

浅谈单分子荧光检测技术的原理及其在生命科学中的应用

吴晶¹, 刘皎^{1,*}

(北京大学医药卫生分析中心, 北京, 100191)

摘要: 由于单分子检测 (Single Molecule Detection, SMD) 特有的高灵敏度、高空间分辨率、高时间分辨率、高信号质量等特点, 使其有望发现其他常规实验中难以发现的实验现象, 因此成为了生物学、医学及药学等生命科学领域重要的科研工具。本文结合作者所在的北京大学医药卫生分析中心生物成像平台的工作经验, 概述了单分子荧光检测技术的原理以及在生命科学中的应用, 以期为相关科研技术人员提供参考。

关键词: 单分子荧光检测, 荧光互相关光谱, 荧光寿命成像, 应用

Abstract: Single Molecule Detection (SMD) has become an important scientific research tool in the fields of biology, medicine and pharmacy due to its unique sensitivity, resolution and signal quality. Based on the author's work experience in the biological imaging lab of Peking University Medical and Health Analysis Center, this paper summarizes the principle and applications of SMD in the life sciences, in order to provide reference for related scientific researchers and technicians.

Key Words : SMD, FCS, FLIM, Application

1 引言

单分子检测 (Single Molecule Detection, SMD) 技术是一种能够在单分子水平上检测分子的技术, 它具有高灵敏度、高空间分辨率、高时间分辨率、高信号质量等特点。它不但实现了某种意义上可称之为最高灵敏度的分子检测, 而且有可能实时监测反应途径和追踪大分子在执行生理功能时的结构变化, 因此有望发现其他常规实验中难以发现的实验现象。

在单分子检测技术发展之前, 大多数的分子实验是探测分子的综合平均效应 (Ensemble Averages), 即探测大量由一种 (或多种) 对象组成的一个整体所表现出的平均响应和平均值[1]。这一平均效应掩盖了许多特殊的信息, 尤其是生物学里很多小概率事件的发生。相比之下, 单分子检测可以逐个地对体系中的单个分子进行研究, 通过时间相关的方法, 得到某一分子特性的分布状况。这对于了解机体细胞的物理、化学性质及其参与细胞正常功能的机制是十分必要的。它快速、卓越的进展无疑将影响许多科学领域, 为医学、生物学、化学、

物理学和纳米材料等领域提供新的检测手段，目前已成为当今科学研究的热点之一。

在过去的几十年里，科研人员开发和设计了各种技术和实验来检测单个分子。例如上个世纪五十年代使用透射电镜拍摄了 DNA 和蛋白质等单分子的第一张图像；六十年代，有学者开展了间接检测水溶性生物分子的荧光研究，获得了含有高浓度底物的低浓度酶的液滴中存在的分子数量；七十年代，膜片钳被用于研究单分子，此后被广泛应用于离子通道蛋白的研究；八十年代，利用可扩散的多重荧光标记技术检测了单脂质分子；九十年代，应用宽场单荧光成像技术对单荧光团分子进行检测和成像，并且利用单分子荧光定位技术获得了大约 30nm 的分辨率；进入二十一世纪，研究人员开始在单分子水平上只使用一种荧光染料标签，对活细胞进行直接成像，并通过荧光显微镜进行观察[2]。

单分子荧光检测技术是实现单分子检测的手段之一，它利用单个荧光分子的荧光发射特性，对其进行精细控制和观测。本文拟通过对单分子荧光检测技术，包括荧光相关光谱/荧光互相关光谱（Fluorescence Correlation Spectroscopy/ Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, FCS/FCCS）及荧光寿命成像（Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM）技术的特征、原理及这些技术在生命科学领域的应用等方面进行阐述，以其为相关科研技术人员提供参考。

2 单分子荧光检测技术概述

2.1 荧光发射原理[3]

荧光作为一种发射光，它的产生涉及对光子的吸收和再发射两个过程。简单的说，荧光产生有四个步骤（图 1）：

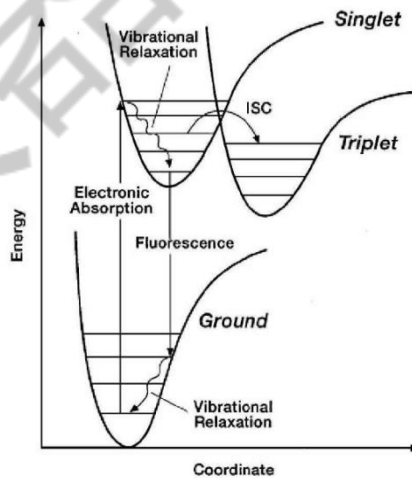


图 1 荧光发射循环示意图