中国科学: 化学 2017 年 第 47 卷 第 10 期: 1161 ~ 1169
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述

定量单分子检测研究进展

胡娟†, 王子月†, 张春阳*

山东师范大学化学化工与材料科学学院, 济南 250014
†同等贡献
*通讯作者, E-mail: cyzhang@sdnu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-24; 接受日期: 2017-05-19; 网络版发表日期: 2017-07-28
国家杰出青年科学基金(编号: 21325523)和科技部重点领域创新团队(编号: 2015RA4024)资助项目

摘要 单分子检测是指在单分子水平上通过生物分子的构象变化、动力学、分子之间相互作用以及对单个分子进行操纵等方式进行检测. 作为一种新型超灵敏检测手段, 单分子检测在生物分子的定量检测领域有广阔的应用前景, 尤其单分子荧光检测技术, 近年来取得了很大进展, 被广泛用于研究多种生物体系. 本文对定量单分子检测的最新研究进展进行了系统综述, 主要聚焦于定量单分子检测在生物标志物(包括DNA、酶和miRNA等)的超灵敏检测研究中的应用, 及其在研究生物分子结构与动态、生物分子间相互作用、生物分子修饰和活细胞检测等方面的应用, 本文也对定量单分子检测的发展方向进行了展望.

关键词 单分子检测, 超灵敏检测, 生物标志物, 荧光共振能量转移, 量子点

1 引言

传统的生物学研究是基于对大量分子在一段时间内平均行为的描述, 导致单个生物分子的行为被平均化, 无法对单个分子结构和功能进行系统研究. 随着20世纪80年代扫描隧道显微术(scanning tunneling microscopy, STM)的发现, 研究者逐渐创立了单分子检测(single-molecule detection, SMD)技术, 实现了对单个分子的研究[1]. 单分子检测是指在单分子水平上通过生物分子的构象变化、动力学、分子之间相互作用以及对单个分子进行操纵等方式进行检测[2], 是一种新型的超灵敏检测手段[3], 在生物分子的定量检测领域有广阔应用前景[4]. 单分子检测技术发展迅速, 从只能在低温、真空条件下进行检测发展到现在可以在常温溶液中研究单个分子的反应动力学过程和机制[5]. 目前, 单分子检测技术可以分为两类: 一类是荧光成像(包括离体和在体成像)及光谱学[6], 另一类是基于力学的操作和检测(包括光阱、磁阱、原子力显微镜及纳米孔等)[7].

在单分子检测技术中, 单分子荧光检测技术发展尤为迅速. Yanagida等[8]于1995 年报道了溶液中单个荧光分子的检测; Ha等[9]于1996年建立了基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的单分子检测方法; Schindler等[10]于2000年报道了单分子示踪荧光标记脂质分子在肌肉细胞膜上的运动. 如今, 单分子荧光检测技术已经取得了很大进展, 广泛应用于研究多种生物体系. 与传统荧光方法相比, 单分子荧光检测具有信噪比高、灵敏度高和样品消耗少等优点, 可以对单个分子、微粒、细胞及病毒等进行检测和成像[11], 并且可以通过实时监测生化反应

引用格式: 胡娟, 王子月, 张春阳. 定量单分子检测研究进展. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1161–1169
Hu J, Wang ZY, Zhang CY. Advance in quantitative single-molecule detection. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1161–1169, doi: 10.1360/N032017-00074

© 2017 《中国科学》杂志社

过程研究分子结构与功能之间的关系[12]. 另外, 单分子荧光检测观测到的是单个分子的个体行为, 可用于研究在溶液中极难观察到的小概率事件、动力学慢事件和异常分布等[13,14].

近年来, 随着单分子技术的发展, 定量单分子检测技术越来越广泛地被应用于生物标志物的超灵敏检测[15]、RNA分子结构折叠[16]和蛋白质结构折叠[17]及其动态过程[18,19]等生物学研究领域[20]. 本文将定量单分子检测领域分为生物标志物检测和其他生物学研究两大类, 对定量单分子检测领域的最新研究进展进行了系统综述. 生物标志物包括DNA[21~26]、酶[27~30]、miRNA (microRNA)[31~34]等, 其他生物学研究包括生物分子结构与动态[35~40]、生物分子间相互作用[41~47]、生物分子修饰[48~51]和活细胞检测[52~54]等.

2 定量单分子检测在生物标志物超灵敏检测领域的应用

生物标志物尤其是与重大疾病相关的生物标志物在人体内的含量与多种生物学过程密切相关[55]. 这些生物标志物在疾病发生的早期阶段含量较低, 传统方法难以实现准确有效地检测分析[56]. 单分子检测技术在该领域发挥着重要作用, 已成功应用于超灵敏检测DNA、酶和miRNA等[57].

2.1 超灵敏检测DNA

DNA序列的变化与阿尔茨海默症、癌症等多种疾病密切相关[58],可应用于临床诊断和基因治疗等[59]. YOYO、TOTO、SYBR Green等荧光染料对核酸具有高度亲和力[60], 可作为双链DNA的嵌入剂通过静电吸附的方式插入核酸碳骨架[61], 导致荧光强度增强一千倍以上, 广泛应用于DNA的定量检测. Liu等[21]利用荧光染料TOTO-3标记DNA, 用共聚焦显微镜进行单分子检测, 建立DNA长度与光子爆发之间的关系. 该方法可直接用于病人血清样品中游离循环核酸的检测. 另外, 酶产物的荧光信号可用于直接检测DNA. Li等[22]在光纤阵列上刻蚀制作fL级别的反应池, 在其中修饰核酸探针以捕获生物素标记的目标DNA, 所得产物与链霉亲和素标记的酶进行反应. 当加入过量酶底物时, 结合的酶分子可进行单个催化反应, 生成可检测的荧光分子. 该方法样品消耗量极小、灵敏度高、检测限可达1 fmol/L.

量子点(quantum dot, QD)是一种新型半导体荧光纳米颗粒[62], 具有亮度高、耐漂白和荧光寿命长、量子产率高、吸收光谱宽和发射光谱窄等特性[63]. 基于双色量子点的单分子检测技术可应用于核酸的超灵敏检测[64,65]. 525 mm发射波长的荧光微球(525 Bead)和655 mm发射波长的量子点(655 QD)可用作双色荧光标记物分别连接于两种DNA 探针(Probe 1 和Probe 2). 探针1和探针2与目标检测物DNA杂交形成三明治复合结构, 导致525 Bead与655 QD特征波长的光信号在双检测通道同时被检出. 这种单分子检测技术具有分析时间短、无需分离等优点, 可以显著提高核酸检测的灵敏度, 检测限达5.0 fmol/L, 并可进一步拓展至蛋白质与病毒分子的检测[23].

序列扩增技术与单分子检测技术相结合可实现生物标志物的超灵敏检测. Tanaka等[24]将挂锁探针与滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)相结合进行DNA单分子检测. 当目标探针存在时, 其与挂锁探针进行杂交形成环形模板, 在微通道表面进行RCA反应, 生成具有许多重复片段的产物. 随后该产物与Alexa594荧光分子标记的DNA探针杂交, 通过记录产生的荧光信号可实现对目标DNA的检测. 该方法样品消耗量小(从原来的几百微升变为5纳升), 且最高检测效率可达22.5%. 由于生成的RCA扩增产物是长单链DNA, 在被荧光染料SYBR Green I标记之后会产生强荧光信号, 该方法可用于单核苷酸多态性分析[25].

近年来, Zhang课题组[26]将脂质体包裹的量子点与单分子检测技术相结合, 实现了DNA的超灵敏检测(图1). 该方法分别利用脂质体-量子点复合物和磁珠来修饰报告探针和捕获探针. 目标DNA的存在能导致三明治杂交反应, 后经磁性分离纯化结合目标DNA的脂质体-量子点复合物, 并对其释放出的量子点进行单个粒子计数. 该方法检测限低至1 amol/L, 灵敏度较基于单个量子点标记DNA探针的方法提高了3个数量级, 较基于荧光微球标记DNA探针的方法提高了5个数量级, 并可进一步用于同时检测多种目标DNA分子.

2.2 超灵敏检测酶活性

生物体中的酶种类众多, 且与各类生命过程关系密切, 多种酶活性的异常变化可能会引发重大疾病[66]. 例如, 血浆肾素活性是评估高血压、充血性心力衰竭、癌症等疾病的重要指标[67]; 端粒酶是一种核蛋白逆转录酶, 能增强细胞的增殖能力, 若端粒酶活

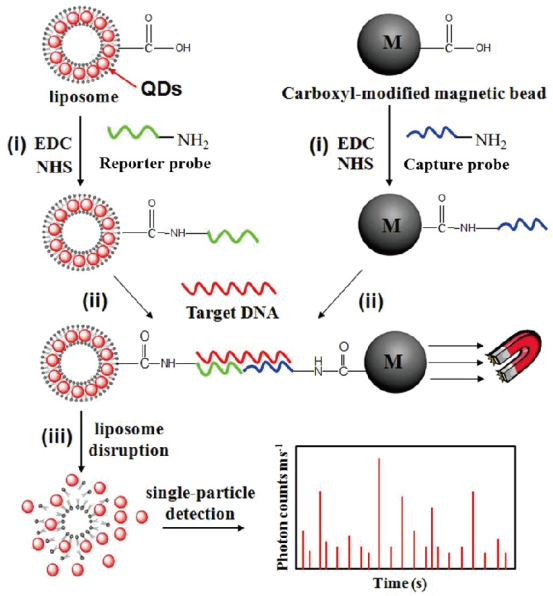


图 1　脂质体-量子点复合物和单颗粒检测技术相结合对低浓度DNA进行超灵敏检测示意图[26](网络版彩图)

性被激活, 将导致细胞无限分裂甚至引发癌症[68]; 蛋白激酶在细胞内信号传导和代谢过程中发挥着重要的作用, 蛋白激酶活性的监测对相关疾病的诊断和治疗意义重大[69]; DNA糖基化酶是细胞碱基切除修复的起始酶, 其异常表达与人类多种疾病相关. 因此, 酶活性的超灵敏检测成为重大疾病临床诊断和治疗的迫切要求[70].

FRET是生物学研究的常用工具[71]. 当供体和受体荧光分子在相近的距离范围(通常为2~8 nm)时, 能量通过偶极-偶极相互作用, 从供体分子转移至受体分子[72], 引起供体荧光分子发射光谱的减弱, 并伴随受体分子发射光谱的增强. 量子点可以用作FRET研究中的能量供体[73~75]. Zhang课题组[27]将基于单个量子点的FRET与单分子检测技术相结合实现肾素的超灵敏检测. 多肽分子两端被分别标记上生物素和荧光分子. 当目标检测物肾素不存在时, 多肽末端的生物素与量子点上的链霉亲和素结合, 导致多肽上的荧光分子与量子点之间产生FRET信号. 当肾素存在时, 多肽被消化, 导致多肽末端的荧光分子无法结合到量子点表面, 因而无FRET信号产生. 该方法操作简单、样品用量少、灵敏度高, 检测限达25 pmol/L.

Zhang课题组[28]还利用基于单个量子点的生物传感器对端粒酶活性进行超灵敏检测. 端粒酶能引发延伸反应, 在引物的3'端引入Cy5-三磷酸腺嘌呤脱氧核苷酸(dATP), 随后Cy5标记的引物与生物素化的捕获探针杂交, 并自组装到QD表面, 导致QD与Cy5之间发生FRET. 通过检测Cy5 信号可实现端粒酶活性的定量检测. 该方法无需扩增步骤, 灵敏度高, 检测限达7细胞/μL, 并且可以用于筛选端粒酶抑制剂.

近年来, Zhang课题组[29]基于蛋白激酶(protein kinase, PKA)能将三磷酸腺苷(ATP)的磷酸基团转移到蛋白质氨基酸残基上进行磷酸化的原理, 构建了基于单个量子点的纳米传感器, 可对PKA进行超灵敏度检测(图2). γ-生物素-ATP可作为磷酰基供体, 经PKA催化与Cy5标记的多肽底物结合, 使多肽底物同时实现磷酸化和生物素化, 随后自组装到量子点表面, 导致QD与Cy5之间发生FRET. 通过检测Cy5信号可对PKA活性进行准确定量. 该方法无需洗涤和分离步骤、灵敏度高, 检测限达9.3×10^{-6} U/μL, 并且可以用来筛选PKA抑制剂和激活剂.

最近, Zhang课题组[30]发展了一种由碱基切除修复诱导的单个量子点传感器, 可在单分子水平上实现DNA糖基化酶活性的超灵敏检测(图3). 人8-氧桥鸟嘌呤-DNA糖基化酶1 (human 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1, hOGG1)能从DNA底物上除去受损的8-羟基鸟嘌呤, 生成一个无嘌呤/无嘧啶(AP)位点. 该AP位点被核酸内切酶切割后形成单核苷酸缺口, 在核酸聚合酶的作用下与Cy5标记的三磷酸鸟苷酸脱氧核苷酸(dGTP)反应, 生成Cy5标记的DNA底物. 该底物能自组装到QD表面, 导致QD和Cy5之间发生FRET. 通过检测Cy5信号可实现DNA 糖基化酶活性的定量分析. 该方法无需扩增、灵敏度高, 检测限低至1.8×10^{-6} U/μL, 并且可应用于酶反应动力学和细胞内DNA糖基化酶活性分析.

2.3　超灵敏检测miRNA

miRNA是一类非编码小分子单链RNA, 参与转录后基因的表达与调控[76], 可作为癌症诊断和预测的生物标记物, 也可作为新药物的潜在作用靶点. Ho等[31]将miRNA与互补的核酸探针杂交, 在杂交双链中插入荧光染料YOYO-1, 通过全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)观察杂交反应过程, 并实现对miRNA-205 的定量检测, 检测限可达500 fmol/L[32].

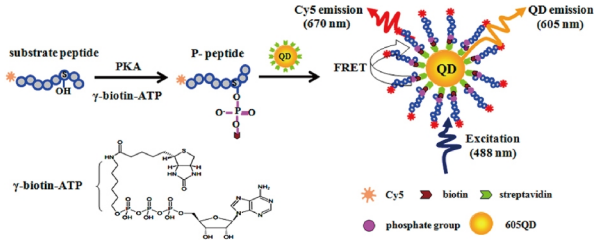


图 2　蛋白激酶分析示意图[29] (网络版彩图)

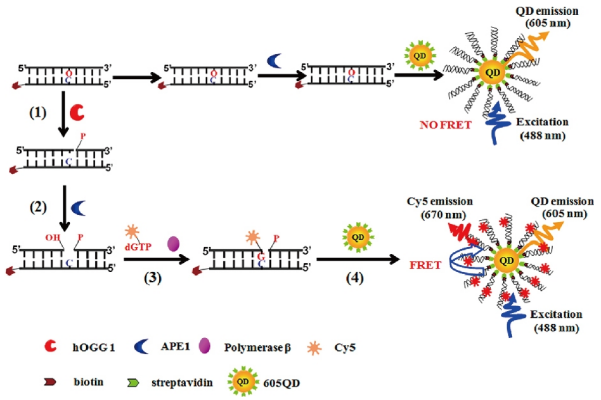


图 3　基于单个量子点的纳米传感器用于hOGG1分析的示意图[30] (网络版彩图)

Zhang课题组[33]将基于FRET的单分子检测与滚环扩增和酶切反应相结合, 用于分析非小细胞肺癌病人组织样品中mir-196a2的多态性. 当目标物以mir-196a2T形式存在时, mir-196a2T与挂锁探针连成环形, 引发滚环扩增, 扩增产物能与Cy5修饰的捕获探针杂交, 形成带有内切酶Nt.BstNBI切割位点的双链DNA, 导致捕获探针被酶切而释放Cy5. 因而, 量子点和Cy5之间不能产生FRET. 当目标miRNA以mir-196a2C形式存在时, 挂锁探针无法连成环形, 导致捕获探针不能被切断, 因而产生FRET. 该方法灵敏度高, 检测限低至50.9 amol/L, 动态范围达7个数量级(从0.1 fmol/L到1 nmol/L).

Zhang课题组[34]进一步将两步指数扩增和基于单个量子点FRET的单分子技术结合, 实现快速超灵敏检测miRNA (图4). 该方法包括两种模板和两步等温扩增反应. 模板1对目标miRNA进行扩增, 模板2对扩增产物进一步扩增并转换成报告寡核苷酸. 报告寡核苷酸能与捕获探针和指示探针结合形成三明治结构, 自组装到量子点的表面, 导致量子点和Cy5之间发生FRET. 该方法检测限达0.1 amol/L, 可用于分析miRNA家族中单核苷酸的多态性.

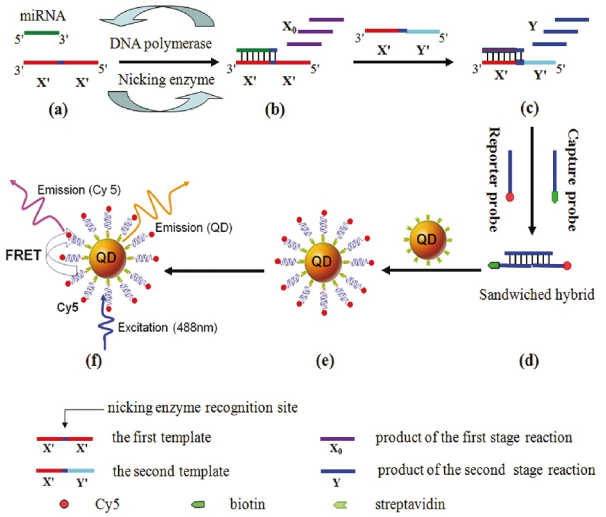


图 4　两步指数扩增和单个量子点纳米传感器相结合用于miRNA超灵敏检测的示意图[34] (网络版彩图)

3　定量单分子检测在其他生物学研究领域的应用

近年来, 单分子检测技术的应用范围不断拓展, 广泛应用于研究生物分子结构与动态、生物分子间相互作用、生物分子修饰、活细胞检测等众多领域.

3.1　生物分子结构与动态变化

基于FRET的单分子检测技术可预测分子间的距离[77]和研究生物分子空间的变化, 捕捉到常规方法无法提供的分子运动及构象动力学信息[78]. 随着单分子对FRET (single pair FRET, spFRET)技术的发展[9], 单分子检测技术应用于DNA/RNA折叠催化方面的研究取得了很大进展[79].

Ha等[35]利用FRET单分子检测技术研究核糖体蛋白S15和Mg^{2+}离子对三螺旋RNA结构变化的影响. 该课题组将受体和供体荧光分子分别标记在三螺旋RNA分子不同的螺旋结构上. 当核糖体蛋白S15、Mg^{2+}离子与三螺旋RNA分子相遇时, 核糖体蛋白S15可与三螺旋RNA分子的节点结合, 引起三螺旋结构发生改变, 拉近受体和供体荧光分子之间的距离, 从而诱发FRET, 使受体产生荧光信号. Zhuang等[36]利用FRET单分子检测技术研究发卡核糖体酶(一种RNA酶)的折叠动力学与功能之间的关系. RNA酶A链的3’末端和5’末端被分别标记上供体Cy3和受体Cy5, 然后通过RNA酶B链5’端标记的生物素将该酶固定于分子表面. 底物与

RNA酶结合形成的复合物随机裂变为两部分, 使供体和受体分离. 通过监测FRET效率的变化可研究RNA酶中间产物的多种折叠状态. Zhuang等[16]还研究了四膜虫核糖酶(一种大分子RNA酶)的折叠动力学与RNA酶催化过程中结构的变化, 通过FRET信号变化对催化过程中反应中间体的形态进行了研究[37].

单分子检测技术可在单分子水平上研究蛋白质折叠和蛋白质生物过程. Schuler等[38]将荧光供体和受体分子分别标记在冷休克蛋白的氨基和羧基末端, 用于研究蛋白质的表面自由能对蛋白质折叠的影响. 研究结果表明, 蛋白折叠过程中的自由能障碍不仅包括激活熵, 还包含动力过程. Rhoades等[39]将荧光供体分子和受体分子分别标记于腺甘酸激酶的203号和73号半胱氨酸残基, 用于研究单个腺甘酸激酶在中间过渡条件下的折叠过程. 另外, FRET单分子检测技术可应用于蛋白质折叠中疏水基团解离过程的研究[80]. 最近, Shen等[40]利用定量单分子检测技术发现了一种信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP) RNA帮助蛋白运动的过程(图5). 大肠杆菌SRP-SRP受体三磷酸鸟苷(GTP)酶复合物(Ffh-FtsY GTPase)的蛋白质亚基Fts被标记上供体Cy3, 在RNA链的末端标记上受体Quasar 670. 利用单分子荧光显微镜可观察到复合物在SRP RNA四环末端组装, 随后移动到RNA链的末端并发生GTP快速水解的过程. 研究结果表明, RNA可以作为分子支架协助蛋白运动.

3.2　生物分子间的相互作用

单分子检测技术具有灵敏度高和可监测单个复合物动力学的优势, 可应用于研究生物分子间的相互作用. 目前, miRNA的种子序列(seed region)与目标mRNA的识别机理仍有待深入探讨. Zhang课题组[41]利用单分子FRET技术实时研究与人类miRNA诱导的沉默复合物(miRISC)相关的miRNA-目标识别机理. 研究结果表明, miRISC在调节种子序列错配中的结构可塑性, miRNA与完全碱基配对的目标物质以双态模式进行识别, 以守恒模式指导RNA/DNA链的识别.

FRET单分子检测技术可用于在单分子水平上研究染料标记双链DNA之间的相互作用[42]. FRET与单分子光谱/时间相关单分子技术及微流控系统相结合, 可应用于研究蛋白质与蛋白质之间的相互作用[43,44]. 基于单个量子点FRET的纳米生物传感器可应用于研究RNA与多肽的相互作用及药物筛选[45]. 另外, FRET

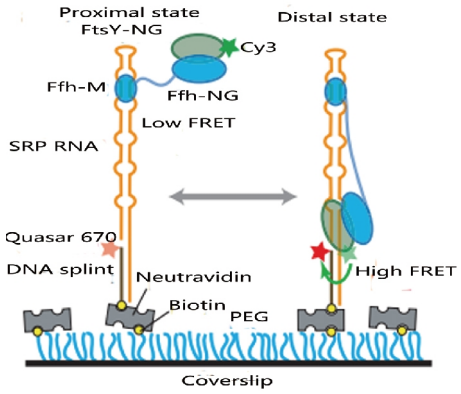


图 5　SRP-FtsY复合物在SRP RNA上的运动过程研究示意图[40] (网络版彩图)

单分子技术还可应用于研究限制性酶与DNA底物[46]、艾滋病病毒反转录酶与核酸底物的相互作用[47].

3.3　生物分子修饰

单分子检测技术还可以用来研究DNA和蛋白等生物分子修饰. 荧光标记的甲基化结合蛋白(methyl-CpG-binding domain, MBD)[81]和甲基转移酶(DNA methyl-transferase, MTase)[82]常被用于研究甲基化修饰. Kim等[48]分别将发射光为625和700 nm的两种量子点修饰到甲基转移酶M.BseCI和RNA聚合酶上, 两种酶特异性地结合T7噬菌体DNA上的甲基化转移酶位点和启动子位点, 经YOYO-1染色后可呈现DNA分子序列的高分辨荧光图像. 该方法能提供DNA甲基化类型及位置等表观信息, 具有300 bp的精确度. Lim等[49]基于Alexa 568标记的MBD可结合噬菌体DNA甲基化位点的原理, 利用YOYO-1染色分辨甲基化和非甲基化片段. 该方法分辨率大于10 kbp, 单分子读取长度超过140 kbp.

近来, Zhang课题组[50]结合特异性荧光标记抗体和单分子检测技术, 实现了多种组蛋白修饰酶(HMEs)的同时检测. 组蛋白乙酰转移酶GcN5和组蛋白甲基转移酶G9a能够分别修饰生物素标记的底物肽, 其修饰位点可被特异性荧光标记抗体识别, 将两种酶的生物信息转化为两种可区分的荧光信号. 该方法特异性好、灵敏度高, 检测限可达21 pmol/L (GcN5)和12 pmol/L (G9a), 可用于筛选HME抑制剂. Zhang课题组[51]将SNAP/CLIP-Tag介导的翻译技术和单分子成像技术相结合, 可在单分子水平上同时对细胞内的

多种小泛素样修饰(SUMO)蛋白进行定量检测(图6). SNAP/CLIP-Tag技术能够使小泛素样修饰的蛋白与荧光标记的O^6-苄基鸟嘌呤/O^2-苄基胞嘧啶衍生物发生反应, 从而将小泛素样修饰信息转化为可检测的荧光信号, 通过双波长TIRFM 在单分子水平上对荧光信号进行检测. 该方法不仅灵敏度高, 还可研究各种生理条件下小泛素样修饰蛋白的变化, 为蛋白质翻译后修饰的相关研究提供了新途径.

3.4 检测活细胞

单分子检测技术可直接应用于活细胞分析与检测, 无需分离提纯DNA、miRNA和蛋白质. Brandenburg等[52]在流感病毒上标记亲脂性染料DiD, 在细胞包涵素(clathrin)上标记荧光蛋白, 通过荧光显微镜拍摄单个病毒的连续影像来记录病毒侵入细胞的过程. Zhang课题组[53]利用单分子检测技术可实现超灵敏检测单个癌细胞. 标记生物素分子和荧光分子的癌细胞核酸适体可分别作为捕获探针和报告探针. 当目标细胞存在时, 通过核酸适体和细胞表面受体的特异性识别可将捕获探针和报告探针结合到单个细胞, 随即捕获探针上的生物素与磁珠上的链霉亲和素结合. 经磁性分离及二硫苏糖醇(DTT)处理, 从细胞上释放捕获探针和报告探针. 通过对报告探针的超灵敏检测可实现对单个癌细胞的特异性检测. 由于每个细胞能结合大量的捕获探针和检测探针,无需序列扩增反应即能实现对活细胞的超灵敏性检测, 检测限可达0.4 细胞/100 μL.

单分子检测技术还可用于研究活细胞内mRNA的运动轨迹[83]和活细菌中单个DNA的修复过程. Uphoff等[54]利用荧光标记的DNA聚合酶和连接酶结合光敏定位显微镜技术(photoactivated localization microscopy, PALM)研究DNA碱基受损后的切补修复过程. 研究发现, (1) DNA修复点遍布于整个细胞, 且单个修复事件中聚合酶和连接酶的持续时间分别为2.1和2.5 s; (2) 在DNA没有受损的细胞内, 只有2.7%的聚合酶和3.8%的连接酶用于复制和修复DNA; (3) 当细胞内DNA受损时, 两种酶均以超过80%寿命的时间来寻找底物并进行修复工作, 从而使DNA缺口与切口的生存时间最小化.

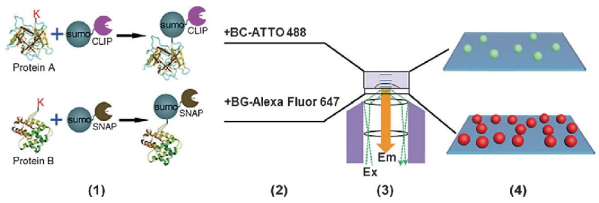


图 6 利用SNAP/CLIP-Tag 翻译和单分子检测技术同时检测两种SUMO 蛋白的示意图[51](网络版彩图)

4 结论与展望

单分子检测技术可实现在分子水平上检测和操纵物质, 是目前最灵敏的检测手段[84], 其中单分子荧光检测技术发展尤为迅速, 在生物化学的各个领域应用广泛[85]. 基于定量单分子检测的生物传感器具有操作简单、灵敏度高、样品消耗少、可以在复杂的生物样品环境中进行检测等优点[86], 不仅已经广泛应用于DNA、酶、miRNA等关键生物标志物的超灵敏检测, 而且进一步拓展至生物分子结构与动态、分子间相互作用、分子修饰以及活细胞检测等研究领域. 应该指出的是, 单分子检测技术仍面临着许多挑战. 例如, 生物大分子标记位点的专一性, 荧光性能与FRET效率对环境及染料取向的依赖性, 荧光探针的量子产率、光闪烁和光漂白等光物理性质影响[87,88], 还有目前的单分子检测仪器价格昂贵、操作复杂[89]、对较弱荧光信号检测能力不足等[90].

目前, 定量单分子检测正逐步向简单、快速、灵敏等方向发展, 并呈现以下趋势: (1) 发展不易光解、性能稳定的荧光标记物和新型标记方法, 提高单分子生物传感器的性能; (2) 改进单分子检测仪器, 使其操作更加简单方便、价格更加低廉; (3) 将单分子检测与适配体[91]、等温扩增[92]等技术相结合, 提高检测特异性和灵敏度; (4) 研发能同时检测多种物质的单分子技术, 研究由多组分构成的复杂分子马达[93]; (5) 改进单分子检测方法, 在接近生理条件、活细胞甚至是生物整体水平中实现单分子实时检测[94]. 我们坚信, 定量单分子检测技术将会展现更广阔的应用前景, 为癌症等重大疾病的早期诊断、治疗监测和预后判断做出更大贡献[95,96].

参考文献

1 Binning G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. *Phys Rev Lett*, 1982, 49: 57–61

2 Sorgenfrei S, Chiu CY, Gonzalez RL, Yu YJ, Kim P, Nuckolls C, Shepard KL. *Nat Nanotech*, 2011, 6: 126–132
3 Neely LA, Patel S, Garver J, Gallo M, Hackett M, McLaughlin S, Nadel M, Harris J, Gullans S, Rooke J. *Nat Meth*, 2006, 3: 41–46
4 McAlpine MC, Ahmad H, Wang D, Heath JR. *Nat Mater*, 2007, 6: 379–384
5 Ma F, Li Y, Tang B, Zhang CY. *Acc Chem Res*, 2016, 49: 1722–1730
6 Rasnik I, McKinney SA, Ha T. *Nat Meth*, 2006, 3: 891–893
7 Hinterdorfer P, Dufrêne YF. *Nat Meth*, 2006, 3: 347–355
8 Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, Saito K, Yanagida T. *Nature*, 1995, 374: 555–559
9 Ha T, Enderle T, Ogletree DF, Chemla DS, Selvin PR, Weiss S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6264–6268
10 Schütz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H. *EMBO J*, 2000, 19: 892–901
11 Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. *Science*, 2005, 307: 538–544
12 Peterson EM, Manhart MW, Harris JM. *Anal Chem*, 2016, 88: 6410–6417
13 Weiss S. *Science*, 1999, 283: 1676–1683
14 Pappas D, Burrows SM, Reif RD. *TrAC Trends Anal Chem*, 2007, 26: 884–894
15 Huang B, Wu H, Bhaya D, Grossman A, Granier S, Kobilka BK, Zare RN. *Science*, 2007, 315: 81–84
16 Zhuang X, Bartley LE, Babcock HP, Russell R, Ha T, Herschlag D, Chu S. *Science*, 2000, 288: 2048–2051
17 Deniz AA, Laurence TA, Beligere GS, Dahan M, Martin AB, Chemla DS, Dawson PE, Schultz PG, Weiss S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 5179–5184
18 Elf J, Li GW, Xie XS. *Science*, 2007, 316: 1191–1194
19 Liu S, Harada BT, Miller JT, Le Grice SFJ, Zhuang X. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 1453–1460
20 Yang Y, Zhang CY. *Anal Chem*, 2014, 86: 967–972
21 Liu KJ, Brock MV, Shih IM, Wang TH. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 5793–5798
22 Li Z, Hayman RB, Walt DR. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 12622–12623
23 Agrawal A, Zhang CY, Byassee T, Tripp RA, Nie S. *Anal Chem*, 2006, 78: 1061–1070
24 Tanaka Y, Xi H, Sato K, Mawatari K, Renberg B, Nilsson M, Kitamori T. *Anal Chem*, 2011, 83: 3352–3357
25 Nie B, Shortreed MR, Smith LM. *Anal Chem*, 2005, 77: 6594–6600
26 Zhou J, Wang Q, Zhang CY. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 2056–2059
27 Long Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang CY. *Anal Chem*, 2012, 84: 8846–8852
28 Zhu G, Yang K, Zhang CY. *Chem Commun*, 2015, 51: 6808–6811
29 Wang LJ, Yang Y, Zhang CY. *Anal Chem*, 2015, 87: 4696–4703
30 Wang LJ, Ma F, Tang B, Zhang CY. *Anal Chem*, 2016, 88: 7523–7529
31 Ho SL, Chan HM, Ha AWY, Wong RNS, Li HW. *Anal Chem*, 2014, 86: 9880–9886
32 Chan HM, Chan LS, Wong RNS, Li HW. *Anal Chem*, 2010, 82: 6911–6918
33 Zeng Y, Zhu G, Yang X, Cao J, Jing Z, Zhang CY. *Chem Commun*, 2014, 50: 7160–7162
34 Zhang Y, Zhang CY. *Anal Chem*, 2012, 84: 224–231
35 Ha T, Zhuang X, Kim HD, Orr JW, Williamson JR, Chu S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9077–9082
36 Zhuang X, Kim H, Pereira MJB, Babcock HP, Walter NG, Chu S. *Science*, 2002, 296: 1473–1476
37 Liu S, Bokinsky G, Walter NG, Zhuang X. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12634–12639
38 Schuler B, Lipman EA, Eaton WA. *Nature*, 2002, 419: 743–747
39 Rhoades E, Gussakovsky E, Haran G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3197–3202
40 Shen K, Arslan S, Akopian D, Ha T, Shan SO. *Nature*, 2012, 492: 271–275
41 Li Y, Zhang CY. *Anal Chem*, 2012, 84: 5097–5102
42 Di Fiori N, Meller A. *Biophys J*, 2010, 98: 2265–2272
43 Liu R, Hu D, Tan X, Lu HP. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 10034–10042
44 Benz C, Retzbach H, Nagl S, Belder D. *Lab Chip*, 2013, 13: 2808–2814
45 Zhang C, Johnson LW. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 5324–5325
46 Li HW, Yeung ES. *Anal Chem*, 2005, 77: 4374–4377
47 Liu S, Abbondanzieri EA, Rausch JW, Le Grice SFJ, Zhuang X. *Science*, 2008, 322: 1092–1097
48 Kim S, Gottfried A, Lin RR, Dertinger T, Kim AS, Chung S, Colyer RA, Weinhold E, Weiss S, Ebenstein Y. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 3578–3581
49 Lim SF, Karpusenko A, Sakon JJ, Hook JA, Lamar TA, Riehn R. *Biomicrofluidics*, 2011, 5: 034106–341068

50 Ma F, Liu M, Wang Z, Zhang CY. *Chem Commun*, 2016, 52: 1218–1221
51 Yang Y, Zhang CY. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 691–694
52 Brandenburg B, Zhuang X. *Nat Rev Micro*, 2007, 5: 197–208
53 Hu J, Zhang CY. *Chem Commun*, 2014, 50: 13581–13584
54 Uphoff S, Reyes-Lamothe R, Garza de Leon F, Sherratt DJ, Kapanidis AN. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8063–8068
55 Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6: 606–613
56 Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 961–967
57 Degliangeli F, Kshirsagar P, Brunetti V, Pompa PP, Fiammengo R. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 2264–2267
58 Cleaver JE. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 564–573
59 Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. *Science*, 2000, 289: 1757–1760
60 Kapanidis AN, Ebright YW, Ebright RH. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 12123–12125
61 Sukhanova A, Susha AS, Bek A, Mayilo S, Rogach AL, Feldmann J, Oleinikov V, Reveil B, Donvito B, Cohen JH, Nabiev I. *Nano Lett*, 2007, 7: 2322–2327
62 Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LWK, Nie S. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 969–976
63 Wu S, Han G, Milliron DJ, Aloni S, Altoe V, Talapin DV, Cohen BE, Schuck PJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 10917–10921
64 Zhang CY, Johnson LW. *Analyst*, 2006, 131: 484–488
65 Zhang CY, Yang K. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 703–708
66 Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. *Nature*, 1998, 395: 451–452
67 Bernal-Mizrachi C, Gates AC, Weng S, Imamura T, Knutsen RH, Desantis P, Coleman T, Reid Townsend R, Muglia LJ, Semenkovich CF. *Nature*, 2005, 435: 502–506
68 Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, Viña J, Serrano M, Blasco MA. *Cell*, 2008, 135: 609–622
69 Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA. *Nat Genet*, 2000, 26: 89–92
70 Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A. *Cell*, 2011, 146: 67–79
71 Sekar RB, Periasamy A. *J Cell Biol*, 2003, 160: 629–633
72 Yuan L, Lin W, Zheng K, Zhu S. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 1462–1473
73 Zhang CY, Yeh HC, Kuroki MT, Wang TH. *Nat Mater*, 2005, 4: 826–831
74 Zhang CY, Hu J. *Anal Chem*, 2010, 82: 1921–1927
75 Pons T, Medintz IL, Wang X, English DS, Mattoussi H. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 15324–15331
76 Kim VN. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 376–385
77 Deniz AA, Dahan M, Grunwell JR, Ha T, Faulhaber AE, Chemla DS, Weiss S, Schultz PG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3670–3675
78 Ying L, Green JJ, Li H, Klenerman D, Balasubramanian S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14629–14634
79 Lee JY, Okumus B, Kim DS, Ha T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18938–18943
80 Miyake-Stoner SJ, Miller AM, Hammill JT, Peeler JC, Hess KR, Mehl RA, Brewer SH. *Biochemistry*, 2009, 48: 5953–5962
81 Cerf A, Cipriany BR, Benítez JJ, Craighead HG. *Anal Chem*, 2011, 83: 8073–8077
82 Clark TA, Murray IA, Morgan RD, Kislyuk AO, Spittle KE, Boitano M, Fomenkov A, Roberts RJ, Korlach J. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: e29
83 Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E. *Curr Biol*, 2003, 13: 161–167
84 Cui Y, Wei Q, Park H, Lieber CM. *Science*, 2001, 293: 1289–1292
85 Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Büning H, Hallek M, Bräuchle C. *Science*, 2001, 294: 1929–1932
86 Walt DR. *Anal Chem*, 2013, 85: 1258–1263
87 Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, Kusumi A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7317–7322
88 Chan EY, Goncalves NM, Haeusler RA, Hatch AJ, Larson JW, Maletta AM, Yantz GR, Carstea ED, Fuchs M, Wong GG, Gullans SR, Gilmanshin R. *Genome Res*, 2004, 14: 1137–1146
89 Neuman KC, Nagy A. *Nat Meth*, 2008, 5: 491–505
90 Roy R, Hohng S, Ha T. *Nat Meth*, 2008, 5: 507–516
91 Famulok M, Mayer G. *Acc Chem Res*, 2011, 44: 1349–1358
92 Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. *Chem Rev*, 2015, 115: 12491–12545

93 Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, Tyagi S. *Nat Meth*, 2008, 5: 877–879
94 Li GW, Xie XS. *Nature*, 2011, 475: 308–315
95 Tachikawa T, Yamashita S, Majima T. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 7197–7204
96 Zhou J, Yang Y, Zhang CY. *Chem Rev*, 2015, 115: 11669–11717

Advance in quantitative single-molecule detection

Juan Hu†, Zi-Yue Wang†, Chun-Yang Zhang*

College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science; Shandong Normal University, Jinan 250014, China
†*These authors contributed equally to this work*
**Corresponding author (email: cyzhang@sdnu.edu.cn)*

Abstract: Single-molecule detection enables the measurement of molecules at the single-molecule level, and it can be used to study the conformational changes, dynamics, interaction between the molecules and the manipulation of single molecules. Especially, single-molecule detection has emerged as an ideal analytical approach to quantify low-abundance biomolecules with significant advantages of rapidity, simplicity, high sensitivity and low sample-consumption. Recently, great progress has been made in single-molecule fluorescence detection, which has found wide applications in a variety of research fields. In this review, we summarize the recent advance in single-molecule detection, focusing on its applications in sensitive detection of biomarkers (e.g., DNAs, enzymes and miRNAs) and the study of biomolecular structure and dynamics, biomolecule interactions, biomolecule modification as well as live cell assay. Furthermore, we give a new insight into the future direction of single-molecule detection.

Keywords: single-molecule detection, ultrasensitive detection, biomarkers, fluorescence resonance energy transfer (FRET), quantum dots

doi: 10.1360/N032017-00074