

單一分子的無秩序光物理及光化學 變化之觀測

Observation of Non-Controllable Photo-Physical and Photo-Chemical Reactions by Single Molecule Fluorescence Investigations

徐瑞鴻

Jui-Hung Hsu

無秩序反應過程通常不易觀測，特別當事件機率偏低時，經常會被掩蔽而無法察覺。藉著同時紀錄單一分子產生螢光光子的螢光偏振狀態及螢光生命期等訊息，觀察染料分子 DiI 的無秩序可逆反應過程，包括光誘發構型轉化及環境影響三重態停留時期。當偶發事件不易控制時，單分子螢光計數可有助於瞭解這些無秩序反應。

Non-controllable rare events are easily being hidden, thus not easy to monitor. We report the observation of photo-physical and photo-chemical reactions of DiI molecules by single molecule fluorescence experiments. By monitoring the polarization and PL lifetime information from individual emission photon, it is possible to distinguish the rare reactions, include photo-induced isomerization, and environmental induced triplet state quenching. Our results demonstrate that single molecule fluorescence measurement is a unique tool for non-controllable reactions.

一、前言

單分子測量，或稱為單分子光譜測量，是指利用光譜量測方式觀測到單一分子，觀察單一分子之暫態 (transient) 反應，或者觀察單一分子的運動行為等。但這不表示可以利用可見光來看到單一分子的結構。從 1 nm 大小的簡單分子到數十微米 (micron) 長的高分子，結構均小於奈米尺度，並不是光學顯微鏡所能看清楚結構的。我們可以利用

STM、AFM 或 TEM 技術，觀察到單一分子或原子大小的結構，但當使用可見光波進行物質的觀測，受到光波波長及顯微鏡的收光範圍限制，所能達到的繞射解析極限約為波長之半，遠比一個分子的大小大了許多。因此使用光學技術進行單分子觀測的目的，並非藉著光學顯微鏡看到單一分子的結構，而是利用光譜測量的優勢，得以觀測到單一分子的光譜資訊。當觀測對象包含許多分子，所得為其平均結果；但若可以得到個別分子資訊，便可

以得到樣品的分布狀況，而非僅是其平均表現。特別的是，對於某些不容易控制的動態變化，樣品表現是無秩序的，也不容易建立事件的起始時間，而僅能藉著觀察每個單一事件的時間演化，才有機會掌握這些事件的變化狀況。

在眾多光譜技術中，較成熟的單分子光譜測量的方式是觀測其螢光表現。雖然第一個偵測單分子光譜訊號是低溫下以吸收技術進行⁽¹⁾，但後來的主流是以螢光技術進行⁽²⁾。比起吸收、光散射或其他機制，螢光偵測技術具有較高的訊噪比，因此容許微小至單一分子所產生的訊號大小依然可被清楚地辨識。近年來藉著奈米金屬顆粒結構的表面電漿共振 (surface plasmon resonance)，可以將分子拉曼散射 (Raman scattering) 訊號增強 10^{14} ，因此可以觀察到單一分子振動的拉曼光譜⁽³⁾。此外，藉著吸收或光散射技術觀察單一奈米尺度的金屬顆粒或半導體奈米顆粒結構的技術也陸續地被發展⁽⁴⁾。

本文中藉著分析從單一分子產生螢光的偏極性 (polarization)、瞬時光強度、及螢光生命期 (fluorescence lifetime) 等變化關係，說明 DiI 分子 (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate；結構如圖 1) 會在觀測過程中表現光物理或光化學性變化。這些「事件」的發生次數非常稀少，因此未能有效地分析 DiI 分子發生這些光物理或光化學變化反應的機率，但這些結果顯示對於這類不易控制的偶發事件，單分子觀測是瞭解及探討其變化非常有效的工具。

二、實驗架構

筆者的實驗系統是架構在一個高 NA 值 (numerical aperture) 物鏡的光學顯微鏡上，目前使用兩種不同的觀測方式：廣場 (wide-field) 架構與共焦 (confocal) 架構。廣場架構是指先將雷射光束以透鏡聚焦在物鏡之背焦點處 (back focal plane)，如此可在樣品上照亮一個約數十微米的範圍，在光學顯微鏡下可利用影像 CCD 觀測這範圍內螢光光點的分布。而共焦架構則是以平行雷射光束經由物鏡聚焦在樣品上，可得到近乎繞射極限 (~300 nm) 的聚焦光點，當螢光樣品分散的程度遠稀疏於聚焦

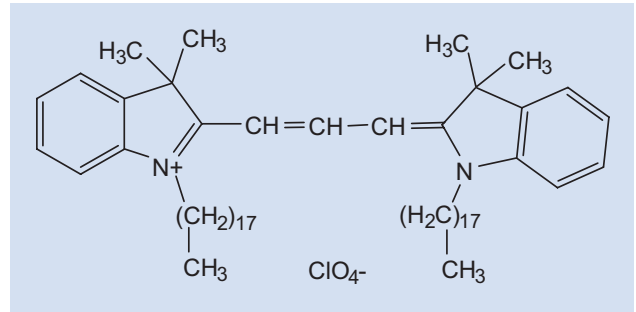


圖 1. 實驗使用的染料分子：DiI 的分子結構。

光點的大小，則可以僅讓單一螢光分子被激發。當螢光收集也以一孔徑限制而進入光偵測器，則形成共焦顯微觀測架構，也就是藉助激發光源與光偵測雙重限制其他位置的貢獻，以加強在焦點位置的樣品產生螢光之訊噪比。這兩個不同架構在顯微鏡上有明確位置的對應關係，俾能在廣場架構下先得到樣品之亮點分布狀況，再將個別亮點移至共焦架構下之雷射聚焦位置，切換為共焦架構，並在該架構下進行單一亮點的螢光測量。

簡化實驗光路如圖 2 所示，使用的雷射光源為脈衝寬度約 8 ps 的 Nd:YVO₄ 雷射，工作波長為 1064 nm，經過倍頻晶體產生 532 nm 光束，引導進入顯微鏡激發樣品，螢光經同一物鏡收集引導，經過濾光片 (538AELP+565ALP, Omega Optical) 將激發光有效濾除後，再進行觀測。在共焦架構下，將螢光導入一偏振分光鏡組 (polarization beam splitter)，再將不同偏振方向螢光聚焦進入光纖，引導到兩個單光子光偵測器 (Perkin Elmer SPCM-AQR-14-FC)。所偵測的每個光子訊號會轉化為電脈衝訊號，再送入計數卡 (Becker-Hickl photon counting card) 中。計數卡則會針對每個送入的光子脈衝訊號提供兩組時間訊息 (τ_i 及 t_i)： τ_i 對應到螢光光子與激發雷射光之時間差，便是一般使用時間解析單光子計數 (time-correlated single-photon counting, TCSPC) 技術來進行螢光生命期實驗所需的訊號。這時間準確度決定於雷射脈衝寬度、單光子光偵測器的誤差，以及實驗架構中其他時間增寬等因素。

以筆者的系統為例，目前限制於使用的單光子光偵測器的時間精準度，可到達之時間解析度為

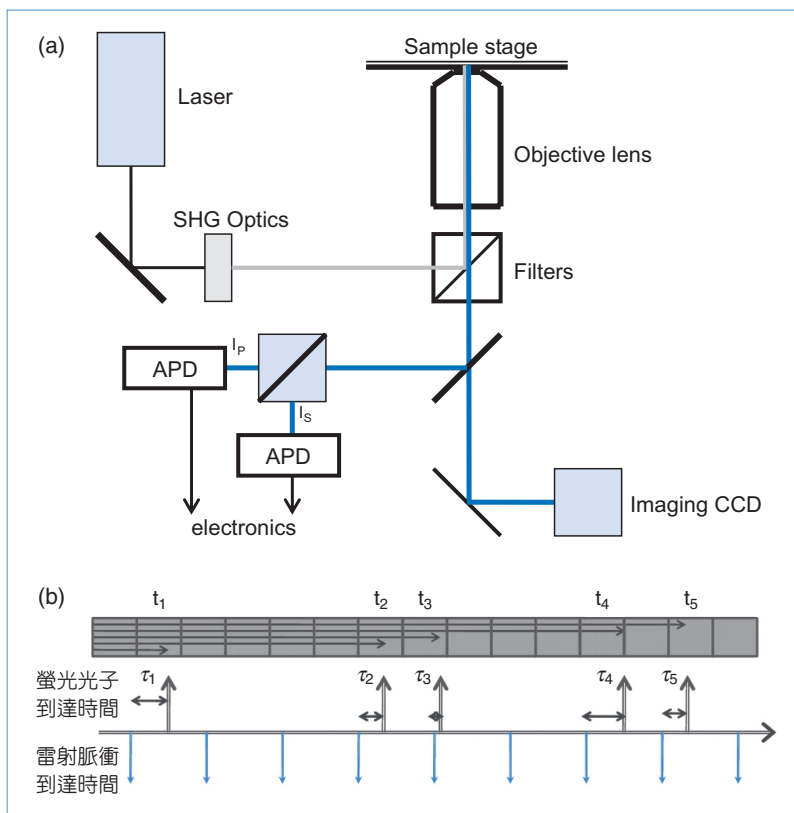


圖 2.
 (a) 實驗光路架構之簡圖，廣場架構與共焦架構之差異並未標示在圖中。(b) 光偵測器所得到的每個光子會轉換為電脈衝訊號，計數卡則針對每個電脈衝訊號提供兩組時間訊息 (τ_i 及 t_i)。其中 τ_i 是雷射脈衝到螢光光子之時間間隔，具高時間精準度；而 t_i 則是以 25 ns (方格狀標示) 時間精準度計算該光子產生時間。

250 ps，而其最大時間長度則與相鄰雷射脈衝之間隔時間相當。另一組時間訊息 (t_i) 則是藉著計數卡的時序，以 25 ns 時間精準度來紀錄這光子到達的時間，而其最大時間長度即是實驗進行全程時間。這兩組時間訊息是以不同方式產生，互為獨立，因此無法進一步建立長時期高精準之時序，但這已足夠提供對於分析單一分子的暫態光物理或光化學變化分析所需的資訊。藉著 t_i 時序，可以知道是在哪一時間區段 (每一個毫秒時間段落) 中偵測到的，甚至可以進一步得到在單位毫秒時間內個別光偵測器收集到多少光子，這樣便可以建立這一毫秒時間區段中的螢光強度及其螢光偏極性。此外，集結這段時間內每個螢光光子所對應的 τ_i ，得到其螢光衰變統計，藉此得到螢光生命期的資訊，便可觀測實驗過程中是否有對應之訊息變化。

將 DiI 分子稀釋至約 10^{-10} M 濃度之甲苯溶液，溶液中同時具有 3% PMMA，再以旋轉塗佈方式將樣品散佈在乾淨的蓋玻片表面，所得到為 DiI 分子散佈之平均距離約 1–10 微米。選擇 DiI 分子是因為它具有適合單分子螢光實驗的許多特性。

DiI 分子在溶液中的螢光效率不高⁽⁵⁾，但當其被固定在高分子薄膜時螢光效率近乎百分之百⁽⁶⁾。它是第一個室溫下薄膜狀態的單分子螢光實驗樣品⁽⁷⁾，也具有很好的光穩定性，因此 DiI 分子或許是在單分子螢光實驗中被研究最透徹的樣品之一。

三、實驗結果與討論

我們總共偵測超過 160 個 DiI 分子亮點，絕大部分均屬於正常 DiI 單分子所表現的性質。每個分子在實驗中被重複光激發約百萬次，僅有極少數表現特殊的結果。然而所挑選進行討論的分子中，部分行為一再出現，顯示這些行為發生機率並非真的如此稀少，而僅是因為我們不清楚該如何準備適應環境，來製造這些特殊表現的分子狀態。

圖 3 代表單一 DiI 分子的一般結果。圖 3(a) 表示單位時間內的光強度，這個分子在雷射光開始照射約 20 秒後就產生光漂白而失去螢光，但在此之前，光激發過程可以有效地重複激發該分子產生超過百萬個螢光光子。當螢光經過偏振分光鏡組之

後，兩個光偵測器所得到強度之比值可用偏振值 (anisotropy)，也就是 $(I_p - I_s)/(I_p + I_s)$ 比值來定義，其中 I_p 與 I_s 為兩光偵測器所得到之強度。圖 3(b) 便是該分子在兩個光偵測器所得之偏振值，在分子可有效地產生螢光的這段時間內，其偏振值均維持在 0.45 左右。單一分子的偏振值代表著一個分子在接受光激發之後，產生螢光過程所對應的光偶極矩 (transition dipole moment) 方向的物理意義。由於 DiI 分子被固定於蓋玻片的基板上，因此我們會預期實驗所得到的偏振值會是個定值，分子不會隨意轉動。而 (c) 則是其局部時間內的表現，DiI 分子會有交替地亮暗表現。光激發後，DiI 分子由基態躍升至單重激發態 (singlet excited state)，然後以發光或不發光形式將能量釋放而回到基態，所停留的時間便是螢光生命期，DiI 分子的螢光生命期約為 3 ns。當夠強光激發時，可接連得到由同一分子所發出的螢光，便是亮的狀態。偶爾 DiI 分子在單重態會轉換其分子之自旋狀態成為三重激發態 (triplet excited state)，這時分子會停留較久的時間 (DiI 分子約從次微秒到數十微秒不等)。而當分子位在三重激發態時，分子能階組態不同，不再吸收光，而到達單重激發態，因此持續維持在暗的狀態，直到分子再度回到基態才能再度被激發而成為亮的狀態。若是亮點包含超過一個分子以上，則這些分子不可能會同步跳躍到亮或暗的狀態，因此反過來說，若亮點呈現清楚的亮暗狀態之交替閃爍行為，是這些亮點上僅由單一分子構成的明確證據。

實驗樣品中 DiI 分子被透明的高分子薄膜固定在蓋玻片上，分子之光偶極矩維持在固定方向，因此實驗所得之偏振值應該維持定值。然而在實驗中，曾經觀察到分子的偏振值之變化，圖 4 所顯示的是其中一個例子。(a) 這個所觀測的分子，經過約 30 秒的光激發後就被光漂白而失去螢光，但不同於前一個例子，該分子的螢光偏振並非固定在特定方向。而圖 (b) 顯示該分子在時間約 0 及 15 秒後，偏振值均產生變化。而進一步圖 (c) 與 (d) 表現其在 18.3 秒至 18.8 秒期間的螢光行為。圖 (c) 為兩光偵測器所得的螢光強度，圖中可以清楚地看到分子的亮暗閃爍行為，而且兩個光偵測器所得到的亮暗變化時間點均一致，這些清楚的亮暗變化行為

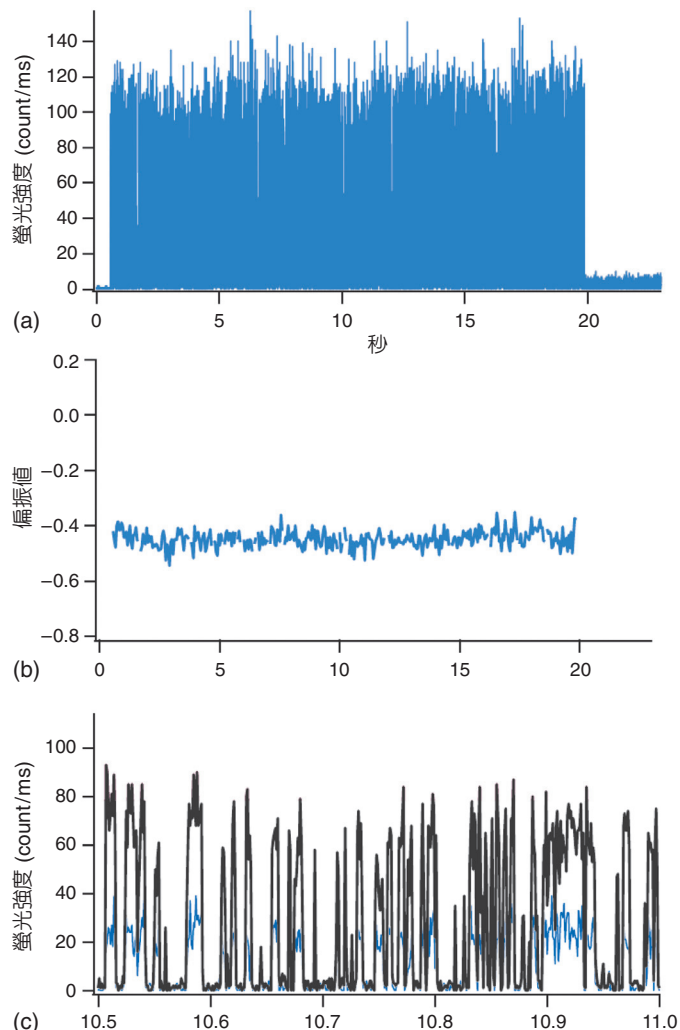


圖 3. 一般 DiI 單分子螢光實驗的結果。(a) 以每毫秒所得螢光光子數表示其螢光強度之變化。圖中這分子在持續光激發約 20 秒後即產生光漂白而不再產生螢光。20 秒後的訊號為玻片背景所造成的，強度遠低於螢光分子所貢獻的。(b) 兩光偵測器之比值：定義為其偏振值，用來表示分子的光偶極矩的方向。不同分子之光偶極矩方向不同，會對應到不同的偏振值。但因 DiI 分子被固定於玻片上，因此每個分子所得偏振值應保持固定。(c) 紅與藍線分別表示兩光偵測器所收集到 DiI 分子產生的螢光，局部時間內所觀測的強度會有清楚的亮暗閃爍變化，因為是來自同一分子的閃爍行為，因此兩光強度呈現同步亮暗變化。

表現，說明這個光點的變化是來自於單一分子，而非其他因素造成。兩光偵測器所得之個別螢光強度可以整理為該分子之偏振值，表現在圖 (d)。圖中顯示這段期間中該分子不但偏振值跳躍在兩個特定數值之間，而且在接近 18.7 秒時，偏振值變動所需時間遠較於我們在這實驗中所有的時間解析度 (1 微秒) 為長。而且分析不同時段所對應之螢光生命期，發現其螢光生命期與其偏振值之變動有關。當偏振值趨近 -0.2 時，其生命期約 2.1 ns；然而當偏振值約為 -0.8 時，其生命期縮短為 1.9 ns。這項結果說明：該分子具有不同構型 (isomers)，當分子在不同構型間轉化時，同時引起其方位的變化，因此表現出偏振值與螢光生命期的變動。

R. A. L. Vallee 等曾研究類似分子 (DiD) 的單分子螢光及理論模擬⁽⁸⁾，並發現其分子可以穩定地存在數種同分異構物，且彼此具有相近的能階，螢光生命期差異也不大。因此分子可以因光激發而轉化為不同構型，表現出稍有差異的螢光生命期。此外，Z. Huang 等人也針對 Cy5 分子，提出這類分子可以因光激發而進行順式與反式不同結構間的光轉變⁽⁹⁾。他們的研究結果也顯示，Cy5 分子的不同構型間能階相近，可以因光激發而產生構型之間的變化。我們並未進行理論計算，未能確定 DiI 分子也會有這些光構型轉化 (photo-isomerization) 反應，但類比於前述這些結構類似分子的表現，相信類似的反應也會發生在 DiI 分子上。若 DiI 分子僅有部分結構被束縛在玻璃片上，則當光激發產生構型變化時，其反應便可能表現如圖 5 所示，由於一端結構被固定，當其產生構型變化時，將同時誘發方位的變化。這樣便可合理的解釋所觀測到的螢光生命期與偏振值同時進行變化。最特別的是，接近 18.7 秒時所觀測到的持續變化。這段時間內該分子雖然進行構型變化，但仍可持續的被激發而產生螢光。這顯示：DiI 分子在不同構型的中間狀態，仍具有類似的能階結構與螢光性質，因此可以持續貢獻螢光。而且其構型變化所需時間可以高達數十微秒。這類具 cyanine 結構的染料，被廣泛地應用於照相感光、光儲存媒介以及雷射染料等不同用途，其溶液中或薄膜狀態之光穩定性，特別是光構型轉化，一直是人們有興趣的題目。但由於 DiI 是室溫

中單分子螢光實驗的先鋒，其在高分子薄膜的光穩定性相當良好，因此並未發現文獻報導其光構型轉化之變化。但上述文獻中，不同異構物可以在實驗中被有效的光激發而產生螢光。在筆者的觀察中，分子改變了光偏振方向時，其對應之螢光輻射衰變

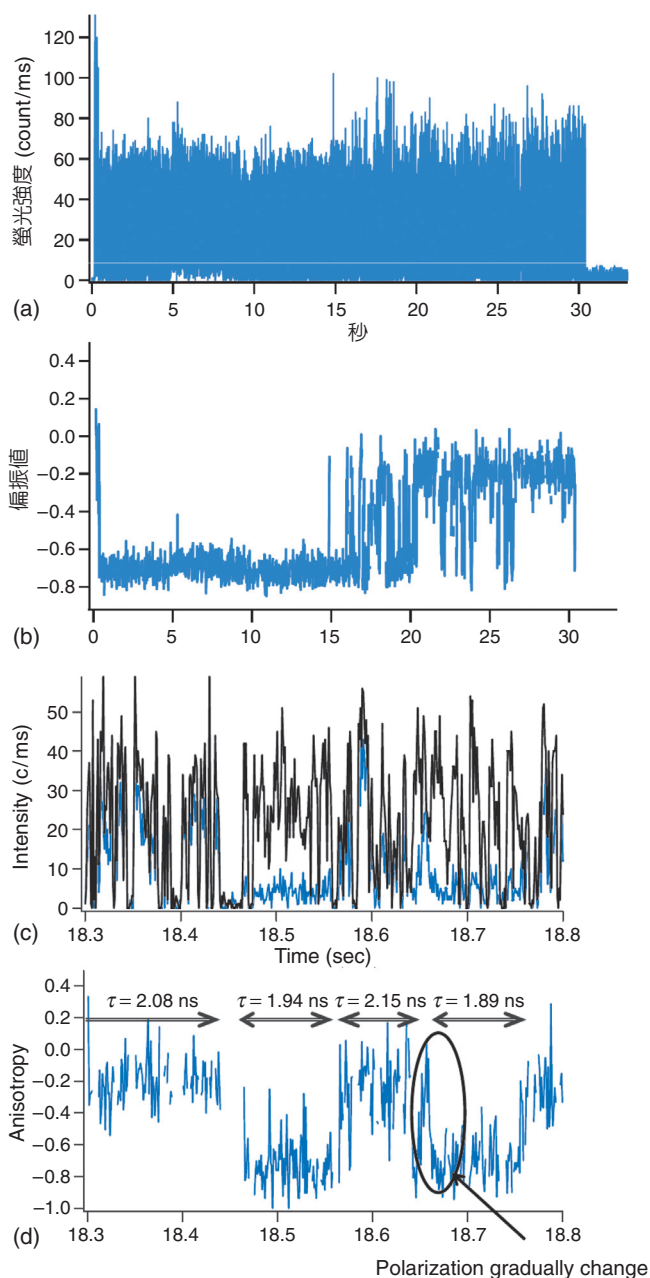
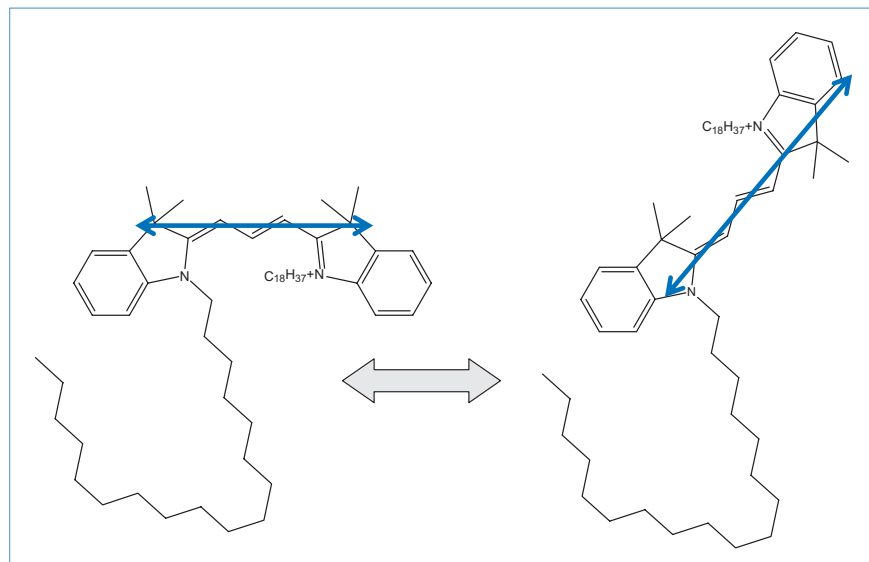


圖 4. (a) 分子螢光強度，(b) 對應的偏振值，(c) 18.3 至 18.8 秒間兩光偵測器所得光強度之變化，(d) 局部時間內偏振值的變化。此外，箭頭區間內收集到光子所統計的時間生命期標示在圖上。

圖 5.

DiI 分子可能進行的光構型轉化過程。圖中分子兩側長鏈 ($C_{18}H_{37}$) 以不同方式表示，主要是希望呈現一端固定在玻片，而另一端可因順式-反式構型改變而變化。藍色箭頭是為標示分子之共軛結構方向。



速率 (decay rates) 也隨之不同。這些證據支持這項觀察到的變化是來自於光誘發的構型轉化反應。

此外，也曾觀察部分 DiI 分子在螢光亮暗閃爍表現的變化。如圖 6 所示，該分子在持續光激發約 17.9 秒後便不再貢獻螢光。在其局部時間表現時，分別觀察時間 2.8 秒至 3.3 秒之區間及 7.0 秒至 7.5 秒區間，可以發現在 3.1 秒時，其亮暗變化之週期有所改變，而約 7.2 秒又變化回復原來的狀態。然而分析這段時間所對應的螢光生命期及偏振值，均保持在相同的範圍內。因此上述螢光表現之改變，應該不是來自其 DiI 分子之結構變化。我們推測可能在實驗進行中，DiI 分子的周遭環境有所變化，使得其分子停留在三重激發態的時間改變，導致其亮暗閃爍行為改變，但由於這變化對其單重激發態及基態並無影響，因此不影響其螢光生命期以及偏振值等。對於有機分子結構，氧氣除了容易與這些分子進行反應而產生光氧化外，由於氧分子之基態為三重態，氧分子也容易與位於三重激發態的分子進行碰撞而轉移能量，使得分子由三重激發態回到基態。當 DiI 分子在隔絕氧的環境中，其具有明顯的亮暗閃爍行為。但當其在氧充斥的環境中，便會因為氧碰撞而縮短其處在三重激發態的時間⁽¹⁰⁾，因此縮短其處在「暗」態停留時間。我們所觀察到的結果，可能便是氧氣或具有類似效果的結構，靠近這分子所得到的改變。

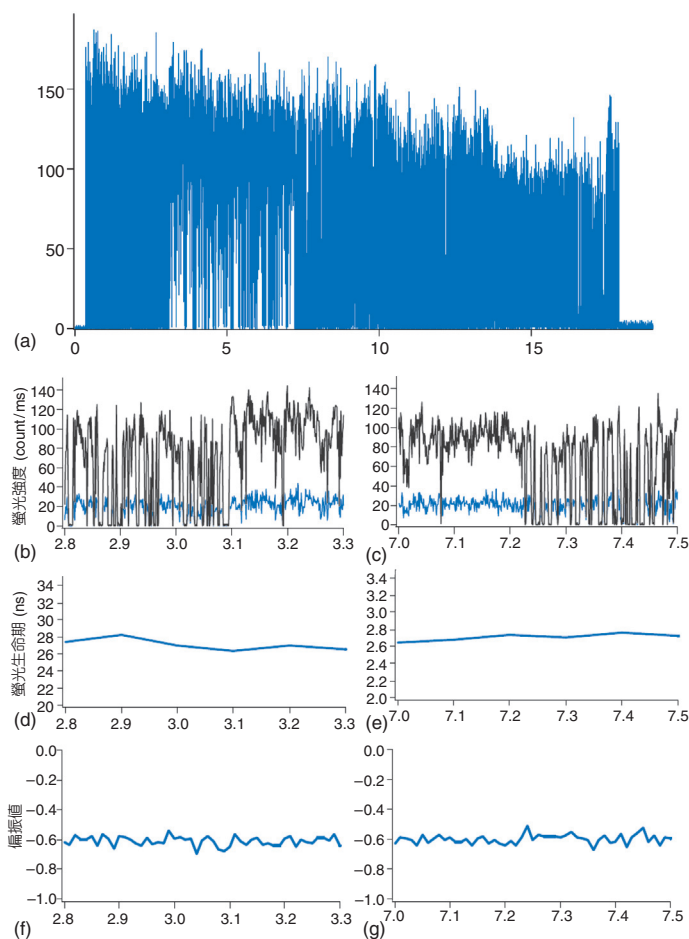


圖 6. (a) 分子螢光強度，(b) 與 (e) 分別標示 2.8 至 3.3 秒及 7.0 至 7.5 秒的螢光強度。(c) 與 (f) 則標示其對應的螢光生命期。而偏振值則表示在 (d) 與 (g) 圖上。

這些光物理或光化學變化的例子，僅是少數個案，是否可能是來自雜質或其他污染的結果？由於單分子螢光實驗是進行個別單一樣品的觀測，偶爾觀測污染或其他雜質的結果在所難免。上述每項例子中，都有部分期間內的表現與其他 DiI 分子相同。此外，並非僅觀測到這兩個分子產生變化。因此我們相信，這些觀測的結果應是 DiI 分子所對應的光物理及光化學反應的過程。

四、結論

當觀測的樣品僅包含單一螢光分子時，這項結果不僅提供我們可以分析樣品之螢光性質的統計分布，並且得以探測樣品在光激發過程中產生的極少數光物理或光化學變化。以這些特別的例子來說明，藉著觀測單一分子的螢光生命期以及螢光偏極性，可以進行這類不易控制的無秩序光物理或光化學變化反應的觀測。觀測樣品中，所發現具有這類變化的分子樣品不超過 10 個。但這並不表示 DiI 分子產生光物理或光化學反應的機率。同一分子在觀測過程中，有相當大的機會重複出現類似的反應。因此僅是我們無法掌握合適的實驗控制條件，而非 DiI 分子發生光物理或光化學反應的機率是如此低。但這也顯示 DiI 分子的反應受到環境的影響甚大，也因此不容易做適當的環境控制。而單分子觀測技術對於這類無法控制的反應觀測，具有好的靈敏度及有效掌握極少數發生的事件，因此可以有效地觀測這些事件。

誌謝

本文的實驗工作主要是由莊育慈先生及陳志豪先生所完成，筆者在此向他們致謝，同時也感謝國立中山大學及國科會的支助；最後要特別感謝范文祥教授過去對於我在科學研究上的指導，這使我終身受益匪淺。想念你，范老大！

參考文獻

1. W. E. Moerner and L. Kador, *Phys. Rev. Lett.*, **62**, 2535 (1989).
2. 至今已有多數文獻的回顧，如 F. Kulzer and M. Orrit, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **55**, 585 (2004).
3. S. M. Nie and S. R. Emery, *Science*, **275**, 1102 (1997).
4. M. A. van Dijk, *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 3486 (2006).
5. DiI 分子在甲醇溶液中，螢光效率低於 0.1.
6. C. G. Hubner, *et al.*, *J. Chem. Phys.*, **115**, 9619 (2001).
7. E. Betzig and R. J. Chichester, *Science*, **262**, 1422 (1993).
8. R. A. L. Vallee, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12011 (2005).
9. Z. Huang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 8064 (2005).
10. D. S. English, A. Furube, and P. F. Barbara, *Chem. Phys. Lett.*, **324**, 15 (2000).

-
- 徐瑞鴻先生為國立台灣大學物理博士，現任中山大學材料與光電科學系助理教授。
 - Jui-Hung Hsu received his Pd.D. in physics from National Taiwan University. He is currently an assistant professor in the Department of Materials and Opto-electronic Science at National Sun Yat-sen University.