

表 2 移植胚胎的存活率

实验次数	小鼠品系	移植胚胎数		养母数	产仔数	
		聚合的桑椹胚或胚泡	对照桑椹胚或胚泡		黑嵌合体	白色小鼠
1	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	10	0	1		6
2	昆明白♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	4	6*	1	2	5
3	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	20	0	1		10
4	C ₅₇ 黑♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	10	0	1	2	2
总数		44	6	4	4	23

* 因本次实验仅有 4 个聚合胚泡, 不足以移至一只小鼠, 故在一侧移植了来自白色小鼠的未经聚合的胚泡 6 个。

参 考 文 献

- [1] Tarkowski, A. K., 1961 *Nature, Lond.*, 190: 857—60.
- [2] Tarkowski, A. K., 1963 *J. Natl. Cancer Inst Monograph*, 11: 51—57.
- [3] Mintz, B., 1964 *b. J. Exp. Zool.*, 157: 85—100.
- [4] Mintz, B., 1971 *Allophenic mice of multi-embryo origin*, *Methods in Mammalian Embryology*, W. H. Reeman and Company San Francisco.
- [5] Mintz, B. Gearhart, J. D. et al. 1973 *Dev. Biol.* 31: 195—9.
- [6] Nicholson, G. L., Yanagimachi, R. et al., 1975 *J. Cell Biol.* 66: 263—274.

一台自制的激光漂白荧光恢复测量装置*

张孔华 孙伟利 张伯新

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

细胞表面的蛋白质是能够侧向运动的, 那末, 它的运动方式是扩散还是流动? 如果是扩散, 它的扩散系数是多少? 1974年蒲慕明等用光漂恢复法测出了视网膜视杆外节盘膜中视紫红质的扩散系数^[1]。同年, Peters等利用荧光素能被光漂以及异硫氰基荧光素能与膜蛋白结合的特点, 测定了红细胞膜蛋白的扩散系数^[2], 从而扩大了光漂恢复技术的应用范围。以后, Jacobson等又改用了激光光源, 改为激光漂白恢复测定(fluorescence photobleaching recovery, 简称FPR)或称荧光漂白后恢复测定(fluorescence recovery after photobleaching 简称FRAP)^[3]; 并在理论上进行了分析^[4]和探讨了激光可能引起的生物效应^[5], 使这一方法渐趋完善和可信, 因此应用的

人也逐渐增多。但目前这种装置还没有商品出售。我们根据以下原理完成了本装置**。

基本原理

FRAP方法的基本原理参见图1。先将待测细胞的表面特定物质用荧光标记, 洗去多余的荧光物质。选择适当的激光束波长通过显微镜聚焦在待测细胞表面的一个小区域上。光电倍增管测出标记荧光的荧光强度, 即原始荧光, F_i 。接着用强激光脉冲(光漂脉冲)在瞬时, T_B , 内照射上述小区域以破坏其荧光。光漂脉冲结束时该区域荧光强度降为 F_0 , F_0 的大小显然与漂白程度有关。测定区域的荧光由于该区域内外标记物质的彼此随机扩散运动而逐渐恢复, 最终趋于 F_{∞} , 恢复过程即告完成。

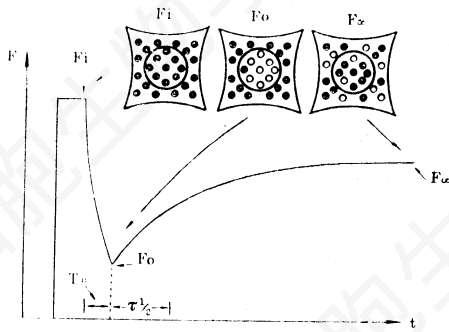


图1 用FRAP方法测定活细胞表面荧光标记成分侧向运动的图解

四边形表示细胞表面的一个部分细胞表面激光照射，区域用大圈表示，细胞表面未经漂白的荧光分子用小黑圈表示，漂白后用小白圈表示。 F_1 , T_0 , F_0 , F_∞ 的定义见文中说明。

由于光漂过程是不可逆的，荧光恢复过程明显地反映了荧光标记物质及其结合物的运动。从理论上说，这种复合分子运动可能是几种运动的合成，如分子自身的随机运动，细胞膜的运动以及整个细胞的移动等。根据恢复曲线的形状，可以确定运动的类型是属于流动还是扩散。扩散过程用荧光恢复至一半所需时间， $\tau_{1/2}$ ，来表征，即 $t = \tau_{1/2}$ 时， $F = \frac{F_\infty + F_0}{2}$ 。

恢复过程还与测量区域的大小有关。测量区域大小用激光束的束腰， W_s ，来表示。 W_s 定义为样品平面上激光束中心至强度为中心 $\frac{1}{e^2}$ 处的距离。为了使实验情况更符合理论分析的条件， W_s 相对于细胞表面积来说应该足够的小，一般取 W_s 为 $1-3\mu\text{m}$ 。荧光标记物质及其结合物的扩散系数 D ，可由 Axelrod 等人提供的表达式给出^[4]。 $D = \frac{W_s^2}{4\tau_{1/2}} \gamma$ 。式中 γ 是一常数，其大小由漂白量 K 决定。 K 值则可根据下式求出， $F_0 = F_1 K^{-1} (1 - e^{-K})$ 。在恢复曲线中 F_∞ 常低于 F_1 ，即恢复不完全。这是表示在测量区域中有一部分被荧光标记的分子是相对不动的，其它未经漂白的荧光分子无法占位。表面不动分子的比例，即恢复率 $R\%$

$$= \frac{F_\infty - F_0}{F_1 - F_0} \times 100\%$$

实验装置

本装置由光学和电子两部分以万用显微镜 NU2 为中心组装而成。实物见图 2 上，系统方框图见图 2 下。

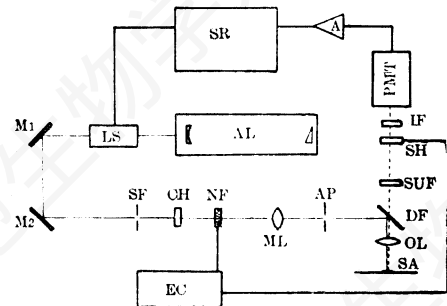
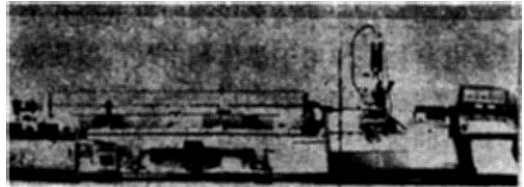


图2上 激光漂白荧光恢复测量装置

图2下 激光漂白荧光恢复测量装置方框图

AL, 氩离子激光器, LS, 激光稳定器; M_1 , M_2 , 反射镜; SF, 空间滤波器; CH, 斩波器; NF, 中性滤色镜; ML, 匹配透镜; AP, 光阑; DF, 二向色镜; OL, 物镜; SA, 样品; SUP, 抑制滤色镜; SH, 电磁阀驱动快门; IF, 干涉滤色镜; PMT, 光电倍增管; A, 放大器; SR, 记录仪; EC, 电子定时装置。虚线所示为发射荧光，细实线为激发光

用 YJ-1 氩离子激光器(上海亚明灯泡厂出品)作为激发光束及漂白脉冲的光源，它能

* 本文曾于 1981 年 9 月在上海激光学会年会上宣读。

本工作承顾国彦同志关心，厉梅芳同志赠送 FITC-ConA。谈曼琪和张志鸿两同志提出了许多宝贵意见，均此致谢。

** 北京医学院和北京肿瘤研究所也各自装置了激光漂白荧光恢复测量装置并已投入使用。

产生 450—515nm 光谱范围内六条谱线之中的任一条, 旋动激光器谐振腔的分光棱镜可以选择波长。实验中因为使用异硫氰基荧光素(FITC), 故选择 496.5nm 或 488.0nm 谱线, 并尽量将激光输出光束调整至 TEM₀₀ 模式。由于激光器输出功率不稳定, 因而在激光器输出端安装一个激光功率稳定器(上海计量测试技术研究所制造)。此系统采用铌酸锂电光开关, 用反馈电路控制作用于晶体的电场, 以使激光器的稳定性在一定范围内提高一个数量级。稳定器输出的激光束经反射镜 M₁、M₂ 引入光具座上一系列光学元件, 再进入 NU2 万用显微镜(东德 Zeiss 厂出品)。光具座上装有光阑, 由电子定时装置控制的具有两个功能位的中性滤色镜, 转轮斩波器, 匹配透镜等光学元件。光阑用作空间滤波器, 其功能是改善高斯光束的轮廓并去除高频空间波动。中性滤色镜在两个功能位上能分别产生测量荧光的激发光束和光漂脉冲。为了消除测量荧光时激发光束的漂白作用, 使用转轮斩波器。由于激发光束强度比光脉冲低 10⁴—10⁵ 倍, 激发光束的漂白作用可以忽略不计。透镜(ML, 焦距 460mm) 其功能主要是将位于激光器谐振腔端部的分光棱镜处的原始束腰, W₀, 进行第一次高斯光束变换, 在透镜 ML 与显微镜之间的某个位置可以得到第一次变换的束腰, W₁ 再经过物镜 OL 将 W₁ 变换成样品平面上的激光束的束腰, W_s。

样品面上测量区域发出的发射荧光通过物镜, 二向色镜, 抑制滤色镜和干涉滤色镜, 经过一个由电子定时装置控制的快门, 再由光电倍增管 EMI9789QB(英国 EMI 公司出品) 加以检测。二向色镜把来自激光器的激发光束反射至样品。样品的发射荧光则透过二向色镜。抑制滤色镜用来排除细胞内的自发荧光。用中心波长 5280 Å, 半宽为 100 Å 的干涉滤色镜进行滤色。由于实验在荧光标记后马上进行, 胞饮作用可忽略不计, 这样就基本上保证了测到的荧光为标记荧光素发射的特异荧光。光电倍

增管产生的光电流经一高阻抗集成运算放大器放大送至 XWT 记录仪(上海自动化仪表二厂出品)的一路。光电倍增管及放大器均装于一个密闭的屏蔽罩壳内, 放大器电子线路如图 3 所示。光电倍增管由一负高压电源供电, 放大器则由一正负 15V 的直流稳压电源供电。为了测定激光器的稳定程度, 用 XWT 记录仪的另一路记录来自激光功率稳定器的采样信号, 以监视实验曲线。

为了进行 FRAP 测量, 光具座上的中性滤色镜和光电倍增管前的快门是由电磁铁驱动而协调动作的, 它们均由一电子定时装置所控制。它可控制激光器输出的光漂脉冲的宽度, 并在光漂脉冲结束的瞬时, 随即打开光电倍增管前的快门以测量荧光恢复过程。

在 FRAP 测量之前, 藉万用显微镜的明视野聚焦样品并将样品待测区移至激光束照射处然后进行 FRAP 测量。先手动开启快门测量原始荧光, 接着按下电子装置启动按钮, 自动发出一个光脉冲(宽度为 300ms—4s 可调)并自动记录荧光恢复过程, 一俟恢复完全, 按下电子定时装置复位按钮, 测定过程即告完成。

模型实验

为了证实本装置的可靠性, 我们测量了荧光标记的伴刀豆球蛋白 A(F-ConA)在不同浓度的甘油中的扩散系数。

将 15 毫克/毫升的 F-ConA 分别溶于 98% 甘油, 2% 磷酸缓冲盐溶液, 76% 甘油, 24% PBS 和 26% 甘油, 74% PBS(V/V) 三种溶液中。分别各取 32 μl 滴于载玻片并盖上 20mm × 20mm 的盖玻片, 使溶液层厚度达 80 μm。在 26°C 下对三种样品分别进行 FRAP 测量, 物镜为 25 倍, 根据理论计算^[6] W_s 为 1.88 μm, 近似取作 2 μm, 漂白光束功率经上海计量局测试所测定功率为 5mW, 光源脉冲宽度为 500ms, 中性滤色镜衰减倍数为 14000。测定结果见表 1, 实测荧光恢复曲线见图 4、5、6。上述结果与国外已发表的结果基本相符。实验结果均能较好地重复。

不同浓度的 F-ConA 溶于相同浓度的甘

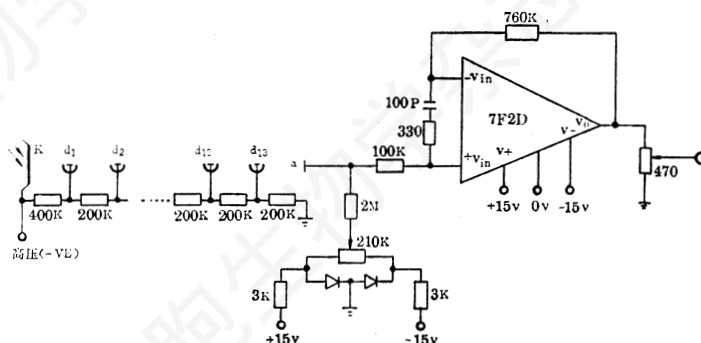


图3 荧光信号检测和放大线路

表1 不同浓度甘油中荧光标记物的扩散系数之比较

右边一列是本文结果, * 参见文献[7], + 参见文献[8]。

$T = 26^{\circ}\text{C} \quad \delta = 80\mu\text{m}$			
甘油%	$D_{\text{Fab}}^* \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$	$D_{\text{S-ConA}}^+ \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$	$D_{\text{ConA}} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$
26	$(12.27 \pm 0.54) \times 10^{-9}$	12×10^{-9}	$(11.81 \pm 0.22) \times 10^{-9}$
76	$(2.2 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	3.7×10^{-9}	$(3.87 \pm 0.59) \times 10^{-9}$
98	$(0.5 \pm 0.15) \times 10^{-9}$	0.7×10^{-9}	$(0.74 \pm 0.12) \times 10^{-9}$

油溶液中测得的结果相同。这说明恢复过程与 F-ConA 的浓度不怎么相关。

值得提出的是当甘油溶液层厚薄不一时, 测量结果相差甚为悬殊, 因此测定中须尽可能准确地控制其厚度便与其它实验结果在相同条件下作比较。测定过程中荧光恢复达不到 F_i , 恢复率在 90% 左右, 这可能是贴近玻片处的甘油溶液中的 F-ConA 分子有粘附的情况, 因为原点重复 FRAP 测量时, 该点的荧光恢

复率增高了。

Saffman 和 Delbrück 曾对膜蛋白的流动性作过理论分析^[9], 认为分子大小对其侧向运动影响不大, 扩散系数主要决定于介质的粘度。在此前提下, 我们将模型实验的结果与前人已发表的数据作比较。比较表明, 在相同甘油浓度下, 我们所用的 F-ConA 与前人所用的荧光标记琥珀酰伴刀豆球蛋白 A (F-S-ConA) 及荧光标记免疫球蛋白 Fab 具有相近的扩

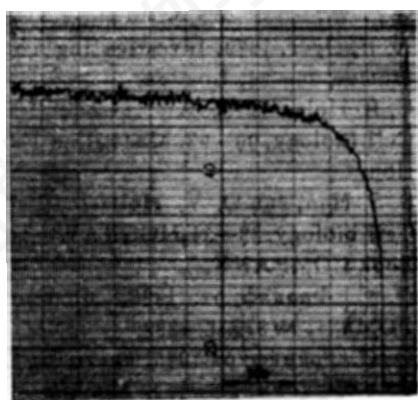


图4 F-ConA 在 26% 甘油溶液中光漂荧光恢复曲线, $T = 26^{\circ}\text{C}$

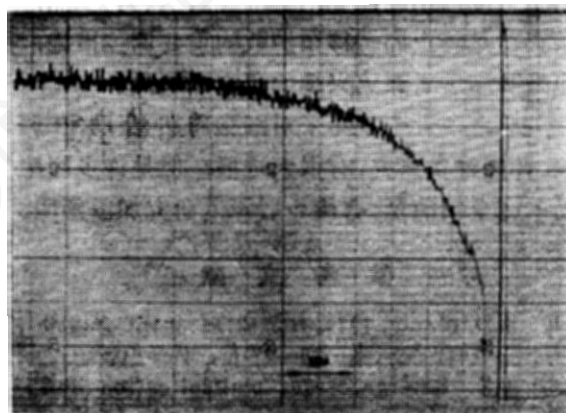


图5 F-ConA 在 76% 甘油溶液中光漂荧光恢复曲线, $T = 26^{\circ}\text{C}$

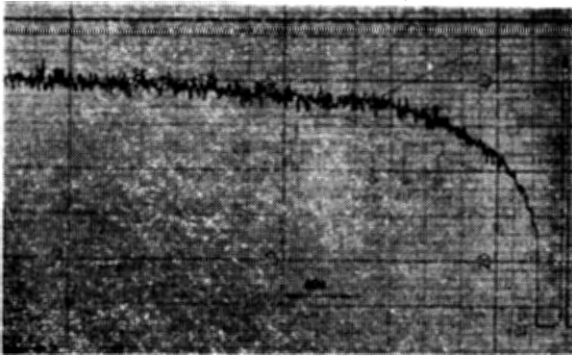


图6 F-ConA在98%甘油溶液中光漂荧光恢复曲线, $T = 26^{\circ}\text{C}$

散系数。从而证实了本仪器的可靠性。

我们已用此装置测定了肿瘤细胞表面伴刀豆球蛋白受体的侧向运动^[10]。

参 考 文 献

- [1] Poo, M-m. (蒲慕明) and R. A. Cone, 1974. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature*, 247: 438—441.
- [2] Peters, R., J. Peters, K. H. Tews, and W. Bähr, 1974. A Microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 367: 282—294.
- [3] Jacobson, K., Z. Derzko, E-S. Wu, Y. Hou, and G. Poste, 1976. Measurement of the lateral mobility of cell surface

(上接封三页)

肿瘤治疗后再次复发和转移的原因。诱发G₀期细胞进入细胞周期,合理使用抗癌药物加以杀灭,是防止癌转移和扩散的重要调控措施,也是肿瘤学者深感兴趣的研究课题。

总之,近十多年来对细胞周期活动和调控,开展许多研究,有很大进展,但是许多问题尚未完全搞清楚,有待今后深入研究加以阐明。

参 考 文 献

- [1] D. Mazia, 1974, 细胞周期。生物科学参考资料,第六集,35—47页,科学出版社。
- [2] R. Baserga, 1976, multiplication and division in mammalian cells, 1—50, Now York and Basel.
- [3] P. L. Atman, Katz, D. D. 1976, Cell

components in single, living cells by fluorescence recovery after photobleaching. *J. Supramol. Struct.* 5: 565—576.

- [4] Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Ebson and W. W. Webb, 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16: 1055—1069.
- [5] Peters, R., 1981. Translation diffusion in the plasma membrane of single cells as studied by fluorescence microphotolysis. *Cell. Biol. Int. Rep.* 5: 733—760.
- [6] Dickson, L. D. 1970. Characteristics of a propagating gaussian beam. *Applied Optics*, 9: 1854—1861.
- [7] Johnson, M. and M. Eddin, 1978. Lateral diffusion in plasma membrane of mouse egg is restricted after fertilization. *Nature*, 272: 448—450.
- [8] Jacobson, K., E. Wu, and G. Poste, 1976. Measurement of the translational mobility of concanavalin A in glycerol-saline solutions and on the cell surface by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochim. Biophys. Acta*, 433: 215—222.
- [9] Saffman, P. G. and M. Delbrück, 1975. Brownian motion in biological membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 3111—3113.
- [10] 孙伟利, 1982, 鼻咽癌上皮细胞表面 ConA 受体复合物侧向运动的研究。实验生物学报, 15: 209—218.

biology(I), 11—14, Bethesda, Maryland.

- [4] D. M. 普列斯谷脱, 1976, 真核细胞的繁殖。孙伟成等译。1980年。科学出版社出版。
- [5] A. F. Dyer, 1979, Investigating chromosomes, 29—34, London.
- [6] C. B. Hole, 1979, An Introduction to Cell Biology, 90—93, Macmillan Education.
- [7] S. S. Han, Jan O. V. Holmstedt, 1979. Cell biology, 33—34, MCGRAW—HILL Book COMPANY.
- [8] O. C. Франкфурт, 1965, цитология, ГОМVII, №3, 386—398.
- [9] O. C. Франкфурт, 1975, клеточный цикл в опухолях, 6—110, Москва «Медицина».
- [10] 太田行人, 岡田节人, 岡田善雄编。1975。细胞の構造と機能Ⅱ, 177—196。岩波書店。