

现代生物技术前沿

陈宜张 林其谁 主编

生命科学中的单分子行为 及细胞内实时检测



科学出版社
www.sciencep.com

现代生物技术前沿

陈宜张 林其谁 主编

生命科学中的单分子行为 及细胞内实时检测



科学出版社

北京

内 容 简 介

活细胞单分子行为及实时检测研究是生命科学向微观世界深入探索的一个重要标志,它需要生物、化学、物理等多学科的交叉,已经成为目前研究的一个热点。本书基本上涵盖了该领域最新的研究进展与发展趋势,包括:细胞内单个大分子的实时视见研究、细胞内大分子的超微量实时检测、在视见及检测中常用的光学方法及其他方法的介绍、单分子弹性理论等四大方面的内容。该领域内的 30 多位不同学科的知名专家参加编写,可以让读者对发展较快的该研究领域形成一个整体的概念。

本书适合于对该研究领域感兴趣的科研人员、研究生等参考。

图书在版编目(CIP)数据

生命科学中的单分子行为及细胞内实时检测/陈宜张,林其淮主编.
—北京:科学出版社,2005
(现代生物技术前沿)
ISBN 7-03-015448-7

I. 生… II. ①陈…②林… III. ①生命科学-分子作用-研究 ②细胞内-检测-研究 IV. Q1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 043011 号

责任编辑:庞在堂 彭克里 席慧/责任校对:朱光光

责任印制:钱玉芬/封面设计:王浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年9月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2005年9月第一次印刷 印张:23 1/2 插页:2

印数:1—2 500 字数:539 000

定价:68.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

编 委 会

主 编 陈宜张 林其谁

编 委 (按姓氏笔画排序)

方晓红 李民乾 张幼怡 陈宜张

林其谁 欧阳钟灿 罗建红 赵新生

编 辑 刘天玉

序 言

在原子分辨水平上观测单个生物分子动态行为 是结构生物学家所追求的愿望

蒸汽机的发明驱动了工业革命。单个生物分子的观察与操作技术已经显示了它的巨大魅力，而能量利用最高的单分子技术的应用更使科学家们神魂颠倒、梦寐以求。单分子技术必将驱动一场不亚于工业革命的另一场革命——纳米器件革命，从而将人类带入一个崭新的纪元。

目前人类还没有能力制造出像生物分子马达那样奇妙的纳米引擎，但是大自然已经给我们提供了能够高效率地执行特定功能的生物纳米马达，它的发现使全世界科学家欢欣鼓舞。简单回顾 F_1 分子马达的发展历史，可以看到，正因为 Abrahams 于 1994 年得到了牛心线粒体 F_1 -ATPase ($\alpha_3\beta_3\gamma$ 复合体) 的高分辨 X 射线衍射的晶体结构，从而使 Boyer 所提出的 ATP 合成酶催化机制的模型，即“结合-变构模型”得到了直接的实验证明，为此 Boyer 与 Walker 在 1997 年获得了诺贝尔化学奖。就在 Abrahams 等发表 F_1 -ATPase 的高分辨晶体结构后不到三年，Noji 等于 1997 年在 *Nature* 上报道了他们直接观测到有关分子马达的实验结果。他们将 β 亚基上带有 10 个组氨酸尾巴的 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 复合体（最小的水解活性单位）通过 Ni-NTA-HRP 固定在玻璃板上，让 γ 亚基连接 F_o 的那一端朝外，而且依靠生物素-链霉亲和素的作用将荧光标记的肌动蛋白微丝连接到 γ 亚基上。这样，他们在荧光显微镜下直接观测到 ATP 水解时 γ 亚基的旋转。虽然上述观测远非在原子分辨水平上的结果，然而却是当今科学研究中最激动人心的结果之一。上述表明，生物学研究中单分子行为的观测既是十分重要的又是十分前沿的领域，它也是结构生物学的发展与延伸。结构生物学家可以在原子分辨水平上测定生物大分子的精妙绝伦的三维结构，研究其结构与功能关系，如上述 F_1 -ATP 的研究。但至今，结构生物学仍不可能在原子分辨水平上直接测定单分子的动态行为。显然，结构生物学本身需要不断地发展与创新，更需要与其他学科的交叉，与新技术、新方法的结合。生命科学中单分子行为的研究领域是多个学科和技术交叉的产物，目前正方兴未艾，它还需要更多的交叉与融合，特别需要更多的新技术、新方法的发展与融合。我们相信，随着新方法与新技术的不断创新发展，在原子水平上观测与研究单分子动态行为是可以实现的。人类制造出生物纳米马达的愿望也将会实现。

梁栋材

2005 年 1 月 25 日

前 言

活细胞内单个大分子研究就是在活体情况下对单个生物大分子（蛋白质和核酸）的动态以及动力学过程做定量研究。已经试用过许多方法来研究单分子，如隧道显微镜、原子力显微镜（AFM）、X 射线衍射技术等，人们已能对结晶状态的单分子进行观察；纳米技术的出现，使得对单分子的结构有了新的认识。但是在活体条件下（活细胞，整体）对单个分子活动进行研究是 20 世纪末刚刚出现的新事物。迄今为止，几乎细胞生物学及分子生物学中的所有重要结论，如受体激活、细胞内信号转导、蛋白质亚单位的寡聚化、DNA 的转录活动等，大都是基于生物化学或药理学实验中一些分子的浓度变化而做出的，是许多分子活动的一个平均结果，即集群（系综）平均。集群平均的研究结果无疑是正确的，但它往往掩盖了各个分子的个性，因此很需要从实际的单个分子活动加以验证。如果做成了单分子水平的实验，则①可以实时看到标记分子的活动；②可以揭露被集群平均掩盖的分子活动特点；③反映细胞异质微环境。随着生物化学与分子生物学的发展与各种物理、化学、生物学的研究手段的应用使生物体内的化学反应过程逐渐得到阐明。但是与此同时也积累了越来越多的实验证据表明在试管里研究得到的结果未必就完全反映了活体内的情况。首先，细胞不是一个均匀的容器，细胞内实际上包含着一系列生物大分子的阵列。细胞内的膜结构与微管系统将它分成许多功能小区，小区之间有物理屏障，也有促进不同小区间物质交流的转运体或载体。另外，细胞内某些生物大分子的浓度很高，如线粒体基质内高蛋白质浓度在试管内是难以达到的，它已接近压缩极限，在高蛋白质浓度下，蛋白质与蛋白质相互作用更易于发生。在生物化学与分子生物学研究中，为了了解蛋白质与蛋白质的相互作用，往往采用酵母双杂交或免疫共沉淀的方法。但是酵母双杂交的成功只能说明两个蛋白质之间有相互作用的结构基础，并不表示这两个蛋白质在细胞内的确会相遇，而这种相互作用在细胞内确实存在。免疫共沉淀研究不能给出动态的结果，同时也还应该排除在破碎细胞时导致本来没有相互作用的蛋白质之间发生凝聚的可能性。要真正了解生命，必须了解细胞内各种分子的实时变化。

不难看出，活细胞单分子行为及实时检测研究是生命科学向微观世界深入探索的一个重要标志。正因为如此，最近若干年来上述研究越来越受到生物学家的重视，同样也得到物理学家、化学家与信息科学家的重视，它很可能是生命科学，特别是分子和细胞生物学领域发展的重要里程碑之一。

本书是 2004 年 5 月香山科学会议“生命科学中的单分子与细胞内实时检测问题”学术讨论会许多与会科学家的共同贡献。在那次讨论会上，来自国内外的三十多位生命科学、物理学、化学专家聚集一起对上述问题的各个方面及国际进展做了详细、深入的讨论。会后，专家们热情地提出，如能以此次讨论会的发言为基础，整理成书面材料，汇集出版，必将对我国的生命科学定量研究起很好的推动作用。这个建议得到了科学出版社的大力支持。于是，有 20 多位专家写成了各自的专文，由我们把它们加以汇集、

整理出版。

本书基本上涵盖了这个领域最新的研究进展与趋势。大致上可以分为以下几个方面：细胞内单个大分子的实时视见研究，细胞内大分子的超微量实时检测，在视见及检测中常用的光学方法及其他方法的介绍与讨论，以及单分子弹性理论。由于单分子视见研究在国际上开始不久，在我国也仅仅只是刚起步数年，因此在这方面我国科学家在国内开展的实验工作还不多，但理论物理方面已有长足的进步。我们相信，再过几年，我国在这方面的研究一定会多起来。到时再回头来看这一次香山科学会议和与此相伴的本书的出版时，一定会倍感喜悦与鼓舞。

贾东梅同志以及研究生肖林和杨华艳对于书稿的整理和索引编制投入了大量的精力。对此，我们表示衷心感谢。

陈宜张 林其谁

2005 年 1 月

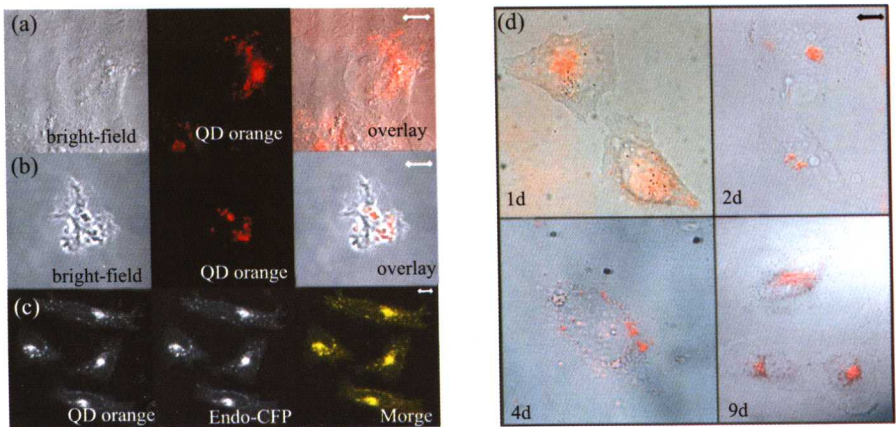


图 3-4 量子点标记在活细胞长时间观察应用
(引自: Jaiswal *et al.* 2003)

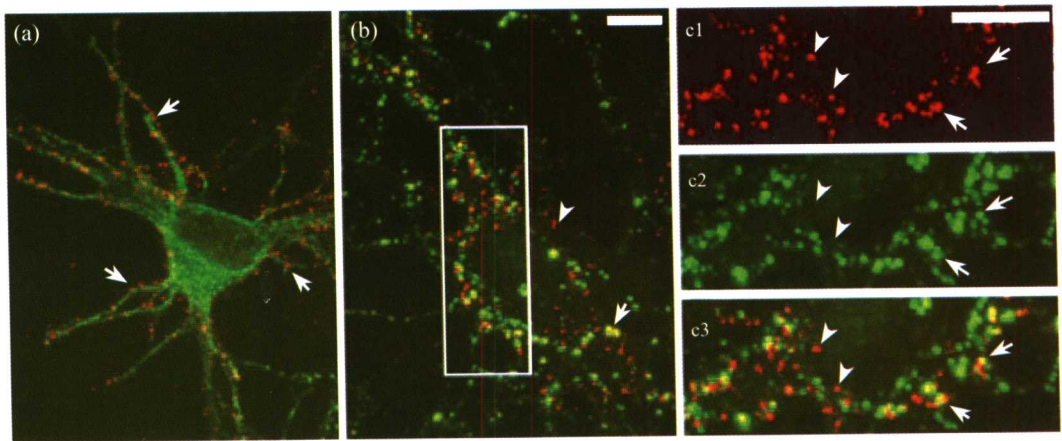
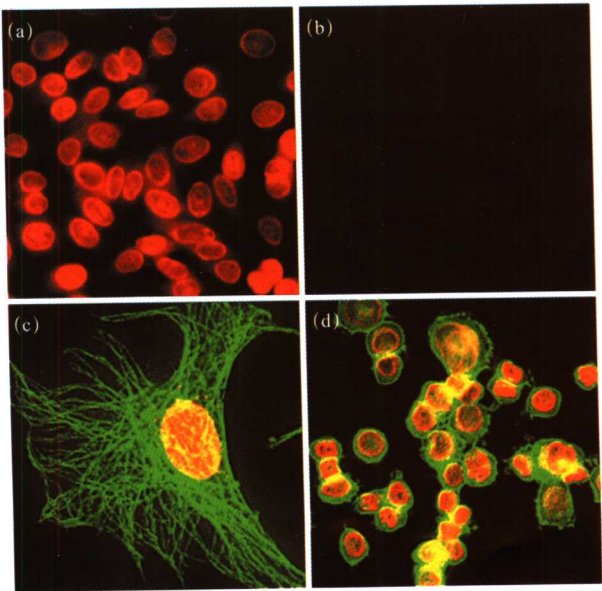


图 3-5 神经元细胞表面量子点标记的甘氨酸受体研究
(引自: Dahan *et al.* 2003)

图 10-2 量子点特异性标记细胞结构

(a) 人类上皮细胞核的核抗原用 ANA, 抗人 IgG-生物素和 630nm 量子点的链霉抗生物素蛋白染色。(b) IgG 对照。(c) 3T3 细胞核用 ANA, 抗人 IgG-生物素及 630nm 量子点的链霉抗生物素蛋白染色 (红色); 微管用抗微管蛋白抗体, 抗鼠 IgG-生物素及 535nm 量子点链霉抗生物素蛋白 (绿色)。(d) SK-BR3 细胞表面的 Her2 用鼠抗 Her2 抗体染色 (绿色), 及 535nm 量子点联接到抗鼠 IgG 核抗原, IgG-生物素及 630nm 量子点链霉抗生物素蛋白 (红色) (引自: Wu *et al.* 2003)



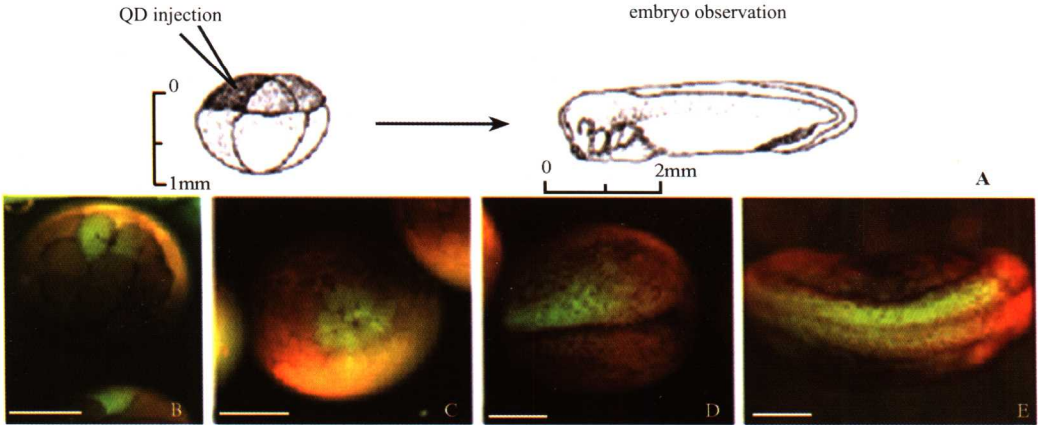


图 10-3 爪蟾胚胎不同育时期的量子点标记
(引自: Dubertret *et al.* 2002)

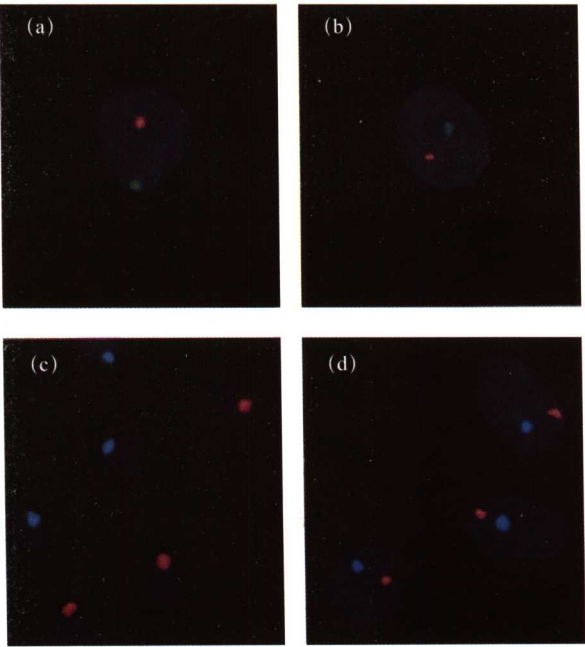


图 14-3 用 CEP 探针、1 分钟杂交的超快速 FISH 方法测定性染色体 X (绿色信号) 和 Y (红色信号)
(a) 卵裂细胞。(b) 成羊膜细胞。(c) 精子细胞。(d) 椎性淋巴细胞。(引自: Liu *et al.* 1998)

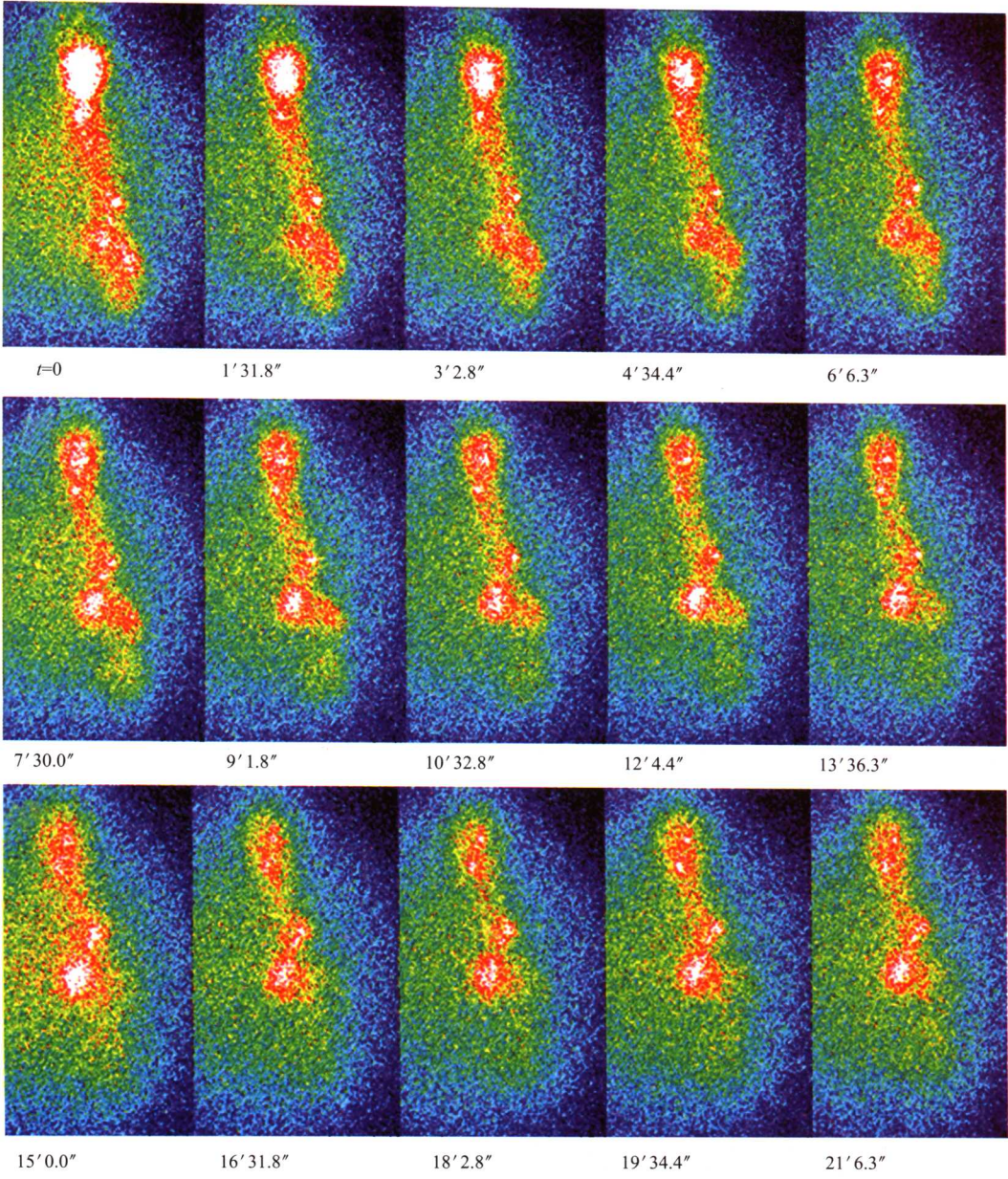


图 16-12 大鼠脑微血管内皮细胞增殖分裂过程钙离子浓度动态变化的蒙太奇图像

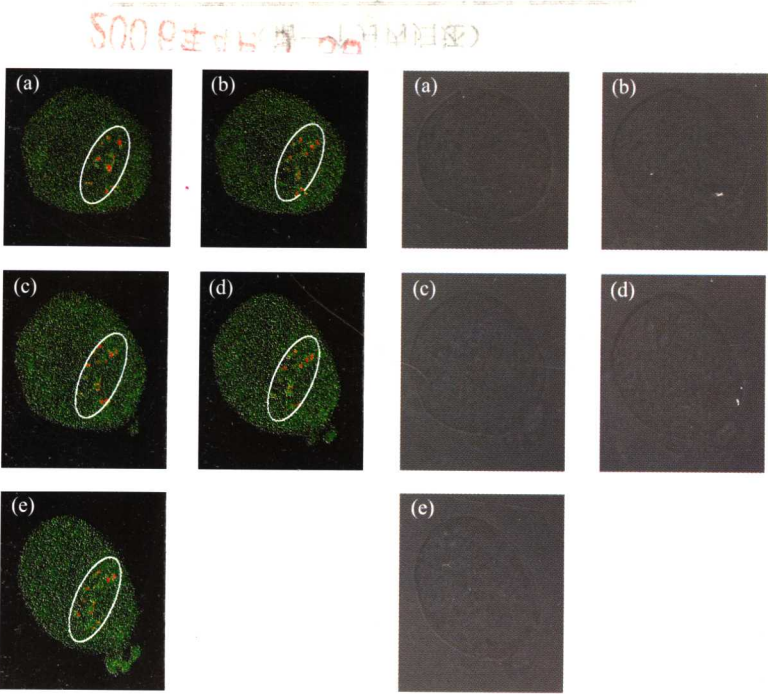


图 16-16 小鼠受精卵中的染色体和 Ca^{2+} 随时间变化图像

左侧为双光子激发荧光图，右侧为透射图；每幅荧光图之间的时间间隔为 30min，荧光图中椭圆内红色的两排为染色体，由图(a)~(e)可以看出细胞以及细胞内染色体和细胞质的旋转运动及细胞的拉长。图片大小 $92.4\mu\text{m} \times 92.4\mu\text{m}$

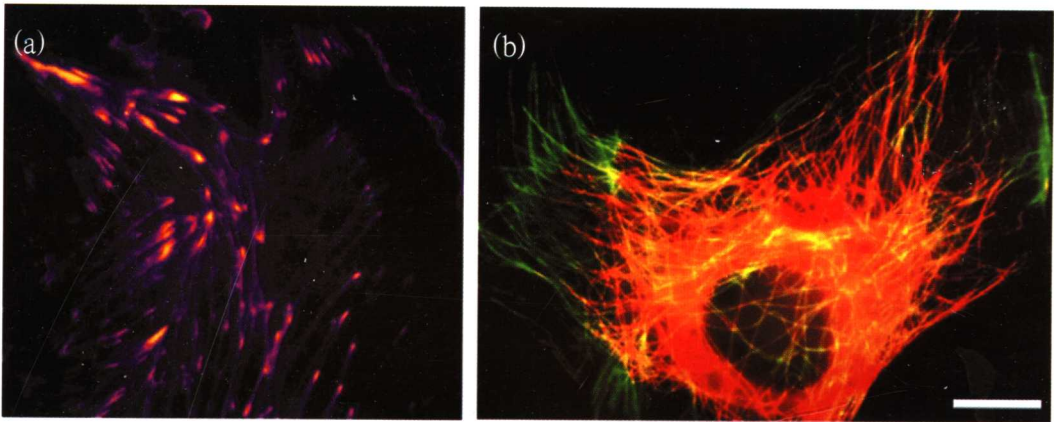


图 17-7 全内反射荧光显微镜下拍到的位于表面的 actin-YFP (a)和 Tubulin-YFP (b)蛋白分子图片

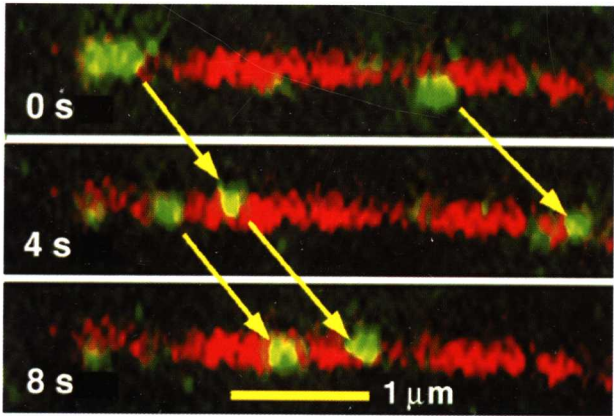


图 17-8 拍到的 kinesin-GFP 分子沿着微管的运动
绿色的为 kinesin-GFP 分子，红色的为神经细胞微管（引自：Daniel *et al.* 1997）

目 录

序言	梁栋材 (i)
前言	陈宜张 林其谁 (iii)
1 活细胞内单个大分子的行为	陈宜张 (1)
2 单分子荧光成像和单分子力谱研究活细胞中的单分子行为	余军平 林毅 江雅新 赵新生 方晓红 (13)
3 活细胞中生物单分子光学检测及操纵研究现状	徐宁 万志超 徐明 张幼怡 (31)
4 细胞内蛋白质相互作用的实时检测	滑玉林 邱爽 罗建红 (44)
5 运用荧光共振能量转移技术在活细胞中实时检测信号转导过程	张峰 曹莉 陈宜张 何成 (67)
6 非配体依赖性受体激活	崔宗杰 (86)
7 细胞内实时检测的意义	林其谁 (103)
8 单细胞多成分分析检测技术及其应用	肖华 徐松云 邹汉法 (122)
9 关于单分子单细胞分析问题的一点思考	陈义 (148)
10 荧光量子点在生物分析与细胞成像中的应用	李军 李景虹 (165)
11 小分子荧光探针进展	王彦广 (179)
12 全内反射荧光显微术在生物单分子探测中的应用	金文睿 殷学锋 范子琳 (198)
13 单分子的原子力显微镜研究进展	朱杰 齐浩 孙润广 (219)
14 荧/磷光探针技术在活细胞单分子检测中的应用	张海容 (234)
15 蛋白质相互作用的实时在体光学检测	骆清铭 陆锦玲 曾绍群 张智红 (244)
16 活细胞内荧光分子实时原位成像技术	马万云 (269)
17 单分子行为可视化研究中的光科学与技术	王桂英 王琛 (287)
18 光镊——单细胞与单分子操控技术	李银妹 (306)
19 DNA 单分子手术	张益 李民乾 胡钧 (328)
20 单分子弹性理论	黎明 柳飞 周海军 欧阳钟灿 (337)
缩略语表	(359)
索引一 方法和技术	(361)
索引二 细胞内的分子及过程	(364)

活细胞内单个大分子的行为

陈宜张

活细胞内单个大分子研究为的是要在活体 (*in vivo*) 情况下对单个生物大分子 (蛋白质与核酸) 的动态 (dynamics) 以及动力学 (kinetics) 过程做定量研究。在讨论活细胞内单个大分子时, 也讨论单分子的离体实验和分子影像学 (molecular imaging) 问题。

1952 年, Erwin Schrödinger 曾说过: 我们绝不可能用一个电子、原子或分子做实验。仅仅过了 8 年, Richard 就指出: 在如何排列原子方面并无物理学上的困难 (Gimzewski *et al.* 1999), 我们可以在原子和分子水平上操纵并控制物质。20 世纪 80 年代早期发明的扫描隧道显微镜 (scanning tunneling microscope, STM) 方法就实现了对单个原子及分子的观察。

20 世纪 80 年代末和 90 年代初的单分子工作, 都是在低温下进行的, 后来很快发展到能在常温下观察。早期是把分子放在溶液中, 或涂在固体表面进行的, 现在也已经在活细胞表面, 甚至胞液内、细胞核内等条件下进行了。

已经试用过许多方法来研究单分子, 如 STM、原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM)、X 射线衍射技术等, 人们已能对结晶状态的单分子进行观察。纳米技术的出现, 使得对单分子的结构有了新的认识。但是在活体条件下 (活细胞, 整体) 对单个分子的活动进行研究是从未有过的 (Gimzewski *et al.* 1999, Mehta *et al.* 1999, Moerner *et al.* 1999, Weiss 1999)。如果以活细胞为对象, 首先选用的是光学技术, 这是因为只有光子对受研究分子的扰乱最轻微, 因此结果更为可靠和直接。在光学技术中, 荧光常常被选用, 因为它的检测灵敏度高。就当前活细胞单分子实时视见 (visualization) 研究技术而言, 光学方法几乎是唯一的选择了。

1999 年在法国 Tours 由欧洲分子生物学组织 (EMBO) 召集的研讨会 Single Molecule Biophysics (an EMBO workshop) 以及 *Science* 的 4 篇专论 (Gimzewski *et al.* 1999, Mehta *et al.* 1999, Moerner *et al.* 1999, Weiss 1999) 对单分子研究, 特别是它的生物物理学方面的研究, 做了系统回顾, 其中提到了活细胞内单个大分子的研究。过了 4 年, *Science* (卷 300) 出了“前景明亮”的专刊 (Beckman 2003, Greg 2003, Lippincott-Schwartz *et al.* 2003, Stephens and *et al.* 2003, Swedlow *et al.* 2003, Weijer 2003); *Nature Cell Biology* (卷 5) (Gerlich *et al.* 2003, Lippincott-Schwartz *et al.*

2003, Miyawaki *et al.* 2003) 与 *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (卷 4) (Sako *et al.* 2003, Koster *et al.* 2003, Jacobs *et al.* 2003, Tsien 2003) 联合出了“细胞生物学中的成像问题”的专刊; *Nature Biotechnology* (卷 21) 出了“光学成像聚焦”的专刊 (Dyba *et al.* 2003, Hell 2003, Campagnola *et al.* 2003, Fujimoto 2003, Zipfel *et al.* 2003, Lewis *et al.* 2003, Jares-Erijman *et al.* 2003)。这些专刊强调了成像研究, 也就是 1999 年所提的光学探查方法, 再一次提出了活细胞内单个大分子的问题, 也涉及分子影像学问题。

国内于 2001 年召开了“活细胞内化学过程的实时单分子显示问题”研讨会, 于 2002 年召开了“活细胞内化学过程的实时单分子显示问题”专题研讨会。不少实验室对会议内容很有兴趣。

人们很想在单分子水平更深入地了解细胞及分子生物学的基本问题, 并希望在化学及物理学基础理论的水平上阐明生命科学中的问题。

1.1 为什么要重视活细胞内单个大分子研究

迄今为止, 几乎细胞生物学及分子生物学中的所有重要结论, 如受体激活、细胞内信号转导、蛋白质亚单位的寡聚化、DNA 的转录等, 都是基于生物化学或药理学实验中一定浓度变化而做出的, 是许多分子活动的一个平均结果, 即集群 (系综) 平均 (ensemble averaging)。集群平均的研究结果无疑是正确的, 但它往往会掩盖每个分子的个性, 因此很需要从实际的单个分子活动加以验证。如果做成了单分子水平的实验, 至少有以下一些可见到的好处。

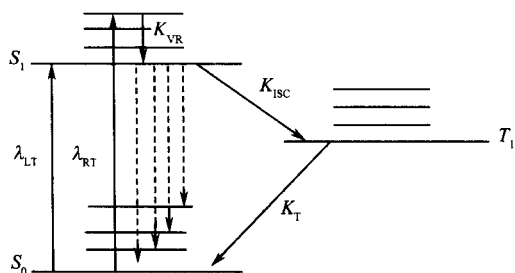


图 1-1 分子的电子能量水平结构示意图

S_0 , 基单线态; S_1 , 单受激态; T_1 , 最低三重线态或其他中间态。在低温条件下用波长 λ_{LT} 可以促使 0-0 转换, 而在室温下则用较短波长 λ_{RT} 。 K_{ISC} 代表系统间交叉或中间物产生率, 而中间产物衰变率为 K_T 。由上向下的带箭头虚线表示荧光发射, 它们从 S_1 出发, 可以终止于 S_0 本身或它的各种振动水平 (引自: Moerner *et al.* 1999)

种电子态 (图 1-1) 而被不合理平均的情况 (Moerner *et al.* 1999)。

1.1.3 反映细胞异质微环境

细胞不是一个匀质系统, 细胞浆内有许多细胞器, 大分子是在非匀质系统环境中活

1.1.1 实时看到标记分子的活动

用荧光标记的方法有可能记录或演示以前未曾实时看到的大分子动态变化及动力学过程, 如大分子的定位、运动轨迹、寡聚体的分子比等, 当然, 看到的是被标记大分子的荧光或某种物理属性。

1.1.2 揭露被集群平均掩盖的分子活动特点

单分子研究可以完全排除以前集团平均方法中不同分子处于单线基态 (ground singlet state)、单受激态 (first excited singlet)、最低三重态 (lowest triplet state) 三

动的，单分子研究有可能把分子在细胞异质微环境中的行为显明地揭示出来。以细胞膜为例，上面有“筏 (raft)”，有蛋白质的“篱笆 (fence)”，以及与细胞骨架的联系 (Ritchie *et al.* 2003, 图 1-2)。因此膜上蛋白质分子或脂质分子的活动是跳跃的，而不是通常在溶液情况下的布朗 (Brown) 运动 (图 1-3 和图 1-4)。

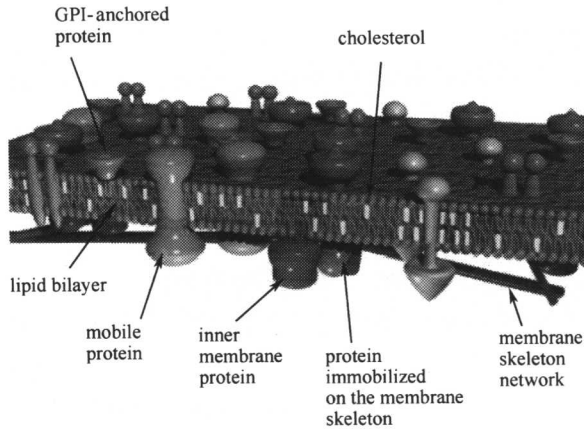


图 1-2 质膜结构的复杂性

质膜包含一个脂双层及嵌入其中的胆固醇及蛋白质。蛋白质可以是可运动的或固定于质膜深部的细胞骨架，后者是不可运动的。即使是那些可运动的蛋白质分子也不能自由活动，因为它们受到邻近肌动蛋白的作用。蛋白质可以是跨膜的、糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 固着的或与脂双层内层叶片相关联的 (引自: Ritchie *et al.* 2003)

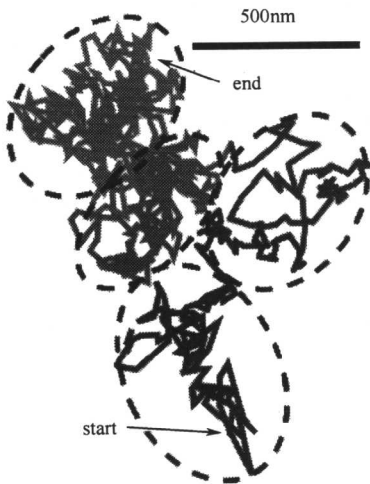


图 1-3 跨膜蛋白的跳跃式扩散

NRK 细胞表面的 CD44 分子用胶金颗粒标记。分子运动的轨迹 (trajectory) 以 2ms 一帧的时间分辨率做记录。时间上按深 (start) 向浅 (end) 阴影方向前进。虚线围成的卵圆范围表示蛋白质分子扩散所受到的可能约束 (引自: Ritchie *et al.* 2003)

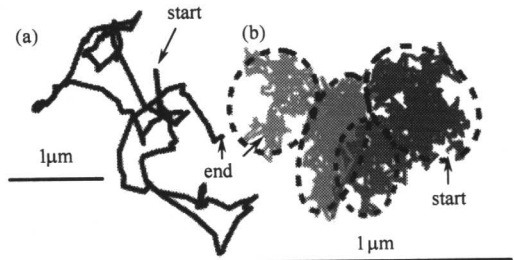


图 1-4 DOPE 脂质分子在细胞质膜上的跳跃式扩散

DOPE (*L*- α -dioleoylphosphatidylethanolamine) 用胶体金颗粒标记，然后观察其运动轨迹。活 NRK 细胞以 (a) 33ms, (b) 25μs 的速度摄影。在正常摄像速度下，DOPE 看起来是在进行布朗扩散，但当摄影速度增加时，可看出它的跳跃扩散。行进的方向是由深 (start) 向浅 (end) 阴影，虚线围起来的卵圆范围表示脂质分子扩散时所遇到的区室边界 (引自: Ritchie *et al.* 2003)

1.2 1999 年以来的重要进展

自 1999 年以来,活细胞内单个大分子研究有许多重要进展。其中许多是与光学方法及荧光标记技术的改进相关联的,这些方法是:①全内反射荧光显微术 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM);②绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的构建;③荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 术等。

有关活细胞内单分子研究,有代表性的进展如下。

1.2.1 以活细胞为对象的单分子研究 (Sako *et al.* 2003)

(1) 受体-配基作用的动力学分析。对单细胞生物阿米巴变形虫来说, cAMP 是它的激动剂,它促使细胞趋向 cAMP。单分子实验结果表明,当细胞向 cAMP 做趋向活动时,细胞的前沿(趋向那一侧)与后沿的 cAMP 受体与 cAMP 的结合活性是不同的,前沿结合活性高于后沿 (Sako *et al.* 2003, Ueda *et al.* 2001)。

(2) 脂质组分在细胞质膜上的动态过程。观察到 Cy5 标记的脂质分子被约束在大约 $0.7\mu\text{m}$ 的膜范围内,这相当于膜的微域或“筏”。

(3) 细胞骨架纤维的动态过程。肌动蛋白是成纤维细胞的细胞骨架成分,用 GFP 标记单分子肌动蛋白,可以观察到单个肌动蛋白分子向细胞中心的运动以及它的脱落,由此弄清了肌动蛋白的聚合及解聚的动力学过程。

(4) 膜受体激活及受体磷酸化。表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 作用于细胞,膜上的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 被激活并磷酸化。用 Cy3 标记抗磷酸化 EGFR 的抗体,用 Cy5 标记的 EGF。结果显示,细胞内出现磷酸化 EGFR 的位点,其位置正好针对细胞外的 EGF 位置 (Sako *et al.* 2000)。

在标记条件下,显微镜下看到的单分子荧光常常是一个 $0.2\mu\text{m}$ 左右的小点。因此这类实验就被称为斑点 (speckle) 分析。可以分析斑点的位置、移动、闪光及灭光的瞬变等。

(5) 实时视见了标记的单个腺相关病毒 (AAV) 颗粒与细胞膜接触并进入细胞内的动力学过程 (Seisenberger *et al.* 2001)。这里所用的是用单个染料 Cy5 标记单个腺病毒颗粒,因此所观察的仅是单个病毒颗粒的运动。

(6) 用 AFM 分析了活细胞黏附力及顺应性 (compliance), 详见后文 (Wojcikiewicz *et al.* 2003)。

1.2.2 相应的离体研究

活细胞内单个大分子视见研究,研究的仅仅是色团 (chromophore) 或其他标记物所显示大分子的位置或轨迹。要想了解单分子活动所反映的功能,必须同时配以能够显示大分子功能的其他检测。目前,功能实验主要还是在离体 (*in vitro*) 条件下得到的,如以下几个方面。

(1) 把光镊 (optical tweezer, OT) 与 GFP 标记的肌动蛋白联用, 观察了肌球蛋白在肌动蛋白上的移动及移动时的力 (Sako *et al.* 2003)。

(2) 把膜片钳技术与荧光标记技术相结合, 研究了单个电压敏感离子通道的离子电流 (Sako *et al.* 2003)。

(3) 把 AFM、生物膜力探针 (BFP)、激光光镊 (LOT) 应用于单分子间力的测量和分析力-寿命 (life-time) 及化学关系 (Evans 2001)。例如, AFM 与单分子力谱相结合, 测量了细菌视紫红素蛋白的去折叠 (unfolding) 或拉开过程 (Oesterhelt *et al.* 2000, Zhuang *et al.* 2003)。细菌膜上的视紫红质分子是一个跨膜 7 次的 G 蛋白偶联受体, 当 C 端受外力拉引时, 分子的跨膜段会被拉长, 从而脱离细胞膜的脂质分子环境。实验证明这种分子以两个跨膜段为一个单位被拉脱。拉力大时, 可以把整个分子拉出膜外。

1.3 展望

活细胞单分子行为研究的发展前景非常诱人, 它将可能推动整个细胞及分子生物学的发展, 成为一个新的研究时代的标识。有许多工作可以做, 但工作首先要结合自己的基础并争取可能的最好条件。例如, ①硬件建设, 包括高灵敏度的 CCD 相机等; ②生物信息技术的应用 (Swedlow *et al.* 2003); ③多种技术的联用, 如 AFM、电子显微镜、结构生物学技术、膜片钳、光镊的联用, 又如纳米技术及量子点技术的联用; ④四维 (三维加时间) 成像技术的建立 (Gerlich *et al.* 2003)。

就荧光成像技术而言, 也已有许多发展。除 FRET 和 TIRFM 以外, 可以有多光子荧光成像术 (Zipfel 2003)、荧光相关光谱 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS)、光漂白后荧光恢复技术 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)、光漂白后荧光丢失技术 (fluorescence loss after photobleaching, FLIP)、荧光寿命成像显微术 (fluorescence life-time imaging microscopy, FLIM) 等 (Lippincott-Schwartz *et al.* 2003, Lippincott-Schwartz *et al.* 2003)。

为了切实推进科学的发展, 似应抓住两个重点: 一是要研究生命科学中最基本的问题, 二是要在技术上有所创新。

1.3.1 细胞生物学中的基本问题

细胞生物学中的基本问题, 例如蛋白质折叠、大分子的构象变化; 大分子间的作用力及相互辨认; 分子马达、离子通道、泵蛋白及酶的工作原理; 配基-受体相互作用、抗原-抗体相互作用; 亚单位的寡聚化、分子比; DNA 的转录等。上述每个问题都会牵涉细胞活动的最基本方面。事实上, 国际上近些年来对于酶的活性、DNA 转录装置的功能等已从单分子水平上给予了相当深入的分析。

试举受体与配基的相互作用为例, 这个反应最基本的表述方式就是 Scatchard 作图, 它来源于化学反应中的质量作用原理 (mass action principle), 与酶反应中的米氏方程有类似之处 (Gardner 2003)。表征受体与配基相互作用的基本参数是 K_d 和 R_0 。试想一下, 在单分子水平上, 我们将会看到什么现象呢? 分子与分子之间的碰撞概率 (probability), 两个单分子间的碰撞概率与两个浓度的两种分子之间的碰撞概率是什么关系?