基于热还原氧化石墨烯的单分子表面诱导荧光衰逝技术*

樊秦凯[1)2)] 杨晨光[1)2)] 胡书新[1)] 徐春华[1)] 李明[1)2)] 陆颖[1)2)†]

1) (中国科学院物理研究所, 北京凝聚态物理国家研究中心, 软物质物理重点实验室, 北京 100190)

2) (中国科学院大学, 北京 100049)

(2023 年 3 月 26 日收到; 2023 年 4 月 19 日收到修改稿)

单分子表面诱导荧光衰逝 (single molecule surface-induced fluorescence attenuation, smSIFA) 技术是一种基于二维材料受体、用于研究生物大分子法向运动的精密测量方法, 该方法不受二维平面运动的干扰. 作为受体的二维材料, 其特征淬灭距离决定法向上探测的距离和精度. 近年来以氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 和石墨烯作为介质受体的 SIFA 技术在生物大分子的研究中发挥了重要作用, 但石墨烯和 GO 具有固定的特征淬灭距离, 探测范围有限. 调整探测范围需要更换介质材料, 面临材料选择与制备的困难, 亟需开发用于技术的可调控材料. 本文改良了以 GO 为介质受体的单分子 SIFA 技术, 利用热还原的方法对 GO 进行还原, 通过控制还原温度, 制备出了还原程度不同的还原氧化石墨烯 (reduced graphene oxide, rGO), 调控特征淬灭距离, 利用荧光标记的 DNA 测量 rGO 的特征淬灭距离. 将 rGO 用于单分子 SIFA 技术, 对 Holliday junction 构象变化的观察, 论证了 rGO 的探测范围.

关键词: 还原氧化石墨烯, 表面诱导荧光衰逝, 特征淬灭距离, 荧光共振能量转移

PACS: 78.67.Wj, 82.80.Pv, 87.14.gk, 87.15.H– **DOI:** 10.7498/aps.72.20230450

1 引 言

单分子荧光共振能量转移 (single molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET) 是研究生物大分子动力学过程的常用方法, 具有较高的时间和空间分辨率[1–4]. 膜蛋白是生物膜功能的主要承担者, 在细胞内约有 1/3 的基因编码膜蛋白[5]. 研究膜蛋白在细胞膜上的取向和插膜深度对于理解其结构与功能至关重要[6,7]. 由于细胞膜具有流动性, 处于细胞膜上的膜蛋白会发生横向位移, 将 FRET 用于膜蛋白的研究时具有局限性[8–10]. 近年来基于荧光共振能量转移原理发展的表面诱导荧光衰逝 (surface-induced fluorescence attenuation, SIFA) 技术是将二维介质作为荧光受体, 通过分析其对荧光供体的光强衰逝程度, 可以计算出荧光供体距和材料表面的法向距离[11,12]. 荧光衰逝效率和供体距介质表面法向距离的关系由 (1) 式描述:

$$E_{\mathrm{SIFA}} = 1 - \frac{I}{I_0} = \frac{1}{1 + (d/d_0)^4}, \tag{1}$$

式中: I_0 为没有介质存在时荧光供体的初始强度; I 为当介质存在时测得的供体荧光强度; d_0 为介质的特征淬灭距离, 是 $I/I_0 = 0.5$ 时荧光供体和介质

* 国家重点研发项目 (批准号: 2019YFA0709304)、国家自然科学基金 (批准号: T2221001, 12090051, 11974411, 91753104, U1930402, 12090050, 12022409, 32000871)、中国科学院战略性先导科技专项 (批准号: XDB37000000, XDB0480000)、中国科学院前沿科学重点研究计划 (批准号: ZDBS-LY-SLH015) 和中国科学院青年创新促进会 (批准号: Y2021003) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn

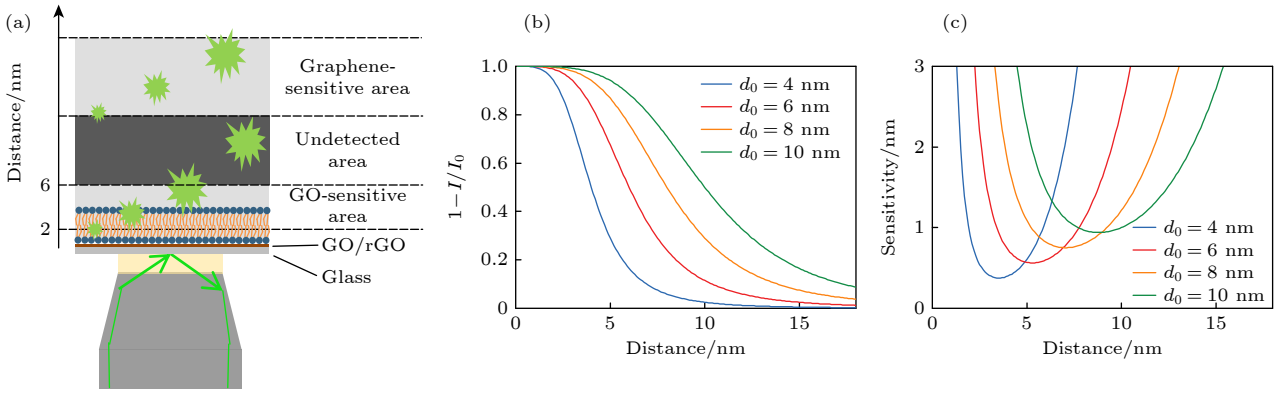

图 1 调控 d_0 的 SIFA 方法 (a) SIFA 方法示意图; (b) 荧光供体光强衰减和表面距离的关系; (c) SIFA 探测灵敏度和荧光供体距表面距离的关系

Fig. 1. SIFA method of adjustable d_0: (a) Schematic representation of SIFA method; (b) relationship between degree of attenuation of a fluorescent donor and donor-surface distance; (c) relationship between detection sensitivity of SIFA and donor-surface distance.

表面的法向距离. 在选择二维介质作为荧光受体时不仅要考虑到材料的亲生物性, 同时还要考虑到材料的光学性能以及制备难易度. 近年来基于氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 的 SIFA 方法在膜蛋白的研究中有着广泛的应用[13,14], 基于石墨烯的单分子荧光成像也取得了一定成果[15,16]. 以往研究表明, GO 的 $d_0 = 4$ nm[11], 石墨烯的 $d_0 \approx 18$ nm[16–18]. GO 的 d_0 较小, 适合探测距离其表面 2—6 nm 范围内的信号[11]; 石墨烯的 d_0 较大, 适合探测距离其表面 12 nm 以外的区域[16]. 图 1(a) 展示了利用 GO 和石墨烯作为介质受体时的局限, 以石墨烯和 GO 作为介质受体时并不能全方位的覆盖近细胞膜表面的区域, 存在无法探测的区间. 图 1(b) 展示了不同 d_0 的距离淬灭曲线, 在 d_0 附近衰减曲线的斜率最大, 探测的灵敏度最高, 当荧光供体距离介质表面较近或较远时探测的灵敏度显著下降. 不同的二维材料的 d_0 不同, 能够探测的范围不同, 进行 SIFA 实验时需要根据目标大分子的尺寸以及荧光标记位点等信息来选择具有目标 d_0 的材料.

SIFA 方法探测荧光供体距离细胞膜法向距离的变化是通过测量供体的光强来实现的, 因此 SIFA 的灵敏度受制于仪器对于荧光供体光强的探测. 通常认为仪器能够分辨的光强变化率约为 10%[11], 基于此可以利用 (1) 式计算出不同 d_0 的距离探测灵敏度. 图 1(c) 展示了 SIFA 探测的距离灵敏度曲线, GO 的 $d_0 = 4$ nm, 在 d_0 附近的探测灵敏度可以接近 0.5 nm, 在距离其表面 2—6 nm 的范围内可以实现 1 nm 的分辨率, 然而一旦超出 3—6 nm 的灵敏范围之后, GO 的探测分辨率将低至 3 nm, 并且随着距离的增加分辨率呈指数下降. 当 d_0 提高到 10 nm 时, 虽然能够探测距离介质表面距离更远范围的荧光信号, 但即便是在最灵敏的 d_0 附近也只能实现 1 nm 的探测精度. 在进行 SIFA 实验时, 如果要实现 1 nm 的空间分辨率, 则介质受体的 d_0 应不大于 10 nm. 如图 1(c) 所示, 要对介质受体表面 12 nm 以内的生物大分子进行探测, 以弥补石墨烯和 GO 探测的局限, 并保证 1 nm 的空间分辨率, 需要对 d_0 在 4—10 nm 之间进行连续调节. 制备 d_0 在 3—10 nm 的介质材料并用于 SIFA实验来观察生物大分子面临材料选择和制备的困难. 有研究表明, 对石墨烯进行通电使其氧化可以减小 d_0, 但石墨烯氧化具有不均匀性[19]. 还原氧化石墨烯 (reduced graphene oxide, rGO) 是 GO 通过加热、化学和电学等方法进行还原后所得到的材料, rGO制备方便, 且物理和化学性质和石墨烯接近[20–22]. 有研究表明, rGO 对荧光的淬灭效果介乎与 GO 和石墨烯之间[23,24], 但 rGO 仍缺乏单分子荧光成像的应用. 本文采用热还原方法制备 rGO, 并用于单分子荧光成像. 通过荧光白标记的双链 DNA 标尺精确测量了不同还原程度 rGO 的 d_0, 改良了已有的 SIFA 技术, 并通过与 GO 进行对比, 验证了 rGO-SIFA 技术的优势.

2 实验材料与方法

2.1 GO 分散液的制备

GO 分散液制作方法参照 Hummers 方法[25,26]. 取 1 g $NaNO_3$, 46 mL H_2SO_4 以及 1 g 石墨, 于 0 ℃

温度下混合均匀, 对混合物进行冰浴以保持其环境温度为 0 ℃, 并向混合物中缓慢加入 6 g $KMnO_4$. 此后不断搅拌约 2 h, 而后将混合物整体移至 35 ℃ 继续搅拌 2 h, 将 120 mL 去离子水缓慢加入混合溶液中 (30 min), 最后将 6 mL H_2O_2(质量分数为 30%) 缓慢加入混合溶液中, 并培养 20 min 左右. 超高速离心 (15000 r/min) 20 min 制得的混合溶液, 去除上清液, 将得到的沉淀再次分散溶于去离子水中, 进行超声 (100 W, 30 min), 对多层氧化石墨进行剥离. 对溶液进行低速离心 (1000 r/min) 10 min, 去除沉淀保留上清液, 重复该步骤 3—4 次, 直到不再出现明显的沉淀. 将收集到的溶液进一步离心, 每次离心取走上清液后将沉淀再次溶解进行下一次离心. 分别以 8000, 6000, 4000 r/min 离心 25 min, 4000 r/min 离心后的沉淀溶解后再次以 2000 r/min 离心 25 min, 所得到的上清液即为实验所用的 GO 分散液.

2.2 XPS 方法分析 GO 的还原

用硝酸纤维素膜 (直径 47 mm, 孔径 0.2 mm, Whatman) 对制备的 GO 分散液进行真空抽滤[27], 所形成的薄膜自然晾干之后从滤膜上分离下来. 剪取少量 GO 薄膜, 用 2 片干净的盖玻片将 GO 薄膜夹在中间, 放置于真空管式炉内烘烤, 升温速度设为 8 ℃/ min, 升温至目标温度后维持 2 h, 而后自然冷却至室温. 将加热还原后的 rGO 薄膜与 GO 薄膜在中国科学院物理研究所的 X 射线光电子能谱仪 (XPS, Thermo Fisher Scientific ESCALAB 250X) 上测量结合能, 所用 X-射线源为单色化的铝 K_α 射线, 能量为 1486.6 eV.

2.3 rGO-SIFA 实验步骤

rGO-SIFA 实验包含 rGO-SIFA 样品腔室制备、单分子荧光实验材料与样品制备, 以及荧光观测三部分.

2.3.1 rGO-SIFA 样品腔室的制备过程

实验所用的盖玻片需要清洗掉表面的荧光杂质, 以免对单分子荧光成像实验造成影响. 具体清洗流程是先使用丙酮对盖玻片超声清洗 30 min, 然后用去离子水超声清洗洗去丙酮残留, 再用甲醇超声清洗 30 min, 并在超声清洗结束后用去离子水超声清洗洗去甲醇残留. 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液对盖玻片进行超声清洗, 每次清洗 10 min 后更换 NaOH 溶液, 共超声清洗 3 次, 得到干净且没有荧光杂质的盖玻片.

利用 LB(Langmuir-Blodgett) 技术将 GO 分散液中的单层 GO 转移至清洗干净的盖玻片上[28], 将另一块干净的盖玻片覆盖其上, 放置于真空管式炉内烘烤, 升温速度设为 8 ℃/min, 升温至目标温度后维持 2 h, 而后自然冷却至室温. 用双面胶将 rGO 盖玻片和清洗干净的载玻片黏合在一起, 做成适合装载在全内反射荧光显微镜上的样品腔室.

2.3.2 单分子荧光实验材料与样品制备

实验所用的 DNA 序列采购于上生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 双链 DNA 的序列为 TATGGTCAACTGCTGAGCGTAG-biotin, ATACCAGTTGACGACTCGCAT. DNA Holiday junction 的 4 条链序列如表 2 所示. 退火缓冲液 (pH = 7.5) 成分为 50 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl. 双链 DNA 退火时将 2 条单链 DNA 按照 1∶1 混合, 退火缓冲液 (pH = 7.5) 成分为 50 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, 加热至 95 ℃ 孵育 5 min, 而后在 7 h 内缓慢冷却至室温.

观察双链 DNA 样品时的缓冲液成分为 50 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5. 观察 DNA Holiday junction 样品时的缓冲液成分为50 mmol/L NaCl,50 mmol/L $MgCl_2$,25 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5. 在进行单分子荧光成像时缓冲液内需要加入抗淬灭体系, 成分为 0.8% D-葡萄糖、1 mg/mL 葡萄糖氧化酶、0.4 mg/mL 过氧化氢酶、1 mmol/L Trolox.

2.3.3 rGO-SIFA 荧光观测的步骤

首先, 将 1 mg/mL 生物素修饰的牛血清蛋白 (biotin-BSA) 注入样品腔室, 孵育 5 min 后用 PBS 缓冲液冲洗掉游离的 biotin-BSA; 加入 10 μg/mL 链霉亲和素 (strepavidin, SA) 溶液孵育 5 min 后用 PBS 缓冲液冲洗掉游离的 SA. 然后, 将 100 pmol/L 末端标记了 biotin 的荧光标记 DNA 注入样品腔室, 孵育 5 min 后用PBS 缓冲液冲洗掉游离的 DNA. 最后, 将缓冲液和抗淬灭体系混合注入样品腔内进行单分子荧光成像. 实验装置采用以全内反射荧光显微镜和 EMCCD 为基础的双通道荧光共振能量转移观测装置[29−31], EMCCD 曝光时间设

为 50 ms. 利用 ImageJ 和 Matlab 等软件记录及分析光强数据.

3 结果与讨论

3.1 XPS 分析 GO 的热还原

利用 LB 技术可以便捷、低成本地在盖玻片上修饰单层 GO, 以制备成样品腔室进行单分子 SIFA 实验[11]. 实验所用的盖玻片最高能够在 600 ℃ 高温下不发生断裂与形变, 基于此, 将修饰了单层 GO 的盖玻片直接放置于真空管式炉内进行烘烤, 便可得到修饰了 rGO 的盖玻片, 并进行 SIFA 实验.

不同还原程度的 rGO 在物理、化学和光学等性质上可能存在区别[32]. 通过 XPS 方法测量 GO 与 rGO 的表面化学成分和结合状态, 可以分析经过管式炉烘烤后 GO 的还原情况[33]. 单层 GO 片径大多在微米级别[11], 小于 XPS 的探测范围, 直接对盖玻片上的 rGO 进行测量时玻璃成分的盖玻片会对实验结果产生干扰, 因此将 GO 分散液制备成 GO 薄膜, 用 2 块盖玻片将 GO 薄膜夹在中间, 与修饰了 GO 的玻片同时烘烤, 并对热还原后的 rGO 薄膜进行 XPS 分析.

如图 2(a) 所示, GO 的 C1S 谱图展示出了 3 个峰, 分别对应 C—C (sp^2 杂化碳)、C—O(羟基和环氧化物)、C=O(羰基)[27]. 经过 300 ℃ 和 400 ℃ 烘烤 2 h 进行还原的 rGO 其 C—O 与 C=O 的峰明显变低 (图 2(b), (c)), 表明大部分含氧基团已被去除. XPS 全谱的结果也表明经过烘烤后 GO 得到了很好的还原, 如图 2 右侧一列所示, 未还原的 GO, 300 ℃ 温度下烘烤 2 h 还原的 rGO (300 ℃-2h-rGO), 以及 400 ℃ 温度下烘烤 2 h 还原的 rGO (400℃-2 h-rGO), C/O 比值分别是 1.14, 2.48 和 3.29. 这一结果和以往的研究一致, 热还原 rGO 的还原程度主要取决于还原温度和还原时间[34,35]. 还原温度和还原时间的调节是连续的, 通过设定不同还原参数可以对 rGO 的还原程度进行连续调控.

3.2 热还原 rGO 特征淬灭距离 d_0 的测定

在应用以 rGO 作为介质受体的 SIFA 技术研究生物大分子在细胞膜表面的法向运动之前还面临 2 个问题: 一是验证 rGO 是否能够用于生物大分子的研究; 二是测定 rGO 的 d_0. 双链 DNA 在溶液中的结构稳定, 荧光标记的 DNA 不仅可以作为单分子荧光成像技术的标准样品来验证方法的可行性, 还可以用于研究与 DNA 相互作用的蛋白质. 将同时标记了 Cy3 和 biotin 的双链 DNA 通过 biotin-BSA 以及 SA 连接在 rGO 表面, 如图 3(a) 所示. 通过测量 Cy3 的光强, 与玻璃表面测得的光强进行对比, 即可利用 (1) 式计算出 rGO 的 d_0. 图 3(b) 左列是在 DNA 未链接到表面上之前对样品腔室

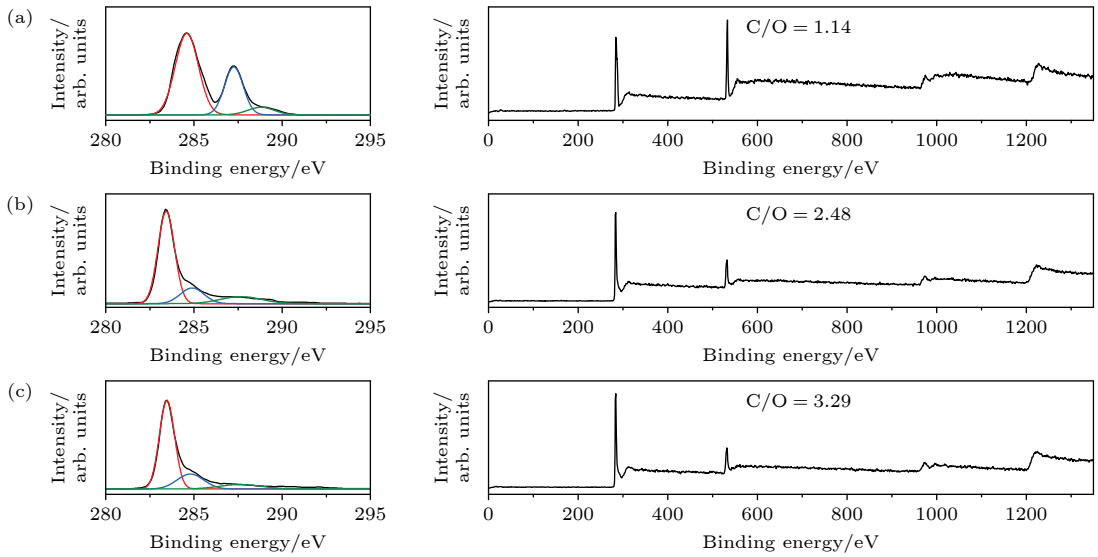

图 2 初始 GO 以及 rGO 薄膜的 XPS 谱 (a) 初始 GO 薄膜 C 1s 的 XPS 谱 (左) 以及 XPS 全谱 (右); (b) 300 ℃-2 h-rGO 薄膜 C 1s 的 XPS 谱 (左) 以及 XPS 全谱 (右); (c) 400 ℃-2 h-rGO 薄膜 C 1s 的 XPS 谱 (左) 以及 XPS 全谱

Fig. 2. XPS spectra of original GO and rGO thin films: (a) C 1s XPS spectra (left) and XPS survey spectra (right) for original GO thin films; (b) C 1s XPS spectra (left) and XPS survey spectra (right) for 300 ℃-2 h-rGO thin films; (c) C 1s XPS spectra (left) and XPS survey spectra (right) for the 400 ℃-2 h-rGO thin films.

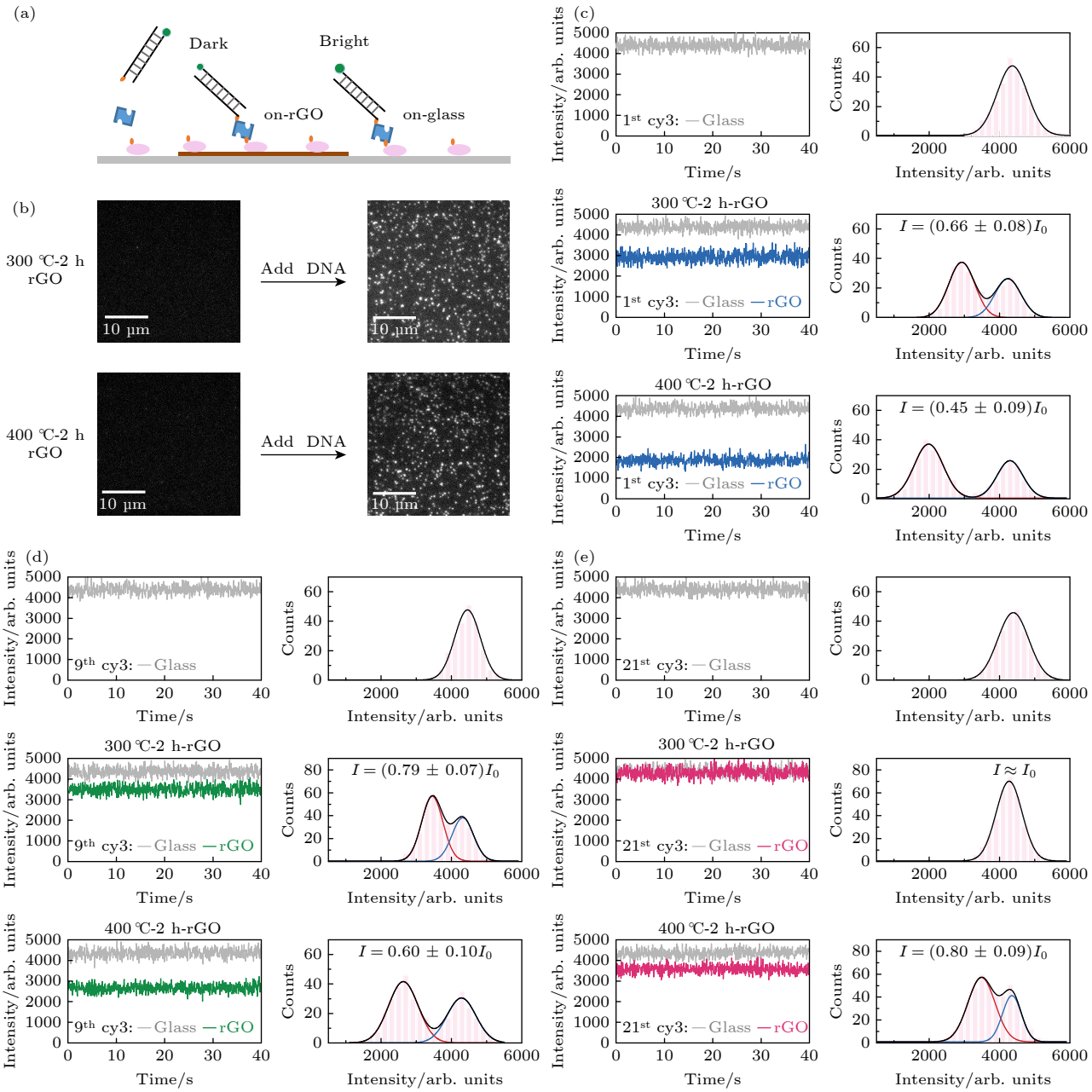

图 3 荧光标记 DNA 测量 rGO 的 d_0 (a) DNA 成像实验示意图; (b) 在 300 ℃-2 h-rGO (上) 以及 400 ℃-2 h-rGO (下) 样品腔内观察 DNA; Cy3 标记在 1 bp (c), 9 bp (d) 和 21 bp (e) 处的 DNA 在玻璃以及 rGO 上成像时的单分子光强

Fig. 3. Determination of d_0 of rGO by fluorescence labeled DNA: (a) Schematic representation of DNA imaging; (b) DNA imaging on 300 ℃-2 h-rGO (upper) and 400 ℃-2 h-rGO (lower); intensities of Cy3 labeled at 1 bp (c), 9 bp (d) and 21 bp (e) of DNA on glass and rGO.

进行成像, 右列是 DNA 连接后的成像图. 经过热还原后的 rGO 已不自发荧光, 通过图像已无法区分荧光点处于 rGO 区域还是玻璃区域, 因此需要分析和统计所有单个 Cy3 分子的光强. 图 3(c)—(e) 的首行分别展示了 Cy3 标记在双链 DNA 第 1 bp、第 9 bp、第 21 bp 位点时单个 Cy3 分子的光强曲线, 以及光强的统计图. 结果表明: Cy3 标记在双链 DNA 上时的光强稳定, 并且荧光强度和标记位点无关. Cy3 的光强呈高斯分布, 峰值即为 I_0. 图 3(c) 第 2 行和第 3 行分别是在 300 ℃-2 h-rGO 和 400 ℃-2 h-rGO 样品腔内对 Cy3 标记在第 1 bp 的 DNA 进行成像所得到的单个 Cy3 的荧光强度曲线以及强度分布. 在 rGO 样品腔内观察到 Cy3 具有 2 个稳定的光强, 较高的光强和玻璃上成像的强度相同, 表明此时 DNA 连接在了玻璃上. 较低的光强是因为 DNA 连接在了 rGO 上, rGO 对 Cy3

有衰逝作用, 从而导致 Cy3 光强降低. Cy3 光强较低的曲线光强稳定、不波动, 表明 Cy3 距离 rGO 的高度保持恒定.

300 ℃-2 h-rGO 和400 ℃-2 h-rGO 样品腔内Cy3的低光强存在差异, 分别是 $0.66I_0$ 和 $0.45I_0$, 表明 400 ℃-2 h-rGO 对荧光的衰逝作用比 300 ℃-2 h-rGO 要强. 在 rGO 样品腔对 Cy3 标记在第 9 bp 的 DNA 进行成像并分析单个 Cy3 分子的光强, 如图 3(d) 所示, 当 Cy3 标记在第 9 bp 时光强比标记在第 1 bp 时要强, 这是由于 Cy3 距离 rGO 表面的距离比标记在 1 bp 时要远. 在 300 ℃-2 h-rGO 样品腔内对 Cy3 标记在第 21 bp 的 DNA 进行成像, 此时单个 Cy3 分子只有一个光强, 且和玻璃样品腔内测得的光强接近, 表明此时 rGO 对 Cy3 的荧光衰逝效果已经不显著了. 统计结果表明 Cy3 的光强只有一个峰, 但峰宽较玻璃上测得的 I_0 分布要宽. Cy3 标记在第 21 bp 的 DNA 在 400 ℃-2 h-rGO 样品腔内依旧能够展示出 2 个光强分布, 表明 400℃-2 h-rGO 具有更强的荧光衰逝效果.

双链 DNA 在溶液中的驻留长度为 50 nm[36], 相邻碱基对的距离是 0.34 nm[37], 因此实验所用的 21 bp 双链 DNA 可以近似看作是长 7.1 nm 的杆状刚体. 在计算 Cy3 与 rGO 表面的高度时只需要考虑双链 DNA 与 rGO 表面法向的夹角. 有研究表明溶液中固定在表面的短双链 DNA 和表面法向的夹角是恒定的, 并且夹角约为 60° [38,39], 再结合以往研究表明 BSA 的尺寸大约是 3 nm[40], SA 的尺寸大约是 4.2 nm[41], Cy3 标记在第 1 bp、第 9 bp以及第 21 bp 时和 rGO 表面的法向距离便可以计算出来. 表 1 总结了不同荧光标记的 DNA 在玻璃以及 rGO 上进行成像, 利用光强与距离信息计算出的 d_0. 在相同的 rGO 样品腔内对不同荧光标记的 DNA 进行成像并计算 d_0, 所得到的结果接近, 更加证实了 rGO-SIFA 方法的可行性. 在相同还原条件的 rGO 上对不同荧光标记位置的 DNA 进行成像并计算 d_0 属于独立实验, 可将独立实验的结果联合起来得到更为准确的结果, 通过加权平均计算后可以得到300 ℃-2 h-rGO 的 $d_0 = (6.3 \pm 0.5)$ nm, 400 ℃-2 h-rGO 的 $d_0 = (7.9 \pm 0.5)$ nm. 将计算得到的 300℃-2 h-rGO 的 d_0 以及 Cy3 标记在第 21 bp时的高度代入 (1) 式可以计算出 Cy3 的理论光强, 大约为 $0.9I_0$. 由于单分子的差异以及仪器测量存在误差, Cy3 的光强呈高斯分布, 具有一定的峰宽, 即便光强分布具有 $0.9I_0$ 和 I_0 两个峰也无法区分, 和实验测量的结果一致. 300 ℃-2 h-rGO 和 400 ℃-2 h-rGO 的 d_0 存在差异, 可以预计的结果是通过降低还原温度 d_0 能从 6.3 nm 逐渐向 4 nm 过渡. 本文采用最高还原温度为 400 ℃, 距离实验所用盖玻片的 600 ℃ 耐高温上限还有升温空间. 另一方面也可以将玻璃盖玻片更换为石英盖玻片, 从而实现更高温度的热还原, 以进一步提高 d_0.

3.3 rGO-SIFA 测量 DNA Holliday junction 构象变化

将不同 d_0 的受体介质用于单分子 SIFA 技术时能够探测距离细胞膜表面不同高度的生物大分子动力学过程. 利用荧光标记的双链 DNA 来测量 rGO 的 d_0 时在 rGO 上连接的 DNA 只有一个光强, 即目标生物大分子只有一个状态. 为了更好地验证 rGO-SIFA 方法的可行性, 应选择一个荧光标记位点距离 rGO 高度发生变化的生物大分子来进行研究, 这个生物大分子在溶液中的结构稳定, 并且被研究得比较充分. Holliday junction 是 DNA 复制以及同源重组的重要中间体, 是由 4 条 DNA 链组成的四链结构[42]. 在溶液中没有 2 价金属离子存在时, Holliday junction 呈现出静止的十字形结构, 当溶液中有 2 价金属离子存在时, Holliday junction 将堆叠成 X 型结构[43]. Holliday junction 堆叠成的 X 型结构存在 2 种不同的构象, 并且这 2 种构象在不断地互相转换, 转换速率受到 2 价金属离子浓度的调控[44,45]. Holliday junction 的构象变换是发生同源重组的必要条件, 其中心区域的核苷酸序列会影响 2 种构象的转换速率以及构象持

表 1 荧光标记 DNA 测量 rGO 的 d_0

Table 1. Determination of d_0 of rGO by fluorescence labeled DNA.

样品	1 bp (7.5 nm)	9 bp (8.9 nm)	21 bp (10.9 nm)
300 ℃-2h-rGO	$I = (0.66 \pm 0.08)I_0$ $d_0 = (6.4 \pm 0.7)$ nm	$I = (0.79 \pm 0.07)I_0$ $d_0 = (6.2 \pm 0.6)$ nm	$I \approx I_0$
400 ℃-2h-rGO	$I = (0.45 \pm 0.09)I_0$ $d_0 = (7.9 \pm 0.7)$ nm	$I = (0.60 \pm 0.10)I_0$ $d_0 = (8.1 \pm 0.8)$ nm	$I = (0.80 \pm 0.09)I_0$ $d_0 = (7.8 \pm 0.9)$ nm

续时间[45,46]. 由于 Holliday junction 的结构简单、易于制备, 且在溶液中能够稳定观察到 2 种构象的互相转换, 荧光标记的 Holliday junction 常用于高级单分子荧光成像技术的验证[47,48]. 构建如图 3 所示的 Holliday junction, 表 2 展示了构成 Holliday junction 的 4 条短链 DNA 的核苷酸序列, 以及 Cy3 的标记位置, 该序列的 Holliday junction 可被连接到盖玻片表面, 并在 2 价金属离子存在时存在稳定的构象变换[46,48].

表 2 DNA Holliday junction 的核苷酸序列

Table 2. Nucleotide sequence of DNA Holliday junction.

名称	核苷酸序列
X	CCC AGT TGA GAG CTT GAT AGG G
B	CCC TAT CAA GCC GCT GTT ACG G
R	CCC ACC GCT CTT CTC AAC TGG G
H	biotin-CCG TAA CAG CGA GAG CGG TGG G(Cy3)

Cy3 标记在 H 链的 3'末端, Holliday junction 通过 H 链 5'末端标记的 biotin 固定在表面. 在 50 mmol/L Mg^{2+}, 50 mmol/L Na^{+}条件下 Holliday junction 不断地发生构象变化, 处于 state 1 时 Cy3 距离 rGO/GO 或玻璃表面距离近 (约 7.5 nm), 处于 state 2 的时候距离表面距离远.

图 4(a) 是玻璃样品腔内对 Holliday junction 进行观察的结果, 左列展示了单个 Cy3 分子的光强, 光强稳定未发生任何波动, 统计结果表明 Cy3 的光强为高斯分布, 中心值即为 I_0. 图 4(b) 是在 GO 样品腔内对 Holliday junction 进行观察, 未观测到 Cy3 的光强发生变化. Cy3 距离表面最近的距离约为 7.5 nm, GO 的 $d_0 = 4$ nm, 通过 (1) 式可以计算出 Cy3 距离 GO 较近时的理论光强为 $0.94I_0$. 距离 7.5 nm 已经超出了 GO 的灵敏范围, 此时随着距离的增大光强从 $0.94I_0$ 逐渐靠近 I_0, 这一微小的光强变化已经低于仪器探测的灵敏度. 对 GO 上 Cy3 的光强进行统计, 结果为高斯分布, 但半高宽较玻璃上要大. 这一现象的原因有 2 个: 一是理论计算表明 GO 上 Cy3 有 2 个光强, 并且这 2 个光强大小都和 I_0 很接近, 实验上很难区分出这 2 个光强; 二是 GO 本身会自发微弱的荧光, 在 GO 上对单分子进行成像所得到的信噪比要比玻璃上差, 因此光强分布的峰宽会比玻璃上要大. 图 4(c) 是在 400 ℃-2 h-rGO 样品槽内对 Holliday

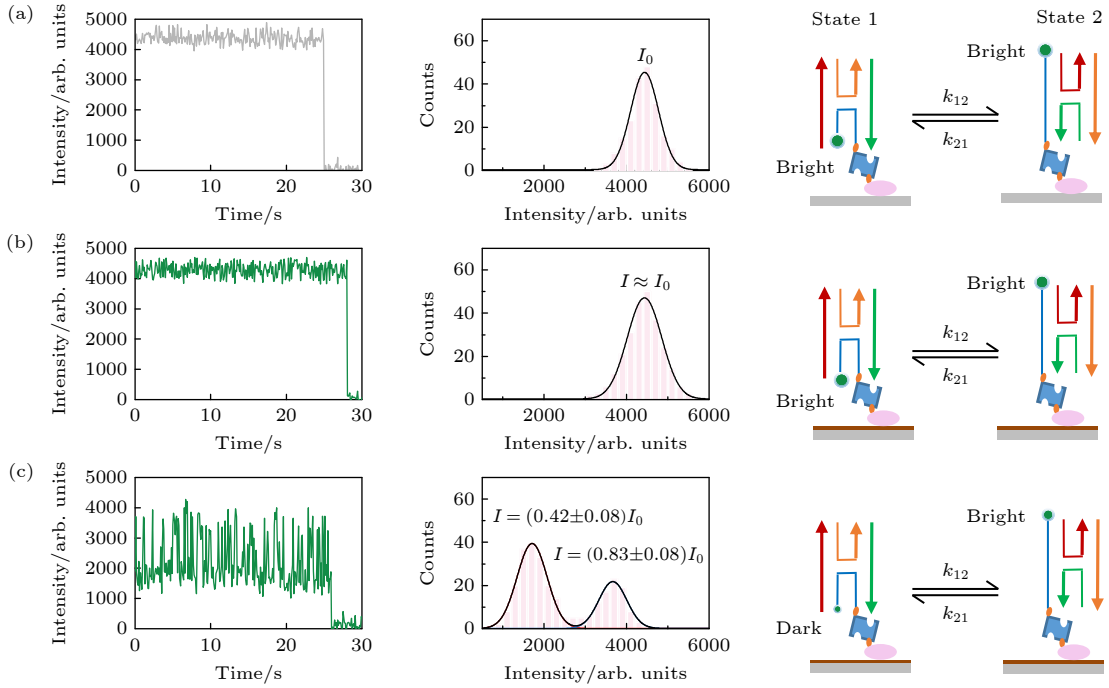

图 4 SIFA 观察 Holliday junction 的构象变换, 在玻璃 (a), GO (b) 和 400 ℃-2 h-rGO (c) 上观察 Cy3 标记的 Holliday junction, 左列为单个 Cy3 的光强时间曲线, 中间为 Cy3 的光强统计图, 右列为 Holliday junction 构象变换导致 Cy3 光强变化的示意图

Fig. 4. Observing conformational transformation of Holliday junction by SIFA, observing the Cy3 labeled Holliday junction on glass (a), GO (b) and 400 ℃-2 h-rGO (c), left columns show intensity-time curves of a single Cy3, middle columns show distribution of intensities of Cy3, right columns show schematic representation of the change of Cy3 light intensity caused by the conformational transformation of Holiday junction.

junction 进行观察, Cy3 的光强不断在高和低 2 个值之间跳变. 在 400 ℃-2 h-rGO 上观察 Cy3 标记的双链 DNA 时 Cy3 的光强稳定、不波动, 表明 400 ℃-2 h-rGO 只对 Cy3 的光强有衰逝作用, 但并不影响 Cy3 光强的稳定性. 因此, 观察到 Holliday junction 所标记的 Cy3 光强发生变化是由于 Cy3 距离 400℃-2h-rGO 的高度发生了变化. 对 Cy3 的光强进行时间加权统计, 结果表明 Cy3 的光强呈现 2 个峰的分布, 峰值分别是 $0.42I_0$ 和 $0.83I_0$. 利用 (1) 式, 代入 400 ℃-2 h-rGO 的 $d_0 = (7.9\pm0.5)$ nm 可以计算出 Cy3 与 rGO 表面的法向距离分别是 7.3 nm 以及 11.7 nm, 与 Cy3 的理论距离 7.5 nm 以及 11.1 nm 比较接近. 根据图 4(c) 中 Cy3 的光强分布图可以计算出高光强和低光强的峰高比为 1:2, 表明 Holliday junction 的 state 1 构象持续时间是 state 2 的 2 倍, 和以往采用相同 DNA 序列的 Holliday junction 研究结果一致[46]. 基于以上两点, 证实了用 400 ℃-2 h-rGO 观察到了 Holliday junction 的构象变换, 并且这一构象变换无法被 GO 观察到. 造成这一结果差异的原因是 400 ℃-2 h-rGO 具有比 GO 更大的 d_0, 能够观测更远的范围. 热还原的 rGO 可以通过控制还原温度来调控 d_0, 在进行具体研究时应根据目标大分子的尺度和荧光标记位点来灵活设还原温度, 以选择适合观测的 d_0.

4 结 论

本文进一步拓展了课题组研究的 SIFA 技术, 将修饰了 GO 的盖玻片置于真空管式炉内烘烤, 通过控制温度获取不同还原程度的 rGO, 从而调控特征淬灭距离, 使得该方法广泛用于具有二维体系的单分子研究. 本文采用荧光标记的 DNA 测量出了 300 ℃-2 h-rGO 的 $d_0 = (6.3\pm0.5)$ nm, 400 ℃-2 h-rGO的 $d_0 = (7.9\pm0.5)$ nm. 可预计的结果是在室温和 400 ℃ 之间改变还原温度能够实现 d_0 从 4 nm 到 7.9 nm 的连续调节. 本文分别在 400 ℃-2 h-rGO 和 GO 上对 Cy3 标记的 Holliday junction 进行观察, GO 不能探测到 Cy3 光强发生变化, 而 400 ℃-2 h-rGO 上可以看到 Cy3 的光强不断地在高低之间跳变, 并通过光强计算出了 Cy3 和 rGO 表面的距离, 计算结果和理论距离接近, 表明基于 rGO 的 SIFA 不仅提升了 SIFA 的适用范围, 更具有较高的测量精度以及空间分辨率. 此外, 由于 rGO 本身不发荧光, 在进行单分子荧光成像时并不会影响图像的信噪比, 将 SIFA 技术和 FRET 技术联用起来可以实时地观察生物大分子的三维运动与构象变换信息. 期待未来在膜蛋白功能和结构的研究中, rGO-SIFA 技术能得到更广泛的应用.

参考文献

[1] Lerner E, Barth A, Hendrix J, et al. 2021 *Elife* **10** e60416
[2] Keller A M, DeVore M S, Stich D G, Vu D M, Causgrove T, Werner J H 2018 *Anal. Chem.* **90** 6109
[3] Ishikawa-Ankerhold H C, Ankerhold R, Drummen G P 2012 *Molecules* **17** 4047
[4] Jia Q, Fan Q K, Hou W Q, Yang C G, Wang L B, Wang H, Xu C H, Li M, Lu Y 2021 *Acta Phys. Sin.* **70** 158701 (in Chinese) [贾棋, 樊秦凯, 侯文清, 杨晨光, 王利邦, 王浩, 徐春华, 李明, 陆颖 2021 物理学报 **70** 158701]
[5] Almen M S, Nordstrom K J V, Fredriksson R, Schioth H B 2009 *Bmc. Biology.* **7** 50
[6] White S H, Wimley W C 1999 *Annu. Rev. Bioph. Biom.* **28** 319
[7] Ma D F, Hou W Q, Xu C H, Zhao C Y, Ma J B, Huang X Y, Jia Q, Ma L, Liu C, Li M, Lu Y 2020 *Acta Phys. Sin.* **69** 038701 (in Chinese) [马东飞, 侯文清, 徐春华, 赵春雨, 马建兵, 黄星榱, 贾棋, 马璐, 刘聪, 李明, 陆颖 2020 物理学报 **69** 038701]
[8] Ponmalar, II, Cheerla R, Ayappa K G, Basu J K 2019 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116** 12839
[9] King C, Raicu V, Hristova K 2017 *J. Biol. Chem.* **292** 5291
[10] King C, Sarabipour S, Byrne P, Leahy D J, Hristova K 2014 *Biophys. J.* **106** 1309
[11] Li Y, Qian Z, Ma L, Hu S, Nong D, Xu C, Ye F, Lu Y, Wei G, Li M 2016 *Nat. Commun.* **7** 12906
[12] Ma L, Li Y, Ma J B, Hu S X, Li M 2018 *Biochemistry* **57** 4735
[13] Jiang X, Yang C G, Qiu J, Ma D F, Xu C, Hu S X, Han W J, Yuan B, Lu Y 2022 *Nanoscale* **14** 17654
[14] Ma L, Hu S X, He X L, Yang N, Chen L C, Yang C G, Ye F F, Wei T T, Li M 2019 *Nano. Lett.* **19** 6937
[15] Kaminska I, Bohlen J, Yaadav R, Schuler P, Raab M, Schroder T, Zahringer J, Zielonka K, Krause S, Tinnefeld P 2021 *Adv. Mater.* **33** e2101099
[16] Kaminska I, Bohlen J, Rocchetti S, Selbach F, Acuna G P, Tinnefeld P 2019 *Nano. Lett.* **19** 4257
[17] Federspiel F, Froehlicher G, Nasilowski M, Pedetti S, Mahmood A, Doudin B, Park S, Lee J O, Halley D, Dubertret B, Gilliot P, Berciaud S 2015 *Nano. Lett.* **15** 1252
[18] Gaudreau L, Tielrooij K J, Prawiroatmodjo G E D K, Osmond J, de Abajo F J G, Koppens F H L 2013 *Nano. Lett.* **13** 2030
[19] Li W, Wojcik M, Xu K 2019 *Nano. Lett.* **19** 983
[20] Eda G, Fanchini G, Chhowalla M 2008 *Nat. Nanotechnol.* **3** 270
[21] Pei S F, Cheng H M 2012 *Carbon* **50** 3210
[22] Stankovich S, Dikin D A, Piner R D, Kohlhaas K A, Kleinhammes A, Jia Y, Wu Y, Nguyen S T, Ruoff R S 2007 *Carbon* **45** 1558
[23] Sulowska K, Wiwatowski K, Szustakiewicz P, Grzelak J, Lewandowski W, Mackowski S 2018 *Materials (Basel)* **11** 1567

[24] Kim J, Cote L J, Kim F, Huang J X 2010 *J. Am. Chem. Soc.* **132** 260
[25] Kovtyukhova N I, Ollivier P J, Martin B R, Mallouk T E, Chizhik S A, Buzaneva E V, Gorchinskiy A D 1999 *Chem. Mater.* **11** 771
[26] Hummers W S, Offeman R E 1958 *J. Am. Chem. Soc.* **80** 1339
[27] Chen X, Meng D, Wang B, Li B W, Li W, Bielawski C W, Ruoff R S 2016 *Carbon* **101** 71
[28] Lazauskas A, Baltrusaitis J, Grigaliūnas V, Guobienė A, Prosyčevas I, Narmontas P, Abakevičienė B, Tamulevičius S 2014 *Superlattices Microstruct.* **75** 461
[29] Li J, Ma J, Kumar V, Fu H, Xu C, Wang S, Jia Q, Fan Q, Xi X, Li M, Liu H, Lu Y 2022 *Nucleic. Acids. Res.* **50** 7002
[30] Ma J B, Chen Z, Xu C H, Huang X Y, Jia Q, Zou Z Y, Mi C Y, Ma D F, Lu Y, Zhang H D, Li M 2020 *Nucleic. Acids. Res.* **48** 3156
[31] Chen Z, Ma J B, Huang X Y, Jia Q, Xu C H, Zhang H D, Lu Y 2018 *Acta Phys. Sin.* **67** 118201 (in Chinese) [陈 泽, 马建兵, 黄星榱, 贾棋, 徐春华, 张慧东, 陆颖 2018 物理学报 **67** 118201]
[32] Wei A, Wang J X, Long Q, Liu X M, Li X G, Dong X C, Huang W 2011 *Mater. Res. Bull.* **46** 2131
[33] Luo D, Zhang G, Liu J, Sun X 2011 *J. Phys. Chem. C.* **115** 11327
[34] Xu S T, Liu J K, Xue Y, Wu T Y, Zhang Z F 2017 *Fuller. Nanotub. Car. N.* **25** 40
[35] Zhen X J, Huang Y F, Yang S S, Feng Z Z, Wang Y, Li C H, Miao Y J, Yin H 2020 *Mater. Lett.* **260** 126880
[36] Dessinges M N, Maier B, Zhang Y, Peliti M, Bensimon D, Croquette V 2002 *Phys. Rev. Lett.* **89** 248102
[37] Baumann C G, Smith S B, Bloomfield V A, Bustamante C 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** 6185
[38] Son S, Takatori S C, Belardi B, Podolski M, Bakalar M H, Fletcher D A 2020 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117** 14209
[39] Demirel G B, Caykara T 2009 *Appl. Surf. Sci.* **255** 6571
[40] Lu J R, Su T J, Thomas R K 1999 *J. Colloid. Interf. Sci.* **213** 426
[41] P. C. Weber J J W, f M. W. Pantoliano, and F. R. Salemme 1992 *J. Am. Chem. Soc.* **114** 3197
[42] Liu Y L, West S C 2004 *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **5** 937
[43] Clegg R M, Murchie A I, Lilley D M 1994 *Biophysical. J.* **66** 99
[44] McKinney S A, Tan E, Wilson T J, Nahas M K, Declais A C, Clegg R M, Lilley D M J, Ha T 2004 *Biochem. Soc. T* **32** 41
[45] McKinney S A, Declais A C, Lilley D M J, Ha T 2003 *Nat. Struct. Biol.* **10** 93
[46] Hohng S, Joo C, Ha T 2004 *Biophys. J.* **87** 1328
[47] Lee J, Lee S, Ragunathan K, Joo C, Ha T, Hohng S 2010 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49** 9922
[48] Uphoff S, Holden S J, Le Reste L, Periz J, van de Linde S, Heilemann M, Kapanidis A N 2010 *Nat. Methods.* **7** 831

Single-molecular surface-induced fluorescence attenuation based on thermal reduced graphene oxide*

Fan Qin-Kai [1)2)] Yang Chen-Guang [1)2)] Hu Shu-Xin [1)] Xu Chun-Hua [1)]
Li Ming [1)2)] Lu Ying [1)2)†]

1) (*Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100190, *China*)

2) (*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

(Received 26 March 2023; revised manuscript received 19 April 2023)

Abstract

Single-molecular surface-induced fluorescence attenuation (smSIFA) is a precise method of studying the vertical movement of biological macromolecules based on two-dimensional material receptors. This method is not affected by two-dimensional planar motion of membrane or proteins. However, the detection range and accuracy of vertical movement are determined by the properties of two-dimensional materials as receptors. In recent years, surface induced fluorescence attenuation based on graphene oxide and graphene has played an important role in studying biomacromolecules. However, the detection range of graphene and graphene oxide are limited owing to the fixed and limited characteristic quenching distance. Adjusting the detection range requires replacing the medium material, which poses difficulties in selecting and preparing materials. Therefore, it is urgently needed to develop controllable materials for single-molecular SIFA. In this study, the single-molecule SIFA with graphene oxide as the medium acceptor is improved by reducing graphene oxide through thermal reduction. By controlling the reduction temperature, reduced graphene oxides to different reduction degrees are prepared and the characteristic quenching distances are adjusted. The characteristic quenching distance is measured by fluorescent labeled DNA. Single-molecule SIFA based on reduced graphene oxide is used to observe the conformational changes of Holliday junction, and the detection range of reduced graphene oxide is demonstrated.

Keywords: reduced graphene oxide, surface-induced fluorescence attenuation, characteristic quenching distance, fluorescence resonance energy transfer

PACS: 78.67.Wj, 82.80.Pv, 87.14.gk, 87.15.H– **DOI:** 10.7498/aps.72.20230450

* Project supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2019YFA0709304), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. T2221001, 12090051, 11974411, 91753104, U1930402, 12090050, 12022409, 32000871), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant Nos. XDB37000000, XDB0480000), the Key Research Program of Frontier Sciences, Chinese Academy of Sciences (Grant No. ZDBS-LY-SLH015), and the Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (Grant No. Y2021003).

† Corresponding author. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn

物理学报 Acta Physica Sinica
Chinese Physical Society
Institute of Physics, CAS

基于热还原氧化石墨烯的单分子表面诱导荧光衰逝技术

樊秦凯 杨晨光 胡书新 徐春华 李明 陆颖

Single-molecular surface-induced fluorescence attenuation based on thermal reduced graphene oxide

Fan Qin-Kai Yang Chen-Guang Hu Shu-Xin Xu Chun-Hua Li Ming Lu Ying

引用信息 Citation: Acta Physica Sinica, 72, 147801 (2023) DOI: 10.7498/aps.72.20230450
在线阅读 View online: https://doi.org/10.7498/aps.72.20230450
当期内容 View table of contents: http://wulixb.iphy.ac.cn