



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Single molecules in soft matter : a study of biomolecular conformation, heterogeneity and plasmon enhanced fluorescence**

Yuan, H.

### **Citation**

Yuan, H. (2013, November 19). *Single molecules in soft matter : a study of biomolecular conformation, heterogeneity and plasmon enhanced fluorescence*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22072>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22072>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22072> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Yuan, Haifeng

**Title:** Single molecules in soft matter : a study of biomolecular conformation, heterogeneity and plasmon enhanced fluorescence

**Issue Date:** 2013-10-29

## Samenvatting

In het onderzoek beschreven in dit proefschrift hebben wij de dynamica van individuele moleculen en nanodeeltjes in glycerol, een visceuze vloeistof, bij verschillende temperaturen onderzocht. Wij geven hier een samenvatting van de belangrijkste resultaten en een aantal perspectieven op toekomstige onderzoek.

### Temperatuur-cyclus microscopie van individuele moleculen

Om toegang te krijgen tot de snelle conformationele dynamica van individuele moleculen, combineren wij de temperatuur-cyclus methode en fluorescentie resonant energie-overdracht (FRET) microscopie. Zowel polyproline als dubbelstrengs DNA (dsDNA) bezitten rigide structuren en zijn vaak gebruikt als modelsystemen voor FRET. Daarom demonstreren wij eerst onze temperatuur-cyclus methode met deze moleculen, zoals beschreven in hoofdstuk 2 en hoofdstuk 3.

In hoofdstuk 2 bestuderen wij polyproline moleculen met verschillende afstanden tussen de donor-acceptor kleurstoflabels, zowel in de stabiele toestand als tijdens temperatuur cycli. Individuele 6-residu polyproline structuren in steady state tonen een andere FRET verdeling dan men zou verwachten op grond van de Förster theorie. In plaats van een grote waarschijnlijkheid voor een hoge-FRET efficiëntie, vertonen de steady-state FRET efficiënties brede distributies. Bovendien observeren wij op een individuele polyproline-6 structuur overgangen tussen een lage-FRET toestand en een hoge-FRET toestand tijdens de 2600 temperatuur cycli. De resulterende verdeling van FRET efficiënties lijkt sterk op die van de steady state. De oorsprong van de FRET overgangen is niet achterhaald. De resultaten tonen aan dat de temperatuur-cyclus werkwijze geschikt is om snelle conformationele dynamica te bestuderen.

In hoofdstuk 3 passen wij de temperatuur-cyclus methode toe op FRET-gelabelde dsDNA-moleculen en vergelijken ze met polyproline moleculen met soortgelijke afstand tussen de kleurstoflabels. Met behulp van een vastestof immersie lens en een uit één component bestaand reflecterend objectief, zijn wij

in staat de collectie-efficiëntie en de ruimtelijke resolutie van onze lage temperatuur microscoop te verbeteren en toegang te krijgen tot zowel de fluorescentie levensduur als de polarisatie van het uitgezonden licht. In steady state, observeren wij verschillende distributies van FRET efficiënties op FRET-gelabelde polyproline en dsDNA-moleculen. Hoewel beide distributies breed zijn, vertonen polyproline structuren een grote populatie in de lage-FRET regio terwijl dsDNA structuren een grote populatie in de hoge-FRET regio vertonen. Bovendien laten polyproline structuren en dsDNA structuren verschillend FRET gedrag zien onder dezelfde temperatuurcycli. Voor polyproline constructies observeren wij actieve overgangen tussen drie FRET toestanden, een lage-FRET toestand, een hoge-FRET toestand en een donkere toestand. Voor dsDNA structuren, vinden we af en toe overgangen van een hoge-FRET toestand naar een kortstondige lage-FRET toestand. Wij wijzen deze overgangen in FRET toe aan de kleurstof-kleurstof interacties bij korte kleurstofafstanden, zoals voorgesteld in moleculaire dynamica simulaties en andere kamertemperatuur experimenten.

De resultaten in hoofdstuk 2 en hoofdstuk 3 hebben aangetoond dat de combinatie van temperatuur-cyclus en FRET methodes nieuw inzicht kan geven in snelle conformationele dynamica van individuele moleculen. Echter, twee uitdagingen blijven. Enerzijds is de temperatuur-cyclus methode tot nu toe beperkt tot glycerol. Hoewel glycerol vaak als cryobeschermer voor biologische moleculen wordt gebruikt, vertoont het complexe dynamica bij temperaturen dichtbij de glasovergang. Anderzijds, bereikt de oriëntatie van de kleurstofmoleculen niet haar gemiddelde waarde voor temperaturen beneden de glasovergangtemperatuur ( $T_g$ ). Derhalve is naast de afstand tussen de kleurstofflabels, de kleurstoforiëntatie een factor die in overweging moet worden genomen bij gecombineerde temperatuur-cyclus FRET metingen. Verder onderzoek vereist optimale temperatuur-cyclus parameters om complexiteit in de dynamica van het oplosmiddel te voorkomen, en om de kleurstoforiëntatie toe te staan haar gemiddelde te bereiken. Bijvoorbeeld door het kiezen van de minimum temperatuur in de temperatuurs cycli boven de crossover temperatuur ( $T_c$ ). Naast FRET labels kunnen ook kleurstoffen en quenchers worden gebruikt om conformationele veranderingen te detecteren. Dynamische tweetoestands systemen zoals DNA haarspelden en Holliday-junctions zijn goede kandidaten voor verdere studies met de temperatuur-cyclus methode.

## Heterogeniteit in supergekoelde vloeistoffen

Hoewel heterogeniteit is waargenomen in talrijke supergekoelde vloeistoffen met behulp van verschillende experimentele methoden, blijven er nog veel open vragen. Eerdere experimenten in onze groep hebben vastestof-achtige structuren geïdentificeerd, die verschijnen bij temperaturen dichtbij, maar boven de glasovergangstemperatuur ( $T_g$ ) in glycerol. Echter, de aard van dergelijke vastestofachtige structuren en hun invloed op de waargenomen dynamische heterogeniteit is niet duidelijk. In hoofdstuk 4, beschrijven wij een neutron scattering/diffractie studie van supergekoeld glycerol met verschillende thermische geschiedenissen. We vinden dat nucleatie van kristallieten plaatsvindt bij temperaturen dichtbij  $T_g$ , maar kristallisatie kan slechts plaatsvinden na een lange tijd (30 uur) rijpen bij 195 K (5 K boven  $T_g$ ). Onze resultaten benadrukken het belang van het beheersen van de thermische geschiedenis voor het bestuderen van heterogeniteit in supergekoelde vloeistoffen.

Om te vermijden dat gemiddeld wordt over een ensemble van moleculen, wordt heterogeniteit het best onderzocht op het niveau van één enkel molecuul. Door naar één molecuul tegelijk te kijken krijgt men niet alleen informatie over heterogeniteit in de ruimte, maar ook in de tijd. Echter, in verschillende experimenten worden verschillende ruimte- en tijdschalen van heterogeniteit gemeten. Zonder overeenstemming over deze fysieke eigenschappen, zullen diepere mechanische vraagstukken open blijven. In hoofdstuk 5 demonstreren wij individuele gouden nanostaafjes als nieuwe probes om heterogeniteit in supergekoeld glycerol te bestuderen. Gecorrigeerd voor hun volume, weerspiegelt de rotatie snelheid van gouden nanostaafjes de lokale viscositeit. Aan de hand van de rotatie-dynamiek van 19 individuele nanostaafjes, zien we afwijkingen in de lokale viscositeit van de bulkviscositeit van glycerol bij temperaturen beneden 226 K. Onze resultaten geven aan dat heterogeniteit optreedt op lengteschalen die vergelijkbaar zijn met de grootte van de nanostaafjes (30 nm), bij afkoeling onder 226 K. Bovendien middelt de heterogeniteit niet uit in een periode van 50 keer de totatietijd van de nanostaafjes. Echter, de grote omvang van onze nano-staafjes maken het moeilijk om hen te volgen bij lagere temperaturen. Er blijft een verschil van 10 K in temperatuur tussen onze metingen aan nanostaafjes en metingen aan individuele moleculen.

Om de 10 K temperatuurkloof tussen onze studie aan nanostaafjes en studies aan individuele moleculen te onderzoeken, is het gebruik van nog kleinere nano-staafjes een voor de hand liggende manier. Bovendien kan fluorescentie-correlatie spectroscopie (FCS) aan kleurstof moleculen in de nabijheid van gouden nanostaafjes ook worden toegepast om de lokale viscositeiten te meten; dit verifiëren wij in de volgende paragraaf.

## Plasmon versterkende fluorescentie

Plasmonische nanostructuren kunnen de fluorescentie van nabijgelegen moleculen sterk verhogen. De versterking komt door twee factoren. Enerzijds wordt de excitatie van nabijgelegen moleculen versterkt door concentratie van het optische veld. Anderzijds kunnen zowel stralende als niet-stralende vervalssnelheden van de kleurstof worden vergroot door het antenne-effect. Met behulp van een eenvoudige plasmonische nanostructuur, een gouden nanostaafje, vinden wij grote fluorescentie versterkingen van meer dan duizend keer voor individuele kleurstof moleculen (crystal violet); dit wordt beschreven in hoofdstuk 6. Door kleurstoffen met een lage kwantumopbrengst (0.019) toe te staan vrij te diffunderen in glycerol, zien wij sterke fluorescentie uitbarstingen in de luminescentie nabij individuele gouden nanostaafjes. Uit de intensiteit van de uitbarstingen kunnen wij de fluorescentie versterkingsfactoren berekenen. Verder demonstreren wij dat de verhoging sterk afhankelijk is van de polarisatie van het uitgezonden licht. Door hetzelfde gouden nanostaafje bij verschillende golflengtes te exciteren vinden wij een verhoogde versterking van de fluorescentie voor golflengtes dichtbij de plasmon resonantie. Bovendien vinden wij dat de fluorescentie levensduur van individuele uitbarstingen correleren met hun versterkingsfactoren. Een aanzienlijke verkorting van de fluorescentie levensduur is waargenomen bij uitbarstingen met hoge intensiteiten. Dit resultaat toont duidelijke veranderingen aan in de verval-snelheid van de kleurstofmoleculen. FCS toont een bijna twee ordes van grootte langere correlatietijd dan men zou verwachten voor vrije diffusie. Deze verlenging is waarschijnlijk het gevolg van kleven van de kleurstofmoleculen aan het glazen substraat.

De grote fluorescentie versterking door individuele gouden nanostaafjes, aangetoond in deze studie, verschaft een nieuw instrument voor het opsporen van zwak fluorescerende moleculen en voor het uitvoeren van FCS bij hogere kleurstof concentraties. Er moet echter nog veel geleerd worden om deze werkwijze te optimaliseren voor verdere toepassingen. Ten eerste moet de spectrale afhankelijkheid van fluorescentie versterking worden onderzocht. Begrip van de spectrale afhankelijkheid zal helpen bij het beter ontwerpen van het experimentele systeem, zoals het kiezen van de juiste kleurstoffen en nanostructuren. Het kan mogelijk leiden tot spectraal selectieve detectie van zwak fluorescerende moleculen. Ten tweede, is de fluorescentie versterking sterk afhankelijk van de relatieve positie van de kleurstof ten opzichte van nanostructuren, wat het nuttig maakt voor superresolutie beeldvorming. Dit vereist meer experimenteel en theoretisch werk. Verder kan FCS in de nabijheid van een gouden nanostaafje de huidige FCS studies uitbreiden tot hogere concentraties en klei-

neren volumes, wat handig kan zijn voor de bestudering van heterogeniteit in supergekoelde vloeistoffen. De lokale viscositeiten worden weerspiegeld in de FCS van kleurstoffen met een lage kwantumopbrengst die vrij diffunderen in de nabijheid van een gouden nanostaafje. Het detectievolume is in dit geval ongeveer  $10^3 \text{ nm}^3$ . Door het vergelijken van FCS in de ruimte en in de tijd kan dynamische heterogeniteit worden bestudeerd. Aangezien deze methode gebruik maakt van de translationele diffusie van kleurstofmoleculen, kan het worden toegepast in een breed temperatuur bereik. Daarom hopen wij dat de 10 K temperatuurkloof tussen metingen aan individuele moleculen en individuele gouden nanostaafjes kan worden gedicht door de toepassing van FCS op een enkel gouden nanostaafje in aanwezigheid van vrije diffunderende kleurstofmoleculen met lage kwantumopbrengst.

