



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY



Efficient switching of mCherry fluorescence using chemical caging

运用化学方法实现mCherry的光转换

报告人: 李晓丹
学院: 生命科学技术学院



background

1, 荧光蛋白

绿色荧光蛋白 (GFP) 的发现极大的加快了生命科学的发展，钱永健等人也因此获得了2008年的诺贝尔化学奖。

红色荧光蛋白 (RFPs) 的发现使得科学家们能够联合GFP实现动物细胞内的多色成像，而近几年发展起来的运用细菌光敏色素进化而来的近红外荧光蛋白 (iRFPs) 更是能够减少细胞自发荧光的干扰，提高成像效果。

然而具有光转换的荧光蛋白 (既荧光发射可以被某些因素激活或者改变) 对于超分辨成像具有重要的意义。这也是这篇文章的重要价值之所在。



background

2, 超分辨荧光显微镜

超分辨荧光显微镜的发明突破了光学衍射极限，将显微镜的分辨率从200nm提高到了20nm。使得科学家们能够活体观测亚细胞结构，极大的推进了生命科学的发展，因此而获得了2014年的诺贝尔化学奖。

具有光转换的的mCherry用于单分子定位荧光显微镜（SMLM），其基本原理是某个荧光分子发射的荧光会与附近的荧光发生干扰，从而降低分辨率。而SMLM能够利用mCherry的光转换过程，实现单个荧光分子的发光并进行定位，通过拍摄上万张照片并叠加从而获得分辨率更高的图片。



introduction

mCherry作为一种红色荧光蛋白，已经广泛应用于活体生物成像。它的最大吸收峰位置在590nm，最大荧光峰位置在610nm。

在这篇文章中，作者用 β -巯基乙醇诱导mCherry从红色荧光（610nm）状态转换到蓝色荧光（460nm）状态。并可以通过洗脱 β -巯基乙醇或用紫光（405nm）照射恢复红色荧光。

该方法可用于单分子定位荧光显微镜，获得超分辨率的细胞成像图片。

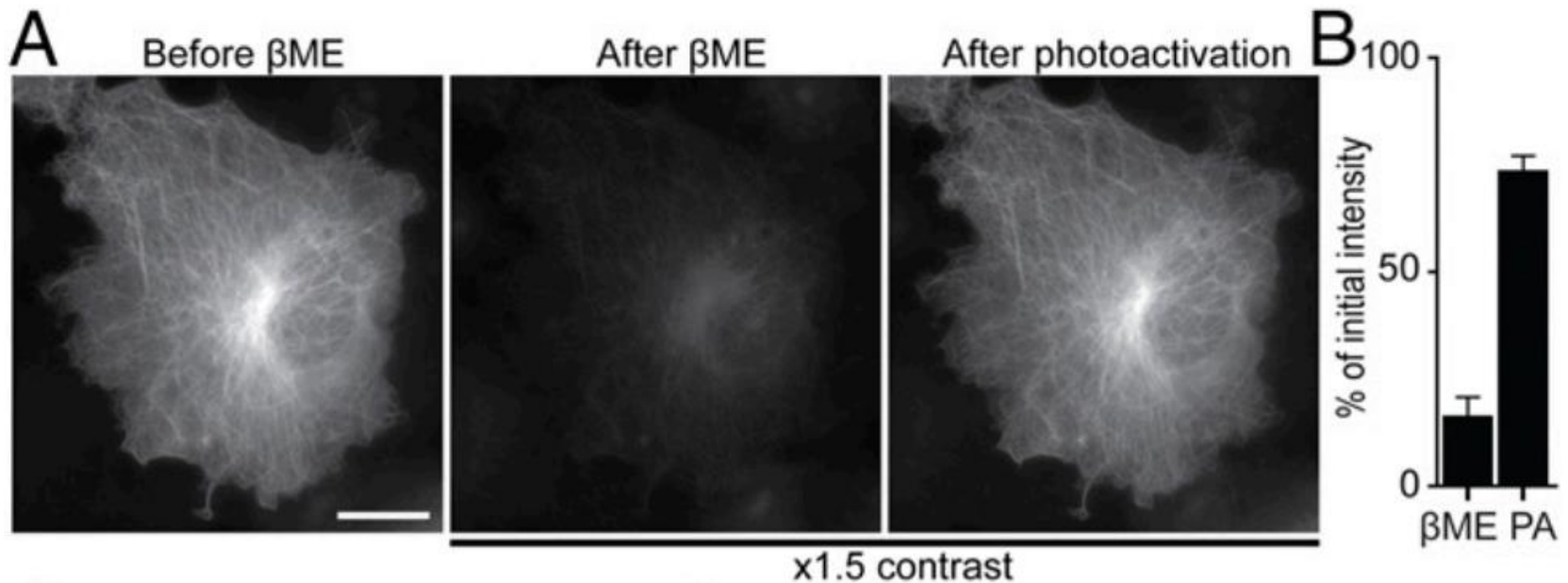
作者还通过X射线晶体衍射、核磁共振、量子化学计算等方法论证了 β -巯基乙醇诱导mCherry光转换的原因是 β -巯基乙醇还原了mCherry的生色团或是 β -巯基乙醇直接加成到mCherry生色团的酪氨酸的C _{β} 上。

该方法不仅对于单分子定位荧光显微镜成像具有重要的意义，还为运用化学方法实现荧光分子的光转换提供了独特的见解。



Results and Discussion

1, β -巯基乙醇对mCherry的荧光淬灭

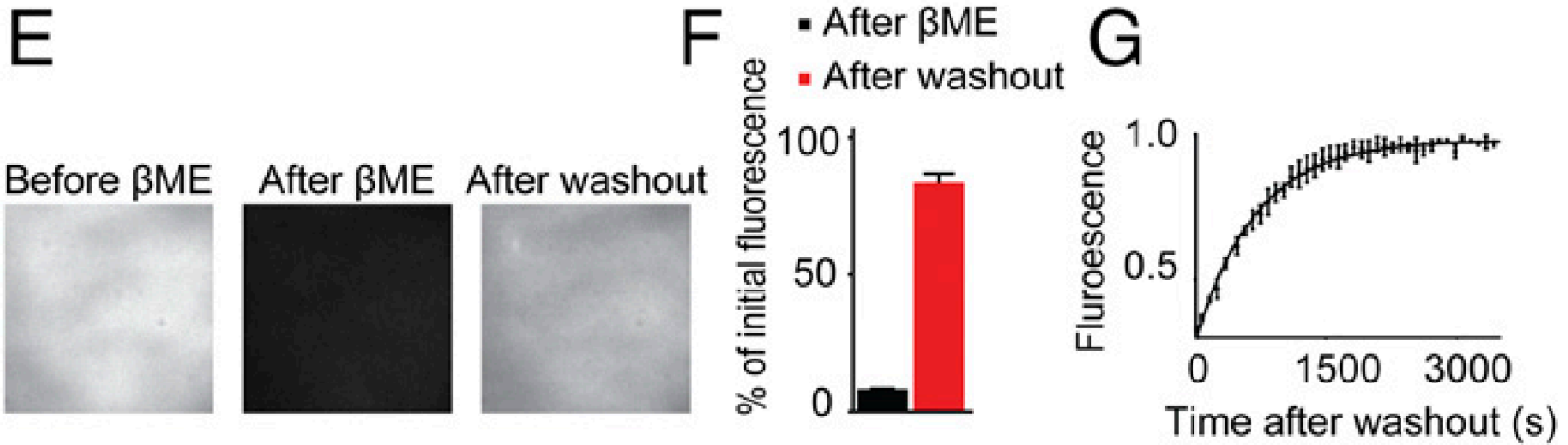


由图A可知加 β -巯基乙醇之前，有mCherry的荧光，当加入286mM β -巯基乙醇之后，大部分荧光（红光通道）都消失了。用紫色光（405nm）照射后，荧光得到了恢复。

图B表示 β -巯基乙醇能够淬灭90%左右的荧光，而紫光能恢复到74%左右的荧光。



Results and Discussion



图E表示加 β -巯基乙醇之前，有mCherry的荧光，当加入286mM β -巯基乙醇之后，荧光（红光通道）消失。洗掉 β -巯基乙醇之后，荧光得到恢复。

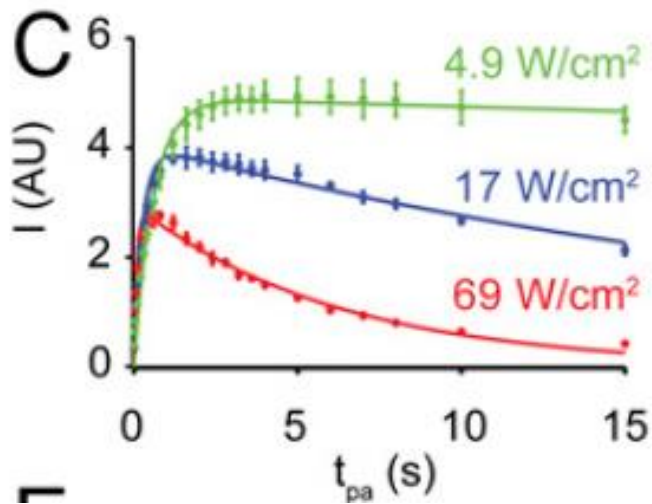
图F表示 β -巯基乙醇能够淬灭90%左右的荧光，而洗掉 β -巯基乙醇后，荧光能恢复到83%左右。

图G表示洗掉 β -巯基乙醇后，荧光恢复随时间的变化函数



Results and Discussion

2, 光强对于荧光分子恢复的动力学分析



C图表示不同光照强度恢复荧光随时间的变化。由图可知，强光反而不利于荧光的恢复。这主要是因为紫光不仅能恢复荧光分子，还能漂白荧光分子。



Results and Discussion

2, 光强对于荧光分子恢复的动力学分析

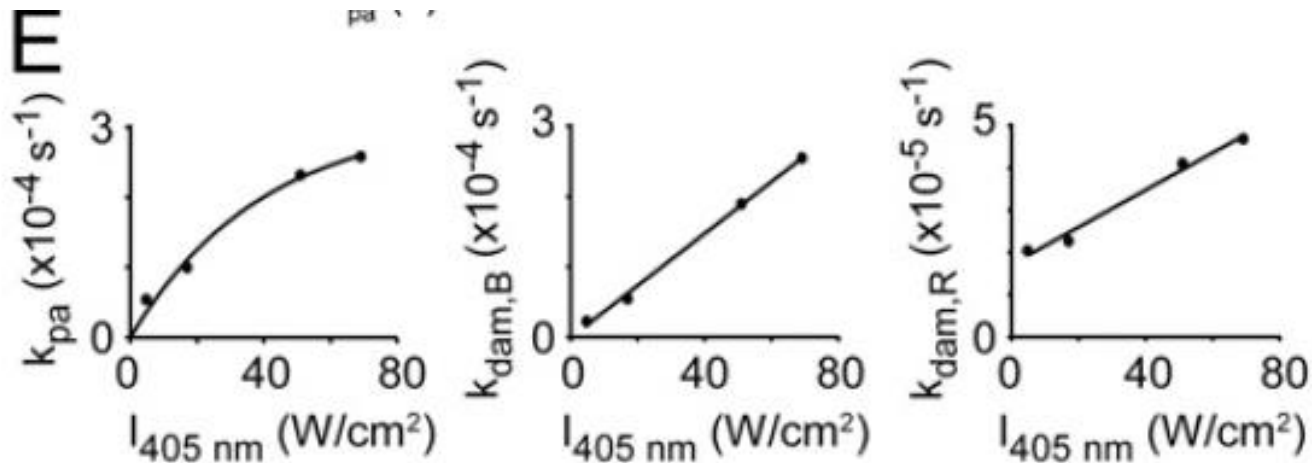


D图中 k_{pa} 表示紫光激活荧光分子的速率， $k_{dam,B}$ 表示淬灭状态下漂白荧光分子的速率， $k_{dam,R}$ 荧光状态下漂白荧光分子的速率。



Results and Discussion

2, 光强对于荧光分子恢复的动力学分析

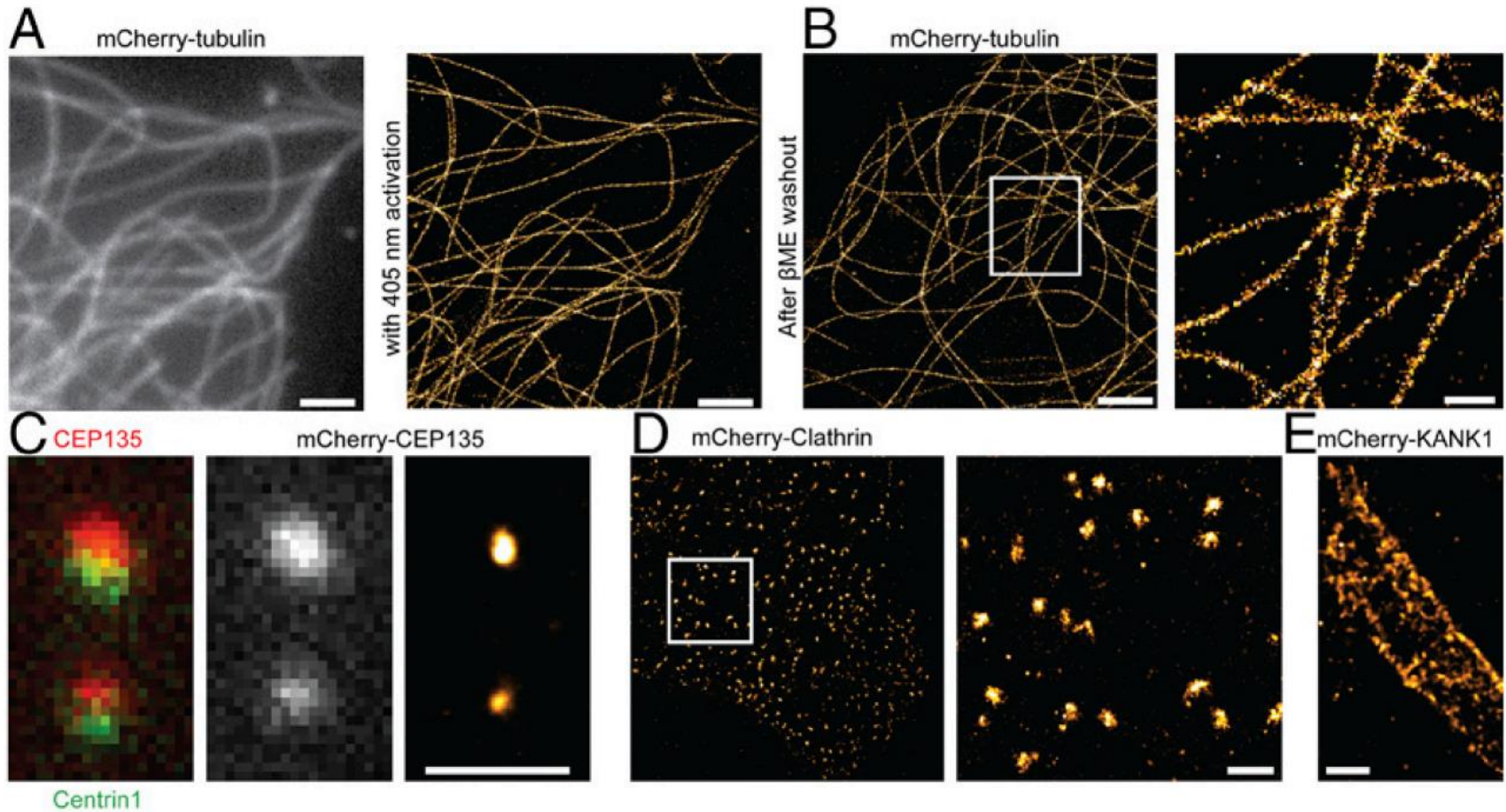


由E图可知光照强度越大， k_{pa} 、 $k_{dam,B}$ 、 $k_{dam,R}$ 都会增大，所以并不是光强越大，荧光的恢复效率越好。



Results and Discussion

3, 超分辨成像





Results and Discussion

最左边的两幅图是宽场荧光显微镜的成像图，右边的为单分子荧光定位荧光显微镜的成像图。

A、B图标记的是微管蛋白，其中A图是通过405nm的光激活荧光分子，而B图是通过洗掉 β -巯基乙醇来激活荧光分子。

C图标记的是中心体。

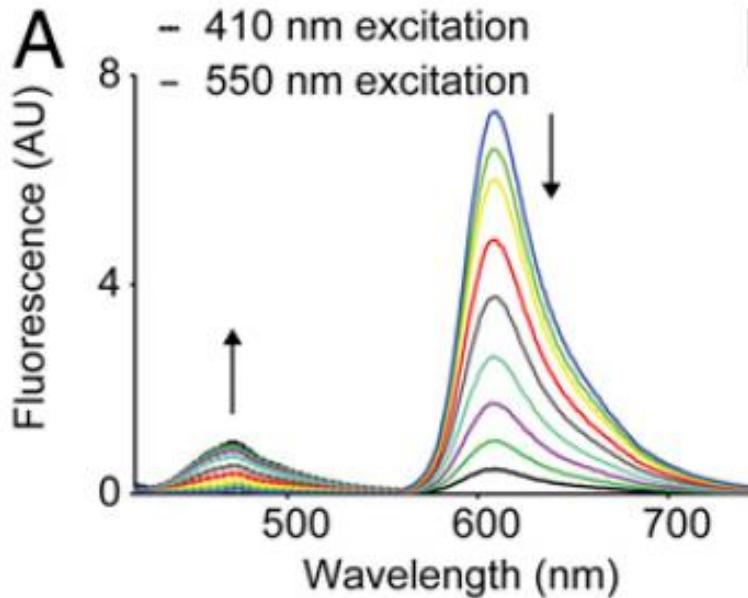
D图标记的是网格蛋白。

E图标记的是大脑皮层微管稳定复合物。



Results and Discussion

4.1 光转换的动力学分析

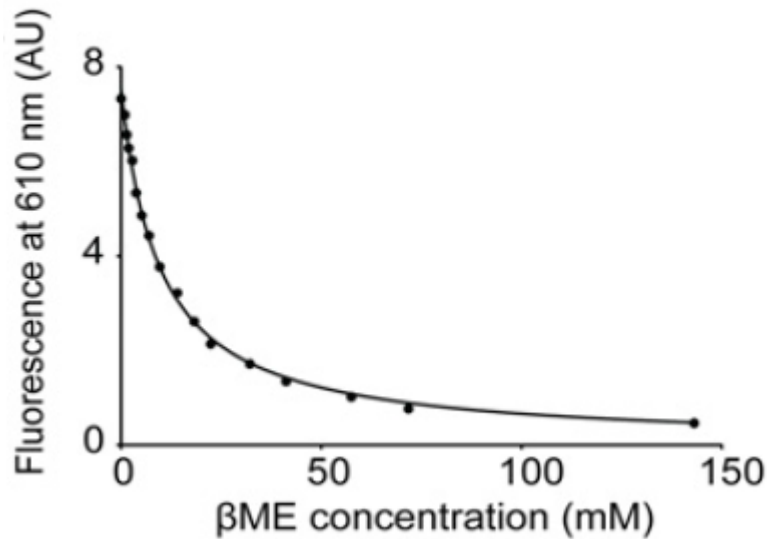


A图表示用不同浓度的 β -巯基乙醇处理mCherry后，mCherry荧光曲线的变化。由图可知， β -巯基乙醇能将mCherry的最大荧光峰位置从610nm（红光）转化到460nm（蓝光），且浓度越高，转化效率越高。



Results and Discussion

4.2 光转换的动力学分析

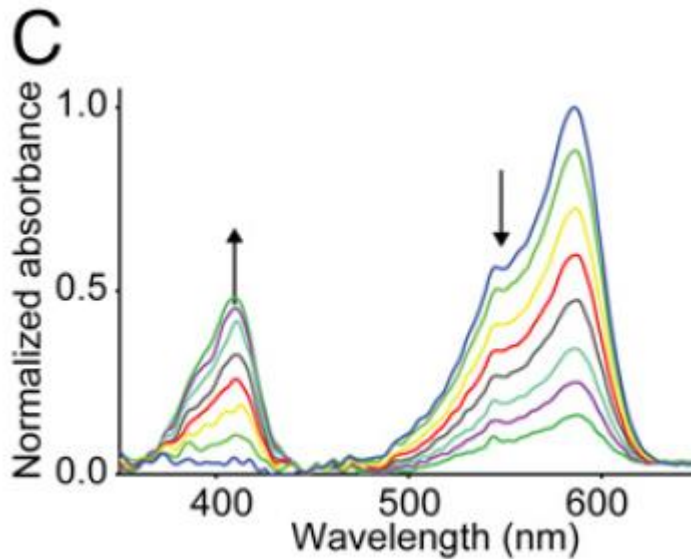


B图为 β -巯基乙醇的浓度对于mCherry610nm处荧光淬灭的动力学曲线。



Results and Discussion

4.3 光转换的动力学分析

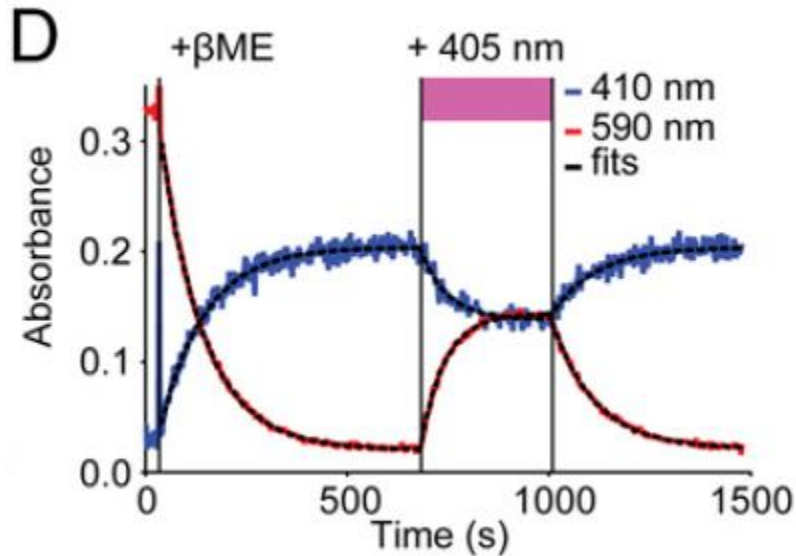


C图为用不同浓度的 β -巯基乙醇处理mCherry后，mCherry吸收曲线的变化。由图可知， β -巯基乙醇能将mCherry的最大吸收峰位置从590nm转化到410nm，且浓度越高，转化效率越高。



Results and Discussion

4.4 光转换的动力学分析

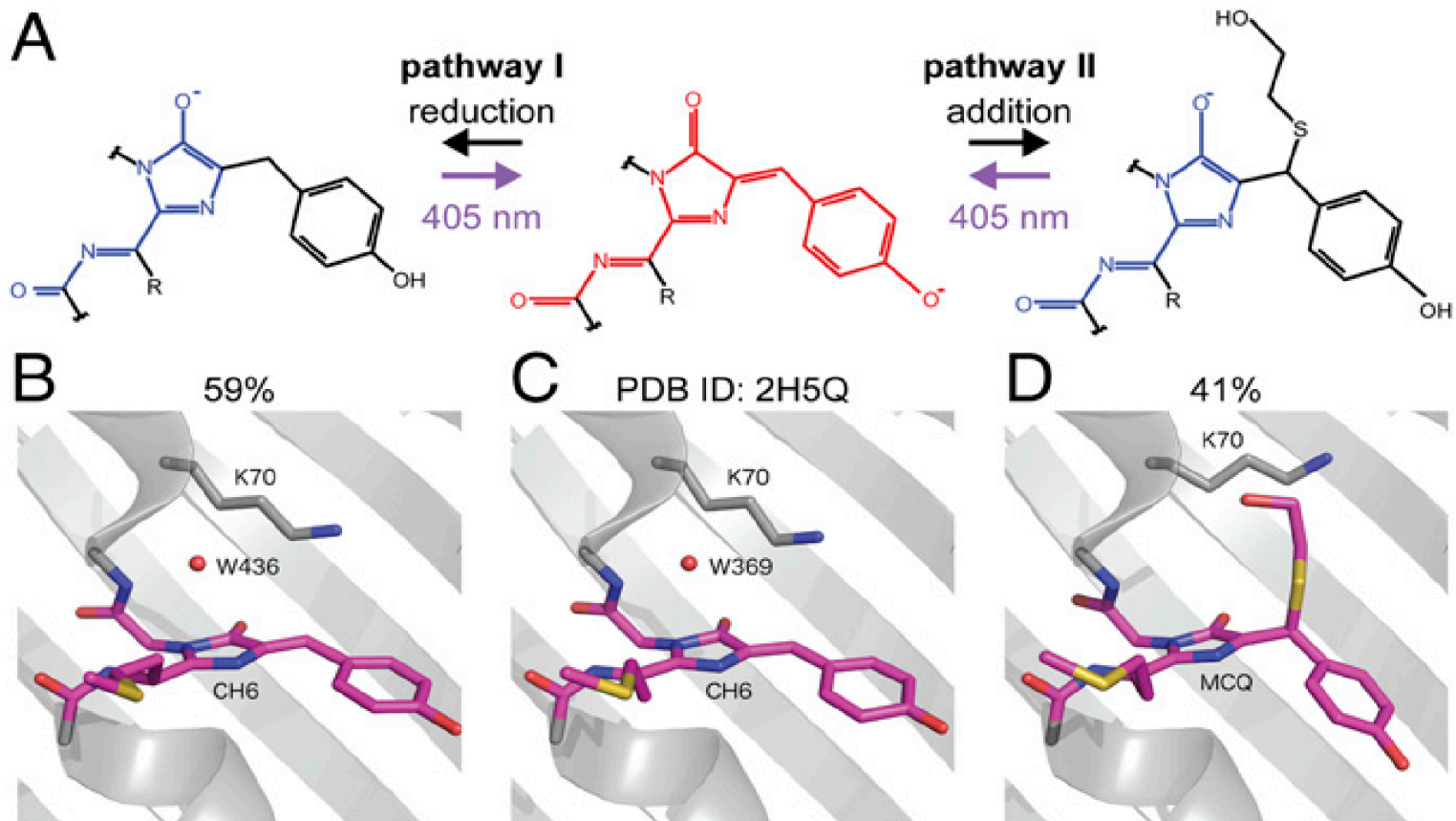


由D图可知，当用β-巯基乙醇处理mCherry后，590nm处的吸收会逐渐减小，而410nm处的吸收会逐渐增大。405nm的光照射后，410nm处的吸收会逐渐减小，而590nm处的吸收会逐渐增大。撤除光照后，又会恢复到之前的情况。



Results and Discussion

5, 光转换的原因分析





Results and Discussion

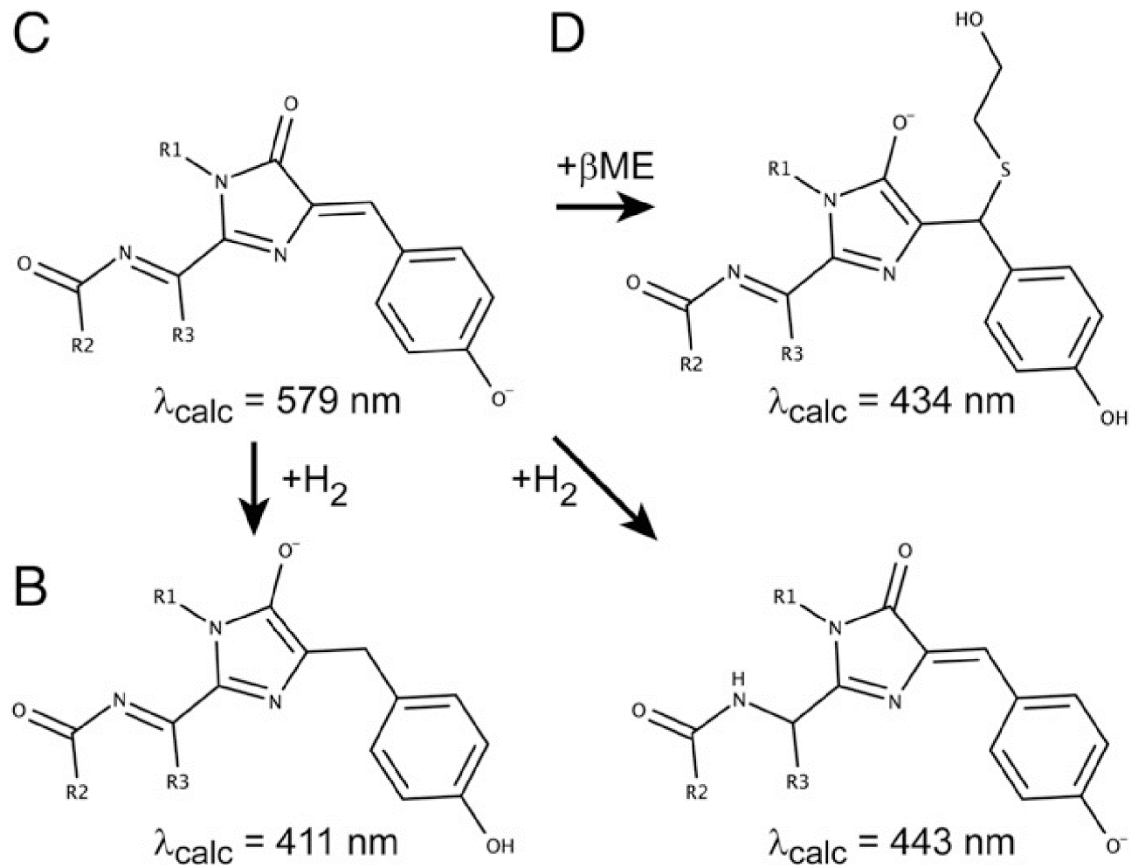
本文作者对于 β -巯基乙醇导致mCherry光转换的原因给出了两种解释，并用X射线衍射分析、核磁共振以及同位素标记法进行了验证。其一为 β -巯基乙醇还原了mCherry生色团中的一个双键，其二为 β -巯基乙醇通过巯基加成到了mCherry生色团酪氨酸的 C_β 上。这两种方式都减小了mCherry生色团的共轭程度，从而使mCherry的吸收和荧光发生了蓝移。

其中以第一种方式得到的产物占59%，以第二种方式得到的产物占41%。最后通过量子化学的方式进一步验证了猜想。



Results and Discussion

6, 量子化学计算





Results and Discussion

由C图可知，mCherry生色团最大吸收峰位置的计算值（579nm）与实验值（587nm）匹配得很好。

通过计算 β -巯基乙醇加成到mCherry生色团上之后的最大吸收峰位置，得到了两个与实验值（410nm）相匹配的产物，它们的最大吸收峰位置分别在419nm和434nm，但419nm的产物需要经过加成-氧化-加成才能形成，与X-ray的数据相违背，因此只剩下了434nm的产物，既图D所示。通过计算还原产物的最大吸收峰位置，得到了两种产物，它们的最大吸收峰位置分别在411nm和443nm处。核磁共振的数据支持了B图所示的结构。



Conclusion and innovation

- 1, β -巯基乙醇具有转换mCherry荧光的功能, 并可以通过洗脱 β -巯基乙醇或用紫光照射来重新激活mCherry的荧光。
- 2, 该方法可用于单分子定位荧光显微镜的成像。
- 3, β -巯基乙醇主要是通过加成或还原mCherry的生色团从而达到mcherry光转化的目的



enlightenment

有些蛋白在体内和体外表达的是不一样的，这将导致很多误区，可以在活体内观察细胞的亚显微结构，这样可以加快科学研究。



Problem

- 1, 没有比较mCherry用于超分辨成像相比于其它荧光蛋白的优势。
- 2, 没有介绍 β -巯基乙醇与mCherry生色团之间的具体作用方式。
- 3、 β -巯基乙醇和紫光对活体是有伤害的，没有消除这种伤害。



谢谢

我叫李晓丹