

# 饱和激发情况下的荧光关联谱测量\*

丁建英<sup>1)</sup> 陈波<sup>1)</sup> 孟凡波<sup>1)</sup> 马辉<sup>1)†</sup>

<sup>1)</sup> 清华大学物理系, 原子分子纳米科学教育部重点实验室, 北京 100084)

<sup>2)</sup> 清华大学深圳研究生院, 深圳 518057)

(2003 年 8 月 20 日收到, 2003 年 10 月 13 日收到修改稿)

研究了激发光增强时其对荧光关联谱(FCS)测量的影响. 强激发光产生的饱和激发会改变激光诱导荧光的空间分布函数, 从而影响 FCS 的测量结果. 首先根据饱和吸收的物理模型, 推导出强激发光情况下有效探测区域变化的定量公式, 获得了 FCS 测量所得到的粒子数和扩散时间与饱和激发光强和激光光强的函数关系, 并用于消除饱和和吸收造成的系统误差. 采用 Monte-Carlo 模拟方法和实验, 对理论分析结果进行了验证. 这将有助于完善 FCS 分析方法的理论模型, 为高激发光强度下的 FCS 探测提供依据.

关键词: 荧光关联谱, 饱和激发, Monte-Carlo 模拟

PACC: 3250, 6740D, 7115Q

## 1. 引 言

荧光关联谱(FCS)技术是一项近几年发展很快的实验方法. 它通过分析微小探测区域内少量发光粒子由于布朗运动产生的荧光涨落信号, 得到有关粒子的微观浓度和扩散系数<sup>[1,2]</sup>, 进而获得粒子的结构、所处的微观环境以及微观相互作用等信息<sup>[3-5]</sup>. 由于测量具有很高的灵敏度、测量时不破坏研究体系的平衡状态以及可以进行实时监测等优点, FCS 技术在生物学领域研究中, 特别是对活体中动态过程的测量显示出广阔的应用前景<sup>[6-8]</sup>.

现有 FCS 理论中, 激光诱导荧光强度与激发光强度成线性关系(单光子激发)或平方关系(双光子激发)<sup>[8,9]</sup>, 因此, 从激发光空间分布函数可以直接计算出荧光空间分布函数. 但实际上, 只有在激发光强度较低、激发没有达到饱和时, 激发光与荧光才存在这样简单的关系. 特别是在单光子激发 FCS 实验中, 激发光功率一般要控制在微瓦量级. 另一方面, 当待测分子荧光亮度比较低时, 为了提高荧光强度和信噪比, 往往希望提高激发光强度. 此时, 激光诱导荧光容易出现饱和, 从而影响测量结果. 因此有必要对原 FCS 理论进行修正.

从理论上推导激发光增强情况下荧光出现饱和

时的 FCS 的自关联函数需要求解含有饱和项的复杂积分方程, 该积分方程目前还没有解析解. 本文中我们根据物理过程, 定性分析了实际体系中所测得的探测区内粒子数  $N_0$  和扩散时间  $\tau_D$  在激发光强度增加时的变化特征, 并采用 Monte-Carlo 模拟方法和实验验证该理论结果.

## 2. 理 论

### 2.1. 荧光激发理论

分子受到激光激发时, 所发出的荧光强度有如下关系<sup>[10]</sup>:

$$F = K \cdot dI, \quad (1)$$

式中,  $K$  是取决于荧光量子效率的系数,  $dI$  是被吸收的光强度. 由比尔-朗波特定律可以将(1)式表示为

$$F = KI(1 - \exp[-2.3\epsilon bC]), \quad (2)$$

式中,  $I$  是入射光强度,  $\epsilon$  为摩尔吸收系数,  $b$  为样品厚度,  $C$  是荧光物质浓度. 当溶液浓度很低时(2)式可以简化成

$$F = 2.3K\epsilon bCI. \quad (3)$$

在用低强度光源照射时, 吸收系数  $\epsilon$  与入射光功率无关, 此时荧光强度与入射光强度的关系如(3)式所

\* 国家自然科学基金(批准号: 19928408, 60138010, 10274039)资助的课题.

† 通讯联系人. E-mail: mahui@tsinghua.edu.cn

示,成正比例关系.但是,当入射光强度增加,吸收系数成为入射光强度的函数,即所谓非线性吸收.当光源的发光强度增加到某一限度,共振荧光的低能级和高能级上的粒子数接近,出现饱和现象.这时吸收系数与入射光强度的关系为<sup>[11,12]</sup>

$$\epsilon = \epsilon_0 \frac{I_s}{I + I_s}. \quad (4)$$

将(4)式代入(3)式,可得到荧光强度与入射光强度的关系,

$$\begin{aligned} F &= 2.3Kb\epsilon_0 CI \frac{I_s}{I + I_s} \\ &= \phi \cdot CI \frac{I_s}{I + I_s}, \end{aligned} \quad (5)$$

式中 $\epsilon_0$ 即是在低激发光强度时的吸收系数,是个常量. $I_s$ 是使荧光出现饱和时的激发光强度,称作饱和光强.对不同发光物质或体系, $I_s$ 值不同. $\phi = 2.3Kb\epsilon_0$ 是与浓度和入射光强度无关的系数.从(5)式可以看出,当 $I \ll I_s$ 时(5)式还原为(3)式,此时 $\epsilon$ 即为 $\epsilon_0$ .

在实际实验体系中,激光器的输出光强分布一般可以用半轴长分别为 $w_0, z_0$ 三维高斯分布来描述,因此(5)式中的 $I$ 写成如下形式<sup>[11]</sup>:

$$\begin{aligned} K(r) &= I_0 \times W(r) \\ &= I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{z_0^2}\right). \end{aligned} \quad (6)$$

$$\alpha(\tau) = \frac{\iiint \frac{W(r)W(r')}{(I_s + I_0 W(r))(I_s + I_0 W(r'))} \alpha(r) \Psi(r, r', \tau) dV dV'}{\left(\int \frac{W(r)}{I_s + I_0 W(r)} \alpha(r) dV\right)^2}, \quad (9)$$

其中的 $C(r) = \langle C(r, t) \rangle$ 是浓度的稳态分布, $\Psi(r, r', \tau)$ 是体系中粒子扩散的格林函数.在一个实际选定的体系中,写出这个体系中浓度变化的微分方程, $\Psi(r, r', \tau)$ 就是该方程以点源为初始条件的解.对于溶液中自由扩散粒子,

$$\Psi(r, r', \tau) = (4\pi D\tau)^{-3/2} \exp\left[-\frac{(r' - r)^2}{4D\tau}\right]. \quad (10)$$

将(10)式代入(9)式求相应积分便可以得到任意入射光强度下的自关联函数的解析形式,但是该积分目前还没有解析解.

溶液中粒子浓度 $C$ 是位置的函数,即 $C(r, t)$ ,因此粒子在某一处发出的荧光光强可以表示为

$$F(r, t) = \phi C(r, t) K(r) \frac{I_s}{I + I_s}. \quad (7)$$

$F(r, t)$ 对探测区域全空间积分得到总荧光强度 $F(t)$ .

## 2.2. 强激发光下的荧光关联谱

处于宏观平衡态的溶液体系,微观上由于热力学效应等而处于动态平衡状态.在一个微小的荧光激发区域(一般小于 $1 \mu\text{m}^3$ )内,由于扩散运动,发光粒子数将围绕热力学平均值涨落,进而产生荧光光强的涨落.FCS方法是对这个荧光涨落信号作相关分析,获得自关联函数 $G(\tau)$ ,并进一步获得发光粒子的微观浓度和扩散系数等信息.此时,荧光强度涨落自相关函数 $G(\tau)$ 的宽度取决于粒子的扩散系数和激发区域的空间尺寸,而幅度取决于激发区域内荧光粒子的数目.

归一化的荧光涨落自相关函数定义为<sup>[11]</sup>

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle}, \quad (8)$$

式中 $\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$ ,表示荧光强度相对于平均值的涨落, $\langle F \rangle$ 为荧光强度平均值.

将(7)式代入(8)式展开并化简后得到

虽然理论上我们不能得出这个自关联函数,但是通过实验或 Monte-Carlo 模拟方法可以得到不同入射光强度下的荧光关联曲线,通过该曲线我们可以对比理论上的研究.图1是通过 Monte-Carlo 模拟获得的不同入射光强度下的 FCS 曲线对比,横坐标为对数坐标,取 1000 个时间单位,在 FCS 实验中可以得到类似的实验曲线.从图1可以看出, $G(\tau)$ 的值随着入射光强度的增大而减小.

当 $I \ll I_s$ 时,即在低激发光强度时, $F(r, t) = \phi C(r, t) I_0 W(r)$ , (9)式的积分化简为

$$\alpha(\tau) = \frac{\iint W(r)W(r')\alpha(r) \frac{1}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \exp\left[-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}\right] dVdV'}{\left(\int W(r)\alpha(r)dV\right)^2}. \quad (11)$$

从上式可以得到

$$\begin{aligned} \alpha(0) &= \frac{\int W^2(r)dV}{C_0 \cdot \left(\int W(r)dV\right)^2} \\ &= \frac{1}{C_0 \cdot \frac{\left(\int W(r)dV\right)^2}{\int W^2(r)dV}} \\ &= \frac{1}{C_0 \cdot \pi^{\frac{3}{2}} w_0^2 z_0} \\ &= \frac{1}{C_0 \cdot V_{\text{det}}} \\ &= \frac{1}{N_0}, \end{aligned} \quad (12)$$

式中  $V_{\text{det}}$  定义为激光焦点形成的探测区的体积,  $C_0$  是溶液的宏观浓度. 因此  $N_0$  表示探测区中的平均粒子数. 从(12)式中可以看出, 自关联函数零点值  $\alpha(0)$  的倒数等于探测区中的粒子数  $N_0$ , 由此可以计算出粒子浓度.

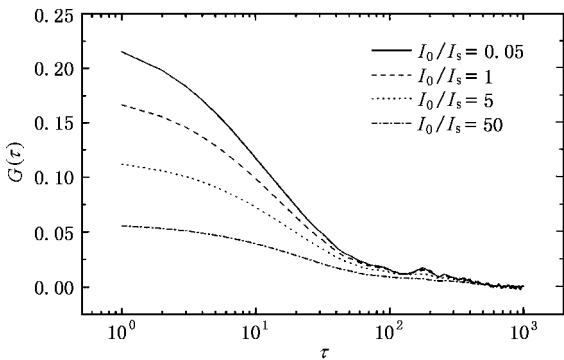


图1 考虑饱和激发效应之后, 利用 Monte-Carlo 模拟获得的不同入射光强度下的 FCS 曲线对比. 曲线从上到下  $I_0/I_s$  的值逐渐增大, 即入射光强度逐渐增强.  $\alpha(\tau)$  的值随着入射光强度的增大而减小.

上述自关联函数的解析形式为<sup>[13]</sup>

$$\alpha(\tau) = \frac{1}{N_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{k^2 \tau_D}\right)^{-1/2}, \quad (13)$$

其中,  $k = z_0/w_0$  是探测区的长度与宽度比;  $\tau_D =$

$w_0^2/4D$  定义为粒子穿越探测区的平均时间, 即扩散时间,  $D$  是粒子的扩散系数. 因此, 由参数  $N_0$  和  $\tau_D$  可以获得宏观体系相应的浓度和扩散等物理过程的信息.

从物理机制出发, 可以估算强激发光情况下探测区的变化. 根据半轴长定义,  $w_0, z_0$  分别为横向和纵向强度值下降到中心强度值  $1/e^2$  的点与中心点的距离. 因此, 从(7)式可以推导出对应任意入射光强度的探测区域半轴长表达式.

在(7)式中, 任意入射光强度时的荧光强度的最大值为  $\phi C / \left(\frac{1}{I_0} + \frac{1}{I_s}\right)$ , 强度下降到最大值的  $1/e^2$  有

$$\phi C \cdot \frac{I_s \cdot I_0 \exp\left[-\frac{2z^2}{z_0^2}\right]}{I_s + I_0 \exp\left[-\frac{2z^2}{z_0^2}\right]} = e^{-2} \cdot \phi C / \left(\frac{1}{I_0} + \frac{1}{I_s}\right). \quad (14)$$

解(14)式, 可求得  $z(I_0)$ , 即半轴长与入射光强度的关系式,

$$z = z_0 \cdot \sqrt{\frac{1}{2} \ln\left(\frac{I_0}{I_s} \cdot (e^2 - 1) + e^2\right)}. \quad (15)$$

同理可知,  $w$  具有同样的关系. 因此根据(12)式可定义等效体积  $V_{\text{equiv}}$ ,

$$\begin{aligned} V_{\text{equiv}} &= \pi^{3/2} w^2 z \\ &= \pi^{3/2} w_0^2 z_0 \cdot \left(\frac{1}{2} \ln\left(\frac{I_0}{I_s} \cdot (e^2 - 1) + e^2\right)\right)^{3/2} \\ &= V_{\text{det}} \cdot \left(\frac{1}{2} \ln\left(\frac{I_0}{I_s} \cdot (e^2 - 1) + e^2\right)\right)^{3/2}. \end{aligned} \quad (16)$$

它表示由于荧光强度空间分布变化而导致探测区体积的变化. 从而可定义等效粒子数  $N_{\text{equiv}}$ ,

$$\begin{aligned} N_{\text{equiv}} &= C_0 \cdot V_{\text{equiv}} \\ &= N_0 \cdot \left(\frac{1}{2} \ln\left(\frac{I_0}{I_s} \cdot (e^2 - 1) + e^2\right)\right)^{3/2}, \end{aligned} \quad (17)$$

式中  $N_0$  即是低激发光强度下探测区中的平均粒子数. 考虑这种情况下的扩散动力学过程, 同理可获得等效扩散时间  $\tau_{\text{D-equiv}}$ ,

$$\tau_{\text{D-equiv}} = \tau_D \cdot \frac{1}{2} \ln\left(\frac{I_0}{I_s} \cdot (e^2 - 1) + e^2\right), \quad (18)$$

式中  $\tau_D$  是低激发光强度所对应的粒子扩散时间.

对于上述理论分析结果,我们采用 Monte-Carlo 模拟方法和实验来进行对比验证.

### 3. 强激发光条件下 FCS 的 Monte-Carlo 模拟

首先可利用 Monte-Carlo 方法对存在饱和激发时的荧光关联谱进行模拟,所采用的模拟程序在文献 [14] 中已有详细介绍,并曾成功用于激光梯度场中荧光关联谱的模拟<sup>[15]</sup>,所得结论与激光梯度场中荧光关联谱的实验相符合<sup>[16]</sup>. 但原模拟程序中荧光与激发光强成正比,因此荧光光强的空间分布与激发光相同,一般取三维高斯形式. 本工作中荧光与激发光强的关系采用上述推出的饱和关系式(即(7)式),激发光空间分布仍然采用三维高斯形式,但激光诱导荧光空间分布与激发光强有复杂关系.

为了将理论计算与模拟结果进行对比,首先选取一组参数,运用 Monte-Carlo 模拟程序计算荧光涨落谱,进而计算出自关联函数曲线并对其进行拟合. 由于目前还没有从理论上推导出存在饱和激发时荧光关联谱的解析表达式,本工作中仍采用弱激发光下 FCS 理论表达式(即(13)式)进行拟合. 因此,拟合所得到的粒子数和扩散时间等参数实际上为等效值,包含了强激发光所造成饱和效应的影响. 图 2 (a)和(b)显示理论计算和对模拟结果进行拟合所得到的粒子数与扩散时间随入射光强度的关系. 图 2 的纵轴是相对值,即理论计算和模拟结果在不同的  $I_0/I_s$  下所得值与在  $I_0/I_s = 0.01$  得到的结果相比.

从图 2 可以看出,理论与模拟结果在  $0.01 < I_0/I_s < 1$  范围内基本一致,从模拟光谱得到的数据点与理论值的偏差在 10% 以内(在  $0.01 < I_0/I_s < 0.1$  范围内偏差在 3% 以内);当  $I_0/I_s > 1$  时,理论和模拟结果定性符合,从模拟光谱得到的数据点与理论值的偏差达 20%. 偏差增大的原因是:激发光强度小于饱和光强时,自关联曲线的形状与低激发光情况下的曲线形状(13 式)比较接近;当激发光强度大于饱和光强时,曲线形状变化较大,拟合误差增加. 由图 2 可以看出,理论计算所得到的等效粒子数和等效扩散时间随  $I_0/I_s$  的变化更快一些. 这可以解释为:在  $I_0/I_s$  较小时(17)和(18)式中的  $N_{\text{equiv}}$  与  $\tau_{D,\text{equiv}}$  近似等于低激发光强度(即  $I_0/I_s$  非常小)下的  $N_0$  与  $\tau_D$ ;而当  $I_0/I_s$  进一步增大时,FCS 的解

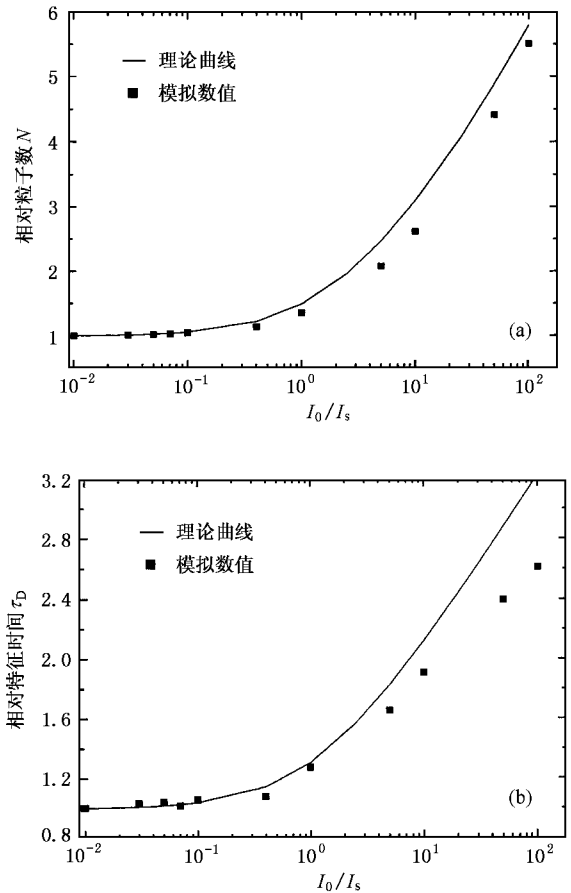


图 2 粒子数和扩散时间随入射光强度变化的理论曲线与模拟结果对比 (a)  $N-I_0/I_s$  关系 (b)  $\tau_D-I_0/I_s$  关系

析式是  $N_0$  与  $\tau_D$  的复杂函数,不再是(13)式所具有的简单形式,使用(13)式进行拟合会产生误差;另外,在强激发光情况下,激光诱导荧光强度分布是半轴长为  $z_0, w_0$  的复杂函数. 在理论推导过程中,我们假设探测区等效体积可以由(16)式得到,这也会带来一定误差. 从图 2(a)和(b)的对比中,我们还可以看到,粒子数的理论曲线与模拟结果的符合程度要比扩散时间的较好一些,原因是扩散时间与  $I_0/I_s$  的关系比粒子数与  $I_0/I_s$  的关系更加复杂.

## 4. 强激发光条件下 FCS 实验

### 4.1. 实验装置

FCS 实验装置基于一台 Nikon TE300 倒置显微镜,激发光源选用氩离子激光器(Ion Laser Technology 公司,5425 型)输出波长为 488/514 nm 的  $\text{Ar}^+$  激光(实验中对荧光小球使用 488 nm 激发),输出功率在

7 mW 左右. 激发光路中加入一个可调的光强衰减片, 用于调节激发光强度, 研究 FCS 参数与激发入射光强度的关系主要通过该装置实现. 激光的聚焦和荧光的收集选用数值孔径为 1.4 的 60 倍油镜, 以减小探测区体积并增大荧光的收集效率, 提高信噪比. 信号收集端的共焦光阑直径为 60  $\mu\text{m}$ . 荧光光子由雪崩二极管单光子计数模块(Perkin-Elmer 公司 SPCM-AQR-14FC 型)记录, 其暗计数约为 50  $\text{s}^{-1}$ . 单光子计数模块输出的光子计数信号采用相关卡(Correlator 公司 Flex99R-160 型)作硬件相关处理.

实验中使用经过净化处理的自制的玻璃底小皿. 发光样品使用的荧光小球(Molecular Probes 公司 FluoSpheres F-8888 型)半径为 110 nm. 为防止小球凝聚, 我们在溶液中加入分散剂(Tween 80, Altas Chemicals Industries 公司产品), 实验前对溶液进行超声处理, 并利用滤膜滤除聚集产生的大粒子.

#### 4.2. 实验结果

应用上述装置, 我们测量了改变激发光强度时荧光小球的荧光强度涨落信号. 对应每一个激发光强度由相关卡得到的自相关曲线, 仍使用(13)式进行拟合, 得到不同激发光强度下的粒子数和扩散时间. 运用上述的理论分析与实验拟合得到的结果进行对比, 以验证理论结果的正确性.

考虑到我们不知道实际体系的饱和光强, 所以, 可以通过(17)和(18)式对测得的数据点进行拟合, 从而获得该体系的  $N_0$  和  $\tau_D$  的值以及  $I_s$  的值, 如图 3 所示. 在图 3 中, 归一化光强  $I_0$  表示: 实验中系统所允许的激发光强度的最大值设为 1, 其他强度值与最大值相比, 得到归一化的强度值.

从图 3 中可以看出, 利用弱激发的 FCS 解析函数进行拟合所得出的粒子数与理论推导的结果基本相符. 但是采用(18)式拟合实验中得到的扩散时间偏差较大, 原因是扩散时间对 FCS 曲线的形状影响较大, 采用(13)式拟合所带来的误差也比较大.

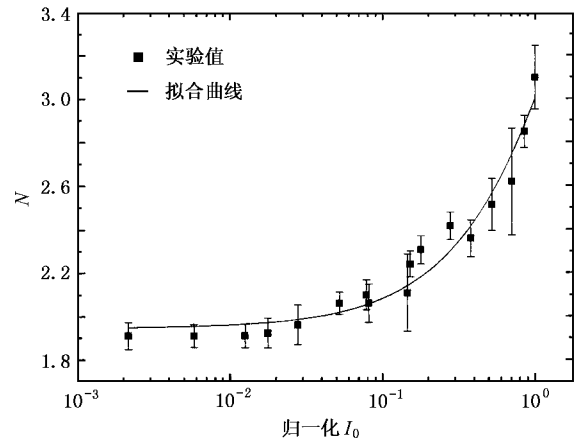


图 3 运用(17)式对实验得到的数据进行拟合, 得到  $N_0$  的值为 1.95,  $I_s$  为 0.91

## 5. 总 结

在 FCS 实验中, 一般假定激光诱导荧光探测区域与激发光强无关. 但当针对弱荧光粒子进行 FCS 探测时, 往往需要采用比较强的激发光, 以便提高荧光信号的强度, 改善信噪比. 随着入射光强度的增大, 由于饱和激发效应, 荧光分布函数会随激发光强改变, 探测区域和实际测得的粒子数目与扩散时间相应发生变化. 我们利用饱和和激发的物理模型, 并引入等效体积的概念, 定量计算出 FCS 实验中探测体积随入射光强变化的函数关系, 并由此计算出包含饱和和激发影响的粒子数与扩散时间表达式, 即(17)(18)式. 采用针对三维高斯激发光强分布推出的 FCS 拟合公式(13), 对 Monte-Carlo 模拟和实验结果进行的分析显示, 利用(17)(18)式可以有效修正饱和和激发对测量结果的影响. 上述方法可以提高在强激发光条件下测量结果的可靠性. 另外, 针对不同光强下所获得的 FCS 曲线进行分析, 有利于降低实验中其他偶然干扰因素对实验结果的影响, 同时获得更多信息, 如分子的饱和激发光强  $I_s$ .

[1] Sudipta M, Ulrich H, Webb W W 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 11753

[2] Pederson T 2000 *Nature Cell Biology* **2** 73

[3] Wennmalm W, Edman L, Rigler R 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 10641

[4] Brook R, Vamosi G, Vereb G et al 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 10123

[5] Hausteil E, Schwille P 2003 *Methods* **29** 153

[6] Kohler R H, Schwille P, Webb W W et al 2000 *J. Cell Sci.* **113** 3921

- [ 7 ] Thompson N L , Allen N W 2002 *Current Opinion In Structural Biology* **12** 634
- [ 8 ] Schwille P ,Haupts U ,Maiti S *et al* 1999 *Biophys. J.* **77** 2251
- [ 9 ] Keith M B , Peter T C S , Enrico G 1995 *Biophys. J.* **68** 694
- [ 10 ] Zhang Z Q 2001 *Analytical Chemistry* ( Beijing Science Press ) p321 ( in Chinese ] 张正奇 2001 分析化学( 北京 :科学出版社 ) 第 321 页 ]
- [ 11 ] Omenetto N *et al* 1973 *Spectrochim. Acta B* **28** 289
- [ 12 ] Omenetto N *et al* 1973 *Spectrochim. Acta B* **28** 301
- [ 13 ] Waizenegger T ,Fischer R ,Brock R 2002 *Biol. Chem.* **383** 291
- [ 14 ] Chen B ,Meng F B ,Ma H *et al* 2001 *Spectroscopy and Spectral Analysis* **3** 263 ( in Chinese ] 陈 波、孟凡波、马 辉等 2001 光谱学与光谱分析 **3** 263 ]
- [ 15 ] Meng F B ,Chen B ,Ding Y *et al* 2001 *Chin. Sci. Bull.* **46** 1589
- [ 16 ] Ding Y ,Meng F B ,Chen B *et al* 2001 *Acta Phys. Sin.* **50** 2269 ( in Chinese ] 丁 尧、孟凡波、陈 波等 2001 物理学报 **50** 2269 ]

## Fluorescence correlation spectroscopy with saturated excitation \*

Ding Jian-Ying<sup>1)</sup> Chen Bo<sup>1)</sup> Meng Fan-Bo<sup>1)</sup> Ma Hui<sup>1)2)†</sup>

<sup>1)</sup>( Key Laboratory for Atomic and Molecular Nanoscience of Education Ministry ,Department of Physics ,Tsinghua University ,Beijing 100084 ,China )

<sup>2)</sup>( Graduate School at Shenzhen ,Tsinghua University ,Shenzhen 518057 ,China )

( Received 20 August 2003 ; revised manuscript received 13 October 2003 )

### Abstract

In this paper ,we study the errors caused by an intense excitation beam in fluorescence correlation spectroscopy ( FCS ). Saturated excitation induced by an intense excitation beam will alter the spatial distribution function of the laser-induced fluorescence ; therefore it changes the results of FCS measurements . Using the theory for saturated excitation ,we derived a general expression for the effective detection volume as a function of the excitation laser intensity . Quantitative relations between the particle number and diffusion time ,both obtained from FCS measurements ,and the excitation laser intensity are established and used to remove the systematic error due to saturated excitation . The success of this technique is demonstrated in both Monte-Carlo simulations and experiments .

**Keywords :** fluorescence correlation spectroscopy , saturated excitation , Monte-Carlo simulation

**PACC :** 3250 , 6740D , 7115Q

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( Grant Nos. 19928408 ,60138010 , 10274039 ).

† Corresponding author. E-mail : mahui@tsinghua.edu.cn