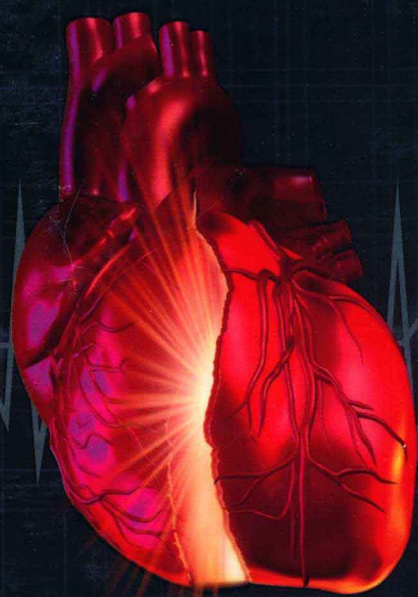




“十二五”国家重点图书出版规划项目
国家出版基金项目

心肌细胞的 分子解剖

主编 余志斌



第四军医大学出版社



“十二五”国家重点图书出版规划项目

国家出版基金项目

心肌细胞的分子解剖

主 编 余志斌

编 者 (按姓氏笔画为序)

王云英 圣娟娟 余 愿

张 琳 岳志杰 茹凝玉

徐彭涛 常 惠 崔龙彪

焦 博

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目 (CIP) 数据

心肌细胞的分子解剖/余志斌主编. —西安: 第四军医大学出版社, 2013. 6

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0336 - 6

I. ①心… II. ①余… III. ①心肌 - 细胞 - 研究 IV. ①R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 100603 号

xinjixibao de fenzijiepou

心肌细胞的分子解剖

出版人: 富 明 责任编辑: 富 明 土丽艳 执行编辑: 王 雯 责任校对: 黄 璐

出版发行: 第四军医大学出版社

地址: 西安市长乐西路 17 号 邮编: 710032

电话: 029 - 84776765 传真: 029 - 84776764

网址: <http://press.fmmu.sn.cn>

制版: 绝色设计

印刷: 中煤地西安地图制印有限公司

版次: 2013 年 6 月第 1 版 2013 年 6 月第 1 次印刷

开本: 889 × 1194 1/16 印张: 34.5 字数: 1020 千字

书号: ISBN 978 - 7 - 5662 - 0336 - 6 / R · 1200

定价: 186.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

前 言

在人的一生中,由平均大约 50 亿个心肌细胞构成的心脏一直在默默地、一刻也不停歇地收缩,其搏动总数可达 30 亿次。不知疲倦地搏动着的心脏,每天驱动 7000 升血液沿 3 万余千米的血管循环,相当于背负 7 吨的重物沿着地球赤道绕行近一周。随着生活水平的提高和生活方式的转变,很不幸,高血脂、高血糖、肥胖与高血压等危险因素使心脏这个任劳任怨的群体长期遭受“过度劳累”的困扰。我国心血管疾病发病率将以超过 50% 的幅度上升,而心血管疾病引发的死亡率,一直位列各类疾病榜首。因此,防治心血管疾病是全世界医疗卫生领域的头等大事,云集着大批精英为之奋斗。

随着人类基因组计划的完成,已确立大约 2.4 万个基因,可能调控大约 10 万种蛋白的表达。因此,为深入阐明心肌细胞生理学功能及其肥大与衰竭的机制,应该首先探明心肌细胞中的重要分子——蛋白质的构成、定位与功能。因此,依据国内外最新研究成果,并结合我们的实验观测,编著了这册单个心肌细胞内蛋白分子定位“图谱”,并命名为《心肌细胞的分子解剖》。其实,分子解剖(molecular anatomy)的原意为观测胚胎发育过程中,器官、组织或细胞内的分子变化。我们借用该概念的内核,将心肌细胞分子解剖定义为:观测心肌细胞外基质与细胞内细胞器的分布、定位与结构特征,蛋白分子的分布与定位,蛋白-蛋白相对位置关系,以及蛋白运输通路或发挥生理与病理作用时的运行轨迹。

基于对心肌细胞分子解剖的定义,本书采取图文并茂——文为线、图为珠,以图为主的方式,分十章进行描述。首先简介开展细胞分子解剖的方法,进而由表及里,对心肌细胞外基质、细胞膜、肌质网、肌节肌原纤维、线粒体、细胞核、细胞骨架与信号转导通路等进行详细描述。不仅对正常新生与成年心肌细胞进行解剖,而且描述了在心肌肥大与心力衰竭条件下,心肌细胞蛋白分布与定位的改变。每章先进行概述,再采用表格进行分类与归纳,然后依据图片进行描述。对重要蛋白分子不仅介绍其分子结构,而且用模式图描述蛋白分子间的相对位置。本书试图使读者在掌握概况的基础上,了解每一蛋白分子定位与功能的详细内容,将读者引导至前沿。每章后附有最新的参考文献,有助于读者深入阅读与研究。

本书虽力求系统,但难免挂一漏万,希望读者能从中获得启发,不断去探索补充。另外,对书中的不足之处,敬请谅解,亦请不吝赐教。

余志斌
2012 年 6 月

目 录

第一章 心肌细胞分子解剖的方法	(001)
第一节 显微镜	(001)
第二节 荧光探针	(007)
第三节 荧光探针标记技术	(009)
第四节 荧光探针检测技术	(010)
参考文献	(014)
第二章 心肌组织	(016)
第一节 心肌细胞外基质	(016)
第二节 非心肌细胞	(033)
第三节 心肌细胞	(038)
参考文献	(054)
第三章 心肌细胞膜	(058)
第一节 T管系统	(058)
第二节 小窝与小窝蛋白	(066)
第三节 受体	(074)
第四节 离子通道	(095)
第五节 离子泵、交换体与转运体	(126)
参考文献	(149)
第四章 肌质网	(156)
第一节 肌质网的结构	(156)
第二节 肌质网膜蛋白	(163)
第三节 肌质网管腔内蛋白	(180)
参考文献	(185)
第五章 肌节	(188)
第一节 粗丝	(190)
第二节 细丝	(196)
第三节 M带	(203)
第四节 Z盘	(210)
参考文献	(231)
第六章 线粒体	(236)
第一节 线粒体的结构特征	(236)
第二节 线粒体外膜蛋白	(241)
第三节 线粒体膜间隙蛋白	(245)

第四节 线粒体内膜蛋白	(248)
第五节 基质蛋白	(264)
第六节 心肌细胞中 ROS	(267)
参考文献	(270)
第七章 心肌细胞核	(273)
第一节 核膜与核膜蛋白	(275)
第二节 核质亚结构	(285)
第三节 核质网与核膜受体	(298)
第四节 核受体	(305)
第五节 鉴别心肌细胞核	(307)
参考文献	(311)
第八章 蛋白质合成与降解系统	(315)
第一节 内质网	(315)
第二节 高尔基体	(320)
第三节 囊泡转运系统	(323)
第四节 蛋白质降解系统	(337)
参考文献	(356)
第九章 心肌细胞骨架	(360)
第一节 肌动蛋白丝	(360)
第二节 中间丝	(369)
第三节 微管	(406)
参考文献	(415)
第十章 心肌细胞信号转导通路	(420)
第一节 配体与受体	(420)
第二节 信号转导通路	(429)
第三节 兴奋-收缩耦联与 Ca^{2+} 信号转导通路	(439)
第四节 心保护与代谢信号转导通路	(447)
第五节 促肥大信号转导通路	(467)
第六节 凋亡与自噬信号转导通路	(488)
第七节 炎症因子信号转导通路	(495)
第八节 应激与老化信号转导通路	(502)
参考文献	(503)
索 引	(512)
后 记	(542)

心肌细胞分子解剖的方法

METHODS OF MOLECULAR ANATOMY IN CARDIOMYOCYTE

经典的人体解剖学(human anatomy)是研究人体正常形态结构的科学。解剖指用手术器械剖割尸体以了解人体内部各器官的形态、位置、构造及其相互关系,以人肉眼观察为主。如果将解剖学范围扩大到组织学,则主要用普通光学显微镜进行观察。分子解剖(molecular anatomy)的原意为观测胚胎发育过程中器官、组织或细胞内的分子变化。我们借用原分子解剖概念的内核,将心肌细胞分子解剖定义为:观测心肌细胞外基质与细胞内细胞器的分布、定位与结构特征,生物大分子(主要涉及蛋白分子)的分布与定位,蛋白-蛋白相对位置关系与相互作用,以及蛋白运输通路、装配过程及其发挥生理与病理作用时的运行轨迹等。那么,如何在细胞水平进行这样的分子解剖呢?这是一个已经开展多年研究,但尚未进行系统归纳的领域。其实,依据我们对细胞分子解剖的定义,细胞水平的分子解剖则主要依赖于先用探针标记靶蛋白,然后采用高分辨率显微镜进行观测。

迄今为止,采用透射与扫描电子显微镜,对心肌细胞内细胞器的定位与结构特征已基本阐明,本书以此作为划分章节的重要依据。观测心肌细胞内蛋白分子的分布与定位,可采用免疫胶体金(immune colloidal gold)技术标记靶蛋白,然后用透射电镜确定靶蛋白在细胞内的定位。采用更多的是用免疫荧光探针标记靶蛋白,在激光扫描共聚焦显微镜下进行观测。由于激光扫描共聚焦显微镜空间分辨率的限制,为观测心肌细胞内蛋白-蛋白相对位置关系与相互作用,一般采取荧光共振能量转移技术。这是因为只有两个分子间距离在 2~6 nm 时,才能发生荧光共振能量转移^[1]。观测心肌细胞内蛋白运输通路、装配过程及其发挥生理与病理作用时的运行轨迹,必须在活细胞上进行,这需要特殊的荧光探针与更加先进的荧光显微镜。

第一节 显微镜

一、光学显微镜

1. 普通光学显微镜及其分辨率

人的肉眼最小能看到 0.2 mm 的物体,小于 0.2 mm 的微观世界,必须借助于显微镜进行观察。荷兰博物学家与显微镜创制者 Antonie van Leeuwenhoek (1632—1723)在 17 世纪第一次将光线通过透镜聚焦制成光学显微镜,并用它观察微生物(microorganisms 或 animalcule),打开了人类进入微观世界的大门。继 Leeuwenhoek 的这项伟大发明之后,后继者对显微镜技术不断改进和发展,光学显微镜已形成系列。按物镜接近标本的方向,分为正置与倒置显微镜。按光源分为明场、暗视野、偏振光与荧光显微镜。明场显微镜根据观察方式不同,又可分为实体、位相与微分干涉差显微镜(DIC)。这些光学显微镜的应用较为普及,均有专著详细介绍其原理与组成。其中,由于荧光显微镜的巨大潜力,使其得以迅速发展。

光学显微镜的关键是其分辨率,光的波动性限制了光学显微镜的分辨率。光学显微镜空间分辨率极限大约是光波的半个波长,约为 200 nm(可见光光波范围为 400~750 nm)(图 1-1)。即使是很小的

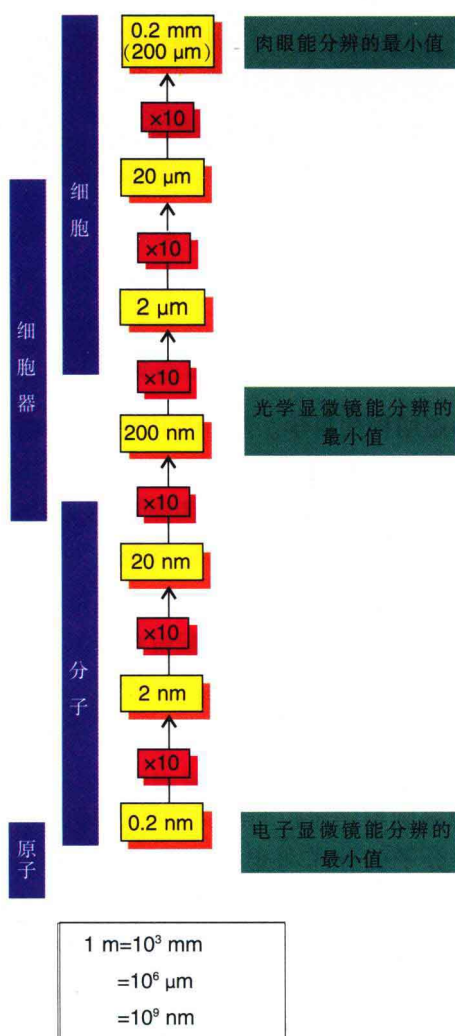


图 1-1 显微镜的分辨率

或组织内部细微结构的荧光图像,在亚细胞水平上观测诸如 Ca^{2+} 、pH 值、膜电位等生理信号及细胞形态的变化,成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具。传统的光学显微镜使用场光源,标本上每一点的图像都会受到邻近点的衍射或散射光的干扰。激光扫描共聚焦显微镜利用激光束经照明针孔形成点光源对标本内焦平面的每一点进行扫描,标本上被照射点,在探测针孔处成像,由探测针孔后的光电倍增管(PMT)或冷电耦器件(cCCD)逐点或逐线接收,迅速在计算机屏幕上形成荧光图像。照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的,焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和发射针孔,焦平面以外的点不会在探测针孔处成像,这样得到的共聚焦图像是标本的光学横断面,克服了普通显微镜图像模糊的缺点。与传统光学显微镜相比,它具有更高的分辨率(图 1-2)、实现多重荧光同时观察并可形成清晰的三维图像等优点(图

物体(如 1 nm 直径),在显微镜下它的图像也将显著扩散。Abbe 首先提出这种现象是光的衍射特性造成的,取决于光的波长和显微镜物镜的有限尺寸。一个无限小的物点在像平面处的光强分布函数称为点扩散函数(point spread function, PSF)。PSF 通常在 X-Y 平面上呈径向对称分布,但沿 Z 光轴方向具有明显的延伸。根据瑞利(Rayleigh)准则,两点之间可分辨的最小距离相当于 PSF 的宽度。所以,分辨率其实就是两点之间可分辨的最小距离。

根据瑞利准则,传统光学显微镜的分辨率极限遵循以下公式:

$$\text{侧向分辨率: } d_{x,y} = 0.61\lambda / \text{NA}$$

$$\text{轴向分辨率: } d_z = 2\lambda / \text{NA}^2$$

λ 表示光的波长,NA 是物镜的数值孔径, $\text{NA} = n \times \sin(u/2)$ 。n 是透镜和样品之间的介质折射率,u 是孔径角。这种限制就是光衍射极限,是改进分辨率的起点;PSF 越窄,获得的分辨率越高。从上式还可见,侧向分辨率大于轴向,因物镜最大 NA 可达 1.66,故侧向:轴向最小约等于 1:2。也就是说,如果最大侧向分辨率为 200 nm,其最大轴向分辨率则大约为 400 nm。

2. 激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)

激光扫描共聚焦显微镜是 20 世纪 80 年代发展起来的一项具有划时代意义的高科技新产品,是当今世界最先进的细胞生物学分析仪器。它是在荧光显微成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,使用紫外或可见光激发荧光探针,从而得到细胞

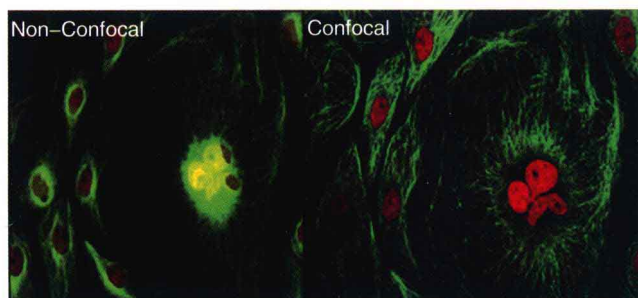


图 1-2 荧光显微镜(non-confocal)与激光扫描共聚焦显微镜(confocal)的图像差别

左图为普通荧光显微镜拍摄的照片;右图为相同细胞,采用激光扫描共聚焦显微镜拍摄的照片。

1-3)。另外,在显微镜的载物台上加一个微量步进马达,可使载物台上下步进移动,最小步进距离为10 nm,则细胞或组织各个横断面的图像都能清楚地显示,实现了“光学切片”(optical sectioning)的目的,这一功能被形象地称为“细胞CT”。

目前,研究多组分聚合物共混体系形态结构最常用的方法是电子显微技术,如扫描电镜法、透射电镜法、X射线光电子能谱法(XPS)、原子力显微镜法(AFM)、直接无辐射能量转移法(DET)等。这些方法中,有的可以在分子水平上获得共混体系中各组分相互作用或形态结构的信息,但也各自存在一些局限性,如有的方法对样品的要求较为苛刻,制样比较复杂。而更主要的是它们或为表面分析方法,只能给出表面结构的信息;或者只能获得宏观平均结构图像,如果要了解材料的层次形态结构及其分布,就要破坏样品,XPS虽可以给出表面以下的组成分布,但只能提供约10 nm厚度以内的信息。

激光共聚焦荧光显微技术是一种无损的多层形态观测的新方法,它提供了有效的途径弥补上述各种手段的不足。其检测深度可达100 μm ,制样简单、快速,图像直观。由于它是光学观察方法,因此其分辨率较电镜为低,约0.2 μm 。另外,为了得到一定的反差,进行观察前,需对多组分聚合物体系中的某一(或某些)组分进行荧光标记。可得到比普通荧光显微镜更高分辨率、更高灵敏度的图像,并有效地保护标本。不仅在X-Y平面,同时在Z轴方向,可获得样品不同深度层面的信息,即光学切片或断层扫描,而无需破坏样品。另外,获得的图像信息通过相关软件的帮助,可对标本各深度层面的信息进行三维重建,从而得到表面及内部结构都非常清晰的三维图像。因此,在生物学、医学、高分子材料科学、生物化学、胶体化学(如研究胶体分散相中乳胶颗粒的分布、排列、热运动及器壁效应)等众多研究领域,激光共聚焦技术都有着广泛的应用。

3. 双光子激光扫描显微镜(two-photon excitation microscope, TPE microscope)

现在普遍采用的为单光子激发显微镜,由于单光子激发产生的发射荧光与激发光呈线性关系,即在照射路径上均可产生发射荧光,为了增加图像的清晰度,对激发光与发射光均需聚焦,并使两个焦点共轭,从而设计出激光扫描共聚焦显微镜。在激光照射下,基态荧光分子或原子吸收一个光子后成为激发态,随后又弛豫到某一基态,同时以光子形式释放能量而发出荧光,这一过程就是通常的单光子激发情况。1931年Maria Göppert-Mayer预言,一个分子或原子可以在同一个量子过程中,同时吸收两个光子而成激发态,这种情况就是双光子激发过程。如在单光子激发情形,NADH酶在350 nm光激发下产生450 nm的荧光,而在双光子激发下,NADH酶则需同时吸收两个700 nm的光子才能产生450 nm的荧光。由于双光子激发所产生的荧光强度与激发光的光强平方成正比,因而与单光子激发的线性过程相比,双光子激发就需要很强的激发光强,这就使双光子激发具有很高的空间局域特点(图1-4)。也就是说,在激发光焦点外的分子不会被激发出荧光,因此就免除了发射荧光经针孔聚焦的环节。

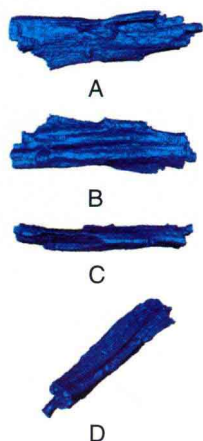


图 1-3 激光扫描共聚焦显微镜三维重建的心肌细胞

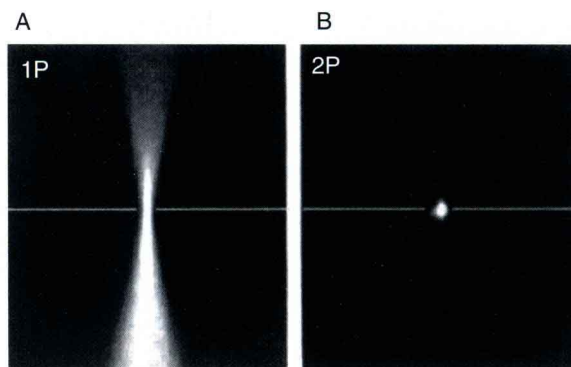


图 1-4 单与双光子激发的不同特征

A:488 nm 激光产生的单光子(1P)激发在 X-Z 平面的荧光分布。B:850 nm 双光子(2P)激发在 X-Z 平面的荧光分布。在单光子和双光子激发中光源通过相同的物镜照在样本上,白线指示焦平面^[2]。

基于双光子激光扫描显微镜这些优越的特性,该显微镜可观测较厚标本(200~500 μm),特别有利于进行活体直接观测^[2]。另一方面,其对细胞的光中毒作用弱,故有利于进行长时间观测。

无论是激光扫描共聚焦显微镜,还是双光子激光扫描显微镜,这些都是光学显微镜。由于光学显微镜的最大分辨率为 200 nm,而采取双标记两种不同蛋白来观测它们之间是否共定位或发生相互作用,其分辨率则不能满足要求。在 X、Y 轴方向上,虽然红、绿两种荧光照片叠放在一起呈黄色,但可能两分子间的距离在 200 nm,显然是光学分辨率的限制形成的共定位伪像;在 Z 轴方向上,只要两个标记蛋白位于一条直线上,亦可能产生共定位伪像。另一方面,虽然显微镜控制载物台升降的微动步进马达的最小步距已达到 10 nm,然而,当两种标记蛋白在垂直方向上位于一条直线上,分子间的距离为 400 nm 左右时,亦有形成共定位伪像的可能性。为克服这一限制因素,则需采用荧光共振能量转移技术,或者使用超高分辨率荧光显微镜。

4. 超高分辨率荧光显微镜(super resolution microscope, SRM)

近 20 年显微技术的发展,已经大大提高了显微镜的分辨率。当前出现了多种显微技术,使光学显微镜的空间分辨率,超越了理论的光学分辨率极限。这些技术统称为超高分辨率显微技术。这些超高分辨率显微镜有的是通过改进图像处理技术与荧光标记技术而提高分辨率,有的则是突破传统的点扩散函数理论而提高分辨率。表 1-1 列出了目前已知的超高分辨率显微镜,有的已经上市(如 TIRF、STED 与 STORM),但价格昂贵;有的还处在实验室研究阶段,稳定性尚待提高。

表 1-1 超高分辨率显微镜

发明者	年代	显微镜名称	分辨率(nm)	图像	文献
		TIRF, total internal reflection fluorescence imaging,全内反射荧光成像系统	轴向 100	研究细胞膜上的蛋白质簇	[3]
Stefan W. Hell	1992	Spot-scanning 4Pi	40~50	图 1-5	[4]
Stefan W. Hell	2000	STED, stimulated emission depletion, 受激发射损耗显微镜	40~50 侧向 28	图 1-6	[5]
Mats Gustafsson group	2005	SIM (SSIM), (saturated) structured-illumination microscope, 饱和结构光学显微镜	侧向 50	图 1-7	[6]
Eric Betzig, Harald Hess and Jennifer Lippincott-Schwartz group	2006	PALM, photoactivated localization microscope, 光敏定位显微镜		图 1-8 可以分辨细胞黏着斑和特定细胞器内的蛋白质	[7]
Samuel Hess group	2006	FPALM, fluorescence photoactivation localization microscope, 荧光光敏定位显微镜		图 1-9 可以分辨细胞膜脂筏上的蛋白质簇	[8]
Xiaowei Zhuang group	2006	STORM, stochastic optical reconstruction microscope, 随机光学重建显微镜	20	图 1-10 可以分辨 DNA 分子和 DNA-蛋白质复合体分子	[9]

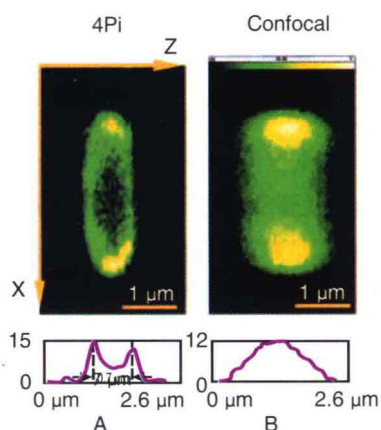


图 1-5 4Pi 显微镜与 Confocal 照片的比较

A: 用 4Pi-Confocal 拍摄的活大肠杆菌图像。B: 用 Confocal 拍摄的活大肠杆菌图像。4Pi-Confocal 拍摄的图片可从轴向分辨荧光标记的膜结构, 而普通 Confocal 则无法分辨。轴向膜间距为 $0.74 \mu\text{m}$ 。图中 X-Z 图像面积为 $4.4 \mu\text{m} \times 2.6 \mu\text{m}^{[4]}$ 。

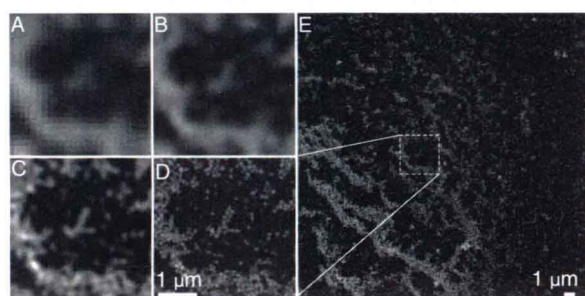


图 1-7 SIM 显微镜与 Confocal 照片的比较

50 nm 荧光颗粒。A: 常规显微镜下的图像。B: 加滤波的常规显微镜下的图像。C: 线性光照下的图像。D: E 图方框放大图, 光波脉冲能量密度 $5.3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 的饱和光照下的图像^[6]。

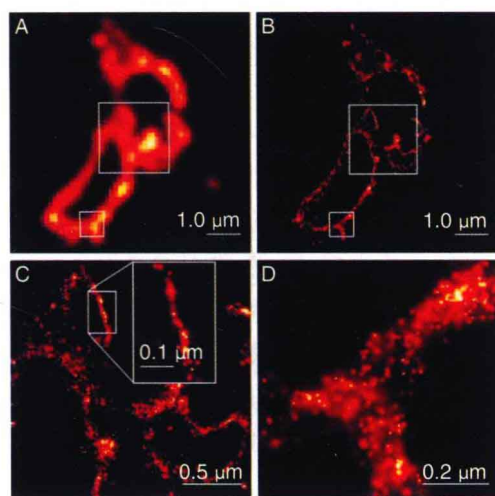


图 1-8 PALM 显微镜与 Confocal 照片的比较

TIRF (A) 和 PALM (B) 图像显示 COS-7 细胞冰冻切片的同一区域, 细胞表达带有 PA-FP Kaede 标签的溶酶体跨膜蛋白 CD63。B 图中较大的方框区域放大为 C 图, C 图显示溶酶体或晚期内体相互作用的较小结合膜, 而 TIRF 图像则不能显示这种关系; C 图中的插图显示许多分子高度集中于约 10 nm 宽的区域。B 图中较小的方框区域为斜切区, 放大图为 D, 可见 CD63 分布于膜平面^[7]。

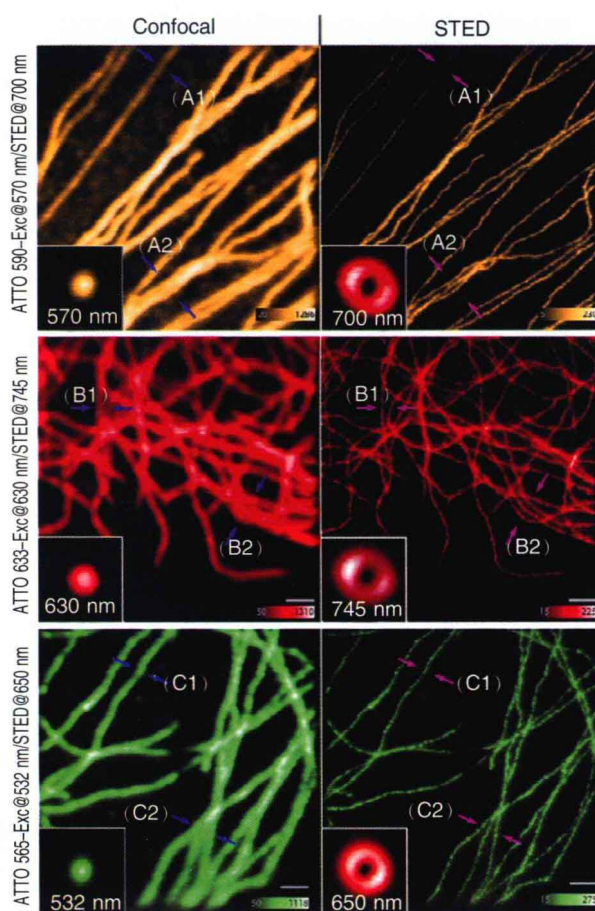


图 1-6 STED 显微镜与 Confocal 照片的比较

小方框中分别为激发光波长。紫色箭头指示在 Confocal 显微镜下不可区分的部位。标尺: $1 \mu\text{m}^{[16]}$ 。

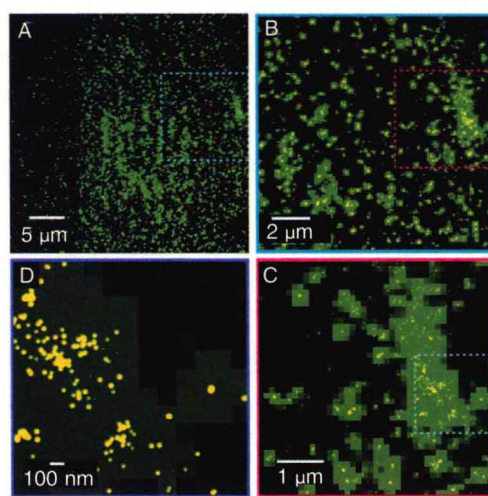


图 1-9 FPALM 显微镜与 Confocal 照片的比较

在玻璃盖玻片上拍摄的激光激活绿色荧光蛋白的 FPALM 图像。从 A 至 D 为逐步放大的图片, 即 B 为 A 图中蓝色方框的放大图, C 为 B 图中红色方框的放大图, D 为 C 图中蓝色方框的放大图。A 图测量 48 746 个分子的定位, 并标记为黄色; A 图为空旷照片, 即 Confocal 照片。从 B 到 D 图, 经 Gaussian 拟合方程计算, 获得加权的分子中心的峰值荧光值, 图 D 表明, 经处理后 FPALM 图像分辨率明显增高^[8]。

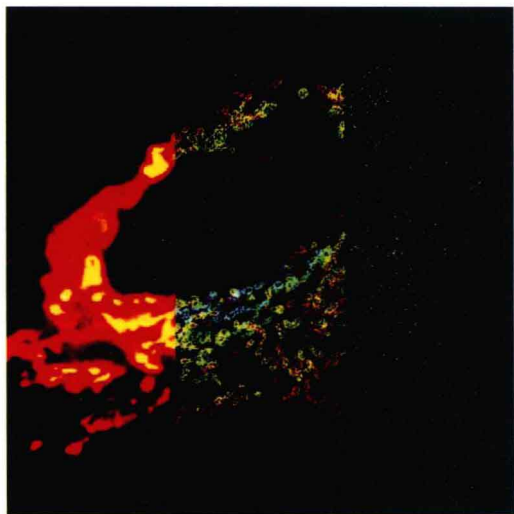


图 1-10 STORM 显微镜与 Confocal 照片的比较

用 3D STORM 拍摄的哺乳动物线粒体网。左为普通荧光照片,中为 3D STORM 图像并包括 Z 轴方向颜色,右为 X-Y 横切面 3D STORM 图像^[17]。

二、电子显微镜

1. 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)

透射电子显微镜通常称作电子显微镜或电镜 (EM),是使用最为广泛的一类电镜。透射电镜是一种高分辨率、高放大倍数的显微镜,是细胞研究的重要手段,能提供极细微的细胞结构信息。透射电镜的分辨率为 0.1~0.2 nm,放大倍数为几万至几十万倍。由于电子易散射或被物体吸收,故穿透力低,必须制备更薄的超薄切片(通常为 50~100 nm)。

电子显微镜是根据电子光学原理,用电子束和电子透镜代替光束和光学透镜,使物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器。电子显微镜的分辨能力以它所能分辨的相邻两点的最小间距来表示。20 世纪 70 年代,透射式电子显微镜

的分辨率约为 0.3 nm。现在电子显微镜最大放大倍率超过 300 万倍,而光学显微镜的最大放大倍率约为 2000 倍。

2. 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)

扫描电镜的制造是依据电子与物质的相互作用。当一束高能的人射电子轰击物质表面时,被激发的区域将产生二次电子、俄歇电子、特征 X 射线和连续谱 X 射线、背散射电子、透射电子,以及在可见、紫外、红外光区域产生的电磁辐射。同时,也可产生电子-空穴对、晶格振动(声子)、电子振荡(等离子体)。原则上讲,利用电子和物质的相互作用,可以获取被测样品本身的各种物理、化学性质的信息,如形貌、组成、晶体结构、电子结构和内部电场或磁场等等。扫描电子显微镜正是根据上述不同信息产生的机制,采用不同的信息检测器,使选择检测得以实现。如对二次电子、背散射电子的采集,可得到有关物质微观形貌的信息;对 X 射线的采集,可得到物质化学成分的信息。正因如此,根据不同需求,可制造出功能配置不同的扫描电子显微镜。

三、扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM)

这是 20 世纪 80 年代初期出现的一种新型表面分析工具,其基本原理是基于量子力学的隧道效应和三维扫描。它是用一个极细的尖针(针尖头部为单个原子)去接近样品表面,当针尖和样品表面靠得很近,即小于 1 nm 时,针尖头部的原子和样品表面原子的电子云发生重叠。此时若在针尖和样品之间加上一个偏压,电子便会穿过针尖和样品之间的势垒而形成纳安级(10^{-9} A)的隧道电流。通过控制针尖与样品表面间距的恒定,并使针尖沿表面进行精确的三维移动,就可将样品表面形貌和表面电子态等有关样品表面信息记录下来。

扫描隧道显微镜具有很高的空间分辨率,横向可达 0.1 nm,纵向可优于 0.01 nm。它主要用来描绘样品表面三维的原子结构图,在纳米尺度上研究物质的特性,利用扫描隧道显微镜还可以实现对样品表面的纳米加工,如直接操纵原子或分子,完成对样品表面的剥蚀、修饰以及直接书写等。目前扫描隧道显微镜取得了一系列新进展,出现了原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)、弹道电子发射显微镜(ballistic electron emission microscope, BEEM)、光子扫描隧道显微镜(photon scanning tunneling microscope, PSTM),以及扫描近场光学显微镜(near-field scanning optical microscope, NSOM)等。

第二节 荧光探针

通常将经一定波长光线照射后能发出荧光的生物(有机)染色剂称为荧光染料(fluorescent dye)、荧光素(fluorescein)或荧光探针(fluorescent probe)。按化学反应性可将荧光染料分为三类。①碱性荧光染料:含碱性助色团,在酸性溶液中电离,荧光色离子为阳离子。如溴化乙啶直接嵌入DNA,在紫外线照射下发出红色荧光。②酸性荧光染料:含酸性助色团,在碱性溶液中电离,荧光色离子为阴离子。③中性荧光染料:由碱性与酸性荧光染料混合而成的一种复合染料。

一、小分子有机荧光探针

小分子有机荧光探针是指分子量小于1 kDa的小分子物质,分子量小,仅由大约20个原子组成,可通过与生物大分子共价连接的方式对其进行标记。现在对这种荧光探针的最佳检测波长范围、亮度、光稳定性和淬灭特性都有了比较详尽的了解。已经有数百种这类有机荧光探针的商业化产品可供选择,而且还在不断增加之中。由于这类荧光探针对蛋白质缺乏特异性,因此多需与抗体联用。除细胞内离子有特异性示踪荧光探针外,每类细胞器也均有相应的荧光探针^[10],并有专著详细介绍各类荧光探针的性质、特点与应用^[20]。

二、荧光蛋白

第一批用于细胞生物学的荧光蛋白包括藻胆蛋白(phycobiliproteins)和从蓝藻(cyanobacteria)中提取的触角光合色素(photosynthetic antenna pigments)。这些生物大分子都含有多种胆汁三烯生色基团(bilin chromophores)。这些生色基团都包裹在一种基质结构中,这样就能将它们的淬灭作用降至最小,因此这些藻胆蛋白的荧光亮度要比小分子荧光探针的亮度高出两个数量级。不过这些藻胆蛋白的分子量高达200 kDa,限制了它们在细胞内的扩散,因此,它们也只能与抗体联用,在流式细胞或ELISA实验中用来检测细胞表面的蛋白质分子。

自从维多利亚发光水母中发现了绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP, 分子量大约为26 kDa)之后,生物成像领域就发生了革命性的改变^[11]。单独表达绿色荧光蛋白或与其他蛋白融合表达就可以在细胞内发出绿色荧光,使用这种方法除需要氧气之外,不再需要任何其他辅助因子。因为生色基团是深埋在直径为2.4~4 nm的 β 桶状结构(beta barrel)核心中的三个氨基酸(丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸),通过自发环化与氧化作用而发出荧光。绿色荧光蛋白只是荧光蛋白大家族中的一员,这些荧光蛋白大部分都来自海洋腔肠动物,由于各自生色基团含有不同的共价结构,以及不同的非共价环境,所以发出不同颜色的荧光。在实验室中对这些荧光蛋白进行遗传修饰之后可以进一步丰富它们的特性,比如增加亮度和折叠效率、减少寡聚体形成等。突变既可以增加荧光蛋白的光稳定性,还可以赋予荧光蛋白光操控性,比如控制荧光发射与否,或者发出特定颜色的荧光。这种光操控性既可以是可逆的也可以是不可逆的,可以用于监测蛋白的弥散过程、运输过程和老化过程等。虽然荧光蛋白在生色基团形成的过程中会生成 H_2O_2 ,但似乎没有产生太多的活性氧簇(ROS)。不过也可以对荧光蛋白进行改造使其能够形成ROS。荧光蛋白发出的荧光一般对它们所处的生化环境都不太敏感,但是酸性环境或变性剂的存在可以淬灭荧光。目前,经过遗传修饰后的荧光蛋白,能耐受酸性环境或者能对金属离子、卤化物离子和巯基二硫化物氧化还原剂起反应^[11]。

这些有机荧光探针和荧光蛋白,仍存在着一些局限性。一是荧光消失的速度快,限制了观测时间,不利于长期的动态观测。另外,每种荧光探针须以不同波长的光激发,所以目前能使用的颜色最多为3种^[10]。而新近发展的量子点标记技术,则能较好地克服这些不足。

三、量子点标记技术

半导体材料中,微小晶体通常被称作量子点(quantum dot)。量子点是人工激光切割出来的半导体纳米晶体,为 2~10 nm,这与蛋白质分子大小相当。这种量子点可以把电子锁定在一个非常微小的三维空间内,当有一束光照射上去的时候,电子会受到激发跳跃到更高的能级。当这些电子回到原来较低能级的时候,会发射出波长一定的光束。量子点具有独特的光谱特性:①只需单一激光激发,荧光亮度强,且其半衰期为 960 秒,近似有机荧光探针的 100 倍。另外,量子点在照射次数达 100 次时其荧光效率还可达 70%,不似一般有机染料很快就会被分解。②较高的光化学稳定性可以保证其在体内存留数天乃至数月。③在同一激光激发下,通过调整纳米颗粒的大小,可以发出不同颜色的光(图 1-11)。研究人员已经制造出可以产生超过 12 种颜色荧光的量子点,而且理论上讲可以产生出更多的颜色。因此,量子点在示踪多种蛋白质或细胞时,只需要一台荧光显微镜,即可记录被色彩编码的目标每一分钟间隔的动态并延续数天之久。同一个蛋白质分子更可结合多个异色量子点形成独特的彩虹标记。利用量子点与生物探针结合,还可区分出不同的生物分子,达到传统有机荧光探针的动态示踪与细胞显像之效果,如已有研究利用量子点将不同的细胞结构标记成 5 种不同的颜色(图 1-12)。实时而长期的生物分子示踪在医学上有极大的应用空间,例如,可以观测线虫从胚胎到成熟阶段每一个细胞的流向;可示踪纤维囊化症与阿尔茨海默病是何种蛋白质运送至错误的位置引起细胞网络的破坏等。

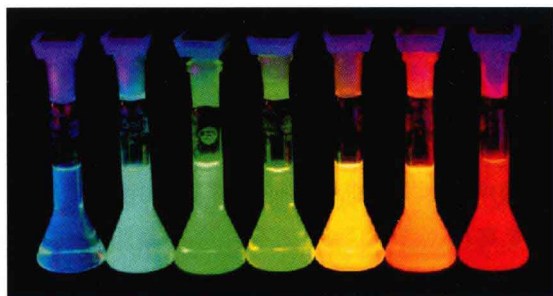


图 1-11 不同大小的 CdSe 量子点在紫外光照射下发出不同颜色的荧光

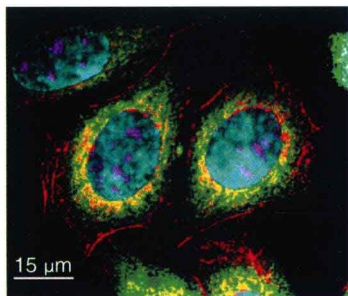


图 1-12 五色量子点标记的照片

用 QD 共轭体同时显示 5 种颜色的人内皮细胞。这些颜色显示了细胞蛋白定位和亚结构:核(蓝绿色),细胞增殖蛋白 Ki-67(紫红色),线粒体(橘黄色),微管(绿色),肌动蛋白丝(红色)^[10]。

近年来,科学家一直在进行量子点技术的生物影像学研究。他们发现基于量子点的影像学技术联合灵敏性更高的荧光显微镜检查(如多光子显微镜),可实现对人类等大型动物的深层组织扫描。但量子点技术也受到两方面问题的困扰,其一,由于量子点在活体中易于聚集,并且可以非特异性地结合于不同的分子和组织中,因而生物兼容性较差;其二,量子点通常是由诸如硒化镉或硒化铅制成,这些有毒物质存在安全性问题。

Dubertert 及其同事发现了一种简单但有效的方法——将磷酸微胶粒包被在量子点表面。具有液体表面覆盖层的纳米颗粒不仅对细胞没有毒性作用,而且可维持数天不损失荧光^[12]。随后,其他几个研究小组也报道了类似的研究结果,均证实对量子点外表面进行适当的修饰可以改善其生物兼容性。

围绕量子点的安全性问题的最新进展为:将量子点标记的肿瘤细胞注射入大鼠体内,经过数周的仔细检查,在量子点标记的肿瘤细胞以及动物体内并未出现异常迹象。由此说明,量子点是安全的技术,至少在大鼠中如此。该研究还显示,使用多光子荧光显微镜,量子点可同时监测超过 36 种细胞,并且可应用于深层组织中。

尽管已取得一定的进展,但是将量子点影像技术用于人类的临床试验研究还需要几年的时间。因为人们对量子点的安全性仍然存有疑虑。还有一些关键问题亟待解决。例如,在动物活体较厚的组织,如骨组织中,量子点技术能否发挥作用?如何开发有效的产生量子点聚合物微珠的化学制剂?经量子

点标记的生物分子与人体自身的生物分子(以及细胞和组织)如何区别等等。尽管困难重重,但这无疑是一项非常有前景的荧光标记技术,必将在细胞的分子解剖中发挥巨大的作用。

第三节 荧光探针标记技术

一、免疫标记技术

1. 免疫荧光标记(immunofluorescence labeling)技术

免疫荧光标记技术即先用特异性抗体(一抗)识别靶蛋白,再用标记有小分子有机染料、藻胆蛋白或量子点的二抗显色。也可以直接将荧光标记在一抗上,或将生物素(avidin)与一抗连接,然后再用生物素的链亲和素(streptavidin)检测。当把抗体直接注入细胞时或者为了对多个蛋白进行检测而使用了多种颜色的荧光时,采用这种直接将标记物连接在一抗上的方法非常有效。当缺乏特异性一抗检测靶蛋白时,可在靶蛋白上融合表达标签(tag)蛋白,然后用抗体识别这一标签蛋白。使用免疫荧光标记法的缺点为:该方法只能用于检测胞外蛋白和可被细胞内吞的蛋白,检测细胞内蛋白必须先固定并通透处理细胞。这些抗体标记物的多价性(multivalency)还可能会导致靶蛋白形成寡聚体。在标准的免疫标记法中,荧光标记的复合体的分子量一般会超过 200 kDa,这有可能会影响到蛋白间的相互识别过程。

2. 胶体金标记(colloidal gold labeling)技术

胶体金标记技术是 Faulk 和 Taylor(1971)提出的,并首先用于免疫电镜。当用金标记的抗体与抗原反应时,在光镜水平胶金液呈现鲜艳的樱红色,不需外加染色。在电镜水平,金颗粒具有很高的电子密度,清晰可辨。因此,免疫胶体金标记电镜技术近年来被成功地应用于生物学的各个方面,并取得了可喜的进展。胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂如白磷、抗坏血酸等作用下,聚合成为特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态,称为胶体金。

免疫胶体金标记电镜技术广泛应用于细胞及组织内蛋白的定位研究,是利用胶体金在碱性环境中带负电的性质,使其与抗体相吸引,从而将抗体标记。电镜水平的免疫金染色是目前较理想的免疫定位方法,具有特异性强、灵敏度高、定位准确和双重标记功能等优点。例如用连有 5 nm 金颗粒的钠通道(Nav1.5)单克隆抗体,以及连有 10 nm 金颗粒的锚蛋白-G(ankyrin-G)抗体作为一抗进行免疫金标,证明在心肌细胞膜上钠通道与 ankyrin-G 具有共定位关系,两分子间的距离小于 10 nm (图 1-13)^[13]。本方法的缺点在于:因使用电镜,标本制备过程复杂,技术上具有一定难度,且必须在固定组织或细胞上进行观测。

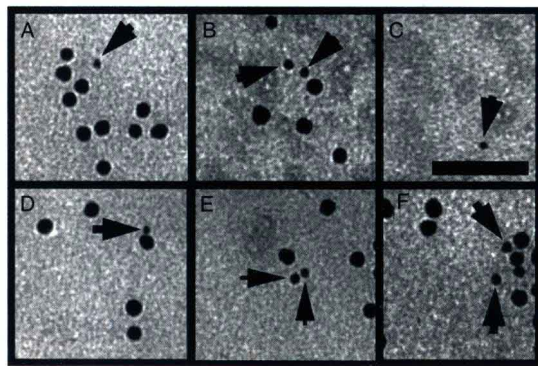


图 1-13 金颗粒双标技术

成年大鼠心肌细胞膜结构的免疫金电镜照片。Ankyrin-G 的免疫球蛋白抗体颗粒是 10 nm 金颗粒,Nav1.5 抗体颗粒是 5 nm 金颗粒(箭头所指),Nav1.5 与 ankyrin-G 呈簇状聚集于心肌细胞膜表面。大部分 Nav1.5 阳性金颗粒聚集在靠近(< 10 nm) ankyrin-G 阳性金颗粒的位置(A, B 和 D~F)。但是也发现少量的 Nav1.5 阳性金颗粒完全与 ankyrin-G 分离(C)。标尺: 50 nm^[13]。

二、遗传标记

将荧光蛋白与靶蛋白融合在一起的遗传标记法最大的优势就是可以对靶蛋白进行精确的标记(图 1-14)。用转染技术和转基因技术进行荧光标记要比用荧光染料容易。遗传标记法的缺点在于表达的蛋白不是“内源性”蛋白,荧光蛋白的分子太大(由 238 个氨基酸组成),形成的融合蛋白可能影响靶蛋白的功能,以及荧光蛋白的中等光稳定性限制了它在单分子研究中的应用等。因此,已开发出几种

新的杂交标签体系:在活细胞内或细胞表面将小分子荧光探针与靶蛋白标签进行共价连接,即定点荧光标记,以及通过非共价连接形成的非定点荧光标记。通过共价成键连接方式实现的蛋白定点荧光标记有正交有机化学反应与细胞酶促连接反应,非定点的荧光标记一般是通过目标蛋白上一些裸露的氨基、巯基或羟基与一些带有活性反应基团的荧光试剂(FITC、罗丹明绿、E-118、DTAF、Alexa488、mBBr、5-IAF、Cy3TM)反应而实现^[21]。

在蛋白定点荧光标记中,较为成熟的技术为双砷染料-四半胱氨酸(the tetracysteine- biarsenical system)标签体系。这种方法所用的荧光标记探针为一类能够穿透细胞膜和含有双砷基团的荧光分子(如 FIAsh-EDT2)。双砷荧光标记分子进入细胞后,与连在重组目标蛋白质末端的六肽标签 CCXXCC 序列(简称 TC,其中 X 是除了半胱氨酸以外的其他氨基酸)特异性作用,生成强荧光的共价结合的双砷-四半胱氨酸体系(荧光强度约为 FIAsh-EDT2 的 50 000 倍)。在这个体系中,活细胞表达的重组蛋白能够被可透膜的双砷染料特异性标记。在这个体系中加入的乙二硫醇(EDT)是一种解毒剂,它能够保护内源性的半胱氨酸对,同时使染料在遇到最终的 TC 靶之前保持不发荧光。目前已经开发出可产生蓝色(ChoXAsH)、绿色(FIAsh)或红色(ReAsH)荧光的双砷染料。这一标记体系的应用逐渐增多,如活细胞中 C 末端带有 TC 标签的重组钙调蛋白(CaM-TC)被 BarNile-EDT2 特异性标记后,它的构象随 Ca^{2+} 的浓度改变而发生变化,相应地引起荧光强度的变化^[14]。双砷染料-四半胱氨酸标记体系具有背景噪音低、对靶蛋白功能影响小、荧光团共价连接牢固等优点,并且整个体系可以通过电子显微镜监测(图 1-15)。双砷染料体系也存在一些缺点,当双砷染料用于含有较多半胱氨酸残基的体系时,它存在非特异性的连接作用,而且这样的作用不能通过简单地加入过量的乙二硫醇避免,所以检测的背景荧光较高。



图 1-14 绿色荧光蛋白标记细胞

遗传编码的内源绿色荧光蛋白(GFP)标记 HeLa 细胞 connexin43(CX43)。标尺:20 μm ^[11]。

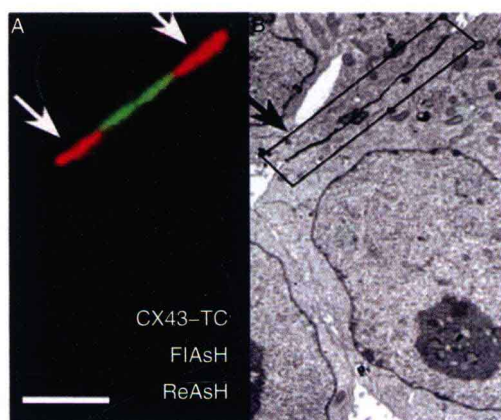


图 1-15 双砷染料-四半胱氨酸标签

FIAsh-EDT2 (绿色) 仅标记已存在的 CX43-TC, ReAsH-EDT2 (红色) 只标记新合成的重组体 CX43。A: Confocal 图像。B: 电镜图像, 方框区域示缝隙连接。标尺: 2 μm ^[18]。

第四节 荧光探针检测技术

一、荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术

在体外条件下有多种技术,如噬菌体展示技术(phage display techniques, PDT)、酵母双杂交 (yeast two-hybrid, Y2H)、串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)与表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)等技术,可用来检测大分子的相互作用。在活体细胞生理条件下,FRET 技术是实时动态研究蛋白-蛋白相互作用与位置关系的重要手段之一,已在细胞生物学研究与医学研究中被广泛应用。1948 年 Förster 提出荧光共振能量转移理论,即一对合适的荧光物质构成一个能量供-受体对时,能量在它们之间可以发生转移。能量转移的条件为供体(donor)与受体(receptor)两分子间的距离为 2~

6 nm, 两分子具有合适的空间构象, 供体发射光谱与受体激发光谱有超过 30% 的重叠(图 1-16)。基于这一要求, 目前最好的荧光供-受体对为天青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)与黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)。CFP-YFP 转染细胞后, 在激光扫描共聚焦显微镜上观测其变化。由于供体荧光蛋白发射光波长与受体荧光蛋白激发光波长有重叠, 激发供体荧光蛋白的光波也可能激发受体蛋白, 而发生光渗(bleedthrough)现象, 从而影响对能量转移结果的判断, 因此引入谱去卷积技术(a spectral deconvolution approach)以克服光渗现象。另外, 因供体蛋白能量转移越多, 其发射光强度衰减越大, 故也有研究者测量受体荧光蛋白光漂白(receptor photobleaching)前后, 供体荧光蛋白发射光的强度, 如果存在 FRET, 则受体荧光蛋白淬灭后, 供体荧光蛋白发射光强度明显增加。还有研究者采用供体荧光蛋白光漂白(donor photobleaching)方法进行 FRET 研究。

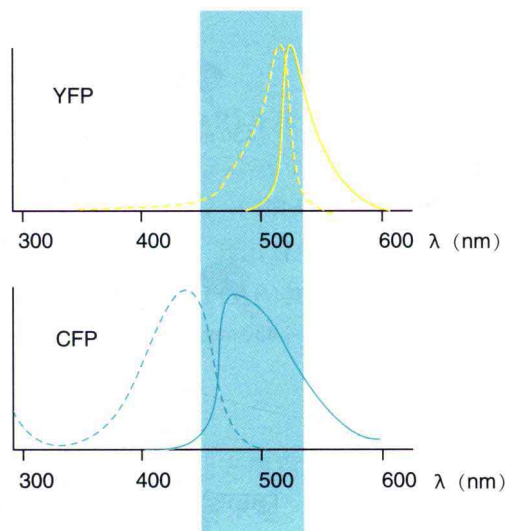


图 1-16 供体发射光谱与受体激发光谱的重叠

黄色荧光蛋白(YFP)和天青色荧光蛋白(CFP)的发射光谱(实线)与激发光谱(虚线)。灰色方框标示 CFP 发射光谱与 YFP 激发光谱的重叠部分^[1]。

正是因为 FRET 技术可在纳米精度上观测单个活细胞内蛋白-蛋白相互作用, 因此, 其应用越来越广泛。目前的应用有: ①观测第二信使浓度的动态变化。如按 CFP-CaM-M13-YFP 顺序构建嵌合蛋白(CaM, 钙调素; M13, 平滑肌肌球蛋白轻链激酶来源的钙调素结合结构域), 这一嵌合蛋白亦被称为 cameleons。当细胞内钙离子浓度升高时, Ca^{2+} 与 CaM 结合, 使 CaM 包裹 M13, 从而发出黄色荧光(图 1-17A)。②观测蛋白磷酸化与去磷酸化的动态过程。如按 CFP-(14-3-3)-kpt-YFP 顺序构建嵌合蛋白(kpt, kemptide, PKA 磷酸化靶序列), 当 PKA 激活后磷酸化 kpt, 发生 kpt 与 14-3-3 蛋白结合, 呈现黄色荧光(图 1-17B)。③观测多亚基结合蛋白的结合与解离动态。如将 CFP 与 PKA 的调节亚基结合, YFP 与 PKA 的催化亚基结合, 当细胞内 cAMP 浓度较低时, PKA 调节亚基与催化亚基结合在一起, 呈现 FRET; 当 cAMP 浓度升高, PKA 催化亚基与调节亚基解离, FRET 现象消失(图 1-17C)。④观测受体激活动态变化。如将 CFP 与 G 蛋白耦联受体(GPCR)细胞内第三环上的分子结合, YFP 与 GPCR 羧基末端结合。GPCR 未激活时, 因 CFP 与 YFP 接近, 呈现 FRET; 当 GPCR 与激动剂结合, GPCR 羧基末端 YFP 与 CFP 分离, FRET 消失(图 1-17D)。⑤观测细胞内蛋白分区激活与传播途径。细胞内小 GTP 酶 Ras 可被表皮生长因子激活, Raf1 为 Ras 的结合结构域, 构建 CFP-Raf1-Ras-YFP 串联的嵌合蛋白, 当 Ras 被激活时, 结合 Raf1 使 CFP 与 YFP 靠近, 当采用 433 nm 光激发时, 发射 527 nm 的黄色荧光, 呈现 FRET。研究表明, 当表皮生长因子刺激时, 细胞游离的边缘激活程度大, 而与其他细胞接触的部位 Ras 的激活被抑制。采用相同方法还观测到 Ras 激活从核周开始, 向细胞边缘扩散(图 1-18)。

上述这些研究表明, 采用 FRET 技术, 可在单个活细胞上, 实时观测蛋白-蛋白相互作用、蛋白分子空间构象变化, 以及信号转导的动态过程; 且具有较高的时间与空间分辨率, 特别是可以观测单个蛋白分子的分区激活情况。当然, FRET 技术目前还存在一定的局限性, 如嵌合 GFP 的供体或受体蛋白不能与受体或供体蛋白的特定结构域结合; 或者 GFP 蛋白形成二聚体, 从而影响了 FRET 结果的准确性。随着技术的完善, 这些均能最终克服。

将 GFP 标记的供体、受体蛋白制备为转基因鼠, 利用双光子激光扫描显微镜可在较厚标本上进行观测的特性, 将来可在活体上观测细胞内蛋白-蛋白相互作用与信号转导通路。目前, 这方面的探索性研究已经开始。除 FRET 技术外, 对特定细胞器或蛋白进行荧光标记探针的发展, 将会使心肌细胞内蛋白分子的运动状态变得“一目了然”。