

“十一五”国家重点图书出版规划项目



生命科学实验指南系列

Single-Molecule Techniques  
A Laboratory Manual

# 单分子技术 实验指南

〔美〕 P.R. 塞尔文

主编

〔韩〕 河泽集

罗建红

主译



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

中国科学院 中国科学院大学 中国科学院研究生院

中国科学院图书馆 中国科学院南京地质研究所图书馆

Single-Molecule Technology

Experimental Guide

# 单分子技术 实验指南

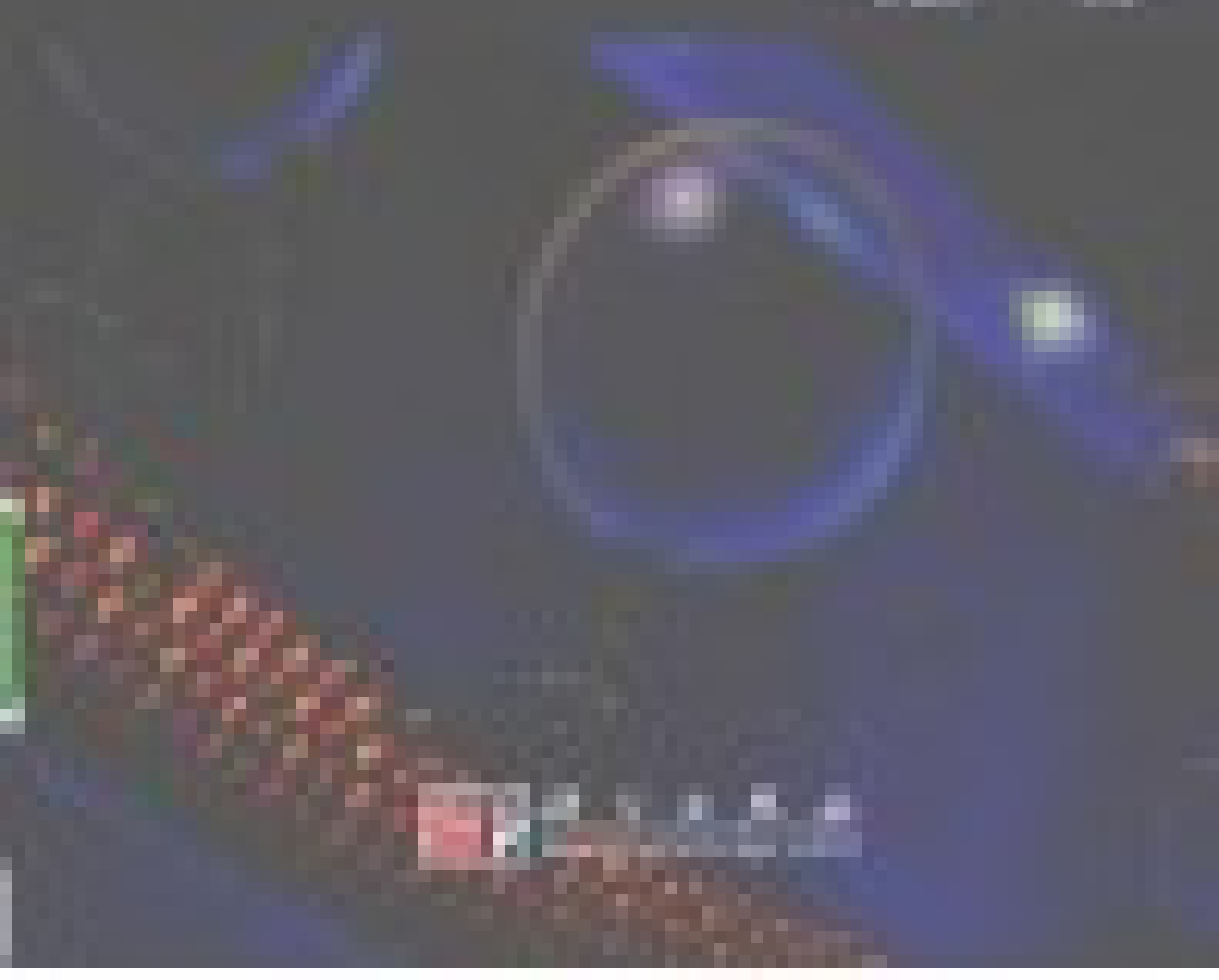
（第二版）

陈 旭 编

陈旭

110

110



“十一五”国家重点图书出版规划项目

生命科学实验指南系列

# 单分子技术实验指南

**Single-Molecule Techniques**

A Laboratory Manual

科学出版社

北 京

图字:01-2008-3026 号

## 内 容 简 介

生命过程的单分子研究是一个新兴的研究领域,常常清晰并令人惊奇地揭示出生物大分子的精细工作。本书在世界范围内首次较全面地介绍了单分子研究技术,主要涉及两大类技术,一是荧光成像和光谱学技术,二是基于力学的操作和检测。全书共分 21 章。第 1 章对单分子技术的发展做了回顾和展望,其余 20 章均以技术为主题,除扼要介绍相关理论外,主要是结合具体的研究实例较详细地介绍实验方法。本书语言清晰易懂,具有很强的实用性。

本书不仅对单分子生物学领域的专家具有重要的参考价值,更重要的是对那些想要在单分子领域做些研究的研究生、博士后及其他研究者也将会是极大的帮助。

Originally published in English as *Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual* by Paul R. Selvin, Taekjip Ha © 2008 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

© 2009 Science Press. Printed in China.

Authorized Simplified Chinese translation of the English edition © 2008 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Laboratory Press, the owner of all rights to publish and sell the same.

## 图书在版编目(CIP)数据

单分子技术实验指南/(美)塞尔文(Selvin, P. R.)等主编;罗建红主译. —北京:科学出版社, 2010

(生命科学实验指南系列)

书名原文:Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual

ISBN 978-7-03-025892-2

I. 单… II. ①塞…②罗… III. 分子生物学-研究 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 198042 号

责任编辑:夏 梁 席 慧/责任校对:宋玲玲

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2010 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010 年 1 月第一次印刷 印张:31 1/4 插页:6

印数:1—3 000 字数:725 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换<长虹>)

## 中译本序

20 世纪 90 年代后期，由于科学发展的必然以及技术条件的渐臻完备，兴起了以研究活细胞大分子为目的的单分子研究，有人称之为单分子生物学 (biology in singulo)，它是 21 世纪生命科学发展的一个重要方向，其前景非常广阔。

《单分子技术实验指南》就是为了满足这一客观需要而出版的，它涵盖了相关的各项技术，是世界范围内第一本较全面介绍单分子技术的技术手册专著。它的特色是：①内容新颖，都是最近几年的实验资料和经验总结；②内容翔实，都是各实验室自己做过的实验资料；③有一定的理论阐述，主要见于各章的概论部分。所以，这本手册将会帮助有关科研人员较快地掌握和运用单分子技术；另外，阅读各章节前面所写的理论引言，对于我们理解单分子行为也有所裨益。

单分子研究对于我国的基础科学，特别是生命科学研究具有重要意义，对于推进我国的科学、技术发展也会有长远、持久的作用。《单分子技术实验指南》中译本的问世，一定会对我国单分子研究的发展起到良好的推动作用。

陈宜张

中国科学院院士

2009 年 11 月 17 日

## 前 言

在过去的 20 多年里, 有关生物系统内单分子行为的研究中, 其科学发现的步伐令人印象深刻。如同其他许多领域一样, 这门科学始于技术的发展, 随后不久便应用于生物学。例如, 光阱技术, 始于 1986 年, Arthur Ashkin 发表了用光阱研究单个绝缘颗粒的论文, 之后不到一年他就利用新的光阱技术分离到单个的细菌细胞。1993 年, Steven M Block 用光阱测量了 8 nm 步长的驱动蛋白 (kinesin); 2005 年, 他又测量了 RNA 聚合酶在 DNA 上移动时的单碱基对步长。光学检测也有类似的经历。1989 年, W. E. Moerner 和 L. Kador 发表了有关在液氮温度下检测单分子不均一性的论文。1995 年, Toshio Yanagida 检测到溶液中单个的荧光分子, 今天这已经成为光学成像的标准技术; 1996 年, Taekjip Ha 及其同事拓展了该技术, 建立了检测产生荧光共振能量转移的单分子对的方法。2000 年, Yanagida 和 Hansgeorg Schindler 各自独立完成了在体条件下的单分子分析。今天, 单分子荧光技术 (大多在离体条件下, 也有在在体条件下的) 已成为一个欣欣向荣的领域。其他的一些单分子技术多年来已成为经典方法, 如细胞离子通道的电学测定, Erwin Neher 和 Bert Sakmann 因发明这项技术于 1991 年荣获诺贝尔生理学或医学奖。也有一些新近发展的技术, 如原子力显微镜和应用纳米孔道的电轨迹分析等, 其应用尚未展开。

现在看来应该把单分子检测技术教给一般研究者了, 而不仅仅限于该领域的专家。本书的目的是想教会研究生、博士后研究人员及教授们如何在单分子领域去做一些看似普通或深奥的研究。为了获得更多的读者, 我们尽量使语言表达得清晰、易懂, 而避免成为一个面面俱到的技术总结。希望这样的努力将进一步促进单分子研究领域的发展。

我们从参与写作的优秀的研究人员那里得到了巨大的帮助, 他们花费了大量的时间为本书写了一个或更多的章节。对此, 我们感激不尽! 我们还要感谢冷泉港实验室出版社的工作人员: 编辑部主任 Alex Gann, 是他最早说服我们从事这项工作的; 项目协调员 Inez Sialiano, 他一直非常耐心和友善地与我们一道工作; 发展编辑 Kaaren Janssen, 她一直在做很有价值的工作。我们还要感谢其他所有使本书得以出版的人们。对读者而言, 我们希望你们能喜欢这本书。

伊利诺伊大学 厄本那-香槟分校

P. R. 塞尔文 河泽集

于 2007 年夏

# 目 录

中译本序

前言

|        |                                      |     |
|--------|--------------------------------------|-----|
| 第 1 章  | 单分子生物学的新时代 .....                     | 1   |
| 第 2 章  | 采用全内反射显微镜的单分子荧光共振能量转移技术 .....        | 3   |
| 第 3 章  | 在体和离体条件下用单纳米精度的荧光成像技术观察分子马达的步行 ..... | 38  |
| 第 4 章  | 荧光探针共定位: 具有纳米级分辨率的精准定位 .....         | 72  |
| 第 5 章  | 交替激光激发的单分子检测 .....                   | 84  |
| 第 6 章  | 采用偏振全内反射荧光显微术观察单分子的取向和旋转 .....       | 117 |
| 第 7 章  | 单分子水平的活细胞基因表达的成像 .....               | 146 |
| 第 8 章  | 活细胞内单个病毒的示踪 .....                    | 166 |
| 第 9 章  | 采用荧光量子点进行活细胞超敏感成像 .....              | 188 |
| 第 10 章 | 活体实时基因表达成像技术 .....                   | 203 |
| 第 11 章 | 活细胞内随机信号转导事件的单分子成像技术 .....           | 233 |
| 第 12 章 | 离体和在体的荧光相关光谱术 .....                  | 252 |
| 第 13 章 | 采用光阱技术研究分子马达的性质 .....                | 269 |
| 第 14 章 | 高分辨双光阱光镊的差分检测 .....                  | 286 |
| 第 15 章 | 肌动球蛋白马达的成像和纳米操纵技术 .....              | 312 |
| 第 16 章 | 采用磁阱技术的单分子研究 .....                   | 333 |
| 第 17 章 | 利用原子力显微镜进行多糖和蛋白质的力学探测 .....          | 355 |
| 第 18 章 | 用纳米孔技术进行核酸及 DNA-蛋白质相互作用的单分子研究 .....  | 379 |
| 第 19 章 | 无外部负载、具有高时空分辨率的单分子纳米金颗粒示踪技术 .....    | 407 |
| 第 20 章 | 基于表面的单分子检测技术的进展 .....                | 417 |
| 第 21 章 | 液流牵张力分析法用于核酸-蛋白质相互作用的单分子研究 .....     | 446 |
| 附录     | 警示 .....                             | 478 |
| 索引     | .....                                | 488 |

图版

# 第 1 章 单分子生物学的新时代

Taekjip Ha<sup>\*†‡</sup> Paul R. Selvin<sup>\*†</sup>

<sup>\*</sup> Department of Physics,<sup>†</sup> Center for Biophysics and Computational Biology,  
University of Illinois, Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801;

<sup>‡</sup> Howard Hughes Medical Institute, Urbana, Illinois 61801

由于许多生物学反应过于复杂，用传统的“一锅烩”检测技术难以完全理解。从本质上讲，所有的生物学反应都是通过单个酶、DNA 或 RNA 分子起作用的。单个生物大分子的研究，或称单分子生物学（biology in singulo），能非常清晰并常常令人惊奇地看到生物大分子究竟是如何起作用的。

除了早已建立的生理学核心技术——单通道记录，生命过程的单分子研究是一个新近发展起来的研究领域，整个历史还不到 20 年，近年来得到了蓬勃发展。例如，该领域的论文发表数呈指数增长，约 2.2 年翻一番（Cornish and Ha 2007）。如果这一趋势得以持续，那么 20 年内生物医学的每一篇论文都将包含单分子的数据！但就目前而言，单分子技术仍然还是难以掌握的，而且只有少数研究组获得了该领域研究的资助。我们相信，当单分子技术普及的时候，这种情况就会有所改变。我们希望本实验指南有助于把单分子技术从专家手中交给那些普通的生物医学研究者。

有两类广义的单分子方法，一是荧光成像及其光谱学，二是基于力学的操作和检测。我们将荧光部分又分成离体和在体（即活细胞内）两种。基于力学的单分子技术又分为采用光阱、磁阱、原子力显微镜及纳米孔等几种。

最初单个荧光团的检测是在液氮下通过测量吸收（Moerner and Kador 1989）和荧光（Orrit and Bernard 1990）完成的，后来发展到在室温下完成（Bitzig and Chichester 1993），从而开启了生物学应用的可能性。单分子荧光检测蕴涵了标记生物大分子的哪些信息呢？首先是它的存在和它所在的位置，即定位。通过荧光标记酶或 ATP 分子就能检测出单个酶分子或单个与酶结合的 ATP 分子的存在（第 15 章）。采用二维高斯拟合对单个荧光团（或两个不同颜色的荧光团）的成像进行拟合就可以实现约 1 nm 精度的单个荧光团定位（第 3 章和第 4 章）。其次，单个荧光团的偏振反应可用于推导标记分子或功能域的取向（第 6 章和第 3 章的部分内容）。第三，两个荧光团（分别称为供体和受体）之间的距离可以通过测量两者之间的荧光共振能量转移（FRET）推导得到。两种主要的单分子 FRET 技术，即用全内反射荧光显微镜（TIRFM）对许多分子做平行检测或对弥散分子做共焦检测，将分别在不同的章节中予以介绍（第 2 章和第 5 章）。TIRFM 的检测要求把目标分子定位于表面且不影响其功能。几种表面固定的方法也会在第 20 章及第 2 章、第 3 章和第 21 章的部分内容中加以讨论。

将单分子检测技术扩展到活细胞是个难题，但通过使用以下方法还是可以实现，即高亮度量子点标记（第 9 章）、多拷贝荧光团（第 3 章、第 8 章和第 10 章）、固相化



检测(第7章),及背景荧光的自然衰减(第11章)。严格地说,荧光相关光谱学(FCS)并不是单分子技术,这是因为FCS的信号是来自数以千计的分子信号的平均,但是检测是在“单分子”浓度下完成的,所以在某个特定的时刻,在检测池中只有一个或几个分子。离体及活细胞在体条件下的FCS将在第12章中讨论。

光阱(optical trap 或 optical tweezer)(Ashkin et al. 1986)通过高度聚焦的激光微束可以对捕获的颗粒产生作用力和微小位移。第13章介绍了主要用于肌球蛋白研究的具有纳米级分辨率的单光阱和双光阱技术。第14章介绍了亚纳米级分辨率的双光阱技术。磁阱(magnetic trap 或 magnetic tweezer)(Strick et al. 1996)目前的时空分辨率不如光阱好,但其最大的优点是能产生扭矩并控制DNA分子的超螺旋状态(第16章)。

原子力显微镜(AFM)主要有两种不同的用途,一是作为成像工具(不在本指南讨论范围),二是作为力的传导装置和感受器(第17章)。就力学的测量而言,AFM不如光阱和磁阱敏感,但是它能荷载的力要大得多,已被证明是研究蛋白质折叠和去折叠的理想方法。最后,纳米孔道可以源自天然蛋白质,也可以是薄膜材料上的人造孔道,通过测量纳米孔道的电流可以用来检测DNA和其他大分子在电场驱动下的转运(第18章)。

这些单分子技术未来到底会怎样呢?迄今为止,大多数的离体研究仅限于相对简单的系统,仅涉及一个分子或两个分子的相互作用。然而,在细胞内这些分子并不是孤立起作用的。为了研究由多组分构成的更为复杂的分子机器,必须进一步研发能同时检测两个或更多可观察分子的技术,如通过三色FRET测量多个分子间的距离(第2章和第5章),或把基于力学和荧光的方法组合起来使用。第15章探讨了在光阱下测量荧光的技术。在离体条件下加入越来越多的纯化组分最终会导致研究意义的缩水,自然也就水到渠成地到了进行活细胞在体研究的时候,因为只有细胞能提供所有必需的并使研究具有生理学意义的成分。单分子研究的技术前沿可能会走向以下两个极限:①超高精度的离体单分子研究;②活细胞甚至是生物整体水平的单分子研究。

## 参考文献

- Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., and Chu S. 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* 11: 288–290.
- Betzig E. and Chichester R.J. 1993. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* 262: 1422–1425.
- Cornish P.V. and Ha T. 2007. A survey of single-molecule techniques in chemical biology. *ACS Chem. Biol.* 2: 53–61.
- Moerner W.E. and Kador L. 1989. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.* 62: 2535–2538.
- Orrit M. and Bernard J. 1990. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a *p*-terphenyl crystal. *Phys. Rev. Lett.* 65: 2716–2719.
- Strick T.R., Allemand J.F., Bensimon D., Bensimon A., and Croquette V. 1996. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* 271: 1835–1837.

(罗建红 译)

## 第2章 采用全内反射显微镜的单分子 荧光共振能量转移技术

Chirlmin Joo Taekjip Ha

Department of Physics and Howard Hughes Medical Institute, University of Illinois,  
Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801

### 摘要

单分子 (single molecule, sm) 荧光检测是研究生物事件的一种非常有力的工具。单分子荧光共振能量转移技术 [single molecule Förster (fluorescence) resonance energy transfer, smFRET] 也已经被用来研究各种不同的生物系统。本章主要介绍建立在全内反射 (total internal reflection, TIR) 荧光显微技术基础上的 smFRET。首先介绍染料的选择以及核酸和蛋白质的标记, 然后介绍表面的制备和数据的获取, 接下来讨论关于数据分析的各种方法, 以及物镜型和棱镜型 TIR 显微镜平台的搭建。在本章的最后将提供一系列材料制备以及成像和显微镜技术的实验方案。

### 概述

单分子荧光检测是一项非常强大的技术, 它可以避免时间和群体的平均化对生物事件进行探测 (Weiss 1999; Cornish and Ha 2007)。smFRET 于 1996 年首次被提出 (Ha et al. 1996), 然后被世界各地很多实验小组采用, 用于研究各种不同的生物系统, 包括 DNA、RNA (Zhuang 2005)、蛋白质及一些大的多分子复合物 (Ha 2001a, 2004; Myong et al. 2006)。本章主要聚焦在建立于全内反射荧光显微技术基础之上的 smFRET (表 2-1 总结了本章主要缩略词或简写的全称)。

表 2-1 缩略词/简写及其全称

| 缩略词/简写    | 全称                                                        |
|-----------|-----------------------------------------------------------|
| APD       | 雪崩光电二极管 (avalanche photodiode)                            |
| BSA       | 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)                             |
| CV        | 柱床体积 (column volume)                                      |
| Cys       | 半胱氨酸 (cysteine)                                           |
| DM        | 二色镜 (dichroic mirror)                                     |
| $E$       | FRET 效率 (FRET efficiency)                                 |
| $E_{app}$ | 表观 FRET 效率 (apparent FRET efficiency)                     |
| EMCCD     | 电子倍增电荷偶联器件 (electron multiplying charge-coupled device)   |
| FRET      | 荧光共振能量转移 (Förster/fluorescence resonance energy transfer) |
| HaMMY     | 隐马尔可夫模型 (Hidden Markov modeling)                          |
| $I_A$     | 受体分子的发射强度                                                 |

| 缩略词/简写 | 全称                                                                                |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| $I_D$  | 供体分子的发射强度                                                                         |
| PEG    | 聚乙二醇 (polyethylene glycol)                                                        |
| sm     | 单分子 (single molecule)                                                             |
| TIR    | 全内反射 (total internal reflection)                                                  |
| TMR    | 四甲基罗丹明 (tetramethylrhodamine)                                                     |
| Trolox | 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色酮-2-羧酸 (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromone-2-carboxylic acid) |
| T50    | 含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 50 mmol/L NaCl 的溶液                                |

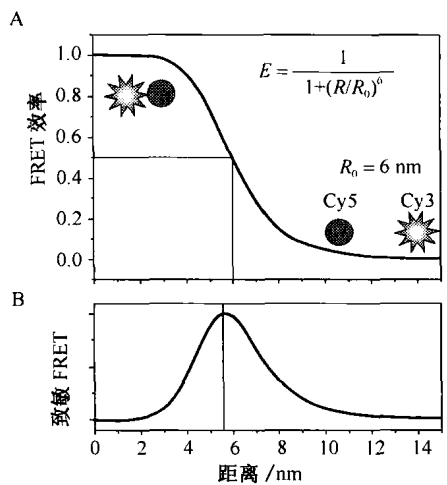


图 2-1 FRET。A. FRET 效率 (FRET efficiency) 依赖于供体与受体之间的距离。当 Cy3 (供体, 圆形) 与 Cy5 (受体, 星形) 之间的距离为  $R_0$  (6 nm) 时, Cy3 将它一半的能量传递给 Cy5; B. 在  $R_0$  附近时 FRET 的改变最显著。

FRET 是一个可以测量距离 (范围在 30~80Å) 的光谱技术 (见第 5 章)。供体分子的激发能量通过两个诱导偶极的相互作用传递给受体分子 (Förster 1948)。能量传递的效率 ( $E$ ) 的计算公式如下:

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

式中,  $R$  为供体和受体之间的距离;  $R_0$  为当转移能量为 50% 时供体与受体之间的距离 (Clegg 1992)。对于 Cy3 和 Cy5 这对比较经典的 smFRET 荧光对来说,  $R_0$  大约是 60 Å。如图 2-1 所示, 当供体与受体分子之间的距离改变几埃或几纳米时,  $E$  就可以发生很大的变化。因此, 可以通过 FRET 来探测一个生物分子的结构改变或者两个相互作用分子的相对位移 (Selvin 2000)。

插注 1.  $R_0$  的计算

$R_0$  的计算公式如下:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\Phi_D\kappa^2J(\nu)}{128\pi^3N_A n^4}$$

式中,  $\Phi_D$  为供体分子的量子产率;  $N_A$  为阿伏伽德罗常数 (Avogadro's number);  $n$  为介质的折射指数;  $\kappa^2$  为取向因子, 它的平均值一般是 2/3;  $J(\nu)$  为标准化的供体发射光谱  $f_D(\lambda)$  和受体吸收光谱  $\epsilon_A(\lambda)$  的重叠, 计算如下:

$$J(\nu) = \frac{\int \epsilon_A(\lambda)f_D(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda)d\lambda}$$

式中,  $\epsilon_A(\lambda)$  的单位为  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ,  $M^{-1}$  为 1000  $cm^3/mol$ 。计算  $R_0$  的免费软件可以从 <http://www.photochemcad.com> 下载, 也可以用 Matlab 程序编写计算。

在整体 FRET 测量中，通常很难让生物分子的构象改变同步化，也无法检测到短暂存在的构象体（图 2-2A）。smFRET 则使实时观测单个生物分子的结构改变成为可能（图 2-2B）。它能够确定几种构象的分布，而不是仅仅将这些构象平均化（McKinney et al. 2003；Lee et al. 2005）。它还可以直接观测到整体条件下很少能观察到的短暂存在的一些结构状态（Nahas et al. 2004；McKinney et al. 2005）。因为可以在数据分析时进行后期同步化处理，因此也就避免了在测量过程中同步化的需要（图 2-2C）（Blanchard et al. 2004）。它还可以研究分子之间的异质性（Zhuang et al. 2002；Okumus et al. 2004）。最后一点，但并不等于不重要，单分子水平的直接观察经常可以得到一些基于整体测量本身无法想象或演算出来的结论（Myong et al. 2005；Joo et al. 2006）。

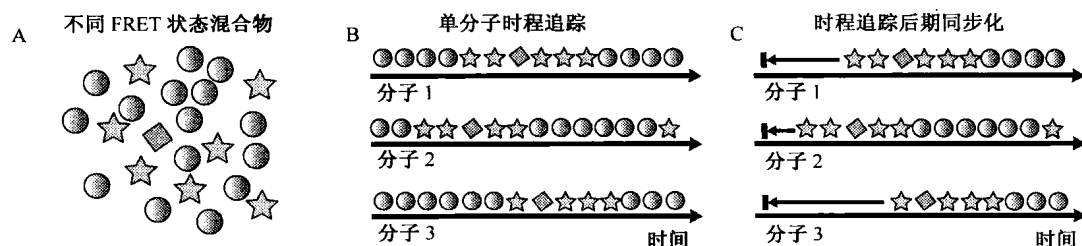


图 2-2 单分子 FRET 研究。A. 整体水平 FRET 检测得到的是众多分子的平均值（mixture of different FRET status）；B. 单分子的时程追踪（single-molecule time trajectory）可以实时观测不同构象的真正的 FRET 状态；C. 观察的事件在数据处理时可以进行后期同步化处理（postsynchronizing time trajectory）。

与其他的单分子技术（如 FIONA、光阱、磁阱等）相比，smFRET 不容易受环境噪声的影响，因为：①它本质上是个比值测量技术，既通过计算两种不同颜色的强度比值来计算 FRET 效率；②它反映了质心系中分子的内在移动。因此可以允许分子之间激发和检测效率的不同。另外，与那些在实验体系中依赖于绝对定位的技术相比，smFRET 实验体系中分子的相对漂移不再是个大问题（见下文，光学平台）。另外，与光阱和磁阱相比，smFRET 更容易从几百个分子中获得数据（如下文的 FRET 柱状图）。因此，可以高度精确地测定生物事件的动力学速度，而且可以筛选出分子之间的内在异质性。不过，有机染料的光物理特性限制了它的时间分辨率，使之局限于毫秒级（ms）（Ha 2001b）。

## 染料的选择

作为单分子研究的理想染料应该尽可能具有以下特点：①光稳定，保证在光漂白之前释放出上百万的光子；②足够亮（高消光系数和量子产率）；③强度波动小，至少在研究的生物事件发生的时程之内保证一定的稳定性；④可激发光和发射光在可见波长范围内；⑤比较小，对宿主细胞干扰少；⑥染料已经商品化并能够交联到生物分子上。

### 最常用的染料

很多种染料（包括 Alexa 和 Atto 系列染料）被用于 smFRET 的研究，其中，Cy3、Cy5 以及四甲基罗丹明（tetramethylrhodamine, TMR）因其优良的光物理学特性，成

为固定分子 FRET 检测的首选染料。Cy3 是我们所测到的最稳定的染料，而对于 Cy5 来说，如果应用含有 Trolox（水溶性维生素 E）的除氧体系也可以大大增加其稳定性（Rasnik et al. 2006）（见成像缓冲液）。TMR 也非常好，它有着与 Cy3 基本相同的光谱，但是消光系数略低。不过，TMR 有可以在两个或三个不同水平之间改变强度的趋势（Buranachai 等未发表数据）。

常用的供体和受体荧光对

对于 smFRET 研究来说，一个理想的荧光对应该是：①供体发射光谱和受体吸收光谱有一定的重叠（图 2-3A）；②供体发射光和受体发射光光谱应该尽可能分开，从而尽量减少漏到受体发射区域的供体发射部分，以及减少激光对受体的直接激发数量（图 2-3B）；③供体和受体的发射量子产率相当，以保证供体和受体的反相关强度的改变。目前研究证明 Cy3 和 Cy5 是最普遍应用的 smFRET 供体和受体荧光对，因为：①它们的光谱分离很大（约 100 nm）（图 2-3B）；②它们在无氧环境下非常稳定；③两者的量子产率相当（约 0.25）；以及④它们都已经商品化，并且具有氨基、巯基及其他反应形式。

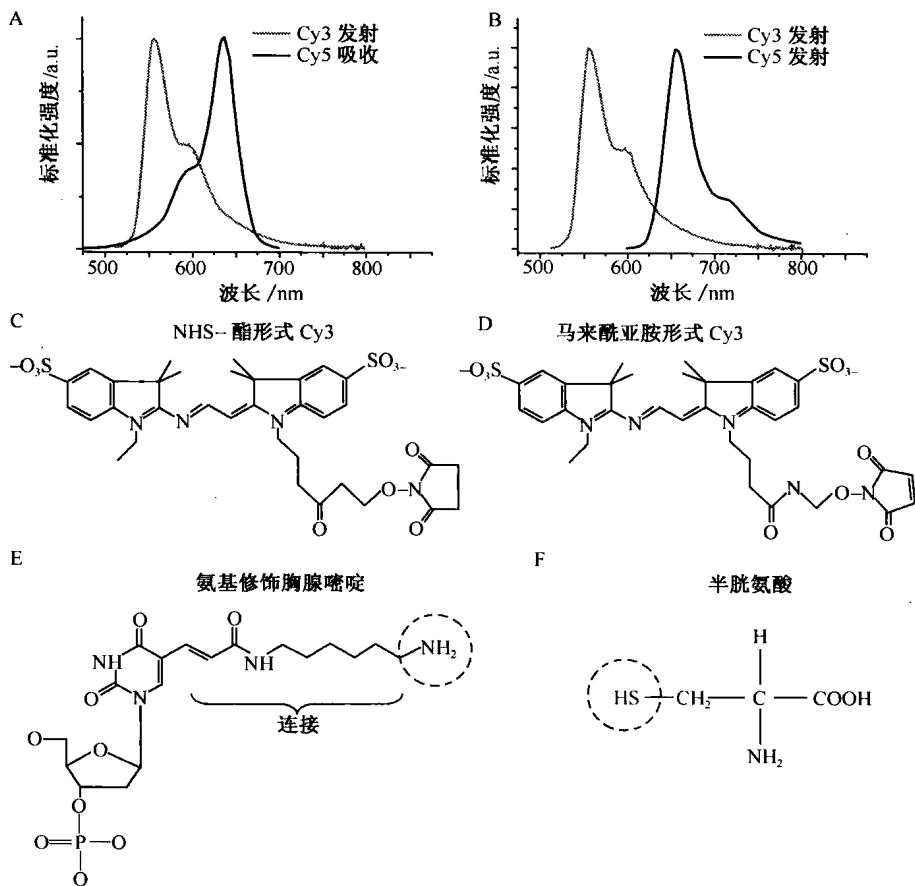


图 2-3 荧光团。A. Cy3（供体）的发射光谱（Cy3 emission）与 Cy5（受体）的吸收光谱（Cy5 absorption）重叠；B. Cy3 和 Cy5 的发射光谱很好地分开；C, D. 分别是 Cy3 染料 NHS-酯形式（NHS-ester form Cy3）和马来酰亚胺形式（maleimide form Cy3）；E. 通过一个碳连接将一个氨基与胸腺嘧啶的碱基相连，此氨基可以与 NHS-酯相互反应；F. 半胱氨酸的巯基与马来酰亚胺相互反应。

三色 FRET 则根据其特殊的应用有额外的染料选择标准，通常根据三种荧光团的光谱分为下列几种类型：①一个供体/两个受体型（Hohng et al. 2004a）；②两步 FRET 型（Clamme and Deniz 2005）；③两个供体/一个受体型。这些分型不是非常绝对的，也不是彼此排除的，它们在不同的应用中有各自的优缺点（见下文，常规方案：染料分子间的距离）。

## 标记

---

为了能够进行 smFRET 实验，必须在生物分子的特殊部位标记单个供体、受体和生物素。下面介绍的是短寡核苷酸及含有半胱氨酸的蛋白质的特殊标记方法。需要注意的是，宿主分子的不完全标记将导致 smFRET 检测的相对不敏感。如果供体标记缺失，分子则无法被观察到；如果受体标记缺失，那么这个只含有供体的分子不可能检测到 FRET 的发生。

### DNA（或 RNA）的标记

目前有几家公司提供荧光标记的 DNA（或者 RNA）寡核苷酸。例如，IDT DNA（Integrated DNA Technologies）能够提供长度在 5~100 核苷酸范围内的 DNA 链的 5' 端标记，以及 5~50 核苷酸长度的 DNA 链的 3' 端标记。链的中央部位的标记（内部标记）目前也有市售。尽管在寡核苷酸合成的过程中，可以通过亚磷胺化学法（phosphoramidite chemistry）来进行染料的插入，但是这需要打断寡核苷酸的主链，因此有可能破坏其生物功能。因此，我们推荐另外一种方法来进行内部标记，即在寡核苷酸合成过程中，在特定部位添加氨基修饰过的胸腺嘧啶（图 2-3E）。氨基基团与 NHS-酯相互作用可以形成一种染料（图 2-3C），然后通过一个简单的纯化方案一天之内就可以产生纯化的、被标记的 DNA。本章末尾的实验方案 1，详细讨论了 DNA（或 RNA）的标记。

### 蛋白质的标记

目前有多种方法进行蛋白质标记（Schatz 1993；Heyduk 2002）。这里我们主要介绍其中之一。染料的马来酰亚胺形式（图 2-3D）可以与巯基非常特异性地反应，在天然氨基酸中半胱氨酸（图 2-3F）是唯一含有巯基的氨基酸，而且两者反应条件相对温和。因此，如果一个蛋白质只有一个半胱氨酸而且这个半胱氨酸又充分暴露，那么只要把马来酰亚胺染料与蛋白质在一个合适的溶液中混合，就可以很好地标记蛋白质。然而，很多蛋白质都含有多个暴露的半胱氨酸，因此，需要将其他的位点进行点突变（Rasnik et al. 2004）。否则，FRET 的结果反映的是几个 FRET 荧光对的平均值，这样 smFRET 的独特优点就无法展示。如果野生型的蛋白质有很多 Cys 残基，我们不推荐使用这种标记方法。本章末尾的实验方案 2 介绍这种标记方法。一旦标记被成功实施，需要进一步检测蛋白质的功能活性，以防止染料标记可能产生一些假象。

# DNA 构建物设计

将荧光团标记到理想位置对于成功进行 smFRET 测量是非常关键的。接下来，我们列出了研究蛋白质-DNA（或者蛋白质-RNA）相互作用时设计构建物应该注意的几点。另外，在任何情况下，对于一个蛋白质来说，染料的标记和因固定导致的物理上的限制都有可能影响其活性，因此，smFRET 数据需要与生物集团数据相互验证来判断其真伪。

## 常规方案：染料分子间的距离

当供体与受体之间的距离在  $R_0$  时，FRET 最敏感（图 2-1B）。因此，通常情况下，放在宿主分子上的两个染料之间的距离在整个构象改变过程中最好都在  $R_0$  附近（图 2-4A~C，见图版）。对于 DNA 来说，采用内部标记法（见上文，标记 DNA）可以移动荧光团，使之有个最佳的定位（图 2-4A）。当一个荧光团标记 DNA，另一个标记蛋白质时，或者两个荧光团都标记蛋白质时，需要有蛋白质高分辨率的结构信息来确定理想的标记定位（图 2-4B）。

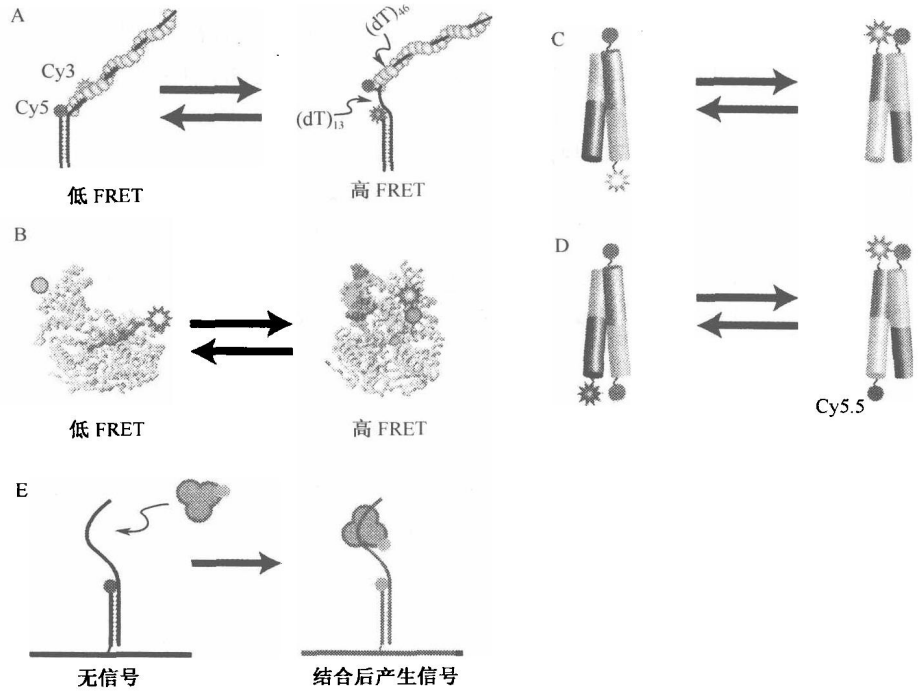


图 2-4 样本标记。A. Cy3 和 Cy5 的放置方式不同，它们的距离不同，长于  $R_0$ （左图）或短于  $R_0$ （右图）（Joo et al. 2006）。B. 根据蛋白质两种构象的 X 射线晶体结构来选择两个染料的定位。因此，它们被两种不同的 FRET 状态所区分（Myong et al. 2005）。C、D. 用两种不同的 FRET 状态显示一个四通接头的两种不同构象，其中 C 图是一个常用的两色体系，D 图是一个三色体系。在三色体系中，Cy5 和 Cy5.5 在两种构象中都被很好地分开；因此，它们之间的 FRET 可以被忽略（Hohng et al. 2004a）。E. 当一个标记了受体的 DNA 分子被固定时，只有当供体标记的分子与 DNA 结合，才能观察到 FRET 信号。

在三色 FRET 分析中（见图 2-9C），因为 FRET 可以在三个荧光团中任意两个荧光团之间发生，所以如果三个荧光团彼此之间距离非常近，那么，数据会很难分析。例如，如果用两个不同的受体分子（Cy5 和 Cy5.5）来竞争性接受供体分子（Cy3）的能量（见上文，常用的供体和受体荧光对），而这两个受体分子又靠得足够近，那么将很难辨别 Cy5.5 的信号是来自 Cy3 的能量转移，还是来自 Cy3 先转移给 Cy5，再转移给 Cy5.5 的能量转移。在这种情况下，设计构建物时，最好将两个受体分子的距离设计得足够远（远远大于  $R_0$ ）（图 2-4D）。

### 同时标记供体和受体的 DNA

如果实验中不标记蛋白质，那么 DNA 分子需要固定，并且要同时标记供体和受体荧光团。但是，考虑到产量和成本，将三个修饰（生物素、供体和受体）都施加于一个单链 DNA 上，是非常不切合实际的。所以，一般都是在不同的 DNA 链上进行这些修饰，然后再将两条链退火。例如，如果实验需要一个单链 DNA（ssDNA），通常也是采用一段双链 DNA（dsDNA）（图 2-4A）（Lee et al. 2005；Myong et al. 2005；Joo et al. 2006）。

蛋白质能够改变荧光团的光物理学特性。例如，我们观察到，当附近结合了蛋白质之后，交联在 DNA 上的 Cy3 的荧光强度可以增加。这一般不会给数据分析带来太多的困难，因为我们通常采用 FRET 效率的近似值，可以避免这部分对结果的干扰（Joo et al. 2006）。

关于标记位点选择的其他常规设计原则还包括：①如果蛋白质可以识别 DNA 的一个特殊的化学特征，那么荧光团应该被放在其他的位置；②对于内部标记来说，应该保持 DNA 主链的完整性（见上文，DNA 标记）；③在 DNA 中，与蛋白质相互作用的部分应当远离玻璃表面以避免可能的物理限制。

### 标记的蛋白质

当研究固定在表面的 DNA 与溶液中的蛋白质之间相互作用时，如果两者都需要被标记，那么最好将供体标记到蛋白质上，而将受体标记到 DNA 上，因为在这种情况下，当蛋白质与 DNA 结合时，能够观察到荧光信号的突然增强（图 2-4E；也可以见图 2-7D）。如果相反，蛋白质标记受体而 DNA 标记供体，那么结合将导致低 FRET 状态很难被检测到。同样，如果蛋白质标记受体，那么蛋白质结合后发生的任何额外的 FRET 改变就很难与其他的蛋白质和 DNA 结合导致的 FRET 改变相区别。如果溶液中荧光团浓度太高，那么背景荧光很可能掩盖掉单分子信号。特别是当供体浓度大于 2 nmol/L，受体浓度大于 20 nmol/L 时，这种情况非常容易发生。如果蛋白质-DNA 亲和力比较低，必须要保证蛋白质有较高浓度时，最好用不标记的蛋白质，然后通过测量 DNA 构象改变来观察蛋白质对 DNA 的作用（Joo et al. 2006）。

### 表面制备

---

为了能够长时程研究单个生物分子的构象改变，分子在空间上必须是固定的。这一



般是通过表面固定来实现 (Rasnik et al. 2005)。一个理想的表面应该是能够特异性固定 DNA、RNA 或者蛋白质，而且可以排除非特异性吸收。对于核苷酸研究，我们倾向于用一个包被了生物素化 BSA 和中性链亲和素（或者链霉抗生物素蛋白）的玻璃（或石英）表面，因为这样的系统非常简单（图 2-5A）。与不包被生物素或者中性链亲和素的对照实验相比，我们可以高特异性地 ( $>500:1$ ) 固定 DNA（或者 RNA），而且还可以可靠地保证它们在溶液中的活性 (McKinney et al. 2003, 2005; Tan et al. 2003; Hohng et al. 2004b; Murphy et al. 2004; Nahas et al. 2004; Lee et al. 2005)。这可能是因为这三种表面成分 (BSA、中性链亲和素和玻璃) 在中性 pH 时都是负电荷，可以很好地排斥核苷酸。

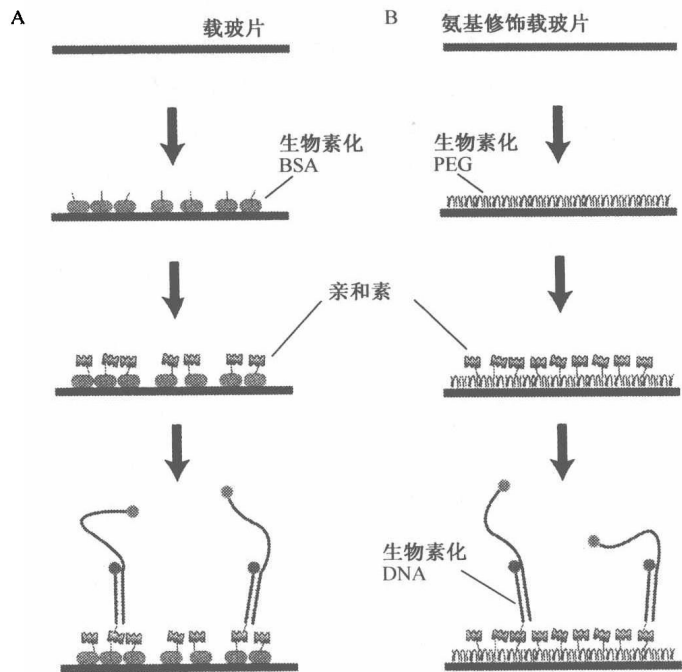


图 2-5 样本固定。A. 在裸露的玻璃表面 (glass slide)，生物素化的 BSA (biotinylated BSA) 沉淀在玻璃表面，然后抗生物素 (neutravidin) 与生物素化的 BSA 交联。生物素化的样本（这里是 DNA）通过生物素-抗生物素结合被固定。B. 在氨基修饰的玻璃表面 (amine-modified glass slide)，PEG 的 NHS-酯形式与之共价交联，抗生物素特异性地与在末端有生物素的 PEG (biotinylated PEG) 分子相互结合。

如果研究蛋白质，那么 BSA 包被的表面黏附性太强。因此，我们采用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 包被的表面来将蛋白质的非特异性吸附降低到不能被检测的水平 (图 2-5B)。自从 2002 年第一次在单分子研究中用 PEG 来钝化表面之后 (Ha et al. 2002)，很多小组也成功采用此方法进行单分子研究。如果在玻璃的表面形成厚厚的一层 PEG，它能形成一个聚合物刷从而阻止蛋白质吸附到其下的玻璃表面。我们将 PEG 聚合物的一小部分进行末端生物素化修饰，并以此来固定中性链亲和素，从而进一步固定生物素化的大分子。蛋白质特异性地与固定在 PEG 包被表面的 DNA 相互作用，在我们检测的所有系统中，它们的生物活性都是可以重复的 (Ha et al. 2002;