

单分子荧光技术与聚合物单链物理性质的研究

王生勤, 贾鹏翔, 陈 锐, 郑中礼, 罗双江, 卢 曦, 李德胜, 赵 江^{*}

(中国科学院化学研究所, 北京 100190)

摘要: 对以荧光关联光谱、荧光光子计数直方图技术、单分子荧光成像、单分子荧光散焦成像等单分子荧光技术为主要研究手段开展的关于聚合物单分子链物理化学性质的研究工作进行了总结与介绍, 重点介绍了本实验室在聚电解质单链构象转变及抗衡离子分布、表界面聚合物单链动态性质、空间受限状态下聚合物单分子链及单分子链段的平动扩散、转动运动的研究工作。研究表明, 单分子荧光技术在研究高分子单链物理化学方面具有很大的潜力, 发展新的技术与方法能够大力促进我们对于高分子体系微观结构与性质的理解与认识。

关键词: 单分子荧光; 高分子单链; 聚电解质; 高分子结晶; 玻璃化转变

引言

鉴于其链状分子的特征, 高分子体系具有与常见的小分子体系截然不同的性质与特点, 在小分子体系中的物理与化学相互作用往往在分子体系得以放大而体现的尤为突出, 而高分子体系中独特的构象熵因素也是赋予其特殊性质的重要因素。因此, 在分子物理的研究中, 基本出发点就是以单根分子链为基础的, 人们关于分子链的理论模型的进步与完善大大地促进了关于高分子结构与性质的认识与理解, 推动了高分子体系在多个领域中的应用^[1]。

然而, 人们关于高分子单链性质的研究仍然是很有限的, 其主要成就来自与高分子链理论的发展与进步, 而从实验角度开展的关于高分子单链的研究却显得相对缺少。关于高分子单链的实验研究不仅仅能够揭示高分子体系的微观性质与行为, 更重要的是, 这样的研究对于人们验证很多关于高分子的基本物理模型具有十分重要的意义, 同时为进一步提出、发展与完善新的物理模型提供直接的实验依据。正是由于关于单根高分子链实验研究具有众所周知的重要性, 人们很早就开始探索相关的实验方法与技术。

在以往的研究中, 人们采用散射方法研究单根聚合物分子链的尺度与结构, 正是散射方法的成功应用, 人们完善了关于聚合物分子链的溶液理论模型^[2]。人们还采用单分子力谱技术探寻单根高分子链的力学性质, 探寻分子链熵弹性的特点^[3]; 采用分子量很大的天然大分子(如 DNA)作为模型体系来研究单根高分子链的动态性质、界面结构与性质等^[4]。

每一种研究手段都有其局限性, 因而, 上述方法也仅能对于部分高分子单链的性质, 或者是高分子的一部分性质开展研究。发展新的研究方法与技术手段, 深入地开展关于高分子单链物理与化学性质的研究无疑是高分子科学研究的重要课题。本论文介绍了以单分子荧光显微技术为手段的高分子物理研究内容, 重点总结了本实验室的研究进展, 同时也对将来的研究方向与内容进行了展望。

1 荧光涨落光谱与溶液、界面聚合物单链结构及动态性质的研究

近年来, 随着单分子探测技术的不断发展, 荧光涨落光谱(Fluorescence Fluctuation Spectroscopy, FFS)已经发展成为高分子物理研究中一项重要的研究手段。荧光涨落光谱是利用单个分子荧光信号的涨落来获得研究对象的微观信息。根据原始数据处理方法的不同, 荧光涨落光谱可以分为荧光关联光谱

收稿: 2011-08-30; 修回: 2011-09-01;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20925416、50730007);

通讯联系作者: jzhao@jccas.ac.cn.

(Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) 和光子计数直方图(Photon Counting Histogram, PCH)。在荧光关联光谱中,利用快速数字时间相关仪记录荧光光强随时间的涨落,也即时间相关函数,可以得到荧光的特征衰减时间 τ_0 ,进而求得扩散系数 D 和对应的流体力学半径 R_H ;在光子计数分布方法中,通过分析到达探测器的光子数目的概率分布函数,可以得到荧光分子的发光亮度 ϵ 和荧光分子的浓度 N 。在使用过程中,荧光关联光谱和光子计数直方图两种实验手段可以用来研究很多涉及到扩散运动、流体力学体积以及荧光分子发光亮度发生变化的物理过程,例如溶液本体和表界面上的扩散运动、化学反应动力学、高分子的构象行为、分子聚集、分子间的相互作用等等,借用这两种实验手段我们可以得到很多关于高分子在溶液与表界面上有意义的微观信息。在本节中,作者就荧光涨落光谱的发展简史、基本原理、仪器设备以及荧光涨落光谱在高分子物理研究中的典型应用做一个介绍。

1.1 发展简史

FFS 最早是在 1970 年代由 Madge、Elson 和 Webb 发展起来的^[5],在早期的实验中,观察区域内平均有大约 10^4 个发光的分子。检测的荧光分子数多、检测效率低以及杂质背景信号的干扰,使得在这些实验中的信噪比很差。由于技术条件的限制,FCS 在接下来的二十年间并没有得到大的发展。直到上世纪 90 年代初特别是 Rigler 将共聚焦技术引用到 FCS 中以来^[5,6],再加上数据采集卡的功能越来越强,可以让我们进行实时相关计算,FCS 技术取得了重大的突破并且得到了越来越广泛的应用。采用共聚焦技术,可以将激发空间的体积降低到 10^{-15} L 左右。使用高性能的滤光片可以将杂质的背景光降低到很低的程度,而且检测器的灵敏度也越来越高,目前的 FCS 技术可以达到很高的信噪比,能够实现单分子层次上的测量。

1.2 基本原理

荧光是指处于基态的分子吸收光后,从第一电子激发单重态回到基态而产生的辐射伴随的发光现象。当一束单色激光照射到荧光分子时,荧光基团会被激发而发出荧光,探测器光子计数器探测共聚焦激发体积内不同时刻的荧光光子数。对所测到的光子数的数据的处理,有两种方法:第一,通过计算光子数的时间相关函数来得到荧光物质的瞬时动态性质,这就是荧光关联光谱(FCS)的方法;第二,在一定的时间内是对到达探测器的光子数进行概率分布的统计,来得到荧光分子的亮度及浓度,即光子计数直方图的方法(PCH)。

1.2.1 荧光关联光谱^[1-9] FCS 测到的荧光涨落的相关函数为

$$G(\tau) = \frac{\langle \mathcal{F}(t) \mathcal{F}(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1-1)$$

$\mathcal{F}(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ 为 t 时刻荧光的涨落值, $\mathcal{F}(t+\tau) = F(t+\tau) - \langle F(t+\tau) \rangle$ 为 $t+\tau$ 时刻荧光的涨落值, $\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt$ 为 0 到 T 时间内荧光的平均强度, $W(r)$ 表示在观察区域内光强的分布,即

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(r) W(r') \langle \mathcal{F}(r, 0) \mathcal{F}(r', \tau) \rangle dV dV'}{\left[\langle c \rangle \int W(r) dV \right]^2} \quad (1-2)$$

我们考虑单光子激发的体系,即共聚焦技术形成的激发空间,其光强符合 Gaussian 分布 $W(r) = e^{-\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{z^2}{z_0^2}}$, x, y, z 分别为在 r 处的三维坐标,激发空间为椭球形, r_0, z_0 分别为椭球的长轴和短轴的长度。

对于不同的动力学行为的体系,通过不同的对浓度相关的函数的计算,就能得到相应的相关函数表达式。

如果我们考察的是溶液中的三维扩散,根据中心极限定理,经过时间 τ ,在 r' 处对 r 处的关联为 $r'-r$ 的高斯分布函数为

$$\langle \mathcal{F}(r, 0) \mathcal{F}(r', \tau) \rangle = \langle c \rangle \frac{1}{(4\pi D\tau)^{-3/2}} e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}} \quad (1-3)$$

将上式带入(1-2),得到

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle c \rangle (4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \frac{\iint W(r)W(r') \cdot e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}} dVdV'}{(\int W(r)dV)^2} = \frac{1}{V_{eff} \langle c \rangle} \left[\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_0}} \right] \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{r_0}{z_0})^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_0}}} \quad (1-4)$$

式中, $V_{eff} = \frac{\left(\int e^{-\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{z^2}{z_0^2}} dV \right)^2}{\int e^{-\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{z^2}{z_0^2}} dV} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0$, 表示激发空间的体积, $\tau_0 = \frac{r_0^2}{2D}$ 表示荧光分子通过激发空间所

需的平均时间, D 为荧光探针分子的扩散系数。 $G(0) = \frac{1}{V_{eff} \langle c \rangle} = \frac{1}{N}$ 为激发空间内荧光分子平均数目的倒数。

从 $G(\tau)$ 的表达式我们可以看到, $G(\tau)$ 有四个因变量: r_0, z_0, c, D 。其中 r_0, z_0 为仪器的参数, c, D 是被测物质的浓度和扩散系数。因此, 我们可以通过测量已知浓度和扩散系数的样品, 进行 $G(\tau)$ 函数的数值拟合而得到 r_0, z_0 。

在利用 FCS 测量体系中的扩散性质的实验中, 通过对所测到的相关函数进行曲线拟合, 就能得到样品的浓度和扩散系数。根据 Stokes-Einstein 公式, 我们就能得到表征被测物质大小的流体力学半径 R_h : $R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$ 。 η 为溶剂的粘度。

1.2.2 光子计数直方图^[7-10] 在荧光涨落光谱的实验装置中, 我们用光子计数器测到了共聚焦激发体积内不同时刻的荧光光子数。常用的光子检测器的基本元件是光电倍增管(PMT)和雪崩二极管(APD), 它们基本工作原理都是光电效应, 即通过光子与基板的作用产生电子, 然后再将微弱的电子信号放大为可以探测到的电流。基板对光子的吸收从物理上来说是一个纯粹的量子过程, 但是, 通常对于常见的 PMT 和 APD 探测器, 我们可以用一个半经典的理论处理光子的探测过程, 即 M adel 公式:

$$p(k, t, T) = \int_0^\infty \frac{(\eta_w W(t))^k e^{-\eta_w W(t)}}{k!} p(W(t)) dW(t) \quad (1-5)$$

式中 $p(k, t, T)$ 表示在时间积分时间为 T 范围内, 在时刻 t 测到光子数为 k 的概率。 $W(t) = \int_t^{t+T} \int_A I(r, t) dA dt$ 表示照射到探测板表面的光强。

因此, 当一束光强稳定的光到达探测器时, 探测器测到的光强的概率分布为:

$$p(k, \langle k \rangle) = \frac{(\eta_w W)^k e^{-\eta_w W}}{k!} \quad (1-6)$$

所以对于稳定的光强, 探测器测到的光强符合 Poisson 分布。如果到达探测器之前的光强有涨落, 实际测到的光强分布会使 Poisson 变宽, 称为“Super Poisson”分布。这时测到的光子数 k 的分布概率为

$$p(k) = \int_0^\infty \frac{(\eta_l I_D)}{k!} p(I_D) dI_D = \int_0^\infty Poi(k, \eta_l I_D) p(I_D) dI_D \quad (1-7)$$

在我们的实验中, 采用的是共聚焦探测系统, 光强的空间分布为三维的高斯分布, 即

$$PSF_{3D}(x, y, z) = \frac{I(x, y, z)}{I_0} = \exp\left[-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_0^2} - \frac{2z^2}{z_0^2}\right] \quad (1-8)$$

因此, 到达探测器的光强为 $I_D = I_0 \beta PSF(r_0)$, 其中 β 为光电转换的效率。

测到光强为 I_D 的概率为

$$p(I_D) = \int \delta(I_D - I_0 \beta PSF(r_0)) p(r) dr \quad (1-9)$$

式中 $p(r) = 1/V_0, r \in V_0$ 。

将上式代入(1-7)得到亮度为 ϵ 的荧光染料, 激发空间 V_0 内测到 k 个光子的总的概率为

$$p(k; V_0, \epsilon) = \frac{1}{V_0} \int_{V_0} Poi(k, \epsilon PSF(r)) dr = \frac{1}{V_0} \frac{\pi w_0^2 z_0^2}{k!} \int_0^\infty \gamma(k, \epsilon e^{-2x^2}) dx \quad (1-10)$$

$$\langle k \rangle = \frac{\epsilon}{V_0} \int_{V_0} PSF(r) dr = \epsilon \frac{V_{PSF}}{V_0} \quad (1-11)$$

在激发空间内的荧光分子数是存在涨落的。因此测到 k 的光子数的概率是 N 个分子关于 Poisson 分布的平均值, 即

$$\prod(k; N_{PSF}, \epsilon) \equiv \hat{p}(k; V_0, N, \epsilon) = \langle p^{(N)}(k; V_0, \epsilon) \rangle_N = \sum_{N=0}^{\infty} p^{(N)}(k; V_0, \epsilon) p^{\#}(N) \quad (1-12)$$

式中 $\langle k \rangle = \epsilon N_{PSF}$ 。

因此, 对我们实验测到的光子数的概率分布直方图, 用以上的公式进行曲线拟合, 即可得到表征体系荧光强度及分布的两个参数值: 激发空间内荧光分子的平均数目 N 及荧光分子的亮度 ϵ (每秒每个分子发出的光子数 CPSM)。

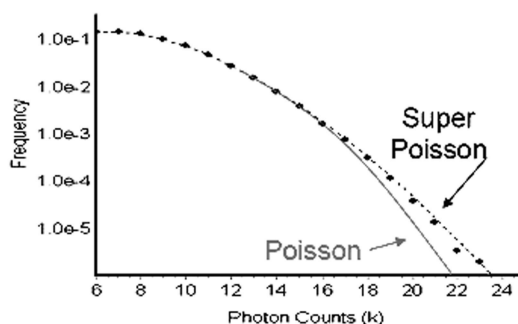


图 1 典型的光子计数图

曲线用方程 1-12 来拟合。点线为超 Poisson 分布, 实线为 Poisson 分布。

Figure 1 Typical Photon counting histograms (filled dots)

Fitting curves by equation (1-12). Super Poisson distribution (dotted line) and Poisson distribution (filled line)

1.3 仪器设备

图 2 为本实验室自行搭建的荧光涨落光谱的示意图。借助于激光的高亮度以及共聚焦检测手段的高灵敏度和高信噪比, 可实现单分子水平的荧光涨落光谱的检测。

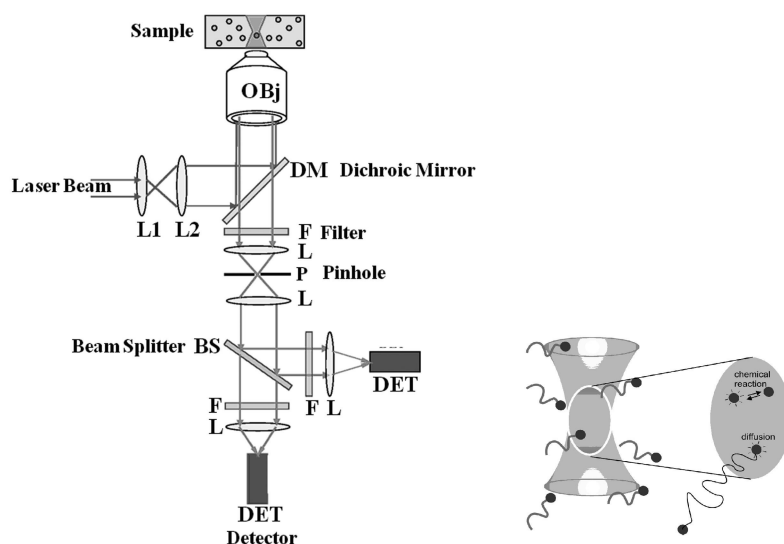


图 2 共聚焦 FCS 仪器设备以及激发空间示意图

Figure 2 Schematic diagram of confocal FCS setup and observation volume

1.4 荧光涨落光谱的应用

荧光的高灵敏性使得荧光涨落光谱可以测量极低浓度 ($10^{-9} \sim 10^{-12}$ M) 溶液中的物理量。在此浓度范

围内, 高分子链间的距离要远远大于分子链尺寸, 分子间作用可以忽略不计, 这样就可以实现真正意义上的单分子测量。荧光涨落光谱的这一优点用于聚电解质体系的研究可以克服聚电解质研究中传统研究方法(如黏度法、光散射法等)的不足, 研究单根链在不受其它分子作用时的构象信息和离子分布状态。此外, 荧光涨落光谱的另一突出优点在于它可以研究界面(包括液-液界面和固-液界面)上分子的扩散运动。在本节中, 作者就荧光涨落光谱在聚电解质体系^[11-13]以及界面上扩散运动^[14]的研究作一个简单介绍。

1.4.1 聚电解质在溶液中的构象及离子分布 理论预测与计算机模拟^[15-17]的结果都表明, 聚电解质链在溶液中的构象转变具有一级相变的规律。但是从实验上来验证这一规律却非常困难, 因为在聚合物单链的构象从线团转变到坍缩小球的同时常常伴随着分子链间的聚集, 从而对单链的研究产生干扰。传统的实验方法(如电位滴定、浊度法、粘度法等)通常测到的是多个分子的聚集体的信息, 并不能直接得到链的构象信息。我们利用 FCS 对聚电解质单链的构象转变进行了研究。

图 3(a) 显示的是被荧光标记的聚 2-乙烯基吡啶(P2VP, $M_n = 109800 \text{ g mol}^{-1}$, $M_w/M_n = 1.03$ polymer source) 分子在两种 pH 值差别很小(pH 值为 4.08 和 4.10)的溶液中扩散的关联函数。关联函数拟合结果得到 P2VP 在 pH 值为 4.08 和 4.10 时的扩散系数分别为 $11.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 和 $33.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。通过相关曲线上的 $G(0)$ 值可以看到, 在激发空间内平均有 2 到 3 个 P2VP 分子, 表明我们是从单分子层次上对 P2VP 分子进行的观测。图 1.3(b) 显示的是 P2VP 分子的扩散系数随着 pH 值的变化关系。很明显, 我们发现 P2VP 在溶液中的扩散系数在溶液 pH 值为 4.09 时有一个突变, 当 pH 值小于 4.09 时, 扩散系数约为 $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 当 pH 值大于 4.09 时, P2VP 的扩散系数约为 $33 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。

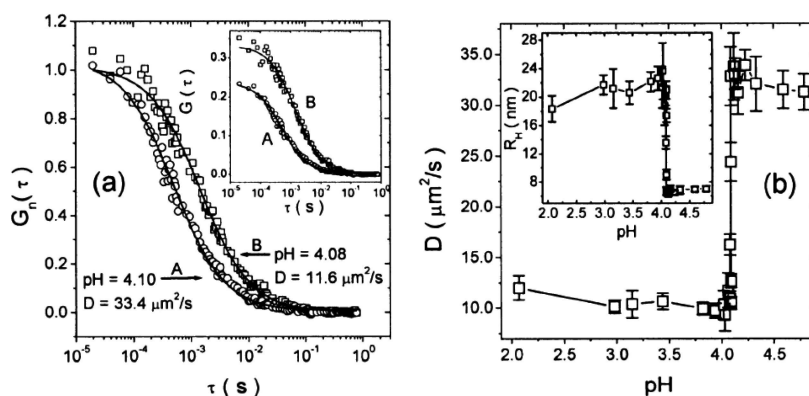


图 3(a) 聚 2-乙烯基吡啶在 pH 值为 4.08 和 4.10 的水溶液中扩散的归一化的自关联曲线。插图: 原始关联曲线; (b) 聚 2-乙烯基吡啶在水溶液中的扩散系数随 pH 值的变化关系。插图:

聚 2-乙烯基吡啶的流体力学半径随溶液 pH 的变化关系^[11]。

Figure 3 (a) Normalized autocorrelation functions of poly(2-vinylpyridine) in aqueous solutions at pH's of 4.08 and 4.10. Inset: The original autocorrelation functions. (b) Diffusion coefficient of poly(2-vinylpyridine) as a function of pH value of the solution. Inset: The hydrodynamic radius of poly(2-vinylpyridine) as a function of pH value^[11].

P2VP 扩散系数的变化就对应着 P2VP 链流体力学半径的变化, 根据 Stokes-Einstein 公式, 我们可以计算不同 pH 值下 P2VP 的流体力学半径 R_h , 结果见插图 3(b), 从图中可以发现 P2VP 的流体力学半径在 pH 值为 4.09 时也会发现一个突变, 流体力学半径可以反映链的构象, 流体力学半径的突变也反映了 P2VP 链的构象在 pH 值为 4.09 时发生了突变。回顾一下理论计算和计算机模拟的结果, Raphael 等、Uyaver 等和 Yamaguchi 等的研究都预测了疏水的聚电解质随带电分数变化的一级相变过程^[15-17]。在我们的实验中, 流体力学半径的突变也预示了 P2VP 发生了一级构象转变过程, 即 P2VP 由低 pH 值下的伸展的无规线团坍缩到高 pH 值下的紧密小球构象。

因为实验中是用低浓度的 HCl 溶液而不是缓冲液来调节溶液的 pH 值的, 因此可以最大限度地降低离子的静电屏蔽效应。pH 为 3 时的 Debye 长度大约为 9.5 nm, 升高溶液的 pH 会导致更低的离子浓度

和更高的 Debye 长度。Debye 长度的尺寸都远远大于分子链的尺寸,这就解释了为什么在转变点前后 P2VP 的扩散系数都几乎保持不变。但是在 pH 为 2.0 时扩散系数稍微偏高,原因在于氢离子的静电屏蔽效应。因为 pH 为 2.0 时的 Debye 长度约为 3.0 nm,这和 P2VP 分子链的尺寸是相当的。

以上我们从实验上首次观察到了 pH 值诱导的 P2VP 单链在溶液中的一级构象转变过程。我们知道,有别于小分子的电解质,弱聚电解质一个重要的特征是其电离常数并不是一个固定值,聚电解质的解离常数与溶液的 pH 值、浓度都有关。这是因为聚电解质溶液中离子的分布并不是均一的,只有链附近的氢离子或氢氧根离子才能与聚电解质形成酸碱平衡。由于电场的存在,链附近的氢离子或氢氧根离子浓度与体相溶液之间存在很大的梯度。但是在实验上,从未有人测量过在聚电解质链附近的氢离子或氢氧根离子的浓度究竟是多少,链附近与体相中的浓度梯度究竟有怎样的影响因素?因此我们期待从实验上来回答这些问题。

为了回答上述问题,我们把两种 pH 敏感的染料 Oregon Green 488 和 Fluorescein 通过化学反应标记在 P2VP 链的末端,利用 PCH 实验方法来探测染料的发光亮度。图 4 的插图比较了没有标记的自由染料和标记在分子链末端的 Oregon Green 染料的发光亮度随着溶液 pH 的变化关系。我们发现,被标记在 P2VP 链末端的染料发光曲线相比自由没标记染料的发光曲线向低 pH 值方向发生了很明显的偏移。为了更定量分析,我们把被标记染料的发光亮度与自由染料发光亮度相同时的 pH 值定义为聚电解质链附近的局部 pH 值(Local pH)。如图 4 所示,把 Local pH 对溶液本体的 pH 作图,可以发现, P2VP 链附近的氢离子浓度要比溶液本体的氢离子浓度低 2—3 个数量级,这主要是带正电的 P2VP 会排斥链附近的氢离子所致。我们用 Boltzmann 分布函数 $[H^+]_0 = [H^+]_{bulk} e^{-e\phi_0/kT}$ 对数据进行曲线拟合以期得到 P2VP 的电位信息, Boltzmann 分布函数对曲线的拟合并不是很好(虚线部分为 Boltzmann 曲线,电位拟合的近似结果为 0.08 V)。可能原因是随着溶液中氢离子浓度的升高,静电屏蔽效应使得 P2VP 链的尺寸发生改变。另外,由于熵的增加反离子的沉积也更为严重,结果导致 P2VP 带电分数的下降,实验得到的曲线在低的 pH 下比线性拟合的结果要偏低。

我们发现 P2VP 链附近的 pH 值要比溶液本体的 pH 高 2—3 个 pH 单位,链附近的氢离子浓度与溶液本体的氢离子浓度之间存在着一个浓度梯度。那么它与盐的浓度有怎样的关系呢?在前面的

实验中,我们测量了 P2VP-Oregon Green 在不同 pH 值下的亮度。我们发现,链附近的 pH 值要比溶液中高 3 以上。但是,在 P2VP 发生构象转变时,链附近的 pH 值在 7 左右。而在这一 pH 值区间内 Oregon Green 已经处于完全电离状态,其亮度不再具有 pH 值的依赖性。为此,我们采用 pH 敏感区域在 6 到 8 之间的荧光素来作为探针分子来测量发生构象转变时链附近的 pH 值。

在不同的盐浓度测得 P2VP-FITC 的亮度随溶液中 pH 的变化规律见图 5。我们增加 NaCl 的浓度时,在 P2VP 发生构象转变点溶液中的 pH 值会逐渐上升。但是,在构象转变点处 P2VP 链附近的 pH 值却保持不变(由虚线给出)。这一结果说明:在不同盐浓度下发生构象转变时 P2VP 链的带电分数为一常

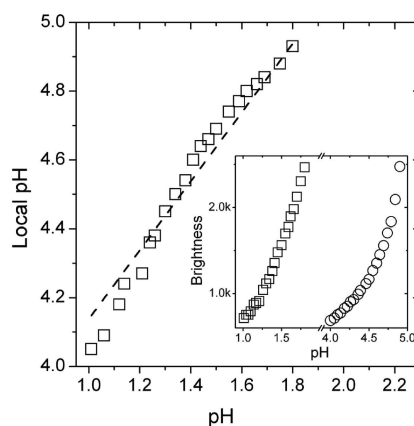


图 4 利用一种 pH 敏感的染料来探测链附近的 pH 值
插图:自由 Oregon Green 488 的发光亮度(○)和被标记在 P2VP 链末端的染料的发光亮度(□)对溶液 pH 作图。
主图:链附近的 pH 值(定义为被标记染料的发光亮度与自由染料发光亮度相同时的 pH 值)随溶液 pH 的变化关系^[12]。

Figure 4 Using a pH-sensitive dye to infer local pH
Inset: brightness of Oregon Green 488, measured from photon counting histograms compiled within the FCS confocal volume, plotted against solution pH for this fluorophore dissolved freely in solution (○) or attached to one end of the polymer chain (□). Main figure: the local pH of polymer-attached fluorophore, defined as the pH at which the polymer-attached fluorophore displays the same brightness as when not attached, is plotted against bulk pH^[12].

数, P2VP 的静电排斥能并没有发生改变。在 FITC 的亮度在 2700 至 3400 的区域内, 即链附近的 pH 值在 7.05 到 7.56 之间, P2VP 链保持线团构象, 但此时链上的吡啶基团并没有全部电离, 链的带电分数较小。此时, 当我们增加 NaCl 的浓度时, 在图中我们可见, 荧光素的亮度突然上升到 3400, 表明 P2VP 的带电分数有一突然的增加。这是因为, 随着 NaCl 浓度的增加, 体系的熵对自由能的贡献增加导致 P2VP 的反离子沉积程度增强。更多的氯离子沉积到 P2VP 的主链上, 与此同时, P2VP 链附近的氢离子浓度也有增加。氢离子浓度的增加使得 P2VP 链上未电离的吡啶基团产生电离, 从而增加了 P2VP 的带电分数。尽管反离子沉积程度有所增强, 但是由于更多的吡啶基团被电离, 其结果使得 P2VP 的有效带电分数增加。

以上我们讨论了一种弱聚电解质 P2VP 在水溶液中随溶液 pH 值而发生的一级构象转变。我们知道, 氢离子与 P2VP 主链上的吡啶基团之间存在着电离平衡, 改变氢离子的浓度会直接改变 P2VP 的带电量, 从而影响弱聚电解质在溶液中的构象状态。而对于强聚电解质而言, 改变溶液氢离子的浓度并不能显著改变其带电量, 强聚电解质的带电量往往是通过向溶液中加入盐来改变的, 为了理解强聚电解质在盐溶液的构象状态并与弱聚电解质的性质进行比较, 我们研究了一种强聚电解质聚苯乙烯磺酸钠($\text{PSS}^- \text{Na}^+$) 在不同类型不同浓度的盐溶液的构象状态。

图 6 显示的是单链 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子分别在不同价态的盐溶液中的流体力学半径 R_h 随盐浓度的变化关系。

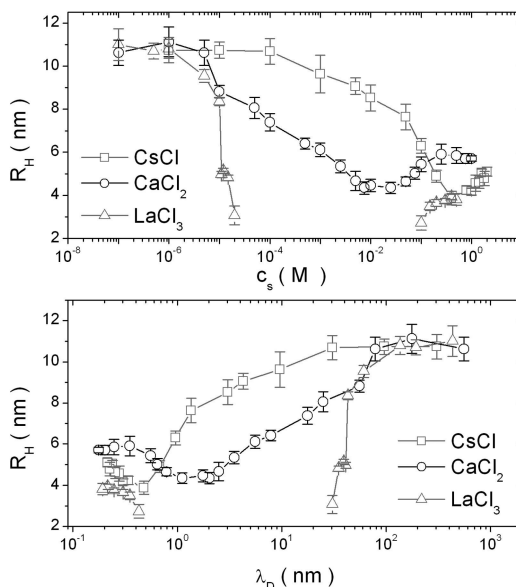


图 6 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 单链的流体力学半径随盐浓度(上图)和相对应的 Debye 长度(下图)的变化关系。

盐的类型在图中标出^[13]

Figure 6 Value of hydrodynamic radius of $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ single chain as a function of salt concentration (top panel) and corresponding Debye length (bottom panel). The type of the salts is indicated in figures^[13]

对于氯化铯、氯化钙以及氯化镧的实验, 我们观察到了盐浓度诱导的 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 的分子尺寸链先塌缩然后再度伸展的过程, 也即回归凝聚现象(reentrant condensation)。对于三价的氯化镧, 得到的这个结

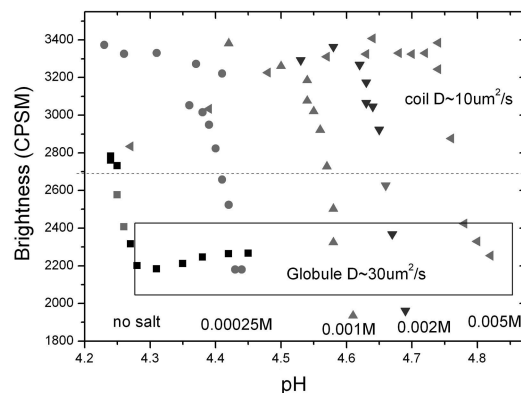


图 5 P2VP-FITC 在不同浓度的 NaCl 盐溶液中的发光亮度随溶液 pH 值的变化关系^[12]

Figure 5 Brightness of P2VP-FITC as a function of bulk pH values at various NaCl concentrations^[12]

果在意料之中,因为以往对 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 相图的研究^[18] 已经证明了这一现象。在盐浓度 $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ 到 0.1 M 之间, FCS 测不到荧光信号, 仔细检查样品池后发现样品沉淀到了样品池底部, 当继续增加盐浓度时, 在 0.1 M 又能测到荧光信号。在盐浓度继续增大时, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链的流体力学半径随盐浓度的增大而增大。也就是说, 氯化镧浓度在 $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ 到 0.1 M 之间时, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 发生了相分离。在我们研究的体系中, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 的浓度相当低, 约 10^{-4} mg/mL , 这个浓度远小于交叠浓度。但在氯化镧的实验中, 我们仍然观察到了相分离的发生。有两个原因: 第一, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 与 La^{3+} 的相互作用很强, 使 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链采取比较紧密的构象, 更由于在盐浓度比较高的情况下桥接作用不仅在分子内发生, 在分子间也会起作用, 因而容易形成聚集; 第二, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链的疏水性非常强, 当电荷被中和后在水中的稳定性较差, 也会促使相分离的发生。在盐浓度继续增大时, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链的流体力学半径随盐浓度的增大而增大。

在以往的实验中, 没有发现二价盐(除钡离子) 或者一价盐会使 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 发生回归凝聚现象。计算模拟发现二价离子可能会使聚电解质链先塌缩然后再度伸展, 只是变化的程度与三价以及四价离子相比要小得多^[19]。一个有趣的问题是, 为什么在我们的实验中 Mg^{2+} 或者 Sr^{2+} 没有观察到这一现象? 有两个可能的影响因素: 第一, 离子的尺寸。Hsiao 等^[20] 发现, 对于价态相同的抗衡离子, 尺寸与单体的尺寸越接近, 则观察到的回归凝聚现象(reentrant condensation)越明显; 第二, 离子与聚电解质链所带电荷的作用力的强弱。以溶解度为例, 以每 100 g 溶液中所含溶质的量为例, 在 25°C 时, MgSO_4 为 26.3 g , CaSO_4 为 0.205 g , SrSO_4 为 0.0135 g ^[21], Ca^{2+} 与 Sr^{2+} 与磺酸根的结合能力要比 Mg^{2+} 强得多, 因此会使聚电解质链采取更紧密的构象。但这种作用又不能太强, 否则, 即使电荷过度沉积, 发生电荷反转, 分子链也不会重新张开。

在一价的抗衡离子(Cs^+) 实验中观察到回归凝聚现象(reentrant condensation)确实令人意外。Volk 等^[22] 的研究发现季铵化的聚 2-乙烯基吡啶在加入碘离子时观察到了溶液分相然后再溶解的过程。他们发现这一过程的出现与聚电解质的疏水性、抗衡离子的尺寸以及聚电解质的带电量有关。他们用不同的季铵化(或质子化)试剂和聚合物反应得到亲疏水性不同的产物, 他们只在疏水性处于中间值, 用乙基季铵化的样品, 在带电量较高, 且抗衡离子尺寸较大的一价抗衡离子实验中, 观察到这一现象。疏水性太差, 如用卤化氢质子化, 得到的样品不会分相; 疏水性太强, 得到的样品(如以丁基季铵化)分相以后继续加盐不会再溶解。此外, 带电量较低的样品在出现分相以后继续加盐不会再溶解; 抗衡离子尺寸较小的话也不会观察到这一现象。在以往的研究中, 用计算模拟的方法都没有考虑主链疏水性的影响, 可能这是在一价盐中没有观察到回归凝聚现象(reentrant condensation)的原因。

除了研究强聚电解质 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 单链分子在水溶液中的回归凝聚现象之外, 我们还研究了 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链在纯水和不同浓度 NaCl 盐溶液中的标度关系。结果发现 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链在纯水中的构象随着分子量呈现非均匀性。在分子量较小(聚合度小于 310)时, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链在纯水中呈现刚性的棒状结构; 而当 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 聚合度大于 310 时, $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子在纯水中呈现无归线团的构象。同时我们还利用 PCH 的实验手段研究了不同分子量的 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 的链周围抗衡离子分布及电位, 发现 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$ 分子链的末端电位随着分子量的增加而增大, 而且相同分子量的 $\text{PSS}^- \text{Na}^+$, 链末端的氢离子浓度要低于链中间的氢离子浓度。关于这部分的工作我们会继续完善并且陆续发表出来。

1.4.2 界面上的单分子动力学研究 由于工业界以及日常生活中对于高性能聚合物复合材料的强烈需求, 聚合物共混体系的研究一直都是高分子科学领域的重点与热点问题。不相容聚合物间的微观结构及性质对聚合物共混、增塑及聚合物间粘结等方面具有非常重要的作用, 因此, 针对于聚合物界面的研究具有重要的现实意义。但由于研究方法的限制, 从微观角度或者单分子角度来理解和研究聚合物多相体系中相界面的有关性质, 是一个重要且具难度的课题。

根据前人的理论研究, 当聚合物的分子量足够高时, 聚合物-聚合物界面的黏度将不随着分子量的改变而变化, 但是这个预言始终没有得到实验上的验证。因此我们通过下面的实验开展这方面的研究, 我们改变构成 N, N -二甲基甲酰胺-聚异戊二烯(DMF-PI)界面的聚合物 PI 的分子量, 通过荧光关联光谱

来测量一种荧光标记的嵌段聚合物在 DMF-PI 界面上的扩散系数, 通过扩散系数的变化来反映界面黏度的变化。

DMF 是聚苯乙烯(PS)的良溶剂, 是 PI 的非溶剂。DMF 作为 PI 的非溶剂在与 PI 接触时, 尽管不能在宏观上使 PI 发生溶胀或溶解, 但是在界面上会形成和本体不同的微区, 这些微区就是界面层。界面层的性质是影响不相容共混聚合物性能的重要因素, 对于不相容体系来说, 它们之间性质不仅与聚合物种类有关, 而且, 与聚合物的分子量有着重要的联系, 考虑到分子量对界面性质的影响, 可以通过改变 PI 的分子量来考察界面流变学性质的变化。

实验中采用的 PI 的分子量从 $1.2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 增加到 $138 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, 跨越了 2 个数量级; 更为重要的是, 其本体粘度^[23] 从 $0.8 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 增加到 $9.77 \times 10^4 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, 跨越了 5 个数量级。然而, 与本体粘度的巨大变化相比, PI-*b*-PS 在界面上的扩散系数变化却很小, 仅有轻微变化, 见图 7。这说明 PI/DMF 界面上存在一个低粘度的界面层, 而且这个界面层的粘度与构成界面的本体聚合物分子量仅存在很微弱的依赖性。这一实验结果很好地验证了前人的理论模型^[24~26]。

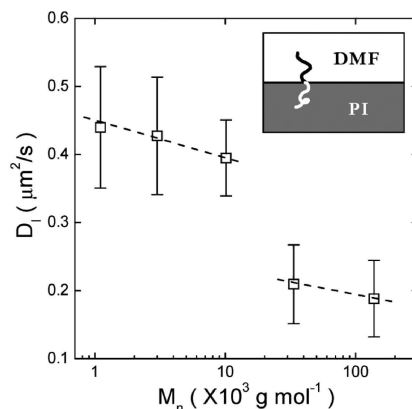


图 7 PS-*b*-PI 单链的表明扩散系数随本体 PI 分子量的变化关系。插图: PS-*b*-PI 分子在界面上的示意图^[14]

Figure 7 Interfacial diffusion coefficient of single PS-*b*-PI chain as a function of the molecular weight of bulk PI. Inset: illustration of the sample geometry^[14]

我们的实验结果也存在与前人的理论预言不一致的地方。de Gennes 等^[24~26] 认为随着分子量的增加, 界面粘度会保持恒定, 不再随分子量的增加而发生变化。然而, 从图 7 可以看到, 随着分子量的增加, PI-*b*-PS 在界面的扩散系数随着 PI 分子量的增加而逐步减小, 并且在分子量为 $10 \sim 30 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 区间存在明显下降。我们认为, 这是由于界面张力随分子量的增加而增加带来的效应。前人的研究表明, 聚合物界面张力随着其分子量的增加而增加, 而界面张力的增加一定会导致界面厚度减小^[27]。在实验中, 我们使用的探针分子的分子量较大(PI 段分子量为 $37.5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$), 界面厚度的减小使得 PI-*b*-PS 中部分 PI 链段超越界面区域而进入 PI 本体, 从而感受到 PI 本体的高粘度。这使得探针分子感受到很大的界面摩擦阻力而减慢界面扩散运动速率。如果利用 Einstein 方程 $D = kT/\zeta$ 来计算 PI-*b*-PS 在界面运动感受到的摩擦力, 就可以发现随着 PI 本体分子量的增加, 界面摩擦力逐步增大。

2 单分子荧光成像技术与聚合物分子链的界面扩散运动

聚合物在受限状态下, 聚合物链的很多性质与本体会有巨大的差异, 例如链构象、单链动力学、相分离、玻璃化转变等, 都表现出与本体不同的性质^[28]。研究超薄膜中的聚合物链性质不仅对基础物理问题的研究有重要意义, 而且对于聚合物在涂料、摩擦与润滑、微电子材料、纳米器件等方面的应用有重要的意义。

聚合物超薄膜结晶是高分子物理领域的一个重要研究课题^[30~33]。当聚合物超薄膜的厚度降低到与聚合物链的均方根旋转半径 R_g 相当时, 超薄膜中聚合物的结晶行为与本体聚合物表现出巨大的差别, 一是因为厚度很小的超薄膜对聚合物链产生了很强的空间受限效应; 二是因为聚合物链与基底之间的相互

作用。因此, 聚合物在超薄膜中表现出很多新的性质, 如超薄膜中聚合物一次成核的能垒很高, 聚合物能在相当长时间保持过冷熔体状态; 多次折叠链形成的单层片晶不稳定, 能够在平衡熔点以下就发生增厚现象等等。

目前研究聚合物超薄膜结晶一般都使用原子力显微镜、光学显微镜、DSC、红外、核磁共振等手段。这些研究对我们了解聚合物的结晶过程有了很大的帮助, 但是我们也应该看到, 由于这些手段没有单分子水平的分辨能力, 只能得到聚合物的聚集体表现出来的平均的信息。

与传统研究手段相比, 单分子荧光显微技术^[33~36]具有快速、无损、高灵敏度、时间和空间分辨能力的分析特点, 使我们能够观察到单个大分子的位置信息和扩散运动轨迹。以揭示被系综研究所掩盖的微观细节, 反应大分子在异质微环境中的扩散、构象等信息随时间变化的静态和动态的非均匀性。

2.1 单分子荧光成像技术的建立

单分子的光学探测可由频率调制的吸收光谱和激光诱导荧光检测, 因其背景低、信噪比高, 激光诱导荧光成为单分子检测最常用的方法。在最佳情况下, 1 个分子大约能辐射出 $10^5 \sim 10^6$ 个荧光光子。利用高效单光子计数雪崩光电二极管, 目前能接收到约 5% 的荧光光子。因此, 可从一个荧光分子中观测到 5000 到 50000 个光子, 这一数目不仅足以探测到单个分子, 而且足以进行光谱辨认和实时监测。

全内反射荧光显微技术是当今世界上最具前途的新型生物光学显微技术之一, 可以用来实现对单个荧光分子的直接探测。它利用全内反射产生的消逝波照明样品, 使照明区域限定在样品表面的薄层范围内, 因此具有其它光学成像技术无法比拟的高的信噪比和对比度。全内反射是一种普遍存在的光学现象。我们考虑一束平面光波从玻璃表面进入到溶液中如图 8 所示。入射光在玻璃表面上一部分发生反射, 另一部分则透射进溶液。从几何光学的角度来看, 当光发生全反射时, 光会在玻璃界面上完全反射而不进入溶液中。实际上, 由于波动效应, 有一部分光的能量会穿过界面渗透到溶液中, 平行于界面传播。这部分光场是所谓的消逝场。

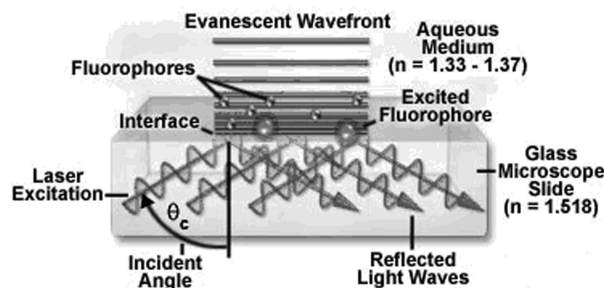


图 8 全内反射荧光示意图

Figure 8 The sketch of total internal reflection fluorescence

由于发生全内反射时, 在低折射率介质中消逝波的典型穿透深度一般在 100nm 量级, 如果样品紧贴界面放置, 则消逝波对样品的垂直照射深度也为约 100nm。只有位于这个小范围内的荧光分子才会被激发, 而在这个范围以外的荧光分子则完全不受影响。用消逝波照明, 再结合灵敏度非常高的高分辨冷却型电荷耦合器件, 就可以得到信噪比非常高的单分子影像。到目前为止, 已有多种全内反射荧光显微成像系统问世, 其中最为普遍的两种类型是棱镜型和物镜型。

本组所用显微镜为物镜型全内反射成像装置, 如图 9 所示, 固体激光器发出的激光通过衰减片得到合适的光强, 透过物镜以一定角度照射到样品上, 在样品和空气界面发生全反射, 激发样品中的荧光分子, 荧光分子发出的荧光再被物镜接收通过滤光片到达高分辨冷却型电荷耦合器件 (CCD), 而激光则被滤光片滤掉而不能到达 CCD, 从而在 CCD 上得到清晰的单分子的荧光信号。这套装置由本实验室自行搭建而成, 我们采用的显微镜是奥林巴斯的倒置显微镜 (Olympus IX-71), 物镜为放大倍数为 100、数值孔径为 1.45 的油浸物镜 (Plan Apochromat, Olympus, Japan)。激光器为 532nm 固体激光器 (长春, 中国), 荧光信号由滤光镜和二色镜 (Chroma Tech, USA) 过滤而降低背景噪声, 然后用冷却型 CCD 记录 (Andor DV887

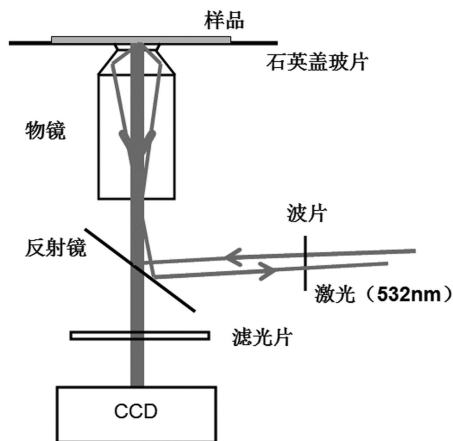


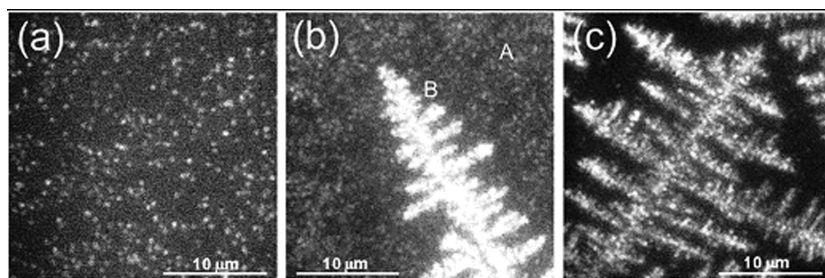
图 9 全内反射荧光显微镜示意图

Figure 9 The sketch of trans-fluorescence microscopy

EMCCD), 数据处理软件为 Andor Ixon (Andor, Northern Ireland)、MetaMorph 和 Image J。

2.2 PEO 超薄膜结晶前后的单链扩散研究

Yeow 等^[37]首次运用单分子追踪技术研究 PEO 超薄膜的结晶过程。并发现大分子在结晶前通过扩散并沉积到晶体生长面上具有不同的运动方式, 例如布朗运动和直接运动。通过 PEO 链在无定形层中和耗散层中以不同的扩散速率进行布朗运动揭示了界面环境的异质性。

图 10 PEO 样品维持在 45 °C 为 (a) 35h, (b) 47h, and (c) > 65h 的荧光图像^[37]Figure 10 Fluorescence images of images of a PEO sample maintained at 45 °C for (a) 35h, (b) 47h, and (c) > 65h^[37]

以下是我们组的工作^[38]: 聚乙二醇(PEO)超薄膜加热到 80 °C 后, 用原子力显微镜(AFM)观察超薄膜融化以后的形貌。如图 11 显示, PEO 超薄膜熔融后在硅羟基表面形成平整的熔体膜, 没有发生去浸润的现象。并且把熔融的超薄膜降到室温 22 °C 以后, 仍然能在很长时间(> 4h)保持过冷的熔体状态而不结晶。这是由于 PEO 链在超薄膜中处于受限状态, 结晶成核的位垒很高, 使得超薄膜难以均相成核, 因此过冷的超薄膜能保持熔体状态很长时间。为了得到超薄膜的厚度, 用椭圆偏振仪进行测量, 测得其膜厚为 2.4nm, 由于分子量为 5000 $\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 PEO 的均方根旋转半径(R_g)为 2.5nm, 因此认为超薄膜是由单分子层的 PEO 链形成的。

由于超薄膜在过冷状态下能保持熔体状态很长时间, 因此可以利用单分子荧光显微镜对超薄膜过冷溶体中的单链扩散进行研究。把涂覆有 PEO 超薄膜的石英片置于热台中, 分别在 50 °C, 38 °C 和 22 °C 的温度下用单分子荧光显微镜观察超薄膜中荧光标记 PEO 的扩散运动。单分子荧光显微镜曝光时间为 0.1s, 每 0.1s 拍摄 1 幅照片, 连续拍摄 200 幅, 得到单分子荧光图像如图 12 所示。

从图 12 的单分子荧光图像可以看到, 过冷的 PEO 超薄膜中的荧光标记的分子链在膜内做无规扩散运动。由于在荧光显微镜下, 只能看到样品荧光标记的 PEO, 而不能看到未标记的 PEO, 因此用荧光标记的 PEO 的扩散行为来代表所有 PEO 的扩散行为。

通过对单分子荧光图像中的单个分子的位置进行荧光追踪, 可以得到单个分子链的扩散轨迹。对连

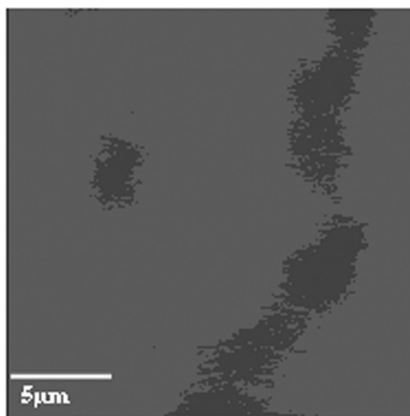


图 11 原子力图像显示在 80 °C 熔融状态下 PEO 超薄膜平整的形貌
纵向的尺度是 30 nm

Figure 11 AFM image showing the featureless morphology of the PEO ultrathin film after melting at the temperature of 80 °C. The scale in z-direction is 30 nm

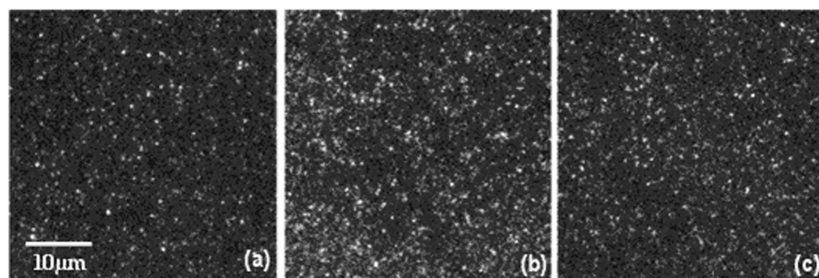


图 12 结晶前过冷状态下 PEO 超薄膜的荧光图像
(a) 50 °C (b) 38 °C (c) 22 °C

Figure 12 Fluorescence images of the supercooled PEO ultrathin film at the temperatures of (a) 50 °C (b) 38 °C (c) 22 °C before crystallization

续拍摄的单分子荧光影像图进行单分子手工追踪,可以把单个分子的扩散运动的轨迹提取出来。其中一个聚合物链在超薄膜内的二维扩散轨迹如图 13a 所示。图中每一步的间隔时间为 0.1 s,连续追踪了 30 步。为了得到分子链的二维扩散系数,我们对分子链的扩散轨迹进行均方根位移统计如图 13b 所示,PEO 链的扩散系数 D 可以由公式 $\langle R^2(t) \rangle = 4Dt$ 拟合得到。

为了得到有代表性的 PEO 分子链的扩散系数,我们对这 50 个分子链的扩散系数的分布情况进行了柱状图统计。从统计中得到,扩散系数的分布相对集中于一个值,并且呈高斯分布,对柱状图进行高斯分布拟合,可以得到平均的扩散系数为 $3.1 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 。对于结晶前后自由分子链的扩散,用单分子荧光追踪的方法进行统计,对每个温度下的样品选择 50 个独立的分子链进行追踪,得到了单链的扩散系数分布情况,如图 14 所示。用高斯拟合可以得到单链的平均扩散系数。由于结晶后的扩散系数较慢,我们拍摄过程相邻两帧之间时间间隔为 1 s,连续拍摄 200 s。

同一个样品中的 PEO 分子链的扩散系数分布比较宽,如图 15a 所示,这是由于基底表面的化学性质和物理性质的不均匀性带来的。对结晶前 38 °C 和 22 °C 的样品分布别用同样的方法进行统计,如图 15b 所示,PEO 超薄膜结晶前过冷状态下 50 °C、38 °C 和 22 °C 的扩散系数并没有明显的变化。通过精确的对比超薄膜结晶前后的扩散系数,对扩散系数的统计平均值进行对比,结晶后的扩散系数确实比结晶前低了一个数量级。

2.3 PEO 超薄膜结晶形貌变化的研究

超薄膜的温度降至室温 22 °C 放置 24 h 以后,用 AFM 观察,发现超薄膜已经结晶,并且形成了树枝状

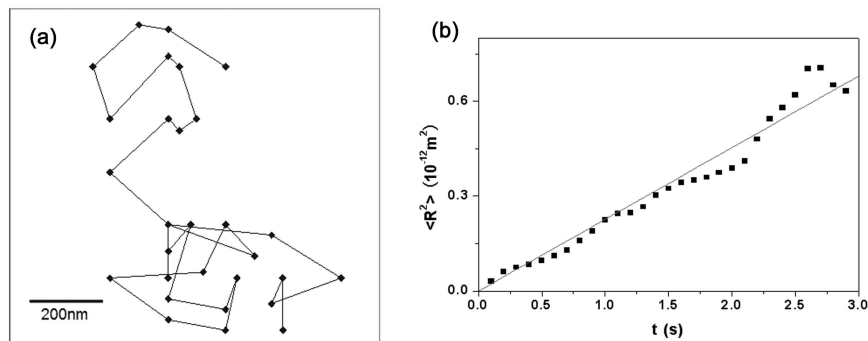


图 13 (a) PEO 单分子在过冷单层膜中典型的扩散轨迹, 每步时间间隔是 0.1 s。 (b) 对扩散轨迹均方位移 $\langle R^2 \rangle$ 的统计结果

Figure 13 (a) Typical diffusing trajectory of PEO molecule in supercooled monolayer at 50°C. Time interval between adjacent steps = 0.1 s. (b) The temporal profile of mean square displacement $\langle R^2 \rangle$

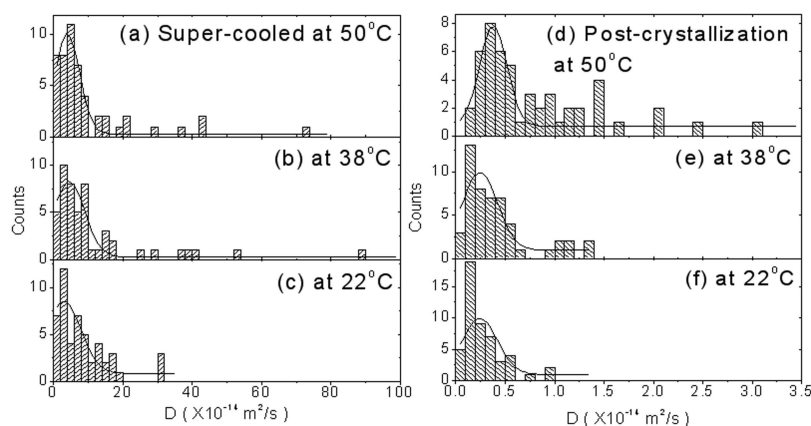


图 14 独立 PEO 链的扩散系数直方图, 左图是在过冷未结晶状态下的扩散数据而右图是结晶后链的扩散数据^[38]。结晶前后样品在: (a, d) 50°C; (b, e) 38°C; (c, f) 22°C。实线是高斯拟合的结果, 每个数据来源于 50 个独立的追踪样本。

Figure 14 Histogram of diffusion coefficient of individual PEO chains^[38], in which the left panel shows data for super-cooled sample before crystallization and right panel shows the post crystallization samples; (a, d) 50°C; (b, e) 38°C; (c, f) 22°C. The solid lines are the results of Gaussian fitting.

The data were from tracking analysis of 50 individual molecules.

的单层片晶结构, 如图 16 所示。这种树枝状的片晶是由扩散控制结晶速度而形成的典型的晶体结构。单层片晶的厚度为 6 nm, 因为 PEO 形成的单层片晶总是其链长的整数分之一, 厚度 $h = L/(n+1)$, 其中 n 为折叠次数, 实验中使用的 PEO 的链长为 31.6 nm, 由此可知此片晶为 4 次折叠片晶。

由于链折叠以后体系的自由能升高, 折叠次数越多, 自由能越高, 因此 4 次折叠链片晶在热力学上是亚稳态。我们对样品进行升温, 随着温度的升高, 片晶发生了增厚现象, 片晶的厚度增加反映了链的折叠次数在减小, 晶体在向相对稳定的另一个折叠次数较少的亚稳态转变。当温度升高到 38°C, 致密的片晶结构破裂, 原来的树枝状的片晶变成一个个孤立的岛状结构, 如图 16 所示。片晶的厚度也增加到 8 nm, 对应为 3 次折叠链片晶。当温度升高到 50°C, 片晶进一步破裂, 厚度进一步增加到 11 nm, 对应为 2 次折叠链片晶。用原子力显微镜可以很清楚的观察到片晶在升温过程中的增厚现象, 由于有些片晶在增厚的过程中消失, 有些片晶在增厚过程中变大, 因此, 这个增厚过程一定伴随着分子链的输运和转移, 即分子链从一个片晶输运到另一个片晶, 分子链要进行输运, 那就必须在基底上形成一层熔融聚合物层, 分子链通过这一层聚合物进行输运。但是, 由于 AFM 不能识别单个分子链, 片晶增厚过程中的分子链运动情

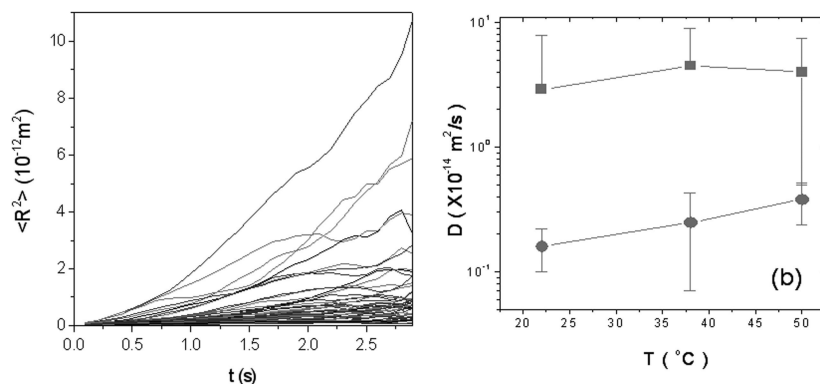


图 15 (a) 50 个 PEO 过冷超薄膜样本(膜厚: 2.4 nm) 的在结晶前 50 °C 的均方位移;
(b) PEO 链在过冷超薄膜中结晶前和结晶后在不同温度下的扩散系数^[38]。

Figure 15 (a) The temporal profile of mean square displacement of 50 individual PEO chains in the super-cooled sample at 50 °C before crystallization; (b) The value of diffusion coefficient of PEO chains in its super-cooled condition at different temperature and post-crystallization samples at different temperature^[38].

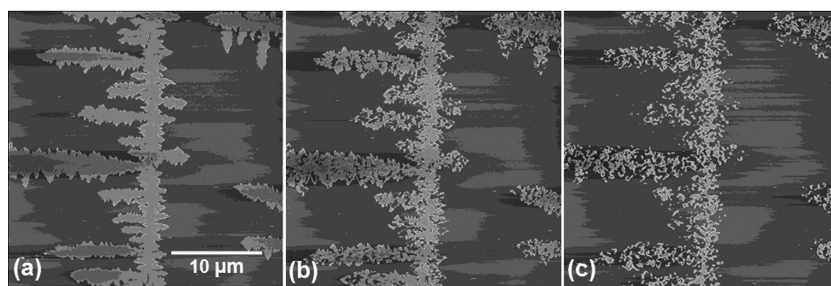


图 16 原位 AFM 高度图显示 PEO 单片层晶体随升温从(a): 22 °C; (b): 38 °C; (c): 50 °C 过程中形貌的演变^[38]。Z 轴的尺度是 30 nm。

Figure 16 In-situ AFM height images showing the morphology evolution of PEO mono-lamellar crystals under increasing temperatures (a): 22 °C; (b): 38 °C; (c): 50 °C^[38].

况不能用 AFM 观察到,用单分子荧光显微镜来观察增厚过程的分子链运动情况。

运用单分子荧光显微镜,我们同样观察到室温下 22 °C 放置 24 h 的 PEO 超薄膜结晶形成了树枝状的晶体结构,如图 17 所示。这个结果和 AFM 的观察结果是相同的。我们通常认为当 AFM 扫描到的片晶形貌不再发生变化时,结晶就已经结束了,但是用单分子荧光显微镜我们却发现结晶结束以后仍然能够在树枝状片晶的外面发现扩散运动的单链,这说明树枝状片晶之间的基底上仍然残留着很多的 PEO 链没有结晶,它们以熔体的形式存在,能够自由扩散运动,而 AFM 是无法观察到它们的存在。超薄膜的结晶很难真正结束,因为片晶之间残留的自由分子链能够不停的扩散,能够继续参与结晶,只是这些分子结晶引起的形貌变化不能被 AFM 发现。

我们把样品的温度升高到 38 °C,与 AFM 观察结果相同,原来致密的树枝状的荧光图像破裂,形成孤立岛状结构。同时,我们发现片晶外自由扩散的分子更多,而且扩散系数变快,当样品温度升高到 50 °C 时,片晶外面扩散的分子进一步增多,扩散系数也变得更快速。这些片晶外扩散的分子链说明基底上存在一层非晶态的聚合物熔体层。

前人的研究提出,在片晶增厚的过程中,基底表面存在一层单分子层的非晶态聚合物链,片晶之间通过这一层非晶态链进行物质运输,从而使得有些片晶消失,有些片晶增厚。但他们由于实验手段的限制,不能观察到这层非晶态链,更不能得到层内单链扩散的信息。而我们的实验可以非常清楚的观察到这层非晶态链的存在,并且还能进一步得到层内的单链扩散信息。我们通过观察单分子荧光录像发现了分子

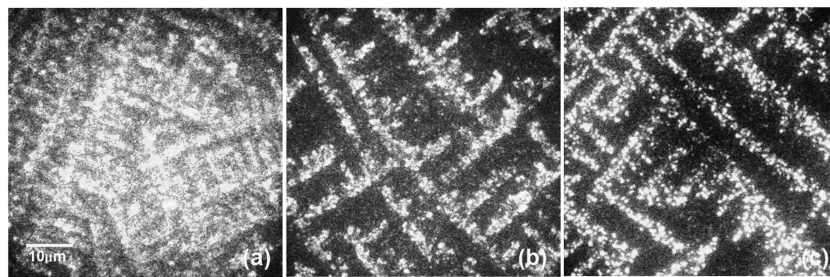


图 17 PEO 片层晶体在不同温度下(a): 22 °C; (b): 38 °C; (c): 50 °C 的荧光显微图^[38]

Figure 17 Fluorescence microscope images of PEO mono-lamellar crystals under increasing temperatures
(a): 22 °C; (b): 38 °C; (c): 50 °C^[38]

进入晶区和从晶区出来的现象, 这就直接证明了增厚过程中的物质输运现象的存在。

2.4 PEO 超薄膜中影响扩散系数的机理

结晶前后的厚度不同会影响扩散系数是因为分子链在硅羟基表面的构象随厚度变化带来的^[39]。在不同的厚度情况下, 分子链在基底表面形成不同的构象。在结晶后的非晶区, PEO 分子链形成更加扁平的构象, 分子链与硅羟基表面的相互作用力更强, 从而使得其扩散系数慢了一个数量级。

由于界面上吸附的聚合物链构象随着吸附浓度而改变, 聚合物链在界面的侧向扩散系数同样也会随着吸附浓度而改变。这是因为聚合物链与固体界面的作用主要由链的链段比例决定, 环链和尾链由于没有直接与固体界面吸附, 不会对聚合物链的扩散起阻碍作用^[40]。一根聚合物链中链段的链段比例越高, 聚合物链与固体界面的作用就越强, 聚合物侧向扩散运动受到的阻力就越大, 从而扩散系数越小。这就是链的吸附浓度会影响链侧向扩散运动的原因, 而链的吸附浓度在实验中表现为超薄膜的厚度, 超薄膜的厚度也就能影响链的扩散系数。

PEO 链与硅羟基界面由于氢键的作用而发生强烈吸附, 结晶前的界面吸附浓度(可以用超薄膜厚度来表征)很高, 聚合物链之间的拥挤作用使得聚合物链形成蓬松的构象, 环链和尾链比例较高, 链段比例较低。但是结晶以后, 由于大量的聚合物链参与了结晶, 非晶区的聚合物链大量减少, 界面的吸附浓度减少, 从而使得聚合物链在硅羟基表面的链段比例增加, 链段的增加使得聚合物链与固体界面的作用力大大增加, 从而使得扩散系数降低。

我们做了不同厚度的过冷态超薄膜在结晶前的扩散系数与膜厚的关系, 聚合物链的表面吸附浓度用膜的厚度来表示, 膜的厚度越大, 则表面吸附浓度越大, 如图 18 所示, 最左边的数据点表示膜厚为零, 这是一个表面吸附浓度极低的情况, 表面上的 PEO 分子链彼此之间的距离足够远, 以至完全不能“感受到”对方的存在。

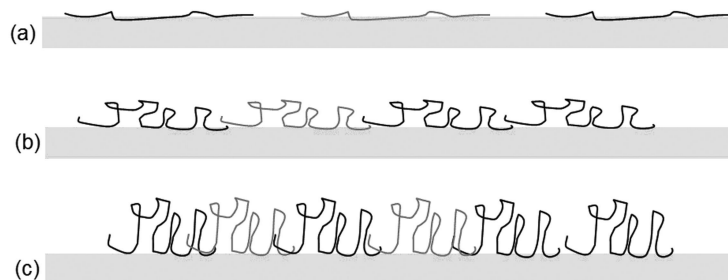


图 18 聚合物链的构象随着吸附在固体界面上浓度的变化

Figure 18 Conformation of a polymer chains on an attractive solid surface with different surface concentrations

在超薄膜结晶前, 温度从 50 °C 降低到 22 °C, 但是扩散系数并没有发生明显变化, 这是因为超薄膜在此时未结晶, 膜的厚度没有发生变化, 也就是链的吸附浓度没有发生变化, 从而聚合物链的构象没有发生

变化, 扩散系数也就没有明显变化。而对于结晶后的情况则不同, 我们可以看到结晶后, 随着温度的升高, 非晶区分子的扩散系数有逐渐增高的趋势, 这是由于结晶后, 随着温度的升高, 晶区逐渐融化, 越来越多的分子链从晶区进入非晶区, 从而使得非晶区的表面吸附浓度增加, 从而使得链的扩散系数增加。如图 19 所示, 结晶后的扩散系数随着温度升高而逐渐增高并不是由于温度带来的影响, 这可以从结晶前的扩散系数没有受到温度影响而得到证明。

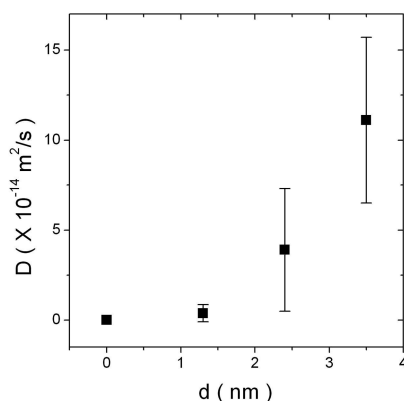


图 19 PEO 单链的在 50 °C 过冷超薄膜内扩散系数随膜厚的变化^[38]

Figure 19 Diffusion coefficient (D) of single PEO chains in its super cooled monolayers at 50 °C as a function of the film thickness^[38]

3 单分子荧光散焦成像与聚合物分子链段运动

聚合物超薄膜的链段松弛和玻璃化转变是本组的研究课题之一。研究手段主要是单分子荧光散焦成像技术。

聚合物超薄膜一般是指其厚度小于 100nm 的聚合物膜。在现代工业的很多领域如光伏器件、纳米刻蚀、粘接、涂覆和封装等聚合物薄膜材料都有重要应用。聚合物超薄膜体系往往具有不同于本体的物理性质^[41], 玻璃化转变温度(T_g)^[42] 便是其一。目前, 对于聚合物薄膜玻璃化过程的研究大都是基于对聚合物体系宏观性质的测量, 如膜厚^[42]、热容^[43]、粘度^[44]、模量^[45]等。聚合物玻璃化转变的微观本质是聚合物链段由运动到冻结的转变, 因此在单分子链段层次上进行的研究是十分必要的。单分子荧光散焦成像技术具有单分子级别的灵敏度, 并且可以获得单个荧光分子的三维空间取向信息和转动信息^[6], 为链段层次的直接研究提供了可能。

3.1 单分子荧光散焦成像技术的原理和应用

所谓散焦成像就是偏离焦点的成像。一般情况下, 成像多采用正焦成像以追求图像的高清晰度。本研究采用散焦成像是为了获得荧光分子的三维空间取向信息。

3.1.1 单分子荧光散焦成像技术原理简介 对于尺寸小于可见光半波长的物体, 由于受到衍射效应的限制, 用光学方法不可能看到其细微结构。对于该尺寸下的物体, 在正焦理想成像的情况下, 只能得到一个尺寸在半波长附近的衍射光斑, 就是所谓的“艾里斑”(Airy spot)。在散焦成像的情况下, 如果这个物体是荧光分子的聚集体, 其所发出的荧光在散焦成像的情况下, 会是中间一个亮点, 周围有一个瑞利散射环(Rayleigh scattering circle)。然而对于单个荧光分子, 即发光体只是一个单偶极矩的分子时, 情况会有所不同。

Robert Dickson 研究组首先对此进行了研究^[47]。他们采用单分子荧光成像中的垂直光路全内反射模式。实验发现, 单个荧光分子在散焦成像的情况下 CCD 上所接受到的光强分布出现了一个图案, 如图 20 所示。

过焦时如图 20b 所示, 原来在正焦时只是一个衍射极限点的荧光分子的发光强度散焦时在 CCD 上出现了一个图案, 即单个荧光分子所发射光光强的分布。而这个强度分布在电磁学上来说, 是与单个荧

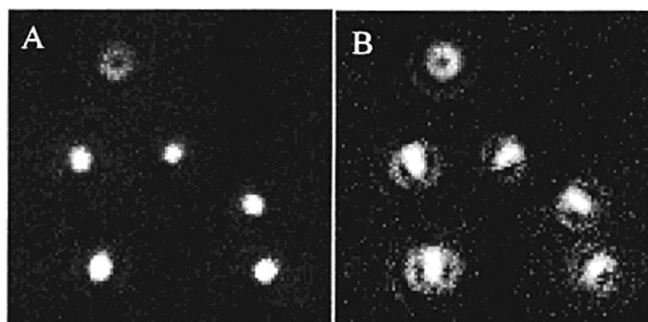


图 20 (a) 正焦图案; (b) 散焦图案

Figure 20 (a) In-focused image; (b) Defocused image

光分子偶极矩的取向一一对应的。Dickson 认为可以把散焦当作是一种非理想成像的情况来进行考虑。利用 Kirchhoff 积分方程来描述散焦时的衍射情形:

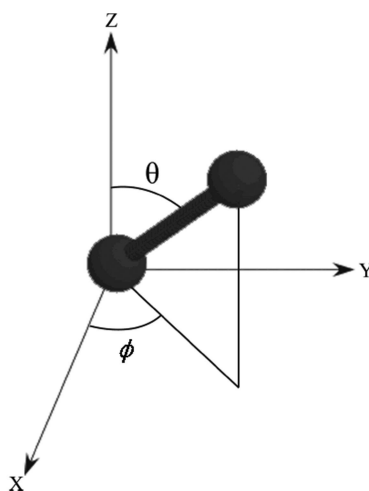
$$I(x, y, z) = \frac{I_0(\theta, \varphi)}{z^2} \left| \int_0^1 J_0(ka\rho) \frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{z} \exp(-ikopd(\rho)) \rho d\rho \right|^2 \quad (2.1)$$

式中

$$opd(\rho) = -n_1 t_1 \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n_1} \rho\right)^2} + n_2 t_2 \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n_2} \rho\right)^2} \quad (2.2)$$

$Opd(\rho)$ 代表非理想成像情况下的光程差, ρ 是归一化的显微镜物镜的孔径, n_1 和 n_2 代表光路中不同介质的折射率, t_1 和 t_2 则代表相应介质层的厚度。NA 是数值孔径。

$I(x, y, z)$ 式中 $I_0(\theta, \varphi)$ 是指在笛卡尔坐标中的偶极矩发光强度的分布, 它依赖于偶极矩在三维空间的取向角度 θ 和 φ , 如图 21 所示。x, y, z 代表在 CCD 成像芯片上的不同坐标。k 是波矢, $k=2\pi/\lambda$ 。

图 21 发光偶极矩的空间取向可以用极化角 φ 和方位角 θ 表示Figure 21 Schematic of an emission dipole oriented in space showing the convention used here for the polar (φ) and azimuthal (θ) angles

这样就可以把实验得到的图案与通过上述公式计算拟合所得的图案进行对比, 进而就可以得到荧光分子偶极矩在三维空间的取向信息, 即得到具体的取向角度 θ 和 φ , 如图 22 所示。通过对单个荧光分子的三维空间取向角度变化的实时动态追踪, 就可以在单分子的层面上来研究其动力学行为。

Enderlein 等进一步完善了关于这个现象的理论^[48]。他们理论的出发点就是把单个荧光分子的发光偶极矩视为一个电矢量, 这样就可以从电磁学的角度来推导其发射光强的分布与其空间取向角度的关系。

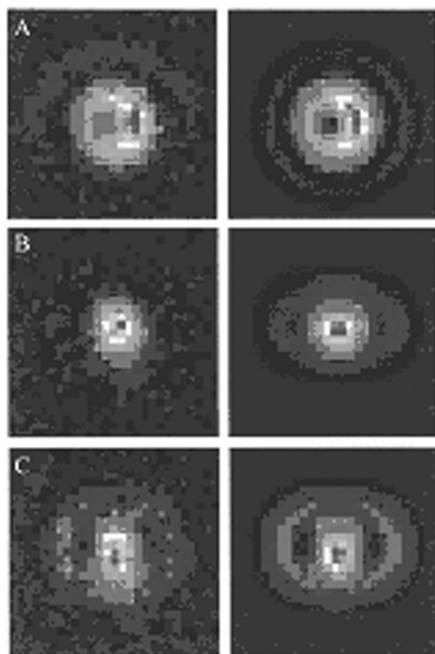


图 22 模拟图案(右)和实验图案(左)的比对

Figure 22 Fits of simulated images (right panel) to experimental emission patterns (left panel)

3.1.2 单分子荧光散焦成像技术的应用 由于具有荧光分子三维空间取向的分辨能力,单分子荧光散焦技术在化学、生物、高分子科学等领域都有重要应用。这里主要介绍该技术在高分子物理领域的研究工作。

Robert Dickson 组测量了掺杂于聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)中的荧光分子 DiIC₁₈ 在其处于远低于本体 T_g 的温度时的玻璃态的转动弛豫过程^[46]。他们追踪了单个荧光分子的三维空间取向过程,即转动过程,然后利用其转动弛豫的自相关函数耦合得到转动弛豫时间。他们认为他们所检测到的转动的荧光分子的弛豫过程反映的是周围聚合物链在深玻璃态的 α 松弛的过程,并且使用这个方法可以测量聚合物玻璃态的动态非均匀性。

Johan Hofkens 组测量了掺杂于聚丙烯酸甲酯中的荧光染料 TPDI 在 T_g 附近的转动弛豫过程^[9]。由于这个荧光分子共轭结构较大,耐漂白,适合做长时间的转动追踪分析。他们选用了三维空间的转动扩散方程对转动弛豫过程进行了分析。通过对 40 个荧光分子转动弛豫过程的取向追踪和分析,可以得到自相关函数与时间的关系,用双指数函数拟合自相关函数,可以得到两个弛豫时间。这可能与聚合物体系玻璃态时的动态非均匀性有关。

Satoshi Habuchi 组用多束激光激发探针分子,用荧光散焦技术研究了聚合物薄膜内探针分子的取向及分布^[50]。统计发现探针分子的取向有膜厚及 T_g 的依赖性。用取向分布可以反映薄膜局部的各向非均匀性。

如上所述,单分子荧光散焦成像技术已经在聚合物领域获得了很好的应用,可以获得一些直接的、传统研究手段无法获得的信息。

3.2 聚合物超薄膜链段松弛和玻璃化转变

3.2.1 聚合物超薄膜链段松弛和玻璃化转变的研究现状 类似于聚合物本体玻璃化转变的研究,可以用聚合物薄膜的性质与温度的关系来定义聚合物薄膜的玻璃化转变。首先是基于聚合物薄膜膜厚测量的研究手段。测量膜厚与温度之间的依赖关系,从而就可以得到聚合物薄膜在不同状态的膨胀系数,膨胀系数发生改变的溫度就是 T_g 。这个思路的研究手段有:椭圆偏振法^[42]、中子反射法^[51]和 X-射线反射法^[52]。这个思路的研究开展的很早,得到的实验数据也很丰富。尽管不同报道之间的相符性不好甚至差别很大,但总的趋势是:聚合物超薄膜与基底的相互作用会影响超薄膜的 T_g 。如果超薄膜与基底之间是吸引相互作用,则聚合物超薄膜的 T_g 比本体偏高;反之,较本体偏低。

上述手段都是直接测量升温过程中样品的密度变化。Torkelson 组用荧光强度法间接测量聚合物薄膜在不同温度下的密度变化来研究其玻璃化转变现象^[53]。他们利用掺杂或者标记在聚合物链上的荧光分子作为探针,该探针是密度敏感的,通过其发光强度与温度依赖性反映聚合物的玻璃化转变。他们把这种方法与聚合物多层膜的制备技术结合起来,可以选择荧光分子处于不同的位置,进而可以测量聚合物薄膜从表层到界面不同位置的玻璃化转变。通过这个方法可以得到聚合物薄膜中的 T_g 的分布情况。

Ediger 组利用光学漂白技术直接测量了探针分子在聚合物自支持膜中的转动行为^[54]。他们先在聚合物溶液中掺杂适量浓度的探针分子,旋涂成膜。用高强度线性偏振光漂白薄膜样品,形成膜内荧光分子各向异性的状态。然后用较弱的圆偏振光激发样品,测量各向异性参数的衰减。在玻璃化转变温度下,链段运动是冻结的,各向异性参数能长时间维持。当温度升高,链段开始松弛,探针分子就开始转动,各向异性参数就会衰减。这种方法和散焦成像技术测量的都是探针分子的转动。不同的是这种方法得到的是统计平均的信息,而散焦成像技术得到的是局部的、单个荧光分子的信息。

除此之外,还有一些别的方法或技术也被应用到聚合物超薄膜玻璃化转变及链段动力学的研究中,如示差扫描纳热法^[43]、二次谐波共振技术^[55]、介电松弛法^[56]、石英晶体微天平^[57]等。

众多的研究小组用不同的方法对聚合物超薄膜的玻璃化转变行为进行了系统的研究,但迄今为止仍未得到一致的结论。聚合物超薄膜的表征仍然存在很多未知的因素。

我们采用自行搭建的单分子荧光散焦成像装置研究了聚苯乙烯链末端标记的荧光探针 Alexa 532 的转动行为,并取得了初步的成果^[58]。

3.2.2 单分子荧光散焦成像装置 本实验室所用显微镜为物镜型宽场成像(epi-fluorescence)装置,如图 23 所示,激光通过物镜照射到样品上激发样品中的荧光分子,荧光分子发出的荧光再被物镜接受,这套装置由本实验室自行搭建而成。我们采用的显微镜是奥林巴斯的倒置显微镜(Olympus IX-71),物镜为放大倍数为 100、数值孔径为 1.45 的油镜(Plan Apochromat, Olympus, Japan)。激光器为 532nm 固体激光器(长春,中国),荧光信号由滤光镜和二色镜(Chroma Tech, USA)过滤而降低背景噪声,然后用冷却型 CCD 记录(Andor DV887 EM CCD),数据处理软件为 Andor Ixon(Andor, Northern Ireland)、Matlab 和 Image J。为保证样品中所有取向态的荧光分子都能够被有效激发,激光在进入物镜之前通过起偏棱镜和 1/4 玻片调成圆偏振光。

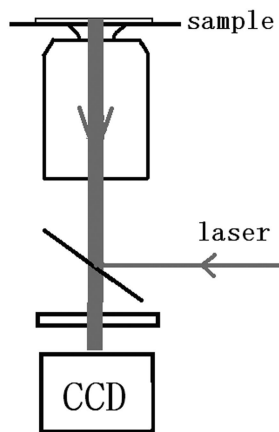


图 23 荧光显微装置示意图

Figure 23 The sketch of epi-fluorescence microscopy

我们使用 Jorg Enderlein 研究组网站(<http://www.joerg-enderlein.de/?292>)上所提供的基于 Matlab 的软件,结合我们仪器自身的参数,对散焦的荧光分子的图案进行了模拟和计算,得到不同角度的散焦图案。通过实验图案和模拟图案的比对可以确定荧光分子在三维空间的取向。

3.2.3 聚苯乙烯超薄膜的单分子散焦成像研究 使用氨基封端的聚苯乙烯(polystyrene-NH₂, $M_w = 355,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, PDI = 1.18, Polymer Source, Canada)与带有琥珀酰亚胺酯官能团的荧光染料

Alexa532(Alexa Fluor 532 carboxylic acid succinimidyl ester, Invitrogen, USA) 反应得到链末端标记的聚苯乙烯(PS-Alexa532)。标记后的样品需要过聚苯乙烯凝胶色谱柱以除去未反应的自由染料。配制聚苯乙烯(polystyrene, PS, $M_w = 392,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, PDI = 1.18, Polymer Source, Canada) 的 1-氯代戊烷(Aldrich, USA) 溶液, 并合理调控其中掺杂的分子量相近的探针分子(PS-Alexa532)。PS 超薄膜样品采用旋涂法(spin coating) 制备, 通过调节溶液浓度和转速来控制薄膜厚度。制得的样品在真空烘箱中(100°C) 退火 24h, 然后在真空状态下自然放置并降温至室温以供实验使用。超薄膜厚度是散焦实验完毕后用原子力显微镜(Nanoscope IIIA, Veeco, USA) 划痕法测得。

图 24 是一张典型的单分子荧光散焦图像^[58]。在适度过焦($0.6 \mu\text{m}$) 的情况下, 荧光分子的图案清晰可见。图像的曝光时间是 1s, 所用聚苯乙烯超薄膜样品的厚度是 11.5nm, 温度是 40°C 。图中的化合物结构就是标记在聚苯乙烯链末端的 Alexa 532。白色的箭头代表其偶极矩的方向。图中的双翼图案就是链接在聚苯乙烯链末端的 Alexa 532 的过焦图案。通过和模拟图像的比对可知, 这个双翼图案代表偶极矩的取向与物镜中轴垂直, 即与聚合物超薄膜的表面相平行。如果偶极矩取向与物镜中轴平行, 则在散焦成像的情况下是一个中空的光环。介于二个取向角度之间的图案就是弧形的结构, 如图 24 中单箭头所指的图案就代表一个处于垂直与平行中间状态的情形。由该图像可以看出, 探针分子 PS-Alexa 532 在聚苯乙烯超薄膜中均匀分散, 并没有聚集现象发生。以 0.5Hz 的频率拍摄 200 帧的录像, 分析录像没有发现荧光分子的平动扩散。以 10° 为参考标准, 该温度下大部分荧光分子都没有转动。

可以发现整个图像中几乎所有的荧光分子的过焦图案都是双翼结构, 这表明绝大多数荧光分子的偶极矩取向都平行于基底和膜表面, 只有少数呈现出非双翼的弧形结构(如图 24 中 A 箭头所示)。统计发现, 如图 25 所示, θ 角的分布 95% 以上都是 90° , 只有少量的低于 90° , ψ 角的分布没有特定的选择性。该超薄膜膜厚是 11.5nm, 小于所用聚苯乙烯的 R_g (16.5nm)。垂直方向上的受限使得聚合物分子链沿平行于膜表面的方向排列, 这样荧光分子的排布就受到聚合物链排列的影响, 其取向与聚合物分子链排列方向平行, 即平行于膜表面的方向。

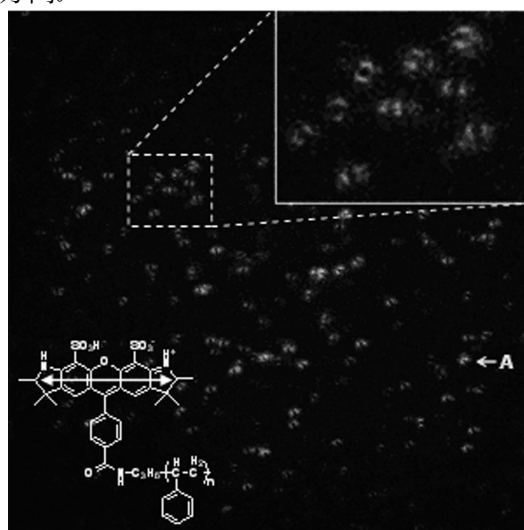


图 24 典型的荧光散焦图像(膜厚 11.5nm, 温度 40°C)。大部分图案都呈对称的哑铃状, 说明大部分荧光分子都是平行于基底取向的^[58]。小箭头 A 标注了非面内取向的一个例子。图像尺寸 $50.6 \mu\text{m} \times 50.6 \mu\text{m}$ 。

左下角是 Alexa532 标记的 PS 的化学结构, 白色双箭头表示发光偶极矩的方向。

Figure 24 A typical fluorescence de-focus image of PS film (thickness: 11.5 nm) at 40°C . Most of the molecules show orientation parallel to the substrate's surface, demonstrated by the symmetrical dumbbell-shaped patterns^[58]. A small portion has noticeable out-of-plane orientation, denoted by Arrow A as an example.

The size of the image is $50.6 \mu\text{m} \times 50.6 \mu\text{m}$. The inset shows a magnified section of the original image. The chemical structure of fluorophore (Alexa532) labeled polymer is also shown. The double arrow in white denotes the direction of emission dipole moment of the fluorophore.

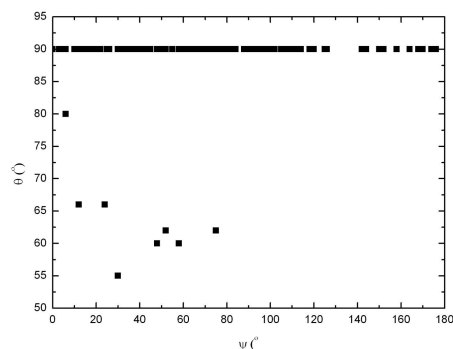


图 25 图 24 中荧光分子三维取向角的分布

Figure 25 Distribution of 3-D orientation angle of fluorescence molecule in Figure 24

当再进一步升高温度到 44 °C 时, 减少曝光时间到 0.5 s 以减弱荧光分子的漂白。其它条件不变, 拍摄散焦录像。分析录像发现: 与 40 °C 时不同, 大部分的荧光分子都开始转动起来。在此还有另外一个现象, 就是发生转动的荧光分子更容易光漂白, 这也许与自由体积增加所形成的氧气的氛围有关。选此温度的录像中的一个荧光分子做转动追踪分析。如图 26 所示, 左侧的原始图可以发现荧光分子很短的时间范围内就已经发生了剧烈的转动行为。如图 26 右侧, 在 14.5 s 到 16.5 s 这 2.0 s 的时间范围内, 荧光分子的空间取向角度 ψ 的改变高于 90°, 而该过程中 θ 角基本没有大的改变。

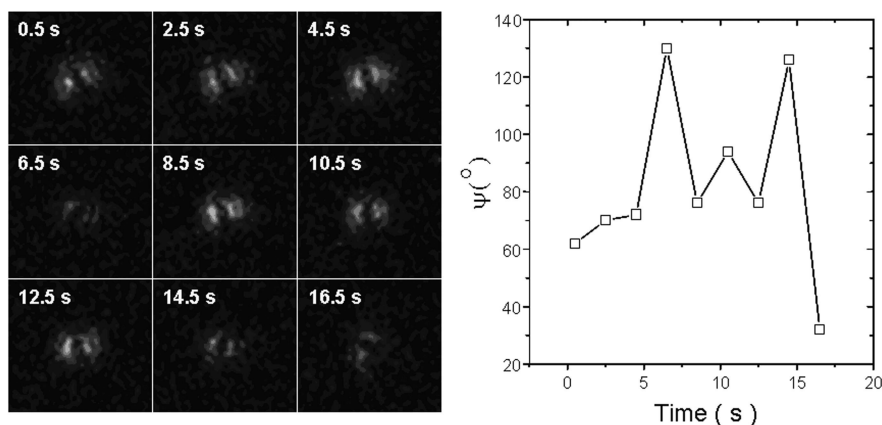


图 26 左图: 特定荧光分子不同时刻的荧光散焦图案^[38]。右图: 该荧光分子在不同时刻的面内取向角。PS 超薄膜膜厚 11.5 nm, 温度 44 °C。

Figure 26 Left panel: A series of typical de-focus fluorescence images of one specific fluorophore at different time of observation^[38]. Right panel: The in-plane dipole orientation angle (ψ) of this fluorophore as a function of observation time. The sample is 11.5 nm thick PS film and the temperature is 44 °C.

在 44 °C 时拍摄的录像中荧光分子的空间取向趋势与 40 °C 时一样, 荧光分子的散焦图案都是双翼结构, 事实上在实验所测量的从 31 °C 到 48 °C 的温度范围内, 荧光分子不管有无转动发生, 几乎其散焦图案都是双翼结构, 即其偶极矩取向是平行于聚合物膜表面的。

在整个升温的过程中, 最明显的变化就是荧光分子出现的由冻结到转动的转变。定义荧光分子转动分数(Rotation fraction, f_R):

荧光分子转动分数 = 录像中转动的荧光分子数 / 荧光分子总数

录像中转动的荧光分子是指在录像所对应的时间范围内转动角度大于 10° 的荧光分子。之所以选用 10° 作为一个量化标准, 是因为低于 10° 的转动很不容易分辨清晰。荧光分子总数是指在整个录像拍摄过程中所有出现的荧光分子的总和, 包括始终发光的荧光分子、中途发光的荧光分子、被漂白和发生淬灭的荧光分子。

针对这个膜厚不同温度的转动录像,我们统计了荧光分子转动分数与温度之间的关系,如图 27 所示。随着温度的升高,在 40 °C 之前荧光分子转动分数并没有大的改变发生,均小于 5%。但当温度升高到 44 °C 时,转动分数急剧增加,95% 以上的荧光分子都发生了转动。将转动分数发生剧烈增加时所对应的温度定义为 T_c (critical temperature or changing temperature of rotation fraction), 以此可以考察 T_c 的膜厚依赖性、分子量的依赖性等,进而研究超薄膜玻璃化转变过程中自用表面效应、基底界面效应、受限作用等因素的作用。相关工作已经开展。

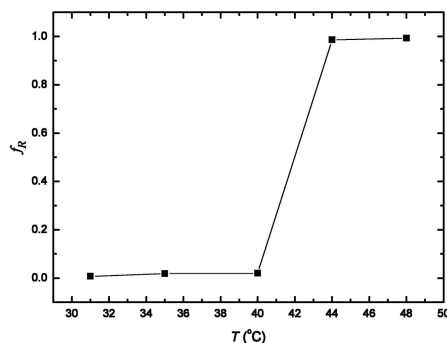


图 27 荧光分子转动分数(f_R)和温度的关系。PS 超薄膜膜厚 11.5 nm。

Figure 27 The value of fraction of rotating molecules (f_R) as a function of temperature in 11.5 nm PS film.

关于 T_c 的膜厚依赖性,初步的结果是 11.5 nm 的聚苯乙烯超薄膜的 T_c 为 42 °C (取 40 °C 和 44 °C 的中间值), 20.2 nm 厚的超薄膜的 T_c 为 54 °C, 36.5 nm 厚的超薄膜在 65 °C 之前没有看到荧光分子有不转到转动的转变。为保护油镜物镜,没有做更高温度的散焦实验。在该聚合物超薄膜体系中,PS 与硅片基底的亲和性不好。所以基底界面效应和自由表面效应一样,都是促进链段运动的因素。超薄膜厚度增加,这两部分的贡献减弱,链段运动能力逐渐向本体回归, T_c 逐渐增大。

标记在聚合物链末端的荧光分子的转动反映的是什么层次上的松弛运动? 对于本体聚合物体系,掺杂或标记在聚合物链上的荧光分子的转动与玻璃化转变或 α 松弛运动直接相关的^[59]。类似的介电实验^[56]也说明探针分子的介电响应与体系 α 松弛偶合。实验中的时间尺度是 400 s, 聚合物在玻璃化转变温度时的 α 松弛时间也是这个数量级。所以,我们认为实验中看到的荧光分子由冻结到转动的转变与 α 松弛过程相关^[56]。对比超薄膜的 T_c 数据和文献中的椭圆 T_g 数据^[42], 首先两者都低于本体玻璃化转变温度 $T_{g,DSC}$ 。硅片表层的二氧化硅层与 PS 链的亲和性不好,上述结果是可以预见的。然而,还发现 T_c 数据比报道的椭圆 T_g 数据还要低 20 ~ 30 °C。如此低的转变温度反映的是 α 松弛的前期过程, β 松弛过程还是其它松弛过程? 对于 T_c 转变的物理意义还有待进一步探究,这也是下一步我们工作的重点。聚合物玻璃化转变是高分子物理中的经典难题。对于此问题的探究我们需要不断发展的新思路、新手段。单分子荧光散焦成像技术具有单分子级别的灵敏度,能对单个链段运动进行直接的观察。基于链段运动的直接信息对理解玻璃化转变过程是很有意义的。我们成功将单分子荧光散焦技术引入聚合物超薄膜链段松弛的研究中,观察到了探针分子由冻结到转动的转变过程。后续的工作如探针分子转动的膜厚依赖性、分子量依赖性、外场激励下的运动等将持续开展。

4 结论与展望

采用单分子荧光显微与光谱方法开展关于高分子单链的研究,能够成功地做到无扰动测量,能够最大限度地展现单分子链的本征性质与特点,因此,其在高分子物理的研究中具有很大的潜力,特别是对于那些常规方法难以涉及的科学问题。在我们的研究中,荧光关联光谱成功地观察到了聚电解质单分子链的构象随电荷密度以及盐浓度的变化,揭示了其分子链周围的抗衡离子的分布规律。荧光关联光谱还有效地研究了液体聚合物界面处单分子链的横向运动规律,验证了 de Gennes 关于不相容聚合物的界面流变学分子模型。单分子荧光显微成像技术不仅仅让我们观察并追踪了单个分子链的运动,还使得我们

成功地跟踪了聚合物分子链的链段运动,为我们理解聚合物相变过程(结晶、玻璃化转变)的动态性质提供了新的实验数据。

我们的研究还表明,发展更新的、更加有效的单分子研究的新方法对于高分子单链的研究无疑是至关重要的,将单分子实验方法与传统的研究方法相结合,揭示高分子体系众多性质的微观实质,对于我们更加深入认识高分子物理的基本规律与原理具有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] Flory P J. Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press, 1953; De Gennes P G, Scaling Concepts in Polymer Physics, Cornell University Press, 1979; Rubinstein M, Colby R H. Polymer Physics, Oxford University Press, New York, 2003
- [2] Chu B. Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice, Dover, 2007; Berne B J, Pecora R. Dynamic Light Scattering, Dover, 2000; Higgins J S, Benoit H C. Polymers and Neutron Scattering, Clarendon Press, 1997
- [3] Zhang W K, Zhang X. Prog Polym Sci, 2003, 28: 1271 ~ 1295; Oesterhelt F, Rief M, Gaub H E. New J Phys, 1999, 1, 6 1
- [4] Smith D E, Babcock H P, Chu S. Science, 1999, 283, 1724; Schroeder C M, Babcock H P, Shaqfeh E S G, Chu S. Science, 2003, 301, 1515
- [5] Magde D, Elson E, Webb W W. Phys Rev Lett, 1972, 29: 705; Elliot L, Elson D M. Biopolymers, 1974, 13: 1; Magde D, Elson E, Webb W W. Biopolymers, 1974, 13: 29; Rigler R, Widengren J, Kask P. Eur Biophys J, 1993, 22: 169; Eigen M, Rigler R. PNAS, 1994, 91: 5740
- [6] Blom H, Eggeling C. Current Pharmac Biotechnol, 2006, 7: 51
- [7] Chen Y, Muller J D, Cratton E. Biophys J, 1999, 77: 553.
- [8] Hillesheim L N, Muller J D. Biophys J, 2003, 85: 1948
- [9] Huang B, Perroud T D, Zare R N. Chem Phys Chem, 2004, 5: 1523
- [10] Perroud T D, Huang B, Wallace M I, Zare R N. Chem Phys Chem, 2003, 4: 1121
- [11] Wang S, Zhao J. J Chem Phys, 2007, 126: 091104
- [12] Wang S, Granick S, Zhao J. J Chem Phys, 2008, 129: 241102
- [13] Jia P, Zhao J. J Chem Phys, 2009, 131: 231103
- [14] Yang J, Zhao J, Han C C. Macromolecules, 2008, 41: 7248
- [15] Raphael E, Joanny J F. Europhys Lett, 1990, 13: 623
- [16] Vyaver S, Seidel C. J Phys Chem B, 2004, 108, 18804
- [17] Vyaver S, Seidel C. Europhys Lett, 2003, 64: 536
- [18] Olvera M, Belloni L, Delsanti M, Dalbiez J P, Spalla O, Drifford M. J Chem Phys, 1995, 103: 5781
- [19] Hsiao P Y, Luijten E. Phys Rev Lett, 2006, 97: 148301
- [20] Hsiao P Y. Macromolecules, 2006, 39: 7125
- [21] In CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version, 2007(87th Edition).
- [22] Volk N, Vollmer D, Schmidt M, Oppermann W, Huber K. Adv Polym Sci, 2004, 166: 29
- [23] Abdel-Goad M, Pyckhout-Hintzen W, Kahle S, Allgaie J, Richter D. Macromolecules, 2004, 37: 8135.
- [24] Brochard F, de Gennes P G, Troian S. C R Acad Sci, 1990, 310: 1169
- [25] de Gennes P G. C R Acad Sci, 1989, 308: 1401
- [26] Goveas J L, Fredrickson G H. Eur Phys J B, 1998, 2: 79
- [27] Wool R P. Polymer Interfaces. Hanser Verlag, Munich, Germany, 1995.
- [28] Granick S. Science, 1991, 253 (5026): 1374 ~ 1379
- [29] Cheng S Z D, Zhang A Q, Barley J S, Chen J H, Habenschuss A, Zschack P R. Macromolecules 1991, 24 (13): 3937 ~ 3944
- [30] Reiter G, Castelein G, Sommer J U. Phys Rev Lett, 2001, 86 (26): 5918 ~ 5921
- [31] Zhu D S, Liu Y X, Shi A C, Chen E Q. Polymer, 2006, 47 (15): 5239 ~ 5242
- [32] Zhai X M, Wang W, Ma Z P, Wen X J, Yuan F, Tang X F, He B L. Macromolecules, 2005, 38 (5): 1717 ~ 1722
- [33] Antia M, Islas L D, Boness D A, Baneyx G, Vogel V. Biomaterials, 2006, 27 (5): 679 ~ 690
- [34] Moerner W E. Proc National Acad Sci USA, 2007, 104 (39): 15584 ~ 15584
- [35] Ram S, Prabhat P, Ward E S, Ober R J. Optics Express, 2009, 17 (8): 6881 ~ 6898
- [36] Ambrose W P, Goodwin P M, Jett J H, Van Orden A, Werner J H, Keller R A. Chem Rev, 1999, 99 (10): 2929 ~ 2956
- [37] Bi W, Teguh J S, Yeow E K L. Phys Rev Lett, 2009, 102 (4): 048302
- [38] Chen R, Li L, Zhao J. Langmuir, 2010, 26 (8): 5951 ~ 5956

- [39] Sukhishvili S A, Chen Y, Muller J D, Gratton E, Schweizer K S, Granick S. *Nature*, 2000, 406 (6792): 146~146
- [40] (a) Zhao J, Granick S. *J Am Chem Soc*, 2004, 126 (20): 6242~6243; (b) Zhao J, Granick S. *Macromolecules*, 2007, 40 (4): 1243~1247
- [41] Frank C W, Rao V, Despotopoulou M M, Pease R F W, Hinsberg W D, Miller R D, Rabolt J F. *Science*, 1996, 273 (5277): 912~915
- [42] Keddie J L, Jones R A L, Cory R A. *Europhys Lett*, 1994, 27 (1): 59
- [43] Efremov M Y, Olson E A, Zhang M, Zhang Z, Allen L H. *Phys Rev Lett*, 2003, 91 (8).
- [44] Yang Z, Fujii Y, Lee F K, Lam C H, Tsui O K C. *Science*, 2010, 328 (5986): 1676~1679
- [45] OConnell P A, McKenna G B. *Science*, 2005, 307 (5716): 1760~1763
- [46] Bartko A P, Xu K, Dickson R M. *Phys Rev Lett*, 2002, 89 (2), 026101.
- [47] Bartko A P, Dickson R M. *J Phys Chem B*, 1999, 103 (51): 11237~11241
- [48] Bohmer M, Enderlein J. *J Opt Soc Am B: Opt Phys*, 2003, 20 (3): 554~559.
- [49] Uji-i H, Melnikov S M, Deres A, Bergamini G, De Schryver F, Herrmann A, Müllen K, Enderlein J, Hofkens J. *Polymer*, 2006, 47 (7): 2511~2518
- [50] Habuchi S, Oba T, Vacha M. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13 (15): 6970~6976
- [51] Inoue R, Kawashima K, Matsui K, Kanaya T, Nishida K, Matsuba G, Hino M. *Phys Rev E*, 2011, 83 (2): 021801.
- [52] Wallace W E, Vanzanten J H, Wu W L. *Phys Rev E*, 1995, 52 (4): R3329~R3332
- [53] Ellison C J, Torkelson J M. *Nature Mater*, 2003, 2 (10): 695~700
- [54] Paeng K, Swallen S F, Ediger M D. *J Am Chem Soc*, 2011, 133 (22): 8444~8447
- [55] Hall D B, Hooker J C, Torkelson J M. *Macromolecules*, 1997, 30 (3): 667~669
- [56] Priestley R D, Broadbelt L J, Torkelson J M, Fukao K. *Phys Rev E*, 2007, 75 (6): 061806
- [57] Forrest J A, Svanberg C, Revesz K, Rodahl M, Torell L M, Kasemo B. *Phys Rev E*, 1998, 58 (2): R1226
- [58] Zheng Z L, Kuang F Y, Zhao J. *Macromolecules*, 2010, 43 (7): 3165~3168
- [59] Lee H N, Paeng K, Swallen S F, Ediger M D. *Science*, 2009, 323 (5911): 231~234

The Studies on the Physics of Polymer Single Chain by Single Molecule Fluorescence Techniques

WANG Sheng-qin, JIA Peng-xiang, CHEN Rui, ZHENG Zhong-li, LUO Shuang-jiang,

LU Xi, LI De-sheng, ZHAO Jiang^{*}

(*Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

Abstract: This article summarizes recent studies on the physics of single polymer chains by the application of single molecule fluorescence techniques, especially the recent researches from our laboratory. By applying single molecules microscopy and spectroscopy, such as fluorescence correlation spectroscopy, photon count histogram, single molecule fluorescence imaging, and single molecule fluorescence de-focus imaging, we have studied conformational transition and counterion distribution of polyelectrolytes, single chain dynamics of polymers at interfaces, single chain diffusion and segmental motion of polymers under confinements. The results indicate the great potential of single molecule fluorescence techniques in the study of polymer physics.

Key words: Single molecule fluorescence; Single chain of polymer; Polyelectrolytes; Polymer crystallization; Glass transition