

分辨率极限大挑战

新工具帮科学家看到活细胞蛋白质

生物物理学家 Joerg Bewersdorf 说,2006 年是荧光显微镜学的奇迹之年。而与之相媲美的另一个年份是 1905 年,当时爱因斯坦以相对论、量子论和原子物理学变革了物理领域。而这场显微镜学革命,则是由 3 篇论文组成的,科学家首次能窥见细胞内部并追踪单个分子的行为。

“每个分子是一台机器,一台纳米机器。” Bewersdorf 说。其中,蛋白质是尤为复杂的分子,它们以多种方式弯曲缠绕,执行细胞新陈代谢和生长需要的反应。“我们感兴趣的是,这些微型机器是如何整合在一起完成细胞机能的?”

长期以来,光学显微成像技术的发展一直受制于一个物理极限值的约束,也就是德国物理学家、显微技术专家恩斯特·阿贝在 1873 年提出的预言:光学显微镜的成像效果被认为受到光的波长限制,无法突破 0.2 微米,即光波长 1/2 的分辨率极限,此后被称为“阿贝分辨率”。

在能够窥见细胞内部之前,科学家对该问题并没有清晰的答案。光学显微镜无法提供任何帮助,超越一定放大率后,衍射使得光线四散而非集中于一点。任何距离小于 200 纳米或宽度是细胞膜 40 倍的物体都会变成一个模糊点。使用电子显微镜制作的图片能分辨精细结构,但必须是静态的,无法用于活细胞。

2006 年,3 个实验室各自采用相似策略克服了“衍射障碍”:利用专业的荧光探针分析样本。这些探针能被有选择地开启,直到所有探针能在一系列图像中被捕捉到。科学家能像印象派画家利用颜色点构建一个场景那样将这些图像制作成一张图片。这 3 个技术——光敏定位显微镜(PALM)、荧光 PALM(FPALM)和随机光学重建显微镜(STORM),能区分相距 20 纳米的目标,产生单分子尺度的荧光照片。这些技术为研究人员插上前进的翅膀。例如,Bewersdorf 在美国耶鲁大学的实验室正为活动在活细胞表面的蛋白质“照相”。

自 2006 年到现在的 10 年间,这 3 个技术掀起了技术和方法的革新浪潮。2014 年,德国马克斯普朗克学会生物物理化学研究所的 Stefan Hell、美国霍华德·修斯医学院珍妮莉娅法姆研究院的 Eric Betzig 和美国斯坦福大学的 William Moerner 提出的打破衍射极限的成像策略使他们成为诺贝尔化学奖得主。研究人员目前正在制造更明亮的荧光探针,以便照亮未曾展现在人们面前的细胞进程。

“令人兴奋的是,这些技术让观察活细胞成为可能。”珍妮莉娅法姆研究院 Jennifer Lippincott-Schwartz 说,“目前,使用荧光探针拍摄单个蛋白质时机已经成熟。”

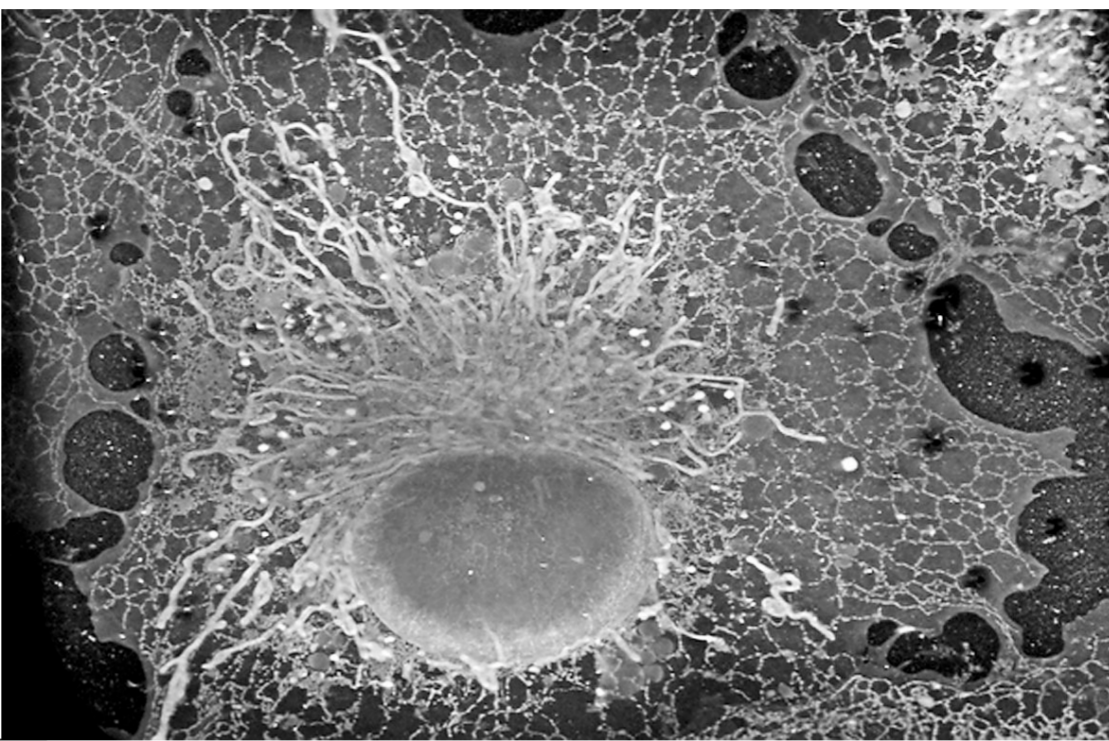
更持久、更明亮

这 3 个超分辨率显微镜技术都是依靠绿色荧光蛋白(GFP)等化合物发出光线的。这些物质的基因能被插入编码细胞蛋白质的基因中。然后,生成的蛋白质中则附着着荧光物质,并通过发出荧光显示其存在位置。

但这些技术均存在限制。一个大问题是,在被刺激其发光的激光彻底损坏前,这些探针

“这些技术为研究人员插上前进的翅膀。”

荧光标签和光片成像相结合,产生超分辨率图像。
图片来源: Wesley R. Legant



只能发出极为有限的光。甚至在光颜色效应发生前,探针的光已经非常微弱了。

而这些探针的综合版本有机染料,能发出更明亮的光,但却无法编码目标基因,并插入细胞内部。相反,它们通常与能到蛋白质的抗体结合在一起。但这种组合使得探针过大,无法穿过细胞膜或干扰蛋白质功能。“这些探针确实存在限制。”Bewersdorf 说。

幸运的是,革新正在出现。Bewersdorf 团队正在与两个团队合作研究可点击化学探针:新英格兰生物实验室的 SNAP-tag 和普洛麦格生物技术公司的 HaloTag。这些技术包含一种能被编码到兴趣蛋白质中的较短的靶序列和一个能通过简单化学反应嵌入靶蛋白中的染色分子。Bewersdorf 和同事已经证明这两种技术能使用有机染料作用于活细胞。

另外,研究人员还求助于量子点——纳米级半导体。这种物质不仅明亮且持续一个月甚至更久,还能与生物分子相连接。新墨西哥大学生物物理学家 Diane Lidke 在细胞传导实验中就使用了量子点。但量子点存在一个缺点:体积过大。市场上能买到的量子点都有一个壳,这让其直径大了 15~25 纳米。与只有 4 纳米宽的荧光蛋白质相比,“它们太太太重了”。

这一缺点意味着研究人员很难将量子点放入细胞或其他紧密空间中,但能有效应用于在细胞外基质和膜结合蛋白中。在与其丈夫、该校物理学家 Keith Lidke 的合作中,Lidke 开发出了多色、快速、单分子追踪技术,能用量子点在定制显微镜中生产图片。

打开细胞

穿越细胞膜是荧光显微镜面临的重大障碍之一。“即便只有 5 纳米厚,细胞膜已经进化

了数十亿年,以便隔离细胞内外,而且,效果出奇地好。”伊利诺伊大学香槟分校生物物理学家 Paul Selvin 说。

Selvin 的实验室开发出的量子点更小,直径接近 9 纳米。这一尺寸能让他将量子点滑过神经细胞之间 20~40 纳米的空隙,信息传导分子经由这里向相邻神经细胞传递信息。一旦进入这里,量子点能束缚并突出帮助记忆形成的受体的存在。虽然 Selvin 并没有将这些量子点植入活细胞内,但他认为这是可行的。

该实验室还计划在细胞膜上穿孔,然后迅速密封起来,以避免破坏细胞。“我们能够使用一种名为链球菌溶血素的细菌酶在细胞膜上钻一个约 5 纳米的微小孔洞。”Selvin 说。这一宽度足以让荧光蛋白质通过,甚至是联合了抗体的蛋白质,以便寻找细胞内部的目标物体。之后,研究人员能利用尚未发表的方法在 20 分钟内修补这些孔洞。

另外,还有人担忧,这些探针会干扰靶蛋白的功能。而约翰斯·霍普金斯大学生物物理学家 Jie Xiao 则提出了一个不会损伤这些蛋白质的替代方案。

她的探针分子经过基因修饰,并非附着在目标分子上,它们被制作出来后,就立刻被一种酶剪开,并进入细胞膜的一个特定位置。这就意味着它们不再携带靶分子的位置信息,但却位于能对其进行精确计算的位置,并由此获得蛋白质产生的精确计数,同时,蛋白质本身能自由发挥功能。Xiao 将该技术称为裂解共转化活化(CoTrAC)。

“量化活细胞的蛋白质水平非常重要。”Xiao 解释道,“人们通常使用荧光指示出相对变化。”但其研究的基因调控蛋白极少,很难用超分辨计数成像。此外,这些蛋白质的精确数字的细微变化也能判断细胞状态改变与否。

让背景暗下去

除了更明亮,另一个让探针脱颖而出的方法是降低背景亮度。德国波恩大学生物物理学家 Ulrich Kubitschek 表示,“细胞中也有扩散的背景。”非靶蛋白甚至本身就有天然、暗淡的荧光,这就造成了背景噪音。如果减少背景噪音,图像的清晰度就会提高。

因此,研究人员不断改进亮度策略。Kubitschek 实验室使用激光层照显微技术生产一个非常细的精确聚焦光束,该光束能从侧面穿过样本。“我们建造了一些下部和四周透明的玻璃室。”他说。通过从侧面而非顶部向样本照射光线,该团队照亮了一个 200~300 纳米厚的切片,并从下部对样本进行观察。科学家利用这种方法,看到 RNA 分子经过一种名为核膜孔的蛋白质结合物输出,进入细胞质。在这里,它们开始指挥蛋白质合成。

能进行激光层成像的显微镜已经商业化。具备专业知识的研究团队已经组成,并开始定制自己的显微镜。

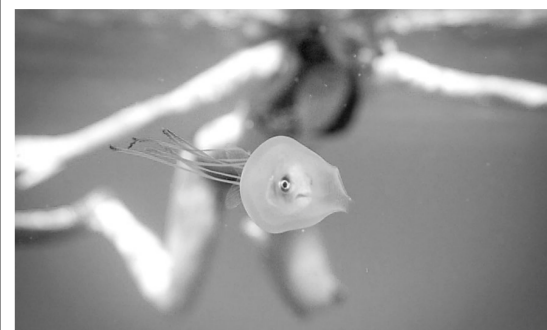
而下一代选择性平面照明显微术被称为晶格光片显微镜,诞生自 Betzig 的实验室。项目合作者、珍妮莉娅法姆研究院细胞生物学家 Zhe Liu 说,该技术能产生 300~500 纳米厚的照明平面,其优点在于光点的结构。晶格能形成一个三维网格,照亮样本的连续剖面。

总之,显微镜技术在生物学发展历程中至关重要,尤其是早期显微术领域的某些重要发现,直接促成了细胞生物学及其相关学科的突破性发展。随着生命科学的研究由整个物种发展到分子水平,显微镜的空间分辨率及鉴别精细细节的能力已经成为关键技术问题。光学显微镜的发展史就是人类不断挑战分辨率极限的历史。

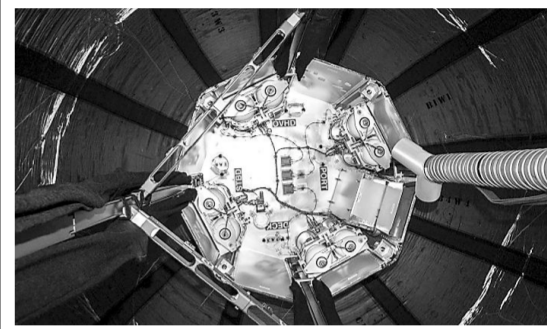
影像·6 月

来自全球的科学图片

(冯丽妃)



鱼与水母:尽管这幅图是去年由摄影师 Tim Samuel 拍摄后上传到网络的,但直到今年 6 月,这幅水母体内可辨认出一条鱼的奇图才犹如病毒般在网络空间传播开来。 Tim Samuel 摄影



比奇洛可扩展活动模块;BEAM(比奇洛可扩展活动模块)是连接到国际空间站的充气可充气房间。该模块在今年 4 月发射后被连接在一起,并于 5 月充气,但宇航员直到 6 月才被允许进入该模块。 NASA 供图



极地救援:美国国家科学基金会正在进行一项非常罕见且具有风险的任务,从阿蒙森-史考特南极站将一名生病的职员送回本土。一架双水獭飞机连续飞行 2400 多公里,穿过南极极夜到达该基地。图中飞机正计划返航。 Robert Schwarz 摄影



乌龟追踪者:研究人员和动物保护人士在所罗门群岛的 10 只玳瑁身上放置了标签,以此了解 Arnavon 海洋保护区的边界与这些动物切实的游泳范围在多大程度上匹配。这幅图于 6 月 16 日在世界海龟日公开。 Tim Calver 摄影



鲨鱼圈养被打破:今年 5 月底,野生动物保护协会(WCS)宣布,印尼政府释放了非法圈养在印尼东部的两头鲸鲨。WCS 表示,这种能够成长为海洋中最大鱼类的动物可能与蝠鲼、其他鲸类一起被有意捕捉,并销售到亚洲的水族馆中。 Paul Hilton 摄影



琼脂艺术:2016 年度琼脂艺术获胜作品利用培养基中的各种葡萄球菌和谷氨酸棒状杆菌绘制了受精卵。这幅作品题为《第一场比赛》,由丹麦哥本哈根研究生 Zohorul Islam 创作,并于 6 月在马萨诸塞州波士顿举办的美国微生物学年会上展出。 Zohorul Islam 摄影 (宗华)

没有硫酸一样播云

研究表明树木同样能催化云的形成

两项试验表明,树木释放的微粒能催化云的形成。这两项日前分别发表于《自然》《科学》杂志的成果同这样一种假设相左,即污染物硫酸对于特定类型的云层形成是必需的。它们还表明,气候预测可能低估了云在形成工业化前气候中的作用。

瑞士联邦理工学院气候建模专家 Reto Knutti 表示,如果试验结果证明属实,对于未来气候变化的预测应将其考虑在内。在 20 年甚至更长的时间里,云一直是理解人造排放物如何影响大气的最大的不确定性来源。

除了释放二氧化碳,燃烧化石燃料会间接产生已知能催化云层形成的硫酸。因此,气候学家推断,从工业化之前的时代开始,云量便大幅增加,而这被认为通过将阳光反射回太空产生了整体冷却效应。他们还认为,这种整体冷却效应掩饰了气候对不断上升的二氧化碳浓度的潜在敏感性。

领导其中一项试验的欧洲核子研究委员会(CERN)物理学家 Jasper Kirkby 介绍说,最新试验表明,工业化之前的时代可能拥有比此前认为的更厚的云层。相反,二氧化碳的变暖效应可能被低估。

不过,Kirkby 表示,判断这在实践中是否属实或者在多大程度上属实还为时过早,因为很多因素在此类推测中发挥作用。“这里面有很多不确定性,我们只是讨论了其中一个。” Kirkby 说。Knutti 认为,试验结果可能不会影响到政府间气候变化专门委员会提出的最有可能的变暖预测。

云由微小的液态水滴,或者某些情形下由微小冰晶构成。不过,在大气中,水蒸气不会简单地变成云:它需要凝结在固体或液体颗粒上,也就是已知的气溶胶。

约一半的气溶胶以固体形式存在,并且源



树木在云层形成中的作用一直未受到重视。

图片来源: Neil McAllister / Alamy Stock Photo

自地球表面:比如,来自沙漠的尘埃、来自海洋的盐晶,或者来自燃烧的烟灰。其他一半在大气中重新形成气态杂质。单独的气体分子会捕获空气中的更多分子,以形成固体颗粒。如果它们增大到 50~100 纳米,水蒸气便会凝结在上。

直到最近,大气科学家还认为,只有火山爆发或化石燃料燃烧产生的硫酸雾才会触发

这一过程。因此,Kirkby 表示,工业化之前的天空被认为在一定程度上没有现在的天空那么多云,因为它们含有的这种污染物较少。

为探寻这一过程,Kirkby 转向其创建的“宇宙射线带来的室外液滴”(CLOUD)试验。CLOUD 是一个 3 米高的不锈钢罐子,里面能再现各种大气条件。它被连接到流入 CERN 大型强子对撞机(LHC)的粒子束。这模拟了大气

中宇宙射线的影响——来自太阳系以外的高能亚原子粒子被认为在云形成中发挥了作用。

在两篇发表于《自然》杂志的论文中,Kirkby 和共同作者报告称,气溶胶能形成于树木释放的化合物,并长到催化云形成所需的大小。这是在没有任何硫酸的情形下发生的,同时模拟的宇宙射线加速了该过程。在这些试验中,该团队利用了一种有助于赋予冷杉林特殊气味的分子—— α -蒎烯。不过,科学家表示,来自其他类型植被的化合物可能也会表现出类似效应。

在第三篇发表于《科学》杂志的论文中,一个团队利用一项不同试验报告了类似发现。该团队包括了 Kirkby 的一些共同作者。目前在芬兰赫尔辛基大学任职的化学家 Federico Bianchi 及其合作者,在海拔约 3500 米的瑞士阿尔卑斯山 Jungfraujoch 研究站测量了大气组成,并监测了当地天气。他们发现,同样源自植被且和 α -蒎烯类似的分子能在没有太多硫酸的情形下催化云的形成。

德国马普学会气象研究所大气科学家 Bjorn Stevens 介绍说,除了为气候预测提供依据,这些发现还有其他潜在意义。一些科学家曾警告说,诸如从燃煤电厂排放物中将二氧化碳分离出来等举措会消除云层产生的一些有益的冷却效应,并且促进全球变暖。不过,现在看来,人们可能不用太多关注这个问题,因为树木也能催化云的形成。“这意味着我们不必担心清洁的空气。”Stevens 说。

Kirkby 表示,推测树木是否释放这些化合物也很有意思,部分原因在于这对它们形成自己的气候也有好处。“这真的涉及到了盖亚假说。”Kirkby 说,“树木能控制自己的环境是一种美妙的机制。”盖亚假说理论认为,地球上的生命作为一个单独的有机体运行,并且往往会保护自己。