

كشف ومعالجة الجزيء الوحيد في تقنية

النانو والبيولوجيا

Single-Molecule Detection and Manipulation in Nanotechnology and Biology

كريستوفر ل. كبير، وغافن د.م. جيفريز، وروبرت م. لورينز، ودانيال ت. تشيو
Christopher L. Kuyper, Gavin D. M. Jeffries, Robert M. Lorenz, and Daniel T. Chiu

٨,١ المقدمة Introduction

لقد تم توسيع مجموعة الأدوات وتنقيحها؛ لرؤية العالم في المستوى النانومتري والجزيئي على مدار العقود الماضية. كما أن فحص الجزيئات الفردية أصبح أكثر روتينية، وقد كشفت مصفوفة واسعة من الطرائق عن معلومات جديدة مثيرة، والتي لا يمكن الحصول عليها في غيرها من الدراسات الأخرى. وتتضمن الأمثلة على هذه الأدوات عائلة مجاهر المسبار المساح (SPM)، مثل مجهر التنفق المساح (STM)، ومجهر القوة الذرية (AFM)، والذي قدّم لنا تفاصيل رائعة، وتصورات عن الذرات الوحيدة والجزيئات على السطوح [1-5]. لقد اكتسب استعمال التقنيات البصرية في كشف الجزيئات الوحيدة ودراساتها أهمية كبيرة في السنوات الأخيرة؛ نظراً لسهولة تنفيذها، وقدرتها على تقصي النظم البيولوجية في المحلول، تحت الظروف ذات الصلة من الناحية الفسيولوجية. وقد أصبحت أنظمة التشغيل الأساسية platforms، مثل البصريات متحدة البؤرة، وكشف التآلق

الخارجي epifluorescence، ومجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي (TIRF)؛ شائعة على نحو متزايد؛ بسبب تصميمها البسيط نسبياً، وحساسية كشفها الرائعة، وسهولة تكاملها في أنظمة مجهرية متوافرة تجارياً [6-9]. ولا تقتصر تجارب الجزيء الوحيد البصرية على الكشف والتصوير فقط، فالمصائد البصرية تكون بمثابة أدوات لقياس قوى الجزيئات الحيوية الفردية في المحلول وحركاتها [10-14]. ونظراً للتشكيلة الواسعة من التقنيات البصرية التي تم تطويرها؛ لكشف الجزيئات الوحيدة ومعالجتها، والتي تتراوح بين استخدام مجهر المجال القريب، إلى استخدام الطرائق البصرية غير الخطية [15-19]، فلن نستطيع مناقشة كل هذه الأمثلة في هذا الفصل. وبدلاً من ذلك، سنبدأ بمقدمة عن التقنيات الشائعة المستخدمة في كشف الجزيء الوحيد بصرياً، مثل (المجهر متحد البؤرة، ومجهر التألق الخارجي، ومجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي)، والمعالجة، مثل (الحصر البصري)، والتي تتصل بتقنية النانو وعلم الأحياء. ثم نستمر بمناقشة بضعة مناطق متتقة تطبق هذه التقنيات، على حدٍ سواء؛ لإبراز الإنجازات الماضية والإمكانية المستقبلية لمنهجيات الجزيء الوحيد البصرية.

٨,٢ الكشف البصري عن الجزيئات الوحيدة

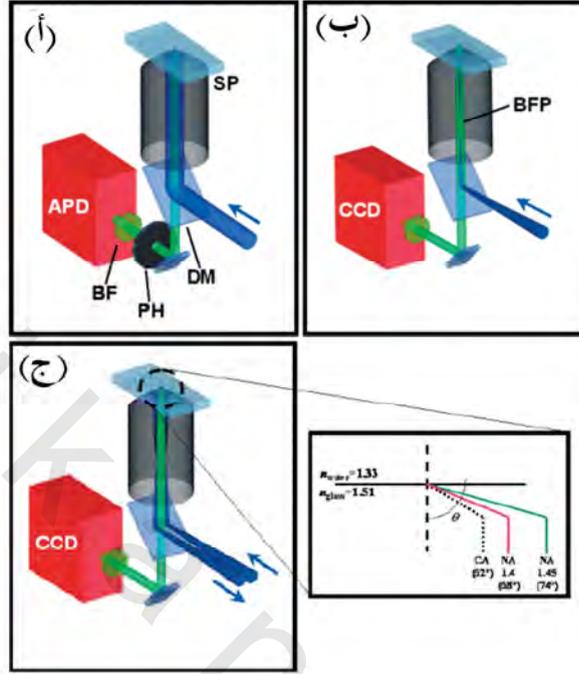
Optical Detection of Single Molecules

٨,٢,١ الكشف عن الجزيئات الوحيدة بمجهر التألق متحد البؤرة

Detecting Single Molecules with Confocal Fluorescence Microscopy

في المجهر متحد البؤر [الشكل رقم ٨,١ (أ)]، يُوازى ويُعكس شعاع الليزر المترابط من مرآة ثنائية اللون لملء الفتحة الخلفية لشيئية (لعدسة شيئية) ذات فتحة رقمية عالية (NA) ($NA > 1.2$). ويخرج من الشيئية ضوء الليزر مركزاً على بقعة محدودة الحيود، التي تحتوي على شعاع له خصر (وسط)، بقطر $\sim 200-350$ نانومتر، كما هو معرف من قبل معيار رايلي Rayleigh، الذي يعتمد على الطول الموجي، والفتحة العددية NA للشيئية. وعلى طول المحور نفسه للضوء الساقط، يتم إعادة جمع التألق المنبعث من

النقطة البؤرية في مستوى العينة بالعدسة الشيئية، ويمر من خلال مرآة مزدوجة اللون، ومرشح إمرار نطاقي band-pass filter، واللذين يضمنان عدم حدوث تشتت رايلي، أو إشعاع ليزري، ويصطدم بالكاشف. وقبل مرشح الإمرار النطاقي، يتم تركيز إشارة التآلق بعدسة أنبوبية في الثقب الواقع على مستوى صورة المجهر، ولتحقيق أقصى درجة وضوح من الدقة المكانية، وكفاءة تجميع الإشارة، فإن اختيار قطر الثقب الصحيح أمر حرج [20, 21]. وفي تجارب الجزيء الوحيد، ترتيبات مصممة بشكل مثالي لشيئية الفتحة الرقمية العالية NA، بتكبير $100\times$ مرة، تستخدم نموذجياً ثقباً بقطر من 20-100 ميكرومتر، وتنتج وضوحاً محورياً من $0.5 - 1$ ميكرومتر. ويكون خصر الشعاع من 200-350 نانومتراً، وطول محوري 1 ميكرومتر، وحجوم الكشف الأهليلجية أو البيضاوية بمقادير تساوي تقريباً 10^{-15} لتر؛ ونتيجة لذلك تكون حجوم الكشف ضئيلة للغاية، ويتم تخفيض مصادر الخلفية أو المعلومات الأساسية، مثل تشتت رامان في الماء (Raman scattering)؛ لتحسين مستوى إشارة الجزيء الوحيد. ولكي يتم تسجيل الإشارة، تستخدم عموماً ثنائيات (صمامات ثنائية) ضوئية انهيارية avalanche photo-diodes؛ بسبب كفاءتها الكمية الرائعة ($QE < 70\%$)، وضوضاء إظلام منخفضة (أقل من 25 عدد التحللات النبضية لكل ثانية)، والتي تعطي سوياً مع الخلفية المنخفضة نسب الإشارة إلى الضوضاء مذهلة (SNRs)، وذلك بالمقارنة مع أساليب بصرية أخرى، مثل (التآلق الخارجي). بينما تقوم التصاميم متحدة البؤرة عادة بالكشف عن نقطة، واستخدام المرآة الماسحة أو المرحلة الكهروضغطية عالية الوضوح، يمكن أن يُنتج صوراً ذات حساسية للجزيء الوحيد. وعلى الرغم من أن هذه الصور تعرض نسب الإشارة إلى الضوضاء مذهلة SNRs عالية، وتأخذ التقاط الصورة الكاملة دقائق، فإنها تكون بطيئة، مقارنة بطرائق كشف المجال العريض، باستخدام كاميرا ذات جهاز مزدوج الشحنة CCD Camera (انظر المقاطع 8.2.2 و 8.2.3).



الشكل رقم (١، ٨): الطرائق البصرية الثلاث شائعة الاستخدام للكشف عن الجزيئات الوحيدة (أ) كشف النقطة متحد البؤرة. (ب) تصوير بالتألق الخارجي. (ج) مجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي. في كل الهندسيات الثلاث، يتم عكس ضوء الليزر الموجهة من مرآة ثنائية (DM) إلى الفتحة الخلفية مرة أخرى، لشينية الفتحة الرقمية العالية (NA)، ويتم تصويرها بعد ذلك في مستوى العينة (SP). ويتم تجميع التألق الناشئ من جزيء وحيد خلال الشينية نفسها، ويتم ترشيحه أكثر بمرشح إمرار نطاقي (BF). وفي الكشف متحد البؤرة، يتم إمرار الضوء المرشح طيفياً بعد ذلك خلال ثقب صغير (PH)، موضوع على مستوى الصورة الابتدائي. ويحتاج كل من تصميمي تصوير التألق الخارجي، ومجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF إلى أن يكون ضوء الليزر مركزاً على المستوى البؤري الخلفي (BFP) للشينية (BFP). وللكشف، تستخدم تجهيزات متحدة البؤرة نموذجياً ثنائيات ضوئية انهيارية الجسيمات (APD)، بينما يستخدم مجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF والتألق الخارجي كاميرات ذات جهاز مزدوج الشحنة CCD عالية الحساسية. (د) يبين الزاوية الحرجة المطلوبة لتحقيق الشينية لمجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF ، بفتحة رقمية عالية مقدارها ١,٤ أو ١,٤٥ .

وهذه المزايا الفريدة للمجهر متحد البؤرة، قد أدت إلى مجموعة واسعة من الدراسات المتعلقة بمطيافية الجزيء الوحيد (SMS). إن حساسية الجزيء الوحيد ميزة مهمة في العلاقة بين التآلق والمطيافية، التي تكشف وتربط بين الإشارات الفردية لانتشار الجزيئات أثناء الدخول والخروج من حجم الكشف؛ لإعطاء معلومات انتشارية حول أي نوع من أنواع التآلق [22-29]. وعلاوة على ذلك، أفاد زار Zare وزملاؤه المشاركون بملاحظات في الوقت الحقيقي لانتشار الجزيئات الوحيدة خلال حجم المسبار بدقة ٢ ميكروثانية [30, 31]. وعلى الرغم من أن الميزة الرئيسية للكشف متحد البؤرة تكمن في قدرته على دراسة انتشار الجزيئات بحرية، إلا أنه يسمح كذلك بدراسة سهلة للجزيئات الوحيدة المثبتة في المواد الصلبة ومصنوفات البوليمر، والمواد الهلامية، وعلى السطوح. ومحاسبات كشف ودقة زمنية رائعة، تستطيع تجارب متحدة البؤرة دراسة العمليات البيولوجية التي تحدث على نطاق زمني، يصل إلى ميلي ثانية، وبشكل محدد؛ حركية الإنزيم الوحيد [32, 33]، وتغيرات الشكل الجزيئي في الأحماض النووية والإنزيمات [34-37]، والوظيفة الريبوزيمية ribozyme والديناميكية [38, 39]، ومعقدات البروتين [40, 41]، وكشف الأحماض النووية في تقنية المسام النانوية [42]، بالإضافة إلى ديناميكية التوجيه والخواص البصرية لجزيئات الصبغة الوحيدة [43-47]. ولا يمكن فقط فحص خواص الجزيئات الوحيدة، ولكن يمكن أيضاً فحص البيئات النانوية المحيطة. وعلى سبيل المثال، يمكن أن تستخدم ديناميكية الدوران غير المتجانس، وأعمار الجزيئات الوحيدة في أغشية البوليمر لفحص البيئات الجزيئية الموجودة داخل مناطق مختلفة من الغشاء [48, 49]. وتم استخدام حساسية التغيرات في عدم الألفة المائية، وصبغة كرومية تداوية جديدة (صبغة يتغير لونها تبعاً لتغير قطبية المذيب) solvatochromic dye، ترتبط تساهمياً بالبولي بيتيد - على سبيل المثال - لمراقبة التفاعلات بين البروتين - البروتين في مستوى جزيء وحيد [50]. إن تعددية الاستعمال

متأصلة، والدقة الزمنية السريعة، وارتفاع نسبة الإشارة إلى الضوضاء SNR، ستستمر في تعزيز استخدام البصريات متحدة البؤرة في مطيافية الجزيء الوحيد SMS، وعلى أية حال، بالمقارنة مع تصاميم تصوير التآلق بمجهر التآلق الخارجي، ومجهر تآلق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF، والتي يمكنها دراسة مصادر متعددة النقطة مرة واحدة، فإن مجهر الكشف متحد البؤرة يستطيع أن يكتشف فقط شيئاً واحداً، مصدر النقطة في المرة الواحدة.

٢,٢,٨ إظهار (رؤية) الجزيئات الوحيدة بكشف التآلق الخارجي

Visualizing Single Molecules with Epifluorescence Detection

إن تركيبات التآلق الخارجي خاصةً، تعتبر من التصاميم الأكثر شعبية في المجهر البصري (الضوئي). ويستخدم الليزر عموماً للإضاءة في دراسات الجزيء الوحيد، على الرغم من أن التقارير الحديثة توضح كشف الجزيء الوحيد باستخدام مصابيح الزئبق، وثنائيات الانبعاث الضوئي LEDs [51, 52]. ومماثلة لتصاميم متحدة البؤرة، يتم تنفيذ تجميع التآلق، وإضاءة التآلق الخارجي باستخدام شبيثة الفتحة الرقمية العالية NA نفسها؛ مما يؤدي إلى إضاءة مساحة عادةً، بقطر من ٥٠-١٠٠ ميكرومتر بالنسبة للشبيثة، بتكبير $\times 100$ مرة. وببصريات المسامته (الموازية) المناسبة، ومصابيح وثنائيات الانبعاث الضوئي LEDs، تنتج الإضاءة على مساحة واسعة؛ بسبب الطبيعة غير المترابطة لمثل مصادر الضوء هذه. وعلى أية حال، يستلزم بعض البصريات الإضافية، حتى يمكن تحقيق إضاءة منطقة واسعة بالليزر. وأيضاً يتم وضع ناشر تصوير مجسم دوار أو لوح زجاج مسنفر (مضّيب) في مسار خط الشعاع قبل الشبيثة؛ لعرقلة تماسك ضوء الليزر، وإزالة الأنماط البراقة (المنظارية) في مستوى الصورة [13, 53]. ولسوء الحظ، قد تعاني هذه التصاميم من فقدان غير ضروري لضوء الليزر الساقط عن طريق الانعكاس والتشتت؛ ولذلك فهناك تصميم أكثر كفاءة [الشكل رقم ٨.١(ب)]، حيث يُركز ضوء

الليزر في المستوى البؤري الخلفي لشيئية الفتحة الرقمية العالية NA؛ مما يؤدي إلى ظهور شعاع ليزر موازٍ (متسامت) في مستوى الشيئية، ويوفر مجال إضاءة عريض للعينة [54]. وبالنسبة للتصوير، تستخدم كاميرات ذات جهاز مزدوج الشحنة (CCD)، وهي الأكثر شيوعاً، ويمكن أن تصل إلى دقة زمنية من عشرات إلى مئات من الملي ثانية لتجارب الجزيء الوحيد، وهي محدودة بالإشارة المتوفرة، وحساس زمن القراءة. بينما نجد أن الدقة الزمنية لكل بكسل مع التصوير بكاميرا ذات جهاز مزدوج الشحنة؛ تكون أبطأ بمقدار درجتين أو ثلاث درجات من كشف النقطة متحد البؤرة، حيث إنه يمكن دراسة الجزيئات المتعددة بشكل متزامن. وفي التآلق الخارجي، تكون الخلفية من الضوء خارج نطاق البؤرة وتشتت رaman، الصادر من حجم الكشف الكبير، على أية حال، يُحدد كشف إشارة الجزيء الوحيد. والإستراتيجية الأساسية لزيادة خفض الخلفية، هي استخدام أصباغ تفلور (تتألق) في الضوء الأحمر [55]. ولحسن الحظ، تتحسن حساسية الكشف بانتظام، مثلما تطورت الكاميرات ذات الجهاز مزدوج الشحنة، رقيقة الخلفية حديثاً، والتي تنتج صوراً بضوءاً (بتشويش) منخفضة، ويمكن أن يتحقق بـ QEs ~ ٩٠٪. وسوف يستمر التقدم نحو عمل رقائق QE عالية بضوءاً قراءة أقل، وسرعات قراءة أسرع؛ لتحسين كشف التآلق الخارجي.

ويمكن أن يوفر كشف التآلق الخارجي معلومات عن الجزيئات الوحيدة المثبتة، بالإضافة إلى الأنواع الفردية التي تتحرك عبر مسافات بالميكرونات. وهناك بعض التطبيقات البيولوجية المهمة، مثل: (i) دراسة الانتشار البراوني brownian diffusion، وديناميكية جزيئات الحمض النووي الوحيدة [62-56]، (ii) التصوير المباشر للمحركات الجزيئية الفردية، مثل (المايوسين myosin، وبروتين الكاينيسين kinesin)، وتحرك الجسيمات الحيوية على طول سطح شريحة التغطية الزجاجية [66-63]، (iii) ملاحظة الدوران المنفصل لجزيء FIATPase النشاط [67]، و (iv) مراقبة معدلات

الهضم الأنزيمي لجزيئات الحمض النووي DNA بإنزيم أكسونيوكلياز (إنزيم قاطع لحمض نووي من نهايته) λ -exonuclease [68]. وعلاوة على ذلك، فعند توفر إشارة كافية، وضوضاء منخفضة، وبصريات مستقرة، يمكن أن تحدد بدقة مواقع النوع المتفلور (التألق)، نزولاً إلى ١٠ نانومتر، من خلال مطابقة جاوس لرسم التفلور [68]. إن تألق نقطة المصدر بالنسبة للجزيء الوحيد، أقل من حد الحيود (~ ٢٠٠-٣٥٠ نانومتر)، ويمكن تكبيره إلى حد كبير ($\times 100-500$ مرة)؛ للوصول إلى البقعة المصورة التي تنتشر على مدى عدة بكسلات بحجم ميكرون (بقطر ~ ٧-٢٥ ميكرومتر)، مع كل بكسل تناظر مسافات العينة من عشرات النانومترات. وعلى نحو رائع، يمكن أن تسجل المعلومات الانتشارية من تصوير حركات جزيء وحيد بمرور الزمن على أغشية هلام- صول ومواد مسامية، وفي أغشية دهنية ثنائية الطبقة [53, 69, 71]. ونظراً لانخفاض نسبة الإشارة إلى الضوضاء SNR، فإن مسارات الجزيء الوحيد، عادة ما تكون دقيقة فقط في حدود ١٠٠-٢٠٠ نانومتر، بينما يعطي تصميم التألق الخارجي فائدة عظيمة لدراسة جزيئات عديدة الميكرونات فوق شريحة التغطية الزجاجية. إن كفاءات الكشف للدراسات على السطوح قليلة جدا عن النتائج المنتجة باستخدام مجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF.

٨, ٢, ٣ مجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي (TIRF)

Total Internal-Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy

بالمقارنة مع تقنيات كشف النقطة، كالمجهر متحد البؤرة، وتصوير المجال العريض للجزيئات الوحيدة في محلول حر، باستخدام التألق الخارجي؛ يمتاز مجهر الانعكاس الداخلي الكلي بتخفيض رائع للخلفية والضوضاء؛ لإنتاج صور المجال العريض للجزيئات الوحيدة على السطوح. ويجدث الانعكاس الداخلي الكلي في السطح الفاصل بين مواد ذات معامل انكسار منخفض ومرتفع، عندما يكون الضوء

الساقط موجهاً بزواوية أكبر من الزاوية الحرجة المعرفة بالوسطين. وعند السطح الفاصل، يخترق الضوء الوسط ذا معامل الانكسار المنخفض لإنتاج المجال المتلاشي، الذي يتهاوى أسياً، وهكذا يُحدد سمك الإضاءة ~ ١٠٠-١٥٠ نانومتر، اعتماداً على الطول الموجي المستخدم، ومعاملات الانكسار لكلا الوسطين [72]. وبشكل ملائم، إثارة أي نوع متفلور (متألق)، سيحدث فقط ضمن المجال المتلاشي الرقيق. ومع كثافة الطاقة العالية داخل المجال المتلاشي، التي تعزز إشارة الجزيء الوحيد، وتخفيض الخلفية بدرجة كبيرة بسبب تناقص حجم المسبار؛ يتم تحسين كفاءات الكشف بمجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF بشكل بارز بالمقارنة إلى التألق الخارجي.

وهناك ترتيبان من ترتيبات مجهر تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF مستخدمان عموماً، هما: (i) نوع الهدف و(ii) نوع أساسه الموشور prism. ولا يتطلب تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF نوع الهدف، سوى تركيز شعاع الليزر في المستوى البؤري الخلفي للشبيثة، مثل التألق الخارجي (انظر المقطع ٨.٢.٢)، ولكن لضمان حدوث انعكاس داخلي كلي، يجب أن يكون الشعاع أيضاً موجهاً نحو الحافة الخارجية لشبيثة الفتحة الرقمية العالية NA، إذاً مثل هذا الضوء سيسقط بزواوية أكبر من الزاوية الحرجة [الشكل رقم ٨.١ (ج)]. إن الزاوية الحرجة في التجارب، التي تستخدم شريحة التغطية الزجاجية ($n = 1.15$)، والمحلول المائي ($n = 1.33$)؛ تكون ~ ٦٢°؛ مما يتطلب استخدام شبيثة ذات فتحة رقمية NA، تساوي ١.٤ ($\theta \sim 68^\circ$) أو ١.٤٥ ($\theta \sim 74^\circ$)؛ لتحقيق الانعكاس الداخلي الكلي. وعملياً، الدرجات الست (٦) الزيادة المقدمة من قبل شبيثة الفتحة الرقمية NA ١.٤٥، تجعل تنفيذ تألق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF مهمة بسيطة نسبياً. إن ترتيبات أساسها الموشور، كما يدل الاسم، تستخدم موشورا موضوعا على رأس العينة؛ لتوجيه الشعاع الساقط إلى الزاوية اللازمة؛ لتحقيق انعكاس داخلي كلي TIR. ولسوء الحظ، فهذه التصاميم

ليست متعددة الاستعمال، كما في تآلق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF من نوع الشبيئية؛ لأن موقع الموشور يحدّ من أنواع الأنظمة التي يمكن دراستها. وعلى الرغم من أنه في مقارنة الجانب بالجانب، فقد أعلن أمبروز Ambrose وزملاؤه الحصول على نسب خلفية (SBRs) إلى الإشارة أفضل لتآلق انعكاس داخلي كلي TIRF أساسه الموشور، وأنتج تآلق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF من نوع الشبيئية فوتونات أكثر بكثير من الجزئيات الوحيدة [73]. وبالإضافة إلى ذلك، فقد حسّنت تصاميم تآلق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF من نوع الشبيئية كلا من نسبة الإشارة إلى الضوضاء SNR، ونسبة الإشارة إلى الخلفية SBRs على حد سواء، وبمعامل يصل إلى أربعة عند المقارنة بالتآلق الخارجي [54, 74].

وعلى الرغم من أن تجارب الانعكاس الداخلي الكلي للجزئيء الوحيد محدودة على دراسة الجزئيات المثبتة أو القريبة من السطوح، إلا أن تحسينات الحساسية أثبتت أنها مفيدة جداً للعديد من التطبيقات. ويمكن تحديد كل جزئيء في جميع الأبعاد الثلاث بتجريد بؤرة الانبعاث من حاملات التآلق fluorophores الوحيدة، عن طريق تغيير استقطاب شعاع الإثارة، وتوجيه ثنائيات أقطاب الانبعاث؛ وقد أظهرت الجزئيات ثنائية القطب الموجهة في المحور- z صورة الكثافة شبيهة بالدونات [75-76]. وعلاوة على ذلك، فبسبب مستوى العينة النحيف، تم استخدام تآلق الانعكاس الداخلي الكلي TIRF؛ للكشف المعزول عن حالات ترابط فردي بين الجزئيات على السطح والجزئيات الحرة في المحلول. وعلى سبيل المثال، يمكن أن تتأثر معدلات الامتصاص والتغيرات الشكلية لجزئيات الحمض النووي DNA- λ ، المرتبطة بسطوح سيليكاً منصهرة نظيفة بالرقم الهيدروجيني pH، وتركيب المحلول الصاد أو المنظم [77]. وبالإضافة لذلك، يستطيع مجهر تآلق الانعكاس الداخلي الكلي رصد ترابط الحمض النووي DNA، ذات البيوتين المرتبط بالبروتين إلى شريحة مغطاة بسترينافيدين،

والارتباط التساهمي من الحمض النووي DNA إلى الرباطات (الوصلات) المتعلقة بالسطح، ويسمح برؤية (بتصور) تفاعلات البروتين- البروتين في الزمن الحقيقي [78، 79]. وتتضمن الأمثلة الأخرى، مراقبة حركات بروتين الكاينيسين kinesin على إنبيبات دقيقة [80، 81]، والميوسين myosin على طول سطح شريحة التغطية الزجاجية [82، 83]. وحتى إنزيم البوليميريز RNA الموسوم فلورياً (بشكل متفلور) الوحيد، يمكن رؤيته في الزمن الحقيقي خلال تحركه على طول الجديلة المفردة للحمض النووي DNA [84]. ولقد كشف تحليل معدلات حركة بروتين الكاينيسين، والميوسين، وإنزيم البوليميريز RNA عن معلومات حركية جديدة عن كل نظام. ونموذجياً في تألق الانعكاس الداخلي الكلي، تبحث التجارب في إشارات السطح الفاصل بين الصلب/ والسائل، ولكن يمكن أيضاً دراسة الانتشار الأفقي للأصباغ على السطح الفاصل بين سائلين غير قابلين للامتزاج [85].

٤، ٢، ٨ مطيافية رامان الرنينية معززة السطح لجزيء وحيد

Single-Molecule Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy

لقد تم الإعلان عن مطيافية رامان الرنينية معززة السطح لجزيء وحيد لأول مرة في التسعينيات من قبل مجموعتين، هما: ني Nie وزملاؤه، وكنيب Kneipp وآخرون [86، 87]، وقد برزت مطيافية رامان الرنينية معززة السطح لجزيء وحيد (SM-SERRS) كطريقة جديدة واعدة لدراسة الجزيئات الوحيدة. وقد أعلنت هذه الأعمال المبكرة عن عوامل تعزيز رائعة، تصل إلى رتبة 10^{10} - 10^{15} بالنسبة لجزيئات الصبغة الوحيدة، مثل (رودامين 6G والبنفسجي البلوري) المتمزة على عناقيد نانوية لجسيمات الفضة. ويعرض تحليل رامان معزز السطح للجزيئات الوحيدة عدة مزايا فريدة، منها: (i) على عكس مطيافية التألق، التي تثير الحالة الإلكترونية الجزيئية، تتقصى مطيافية رامان أنماط الاهتزاز لاستيضاح المعلومات التركيبية عن الجزيء الوحيد، (ii) تكشف

مطيافية رامان الرنينية معززة السطح لجزيء وحيد SM-SERRS بطريقة رائعة أطياف بإشارات انطباعية (مؤثرة)، يمكن أن تكون أكثر سطوعاً من كشف التآلق بمقدار يتراوح من مرتين إلى ثلاث مرات (iii) يمكن ملاحظة الجزيئات المدروسة باستخدام مطيافية رامان الرنينية معززة السطح لجزيء وحيد SM-SERRS، لفترات أطول قبل عملية الهدم الضوئي؛ بسبب استخدام طول موجة الإثارة، الذي يكون في منطقة الضوء الأحمر من طول موجة الامتصاص للصبغة، وإخماد الحالة المثارة بالعناقيد النانوية الفلزية. ونلاحظ أنه منذ التجارب الأولية، ظهر المزيد من الأوراق البحثية، بما في ذلك الدراسات على عوامل التعزيز الهامة في مطيافية رامان الرنينية، معززة السطح لجزيء وحيد SM-SERRS [88]، والكشف عن جزيئات الصبغة الوحيدة في طبقة أحادية لانجموير- بلودجيت Langmuir- Blodgett [89-91]، وصور شبكة ممسوحة بمطيافية رامان الرنينية، معززة السطح لجزيء وحيد [89, 92]، ومراقبة الديناميكية السطحية [93]، وفحص مغناطيسيات الجزيء الوحيد [94, 95]، وملاحظة جزيئات البروتين الوحيدة في الزمن الحقيقي [96-99]. وللقارئ المهتم، نوصي بالاستعراضات الشاملة من قبل زاندر Zander وكنيب وآخرين [100, 101].

والجدير بالذكر أن هوفكن Hofkens وزملاءه أعلنوا عن استخدام مطيافية رامان الرنينية معززة السطح للجزيء الوحيد SM-SERRS، لدراسة بروتين متآلق (فلوري) أخضر محسّن (EGFP)، والذي يتكون من ترتيب فريد لبقايا ثلاثة أحماض أمينية، التي تنتج معقداً متآلقاً جداً [99]. ومن المعروف أن البروتين المتآلق الأخضر المحسّن وعائلة البروتينات المتألقة الخضراء GFPs، تستخدم للتحويل بين الحالة البروتونية والحالة اللابروتونية، وومضة التشغيل/ والغلق. ويعتقد أن الشكل البروتوني يسبب فترات مظلمة في التآلق المرصود للبروتين [102]. ويمكننا الحصول على أطياف مطيافية رامان الرنينية معززة السطح للجزيء الوحيد SM-SERRS في الزمن

الحقيقي من البروتين المتألق الأخضر المحسن بدقة زمنية ٥ ثانية، وموافقة مقدارها (± 10 سم⁻¹) بيانات البروتين المتألق الأخضر المحسن الكلية. وبشكل مثير للاهتمام، لاحظ الفريق قفز تردد معين على الزمن الذي كان يعتقد أن يتوافق مع الأشكال البروتونية واللابروتونية للجزيء. إن مطيافية رامان الرنينية معززة السطح للجزيء الوحيد SM-SERRS، تمثل اتحاد المطيافية وتقنية النانو، التي توفر معلومات تركيبية مفصلة عن الجزيئات الوحيدة، التي ستكون مستحيلة المنال باستخدام طرائق أخرى. بينما يقتصر استخدام مطيافية رامان الرنينية معززة السطح للجزيء الوحيد SM-SERRS على الأطياف التي لا يمكن أن تجمع بدون امتزاز الجزيئات إلى الجسيمات النانوية الفلزية المناسبة، وسوف تستمر هذه الطريقة بدون شك في تحقيق اكتشافات جديدة ومثيرة، في مجال طيف الجزيء الوحيد SMS.

٨,٣ معالجات الجزيء الوحيد باستخدام مصائد بصرية

Single-Molecule Manipulations Using Optical Traps

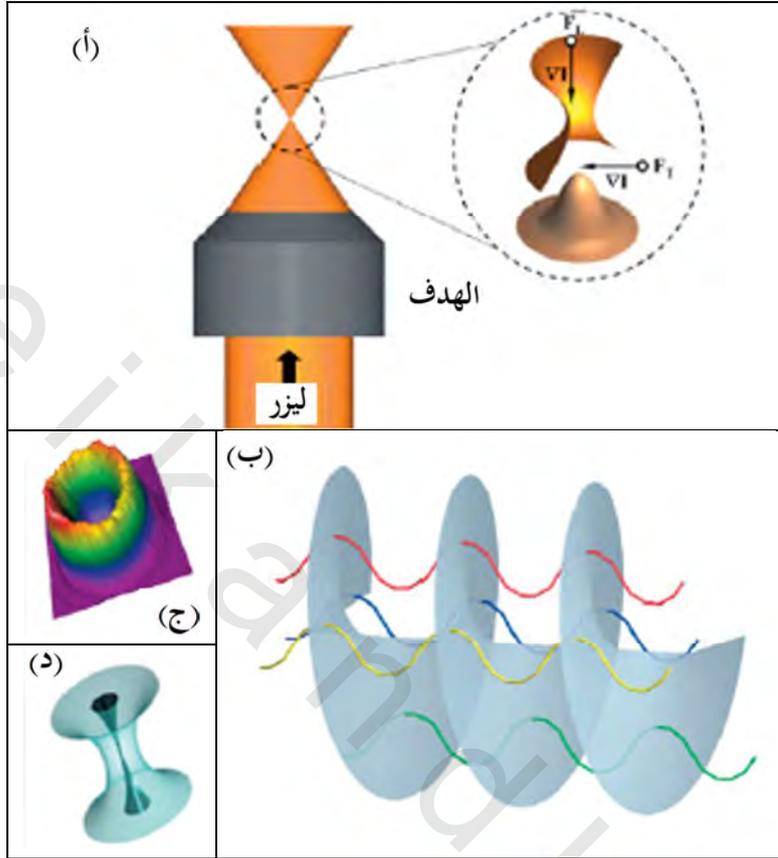
٨,٣,١ دراسات القوة باستخدام مصائد انحدار (ميل) الشعاع الوحيد

Force Studies Using Single-Beam Gradient Traps

إن جمع البيانات باستخدام تقنيات، مثل المجهر متحدة البؤرة، ومجهر التآلق الخارجي، أو مجهر تآلق الانعكاس الداخلي الكلي، يعتمد على كشف تآلق جزيء الصبغة الوحيد المستحث بضوء الإنارة. وعلى أية حال، لا يقتصر الليزر فقط على التآلق المثار؛ بل يمكن أيضا استخدام الإشعاع المترابط المركز لتقصي الجزيئات الوحيدة خلال المعالجة الميكانيكية بمصيدة ليزر بصرية. وكان أشكن Ashkin وزملاؤه أول من أعلنوا عن استخدام مصيدة انحدار الشعاع الوحيد، تتكون من شعاع ليزر جاوس (نقط TEM₀₀)، الذي يتم تركيزه بإحكام على العينة من خلال شبيثة الفتحة الرقمية NA العالية، مثل (قطر الفتحة الرقمية NA يساوي ١,٣) [103]. وسوف يواجه الجسيم

الواقع بالقرب من البقعة البؤرية القوة الجاذبة التي تتناسب مباشرة مع قوة المجال الكهربائي، وقابلية استقطاب الجزيء. وكما هو مبين في الشكل رقم (٨.٢ أ)، سيتم مسك الجسم بإحكام داخل انحدار الشدة ثلاثي الأبعاد (3D) بالقوة المستعرضة (F_T)، التي تنشأ من رسم شدة جاوس لليزر والقوة الطولية (F_L)، التي تنشأ من التركيز المحكم (الضيق) من شبيثة الفتحة الرقمية NA العالية. وعلى عكس قوة الانحدار الجاذبة هذه - على أية حال - تكون قوة التشتت التي يكون في اتجاه انتشار الشعاع أساساً وبشكل تجريبي، تجعل الحصر في اتجاه المحور-z أكثر صعوبة مما كان عليه في المستوى x-y.

ومن خلال دراسة متأنية لتوازن القوة مع التكامل الذكي للمصائد البصرية في مخططات الكشف المبتكرة، تم جمع قياسات الإزاحة على تشكيلة متنوعة من الجزيئات البيولوجية الفردية، ولاسيما المحركات الجزيئية. إن الطبيعة المرنة للمصيدة البصرية، تسمح بقياس القوى الصغيرة (~ ١٠^{-١٣} نيوتن) الناتجة من الجزيئات الحيوية بشكل رائع، التي تحوّل (تبدل) الطاقة الكيميائية إلى طاقة ميكانيكية، تستخدم للدفع ضد القوة المطبقة من المصيدة. ولقياس القوى المتولدة بالجزيئات الوحيدة، يتم ربط حبة بوليمر بحجم ميكرون (عادة البوليسترين) كيميائياً، أو كيميائياً حيوياً، إلى الجزيء الحيوي، وتكون بمثابة مقبض للمعالجة البصرية اللاحقة. ويتم استشعار (حسّ) إزاحات الحبيبة النانومترية، الناشئة من القوى الجزيئية الحيوية بآلية التغذية المرتدة، التي تزيد من قوة الليزر إلى المستوى اللازم؛ لاستعادة موقع الحبة المزاحة بمقدار طفيف. إن معايرة الإزاحات وتذبذبات القوة، توفر وسائل لرصد معلومات مفصلة حول علم الطاقة وحركة المحركات الجزيئية في مستوى الجزيء الوحيد. وتم مناقشة هذه التطورات المثيرة في عدد من الأبحاث الاستعراضية [10-13, 104-106].



الشكل رقم (٢، ٨). (أ) رسم موسع توضيحي لبؤرة الليزر ثلاثية الأبعاد من مصيدة انحدار الشعاع الوحيد. يتم توجيه شعاع ليزر جاوس خلال شبيئية الفتحة الرقمية NA العالية، لإنتاج انحدار شدة مركزة بإحكام ($|E_z|$). أي جسيم في محيط انحدار الشدة يواجه قوة مستعرضة (E_r) من نمط TEM_{00} من الليزر وقوة طولية (E_z)؛ للتركيز المحكم من الشبيئية. (ب) نمط دونات لاجير - جاوس Laguerre-Gaussian (LG_0^1) يبين التداخل الهدام على طول محور الشعاع؛ بسبب الطور الدوار للشعاع. والأشرطة الملونة تُمثل الموجات الضوئية الفردية التي تشكل الطور الدوار لجبهة الموجة الموضحة باللون الرمادي. (ج) صورة للشدة الناتجة منتجة من نتائج الوضع في انحدار شبيه بالدونات، الذي يحافظ على القلب مظلمًا (د) عندما يتم تركيزه بشبيئية الفتحة الرقمية NA العالية.

٨,٣,٢ الحصر (الأسر) الدوامي البصري Optical Vortex Trapping

منذ الملاحظات الأولية لأشكن وزملائه [103]، فقد تحقق تقدم في مجال الحصر البصري إلى حد كبير، سواء في مجال قياسات قوة الجزيء الوحيد، أو في تطوير أنواع أكثر كفاءة وتنوعاً من المصائد؛ لمعالجة طيف أوسع من الجسيمات في النطاق المجهرى (الميكروسكوبي) والنانوي (النانوسكوبي)، مع التركيز على التطبيقات البيولوجية. وتستند مصيدة انحدار الشعاع الوحيد، التي تستخدم نمط الليزر TEM₀₀ على توازن قوة الانحدار، الذي يحصر الجسيم وقوة التشتت المعاكسة، التي تقلل كفاءة حصر مصيدة الانحدار. وللحد من قوة التشتت هذه، ناقش أشكن استخدام أنماط ليزر الرتبة الأعلى [107]. وتضمنت دراسته نمط دونات لاجير- جاوس (LG₀¹)، الذي له قلب مظلم [108]. إن النظرة الاستثنائية لهذا النمط، هي نتيجة التداخل الهدام في الشعاع على طول المحور البصري، والمتولد بالطور الدوار للشعاع، كما هو موضح في الشكل رقم (٨,٢ ب) [109]. ويعرض الشكل رقم (٨,٢ ج) انحدار الشدة الناتج عن ذلك.

في السنوات الأخيرة، أصبح تطوير هذه الأشعة أو الحزم المضبوطة، أحد المجالات الواسعة والنشطة في مجال البحث [110]. ولقد أجرى هي He وآخرون دراسات في توليد هذه الأشعة للحصر البصري (بدءاً من نمط الدونات LG₀¹) [109]، باستخدام صورة ثلاثية الأبعاد hologram منتجة بالحاسوب (CGH)، واستخدمت لاحقاً بشكل كبير من قبل جاهجان Gahagan وآخرين [111] وأرلت Arlt وآخرين [112]. وكان التوضيح الأولي لفائدة الصورة ثلاثية الأبعاد المولد بالحاسوب CGHs في عام ١٩٩٢م من قبل بازينوف Bazhenov وآخرين [113]، مبيناً أن عناصر التصوير ثلاثي الأبعاد، يمكن أن تحت انحلافاً لولياً في جبهة الموجة الضوئية. وتعمل أنماط الصورة ثلاثية الأبعاد المولد بالحاسوب CGH كعنصر بصري انحرافي (DOE)، في مسار

الشعاع لإنتاج النمط المطلوب، والذي يمكن بعد ذلك اختياره واستخدامه. كما يمكن إحداث هذا الانخلاع نفسه بالإزاحة الحلزونية لجهة الموجة [114]. وعندما تم تركيزه أسفل بواسطة فتحة الشبيثة الرقمية NA العالية، يُحافظ الشعاع على قلبه مظلماً (الشكل رقم ٨،٢ د).

وفي ملاقيط tweezers الليزر التقليدية، يجب أن تكون أنواع الجسيمات التي يمكن حصرها ذات معامل انكسار أعلى من الوسط المحيط. وعلى الرغم من ظهور إمكانية حصر جسيمات ذات معامل انكسار منخفض، عن طريق استخدام شعاع الليزر TEM_{00} ، فإن هذه المخططات تتطلب مسحا سريعا لبؤرة الليزر حول الجسيم، أو استخدام نمط التداخل بين شعاعين من أشعة جاوس مزاحة الطور [115-116]. وبنمط LG_0^1 ، يمكن أن تُمسك بشكل مستقر كل من الجسيمات منخفضة الانكسار وعالية الانكسار في بؤرة الليزر [117, 118]. ولقد أعلنت الحسابات النظرية لكفاءات الحصر والجهود [119]، والتي تشير إلى أن كفاءات الحصر، تكون في المتوسط أكبر مع استخدام شعاع LG_0^1 من شعاع TEM_{00} [120, 121]. إن قوى الحصر الجانبية المعلنه لا تتغير، والزيادة في الكفاءة تكون إلى حد كبير؛ بسبب انعدام قوة التشتت، التي تؤدي إلى حصر أكثر كفاءة في الاتجاه الطولي.

إن استعمال أنماط الليزر، بخلاف الليزر المعتاد TEM_{00} مفيد في المجالات، حيث يكون الجسيم غير شفاف أو حساس جداً للتلف الضوئي. وسوف يسمح اختزال التلف الضوئي باختيار أكبر للمواد البيولوجية التي ستعالج بصرياً، بالإضافة إلى تقليل تسخين العينة. والملاحظة الأخرى للحصر الدوامي، هي القدرة على توليد حركة للجسيم المحصور بالطور الدوار للشعاع [122, 123]. ويسمح هذا الانتقال من العزم الزاوي إلى الجسيمات الماصة بدوران محكوم للجسيم المحصور، وهي أداة مفيدة جداً في الدراسات الخلوية [124, 125].

٨,٣,٣ الصفوف البصرية Optical Arrays

لقد كان العمل المثير نوعاً ما في مجال الحصر البصري، هو تطوير صفوف ملاقيط tweezers بصرية. و يمكن أن تُبنى مصائد متعددة بتبني مخطط اقتسام (اشتراك) الزمن، والذي تقوم فيه مرايا جلفانو أو كهروضغطية محكومة بالحاسوب، بمسح سريع لشعاع الليزر؛ لكي يضع بؤرة الليزر في مواقع متعددة في مستوى الشبيئية [115]. ويعتمد هذا المخطط على زمن الانتشار المحدود، الذي يأخذه الجسيم لترك موقع حصره الأصلي، ولا يعد هذا المخطط مثاليا لحصر الجسيمات الصغيرة، أو عدد كبير من الجسيمات. وللتغلب على هذا القيد، فقد تم تطوير صفوف ملاقيط بصرية ثلاثية الأبعاد (HOT arrays)، يمكن أن تتولد إما في بعدين أو ثلاثة أبعاد. وباستخدام تقنيات التصوير ثلاثي الأبعاد نفسها، المستخدمة في إنتاج المصيدة الدوامية البصرية، يمكن أن تتولد مصائد بصرية متعددة من شعاع ليزر وحيد. وقد تكون هذه المصائد ساكنة (ثابتة) أو ديناميكية (متحركة)، وقد تكون ملاقيط بصرية تقليدية، ومصائد دوامية، أو مصائد معتمدة على أنماط ليزر الرتبة الأعلى الأخرى. وهناك عدد من الطرائق الموجودة لإنتاج صفوف الملاقيط البصرية ثلاثية الأبعاد HOT، تتضمن استخدام شاشات عرض بلورية سائلة (LCDs) [126]، ومنغمات (معدلات) ضوئية مكانية [127] (SLMs)، وبصريات جيود (طبيعية، مجسمة) [128]. ويتضمن استخدام شاشات عرض بلورية سائلة LCDs أو المنغمات الضوئية المكانية SLMs، تقسيم الشعاع الوحيد إلى عدة أشعة منفصلة، حيث يمكن أن يكون لكل شعاع خواص متماثلة أو مختلفة في جهات موجته البصرية [129]. وعندما يتم تركيز الأشعة المفردة إلى أسفل بشبيئية الفتحة الرقمية NA العالية، تتولد قوى حصر في الأبعاد الثلاث [127]. وأحد التطبيقات المهمة لصفوف الملاقيط البصرية ثلاثية الأبعاد HOT، هو تشكيل المواد النانومترية، كل من الطبيعية (أي: الدائمة) والافتراضية (أي: المؤقتة). والقدرة على تراصف أو

ترتيب الجسيمات في صف محدد سلفاً أو منتظم، والذي يمكن التحكم فيه ديناميكياً بمرور الزمن، يجب أن تؤدي إلى تطبيقات مهمة في مجالات المعالجة الحيوية والتنظيم والبناء، وكذلك في التصنيع الدقيق وتقنية النانو [130].

٤، ٨ التطبيقات في مطيافية الجزيء الوحيد

Applications in Single-Molecule Spectroscopy

١، ٤، ٨ ديناميكية الشكل الجزيئي لجزيئات الحمض النووي DNA الوحيدة في

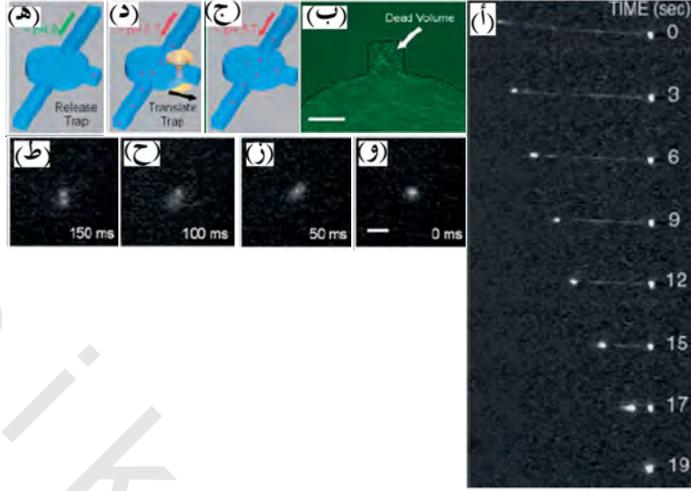
المحلول Conformational Dynamics of Single DNA Molecules in Solution

ونظراً لإقحام حاملات التآلق المتعددة، يمكن بسهولة رؤية جزيئات الحمض النووي DNA الوحيدة بأطوال تتراوح من ~ ٥ إلى ~ ٦٠ ميكرومتر في محلول باستخدام مجهر التآلق. وعلى الرغم من أنه يمكن الحصول على المعلومات المفيدة من مجرد ملاحظة حركات الحمض النووي DNA في المحلول، فلقد نتجت الاكتشافات المثيرة حول ديناميكية شكل جزيئي الحمض النووي، من استخدام مصائد الشعاع الوحيد البصرية لمعالجة جزيئات الحمض النووي DNA المتألقة، إما مباشرة، أو من خلال توجيه الحبة المرفقة [13]. وتوجيه الحبة، يمكن دراسة حركة البوليمر، وديناميكية الاسترخاء، والمعالجات المبتكرة في الزمن الحقيقي لزيادة فهمنا لسلوك البوليمر في المحلول [131, 60, 59]. وبالإضافة إلى فهم الخواص الفيزيائية للبوليمرات، فقد كان للحصر البصري والتصوير التآلقي قيمة في كشف حركية تكثيف وإزالة تكثيف جزيئات الحمض النووي DNA الوحيد. ويؤدي رصد الحمض النووي DNA في الخلايا دوراً حاسماً في تنظيم الفراغ وحفظه، ويرتبط بمجموعة من الوظائف البيولوجية المهمة، مثل تنشيط الجينات ونسخها. وفي الطبيعة - على سبيل المثال - يتم رصد حمض نووي DNA فيروس العاثية λ بطول كنتوري ~ ١٧ ميكرومتر بإحكام داخل

الرأس فقط ، بقياس قطري ٥٠ نانومتر. بينما يمكن ملاحظة الحمض النووي المكثف في الجسم الحي. إن الدراسات خارج الجسم ، تقدم مزيداً من المعلومات المفصلة حول الخواص التركيبية لمكثفات الحمض النووي DNA. وقد لوحظت جزيئات الحمض النووي DNA بأطوال كنتورية في نطاق الميكرومتر خارج الجسم ؛ لإحكام رصه في تراكيب حلقيه منظمة للغاية ، أو شبيهة بالدونات ، في وجود العديد من الكاتيونات المتعددة المختلفة والبروتينات. ويعتقد أن تكثيف الحمض النووي DNA ، يكون مستحثاً بداية بتعادل إلكتروستاتيكي من عمود فقري الحمض النووي المشحون سلبياً ، والذي يسمح بالرص المحكم نتيجة للنقص الكافي في طاقات التنافر [132].

لتقصي العمليات التحتية (الأساسية) لتكثيف الحمض النووي DNA ، فقد تم استخدام تقنيات التصوير الساكن ، مثل [المجهر الإلكتروني (EM) ، ومجهر القوة الذرية AFM] ؛ للحصول على صور عالية الوضوح لمكثفات الحمض النووي [132-134]. وتوفر هذه المناهج صوراً ساكنة للحمض النووي المكثف ، تحتوي على كم معلوماتي عالٍ. وعلى أية حال ، يتم عرض معلومات قليلة على حركية عملية التكثيف ، والتي تشترك في تحديد التركيب النهائي لمكثفات الحمض النووي [135]. وباستخدام تشتت الضوء الديناميكي ، تم جمع القياسات الكاملة على حركية تكثيف ، وإزالة تكثيف الحمض النووي ، ومع ذلك لم تتمكن هذه الدراسات من تصوير الأحداث الفردية على مستوى الجزيء الوحيد [136]. وحديثاً ، رُصدت عدة دراسات طيفية للجزيء الوحيد SMS لتكثيف وإزالة تكثيف الحمض النووي DNA الوحيد في المحلول [57, 61, 137]. لقد قام بالهورن Balhorn وزملاؤه بدمج علم الموائع الدقيقة ، والحصص البصري لعزل متسلسلات وحيدة من الحمض النووي DNA- λ (المرتبطة بالحببات) في تدفق البروتامين ، وهو البروتين المعروف لتكثيف الحمض النووي في المنى (الحيوان المنوي) [61] [الشكل رقم ٨.٣ (أ)]. وباستخدام التألق للتصور ، كشفت التغييرات

الديناميكية في طول الحمض النووي DNA معلومات على حركية تكثيف وإزالة تكثيف الجزيء. وتم إجراء دراستين من قبل يوشيكافا Yoshikawa وزملائه لمراقبة تكثيف وإزالة تكثيف لكل من (i) الحمض النووي الفردي T4DNA (~ ١٦٦ من أزواج الألف قاعدة kilobase) في المحلول، باستخدام البولي إيثيلين جليكول وكاتيون المغنسيوم Mg^{2+} [57] و(ii) وينتقل الحمض النووي الوحيد، المحصور بصرياً بين بيئتي التكثيف وإزالة التكثيف [137]. ومؤخراً، أعلن تشيو Chiu وزملاؤه، أن الصبغة الفلورية المقحمة YOYO-1 في الحمض النووي المستخدم بشكل شائع، يمكن أن تعمل كعامل تكثيف، تحت ظروف رقم هيدروجيني pH حمضي معتدل [62]. إن جزيئات الحمض النووي DNA المقحمة بصبغة YOYO - الفردية (~ ٤٨,٥ أزواج الألف قاعدة) - على سبيل المثال - كانت تنهار إلى تراكيب حلقية، بقطر يتراوح من ١٠٠ إلى ١٥٠ نانومتر، في رقم هيدروجيني pH ، يساوي ٥,٧. وباستخدام علم الموائع الدقيقة، يمكن تغيير بيئة المحلول حول مكثف الحمض النووي DNA ، المحصور بصرياً [الشكل رقم ٨,٣ (ب-هـ)]. إن إغلاق المصيدة يعمل على بدء تحولات الشكل الجزيئي لجزيئات الحمض النووي DNA المقحمة، بصبغة YOYO الوحيدة إلى حالة لفيفة (حلزون) عشوائية ممتدة، تحدث على مدى فترة زمنية ~ ١٥٠ ميلي ثانية [الشكل رقم ٨,٣ (و-ط)]. ومن المثير للاهتمام، أن الدراسات التي قام بها كل من بالهورن ويوشيكافا، قد رصدت اكتمال عملية التكثيف، وإزالة التكثيف للحمض النووي على فترة زمنية بالثنائي. ومن المحتمل أن تُعزى أزمنة الاكتمال الأبطأ إلى نقل كتلي بطيء في تصاميم الموائع، الأمر الذي يتطلب حدوث تعبئة (أو تفريغ) خلال تبادل المحلول. وبالنسبة لتشيو وزملائه، فقد كان يتم تبادل المحلول قبل بدء عملية إزالة التكثيف؛ مما يتيح الوصول إلى ديناميكية الفك (فك اللفيفة) الأسرع. وسيسمح التصوير السهل بمطيافية الجزيء الوحيد بإجراء مزيد من التحقيقات في العمليات المهمة والمثيرة من الناحية البيولوجية.



الشكل رقم (٨,٣). (أ) يوضح تسلسل الصور تكثيفاً متسلسلاً concatemer وحيداً من الحمض النووي λ -DNA في محلول البروتامين. (ب) تعرض الصور المتألفة تدفقاً بطيئاً من الحبات المتألفة ١ ميكرومتر داخل الشق الجانبي للغرفة الدقيقة الدائرية (شريط المقياس: ٥٠ ميكرومتر). (ج-هـ) الإجراءات المستخدمة لبدء إزالة تكثيف جزيئات الحمض النووي DNA الوحيد، مكونة من (i) تدفق أحماض نووية مكثفة DNAs في محلول ذي رقم هيدروجيني pH يساوي ٧,٥ ، داخل الغرفة الدقيقة الدائرية (ج)، (ii) حصر فردي، وانتقال الحمض النووي إلى الشق الجانبي (د). و (iii) تبدأ إزالة التكثيف بالمصيدة البصرية بعد إحلال المحلول ذي الرقم الهيدروجيني ٨ pH محل المحلول ذي الرقم الهيدروجيني ٧,٥ بالانتشار. (و-ط) تحدث إزالة تكثيف جزيء الحمض النووي λ -DNA الوحيد لأكثر من ١٥٠ ملي ثانية. وبعد $t = 0$ صفر، كان يكتسب كل إطار بدقة زمنية ٥٠ ملي ثانية. تحدث غشاوة طفيفة؛ لأن الحركات الداخلية للحمض النووي DNA ، كانت أسرع من معدل التقاط الصورة للكاميرا. وتم إعادة الطبع بترخيص من بروير Brewer وآخرين، Copyright Science (Washington, D. C.) 286, 120, 1999 AAAS.

٢, ٤, ٨ تقصي حركية جزيئات الإنزيم الوحيدة

Probing the Kinetics of Single Enzyme Molecules

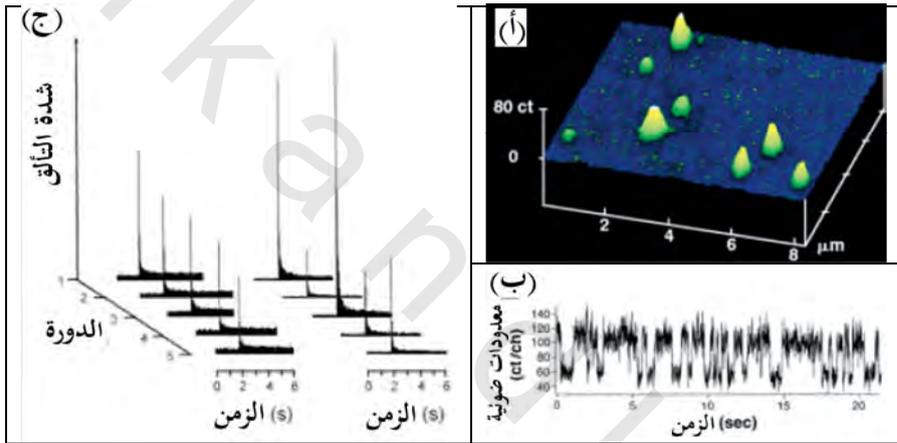
لتحقيق الكشف عن الجزيء الوحيد، يجب على الباحثين تكثيف المناهج التجريبية للتغلب على العوامل المحددة، مثل الضوضاء، والخلفية، وكفاءات

الكشف، والإشارات المنخفضة من الجزيئات قيد الفحص. وفي علم إنزيمات الجزيء الوحيد، فكل واحد من العوامل المحددة يفرض الاتجاه التجريبي نحو توضيح النشاط الحفزي لجزيئات الإنزيم الفردية. وأي تصميم بسيط نسبياً، يُستخدم للتغلب على عقبات الكشف، يعتمد على استخدام إنزيم لتضخيم الإشارة؛ نظراً لأن كل إنزيم يمكن أن يُحفز إنتاج العديد من جزيئات المنتج المتألقة من جزيئات ركيزة غير متألقة. واستخدام هذه الإستراتيجية، والإعلان عن أول دراسة للإنزيم الوحيد، كان في عام ١٩٦١م، من قبل روتمان Rotman، حيث قام بتحضير إنزيم بيتا-جالاكتوزيداز β -galactosidase الوحيد في قطرات دقيقة مائية، محتوية على ركائز غير متألقة لعدة ساعات، حتى يتراكم المنتج المتألق الكافي، ونستطيع الكشف عنه [138]. وللأسف فمع وجود فترة حضانة تستغرق ساعات، يكون هناك الحاجة إلى دقة زمنية أفضل؛ للحصول على معلومات مفصلة حول معدلات الحفز للإنزيم الوحيد. والأكثر حداثة، أن شيويه Xue ويونغ Yeung درس سلوك الإنزيم الوحيد بدقة زمنية في نطاق دقائق، عن طريق حقن تراكيز منخفضة من محلول الإنزيم، في أوعية شعرية بحجم الميكرون، متبوعة بتحضير جزيئات إنزيم الديهيدروجينيز لآكتات (LDH-1) lactate dehydrogenase الوحيدة في تراكيز بالملي مول من اللاكتات والـ NAD^+ غير المتألق [139]. وبشكل مثير للاهتمام، أظهرت البيانات أن معدلات الحفز للإنزيمات الفردية، كانت ثابتة على فترة ~ ساعتين، ورغم ذلك فهناك تفاوت بين كل معدلات الإنزيم، بنسبة تصل إلى عامل الأربعة، والذي من المفترض أن يكون بسبب التشكلات (الترتيبات) طويلة العمر المختلفة لكل إنزيم. وبالطريقة نفسها، قام دافيتشي Dovichi وزملاؤه بفحص نشاط إنزيم فوسفاتيز قلوي أمعاء العجل الوحيد في الأوعية الشعرية، ولاحظ عدم التجانس في معدلات الحفز، والذي كان يعتقد في هذه الحالة بأنه بسبب الاختلافات في التعديل الكيميائي للبروتين، مثل (عملية إضافة شق

جليكوزيل glycosylation بعد النقل (posttranslational)، بدلاً من التشكلات المختلفة للإنزيمات المتماثلة [140]. وقد ذكر تحليل المتابعة أن الإنزيمات عالية النقاوة لها معدلات تجانس متماثلة، واقترح أن عدم التجانس يكون نتاج الاختلافات الكيميائية بين الإنزيمات الوحيدة [141]. وبينما يمكن أن توفر تقنيات التضخيم هذه معلومات حول عدم التجانس الأستاتيكي للحفز الإنزيمي، فإن الكشف عن أحداث تحول إنزيمي وحيد في الزمن الحقيقي، يكون مستحيل المال بدقات زمنية منخفضة، على نحو مميز وكفاءات كشف غير كافية.

لقد تم رصد تحولات إنزيم وحيد في الزمن الحقيقي باستخدام بصريات متحدة البؤرة. وبشكل خاص، فلقد اكتشف شي Xie وزملاؤه أحداث تحولات فردية لجزيئات أوكسيداز الكولسترول المحصورة في مسام هلام الأجاروز agarose gel [الشكل رقم ٨،٤ (أ)]، المحتوي على الأكسجين وتراكيز من الكولسترول في مدى من الميكرو مول إلى الملي مول [32]. ويتم اختزال ثنائي نيوكليوتيد أدنين الفلافين (FAD) flavin adenine dinucleotide، الذي يعد مجموعة متألقة مرتبطة تساهمياً بالإنزيم، عن طريق الكولسترول إلى الصيغة غير المتألقة $FADH_2$ ، ثم يتأكسد بعد ذلك بالأكسجين ليعود الجزيء متألقة مرة ثانية. وكل دورة تألق/فتح/غلق، تمثل حدث تحول وحيد. وكما تم صياغته، فقد سمحت التجربة بدراسة مباشرة لكل تفاعل نصفى حفزي، وتم تحقيق المراقبة المباشرة لهذه الدورات فتح/غلق [الشكل رقم ٨،٤ (ب)] بدقة زمنية، تصل إلى ~١٠ ملي ثانية، كما وفرت معلومات مفصلة عن الخلل (الفوضى) الأستاتيكي للإنزيمات الوحيدة، بالإضافة إلى عنصر جديد، وهو الخلل الديناميكي. وكشف التحليل المفصل للأزمة على فترة زمنية من ثوان إلى دقائق، أن معدل الإنزيم يتغير (يتقلب) بمرور الزمن - هذه الخاصية تدعى "الخلل الديناميكي dynamic disorder" - ويعتقد أنها خاصة تعتمد على التغييرات الشكلية لجزيئي الإنزيم. وبالإضافة إلى مراقبة التألق المنبعث من الإنزيم، فيمكن ملاحظة أحداث

تحولات من إنتاج حاملات التآلق الوحيدة من ركائز غير متألقة مخمدة. ولقد استخدم ريجلر Rigler وزملاؤه المجهر متحد البؤرة، لدراسة الحفز من ثنائي هيدرورودامين dihyrorrhodamine 6G، عن طريق تثبيت جزيئات إنزيم بيروكسيداز الفجل الوحيدة على شريحة التغطية الزجاجية [33]. وهنا اكتشفت الإشارات المتألقة المستخلصة بمعقد المنتج والإنزيم، بدقة زمنية مقدارها ~ 20 ميلي ثانية، واستخدمت في حساب معدلات حفز الإنزيم الوحيد. وبالإضافة إلى البيانات التجريبية، تقدم أيضاً المناقشات النظرية فكرة مثيرة عن هذه الملاحظات الجديدة والمثيرة للاهتمام [142-145].



الشكل رقم (٤، ٨). (أ) صورة متحدة البؤرة ماسحة، لجزيء أوكسيداز الكولسترول متآلق فردي في هلام الأجاروز. (ب) أثر فلورسيني لدورات فتح/غلق، ناتجة من جزيء أوكسيداز الكولسترول النشط، تم إعادة طبعها بترخيص من لو Lu وآخرين، Science (Washington, D. C.) 282, 1877, Copyright 1998. (ج) نشاط الحفز للفوسفاتيز القلوي الموجودة داخل حويصلات دهنية وحيدة. كل ٦٠ ثانية، تم فحص المنتجات المتألقة المتراكمة المتشكلة من ركيزة غير متألقة (ثنائي فوسفات الفلورسين) عند طول موجي ٤٨٨ نانومتر، ثم تبيض لإعادة ضبط ساعة التفاعل. الجانب الأيسر من (ح)، يبين الحفز في حويصلة نصف قطرها ١,٥ ميكرومتر، والجانب الأيمن في حويصلة نصف قطرها ٥٠٠ نانومتر، وتم إعادة طبعها بترخيص من دار النشر السيفير: Chem. Phys., 247, Chiu et al., Manipulating the biochemical nanoenvironment around single molecules contained within vesicles, 133, Copyright (1999).

ولقد فتحت مطيافية الجزيء الوحيد الأبواب لإمكانية الملاحظة الجديدة في مجال حفز الإنزيم الوحيد، وبشكل مثير للاهتمام، تحظى التحقيقات عن تأثير البيئة المحيطة بالإنزيم باهتمام أقل. ومن الممكن تعديل النشاط الحفزي بتغيير خواص السطح أو الحجم المحيط بالإنزيم. وإجمالاً، يمكن أن تعرض الإنزيمات المحصورة في المواد المسامية المعدلة كيميائياً معدل تحسينات كبيراً، مقارنة بالإنزيم الموجود في محلول حر [146,147]. وعلاوة على ذلك، تشير كذلك تجارب الجزيء الوحيد إلى أن خواص السطح، ونسب السطح للحجم، يمكن أن تؤثر على النشاط. وعلى سبيل المثال، وجد تان Tan ويونغ Yeung أن جزيئات LDH-1 الوحيدة في غشاء البولي كربونات المسامي، تظهر فترات متقطعة من النشاط الحفزي المتغير، ومع ذلك فعندما تم دراستها في السيليكا المنصهرة (الملتحمة)، حيث يكون امتزاز الـ LDH-1 غير مفضل فيها؛ كانت معدلات الحفز ثابتة على مدى الفترة الزمنية نفسها [148]. وهناك منصة أخرى مصممة من قبل زاري Zare وزملائه، فحصت التأثيرات البيئية بالإنزيمات الكبسولية (المغلقة) داخل حويصلات وحيدة؛ بغية محاكاة البيئة البيولوجية [149, 150]. وباستخدام مصيدة بصرية، يتم تثبيت الحويصلة، وبالكشف متحد البؤرة، تم مراقبة عملية الحفز من ثنائي فوسفات الفلورسين بالفوسفاتيز القلوي، وكل أثر فلورسيني في الشكل رقم (٨.٤ ج)، يقابل تراكم المنتج متبوعاً بتقصي (باستشعار)، وتبييض منتج الصبغة المتكون بالإنزيم. ويبدو معدل الحفز متجانساً نسبياً في حويصلة نصف قطرها ١,٥ ميكرومتر، ولكن بالنسبة لحويصلة نصف قطرها ٥٠٠ نانومتر، تكون الإشارة المحضنة متغيرة تماماً، ويعتقد أنها ترتبط بنسبة السطح إلى الحجم للبيئة المحيطة بالإنزيم. وبالتفصيل الرائع المقدم من خلال كشف الجزيء الوحيد، فإن الإمكانيات المثيرة تكمن في دراسة تفاصيل الحفز الإنزيمي المتأثر بمجموعة العوامل البيئية.

٣, ٤, ٨ كشف وفرز وتسلسل جزيء وحيد للحمض النووي DNA

Single-Molecule DNA Detection, Sorting, and Sequencing

لقد وفرت الحساسية المعروضة بكشف الجزيء الوحيد إمكانيات مثيرة للاهتمام في مجال الكيمياء التحليلية، بما في ذلك تحليل الحمض النووي DNA، وعلم البروتينات، والحساسات، وفحص الجزيئات النادرة ضمن خليط معقد (من تشييد اندماجي). ومن هذه التطبيقات التحليلية المتنوعة، الدراسات التي تتضمن جزيئات الحمض النووي، وهي الأكثر انتشاراً وتطوراً. وتحتل جزيئات الحمض النووي DNA مركز الاهتمام في العديد من المجالات، مثل الطب، والطب الشرعي، والدراسات البيئية، وعلم الوراثة الأساسي، ولكن مازالت هناك عقبات كثيرة قائمة. إن تطوير تقنية تفاعل إنزيم البوليميريز المتسلسل (PCR) تغلبت على هذه المشاكل مبكراً، عن طريق جمع ما يكفي من الحمض النووي DNA للتجارب. ومع ذلك فما زال هذا الأسلوب يتطلب بروتوكول (نظام) عمل معين، أو مجموعة من شروط تفاعل البوليميريز المتسلسل لكل عينة من الحمض النووي DNA موضع الاهتمام، وهو ما يمثل تحدياً لإنتاج عينة حمض نووي DNA عالية الجودة، حتى لا يتم تكبير الشوائب، بالإضافة إلى تكبير تسلسل الحمض النووي المطلوب. ويلاحظ أنه مع تضخيم الحمض النووي، يتم استخدام تقنية الاستشراء الهلامي (الرحلان الكهربائي بالهلام)، والأداة التحليلية لتضخيم (لتقدير حجم) الحمض النووي DNA، كوسائل لتحديد التسلسل والبصمة الجينية، وعمل خرائط القيود، والتنميط الجيني (تحديد النمط الجيني) للعينة. ولقد ساهمت الابتكارات الحديثة في تحسين، أو حتى القضاء على هذه التقنيات في دراسات الحمض النووي وحيد الجزيء، حيث سهلت كثيراً مع ظهور الأصباغ عالية التألُّق الجديدة، مثل YOYO-1 (زيادة الحاصل الكمي على الترابط إلى الحمض النووي $500 \times$) [151]. وتشكل هذه العائلة من الأصباغ معقدات مستقرة مع الحمض النووي

DNA، عن طريق إقحام وإنتاج خلفية صغيرة، عندما تكون غير مرتبطة؛ مما يتيح الكشف عن الجزيئات الوحيدة للحمض النووي DNA في عينات مخففة تحت مجموعة واسعة من الظروف التجريبية [151]. وعلى سبيل المثال، فاستخدام الحساسية المعززة الممكنة بهذه الصبغة، بالإضافة إلى نسبة الصبغ (التلوين) المعروفة لجزيئات الصبغة إلى أزواج القاعدة؛ يكون من الممكن عمل علاقة بين الإشارة المتألقة المكتشفة مباشرة مع حجم أجزاء (شظايا) الحمض النووي (من عشرات إلى المئات من أزواج الألف قاعدة) الموجودة في تراكيز بالفيمتو مول femto-molar. ومع تصاميم المواع الدقيقة المضبوطة، وباستخدام لوح مستوٍ من الليزر المثار [152]، يكون من الممكن زيادة سريان العينة الحجمية (٢٠٠٠ جزء لكل ثانية، كما تم توضيحه)، أو لفرز جزيئات الحمض النووي، بعد الكشف بالتغيرات المتحكم فيها بتدفق التناضح الكهربائي [153]. إن تلك الطرائق المستخدمة لتحجيم أجزاء الحمض النووي من إشارة التفلور (التألق)، المنبعثة من الحمض النووي الفردي، توفر الوقت أيضاً من خلال تجاوز عملية الفصل بالاستشراد الكهربائي.

ويتم إجراء تحسينات مستمرة على هذه التقنيات؛ لتحليل الحمض النووي الوحيد، ومن الأمثلة على ذلك، تعديل هندسي بسيط على القنوات الدقيقة بإضافة مستدق (استدقاق: تضيق تدريجي) taper قبل منطقة الكشف، وذلك لتركيز وخلق تيار العينة الرقيق، الذي يتدفق بشكل مثالي خلال حجم مسبار الليزر المركز بشدة، والذي يُحسن كفاءة الكشف بمقدار ثلاثة أضعاف [154]. واستخدام تقنيات التصوير بالمللي ثانية المتنوعة، لقياس حركات الاستشراد الكهربائي بدون فصل كامل لجزيئات الحمض النووي DNA، وذلك بهدف زيادة الإنتاجية [155]. ومن خلال الدمج بين التصنيع الدقيق، وتصوير الحمض النووي DNA الوحيد، قام كرايجهيد Craighead وزملاؤه بإنشاء مصائد أنترابية، عن طريق إدخال مناطق متناوبة من انقباضات بحجم

نانومتري وميكرومتري على طول مسار هجرة الحمض النووي DNA، المدفوعة بتطبيق مجال كهربائي، وصنعت الملاحظة المثيرة للاهتمام، وهي أن جزيئات الحمض النووي DNA المحصورة، هربت بعمُر مميز، وأن جزيئات الحمض النووي DNA الطويلة، هربت من المصيدة الأنتروبية أسرع من جزيئات الحمض النووي الأقصر [156]. ومشابهة لتحجيم الأجزاء في متطلباتها التقنية، تم أيضاً إنجاز خريطة تقييد جزيء الحمض النووي الوحيد [157]، والتي تعطي معلومات تسلسل مهمة عن عدد وطبيعة مناظر (مشاهد) الانقسام، وأجزاء الحمض النووي الناتجة.

وبالإضافة إلى الفحوصات التحليلية، مثل تحجيم جزيء الحمض النووي، بالتسلسل الكامل للجينات العديدة، وأبرزها الجينات البشرية، فقد تطور مجال علم الجينات المقارن، ومعه الحاجة إلى تقنية التسلسل الحساسة والسريعة والدقيقة. وما تزال تقنيات تسلسل جزيء الحمض النووي الوحيد في مهدها، ولكن إثبات صحة مفهوم التجارب يعرض إمكانية وجود طريقة مجدية في نهاية المطاف، والتي تستطيع عمل تسلسل فعلي، يصل إلى ٢٠٠٠ زوج قاعدة ثنائية^١ (تفوق كثيراً تقنية التسلسل الأسرع اليوم) [158-162]. وتوجد عدة مخططات لتسلسل الجزيء الوحيد، ولتوضيح المنهج العام، نعطي مثالا لمخطط واحد يتكون من: (i) توسيم فلوري أو إدراج نيوكليوتيدات موسومة (معلمة) فلورياً في الحمض النووي DNA، بالإثارة المختلفة والأطوال الموجية المنبعثة لكل من القواعد الأربع (أو ما لا يقل عن قاعدتين). (ii) معالجة جزيئات الحمض النووي DNA الموسومة، والتي نفذت خلال ربط البيوتين- ستربتايفدين إلى المجال الدقيق، ويمكن التحكم فيها خلال شطف بالأوعية الشعرية أو بالحصر البصري. (iii) تحلل متسلسل أو شق قاعدة واحدة من الحمض النووي DNA كل مرة، بـ ٣-٥ إكسونوكلياز exonuclease 3'-5'. (iv) اعتبر كشف فعال لكل نيوكليوتيد موسوما فلورياً مفرداً، كما يُصبح معزولاً عن الحمض النووي

بعد الانشقاق. وسوف تستفيد هذه الطريقة من أفضل كفاءة توسيم، وفهم محسن للظروف الملائمة اللازمة لانشقاق قاعدة وحيدة. ويتضمن المثال الآخر التسلسل الآني (المتزامن) للعديد من الجزيئات الوحيدة خلال إدماج النيوكليوتيدات الموسومة بالصبغة، بواسطة بوليميريز الحمض النووي الراسي على شريحة التغطية الزجاجية، مع كشف مجهر التآلق [163]. وبالإضافة إلى ذلك، يستخدم المخطط المعروف بتسلسل الحمض النووي المسامي النانوي بروتينا عبر غشاء ألفا-هيموليزين α -hemolysin، وكشفا معتمدا على الكهرباء؛ لتمييز القواعد وفقاً للتغير المتميز في تدفق التيار [164]. وبغض النظر عن التفاصيل الدقيقة لإستراتيجيات تسلسل الجزيء الوحيد، فإن كل هذه الإستراتيجيات تواجه تحديات رهيبية. وعلى الرغم من ذلك، يبدو أن هذا الهدف الطموح سيتم تحقيقه بالتقدم الهائل في تقنيات الجزيء الوحيد.

٨،٤،٤ تصوير الجزيء الوحيد في الخلايا الحية

Single-Molecule Imaging in Living Cells

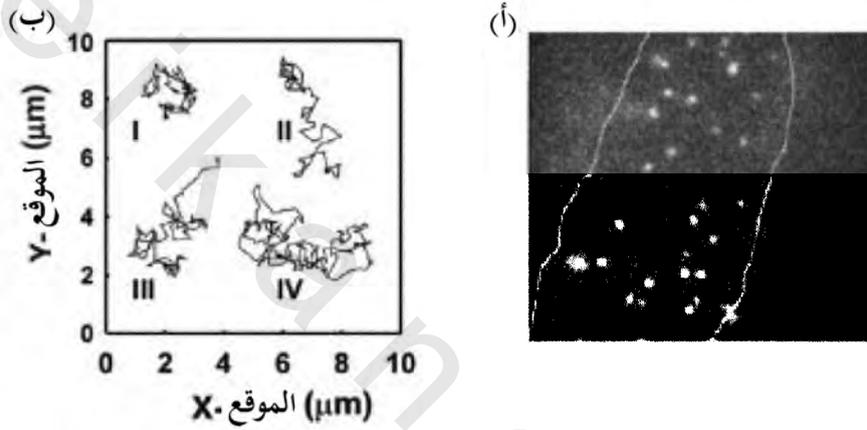
إن الخلية البيولوجية ربما تكون هي الآلة الجزيئية بالمقياس النانومتري المطلق. كما أن الخطوة التالية في فهم السلوك والوظيفة الخلوية، هي دراسة كل مكون من مكونات هذه الآلة بالتفصيل أثناء تنفيذها لمهامها الخاصة. وتقوم البروتينات بتنفيذ الجزء الأكبر من العمل في الخلية، وتعمل ضمن الشبكات الجزيئية التي يتم التحكم في وظائفها بالتمثيل الجيني، وتحويل الطاقة، والنقل عبر الغشاء. ولتقصي هذه العمليات في أغلب الأحيان، يتم تصوير الجزيء الوحيد من الخلايا باستخدام مجهر تآلق الانعكاس الداخلي الكلي (TIRF) (انظر المقطع ٨.٢.٣)، وأحياناً بالتآلق الخارجي. وبشكل رائع، لا يحدد التصوير الخلوي مواقع تركز البروتينات وتوزيعها داخل الخلية فقط، ولكن يمكنه أيضاً تحديد التراكم المرتبطة بها، ووضع تصور لمدى سرعة تحرك البروتينات، والربط والحل ضمن مسارات الإشارة. وعلاوة على ذلك، لا يتطلب

تصوير الجزيئات الوحيدة في الخلايا تزامن أنواع التفاعل، مثل معظم التجارب، ويمكنه كشف المعلومات عن الأوساط النادرة، و"تأثيرات الذاكرة" "memory effects"، التي عادة ما تُفقد خلال توسيط المجموعة.

وفي مجال التصوير الخلوي، فإن المنهج الأكثر تنوعاً، هو حث تعديل البروتين المتألق الأخضر (GFP) داخل خلية العائل (المضيف) خلال المعالجة الجينية [165]. والتحذير ذو الصلة بدراسات الجزيء الوحيد، هو أن فرط التعديل للبروتينات الموسومة GFP-، يُعقّد تحديد الجزيئات الوحيدة وتتبعها. ولسوء الحظ، يتكبد البروتين المتألق الأخضر GFP أعلى معدل تبيض ضوئي من بعض الأصباغ العضوية القوية، ويمكن أن يؤثر حجم البروتين المتألق الأخضر GFP (~٢٧ كيلو دالتون) على معدل الانتشار للبروتين الموسوم، ويشوش على وظيفته بسبب الإعاقة الفراغية.

إن التحدي الأكبر في تصوير جزيئات وحيدة داخل الخلايا، يكمن في وجود ضوء الخلفية المرتفعة. ووجود جزيئات، مثل الفلافينات flavins، وهيدريد ثنائي نيوكليوتيد أدينين نيكوتيناميد NADH [55]- على سبيل المثال - يمكن أن يولد مستويات عالية من التألق التلقائي. وقد يستخدم عدد من المخططات لتقليل ضوء خلفية إلى الحد الأدنى، بما في ذلك استخدام الإثارة في الضوء الأحمر، (الذي يقلل أيضاً التسمم الضوئي للخلية)، زمن الإطلاق، وتألق الانعكاس الداخلي الكلي. إن المعالجة الحذرة، وزراعة الخلايا في الأوساط الصحيحة، تساعد أيضاً في تخفيض تألق الخلفية [166]. وبعض الأمثلة (الشكل رقم ٨،٥) عن كيفية تطبيق طرائق تصوير الجزيء الوحيد تتضمن: (i) تتبع الجزيئات على سطح الخلية [169-166, 55]، وكذلك داخل السيتوبلازم [170, 169, 167, 55]، والنواة [170, 169]. (ii) دراسة تحويل (تبديل) الإشارة [171]. (iii) تصوير العدوى الفيروسية للخلايا [172]. (iv) قياس حركية التفكك بين الليجاند والمستقبل [171]. وسوف يعتمد التقدم المستقبلي على كل من

التقنيات الجديدة في استعمال المجهر، وتطوير المسابر البصرية الجديدة، مثل البروتينات المتألقة بالاستقرار الضوئي المحسن، والنوع الذي يمكن أن يُثار في الضوء الأحمر [173-174]. إن القدرة على تصوير عملية جزيئية على مستوى الجزيء الوحيد، سوف تُعرض مستويات جديدة من المعلومات حول العمليات الخلوية، وستزيد فهمنا للأنظمة البيولوجية.



الشكل رقم (٨،٥). (أ) صورة مجهر التآلق الخارجي لجزيئات متألقة وحيدة على سطح الخلية. (ب) قياس تجريبي لمسارات انتشار جزيء وحيد. تم إعادة الطبع بترخيص من السيفير، منقولة من: TrAC, 22, W. E. Moerner, Optical measurements of single molecules in cells, 544, Copyright (2003).

٨،٥ كشف الجزيء الوحيد بالأنواع الفلورية اللامعة

Single-Molecule Detection with Bright Fluorescent Species

٨،٥،١ المسابر البصرية Optical Probes

يمكن جعل الملاحظات مباشرة في العالم الجزيئي الوحيد النانوسكوبي باستخدام تقنيات لا بصرية، مثل مجاهر المسبار الماسح (SPM)، وماسك موضعي لقياس فولطية قنوات patch clamp، أو من خلال استخدام دورات الأكسدة

والاختزال. وعلى أية حال، فمعظم هذه المناهج غير صالحة لمراقبة الجزيئات الوحيدة في المحلول في الزمن الحقيقي. ولمثل هذه الدراسات، فقد ثبت أن كشف الجزيء الوحيد المستند على أساس بصري، يكون متعدد الاستعمال بشكل ملحوظ [7, 86]. وعلى الرغم من التقدم الرائع في مجال الأجهزة المستخدمة لرصد الجزيئات الوحيدة، إلا أن القياسات تكون محدودة في النهاية بالجزيئات المرسلة، والتي تكون في معظم الحالات أصبغا عضوية. أما بالنسبة لتجارب الجزيء الوحيد، فينبغي أن تمتلك الصبغة المثالية الخواص البصرية التالية: (i) استقرار ضوئي ممتاز. (ii) كفاءة الكم مرتفعة، ومقطع امتصاص عرضي (iii) دورات سريعة بين الحالات الأرضية والمثارة لإنتاج معدل عالٍ من انبعاث الفوتون (iv) احتمالية منخفضة للعبور بين الأنظمة من الحالة المثارة الأحادية إلى الحالة المظلمة الثلاثية (v) قمة انبعاث ضيقة، يتم فصلها جيداً عن قمة الامتصاص (vi) قمة إثارة تتوافق جيداً مع الأطوال الموجية لليزر المستخدم عادة، والتي تتجه بشكل مفضل نحو الضوء الأحمر، حيث تكون ضوضاء الخلفية والتألق الذاتي للعينات البيولوجية أقل ما يمكن [175]. وبالإضافة لهذه الخواص البصرية، يجب أن تحتوي الصبغة أيضاً على مجموعات وظيفية سهلة التعديل، بحيث يمكن أن تتكيف مع الوظائف الكيميائية المطلوبة الضرورية للتطبيق النهائي [176].

وحيالاً لا توجد صبغة تستوفي هذه المجموعة من المعايير المطلوبة تماماً، ولكن تم عمل تحسينات كبيرة على الأصباغ التقليدية، مثل (الفلورسين). وبالنسبة للخواص البصرية المعززة، تتضمن الأمثلة عائلة أصباغ ألكس Alex Family من المسابر الجزيئية، وكذلك عائلة أصباغ الكاربوسيانين (CyDyes) carbocyanine المصنعة بواسطة أميرشام العلوم الحيوية Amersham biosciences. وللحصول على وظائف كيميائية، فهناك الآن مجموعة مختارة عريضة تتضمن الأصباغ التي تغيير خواصها التألقية انتقائياً، عندما ترتبط مع أيونات مهمة بيولوجياً، مثل (الكالسيوم)، ولها مجموعات وظيفية كيميائية

متنوعة وكيمياء اقتران، ومتوافقة مع زراعة الخلايا طويلة المدى، وذلك لتسجيل الوظائف أو الحالات الخلوية المعينة [177]. إن عائلة البروتينات المتألقة الخضراء GFPs، هي إحدى أقوى المراسلين بشكل خاص، وذلك بسبب سهولة معالجة المراسل المتألق جينياً [25, 176, 178]. وفي هذه الحالة، يوفر اقتران علم الوراثة مع المراسل المتألق الجيد والتصوير الضوئي عالي الحساسية، نظرة ثاقبة غير مسبقة على الوظيفة الخلوية.

٢, ٥, ٨ النقاط الكمية Quantum Dots

لقد مكّن التقدم في مجال توليد البلورة غير العضوية من إنتاج جسيمات نانوية للاستعمال كمسابر جزيئية، كما أن بلورات أشباه الموصلات النانوية، والتي يُطلق عليها عموماً النقاط الكمية أو نقاط الكم (QDs)، تمتلك خواص بصرية فريدة؛ مما يجعلها تتصرف لا كجزيئات صغيرة، ولا كمواد صلبة كبيرة. إنها تتكون عادة من قلب من سيلينيد الكاديوم CdSe، وصدفة من كبريتيد الكاديوم Cds أو كبريتيد الزنك ZnS، وعادة ما يتراوح حجم هذه الجسيمات النانوية في المدى من ٢ إلى ١٠ نانومتر [179]. ولنقاط الكم QDs أفضلية على الأصباغ العضوية، حيث يمكن ضبطها للحصول على الخواص المتألقة المطلوبة، مثل: حاصل كمّ عالٍ، واستقرار ضوئي عالٍ، ومعامل إخماد (اندثار) عالٍ، وأطياف انبعاث ضيقة، ولكن مع نطاق إثارة عريض (يمكن أن تُثار مراسلات متعددة في طول موجي واحد)، وعمر تألق طويل [179-182]. وهذه الخواص تجعل الانبعاثات كثيفة ومثالية لدراسات الجزيء الوحيد. وعلى أية حال، فإضافة أصداف مُشيدة لزيادة الذوبانية والتوافق الحيوي، يمكن أن تجعل الجزيئات ضخمة بالمقارنة مع مسابر أخرى. إن المجال الصاعد الرئيس من نقاط الكم، يكون في عمل مترافق حيوي لجزيء وحيد للدراسات داخل الجسم وخارجه من الأنظمة البيولوجية، التي يمكن إجراؤها في بعض الحالات بدون إعاقة العمليات

الخلوية [183-185]. ولكن لسوء الحظ، وعلى عكس البروتينات المتألقة الخضراء GFPs، لا يمكن أن ترتبط نقاط الكم QDs بالبروتينات إلا بعد استخلاصها.

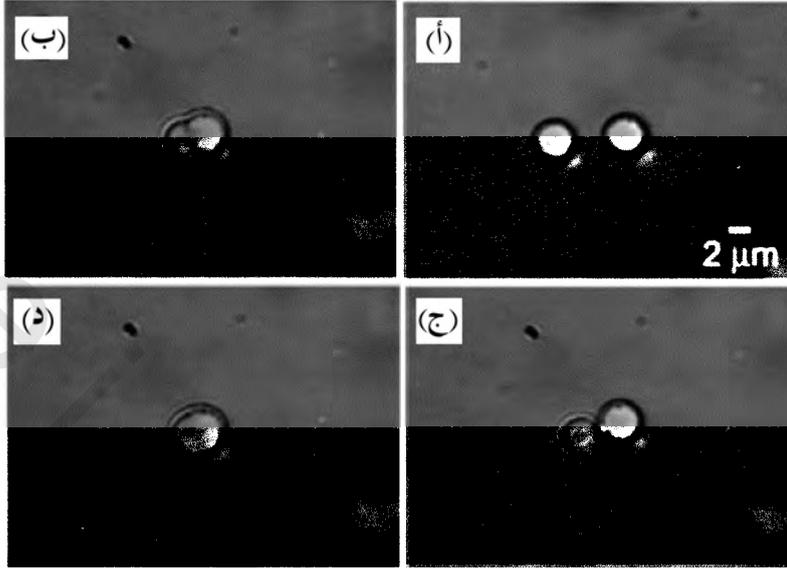
٦، ٨ الكيمياء النانوية بالحوصلات والقطيرات الدقيقة

Nanoscale Chemistry with Vesicles and Microdroplets

بينما شهد مجال علم النانو نموا هائلا في كل من تصنيع التراكيب النانوية، وتصوير مثل هذه الأشياء النانوية، إلا أن تجارب قليلة عرضت القدرة على التحكم في التفاعلات الكيميائية في النطاق النانومتري، والمحصور ضمن حجوم من المحلول بالفيمتو لتر (10^{-15} لتر). وهذه القدرة ذات صلة خاصة بالتقدم في كشف الجزيء الوحيد. وبالرغم من أننا نستطيع الكشف عن الجزيئات الوحيدة، إلا أن معظم هذه الدراسات تعتمد على استخدام محاليل ضخمة، والتي ينبغي أن تحتوي على تراكيز عالية بما فيه الكفاية من الجزيئات المهمة، ولذلك يمكن عزل جزيء وحيد بسهولة [186, 187]. ولكي نستطيع المعالجة الكيميائية وبشكل انتقائي لجزيء واحد فقط، أو لعدد قليل من الجزيئات في زمن واحد، تلزم إستراتيجية لتحديد موضع التحول الكيميائي وحصره في محلول الجزيئات المختارة المهمة.

ولقد استخدم منهجان للتحكم في التحولات الكيميائية للجزيئات ضمن حجوم فائقة الصغر (فيمتو لتر أو أقل). وأعلن زاري Zare وزملاؤه، أن المنهج الأول يعتمد على استخدام الحوصلات الدهنية، والتي يتم فيها أولاً تغليف الجزيئات موضع الدراسة داخل الحويصلة [149]. وبعدئذ يمكن معالجة الحوصلات الفردية ميكانيكياً (بمصيصة بصرية أو ماصات دقيقة). ولبدء التحول الكيميائي في مقياس الطول الصغير هذا، يتم جلب حويصلتين، تحتوي كل واحدة على نوع مختلف من الجزيئات المتفاعلة في تلامس، وتدمجان معاً عن طريق تطبيق مجال كهربائي قصير (ميكرو ثانية)، ومكثف (ك فولت سم⁻¹) من خلال زوج من إلكترودات ألياف الكربون الدقيقة [150]

[188, 189]. وبالإضافة إلى استخدام المجال الكهربائي، يمكن تحقيق دمج الليبوزومات على أساس فردي، باستخدام شعاع ليزر مركز، وعلى مقياس كبير باستخدام المواد الكيميائية [190]. والطريقة الثانية لتحقيق التحكم في التحولات الكيميائية النانوية، هي استخدام قطيرات مائية دقيقة ونانوية، يتم نثرها في وسط عديم الامتزاج [191]. ويمكن أن تتولد هذه القطيرات على رقاقة في نظام موائع دقيق بتحكم ممتاز، ويمكن تغليف الجزيئات موضع الدراسة ضمن القطيرات أثناء تكوينها. وعلى أية حال، فالمعالجة الميكانيكية المباشرة لهذه القطيرات غير بسيطة، ويتم تحقيقها بشكل أفضل من خلال استخدام المصيدة الدوامية [117, 110]. ومثل الحويصلات، يمكن أن تندمج هذه القطيرات الفردية معاً، إما تلقائياً، وإما بقوة مطبقة صغيرة (الشكل رقم ٨، ٦)، بحيث ستختلط مكوناتها الخاصة ويبدأ التفاعل [191]. وتكمن فائدة استخدام الحويصلات الدهنية في طبيعة محاكياتها الحيوية - كما هو موضح من قبل أوروار Orwar وزملائه - والمجموعة الرائعة للطوبولوجيا والأشكال التي تُظهرها هذه الليبوزومات [192-194]. وتستند فائدة منصة القطيرة على السهولة والتحكم التي تنتج بها القطيرات في منصة الموائع الدقيقة، بالإضافة إلى تشكيلة واسعة من الظواهر البيئية المهمة التي قد تُدرس وتستغل في استخدام القطرات. والمثال المفيد بشكل خاص، هو إمكانية تركيز الجزيئات داخل قطيرات مائية فردية لمستويات عالية جداً [195]، والتي تقدم إمكانيات جديدة في فهم تفاعلات الجزيء الوحيد المؤكدة مكانياً، وتأثيرات الازدحام (الاحتشاد) للجزيئات الضخمة.



الشكل رقم (٦، ٨). تسلسل من صور يوضح دمج الموجة لانتين من القطيرات الدقيقة المائية في الزيت. القطيرات بمقاس قطر ٤ ميكرومتر، يناظر حجم ١٠×٢^{-١٣} لتر. تم إعادة الطبع بترخيص من السيفير، نقلاً من: TrAC, 22, D. T. Chiu, Micro- and nanoscale chemical analysis of individual sub-cellular compartments, 528, Copyright 2003.

٨,٧ وجهات النظر Perspectives

إن دراسات الجزيء الوحيد والتقنيات، تستعد لعرض المفاهيم الأساسية عن العالم الجزيئي والنانوي، ولتوفير الأدوات الجديدة التي تتقصى طرائق العمل الداخلية للخلايا الحية الفردية. وخلال الأعوام الماضية، شهدنا التطبيق المتزايد لطرائق الجزيء الوحيد المؤسسة في علم الأحياء، مثل مجهر القوة الذرية AFM، ومجهر التآلق عالي الحساسية، بالإضافة إلى نشوء التقنيات الجديدة التي أصبحت ممكنة بفضل التقدم في مجال البصريات والأجهزة. وبالتأكيد ستستمر الوتيرة السريعة التي يتقدم بها هذا المجال في السنوات القادمة، ليقدم لنا وجهات النظر في عرض الآلات بمقياس النانو والمحركات الجزيئية اللذين صنعا العمل البيولوجي.

شكر وتقدير Acknowledgments

يتقدم كريستوفر C. L. K. بالشكر إلى المؤسسة القومية للعلوم على أبحاث الدراسات العليا. وقد تم دعم هذا العمل من قبل المعاهد القومية للصحة (R01 GM65293)، ومؤسسة كيك.

المراجع References

- 1 W. Ho, Single-molecule chemistry, *J. Chem. Phys.* 2002, 117, 11033–11061.
- 2 A. Ikai, STM and AFM of bio/organic molecules and structures, *Surf. Sci. Rep.* 1996, 26, 263–332.
- 3 M. A. Poggi, L. A. Bottomley, P. T. Lillehei, Scanning probe microscopy, *Anal. Chem.* 2002, 74, 2851–2862.
- 4 P. T. Lillehei, L. A. Bottomley, Scanning probe microscopy, *Anal. Chem.* 2000, 72, 189R–196R.
- 5 L. A. Bottomley, Scanning probe microscopy, *Anal. Chem.* 1998, 70, 425R–475R.
- 6 S. Nie, R. N. Zare, Optical detection of single molecules, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1997, 26, 567–596.
- 7 X. S. Xie, J. K. Trautman, Optical studies of single molecules at room temperature, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1998, 49, 441–480.
- 8 S. Weiss, Fluorescence spectroscopy of single biomolecules, *Science* (Washington, D. C.) 1999, 283, 1676–1683.
- 9 W. E. Moerner, A dozen years of single-molecule spectroscopy in physics, chemistry, and biophysics, *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 910–927.
- 10 C. Bustamante, J. C. Macosko, G. J. L. Wuite, Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000, 1, 130.
- 11 K. Svoboda, S. M. Block, Biological applications of optical forces, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994, 23, 247–285.
- 12 A. D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith, R. M. Simmons, Single-molecule biomechanics with optical methods, *Science* (Washington, D. C.) 1999, 283, 1689–1695.
- 13 C. L. Kuyper, D. T. Chiu, Optical trapping: a versatile technique for biomanipulation, *Appl. Spectrosc.* 2002, 56, 300A–312A.
- 14 M. Ludwig, M. Rief, L. Schmidt, H. Li, F. Oesterhelt, M. Gautel, H. E. Gaub, AFM, a tool for single-molecule experiments, *Appl. Phys. A* 1999, 68, 173–176.
- 15 J. K. Trautman, J. J. Macklin, L. E. Brus, E. Betzig, Near-field spectroscopy of single molecules at room temperature, *Nature* (London) 1994, 369, 40–42.
- 16 S. Xie, R. C. Dunn, Probing single molecule dynamics, *Science* (Washington, D. C.) 1994, 265, 361–364.
- 17 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, 2-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science* (Washington, D. C.) 1990, 248, 73–76.

- 18 T. Plakhotnik, D. Walser, M. Pirotta, A. Renn, U. P. Wild, Nonlinear spectroscopy on a single quantum system: two-photon absorption of a single molecule, *Science* (Washington, D. C.) 1996, 271, 1703.
- 19 E. J. Sanchez, L. Novotny, G. R. Holtom, S. Xie, Room-temperature fluorescence imaging and spectroscopy of single molecules by two-photon excitation, *J. Phys. Chem. A* 1997, 101, 7019–7023.
- 20 T. Wilson, *Confocal Microscopy*, Academic Press, San Diego, 1990.
- 21 J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York, 1995.
- 22 M. Eigen, R. Rigler, Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994, 91, 5740–5747.
- 23 P. Schuille, U. Haupts, S. Maiti, W. W. Webb, Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation, *Biophys. J.* 1999, 77, 2251–2265.
- 24 M. J. Wirth, D. Swinton, Single-molecule study of an adsorbed oligonucleotide undergoing both lateral diffusion and strong adsorption, *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 1472–1477.
- 25 A. Zumbusch, Single-molecule spectroscopy of the green fluorescent protein, *Single Mol.* 2001, 2, 287–288.
- 26 M. Boehmer, J. Enderlein, Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: methodology and technology, *Chem. Phys. Chem.* 2003, 4, 792–808.
- 27 M. Diez, M. Boersch, B. Zimmermann, P. Turina, S. D. Dunn, P. Graeber, Binding of the b-subunit in the ATP synthase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 2004, 43, 1054–1064.
- 28 S. A. Sanchez, J. E. Brunet, D. M. Jameson, R. Lagos, O. Monasterio, Tubulin equilibrium unfolding followed by time-resolved fluorescence and fluorescence correlation spectroscopy, *Protein Sci.* 2004, 13, 81–88.
- 29 A. Schenk, S. Ivanchenko, C. Roecker, J. Wiedenmann, G. U. Nienhaus, Photodynamics of red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 2004, 86, 384–394.
- 30 S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare, Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy, *Science* (Washington, D. C.) 1994, 266, 1018–1021.
- 31 S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare, Real-time detection of single molecules in solution by confocal fluorescence microscopy, *Anal. Chem.* 1995, 67, 2849–2857.
- 32 H. P. Lu, L. Xun, X. S. Xie, Single-molecule enzymatic dynamics, *Science* (Washington, D. C.) 1998, 282, 1877–1882.
- 33 L. Edman, Z. Foeldes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, The fluctuating enzyme: a single molecule approach, *Chem. Phys.* 1999, 247, 11–22.
- 34 S. Wennmalm, L. Edman, R. Rigler, Conformational fluctuations in single DNA molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, 94, 10641–10646.

- 35 D. M. Warshaw, E. Hayes, D. Gaffney, A.-M. Lauzon, J. Wu, G. Kennedy, K. Trybus, S. Lowey, C. Berger, Myosin conformational states determined by single fluorophore polarization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 8034–8039.
- 36 T. Ha, A. Y. Ting, J. Liang, W. B. Caldwell, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss, Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 893–898.
- 37 H. Yang, G. Luo, P. Karnchanaphanurach, T.-M. Louie, I. Rech, S. Cova, L. Xun, X. S. Xie, Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer, *Science* (Washington, D. C.) 2003, 302, 262–266.
- 38 X. Zhuang, H. Kim, M. J. B. Pereira, H. P. Babcock, N. G. Walter, S. Chu, Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules, *Science* (Washington, D. C.) 2002, 296, 1473–1476.
- 39 E. Tan, T. J. Wilson, M. K. Nahas, R. M. Clegg, D. M. J. Lilley, T. Ha, A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 9308–9313.
- 40 K. Weninger, M. E. Bowen, S. Chu, A. T. Brunger, Single-molecule studies of snare complex assembly reveal parallel and antiparallel configurations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 14800–14805.
- 41 C. Hofmann, T. J. Aartsma, H. Michel, J. Koehler, Direct observation of tiers in the energy landscape of a chromoprotein: a single-molecule study, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 15534–15538.
- 42 E. L. Chandler, A. L. Smith, L. M. Burden, J. J. Kasianowicz, D. L. Burden, Membrane surface dynamics of DNA-threaded nanopores revealed by simultaneous single-molecule optical and ensemble electrical recording, *Langmuir* 2004, 20, 898–905.
- 43 T. Ha, T. A. Laurence, D. S. Chemla, S. Weiss, Polarization spectroscopy of single fluorescent molecules, *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 6839–6850.
- 44 C. G. Hubner, A. Renn, I. Renge, U. P. Wild, Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen, *J. Chem. Phys.* 2001, 115, 9619–9622.
- 45 B. Bowen, N. Woodbury, Single-molecule fluorescence lifetime and anisotropy measurements of the red fluorescent protein, DsRed, in solution, *Photochem. Photobiol.* 2003, 77, 362–369.
- 46 J. Hernando, M. van der Schaaf, E. M. H. P. van Dijk, M. Sauer, M. F. Garcia-Parajo, N. F. van Hulst, Excitonic behavior of rhodamine dimers: a single-molecule study, *J. Phys. Chem. A* 2003, 107, 43–52.
- 47 D. S. Ko, Photobleaching time distribution of a single tetramethylrhodamine molecule in agarose gel, *J. Chem. Phys.* 2004, 120, 2530–2531.
- 48 L. A. Deschenes, D. A. Vanden Bout, Single molecule studies of heterogeneous dynamics in polymer melts near the glass transition, *Science* (Washington, D. C.) 2001, 292, 255–258.

- 49 R. A. L. Vallee, M. Cotlet, J. Hofkens, F. C. De Schryver, K. Muellen, Spatially heterogeneous dynamics in polymer glasses at room temperature probed by single molecule lifetime fluctuations, *Macromolecules* 2003, 36, 7752–7758.
- 50 X. Tan, P. Nalbant, A. Toutchkine, D. Hu, E. R. Vorpagel, K. M. Hahn, H. P. Lu, Single molecule study of protein-protein interaction dynamics in a cell signaling system, *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 737–744.
- 51 M. Unger, E. Kartalov, C.-S. Chiu, H. A. Lester, S. R. Quake, Single-molecule fluorescence observed with mercury lamp illumination, *BioTechniques* 1999, 27, 1008–1014.
- 52 J. S. Kuo, C. L. Kuyper, P. B. Allen, D. T. Chiu, High power LED as excitation source for fluorescence applications, *Electrophoresis* 2004 in press.
- 53 K. S. McCain, D. C. Hanley, J. M. Harris, Single-molecule fluorescence trajectories for investigating molecular transport in thin silica sol-gel films, *Anal. Chem.* 2003, 75, 4351–4359.
- 54 M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane, T. Yanagida, Single molecule imaging of fluorophores and enzymic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 235, 47–53.
- 55 W. E. Moerner, Optical measurements of single molecules in cells, *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 544–548.
- 56 T. T. Perkins, D. E. Smith, S. Chu, Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain, *Science* (Washington, D. C.) 1994, 264, 819–822.
- 57 K. Yoshikawa, Y. Matsuzawa, Nucleation and growth in single DNA molecules, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 929–930.
- 58 D. T. Chiu, R. N. Zare, Biased diffusion, optical trapping, and manipulation of single molecules in solution, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 6512–6513.
- 59 S. R. Quake, H. Babcock, S. Chu, The dynamics of partially extended single molecules of DNA, *Nature* (London) 1997, 388, 151–154.
- 60 Y. Arai, R. Yasuda, K.-I. Akashi, Y. Harada, H. Miyata, K. Kinoshita, H. Itoh, Tying a molecular knot with optical tweezers, *Nature* (London) 1999, 399, 446–448.
- 61 L. R. Brewer, M. Corzett, R. Balhorn, Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule, *Science* (Washington, D. C.) 1999, 286, 120–123.
- 62 C. L. Kuyper, G. P. Brewood, D. T. Chiu, Initiating conformation transitions of individual YOYO-intercalated DNA molecules with optical trapping, *Nano Lett.* 2003, 3, 1387–1389.
- 63 I. Sase, H. Miyata, S. I. Ishiwata, K. Kinoshita, Jr., Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, 94, 5646–5650.
- 64 T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokota, T. Ando, Direct observation of processive movement by individual myosin v molecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 272, 586–590.

- 65 A. B. Asenjo, N. Krohn, H. Sosa, Configuration of the two kinesin motor domains during ATP hydrolysis, *Nat. Struct. Bio.* 2003, 10, 836–842.
- 66 H. Hess, C. M. Matzke, R. K. Doot, J. Clemmens, G. D. Bachand, B. C. Bunker, V. Vogel, Molecular shuttles operating undercover: a new photolithographic approach for the fabrication of structured surfaces supporting directed motility, *Nano Lett.* 2003, 3, 1651–1655.
- 67 K. Adachi, R. Yasuda, H. Noji, H. Itoh, Y. Harada, M. Yoshida, K. Kinosita, Jr., Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 7243–7247.
- 68 A. M. van Oijen, P. C. Blainey, D. J. Crampton, C. C. Richardson, T. Ellenberger, X. S. Xie, Single-molecule kinetics of α -exonuclease reveal base dependence and dynamic disorder, *Science* (Washington, D. C.) 2003, 301, 1235–1238.
- 69 T. Schmidt, G. J. Schutz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, Imaging of single molecule diffusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, 93, 2926–2929.
- 70 P. C. Ke, C. A. Naumann, Hindered diffusion in polymer-tethered phospholipid monolayers at the air-water interface: a single-molecule fluorescence imaging study, *Langmuir* 2001, 17, 5076–5081.
- 71 C. Seebacher, C. Hellriegel, F.-W. Deeg, C. Braeuchle, S. Altmaier, P. Behrens, K. Muellen, Observation of translational diffusion of single terrylenediimide molecules in a mesostructured molecular sieve, *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 5591–5595.
- 72 D. Axelrod, Total internal-reflection fluorescence microscopy, *Methods. Cell Biol.* 1989, 30, 245–270.
- 73 W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. Van Orden, J. H. Werner, R. A. Keller, Single-molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature, *Chem. Rev.* 1999, 99, 2929–2956.
- 74 M. F. Paige, E. J. Bjerneld, W. E. Moerner, A comparison of through-the-objective total internal reflection microscopy and epi-fluorescence microscopy for single-molecule fluorescence imaging, *Single Mol.* 2001, 2, 191–201.
- 75 R. M. Dickson, D. J. Norris, W. E. Moerner, Simultaneous imaging of individual molecules aligned both parallel and perpendicular to the optic axis, *Phys. Rev. Lett.* 1998, 81, 5322–5325.
- 76 A. Bartko, R. M. Dickson, Imaging three dimensional single molecule orientations, *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 11237–11241.
- 77 S. H. Kang, M. R. Shortreed, E. S. Yeung, Real-time dynamics of single-DNA molecules undergoing adsorption and desorption at liquid-solid interfaces, *Anal. Chem.* 2001, 73, 1091–1099.
- 78 M. A. Osborne, C. L. Barnes, S. Balasubramanian, D. Klenerman, Probing DNA surface attachment and local environment using single-molecule spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 3120–3126.

- 79 R. Yamasaki, M. Hoshino, T. Wazawa, Y. Ishii, T. Yanagida, Y. Kawata, T. Higurashi, K. Sakai, J. Nagai, Y. Goto, Single molecular observation of the interaction of GroEL with substrate proteins, *J. Mol. Biol.* 1999, 292, 965–972.
- 80 R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, T. Yanagida, Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules, *Nature* (London) 1996, 380, 451–453.
- 81 A. Seitz, H. Kojima, K. Oiwa, E.-M. Mandelkow, Y.-H. Song, E. Mandelkow, Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and map2c, *EMBO J.* 2002, 21, 4896–4905.
- 82 T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution, *Nature* (London) 1995, 374, 555–559.
- 83 K. Oiwa, J. F. Eccleston, M. Anson, M. Kikumoto, C. T. Davis, G. P. Reid, M. A. Ferenczi, J. E. T. Corrie, A. Yamada, H. Nakayama, D. R. Trentham, Comparative single-molecule and ensemble myosin enzymology: sulfoin-docyanine ATP and ADP derivatives, *Biophys. J.* 2000, 78, 3048–3071.
- 84 Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, T. Yanagida, Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real-time, *Biophys. J.* 1999, 76, 709–715.
- 85 F. Hashimoto, S. Tsukahara, H. Watarai, Lateral diffusion dynamics for single molecules of fluorescent cyanine dye at the free and surfactant-modified dodecane-water interface, *Langmuir* 2003, 19, 4197–4204.
- 86 S. Nie, S. R. Emory, Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering, *Science* (Washington, D. C.) 1997, 275, 1102–1106.
- 87 K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, Single-molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* 1997, 78, 1667–1670.
- 88 J. Jiang, K. Bosnick, M. Maillard, L. Brus, Single-molecule Raman spectroscopy at the junctions of large Ag nanocrystals, *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 9964–9972.
- 89 C. J. L. Constantino, T. Lemma, P. A. Antunes, R. Aroca, Single-molecule detection using surface-enhanced resonance Raman scattering and Langmuir-Blodgett monolayers, *Anal. Chem.* 2001, 73, 3674–3678.
- 90 T. Lemma, R. F. Aroca, Single-molecule surface-enhanced resonance Raman scattering on colloidal silver and Langmuir-Blodgett monolayers coated with silver overlayers, *J. Raman Spectrosc.* 2002, 33, 197–201.
- 91 P. Goulet, N. Pieczonka, R. Aroca, Single molecule SERRS of mixed perylene Langmuir-Blodgett monolayers on novel metal island substrates, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* 2003, 48, 146–152.
- 92 Z. Wang, S. Pan, T. D. Krauss, H. Du, L. J. Rothberg, The structural basis for giant enhancement enabling single-molecule Raman scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 8638–8643.

- 93 A. Weiss, G. Haran, Time-dependent single molecule Raman scattering as a probe of surface dynamics, *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 12348–12354.
- 94 J. M. North, L. J. van de Burgt, N. S. Dalal, A Raman study of the single molecule magnet Mn12-acetate and analogs, *Solid State Commun.* 2002, 123, 75–79.
- 95 J. M. North, N. S. Dalal, Raman and infrared modes of the single molecule magnet Fe8Br8 and analogs, *J. Appl. Phys.* 2003, 93, 7092–7094.
- 96 H. Xu, E. J. Bjerneld, M. Kaell, L. Borjesson, Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering, *Phys. Rev. Lett.* 1999, 83, 4357–4360.
- 97 A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, Surface enhanced resonance Raman spectroscopy signals from single myoglobin molecules, *Appl. Spectrosc.* 2002, 56, 1531–1537.
- 98 E. J. Bjerneld, Z. Foeldes-Papp, M. Kaell, R. Rigler, Single-molecule surface enhanced Raman and fluorescence correlation spectroscopy of horseradish peroxidase, *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 1213–1218.
- 99 S. Habuchi, M. Cotlet, R. Gronheid, G. Dirix, J. Michiels, J. Vanderleyden, F. C. De Schryver, J. Hofkens, Single-molecule surface enhanced resonance Raman spectroscopy of the enhanced green fluorescent protein, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8446–8447.
- 100 C. Zander, Single-molecule detection in solution: a new tool for analytical chemistry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 745–751.
- 101 K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *J. Phys. Condens. Matter* 2002, 14, R597–R624.
- 102 R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, On/off blinking and switching behavior of single molecules of green fluorescent protein, *Nature (London)* 1997, 388, 355–358.
- 103 A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu, Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, *Opt. Lett.* 1986, 11, 288–290.
- 104 A. Ashkin, History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules, *IEEE J. Select. Topics Quantum Electr.* 2000, 6, 841–856.
- 105 M. D. Wang, Manipulation of single molecules in biology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999, 10, 81–86.
- 106 G. J. Sonek, W. Wang, Theory of optical trapping forces: a review, *Rev. Laser Eng.* 1994, 24, 3–11.
- 107 A. Ashkin, Forces of a single beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime, *Biophys. J.* 1992, 61, 569–582.
- 108 M. A. Clifford, J. Arlt, J. Courtial, K. Dholakia, High-order Laguerre-Gaussian laser modes for studies of cold atoms, *Opt. Commun.* 1998, 156, 300–306.
- 109 H. He, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, Optical particle trapping with higher-order doughnut beams produced using high efficiency computer generated holograms, *J. Mod. Opt.* 1995, 42, 217–223.

- 110 D. G. Grier, A revolution in optical manipulation, *Nature* (London) 2003, 424, 810–816.
- 111 K. T. Gahagan, G. A. Swartzlander, Jr., Optical trapping of particles, *Opt. Lett.* 1996, 21, 827–829.
- 112 J. Arlt, K. Dholakia, L. Allen, M. J. Padgett, The production of multiringed Laguerre- Gaussian modes by computer-generated holograms, *J. Mod. Opt.* 1998, 45, 1231–1237.
- 113 V. Y. Bazhenov, M. S. Soskin, M. V. Vasnetsov, Screw dislocations in light wavefronts, *J. Mod. Opt.* 1992, 39, 985–990.
- 114 D. Ganic, X. Gan, M. Gu, M. Hain, S. Somalingam, S. Stankovic, T. Tschudi, Generation of doughnut laser beams by use of a liquid-crystal cell with a conversion efficiency near 100%, *Opt. Lett.* 2002, 27, 1351–1353.
- 115 C. Mio, T. Gong, A. Terray, D. W. M. Marr, Design of a scanning laser optical trap for multiparticle manipulation, *Rev. Sci. Instrum.* 2000, 71, 2196–2200.
- 116 M. P. MacDonald, L. Paterson, W. Sibbett, K. Dholakia, P. E. Bryant, Trapping and manipulation of low-index particles in a two dimensional interferometric optical trap, *Opt. Lett.* 2001, 26, 863–865.
- 117 K. T. Gahagan, G. A. Swartzlander, Jr., Simultaneous trapping of low-index and high-index microparticles observed with an optical-vortex trap, *J. Opt. Soc. Am. B Opt. Phys.* 1999, 16, 533–537.
- 118 K. T. Gahagan, G. A. Swartzlander, Jr., Trapping of low-index microparticles in an optical vortex, *J. Opt. Soc. Am. B Opt. Phys.* 1998, 15, 524–534.
- 119 N. B. Simpson, L. Allen, M. J. Padgett, Optical tweezers and optical spanners with Laguerre-Gaussian modes, *J. Mod. Opt.* 1996, 43, 2485–2491.
- 120 N. B. Simpson, D. McGloin, K. Dholakia, L. Allen, M. J. Padgett, Optical tweezers with increased axial trapping efficiency, *J. Mod. Opt.* 1998, 45, 1943–1949.
- 121 A. T. O’Neil, M. J. Padgett, Axial and lateral trapping efficiency of Laguerre-Gaussian modes in inverted optical tweezers, *Opt. Commun.* 2001, 193, 45–50.
- 122 H. He, M. E. J. Friese, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, Direct observation of transfer of angular momentum to absorptive particles from a laser beam with a phase singularity, *Phys. Rev. Lett.* 1995, 75, 826–829.
- 123 V. Garces-Chavez, K. Volke-Sepulveda, S. Chavez-Cerda, W. Sibbett, K. Dholakia, Transfer of orbital angular momentum to an optically trapped low-index particle, *Phys. Rev. A Atom. Mol. Opt. Phys.* 2002, 66, 063402/063401–063402/063408.
- 124 M. E. J. Friese, T. A. Nieminen, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, Optical alignment and spinning of laser trapped microscopic particles, *Nature*(London) 1998, 395, 621.
- 125 L. Paterson, M. P. MacDonald, J. Arlt, W. Sibbett, P. E. Bryant, K. Dholakia, Controlled rotation of optically trapped microscopic particles, *Science* (Washington, D. C.) 2001, 292, 912–914.

- 126 J. Liesener, M. Reicherter, T. Haist, H. J. Tiziani, Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms, *Opt. Commun.* 2000, 185, 77–82.
- 127 J. E. Curtis, B. A. Koss, D. G. Grier, Dynamic holographic optical tweezers, *Opt. Commun.* 2002, 207, 169–175.
- 128 E. R. Dufresne, G. C. Spalding, M. T. Dearing, S. A. Sheets, D. G. Grier, Computer-generated holographic optical tweezer arrays, *Rev. Sci. Instrum.* 2001, 72, 1810–1816.
- 129 V. R. Daria, P. J. Rodrigo, J. Gluckstad, Dynamic array of dark optical traps, *Appl. Phys. Lett.* 2004, 84, 323–325.
- 130 P. Korda, G. C. Spalding, E. R. Dufresne, D. G. Grier, Nanofabrication with holographic optical tweezers, *Rev. Sci. Instrum.* 2002, 73, 1956–1957.
- 131 T. T. Perkins, S. R. Quake, D. E. Smith, S. Chu, Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy, *Science* (Washington, D. C.) 1994, 264, 822–826.
- 132 V. A. Bloomfield, DNA condensation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, 6, 334–341.
- 133 N. V. Hud, K. H. Downing, R. Balhorn, A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 3581–3585.
- 134 D. Liu, C. Wang, J. Li, Z. Lin, T. Zukun, C. Bai, Atomic force microscopy analysis of intermediates in cobalt hexamine-induced DNA condensation, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2000, 18, 1–9.
- 135 N. V. Hud, F. Milanovich, R. Balhorn, A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 3581–3585.
- 136 D. Porschke, Dynamics of DNA condensation, *Biochemistry* 1984, 23, 4821–4828.
- 137 Y. Yoshikawa, S. M. Nomura, T. Kanbe, K. Yoshikawa, Controlling the folding/unfolding transition of the DNA-histone H1 complex by direct optical manipulation, *Chem. Phys. Lett.* 2000, 330, 77–82.
- 138 B. Rotman, Measurement of activity of single molecules of b-D-galactosidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1961, 47, 1981–1991.
- 139 Q. Xue, E. S. Yeung, Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme, *Nature* (London) 1995, 373, 681–684.
- 140 D. B. Craig, E. Arriaga, J. C. Y. Wong, H. Lu, N. J. Dovichi, Studies on single alkaline phosphatase molecules: Reaction rate and activation energy of a reaction catalyzed by a single molecule and the effect of thermal denaturation: the death of an enzyme, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 5245–5253.
- 141 R. Polakowski, D. B. Craig, A. Skelley, N. J. Dovichi, Single molecules of highly purified bacterial alkaline phosphatase have identical activity, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4853–4855.
- 142 D. Astumian, Protein conformational fluctuations and free-energy transduction, *Appl. Phys. A* 2002, 75, 193–206.

- 143 H. Qian, E. L. Elson, Single-molecule enzymology: stochastic Michaelis–Menten kinetics, *Biophys. Chem.* 2002, 101–102, 565–576.
- 144 L. Edman, R. Rigler, Memory landscapes of single-enzyme molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 8266–8271.
- 145 G. K. Schenter, H. P. Lu, X. S. Xie, Statistical analyses and theoretical models of single molecule enzymatic dynamics, *J. Phys. Chem. A* 1999, 103, 10477–10488.
- 146 C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11242–11243.
- 147 J. Drott, L. Rosengren, K. Lindstrom, T. Laurell, Pore morphology influence on catalytic turn-over for enzyme activated porous silicon matrices, *Thin Solid Films* 1998, 330, 161–166.
- 148 W. Tan, E. S. Yeung, Monitoring the reactions of single enzyme molecules and single metal ions, *Anal. Chem.* 1997, 69, 4242–4248.
- 149 D. T. Chiu, C. F. Wilson, A. Karlsson, A. Danielsson, A. Lundqvist, A. Stromberg, F. Ryttsen, M. Davidson, S. Nordholm, O. Orwar, R. N. Zare, Manipulating the biochemical nanoenvironment around single molecules contained within vesicles, *Chem. Phys.* 1999, 247, 133–139.
- 150 D. T. Chiu, C. F. Wilson, F. Ryttsen, A. Stromberg, C. Farre, A. Karlsson, S. Nordholm, A. Gaggari, B. P. Modi, A. Moscho, R. A. Garza-Lopez, O. Orwar, R. N. Zare, Chemical transformations in individual ultrasmall biomimetic containers, *Science* (Washington, D. C.) 1999, 283, 1892–1895.
- 151 S. Gurrieri, K. S. Wells, I. D. Johnson, C. Bustamante, Direct visualization of individual DNA molecules by fluorescence microscopy: characterization of the factors affecting signal/background and optimization of imaging conditions using YOYO, *Anal. Biochem.* 1997, 249, 44–53.
- 152 A. Van Orden, R. A. Keller, W. P. Ambrose, High-throughput flow cytometric DNA fragment sizing, *Anal. Chem.* 2000, 72, 37–41.
- 153 H. P. Chou, C. Spence, A. Scherer, S. Quake, A microfabricated device for sizing and sorting DNA molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 11–13.
- 154 B. B. Haab, R. A. Mathies, Single-molecule detection of DNA separations in microfabricated capillary electrophoresis chips employing focused molecular streams, *Anal. Chem.* 1999, 71, 5137–5145.
- 155 M. R. Shortreed, H. Li, W.-H. Huang, E. S. Yeung, High-throughput single-molecule DNA screening based on electrophoresis, *Anal. Chem.* 2000, 72, 2879–2885.
- 156 J. Han, S. W. Turner, H. G. Craighead, Entropic trapping and escape of long DNA molecules at submicron size constriction, *Phys. Rev. Lett.* 1999, 83, 1688–1691.
- 157 B. Schafer, H. Gemeinhardt, V. Uhl, K. O. Greulich, Single-molecule DNA restriction analysis in the light microscope, *Single Mol.* 2000, 1, 33–40.

- 158 J. H. Werner, H. Cai, J. H. Jett, L. Reha-Krantz, R. A. Keller, P. M. Goodwin, Progress towards single-molecule DNA sequencing: a one color demonstration, *J. Biotechnol.* 2003, 102, 1–14.
- 159 M. Sauer, B. Angerer, W. Ankenbauer, Z. Foldes-Papp, F. Gobel, K. T. Han, R. Rigler, A. Schulz, J. Wolfrum, C. Zander, Single-molecule DNA sequencing in submicrometer channels: state of the art and future prospects, *J. Biotechnol.* 2001, 86, 181–201.
- 160 M. Sauer, B. Angerer, K. T. Han, C. Zander, Detection and identification of single dyelabeled mononucleotide molecules released from an optical fiber in a microcapillary: First steps towards a new single-molecule DNA sequencing technique, *PCCP Phys. Chem. Chem. Phys.* 1999, 1, 2471–2477.
- 161 M. A. Augustin, W. Ankenbauer, B. Angerer, Progress towards single-molecule sequencing: enzymatic synthesis of nucleotide-specifically labeled DNA, *J. Biotechnol.* 2001, 86, 289–301.
- 162 Z. Foldes-Papp, B. Angerer, W. Ankenbauer, R. Rigler, Fluorescent high-density labeling of DNA: error-free substitution for a normal nucleotide, *J. Biotechnol.* 2001, 86, 237–253.
- 163 I. Braslavsky, B. Hebert, E. Kartalov, S. R. Quake, Sequence information can be obtained from single DNA molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 3960–3964.
- 164 M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. W. Deamer, Microsecond timescale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules, *Biophys. J.* 1999, 77, 3227–3233.
- 165 R. Brock, G. Vamosi, G. Vereb, T. M. Jovin, Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 10123–10128.
- 166 R. Iino, I. Koyama, A. Kusumi, Single-molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface, *Biophys. J.* 2001, 80, 2667–2677.
- 167 G. I. Mashanov, D. Tacon, A. E. Knight, M. Peckham, J. E. Molloy, Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy, *Methods* 2003, 29, 142–152.
- 168 M. Vrljic, S. Y. Nishimura, S. Brasselet, W. E. Moerner, H. M. McConnell, Translational diffusion of individual class II MHC membrane proteins in cells, *Biophys. J.* 2002, 83, 2681–2692.
- 169 T. A. Byassee, W. C. W. Chan, S. M. Nie, Probing single molecules in single living cells, *Anal. Chem.* 2000, 72, 5606–5611.
- 170 U. Kubitscheck, Single protein molecules visualized and tracked in the interior of eukaryotic cells, *Single Mol.* 2002, 3, 267–274.
- 171 Y. Sako, T. Uyemura, Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells, *Cell Struct. Func.* 2002, 27, 357–365.

- 172 G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endress, H. Buning, M. Hallek, C. Brauchle, Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus, *Science* (Washington, D. C.) 2001, 294, 1929–1932.
- 173 R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, A monomeric red fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99, 7877–7882.
- 174 N. G. Gurskaya, A. F. Fradkov, A. Terskikh, M. V. Matz, Y. A. Labas, V. I. Martynov, Y. G. Yanushevich, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov, GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins, *FEBS Lett.* 2001, 507, 16–20.
- 175 A. N. Kapanidis, S. Weiss, Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single molecule fluorescence analysis of biomolecules, *J. Chem. Phys.* 2002, 117, 10953–10964.
- 176 J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, Creating new fluorescent probes for cell biology, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002, 3, 906–918.
- 177 K. A. Willets, O. Ostroverkhova, M. He, R. J. Twieg, W. E. Moerner, Novel fluorophores for single-molecule imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 1174–1175.
- 178 R. Tsien, Rosy dawn for fluorescent proteins, *Nat. Biotech.* 1999, 17, 956–957.
- 179 M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science* (Washington, D. C.) 1998, 281, 2013–2016.
- 180 X. Michalet, F. Pinaud, T. D. Lacoste, M. Dahan, M. P. Bruchez, A. P. Alivisatos, S. Weiss, Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling, *Single Mol.* 2001, 2, 261–276.
- 181 Y. Ebenstein, T. Mokari, U. Banin, Fluorescence quantum yield of CdSe/ZnS nanocrystals investigated by correlated atomic-force and single-particle fluorescence microscopy, *Appl. Phys. Lett.* 2002, 80, 4033–4035.
- 182 B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, (CdSe).ZnS core-shell quantum dots: synthesis and optical and structural characterization of a size series of highly luminescent materials, *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 9463–9475.
- 183 W. C. W. Chan, S. Nile, Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science* (Washington, D. C.) 1998, 281, 2016–2018.
- 184 M. Han, X. Gao, J. Z. Su, S. Nie, Quantumdot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules, *Nat. Biotech.* 2001, 19, 631–635.
- 185 X. Gao, S. Nie, Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots, *Trends Biotech.* 2003, 21, 371–373.
- 186 M. D. Barnes, K. C. Ng, W. B. Whitten, J. M. Ramsey, Detection of single rhodamine 6G molecules in levitated microdroplets, *Anal. Chem.* 1993, 65, 2360–2365.
- 187 M. D. Barnes, N. Lermer, C. Y. Kung, W. B. Whitten, J. M. Ramsey, S. C. Hill, Realtime observation of single-molecule fluorescence in microdroplet streams, *Opt. Lett.* 1997, 22, 1265–1267.

- 188 C. F. Wilson, G. J. Simpson, D. T. Chiu, A. Stroemberg, O. Orwar, N. Rodriguez, R. N. Zare, Nanoengineered structures for holding and manipulating liposomes and cells, *Anal. Chem.* 2001, 73, 787–791.
- 189 A. Stromberg, F. Ryttsen, D. T. Chiu, M. Davidson, P. S. Eriksson, C. F. Wilson, O. Orwar, R. N. Zare, Manipulating the genetic identity and biochemical surface properties of individual cells with electricfield- induced fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 7–11.
- 190 S. Kulin, R. Kishore, K. Helmersson, L. Locascio, Optical manipulation and fusion of liposomes as microreactors, *Langmuir* 2003, 19, 8206–8210.
- 191 D. T. Chiu, Micro- and nano-scale chemical analysis of individual sub-cellular compartments, *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 528–536.
- 192 A. Karlsson, M. Karlsson, R. Karlsson, K. Sott, A. Lundqvist, M. Tokarz, O. Orwar, Nanofluidic networks based on surfactant membrane technology, *Anal. Chem.* 2003, 75, 2529–2537.
- 193 M. Karlsson, K. Sott, M. Davidson, A.-S. Cans, P. Linderholm, D. Chiu, O. Orwar, Formation of geometrically complex lipid nanotube-vesicle networks of higher-order topologies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99, 11573–11578.
- 194 A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A.-S. Cans, A. Stromberg, F. Ryttsen, O. Orwar, Molecular engineering: networks of nanotubes and containers, *Nature (London)* 2001, 409, 150–152.
- 195 M. He, C. Sun, D. T. Chiu, Concentrating solutes and nanoparticles within individual aqueous microdroplets, *Anal. Chem.* 2004, 76, 1222–1227.