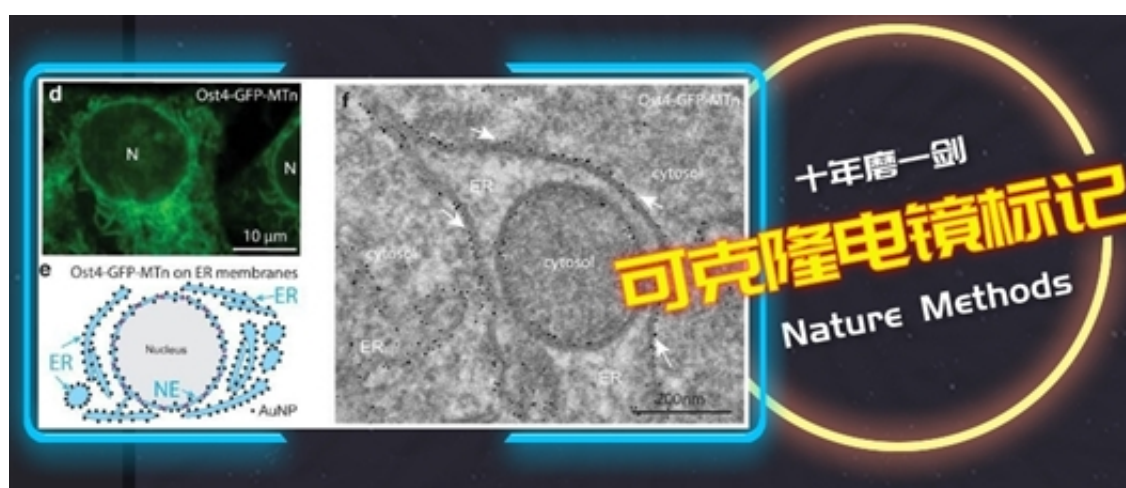


科学家开发可克隆电镜标记技术实现细胞单分子精准定位

作者：writer 来源：爱科学

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/10697.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！



科学家开发可克隆电镜标记技术实现细胞单分子精准定位 刊发于《自然-方法》杂志

（插图绘制：张婧）

从2010年回国至今整整10年，北京生命科学研究所研究员何万中终于在黑暗中探出了一道光，给自己和支持者们上交了一份满意答卷。

这道光就是，他带领团队原创性地开发了一种新型克隆电镜标记技术，该技术可直接在细胞中遗传编码表达的标记蛋白上原位合成纳米金颗粒，从而实现细胞超微结构上单分子水平的精确识别与定位，为细胞的电镜超微结构单分子水平研究提供了新工具。相关研究成果于8月10日在线发表于《自然—方法》杂志。

何万中称这10年是一场大冒险，原创探索不仅没有效率，还要顶着压力和风险，有的只是坚持只

做真正原创工作的信念。

3年没有成果，逼走了一位工程师

电镜超微结构水平细胞中的单分子可视化技术是细胞生物学家期盼已久的工具。

当今，生命科学已进入分子生物学时代，人们对生命现象的研究已经深入到单细胞、单分子的纳米尺度水平，如何在这样的尺度范围内定位、识别、操纵目标分子，从而获取功能性的生物化学信息，将对生命现象的解读等意义重大。

论文通讯作者何万中告诉《中国科学报》，近50年来，识别细胞中的蛋白质分子主要依赖传统的抗体免疫金标记技术，但受到抗体及抗原的稳定性和特异性、化学固定剂、细胞切片渗透性、胶体金颗粒大小等因素影响，该技术通常标记效率很低(低于10%)，甚至无法标记，多数情况也只能标记上细胞切片表面的极少部分抗原，且还要受到背景噪声干扰。此外，传统免疫标记需要标记每一个切片，对于细胞组织样品大尺度的标记是十分费钱、费时、费力的工作。

超分辨率荧光显微学成像技术发展，使得单分子水平的细胞成像成为现实，不过，其也只能对有标记的少数分子成像，对没有标记的多数分子甚至细胞器成像时仍是一片模糊。

因此，细胞生物学家迫切希望电镜领域也能够开发出类似光学显微成像领域广泛应用的绿色荧光蛋白（GFP）标记技术，通过遗传操作来实现细胞及生物组织在电镜超微结构样品上的分子识别和精确定位。科学家将这种技术称为基于遗传编码的可克隆电镜标记技术。

为此，科学家们尝试探索开发可克隆电镜标记，比如：提出利用重金属离子直接与标记蛋白（包括富含半胱氨酸的金属结合蛋白、铁蛋白多聚合体等）结合形成纳米金属颗粒示踪的方式。在电镜下，纳米金属颗粒表现为一个大黑点，类似荧光显微成像的绿色荧光蛋白，可让目标分子从细胞中无数分子中脱颖而出。

2007年，何万中在美国加州理工学院做博士后时，发明了冷冻细胞内吞纳米金颗粒原位增大技术，可在超微结构水平示踪每个被细胞内吞的抗体共价交联的1.4纳米金簇，相关成果在《自然》杂志刊发。不过，该技术基于细胞内吞机制，并不适合标记细胞内部绝大多数分子。

此时，他敏锐地注意到2006年David DeRosier博士刚刚提出的基于富含半胱氨酸的金属蛋白（MT）的开发可克隆电镜标记新概念极具潜力解决上述问题，随后，何万中独立组建实验室，立刻着手将MT改造成更好的MTn和MTa，从此走上了长达十年的可克隆电镜标记技术漫长而艰辛的开发之路。

事实上，国际上有5个团队先后对该技术有过探索，但因诸多技术障碍没有攻克，如存在无可避免的背景噪声导致特异性差，金离子无法有效进入细胞，不耐化学固定剂，合成纳米金颗粒效率低且颗粒极小等，因此，迄今无人开发成功细胞超微结构单分子水平的可克隆电镜标记技术。

2010年，入职北京生命科学研究所后，何万中建立团队开始致力于攻克上述难题。经历3年艰难探索，始终存在的非特异性背景噪声成为他们迟迟难以突破的技术障碍，其中一位负责该金颗粒合成的工程师认为成功希望渺茫，无奈之下，他放弃项目离开了团队。

何万中不甘心就此止步，概念有了，就是一步步解决这个关键问题的事儿，我相信肯定能够解决

的。

意外的收获

做生物物理学交叉研究多年的何万中，决定自学化学知识攻克这个难题，他把自己关在办公室研读化学文献。

在一个周末，他阅读的一篇文献提到，一价金离子可以与氮、氧、硫等诸多元素有着不同的结合强度（与硫结合比氮氧更强），他马上联想到一价金离子与不同含巯基（含硫）化合物之间也有不同结合强度。这使他眼前一亮：蛋白质的20种氨基酸由碳、氢、氧、氮、硫等有限几种元素组成的，如果设计一种方法，找到一种与金离子结合的含硫（巯基）化合物做反应前体，让金离子只与标记上的半胱氨酸的硫结合，而不与其他元素组合，不就可以形成特异性纳米金颗粒同时避免背景噪声了么？

因为手边没有现成化合物，他就地取材，在实验室找到巯基乙醇，并随意加入含0.1%的氯金酸试管中，现场合成金的硫醇盐做前体，结果发现本应浑浊的液体居然是透明的。因无法短期内提纯这种金的硫醇盐，于是他把这种透明溶液，直接加入了含有对照蛋白和另外两种标记蛋白的三个离心管中，溶液依然透明（意味着没有形成金颗粒）。

此时，他想到了Brust-Schiffrin方法(BSM)合成硫醇(RSH)包被的纳米金颗粒基本原理，便立马又加入了强还原剂硼氢化钠溶液，令人意外的现象发生了：含对照蛋白的那个离心管里依然无色透明，而含标记蛋白的两个离心管变成了深棕色！这很有可能意味着背景噪声的消失。何万中说。

于是，第二天他找团队新成员、有着化学背景的金秀梅开展重复实验，结果怎么都重复不出来，原因在于前一天的随意实验没有严格浓度控制。经过很多次不同浓度的配比探索，终于发现，当在硫醇阴离子与三价金离子浓度比率 $\geq 2:1$ 的条件下，上述现象再次重现了。

随后，经过理论和实验分析，何万中发现：经典的BSM合成纳米金颗粒通常是在硫醇阴离子与三价金离子浓度比率 $< 2:1$ 条件进行，会形成巯基与金离子形成 $1:1 \text{ RSAu(I)}$ 链状聚合物经 Au(I) 离子间的范德华力聚集为成核中心，再经强还原剂硼氢化钠还原成纳米金颗粒。

而现在发现的硫醇阴离子与三价金离子的浓度比率 $\geq 2:1$ 条件，可形成另一种 $2:1$ 的可溶 RSAu(I) 金硫醇盐，不能自发形成成核中心（这就是控制样品中没有形成金颗粒的原因），何万中把这种机制命名为自成核抑制机制（ANSM）。

何万中解释，当把富含半胱氨酸的标记蛋白加入ANSM的反应体系时，标记蛋白上的巯基与金离子会形成 RSAu(I) 类似的链状聚合物成为成核中心，此时溶液里完全没有非标记的自成核链状聚合物（背景噪声），因此加入强还原剂硼氢化钠溶液后在标记蛋白上特异性合成纳米金颗粒就毫不奇怪了！

这是一个由于实验时试剂浓度不严格而带来的意外科学发现。ANSM金颗粒合成化学原理的关键发现，为后续可克隆标记技术在细胞中的实现与优化奠定了坚实的理论基础。何万中兴奋地说。

随后，何万中带着团队又花费7年时间，攻克了可克隆电镜标记技术在细胞的开发实现中的一系列技术挑战。

他们首先成功开发了一系列针对纯化的标记蛋白特异性合成²⁻⁶

纳米大小的金颗粒技术，并证明纳米金颗粒是在单个标记分子上形成的。利用简单的原核细胞（大肠杆菌系统）摸索优化出细胞中的标记蛋白上特异性合成纳米金颗粒的实验方案，获得了前所未有的超高标记效率。

此时，受过细胞电镜制样技术系统训练的博士生姜招弟加入团队，主攻在真核细胞应用中的难题。经过技术探索和迭代演进，他们将细菌和酵母中摸索出来的金颗粒合成技术推广至哺乳动物细胞。

研究人员用冷冻替代固定条件下只用鞣酸(tannic acid)与醋酸铀联合的低温脱水固定，避免使用巯基氧化剂和醛固定剂，实现保证细胞超微结构下高效合成纳米金颗粒，且不再受标记蛋白折叠状态限制。

经试验测试证明，该方案已经高度成熟有效，重复率极高，可以广泛推广使用。这也意味着终于全面攻克了在保证细胞超微结构前提下如何在标记蛋白上高效合成纳米金颗粒的难题。何万中说。

做真正原创技术

令研究人员感到欣喜的还有，他们开发的基于自成核抑制机制在富含半胱氨酸标记蛋白上合成纳米金颗粒技术，合成条件比较温和，接近生理条件，可用来开发一系列新型单分子探针。例如，他们利用大肠杆菌表达纯化的绿色荧光蛋白纳米抗体(GBP)与MT标记的融合蛋白GBP-MT，可成功免疫标记细胞中表达的绿色荧光标记蛋白，这显示出该技术可广泛用来标记目前已有绿色荧光蛋白标记的各种细胞及动物组织。

此外，在其他通用抗体、冷冻电镜分子标记等也具备应用潜力。

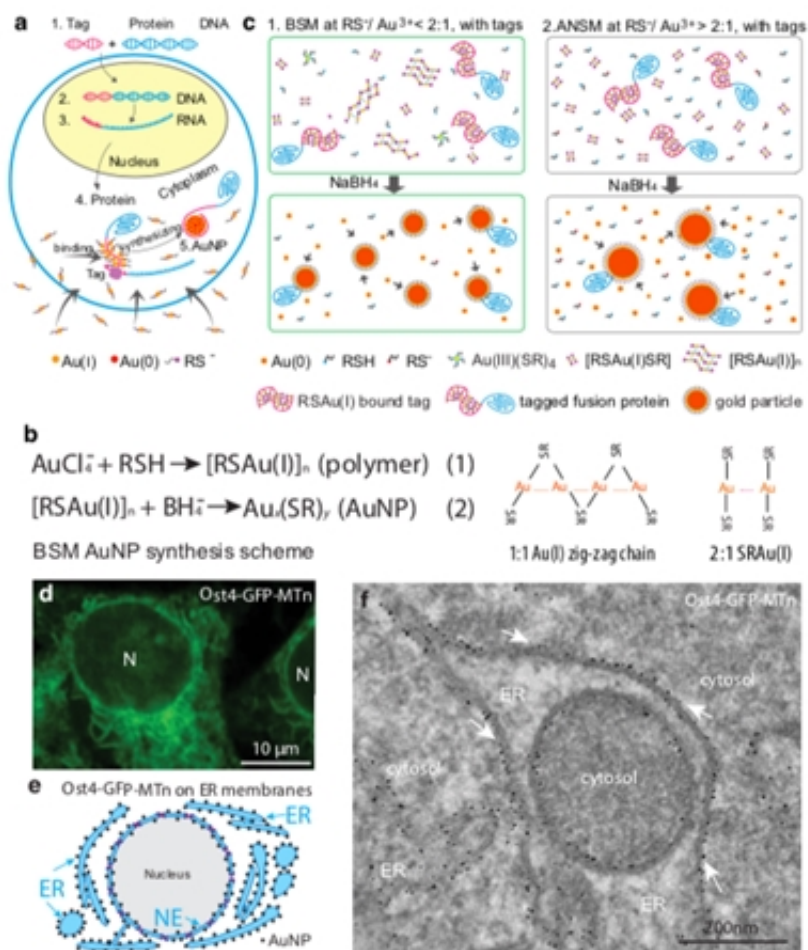
论文3位审稿人均对该研究给予高度评价。该技术是对前人提出的基因编码电镜标记概念的深入探索与实现……总体看，我认为这项工作会非常有用该研究有望成为电子显微学领域里程碑式的论文我认为这项工作是细胞生物学研究方法的重大进展。

何万中感到收获的喜悦的同时，他坦承，这场大冒险很折腾，需要超长的耐力，需要不断探索积累直至灵感闪现的时刻。尽管中途有很多次发文章的机会，但他们都决心沉下心，一定要把问题研究透彻，直到真正创造出可在未来几十年甚至更长时间里被广泛应用的新技术。

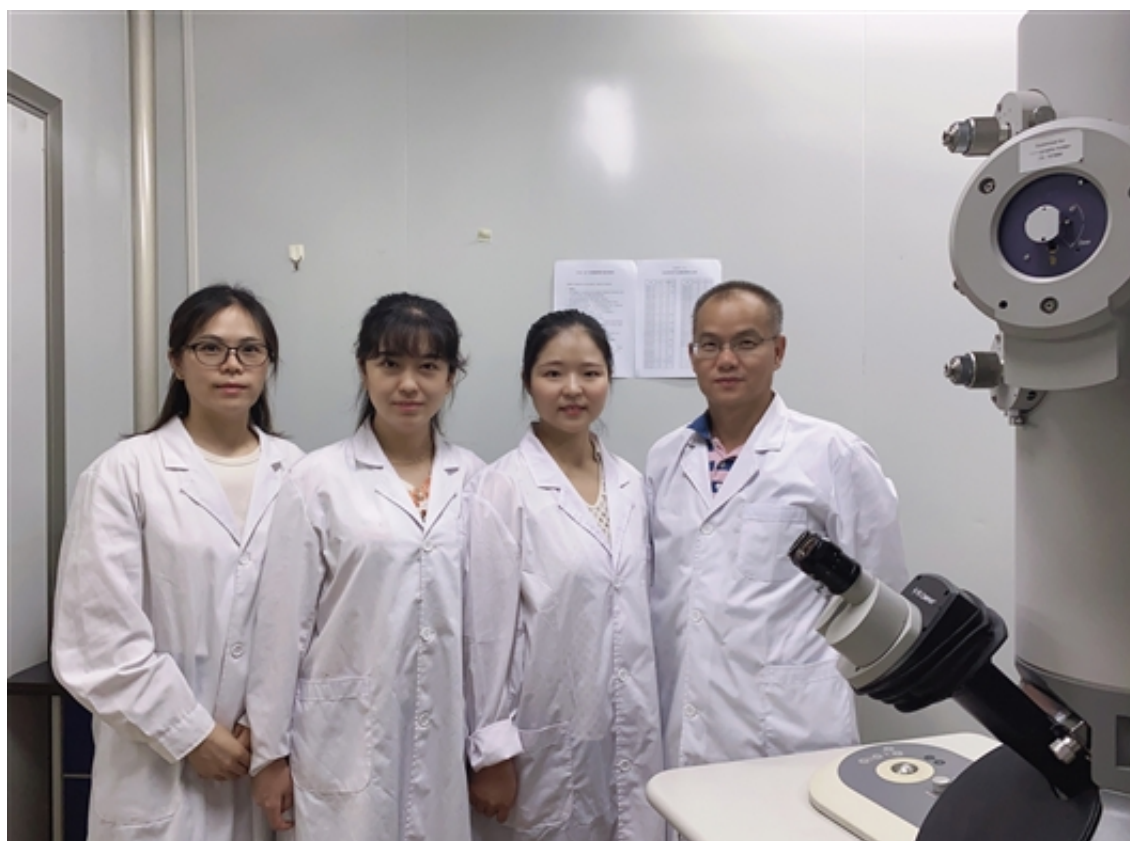
从发论文效率上来看，我是个失败者；但从真正创新意义上来说，我是成功的。何万中同时指出，此项马拉松式的原创研究工作的成功，离不开北京生命科学研究所这种特殊资助体制，以及王晓东所长对原创工作的充分理解和坚定支持。

接下来，他希望进一步优化技术，从单分子标记拓展到两个、三个甚至更多目标分子的同时标记；通过一些设计，提高分子的表达量，开发适应各种条件的、对目标分子影响更小的标记技术等，让该技术获得国际同行的广泛应用。（来源：中国科学报 韩扬眉）

相关论文信息：DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0911-z>



新型可克隆电镜表技术的实现



何万中和三位第一作者（从右至左：何万中，姜招弟，金秀梅，李玉华）

版权声明：凡本网注明来源：中国科学报、科学网、科学新闻杂志的所有作品，网站转载，请在正文上方注明来源和作者，且不得对内容作实质性改动；微信公众号、头条号等新媒体平台，转载请联系授权。邮箱：shouquan@stimes.cn。

作者：何万中等 来源：《自然—方法》

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发