活细胞大分子的定位和定量问题

陈宜张

第二军医大学神经科学研究所, 上海 200433

E-mail: chenyzhang1927@163.com

2013-04-15 收稿, 2013-05-20 接受

国家自然科学基金重大项目(3049173)资助

摘要 细胞的极性, 以脂筏与胞膜窖(caveolae)为特征的细胞质膜的非匀质性; 细胞质膜上受体的不均匀分布; 细胞内信号转导系统分子的“区隔化”和分子间的“牵拽”作用; 细胞内各种区隔(compartment)、微域(microdomain)的存在; 以及细胞骨架分子的结合蛋白和缔合蛋白的作用等事实, 都表明了细胞结构及功能的非均一性. 这些事实也强力地提示, 细胞内的蛋白大分子组成为有效的分子机器, 是当它们处于一定位置和具备一定浓度(量)的条件下发生相互作用的. 所以, 蛋白大分子的定位和定量问题是细胞生物学的一个基本问题. 当细胞主要大分子在一定时间范围内的定位和定量问题得到基本阐明以后, 融入单分子研究材料, 人们将可以在更精确的水平上描述细胞的功能活动, 这应当称之为精确细胞生物学(precision cell biology). 但是, 直观地演示蛋白大分子之间的定位关系, 确切地测定它们的微局域浓度, 并非易事, 这主要是受到了技术条件的限制. 近年发展起来的超分辨荧光显微镜、冷冻高压电子显微镜等新技术, 极大地有利于这方面的研究, 但仍远不能满足需要, 还需要继续发展.

关键词

大分子
活细胞
定位
定量
精确细胞生物学

细胞生物学是所有生命科学的重要基础和支柱, 因为任何生物体的活动, 究其基础, 乃是细胞的活动, 细胞间隙(细胞外)的许多分子也是细胞产生的.

细胞活动, 本质上是一些化学反应. 细胞当然也有机械的变形, 电位的产生、发光和发热等过程, 但就其终极的能量来源而言, 它们仍然是化学反应的产品和副产品. 细胞内许多化学反应的参与者, 有大分子, 也有小分子, 本文讨论的是细胞内的蛋白大分子; 当然, 核酸也是大分子.

1 问题的提出

细胞内大分子之间的化学反应能否发生, 发生的强度如何, 从经典(牛顿)力学的范畴来看, 取决于参与化学反应分子的存在位置(localization)、局域浓度以及存在的时间. 如果不考虑时间因素, 假定有关的分子是可以同时存在的, 那么细胞内大分子活动

最重要的参数, 就是它们存在于什么局域(domain)(定位问题), 以及以多大的浓度存在(定量问题).

试设想一下, 细胞内有生物学意义的化学反应, 会在什么情况下发生? 一种可能是分子的浓度非常高, 如线粒体内的酶, 文献早有报道, 在那里分子几乎达到过饱和的程度, 这种条件下的化学反应是一种极端的形式, 但可能并不罕见.

另一种可能是, 化学反应随机地发生在溶解于胞浆内或核浆内溶液中的分子之间. 胞浆内大分子的浓度一般很低, 发生反应的几率一定也很低(但不是没有可能). 试作分析, 便可以看出上述问题的重要性. 取 1 fl (1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) 的细胞区隔(compartment), 在一定浓度下, 这样一个小体积中的分子数量有多少? 当分子浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, fl 体积里面含有的分子数目是 600 多个; 如果为 10^{-9} mol/L (nmol/L), 则 1 fl 所含的分子数为 0.6 个, 这意味着在这个体积里

引用格式: 陈宜张. 活细胞大分子的定位和定量问题. 科学通报, 2013, 58: 2863-2871

Chen Y Z. Quantitation and localization of protein molecules in living cells (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 2863-2871, doi: 10.1360/972013-438

面, 有时有 1 个分子, 有时还不到 1 个分子. 在 1 μL 边长 1 μm 的长度上, 可以排列 100 个直径为 10 nm 的分子. 两个直径为 10 nm 的分子, 其浓度均为 10^{-9} mol/L, 它们互相碰撞的机会如何? 可以作一个比喻, 设想在一个空间内两个篮球相碰撞的几率, 如篮球直径为 7 英寸(17.78 cm), 100 个篮球按直径对准排列起来, 其长度为 17.78 m; 所以, 上述命题相当于直径为 17.78 cm 的两个篮球, 在 17.78 m $\times$ 17.78 m $\times$ 17.78 m 的大空间内碰撞的机会, 可见其碰撞几率很低.

活细胞检测到的蛋白浓度, 往往是超微量或痕量的. 显然, 在这种条件下, 化学反应很难组构成为有生物学意义的反应, 有时它可能仅为细胞提供噪音和背景而已.

第 3 种形式可能是最具有生物学意义的, 分子的分布具有一定的局域特异性, 即具有较高的局域浓度, 分子主要在一定范围内互相反应, 这类反应可能正是我们正在努力、试图弄清其发生条件的那些大分子间的反应. 但是, 恰恰就在这方面, 当前的细胞生物学研究存在重大不足. 因此, 这是当前细胞生物学领域的一个重大问题, 这也就是我们为什么提出细胞内大分子定位和定量问题的出发点.

大分子定位和定量问题如此重要, 却与当前实际掌握的关于蛋白大分子的定位、定量知识的现实并不相称, 我们的知识还很单薄. 许多数据往往是用人工方法把数以万计的细胞裂解, 破坏了细胞完整性而得, 所谓浓度是裂解物(lysate)的浓度; 亚细胞定位信息丧失殆尽; 定量数据也仅是一个平均数而已.

2 现有细胞生物学资料举例和给予的启发

细胞构造的异质性、细胞内分子微域(micro-domain)的存在以及细胞活动的特异性等事实表明, 在细胞活动中扮演主要角色的蛋白大分子, 应该是在一定位置、一定浓度(量)的条件下发生相互作用的.

对于蛋白大分子定位和定量问题的要求而言, 目前细胞生物学资料所提供的主要是暗示(hint)和线索(clue), 这就是说, 目前所知道的分子间“结合”、“缔合”, 都是根据化学测定得出的推理和结论, 而并非已经被确证的分子的“定位”和“定量”事实. 由于文献浩瀚, 本文仅举几方面实例, 目的为说明问题, 并不求完备.

2.1 细胞膜接受细胞外信息是以区格化、微域化的模式展开的

(1) 细胞的极性. 上皮细胞具有顶侧(apical)与基底侧(basal)的极性, 极化上皮的离子通道(Cl^- 通道, K^+ 通道), 转运蛋白(Na^+ , K^+ , 2Cl^- 转运蛋白)及 Na^+/K^+ -ATP 酶等均呈极性分布. 游走性间充质细胞则呈前沿-后延(front-rear)极性分布^[1]. 神经元的轴突和树突具有最明显的极性, 轴突末梢含有突触前的各种分子, 而树突棘含有的是突触后的各种分子; 即使同一树突棘, 功能上也分隔为多个独立的微域^[2]. 仅根据细胞极性这一现象看, 细胞的有关分子活动, 一定是既定位, 又定量的.

(2) 非匀质性的细胞质膜: 脂筏与胞膜窖. 细胞质膜是非匀质(non-homogeneity)的, 细胞质膜上的脂筏结构本身就是质膜的特殊微域, 在此微域内浓集有功能蛋白, 如 GPI-链接蛋白、异三聚体 G-蛋白、Src-家族激酶等. 因此, 脂筏是协调信号转导的一个平台^[3]. 胞膜窖的窖蛋白有许多调节功能. 可以看出, 细胞膜是细胞接受外来刺激的门户, 就在这里, 蛋白大分子的定位、定量已明显地显示出来.

(3) 突触前神经末梢钙离子通道的 synprint 位点. 膜整合蛋白处于质膜上的相对固定位置, 与它相互作用的细胞内作用伴侣, 必然与它共定位. 突触前神经末梢钙离子通道的 synprint 位点, 便是一个最好的例子, 它促成功能分子的共定位. 神经末梢钙离子通道的主要作用是触发突触小泡的释放. 钙通道 Ca_v 2.2 的 $\alpha 1$ 亚单位的域 II 和域 III 含有突触蛋白相互作用位点(synaptic protein interaction site, synprint), 它可以与 SNARE 蛋白(包括突触融合蛋白-1, SNAP-25)及半胱氨酸串蛋白(CSP), 突触结合蛋白-1 等相接合^[4]. 因为 SNARE 蛋白负责突触小泡的泡裂外排, 所以钙通道与它们的相互作用, 对于突触前末梢的活动至关重要. 膜整合蛋白通过其细胞内域的相互作用, 达到蛋白分子共定位的目的. 钙离子通道如此, 其他膜整合蛋白的细胞内域的作用也值得重视.

2.2 信号转导系统分子的“区隔化”和分子间“牵拽”

已经有不少材料表明信号转导系统分子成员在细胞内的分布不是均匀的, 而是“区隔化”的, 信号转

导系统相关成员之间往往依靠分子本身,或另一个脚手架分子“牵拽”而相互靠近。

(1) cAMP-PKA 的“区隔化”。在有些细胞,如心肌细胞, cAMP-磷酸激酶 A(PKA)的细胞内分布是“区隔化”的。cAMP 局部浓度的“成形”(shaping)有赖于两种酶的活性。cAMP 的产生依赖于腺苷酸环化酶,它的破坏依赖于磷酸二酯酶, cAMP 的局部浓度是由这两者的力量平衡所决定。用荧光共振能量转移(FRET)方法检测腺苷酸环化酶的结果表明, cAMP 区隔化的基础可能有二,一是质膜亚区产生 cAMP 的点来源(point source),二是它被空间分离的、锚定的 cAMP 磷酸二酯酶(PDE)所分解。cAMP 特异磷酸二酯酶-4(PDE4)的同工分子在决定 cAMP 区隔化方面起决定性作用,这在心肌细胞和 T-细胞已得到充分证明。下述情况,如经 β_2 -肾上腺素受体激活的 PKA 磷酸化状态,也即 PKA 能够把信号从 G_s 转换到 G_i 状态,从而激活 ERK,是受激动剂刺激的 PDE4 募集到受体(在 β -arrestin 帮助下)有关的^[5]。

(2) 脚手架分子、锚定蛋白的“牵拽”作用。在信号转导系统中,蛋白激酶经常被牵拽(tether)到一个大的分子复合体,这样有利于实施紧密的时-空调控。在这里,个别分子的功能是以大的多价复合物的部分功能而实现的。这种大的多价分子往往是信号传送的脚手架蛋白,在一些情况下,这种脚手架稳定地集合在转运蛋白,离子通道的胞浆侧表面;在另一种情况下,脚手架蛋白是细胞内分子,它的组装是由于细胞外的配基结合于膜受体的结果。不论何种情况,这些脚手架分子受磷酸离子周转的调节,而磷酸离子的周转又受磷酸酶和与之共定位的磷酸激酶所调节;脚手架分子也受第二信使的调节,第二信使可以是钙离子,也可以是 cAMP,如果是 cAMP 的话,它又受腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶的调节^[6]。所以,配基诱导的 cAMP 浓度的变化在时程、幅度和细胞不同深度上各不相同,这就是 cAMP 浓度的微域,而微域是由产生 cAMP 的腺苷酸环化酶和分解 cAMP 的磷酸二酯酶这两者的作用所形成的^[7]。

至于如何达到系统功能的特异性,这要依赖某种脚手架蛋白的差别表达,在 PKA 系统,就是 AKAP(A-kinase anchoring protein, 蛋白激酶 A 锚定蛋白)。AKAP 的作用是押集(sequester)PKA 信号蛋白家族,使之靠近相关底物,如离子通道、受体、或转运蛋白。正是利用这样的方式,细胞创造出了 cAMP 信号转导

分离的聚焦点^[6]。所以, cAMP 信号传送中大分子复合体的作用是,把 PKA 信号蛋白家族(也包括磷酸二酯酶)押集到特定位点,这样就保证了细胞的 cAMP 信号是局部化的,而并不弥散到整个细胞。试设想一种人为情况,在培养液中加毛喉素(Forskolin),毛喉素刺激腺苷酸环化酶;或加磷酸二酯酶抑制剂, IBMX,这样将会产生高浓度的 cAMP,从而使 PKA 全酶解离,但在上述情况下(我们的实验往往都是这样做的),虽将引导细胞内 PKA 信号的传送,但一切特异性都将不复存在。相反,生理情况下的 PKA 信号传送,可能是由局限的、脉冲式的 cAMP 完成的,这就是一种局限的变化了^[6]。PKA 可以锚定到脚手架蛋白上,而脚手架蛋白则聚集了大分子复合物,从而规定了 PKA 信号传送的局灶性,这种把含有 PKA 的复合体靶向并集合起来,是 AKAP 的功能,而多数 AKAP 对腺苷酸环化酶的 RII 调节亚单位都是特异的^[6]。另外, AKAP 可以与一些蛋白缔合,例如,与离子通道、细胞骨架和线粒体缔合, AKAP 还参与调节细胞核动力学和染色体凝聚^[7]。

(3) ERK/MAPK 与 FAK 传导通路中的桩蛋白。某些脚手架分子既增强信号流动,也可以介导与其他信号通路的交互作用,如某些接头蛋白把 MEK, ERK 复合体靶向到亚细胞定位,有些还可以调节其抑制作用。Paxillin 是一个脚手架分子,它可以连接胞外信号调节激酶(ERK)/促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)与黏着斑激酶(FAK)传导通路。桩蛋白是黏着斑成分之一,当肝细胞生长因子(HGF)作用于细胞膜上受体,桩蛋白就募集细胞内的 ERK/MAPK,于是 MAPK 和 MEK(ERK 激酶)就组成型地和桩蛋白在一起。但 ERK/MAPK 与桩蛋白的结合又需要 SRC 介导的桩蛋白 Y118 位点的磷酸化……激活了的 ERK/MAPK 使桩蛋白 S83 位点磷酸化,此磷酸化又诱导黏着斑激酶与脚手架蛋白结合……这些过程导致片状伪足的延伸。FAK 则导致黏着斑消失,从而协调了底物的脱离及细胞运动的发动^[8]。

(4) ERK/MAPK 传导通路中的 MORG1 和 MP1。MP1(MEK 伴侣-1)是一个脚手架蛋白,它协调 ERK/MAPK, MEK(MAPK 和 ERK 激酶)的协同作用。MP1, MEK 和 ERK/MAPK 复合物经 p14 靶向到晚内小体。MP1 也可以结合 MORG1(MAPK 组构者-1),但 MORG1 的确切组成和定位还不清楚。除 MP1 外, MORG1 也与 Raf-1 结合,它与细胞的囊泡共定位。

与 MORG1 结合的 ERK/MAPK 复合体可选择性地被血清和溶血磷脂酸所刺激,而后者主要通过 GPCR 行使其功能^[8].

(5) 酵母 MAPK 传导通路中的 Ste5p. 酿酒酵母(*Saccharomyc cerevisiae*)传导通路中的蛋白激酶的相互组构,以及蛋白激酶与其他转导蛋白的组构,对其作用有明显影响,会影响其效率、特异性,以及在某种程度上消除催化的混乱.这种信号事件的组构是由于分子的共定位或信号转导分子本身的押集而实现的;具体是通过蛋白脚手架,膜域的支持;笼统一点讲,是在细胞器上面.

蛋白脚手架参与信号传递分子的空间组构,有些是通过蛋白激酶的,目前了解最清楚的脚手架分子是 Ste5p.它负责酿酒酵母接受外激素的信号传导通路的组构,它可以与外激素反应通路上属于 MAPK 系统的所有 4 种激酶相结合,赋予其特异性和效力.但这种高阶的组构并非是静态或被动的,它可以在受刺激后产生. Ste5p 还可以与 MAPK 激酶(MAPKKK)相互作用,通过变构机制,正性调节 MAPKK 活性^[9].

2.3 细胞骨架分子的结合蛋白和缔合蛋白

细胞骨架的细胞学含义,是它规定,赋予细胞以固定形态,但是从大分子之间起反应的角度看,骨架恰恰是一个可以为定位提供良好平台的结构.细胞骨架分子的结合、缔合蛋白,如肌动蛋白结合蛋白(actin-binding protein, ABP)、微管缔合蛋白(microtubule-associated protein, MAP)、微管结合蛋白(microtubule binding protein, MBP)等,应该是优越的候选者.经典的想法,这些分子的作用是调节细胞骨架的肌动蛋白细丝和微管,维持和形成细胞形态.但有证据表明,微管缔合蛋白 MAP1B 可以与 GABA, 甘氨酸,谷氨酸受体链接、缔合^[10].非受体酪氨酸激酶 ABP 之一的 Ablson(Abl),它可以与肌动蛋白细胞骨架直接结合,果蝇的 Abl 则含有肌动蛋白结合基序(motif)^[11].

2.4 得到的启发

由上述可以引申出一些有趣的问题.例如,受体、离子通道、转运蛋白等膜整合蛋白,它们在细胞质膜表面是如何分布的;它们的分布与质膜的异质性有何关系;它们的分布又和与之相互作用的细胞内蛋白、下游分子,在物理分布上有何相关;等.

又如,许多已经描写的信号转导通路,相互靠近关系,都有待蛋白分子的定位和定量研究加以确证.细胞的许多信号转导系统构成了复杂网络,出现了许多网络图,其复杂程度令人望而生畏.网络中的每一条路径是否都重要,或有些路径是否真实起作用,可能有问题.重要问题之一就是:网络每个节点上的分子浓度是否清楚,定位是否确实.当蛋白分子的定位和定量问题解决之后,有可能厘定一个个节点,一条条通路的真实、具体情况,从而弄清楚有些通路是确实存在的,而有些通路可能是并不“工作”的.

细胞骨架分子给人的启发是:细胞骨架也有可能为蛋白生物大分子的相互作用提供平台,但这方面的资料尚不多,而且仅是初步推断,有待更多事实的证明,或者被否定.

3 如何测定蛋白分子在细胞内的定位及局域浓度

细胞是异源、非均一结构,里面有各种细胞器:线粒体、内质网、细胞核,等;细胞内及膜结构表面的特化和区隔化(compartmentalization)更加强了这一特征;不能把胞浆仅仅看成均匀的水性溶液.因此,测定细胞内不同局部(微域, microdomain)蛋白质的分子浓度就显得非常必要.只有这样,我们才有可能知道细胞生物学的各种生命过程在哪里以及以什么样的量发生.许多研究者都认识到定位和定量数据的重要性,但实际情况是,要做到这一点相当困难.下面将引用几个实例加以分析.

3.1 测定细胞内 cAMP 与蛋白激酶 A(PKA)的局域浓度很困难

信号转导系统中的蛋白大分子的定位和定量问题,历来受到重视, cAMP 与 PKA 的定位和定量,同样十分重要.例如,因肾上腺素受体激动而引起的心肌细胞收缩增强,应该是由 cAMP 与 PKA 的局域浓度变化引起的.但是对于这两者在细胞内的分区浓度,我们知道得太少.现有的材料大多是细胞裂解(lysis)后测定它的总量,然后根据细胞体积计算出来的.

Iain 课题组^[12]检测了心肌细胞的 cAMP 和 PKA 活力.他们用培养纯化的心肌细胞作细胞匀浆制备(方法为 3000×g, 5 min).如果给以异丙(去甲)肾上腺

素刺激,则细胞匀浆中的细胞内 cAMP 浓度(cAMP 检测方法:用 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个细胞,以 pmol cAMP/mg 蛋白表示),溶解(soluble)部分从 $2.3 \rightarrow 7.7$ pmol/mg 蛋白;微粒状(particulate)部分从 $3.0 \rightarrow 9.2$ pmol/mg 蛋白.溶解部分 cAMP 依赖的 PKA 活力(用测定 PKA 底物分解的方法)比例从 $0.21 \rightarrow 0.66$ ^[12].应该指出,测定所用的标本是细胞匀浆,因此上述结果仅是许多细胞的泡液含量的一个平均值.其他细胞的 cAMP 和 PKA 活力也有报道,如 HEK 293^[13]、人血小板^[14],但都是细胞裂解物的测定结果.

Zaccolo 和 Pozzan^[15]用改进方法测定心肌细胞的 cAMP 和 PKA 活力,他们把青色荧光蛋白(cyan fluorescence protein, CFP)连接到 PKA 的调节亚单位(R),而把黄色荧光蛋白(yellow fluorescence protein, YFP)连接到催化亚单位(C),当 PKA 未被 cAMP 激活时, R 与 C 靠近,发生强的 FRET;而当 cAMP 激活时, R 与 C 分离,发生弱的 FRET.因此,可以根据 FRET 的变化,判定 cAMP 浓度的高低.此法的优点是可以单个细胞进行实验,可以根据 FRET 反应的分布,判断不同细胞微域的 cAMP 浓度变化.实验发现新生鼠心肌细胞接受 β -肾上腺能刺激后,可以引起多个微域的 cAMP 浓度升高,其部位在横管/接头肌质网膜区,范围仅 $1 \mu\text{m}$.更有甚者,此 cAMP 的弥散,受磷酸二酯酶的限制.又根据加入 100 mmol/L 的磷酸二酯酶抑制剂, IBMX(异丁酸甲基黄嘌呤)后,横纹部位的 C-YFP 与 RII-CFP 互相解离(解离表示 cAMP 浓度升高,因磷酸二酯酶活力低了).实验说明 β -肾上腺能刺激后,鼠心肌细胞的 cAMP 浓度变化具有微域特异性,并且他们证明, cAMP 浓度变化的微域范围约 $1 \mu\text{m}$.但实验没有提供 PKA 浓度变化的具体数据^[15].应该认为,可以不需要细胞匀浆做实验,这是一个进步,但由于测定方法的局限性,真正的 cAMP 和 PKA 局域浓度,并未得到检测.

3.2 依赖特异的探针和手段,细胞内钙微域得到了测定

钙离子并非大分子,但它的细胞内钙微域却得到测定,这说明,如果具备特异的探针和手段,活性分子的定位和定量测定是有可能的. Neher^[16]提出,细胞内钙微域的不同,对于细胞分泌具有极端重要意义,他曾分析了两种不同情况.某一细胞内域,如果它离钙通道很近,其距离仅 20 nm ,则当一个钙通

道开放时,将引起细胞内钙离子浓度升高到 100 mmol/L 或更高,且升高很快(100 ms);反之,如离钙通道较远,如 200 nm ,则钙离子浓度仅能升高到 100 mmol/L ,且升高缓慢(10 ms)^[16].事实证明, Neher 的这种看法是正确的.如 Rizzuto 和 Pozzan^[17]用重组水母发光蛋白(aequorin)指示相对钙离子浓度,观察细胞内 2 个部位的钙离子浓度,一个是靠近钙离子通道的质膜内侧叶片(leaflet),另一个是远离钙离子通道的一般胞浆.结果发现,当激动剂引起钙通道开放,而使细胞内钙离子浓度增高时,贴近质膜内侧叶片的离子浓度增高远远高于一般胞浆的^[17].总之,细胞内钙离子的局域浓度对于钙依赖的各种细胞功能活动都十分重要.

3.3 联合应用多种技术,裂殖酵母胞质分裂蛋白的局部浓度得到测定

Wu 和 Pollard^[18]联合应用 3 种技术:荧光显微镜技术(fluorescence microscopy)、流式细胞仪(flow cytometry)和定量免疫印迹法(quantitative immuno-blotting),测定了裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)胞质分裂蛋白的总体浓度和局部浓度.实验结果令人惊讶,存在于纺锤体极体的某些蛋白,其浓度可以比细胞总体浓度高出 7500 倍.这个实验既说明测定蛋白局部浓度的困难,因为部分所得结果来自推算,而非直接读出;也说明测定蛋白局部浓度是何等重要.

4 发展新技术

近一、二十年来相关技术和方法学的进展,为研究细胞内大分子定位和定量问题,提供了难得的机遇,人们看到了希望.但即便如此,还不能满足细胞内大分子定位和定量研究的需求,还需要更多、更高水平的技术和方法学方面的发展.

4.1 荧光显微成像技术

自 GFP 应用以来,细胞生物学各方面的研究,特别是荧光显微镜的应用,使得荧光成像研究有很大的进展.超分辨光学显微镜技术(super-resolution microscopy),如光激活定位显微术(photoactivated localization microscopy, PALM)、荧光激活定位显微术(fluorescence photoactivation localization microscopy, FPALM)、刺激发射耗竭显微术(stimulated

emission depletion microscopy, STED)、随机光重组显微术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)、饱和结构照明显微术 (saturated structured-illumination microscopy, SSIM), 纷纷发展起来. 还有一个新的方法, 1 纳米准确度荧光成像 (fluorescence imaging with 1 nm accuracy, FIONA)^[19-21]. 超分辨光学显微镜技术的发展, 突破了显微镜分辨极限 Abbe 定律.

多光子显微镜技术也得到广泛应用, 如双光子激动激光扫描显微镜 (two-photon excitation laser scanning microscopy, TPLSM)、双光子光释放技术 (two-photon photorelease, TPR)^[22].

4.2 电子显微镜技术

最近, 电子显微镜技术有很大进展, 应用高压冷冻 (high pressure freezing, HPF) 技术, 可以在不经固定处理条件下实施电子显微镜操作. 在这种新的方法下, 看到了细胞内不少细丝样 (filamentous) 结构, 这已经到了与大分子尺度的数量级相接近的水准. 高压冷冻技术实行快速固定, 高压冷冻, 随之以冷冻的代替, 这样可以更好地保存分子、细胞器和细胞骨架. 该技术可以与电子显微镜断层切片相结合. 最近有人报道了突触前超结构的三维构筑, 突触小泡之间通过约 25 nm 长的丝样结构互有联系, 被称为连接器 (connectors), 位于活动带上的入坞小泡有额外的细丝. 细丝是从致密突起的中心发射出来的, 如果把活动带蛋白 UNC-10/RIM, 或 SYD-2/Liprin- α 零突变, 突变后的线虫突触的表现是, 诱发小泡释放减少, 接触致密突起的小泡数, 纤维数减少. 这是两个蛋白参与入坞小泡到活动带的证据^[21]. 这种细丝样结构, 有可能是细胞骨架相关蛋白, 也有可能是脚手架蛋白或结头蛋白的集合体. 追踪细丝样结构的分子性质, 有可能弄清蛋白大分子的定位.

4.3 超分辨光学显微技术与电子显微镜技术的联用

在高压冰冻电子显微镜技术基础上, 结合其他技术, 如荧光技术, 获得与化学特性有关的信息, 扩展电子显微镜的成就, 可以把形态与化学结合起来. 这是一个颇有希望的技术领域. 例如, 日本学者 Watanabe 经过艰苦工作找到了最优的固定和塑料包埋条件, 找到了一个折衷条件, 使得光学显微镜和扫描电子显微镜可以并用, 这样可以把光学显微镜的

荧光颗粒与电子显微镜的突触超微结构重叠在一起. 他们把用 PALM 和 STED 得到的 SYD-2/Liprin- α 信号和电子显微镜的致密突起重叠对齐, 于是这个分子就被定位在致密突起上. 富有前景的、应用于电子显微镜和光学显微镜的试剂是一个用遗传学方法编码的、称为小 SOG (miniSOG) 的单线态氧发生器 (singlet oxygen generator). 小 SOG 含 106 个氨基酸, 是一个黄素结合荧光蛋白, 它的获得是通过突变筛选方法筛选植物向光蛋白 (phototropin) 中的 LOV (light, oxygen, and voltage) 结构域, 把这个分子找出来. 用蓝色光照射时, 小 SOG 产生绿色荧光, 同时还有单线态氧的量子产率, 它可以把二氨基联苯转变为电子致密沉淀物, 用于电子显微镜检测. 所以, 这个方法一方面可用于荧光检测, 另一方面可以用于电子显微镜检测. 小 SOG 标记方法已用于整体线虫, 帮助我们准确分辨该分子的定位; 也已用于定位 synCAM1 和 synCAM2 于鼠脑突触^[21].

Cryo-ET 有可能在细胞生物与结构生物学之间架桥. 例如, 冷冻电子断层 (cryo-electron tomography, cryo-ET) 与结构照明显微镜 (structured illumination microscopy, SIM) 的联用, 将有可能应用于探索细胞的分子构筑. 例如, 已获得胞质分裂早-中期细胞中间体上一个蛋白 TSG101 的精确定位; 冷冻电子断层扫描术和超分辨显微镜的联用, 有可能得到细胞内蛋白的高分辨定位, 这样就有可能更真实地阐明细胞活动过程^[23].

研究多条信号通路的协调时, 将需要实施多通道检测, 这时需要两种技术, 一是荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 另一种是计算机处理. 为了确定细胞内多个分子的定位, 可能需要在细胞内应用多对 FRET. 利用基因编码蛋白的 FRET, 可以实现多通道检测, 当前已经可以用不同 FRET 分子对来制造生物传感器, 例如, 有蓝色荧光蛋白 (BFP) 和青色荧光蛋白 (CFP); 有增强绿色荧光蛋白 (EGFP) 和红色荧光蛋白 (DsRed); 有 CFP 和 YFP. 在这些“对”中, CFP 和 YFP 这一对被证明最适用于多通道 FRET, 这是由于其高荧光特征, 以及其激动和发射波长特点, 因此可以与其他荧光分子共用, 能够辨别开来. 另外, 又产生了桔黄色和红色的蛋白, 这两个在光谱上与 CFP 和 YFP 是可以区分的, 再进一步改进其光稳定性和亮度. 这样一来, 就提供了可以方便应用的、作多通道用的 FRET 对. 当然,

多通道 FRET 技术, 还需要相适应的、用于多通道的计算机处理^[24].

4.4 定量研究技术

分子定量技术, 近年来也有很好的进展. 这得益于许多分析化学和物理学基础技术的发展. 现在, 化学计量法或分子比(stoichiometry), 已发展到真正的定量. 例如, 在一种特殊标本, 大脑兴奋性突触的突触后致密结构(PSD), 因为它有独特的物理性状, 可以从脑匀浆中分离出来, 获得相当的数量, 然后进行化学分析. 如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight(MALDI-TOF) MS), 这是一种质谱(MS)方法, 还有液体色谱法耦合串联质谱(tandem MS)法, AQUA-MS 方法(AQUA, absolute quantitation, 绝对定量的简写). 利用这些方法, 可以检测存在于 PSD 组分中的大量蛋白, 或从免疫沉淀 NMDA 受体复合体所得到的成分. 已经能够测出, 一个直径约 360 nm 的 PSD(其体量大约为 $1 \mu\text{m}^3$)中, 其所含的 NMDA 受体分子数大约是 20 个, AMPA 受体分子大约是 15 个, 等等^[25].

但是, PSD 是结构特殊的一个例子, 所谓 PSD 上的分子数目, 并非单个 PSD 上的测定结果, 我们现在还没有办法(利用扫描的方法, 或印迹的方法)测出单个 PSD 上真实的受体数目和它的分布. 这样来要求定量研究技术, 还有很大差距.

4.5 努力发展更好的方法

既然我们已经认识到大分子定位、定量问题的重要性, 又为什么迟迟没有进展呢? 在我看来, 主要的障碍是技术. 目前测量的手段还达不到完善地解决这些问题的水平. 具体地说, 从化学方面看, 希望发展更好、更特异、更便于检测的探针, 特别是特异的小分子探针和适合生物样品的标记技术; 从物理学方面看, 希望发展更灵敏、易于操作的检测方法.

5 精确细胞生物学(precision cell biology)

细胞内蛋白质分子的空间(spatial)分布, 其随时间(temporal)变化, 以及定量(quantitative)研究是“活体(*in vivo*)蛋白质研究”的 3 大基本要素. 时间分辨十分重要, 对此将暂不作讨论, 本文假定参与反应的分子在时间上同时存在. 活细胞的单分子实时视见研究, 其重点在空间分布, 偏于定性. 但定量研究十分重要, 结合细胞内的具体情况, 这里提出的就是要做细胞内分区的超微量、痕量(trace)蛋白质分子浓度的测定. 在极微小空间、极低浓度下, 估计会出现“测不准”现象. 当分子浓度很低, 空间极为微小, 而测量仪器准确度又达不到分子直径, 分子运动维度的时候, 仪器不可能提供准确的信息. 例如, 在一个微小体积内, 分子的数目, 可以没有(0 个), 或 1 个, 平均是几个呢? 是 0.5 个? 但瞬时分子是不能分为半个的, 这时测到的平均数据就不能准确反映细胞内的原貌. 那么, 我们能够在多快的时间尺度上测定一个确定的微小体积内的分子数目呢? 这里肯定存在一个极限. 量子力学有所谓“测不准”原理. 我们的测定可能也会出现类似的那种“测不准”. 当然, 这是一个统计学问题了.

从 1934 年始, 美国冷泉港开始了定量生物学的系列讨论会. 讨论会延续至今, 已经开了近百次, 影响很大, 定量生物学成为生物学研究的一个重要指导原则. 我们今天所讨论的, 是在定量生物学的基础上向前迈进一步, 可以称之为定量细胞生物学(quantitative cell biology). 从字面上看, “定量”不包括定位的意思, 如果把定位和时间这两个因素都包括进去, 再把单分子的研究结果也整合进去, 我们将能更好地在分子水平描述一个有意义的细胞活动. 有一个准确而又能启发人们思维的名词, 有时会有意想不到的推动作用, 我认为可以称之为精确细胞生物学(precision cell biology). 6 年前我曾提出过细胞分子断层扫描(cell molecular tomography)的设想^[26], 这可以看作精确细胞生物学的一个特例, 精确细胞生物学的概念将包括更丰富的内容.

致谢

中国科学院上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室王桂英、程亚; 中国科学院上海有机化学研究所姚祝军、康经武; 中国科学院上海应用物理研究所胡钧; 浙江大学医学院周天华、罗建红等参与过讨论; 第二军医大学神经科学研究所贾东梅帮助材料整理. 作者对他(她)们表示感谢.

参考文献

- 1 Nelson W J. Remodeling epithelial cell organization: Transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1: a000513
- 2 Chen Y, Sabatini B L. Signaling in dendritic spines and spine microdomains. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 389–396
- 3 Yang X L, Xiong W C, Mei L. Lipid rafts in neuregulin signaling at synapses. *Life Sci*, 2004, 75: 2495–2504
- 4 Sheng Z H, Lee A, Catterall W A. Initiation and regulation of synaptic transmission by presynaptic calcium channel signaling complexes. In: Hell J W, Ehlers M D, eds. *Structural and Functional Organization of the Synapse*. New York: Springer Science Business Media, 2008. 147–172
- 5 Baillie G S, Houslay M D. Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17: 129–134
- 6 Taylor S S, Ilouz R, Zhang P, et al. Assembly of allosteric macromolecular switches: Lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 646–658
- 7 Tasken K, Aandahl E M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 2004, 84: 137–167
- 8 Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 827–837
- 9 Rosse C, Linch M, Kermorgant S, et al. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 103–112
- 10 Riederer B M. Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull*, 2007, 71: 541–558
- 11 Dent E W, Gupton S L, Gertler F B. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011: 3a001800
- 12 Buxton I L O, Brunton L L. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 1983, 258: 10233–10239
- 13 Kopperud R, Christensen A E, Kjærland E, et al. Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP dependent protein kinase under physiological conditions. *J Biol Chem*, 2002, 277: 13443–13448
- 14 Elgenthaler M, Nolte C, Halbrügge M, et al. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets: Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem*, 1992, 205: 471–481
- 15 Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*, 2002, 295: 1711–1715
- 16 Neher E. Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 1998, 20: 389–399
- 17 Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : Molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*, 2006, 86: 369–408
- 18 Wu J Q, Pollard T D. Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science*, 2005, 310: 310–314
- 19 Greenfield D, McEvoy A L, Shroff H, et al. Self-organization of the *Escherichia coli* chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy. *PLoS Biol*, 2009, 7: e1000137
- 20 Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13081–13086
- 21 Yan D, Noma K, Jin Y. Expanding views of presynaptic terminals: New findings from *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 22: 431–437
- 22 Sabatini B L, Svoboda K. Ca^{2+} signaling in dendritic spines. In: Hell J W, Ehlers M D, eds. *Structural and Functional Organization of the Synapse*. New York: Springer Science Business Media, 2008. 441–458
- 23 Fridman K, Mader A, Zwerger M, et al. Advances in tomography: Probing the molecular architecture of cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 736–742
- 24 Welch C M, Elliott H, Danuser G, et al. Imaging the coordination of multiple signalling activities in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 749–756
- 25 Sheng M, Hoogenraad C C. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 823–847
- 26 Chen Y Z, Chen X P. Do we need molecular tomography of a cell and how can it be achieved? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35: 872–877

Quantitation and localization of protein molecules in living cells

CHEN YiZhang

Institute of Neuroscience Research, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

The structural and functional heterogeneity of cells is exemplified by their polarity, the presence of lipid rafts and caveolae in the plasma membrane, the uneven distribution of receptors on the cell membrane, compartmentalization of messenger molecules and tethering effects of scaffolding molecules, the existence of distinct microcompartments and microdomains within the cell, and of molecules that bind or associate with the cytoskeletal proteins, tubulin and actin. These features imply that the major determinants of cell function, the protein molecules, are assembled in microdomains and interact with each other in distinct locations and at precise concentrations. The issues of protein localization and quantitation in cells are thus of fundamental importance in cell biology. Information on the localization and quantity profiles of proteins in a cell at a given time, together with data from single-molecule studies, will lead to a better understanding of cell functioning. It is proposed that a new term, precision cell biology, should be coined for this kind of cell biology. However, direct demonstration of the spatial relationships between interacting proteins and accurate determination of the quantities of interacting protein molecules in live cells are not easy, and convenient and efficient methods are lacking. Although recent improvements in technologies, such as super-resolution fluorescence microscopy and high-pressure cryoelectron microscopy have greatly facilitated progress in this direction, further studies are needed to satisfy the requirements.

protein molecules, living cell, localization, quantitation, precision cell biology

doi: 10.1360/972013-438