



聚乙二醇单分子的界面扩散: 荧光关联光谱与单分子轨迹追踪测量的一致性

李卓^{1,2}, 陈阔^{1,2}, 侯天昊^{1,2}, 杨京法^{1,2}, 赵江^{1,2*}

1. 北京分子科学国家研究中心, 中国科学院化学研究所, 北京 100190

2. 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: jzhao@iccas.ac.cn

收稿日期: 2022-12-28; 接受日期: 2023-02-10; 网络版发表日期: 2023-03-15

国家自然科学基金(编号: 21833012)资助项目

摘要 高分子界面的扩散运动在决定体系流变学性质、界面化学反应速率、相分离及其动力学、生物功能与信号传导等方面发挥着关键作用, 因而, 有效、准确地测量界面处单个高分子的扩散运动具有十分重要的意义. 本文以荧光关联光谱、单分子荧光轨迹追踪技术为手段, 以吸附于固液界面的聚乙二醇(PEO)分子为模型体系, 对上述两种研究方法进行了详细的比较. 结果表明, 虽然两种方法原理不同, 覆盖的时间窗口不同, 测量空间范围不同, 但是在合适的测量时间窗口内对理想界面(水/硅烷化单晶薄膜的界面)处的PEO单分子扩散运动进行测量, 获得了一致的扩散系数结果, 表明了两种研究方法对理想界面处单分子扩散测量的准确性与可靠性.

关键词 界面扩散, 荧光关联光谱, 单分子轨迹追踪, 关联函数, 方均位移

1 引言

自然界中表面与界面是最为普遍存在的形态与现象, 众多物质、结构、过程、功能都与表面相关^[1]. 与此同时, 表面高分子的性质是高分子物理领域的重要课题, 其中的物理原理将帮助我们认识与理解诸多重要的自然现象、工业过程, 能够帮助我们设计与制造新材料, 发展新原理, 发明新技术^[2]. 在过去几十年中, 关于表面高分子的研究一直吸引着大量的研究力量. 由于热激发的存在, 处于表面的分子时时刻刻都在进行着运动, 包括平动、转动、振动等运动模式. 在多重动态模式并存的动力学过程中, 高分子

的平动扩散运动被视为其最初级的动力学过程, 因此, 关于表面高分子单链扩散运动的研究对于揭示重要的表面现象与过程具有十分重要的意义, 如高分子流变学、相分离动力学、界面反应动力学、生物功能及信号传导等^[3].

关于表面高分子动力学的研究一直备受关注, 人们试图以各种可能的方法开展相关的研究^[4]. 然而, 表面单分子扩散运动的观察与测量颇具难度, 传统的研究方法缺乏足够高的灵敏度与信噪比, 因而难以准确地捕捉表面单分子的信息^[5]. 目前, 能够有效、无扰地测量表面单个高分子扩散运动的有效方法主要以单分子荧光显微与光谱方法为主, 其中包含两个重

引用格式: Li Z, Chen K, Hou T, Yang J, Zhao J. Interfacial diffusion of single polyethylene oxide molecules: the consistency between fluorescence correlation spectroscopy and single molecule fluorescence tracking. *Sci Sin Chim*, 2023, 53: 762–767, doi: [10.1360/SSC-2022-0249](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0249)

要方法: 荧光关联光谱^[6-8]和单分子轨迹追踪^[9-11]. 荧光关联光谱方法利用涨落统计光谱原理, 以共聚焦显微技术为基础, 在单光子计数的灵敏度下, 获取扩散运动所导致的共聚焦空间中的荧光信号涨落, 进而获取其关联函数, 并通过对其进行数值拟合而获得被测量分子的扩散系数及平均浓度. 单分子荧光轨迹追踪方法以单分子荧光显微成像技术为基础, 通过高灵敏的影像摄取而测量单个分子的空间位置, 实现对单个分子的运动轨迹及其随时间的演变, 进而获得其扩散系数的数值.

由于测量原理及软硬件的差别, 荧光关联光谱与单分子轨迹追踪技术各有特点, 其适合测量的体系与时间窗口也不尽相同. 荧光关联光谱采用激光共聚焦技术, 将采样测量空间定位于被测量区域, 能够测量不同维度的扩散运动与定向运动. 同时由于其具备单光子计数的探测能力, 因而拥有很高的灵敏度与时间分辨率^[12]. 单分子轨迹追踪方法则基于显微成像技术, 能够直观、准确地记录单个分子的坐标与运动轨迹. 由于该技术要求对被研究区域进行单分子级别的大范围成像, 对微弱光信号的面探测技术具有较高要求, 因而其时间分辨率决定于探测技术水平, 而目前的技术则决定该方法适合于测量相对较慢的扩散运动^[13]. 正是由于原理及方法上的巨大差别, 人们对于这两种方法测量数据的彼此认可度一直未能有明确的结论, 而且还存在着不少争论. 例如, 有研究人员认为在荧光关联光谱的测量中可能包含着界面分子吸附与脱附的过程而非理想的平动扩散^[14]; 有研究人员认为由于成像速度的影响, 单分子轨迹追踪测量的是慢速运动的分子而忽略了在理想表界面处进行高速扩散运动的分子: 这些分子由于处于不存在缺陷、近乎理想的表界面, 其扩散运动速率超越了单分子荧光成像技术的时间分辨率^[15].

基于两种研究方法的差异以及相关争论的存在, 同时鉴于二者在测量表界面扩散运动中的重要性, 有必要对这一议题进行研究与论证. 如果能够设计与制备合适的研究体系, 使得两种研究方法能够进行同步测量从而实现有效的比较, 无疑具有重要的意义与价值. 这样的研究不仅能够澄清人们关于二者之间的误解, 更重要的是能够帮助研究人员有效地采用合适的研究方法, 准确客观地实施测量.

基于这一出发点, 本文以疏水硅烷分子自组装薄

膜覆盖的二氧化硅平面为表面, 以聚乙二醇(PEO)为被测量模型分子, 分别采用荧光关联光谱和单分子荧光轨迹追踪技术, 对吸附于水与上述薄膜界面的单个PEO分子的平动扩散运动进行测量与研究, 有效地比较了两种研究方法在测量表界面分子扩散运动的异同.

2 实验部分

实验采用被十八烷基三乙氧基硅烷(OTE)分子自组装单分子膜覆盖的熔融石英作为表面, 以荧光标记的PEO分子为模型体系, 分别采用荧光关联光谱与单分子轨迹追踪技术, 测量从水溶液中吸附于水/OTE界面的PEO分子的横向界面扩散运动.

2.1 试剂与仪器

OTE购自美国Alfa Aesar公司, PEO购自美国Nanocs公司, 其分子量分别为 10×10^3 与 40×10^3 g/mol, 其 M_w/M_n 值介于1.03与1.07之间. 活性荧光分子Alexa 647购自美国ThermoFisher公司, 熔融石英基片购自美国ESCO Products公司, 去离子水(18.2 M Ω cm)由美国Milli-Q纯水仪制备.

Langmuir-Blodgett (LB)制膜机为瑞典的KSV NIMA, 原子力显微镜为美国布鲁克公司的Multimode 8, 荧光关联光谱实验装置为基于德国Karl Zeiss公司的LSM780激光扫描共聚焦显微镜, 使用其40倍水浸物镜(数值孔径为1.2), 以633 nm激光作为激发光源. 在实验中, 通过使用已知扩散系数及浓度(Alexa 647, 在25 $^{\circ}$ C条件下, 扩散系数为 $330 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 配制得到的浓度为 5.0×10^{-9} mol/L)的标准样品进行校准, 测量得到其共聚焦空间的横向半径约为 $0.28 \mu\text{m}$, 纵向半高度约为 $1.46 \mu\text{m}$. 单分子荧光成像及轨迹追踪实验装置为自行搭建, 使用日本奥林巴斯IX-71显微镜为平台, 使用100倍油浸物镜(数值孔径为1.49), 以639 nm固体激光为激发光源, 采用全内反射模式实现激发与成像, 图像由EMCCD相机收集与记录(英国Oxford Instruments, iXon Ultra)^[16].

2.2 实验方法

OTE单分子自组装薄膜采用LB膜方法制备^[17]. 在实验中, OTE及其溶剂氯仿均经过减压蒸馏纯化, 随后

配制浓度为2.0 mg/mL的溶液. 将20 μL 溶液滴加在LB制膜机的液相(pH值为2.0的稀硝酸)表面, 滴加溶液的体积根据LB制膜机液槽面积计算得到. 静置30 min, 使得滴加溶液中的溶剂挥发完毕且硅烷化试剂充分水解, 之后驱动LB制膜机的横梁, 使得体系的表面压达到 $26.0 \times 10^{-3} \text{ N/m}$, 并在维持该表面压的条件下, 将液相表面的单分子薄膜(Langmuir膜)转移至固态石英基片上. 之后将基片置于 120°C 的真空中退火处理10 h^[18]. PEO的荧光标记通过将活性荧光分子Alexa 647与PEO分子链末端的活性基团反应而实现, 反应完成后, 通过体积排阻层析柱进行提纯^[19].

为了实现PEO在水/OTE界面的吸附, 首先配制浓度为 10^{-10} mol/L 的PEO稀薄溶液, 随后将其滴加于被OTE单分子薄膜覆盖的基片表面, 在 20°C 静置12 h后再进行去离子水交换, 以去除溶液中残留的PEO分子. 随后样品被放置于显微镜样品台上, 通过仔细调节物镜的位置而确保其焦点与样品界面重合, 或确保显微成像的激发光与焦平面都与界面重合. 单分子荧光成像实验的时间分辨率为50 ms/帧, 拍摄长度约为300~400帧, 图像分析及轨迹追踪采用IDL语言编写的程序^[20].

3 结果与讨论

采用LB膜技术制备并经退火稳定后的OTE单分子薄膜的平均厚度为2.1 nm, 其表面形貌如图1所示. OTE单分子薄膜的表面由大量近似圆形的单晶畴区覆盖, 畴区的尺寸为7~13 μm , 表面粗糙度为0.2 nm, 单晶畴区内部很平整, 近乎为理想表面. OTE薄膜的表面大部分被单晶畴区覆盖, 而单晶畴区的尺寸远大于荧光关联光谱的共聚焦空间尺寸(直径约为0.56 μm , 为单晶畴区的1/23至1/13), 因此, 当进行荧光关联光谱测量时, 共聚焦空间与单晶畴区重叠的概率很高, 能够大概率地实现单晶表面的分子扩散测量.

采用荧光关联光谱对吸附于水/OTE界面的PEO单分子横向扩散运动测量时, 通过调节显微物镜的位置, 实时监控仪器的单分子荧光光子计数, 发现在溶液中仅存在很低的背景光, 而在焦点与界面重合时, 则出现了远高于背景光水平的荧光强度^[19], 这种现象帮助我们实现了焦点与界面的准确定位^[16].

图2为PEO-10k与PEO-40k在水溶液及水/OTE界

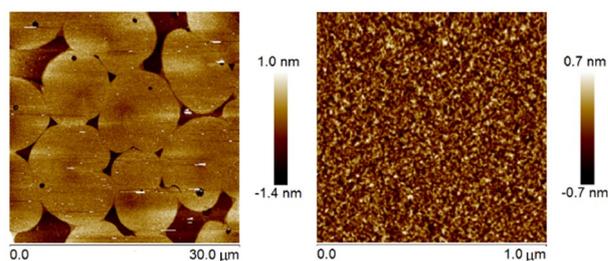


图1 OTE自组装单分子薄膜的表面形貌(采用原子力显微镜观察)(网络版彩图)

Figure 1 The surface morphology of self-assembled monolayer of OTE as observed by atomic force microscope (color online).

面处扩散运动的归一化关联函数. 对于二维平动布朗运动, 其关联函数可以表达为

$$G(\tau)_{2D} = (\pi w_0^2 \langle \rho \rangle)^{-1} (1 + 4D\tau / w_0^2)^{-1} \quad (1)$$

其中 w_0 为共聚焦空间的横向半径, $\langle \rho \rangle$ 为界面浓度, D 为扩散系数^[21]. 数值拟合的结果表明, PEO-10k、PEO-40k的单链界面扩散系数分别为0.13和0.06 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. 这些数值远低于PEO在水溶液中的扩散系数(PEO-10k: 74.3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, PEO-40k: 42.0 $\mu\text{m}^2/\text{s}$), 这表明PEO分子与固体OTE表面的疏水相互作用使得其受到的来自于固体表面的阻力远大于来自于液态水的流体力学阻力. 实验结果还显示, 界面处PEO分子的平均数量浓度介于8~37 μm^{-2} 之间, 因而其对应的分子间平均距离均大于158 nm (以数量浓度为40 μm^{-2} 计算), 远大于单个PEO分子的大小, 表明PEO分子链在疏水单层分子膜上以单链形态存在并进行扩散运动, 分子间相互作用可以忽略, 从而满足独立布朗运动的条件^[22].

采用单分子荧光成像方法拍摄的PEO-10k在水/OTE界面处扩散运动的影像以及通过单分子轨迹追踪获得的方均位移(mean square displacement, MSD)随时间延时的数据均见网络版补充材料. 同一样品的平均方均位移随时间延时的数据如图3所示. 以布朗运动的方均位移与时间延时的相互关系:

$$\langle r^2 \rangle = 4D\tau \quad (2)$$

对数据进行数值拟合(图3中的直线为拟合结果), 可以看到数据体现了PEO分子的界面运动具有良好的布朗运动特征, 表明在OTE单晶畴区满足理想表面的条件. 数值拟合得到的PEO-10k、PEO-40k的界面扩散系数分别为0.16和0.04 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

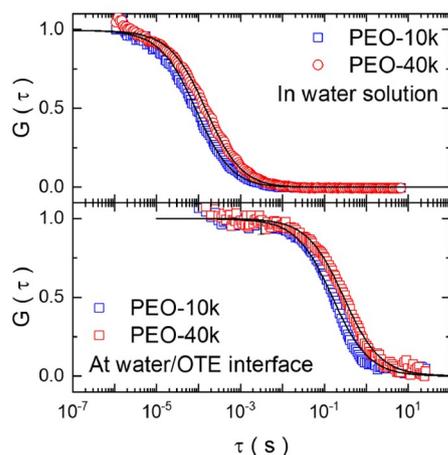


图 2 PEO在水溶液及水/OTE界面处进行扩散运动的归一化荧光关联函数数据, 数据由多次测量的关联函数平均得到, 原始数据见网络版补充材料(网络版彩图)

Figure 2 Normalized auto-correlation function of PEO diffusing in aqueous solution and at water/OTE interface. The data are averaged over multiple original auto-correlation functions, which are provided in Supporting Information online (color online).

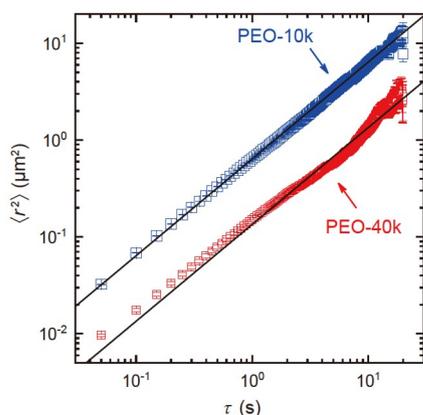


图 3 单分子荧光轨迹追踪方法获得的PEO分子在水/OTE界面的方均位移随时间延时的数据(网络版彩图)

Figure 3 Mean square displacement as a function of lag time of PEO molecules diffusing at the interface between water and OTE (color online).

将荧光关联光谱、单分子荧光轨迹追踪测量得到的PEO分子在水/OTE界面处的横向扩散运动结果比较(表1), 可以看到两种方法测量得到的结果十分接近, 表明虽然两种研究方法的原理不同, 测量区域不同, 时间分辨率不同, 但是针对同一扩散运动过程的测量结果相同, 表明这两种研究方法均能够进行如实、准确的测量(鉴于聚合物界面扩散速率的数值与多种因素相关, 如界面质量、溶剂性质、离子强度等, 而与本研究

完全一致的体系以前未有报道, 因而暂时无法将本研究的数据与以往数据进行比较^[12,21]).

从上述的比较可以得出重要结论: 当界面均匀度高、缺陷少的条件下, 荧光关联光谱与单分子荧光成像与轨迹追踪方法测量得到的扩散系数是一致的. 这源自于体系在不同尺度的自相似性, 即理想界面条件下, 扩散分子在不同空间尺度均满足布朗运动特征, 因而, 关于其扩散系数的测量不会因为研究方法测量的尺度差别而不同. 如果将关联函数转换成方均位移, 并将其与单分子荧光轨迹追踪数据进行比较(详细数据见网络版补充材料), 二者在一定的时间延时区域重合或近似重合, 这可以作为二种方法测量结果接近的直观表述.

图4为水/OTE界面处PEO分子扩散运动的步长分布. 数据表明, PEO分子扩散运动步长分布很好地符合高斯分布函数, 这一部分占据了绝大部分步长分布, 而

表 1 PEO分子在水/OTE界面处的横向扩散系数比较

Table 1 Diffusion coefficients of PEO at water/OTE interfaces

样品	扩散系数(μm ² /s)	
	荧光关联光谱	单分子荧光轨迹追踪
PEO-10k	0.13	0.16
PEO-40k	0.06	0.04

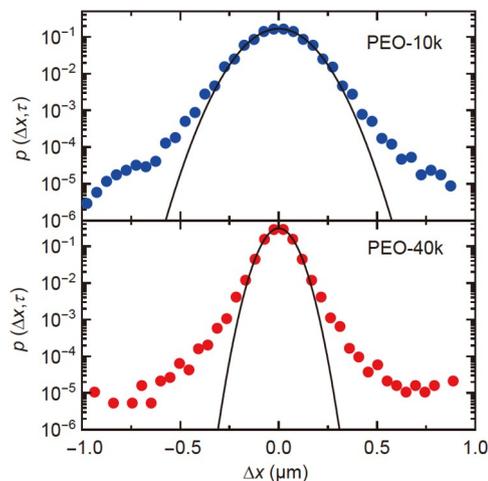


图 4 水/OTE界面处进行PEO分子扩散运动的步长分布, 黑色曲线表示高斯函数拟合结果. 其中, $\tau=0.05$ s(网络版彩图)

Figure 4 Distribution of step-size of PEO diffusion on the water/OTE interface. The solid curves denote fitting by Gaussian function. In the figure, τ equals to 0.05 s (color online).

仅有很小部分的大步长分布偏离了高斯分布函数。PEO-10k和PEO-40k样品在步长小于 $0.5\ \mu\text{m}$ 的区域内的分布完全满足高斯分布, 数据分析表明, 步长大于 $0.5\ \mu\text{m}$ 的分布占比都远低于 10^{-3} , 而满足高斯分布的步长分布概率累计均大于99.9%。

上述结果明确说明了在均匀的OTE单分子薄膜表面, 由于薄膜缺陷数量很少, PEO分子能够在满足理想界面的条件下进行扩散运动。如果将每一帧单分子荧光影像进行叠加后平均, 可以看到, 进行扩散运动的PEO分子在叠加平均后的图像中表现为模糊的轨迹, 而与之形成反差的是, 图像中有少数几个点具有高亮度与高反差(见网络版补充材料)。对照动态录像可以看出, 这几个亮点来自于不运动的分子, 这明确说明了PEO分子在OTE单晶畴区上的扩散运动远快于处于缺陷上的分子, 而这也表明荧光关联光谱及单分子荧光轨迹追踪方法测量这类满足布朗运动条件的分子扩散并得到一致测量结果的根本原因。

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com。补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责。

参考文献

- 1 Israelachvili J. *Intermolecular and Surface Forces*. London: Academic Press, 1991
- 2 Fleer GJ, Cohen Stuart MA, Cosgrove T, Scheutjens JM, Vincent B. *Polymers at Interfaces*. London: Chapman & Hall, 1993
- 3 Ferry JD. *Viscoelastic Properties of Polymers*. New York: Wiley, 1980
- 4 Maier B, Rädler JO. *Phys Rev Lett*, 1999, 82: 1911–1914
- 5 Santore M. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2005, 10: 176–183
- 6 Rigler R, Elson E. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications*. Berlin: Springer, 2001
- 7 Magde D, Elson E, Webb WW. *Phys Rev Lett*, 1972, 29: 705–708
- 8 Rigler R, Mets U, Widengren J, Kask P. *Eur Biophys J*, 1993, 22: 169–175
- 9 Moerner WE. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 8067–8093
- 10 Shen H, Tauzin LJ, Baiyasi R, Wang W, Moringo N, Shuang B, Landes CF. *Chem Rev*, 2017, 117: 7331–7376
- 11 Joo C, Balci H, Ishitsuka Y, Buranachai C, Ha T. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77: 51–76
- 12 Sukhishvili SA, Chen Y, Müller JD, Gratton E, Schweizer KS, Granick S. *Nature*, 2000, 406: 146
- 13 Skaug MJ, Mabry JN, Schwartz DK. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 1327–1332
- 14 Wirth MJ, Ludes MD, Swinton DJ. *Appl Spectrosc*, 2001, 55: 663–669
- 15 Liao Y, Yang SK, Koh K, Matzger AJ, Biteen JS. *Nano Lett*, 2012, 12: 3080–3085
- 16 Cheng B, Jiang Z, Yang J, Zhao J. *J Chem Phys*, 2021, 155: 234903
- 17 Schneider J, Dori Y, Tirrell M, Sharma R. *Thin Solid Films*, 1998, 327–329: 772–777
- 18 Kessel CR, Granick S. *Langmuir*, 1991, 7: 532–538
- 19 Li Z, Yang J, Hollingsworth JV, Zhao J. *RSC Adv*, 2020, 10: 16565–16569
- 20 Crocker JC, Weeks ER. Particle Tracking Using IDL. <http://www.physics.emory.edu/faculty/weeks/idl/index.html>

4 结论

荧光关联光谱通过检测亚微米尺寸空间内的荧光强度涨落而获取分子扩散运动信息, 虽然这种方法没有采用单分子成像与轨迹追踪的方式采集被研究分子大尺度范围的扩散运动信息, 但是由于OTE单分子薄膜具有很高的均匀性, 使得吸附于其上的PEO分子满足布朗运动条件, 因而具备了不同尺度随机运动的自相似性, 因而确保了测量的准确性。在PEO分子量合适的条件下, 其界面扩散运动同时适合荧光关联光谱与单分子荧光成像及轨迹追踪的测量时间窗口, 数据表明, 两种测量方法得到的扩散系数一致。

作为原理不同、时间窗口不同、空间范围不同的研究界面扩散运动的手段, 荧光关联光谱、单分子成像与轨迹追踪方法具有很强的互补性, 在合适的研究对象中, 选取正确的方法将不仅能够帮助我们实现有效测量及研究, 更能够帮助我们深入研究界面扩散运动及其物理机理。

21 Zhao J, Granick S. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 6242–6243

22 Kalmykov YP, Coffey W. *The Langevin Equation: with Applications to Stochastic Problems in Physics, Chemistry and Electrical Engineering*. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2017

Interfacial diffusion of single polyethylene oxide molecules: the consistency between fluorescence correlation spectroscopy and single molecule fluorescence tracking

Zhuo Li^{1,2}, Kuo Chen^{1,2}, Tianhao Hou^{1,2}, Jingfa Yang^{1,2}, Jiang Zhao^{1,2*}

¹ Beijing National Laboratory for Molecular Science, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (email: jzhao@iccas.ac.cn)

Abstract: Due to the importance of investigation into interfacial diffusion of single polymer molecules, it is essential to conduct effective and precise measurements of interfacial diffusion. Since there have been debates on the difference between two major methods for interfacial diffusion measurement, *i.e.*, fluorescence correlation spectroscopy and single molecule fluorescence imaging and tracking, the current study is trying to address this issue, by using these two methods to measure lateral diffusion of single molecules of polyethylene oxide (PEO) adsorbed on the interface between water and alkane silane monolayers. The results have demonstrated that due to the homogeneity of the single crystalline monolayer, the measurements on lateral diffusion of fluorescence-labeled PEO at the interface by the two methods provide the same results, despite their difference in principle, time window and length scale of measurements. The study has proved that both fluorescence correlation spectroscopy and single molecule fluorescence imaging and tracking can provide reliable measurements on interfacial diffusion of single polymer molecules on homogeneous or nearly ideal interfaces.

Keywords: interfacial diffusion, fluorescence correlation spectroscopy, single molecule tracking, correlation function, mean square displacement

doi: [10.1360/SSC-2022-0249](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0249)