

微腔中单分子对荧光共振能量转移光谱学的理论研究

单光存^{1,2,3} 黄 维^{1,3}

(¹ 复旦大学先进材料实验室, 上海 200433; ² 上海师范大学天华学院, 上海 201800)

³ 南京邮电大学信息材料与纳米技术研究院, 江苏 南京 210003

摘要 生物大分子动态的结构变化能够使用单分子对荧光共振能量转移谱技术来研究。主要研究了微腔在单分子对共振能量转移实验中有效提高相应单分子对的荧光发射信号的作用,从而提高该技术的时间分辨率。研究发现,由于受体-微腔的强耦合相互作用,光学微腔使得受体分子变成了一个类似于单原子激光的激光体。此外,随着距离的增加,受体的光子数会很快下降。微腔使受体的发射光对单分子对间的距离有更大的依赖性,在腔体中进行单分子对共振能量转移实验可以得到更高的时间分辨率。研究结果为单分子对荧光共振能量转移技术提供了实验方法和理论指导。

关键词 生物光学; 荧光共振能量转移; 蛋白质折叠; 单分子对; 微腔

中图分类号 O439; Q631 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20092904.1049

Theoretical Study of Single-Pair Fluorescence Resonant Energy Transfer Spectroscopy in Microcavity

Shan Guangcun^{1,2,3} Huang Wei^{1,3}

¹ Institute of Advanced Materials, Fudan University, Shanghai 200433, China

² Tianhua College, Shanghai Normal University, Shanghai 201800, China

³ Institute of Advanced Materials, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing, Jiangsu 210003, China

Abstract Dynamic structural changes of bio-macromolecules undergoing biochemical reactions can be studied using the single-pair fluorescence resonance energy transfer (sp-FRET) experiments, which can be used as a nanoscale ruler. The ability to use the optical microcavity to amplify the sp-FRET fluorescence signal has been investigated. When the single FRET-coupled pair and the attached bio-macromolecule are placed in an optical cavity with the emission mode of the acceptor dye in resonance with the cavity mode, the results of a fully quantum-mechanical treatment show that, the photon emission intensity from acceptor amplified by the cavity coupling field mode would reach a significant value, leading to a much brighter photon signal. It is concluded that the microcavity can serve as a sharper structural-sensitivity observable tool to the distance of single pair. The work establishes experimental methods and useful guidelines for the single-molecule studies of biomacromolecules in real time at molecule scale.

Key words biological optics; fluorescence resonant energy transfer; protein folding; single pair; microcavity

1 引 言

近年来,为了研究蛋白质等生物大分子的细胞定位、相互作用及其动态变化,单分子对荧光共振能量转移(sp-FRET)实验广泛用于对生物大分子、超分子之间的距离进行定性、定量检测,该单分子光谱学方法引起了国内外多个学科研究者的广泛兴趣,其研究内容涉及物理、光学、化学、材料等学科,已成为一

门新兴的交叉学科^[1~18]。特别是 Weiss, Morner 的研究小组在利用单分子对荧光共振能量转移在生物大分子的动态结构变化的研究中取得了突破性进展。传统的系综层次上的 FRET 测量依赖于许多个分子的信号的系综平均,不能反映分子上供体和受体之间的相对运动。单分子 FRET 试验可以使我们能研究依赖于时间变化的动力学现象,例如蛋白质折叠构象

收稿日期: 2008-10-06; 收到修改稿日期: 2008-11-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(60325412)和国家杰出青年科学基金(50428303)资助课题。

作者简介: 单光存(1982-),男,博士,讲师,主要从事纳米技术与纳米光子学等方面的研究。

E-mail: 041055004@fudan.edu.cn

变化和生物蛋白马达的构象变化。单分子对荧光共振能量转移特殊的性质使得它在生物化学, 分子生物学、结构生物学、蛋白质组学、生物大分子相互作用等研究中有极大的应用前景^[1~18]。

荧光共振能量转移(FRET)是从初始激发的供体(D)到受体(A)的激发态能量的转移。能量转移的速率取决于供体的发射谱与受体的吸收谱之间的谱宽重叠、供体的量子产率、供体与受体跃迁偶极的相对取向, 以及供体分子与受体分子之间的距离。关于一个相隔特定距离的供体-受体(D-A)对的荧光共振能量转移技术的详细介绍, 可以参考文献[7]。FRET最广泛的用处是测量高分子的两个基团之间的距离。典型例子就是一个蛋白质通过共价键被一个供体分子和一个受体分子来标记。荧光能量转移的一个重要性质是它发生在一个可与生物大分子尺度相比拟的距离上。从供体到受体的能量转移速率(Γ_F)与单分子对间距 r 的六次方成反比。这个特性可以用作纳米尺子, 用来推断出被观测的生物大分子的动态距离变化并进而揭示出构象变化。

任何影响单分子对间距 r 的现象就会影响共振能量的转移速率, 这使得分子结构的变化可以量化揭示。能量转移的效率是被供体所吸收的光子被转移到受体分子上的分数比。总之, 根据FRET技术的能量转移的原理, 每一分子对由于其特殊的距离和方位以及光谱特征而表现出其能量转移特性, 这便可以揭示分子的结构、空间构象变化和反应的动力学过程。能量转移是一个时间依赖的动态过程, 单分子对荧光共振能量转移技术的时间分辨率可以是皮秒到毫秒数量级。

单分子对荧光共振能量转移试验适合于研究分子的构象变化(供体D和受体A连接在同一个生物大分子的不同基团上)和分子间的相互作用(供体D连接在一个生物大分子上, 而受体A连接在另外一个生物大分子上)。本质上说来, 单分子对荧光共振能量转移试验正逐渐成为研究诸如蛋白质折叠动力学等快速生物化学动力学过程的强大工具。在单分子对荧光共振能量转移谱实验中, 研究人员会在一个固定的测量时间窗 T 来测量在生物大分子上的供体和受体发射的光子数目, 那么单分子对荧光共振能量转移谱将会反应生物大分子的折叠动力学与结构动态变化的信息^[1,2,5,7,8,11]。然而, 单分子对荧光共振能量转移实验的瓶颈是从一个单个分子发光体发出的光子数太低^[1,3,5~9]。在时间分辨的单分子对荧光共振能量转移试验中, 从单个FRET对所发

出的光子数被分成一个个观测时间窗口。时间分辨率正是受限于分子辐射发光较弱且有一个上限这个属性, 这一特性导致了一个最小的观测窗口的极限。

目前单分子对荧光共振能量转移试验中所能达到的时间分辨率要比蛋白质折叠中的一些细节上的动力学过程的时间尺度大1~3个数量级^[1,3,5~9,11]。作者最近的研究结果表明了当实验中的时间分辨率较长时, 实验仅能反映有限的动力学过程信息, 而且甚至可能是虚假的、不正确的^[2]。只有足够的时间分辨率时蛋白质折叠的真实能量景观关系才能被揭示^[2]。总之, 对于单分子对荧光共振能量转移试验, 提高时间分辨率(T)是非常必要的, 这要求我们提高实验中的FRET对的荧光信号强度。受近十多年来单原子激光器和单量子点激光器的研究工作的启发, 本文研究在光学微腔中单个FRET对的荧光发射光子数目问题。在一个单分子对荧光共振能量转移实验中, 单分子对发射的光子数是用来研究对应的动力学过程的唯一信息来源。本文提出并计算模拟了单个FRET对在一个光学微腔中的荧光信号放大特性。

2 模型与计算模拟

受近年来单量子体激光器研究工作的启发, 本工作主要讨论使用光学微腔来增强单个FRET对的发射光子数目问题。在微腔中单发光体的发光特性可以发生很大的改变。当发光分子与腔体的电磁模式存在很强的共振耦合作用时, 光子发射便得到极大的提升; 反之, 当两者没有共振耦合作用时, 发光特性便会被抑制。本文的工作是基于目前高品质光学微腔的微纳米加工工艺的可行性^[12,13,19~24]。为了适合生物学上的实际应用, 研究工作的参数均参考取自在常温下液体中进行的一系列实验工作^[1,8,11~17]。同时, 这里要强调两点: 首先, 单FRET对的受体A必须与光学微腔的电磁场模式存在足够强的共振耦合相互作用; 此外, 单个FRET对的距离 r 必须设定在FRET机制起明显适用范围(0.1~1 nm)。

对工作机制建立一个合适的物理模型, 并模拟验证此微腔的信号放大机制的效果。由于一个分子的振动弛豫时间通常比其激发态寿命短很多, 所以单个FRET对能够被近似地对待为一对两能级系统。假设单个FRET对和光学微腔之间的相互作用来自于腔的电磁模式与受体A的能级跃迁之间的共振相互作用(如图1所示)。E和 fE ($f \ll 1$)为

供体 D 和受体 A 的激光激发速率。 γ_a 和 γ_d 为受体和供体的自发辐射速率。 Γ_F 为从供体 D 到受体 A 的共振能量转移的速率。 g 为受体分子 A 能级和微腔的电磁模式共振耦合系数。 κ 为微腔的衰减速率, ω_0 为受体分子 A 的能级跃迁频率。使用全量子化方法可以得到一个 Lindblad 形式的密度矩阵运动方程来描述分子-腔体相互作用系统。

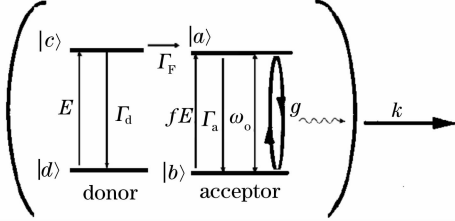


图 1 微腔内单分子 FRET 对的能级示意图

Fig. 1 Schematic illustration of energy diagrams for a single pair of FRET dye molecules in a cavity

在偶极-偶极相互作用和旋转波近似的条件下,分子与腔体的共振模式的相互作用哈密顿量为^[20~22]

$$\hat{H}_I = i\hbar g (a^+ \sigma - a \sigma^+), \quad (1)$$

式中 a^+ 和 a 分别为光学微腔中的电磁场模式对应的光子产生算符和湮灭算符。分子对应的能级上升算符和下降算符分别为

$$\sigma^+ = |A\rangle\langle B|, \quad \sigma = |B\rangle\langle A|, \quad (2)$$

从而,在相互作用的图像下,受体分子 A 对应的哈密顿量为^[20~22]

$$\hat{H} = (\omega_0 - \omega_L) \sigma_+ \sigma_- + (\omega_c - \omega_L) a^+ a + ig(a^+ \sigma_- - \sigma_+ a) + fE(a^+ + a), \quad (3)$$

式中 ω_c 为光学微腔的电磁场模式的频率, ω_L 为激发激光的频率, f ($f \ll 1$) 大约为 0.05。

弛豫项和激发项为^[20~22]

$$L_{\text{relax}} \rho = -\frac{\gamma_a}{2} (\sigma^+ \rho + \rho \sigma^+ - 2\sigma \rho \sigma^+) - \kappa (a^+ \rho + \rho a^+ - 2a \rho a^+), \quad (4)$$

$$L_{\text{pump}} \rho = -\frac{\Gamma_F}{2} (\sigma \sigma^+ \rho + \rho \sigma \sigma^+ - 2\sigma^+ \rho \sigma), \quad (5)$$

因此,对应受体分子 A 的密度矩阵的运动方程为

$$L \rho = -i[\hat{H}, \rho] + \sum_{k=1}^3 \left(C_k \rho C_k^+ - \frac{1}{2} C_k^+ C_k \rho - \frac{1}{2} \rho C_k^+ C_k \right), \quad (6)$$

式中 $C_1 = \sqrt{2\kappa} a$, $C_2 = \sqrt{\gamma_a} \sigma_-$ 和 $C_3 = \sqrt{\Gamma_F} \sigma_+$ 。

同理,对应供体分子 D 的密度矩阵的运动方程为

$$L \rho = -i[\hat{H}, \rho] + \sum_{k=1}^3 \left(C_k \rho C_k^+ - \frac{1}{2} C_k^+ C_k \rho - \frac{1}{2} \rho C_k^+ C_k \right), \quad (7)$$

这里,在相互作用的图像下,供体分子 D 对应的哈密顿量为^[20~22]

$$\hat{H} = (\omega_0 - \omega_L) \sigma_+ \sigma_- + (\omega_c - \omega_L) a^+ a + E(a^+ + a), \quad (8)$$

式中 $C_1 = \sqrt{2\kappa} a$, $C_2 = \sqrt{\gamma_d} \sigma_-$ 和 $C_3 = \sqrt{\Gamma_F} \sigma_-$ 。 E 为对于供体 D 分子的激光激发能速率。(6)式和(7)式是一组完整的描述单分子对系统的方程组。使用量子轨迹算法^[3,20~23]来求解密度矩阵方程(6)和(7)。

作为一个具体的例子,考虑一个长度 L_0 为 $8 \mu\text{m}$,半径 r_0 为 $1.6 \mu\text{m}$ 的光学微腔。腔体的容量 V 为 $45 \mu\text{m}^3$,这足够大从而不至于影响蛋白质等生物大分子的生物化学构象过程。具有如上参数的光学微腔是实验上可以利用微纳米加工技术实现的^[12,13,19]。考虑到受体分子的发射跃迁能级与腔体的电磁模式场存在共振,激光的频率和受体 A 的能级跃迁频率设定为 $\omega_0 = \omega_L \approx 5 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$ 。假设此情况下的介电常数 $\epsilon = 10$,腔体为高斯环形状的光学微腔,且衰减速率 κ 为 0.05 ns^{-1} ,从而可以估测耦合常数 g 为 $(2 \sim 6) \times 10^2$ 。同时,激光的激发能速率设定为 $E = 5 \text{ ns}^{-1}$,Förster 距离 R_0 为 3 nm 。

3 结果与讨论

为了揭示光学微腔的作用,进行了两个独立的计算:一是在微腔中的单 FRET 对的发光情形;二是没有采用微腔时的单 FRET 对的发光情形。正如图 2 所示,受体的荧光光子发射数目可以被放大。没有微腔时,仅能量转移机制并不可能得到比受体的自发辐射更多的光子。这样的一个瓶颈被光学微腔的光信号放大机制所打破。对于小的 r ($r < R_0$),由于分子-腔体的共振耦合作用,受体的光子发射强度远大于其自发辐射强度。可见,微腔使得受体分子变成了一个类似于单原子激光的激光体^[20]。此

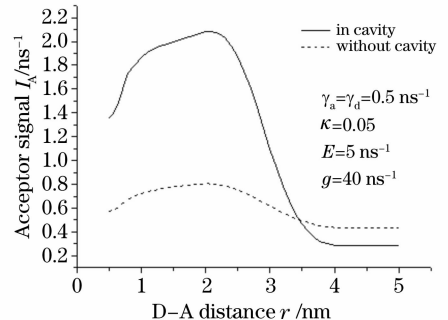


图 2 受体 A 发出的荧光信号 $I_A(r)$

Fig. 2 Steady-state fluorescence intensity from the acceptor $I_A(r)$

外,随着距离 $r(r > R_0)$ 的增加,受体分子得到的激发能量会变小,激发光子数下降很快,比自发辐射要快很多。如图 2 所示,微腔导致了受体的发射光对单分子间的距离 r 有更大的依赖性。最近的研究结果表明当单分子对共振能量转移实验的时间观测分辨窗口较大时,荧光信号仅能反映有限的动力学过程信息,而且甚至可能是虚假的。在单分子对共振能量转移实验中,供体分子 D 被一束很强的激光激发,但受体分子 A 的自发辐射衰减太慢时,受体分子 A 的光学信号较弱,较大的时间观测分辨窗口(较低的时间分辨率)便被采用,以便可以在足够宽的时间观测分辨窗口内采集足够大的荧光光子数目。因而,使用微腔放大光信号机制便可以将单分子对共振能量转移实验的时间分辨率提高到合适范围,此时蛋白质折叠的真实能量景观才能被有效地揭示。总之,在单分子对荧光共振能量转移试验中,用微腔放大光信号的机制来提高其时间分辨率是非常必需且有效的。图 3 表明了由于腔体与供体 D 分子并不存在很强共振耦合作用,因此,光学微腔只能使得供体 D 发出比自发辐射多出的光子数并不明显。研究结果表明了在腔体中进行单分子对共振能量转移实验可以得到更高的时间分辨率。

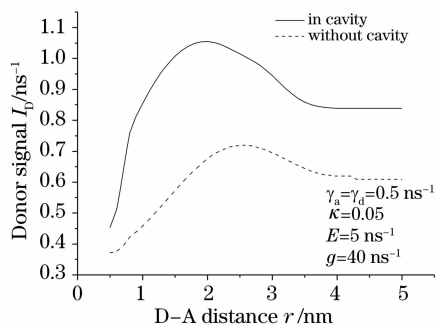


图 3 供体 D 发出的荧光信号 $I_D(r)$

Fig. 3 Steady-state fluorescence intensity from the donor $I_D(r)$

4 结 论

在单分子对荧光共振能量转移实验中,首先激光激发单分子对,然后激发能量以依赖于单分子对间距离 r 的方式从供体分子 D 传到受体分子 A,最终单分子对发出的荧光光子信号会反映出单分子对两者间距离的变化,从而反映出相应的生物大分子的构象变化动力学过程。当供体分子 D 被一束很强的激光激发,但受体分子 A 的自发辐射衰减太慢时,光学微腔机制可以用来放大单分子对的荧光信号。研究结果

表明受体分子 A-腔体的共振耦合作用使得受体的光子发射强度远大于其自发辐射强度。此外,随着距离 $r(r > R_0)$ 的增加,激发光子数下降很快。因此,微腔导致了受体的发射光信号对距离 r 有更大的依赖性。从而可以推断在腔体中进行单分子对共振能量转移实验可以提高相应的分子荧光信号,得到更高的时间分辨率。本文的研究结果为单分子对荧光共振能量转移实验提供了较好的实验指导。

参 考 文 献

- Ha T, Ting A Y, Liang J *et al.*. Intradomain distances in the regulatory domain of the myosin head in prepower and postpower stroke states: fluorescence energy transfer[J]. *Chem. Phys.*, 1999, **247**: 107~118
- Shan Guangcun, Huang Wei. Theoretical study of single-pair fluorescence resonance energy transfer technique[J]. *J. Chem. Phys.*, submitted
- Shan Guangcun, Huang Wei. Theoretical study on single-molecule spectroscopy[J]. *Front. Phys. China*, 2006, **4**: 405~411
- Chang Q, Sipior J, Lakowicz J R *et al.*. A lifetime-based fluorescence resonance energy transfer sensor for ammonia[J]. *Anal. Biochem.*, 1995, **232**: 92~97
- Shan Guangcun, Huang Wei. Optical single molecule spectroscopy for monitoring conformational dynamics of a single biomacromolecule[J]. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2006, **28**: 57~61
- Mizuno H, Sawano A, Eli P *et al.*. Red fluorescent protein from discosoma as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer[J]. *Biochemistry*, 2001, **40**: 2502~2510
- Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy[M]. New York: Kluwer Academic, 1999. 302~401
- Weiss S. Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy[J]. *Nature Struct. Biol.*, 2000, **7**: 724~729
- Ghosh S. S., Peggy S. Eis, Kirsten Blumeyer *et al.*. Real time kinetics of restriction endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy transfer[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**: 3155~3159
- Norman D. G.. Location of cyanine23 on double-stranded DNA: importance for fluorescence resonance energy transfer studies[J]. *Biochemistry*, 2000, **39**: 6317~6324
- Lipman E. A., Schuler B., Bakajin O. *et al.*. Single molecule measurement of protein-folding kinetics[J]. *Science*, 2003, **301**: 1233~1235
- Mark A. Rizzo, Gerald H Springer, Butch Granada *et al.*. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**: 445~449
- Zhuang Xiaowei, Laura E. Bartley, Hazen P. Babcock *et al.*. A single-molecule study of RNA catalysis and folding[J]. *Science*, 2000, **288**: 2048~2051
- Ha T, Enderle T, Ogletree D F *et al.*. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**(13): 6264~6268
- Deniz A A, Laurence T A, Beligere G S *et al.*. Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**: 5179~5184
- Jia Y, Talaga D S, Lau W L *et al.*. Folding dynamics of single GCN-4 peptides by fluorescence resonant energy transfer confocal microscopy[J]. *Chem. Phys.*, 1999, **247**: 747~765
- Schuler B., Lipman E. A., Eaton W. A.. Probing the free energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy[J]. *Nature*, 2002, **419**: 743~747

- 18 Talaga David S., Lau Wai Leung, Roder Heinrich *et al.*. Dynamics and folding of single two-stranded coiled-coil peptides studied by fluorescent energy transfer confocal microscopy[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**: 13021~13026
- 19 J. McKeever, A. Boca, A. D. Boozer *et al.*. Experimental realization of a one-atom laser in the regime of strong coupling [J]. *Nature*, 2003, **425**: 268~272
- 20 R. J. Thompson, G. Rempe, H. J. Kimble. Observation of normal-mode splitting for an atom in an optical cavity[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1992, **68**: 1132~1135
- 21 M. O. Scully, M. S. Zubairy. Quantum Optics[M]. London: Cambridge University Press, 1997. 190~201
- 22 Y. Mu, C. M. Savage. One-atom lasers[J]. *Phys. Rev. A*, 1992, **46**: 5944~5954
- 23 Berglund A. J., Doherty A. C., Mabuchi H.. Photon statistics and dynamics of fluorescence resonance energy transfer [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **89**: 068101~068104
- 24 Meng Hongyun, Lee Changhee. Amplified spontaneous emission injection wavelength-locked Fabry-Pérot laser diodes[J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(8): 1181~1184
蒙红云,李昌熹. 放大自发辐射注入波长锁定法布里-珀罗激光器[J]. *中国激光*, 2008, **35**(8): 1181~1184

***Chinese Optics Letters* (《中国光学快报》)2009 年“Nanophotonics”和 “Digital and Computer-Generated Holography” 专题征稿启事**

Chinese Optics Letters (《中国光学快报》)计划于 2009 年 10 月在正刊上推出“Nanophotonics”(“纳米光子学”)专题,特向国内外广大读者以及作者征集该方面原创性的研究论文。征稿范围包括:

- Metamaterials; negative index, cloaking and nonlinear phenomena
- Materials synthesis; molecular architectures for photonic applications, eg. carbon nanotubes, DNA and dendrimers
- Nanofabrication techniques; eg. multiphoton polymerization and nanoimprint technology
- Nanocharacterization methods and instrumentation; Near-field techniques, super-resolution and high temporal resolution
- Nanosensors; resonators and field enhancement strategies for improved sensitivity
- Photonic crystals; spatial and temporal dispersion phenomena with applications and nonlinear effects
- Plasmonics; localized and propagating surface modes, metallodielectrics, fishnet structures
- Quantum confined structures; quantum dots to quantum wells with applications to sources and detectors
- Nanostructures for energy; Dye-sensitization, plasmonic enhancement, organic and carbon based nanomaterials, quantum structures

Feature Editors:

Joseph W. Haus, Director

Electro-Optics Program, University of Dayton, Dayton, USA

Yiping Cui

Advanced Photonics Center, Southeast University, Nanjing, China

截稿日期:2009 年 5 月 30 日

Chinese Optics Letters (《中国光学快报》)计划于 2009 年 12 月在正刊上推出“Digital and Computer-Generated Holography”(“数字与计算全息”)专题,特向国内外广大读者以及作者征集该方面原创性的研究论文。征稿范围包括:

- Digital holography theory and systems
- Phase unwrapping
- Computer generated holograms
- Spatial light modulators for holography
- Holographic optical elements
- 2D and 3D pattern recognition
- Three-dimensional imaging and processing
- Three-dimensional display
- 2D-3D content conversion
- Shape and deformation measurement
- Holographic imaging and microscopy
- Holographic Optical Micro-Manipulation

Feature Editor:

Ting-Chung Poon, Ph. D., Professor

Bradley Department of Electrical and Computer Engineering

Virginia Tech

Blacksburg, Virginia 24061 USA

截稿日期:2009 年 7 月 15 日

投稿方式以及格式:可直接将稿件电子版发至邮箱:col@mail.shcnc.ac.cn(主题标明“专题(上述两个专题的具体名称)投稿”),或通过网上投稿系统直接上传稿件(投稿类型选择 focus issue submission,备注中写明具体专题名称,推荐用此方式投稿),详情请参见《中国光学快报》网站:<http://www.col.org.cn>。投稿必须是英文稿,其电子版请使用 Latex 或者 MS-Word 格式。有任何问题请发邮件至 col@mail.shcnc.ac.cn 询问。