

应用光阱技术测量 P-selectin/PSGL-1 键解离的断裂力*

章燕¹ 叶志义^{1,2} 霍波¹ 孙淦云¹ 龙勉^{1Δ}

1(中国科学院力学研究所,北京 100080)

2(重庆大学生物工程学院,重庆 400044)

摘要 选择素(selectin)与配体相互作用在诸如炎症反应、肿瘤转移等生物学过程中具有重要作用;作用力影响受体-配体键解离。本文发展了基于光阱技术的新实验方法,用于考察 P-选择素(P-selectin)与 P-选择素糖蛋白配体-1(P-selectin Glycoprotein Ligand 1, PSGL-1)相互作用的解离过程。采用黏滞力法对光阱刚度系数进行标定,并通过分子在玻璃小球表面的功能化表征,研究力作用下 P-selectin/PSGL-1 键的解离,得到了在较低加载率(< 25 pN/s)下键解离的断裂力分布,发现键的最可几断裂力随加载率而增加。实验结果在较低加载率下补充和验证了已有的结论。

关键词 光阱 刚度系数 P-selectin/PSGL-1 键 断裂力

Measuring Rupture Forces of P-selectin/PSGL-1 Bonds Using an Optical Trap Assay

Zhang Yan¹ Ye Zhiyi^{1,2} Huo Bo¹ Sun Ganyun¹ Long Mian^{1Δ}

1(Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

2(School of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract Selectin/ligand interaction plays an important role in such biological processes as inflammatory reaction, tumor metastasis, etc. External forces affect dissociation of receptor-ligand bonds. A novel approach, upon optical trap technique, was developed in this study to investigate the dissociation of P-selectin/PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1) bindings. Stiffness of optical trap was calibrated with laser power using a viscous drag method. While P-selectin and PSGL-1 molecules were functionally coated on surfaces of glass beads, respectively, the dissociation of interacting molecule bond was studied by measuring the rupture force distribution. It was found that most probable rupture force increased with loading rate at < 25 pN/s. These results complemented and validated the current theory at low loading rates.

Key words Optical trap Stiffness P-selectin/PSGL-1 bond Rupture force

1 引言

在(单)分子水平对生物大分子相互作用的定量测量对于认识生物分子的结构-功能关系及生物物理特性是非常重要的。但是,对于单分子水平分子间相互作用强度的研究,采用传统的热力学及统计方法是难以完成的,直至 pN/nm 尺度检测方法的出现。随着实验技术的不断发展,用于研究生物大分子间相互作用的主要工具包括:微吸管(Micropipette)^[1,2],微悬臂梁(Microcantilever)^[3],原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM)^[4]、生物膜

力探针(Biomembrane Force Probe, BFP)^[5]以及光阱(或光镊)(Optical Trap/Optical Tweezers)^[6-8]等等。由于不同生物大分子间作用强度从 pN 到 nN 不等^[9],因此任何一种实验技术都难以覆盖所有生物大分子间作用力的测量范围。比如,原子力显微镜技术可以测量从 10~ 4000 pN^[10]范围的作用力,而微吸管、微悬臂梁和生物膜力探针方法的测力范围一般从十几个 pN 到几十个 pN^[1,3,5]。光阱技术的测力范围一般不超过 100 pN,其主要技术优势在于能测量分子之间作用力很小的情形,如 10⁻²~ 10⁰ pN。在光阱实验发展的 20 多年里,已经实现了对微米量级的活细胞、细胞器的固定、分选、细胞融合等等,只是近几年光阱才被用于生物系统中皮牛和亚皮牛量级微小力的测量。

光阱刚度系数的标定是应用光阱技术准确测力

* 国家自然科学基金资助项目(10332060/30225027/10128205);中国科学院知识创新工程资助项目(KJ951-A1-006)和中国科学院力学所创新领域前沿资助项目

Δ 通讯作者。E-mail: mlong@imech.ac.cn

的前提。光阱是依靠光与物体间动量传递引起的光力学效应来实现的,如图 1 插图所示。a、b 两条光线在进入和穿出小球时光的传播方向发生改变,导致光的动量发生改变。根据动量守恒,这些光线施加给小球一个与它们动量改变值相等、但方向相反的力(F_a 、 F_b)。若小球处于强度分布存在梯度的光场中,小球在光场中获得一个指向光最强处的合力(F)。基模高斯光束经物镜聚焦所形成的三维梯度光场能将小球束缚在物镜焦点附近。生物分子的尺寸一般来说小于光波波长,光阱无法对其进行直接操控,通常的做法是用微米量级的二氧化硅或聚苯乙烯小球作为光阱施加力作用的“手柄”,将蛋白质分子用物理吸附或化学耦联的方法包被在小球上,通过测量小球的运动来了解分子的受力状况。因此,对光阱刚度系数的标定实际上是对光阱施加在小球上的力和小球受力后在光阱中平衡位置的标定,它不仅与光源的强度以及光束的性质有关,也与被作用的小球的形状、大小、成分等几何、物理性质有关。

细胞黏附分子相互作用为细胞间提供物理连接并维持作用力存在。比如,表达在白细胞微绒毛上的 PSGL-1 分子与表达在内皮细胞膜上的 P-selectin 分子之间的相互作用,可导致在血流剪切作用下白细胞在内皮细胞表面的滚动,这正是白细胞从血流中浸润、迁移到炎症部位级联过程的第一步。由于血流剪切作用下 P-selectin/PSGL-1 相互作用可介导白细胞与内皮细胞的结合与解离,从而调控其生理功能,因此对 P-selectin/PSGL-1 键在不同外力作用下断裂力(Rupture force)的研究可深化对 P-selectin/PSGL-1 相互作用的定量认识。Evans 等^[11, 12]提出了分子键解离与加载率成正相关的理论,并应用 BFP 技术证实了在加载率为 $10^1 \sim 10^6$ pN/s 范围内键解离的断裂力随加载率而呈指数增加的假设。Fritz 等^[13]采用 AFM 系统对 P-selectin/PSGL-1 键的断裂力进行了研究,得到了不同加载率下分子键解离的断裂力分布,发现不同加载率下分子键解离的断裂力的最可几值(Most probable value)随着加载率增大而增大;但由于所采用的 AFM 探针刚度较大(60 pN/nm),导致实验的加载率非常大($> 18\ 000$ pN/s)。

本文采用黏滞力法^[14](Drag Force Method)标定了光阱刚度系数,并通过分子在玻璃小球表面的功能化表征,测量了低加载率(< 25 pN/nm)下 P-selectin/PSGL-1 分子复合物的断裂力分布。实验结果不仅验证了光阱技术在分子力学测试中的可行

性,而且在较低加载率下补充和验证了 P-selectin/PSGL-1 键解离的断裂力随加载率而增加的结论。

2 材料与方法

2.1 光镊实验装置

图 1 为光阱实验装置结构示意图。双光阱实验系统(Micro-Com binesystem, 德国 PALM 公司)基于倒置荧光显微镜(Zeiss Axiovert 200, Germany),配高数值孔径物镜(Oil Planneofluar 100X/NA 1.3)。激光光源为二极管泵浦 YAG 激光器(COHERENT, 4 000M CW),波长为 $1\ 064$ nm,最大输出功率为 4 W。激光从激光器输出后,由分束器(BS1)一分为二,其中的一束激光固定不动,称为固定光阱,它对微粒的操控可由载物台相对运动来完成;另一束激光由透镜组(L3、L4)控制,可相对于载物台自由移动,称为可动光阱。两个光阱的能量分配由偏振片(Polarizer)的转动来控制。扩束后的两束激光经外荧光通道耦合进入显微镜,充满物镜后瞳,然后由物镜(Objective)聚焦。显微镜配有电动载物台,其移动由计算机控制步进电机完成。显微图像由电荷耦合元件(CCD)接受并送入计算机,进行数据分析。

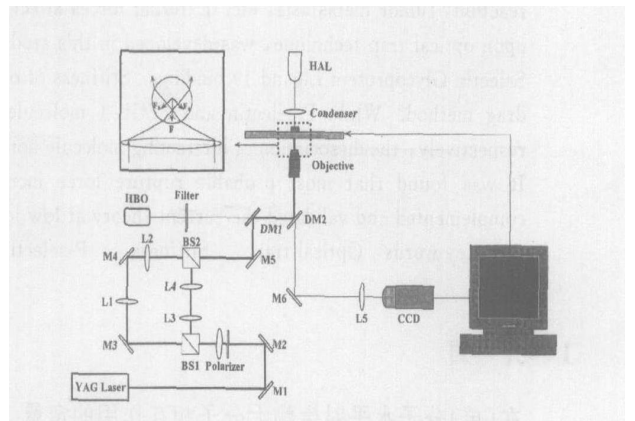


图 1 光镊实验装置示意图

M (Mirror) 为反射镜,BS (Beam Splitter) 为分束器,L (Lens) 为透镜,DM (Dichroic Mirror) 为双色分色镜,其中插图为光镊工作原理图

Fig 1 Schematic of optical trap setup

M represents Mirror, BS represents Beam Splitter, L represents Lens, and DM represents Dichroic Mirror. The insert illustrates the working principle of optical trap

2.2 实验材料

$2.32 \mu\text{m}$ (SS04N, Silica) 和 $5.66 \mu\text{m}$ 玻璃小球(SS06N, Silica) 购自美国 Bangs Laboratories, Inc. P-selectin 胞外片段(soluble P-selectin, sPs), 抗 P-selectin 单抗(mAbs) S12(捕获单抗)、G1(阻断单抗)和抗 PSGL-1 单抗 PL1(阻断单抗)

由美国俄克拉荷马医学研究基金会(Oklahoma Medical Research Foundation)Rodger P. McEver博士赠送^[15, 16]。PSGL-1由本实验室从人白细胞中提取并纯化;抗PSGL-1单抗PL2(捕获单抗)购自美国Bioscience公司。所有单抗均为鼠-抗-人免疫球蛋白1(mIgG1k)。牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购自美国Pierce公司。

2.3 光阱刚度系数的标定

本实验中采用黏滞力法对刚度系数进行标定。实验采用悬浮在磷酸盐缓冲液(PBS)中的2.32 μm玻璃小球为对象进行标定。实验时,用光阱抓住小球,移动电动载物台带动PBS以一定的速度相对于小球运动,流体对小球产生的黏滞力使得小球偏离光阱中心位置。当黏滞力与光阱力大小相等、方向相反时,小球就停留在某一平衡位置。由于小球尺度很小,雷诺数在 10^{-5} 左右,因此惯性项可以忽略。根据Stokes公式有:

$$F = 6\pi\eta\alpha v \quad (1)$$

其中: η 为流体黏性系数; α 为粒子半径; v 为流体速度。当小球偏移光阱中心的位移不超过小球半径时,可以近似地认为小球所受的光阱力正比于小球的位移,即

$$F = kx \quad (2)$$

其中: x 为小球位移; k 为光阱刚度系数。实验采用录像的方式记录在不同激光功率下小球偏离光阱中心的位移。录像的采样速度为25 frame/s,显微图像系统的空间分辨率为125 nm/pixel。

2.4 分子在玻璃小球表面的功能化表征及特异性测试

玻璃小球蛋白质功能化是将P-selectin和PSGL-1分子分别包被在不同的玻璃小球表面,使其具有功能化构象,从而介导分子间特异性黏附(图3 Insert)。首先将捕获单抗S12和PL2采用物理吸附方法($10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 4 h, 孵育过夜)分别包被到2.32 μm和5.66 μm玻璃小球表面,再将包被好S12和PL2的小球分别与sPs和PSGL-1溶液反应($20 \text{ ng}/\text{ml}$, 4 h, 孵育过夜),从而使sPs和PSGL-1被捕获固定在小球表面。同时,为了减少非特异性黏附,采用3% BSA对两种玻璃小球表面进行封闭。

为了证明2.32 μm小球与5.66 μm小球间的黏附是由sPs/PSGL-1特异性相互作用所介导的,设计了相应的对照实验和阻断实验。对照实验分为两组:一组采用包被S12并捕获了sPs的2.32

μm小球与只包被了PL2的5.66 μm小球作碰撞黏附实验;另一组采用只包被了S12的2.32 μm小球与包被PL2并捕获了PSGL-1的5.66 μm小球作碰撞黏附实验。阻断实验分为三组:第一组采用G1单克隆抗体与sPs的Lectin区结合,从而阻断sPs与PSGL-1相互作用的结合位点;第二组采用PL1单克隆抗体与PSGL-1的氨基端结合,从而阻断PSGL-1与sPs相互作用的结合位点;第三组采用EDTA络合溶液中的钙离子(Ca^{2+}),由于sPs/PSGL-1反应具有 Ca^{2+} 依赖性,当钙离子被络合后其反应就不能进行。

2.5 不同加载率下P-selectin/PSGL-1键断裂力的测量

用光阱捕获包被了sPs的2.32 μm小球与沉降在载玻片上的包被了PSGL-1的5.66 μm小球进行碰撞,观测并记录黏附现象,实验循环分为靠近、接触、回拉三步。如果2.32 μm小球上的sPs与5.66 μm小球上的PSGL-1发生结合,光阱在进行回拉的时候,受键的约束,2.32 μm小球就会偏离光阱中心,直至sPs/PSGL-1键断裂,小球重新回到光阱中心。采用CCD对实验过程进行记录(25 frame/s),对每帧的图像用灰度重心法进行处理,算出小球偏离光阱中心的最大位移,乘以光阱的刚度系数,就能得到sPs/PSGL-1键的断裂力分布。实验时通过变化回拉速度和光阱刚度系数改变加载率(回拉速度和光阱刚度系数的乘积),得到分子键断裂的解离力与加载率之间的关系。

3 实验结果

3.1 光阱刚度系数的标定

图2给出了用黏滞力法标定的光阱刚度系数与物镜后瞳入射的激光功率之间的关系。从图中可以看出,随着物镜后瞳的入射功率的增大,光阱对应的刚度系数也呈线性增大。因此,对特定的小球和溶液环境,可以通过直接改变激光功率来控制光阱的刚度系数。

3.2 特异性测试

图3给出了两种小球表面分别包被sPs和PSGL-1分子的特异性测试结果。结果表明,包被于2.32 μm小球上的sPs与包被于5.66 μm小球上的PSGL-1的特异性黏附概率为17%。当小球只包被有捕获抗体(S12和PL2)而不耦联相应受体和配体(sPs和PSGL-1),或溶液中加入EDTA络合 Ca^{2+} 时,黏附概率降低至非特异性水平(~6%)。上

述实验证明了两个小球间黏附是由 sPs/PSGL-1 特异性相互作用所介导的。

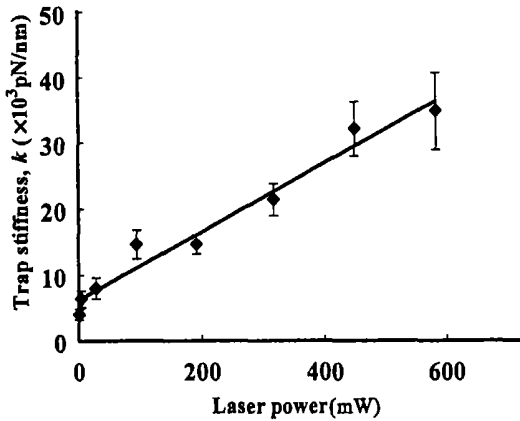


图 2 光阱刚度系数标定

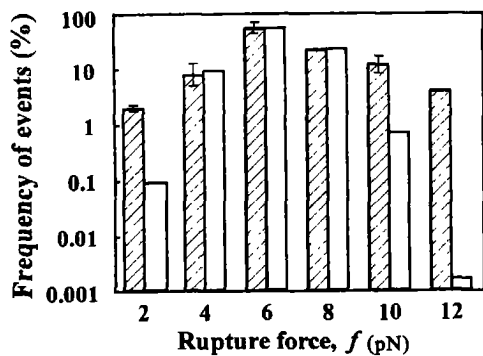
实验数据为 10 次标定的平均值, 方差为 S.E.M.; 实线为拟合曲线

Fig 2 Trap stiffness calibration. Trap stiffness was plotted against laser power

Experimental data (points), obtained from 10-time calibrations and presented as the mean \pm S.E.M., were compared to the predictions (solid line), obtained by linear fitting to the data

3.3 低加载率下 sPs/PSGL-1 键断裂力的测量

实验所设计的加载率为 0.45、4.25、13.70、24.39 pN/s。测量每一加载率下所有黏附事件对应的断裂力值, 每个加载率下断裂力的样本量为 60~90 不等。将所测量的断裂力值排序, 以 2 pN 为区间分区平均后作直方图(图 4(a) 实心柱), 并用高斯分布拟合实验数据(图 4(a) 空心柱)。结果表明, 实验



(a)

值与预测值相符($R^2 = 0.97$)。同时, 从拟合得到的高斯分布中还可以获得该加载率下断裂力的最可几值, $\langle f \rangle$ (参见图 4(b))。图 4(b) 给出了 sPs/PSGL-1 分子键解离过程中断裂力最可几值与加载率的相关性。结果表明, 在较低的加载率(< 25 pN/s)下断裂力随加载率呈近似指数增加。与 AFM 实验结果相比较, 无论是在高加载率还是在低加载率下, 键解离的断裂力与加载率的相关性与 Evans 的理论一致。

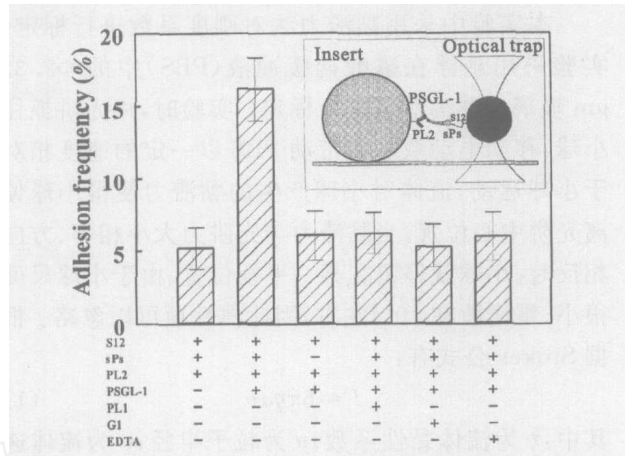
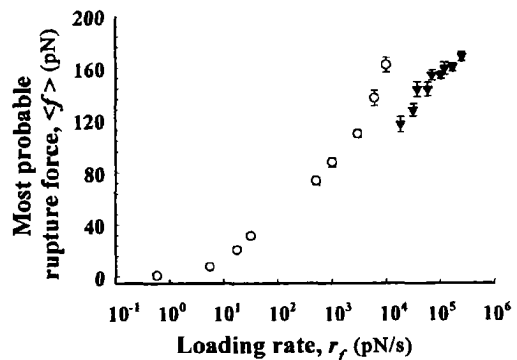


图 3 玻璃小球蛋白质功能化特异性测试

每个实验数据都来自 10 对小球, 每对小球碰撞 100 次, 方差为 S.E.M.; 其中插图为功能化分子系统

Fig 3 Specificity of sPs/PSGL-1 bindings

Adhesion frequency for each condition was obtained from 10-bead pairs with 100 contacts each pair. Data was presented as the mean \pm S.E.M. The insert demonstrates the functionally coated molecule pair



(b)

图 4 键解离的断裂力与加载率的关系

(a) 加载率为 4.25 pN/s 时 sPs/PSGL-1 键的最可几断裂力分布。▨代表实测分布, ○代表高斯拟合分布; (b) 加载率与 sPs/PSGL-1 键最可几断裂力的关系。○为采用光镊技术的测量值(样本量 $N = 60-90$); ▽为采用探针刚度分别为 10^{17} 和 60 pN/nm 的原子力显微镜的测量值^[13]。方差为 S.D.

Fig 4 Dependence of rupture force on loading rate

(a) Comparison of measured (hatched bars) and predicted (open bars), using a Gaussian distribution, rupture force histogram of sPs/PSGL-1 bonds at loading rate of 4.25 pN/s; (b) Dependence of most probable rupture force of sPs/PSGL-1 dissociation on loading rates. Plotted together were data measured by an optical trap (○; sample size $N = 60-90$), and by an AFM at the spring constant of 10 (○) and 60 pN/nm (▽), respectively. Error bars are the standard deviations of mean value

4 讨论

本文发展了基于光阱技术的分子力学新方法用于 sPs/PSGL-1 分子键解离的测量,发现在较低加载率下断裂力随加载率而增加。在已有的 AFM 实验中, Fritz 等^[13]采用探针刚度为 60 pN/nm 的 AFM 对 sPs/PSGL-1 键施加的加载率为 18 000~240 000 pN/s,而我们则采用探针刚度为 10 pN/nm 的 AFM 对 sPs/PSGL-1 键在加载率为 500~5 000 pN/s 下的断裂力进行了测量^[17];但是由于 AFM 的探针刚度和加载速度无法再减小,因此未能对加载率小于 500 pN/s 的键断裂力进行测量。光阱系统正好克服了 AFM 在低加载率方面的限制,是对 AFM 实验结果进行了补充,由此得到的完整键断裂力谱可以用来分析键内部的结构-功能关系。

壁面效应对光阱刚度系数标定的影响必须考虑。由于玻璃小球非常靠近样品池的底面,当用黏滞力法标定小球的刚度系数时,靠近样品池底面的壁面效应导致流体对小球的作用力发生改变。实验样品液池高度为 $d=2\text{ mm}$,光阱捕获小球在距液池底面 $Z=2.8\text{ }\mu\text{m}$ 的高度运动。在 Z 与小球半径相当时,小球受到的流体力学作用力为

$$F=6\pi\eta v\lambda \quad (3)$$

其中: λ 为修正系数,它与小球和样品池底面之间的距离 Z 以及小球的半径 a 有关,并满足如下关系^[18]

$$\lambda = \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{Z} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{Z} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{Z} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{Z} \right)^5 \right]^{-1} \quad (4)$$

本实验中的修正系数为 1.29。

5 结论

通过微米尺寸的小球作为光阱的“手柄”来操纵分子或分子的集合体将光阱的应用从细胞、亚细胞层次推向了分子层次。在我们的实验中不仅得到了 10^{-3} pN/nm 量级的光阱刚度系数,而且测量了在较低加载率 ($< 25\text{ pN/s}$) 下 sPs/PSGL-1 键断裂力分布。实验结果还显示了光阱技术在单分子研究中所能够达到的纳米量级位移以及亚皮牛量级力的测量精度,与其它研究方法比较具有其独特的优势。

参 考 文 献

1 Chesla SE, Selvaraj P, Zhu C. Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophysical*

- Journal* 1998; 75: 1553-1572
- 2 Long M, Zhao H, Huang KS, *et al*. Kinetic measurements of cell surface E-selectin/carbohydrate ligand interactions. *Annals of Biomedical Engineering*, 2001; 29: 935-946
- 3 Tees DFJ, Waugh RE, Hammer DA. A microcantilever device to assess the effect of force on the lifetime of selectin-carbohydrate bonds. *Biophysical Journal*, 2001; 80: 668-682
- 4 Sarangapani KK, Yago T, Klopocki AG, *et al*. Low force decelerates L-selectin dissociation from P-selectin glycoprotein ligand-1 and endoglycan. *J Biol Chem*, 2004; 279: 2291-2298
- 5 Evans E, Leung A, Hammer D, *et al*. Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98: 3784-3789
- 6 Nishizaka T, Seo R, Tadakuma H, *et al*. Characterization of single actomyosin rigor bonds: Load dependence of lifetime and mechanical properties. *Biophysical Journal*, 2000; 79: 962-974
- 7 Thoumine O, Kocian P, Kottelat A, *et al*. Short-term binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2000; 29: 398-408
- 8 Uemura S, Kawaguchi K, Yajima J, *et al*. Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002; 99: 5977-5981
- 9 Weisel JW, Shuman H, Litvinov RI. Protein-protein unbinding induced by force: single-molecule studies. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003; 13: 227-235
- 10 Marshall BT, Long M, Piper JW, *et al*. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 2003; 423: 190-193
- 11 Evans E, Ritchie K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal*, 1997; 72: 1541-1555
- 12 Evans E. Probing the relation between force-lifetime and chemistry in single molecular bonds. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 2001; 30: 105-128
- 13 Fritz J, Katopodis AG, Kolbinger F, *et al*. Force-mediated kinetics of single P-selectin ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998; 95: 12283-12288
- 14 Felgner H, Muller O, Schliwa M. Calibration of light forces in optical tweezers. *Applied Optics*, 1995; 34: 977-982
- 15 Mehta P, Cummings RD, McEver RP. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273: 32506-32513
- 16 Patel KD, Nollert MU, McEver RP. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *Journal of Cell Biology*, 1995; 131: 1893-1902
- 17 叶志义. 接触速度, 接触时间以及加载率对力作用下 P-selectin/PSGL-1 键解离的影响. 中国科学院力学研究所博士后研究报告. 2004: 22-25
- 18 Happel J, Brenner H. *Low Reynolds number hydrodynamics*. Kluwer, Dordrecht, 1983: 322-345

(收稿: 2005-02-23 修回: 2005-04-13)