

或蛋白质合成的能力有关；而胞质中各种结构成分的体密度，也反映了细胞的生物学特征。在研究细胞形态变化时，首先求出细胞的全部体密度数值，得到最基本的定量资料，这对客观地准确地分析细胞，无疑是很有意义的。

2. 体密度是无量纲的比值，不包含细胞结构绝对大小的数值。用不同的方法做细胞包埋块，可能有不同程度的收缩，但由于体密度是相对值，基本上不受收缩的影响。不同的实验室做出的结果可以互相比较，有利于资料的积累与整理。

3. 把细胞的体密度特征参数绘制成图，更加形象化，图1是LACA小鼠正常肝细胞的体密度图。其绘制原则是：核与细胞的大小，以相对的球径为比例。球径比等于体积比的三次方根，这里就是核的体密度的三次方根。胞质中各结构成分的体密度，用扇形面积的大小代表。这种作图法，相当于把细胞与细胞核按同体积原则变换为同心球，胞质中各种结构成分分类集中成桔瓣状，然后通过赤道作截面所得出的结果。

对各种细胞的体密度特征参数进行分析比较，有可能找到细胞结构的一些规律，但这有待于资料的积累。

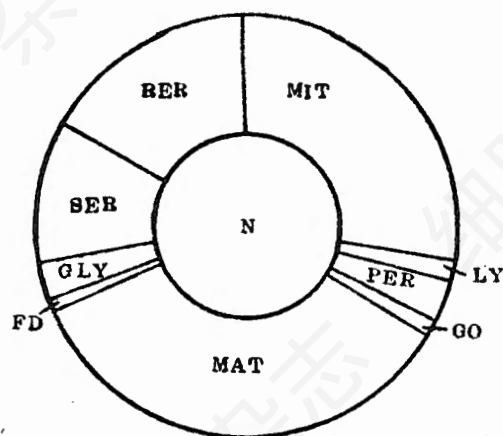


图1 细胞的体密度特征参数图

图中符号：N—核，MIT—线粒体，LY—溶酶体，PER—微体，GO—高尔基体，MAT—基质，FD—脂滴，GLY—糖原，SER—滑面内质网，RER—粗面内质网

参考文献

- [1] David, H. 1977. Quantitative Ultrastructural Data of Animal and Human Cells, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. New York.
- [2] Weibel, E. R. 1979. Stereological Methods Vol. 1: Practical Methods for Biological Morphometry, Academic Press, London.
- [3] Cochran, W. G. 1977. Sampling Techniques 3rd ed., Wiley, New York.
- [4] 郑富盛等。1983, 中华物理医学杂志, 5(1): 37.

FPR 实验装置的一些改进*

张孔华 徐成汤 蔡永和 张跃远

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

荧光漂白恢复(FPR)技术最初由 Peters 等(1974)提出^[1]，后经 Koppel 和 Smith^[2-4]等加以改进和发展，目前已广泛用于测量细胞膜和人工膜分子的侧向运动。

根据 FPR 原理，我们于 1981 年组装了一台 FPR 测量装置^[5]，并用它测定了人鼻咽癌常温和高温细胞株表面伴刀豆球蛋白受体的侧向扩散系数^[6]。在工作中我们感到实验装置本身

能引起一定程度的系统误差。例如，激光器件的波动性和激光模式，光学元件的不完整性和光电接收器件的噪声等都会降低 FPR 数据的精度。为了进一步提高其精度和灵敏度，完善实验装置，我们对光学和电子系统作了改进。另外，为了提高实验系统的可靠性，采用了 DBJ-Z80 单板微处理机控制实验程序。现分述如下：

一、光学系统

FPR 技术的基本原理：是一束强激光脉冲漂白细胞表面微区域上(小于 10 平方微米)的荧光标记分子，然后经衰减 10^3-10^4 倍的同一激光束监测漂白区荧光浓度不均匀分布的过程，获得荧光漂白恢复动力学曲线，根据曲线可计算出扩散系数(D)或流动速度(V)^[7]。

测量过程中引起扩散系数的一个系统误差是漂白光束和测量光束不能完全重合，从而人为地延长了荧光恢复时间，计算出的 D 偏小。为了使这一步引起的 D 误差小于 10%，Barisaz 提出了测量光束相对于漂白光束的位移 d 值不能超过 $0.3W$ ^[8]。(W 是样品平面上聚焦光束强度为 $1/e^2$ 处的半径)。我们原来的装置是用电磁阀驱动中性衰减片平移插入光学系统以控制光漂和测量光束的衰减比，由于中性衰减片的光学不完整性，如衰减片的楔角和位置取向，均会使在样品平面聚焦的漂白光束和测量光束的重合带来不利影响。据计算要保证 d 小于 $0.3W$ ，中性衰减片的楔角不能大于 16 秒，要加工这种高质量的中性滤片在光学上是困难的。为此，改用了 Koppel^[4] 在多点分析系统提出的光学分束法，如图 1 所示。

氩离子激光器发出的 488nm 激光束，通过一组平行平面玻璃 BS₁ 和 BS₂(平整度 $\lambda/20$ ，平行度 3 秒，厚 6 毫米)组成的测量光束分束器，使激光入射光束分为两束：其中透过的主光束作为漂白光束，由电子快门 SH₁ 控制；另一束是先后在 BS₁ 和 BS₂ 的玻璃-空气分界面上经过四次反射的弱光束作为测量光束，这样总的衰减系数为 10^3-10^4 。为了灵活地控制测量光束的衰减系数，在弱光路中还可固定插入中性衰减片 NF，以减少慢漂白。最后漂白光束与测量光束又重新调整成共轴，经匹配透镜 ML 和 AL₂、二向色镜 DM 引入显微镜聚焦在样品的平面上。AL₂ 是显微镜的辅助透镜，能使激光聚焦点与样品共焦。光阑 D₁ 和 D₂ 可限制杂散光。本装置经激光功率器校验测得漂白和测量

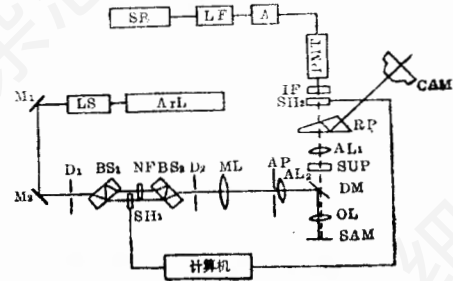


图 1 FPR 实验装置图

AL, 氩离子激光器; LS, 激光稳定器; M₁、M₂, 反射镜; D₁、D₂, 光阑; NF, 中性衰减片; BS₁、BS₂, 平行平板玻璃; ML, 匹配透镜; AP, 可变光阑; AL₁、AL₂, 辅助透镜; DM, 二向色镜; OL, 物镜; SAM, 样品; SUP, 抑制滤片; RP, 反射棱镜; CAM, 照相机; IF, 干涉滤片; PMT, 光电倍增管; SH₁、SH₂, 电子快门; A, 放大器; LF, 低通滤波器; SR, 记录仪。

的光强比为 1:3500。

为了能实时拍摄细胞表面测量区域的照片，实验装置还配备了照相机，照相机位于显微镜的物象平面上，使样品经物镜 OL 和辅助透镜 AL₁ 直接成象于底片上。显微镜的双筒观察目镜与照相机具有互换性。

二、电子系统

一般说来，FPR 技术检测生物样品时，待测的荧光强度是相当微弱的，因为(1)FPR 技术中采用了荧光微探针技术，激发光仅对直径约为 $2\mu\text{m}$ 光斑的微区进行照明，而在这样一个微小的区域内，荧光分子是很少的；(2)在测量时为了避免测量光束对荧光染料产生慢漂白而导致测量误差，测量用的光强度通常是很低的，仅约 $10-100\text{ntw}$ ，再加上荧光量子产额和光学接收系统的损失，待测荧光是很微弱的。据报道，光电倍增管靶面所接收到的光子流甚至低于每秒 10^5 个光子^[9]，这接近直流法测量极限的微弱光了，这样的微弱光在采取一定措施以后，直流法还能够取得十几—几十的信噪比^[10]。

我们知道，对于按高斯分布的光电场，通过光电效应进行检测时，其光电流的功率谱由

三部分组成^[11]：正比于平均光电流的 shot 噪声；和平均光电流的平方成正比的直流成分以及一个场的相关部分。它的功率谱如图 2 所示。

因此在入射光强的时候，光电倍增管的输出波形是一个叠加有交流成份的直流，随着入射光强度的减弱，交流成份渐渐地相对变大，便信噪比下降。从图 2 可以看出，在用直流法进行微弱光检测时，只要压缩通频带就可以有效地降低噪声水平，相对地提高信噪比。因此，我们在原有的光电测量系统中加入了一个截止频率 f_0 约为 4 HZ、截止特性达 26 db/oct 的低通滤波器。此外，在微弱直流信号检测时，系统的慢漂移往往是一个较为严重的问题。为此我们一方面尽量提高光电倍增管的输出，另一方面，把原来的放大器改为电流—电压转换器。光电测量系统如图 3 所示。其中电流—电压转换器由 IC₁(5 G 28) 构成，这样不仅由于电流—电压转换器的输入阻抗和输出阻抗都很低，不易感受外源噪声，而且充分发挥了场效应管输入高增益运算放大器 5 G 28 的失调电流和失调电流漂移小的特点。

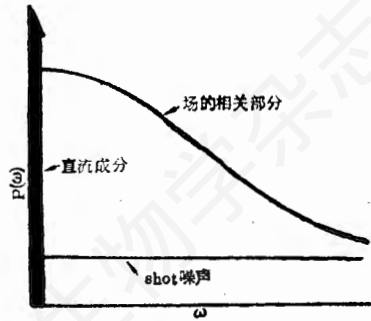


图 2 光电流的功率谱^[11]

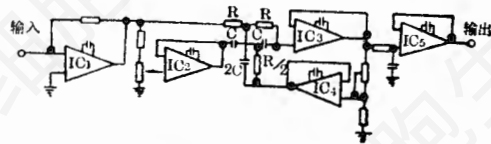


图 3 光电检测系统

为了提高信噪比，必须使信号在测量通带以外取得较大的衰减，采用四个 5 G 28 组成了一个带零传输点的三阶有源低通滤波器，滤波器的传输特性如图 4 所示。图中， $Y = f/f_0$ ，这

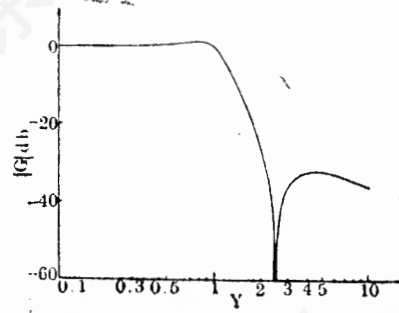


图 4 滤波器的传输特性

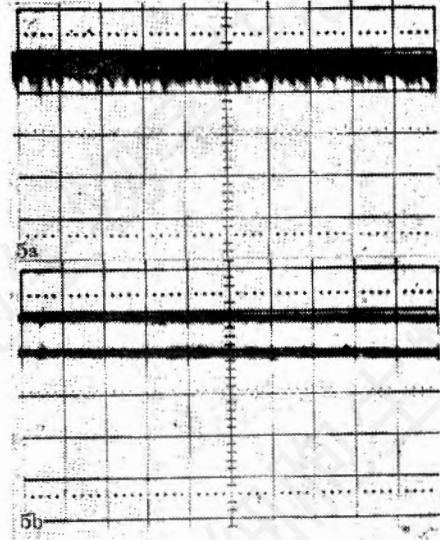


图 5 光电流输出波形图 (X 轴 0.5ms/格, y 轴 10 mv/格) 图 5 (a) 不使用滤波器, 图 5 (b) 使用滤波器

里 $f_0 \approx 4\text{HZ}$ 。

从图 5 可以看出该滤波器具有较强的抑制噪声能力。图 5 (a) 是不使用滤波器的情况。这时光电倍增管的输出波形是在很小的直流上叠加有很高的脉冲；图 5 (b) 是使用滤波器后的情况，可以看到高脉冲都消失了，只剩下平滑的直流成份。

三、实验程序的控制

在 FPR 技术测量实验中，实验装置测量的死时间^[12](即漂白结束和第一次测量时间的间隔)对于快速扩散测量是很重要的。因此测量光束和漂白光束的开启和关闭必须非常精确的谐调，不然既影响测量精度，还可能损伤光电

倍增管。

一般认为在开启漂白光束的同时，应立即关闭光电倍增管的电子快门，而当漂白光束结束的瞬间又应立即开启光电倍增管的电子快门。由于电流驱动的机械快门存在着不可避免的开启和闭合时间迟延，而且不同类型的电流驱动快门之间本身又有较大的离散性，因此在这两个快门之间必须加谐调控制。在实验过程中，我们采用了 DBJ-Z80 单板微处理机(福州电子计算机厂生产)来协调控制电子快门 SH₁ 和 SH₂，测量的死时间为 120 毫秒。经实验使用实行单板机来控制实验，在改变实验程序时由于只须改变软件不需要更动硬件，因此在使用时显得方便和可靠。又考虑到实验过程要求漂白光束的时间选取连续可调，因此时间确定还是由外电路来完成。于是在 DBJ-Z80 单板微处理机和外电路之间通过 Z-80 系列的接口芯片(Z80-PIO)来连接。图 6 和图 7 分别是这一控制部的连接示意图及其控制程序的框图。

四、结 语

用上述改进的 FPR 实验装置与原先装置

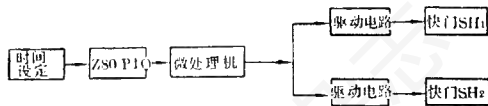


图 6 控制部分的连接示意图

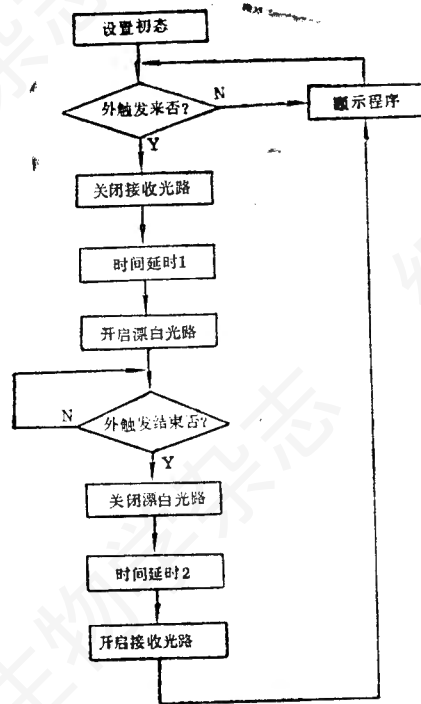


图 7 程序框图

在全部相同的条件下进行了比较模型试验。测量样品是溶于 76% 甘油溶液中的荧光标记的伴刀豆球蛋白(F-ConA)，它们的光漂白荧光恢复曲线见图 8。

改进后的 FPR 实验装置的信噪比较原来的可提高约 5 倍。在信噪比 2:1 情况下，光电接收系统测量荧光(5300 Å)的灵敏度可达到

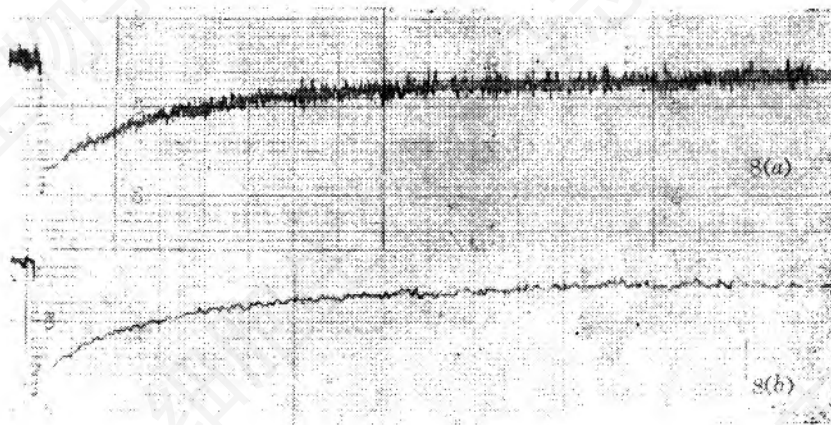


图 8 F-ConA 在 76% 甘油溶液中光漂白荧光恢复曲线
图 8 (a)是原先的系统，图 8 (b)是改进后的系统

$3 \times 10^{-15} \text{W}$ 。此实验装置用于测量林蛙卵表面凝集素受体在卵割前和卵割时的运动^[13]。

参 考 文 献

- [1] Peter, R. J., J. Peter, K. H. Tews, and W. Bahr, 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 367: 282—294.
- [2] Koppel, D. E., D. Axelrod, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb, 1976. *Biophys. J.* 16: 1315—1329.
- [3] Smith, B. A., and H. M. McConnell, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 2759—2763.
- [4] Koppel, D.E., 1979. *Biophys. J.* 28: 281—291.
- [5] 张孔华, 孙伟利, 张伯新。1982。细胞生物学杂志, (3): 36—40。
- [6] 孙伟利。1982, 实验生物学报, 15: 209—218。
- [7] Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb, 1976. *Biophys. J.* 16: 1055—1069.
- [8] Barisas, B. G., 1980. *Biophys. J.* 29: 545—548.
- [9] Schlessing, J., E. L. Elson, W. W. Webb, I. Yahara, U. Rutishauser, and G. M. Edelman, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 1110—1114.
- [10] 清水慶昭, 稻場文男。1973。分光研究, 22: 195—214。
- [11] 藤目智。1974。生物物理14: 9—24。
- [12] Jacobson, K., E. S. Wu, and G. Poste, 1976. *Biochim. Biophys. Acta.* 433: 215.
- [13] 顾国彦, 张孔华, 徐成汤。1983。实验生物学报, 16: 467—476。

* 本文承蒙顾国彦先生指导, 特此致谢。

基础知识

外源环核苷酸与植物细胞分裂、分化的关系

张 述 祖

(北京师范大学生物系)

环核苷酸的细胞生物学意义

近年来大量研究工作表明, 环腺苷酸(c-AMP)与环鸟苷酸(c-GMP)分别是调节控制细胞分化和分裂的物质。1957年 Sutherland 首先发现 c-AMP 的生理效应, 随之 Sutherland 和 Rall 分离与鉴定了该化合物为 3', 5' 环腺苷酸, 并阐明其有激素第二信使的功能。

近几年的研究表明, c-AMP 的作用远远超过动物激素及神经递质第二信使的作用范围, 而具有广泛的生理效应。这些效应大多是通过酶的影响, 经由两种途径来实现的。一方面是对酶活性的影响。在高等动物中, c-AMP 通过激活“蛋白激酶”, 进而催化糖原磷酸化酶、糖原合成酶、脂酶等的磷酸化来调节这些酶的活性。另一方面是通过调节控制基因的表达,

进一步影响某些酶的形成。

通过下列反应生成 c-AMP:



催化这一反应的腺苷环化酶, 存在于一切动物、微生物及某些植物细胞的质膜上。氟化钠能促进它的活性; 四氧嘧啶可抑制其活性。

c-AMP 在机体内经下列反应分解:



催化这一反应的磷酸二酯酶可被甲基黄嘌呤类化合物(如咖啡因、茶碱等)所抑制; 胰岛素等能促进它的活性。细胞内 c-AMP 的水平决定于腺苷环化酶和磷酸二酯酶的活性大小, 也就是决定于 c-AMP 生成和分解之间的相互关系。