

荧光膜片钳新技术的应用及进展*

程 为^{1)**} 李 玫¹⁾ 杜 莎¹⁾ 郑 劼²⁾

(¹⁾ 大连医科大学肿瘤干细胞研究院, 大连 116044;

²⁾ Department of Physiology and Membrane Biology, University of California, Davis, California 95616, USA)

摘要 荧光膜片钳(patch-clamp fluorometry, PCF)是将离子通道蛋白局部的构象变化和门控紧密结合, 实时记录同一膜片上离子通道的荧光和电流信号的创新型生物物理学技术, 其特点是将经典的膜片钳和现代光学记录结合起来, 实时同步完美呈现离子通道执行其功能时的蛋白质构象信息。与研究结构的 X 射线和冰冻电镜不同, 荧光膜片钳提供离子通道处于真实细胞膜生理环境并执行功能的实时动态结构信息。随着新的光学技术、显微成像技术、图像分析技术等进步, 大大地扩展了荧光膜片钳技术的记录范围、分辨精度及敏感度, 使研究者以前所未有的时空分辨率来实时观察和记录离子通道蛋白的结构变化。

关键词 荧光膜片钳, 荧光分子, 蛋白质构象, 膜蛋白, 门控

学科分类号 Q6-33, Q615

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0319

离子通道和转运蛋白是一类复杂的细胞膜蛋白, 其存在使得细胞-细胞间以及细胞-环境间离子交换及相关的信息交流成为可能, 其功能的执行同蛋白质结构变化息息相关。离子通道的开放和关闭的过程称为门控, 离子通道门控的过程是以蛋白质构象重排的形式实现的, 精确地观察解析构象变化及其在信号转导中的作用是揭示通道蛋白功能的分子机制的关键。长期以来, 对离子通道门控的研究通常采用膜片钳这个“金标准”技术来实现。随着对离子通道研究的深入, 简单地记录离子电流显示出了它的局限。首先, 离子电流反映的是通道在开放状态下的功能指标, 它无法直接反映通道蛋白在门控的过程中结构变化的特性; 其次, 由于离子电流仅存在于开放状态, 在多重关闭状态以及过渡状态的信息是缺失的。

荧光膜片钳(patch-clamp fluorometry, PCF)^[1-4]是用来研究这些缺失的信息的一种新的实验技术。荧光膜片钳借助特异位点荧光记录使在细胞膜环境下直接实时观察蛋白质分子活动成为可能, 实现同时记录细胞膜片上的离子通道蛋白的局部结构变化和功能状态。为了获取各种与功能相对应的结构构象信息, 荧光膜片钳利用小荧光分子作为定位探

针, 荧光团被嵌入到通道蛋白或通道配体分子的特异位点(图 1), 研究者可同时记录特异位点的实时荧光和电流^[5-6]。荧光膜片钳技术的应用为膜蛋白及相关转运蛋白、膜受体蛋白结构功能的关系研究提供了一个全新的工具。

1 荧光电压钳技术

在过去的几十年里, 电生理技术的应用使离子通道的功能和调控被广泛研究, 通道蛋白的详细结构信息则采用 X 射线和冰冻电镜的方法获得, 特别是冰冻电镜技术的使用, 在近两年提供了大量存在于膜环境中的通道蛋白的结构信息。然而, 这些方法要么单纯跟踪功能变化, 要么只显示蛋白质结构, 没有一种方法可以直接将离子通道的构象变化和功能状态结合起来。为了克服这一缺陷, 不同的光谱技术被尝试着与经典的电生理学方法结合, 将同时检测通道功能和构象变化直接联系起来。

* 国家自然科学基金海外及港澳学者合作研究基金资助项目(31328011)。

** 通讯联系人。

Tel: 0411-86110529, E-mail: wcheng@dmu.edu.cn

收稿日期: 2015-10-13, 接受日期: 2016-01-12

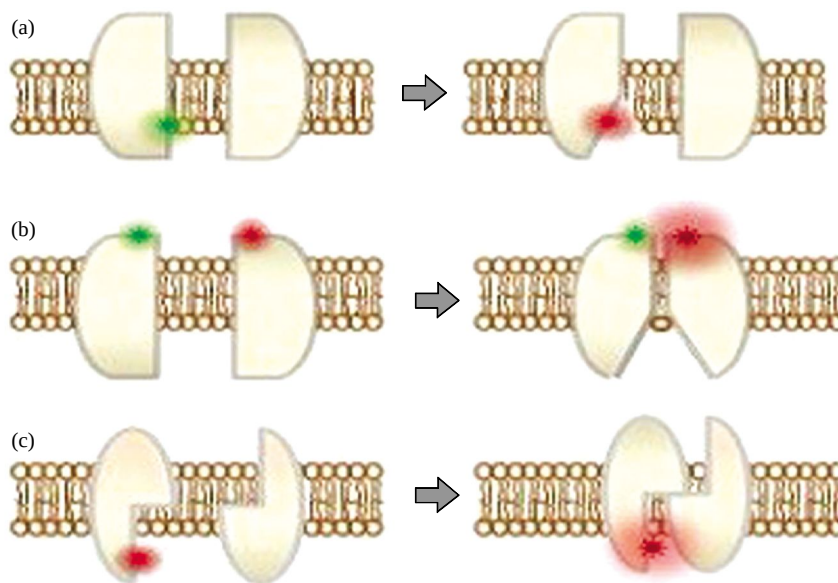


Fig. 1 Site-specific fluorescent labeling as a molecular sensor of conformational change of ion channel protein

图 1 荧光定位标记作为蛋白质结构变化的分子感受器

蛋白质构象变化影响到荧光发射强度的变化(荧光团亮度)或波长的变化(荧光团颜色). (a) 蛋白质局部构象变化引起荧光信号的变化. (b) 由于蛋白质相互作用使荧光团相距变近,发生荧光共振能量转移. (c) 蛋白质相互作用促使荧光信号变化.

20 世纪 90 年代, Dr. Isacoff 等^[7]建立了荧光电压钳(voltage-clamp fluorometry, VCF)技术, 研究钾离子通道蛋白的电压敏感域在电压激活过程中的运动. 最初荧光电压钳用来记录爪蟾卵母细胞全细胞模式下的功能性离子通道. 在实验前几天, 编码包含半胱氨酸离子通道蛋白的 mRNA 通过显微注射, 表达于非洲爪蟾卵母细胞, 随后将卵母细胞浸入包含可与半胱氨酸反应的荧光团的溶液中, 在卵母细胞胞外暴露的半胱氨酸残基即可与荧光团分子通过形成共价键被荧光标定. 通常选取卵母细胞富含色素且胞体组分中产生的自发荧光较少的动物极进行荧光记录. 实验中电压钳记录电压敏感离子通道的激活及检测通道的功能状态, 荧光变化直接记录暴露于细胞外侧的蛋白质结构的实时运动, 其开发者将这一技术命名为荧光电压钳(VCF). 随着该项技术的发展, 结合荧光电压钳和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术, 研究人员证明了电压敏感钾通道的第四跨膜域在电压门控通道的激活过程中经历了原子水平分辨率的转动和可能的平移运动^[7-9]. 同时荧光电压钳也被应用到不同家族的离子通道及膜转运蛋白、受体蛋白的研究^[10-17]. 然而, 研究者发现荧光电压钳受其电压钳制模式和敏感性的限制, 无法解决对于

离子通道胞内部分的结构变化问题.

2 荧光膜片钳技术

2.1 荧光膜片钳技术及其应用

2000 年, 受荧光电压钳的启发, Zheng 与 Zagotta^[18]共同努力, 一种新的结合荧光记录和内面向外膜片钳模式的荧光膜片钳(PCF)技术应运而生, 该技术最初设计解决环核苷酸门控(CNG)通道蛋白与 cGMP 结合所产生的化学能如何驱动通道被激活的问题. 首次报道的荧光膜片钳研究中, 将马来酰亚胺用 Alexa488 荧光标记后, 观察其修饰 CNG 通道蛋白上的半胱氨酸(胞内 C 端环核苷酸结合域的 C481 位点)的作用, 通过记录荧光信号判断修饰所引发的通道蛋白结构变化, 从而影响 cGMP 与 CNG 通道蛋白结合以及通道的激活. 实验时, 采用一根开口大约为几微米的抛光玻璃电极, 封接表达于包含半胱氨酸的离子通道蛋白的细胞膜表面, 通过拉回玻璃电极使细胞表面撕下的一小块细胞膜附着于玻璃电极尖部, 荧光团标记和记录都在这一平方微米尺度的细胞膜片上进行. 荧光膜片钳允许在通道蛋白的胞内及胞外两侧记录荧光信号. 由于荧光信号记录的是从一小片游离膜上包含的离子通道信息, 由胞内组分所产生的自发荧光造成的污染

被除去. 这使得荧光信号的信噪比增加, 从而得到更高的分辨率. 当结合高度敏感性、低噪声的荧光探测器, 荧光膜片钳可以记录到单独一个蛋白质分子, 实现单分子实时记录.

基于内面向外的荧光膜片钳被称为经典荧光膜片钳, 而后不同的研究小组也陆续报道了全细胞模式、细胞贴附模式的荧光膜片钳, 作为荧光膜片钳技术的扩展. Yang 等^[6]将荧光膜片钳技术应用到 HEK 全细胞模式下温度敏感 TRP 离子通道的温度激活的实验研究中, 采用全细胞模式, 同时记录通道电流和荧光信号, 使得荧光膜片钳最初的大部分优势得以保留, 在电流发生阶段, 全细胞荧光膜片钳只记录胞外标定的荧光团. 到目前为止, 荧光膜片钳被应用于 CNG 通道门控及构象变化关系^[1,18]、CNG 通道蛋白亚基配比^[19]、HCN 通道在超极化激活下配体结合和门控间的关系研究^[20-23]. Mony 等^[24]应用荧光膜片钳结合荧光电压钳, 对质子通道 Hv1 的门控研究揭示了通道激活过程中 S1 和 S4 的结构重排, 指出两部分在通道活动中既相互独立又相互影响的特性. 最近 Nomura 等^[25]将荧光膜片钳技术应用于细菌源的机械刺激敏感通道在人工构建的脂质膜中重组的方向特性研究. 毫无疑问, 膜片钳的多种钳制模式使开发荧光膜片钳新方法具有了许多优势.

2.2 荧光膜片钳技术优势

荧光膜片钳技术对胞膜上离子通道的特异位点采用荧光标记, 研究者可以直接观察发生在特定通道结构上的实时构象重排. 半胱氨酸通过基因突变技术被引入到通道蛋白的兴趣位点, 如果必要, 通道蛋白上原有的半胱氨酸可以通过基因突变被全部替换以确保所有记录信号的特异性. 半胱氨酸残基作为与巯基特异反应的荧光团的定位点, 允许特异位点荧光团标定. 电流和荧光信号被同时从同一组

离子通道蛋白记录, 这是荧光膜片钳与荧光电压钳的主要区别之一. 电流信号, 作为通道开放和离子流动的结果, 可做为通道功能的指示器. 当半胱氨酸附近的蛋白质结构重排影响到荧光团的量子产出、迁移率、与邻近的荧光团的距离变化等因素时, 荧光发射也发生改变. 这样, 荧光团可作为蛋白质构象变化的高度敏感的报告基团. 因为荧光信号不像离子电流信号那样依赖于离子通道孔区的开放, 荧光记录为探究离子通道蛋白到达开放状态前的构象变化的时空信息提供了一个新的手段. 荧光膜片钳作为一种全新的研究正常功能下通道蛋白分子活动的方法, 可以广泛应用于任何通道类型, 甚至可以尝试非通道的膜蛋白, 如转运蛋白、受体蛋白等. 研究也表明, 荧光记录也可以成为高通量药物筛选中电流记录的有效替代^[26].

与直径 1 mm 的卵母细胞相比, 分离的膜片要小得多. 那么为什么还能得到足够强的荧光信号呢? 这其中的原因主要有两个. 第一, 在 HEK 细胞膜上可以高密度地表达通道蛋白, 对许多离子通道而言, 从一片分离的细胞膜上可以得到几百到几千个通道分子, 因为敏感的光学探测器(如 CCD 相机)可以观察单个荧光分子, 成百上千个荧光分子所发出的荧光在检测上自然没有问题. 第二, 因为膜片很小, 这样就可以使用高采光效率的光学镜头(如 40 倍数值孔径 NA 值大于 1.4 的高分辨物镜)采集整个膜片上所有的荧光信号. 与之相比, 卵母细胞虽然很大, 但大多数荧光都没有被收集到.

荧光膜片钳记录提供了优越的敏感性和时间分辨率, 而且同荧光电压钳记录相比(图 2), 荧光膜片钳可以直接控制胞内环境, 优势如下: 第一, 可以面对离子通道胞内一侧并对相关区域进行标定; 第二, 排除了由胞内环境所造成的自发荧光, 荧光探测敏感性大为提高; 第三, 可以施加胞内配体及

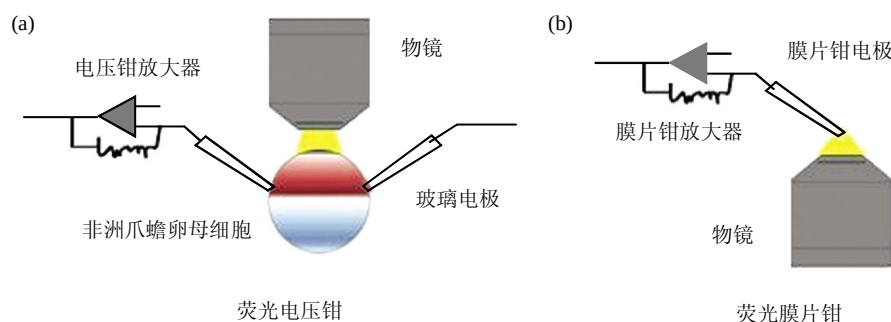


Fig. 2 The schematic diagram of voltage-clamp fluorometry and patch-clamp fluorometry

图 2 荧光电压钳和荧光膜片钳的结构示意图比较

(a) 荧光电压钳操作示意图. (b) 荧光膜片钳操作示意图. 电压钳钳制模式为全细胞而膜片钳为一片独立膜片形式.

通道调节分子来调节通道的门控；第四，电流记录具有更高的时间分辨率^[1, 27]。

荧光膜片钳利用小的荧光分子作为定位分子探针，这些荧光团被嵌入到通道蛋白或通道配体分子的特异位点，荧光发射过程对荧光团周围环境变化具有高度的敏感性，如疏水性、电荷或是偶极、空间制约等等，在荧光团附近的通道蛋白构象重组影响这些参数会改变其荧光发射，这种变化可以从记录到的荧光强度、颜色、各向异性等指标的变化中反映出来。该技术的优势在于其将通道功能状态与通道结构变化完美关联起来^[1, 5-6, 27]。

2.3 荧光膜片钳结合 FRET 技术的应用

随着荧光膜片钳技术的发展，荧光膜片钳结合荧光共振能量转移(FRET)等技术使研究者获得了更多的关于结构变化的细节部分。FRET 是被广泛应用于蛋白质-蛋白质相互作用、域-域相互作用及构象重排的有力工具。结合 FRET 技术监测通道构象变化时，通道蛋白两个或更多位点被供体和受体荧光团同时标记，荧光共振能量转移发生。FRET 可以敏感地探测微小距离的变化，使其成为离子通道研究的有力工具^[28]。Miranda 等^[29]应用荧光膜片钳并结合 FRET 技术检测 BK(大电导、电压及钙离子依赖的钾通道)通道蛋白构象重排，观察到了钙离子的结合诱发通道门控环区域的蛋白质构象发生变化，较之于应用 X 射线测定离体蛋白的晶体结构后所预测的构象变化幅度要大得多。应用 FRET，Yang 等观察到 TRPV1 外孔区在热激活过程的结构变化：通过采用荧光素-马来酰亚胺(FM)和四甲基罗丹明-马来酰亚胺(TMRM)荧光标记位于温度敏感 TRPV1 通道蛋白孔区的两个半胱氨酸测定其 FRET 效率的变化，从而确定温度激活过程引起孔区结构变化从而使通道开放^[5-6]。

新的小分子荧光团及过渡金属离子的引入使得荧光检测的范围更广、灵敏度更高。利用过渡金属与小分子荧光团之间的能量转移(tmFRET)，可以更加准确地记录蛋白局部的微小结构变化。新的超敏感光学探测器如电荷耦合(CCD)相机为荧光膜片钳技术的更新提供了便利基础，而光谱仪(spectrograph)的引入极大地提高了荧光信号的分辨、分离及信息提取能力。

3 结 语

荧光膜片钳技术是膜片钳技术和光学记录完美结合的一项创新型生物物理学技术，该技术利用蛋

白质巯基可被氧化修饰的特点实现了实时动态检测离子通道蛋白的结构和功能，从而达到同时记录在同一膜片上的同一(组)离子通道的荧光信号和电流信号。这一技术可以应用于研究离子通道的结构和功能关系，也可应用于膜蛋白、转运蛋白、受体蛋白等的动力学研究，甚至可以作为高通量药物筛选的有效手段。

但是，目前世界范围内能够成功应用此技术的实验室仍然很少。无论是膜片钳操作，还是荧光标记对于实践者的技能操作要求都非常高，这也是目前为止阻碍这项技术得以推广的主要挑战。同时将荧光标记扩展到如荧光蛋白、小分子荧光团等更广范围，将使研究者有更多的选择。只有这些问题都得到解决，伴随着光学技术、成像技术的创新发展，荧光膜片钳技术将会为研究者提供洞悉蛋白质结构功能的更进一步的微观细节，而不断更新的荧光膜片钳技术必将为生命科学研究领域带来新的曙光。

参 考 文 献

- [1] Zheng J, Zagotta W N. Gating rearrangements in cyclic nucleotide-gated channels revealed by patch-clamp fluorometry. *Neuron*, 2000, **28**(2): 369-374
- [2] Zheng J. Patch fluorometry: shedding new light on ion channels. *Physiology*, 2006, **21**(1): 6-12
- [3] Zheng J, Yang F. Patch fluorometry. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2013
- [4] Kusch J, Zifarelli G. Patch-clamp fluorometry: electrophysiology meets fluorescence. *Biophys J*, 2014, **106**(6):1250-1257
- [5] Yang F, Ma L L, Cao X, *et al.* Divalent cations activate TRPV1 through promoting conformational change of the extracellular region. *J Gen Physiol*, 2014, **143**(1): 91-103
- [6] Yang F, Cui Y Y, Wang K W, *et al.* Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(15): 7083-7088
- [7] Mannuzzu L M, Moronne M M, Isacoff E Y. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*, 1996, **271**(5246): 213-216
- [8] Cha A, Snyder G E, Selvin P R, *et al.* Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured *via* spectroscopy. *Nature*, 1999, **402**(6763): 809-813
- [9] Glauner K S, Mannuzzu L M, Gandhi C S, *et al.* Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*, 1999, **402**(6763): 813-817
- [10] Gandhi C S, Loots E, Isacoff E Y. Reconstructing voltage sensor-pore interaction from a fluorescence scan of a voltage-gated K⁺ channel. *Neuron*, 2000, **27**(3): 585-595
- [11] Li M, Farley R A, Lester H A. An intermediate state of the γ -aminobutyric acid transporter GAT1 revealed by simultaneous

- voltage clamp and fluorescence. *J Gen Physiol*, 2000, **115**(4): 491–508
- [12] Chanda B, Bezannila F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *J Gen Physiol*, 2002, **120**(5): 629–645
- [13] Schonherr R, Mannuzzu L M, Isacoff E Y, *et al.* Conformational switch between slow and fast gating modes: Allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K⁺ channel. *Neuron*, 2002, **35**(5): 935–949
- [14] Sonleitner A, Mannuzzu L M, Terakawa S, *et al.* Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(20): 12759–12764
- [15] Chang Y, Weiss D S. Site-specific fluorescence reveals distinct structural changes with GABA receptor activation and antagonism. *Nat Neurosci*, 2002, **5**(11): 1163–1168
- [16] Asamoah O K, Wuskell J P, Loew L M, *et al.* A fluorometric approach to local electric field measurements in a voltage-gated ion channel. *Neuron*, 2003, **37**(1): 85–97
- [17] Fryatt A G, Evans R J. Kinetics of conformational changes revealed by voltage-clamp fluorometry give insight to desensitization at ATP-gated human P2X1 receptors. *Mol Pharmacol*, 2014, **86**(6): 707–715
- [18] Trudeau M C, William N Z. Dynamics of Ca²⁺-calmodulin-dependent inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels measured by patch-clamp fluorometry. *J Gen Physiol*, 2004, **124**(3): 211–223
- [19] Zheng J, Trudeau M C, Zagotta W N. Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron*, 2002, **36**(5): 891–896
- [20] Kusch J, Biskup C, Thon S, *et al.* Interdependence of Receptor Activation and Ligand Binding in HCN2 Pacemaker Channels. *Neuron*, 2010, **67**(1): 75–85
- [21] Wu S, Vysotskaya Z V, Xu X, *et al.* State-Dependent cAMP Binding to Functioning HCN Channels Studied by Patch-Clamp Fluorometry. *Biophys J*, 2011, **100**(5): 1226–1232
- [22] Marni F, Wu S, Shah G M, *et al.* Normal-mode-analysis-guided investigation of crucial intersubunit contacts in the cAMP-dependent gating in HCN channels. *Biophys J*, 2012, **103**(1): 19–28
- [23] Xu X, Marni F, Wu S, *et al.* Local and global interpretations of a disease-causing mutation near the ligand entry path in hyperpolarization-activated cAMP-gated channel. *Structure*, 2012, **20**(12): 2116–2123
- [24] Mony L, Berger T K, Isacoff E Y. Specialized molecular motion opens the Hv1 voltage-gated proton channel. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, **22**(4): 283–290
- [25] Nomura T, Cox C D, Bavi N, *et al.* Unidirectional incorporation of a bacterial mechanosensitive channel into liposomal membranes. *FASEB J*, 2015, **29**(10): 4334–4345
- [26] Xu J, Wang X, Ensign B, *et al.* Ion-channel assay technologies: Quo vadis? *Drug Discov. Today*, 2001, **6**(24): 1278–1287
- [27] Zheng J, Zagotta W N. Patch-clamp fluorometry recording of conformational rearrangements of ion channels. *Science's STKE*, 2003, (176): PL7
- [28] Zheng J. Domain-domain interactions in ion channel. *J Gen Physiol*, 2013, **142**(4): 347–350
- [29] Miranda P, Contreras J E, Plested A J, *et al.* State-dependent FRET reports calcium- and voltage dependent gating-ring motions in BK channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(13): 5217–5222

Development and Application of Patch-clamp Fluorometry in Life Science Research*

CHENG Wei^{1)**}, LI Mei¹⁾, DU Sha¹⁾, ZHENG Jie²⁾

¹⁾ *Institute of Cancer Stem Cell, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;*

²⁾ *Department of Physiology and Membrane Biology, University of California, Davis, California 95616, USA)*

Abstract Patch-clamp fluorometry is a powerful biophysical method that allows the researcher to monitor conformational changes of ion channel in real time, and to correlate dynamic structural information to functional states. As a natural combination of the classic patch-clamping method and state-of-art optical methods, patch-clamp fluorometry is applicable to a wide spectrum of channel studies with unprecedented spatial-temporal resolutions. Unlike other structure-oriented methods such as X-ray crystallography and cryo-EM, patch-clamp fluorometry provides dynamic structural information of channel proteins in intact cell membrane under physiological conditions.

Key words patch-clamp fluorometry, fluorophore, conformational change, membrane protein, gating

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0319

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31328011).

**Corresponding author.

Tel: 86-411-86110529, E-mail: wcheng@dmu.edu.cn

Received: October 13, 2015 Accepted: January 12, 2016