金纳米棒的偏光特性及其作为方向探针在单分子水平成像上的应用

杨玉东*, 刘公召, 李冬至, 徐菁华, 杨林梅

沈阳工业大学理学院, 沈阳 110870

*通讯作者, E-mail: songzx07@163.com

收稿日期: 2015-05-16; 接受日期: 2015-06-10; 网络版发表日期: 2015-07-22

doi: 10.1360/N032015-00073

摘要 随着生物医学的发展, 对生物成像技术和成像分辨率的要求越来越高, 纳米材料和技术被越来越多地应用到生物医学领域. 各向异性的金纳米棒由于具有较高的电子密度、较大的吸收截面、特殊的表面等离子共振光学特性、优良的生物相容性和化学稳定性而被广泛应用于生物成像领域. 复杂的活细胞组织内纳米级目标的位置和动态的空间构型对于我们理解很多生物物理学过程的细节问题至关重要. 本文结合本课题组在该领域的研究经验, 并从金纳米棒局部等离子共振特性和偏光特性出发, 综述了金纳米棒作为方向探针的 3D 跟踪定位成像技术与手段. 包括暗场成像技术、微分干涉成像、光热成像、共聚焦显微镜成像等生物成像技术和脱焦成像、全内反成像和双通道等生物成像手段. 同时阐述了金纳米棒作为方向探针在生物成像领域中的应用进展.

关键词

金纳米棒
生物医学
单分子方向
三维示踪

1 引言

20 世纪 90 年代, 常温溶液中单分子光学检测的实现是分析化学发展历史上的一个标志性成果, 以此为开端的单分子检测技术在各研究领域的应用蓬勃发展. 单分子检测技术为发现和研究个别分子的活动特征, 揭示特定时刻分子的位置和行为, 探讨生命活动中分子活动的过程和机理提供了可行性. 随着单分子技术的发展, 科研人员越来越关心光学探针在纳米尺度的方向问题. 很多生物学过程如蛋白质发生结构形变、ATP 酶的转动、细胞膜的形变等都会导致分子或纳米颗粒的方向发生改变^[1].

目前, 方向探针大部分使用的是荧光标签, 包括荧光聚合物、有机染料和无机半导体纳米颗粒等^[1]. 然而, 荧光探针在有限测量时间的光闪烁和光漂白

严重限制其应用与生物成像^[2]. 虽然核壳结构半导体纳米粒子可以在一定程度上缓解光漂白, 但这些纳米颗粒的毒性在生命科学的实际应用中可能是一个致命的缺点.

贵金属纳米颗粒(NPs)表现出非凡的等离子共振特性、奇异的光学性能、良好的生物相容性和无生物毒性, 因此可能是一种替代有机染料或量子点的生物探针^[3]. 除了比染料分子具有更大的吸收和散射截面外, 局部表面等离子体的集体振荡(LSPs)也激发了强烈的荧光, 极化的光吸收和光散射^[4], 这种极化特性可以通过调控 NPs 的形状用于生物成像. 特别是具有形状各向异性的金纳米棒(AuNRs), 其纵向和横向局部表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)模式分别平行和垂直于 AuNRs 长轴方向. 由于其尺寸的各向异性, 它对光的吸收和散射

是非线性的, 是一种非常良好的旋转和方向探针. 利用其长轴等离子共振光偏振的敏感性, 目前已经开发了利用暗场显微镜、微分干涉相差显微镜和光热成像等技术来获得它的二维和三维方向. 这些方法已经被用来研究酶的催化作用、聚合物的自组装、分子马达的旋转、膜上纳米颗粒的动态行为等^[5,6].

基于上述特性, 金纳米棒辅助的生物成像被广泛地应用到多种成像技术和方法中, 是近几年发展最快的生物成像技术^[7]. 目前还未见关于金纳米棒方向成像的综述文章. 鉴于此, 本文综述了金纳米棒作为方向探针在单分子生物成像技术及其在生物医学中的典型应用.

2 金纳米棒的偏光特性

通常情况下, 贵金属(金、银)内部与表面存在大量自由电子, 形成自由电子气团, 即等离子激元(plasmon); 而表面等离子体则特指存在于贵金属表面的自由电子气团. 当入射光与贵金属纳米结构表面自由电子气团的振动发生共振时就形成了表面等离子激元共振(SPR)^[8]. 各向异性的金纳米棒的纳米级尺度限制了电子的运动范围, 使其只能在微粒表面进行振荡, 因而称之为局域表面等离子共振现象LSPR. LSPR的宏观表现是在消光(吸收+散射)光谱中有峰的出现, 这些峰被称作 LSPR 峰. 研究发现, LSPR 峰位主要依赖于纳米颗粒的尺寸、形状、颗粒成分、周围环境介电常数等因素影响^[9]. 上述因素变化时, 将引起表面自由电子振荡频率的变化, 从而造成包括吸收和散射光学性质的改变.

对于近似于偶极子模型的金纳米棒, 其散射是偏振的, 只会在垂直于长轴的方向传播. 金纳米棒的这种光学性质不但奠定了金纳米棒检测方向基础, 而且也意味着金纳米棒的检测光强也有方向性. 当一个 AuNR 平行于成像平面时, 检测器收集到的光强

度信号最强. 而当 AuNR 垂直于成像平面时, 检测器基本上收集不到光信号. 金纳米棒的长轴和短轴等离子体共振是相互独立的, 它们可以分别被偏振方向平行和垂直于棒的长轴方向的光激发. 金纳米棒的光吸收也是偏振性的. 紫外可见光谱仪获得的金纳米棒光谱响应实际上是方向随机的金纳米棒整体对光吸收的结果.

目前, 已有文献主要通过以下两种方式来研究金纳米棒的光学偏振特性:

(1) 将金纳米棒分散在凝胶或者聚合物中, 然后沿着一个方向拉伸凝胶或者聚合物, 这样就能够使金纳米棒准直排列^[10]. 当光的偏振方向与聚合物的拉伸方向一致时, 金纳米棒对光的吸收最强. 慢慢增大入射光的偏振方向和金纳米棒的延伸方向夹角时, 金纳米棒对光的吸收值明显下降. 所以这种复合物薄膜的颜色和吸光度是偏振依赖性的. Li 等^[11]通过将金纳米棒掺杂到聚乙烯醇(PVA)聚合物薄膜中并进行加热拉伸, 成功将群体金纳米棒按照拉伸方向排列起来. 这样, 从宏观上很容易分辨出纳米棒的排列取向, 使线偏光能够有选择地同时激发所有金纳米棒的纵向或横向 SPR (图 1). 金纳米棒的吸收值随着偏振方向的改变而变化.

(2) 更直接的方式是研究单个金纳米棒的吸收和散射偏振特性. 早在 2002 年, Sönnichsen 等^[12]证明, 金纳米棒的失相速率比球形纳米颗粒快得多, 而且暗场显微镜下改变入射光的偏振方向会周期性地得到金纳米棒的散射光强值. 2005 年, Sönnichsen 等^[13]用双通道暗场显微镜通过观测单个金纳米棒的两个通道散射光, 示踪了金纳米棒随时间改变的方向变化, 证明了金纳米棒是具有高信噪比、高化学稳定性和光学稳定性, 可快速成像的单分子方向探针. 在 2010 年, Chang 等^[14]采用光热成像技术得出 25 nm×73 nm 的金纳米棒的图像是偏振依赖性的. Huang 等^[15]采用偏振光照射 AuNRs, 利用暗场显微镜拍摄了长

图 1 AuNRs 的偏光特性. (a) 薄膜拉伸方法示意图; (b) 横向(II, IV)和纵向(I, III)偏振光激发下 AuNRs 吸收谱^[10]

径大于 30 nm 的单颗粒 AuNR 探针在不同偏振角下的彩色暗场散射图像, 图像从棕色、红色、黄色转变为绿色, 这一结果可用于活细胞和微流体等研究领域。

3 单个金纳米棒方向成像方法

3.1 暗场显微镜成像

暗场显微镜(dark field microscope, DFM)通常以卤钨灯为照明光源, 在照明光路上以聚光镜聚焦, 聚光镜中心区有遮光板, 形成一个空心圆锥形光区。当载玻片上的样品与照明光相互作用, 照明光线的传播方向发生改变并进入物镜成像。这样的成像方式中背景为黑, 只有样品发光, 因此被称为 DFM。DFM 适合对单个金属纳米颗粒成像。Jun 等^[16]在 DFM 下通过获得纳米粒子从聚集到解聚过程中 LSPR 的变化来实时监测了细胞中酶的动态构象变化。基于散射技术的暗场成像, 许多生物对象的强烈散射产生一个大的背景, 降低了灵敏度。此外, 散射截面与纳米粒子的半径 R^6 有关^[17]。金属纳米颗粒的直径远小于 50 nm, 因此检测不到暗视场单粒子的成像^[6], 目前, 用于体内检测的金纳米棒尺寸长径为 60~75 nm, 短径为 20~40 nm^[18,19]。40 nm 以下的纳米粒子利用基片样本已经被定向检测过^[20], 但在细胞系统 3D 的定位与跟踪还没有报道过。有理论认为: 小的粒径导致了

吸收截面的减小(与半径 R^3 成正比), 也导致纳米颗粒吸收的减弱^[17]。但相反的是, 在实际应用中较小的颗粒可以减小纳米探针的尺寸, 当探针尺寸小于待观测体时, 小探针对于细胞生物过程影响更小, 并且能够更真实地进行全方位动态观测和更清楚地理解生物过程。例如, 利用 77 nm×39 nm 金纳米棒和长为 1000~2600 nm、宽为 10 nm 的肌动蛋白微丝, 成功地观测到了 FoF1- ATP 合成酶^[21]与 F1-ATP 合成酶^[22]的跨膜运输和旋转运动。

2014 年, Chaudhari 等^[23]利用简单的 DFM 首次观测了超小型动态 AuNR_{30×10} (长径 30 nm, 短径 10 nm) 的三维运动。没有使用任何共焦设备或者复杂的偏振或者聚光系统^[24]。利用可见光近红外光取代激光, 降低了金纳米棒加热的可能性并使探针本身对被监测系统的影响达到最小化(图 2(a))。图 2(b)显示了金纳米棒原位极性测量方法。由于金纳米棒的固有极化性, 散射光有沿金纳米棒纵向极性轴线的偏振现象。当这种光穿过检偏器时, 一个微小的角度通过检偏镜会产生折射引起图像向检偏器轴方向移动几个像素。用检偏镜微小的角度差来绘制 AuNRs 极性图。通过统计学及 DDA 模拟的方式分析单粒子 SPR 峰并用来区分样品。利用 AuNRs 探针在不同环境中的极化图、暗场单粒子成像和单粒子散射谱进行 AuNRs 原位极化定位, 实时观测到了 AuNRs 探针进入 HEK293 细胞膜, 在 HEK293 细胞及 BSA 中的二维平

图 2 (a) 暗场显微镜装置图; (b) 极性图的绘制方法; (c) 金纳米棒的 TEM 照片; (d) AuNR_{30×10}; (e) AuNR_{30×10}@HEK293. (d, e)图中从上至下分别为极坐标图、极化图和单粒子散射光谱(P 表示极化率)。极化图中的插图表示当检偏器平行(d)和垂直(e)于最大散射效应法线方向时的暗场图像^[23]

面旋转模式(图 2(d, e)), 并首次实时动态观测到了转铁蛋白共轭 AuNRs 在 HEK293 细胞内的三维旋转动力学过程, 即 AuNRs 在 HEK293 环境下是沿 Z 轴移动并伴随面外的旋转.

3.2 光热成像

用于生物成像的光学探针由于自发荧光或散射, 应该产生大量光子数, 具有背景噪声较小、稳定性很高、生物相容性良好和最小干扰等特点. 基于金纳米棒的表面等离子体激发(SP)特异性吸收的高灵敏度光热成像技术, 提供了一个极优化的并且满足上述特性的光学探针. 高度偏振各向异性的金纳米棒作为方向光学探针可以提供探针的取向, 从而提供有关的重要信息, 如生物系统动力学^[25]. 特别是通过检测快速非辐射衰变产生热量的光热吸收成像, 能够检测金属纳米颗粒的直径最小达到 2 nm^[26]. 通过调整金纳米颗粒的形状得到的各向异性 SPR 振荡, 单个金纳米棒的取向可以非常准确地依赖 SPR 的吸收测定. 对 AuNR 方向的确定, 可以利用扫描电镜与在纵向模式光偏振敏感吸收成像. 此外, 在较小的 AuNR 维度的横向模式, 使用低倍显微物镜也能提供精确的 AuNR 方向定位, 而常规暗场散射光谱不能完成^[27].

在 2010 年, Chang 等^[14]采用光热成像技术得出 25 nm×73 nm 的金纳米棒的图像是偏振依赖性的, 说明了金纳米棒是一个非常好的等离子体吸收方向探针(图 3). 金纳米棒的这种光学偏振性质为它们在材料科学和分子生物学应用奠定了基础. 光热成像对大分子取向和动力学过程的研究非常有效, 其也适用于高散射环境. 例如, 对液晶材料的局部结构、生物膜的合成、各向异性的金纳米棒在活细胞中蛋白质的构象和扩散等. 此外, 光热成像比暗场散射谱有更大的偏振敏感性, 有可能进一步减少 AuNR 探头的尺寸, 当金纳米棒小于 5 nm 时, 可以显著提高数据采集的速度. 特别是加入电光调制器后, 单个 AuNR 成像的时间分辨率在毫秒尺度^[14].

利用各向异性的纳米金棒的表面等离子体共振的横向和纵向模式, 通过偏振光激发和监测散射或吸收的偏振信号的光热成像, 可以获得更高的光散射效率. 然而, 偏振各向异性的 AuNRs 无法显示其极角, 只适合于纳米粒子的 2D 空间定位.

图 3 AuNRs 二聚物和一个单个金纳米棒在同一区域的扫描电镜图(a)和光热成像图(b)^[14]

3.3 共聚焦显微镜成像

共聚焦显微镜是利用放置在光源后的照明针孔和放置在检测器前的探测针孔实现点照明和点共聚焦原理探测, 来自光源的光通过照明针孔发射出的光聚焦在样品焦平面的某个点上, 该点所发射的荧光成像在探测针孔内, 照明针孔与探测针孔对被照射点或被探测点来说是共轭的, 被探测点即为共焦点, 所在的平面为共焦平面. 计算机以像点的方式将被探测点显示在计算机屏幕上, 由光路中的扫描系统在样品焦平面上扫描, 产生一幅完整的共焦图像. 随着 Z 轴的不断移动, 就可得到样品不同层面的连续光切图像. Failla 等^[28]使用共聚焦显微镜, 通过调制激光的有序模式得到了金纳米棒在表面的 2D 角度信息(图 4). Züchner 等^[29]研究了单个金纳米棒放置在两种介质之间的界面, 使用共焦干涉散射显微镜和具有高阶的激光模式组合. 在接近折射率匹配的条件下, 观察到的单个纳米棒的散射图案、散射强度和信号背景比按指数规律增长. 在满足折射率匹配条件时, 在活体生物测量中数据采集速率达到最大化, 图像对比度是界面处折射率变化的一个直接后果. 可以获得金纳米棒准确的定位.

共聚焦显微镜成像可以在生物活体中对金纳米棒实现准确的定位, 空间分辨率很高. 但该方法需要使用价格昂贵的激光器, 同时采样速度也十分缓慢. 这限制了它不能用于快速动态反应的跟踪.

3.4 微分干涉对比显微镜成像

3.4.1 微分干涉对比显微镜成像

微分干涉对比显微镜(differential interference contrast, DIC)是将入射光在第一个渥拉斯顿棱镜作用下分成强度相等且偏振方向正交的两束线偏振光,

图4 高度有序激光照射下具有不同空间方向的金纳米棒的散射图像样式^[28]

这两束光经过透镜准直后变成平行光并同时照明样品。穿过样品后的光波经物镜放大, 然后在第二个渥拉斯顿棱镜的作用下重新合在一起沿相同的方向传播。通过检偏器后, 两光束发生干涉。干涉图样反映了被测样品在剪切方向上的相位导数的分布。物平面上两束平行光之间的距离对应于微分干涉中的剪切量。通过对两个正交方向上的相位梯度进行积分, 最终可以求出样品的相位分布。通过改变光程差, 来改变影像的亮度, 使纳米粒子的细微结构呈现出正或负的投影形象, 金纳米棒出现人为三维立体感。

DIC 在活细胞成像技术中具有很强的优势, 如更高的空间分辨率、较浅的光学切片, 相比于 DFM, 能显著降低来自细胞组织和碎屑的散射光干扰和更快的成像率(下降到几毫秒的时间分辨率)。基于 DIC 的单粒子取向旋转跟踪(SPORT)技术对研究活细胞快速转动动力学是非常适用的。对于活细胞力学性能的解析, 需要建立旋转动力学模型。Gu 等^[30]利用 200 帧/秒的 DIC, 首次对表面官能化的金纳米棒在活细胞膜上的旋转动力学行为进行了研究, 对更好地了解药物释放机制有实际意义。Wang 等^[31]利用 DIC 对金纳米棒探针在三维空间的动态旋转运动进行跟踪定位, 实验表明, 利用金纳米棒探针和 DIC 的组合, 可实时监视金纳米棒在细胞微管运动的全过程。Xiao 等^[32]利用 DIC, 结合金纳米棒的散射图像样式和光强计算方法达到了更好的效果, 能够明确给出细胞膜上 3D 空间内全角度信息。

2015 年, Chen 等^[33]利用三层核壳结构的等离子体纳米棒(金纳米棒为核心、银壳和最外层的硅层), 制备了基于 DIC 的光学成像探针, 用于单粒子的取向和旋转跟踪。外层的银壳在不改变金纳米棒光学各向异性特性的基础上, 导致了纳米棒局域表面等离子体共振的进一步增强, 二氧化硅涂层作为硅烷偶联剂可使表面官能化和增强探针的稳定性和生物

相容性。在活细胞膜上的脂质双分子层获得了纳米棒的取向和旋转信息。得到了毫秒级的时间分辨率, 结果表明, 所合成的杂化纳米棒是一种很有前途的成像方向探针, 具有较高的灵敏度和好的生物相容性。

3.4.2 双模式 DIC/荧光光路显微镜成像

在生物成像中, 利用 DIC 对单粒子棒取向和旋转跟踪可以进行单分子定位。然而, 细胞活动通常涉及多个分子。因此, 一个单一的分子/物体的运动跟踪是不够的。DIC/双模态成像技术中利用荧光显微镜可观察荧光标记的大量生物分子, 同时利用 DIC 可以获得纳米探针在活细胞的图像。Sun 等^[34]将直立尼康 Eclipse 80I 显微镜改造成可以在 DIC 模式、落射荧光模式和 DIC/荧光双模式工作(图 5(a))。当显微镜在双模式操作时, 中间图像准直后被波长为 560 nm 的分色镜分成两个通道, 用适当的带通滤波器插入两光路, 选择 700 nm 的波长为 DIC 成像, 540 nm 的为明场成像。两个滤波器的带宽为 20 nm。这两个波长分别对应金纳米棒(25 nm×73 nm)的纵向和横向 SPR 模式。在 700 nm 的 DIC 的通道, 第二偏振片上两个中间亮场图像的偏振面发生干涉, 产生典型的亮/暗 DIC 图像灰度背景(图 5(b)), 该通道是跟踪纳米棒纵向 SPR 模式的三维定位。在 540 nm 的明场通道, 两个中间图像投射在第二偏振器的无干扰相机上, 形成一个覆盖亮场图像, 对应于金纳米棒的横向共振模式。通过 Nomarski 棱镜的明场显微镜成像结果为一个新的点扩散函数。可以近似为一个双峰高斯分布, 单个粒子的质心可以通过非线性最小二乘拟合, 给出明场图像的双峰高斯函数分布^[35]和拟合的图像(图 5(c, d))。

Sun 等^[34]利用双模式 DIC/荧光显微镜, 从光学各向异性的金纳米棒获得了三维运动模式显微图像。

图 5 双模式 DIC/荧光光路显微镜示意图. (a) 红色线代表常规的 DIC 类型, 蓝色和绿色线代表荧光光路显微镜^[34]; (b) 显微镜下的 DIC 图像^[35]; (c) 双高斯亮场图像^[35]; (d) 拟合的图像^[35]. 标尺为 1 μm (网络版彩图)

对纳米药物在活哺乳动物细胞中的主动运输过程, 在微管输运进行定位跟踪. Gu 等^[35]采用双模态显微镜对单个金纳米棒同时进行取向和旋转的 3D 跟踪和定位, 获得了纳米级的精确定位, 已成功用于研究具有较大空间位阻的纳米药物在微管中的运动和在拥挤细胞环境中的跟踪检测. 该技术对研究生物过程中单分子和纳米颗粒的定位和旋转信息具有很大的潜力.

双模成像技术对现有的无荧光粒子跟踪技术是一个重大的改进. 它可以应用于许多生物过程的研究, 需要精确定位纳米探针的方向和转动信息. 但是, 通过修改亮场通道可实现的信噪比是有限的, 与黑暗的背景荧光图像不同, 高背景亮场图像导致信噪比大大降低. 目前报道使用 100 W 卤素灯作为光源, 获得的纳米尺度定位的时间分辨率需要 74 ms. 将来可以通过一个更强的激光光源, 在允许定位精度的情况下, 可以实现更高的时间分辨率.

4 单个金纳米棒方向成像技术手段

单个纳米颗粒的方向成像目前一般利用光热成像、共聚焦显微镜成像、微分干涉对比显微成像和暗场显微成像. 但前两种成像技术不能给出金纳米棒的 3D 角信息. 单个纳米颗粒的散射成像一般利用暗场显微成像, 这种成像技术可以给出 3D 角信息和高的对比度图像. 由于散射波谱与纳米材料的尺寸、形状、介质介电常数密切相关, 因此纳米材料对其周围

介质环境的变化相当敏感. 功能化的纳米粒子与不同浓度的目标物结合产生不同的散射波谱, 可以作为定性、定量分析的基础. 到目前为止, DFM 是一种应用广泛的监测生物事件的生物成像技术, 利用不同的照明光源、各种 CCD 和不同的图像采集方法对传统的成像系统进行改装, 使 DFM 成像的信噪比和时间分辨率大大提高.

此外, 还出现了基于荧光显微镜或者 DIC/荧光双模态成像技术的金纳米棒包量子点的散射与荧光结合的探针形式. 目前, 金纳米棒方向成像技术手段主要有如下三种: 脱焦成像、全内反成像、双通道成像.

4.1 脱焦成像

2005 年, Sönnichsen 等^[13]首次利用金纳米棒作为方向探针, 在 DFM 光路中加一双折射晶体, 可以在一个 CCD 中同时获得两个通道的强度, 通过强度计算出面内角, 证明金纳米棒的取向成像能力. 通过这种技术他们观测到了玻片表面不同的旋转状态, 获得了金纳米棒的 2D 方向信息(图 6(a)). Spetzler 等^[5]利用类似的偏振测量方法探讨 F1-ATP 酶旋转(耦合到金纳米棒后), 他们发现, 大肠杆菌 F1-ATP 酶的 γ -亚基的旋转约 7.6 rad/ms, 该偏振检测方案的主要限制是, 监测结果只反映投射在 x - y 平面的第一象限内的定位信息, 但在大多数情况下, 由于纳米棒不能连续呆在 x - y 平面内, 该方法不能给出金纳米棒的平面和倾斜角, 因此遗漏了大量的附加信息(图 6(b)). 在此基础上, Failla 等^[28]成功实现了共聚焦显微镜具

图 6 (a) 在盖玻璃表面上金纳米棒的旋转动力学与常规的暗视野显微镜记录^[13]; (b) 不同取向的单个金纳米棒的暗场图像, 颜色的变化是由 ATP 酶的旋转引起的^[5]; (c) (左到右)盖玻片表面上测量和模拟的单个金纳米棒脱焦暗场图像、3D 三维强度图(结果), 以及相应的金纳米棒的三维定位算法^[36]

有高阶激光模式组合在 x - y 平面识别单个金纳米棒的实际取向. Xiao 等^[36]报道了另一种方便的方法来解决金纳米棒在传统的 DFM 成像的 3D 方向信息. 这就是脱焦成像技术. 该技术可以实现单个金纳米棒的平面和倾斜角度的 3D 准确测量和定位(图 6(c)).

传统的成像方法, 由于散射或反射光的偶极子都集中在焦平面的一个艾里斑上(在颗粒尺寸小于光学显微镜分辨率的情况下), 由于光学显微成像的局限性, 不可能在聚焦后的暗场图片中将纳米颗粒场强分布的信息有效地提取出来, 因而不能解决三维取向问题. 然而这些场强分布信息却和纳米颗粒空间构型密切相关. 如果故意在成像系统中引入一个像差(轻微的转动偶极距焦平面), 就可以直接观察反射和散射的单偶极子辐射场的空间分布(脱焦图像). 根据这些空间分布的信息, 便可以快捷地识别出金纳米棒的空间构型. 基于图像样式识别获得金纳米棒的角度信息是很直观的. 脱焦图像与 AuNR 的长径比、数值孔径的大小、离焦量、入射光的强度和偏振方向等密切相关. 基于上述方法, Xiao 等^[36]在 DFM 下开发了脱焦成像技术. 在使用物镜数值孔径(NA)大于 1 的情况下, 金纳米棒散射脱焦的图像是不同的, 是与金纳米棒的三维角度密切相关的. 他们首先用模拟的方法建立了一系列的角度图形库, 将脱焦图像与之对比从而得到金纳米棒的面内角和面外角. 通过这个技术能够同时获得玻片表面上多个金纳米

棒的角度, 这种方法可实现视频数据采集以及方便、可靠、快速的角分辨能力.

荧光团的图像采集过程中产生的衍射图案, 可提取荧光偶极子固定的取向特性. 荧光定位显微镜技术是基于高斯拟合算法, 在荧光聚焦图像上实现超分辨率成像. 当应用于固定偶极子, 这会导致在 5~20 nm 范围内的偏差. Aguet 等^[37]在荧光显微镜成像的基础上, 利用脱焦采集技术, 对偶极子的位置和方向采用联合估计方法, 基于物理图像建立了三维可调滤波器模型. 可以实现 5 nm 的空间分辨和 2° 的方位分辨精度. 利用该成像模型来估计偶极子位置/方向与实验结果很好的匹配.

基于微分干涉对比或散焦暗场的方案会导致空间分辨率的损失, 其结果为退化点扩散函数^[35]. Xiao 等^[38,39]改进了该方法, 采用 $25\text{ nm} \times 70\text{ nm}$ 的金纳米棒作为探针, 通过添加另一个聚焦激光, 并同时监测横向振荡模式. 利用双波长立式暗视野显微镜通过离焦纵模确定方位信息. 利用显微镜物镜固有的色差制作了两个图像. 用高速 CCD 摄像机, 发现了转铁蛋白修饰的金纳米棒和活细胞之间前膜内化相互作用的细节, 实现大范围纳米尺度的精准定位.

Li 等^[20]报告了通过一个普通的宽场光学显微镜, 对纳米级的单个金纳米棒进行的脱焦成像, 该方法可以同时记录大量单 AuNRs 的图像和双光子荧光强度, 获取相关的散焦图像与三维空间取向. 大量的单

AuNRs 可以同时监测, 单 AuNRs 的脱焦成像是一种高通量检测技术, 能够在原位和实时的一帧图像获取其空间取向, 探头尺寸可以下降到几纳米. 此外, 激发极化探头的传感性能对探头的纵横比不敏感, 它允许使用一个适当长度的金纳米棒作为定位传感器不改变激光激发频率和极化方向. 这些独特的特点使得定位探针的光学成像在材料科学和生物传感领域有巨大的应用潜力.

对于脱焦成像技术, 当探针位于在焦平面提取光强分布时, 脱焦图像提供该纳米探针定位的偶极子发射信息, 由于在很大程度上信号强度的精确度下降了, 因此标准的离焦成像技术并不总是能获得取向定位. 通常需要之间来回切换聚焦和脱焦成像获得的取向并同时获得精确的定位信息, 这降低了动态跟踪的时间分辨率. Toprak 等^[40]证明, 脱焦成像分辨率仅为每秒 1~2 帧. 另外, 脱焦成像技术获得的图像的对比度不够高, 因此, 脱焦成像更适合于静态事件的表征, 如观察固定在玻片上的金纳米棒等.

4.2 全内反成像

Ha 等^[41]基于散射图像样式识别开展了全内反(TIR)照明方式得到金纳米棒三维空间方向的方法. 在他们的技术中, 先在基底镀上一层 50 nm 左右的金膜, 这层金膜减弱了面内偶极子的信号, 同时增强了面外偶极子的信号, 使得在焦面内的金纳米棒的散射图像呈现不同的散射图样. 而且这种 TIR 得到的图像背景低, 可以提高角度定位的精确度.

为了获得单一的纳米颗粒足够的成像信噪比和时间分辨率, 使用强光源和以秒为单位的长时间记录通常是必需的, 这使得传统的 DFM 不适合快速动态观察. 目前, 已开发了几个对 DFM 的光学修改方案. 例如, Ueno 等^[42]改进的 DFM 方案是通过渐变型物镜取代二向色镜与传统穿孔镜. 这个系统采用 TIR 照明、入射激光在盖玻片表面的水/玻璃反射界面形成倏逝场, 倏逝场诱发粒子的偶极子振荡, 导致非传播的近场光转化为传统传播散射光. 摄像头检测到散射光而返回的激光被阻止, 导致暗视野的效果. 采取的优势在于薄层红外照明获得了较低的背景噪声和较高的图像信噪比. 通过将这种自制的 TIR DFM 系统成功地应用在 F1-ATPase 旋转机构的研究中, 获得了 1~2 nm 的空间分辨率和 9.1 s 的时间分辨率.

为了提高 DFM 成像的灵敏度, Ament 等^[43]报道了使用平均输出功率为 2.8 W 的白光强激光光源作为 TIR 照明光源, 对蛋白质和一个单个金纳米棒的动态结合过程进行动态跟踪, 其时间分辨率在毫秒级. 虽然 DFM TIR 照明可以降低背景噪声, 但该技术被限制在界面处很薄区域. Baumberg 课题组^[44]用超连续激光通过聚焦, 在焦点处产生的光照强度为 10 mW/cm². 如此光强下, 实时观察到了一个单个金纳米棒的散射光谱, 获得了 8 ms 的时间分辨率. 更重要的是, 这种方法可以进入样品进行探测, 增大了探测的深度.

Xiao 等^[45]基于传统的暗场成像技术, 开发了一种低环境噪声的双波长的活细胞成像新技术(DWD). 他们仅把显微镜的传统光源替换成了两束不同波长的激光, 其中一束是所要观察颗粒的最大吸收波长, 另一束作为参比波长. 由活细胞环境散射光的波长变化, 获得最强的共振频率信号和不敏感的噪声信号, 无噪声的图像可以通过探测光束在共振波长处的散射光束和波长远离共振频率的参照光束图像的叠加获得. 使用双波长的暗场成像技术对单个金纳米棒进行了成像. 通过分析其长轴和短轴的振荡模式, 实现了对单个金纳米棒在三维空间内位置和角度信息的获得. 应用该方法研究了金纳米棒在细胞膜表面的运动行为, 发现修饰后的金纳米棒与细胞膜表面受体间的结合过程是独立的, 与金纳米棒的横向扩散模式无关.

近年来, TIR 成像技术已被广泛地应用于分子马达的运动、活细胞中单分子成像、生物大分子的相互作用、生物大分子的构象变化、ATP 酶反应、单分子的电子转移反应等研究领域^[39,42].

TIR 显微成像系统观察的动态范围通常在 200 nm 以下, 并且它的信号收集由具有高灵敏度和高时间分辨率的 CCD 相机完成, 因此具有分辨率高、对样品损伤小、信噪比高等特点, 非常适合观察单个分子的运动行为. TIR 成像技术的缺点主要是只能对细胞表面成像, 而不能用于研究细胞深处的信号. 另外, 全内反射的信号对 Z 轴的漂移非常敏感^[46].

4.3 双通道成像

通过获得两个以上偏振通道的散射光强值来计算金纳米棒的角度, 是另外一个获得金纳米棒方向非常优秀的方法. 检测到的金纳米棒的散射光强依

图7 双通道成像技术. (a) 通过使用分光器和偏振片的双通道偏振系统暗场显微镜^[47]; (b) 通过双折射棱镜将光直接分成两束正交垂直偏振通道的平面照明显微镜^[48]; (c) 多通道光学显微镜的示意图, 金纳米棒同时用于 TPL、RLS 和 SHG 成像^[50]

赖于两个因素: 金纳米棒对光的吸收, 以及金纳米棒散射光有多少进入检测器. 而这两个因素是与金纳米棒的空间方向密切相关的. Pierrat 等^[47]通过偏振分光器, 同时获得了两个正交垂直通道的光强值, 可以非常方便地得到金纳米棒的面内角(图 7(a)). Xiao 等^[48]报道了采用平面照明方法和双折射晶体, 通过一个双折射棱镜将金纳米棒的散射光分为两部分(偏振方向分别平行和垂直于棱镜光轴方向), 将与纳米棒构型相关的散射信号中的偏振信息有效地提取出来(偶极子模型), 从而推导出金纳米棒的构型信息(图 7(b)). 利用这种激发模式, 金纳米棒被激发的几率函数可以被简单地描述成一个连续性方程. 与传统的偏振暗场检测技术相比, 该方法有了很大的提高. 同时, 由于金纳米棒很强的散射截面积和特定的共振频率, 可以很容易地将金纳米棒从复杂的环境中分辨出来并进行追踪. 而且, 利用这个方法, 不仅能够获得金纳米棒的旋转信息, 也可以得到金纳米棒的位移信息. 利用该技术能够得到 AuNR 在不同照明模式下的方位角和极化角. 可获得金纳米棒的实时 3D 空间信息. Wang 等^[31]使用微分干涉相差显微镜, 通过获得两个通道的光强也能够通过相应的计算公式来获得 AuNRs 的 3D 空间角度.

2014 年, Xu 等^[49]采用双通道偏振 DFM 和单个金

纳米棒为方向的探针, 利用环形斜照明和双折射棱镜, 建立了一种简单的获得金纳米棒 3D 角度方向的技术. 首先将成像焦面聚焦在细胞侧壁, 这样不仅能够增加所得角度的精确度, 还有利于获得金纳米棒和细胞膜的夹角信息, 提高了金纳米棒成像的信噪比(S/N). 最后通过实时观测金纳米棒的跨膜方向动态变化证明了双通道暗场细胞侧壁成像是研究跨膜机制的良好技术手段, 对研究细胞内吞过程很有意义.

最近, Cao 等^[50]采用多通道光学成像技术, 使用近红外激光激发, 诱导金纳米棒产生的线性(共振光散射 RLS)与非线性(双光子 TPL 和二次谐波 SHG)光学过程, 获得了多路平行互补的光学信号, 提供了有关细胞和组织的功能信息. 他们利用自制的多通道光学显微镜成功地完成了人类皮肤上皮癌细胞 A431 的多通道光学成像. 该方法可能会提供一种可靠的、互补的生物和生物医学的研究方法(图 7(c)).

5 金纳米棒作为方向探针在生物学中的应用

光学探针纳米定位传感在单分子光谱及成像领域吸引了广泛的关注. 一方面, 方向定位传感器在材料研究中非常重要, 如液晶取向、聚合物的玻璃化转

变温度附近的动力学和单一聚合物链的构象和旋转^[51]。另一方面,在生物物理学研究中,探针的空间取向是了解某些重要生物机制的重要手段,如肌球蛋白的结构动力学、活细胞内纳米物体的旋转运动^[31]等。金纳米棒作为方向探针在生物学中获得了广泛的应用,我们从以下几个方面重点介绍最近几年在生物学中的典型应用。

5.1 生物过程的运动定位

在许多生物过程和生物环境中,利用光学探针的旋转运动、定位和跟踪是理解这些重要性过程必不可少的重要手段。Spetzler 等^[5]在 μs 时间尺度内研究了 F1-ATP 酶的旋转。他们将金纳米棒的一端连接在酶的 γ -亚基上,通过获得金纳米棒的旋转行为,得出埃希氏大肠杆菌的 ATP 酶的 γ -亚基旋转速度为 7.62 rad/ms,两次旋转之间的时间间隔为 8.03 ms。这些成果使得我们更清楚认识了 ATP 酶的工作机制(图 6(b))。

2015 年,Enoki 等^[52]使用立式照明暗场显微镜和高速 CMOS 摄像头,开发了两种类型微秒尺度和高速角分辨率的金纳米棒(80 nm $\times$ 40 nm)方向成像:(1)分析金纳米棒聚焦图像的两个正交的偏振分量的强度;(2)分析金纳米棒的脱焦图像。两种方法获得的时间分辨率为 10 μs ,聚焦图像的方位角的精度 $\sim 1^\circ$ 。脱焦图像的角精度结果优于 $\sim 5^\circ$,极角精度 $\sim 1^\circ$ 。通过与模拟图像拟合,可获得同时测量大范围方位角的优势。他们利用旋转分子马达旋转 F1-ATP 酶,获得了 3.3 s 的时间分辨率。可以成功测量 ATP 水解反应和机械转动中的时间常数。金纳米棒的高速角分辨率成像方法将适用于许多生物分子机器快速构象变化的监测。

5.2 单分子示踪技术

随着高灵敏检测设备的完善,新型纳米探针的开发,全新检测方法的提出,单分子示踪技术已经成功地应用到细胞体系。但是对于自由溶液和活体体液内超快运动的单分子示踪以及近似静止的运动分子示踪还存在很大挑战。

5.2.1 活细胞内单分子的示踪

单分子运动过程的研究有助于探明分子在细胞表面和内部的运动规律,理解细节,如定向运动、受

限运动、布朗运动等。单分子示踪技术检测细胞膜内分子的运动,空间分辨率比荧光漂白恢复技术至少高一个数量级,应用单分子示踪技术对活细胞膜内单个分子的研究可以揭示分子的跨膜运动机理以及分子在细胞内的信号传导过程、细胞质和细胞核内单分子的扩散行为、细胞核和胞液中单分子的运动,监测病毒分子感染细胞的全过程,实时监测生物分子在细胞内传导、运输等过程。

(1) 细胞膜上的平动和转动

细胞膜是一种非常复杂的组合材料,它由磷脂双分子层和锚定在表面的少量蛋白质、脂类和少量糖类组成^[53]。它是一种二维结构体,在生物信息识别、物质转运、电子传递等过程中起到重要作用^[54]。

Gu 等^[55]深入研究了神经元细胞的轴突上纳米颗粒的运输过程,看到了金纳米棒在被运输时定向运动和短暂的停止过程中的旋转行为,给出了在运输过程中的细节。Gu 等^[30]考察了修饰不同分子的金纳米棒在膜上的行为,发现纳米载药体在膜上的行为与其表面所修饰的基团,以及修饰后所带的电荷密切相关。带正电荷的纳米棒(修饰了反转录激活因子或聚酰胺 PEI)会较快地吸附在细胞表面,但是在表面上基本不转或转得很慢;而带负电荷的被细胞捕捉的速度慢,但是在细胞膜上的旋转速度快。金纳米棒在细胞膜的旋转运动、布朗运动能更好地了解药物释放机制,并为药物载体的表面改性提供指导设计。该课题组^[56]建立了半定量技术,给出了纳米颗粒在膜上不同的旋转模式,他们采用统计方法,通过相关系数的分析确定了基本转动方式为平面旋转和平面倾斜,选细胞膜的平面作为参考。所有金纳米棒在细胞膜上的旋转行为被看作是两种基本模式和它们以不同比例的组合,表现出不同程度的随机性。随机的旋转行为与膜特性密切相关。

Xiao^[57]开发了平面照明的 DFM 方法,采用图像样式识别法和偏振光强检测法,以各向异性的金纳米棒为方向探针,研究了金纳米棒在膜上的 3D 角度变化和细胞内动力蛋白的平动和转动信息。研究了金纳米棒在微管上“之”字形的运动行为,发现在这个运动过程中金纳米棒的空间旋转是受到限制的,整个过程中的面内角和面外角都只有小幅波动。与已知的肌动蛋白的运动模型不同,该金纳米棒在微管上的平均运动速度大约为 0.58 $\mu\text{m/s}$ ^[47]。Courty 等^[58]报道的单个肌动蛋白在微管上的运动速度 0.6 $\mu\text{m/s}$ 。

说明了该金纳米棒有可能是由一个肌动蛋白运载着在微管上行走. 其角度变化幅度都很小, 证实金纳米棒在水平和垂直方向没有随机转动. 该现象与 Hua 等^[59]在溶液中的实验结果一致, 说明金纳米棒被肌动蛋白运载迁移时其空间构型变化不大.

Xiao 等^[38]利用双波长 DFM 通过离焦纵模追踪单个金纳米棒的高速平移和旋转运动, 监测到了发生在用转铁蛋白修饰的金纳米棒与细胞膜之间的动态作用. 研究发现, 金纳米棒的平移运动主要是受到与细胞膜上的铆接点的运动控制. 而且, 旋转扩散运动与配体-受体的成簇过程有关. 在单颗粒的水平上, 这两个过程在空间和时间上都是相互独立的. 这对于理解纳米载体的运输机理和对新型载体的设计都有很大的帮助. 这种全方位的角度分辨和纳米级的定位能力能够应用到其他生物学领域, 如细胞内分子马达的追踪、蛋白质构型的监测等.

(2) 细胞内吞跨膜输运过程研究

细胞内吞过程是通过细胞膜内陷形变将细胞外的物质摄入细胞内的过程, 不仅是为了摄取营养物质, 而且在调控膜上蛋白活性(如信号转导因子、小分子转运因子、离子通道)、细胞迁移和有丝分裂过程中起到重要作用^[60]. 细胞内吞也是病毒和细菌进入细胞的主要方式^[61]. 纳米粒子的内吞机制是非常复杂的, 不仅涉及流动的脂质双层膜、膜上的蛋白质分子, 还需要其他细胞成分和细胞外结构的参与^[60]. 在单分子水平研究纳米颗粒和细胞的相互作用有助于深入了解纳米颗粒的细胞摄取机制, 包括内吞路径、中间状态和特殊事件等^[61].

近年来, 用功能化纳米材料作为靶向药物和基因载体, 在癌症治疗中受到广泛的重视. 金纳米棒作为方向探针, 研究其在膜上的动态机制, 不仅能够为这些药物载体的设计和其内吞效率的调控提供有价值的信息, 而且还可以认识膜的组织结构^[62].

Xu 等^[49]在 DFM 光路中加一双折射晶体, 给出了获得金纳米棒三维方向的方法. 将显微镜焦面聚焦在细胞侧壁位置能够很好地对金纳米棒在和细胞相互作用中跨膜过程的方向动态行为进行监测. 在细胞侧壁成像, 提高了信噪比. 在细胞顶部成像时, 来自于细胞成分和细胞外环境的运动纳米颗粒的散射背景很强^[63], 会影响它们在膜上的空间定位和旋转行为示踪. 通过旋转研究发现, 金纳米棒在跨膜时, 要经历吸附在细胞膜表面、受细胞膜强烈限制、从细

胞膜解吸附三个过程. 对于蛋白质包裹的金纳米棒, 颗粒带负电, 为了降低内吞过程所消耗的能量, 降低细胞膜的弹性形变, 一维纳米材料更倾向于通过端点与细胞膜接触, 需要以 90°垂直于细胞膜的方式进入细胞^[64,65]. 根据金纳米棒在细胞膜上三个过程发生的动态行为, 他们给出了金纳米棒跨膜的全过程: ① 金纳米棒完全受限在细胞膜上, 可能细胞膜已经形成了囊泡, 这时囊泡紧紧地包裹住金纳米棒, 囊泡还没有完全封口, 并与细胞膜连成一体; ② 金纳米棒发生了两次明显摆动, 此时囊泡已经完全形成, 并达到封闭状态, 囊泡作为一个整体开始从细胞内壁脱离; ③ 金纳米棒开始迅速发生转动, 离开最初位置, 并发生定向运动, 最后, 金纳米棒在细胞内部的微管上发生定向运动.

Wang 等^[66]利用三维的暗场照明成像系统, 研究了尺寸依赖的纳米颗粒的内吞行为. 他们发现, 45 nm 的颗粒具有最快的内吞速度, 累积于细胞的囊泡中, 适合被应用于基因或药物载体. 而较大的颗粒(75 nm)在细胞膜上运动较慢, 更适合被用于重构细胞膜的形貌.

Morris 等^[67]采用 DIC 成像, 利用平均尺寸为 25 nm×73 nm 的金纳米棒装载细胞穿透肽(CPP)和转铁蛋白. 这两种不同的表面改性技术, 使细胞膜上纳米粒子的旋转行为出现明显差异. 他们研究了金纳米棒进入人肺癌细胞 A549 形成胞吞囊泡, 沿细胞骨架轨道运输的全过程^[67]. Sun 等^[34]利用双模式 DIC/荧光显微镜, 不仅记录了金纳米棒胞吞囊泡在由 13 根原纤维形成中空细胞微管的胞内运输, 还对胞吞囊泡内的金纳米棒布朗运动和旋转进行了动态定位和视频监测, 并完整记录了含有金纳米棒囊泡的胞内转运过程、从进入细胞壁到纳米棒与细胞膜接触的黏附过程、微管输运直到脱离微管轨道的全过程.

5.2.2 自由溶液中单分子的示踪

自由溶液中的单分子示踪研究, 是活体内体液中单分子行为研究的基础. 已有研究表明, 可以实时追踪水溶液中链霉抗生物素蛋白和免疫球蛋白的运动. 所得结果与荧光相关光谱和理论推测相近, 生物分子在水溶液中的扩散速度比细胞内快很多, 常规方法难以追踪, 监测单个分子在水溶液中的运动行为, 利用金纳米棒作为方向探针引起了人们的普遍关注.

Xiao 等^[48]利用 67 nm×36 nm 的金纳米棒, 表面分别用 CTAB 和 PEG 修饰, 在溶液和活细胞中, 直接跟踪各向异性纳米粒子的旋转和平移扩散动力学行为, 实现三维角分辨能力. 研究发现, CTAB 修饰的金纳米棒旋转的度数明显大于 PEG 修饰的金纳米棒. 说明长链的 PEG 分子极大程度上抑制了金纳米棒的旋转, 同时发现这些纳米棒在溶液中的旋转行为在三维空间上是随机的. 在纯甘油溶液中, 金纳米棒的自由扩散运动受到了明显的限制. 并对这两种不同修饰的金纳米棒的旋转行为进行定量分析, 通过计算角度随着时间变化的自相关函数, 获得了金纳米棒的旋转系数. 该方法是一种简便的可以快速提取单个金纳米棒三维方向信息的方法. 其不仅适用于溶液中的金纳米棒, 还可以应用于噪音很强的活细胞体系中. 该技术有望用于分子生物学领域, 如用来研究纳米尺度上的一些蛋白质的运动行为等. Chaudhari 等^[23]利用 DFM, 捕捉到了在 PEG 溶液中自由移动的单个 AuNR_{30×10} 的图像, 当 AuNR 与 PEG 混合时, 可能是化学吸附物使其 SPR 值变宽, 并使 TSPR(横向 SPR)值不为零, TSPR 非零提供了一种有效的方法来区分定向移动和沿 Z 轴移动. 他们利用颜色的改变来判断其方向, 二维高斯曲线宽度(W_g)可以用来确定其沿 Z 轴的运动, 只有当 AuNR 沿着 Z 轴运动时, W_g 值会减小 60%.

5.2.3 液固界面上单个纳米颗粒方向动态行为

研究单分子或者单颗粒在界面上的行为对生物传感、生物制药、材料科学和色谱分离等很多领域^[68]具有很重要的价值. 为了实现这个目标, 科研工作者发展了非损伤性的单分子光学成像技术, 利用这种技术实时研究单个分子和功能化界面的相互作用^[69]. 通过如光强、光谱、停滞时间、轨迹、扩散系数等参数在时间和空间上的变化, 研究界面上分子动态行为^[70,71], 更好地控制分子与界面的相互作用. 蛋白质分子与界面的相互作用导致的其构型变化、蛋白质分子方向和旋转状态的变化, 非常快速^[72], 目前二维检测器还没有达到这么高的检测能力.

Pierrat 等^[73]利用聚合物包覆的金纳米棒的横向

振动监测了附着在固体载体上的人工生物膜的扩散和旋转. 金纳米棒由生物素链霉素亲和素受体-配体系统介导的, 测量了 0.5 μm^2 范围内金纳米棒 2D 横向扩散的扩散系数, 这种横向运动随与链霉素亲和素的添加显著降低. 但粒子仍然是可以转动的. 使用偏振镜研究金纳米棒的旋转运动, 结果发现, 金纳米棒在人工膜上扩散时间为 100 ms 范围内的旋转取决于膜生物素的浓度、温度和锚点的数量等因素.

Xu 等^[74]使用双通道偏振 DFM 研究了蛋白包裹的单个金纳米棒的方向动态, 确定了 4 种不同的旋转状态. 这 4 种状态反映了金棒和疏水界面作用力的大小. 这些状态的分布是随着洗脱液盐浓度的改变而变化的. 实时研究单个纳米颗粒的洗脱过程证明了大分子或者纳米颗粒从表面解吸附要经过一系列的方向调整和旋转状态的改变. 虽然体系中用的金纳米棒比一般蛋白质分子大, 旋转得慢, 但是它们的界面动力学仍然反映了吸附在表面上的弹性蛋白结构变化、接触位点的改变和表面作用力大小的改变. 蛋白分子也是由许多疏水区域和带电荷部分组成的, 在解吸附过程仍然经历从面内转到面外转, 从多位点接触到单位点接触的过程. 从旋转的角度对吸附和解吸附产生了新的认知. 这种方法可以用来研究各种领域的界面问题.

6 结语

单个金纳米棒作为方向探针的光学成像技术是单分子检测技术的一种, 其具有通量高、参数多样、可实时动态监测等优点. 其实际应用可分为溶液体系和细胞体系, 即体外和体内. 通常的研究思路是先体外再体内, 先证实方法可靠性再拓展至实际体系, 按这样的逻辑思维, 不难理解未来的单分子 3D 成像技术甚至单分子检测技术的发展方向正在向仪器设备的实用化和简易化、测量参数的精确化和可视化、研究范围的广泛化和复杂化等方面发展. 未来几年, 单分子 3D 成像的研究重点可能会集中在实用定量突破衍射极限的距离测量、3D 角度实时监测、重要生物过程的机理探索和纳米目标物的表征等方面.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(50375102)和沈阳工业大学博士后启动基金(521101302)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Kukura P, Ewers H, Müller C, Renn A, Helenius A, Sandoghdar V. High-speed nanoscopic tracking of the position and orientation of a single virus. *Nat Methods*, 2009, 6: 923–927
- 2 Frantsuzov P, Kuno M, Janko B, Marcus RA. Universal emission intermittency in quantum dots, nanorods and nanowires. *Nat Phys*, 2008, 4: 519–522
- 3 Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, Baxter SC. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 1721–1730
- 4 Zijlstra P, Chon JWM, Gu M. Five-dimensional optical recording mediated by surface plasmons in gold nanorods. *Nature*, 2009, 459: 410–413
- 5 Spetzler D, York J, Daniel D, Fromme R, Lowry D, Frasch W. Microsecond time scale rotation measurements of single F1-ATPase molecules. *Biochemistry*, 2006, 45: 3117–3124
- 6 杨玉东, 刘公召, 李冬至, 徐菁华, 杨林梅. 金纳米棒: 性能、制备、修饰、生物成像技术及应用. 科学通报, 2015, 60: 817–829
- 7 杨玉东, 刘公召, 徐菁华, 杨林梅, 李冬至. 金纳米棒: 合成、修饰、自组装、SERS 及生物医学应用. 中国科学: 化学, 2015, 45: 581–596
- 8 Rycenga M, Cobley CM, Zeng J, Li W, Moran CH, Zhang Q, Xia Y. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chem Rev*, 2011, 111: 3669–3712
- 9 杨玉东, 徐菁华, 杨林梅, 潘卫三. 金纳米棒的光学性质及其在癌症诊断和光热疗法中的应用. 应用激光, 2009, 29: 260–264
- 10 Pérez-Juste J, Rodríguez-González B, Mulvaney P, Liz-Marzán LM. Optical control and patterning of gold-nanorod-poly(vinyl alcohol) nanocomposite films. *Adv Funct Mater*, 2005, 15: 1065–1071
- 11 Li J, Liu S, Liu Y, Zhou F, Li ZY. Anisotropic and enhanced absorptive nonlinearities in a macroscopic film induced by aligned gold nanorods. *Appl Phys Lett*, 2010, 96: 260103
- 12 Sönnichsen C, Franzl T, Wilk T, von Plessen G, Feldmann J, Wilson O, Mulvaney P. Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods. *Phys Rev Lett*, 2002, 88: 077402
- 13 Sönnichsen C, Alivisatos AP. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Lett*, 2005, 5: 301–304
- 14 Chang WS, Ha JW, Slaughter LS, Link S. Plasmonic nanorod absorbers as orientation sensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 2781–2786
- 15 Huang Y, Kim DH. Dark-field microscopy studies of polarization-dependent plasmonic resonance of single gold nanorods: rainbow nanoparticles. *Nanoscale*, 2011, 3: 3228–3232
- 16 Jun Y, Sheikholeslami S, Hostetter DR, Tajon C, Craik CS, Alivisatos AP. Continuous imaging of plasmon rulers in live cells reveals early-stage caspase-3 activation at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 17735–17740
- 17 van Dijk MA, Tchegobtareva AL, Orrit M, Lippitz M, Berciaud S, Lasne D, Lounis B. Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Phys Chem Chem Phys*, 2006, 8: 3486–3495
- 18 Ha JW, Sun W, Wang G, Fang N. Differential interference contrast polarization anisotropy for tracking rotational dynamics of gold nanorods. *Chem Commun*, 2011, 47: 7743–7745
- 19 Ha JW, Sun W, Stender AS, Fang N. Dual-wavelength detection of rotational diffusion of single anisotropic nanocarriers on live cell membranes. *J Phys Chem C*, 2012, 116: 2766–2771
- 20 Li T, Li Q, Xu Y, Chen XJ, Dai QF, Liu H, Wu LJ. Three-dimensional orientation sensors by defocused imaging of gold nanorods through an ordinary wide-field microscope. *ACS Nano*, 2012, 6: 1268–1277
- 21 Ishmukhametov R, Hornung T, Spetzler D, Frasch WD. Direct observation of stepped proteolipid ring rotation in E. coli FoF1-ATP synthase. *Embo J*, 2010, 29: 3911–3923
- 22 Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 1997, 386: 299–302
- 23 Chaudhari K, Pradeep T. Spatiotemporal mapping of three dimensional rotational dynamics of single ultrasmall gold nanorods. *Sci Rep*, 2014, 4: 5948
- 24 Biswas S, Nepal D, Park K, Vaia RA. Rientation sensing with color using plasmonic gold nanorods and assemblies. *J Phys Chem Lett*, 2012, 3: 2568–2574
- 25 Wang H, Huff TB, Zweifel DA, He W, Low PS, Wei A, Cheng JX. *In vitro* and *in vivo* two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 15752–15756
- 26 Berciaud S, Cognet L, Blab GA, Lounis B. Photothermal heterodyne imaging of individual nonfluorescent nanoclusters and nanocrystals.

Phys Rev Lett, 2004, 93: 257402

- 27 Hu M, Novo C, Funston A, Wang H, Staleva H, Zou S, Hartland GV. Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. *J Mater Chem*, 2008, 18: 1949–1960
- 28 Failla AV, Qian H, Qian H, Hartschuh A, Meixner AJ. Orientational imaging of subwavelength Au particles with higher order laser modes. *Nano Lett*, 2006, 6: 1374–1378
- 29 Züchner T, Failla AV, Steiner M, Meixner AJ. Probing dielectric interfaces on the nanoscale with elastic scattering patterns of single gold nanorods. *Opt Express*, 2008, 16: 14635–14644
- 30 Gu Y, Sun W, Wang G, Fang N. Single particle orientation and rotation tracking discloses distinctive rotational dynamics of drug delivery vectors on live cell membranes. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 5720–5723
- 31 Wang G, Sun W, Luo Y, Fang N. Resolving rotational motions of nano-objects in engineered environments and live cells with gold nanorods and differential interference contrast microscopy. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 16417–16422
- 32 Xiao L, Ha JW, Wei L, Wang G, Fang N. Determining the full three-dimensional orientation of single anisotropic nanoparticles by differential interference contrast microscopy. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 7734–7738
- 33 Chen K, Lin CC, Vela J, Fang N. Multishell Au/Ag/SiO₂ nanorods with tunable optical properties as single particle orientation and rotational tracking probes. *Anal Chem*, 2015, 87: 4096–4099
- 34 Sun W, Gu Y, Wang G, Fang N. Dual-modality single particle orientation and rotational tracking of intracellular transport of nanocargos. *Anal Chem*, 2011, 84: 1134–1138
- 35 Gu Y, Wang G, Fang N. Simultaneous single-particle superlocalization and rotational tracking. *ACS Nano*, 2013, 7: 1658–1665
- 36 Xiao L, Qiao Y, He Y, Yeung ES. Three dimensional orientational imaging of nanoparticles with darkfield microscopy. *Anal Chem*, 2010, 82: 5268–5274
- 37 Aguet F, Geissbühler S, Märki I, Lasser T, Unser M. Super-resolution orientation estimation and localization of fluorescent dipoles using 3-D steerable filters. *Opt Express*, 2009, 17: 6829–6848
- 38 Xiao L, Wei L, Liu C, He Y, Yeung ES. Unsynchronized translational and rotational diffusion of nanocargo on a living cell membrane. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 4181–4184
- 39 Xiao L, Yeung ES. Optical imaging of individual plasmonic nanoparticles in biological samples. *Ann Rev Anal Chem*, 2014, 7: 89–111
- 40 Toprak E, Enderlein J, Syed S, McKinney SA, Petschek RG, Ha T, Selvin PR. Defocused orientation and position imaging (DOPI) of myosin V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6495–6499
- 41 Ha JW, Marchuk K, Fang N. Focused orientation and position imaging (FOPI) of single anisotropic plasmonic nanoparticles by total internal reflection scattering microscopy. *Nano Lett*, 2012, 12: 4282–4288
- 42 Ueno H, Nishikawa S, Iino R, Tabata KV, Sakakihara S, Yanagida T, Noji H. Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution. *Biophys J*, 2010, 98: 2014–2023
- 43 Ament I, Prasad J, Henkel A, Schmachtel S, Sönnichsen C. Single unlabeled protein detection on individual plasmonic nanoparticles. *Nano Lett*, 2012, 12: 1092–1095
- 44 Herrmann LO, Baumberg JJ. Watching single nanoparticles grow in real time through supercontinuum spectroscopy. *Small*, 2013, 9: 3743–3747
- 45 Xiao L, Wei L, Cheng X, He Y, Yeung ES. Noise-free dual-wavelength difference imaging of plasmonic resonant nanoparticles in living cells. *Anal Chem*, 2011, 83: 7340–7347
- 46 Fish KN. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Curr Protoc Cytom*, 2009, 10: 12–18
- 47 Pierrat S, Hartinger E, Faiss S, Janshoff A, Sönnichsen C. Rotational dynamics of laterally frozen nanoparticles specifically attached to biomembranes. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 11179–11183
- 48 Xiao L, Qiao Y, He Y, Yeung ES. Imaging translational and rotational diffusion of single anisotropic nanoparticles with planar illumination microscopy. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 10638–10645
- 49 Xu D, He Y, Yeung ES. Direct Imaging of transmembrane dynamics of single nanoparticles with darkfield microscopy: improved orientation tracking at cell sidewall. *Anal Chem*, 2014, 86: 3397–3404
- 50 Cao CJ, Li DR, Chen CX, Yang XY, Hu J, Yang Y, Zhang CY. Multimodal optical microscopy in combination with gold nanorods for cancer cell imaging. *J Biomed Opt*, 2012, 17: 126002–126002
- 51 Link S, Chang WS, Yethiraj A, Barbara PF. Orthogonal orientations for solvation of polymer molecules in smectic solvents. *Phys Rev Lett*, 2006, 96: 017801
- 52 Enoki S, Iino R, Niitani Y, Minagawa Y, Tomishige M, Noji H. High-speed angle-resolved imaging of a single gold nanorod with

- microsecond temporal resolution and one-degree angle prec. *Anal Chem*, 2015, 87: 2079–2086
- 53 Whitty A. Cooperativity and biological complexity. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 435–439
- 54 Edidin M. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 492–496
- 55 Gu Y, Sun W, Wang G, Jeftinija K, Jeftinija S, Fang N. Rotational dynamics of cargos at pauses during axonal transport. *Nat Commun*, 2012, 3: 1030
- 56 Gu Y, Sun W, Wang G, Zimmermann MT, Jernigan RL, Fang N. Revealing rotational modes of functionalized gold nanorods on live cell membranes. *Small*, 2013, 9: 785–792
- 57 肖乐辉. 基于单分子光谱技术的功能纳米材料成像研究. 博士学位论文. 湖南: 湖南大学, 2011
- 58 Courty S, Luccardini C, Bellaiche Y, Cappello G, Dahan M. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano Lett*, 2006, 6: 1491–1495
- 59 Hua W, Chung J, Gelles J. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*, 2002, 295: 844–848
- 60 Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Ann Rev Biochem*, 2009, 78: 857–902
- 61 Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Ann Rev Biochem*, 2010, 79: 803–833
- 62 Chen LQ, Xiao SJ, Hu PP, Peng L, Ma J, Luo LF, Huang CZ. Aptamer-mediated nanoparticle-based protein labeling platform for intracellular imaging and tracking endocytosis dynamics. *Anal Chem*, 2012, 84: 3099–3110
- 63 Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J*, 2006, 25: 3446–3457
- 64 Cureton DK, Massol RH, Saffarian S, Kirchhausen TL, Whelan SP. Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *Plos Pathog*, 2009, 5: e1000394
- 65 Yang K, Ma YQ. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 579–583
- 66 Wang SH, Lee CW, Chiou A, Wei PK. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J Nanobiotechnol*, 2010, 8: 33
- 67 Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol*, 2009, 157: 195–206
- 68 Schwierz N, Horinek D, Liese S, Pirzer T, Balzer BN, Hugel T, Netz RR. On the relationship between peptide adsorption resistance and surface contact angle: a combined experimental and simulation single-molecule study. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 19628–19638
- 69 Wirth MJ, Legg MA. Single-molecule probing of adsorption and diffusion on silica surfaces. *Ann Rev Phys Chem*, 2007: 489–510
- 70 Kastantin M, Walder R, Schwartz DK. Identifying mechanisms of interfacial dynamics using single-molecule tracking. *Langmuir*, 2012, 28: 12443–12456
- 71 Myers GA, Gacek DA, Peterson EM, Fox CB, Harris JM. Microscopic rates of peptide-phospholipid bilayer interactions from single-molecule residence times. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 19652–19660
- 72 Zhang L, Zhao GF, Sun Y. Molecular insight into protein conformational transition in hydrophobic charge induction chromatography: a molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B*, 2009, 113: 6873–6880
- 73 Pierrat S, Hartinger E, Faiss S, Janshoff A, Sönnichsen C. Rotational dynamics of laterally frozen nanoparticles specifically attached to biomembranes. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 11179–11183
- 74 Xu D, He Y, Yeung ES. Direct observation of the orientation dynamics of single protein-coated nanoparticles at liquid/solid interfaces. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 6951–6955

Polarization properties of gold nanorod and its applications in single-molecule level imaging as a direction probe

Yudong Yang^{*}, Gongzhao Liu, Dongzhi Li, Jinghua Xu, Linmei Yang

School of Science, Shenyang University of Technology, Shenyang 110870, China

^{*}Corresponding author (email: songzx07@163.com)

Abstract: With the development of biomedicine, since higher resolution capability of biomedical imaging system is needed, the nanometer material and technology are increasingly applied in biomedical fields. Due to the high electron density, large absorption cross section, special surface plasma resonance, good bio-compatibility and chemical stability, anisotropic gold nanorods are widely used in the field of biological imaging. It is essential for us to understand the details of a lot of biophysics process with the position and dynamic space imaging of the nanoscale target inside the complex living cells. In this paper, from the local plasma resonance of gold nanorods and polarization characteristics, we summary the tracking 3D imaging techniques and methods of gold nanorods as a direction probe, with our experience in the field of study. These details include the techniques of dark field scattering imaging, differential interference, photo thermography and confocal microscopy, and the methods of bokeh imaging, total internal reflection imaging and dual channels. Finally, the application progress of gold nanorods as a direction probe in biological imaging is described.

Keywords: gold nanorods, biomedical science, single molecule orientation, 3D tracking