

# 通过动态单分子方法研究 基本的病毒过程

病毒过程应用案例

2020

# 目录

简介	3
实验	4
用于光镊实验单个病毒颗粒的检测和选择	4
记录病毒与宿主细胞之间的相互作用力	4
建立病毒蛋白质构象变化的动力学和能量场	5
操纵和可视化病毒RNA翻译的自动调节	5
病毒DNA包装的时间和量化	6
病毒DNA与衣壳蛋白质之间的相互作用测量与可视化	6
研究和监测蛋白质诱导的病毒脱落和融合	7
结论	9
参考文献	9

# 通过动态单分子方法研究基本的病毒过程

病毒复制策略和生命周期取决于病毒类型，并可能在所有阶段都有所不同，包括病毒进入、复制、潜伏期和脱落(图1)。了解病毒的感染和复制过程是开发减轻或治疗病毒性疾病的治疗策略的重要一步。

目前病毒学的方法依赖于电子显微镜或RNA和蛋白质定量检测病毒的特性。这些方法要么局限于静态图像，不能记录动态事件，要么局限于集成方法，不能描述个体翻译或复制过程的调控机制。相反，它们提供了一个平均读数。

在这个应用案例中，我们展示了基于集成了荧光和无标记显微镜和光镊的单分子方法，可以应用于详细地研究病毒复制过程，并有助于治疗和病毒研究的整体发展。

## C-Trap的特征

光镊可以让你用高度聚焦的激光束捕捉微米大小的物体，如微球或病毒颗粒。捕获两个或更多的微球将允许你把一个生物分子，比如DNA，拴在微球之间，并建立复杂的生物系统。然后你可以通过控制光束的方向来操纵被捕获物体的位置和运动。

实时成像可以让你看到捕获的生物分子(例如，DNA或病毒颗粒)或者与之相互作用的蛋白质。例如，你可以标记参与病毒过程的不同生物分子，并通过集成的荧光显微镜系统监测它们。



## 在此应用案例中

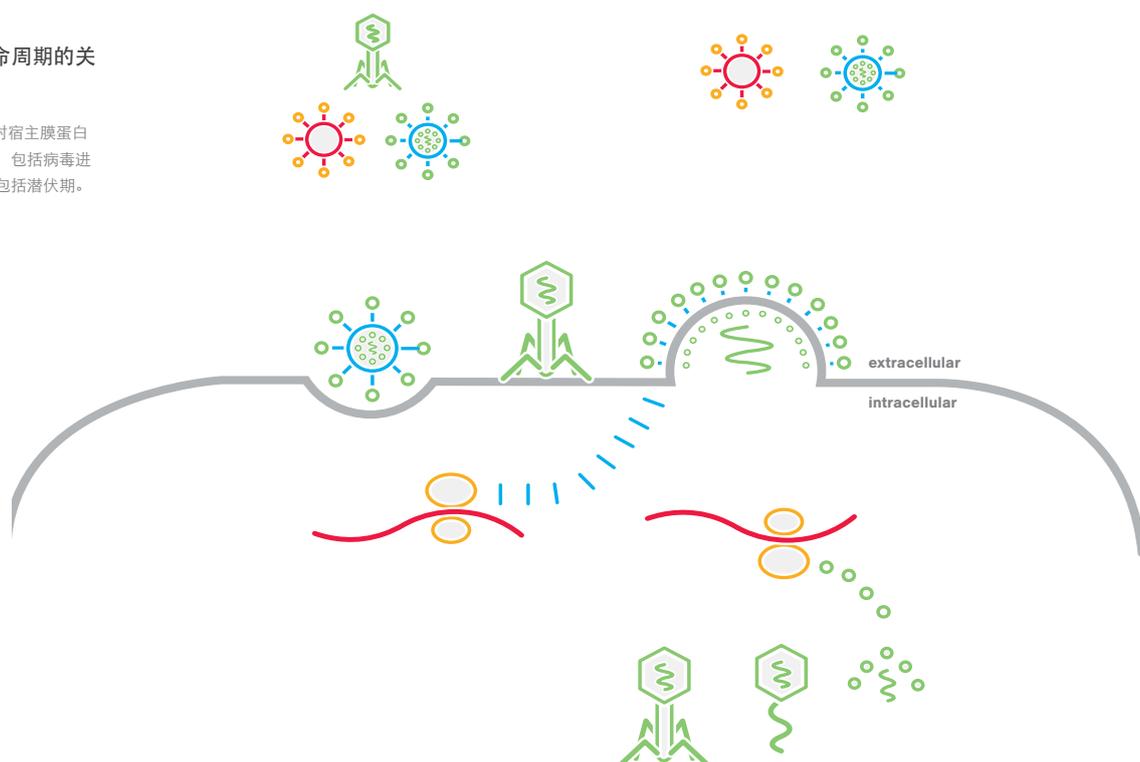
这个应用说明展示了如何使用C-Trap光镊荧光和无标记显微镜来深入了解与病毒感染和复制相关的各种过程。我们列出了七个实验设计，展示了如何在实时和单分子水平上分析与病毒学相关的各个方面。

我们展示了7个应用案例：

- 检测和选择用于光镊实验的单个病毒颗粒。
- 记录病毒与宿主细胞之间的相互作用力。
- 建立病毒蛋白质构象变化的动力学和能量场。
- 操纵和可视化病毒RNA翻译的自动调节。
- 病毒DNA包装的时间和量化。
- 病毒DNA与衣壳蛋白质之间的相互作用测量与可视化。
- 研究和监测蛋白质诱导的病毒脱落和融合。

## 在宿主感染期间，病毒生命周期的关键步骤

图 1 病毒与宿主细胞膜相互作用。对宿主膜蛋白的识别启动了病毒细胞周期的开始，包括病毒进入、复制、脱落，在某些情况下还包括潜伏期。



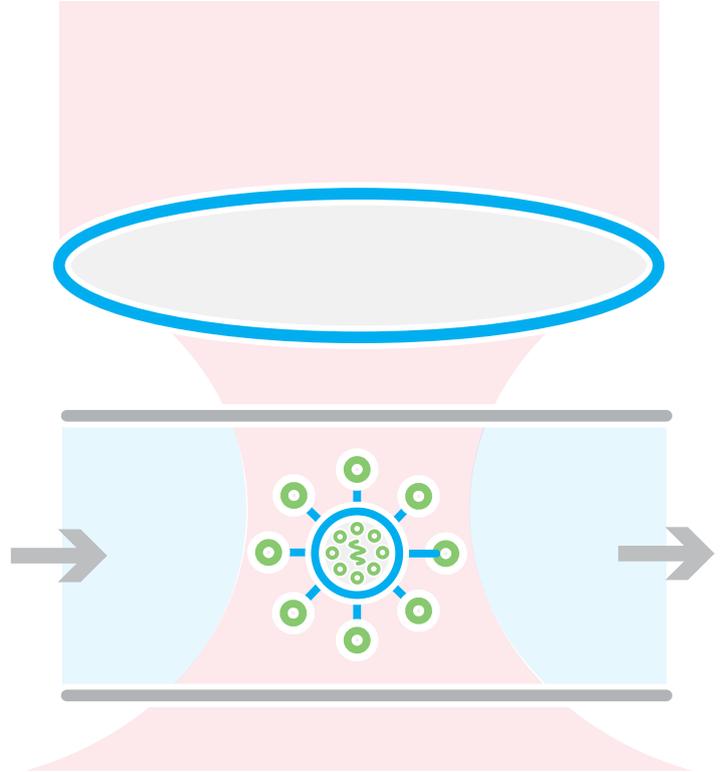
# 实验

## 检测 and 选择用于光镊实验的单个病毒颗粒

光镊是以非接触方式检测和分离单个病毒粒子的最佳工具。虽然在大多数情况下，病毒粒子都很小，并在液体中聚集，可能会影响预期的测量结果，但这项技术可以让你在溶液中捕捉病毒粒子，并从聚集体中区分单个粒子(图2)。

单个病毒粒子的光学捕获使你能够控制它的位置。除此之外，你还可以用荧光标记病毒膜蛋白，并根据荧光强度对其进行定量，以便将蛋白质水平与你想要的测量结果联系起来。

图 2 在微流控室中光学阱捕捉病毒粒子的实验装置示意图。病毒或病毒聚合体的移动性由光阱控制和记录。病毒的荧光标记膜蛋白为成像分析提供了多种可能性。



### Read more

[1] Pang et al. (2014) *Nature Nanotechnology*

## 记录病毒与宿主细胞之间的相互作用力

病毒与宿主细胞之间的相互作用是病毒入侵和感染的第一个关键步骤。你可以用C-Trap来研究单个病毒和宿主细胞表面受体之间的动态相互作用。这种方法可以让你用激光捕捉一个包裹着你感兴趣的病毒的微球并牵引向贴壁的细胞运动。然后你可以推动微球向细胞膜运动，在接触后在拉着微球远离细胞(图3)。破坏病毒和宿主细胞之间已建立的相互作用所需的拉力表明了相互作用的强度。

了解病毒和宿主细胞之间最初相互作用的动力学，将有助于开发新的治疗方法，预防或减轻病毒感染。例如，你可以应用类似的方法，通过比较不同治疗条件下的拉力，筛选出阻止病毒识别宿主细胞的药物。



图 3 C-Trap可以测量病毒与宿主相互作用的力和动力学。相关荧光成像和光镊可以同时表征宿主细胞的变化和测量相互作用的力。



### 参考文献

[2] Sieben et al., (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences*

请阅读LUMICKS细胞力学应用案例获得更多相关知识

# 实验

## ■ 建立病毒蛋白质构象变化的动力学和能量场

一旦病毒识别并通过病毒融合蛋白粘附在宿主细胞上，病毒颗粒就开始入侵。这些蛋白质的构象变化允许它们附着在宿主细胞上，并对宿主细胞膜施加力。了解它们的动态可以扩展我们对这些过程的认识，并随后帮助我们开发未来的抗病毒疗法。然而，与蛋白质折叠和去折叠相关的能量很难用传统的方法测量。

利用C-Trap这样的光镊仪器，你可以将病毒蛋白质的两端连接在两个珠子之间，施加机械力展开蛋白质，并研究相关的动力学(图4)。通过在单分子水平上研究这些特征，你可以探测到中间构象，这是其他常规方法通常忽略的一个关键细节。例如，这种检测方法可以让你深入了解，特定的药物是如何在感染过程中破坏病毒蛋白质及其构象动态的。

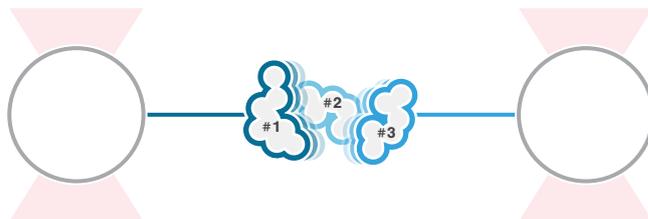


图4 两个DNA把手将目标蛋白质拴在两个微球之间。将微球分开并释放力量，使蛋白质及其结构域展开和重新折叠。时间、距离和力信号被用来计算动力学和重建蛋白质去折叠的能量谱。

### 参考文献

[3] Jiao et al. (2015) *Proceedings of the National Academy of Sciences*

请阅读LUMICKS蛋白质折叠应用案例获得更多相关知识

## ■ 操纵和可视化病毒RNA翻译的自动调节

RNA假结是RNA的二级结构，在许多病毒类型中，RNA假结是自动调节翻译和核糖体框架移动的关键。C-Trap为你提供了在单分子水平上研究RNA假结结构动力学的方法，从而揭示二级和三级RNA构象如何调节病毒翻译。

通过创建和拉伸一个所谓的哑铃系统，包括一个RNA和两个被抓微球(图5)，你可以探索与结构的每一步展开和折叠相关的力。从这些实验中获得的结果读数也揭示了中间构象状态，为你提供了一个结构特定的能量谱。这些类型的数据为您提供了一个深入了解病毒基因表达的动态翻译调节。

结合力诱导测量的二级结构与单分子荧光共振能量转移(smFRET)提供了一个更加完整的画面。结合的方法使你能够将折叠机制与RNA的三级结构联系起来，并研究抑制病毒翻译的自我调节机制。

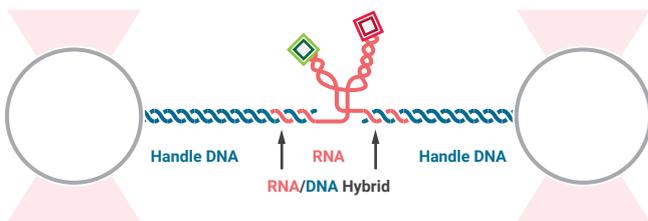


图5 一个带有假结结构的RNA连接到两端的DNA柄上，并拴在两个光学捕获的微球之间。光镊可以拉伸假结的结构，以检测与假结构象变化有关的力。smFRET实验可以揭示不同荧光染料标记mRNA两个结构域的结构域依赖动力学。

### 参考文献

[4] Zhong et al. (2016) *Scientific Reports*

请阅读LUMICKS RNA动力学应用案例获得更多相关知识

# 实验

## 病毒DNA包装的时间和量化

在病毒组装过程中，双链DNA病毒需要依赖ATP包装运动复合物的帮助。使用光镊，你可以研究病毒在封闭环境中包装大量遗传物质的过程，揭示病毒DNA包装的关键步骤和要求。

例如，你可以将DNA包装马达和DNA底物的一端拴在两个光学捕获的微球之间(图6)。接下来，你可以直接测量DNA包装过程中，两个被抓微球之间的距离变化。无论是周期时间(周期的快速包装和暂停)和包装DNA的数量揭示了特定的马达蛋白的功能。该程序可让你测量和比较DNA包装马达蛋白的机械化学功能，例如，ATP浓度或衣壳的容量，以及对DNA的不同力。

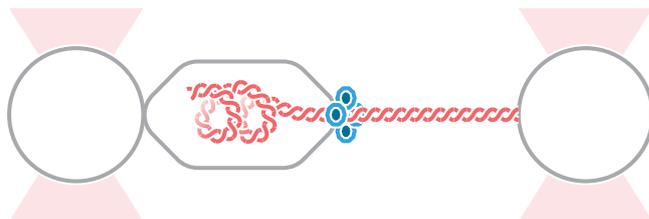


图 6 建立单病毒DNA包装评价方法。一个微球用预先包装好的DNA缠住衣壳，另一个微球缠住游离的DNA。一旦这些被拴住，C-Trap可以测量微球之间的距离变化，以及相关的力，来研究马达蛋白的活动。

### 参考文献

[5] Liu et al. (2014) *Cell*

## 病毒DNA与衣壳蛋白质之间的相互作用测量与可视化

病毒衣壳通常由有限种类的病毒颗粒组成，有些只包含单一种类。然而，这些粒子可以组装成各种各样的几何形状和形状，以保护和传递遗传物质。

使用与荧光显微镜集成的光镊，你可以研究病毒颗粒的成核和生长过程，以及衣壳蛋白与核酸相互作用。例如，C-Trap可以将双链DNA拴在两个微球之间，然后将单个分子暴露在病毒衣壳蛋白之下(图7)。当这些蛋白质与DNA结合时，它们通过压缩缩短了核酸。荧光标记的衣壳蛋白显示了随着荧光强度的增加逐渐压缩的蛋白质-DNA复合物。

这些信息，反过来，揭示了病毒衣壳是如何紧密结合并储存遗传物质，比如DNA。了解蛋白质如何与DNA相互作用，有助于理解DNA是如何以及以何种构象包装在衣壳内。



图 7 与DNA相互作用的蛋白质复合物的数量可以用荧光强度来定量。同时，对DNA的作用力可以被控制，以研究它与病毒蛋白质的相互作用。

### 参考文献

[6] Marchetti et al. (2019) *Nano Letters*

请阅读LUMICKS C-Trap手册获得更多相关知识

# 实验

## 研究和监测蛋白质诱导的病毒脱落和融合

从寄主细胞脱落后代是病毒生命周期中至关重要的一步。脱落的一个例子是病毒从细胞出芽，包括细胞膜张力和几个病毒相关蛋白。

光镊是最佳的仪器可以同时施加和测量病毒脱落时膜变形相关的力(图8)。C-Trap提供的荧光图片，可让你更清晰地观察宿主细胞膜的弯曲程度，以及标记的膜蛋白的分布，同时评估脱落时的力。

该方法的独特之处在于，它揭示了出芽过程中膜曲度与病毒蛋白质之间的关系，这可以与其脱落效率相关。

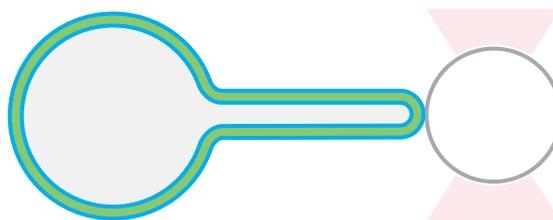


图 8 光镊捕获链霉素和素涂层的微球并将其导向带有荧光标记的膜蛋白的膜囊。在与膜接触时缩回微球，从膜囊中产生一个纳米管，可以通过荧光显微镜观察到，以验证曲率。



### 参考文献

[7] Moreno-Pescador et al. (2019) ACS Nano

请阅读LUMICKS膜融合应用案例获得更多相关知识

“我认为用单分子技术研究病毒非常有价值。在研究病毒膜融合过程中的出芽力方面，有很大的潜力。我认为光镊是最合适的工具。”

保罗·马丁·本迪克斯教授，尼尔斯·波耳研究所

“单分子操纵和可视化使我们对病毒生命周期的机制和力学有了前所未有的了解，这些机制和力学具有惊人的适应性和复杂性。这些见解可以告诉我们遏制病毒感染和在宿主体内传播的新方法。”

刘士新教授，洛克菲勒大学



# 总结

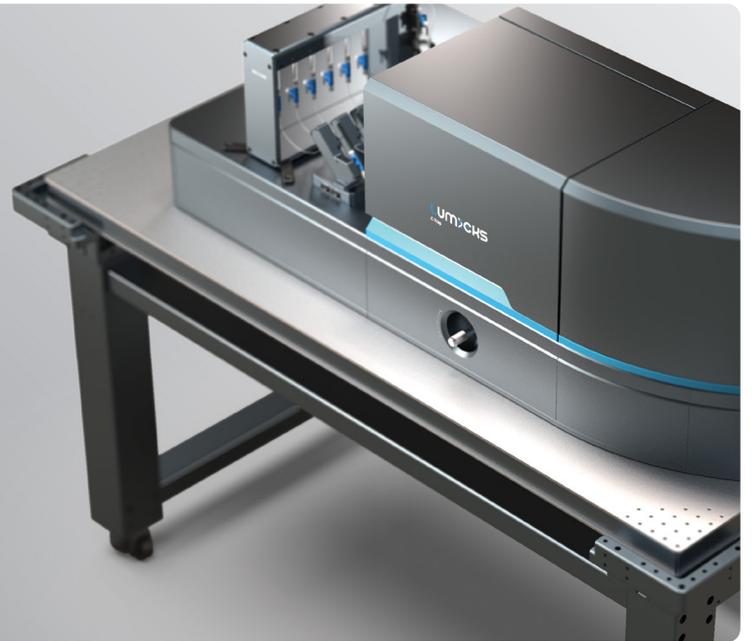
虽然传统的病毒特性评估，例如，电子显微镜和表达谱，描述了病毒群体的病毒感染特征，它们仅限于静态或平均结果。通过单分子方法研究病毒的生命周期，例如光镊，可以让你发现与病毒感染相关的特定的随机机制事件。

C-Trap是一种独特的工具，可以提供高度集成的光镊和最先进的成像技术。一体化方法提供了同步力学测量和特定病毒事件的荧光可视化。

你可以使用动态单分子方法来揭示病毒生命周期的特定步骤，从病毒与宿主细胞的初始相互作用到病毒后代的脱落。这些对病毒感染的详细分析，最终，有助于开发对抗病毒的新疗法，并有可能让我们领先病原体一步。

## C-Trap的技术特点

- 力学分辨率:  $<0.1$  pN 100Hz  $1 \mu\text{m}$   $\geq 0.35$  pN/nm(抓捕刚度)
- 最小增量步长:  $2 \text{ \AA}$ / 绝对位置
- 支持的显微镜类型: 共聚焦/STED 或者 宽场/TIRF/IRM
- 共聚焦颜色: 最多3种 (默认: 488 nm, 532/561 nm, 639 nm)
- 宽场/TIRF颜色: 最多3种 (默认: 488 nm, 561 nm, 639 nm)



## 相关文献

1. Pang Y, Song H, Kim JH, Hou X, Cheng W. Optical trapping of individual human immunodeficiency viruses in culture fluid reveals heterogeneity with single-molecule resolution. *Nature Nanotechnology*. 2014 Aug;9(8):624.
2. Sieben C, Kappel C, Zhu R, Wozniak A, Rankl C, Hinterdorfer P, Grubmüller H, Herrmann A. Influenza virus binds its host cell using multiple dynamic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Aug 21;109(34):13626-31.
3. Jiao J, Rebane AA, Ma L, Gao Y, Zhang Y. Kinetically coupled folding of a single HIV-1 glycoprotein 41 complex in viral membrane fusion and inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Jun 2;112(22):E2855-64.
4. Zhong Z, Yang L, Zhang H, Shi J, Vandana JJ, Olsthoorn RC, Lu L, Chen G. Mechanical unfolding kinetics of the SRV-1 gag-pro mRNA pseudoknot: possible implications for -1 ribosomal frameshifting stimulation. *Scientific Reports*. 2016 Dec 21;6(1):1-4.
5. Liu S, Chistol G, Hetherington CL, Tafoya S, Aathavan K, Schnitzbauer J, Grimes S, Jardine PJ, Bustamante C. A viral packaging motor varies its DNA rotation and step size to preserve subunit coordination as the capsid fills. *Cell*. 2014 Apr 24;157(3):702-13.
6. Marchetti M, Kamsma D, Cazares Vargas E, Hernandez García A, Van Der Schoot P, De Vries R, Wuite GJ, Roos WH. Real-time assembly of viruslike nucleocapsids elucidated at the single-particle level. *Nano Letters*. 2019 Aug 1;19(8):5746-53.
7. Moreno-Pescador G, Florentsen CD, Østbye H, Sønder SL, Boye TL, Veje EL, Sonne AK, Semsey S, Nylandsted J, Daniels R, Bendix PM. Curvature-and Phase-Induced Protein Sorting Quantified in Transfected Cell-Derived Giant Vesicles. *ACS Nano*. 2019 Jun 5;13(6):6689-701.

[info@lumicks.com](mailto:info@lumicks.com)

[www.lumicks.com](http://www.lumicks.com)

Or find us on:



## LUMICKS HQ

Pilotenstraat 41  
1059 CH Amsterdam, The Netherlands  
+31 (0)20 220 0817



## LUMICKS Americas

800 South Street, Suite 100  
Waltham, MA 02453, USA  
+1 781 366 0380



## LUMICKS 亚太

中国北京市朝阳区东三环中路20号 乐成  
中心A座 577房间  
电话: +86 (0)10 58783028

All content and images used in this document are owned or licensed by LUMICKS Technologies B.V and/or its subsidiaries (LUMICKS)!. Unauthorized use is prohibited. Any information provided herein by LUMICKS is made available "as is" and [you] understand and agree that such information is made available without any representation or warranty, express or implied, including any implied warranty of merchantability, satisfactory quality or fitness for any particular purpose or any warranty that the use of such information will not infringe or violate any patent or other proprietary rights of any third party.

For the latest product information please consult us directly. C-Trap®, m-Trap®, AFS®, u-Flux™, Bluelake™, z-Movi®, LUMICKS and the LUMICKS logo are registered trademarks of LUMICKS.

© LUMICKS. Amsterdam, The Netherlands.

# LUMICKS