



## 利用荧光寿命变化定量分子内和分子间相互作用的方法\*

王文娟<sup>1,2)\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 清华大学生命科学学院, 北京 100084; <sup>2</sup> 清华大学蛋白质研究技术中心, 北京 100084)

**摘要** 荧光寿命是指荧光分子在回到基态前在激发态停留的平均时间. 本文发展了基于荧光寿命测量来定量分子内和分子间相互作用的方法: 通过G碱基猝灭对于荧光寿命的影响定量DNA二级结构的形成; 通过荧光共振能量传递(FRET)中荧光寿命的变化来定量分子间的相互作用. 第一种方法巧妙利用了G碱基会猝灭临近的染料分子的性质, 结合荧光寿命的变化, 可以判断DNA二级结构的形成以及形成的比率. FRET是用于研究生物分子相互作用的一个重要手段. 传统的FRET方法主要是基于强度的变化, 但这种变化容易受到荧光表达水平变动、样品中分子扩散以及荧光串色的影响, 因此经常存在着实验比较复杂和重复性差的问题. 而基于荧光寿命的FRET研究则可以很好地克服上述缺点. 通过检测供体荧光寿命的变化, 我们能够方便快捷地判断是否发生FRET, 并通过建立系统的数据分析方法, 得到FRET的效率以及分子之间相互作用的信息.

**关键词** 荧光寿命, 荧光猝灭, G碱基猝灭, 荧光共振能量传递, 荧光衰减曲线, 分子内相互作用, 分子间相互作用, 发卡结构, 时间相关单光子计数

**中图分类号** Q6, Q7

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0359

荧光成像是生命医学研究中的重要研究手段, 广泛应用于细胞生物学、脑科学、免疫学、植物学、分子医学等学科领域<sup>[1]</sup>. 特别是随着超分辨荧光显微技术的发展, 其应用的深度和广度更加拓展<sup>[2]</sup>. 但目前荧光成像技术大部分利用的都是荧光强度和荧光光谱的性质, 而荧光的另外一个特性荧光寿命却很少用到<sup>[3]</sup>. 荧光分子被激发后会从基态跃迁到激发态, 然后从激发态以辐射和非辐射衰减的方式回到基态. 荧光寿命指的是荧光分子在回到基态前在激发态停留的平均时间<sup>[4-5]</sup>. 与荧光强度不同, 荧光寿命不受荧光分子浓度影响, 而受荧光分子所处环境的影响, 例如荧光分子附近是否有能够发生荧光共振能量传递的其他荧光分子, 以及荧光分子附近是否有猝灭剂等<sup>[6]</sup>. 因此, 通过荧光寿命测量可以直接得到荧光分子和周围环境作用的相关信息, 从而用于定量分子内和分子间相互作用. 本方法正是基于结合荧光寿命和荧光共振能量传递(FRET)以及荧光猝灭来检测分子内以及分子间的相互作用.

### 1 仪器与方法

#### 1.1 仪器

本文中采用的仪器是在Olympus FV1200共聚焦系统上搭建的Picoquant荧光寿命和荧光相关光谱系统. 激光器包括: 405、440、485、510、561和640 nm皮秒(ps)脉冲和连续双模式激光器. 时间相关单光子计数(time-correlated single-photon counting, TCSPC)器为TimeHarp 260 PICO Dual TCSPC. 检测器包括: 双通道单光子计数探测器SPAD和双通道PMA Hybrid40检测器(光谱响应范围300~720 nm, 探测效率高达45%, 在500 nm时间响应120 ps, 有效区域直径3 mm), 带光闸(shutter)和过载保护. 采集软件为SymPhoTime64.

\* 国家自然科学基金(22007054)和清华大学实验室创新基金资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-62781599, E-mail: wenjuan@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2020-10-06, 接受日期: 2021-05-13

## 1.2 样品

基于G碱基荧光猝灭定量分子内相互作用方法采用的DNA序列为TMR-4C20T和TMR-24T.

基于FRET定量分子间相互作用方法采用的是供体染料 (Cy3 或者 Alexa488) 标记的DNA单链和受体染料 (Cy5) 标记的DNA单链通过退火杂交形成的DNA双链. 其中 Cy3 和 Cy5 标记的供体和

受体对分别为 Cy3-5N11A 和 Cy5-5N30A. Alexa488 和 Cy5 标记的供体和受体对分别为 Alexa488-D 和 Cy5-A. 以上 DNA 序列见表 1. 采用的缓冲液为 TAM15 Buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 30 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 70 mmol/L KCl, 15 mmol/L  $\text{MgAc}_2$ , 1 mmol/L DTT).

Table 1 DNA sequences

Names	Sequences
TMR-4C20T	CCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGTTTTTT GCAGCATACATCTAG
TMR-24T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGTTTTTT GCAGCATACATC TAG
Cy3-5N11A	Cy3-GCACTGCTAGG
Cy5-5N30A	Cy5-CCTAGCAGTGCAGTGGTAATGCGGCGGCC
Alexa488-D	CCGATAGGAGTAGCACCGATTCTCATAGT(Alexa488)CGTGATGCTGGTGACGATCA
Cy5-A	GGCGGACCACGGACCAGGGTGATCGT(Cy5)CACCAGCATCACGACTATGAGAATCGGTGCTACTCCTATCGG

## 1.3 数据分析方法

荧光衰减曲线通过 Picoquant 公司的 SymPhoTime64 进行初步拟合, 后续的分析比较采用 Origin 9 软件. DNA 的设计及二级结构的预测使用了 IDT 公司的 OligoAnalyzer 3.1 工具.

## 2 结果与分析

### 2.1 基于时间相关的单光子计数荧光寿命测定方法及其应用于分子相互作用研究的原理

基于时间相关的单光子计数荧光寿命测定方法

是基于测定从脉冲激光激发到检测器检测到单个光子的时间 (图 1a). 因此在仪器设备上需要有脉冲激光、单光子计数器和具有单光子灵敏度的检测器. 单光子计数器会记录每个光子的寿命, 这些光子统计在一起就形成具有指数衰减性质的荧光寿命曲线 (图 1b). 荧光寿命就是通过对曲线拟合得到. 荧光寿命取决于染料分子本身的性质, 也会受到环境的影响, 例如发生荧光猝灭和共振能量转移. 荧光寿命就会缩短 (图 1b). 通过对荧光衰减曲线的拟合, 可以得到分子相互作用的信息, 例如是否

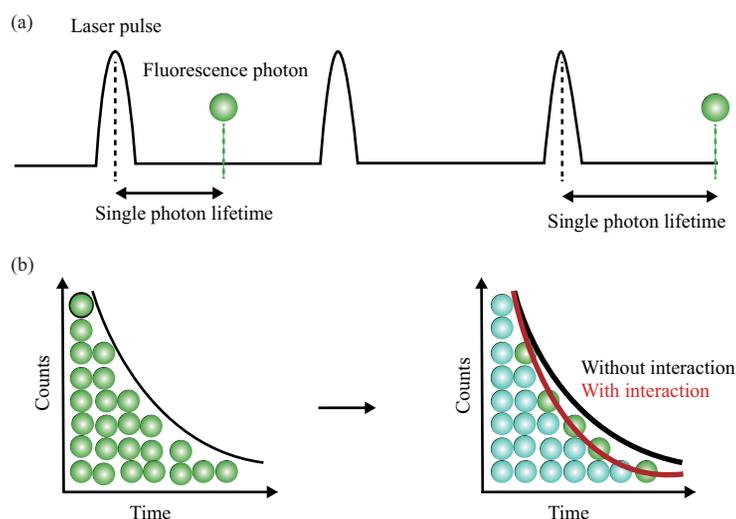


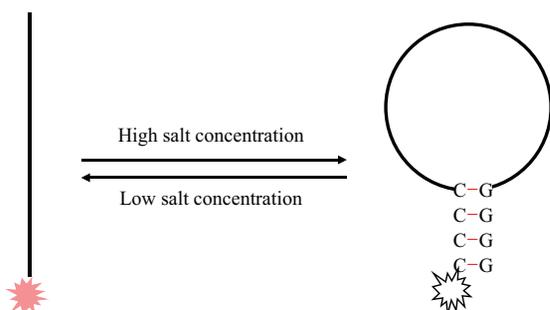
Fig. 1 Principles for fluorescence lifetime measurement and applications for studying molecular interactions

(a) Time-correlated single-photon counting (TCSPC) uses short laser pulses to excite fluorescence, and the time difference between excitation and emission is measured to get the lifetime of a single photon. Photons are accumulated to get a histogram and lifetime can be fitted. (b) Fluorescence lifetime of fluorophores with and without molecular interactions. Fluorescence lifetime decreases at fluorophore quenching or fluorescence resonant energy transfer.

会形成复杂的发卡结构, 以及发生相互作用的比率等.

## 2.2 基于G碱基猝灭和荧光寿命变化定量分子内相互作用的方法

一些荧光染料能够被DNA链上G碱基所猝灭, 这种猝灭是通过电子传递所实现并且是完全可逆的<sup>[7]</sup>. 这种G碱基猝灭在一些方法如原位杂交中会给检测带来困难, 应该避免. 但这种猝灭也可以被利用起来, 用于研究分子内复杂结构的形成以及分子间相互作用的检测<sup>[8]</sup>. 本方法正是利用了G碱基能够猝灭荧光染料四甲基罗丹明 (tetramethylrhodamine, TMR) 的性质, 结合在荧光猝灭过程中荧光染料寿命缩减的性质, 进行DNA分子内发卡结构形成的研究. TMR标记的DNA在低盐浓度下一般以单链形式存在 (图2), 此时荧光分子寿命较长. 在高盐浓度下, DNA容易形成复杂的二级结构例如发卡结构, 此时荧光分子TMR贴近G碱基, 从而发生荧光猝灭, 荧光寿命缩短.

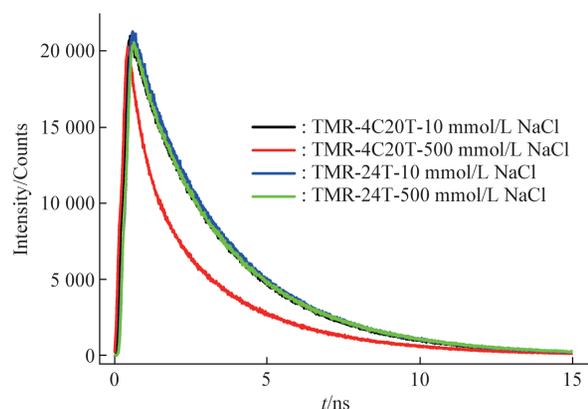


**Fig. 2 Combination of fluorescence lifetime and G-base quenching for detection of DNA hairpin formation**

TMR-4C20T forms hairpin structure at high salt concentration, which brings fluorophore TMR close to G-base and causes G-base quenching. The fluorescence lifetime decreases upon quenching.

实验中采用TMR-4C20T DNA作为实验组, 对照组则采用在高盐浓度下也不会形成发卡结构的TMR-24T DNA. 分别测量在低盐浓度 (10 mmol/L NaCl) 和高盐浓度 (500 mmol/L NaCl) 条件下的两组DNA荧光寿命的变化 (图3). 发现不会形成发卡结构的TMR-24T在低盐浓度 (蓝色实线) 和高盐浓度 (绿色实线) 下荧光衰减曲线都不会发生变化, 不会形成发卡结构, 因此荧光寿命较长. 而TMR-4C20T在低盐浓度 (黑色实线) 和高盐浓度下 (红色实线) 荧光衰减曲线发生明显变化, 其在10 mmol/L NaCl中不形成发卡结构, 荧光寿命较长

(黑色实线); 而在500 mmol/L NaCl条件下则会形成图2中的发卡结构, 因此荧光寿命缩短 (红色实线).



**Fig. 3 Fluorescence lifetime decay curve**

对TMR-4C20T-10 mmol/L NaCl的荧光衰减曲线进行单指数衰减拟合, 得到此条件下的TMR染料的荧光寿命 $\tau$ 为3.147 ns. 对于TMR-4C20T-500 mmol/L NaCl进行拟合时, 考虑到溶液中存在着未被猝灭的TMR以及形成发卡结构后被猝灭的TMR, 本研究采用了双指数衰减拟合. 通过指定一个荧光寿命为未被猝灭的TMR寿命3.147 ns, 得到第二个荧光寿命 $\tau_0$ 为0.577 ns.  $\tau$ 和 $\tau_0$ 的丰度 (amplitude) 分别为 $(11.59 \pm 0.01)$ 和 $(7.54 \pm 0.03)$  kilocounts, 因此可以得到形成发卡结构的DNA分子占总的分子数的比率为 $7.54/(11.59 + 7.54)=39.41\%$ .

从以上实验结果可以看出, 结合荧光寿命变化和G碱基猝灭可以用于分子内相互作用如分子构象变化的研究以及对形成二级结构的分子比率的计算. 这个检测方法的优势在于标记和数据收集简单易行, 可以只进行单个荧光分子的标记, 并且通过这个方法不仅可以判定分子内二级结构的形成, 还可以得到二级结构形成的比率, 并且可以测定反应的平衡常数、反应速率和自由能等参数. 这个方法的应用前景也比较广泛, 例如很多核酸适体在和蛋白质结合的时候就会发生分子内构象的变化, 那么结合该方法, 就可以利用荧光寿命的变化检测蛋白质的丰度和发展蛋白质芯片等<sup>[8]</sup>.

## 2.3 基于荧光共振能量传递 (FRET) 和荧光寿命变化定量分子间相互作用的方法

FRET是研究分子间相互作用的一个重要方

法, 在生物医学中有广泛的应用. FRET 效率在一定范围内随分子之间距离增加呈指数衰减, 一般用于研究 10 nm 以下的分子相互作用<sup>[9]</sup>. 传统的 FRET 方法主要是基于强度的变化, 但这种变化容易受到荧光表达水平变动、样品中分子扩散或者其他外在因素的影响. 并且基于强度的 FRET 方法用供体的激发光激发, 测量发生 FRET 后的受体荧光, 因此存在着串色的问题<sup>[10]</sup>. 从 FRET 对 Cy3-Cy5 来看 (图 4), Cy3 和 Cy5 的激发和发射光谱都有一定程度的重叠, 因此在用供体激发光激发供体

的时候, 同时也会有一部分受体不通过 FRET 而被激发光直接激发 (激发串色), 而在收集受体的发射光谱时, 也会收集到部分供体的发射光 (发射串色). 因此为了得到准确的 FRET 效率, 通常需要收集多张对照图像进行荧光串色校正, 增加了实验的复杂度. 而基于荧光寿命的 FRET 研究则可以很好地克服上述缺点<sup>[11]</sup>. 基于荧光寿命的 FRET (FLIM-FRET) 直接测量供体在发生 FRET 前后的荧光寿命的变化, 因此避免了串色的影响, 简化了实验, 提高实验的可重复性.

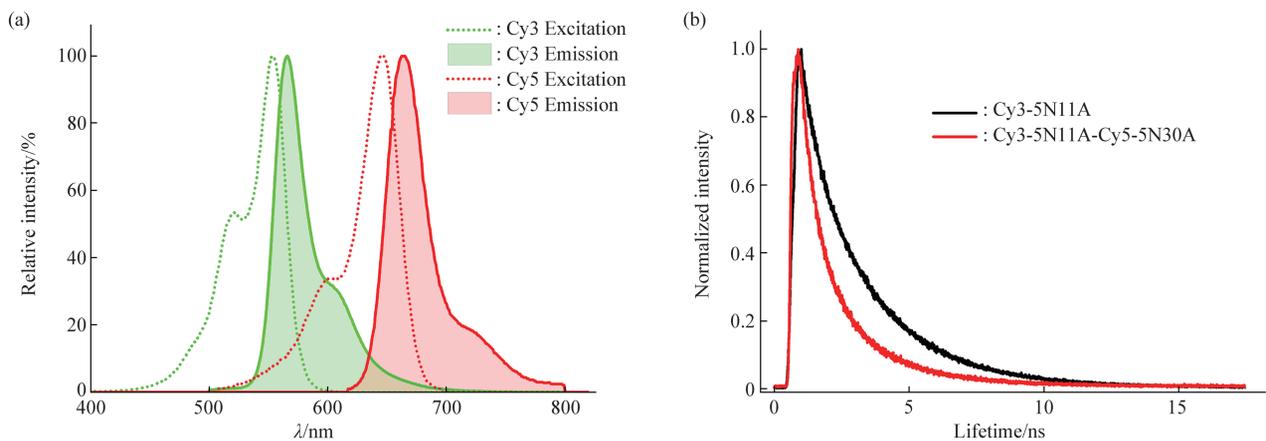


Fig. 4 Comparison of intensity based FRET and FLIM-FRET

(a) Comparison of donor Cy3 (green) and acceptor Cy5 (red) excitation (dashed curves) and emission (solid curves) spectra. Both excitation and emission spectra have some overlap, which cause either excitation or emission bleed through. (b) FLIM-FRET can be done through analyzing the lifetime changes of donor to avoid influence of fluorescence bleed-through. Black curve represents fluorescence decay curve of donor Cy3 without acceptor, and the red curve represents fluorescence decay curve of Cy3 after FRET.

该方法使用 Cy3 标记的单链 DNA (Cy3-5N11A) 作为供体, Cy5 标记的 DNA 互补链 (Cy5-5N30A) 作为受体, 通过测量只有 Cy3-5N11A 时 Cy3 的荧光寿命 (图 4b 黑色曲线) 以及当其和对应 Cy5 标记的互补链杂交后产生 FRET 后的 Cy3 荧光寿命 (图 4b 红色曲线), 可以计算得到 FRET 效率.

FRET 效率的计算通过以下公式得到:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (1)$$

其中  $E$  为 FRET 效率,  $\tau_{DA}$  为受体存在时的供体的荧光寿命,  $\tau_D$  为供体单独存在时候的荧光寿命.

Cy3-Cy5 荧光染料对是荧光共振能量传递研究中比较经典的一对染料. 但是链接 DNA 后的 Cy3 荧光寿命相对复杂, 通常存在着顺反异构两种构象, 因此通常需要进行双指数拟合<sup>[12]</sup>. 因此本方法采

用了平均荧光寿命的方法进行后续 FRET 效率的计算. 平均寿命的计算公式如下:

$$\tau_{ave} = \frac{A_1\tau_1 + A_2\tau_2}{A_1 + A_2} \quad (2)$$

其中  $\tau_{ave}$  为平均荧光寿命,  $\tau_1$  和  $\tau_2$  为双指数拟合得到的两个寿命,  $A_1$  和  $A_2$  为对应拟合得到两个寿命的丰度.

通过对 Cy3-5N11A 以及形成 FRET 对的 Cy3-5N11A-Cy5-5N30A 荧光寿命衰减曲线进行拟合 (图 4b), 可以得到 Cy3-5N11A 的平均荧光寿命为 1.689 ns, 而形成 FRET 对的 Cy3-5N11A-Cy5-5N30A 平均荧光寿命为 1.363 ns. 将这个寿命带入计算公式 (1), 可以得到发生 FRET 效率为 18.95%. 这个 FRET 效率代表了溶液中所有分子平均的 FRET 效率, 但是可能有游离 Cy3-5N11A 单独存在的情况, 因此实际杂交形成双链 DNA 的 FRET

效率可能高于这个数值。

如果采用荧光寿命比较单一的染料，例如供体荧光染料采用荧光寿命符合单指数衰减的 Alexa488 染料，那么在样品准备和数据分析中就可以采用更为简单的方法。从样品准备上，可以只准备有 FRET 的样品，通过对 FRET 样品的荧光衰减曲线进行双指数拟合，可以得到  $\tau_1$  和  $\tau_2$  以及对应的  $A_1$  和  $A_2$ 。其中长寿命的  $\tau_1$  就代表了 FRET 样品中游离供体单体的荧光寿命， $A_1$  代表其丰度。 $\tau_2$  和  $A_2$  则分别代表了发生 FRET 的供体的荧光寿命和丰度。那么根据 FRET 效率定义，可以将荧光共振能量公式直接简化为：

$$E = 1 - \frac{\tau_2}{\tau_1} \quad (3)$$

而发生 FRET 的供体占总供体中的比率则可以用以下公式计算：

$$R = \frac{A_2}{A_1 + A_2} \quad (4)$$

采用以上公式 (3) 和 (4) 对图 5 中 FRET 曲线 Alexa488-D-Cy5-A 进行拟合，得到  $\tau_1$  和  $\tau_2$  分别为 3.792 ns 和 1.191 ns， $A_1$  和  $A_2$  分别为 25.478 和 14.796。计算得到发生供体的 FRET 效率为 68.59%，其中发生 FRET 的供体占总供体的比率为 36.74%。由此可以看出溶液中实际存在着大量没有发生 FRET 的供体荧光染料单体，这很有可能是在进行 DNA 标记的时候荧光染料没有完全分离纯化导致的。当然也可以计算平均的 FRET，根据 (2) 得到 Alexa488-D 以及 Alexa488-D-Cy5-A 的平均荧光寿命分别为 3.955 ns 和 2.837 ns，根据 (1) 得到的平均 FRET 效率为 28.27%。

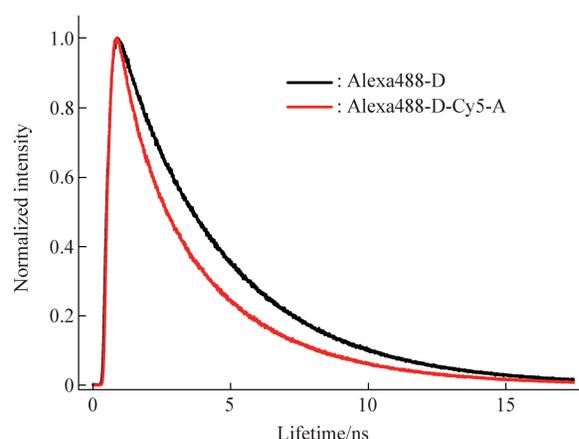


Fig. 5 Fluorescence lifetime FRET analysis based on Alexa488-Cy5 fluorophores pair

从上述两对染料来看，染料本身的性质对于 FRET 的实验设计和数据分析有着至关重要的影响。我们比较推荐采用荧光寿命符合单指数衰减的染料作为供体染料。当然，受限于实验条件，特别是在进行活细胞标记时染料的选择限制更大，如果采用荧光寿命比较复杂的染料作为供体，需要有单独的染料作为供体荧光寿命的对照，并且在分析数据时要注意能得到的通常是平均 FRET 效率。

### 3 讨 论

揭示和认知生物大分子的相互作用是生命科学研究中极其重要且基础的一环。通常可以利用 FRET 和双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 等技术手段，通过比对待测样品和参照样品相对荧光强度的变化，来定性或半定量地表征样品中生物大分子的互作。但由于样品标记的不完全等复杂因素的影响，传统基于荧光强度测量的技术手段难以定量表征样品中的分子相互作用。

针对以上问题，本文发展了基于荧光寿命测量来定量分子内和分子间相互作用的方法：a. 通过 G 碱基猝灭对于荧光寿命的影响研究 DNA 二级结构的形成。这种方法巧妙利用了 G 碱基会猝灭临近染料分子的性质，结合荧光寿命的变化，可以定量 DNA 二级结构的形成以及形成的比率，并且形成的实验技术和数据分析方法能够应用于荧光寿命受环境影响而变化的体系研究。b. 通过 FRET 中荧光寿命的变化来研究分子间的相互作用。此方法利用 FRET 过程中供体荧光寿命的变化来定量 FRET 效率以及发生 FRET 分子的比率。FRET 是用于研究生物分子相互作用的一个重要手段。传统的 FRET 方法主要是基于强度的变化，但这种变化容易受到荧光表达水平变动、样品中分子扩散以及荧光串色的影响，因此经常存在着实验比较复杂和重复性差的问题。而基于荧光寿命的 FRET 研究则可以很好地克服上述缺点。通过检测供体荧光寿命的变化，能够方便快捷地判断是否发生 FRET，并通过建立系统的数据分析方法，定量相互作用分子 FRET 的效率、发生 FRET 的分子在样品中的比率以及结合平衡常数等量化信息。本方法不但可以用于体外的生化研究，也可以用于定量细胞内的分子相互作用，实现细胞器水平空间分辨率。同时还可以扩展到化学高分子的相互作用等研究领域。

从以上的结果可以看到，荧光寿命成像是研究

分子内和分子间相互作用的一种非常有前景的方法. 基于荧光寿命的成像方法可以有效避免荧光强度成像方法带来的一些偏差, 如荧光分子浓度、荧光漂白和荧光串色对于荧光强度的影响, 从而降低实验的复杂性并提高定量分析的准确性.

目前基于时间分辨的荧光寿命方法通常可达到几百个 ps 的时间分辨率<sup>[13]</sup>, 可用于实时分子动态过程的研究, 我们将结合 FRET 和荧光寿命进一步发展动态测量分子的构象变化技术. 荧光寿命方法的空间分辨率取决于显微成像系统的空间分辨率<sup>[14]</sup>, 因此结合高空间分辨的显微成像系统来拓展荧光寿命方法的应用也是未来发展的方向.

### 参 考 文 献

- [1] Rino J, Braga J, Henriques R, *et al.* Frontiers in fluorescence microscopy. *Int J Dev Biol*, 2009, **53**(8-10): 1569-1579
- [2] Han R C, Li Z H, Fan Y Y, *et al.* Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology. *J Genet Genomics*, 2013, **40**(12): 583-595
- [3] Becker W. Fluorescence lifetime imaging-techniques and applications. *J Microsc*, 2012, **247**(2): 119-136
- [4] Jain A, Blum C, Subramaniam V. Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging of visible fluorescent proteins. *Advances in Biomedical Engineering*, 2009: 145-174
- [5] Dysli C, Wolf S, Berezin M Y, *et al.* Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Prog Retin Eye Res*, 2017, **60**: 120-143
- [6] Suhling K, French P M W, Phillips D. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photoch Photobio Sci*, 2005, **4**(1): 13-22
- [7] Torimura M, Kurata S, Yamada K, *et al.* Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base. *Anal Sci*, 2001, **17**(1): 155-160
- [8] Wang W J, Chen C L, Qian M X, *et al.* Aptamer biosensor for protein detection based on guanine-quenching. *Sensor Actuat B-Chem*, 2008, **129**(1): 211-217
- [9] Cardullo R A, Parpura V. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: theory and instrumentation. *Methods Cell Biol*, 2003, **72**: 415-430
- [10] Zhong W, Wu M, Chang C W, *et al.* Picosecond-resolution fluorescence lifetime imaging microscopy: a useful tool for sensing molecular interactions *in vivo* via FRET. *Opt Express*, 2007, **15**(26): 18220-18235
- [11] Chen Y E, Periasamy A. Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization. *Microsc Res Techniq*, 2004, **63**(1): 72-80
- [12] Sanborn M E, Connolly B K, Gurusathan K, *et al.* Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA. *J Phys Chem B*, 2007, **111**(37): 11064-11074
- [13] Gerritsen H C, Asselbergs M A H, Agronskaia A V, *et al.* Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition speed, photon economy and lifetime resolution. *J Microsc*, 2002, **206**(Pt 3): 218-224
- [14] Chen L C, Lloyd W R, Chang C W, *et al.* Fluorescence lifetime imaging microscopy for quantitative biological imaging. *Method Cell Biol*, 2013, **114**: 457-488

## Quantification of Intra- and Inter-molecular Interactions Based on Fluorescence Lifetime Measurement\*

WANG Wen-Juan<sup>1,2</sup>\*\*

<sup>1</sup>*School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;*

<sup>2</sup>*Technology Center for Protein Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)*

**Abstract** Fluorescence lifetime is the average amount time a fluorophore spends in excited state before returning to the ground state. In this paper, methods for quantifying intra- and inter-molecular interactions based on fluorescence lifetime measurement were developed. One is quantification of DNA secondary structures formation by fluorescence lifetime change through G-base quenching, and the other is quantification of inter-molecular interactions by fluorescence lifetime change through fluorescence resonance energy transfer (FRET). The first method cleverly utilizes the properties of G-base to quench adjacent dye molecules, and combines with changes in fluorescence lifetime, to determine the formation of DNA secondary structure and the formation ratio. FRET is an important means for studying biological molecular interactions. Traditional FRET methods are mainly based on change in intensity, but this change is susceptible to changes in fluorescence expression levels, molecular diffusion in samples and crosstalk between fluorophores, which brings complexity in experimental design and poor repeatability of experimental data. FRET measurement based on fluorescence lifetime can overcome the disadvantages mentioned above. By detecting changes in the fluorescence lifetime of the donor, we can quickly and easily determine whether FRET occurs, and through establishing a systematic data analysis method we can get FRET efficiency and information about inter-molecular interactions.

**Key words** fluorescence lifetime, fluorescence quenching, G-base quenching, fluorescence resonance energy transfer (FRET), fluorescence decay curve, intra-molecular interactions, inter-molecular interactions, hairpin structure, time-correlated single photon counting

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0359

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22007054) and Innovation Funding from Office of Laboratory Management, Tsinghua University.

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-10-62781599, E-mail: wenjuan@mail.tsinghua.edu.cn

Received: October 6, 2020 Accepted: May 13, 2021