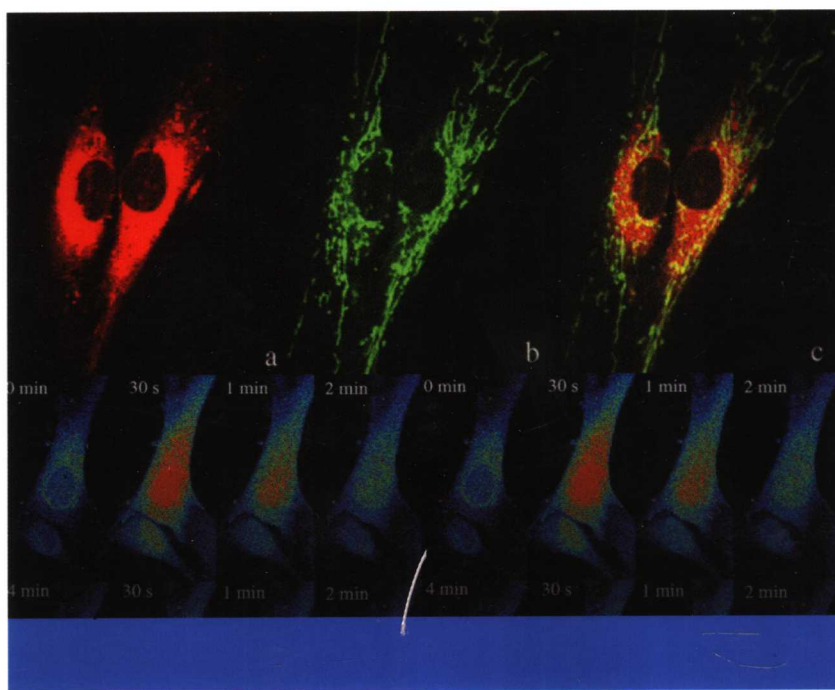


化学前沿应用丛书

化学标记与探针技术在分子生物学中的应用

王彦广 刘 洋 编著



Chemical Industry Press

 化学工业出版社

化学前沿应用丛书

化学标记与探针技术 在分子生物学中的应用

王彦广 刘 洋 编著



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书是《化学前沿应用丛书》分册之一。着重介绍了荧光标记、同位素标记、自旋标记等技术的基本原理及其在分子生物学中的应用,内容涉及各种荧光标记物、同位素标记物、氮氧自由基自旋标记物的结构、理化性质、化学合成、标记方法和应用等,同时还评述了上述各领域的最新研究进展情况和的发展趋势。

本书内容前沿、技术新,可供化学、生物学、医学、物理学等领域的科研人员及高等院校相关专业的师生使用。

图书在版编目(CIP)数据

化学标记与探针技术在分子生物学中的应用/王彦广,
刘洋编著. —北京:化学工业出版社, 2007. 4
(化学前沿应用丛书)
ISBN 978-7-122-00172-6

I. 化… II. ①王…②刘… III. 化学-技术-应用-
分子生物学 IV. Q7

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第041811号

责任编辑:梁虹
责任校对:王素芹

文字编辑:周侗
装帧设计:郑小红

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张9½ 字数202千字 2007年6月北京第1版第1次印刷

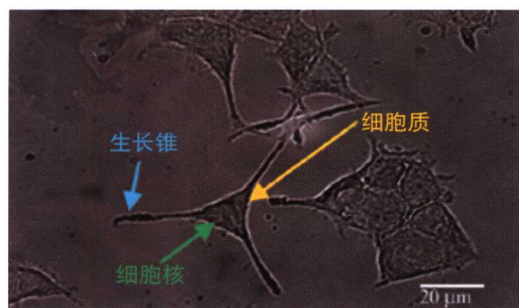
购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

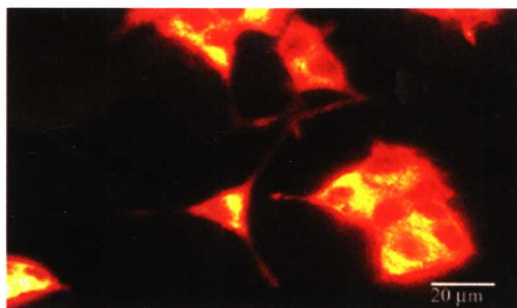
凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:28.00元

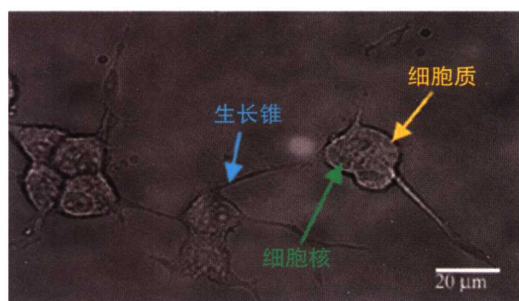
版权所有 违者必究



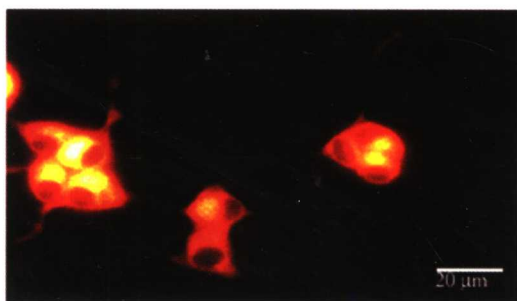
(a) 用 NGF 处理后(3d)



(b) 载有 KMG-20-AM

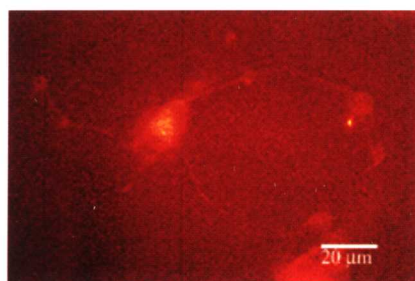


(c) 用 NGF 处理后(5d)

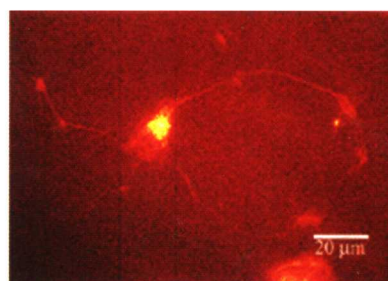
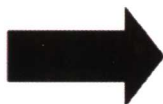


(d) 载有 KMG-27-AM

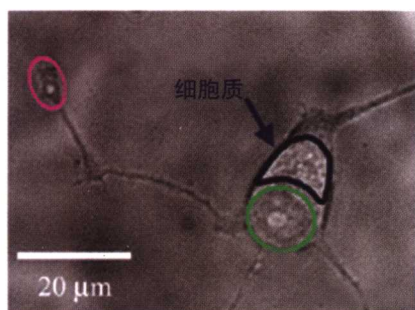
图 3-6 PC12 细胞-Mg²⁺分布成像 (引自: Suzuki et al.2002)



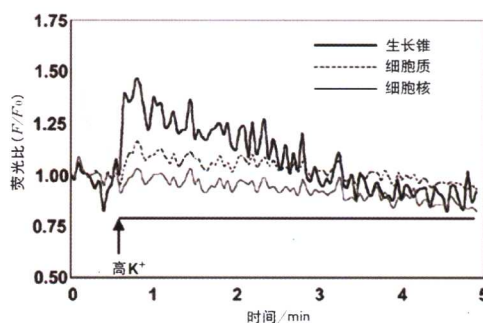
(a)



(b)



(c)



(d)

图 3-7 PC12 细胞的 Mg²⁺ 浓度实时成像 (引自: Suzuki et al.2002)

序

化学作为一门核心的、实用的创造性科学，为人类认识物质世界和人类社会的文明进步做出了巨大的贡献。化学又是许多其他学科的基础，随着其在不同领域的应用，产生了许多交叉学科，这种交叉与渗透，大大地推动了科技进步，并使化学自身向着更深层次和更高水平发展。我国的化学研究，已从不可控的碰撞反应扩展到定向、可控和高选择性的反应或分子剪裁；研究的对象，已从简单体系扩展到复杂体系，从无机扩展到有机和生命系统，从晶态扩展到非晶态，从正常态扩展到临界和超临界态；研究的化学过程，已从平衡态逐步转向非平衡态，从慢反应发展到快和超快（如飞秒）过程；研究的尺度，已从宏观向下延伸至单分子和单原子，向上延伸至介观（纳米尺度）以及分子、离子聚集体；研究的视界，已从国内扩大到国际，从点扩大到面；研究的指导策略，不仅兼顾了短期目标和学科自身的发展，而且重视重大的影响和国家的需求。面临诸如人口控制问题、健康问题、环境问题、能源问题、资源与可持续发展等方面的挑战，化学家们从化学的角度，通过化学的方法解决其中的问题，为我国可持续发展和中华民族的振兴做出了重要的贡献。上述研究所涉及的若干基本化学问题及交叉学科领域，将成为 21 世纪我国化学研究的新方向，成为我国化学家在此领域研究的新的突破点。

化学工业出版社密切关注化学学科的发展前沿和动态，邀请一部分院士和专家组织策划了这样一套高水平、高起点、反映学科发展前沿及化学在高新技术领域中的应用方面的丛书，旨在使读者进一步了解化学这一中心学科对科技发展的重要作用。该丛书从化学的视角，重点阐述化学基本原理应用于生命科学、材料科学、信息科学的最新研究进展以及在学科交叉过程中所形成的新方法和新的实验手段。从而为相关领域的科研人员解决问题提供参考。这套丛书最大的特点是选题立足前沿、方法先进实用、内容阐述深入透彻，第一批包括《纳米超分子化学——从合成受体到功能组装体》、《纳米传感技术及应用》、《化学标记与探针技术在分子生物学中的应用》、《酶联免疫分析技术及应用》、《手性分离技术及应用》、《分子印记技术及应用》、《微流控分析芯片的制作及应用》、《介电谱方法及应用》8 个分册。相信这套丛书的出版将对我国化学及其交叉学科的研究和发展起到积极的推动作用。

白善礼

2007 年 1 月

前 言

20 世纪生命科学的飞速发展不仅得益于化学所提供的原理和理论,而且还得益于化学家所发明的各种分析与检测技术,化学标记和分子探针就属于这样的技术之一。对于复杂的生命体系的分析与检测,标记和探针技术具有灵敏度高、专一性强、快速准确等特点,而且利用标记和探针技术可进行高通量分析、实时检测和分子影像等。正因为这些特点,标记和探针技术已成为现代生物学、医学和药学等领域中不可缺少的重要技术,并得到广泛应用。为此,作者和化学工业出版社都认为有必要撰写一部介绍这方面技术的书籍。

本书内容包括蛋白质与核酸的荧光标记、小分子荧光探针、绿色荧光蛋白及其类似物、量子点荧光探针、同位素标记、自旋标记等。化学标记和分子探针的应用领域发展非常迅速,内容极为丰富,但作为介绍化学学科发展及应用的丛书之一,本书在内容安排上采取了少而精的原则,在取材方面力求新颖性和前沿性,例如,在部分章节中介绍了近年来发展起来的用于单细胞、单分子检测的标记与探针技术,以及量子点荧光探针等。绿色荧光蛋白的制备与标记虽然采用生物技术,但绿色荧光蛋白本身包含了丰富的化学知识,故本书将其作为单独的一章进行讨论。此外,本书各章末还列出了相应的参考文献,以便读者查阅。

我们在突出上述主要特色方面做了一定努力,在有些方面可能是成功的,但在某些方面可能还不尽如人意。由于作者水平有限,时间仓促,书中不妥之处,恳切希望同行及读者批评指正。

作 者

2007 年 3 月于求是园

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 探针与标记	1
1.2 探针的分类及其检测技术	2
1.3 芯片技术	3
1.4 基于探针技术的单细胞和单分子检测	3
参考文献	5
第 2 章 蛋白质与核酸的荧光标记	6
2.1 基本原理	6
2.1.1 荧光的产生	6
2.1.2 荧光探针的一些重要参数	7
2.1.3 分子结构与荧光的关系	8
2.1.4 细胞内常见的内源性荧光分子	9
2.1.5 荧光探针	9
2.2 蛋白质的荧光标记	10
2.2.1 通过化学反应进行标记	10
2.2.2 蛋白质的特异性标记方法	16
2.2.3 抗体的标记	25
2.3 核酸的荧光标记	25
2.3.1 寡核苷酸的标记	26
2.3.2 核酸的标记	32
2.3.3 通过生物素-亲和素系统进行特异性标记	33
2.3.4 核酸荧光探针的应用	33
参考文献	38
第 3 章 小分子荧光探针	39
3.1 用于检测阳离子的小分子荧光探针	39
3.1.1 金属离子荧光探针的基本结构	39
3.1.2 检测钾离子和钠离子的荧光探针	41
3.1.3 检测钙离子的荧光探针	43

3.1.4 检测镁离子的荧光探针	45
3.1.5 检测锌离子的荧光探针	49
3.2 用于检测 pH 的小分子荧光探针	53
3.3 用于检测阴离子的小分子荧光探针	55
3.4 用于检测自由基的小分子荧光探针	58
3.4.1 检测活性氧的荧光探针	59
3.4.2 检测活性氮的荧光探针	65
3.5 用于测定酶活性的小分子荧光探针	68
参考文献	68
第 4 章 绿色荧光蛋白及其类似物	71
4.1 绿色荧光蛋白的化学结构	71
4.1.1 一级结构及发光原理	71
4.1.2 三维结构	72
4.2 绿色荧光蛋白的性质	73
4.2.1 GFP 的光谱特性	73
4.2.2 GFP 和它的突变体	73
4.2.3 双光子激发	75
4.2.4 GFP 的稳定性	75
4.2.5 GFP 的改进	75
4.3 绿色荧光蛋白在分子生物学中的应用	76
4.3.1 作为报告基因的应用	76
4.3.2 作为融合标签的应用	77
4.3.3 作为生物传感器的应用	78
4.4 绿色荧光蛋白类似物	87
4.4.1 来自珊瑚虫的荧光蛋白 DsRed	87
4.4.2 来自海洋中三色紫罗兰的荧光蛋白	89
4.4.3 来自地中海海葵中的荧光蛋白	89
参考文献	90
第 5 章 量子点荧光探针	94
5.1 量子点荧光探针的化学性质	94
5.2 量子点荧光探针的光学性质	97
5.3 量子点荧光探针在生物学中的应用	99
5.3.1 量子点荧光探针用于细胞成像	100
5.3.2 量子点荧光探针用于体内成像	101
5.3.3 量子点荧光探针用于荧光免疫分析	103

5.3.4 量子点荧光探针在 FRET 研究中的应用	104
5.4 量子点荧光探针的毒性	106
参考文献	106
第 6 章 同位素标记	109
6.1 放射性同位素的一些基本概念和检测技术	109
6.1.1 放射性活度及其度量单位	109
6.1.2 放射性同位素的半衰期	109
6.1.3 放射性的测量	111
6.2 放射性同位素标记的氨基酸探针和蛋白质探针	111
6.2.1 氨基酸的放射性同位素标记	112
6.2.2 蛋白质和多肽的放射性同位素标记	112
6.2.3 用标记转移技术研究蛋白质-蛋白质相互作用	112
6.3 放射性同位素标记的核酸探针	114
6.3.1 放射性同位素标记的 DNA 探针和 RNA 探针	114
6.3.2 放射性同位素标记的寡核苷酸探针	115
6.4 放射性同位素标记的小分子探针	115
6.4.1 放射性同位素标记的底物在酶结构研究中的应用	115
6.4.2 放射性同位素标记的底物在酶活性检测中的应用	116
6.4.3 放射性同位素标记的小分子探针在生物学和医学领域中的应用	117
6.4.4 放射性同位素标记的配体和药物在正电子发射断层显像技术中的 应用	118
6.5 稳定性同位素标记技术在蛋白质组学定量分析中的应用	120
6.5.1 代谢标记方法	120
6.5.2 提取后标记方法	121
6.5.3 反转标记方法	122
参考文献	123
第 7 章 自旋标记	125
7.1 基本原理	125
7.2 蛋白质和肽的自旋标记	126
7.2.1 标记方法	126
7.2.2 自旋标记法用于研究蛋白质的结构及动力学	126
7.2.3 自旋标记法用于研究蛋白质-核酸的相互作用	131
7.2.4 自旋标记法用于研究蛋白质-蛋白质的相互作用	134
7.3 糖和糖苷的自旋标记	135
7.4 脂质的自旋标记	135

7.4.1	脂质的自旋标记方法	135
7.4.2	自旋标记的脂质在生物膜结构研究中的应用	136
7.4.3	自旋标记的脂质在脂质-蛋白质、蛋白质-蛋白质相互作用研究中的 应用	136
参考文献		139

第 1 章 结 论

1.1 探针与标记

探针 (probes) 是针对某种特定目标物 (生物分子或离子) 的探测器, 它能够特异性识别目标物, 并可直接进行检测或带有可检测标记物的高效探测试剂。化学及生物学意义上的探针被称为化学探针或分子探针, 是指与特定的靶分子发生特异性相互作用, 并可被特殊的检测技术探知的分子。与一般的检测方法相比, 探针技术具有许多特点, 包括灵敏度高, 专一性强, 快速准确, 特别是适合于实时检测和分子影像。这些特点使得探针成为现代生物学、医学和药学等领域中不可缺少的重要技术。

一般情况下, 化学探针至少由两部分构成: 一是具有反应或识别功能的部分; 二是具有信号输出功能的部分。具有识别功能的部分可以是某种核酸或蛋白质等生物大分子, 也可以是某种配体、底物、药物等有机小分子, 在探针中它们负责识别待测的生物靶标。具有信号输出功能的部分通常是某种标记 (labels), 常用的标记有同位素标记、荧光标记、自旋标记、电化学标记等, 它们负责将探针探测到的生物学信息以物理学信号 (如光学、磁学、电学参数) 的形式传输并记录下来。

需要指出的是, 还有一些新兴的探针不带化学标记。这些无标记探针是通过观察探针分子与目标分子杂交前后的质量、构象、介电常数等性质的变化来进行分析与检测的。相应的检测技术包括石英晶体微天平、电化学检测、表面等离子体共振、质谱等。在灵敏度和特异性得到保证的前提下采用无标记技术可使技术成本降低。本书将不对这类技术作进一步讨论。

人类使用探针与标记技术的历史可以追溯到 20 世纪初示踪剂的发明。1904 年, 德国生物化学家努普用带有标记的脂肪分子喂狗, 然后观察这些分子会发生什么变化。他把一个苯环连接在链的一端, 给脂肪分子做上标记。他使用苯环是因为哺乳动物体内没有能够分解苯环的酶。结果发现狗排出的苯环总是附带着一个双碳的侧链。由此推断, 身体一定是每次从脂肪分子上分解出两个碳原子。一般脂肪分子的碳链都含有偶数个碳原子。如果使用链上含有奇数碳原子的脂肪又会如何呢? 在这种情况下, 要是一次截去两个碳原子的话, 最后在苯环上就会只附带一个碳原子。努普用这种脂肪喂狗, 最后的结果果然如此。

1913 年, 匈牙利化学家赫维西和德国化学家帕内特想出了用放射性同位素标记分子的方法。他们以铅盐溶液的方式测量一棵植物吸收了多少铅。由于植物吸收铅的量确实太小了, 用任何可以利用的化学方法都测量不出来。但是, 如果使用放射性铅, 利用铅的放射性就很容易测量出来。赫维西和帕内特给植物施加上这种带有放射性标记的铅

盐溶液；每过一段时间，他们就烧掉一颗植物，然后测定它的灰烬的放射性。用这种方法，他们能够确定植物细胞吸收铅的速率。但是苯环和铅是对生理过程有影响的物质，用它们来作标记很容易破坏活细胞正常的化学反应。最好能够使用实际参与体内一般代谢作用的原子（如氧、氮、碳、氢、磷等原子）来作标记。

1934 年约里奥·居里夫妇证实了人工放射性以后，赫维西立即转到这个方向上来，开始使用含有放射性磷的磷酸盐。他用这种盐测定了植物中磷酸盐的吸收量。遗憾的是，活组织中的一些主要元素的放射性同位素（尤其是氮和氧）是不稳定的，因为它们的寿命很短，最多只有几分钟的半衰期。但是，一些最重要的元素中的确有可以用作标记的稳定同位素，例如 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 和 ^2H 。1931 年尤里分离出氘之后人们就开始用氘来作示踪剂，并发现体内的氢原子并不像人们曾经认为的那样固定在它们的化合物上，而是从一种化合物到另一种化合物穿梭般地来回跑动，在糖分子、水分子等的氧原子上不停地交换位置。因为无法把一个一般的氢原子与另一个相区别，所以，如果没有氘来泄露，这种穿梭活动是发现不了的。这一发现表明，氢原子在体内到处跑动，如果把氘原子附着在氧上，那么，不管有关化合物是否发生全部的化学变化，氘原子都会散布到全身。因此，研究人员必须查明，在一种化合物中发现的氘原子是通过某种确定的酶促反应到那里去的，而不只是通过穿梭或交换的方法跑去的。

1937 年，美国生物化学家舍恩海默用带有 ^{15}N 标记的氨基酸喂养大鼠，又一次发现了交换现象。一个带有标记的氨基酸进入体内以后，几乎所有的氨基酸就都带有 ^{15}N 了。

使用示踪剂使人们对代谢过程逐渐有了详细的了解。它进一步证实了诸如糖的分解、柠檬酸循环以及尿素循环的总图式。它使人们认识了更多新的中间产物，找到了许多其他的反应途径等。1942 年，美国生物化学家 K. E. 布洛赫等把示踪剂氘连接在乙酸根离子的甲基碳原子上，然后用这种乙酸根离子喂大鼠。结果发现氘出现在大鼠的胆固醇分子中。1950 年，布洛赫又利用 ^{14}C 标记的乙酸根离子重复了这个实验。用稳定示踪剂 ^{13}C 标记甲基上的碳，用放射性 ^{14}C 标记羰基上的碳。然后把这种化合物喂给大鼠，分析大鼠的胆固醇，看这两个带有标记的碳在胆固醇分子的什么地方出现。通过对胆固醇碳原子的来源逐一确认，最后形成的图式表明，乙酸根离子在体内首先形成一种名为鲨烯的物质。由于这项工作，布洛赫荣获了 1964 年的诺贝尔生理学或医学奖。

1.2 探针的分类及其检测技术

根据探针本身的化学组成和性质，可将探针分为蛋白质探针、核酸探针以及用于检测阳离子、阴离子、过氧化氢、NO、氨基酸、糖和酶的小分子指示剂和传感器等。其中发展最早、应用最多的是基于碱基配对和分子杂交原理而设计的核酸探针。核酸探针是指带有标记物的已知序列的核酸片段，它能够和待测样品中与其互补的核酸序列杂交而形成双链，已广泛用于基因测序研究中。每一种病原体都具有独特的核酸片段，通过分离和标记这些片段就可制备出探针，用于临床诊断等领域。

根据标记和检测技术类型，又可将探针分为放射性标记和非放射性标记两大类，其中非放射性标记包括荧光标记、自旋标记、地高辛半抗原标记、生物素标记和酶标记等。

放射性标记探针采用放射性同位素作为标记物,所用检测技术为各种探测器,主要包括闪烁探测器、晶体闪烁计数器、液体闪烁计数器。放射性同位素是最早使用,也是应用最广泛的探针标记物。常用的同位素有 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 。其中,以 ^{32}P 应用最普遍。放射性标记的优点是灵敏度高,可以检测到皮克级;缺点是易造成放射性污染,同位素半衰期短、不稳定、成本高等。因此,放射性标记的探针很难商品化。

荧光探针中的标记物为荧光染料以及近年来发展起来的荧光蛋白和量子点,所用检测技术为各种荧光显微技术,包括普通荧光显微镜、激光共聚焦荧光显微镜、多光子激发荧光显微镜、全反射荧光显微镜、荧光寿命图像显微镜等。目前,利用这些技术可进行单细胞、单分子检测。

自旋标记中的标记物通常是稳定氮氧自由基,所用的检测技术为顺磁共振波谱(EPR)。

1.3 芯片技术

芯片技术(又称为微阵列探针技术)是一种将探针以高密度点阵形式固定于小型固体支载体(如硅片、玻片、聚丙烯酰胺凝胶和尼龙膜等)表面,通过靶分子与芯片上探针的特异性结合而对生物样品进行分析检测的高通量探针技术。与传统的探针技术相比,微阵列探针的探针数量大,而且分布密集,因此具有低成本、高速度、高通量等特点。

在微阵列探针中,以 cDNA、基因组 DNA 和寡核苷酸为固定化探针的芯片称为 DNA 芯片或基因芯片;而以多肽和蛋白质为固定化探针的芯片则称为蛋白芯片。大部分 DNA 芯片和蛋白芯片都是采用荧光标记,然后用激光共聚焦扫描仪或 CCD 荧光显微照相技术进行检测。除荧光标记外,电化学标记、同位素标记以及无标记技术(如生物质谱等)也都得到广泛的研究和应用。

自从 20 世纪 80 年代初以来,芯片技术迅速从实验室走向工业化,并在生命科学的诸多领域得到广泛应用,这直接得益于荧光探针固相原位合成技术和照相平版印刷技术的有机结合,以及激光共聚焦显微技术的引入。前者使合成、固定高密度的数以万计的探针分子成为可能,而后者实现了杂交信号的实时、灵敏、准确的分析和检测。

芯片技术为改造传统生物学作出了重要贡献。它将量化的概念和高通量信息学分析引入生物学,使生物学研究从传统的半定量和小批量的数据分析模式进入了高度定量化和大规模集成化的新模式。目前,芯片技术在灵敏度、准确性和高通量检测等方面均取得了重大突破,在基因测序、临床诊断、遗传学普查、蛋白质-DNA 相互作用、小分子-DNA 相互作用、蛋白质功能、药物靶标、新药筛选等研究领域正在发挥着日益重要的作用。

1.4 基于探针技术的单细胞和单分子检测

生命体系中痕量活性物质的分析与检测对获取生命过程中的化学与生物信息、了解

生物分子及其结构与功能的关系、阐明生命现象的原理以及疾病的诊断和治疗等都具有重要的意义。随着生命科学的迅速发展,人们对生命现象的研究已深入到单个细胞和单个分子这样的层次上,迫切需要在更加微观的尺度上对活体进行原位、实时地分析和检测。这为探针和标记技术提出了新的挑战,同时也带来了众多机遇。

细胞是生物体的形态结构和生命活动的基本单位。了解生物体生命活动的规律,必须以研究细胞为基础,探索细胞的生命活动。由于细胞极小(一般直径 $7\sim 100\mu\text{m}$),样品量很少(体积 fL 至 pL),细胞内组分十分复杂(最简单的红细胞含蛋白质上千种),细胞内生化反应速度快(ms 级至 s 级)。因此,对于单细胞的检测要求超小体积、灵敏度高($10^{-15}\sim 10^{-21}\text{mol/L}$)、选择性好、响应速度快的分析技术。采用荧光标记和探针,借助各种荧光显微以及单细胞操纵技术,在单个细胞水平上对细胞进行成像分析和实时动态检测已成为现实(陈宜章等 2005;程介克等 2003)。

单分子测量能够提供不均一的分子群体的信息,例如可以得到所观察到的完整的分布状态(不仅仅是最初的瞬间),可以区分静态不均一性和动态不均一性,还可以检测罕见事件以及被集团平均和分子的不同步所掩盖的事件(Tinnefeld et al. 2005)。为了说明单分子实验和集团平均实验之间的不同,做这样一个比喻:当你在一个大火车站观察数以千计到达的乘客时,你并不能够回答每个火车走的什么路径,多少乘客在哪一站在何时搭乘了火车,或每列火车停了多少次之类的问题。你仅仅观察到了一个平均数,只能得出通常火车一次可以输送数百名乘客这个结论。如果你跟踪某一位乘客的行踪,你就可以轻松地回答上述问题了。如果用单分子技术来监测生物学的反应,就可以检测到单个个体的性质,而在一般的实验中,只能观察到平均结果。

单分子方法的应用已经扩展到多个学科领域,它从一个实验验证手段发展成为一个决定性的研究工具。虽然许多技术已用于单分子研究,但分子探针特别是荧光探针技术尤其适合于蛋白质结构、动力学和功能的单分子研究。现在科学家们只需要借助荧光探针和荧光显微镜,通过单分子荧光光谱学(SMFS)方法检测由单个荧光团发射出来的荧光,就可以“看见”单个微粒和分子。甚至可以直接在原生环境中对单个分子个体进行可视化和示踪,即在分子尺度上对生物系统进行研究。人们已经能用单分子可视化技术来对DNA聚合酶的催化机制进行研究。DNA聚合酶像火车头一样在互补DNA模板链上移动的时候,通过不断插入核苷来合成DNA的一个单链。人们不再需要借助考察DNA的平均长度来计算结合速率,而是直接追踪单个酶分子。此外,通过单分子研究人们还对酶的工作机制和性能有了更新的了解。有关单分子荧光光谱学方面的研究进展,读者可阅读Michalet (Michalet et al. 2006)、Neuweiler (Neuweiler et al. 2005)、陈宜章(2005)、赵新生(梁璋仪等 2005)、Kubitscheck (Kubitscheck 2002)等人最近的综述。

近年来,对活细胞内单个荧光蛋白分子、纳米尺寸的核蛋白微粒以及病毒分子的可视化和示踪研究得到了实现(Kubitscheck 2002)。这一切主要得益于光稳定性好的荧光染料和极低浓度的荧光探针的发明和使用,以及装备有高灵敏的慢扫描或增强CCD的广角荧光显微镜的开发应用。在纳米精度上对细胞内单个分子的观测可以绘出细胞内分子动力学的全景图。这意味着将可以直接得到诸如蛋白质复合物的装配位点以及相互

作用时的排列顺序和几何构型，蛋白质运动性的结构基础、运输机制、相互作用的位点，蛋白质复合物的分解等信息。因此，通过直接显示活细胞内分子组分的活性，单分子示踪将使细胞内复杂的过程更容易理解。

参 考 文 献

- 陈宜章，林其谁. 2005. 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.
- 程介克，庞代文，黄卫华，鲁馨. 2003. 大学化学，18：1-10.
- 梁璋仪，赵新生. 2005. 大学化学，20：1-10.
- Kubitscheck U. 2002. Single Mol, 3：267-274.
- Michalet X, Weiss S, Jäger M. 2006. Chem Rev, 106：1785-1813.
- Neuweiler H, Sauer M. 2005. Anal Chem, 77：179A-185A.
- Tinnefeld P, Sauer M. 2005. Angew Chem Int Ed, 44：2642-2671.

第 2 章 蛋白质与核酸的荧光标记

荧光探针技术已发展成为借助荧光显微镜在分子水平上进行实时检测的重要手段。这种技术灵敏度高, 可视性强, 而且对所研究的生物大分子或细胞干扰少, 因而得到普遍应用。分子荧光探针对于金属离子、生物小分子和生物大分子的响应, 使得人们能够用荧光显微镜、荧光光谱, 特别是荧光成像技术来实时检测活细胞内分子或离子浓度以及生物大分子结构的变化过程。用绿色荧光蛋白 (GFP) 及其变体 (如 CFP、YFP 等) 或者小分子荧光染料标记的蛋白质探针在各种细胞事件的实时可视化及示踪细胞内蛋白质表达和定位等方面已得到广泛应用 (Zhang et al. 2002)。另外, 随着人类基因组工程和以核酸为基础的医学诊断技术的发展, 核酸的检测、量化和定性变得越来越重要。检测的方法也从传统的同位素标记逐渐转向荧光检测技术。20 世纪 80 年代, 人们开始使用激光荧光检测器来进行全自动的核酸测序。荧光技术可以弥补传统的同位素检测方法的缺陷, 比如放射性物质的稳定性、储存和处置等方面的问题。通过引入新的硬件和检测系统, 荧光检测可以达到和放射性同位素检测方法同样的灵敏度, 并且通过挖掘荧光过程中的特点, 可以为检测分子间相互作用、生物化学过程和细胞的功能提供新的契机。因而, 人们对荧光标记的核酸的需求和应用在不断地加大。目前, 很多的荧光团都已经商业化, 它们的种类繁多, 最大吸收波长和最大发射波长涵盖了从 350~700nm, 直至处于远红外的电磁波。

本章先介绍蛋白质与核酸的荧光标记, 小分子荧光探针、绿色荧光蛋白以及近年来发展起来的量子点荧光探针将分别在第 3 章、第 4 章和第 5 章中讨论。

2.1 基本原理

2.1.1 荧光的产生

分子中的电子处于不同的能级中, 只要捕获合适的能量 (比如吸收一部分光子), 它就可以从低能级跃迁到高能级。任何波长的光都具有能量 E , $E=h\nu$ (h 是普朗克常数, ν 是光的频率)。由于电子的能级是量子化的, 因此对于一个给定的分子, 它的电子发生能级跃迁所需要的能量也是一个定值。因此只有特定频率的光才会引起某个分子内电子发生能级跃迁。通常, 这只会与跃迁所涉及的那两个轨道的本身性质有关。所以, 简单的官能团如碳碳双键总是在光谱的同一区域引起吸收。而引起吸收的基团被称做发色团。

大多数的有机分子，处于基态的电子都是成对的，而且它们自旋相反。当其中的一个电子被激发到能量高的轨道时，它们不再占有同一轨道，因此它有可能保持原来自旋方向，也可能变成相反的方向。如果一个分子中两个未成对电子的自旋方向相同，那么它叫做三线态（T）；如果一个分子中所有未成对电子的自旋方向都是成对的，就叫做单线态（S）。能量最低的单线态激发态叫做 S_1 ，次低的叫 S_2 ……，同时三线态也分别记做 T_1 、 T_2 ……。 S_0 是指基态，大多数情况下，由 S_0 激发到 T 是不可能的。因此，大多数分子，只发生单线态到单线态的激发。

一个分子被激发之后，激发态不会维持很久。在液体或者固体状态，激发到 S_2 或更高能级的分子在极短的时间内就会回到 S_1 态，而在 S_1 态内不同能级的分子也会极快地回到 S_1 态最低能级。所以，一般情况下， S_1 态最低能级是最主要的激发态。激发态回到基态有很多种过程，其中，分子如果从 S_1 态最低能级直接回到 S_0 态，那么它将以光的形式释放能量，这就是荧光。这个过程在小分子和刚性分子里是较为常见的。

2.1.2 荧光探针的一些重要参数

2.1.2.1 吸收系数 (ϵ)

荧光探针的荧光取决于它吸收和放出光子的效率，吸收系数是光子吸收效率的度量。计算式是： $\epsilon = E/cl$ ，式中， c 代表探针的物质的量浓度， l 代表比色皿的厚度， $E = \lg I_0/I$ ， I_0 是激发光的强度， I 是透过光的强度。目前，有实际价值的荧光探针的吸收系数一般在 $5000 \sim 200000 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

2.1.2.2 量子产率 (Φ)

发射光的强度直接与量子产率有关，它是指发射光子的数目与吸收光子的数目之间的比值。荧光探针的荧光强度是由吸收系数和量子产率的乘积决定的。

2.1.2.3 激发波长

当用 500nm 以下的激发光照射时，细胞将会产生自发荧光，这些荧光主要来自黄素、黄素蛋白、NADH 等分子。为了减少细胞自发荧光的影响，需要探针的激发波长大于 500nm 。用长波长的激发光的优点不止如此，还可以减少对细胞的损伤，减少光的散射，增加穿透能力。

2.1.2.4 光稳定性

荧光探针必须能够重复地被激发和检测，所以它们必须有强的光稳定性。但是大多数荧光探针在激发时总会产生不可逆的损伤，即产生了光漂白，这种现象在显微镜检测时较常发生。

2.1.2.5 激发态寿命 (τ)

激发态寿命是指一个分子在激发态的平均时间。激发态寿命短的荧光探针灵敏度高，这是因为它可以迅速地由激发态恢复，允许多次激发。大多数生色团的激发态寿命在纳秒数量级。

2.1.2.6 其他要求

荧光探针的设计还要考虑它的可溶性，如果是在细胞内应用的探针，还要考虑它的透膜性，不能影响靶分子、细胞和组织的功能等。