

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.003

BK 通道在细胞膜上的单分子定位及空间分布 *

刘永锋¹ 侯盼盼¹ 夏程龙² 王 伟¹ 孔文娟¹ 丁久平^{1△}

(1 华中科技大学生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074; 2 中国科学技术大学生命科学学院 安徽 合肥 230027)

摘要 目的:研究大电导、钙离子和电压激活的钾离子通道(BK 通道)在 HEK293 细胞膜上的单分子定位及其总体空间分布情况。**方法:**分别用 mEos2、Dronpa 等荧光蛋白标记 BK 通道的 α 亚基和辅助性 $\beta 2$ 亚基,将这些质粒在 HEK293 细胞内瞬时转染以表达通道蛋白,然后用激光共聚焦荧光显微成像、全内反射荧光显微成像、光敏定位荧光成像等技术观察 BK 通道的亚细胞定位及单分子分布,并用电生理实验技术检测荧光蛋白对 BK 通道有影响。**结果:**激光共聚焦荧光显微成像和全内反射荧光显微成像技术只能在亚细胞水平定位通道蛋白,BK 通道在细胞膜上聚集并形成不规则的蛋白簇,它的 α 亚基和 $\beta 2$ 亚基在细胞膜上完全共定位;光敏定位荧光成像技术成功定位 BK 通道蛋白簇里面的单分子,虽然 α 和 $\beta 2$ 亚基紧紧靠在一起,它们之间依然存在空间距离;BK 通道的质膜表达和功能特性不受荧光蛋白的影响。**结论:**BK 通道蛋白簇里面包含大量的 α 和 $\beta 2$ 亚基的蛋白单分子,它们紧密地聚集在一起,但是并没有完全共定位,在分子水平上揭示了 BK 通道 α 和 β 亚基功能耦合的结构基础,为以后研究大分子蛋白质间的相互作用机制提供了很好的分子模型,光敏定位荧光成像技术作为一种全新的单分子荧光成像手段,在基因表达、信号通路、蛋白质相互作用等许多重要生命活动的研究中发挥重要作用。

关键词:BK 通道;辅助性亚基;光敏定位荧光成像(PALM);共定位

中图分类号:Q73,Q248,Q952.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1411-04

Single-Molecule Localization and Spatial Distribution of BK Channels in the Cell Membrane*

LIU Yong-feng¹, HOU Pan-pan¹, XIA Cheng-long², WANG Wei¹, KONG Wen-juan¹, DING Jiu-ping^{1△}

(1 College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430074, China;

2 School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui, 230027, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the Single-molecule localization and spatial distribution of BK channels in cultured HEK293 cells. **Methods:** BK α and $\beta 2$ subunits were labeled with fluorescence proteins, such as mEos2, Dronpa, TagGFP. Then the plasmids were transferred into HEK293 cells and cultured at 37°C for 24 h. The cells were observed by laser scanning confocal microscopy (LSCM), total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) and photoactivated localization microscopy (PALM). The effects of fluorescence proteins on BK channel were also investigated by patch clamp recording technique. **Results:** Fluorescence images obtained from LSCM and TIRFM microscopy revealed that BK channels assembled into irregular clusters and BK α subunits were well co-localized with $\beta 2$ subunits in HEK293 cells. While the PALM microscopy illustrated that there is spatial distance between BK α and $\beta 2$ molecules. The localization and function properties of BK channel were not influenced by the fused fluorescence proteins. **Conclusion:** Each cluster of BK channel was assembled with many α and β molecules but they were not fully co-localized. This result revealed the structural basis of BK channels at the molecule level and provided a model for studying the molecular mechanisms of protein interaction. Also PALM microscopy serves as a new tool in the research of many vital activities, such as gene expression, signaling pathways and protein-protein interaction.

Key words: BK channel; Modulatory subunit; Photoactivated localization microscopy (PALM); Co-localization

Chinese Library Classification: Q73, Q248, Q952.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1411-04

前言

大电导、钙离子和电压激活的钾离子通道(large-conductance, calcium- and voltage-activated potassium channels),即 BK 通道,广泛表达于哺乳动物的平滑肌、骨骼肌、血管、脑、胰腺、

膀胱等器官和组织,在神经递质释放、激素分泌、肌肉收缩、血流等许多生命活动中发挥着重要的生理作用^[1]。BK 通道的突变或者功能缺失,会导致癫痫、高血压、性功能障碍等多种疾病的产生^[2]。因而,对 BK 通道的结构、功能和生理机制的研究一直是生命科学研究的重点。BK 通道在细胞内的正确定位是它

* 基金项目:国家重点基础发展规划项目(2010CB529804);国家自然科学基金项目(31170814)

作者简介:刘永锋(1985-),男,博士研究生,研究方向:BK 通道与钙离子通道的结构、功能以及它们之间的相互作用机制,

电话:15527303468, E-mail: yfengliu@hust.edu.cn

△ 通讯作者:丁久平, E-mail: jpding@hust.edu.cn

(收稿日期:2013-09-13 接受日期:2013-10-11)

的一种重要调节机制,改变它在细胞膜上的表达水平可以满足不同生理功能的需要^[3]。但是,传统光学荧光成像技术由于受到衍射极限的限制,其分辨率只有 200 nm 左右,只能在亚细胞水平研究蛋白质分子的空间定位以及它们之间的相互作用机制。近年来,受激发射损耗(stimulated emission depletion, STED)^[4]、饱和结构照明(saturated structure illumination microscopy, SSIM)^[5]、随机光学重构荧光成像(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[6]、光敏定位荧光成像(photoactivated localization microscopy, PALM)^[7]等超高分辨率显微荧光成像技术的出现成功地打破了衍射极限的限制,在不损伤细胞的前提下将成像分辨率提升到 20~50 nm,真正意义上地实现了分子水平上的荧光成像。本研究就旨在利用双色 PALM 技术^[8]研究 BK 通道在细胞膜上的定位及分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

哺乳动物表达载体 pcDNA3.1/Zeo(+)以及质粒 pcDNA3.1-TagGFP, pcDNA3.1-TDimer II, pcDNA3.1-mEos2, pcDNA3.1-Dronpa, pcDNA3.1-mSlo1, pcDNA3.1-hβ2, hβ2-myc 由本实验室提供。感受态菌株 *E. coli* DH5α、HEK293 细胞由本实验室保存。Pfu 酶、T4 连接酶(美国, Thermo 公司)。限制性内切酶 *Hind*III、*Kpn*I、*Not*I、*Xho*I、*Xba*I(英国, New England Biolabs 公司), 胎牛血清、DMEM 培养基、脂质体 Lipofectamine 2000(美国, Invitrogen 公司)。小鼠抗人 c-myc 单克隆抗体(美国, Abcam 公司), 羊抗小鼠罗丹明标记的第二抗体(美国, Proteintech Group)。其他化学试剂(美国, Sigma 公司)。激光共聚焦荧光显微镜(日本, Olympus 公司), 全内反射荧光显微镜(日本, Olympus 公司), 膜片钳实验操作系统。

1.2 质粒构建

mSlo1-TagGFP: 从质粒 pcDNA3.1-TagGFP 上扩增 TagGFP 的基因, 从质粒 pcDNA3.1-mSlo1 上面扩增 mSlo1 基因 C 末端包含 *Xho*I 位点在内的一个 700bp 的片段, 然后用重叠延伸 PCR(overlap extension PCR)的方法将这两个基因片段连接起来, 最后用限制性内切酶 *Xho*I / *Xba*I 将其连接进 pcDNA3.1-mSlo1, 构建成 mSlo1-TagGFP 质粒。

hβ2-TDimer II: 以质粒 pcDNA3.1-hβ2 为模板扩增 hβ2 基因, 再用 *Hind*III / *Kpn*I 多克隆位点连接入 pcDNA3.1-TDimer II 载体。

mSlo1-mEos2: 以质粒 pcDNA3.1-mSlo1 为模板扩增 mSlo1 基因, 然后用多克隆位点 *Kpn*I / *Not*I 连接入 pcDNA3.1-mEos2 载体。

hβ2-Dronpa: 以质粒 pcDNA3.1-hβ2 为模板扩增 hβ2 基因, 再用 *Hind*III / *Kpn*I 多克隆位点连接入 pcDNA3.1-Dronpa 载体。

所有构建好的质粒都经过上海英骏生物技术有限公司基因测序鉴定。

1.3 BK 通道在 HEK293 细胞里的表达

HEK293 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 并在 37℃, 含有 5% CO₂ 的恒温培养箱中生长。转染前一天, 将适量的细胞转移至 24 孔板中, 待其密度达到 80%~90

% 以后, 用脂质体 Lipofectamine 2000 将上述质粒按照 1:1 的比例瞬时转染进入细胞, 所用 DNA 的浓度为 1 μg/ml。转染后 24~48 h 内可进行荧光成像或者电生理实验。

1.4 免疫荧光实验

质粒 mSlo1-TagGFP 和 hβ2-myc 按照 1:1 的比例转染进入 HEK293 细胞, 4~6 小时后转移细胞至 chamber 内继续培养 1~2 天, 然后进行免疫荧光实验。首先, 用 2% 的多聚甲醛固定细胞 10 分钟, PBS 润洗 2~3 次以后, 再用 5% FBS 将细胞封闭 1 个小时。将单克隆抗体 c-myc 用 2.5% 的 FBS 稀释 300 倍, 然后加到 chamber 中 4℃ 孵育细胞过夜。去掉抗体溶液后, 用 2.5% FBS 润洗细胞 6 次, 每次 5 分钟。再用稀释的带有罗丹明标记的第二抗体溶液避光孵育细胞 2 小时, 最后用 PBS 溶液润洗掉残余的抗体溶液。细胞样品的图像采集是在激光共聚焦显微荧光操作系统(laser scanning confocal microscopy, LSCM)下完成的, 所用的物镜为 Zeiss 100×(NA=1.40)油镜, TagGFP 用 488 nm 氩离子激光器激发, TDimer II 和罗丹明(标记于第二抗体)用 561 nm 氦氖激光器激发。参数选择、样品扫描和图像采集都由应用软件 Andor iQ 控制。

1.5 光敏定位荧光成像(PALM)

PALM 荧光成像是在全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)的基础上实现的^[9], 其核心是 IX71 倒置显微镜成像系统, 配备有一个 100× 1.65 NA 的目镜和 405 nm、488 nm、561 nm 三种激光器, 并通过声光可调节滤波器(AOTF)来调节光强度, 使每次成像过程中只有很少的荧光蛋白分子被激活。在表达有 mSlo1-mEos2 和 hβ2-Dronpa 的 HEK293 细胞中, 先用 405 nm 和 561 nm 的激光器不断地激活和激发 mEos2 荧光分子, 然后传递到电子倍增电荷耦合装置(EMCCD)进行成像, 将多次成像的图片叠加在一起, 就可以得到 mSlo1 完整的单分子荧光图像。再用 405 nm 和 488 nm 的激光器激活和激发 Dronpa, 以同样的方法完成 hβ2 的单分子荧光成像。PALM 成像实验开始前, 需要加入荧光纳米金颗粒来校准样品采集过程中产生的漂移。PALM 图像采集过程中的光强度一般为 0.5~2.0 kW/cm², 每 20~50 毫秒采集一帧图片, 在 5~30 分钟内完成图像采集。

1.6 电生理特性检测

在 HEK293 细胞内分别表达野生型和标记有荧光蛋白的 BK 通道质粒, 然后用内膜向外记录模式记录 BK 通道电流, 先用 -180 mV 的外加电压使 BK 通道关闭, 然后在 -150 mV 到 150 mV 的范围内记录 BK 通道的激活电流。实验过程中用到的玻璃微电极用 PC-10 拉制仪制成, 所得到的电流经过 EPC-9 放大器转换为宏观电流, 并用 Pulse/PulseFit8.3 软件设计操作步骤和控制数据采集。实验过程中用到的电极内液成分包括(mM): 160 MeSO₃K, 2 MgCl₂, 10 H⁺-HEPES, 用 MeSO₃H 调节 pH 值至 7.0。0 μM Ca²⁺ 浓度的细胞外液组分包括(mM): 160 MeSO₃K, 10 HEPES, 5 EGTA。10 μM Ca²⁺ 浓度的细胞外液成分包括(mM): 160 MeSO₃K, 10 HEPES, 5 HEDTA, 并添加 Ca²⁺ 离子浓度至 10 μM, 这个溶液中的自由 Ca²⁺ 浓度是在 pH 7.0 的条件下通过 EGTAETC 软件计算的。本研究所有的实验操作都在室温(22~25℃)下完成。

1.7 数据处理

免疫荧光和 PALM 荧光成像数据用 Image J (National Institutes of Health) 和 Matlab 软件处理。电生理实验数据用 Clampfit (Axon Instruments) 和 Sigmaplot (SPSS Science) 软件进行统计分析和画图。

2 结果

2.1 BK 通道的质膜表达

BK 通道由形成孔区的 α 亚基以及辅助性的 β 和 γ 亚基组成^[9]。其中 α 亚基由 Slo1 基因编码,并组装成四聚体构成 BK 通道的功能核心,辅助性亚基可以调控 BK 通道的门控特性^[1,2,10]。为了观察 BK 通道在细胞内的定位情况,我们在 HEK293 细胞中共同表达 mSlo1-TagGFP 和 h β 2-TDimer II,然后用激光共聚焦荧光显微镜观察细胞,结果表明,mSlo1 和 h β 2 在细胞内大量表达,并且很明显地定位在一起(图 1-A)。另外,用免疫荧光技术标记 h β 2,并将它与 mSlo1-TagGFP 共同表达,结果发现它与 mSlo1 共同定位于细胞膜上(图 1-B)。全内反射荧光成像技术也揭示 mSlo1 和 h β 2 在细胞膜上呈不规则的簇状分布,并且具有很明显的共定位现象(图 2,左)。总之,由于衍射极限的限制,我们只能看到 mSlo1 和 h β 2 的亚细胞定位,却无法进一步看清楚细胞膜上这些蛋白簇的分子组成,因而无法确切判断它们分子间的结合方式和相对分布情况,这为在分子水平上研究生命现象造成了很大的障碍。

2.2 BK 通道的单分子荧光定位

为了进一步探索 BK 通道蛋白分子在细胞膜上的定位情

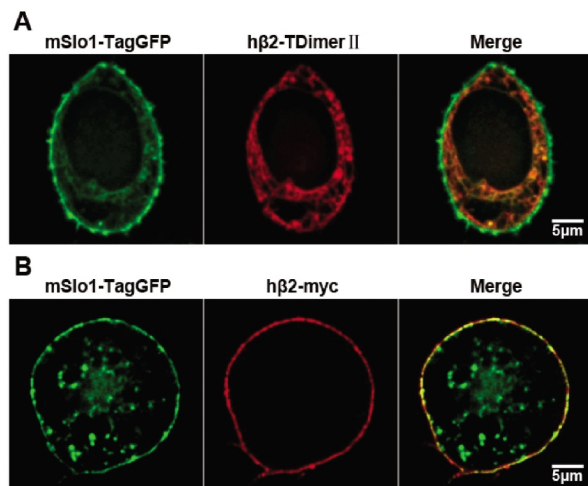


图 1 BK 通道在 HEK293 细胞内的表达及其亚细胞定位:(A)mSlo1 和 h β 2 在 HEK293 细胞内的亚细胞定位。(B)mSlo1 和 h β 2 在细胞膜上共定位的免疫荧光图像

Fig. 1 Expression and subcellular localization of BK channels in HEK293 cells: (A) Representative confocal images of HEK293 cells expressing mSlo1-TagGFP and h β 2-TDimer II. (B) Immunofluorescence imaging for the plasma co-localization of mSlo1 and h β 2 in HEK293 cells

况,我们又进行了双色 PALM 实验。mEos2 是一种光转换荧光蛋白,本身发射绿色荧光,但是在 405 nm 激光的照射下转为红色荧光^[11]。Dronpa 是一种光激活荧光蛋白,在 405 nm 激光的照射下从失活态转变为激发态^[12]。分别用 mEos2 和 Dronpa 标记

mSlo1 和 h β 2,它们的 PALM 成像结果表明,每个蛋白簇里面都有许多蛋白分子紧密地聚集在一起,虽然 mSlo1 和 h β 2 蛋白分子靠的很近,却并没有完全定位在一起,而是存在一定的空间距离(图 2)。

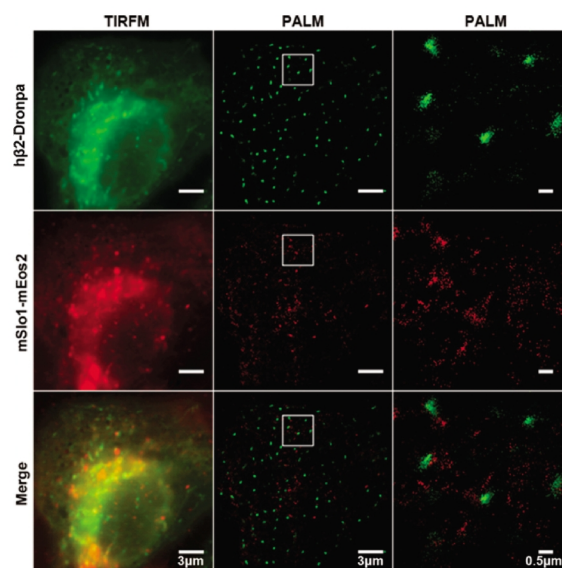


图 2 BK 通道在 HEK293 细胞膜上的单分子定位和空间分布
Fig. 2 Single-molecule localization and spatial distribution of BK channels in cultured HEK293 cells

2.3 荧光蛋白不影响 BK 通道的动力学特性

由于荧光蛋白的分子量比较大,在其折叠并形成成熟蛋白质的过程中,很可能会影响到和它融合在一起的 BK 通道亚基的表达,进而改变通道蛋白的质膜表达水平和功能特性,因此,我们还研究了荧光蛋白对 BK 通道电生理特性的影响。结果发现,无论是没有 Ca^{2+} 存在,还是在含有 10 mM 细胞外 Ca^{2+} 的溶液中,野生型 mSlo1 与 mSlo1-mEos2 的电流特性并没有明显变化(图 3)。这表明 BK 通道亚基上融合的荧光蛋白标记,对 BK 通道的表达和功能并没有影响。

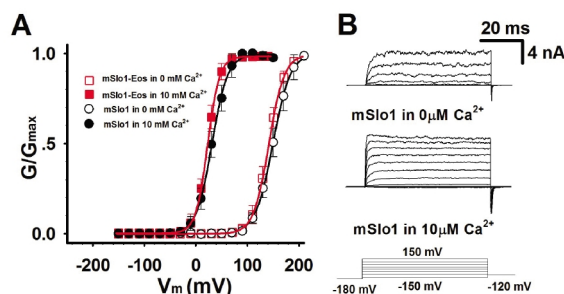


图 3 荧光蛋白对 BK 通道的动力学特性没有影响:(A)BK 通道电流的动力学特性。(B)代表性的 BK 通道电流激活曲线
Fig. 3 Fluorescence proteins have no effects on the kinetics of BK channels: (A) Kinetics properties of BK channels in HEK293 cells. (B) Representative current traces of mSlo1 and mSlo1-mEos2

3 讨论

近年来,随着超高分辨率显微荧光成像技术的不断发展更

新,它们的功能更加全面多样,不仅实现了多色成像^[9],还可以进行活体和三维层面的荧光定位^[13,14],因而在生命科学中的应用越来越广泛,解决了很多传统光学荧光成像技术无法分辨的科学难题。本研究采用光敏定位荧光成像技术,在 HEK293 细胞的质膜上观察 BK 通道蛋白分子的定位情况和空间分布,结果表明在 BK 通道的蛋白簇里面,聚集着大量的通道蛋白单分子,它们紧密地聚集在一起。另外, α 亚基与 β 亚基的蛋白分子在空间位置上靠的很近,但是并没有完全定位在一起,而是具有一定的空间距离。这与传统的光学荧光图像相比,其分辨率提高了 10 倍,正好与蛋白分子的大小相符,真正实现了单分子成像。

BK 通道的 α 亚基具有多个跨膜结构域(S0-S6)和一个大的胞内结构域,而 β 亚基由两个跨膜部分及它们之间的大的胞外环状结构组成, α 亚基可以与 β 亚基结合形成功能性蛋白质复合体^[15]。免疫共沉淀和二硫键交联研究发现, α 亚基的 S1、S2 可以与 β 亚基的第一个跨膜部分相结合,S0 与 β 亚基的第二跨膜部分相互作用^[16,17]。免疫荧光和电生理研究还表明, β 2 亚基本身很少上膜,只有与 α 亚基共同表达之后才能在质膜上大量表达,它们直接通过 PI 位点、E 位点等多个结合位点相互作用^[18,19]。但是,所有这些实验证据都只能间接证明 α 亚基与 β 亚基可能存在结构上的耦合,无法确切得知它们的空间分布与分子定位情况。超高分辨率显微荧光成像技术与这些技术相比,可以更加直观地观察通道蛋白内部不同亚基分子的定位情况及其相对空间分布,这对在分子水平上进一步了解蛋白质的结构、功能和作用机理具有重要的生理意义。

总之,超高分辨率显微荧光成像技术的出现,真正意义上地实现了单分子荧光成像,为我们研究大分子蛋白质提供了一个全新的技术平台。BK 通道内部亚基相互作用的分子机制研究,也为研究其他蛋白质分子相互作用提供了一个理想模型。不过,由于荧光探针的分子量比较大,荧光操作系统也存在一定的技术缺陷,目前的超高分辨率显微荧光成像技术依然有很大的提升空间,相信随着新的荧光探针的不断出现和荧光成像技术的不断革新,它们在生命科学研究中的应用会越来越广泛。

参考文献(References)

- [1] Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, et al. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 110(1): 103-116
- [2] Chen L, Jeffries O, Rowe IC, et al. Membrane trafficking of large conductance calcium-activated potassium channels is regulated by alternative splicing of a transplantable, acidic trafficking motif in the RCK1-RCK2 linker [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(30): 23265-23275
- [3] Sorensen MV, Matos JE, Sausbier M, et al. Aldosterone increases KCa1.1 (BK) channel-mediated colonic K⁺ secretion [J]. *J Physiol*, 2008, 586(Pt 17): 4251-4264
- [4] Meyer L, Wildanger D, Medda R, et al. Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution[J]. *Small*, 2008, 4(8): 1095-1100
- [5] Gustafsson MG. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(37): 13081-13086
- [6] Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(10): 793-795
- [7] Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645
- [8] Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, et al. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(51): 20308-20313
- [9] Huang ZL, Zhu H, Long F, et al. Localization-based super-resolution microscopy with an sCMOS camera[J]. *Opt Express*, 2011, 19(20): 19156-19168
- [10] Rothberg BS. The BK channel: a vital link between cellular calcium and electrical signaling [J]. *Protein Cell*, 2012, 3(12): 883-892
- [11] McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, et al. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(2): 131-133
- [12] Andresen M, Stiel AC, Trowitzsch S, et al. Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(32): 13005-13009
- [13] Lord SJ, Lee HL, Moerner WE. Single-molecule spectroscopy and imaging of biomolecules in living cells [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(6): 2192-2203
- [14] Shtengel G, Galbraith JA, Galbraith CG, et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3125-3130
- [15] Berkefeld H, Fakler B, Schulte U. Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(4): 1437-1459
- [16] Liu G, Zakharov SI, Yang L, et al. Locations of the beta1 transmembrane helices in the BK potassium channel [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(31): 10727-10732
- [17] Wu RS, Chudasama N, Zakharov SI, et al. Location of the beta 4 transmembrane helices in the BK potassium channel [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(26): 8321-8328
- [18] Chen M, Gan G, Wu Y, et al. Lysine-rich extracellular rings formed by hbeta2 subunits confer the outward rectification of BK channels [J]. *PLoS One*, 2008, 3(5): 2114-2114
- [19] Hou P, Zeng W, Gan G, et al. Inter-alpha/beta subunits coupling mediating pre-inactivation and augmented activation of BKCa (beta2) [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1666-1666