

tBid 蛋白引发磷脂膜透化过程的研究

马丽 贺小龙 李明 胡书新

Fluorescent investigation on process of tBid inducing membrane permeabilization

Ma Li He Xiao-Long Li Ming Hu Shu-Xin

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 67, 148703 (2018) DOI: 10.7498/aps.67.20180099

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20180099>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2018/V67/I14>

---

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[基于片层光照明的新型单分子横向磁镊](#)

Single molecule transverse magnetic tweezers based on light sheet illumination

物理学报.2018, 67(14): 148702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.148702>

[磁镊结合 DNA 发夹的方法在 RecA 蛋白介导的同源重组机制研究中的潜在应用](#)

Combination of magnetic tweezers with DNA hairpin as a potential approach to the study of RecA-mediated homologous recombination

物理学报.2016, 65(21): 218702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.218702>

[磁镊结合 DNA 发夹的方法在 RecA 蛋白介导的同源重组机制研究中的潜在应用](#)

Combination of magnetic tweezers with DNA hairpin as a potential approach to the study of RecA-mediated homologous recombination

物理学报.2016, 65(21): 218702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.218702>

[软物质实验方法前沿: 单分子操控技术](#)

Frontier of soft matter experimental technique: single molecular manipulation

物理学报.2016, 65(18): 188706 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.188706>

[全内反射瞬逝场照明高精度磁镊及其在 DNA 解旋酶研究中的应用](#)

A pair of high resolution magnetic tweezers with illumination of total reflection evanescent field and its application in the study of DNA helicases

物理学报.2013, 62(16): 168703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.168703>

## tBid蛋白引发磷脂膜透化过程的研究\*

马丽<sup>1)2)</sup> 贺小龙<sup>3)</sup> 李明<sup>1)</sup> 胡书新<sup>1)†</sup>

1) (中国科学院物理研究所, 北京凝聚态物理国家研究中心, 软物质物理重点实验室, 北京 100190)

2) (中国科学院大学物理科学学院, 北京 100049)

3) (中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

(2018年1月15日收到; 2018年4月9日收到修改稿)

Bid蛋白是仅有BH3结构域的Bcl-2家族蛋白,在溶酶体膜透化以及线粒体外膜透化引发的细胞凋亡过程中起着非常重要的调控作用,但是Bid蛋白与生物膜之间的相互作用导致脂膜透化的确切机制尚不十分清楚.本文利用激光扫描共聚焦显微成像技术及基于氧化石墨烯表面诱导荧光衰减的单分子荧光技术,分别从单囊泡及单分子水平对tBid蛋白与磷脂膜之间的相互作用进行了系统的研究.结果表明,tBid蛋白在膜上聚集后可引起脂膜的透化,且脂膜透化的发生源于聚集体中一些tBid蛋白更深入地插入了脂膜中.

**关键词:** tBid蛋白, 磷脂膜, 细胞凋亡, 单分子荧光技术

**PACS:** 87.80.Nj, 82.37.Vb, 87.15.kt, 87.50.wf

**DOI:** 10.7498/aps.67.20180099

## 1 引言

细胞凋亡是多细胞生物体为保证机体健康发展,维持内环境稳定,清除体内多余物质及危险细胞,由基因控制的细胞程序性死亡,是生物体为更好地适应环境而主动争取的一种死亡过程<sup>[1,2]</sup>.在细胞凋亡的线粒体凋亡路径中,B-cell lymphoma protein-2(Bcl-2)家族蛋白通过蛋白-蛋白间以及蛋白-生物膜间相互作用充当着凋亡过程的中心调控者<sup>[3,4]</sup>.根据Bcl-2家族蛋白的结构和功能,Bcl-2家族成员可以分为三大类,即抗凋亡蛋白、促凋亡蛋白以及BH3-only蛋白.以Bcl-XL,Bcl-2以及Mcl-1为代表的抗凋亡蛋白,包含有完整的BH1,BH2,BH3,BH4四个保守结构域,通过抑制促凋亡蛋白来促使细胞继续存活<sup>[5]</sup>.促凋亡蛋白,包括Bax,Bak等蛋白,包含了BH1,BH2,BH3三个结构域,被认为可直接导致线粒体外膜透化.BH3-only蛋白仅含有一个BH3结构域,包括tBid,Bad,PumaUMA,NoxaOXA等蛋白.这类蛋白可以响

应紫外辐射、DNA损伤、生长因子缺失等多种细胞内凋亡刺激,激活Bax,Bak等蛋白从而引发下游级联反应,其中不同的BH3-only蛋白对刺激的不尽相同<sup>[6-8]</sup>.Bid是BH3-interacting domain death agonist的简称,在一些细胞中,它是细胞凋亡内源路径和外源路径的联系纽带<sup>[9,10]</sup>.在细胞凋亡过程中,被激活的凋亡酶Caspase-8将Bid剪切为N-端和C-端两个片段,成为cleaved Bid(cBid).此时cBid的两部分仍依赖亲疏水相互作用吸附在一起,当其由胞质转移至线粒体外膜时<sup>[11]</sup>,两个片段迅速分开,含有N-端的前两个 $\alpha$ 螺旋p7飞走,而含有C-端的后六个 $\alpha$ 螺旋(tBid蛋白)p15结合在脂膜表面,并进一步引起依赖Bax,Bak等蛋白的线粒体外膜透化,导致细胞色素C以及其他凋亡因子从线粒体中释放<sup>[3,4,11-17]</sup>,而最终细胞走向死亡还是存活则取决于膜上Bcl-2家族中促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白的相对水平与活动情况<sup>[8,18,19]</sup>.在溶酶体膜的透化引发的细胞凋亡,如TNF- $\alpha$ 诱导的肝细胞凋亡中,tBid蛋白也被证明是不可或缺的调控者<sup>[20]</sup>.tBid蛋白对细胞凋亡的调控过程均发

\* 国家自然科学基金重大研究计划(批准号:91753104)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: hushuxin@iphy.ac.cn

生在细胞器膜上,因而研究 tBid 蛋白与磷脂膜之间的相互作用对阐明细胞凋亡的分子机制具有重要的意义. 虽然前人已经进行了大量的研究,但是 tBid 蛋白与磷脂膜作用是否可以造成磷脂膜的透化仍存在较大争议. 1999年, Schendel 等<sup>[21]</sup>通过膜片钳技术指出 tBid 蛋白具备在膜上形成某种通道的能力(tBid 蛋白浓度较高,为 2.72  $\mu\text{M}$  ( $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$ )). 2002年, Grinberg 等<sup>[22]</sup>也以辅助方法,在 Bax 蛋白存在的情况下使 tBid 蛋白寡聚于线粒体外膜,并进一步导致细胞色素 C 的泄露. Zhao 等<sup>[23]</sup>以细胞实验及体外实验直接指出微摩尔级的 tBid 蛋白可以引发溶酶体膜的透化成孔,但是成孔机制不明确<sup>[23]</sup>. 对 tBid 蛋白进行了广泛研究的 Andrews 等<sup>[3,11,24]</sup>认为 tBid 蛋白虽然在很多方面与 Bax 蛋白极为相似,可在磷脂膜上形成聚集体,但该聚集体不足以形成可使分子通透的孔道(使用的 tBid 蛋白浓度为纳摩尔级). Bleichen 等<sup>[25]</sup>亦认为虽然 tBid 蛋白与磷脂膜作用时可引起并进一步稳定膜的弯曲结构,然而 tBid 蛋白自身在较低浓度条件下(tBid 蛋白浓度为 10 nM)并不能引起脂膜的透化,从而使细胞色素 C 自由通过.

为了确定 tBid 蛋白自身是否可以在较低浓度条件下引发磷脂膜的透化,我们采用激光扫描共聚焦显微技术及基于氧化石墨烯(graphene oxide, GO)表面诱导荧光衰减的单分子荧光技术对 tBid 蛋白与磷脂膜的相互作用进行了系统的研究. 激光扫描共聚焦显微技术用激光作为光源,采用共轭聚焦原理和装置,可以实现多激光多通道同时扫描、同时探测,对样品进行成像. 利用荧光标记探针,可以在亚细胞水平对 tBid 蛋白与磷脂膜的相互作用进行研究. 而利用基于 GO 的表面诱导衰减技术,即单分子表面诱导荧光衰减技术(single molecule surface induced fluorescence attenuation, sm-SIFA)则可以在分子水平展示 tBid 蛋白与磷脂膜作用的过程. sm-SIFA 技术是利用薄膜介质引起的表面荧光衰减效应(SIFA)发展的一种新的单分子荧光探测技术<sup>[26]</sup>. 当荧光探针靠近金属或介质膜表面时,荧光淬灭效应会随着距离的变化而发生显著的变化,实验得到的荧光强度变化是荧光分子相对于介质表面的距离变化引起的,这使得我们在获得单个膜蛋白在平行于膜表面运动(通过单分子定位技术)的同时,还能获得垂直于脂膜表面的单分子运动轨迹. 以单层 GO 为吸收体, sm-SIFA 技术的纵向空间分辨率可以达到 0.6 nm,而脂双层的

总厚度一般只有约 4 nm,因此利用 sm-SIFA 技术研究跨膜蛋白与脂膜之间的相互作用具有很大的优势.

## 2 实验方法与材料

### 2.1 实验原理

以单层 GO 作淬灭剂,当荧光分子靠近 GO 表面时,由于 SIFA 效应,荧光分子的荧光强度  $I$  满足  $I/I_0 = (d/d_0)^4/[1 + (d/d_0)^4]$ <sup>[27,28]</sup>,其中  $I_0$  为单个荧光分子远离 GO 时的强度,  $d_0$  (约 4 nm) 为荧光分子在 GO 表面的衰减常数,  $d$  为待测荧光分子与 GO 的距离. 将磷脂膜组装到修饰有聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)的 GO 表面,当单个荧光分子在磷脂膜内运动时,其纵向入膜深度可以通过荧光强度来测量,分辨率可达亚纳米级<sup>[26]</sup>.

同时,由于实验中使用荧光标记的蛋白分子标记率为 100%,可以通过分析实验结果得出 tBid 蛋白形成聚集体中的分子个数. 首先,石英玻璃上单个荧光分子的光强稳定,可以以聚集体的总光强除以单个荧光分子的平均光强得到 tBid 蛋白聚集体的个数;其次,在 GO 表面,聚集体的个数需要通过分子的分步淬灭曲线分析得到. 荧光分子在脂膜中的位置(离开氧化石墨烯的距离)可以通过公式  $I/I_0 = (d/d_0)^4/[1 + (d/d_0)^4]$  计算得到. 其中  $d$  为荧光分子离开 GO 的距离.

### 2.2 实验材料与材料

#### 2.2.1 实验材料

实验中所用的所有磷脂、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰磷脂酸(DOPA)以及二油酰磷脂酰-N-磺化丽丝胺罗丹明的铵盐(Rh-PE)均购于 Avanti Polar Lipids 公司; HEPES, 5-(6)-羧基荧光素、NHS-PEG (分子量 5000)、四甲基罗丹明、膨胀石墨以及实验中用到的各种有机溶剂均购于西格玛奥德里奇公司. 实验用水为 Milli-Q (Millipore) 超纯水(电阻率为 18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

#### 2.2.2 Giant unilamellar vesicles (GUVs) 的制备

利用振荡电场方法制备 GUVs. ITO 电极的处理:先用无水乙醇超声 10 min,再用氯仿/甲醇(体积比 1:1)溶液超声 10 min,最后用甲醇淋洗并氮气吹干,置于 30  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥箱中干燥 120 min

后备用. 用氯仿作为溶剂, 配制 1 mg/mL 磷脂成膜液, 并将其均匀地分散铺展在处理好的 ITO 电极上, 置于真空干燥箱干燥 30 min. 制备 GUVs 时, 先向反应舱室注入 0.3 mol/L 的蔗糖溶液适量, 然后施加 10 Hz, 2.3 V 的交变电场, 在室温下作用 2 h 后, 缓慢降为 2 Hz, 2.3 V 继续作用 30 min; 最后电压降至 0 V 后吸出制备好的 GUVs 溶液, 以备使用. 实验时, 取适量该 GUVs 溶液与适量溶于 HEPES 缓冲液的 5-(6)-羧基荧光素 (最终浓度为 20  $\mu$ M), tBid 蛋白 (终浓度 20 nM) 共同混合. 实验中所用 tBid 蛋白均由合作者中国科学院生物物理研究所杨福愉研究组提供.

### 2.2.3 Small unilamellar vesicles (SUVs) 的制备

将 DOPC 及 DOPA 以摩尔比 4 : 1 溶于适量的氯仿甲醇混合溶液中, 混合均匀后用氮气吹干, 然后置于真空塔中抽真空处理 1 h 以上, 以保证除去残留的溶剂. 以缓冲液进行水合, 得到浓度约 2 mg/mL 的多层囊泡, 静置 1 h 后, 超声处理以获得透亮的磷脂小囊泡溶液, 于 4  $^{\circ}$ C 条件下保存. 实验中均采用囊泡破裂法制备平面支撑磷脂双层膜, 即取该溶液 200  $\mu$ L 缓慢注入样品池, 并将样品池置于 37  $^{\circ}$ C 恒温箱中过夜. 实验前使用 2 mL 缓冲液冲洗, 以除去多余的囊泡.

### 2.2.4 GO-聚乙二醇-磷脂双分子层的制备

采用改进的 Hummer 方法制备得到大片的单层 GO<sup>[29,30]</sup>, 并利用 Langmuir-Blodgett (LB) 技术将大片单层 GO 转移至清洗干净的石英载玻片表面, 经 85  $^{\circ}$ C 真空干燥 2 h 后, 用双面胶将其与盖玻片黏合在一起, 制备样品池, 并用硅胶对样品池四周进一步密封.

配制浓度为 0.2 mM 氨基吡与 2 mM NHS-PEG 的混合水溶液, 以 300 r/min 在摇床上震动摇匀 2 h, 使二者充分反应. 取反应后的氨基吡-NHS-PEG 水溶液 200  $\mu$ L 缓慢注入样品池, 氨基吡的芳香基团与 GO 之间的  $\pi$ - $\pi$  相互作用可以将 PEG 分子锚定在 GO 的表面. 孵育 3 h 后, 再用 2 mL 二次去离子水冲洗样品池, 以除去未与 GO 表面连接的多余物质. 灌注 400  $\mu$ L 缓冲液 (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH = 7.4) 待用.

本实验体系使用囊泡破裂法在修饰有 PEG 的 GO 表面构筑平面支撑磷脂双层膜.

## 3 实验结果与讨论

### 3.1 tBid 蛋白在 GUVs 及平面支撑膜表面具有很好的吸附性实验材料

Zhao 等<sup>[23]</sup> 在研究 tBid 蛋白与类溶酶体膜之间的相互作用时发现, 溶酶体膜富含酸性磷脂, tBid 蛋白会插入含有酸性磷脂的单层膜中, 并在酸性磷脂的环境发生分子构象的改变, 形成寡聚体, 继而引起脂质体内容物的释放, 但其精确机制并未得到阐释. 我们选择 DOPA : DOPC = 1 : 4 富含磷脂酸的双组分磷脂膜为模型膜体系, 进行 tBid 蛋白与磷脂膜之间相互作用的研究. 首先对 tBid 蛋白分子与囊泡及平面支撑单层膜两种模型膜体系之间的吸附作用进行研究. 激光扫描共聚焦显微镜可以通过多通道同时扫描同时成像的方式对 tBid 蛋白分子与囊泡之间的吸附作用进行直观成像. 将制备好的 GUVs 与荧光探针 5-(6)-羧基荧光素溶液混合后, 使用激光扫描共聚焦显微镜进行观测. 结果显示, 488 nm 激光激发的通道 GUVs 外部绿色荧光信号很强, 表明溶液中充满了发绿光的 5-(6)-羧基荧光素, 而 GUVs 内部无荧光信号, 561 nm 激光激发的通道无信号, 表明囊泡此时具有非常好的完整性. 加入四甲基罗丹明标记的 tBid 蛋白后, 发现 561 nm 激光激发的通道中可见明显的红色荧光信号 (图 1 (a)). 此时 GUVs 内部仍无荧光信号, 表明 tBid 蛋白可迅速吸附在 GUVs 表面, 在极短的时间内囊泡结构仍旧保持非常好的完整性, 没有出现变形和泄漏.

平面支撑膜体系是另外一种常用的用于研究膜蛋白与脂膜之间相互作用的典型模型体系<sup>[24]</sup>. 利用囊泡破裂法直接在干净的石英片表面生长磷脂双分子层, 再缓慢灌入 20 nM 荧光标记的 tBid 蛋白溶液, 即可得到如图 1 (b) 所示的荧光成像, 结果表明 tBid 蛋白在平面支撑膜体系中具有很好的吸附性. 同时, 可以观察到 tBid 蛋白吸附到脂膜表面后有明显的扩散运动, 如图 1 (c) 所示, 表明所使用的平面支撑膜具有较好的流动性, 是非常适用于研究膜蛋白与磷脂膜间相互作用的模型系统. 得到的典型单分子荧光实验结果如图 1 (d) 所示, 荧光分子的淬灭为一步淬灭, 表明吸附在脂膜表面的 tBid 蛋白分子是以单体的形式存在的.

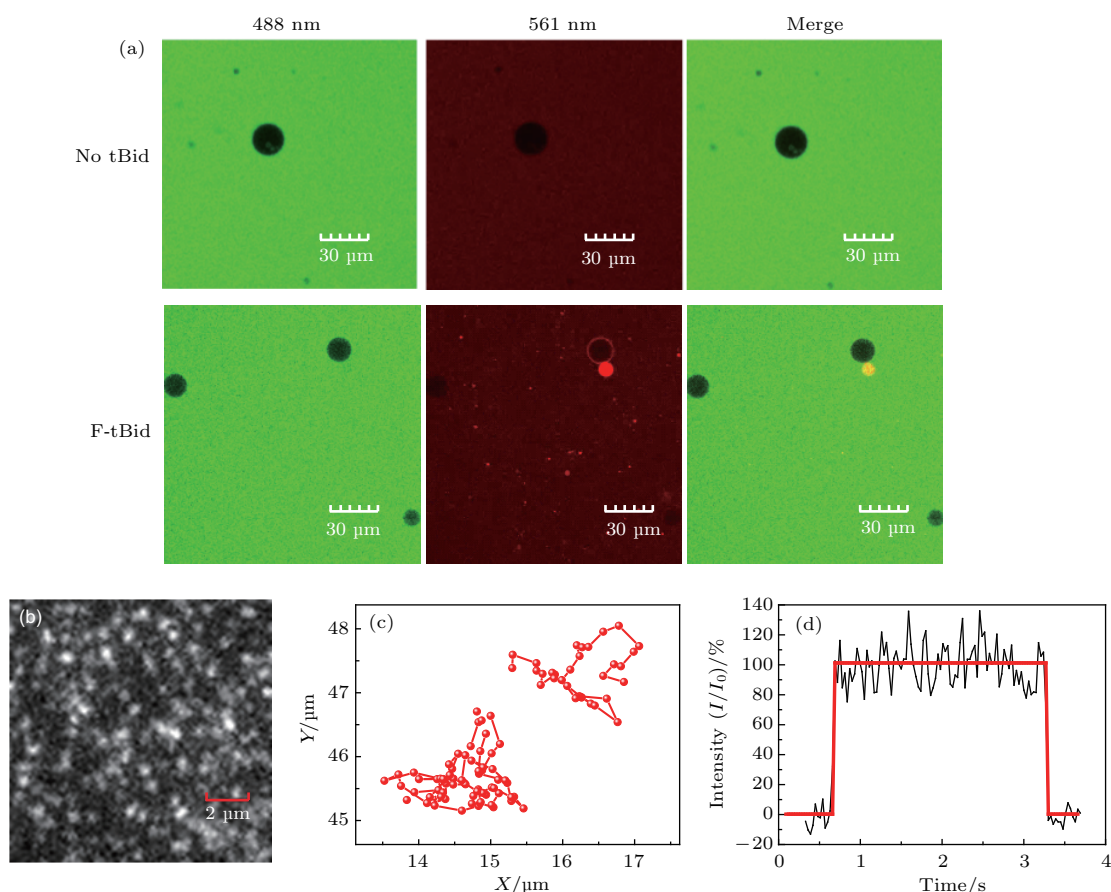


图1 tBid 蛋白在脂膜表面的吸附 (a) tBid 蛋白在囊泡表面的吸附结果; 上排 (体系中无 tBid 蛋白存在) 从左至右分别是 488 nm 激光激发的通道, 发绿光的 5-(6)-羧基荧光素的成像结果; 561 nm 激光激发通道的成像结果; 各通道成像结果的合成; 下排 (与 tBid 蛋白一起孵育的结果) 从左至右分别是 488 nm 激光激发的通道, 发绿光的 5-(6)-羧基荧光素的成像结果; 561 nm 激光激发的通道, 发红光的 4-甲基罗丹明的成像结果, 各通道成像结果的合成; (b) tBid 蛋白在平面支撑膜表面吸附的单分子荧光成像结果; (c) 两个 tBid 蛋白分子在平面支撑膜表面的运动轨迹; (d) 平面支撑膜表面单个 tBid 蛋白分子一步淬灭的单分子荧光实验结果

Fig. 1. Adhesion of tBids on membrane. (a) Adhesion of tBids on GUVs surface; upper (without tBid): fluorescence images of 5-(6)-carboxyfluorescein excited by 488 nm laser (left), excited by 532 nm laser (middle) and merged image (right). Lower (incubated with tBid): fluorescence images of 5-(6)-carboxyfluorescein excited by 488 nm laser (left), tetramethylrhodamine excited by 532 nm laser (middle) and merged image (right). (b) Adhesion of tBids on solid supported bilayers surface. (c) Typical traces of two tBid molecules moved on a solid-supported bilayer. (d) A representative trace of fluorescence labelled tBid incubated with solid-supported bilayer.

### 3.2 tBid 蛋白膜上累积致磷脂膜透化

根据已有的研究工作推测, 在 tBid 蛋白与磷脂膜相互作用的过程中, 当 tBid 蛋白自身浓度较低时, 可能不会引起细胞器内容物的泄露<sup>[25]</sup>. 本文从单囊泡和单分子水平对这个相互作用过程进行了系统研究. 为了探索 tBid 蛋白与磷脂膜作用时 GUVs 形状的变化, 在制备 GUVs 时, 掺入了 0.001% 的 Rh-PE, 此时囊泡的形状在 561 nm 激光激发的红光通道中可以被清晰地显示出来. 同时在 GUVs 体系中加入染料 5-(6)-羧基荧光素, 则溶液中充满了发绿光的羧基荧光素分子. 将野生型

tBid 蛋白灌入上述 GUVs 体系中, 使其最终浓度为 20 nM, 并置于 37 °C 恒温箱中孵育. 10 min 后, 囊泡的形态未见明显变化 (图 2 (a)), 即囊泡轮廓为球形, 羧基荧光素存在于囊泡的外围. 这个结果表明, 短时间内低浓度的 tBid 蛋白与脂膜之间的相互作用无法导致囊泡上形成孔道. 同时, 使用单分子荧光技术对平面支撑膜体系中 tBid 蛋白与膜之间相互作用 10 min 后的结果进行了分析. 如图 2 (b) 所示, 与单体状态时的图 1 (b) 相比较, 此时蛋白的荧光强度及大小不再均一, 出现了一些蛋白团簇. 通过对荧光强度分析, 可以得到团簇中 tBid 蛋白分子个数的分布状态, 即团簇中的蛋白个数不一, 但以

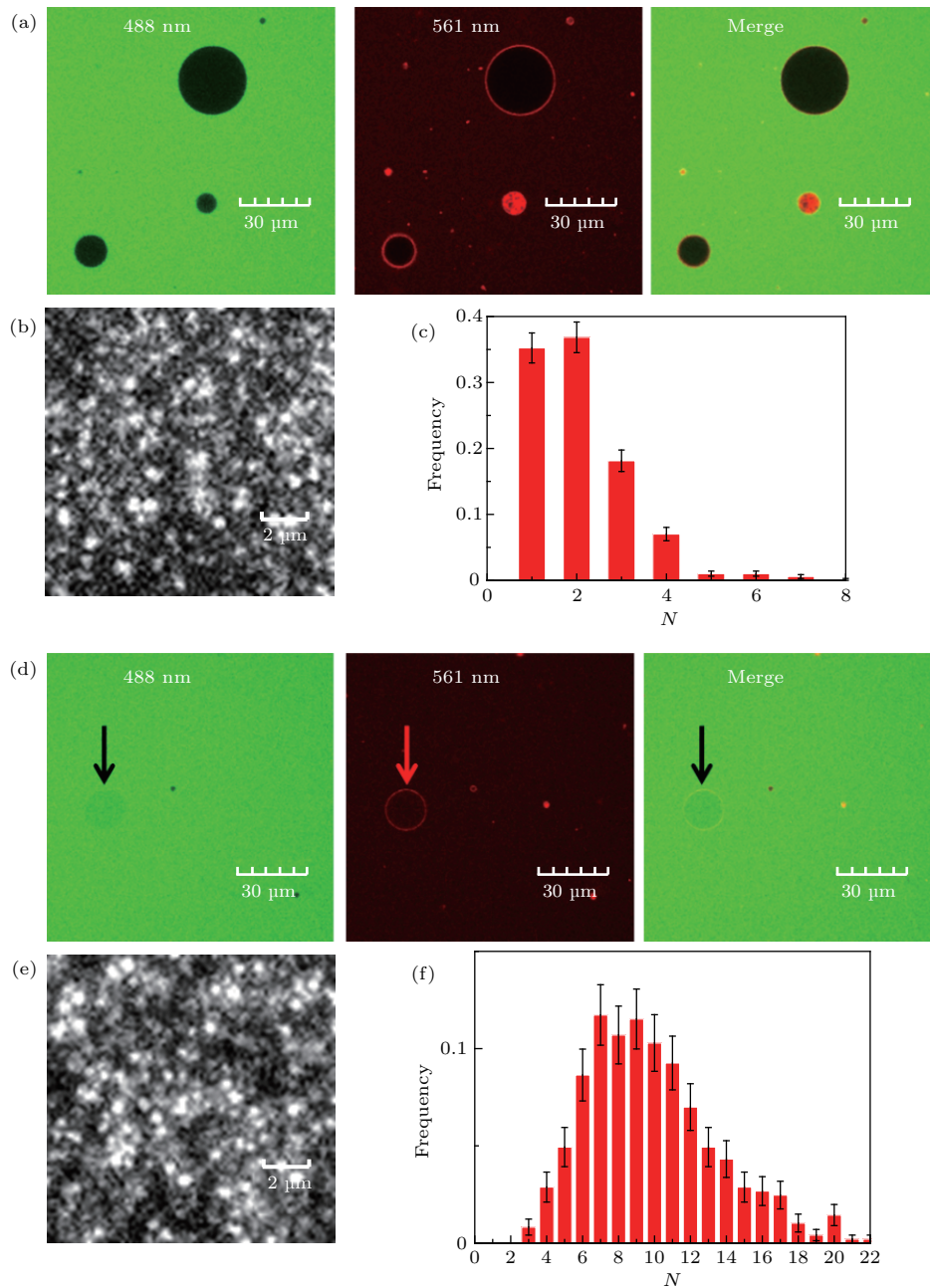


图2 tBid 蛋白在脂膜上的累积导致其内容物泄露 (a) 野生型 tBid 蛋白与含 Rh-PE 的囊泡孵育 10 min 后的实验结果; 从左至右分别是 488 nm 激光激发的通道, 发绿光的 5-(6)-羧基荧光素的成像结果; 561 nm 激光激发通道, 发红光罗丹明的成像结果; 各通道成像结果的合成; (b) 荧光标记的 tBid 蛋白与平面支撑膜孵育 10 min 后, 在脂膜表面吸附的荧光成像结果; (c) 荧光标记的 tBid 蛋白与平面支撑膜孵育 10 min 后团簇大小的统计结果; (d) 野生型 tBid 蛋白与含 Rh-PE 囊泡孵育 60 min 后的实验结果; 从左至右分别是 488 nm 激光激发的通道, 发绿光的 5-(6)-羧基荧光素的成像结果; 561 nm 激光激发通道, 发红光罗丹明的成像结果; 各通道成像结果的合成; (e) 荧光标记的 tBid 蛋白与平面支撑膜孵育 60 min 后, 在脂膜表面吸附的荧光成像结果; (f) 荧光标记的 tBid 蛋白与平面支撑膜孵育 60 min 后团簇大小的统计结果

Fig. 2. Permeabilization with accumulation of tBid on Membrane. (a) Representative images of GUVs incubated with wild-type tBid for 10 min; fluorescence images of 5-(6)-carboxyfluorescein excited by 488 nm laser (left), rhodamine excited by 532 nm laser (middle) and merged image (right); (b) image of the fluorescence labelled tBid incubated with a solid-supported bilayer for 10 minutes; (c) probability distribution function (PDF) of the fluorescence labelled tBid cluster size for 10 minutes incubation with a solid-supported bilayer; (d) representative images of GUVs incubated with wild-type tBid for 60 min; fluorescence images of 5-(6)-carboxyfluorescein excited by 488 nm laser (left), rhodamine excited by 532 nm laser (middle) and merged image (right); (e) image of the fluorescence labelled tBid incubated with a solid-supported bilayer for 60 min; (f) probability distribution function (PDF) of the fluorescence labelled tBid cluster size for 60 min incubation with a solid-supported bilayer.

单体、二聚体为主, 出现了少量的三聚体、四聚体, 偶尔可见五聚体及更大的聚集体(图 2(c)). 上述结果表明, tBid 蛋白分子在脂膜表面可缓慢聚集在一起, 但在短时间内不足以引起脂膜的透化, 导致内

容物的泄露.

延长 tBid 蛋白与 GUVs 及平面支撑膜体系的孵育时间至 1 h, 在不同体系中均看到了与之前不同的现象. 在 GUVs 体系中, 少量的囊泡内部开始

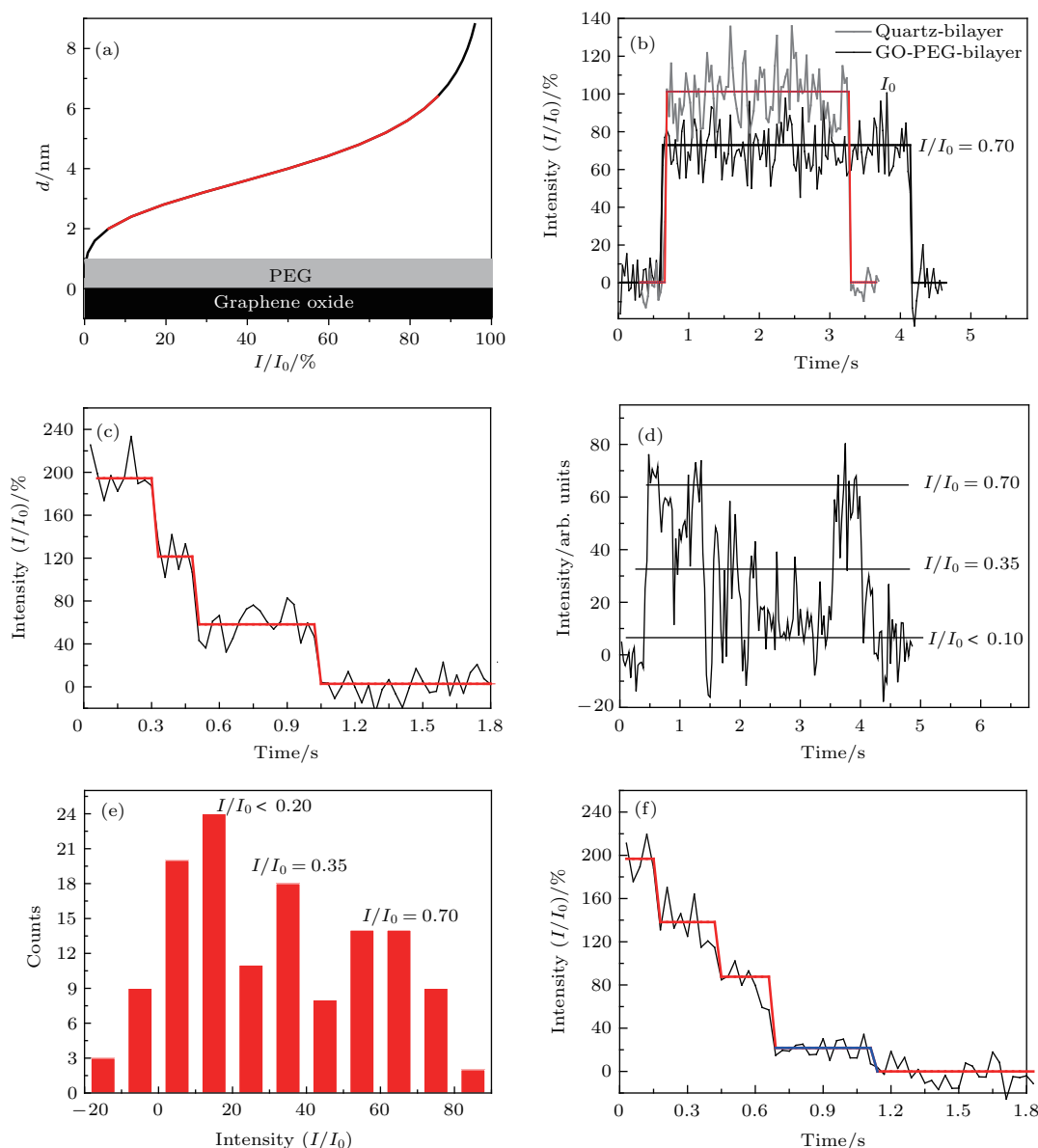


图 3 (a) 单分子表面诱导荧光衰减技术 (sm-SIFA) 示意图; (b) 荧光标记在 181 位点单个 tBid 蛋白分子在石英表面和单层 GO-PEG-bilayer 体系中荧光光强实验结果的对比; (c) tBid 蛋白分子聚集状态处于低聚集状态时, 荧光分布淬灭的实验结果; (d) tBid 蛋白分子聚集状态处于高聚集状态时, 平面支撑膜表面 tBid 蛋白的单分子荧光实验结果; (e) 相应于 (d) 中曲线的单层 GO 表面荧光分子的光强分布图; (f) tBid 蛋白分子聚集状态处于高聚集状态时, 荧光分布淬灭的实验结果; 红色台阶是处于脂膜表面荧光分子的淬灭, 蓝色是处于脂膜深处荧光分子的淬灭过程

Fig. 3. (a) Schematic diagram of single molecule surface-induced fluorescence attenuation (sm-SIFA); (b) comparison of the fluorescent intensity of 181 labelled tBid on a monolayered GO-PEG-supported bilayer (black) to that on a quartz-supported bilayer (grey); (c) photobleaching results of 181 labelled tBid incubated with GO-PEG-supported bilayer for a few minutes; (d) a fluorescence trace of 181 labelled tBid incubated with GO-PEG-supported bilayer for a long time; (e) probability distribution function (PDF) of the fluorescent intensity built from trace in curve (d); (f) photobleaching results of 181 labelled tBid incubated with GO-PEG-supported bilayer for a long time; red step is ascribed to the photobleach of the fluorescence on the membrane surface, and blue step is ascribed to the photobleach of the fluorescence inserted deeply into the membrane.

出现 488 nm 激光激发的绿色荧光信号, 如图 2(d) 中的箭头所指. 尽管囊泡内荧光强度略低于囊泡外, 但明显已经有 5-(6)-羧基荧光素分子渗透进入了囊泡内部, 而此时 561 nm 激光激发通道显示的囊泡依然保持原有的形状. 这表明, 羧基荧光素由囊泡外部进入到囊泡内部是由于 tBid 蛋白与 GUVs 之间的相互作用, 导致囊泡形成通道发生了泄漏. 在平面支撑膜体系中(图 2(e)), 与图 2(b) 相比较, tBid 蛋白团簇变得更多更大了, 统计结果显示团簇中蛋白聚集体中蛋白分子的个数分布变宽、变大, 峰值为 9 个分子(图 2(f)). 上述结果表明, 当 tBid 蛋白聚集到一定程度时, 可在膜上形成某种通道, 且通道大小足以使荧光分子自由通过.

### 3.3 聚集体中 tBid 蛋白可深入插入膜中

为了探索 tBid 蛋白聚集体引起磷脂膜透化的分子机制, 我们利用新发展的 sm-SIFA 研究了 tBid 蛋白与磷脂膜相互作用时 tBid 蛋白构型的变化, 该技术优势在于能以亚纳米精度实时测量单个荧光分子在脂膜内的位置. 如图 3(a) 所示, 选用 GO-PEG 的平面支撑膜体系, 通过测量单个荧光分子荧光强度的变化来测定荧光分子距离 GO 表面的距离, PEG 分子层的厚度为 1 nm, 磷脂双分子层的厚度为 4 nm, 根据公式  $I/I_0 = (d/d_0)^4/[1 + (d/d_0)^4]$ , 可以精确地测量出所标记位点在磷脂膜中的纵向位置.

实验中, 181 残基上标记了荧光分子的 tBid 蛋白分子刚吸附在脂膜表面上时, 荧光强度均一, 表现为典型的单分子荧光曲线(图 3(b)). 单个 tBid 蛋白分子在单层 GO 体系中光强约为石英表面荧光强度的 70%, 根据计算, 对于 tBid 蛋白单体而言, 此时 181 位点位于膜表面的位置, 与前人的核磁共振结果以及电子顺磁共振结果相一致, 显示了我们所使用的单分子方法的可靠性<sup>[31,32]</sup>. 将 tBid 蛋白与脂膜一起孵育, 由于实验中所用蛋白分子的荧光标记率约为 100%, 通过分析分子分步淬灭曲线中台阶的个数, 可以得到聚集体中的分子个数. 如图 3(c) 所示, 当 tBid 蛋白聚集体个数为 3 时, 每个荧光分子光强仍旧较为接近, 约为 70%  $I_0$ , 表明在三聚体中 181 位点仍位于脂膜表面. 延长孵育时间, 实验结果中出现了如图 3(d) 中所示的典型实验曲线, 表明单分子荧光信号出现了不稳定性, 荧光强度的涨落较大. 对该单层 GO 体系中荧光分子

的光强信息进行统计, 可以看出有明显的三态分布(图 3(e)). 除了小于石英表面荧光强度 20% 的背景信号以及位于脂膜表面的荧光强度约为 70%  $I_0$  的荧光信号外, 还出现了荧光强度更弱一点的信号, 其荧光强度约为 35%  $I_0$ . 此时, tBid 蛋白聚集体个数为 4, 甚至更大. 分步淬灭的单分子荧光曲线如图 3(f) 所示, 除了荧光强度为 70%  $I_0$  的淬灭台阶外(图 3(f) 中的红色台阶), 还出现了荧光强度为 35%  $I_0$  的淬灭台阶(图 3(f) 中的蓝色台阶), 此台阶的出现说明 181 位点进入到脂膜表面以下更深一些的位置, 即距离脂膜上表面  $(1.5 \pm 0.4)$  nm 处. 上述结果综合表明, 在这种聚集状态中, 181 位点可以从脂膜的表面进入到膜中较深的位置; 同时, 对于聚集体而言, 并不是每个蛋白的 181 位点都位于膜中同一深度, 它们的入膜深度有深有浅, 表明聚集体中每个蛋白构象并不一致.

上述结果表明, 聚集体中 tBid 蛋白深入脂膜是引起磷脂膜透化的分子机制. 因为只有当 tBid 蛋白聚集到一定程度时, 磷脂膜才能透化, 而 tBid 蛋白也只有聚集到一定个数时, 才会出现入膜较深的状态. tBid 蛋白可深入脂膜是引起膜透化的必要条件, 尽管在透化时聚集体中蛋白构象不一, 但不是每一个蛋白都入膜很深.

## 4 结 论

通过 GUVs 和平面支撑膜体系分别从单囊泡水平和单分子水平研究了 tBid 蛋白与脂膜之间的相互作用, 两种体系以互为补充的方式提供了同一条件下不同尺度的信息. 实验结果明确了 tBid 蛋白与磷脂膜作用时可引起膜的透化, 使得荧光分子可以自由通过. 磷脂膜透化的发生由 tBid 蛋白在磷脂膜上逐步形成聚集体引起, 其分子机制为聚集体中某些 tBid 蛋白的一些区域可以深入至膜中较深位置, 且聚集体中蛋白构象不一致. 结果展示了单囊泡、单分子水平实验相结合的优势, 并且直接从单分子水平指出 tBid 蛋白引起膜透化的分子机制, 同时体现了 SIFA 技术的优越性.

### 参考文献

- [1] Golstein P 1998 *Science* **281** 1283
- [2] Danial N N, Korsmeyer S J 2004 *Cell* **116** 205
- [3] Lovell J F, Billen L P, Bindner S, Shamas-Din A, Fradine C, Leber B, Andrews D W 2008 *Cell* **135** 1074



- [4] Shamas-Din A, Bindner S, Zhu W, Zaltsman Y, Campbell C, Gross A, Leber B, Andrews D W, Fradin C 2013 *J. Biol. Chem.* **288** 22111
- [5] Subburaj Y, Cosentino K, Axmann M, Pedrueza-Villalmanzo E, Hermann E, Bleicken S, Spatz J, Garcia-Saez A J 2015 *Nat. Commun.* **6** 8042
- [6] Roy M J, Vom A, Czabotar P E, Lessene G 2014 *Br. J. Pharmacol.* **171** 1973
- [7] Youle R J, Strasser A 2008 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** 47
- [8] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, Adams J M 2014 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** 49
- [9] Kaufmann T, Jost P J, Pellegrini M, Puthalakath H, Gu-gasyan R, Gerondakis S, Cretney E, Smyth M J, Silke J, Hakem R, Bouillet P, Mak T W, Dixit V M, Strasser A 2009 *Immunity* **30** 56
- [10] Hutt K J 2015 *Reproduction* **149** R81
- [11] Billen L P, Shamas-Din A, Andrews D W 2009 *Oncogene* **27** S93
- [12] Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu H C, Jeffers J R, Zambetti G P, Hsieh J J, Cheng E H 2006 *Nat. Cell Biol.* **8** 1348
- [13] Gross A, Yin X M, Wang K, Wei M C, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer S J 1999 *J. Biol. Chem.* **274** 1156
- [14] Tait S W, Green D R 2010 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11** 621
- [15] Li H L, Zhu H, Xu C J, Yuan J Y 1998 *Cell* **94** 491
- [16] Wei M C, Lindsten T, Mootha V K, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson C B, Korsmeyer S J 2000 *Gene. Dev.* **14** 2060
- [17] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou J C 2000 *Mol. Cell. Biol.* **20** 929
- [18] Happo L, Strasser A, Cory S 2012 *J. Cell Sci.* **125** 1081
- [19] Billen L P, Kokoski C L, Lovell J F, Leber B, Andrews D W 2008 *Plos Biol.* **6** e147
- [20] Guicciardi M E, Bronk S F, Werneburg N W, Yin X M, Gores G J 2005 *Gastroenterology* **129** 269
- [21] Schendel S L, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan B L, Reed J C 1999 *J. Biol. Chem.* **274** 21932
- [22] Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, Gross A 2002 *J. Biol. Chem.* **277** 12237
- [23] Zhao K, Zhou H J, Zhao X Y, Wolff D W, Tu Y P, Liu H L, Wei T T, Yang F Y 2012 *J. Lipid Res.* **53** 2102
- [24] Shivakumar S, Kurylowicz M, Hirmiz N, Manan Y, Friaa O, Shamas-Din A, Masoudian P, Leber B, Andrews D W, Fradin C 2014 *Biophys. J.* **106** 2085
- [25] Bleicken S, Hofhaus G, Ugarte-Urbe B, Schroder R, Garcia-Saez A J 2016 *Cell Death Dis.* **7** e2121
- [26] Li Y, Qian Z Y, Ma L, Hu S X, Nong D G, Xu C H, Ye F F, Lu Y, Wei G H, Li M 2016 *Nat. Commun.* **7** 12906
- [27] Swathi R S, Sebastian K L 2008 *J. Chem. Phys.* **129** 054703
- [28] Swathi R S, Sebastian K L 2009 *J. Chem. Phys.* **130** 086101
- [29] Zhao J P, Pei S F, Ren W C, Gao L B, Cheng H M 2010 *ACS Nano* **4** 5245
- [30] Hummers Jr W S, Offeman R E 1958 *J. Am. Chem. Soc.* **80** 1339
- [31] Wang Y, Tjandra N 2013 *J. Biol. Chem.* **288** 35840
- [32] Oh K J, Barbuto S, Meyer N, Kim R S, Collier R J, Korsmeyer S J 2005 *J. Biol. Chem.* **280** 753

# Fluorescent investigation on process of tBid inducing membrane permeabilization\*

Ma Li<sup>1)2)</sup> He Xiao-Long<sup>3)</sup> Li Ming<sup>1)</sup> Hu Shu-Xin<sup>1)†</sup>

1) (*Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

2) (*School of Physical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

3) (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

( Received 15 January 2018; revised manuscript received 9 April 2018 )

## Abstract

The proapoptotic protein tBid is a member of Bcl-2 family, and it plays an important role in apoptosis by inducing mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and lysosomal membrane permeabilization (LMP). Previous studies have shown that the mechanism of tBid-dependent MOMP and LMP depends on tBid interacting with membranes. Researchers hold different opinions about whether tBid itself could induce MOMP and LMP. Some of the researchers insist that tBid must trigger other proteins like Bax or Bak inserting into the membrane, and assembly of tBid itself could not form pores large enough to release cytochrome c. Some others think that tBid just like Bax, can permeabilize mitochondrial outer membrane releasing cytochrome c and lysosomal membrane with the leakage of lysosomal cathepsin B. Here, we want to know whether the tBid itself can induce membrane permeabilization in our model system at low concentration. We use 3 ways to observe tBid and membranes interactions. They are confocal imaging of GUVs (giant unilamellar vesicles), traditional single molecular fluorescence assay, and a recently developed approach, single molecular surface-induced fluorescence attenuation (sm-SIFA). So we can obtain information from single vesicle level and single molecule level. At single vesicle level, we can directly find out whether the GUVs are permeabilized and at the same time the shape of the GUVs is changed. At a single molecule level, we can know the properties of one protein. Especially by using the sm-SIFA, we can obtain the insertion depth of exact residue. Combining the results obtained from different ways under the same conditions, we find that tBid itself can induce the model membrane to permeate, releasing the fluorescent molecules, by oligomerization. What is more, we suggest that the mechanism is that in oligomers some tBids can be inserted deep into the membrane although in oligomers not all the proteins have the same insertion depth. It is indicated that the conformations of tBids in oligomers are diversified. We also prove that the ways we use here are efficient. The GUVs and supported lipid bilayers are indeed tenable model systems. Sm-SIFA has a grand future in the study of protein and membrane interactions.

**Keywords:** tBid protein, lipid membrane, apoptosis, single molecule techniques

**PACS:** 87.80.Nj, 82.37.Vb, 87.15.kt, 87.50.wf

**DOI:** [10.7498/aps.67.20180099](https://doi.org/10.7498/aps.67.20180099)

\* Project supported by the Major Research Plan of the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 91753104).

† Corresponding author. E-mail: [hushuxin@iphy.ac.cn](mailto:hushuxin@iphy.ac.cn)