

单分子荧光共振能量转移技术在核糖体移位研究中的进展*

徐本锦^{1,2,3)} 宋广涛¹⁾ 秦燕^{1,2)**}

¹⁾中国科学院核酸生物学重点实验室, 中国科学院生物大分子卓越中心, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;

²⁾中国科学院大学, 北京 100049; ³⁾山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200)

摘要 核糖体是蛋白质的“合成工厂”,也是临床上多种抗菌药物的作用靶点,因此,深入理解细菌核糖体的蛋白质翻译机制意义重大.蛋白质翻译是通过多步骤相互协调、多组分精细配合来实现高保真和精确调控.核糖体在 mRNA 上的移位作为翻译过程中最重要的事件之一,需要核糖体大规模的构象重排以及 tRNA²-mRNA 沿着核糖体的精确移动.在细菌中,移位是由延伸因子 EF-G 催化 GTP 水解来驱动的.近年来,单分子荧光共振能量技术(smFRET)的发展使得人们可以探究单个 tRNA 分子移位的动力学过程并实时观测核糖体的构象变化.本文首先介绍了 smFRET 技术的原理及特点,对其在核糖体结构动态及 tRNA 移位研究中的应用进行了较为系统的总结,并对其应用前景进行了展望.

关键词 核糖体, 移位, tRNA, 单分子荧光共振能量转移
学科分类号 Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0328

核糖体催化的蛋白质翻译是一个快速、连续和高度调控的过程,需要 tRNA 和多个翻译因子的协同作用将 mRNA 编码的遗传信息转化为多肽链^[1].细菌核糖体是由 30S 小亚基和 50S 大亚基组装而成的分子质量为 2.4 Mu 的 RNA-蛋白酶^[2],其上有 3 个 tRNA 结合位点,分别是 A(aminoacyl-tRNA binding site)、P(peptidyl-tRNA binding site)和 E(exit-tRNA site)位点. tRNA 的反密码子与 mRNA 的密码子精确配对,将密码子上的遗传信息转变成一个特定的氨基酸,这一过程叫做解码.之后延伸因子 Tu(elongation factor Tu, EF-Tu)携带氨酰 tRNA 进入核糖体 A 位点,在肽酰转移酶的催化下, A 位点氨酰 tRNA 上氨基酸的 α 氨基与多肽链与肽酰 tRNA 之间的酯键进行反应,这样,延伸了一个氨基酸的多肽链由 P 位点 tRNA 转移到 A 位点 tRNA.接着,延伸因子 G(elongation factor G, EF-G)催化 GTP 水解促使 tRNA 移位^[3], A 位点和 P 位点 tRNA 分别移向 P 位点和 E 位点.同时, mRNA 相对核糖体精确移动一个密码子.随着 E 位点 tRNA 解离,翻译进入下一个延伸循环.当核

糖体遇到终止密码子时,释放因子 1(release factor 1, RF1)和释放因子 2(release factor 2, RF2)来到核糖体的 A 位点,促使新生肽链释放.肽链释放后,释放因子 3(release factor 3, RF3)结合到 RF1 和 RF2 上,催化 GTP 水解,然后 3 个释放因子离开核糖体.紧接着核糖体再循环因子(ribosome recycling factor, RRF)和 EF-G•GTP 同时结合到核糖体上,伴随着 GTP 的水解,核糖体大小亚基解离,重新进入下一轮翻译循环过程(图 1).

移位是翻译过程中最重要的事件之一,需要核糖体构象的大规模改变以及 tRNA²-mRNA 沿着核糖体的精确移动.尽管生化和结构生物学手段在核糖体移位研究中已经取得了一些进展,然而,翻译延伸过程中核糖体构象重排驱动 tRNA 运动的机制,以及 EF-G 催化的 GTP 水解所扮演的角色仍不

* 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-SMC028)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64869250, E-mail: qiny@ibp.ac.cn

收稿日期: 2017-10-20, 接受日期: 2017-10-30

清楚. 最近发展起来的单分子荧光共振能量技术 (single molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET), 通过检测供体与受体间荧光能量转移的效率, 既可以研究单个分子的构象变化, 也可以研究两个分子之间的相互作用. 该方法能够探测翻译延伸过程中单个 tRNA 分子移位的动力学过程并实时观测核糖体的构象变化, 还能够捕获移

位过程中的一些重要而短暂的中间状态. 在蛋白质翻译研究方面具有强大的力量和广阔的前景, 非常适于研究翻译过程中核糖体与翻译因子的构象变化和结构动力学. 本文主要论述了该技术在细菌核糖体移位研究中的应用, 以期理解蛋白质翻译机制提供新的视角.

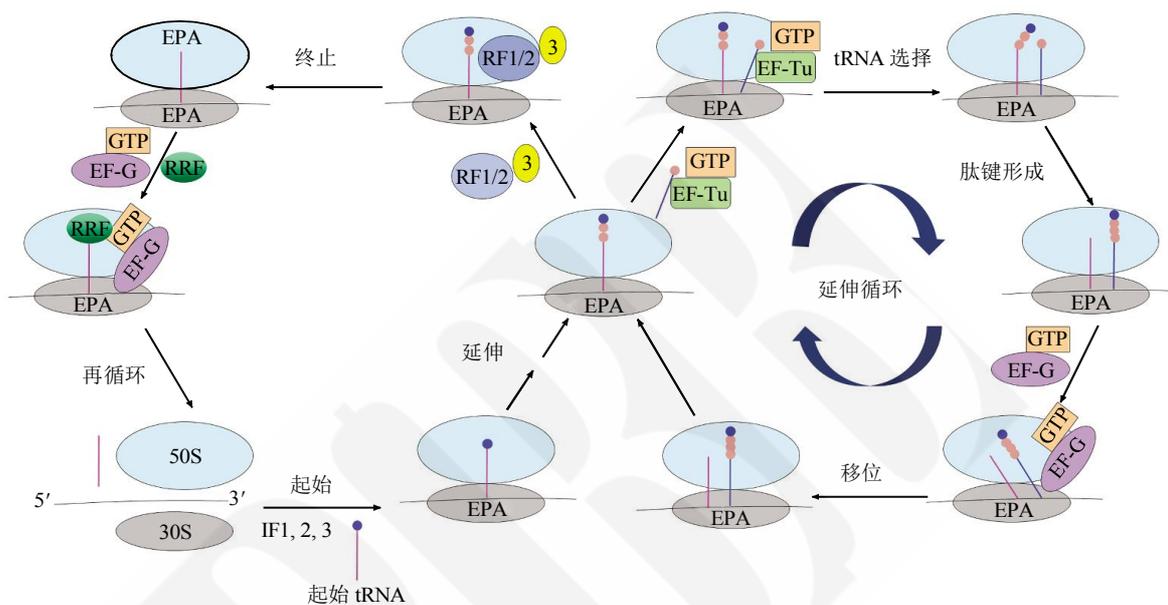


Fig. 1 The prokaryotic translation cycle

图 1 原核生物蛋白质翻译循环示意图

A: 核糖体 A 位点; P: 核糖体 P 位点; E: 核糖体 E 位点; EF-G: 延伸因子 G; EF-Tu: 延伸因子 Tu; RRF: 核糖体再循环因子; RF: 释放因子.

1 tRNA 移位

细菌蛋白质翻译过程由四步构成, 分别是起始、延伸、终止和再循环(图 1). 翻译延伸循环可分为三个基本步骤: 第一步是氨酰 tRNA 的选择, 由 GTP 酶延伸因子 EF-Tu 催化并携带氨酰 tRNA 进入核糖体 A 位点. 第二步是肽基转移, 也就是肽键的形成. 新生肽链由核糖体 P 位点的氨酰 tRNA 转移到 A 位点的氨酰 tRNA 上, 使 P 位点 tRNA 去酰化并将 A 位点 tRNA 上的新生肽链延长了一个氨基酸. 第三步是移位, 核糖体沿着 mRNA 精确移动一个密码子的距离, 新生的脱酰基 tRNA 和肽基 tRNA 分别由核糖体 P 位点和 A 位点移动到 E 位点和 P 位点, 这一步是由另一个重要的 GTP 酶延伸因子 EF-G 催化的^[4]. 移位促使 mRNA 的下一个密码子进入核糖体 A 位点, 以便

该密码子决定的氨基酸参与到下一轮的延伸反应.

移位是翻译延伸过程的主要步骤, 在翻译延伸阶段, EF-Tu 与 GTP、氨酰 tRNA 形成的三元复合物(tertiary complex, TC)来到核糖体 A 位点, 随着氨酰 tRNA 与核糖体的结合, EF-Tu 催化 GTP 水解并带着 GDP 离开核糖体. 此时, 核糖体 A 位点氨酰 tRNA 上氨基酸的 α 氨基, 在肽酰转移酶的催化下, 对多肽链与氨酰 tRNA 之间的酯键进行亲和和攻击, 通过这步反应, 延伸了一个氨基酸的多肽链由 P 位点 tRNA 转移到 A 位点 tRNA. 此时的核糖体被称作移位前复合体(pre-translocation state). 接着, EF-G·GTP 结合上来, EF-G 催化 GTP 水解促使 tRNA 移位, A 位点和 P 位点 tRNA 分别向 P 位点和 E 位点移动约 20Å 的距离^[5]. 同时, mRNA 相对核糖体精确移动一个密码子, 以维持正确的读码框. EF-G·GDP 和 Pi 解离后, 此时的核糖体处于

移位后状态(post-translocation state). 随着 E 位点 tRNA 的解离和新的氨酰 tRNA 的到来, 翻译进入下一个延伸循环(图 1).

2 单分子荧光共振能量转移

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是相距较近的两个荧光分子

之间产生的一种能量转移现象. 当供体的发射光谱与受体的吸收光谱重叠, 且两个分子相距 10 nm 以内时, 就会发生一种非放射性的能量转移, 即 FRET 现象, 使供体的荧光强度减弱, 而受体发射的荧光却增强. FRET 效率与供、受体分子的空间距离紧密相关, 随着距离延长, FRET 效率显著减弱(图 2).

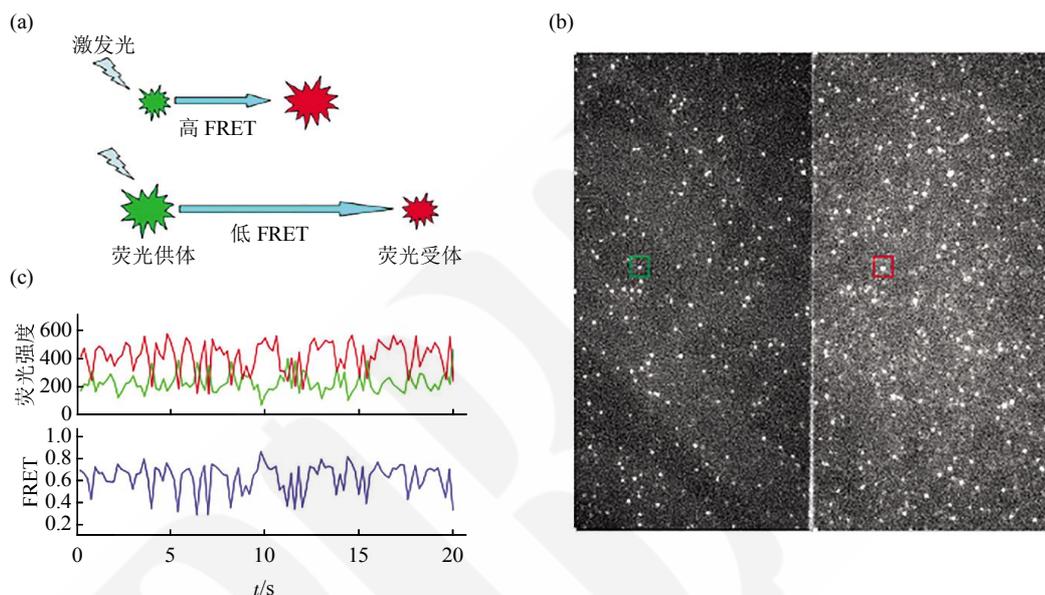


Fig. 2 Schematic diagram of single molecule fluorescence data

图 2 单分子荧光数据示意图

(a) 荧光共振能量转移原理示意图. (b) 典型的 DNA Holliday junction 结构 smFRET 实验荧光图像. (c) 图(b)中方框对应的单分子对 smFRET 曲线.

单分子技术出现之前, 动力学实验只能表示测量时间内的大量分子的平均行为, 而生物体是一个复杂的、动态的不均一系统, 因此, 监测单个分子的动态变化意义重大. SmFRET 通过检测单个分子内供体与受体间荧光能量转移的效率, 来研究分子的构象变化. 常用于研究 3~8 nm 范围的距离变化. SmFRET 技术于 1996 年首次引入^[6], 近年来发展迅速, 已被广泛用于一系列生物系统的研究, 包括 DNA/RNA^[7]、蛋白质和大分子复合体^[8], 以及免疫分析. SmFRET 的敏感性主要依赖于选择的荧光基团, 实验室常用的有 Cy 系列和 Alexa 系列荧光染料, Cy3/Cy5 以及 AF647/AF555 是 smFRET 研究最常用染料对.

利用 smFRET 研究核糖体移位的动力学过程, 通常需要对核糖体或 tRNA 进行荧光标记. 由于 FRET 技术对荧光分子对之间的距离要求较高, 因

此, 选择合适的标记位点非常重要. 通常, 人们首先根据已有的核糖体高分辨结构进行位点选择, 并通过实验进行筛选. 目前已经获得了多种比较合适的标记方式. 对于核糖体的标记, 包含 rRNA 或核糖体蛋白(r-protein)标记两种. Dorywalska 等^[9]报道了一种利用荧光标记的寡核苷酸与特定的 rRNA 杂交来实现核糖体标记的方法. 并且该方法已被成功用于核糖体动力学研究当中^[10]. 对于 r-protein 的标记, 常用的策略是, 通过系统分析和结构建模选定目标 r-protein; 然后体外构建只含单个半胱氨酸的突变体 r-protein, 例如 L1(T202C)^[11]/L1(S55C)^[12]或 L11(C38S/S87C)^[13], 并使用 Cy3/5 马来酰亚胺衍生物对该突变体 r-protein 进行特定定位点的荧光标记, 这种标记的原理是利用 Cy3/5 的马来酰亚胺与突变体 r-protein 中半胱氨酸的巯基反应实现的; 最后将标记的 r-protein 体外重构到该 r-protein 敲除的核糖

体中来实现对核糖体的标记. 由于核糖体重构过程非常复杂, 且效率不高, 人们也开始尝试其他替代方式, 如 Q-tag^[14]、sfp^[15]等方式. 对 tRNA 的标记, 主要利用 tRNA 特有的稀有碱基的特殊反应活性来实现. 在 smFRET 研究中, 主要有 3 种碱基, 分别是: 二氢尿苷(dihydrouridine)^[16]、3-(3-氨基-3-羧丙基)-尿苷(acp³U)和 4-硫代尿苷(s⁴U)^[17]. 对起始 tRNA^{Met} 的荧光标记, 通常是通过第 8 位的 4-硫代尿苷(s⁴U8)与 Cy3/5-马来酰亚胺之间的烷基化反应实现的^[18]. 对 tRNA^{Phe} 的荧光标记, 则是通过第 47 位 3-(3-氨基-3-羧丙基)-尿苷(acp³U47)的伯脂肪族氨基与 Cy3/5-NHS 酯之间的酰化反应实现的^[19]. 由于在原核和真核细胞内的广泛存在, 以及被 NaBH₄ 还原时呈现出的独特化学活性, 二氢尿苷(dihydrouridine)长期以来被选做共价连接荧光基团的位点. 但是这种标记方法的精确反应机制到目前为止仍不清楚^[16]. SmFRET 已成为检测活体中生物大分子纳米级距离和纳米级距离变化的有力工具.

SmFRET 效率可用下述公式^[20]计算:

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

其中 E 表示供体与受体之间的荧光传递效率, R 表示 2 个荧光基团之间的距离, R_0 代表荧光传递效率为 50% 时, 2 个荧光基团之间的距离, 一般在 ~6 nm. 对离散状态的荧光强度进行分析, 可以鉴定出反应的中间状态, 对不同 FRET 状态的寿命分布进行统计学分析, 可以得到反应的动力学数据^[21].

SmFRET 的发展得益于技术的进步. 近年来, 显微技术和照相技术的突破性进展以及荧光染料的发展, 推动了 smFRET 的快速发展. 首先, 全内反射荧光(total internal reflection fluorescence, TIRF)显微镜的发展^[22], 使信噪比显著提高; 其次, 荧光染料的亮度及光学稳定性得到极大的提高^[23]; 再次, 低温电荷耦合器的突破性进展, 使量子效率得到极大提高, 时间分辨率也达到了毫秒级^[23]. 此外, smFRET 技术的发展还得益于数据处理模型的发展, 主要的包括基于隐马尔可夫模型(hidden Markov model)的 Hammy 软件^[24]和 post-synchronization 的数据处理方法^[25]. SmFRET 的最大特点是能实时反应生物体系内单个分子的分布状况及构象变化. 在复杂的生化体系中, 单分子方法能在不同步化每一步反应的情况下研究特定的动态

化学反应^[26]. SmFRET 可用于研究群体分子的分布状态, 同时还能探测短暂且稀有的构象变化^[23].

SmFRET 时间分辨率高, 可达微秒级, 灵敏度强, 能用于复杂体系, 离体和活体系统均适用. 在生物大分子结构研究方面, 相比 X-Ray、NMR 等手段, smFRET 操作简便, 在溶液中即可进行. 另外, 与光镊、磁镊技术相比, smFRET 不太容易受环境噪音的影响, 获取数据 相对容易. SmFRET 还能筛选出单个分子间的内源不均一性, 最大程度地实现生化反应速率的准确定量^[27].

3 smFRET 在核糖体移位研究中的应用

过去的 10 多年里, smFRET 方法已被成功用于研究核糖体移位过程中的多个事件. 实验中所用过的 FRET 对主要包括 L1-tRNA 来研究 tRNA 在 P- 和 E- 位点的移动^[11], L11-tRNA 来研究 tRNA 在 A- 和 P- 位点的移动^[13], S11-L9^[28]、S6-L9^[28]和 30S h44-50S H101^[29]来研究核糖体大小亚基的相对转动, 以及 S13-L5^[30]来研究核糖体小亚基头部相对于大亚基中央凸起的扭动(图 3). 图 3a 是利用 smFRET 研究核糖体移位的示意图, 核糖体通过 mRNA 被固定在玻片表面, 特定的 FRET 对分别被荧光标记, 通过探测二者之间的 FRET 变化来研究核糖体移位的动力学过程.

3.1 移位过程中核糖体本身的动态特性

单分子方法研究翻译过程的一个主要目标就是直接并实时跟踪核糖体的动态运动, 包括局部结构域的运动(例如 L1 Stalk、30S 亚基的头部结构域)和核糖体亚基的运动. Spirin^[31]和 Bretscher 等^[32]首次将核糖体功能与其结构动力学联系在一起. 他们推测, mRNA 和 tRNA 在核糖体上的偶联移动是基于大小亚基间的旋转运动. Frank 和 Agrawal^[33]的冷冻电镜数据第一次直接证明了移位过程中核糖体亚基的独立运动. Ermolenko 等^[28]用 smFRET 方法研究了溶液中核糖体大小亚基之间的运动. 通过观察核糖体蛋白 S6-L9 与 S11-L9 之间的 FRET 变化, 作者推测翻译过程中核糖体大小亚基存在相对运动, 并发现 EF-G 的结合导致 30S 亚基相对 50S 亚基发生逆时针旋转运动. 这与之前报道的冷冻电镜结果一致. 结合化学探针和 smFRET 方法, 研究发现, EF-G 诱导的亚基旋转状态相当于早期化学探针法描述的核糖体杂合构象. 因此, 核糖体杂合状态与棘轮模型在移位机制上是一致的. 另外, 已经有直接和间接的实验证明, EF-G 可直接与经典和

杂合状态的移位前复合体结合来诱导移位过程^[13,34-35]。并且 EF-G 的结合会加速移位前复合体由经典状态

向旋转状态的转变(图 4)。

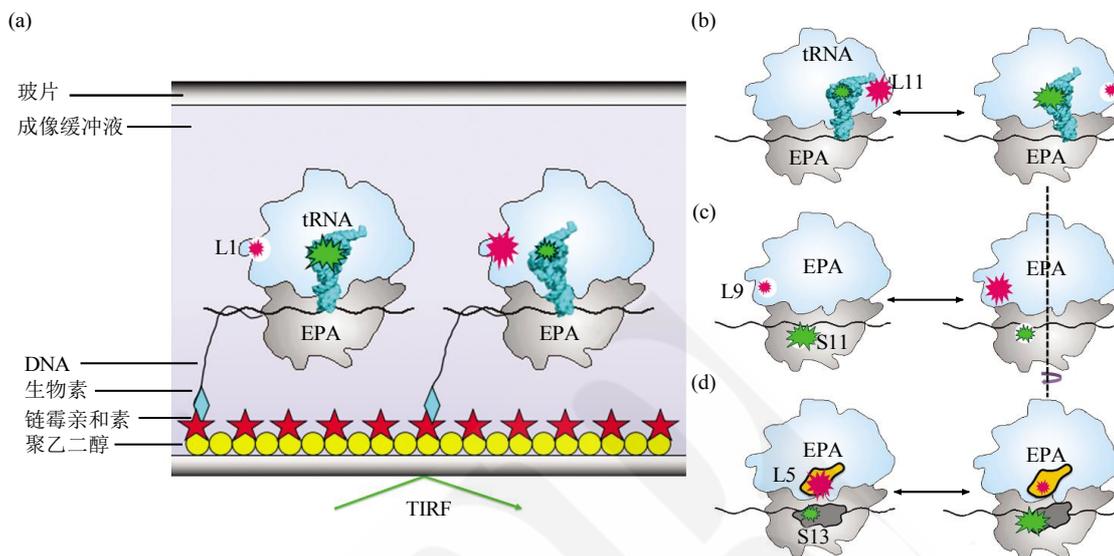


Fig. 3 Basic setup and labeling sites of smFRET experiment used in translocation study

图 3 核糖体 smFRET 实验设计示意图和标记位点

(a) P 位点 tRNA 和 L1 分别作为供体(用绿球表示)和受体(用红球表示), 用于研究 tRNA 从 P 位点向 E 位点的移动. (b) A 位点 tRNA 和 L11 分别作为供体和受体, 用于研究 tRNA 从 A 位点向 P 位点的移动. (c) S11 和 L9 分别作为供体和受体, 用于研究移位过程中核糖体大小亚基的相对运动. (d) S13 和 L5 分别作为供体和受体, 用于研究移位过程中核糖体小亚基的头部相对于大亚基中央凸起的运动.

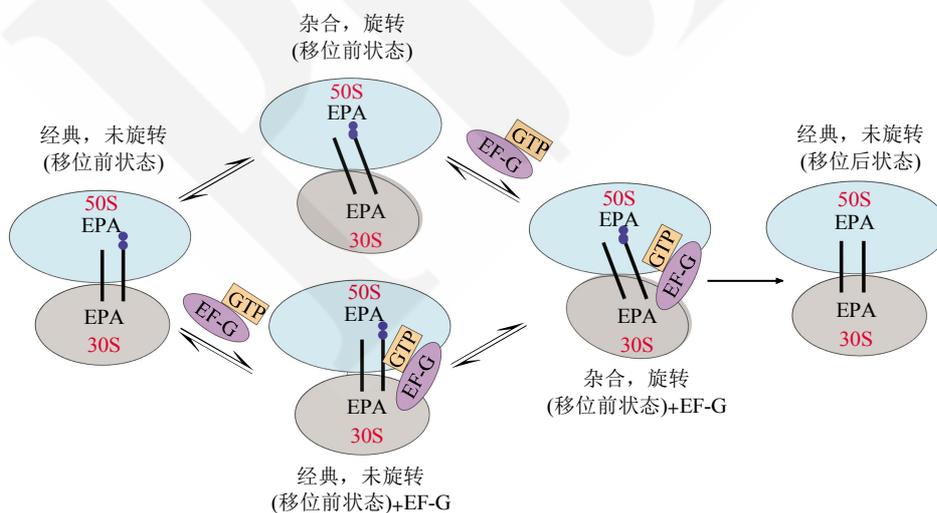


Fig. 4 Schematic depiction of the movement of tRNAs during translocation

图 4 核糖体移位过程中 tRNA 运动示意图

Spirin^[31]认为, 移位是由一系列“locking”和“unlocking”事件控制的, 这些事件导致核糖体出现“locked”和“unlocked”两种构象. 肽键形成之前, 大小亚基结合紧密. 肽键形成后, 核糖体处于 unlocked 状态, 大小亚基和 tRNA 可以自由移动

以便移位. 移位完成后, 核糖体回到 locked 状态, 再次限制了大小亚基和 tRNA 的运动. Aitken 和 Puglisi^[29]分别标记 30S helix44 与 50S helix101, 追踪了 30S 亚基 body 结构域的运动, 证实延伸过程中核糖体存在两种整体构象, 为 Spirin 提出的

“locking/unlocking”翻译延伸模型提供了直接证据。即非旋转状态的核糖体处于 locked 构象,一旦肽键形成,核糖体回到 unlocked 构象,tRNA 在经典与杂合状态间波动,核糖体处于高度动态状态,准备移位。EF-G 催化的移位将核糖体 relock,再次抑制了核糖体的局部动态性^[29]。

处于 unlocked 状态的核糖体复合物除了 tRNA 动态活性较高外,其他部位也有较高的动态活性。Cornish 等^[36]利用 smFRET 方法标记核糖体蛋白 S6、S11、L9 等,研究了大小亚基的运动情况。他们发现,肽键形成后 30S 亚基的 head 结构域会发生自发旋转。作者认为,S6:L9 的高 FRET(~ 0.6)表示核糖体处于非旋转构象,tRNA 处于经典状态;S6:L9 的低 FRET(~ 0.4)表示核糖体处于旋转构象,tRNA 处于杂合状态。因此,30S 亚基 head 结构域的构象重排可能与 tRNA 的动态波动是偶联的。此外他们还发现,P 位点若结合脱酰基 tRNA,移位前核糖体在经典和杂合构象间自发波动^[36]。P 位点若结合肽酰 tRNA,移位后核糖体则主要处于经典的非旋转构象。基于 smFRET 和化学探针数据,研究表明,核糖体杂合构象的稳定性既受 EF-G 的影响,又受脱酰基 tRNA 接受臂向 50S 亚基 E 位点移动的影响^[36]。Marshall 等^[37]对核糖体大小亚基进行了位点特异性标记,通过 smFRET 研究了核糖体整体动力学,认为肽键的形成与亚基间的棘轮运动是偶联的。肽键形成释放的能量也许为 30S 亚基的棘轮运动提供了推动力。核糖体亚基间的旋转运动涉及蛋白质翻译的起始、延伸和终止,小亚基的逆时针运动在真核翻译中也存在,因此,亚基间的运动以及杂合的中间状态似乎是所有生物蛋白质翻译过程的普遍特征,同时也解释了核糖体在生物界的高度保守性^[38]。

3.2 移位过程中 tRNA 的运动特性

翻译延伸过程中,核糖体选择合适的氨酰-tRNA 并催化肽键形成。随后,tRNA 沿着 mRNA 在核糖体上移动,这一过程中涉及到众多 RNA-RNA 以及 RNA-蛋白质相互作用的打破与形成。SmFRET 技术在蛋白质翻译方面的研究最初主要集中在 tRNA 的动态特性上^[39-41]。Blanchard^[40]和 Kim^[42]分别对 A 位点和 P 位点 tRNA 进行荧光标记,研究了延伸过程中 tRNA 的运动行为。他们发现,肽键形成后 2 个 tRNA 之间的 FRET 在不断变化,作者认为低 FRET 是 tRNA 的杂合状态,即 A 位点和 P 位点 tRNA 的 3'端转移到了 50S 亚基的 P

位点和 E 位点。tRNA 的这一杂合状态出现在移位之前,冷冻电镜结构也验证了这一点^[43]。Munro^[44]用相同的方法得到了相似的结果,即没有 EF-G 时,tRNA 在移位前核糖体上处于经典和杂合构象的动态平衡。有文献报道^[45]核糖体 A 位点被肽基 tRNA 占据时,tRNA 处于杂合构象,然而当 A 位点被氨酰-tRNA 占据时,tRNA 则保持经典构象。Semenkov 等^[46]研究表明,A 位点是肽基 tRNA 的移位速率要比 A 位点是氨酰 tRNA 的移位速率快。这些结果表明,肽键形成后,tRNA 更倾向于形成杂合状态,为 EF-G 催化的移位做好准备。另外,Munro 等^[44]的实验同时观测到 tRNA 的两种不同的杂合构象。第一种是常见的杂合构象,即 A 位点和 P 位点 tRNA 的 3'端分别指向了 50S 亚基的 P 位点和 E 位点。另一种杂合构象是一种亚稳态构象,即只有 P 位点 tRNA 的 3'端指向邻近的 50S 亚基 E 位点。

Blanchard 等^[47-49]通过 smFRET 监测核糖体内部多个距离的变化,研究了移位前核糖体构象的动态波动。研究表明^[11], Mg^{2+} 在生理浓度(3.5 mmol/L)且没有 EF-G 时,PRE 状态的核糖体亚基会发生随机旋转。该现象已被冷冻电镜结果所证明^[33]。Wang 等^[50]的 smFRET 实验证明,PRE 状态核糖体在经典和杂合构象之间的转变是温度依赖的,是热驱动的布朗过程。SmFRET 强调,tRNA 在核糖体上由经典构象向杂合构象的转变,与核糖体亚基间的旋转是热力学和动力学耦合的。而 Cornish 等^[36]发现核糖体亚基间的旋转速率比 tRNA 在经典与杂合状态间的波动速率慢 10 倍。同样的,一项三色 FRET 研究表明,50S 亚基 L1 stalk 的打开和关闭与 P 位点 tRNA 在经典-杂合构象间的波动只是松散偶联^[51]。可以推定,tRNA 的构象受核糖体内部缓慢变化的分子环境的影响^[52]。换句话说,tRNA 的移动与核糖体亚基间的运动是热力学而非动力学偶联的。

3.3 移位过程中 L1 stalk 的动态特性

移位过程由两个独立并连续的步骤构成。第一步发生在肽键形成之后,tRNA 的氨基酸接收臂末端由 A、P 位点分别移向 P、E 位点。而肽酰 tRNA 和去氨酰 tRNA 的反密码环末端仍处于 30S 亚基的 A 位点和 P 位点,使 tRNA 形成 A/P 和 P/E 的杂合状态。随后,在 EF-G•GTP 的催化下,tRNA 分别由 A/P、P/E 的杂合状态转向 P/P、E/E 的经典状态(图 4)。核糖体冷冻电镜结构和 X 射线晶体结构比

对结果表明, tRNA 移位过程中, 亚基间的运动与核糖体大小亚基内部额外的结构重排是偶联的^[53-54]. 特别是作为 50S 亚基结构特征的 L1 Stalk 的运动, 被认为与 tRNA 移位有关^[54-55]. L1 Stalk 是 50S 亚基普遍保守和高度动态的结构特征, 主要由 L1 蛋白和 23S rRNA 的 helices 76~78 组成. 研究表明, L1 蛋白的缺失强烈抑制移位^[56]. Munro 等^[44]利用 tRNA:tRNA 的 FRET 信号, 发现 L1 的缺失倾向于使 tRNA 保持经典状态, 表明 L1 stalk 的动态运动也许有助于 tRNA 的移动. Valle 等^[55]的冷冻电镜数据表明, 移位过程中核糖体 30S 亚基相对于 50S 亚基转动时, 伴随着 L1 stalk 约 20Å 的移动, 同样暗示 L1 stalk 可能参与脱酰基 tRNA 由 P 位点向 A 位点的移位. 结合 EF-G 的核糖体冷冻电镜结构显示, L1 Stalk 与 P/E 杂合状态的脱酰基 tRNA 肘部存在直接相互作用. 基于这一发现, Valle 等^[55]认为 L1 Stalk 也许直接参与新生脱酰基 tRNA 由 P 位点向 E 位点的移位.

近年来, Fei 等^[11]利用 smFRET 方法对 E 位点或 A 位点 tRNA 与 L1 stalk 之间的动力学进行了研究. 作者发现, 不加 EF-G 时, 移位前核糖体在两种构象之间波动, 一种是非旋转状态, tRNA 处于经典构象, L1 Stalk 与 tRNA 之间没有相互作用 (FRET 为 0). 另一种是旋转状态, tRNA 处于杂合的中间构象, L1 Stalk 与 tRNA 之间具有直接相互作用 (FRET 为 0.8). EF-G 的加入促使平衡朝向旋转状态进行, 导致 FRET 信号增强. 以上结果表明, 移位过程中 L1 stalk 的关闭稳定了 tRNA 的杂合状态, 然后护送 E 位点 tRNA 离开核糖体. 然而, L1:tRNA FRET 信号并不能给出 L1 stalk 相对于整个核糖体的方向. 另外, 研究发现经典 E/E 状态的 tRNA-L1 FRET 与杂合 P/E 状态的 tRNA-L1 FRET 并没有显著差异. 再加上标记的 tRNA 和 L1 stalk 都是可动的结构元件, 因此, 对这一结果的解释是不明确的.

Cornish 等^[57]用 Cy5 和 Cy3 对 50S 亚基的 L1 和 L33 蛋白分别进行了标记, 直接观测了翻译延伸阶段 L1 Stalk 的实时动力学. 作者发现, L1 Stalk 相对于 50S 亚基的运动至少有 3 种不同的构象状态: 打开、半关闭和完全关闭. 作者认为低 FRET 是因为 L1 Stalk 发生了最大限度的旋转, 远离了 50S 亚基, 这可能促进 E 位点 tRNA 的解离. 中间状态 FRET, 表明 L1 Stalk 向内移动, 以便与 E/E 状态的 tRNA 肘部相互作用. 高 FRET 是脱酰

基 tRNA 处于 P/E 杂合状态时观察到的, 很可能是由于 L1 Stalk 最大程度的向内偏移, 以便到达 P/E tRNA 的肘部^[58]. 作者认为 L1 Stalk 通过重构 50S 亚基 E 位点的结构而使其处于三种不同的构象状态, 帮助脱酰基 tRNA 在核糖体的结合、移动和释放, 并且这三种状态受 tRNA 在核糖体上的位置和酰化状态的控制. 当 L1 Stalk 与经典 E/E 状态的脱酰基 tRNA 相互作用时, 它处于一种“半关闭”的中间构象. 由此可以推测, L1 Stalk 与 E 位点 tRNA 的相互作用稳定了 L1 Stalk 的“关闭”构象. 这些发现为理解翻译延伸阶段 tRNA 在核糖体上移动和释放机制提供了线索.

脱酰基 tRNA 在移位结束后离开核糖体 E 位点^[59]. Cornish 等^[57]发现绝大部分移位后核糖体的 L1 Stalk 处于打开状态, 这与脱酰基 tRNA 进入 E/E 位点后再从 E 位点释放是一致的. 因此, 普遍认为移位后 L1 Stalk 的“打开”协助 E 位点 tRNA 的解离, 然而, 究竟是什么因素触发了 L1 Stalk 的打开仍不清楚. Fei 等^[11]实时单分子实验表明, L1 Stalk 与 tRNA 的相互作用持续存在于整个移位过程中, 因此 L1 Stalk 护送 tRNA 由杂合的 P/E 转向经典的 E/E 构象, 指导 tRNA 在核糖体上的移动 (图 5). Fei 等^[60]进一步研究表明, EF-G 的结合促使 L1 Stalk 采取关闭构象, 在移位后复合体中, L1 Stalk 的构象依赖于 E 位点 tRNA 的存在和性质, 因此, 作者认为 EF-G 与 L1 Stalk 变构调节并指导 tRNA 由 P 位点向 E 位点移动. 冷冻电镜结果显示, L1 Stalk 存在大规模的运动, 这也许与 E 位点 tRNA 的定位和动力学有关^[61]. 然而, 到目前为止, L1 Stalk 的动力学与整个核糖体动力学之间的关系仍不清楚. 当前普遍认为, 移位过程中, 非旋转构象核糖体上的 tRNA 处于经典状态, L1 stalk 打开. 肽键形成后核糖体亚基间的棘轮运动导致 tRNA 和 L1 Stalk 分别在经典 - 杂合、打开 - 闭合状态间波动. 这种运动有助于 tRNA-mRNA 的移位. Chen 等^[34]利用 smFRET 方法发现, 在肽链延伸的早期, 脱酰基 tRNA 被保留在 E 位点, 当下一轮氨酰 tRNA 进入 A 位点后, E 位点 tRNA 才被别构调节而解离, 并且这一过程受移位前新生肽链的长度、序列以及 tRNA 构象的调控. 而在蛋白质合成的后续循环, E 位点 tRNA 的解离是自发进行的. 然而, 核糖体如何调控 tRNA 解离, L1 Stalk、tRNA 以及核糖体亚基的运动是随机发生还是相互偶联, 这些问题的研究仍有待深入^[12].

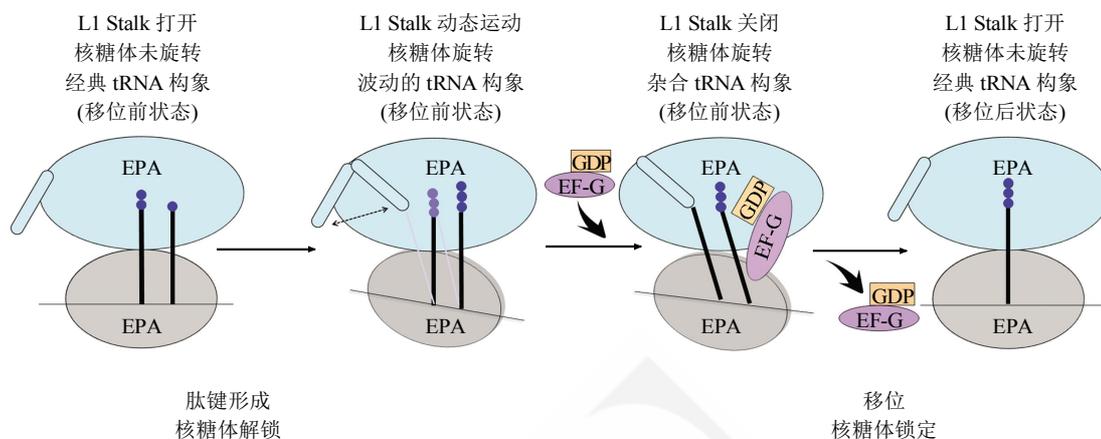


Fig. 5 Schematic depiction of the dynamics of ribosome complex during translocation

图 5 核糖体移位过程中核糖体本身动态行为示意图

3.4 EF-G 和 EF4 对移位过程的影响

EF-G 的 domain I 包含 G' 和 G 2 个亚结构域, G 的主要功能是催化 GTP 水解, domain IV 负责催化移位. 研究表明, 移位前核糖体 A 位点有 tRNA, EF-G domain IV 的头部离 A 位点约 20Å 的距离. 然而, 移位后核糖体 A 位点没有 tRNA, EF-G domain IV 占据 A 位点. 因此, 很可能是 EF-G 的 domain IV 相对 domain I 的旋转运动促使 A 位点 tRNA 移位. 另外, EF-G 的 G 结构域与肌动蛋白和肌球蛋白等马达蛋白具有很多结构上的相似点, 因此, 可以预测, EF-G 的超级结构域 III-IV-V 相对于 I-II 的运动推动了 tRNA 的移位. Salsi 等^[61]利用整体和 smFRET 方法分别研究了不结合核糖体的自由 EF-G 和结合核糖体的 EF-G domain IV 相对于 domain II 的运动. 结果表明, 溶液中 EF-G 在紧密和伸展两种构象之间转变. 不结合核糖体的 EF-G 大部分处于结构紧凑的构象, 而核糖体结合的 EF-G 主要处于伸展构象, domain IV 远离了 domain II. 出乎意料的是, 通过抗生素抑制移位实验和 GTP 类似物替代 GTP 实验, 作者发现, EF-G 结构域间的大规模重排不直接与 GTP 水解和 tRNA₂-mRNA 移位偶联, 而是由 EF-G 与核糖体的相互作用引起的. 因此, 很可能是在 GTP 水解和 tRNA₂-mRNA 移位之前, EF-G 一旦与核糖体相互作用, 便很快从紧凑构象转变为伸展构象.

移位反应的快速和精确进行需要 EF-G 催化 GTP 水解所释放的能量. 然而, 该能量主要作用是驱动 tRNA₂-mRNA 移动, 还是移位结束后催化

EF-G 从核糖体解离, 这个问题很长时间都没有定论. Chen 等^[63]利用单分子极化全内反射荧光显微镜, 第一次捕获到正常移位反应中 EF-G 的单个结构域相对核糖体的旋转运动. 作者发现, GTP 水解后, 整个 EF-G 相对核糖体有一个 10° 左右的运动, 紧接着, EF-G 的 domain III 会发生更大角度的旋转运动, 然后从核糖体解离. 由此他们提出了一个移位的杂合模型, 即移位的起始步骤是由 EF-G 催化 GTP 水解的能量驱动的核糖体 “unlocking” 过程, 而后面的步骤主要是由核糖体自身的能量来驱动的. 这些结果表明, 核糖体与 EF-G 利用 “做工” 和 “棘轮运动” 两种机制来确保移位的效率和准确性.

EF4 是细菌体内高度保守的蛋白质, 对细菌的生长和功能蛋白的合成非常重要. EF4 与 EF-G 具有相似的结构特点. 研究发现, EF4 是一个核糖体延伸因子, 与移位后复合体存在相互作用, 并具有反移位酶的活性, 可以促使核糖体反向移位^[64-65]. 溶液中自由的 EF4 可以识别停滞的 POST 状态核糖体, 让 POST 核糖体回到 PRE 状态, 重新进入移位循环过程^[66]. 这种反向移位对于新生肽链的正确合成非常重要^[67]. 一方面, EF4 给核糖体和 tRNA 二次移位的机会, 有助于核糖体检验并校正 A 位点读码框的正确性. 另一方面, 这种反向移位增加了新生肽链在核糖体的停留时间, 有助于新生肽链的边合成边折叠. Liu 等^[68]的 smFRET 研究发现, EF4 对翻译延伸循环具有调控作用. EF4 能与 EF-G 竞争结合移位前核糖体, 使翻译延伸受到短

暂抑制, 这种抑制有助于功能蛋白的合成。

4 结论与展望

复杂的翻译系统需要核糖体的精细调控以及翻译因子和 tRNA 的协同作用。过去的十多年里, 借助已有的生化数据和高分辨率结构信息, 人们利用 smFRET 技术对一些重要的翻译事件, 例如 tRNA 选择、肽键形成以及核糖体移位进行了系统研究, 使我们对蛋白质翻译机制有了许多新的认识和理解。然而, 真实翻译系统的分子复杂性和高背景信号仍然是一个挑战^[69]。此外, 该技术本身的不足和缺陷导致许多研究仍不能有效开展。例如: smFRET 对两个荧光染料之间的距离要求是 1~10 nm, 超出该范围后 FRET 对距离的变化变得不敏感; 受 CCD 相机帧频的限制, smFRET 的时间分辨率较低; 荧光特性和能量转移对染料环境和方向具有依赖性, 并且容易受潜在的人为因素的影响^[70]。因此, 核糖体动态研究的进一步深入有赖于该 smFRET 技术本身的日益完善与改进以及与其他方法的联用。事实上, 近年来 Puglisi 研究组及其合作者, 将零级波导(zero mode waveguides, ZMW)技术与单分子荧光技术联用, 实时观测到了近生理条件下单个核糖体如何将氨基酸串联起来的过程^[1]。最近, Peng 等^[71]发展了 sm-PAFRET 的新方法, 实现了在近生理浓度下观测蛋白质翻译的延伸过程, 并发现了以前在低浓度实验条件下没有观测到的新现象。我们相信, 随着 smFRET 技术的日益完善, 其在生物翻译系统的更精细的调控事件, 例如核糖体在 mRNA 上的扫描机制、预起始复合物的结构重排过程、IRES 控制的翻译起始等关键问题研究中会发挥更加重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Uemura S, Aitken C E, Korlach J, *et al.* Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, 2010, **464**(7291): 1012-1017
- [2] Yusupov M M, Yusupova G Z, Baucom A, *et al.* Crystal structure of the ribosome at 5.5Å resolution. *Science*, 2001, **292** (5518): 883-896
- [3] Rodnina M V, Savelsbergh A, Katunin V I, *et al.* Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature*, 1997, **385**(6611): 37-41
- [4] Wintermeyer W, Peske F, Beringer M, *et al.* Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine. *Biochemical Society Transactions*, 2004, **32**(Pt 5): 733-737
- [5] Fourmy D, Recht M I, Puglisi J D. Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16 S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, 1998, **277**(2): 347-362
- [6] Ha T, Enderle T, Ogletree D F, *et al.* Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(13): 6264-6268
- [7] Zhuang X. Single-molecule RNA science. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2005, **34**: 399-414
- [8] Myong S, Stevens B C, Ha T. Bridging conformational dynamics and function using single-molecule spectroscopy. *Structure*, 2006, **14**(4): 633-643
- [9] Dorywalska M, Blanchard S C, Gonzalez R L, *et al.* Site-specific labeling of the ribosome for single-molecule spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(1): 182-189
- [10] Marshall R A, Aitken C E, Puglisi J D. GTP hydrolysis by IF2 guides progression of the ribosome into elongation. *Molecular Cell*, 2009, **35**(1): 37-47
- [11] Fei J, Kosuri P, Macdougall D D, *et al.* Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation. *Molecular Cell*, 2008, **30**(3): 348-359
- [12] Munro J B, Altman R B, Tung C S, *et al.* A fast dynamic mode of the EF-G-bound ribosome. *The EMBO Journal*, 2010, **29** (4): 770-781
- [13] Chen C, Stevens B, Kaur J, *et al.* Single-molecule fluorescence measurements of ribosomal translocation dynamics. *Molecular cell*, 2011, **42**(3): 367-377
- [14] Lin C W, Ting A Y. Transglutaminase-catalyzed site-specific conjugation of small-molecule probes to proteins *in vitro* and on the surface of living cells. *JACS*, 2006, **128**(14): 4542-4543
- [15] Wang L, Pulk A, Wasserman M R, *et al.* Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, **19**(9): 957-963
- [16] Kaur J, Raj M, Cooperman B S. Fluorescent labeling of tRNA dihydrouridine residues: Mechanism and distribution. *RNA*, 2011, **17**(7): 1393-1400
- [17] Fei J, Wang J, Sternberg S H, *et al.* A highly purified, fluorescently labeled *in vitro* translation system for single-molecule studies of protein synthesis. *Methods Enzymol*, 2010, **472**(12): 221-259
- [18] Carbon J, David H. Studies on the thionucleotides in transfer ribonucleic acid. Addition of N-ethylmaleimide and formation of mixed disulfides with thiol compounds. *Biochemistry*, 1968, **7**(11): 3851-3858
- [19] Plumbridge J A, Baumert H G, Ehrenberg M, *et al.* Characterisation of a new, fully active fluorescent derivative of *E. coli* tRNA Phe. *Nucleic Acids Research*, 1980, **8**(4): 827-843
- [20] Weiss S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 1999, **283**(5408): 1676-1683
- [21] Shi J, Dertouzos J, Gafni A, *et al.* Application of single-molecule spectroscopy in studying enzyme kinetics and mechanism. *Methods in Enzymology*, 2008, **450**(7): 129-157
- [22] Nishikawa S. [Basics of TIRFM]. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2007, **65**(2): 263-269
- [23] 赵永芳. 单分子荧光共振能量转移技术. *生命科学*, 2011, **23**(11): 1140-1144
- Zhao Y F. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, **23**(11): 1140-

- 1144
- [24] McKinney S A, Joo C, Ha T. Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling. *Biophysical Journal*, 2006, **91**(5): 1941–1951
- [25] Chen C, Greenberg M J, Laakso J M, *et al.* Kinetic schemes for post-synchronized single molecule dynamics. *Biophysical Journal*, 2012, **102**(6): L23–25
- [26] Roy R, Hohng S, Ha T. A practical guide to single-molecule FRET. *Nature Methods*, 2008, **5**(6): 507–516
- [27] Joo C, Ha T. Single-molecule FRET with total internal reflection microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012, **2012** (12): 1223–1237
- [28] Ermolenko D N, Majumdar Z K, Hickerson R P, *et al.* Observation of intersubunit movement of the ribosome in solution using FRET. *Journal of Molecular Biology*, 2007, **370**(3): 530–540
- [29] Aitken C E, Puglisi J D. Following the intersubunit conformation of the ribosome during translation in real time. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, **17**(7): 793–800
- [30] Wasserman M R, Alejo J L, Altman R B, *et al.* Multiperspective smFRET reveals rate-determining late intermediates of ribosomal translocation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, **23**(4): 333–341
- [31] Spirin A S. A Model of The Functioning Ribosome: Locking and Unlocking of The Ribosome Subparticles. Woodbury N Y: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1969: 197–207
- [32] Bretscher M S. Translocation in protein synthesis: a hybrid structure model. *Nature*, 1968, **218**(5142): 675–677
- [33] Frank J, Agrawal R K. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature*, 2000, **406** (6793): 318–322
- [34] Chen C, Stevens B, Kaur J, *et al.* Allosteric *vs.* spontaneous exit-site (E-site) tRNA dissociation early in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(41): 16980–16985
- [35] Sharma H, Adio S, Senyushkina T, *et al.* Kinetics of spontaneous and EF-G-accelerated rotation of ribosomal subunits. *Cell Rep*, 2016, **16**(8): 2187–2196
- [36] Cornish P V, Ermolenko D N, Noller H F, *et al.* Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes. *Molecular Cell*, 2008, **30**(5): 578–588
- [37] Marshall R A, Dorywalska M, Puglisi J D. Irreversible chemical steps control intersubunit dynamics during translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(40): 15364–15369
- [38] Korostelev A, Ermolenko D N, Noller H F. Structural dynamics of the ribosome. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, **12**(6): 674–683
- [39] Blanchard S C, Gonzalez R L, Kim H D, *et al.* tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, **11**(10): 1008–1014
- [40] Blanchard S C, Kim H D, Gonzalez R L Jr, *et al.* tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(35): 12893–12898
- [41] Lee T H, Blanchard S C, Kim H D, *et al.* The role of fluctuations in tRNA selection by the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(34): 13661–13665
- [42] Kim H D, Puglisi J D, Chu S. Fluctuations of transfer RNAs between classical and hybrid states. *Biophysical Journal*, 2007, **93**(10): 3575–3582
- [43] Agirrezabala X, Lei J, Brunelle J L, *et al.* Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome. *Molecular Cell*, 2008, **32**(2): 190–197
- [44] Munro J B, Altman R B, O'connor N, *et al.* Identification of two distinct hybrid state intermediates on the ribosome. *Molecular Cell*, 2007, **25**(4): 505–517
- [45] Moazed D, Noller H F. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, 1989, **342**(6246): 142–148
- [46] Semenov Y P, Rodnina M V, Wintermeyer W. Energetic contribution of tRNA hybrid state formation to translocation catalysis on the ribosome. *Nature Structural Biology*, 2000, **7**(11): 1027–1031
- [47] Aitken C E, Petrov A, Puglisi J D. Single ribosome dynamics and the mechanism of translation. *Annual Review of Biophysics*, 2010, **39**: 491–513
- [48] Blanchard S C. Single-molecule observations of ribosome function. *Current Opinion in Structural Biology*, 2009, **19**(1): 103–109
- [49] Frank J, Gonzalez R L. Structure and dynamics of a processive Brownian motor: the translating ribosome. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, **79**: 381–412
- [50] Wang B, Ho J, Fei J, *et al.* A microfluidic approach for investigating the temperature dependence of biomolecular activity with single-molecule resolution. *Lab on a Chip*, 2011, **11** (2): 274–281
- [51] Munro J B, Altman R B, Tung C S, *et al.* Spontaneous formation of the unlocked state of the ribosome is a multistep process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(2): 709–714
- [52] Agirrezabala X, Liao H Y, Schreiner E, *et al.* Structural characterization of mRNA-tRNA translocation intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(16): 6094–6099
- [53] Schuwirth B S, Borovinskaya M A, Hau C W, *et al.* Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 2005, **310**(5749): 827–834
- [54] Gao H, Sengupta J, Valle M, *et al.* Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*, 2003, **113**(6): 789–801
- [55] Valle M, Zavialov A, Sengupta J, *et al.* Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell*, 2003, **114**(1): 123–134
- [56] Subramanian A R, Dabbs E R. Functional studies on ribosomes lacking protein L1 from mutant *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1980, **112**(2): 425–430
- [57] Cornish P V, Ermolenko D N, Staple D W, *et al.* Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(8): 2571–2576
- [58] Julian P, Konevega A L, Scheres S H, *et al.* Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(44): 16924–16927
- [59] Semenov Y P, Rodnina M V, Wintermeyer W. The "allosteric three-site model" of elongation cannot be confirmed in a well-defined ribosome system from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(22): 12183–12188
- [60] Fei J, Bronson J E, Hofman J M, *et al.* Allosteric collaboration between elongation factor G and the ribosomal L1 stalk directs

- tRNA movements during translation. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(37): 15702–15707
- [61] Hamel E, Nakamoto T. Studies on the role of an *Escherichia coli* 50 S ribosomal component in polypeptide chain elongation. The Journal of Biological Chemistry, 1972, **247**(21): 6810–6817
- [62] Salsi E, Farah E, Netter Z, *et al.* Movement of elongation factor G between compact and extended conformations. Journal of Molecular Biology, 2015, **427**(2): 454–467
- [63] Chen C, Cui X, Beausang J F, *et al.* Elongation factor G initiates translocation through a power stroke. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, **113**(27): 7515–7520
- [64] Qin Y, Polacek N, Vesper O, *et al.* The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. Cell, 2006, **127**(4): 721–733
- [65] Liu H, Pan D, Pech M, *et al.* Interrupted catalysis: the EF4 (LepA) effect on back-translocation. Journal of Molecular Biology, 2010, **396**(4): 1043–1052
- [66] Pech M, Karim Z, Yamamoto H, *et al.* Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(8): 3199–3203
- [67] Zhang D, Qin Y. The paradox of elongation factor 4: highly conserved, yet of no physiological significance?. The Biochemical Journal, 2013, **452**(2): 173–181
- [68] Liu H, Chen C, Zhang H, *et al.* The conserved protein EF4 (LepA) modulates the elongation cycle of protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(39): 16223–16228
- [69] Levene M J, Korlach J, Turner S W, *et al.* Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. Science, 2003, **299**(5607): 682–686
- [70] Petrov A, Chen J, O'leary S, *et al.* Single-molecule analysis of translational dynamics. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012, **4**(9): a011551
- [71] Peng S, Sun R, Wang W, *et al.* Single-molecule photoactivation FRET: A general and easy-to-implement approach to break the concentration barrier. Angewandte Chemie, 2017, **56**(24): 6882–6885

smFRET Study Progress in The Dynamics of Ribosome Translocation*

XU Ben-Jin^{1,2,3}, SONG Guang-Tao¹, QIN Yan^{1,2}**

¹Key Laboratory of RNA Biology, CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China)

Abstract Ribosome is a protein translation machine and the target of a variety of clinical antimicrobial drugs. Therefore, in-depth understanding of bacterial protein translation mechanism is of great significance. Translation consists of initiation, elongation, termination, and recycling, coordinating to achieve high fidelity and precise regulation. Translocation is one of the most important events in the process of translation, which requires large conformational changes of the ribosome as well as the precise movement of tRNA₂-mRNA through ribosome. In bacteria, translocation is driven by elongation factor G that catalyzes the hydrolysis of GTP. The recent development in single molecule fluorescence resonance energy transfer (smFRET) makes it possible to study tRNA movements and observe the conformational dynamics of the ribosome in real time. Here, we review the recent smFRET study progress in the dynamics of ribosome translocation. These advances will provide much insights into the molecular details and dynamics of the ribosome complexes, shedding new light on the process of translocation.

Key words ribosome, translocation, transfer RNA, single-molecule fluorescence resonance energy transfer

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0328

*This work was supported by a grant from Key Research Projects of Frontier Science of Chinese Academy of Sciences (QYZDB-SSW-SMC028).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64869250, E-mail: qiny@ibp.ac.cn

Received: October 20, 2017 Accepted: October 30, 2017