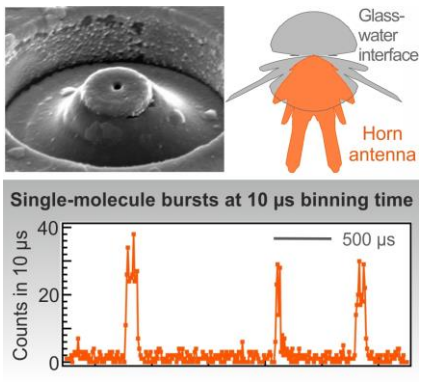
利用等离激元纳米天线实现单分子荧光技术的高时间分辨率

Sunny Tiwari，[1] Prithu Roy，[1] Jean-Benoît Claude，[1] Jérôme Wenger[1,*1] 艾克斯-马赛大学、法国国家科学研究中心、马赛中央理工学院、菲涅耳研究所、*AMUTech*，*13013* 马赛，法国 * 通讯作者：*jerome.wenger@fresnel.fr*

摘要：

单分子荧光技术对于研究生物过程中的分子机制至关重要。然而，实现亚毫秒时间分辨率以监测快速分子动力学仍是一项重大挑战。荧光亮度是通常决定这些技术时间分辨率的关键参数。传统显微镜和标准荧光发射体无法达到亚毫秒监测所需的高亮度。等离激元纳米天线已被提出作为一种解决方案，但尽管这些结构能够实现极大的荧光增强，其亮度通常仍低于每秒每个分子 100 万个光子。因此，时间分辨率的提升一直被忽视。本文提出一种利用等离激元纳米天线，特别是光学喇叭天线，实现单分子荧光技术高时间分辨率的方法。我们展示了对总发射光约 90% 的收集效率，在饱和区间实现了每秒每个分子 200 万个光子的高荧光亮度。这使得以微秒分箱时间观测单分子并进行快速荧光相关光谱（FCS）测量成为可能。本研究拓展了等离激元天线和零模波导在荧光饱和区间的应用，可获得更明亮的单分子信号、更快的时间分辨率和更高的检测速率，从而推动荧光传感、DNA测序以及分子相互作用动力学研究的发展。



目录图

关键词： 光学纳米结构、等离激元学、光学天线、单分子荧光、光与物质相互作用

1. 引言

单分子荧光技术对于研究和理解生物过程背后的分子机制至关重要。[1–5] 人们已开发出一大类单分子光谱学方法，包括荧光时间轨迹分析、[6] 荧光相关光谱（FCS）、[7] Förster共振能量转移（FRET）、[8,9] 单颗粒跟踪（SPT），[10] 以及多参数荧光检测（MFD）。[11,12] 利用这些技术，在毫秒至分钟的时间尺度上观察单分子动力学十分常见。然而，要实现亚毫秒时间分辨率以监测快速分子动力学，仍然极具挑战。[2,13–19]

荧光亮度（每秒、每个分子检测到的光子数）通常是决定不同单分子荧光技术时间分辨率的关键参数。以典型的 50,000 光子/秒/分子的单分子荧光亮度为例，需要 1 ms 才能收集到 50 个光子，并可靠地检测到荧光信号。然而，如果将记录时间设为 100 µs，则在这一时间间隔内平均只能检测到 5 个光子，从而导致较大的散粒噪声贡献和较差的信噪比。若要在 10 µs 内获得 50 个光子，荧光亮度必须达到 500 万光子/秒/分子。遗憾的是，如此高的荧光亮度及其相应的快速时间分辨率，仍然超出了传统共聚焦显微镜和标准荧光发射体的能力范围。[20] 单个分子与光波长之间巨大的尺寸差异意味着，衍射现象最终限制了传统显微镜中的光与物质相互作用，以及这些显微镜收集单个分子辐射能量的能力。[21,22]

等离激元纳米天线被引入以克服光与物质相互作用中的衍射极限。[22,23] 利用蝴蝶结天线、[24] 纳米棒、[25,26] 纳米颗粒组装体、[27] DNA折纸二聚体、[28–32] DNA模板二聚体、[33–35] 或盒中天线，[36,37] 已实现超过1000倍的显著荧光增强因子。通常，通过使用低量子产率发射体，并在中等激发强度下避免饱和，以最大化纳米天线增强，从而实现如此大的增强。尽管不同研究已报道，DNA 折纸纳米天线可使单个分子的荧光亮度达到每秒超过100万个光子，[28,29,32] 但该领域的大多数研究侧重于最大化荧光增强因子，而非净探测到的荧光亮度。

提高单分子荧光技术的时间分辨率，需要在微秒内探测到多个光子，这意味着荧光亮度必须超过每分子每秒一百万个光子。荧光增强并非主要关注点，此处最重要的是绝对亮度或单分子计数率。为了实现较高的探测

速率，需要提高激发功率，使其达到荧光饱和区间；荧光饱和源于激发态寿命有限，以及三重态或暗态的积累。[20] 在饱和区间内，每个发射体的荧光亮度不再与激发强度和量子产率成正比，而取决于收集效率与辐射衰减速率常数的乘积。[38–40,32] 这使得增强荧光的等离激元纳米天线通常设计规则略有改变，并要求专门优化收集效率和辐射速率增强。尽管荧光饱和对决定荧光最大亮度至关重要，但仅有少数研究明确考察了饱和状态下的天线-发射体耦合。[38–40,32] 利用金纳米棒，饱和时的最大光子计数率可提高至原来的100倍，[39,40] 然而，研究发现，暗态形成和光异构化等光物理过程仍会限制纳米天线中的饱和荧光亮度。[32] 尽管上述研究为该领域的开创性工作作出了重要贡献，但纳米天线在提升生物学应用时间分辨率方面的作用仍鲜有探索。

在此，我们专门探索利用等离激元天线，在饱和区间最大限度提高每分子荧光亮度，同时提升单分子技术的时间分辨率。由于收集效率和辐射速率增强是决定饱和时亮度的两个重要参数，我们选择采用光学喇叭天线。这种天线由锥形喇叭微反射器和刻蚀在铝膜上的中心纳米孔径组成，是微波喇叭天线的光学对应物（图 1a-c）。[41] 这一设计的依据有两点：（i）直径为 120 nm 的纳米孔径可作为阿升级分析室，在局部增强荧光发射速率，[38,42] （ii）锥形反射器可将荧光引向显微镜物镜，从而提高总收集效率。[43–45] 纳米孔径兼具零模波导（ZMW）的优势，可提升对溶液中荧光分子的检测能力；与标准衍射极限显微镜相比，它能实现更高亮度，并可检测浓度高出 1000 倍的分子。[46–52] 锥形反射器能够收集所谓的超临界光或禁戒光，即在玻璃-水界面处以高于全内反射临界角的角度发射的光。[21,53] 与用于控制指向性的八木-宇田天线或靶心天线不同，喇叭天线的工作原理不依赖干涉效应，[54,55] 因此能够在宽广的光谱范围内工作，基本覆盖整个荧光发射光谱。得益于中心孔径，喇叭天线完全兼容对溶液中扩散的荧光分子的检测，因为与介质天线或贴片天线设计不同，发射体无需嵌入天线材料中。[56–59] [60–63] 我们团队近期开发了紫外喇叭天线，旨在提高紫外线下无标记蛋白质的自发荧光检测灵敏度

。[43,44] 然而，这种天线设计此前从未用于可见光谱范围，也从未用于饱和条件下的荧光研究。

在此，我们展示了单偶极子总发射光的收集效率接近 90%，使饱和区间内的荧光亮度达到每个分子每秒 200 万个光子。我们讨论了暗态积累如何成为限制最大光子计数率的主要因素，并表明局部温度升高对饱和条件有显著影响。喇叭天线实现的高荧光亮度使我们能够以短至 10 μs 的分箱时间，在单个扩散突发中观测单分子。它还支持积分时间仅为 200 ms 的快速荧光相关光谱测量，以监测高亲和力分子相互作用动力学；我们以微摩尔浓度下的链霉亲和素-生物素结合为例进行了展示。本研究进一步拓展了等离激元天线和零模波导的应用，可实现更高的荧光计数率和更快的时间分辨率，从而改进纳米孔传感[64–67] DNA测序、[68–71]以及分子相互作用动力学、[72–79] 蛋白质构象[18,80] 和生物膜组织[81–86]的动态研究。

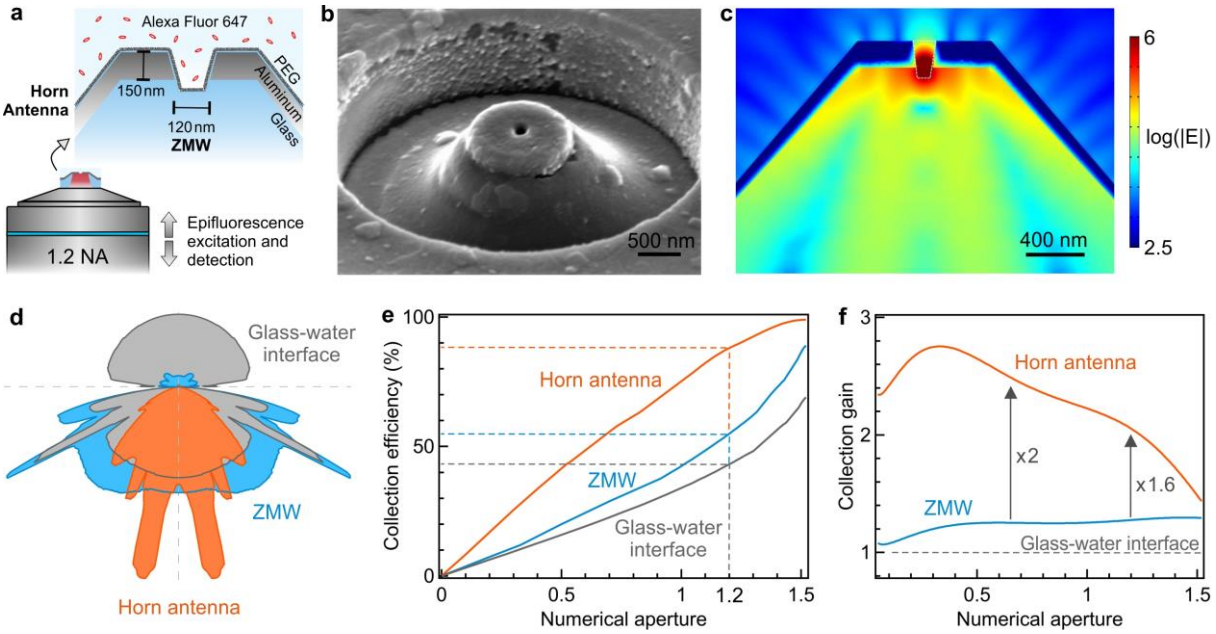


图 1。光学喇叭天线可实现对单发射体荧光的 90% 收集效率。(a) 实验配置示意图。(b) 喇叭天线的扫描电子显微镜图像，其中央铣刻有一个直径为 120 纳米的 ZMW纳米孔径。(c) 对置于纳米孔径中央、垂直取向且发射波长为 670纳米的单偶极子所辐射的电场强度进行数值模拟。(d) 计算得到的三维辐射方向图，显示了置于喇叭天线、ZMW 以及玻璃-水界面上方 5 纳米处的偶极辐射源（对 x、y 和 z 取向进行平均）的辐射情况。(e) 收集效率随数值

显微镜物镜所用的孔径。(f) 喇叭天线和零模波导相对于玻璃-水界面的收集效率增益随显微镜物镜数值孔径的变化。箭头旁的数字表示在本研究采用的两种数值孔径下，喇叭天线相对于零模波导带来的额外增益。

2. 结果与讨论

我们的主要实验采用 Alexa Fluor 647 染料（激发波长为 633纳米，发射峰位于 670纳米）。这类染料具有较高的辐射速率常数（补充信息图 S1），因此是饱和条件下最大化光子计数率的理想选择。图 1a 展示了实验配置示意图。我们使用落射荧光共聚焦显微镜，以聚焦的633纳米连续波激光束激发一个通过聚焦离子束（FIB）制备的喇叭天线（图 1b 和 S2）（详情请参见实验部分）。喇叭天线的中心设有一个直径为 120 纳米的纳米孔径；根据我们此前关于零模波导的研究，我们选择这一尺寸以最大化荧光亮度增强。[38,87] 锥形反射器的角度设为43°，这一选择基于对可见光范围内不同微反射器的直接实验表征（图 S3 ），并结合了我们现有的紫外光数据。[43] 在本研究中，我们将完整的喇叭天线（零模波导 + 微反射器）与不带微反射器的裸ZMW进行比较。这为评估微反射器对提高收集效率的影响提供了重要参照。图 S4 所示的数值模拟表明，微反射器不会改变纳米孔径内的局部强度：喇叭天线和裸ZMW在120 纳米孔径内呈现出非常相似的电磁强度分布。这一结果符合预期，因为激发光束由数值孔径为 1.2 的物镜聚焦，形成直径为 700 纳米的衍射极限光斑，小于喇叭天线顶部平台的尺寸。

如图1c、d和S5中的数值模拟所示，喇叭天线的反射壁将大部分发射光引导至收集物镜方向，使其集中在狭窄的角度范围内。作为比较，图1d还绘出了裸ZMW和玻璃-水界面的辐射方向图。为量化喇叭天线的波束转向能力，我们针对三种不同配置——喇叭天线、ZMW以及玻璃-水界面上方5 nm处——计算了收集效率随实验所用数值孔径的变化关系（图1e）。对于实验中使用的数值孔径为1.2的显微镜物镜，在共聚焦配置下，玻璃-水界面正上方发射的总光量中有43%被收集。裸ZMW的收集效率提升至55%，而喇叭天线则能收集所有三个空间方向上总辐射功率的90%，表现出色。我们的模拟预测，对于数值孔径为1.2的物镜，喇叭天线的收集增益是ZMW的1.6倍，

对于数值孔径为1.2的物镜。由于喇叭天线将大部分发射光引导至一个狭窄的±20°锥角范围内（图1d），数值孔径较低的物镜可获得更高的增益（图1f）。

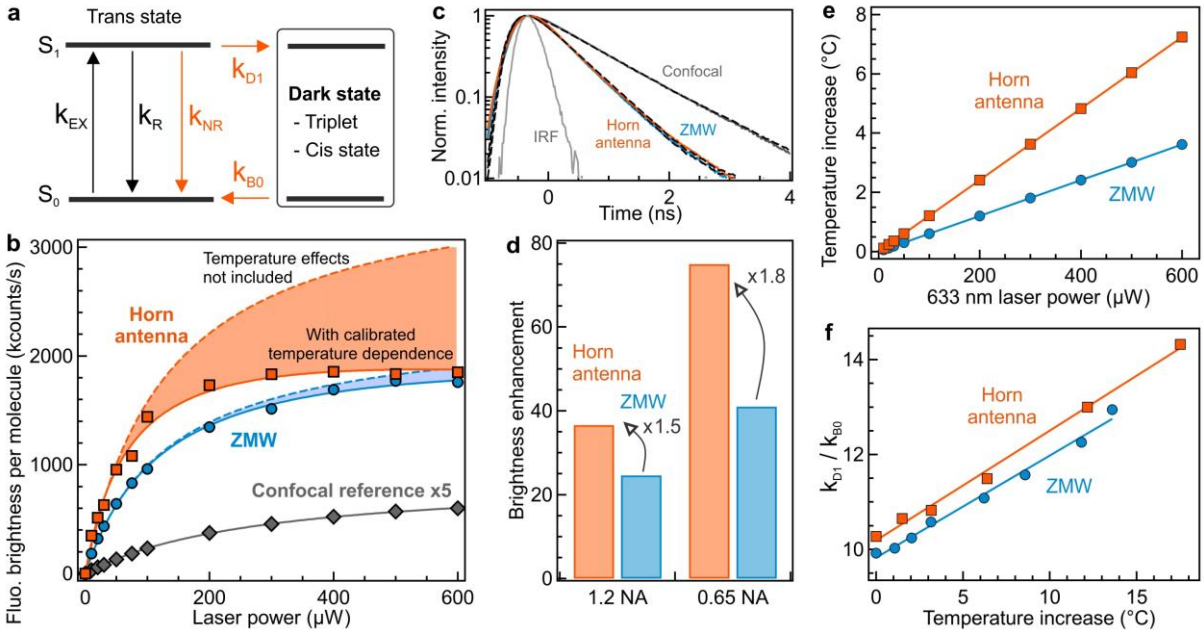


图 2。饱和区间内的荧光：借助喇叭天线实现每秒每分子超过 100 万计数的高荧光亮度，以及局部温度的影响。(a) 光物理速率常数的标注（详见正文）。(b) 喇叭天线、零模波导和共聚焦参考中，每分子荧光亮度随激光功率的变化。曲线是使用方程（1）模型进行的数值拟合，分别考虑和不考虑温度对跃迁速率的影响。(c) 归一化荧光寿命衰减曲线显示，与共聚焦参考相比，喇叭天线和零模波导的寿命均等幅缩短。IRF 表示仪器响应函数。(d) 在 50 μW 激光功率下，使用两个不同物镜数值孔径对喇叭天线和零模波导进行测量所得的荧光亮度增强。(e) 喇叭天线和零模波导中的温升随 633 nm 激光功率的变化。标记表示根据红外测量（图S11）推导出的实验数据，实线表示数值拟合。(f) 导致暗态形成的衰减速率常数 k_{D1}/k_{B0} 与温升的关系。标记表示根据荧光相关光谱测量（图S12）推导出的实验数据，实线表示数值拟合。

图 2 总结了我们对线性区间和饱和区间内荧光增强及荧光亮度的实验表征。作为一种花菁染料，Alexa Fluor 647

会发生反式-顺式光异构化，并在微秒时间尺度上进入非发射态。[88,89] 由于我们的 FCS实验无法区分光异构化和三重态闪烁，因此我们决定采用图 2a 所示模型来表示 Alexa Fluor 647 的光物理学，其中 k_{EX}、 k_R 辐射速率常数k_{NR} 分别是荧光反式构象的激发速率常数、辐射速率常数和非辐射速率常数，k_{D1} 是从 S_1 到暗态的跃迁速率常数，而k_{B0} 是从暗态返回基态 S_0 反式构象的恢复速率常数。[88,89] k_{D1} 和k_{B0} 包含反式-顺式光异构化和三重态跃迁的贡献，从而以最少的参数建立能够确切描述我们数据的模型。根据这些符号，荧光亮度（单分子计数率 CRM）表示为[20,90]

$$CRM = \kappa \frac{k_R}{k_R + k_{NR}} \frac{k_{EX}}{1 + \frac{k_{EX}}{k_R + k_{NR}}\left(1 + \frac{k_{D1}}{k_{B0}}\right)} \quad (1)$$

其中 κ 表示收集效率。在量子效率项 $k_R\ (k_R + k_{NR})/$ 中，我们忽略了跃迁速率常数 k_{D1} ，因为它比辐射和非辐射速率常数小三个数量级。[88] 在饱和条件 $k_{EX} \gg k_R + k_{NR}$下，当激发速率较高时，分子亮度变为

$$CRM_{saturation} = \kappa \frac{k_R}{1 + \frac{k_{D1}}{k_{B0}}} \quad (2)$$

如引言中所述，该方程提示，饱和条件下的荧光亮度取决于收集效率 κ、辐射速率常数 k_R 以及暗态的形成 k_{D1}/k_{B0}。

为测量不同实验中的荧光亮度，我们进行荧光相关光谱（FCS）测量，以记录每次实验运行中的平均荧光强度和检测到的平均分子数（详情请参见实验部分和图 S6-S9）。[7] 图2b是我们的主要实验结果：在共聚焦配置中，分子亮度 CRM 在低于 120 kcounts/s 的数值处达到饱和，而喇叭天线则使其接近每个分子每秒 200 万个光子（Mcounts/s/molecule），与衍射极限情况下每个分子的净最大检测计数率相比，提高了 16 倍。令人惊讶的是，与零模波导相比，喇叭天线在低激发功率和中等激发功率（低于 100 μW）下的增益十分显著，但随着功率超过 400 μW、完全达到饱和条件，其增益趋于降低。这一特征出人意料，因为对于所有不同的激发功率，收集效率增益都应保持不变（公式（1-2））。为解释这些不同的观察结果

对于图 2b 中的结果，我们需要分别探讨收集效率方面的实验增益，以及喇叭天线中荧光饱和的物理起源。

首先，我们确认喇叭天线和零模波导对局域光学态密度（LDOS）的影响相似：在与FCS实验条件相似的条件下进行的荧光寿命测量表明，Alexa 647在喇叭天线和零模波导中的荧光寿命相近；与共聚焦配置下的1.0 ns相比，在喇叭天线和零模波导中均缩短至0.57 ns（图 2c）。这一结果与图 S4 中的数值模拟一致，模拟表明，无论是否存在微反射器，纳米孔径内部的电场分布都相似，而微反射器仅影响发射光的指向性。这说明在低于饱和的低激发功率下，衰减速率常数 k_{EX}， k_R， k_{NR} 在喇叭天线和零模波导中相近。比较低于饱和时喇叭天线和裸ZMW的荧光亮度，根据式（1），二者的亮度差异即为收集效率增益 κ。实验上，对于数值孔径为1.2的物镜，在荧光达到饱和之前，喇叭天线相较于裸ZMW实现了1.5倍的收集增益（图 2d）。这一结果与图1f中的数值模拟非常吻合，模拟预测的增益为1.6倍。使用数值孔径较低（0.65）的物镜重复了同一组实验（图 S10）。在这种情况下，喇叭天线相较于零模波导实现了更大的收集增益，达到1.8倍（图 2d），同样与图1f中的数值模拟吻合良好。 总之，这些结果证明了喇叭天线的波束转向能力；与零模波导相比，这一能力有助于进一步提高探测到的荧光亮度。

如果喇叭天线只是将高角度发射的荧光重新导向显微镜物镜，那么喇叭天线中的荧光亮度应始终比零模波导的亮度高 1.5 倍，与图 2d 中的橙色虚线一致，并达到约 3 百万光子/秒/分子的数值。然而，当激发功率高于 100 μW、处于饱和区间时，我们的实验数据明显偏离这一趋势。FCS结果显示，喇叭天线与零模波导中的分子数和扩散时间并无显著差异（图 S7），因此排除了喇叭天线中相较于零模波导会发生更多光漂白的可能性（低于 50 μs 的快速扩散时间以及持续照明避免了导致严重光漂白的条件）。[90]

在存在金属且局域激发强度超过数百 μW/μm2 时，激发光被金属吸收所导致的局部温度升高（焦耳热）不可忽略。该过程发生的一个初步迹象是，随着激发功率增加，荧光相关光谱扩散时间缩短（图 S7d），这是由于温度升高时水的黏度降低[91] 以及热渗流的产生

从而加快表观扩散。[92] 我们采用[93] 中介绍的荧光寿命测量方案，测量喇叭天线和裸ZMW内部的局部温度；该方案总结于补充信息第 S11 节。图 2e 展示了喇叭天线和ZMW中的温升随633纳米激发功率变化的实验值。我们确认，ZMW的实验结果与[94]中进行的数值模拟一致。对于相同的入射激光功率，喇叭天线中的温升约为ZMW中的两倍，在 400 μW 时达到不可忽略的+5°C。我们认为，喇叭天线中的温升较高，是因为铝层仅延伸数 μm，且由于整个喇叭天线被铣刻入基底中（图 1b），该铝层与其余金属薄膜不连续。对于铣刻于平面金属薄膜中的ZMW，由于其直接连接到覆盖整个基底的 1 英寸铝层，热量能够更高效地散出。[95]

局部温度升高主要通过两种方式影响荧光光物理学。首先，它会提高非辐射衰减速率k_{NR} 并缩短荧光寿命。[88,93] 然而，在荧光饱和时，式 (2) 表明 k_{NR} 并不起主要作用（量子产率和饱和强度所受的影响往往会相互抵消）。其次，温度也会影响反式-顺式光异构化过程， [88,89] 改变暗态跃迁速率常数k_{D1} 和k_{B0}。我们通过补充信息 S12 节中讨论的补充荧光相关光谱测量来探究这一影响。两个速率常数均随温度升高而增加（图S12），[88]最重要的结果是，暗态累积k_{D1}/k_{B0} 与局部温度呈线性关系（图 2f）。喇叭天线和零模波导均呈现出k_{D1}/k_{B0} 随局部温度变化的相似关系（图 2f），这证实了我们结果的有效性。激发功率逐渐增大至荧光饱和时，局部温度也随之升高，导致暗态累积k_{D1}/k_{B0} 增大，进而降低饱和时的荧光亮度（式 (2) 的分母）。由于喇叭天线情况下的温升是零模波导的两倍，这种效应在喇叭天线中比在零模波导中更为显著（图 2e）。温度对k_{D1}/k_{B0}的影响，使得喇叭天线实验测得的亮度（图2b中的标记）明显偏离了预期的无温升情况下的行为（橙色虚线）。利用实验测得的局部温度值以及k_{NR}、 k_{D1} 和k_{B0}对温度的依赖关系，我们无需引入自由参数，就能对喇叭天线的亮度数据进行良好插值（图2b中的橙色实线），而零模波导的拟合则需要自由参数。

总的来说，图 2 中的结果表明，得益于喇叭天线更高的收集效率，其单分子荧光亮度可达到约 2 百万光子/秒，这与数值模拟结果一致。

饱和时的亮度目前受暗态累积k_{D1}/k_{B0}的限制，而这一现象取决于局部温升。这种现象并非 Alexa 647 染料所独有；我们对 Alexa 546 分子的实验也观察到了类似结果（图 S13）。而在 DNA 折纸纳米天线中，纳米天线的荧光亮度仍受其底层光物理过程限制，例如暗态形成和光异构化。[32] 对于高级应用，蓝宝石基底可能比玻璃更有效地散发多余热量，[94] 但我们发现，在蓝宝石基底上采用镓离子束聚焦离子束铣削制备喇叭天线会产生过强的发光背景，因此这类应用需要更先进的纳米制造技术（氦离子束聚焦离子束、对发光污染物进行反应离子刻蚀……）。

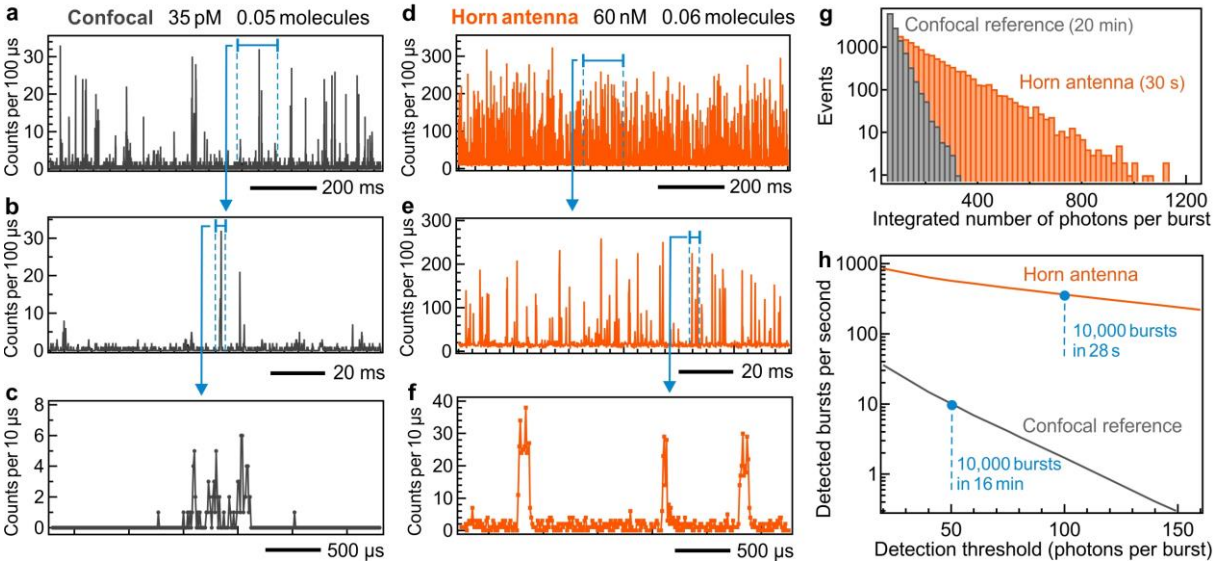


图 3。 借助喇叭天线带来的高荧光亮度，以 10 微秒分辨率观测单分子突发信号。(a-c) 共聚焦参考的荧光时间轨迹，展示了扩散中的单分子产生的典型突发信号；分箱时间分别为 100 µs（a、b）和 10 µs（c）。(d-f) 喇叭天线的结果，与 (a-c) 相同。Alexa 647 的浓度经过选择，使两种配置下荧光相关光谱测得的分子平均数相近（补充信息图 S14）。激光功率为 200 µW。(g) 每次突发的光子总数直方图。共聚焦参考的积分时间为 20 min，而喇叭天线为 30 s。(h) 对应于 (a、d) 的配置中，每秒探测突发信号数随检测阈值的变化。

接下来，我们利用喇叭天线实现的高每分子荧光亮度，以快速的微秒分箱时间监测单分子动力

单个 Alexa 647 分子在低浓度下扩散的轨迹。对于共聚焦配置（图 3a–c）和喇叭天线配置（图 3d–f），我们选择 Alexa 647 的浓度，使两种情况下的分子平均数相近，均为 0.05（这一参数由荧光相关光谱控制，见图 S14），如此低的分子平均数可确保突发信号来自单个扩散分子。共聚焦和喇叭天线配置下的浓度分别为 35 皮摩尔和 60 纳摩尔。

在共聚焦配置中，以10微秒时间窗对时间轨迹进行分箱，甚至无法清晰分辨最亮的突发信号（图3c）。这是因为共聚焦方法中，头part分子每秒产生计数，这意味着在10微秒内平均检测到的光子数不到1个。采用喇叭天线后，亮度达到每分子每秒1.7兆计数，因此在10微秒内平均可探测到17个光子，从而能够以微秒分辨率直接监测荧光的时间轨迹（图3f）。这一特点表明，高荧光亮度可直接提升监测单分子动力学的时间分辨率。喇叭天线的高荧光亮度还清晰体现在时间轨迹（图S15中对单分子突发信号的比较分析证实了喇叭天线的优异性能。另外，图S15a, c中根据单分子突发信号分析得到的荧光亮度证实了图2b中的荧光相关光谱结果。

比较共聚焦装置和喇叭天线的时间轨迹（图3b和3d）时，另一个显著特征是：与共聚焦参考相比，使用喇叭天线可明显减少单个染料的强荧光突发信号，尽管两种情况下所选浓度均使荧光相关光谱平均探测分子数相近（图S14），仍会出现这一现象。使用 BAM 软件的突发搜索模块进行的详细分析（详见实验部分）证实，喇叭天线的每秒探测突发信号数更高（图3f和3h）。使用喇叭天线，仅需28秒即可收集10,000次、每次100个光子的突发信号，而在共聚焦装置中则需要 4 小时。由于荧光亮度得到提高，喇叭天线每秒可检测到多30%的单分子荧光突发事件和检测阈值下降。由于荧光亮度得到提高，喇叭天线每秒可检测到多30%的单分子荧光突发事件和检测阈值下降。

喇叭天线能够以更高的探测率检测到强烈爆发，这是由两个特点造成的：(i) 由于喇叭天线的探测体积减小，扩散时间和突发持续时间缩短了约 4 倍。因此每秒可发生的扩散事件数量增加了 4 倍。

，而 (ii) 由于喇叭天线增强了亮度，突发信号在检测阈值以上更容易分辨。对于平均含有 [illegible] 事件，这与图2d中的数据相对应。然而，对于含有 0.05 个分子、平均突发持续时间为 500 μs 的共聚焦参考配置，每 20 ms 预计会有 2 个检测事件；换算而言，在图3b所示的整个 125 ms 的长时，会有 12 个单分子扩散事件。显然，采用共聚焦模式每次发现 50 个光子的 [illegible] 只有几个光子；它们并非噪声，而是未被检测到的单分子扩散事件。喇叭天线增强的高度有效解决了这一问题，使所有单分子扩散事件都能轻松地从背景中检测出来。

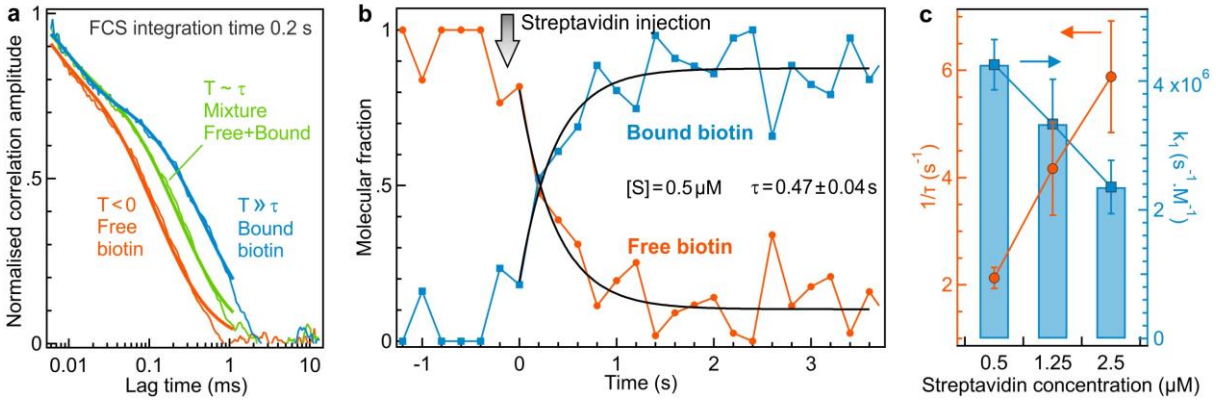


图4。喇叭天线中的高荧光亮度使得快速荧光相关光谱测量成为可能，可用于监测链霉亲和素与生物素的高亲和力缔合速率。(a) Atto 643-生物素与链霉亲和素溶液混合后，在 T = 0 条件下测得的振幅归一化 FCS 相关曲线。计算每条 FCS 曲线的积分时间为 200 ms。扩散时间发生 3.8 倍的变化，表明生物素与链霉亲和素结合。(b) 向 0.5 μM 生物素溶液中加入 0.5 μM 链霉亲和素溶液后，生物素游离态和结合态分子组分随时间的演化。每个数据点均来自一次 200 ms 的荧光相关光谱测量。τ 为指数演化的特征时间（见补充信息 S17 节）。(c) 缔合时间倒数 τ （橙色标记，左轴）和缔合速率常数 k_1 （蓝色柱，右轴）随链霉亲和素浓度的变化。

最后，我们利用喇叭天线实现的高单分子计数率，在微摩尔浓度下通过荧光相关光谱测定生物素与链霉亲和素的缔合速率常数。生物素与链霉亲和素的结合在生物技术中有着重要应用，也是高亲和力生化反应的典型例子。研究发现，链霉亲和素与生物素的结合速率常数范围为 3.0 × 10^6 至 4.5 × 10^7 $M^{-1}.s^{-1}$.[96] 在 1 μM 浓度下，特征缔合时间仅为 20 至 330 ms。这个时间太短，无法通过共聚焦荧光相关光谱进行探测，因为这通常需要超过 5 s 的积分时间。[7,97] 然而，喇叭天线带来的高亮度使我们能够大幅缩短荧光相关光谱的积分时间，如此处所示，可缩短至 200 ms（图 4a）。

我们的实验使用浓度为 0.5 μM、标记了 Atto-643 的生物素，并将其与浓度为 0.5 至 2.5 μM 的未标记链霉亲和素混合。这些条件确保每个链霉亲和素仅结合一个生物素，因此此处可以忽略 4 个不同结合位点之间的协同性。与链霉亲和素结合后，Atto643-生物素的扩散时间逐渐从 190 μs（游离生物素）变为 730 μs（完全结合的生物素）（图 4a）。扩散时间增加 3.8 倍，这与分子量从 1.26 kDa（游离 Atto643-生物素）变为 67 kDa（Atto643-生物素-链霉亲和素复合物）相符，因为 $\sqrt[3]{67/1.26} \sim 3.8$。[97] 我们使用包含两种物种的荧光相关光谱拟合结果，确定游离态和结合态生物素各自的比例（详情见实验部分）。这种高荧光亮度使得以 0.2 s 的积分时间进行荧光相关光谱测量成为可能，足以在微摩尔浓度下监测链霉亲和素-生物素结合。使用喇叭天线时，可达到的最短荧光相关光谱积分时间不再仅由信噪比决定，而是受荧光相关光谱测量的要求限制：为避免伪影，积分时间至少要比扩散时间长 200 倍。

不同微摩尔范围链霉亲和素浓度下，游离态和结合态所占比例随时间的变化如图 4b 和 S17 所示。生物素与链霉亲和素结合后，游离生物素的比例特征时间 [illegible] 指数衰减，其中 k_1 为缔合速率常数，[illegible] 为链霉亲和素浓度（一般性讨论见补充信息 S17 节）。拟合游离态和结合态所占比例，提取特征时间 [illegible]（图 4c，左轴），即可计算缔合速率常数 k_1（图 4c，右轴）。我们发现，k_1的值介于 2.4 × 10^6 至 4.3 × 10^6 $M^{-1}.s^{-1}$ 之间，与超过液滴微流控中的荧光共振能量转移读出所报道的数值高度吻合。[96] 利用在 [99,100], 中测得的解离速率常数 k_{-1} [illegible]数 $K_d = k_{-1}/k_1$ 约为 10^{-14} M，与普遍报道的数值一致。[101] 本文的数据如图 4 所示，证明喇叭天线提升的高亮度使得在微摩尔浓度下，能够对具有挑战性的高亲和力缔合动力学进行快速荧光相关光谱测量。

3. 结论

我们证明了等离激元纳米天线可用于在单分子荧光技术中实现高时间分辨率。借助光学喇叭天线，我们实现了对单个偶极子总发射光接近 90% 的收集效率，在饱和区间内获得了每个分子每秒 200 万光子的高荧光亮度。我们还讨论了暗态积累和局部温度升高在限制饱和条件下最大光子计数率方面的作用。喇叭天线所实现的高荧光亮度，使我们能够以短至 10 μs 的分箱时间观测单分子，并在 200 ms 积分时间下进行快速荧光相关光谱测量。这为在微摩尔浓度下监测高亲和力分子相互作用开辟了新途径，正如我们展示的链霉亲和素与生物素缔合实例。喇叭天线的一项关键优势是，与共聚焦装置相比，它大幅提高了检测效率。具体而言，与共聚焦参考相比，我们观察到喇叭天线检测到的荧光突发数量高出 > 20 倍，因此可有效解决共聚焦配置中常见的漏检事件。另一方面，喇叭天线和零模波导方法需要数十纳摩尔的浓度；对于某些蛋白质应用而言，这可能构成挑战，因为这些应用中的合成产率较低，难以达到超过几纳摩尔的浓度。此外，喇叭天线概念还可扩展至单光子源和非线性发光器件。尽管采用平面介电天线或等离激元贴片天线已取得令人瞩目的成果，[56–63] 这些设计会将发射体嵌入介电材料中，这并不适合生物学应用。本研究提出的喇叭天线旨在使荧光分子处于水环境和室温下，从而提高单分子荧光分析的时间分辨率。然而，分子发射体的取向无法控制，而且与其他等离激元设计相比，该设计所提供的荧光增强较弱。本研究拓展了等离激元天线和零模波导的应用，使其能够实现更高的荧光计数率和更快的时间分辨率，从而改进单分子荧光传感、DNA测序，以及对分子相互作用、蛋白质构象和生物膜组织的动态研究。

4. 实验部分

纳米制造。 喇叭天线和零模波导纳米孔径通过聚焦离子束（FIB，图 S1）制备。[43] 首先使用 FIB（FEI DB235 Strata，30 kV 加速电压，300 pA 离子电流）铣削出锥形结构。随后通过电子束蒸发（Bühler Syrus Pro 710）沉积一层厚 100 纳米的铝层，使锥壁具有反射性。接着使用 FIB（10 pA 电流）在微反射器中心铣削出直径为 120 纳米的孔径，以制成喇叭天线。对于零模波导，在样品的其他位置采用相同的 FIB 条件铣削纳米孔径，以便与喇叭天线直接比较。最后，使用等离子体增强化学气相保护（Oxford Instruments PlasmaPro NGP80）沉积一层厚 12 纳米的二氧化硅层，对铝样品进行保护。[102]

数值模拟。 使用 COMSOL Multiphysics v5.5 的波动光学模块，通过有限元法模拟电场分布。喇叭天线和零模波导中的直径为 120 纳米的纳米孔径均由下方的高斯光源激发，光源波长为633纳米。玻璃基底和水（孔径内及上方介质）的折射率分别设为 1.52 和 1.33，而铝的折射率取自参考文献。[103] 设置尺寸范围为 0.3 纳米至 10 纳米的用户定义网格，以生成四面体几何结构网格。为抑制边界反射，采用散射边界条件。为计算傅里叶平面图像，将 COMSOL 中计算得到的近场分布转换为远场，所用工具为开源 MATLAB工具箱 RETOP。[104] 分别沿 x、y 和 z 方向使用单个振荡偶极子激发喇叭天线或零模波导。振荡波长设为 670纳米，接近实验中使用的 Alexa 647 染料的发射峰值。通过非相干叠加分别沿 x、y 和 z 方向取向的偶极子各自发射的辐射图样，计算傅里叶平面图像。与零模波导中较宽的发射相比，喇叭天线的傅里叶平面图像显示发射角受到限制。

样品制备。 从 ThermoFisher 购买的 Alexa 647 染料按收到时的状态使用，并稀释于磷酸盐缓冲盐水（PBS）溶液中。使用前，按照 [105] 中的方案，使用摩尔质量为 1000 Da 的聚乙二醇（PEG）硅烷（Nanocs PG1-SL-1K）对喇叭天线和零模波导表面进行钝化。钝化前，先用水清洗样品，再用乙醇（97%）清洗，并用异丙醇冲洗。随后，将样品置于紫外臭氧下处理 10 分钟，以清除有机杂质。重复进行三次水、乙醇和异丙醇清洗及紫外臭氧处理，以彻底清洁表面。最后，将样品放入空气等离子体清洗机中处理 5 分钟。等离子体清洗后，立即用以无水乙醇配制、含 1% 乙酸的 1 mM PEG溶液覆盖样品。向腔室中吹入氩气，并在室温下静置 4 小时。用乙醇冲洗样品，并用氮气吹干。为储存钝化后的样品，使用无水乙醇配制的 1% Tween20溶液。

从 ATTO-TEC 购买标记有 Atto 643 染料的生物素分子。从 阿维链霉菌中提取的链霉亲和素购自 Sigma-Aldrich。使用 Airfuge 20 psi 超速离心机以 142000 g 离心 12 分钟后，分离其上清液并储存于 -20°C。 对于图 2，PBS 溶液中 Alexa 647 染料的浓度在喇叭天线和零模波导中为 600 nM，在共聚焦参考中为 1 nM。所有分子浓度均使用 Tecan Spark 10 M 荧光分光光度计测量。

实验装置。 荧光相关光谱测量使用一台定制的共聚焦显微镜（Nikon Ti-U Eclipse）进行，该显微镜配备连续波 633纳米 氦氖激光器和 635 nm 脉冲激光器（LDH 系列激光二极管，PicoQuant，脉冲持续时间为 ~ 50 ps）。使用多波段二向色镜（ZT 405/488/561/640rpc，Chroma）将两台激光器反射至显微镜。使用 63 倍、数值孔径为 1.2 的水浸物镜（Zeiss C-Apochromat）或 40 倍、数值孔径为 0.65 的空气物镜（Olympus PlanN）激发分子，并以落射荧光配置收集发射光。为有效抑制反向散射的激光，发射光首先通过同一多波段二向色镜（ZT 405/488/561/640rpc，Chroma），随后通过两个发射滤光片（ZET405/488/565/640mv2 和 ET655，Chroma）。收集到的信号经过 50 或 100 μm 针孔进行空间滤波，以分离分子荧光，随后聚焦到单光子雪崩光电二极管（APD）（Perkin Elmer SPCM AQR 13）上。在 APD 前放置了一个辅助发射滤光片（FF01- 676/37，Semrock），以阻止杂散光进入 APD，并进一步滤除瑞利散射光。光子计数事件由快速时间相关单光子计数模块（HydraHarp 400，Picoquant）以时间标记时间分辨模式进行检测。我们的雪崩光电二极管的死时间为 50 ns。在此处检测到的最高计数率为 2 百万光子/秒时，雪崩光电二极管死时间的校正因子为 1.11。为便于与其他实验进行比较，我们决定在此忽略这一校正。

荧光相关光谱分析。所有荧光相关光谱曲线均使用以下方程进行拟合，其中采用三维布朗扩散模型，并加入一个额外项以纳入闪烁效应。[7,87,105]

$$G(\tau) = \rho\left[1 + \frac{T_{ds}}{1 - T_{ds}}\exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{\mathrm{ds}}}\right)\right]\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\mathrm{d}}}\right)^{-1}\left(1 + \frac{1}{s^2}\frac{\tau}{\tau_{\mathrm{d}}}\right)^{-0.5} \quad (3)$$

其中， G（τ）为相关振幅， ρ 为相关振幅， T_{ds} 为进入暗态的分子比例，τ_{ds} 为暗态的闪烁时间， τ_{d} 为平均扩散时间，κ 对应于溶液中激发光源轴向尺寸与横向尺寸的纵横比。对于共聚焦情况，我们采用了s=5的值；而对于光学喇叭天线，根据我们此前针对零模波导孔径的研究结果，我们采用了s=1 的值，该值与实验相关振幅拟合良好。为提取拟合参数（例如分子数和扩散时间），对于共聚焦情况，我们对延迟时间为 3 μs 至 10 ms 的实验数据进行拟合，

而对于零模波导和喇叭天线，由于拟合模型在较长延迟时间下开始偏离实验数据，数据拟合范围为 3 μs 至 0.1 ms。根据相关振幅的拟合值ρ、喇叭天线和零模波导上测得的背景B，以及总探测强度F，我们提取出平均分子数N 以及亮度或单分子计数率CRM ，计算如下：

$$N = \frac{1}{\rho}\left(1 - \frac{B}{F}\right)^2 \tag{4}$$

$$CRM = \frac{1}{N}(F - B) \tag{5}$$

在荧光相关光谱中，平均分子数 N 定义为实验持续期间观测体积内检测到的荧光分子的平均数量。[7]

荧光突发分析。 我们使用 MATLAB 脉冲交错激发分析（PAM）中的突发分析模块。[106] 通过设置光子计数阈值、突发的时间窗口以及每次突发的总光子计数，使用全光子突发搜索 函数进行突发检测。由于喇叭天线、零模波导和共聚焦参考三种情况下的扩散时间和背景信号不同，因此针对突发中的光子数阈值、每个时间窗口内的最小光子数以及突发时间窗口，采用了不同的取值。对于共聚焦配置，每个峰均视为一次单分子突发，其中至少包含 50 个光子，且每个 100 μs 的突发时间窗口内至少包含 2 个光子。对于喇叭天线（零模波导），每次突发的最小光子数为 100（75），每个 50（50）μs 突发时间窗口内的最小光子数为 12（10）。喇叭天线、零模波导和共聚焦参考的突发时间窗口取值接近荧光相关光谱分析中提取的扩散时间。对于图 3h，在其他参数保持不变的情况下，调整了三种配置的突发检测阈值（每次突发的最小光子数）。

补充信息

荧光染料的辐射速率常数、喇叭天线的制备、微反射器锥角的影响、孔径中的近场增强、使用喇叭天线实现定向发射、荧光相关光谱时间轨迹和相关函数、荧光相关光谱中的分子数和扩散时间、背景强度、不同结构之间的统计离散度、数值孔径为 0.65 时的收集增益、温度测量、Alexa Fluor 647 的暗态跃迁速率常数随温度的变化、Alexa 546 的荧光亮度、与突发分析对应的荧光相关光谱数据、亮度统计和每次突发光子计数、零模波导中的单分子突发信号、生物素-链霉亲和素缔合速率计算、生物素-链霉亲和素缔合速率的测量。

致谢

作者感谢 Don Lamb 提供了富有启发性的讨论。本项目获得了欧洲研究委员会（ERC）在欧盟地平线2020研究与创新计划框架下的资助（资助协议编号：723241）。

利益冲突

作者声明不存在利益冲突。

数据可用性声明

支持本研究结论的数据可根据要求向通讯作者索取。

参考文献

[1] T. Ha、P. Tinnefeld，《年度物理化学评论》 2012年，63，595。[2] B. Schuler、H. Hofmann，《结构生物学当前观点》 2013，23，36。[3] M. Orrit，《应用化学国际版》 2015年，54，8004。[4] C. Joo、H. Balci、Y. Ishitsuka、C. Buranachai、T. Ha，《年度生物化学评论》 2008年，77，51。[5] S. Dey、M. Dolci、P. Zijlstra，《ACS物理化学Au》 2023，DOI：10.1021/acsphyschemau.2c00061。[6] H. P. Lu、L. Xun、X. S. Xie，《科学》 1998，282，1877。

[7] T. Wohland、S. Maiti、R. Machan，荧光相关光谱导论，IOP出版有限公司，**2020**。

[8] E. Lerner、T. Cordes、A. Ingargiola、Y. Alhadid、S. Chung、X. Michalet、S. Weiss，《科学》 **2018**，*359*，eaan1133。

[9] B. Hellenkamp, S. Schmid, O. Doroshenko, O. Opanasyuk, R. Kühnemuth, S. R. Adariani, B. Ambrose, M. Aznauryan, A. Barth, V. Birkedal, M. E. Bowen, H. Chen, T. Cordes, T. Eilert, C. Fijen, C. Gebhardt, M. Götz, G. Gouridis, E. Gratton, T. Ha, P. Hao, C. A. Hanke, A. Hartmann, J. Hendrix, L. L. Hildebrandt, V. Hirschfeld, J. Hohlbein, B. Hua, C. G. Hübner, E. Kallis, A. N. Kapanidis, J.-Y. Kim, G. Krainer, D. C. Lamb, N. K. Lee, E. A. Lemke, B. Levesque, M. Levitus, J. J. McCann, N.

Naredi-Rainer, D. Nettels, T. Ngo, R. Qiu, N. C. Robb, C. Röcker, H. Sanabria, M. Schlierf, T. Schröder, B. Schuler, H. Seidel, L. Streit, J. Thurn, P. Tinnefeld, S. Tyagi, N. Vandenberk, A. M. Vera, K. R. Weninger, B. Wünsch, I. S. Yanez-Orozco, J. Michaelis, C. A. M. Seidel, T. D. Craggs, T. Hugel, 《自然·方法》 **2018**, *15*, 669.

[10] A. Kusumi, T. A. Tsunoyama, K. M. Hirosawa, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, 《自然·化学生物学》 **2014年**, *10*, 524.

[11] C. Eggeling, S. Berger, L. Brand, J. R. Fries, J. Schaffer, A. Volkmer, C. A. M. Seidel, 《生物技术杂志》**2001年**, *86*, 163.

[12] J. Widengren, V. Kudryavtsev, M. Antonik, S. Berger, M. Gerken, C. A. M. Seidel, 《分析化学》**2006年**, *78*, 2039.

[13] L. A. Campos, J. Liu, X. Wang, R. Ramanathan, D. S. English, V. Muñoz, 《自然·方法》**2011年**, *8*, 143.[14] T. Otosu, K. Ishii, T. Tahara, 《自然·通讯》 **2015年**, *6*, 7685.

[15] S. Kilic, S. Felekyan, O. Doroshenko, I. Boichenko, M. Dimura, H. Vardanyan, L. C. Bryan, G. Arya, C. A. M. Seidel, B. Fierz，《自然·通讯》**2018**，*9*，235。

[16] H. Sanabria, D. Rodnin, K. Hemmen, T.-O. Peulen, S. Felekyan, M. R. Fleissner, M. Dimura, F. Koberling, R. Kühnemuth, W. Hubbell, H. Gohlke, C. A. M. Seidel, 《自然·通讯》**2020**, *11*, 1231.[17] A.-M. Cao, R. B. Quast, F. Fatemi, P. Rondard, J.-P. Pin, E. Margeat, 《自然·通讯》 **2021**, *12*, 5426.[18] M. F. Nüesch, M. T. Ivanović, J.-B. Claude, D. Nettels, R. B. Best, J. Wenger, B. Schuler, *J. Am.Chem. Soc.* **2022**, *144*, 52.[19] D. E. Makarov, A. Berezhkovskii, G. Haran, E. Pollak, 《物理化学杂志*B*》 **2022**, *126*, 7966.[20] J. Enderlein, C. Zander，载于《溶液中的单分子检测》，Wiley-Blackwell，**2003年**，第21–67页。[21] L. Novotny, B. Hecht，《纳米光学原理》，剑桥大学出版社，**2012年**。[22] L. Novotny, N. van Hulst, 《自然·光子学》 **2011年**, *5*, 83.[23] A. F. Koenderink, *ACS Photonics* **2017**, *4*, 710. [24] A. Kinkhabwala, Z. Yu, S. Fan, Y. Avlasevich, K. Müllen, W. E. Moerner, 《自然·光子学》**2009 年** , *3*, 654.

[25] H. Yuan, S. Khatua, P. Zijlstra, M. Yorulmaz, M. Orrit, 《应用化学国际版》 **2013**, *52*, 1217.[26] S. Khatua, P. M. R. Paulo, H. Yuan, A. Gupta, P. Zijlstra, M. Orrit, *ACS Nano* **2014年**, *8*, 4440.

[27] D. Punj, R. Regmi, A. Devilez, R. Plauchu, S. B. Moparthi, B. Stout, N. Bonod, H. Rigneault, J. Wenger, *ACS Photonics* **2015年**, *2*, 1099.

[28] G. P. Acuna, F. M. Möller, P. Holzmeister, S. Beater, B. Lalkens, P. Tinnefeld, 《科学》 **2012年**, *338*, 506.

[29] A. Puchkova, C. Vietz, E. Pibiri, B. Wünsch, M. Sanz Paz, G. P. Acuna, P. Tinnefeld, 《纳米快报》**2015年**, *15*, 8354.

[30] K. Trofymchuk, V. Glembockyte, L. Grabenhorst, F. Steiner, C. Vietz, C. Close, M. Pfeiffer, L. Richter, M. L. Schütte, F. Selbach, R. Yaadav, J. Zähringer, Q. Wei, A. Ozcan, B. Lalkens, G. P. Acuna, P. Tinnefeld, 《自然·通讯》 **2021**, *12*, 950.

[31] K. Trofymchuk, K. Kołątaj, V. Glembockyte, F. Zhu, G. P. Acuna, T. Liedl, P. Tinnefeld，《ACS Nano》*ACS Nano***2023**年，*17*，1327–1334。

[32] L. Grabenhorst, K. Trofymchuk, F. Steiner, V. Glembockyte, P. Tinnefeld，《荧光方法与应用》《荧光方法与应用》**2020**年，*8*，024003。

[33] M. P. Busson, B. Rolly, B. Stout, N. Bonod, S. Bidault，《自然·通讯》《自然·通讯》**2012**年，*3*，962。

[34] S. Bidault, A. Devilez, V. Maillard, L. Lermusiaux, J.-M. Guigner, N. Bonod, J. Wenger，《ACS Nano》*ACS Nano***2016**年，*10*，4806。

[35] A. P. Francisco, D. Botequim, D. M. F. Prazeres, V. V. Serra, S. M. B. Costa, C. A. T. Laia, P. M. R. Paulo, 《物理化学快报》 **2019**，*10*，1542。

[36] D. Punj, M. Mivelle, S. B. Moparthi, T. S. van Zanten, H. Rigneault, N. F. van Hulst, M. F. García- Parajó, J. Wenger, 《自然·纳米技术》 **2013**，*8*，512。

[37] V. Flauraud, R. Regmi, P. M. Winkler, D. T. L. Alexander, H. Rigneault, N. F. van Hulst, M. F. García-Parajo, J. Wenger, J. Brugger, 《纳米快报》 **2017**，*17*，1703。

[38] J. Wenger, D. Gérard, J. Dintinger, O. Mahboub, N. Bonod, E. Popov, T. W. Ebbesen, H. Rigneault，《光学快报》 2008年，16，3008。

[39] Y. Wang, M. Horáček, P. Zijlstra，《物理化学快报》2020, 11, 1962。[40] E. Wientjes, J. Renger, R. Cogdell, N. F. van Hulst，《物理化学快报》2016, 7, 1604。[41] C. A. Balanis，《天线理论：分析与设计》，约翰·威立父子出版公司，2005。[42] J. de Torres, P. Ghenuche, S. B. Moparthi, V. Grigoriev, J. Wenger，ChemPhysChem 2015, 16, 782。[43] A. Barulin, P. Roy, J.-B. Claude, J. Wenger，《自然·通讯》2022, 13, 1842。[44] P. Roy, J.-B. Claude, S. Tiwari, A. Barulin, J. Wenger，《纳米快报》2023, 23, 497–504。[45] T. Grosjean, M. Mivelle, G. W. Burr, F. I. Baida，《光学快报》2013, 21, 1762。[46] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb，《科学》2003, 299, 682。[47] P. Zhu, H. G. Craighead，《生物物理学年度评论》2012, 41, 269。[48] P. Holzmeister, G. P. Acuna, D. Grohmann, P. Tinnefeld，《化学学会评论》2014, 43, 1014。[49] D. Punj, P. Ghenuche, S. B. Moparthi, J. de Torres, V. Grigoriev, H. Rigneault, J. Wenger，《威立跨学科评论：纳米医学与纳米生物技术》2014, 6, 268。[50] M. S. Alam, F. Karim, C. Zhao，Nanoscale 2016, 8, 9480。[51] N. Maccaferri, G. Barbillon, A. N. Koya, G. Lu, G. P. Acuna, D. Garoli，《纳米尺度进展》2021, 3, 633。[52] G. M. Crouch, D. Han, P. W. Bohn，《物理学杂志：应用物理》2018, 51, 193001(1。[53] T. Ruckstuhl, J. Enderlein, S. Jung, S. Seeger，《分析化学》2000, 72, 2117。[54] A. G. Curto, G. Volpe, T. H. Taminiau, M. P. Kreuzer, R. Quidant, N. F. van Hulst，《科学》2010, 329, 930。[55] H. Aouani, O. Mahboub, N. Bonod, E. Devaux, E. Popov, H. Rigneault, T. W. Ebbesen, J. Wenger，《纳米快报》2011, 11, 637。[56] K. G. Lee, X. W. Chen, H. Eghlidi, P. Kukura, R. Lettow, A. Renn, V. Sandoghdar, S. Götzinger，《自然·光子学》2011, 5, 166。[57] X.-L. Chu, T. J. K. Brenner, X.-W. Chen, Y. Ghosh, J. A. Hollingsworth, V. Sandoghdar, S. Götzinger，《光学》2014, 1, 203。

[58] W. Li, L. Morales-Inostroza, W. Xu, P. Zhang, J. Renger, S. Götzinger, X.-W. Chen，《style id='2'>ACS Photonics**2020**，*7*，2474。

[59] M. Colautti, P. Lombardi, M. Trapuzzano, F. S. Piccioli, S. Pazzagli, B. Tiribilli, S. Nocentini, F. S. Cataliotti, D. S. Wiersma, C. Toninelli，《style id='2'>Adv. Quantum Technol. **2020**，*3*，2000004。

[60] C. Belacel, B. Habert, F. Bigourdan, F. Marquier, J.-P. Hugonin, S. Michaelis de Vasconcellos, X. Lafosse, L. Coolen, C. Schwob, C. Javaux, B. Dubertret, J.-J. Greffet, P. Senellart, A. Maitre，《style id='2'>《纳米快报》 **2013**，*13*，1516。

[61] T. B. Hoang, G. M. Akselrod, M. H. Mikkelsen，《纳米快报》 *2016*，**16**，270。

[62] S. Checcucci, P. Lombardi, S. Rizvi, F. Sgrignuoli, N. Gruhler, F. B. Dieleman, F. S Cataliotti, W. H. Pernice, M. Agio, C. Toninelli，《Light Sci. Appl.》 *2017*，**6**，e16245。

[63] S. Morozov, M. Gaio, S. A. Maier, R. Sapienza，《纳米快报》 *2018*，**18**，3060。

[64] O. N. Assad, T. Gilboa, J. Spitzberg, M. Juhasz, E. Weinhold, A. Meller，《Adv. Mater.》 *2017*，**29**，1605442。

[65] D. V. Verschueren、S. Pud、X. Shi、L. De Angelis、L. Kuipers、C. Dekker，*ACS Nano* **2019**，*13*，61。[66] N. Klughammer、C. Dekker，*Nanotechnology* **2021**，*32*，18LT01。

[67] F. Farhangdoust、F. Cheng、W. Liang、Y. Liu、M. Wanunu，*Adv. Mater.* **无日期**，不适用，2108479。[68] J. Eid、A. Fehr、J. Gray、K. Luong、J. Lyle、G. Otto、P. Peluso、D. Rank、P. Baybayan、B. Bettman、A. Bibillo、K. Bjornson、B. Chaudhuri、F. Christians、R. Cicero、S. Clark、R. Dalal、A. DeWinter、J. Dixon ,

M. Foquet、A. Gaertner、P. Hardenbol、C. Heiner、K. Hester、D. Holden、G. Kearns、X. Kong、R. Kuse、Y. Lacroix、S. Lin、P. Lundquist、C. Ma、P. Marks、M. Maxham、D. Murphy、I. Park、T. Pham、M. Phillips、J. Roy、R. Sebra、G. Shen、J. Sorenson、A. Tomaney、K. Travers、M. Trulson、J. Vieceli、J. .

Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach, S. Turner, 《科学》 **2009年**, *323* ,

133.[69] S. Uemura、C. E. Aitken、J. Korlach、B. A. Flusberg、S. W. Turner、J. D. Puglisi，《自然》*2010*年，**464**，1012。

[70] J. Chen、R. V. Dalal、A. N. Petrov、A. Tsai、S. E. O'Leary、K. Chapin、J. Cheng、M. Ewan、P. L. Hsiung、P. Lundquist、S. W. Turner、D. R. Hsu、J. D. Puglisi，《美国国家科学院院刊》*2014*年，**111**，664。[71] J. Larkin、R. Y. Henley、V. Jadhav、J. Korlach、M. Wanunu，《自然·纳米技术》*2017*，**12**，1169。[72] K. T. Samiee、M. Foquet、L. Guo、E. C. Cox、H. G. Craighead，《Biophys. J.》*2005*年，**88**，2145。

[73] T. Miyake, T. Tanii, H. Sonobe, R. Akahori, N. Shimamoto, T. Ueno, T. Funatsu, I. Ohdomari, 《分析化学》 **2008年**，*80*，6018。

[74] T. Sameshima, R. Iizuka, T. Ueno, J. Wada, M. Aoki, N. Shimamoto, I. Ohdomari, T. Tanii, T. Funatsu, 《生物化学杂志》 **2010年**，*285*，23159。

[75] J. Zhao, S. P. Branagan, P. W. Bohn, 《应用光谱学》 **2012年**，*66*，163。

[76] T. Sandén, R. Wyss, C. Santschi, G. Hassaïne, C. Deluz, O. J. F. Martin, S. Wennmalm, H. Vogel，《纳米快报》 **2012年**，*12*，370。

[77] Y. Zhao, D. Chen, H. Yue, M. M. Spiering, C. Zhao, S. J. Benkovic, T. J. Huang，《纳米快报》 **2014年**，*14*，1952。

[78] L. C. Schendel, M. S. Bauer, S. M. Sedlak, H. E. Gaub，《*Small*》 **2020**，*16*，1906740。[79] S. Patra, J.-B. Claude, J.-V. Naubron, J. Wenger，《核酸研究》 **2021**，*49*，12348。

[80] M. P. Goldschen-Ohm, D. S. White, V. A. Klenchin, B. Chanda, R. H. Goldsmith，《应用化学》**2017**，*129*，2439。

[81] J. Wenger, F. Conchonaud, J. Dintinger, L. Wawrezinieck, T. W. Ebbesen, H. Rigneault, D. Marguet, P.-F. Lenne，*Biophys. J.* **2007**，*92*，913。

[82] C. V. Kelly、D. L. Wakefield、D. A. Holowka、H. G. Craighead、B. A. Baird，*ACS Nano* **2014年**，*8*，7392。[83] J. M. Chandler、H. Xu，*AIP Advances* **2021**，*11*，065112。

[84] R. Regmi、P. M. Winkler、V. Flauraud、K. J. E. Borgman、C. Manzo、J. Brugger、H. Rigneault、J. Wenger、M. F. García-Parajo，《纳米快报》 **2017**，*17*，6295。

[85] P. M. Winkler, R. Regmi, V. Flauraud, J. Brugger, H. Rigneault, J. Wenger, M. F. García-Parajo, 《物理化学快报》 **2018**, *9*, 110.

[86] P. M. Winkler, R. Regmi, V. Flauraud, J. Brugger, H. Rigneault, J. Wenger, M. F. García-Parajo, ACS Nano 2017, 11, 7241.[87] M. Baibakov, S. Patra, J.-B. Claude, A. Moreau, J. Lumeau, J. Wenger, ACS Nano 2019, 13, 8469.[88] J. Widengren, P. Schwille, J. Phys. Chem. A 2000, 104, 6416.[89] M. Levitus, S. Ranjit, Q. Rev. Biophys. 2011, 44, 123.[90] C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel, ChemPhysChem 2005, 6, 791.[91] D. R. Lide, CRC《化学与物理手册》, 第85版, CRC出版社, 2004.[92] M. Fränzl, F. Cichos, 《自然·通讯》2022, 13, 656.[93] Q. Jiang, B. Rogez, J.-B. Claude, G. Baffou, J. Wenger, ACS Photonics 2019, 6, 1763.[94] Q. Jiang, B. Rogez, J.-B. Claude, A. Moreau, J. Lumeau, G. Baffou, J. Wenger, Nanoscale 2020, 12, 2524.[95] K. Wang, E. Schonbrun, P. Steinvurzel, K. B. Crozier, 《自然·通讯》2011, 2, 469.[96] M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. deMello, J. B. Edel, 《分析化学》2008, 80, 7063.[97] J. Strömqvist, L. Nardo, O. Broekmans, J. Kohn, M. Lamperti, A. Santamato, M. Shalaby, G. Sharma, P. Di Trapani, M. Bondani, R. Rigler, Eur. Phys. J. Spec. Top. 2011, 199, 181.[98] A. Tcherniak, C. Reznik, S. Link, C. F. Landes, 《分析化学》2009, 81, 746.[99] U. Piran, W. J. Riordan, J. Immunol. Methods 1990, 133, 141.[100] L. Deng, E. N. Kitova, J. S. Klassen, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2013, 24, 49.[101] A. Chilkoti, P. S. Stayton, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 10622.[102] P. Roy, C. Badie, J.-B. Claude, A. Barulin, A. Moreau, J. Lumeau, M. Abbarchi, L. Santinacci, J. Wenger, ACS Appl. Nano Mater. 2021, 4, 7199.[103] K. M. McPeak, S. V. Jayanti, S. J. P. Kress, S. Meyer, S. Iotti, A. Rossinelli, D. J. Norris, ACS Photonics 2015, 2, 326.[104] J. Yang, J.-P. Hugonin, P. Lalanne, ACS Photonics 2016, 3, 395.[105] S. Patra, M. Baibakov, J.-B. Claude, J. Wenger, Sci. Rep. 2020, 10, 5235.[106] W. Schrimpf, A. Barth, J. Hendrix, D. C. Lamb, Biophys. J. 2018, 114, 1518.

补充信息

利用等离激元纳米天线实现高时间分辨率的单分子荧光使用等离激元纳米天线的技术

Sunny Tiwari，[1] Prithu Roy，[1] Jean-Benoît Claude，[1] Jérôme Wenger[1,*1] 艾克斯-马赛大学、法国国家科学研究中心、马赛中央理工学院、菲涅耳研究所、*AMUTech*，*13013* 马赛，法国 * 通讯作者：*jerome.wenger@fresnel.fr*

目录：

S1. 常见荧光染料的辐射速率常数比较 S2. 使用聚焦离子束制备喇叭天线 S3. 单分子计数率随微反射器锥角的变化 S4. 喇叭天线不会改变孔径中的近场增强 S5. 使用喇叭天线在窄角度范围内重新定向最大发射 S6. 共聚焦、零模波导和喇叭天线中的荧光相关光谱时间轨迹与相关函数 S7. 随着入射激光功率增加，喇叭天线、零模波导和共聚焦配置中提取的分子数及扩散时间的变化 S8. 喇叭天线和零模波导中的背景测量 S9. 不同结构之间的统计离散度 S10. 使用 0.65 数值孔径空气物镜获得更大的收集增益 S11. 喇叭天线和零模波导中的温度测量 S12. Alexa Fluor 647 的暗态跃迁速率常数随温度的变化 S13. 喇叭天线中 Alexa Fluor 546 染料增强的荧光亮度 S14. 与突发分析对应的荧光相关光谱数据 S15. 使用喇叭天线获得高亮度和每次突发光子计数 S16. 以微秒分箱时间可视化零模波导中的单分子突发 S17. 生物素-链霉亲和素缔合速率计算 S18. 不同链霉亲和素浓度下生物素-链霉亲和素缔合速率的额外测量

S1. 常见荧光染料辐射速率常数的比较

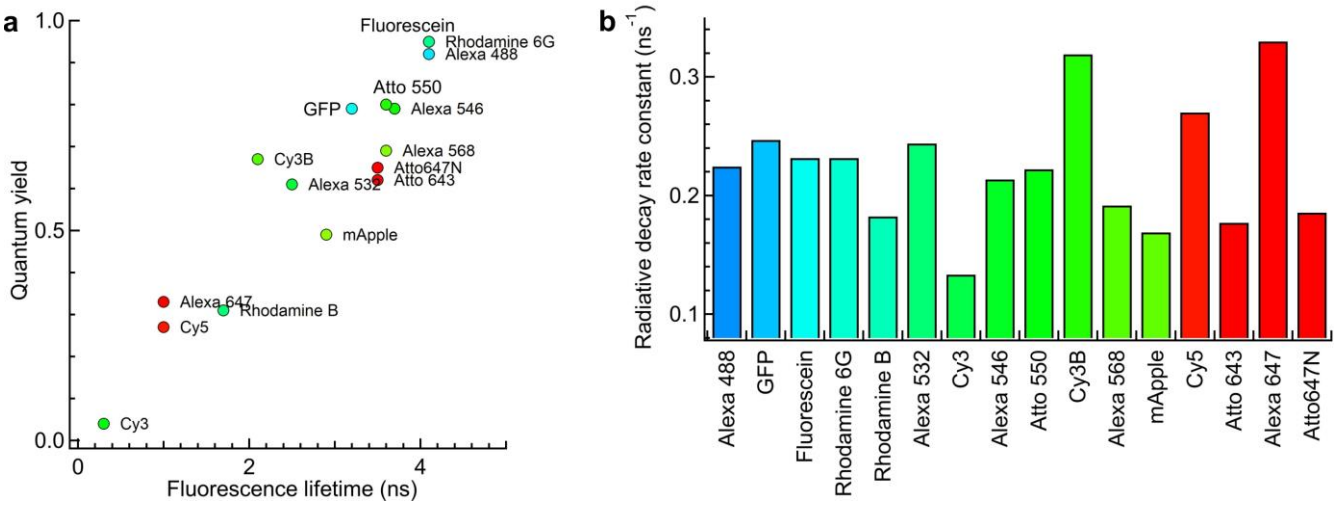


图 S1. Alexa 647 是辐射衰减速率常数k_R最高的荧光染料之一。(a) 常见荧光染料的量子产率 ϕ 与荧光寿命 τ 的散点图。使用这些数值计算辐射速率常数$k_R = \phi * k_{TOT} = \phi/\tau$，结果显示于 (b) 中。

S2. 使用聚焦离子束制备喇叭天线

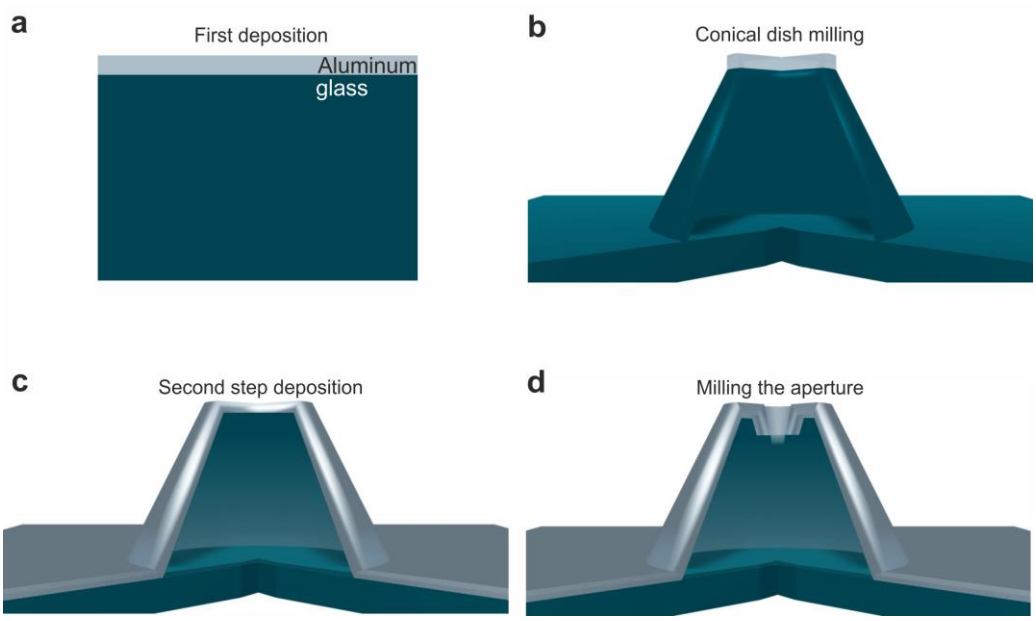


图 S2。 步骤 a）将厚度为 150 μm 的玻璃盖玻片进行等离子清洗，用作基底。在该玻璃基底上沉积一层 100 nm 厚的铝层，作为导电层。步骤 b）使用镓离子源，通过聚焦离子束（FIB）铣削喇叭天线，其上平台直径为 1 μm，下底座直径为 2–3 μm（取决于反射臂的角度）。步骤 c）在该喇叭天线上再沉积一层 100 nm 厚的铝层，使反射器壁面具有反射性。步骤 d）在喇叭天线上平台的中心铣削一个直径为 120 nm 的纳米孔。最后，在顶部沉积一层 12 nm 厚的 SiO_2 层，以保护铝层免受腐蚀，并帮助实现表面钝化。

S3. 分子亮度随微反射器锥角的变化

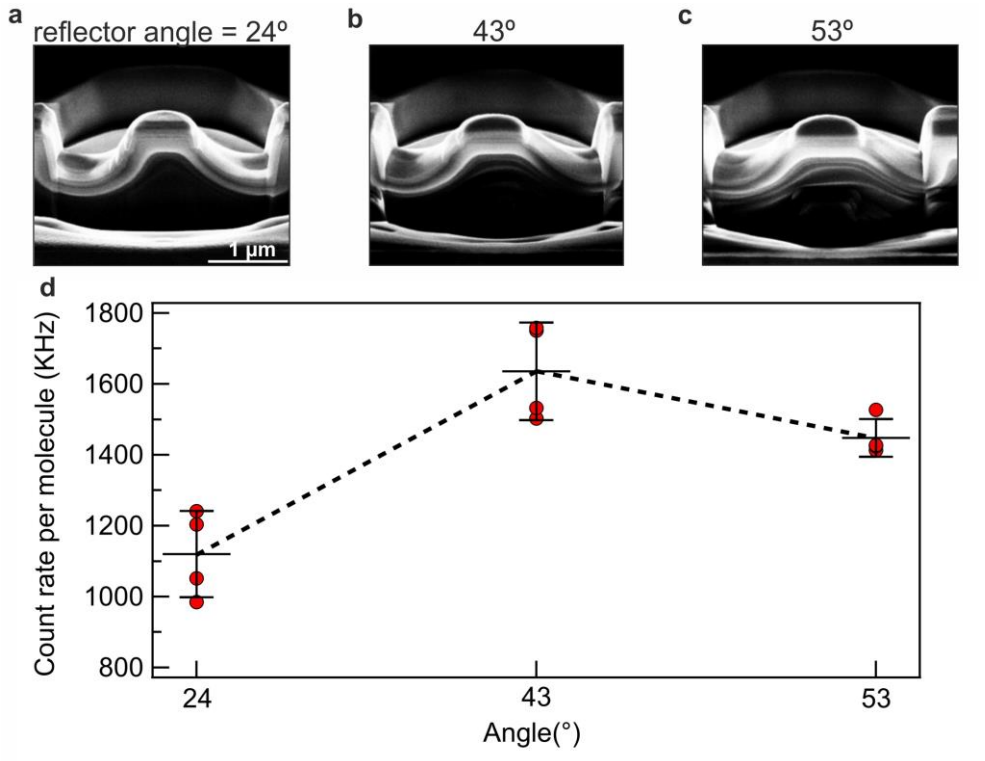


图 S3： 单分子计数率随微反射器锥角变化而变化。(a-c) 臂角分别为 24°、43° 和 53° 的喇叭天线扫描电子显微镜图像。(d) Alexa 647 染料在浓度为 60纳摩尔时，输入功率为 200 µW 对应的单分子计数率。实验中使用臂角为 43° 的喇叭天线，因为喇叭天线的臂角增大或减小都会使亮度降低。拍摄这些具有代表性的扫描电子显微镜图像时，样品倾斜了 52°。这些具有代表性的扫描电子显微镜图像中未铣刻孔径。文献 [1] 对紫外染料三联苯的反射器角度影响进行了完整表征。这里展示的结果支持紫外系统的研究发现，并证实约 40° ± 5° 的反射器角度接近最优。

S4. 喇叭天线不会改变孔径内的近场强度增强

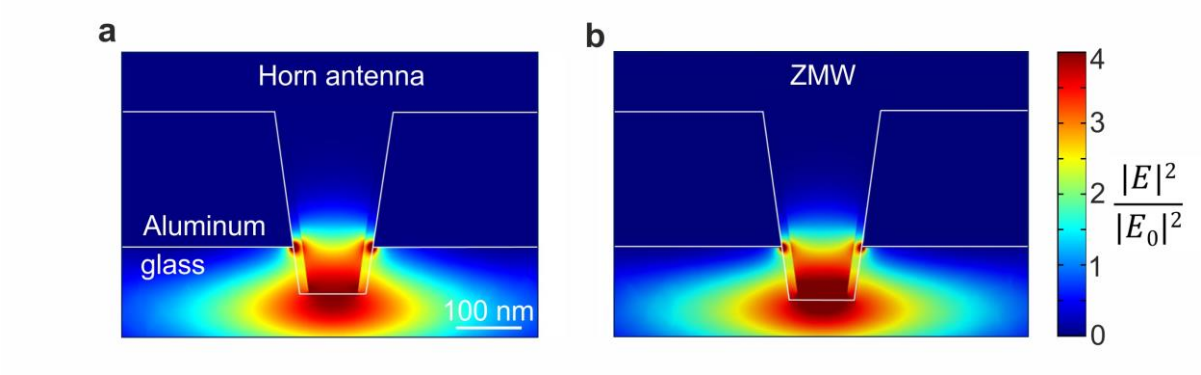


图 S4。喇叭天线和 ZMW 纳米孔径（无反射锥形结构）中的电场强度增强。在喇叭天线（a）和 ZMW（b）中观察到相近的强度增强值，表明微反射器结构不会改变局部近场增强。喇叭天线和 ZMW 均从底部（玻璃）侧使用波长为 633纳米的高斯光源激发。

S5. 使用喇叭天线在窄角度范围内引导最大发射

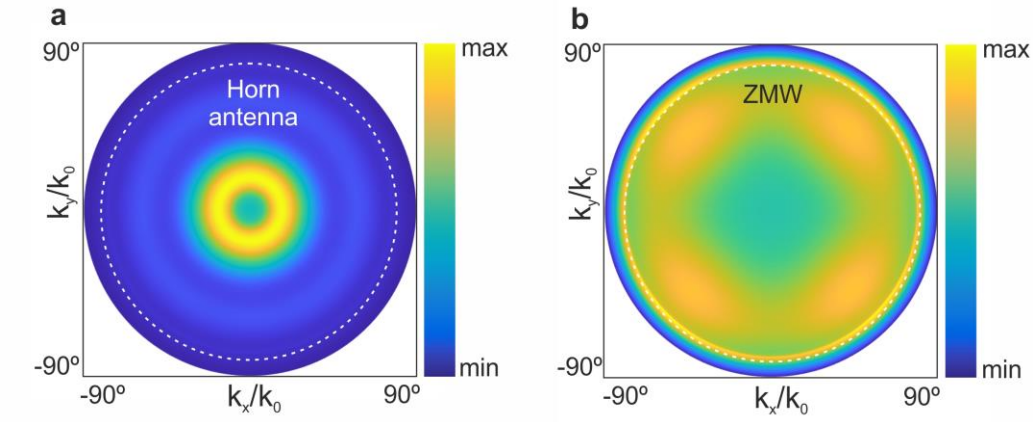


图 S5。置于喇叭天线（a）和 ZMW（b）中的振荡偶极子的发射的傅里叶平面图像计算结果。从喇叭天线出耦的发射集中在窄角度范围内，这一点可从计算得到的傅里叶平面图像中的限制现象看出。傅里叶平面图像通过非相干叠加分别置于喇叭天线和 ZMW 中心、取向为 x、y 和 z 的各个单独偶极子的发射辐射图样计算得到。振荡波长设定为 670纳米，接近实验中所用 Alexa 647 染料的发射峰值。白色虚线圆表示水-玻璃临界角。

S6. 共聚焦、零模波导和喇叭天线中的荧光相关光谱时间轨迹及相关函数 a

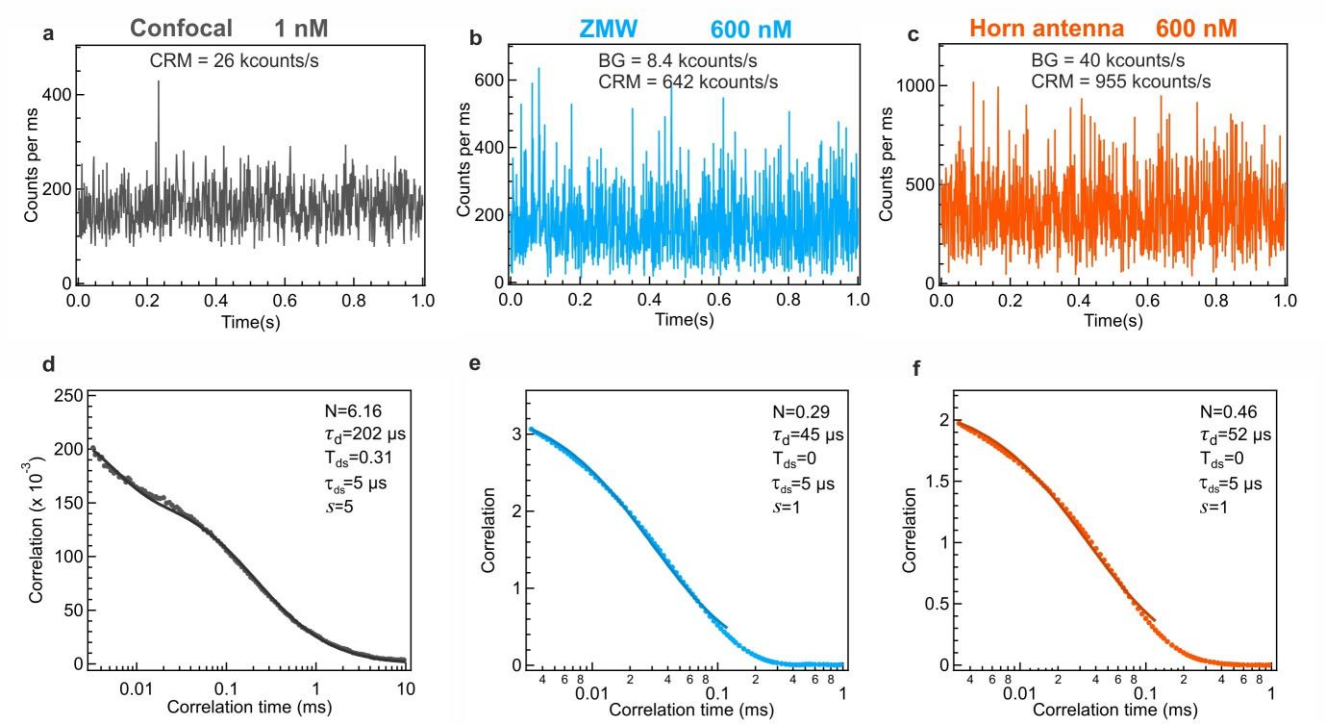


图 S6： 共聚焦配置、零模波导和喇叭天线中 Alexa 647 分子的荧光相关光谱。共聚焦配置、零模波导和喇叭天线中的荧光强度时间轨迹（a-c）及相应的荧光相关光谱相关函数（d-f）。虚线为实验获得的荧光相关光谱相关振幅，实线则是根据方法部分所述的方程 1，对三维布朗运动并加入闪烁项进行数值拟合所得。共聚焦配置中的 Alexa 647 分子浓度为 1 nM，喇叭天线和零模波导中的浓度为 600 nM。三种配置下，633 nm 激光器的输入功率均保持在 50 μW。

S7. 随着入射激光功率增加，喇叭天线、零模波导和共聚焦配置中提取的分子数与扩散时间的变化

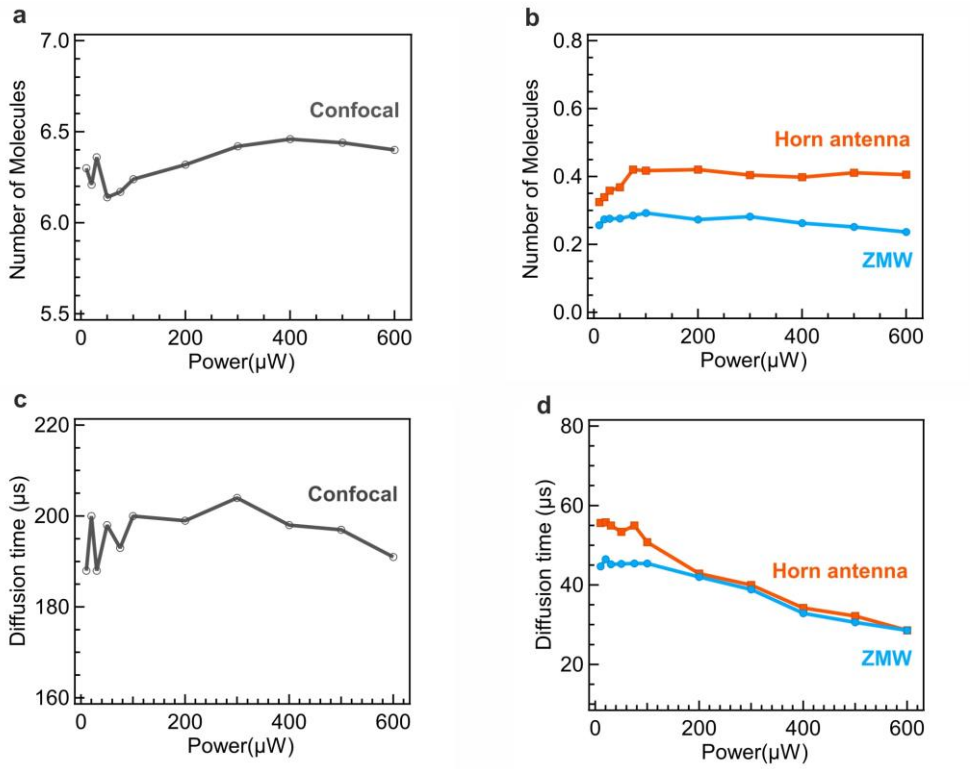


图 S7：喇叭天线、零模波导和共聚焦配置中，提取的分子数 (a、b) 和扩散时间 (c、d) 随入射激光功率的变化。共聚焦配置、喇叭天线和零模波导中的分子数仅有轻微变化，而随着激光功率增加，分子在喇叭天线和零模波导中的扩散速度明显加快；这可能是因为周围温度升高，进而影响水的黏度并产生热流。

S8. 喇叭天线和零模波导中的背景测量

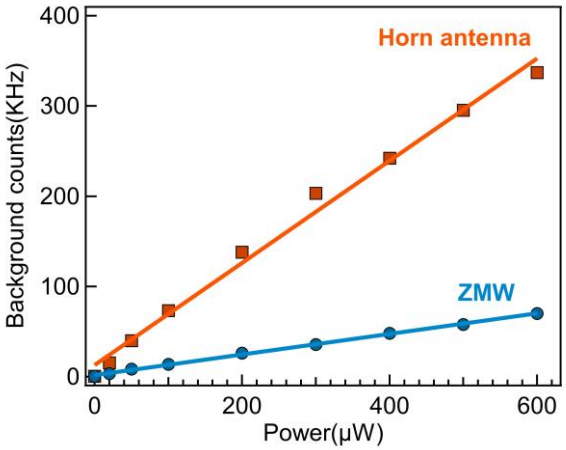


图 S8： 喇叭天线和零模波导的背景强度随 633 nm 激光功率的变化。与零模波导相比，喇叭天线中的背景发射更强。这一较高的背景部分是由于喇叭天线能够更有效地收集来自基底的背景发光。背景较高的另一个原因与微反射器的 FIB 铣削有关，该过程会产生更多发光氧化镓污染。[2]

S9. 不同结构之间的统计离散度

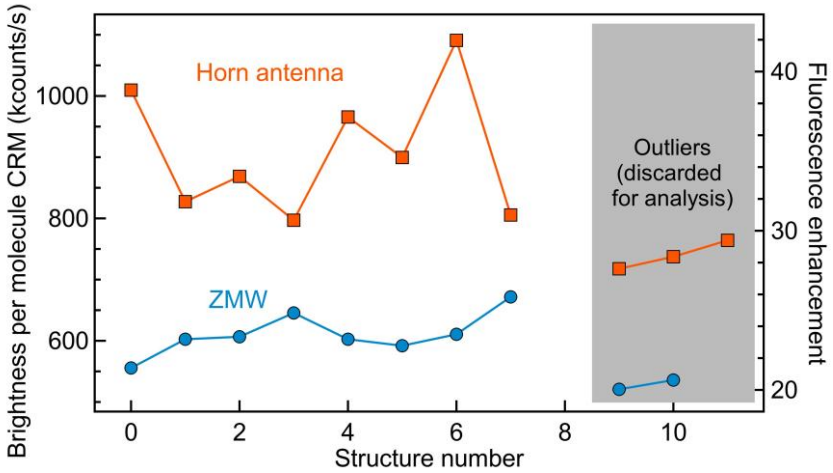


图 S9： 在 50 μW 激发功率下，测得不同喇叭天线和零模波导中 Alexa Fluor 647 的每分子荧光亮度。对于部分结构（阴影区域所示），我们发现其亮度比平均值低约 20%。对于这些结构，聚焦离子束铣削过程可能因铣削参数（离子束电流、局部束流畸变、铝膜上的局部缺陷、机械振动等）发生不可控变化而在局部效率较低（或效率不高）。这些结构未纳入分析。

S10. 使用数值孔径为 0.65 的空气物镜获得更大的收集增益

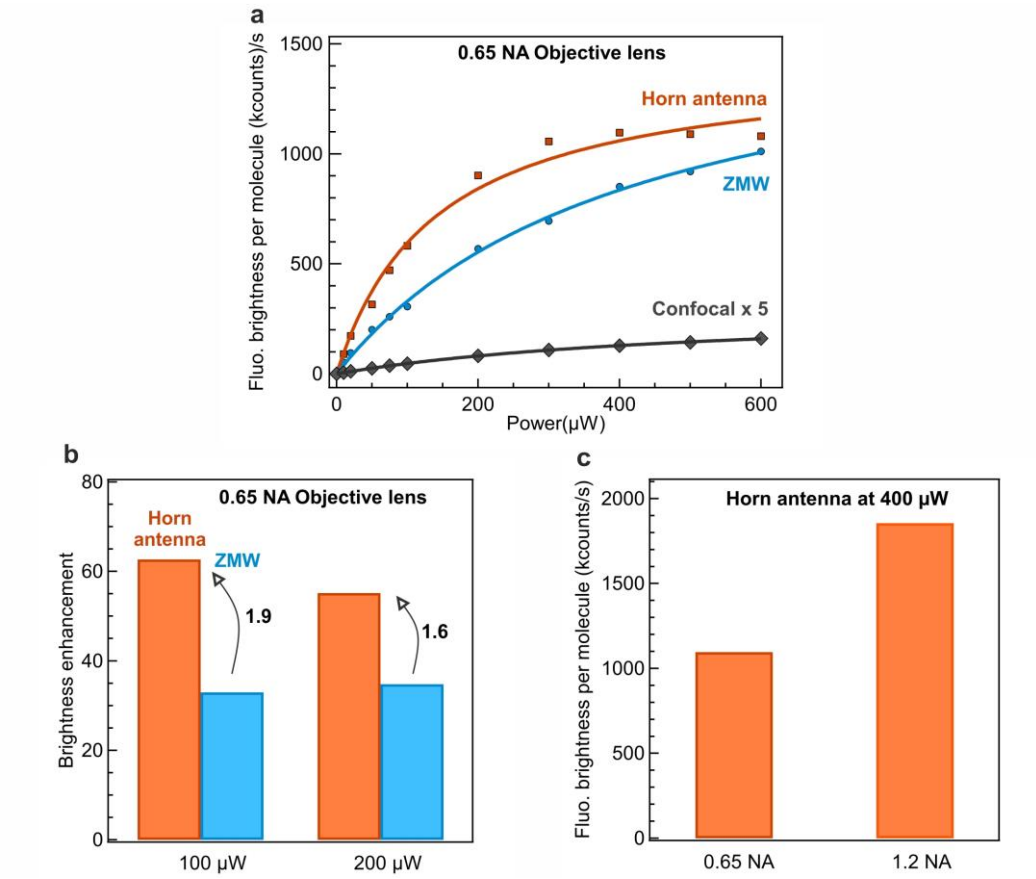


图 S10： 使用较低数值孔径（0.65 数值孔径空气）的物镜获得更大的收集增益。(a) 使用数值孔径为 0.65 的空气物镜时，喇叭天线中的 Alexa 647 染料每分子荧光亮度随输入功率的变化，并与零模波导和共聚焦参考进行比较。即使使用低数值孔径物镜，也能实现显著增强，因为喇叭天线会将大部分发射重新导向窄角度，即使使用低数值孔径镜头也能高效收集。(b) 柱状图显示在 100 和 200 μW 下，使用数值孔径为 0.65 的空气物镜时，喇叭天线和零模波导相对于共聚焦参考所实现的亮度增强。共聚焦配置中 PBS 缓冲液内 Alexa 647 分子的浓度为 1 nM，喇叭天线和零模波导中的浓度为 600 nM。

S11. 喇叭天线和零模波导中的温度测量

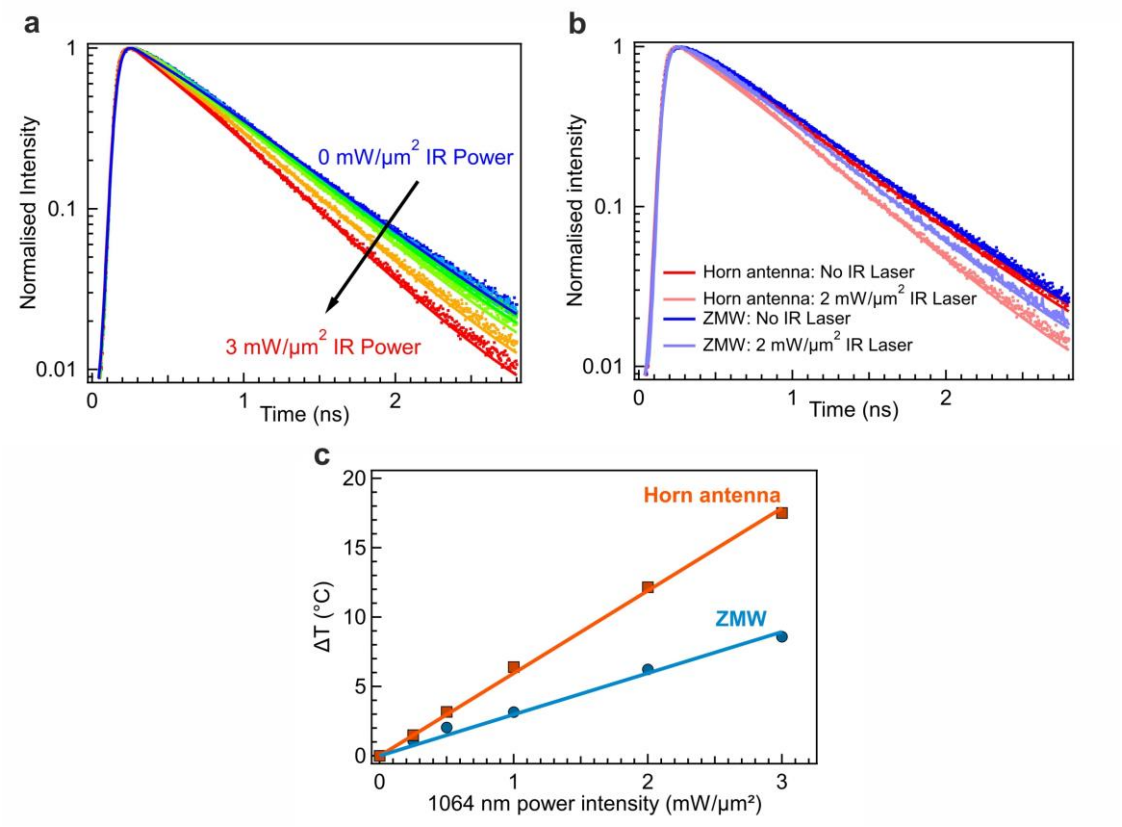


图 S11： 喇叭天线和零模波导中的温度测量。(a) 六种不同红外功率强度（0、0.25、0.50、1.0、2.0 和 3.0 mW/μm²：从右上到左下）下，喇叭天线中 Alexa 647 染料的归一化荧光衰减曲线。(b) 在 2 mW/μm² 的红外（1064 nm）激光激发下及无红外激光激发时，喇叭天线和零模波导内部 Alexa 647 染料的归一化荧光衰减曲线。如前文在文献[3,4]中所讨论，由于局部温度较高，Alexa 647 的荧光寿命会随红外激光照射而缩短。(c) 按照下文概述的步骤估算的喇叭天线和零模波导的温度增量，作为 1064 nm 激光功率强度的函数。所用 Alexa 647 染料的浓度为 300 nM。635 nm 脉冲激光器的输入功率保持恒定为 15 μW/μm²，同时红外激光器的功率从 0 变化至 3 mW/μm²。

为测量光学喇叭天线内部的温度变化，我们采用了近期开发的技术，通过利用 Alexa 647 染料的荧光寿命随温度变化而产生的变化，来测量零模波导中的温度变化。下面我们简要讨论该技术的基本原理，详细方法见参考文献[3]。荧光

分子的寿命与发射的辐射衰减速率和非辐射衰减速率的关系如下：

$$\frac{1}{\tau} = k_R + k_{NR}(T)$$

其中，k_R 是辐射衰减速率常数，假设其与温度无关（已在 [3] 所研究的温度范围内得到验证）。然而，k_{NR}，即非辐射衰减速率常数，会随温度变化而改变，进而导致分子的寿命发生变化。荧光寿命的这一变化可以通过改变周围环境的温度进行校准。对于室温下量子产率为 33% 的 Alexa 647 分子，温度变化（ΔT）与非辐射衰减速率的变化（k_{NR}）之间的关系如下：

$$\Delta T = 91.31 - 91.22 \times \left(\frac{k_{NR}(21^0C)}{k_{NR}(T)}\right)^{0.42}$$

其中，$k_{NR}(21°C)$ 是室温下的非辐射衰减速率。这种温度依赖关系已在文献 [3] 中完成校准，并通过另外两种基于荧光强度和荧光相关光谱扩散时间的方法得到确认。

在存在喇叭天线的情况下，由于珀塞尔增强导致辐射衰减速率发生变化，以及附近金属的存在引入了新的衰减通道，Alexa 染料的寿命会发生改变。在对光学喇叭天线进行激光激发时，由于喇叭天线受到激光加热，周围环境的温度发生变化，非辐射衰减速率也会随之改变。除辐射衰减速率外，发射与金属耦合所造成的损耗也不受温度变化的影响。因此，方程 1 变为

$$\frac{1}{\tau_{T^*}} = k_R^* + k_{loss}^* + k_{NR}^*(T)$$

其中 k^*_{loss} 表示由于发射与金属耦合而导致的发射猝灭。提高喇叭天线周围环境的温度会缩短 Alexa 647 荧光发射的寿命，因此光学喇叭天线内的归一化衰减速率变为：

$$\frac{k_{NR}(T)}{k_{NR}\,(21^0C)} = 1 + \frac{1}{k_{NR}(21^0C)}\left(\frac{1}{\tau_{T^*}} - \frac{1}{\tau_{21^0C^*}}\right)$$

所使用的 Alexa 647 分子的量子产率为 33%，寿命为 1 ns，由此得到 0.67 ns^{-1} 作为$k_{NR}(21°C)$的值。最后，我们得到如下用于计算光学喇叭天线周围温度变化的方程：

$$\Delta T = 91.31 - 91.22 \times \left[1 + \frac{1}{0.67}\left(\frac{1}{\tau_{T^*}} - \frac{1}{\tau_{21^0C^*}}\right)\right]^{-0.42}$$

为提取 633 nm 激光激发时喇叭天线的温度变化，我们首先提取喇叭天线温度随 1064 nm 红外激光变化的情况。在喇叭天线中，铝金属对光的吸收是加热效应的主要来源。我们利用铝在 1064 nm 和 633 nm 激光下的吸光度之比，推算 633 nm 激发时喇叭天线的温度增量。铝在 633 nm 和 1064 nm 下的复折射率取自参考文献[5,6]

所有荧光衰减直方图均使用*Picoquant SymPhoTime 64*软件，通过 Levenberg-Marquard 优化进行拟合。拟合采用迭代再卷积方法，并将仪器响应函数纳入考量。我们使用双指数函数拟合衰减曲线，其中较短的寿命对应于耦合至金属所导致的损失，较大的寿命参数则对应于温度变化引起的荧光寿命变化。温度测量在一台倒置显微镜上进行，该显微镜配备两束重叠光束，分别为波长 635 nm 的脉冲激光（*Picoquant* LDH-P-635，重复频率为 80 MHz）和 1064 nm 红外激光（*Ventus* 1064-2W）。使用高数值孔径油浸物镜（40x，数值孔径 1.3，*Zeiss Plan-Neofluar*）将两束激光聚焦到样品上。测得的 635 nm 和 1064 nm 激光光斑尺寸分别为 0.6 µm 和 1.0 µm。使用功率为 15 µW 的低功率 635 nm 脉冲激光激发 Alexa 647 荧光，以同时避免红色激光加热喇叭天线，并避免 Alexa 分子发生光漂白和饱和。此外，溶液中的扩散分子也能持续补充新的荧光分子，从而进一步降低光漂白和饱和效应发生的可能性。红外激光的功率在 0 至 3 mW/μm^2 之间调节，以加热喇叭天线和零模波导。未观察到喇叭天线或零模波导有任何损坏迹象（通过测量红外激光照射前后的荧光信号予以确认）。

使用磷酸盐缓冲盐水溶液中的 300 nM Alexa 647 分子，探究荧光和寿命随红外激光功率的变化。采用落射荧光配置激发这些分子的荧光。发射信号经 50 µm 针孔进行空间滤波后，传送至两个雪崩光电二极管（*Picoquant MPD-5CTC*）进行记录。随后，信号由时间相关单光子计数系统

（*Picoquant Picoharp300*）采集，该系统配备时间标记时间分辨（TTTR）选项，总时间分辨率（仪器响应函数的半高全宽）为 100 ps。

S12. Alexa Fluor 647 的暗态跃迁速率常数与温度的关系

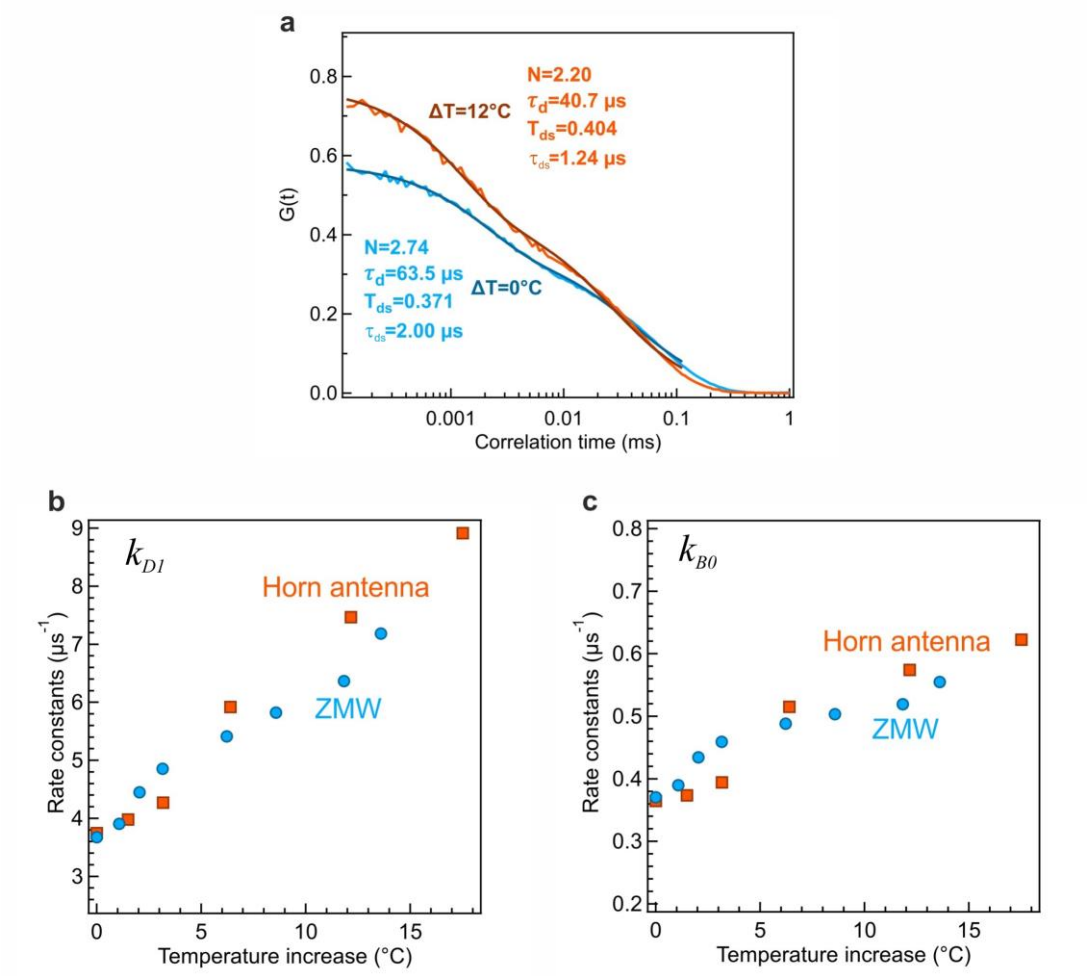


图 S12：Alexa Fluor 647 染料在喇叭天线和零模波导中，跃迁速率常数 k_{D1} 和 k_{B0} 在暗态之间随温升的变化。(a) 室温和温度升高 12°C 时（通过额外的 1064 nm 激光设定，如 S11 节所述），喇叭天线中 Alexa 647 染料的 FCS 相关曲线及数值拟合。使用两个雪崩光电二极管并结合荧光寿命相关光谱（FLCS）背景校正，可消除后脉冲的影响，从而准确获取微秒动力学信息。额外的红外激光可精确控制局部温度，同时测量温度对 k_{D1} 和 k_{B0}的影响。(b、c) 根据喇叭天线和零模波导中的荧光相关光谱测量结果，推导出的暗态跃迁 k_{D1} 和 k_{B0} 速率常数随温度增量的变化。

为通过实验确定 k_{D1} 和 k_{B0}，我们使用相关函数中快速闪烁项的荧光相关光谱拟合结果 T_{ds} 和 τ_{ds} （正文中的式（3））。图S11中的实验旨在测量 k_{D1} 和 k_{B0} 随温度的变化。为此，我们使用辅助红外激光器控制局部温度（如图S11的实验所用，且在[3]中有所描述）。在 635 nm 波长下以 15 μW 功率激发 Alexa 647 时，激发保持在线性区，远低于饱和状态，从而清楚地区分局部温度的影响。在这种条件下，荧光相关光谱量 T_{ds} 和 τ_{ds} 与衰减速率常数的关系为：[7,8]

$$T_{ds} = \frac{k_{D1}}{k_{B0}} \frac{k_{EX}}{k_R + k_{NR}}$$

$$\frac{1}{\tau_{\mathrm{ds}}} = k_{B0} + k_{D1} \frac{k_{EX}}{k_R + k_{NR}}$$

This 这组方程可求解，得到 k_{D1} 和 k_{B0} 与可测量量之间的关系 s:

$$k_{D1} = \frac{T_{ds}}{1 + T_{ds}} \frac{k_R + k_{NR}}{k_{EX}} \frac{1}{\tau_{\mathrm{ds}}}$$

$$k_{B0} = \frac{1}{1 + T_{ds}} \frac{1}{\tau_{\mathrm{ds}}}$$

对于激发速率，我们采用 15 μW 的平均功率，相当于 1.45e22 photons/s/cm^2 的光子强度。结合 Alexa 647 的吸收截面 σ = 1e-15 cm^2 以及 4 倍局部强度增强（图S4），可得激发速率 k_{EX} 为 0.06 ns^{-1}。总和 $k_R + k_{NR}$ 相当于纳米孔径中的总衰减速率常数；对于图S12中的实验，该值取为 600 ps 荧光寿命的倒数。

S13. 喇叭天线中 Alexa 546 染料的增强荧光亮度

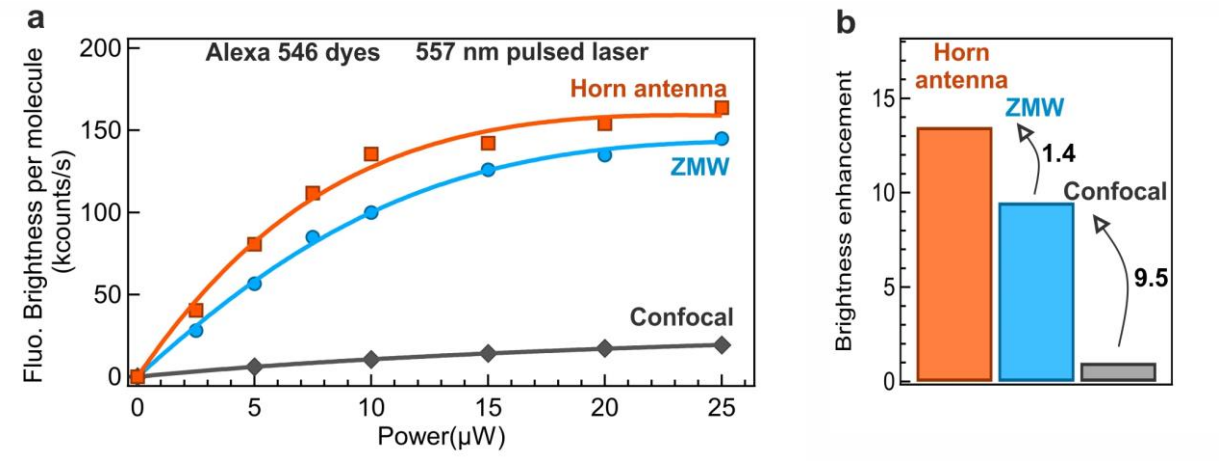


图 S13： 喇叭天线中 Alexa Fluor 546 染料的每分子增强荧光亮度。(a) 在波长为 557 nm 的入射激光功率下，喇叭天线、零模波导和共聚焦配置中每分子荧光亮度的变化。(b) 柱状图显示，在激光功率为 10 μW 时，与零模波导和共聚焦配置相比，喇叭天线中的每分子荧光亮度具有更大的增强。喇叭天线和零模波导中 Alexa 546 染料的浓度为 200 nM，而共聚焦配置中为 1 nM。关于实验装置的完整细节请参见文献 Ref.[9] 此处，Alexa 546 染料标记在一个 51碱基对双链DNA分子上。

S14. 与突发分析相对应的荧光相关光谱数据

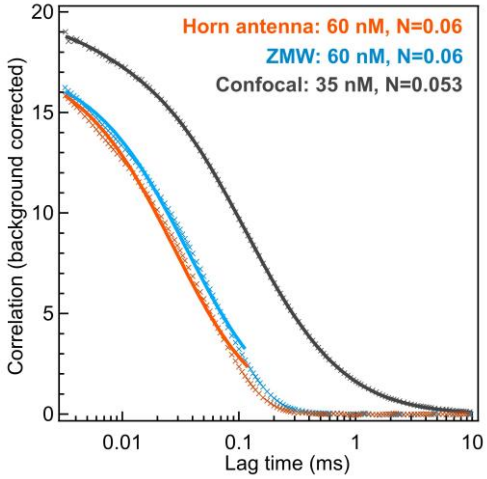


图 S14：背景校正后的荧光相关光谱振幅 $G/\left(1-\frac{B}{F}\right)^2$ 喇叭天线、零模波导和共聚焦配置中的 Alexa 647 染料。提取的分子数为：共聚焦配置下为 ~0.05，喇叭天线和零模波导下为 0.06。喇叭天线中使用的 Alexa 647 染料浓度为 60纳摩尔，共聚焦参考中的浓度为 35 皮摩尔。在这三种配置中，相关函数均根据背景进行了归一化，因此得到的分子数大致相同。633 nm 激光器的输入功率为 200 μW。

S15. 使用喇叭天线实现高亮度和每次突发的光子计数

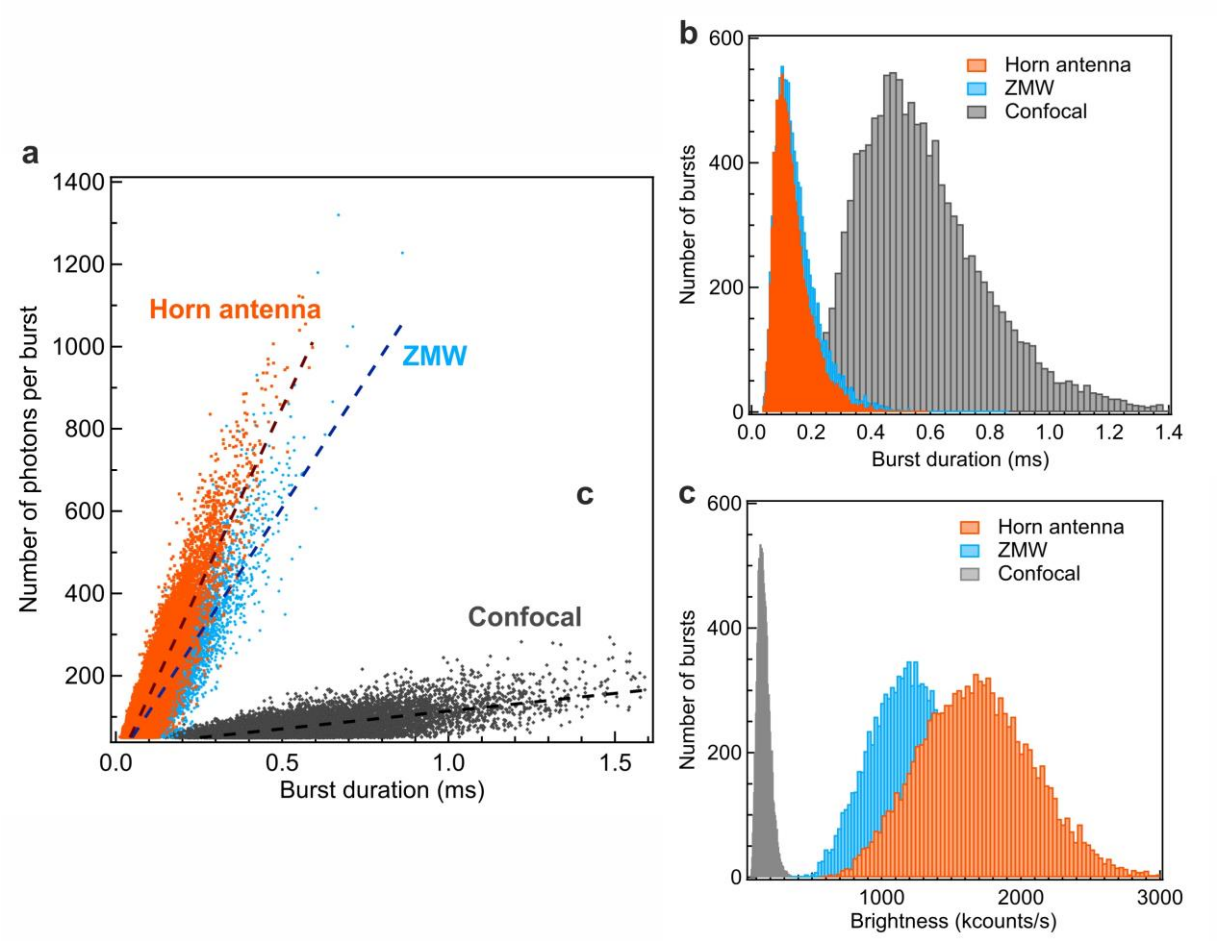


图 S15： (a) 突发积分强度随突发持续时间变化的散点图，对比喇叭天线、零模波导和共聚焦参考。每个点代表检测到的一次荧光突发。与衍射极限共聚焦配置相比，喇叭天线和零模波导中的突发持续时间较短，这是体积缩小所致。(b) 突发持续时间的直方图显示，与突发持续时间较长的共聚焦参考相比，喇叭天线和零模波导中持续时间较短的突发数量更多。(c) 各次突发的荧光亮度直方图显示，喇叭天线中亮度极高（达到 200 万计数/秒）的突发数量更多，其亮度超过了零模波导和共聚焦配置所达到的水平。

S16. 在微秒分箱时间下对零模波导中的单分子突发进行可视化

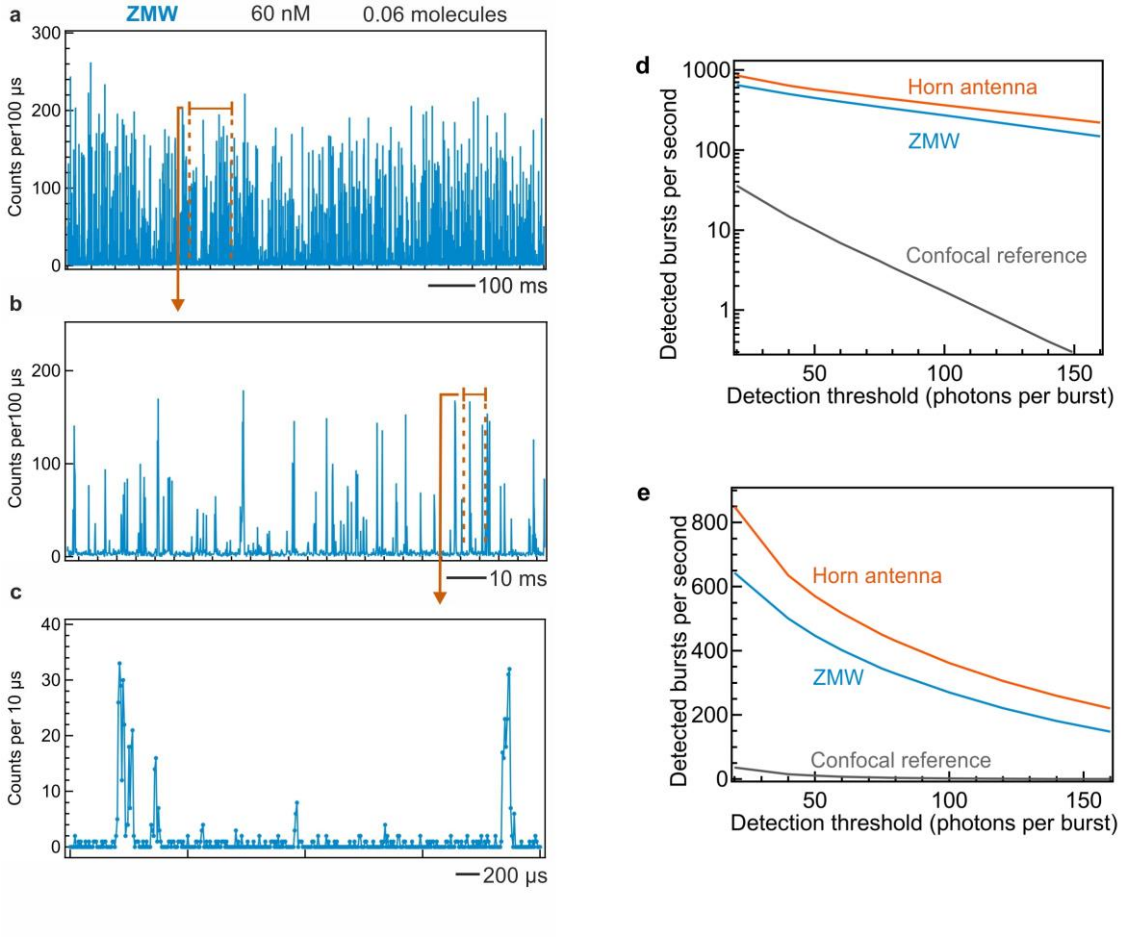


图 S16：(a) 在100微秒分箱时间下，零模波导中 Alexa 647 染料的荧光时间轨迹。(b) (a)中虚线矩形区域的放大时间轨迹。(c) (b)所示矩形区域在10微秒分箱时间下的时间轨迹，显示出清晰分辨的单分子突发。所用 PBS 溶液中 Alexa 647 染料的浓度为60纳摩尔，对应于零模波导中平均0.06个分子。所用 633 nm 激光器的输入功率为200 µW。(d,e) 检测到的每秒探测突发信号数随检测阈值的变化关系，将零模波导数据添加至图 3h，以便于对喇叭天线、零模波导和共聚焦参考进行比较。两幅图(d,e)显示相同的数据，(d)采用对数纵轴，而(e)采用线性尺度。喇叭天线使零模波导的数值提高了约30%。

S17. 生物素-链霉亲和素缔合速率计算

我们研究如下形式的结合与解离反应动力学：$S + B \rightleftarrows SB$ 其中，S 表示游离链霉亲和素，B 表示游离生物素，SB 表示复合物。在本例中，生物素浓度是限制因素，始终远低于链霉亲和素浓度。因此，我们可以放心地假设每个链霉亲和素仅结合一个生物素。这样便无需考虑单个链霉亲和素上有 4 个生物素结合位点这一事实。出于相同原因，此处不考虑协同性。

形成复合物的缔合速率常数记为 k_1 ，而解离速率常数记为k_{-1}。时间原点 t=0 设定为将链霉亲和素加入生物素溶液的时刻。可以列出一组微分方程来研究反应动力学：

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_1[S][B] + k_{-1}([B_{tot}] - [B])$$

$$\frac{d[SB]}{dt} = k_1[S][B_{tot}] - (k_1[S] + k_{-1})[SB]$$

其中，总生物素浓度 $[B_{tot}] = [B](t) + [SB](t)$为常数。以 $[B](0) = [B_{tot}]$ 和 $[SB](0) = 0$为边界条件，可以求解这组微分方程。游离生物素比例为：

$$\frac{[B](t)}{[B_{tot}]} = e^{-(k_1[S]+k_{-1})t} + \frac{k_{-1}}{k_1[S] + k_{-1}}\left(1 - e^{-(k_1[S]+k_{-1})t}\right)$$

右侧的第二项是一个很小的偏移修正；如果解离k_{-1} 远低于结合$k_1[S]$ ，便可轻松忽略，因此整体上就是指数衰减。

结合态生物素比例为：

$$\frac{[SB](t)}{[B_{tot}]} = \frac{k_1[S]}{k_1[S] + k_{-1}}\left(1 - e^{-(k_1[S]+k_{-1})t}\right)$$

游离态和结合态生物素比例均遵循指数时间演化$e^{-t/\tau}$ ，其特征时间为 $\tau = 1/(k_1[S] + k_{-1})$。实验中，我们根据扩散时间的差异，通过荧光相关光谱测定分别对应游离态和结合态生物素的相关振幅ρ_1 和ρ_2 。由这些比值可得游离态和结合态生物素的比例：

$$\frac{\rho_1}{\rho_1+\rho_2} = \frac{[B](t)}{[B_{tot}]} \quad \text{and} \quad \frac{\rho_2}{\rho_1+\rho_2} = \frac{[SB](t)}{[B_{tot}]}$$

用指数函数拟合这些比值，可得速率常数$k_1[S] + k_{-1}$。在20°C时，链霉亲和素-生物素的解离速率常数k_{-1} 为2e-6 s^{-1} [10] ，因此可以轻松忽略这一项。

S18. 不同链霉亲和素浓度下生物素-链霉亲和素结合的补充测量

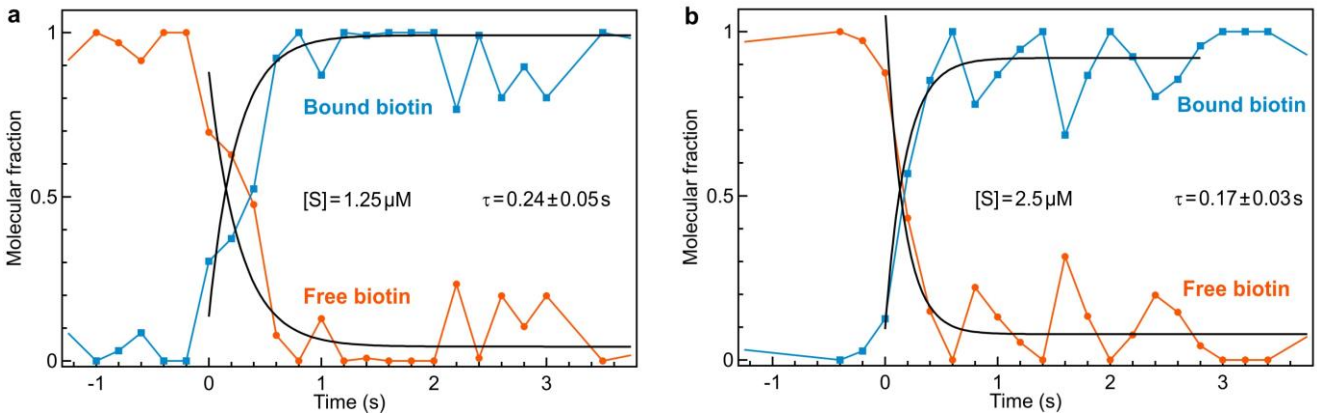


图 S17： 特征时间随所用链霉亲和素浓度的变化。在生物素-Atto643 浓度固定为 0.5 μM 时，链霉亲和素浓度为 1.25 μM（2.5 μM）对应的特征时间为 0.24 s（0.17 s）。荧光相关光谱测量的积分时间为 200 ms。使用孔径为 200 nm 的孔径，在 633 nm 激光器的输入功率为 50 μW 时进行测量。所有荧光相关光谱曲线均采用双组分模型拟合，[11] 其中各组分（游离态和结合态）的荧光相关光谱扩散时间固定为图 4a 中 30 s 积分时间下测得的数值。结合态和游离态生物素的分子比例变化按照 S17 节推导的指数演化进行拟合。

补充参考文献

[1] A. Barulin, P. Roy, J.-B. Claude, J. Wenger, 《自然·通讯》 **2022**，*13*，1842。[2] P. Roy, J.-B. Claude, S. Tiwari, A. Barulin, J. Wenger, 《纳米快报》 **2023**，*23*，497–504。[3] Q. Jiang, B. Rogez, J.-B. Claude, G. Baffou, J. Wenger, *ACS Photonics* **2019**，*6*，1763。[4] Q. Jiang, B. Rogez, J.-B. Claude, A. Moreau, J. Lumeau, G. Baffou, J. Wenger, *Nanoscale* **2020**，*12*，2524。

[5] K. M. McPeak, S. V. Jayanti, S. J. P. Kress, S. Meyer, S. Iotti, A. Rossinelli, D. J. Norris, *ACSPhotonics* **2015年**，*2*，326。

[6] M. N. Polyanskiy，折射率数据库，https://refractiveindex.info，访问日期：2019年7月。[7] J. Widengren，R. Rigler，Ü. Mets，*Journal of Fluorescence* **1994**，*4*，255。

[8] J. Wenger，B. Cluzel，J. Dintinger，N. Bonod，A.-L. Fehrembach，E. Popov，P.-F. Lenne，T. W. Ebbesen，H. Rigneault，*Journal of Physical Chemistry C* **2007**，*111*，11469。

[9] M. Baibakov，S. Patra，J.-B. Claude，A. Moreau，J. Lumeau，J. Wenger，*ACS Nano* **2019**，*13*，8469。[10] L. Deng，E. N. Kitova，J. S. Klassen，*J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**，*24*，49。

[11] J. Strömqvist、L. Nardo、O. Broekmans、J. Kohn、M. Lamperti、A. Santamato、M. Shalaby、G Sharma、P. Di Trapani、M. Bondani、R. Rigler，*Eur. Phys. J. Spec. Top.* **2011年**，*199*，181。