

荧光标记微管的光敏断裂及机理^{*}

徐春华¹⁾ 刘春香²⁾ 郭红莲²⁾ 李兆霖²⁾ 降雨强²⁾ 张道中²⁾ 袁 明^{1)†}

1) 中国农业大学生物学院植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094)

2) 中国科学院物理研究所, 凝聚态物理中心光物理实验室, 北京 100080)

(2005 年 3 月 24 日收到, 2005 年 5 月 11 日收到修改稿)

荧光标记的微管经激发光照射会引起微管的断裂, 但其断裂过程及机理并不清楚. 通过光镊研究了微管光敏断裂的动态过程. 实验结果表明组成微管的原丝并不是同时断裂的, 而是相继断裂最终导致微管的断裂. 经过一系列生物学实验, 确定了活性氧中的自由基是造成微管光敏断裂的主要因素. 根据光镊研究的结果推测了自由基作用于微管的机理.

关键词: 光镊, 微管, 断裂, 自由基

PACC: 4260, 4262, 8750

1. 引 言

微管是普遍存在于真核细胞中的一种重要的蛋白骨架, 它由 α 和 β 两种微管蛋白的异二聚体首尾相接形成原丝, 再由 13 根原丝围成一根中空的微管. 微管外径只有 25 nm, 超过一般光学显微镜的分辨率因而无法看到. 用免疫荧光的方法虽然可以观察到细胞内的微管, 但是不能应用在活体研究上. 而用荧光染料标记微管蛋白或使微管蛋白与荧光蛋白融合, 则可以研究微管的动态和功能.

虽然这种方法便于活体研究, 但是有文献报道荧光标记的微管在激发光下会发生断裂. Vigers 等^[1]将荧光染料标记的微管蛋白注射到细胞内或在体外聚合成微管, 在相应的激发光下均观察到微管的断裂现象, 并发现抗坏血酸能减缓这种断裂. Dixit 和 Cyr^[2]也观察到荧光显微镜对植物细胞的破坏作用. 他们以各种内源荧光蛋白标记的烟草悬浮细胞为材料, 以细胞周期被阻滞为指标统计被激发光照射而遭到破坏的细胞, 发现分裂期停滞与光照剂量有关. 光动力疗法是近年来兴起的一种治疗肿瘤的方法. 它利用一些光敏剂在肿瘤细胞中大量滞留的特性, 通过光照使光敏剂产生光毒性, 杀死肿瘤细胞. 有文献报道这些光敏剂能破坏微管网络^[3-5]. 但到目前为止还没有直接的证据来说明微管光敏断裂

的过程和机理.

近年来已有不少文献报道未经荧光标记的微管的一些力学特性. 如 Pablo 等^[6]用扫描力学显微镜研究了切断微管的力和过程. Kersemakers 等^[7]用多光镊系统测定了微管聚合时产生的力. 但是还未见对荧光标记微管力学性质研究的报道. 然而目前对微管的研究多数都需要对微管进行荧光标记, 因此对荧光标记微管力学性质的研究有助于对相关实验结果提供合理的解释.

本文利用双光镊技术测定了荧光标记微管光敏断裂的动态过程, 测量结果表明形成微管的原丝的断裂不是同时发生的. 并对荧光标记的微管在不同波长光照射下以及不同处理条件下发生的现象作了较为详细的研究. 研究表明微管的断裂与激发光的强度以及荧光的标记率密切相关, 染料与相应激发光发生光化学反应释放出的自由基是造成微管断裂的主要原因. 自由基对微管各原丝的攻击是相互独立的, 且首先使微管的结构变松懈.

2. 材料和方法

实验所用微管蛋白从猪脑中纯化^[8]. 5(and-6) carboxytetra-methyl-rhodamine succinimidyl ester (NHS-Rhodamine) 标记的微管蛋白的制备见文献^[9]的方法. 用同样方法使微管蛋白标记上 NHS-生物素. 标

^{*} 国家自然科学基金(批准号 30421002, 30128008 和 30170057)和国家重点基础研究专项基金(批准号 2002CB713805)资助的课题.

[†] E-mail: mingyuan@cau.edu.cn.

记时可同时加入 NHS-Rhodamine 和 NHS-生物素,使微管蛋白同时标上两种分子.在观察不同标记率的微管的断裂现象时用没有标记的微管蛋白与标记的微管蛋白以一定比例混合以达到不同的标记率梯度.加入聚合缓冲液:100 mmol/L 1,4-piperazinediethanesulfonic acid(PIPES),1mmol/L $MgSO_4$,1 mmol/L ethylene glycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetra-acetic acid(EGTA),1 mmol/L GTP,10% 二甲基亚砜(DMSO),pH 6.9.将标记好的微管蛋白稀释到 $10\mu\text{mol/L}$,于 37°C 聚合 30—60 min.然后加入预热的 5 倍体积的 PEMT:0.1mol/L PIPES,1mmol/L EGTA,1mmol/L $MgSO_4$, $10\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇,10% DMSO,pH 6.9.轻轻混匀,于 35°C 50000g 离心 30min,再用适量 PEMT 重悬微管沉淀,室温放置.

实验中使用的双光镊系统主要由倒置荧光显微镜(Leica DMIRB 型,德国,50W 汞灯)和 Nd-YVO₄ 激光(1064 nm,Coherent,美国)组成.两束平行的激光束从显微镜物镜(HCXAPO 100 \times ,1.30NA,oil immersion)的后瞳进入,聚焦在样品上,形成双光阱.主光阱是固定的,副光阱可以通过超声波马达转镜系统在 x - y 方向移动.四象限探测器(quadrant detector,QD)用来测量主光阱中微球的位移,CCD(CoolSNAP-fx,美国)可以采集微球和微管的完整图像.每束光在物镜后瞳处的功率分别为 160 mW,光阱的刚度为 0.042 pN/nm.

光镊通常以微米级的微球为手柄间接操作生物材料.本实验采用的微球为 $1\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯荧光小球(molecular probe),其表面包被的抗生物素可与微管上的生物素相结合,从而使光镊通过微球操作微管.聚合好的微管用 PEMT 稳定并稀释后加入适量微球和 8 mmol/L 抗坏血酸.样品小池预先用 3% 牛血清蛋白溶液封闭 2h,防止微管和微球粘在池底.使用前吸去封闭液,加入上述样品溶液.移动载物台,让两个光阱分别抓住两个微球,右边的是主光阱,主光阱中的微球为 A 球,左边是副光阱,副光阱中的微球为 B 球.在荧光下移动载物台使一根微管与 A,B 两球表面接触.微管上的生物素与微球表面的抗生物素相互作用可以使微球粘住微管.此过程大约在 15s 内完成.以 158 nm/s 的速度向左移动副光阱拉伸微管,当施加到微管的外力达到约 5 pN 时,停止副光阱的移动,通过用 QD 探测主光阱小球的位移信号来观察微管断裂的动态过程,并用 CCD 连续拍摄的整个微管和小球的图像来了解微管的

形变.

3. 实验结果

图 1 是 QD 探测到的主光阱中的小球位移随时间变化的关系曲线,由于此小球与微管相连,所以这一位移直接反映了微管被拉伸的动态过程.图线一开始有些波动(ab 段),是由于 A,B 球之间的微管还处于松弛状态,微管的漂动使微球略有晃动.之后的一段图线呈平滑的上升趋势(bc 段),表示此时微管受到了光阱力的作用,而从 CCD 拍摄的微管的动态变化可以看出微管在此外力作用下发生了形变.所以 bc 段反映的是外力与微管形变之间的关系,即反应了微管的弹性这一特性.当光阱力达到 5 pN 时停止移动副光阱(对应于此曲线中的 c 点),观察微管在一外力作用下的变化过程.从图中可以看出,A 球分 3 次逐步回到光阱中心,图线呈“台阶式”下降(cd 段).每一个“台阶”表示 A 球向光阱中心回弹一次.A 球还未完全回到光阱中心之前的每一次回弹都表示微管又被拉长了一点.这种拉长不同于之前 B 球移动过程中的拉长,这是一个瞬间的过程,说明微管发生了一次突变,其中的一根或者几根原丝发生了断裂,剩下的原丝相对而言就承受了更大的外力所以会产生一定的形变,结果造成了 A 球的瞬时回弹.每个“台阶”都是一次微管原丝的断裂,直到最后一根原丝断裂,A 球才完全回到光阱中心.

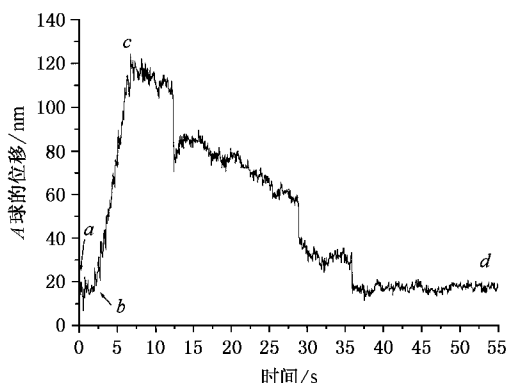


图 1 用 QD 探测的 A 球的位移随时间变化的关系图(ab 段由于微管尚未拉直,图线略有波动;bc 段反映外力与微管形变之间的关系,cd 段图线呈“台阶式”下降,显示微管各原丝的相继断裂过程)

通过对 bc 段的分析以及结合 CCD 拍摄的微管的动态变化照片,可知微管最初的长度以及形变量.

此实验中,微管的初始长度为 $3.5\mu\text{m}$,被拉伸后的微管长度为 $4.3\mu\text{m}$,由此得出微管被拉伸了 23%.微管本身是一个比较刚性的结构,紫杉醇的存在会使微管变柔软^[10].由于本实验中使用了紫杉醇,微管在拉伸时有 23% 的伸长更直观地说明在紫杉醇作用下微管弹性发生的变化.从 *c* 点以后,副光阱停止移动,所以微管断裂时所受拉力不变.因此微管的断裂不是由拉力直接造成的,而是激发光照造成的.此外,由于此状态下的微管原丝之间的相互作用力很小,其中一根或几根断裂以后,就不再分担拉力,剩下的原丝平均受力变大,整体比较均匀的被拉长.因为如果原丝之间的相互作用力很大的话,已经有断口的原丝在断口以外的其他部分仍可以分担拉力,未发生断裂的原丝应仅在断口位置受到的平均拉力会变大,所以微管的伸长应只发生在断口位置.从图中前 2 个台阶所表示的 *A* 球回弹位移可知微管分别伸长了 50nm 和 36nm,而组成原丝的基本单位——微管蛋白异二聚体的长度仅 8nm,如此长的拉伸距离仅发生在断口位置几乎是不可能的.因此未发生断裂的原丝的伸长应是比较均匀的,也说明原丝之间的相互作用力很小.

从图 1 还可以看出,当副光阱停止移动后,原丝断裂之前,即曲线的“平台区”,有一个缓慢下降的趋势,说明微管在被缓慢拉长.当微球粘住微管以后,在关闭激发光的情况下拉伸微管,可以看见“平台区”的缓慢下降趋势是比较稳定的.为了验证光照对微管弹性的影响,我们在“平台区”的中间再打开激发光以观察微管拉伸情况的变化.图 2 为截取的微管断裂过程中的一个“平台区”,在箭头所指位置处打开激发光,发现 5s 以后图线下降趋势明显变陡,说明微管被拉伸的速度变快.由此可见,激发光的照射可以加剧微管结构的变化,即使得微管结构更加松懈.

基于以上通过光镊观察到的荧光标记微管的光敏断裂过程,我们对其机理进行了比较深入的研究.首先用能量大大高于绿色激发光的氦氖激光(632.8nm ,功率 17mW ,能被生物体有效吸收^[11])和与 rhodamine 受绿光激发后所发射荧光波长相接近的钠灯(589nm)照射微管 5—10min,都不造成微管的断裂,说明微管断裂不是由光的能量直接打断的,而是与特定波长的激发光有关.因为单根微管在透射光下无法观察,我们在微管聚合溶液中加入一种微管结合蛋白——MAP65^[12]($0.4\mu\text{mol/L}$),使微管聚合

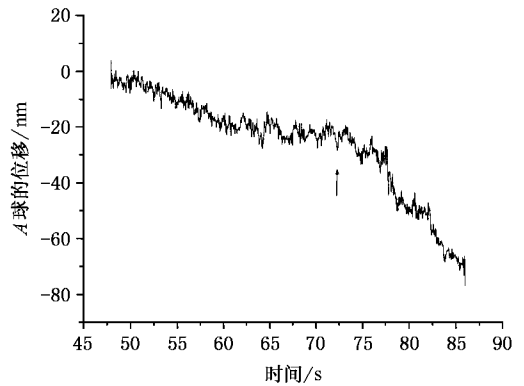


图 2 用 QD 探测的 *A* 球位移信号中截取的一段“平台区”.(箭头所指处之前关闭激发光,之后打开激发光,可见“平台区”的下降趋势变陡,说明微管拉伸速度变快)

成束.微管束可以在透射光下观察到.经过标记的微管束照射后很快变成碎片而散掉,而没有经过标记的微管束用激发光照射同样甚至更长时间后,结构仍不变.说明微管断裂同时还由于染料分子的存在.

为了探索微管断裂速度与激发光强度和染料浓度的关系,我们做了激发光衰减实验和不同标记率的实验.图 3(a)为微管断裂时间与激发光强度的关系曲线,横座标是激发光强度,设未经衰减的光强为 1,图中 5 个点分别表示激发光衰减了 20%,50%,60%,90%,99%.纵座标是微管断裂时间,根据 CCD 连续拍摄的照片统计每种处理下最先断裂的 10 根微管的断裂时间,以其平均值作为该处理的微管断裂时间.当激发光衰减到原来的 1%时,微管断裂时间大约为 280s,比未衰减时延长了约 50 倍.图 3(b)是微管断裂时间与微管蛋白不同标记率的关系曲线,从图中可以看出标记率越高断裂越快.以上实验结果进一步验证了微管的断裂是由于激发光作用于染料所致.

微管用激发光照射 1—3s 后关闭激发光,30—50s 后再打开激发光观察,发现微管已经开始断裂.说明在最初的短时间照射过程中已经发生了某种光化学反应,产生了某种物质,这种物质在关闭激发光以后仍然能够作用于微管使之断裂.如果在关闭激发光后使样品温度升至 56°C ,5min 后观察,发现微管断裂的区域由不加热时的原视野扩展到原视野周围的区域,且离原视野越远断裂情况越轻.说明加热促使了这种物质的扩散.

光化学反应常常产生活性氧,活性氧的种类很多,它们对生物分子有很强的破坏作用.双氧水是活性氧的一种.在微管溶液中加入 0.44mol/L 双氧水,

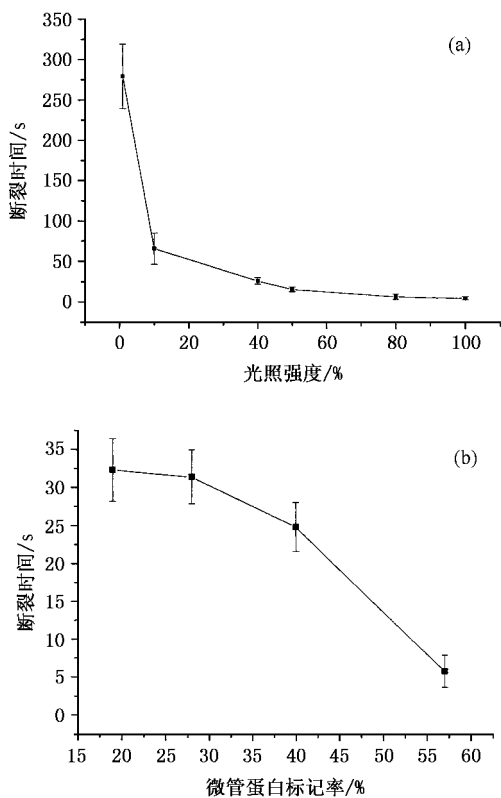


图3 微管断裂时间与光照强度和微管蛋白标记率的关系 (a) 微管断裂时间与光照强度的关系 (b) 微管断裂时间与微管蛋白标记率的关系(结果显示激发光强度越低或者微管蛋白标记率越低,微管断裂越慢)

不经照射在 5min 内对微管基本不会造成影响,但一经激发光照射,微管立刻发生断裂,5s 内完全断裂并漂白(图 4)。加入 0.5 mg/mL 过氧化氢酶使双氧水充分分解后,微管断裂速度减慢很多,但仍比不加双氧水时快。将氮气通入微管溶液排掉溶液中的氧后,发现微管断裂速度也减慢。因此,双氧水可能为光化学反应提供了底物。一方面双氧水即使被过氧化氢酶分解后,仍然可以使水中的溶解氧含量有所增加。而另一方面,降低溶液中的溶解氧浓度又能减缓微管断裂。所以,溶液中的氧气分子可能是一种反应底物,而不是双氧水本身。

叠氮化钠可以猝灭单态氧^[13]。加入 50 mmol/L 叠氮化钠以后发现,在从开始照光的前 10s 内微管几乎不发生断裂,但是从约 15s 时,微管开始迅速发生大量断裂(图 4),大约在 3s 内几乎完全断裂。而不像对照中在最初的一定时间(5—10s)内发生少量的断裂。随着时间的延长微管断裂的频率逐渐增高。可见叠氮化钠只能在短时间内抑制微管断裂,我们推测可能是单态氧以外的其他活性氧导致微管断裂。

抗坏血酸是自由基消除剂。在微管溶液中加入 4 mmol/L 抗坏血酸,可使微管断裂时间延长到 70 多秒(图 4),且漂白也减慢。当抗坏血酸浓度为 8 mmol/L 时,照射 3 min 后只有轻微漂白,且无断裂;照射 6 min 后已基本漂白,但仍未见断裂。说明自由基是导致微管断裂的主要原因。

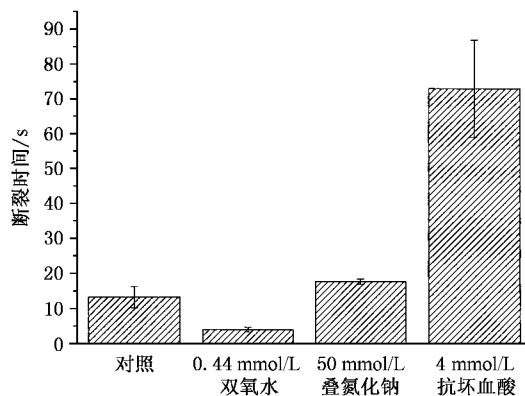


图4 双氧水和活性氧抑制剂对微管断裂的加速或延迟作用(0.44 mol/L 双氧水加速微管断裂,而 50 mmol/L 叠氮化钠和 4 mmol/L 抗坏血酸减缓微管断裂。以 PEPT 为缓冲液的荧光标记微管作为对照)

由此可见,自由基是造成微管光敏断裂的主要因素。结合前面光镊实验的结果可以看出微管各原丝受自由基的攻击不是均衡和相互关联的,而是相互独立的。另外,激发光与染料分子的相互作用,也可以使微管的结构发生变化,这也可能是自由基对微管的破坏作用的一种,或者说自由基对微管的破坏作用可能首先是使微管的结构变松懈。

4. 结 论

本实验用光镊测定了荧光标记微管的光敏断裂过程,发现这种用荧光标记并经紫杉醇稳定后的微管的光敏断裂,实际上是各原丝分别受到自由基的攻击相继断裂而造成微管的最终断裂,微管各原丝之间的相互作用力很小。该状态下的微管易被拉伸,可以伸长达 20%,这与紫杉醇的作用有关,也包括自由基使微管的结构变松懈的作用。因此,不论是紫杉醇还是荧光染料,都对微管的性质有一定的影响。如果在研究微管功能的过程中加入了这两种物质,应该考虑所得到的结论是否涉及微管力学性质的改变。研究结果在方法学上告诉我们在观察样品时如何防止得到因微管断裂而产生的假象。对理解细胞

中活性氧的作用机理也有一定的意义.此外,我们利用光镊技术的研究也为研究微管动态提供了新的手

段和思路,为更深入系统地研究细胞骨架分子力学特征及其他生物大分子的分子力学特征奠定了基础.

- [1] Vigers G P , Coue M , McIntosh J R 1988 *J. Cell Biol.* **107** 1011
- [2] Dixit R , Cyr R 2003 *The Plant J.* **36** 280
- [3] Spom L A , Foster T H 1992 *Cancer Res.* **52** 3443
- [4] Juarranz A , Villanueva A , Diaz V , Canete M 1995 *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **27** 47
- [5] Stockert J C , Juarranz A , Villanueva A , Canete M 1996 *Cancer Chemother. Pharmacol.* **39** 167
- [6] de Pablo P J , Schaap I A , MacKintosh F C , Schmidt C F 2003 *Phys. Rev. Lett.* **91** 098101
- [7] Kerssemakers J W , Janson M E , Van der Horst A , Dogterom M 2003 *Appl. Phys. Lett.* **83** 4441
- [8] Castoldi M , Popov A V 2003 *Protein Expr. Purif.* **32** 83
- [9] Keating T J , Peloquin J G , Rodionov V I , Momcilovic D , Borisy G G 1997 *PNAS* **94** 5078
- [10] Dye R B , Fink S P , Williams R C Jr 1993 *J. Biol. Chem.* **268** 6847
- [11] Svoboda K , Block S M 1994 *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23** 247
- [12] Smertenko A P , Chang H Y , Wagner V , Kaloriti D , Fenyk S , Sonobe S , Lloyd C , Hauser M T , Hussey P J 2004 *Plant Cell* **16** 2035
- [13] Kochevar I E , Dunn D A 1990 *Bioorganic Photochemistry* (New York : Wiley) 273

Photosensitive breaking of fluorescent labeled microtubules and its mechanism^{*}

Xu Chun-Hua¹⁾ Liu Chun-Xiang²⁾ Guo Hong-Lian²⁾ Li Zhao-Lin²⁾ Jiang Yu-Qiang²⁾ Zhang Dao-Zhong²⁾ Yuan Ming^{1)†}

¹ *State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China*

² *Optical Physics Laboratory, Institute of Physics and Center for Condensed Matter Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*

(Received 24 March 2005 ; revised manuscript received 11 May 2005)

Abstract

It is reported that fluorescent microtubules may break under irradiation. However, the process and mechanism are not well understood. In this paper, we study the process of light-induced microtubule breaking by optical tweezers and find the breakup of protofilaments in microtubule is not simultaneous but proceeds step-by-step. After a series of biological experiments, we confirm that free radicals are the main reason for the photosensitive breaking of microtubule. According to the results of optical tweezers experiments, the mechanism of free radicals acting on microtubule is inferred.

Keywords : optical tweezers , microtubule , break , free radicals

PACC : 4260 , 4262 , 8750

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 30421002 , 30128008 and 30170057) and the Chinese National Key Basic Research Special Fund (Grant No. 2002CB713805).

[†] E-mail : mingyuan@cau.edu.cn