

CorTector™ SX100: 一款桌面式荧光相关光谱仪的原理和应用*

王柱楼 康 宁 梁艳琴 肖 茜** 黄韶辉**

(中国科学院生物物理研究所, 交叉科学所重点实验室, 北京 100101)

摘要 荧光相关光谱检测技术具有超灵敏(单分子)、快速(数秒至数分钟)和多功能(检测分子浓度、大小和相互作用)等技术优点, 且无需反应物分离, 因此有潜力成为一种新型均相、高敏荧光免疫检测技术, 适用于在溶液或单个活细胞内检测生物分子特性。本文首先介绍荧光相关光谱检测技术的原理和研究进展, 然后结合项目团队自主研发的目前全球唯一一款可靠、易使用的桌面式荧光相关光谱仪, 进一步探讨荧光相关光谱检测技术的具体实现和潜在应用。

关键词 荧光相关光谱学, 荧光自相关, 荧光交相关, 单分子荧光

学科分类号 Q6

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0058

荧光相关光谱学 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) 是美国科学院和工程院两院士 Watt W. Webb 教授与同事在 1970 年代建立理论基础并进行实验验证后建立起来的^[1-3]。进入 1990 年代, 随着显微镜、激光器、计算机、数据采集卡、光子探测器、荧光分子和标记技术的巨大进步, FCS 技术才具备软、硬件条件并首先在科学研究的各个领域得到了广泛应用^[4-6]; 仅在 PubMed 论文库中用 “fluorescence correlation spectroscopy” 关键词进行检索, 就得到近 7000 篇学术论文。FCS 及其衍生技术已经被应用于单分子研究、分子-分子相互作用研究、化学反应动力学、病原体检测、酶活性检测、纳米颗粒特性分析、光物理学、等离子体纳米光学和微流控技术开发等。然而中国学术界目前对该技术了解还较少, 只有少数几个实验室应用了这一技术, 可能原因有:

a. 商业荧光相关光谱仪目前由国外高端显微镜厂商垄断, 仪器售价及后续维护费高。以德国 Zeiss 公司的 Confocor 产品系列为例, 基于共聚焦或多光子显微镜的荧光相关光谱仪 (Confocor 3) 售价可达 50~100 万美元, 整套系统需配置显微镜实验间和专业操作人员, 年维护费可达售价的 10%。

b. 少数具光学、物理学背景的实验室可自主搭建低成本的 FCS 系统, 但在普通生物医学、化学实验室中搭建、维护和应用此类系统的难度很大。

c. 荧光相关光谱学原理较复杂, 实验操作和数据分析需要对干扰因素和技术原理有全面和深入的了解, 因此 FCS 技术的推广难度较大。

基于以上分析, 项目团队开发了目前全球市场上唯一一款低价、可靠、易使用的桌面式商业荧光相关光谱仪 (CorTector™ SX100)。该仪器无需独立显微镜实验室, 适用于研究溶液样品中的分子特性, 可在生物医学、化学、物理学等学科的普通实验室中推广应用。

1 荧光相关光谱学基本原理

FCS 技术的关键是在一个宏观溶液样品中, 利

* 广东省科技计划项目资助(20140215)。

** 通讯联系人。

黄韶辉. Tel: 010-64887732, E-mail: shaohuih@ibp.ac.cn

肖 茜. Tel: 010-64887732, E-mail: qianxiao@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2018-02-10, 接受日期: 2018-07-17

用激光和光学器件非接触性地分离出一个极小的荧光激发和检测体积 V (图 1). 该体积通常只有数个飞升($1\text{fl} = 10^{-15}\text{L}$; 约一个细菌大小), 包含几个至几百个基于布朗运动而自由扩散的荧光分子或经过荧光标记的分子、纳米颗粒等. 受检荧光分子的浓度在溶液样品中是恒定的, 但在微观体积 V 内的荧光分子个数 $N(t)$ 因自发的热力学不平衡而随时间 t 波动 $\delta N(t)$, 进而反映在相应的荧光信号 $F(t)$ 及其波动 $\delta F(t)$ 上. 因此:

$$\frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta N(t)^2 \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad (1)$$

尖括号代表时间平均值. 在微观体积 V 内以

小概率随机存在的分子个数 $N(t)$ 由泊松统计学 (Poisson statistics) 原理决定, 因此分子个数的方差 $\delta N(t)^2$ 等于其平均值 $\langle N(t) \rangle$, 方程式(1)演变为:

$$\frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{\langle N(t) \rangle} = \frac{1}{CV} \quad (2)$$

C 为受测分子的计数浓度 (number concentration; 个数 / 升). 方程式(2)阐明了 FCS 技术的最基本原理: 即通过检测宏观溶液样品中, 某一微观体积 V 内荧光信号的波动幅度 $(\langle \delta F(t)^2 \rangle / \langle F(t) \rangle^2)$ 从而推导受测分子溶度 C . 因此, FCS 技术从本质上就是一种超灵敏检测方法.

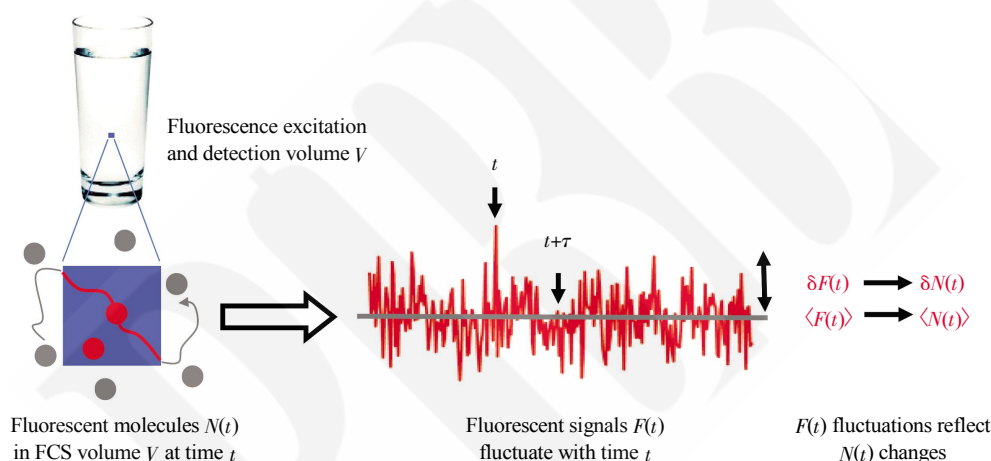


Fig. 1 Schematic illustration of the principle of fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

Fluorescent molecules $N(t)$ freely diffuse through the FCS volume V at time t . The spontaneous thermodynamic fluctuations of the number of fluorescent molecules in the FCS volume V lead to corresponding fluctuations in the recorded fluorescent signals $F(t)$. The experimental measurements of the time-averaged fluorescence intensity $\langle F(t) \rangle$ and its temporal fluctuations $\delta F(t)$ reflect respectively the average number of fluorescent molecules $\langle N(t) \rangle$ and its temporal fluctuations $\delta N(t)$ in the FCS volume V .

FCS 技术需要在溶液样品中分离出一个极小的荧光激发和检测体积, 而基于点扫描三维成像的共聚焦或多光子荧光显微镜的高分辨率也取决于在一个极小样品体积内激发和检测荧光信号. 因此, 现有商业荧光相关光谱仪都是在共聚焦或多光子荧光显微镜上实现的 (图 2a). 激发荧光分子的激光 (绿线) 被显微镜镜头 (OBJ) 聚焦到溶液样品 (S) 中的一个极小的体积内 (聚焦点: 图 2b 绿色区域); 聚焦光路 (包括聚焦点) 内的所有荧光分子受激产生荧光信号 (红线), 这些信号的一部分被同一显微镜镜头 (OBJ) 收集, 经过二向分色镜 (DM) 反射、成像镜

(TL) 聚焦和滤光片 (F) 过滤, 最终被单光子计数荧光探测器 (DET) 接收; 为了在聚焦点内分离出一个更小的荧光检测体积 V (图 2b 橙色部分), 在与聚焦点相对应的成像点放置一共聚焦针孔 (P); 通过调节该针孔的大小, 使得只有从检测体积 V 内发出的荧光信号才能被探测器接收到. 理想状态下, 单个荧光分子自由扩散经过体积 V 时, 可产生背景噪声为零, 脉冲形状可用二维高斯分布公式描述的理想脉冲信号 (图 2b). 但是在实际操作中, 由于背景信号和探测器噪音等因素, 实验测得的是更为复杂的波动荧光信号 $F(t)$ (图 2b).

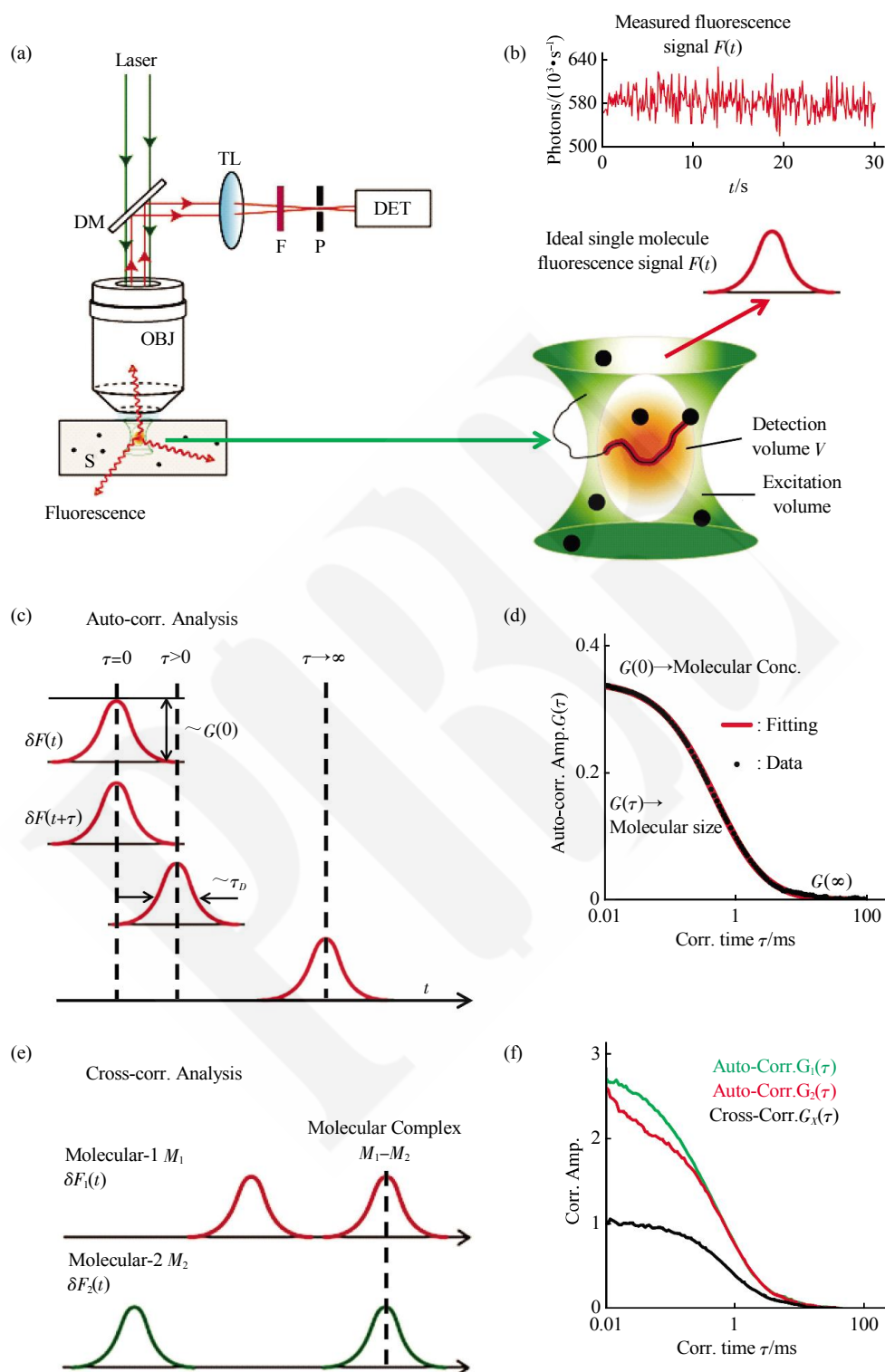


Fig. 2 Principles of auto- and cross-correlation analysis

(a) Fluorescence correlation spectrometer based on a confocal optical pathway. (b) Fluorescence excitation (green) and detection volume (orange) V in a solution sample with fluorescence signals $F(t)$ detected from this volume V . (c) Schematic illustration of fluorescence auto-correlation analysis: τ is correlation time; $G(0)$ is the correlation amplitude with $\tau=0$, τ_D is diffusion correlation time. (d) An example of experimentally acquired autocorrelation decay curve. (e) Schematic illustration of fluorescence cross-correlation analysis (FCCS). (f) An FCCS experiment yields two auto-correlation decay curves (green and red) and one cross-correlation decay curve (black). DET: Single-photon counting fluorescence detector; DM: Dichroic mirror; F: Filter; OBJ: Objective; P: Pinhole; S: Sample; TL: Tube lens; V: Fluorescence detection volume.

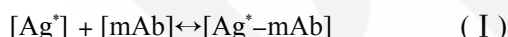
1.1 荧光自相关技术的原理和应用

荧光自相关光谱 (fluorescence auto-correlation spectroscopy) 是最早开发的 FCS 技术. 自相关分析就是计算波动荧光信号 $F(t)$ 与自身在相关时间 τ (correlation time) 的时滞信号 $F(t+\tau)$ 之间的重叠程度, 即自相关幅度 $G(\tau)$ ^[5,7]:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3)$$

其中 $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$, 尖括号代表时间平均值. 以理想的单分子荧光信号为例, 信号本身即为波动幅度: $F(t) = \delta F(t)$. 因此, 当相关时间 $\tau=0$ 时, 自相关幅度 $G(0)=1$ 为最大值; 当 $\tau>0$ 时, 两组信号之间的重叠区域随 τ 值的增加而减少, $G(\tau)$ 下降; 当 $\tau \rightarrow \infty$ 时, 两组信号之间无重叠区域, $G(\infty)=0$ (图 2c). 同样的, 对实验所得波动荧光信号 $F(t)$ 进行自相关计算, 可得到随相关时间 τ 增长而衰减的自相关幅度 $G(\tau)$ (图 2d, 黑色数据点). 对这些实验数据进行拟合后 (图 2d, 红色曲线) 得到的拟合参数 $G(0)$ 和 τ_D (diffusion correlation time) 分别反应了受测分子的浓度和大小 (附录 1).

利用荧光自相关技术可在溶液或单个活细胞内定量分析分子-分子相互作用, 比如测定抗原-抗体结合反应的亲和力 K_D 值^[8]:



Ag^* 为经荧光分子标记的抗原分子, mAb 为其特异性单克隆抗体, Ag^*-mAb 为抗原-抗体结合物. 如果抗体 mAb 与抗原 Ag 分子质量比值超过 8, FCS 技术能在均相反应液中定量检测游离态和结合态抗原分子的浓度 $[Ag^*]$ 和 $[Ag^*-mAb]$ (附录 2). 通过系统性地改变反应液中 $[Ag^*]/[mAb]$ 比例, 并测定相应的 $[Ag^*]$ 、 $[Ag^*-mAb]$ 摩尔浓度, FCS 可测定该抗原-抗体结合反应的解离常数 K_D 值 (图 7c).

1.2 荧光交相关技术的原理和应用

然而并不是所有的分子间相互作用都发生在分子质量/体积悬殊的两者之间. 因此, 在荧光自相关光谱技术的基础上又发展了荧光交相关光谱 (fluorescence cross-correlation spectroscopy, FCCS) 技术^[6,9]. FCCS 技术可在共聚焦光路上实现, 通常需要 2 个不同波长的激光器和与之对应的 2 个荧光检测通道. 这 2 个激光器被用于激发溶液样品中 2 种被不同颜色的荧光分子标记的受测分子 (M_1 、 M_2). 这 2 种分子自由扩散经过相应的荧光检测体积 V_1 和 V_2 时分别产生 $F_1(t)$ 和 $F_2(t)$ 两种随时间 t 波

动的荧光信号 (图 2e, 红色和绿色曲线). 以单个红色或绿色荧光分子产生的理想脉冲信号为例, 假设 $V_1=V_2=V$ 并且 V_1 和 V_2 在三维空间重叠. 如果两种荧光分子之间无相互作用, 那么两种分子通过自由扩散进入检测体积 V 的时间是相互独立的, 相应的荧光信号通常不在同一时间 t 出现 (无交相关性). 而当这两种分子形成稳定的分子复合物 (M_1-M_2) 因此同时进入荧光检测体积 V 时, 红色和绿色荧光信号被同时检测到 (有交相关性), 这两组荧光信号在相关时间 τ 的交相关幅度 $G_X(\tau)$ 可由公式 (4a) 计算 (图 2f; 黑色曲线)^[6,9]:

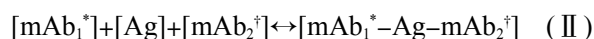
$$G_X(\tau) = \frac{\langle \delta F_1(t) \delta F_2(t+\tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle} \quad (4a)$$

针对红色和绿色波动荧光信号分别进行自相关分析可得到相应的自相关幅度 $G_1(\tau)$ 和 $G_2(\tau)$ (图 2f; 红色和绿色曲线):

$$G_1(\tau) = \frac{\langle \delta F_1(t) \delta F_1(t+\tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle^2} \quad (4b)$$

$$G_2(\tau) = \frac{\langle \delta F_2(t) \delta F_2(t+\tau) \rangle}{\langle F_2(t) \rangle^2} \quad (4c)$$

运用特定的数学模型 (附录 3) 对实验所得荧光交相关幅度进行拟合, 可得拟合参数值 $G_X(0)$ 和 τ_{XD} . 与自相关分析类似, $G_X(0)$ 与 τ_{XD} 分别反应了分子复合物 $[M_1-M_2]$ 的摩尔浓度和大小^[6,9]. 参照体外医疗检验 (*in vitro diagnosis*) 最常用的“夹心法”, 可以用两种经不同颜色荧光分子标记的抗体 mAb_1^* 和 mAb_2^* 来设计一种针对特定疾病标记物 (抗原 Ag) 的均相荧光免疫检验法:



通过对一次 FCCS 实验所得的两条荧光自相关和一条荧光交相关衰减曲线 (图 2f) 进行拟合并得到相应的 $G_X(0)$ 、 $G_1(0)$ 和 $G_2(0)$ 值, 疾病标记物 $[mAb_1^*-Ag-mAb_2^*]$ 浓度 C_X 可由公式 (5) 计算得到:

$$C_X = \frac{G_X(0)}{G_1(0)G_2(0)V} \quad (5)$$

如上所述, 荧光交相关检测有以下优点: a. 受测分子本身无需荧光标记; b. 受测分子体积大小无限制但需要被两种抗体同时识别; c. 可使用饱和 (经荧光标记的) 抗体浓度 (nmol/L) 来检测极低浓度 (fmol/L ~ pmol/L) 的疾病标记物. 然而, 实现 FCCS 技术需要: a. 对两种抗体分别进行两种不同颜色 (荧光发射光谱完全分离) 的荧光分子标

记; b. 通常需要两个激光器来分别激发这两种荧光分子, 并且相应的两个荧光检测体积大小类似($V_1 \approx V_2$)且在三维空间上高度重叠. 因此, 荧光交相关技术相对于荧光自相关技术有更大的实现难度.

1.3 荧光相关光谱技术优点

在特定实验条件下检测分子浓度、大小和相互作用是生物医学和化学研究的主要课题. 如上所述的 FCS 和 FCCS 技术能在溶液环境中或单个活细胞内定量检测分子的浓度、大小和相互作用, 因此在生物医学、化学等研究领域具有无可取代的综合技术优势: a. 超灵敏, 最高检测灵敏度是单分子, 适用于检测极低浓度(pmol/L~nmol/L)的溶液样品; b. 微量, 荧光检测体积小至数个飞升, 因此溶液样品或单个活细胞体积也可以非常小(数 10 个微升), 适用于检测非常少或非常珍贵的样品; c. 快速, 一次检测只需几秒钟至几分钟; d. 多功能, 一次检测可同时获取分子浓度、大小和相互作用的定量信息; e. 均相检测, 可在保持生物分子活性的溶液或活细胞内直接检测分子特性, 无需将受测物分离提纯(均相).

2 桌面式荧光相关光谱仪的研制

现有的商业荧光相关光谱仪在共聚焦或多光子显微镜的基础上开发, 因此体积大、价格高、需

要显微镜暗室和专业操作人员. 而实验室搭建的荧光相关光谱仪对操作者的专业技能, 特别是共聚焦光路调节能力要求高. 因此, 为促进 FCS 技术在普通生物医学、化学实验室中的推广应用, 本课题组历经 4 代工程样机(图 3a~3d)研制, 成功开发了目前全球市场上唯一一款自动化程度高、性价比高、并且整合了 FCS 和 FCCS 技术的桌面式荧光相关光谱仪(CorTector™ SX100; 图 3d). 与传统的基于商业显微镜的荧光相关光谱仪相比, 该设备进行了多项技术创新: a. CorTector™ SX100 的所有子系统, 包括共聚焦光路、电子与机械系统、光密样品仓等, 都被整合在一个 733 mm×410 mm×349 mm 体积内. 因此, CorTector™ SX100 可在普通实验室的桌面环境中使用. b. 荧光相关光谱仪的技术难点是实现共聚焦针孔(图 2a)的精确、可重复定位. 因此, CorTector™ SX100 为 2 个荧光探测通道的每一共聚焦针孔(图 4)都配置了 3 个伺服-步进电机并开发了相应控制软件, 从而实现了共聚焦针孔在三维空间内的全自动、高精度(约 1 μm)定位. c. CorTector™ SX100 配置了电机驱动三维定位样品台, 目前已实现对 8 个溶液样品的批量、自动检测. d. 项目团队自主开发了数据采集(correlation acquisition)和数据分析(correlation analysis)软件, 在很大程度上减轻了实验者的工作负担, 并可根据具体实验需要开发相应的软件任务包.

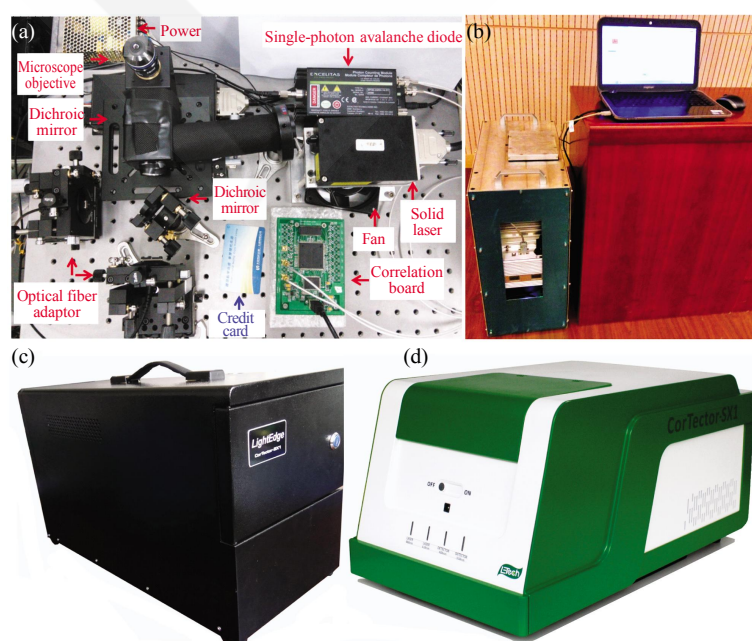


Fig. 3 Development of the bench-top fluorescence correlation spectrometer

(a) The first generation proof-of-principle prototype. (b) The second generation prototype. (c) The third generation prototype. (d) The fourth generation prototype (i.e., the first generation commercial product: CorTector™ SX100).

2.1 硬件实现

CorTector™ SX100 荧光相关光谱仪的硬件系统如图 4 所示, 主要包括四部分: 荧光激发系统、样品检测系统、荧光检测系统和数据采集 / 分析系统. 两个激光器(488 nm、638 nm)产生的两束激发光经波分复用器(WDM)耦合入一根单模光纤(SMF), 经光束准直器(BC)转为空间准直光, 然后经激发二向色镜(ExD)反射入显微镜物镜后瞳并被聚焦至溶液样品内. 样品经激光激发产生荧光, 部分荧光被同一物镜收集并以准直光从后瞳射出, 经激发二向色镜(ExD)过滤激发光. 不同波长的荧光(红色和绿色)通过发射二向色镜(EmD)分离和滤光

片(EmF)过滤后, 被各自检测通道的透镜(L)聚焦至用于信号采集的多模光纤(MMF)端口; 此光纤端口内径即为共聚焦针孔; 多模光纤的另一端连接单光子雪崩光电二极管(SPAD), SPAD 将单光子信号转换成相应的电脉冲信号并传输至相关计算卡(correlation board). 相关计算卡的 FPGA 芯片以 90 ns 的时间分辨率, 对随时间波动的荧光信号进行相关计算(公式 3、4a)并实时输出荧光自相关、交相关数据至计算机; 计算机预装的数据采集软件控制仪器硬件并采集实验数据, 数据分析软件对实验数据运用自相关、交相关数学模型进行定量分析从而得到受测分子的浓度、大小和相互作用等特性.

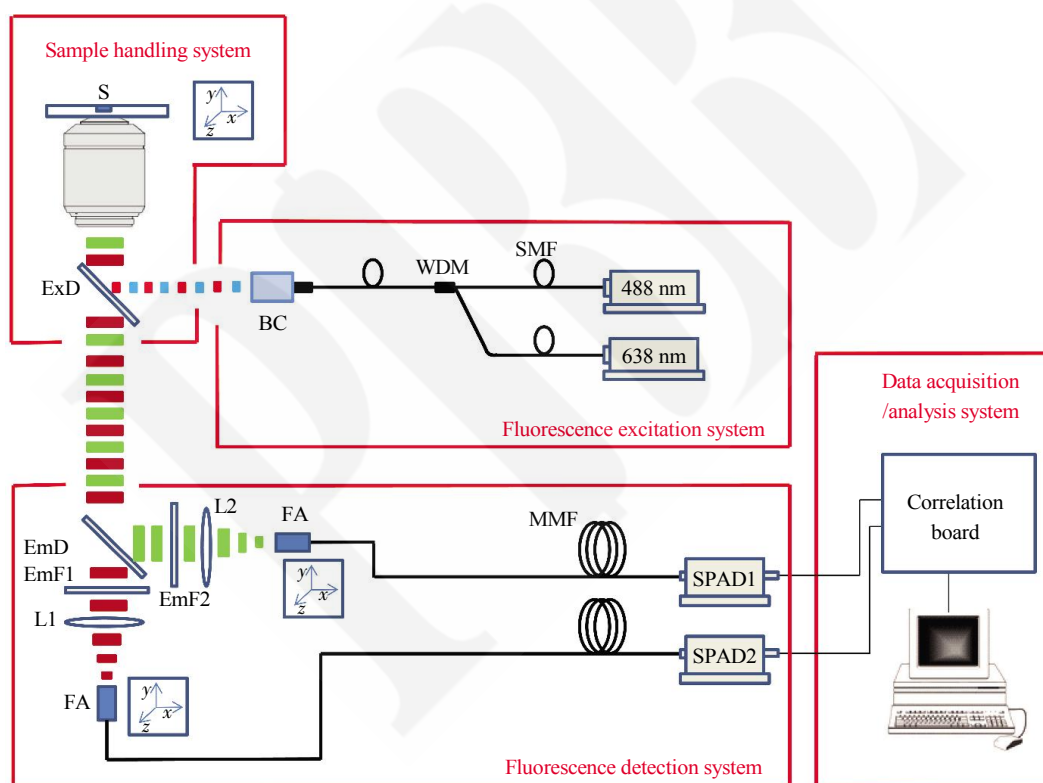


Fig. 4 Schematic illustration of the bench-top fluorescence correlation spectrometer including the fluorescence excitation system, the sample handling system, the fluorescence detection system and the data acquisition/analysis system

BC: Beam collimator; EmD: Emission dichroic mirror; EmF: Emission filter; ExD: Excitation dichroic mirror; FA: Optical fiber adaptor; L: Lens; MMF: Multi-mode optical fiber; S: Sample; SMF: Single-mode optical fiber; SPAD: Single-photon avalanche diode; WDM: Wavelength division multiplexing.

硬件系统需解决的关键问题是如何调节荧光激发和检测光路, 从而在溶液样品中精确、可重复地分离出一个极小的荧光激发和检测体积 V (图 2a, 2b), 并且该体积内的激发光强度分布可近似用三维高斯

分布公式描述. 因此, 激发光需以平行光束入射并覆盖约 80% 显微镜后瞳^[10]. 更重要的是, 多模光纤端口内径(即共聚焦针孔)必须与透镜聚焦点处的荧光信号精确重合(图 4), 以高效屏蔽荧光检测体积

V 外的荧光信号(图 2a, 2b). 光纤内径大小($50\ \mu\text{m}$)由显微镜物镜放大倍数和透镜焦距共同决定, 其空间定位决定了 FCS 实验数据的准确性和可重复性. 因此, CorTector™ SX100 的每一荧光信号检测通道都配置 3 个伺服 - 步进电机, 分别控制共聚焦针孔在 x 、 y 和 z 轴上的精确定位(约 $1\ \mu\text{m}$). 此外, CorTector™ SX100 的样品台也由三个电机控制, 可实现对多个溶液样品的自动定位. 这些自动检测和定位系统大大减低 FCS 技术的使用难度, 使非专业人员经简单培训即可操作仪器并实现批量样品的自动检测.

2.2 软件实现

样品的检测过程大致分为三步: a. 使用 HPLC 级纯净水作为样品($\geq 20\ \mu\text{l}$)检测仪器在当前工作环境下的背景噪声(散射光、探测器暗计数、Shot Noise、After Pulse 等); b. 使用高光量子效率、不易猝灭、且已知浓度的标准荧光分子(Alexa488、Rhodamine Green)校验仪器光路并测定

荧光检测体积 V (图 2b); c. 检测待检样品: 每一样品的一次 FCS/FCFS 实验通常持续 $5\sim 10\ \text{s}$, 并重复 10 次. 相关计算卡采集原始荧光信号, 并根据实验要求进行自相关或交相关计算, 计算结果实时输出至计算机, 由数据分析软件做进一步分析.

为控制硬件设备完成上述检测, 项目团队开发了便于操作的数据采集和数据分析软件. 借助于数据采集软件(correlation acquisition)的操作界面, 用户只需要简单操作就可以实现光路选择和数据采集等多个功能(图 5a). 根据实验设计, 用户可选择启动 488 nm、638 nm 激光器及相应的荧光探测光路; 选择对 1~8 个溶液样品进行自动检测; 驱动每一荧光探测通道的共聚焦针孔在 $x/y/z$ 轴方向上的精确定位(约 $1\ \mu\text{m}$)(图 5b). 软件实时显示当共聚焦针孔处于搜索空间内不同位置时, 仪器所检测到的荧光强度; 待搜索完所有空间后, 软件通过最小二乘法拟合获得荧光强度最优的位置(图 5c).

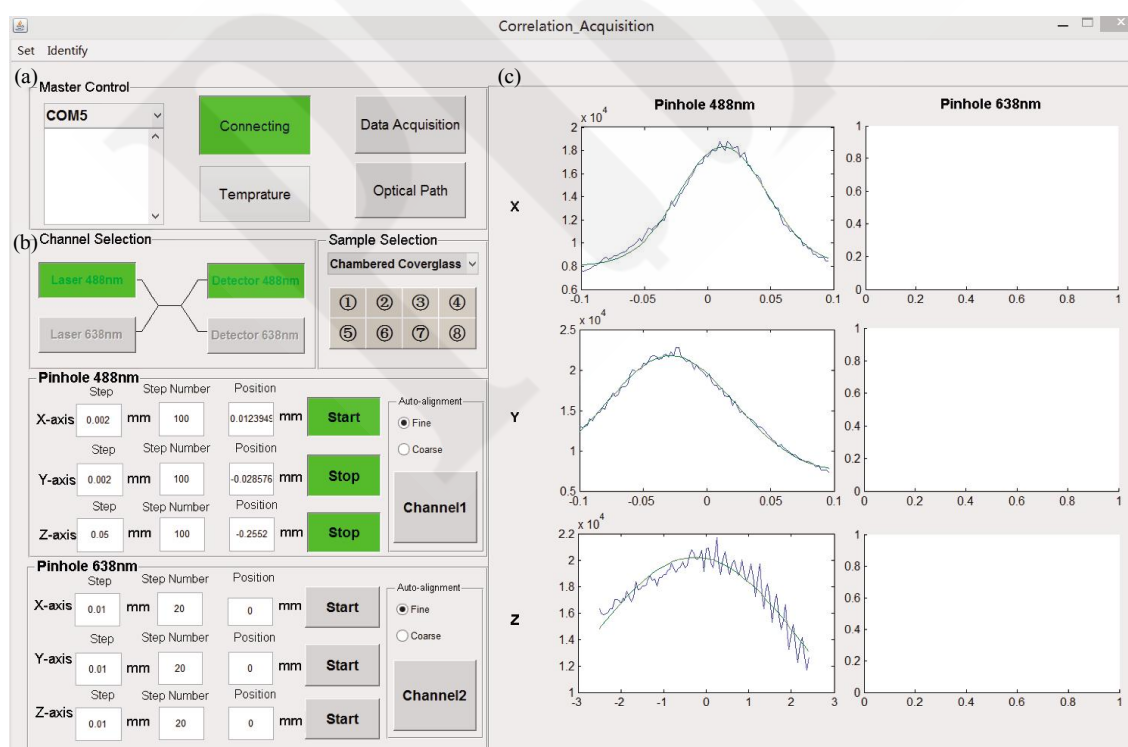


Fig. 5 User interface example of the data acquisition software (Correlation Acquisition)

(a) Master control. (b) Channel selection. (c) Photon intensity at each position of x , y and z axis.

图 6 所示的是数据分析软件(correlation analysis)的操作界面. 用户需要选择待拟合的数据

和自相关 / 交相关拟合函数(图 6a); 通常情况下, 同一样品的检测要进行多次重复实验, 因此软件需

要对相关计算卡所得的多组实验数据分别进行拟合(附录 1, 3), 并显示平均自相关衰减曲线和拟合误差(图 6d); 若某组数据的拟合结果明显偏离拟合平均值, 用户可以手动删除这组数据, 然后软件会对剩余的实验数据进行重新拟合(图 6b)。

以自相关分析为例, 拟合参数包括: N 为待测样品荧光检测体积 V 内的平均受测分子个数, τ_D 为受测分子的特征扩散相关时间, S 为荧光检测体积 V 的形状参数, $T(0 \leq T < 1)$ 为检测体积 V 内受

激荧光分子处于三重态的比例, τ_T 为三重态寿命(即磷光寿命)。如前所述, 正式的样品检测前, 需要使用已知浓度的标准荧光分子溶液测定仪器在当前工作条件下的荧光检测体积 V , 然后根据检测体积 V 和待测样品的自相关幅度 $G(0)$ 值得该样品浓度 C (图 6c)(附录 1)。同样的, 通过荧光交相关分析可得荧光交相关幅度 $G_X(0)$ 、分子复合物 M_1 - M_2 的浓度 C_X 和荧光检测体积 V 内分子复合物 M_1 - M_2 的平均个数(附录 3)。

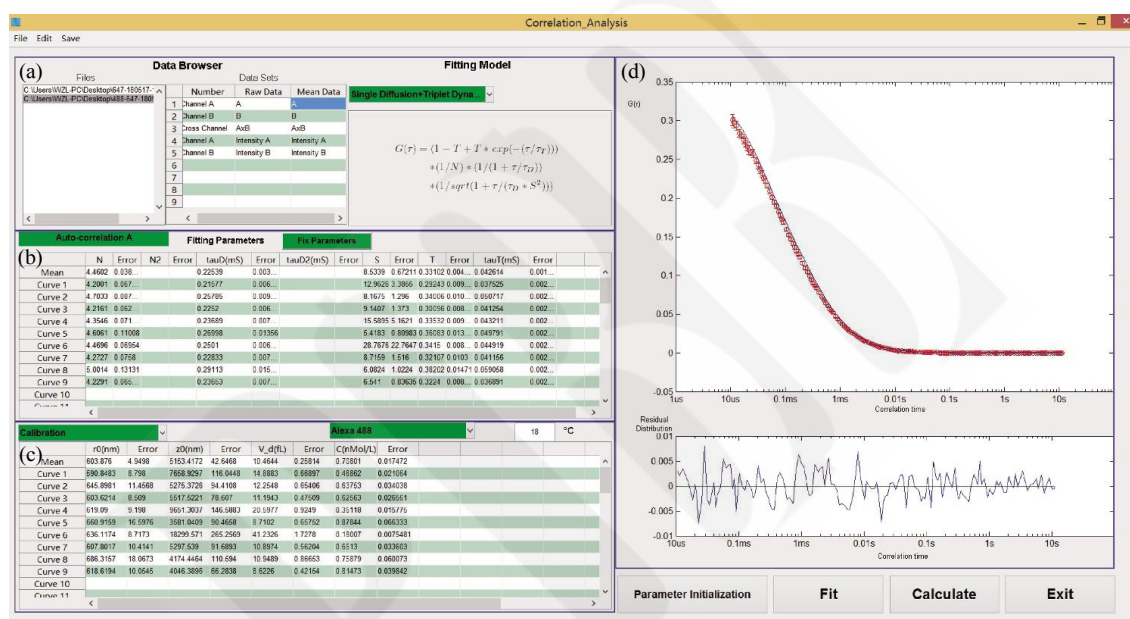


Fig. 6 User interface example of the data analysis software (Correlation Analysis)

(a) Selection of data and fitting model. (b) Analysis results. (c) Calibration. (d) Decay curve and residual distribution.

3 桌面式荧光相关光谱仪的性能测试

3.1 样品制备

3.1.1 实验试剂

Alexa Fluor™ 647 (Life Technology, A20186); Alexa Fluor™ 488 TFP ester (Invitrogen, A37570); 经 Alexa488 标记的单克隆抗体 (Alx488-mAb, donkey anti-goat IgG, Invitrogen, A11055); Alexa488 标记的 DNA 单链 (Alx488-ssDNA; Alx488-5' CCG CAC TAT ACG ATA GTA GTC ATC AGC AGT CAG AGA CGG C 3'; 1 μ mol/L); Alexa647 标记的 DNA 单链 (Alx647-ssDNA; Alx647-5' GCC GTC TCT GAC TGC TGA TGA CTA CTA TCG TAT AGT GCG G 3'; 1 μ mol/L);

FITC(F7250, Sigma, USA); 抗 FITC 单克隆抗体 (Abcam, UK); 荧光峰值为 680 nm 的量子点 (CdTe/CdS/ZnS Qdot680, 北京北达聚邦科技有限公司); Nuclease-Free Water (康维世纪); Annealing Buffer for DNA oligos (5X, Byotime, D0251); HPLC 级 Water (北京百灵威科技有限公司, CAS: 7732-18-5); EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (FLUKA 318892-500ML); NaOH 颗粒 (SIGMA 71687-500G); Tris (Sigma 20160726); 硼酸 (Acros 315181000); 丙烯酰胺 (华兴博创 HX1869); 过硫酸铵 (Sigma 215589-100g); TEMED (Amresco M146-100ML); 20 bp DNA Ladder Marker (Takara, Cat#3420A)。

3.1.2 双链 DNA 复合及提纯^[11]

用生理盐水分别配制浓度为 1 nmol/L 的互补

Alx488-ssDNA 和 Alx647-ssDNA 溶液各 50 μl , 放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用. 将以上溶液混合摇匀并室温放置 10 min, 然后依次在第 15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80 和 100 min 对混合样品进行 FCCS 检测.

配置单链 DNA 复合反应液: nuclease-free water(24 μl), annealing buffer for DNA oligos (5 $\times$, 8 μl), Alx488-ssDNA(1 $\mu\text{mol/L}$, 4 μl) 和 Alx647-ssDNA(1 $\mu\text{mol/L}$, 4 μl). 将上述反应液放置于 PCR 仪中, 先设置 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应时间 5 min, 然后设置 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应时间 2 min, 取出反应液后冷却至室温. 用 15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、纯化,

然后放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存. 实验时将 Alexa488 和 Alexa647 荧光标记的 DNA 双链(Alx488-dsDNA-Alx647)溶液依次稀释 5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1 000 倍、5 000 倍、10 000 倍、20 000 倍和 40 000 倍进行 FCCS 检测.

3.2 CorTector™ SX100 检测分子浓度、大小和相互作用

对配制浓度为 1 nmol/L 的 Alexa647(Alx647)荧光分子标准样品进行 10 s, 每次 10 s 的重复荧光自相关实验(图 7a); 10 次自相关衰减曲线几乎完全重叠, 验证了仪器的稳定性. 对平均自相关幅度(图 7a; 黑色数据点)进行最小二乘拟合, 从拟合曲

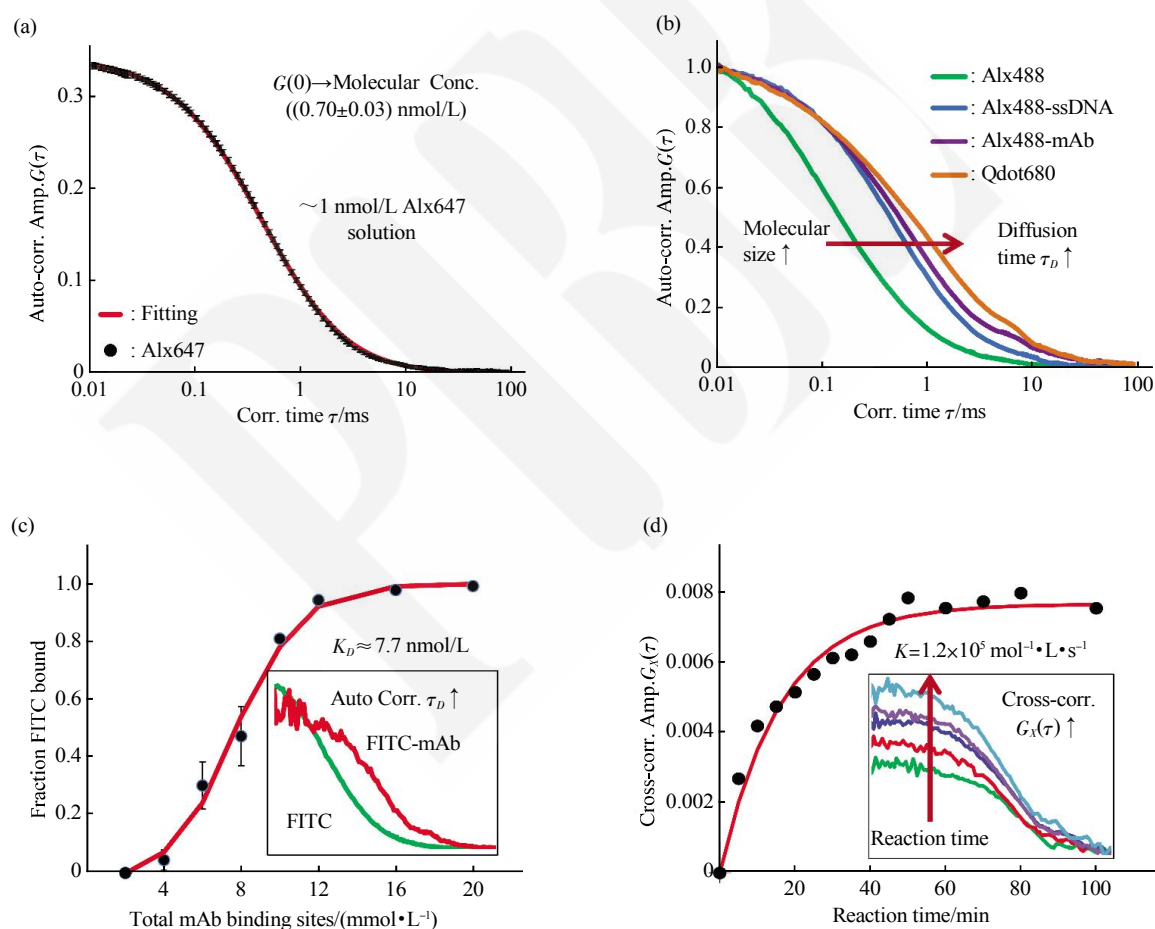


Fig. 7 Measurements of molecular concentration, size and interaction using the bench-top fluorescent correlation spectrometer (CorTector™ SX100)

(a) FCS measurement of fluorescent molecule Alexa647 (Alx647) concentration. (b) FCS measurement of molecular sizes: Alexa488(Alx488), Alx488 labeled single-stranded DNA (Alx488-ssDNA), monoclonal antibody (Alx488-mAb) and quantum dots Qdot680. (c) FCS measurement of the dissociation constant K_D of antigen (FITC) and anti-FITC monoclonal antibody (mAb) binding reaction. The inset shows the volume changes after binding of FITC to its mAb. (d) FCCS measurement of the kinetic constant (K) of the annealing reaction of two complementary single-stranded DNAs (Alx488-ssDNA, Alx647-ssDNA) into the double-stranded DNA (Alx488-dsDNA-Alx647). The inset shows the increasing cross-correlation amplitude $G_x(\tau)$ with increasing reaction time; $G_x(\tau)$ is proportional to the molar concentration of Alx488-dsDNA-Alx647 in the reaction solution.

线(图 7a; 红色曲线)的 $G(0)$ 值可计算样品浓度为 (0.70 ± 0.03) nmol/L (standard error). 对 3 个数量级浓度区间(10 pmol/L~10 nmol/L)的 Alx647 样品进行测量, 可得配制浓度与测得浓度之间的完美线性关系(线性回归系数 $R^2=1$; 图 8a).

在相同浓度(1 nmol/L)条件下, 应用荧光自相关技术对比不同分子质量的荧光待测物: 荧光分子 Alexa488(Alx488; 分子质量约 643 u), 经 Alx488 标记的单链核酸片段(Alx488-ssDNA; 40 碱基, 约 13 ku), 经 Alx488 标记的单克隆抗体(Alx488-mAb, 约 15 ku)和荧光峰值为 680 nm 的量子点(CdTe/CdS/ZnS Qdot680, 约 15 ku). 受测物分子质量(体积)的增加反应在其自相关曲线的 τ_D 值增长(图 7b). τ_D 值显示 Alx488 的水动力半径(R_H)远小于其他三种受测物. Alx488-ssDNA 与 Alx488-mAb 的分子质量相差不大, 但前者为线性分子, 后者更接近球形; 因此两者在水溶液中因平移、翻滚运动而产生的水动力半径 R_H 仍可通过自相关技术区分. 厂家提供的 Qdot680 平均分子质量与

Alx488-mAb 相同, 但我们的实验数据表明前者的 RH 比后者显著的大. 厂家提供的 Qdot680 的直径分布差异也很大(2~10 nm); 相应的自相关曲线的实验误差也很大. 因此, 荧光相关光谱技术可精确分析量子点体积及其分布, 而量子点的大小是决定其光物理特性(比如荧光光谱)的关键因数之一. 已有文献表明 FCS 技术还可用于测定量子点的关键光物理参数(光量子效率、化学修饰程度、光闪烁系数等)^[12-13].

筛选具高度特异性亲和力的单克隆抗体是科学研究和医疗检验的必要工作, 而 FCS 技术可定量检测抗原-抗体结合反应的 K_D 值. 比如, 荧光分子 FITC 的分子质量(约 389 u)远小于抗 FITC 单克隆抗体(mAb, 约 15 ku), 因此可以在均相溶液中的应用荧光自相关技术直接检测游离态 FITC 和结合态 FITC-mAb 的摩尔浓度. 通过系统性地改变反应液中的 FITC/mAb 比例, 并测定游离态和结合态的 FITC 摩尔浓度, 可得抗原-抗体结合曲线及其 $K_D \approx 7.7$ nmol/L(图 7c)^[8].

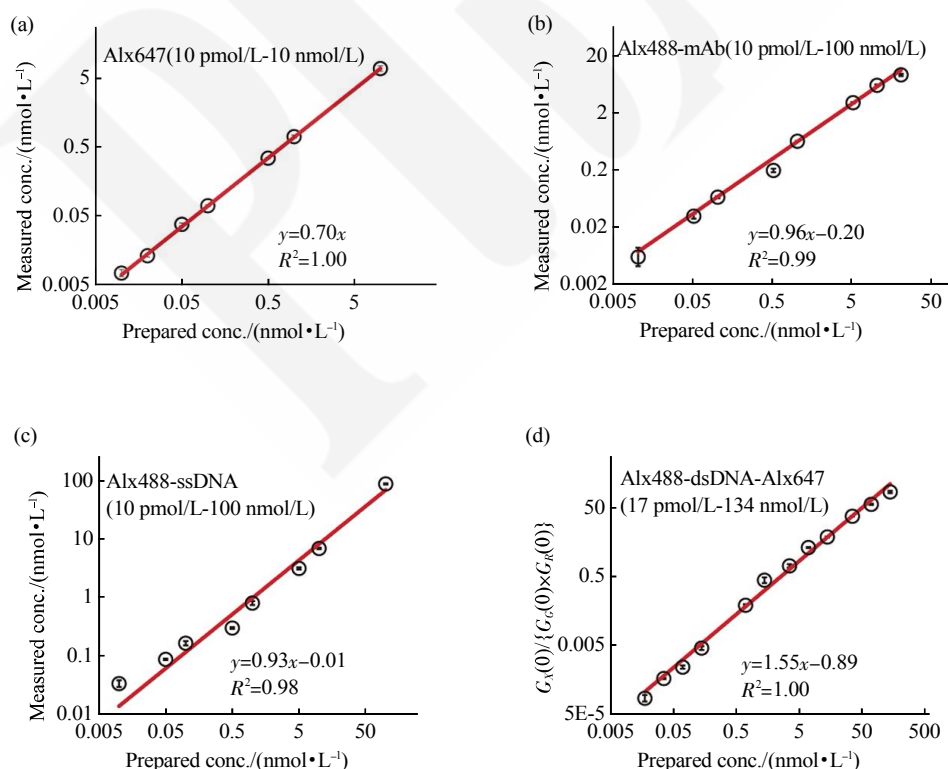


Fig. 8 Measurements of molecular concentrations in homogenous solution using the bench-top fluorescence correlation spectrometer (CorTector™ SX100)

(a) FCS measurement of the molar concentrations of the fluorescent molecule Alx647. (b) FCS measurement of the molar concentrations of the Alx488 labeled monoclonal antibody (Alx488-mAb). (c) FCS measurement of the molar concentrations of the Alx488 labeled single-stranded DNA (Alx488-ssDNA). (d) FCCS measurement of the molar concentrations of the Alx488 and Alx647 labeled double-stranded DNA (Alx488-dsDNA-Alx647).

如果结合反应发生在大小相似的两种分子之间, 比如两条互补单链 DNA 复合成一条双链 DNA, 那么荧光交相关技术可用于测定该反应的反应速率和动力学常数 K . 例如, 对两种互补的单链 DNA (Alx488-ssDNA 和 Alx647-ssDNA; 40 碱基) 室温条件下在生理盐水中复合, 然后用 FCCS 定时检测混合液的交相关幅度可得双链 DNA 产物的摩尔浓度变化(图 7d 中的插图). 上述方法可监控 DNA 复合反应历程及其动力学参数 $K=1.2 \times 10^5 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (图 7d).

3.3 CorTector™ SX100 的浓度检测线性区间

如前所述, FCS 技术可精确测量荧光分子溶液样品的浓度(图 7a); 通过一系列浓度检测实验, 我们确定了 CorTector™ SX100 的灵敏度下限及线性检测区间(图 8a). 各类医疗检测应用中, 最常用的探针分子为经荧光标记的单克隆抗体或单链 DNA 片段. 因此, 我们测定了荧光自相关技术对 Alx488-mAb 和 Alx488-ssDNA(40 碱基)探针分子的线性浓度检测区间. 实验结果显示, FCS 技术可在 4 个数量级的浓度区间内(10 pmol/L~100 nmol/L)线性检测抗体和 DNA 探针分子的摩尔浓度(图 8b、8c). 为了验证医疗检测试剂盒中最常用的“夹心法”(荧光免疫反应 II), 我们对图 7d 实验所得的双链 DNA(Alx488-dsDNA-Alx647)进行纯化, 然后应用 FCCS 技术定量检测其摩尔浓度. 实验

结果显示, FCCS 技术可对 4 个数量级浓度区间(17 pmol/L~143 nmol/L)的双链 DNA 样品进行精确测量, 并且配制浓度与测得浓度之间呈完美的线性关系($R^2=1.00$; 图 8d).

以上结果表明, 桌面式荧光相关光谱仪 CorTector™ SX100 在检测分子浓度、分子体积和分子间相互作用等方面具良好性能, 并在医疗体外检验领域有潜在的商业应用价值.

4 讨 论

商业荧光相关光谱仪目前由国外高端显微镜厂商垄断, 售价及维护费极高. 表 1 列举了 CorTector™ SX100 与现有商业荧光相关光谱仪的性能和价格对比, 可以发现前者具有很高的性价比. 与德国 Zeiss 公司的 Confocor3 产品和美国 ISS Alba 公司的 FCS V5 相比, CorTector™ SX100 价格有巨大的竞争优势, 能实现对溶液样品的常规荧光相关光谱技术. 更重要的是, Confocor3 是显微镜实验室专用的大型光学设备. 而 CorTector™ SX100 是桌面仪器, 其光密设计能在室内、外光条件下应用于多种样品采集、制备场所. 相应的, CorTector™ SX100 后期使用、维护费也很低. 更重要的是, CorTector™ SX100 实现了 FCS 技术从实验室专业技术向大众技术的转变, 在高性价比基础上保证了仪器可靠性和使用方便性, 从而为该技

Table 1 Comparison of the performance-price characteristics of the commercial fluorescence correlation spectrometers

	Zeiss Confocor3(Germany)	ISS Alba FCS V5(USA)	LE CorTector-SX100(China)
Microscope	Confocal or multiphoton	Confocal or multiphoton	Confocal optical pathway
Fluorescence excitation	3-5 lasers	2-6 lasers	2-4 lasers(488, 638nm)
Fluorescence detection	2-4 channels	2-4 channels	2-3 channels
Microscope objective	Zeiss 40X NA1.2 water	Nikon 60X NA1.2 water	Olympus 60X NA1.2 water
Single-photon counting detector	APD or GaAsP PMT	APD or GaAsP PMT	APD
Automatic pinhole alignment	XYZ-axes automatic	Single-axis semi-automatic	XYZ-axes automatic
Sample option	Solution, single cell (8-well chamber optional)	Solution, single cell (8-well chamber optional)	Solution (8-well chamber equipped)
FCS, FCCS Analysis	Yes	Yes	Yes
RICS analysis	Optional with laser scanning microscope	Optional with laser scanning microscope	No
FLCS analysis	Optional with multiphoton microscope	Optional with multiphoton microscope	No
PCH analysis	Optional with software correlator	Optional with software correlator	Optional with software correlator
Operation software	Zen	Vista vision	Correlation Acquisition, Correlation Analysis
Environment	Microscope room	Microscope room	Regular lab bench-top
Whole-system price	750-1,250k USD	250-500k USD	100-150k USD
Maintenance	Aannual cost ~10% of sales price	Annual cost ~10% of sales price	Annual cost ~5% of sales price

术在科学研究、医疗检测、环境检测、药物开发、传染病防治等领域的普及应用奠定了基础。

附件 附录 1~附录 3 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Elson E L, Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy .1. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 1974, **13**(1): 1-27
- [2] Magde D, Elson E L, Webb W W. Fluorescence correlation spectroscopy .2. experimental realization. *Biopolymers*, 1974, **13**(1): 29-61
- [3] Magde D, Elson E, Webb W W. Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev Lett*, 1972, **29**(11): 705-708
- [4] Elson E L. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophys J*, 2011, **101**(12): 2855-2870
- [5] Hess S T, Huang S, Heikal A A, *et al.* Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry*, 2002, **41**(3): 697-705
- [6] Haustein E, Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007, **36**(1): 151-169
- [7] Haustein E, Schwille P. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods*, 2003, **29**(2): 153-166
- [8] Tetin S Y, Ruan Q, Skinner J P. Studying antibody-antigen interactions with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Methods Enzymol*, 2013, **519**(519): 139-166
- [9] Bacia K, Kim S A, Schwille P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods*, 2006, **3**(2): 83-89
- [10] Hess S T, Webb W W. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, 2002, **83**(4): 2300-2317
- [11] Schwille P, Meyer-Almes F J, Rigler R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J*, 1997, **72**(4): 1878-1886
- [12] Dong C, Huang X, Ren J. Characterization of water-soluble luminescent quantum dots by fluorescence correlation spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, **1130**(1): 253-261
- [13] Yao J, Larson D R, Vishwasrao H D, *et al.* Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(40): 14284-14289

CorTector™ SX100: Principles and Applications of a Bench-top Fluorescence Correlation Spectrometer*

WANG Zhu-Lou, KANG Ning, LIANG Yan-Qin, XIAO Qian**, HUANG Shao-Hui**

(Key Laboratory of Interdisciplinary Research, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) technologies have the advantage of ultrasensitivity (single molecule), fast speed (seconds and minutes measurement time), and multifunctionality (simultaneously analyzing molecular concentration, size and interaction). Thus, FCS technologies have the potential of being a novel fluorescence immunoassay suitable for high-sensitivity analysis of homogeneous sample solution. This article introduces the principles and applications of FCS technologies based on the reliable, easy-to-use, bench-top fluorescence correlation spectrometer developed by the project team.

Key words fluorescence correlation spectroscopy, fluorescence auto-correlation, fluorescence cross-correlation, single-molecule fluorescence

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0058

* This work was supported by a grant from Guangdong Science and Technology Grant (20140215).

**Corresponding author.

HUANG Shao-Hui. Tel: 86-10-64887732, E-mail: shaohuih@ibp.ac.cn

XIAO Qian. Tel: 86-10-64888778, E-mail: qianxiao@moon.ibp.ac.cn

Received: February 10, 2018 Accepted: July 17, 2018

附录

附录 1 荧光自相关衰减曲线的拟合方法

结合公式(2)和(3)可得相关时间 $\tau=0$ 时的自相关幅度 $G(0)$:

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t) \rangle^2}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{\langle N(t) \rangle} = \frac{1}{CV} \quad (s-1)$$

因此, 实验测得的荧光信号波动幅度 $G(0)$ 值与荧光检测体积 V 内的平均受测分子个数 $\langle N(t) \rangle$ 和受测分子浓度 C 成反比. 应用已知浓度 C 的标准荧光分子溶液样品, 通过实验测得其 $G(0)$ 值(图 2d)后, 根据公式(s-1)可测定 FCS 仪器的荧光检测体积 V (图 2b). 然后在当前状态下, 对未知浓度的受测荧光分子样品测定其 $G(0)$ 值, 根据公式(s-1)可得该样品浓度 C .

如果溶液样品中存在一种自由扩散的荧光受测分子, 并且荧光检测体积 V 内的激发光强度分布近似于三维高斯分布, 就可以对实验所得自相关幅度 $G(\tau)$ 进行最小二乘法拟合^[5,7]:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{(1 - T + T e^{-\tau/\tau_r})}{1 - T} \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_D}) \sqrt{1 + \frac{\tau^2}{\tau_D^2 S^2}}} \quad (s-2)$$

其中 $N=1/G(0)$ 为荧光检测体积 V 内的平均受测分子个数, τ_D 为受测分子的特征扩散相关时间, S 为荧光检测体积 V 的形状参数(structure parameter), $T(0 \leq T < 1)$ 为检测体积 V 内受激荧光分子处于三重态(Triplet State)的比例, τ_r 为三重态寿命(即磷光寿命). T 与激发光强度成正比; 因此, 在保证实验数据信噪比的前提下, FCS 实验通常采用最小激发光强度使 $T \rightarrow 0$ 并由此最大限度地减少荧光分子猝灭.

拟合参数 S 描述的是荧光检测体积 V 的形状, 由公式(s-3)确定:

$$S = \frac{z_0}{r_0} \quad (s-3)$$

荧光检测体积 V 中心处激发光的光强(I_0)最强; z_0 和 r_0 分别是沿 Z 或 $X(Y)$ 轴, 激发光强度减弱为 I_0/e 处离体积 V 中心的距离; e 为自然常数. S 的理论值为 $2 \sim 3$, 若 FCS 仪器的荧光激发和检测光路工作状态良好, S 的实验测得值应小于 10; 另外, S 值测量的可重复性反应了仪器工作状态

态的稳定性.

对于理想的单分子荧光脉冲信号, 拟合参数 τ_D 代表的是脉冲信号宽度(图 2c): 即脉冲信号越宽, 从 $G(0)=1$ 衰减到 $G(\infty)=0$ 所需的时间 τ_D 越长; 而脉冲信号的宽度反应的是自由扩散的受测分子在荧光检测体积 V 内的停留时间; 很显然, 分子质量(体积)越大的受测分子扩散得越慢, 在检测体积 V 内的停留时间也越长, 因此相应的 τ_D 值就越大. 同理, 实验测得的 τ_D 值(图 2d)反应的是受测分子在溶液环境中的动态(翻滚、平移等)体积, 并与其水动力半径 R_H (hydrodynamic radius)成正比(公式 s-5).

根据拟合参数 N , τ_D 和 S 值, 可进一步计算 FCS 仪器和受测样品的属性^[5,7]:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (s-4)$$

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (s-5)$$

$$V = \pi \frac{3}{2} r_0^2 z_0 \quad (s-6)$$

$$C_M = \frac{N}{N_A V} \quad (s-7)$$

其中 D 为受测分子在溶液中的扩散系数(diffusion coefficient; m^2/s), 由 Stokes-Einstein 方程式(公式 s-5)决定: K_B 为 Boltzmann 常数(J/K)、 T 为开尔文温度(K)、 η 为溶液的粘稠度($N \cdot s/m^2$)、 R_H 为受检分子的水动力半径. C_M 为受测分子的摩尔浓度, N_A 为阿伏伽德罗常数.

使用极低浓度样品时(比如 10 pmol/L Alexa488), FCS 实验的背景信号(即 HPLC 纯水样品信号 $\langle F_{BG}(t) \rangle$)变得不可忽略并可能占样品信号 $\langle F(t) \rangle$ 的 90% 以上. 但是, 只要背景信号本身没有自相关性(即 $G(\tau) \rightarrow 0$)则实验测得的样品浓度可由以下公式修正^[5]:

$$C' = \frac{[\langle F(t) \rangle - \langle F_{BG}(t) \rangle]^2}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (s-8)$$

附录 2 荧光自相关技术定量分析分子-分子相互作用

如果溶液样品中存在 i 个自由扩散的荧光分子且相应的荧光亮度为 γ_i , 则实验测得自相关幅度可由以下公式拟合^[5]:

$$G(\tau) = \frac{\sum_{i=1} \langle \gamma_i N_i(t) \rangle^2 G_i(\tau)}{(\sum_{i=1} \langle \gamma_i N_i(t) \rangle)^2} = \frac{\sum_{i=1} \langle F_i(t) \rangle^2 G_i(\tau)}{(\sum_{i=1} \langle F_i(t) \rangle)^2} \quad (\text{s-9})$$

其中 $\langle F_i(t) \rangle$ 和 $G_i(\tau)$ 分别为 i^{th} 荧光分子的平均信号强度和自相关幅度。

因此, 对于荧光免疫结合反应 I, 假设游离态或结合态抗原并不影响其标记荧光分子的三重态光物理特性, 其自相关幅度可用以下公式描述^[5, 8]:

$$G(\tau) = \frac{(1-T+Te^{-\tau/\tau_f})}{1-T} \cdot \left[\frac{\gamma_F^2 N_F}{(\gamma_F N_F + \gamma_B N_B)^2} \cdot \frac{1}{(1+\frac{\tau}{\tau_{BD}}) \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{BD} S^2}}} \right. \\ \left. + \frac{\gamma_B^2 N_B}{(\gamma_F N_F + \gamma_B N_B)^2} \cdot \frac{1}{(1+\frac{\tau}{\tau_{BD}}) \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{BD} S^2}}} \right] \quad (\text{s-10})$$

其中 γ_F 和 γ_B 分别是实验测得的游离态或结合态抗原标记荧光分子的亮度; N_F 和 N_B 分别是游离态或结合态抗原分子在荧光检测体积 V 内的平均分子个数; τ_{FD} 和 τ_{BD} 分别是在抗体分子缺失或饱和的实验条件下, 单独测定的游离态或结合态抗原分子的相关扩散时间。上述荧光免疫结合实验也可在足够低的激发光强度条件下进行, 从而忽略标记荧光分子的光物理特性(即 $T \rightarrow 0$)。

附录3 荧光交相关衰减曲线的拟合方法

按照以下公式对实验测得的荧光交相关幅度进行拟合^[6,9]:

$$G_X(\tau) = G_X(0) \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{XD}}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau^2}{\tau_{XD}^2 S^2}}} \quad (\text{s-11})$$

τ_{XD} 是分子 M_1 和 M_2 结合反应形成的分子复合物 M_1-M_2 的相关扩散时间, 其中:

$$G_X(0) = \frac{VC_X}{V(C_1+C_X) \cdot V(C_2+C_X)} = G_1(0)G_2(0)N_X \quad (\text{s-12})$$

C_1 、 C_2 和 C_X 分别代表游离态 M_1 、游离态 M_2 和结合态 M_1-M_2 分子浓度, N_X 为分子复合物 M_1-M_2 在荧光检测体积 V 内的平均分子个数. 由于 (C_1+C_X) 和 (C_2+C_X) 分别代表了分子 M_1 和 M_2 在溶液样品中的总浓度(固定常数), 实验测得的荧光交相关幅度 $G_X(0)$ 与分子复合物 M_1-M_2 的浓度 C_X 成正比. 此外, 由公式(s-12)可得 $N_X = G_X(0) / G_1(0)G_2(0)$; 因此对一次交相关实验所得的两条自相关衰减曲线和一条交相关衰减曲线进行分析可得荧光检测体积 V 内分子复合物 M_1-M_2 的平均个数.