

用于定量分析分子動力學和分子相互作用的雙光子螢光相干光譜學

Keith M. Berland*
Physics Department, Emory University
Atlanta, GA 30322-2430
E-mail: kerland@physics.emory.edu.tw

摘要

由于螢光光譜學的多用途和高靈敏度,它越來越廣泛地被應用于生物學和生物物理學的研究。在合適的條件下,螢光光譜學測量可以準確地提供生物系統的物理化學和動力學特性。本文介紹了螢光光譜學的基本概念和理論,同時敘述了如何利用雙光子自動相干和雙光子雙色交叉相干螢光光譜測量分子動力學和分子的相互作用。應用實例包括定量分析蛋白質-蛋白質的相互作用,分子擴散的細胞外和細胞內測定,定量分析特定核酸的雜交反應。

本研究由 Emory University Research Fund 資助。

1. 引言

為了理解生物系統的生物和物理機制,定量分析生物分子的相互作用和相關的動力學是十分重要的,定量分析提供了一種重要手段去認識分子的結構,動態和功能。自從 Magde 等^[1]首先將螢光相干光譜學 (fluorescence correlation spectroscopy) 應用于生物物理學測量后,螢光相干光譜學在這十年中已發展成為一種強有力的研究工具,它能定性和定量地分析生物分子的相互作用,化學反應,流體動力學和光物理特性等^[2, 3]。由于實驗儀器的發展,共聚焦(confocal)和雙光子顯微(two-photon microscopy)可方便地檢測單個分子的螢光^[4-6],因此螢光相干光譜法的優點也越來越明顯。在各種螢光光譜法應用中,利用共聚焦

或雙光子螢光顯微的微小的觀測體積(10^{-18} m^3)特性來監測螢光信號隨時間變化的波動(functuation)是最常見的手段^[2, 7]。很多因素可導致這種自發性平衡波動,如擴散(分子流出/流入觀測體),化學反應及光物理作用等。對於稀釋濃度(10^{-9} M)的樣品,觀測體積內任何時候的分子總數都很小(1-1000),確保了相對於平均螢光信號的信號波動的獲得。從螢光信號的振幅和時間相干特性中可獲得許多有用的參數,如擴散系數和樣品中各種分子之間的連接特性等^[8-10]。用螢光相干光譜法測量分子間相互作用的一大優勢在于,它是直接測量獨立的分子而不是間接測定分子間相互作用。因此,在用螢光相干光譜法測量相互作用時,不存在對相互作用分子重量的限制。共聚焦和雙光子螢光顯微鏡對各種螢光相干光譜法使用均十分

有用。本文重點介紹雙光子螢光相干光譜學，雙光子螢光激發在生物學上的應用有著顯著的優勢^[11-13]。如文中所討論的，雙光子螢光激發對雙色交叉相干(dual-color cross-correlation)測量特別有利。

2. 理論

2.1 概論

對於一種特定的分子，由雙光子激發所產生的螢光信號(F)隨激發信號強度的平方變化，如下式所示：

$$\langle F \rangle = \alpha \delta \eta \Omega \int \langle C \rangle S^2(\vec{r}) = \psi \langle C \rangle V_{\text{eff}} = \psi \langle N \rangle \quad (1)$$

其中： α 為入射光強， C 為濃度， δ 為雙光子交叉截面， η 為螢光量子產率， Ω 為測量效率， S 為激光空間分佈，尖括號為對時間的平均^{*}。 V_{eff} 表示測定體積，可由對 S 的積分得到。 N 為激發(測量)體積內的獨立分子的平均數。 ψ 表示分子的螢光亮度(光子/分子/秒)，它由分子的內在特性(δ, η)和測量系統相關參數(Ω, α)決定，是確定螢光相干光譜法測試精度的最關鍵參數之一^[14]。

在波動光譜學中，人們對映像測量中所見到的螢光強度隨時間變化的波動感興趣。以下給出了雙通道測量(dual-channel detection)的公式：

$$\delta F_n(t) \equiv F_n(t) - \langle F_n \rangle = \sum_i \psi_{i,n} \int dV \delta C_i(\vec{r}, t) S^2(\vec{r}) \quad (2)$$

因系統中不同種類分子的存在，用 $\delta F_n(t)$ 表示測量器通道 "n" (如"紅"或"綠"測量通道)的總波動

信號， $\delta C_i(\vec{r}, t)$ 表示不同分子的濃度在空間分佈的波動。 $\psi_{i,n}$ 為 n 測量通道中 i 種分子的亮度。螢光相干函數定義如下：

自動相干：

$$G_{mm}(\tau) = \frac{\langle \delta F_m(\vec{r}, t) \delta F_m(\vec{r}', t + \tau) \rangle}{\langle F_m \rangle^2} \quad (3)$$

交叉相干：

$$G_{mn}(\tau) = \frac{\langle \delta F_m(\vec{r}, t) \delta F_n(\vec{r}', t + \tau) \rangle}{\langle F_m \rangle \langle F_n \rangle} \quad (4)$$

利用適當的代入，相干函數的公式可演繹為：

$$G_{mn}(\tau) = \frac{\gamma \sum_i \psi_{i,m} \psi_{i,n} \langle C_i \rangle A_i(\tau)}{V_{\text{eff}} \left[\sum_i \psi_{i,m} \langle C_i \rangle \right] \left[\sum_i \psi_{i,n} \langle C_i \rangle \right]} \quad (5)$$

對於自動相干測量， m 和 n 相等。對交叉相干， m 和 n 則代表不同的測量通道。前置常數 γ 取決于激發光源的空間分佈，參數 A_i 表示每種分子如何影響相干函數的

*如是脈沖激光 $\alpha = \left[\frac{P}{h\nu} * \frac{2}{\pi\omega_0^2} \right]^2 \left[\frac{\ln(4)}{\pi} \right]^{1/2} \frac{1}{f_p \tau} * \frac{1}{2}$ (高斯脈

沖)， P ：平均功率， f_p ：循環率， τ ：脈沖寬度。隨時間變化特性，這些參數取決于波動信號的來源。在交叉相干測量時，只有 $\psi_{i,m}$ 和 $\psi_{i,n}$ 值同時不為零時才對式5有貢獻，所以多色探測方法能夠在複雜的異性樣品中有選擇性地測量那些特定的分子。

當所有分子的亮度參數均相同(ψ)時，式5可以簡化為以下的形式(式6)。

$$G_{n,n} = \gamma \frac{\sum_i \langle N_i \rangle A_i(\tau)}{\left[\sum_i \langle N_i \rangle \right]^2} \quad (6)$$

顯然它和單一分子的相干函數相同，所以時間為零時的振幅仍和總的分子數成反比，這也體現了螢光相干光譜測量的"計量(counting)"特性。

要進一步推導相干函數，必須知道螢光波動的末源和激發光源的空間分布。在螢光相干光譜測量中，激發光源的空間分布通常被描述成三維高斯分布(3DG)。

$$S_{3DG}(r, z) = \exp\left(-2r^2/w_0^2\right) \exp\left(-2z^2/z_0^2\right) \quad (7)$$

ω_0 和 z_0 分別是在聚焦平面和軸向的特征量。如上所述，有效的雙光子測量體積 [$V_{3DG} = (\pi/2)^{3/2} \omega_0^2 z_0, \sim 0.1 \mu\text{m}^3$] 可從歸一化的激發概率(S^2)的全空間積分得到。在最基本的螢光相干光譜實驗中，螢光波動是因分子擴散運動(進出測量體積)而產生的。在獨立分子的自由擴散和激發光源具有三維高斯形狀的條件下，參數 A_i 可用一無量綱量 $\varphi_i = 4D_i\tau / \omega_0^2$ 來表示：

$$A_i(\tau) = (1 + 2\varphi_i)^{-1} (1 + 2\varphi_i x^2)^{-1/2},$$

$$x^2 \equiv \frac{\omega_0^2}{z_0^2} \quad (8)$$

我們用這一模型來分析實驗數據，獲得分子動力學和分子相互作用等信息。本文給出了幾個應用實例，包括在細胞體內(*in vivo*)和細胞體外(*in vitro*)

測量擴散系數，利用擴散分析和分子計量來量化分子的相互作用。

3. 材料和方法

3.1 儀器

雙通道螢光探測系統是由對原單通道螢光相干光譜系統改進得到^[7]。其基本設置見示意圖(圖1)。雙光子激發光源是一鎖模(mode-locked) Tsunami Ti: sapphire 激光，它由一台 5W 固體激光來輔(pumped)。其發射波長可在 700 - 1000 nm 之間調節，輸出循環率為 80 兆赫寬度約為 100×10^{-15} s 的脈沖波。一個 Zeiss (Thornwood, NY) 63X C-Apochromat (NA 1.2) 水浸沒透鏡被用來將激光聚焦在樣品上。根據不同的樣品特性，照射在樣品上的平均功率在 2 - 20 mW 之間。為了隔離散射光，由同一水浸沒透鏡採集到的螢光信號通過一個 E700SP (Chroma Technology, Brattleboro, VT) 分光片(dichroic)，然後被第二個分光片分成兩束光分別進入兩個不同的探測通道。根據不同的染色體，每個通道要測量的顏色(波長)由選擇不同的濾色片來實現。最後，螢光信號通過自制的接口進入 100 μm 直徑的光纖。使用光纖傳輸不需重新調節光學系統即可方便地轉換不同的探測器，如雪崩式光電二極管 (SPCM-AQR-16-FC, EG&G, Vaudreuil, Quebec)，光電倍增管(H 7421-40, Hamamatsu, Bridgewater, NJ)，光柵式分光儀 (Ocean Optics, Dunedin, IL) 等。光子計數器的輸出直接送入 ALV-6000 相干儀(ALV GMBH, Langen, Germany)，由它計算出相應的自動和交叉相干函數。最後的數據分析是在 Igor Pro(版本 4, Wavemetrics, Lake Oswego, OR) 上完成。

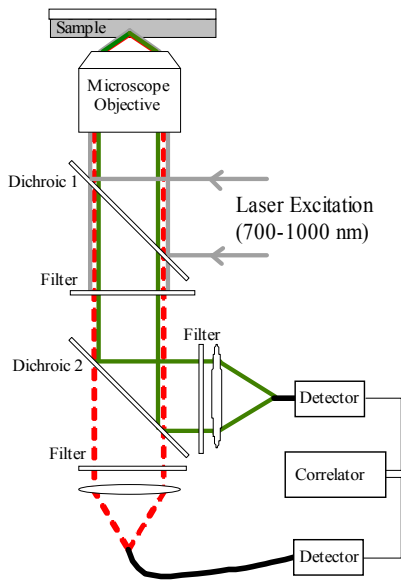


圖 1 雙色雙光子光譜測量的實驗裝置。正文中給出了各光學部件的詳細說明。

3.2 樣品制備

用于系統校准的 Rhodamine 6G (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)被溶于去離子水中，在進一步稀釋前用 0.01 微米的過濾器過濾。染色體的濃度用吸收光譜測定。螢光 NLS 縮氨酸(peptide)和純化的 imprin - α 蛋白質由 Alec Hodel 博士 (Department of Biochemistry, Emory University)提供。脫氧核糖核酸(DNA)樣品購于 Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)。DNA 的序列由 Tubulin gene 提供，為了減小自我耦合和發夾式復合(Self-dimerization and hairpin formation)，選用了特定的寡核苷酸(oligonucleotides)。兩種 18mer 的單鏈核酸(oligos)A 和 B 分別用 Cy3.5 和 Oregon Green 488 標志，第三種單鏈核酸 X 無任何標志，Integrated DNA Technologies 還提供了 DNA 的純化服務(HPLC 用于標志的分子和 PAGE 用于無標志單鏈核酸)。在螢光相干光譜測量中，樣品

被稀釋到合適的濃度(通常在 10 - 50 nM)，然後滴在玻璃樣片上(Nunc, Napeville, IL)，合上玻璃蓋片。所有的實驗都是在室溫下進行。

4. 應用

4.1 流體動力學：擴散測定

分子擴散的實驗室測試是最簡單的螢光相干光譜測量應用。圖 2 顯示了一條典型的 rhodamine 6G 的螢光相干光譜曲線。時間為零時的曲線幅度依賴于樣品的濃度，擬合(fitting)曲線隨時間衰減的特性可用來測定分子的擴散系數。圖 2 中曲線的擴散系數是 $3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ，它不依賴于測定方法，因此常用來校准系統的測量體積。一旦測量體積確定后，這一方法可以測定複雜環境中不同分子的擴散系數。最令人感興趣的是這種方法在活細胞中的應用^[7, 15]。

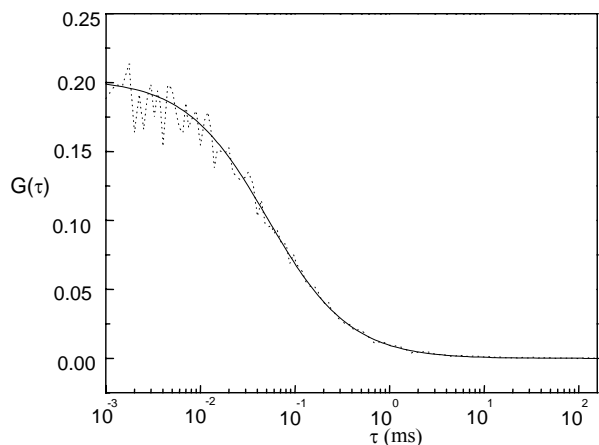


圖 2 水溶液中 rhodamine6G 的螢光自動相干曲線。曲線在時間為零時的幅度依賴于樣品濃度，曲線隨時間的衰減是由光斑大小(測量體積)和分子的擴散系數決定。在已知樣品濃度和擴散系數情況下，曲線可以用于測定光斑的大小。由圖 2 曲線確定的光斑半徑為 0.3 微米。

下面給出一個測量擴散系數的應用實例。該例子是測量生長在玻璃樣片上的含有強綠色螢光蛋白質(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的 HEK293 細胞。利用雙光螢光成像術得到這些細胞的圖像后，激光可直接照射在感興趣的區域進行螢光相干光譜測量，從而能測定活細胞中不同區域內 EGFP 的流體運動，如圖 3 所示。細胞內的擴散測量提供了一種對生物體系進一步認識的方法。然而在活細胞中應用螢光相干光譜測量時需注意：細胞膜可能會改變測量體積的大小和形狀，細胞的大範圍動態重組也可能嚴重地影響實驗結果，背景螢光同樣會影響相干光譜曲線。

4.2 測量分子相互作用 I: 擴散分析

精確地測量擴散系數同樣可以用于定量分析特定分子之間的相互作用，此應用可通過對擴散機理的分析或分子計數來實現。擴散分析(diffusion based analysis)和螢光偏振分析(fluorescence polarization assays)很相似，它們的擴散系數均因兩個不同分子的結合而變化。其主要區別在于偏振分析基于旋轉(rotational)擴散而螢

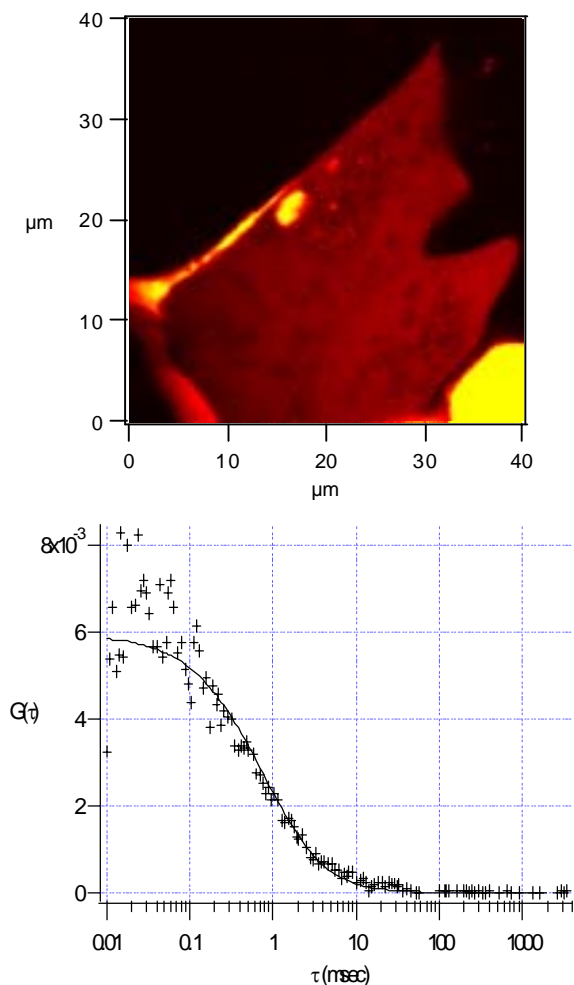


圖 3 螢光相干光譜法應用于細胞內擴散測量。左:含有強綠色螢光蛋白質的 HEK293 的雙光子螢光圖像。在該圖像中選擇感興趣的區域進行螢光相干光譜測量。右:在活細胞的細胞漿(cytoplasm)中測量典型的螢光相干光譜曲線。平均擴散速度小於 EGFP 的水中擴散速度(~3X)。不同區域內擴散速度的變化提供了一種敏感測量周圍環境及特定分子流體特性的方法。

光相干光譜法基于平移(translational)擴散。這裡所給的例子是帶有 SV40 細胞核定位信號(nuclear localization signal, NLS)的縮氨酸和 importin - α 受器(receptor)蛋白質之間的相互作用。這些分子

在細胞植入，細胞調節和控制中均十分重要。在實驗中，每個縮氨酸均被一個螢光染色分子標志，而 importin - α 蛋白質無任何標志。importin - α 蛋白質的分子重量是 60kD，遠大於含有 20 個氨基酸的縮氨酸分子。因此，黏合后的縮氨酸 - importin 複合體的擴散要遠小於自由縮氨酸的擴散。圖 4 顯示了兩種極端情況，即所有的縮氨酸都和 importin - α 黏合或兩者間無任何黏合。從這兩條曲線中確定該兩種結構的擴散系數后，在固定縮氨酸濃度和變動 importin - α 濃度的條件下進行一系列的螢光相干光譜實驗。在不同 importin - α 濃度下，縮氨酸分子的黏合百分比可通過擬合的方法獲得，如圖 4 中右圖所示。該方法提供了十分精確的蛋白質 - 蛋白質相互作用的定量表示，而且還有許多其他的應用。這種測量的優點是大分子(如本例中的 importin - α)不需任何螢光標識。但是，因擴散系數對分子重量不是十分敏感，擴散分析只能局限于兩種分子相互黏合前後分子重量有較大變化的情況，該限制可由螢光相干光譜法的"計量"來解決，這一點將在下面討論。

4.3 測量分子的相互作用 II：分子計量

利用分子計量(molecular counting)方法來測定分子組合的概念很簡單。在最基本的情況下(單一分離的樣品)，如理論部分所述，相干函數在時間為零時的振幅($A_i = 1$)與測量體積中獨立的分子數(N)成反比。因此，如果分子聚合，分子數隨之改變，例如分子數因單一的二聚合轉換而減少一半。對於不是單一分離的樣品，其基本概念保持不變，相干函數在時間為零時的振幅還是與不同

分子濃度平均值(權重于分子亮度)有關，從而分子的聚合可通過分析相干函數在時間為零時的振

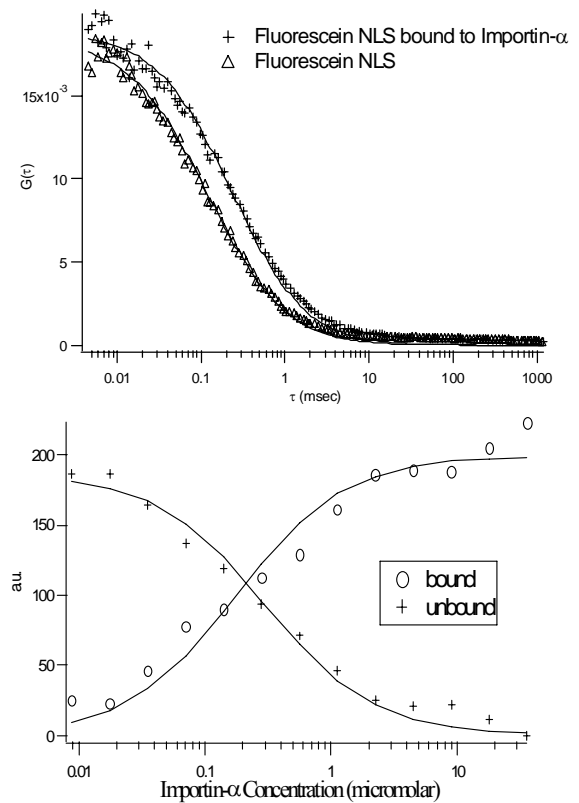


圖 4：縮氨酸和 importin - α 黏合的黏合分析。左：非黏合縮氨酸和完全黏合縮氨酸 - importin - α 的螢光相干光譜曲線。黏合的縮氨酸 - importin - α 複合體擴散很慢，所以它的曲線向右移(較大的相干時間常數)。右：通過固定縮氨酸濃度和變動 importin - α 濃度的螢光相干光譜測量，同時利用已知的黏合和非黏合擴散系數，可確定不同的 importin - α 濃度下黏合和非黏合的縮氨酸分子數，然后用一黏合曲線來擬合這組數據，從而獲得相互作用的分裂常數為 $180 \times 10^{-9} M$ 。

幅來測定，該振幅並不依賴于相對分子重量。與其他測量技術相比，這是相干函數測量的一大優

勢。儘管強烈的自身螢光會影響測量的精度，該技術仍可應用于包括活細胞在內的複雜環境中。

在分子計量方法中(不同于擴散分析)，所有測量的分子需有螢光。它們可用同色螢光標識來進行自動相干光譜測量，或用不同顏色的螢光進行雙色交叉相干光譜測量。在雙色交叉相干光譜測量中，除非有一種分子能均被兩個通道"看到"，否則兩測量通道間沒有相干作用。換言之，兩種不同單一螢光標識的分子通過聚合作用形成一個具有兩種螢光的復合體，而交叉相干測量對該復合體的存在尤為敏感。雙色螢光相干光譜測量中，雙光子激發具有顯著的優越性^[16,17]。為強調雙色法的優越性，以下我們基于概論中所述的通式給出其相干函數。

在一個實驗系統中，有兩個獨立的探測通道(紅色 R 和綠色 G)和三種獨立的單鏈脫氧核糖核酸(A,B,X)。如圖 5 所示，其中兩種核酸具有螢光標識。其雜交反應為： $A + B + X \leftrightarrow ABX$ ，即這三種核酸黏合在一起形成一個復合體。

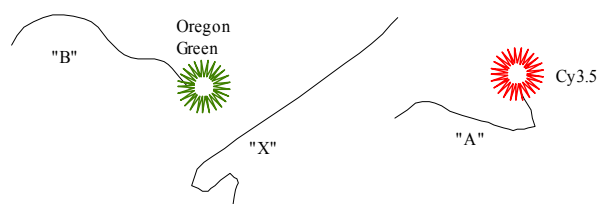


圖 5 用于雙色螢光相干光譜測量的三種核酸。

核酸 A 被 Cy3.5 標志，核酸 B 被 Oregon Green 488 標志，核酸 X 沒有標志，核酸序列是按 gamma tubulin gene 選用。

A 核酸由紅色染色體標識，而 B 核酸有綠色染色體標識。綠色通道不能探測到紅色的染色體，但紅色通道因微弱的洩漏可看到綠色染色體。假定雜交反應不改變染色體的螢光特性，根據公式 5，雙色交叉相干函數可表達為：

$$G_{GR}(\tau) = \frac{\gamma}{V_{eff}} \frac{[\psi_{ABX,R} \psi_{ABX,G} \langle C_{ABX} \rangle A_{ABX} + \psi_{B,R} \psi_{B,G} \langle C_B \rangle A_B]}{[\psi_{B,G} \langle C_B \rangle + \psi_{ABX,G} \langle C_{ABX} \rangle][\psi_{A,R} \langle C_A \rangle + \psi_{B,R} \langle C_B \rangle + \psi_{ABX,R} \langle C_{ABX} \rangle]} \quad (9)$$

如在不同的通道間成在微弱的相互對話(如紅色通道可探測到綠色螢光)，且亮度參數不受雜交反應的影響，則上式可進一步簡化為：

$$G_{GR}(\tau) = \frac{\gamma}{V_{eff}} \frac{\langle C_{ABX} \rangle A_{ABX}}{[\langle C_B \rangle + \langle C_{ABX} \rangle][\langle C_A \rangle + \langle C_{ABX} \rangle]} \quad (10)$$

在這種情況下，復合體 ABX 的濃度可直接從相干函數在時間為零時的振幅($A_1 = 1$)中獲得。有趣的是隨時間變化的相干函數 $G_{GR}(\tau)$ 只依赖于復合體 ABX 的特性。

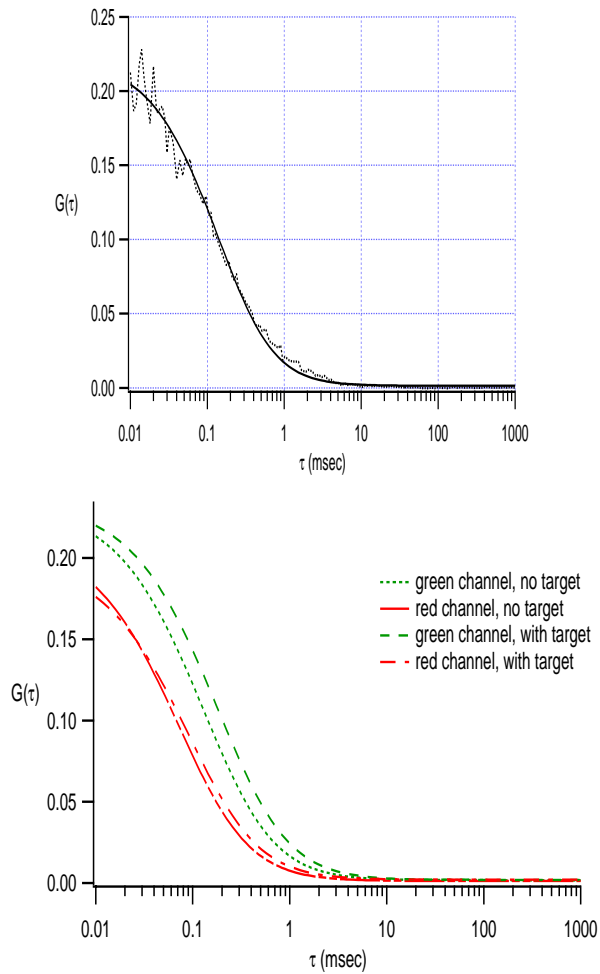


圖 6 核酸 A 和核酸 B 分別與核酸 X 的黏合和非黏合自動相干曲線。左：典型的綠色通道的自動相干曲線(虛線)和它的擬合曲線(實線)。右：不同通道的不同自動相干曲線的擬合曲線。在實驗中，所有核酸濃度為 10^{-8} M。由于自由染色體的存在，紅色通道的相干曲線振幅略低于綠色通道。

實驗中我們測量了自動相干和交叉相干曲線。圖 6 顯示了各通道的自動相干曲線以及它們的擬合曲線。自由 Oregon Green 的擴散系數是 1.2×10^{-6} cm^2/s ，但當它和目標黏合后的擴散系數降為 8×10^{-7} cm^2/s 。在紅色通道中同樣觀測到 Cy3.5 的擴散系數下降，但變化非常小。當相互

作用分子的尺寸相近時，黏合(帶目標)和非黏合(無目標)曲線的相似性體現了用擴散分析法來獲取分子相互作用信息的難度。另一方面，用相干函數的振幅來量化相互作用得到很好的效果。雙色方法在得到所要求復合體的信息上具有顯著的優勢，如圖 7 所示。ABX 是一個被 Cy3.5 和 Oregon - Green 標志的雙鏈復合體。伴隨反應的進行，隨時間變化的雙鏈核酸復合體的數量持續增長，通過測量交叉相干函數的振幅可直接觀測到其濃度變化。

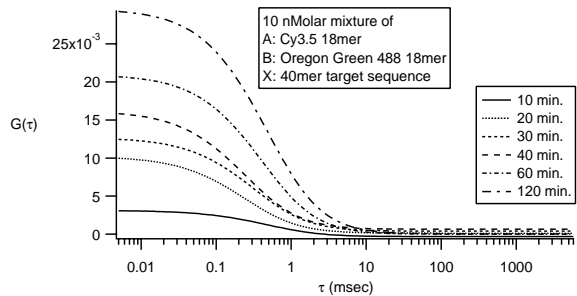


圖 7 三種核酸(A,B,X)和它們的復合體(ABX)混合溶液的交叉相干曲線。相干曲線隨時間而變化，曲線振幅的增強表示雙鏈復合核酸的數量增加。

要說明的是如果用同樣的染色體來標志核酸 A 和核酸 B，自動相干函數仍然可以反應相關的雜交反應信息^[18]。但是，由于自由染色體的存在，數據分析會非常複雜。圖 8 給出了隨時間變化的雜交反應動力學。

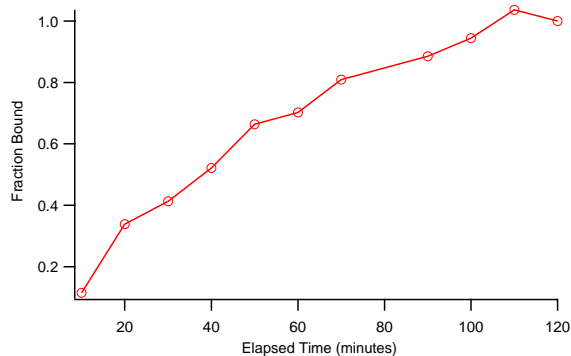


圖 8 雜交反應的動力學。黏合分數 (Fraction Bound) 表示以反應結束時濃度歸一化的雙鏈復合核酸的濃度。混合效率和反應速度受反應時間的影響。水平軸上的時間為自加入目標核酸 X 到螢光相干光譜測量的時間。

5. 結論

本文簡單地介紹了螢光相干光譜測量，著重於分子移動和分子相互作用的量化分析。還闡述了在溶劑和活細胞中測量擴散系數，確定蛋白質-蛋白質的相互作用，由黏合曲線得到分裂常數，以及對核酸的雜交反應和聚合動力學進行量化分析。對解決許多生物物理學，分子生物學以及細胞生物學上的難題，螢光相干光譜測量有著巨大的潛力。最後，著者感謝 Dr. Guoqing Shen 將本文譯成中文。

參考文獻

1. Magde D, Elson E, Webb WW. 1972. *Phys. Rev. Lett.* 29: 705-8
2. Eigen M, Rigler R. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 5740-7
3. Maiti S, Shear JB, Williams RM, Zipfel WR, Webb WW, School A, Engineering Phys CUINYUSA. 1997. *Science (Washington, D. C.)* 275: 530-2
4. Ambrose WP, Goodwin PM, Jett JH, Orden AV, Werner JH, Keller RA. 1999. *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* 99: 2929-56
5. Mets U, Rigler R. 1994. *J. Fluoresc.* 4: 259-64
6. Mertz J, Xu C, Webb WW. 1995. *Opt. Lett.* 20: 2532-4
7. Berland KM, So PTC, Gratton E. 1995. *Biophys. J.* 68: 694-701
8. Elson EL, Magde D. 1974. *Biopolymers* 13: 1-27
9. Magde D, Elson EL, Webb WW. 1974. *Biopolymers* 13: 29-61
10. Thompson NL. 1991. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, ed. JR Lakowicz, pp. 337-78. New York: Plenum
11. Denk W, Strickler JH, Webb WW. 1990. *Science* 248: 73-6
12. So PTC, Dong CY, Masters BR, Berland KM. 2000. In *Annual Review of Biomedical Engineering*, ed. ML Yarmush, pp. 399-429. Palo Alto: Annual Reviews
13. Xu C, Webb WW. 1997. *Top. Fluoresc. Spectrosc.* 5: 471-540
14. Koppel DE. 1974. *Physical Review A* 10: 1938-45
15. Schwille P, Haupts U, Maiti S, Webb WW. 1999. *Biophys. J.* 77: 2251-65
16. Heinze KG, Koltermann A, Schwille P. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 10377-82
17. Berland KM. 2001. *Proceedings of SPIE* 4262: 268-78
18. Berland KM, So PTC, Chen Y, Mantulin WW, Gratton E. 1996. *Biophys. J.* 71: 410-20