第 13 卷第 3 期
2004 年 6 月

激 光 生 物 学 报
ACTA LASER BIOLOGY SINICA

Vol. 13 No. 3
Jun. 2004

组织光学 ·

激光扫描共聚焦显微镜在蛋白质晶体生长研究中的应用*

代连花, 戴国亮

(中国科学院力学研究所国家微重力实验室, 中国 北京 100080)

摘 要: 激光扫描共聚焦显微镜与普通光学显微镜相比, 其分辨率高, 同时具有可对样品进行非侵入性无损伤断层扫描, 以及对样品形貌进行三维成建等特点, 因此, 可作为研究晶体生长强有利的工具。本文介绍了其在定量测量晶体的个数, 重组三维图像以获得晶体生长的过程信息及测定晶体生长台阶动态变化等方面的应用。还对激光扫描共聚焦显微镜在晶体生长研究的其它方面应用前景作了展望。

关键词: 激光扫描共聚焦显微镜; 蛋白质晶体生长; 动力学研究

中图分类号: Q631; Q816

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2004)03-0210-04

The Applications of the Laser Scanning Confocal Microscopy in the Protein Crystal Growth Studies

DAI Lian-hua, DAI Guo-liang

(National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The confocal laser scanning microscopy (CLSM) can be a powerful tool for in situ observation and analysis of protein crystal growth kinetics, because of its high-resolution, noninvasive scanning for crystal and 3-D reconstruction. In this paper, we introduce the function of the confocal laser scanning microscopy in the studies of protein crystal growth kinetics, such as measuring the numbers of crystal, reconstruction 3-D image to acquire the information of crystal growth process. In addition, we have expected the applications of the confocal laser scanning microscopy in the other research of protein crystal growth.

Key words: laser scanning confocal microscopy; protein crystal growth; kinetic research

0 前言

蛋白质是生物体内最重要的物质之一, 是生命的物质基础, 了解蛋白质的结构和功能已成为后基因组时代日益关注的焦点, 但是面对成千上万的未知蛋白质结构, 如何精细测量其三维结构, 进而探索结构与功能的关系是许多生物学家迫切需要解决的问题。蛋白质晶体学在可预见的将来仍然是得到蛋白质精细结构的主要技术, 了解蛋白质的生长情况(如生长方式、缺陷种类等)对于蛋白质晶体有重要的意义。最近二十年来, 人们已经借助于很多仪器如传统光学显微镜、激光散射仪[1]、原子力显微镜[2]、干涉仪[3]等来研究蛋白质晶体。蛋白质结晶可分为两个阶段: 一个是晶核形成阶段, 另一个是晶体不断长大阶段。前一阶段是自发的, 由于主要受热力学参数的控制, 在时间上和空间上不可预测, 因此很难用成像的方法来观察与描述它, 一般来说可用中子散射仪或小角度 X-射线散射仪[4]、光散射等

* 基金项目: 国家自然科学基金(30270302)
收稿日期: 2003-12-03

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

方法来研究这一成核过程;后一阶段是生长基元从液体相中不断通过界面进入晶格座的过程,晶格座的点是可预测的,并且晶体尺寸大小和生长的时间量程是可以观察和记录的,因此可用显微镜来研究晶体的生长过程,并直接观察与之相关联的现象。

随着科学研究的发展,普通光学显微镜由于其固有的缺陷已经不能满足科研的要求,取而代之是用可形成立体图像的激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy,LSCM)。

LSCM 是近十几年来才发展起来的图像分析仪器,其性能与普通光学显微镜相比是一个质的飞跃,是电子显微镜的一个补充。它是在荧光显微镜成像的基础上加装激光扫描装置,使用紫外或可见光激发荧光探针,利用计算机进行图像处理,从而得到晶体组织内部的微细荧光图像以及晶体生长的形态变化。LSCM 的成像原理如图 1 所示,从工作原理可知由于其分辨率不受物体衍射的限制,在一定情况下,可以显现分子大小的物体图像。同时,LSCM 可以在不同的观察方向上对不同深度层次的样品进行非侵入性无损伤断层扫描,不会对样品造成物理和化学特性的破坏,并且可对样品形貌进行三维成建,重现立体图像。由于这些特点,使 LSCM 成为晶体生长领域新一代强有利的研究工具。

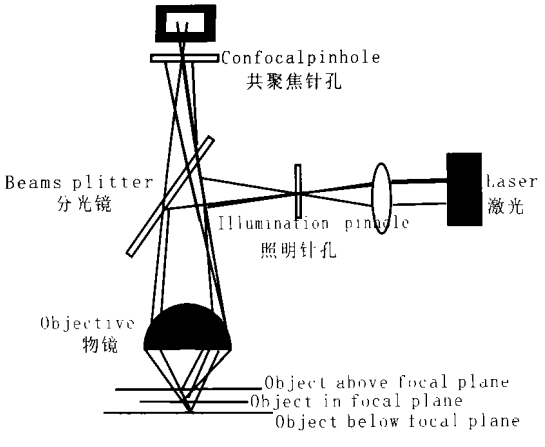

图 1　LSCM 工作原理

Fig. 1　The working principle of a laser scanning microscopy

1　LSCM 在蛋白质晶体生长研究中的应用

用 LSCM 来观察样品时需要有能产生荧光的物质(或能产生荧光的氨基酸残基)作为示踪物,并且要求样品中荧光物质浓度不应当过高,才能保持在线性响应区内。蛋白质在晶核形成和晶体生长过程中浓度是非常高的,本身具有的内源荧光不能直接应用于 LSCM 观察中,解决这一问题的方法是在蛋白质分子上用共价的方法连接上一荧光探针,该荧光探针必须不参与晶体成核和生长过程。选择合适的荧光探针的要求是荧光标记物的紫外 - 可见吸收特性、荧光发射和激发光谱、荧光寿命和荧光探针激发态的猝灭等物理性质要和原来蛋白质分子相符合[5]。

P. Mühlig 等在 2001 年首次用 LSCM 对胰岛素晶体的早期生长阶段进行了观察,样品型号为 Des-Thr30[6]。2003 年他们又用 LSCM 对型号为 Glargine 的胰岛素进行了实验[7],进一步阐明了晶体的动力学特征。实验中的晶体用改进的批量法制备:先在一个密闭容器内的盖玻片上滴入几滴蛋白质溶液(液滴为坐滴状态),几小时后,用 LSCM 观察,观察时把密闭容器倒置(此时液滴呈悬滴态),使观察视野更加明亮。LSCM 在晶体生长研究中有以下几个方面的应用:

1.1　定量测量晶体的个数

在晶体相互间隔较好阶段时,用 LSCM 观察晶体,然后推算出每平米晶体的数目,来确定晶体与胚芽之间的定量信息。通过观察可以确定出生长的蛋白质晶体的数目与溶液中所含的胚芽数目和胚芽大小的关系,并且可以观察到出现第一个晶体的时间与溶液中胚芽的存在之间的关系。

1.2　重组三维图像以获得晶体生长的过程信息

借助于 LSCM 系统,可以获得晶体样品多层面光学切面的二维图像,通过这些反差大、分辨率高的图像可得到晶体各层面的信息,利用计算机图像处理及三维重建软件将各光学切片的图像组合成一个三维图像,并且可以从任意角度观察,也可以借助改变照明角度来突出其特征,产生更生动逼真的三维效果。三维重建后的图像可以揭示晶体结构的空间关系,能测定晶体光学切片的物理特性的变化(如单个晶体的边长(edge length)和高度(height)随时间的变化),也可以对这些动态变化来进行准确的定时、定量、定性及定位分析。P. Mühlig 等用 LSCM 得到了 Des-Thr30 胰岛素单斜晶体的三维构建图像(如图 2)。图 3 为 Des-Thr30 胰岛素晶体的边长和高度随时间变化的曲线图,从图中可以看到 Des-Thr30 胰岛素晶体在长度大约 2μm 处有一明显的拐点,这一拐点揭示了晶体中台阶并聚现象出现时晶体的最小尺寸。而在 Glargine 胰岛素单斜晶体中却没有产生拐点,说明在其生长过程中没有发生宏观的台阶并聚现象。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

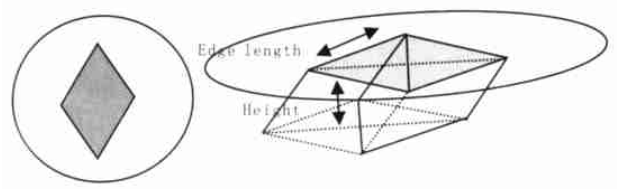

图 2 Des-Thr30 胰岛素单斜晶体的三维构建图

Fig. 2 Des-Thr30 insulin monoclinic crystallite 3-D reconstruction

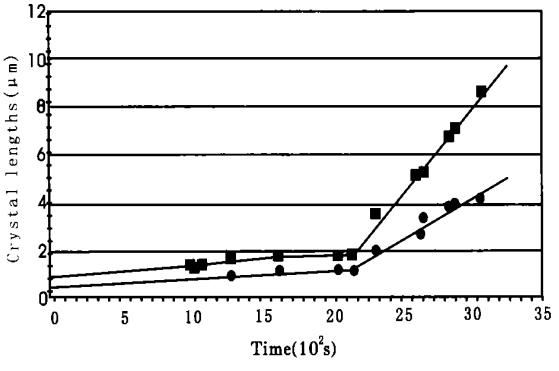

图 3 Des-Thr30 胰岛素单斜晶体长度与时间的曲线图

Fig. 3 Des-Thr30 insulin monoclinic crystallite time dependence of crystal lengths

1.3 晶体生长台阶动态变化的测定

LSCM 能对蛋白质样品进行点、线、面的二维图像扫描,测量出晶体内部台阶随时间的动态变化,直接得到台阶的切线生长速率。图 4 为 P. Mühlig 等在 2003 年用 LSCM 观察的 Glargine 胰岛素晶体(010)晶面台阶生长图。通过 LSCM 的进一步观察可以得到:Glargine 胰岛素晶体层首先在边缘产生,接着便蔓延到整个晶体面。台阶的法向速度被限定,几乎与位置无关,沿着晶体面的任何方向,台阶速度几乎保持不变,没有发生台阶并聚的现象。

另外,通过研究各种不同条件下晶体生长机理,可获得晶体生长速度和生长驱动力之间的关系,得到晶体生长动力学参数。晶体生长速度是实验和物质参数的函数,一旦选好这些参数,就可借助于现有的晶体生长动力学理论来分析判断实际晶体中的微观生长机制,也可以通过图像来判断,然后比较理论数据与实验数据相吻合的程度。

2 展望

LSCM 是近十几年来发展起来的观察与分析的图像仪器,与传统的光学显微镜相比,大大提高了分辨率,可以得到真正的高清晰度的三维的原色图像。

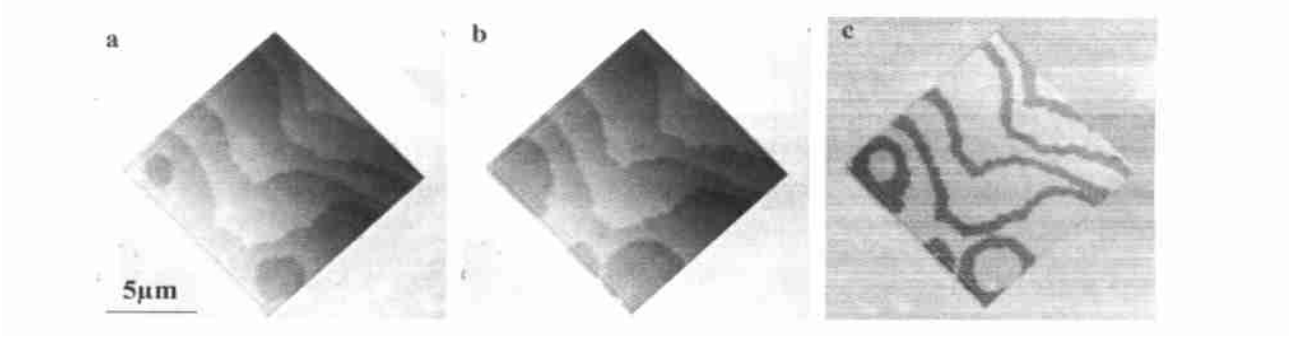

图 4 Glargine 胰岛素晶体(010)晶面的台阶变化图。a:010 晶面的层状结构图; b:a 图经过 120 秒后台阶的变化; c:a、b 图的电子减弱图,黑色条纹代表了在 120 秒内台阶的位移。

Fig. 4 CLSM image of the layer structure of the upper (001) face of a monoclinic Insulin Glargine crystalliteImage; b: was recorded 120 s after recording of image a. Image; c: is the electronic subtraction of images a and b. The black strips in c indicate the step shifting during 120 s.

但在蛋白质晶体研究领域,LSCM 技术应用尚处于初期探索阶段,我们可以利用其非介入无损伤连续光学切片、三维图像、实时动态等优势来观察嫁接了荧光探针的蛋白质分子结晶的情况,以获得其生长动力学参数,并分析晶体生长的机理。但是利用 LSCM 对晶体的成核阶段以及蛋白质晶体的缺陷结构的研究,尚未见文献。另外 LSCM 自身也需要在发展中不断完善和更新,而且它只能够用来研究蛋白质的某一方面的性质(如生长动力学),要全面了解蛋白质晶体的生长过程与机理,还必须与其它仪器,如原子力显微镜、动态光散射仪等联合使用。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

References

[1] WILLIAM W W. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth-A practical approach[J]. Journal of Structural Biology, 2003, 142(1): 56-65.

[2] ALEXANDER M C, KUZNETSOV Y G, ALEXANDER M, et al. Macromolecular crystal growth as revealed by atomic force microscopy[J]. Journal of Structural Biology, 2003, 142(1): 32-46.

[3] PETER G V, MONACO L A, ROSENBERGER F. High resolution interferometric technique for in-situ studies of crystal growth morphologies and kinetics[J]. Journal of Crystal Growth, 1995, 148(3): 289-296.

[4] TARDIER A T, CHEUNG C L, HAFNER J H, et al. Structure of the macromolecular solutions that generate crystals [J]. Journal of Crystal Growth, 2001, 232(1): 1-9.

[5] JOHN P S, ELIZABETH L F, MARC L P. Preparation and preliminary characterization of crystallizing fluorescent derivatives of chicken egg white lysozyme[J]. Journal of Crystal Growth, 2001, 232(3): 308-316.

[6] MÜHLIG P, KLUPSCH T, SCHELL U, et al. Observation of the early stage of insulin crystallization by confocal laser scanning microscopy[J]. Journal of Crystal Growth, 2001, 232(1): 93-101.

[7] MÜHLIG P, KLUPSCH T, KAULMANN U, et al. Noninvasive in situ observation of the crystallization kinetics of biological macromolecules by confocal laser scanning microscopy [J]. Journal of Structural Biology, 2003, 142(1): 47-55.

作者简介

代连花: 女,1979 年生,山东潍坊人,硕士研究生。主要从事有关蛋白质晶体生长方面研究。Tel:010-62543864; E-mal: dailianhua1979@sohu.com

Biography

DAI Lian-hua: female, born in 1979 in Weifang Shandong province, master. Major in protein crystal growth studies. Tel:010-62543864; E-mal: dailianhua1979@sohu.com

《分子光子学 ——原理及应用》简介

Molecular Photonics Fundamentals and Practical Aspects

屈晓超,张镇西

(西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室 生命科学与技术学院,中国陕西 西安 710049)

内容简介:

本书绪论回顾了分子光子学的发展历程,并概述了相关的研究领域。第一章根据光学原理、分子学理论、辐射理论和分子场与辐射场的相互作用,介绍了分子光子学的基本原理。第二章总结了光化学反应的特性。第三章讨论了受激发能量转移和光诱导电子跃迁等典型物理化学过程。第四章展示了在电场、磁场或声学场的作用下,光的散射现象和材料诱发变性。第五章介绍了由光辐射引起的光变性,并讨论了非线性光学现象和相干光谱学。

该书从分子的角度介绍了分子光子学理论、光化学作用、光物理过程,以及光和物质的相互作用等项内容,结构紧凑,内容充实。

本书引进的重要意义:

生命科学是当今世界科技发展的热点之一,光子学也是随着近代科学技术的进步而日益蓬勃发展的学科。近年来,一个以光子学与生命科学相融合的学科新分支 —生物医学光子学(Biomedical Photonics),也随着激光技术、光谱技术、显微技术以及光纤技术的发展而飞速发展起来,成为本世纪的一个研究热点。一些发达国家,如美国和日本等,一致认为光子学是电子学,光电子学发展的高级形式,是科学发展的必然与飞跃。1991 年,美国政府将光子学确定为国家发展的重点,美国国防部、能源部将它列入当前二十项关键技术 A 组的第五项。日本也在光子学领域做出巨大投资,并制定了一系列促进其发展的重大举措。德国科学家也对光子学给予了足够的重视,将它列入 21 世纪 9 大关键技术之一。

(下转第 231 页)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net