



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113008842 A

(43)申请公布日 2021.06.22

(21)申请号 201911323022.0

(22)申请日 2019.12.20

(71)申请人 中国科学院物理研究所
地址 100190 北京市海淀区中关村南三街8号

(72)发明人 侯文清 陆颖 马东飞 贺小龙
李明

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 王勇

(51)Int.Cl.
G01N 21/64(2006.01)

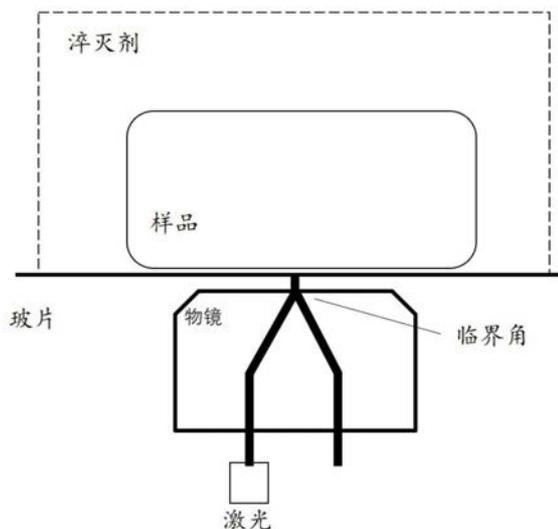
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

观察活细胞细胞膜表面及附近生物大分子的荧光成像方法

(57)摘要

本发明提供一种观察活细胞细胞膜表面及附近生物大分子的荧光成像方法。其基于荧光共振能量转移原理,使用全内反射或者共聚焦照明的照明方式对所述大分子在细胞膜径向位移进行测量。所述方法包括特定荧光供体受体的配对规则,对活体细胞的荧光标记方案以及对测定数据的计算过程。本发明能够以较高时间和空间分辨率在亚纳米尺度观察细胞膜及细胞膜附近生物分子的运动状态与构象变化,同时不破坏细胞膜,能够保持对活体细胞的观测,其次本发明能够高通量快速地完成膜受体相关药物的筛选。



1. 一种原位观察细胞膜及其附近生物大分子的方法, 其中包括如下步骤:

步骤1、基于待观测的荧光供体选择符合FRET特征的淬灭剂作为荧光受体, 其中选择所述淬灭剂使其无法自发扩散进入细胞膜内部;

步骤2、使用所述荧光供体标记待观测的生物大分子, 记录其原始荧光寿命 τ_D 或原始荧光强度 I_D ;

步骤3、模拟计算得到某一浓度的所述淬灭剂作用于所述荧光供体时R与 I_{DA}/I_D 的关系, 或者R与 τ_{DA}/τ_D 的关系, 其中R是所述淬灭剂与荧光供体的距离, I_{DA} 是测定的受所述淬灭剂作用的荧光供体的荧光强度, τ_{DA} 是测定的受所述淬灭剂作用的荧光供体的荧光寿命;

步骤4、用所述浓度的淬灭剂与标记有荧光标记生物大分子的细胞膜进行接触并记录所述荧光标记生物大分子的荧光信息, 根据步骤3所确定的关系确定所述荧光标记生物大分子在所述细胞膜表面的径向距离;

其中, 步骤1和步骤2顺序为任意的。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述淬灭剂对被观察细胞不具有细胞毒性。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中步骤1中, 选择所述荧光供体, 使得标记的待观测的生物大分子只具有单一荧光寿命峰值。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中步骤3包括:

步骤301, 获得所述浓度值下淬灭剂荧光吸收谱 $F_D(\lambda)$ 和供体荧光发射谱 $E_A(\lambda)$;

步骤302, 根据 $F_D(\lambda)$ 和 $E_A(\lambda)$ 计算单个所述供体分子与受体分子之间的荧光共振能量转移距离常数 R_0 , 其中所述计算采用如下公式:

$$R_0^6 = \frac{9 \cdot (\ln 10) \cdot \kappa^2 \cdot Q_D \cdot \epsilon_A \cdot J(\lambda)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4}$$

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) E_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda;$$

其中, Q_D 为供体量子产率, n 为介质的折射率, κ^2 是两个荧光分子之间的偶极取向因子, ϵ_A 是受体最大的消光系数, $J(\lambda)$ 为归一化的供体发射光谱 F_D 与受体吸收光谱 E_A 的光谱重合系数;

步骤303, 如果 R_0 处于0.1-20nm范围内, 使用计算机模拟一定体积的所述浓度的淬灭剂分子, 得到R与 I_{DA}/I_D 的关系, 或者R与 τ_{DA}/τ_D 的关系, 其中所述计算机模拟是以荧光共振能量转移原理的以下公式为基础而构建:

$$\tau_{DA} = \frac{\tau_D}{1 + (R_0/R)^6}$$

$$I_{DA} = \frac{I_D}{1 + (R_0/R)^6}$$

如果 R_0 在0.1-20nm范围之外, 回到步骤1。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中观测在细胞膜外侧小叶上的生物大分子运动时, R_0 需要处于1-5nm范围内; 观测在细胞膜内侧小叶上的生物大分子运动时, R_0 需要处于4-8nm范围内; 观测在细胞膜内的生物大分子运动时, R_0 需要处于7-20nm范围内。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中步骤4所述的记录生物大分子荧光信息是使用荧光共聚焦显微镜记录所述荧光标记生物大分子的荧光信息, 其中所述显微镜的激光器为皮秒

脉冲激光器,接收器为单光子探测器,计数器为时间相关单分子计数卡。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述步骤4是使用全内反射显微镜记录单个生物大分子的荧光信息,步骤4包括:

步骤401,使用所述荧光标记生物大分子对所述细胞膜进行标记;

步骤402,使所述淬灭剂与所述细胞膜进行接触;

步骤403,使用全内反射显微镜对观测目标之外的荧光标记生物大分子进行光漂白,并记录待观测单个荧光标记生物大分子的荧光强度信息;

步骤404,根据步骤3所述关系,由所述单个荧光标记生物大分子的荧光强度信息计算其在细胞膜表面的径向距离。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述全内反射显微镜使用电荷耦合器件图像传感器记录所述单个荧光标记生物大分子的荧光强度信息。

9. 根据权利要求7或8所述的方法,其中所述荧光标记生物大分子的荧光标记量小于等于 10^{-12} 个/ m^2 ,并且所述显微镜的全反射光场照明深度在进行所述光漂白时小于等于50nm,在记录所述荧光强度信息时大于100nm。

10. 根据权利要求1所述的方法,还包括:在步骤4得到所述荧光标记生物大分子在所述细胞膜表面的径向距离后,基于所述距离进行分布统计,得到其在空间上或者在时间上的在细胞膜表面及附近的运动信息。

观察活细胞细胞膜表面及附近生物大分子的荧光成像方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用荧光成像方法观察生物大分子的技术领域,具体地说,本发明涉及一种原位观察活细胞的细胞膜内及细胞膜表面的大分子构象及位置变化的荧光成像方法。

背景技术

[0002] 细胞膜是将细胞与外界环境分割开的选择透过性屏障,它控制着信息的流动和物质的进出,膜蛋白是很多药物的靶标。推进膜相关过程的研究依赖于能够测量膜中生物分子位置和构象变化的新技术。大多数膜相关过程发生在细胞膜内(插膜)或膜附近十纳米范围内。

[0003] 现有技术通常使用荧光方法原位观察活细胞内生物分子构象变化与运动,步骤包括:1)将正常状态的细胞培养并接种到培养皿、多孔板或微流体孔道中;2)对细胞内的目标生物分子进行荧光标记(在细胞体外荧光标记之后将荧光分子导入体内或细胞内原位表达并标记荧光);3)使用全内反射荧光显微镜,膺全内反射荧光显微镜,共聚焦显微技术,落射荧光显微镜、结构光照明显微镜或受激发射损耗荧光显微技术等荧光观察方法观察细胞内荧光标记分子。由于光的衍射效应的存在,可见光范围内的荧光显微镜 x 、 y 方向分辨率只能达到约250纳米, z 方向分辨率约为900纳米。即使使用更精确的结构光照明或STED显微技术观察细胞,也只能将荧光显微镜的分辨率提高到几十纳米。然而,细胞膜的厚度仅为4.5纳米左右,原位观察活细胞膜及其周围纳米范围的分子运动十分困难。

[0004] 现有技术中已知的荧光共振能量转移(FRET)是一种高精度的光谱尺,是解决光学显微镜衍射极限的方法之一,可以用来探测亚纳米级别的供体的运动,荧光共振能量转移指的是当两个荧光基团离得足够近时,只激发其中一个荧光基团A,另一个荧光基团B会接收到非辐射能量,从A的荧光强度可以判断A、B两个荧光基团的间距,其空间分辨率可以达到纳米量级。但荧光共振能量转移方法要求受体的位置完全已知,只能用来简单的观察两个分子之间点对点的距离,这在流动的活细胞膜上很难实现,在膜体系中,由于膜存在流动性,膜上的分子沿着膜表面的切向会不断扩散运动,而真正与膜功能相关的分子运动是沿着膜的法向(即径向)的,在这种情况下常规的FRET方法无法有效得出该分子距离膜表面法向距离的变化。

[0005] 现有技术中的电子显微镜具有较高分辨率,但是其通常只能在低温或真空环境观察固定的细胞样品,所以无法对活体细胞直接进行观测。

发明内容

[0006] 因此,本发明的目的是提供一种原位观察活细胞膜及其附近生物大分子构象及位置变化的方法,来有利地克服现有技术的上述缺点和不足。

[0007] 本发明是基于荧光共振能量转移原理FRET,其中,供体与受体间的能量转移效率E定义为:

$$[0008] \quad E = \frac{1}{1+(R/R_0)^6} \quad (1)$$

$$[0009] \quad R_0^6 = \frac{9 \cdot (\ln 10) \cdot \kappa^2 \cdot Q_D \cdot \varepsilon_A \cdot J(\lambda)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4} \quad (2)$$

$$[0010] \quad J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) E_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

$$[0011] \quad \tau_D = 1/k_D \quad (4)$$

$$[0012] \quad \tau_{DA} = \frac{\tau_D}{1+(R_0/R)^6} \quad (5)$$

[0013] 其中R为两荧光探针间的距离，R₀为特征淬灭距离，转移效率E为50%时所对应的距离。由于供受体间距离R与转移效率E之间是六次方反比关系，因此E对空间距离十分敏感，这也是荧光共振转移可以用来测量纳米量级距离的原因。R₀是由偶极近似计算得到，其中，Q_D为供体量子产率，n为介质的折射率，κ²是两个荧光分子之间的偶极取向因子，ε_A是受体最大的消光系数，J(λ)为归一化的供体发射光谱F_D与受体吸收光谱E_A的光谱重合系数，k_D表示供体分子荧光发射速率。

[0014] 基于以上原理，本发明提供了一种原位观察细胞膜及其附近生物大分子的方法，包括如下步骤：

[0015] 步骤1、基于待观测的荧光供体选择符合FRET特征的淬灭剂作为荧光受体，其中所述淬灭剂是无法自发扩散进入细胞膜内部的淬灭剂；

[0016] 步骤2、使用所述荧光供体标记待观测的生物大分子，记录其原始荧光寿命τ_D及原始荧光强度I_D；

[0017] 步骤3、模拟计算得到某一浓度的所述淬灭剂作用于所述荧光供体时R与I_{DA}/I_D的关系，或者R与τ_{DA}/τ_D的关系，其中R是所述淬灭剂与荧光供体的距离，I_{DA}是测定的受所述淬灭剂作用的荧光供体的荧光强度，τ_{DA}是测定的受所述淬灭剂作用的荧光供体的荧光寿命；

[0018] 步骤4、用所述浓度的淬灭剂与标记有荧光标记大分子的细胞膜进行接触并记录所述荧光标记大分子的荧光信息，根据步骤3所述关系确定所述荧光标记大分子在所述细胞膜表面的径向距离；

[0019] 其中，步骤1和步骤2顺序可以互换。

[0020] 作为上述方法的优选，步骤3包括：

[0021] 步骤301，获得所述浓度值下淬灭剂荧光吸收谱F_D(λ)和供体荧光发射谱E_A(λ)；

[0022] 步骤302，根据F_D(λ)和E_A(λ)计算单个所述供体分子与受体分子之间的荧光共振能量转移距离常数R₀，其中所述计算采用如下公式：

$$[0023] \quad R_0^6 = \frac{9 \cdot (\ln 10) \cdot \kappa^2 \cdot Q_D \cdot \varepsilon_A \cdot J(\lambda)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4}$$

$$[0024] \quad J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) E_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda;$$

[0025] 其中，Q_D为供体量子产率，n为介质的折射率，κ²是两个荧光分子之间的偶极取向因子，ε_A是受体最大的消光系数，J(λ)为归一化的供体发射光谱F_D与受体吸收光谱E_A的光谱重合系数；

[0026] 步骤303，如果R₀处于0.1-20nm范围内，使用计算机模拟一定体积的所述浓度的淬灭剂分子，得到R与I_{DA}/I_D的关系，或者R与τ_{DA}/τ_D的关系，其中所述计算机模拟是以荧光共振

能量转移原理的以下公式为基础而构建：

$$[0027] \quad \tau_{DA} = \frac{\tau_D}{1 + (R_0/R)^6}$$

$$[0028] \quad I_{DA} = \frac{I_D}{1 + (R_0/R)^6}$$

[0029] 如果 R_0 在0.1-20nm范围之外，回到步骤1。

[0030] 作为本发明的一个优选方案，其中所述淬灭剂是不具有细胞毒性的淬灭剂。

[0031] 作为本发明的另一个优选方案，其中步骤1中所述荧光供体标记的待观测的生物大分子只具有单一荧光寿命峰值。

[0032] 作为本发明的另一个优选方案，其中观测在细胞膜外侧小叶上的大分子运动时， R_0 需要处于1-5nm范围内；观测在细胞膜内侧小叶上的大分子运动时， R_0 需要处于4-8nm范围内；观测在细胞膜内的大分子运动时， R_0 需要处于7-20nm范围内。

[0033] 作为本发明的另一个优选方案，其中步骤4所述的记录大分子荧光信息是使用荧光共聚焦显微镜记录所述荧光标记大分子的荧光信息，其中所述显微镜的激光器为皮秒脉冲激光器，接收器为单光子探测器，计数器为时间相关单分子计数卡。

[0034] 作为本发明的再一个优选方案，其中所述步骤4是使用全内反射显微镜记录单个大分子的荧光信息，步骤4包括：

[0035] 步骤401，使用所述荧光标记大分子对所述细胞膜进行标记；

[0036] 步骤402，使所述淬灭剂与所述细胞膜进行接触；

[0037] 步骤403，使用全内反射显微镜对观测目标之外的荧光标记大分子进行光漂白，并记录待观测单个荧光标记大分子的荧光强度信息；

[0038] 步骤404，根据步骤3所述关系，由所述单个荧光标记大分子的荧光强度信息计算其在细胞膜表面的径向运动信息。

[0039] 在上述方法中的进一步优选，其中所述全内反射显微镜使用电荷耦合器件图像传感器记录所述单个荧光标记大分子的荧光强度信息。

[0040] 作为上述方法的又一个优选方法，其中所述荧光标记大分子的荧光标记量小于等于 10^{-12} 个/ m^2 ，并且所述显微镜的全反射光场照明深度在进行所述光漂白时小于等于50nm，在记录所述荧光强度信息时大于100nm。

[0041] 本发明的有益效果：

[0042] 1、本发明的基于FRET原理的原位观察活细胞膜及其附近生物大分子构象变化与运动的方法能够大幅提高观察沿细胞膜法线方向荧光标记分子运动的分辨率，从而能够观察细胞膜及其附近的荧光标记大分子的亚纳米级别运动细节。

[0043] 2、本发明能够以较高时间和空间分辨率在不破坏细胞膜的前提下观察细胞膜内侧分子运动细节；

[0044] 3、本发明能够高通量快速地完成膜受体相关药物的筛选。

附图说明

[0045] 以下附图被并入说明书中并构成本说明书的一部分，示出了符合本发明的实施

例,其仅是示例性和解释性的,并不限制本发明。在附图中:

[0046] 图1示出了本发明使用蒙特卡洛方法计算荧光强度/寿命与淬灭剂-供体距离R的示意图

[0047] 图2示出了本发明计算获得的不同淬灭剂浓度下荧光强度/寿命与淬灭剂-供体距离R的关系曲线。

[0048] 图3a示出了使用共聚焦荧光显微镜观察细胞内荧光寿命的示意图。

[0049] 图3b示出了本发明在图3a基础上添加淬灭剂并观察细胞内荧光寿命的示意图。

[0050] 图4示出了本发明荧光寿命观察结果的一种数据处理方案示意图

[0051] 图5a示出了使用全内反射荧光显微镜观察细胞内荧光强度的示意图。

[0052] 图5b示出了本发明在图5a基础上添加淬灭剂并观察细胞内荧光强度的示意图。

[0053] 图5c示出了本发明将全内反射荧光显微镜调整为pseudo TIRF光场的示意图。

具体实施方式

[0054] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。本领域技术人员在本发明构思的基础上可以对本发明实施例中的部件、参数等进行适当调整,基于本发明中的实施例,本领域技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。在其它情况下,不详细示出或描述公知方法、装置、实现或者操作以避免模糊本发明的各方面。

[0055] 此外,所描述的特征、结构或特性可以以任何合适的方式结合在一个或更多实施例中。在下面的描述中,提供许多具体细节从而给出对本发明的实施例的充分理解。然而,本领域技术人员将意识到,可以实践本发明的技术方案而没有特定细节中的一个或更多,或者可以采用其它的方法、组元、装置、步骤等。在其它情况下,不详细示出或描述公知方法、装置、实现或者操作以避免模糊本发明的各方面。实施例中的流程仅是示例性说明,不是必须包括所有的内容和操作/步骤,也不是必须按所描述的顺序执行。例如,有的操作/步骤还可以分解,而有的操作/步骤可以合并或部分合并,因此实际执行的顺序有可能根据实际情况改变。

[0056] 本发明可以在活体细胞膜表面以及附近观测大分子的径向运动信息,为了达到这一目的,本发明基于荧光共振能量转移原理,首先将待观测的大分子用荧光供体进行标记;然后将其作为整体标记在待观测的活体细胞膜表面附近以及细胞膜内;其次将某一浓度的淬灭剂作为受体加入待观测细胞样品,由于本发明所采用的淬灭剂具有无法自发进入细胞膜内部的特征,所以其在细胞膜表面分布;此后,通过观测技术测得所述荧光标记的大分子的荧光信息,就可以基于荧光共振能量转移原理计算出该荧光标记的大分子距离细胞膜表面的距离,以及该距离随着时间,空间的演化或弛豫信息,以及诸如此类信息,从而实现对接体细胞的细胞膜附近大分子运动信息的高空间分辨率以及高时间分辨率的观测。

[0057] 实施例1

[0058] 本实施例由荧光寿命信息测量目标药物作用下细胞膜表面及其附近生物大分子的运动信息。使用Liss-Rhod-PE(一种绿色荧光标记的磷脂大分子)标记人肺癌上皮细胞A549细胞膜,在细胞膜外侧添加溶解有5mM(物质的量,毫摩尔)蓝色葡聚糖(Blue

Dextran-5) (淬灭剂) 的无色 DMEM培养基, 目的是为了计算该绿色荧光标记的磷脂大分子的集群或者个体在活体细胞膜表面附近的径向运动。本实施例使用荧光寿命显微镜观察磷脂双分子层结构的细胞膜表面, 可以观察到其内外两侧的绿色荧光标记的磷脂大分子的荧光存在两种不同的荧光寿命分布, 由此可以结合所记录的荧光寿命计算出该磷脂大分子的径向运动信息, 其具体步骤如下:

[0059] 步骤1, 基于待观测的荧光供体选择荧光受体即淬灭剂。其中, 淬灭剂属于荧光共振能量转移方法中的一种不发出荧光的受体类型, 当供体靠近淬灭剂的时候, 供体荧光强度会随着与淬灭剂之间的距离变化而变化。除了一般性的基于FRET原理的荧光供体受体挑选规则, 基于本发明的一个实施例中, 所述的淬灭剂附加的选择规则是:

[0060] 1) 淬灭剂无法自发扩散进入细胞膜内部, 其中按照本领域内已知的对淬灭剂扩散性质的常规认知理解, “无法自发扩散进入细胞膜内部” 指的是所述淬灭剂的大于90%的组份无法进入细胞膜内部, 优选的所述淬灭剂的大于95%的组份无法进入细胞膜内部; 更优选的所述淬灭剂的大于99%的组份无法进入细胞膜内部; 更优选所述淬灭剂的大于99.9%的组份无法进入细胞膜内部。

[0061] 2) 淬灭剂无细胞毒性 (术语“无细胞毒性”是本领域内已知的术语, 并在本文包括有不影响细胞正常生理状态和功能的含义)。

[0062] 本实施例中, 基于以上规则选定蓝色葡聚糖 (Blue Dextran-5) 作为优选的淬灭剂。

[0063] 步骤2, 使用预先选定的荧光供体标记待观测的大分子, 记录其原始荧光寿命及原始荧光强度信息, 作为优选的实施例, 还需要确定荧光分子 (供体) 具有单个荧光寿命峰值。本实施例中使用选定的绿色荧光 (供体) Liss-Rhod标记的磷脂大分子Liss-Rhod-PE对人肺癌上皮细胞A549细胞膜进行标记, 在不添加淬灭剂的前提下, 观察并保证该荧光分子的荧光寿命只有一个明显的峰值, 否则重新选择新的荧光分子。在确定荧光分子可用之后, 记录其测得的荧光寿命和荧光强度值作为原始荧光寿命 τ_D (即未添加淬灭剂时的荧光寿命) 以及原始荧光强度 I_D 。

[0064] 其中, 计算荧光分子的荧光寿命和荧光强度过程如下: 使用荧光共聚焦显微镜搭载的荧光寿命显微镜组件观察细胞, 荧光共聚焦显微镜搭载皮秒脉冲激光器以及单光子计数器 (TCSPC), 通过脉冲激光激发荧光分子并使用单光子计数器记录激发光与发射光的时间间隔, 对时间间隔进行记录并统计得到衰减曲线 (decay curve), 取衰减曲线的二分之一高度对应时间 (ns 或ps量级) 作为荧光分子的荧光寿命, 荧光强度可由单光子计数器直接得到。

[0065] 步骤3, 在某一淬灭剂浓度下, 计算并且判断荧光共振能量转移距离常数 R_0 是否在0.1-20nm范围之内, 并模拟计算该荧光供体Liss-Rhod与淬灭剂蓝色葡聚糖的间距 R 和测得荧光强度 I_{DA} 与原始荧光强度 I_D 的比值 I_{DA}/I_D 的关系, 以及所述荧光供体-淬灭剂间距 R 和测得荧光寿命 τ_{DA} 与原始荧光寿命 τ_D 比值 τ_{DA}/τ_D 的关系。该步骤包括:

[0066] 1) 使用荧光光度计检测所述浓度值下淬灭剂蓝色葡聚糖的光谱吸收曲线, 具体为将被检测的蓝色葡聚糖溶液加入比色皿, 使用荧光光度计扫描被测溶液 ($\lambda=350-800\text{nm}$) 的吸收谱, 而供体Liss-Rhod荧光发射谱可从该试剂的产品信息中 (或生产公司) 获取。

[0067] 2) 将供体荧光发射谱与淬灭剂吸收谱绘制于同一坐标系中, 对二者重叠部分进行

积分,结合公式(2)和(3)计算得到单个供体分子与受体分子之间的荧光共振能量转移距离常数 R_0 , R_0 的取值范围需要在0.1-20 nm之内,否则需要回到步骤1和步骤2重新挑选受体。其中优选的,在本发明的另一实施例中,观察细胞膜外侧小叶上生物分子运动时,需要保证 R_0 处于2-4nm范围;观察细胞膜内侧小叶上生物分子运动时,需要保证 R_0 处于5-7nm范围;如果被观察对象位于细胞膜内(比如G蛋白偶联受体的C末端),需要保证 R_0 大于8nm。

[0068] 3)如图1所示,使用蒙特卡洛方法(也可以采用常规可用的其他模拟方法如分子动力学方法等)模拟一个 $100 \times 100 \times 100$ nm体积内的蓝色葡聚糖淬灭剂分子集团(淬灭剂分子个数取决于使用的淬灭剂浓度),并且计算该体积的蓝色葡聚糖淬灭剂分子作为整体对绿色荧光供体分子 Liss-Rhod的淬灭能力,其中该供体分子Liss-Rhod到该立方体积的最近邻表面的最短距离(垂直距离)为 R 。由模拟得到前述的该淬灭剂浓度下, R 与 I_{DA}/I_D 的关系,或者 R 与 τ_{DA}/τ_D 的关系,其中 I_{DA} 是受所述淬灭剂蓝色葡聚糖作用的荧光供体分子Liss-Rhod的荧光强度, τ_{DA} 是受所述淬灭剂作用的荧光供体分子Liss-Rhod的荧光寿命,其中所述计算机模拟是以荧光共振能量转移原理的以下公式为基础而构建:

$$[0069] \quad \tau_{DA} = \frac{\tau_D}{1 + (R_0/R)^6}$$

$$[0070] \quad I_{DA} = \frac{I_D}{1 + (R_0/R)^6}$$

[0071] 图2示出了三种淬灭剂浓度下得到的该曲线关系。

[0072] 步骤4,用所述浓度的淬灭剂蓝色葡聚糖与标记有荧光标记大分子的细胞膜进行接触并记录所述荧光标记大分子的荧光信息,根据步骤3所述关系确定所述荧光标记大分子在所述细胞膜表面的径向距离,以及以此径向距离为基础的所述大分子在时间以及空间内的相关分布信息。该步骤包括:

[0073] 1)使用选定的荧光供体Liss-Rhod对该磷脂大分子进行荧光标记,并将该荧光标记的大分子标记在人肺癌上皮细胞A549细胞膜细胞膜附近。所使用的方法包括但不限于公知的电转法,囊泡包载法以及转染表达法。其中电转法是通过在细胞外加交流电压将蛋白质或DNA导入细胞的方法;囊泡包载法是通过将目标分子包裹进细胞,再将囊泡与细胞融合从而将目标分子导入细胞的方法;转染表达法是将质粒导入细胞使细胞自己生产标记荧光的蛋白质的方法。

[0074] 2)使淬灭剂与该细胞膜进行接触。将所述浓度值的淬灭剂溶解在培养基中,之后将上一步生成的经荧光标记的细胞培养基换成溶解有淬灭剂的培养基,使淬灭剂与细胞膜外侧进行接触。

[0075] 3)如图3所示,使用荧光共聚焦显微镜确定细胞膜位置,测量磷脂大分子荧光寿命。其中图3a作为参照,示出了未添加淬灭剂的荧光共聚焦显微镜观测荧光大分子的示意图;图3b作为本发明的一个实施例中添加淬灭剂后使用荧光共聚焦显微镜观测荧光大分子的示意图。可以使用与该供体或受体光谱距离较远(不产生干扰)的细胞膜标记物将细胞膜染色以便于确定细胞膜位置,将荧光共聚焦显微镜的激发光设置为皮秒激光(脉冲光),使用荧光共聚焦显微镜的时间相关单光子计数卡记录荧光标记的大分子的空间坐标信息,荧光强度以及激发光与发射光的时间间隔,从而记录该荧光标记的大分子的荧光寿命和荧光

强度在空间的分布,随时间的变化,不同荧光的共定位关系等等关键信息,其中荧光寿命计算过程如下:通过对所述的时间间隔进行记录并统计得到衰减曲线,取衰减曲线的二分之一高度对应的时间(ns或ps量级)作为荧光分子的荧光寿命。

[0076] 其中,细胞内的荧光标记量应该控制在在 10^{-11} 至 10^{-15} 个/ m^2 量级,通常,细胞内荧光标记量处于 10^{-11} 至 10^{-12} 个/ m^2 量级时,无法通过区分单个荧光分子荧光强度判断其所处位置,因此本实施例使用荧光共聚焦显微镜搭载荧光寿命显微镜组件 (FLIM) 对整个细胞或组织进行观察以及数据记录 (使用奥林巴斯公司的共聚焦显微镜,搭载有荧光寿命显微镜组件 PicoQuant)。

[0077] 4) 计算荧光分子标记的磷脂大分子在细胞膜表面的径向运动信息。由于淬灭剂均匀分布在细胞膜外表面,所以在细胞膜表面的径向方向 (这里径向方向等同于法向方向,指垂直于细胞膜的该微小表面方向),如果该生物大分子距离淬灭剂足够近,相较于未接近淬灭剂状态下的荧光寿命,其标记荧光寿命会变短,其实际关系由步骤3通过蒙特卡洛或者类似的模拟手段给出的荧光供体-淬灭剂间距R和测得的荧光寿命与原始荧光寿命比值 τ_{DA}/τ_D 的关系来确定,进而通过单/双指数分析法可计算处理多个生物大分子的距离最近淬灭剂 (即细胞膜外表面) 的径向距离,对所述多个距离数据进行分类,获得大分子在细胞膜表面的位置分布以及其随时间的变化,即完成了对该荧光标记磷脂大分子径向运动信息的观测。

[0078] 图4给出了指数分析法的示意图,左侧为双(多)指数分析法示意图,右侧为单指数分析法示意图。指数分析法是使用极大似然法对荧光寿命显微镜得到的衰减曲线进行拟合,判断该衰减曲线符合单指数分布或是双指数分布,然后计算对应的指前因子以及指数项参数,将单指数或双指数的分析分析结果聚类,可以得到荧光寿命具体组份信息,适用于对大量待测大分子径向运动信息的数据分布以及组分分类进行分析。另外当所述荧光标记分子在细胞膜及其附近有大于3个偏好位置时,使用指数分析的方法很难有效得出有较高置信度的分子位置信息,需要适当调低荧光标记密度使每个像素点在1ms内只能观察到一个荧光分子,然后对每个像素点的荧光寿命进行单指数分析,并对分析结果进行统计;当每个像素点内荧光分子数量不足以在1ms内得到足够光子数时,将该测量点相邻的多个像素内信息封装(bin)在一起作为新的单个像素单元 (即降低分辨率),重复上述分析方法。

[0079] 步骤5,测量待测药物对该磷脂大分子的作用信息。该步骤包括:

[0080] 1) 将步骤4中的由荧光标记磷脂大分子标记过的人肺癌上皮细胞接种在多孔板内。

[0081] 2) 向多孔板内各位置添加待测梯度药物 (即一系列不同浓度的该药物样品)。

[0082] 3) 重复步骤4的测量步骤2)、3)、4),测得在该药物作用条件下,该荧光标记的磷脂大分子在该细胞膜表面的径向位置以及位移量。

[0083] 这里所测量的药物对该磷脂大分子的作用信息可以是添加药物之后,磷脂大分子的任何可测量的径向运动,例如未添加药物之前,该磷脂大分子插膜深度为2nm,添加药物之后该磷脂大分子插膜深度变为5nm;又例如该磷脂大分子插膜深度变浅;又例如该磷脂大分子在细胞膜上或者附近发生径向的振荡,以及诸如此类,其在细胞膜径向计算磷脂大分子移动的精度可以达到亚纳米级别。

[0084] 实施例2

[0085] 本实施例由荧光强度信息观测细胞膜磷脂双分子层附近的荧光标记的单个的人源抗菌肽大分子的运动信息。本实施例使用5nM四甲基罗丹明(一种绿色荧光分子)标记的人源抗菌肽LL-37, 侵染人肺癌上皮细胞 A549细胞膜, 在细胞膜外侧添加溶解有5mM蓝色葡聚糖(Blue Dextran-5 等)淬灭剂的无色DMEM培养基, 目的是为了计算该人源抗菌肽LL-37的单个大分子在活体细胞膜表面附近的径向运动。观测时荧光分子标记量以1个 $1\mu\text{m}^2$ 的区域中不能超过1个荧光分子为准(即 10^{-12} 个/ m^2), 其确定过程通过全内反射显微镜(TIRF)实现, 例如观察1个 $1\mu\text{m}^2$ 的区域, 如果该区域内荧光分子大于1个, 其荧光淬灭曲线将是多个阶梯状, 此时即需要使荧光分子密度降低。

[0086] 本实施例的步骤1至3与实施例1的步骤1至3类似:

[0087] 步骤1、基于待观测的荧光供体选择符合FRET特征的淬灭剂作为荧光受体, 其中所述淬灭剂是无法自发扩散进入细胞膜内部的淬灭剂, 并且没有细胞毒性;

[0088] 步骤2、确认由所述荧光供体标记的大分子只具有单一荧光寿命峰值, 并记录其荧光强度信息, 否则回到步骤1;

[0089] 步骤3、在某一淬灭剂浓度下, 模拟计算所述荧光供体与淬灭剂间距 R 和测得荧光强度 I_{DA} 与原始荧光强度 I_D 的比值 I_{DA}/I_D 的关系;

[0090] 本实施例的步骤4针对单个由荧光分子标记的人源抗菌肽大分子在细胞膜表面的运动信息进行测量, 包括:

[0091] 1) 使用荧光标记的待观测人源抗菌肽大分子对细胞膜及附近进行标记。将人源抗菌肽LL-37侵染的人肺癌上皮细胞接种在可以使用全内反射显微镜观测操作的玻璃底面容器内, 培养24小时并使用四甲基罗丹进行荧光标记, 所用方法包括但不限于前文所述的电转法、囊泡包载法、转染表达法或其他方法。

[0092] 作为优选的实施例, 还需要确认所使用的荧光分子是否符合单分子荧光条件, 单分子荧光条件指单个荧光分子荧光强度较高、不易被激光漂白、荧光分子荧光强度较为稳定, 所述荧光分子标记量应不超过 10^{-12} 个/ m^2 , 否则重新回到步骤1-3重新选择新的供体受体。

[0093] 2) 使淬灭剂与该细胞膜进行接触。将前述的一定浓度值的淬灭剂蓝色葡聚糖-5溶解在培养基中, 之后将上一步生成的经荧光标记的细胞培养基换成溶解有淬灭剂蓝色葡聚糖-5的培养基, 使蓝色葡聚糖-5与人肺癌上皮细胞膜外侧进行接触。

[0094] 3) 如图5所示, 使用荧光共聚焦显微镜确定细胞膜位置, 测量人源抗菌肽大分子的荧光强度。其中图5a作为参照, 示出了未添加淬灭剂的全内反射显微镜观测荧光大分子的示意图; 图5b作为本发明的一个实施例中添加淬灭剂后使用全内反射显微镜观测荧光大分子的示意图。

[0095] 使用全内反射显微镜确定该细胞膜位置, 记录单个人源抗菌肽大分子荧光强度信息。本实施例中荧光标记量小于等于 10^{-12} 个/ m^2 , 可以使用全内反射显微镜进行单个人源抗菌肽大分子荧光观察, 其精度相比于实施例 1所使用的共聚焦荧光显微镜更高。首先将全内反射场调至光场深度为玻片表面小于等于50nm范围, 将玻片表面的杂质荧光以及没有被完全导入细胞的荧光标记的荧光使用光漂白的方式照射至样本荧光强度显著降低, 然后将全内反射场调至光场照明深度大于等于100nm, 调节全内反射显微镜反射角, 将光场调成pseudo TIRF场, 如图5c所示; 观察并记录细胞膜及其附近待观测单分子荧光信号的录像数

据,包括该大分子的空间坐标信息,荧光强度信息以及其随时间的变化值;其中,记录所述荧光强度信号使用的是电荷耦合器图像传感器(CCD)。在采集单个大分子信号时,CCD温度应降至 -80°C 。

[0096] 由于细胞膜的磷脂双分子层厚度很薄(约4-6nm范围),细胞膜表面以及细胞膜内,细胞膜外的荧光强度,位置坐标等信息可以被CCD传感器同时采集到。

[0097] 4) 计算荧光分子标记的待观测单个人源抗菌肽大分子在细胞膜表面的径向位置以及位移量。首先将前一步骤所述CCD传感器的录像数据导入追踪软件(这里采用由美国国立卫生研究院开发的图像处理软件 ImageJ),然后追踪锁定某一个待测人源抗菌肽大分子的轨迹,接着记录该单个人源抗菌肽大分子的荧光强度随着时间的变化以及其在空间的轨迹分布,并且采用与实施例1步骤4相同的计算方法,根据淬灭剂在前述的某一浓度下荧光供体-淬灭剂间距 R 与荧光强度与荧光原始强度比值的的关系得到该大分子在细胞膜径向的位移随着时间的变化以及相关的该大分子在空间的位置变化情况等等信息。即完成该荧光标记的人源抗菌肽 LL-37大分子在人肺癌上皮细胞A549细胞膜附近的运动构像变化信息观测,其在细胞膜径向计算大分子移动的精度可以达到亚纳米级别。

[0098] 以上内容仅为本发明的具体实施例,还可以针对其它目标大分子或者目标药物选择相应的供体-受体配对,以及使用其他可替代的测试仪器,模拟方法和数据分析方法进行本发明所述的在活体细胞膜表面以及附近的运动构像观测计算,对于本领域的普通技术人员,依据本发明的思想,很容易对某些具体实施方式及应用范围做些改动或调整,本说明书的内容不应理解为对本发明的限制。

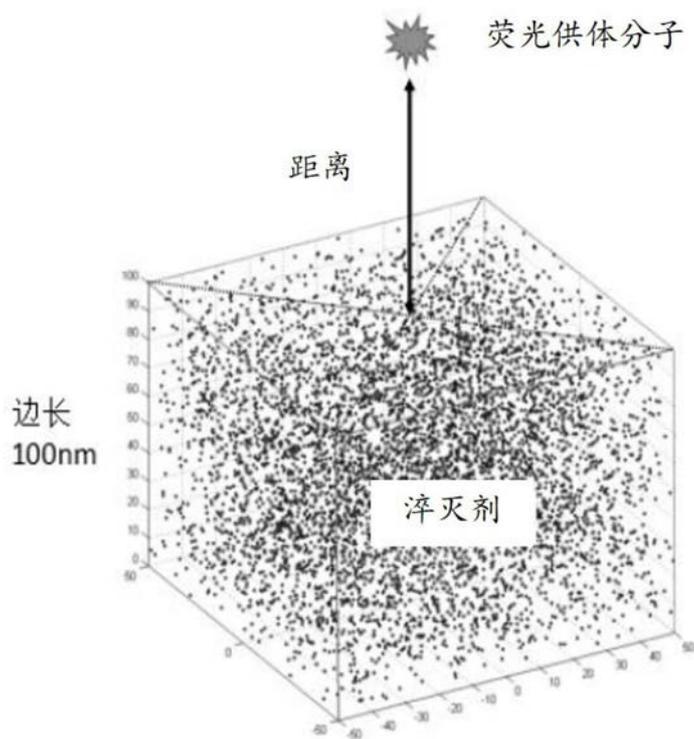


图1

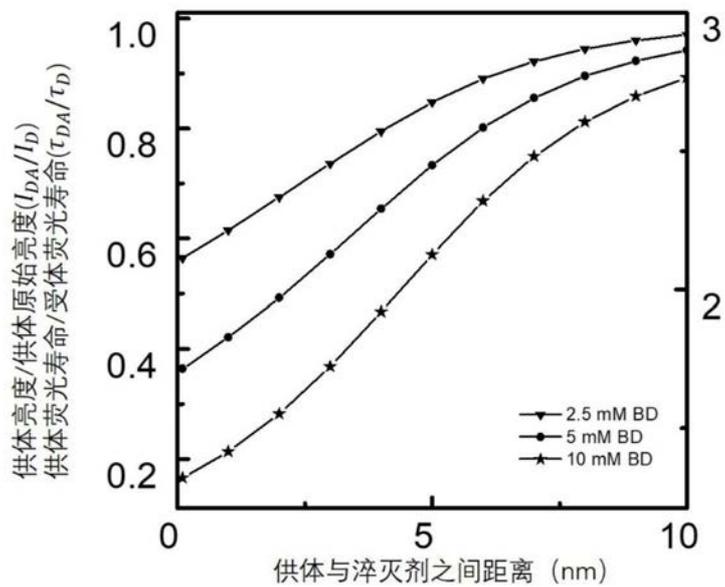


图2

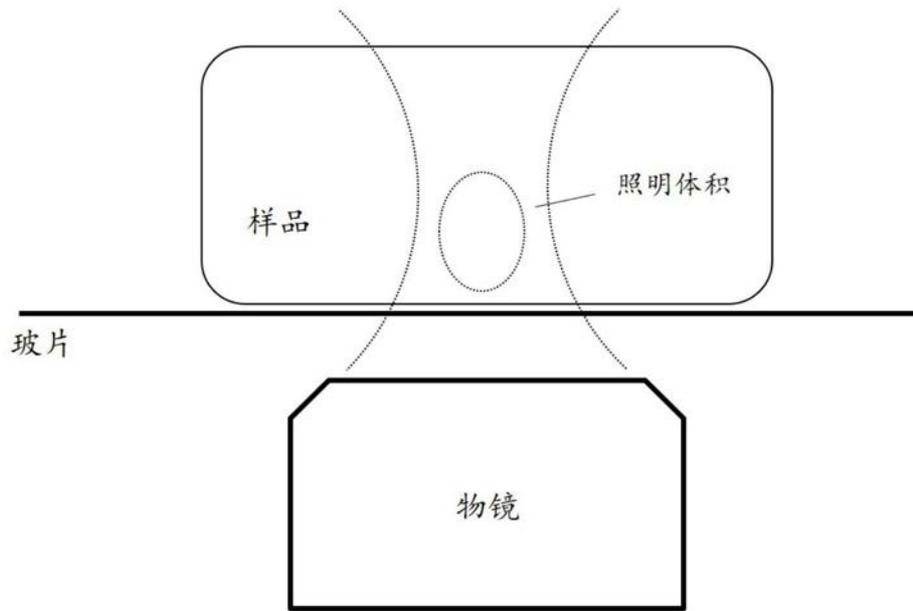


图3a

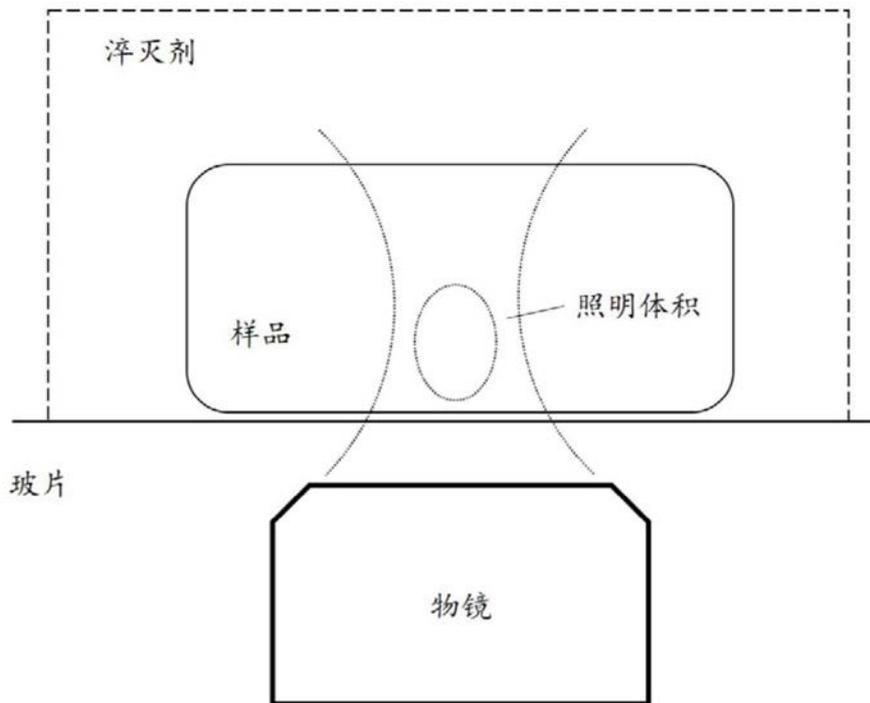
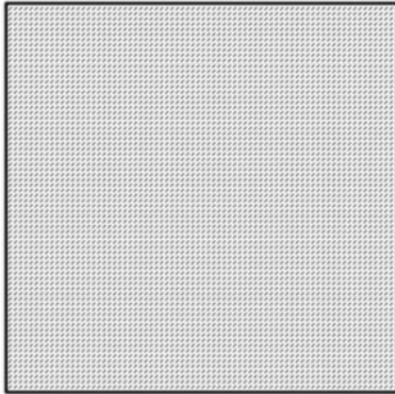


图3b



2us/pixel
多指数分析



1ms/pixel
单指数分析

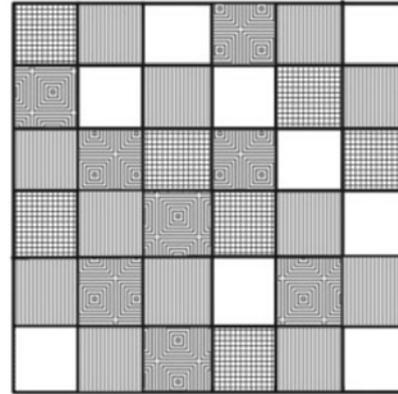


图4

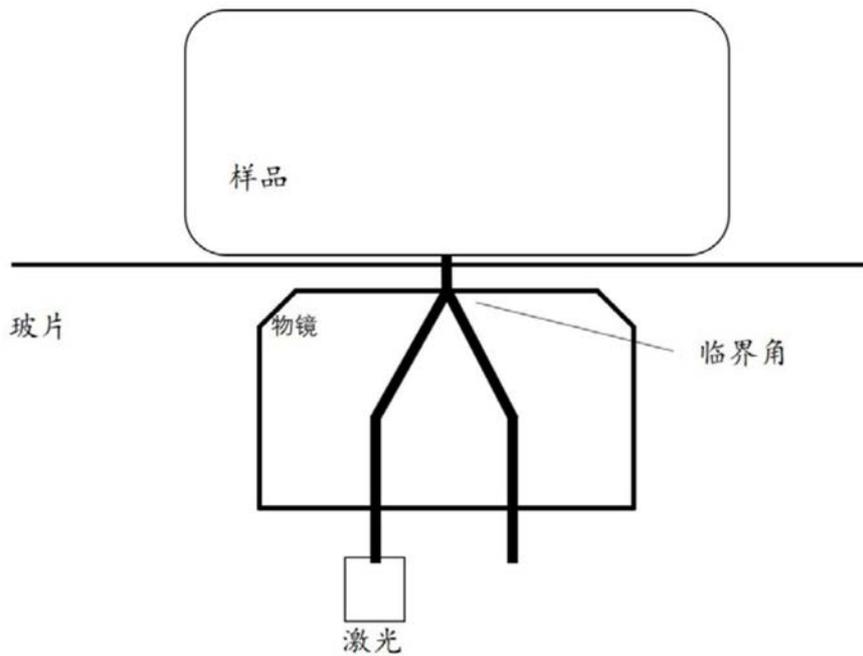


图5a

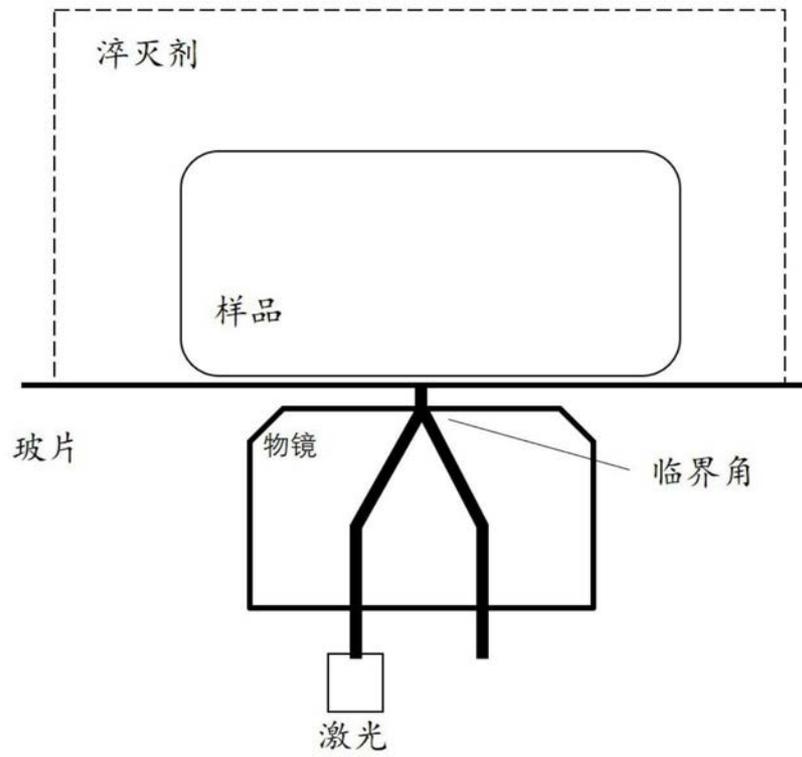


图5b

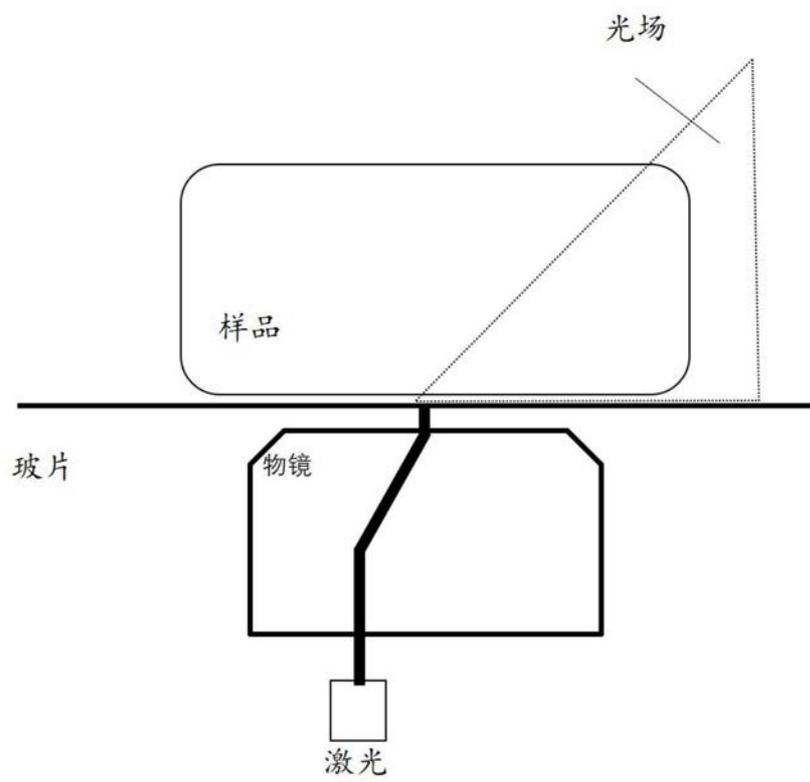


图5c