800)

摘要 现代光学探测技术具有高空间分辨率、高时间分辨率、大信息量、无损伤、可实现活体探测等优点, 因而成为实现单分子探测的首选方法. 针对单分子探测中高时空分辨率、高灵敏度、高特异性的要求建立并发展了多种光学成像和光谱探测方法. 在此基础上, 我们在活细胞内单个蛋白分子之间的相互作用、活细胞内单个蛋白分子动力学、液体环境中单个分子的拉曼光谱等 3 个方面开展了应用基础研究, 这些工作为在单分子水平上研究生命活动的细节奠定了基础.

关键词 单分子探测 全内反射荧光 荧光共振能量转移 双光子
相干反斯托克斯 Raman 表面增强 Raman

2003 年末, 美国 *Science* 杂志评出年度十大科技成就, 其中捕捉到细胞内部单个分子的多种活动情况, 对运动中的分子马达以及正在消化 DNA 的单个酶等进行了观察的单分子科研成果入选其中^[1]. 毋庸置疑, 以解决生命科学问题为目标, 多学科、多角度交叉的单分子研究, 将生命科学推入一个崭新的纪元. 我们知道, 迄今为止在生物学、生物化学、医学等领域所进行的众多研究, 绝大部分是集团水平的平均研究. 集团平均研究能够反应物质的平均特性, 具有良好的代表性. 在过去的研究中, 它给我们带来了丰富的资料, 是我们对于物质世界认识的重要基础. 但集团平均研究的深入, 带来了一系列悬而未决的疑问^[2~7], 例如单个生物分子在细胞内的动力学活动过程、生物大分子之间的相互作用、生化反应的中间产物等. 单分子探测则为科学家解决这些前沿课题提供了全新的手段. 它克服了集团平均研究不可逾越的缺陷, 将整体平均效应掩盖下的单个分子的特殊反应呈现在我们面前, 而对这些特殊反应的了解在我们企图了解生命本质、物理本源的今天显得越来越重要^[8,9].

要想实现单分子研究, 必须发展超高分辨率的成像技术. 在这种需求下, 20 世纪 30 年代扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)发展起来, 它导致了细胞研究的革命, 使得生物学家得以从亚显微水平上认识细胞世界. 进入 80 年代, 物理学家 Binnig 等人^[10]成功地研制了新型的表面分析仪器 - 扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM), 并利用它观察到 Si 的(1 1 1)面的清晰的原子结构, 使人类第一次进入到分子、原子世界. 1986 年, 原

收稿日期: 2007-05-20; 接受日期: 2007-08-10

科学技术部重大基础研究基金资助项目(批准号: 2002BC7138085, 2006CB806000)

* 联系人, E-mail: zzxu@mail.shcnc.ac.cn

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)诞生^[11], 它弥补了 SEM 和 STM 不能直接观察非导电样品的缺陷, 带来了革命性的突破^[12~14]. 随后静电力显微镜^[15]和扫描离子电导显微镜^[16]等相继出现, 形成了一个丰富的扫描探针显微镜体系, 被广泛应用于表面上的单分子研究. 在这些显微镜中, 探针与分子紧密接触, 当探针扫描过分子所附着的平面时, 会出现隧道电流或探针的高度发生改变, 显示出探测到的分子. 扫描探针类显微镜在黏附于表面的分子探测上取得了巨大的成功. 但是它们均存在样品与探针非常接近(在 nm 量级)、系统复杂、成像检测环境苛刻、可能损伤生物体等缺陷, 从而极大地限制了这些方法在单分子研究、尤其是活体研究中的深入. 在扫描探测类技术发展的同时, 电化学方法^[17,18]、膜片钳技术^[19]也相继提出. 电化学方法具有高灵敏度, 可以在液态环境中探测, 但是它的本质是一种离子探测, 而不是真正的单分子探测. 膜片钳技术同样具有高的灵敏度, 直到今天它仍然是离子通道探测的重要方法, 但是它会损伤样品. 这些均严格限制了它们在活细胞单分子成像中的应用.

与此同时, 新一代光学显微技术发展起来. 它们继承了传统光学成像技术的大信息量(如偏振态、折射率、光谱等)的优势, 更以其高的空间分辨率和时间分辨率、无损伤以及对单分子活体探测的可行性, 再次成为生物学家、物理学家和成像学家们研究的热点, 成为单分子探测的首选技术^[20~27]. 单分子光学探测的方法根据探测模式可分为两大类: 宽场成像和点探测^[28]. 点探测的优点在于: 高的信噪比、高的时间分辨(可达 μs 量级的时间分辨)以及可以对静止分子进行光谱测量. 缺点是很难同时观察到几个运动的分子. 宽场探测的优点在于: 可以同时观察到几个分子的运动、时间分辨为 ms 量级. 缺点为: 激发体积相对较大, 信噪比降低(全内反射照明方式的提出弥补了这一缺点, 但它是以减少探测深度为代价的). 点探测采用的探测器主要有雪崩光电二极管(avalanche photodiode)和光电倍增管(photomultiplier tube). 一般光电倍增管的读出噪音为零, 暗电流小于 50 counts/s, 量子产率约 40%. 而宽场探测采用制冷型电荷耦合器件(charge coupled device, CCD), 它的典型读出噪音约 5 个光子, 量子产率约 80%, 暗电流小于 $0.05 \text{ count}/(\text{pixel} \cdot \text{s})^{-1}$. 因此, 对于探测弱信号, 点探测的方式更为有利. 当然, 随着探测设备的发展, 特别是微通道板像增强器(microplate image intensifier)和增强型 CCD(intensified CCD, ICCD)的性能改进, 面探测器的信噪比已经可以完全满足单分子探测的需要.

我们实验室在过去的五年时间里, 对单分子行为可视化的光科学和光技术进行了深入研究^[29~47]. 针对单分子探测中高时空分辨率、高灵敏度、高特异性的要求探讨并发展了多种点探测和面成像的光学方法. 首先从提高探测灵敏度、空间分辨率、时间分辨率和特异性入手, 我们发展并建立了多种新型光学探测方法, 建立了数种具有自主知识产权的光学方法和成像系统. 为实现高灵敏度和多维单分子探测, 我们建立了双通道的全内反射荧光成像方法^[29~33]; 为了实现更高的空间分辨率, 我们建立了双光子荧光成像以及双色荧光成像方法, 并将其与超分辨光瞳技术结合^[34~38]. 为了解决单分子探测的探针问题, 我们建立了无需标记且具有更高特异性的拉曼(Raman)探测方法^[39~42]. 以这些成像方法和系统为基础, 我们在活细胞内蛋白相互作用、活细胞内单个蛋白分子动力学、液体中单个分子的 Raman 光谱等方面开展应用基础研究, 取得了一系列的实验结果^[43~47]. 本文将分为 5 个部分对这些工作进行介绍.

1 全内反射荧光成像系统及其应用

1.1 基于隐失场激发的全内反射荧光成像显微镜

由于单分子所发出的信号是非常微弱的, 因此在单分子探测中, 最关键的问题是如何减

少背景光的干扰,使单分子的光信号超过背景光信号.全内反射荧光显微术(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)利用全内反射产生的隐失场来实现照明.由于隐失波的特点是在平行界面方向以行波场方式传播,在垂直界面方向则是一个指数衰减场^[48].所以这种显微成像技术成像的视野开阔,同时照明深度却很薄,只有百纳米量级,可以将背景光减小到极低的水平,因此具有其他成像技术无可比拟的高的信噪比^[49~52].我们实验室基于Olympus公司的IX71倒置荧光显微镜建立了物镜型荧光显微成像系统,见图1.我们采用多波长可调谐氩离子激光器作为光源,使用工作在450~650 nm波长范围内的单模保偏光纤将激光耦合到显微系统中.探测器选用电子轰击放大电荷耦合器件(electron multiply charge coupled device, EMCCD),其每个像素大小为 $8\text{ }\mu\text{m}\times 8\text{ }\mu\text{m}$,动态范围14 bits,最大读出速率35 M,最大增益可以达到1000倍.在对显微镜进行改造后,我们的全内反射系统不仅可以实现不同偏振态激发光的切换,还可以实现双通道成像或成像/光谱的同时探测.系统的空间分辨率高于200 nm,探测灵敏度约为25个光子.

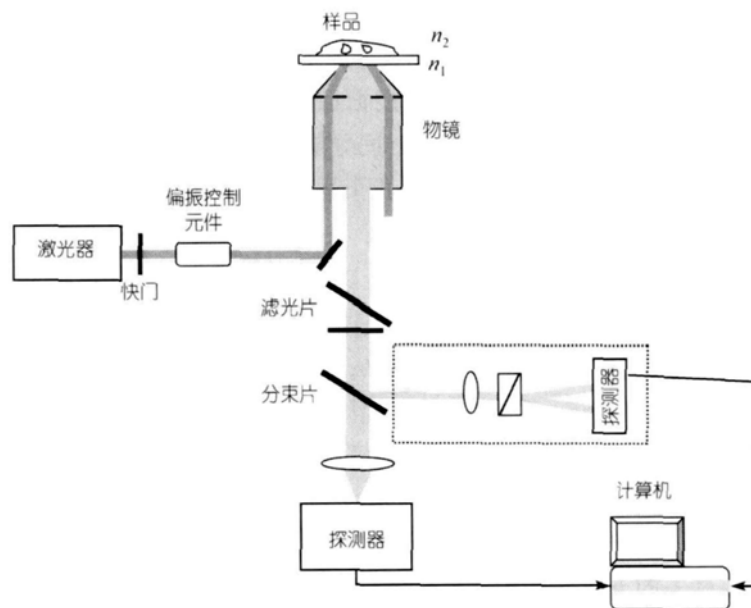


图1 全内反射荧光成像系统示意图

1.2 偏振光激发的全内反射荧光成像

单分子的荧光激发具有偏振选择特性,因此在全内反射单分子荧光探测中,隐失场的偏振理论是一个值得关注的问题^[53~56].我们研究了不同偏振态入射光情况下所产生的隐失场^[29].我们从Maxwell方程出发,根据磁矢量和电矢量的关系以及边界连续条件,得到当入射光为P偏振时,所产生隐失场的 y 分量为零. x 和 z 分量除了数值上的差别外,还相差一个虚数 i ,这表明两者在位相上相差 $\pi/2$,所以合成的偏振光将是一个正椭圆偏振光,其偏振矢在 xz 平面内旋转(这使我们看到隐失场不仅在传播方向和强度上不同于普通传播场,而且具有不同于传播场的非常独特的偏振特性).在这种偏振的隐失场中,偶极矩取向方位角为 0 和 π 的荧光分子偶极子被激发的效率最高,发射的荧光强度最强,见图2,取向极角 ϕ 的变化只引起荧光强度小的波动.当入射光波为S偏振的线偏光时,全内反射形成的隐失场只有垂直分量,即 y 分量,这

种隐失场在取向为 $\theta = \frac{\pi}{2}$, $\phi = \frac{\pi}{2}$ 和 $\theta = \frac{\pi}{2}$, $\phi = \frac{3\pi}{2}$ 上激发的荧光强度最强. 生物学的研究表明, 一些重要的生命活动过程例如细胞内吞作用(包吞)、胞外分泌(包吐)和细胞表面的输运均与膜取向的变化相关; 又如细胞内的能量传递密切依赖供体和受体之间的相对取向. 利用 TIRFM 独特的偏振特性, 这些取向在一定尺寸范围内有序排列的变化, 将引起荧光发射强度的空间变化, 从而被探测到. 所以, 这一特性可以用来对活细胞表面取向的亚显微结构进行视见, 进一步提高系统的分辨率.

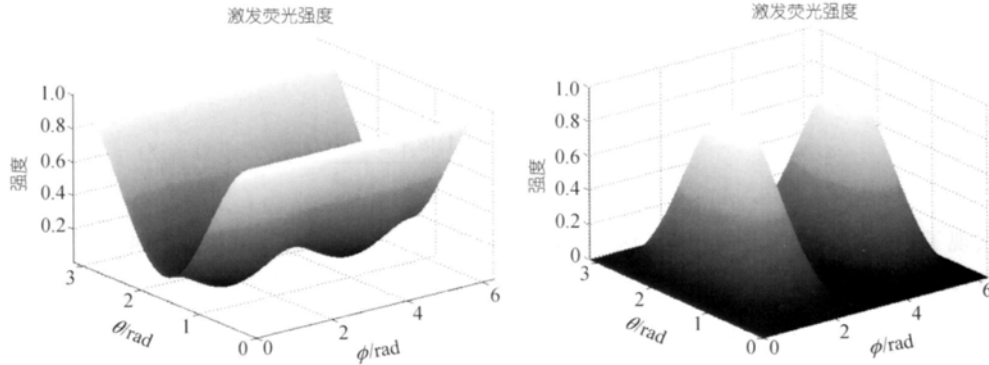


图 2 不同偏振态入射光产生的隐失场激发荧光的强度分布图^[29]

1.3 利用全内反射荧光显微术研究单分子取向

单个分子的取向研究一直是单分子探测中的重要课题. 它不仅是分子自身物理、化学特性的本质反应, 同时也是分子与分子之间, 分子与环境之间相互作用的超灵敏探针, 能提供重要的信息. 近几年来, 科学家尝试了多种方法来确定单分子的三维取向^[56-61], 主要有近场扫描成像法、加入光瞳、离焦法等. 我们实验室提出利用偏振的隐失场和偏振的传播场激发来探测单分子三维取向的方法. 偏振隐失场的激发是基于全内反射荧光显微光路, 远场激发则是宽场落射式荧光显微光路. 结合不同偏振光场激发下的单分子的荧光强度图像, 得到单分子的三维取向^[30]. 值得注意的是, Vacha 等人^[62]也曾提出类似的方法, 但是他们是利用位相信息来获得单分子的取向, 系统装置和分析方法均要复杂.

首先我们在宽场落射式荧光显微光路中, 得到单个分子在 x 偏振和 y 偏振入射下的激发效率及荧光强度比为^[30,63]

$$P_x = |\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}|^2 = \mu_x^2 \varepsilon_x^2,$$

$$P_y = |\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}|^2 = \mu_y^2 \varepsilon_y^2,$$

$$\frac{I_y}{I_x} = \frac{\mu_y^2}{\mu_x^2} = A.$$

进一步在全内反射的荧光显微光路中, 得到单个分子在 P 偏振和 S 偏振入射光下的激发效率及荧光强度比为^[30,64]

$$P_P = (\mu_x \varepsilon_x)^2 + (\mu_z \varepsilon_z)^2,$$

$$P_S = (\mu_y \varepsilon_y)^2,$$

$$\frac{I_P}{I_S} = \frac{(\mu_x \varepsilon_x)^2 + (\mu_z \varepsilon_z)^2}{(\mu_y \varepsilon_y)^2} = B,$$

这里 $\varepsilon_x, \varepsilon_y, \varepsilon_z$ 为隐失场 3 个矢量分量, 具体表达式文献在[29]中已经推导得出. 结合上面得到的两组强度比值 A 和 B , 我们得到偶极矩 3 个分量的解析表达式如下^[30]:

$$\begin{aligned}\mu_x^2 &= \frac{|\varepsilon_z|^2}{AB|\varepsilon_z|^2 + (1+A)|\varepsilon_y|^2 - |\varepsilon_x|^2}, \\ \mu_y^2 &= \frac{A|\varepsilon_z|^2}{AB|\varepsilon_z|^2 + (1+A)|\varepsilon_y|^2 - |\varepsilon_x|^2}, \\ \mu_z^2 &= \frac{(AB-A-1)|\varepsilon_z|^2}{AB|\varepsilon_z|^2 + (1+A)|\varepsilon_y|^2 - |\varepsilon_x|^2},\end{aligned}$$

即实现了单分子三维取向的确定. 这样我们通过改变入射光的偏振态获取两组(4 幅)荧光图像就有可能实现单个分子三维取向的精确确定, 而不需要其他复杂的分析计算和光路设计.

1.4 全内反射荧光显微术中纵向超分辨

TIRFM 不仅具有极低的背景噪声, 而且隐失场强度在纵向呈指数衰减的特性, 使得 TIRFM 在近场区域具有精确的轴向层析能力. 在利用全内反射成像技术进行纵向超分辨的应用中, 使用较多的是可变角度入射全反射荧光成像(variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy, VATIRFM)^[65,66], 这种方法从发生全反射的临界角开始连续改变入射角的大小, 在不同角度情况下记录荧光成像强度, 然后在数学上用反拉普拉斯变换实现重构. 但是这种模型适用于荧光分子数目较多, 聚集形成薄层结构的情形^[67~69]. 基于此, 我们提出了更适用于单分子探测的荧光分布球形模型^[31], 即在观察的区域内, 隐失场中只有有限个数的荧光分子, 荧光分子为球形. 从此数学模型出发, 结合 TIRFM 的成像特性, 我们得到成像分子荧光强度最大值 $(F_1)_{\max}, (F_2)_{\max}$, 渗透深度 d 和荧光分子纵向间距之间的关系^[31]:

$$\Delta c = c_2 - c_1 = d \cdot \ln \frac{(F_1)_{\max}}{(F_2)_{\max}},$$

同时我们还可以得到荧光分子纵向绝对位置(以分界面为零点)^[31]:

$$c_1 = -d_2 \ln \left[F_1(d_2) \frac{1-k^2}{4k} \right], \quad c_2 = -d_2 \ln \left[F_2(d_2) \frac{1-k^2}{4k} \right],$$

其中 $k = [F_1(d_1)]^2 / F_1(d_2) \cdot 2Id_1$, d_1 和 d_2 分别为不同入射角下的渗透深度, 且 $d_2 = 1/2 d_1$. 可以看出如果我们在探测过程中两次变换入射角的大小, 即可重构出单个分子的空间位置, 实现单分子全内反射荧光成像纵向超分辨.

1.5 全内反射系统中的单分子探测

1.5.1 单个荧光素分子和单个绿色荧光蛋白分子的探测

体外单分子探测是单分子研究的重要部分, 它不仅是研究分子在活细胞环境下性质的基

基础, 而且它可以揭示单个分子自身物理、化学的内禀特性, 从而为直接探测单分子之间的异质性、理解分子能级提供重要数据. 因此, 我们开展了对单个荧光素分子和单分子绿色荧光蛋白分子 (green fluorescence protein, GFP) 的探测研究^[43,44]. 实验中采用聚丙烯酰胺 (Poly Acrylamide, PAA) 凝胶方法制备单分子样品^[20], 使用 64, 46 和 22 mW (激光器出射功率) 3 种激发功率, 用以比较激发功率对单分子荧光寿命及荧光发射的影响. 所用物镜为 Olympus 专用全内反射荧光物镜, 60 $\times$, NA = 1.45, 探测器为 EMCCD (iXon 887, Andor Technology Ltd., Ireland), 每帧积分时间为 0.2 s, 连续拍摄 100 帧, 记录过程中激光功率不变. 我们首先在全内反射的模式下对浓度为 10^{-6} mol/L 的荧光素 ($C_{20}H_{12}O_5$) 分子进行观测, 可以看到很多衍射极限的荧光亮点呈随机分布状态. 我们对图像中的荧光点进行了跟踪观测, 发现像点的荧光强度随时间成指数衰减, 这是一种系综平均的结果, 说明每个荧光亮点中含有多个荧光分子. 随后, 我们对 10^{-9} mol/L 的荧光素分子样品进行了观测, 依然可以看到很多衍射极限的荧光亮点呈随机分布状态, 但是每一个点的强度要弱很多, 见图 3(a). 对荧光点进行跟踪观测的结果显示, 强度呈现明显的一步淬灭状态, 见图 3(b). 这正是单分子的典型行为, 由此可以判断这些荧光点就是单个的荧光素分子^[70-72]. 实验中, 我们还观察有些荧光点呈现两步淬灭的行为, 物化理论显示: 在单分子水平, 我们可以根据荧光点的淬灭步骤来判断其中含有的单分子数目^[70,73], 所以两步淬灭的行为说明这些荧光点中包含有两个分子.

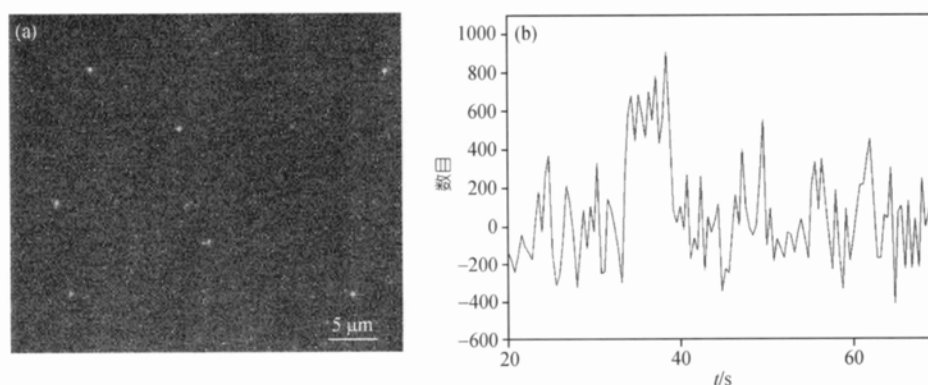


图 3

(a) PAA 膜中荧光素分子的全内反射荧光成像图; (b) 单个荧光素分子的一步淬灭图^[43,44]

我们还将单个荧光素分子和单个 GFP 分子的荧光特性进行了比较, 见图 4. 我们发现 GFP 具有比荧光素分子更高的发射强度以及更稳定的发光特性.

1.5.2 活细胞内单个分子的探测

在体外单分子探测的基础上, 我们进一步进行了活细胞内单个蛋白质分子的深入研究, 见图 5. 我们通过仔细控制全内反射成像方法中的入射角度, 可以实现落射式^[74]、斜入射式^[75]和全内反射式^[76]多种不同的照明方式. 结合这些照明方式, 我们对膜锚定的绿色荧光蛋白质分子 (质粒构建为将 c-H-Ras 蛋白膜锚定的 20 个氨基酸融合到绿色荧光蛋白的 C 末端, 简称为 GFP-F) 在细胞内部不同深度区域的运动进行了观测, 包括细胞膜上、近膜区和细胞质中. 结合单分子/单粒子追踪技术以及单分子的统计方法, 我们对在细胞膜上和细胞内部的绿色荧光蛋白分子的运动进行了分析和比较. 另一方面, 我们利用 TIRFM 观察到 CHO 细胞表面表达的

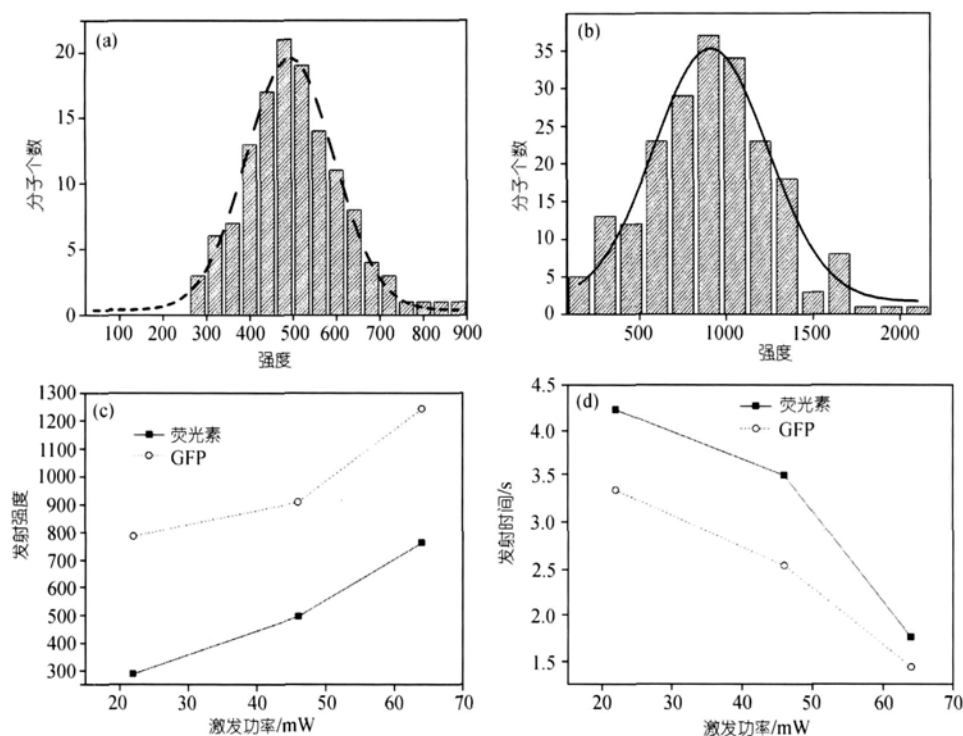


图 4 46 mW 激发功率下荧光素(a)和 GFP 单分子(b)荧光强度统计图; 64, 46 和 22 mW 三种激发功率下荧光素和 GFP 发射强度比较图(c); 64, 46 和 22 mW 三种激发功率下荧光素和 GFP 发光时间比较图(d)^[43]

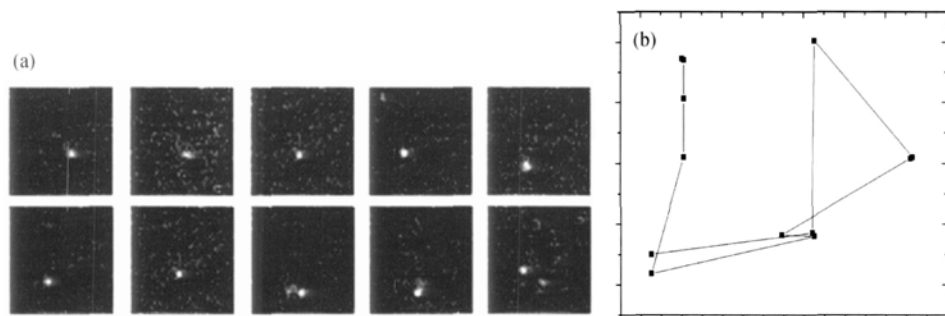


图 5 中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO)细胞膜表面单分子 GFP-F 分子的运动观测

(a) 在不同时刻, 单个 GFP-F 分子的荧光成像图; (b) 根据不同时刻, GFP-F 的空间位置坐标重构的运动轨迹图

单个 Mac-1 亚基, 进行了单个分子的实时观察, 并对其运动轨迹和扩散系数进行了分析. 相关的结果正在整理过程中.

2 荧光共振能量转移探测系统

近年来, 荧光共振能量转移作为活细胞内实时检测蛋白质相互作用的重要光学技术而得到了广泛应用^[77-81]. 所谓荧光共振能量转移(FRET)是由于分子之间的长程偶极子-偶极子相互作用, 能量从受激发的发色团(通常称为供体)无辐射的转移到另一个发色团(通常称为受体)的

物理过程. FRET 能量转移效率与供体和受体的距离的六次方成反比关系, 所以 FRET 对距离的变化非常敏感, 被称为“分子尺”. 我们与上海第二军医大学神经生物教研室合作, 利用 FRET 显微成像技术并结合 FRET 光谱技术对活细胞内部蛋白质之间的相互作用进行了探测. 实验中采用青色荧光蛋白(cyan fluorescence protein, CFP)和黄色荧光蛋白(yellow fluorescence protein, YFP)作为 FRET 荧光对, 成像系统为以奥林巴斯 IX71 倒置荧光显微镜为主体的三通道成像装置, 激发光源为 75 W 氙灯光源, 成像三通道分别为 YFP 通道(激发滤光片参数: 490~500 nm, 发射滤光片参数: 515~560 nm), CFP 通道(激发滤光片参数: 420~450 nm, 发射滤光片参数: 460~500 nm)及 FRET 通道(激发滤光片参数: 420~450 nm, 发射滤光片参数: 520~550 nm). 探测器为 Cascade512F CCD (Roper Scientific, USA). 实验中所设定的参数为曝光时间 200 ms, 物镜 40 $\times$. FRET 光谱探测装置则是以多波长氦离子激光器为光源, 经格兰棱镜和透镜聚焦到石英皿中激发样品, 在垂直方向收集荧光信号, 并用光谱仪记录, 见图 6. 与成像装置相比, 该光谱探测装置不需要任何滤光片, 具有简单、灵活的特点. 同时, 我们发展了结合该探测装置的光谱分离(spectral unmixing)方法, 可以进行快速而准确的 FRET 探测.

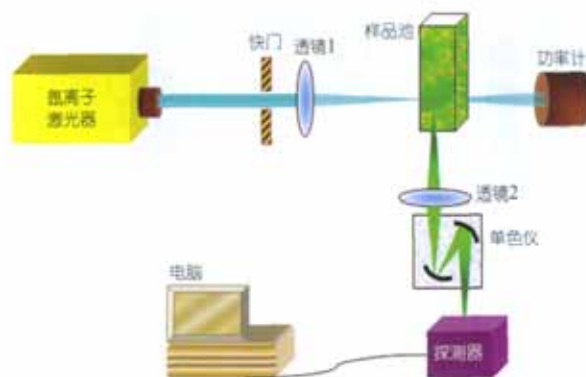


图 6 利用光谱方法进行 FRET 测量示意图

2.1 活细胞内探测 Mac-1 α 和 β 亚基之间的关联

我们利用 FRET 技术在活细胞内对 Mac-1 α 和 β 亚基之间的关联进行了探测. Mac-1 为白细胞表面的整合素家族黏附分子之一, 是白细胞游走、趋化、吞噬的基础, 在机体防御作用及免疫反应中起着重要的作用, Mac-1 是由 α_M 和 β_2 两个亚基非共价结合而成的异源二聚体. 图 7 为利用 FRET 探测 Mac-1 亚基之间关联的示意图. 在中国仓鼠卵巢癌(CHO)细胞和人胚肾(HEK293T)细胞中我们都探测到了 Mac-1 α 和 β 亚基之间的关联. 进一步, 我们利用 FRET 成像方法及荧光光谱方法研究了 Mac-1 α 和 β 亚基之间的关联, 见图 8.

实验采用了 FRET 指数 FRET^C 和 FR 以及有效 FRET 效率 E_{EFF} 来衡量 FRET 的强弱. 第一个 FRET 指数是校正的 FRET(FRET^C), 表达式如下^[81,82]: $\text{FRET}^C = \text{FRET} - a \times \text{YFP} - b \times \text{CFP}$, 这里 CFP, YFP 和 FRET 为样品在 CFP, YFP 和 FRET 通道中成像的荧光强度. a 和 b 分别表示 YFP 和 CFP 荧光漏到 FRET 通道的比例系数. 根据上式直接进行图像之间的运算, 可以得到 FRET 定量的信息, 如果没有 FRET 发生, FRET^C 的值应该等于 0, FRET 越强, FRET^C 值就越大.

另一个 FRET 指数是 FRET 比率(FRET ratio, FR), 表达式如下^[83,84]:

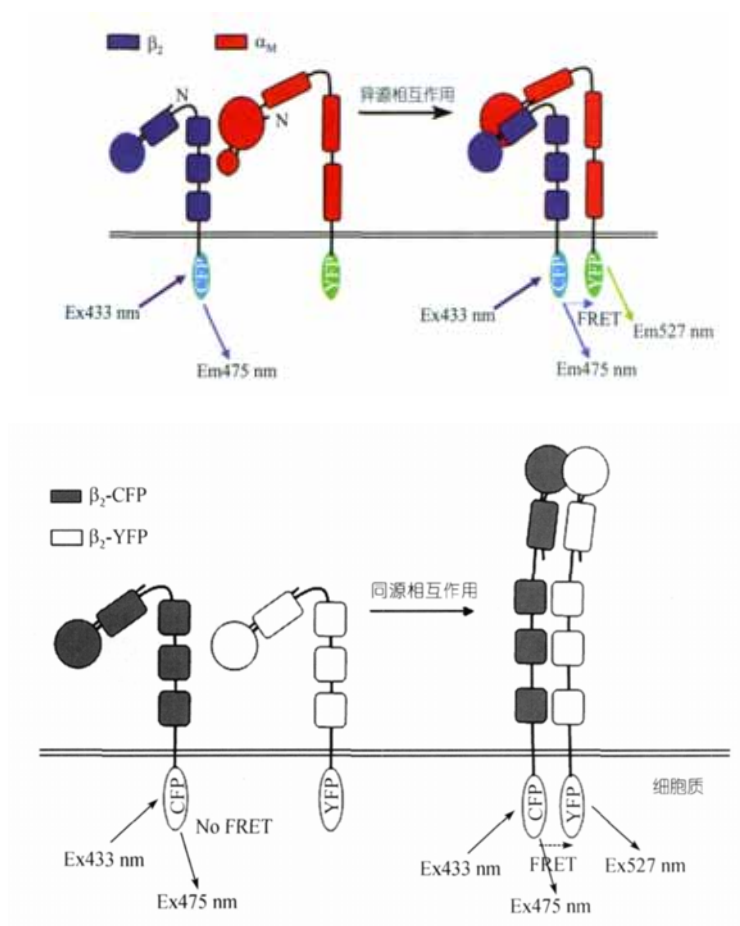


图 7 利用 FRET 探测 Mac-1 亚基之间关联的示意图^[45,46]

$$FR = \frac{\text{FRET} \times b \times \text{CFP}}{a \times \text{YFP}}$$

如果没有 FRET 发生, FR 的值应该等于 1, FRET 越强, FR 值就越大.

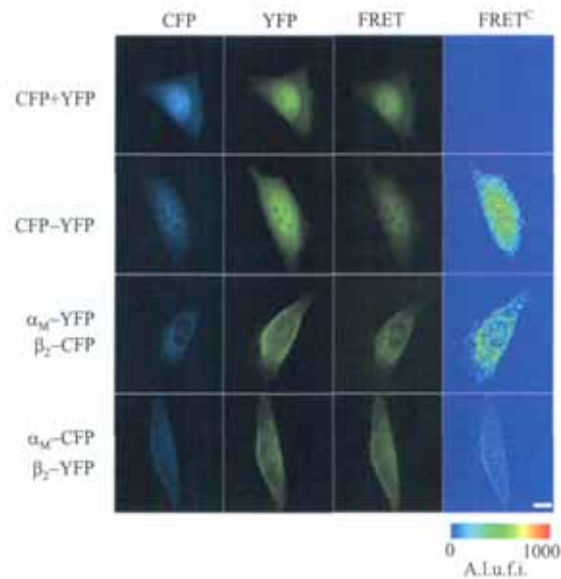
有效 FRET 效率 E_{EFF} 可以表示为^[83]

$$E_{\text{EFF}} = (FR - 1) \times \frac{\varepsilon_{\text{YFP}}(440)}{\varepsilon_{\text{CFP}}(440)} = \frac{\text{FRET}^C}{a \times \text{YFP}} \times \frac{\varepsilon_{\text{YFP}}(440)}{\varepsilon_{\text{CFP}}(440)},$$

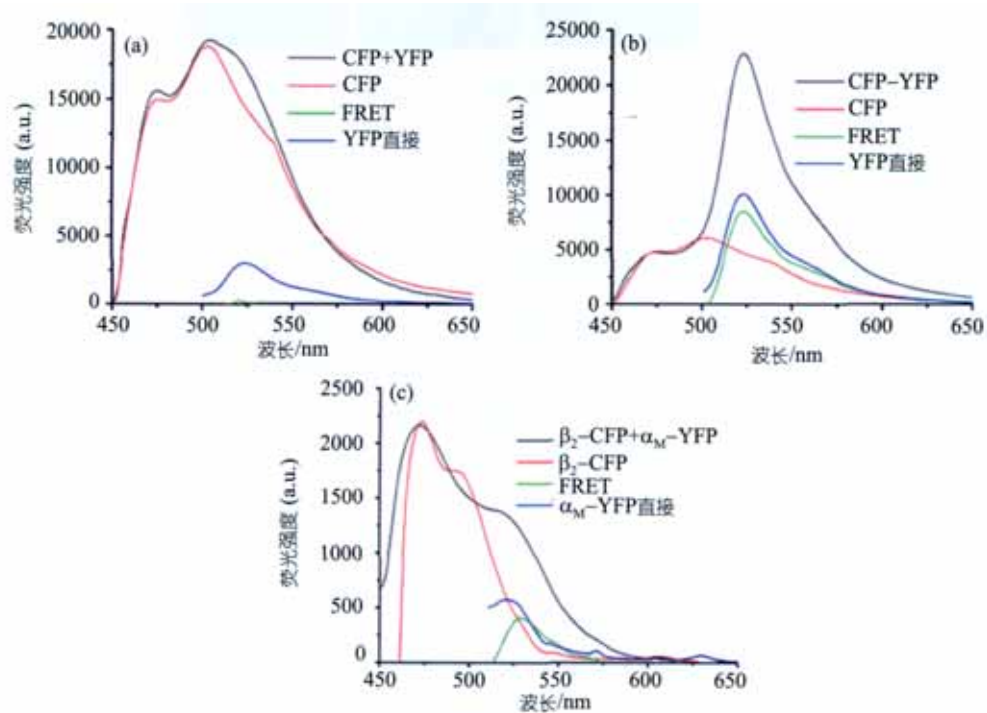
其中 $\varepsilon_{\text{YFP}}(440)$ 和 $\varepsilon_{\text{CFP}}(440)$ 分别为 440 nm 激发下 YFP 和 CFP 的摩尔激发系数, 这个比值取 0.094. 根据测量的有效 FRET 效率 E_{EFF} 以及能量转移效率与距离的六次方成反比的关系, 利用数学模拟的方法, 我们推算了 Mac-1 α 和 β 亚基之间的距离, 在 CHO 细胞内 Mac-1 α 和 β 亚基之间的距离为 6.42 nm, 在 HEK293T 细胞内这个距离为 6.72 nm.

2.2 活细胞内探测 Mac-1 α 亚基之间以及 β 亚基之间的关联

以往的研究提示整合素亚基之间的同源相互作用为整合素的活化提供驱动力, 而且这种同源的相互作用还可以诱导整合素的聚集. 然而, 对于整合素亚基之间是否存在同源相互作用仍然具有争议. 在这里, 我们利用 FRET 显微术和 FRET 光谱技术在活细胞内探测到了

图 8 三通道 FRET 显微镜成像^[45]

共表达 CFP 和 YFP, 或者 CFP-YFP, 或者 α_M -YFP 和 β_2 -CFP 或者 α_M -CFP 和 β_2 -YFP 的 CHO 细胞分别在 CFP 通道(左一列), YFP 通道(左二列)和 FRET 通道(左三列)成像。FRET^C 成像(右一列)用伪彩色表示, 红色示最强的 FRET 信号, 蓝色示没有 FRET 信号。颜色由蓝色到红色对应 FRET 由弱到强。CFP+YFP 为阴性对照样品, CFP-YFP 为阳性对照样品。标尺为 10 μm

图 9 利用 FRET 光谱技术探测 Mac-1 亚基之间的异源相互作用^[45]

(a) CHO 细胞共转染 CFP 和 YFP 质粒; (b) CHO 细胞转染 CFP-YFP 质粒; (c) CHO 细胞共转染 β_2 -CFP 和 α_M -YFP 质粒; 绿色实线示 FRET 信号

Mac-1 α 亚基之间以及 β 亚基之间的关联^[46], 见图 9. 进一步, 我们利用 FRET 成像的方法可视化了 Mac-1 α 亚基之间以及 β 亚基之间的关联, 见图 10.

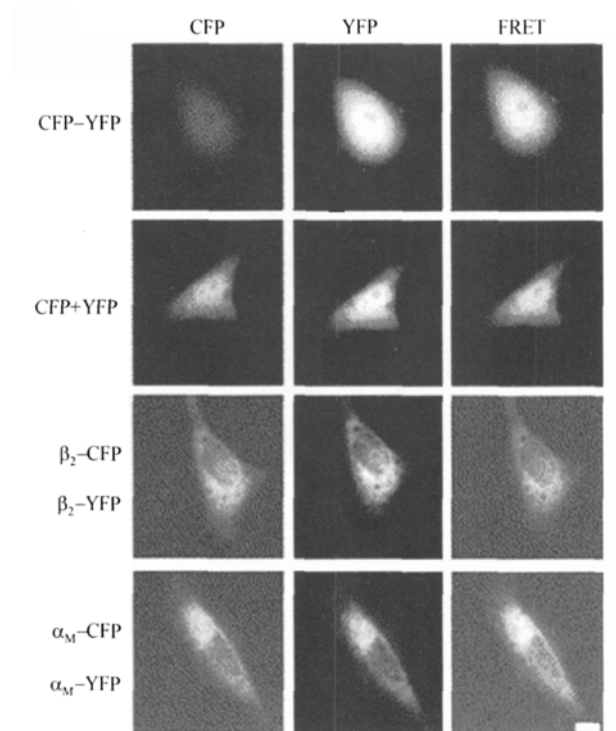


图 10 三通道 FRET 显微镜成像探测 Mac-1 α 亚基之间以及 β 亚基之间的关联^[46]

共表达 CFP 和 YFP, 或者 CFP-YFP, 或者 α_M -YFP 和 α_M -CFP 或者 β_2 -CFP 和 β_2 -YFP 的 CHO 细胞分别在 CFP 通道 (左一列), YFP 通道(左二列)和 FRET 通道(左三列)成像. 标尺为 10 μm

3 双光子荧光成像系统及其应用

3.1 基于飞秒激光光源的双光子荧光显微镜

随着高功率激光技术的发展, 各种非线性光学效应开始在光学成像领域得到广泛应用, 其中最具有代表性的就是双光子成像技术^[85,86]. 与普通光学显微成像中信号主要来自与样品的线性吸收系数和光学密度不同, 双光子成像的信号来源是高强度激光激发下物质本身的非线性光学效应. 由于非线性效应固有的空间局域特性, 双光子成像本身就具有空间滤波的效果. 它不仅解决了普通共焦成像中空间滤波小孔易堵、调节困难等问题, 而且在生物医学领域中, 红移的激发波长还可以极大地减少对样品的漂白损伤和增加成像的层析深度^[87,88]. 正因如此, 双光子激发共焦荧光成像技术已经在生物医学领域得到广泛应用. 图 11 为我们实验室主要利用国产元件建成的双光子荧光成像系统, 自行完成了包括系统设计、探测系统的调试、扫描系统的调试、光学和机械元件的设计、系统软件控制以及图像重组等.

与商用双光子显微镜相比, 我们的系统具有更大的开放性和灵活性, 可以实现多种成像模式的集成, 同时具有与商用系统相当的空间横向分辨率以及纵向层析能力. 为了克服双光子显微系统“零视场”的缺点(必须通过点扫描才能够成像), 我们在原有的双光子显微系统中设计并加入了定位系统, 如图 12. 它可以提供几百微米的视场. 这种定位系统比光学显微镜成品

更具有灵活性. 例如, 可以通过增加样品离焦量及调整目镜与镀铝全反镜的距离来增加视场, 不用考虑定位系统的分辨率随视场的增加而降低的问题. 而光学显微镜为了保证分辨率, 对应一种数值孔径的物镜只有一个确定的视场.

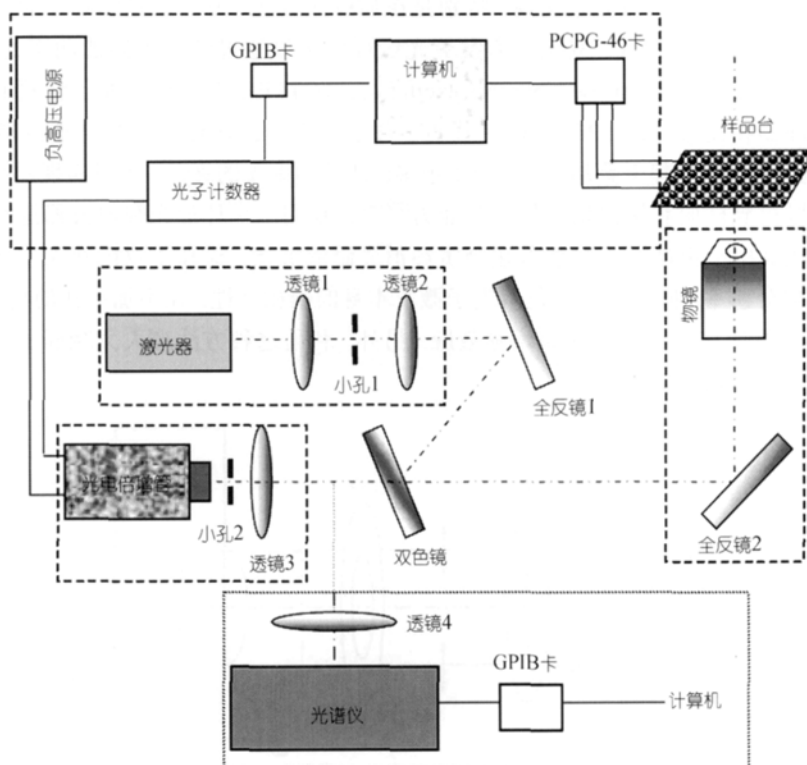


图 11 双光子荧光成像系统示意图

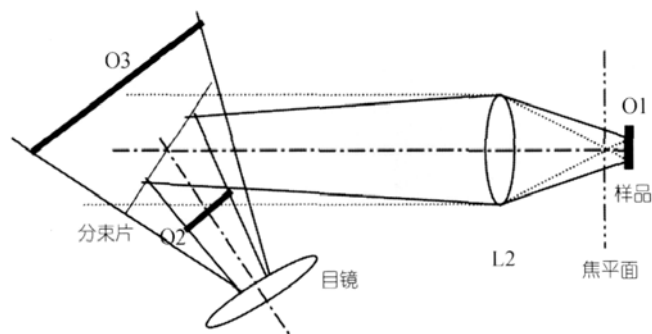


图 12 双光子成像中的定位系统

3.2 结合光学变迹术实现超分辨成像

所谓变迹术是指在光路中加入适当形式的光瞳滤波器, 改变光学系统出瞳的光分布(包括强度和位相), 从而在衍射像场平面上实现特定的零响应点分布, 其中第一零响应点的位置决定了系统的横向分辨能力. 我们实验室在利用光学变迹术实现远场超衍射极限分辨率成像方面做了大量的工作, 例如我们提出了利用单轴晶体制作可调节位相型光瞳滤波器, 通过调节

光瞳滤波器中单轴晶体区域与其他区域之间的位相差实现不同的超分辨效果, 见图 13; 我们提出在共焦系统中采用双 Toraldo 光瞳, 大大降低了单个光瞳滤波器的制作工艺难度^[34~36]. 尤其是我们首次提出了将超分辨技术应用于双色双光子激发荧光显微系统中^[37]. 我们知道, 多光子过程通常可以利用单激光来实现, 特别是在显微成像应用中. 但是实际中的多光子过程并不限于单光束激发的模式, 双光子激发荧光过程就可以通过波长不同的两束光激发实现, 即双色双光子激发(two color two photon excitation, TCTPE). 与单束双光子激发(two photon excitation, TPE)相比较, TCTPE 有以下优点: 背景更干净, 只有两束光交迭区域才能产生 TCTPE 荧光; 两束光非相干叠加, 旁瓣要小很多; 调节两束光的夹角, 可以实现对交迭区域大小控制; 可以得到横向和轴向均一的分辨能力^[89~91]. 我们结合环形光瞳滤波器进行了这方面的工作. 即在其中一束激发光路加入超分辨环形光瞳滤波器, 提高了双色双光子激发荧光显微系统的横向分辨率, 同时利用双色双光子激发本身的乘积特性, 在不加小孔的情况下, 有效地压制了超分辨所引起的横向旁瓣增强效应. 另外, 利用这种方法也大大减弱了通常横向超分辨所无法避免的轴向加宽效应.

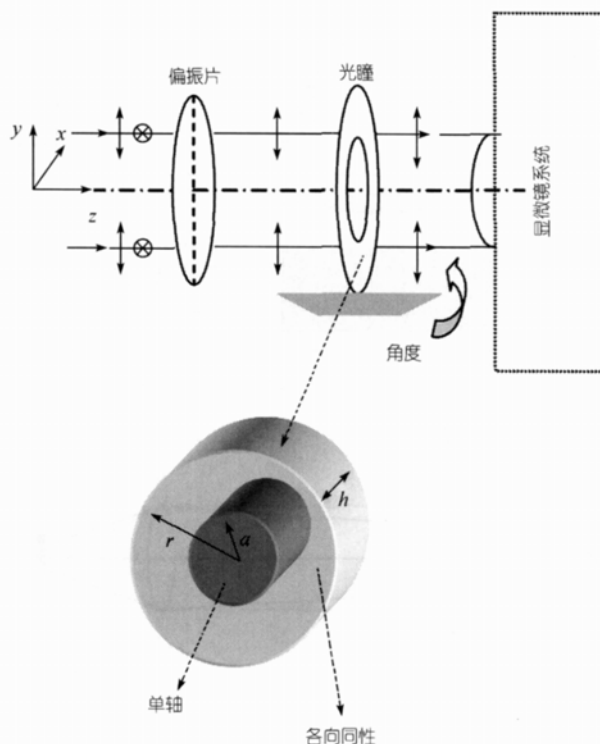


图 13 基于单轴晶体设计的可调节位相型光瞳滤波器^[38]

4 相干反斯托克斯 Raman 成像系统

单分子荧光和光谱学的发展使得在在体条件下检测到单个荧光分子成为现实, 这极大的推动了物理化学、生物学以及医学领域的发展. 但是荧光成像存在两个问题, 需要对样品进行荧光标记以及荧光探针对样品性质的影响. 因此, 在发展荧光成像方法的同时, 我们实验室也开展了对非标记光学成像方法的探索. 基于分子内部振动特性(红外光谱和 Raman 光谱)的成

像技术, 并且可以对生物样品进行组分分析, 而且可以对未标记样品直接进行成像, 是一种好的选择. 其中, 红外光谱探测成像技术由于较长的红外波长导致较低的空间分辨率, 以及水对红外的强吸收, 限制了其在活体细胞研究中的应用^[92]. 与红外光谱相比较, Raman 光谱技术具有以下几点优势^[93]: () 光谱频率的偏移使它可以很好的滤除激发光瑞利散射背景; () Raman 散射可以利用频率远大于分子震动频率的可见光激发, 并且 Raman 散射光一般也在可见光区域; () Raman 光谱具有高度的化学特异性. 对于显微成像应用, 这些优点的重要性不言而喻. 但是自发辐射的 Raman 信号很弱, 10^{10} 个入射光子穿过 $1\ \mu\text{m}$ 后的活性 Raman 介质才能产生一个 Raman 散射光子^[94]. 基于相干 Raman 效应的相干反斯托克斯 Raman 散射(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS)为解决这个问题提供了新的途径. 这种方法产生的振动信号的强度与激发光的强度成非线性关系, 具有很高的能量转换效率, 大约为 10^{-2} ^[95~97].

4.1 相干反斯托克斯 Raman 成像系统的研制

1982 年美国 Naval 实验室激光物理组的 Duncan 等人^[98]首次提出了将 CARS 过程应用于显微成像领域的设想, 开创了一种新的化学成像方法. 在 CARS 成像中, 时域和空域重叠的抽运光和斯托克斯光被高数值孔径的物镜紧紧聚焦到小于 $1\ \mu\text{m}^3$ 的体积内. 通过调节抽运光和斯托克斯光的频率差, 锁定特定的 Raman 振动能级, 快速扫描样品或者光束可以获得 CARS 图像^[99,100]. CARS 信号与激发光的三次方关系也进一步提高了 CARS 在三维成像时的定位能力. CARS 信号属于相干光, 具有很好的方向性, 增加了探测的灵敏度, 降低了对激发光强度的要求. CARS 信号频率的蓝移, 使其可以非常容易地与红移的荧光背景分离. 由于 CARS 成像是实际是抽运光和斯托克斯光的差频成像, 因此需要两束入射光, 现在常用的激发方式使用两束同步的皮秒可调谐激光器作为光源. 我们采用单脉冲激发的方法, 克服了双脉冲激发所需要的同步调节困难. 我们设计的 CARS 光谱和成像实验光路如图 14. 飞秒激光脉冲经过有色玻璃滤波片后滤除抽运光等杂散光的影响, 然后经过半反半透镜将其分为两束, 每一束光都经过光栅、柱面镜以及狭缝组成的脉冲整形装置进行选频, 得到需要的抽运光和斯托克斯光, 两束光经过二向色性片耦合到共焦扫描显微镜中激发样品, CARS 信号经过二向色性片和边值滤波片滤除激发光, 最后由探测器接收.

4.2 相干反斯托克斯 Raman 成像系统特性的分析

在建立了 CARS 光谱成像的基础上, 我们利用缓变振幅近似和菲涅耳衍射积分公式, 对 CARS 显微成像系统的成像特性进行了分析^[39,40]. 我们分析了不同数值孔径下 CARS 显微镜中信号前向角度分布情况, 见图 15(a). 发现随着物镜数值孔径的增大, 在更大的角度范围内存在 CARS 信号, 这是因为在大数值孔径情况下, 有更多的激发光线满足位相匹配条件的结果. 并且我们分析了不同形状的样品, CARS 信号的角度分布, 见图 15(b).

5 表面增强 Raman 光谱探测系统

另一种方法是利用光在纳米金属小球与 Raman 样品之间的等离子体共振增强效应, 实现 Raman 信号的增强. 这种技术称为表面增强 Raman 散射(surface enhancement Raman scattering, SERS), 它可以使 Raman 信号增强 10^{15} 倍以上^[101,102]. 表面增强 Raman 具有高的灵敏度, 自然环

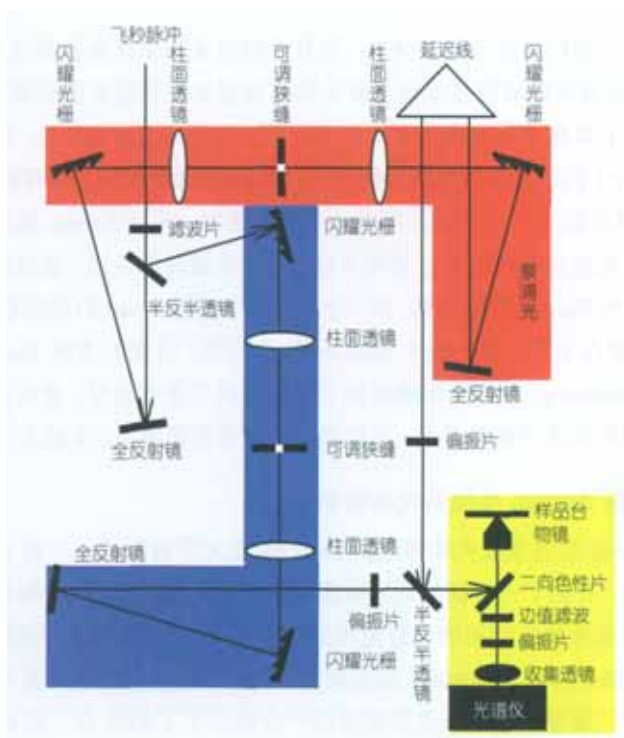
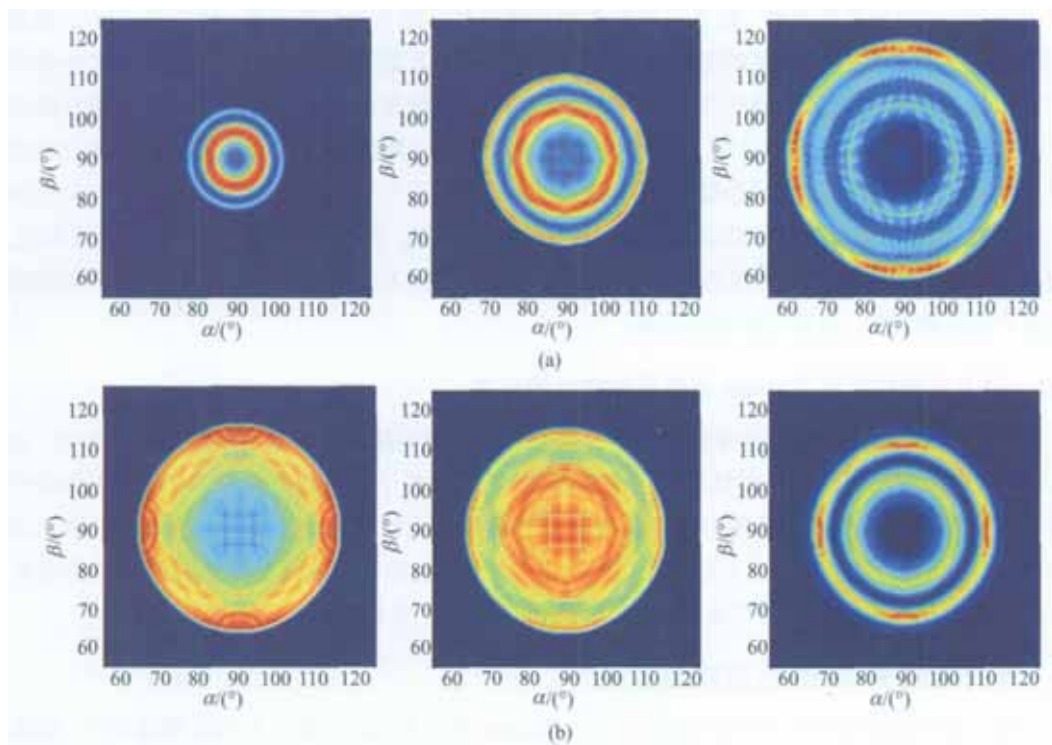


图 14 单束超短脉冲光激发实现 CARS 光路图

图 15 数值孔径分别为 0.2, 0.4 和 0.6 时前向 CARS 信号分布模拟图(a)及球状样品、盘状样品、棒状样品前向 CARS 信号分布模拟图(b)^[39]

α 为 CARS 与 x 轴的夹角; β 为 CARS 与 y 轴的夹角

境中检测, 易于分离信号等优点, 正在成为生命科学单分子、单细胞研究的强有力的探测技术. 我们实验室开展了表面增强 Raman 光谱及其在单分子探测中的应用研究. 利用表面增强 Raman 光谱技术对干燥银胶表面和液体环境中的单分子若丹明分子进行了探测, 图 16 为我们进行单分子表面增强 Raman 光谱检测的光路示意图.

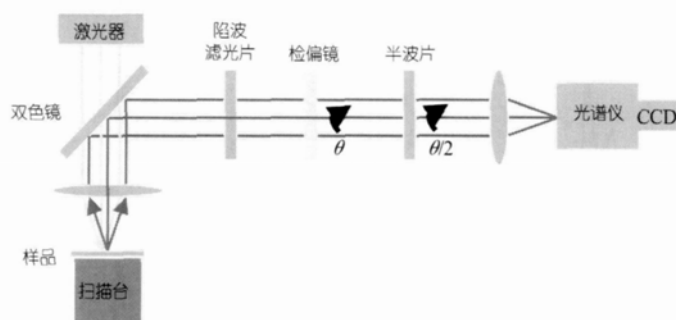


图 16 单分子表面增强 Raman 光谱检测光路

5.1 激发光的偏振态对表面增强 Raman 光谱偏振性的影响

激发光的偏振态对单分子 SERS 光谱的影响在单分子 Raman 光谱检测中是一个重要问题. 因为 Raman 光谱的空间偏振特性将取决于分子的极化率和激发光的偏振方向. 理论上说, 无论采用何种偏振态的激发光, 集团分子的 SERS 光谱应该都是非偏振的. 同时, 单分子的 SERS 光谱应该表现出空间偏振特性. 我们假设在激发焦斑内只存在 4 个分子, 且其取向随机. 当入射光为线偏振光时, 偶极矩与激发光偏振方向相同的分子将被激发出最强的 Raman 信号, 而其他取向的分子 Raman 信号较小, 偶极矩与激发光偏振方向垂直的分子的 Raman 信号最弱, 总的 Raman 信号在空间上呈现出不同的强度分布. 如果在后面的光路中用检偏器来测量 Raman 信号在不同偏振方向的强度, 得到的结果应该是 Raman 强度随检偏器的角度按余弦规律变化, 见图 17. 这意味着即使激发焦斑内存在多个分子, 采用线偏振光激发也会得到空间偏振化的 Raman 光谱, 这与单分子 Raman 光谱的空间偏振化类似, 不能由此判断单分子的存在. 与此相反, 当入射光为圆偏振时, 各个取向的分子得到均匀的激发, 产生的 Raman 光强在空间各方向的强度基本相同. 此时用检偏器来检测其空间分布, 得到的强度分布应该与检偏器的角度无关. 如果此时焦斑内仅存在单个分子, Raman 光谱强度将表现出明显的空间偏振特性. 因此我们提出在单分子检测中, 采用圆偏振光可以根据 Raman 光谱的空间偏振特性比线偏振光激发更有效区分集团分子与单分子^[41,42]. 并且在探测集团分子的 SERS 光谱时, 必须考虑到信号光偏振方向对检测结果的影响, 实验结果也证实了我们的设想.

5.2 液体环境中单分子的检测

液体环境中实现高灵敏度和分子特性的单分子检测具有更重要的科学与实际意义, 在许多领域都有重要的应用, 但其研究相对困难. 我们实验室首次成功实现了对液体环境下单个若丹明分子 SERS 光谱的探测^[47]. 在激发体积内平均存在 0.3 个若丹明 6G(R6G)分子的情况下, 对测量到的 SERS 光谱在 1645 cm^{-1} 处强度的统计分析表明激发体积内的分子数服从泊松分布, 呈现出峰值为 0, 1, 2 的分子“量子化”效应. 实验过程中我们还观察到 Raman 光谱强度的突然爆发, 其最大强度突然增强到 10 倍以上, 并伴随着 Raman 最大增益频率的红移. 我们将之命

名为巨增强 SERS 光谱, 见图 18, 并将其解释为: 在 R6G/银溶胶样品的存放过程中发生了轻微的凝聚, 导致个别 R6G 分子束缚于多个银团簇之间, 而这种结构是一种不稳定结构. 当其进入焦点后, 温度的升高将会引起这种团簇集合体空间的变化, 引起等离子体共振条件的改变. 在这过程中入射场与金属-分子系统有可能达到最佳共振状态然后越过这一状态, 吸附于其中的 R6G 分子的 Raman 光谱强度将会突然增大许多倍, 同时应该伴随着 Raman 信号最大增益频率

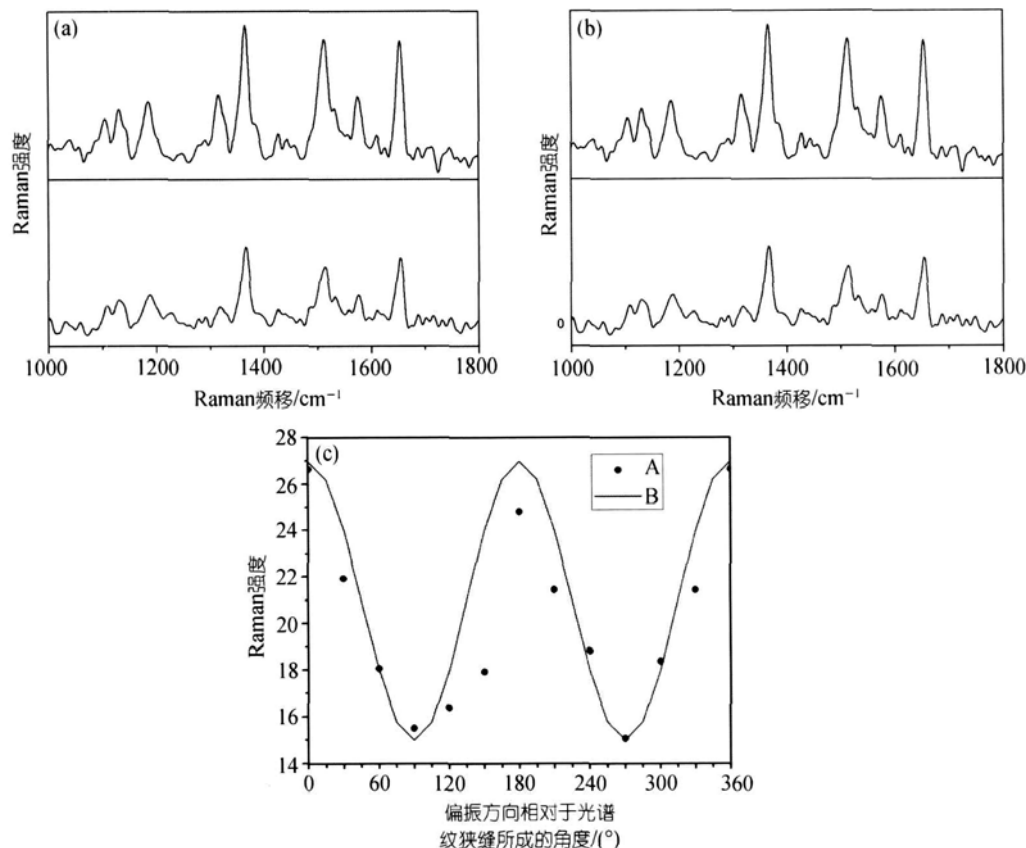


图 17 线偏振光(a)和圆偏振光(b)激发集团分子的偏振 Raman 光谱, 焦斑内平均存在的分子数约为 $10^3 \sim 10^4$ 量级; (c) 信号光偏振方向对检测结果的影响^[41]

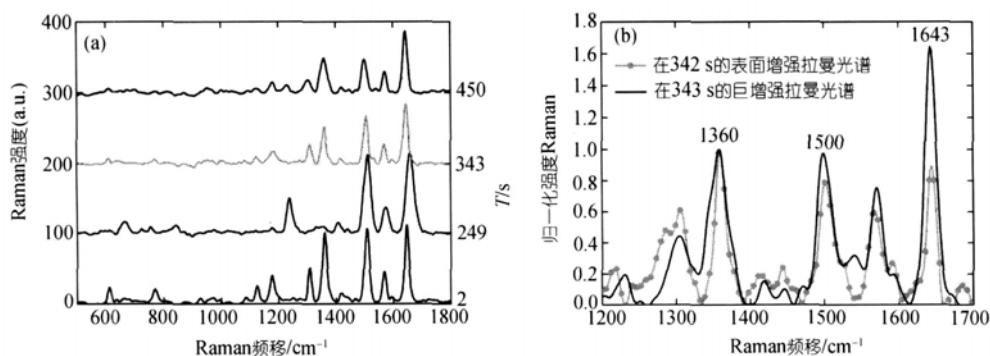


图 18

(a) 巨增强 SERS 在不同时刻呈现出的特征; (b) 长波方向的增强因子明显大于短波方向^[47]

的红移. 这是一个不可逆过程, 温度降低后也不能回到原来状态. 我们的研究为活体单分子水平上的探测奠定了基础.

6 结论

我们对活细胞内单分子探测的光学途径进行了深入研究, 得到了一系列结果. 我们建立了全内反射单分子荧光成像方法、荧光共振能量转移探测方法、双光子荧光探测方法、相干反斯托克斯 Raman 和表面增强 Raman 探测方法, 并对这些方法进行了重要的发展. 从应用角度出发, 我们在单分子水平上对活细胞内 Mac-1 亚基的相互作用、膜锚定蛋白的动力学进行了实时观测, 并实现了液体环境中单分子的 Raman 光谱探测. 这些都为在活细胞内研究生命活动的细节奠定了基础.

1993 年, Betzig 等人^[56]用近场扫描光学显微镜观测了单个 DiIc 分子, 开创了单分子探测的先河. 短短十四年间, 单分子光学探测从最初只能在体外检测单个固定分子, 逐渐发展为在室温下对活细胞内甚至细胞器内的单分子进行成像与操纵. 尤其是近十年来, 基于超短超强激发光源的非线性成像技术, 如双光子成像、Raman 成像以及新兴的受激辐射消耗成像技术 (stimulated emission depletion, STED)^[103~105]所带来的里程碑式的超分辨效果, 无疑给单分子探测带来了更广阔的发展机遇. 当然, 单分子光学探测依然面临着若干关键性问题. 单分子探测的最终目的是实现在复杂生物环境中单分子与其他分子相互作用过程的实时观测, 单个分子的大小只有 $\text{\AA}$ ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$) 到 nm 量级, 并且单个分子一直处于动态, 而且来自单个分子的信号是非常微弱的. 这就要求单分子光学探测技术不仅要克服高的空间和时间分辨率的困难, 同时还要克服探测灵敏度的问题^[106,107]. 目前依靠某种单一的光学成像技术还不能完全实现这些要求. 如 TIRFM 技术虽然能实现高的纵向分辨率和信噪比. 但是, 由于隐失场进入深度的限制, 无法实现深度三维成像. 表面增强 Raman 技术也可以实现高的灵敏度, 但由于这种方法需要样品与金属表面非常接近, 因此在无标记的情况下, 很难实现三维成像^[102]. 又如 STED 的空间分辨率已经大大超过衍射极限的限制, 可以达到数十纳米量级^[105], 但如何使分辨率进一步提高到 10 nm 以内仍是光学成像技术面临的巨大挑战. 双光子显微术在解决穿透问题上具有独特的优势^[108,109], 层析深度已经可以达到毫米级^[110], 同时成像速度也有大幅提高, 从最初的得到一组三维图像需要数十分钟到现在已经实现视频成像^[111]. 国内在改进双光子成像技术方面也做了很好的尝试, 如通过在双光子扫描光路中加入单个棱镜来同时补偿飞秒激光通过声光调制器后空间和时间的色散, 从而有效地增强了双光子荧光信号^[112]. 采用特殊设计的条纹相机, 用梳状小孔阵列代替传统条纹相机光电阴极前的狭缝实现了双光子荧光过程的时间和光谱特性的同时测量^[113]. 进一步提高穿透深度和成像速度仍将是非线性扫描成像孜孜以求的目标. 多种光学探测方法的联合应用将有可能为单分子探测提供更完善的解决方案.

单分子探测的发展已经开创了生命科学的新纪元. 如我们所知, 无脊椎动物和脊椎动物 (包括人) 的基因组 DNA 测序工作完成后, 生物学研究已经跨入后基因组时代. 在这个时代, 科学家们更倾向于结构决定功能的概念, 而且以此为基础来理解蛋白本身的动力学及其相互作用. 单分子探测, 尤其是光学探测手段的出现, 为直接实时监测蛋白质及生物大分子的动力学改变提供了强大的工具. 现在 SMD 已经扩展到包括分子马达、DNA 测序^[114~117]、酶促反应^[118,119]、蛋白质折叠^[120]等在内的更广阔的生物科学研究领域. 最近 7 年, 单分子研究在活细胞内的应用更是取得了长足的发展. 2000 年, 日本大阪大学的研究人员利用全内反射荧光显微

术首次在活体细胞内实现了单分子水平的表面生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)蛋白和其配体蛋白相互作用的视觉(Visualization)研究^[22]。2001 年,德国科学家 Seisenberger 和他的同事们采用全场相衬成像和荧光成像相结合的探测模式,在单分子水平实时观测了腺伴随病毒(Adeno-associated virus, AAV)侵入海拉(Hela)细胞的全过程^[21],为抗病毒药物的研制和基因治疗载体的研究提供了强有力的工具,成为单分子活细胞研究的里程碑。随后,德国威廉大学的研究小组观察到细胞核内的单个蛋白分子的运动^[22]。日本名古屋大学的 Lino 等人^[23]研究了细胞表面单个黏附蛋白的动力学。最近,日本九州大学的 Murakoshi 小组报道了在单分子级对小 G 蛋白 Ras 的研究^[24],在单分子水平上揭示了 Ras 蛋白和它的效应分子、折叠蛋白之间的相互作用,以及在特殊域的定位,为理解活化后的信号转导机制提供了重要信息。这些大大推进了我们在全新的高度上理解生命活动本质的研究。我们有理由相信单分子检测时代已经到来,它必然会成为未来生物学研究的主流技术和最重要的研究领域之一。

致谢 作者由衷感谢上海第二军医大学陈宜张院士和何成教授对本文工作的支持,特别感谢中国科学院上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室的程亚研究员阅读全文并提出宝贵意见。

参 考 文 献

- 1 Breakthrough of the year. *Science* (special issue), 2003, 302(5653): 2017—2172
- 2 Nie S, Zare R N. Optical detection of single molecules. *Annu Rev Biomol Struct*, 1997, 26: 567—596
- 3 Xie X S, Jay T. Optical studies of single molecules at room temperature. *Annu Rev Phys Chem*, 1998, 49: 441—480
- 4 白春礼, 苏明. 单分子化学与物理. *世界科技研究与发展*, 1999, 21: 12—14
- 5 Xue Q, Yeung E S. Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme. *Nature*, 1995, 373: 681—683
- 6 Craig D B, Arriaga E, Wong J C Y. Studies on single alkaline phosphatase molecules. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(22): 5245—5253
- 7 Zwanzig R. Rate processes with dynamical disorder. *Acc Chem Res*, 1990, 23: 148—152
- 8 Ishijima A, Yanagida T. Single molecule nanobioscience. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26: 438—444
- 9 Uppenbrink J, Clery D. Frontiers in Chemistry: Single molecule. *Science*, 1999, 283(2): 1667—1695
- 10 Binnig G, Rohrer H, Gerber C H. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett*, 1982, 49: 57—61
- 11 Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930—933
- 12 Binnig G, Quate C F. Scanning tunneling microscopy: From birth to adolescence. *Rev Mod Phys*, 1987, 59: 612—615
- 13 Hansma P K, Hoh J H. Biomolecular imaging with the atomic force microscopy: Application to biology and technology. *Science*, 1988, 242: 209—216
- 14 Radmacher M, Tillmann R W, Fritz M, et al. From molecules to cells: Imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, 1992, 257: 1900—1905
- 15 Martin Y, Abraham D W, Wickramasinghe H K. High-resolution capacitance measurement and potentiometry by force. *Appl Phys Lett*, 1988, 52(13): 1103—1105
- 16 Prater C B, Hansma P K, Tortonese M, et al. Improved scanning ion-conductance microscope using microfabricated probes. *Rev Sci Instrum*, 1991, 62: 2634—2638
- 17 Fan F-R F, Bard A J. Electrochemical detection of single molecules. *Science*, 1995, 267: 871—874
- 18 Collinson M M, Wightman R M. Observation of individual chemical reactions in solution. *Science*, 1995, 268: 1883—1885
- 19 Orwar O, Jarmark K, Jacobson I. Patch-clamp detection of neurotransmitters in capillary electrophoresis. *Science*, 1996, 272: 1779—1782
- 20 Dickson R M, Norris D J, Tzeng Y L. Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels. *Science*, 1996, 274: 966—968
- 21 Xu X H, Yeung E S. Direct measurement of single-molecule diffusion and photodecomposition in free solution. *Science*,

- 1997, 265: 1106—1109
- 22 Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. Single molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 168—172
- 23 Molloy J E, Burns J E, Kendrick-Jones J. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*, 1995, 378: 209—212
- 24 Vale R D, Funatsu D T, Pierce D W, et al. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature*, 1996, 380: 451—453
- 25 Pierce D W, Hom-Booher N, Vale R D. Imaging individual green fluorescent proteins. *Nature*, 1997, 388: 338
- 26 Kitamura K, Tokunaga M, Iwane A H. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres. *Nature*, 1999, 397: 129—134
- 27 Yildiz A, Forkey J P, McKinney S A. Myosin V walks hand-over-hand single fluorophore imaging with 1.5 nm location. *Science*, 2003, 300: 2061—2065
- 28 Weiss S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 1999, 283: 1676—1683
- 29 Wang C, Yuan J H, Wang G Y, et al. The influence of polarized light on fluorescence emission in total internal reflection microscopy. *Acta Phys Sin*, 2003, 52: 3014—3018
- 30 Wang C, Liu L, Wang G Y, et al. A new method to determine the dipole moment orientation of single fluorophore. *Chin Phys Lett*, 2004, 25: 843—845
- 31 Wang C, Wang G Y, Xu Z Z. The application of total internal reflection fluorescence microscopy in single fluorophore molecules axial imaging. *Acta Phys Sin*, 2004, 53: 1325—1330
- 32 王琛, 刘力, 王桂英, 等. 膜蛋白相互作用的光学探测方法. 中国专利受理号, 200510111594.4
- 33 刘力, 王金媛, 付国, 等. 荧光量子点三维取向的探测方法. 中国专利受理号, 200610119332.7
- 34 Xiao F R, Yuan J H, Wang G Y, et al. Tunable phase-only optical filters with uniaxial crystal. *Appl Opt*, 2004, 43: 3415—3419
- 35 Xiao F R, Yuan J H, Wang G Y, et al. Factors in the design of optical super-resolving filters. *Chin Phys Lett*, 2004, 21: 70—72
- 36 Xiao F R, Yuan J H, Wang G Y, et al. A confocal system with two Toraldo pupil filters. *Acta Phys Sin*, 2004, 53: 1731—1734
- 37 Xiao F R, Wang G Y, Xu Z Z. Superresolution in two-color excitation fluorescence microscopy. *Opt Commun*, 2003, 228: 225—230
- 38 肖繁荣, 王桂英, 徐至展. 可调节位相型光瞳滤波器及其制作方法. 中国专利受理号, 031415229
- 39 Yuan J H, Xiao F R, Wang G Y, et al. The intensity distributions of collected signals in anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Colloid Surf A*, 2005, 525: 257—258
- 40 Yuan J H, Xiao F R, Wang G Y, et al. The imaging properties of coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscope. *Chin Phys*, 2005, 14: 935—941
- 41 Zhou Z H, Xiao F R, Wang G Y, et al. Probing single-molecule by surface-enhanced resonance Raman scattering with linearly and circularly polarized laser. *Opt Commun*, 2005, 251: 209—215
- 42 Zhou Z H, Liu L, Wang G Y, et al. Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy of single R6G molecules. *Chin Physics*, 2006, 15: 126—131
- 43 Wang J Y, Fu G, Wang C, et al. Single dye molecules observed by total internal reflection fluorescence microscopy. In: *SPIE Proceeding 5th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine*. Russia: SPIE, 2006. 6534: 42
- 44 Wang C, Wang J Y, Fu G, et al. Detect motion of green fluorescence proteins within living cell. In: *SPIE Proceeding 5th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine*. Russia: SPIE, 2006. 6534: 39
- 45 Fu G, Yang H Y, Wang C, et al. Detection of constitutive heterodimerization of the integrin Mac-1 subunits by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 847—852
- 46 Fu G, Wang C, Wang G Y, et al. Detection of constitutive homomeric associations of the integrins Mac-1 subunits by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346: 986—991
- 47 Zhou Z H, Wang G Y, Xu Z Z. Single molecule detection in liquid by surface enhanced resonance Raman scattering. *Appl Phys Letts*, 2006, 88: 034104
- 48 Born M, Wolf E. *Principles of Optics*. Cambridge: Cambridge University Press, 1955

- 49 Toomre D, manstein D J. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 298—303
- 50 Funatsu T, Yoshie H, Higuchi H. Imaging and nano-manipulation of single bio-molecules. *Biophys Chem*, 1997, 68: 63—72
- 51 Suzuki Y, Tani T, Sutoh K. Imaging of the fluorescence spectrum of a single fluorescent molecule by prism-based spectroscopy. *FEBS Lett*, 2002, 512: 235—239
- 52 Tokunaga M, Kitamura K, Saito K. 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
- 53 Reichert W M, Truskey G A. Total internal reflection fluorescence microscopy. *J Cell Sci*, 1990, 96: 219—230
- 54 Sund S E, Swanson J A, Axelrod D. Cell membrane orientation visualized by polarized total internal reflection fluorescence. *Biophys J*, 1999, 77: 2266—2283
- 55 Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2001, 2: 764—774
- 56 Betzig E, Chichester R J. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science*, 1993, 262: 1422—1425
- 57 Dickson R M, Norris D J, Moerner W E. Simultaneous imaging of individual molecules aligned both parallel and perpendicular to the optic axis. *Phys Rev Lett*, 1998, 81: 5322—5325
- 58 Sick B, Hecht B, Novotony L. Orientational imaging of single molecules by annular illumination. *Phys Rev Lett*, 2000, 85: 4482—4485
- 59 Bohmer M, Enderlein J. Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy. *J Opt Soc Am B*, 2003, 20: 554—558
- 60 Novotony L, Beversluis M R, Youngworth K S. Longitudinal field modes probed by single molecules. *Phys Rev Lett*, 2001, 86: 5251—5254
- 61 Prummer M, Sick B, Hecht B. Three-dimensional optical polarization tomography of single molecules. *J Chem Phys*, 2003, 118: 9824—9829
- 62 Vacha M, Kotani M. Three-dimansional orientation of single molecules observed by far- and near-field fluorescence microscopy. *J Chem Phys*, 2004, 118: 5279—5282
- 63 Michalet X, Weiss S. Single-molecule spectroscopy and microscopy. *Compt Rend Phys*, 2002, 3: 617—644
- 64 Forkey J N, Quinlan M E, Goldman Y E. Protein Structural dynamics by single-molecule fluorescence polarization. *Prog Biophys Mol Biol*, 2000, 74: 1—35
- 65 Alexlrod R. Observing secretory granules with a multiangle evanescent wave microscope. *Biophys J*, 2000, 78: 2641—2654
- 66 Loerke D, Stuehmer W, Oheim M. Quantifying axial secretory-granule motion with variable-angle evanescent-field excitation. *J Neurosci Meth*, 2002, 119: 65—73
- 67 Burmeister J S, Truskey G A, Reichert W M. Quantitative analysis of variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM) of cell/substrate contacts. *J Microsc*, 1994, 173: 39—51
- 68 Olveczky B P, Periasamy N, Verkman A S. Mapping fluorophore distribution in three-dimensions by quantitate multiple angle total internal reflection fluorescence micsocopy. *Biophys J*, 1997, 73: 2836—2847
- 69 Loerke D, Preitz B, Sthmer W. Super-resolution measurement with evanescent-wave fluorescence excitation using variable beam incident. *J Biomed Opt*, 2000, 5: 23—30
- 70 Jia Y W, Sytnik A, Li L Q. Nonexponential kinetics of a single tRNAPhe molecule under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 7932—7936
- 71 Ha T, Laurence T A, Chemla D S. Polarization spectroscopy of single fluorescent molecules. *J Phys Chem B*, 1999, 103: 6839—6850
- 72 Biju V, Yamauchi M, Ishikawa M. Distribution of single molecules in polymer thin films. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 2001, 140: 237—241
- 73 Weber M A, Stracke F, Meixner A J. Dynamics of single dye molecules observed by confocal imaging and spectroscopy. *Cytometry*, 1999, 36: 217—223
- 74 Lommerse P H M, Blab G A, Cognet L. Single-molecule imaging of the H-Ras membrane-anchor reveal domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. *Biophys J*, 2004, 86: 609—616
- 75 Yasushi S. Imaging single molecules in living cells for systems biology. *Mol Syst Biol*, 2006, 1: 1—6
- 76 Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. Single molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 168—172

- 77 Jares-Erijman E A, Jovin T M. FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1387—1395
- 78 Gadella T W J, Jovin T M, Clegg R M. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophys Chem*, 1993, 48: 221—239
- 79 Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*, 1978, 47: 819—846
- 80 Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan. *Aeq J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223—239
- 81 Gordon G W, Berry G, Liang X H, et al. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J*, 1998, 74: 2702—2713
- 82 Sorkin A, McClure M, Huang F, et al. Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Biol*, 2000, 10: 1395—1398
- 83 Erickson M G, Alseikhan B A, Peterson B Z, et al. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca^{2+} channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron*, 2001, 31: 973—985
- 84 Qiu S, Hua Y L, Yang F, et al. Subunit assembly of N-methyl-D-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 2005, 280: 42923—42930
- 85 Davidovitz P, Egger M D. Scanning laser microscope. *Nature*, 1969, 223: 83
- 86 Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1997, 248: 73—76
- 87 Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth*, 2005, 2: 932—940
- 88 Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1369—1377
- 89 Gryczynski I, Malak H, Lakowicz J R. Two-color two-photon excitation of indole. *Biospectroscopy*, 1997, 3: 97—101
- 90 Lindek S, Stelzer E. Resolution improvement by nonconfocal theta microscopy. *Opt Lett*, 1999, 24: 1505—1507
- 91 Chen J F, Midorikawa K. Two-color two-photon 4Pi fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 2004, 29: 1354—1356
- 92 Humecki H J. Practical Guide to Infrared and Microspectroscopy, Vol. 19 of Practical Spectroscopy. In: Brame J E G, ed. New York: Academic Press, 1995
- 93 Turrell G, Corset J. Raman Microscopy Development and Applications. San Diego: Academic Press, 1996. 30—52
- 94 Sijtsma N M, Wouters S D, de Grauw C J, et al. Confocal direct imaging Raman microscope: Design and applications in biology. *Appl Spectrosc*, 1998, 52: 348—355
- 95 Eric O P, Xie X S. CARS microscopy for biology and medicine. *Opt Photonics News*, 2004, 11: 40—45
- 96 Cheng J X, Volkmer A, Xie X S. Theoretical and experimental characterization of coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Opt Soc Am B*, 2002, 19: 1362—1375
- 97 Cheng J X, Book L D, Xie X S. Polarization coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Opt Lett*, 2001, 26: 1341—1343
- 98 Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J. Scanning coherent anti-stokes Raman microscope. *Opt Lett*, 1982, 7: 350—352
- 99 Volkmer A, Cheng J X, Xie X S. Vibrational imaging with high sensitivity via epidected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Phys Rev Lett*, 2001, 87(2): 0239011
- 100 Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes Raman scattering. *Phys Rev Lett*, 1999, 82: 4142—4144
- 101 Nie S, Emory S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, 1997, 275: 1102—1106
- 102 Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, et al. Molecule Raman scattering. *Appl Spectrosc*, 2006, 60(12): 322A—334A
- 103 Westphal V, Kastrup L, Hell S W. Lateral resolution of 28nm($\lambda/25$) in far-field fluorescence microscopy. *Appl Phys B*, 2003, 77: 377—380
- 104 Willig K Z, Rizzoli S O, Westphal V, et al. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 2006, 440: 935—939
- 105 Westphal V, Hell S W. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Phys Rev Lett*, 2005, 94: 143903
- 106 Scott E F. Crystal gazing in optical microscopy. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1272—1273
- 107 陈宜张, 林其谁. 生命科学中的单分子行为及细胞内实时检测. 北京: 科学出版社, 2005
- 108 Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1369—1377
- 109 Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth*, 2005, 2: 932—940

- 110 Theer P, Hasan M T, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microns in living brains by use of a $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ regenerative amplifier. *Opt Lett*, 2003, 28: 1022—1024
- 111 Fan G Y, Fujisaki H, Miyawaki A. Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with cameleons. *Biophys J*, 1999, 76: 2412—2415
- 112 Zeng S Q, Lv X H, Zhan C. Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism. *Opt Lett*, 2006, 31: 1091—1093
- 113 Qu J L, Liu X, Chen D N. Temporally and spectrally resolved sampling imaging with a specially designed streak camera. *Opt Lett*, 2006, 31: 368—370
- 114 Franca L T, Carrilho E, Kist T B. A review of DNA sequencing techniques. *Quart Rev Biophys*, 2002, 35: 169—200
- 115 Bianco P R, Brewer L R, Corzett M. Processive translocation and DNA unwinding by individual RecBCD enzyme molecules. *Nature*, 2001, 409: 374—378
- 116 Dohoney K M, Gelles J. χ -Sequence recognition and DNA translocation by single RecBCD helicase/nuclease molecules. *Nature*, 2001, 409: 370—374
- 117 Ha T, Rasnik I, Cheng W. Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coli Rep helicase. *Nature*, 2002, 419: 638—641
- 118 Lu H P, Xun L, Xie X S. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 1998, 282: 1877—1882
- 119 Edman L, Rigler R. Memory landscapes of single-enzyme molecules. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 8266—8271
- 120 Zhuang X, Bartley I E, Babcock H P. A single-molecule study of RNA catalysis and folding. *Science*, 2000, 288: 2048—2051
- 121 Seisenberg G, Ried M U, Endress T. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an Adeno-associated virus. *Science*, 2001, 294: 1929—1932
- 122 Kues T, Peters R, Kubitscheck U. Visualization and tracking of single protein molecules in the cell nucleus. *Biophys J*, 2001, 80: 2954—2967
- 123 Lino R, Koyama L, Kusumi A, et al. Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys J*, 2001, 80: 2267—2277
- 124 Murakoshi H, Lino R, Kobayashi T, et al. Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 7317—7322