

◆ 生物科学 ◆

单分子成像和追踪技术在工业微生物研究中的应用*

严少敏,吴光**

(广西科学院,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,非粮生物质酶解国家重点实验室,广西生物质工程技术研究中心,广西生物炼制重点实验室,广西南宁 530007)

摘要:在单分子工具和技术的迅速发展过程中,单分子荧光显微镜技术脱颖而出,可以高特异性地监测荧光标记的生物分子的时空行为,成为研究生物系统的有力工具。然而,单分子成像和追踪技术在工业微生物研究及酶工程领域中的应用仍处于起步阶段。随着生物工程技术、合成生物学和代谢工程等科学技术的迅猛发展,工业微生物的应用日趋广泛。但是,菌株往往难以在整个培养期间保持最大的生产能力,导致在经济效益上不能满足产业化的需求,成为制约微生物细胞工厂发展的一个瓶颈,对酶学研究提出新的挑战。单分子成像和追踪技术具有直接、准确、实时等监测优点,可以直接在活体生物上进行研究,成功地实现了对单分子酶催化过程的实时监控,发现了多种酶的新单分子行为及反应机制。这些技术有助于各种新型酶、新特性酶、新作用方式酶的研发。本文简述单分子成像和追踪技术的主要特点(以荧光显微镜为主),总结近年来单分子成像和追踪技术在微生物研究、酶学研究中的应用,及其在工业微生物研究中的应用现状和面临的挑战。这些技术的应用必将促进纳米生物学的发展,推动酶工程改造,提高细胞工厂的生产能力。

关键词:单分子成像 单分子追踪 工业微生物 酶工程 荧光显微镜

中图分类号:Q331 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)05-0429-11

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20211203.002

0 引言

随着环境保护和可持续发展的强烈需求,绿色制造备受瞩目。现代科技的迅猛发展提升了生物工程、代谢工程、合成生物学等领域的创新能力,工业微生物

物的应用也日趋广泛。然而,作为生产单元的底盘细胞,活的微生物菌株不断对生产过程中的各种应激做出响应,难以在整个培养期间保持最大的生产能力,导致在经济效益上无法满足产业化的要求。这个制约微生物细胞工厂发展的瓶颈问题,对酶学研究提出

收稿日期:2021-06-27

* 广西重点研发计划项目(桂科 AB17195034)和广西科学院科研发展基金项目(2021YFJ1203)资助。

【作者简介】

严少敏(1958-),女,研究员,主要从事计算变异学和生物信息学研究。

【**通信作者】

吴光(1956-),男,研究员,主要从事模型分析和计算变异学研究,E-mail:hongguanglishibahao@gxas.cn。

【引用本文】

严少敏,吴光.单分子成像和追踪技术在工业微生物研究中的应用[J].广西科学,2021,28(5):429-439.

YAN S M,WU G. Application of Single Molecule Imaging and Tracking Technologies in Industrial Microorganism Researches [J]. Guangxi Sciences,2021,28(5):429-439.

了新的挑战。

单分子成像和追踪技术具有独特的监测优点,可对活体生物实施直接、准确、实时的观察,实现对单分子酶催化过程的实时监控。这些技术的应用使多种酶的新单分子行为及反应机制被发现,促进了各种新型酶、新特性酶、新作用方式酶的研发。在各种单分子工具和技术中,单分子荧光显微镜技术脱颖而出,它能够高特异性地监测荧光标记的生物分子的时空行为,成为研究生物系统的有力工具。

目前,在工业微生物及酶工程领域的研究中,单分子成像和追踪技术的应用亟待提高。本文从单分子成像和追踪技术的主要特点(以荧光显微镜为主)及其在微生物研究和酶学研究中的应用,在工业微生物研究中的应用和挑战等4方面探讨了相关内容,旨在推动酶的工程改造,提高细胞工厂的生产能力。

1 单分子成像和追踪技术的主要特点

单分子工具和技术涉及面广,包括原子力显微镜、单分子荧光显微镜、光镊、磁镊、纳米孔镊以及增加可观察物数量的混合技术^[1]。这些方法可以通过施加力和力矩,操纵单个生物分子,观察单个运动复合体的动态构象变化。其中荧光显微镜具有极高的对比度、标记的特异性、对生物样品的干扰相对较小的特点,伴随着监测器、染料技术和图像分析技术的技术进步,单分子荧光显微镜技术脱颖而出,成为研究生物系统的有力工具,因为它可以高特异性地监测几乎任何荧光标记的生物分子的时空行为。这样的

表1 单分子荧光显微镜技术的主要特点

Table 1 Main characteristics of single molecule fluorescence microscopes

名称 Name	特点 Characteristics
共聚焦激光扫描显微镜 Confocal Microscope	在同一图像平面上存在共轭的两个针孔,通过在垂直和水平方向移动激光束来扫描样品,能够有效地对生物样品进行光学切片,通过去除离焦荧光,显著提高检测的有效信噪比 There are two conjugate pinholes on the same image plane. By moving the laser beam in the vertical and horizontal directions to scan the sample, the biological sample can be optically sliced effectively. By removing the defocus fluorescence, the effective signal-to-noise ratio of detection can be significantly improved
全内反射荧光显微镜 Total Internal Reflection Fluorescence Microscope (TIRFM)	基于玻璃-水界面的入射激发光的全内反射,限定激发场以产生选择性照明,激发靠近盖玻片/载玻片表面的荧光团,只检测到来自离焦区域的最小信号,显著提高信噪比,是目前单分子荧光显微镜中最常用的成像方法之一 Based on the total internal reflection of incident excitation light from the glass-water interface, the excitation field is limited to generate selective illumination, excite the fluorophore close to the glass coverslip/slide surface, detect only the minimum signal from the defocus region, and significantly improve the signal-to-noise ratio. TIRFM is one of the most commonly used imaging methods in single molecule fluorescence microscopy
光激活定位显微镜 Photoactivated Localization Microscope (PALM)	远场成像,用于检测荧光团在光激活后的荧光,荧光团可在多个周期中随机激活后成像,具有“拥挤控制”功能,广泛用于单粒子追踪 Far field imaging is used to detect the fluorescence of fluorophores after light activation. Fluorophores are randomly activated and then imaged, which can be conducted in multiple cycles. PALM has the function of "crowd-control", and is widely used in single particle tracking

“超分辨率”显微技术,就是以比光学分辨率极限更高的精度呈现空间信息的光学成像技术^[2]。

实现超分辨率的最简单方法是避免在远场区域成像,执行近场成像(即荧光源和检测器之间的距离小于几个波长的光),从而避免受到显著的光学衍射效应的影响。单分子定位显微镜具有两方面功能,单分子成像能够在纳米尺度上解析生物结构,单分子追踪可以在毫秒范围内监测分子间相互作用。其基本工作原理是通过控制单个荧光团的荧光发射,实现比传统荧光显微镜方法更高的分辨率。随着时间的推移,通过“闪烁信号”策略可以获得不同小荧光团子集的图像,并且可以高精度定位每个单独荧光信号的质心,以创建详细的分子图和纳米尺度的超分辨率图像^[3]。

单分子定位成像中最常用的荧光团是荧光蛋白和有机染料。荧光蛋白具有遗传标记的优势,具有 β -桶状蛋白结构保护中间的发色团。有机染料通常比荧光蛋白提供更高的荧光量子产率,并且可以在化学合成过程中定制。例如,通过不同离域的 π -电子系统设计微调其光谱性质,通过增加发色团两侧的基团来增加其溶解度和光稳定性。此外,由于可以添加可变频组,有机染料的应用非常灵活^[3]。

英国约克大学生物物理科学研究所的 Shashkova 和 Leake 总结了单分子荧光显微镜技术的主要特点及其应用^[2],相关内容见表1。北京大学生命科学学院的孙育杰团队总结了5种单分子成像显微镜的成像模式^[4],相关内容见表2。

续表 1

Continued table 1

名称 Name	特点 Characteristics
随机光学重建显微镜 Stochastic Optical Reconstruction Microscope (STORM)	远场成像,用于检测荧光团在光激活后的荧光,激活和成像同时发生,可以显著提高数据采集的速度,广泛用于单粒子追踪 Far field imaging is used to detect the fluorescence of fluorophores after light activation. Activation and imaging happen simultaneously, which can significantly increase the rate of data collection. STORM is widely used in single particle tracking
光漂白荧光恢复技术 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)	涉及细胞或组织的一个区域的光漂白,采用特定的荧光标记成分定位,然后量化该区域荧光强度的恢复程度,这种荧光强度恢复是分子流动性和转换过程的度量,用于识别分子传输参数,如扩散系数和流速系数,以及分子结合和非结合事件的动力学参数,是在小于微米尺度上研究各向异性分子扩散的主要技术之一 Photobleaching is essentially involved in a region of a cell or tissue, in which a specific fluorescently labelled component is located. Subsequently, the extent of any recovery of fluorescence intensity is quantified in the region. This recovery of fluorescence intensity is a measure of mobility and turnover processes, which is used to identify molecular transport parameters, such as diffusion and velocity coefficients, and kinetic parameters of molecular binding and non binding events. FRAP is one of the main techniques to study anisotropic molecular diffusion on the scale of less than micron
荧光共振能量转移技术 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	利用供体和受体分子之间的非辐射能量转移原理,处于激发电子态的施主可以通过分子轨道的电子共振将其激发能转移到受体,是研究相邻分子间相互作用最常用的技术之一 Using the principle of non radiative energy transfer between a donor and an acceptor molecule, a donor in an excited electron state can transfer its excitation energy to an acceptor through the electron resonance of molecular orbitals. FRET is one of the most commonly used technologies to study the interaction between adjacent molecules
斜角荧光显微镜/HILO 显微镜 Oblique-Angle Epifluorescence/ Highly Inclined and Laminated Optical Sheet Microscope	将宽场成像和散斑成像结合,通过算法对两幅原始图像进行处理,去除焦外信息,是一种既能提供光学切片又能快速成像的技术,实现简单,成本低廉,在活细胞的单分子研究中非常有益 Combining wide field imaging and speckle imaging, two original images are processed by algorithm to remove out of focus information. HILO is a technology that not only can provide optical slices, rapid imaging, but also has the advantages of simple implementation and low cost. It is very useful in the single molecule research of living cells
扫描近场光学显微镜/近场扫描光学显微镜 Scanning Near-Field Optical Microscope/ Near - Field Scanning Optical Microscope (SNOM or NSOM)	传统光学仪器中的镜头被细小的光学探针所代替,激光激发场在小于光学分辨率限制的 length 范围内工作,突破远场的分辨率极限,近场扫描成像,实现纳米尺度光学成像与纳米尺度光谱研究 The lens in the traditional optical instrument is replaced by a small optical probe. The laser excitation field works within the length range less than the optical resolution limit, breaks through the resolution limit of the far field, scans the image in the near field, and realizes the research of nano scale optical imaging and nano scale spectrum
荧光寿命成像显微镜 Fluorescence Lifetime Imaging Microscope (FLIM)	利用荧光染料固有特性进行成像,除了发射光谱外,每个荧光分子还有特有的寿命,它反映了荧光基团在发射光子之前处于激发态的时间,用于跟踪蛋白质聚集的动力学过程 Using the inherent characteristics of fluorescent dyes for imaging. In addition to the emission spectrum, each fluorescent molecule has a unique lifetime, which reflects the time when the fluorescent group is in the excited state before emitting photons. FLIM is used to track the dynamic process of protein aggregation
局部化显微镜 Localization Microscopy	远场区域进行成像, Airy 圆盘图案的中心是对实际荧光发射染料分子空间位置的最佳估计,应用数学拟合方法确定荧光发射“中心”的实际位置,用于单粒子追踪 The far-field region is imaged. The center of Airy disk pattern is the best estimate for the spatial position of the actual fluorescent emission dye molecules. The mathematical fitting method is used to determine the actual position of the fluorescent emission "center" for single particle tracking
受激发射损耗荧光显微镜 Stimulated Emission Depletion Microscope (STEDM)	远场方法,通过控制目标荧光团的选择性去激发,使焦腰处的激发面积最小化,从而打破衍射极限,并能够在衍射极限以下成像;有多种变体,均包括至少两种分子状态之间的光诱导跃迁,其中一种是荧光 In the far-field method, the area of excitation at the focal waist is minimized by controlling the selective de-excitation of the target fluorophore, which breaks the diffraction limit and can image below the diffraction limit. There are many variants, all of which comprise light-induced transitions between at least two molecular states, one of which is fluorescence
结构照明显微镜 Structured Illumination Microscope (SIM)	不需要使用特殊的荧光探针,用空间周期性的结构化照明模式来照明样品,以相对于样品的不同方向在不同采集集中照明的一系列网格状模式,在傅里叶或频率空间中分析图像,实现三维超分辨率成像和追踪 Without using a special fluorescent probe, the sample is illuminated with a spatially periodic, structured illumination mode. Typically, a series of grid-like patterns are illuminated in different acquisitions at different orientations relative to the sample. The images are then analyzed in so-called Fourier or frequency space, realizing 3D super-resolution imaging and tracking
晶格光片显微镜 Lattice Light-Sheet Microscope (LLSM)	利用二维光学晶格制作超薄光片,在 x, y, z 3 个空间维度中显著提高传统光学显微镜的分辨率,对活细胞进行非侵入性四维成像(3 个空间维度加上时间维度),具有低背景、低光毒性、成像速度快等优点,可实现细胞内动力学的可视化 The ultra-thin light sheet is made from two-dimensional optical lattice, which can significantly improve the resolution of traditional optical microscope in the three spatial dimensions of x, y and z . Non-invasive four-dimensional imaging can be carried out in three spatial dimensions plus time dimension in living cells. LLSM has the advantages of low background, low phototoxicity and fast imaging speed, so as to realize the visualization of intracellular dynamics

续表 1

Continued table 1

名称 Name	特点 Characteristics
双分子荧光互补技术 Bimolecular Fluorescence Com- plementation (BiFC)	两个蛋白质分别被标记为截短的荧光蛋白, 荧光蛋白本身不发光; 如果这两种蛋白质相互作用, 荧光蛋白的两个互补部分结合在一起, 恢复成一个完整的荧光蛋白分子, 可以激发成荧光, 是探测蛋白质相互作用的有效方法 The two proteins are labeled as truncated fluorescent proteins, which themselves do not fluoresce. If the two proteins interact, the two complementary parts of the fluorescent protein combine together to restore an intact fluorescent protein molecule that can be excited into fluorescence. BiFC is an effective method to detect protein interaction
自适应光学技术 Adaptive Optics	通过光学校正系统实时补偿波面误差, 对各种因素造成的成像过程中的波前畸变进行校正, 进一步提高单分子成像的性能 The wave front error is compensated in real time by the optical correction system to correct the wave front distortion in imaging processes caused by various factors, so as to further improve the performance of single molecule imaging

表 2 5种单分子成像显微镜的成像模式

Table 2 Imaging mode of 5 single molecule microscopes

成像模式 Imaging mode	数值孔径 Numerical aperture	信号背景比 Signal to background ratio	视野 Field of view	光子收集效率 Photon collection efficiency	维持 Maintenance
宽场显微镜 Wide-Field Microscope	1.49	低 Low	大 Large	高 High	容易 Easy
HILO 显微镜 Highly Inclined and Laminated Optical Sheet Microscope	1.49	中 Median	小 Small	高 High	容易 Easy
点阵光片显微镜 Lattice Light-Sheet Microscope	0.80, 1.49	高(光腰 $\sim 1 \mu\text{m}$) High(Beam-waist $\sim 1 \mu\text{m}$)	中($\sim 10 \mu\text{m}$) Median ($\sim 10 \mu\text{m}$)	高 High	难 Hard
反射光片显微镜 Reflected Light-Sheet Microscope	1.10, 0.65	高(光腰 $\sim 1 \mu\text{m}$) High(Beam-waist $\sim 1 \mu\text{m}$)	大($\sim 50 \mu\text{m}$) Large ($\sim 50 \mu\text{m}$)	中 Median	难 Hard
光片贝叶斯显微镜 Light-Sheet Bayesian Microscope	1.00	高(光腰 $\sim 1 \mu\text{m}$) High(Beam-waist $\sim 1 \mu\text{m}$)	中($\sim 10 \mu\text{m}$) Median($\sim 10 \mu\text{m}$)	低 Low	相对容易 Relatively easy

2 单分子成像和追踪技术在微生物研究中的应用

活体微生物细胞内蛋白质研究经历了细胞整体、单个细胞、亚细胞、低拷贝单分子、任意低拷贝单分子的发展过程^[5]。在活的微生物细胞中实现单分子检测存在三大障碍, 即受到灵敏度、空间分辨率和光稳定性的限制。

绿色荧光蛋白(GFP)的出现, 提供了一种标记蛋白质的简单的基因方法, 该方法能够标记细胞中许多不同的生物分子, 使对细菌的研究从群体研究快速过渡到单细胞研究, 实现了许多细菌蛋白质、染色体和质粒 DNA 以及膜结构的亚细胞分布的成像, 成为微生物研究中的里程碑^[6]。对活细菌进行的第一次单分子荧光研究使用了荧光探针的多个拷贝, 检测细胞中的信使 RNA(mRNA) 分子。一个流行的系统依

赖于 RNA 发夹和 MS2 噬菌体衣壳蛋白之间的高亲和力和相互作用; 通过在相关 mRNA 中引入发夹的多个重复序列, 并表达与 GFP 衍生物融合的 MS2 蛋白, 可以间接地用 GFP 标记 mRNA 分子。

在裂变酵母中, 将一种快速成熟的黄色荧光蛋白(YFP)基因与一种膜定位蛋白片段(Tsr)的染色体拷贝进行基因融合, 通过 *lac* 操作子控制 YFP-Tsr 基因的转录和翻译, 检测新合成的荧光蛋白质, 定位并追踪其扩散, 建立一个可以恢复活细胞内基本过程的定量信息, 可以直接在细胞中测量蛋白质的位置、拷贝数及其出现的时间^[7]。

双标记系统通过 DNA 结合蛋白与插入细菌染色体或质粒的特定 DNA 序列基序的相互作用来“标记”DNA 上的特定位点。例如, 荧光阻遏算子系统(基于转录阻遏, 如 *lacI* 和 *tetR*); *parB-parS* 系统(基于质粒分割蛋白 *parB*, 在染色体中引入的 *parS*

位点上的结合和随后的扩增)。多探针方法在单分子微生物学中被广泛应用,包括分析细菌染色体中核糖体 RNA 操纵子的三维结构, DNA 复制过程中复制叉的运动, 细菌质粒的流动性和位置, 染色体重组, 动力学的直接研究等^[5]。

单分子成像和追踪技术已广泛用于微生物研究中, 包括 DNA 修复^[8-10]、转录机制^[11-13]、膜生物学^[14]、类核结构^[11, 15, 16]、细胞分裂^[3, 15, 17-19]、胞吞作用^[20]、纤毛结构^[21]、分泌系统^[22, 23]、生物膜^[24]等许多方面。分子计数的一个重要扩展是研究在细胞分子机制中组装(稳定或瞬时)的蛋白质组分的数量, 即大分子机器的亚单位化学计量, 通过在体内追踪单个蛋白质, 直接测量体内反应时间, 研究分子间的相互作用。例如, 通过鞭毛将含有 MotB-GFP 染色体拷贝的细胞表面固定化, 并通过亮场和全内反射荧光显微镜交替观察细胞的旋转^[25]。

单分子追踪的数据分析丰富了观察信息。如追踪光激活定位显微镜, 提供了定位和追踪的数量作为感兴趣蛋白质拷贝数的估计值; 通过分析径迹内的位移来计算每个径迹的表观扩散系数(考虑二维扩散), 可以恢复蛋白质扩散过程; 从属于不同迁移组的蛋白质分子轨迹的相对位置推断出大量的空间信息; 蛋白质迁移不同模式之间的转换可提供生化反应或结合动力学的信息^[5, 26]。

3 单分子成像和追踪技术在酶学研究中的应用

对于酶工程领域来说, 酶学研究正处于一个拐点。在分子生物学技术的推动下, 酶工程技术获得了突破性发展, 通过开创性地借助分子生物学的方法进行快速而广泛的分子定向进化, 从而改变酶的功能或特性, 推动了酶工程的应用价值^[27]。而且, 改良的 DNA 技术、各种生物信息学中的新工具, 以及新时代对“绿色催化”的强烈需求, 都推动和促进了酶工程的发展^[28]。对酶制剂的需求不仅局限在传统领域, 在新兴领域酶制剂也获得了广泛应用^[29]。制药、环境、精细化学品等领域对酶制剂的迫切需求, 推动和促进了各种新型酶、新特性酶、新作用方式酶的研发^[6]。这些研发涉及创造新的, 通常是具有非天然催化活性, 或者非天然底物反应等的新酶。这些新酶的研发可以为使用化学合成工艺的传统制药领域带来新的、可持续的绿色催化工艺, 而且可以引入更具有特异性的催化路线^[30]。然而, 这对研发新特性酶的酶工程

而言提出了更大的挑战。

在现阶段, 酶学研究和酶工程改造通常依赖于已知酶的蛋白质结构。例如, 纤维素酶的蛋白质工程主要有两个趋势: 第一, 计算蛋白质工程的结果对于推动该领域的研究越来越重要, 因为实验设想和结果仍然很少; 第二, 进一步研究纤维素水解的辅助蛋白, 如溶解性多糖单加氧酶(LPO), 以改进纤维素酶的性质和结构^[31]。由于蛋白质结晶和蛋白质结构解析的工作费时费力, 大部分酶都没有提供蛋白质结构信息^[32], 因此, 以往在对酶分子改造的研究中, 假设在反应条件下(低酶浓度、高底物浓度、有机溶剂等)酶的结构与结晶酶(高酶浓度、无底物和/或有机溶剂)的结构非常相似, 在此基础上进行各种研究。实际上, 酶在不同条件下的分子作用方式差异极大^[33], 根据结晶酶及其催化反应条件等来设计酶的改造策略往往是失败的。

因此, 对于酶工程研究来说, 急需一种快速直接的蛋白质特性分析手段, 为酶工程改造提供技术支持。单分子成像技术具备这个优势。利用单分子成像可以直接对单分子酶的催化过程实时监控, 直接观察到蛋白质在各种不同条件下的作用方式, 特别是单个蛋白质的各种氨基酸残基的作用力学变化, 这个优势使得研究人员可以根据每个催化反应来观察分子变化, 从而加速了催化策略或分子改造策略的实施方案^[34, 35]。

单分子酶蛋白质研究是新近随着分析仪器的更新和进步, 在生命科学领域开拓出来的新热点和新技术手段。生物学中的各种反应, 都是由单个分子的各种反应聚集而成的宏观现象。实际上, 分子相互作用和化学反应总在单分子水平上发生, 但由于研究手段的限制, 各种化学反应和生物反应的数据几乎都是从含有大量分子的实验中得到。对于由微观汇集成宏观的生物反应过程, 利用传统的研究手段无法触探到反应的本质, 只能是采用间接的方法, 通过宏观的现象变化推测分子级别的反应特性。

随着生命科学中分析仪器和分析技术的发展, 对单个分子进行分析成为可能。从 20 世纪 90 年代中期开始, 许多研究人员转向室温单分子检测, 尤其是生物体系的单分子研究, 实现了对活细胞单分子生化反应的高特异性、毫秒时间分辨率的探测。在过去的十年中, 科学和技术的进步使生物催化成为实验室和工业规模化学合成中, 传统金属和有机催化实用和环境友好的替代品。随着 DNA 测序和基因合成技术

取得的关键进展,在通过蛋白质工程和设计裁剪生物催化剂以及将酶重组为新的生物合成途径的能力方面取得了巨大进展^[36]。由于单分子技术具有避免集群研究的平均效应、捕获瞬态中间产物和表征非均一行为等优势,科研人员得以触探到生物反应的本质变化,从而使生物学的许多领域取得重要突破。

利用单分子成像和追踪技术在研究酶和 DNA 的相互作用方式中,诞生了单分子测序方法,即现在所称的第三代测序技术。单分子测序不需要任何 PCR 的过程,有效避免了以前的测序方法因 PCR 偏向性而导致的系统错误,同时具有提高读长,并保持二代技术的高通量、低成本的优点,从而实现了技术上的大跨越。利用单分子原理的测序技术仪器也得到推广,并且逐步取代在 2008 年才面世的第二代测序仪器,进入第三代测序时代^[37]。

单细胞基因组学通过单分子技术与基因组学的交汇,实现在单细胞中检测基因拷贝数以及单个点突变。与此同时单分子成像和追踪技术用于追踪运动轨迹,探明细胞中单个分子或单个粒子的运动表现^[38]。所以,单分子实验的研究结果不仅是对以往总体平均研究方法的有力补充,而且在许多方面单分子技术已成为深入研究酶的生物活性不可或缺的手段。

单分子成像和追踪技术在酶工程研究中得到应用,如对分子马达机械力化学耦合的深入分析使人工工程马达的发展成为可能。分子马达是一种将化学能转化为机械能的酶,在这种酶的作用下,它可以执行关键的细胞功能,如 DNA 复制和转录、DNA 超螺旋、细胞内运输和 ATP 合成。单分子成像和追踪技术已被广泛用于识别分子马达反应循环中的结构中间体,并了解能量消耗的子步骤如何驱动中间体之间的转换。这些技术被应用于研究各种马达,如螺旋酶、DNA 和 RNA 聚合酶、拓扑异构酶、核小体重组子,以及参与 DNA 缩合、分离和消化的马达^[1]。通过突变、化学修饰和光遗传学等技术,重新设计现有的分子马达,例如改变速度、过程性或功能性^[1,39]。

基于单分子成像和单分子生物学的研究结果,实现了在活细胞里直接观测生物大分子。中国科学院上海生物化学研究所分子生物学国家重点实验室的研究团队鉴定了两种核酸内切酶缺陷、单组分可编程 RNA 引导和 RNA 靶向 Cas13 RNA 酶(dCas13),可对活细胞中的 RNA 进行稳健的实时成像和跟踪。dCas13 和 dCas9(Cas9 的突变形式,其内切核酸酶活

性通过点突变被去除)系统的进一步组合允许同时可视化活细胞中的基因组 DNA 和 RNA 转录^[40]。

使用纳米拷贝技术可以放大单个标记基因,从而能够在拥挤的细胞内环境中,在可寻址的亚衍射体积中进行单分子检测,实现以单分子分辨率对 RNA 聚合酶 II (Pol II) 进行成像、跟踪和量化,揭示其在转录周期中的动态,并进一步研究多个功能相关事件—调节因子—染色质相互作用、Pol II 动力学和新生转录动力学,揭示了迄今为止在体内未发现的基因调控机制的详细操作参数^[41]。此外,一种基于纳米结构的双色荧光探针,通过双色共定位成像提高了测量精度,从而大大避免了假阳性信号,并实现了活细胞中微小 RNA 的实时原位成像,推进了在单分子水平上对活细胞中各种生物分子进行无酶放大监测和成像^[42]。

4 单分子成像和追踪技术在工业微生物研究中的应用和挑战

随着生物工程技术 and 计算机辅助设计的迅猛发展,工业微生物的应用日趋广泛。近年来,新的合成生物学方法提高了原始菌株的高附加值次级代谢产物的产量,新的生物合成基因簇的挖掘和构建开辟了工程菌株的应用途径^[43]。代谢工程提供了以可再生方式生产新分子的极好能力,拓宽了通过细胞系统从化学元素合成有用产品的范围,加速了生物燃料、生物材料和纳米技术的应用^[44]。但是,随着培养条件和细胞状态的动态变化,底盘细胞不能在整个培养期间保持最大的生产能力,在经济效益上不能满足产业化的需求,成为制约微生物细胞工厂发展的瓶颈。

工业微生物在发酵过程中通常作为活细胞催化剂,常用的工业微生物有细菌、放线菌、酵母菌和霉菌。单分子成像和追踪技术在工业微生物研究中得到了应用。德国马克斯普朗克陆地微生物研究所的研究团队详细总结了单分子成像和追踪技术在微生物研究中的应用现状特点^[3],归纳为图 1。从图 1 可见该领域的研究现状有以下特点:①单色研究为主,多色研究尚不多见;②大多数研究在模式微生物中进行;③结构成像较多,单粒子追踪很少;④大多数研究按时间顺序记录不同的靶点,并行成像较少;⑤在各种标记方法中,最主要的是基因标记,特别是荧光蛋白融合;⑥成熟的多色标签不多。因此,单分子成像和追踪技术在工业微生物研究中的应用仍处在起步阶段,这是因为其在实际应用中面临诸多挑战。



图1 单分子成像和追踪技术在微生物研究中的应用现状

Fig.1 Application status of single molecule imaging and tracking technologies in microbial researches

微生物细胞是小而密集的单细胞有机体,其特点是具有强大的细胞壁保护,特定的自体荧光或彩色色素背景,蛋白质的拷贝数相当低,生长速度和新陈代谢速度却相当快^[3]。在微生物细胞中进行单分子检测是一项复杂的工作,这是因为其中存在复杂的扩散模式;许多荧光蛋白倾向于寡聚,扭曲的相互作用会使蛋白质的定位和聚集状态发生改变;在同一个细胞中进行双色/多色测量,共定位检测技术相当复杂;准确计算分子数量是复杂的,可能出现计算不足或过多的情况,需要有每个特定的荧光蛋白在特定的细胞环境中检测效率的知识。

蛋白质完全荧光融合的方法在应用中仍然存在限制,难以处理中到大拷贝数的蛋白质,因为它们会使典型的细菌细胞过于荧光“拥挤”,因此很难研究大多数蛋白质在活细菌中的自然拷贝数行为。对低拷贝数的需求也妨碍了从单个细胞收集大量统计数据,从而限制了研究分子异质性的机会,这种异质性可能反映化学异质性(共价或非共价)或不同的细胞环境^[5]。

标记分子的正常生理功能可能受到干扰。例如,在DNA上标记标签可能会干扰局部染色质的结构和功能;内切酶(TALE, Cas9)或抑制物与染色质的

结合可能干扰基因转录;将多个适配体外壳蛋白标记到单个 mRNA 会显著增加 mRNA 的大小,从而干扰转运动力学;蛋白质标记的潜在缺陷可能源于内源性标记和外源性标记分子之间的差异;大多数单分子成像都是在外源蛋白上进行,由于靶蛋白的过度表达,很可能会产生人为的效应。CRISPR/Cas9 系统等基因工程技术可以有效地将标记模块插入靶标分子的内源性基因组位点,使融合分子在生理水平上表达,实现在生理相关水平上对靶标分子进行成像^[22]。

荧光探针的不理想性能和光毒性,可能导致对单分子数据的不精确甚至不正确解释。蛋白质停留时间的计算取决于标记荧光团的光稳定性,胞内成像所需的标记性能与现有的探针相比还有很大的差距,长期、连续、快速、低光毒性的单分子成像需要更明亮、更稳定、更简单的探针和标记方法,有待开发用于活细胞单分子成像的优秀探针。进一步优化非传统荧光团,例如纳米体、量子点、共轭半导体聚合物点和碳纳米点,可能成为活细胞单分子成像的优秀探针^[4]。

对于单分子动力学和细胞行为之间的联系,目前大多数实验都是在体外培养的细胞系上进行,由于光的散射,很难在生物体内实现单分子成像。另外,组织细胞在培养皿中的培养和驯化可能引起细胞性状和组织成分的改变,可能会导致对结构与功能关系的误解。大体积的高速成像是光片显微技术进一步发展的方向,自适应光学、光片显微镜和明亮的基因编码标签的结合将使单分子成像更加深入^[4]。

当底物和酶以很低的拷贝数存在时,还应考虑生化反应的波动,许多过程具有区隔效应,在限制拷贝数的过程中多功能蛋白质之间存在竞争,无法复制构成活细胞自然环境复杂的生物分子混合物^[5]。

现有的成像工作已是“大数据”项目,所提供的大数据集,需要复杂的图像和时间序列分析来探测蛋白质的位置和流动性。大数据集的可用性以及定量的、统计上可靠的、基于成像的活体内分子特性信息,从活体内的分子扩散到复杂的基因网络和分子机器的功能,也为构建描述许多过程的数学模型提供了极好的输入^[45]。伴随着合成生物学家生产的工程合成细胞、成像分辨率和通量的提高,将进一步扩大数学模型的应用范围。

许多因素会影响微生物细胞内单分子成像的性能,需要进一步提高单分子成像的性能。可通过扩展研究方法,如改进的荧光团和标记方法,高级微拷贝、分辨率更高、内容更丰富、照片损伤更低的成像技术,

力传感器,微流体,数据分析程序,数学建模等,增强单分子成像的能力和适用性^[46]。

所有使用的单分子工具都已接近当前的技术极限。在用纳米技术研究纳米生物学问题时,每一项新技术的发展和应用都离不开方法的改进。一个悬而未决的问题是如何追踪动态、协同移动的交互靶标。探针的发展可能改变当前的技术限制,包括研发能长时间和更精确地追踪不同微生物靶点轨迹,能标记更小靶点的探针,不干扰细胞生物学,高标记密度和效率的探针^[3]。

采用尽量减少样品体积,设计光稳定性更好的荧光蛋白新变体,提高相机探测器的灵敏度,以提高信号的检测能力。开发各种分析工具来提高信噪比,如细胞图像的自动“分割”方法,用于追踪荧光标记分子的稳健软件算法,追踪分子形成的分子络合物的化学计量分析。

对细胞工厂中生产单元的细胞进行单分子成像分析,可借助微流控装置,控制菌细胞的大小或形状,将细胞引入不同的微环境,测试对环境暴露的反应,或监测不同菌株之间的相互作用(合作或对抗)^[46]。

5 展望

单分子成像和追踪技术实现了对细胞内部生命的直接可视化和原位测量,对理解生物过程至关重要,在生物学研究中带来了许多深刻的发现。单分子成像和追踪技术在工业微生物中的研究仍处在起步阶段,在实际应用中仍面临诸多挑战。展望未来,单分子成像和追踪技术的应用必将促进纳米生物学的发展,推动酶工程改造,提高细胞工厂的生产能力。

参考文献

- [1] MOHAPATRA S, LIN C T, FENG X A, et al. Single-molecule analysis and engineering of DNA motors [J]. *Chemical Reviews*, 2020, 120(1): 36-78.
- [2] SHASHKOVA S, LEAKE M C. Single-molecule fluorescence microscopy review: Shedding new light on old problems [J]. *Bioscience Reports*, 2017, 37(4): BSR-20170031. DOI: 10. 1042/BSR20170031.
- [3] VOJNOVIC I, WINKELMEIER J, ENDESFELDER U. Visualizing the inner life of microbes: Practices of multi-color single-molecule localization microscopy in microbiology [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(4): 1041-1065.
- [4] SHAO S P, XUE B X, SUN Y J. Intracellular single-

- molecule imaging in living cells [J]. *Biophysical Journal*, 2018, 115(2):181-189.
- [5] KAPANIDIS A N, LEPORE A, KAROUI M E. Rediscovering bacteria through single-molecule imaging in living cells [J]. *Biophysical Journal*, 2018, 115(2):190-202.
- [6] ELOWITZ M B, SURETTE M G, WOLF P E, et al. Photoactivation turns green fluorescent protein red [J]. *Current Biology*, 1997, 7(10):809-812.
- [7] YU J, XIAO J, REN X J, et al. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time [J]. *Science*, 2006, 311(5767):1600-1603.
- [8] LIAO Y, SCHROEDER J W, GAO B, et al. Single-molecule motions and interactions in live cells reveal target search dynamics in mismatch repair [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112:E6898-E6906.
- [9] STRACY M, JACIUK M, UPHOFF S, et al. Single-molecule imaging of UvrA and UvrB recruitment to DNA lesions in living *Escherichia coli* [J]. *Nature Communications*, 2016, 7:12568. DOI:10.1038/ncomms12568.
- [10] STRACY M, WOLLMAN A J M, KAJA E, et al. Single-molecule imaging of DNA gyrase activity in living *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(1):210-220.
- [11] SPAHN C, CELLA-ZANNACCHI F, ENDESFELDER U, et al. Correlative super-resolution imaging of RNA polymerase distribution and dynamics, bacterial membrane and chromosomal structure in *Escherichia coli* [J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2015, 3(1):014005. DOI:10.1088/2050-6120/3/1/014005.
- [12] UPHOFF S, LORD N D, OKUMUS B, et al. Stochastic activation of a DNA damage response causes cell-to-cell mutation rate variation [J]. *Science*, 2016, 351(6277):1094-1097.
- [13] GARZA DE LEON F, SELLARS L, STRACY M, et al. Tracking low-copy transcription factors in living bacteria: The case of the *lac* repressor [J]. *Biophysical Journal*, 2017, 112(7):1316-1327.
- [14] BIANCHI F, SYGA Ł, MOISET G, et al. Steric exclusion and protein conformation determine the localization of plasma membrane transporters [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1):501. DOI:10.1038/s41467-018-02864-2.
- [15] VIRANT D, TURKOWYD B, BALINOVIC A, et al. Combining primed photoconversion and UV-photoactivation for aberration-free, live-cell compliant multi-color or single-molecule localization microscopy imaging [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7):E1524. DOI:10.3390/ijms18071524.
- [16] SPAHN C K, GLAESMANN M, GRIMM J B, et al. A toolbox for multiplexed super-resolution imaging of the *E. coli* nucleoid and membrane using novel PAINT labels [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):14768. DOI:10.1038/s41598-018-33052-3.
- [17] RIES J, KAPLAN C, PLATONOVA E, et al. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(6):582-584.
- [18] BUSS J, COLTHARP C, SHTENDEL G, et al. A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics [J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4):e1005128. DOI:10.1371/journal.pgen.1005128.
- [19] BAYAS C A, WANG J R, LEE M K, et al. Spatial organization and dynamics of RNase E and ribosomes in *Caulobacter crescentus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(16):E3712-E3721.
- [20] MUND M, VAN DER BEEK J A, DESCHAMPS J, et al. Systematic nanoscale analysis of endocytosis links efficient vesicle formation to patterned actin nucleation [J]. *Cell*, 2018, 174(4):884-896.
- [21] GAHLMANN A, PTACIN J L, GROVER G, et al. Quantitative multicolor subdiffraction imaging of bacterial protein ultrastructures in three dimensions [J]. *Nano Letters*, 2013, 13(3):987-993.
- [22] FABIANI F D, RENAULT T T, PETERS B, et al. A flagellum-specific chaperone facilitates assembly of the core type III export apparatus of the bacterial flagellum [J]. *PLoS Biology*, 2017, 15(8):e2002267. DOI:10.1371/journal.pbio.2002267.
- [23] ZHANG Y D, LARA-TEJERO M, BEWERSDORF J, et al. Visualization and characterization of individual type III protein secretion machines in live bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(23):6098-6103.
- [24] BERK V, FONG J C N, DEMPSEY G T, et al. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms [J]. *Science*, 2012, 337(6091):236-239.
- [25] CRAWFORD R, TORELLA J P, AIGRAIN L, et al. Long-lived intracellular single-molecule fluorescence using electroporated molecules [J]. *Biophysical Journal*, 2013, 105(11):2439-2450.

- [26] STRACY M, KAPANIDIS A N. Single-molecule and super-resolution imaging of transcription in living bacteria [J]. *Methods*, 2017, 120: 103-114.
- [27] BAI C, WANG C, WOLYNES P G, et al. Single molecule physics and chemistry [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(20): 11075-11076.
- [28] LU H P, XUN L Y, XIE X S. Single-molecule enzymatic dynamics [J]. *Science*, 1998, 282(5395): 1877-1882.
- [29] GÜL O T, PUGLIESE K M, CHOI Y, et al. Single molecule bioelectronics and their application to amplification-free measurement of DNA lengths [J]. *Biosensors (Basel)*, 2016, 6(3): E29. DOI: 10.3390/bios6030029.
- [30] STREETS A M, HUANG Y Y. Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 25: 69-77.
- [31] BOMMARIUS A S, SOHN M, KANG Y Z, et al. Protein engineering of cellulases [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 29: 139-145.
- [32] ROGERS J K, CHURCH G M. Genetically encoded sensors enable real-time observation of metabolite production [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(9): 2388-2393.
- [33] AKHTEROV M V, CHOI Y, OLSEN T J, et al. Observing lysozyme's closing and opening motions by high-resolution single-molecule enzymology [J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(6): 1495-1501.
- [34] BLANK K, CREMER G D, HOFKENS J. Fluorescence-based analysis of enzymes at the single-molecule level [J]. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(4): 465-479.
- [35] LIEBHERR R B, GORRIS H H. Enzyme molecules in solitary confinement [J]. *Molecules*, 2014, 19(9): 14417-14445.
- [36] BORNSCHEUER U T, HUISMAN G W, KAZLAUSKAS R J, et al. Engineering the third wave of biocatalysis [J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 185-194.
- [37] ZANGHELLINI A. *De novo* computational enzyme design [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 29: 132-138.
- [38] PAL N, WU M L, LU H P. Probing conformational dynamics of an enzymatic active site by an *in situ* single fluorogenic probe under piconewton force manipulation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(52): 15006-15011.
- [39] DERRINGTON I M, CRAIG J M, STAVA E, et al. Subangstrom single-molecule measurements of motor proteins using a nanopore [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(10): 1073-1075.
- [40] YANG L Z, WANG Y, LI S Q, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems [J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(6): 981-997.
- [41] LI J R, DONG A K, SAYDAMINOVA K, et al. Single-molecule nanoscopy elucidates RNA polymerase II transcription at single genes in live cells [J]. *Cell*, 2019, 178(2): 491-506.
- [42] LI B X, LIU Y J, LIU Y X, et al. Construction of dual-color probes with target-triggered signal amplification for *in situ* single-molecule imaging of microRNA [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(7): 8116-8125.
- [43] DE FRIAS U A, PEREIRA G K B, GUAZZARONI M E, et al. Boosting secondary metabolite production and discovery through the engineering of novel microbial biosensors [J]. *Biomed Research International*, 2018, 2018: 7021826. DOI: 10.1155/2018/7021826.
- [44] REED K B, ALPER H S. Expanding beyond canonical metabolism: Interfacing alternative elements, synthetic biology, and metabolic engineering [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(1): 20-33.
- [45] SEPULVEDA L A, XU H, ZHANG J, et al. Measurement of gene regulation in individual cells reveals rapid switching between promoter states [J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1218-1222.
- [46] ENDEFELDER U. From single bacterial cell imaging towards *in vivo* single-molecule biochemistry studies [J]. *Essays in Biochemistry*, 2019, 63(2): 187-196.

Application of Single Molecule Imaging and Tracking Technologies in Industrial Microorganism Researches

YAN Shaomin, WU Guang

(National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, Guangxi Biomass Engineering Technology Research Center, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

Abstract: Single molecule tools and technologies have been developed rapidly, and among them single molecule fluorescence microscope technology stands out, which can monitor the spatiotemporal behavior of fluorescent labeled bio-molecules with high specificity, and has become a powerful tool for studying biological systems. However, the application of single molecule imaging and tracking technology is still in its infancy in industrial microbial research and enzyme engineering. With the rapid development of bioengineering technology, synthetic biology and metabolic engineering, industrial microorganisms are widely used. However, it is often difficult for strains to maintain the maximum production capacity during the whole cultivation period, which leads to the economic benefits that cannot meet the needs of industrialization, and becomes a bottleneck problem restricting the development of microbial cell factory. Thus, new challenges have been posed to the enzymatic research in the field of enzyme engineering. The technology of single molecule imaging and tracking has the advantages of direct, accurate and real-time monitoring, which can be directly studied on living organisms. It has successfully realized the real-time monitoring of the catalytic process of single molecular enzymes, and found new single molecular behaviors and reaction mechanisms of various enzymes. These technologies contribute to the development of various new enzymes, new characteristic enzymes and new modes of action enzymes. The main characteristics of single molecule imaging and tracking technologies with fluorescence microscopes are briefly described in this article. The application of single molecule imaging technology in microbial research and enzymology research in the field of enzyme engineering in recent years, as well as its application status and challenges in industrial microbial research are summarized. The application of these technologies will promote the development of nanobiology, promote the engineering transformation of enzymes and improve the production capacity of cell factories.

Key words: single molecule imaging, single molecule tracking, industrial microorganism, enzyme engineering, fluorescence microscope

责任编辑: 陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>