

Single Molecule Dynamics Measurement by Using Fluorescence Correlation Spectroscopy

Tieyun Wang^{1,2}, Guofeng Zhang², Liantuan Xiao², Suotang Jia²

¹Department of Electronics Information and Physics, Changzhi University, Changzhi

²College of Physics and Electronics Engineering, Shanxi University, Taiyuan

Email: wty3299@163.com

Received: Jun. 28th, 2012; revised: Jul. 13th, 2012; accepted: Jul. 20th, 2012

Abstract: In this paper, the dynamics of polymer surface and its interior are measured by using fluorescence correlation spectroscopy with the SR dye molecules as optical prods. It is found that there are the anti-correlated characteristics to the orthogonal polarization of single molecules fluorescence when the SR molecules are absorbed onto the PMMA surface. It is presented directly that the rotational dynamics of the polymer surface is revealed by the cross-correlation function, and the rotational time is measurement. Accordingly, the molecules embedded inside the polymer film are restricted by the surrounded environment and have low rotational freedom degree.

Keywords: Fluorescence Correlation Spectroscopy; Single Molecules; Dynamics; Dipole Reorientation

荧光偏振关联光谱用于单分子动力学特性的研究

王铁云^{1,2}, 张国峰², 肖连团², 贾锁堂²

¹长治学院电子信息与物理系, 长治

²山西大学物理电子工程学院, 太原

Email: wty3299@163.com

收稿日期: 2012年6月28日; 修回日期: 2012年7月13日; 录用日期: 2012年7月20日

摘要: 本文以 SR 单分子作为荧光探针, 利用两个正交偏振探测通道的荧光偏振关联函数分别测量聚合物薄膜表面与薄膜内部的动力学特性。分析发现薄膜表面的单分子正交偏振的荧光具有反关联特性, 荧光偏振互关联函数反映了聚合物薄膜表面的转动动力学特性, 测量了单分子转动再取向的特征时间。相应镶嵌在薄膜内部的荧光分子受到环境的束缚, 转动自由度低。

关键词: 荧光关联光谱; 单分子; 动力学; 偶极再取向

1. 引言

最近十年来, 单分子的光学探测在物理、化学及生物学中的广泛应用引起了人们的极大兴趣^[1-3]。在一个典型的系综实验中, 单分子系统的不同动力学特性被大量平均, 其结果是相关参数的平均值。单分子是一个能够用来研究量子动力学效应的简单体系, 单分子光谱不含有任何系综平均, 能够产生非常精细的动力学性质的信息。单个荧光分子具有固有的吸收跃迁偶

极矩, 分子只吸收偏振方向与其吸收跃迁偶极矩方向一致的光子, 然后辐射具有特定偏振方向的荧光。单分子荧光的偏振特性反映了单分子偶极矩的取向特性^[4-8], 对单分子取向的监控对制备单分子光量子器件^[9,10]具有重要的意义, 可用于在纳米尺度上分析材料的微观动力学特性和聚合物的位置异构^[6-8]。人们通过测量两个正交偏振探测通道的荧光强度所得到的偏振度值来标定单分子偶极取向的变化, 利用单分子的

偶极取向和再取向测量了聚合物薄膜中的转动扩散与转动跳跃的动力学行为^[4-8]。

本文以 SR 荧光单分子作为光学探针，通过测量正交偏振的两个探测通道的荧光偏振关联光谱研究单分子偶极取向的变化，分析聚合物薄膜表面与薄膜内部的动力学特性，研究利用荧光偏振关联光谱直接测量纳米环境的转动动力学行为。

2. 实验装置及测量原理

图 1 所示共焦光学显微镜系统测量分子的偶极取向的实验装置。皮秒脉冲二极管激光器(PDL808 Pico Quant)作为激发光源，其内触发重复频率为 40 MHz，激光波长为 635 nm，输出脉冲宽度为 50 ps、功率密度约为 1.5 KW/cm²。激发光通过起偏器和λ/4 波片成为圆偏振光，扩束后进入光学倒置显微镜(Nikon TE2000-U)，被双色镜 D1 (BrightLine, Semrock)反射进入物镜。利用放大倍率为 100、数值孔径为 1.3 的油浸显微镜物镜(Nikon)将激发光聚焦到样品上，处于焦平面上的分子发出的荧光被该显微镜物镜收集。双色镜用于将荧光信号和激发光分离，反射 635 nm 激光同时透射荧光信号。利用直径为 100 μm 的针孔进行空间滤波，将处于激发光聚焦平面外的其它分子

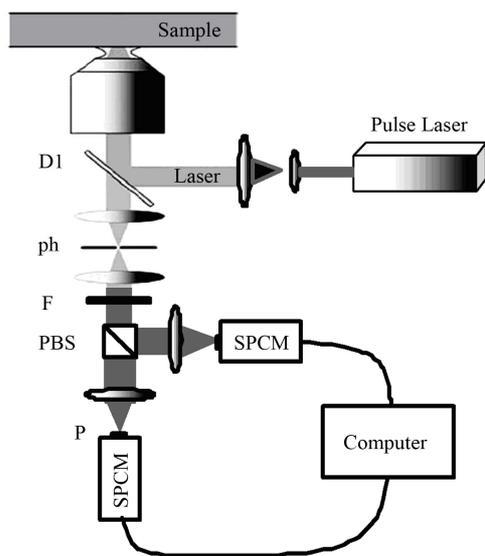


Figure 1. Experimental facilities measuring single molecular by confocal microscopy. D1, Dichroic mirror; ph, pinhole; F, Optical notch filter; PBS, Polarizing beam splitter; P, Horizontal polarization; S, Vertical polarization; SPCM, Single-photon counting module
图 1. 共焦显微镜测量单分子取向的实验装置。 D1, 双色镜; ph, 针孔; F, 光学陷波滤波器; PBS, 偏振分光棱镜; P, 水平偏振取向; S, 垂直偏振取向; SPCM, 单光子探测器

发出的杂散光滤除。通过陷波滤波器(Bright Line Semrock)将激光的散射等背景光滤除。荧光信号通过偏振分光棱镜 PBS 分成两束，其中透射过 PBS 的水平偏振荧光(P)以及反射出 PBS 的垂直偏振荧光(S)分别进入单光子探测器(SPCM, PerkinElmer SPCM-AQR-15)进行荧光探测，探测器的死时间为 50 ns，同步探测的时间通道门宽为 30 ns。SPCM 将入射的光子转化成标准的 TTL 脉冲信号输出，将输出的光电脉冲连接到置于计算机内的时间关联单光子计数采集卡(Becker & Hickl GmbH, DPC230)分别进行光子计数和关联函数分析。分子样品放置于三维纳米位移平台(Tritor 200/20 SG)上实现 x-y-z 三维扫描，利用 LabVIEW 程序来控制三维纳米位移平台的移动并分析处理单分子荧光信号。

2.1. SR 荧光分子的特性与样品制备

实验采用 SR(SRfluor™680 Phenyl)染料分子，其化学结构和吸收发射光谱如图 2 所示。SR 分子是对称扁平的结构，分子量为 1158，体积大约为 1 nm³。

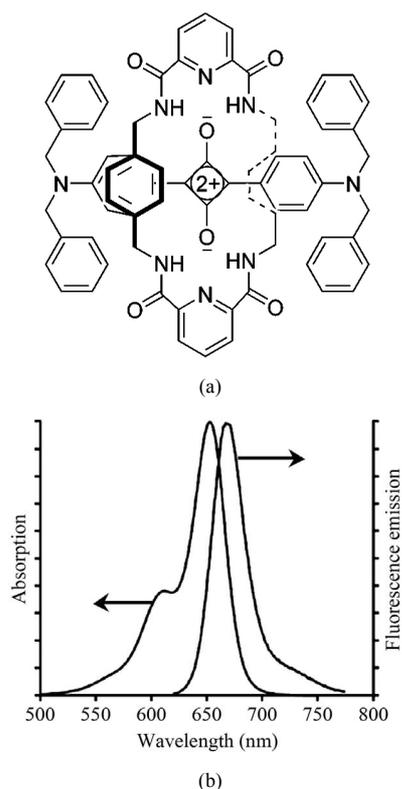


Figure 2. Chemical construction of molecule SR (a) & absorption spectrum and emission spectrum (b)
图 2. SR 分子的化学结构(a)与吸收光谱和发射光谱(b)

SR 分子最强吸收波长为 650 nm, 最强发射光谱为 678 nm。由于 SR 分子对称扁平的结构使得其容易在聚合体表面吸附, 作为探测聚合体表面动力学效应的光学探针, 将 0.2 mg 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA, poly methyl methacrylate)的甲苯溶液滴在清洗后的盖玻片(尺寸为 60 mm × 24 mm × 0.16 mm, 玻片经丙酮、氢氧化钾溶液、超纯水超声清洗)上, 放置于涂覆仪以每分钟 3000 转的转速旋转 60 s, 待甲苯溶液挥发后在玻片上形成厚度约为 50 nm 厚度的 PMMA 薄膜。再将 50 μL 溶有 SR 分子的甲苯溶液滴在 PMMA 薄膜上再次进行上述涂覆过程, 待甲苯溶液挥发后单分子吸附在聚合体表面上。当制备单分子分布在 PMMA 薄膜内部时, 需要将同时混有 PMMA 和 SR 分子的甲苯溶液进行涂覆。这里 SR 分子溶液的浓度要足够低 ($10^{-10} \sim 10^{-9}$ mol), 保证分子之间有足够的空间距离(大于显微镜光学分辨率 $1.6\lambda/\text{NA}$, λ 为激光波长, NA 为物镜的数值孔径)以进行光学测量。

2.2. 单分子的荧光关联光谱

荧光关联光谱用于测量分子荧光起伏信号的关联性, 荧光起伏可以由分子转动、扩散、系间跃迁以及环境变化引起^[11-13]。

通常在激发体积内同时存在一个以上的分子, 荧光关联光谱是这些分子荧光强度起伏的关联函数。相互独立的不同的分子之间的行为是没有关联性的, 分子局部浓度产生的变化会导致荧光的起伏。只要足够长的时间测量, 就可以分析光子计数值(或荧光强度) $N(t)$ 的统计特性。 $N(t)$ 的自关联函数可以如下得到:

$$G(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T N(t)N(t+\tau) = \langle N(t)N(t+\tau) \rangle \quad (1)$$

分子的光物理与动力学的特征时间只有源于单分子荧光的关联函数的测量。对于同步脉冲激光激发的单分子荧光, 设置时间通道门宽 T 小于探测器的死时间, 由于单光子探测器对一个或多个光子的响应输出都为一个 TTL 脉冲, 那么在每一个时间通道门里最多只可能探测到一个光电脉冲, 于是 $N(t)$ 和 $N(t+\tau)$ 就只会是 0 或 1。单分子荧光的光子计数自关联函数为

$$G_n(\tau) = G(\tau) \frac{n_T}{N_p^2} = \frac{n_T}{N_p^2} \sum N(t)N(t+\tau) \quad (2)$$

其中 n_T 是光子序列的所有时间通道门数, N_p 是测量

到的所有光子数。

自关联函数的分析是对时序光子序列的推移、比较、相加生成统计图的过程。首先将测量得到的光电脉冲向后移动一个时间通道间隔 T , 将移动后的结果和初始记录进行比较, 将都有光电脉冲的通道数相加就得到了 $\tau = T$ 时刻的关联性 $G(T)$, 这一过程也可以理解将两个序列相乘, 都有光子的通道为 1, 否则为 0, 然后将都是 1 的通道相加。依次类推就可以得到自关联函数 $G(\tau) = \sum N(t)N(t+\tau)$, 其中 $\tau = nT$, $n = 0, 1, 2, \dots$ 。

单分子荧光的互关联函数相应为

$$G_{12n}(\tau) = G_{12}(\tau) \frac{n_T}{N_{p1}N_{p2}} = \frac{n_T}{N_{p1}N_{p2}} \sum N_1(t)N_2(t+\tau) \quad (3)$$

其中 N_{p1} 是探测通道 1 测量到的所有光子数, N_{p2} 是探测通道 2 测量到的所有光子数。

对于两个探测通道的探测结果之间的互关联函数可以用类似处理自关联函数的方法获得, 这里需要将一个通道的光电脉冲序列相对另一个通道的光电脉冲序列进行时间推移, 然后比较两个序列的一致性, 就可以得到两个探测通道之间的互关联函数。

3. 实验内容及结果

实验中使用脉冲激光激发单个 SR 分子, 利用双通道计数程序同步采集水平和垂直两个偏振方向上的荧光信号。图 3(a)为处在 PMMA 内部的单分子发出的荧光光子的计数随时间的变化曲线, 其中(1)为水平偏振方向上的光子计数随时间的变化曲线, (2)为垂直偏振方向上的光子计数随时间的变化曲线。双通道计数的取样时间为 10 ms。从图 3(a)可以看到分子发出的荧光存在起伏, 在时刻 27 s 至 46 s 之间, 荧光强度明显较低, 这是因为分子布居在三重态而减缓发射荧光的结果, 在 88 秒后分子被光漂白。

通过时间关联单光子计数测量两通道各自的自关联函数和相互之间的互关联函数, 实验结果如图 3(b)所示, 曲线 1、2、3 分别表示水平和垂直偏振荧光光子的自关联函数曲线和它们之间的互关联函数曲线。处在 PMMA 内部的单分子被周围的 PMMA 分子囚禁, 发生单分子转动的几率非常小。在图 3(a)中表现为两通道光子计数信号同时增强与减弱的特性, 表明

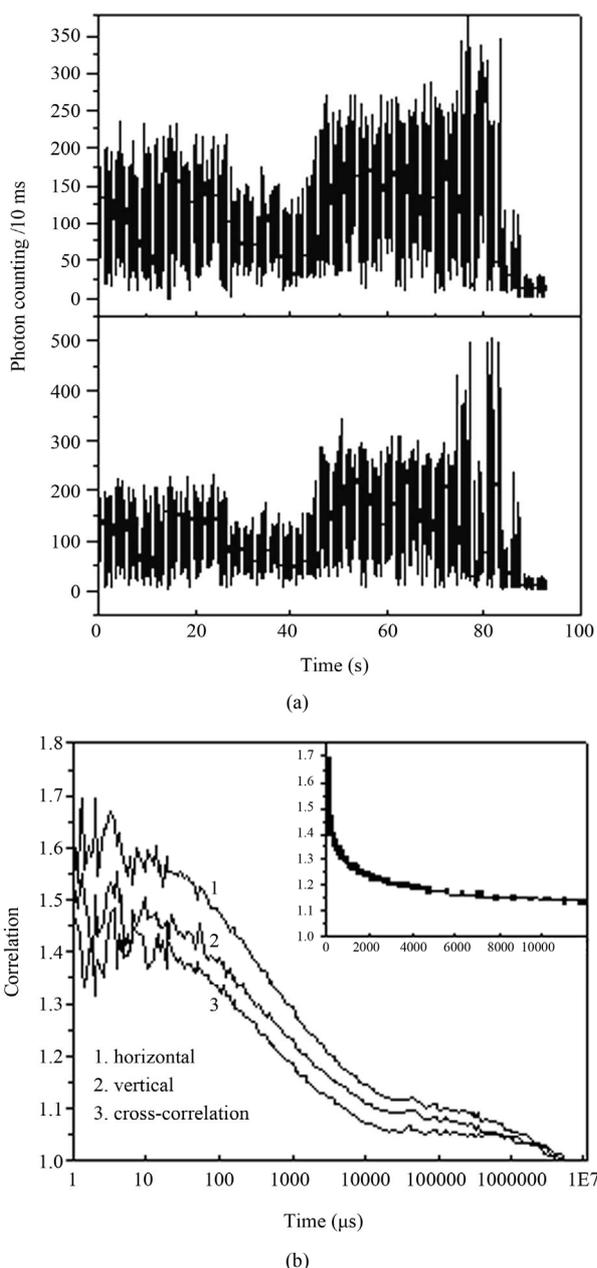


Figure 3. Molecule SR setting in Film PMMA. (a) Single-molecule fluorescence's photon counting of Horizontal polarization (1) and Vertical polarization (2); (b) Autocorrelation function (1, 2) and cross-correlation function (3) of single-molecule fluorescence in cross polarization. In the figure, point refers to data of cross-correlation function; full line refers to exponential fitting curve

图 3. SR 分子镶嵌在 PMMA 薄膜内。(a) 水平偏振取向(1)和垂直偏振取向(2)的单分子荧光光子计数；(b) 对应正交偏振方向的单分子荧光的自关联函数(1, 2)与互关联函数(3)。插图中点为互关联函数数据，实线为指数拟合曲线

分子没有发生转动再取向。相应在如图 3(b)，互关联函数与自关联函数具有相同的迟豫特性。

如图 3(b)中插图所示，对互关联函数的多指数拟

合曲线为

$C = 0.21 \exp(-t/209) + 0.23 \exp(-x/2614) + 1.14$ ，其特征时间为 209 μs 和 2614 μs，分别表示单分子荧光的快速与慢速迟豫特性的光物理特性，这是单分子在三重态布居所决定的荧光强度起伏特性。

图 4(a)为处在 PMMA 表面的单分子发出的荧光光子的计数随时间的变化曲线，其中(1)为水平偏振方向上的光子计数随时间的变化曲线，(2)为垂直偏振方向上的光子计数随时间的变化曲线。双通道计数的取样时间为 10 ms。从图 4(a)可以发现在 PMMA 表面的单分子非常活跃，被探测分子的偶极取向发生了量子跳跃，测量得到的水平偏振和垂直偏振的光子数有较大的起伏。两个通道的光子计数是反关联的，即当测量到的水平偏振的光子计数减少时，测量到的垂直偏振的光子计数就会相应的增大。这说明单分子偶极矩的取向发生了变化，即分子进行了转动再取向行为，单分子发射的荧光光子的偏振方向的改变使得两个正交探测通道上的光子计数发生关联性变化。

图 4(b)所示为两通道的自关联函数和互关联函数，曲线 1、2、3 分别表示水平和垂直偏振光子计数的自关联曲线与互关联曲线。处在 PMMA 表面的 SR 单分子具有较大的自由度，发生单分子转动跳跃的几率较大。在图 4(a)中表现为两通道光子计数的反关联特性，相应在如图 4(b)的互关联函数与自关联函数的迟豫特性有明显的不同。这里的自关联函数表示其荧光强度起伏的光物理特性，而互关联函数表示单分子转动的动力学特性。如图 4(b)中插图所示，对互关联函数的多指数拟合曲线为

$y = 0.88 - 0.04 \exp(-x/5317)$ ，单分子转动再取向的特征时间为 5317 μs，误差为 3%。

4. 结论

单分子偶极取向的改变会直接导致发射的荧光光子偏振方向发生变化，我们利用两个正交偏振探测通道的荧光偏振关联函数测量聚合物薄膜表面与薄膜内部的光动力学特性。研究表明互关联函数可以用于直接测量聚合物表面单分子偶极转动再取向动力学行为，实验测得处在聚合物表面的单分子转动再取向的特征时间为 5317 μs。这种研究方法能够研究用于光场与单分子相互作用的量子动力学特性，以及在

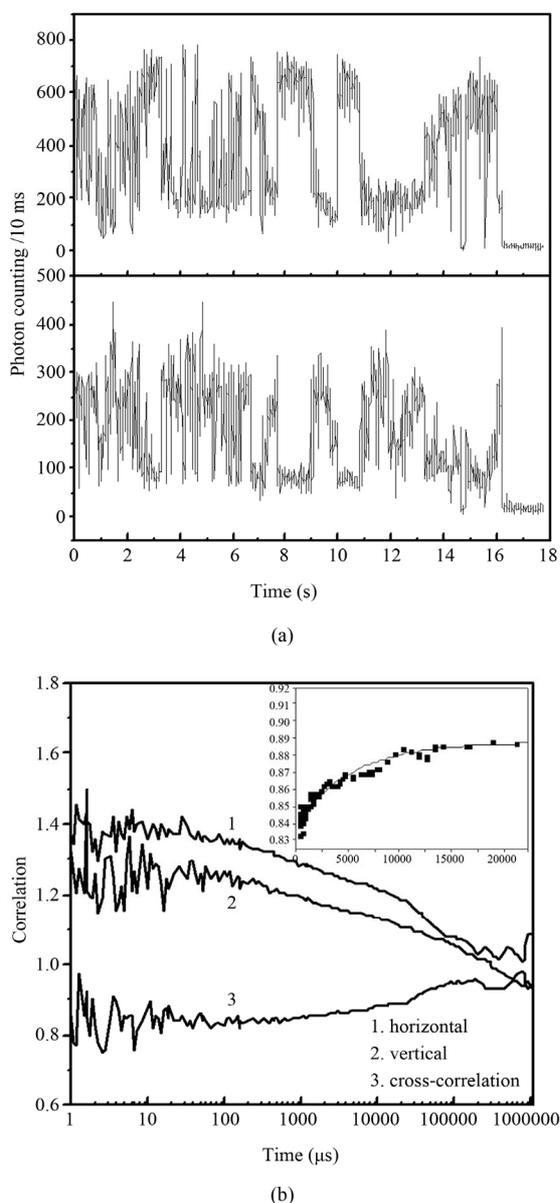


Figure 4. Molecule SR setting in Film PMMA. (a) Single-molecule fluorescence's photon counting of Horizontal polarization (1) and Vertical polarization (2); (b) Autocorrelation function (1, 2) and cross-correlation function (3) of single-molecule fluorescence in cross polarization. In the figure, point refers to data of cross-correlation function; full line refers to exponential fitting curve

图 4. SR 分子分布在 PMMA 薄膜表面。(a) 水平偏振取向(1)和垂直偏振取向(2)的单分子荧光光子计数；(b) 对应正交偏振方向的单分子荧光的自关联函数(1, 2)与互关联函数(3)。插图中点为互关联函数数据，实线为指数拟合曲线

固体以及玻璃体等系统中单分子所处局部纳米环境的变化特性。

5. 致谢

本文得到国家重大科学研究计划(批准号: 2012 CB921603, 2010CB923103), 国家高技术研究发展计划(批准号: 2011AA010801)、国家自然科学基金(11174187, 10934004)、国家基金创新团队(60821004)、山西省科技基础条件平台建设项目(No. 2011091016)、山西省高等学校中青年拔尖创新人才支持计划与山西省高等学校优秀创新团队支持计划等的资助。

参考文献 (References)

- [1] F. Kulzer, M. Orrit. Single-molecule optics. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2004, 55: 585-611.
- [2] M. A. Bopp, A. Sytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdel and R. M. Hochstrasser. The dynamics of structural deformations of immobilizing single light-harvesting complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1999, 96(20): 11271-11276.
- [3] H. P. Lu, L. Xun and X. S. Xie. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 1998, 282(5395): 1877-1882.
- [4] T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin and S. Weiss. Single molecule dynamics studied by polarization modulation. *Physical Review Letters*, 1996, 77(19): 3979-3982.
- [5] T. Ha, J. Glass, T. Enderle, D. S. Chemla and S. Weiss. Hindered rotational diffusion and rotational jumps of single molecules. *Physical Review Letters*, 1998, 80(10): 2093-2096.
- [6] B. Sick, B. Hecht and L. Novotny. Orientational imaging of single molecules by annular illumination. *Physical Review Letters*, 2000, 85(21): 4482-4485.
- [7] M. A. Lieb, J. M. Zavislan and L. Novotny. Single-molecule orientations determined by direct emission pattern imaging. *Journal of the Optical Society of American B*, 2004, 21(6): 1210-1215.
- [8] K. D. Weston, L. S. Goldner. Orientation imaging and reorientation dynamics of single dye molecules. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105(17): 3453-3462.
- [9] B. Lounis, M. Orrit. Single-photon sources. *Reports on Progress in Physics*, 2005, 68(5): 1129-1179.
- [10] S. L. Dong, T. Huang, Y. Liu, J. Wang, G. F. Zhang, L. T. Xiao and S. T. Jia. Fast recognition of single molecules based on single event photon statistics. *Physical Review A*, 2007, 76(6): Article ID: 063820.
- [11] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren and P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*, 1993, 22(3): 169-175.
- [12] D. Magde, E. L. Elson and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 1972, 29(11): 705-711.
- [13] P. Kask, P. Piksarv and U. Mets. Fluorescence correlation spectroscopy in the nanosecond time range: Photon antibunching in dye fluorescence. *European Biophysics Journal*, 1985, 12(3): 163-166.