

# 活细胞内的单分子荧光成像方法\*

林丹樱 马万云<sup>†</sup>

(清华大学物理系原子分子纳米科学教育部重点实验室 北京 100084)

**摘要** 文章介绍近年来新发展的几种重要的活细胞内单分子荧光成像方法,如转盘式共聚焦显微术、全内反射荧光显微术、荧光共振能量转移技术等。通过介绍它们的原理、特点和在活细胞内单分子行为研究中的应用实例,展示了这些新方法在生命科学领域广阔的应用前景。

**关键词** 单分子, 荧光, 成像, 活细胞

## Single molecule fluorescence imaging within living cells

LIN Dan-Ying MA Wan-Yun<sup>†</sup>

(The Key Laboratory of Atomic and Molecular Nanosciences, Ministry of Education, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract** Single molecule detection techniques based on fluorescence imaging such as spinning disk confocal microscopy, total internal reflection fluorescence microscopy and fluorescence resonance energy transfer are reviewed. These techniques have been used in recent years as useful tools to study single molecule behavior within living cells and show broad prospects for application in the life sciences.

**Keywords** single molecule, fluorescence, imaging, living cells

## 1 引言

在原子和分子水平上观测和操纵物质曾是几代科学家的梦想。直到 20 世纪 80 年代扫描隧道显微术(scanning tunneling microscopy, STM)的发明,这一梦想才被实现。近二十年来,单分子技术迅速发展,从一开始只能在低温、真空条件下实现单分子探测,发展到能在常温的溶液中或界面上研究单分子的反应动力学过程和机制,甚至实时记录这些过程。将这些单分子技术进一步应用到生物分子体系,人们发现了很多用传统的基于分子浓度变化的生物化学或药理学实验所得不到的现象,获得了很多被以往的系综平均(ensemble averaging)方法所掩盖的信息,使得离体情况下和活细胞内的生物单分子研究越来越受到重视。

活细胞内的生物单分子研究尤其重要。然而这意味着要在不影响细胞正常生命活动的前提下去实现单分子的探测,因而在众多单分子技术中,人们首先想到的是光学方法,因为只有光子对待测体系的扰动最为轻微,而在各种光学方法中,最有发展潜力的是荧光成像方法,一则荧光检测的灵敏度高,二则成像可以实现“可视化”(visualization),实现人们

“亲眼目睹”活细胞内生物单分子动态行为的梦想。但是,活细胞内的单分子荧光成像仍然面临着前所未有的挑战,因为活细胞不仅是个高散射体,而且含有大量自发荧光物质。所以,活细胞内的单分子荧光成像方法不仅要求高灵敏度和高分辨率,而且还要求有足够高的图像信噪比和足够快的成像速度。

近年来在活细胞内的单分子荧光成像研究中取得显著应用成果的方法有:转盘式共聚焦显微术(spinning disk confocal microscopy, SDCM)、全内反射荧光显微术(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)、荧光共振能量转移术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)等。本文主要介绍这三种方法的原理、特点以及它们在活细胞内单分子行为研究中的一些应用实例。

## 2 转盘式共聚焦显微术(SDCM)

### 2.1 SDCM 的原理及其特点

\* 国家自然科学基金(批准号:10474054)资助项目,教育部科学研究重大项目(批准号:306020)

2007-06-19 收到

<sup>†</sup> 通讯联系人。Email: mawy@tsinghua.edu.cn

SDCM 是把共聚焦激光扫描显微术( confocal laser scanning microscopy , CLSM )的高纵向分辨率和普通宽场荧光显微术的成像速度快两个优点集于一身的一种新技术,要阐明它的原理,首先要从 CLSM 的原理入手。

### 2.1.1 CLSM 的基本原理

CLSM 的基本原理是利用一对共轭的针孔( pin-hole )进行“空间滤波”,从而将焦平面以外的杂散光滤除以提高纵向分辨率,实现非侵入式的“光学切片”( optical sectioning ) (图 1(a))。这两个针孔分别位于光源和探测器之前,称为光源针孔和检测针孔;所谓“共轭”,是指物镜焦平面上的点发出的光通过一系列的透镜最终可同时聚焦于这两个针孔,此即“共焦”之意。目前常用的 CLSM 多以光电倍增管( photomultiplier tube , PMT )为探测器,以激光为激发光源,利用大数值孔径( numerical aperture ,  $N.A.$  )的显微物镜将通过光源针孔的入射光聚焦在物镜焦平面上一个很小的点上,由于检测针孔的存在, PMT 只收集处于物镜焦点上的样品发出的荧光。利用光学扫描振镜使入射光点在物镜焦平面上进行逐点逐行扫描,就能得到焦平面样品的荧光图像,称为一张“光学切片”( optical section );再利用步进马达控制样品台纵向移动,即改变物镜焦平面在样品中的位置,便可采集到样品中不同深度的一系列光学切片,从而获得样品的三维信息。CLSM 的横向分辨率约为 100—200nm,纵向分辨率可达 500nm,大大优于普通非共焦方式的荧光显微成像技术;同时共焦针孔的应用也极大地提高了图像信噪比。这些优点使 CLSM 被广泛应用于细胞生物学的研究,尤其是亚细胞层次空间结构和功能的研究<sup>[1]</sup>。

然而 CLSM 采用的是逐点扫描成像方式,成像速度受到很大限制(目前多数商用的 CLSM 扫描一张图像约需 1s),因而尽管它具有很高的分辨率和图像信噪比,可以实现单分子荧光成像,但要想捕捉到活细胞中单个荧光分子的运动还是很难。近年来出现的 SDCM 是利用 CLSM 中最关键的共焦针孔原理发展起来的,但采用了面成像方式,成像速度达到甚至超过视频速度的要求,成为活细胞内单分子荧光成像的有力工具<sup>[2]</sup>。

### 2.1.2 SDCM 的原理及其特点

SDCM 最基本的指导思想就是保留 CLSM 的共焦针孔原理,同时将一次只能激发一个点改为同时激发焦平面上尽可能多的点以形成面照明,得到的荧光信号可用高分辨率、高灵敏度的电荷耦合器件

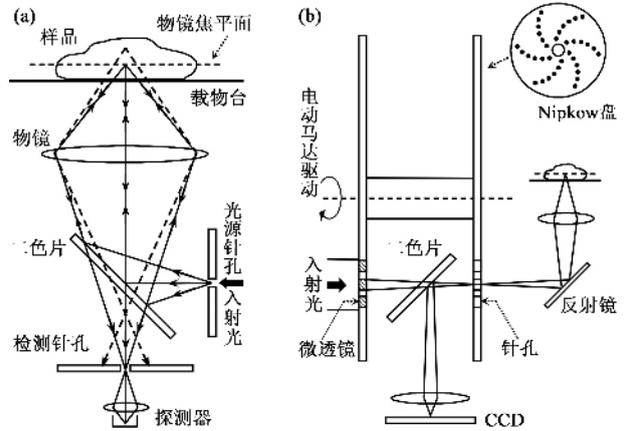


图 1 共聚焦激光显微术( CLSM )和转盘式共聚焦显微术( SDCM )原理示意图 (a) CLSM 原理示意图; (b) SDCM 原理示意图

( charge coupled device , CCD )采集。具体的实现方法有多种形式,但基本上都是在普通倒置显微镜上加上相应的转盘装置即可,目前较常用的转盘装置有日本 Yokogawa 公司的共聚焦旋转单元( confocal spinning unit , CSU )、日本 Olympus 公司的转盘扫描单元( disk scanning unit , DSU )等。

以 Yokogawa 公司的 CSU 为例。CSU 由两个盘片( disk )组成,其中一个盘片上以特殊的方式( 旋转对称的多组螺旋形分布,称为 Nipkow disk )分布着约 20000 个微透镜( microlens ),另一个盘片上对应地分布着相同数量的针孔,入射激光照射在前一盘片上的若干个微透镜上,并聚焦在相应针孔处(图 1(b))。两个盘片在电动马达驱动下同时旋转。这样,入射光被微透镜阵列分成了很多“束”,而每个针孔则同时充当 CLSM 中的光源针孔和检测针孔,即其中一束光从针孔出来后由显微物镜聚焦到样品中物镜焦平面的一点上,该点发出的荧光由同一显微物镜收集,沿原路返回后再次通过该针孔,并由位于两盘片之间的二色片反射到探测器上。因此,这些旋转着的针孔阵列便组成了许多对共焦针孔,实现了去除非焦平面杂散光的共焦效果,相当于很多个 CLSM 在同时工作。由于盘片旋转速度可达每秒几千转,相当于光源按光栅格式高速扫描样品( raster-scan ),实现扫描区域内焦平面上由无数个点组成的面照明,所得荧光信号可用 CCD 采集,成像速度仅取决于 CCD 速度,可达每秒几百帧图像,因而在保持图像质量达到传统 CLSM 水平的同时可以检测到活细胞内的瞬间变化。

Olympus 的 DSU 则是利用盘片上的狭缝条纹快

速旋转形成的虚拟共焦针孔来实现 SDCM 的。由于光通量得到很大程度的提高,使用 DSU 的系统可以采用弧光灯作为激发光源,与激光相比,荧光染料的选择范围更为广泛,但同时由于单色性较差等原因,分辨率不及传统 CLSM。

基于图像质量高和成像速度快的双重优势,目前 SDCM 方法已被应用于活体生物样品的检测<sup>[3-5]</sup>,同时也有不少研究者将其应用于活细胞内的单分子荧光成像研究,并取得了一些初步成果<sup>[6,7]</sup>。

## 2.2 应用举例

2001 年,Hisashi Tadakuma 等首次利用 SDCM 方法以视频速度记录了溶液中单个荧光分子的实时运动<sup>[6]</sup>。他们利用 TMR 标记驱动蛋白(kinesin)分子,用另一种荧光染料 IC5 标记固定在玻璃表面的微管(microtubule),实时记录了单个驱动蛋白分子沿着微管的二维滑行运动(图 2(a)(b))以及单个驱动蛋白在粘稠的蔗糖溶液中的三维布朗运动(图 2(c)(d)(e)),预言了该方法应用于实时研究活细胞内单分子事件的可能性。2006 年,他们利用同样的装置对单个信使核糖核酸(mRNA)分子在活细胞的细胞核内的运动进行了单分子荧光成像研究<sup>[7]</sup>。在真核细胞中,大部分的 mRNA 需要先被转录成前体 mRNA(pre-mRNA),经过 5'端加帽作用(5'-capping,在 pre-mRNA 分子的 5'端加上甲基核苷酸的“帽子”)、剪接(slicing)去除内含子(intron)和 3'端聚腺核苷酸化作用这一系列加工过程后,成熟的 mRNA 才能通过核膜孔(nuclear pore)进入细胞质去参与翻译过程。而转录、加工和出核转运这三个过程是密切相关的,mRNA 是如何从其合成部位被转运到核膜孔处的,这是基因表达和调控中的一个关键问题。Tadakuma 等制备了荧光染料 Cy3 标记的  $\beta$  珠蛋白( $\beta$ -globin)mRNA 和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)mRNA,并将它们显微注射(microinjection)到活的 A6 爪蟾细胞的细胞核内。利用 SDCM 方法,可视化地记录了单个 mRNA 分子在细胞核内的运动,并详细分析其运动轨迹和特征,结果发现 mRNA 分子在细胞核中有两种不同的运动状态,其中超过半数的 mRNA 在细胞核中核仁以外的核质中做布朗运动,其扩散系数为  $0.2\mu\text{m}^2/\text{s}$ ,仅为水中扩散系数的 1/150;这么慢的扩散速度无法用 Stokes-Einstein 扩散理论解释,可能是细胞核里的异质环境(nonhomogeneous environment)造成的,也可能是

mRNA 在这个过程中与细胞核中的某些结构或成分发生了相互作用。另一部分 mRNA 则被局限在直径约 300nm 的隔壁(compartment)内,其平均停留时间长达 30s 左右,且与 mRNA 序列和长度均无关,而对于那些做布朗运动的 mRNA 来说,在 30s 时间内它们以  $0.2\mu\text{m}^2/\text{s}$  的扩散系数移动约  $5\mu\text{m}$  的距离,相当于细胞核的半径大小,也就是说,在这段时间内,mRNA 可以从其合成部位通过扩散运动到达核膜孔处。同时他们观察到 mRNA 还可以从其中一种运动状态突然转变成另一种状态(图 3)。

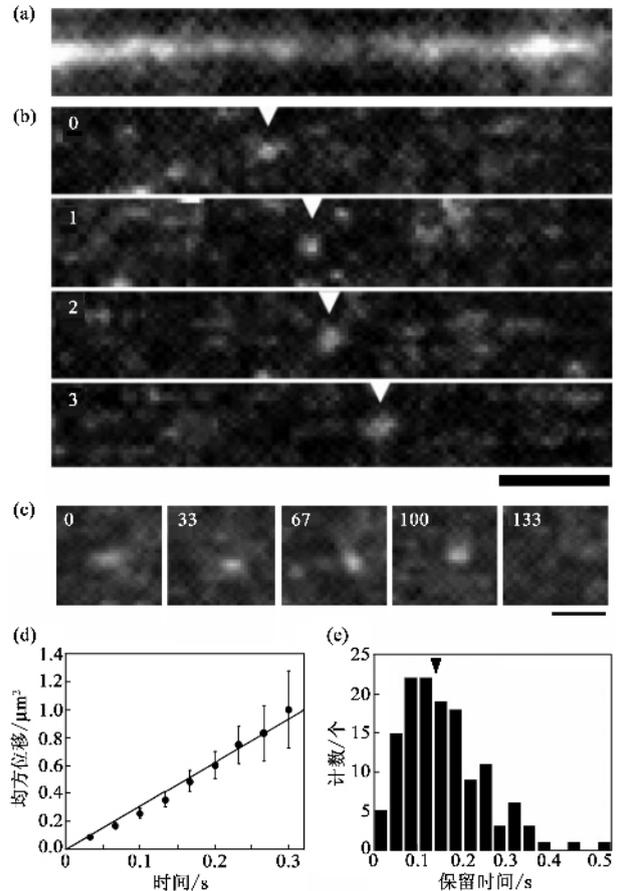


图2 利用 SDCM 方法记录溶液中单个荧光分子的实时运动<sup>[6]</sup>

(a) 单个驱动蛋白分子沿微管的二维滑行运动: IC5 标记的单根微管; (b) TMR 标记的单个驱动蛋白分子每隔 1s 在微管上的不同位置; (c) 单个驱动蛋白在蔗糖溶液中的三维布朗运动: 时间序列(单位为 ms); (d) 均方位移与时间的关系(可计算出扩散系数为  $0.75\mu\text{m}^2/\text{s}$ ); (e) 驱动蛋白分子在焦面上的停留时间(箭头所指为平均停留时间,约为 0.13s)。图中标尺均表示  $2\mu\text{m}$

## 3 全内反射荧光显微术(TIRFM)

TIRFM 是近年来用于离体生物单分子研究最热门的方法之一,同时也有不少关于活细胞内单分

子荧光成像研究的报道,但与SDCM不同的是,TIR-FM多被用于研究活细胞膜表面和细胞内膜附近区域的生物单分子行为<sup>[8-10]</sup>。这是由TIRFM的原理所决定的。

### 3.1 TIRFM的原理及其分类

当一束光从光密介质(高折射率 $n_1$ )射向光疏介质(低折射率 $n_2$ )时,在界面处入射光将有一部分被反射,另一部分发生折射,入射角 $\theta_1$ 和折射角 $\theta_2$ 满足Snell公式,即 $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$ 。由于 $n_1 > n_2$ ,故 $\theta_2 > \theta_1$ 。当 $\theta_2$ 增大到 $90^\circ$ 时,入射光将沿着界面传播,此时的 $\theta_1$ 称为临界角 $\theta_c$ ,即 $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ 。若 $\theta_1$ 继续增大,则入射光将发生全内反射(tot

tal internal reflection, TIR)(图4(a))。由于光的波动效应,入射光发生TIR时仍有少量的光能量会穿透界面渗透到光疏介质中,并沿着平行于界面的方向传播,称为隐失波(evanescent wave)(图4(b))。隐失波的振幅 $E_z$ 在光疏介质中随界面距离 $z$ 指数衰减,即 $E_z = E_0 \exp(-z/d_p)$ ,其中 $E_0$ 为隐失波在界面处的振幅, $d_p$ 为隐失波振幅衰减到 $E_0$ 的 $1/e$ 时离界面的距离,称为穿透深度,它由入射波长 $\lambda$ 、光密介质折射率 $n_1$ 、入射角 $\theta_1$ 和临界角 $\theta_c$ 共同决定,即 $d_p = \lambda/2\pi n_1(\sin^2 \theta_1 - \sin^2 \theta_c)^{1/2}$ 。对于可见光来说, $d_p$ 约为100—200nm,并且随着 $\theta_1$ 对 $\theta_c$ 的偏离程度而急剧减小,故可通过选择合适的入射角度来选择合适的穿透深度。

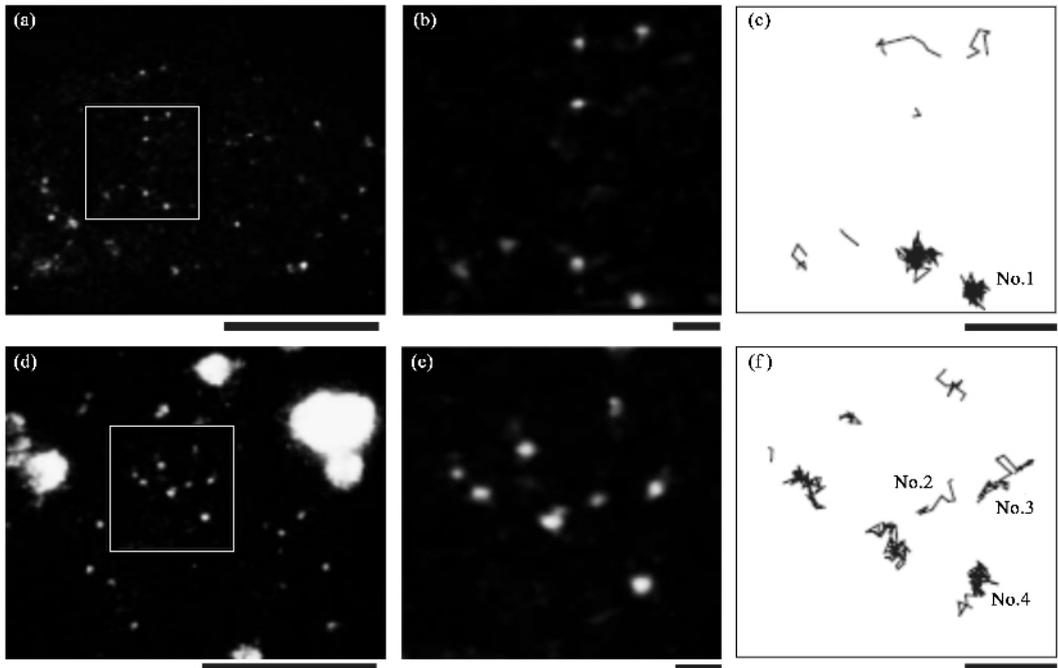


图3 利用SDCM方法记录单个mRNA分子在活细胞的细胞核内的实时运动<sup>[7]</sup>(a)–(c)为单个EGFP mRNA及其运动轨迹;(d)–(f)为单个 $\beta$ -globin mRNA及其运动轨迹(其中(b)和(e)分别为(a)和(d)白色方框所示区域的放大图像,图(a)和(d)的标尺表示 $10\mu\text{m}$ ,其他标尺均表示 $1\mu\text{m}$ )

TIRFM就是利用入射光发生TIR时所产生的隐失波来激发样品荧光的。由于隐失波穿透深度一般只有几百纳米,仅能激发样品中一小薄层的区域,因而纵向分辨率和图像信噪比均大大提高。常见的TIRFM分为棱镜型(prism-type)和物镜型(objective-type)两类。棱镜型TIRFM可以在倒置显微镜上利用棱镜等普通光学元件搭建而成(图4(c)),激发光以一定角度射入棱镜,通过调整入射角度使其在紧贴棱镜底部的玻璃片(其间以折射率匹配的物镜油连接)下表面产生隐失波,激发出的荧光由倒置

显微镜的物镜收集并被探测器接收。棱镜型TIRFM最大的优点是,可以在很宽的范围内精确改变激发光的入射角以选择合适的穿透深度;但在棱镜型TIRFM中,样品被激发的是紧贴其上方的玻璃片部分,荧光信号要通过样品本身的整个厚度才能被显微镜所收集,样品中的吸收和散射很大程度地削弱了这些本来就很微弱的荧光信号,同时由于棱镜及样品上方玻璃片的阻碍,限制了成像过程中对样品的操作(如实时加入药物刺激等),所以这种棱镜型TIRFM并没有在活细胞研究中被广泛采用。

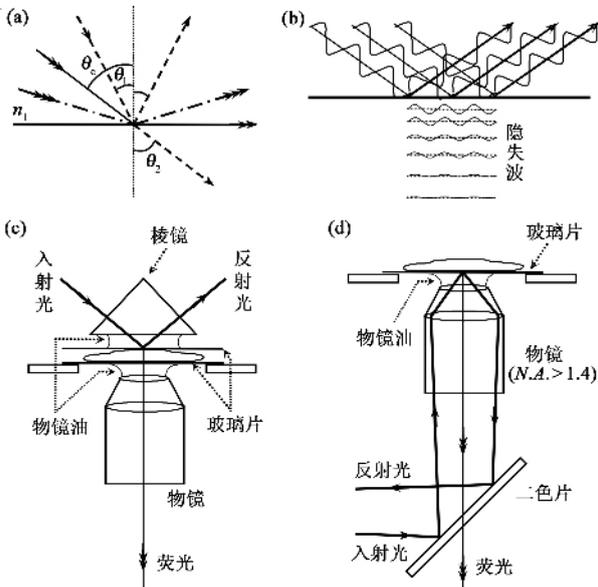


图4 全内反射荧光显微术(TIRFM)原理示意图(a)全内反射(TIR)及临界角 $\theta_c$ 。(b)隐失波(evanescent wave)。(c)棱镜型TIRFM。(d)物镜型TIRFM

在物镜型 TIRFM 中,显微物镜既用于收集荧光信号,同时又是发生全内反射的光学器件(图 4 (d))。入射激光通过光纤引入并由二色片反射后,沿着物镜边缘入射,从物镜出射后经物镜油照射在样品下方的玻璃片上,并在玻璃片上表面发生全内反射,反射光经物镜边缘的另一侧返回,并被导出或吸收掉。为了能发生 TIR,物镜油及玻璃片的折射率均要与物镜的数值孔径  $N.A.$  相匹配,并大于被测样品的折射率。细胞的折射率一般为 1.33—1.38,故物镜型 TIRFM 通常需要使用  $N.A. > 1.4$  的油浸物镜。虽然物镜型 TIRFM 只能在很小角度范围内产生全内反射,产生的隐失波穿透深度偏大,纵向分辨率和图像信噪比均不及棱镜型 TIRFM,但由于其样品制备简单,成像时可以方便地对样品进行实时操作,特别适合活细胞的动态研究,因而在活细胞内生物单分子的研究方面得到了广泛应用。然而由于 TIR 的激发区域仅限于 100—200nm 的一小薄层区域,这些应用多集中在研究细胞膜或膜内附近区域的动态过程(如信号转导等)。

### 3.2 应用举例

2001 年, Ryota Iino 等利用物镜型 TIRFM 首次观察到了活细胞内的单个 GFP 分子<sup>[8]</sup>。他们将小鼠成纤维细胞中的 E-钙粘蛋白(E-cadherin)用 GFP 标记(E-cad-GFP),并根据 TIRFM 得到的单个荧光点的荧光强度发现自由细胞表面大多数 E-cad-GFP

分子形成了不同大小的多种寡聚物,其中多数大于二聚物(图 5),说明 E-钙粘蛋白的寡聚化在其聚集于细胞-细胞粘附位点之前就已经发生了,而正是这些大于二聚物的寡聚物构成了细胞间粘附连接的基础。同时,他们还发现寡聚化后 E-cad-GFP 分子的平移扩散系数减小为原来的(1/10)~(1/40),这个数据不能仅由寡聚物半径的增大来解释,所以他们提出一个模型,认为寡聚化后寡聚物将与细胞膜骨架结合或者被细胞膜骨架所形成的隔室围起来。

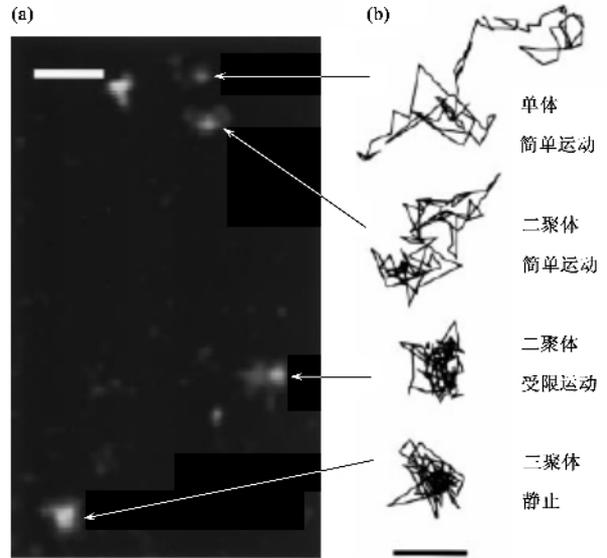


图5 利用物镜型 TIRFM 观察活细胞内的 GFP 标记的单个 E-钙粘蛋白分子(E-cad-GFP)<sup>[8]</sup>(a) E-cad-GFP 分子形成不同大小的多种寡聚物;(b)相应的运动轨迹。图中标尺表示 250nm

2003 年, Gregory I. Mashanov 等从技术角度详细介绍了利用倒置显微镜搭建物镜型 TIRFM 的过程和实验条件的优化,以及他们为 TIRFM 得到的多个单分子荧光像点进行同时精确定位所编写的算法。利用该方法,他们实现了活细胞的细胞膜内侧单个 EGFP 融合蛋白分子的自动识别和精确定位<sup>[9]</sup>。在此基础上, Mashanov 等研究了位于肌球蛋白 X 尾部的 Pleckstrin(一种血小板蛋白激酶 C 的底物)同源结构域(pleckstrin homology domain, PHD)与质膜结合的动力学过程<sup>[10]</sup>。他们利用 EGFP 标记特定的 PHD 观察了单个 PHD 与细胞膜结合、解离等过程,并计算出结合速率(0.03/ $\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )、解离速率(0.05/s)及其在质膜上的平均停留时间(20s),认为这些动力学参数可能与控制肌球蛋白 X 对信号的响应,以及对细胞功能的调节有关。同时,他们还发现,在所研究的小鼠成肌细胞中,结合到质膜上的 PHD 几乎没有横向运动,由此推断 PHD 与细胞骨架相连或者被限

定在某些磷脂形成的隔室中(图6)。

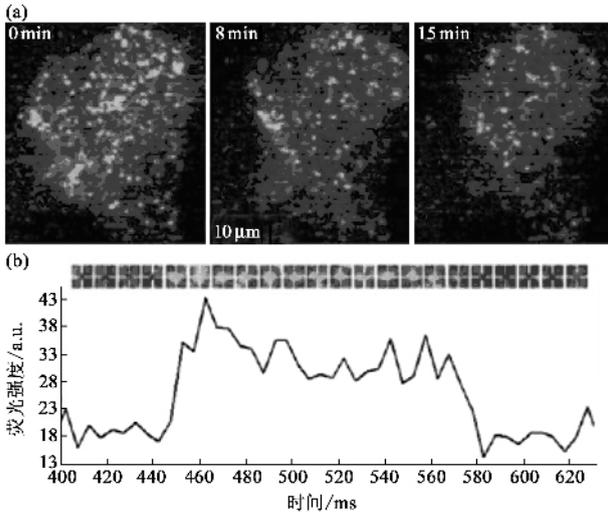


图6 利用物镜型 TIRFM 在单分子水平研究肌球蛋白 X 尾部的 Pleckstrin 同源结构域 (PHD) 与质膜结合的动力学过程<sup>[10]</sup>(a) 活细胞质膜上 EGFP 标记的 PHD 的时间序列;(b) 单个 PHD 在质膜上的停留

## 4 荧光共振能量转移(FRET)

### 4.1 FRET 的原理及其特点

前面所讲的 SDCM 和 TIRFM 均是通过改进激发方式提高分辨率和图像信噪比来实现单分子探测的,其观察对象均是样品中荧光标记的单个生物分子的空间位置(用荧光点 light spot 代表)及其运动轨迹。然而由于衍射效应,点光源的像不是点像,而是形成以爱里斑(Airy disk)为主的衍射图样。根据瑞利判据(Rayleigh criterion),如果一个点光源的爱里斑中心刚好和邻近的另一个点光源的爱里斑边缘重合,则这两个点光源恰好能被分辨,这就是我们通常所说的光学显微镜分辨率的衍射极限(diffraction limit),约为  $0.61\lambda'/N.A.$ ,其中  $\lambda'$  为荧光波长, $N.A.$  是物镜数值孔径,一般可以粗略地取  $\lambda'/2$  作为衍射极限的估计值,对于可见光来说,大约为几百纳米。为了研究分子之间的相互作用,需要突破该极限,发展空间分辨率更高的荧光检测手段。FRET 便是这样一种方法。

FRET 是指两个携带不同荧光基团的大分子之间或同一分子的不同荧光团之间,通过电偶极相互作用所发生的非辐射 Förster 能量转移(Förster energy transfer, FET)(图7(a))。提供能量与接受能量的分子或者荧光团分别称为供体(donor)与受体(acceptor)。FRET 直观的表现是,当供体荧光分子和受体荧光分子相互靠近到合适的距离时,若激发

供体,其荧光强度比其单独存在时要低得多,而受体荧光却大大增强。FRET 的效率( $E$ )与供-受体间距离( $r$ )的六次方成反比,即  $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$ (图7(b)),其中  $R_0$  是  $E = 50\%$  时的供-受体距离,称为 Förster 距离或临界转移距离,对于特定的供-受体对,  $R_0$  是个常量。因此, FRET 效应是一个强烈依赖于供-受体之间距离的物理过程,它的发生一般要满足四个条件:供-受体间距离不超过 10nm; 供体的发射光谱与受体的激发光谱有一定重叠; 供-受体偶极矩具有合适的相对取向; 供体量子产率和受体光吸收系数足够高。

正因为 FRET 效率  $E$  对供-受体距离  $r$  有强烈的依赖性,因此其空间分辨率非常高,可以达到 nm 量级,突破了光学衍射极限的限制。利用 FRET 方法可以研究两种分子之间的相互作用(分子间 FRET, 图7(c))或单一分子内两亚基之间的结合或分子构象的改变(分子内 FRET, 图7(d))等。在实际应用中,可以定性地观察 FRET 的发生与否,也可以定量地测量供体、受体荧光强度的变化,得到 FRET 效率  $E$ , 以得到供-受体距离  $r$ 。FRET 成像既可以在普通双通道荧光显微镜上实现,也可以利用 CLSM 等方法实现。然而 FRET 虽然具有固有的纳米级物理分辨率,但要想可视化地实时研究活细胞内单分子对的相互作用,还需要利用前面提到的提高图像信噪比的快速成像方式如 SDCM、TIRFM 等。近年来 FRET 技术(特别是与 TIRFM 的联用)已在活细胞内单分子荧光成像的研究中得到了广泛的应用<sup>[11,12]</sup>。

### 4.2 应用举例

2000 年, Yasushi Sako 等首次利用 TIRFM 方式的 FRET 研究了活细胞膜蛋白受体与配体的相互作用过程<sup>[11]</sup>。他们在利用 TIRFM 观察和分析了 A431 人表皮样癌细胞质膜上荧光染料 Cy3 标记的单个表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的荧光强度变化,并得出 EGF 受体(EGF receptor, EGFR)二聚化及相关信号转导过程的主要机制是一个 EGF 分子先与 EGFR 的二聚体结合,形成 EGF-EGFR 复合物然后再直接捕获另一个 EGF 分子,即 EGFR 的二聚化。在第二个 EGF 分子与其结合之前就已经形成的推论后,又进一步利用 TIRFM-FRET 直观地观察到了单个 EGF-EGFR 复合物的二聚化过程。他们将荧光染料 Cy3 标记的 EGF 作为供体,用另一种荧光染料 Cy5 标记的 EGF 作为受体,同时加到细

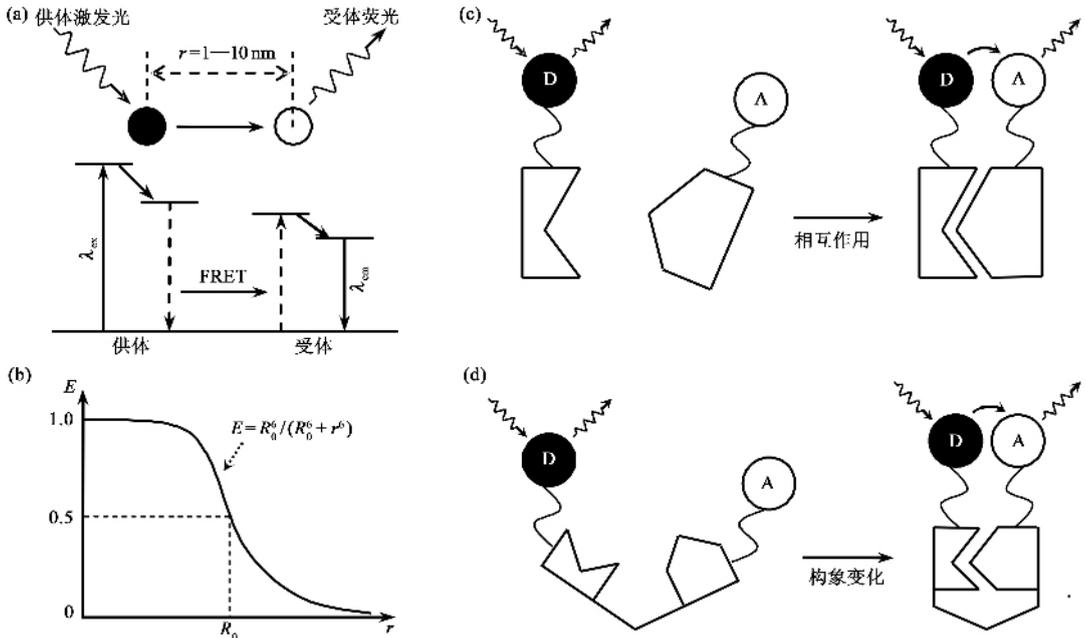


图7 荧光共振能量转移(FRET)原理示意图 (a) Förster 能量转移(FET) (b) FRET 效率  $E$  与供-受体间距离  $r$  的关系 (c) 分子间 FRET (d) 分子内 FRET

胞培养液中,用 Cy3 的激发光 532nm 激发,分别接收 Cy3 和 Cy5 的荧光(中心波长分别为 580nm 和 670nm),观察到同一个荧光点处 Cy3 荧光减弱的同时 Cy5 的荧光相应增强(图 8),说明 Cy3-EGF 和 Cy5-EGF 之间发生了 FRET,从而直观地在单分子水平观察到了 EGF 分子的相互作用。

2004 年,Hideji Murakoshi 等用类似的方法在单分子水平研究了活细胞内 Ras 蛋白的活化过程<sup>[21]</sup>。Ras 蛋白是一种小 G 蛋白,Ras 信号途径是一种很常见的细胞分子信号转导途径。Murakoshi 等利用 GFP 的衍生物黄色荧光蛋白(yellow fluorescence protein, YFP)标记两种 Ras 蛋白(H-Ras 和 K-Ras)作为供体,利用能够发荧光的三磷酸鸟苷(GTP)的类似物 BodipyTR-GTP 作为受体,再利用 EFG 作为刺激因子诱导 BodipyTR-GTP 与 YFP-H/K-Ras 结合,并在该过程中观察到了单分子 FRET 现象(图 9)。他们发现,Ras 蛋白一旦被激活,其扩散将被大幅度抑制甚至被固定不动,说明形成了体积较大的 Ras 信号转导复合物(signaling complex),这些复合物在将 Ras 的信号转导到相关信号接受因子(effector)的过程中可能起到一个平台的作用,进一步说明 Ras 信号转导不是只通过信号接受因子之间的简单碰撞来实现的。同时他们还发现,聚集到细胞膜上的 GFP 标记的 GAP334 分子也静止不动,以此推测它们结合在这些信号转导复合物上。

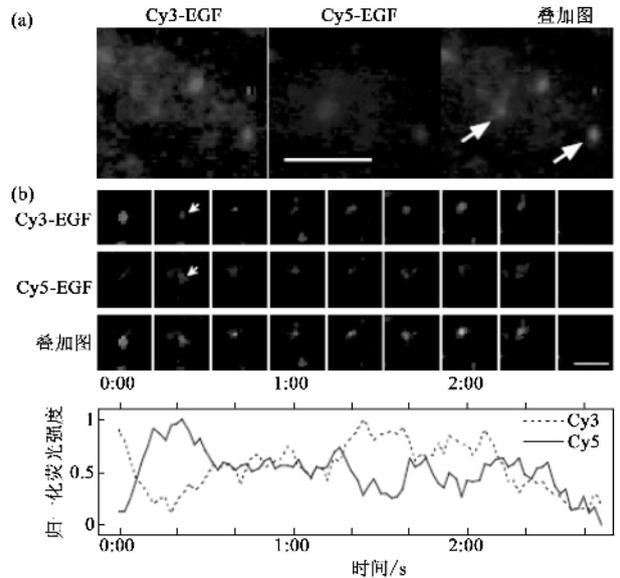


图8 利用 FRET 方法在单分子水平研究活细胞膜蛋白受体与配体的相互作用<sup>[11]</sup> (a) 分别用 Cy3 和 Cy5 标记的表皮生长因子(EGF)同时与膜上受体结合,用 532nm 激发光激发 Cy3 并观察到由于 FRET 作用而产生的 Cy5 荧光(箭头所指);(b) 单个 Cy3-EGF 和 Cy5-EGF 之间发生的 FRET 现象,同一荧光点处 Cy3 荧光减弱的同时,Cy5 荧光增强。(图中标尺原文未给出其代表长度)

## 5 其他相关技术和方法

### 5.1 其他荧光检测方法

除了前面介绍的 FRET,活细胞中的单分子荧

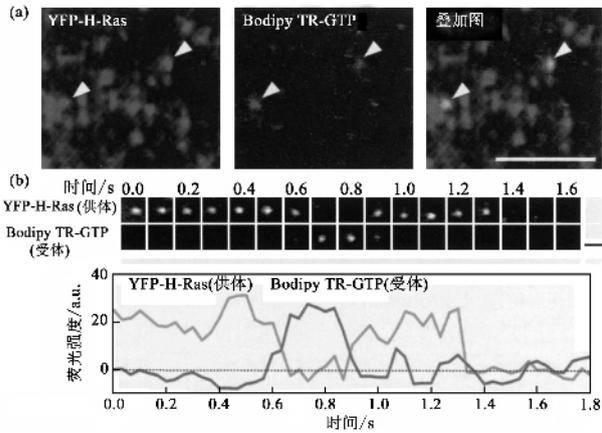


图9 利用 FRET 方法在单分子水平观察活细胞内 Ras 蛋白的活化过程<sup>[12]</sup>(a) 激发 YFP-H-Ras 时观察到由于 FRET 作用而产生的 BodipyTR-GTP 荧光(箭头所指),图中标尺表示  $5\mu\text{m}$ ; (b) 单个 YFP-H-Ras 和 BodipyTR-GTP 之间发生的 FRET 现象,同一荧光点处 YFP 荧光减弱的同时 Bodipy-GTP 荧光增强(图中标尺表示  $0.5\mu\text{m}$ )

光还可通过其他方式进行检测或成像,如:荧光寿命成像显微术(fluorescence life imaging microscopy, FLIM),可通过测定单分子荧光的寿命来研究其所处细胞微环境或与其他分子的相互作用<sup>[13]</sup>;荧光相关光谱(fluorescence correlation spectroscopy, FCS)技术,可通过检测分子的扩散系数、化学反应速率等动力学参量来研究生物单分子的扩散、聚集和翻转等过程<sup>[14]</sup>;光漂白后荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)技术,可通过检测进入特定光漂白区域的未漂白荧光分子来研究生物单分子的扩散、转移或透膜等运动过程<sup>[15]</sup>;光漂白中的荧光损失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)技术,可通过检测邻近重复光漂白区的特定区域内荧光的减少或消失来研究细胞膜或细胞内生物单分子的运动<sup>[15]</sup>等等。

## 5.2 多种方法的联用

每一种方法均有其优越性,也有其局限性,例如 TIRFM 只能观察细胞膜表面和附近区域,而无法观察细胞质或细胞核内部。所以,利用两种甚至多种方法的联用来实现优势互补也成为近年来发展的趋势之一。前面提到的 TIRFM 与 FRET 的联用就是一种多方法联用的方式。这两种方法分别属于不同的激发方式和检测方式的范畴,是最容易实现的一种联用方式,类似的还可以有 CLSM 或 SDCM 与 FRET 的联用, TIRFM、CLSM 或 SDCM 与 FLIM 或 FRAP 的联用等。另一类联用方式是采用不同激发方式的方

法之间的联用,如 TIRFM 与 CLSM 或 SDCM 的联用<sup>[16]</sup>,可同时观察细胞膜和细胞质或细胞核,实现观察对象的互补。还有一类联用方式则是将这些荧光成像方法与其他非光学检测技术联用,如 TIRFM 或 CLSM 与原子力显微术(atomic force microscopy, AFM)<sup>[17]</sup>联用,可同时得到相关的力学信息,如粘附力等。

## 6 结束语与展望

综上所述,近年来发展迅速的单分子荧光成像方法,特别是转盘式共聚焦显微术(SDCM)、全内反射荧光显微术(TIRFM)和荧光共振能量转移(FRET)技术,在活细胞内单分子的运动轨迹、动力学特征、相互作用以及单个生物大分子的构象变化等研究中均已取得了比较显著的应用成果。并且,随着应用于活细胞的荧光标记技术,以及高灵敏、快速检测成像单元如基于微通道板(micro-channel plate, MCP)电子倍增技术的像增强型 CCD(intensified CCD, ICCD)、基于芯片增益放大(on-chip-multiplication gain)技术的级联 CCD(cascade CCD)等的进一步发展,这些新方法和技术在该领域必将具有更广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] Paddock S W. *Mol. Biotechnol.*, 2000, 16 : 127
- [2] Ichihara A, Tanaami T, Isozaki K *et al.* *Bioimages*, 1996, 4 : 57
- [3] Adams M C, Salmon W C, Gupton S L *et al.* *Methods*, 2003, 29 : 29
- [4] Ovechkina Y, Maddox P, Oakley C E *et al.* *Mol. Biol. Cell*, 2003, 14 : 2192
- [5] Hermann M, Pirkebner D, Draxl A *et al.* *Transplant. Proc.*, 2005, 37 : 3409
- [6] Tadakuma H, Yamaguchi J, Ishihama Y *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 287 : 323
- [7] Tadakuma H, Ishihama Y, Toshiharu S *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 344 : 772
- [8] Iino R, Koyama I, Kusumi A. *Biophys. J.*, 2001, 80 : 2667
- [9] Mashanov G I, Tacon D, Knight A E *et al.* *Methods*, 2003, 29 : 142
- [10] Mashanov G I, Tacon D, Peckham M *et al.* *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 : 15274
- [11] Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. *Nat. Cell Biol.*, 2000, 2 : 168
- [12] Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101 : 7317
- [13] Duncan R R. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, 34 : 679
- [14] Wang Z F, Shah J V, Berns M W *et al.* *Biophys. J.*, 2006, 91 : 343
- [15] Leake M C, Chandler J H, Wadhams G H *et al.* *Nature*, 2006, 443 : 355
- [16] Douglass A D, Vale R D. *Cell*, 2005, 121 : 937
- [17] Gorelik J, Shevchuk A, Ramalho M *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99 : 16018