

基于荧光漂白恢复技术定量分析膜蛋白流动性的 实验设计

王书伟¹ 崔宪奎² 朱蕾¹ 王向锋¹ 傅缨^{1*}

(¹中国农业大学生物学院, 植物抗逆高效全国重点实验室, 北京 100193;

²康复大学生命科学与健康学院, 青岛 266113)

摘要 荧光漂白恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)技术作为定量分析细胞质膜流动性的关键手段之一, 在细胞膜动力学研究领域具有广泛的应用价值。囊泡运输(包括胞吞作用与胞吐作用)作为细胞内外物质交换的核心生物学过程, 其运行机制高度依赖于质膜的流动性。基于科教融合的教学理念, 在“细胞生物学实验”研究生课程中融入FRAP技术实验模块, 其核心目标在于引导学生探究“囊泡运输”与“细胞质膜流动性”的内在相关性。该实验教学体系不仅充分凸显了FRAP技术在活细胞动态监测中的独特优势, 更通过“理论知识-实验操作-数据分析”的完整训练体系, 强化了学生对膜流动性与囊泡运输等基础理论知识的理解; 并通过引导学生探究膜异质性及微聚体空间组织特性等细胞生物学前沿科学问题, 拓展了其学术视野, 为后续开展膜蛋白相关研究奠定了方法学基础。

关键词 荧光漂白恢复技术; 细胞质膜流动性; 囊泡运输; 活细胞成像

Experimental Design for Quantitative Analysis of Membrane Protein Mobility Based on Fluorescence Recovery after Photobleaching

WANG Shuwei¹, CUI Xiankui², ZHU Lei¹, WANG Xiangfeng¹, FU Ying^{1*}

(¹State Key Laboratory of Plant Environmental Resilience, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ²School of Life Sciences and Health, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266113, China)

Abstract FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) is a crucial technique for quantifying plasma membrane fluidity and is widely used in the study of cell membrane dynamics. Vesicle trafficking, which includes processes such as endocytosis and exocytosis, represents a fundamental cellular activity essential for the exchange of substances between intracellular and extracellular compartments. Its function efficiency is closely tied to the fluidity of the plasma membrane. Guided by the principle of integrating research and education, this project introduces an FRAP module into the “Cell Biology Experiment” course for graduate students, aiming to elucidate the intrinsic relationship between “vesicle trafficking” and “membrane fluidity”. The experimental teaching framework emphasizes FRAP’s unique capability to monitor real-time live-cell dynamics, while establishing a comprehensive training system that integrates “theoretical knowledge-experimental operation-data analysis”. This approach deepens students’ understanding of core scientific concepts, such as membrane fluidity and vesicle trafficking, as well as

收稿日期: 2025-07-14 接受日期: 2025-11-14

国家重点研发计划(批准号: 2022YFE0108200)和全国高校实验室工作研究会农业高校分会重点研究项目(批准号: NYFH2025-17)资助的课题

*通信作者。Tel: 010-62734395, E-mail: yingfu@cau.edu.cn

Received: July 14, 2025 Accepted: November 14, 2025

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2022YFE0108200) and the Agricultural Colleges Section Research Project of the National Association for University Laboratory Management (Grant No.NYFH2025-17)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62734395, E-mail: yingfu@cau.edu.cn

membrane heterogeneity and nanocluster organization, laying a solid methodological foundation for future in-depth studies of membrane proteins.

Keywords FRAP; plasma membrane fluidity; vesicle trafficking; live-cell imaging

细胞质膜作为细胞与外界环境进行选择性质交换的界膜,由脂质、膜蛋白和糖类组成。其中,磷脂双分子层是组成质膜的基本结构成分,蛋白质分子以不同方式镶嵌在磷脂双分子层中,执行物质运输、信号转导等各种生物学功能,而单糖分子或寡糖链以共价键的形式与膜中的脂质或蛋白质相结合,分别形成糖脂和糖蛋白,参与细胞识别、黏附及信号转导等过程。目前公认的“流动镶嵌模型”强调膜脂分子和膜蛋白具有流动性,“脂筏模型”提出膜上富含鞘磷脂和固醇的相对有序区域(即“脂筏”)承载特定功能蛋白,从而赋予质膜功能分区。膜脂分子与膜蛋白的动态互作和协同作用使细胞质膜具有流动性与功能多样性,这是细胞生命活动的重要结构基础。

囊泡运输(包括胞吞与胞吐作用)作为细胞内外物质交换的核心生物学过程,其运行机制高度依赖于质膜的流动性。在细胞生物学教学体系中,细胞质膜流动性及其相关的囊泡运输过程作为阐释生物膜结构-功能互作的核心理论基础,其动态特性的可视化表征和定性定量分析始终是教学实践中的关键难点。传统教学模式主要依赖静态示意图,致使学生在建构“分子动力学-靶向运输-细胞生理应答”这一整合性认知体系时存在困难。荧光漂白恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)技术整合了荧光分子探针标记、活细胞动态成像和动力学分析,已成为分析细胞表面或细胞内部膜脂分子与膜蛋白运动迁移速率的重要研究手段^[1-3]。基于此,在实验课程中引入FRAP模块,通过活体动态成像与定量分析相结合的直观可视化教学策略,促使学生深入理解细胞质膜流动性、囊泡运输与细胞功能调控机制的理论知识。

基于此,我们设计了以质膜定位的SYP121蛋白为对象的教学案例。该蛋白通过囊泡运输途径运输到质膜,利用FRAP技术构建其运输过程的可视化教学体系,可帮助学生突破对囊泡运输(如胞吐作用)的静态认知局限,为细胞生物学核心概念的深度理解提供可视化解决方案。

1 实验原理

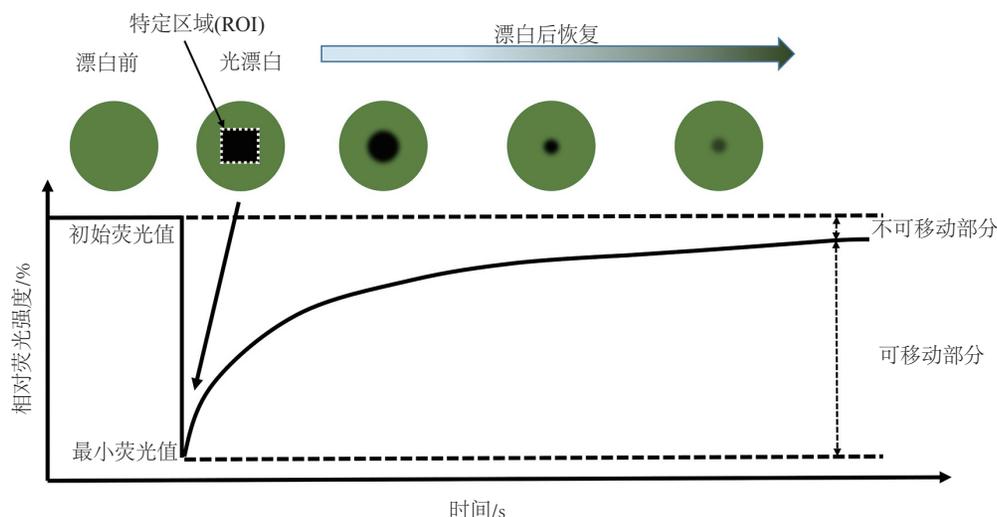
1.1 SNARE蛋白

真核生物中高度保守的SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)家族成员在介导内膜系统之间及靶向质膜的囊泡运输过程中发挥核心作用。大多数SNARE蛋白的C-端均含有跨膜结构域,根据其亚细胞定位的差异,可将其分为囊泡膜定位的v-SNARE(vesicle-SNARE)蛋白和靶膜定位的t-SNARE(target-SNARE)蛋白^[4]。值得注意的是,SNARE蛋白的生物学功能与其在膜系统中的动态分布密切相关,这种时空特异性分布模式是其发挥功能驱动膜融合的重要基础。已有研究表明,植物细胞中多个SNARE蛋白通过调控囊泡运输过程参与植物生长发育、胁迫应答、抗病反应及环境适应等众多生理过程^[5-9]。其中,t-SNARE蛋白SYP121通过胞吞作用和胞吐作用动态分布于囊泡膜与质膜^[10],该过程受多种蛋白的精密调控。例如,组成激活型ROP2(constitutively active ROP2, CA-rop2)不仅促进SYP121通过胞吐作用靶向运输到根毛顶端质膜,还可直接与质膜上的SYP121互作,增强其与R-SNARE蛋白VAMP722的结合能力,从而促进SNARE复合体的装配,最终提高根毛细胞在顶端生长阶段的胞吐运输效率^[5]。基于SYP121的膜定位特性,该蛋白融合荧光蛋白(fluorescence protein)后可作为分子探针,结合FRAP技术分析融合蛋白荧光信号在质膜上的动态恢复过程,为研究植物细胞囊泡运输(如胞吐作用)动力学提供了一种有效手段。

1.2 FRAP技术

在荧光探针标记的细胞中选取感兴趣区域(region of interest, ROI),利用高能激光束照射使该区域内的荧光分子发生不可逆的淬灭(光漂白)。然后由于周围未漂白区域的荧光分子不断向光漂白区域迁移,光漂白区的荧光强度逐渐恢复(图1)。

该技术可以对膜脂或膜蛋白分子的运动行为进行定性定量分析,有助于学生深入理解膜蛋白与脂质分子的动态特性^[5-6,11-13]。此外,FRAP还被用于某些功能蛋白(如受体、通道蛋白等)的研究,旨在阐



在光漂白处理前,采集未漂白区域的荧光信号作为初始荧光强度。通过高强度激光对选取的特定区域(ROI,图中以黑色标示)进行快速光漂白,使荧光信号急剧衰减至最低值,此时的荧光强度记为最小荧光值。随后采用低强度激光对漂白区域进行实时荧光强度监测,直至信号达到稳定。在此过程中,细胞内未被漂白的荧光分子会借助扩散运动或囊泡运输过程进入漂白区域,进而使得该区域的荧光强度逐步恢复,这部分分子群体被定义为可移动部分(mobile fraction),其荧光恢复程度反映分子的动力学特性。初始荧光强度与光漂白后稳态荧光强度的差值所对应的那部分分子,即为不可移动部分(immobile fraction)。

A specific ROI (region of interest, indicated by black square) is imaged to record its pre-bleach fluorescence intensity. An intense, focused laser beam is briefly applied to the defined ROI. This high-intensity light permanently bleaches the fluorescence of the molecules, creating a non-fluorescent dark area without causing significant overall cellular damage. Then the laser intensity is immediately reduced back to a low monitoring level. Time-lapse imaging then captures the fluorescence signal in the bleached ROI over time. Fluorescence recovers as unbleached, mobile fluorescent molecules from the surrounding areas diffuse or are actively transported into the bleached region. This population of molecules is defined as the mobile fraction, as indicated by the extent of fluorescence recovery to the pre-bleach level. In contrast, the immobile fraction is defined as the population of molecules corresponding to the difference between the initial fluorescence intensity and the steady-state intensity after photobleaching.

图1 荧光漂白恢复技术的原理

Fig.1 The principle of fluorescence recovery after photobleaching

明它们响应特定信号后通过胞吞与胞吐途径在胞质与质膜间动态重定位,进而调控不同细胞生命活动的机制^[5-6,14-15]。

2 实验教学课程设计

2.1 实验教学目的

教学团队以FRAP技术为核心,致力于实现“知行合一”的教学效果。我们不仅要求学生在认知层面掌握FRAP技术的核心原理与适用范围,更注重在实践层面培养学生独立完成样本制备、仪器操作与数据分析的关键技能。最终,引导学生通过定量分析荧光恢复曲线,将抽象的囊泡运输与细胞质膜流动性等生物学概念转化为具象的动态过程,从而深化学生对细胞复杂生命现象的理解。

2.2 教学难点与解决策略

本教学案例中所用到的转盘共聚焦显微镜属于精密仪器,操作复杂,学生因对关键参数设置不熟悉,容易在数据采集阶段出现偏差;开源图像分析软件(如FIJI)的使用门槛较高,学生在从图像处理到动

力学参数拟合的全流程中常遇到技术障碍,影响分析准确性。

针对上述难点,可通过以下策略进行改进:在仪器操作方面,通过录制在线教学视频、小规模分组实操培训等方式,强化学生规范操作设备的意识。在数据分析环节,编写详细的图像分析操作指南,逐步阐释关键参数的选取依据,引导学生从机械性的步骤执行,转向对数据内在生物学意义的解读与思考。

2.3 学时安排

本教学实验设计为4学时,具体安排如下:第1学时聚焦于理论原理与操作规范的讲解,为学生奠定必要的知识基础;第2、3学时作为核心实操环节,学生以5~6人小组为单位,在教师指导下轮流使用共聚焦显微镜进行独立的图像采集,确保每人均可获得充分的动手训练;第4学时则引导学生对自行采集的数据进行处理与分析,从而完成从理论认知到实践验证的能力进阶。

2.4 教学内容拓展

为进一步拓展学生的科研视野并深化其对技

术应用的理解,本课程还可从以下三个维度进行丰富与延伸。

2.4.1 蛋白类型拓展 在掌握FRAP基础操作后,可系统比较不同质膜定位蛋白[包括具有多次跨膜结构域的内在膜蛋白(如水通道蛋白PIP2;1^[16]),通过胞吐途径靶向质膜的胞质类受体激酶(如LIP1^[17]),以及脂筏定位蛋白(如flotillin-like蛋白FLOT1^[18])]的动态特性。进一步利用相应的遗传材料(如相关蛋白的功能缺失突变体和转基因过量表达株系),结合胞吞/胞吐过程的动态监测数据,利用FRAP技术对这些膜蛋白的动态参数进行定量分析,旨在深入解析其在质膜与胞内囊泡的时空分布差异,为阐明相关蛋白的生理功能及其响应环境刺激信号的动态调控机制提供重要依据。

2.4.2 细胞类型拓展 基于根毛细胞建立的FRAP技术体系,可拓展至其他具有特定生物学意义的植物细胞系统进行研究。例如,在根组织伸长区细胞中,其快速的伸长生长依赖于高效的膜蛋白转运机制。利用FRAP技术,可定量分析该区域质膜定位蛋白(如生长素转运蛋白PIN2^[19])的动态特性,探究其极性定位是否受囊泡运输调控。此外,结合细胞骨架动态研究(如微管/微丝成像^[20-21]),可深入解析细胞骨架网络对膜蛋白转运和极性定位的调控作用。花粉管是典型的极性生长细胞,其顶端持续性生长严格依赖于极性囊泡运输的精确调控及质膜的高度动态性^[22]。利用FRAP技术,可量化花粉管质膜上关键功能蛋白(如跨膜受体、离子通道)的动力学参数,进而阐明在植物生殖发育过程中,质膜流动性如何通过动态调控机制(如蛋白周转速率)适应花粉管顶端区域对快速膜融合及物质运输的生理需求。

2.4.3 交叉技术拓展 在掌握FRAP实验方法的基础上,可协同整合多种先进光学成像技术,以拓展研究思维。例如,结合全内反射荧光(total internal reflection fluorescence, TIRF)技术研究质膜附近单分子动力学特征^[23],为深入解析膜相分离、脂筏动态组装等前沿科学问题提供了关键技术支撑;结合校正光转换后荧光漂白恢复技术(corrected fluorescence recovery after photoconversion, cFRAPc),利用光转化荧光蛋白,可更精准追踪新合成蛋白经囊泡运输靶向质膜特定区域的时空动态^[14-15],为阐明蛋白质极性定位机制等核心生物学问题开辟动态追踪新途径。

2.5 实验材料与设备

2.5.1 实验材料 稳定表达带绿色荧光蛋白标记的SYP121(GFP-SYP121)的拟南芥转基因植株由本课题组之前所构建。Murashige & Skoog盐(MS, PM1080)、蔗糖(CS10581)、琼脂粉(agar, CA1331)均购于国产酷来博生物技术有限公司。

2.5.2 实验仪器 实验仪器包括:配备Yokogawa转盘共聚焦系统的Olympus IX81倒置显微镜、载玻片(型号:帆船牌NO.7105)、盖玻片(型号:世泰REF.10212450C)。

3 实验教学方法

3.1 固体培养基配制

称取2.2 g MS盐、10.0 g蔗糖,加入800 mL ddH₂O,用5 mol/L NaOH溶液调pH到5.7~5.9,加入ddH₂O定容至1 L,加入10.0 g琼脂,高温高压(121 °C、200 kPa)灭菌15 min。

3.2 拟南芥种植方法

根毛细胞采用改良的盖玻片斜面法培养^[24]。具体流程如下:将4 mL灭菌后的1/2 MS固体培养基均匀涂布于无菌的24 mm×50 mm盖玻片上,待其凝固后,沿长边一侧切出水平切面。另取一无菌玻璃培养皿,于其底部中央区域使用1/2 MS固体培养基固定两组首尾相接的1 mL无菌移液器吸头,作为支撑结构。在吸头支架一侧加入适量固体培养基以增强支撑作用,待其凝固后,将制备好的盖玻片以约30°倾角斜靠于吸头支架上,确保其水平切面朝上。随后,将经0.5%次氯酸钠消毒15 min并4 °C暗处理2天的拟南芥种子置于该水平切面上,并向皿底中加入适量无菌ddH₂O以维持培养皿内湿度,用封口膜密封培养皿,并将其转移至光照培养箱中继续培养。培养箱的环境参数如下:温度20~22 °C、湿度70%、光周期16/8 h(光照/黑暗)。待幼苗生长到5天后,进行显微成像观察。

3.3 药剂学处理实验

取萌发后5天的拟南芥幼苗,在含20 μmol/L BFA(brefeldin A)与50 μmol/L CHX(cycloheximide,一种蛋白质合成抑制剂)的1/2 MS液体培养基中处理20 min,诱导BFA小体形成。随后,将幼苗转移至仅含50 μmol/L CHX的1/2 MS液体培养基中洗脱40 min。分别取BFA处理后的幼苗及洗脱后的幼苗制作临时装片,并于激光共聚焦显微镜下观察(激

发光波长为488 nm, 发射光波长为505~530 nm)。

3.4 细胞学观察

转盘共聚焦显微镜提前开机预热30 min, 待激光光源稳定后, 切换至60×油镜(数值孔径为1.42, Plan-Apochromat)。随后将载有幼苗的盖玻片直接转移至倒置显微镜载物台, 进行细胞学观察。首先, 在漂白前使用488 nm激发光, 以30%的激光强度采集漂白前荧光本底信号的时间序列图像(此激光强度可在不引起明显预漂白的情况下获得足够信噪比); 随后, 选取ROI区域, 在相同波长下将激光强度提高至100%, 以每像素20 μs的曝光时间重复扫描100次, 以确保充分淬灭ROI区域内的GFP-SYP121荧光信号。在光漂白后仍使用488 nm激发光, 将激光强度恢复至30%, 并通过L-488通道(500~550 nm带通滤光片)以100 ms的曝光时间和2 s的时间间隔连续采集141帧图像, 采集荧光恢复过程的时间序列图像。针对于TRIF-FRAP实验, 使用配备150×UAPON TIRF物镜(NA 1.45)和sCOMS相机(Primer 95B, Teledyne Photometrics)的可变角度荧光显微成像系统, 对根毛细胞表面进行延时图像采集。曝光时间为0.3 s, 时间间隔为0.5 s。

3.5 图像处理与数据分析

3.5.1 ROI区域灰度值的定量分析 采用开源图像处理软件FIJI(ImageJ 1.53c)分析数据。在序列图像第一帧, 沿根毛顶端质膜区域绘制一条长度为10 mm、宽度为2像素的曲线作为分析荧光信号恢复情况的ROI区域。随后, 运用“Image>Stacks>Plot z-axis Profile”功能, 对序列图像每一帧中该ROI区域内根毛顶端质膜的平均灰度值进行测定, 获取其随时间变化的动态数据, 并生成原始荧光强度-时间曲线。

3.5.2 数据归一化处理 利用以下公式^[5-6,25]对原始数据进行归一化校正:

$$F_n = \frac{F_t - F_{\min}}{F_{\max} - F_{\min}} \times 100\%$$

其中, F_n 为标准化荧光强度(%), F_t 为漂白后实时灰度值, F_{\min} 为漂白后最低荧光强度($t=0$ 时刻值), F_{\max} 为漂白前稳定荧光强度峰值。标准化后的数据以恢复时间 t (s)为横轴, 以荧光恢复比例(%)为纵轴, 绘制动力学曲线。

动力学曲线拟合: 使用Origin 2018软件(Origin-Lab, USA)对标准化后的数据进行非线性拟合。将

标准化处理后的数据导入该软件, 点击菜单栏的“分析(analysis)>拟合(fitting)>指数拟合(exponential fit)>打开对话框(open dialog)”进行设置, 在对话框界面选择“设置(settings)-函数选取(function selection)”, 从右侧的函数选项中选择合适的预置函数, 最后点击“拟合”完成数据拟合。本案例选取以下单指数方程进行数据拟合:

$$F_t = y_0 + A \times e^{-t/\tau}$$

其中, y_0 是漂白后第一帧的荧光强度值, A 是可移动部分的振幅, τ 是时间常数。

为了计算可移动部分荧光强度恢复一半所用的时间, 采用以下公式^[18]进行计算:

$$t_{1/2} = \ln(2) \times \tau$$

其中, $t_{1/2}$ 表示荧光强度恢复一半的时间点, τ 是时间常数。

为了计算不可移动部分的比例, 采用以下公式^[26]进行计算:

$$IF = F_I - F_E$$

其中, F_I 表示初始荧光强度, F_E 表示恢复终点荧光强度。

4 实验结果示例与分析

荧光漂白前GFP-SYP121在根毛细胞顶端呈现明显的极性分布, 主要定位于质膜及其相邻的胞质倒三角区域(富集囊泡)(图2A), 该区域被认为是质膜与胞内囊泡进行物质交换的活跃部位。为探究GFP-SYP121在质膜与囊泡富集区的动态分布特性是否与囊泡运输有关, 首先进行BFA洗脱实验。BFA是一种真菌来源的脂肪酸衍生物类毒素, 通过抑制分泌囊泡的胞吐作用, 导致内吞的膜蛋白聚集在胞质内, 形成特有的“BFA小体”(BFA body)。当洗脱BFA之后, 膜蛋白通过胞吐作用重新分布到质膜上, BFA小体消失。我们发现, 经20 μmol/L BFA和50 μmol/L CHX共同处理20 min后, 野生型根毛细胞中形成富含GFP-SYP121的BFA小体。随后, 将经BFA处理的拟南芥幼苗转移至只含50 μmol/L CHX的1/2 MS液体培养基中洗脱40 min后, 胞质内BFA小体消失, 同时部分GFP-SYP121重新定位于细胞质膜(图2B)。这证明拟南芥根毛细胞内GFP-SYP121在质膜与囊泡富集区的动态分布特性确实与囊泡运输有关。

接下来, 采用荧光漂白恢复(FRAP)技术进一步证明SYP121的质膜分布受囊泡运输调控。实验采用

转盘共聚焦显微镜,以高强度的488 nm激光(激光强度为100%)对根毛顶端质膜及相邻的胞质倒三角区(图3A蓝色虚线框标记ROI区域)的GFP-SYP121信号进行选择光漂白,随后采集荧光恢复过程中的时序图。结果显示,漂白区域的荧光信号随时间推移逐渐增强(图3B)。值得注意的是,在光漂白后60 s时,野生型根毛中质膜SYP121信号明显恢复;至120 s时,除质膜区域外,囊泡富集区的荧光信号亦呈现显著的恢复(图3B)。已有研究结果表明,ROP2通过促进SYP121-VAMP722 SNARE复合体形成增强胞吐作用,进而调控SYP121在质膜上的分布^[5]。因此,我们在ROP2组成型激活突变体*CA-rop2*与野生型根毛细胞中设置了平行实验,发现了在光漂白后40 s时*CA-rop2*根毛顶端质膜即出现GFP-SYP121荧光信号的明显富集,其恢复速度快于野生型,说明组成激活型*CA-rop2*促进了SYP121所在囊泡的胞吐作用。

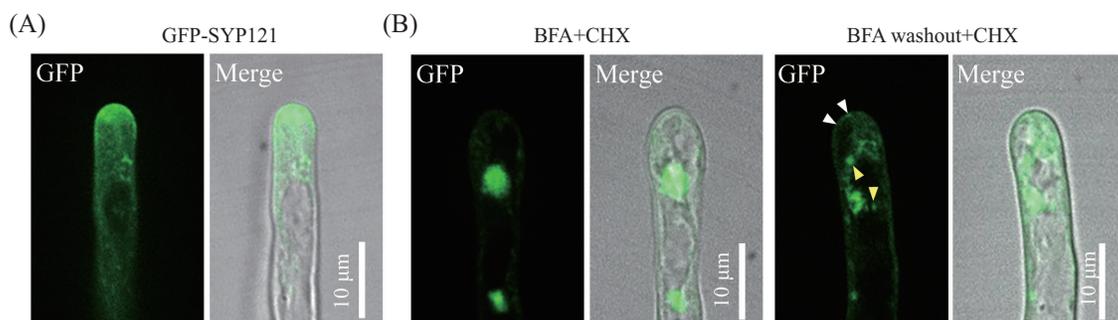
为进一步定量分析,利用FIJI软件对根毛顶端质膜特定区域(图2A红色实线标记)的荧光强度进行量化,进而获取质膜定位的GFP-SYP121荧光恢复动力学参数^[5]。通过对原始数据进行归一化处理后发现,光漂白后40 s时,*CA-rop2*突变体质膜处荧光信号恢复至初始水平的(32.1±2.7%)(均值±标准误),高于野生型[(26.0±1.4)%]。随后两者均呈缓慢上升趋势,至120 s时,野生型恢复至(56.9±1.8)%,*CA-rop2*恢复至(58.5±2.2%)(图4),二者间无显著差异。为了量化胞吐过程的速率,进一步将可移动部分荧光信号恢复一半所需的时间($\tau_{1/2}$)作为衡量指标。对可移动部分的荧光恢复数值进行单指数方程拟合(图4),结果

显示,野生型细胞 $\tau_{1/2}$ 为84 s,而*CA-rop2*突变体细胞的 $\tau_{1/2}$ 仅为45 s,表明*CA-rop2*突变体中SYP121所在囊泡的胞吐速率明显快于野生型。上述结果说明,组成型激活的ROP2通过提高SYP121所在囊泡的胞吐速率,进而调控SYP121在质膜上的分布范围。

由此可见,FRAP实验不仅揭示了SYP121蛋白膜定位的动态模式,同时通过可移动组分的恢复动力学比较,进一步验证了该技术在分析活细胞中胞吐调控相关膜蛋白动态分布中的有效性与适用性。

由于FRAP技术仅能检测膜蛋白的群体迁移行为,而无法实现对单个蛋白分子扩散过程的直接观察^[27],因此采用基于全内反射显微镜技术的荧光漂白恢复实验(TRIF-FRAP),该技术可特异性观察质膜及其邻近区域内单分子水平的蛋白质动力学行为。如图5所示,SYP121在根毛细胞质膜上形成微聚体(nanocluster),提示其可能以二聚体或多聚体形式存在,该结果与文献所报道的一致^[6]。激光漂白使ROI区域荧光信号迅速衰减至背景水平。漂白结束后ROI内信号随时间逐渐恢复,在光漂白后10 s即可观察到带有GFP-SYP121标记的微聚体出现,在光漂白后25 s,ROI区域内已明显重现微聚体结构。观察结果说明GFP-SYP121具备侧向扩散能力,且该过程很可能通过预形成的微聚体整体迁移的方式来实现。因此,TRIF-FRAP实验可在单分子层面证实SYP121的膜动态行为具有结构自主性,为理解膜蛋白在质膜微域中的组织模式与动态调控机制提了新的视角。

综上所述,本文通过BFA抑制和洗脱实验、

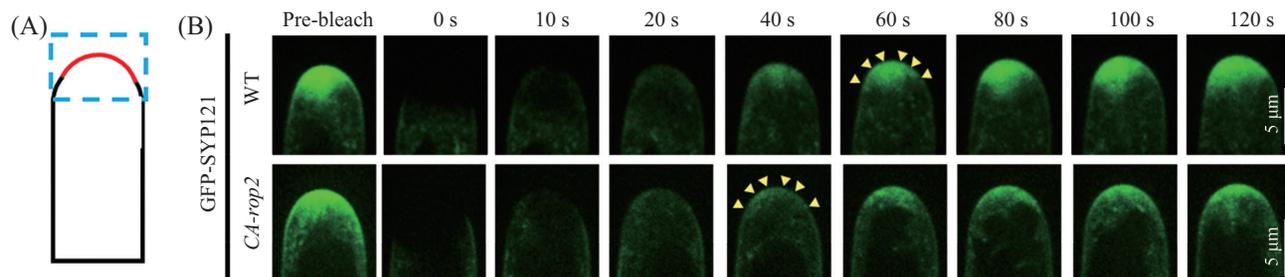


A: GFP-SYP121在萌发后5天的拟南芥根毛细胞中的亚细胞定位。B: BFA处理可诱导GFP-SYP121聚集在BFA小体,洗脱处理40 min后,可在膜泡(黄色箭头)和质膜(白色箭头)上观察到荧光信号。图中GFP为荧光通道, Merge为荧光信号与明场通道的叠加图像。

A: subcellular localization of GFP-SYP121 in 5-day-old *Arabidopsis* root hair cells. B: BFA treatment induced the aggregation of GFP-SYP121 into BFA compartments. After BFA washout treatment for 40 min, fluorescence signals were observed on vesicles (yellow arrows) and the plasma membrane (white arrows). GFP indicates the fluorescence channel, while Merge represents the overlay of the fluorescence signal with the bright-field channel.

图2 BFA处理与洗脱后GFP-SYP121在根毛细胞中的定位变化

Fig.2 Subcellular distribution of GFP-SYP121 in the root hair cell after BFA treatment and washout

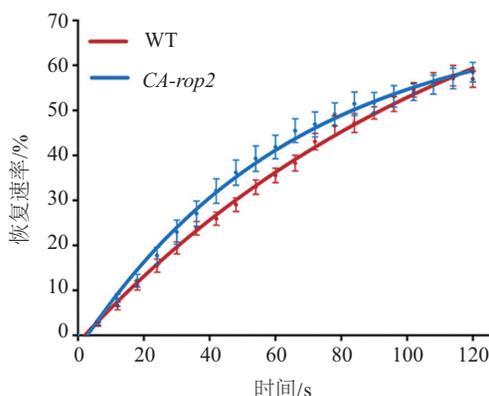


A: 根毛细胞示意图。蓝色虚线框为ROI光漂白区域, 红色实线为顶端质膜上GFP-SYP121荧光恢复信号的定量分析区域。B: 延时成像结果显示萌发后5天的拟南芥野生型和组成激活型*CA-rop2*突变体根毛细胞中GFP-SYP121的荧光恢复过程。黄色箭头代表荧光信号在根毛顶端质膜区域的恢复。

A: schematic diagram of root hair cell. The blue dashed box indicates the ROI for photobleaching, and the red solid line indicates the region for quantitative analysis of the GFP-SYP121 fluorescence recovery signal on the apical plasma membrane. B: FRAP analysis of plasma membrane-localized GFP-SYP121 in the root hair cells of 5-day-old *Arabidopsis* wild-type and *CA-rop2* mutant plants. The yellow arrows indicated the recovery of fluorescence signals in the apical plasma membrane region.

图3 根毛细胞顶端质膜区GFP-SYP121荧光恢复动态过程

Fig.3 Trafficking of GFP-SYP121 to the apical plasma membrane region of root hair cells



定量分析野生型Col-0和*CA-rop2*突变体根毛细胞内GFP-SYP121的荧光恢复速率。对ROI区域内的GFP-SYP121荧光强度进行归一化处理, 取平均值后进行数据拟合, 数据以均值±标准误(mean±SEM)表示($n=13$)。

Quantitative analysis of the fluorescence recovery rate of GFP-SYP121 in wild type and *CA-rop2* mutant root hair. The GFP-SYP121 fluorescence intensity of ROI was normalized, averaged, and fitted. The results are expressed as mean±SEM ($n=13$).

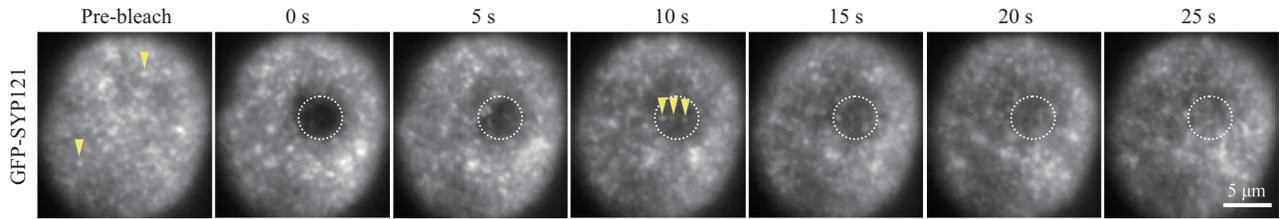
图4 GFP-SYP121荧光恢复动力学的定量分析

Fig.4 Quantitative analysis of the fluorescence recovery velocity of GFP-SYP121

FRAP以及TRIF-FRAP三种实验策略的整合, 构建了一个从囊泡运输、蛋白群体动态到单分子行为的跨尺度研究体系, 不仅确立了囊泡运输在SYP121质膜动态中的主导地位, 也彰显了多尺度方法所代表的研究范式——从不同层次整合分析质膜蛋白的动态行为机制。

进阶内容设计。为了深化学生对质膜蛋白动态行为复杂性的理解, 可在现有囊泡运输依赖的质膜蛋白(SYP121) FRAP实验体系基础上, 增设非囊泡运输依赖膜蛋白的FRAP实验。拟南芥小G蛋白ROP6的质膜定位依赖于其C-端的S-酰基化修饰, 可用于此进阶内容。在实验条件与教学时

长允许的情况下, 学生可使用稳定表达GFP-ROP6的转基因材料, 采用与上述GFP-SYP121相同的FRAP实验流程, 获取GFP-ROP6的荧光恢复动力学曲线, 并将其与GFP-SYP121的荧光恢复曲线进行对比分析。前人曾在拟南芥根细胞中通过FRAP对GFP-ROP6的质膜定位进行分析^[28], 发现GFP-ROP6的荧光强度恢复一半所需时间约为10 s, 显著短于GFP-SYP121所需时间。通过开展该进阶实验以及结合文献阅读, 学生可直观比较囊泡运输依赖型与非依赖型膜蛋白在质膜定位及动态行为上的差异, 从而系统认识不同膜蛋白质膜定位机制的复杂性。



对萌发后5天稳定表达GFP-SYP121的拟南芥幼苗根毛顶端进行TRIF成像。时序图展示了漂白前后的荧光恢复过程。黄色箭头指示GFP-SYP121标记的微聚体。

Time-lapse TRIF images of 5-day-old *Arabidopsis* root hair expressing GFP-SYP121 were shown before and after photobleaching. Yellow arrows indicate nanoclusters labeled by GFP-SYP121.

图5 拟南芥根毛细胞质膜GFP-SYP121的TRIF-FRAP实验结果

Fig.5 TRIF-FRAP images of GFP-SYP121 in the plasma membrane of *Arabidopsis* root hair cells

5 结语

我们利用FRAP技术构建了囊泡运输和细胞质膜流动性的定量分析教学体系,以拟南芥GFP-SYP121蛋白为研究对象,定量解析了该融合蛋白荧光漂白恢复的动态分布特征,为阐释细胞膜动态特性提供了实验证据,实现了从理论认知到动态表征的教学范式革新。该教学创新具有多维度的教育价值:在认知层面,建立了“分子运动-膜特性-细胞功能”的三维理论框架,使学生突破静态结构的认知局限;在技能培养方面,系统训练了共聚焦显微镜操作、FRAP技术实施及活细胞动态成像等关键技术,强化了学生的动力学参数提取与数据分析能力;在科研思维培养上,通过构建多技术联用方案,提升了学生在研究实践中对理论知识和技术的应用能力,更为其开展创新性实验研究构筑了方法论根基。将前沿科研技术转化为教学实践,采用“基础操作-定量解析-创新拓展”的递进式训练模式,有效提升了学生的科研核心素养,其经验可为细胞生物学相关实验教学提供参考。

参考文献 (References)

- [1] D'AGOSTINO M, MAYER A. Assay of lipid mixing and fusion pore formation in the fusion of yeast vacuoles [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1860: 253-62.
- [2] GOEHRING N W, CHOWDHURY D, HYMAN A A, et al. FRAP analysis of membrane-associated proteins: lateral diffusion and membrane-cytoplasmic exchange [J]. *Biophys J*, 2010, 99: 2443-52.
- [3] PINCET F, ADRIEN V, YANG R, et al. FRAP to characterize molecular diffusion and interaction in various membrane environments [J]. *PLoS One*, 2016, 11: 1-19.
- [4] JAHN R, CAFISO D C, TAMM L K. Mechanisms of SNARE proteins in membrane fusion [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(2): 101-18.
- [5] CUI X K, WANG S W, HUANG Y H, et al. *Arabidopsis* SYP121 acts as an ROP2 effector in the regulation of root hair tip growth [J]. *Mol Plant*, 2022, 15(6): 1008-23.
- [6] ZHONG H, WANG S W, HUANG Y H, et al. Endomembrane trafficking driven by microtubule growth regulates stomatal movement in *Arabidopsis* [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 7967.
- [7] ZHANG L, LIU Y, ZHU X F, et al. SYP22 and VAMP727 regulate BR11 plasma membrane targeting to control plant growth in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2019, 223: 1059-65.
- [8] EISENACH C, CHEN Z H, GREFEN C, et al. The trafficking protein SYP121 of *Arabidopsis* connects programmed stomatal closure and K⁺ channel activity with vegetative growth [J]. *Plant J*, 2012, 69: 241-51.
- [9] SUTTER J U, SIEBEN C, HARTEL A, et al. Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane [J]. *Curr Biol*, 2007, 17: 1396-402.
- [10] NIELSEN M E, THORDAL-CHRISTENSEN H. Recycling of *Arabidopsis* plasma membrane PEN1 syntaxin [J]. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 1541-3.
- [11] ZHANG C, CARDERIN J D, HURST L R, et al. Sphingolipids containing very long-chain fatty acids regulate Ypt7 function during the tethering stage of vacuole fusion [J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(11): 107808.
- [12] ROGEZ B, WÜRTHNER L, PETROVA A B, et al. Reconstitution reveals how myosin-VI self-organises to generate a dynamic mechanism of membrane sculpting [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3305.
- [13] FENG Z Y, WANG M J, LIU Y, et al. Liquid-liquid phase separation of TZP promotes PPK-mediated phosphorylation of the phytochrome A photoreceptor [J]. *Nat Plants*, 2024, 10(5): 798-814.
- [14] GUO J Z, YANG Z B. Measuring exocytosis rate in *Arabidopsis* pollen tubes using corrected fluorescence recovery after photoconversion (cFRAPc) technique [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2160: 293-306.
- [15] LUO N, YAN A, YANG Z B. Measuring exocytosis rate using corrected fluorescence recovery after photoconversion [J]. *Traffic*, 2016, 17(5): 554-64.
- [16] LI X J, WANG X H, YANG Y, et al. Single-molecule analysis of PIP2₁ dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 3780-97.
- [17] XIANG X J, WAN Z Y, ZHANG S Z, et al. *Arabidopsis* class A S-

- acyl transferases modify the pollen receptors LIP1 and PRK1 to regulate pollen tube guidance [J]. *Plant Cell*, 2024, 36: 3419-34.
- [18] LI R L, LIU P, WAN Y L, et al. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development [J]. *Plant Cell*, 2012, 24: 2105-22.
- [19] PÉREZ-HENRÍQUEZ P, NAGAWA S, LIU Z C, et al. PIN2-mediated self-organizing transient auxin flow contributes to auxin maxima at the tip of *Arabidopsis* cotyledons [J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 1380.
- [20] YU B, ZHENG W N, XING L, et al. Root twisting drives halotropism via stress-induced microtubule reorientation [J]. *Dev Cell*, 2022, 57: 2412-25.
- [21] HANZAWA A, RAHMAN A A, RAHMAN A. Actin isovariant ACT2-mediated cellular auxin homeostasis regulates lateral root organogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cytoskeleton*, 2024, doi: 10.1002/cm.21956.
- [22] HOU S Y, SHI J, HAO L H, et al. VPS18-regulated vesicle trafficking controls the secretion of pectin and its modifying enzyme during pollen tube growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2021, 33: 3042-56.
- [23] 曹慧珍, 王瑾瑜, 王文娟. 基于全内反射显微镜的荧光漂白后恢复实验方法建立 [J]. *科技与创新* (CAO H Z, WANG J Y, WANG W J. Establishing a fluorescence recovery after photo-bleaching assay using total internal reflection fluorescence microscopy [J]. *Science and Technology & Innovation*), 2022, doi: 10.15913/j.cnki.kjycx.2022.05.041.
- [24] KANG E F, ZHENG M Z, ZHANG Y, et al. The microtubule-associated protein MAP18 affects ROP2 GTPase activity during root hair growth [J]. *Plant Physiol*, 2017, 174(1): 202-22.
- [25] CHANG M, LI Z K, HUANG S. Monomeric G-actin is uniformly distributed in pollen tubes and is rapidly redistributed via cytoplasmic streaming during pollen tube growth [J]. *Plant J*, 2017, 92(3): 509-19.
- [26] GOVINDARAJ K, POST J N. Using FRAP to quantify changes in transcription factor dynamics after cell stimulation: cell culture, FRAP, data analysis, and visualization [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2221: 109-39.
- [27] 于淼, 高建. 荧光漂白恢复、荧光共振能量转移和荧光相关光谱检测的技术特点 [J]. *中国医学装备* (YU M, GAO J. Characteristics of application and technology on FRAP, FRET and FCS [J]. *China Medical Equipment*), 2009, 6(6): 8-9.
- [28] PLATRE M P, BAYLE V, ARMENGOT L, et al. Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine [J]. *Science*, 2019, 364(6435): 57-62.