

实时操控和研究蛋白脂滴的动力学特性

相分离应用案例

2019

目录

序言	3
研究难点和解决方案	4
实验设计	5
脂滴融合	5
微管流变学和粘度	5
模型和使用条件	5
实验	6
脂滴融合过程中分子拥挤效应的影响	6
RNA-RNP的相互作用对蛋白脂滴的状态和融合的影响	8
低复杂度域的变化如何影响蛋白脂滴的凝固	9
盐浓度增加时蛋白脂滴的微管流变学，粘度和弹性	9
总结	11
致谢	11
参考文献	11

实时操控和研究蛋白脂滴的动力学和特性

近年来，越来越多的研究表明细胞的无膜细胞器是一种半瞬态结构，其作用能够使特定生物分子之间有效的相互作用。对此类细胞结构的形成过程、物理性质和机械化学作用的研究帮助科研工作者加深了对多种细胞过程的理解。更重要的是，蛋白脂滴的形成与疾病之间的关系，如神经退行性的肌萎缩侧索硬化以及癌症的关系也促使我们找到更加合适的方法研究其相关性质。在上述疾病发生的过程中，相关蛋白发生聚集并引发了脂滴的固化，形成凝胶状或则类似于淀粉样纤维（血小板）的不可逆固态结构。

无膜细胞器与其他亚细胞机构是由蛋白质和RNA的液液相分离形成的，这些结构包括应激颗粒，核仁，RNA转运颗粒和可能的异质染色质。自1930年以来，越来越多的研究对蛋白质机器在细胞质中均匀分布的传统观念提出了质疑——这种机制就像一锅可溶性分子和膜细胞器的汤。相反，他们认为结构的形成是通过特定蛋白质区域的多价相互作用。

蛋白脂滴具备极高的动力学变化特性，尽管已经经历了长期的研究，但是对于蛋白液体的溶解与形成背后的机制仍未完全了解。支持液液相分离的科学家们没有办法依靠现有的技术捕获蛋白脂滴进而研究其动力学性质。因此，需要开发新的技术并设计系统性实验揭示相分离的基本过程，这些研究内容包括：

- 调节蛋白脂滴及导致其固相聚集的因素有哪些？
- 蛋白脂滴与不可逆的淀粉样纤维结构有什么关系？
- 蛋白脂滴固化的过程中，其材料性质会发生怎样的变化？

应用案例简介

本应用报告将向您介绍集成了高性能光镊技术与先进成像技术的创新系统在在实时研究相分离相关性质上的应用。基于近期发表的高水平研究成果，我们将向您展示如何使用C-Trap®光镊-荧光与无标记集成显微系统研究蛋白脂滴的融合与分解，以及诱导脂滴转变为病理性固化过程中的结构特性。

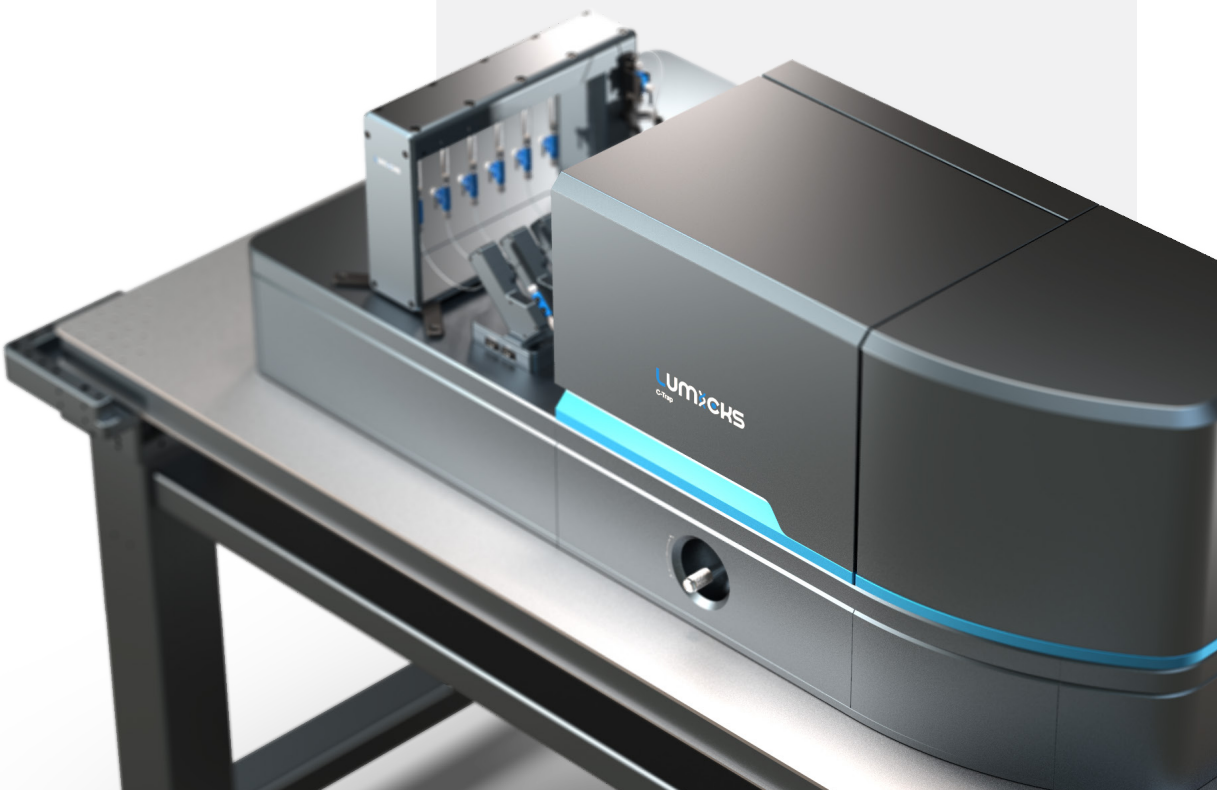
C-Trap系统性能

C-Trap集成了超高性能光镊技术、先进成像技术以及高性能的微流控技术，非常轻易的实现蛋白脂滴的捕获、操控和可视化，研究其不同实验体系中的结构动态性质。

光镊技术使用高度聚焦的激光束捕捉微米级别大小的颗粒，如蛋白脂滴和微球等，通过控制光束的方向和力的大小操控捕获物质的位置。

实时成像技术使捕获的脂滴及其相关的生物分子在光镊操控的过程中可视化。例如标记蛋白脂滴活动过程中的多种生物分子，并使用荧光显微成像技术追踪其运动轨迹。

微流控技术具备层流特性，通过在每个独立的通道中通入不同的反应体系，使实验流程更加准确、有序，不同的通道间没有物理阻隔，保证了实验体系的自由控制，在不同的反应体系中监测其动力学特性。



研究遇到的挑战及解决方案

研究难点

液液相分离是一个全新的研究领域，尽管正在全速发展，然而领域的常规研究方法仍然很难研究其动态变化过程。更重要的是，液液相分离及其与疾病的关系受环境影响很大，仅在特定的条件下具备相关性，因此符合条件的细胞环境非常稀少，这些不确定性使得体外实验结果很难反映实际生理环境中的相关过程。

然而，液液相分离领域内的研究进展为深入理解蛋白液体的形成，凝聚与聚集开辟了新的道路。至今，蛋白脂滴融合与分解及其相关性质的研究仍在依赖脂滴间自发的相互作用，仅能够获得“是”与“否”的结果。例如，传统的脂滴融合实验依靠脂滴间的自发融合，获得的实验结果也就仅仅是脂滴是否融合，没有办法获得更多与融合相关的参数（如，接触到融合的时间）。

荧光漂白后恢复（FRAP）技术是研究脂滴内分子流动性的常规方法，依靠荧光分子漂白后恢复能力表征脂滴内分子在二维层面的流动特性，但是没办法获得被探测脂滴的三维方面的特性，例如其粘弹性。

其他的研究方法如流变学测量需要大量的反应底物，无法正确反映真实的生理学事件，并且花费过高。

实验模型与适用条件

通过力学操控，我们将展示研究两种不同蛋白脂滴特异性性质的方法。

1. 脂滴融合
2. 微流变性和粘度

这些研究中展示的实验大多适用以下三种RNA结合蛋白之一作为模型研究不同实验条件的脂滴特性。

- 肌萎缩侧索硬化（ALS）相关突变体
- 神经退行性疾病如（ALS）相关突变体
- 线虫生殖系中的核周RNA颗粒

其中每个模型中的每个实验都会针对不同实验体系中蛋白脂滴性质和结构的变化进行研究：

- 不同浓度的大分子拥挤
- 不同的RNA与R核糖核蛋白比例
- HnRNPA1的错义突变
- 不同的盐浓度

解决方案

C-Trap®光镊-荧光与无标记集成显微系统具备的多种关键功能，使其非常适合测量蛋白脂滴的精细特性，并比较不同实验体系中的测量结果。该系统在时间和空间上都具备超高分辨率，保证了在予以力学操控时也能够同时探测脂滴特异性事件，通过以下三个方面的基础功能扩展相分离与脂滴分析的研究范围：

1. 光镊技术：直接操控需要研究的反应体系
2. 实时荧光成像技术：实时监测反应体系的进程，第一时间获得实验相关参数
3. 高性能微流控系统：简化实验操作，加快实验流程，构建模拟真实生理环境的反应体系

借助于C-Trap, 您可以进行以下研究：

- 依靠力学操控系统，诱导脂滴融合
- 监测不同实验体系下脂滴融合时间的细微差别
- 脂滴内部的流变学实验获得脂滴的粘弹性等物理参数
- 单一脂滴结构在不同实验体系中的各项性质

■ 脂滴融合

科学家们使用光镊和实时荧光成像技术的集成系统研究并比较不同实验条件下的蛋白脂滴的刚性。双光镊系统捕获两个荧光标记的脂滴，施加力操控脂滴相互靠近，监测两个脂滴融合成一个较大脂滴所需的时间，根据测量到的融合时间评估蛋白脂滴稳定性和刚性。

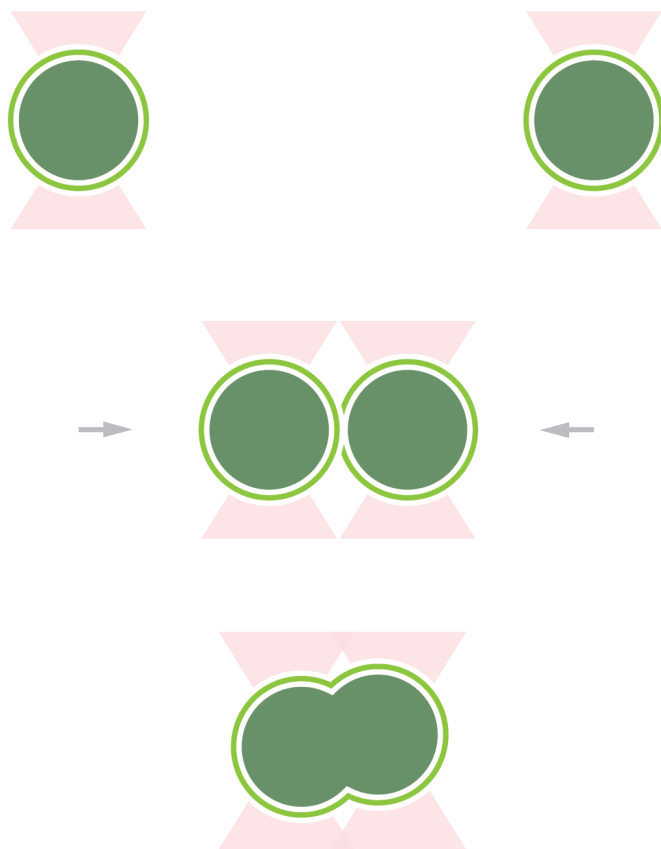


图1光镊系统分别捕获两个荧光标记的蛋白脂滴，使他们相互接近诱导融合

■ 微流变性和粘度

除了直接捕获脂滴，科学家们依靠光镊系统捕获不同类型的微米颗粒，如PS微球。双光镊系统非常轻易的捕获两个微球，与同一个蛋白脂滴接触黏连。固定一个微球的位置，操控另外一个微球在X方向上来回移动，改变脂滴的形状，测量力诱导微球振动参数，系统会自动导出沿着脂滴X方向移动特定区域所需的力和振幅，分析不同条件下所需力的不同获得脂滴的刚性参数和粘滞力参数，而这些参数仅仅与环境的摩擦力相关。

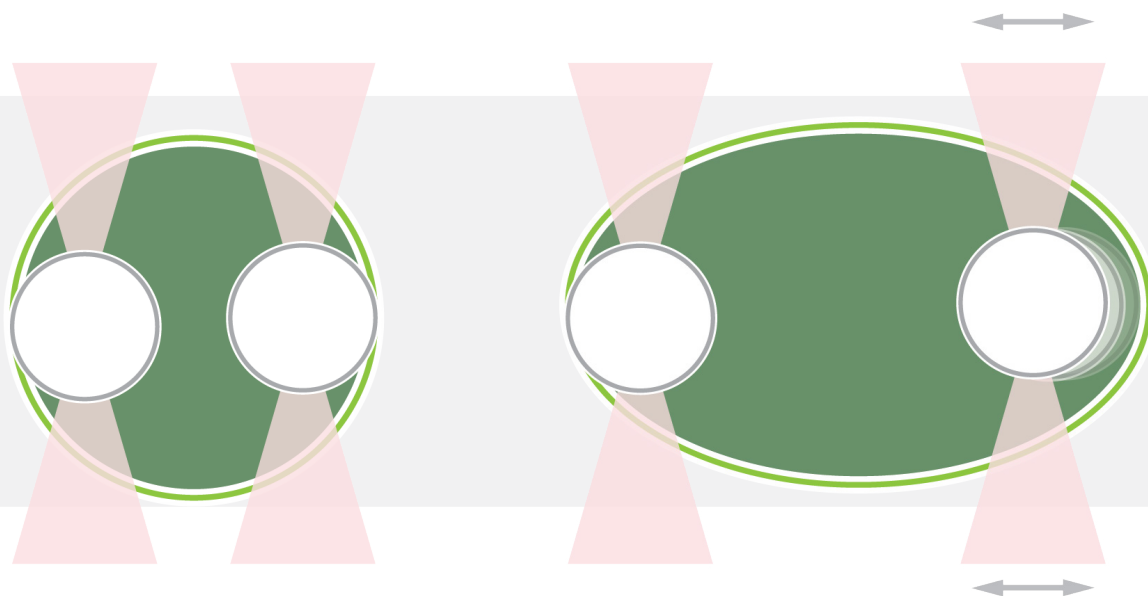


图2光镊微流变实验的原理示意图。双光镊系统捕获两个ps微球，使其与同一个蛋白标记的脂滴黏连，操控其中的一个微球沿着脂滴的X方向来回移动，探测脂滴的微流变特性参数。

实验流程与结果

测量分子拥挤对脂滴融合的影响

研究背景

不同浓度的分子拥挤对蛋白脂滴融合的影响。

细胞环境中包括多种大分子，他们以浓度依赖的方式改变细胞的分子和结构特性。分子拥挤的动力学通过排除体积效应部分解释，即一个分子没有办法进入已经被另外分子占据的空间。细胞内分子与结构特性的改变影响着无膜细胞器的结构和特性，同时也直接或间接的影响着细胞生理过程如蛋白构象，RNA折叠或者蛋白组装。除此之外，分子拥挤还可能给蛋白脂滴凝结的发生过程以及多种神经退行性疾病相关的纤维状结构的形成带来影响。

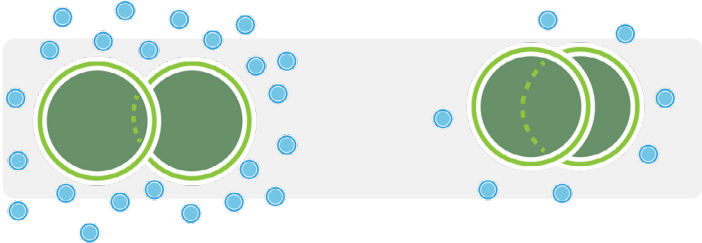


图3 不同浓度的分子拥挤对蛋白脂滴影响的原理示意图

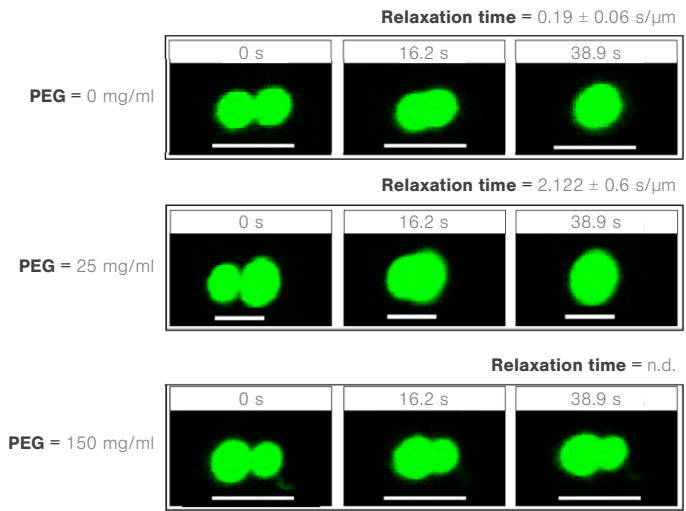


图4 FUS脂滴在不同浓度的PEG8000时间序列图像。实验体系中的PEG8000的浓度分别为0，25,150mg/ml，光镊系统引导脂滴匀速靠近产生融合。Kaur T, et al., Biomolecule, 2019

实验过程

为了研究分子拥挤对RNA结合蛋白FUS相行为的影响，Banerjee Lab at the University at Buffalo的科学家以聚乙二醇PEG8000作为分子拥挤模型。通过调控PEG8000的浓度（150mg/mL），评估分子拥挤浓度对FUS融合的影响。

研究人员首先用光镊捕获两个独立的FUS脂滴，操控一个脂滴以恒定的速度靠近第二个脂滴，测量不同分子拥挤浓度下脂滴的融合时间。结果表明，没有含有PEG8000的体系中，FUS脂滴以更高的速度发生融合（200ms/um），实验体系提高到150mg/mL时，FUS脂滴几乎无法融合。

上述结果表明，分子拥挤体系产生的排空力影响蛋白脂滴的粘度，分子拥挤的细胞环境诱导RNP如FUS的固化，使脂滴由液态向凝胶态转化。

Application ideas



Staying ahead of the curve

- 捕获蛋白脂滴，研究时间，环境（离子强度）和浓度对相变的影响。
- 固定DNA或者亚细胞结构，研究他们与蛋白脂滴间的相互作用。

实验流程与结果

测量RNA/RNP间的相互作用对蛋白脂滴的物质态和融合的影响

研究背景

■ 溶液中的蛋白脂滴如何分离状态？

体外实验表明，在高RNA-核糖核蛋白（RNA-to-RNP）浓度比的反应体系中，RNA分子会抑制蛋白脂滴的凝聚；相对的，在较低的RNA-to-RNP浓度比的反应体系中会促进脂滴凝结，表明RNA分子是可以调控脂滴的物质态行为。进一步的研究表明，RNA与富含正电荷的精氨酸和甘氨酸特定结构域结合，这些结构常见于RNP中，这种结合调制了蛋白脂滴凝聚过程。

实验过程

Banerjee Lab at the University at Buffalo的科学家研究了不同RNA和多肽体系下的脂滴的凝聚行为。科学家们构建了两种RNA序列，分别为Poly A和Poly U，和富含精氨酸/甘氨酸（R/G-rich）或富含赖氨酸/甘氨酸（K/G-rich）的多肽序列，通过设计不同的复合实验体系，研究此体系中的蛋白脂滴的凝聚行为。

表1 不同RNA-RNP复合体系

Combo	RNA	Peptide
1.	poly(A)	R/G-rich domain [RGRGG] ₅
2.	poly(U)	R/G-rich domain [RGRGG] ₅
3.	poly(A)	R/G-rich domain [KGKGG] ₅
4.	poly(U)	K/G-rich domain [KGKGG] ₅

两种多肽序列[RGRGG]₅ [KGKGG]₅在PH值为7.5的缓冲液中含有相同的电荷数，保证了两者与RNA有相同的相互作用。

研究人员使用C-Trap的力学操控功能诱导脂滴融合，比较分析了各复合体系下凝聚体性质，通过定量分析脂滴间的融合时间评估脂滴的稳定性及其融合能力。复合体系从富含R/G的多肽和Poly(A)变为富含K/G的多肽与Poly(U)复合体系时，脂滴的融合速度（平均值0.0028s/um）提高了一倍（图5和6），结果表明蛋白脂滴在后面的复合体系中具备较高的流动性和较低的粘性，表明长程力学操控和短程引力具备调节RNA-多肽复合体系中的蛋白凝聚形成动力学过程，包括结合与凝固。研究者通过富含R/G 结构域的天然FUS模型在PolyA或PolyU缓冲液中的行为证实了这种相变性质是具备序列特异性的。

以上的结果表明RNA和蛋白质的序列和结构在脂滴动力学和刚性中起决定性作用，帮助科学家加深入了解细胞器的自发行为和病理性聚集的潜在机制。

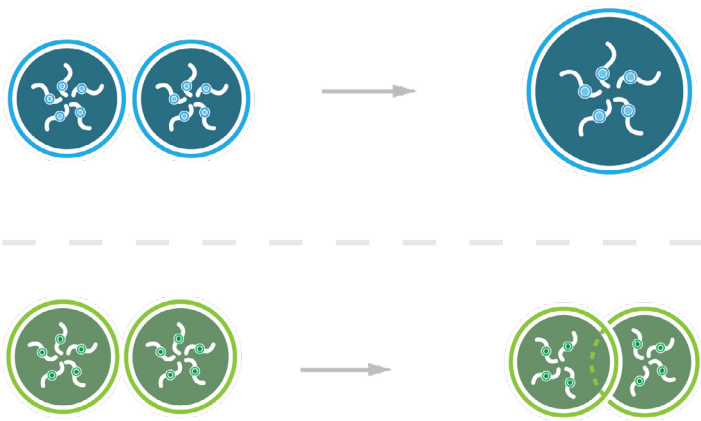


图5 脂滴融合示意图，脂滴的融合时间由RNA-RNP复合体系决定

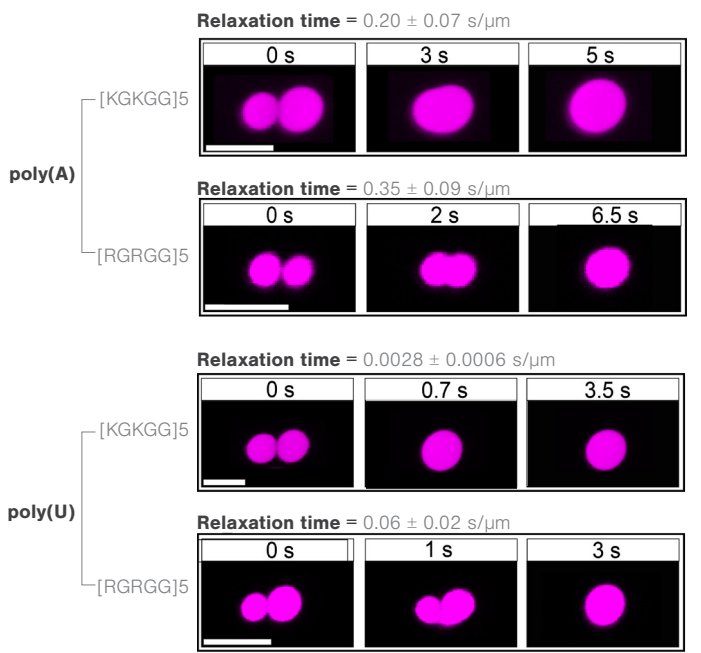


图6 不同RNA-RNP复合体系的光镊诱导脂滴融合的时间序列图像，脂滴在富含R/G的RNA-RNP复合体系中融合时间相对富含K/G的复合体系中更长，同时PolyA会延长融合时间。

实验流程与结果

低复杂度域的变化对蛋白脂滴固化的影响

研究背景

■ 哪些因素影响了液相脂滴和固相脂滴的转变？

相分离中涉及的多种多肽和蛋白分子都包含低复杂度域，而低复杂度域通常通过离子键相互作用诱导液液相分离。这些结构域主要特征为特定氨基酸过度表达，易于形成蛋白质和淀粉样聚集体，许多退行性疾病在该域中存在错义突变。最近的研究发现，中间亚稳态和可逆的淀粉样纤维参与了液相脂滴与不可逆固相聚集体之间的转变。上海科技大的孙博博士针对低复杂度域的变化对蛋白脂滴固化的影响进行了研究。

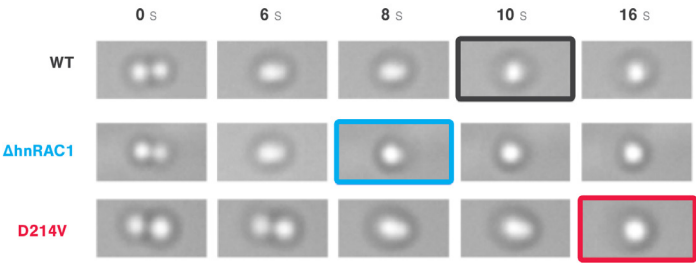


图7 野生型，RAC缺失突变体，RAC错义突变体三种蛋白脂滴在光镊诱导脂滴融合实验中的时间序列图像，突出现实的图像为脂滴融合时间节点（X. Gui et al, Nature Communications, 1 May, 2019. This work is licensed under CC BY-4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

实验过程

研究人员首先识别出hnRNPA1蛋白中促进淀粉样形成的低复杂度域，命名为可逆淀粉样核心区，这些结构域包含有带负电荷的天冬氨酸，在低温（4℃）时形成凝胶，较高温度时（25℃）其纤维结构分解。

与上一个案例相同，研究者使用力学操控诱导蛋白脂滴融合研究脂滴的特性。本案例中将视角对准了hnRAC1突变体对hnRNPA1脂滴物理性质的影响。hnRACH1缺失的突变体蛋白脂滴与野生型相比，具备更快的融合速度（8秒，10秒），而hnRNPA1的天冬氨酸错义突变至缬氨酸的错义突变体(D 214V)导致了不可逆淀粉样蛋白的形成，此时蛋白液体的融合速度更低（16秒，图7）。

经过与其他实验数据结合后分析，研究人员认为可逆淀粉样纤维降低了蛋白脂滴的流动性和增强脂滴的固化作用，促进相分离的产生。这些科学发现突出了可逆淀粉样蛋白在应激颗粒的形成以及作为中间亚稳态在不可逆纤维聚集体中的重要作用。

实验流程与结果

盐浓度上升时蛋白脂滴的微流变性，粘度和弹性的变化

研究背景

蛋白脂滴的物理化学性质

通过液液相变进行区室化通常取决于支架蛋白，这些蛋白通过与其他生物分子（包括RNA和蛋白）的共定位构建了其他结构形成的基础。这些分子相互作用的程度最终影响了蛋白液体的材料特性，包括脂滴的粘度和弹性，进而影响其功能如扩散特性和结构刚性。

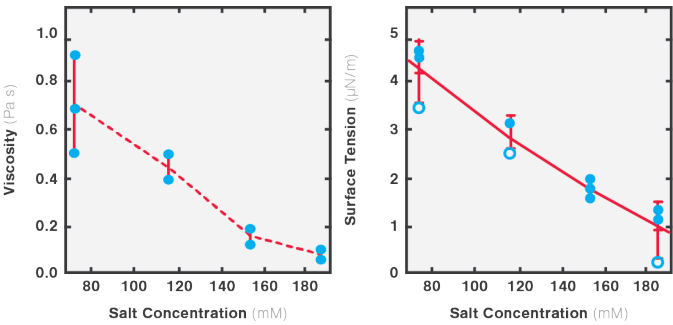


图8 蛋白脂滴的粘度和表面张力随盐浓度的变化曲线

实验过程

研究人员通过研究盐浓度对PGL-3蛋白脂滴微流变性的检测研究蛋白脂滴的材料特性。

Hyman lab at the Max Planck of Molecular Cell Biology and genetics的研究人员使用双光镊系统在四个不同的盐浓度（75,115,150,180mM KCl）缓冲体系中研究PGL-3蛋白液体的微流变性。两个独立捕获的微球与同一个蛋白脂滴黏连，对第一个小球进行力学操控，使其沿着X方向往返移动改变PGL-3液体的形状，移动光阱所需要的力与蛋白脂滴的粘度密切相关，因此不同盐浓度下的操控力的大小可以用来评估此体系中蛋白脂滴的材料特性。

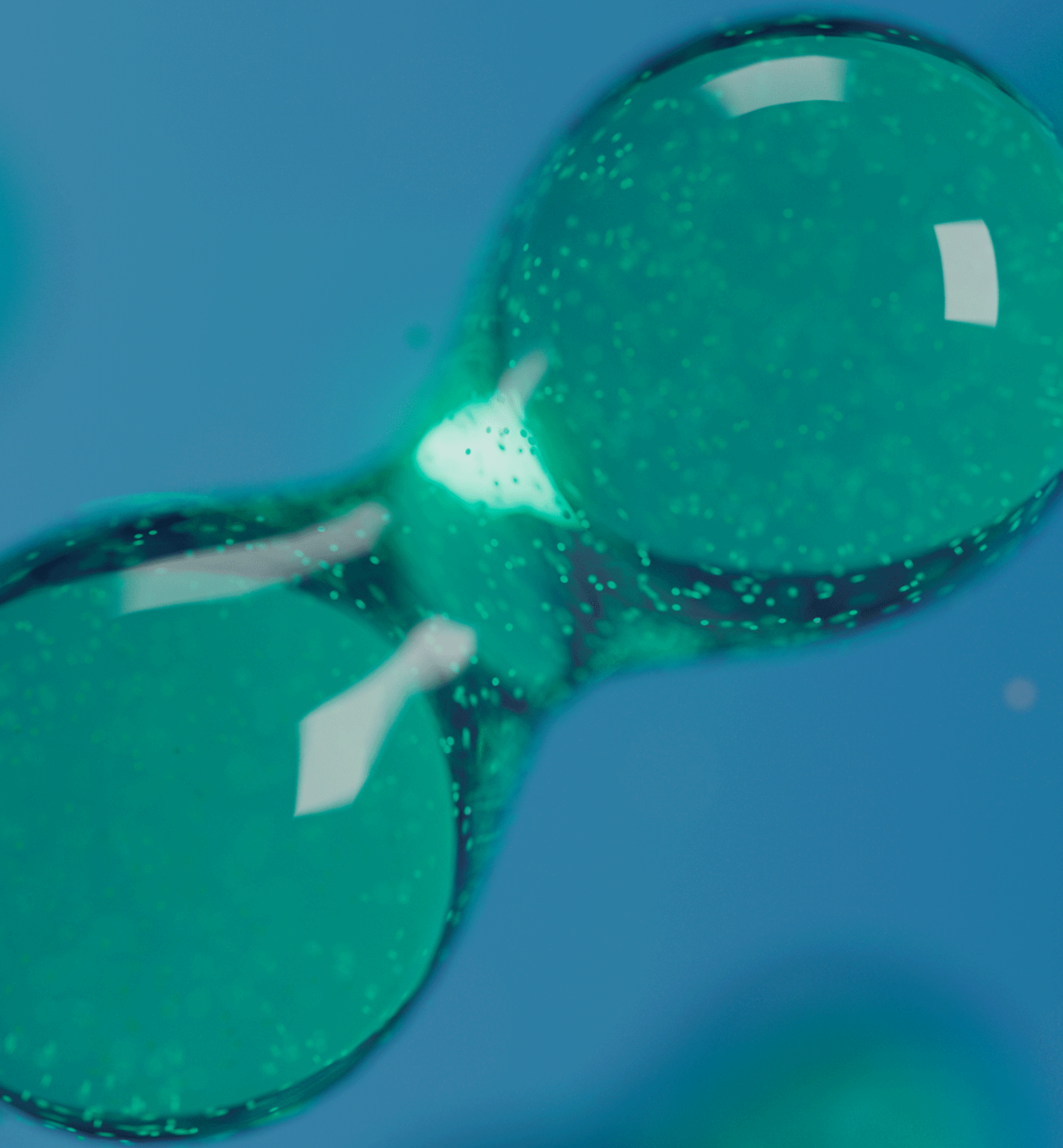
实验数据证实蛋白液体的粘度和表面张力随着盐浓度的增加而降低（图8），这些结果表明经典相互作用影响着蛋白脂滴的材料性质，并且是浓度依赖的。

Application ideas



Staying ahead of the curve

- FCS FRAP研究观测不同浓度下脂滴的形成
- 研究蛋白浓度，缓冲液条件和蛋白组分对蛋白脂滴融合和分离的影响
- 通过操控蛋白脂滴内部微球在多个方向上的移动评估脂滴的异质特性
- 按顺序添加物质，人工构建包含细胞结构如染色体的复合体系
- 演技蛋白脂滴在生物系统（如神经突触）中的转运



总结

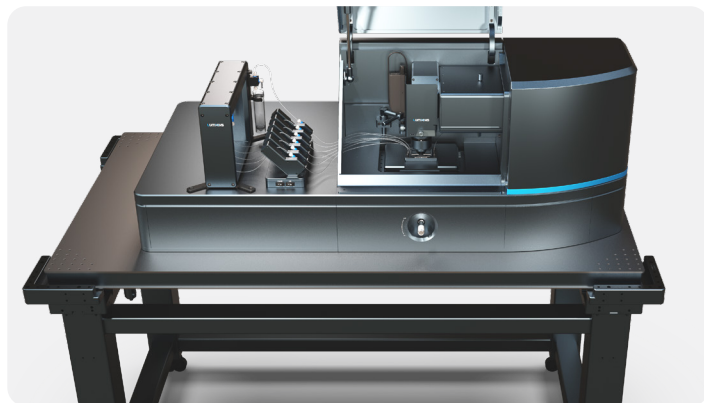
相分离相关的研究领域发展迅速，需要更加详细的力学数据理解其内在机制。

对相分离性质的详细分析不仅能帮助我们进一步理解自然细胞过程，也能够促进药物和治疗方法的开发，包括以脂滴向病理性聚集体转变为靶标的小分子抑制剂，用于治疗神经退行性疾病。

解决方案：C-Trap光镊-荧光&无标记成像集成系统

C-Trap集成了高动态和高灵敏的测量技术与多种显微成像技术，您可以自由选择宽场、共聚焦及STED荧光成像系统，以及无标记纤维成像技术实时监测生物分子间的相互作用（如RNA结合蛋白和核糖核蛋白的形成）。更重要的是，该系统支持你最多三种波长的激发光，为您识别蛋白脂滴中的不同蛋白以及研究这些蛋白间的共定位特性保驾护航。

C-Trap光镊-显微成像集成系统通过实时研究生理环境中的相分离特性，扩展此领域的研究内容，是其他分析技术的有力补充。



致谢

本应用报告中的案例来自于以下文章：

- Kaur et al. 2019, published in Biomolecules.
- Alshareedah et al. 2019, published in the Journal of the American Chemical Society.
- Gui et al. 2019, published in Nature Communications.
- Jawerth et al. 2019, published in Physical Review Letters.

特别感谢Priya Banerjee博士和他的课题组对此应用报告提供的帮助。

相关文献

1. Kaur, T. et al. Molecular Crowding Tunes Material States of Ribonucleoprotein Condensates. Biomolecules (2019) doi:10.3390/biom9020071.
2. Alshareedah, I. et al. Interplay Between Short-range Attraction and Long-range Repulsion Controls Reentrant Liquid Condensation of Ribonucleoprotein-RNA Complexes. J. Am. Chem. Soc. (2019) doi:10.1021/jacs.9b03689.
3. Gui, X. Structural basis for reversible amyloids of hnRNP A1 elucidates their role in stress granule assembly. Nat. Commun. (2019) doi:10.1038/s41467-019-09902-7.
4. Jawerth, L. M. Salt-Dependent Rheology and Surface Tension of Protein Condensates Using Optical Traps. Phys. Rev. Lett. (2018) doi:10.1103/PhysRevLett.121.258101.

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.

LUMICKS