

CorTectorTMSX: 一款桌面式荧光相关光谱仪的原理和应用

王柱楼^{1,2}, 丁波¹, 黄科赢¹, 刘钢¹, 肖茜², 黄韶辉^{1,2*}

(1. 广东中科奥辉科技有限公司, 广东中山 528400; 2. 中国科学院生物物理研究所交叉科学所重点实验室, 北京 100101)

摘要: 荧光相关光谱检测技术具有超灵敏(单分子), 快速(数秒至数分钟)和多功能(检测分子浓度、大小和相互作用)等技术优点, 且无需反应物分离, 因此有潜力成为一种新型均相、高敏荧光免疫检测技术, 适用于在溶液中或单个活细胞内检测生物分子特性。本文首先介绍荧光相关光谱检测技术的原理和研究进展, 然后结合项目团队自主研发的目前全球唯一一款可靠、易使用的桌面式荧光相关光谱仪, 进一步探讨荧光相关光谱检测技术的具体实现和潜在应用。

关键词: 荧光相关光谱学; 荧光自相关; 荧光交相关; 单分子荧光

CorTectorTMSX:

Principles and Applications of a Bench-top Fluorescence Correlation Spectrometer

Wang Zhulou^{1,2}, Ding Bo¹, Huang Keying¹, Liu Gang¹, Xiao Qian², Huang Shaohui^{1,2}

(1. LightEdge Technologies, Ltd, Zhongshan, 528400, China; 2. Key Laboratory of Interdisciplinary Research, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

Abstract: Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) technologies have the advantage of ultrasensitivity (single molecule), fast speed (seconds and minutes measurement time), and multifunctionality (simultaneously analyzing molecular concentration, size and interaction). Thus, FCS has the potential of being a novel fluorescence immunoassay suitable for high-sensitivity analysis of homogeneous sample solution. This article introduces the principle and applications of the FCS technologies based on the reliable, easy-to-use, bench-top fluorescence correlation spectrometer developed by the project team.

Keywords: Fluorescence correlation spectroscopy; fluorescence auto-correlation; fluorescence cross-correlation; single-molecule fluorescence

荧光相关光谱学 (Fluorescence Correlation Spectroscopy; FCS) 是美国科学院和工程院两院院士 Watt W. Webb 教授与同事在 70 年代建立理论基础并进行实验验证后建立起来的^[1-3]。进入 90 年代, 随着显微镜、激光、计算机、数据采集卡、光子探测器、荧光分子和标记技术的巨大进步, FCS 技术才具备软、硬件条件并首先在科学研究的各个领域得到了广泛应用^[4-6]; 仅在 PubMed 论文库中用“Fluorescence Correlation Spectroscopy”关键词进行检索, 就得到近 7000 篇学术论文。FCS 即其衍生技术已经在科学研究的各个领域中得到广泛应用, 包括: 单分子研究、分子-分子相互作用研究、化学反应动力学、病原体检测、酶活性检测、纳米颗粒特性分析、光物理学、等离子纳米光学和微流控技术开发等。然而中国学术界目前对该技术了解还较少, 只有少数几个实验室应用了这一技术, 可能原因有:

(1) 商业荧光相关光谱仪目前由国外高端显微镜厂商垄断, 仪器售价及后续维护费高。以德国 Zeiss 公司的 Confocor 产品系列为例: 基于共聚焦或多光子显微镜的荧光相关光谱仪 (Confocor3) 售价可达 50-100 万美元。整套系统需配置显微镜实验间和专业操作人员, 年维护费可达售价的 10%。

(2) 少数具光学、物理学背景的实验室可自主搭建低成本的 FCS 系统, 但在普通生物医学、化学实验室中搭建、维护和应用此类系统的难度很大。

(3) 荧光相关光谱学原理较复杂, 实验操作和数据分析需要对于干扰因素和技术原理有全面和深入的了解, 因此 FCS 的技术推广难度较大。

基于以上分析, 项目团队开发了目前全球市场上唯一一款低价、可靠、易使用的桌面式荧光相关光谱仪商业仪器 (CorTector™ SX)。该仪器无需独立显微镜实验室, 适用于研究溶液样品中的分子特性, 可在生物医学、化学、物理学等学科和普通实验室中推广应用。

1 荧光相关光谱学基本原理

FCS 技术的关键在于在一个宏观溶液样品中, 利用激光和光学器件非接触性地分离出一个极小的荧光激发和检测体积 V (图 1)。该体积通常只有数个飞升 ($1\text{fl}=10^{-15}\text{l}$; 约一个细菌大小), 包含几个至几百个基于布朗运动而自由扩散的荧光分子 (或经过荧光标记的分子、纳米颗粒等)。受检荧光分子的浓度在溶液样品中是恒定的, 但在微观体积 V 内的荧光分子个数 $N(t)$ 因自发的热力学不平衡而随时间 t 波动 $\delta N(t)$ 。荧光分子个数 $N(t)$ 及其波动 $\delta N(t)$ 反映在相应的荧光信号 $F(t)$ 及其波动 $\delta F(t)$ 上。因此:

$$\frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta N(t)^2 \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (1)$$

尖括号代表时间平均值。在微观体积 V 内以小概率随机存在的分子个数 $N(t)$ 由泊松统计学 (Poisson Statistics) 原理决定, 因此分子个数的方差 $\delta N(t)^2$ 等于其平均值 $\langle N(t) \rangle$; 方程式 (1) 演变为:

$$\frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{\langle N(t) \rangle} = \frac{1}{CV} \quad (2)$$

C 为受测分子的计数浓度 (Number Concentration; 个数/升)。方程式 (2) 阐明了 FCS 技术的最基本原理: 即通过检测宏观溶液样品中, 某一微观体积内波动荧光信号的幅度从而推导受测分子浓度。经平均值修正的荧光信号波动幅度 $\langle \delta F(t)^2 \rangle / \langle F(t) \rangle^2$ 与分子浓度 C 成反比: 即浓度越低, 波动幅度越大。因此, FCS 技术从本质上就是一种超灵敏检测方法。

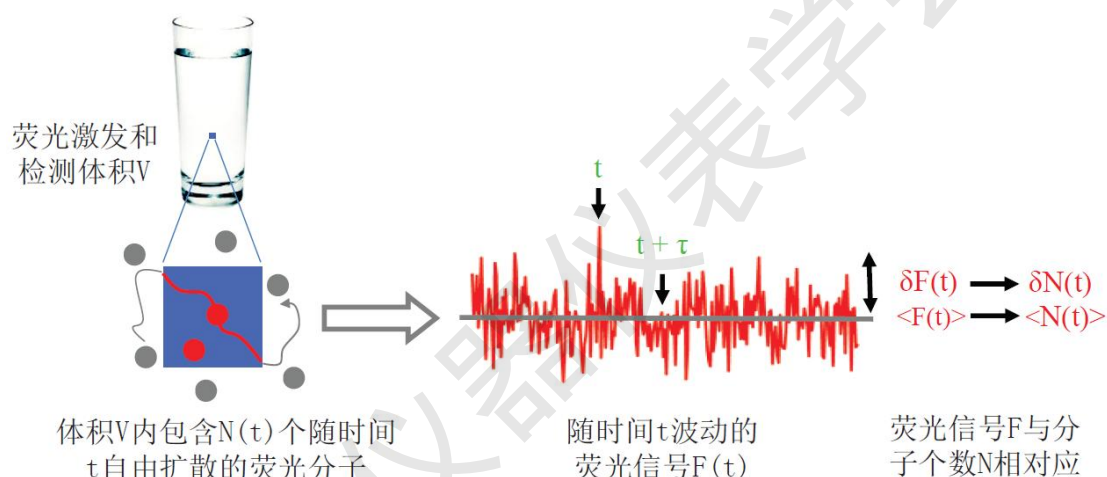


图 1 荧光相关光谱学基本原理。荧光分子与荧光信号在一个微观体积 V 内随时间变化的动态关系。

Figure 1 Schematic illustration of the principle of fluorescence correlation spectroscopy

(FCS). Fluorescent molecules $N(t)$ freely diffuse through the FCS volume V at time t . The spontaneous thermodynamic fluctuations of the number of fluorescent molecules in the FCS volume V lead to corresponding fluctuations in the recorded fluorescence signals $F(t)$. The experimental measurement of the time-averaged fluorescence intensity $\langle F(t) \rangle$ and its temporal fluctuations $\delta F(t)$ reflect respectively the average number of fluorescent molecules $\langle N(t) \rangle$ and its temporal fluctuations $\delta N(t)$ in the FCS volume V .

FCS 技术需要在溶液样品中分离出一个极小的荧光激发和检测体积。同样地, 基于点扫描三维成像的共聚焦或多光子荧光显微镜的高分辨率也取决于在一个极小样品体积内激发和检测荧光信号。因此, 现有商业荧光相关光谱仪都是在共聚焦或多光子荧光显微镜上实现的。如图 2A 所示的是基于共聚集光路的荧光相关光谱仪: 激发荧光分子的激光 (绿线) 被

显微镜镜头（OBJ）聚焦到溶液样品（S）中的一个极小的体积内（聚焦点；图 2B 下图中的绿色区域）；聚焦光路（包括聚焦点）内的所有荧光分子受激产生荧光信号（红线），这些信号的一部分被同一显微镜镜头收集，经过二向分色镜（DM）反射、成像镜（TL）聚焦和滤光片（F）过滤，最终被单光子计数荧光探测器（DET）接收（图 2A）；为了在聚焦点内分离出一个更小的荧光检测体积 V （图 2B 下图中的橙色部分），在与聚焦点相对应的成像点放置一聚焦针孔（P）；通过调节该针孔的大小，使得只有从检测体积 V 内发出的荧光信号才能被探测器接收到（图 2A）。体积 V 内激发光强度的三维空间分布可由三维高斯分布公式近似描述，因此单个荧光分子自由扩散经过体积 V 时，可假设产生如图 2B 中所示的理想脉冲信号：即背景噪声为零，脉冲形状可用二维高斯分布公式描述。但是在实际操作中，由于背景信号、探测器噪音、荧光分子在检测体积 V 内的个数和扩散路径波动等因素，实验测得的是更为复杂的波动荧光信号 $F(t)$ （图 2B 上图）。本文假设的理想单分子荧光脉冲信号可方便地用来解释荧光自相关和交相关分析原理（图 2C-2F），这些原理同样适用于分析实验获得的波动荧光信号 $F(t)$ 。

1.1 荧光自相关技术的原理和应用

荧光自相关光谱（Fluorescence Auto-correlation Spectroscopy）是最早开发的 FCS 技术；因此，FCS 普遍地用于特指荧光自相关技术。自相关（Auto-correlation）分析就是计算波动荧光信号 $F(t)$ 与自身在相关时间 τ 的时滞信号 $F(t+\tau)$ 之间的重叠程度，即自相关幅度 $G(\tau)$ ^[5,7]：

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3)$$

其中 $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ ，尖括号代表时间平均值。对于如图 2B 所示的理想单分子荧光信号，信号本身即为波动幅度： $F(t) = \delta F(t)$ 。因此，当相关时间 $\tau = 0$ 时，自相关幅度 $G(0) = 1$ 为最大值；当相关时间 $\tau > 0$ 时，两组信号之间的重叠区域随 τ 值的增加而减少，即 $\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle$ 值逐渐减少，自相关幅度 $G(\tau)$ 下降；当相关时间 $\tau \rightarrow \infty$ 时，两组信号之间无重叠区域，自相关幅度 $G(\infty) = 0$ （图 2C）。实验所得波动荧光信号 $F(t)$ 可认为是单分子荧光信号的线性组合，因此运用公式（3）对实验所得 $F(t)$ 进行自相关计算，同样可得到随相关时间 τ 增长而衰减的自相关幅度 $G(\tau)$ （图 2D，黑色数据点）。对这些实验数据运用特定数学模型（公式 7）进行拟合（图 2D，红色曲线），由此得到的拟合参数 $G(0)$ 和 τ_D 分别反应了受测分子的浓度和大小。

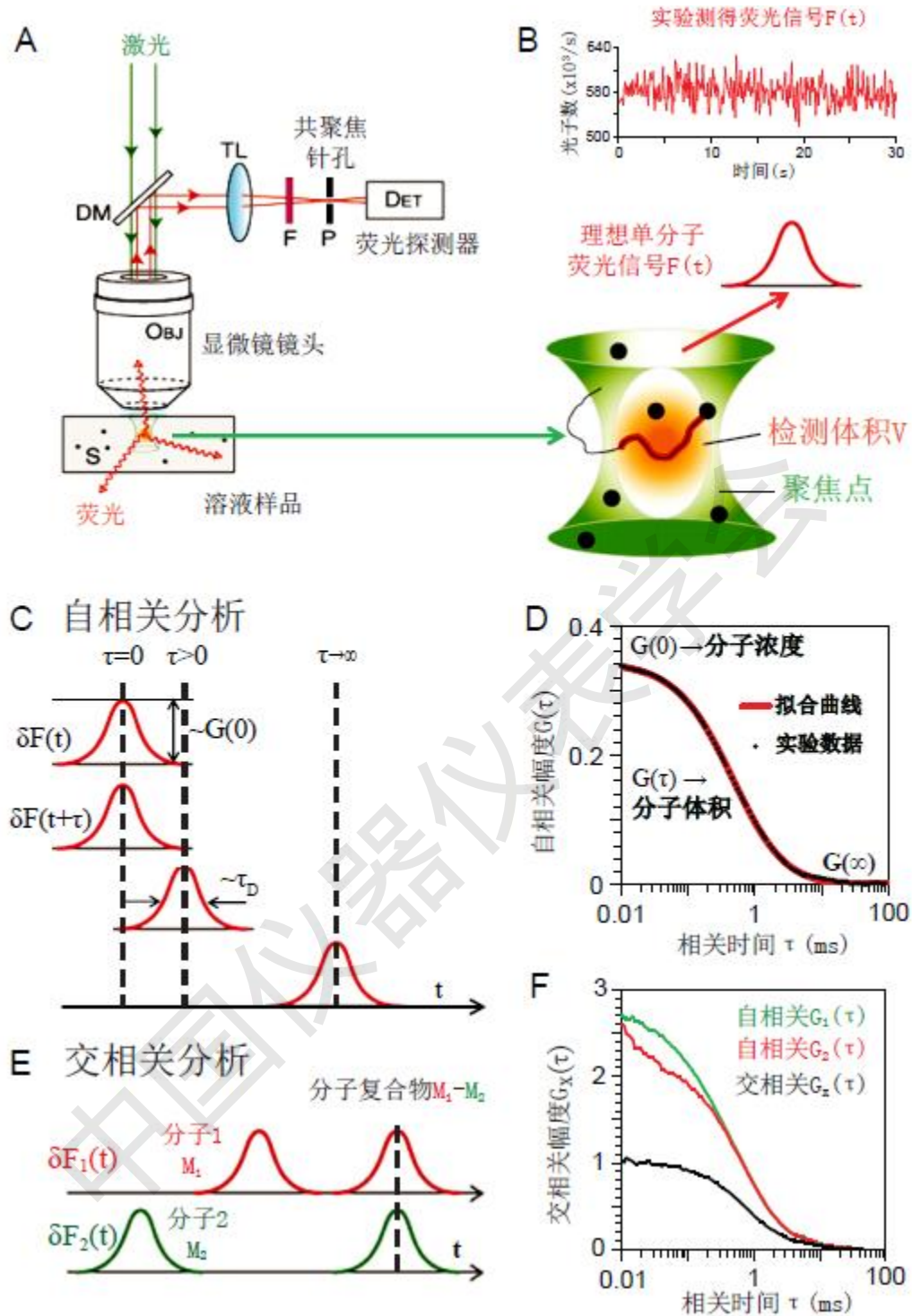


图2 荧光自相关和交相关分析原理。(A) 基于共聚焦光路的荧光相关光谱仪。(B) 荧光激发(绿色)和检测(橙色)体积及从该检测体积获得的荧光信号 $F(t)$ 。(C) 荧光自相关分析示意图： τ 为相关时间， $G(0)$ 为 $\tau=0$ 时的自相关幅度， τ_D 为扩散相关时间。(D) 实验测得的荧光自相关衰减曲线。(E) 荧光交相关分析示意图。(F) 一次荧光交相关实验获得的两条荧光自相关(绿色、红色)和一条荧光交相关(黑色)衰减曲线。DET: 单光子计数荧光探测器; DM: 二向分色镜; F: 滤光片; OBJ: 显微镜镜头; P:

共聚焦针孔；S：溶液样品；TL：显微镜透镜；V：荧光检测体积。

Figure2

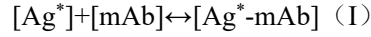
Principles of auto- and cross-correlation analysis. (A) Fluorescence correlation spectrometer based on a confocal optical pathway. (B) Fluorescence excitation (green) and detection volume (orange) V in a solution sample with fluorescence signals $F(t)$ detected from this volume V . (C) Schematic illustration of fluorescence auto-correlation analysis: τ is correlation time; $G(0)$ is the correlation amplitude with $\tau=0$, τ_D is diffusion correlation time. (D) An example of experimentally acquired autocorrelation decay curve. (E) Schematic illustration of fluorescence cross-correlation analysis (FCCS). (F) An FCCS experiment yields two auto-correlation decay curves (green and red) and one cross-correlation decay curve (black). DET: single-photon counting fluorescence detector; DM: dichroic mirror; F: filter; OBJ: objective; P: pinhole; S: sample; TL: tube lens; V: fluorescence detection volume.

结合公式 2 和 3 可得相关时间 $\tau=0$ 的自相关幅度 $G(0)$:

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{\langle N(t) \rangle} = \frac{1}{CV} \quad (4)$$

因此， $G(0)$ 值是实验测得的荧光信号波动幅度，与受测分子浓度 C 成反比。应用已知浓度的标准荧光分子溶液样品，通过实验测得其 $G(0)$ 值（图 2D）后可根据公式 4 测定仪器的荧光检测体积 V （图 2B）。然后，对未知浓度的受测荧光分子样品测定其 $G(0)$ 值，根据公式 4 可得该样品浓度 C 。此外，从荧光自相关衰减曲线可得受测分子的特征扩散相关时间 τ_D （Diffusion Correlation Time）。对于理想的单分子荧光脉冲信号， τ_D 代表的是脉冲信号宽度（图 2C）：即脉冲信号越宽，从 $G(0)=1$ 衰减到 $G(\infty)=0$ 所需的特征时间 τ_D 越长；而脉冲信号的宽度反应的是自由扩散的受测分子在荧光检测体积 V 内的停留时间；很显然，分子量（体积）越大的受测分子扩散得越慢，在检测体积 V 内的停留时间也越长，因此相应的 τ_D 值就越大。同理，实验测得荧光自相关衰减曲线的 τ_D 值（图 2D）反应的是受测分子在溶液环境中的动态（翻滚、平移等）体积，并与其水动力半径 R_H （Hydrodynamic Radius）成正比（公式 8b、8c）。如果在某一溶液样品中存在着两种自由扩散的荧光分子，并且其 R_H 值有 2 倍以上的差异（即体积/分子量有约 8 倍以上的差异），荧光自相关技术无需物理分离提纯这两种分子就能定量检测其浓度（即均相检测；公式 11）。

应用上述荧光自相关技术定量检测分子大小的能力，可在溶液中或单个活细胞内定量分析分子-分子相互作用，比如测定抗原-抗体结合反应的亲和力 K_D 值^[8]：



Ag^* 为经荧光分子标记的抗原分子， mAb 为其特异性单克隆抗体， $\text{Ag}^* - \text{mAb}$ 为抗原-抗体结合物。如果抗体 mAb 分子量远大于抗原 Ag 分子量（即 R_H 比值超过2），FCS技术能在均相反应液中定量检测游离态和结合态抗原分子的浓度 $[\text{Ag}^*]$ 和 $[\text{Ag}^* - \text{mAb}]$ （公式11）。通过系统地改变反应液中 $[\text{Ag}^*]/[\text{mAb}]$ 比例，并测定相应的 $[\text{Ag}^*]$ 、 $[\text{Ag}^* - \text{mAb}]$ 摩尔浓度，FCS可测定该抗原-抗体结合反应的离解常数 K_D 值（图7C）。

1.2 荧光交相关技术的原理和应用

然而并不是所有的分子间相互作用都发生在分子量/体积悬殊的两者之间。因此，在荧光自相关光谱技术的基础上又发展了荧光交相关光谱（Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy; FCCS）技术^[6,9]。FCCS同样可在共聚焦光路上实现，通常需要两个不同波长的激光器和与之对应的两个荧光检测通道。这两个激光器被用于激发溶液样品中两种被不同颜色的荧光分子标记的受测分子（ M_1 、 M_2 ）。这两种分子自由扩散经过相应的荧光检测体积 V_1 和 V_2 时分别产生红色 $F_1(t)$ 和绿色 $F_2(t)$ 两种随时间 t 波动的荧光信号。假设 $V_1=V_2=V$ 并且 V_1 和 V_2 在三维空间重叠，我们可用单个红色或绿色荧光分子产生的理想脉冲信号来解释交相关分析原理。如图2E所示，如果红色和绿色荧光分子之间无相互作用，这两种分子通过自由扩散进入检测体积 V 的时间是相互独立的，相应的荧光信号通常不在同一时间 t 出现（无交相关性）。而当这两种分子形成稳定的分子复合物（ $M_1 - M_2$ ）并因此同时进入荧光检测体积 V 时，红色和绿色荧光信号被同时探测到（有交相关性），这两组荧光信号在相关时间 τ 的交相关幅度 $G_x(\tau)$ 可由公式（5a）计算（图2F；黑色曲线）^[6,9]：

$$G_x(\tau) = \frac{\langle \delta F_1(t) \delta F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle} \quad (5a)$$

同时，针对红色和绿色波动荧光信号分别进行自相关分析可得到相应的自相关幅度衰减曲线 $G_1(\tau)$ 和 $G_2(\tau)$ （图2F；红色和绿色曲线）：

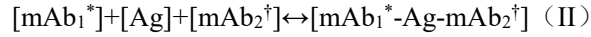
$$G_1(\tau) = \frac{\langle \delta F_1(t) \delta F_1(t + \tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle^2} \quad (5b)$$

$$G_2(\tau) = \frac{\langle \delta F_2(t) \delta F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_2(t) \rangle^2} \quad (5c)$$

运用特定的数学模型（公式12）对实验所得荧光交相关衰减曲线进行拟合，可得关键参数值 $G_x(0)$ 和 τ_{XD} 。与自相关分析类似， $G_x(0)$ 反应了分子复合物的摩尔浓度 $[M_1 - M_2]$ ， τ_{XD} 与该

复合物的 R_H 成正比^[6,9]。

参照体外医疗检验 (InvitroDiagnosis) 最常用的“夹心法”，我们可以用两种经不同颜色荧光分子标记的抗体 mAb_1^* 和 mAb_2^\dagger 来设计一种针对特定疾病标志物 (抗原 Ag) 的均相荧光免疫检验法：



通过对一次 FCCS 实验所得的两条荧光自相关和一条荧光交相关衰减曲线 (图 2F) 进行拟合得到相应的 $G_x(0)$ 、 $G_1(0)$ 和 $G_2(0)$ 值，通过“夹心法”检测的疾病标准物浓度 $[mAb_1^* - Ag - mAb_2^\dagger]$ 可由公式 7 计算：

$$C_x = \frac{G_x(0)}{G_1(0)G_2(0)V} \quad (6)$$

以上公式表明，通过荧光交相关技术测得的分子复合物浓度与交相关幅度 $G_x(0)$ 成正比，而通过荧光自相关技术测得的分子浓度与自相关幅度 $G(0)$ 成反比。

如上所述的荧光交相关检测有以下优点：1) 被测分子本身无需荧光标记；2) 被测分子体积大小无限制但需要被两种抗体同时识别；3) 可使用饱和 (经荧光标记的) 抗体浓度 (nM) 来检测极低浓度 (fM-pM) 的疾病标记物。然而，上述技术需要：1) 对两种抗体分别进行两种不同颜色 (荧光发射光谱完全分离) 的荧光分子标记；2) 通常需要两个激光器来分别激发这两种荧光分子，并且相应的两个荧光检测体积大小类似 ($V_1 \approx V_2$) 且在三维空间上高度重叠。因此，荧光交相关方法有更大的技术实现难度。在上述应用举例中，分子 1 (mAb_1^*) 和分子 2 (mAb_2^\dagger) 的相互作用通过中介分子 (Ag) 来实现 FCCS 技术可同样应用于定量分析两种荧光分子的直接相互作用。

1.3 荧光相关光谱技术优点

在特定实验条件下检测分子浓度、大小和相互作用是生物医学和化学研究的主要课题。如上所述的 FCS 和 FCCS 技术能在溶液环境中或单个活细胞内定量检测分子的浓度、大小和相互作用，因此在生物医学、化学等研究领域具无可取代的综合技术优势：

- (1) 超灵敏：最高检测灵敏度是单分子，适用于检测极低浓度 (pM-nM) 的溶液样品；
- (2) 微量：荧光检测体积小至数个飞升，因此溶液样品 (或单个活细胞) 体积也可以非常小 (数十个微升)，适用于检测非常少或非常珍贵的样品；
- (3) 快速：一次检测只需几秒钟至几分钟；
- (4) 多功能：一次检测可同时获取分子浓度、大小和相互作用的定量信息；

(5) 均相检测：可在保持生物分子活性的溶液或活细胞内，无需受测物分离提纯（均相）直接检测分子特性。

2 桌面式荧光相关光谱仪的研制

现有的商业荧光相关光谱仪在共聚焦或多光子显微镜的基础上开发，因此体积大、价格高、需要显微镜暗室和专业操作人员。而实验室搭建的荧光相关光谱仪对操作者的专业技能，特别是共聚焦光路调节能力，要求高。因此，课题组历经四代工程样机（图 3A-3D）研制，成功开发了目前全球市场上唯一一款自动化程度高、性价比高、并且整合了 FCS 和 FCCS 技术的桌面式荧光相关光谱仪（CorTector™SX；图 3D）。不同于基于商业显微镜的荧光相关光谱仪，CorTector™SX 的所有子系统，包括共聚焦光路、电子与机械系统、光密样品仓等，都被整合在一个 733×410×349mm 体积内；因此，CorTector™SX 可在普通实验室的桌面环境中使用。荧光相关光谱仪的技术难点是实现共聚焦针孔（图 2A）的精确、可重复定位；因此，CorTector™SX 对其两个荧光探测通道的每一共聚焦针孔（图 4）都配置了三个伺服-步进电机并开发了相应控制软件，从而实现了共聚焦针孔的全自动、高精度（约 1μm）定位。此外，CorTector™SX 配置了电机驱动三维定位样品台，目前已实现对 8 个溶液样品的批量、自动检测。项目团队自行开发了数据采集（CorrelationAcquisition）和数据分析（CorrelationAnalysis）软件，在很大程度上减轻了实验者的工作负担，并可根据具体实验需要开发相应的软件任务包。实现了以上目标的商业荧光相关光谱仪 CorTector™SX 可促进 FCS 技术在普通生物医学、化学实验室中的推广应用。



图3 桌面式荧光相关光谱仪的研制。(A) 第一代用于原理验证的实验室样机。(B) 第二代工程样机。(C) 第三代工程样机。(D) 第四代工程样机(即第一代商业仪器:CorTector™SX)。

Figure3

Development of the bench-top fluorescence correlation spectrometer. (A) The first generation proof-of-principle prototype. (B) The second generation prototype. (C) The third generation prototype. (D) The fourth generation prototype (i.e., the first generation commercial product: CorTector™ SX).

2.1 硬件实现

CorTector™ SX 荧光相关光谱仪的硬件系统如图 4 所示，主要包括四部分：荧光激发系统、样品检测系统、荧光检测系统和数据采集/分析系统。两个激光器（488、638nm）产生的两束激发光经波分复用器（WDM）耦合入一根单模光纤（SMF），经光束准直器（BC）转为空间准直光，然后经激发二向色镜（ExD）反射入显微镜物镜后瞳并被聚焦至溶液样品内。样品经激光激发产生荧光，部分荧光被同一物镜收集并以准直光从后瞳出射，经激发二向色镜（ExD）过滤激发光，被透镜（Lens）聚焦至用于信号采集的多模光纤（MMF）端口；此光纤端口内径即为共聚焦针孔；多模光纤的另一端连接发射滤光片系统（FS），将

不同波长的荧光（红色和绿色）分离和过滤，被各自检测通道的多模光纤（MMF）接收，并分别输送至各自检测通道的单光子雪崩光电二极管（SPAD），SPAD将单光子信号转换成相应的电脉冲信号并传输至相关采集卡（CorrelationBoard）。相关采集卡以90纳秒的时间分辨率采集单光子信号，其FPGA芯片对随时间波动的荧光信号进行相关计算（公式3、5a）并实时输出荧光自相关、交相关数据至配套计算机；计算机预装的数据采集软件控制仪器硬件并采集实验数据，数据分析软件对实验数据运用自相关、交相关数学模型进行定量分析从而得到被测分子的浓度、大小和相互作用等特性。

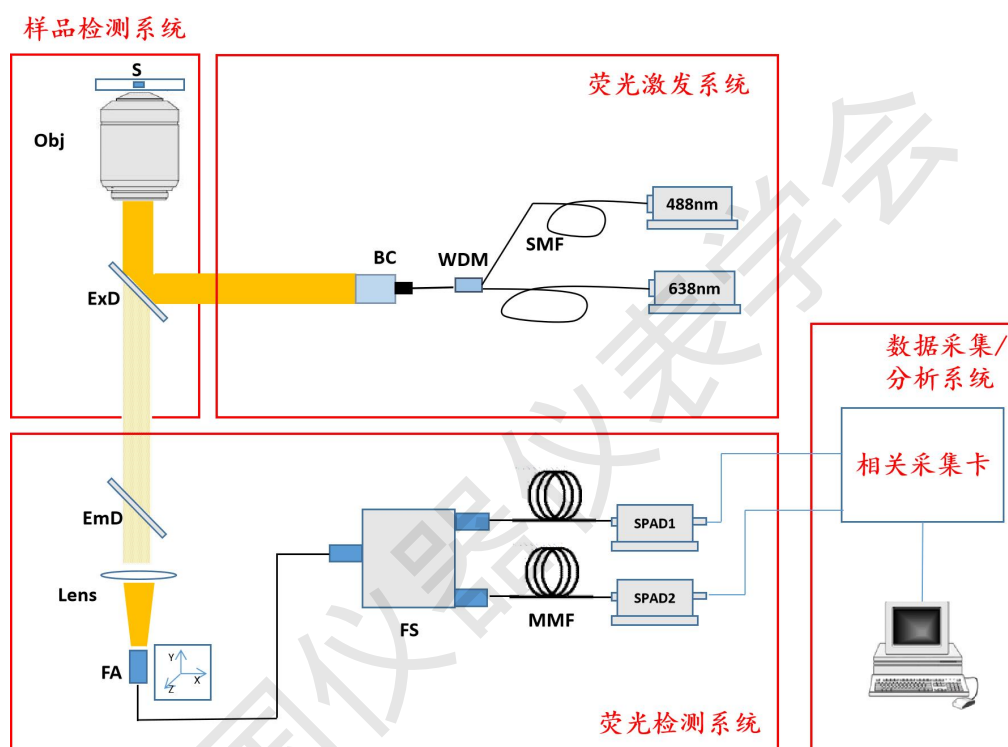


图4 桌面式荧光相关光谱仪的系统结构图，包括荧光激发系统、样品检测系统、荧光检测系统和数据采集/分析系统。SMF：单模光纤、WDM：波分复用器、BC：光束准直器；ExD：激发二向色镜；S：样品；EmD：发射二向色镜；FS：发射光滤光片系统；Lens：透镜；FA：光纤适配器；MMF：多模光纤；SPAD：单光子雪崩光电二极管。

Figure4

Schematic illustration of the bench-top fluorescence correlation spectrometer, including the fluorescence excitation system, the sample handling system, the fluorescence detection system and the data acquisition/analysis system. SMF: single-mode optical fiber; WDM: wavelength division multiplexing; BC: beam collimator; ExD: excitation dichroic mirror; S: sample; EmD: emission dichroic mirror; FS: filter system; FA: optical fiber adaptor; MMF: multi-mode optical fiber; SPAD: single-photon avalanche diode.

硬件系统需解决的关键问题是如何调节荧光激发和检测光路，从而在溶液样品中精确、可重复地分离出一个极小的荧光激发和检测体积 V （图 2A, 2B），并且该体积内的激发光强度分布可近似用三维高斯分布公式描述。因此，激发光需以平行光束入射并覆盖约 80% 显微镜后瞳^[10]。更重要的是，多模光纤端口内径（即共聚焦针孔）必须与透镜聚焦点处的荧光信号精确重合（图 4），以高效屏蔽荧光检测体积 V 外的荧光信号（图 2A、2B）。光纤内径大小（ $50\mu\text{m}$ ）由显微镜物镜放大倍数和透镜焦距共同决定，其空间定位决定了 FCS 实验数据的准确性和可重复性。因此，CorTectorTMSX 的荧光信号检测通道配置了 3 个伺服-步进电机，分别控制共聚集针孔在 X、Y、Z 轴上的精确（约 $1\mu\text{m}$ ）定位。此外，CorTectorTMSX 的样品台也由三个电机控制，可实现对多个溶液样品的自动定位。这些自动定位系统大大减低 FCS 技术的使用难度，使非专业人员经简单培训即可操作仪器并实现批量样品的自动检测。

2.2 软件实现

配合硬件设备，项目团队开发了便于操作的数据采集（CorrelationAcquisition）和数据分析（CorrelationAnalysis）软件，并可根据用户需要开发特定的软件任务包。图 5 示范的是 CorrelationAcquisition 的操作界面；通过该界面用户可选择启动 488、638nm 激光器及相应的荧光探测光路；选择对 1-8 个溶液样品进行自动检测；手动或自动实现共聚集针孔的精度定位。样品检测过程大致分为三步：1）使用 HPLC 级纯净水作为样品（ $\geq 20\mu\text{l}$ ）检测仪器在当前工作环境下的背景噪声（散射光、探测器暗计数、ShotNoise、AfterPulse 等）；2）使用高光量子效率、不易淬灭、已知浓度的标准荧光分子（Alexa488、RhodamineGreen）校验仪器光路并测定荧光检测体积 V （图 2B）；3）检测待检样品：每一样品的一次 FCS 实验通常持续 5-10 秒钟，并重复 10 次。相关计算卡采集原始荧光信号，并根据实验设定进行自相关或交相关计算，计算结果实时输出至计算机，由数据分析软件做进一步分析。

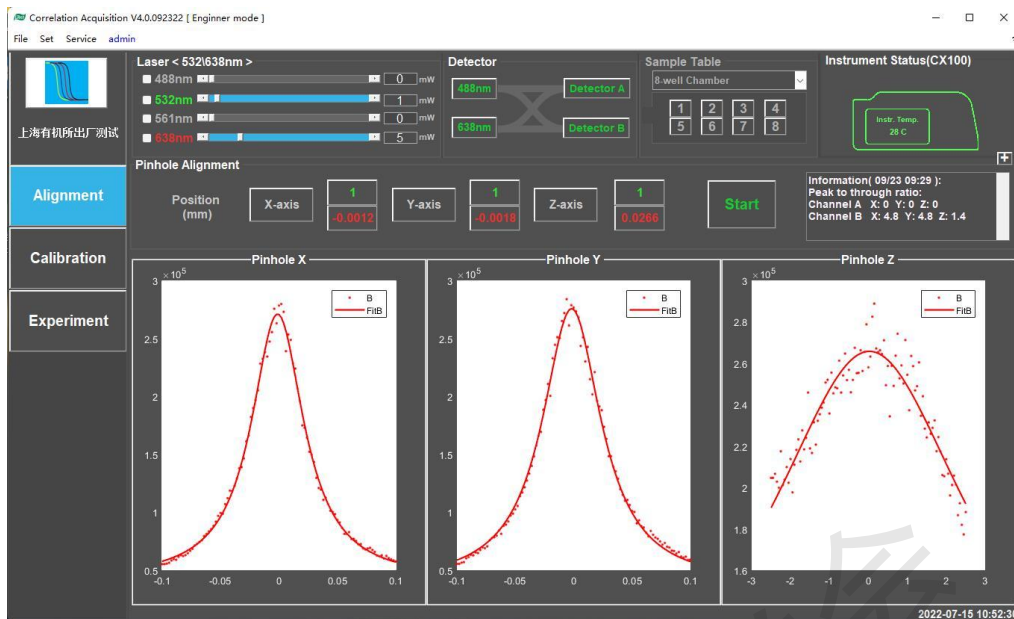


图5 数据采集软件（CorrelationAcquisition）用户界面示范。

Figure5 Userinterfaceexampleofthedataacquisitionsoftware(CorrelationAcquisition).

图6 示范的是数据分析软件（CorrelationAnalysis）操作界面。以荧光自相关分析为例，该软件首先对相关计算卡所得数据作图显示自相关衰减曲线；用户此时可对同一样品的重复实验结果目测检验并删除明显偏离平均值的实验数据。CorrelationAnalysis 然后对剩余实验数据计算并展示平均自相关衰减曲线。如果溶液样品中存在一种自由扩散的荧光受测分子，并且荧光检测体积 V 内的激发光强度分布近似于三维高斯分布，则实验所得自相关衰减曲线 $G(\tau)$ 可用以下数学公式进行最小二乘法拟合^[5,7]：

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{(1-T + Te^{-\tau/\tau_T})}{1-T} \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_D}) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D S^2}}} \quad (7)$$

$N=1/G(0)$ 为荧光检测体积 V （图2B）内的平均受测分子个数， τ_D 为受测分子的特征扩散相关时间, S 为荧光检测体积 V 的形状参数（StructureParameter）， T （ $0 \leq T < 1$ ）为体积 V 内受激发光分子处于三重态（TripletState）的比例， τ_T 为三重态寿命（即磷光寿命）。 T 与激发光强度成正比；因此，在保证实验数据信噪比的前提下，FCS实验通常采用最小激发光强度使 $T \rightarrow 0$ 并由此最大限度地减少荧光分子淬灭。 S 描述的是荧光检测体积 V 的形状，由以下公式确定：

$$S = \frac{Z_0}{r_0} \quad (8a)$$

荧光检测体积 V 中心处激发光的光强 (I_0) 最强; z_0 和 r_0 分别是沿 Z 或 X (Y) 轴, 激发光强度减弱为 I_0/e 处离体积 V 中心的距离; e 为自然常数。 S 的理论值为 2-3, 其实验测得值需小于 10 以反应工作状态良好的荧光激发和检测光路; S 的可重复性反应了 FCS 仪器工作状态的重复性。

根据实验测定的 N , τ_D 和 S 值, 可经一步计算 FCS 仪器和受测样品的属性^[5,7]:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (8b)$$

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (8c)$$

$$V = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0 \quad (8d)$$

$$C_M = \frac{N}{N_A V} \quad (8e)$$

D 为受测分子在溶液中的扩散系数 (DiffusionCoefficient; m^2/s), 由 Stokes-Einstein 方程式 (公式 8c) 决定: 其中, K_B 为 Boltzmann 常数 (J/K)、 T 为开尔文温度 (K)、 η 为溶液的粘稠度 ($N\cdot s/m^2$)、 R_H 为受检分子的水动力半径。 C_M 为受测分子的摩尔浓度, N_A 为阿伏伽德罗常数。

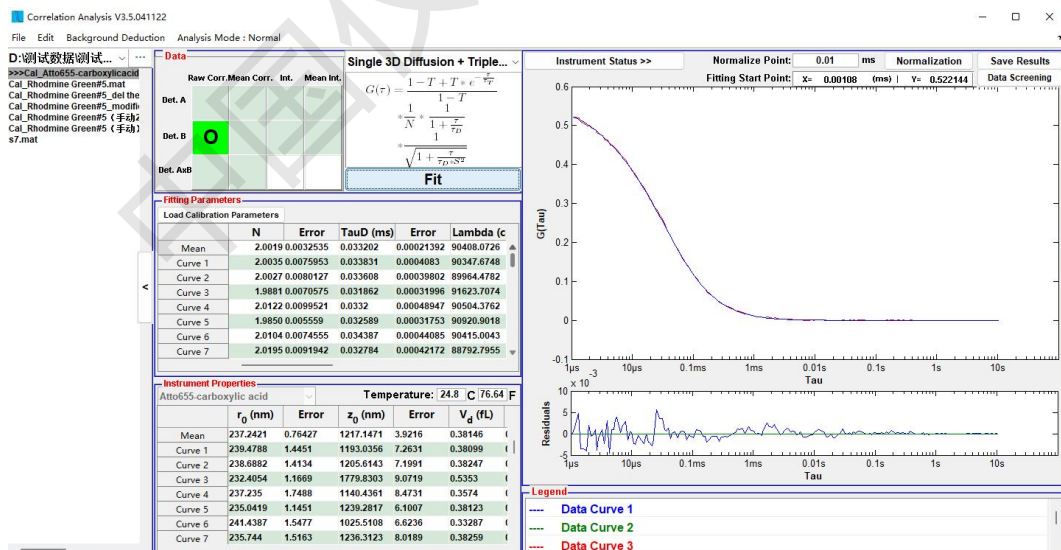


图 6 数据分析软件 (CorrelationAnalysis) 用户界面示范。

Figure6Userinterfaceexampleofthedataanalysissoftware(CorrelationAnalysis).

使用极低浓度样品时（比如 10pMAlexa488）,FCS 实验的背景信号(即 HPLC 纯水样品信号 $\langle F_{BG}(t) \rangle$)变得不可忽律并可能占样品信号 $\langle F(t) \rangle$ 的 90% 以上。然后，只要背景信号本身没有自相关性(即 $G(\tau) \rightarrow 0$)则实验测得的样品浓度可由以下公式修正^[5]:

$$C' = \frac{[\langle F(t) \rangle - \langle F_{BG}(t) \rangle]^2}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (9)$$

如果溶液样品中存在 i 个自由扩散的荧光分子且相应的荧光亮度为 γ_i ，则实验测得自相关衰减曲线可由以下公式拟合^[5]:

$$G(\tau) = \frac{\sum_{i=1} \langle \gamma_i N_i(t) \rangle^2 G_i(\tau)}{(\sum_{i=1} \langle \gamma_i N_i(t) \rangle)^2} = \frac{\sum_{i=1} \langle F_i(t) \rangle^2 G_i(\tau)}{(\sum_{i=1} \langle F_i(t) \rangle)^2} \quad (10)$$

$\langle F_i(t) \rangle$ 和 $G_i(\tau)$ 分别为 i th 荧光分子的平均信号强度和自相关衰减曲线。因此，对于如上所述的荧光免疫结合反应 I，其自相关衰减曲线可用以下公式描述^[5,8]:

$$G(\tau) = \frac{(1-T + Te^{-\tau/\tau_T})}{1-T} \cdot \left[\frac{\gamma_F^2 N_F}{(\gamma_F N_F + \gamma_B N_B)^2} \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_{FD}}) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{FD}} S^2}} \right. \\ \left. + \frac{\gamma_B^2 N_B}{(\gamma_F N_F + \gamma_B N_B)^2} \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_{BD}}) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{BD}} S^2}} \right] \quad (11)$$

γ_F 和 γ_B 分别是实验测定、游离态或结合态抗原标记荧光分子的亮度； N_F 和 N_B 分别是游离态或结合态抗原分子在荧光检测体积 V （图 2B）内的平均分子个数； τ_{FD} 和 τ_{BD} 分别是游离态或结合态抗原分子的相关扩散时间，需在抗体分子缺失或饱和的实验条件下单独测定。方程式 11 假设游离态或结合态抗原并不影响其标记荧光分子的三重态光物理特性。上述荧光免疫结合实验也可在足够低的激发光强度条件下进行，从而忽律标记荧光分子的光物理特性（即 $T \rightarrow 0$ ）。

实验测得的荧光交相关衰减曲线由以下公式描述^[6,9]:

$$G(\tau) = G_X(0) \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_{XD}}) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{XD}} S^2}} \quad (12)$$

τ_{XD} 是分子 M_1 和 M_2 结合反应形成分子复合物 M_1-M_2 的相关扩散时间。公式 12 中:

$$G_X(0) = \frac{VC_X}{V(C_1 + C_X) \cdot V(C_2 + C_X)} = G_1(0)G_2(0)N_X \quad (13)$$

C_1 、 C_2 和 C_X 分别代表游离态 M_1 、游离态 M_2 和结合态 M_1-M_2 分子浓度， N_X 为分子复合物 M_1-M_2 在荧光检测体积 V 内的平均分子个数。由于 (C_1+C_X) 和 (C_2+C_X) 分别代表了分子 M_1 和 M_2 在溶液样品中的总浓度（固定常数），实验测得的荧光交相关幅度 $G_X(0)$ 与分子复合物 M_1-M_2 的浓度 C_X 成正比。此外，由公式 13 可得 $N_X=G_X(0)/G_1(0)G_2(0)$ ；因此对一次交相关实验所得的两条自相关衰减曲线和一条交相关衰减曲线（图 2F）进行分析可得荧光检测体积 V 内分子复合物 M_1-M_2 的平均个数。

3 桌面式荧光相关光谱仪的性能测试

3.1 样品制备

(1) 实验试剂

HPLC 级 Water（北京百灵威科技有限公司，CAS：7732-18-5）；AlexaFluor™647（LifeTechnology, A20186）；AlexaFluor™488TFPester（Invitrogen, A37570）；FITC（F7250, Sigma, USA）；抗 FITC 单克隆抗体（Abcam, UK）；经 Alexa488 标记的单克隆抗体（Alx488-mAb, donkeyanti-goatIgG, Invitrogen, A11055）；荧光峰值为 680nm 的量子点（CdTe/CdS/ZnSQdot680, 北京北达聚邦科技有限公司）；Nuclease-FreeWater（康维世纪）；AnnealingBufferforDNAoligos(5X, Byotime, D0251)；Alexa488 标记的 DNA 单链（Alx488-ssDNA）；Alx488-5'-CCGCACTATACGATAGTAGTCATCAGCAGTCAGAGACGGC-3'；1 μ M)；Alexa647 标记 DNA 单链（Alx647-ssDNA）；Alx647-5'-GCCGTCTCTGACTGCTGATGACTACTATCGTATAGTGCGG-3'；1 μ M)；EDTA-Na₂•2H₂O；NaOH 颗粒；Tris；硼酸；丙烯酰胺；过硫酸铵；TEMED；20bpDNALadderMarker(Takara, Cat#3420A)。

(2) 双链 DNA 复合及提纯^[11]

用生理盐水分别配制浓度为 1nM 的互补 Alx488-ssDNA 和 Alx647-ssDNA 溶液各 50 μ l，放置 4°C 备用。将以上溶液混合摇匀并室温放置 10 分钟，然后依次在第 15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、35 分钟、40 分钟、45 分钟、50 分钟、60 分钟、70 分钟、80 分钟和 100 分钟对混合样品进行 FCCS 检测。

配置单链 DNA 复合反应液：nuclease-freewater(24 μ l)，annealingbufferforDNAoligos(5X, 8 μ l)，Alx488-ssDNA（1 μ M，4 μ l）和 Alx647-ssDNA（1 μ M，4 μ l）。将上述反应液放置于 PCR 仪中，先设置 95°C 反应时间 5 分钟，然后设置 72°C 反应时间 2 分钟，取出反应液后冷

却至室温。用 15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，纯化，然后放置-20°C冰箱保存。实验时将 Alexa488 和 Alexa647 荧光标记的 DNA 双链 (Alx488-dsDNA-Alx647) 溶液依次稀释 5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1000 倍、5000 倍、10000 倍、20000 倍和 40000 倍进行 FCCS 检测。

3.2 CorTectorTMSX 检测分子浓度、大小和相互作用

对配制浓度为 1nM 的 Alexa647 (Alx647) 荧光分子标准样品进行 10 次,每次 10 秒的重复荧光自相关实验 (图 7A)；10 次自相关衰减曲线几乎完全重叠，验证了仪器的稳定性。对平均自相关衰减曲线 (图 7A；黑色数据点) 进行最小二乘拟合 (公式 7)，从拟合曲线 (图 7A；红色曲线) 的 $G(0)$ 值可计算样品浓度为 $0.70 \pm 0.03 \text{ nM}$ (standard error)。对三个数量级浓度区间 (10pM-10nM) 的 Alx647 样品进行测量，可得配制浓度与测得浓度之间的完美线性关系 (线性回归系数 $R^2=1$ ；图 8A)。

在相同浓度 (1nM) 条件下，应用荧光自相关技术对比不同分子量的荧光待测物：荧光分子 Alexa488 (Alx488；分子量~643Da)，经 Alx488 标记的单链核酸片段 (Alx488-ssDNA；40 碱基，~13kDa)，经 Alx488 标记的单克隆抗体 (Alx488-mAb，~15kDa) 和荧光峰值为 680nm 的量子点 (CdTe/CdS/ZnSQdot680，~15kDa)。受测物分子量 (体积) 的增加反应在其自相关曲线的 τ_D 值增长 (图 7B)。 τ_D 值显示 Alx488 的水动力半径 (R_H) 远小于其它三种受测物。Alx488-ssDNA 与 Alx488-mAb 的分子量相差不大，但前者为线性分子，后者更接近球形；因此两者在水溶液中因平移、翻滚运动而产生的水动力半径 R_H 仍可通过自相关技术区分。厂家提供的 Qdot680 平均分子量与 Alx488-mAb 相同，但我们的实验数据表明前者的 R_H 比后者显著地大。厂家提供的 Qdot680 的直径分布差异也很大 (2-10nm)；相应的自相关曲线的实验误差也很大。因此，荧光相关光谱技术可精确分析量子点体积及其分布，而量子点的大小是决定其光物理特性 (比如荧光光谱) 的关键因数之一。已有文献表明 FCS 技术还可用于测定量子点的关键光物理参数 (光量子效率、化学修饰程度、光闪烁系数等) [12,13]。

筛选具高度特异性亲和力的单克隆抗体是科学研究和医疗检验的必要工作，而 FCS 技术可定量检测抗原-抗体结合反应的 K_D 值。比如，荧光分子 FITC 的分子量 (~389Da) 远小于抗 FITC 单克隆抗体 (mAb，~15kDa)，因此我们可以在均相溶液中应用荧光自相关技术直接检测游离态 FITC 和结合态 FITC-mAb 的摩尔浓度 (公式 11)。通过系统性地改变反应液中的 FITC/mAB 比例，并测定游离态和结合态的 FITC 摩尔浓度，可得抗原-抗体结合曲线及其 $K_D \approx 7.7 \text{ nM}$ (图 7C) [8]。

如果结合反应发生在大小相似的两分子之间，比如两条互补单链 DNA 复合成一条双链 DNA，那么荧光交相关技术可用于测定该反应的反应速率和动力学常数 K 。例如，对两种互补的单链 DNA (Alx488-ssDNA 和 Alx647-ssDNA; 40 碱基) 室温条件下在生理盐水中复合，然后用 FCCS 定时检测混合液的交相关幅度可得双链 DNA 产物的摩尔浓度变化 (图 7D 中的插图)。上述方法可监控 DNA 复合反应历程及其动力学参数 $K=1.2 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (图 7D)。

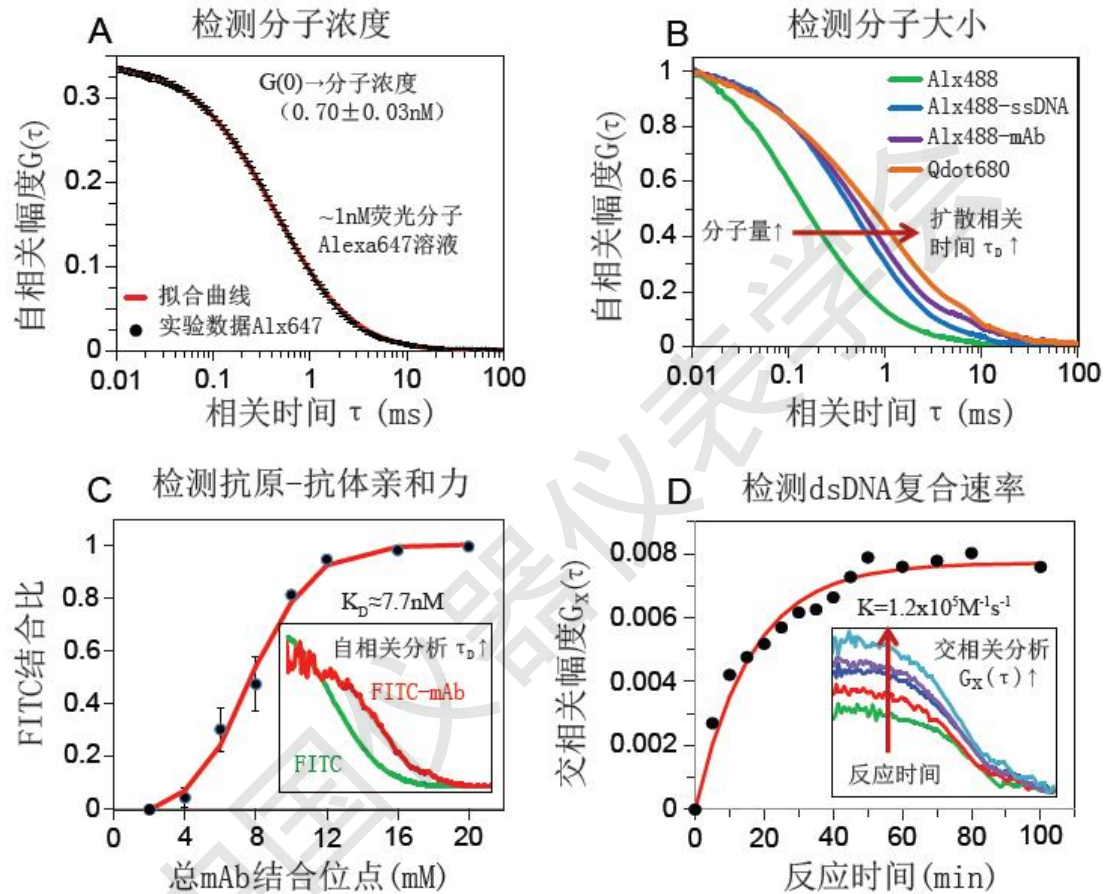


图 7 桌面式荧光相关光谱仪(CorTector™SX)检测分子浓度、分子大小和分子间相互作用。(A) 自相关技术检测荧光分子 Alexa647 (Alx647) 溶液样品浓度。(B) 自相关技术区别分子体积: 荧光分子 Alexa488 (Alx488)、经 Alx488 标记的单链 DNA (Alx488-ssDNA) 和单克隆抗体 (Alx488-mAb)、量子点 Qdot680。(C) 自相关技术检测抗原 (FITC) -抗 FITC 单克隆抗体 (mAb) 结合反应的离解常数 K_D , 插图显示了 FITC 与 mAb 结合后的体积变化。(D) 交相关技术检测经 Alx647 和 Alx488 分别标记的两种互补单链 DNA 复合成一种双链 DNA (Alx488-dsDNA-Alx647) 的化学反应的动力学常数 K ; 插图显示随反应时间增长交相关幅度 $G_X(\tau)$; $G_X(\tau)$ 与反应液中 Alx488-dsDNA-Alx647 的摩尔浓度成正比。

Figure 7

Measurements of molecular concentration, size and interaction using the bench-top fluorescent correlations spectro meter (CorTectorTMSX). (A) FCS measurement of fluorescent molecule Alexa647 (Alx647) concentration. (B) FCS

istinguishes molecular sizes: Alexa488

(Alx488), Alx488 labeled single-stranded DNA (Alx488-ssDNA) and monoclonal antibody (Alx488-mAb), quant um dots Qdot680. (C) FCS measurement of the dissociation constant K_D of antigen (FITC) and anti-FITC monoclonal antibody (mAb) binding reaction. The inset shows the volume changes after binding of FITC to its mAb. (D) FCCS measurement of the kinetic constant K of the annealing reaction of two complementary single-stranded DNAs (Alx488-ssDNA, Alx647-ssDNA) into the double-stranded DNA (Alx488-dsDNA-Alx647). The inset shows the increasing cross-correlation amplitude $G_x(\tau)$ with increasing reaction time; $G_x(\tau)$ is proportional to the molar concentration of Alx488-dsDNA-Alx647 in the reaction solution.

(4) CorTectorTMSX 的浓度检测线性区间

如前所述，FCS 技术可精确测量荧光分子溶液样品的浓度（图 7A）；通过一系列浓度检测实验，我们确定了 CorTectorTMSX 的灵敏度下限及线性检测区间（图 8A）。各类医疗检测应用中，最常用的探针分子为经荧光标记的单克隆抗体或单链 DNA 片段。因此，我们测定了荧光自相关技术对 Alx488-mAb 和 Alx488-ssDNA（40 碱基）探针分子的线性浓度检测区间。实验结果显示，FCS 技术可在 4 个数量级的浓度区间内（10pM-100nM）线性检测抗体和 DNA 探针分子的摩尔浓度（图 8B、8C）。为了验证医疗检测试剂盒中最常用的“夹心法”（荧光免疫反应 II），我们对图 7D 实验所得的双链 DNA（Alx488-dsDNA-Alx647）进行纯化，然后应用 FCCS 技术定量检测其摩尔浓度（公式 12、13）。实验结果显示，FCCS 技术可对 4 个数量级浓度区间（17pM-143nM）的双链 DNA 样品进行精确测量，并且配制浓度与测得浓度之间呈完美的线性关系（ $R^2=1.00$ ；图 8D）。

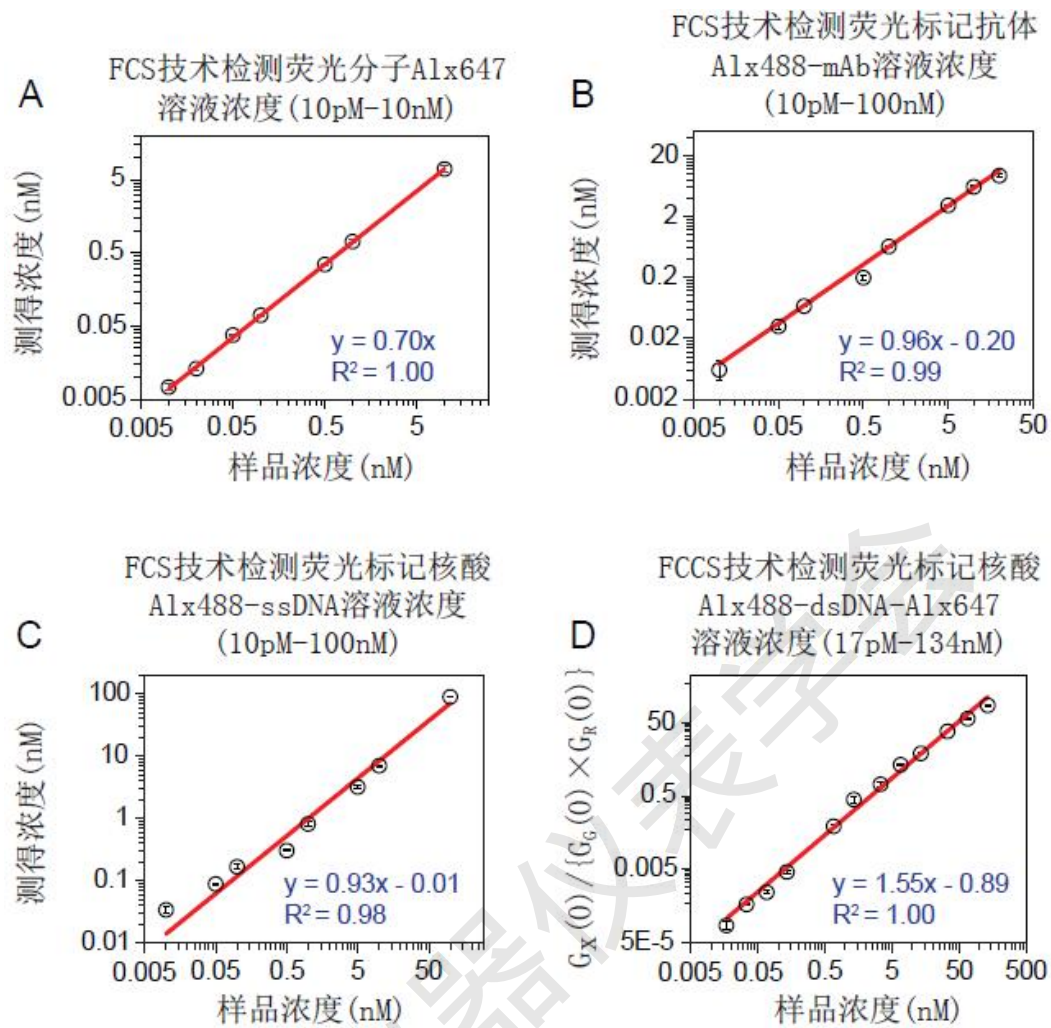


图8 桌面式荧光相关光谱仪 (CorTector™SX) 检测均相溶液中的荧光探针分子浓度。(A) 自相关技术检测荧光分子 Alexa647 (Alx647) 溶液样品的摩尔浓度。(B) 自相关技术检测 Alexa488 标记单克隆抗体 (Alx488-mAb) 溶液样品的摩尔浓度。(C) 自相关技术检测 Alx488 标记单链 DNA (Alx488-ssDNA) 溶液样品的摩尔浓度。(D) 交相关技术检测经 Alexa488 和 Alexa647 标记双链 DNA (Alx488-dsDNA-Alx647) 溶液样品的摩尔浓度。

Figure8

Measurements of molecular concentrations in homogenous solution using the bench-top fluorescence correlation spectrometer (CorTector™SX). (A) FCS measurement of the molar concentrations of the fluorescent molecule Alexa647 (Alx647). (B) FCS measurement of the molar concentrations of the Alexa488 labeled monoclonal antibody (Alx488-mAb). (C) FCS measurement of the molar concentrations of the Alexa488 labeled single-stranded DNA (Alx488-ssDNA). (D) FCCS measurement of the molar concentrations of the Alexa488 and Alexa647 labeled double-stranded DNA (Alx488-dsDNA-Alx647).

以上结果表明，桌面式荧光相关光谱仪 CorTector™SX 在检测分子浓度、分子体积和分子间相互作用等方面具良好性能，并在医疗体外检验领域有潜在的商业应用。

4 讨论

荧光相关光谱技术是基于分子扩散的原理检测分子的属性，因此任何可以导致分子的扩散系数发生变化的过程均可用来研究，如分子间相互作用、分子聚集、多聚体解聚、液-液相分离、生物大分子构象变化等。基于前述荧光自相关技术(FCS)和荧光交相关技术(FCCS)的原理及仪器研制机理，目前使用 CorTector™ 仪器已发表的应用案例如下：

4.1 荧光自相关光谱技术检测抗原抗体亲和力^[14]

基于荧光自相关光谱技术，分别检测了 Alexa Fluor647 carboxylic acid (Thermo Fisher) 和小鼠抗 Cy5 单克隆抗体 (C117, Sigma-Aldrich) 以及 Recombiant eGFP (P7410, Beyotime) 和兔抗 GFP 单克隆抗体 (AF1483, Beyotime) 之间的亲和力大小。文章给出了详细的荧光自相关光谱技术检测抗原抗体亲和力的方法流程，并得到了最终的检测结果，Alexa Fluor647 carboxylic acid 和小鼠抗 Cy5 单克隆抗体的解离常数是 $K_D=0.746 \pm 0.037\text{nM}$ ；Recombiant eGFP 和兔抗 GFP 单克隆抗体的解离常数是 $K_D=35.52 \pm 8.49\text{nM}$ 。

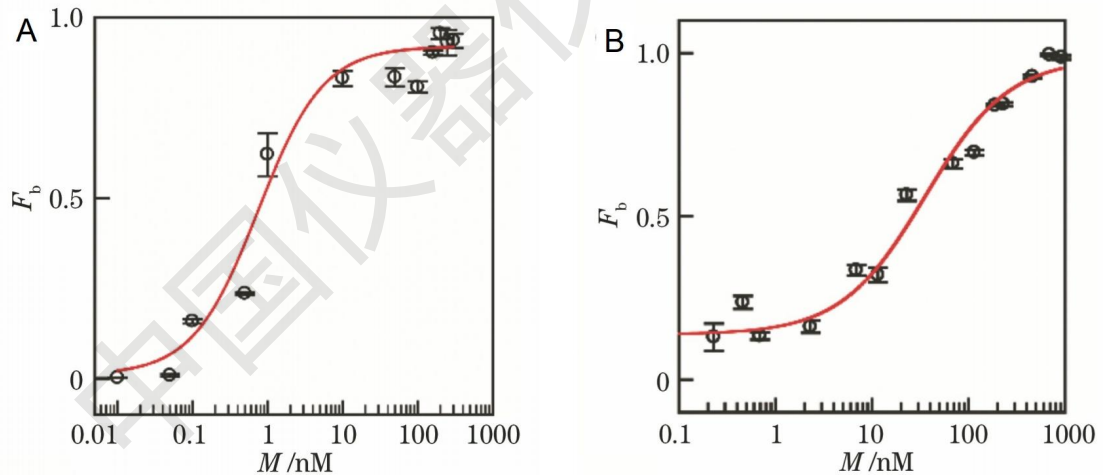


图9 抗原浓度不变的情况下，应抗原结合比例随抗体浓度的变化。(A) Alexa Fluor647 carboxylic acid 浓度不变，其结合比例随小鼠抗 Cy5 单克隆抗体浓度的变化；(B) Recombiant eGFP 浓度不变，其结合比例随兔抗 GFP 单克隆抗体浓度的变化。

Figure9 When the antigen concentration is constant, the antigen binding ratio changes with the antibody concentration. (A) Alexa Fluor647 carboxylic acid concentration is constant, and its binding ratio varies with the concentration of murine anti-CY5 monoclonal antibody; (B) The concentration of Recombiant eGFP was constant, and the binding ratio was changed with the concentration of rabbit anti-GFP

monoclonal antibody.

4.2 荧光自相关光谱技术检测蛋白分子的聚集^[15]

主要研究了一种可导致先天性白内障的酸性 β -结晶蛋白4突变体G64W的生化特性。使用CorTector仪器的荧光自相关光谱技术,进行了CRYBA4野生型(CRYBA4WT)和致病型G64W突变体(CRYBA4G64W)的蛋白质聚合状态的研究,通过对转染CRYBA4WT-EGFP、CRYBA4G64W-EGFP和EGFP的HEK-293T细胞裂解液进行的FCS检测和分析。

根据单粒子实验得到的荧光自相关衰减曲线,得到了单个荧光粒子的特征扩散相关时间 τ_d 。 τ_d -值反映了自由扩散的荧光粒子在FCS荧光检测体积中的停留时间。 τ_d 越大,单粒子直径越大。FCS实验结果表明,大多数CRYBA4WT-EGFP和CRYBA4G64W-EGFP荧光颗粒在细胞裂解物中被保护,其直径小于26nm,与CRYBA4G64W-EGFP颗粒相比,CRYBA4WT-EGFP颗粒的比例更高。此外,CRYBA4G64W-EGFP的荧光颗粒粒径大于40nm,比WT多;突变体G64W可以检测到直径为140nm的非常大的颗粒,但WT和EGFP对照均未检测到(图4G)。根据其晶体结构,EGFP单体的直径约为4nm。考虑到CRYBA4的体积和EGFP与CRYBA4之间的环,作者选择了26nm作为阈值直径可区分单体和寡聚荧光颗粒。对EGFP分子进行了210个单个粒子的分析,其中小粒子(即直径 ≤ 26 nm)的概率为 0.930 ± 0.007 ,大粒子(即直径 > 26 nm)的概率为 0.070 ± 0.007 。CRYBA4WT-EGFP共分析237个粒子,小粒子概率为 0.885 ± 0.038 ,大粒子概率为 0.115 ± 0.038 。共有255个CRYBA4G64W-EGFP蛋白颗粒被检测和分析,其中小颗粒的概率为 0.671 ± 0.012 ,大颗粒的概率为 0.329 ± 0.012 。这些结果表明,与WT相比,G64W突变体有形成更大荧光颗粒的趋势(图4H)。

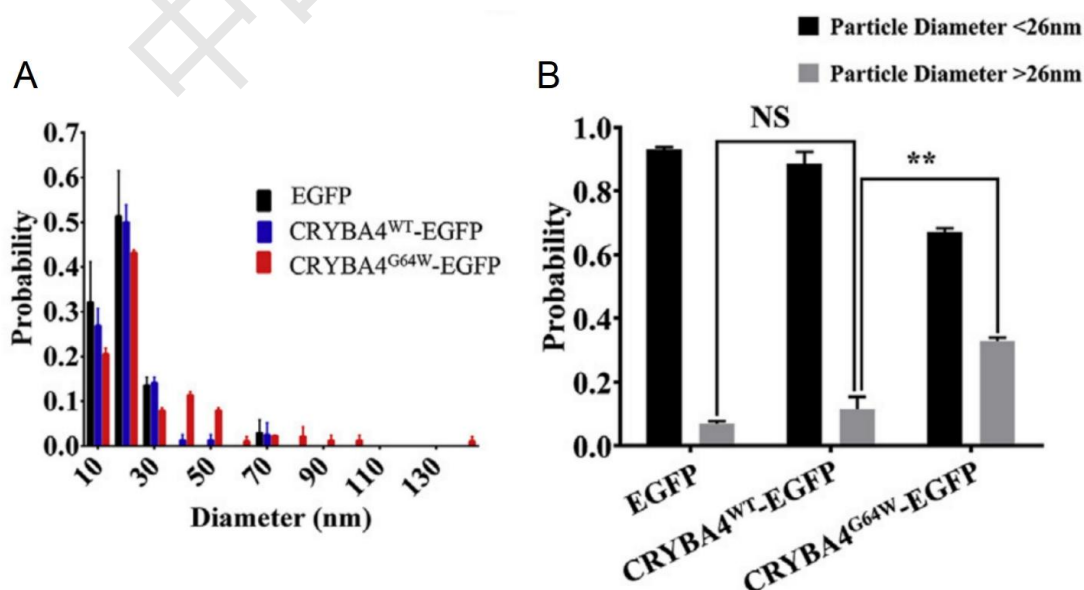


图 10(A)分别转染 CRYBA4WT-EGFP、CRYBA4G64W-EGFP 和 EGFP 的 HEK-293T 细胞裂解液，用于单粒子 FCS 分析。图示为 CRYBA4WT-EGFP(蓝色)、CRYBA4G64W-EGFP(红色)和 EGFP(黑色)的直径分布直方图。(B)小粒子(黑色，直径 ≤ 26 nm)和大粒子(灰色，直径 > 26 nm)的概率。

Figure 10(A) The cell lysate of HEK-293T cells transfected with CRYBA4WT-EGFP, CRYBA4G64W-EGFP and EGFP respectively for single-particle FCS analysis. Histograms of diameter distributions of CRYBA4WT-EGFP (blue), CRYBA4G64W-EGFP (red) and EGFP (black) are shown. (B) Probability of small particles (black, diameter ≤ 26 nm) and large particles (grey, diameter > 26 nm).

4.3 液-液相分离检测^[16]

在大分子相互作用的驱动下，液-液相分离形成无膜隔室，这是含有浓缩大分子的生物分子凝析物。这些凝析物在各种细胞过程中都是必不可少的。然而，由于常用的方法无法捕获小型的自由扩散凝析物，从混溶的单个分子到微米级凝析物的转变过程大多未知。本文采用双色荧光交相关光谱(dcFCCS)方法，捕获了纳米级凝析物的形成，超出了常规荧光显微镜的检测范围。文章给出了使用荧光交相关光谱技术检测液-液相分离的详细方法和流程，并定量检测和分析了纳米级凝析物的尺寸大小和生长速率，以及凝析物内分子的化学计量学和结合亲和力。

4.4 分子组装过程检测^[17]

在 HIV-1 组装过程中，病毒 Gag 多蛋白专门选择二聚体 RNA 基因组包装成新的病毒粒子。二聚体基因组的 5'非翻译区(5'UTR)可能采用一种最适合 Gag 识别的构象。在病毒成熟过程中，Gag 的核衣壳(NC)结构域促进了 5' UTR 进一步的构象重排。有两种不同的 5' UTR 二聚体构象已经在体外被验证过了，接吻二聚体(Kissing Dimer, KD)和扩展二聚体(Extended Dimer, ED)。来自不同 HIV-1 毒株具有不同序列的 5'UTR 是否具有相同的二聚体构象尚未确定。文章应用荧光交相关光谱技术证明了来自两种不同 HIV-1 亚型的 5'UTR 具有不同的稳定性。

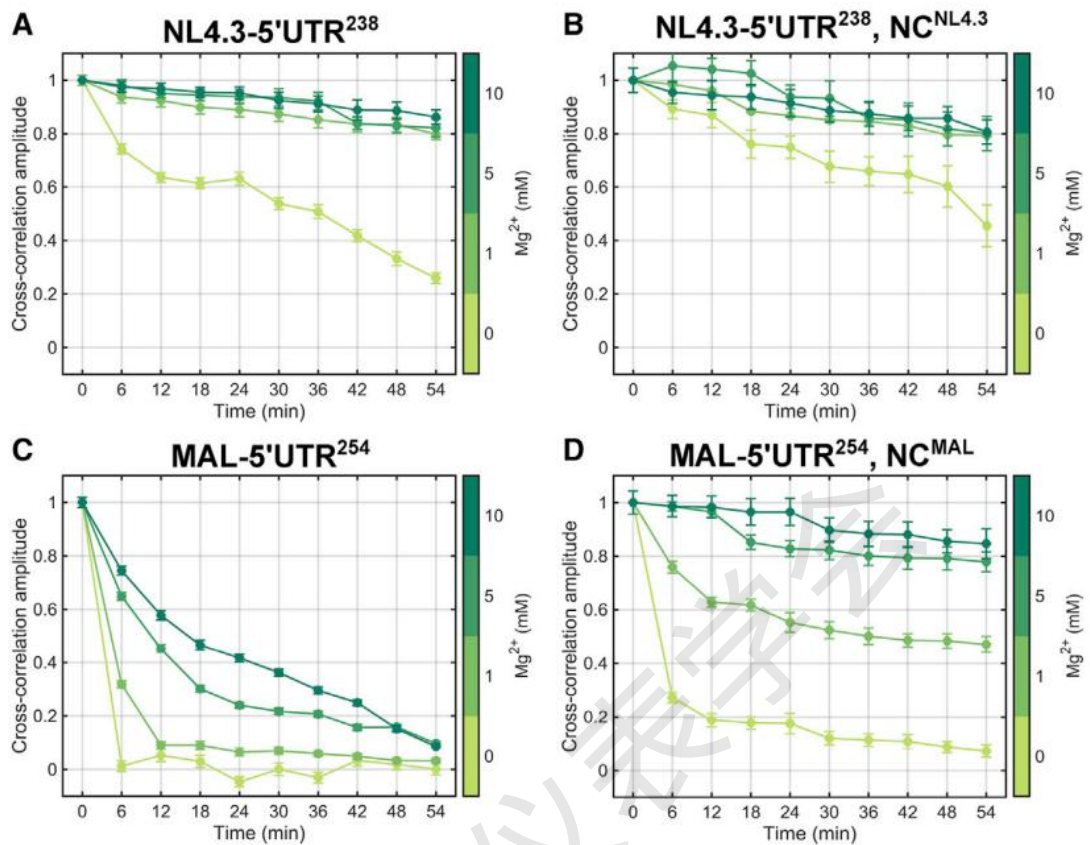


图 11 HIV-1 NL4.3 株和 MAL 株的 5'UTR 二聚体的稳定性。在 1 小时的 FCCS 采集，间隔 6 分钟观察到的 CC(0 毫秒滞后时间)的幅度显示在图中。在 37°C 的环境中，1 小时内 RNA 在 PI 缓冲液(含 1mM Mg^{2+}) 中形成二聚体，然后以指定的 Mg^{2+} 浓度(0-10 mM)稀释到 PI 缓冲液中。所有 FCCS 采集均在室温下进行。通过将 CC 采集的数据拟合到单粒子自由扩散的模型中，可以提取出 CC 的相关幅度。然后将滞后 0-ms 时的 CC 幅度归一化到最大观测值。(A)在没有 $NC^{NL4.3}$ 的情况下，对 NL4.3-5'UTR²³⁸ 形成二聚体的过程数据进行 CC 幅度的归一化。(B)在有 $NC^{NL4.3}$ 的情况下，对 NL4.3-5'UTR²³⁸ 形成二聚体的过程数据进行 CC 幅度的归一化。同样，在(C) NC^{MAL} 不存在和(D) NC^{MAL} 存在的情况下，给出了 MAL-5'UTR²⁵⁴ 形成二聚体过程数据的归一化。数据反映了三次独立测量的平均值，误差条表示平均值的标准误差。

Figure11 Stability of 5'UTR dimers from NL4.3 and MAL strains of HIV-1. The amplitude of the CC (at 0-ms lag time) observed at 6-min intervals over a 1-h FCCS acquisition is shown. RNAs were dimerized in PI buffer (with 1 mM Mg^{2+}) for 1 h at 37 °C, followed by dilution into PI buffer at the indicated Mg^{2+} concentration (0 - 10 mM). All FCCS acquisitions were conducted at room temperature. The CC amplitudes were extracted by fitting the CC functions to a model for a single diffusing species. The CC amplitudes at 0-ms lag time were then normalized to the maximal observed value. (A) Normalized CC amplitudes from NL4.3-5'UTR²³⁸ dimerized in the absence of $NC^{NL4.3}$. (B) The same data from NL4.3-5'UTR²³⁸ dimerized in

the presence of cognate NC^{NL4.3}. Similarly, normalized CC amplitudes from the dimerized MAL-5'UTR²⁵⁴ in the (C) absence and (D) presence of cognate NC^{MAL} are given. The data reflect the mean from three independent measurements, with error bars representing the standard error of the mean.

参考文献:

- [1] Elson E and Magde D, Fluorescence Correlation Spectroscopy.1. Conceptual Basis and Theory[M]. Biopolymers, 1974. 13(1): p. 1-27.
- [2] Magde D, Elson E, and Webb W, Fluorescence Correlation Spectroscopy.2. Experimental Realization[M]. Biopolymers, 1974. 13(1): p. 29-61.
- [3] Magde D, Webb W, and Elson E, Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy[J]. Physical Review Letters, 1972. 29(11): p. 705-&.
- [4] Elson E, Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future[J]. Biophys Journal, 2011. 101(12): p. 2855-70.
- [5] Hess S T, et al., Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review[J]. Biochemistry, 2002. 41(3): p. 697-705.
- [6] Haustein E, Schwille P, Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique[J]. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 2007. 36: p. 151-69.
- [7] Haustein E, and Schwille P, Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy[J]. Methods, 2003. 29(2): p. 153-66.
- [8] Tetin S Y, Ruan Q, Skinner J P, Studying antibody-antigen interactions with fluorescence fluctuation spectroscopy[J]. Methods in enzymology, 2013. 519: p. 139-66.
- [9] Bacia K, Kim S A, Schwille P, Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells[J]. Nat Methods, 2006. 3(2): p. 83-9.
- [10] Hess S T, Webb W, Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy[J]. Biophys J, 2002. 83(4): p. 2300-17.
- [11] Schwille P, Meyer-Almes F J, Rigler R, Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution[J]. Biophys J, 1997. 72(4): p. 1878-86.

- [12] Dong C, Huang X, Ren J, Characterization of water-soluble luminescent quantum dots by fluorescence correlation spectroscopy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1130: p. 253-61.
- [13] Yao J, et al., Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(40): p. 14284-9.
- [14] 骆亚梅, 建林, 等., 荧光自相关光谱技术检测抗原抗体亲和力[J]. *光学学报*, 2021.41 (17): p.1730004-17300012.
- [15] Wenqian Li, Qiangshan Ji, et al., Biochemical characterization of G64W mutant of acidic beta-crystallin 4[J]. *Experimental Eye Research*, 2019. 186(2019-9): p. 107712
- [16] Sijia Peng, Weiping Li, et al., Phase separation at the nanoscale quantified by dcFCCS[J]. *PNAS*, 2020. 117(44): p. 27124-27131.
- [17] Robert J. Blakemore, Cleo Burnett, et al. Stability and conformation of the dimeric HIV-1 genomic RNA 5' UTR[J]. *Biophysical Journal*, 2021. 120(21): p. 4874-4890.