

# “活细胞内化学过程的 实时单分子显示问题”<sup>\*</sup>

## ——中国科学院生物学部组织专题研讨会

(中国科学院 北京 100864)

**关键词** 活细胞内化学过程, 实时单分子显示

受中国科学院生物学部委托, 陈宜张院士负责筹备的“活细胞内化学过程的实时单分子显示问题”研讨会于今年 5 月 31 日在上海第二军医大学召开。

会议由陈宜张院士主持。陈院士在开幕词中指出, 所有以往对细胞内分子-分子相互作用的理论及结论, 基本上都是以浓度变化和药理学效应等资料得出的, 多少属于推断性质。诚然, 大家认为这样的推断是合理和正确的。不单单是两个大分子的相互作用, 单个生物大分子在细胞内的动力学活动过程, 它的轨迹, 也仅仅是从间接测量获知的。迄今还没人看到过单个生物大分子在具体的活细胞环境下是如何运动和如何相互作用的。如果能够看到它, 必将大大推动我们对生命活动、细胞活动的认识。这是一个十分重要且令人感兴趣的问题。此次研讨会的目的, 就是使来自各个专业的专家坐到一起, 集思广益, 为解决这个问题提出办法, 或提出解决问题的思路。

在研讨会上, 大家交流了几种接近于单细胞内实时显示的技术, 这些技术本身的完善和应用研究已在国内开展起来。例如多光子荧光显微成像和多光子荧光寿命成像技术、原子显微镜探针技术以及扫描近场光学显微术、纳米生物传感技术等。

自 20 世纪 90 年代以来, 超快信息光子学、超快激光技术以及超精光电子显微术获得了迅猛的发展。人们不仅获得了超高分辨率, 实现了对于分子级至原子级的信息的检测, 而且由于共焦技术的发展实现了对隐藏在散射介质中的信息检测, 这两者致使对于活细胞中化学过程的实时单分子检测成为可能。在时空高分辨率非线性成像方面, 多光子荧光成像技术在诸多方面优于其它技术。其成像的三维定位能力好, 可达 2nm, 是一种很现实的成像方法。在中国科学院上海光学精密机械研究所, 已经利用这项技术获得了活细胞的三维图像。荧光寿命成像是利用样品荧光寿命作为像的对比度进行成像。由于荧光寿命对样品的微环境变化极为敏感, 因此可用于细胞微环境参数的成像, 染色体分子结构和组份以及蛋白质分子结构的研究, 并可用于癌症的早期诊断等。

原子力显微镜及其相关技术, 可以探测到单个生物大分子, 空间分辨率可达纳米级, 并且可以工作在生理溶液环境中。在离体环境下已可得到 DNA、蛋白质、淀粉链的高分子图像, 并且对一些慢过程(如膜蛋白在人工脂双层上的重组过程)可进行实时成像观察。用原子力显微镜还可对单个生物大分子

<sup>\*</sup> 参加会议的有: 中国科学院上海光学精密机械研究所徐至展院士, 王桂英教授; 浙江大学唐孝威院士, 沈永行教授, 郑筱祥教授; 南京大学王牧教授; 南京东南大学陆祖宏教授; 中国科学技术大学姚雪彪教授; 复旦大学杨芄原教授, 孔继烈教授, 高艳琴副教授; 上海交通大学胡钧教授; 中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所王克夷教授, 王升年教授; 中国科学院生物工程研究中心洪国藩院士; 中国科学院上海神经科学研究所吴建屏院士; 上海第二军医大学吴孟超院士, 陈宜张院士, 何成副教授; 中国科学院生物学部办公室刘峰松主任

收稿日期: 2001 年 8 月 15 日

进行操纵,用来测量生物大分子间的相互作用,蛋白折叠中的不同域(domain)之间的连接力,膜蛋白跨膜部分与膜的作用力大小等。也可以对DNA等链状分子进行精确地切割和操纵。

利用近场光学探针尖端的亚波长尺寸光源作为激发光,在液相环境下实现单分子水平的荧光激发,并研究该过程下溶液中单个荧光染料分子的扩散过程和一些光物理化学特性,可实现近场光学探针技术在溶液相单分子的检测。该技术除了适用于现有单分子检测技术的大多数应用场合以外,一个非常突出的优点是它可以应用于不透明样品内部的单分子检测分析和病毒、细胞与亚细胞结构中生命活动和生理生化反应过程的研究。近场光学探针技术在溶液相单分子分析中的应用超越了光学衍射极限的限制,进一步缩小了观察体积,提高了单分子探测实验的信噪比,同时大大简化了单分子检测的光学测量装置。

荧光共振能量转移技术(FRET)是一种已经应用于活细胞检测两类分子相互作用的最新技术,但就目前能达到的水平看,仍是两类分子,而不是两个单分子。*Molecular Endocrinology*上登载了用HTRF(homogeneous time-resolved fluorescence)技术的结果。

结合材料科学、化学、光学、生物学和检测技术的最新发展,目前已研制出尺寸在微米、纳米量级的生物传感器和生物图像传感器,可进行低创乃至无创测量。由于响应时间可缩短至毫秒级,所以可以测量细胞的瞬态突发性变化。纳米光纤生物传感器损耗小,抗腐蚀能力强,特别是纳米光纤阵列的研究成果用于生物学及细胞学的研究,制成的纳米头阵列及纳米孔阵列,使测量结果以图像的形式输出,直观、准确,分辨率高,响应时间更短。将酶或抗体固定于纳米头表面的纳米传感器,特异性高,选择性强,可监测正常生理条件下神经递质的传递过程,或细胞内物质交换过程。在讨论中,专家们还介绍了其它几种相关的技术,如流式细胞仪细胞分选技术,单细胞水平生物物质电化学分析技术,单细胞蛋白质分离和监测技术等。

就目前的研究现状来看,这些技术与单分子实时监测的应用尚有一段较大距离。但是为发展单分

子实时监测技术开拓了思路。

虽然多光子荧光成像等技术对于单分子实时监测具有良好的应用前景,但是他们自身尚不完善,还存在许多缺点。原子力显微镜方法有两大局限性:表面敏感和不能区分样品的成分,因此使得原子力显微镜对活细胞内部单分子过程无法进行检测。近场扫描成像技术,由于采用点扫描成像,故而速度不可能很快,一般在秒量级。考虑到目前各种方法存在的问题,其应用范围应加以选择,扬长避短,如需观察细胞内分子的运动状况,可考虑采用多光子荧光成像、近场光学探针技术等,而对于细胞膜上的及胞外基质中的分子运动过程可采用原子力显微技术。专家们认为,要实现活细胞中单分子实时显示,需要做的工作还很多,不仅要选择合适的生物学模型,还须不断完善现有技术,将已有的技术有机地结合起来,发挥各自的优势,弥补彼此的不足,同时还需要创造新的更好的方法。

专家们一致认为,这次讨论会的命题选得非常恰当,具有前瞻性。围绕这个问题的研究不仅将大大促进生物学的发展,而且对其它学科提出了挑战,将会极大地促进这些学科共同发展。与会的来自物理、激光领域的专家都表示,他们对生物学家提出的问题很感兴趣,希望双方有更多的交流和合作。生物学家在提出要求的同时,更重要的是提供可操作的生物模型,使在细胞、亚细胞、大分子水平上所观察到的分子活动及分子的相互作用,有重要的和基本的生物学意义。

这次讨论会在学科交叉方面的研讨是一次很好的尝试。由于提出了大家都感兴趣的问题,使各个领域的专家有了进一步交流的基础。大家认为,这种探索是非常重要的。生物学部组织的这次活动促进了各学科间的交流,从中提炼出了有意思的问题和信息。今后仍应继续组织类似的研讨会,探索各学科交叉的创新性课题。对于一个命题,很可能一次讨论会不能解决所有问题,应组织多次连续的讨论,以获得更好的效果。同时,科学院应与高等院校进一步密切联系,进行更有效的合作。