

- Mol. Cell. Biol.*, 7(2): 639—649
- [9] Griep, A. E. and Westphal, H. 1988, *PNAS*, 85: 6806—6810
- [10] Strickland, S. et al., 1988, *Science*, 241: 680—684
- [11] Kim, S. K. and Wold, B. J. 1985, *Cell*, 42: 129—138
- [12] Melton, D. A. 1985, *PNAS*, 82: 144—148
- [13] Harland, R. and Weintraub, H. 1985, *J. Cell. Biol.*, 101: 1094—1099
- [14] Kawasaki, E. S. 1985, *Nucleic Acids Res.*, 13: 4991—5004
- [15] Wang, A. M. et al., 1985, *Science*, 228: 149—154.
- [16] Mizuno, T. et al., 1984, *PNAS*, 81: 1966—1970.
- [17] Coleman, J. et al., 1984, *Cell*, 37: 429—436.
- [18] Stacey, D. W. et al., 1977, *PNAS*, 74: 1614—1618.
- [19] Wormington, W. M. 1986, *PNAS*, 83: 8639—8643.
- [20] Trevor, K. et al., 1987, *PNAS*, 84: 1040—1044.

荧光漂白恢复技术在细胞生物学中的应用*

张 孔 华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近十几年来, 荧光漂白恢复 (Fluorescence photobleaching recovery, FPR) 技术的迅速发展, 并与其它新技术的结合, 为研究膜的流动性提供了新的手段^[1]。目前, FPR 技术已广泛应用于定量测定人工膜、细胞膜以及细胞质分子的二维运动。

FPR 技术的基本原理是用荧光探针进行标记, 强激光脉冲照射, 使待测细胞表面的微区 (小于 $10\ \mu\text{m}^2$) 上的标记分子产生不可逆的光化学漂白, 随即用微弱激光束监测漂白区域的荧光恢复过程。由于该区域内外标记荧光分子的彼此随机扩散或流动, 从而可获得一条以时间为函数的 FPR 动力学曲线。通过 Axelrod 等^[2]的理论模型, 从 FPR 曲线可获得以下的信息: 1. 运动过程的类型是随机扩散还是定向流动。2. 计算出扩散系数 (D) (本方法测量的有效扩散系数范围在 10^{-6} — $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$), 或流动速度。3. 测定出被标记分子的可动及不可动部分的比例。这些信息将有助于了解它们的运动方式、功能以及与其他分子的相互关系。

关于 FPR 的方法学和 FPR 对细胞的影响等问题可参阅前文^[1,3]。本文拟就 FPR 技术在细胞生物学中的应用, 作简略地论述。

一、细胞膜中分子的运动

1. 膜组分的扩散速度^[4] FPR 测量表明, 人工膜和绝大多数细胞膜上脂质的扩散系数均为 $10^{-8}\text{cm}^2/\text{s}$, 个别的 $\ll 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s}$ (见后), 这与电子顺磁共振波谱测量的值相同。细胞膜蛋白质的扩散系数则在 10^{-9} — $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$ 之间。大部分蛋白质的扩散系数 $\leq 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s}$, 可动组分 $\leq 80\%$, 少数的 $< 10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$, 即在 FPR 测量时间内几乎不动。这些结果反映了生物膜结构流体性的特征和动态性质。同时也说明大多数膜蛋白质在膜平面上的扩散运动, 是有一定限制的。Suffman 和 Delbuck 通过一个简单的流体动力学模型, 求解蛋白质的侧向扩散速率。计算表明, 蛋白质分子的大小对扩散速率的影响很小, 仅受磷脂双分子层的粘滞度限制。

* 本文承蒙顾国彦教授指导, 特此致谢。

Hughes 等^[5]发展了 Suffman 模型, 进一步证实当缓冲溶液的粘滞度为 1—2 P(泊), 介质粘滞度为 0.1—0.2 P 时, 模型预测的扩散系数 (10^{-9} — 10^{-8} cm²/s) 接近于某些蛋白质的测量值。因此, 从理论和实验上弄清楚限制膜蛋白分子扩散运动的因素, 在生物学上是很有意义的。

2. 阻滞膜蛋白分子扩散运动的因素^[6-8]

(1) 膜的粘滞度和蛋白质浓度的影响 对 DMPC(二豆蔻酰磷脂酰胆碱) 双分子层中的细菌视紫红质的 FPR 测量表明, 增加膜的粘滞度 12 倍, 蛋白质的扩散系数降低约 50%。同样, 减少脂质/蛋白质的克分子比(210→30), 相应的扩散系数也减少 ($3.4 \rightarrow 0.15 \times 10^{-10}$ cm²/s), 这完全与模型预测的值相吻合, 但对脂质流动性的影响就小得多。又如直接用冰冻蚀刻电镜观察证明, 在线粒体内膜上, 当膜内颗粒(IMP)密度从 $6400/\mu\text{m}^2$ 减少至 $2400/\mu\text{m}^2$, IMPs 的扩散系数却明显增大 (1.3×10^{-10} cm²/s → 3.35×10^{-9} cm²/s)。新近 Chaztte 和 Hackenbrock 的 FPR 研究进一步证实, 通过纯脂质囊泡与线粒体内膜的融合, 使脂质浓度增加 7 倍, 结果脂质和复合物 III 中蛋白质的扩散系数, 分别从 4×10^{-9} cm²/s 和 7×10^{-10} cm²/s 增加至约 1.3×10^{-8} cm²/s, 此值接近于蛋白质分子的“自由”扩散系数。

(2) 蛋白质分子之间的聚合和聚集(aggregation)作用 人为地加入配体(植物凝集素、抗体、激素和毒素等), 使相应的受体缔合或聚集可抑制糖蛋白受体的扩散运动。

(3) 细胞骨架和外周结构可直接限制和调控膜蛋白质分子的扩散速率 表 1 提供了充分有力的证据并得出以下结论: (1) 最大的限制

来自细胞骨架。以红细胞为例, 使细胞骨架中的血影蛋白(Spectrin)缺损, 或者降低磷酸缓冲液的离子强度和增加温度, 以解聚 Spectrin, 都会使区带 3(Band 3)蛋白的扩散系数增快 50 倍左右, 接近视紫红质的扩散系数。Tsuji 和 Ohnishi 研究了红细胞的骨架网络对 Band 3 扩散的限制模式, 进一步证实 Band 3 的运动与 Spectrin 的聚合状态有关。实验表明, 用胰蛋白酶酶解 Band 3 的细胞质区段, 切下内段约 40 kD 的多肽, 能明显地使 Band 3 的扩散速率增加至 4.0×10^{-10} cm²/s, 近似于 Spectrin 缺损型中的数值。(2) 膜外周结构限制的影响。视紫红质可视为特例, 没有外周结构不受任何干扰与限制, 其扩散系数达到蛋白质分子扩散速率的极限。(3) 膜蛋白质在重组膜上的扩散速率远大于天然膜上的值, 接近于脂质的扩散系数。Webb 及其同事, 在神经肌肉的乙酰胆碱受体, 淋巴细胞的 H-2 抗原和成纤维细胞的 LDL 受体上, 通过解除微丝与细胞膜的连接, 使质膜形成膜泡(membrane blebs), 测知膜泡上膜蛋白的扩散速率均为 $\geq 10^{-9}$ cm²/s, 并可消除不可扩散部分, 使荧光恢复达 100%。

最近报道, 有些实验室用基因克隆的位点突变技术(Site-directed mutagenesis)造成膜上胞质区域的位点片断的缺失, 通过 FPR 研究胞质区段突变对膜蛋白质侧向扩散运动的影响。实验表明, 鼠组织相容性抗原和表皮生长因子(EGF)的胞质区段中残基的缺失, 对抗原和 EGF 受体的扩散系数有弱的影响。例如 A 43± 细胞膜上 EGF 受体是一种分子量为 170 kD 的糖蛋白, 它的胞质区段是由 542 个

表 1 膜蛋白质在膜上的扩散速率的比较^[7]

膜蛋白质	扩散系数(cm ² /s)		
	天然膜	细胞骨架缺损	DMPC 重组膜
区带 3 (红细胞)	5×10^{-11}	2×10^{-9}	$(1-2) \times 10^{-8}$
乙酰胆碱受体(横纹肌)	$\leq 10^{-12}$	$\sim 3 \times 10^{-9}$	$(1-3) \times 10^{-8}$
视紫红质(视杆细胞外段)	4×10^{-9}	4×10^{-9}	2×10^{-8}

氨基酸残基组成的羧基端区段,通过突变使其只含有9个氨基酸,这种缺失不会影响EGF受体突变体的侧向扩散系数,但降低EGF受体介导的内吞速率。类似的实验也用于研究疱疹性口炎病毒(VSV)突变基因编码的G蛋白,突变体G蛋白的扩散系数为 $2 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$,接近于淋巴细胞质膜上免疫球蛋白的扩散系数。

3. 膜脂和膜蛋白分子扩散运动变化的生物学意义

(1) 受体的研究^[4] 微光电视观察表明,胰岛素和表皮生长因子与受体相互作用后形成的配体-受体复合物,在23℃或37℃,随机分散在膜上扩散运动,并快速地在被膜凹(coated pits)处聚集成簇,随后通过内吞过程进入细胞内。受体在细胞内吞过程中经溶酶体被降解。FPR对上述的配体-受体复合物的扩散运动进行了定量测定,结果表明胰岛素和表皮生长因子的扩散系数是相同的,均为 $3-5 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ (23℃),可动组分在40-80%。当温度上升至37℃的几分钟后,快速的受体运动变为不动,扩散系数降低为 $10^{-11}-10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$,受体可动组分小于10%。显然,实验表明受体扩散速率是由于配体-受体复合物的聚集和内吞作用,或者是两者兼而有之的作用所引起的。激素-受体复合物的聚集和内吞对温度是灵敏的,在温度4℃时被完全抑制。例如对癌细胞A431表皮生长因子受体所进行的侧向和旋转扩散之间相关性的研究,证实了占有受体(occupied receptor)的快速微聚集和内吞作用对温度也是敏感的。在4℃时,扩散相关时间为25-50μs,只有单个或2-3个受体分子形成聚集,而在高温23℃或37℃,扩散相关时间为300μs,估计有10-50个受体分子形成聚集,随后内吞。这说明表皮生长因子受体不存在扩散速率的限制,这种表皮生长因子受体的聚集——内吞作用被认为是一种“降速调节(down regulation)”的机制,这对触发细胞生物效应可能是有意义的。

另据报道,Barisas^[9]应用FPR、流式细胞计和计算机模拟的方法,研究淋巴细胞在抗原(Ag)刺激下所形成的复合物以及细胞的反应。例如用抗体(R)组合的小鼠细胞用DNP-Ags(包括DNP聚合的鞭毛蛋白和DNP-线性葡萄糖)刺激后,10⁶个细胞中有42000个细胞分化为分泌Ig的细胞,FPR实验表明R-Ag复合物的侧向扩散和恢复与Ag浓度有关,扩散系数在 $(10-5) \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ 时细胞激活效果最佳。

(2) 在细胞周期和生长中的研究 成神经细胞瘤在整个细胞周期中,质膜脂质的侧向扩散系数有成倍的变化,这一结果与荧光偏振法测定膜微粘滞度($\bar{\eta}$)的结果相一致^[10]。在M期时膜脂的D最小($3.1 \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$, $\bar{\eta}$ 为3.5P)而在S期时最大($6.2 \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$, $\bar{\eta}$ 为1.9P)膜蛋白的D亦在M期最小,G₁期达到最大,在S期逐步减少。以上结果提出在M期至G₁期膜脂和膜蛋白的扩散系数都是逐渐增加,说明它们的流动性受到一个共同机制的控制。通过膜超微结构的分析,证明在G₁期膜内颗粒(IMPs)密度最小700/μm²,而在M期IMPs密度则为1100/μm²,这表明在G₁期有一个特殊机制控制膜蛋白的流动性。

我们选用有能在常温和高温下生长特性的人鼻咽癌上皮细胞CNE株分别测定其表面ConA受体复合物的侧向扩散系数^[11],发现它们在各自最适温度时的扩散系数是相同的。当常温株放入高温时,扩散系数明显增加,反之略有下降。

(3) 蛙卵的胞质分裂 Dictus等^[12]研究了爪蟾卵受精前后动物极和植物极表面脂质分子的侧向流动性,发现脂质流动性与动物极/植物极的极性有关。受精前爪蟾卵动物极上脂质的扩散系数比植物极低5倍,表示质膜内形成两个不同的极区。受精后,极性增强(>100倍)推测是大量皮质颗粒插入动物极质膜中。动物极区表面脂质的扩散速率在测量时间内完全不动($D \ll 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$),而在植物极一侧脂质

的流动性仅有微小降低。爪蟾卵裂时,蛙卵表面可简单划分为动物极老膜、植物极老膜和新膜等3个区域。经测定,动物极老膜上荧光显示非均匀分布,没有脂质流动性。在植物极老膜和分裂沟的新膜区域上,荧光分布均匀,有高度流动性^[13]。本实验室测定了林蛙卵裂前和卵裂时表面凝集素(SBA和WGA)受体的运动^[14,15]。在卵裂前动物极上的荧光分布相当均匀。测定表明,不论在卵裂前和卵裂时,绝大部分受体的扩散运动是极其小的,表面蛋白质的扩散系数 $\leq 4.6 \times 10^{-12} \text{cm}^2/\text{s}$,主要是流动。经激光定位多次光漂,所有FPR曲线都是S形,说明蛙卵的表面分子在不停地流动着,这可能起着协助或反映细胞质的运动。以后,我们应用激光漂白荧光图像技术结合微光电视,观察与记录林蛙卵第一次卵裂时卵表面分子的运动^[16]。观察到在与分裂沟长轴平行的方向上引起收缩,和垂直于分裂沟的扩张。这种扩张是被动的还是部分主动,正是目前有争议的问题,仍有待进一步探索。

4. 膜组分的流动性 Koppel等^[17]用微光电视和激光-荧光扫描技术观察和分析了在胞质分裂过程中,大白鼠巨噬细胞表面F-S-ConA(琥珀酰伴刀豆球蛋白A)聚集向分裂沟的运动,由此提出流动和扩散两个运输模型交替地定量分析受体分布和运动的数据。经计算获得F-S-ConA受体聚集运动的流动速度是 $\sim 1 \mu\text{m}/\text{min}$,或 $\sim 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$,与此比较FPR测量,在中期细胞上植物凝集素受体的扩散系数

$\sim 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$,比扩散模型计算的扩散系数慢一个数量级。同时又证实在胞质分裂时受体同样发生单向运动。这些结果说明F-S-ConA受体复合物聚集到分裂沟的运动,很可能是一个定向流动的机制。

我们的测定表明^[15],如前面所述,林蛙卵裂前和卵裂时F-SBA和F-WGA的荧光恢复曲线都是S形,提示受体运动主要是流动。卵裂前细胞表面分子的流动速度为 $10^{-7} \text{cm}/\text{s}$,在归一化时间0.9左右流动速度减慢,可能和胞质分裂有关。卵裂时受体分子流动速度可增大至 $10^{-8} \text{cm}/\text{s}$ 。流动速度有区域性的差异,并随着时间而变化。

二、细胞质中分子的运动

细胞质有大量的蛋白质,有些蛋白质如肌动蛋白和微管蛋白是构成细胞骨架的主要组分,这对细胞的运动非常重要。近几年来,FPR技术结合荧光类似物细胞化学探针(Fluorescent analog cytochemistry, FAC),标记法,用于胞内蛋白质和骨架的动力学检测。

1. 细胞质内蛋白质的扩散 通过显微注射和红细胞介导等方法将荧光标记的多种蛋白质如荧光素标记牛血清蛋白质(F-BSA)等注入各种细胞中。测量结果,注入蛋白质的扩散系数大多数为 $10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}(25^\circ\text{C})$ (表2)^[18]。

实验证实,扩散系数大小与细胞的能量代谢、标记分子的分子量无关,而主要受胞质粘

表2 细胞质内蛋白质的扩散系数^[18,19]

细胞类型	荧光探针	分子量	$D \times 10^8, \text{cm}^2/\text{s}$	温度 $^\circ\text{C}$
鸡砂囊细胞	F-BSA	68,000	0.6	37
	Rh-G-actin	43,000	0.3	37
人成纤维细胞	F-BSA	67,000	1.7	25
	F-Ovalbumin	45,000	3.5	25
海胆卵	F-BSA	68,000	~ 9.2	25
	F-Tubulin	110,000	~ 7.5	25
阿米巴	F-BSA	68,000	~ 40	25
	F-G-actin	43,000	$\sim 10-50$	25
肝癌细胞	F-BSA	67,000	1.0	23

滞度控制。通过修正的 Stokes-Einstein 方程, 计算出肝癌细胞质的粘滞度为 6.6 cP, (23°C)^[19]。用 Video FPR 测定出海胆卵蛋白质的粘滞度大约是水的 8 倍(水粘滞度是 1 cP, 20°C)^[20]。

2. 微丝中肌动蛋白(actin)的动力学 Kreis 等^[21]用纯化的罗丹明标记的 actin 注入鸡胚砂囊细胞内, 以研究细胞骨架动力学特性。他们用激光漂白罗丹明标记的应力纤维(stress fibers), 然后通过微光电视观察荧光的恢复, 测出标记 actin 的扩散系数为 $(2-3) \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$, 荧光恢复半时为 5—10 分钟, 可动组分小于 20% (在纤维中间区域的 actin 可动组分约 70%)。为此, Kreis 等提出应力纤维中荧光的恢复不是由于 actin 的侧向扩散以及沿着应力纤维进行的线性运动, 而主要是应力纤维与其周围可扩散的 actin 之间的化学反应引起的, 所以即使象骨架那样的稳定结构, 它还是在聚合和解聚的稳态平衡中。以上实验结果以后为 Wang Yu-Li^[22]所证实。用罗丹明-phalloidin (Rh-pha) 标记 3T3 细胞的 actin, 在应力纤维中的荧光恢复半时约为 8 分钟。

此外, Wang Yu-Li 通过图像增强荧光显微术检测了 3T3 细胞分裂时收缩环的快速连续运动。记录表明, 在胞质分裂中间阶段 (mid-cytokinesis) 收缩环的荧光强度达到最大, 几乎 30% Rh-pha 位于靠近赤道平面区域, 推测是荧光强度的集合所引起, 随后荧光强度逐步减小。胞质分裂即将结束时, 荧光纤维又重新出现在整个胞质中。这些结果提出 Rh-pha 标记 actin 纤维可参与收缩环的连续运动, 进行重新装配、解聚。

3. 微管的动力学 微管在有丝分裂过程中的作用早为人们所注意。按微管踏车模型 (treadmilling model) 解释^[23], 在有丝分裂中期微管蛋白亚基从半纺锤体中连续均匀地向极区流动, 染色体也向纺锤体极区移动。以前有人用紫外光照射纺锤体发现被照射区是向极区移动的, 但紫外线对纺锤体有损伤作用, 而 FPR

避免了这种缺点。为此, Wadsworth 和 Salmon 将荧光标记的微管蛋白注入 BSC-1 细胞使纺锤体标记, 然后用激光漂白, 在微光电视下监视漂白区的运动。图 1 是激光线形漂白荧光图像预测踏车模型机制的图解。在赤道区, 箭头表示微管蛋白亚基在位点上掺入纺锤体微管, 在极区则为微管蛋白亚基拆卸(图 1A)。激光线形漂白区垂直于纺锤体长轴, 其宽度为 1.6 μm 横跨于半纺锤体区域(图 1B)。在漂白区域的荧光恢复时, 没有发现线形荧光图像有任何易位(图 1C), 大多数细胞在 2 分钟内达到荧光恢复, 荧光恢复率约为 70%, 这与 FPR 测量的结果相符合, 从而否定了踏车模型。

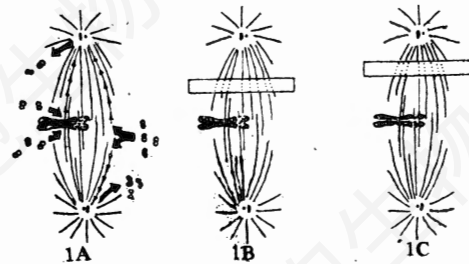


图 1 激光漂白荧光图像预测微管踏车模型的图解^[23]

纺锤体是由许多微管组成, 单根微管的动力学过程又是怎样的呢? Sammak 等^[24]用荧光素标记微管蛋白注射至人成纤维细胞内, 然后进行光漂, 经过不同时间固定, 用荧光素标记的抗微管蛋白抗体和免疫荧光间接法染色后, 带有荧光素的微管漂白后则不再与上述荧光素标记的抗体结合, 从而可分别测定单根微管纤维。这方法可直接检测漂白区域中微管的动力学过程。各根微管纤维荧光的恢复不是同时的和均匀的, 这符合于非稳态动力学模型 (dynamic instability model) 的推测, 即假设微管蛋白在微管末端的交换, 微管的生长和缩短是同时存在的。

三、结束语

应用 FPR 技术已在细胞生物学研究领域

中取得了一些引人注目的结果。据粗略统计,发表的有关文献有百篇以上,而且召开了FPR技术应用于细胞生物学的国际讨论会^[4]。国内的一些单位于1982年前后也开展了FPR工作。目前,FPR技术已应用于测定荧光标记分子在各种系统的侧向扩散,除测定细胞膜和人工膜之外,还可用于细胞质分子、核膜透性、Na⁺通道、细胞融合、染色体运动和溶液中蛋白质分子聚合作用的动力学变化等方面的测定。从本文所述也可以看出FPR已发展成为测定生物膜流动性的方法之一。有关FPR对细胞的影响,以前尚有争议,主要是激光可能对细胞产生损伤效应,从而影响FPR结果。损伤作用可能来源于热效应和光化学效应^[11]。为此,许多人已作了一系列实验进行论证,或者用不同方法测定同一样品作类比印证。结果表明,FPR的结果是可信的,光漂所引起的人为影响是可以避免的。另一方面,荧光探针对膜结构的干扰可以认为是外源标记物对被标记分子运动的影响,使FPR测得的扩散系数偏低。这说明FPR测量还有其局限性。最近几年,随着现代光电技术和电子计算机技术的结合与开发,使FPR技术和装置又有了改进和创新,正在向多用途和多功能的数字荧光显微术(Digitized Fluorescence Microscopy, DFM)的方向发展,并已形成了一系列方法,可统一组建于同一个激光显微术系统。这种系统装置具有检测灵敏度高,可从分子和细胞水平上快速地定量检测活细胞荧光图像的分子运动和分布图,获得有关的空间和时间动力学,在细胞生物学和医学研究领域内有着潜在的应用前景。

摘 要

荧光漂白恢复(FPR)技术已发展成为定量测定细胞膜分子的流动性的方法之一。本文着重介绍了FPR技术应用于测定细胞膜中和细胞质内分子的运动,这些测定将有助于研究活细胞中膜分子的运动方式、功能及其相互关系。

参 考 文 献

- [1] 张孔华,徐成汤,1987,生物化学与生物物理进展,3:36—40.
- [2] Axelrod, D. et al., 1976, *Biophys. J.*, 16: 1055—1069.
- [3] 张孔华等,1982,细胞生物学杂志,4(3):36—40.
- [4] Jacobson, K. et al., 1983, *Fed. Proc.*, 42: 72—79.
- [5] Hughes, B. D. et al., 1982, *Biophys. J.*, 37: 673—676.
- [6] Jacobson, K. et al., 1987, *Ann. Rev. Physiol.*, 49: 163—175.
- [7] Jacobson, K., 1983, *Cell Motility*, 3: 367—373.
- [8] Tsuji, A. and Ohnishi, S. 1986, *Biochemistry*, 25: 6133—6139.
- [9] 林克椿等,1987,生物物理学报,3(4):429—440.
- [10] de Latt, S. W. et al., *Physiology of Membrane Fluidity*, V. 2, pp. 21—51. 1984.
- [11] 孙伟利,1982,实验生物学报,15: 209—218.
- [12] Dictus, W. et al., 1984, *Dev. Biol.*, 101: 201—211.
- [13] Tetteroo, P. A. T. et al., 1984, *Dev. Biol.*, 104: 210—218.
- [14] 顾国彦等,1983,实验生物学报,16: 467—476.
- [15] 徐成汤等,1984,实验生物学报,17: 471—481.
- [16] Ku Kuo-Yen(顾国彦)等,1988, *Cell Biol. Int. Rep.*, 12: 175—187.
- [17] Koppel, D. E. et al., 1982, *J. Cell Biol.*, 93: 950—960.
- [18] Jacobson, K. and Wojcieszyn, J., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 6741—6751.
- [19] Lang, I. et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1183—1190.
- [20] Salmon, E. D. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 99: 2157—2164.
- [21] Kreis, T. E. et al., 1982, *Cell*, 29: 835—846.
- [22] Wang Yu-Li, 1987, *J. Cell Biol.*, 105: 2811—2816.
- [23] Wadsworth, P. and Salmon, E. D., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1032—1038.
- [24] Sammak, P. J. et al., 1987, *J. Cell Biol.*, 104: 395—405.