

全内反射荧光显微术在活细胞单分子检测中的应用

周璇 王磊*

(山东大学药学院, 济南 250012)

摘要 全内反射荧光显微术(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)是一种灵敏、快速的单分子成像和检测技术,近年来得到迅猛发展。该技术已广泛应用于生命科学、化学、物理学等领域。本文综述了全内反射荧光显微术的原理及其在活细胞单分子检测中的应用,并对其发展前景进行了展望。

关键词 单分子检测; 全内反射荧光显微术; 活细胞

全内反射荧光显微术(TIRFM)是20世纪末发展起来的用于单分子成像和检测的光学显微成像技术之一。它利用全内反射产生的隐失波来激发样品,将激发区域限定在样品表面百纳米级厚的范围内,降低了背景荧光的干扰,极大地提高了显微成像的信噪比和分辨率。基于TIRFM的单分子成像和检测技术可以在单分子水平上研究细胞的结构、功能,阐述核酸、蛋白质、糖等生物大分子在生命活动中的地位和作用。该方法已广泛应用于生物单分子在离体以及活体细胞内的生命过程机理的研究。本文对TIRFM原理及其在活细胞单分子研究领域的应用进行了总结,并对其发展前景进行了展望。

1 全内反射荧光显微镜的原理及其构成

1.1 原理

当入射光从高折射率(n_1)的光密介质传播进低折射率(n_2)的光疏介质时,入射光在界面上一部分发生反射,另一部分发生折射,入射角 θ_1 与折射角 θ_2 满足Snell定律:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

入射角 θ_1 逐渐增大至某一角度,折射角 $\theta_2 = 90^\circ$ 时,该入射角称为临界角 θ_c 。

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$$

当入射角 θ_1 大于临界角 θ_c 时,光线完全被反射,不再透射到光疏介质中,即发生了全内反射(图1)。

然而由于波动效应存在,有少量的光能量会穿透界面渗透到光疏介质中,并沿平行于界面的方向传播,这部分透过的能量被称之为“隐失波”(或“隐失场”)。隐失波能够激发界面附近的荧光分子,产生全内反射荧光。隐失波的光强度 I_z 随离开界面的垂直距离 z 呈指数衰减:

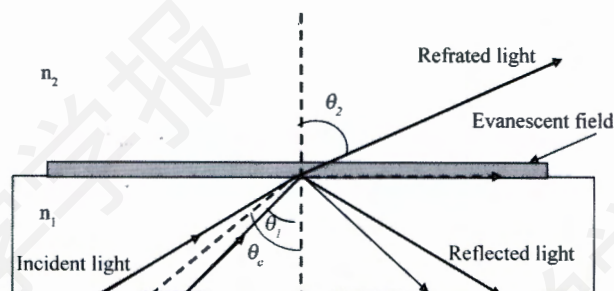


Fig.1 Theory of total internal reflection

$$I_z = I_0 \exp[-z/d]$$

其中,

$$d = (\lambda_0/4\pi) (n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{-1/2}$$

式中 I_0 表示界面处的入射光强度。 d 为隐失波的理论透射深度,等于从界面到光强度衰减到界面处 $1/e$ 的距离。 d 与入射光波长 λ_0 、入射角 θ_1 及两种介质的折射率 n 有关。其大小与入射光波长为同一数量级或更小^[1]。一般小于200 nm,对可见光约为100 nm。

1.2 全内反射荧光显微镜的构成

目前,全内反射荧光显微成像系统有多种配置方法,其中最常见的是棱镜型和物镜型。棱镜型系统在实现上相对容易,成本相对较低,它只需要有激光光源、棱镜和显微镜。棱镜材料的选择受限较小,在不要求较小透射深度的情况下可使用普通光学玻璃棱镜;从探测角度来看,它不易受入射光信号的影响。

收稿日期: 2009-12-02 接受日期: 2010-07-28

国家自然科学基金(No.20875056)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0531-88363888, Fax: 0531-88564464, E-mail:

wangl-sdu@sdu.edu.cn

响, 所以其成像的信噪比较高。但是放置样品的空间受到棱镜的限制。物镜型系统中, 物镜既是全内反射的光学器件又是收集荧光信号的收集器。为了能发生全内反射, 物镜的数值孔径必须大于被测样品的折射率。水和细胞的折射率分别是 1.33 和 1.38, 所以常用物镜的 NA 值大于 1.4。其最大的优点是在进行实验时可对样品进行其他操作(如改变样品介质, 进行细胞微注射及微操作等), 并且可以与纳米操纵、光镊技术相结合。此外, 还可以测定活细胞上表面和下表面的生物单分子, 也可以用油浸物镜摄取细胞的微干涉图像。这种构造特别适合于活细胞的观测, 所以具有更广阔的生物学应用前景^[1]。

2 应用

TIRFM 的特征非常适用于活细胞表层单分子检测, 如受体-配体相互作用、细胞信号转导的研究, 离子通道、膜组分动力学和细胞骨架等研究。TIRFM 用于活细胞单分子检测主要有以下几点优势: (1) TIRFM 具有时间和空间分辨率高、信息量大、损伤小、可应用于活体探测等优点, 而且光子对细胞的扰乱最轻微, 实验结果更为真实、可靠。(2) TIRFM 是一种表面分析技术, 它利用隐失波来激发细胞表层的荧光分子, 不受来自细胞深层区域荧光信号的干扰。在所测范围内, 荧光分子光漂白程度小, 光激发的量子效率高, 因此可获得高信噪比的荧光图像。(3) 隐失波的强度随着扩散深度的增加呈指数衰减, 激发厚度一般小于 200 nm, 这就大大降低了对细胞的光损伤, 从而能够长时间实时示踪活细胞内单个生物分子。(4) TIRFM 不采用扫描成像, 大大提高了成像速度, 可以满足实时成像的要求, 而且对图像的解释相对于近场, 干涉显微图像来说也较为简单。下面我们重点介绍 TIRFM 在活细胞单分子检测方面的研究成果。

2.1 细胞信号转导机制的研究

在单分子水平上研究活细胞内信号转导机制是近几年生命科学研究的一大热点。TIRFM 单分子成像技术能够实时观测活细胞内单个信号分子的定位、运动、翻转以及复合物的形成, 是阐述细胞信号转导机制的有力手段。这类研究中最具代表性的是对表皮生长因子受体(EGFR)的研究。Sako 等^[2]最早将 TIRFM 单分子成像技术用于活细胞膜蛋白受体 EGFR 与配体 EGF 的结合及其相关的信号转导过程的研究。首先证实溶液中的 cy3-EGF 在细胞表面

EGFR 上的定位, 然后测定每个光斑荧光强度的变化, 确定观测到的光斑反映的是单个分子; 再对荧光强度直方图进行分析, 发现有些光斑具有双倍荧光强度, 说明这些光斑是 EGF-EGFR 的二聚体。他们还用 Ca^{2+} 浓度变化实验和 TIRFM 的单分子荧光共振能量转移(FRET)实验证实了二聚过程^[3]。实验观察到加入 cy3-EGF 30~60 s 后细胞表面二聚物明显增加, Ca^{2+} 浓度在 1 min 后也突然增加。在观察 EGFR 二聚化过程中发现大多数情况下光斑的荧光强度突然增加一倍, 而且分两步升高再两步降低。这说明先有 EGFR 的二聚化, 即细胞表面形成了 Cy3-EGF-(EGFR)_2 , 然后第二个 Cy3-EGF 与之结合; 只有少数二聚物是两个 Cy3-EGF-EGFR 沿细胞膜侧向运动相遇后形成的。这表明 EGFR 的二聚体在第二个 EGF 与之结合前就已经形成。Uyemura 等^[4]研究了 EGFR 受体信号转导中信号输入与输出的定量关系。研究中发现 300 个 EGF 分子便可以诱发一半细胞发生钙响应, EGF 结合数与信号响应概率之间是 S 形曲线关系。这种开关式的高灵敏钙响应依赖于 EGFR 动态聚集形成二聚体和侧向运动。Teramura 等^[5]使用 TIRFM 单分子成像对单个 EGF 分子结合 EGFR 动力学过程进行了探讨, 发现 EGF 与二聚体 EGFR 位点结合速率常数比与单体 EGFR 位点结合速率常数高两个数量级, 这证明了 EGF 和 EGFR 结合与 EGFR 二聚化之间存在正协同作用, 这种作用促进 EGF-EGFR 复合物的形成, 这也保证了 EGF 在极低浓度下就可以快速地引发细胞内信号^[6]。实际上在细胞信号转导过程中细胞受体的聚集现象十分常见, 功能相关的受体在细胞表面聚集或者被限定在一个微区域内, 能够作为信号发布和放大的平台, 在信号转导过程中起重要作用。对于细胞信号转导过程中受体相互作用的研究, 传统的测量方法只能反映出平均化的结果, 而单分子研究能反映在细胞信号转导早期只有少数几个分子参与的重要事件和信号转导的分子机制, 这对更加深刻准确地揭示活细胞内信号转导机制有十分重大的意义。

利用 TIRFM 单分子成像技术, Hibino 等^[7]对活细胞膜上 H-Ras 向 cRaf-1 信号转化的单分子和多分子动力学过程进行了研究。Douglass 等^[8]对 T 细胞内绿色荧光蛋白(GFP)标记的酪氨酸激酶 LcK 进行了研究, 发现单个 LcK 蛋白在不同阶段呈现出不同的运动模式。Miyanaga 等^[9]使用 TIRFM 单分子成像技术通过信号分子的观测对盘基网柄菌属细胞的趋化性进行了研究。他们发现化学诱导剂和受体的结合是随

机的而且下游的信号分子也是随机出现的,这些都说明趋化性信号过程的随机性。Sohn等^[10]将TIRFM结合FRET技术研究了抗原与B细胞受体(BCR)结合后引发的免疫应答反应的机制。通过对BCR早期信号事件的观测和分析证明细胞膜微环境在BCR-Lyn复合物形成及B细胞免疫应答中起重要作用。Eltze等^[11]使用TIRFM对活细胞内的G蛋白进行了动态定位。研究发现,未激活的G蛋白和激活的G蛋白在胞质和质膜间快速循环。

2.2 分子马达的研究

分子马达是指肌球蛋白、驱动蛋白、动力蛋白、核苷酸聚合酶等能够沿着纤维型肌动蛋白、微管、RNA和DNA等丝状轨道分子运动的蛋白。目前大部分实验采用TIRFM或原子力显微术(AFM)对离体的单个分子马达进行操纵和检测。在离体实验中人为地排除了生物系统内复杂因素的干扰,因此无法获知目标分子在活体内是否与其他分子相互作用,是否定位于某个区域等相关信息。活细胞内单分子实验所获取信息更能代表分子马达真实的运动特征。Courty等^[12]采用TIRFM单分子成像技术对活细胞内量子点(QDs)标记的单个驱动蛋白进行了研究,实验发现驱动蛋白的运动不受微管相关蛋白和其他蛋白竞争结合位点的影响,在细胞内的运动并不依赖F-actin蛋白骨架,而是依赖微管蛋白。运动轨迹显示,驱动蛋白在细胞内总体上是定向线性运动,期间也伴随着非定向的布朗运动。Kerber等^[13]利用TIRFM单分子成像技术对活细胞丝状伪足内肌球蛋白-10(Myo10)的运动进行了研究。通过实验发现GFP标记的Myo10以大约600 nm/s的速率沿丝状伪足快速运动,而Myo5a和Myo1a以较慢运动速率移动。研究者认为Myo10快速、定向地沿丝状伪足运动是一种新型的远程运输方式。Cai等^[14]使用TIRFM研究了活细胞内单个驱动蛋白的运动。他们将驱动蛋白尾部标记了三个串联的单体荧光蛋白Citrine,通过分析单个荧光点的光漂白行为,证实观测到的荧光点为单个驱动蛋白分子,而且测得驱动蛋白分子在胞浆中的平均速率和平均移动长度。

2.3 生物大分子相互作用的研究

对生物大分子间相互作用的研究不仅能揭示生命活动的基本规律,而且有助于疾病的治疗和新药的开发。基于TIRFM的单分子检测技术在不影响蛋白质和DNA性能的前提下,对活细胞内的生物大分子进行荧光标记,通过单分子荧光成像技术,可以实时、

动态、原位地得出分子间相互作用的信息。Mashanov等^[15]观测了活小鼠成肌细胞内GFP标记的蛋白分子和具有蛋白分子结构域的分子的侧向扩散运动并计算了其光漂白动力学。他们提出在TIRFM的单分子检测中确定了鉴别噪声和单个荧光分子的4条标准:(1)光斑的大小有一定限制。(2)光强度与单个荧光分子的荧光强度相对应。(3)有单步光漂白(只适用于荧光蛋白)。(4)半衰期正比于发射强度。在此基础上,该小组对血小板白细胞c激酶底物同源性(PH)结构域在小鼠成肌细胞膜上扩散的时间和空间动力学进行了研究^[16]。2007年,Mashanov等^[17]提出了一种数字图像处理方法,这种方法可以同时自动检测和示踪数百个荧光分子。通过这种方法可以识别和表征单个大分子的行为,并且可以测得光漂白动力学参数和膜结合蛋白的扩散系数。Fan等^[18]使用TIRFM对肝细胞质膜上胰岛素受体进行了研究,他们使用QDs标记的胰岛素定位细胞膜上的胰岛素受体,实时观测胰岛素受体在细胞膜上的运动、聚集、内吞及内涵体的生成过程。Murakoshi等^[19]对活细胞内小G蛋白Ras的信号转导机制进行了研究。在单分子水平上揭示了Ras蛋白激活后与其效应分子、折叠蛋白之间的相互作用、动力学以及在特殊区域的定位。未激活的Ras在细胞膜上扩散迅速,而激活后的Ras几乎是静止的,这种变化可能是形成了大的信号转导复合物引起的。

2.4 聚合物分子组成的研究

细胞中的蛋白为了实现其功能会形成大小不一的聚合物,这些聚合物的分子比(stoichiometry)受到精确控制。传统的细胞生物学通过复合物的分子量或者宏观功能分析推测其分子比。随着单分子技术的发展,人们已成功的利用单分子技术研究聚合物的分子组成。Ulbrich等^[20]利用荧光蛋白的一步光漂白的性质,通过判断荧光蛋白分子光漂白的步骤,来确定蛋白聚合物亚单位的个数。实验采用TIRFM观测荧光信号的变化,排除细胞质内自发荧光的干扰。他们将蛋白亚单位标记上GFP通过观察复合物中所含GFP的荧光强度以及其漂白步骤就可以判断GFP的个数,GFP的个数代表了亚单位的个数。此方法能够在活细胞内通过计数GFP漂白步骤来快速确定亚单位的分子比,而且分析过程不需要特殊的软件,只需要装备有灵敏相机的TIRFM。这种方法还能够用来检测信号转导复合物的功能。

2.5 离子通道的研究

离子通道的研究在生命科学研究中占有十分重要的地位, 目前对离子通道的孔道特征、功能表达和调节、动力学研究已深入到分子水平。TIRFM 单分子检测技术可以对活细胞膜表面的电压门控型和配体门控型离子通道进行单通道记录, 而且有可能实现高通量的单通道功能分析。Demuro 等^[21]使用 TIRFM 无损地监测了细胞膜上多个钙离子通道的活性和定位, 通过对离子通道中钙离子信号进行高空间和时间分辨率成像, 对其定位并测得电压依赖性、门控动力学参数。结果表明 N 型钙离子通道不均匀地分布在细胞膜上, 而且是不移动的, 非常邻近的通道之间也表现出不一样的门控动力学。Ide 等^[22]设计了用 TIRFM 单分子成像技术观测单个钙活性钾通道的荧光信号, 并同时用生物电技术记录单个离子通道电流的方法。该技术与 FRET 或者双屏光学系统结合能够进一步观察离子通道与其配体的相互作用, 同时也可以研究离子通道的构象变化和离子电流。将光学显微技术和电生物技术结合既可以实时观测离子通道结构的变化, 同时又可以检测通道电压和电流的变化, 两者结合能更清楚地研究离子通道的机制, 是离子通道研究技术的一大突破。Bal 等^[23]将 TIRFM 与 FRET 技术结合, 研究了活细胞中钾离子通道 KCNQ2~4 型通道和 CaM 的相互作用与钙离子的依赖关系。在此基础上对 M 型的钾离子通道五种亚基 KCNQ1~5 之间异源组装能力进行了系统而详细的研究。Mashanov 等^[24]使用 TIRFM 在活细胞表面直接观察 KCNQ1 离子通道的分布特点。他们使用荧光蛋白标记离子通道蛋白并在 HL-1 和 HEK293 细胞内表达。为了证明离子通道在细胞膜上的性质, 他们追踪单个离子通道的运动, 而且比较了两种类型的钾离子通道(KCNQ1, KCNE1)的分布特性。发现钾离子通道的运动依赖离子通道的类型、细胞种类和温度。

2.6 病毒入侵活细胞的实时动态观测

病毒入侵活细胞是个十分复杂的过程。研究病毒感染活细胞的实时动态过程有助于人们更加深入地认识病毒侵染、复制、释放的过程, 这对设计抗病毒药物以及研发基因治疗载体都是非常重要的。单病毒示踪(single-virus tracking)技术利用荧光显微镜示踪单个病毒在活细胞内运动并实时成像。用于单病毒示踪的荧光显微镜主要有落射荧光显微镜、LSCM 和 TIRFM。其中落射荧光显微镜由于背景荧光太高限制其广泛应用。LSCM 虽然能获取三维图

像, 但是信号丢失太大。TIRFM 以其独特的优势广泛应用于示踪发生在活细胞表面病毒入侵的早期事件^[25]。哈佛大学庄小威实验小组研究方向之一就是使用单病毒示踪技术研究病毒侵染细胞过程中的转运、酸化和融合机制^[26,27]。2003 年 Lakadamyali 等^[26]应用单病毒示踪技术观察了单个流感病毒入侵活细胞的动态过程。2007 年, 他们用同样的装置结合生化分析技术对登革热病毒入侵活细胞的早期事件进行了研究^[27]。2008 年, 美国洛克菲勒大学的 Jouvenet 等^[28]使用 TIRFM 记录了 HIV 病毒在 HeLa 细胞表面产生的过程。他们将 GFP 融合到 HIV 病毒的 Gag 基因上, 让发光的 HIV 病毒侵染 HeLa 细胞。实验结果表明每个病毒的组装过程平均需要 8.5 分钟, 而大部分在 5~6 分钟之内就能完成。这是人类第一次在活体细胞表面定量地观测单个病毒的组装过程。至此, 在显微镜下观测病毒的整个生活史已经成为可能。组装和释放是病毒复制的基本步骤。在 HIV-1 病毒中, Gag 蛋白对调节病毒的组装和释放发挥重要的作用。2009 年, Ivanchenko 等^[29]为了更清楚地了解 Gag 蛋白调节 HIV 病毒在活细胞膜表面组装和释放的动力学过程, 使用 TIRFM 观测荧光标记 HIV 病毒结构蛋白。实验发现在核糖体合成 8~9 分钟后, Gag 蛋白直接到达胞膜或内含体膜的结合位点进行组装并且形成单个的病毒颗粒, 大概 25 分钟后释放。组装过程非常迅速, 从细胞表面出现组装位点到病毒释放平均时间为 1500 ± 700 s。

3 展望

短短二十几年中, TIRFM 单分子检测技术经历了一个飞速发展的过程。从最初低温下检测水溶液中的单个分子, 到室温下活细胞内实时视见单分子并进行单分子示踪。该技术今后的研究内容和方向主要表现在: (1)使用 TIRFM 长时间、实时、原位、动态观测活细胞内单个生物大分子的运动, 在分子水平阐明生命活动的本质。(2)利用 TIRFM 研究单个分子的个体行为, 探索单个分子与细胞整体功能的关系以及单个分子如何发挥其功能。(3)通过 TIRFM 结合各种荧光标记技术同时示踪活细胞内多个分子的动力学行为, 研究细胞等复杂体系中各种大分子的相互作用以及产生的生物效应。(4)TIRFM 单分子检测技术的微型化、双色或多色化以及与其他显微成像技术(原子力显微术、扫描电化学显微术和荧光相关光谱技术)联用。新型纳米荧光探针和高分辨率

荧光探测仪器的出现,必将进一步推动 TIRFM 在活细胞单分子检测中的应用。

参考文献(References)

- 1 Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* 2001; 2(11): 764-74.
- 2 Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3): 168-72.
- 3 Sako Y, Uyemura T. Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells. *Cell Struct Funct* 2002; 27(5): 357-65.
- 4 Uyemura T, Takagi H, Yanagida T, Sako Y. Single-molecule analysis of epidermal growth factor signaling that leads to ultrasensitive calcium response. *Biophys J* 2005; 88(5): 3720-30.
- 5 Teramura Y, Ichinose J, Takagi H, Nishida K, Yanagida T, Sako Y. Single-molecule analysis of epidermal growth factor binding on the surface of living cells. *Embo J* 2006; 25(18): 4215-22.
- 6 Ichinose J, Morimatsu M, Yanagida T, Sako Y. Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. *Biomaterials* 2006; 27(18): 3343-50.
- 7 Hibino K, Watanabe TM, Kozuka J, Iwane AH, Okada T, Kataoka T, *et al.* Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells. *Chemphyschem* 2003; 4(7): 748-53.
- 8 Douglass AD, Vale RD. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 2005; 121(6): 937-50.
- 9 Miyanaga Y, Matsuoka S, Yanagida T, Ueda M. Stochastic signal inputs for chemotactic response in Dictyostelium cells revealed by single molecule imaging techniques. *Biosystems* 2007; 88(3): 251-60.
- 10 Sohn HW, Tolar P, Pierce SK. Membrane heterogeneities in the formation of B cell receptor-Lyn kinase microclusters and the immune synapse. *J Cell Biol* 2008; 182(2): 367-79.
- 11 Elzie CA, Colby J, Sammons MA, Janetopoulos C. Dynamic localization of G proteins in Dictyostelium discoideum. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 15): 2597-603.
- 12 Courty S, Luccardini C, Bellaiche Y, Cappello G, Dahan M. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano Lett* 2006; 6(7): 1491-5.
- 13 Kerber ML, Jacobs DT, Campagnola L, Dunn BD, Yin T, Sousa AD, *et al.* A novel form of motility in filopodia revealed by imaging myosin-X at the single-molecule level. *Curr Biol* 2009; 19(11): 967-73.
- 14 Cai D, Verhey KJ, Meyhofer E. Tracking single Kinesin molecules in the cytoplasm of mammalian cells. *Biophys J* 2007; 92(12): 4137-44.
- 15 Mashanov GI, Tacon D, Knight AE, Peckham M, Molloy JE. Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods* 2003; 29(2): 142-52.
- 16 Mashanov GI, Tacon D, Peckham M, Molloy JE. The spatial and temporal dynamics of pleckstrin homology domain binding at the plasma membrane measured by imaging single molecules in live mouse myoblasts. *J Biol Chem* 2004; 279(15): 15274-80.
- 17 Mashanov GI, Molloy JE. Automatic detection of single fluorophores in live cells. *Biophys J* 2007; 92(6): 2199-211.
- 18 Fan Z, Jin W. A method for visualization of biomolecules labeled by a single quantum dot in living cells by a combination of total internal reflection fluorescence microscopy and intracellular fluorescence microscopy. *Talanta* 2007; 72(3): 1114-22.
- 19 Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, Kusumi A. Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(19): 7317-22.
- 20 Ulbrich MH, Isacoff EY. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat Methods* 2007; 4(4): 319-21.
- 21 Demuro A, Parker I. Imaging the activity and localization of single voltage-gated Ca²⁺ channels by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J* 2004; 86(5): 3250-9.
- 22 Ide T, Takeuchi Y, Aoki T, Yanagida T. Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel. *Jpn J Physiol* 2002; 52(5): 429-34.
- 23 Bal M, Zhang J, Zaika O, Hernandez CC, Shapiro MS. Homomeric and heteromeric assembly of KCNQ (Kv7) K⁺ channels assayed by total internal reflection fluorescence/fluorescence resonance energy transfer and patch clamp analysis. *J Biol Chem* 2008; 283(45): 30668-76.
- 24 Mashanov GI, Nobles M, Harmer SC, Molloy JE, Tinker A. Direct observation of individual KCNQ1 potassium channels reveals their distinctive diffusive behavior. *J Biol Chem* 2010; 285(6): 3664-75.
- 25 Brandenburg B, Zhuang X. Virus trafficking-learning from single-virus tracking. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(3): 197-208.
- 26 Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(16): 9280-5.
- 27 van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, *et al.* Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol* 2007; 81(21): 12019-28.
- 28 Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 2008; 454(7201): 236-40.
- 29 Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, Krausslich HG, Eils R, Rohr K, *et al.* Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog* 2009; 5(11): e1000652.

Applications of Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for Single-molecule Detection in Living Cells

Xuan Zhou, Lei Wang*

(School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) is a sensitive and fast single-molecule detection and imaging technique. It has been successfully applied to the fields of life science, chemistry and physics, particularly the area of single-molecule detection in living cells. In this paper, we reviewed the principle of TIRFM and the applications of TIRFM for single-molecule detection in living cells. We also prospected the development of TIRFM.

Key words single molecule detection; total internal reflection fluorescence microscopy; living cell

Received: December 2, 2009 Accepted: July 28, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No.20875056)

*Corresponding author. Tel: 86-531-88363888, Fax: 86-531-88564464, E-mail: wangl-sdu@sdu.edu.cn