

荧光单分子检测技术在生命科学中的应用

李 哲 曹 莉*

(第二军医大学神经生物学教研室, 上海 200433)

摘要 荧光单分子检测技术是用荧光标记来显示和追踪单个分子的构象变化、动力学, 单个分子之间的相互作用以及单分子操纵的研究。过去对于生命科学分子机制的研究, 都是对分子群体进行研究, 然后平均化来进行单分子估测。因此, 单个分子的动态性和独立性也被平均化掉而无法表现出来。荧光单分子检测技术真正实现了对单个分子的实时观测, 将过去被平均化并隐藏在群体测量中不能获得的信息显示出来。近几年来, 荧光单分子检测技术的飞速发展, 为生命科学的发展, 开辟了全新的研究领域。现就荧光单分子检测技术在研究动力蛋白、DNA 转录、酶反应、蛋白质动态性和细胞信号转导方面的应用进展作一综述。

关键词 单分子荧光检测技术

细胞内含有多种分子机器, 涉及细胞运动、DNA 转录加工、细胞信号转导、蛋白质合成和蛋白质折叠等多种过程, 这些分子机器在活细胞中协调运作, 使细胞功能得到发挥。传统的分子和细胞生物学技术已经比较深入地阐明了分子机器中生物分子的构成及其所扮演的角色, 但是单个分子的活动却被平均化而观察不到。迄今为止, 在细胞生物学领域所进行的研究, 绝大部分是集团平均(ensemble averaging)研究, 而不是单分子研究。

所谓单分子研究, 是指对单个分子的构象变化、动力学, 单个分子之间的相互作用以及单分子操纵的研究。单分子水平的检测有助于获得应用整体学研究方法无法观察到的信息, 例如被观察目标的分布函数, 异源样本中的亚群, 以及在生化反应中常被掩盖的非同步的分子轨迹, 此外, 单分子研究还可以检测到发生率较低的结构改变等^[1-4]。

早在量子力学建立的初期, 著名的诺贝尔奖获得者 Feynman 就梦想着能在原子、分子尺度上观察和操纵物质世界, 然而多年以来, 人们对微观世界的观测和研究都是建立在系综平均(system average)的基础上。直到 20 世纪 80 年代扫描隧道显微镜、荧光探针、光镊技术等出现, 进而 20 世纪 90 年代单分子科学的形成与发展才使人们真正实现了 Feynman 的梦想。

荧光单分子检测技术(single molecule detection, SMD)是用荧光标记来显示和追踪单个分子的方法。1976 年, Hirschfeld^[5]检测到标有 80~100 个发光团

的单个抗体分子, 开创了 SMD 的先河。1994 年 Moerner^[6]首先在水容器风干表面对单荧光团进行显象观测, 1995 年 Funatsu 等^[7]又利用全内反射显微镜(total internal reflection microscopy, TIRFM)在水溶液中观察到单个荧光基团标记的蛋白质分子, 并追踪其运动轨迹, 真正实现了 SMD 对单荧光分子的检测。由于荧光信号测量灵敏度高以及光子对分子干扰最轻微, SMD 被广泛应用于单分子研究。尤其对于需观察细胞内单分子实时变化的细胞生物学研究, SMD 可能是唯一有效的技术。

1 SMD 在动力蛋白研究中的应用

1.1 ATP 酶动力蛋白

ATP 合成酶(F_1 - F_0 -ATPase)是一个转动蛋白。它利用 F_0 段 H^+ 的能量, 在 F_1 段使 ADP 转化为 ATP, 这是一个可逆的过程。当 F_1 段水解 ATP 时, F_0 段就向相反的方向泵出 H^+ 。ATP 酶和质子流是由连接 F_0 和 F_1 的轴的旋转结合在一起的, 这个轴的旋转机制一直是科学家们感兴趣的问题。现在利用 SMD 可以清楚地观察到这个旋转过程^[8]。将一个荧光标记的肌动蛋白分子垂直连接于轴的顶部, 并对其进行观测。当 ATP 浓度降低时, 从俯视视角对肌动蛋白进行实时成像, 可以清楚地观察到逆时针的 120° 步进式的旋转, 肌动蛋白分子在时钟 12:00、8:00

收稿日期: 2004-03-10 接受日期: 2005-06-14

* 通讯作者: Tel: 021-25070328-8702, Fax: 021-65503128, E-mail:

happycaolily@hotmail.com

和4:00位置有较长时间的停留,3次旋转后回到原位。

1.2 肌球蛋白

肌球蛋白(myosin)是参与肌肉收缩和其他细胞运动作用的动力分子。在肌肉收缩时,肌球蛋白沿着肌动蛋白丝滑动,并由ATP水解释放的化学能提供能量。对于这一过程的分子机制,现在被广泛接受的是“杠杆摆动模型”,即肌球蛋白头部的颈区随着头部主体而进行摆动,从而产生位移和力,这种摆动与ATP一对一的水解循环紧密相关。随着单分子技术的发展,研究人员完成了对单肌球蛋白分子机械运动的观测,他们将一个肌球蛋白碎片(S1)分子进行荧光标记,并通过检测探针来观察它的活动^[9]。S1是肌球蛋白与肌动蛋白和ATP结合位点的头部,而且与整个肌球蛋白一起快速移动。这里的位移记录显示出,肌球蛋白与肌动蛋白的相对位移,并不是象人们想象的那样一步进行的,而是分成很多随机的步骤^[10],其中甚至有些步骤的位移方向是相反的,而每一步反应的位移绝对值都是5.5 nm,即肌动蛋白丝上邻近分子间的距离。这个结果向科学界提出了肌球蛋白与肌动蛋白在布朗运动作用下产生相对位移的可能性。

1.3 动力素

动力素(kinesin)是另外一种动力分子,它可以沿着微管运输细胞器。动力素不象肌球蛋白那样大量地与微丝结合,它在细胞内只以少量分子的形式工作。动力素分子可以沿着微管长距离运动而不分离^[11],因此对单动力素分子进行荧光标记后,可以观察到一连串的单分子运动^[12]。研究表明,动力素分子在微管上的移动分为若干个步骤,每一步的位移绝对值都是8 nm。这更说明了布朗运动在这些分子机器的分子运动机制中所起的重要作用^[13],而ATP水解的化学能量可以使布朗运动偏向一个特定的方向。

2 SMD在细胞信号转导研究中的应用

细胞信号转导是SMD的主要应用领域之一^[14,15]。细胞十分复杂,但是各种各样的分子机器却组成了很强大的控制系统。在外部的刺激下,细胞进行着自主而有序的工作。信号在细胞内如何传递的问题是生命科学的一个中心课题,虽然已有很大的进展,但是其整个过程的具体机制还是没有被阐明。细胞信号转导是由体外信号触发,并且首先发生在

细胞膜上,因此对于胞膜单分子的监测将是研究信号转导机制的有力手段。已实现利用SMD在人工膜上观察荧光标记的单脂质分子的布朗运动^[16];而科学家们用实验证实,利用TIRFM可以直接观察活细胞表面单分子荧光标记的EGF与受体EGFR的结合以及EGF-EGFR复合物的二聚化^[17]。因为TIRFM技术只能观察到细胞表面附近的单个荧光分子,所以将EGF分子进行1:1荧光标记,当EGF与活细胞表面的EGFR结合时,可以借助TIRFM观察到。这些结合在细胞表面的荧光标记的单个EGF分子就是单个EGF-EGFR复合物。通过这种方法,从单分子水平在活细胞上观察到EGF受体二聚化过程为:先形成EGF-EGFR复合物,然后形成二聚体,激活下游信号通路。这一观察表明了SMD可以被用来研究活细胞内的二聚化,寡聚化,结合、分离以及膜蛋白的构象动力。这为深入研究细胞信号转导的分子机制提供了强大而有效的科学方法。

3 其他方面的应用

3.1 DNA转录

研究人员对基因表达的机制已经有了相当深入的研究,其最初步骤包括RNA聚合酶与DNA的结合,转录开始时DNA序列对启动基因的寻找和在DNA序列基础上RNA的合成,这就是基因表达的中心调节机制。近几年来,SMD技术被应用于对基因表达过程的直接观察^[18]。研究人员将单RNA聚合酶分子进行荧光标记后,观察到了它在DNA表面的滑动运动,这为寻找启动基因的滑动机制提供了直接的证据。当RNA聚合酶与DNA的启动基因结合时,转录过程就开始了。这样,对于曾经只能想象的DNA转录的早期步骤,如今已经可以进行直接的观察。随着SMD技术的深入发展,人们最终可以观察到包括尚未阐明的终止机制在内的DNA转录的全部过程。

3.2 酶催化反应

通过观察荧光标记的ATP类似物——Cy3-ATP,可实现对酶分子催化的单ATP水解循环过程^[19]的观察。Cy3-ATP与ATP有相同的水解机制,其与肌球蛋白标记分子结合位点的荧光团使得对其水解过程的观测成为可能,同时还可以观察到肌球蛋白的机械运动。通过观察可以看到,肌球蛋白头部与肌动蛋白的分离在ATP结合之后很快就发生了,但是这个使得它们分离的力的产生并不只是决定于ATP

的水解, 而是可以看到两种不同的情况: 一种情况下, ADP 一释放, 力就产生了; 另一种情况下, 会在 ADP 释放后延迟 1 s 产生。由此可以推断, ATP 水解释放的能量也可以被储存起来用于以后力的产生。

3.3 蛋白质折叠

蛋白质折叠的机制一直吸引了众多优秀科学家的兴趣。是否每个分子都用相同的方式折叠, 还是可以观察到多种不同的折叠方式呢? 在体内, 蛋白质的折叠是在分子伴侣的辅助下进行的。SMD 可以很好的帮助我们人们了解这一分子机器的运转机制^[20]。

4 小结

单分子层次的某些生物物理现象将与宏观现象、系综平均现象有着显著的差异。SMD 使人们能直接研究和操纵单个的分子。随着各种微测量手段的发展, SMD 已经被更广泛地应用于生命科学研究的各个领域。通过考虑光的偏振性质并刚性联结荧光物质, 可以方便地研究生物分子或其中某部分的取向和旋转。此外, 还可以采用不同荧光物质标定不同分子, 研究分子间相互作用。例如, 通过计算两个荧光物质的荧光共振能量转移效率, 可以计算分子间的距离和相互作用力。这种方法可以达到 2~8 nm 的空间分辨, 从而实现了不使用复杂的近场

光学系统而达到远低于衍射极限的空间分辨。SMD 还为研究单个生物分子的构象状态及构象动力学提供了行之有效的方法。由于荧光染料分子的直径远小于其辐射光波长, 故可将其视为点光源。通过光学系统对点源的响应(点传播函数), 人们可以对点光源位置进行精确定位, 进而研究单分子构象。有理由相信, SMD 将成为生物科学发展的强大动力。

参考文献 (References)

- [1] Johnson CK *et al. Physiology*(Bethesda), 2005, **20**: 10
- [2] Kulzer F *et al. Annu Rev Phys Chem*, 2004, **55**: 585
- [3] Ishijima A *et al. Trends Biochem Sci*, 2001, **26**: 438
- [4] Ishii Y *et al. Trends Biotechnol*, 2001, **19**: 211
- [5] Hirschfeld T. *Appl Opt*, 1976, **15**: 2965
- [6] Moerner WE. *Science*, 1994, **265**: 46
- [7] Funatsu T *et al. Nature*, 1995, **374**: 555
- [8] Noji H *et al. Nature*, 1997, **386**: 299
- [9] Kitamura K *et al. Nature*, 1999, **397**: 129
- [10] Mehta A. *J Cell Sci*, 2001, **114**: 1981
- [11] Vale RD *et al. Nature*, 1996, **380**: 451
- [12] Visscher K *et al. Nature*, 1999, **400**: 184
- [13] Capitanio M *et al. Microsc Res Tech*, 2004, **65**: 194
- [14] Zal T *et al. Curr Opin Immunol*, 2004, **16**: 674
- [15] Jares-Erijman EA *et al. Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 1387
- [16] Wallace MI *et al. J Biol*, 2003, **2**: 4
- [17] Sako Y *et al. Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 168
- [18] Goodwin PM *et al. Curr Pharm Biotechnol*, 2004, **5**: 271
- [19] Lu HP. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, **5**: 261
- [20] Zhuang X *et al. Curr Opin Struct Biol*, 2003, **13**: 88

Application of the Single Molecule Detection Techniques in Life Science

Zhe Li, Li Cao*

(Department of Neurobiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract The single molecule detection technique is a technology to study conformational change, dynamics, interaction and manipulation of single molecule by fluoresce labeling. In ensemble measurements involving a large number of molecules, the dynamic properties of biomolecules and the unique operations of molecular machines are averaged and cannot be observed. Molecule detection techniques have allowed us to record the behavior of individual molecules in real time. The dynamic properties, which were hidden in averaged ensemble measurements, have been unveiled. In recent years, the molecule detection techniques have developed rapidly and opened up a new era of life science. The present review summarized recent progresses in application of molecule detection techniques in molecular motors, DNA transcription, enzyme reactions, protein dynamics, and cell signaling.

Key words single molecule fluorescence detection