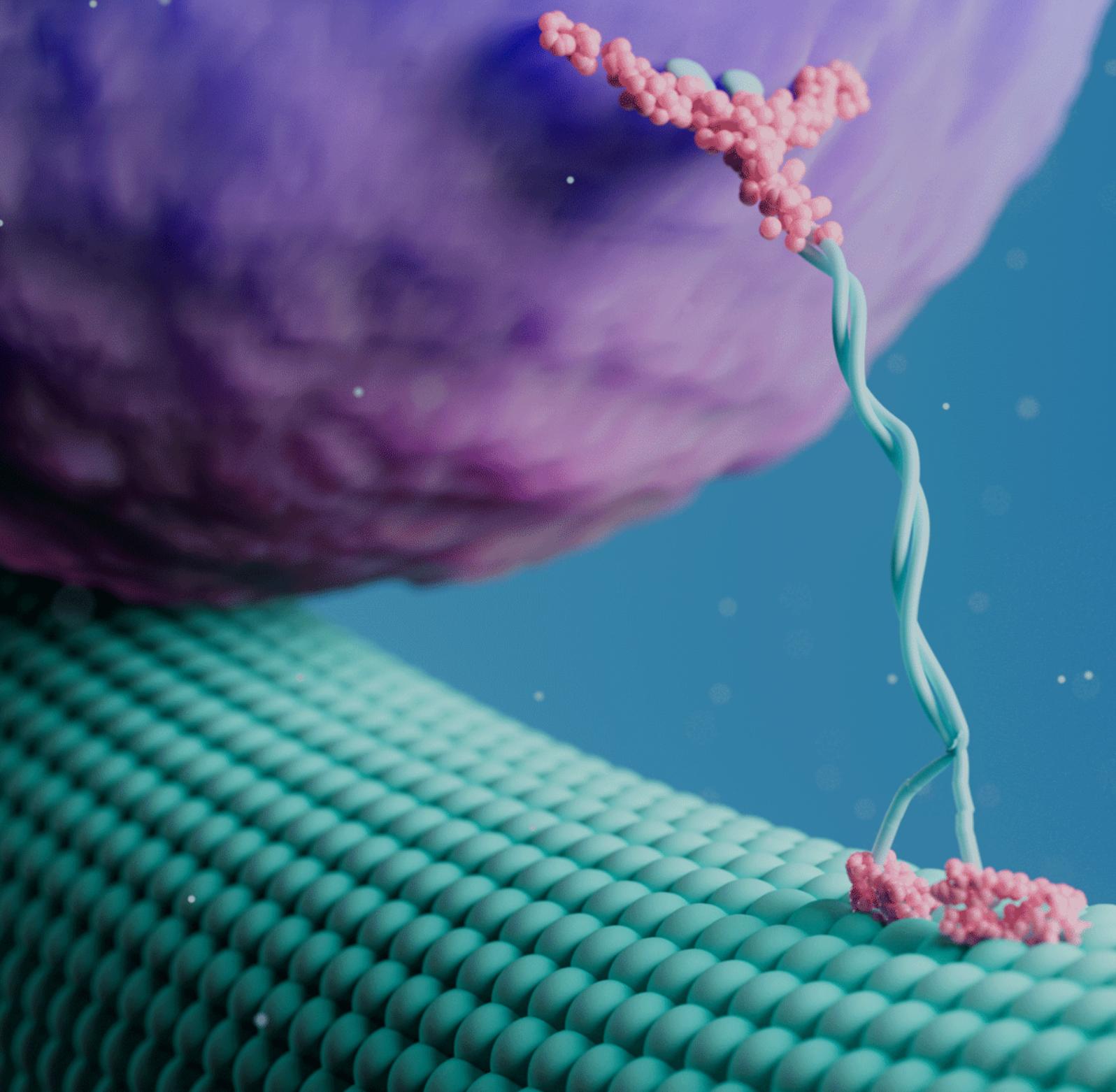


分子马达活性和动力学行为 的实时高通量监测

运动蛋白

2017



分子马达活性和动力学行为的实时高通量监测

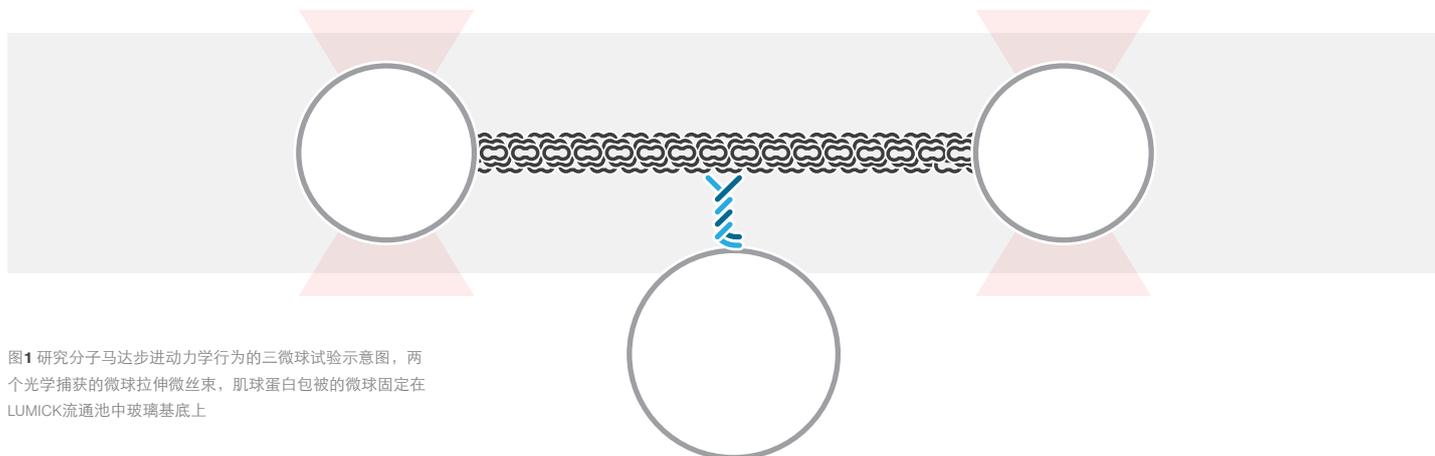


图1 研究分子马达步进动力学行为的三微球试验示意图，两个光学捕获的微球拉伸微丝束，肌球蛋白包被的微球固定在LUMICKS流通池中玻璃基底上

单分子水平上研究肌球蛋白VI的活性

细胞骨架及其众多的相关分子马达蛋白在多种细胞功能中起到重要作用，细胞骨架丝状结构构建而成的相互连接网络系统充当分子马达运动的轨道，并为细胞提供结构支持和组织架构。

马达蛋白中最经典的例子为肌球蛋白家族，这是一类非常庞大的蛋白质家族，包含多种蛋白质，其成员参与多种细胞过程，包括细胞运输，迁移以及结构维持。其中肌球蛋白二聚体以微丝为轨道进行ATP依赖的交替式连续运动。

分子马达的步进式运动动力学是和力（pN）的大小密切相关，其步长通常在纳米级的（1~100nm），并且其行进的频率非常高（1~100Hz）。因此，对类似于肌球蛋白在微丝上运动的离散步进过程及其相应力学过程的研究需要依靠具备时空高分辨率的光镊系统。

光镊技术的独特光学系统让我们能够分辨亚纳米级别的位移并对单个分子施加皮牛级别的力学操控；已有的各类文献证明，这种力谱技术在阐明参与细胞内运输的分子马达蛋白的力学和动力学是行之有效的。LUMICKS的C-Trap®系统高时空分辨特性和高的系统稳定性帮助您研究肌球蛋白的活性、连续运动、沿肌动蛋白的结合动力学，并且能够在单分子水平上确定其热力学特性。

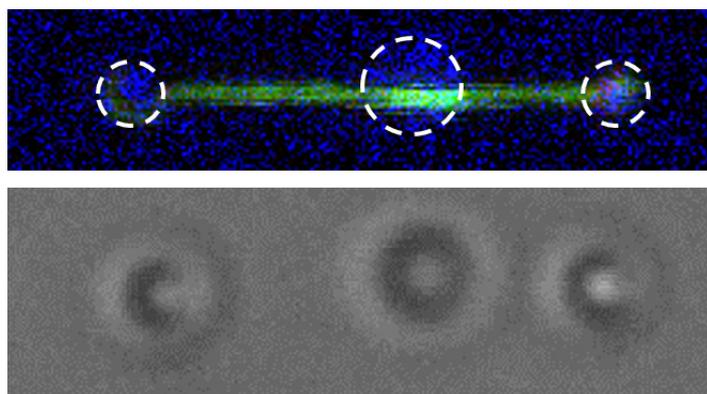
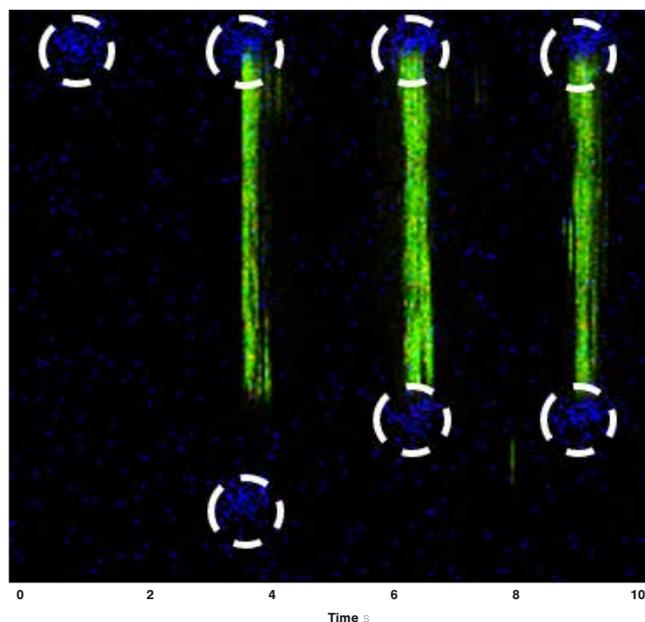


图2a 控系在光镊捕获的两颗微球间的单根微丝的荧光（上图）和明场（下图）图像，此控系结构在力学操控下靠近肌球蛋白包被的第三颗微球

图2b 不同时间点下光学捕获的两个PS微球和单根微丝的荧光图像，整个时间序列图像表征了捕获单根微丝形成稳定的控系结构的过程。



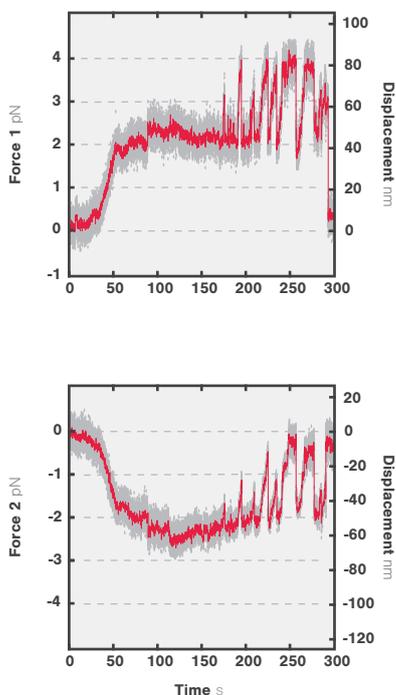


图1展示的一个典型的“三微球试验”，主要有两个光学捕获的微球拴系住单根微丝，第三个微球由肌球蛋白包被然后固定在流通池的玻璃表面。

荧光标记的微丝可以通过集成在C-Trap上的共聚焦荧光系统实时成像，这样加速和简化了形成合适拴系结构的流程。（图2）

经典的三微球试验中微丝拴系结构的形成通常是一个复杂冗长的过程。在C-Trap系统中，力学测量和荧光成像同步执行，与集成的微流控技术结合后有效的简化了实验流程，提高了分子马达力学测量的可靠性、速度和数据量。我们能够在10秒内成功形成微丝拴系结构（图2b），而其他不需要的分子，例如多个微丝或者短的微丝拴系结构，可以通过荧光成像轻松的分辨并且排除。

微丝拴系结构随后在力学操控下朝着第三个微球靠近，让微丝和肌球蛋白紧密接触。肌球蛋白的头部结构在ATP的作用下与微丝底物发生动态的相互作用，其在微丝上的移动产生了作用于微丝上的拉力，肌球蛋白驱动的肌动蛋白翻译导致了处在光学捕获空间中的拴系结构发生位移。C-

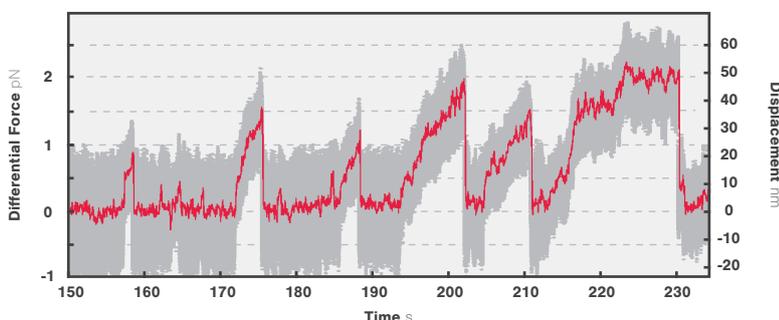


图3 基于光镊系统的三微球法测量肌球蛋白VI的运动动力学，灰色数据和红色数据的采集频率分别为200Hz和10Hz。左边的两幅图表示每个光阱中探测到的微球位移轨迹，右图是表示放大的微分力信号（灰色的为50kHz和红色的是20Hz），获得肌球蛋白运动动力学的高分辨率追踪信号。在数据处理时，预先设定的力归一化为0pN，从而获得马达蛋白步进时产生的力学信号的变化。

Trap的高时空分辨率的特性，能够轻易深入了解肌球蛋白的持续运动动力学特性。

在本实验中，我们使用C-Trap来研究肌动蛋白相对于野生型肌球蛋白VI的位移，此位移通过测量双光镊中捕获微球相对位移的变化来计算得出。图3显示了肌球蛋白以单方向的运动方式拉伸肌动蛋白微丝，使用的力是可以精确测量的。我们在查看独立的力学信号时（图3，左），当肌动蛋白微丝拉至2pN（t=0-50秒）的预紧力时，我们观察到了反向相关力的信号。一旦肌动蛋白微丝与肌球蛋白VI包被的微球建立接触（175秒），两个力通道的信号就出现相关，表明有肌球蛋白的活性引起的定向位移，如图3（右所示），在计算两个光镊之间的差分力时，可以显著提高力位移测量的分辨率。

C-Trap集成的微流控系统不仅能够帮助我们快速的捕获微球和肌动蛋白微丝拴系结构的形成，而且也能帮助我们使用同一组马达蛋白和微丝在不同ATP和盐浓度的体系下研究马达蛋白的运动，增加实验的一致性。

C-Trap系统也能够帮助您对分子马达沿着细胞骨架蛋白的运动动力学实时成像，在单分子水平上确定他们的热力学特性。

马达蛋白的确切动力学可以通过计算微丝相对于马达蛋白的相对位移及相对力的大小得出，从而马达蛋白的速度和运动的持续时间都可以从力-时间轨迹计算得到。

结合了荧光标记的运动蛋白可视化的可能性，为肌球蛋白活性高精度实时测量提供了完整的解决方案。这是进一步准确分析和研究其他的实验参数的先决条件，例如结构转变过程中的力学依赖性以及上述过程是如何与ATP的化学水解产生耦合的。

info@lumicks.com

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.