(1)

(2)

94:464-468.

- [4] Langlois R. G. et al., 1980, Chromosoma 77: 229-251.
 - [5] Atten J. et al., 1980, in"Flow Cytometry

IV" pp 287-292 eds O. D. Laerum et al: Universitetsfortaget Bergen-Oslo-Tromso.
[6] Sillar, R. & B. D. Young., 1981 J. Histo. and Cytochem. 29: 74-78.

FPR 实验结果的计算机分析

徐成汤 张孔华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自 1976 年 Axelrod 等人^[1]首先建立了荧光漂白恢复(简称 FPR)理论以来,该理论已被广泛用 于研究细胞膜中脂类和蛋白质的侧向运动^[2,3]。我们实验室于 1980 年建立了 FPR 实验装置^[4],并 测定了鼻咽癌细胞膜表面受体的扩散系数^[5],和研究了林蛙卵表面受体的运动方式^[6,7]。在数据 处理过程中,感到漂白后的初始荧光强度 $F_k(0)$ 、漂白后荧光恢复的渐近值 $F_k(\infty)$ 以及漂白参量 K 的不确定性均会增加实验结果计算的误差。Yguerabide^[8]首先注意到了这一问题,提出了减小计 算误差的线性化方法。并指出,对于高斯分布光束,在荧光恢复是单一扩散(无流动)时,在一定 的条件下,倒易函数(reciprocal function)R(t) = $F_k(\infty)/[F_k(\infty) - F_k(t)]$ 和时间 t 的关系非常接 近于直线,且该直线的截距与斜率之比等于荧光恢复到全部恢复值 $F_k(\infty)$ 的一半 所需的时间 $\tau_{1/2}$; 扩散系数 D 可以通过 D = $\beta\omega^2/4 \tau_{1/2}$ 来求得(其中 β 是一个限定参数、 ω 是聚焦激光束的有效半 径)。Van Zoelen 等人^[6]又在他的基础上指出,可以用一个参考荧光强度 F_{Reft} 来代替 $F_k(\infty)$,从 而消除了 $F_k(\infty)$ 不确定性的影响。

我们在数据处理时采用了多元非线性优化法,对 $F_k(\infty)$ 、K和 τ_b 进行拟合。这样不仅提高了数据处理的精度,而且在实验中毋需测量 $F_k(0)$ 和 $F_k(\infty)$ (事实上是测量不到的),从而能缩短测量时间,降低对实验装置的要求。本文通过对理论模拟函数、甘油薄层实验数据以及林蛙卵细胞 腹实验数据的拟合处理,表明了这一数据处理方法的实用性。

原理和方法

关于 FPR 实验方法的理论在此不予赘述,详情可参阅文献[1]。对于激光光束为高斯分布的单一纯扩散过程, 荧光强度的恢复和时间 t 的关系由下式给出^[1]

$$F_{k}(t) = F_{i} \sum_{n=0}^{\infty} [(-K)^{n}/n!][1+n(1+2t/\tau_{D})]^{-1}$$

其中, $\tau_D = \omega^2/4 D$, 是特征扩散时间

ω: 激光光束的强度降到中心强度 1/e² 处的半宽

D: 荧光标记分子的侧向扩散系数

Fi: 漂白前的原始荧光强度

K: 漂白参量, 它和剩余荧光率 η 有关, 又和漂白后的初始荧光强度 $F_k(0)$ 有关

$$F_{k}(0)/F_{i} = (1 - e^{-k})/K$$

对于荧光不能完全恢复的情况: 假设激光束对荧光标记分子的可动组分和不动组分都具有相同的漂白率,则 F_k(t)可由下式表示

细胞生物学杂志

$$F_{k}(t) = [F_{k}(\infty) - F_{im}] \sum_{n=0}^{\infty} [(-K)^{n}/n!] [1 + n(1 + 2t/\tau_{D})]^{-1} + F_{i}$$

其中, F_k(∞)为当t 趋于∞时 F_k(t)的渐近值

Fim 为漂白后荧光分子中不动组分的剩余荧光强度

各参量间的关系示于图1。

将实验数据和式(3)的理论表达式进行拟合,使实验数据 yi 和理论函数 fi(X)的方差 S(X)为最小[10]

$$\mathbf{S}(\mathbf{X}) = \sum_{i=1}^{n^2-1} [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}_i(\mathbf{X})]^2$$

其中, X 是拟合参量的集合, X = $\{x_0, x_1, \dots x_{m-1}\}$, m 是 待拟合参量数, n' 是数据数。

为了用数值计算法求满足 S(X) 最小的 X, 必须求解方 程组

$$\sum_{k=0}^{m-1} \frac{\partial^2 S}{\partial x_j \partial x_k} (x_{i+1} - x_i)_k = -\frac{\partial S}{\partial x_j}$$
(5)

j=0, 1, …, m−1

x,是等1次迭代后的近似解,而

$$-\frac{\partial \mathbf{S}}{\partial \mathbf{x}_{j}} = 2 \sum_{i=0}^{n^{r}-1} \frac{\partial \mathbf{f}_{i}}{\partial \mathbf{x}_{j}} [\mathbf{y}_{i} - \mathbf{f}_{i}(\mathbf{X})]$$
(6)

$$\frac{\partial^2 S}{\partial x_j \partial x_k} = 2 \sum_{l=0}^{n^2-1} \left[\frac{\partial f_l}{\partial x_j} \frac{\partial f_l}{\partial x_k} - \frac{\partial^2 f_l}{\partial x_i \partial x_k} \{ y_l - f_l(\mathbf{X}) \} \right] (7)$$

$$j = 0, \ 1, \ \cdots, \ m-1$$

$$k = 0, \ 1, \ \cdots, \ m-1$$



图 1 荧光漂白恢复的理论模拟函数曲线

原始荧光强度 F_i 为 2;可动组分和不动组 分之比为 1; K=4, $F_k(\infty)$ 和 F_{im} 见上; $F_k(0)$ 为漂白后初始荧光强度。

显然,为了解方程组(5),必须求理论函数的二次微商。理论函数是一个如式(3)所示的无穷级数。我们采用了可 以忽略函数二次微分项的高斯一牛顿法。这样方程(5)就变为

$$\sum_{k=0}^{m-1} \sum_{i=0}^{n'-1} \left[\frac{\partial f_i}{\partial x_j} \frac{\partial f_i}{\partial x_k} \right] (\Delta \mathbf{x}_i)_k = \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\partial f_i}{\partial x_j} [\mathbf{y}_i - f_i(\mathbf{X})]$$

$$j = 0, \ 1, \ \cdots, \ m-1$$

$$(\Delta \mathbf{x}_i)_k = (\mathbf{x}_{e+i} - \mathbf{x}_e)_k$$

$$\mathbf{J}(\mathbf{x} \in \mathbf{x}_{e+i} - \mathbf{x}_e)_k$$
(8)

对于我们的情况,具体的方程组为

$$\mathbf{A} \cdot \Delta \mathbf{X} = \mathbf{B}$$

 $\left[\frac{\partial F_{k}(t_{l})}{\partial v_{D}}\right]\left[\frac{\partial F_{k}(t_{l})}{\partial F_{k}(\infty)}\right]\sum_{i=0}^{n'-1}\left[\frac{\partial F_{k}(t_{l})}{\partial v_{D}}\right]\left[\frac{\partial F_{k}(t_{l})}{\partial K}\right] \qquad \sum_{i=0}^{n'-1}\left[\frac{\partial F_{k}(t_{l})}{\partial v_{D}}\right]^{2}$

$$\sum_{i=0}^{n'-1} \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial F_{k}(\infty)} \right]^{2} \qquad \sum_{i=0}^{n'-1} \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial F_{k}(\infty)} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial K} \right] \qquad \sum_{i=0}^{n'-1} \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial F_{k}(\infty)} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial V_{D}} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial V_{D}} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial F_{k}(\infty)} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial F_{k}(\infty)} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial K} \right]^{2} \qquad \sum_{i=0}^{n'-1} \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial K} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial V_{D}} \right] \left[\frac{\partial F_{k}(t_{i})}{\partial V_{D}} \right] \qquad (10)$$

(9)

这里

(3)

(4)

	$\left(\sum_{i=0}^{n'-1} \frac{\partial F_k(t_i)}{\partial F_k(\infty)_i} [F_k'(t_i) - F_k(t_i)]\right)$
B =	$\sum_{l=0}^{n'-1} \frac{\partial F_k(t_l)}{\partial K} [F_k'(t_l) - F_k(t_l)]$
	$\sum_{i=0}^{n'-1} \frac{\partial F_k(t_i)}{\partial v_D} [F_k'(t_i) - F_k(t_i)]$
	$\Delta \mathbf{X} = \begin{pmatrix} \Delta \mathbf{F}_{\mathbf{k}}(\infty) \\ \Delta \mathbf{K} \\ \Delta \mathbf{X}_{\mathbf{k}} \end{pmatrix}$

式中, $v_D = 1/\tau_D$

 $F_k(t_i) = F_k(t_i, F_k(\infty), K, v_D)$, 即理论函数式(3)。

F₄(t₁)是实验数据,即时刻 t₁的荧光强。度由式(3)可以求得

$$\frac{\partial F_k(t_1)}{\partial F_k(\infty)} = \sum_{n=0}^{\infty} \left[(-K)^n / n_1 \right] \left[1 + n(1+2\nu_D t) \right]^{-1}$$
(13)

$$\frac{\partial F_{k}(t_{1})}{\partial K} = \left[(F_{k}(\infty) - F_{im})/K \right] \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot \left[(-K)^{n}/n_{1} \right] \left[1 + n(1 + 2\nu_{D}t)^{-1} \right]$$
(14)

$$\frac{\partial F_{\mathbf{k}}(t_{1})}{\partial v_{\mathbf{D}}} = -2 t [F_{\mathbf{k}}(\infty) - F_{\mathrm{im}}] \sum_{\mathbf{n}=0}^{\infty} \mathbf{n} \cdot [(-K)^{\mathbf{n}}/\mathbf{n}] [1 + \mathbf{n}(1 + 2v_{\mathrm{D}}t)]^{-2}$$
(15)

这样,我们用计算机通过迭代求解方程组(9),就能求得在给定控制误差下的拟合参量 $F_k(\infty)$ 、K、 v_D ,而最终求得扩散系数。与此同时还可求得不动组分百分数、漂白率和 $F_k(0)$ 。在所用的程序中, $F_k(\infty)$ 、K、和 v_D 的控制 误差均选为 0.01。图 2 给出了程序的流程图。

为了防止发散并尽量不使拟合速度下降,在程序设计上采取了两个措施,(1)设置了人机会话试解判断程序, 以便于选择较合理的试解,(2)在经过每次迭代,获得修正矢量{ $\Delta F_k(\infty)$, ΔK , Δv_D }后,都要进行一次一维搜 索,以找到沿修正矢量方向的S曲面的极小值,来确定修正步长。这里选用了 0.618 法^[11]进行一维搜索。

实验与结果

我们从两个方面验证了本方法。(1)根据式(3)设计了一个理论模拟函数,由本程序进行拟合,(2)测定了异 硫氰基荧光素标记的伴刀豆球蛋白 A(F-ConA)*在 76%甘油浓度(V/V)中的扩散系数。

一、模拟函数

该函数的参量为, K=4, F_i=2, τ_D =18, 可动组分和不动组分之比为1。对应于激光光束为 高斯分布的单一纯扩散过程的不完全恢复扩散。该函数的 F_k(t)~t/ τ_D 曲线示于图1。验证时, 对 F_k(∞)、K、 τ_D 分别偏离±20%进行拟合。拟合结果示于表1。可以看到, 拟合值和理论函数值之间的偏差在0.2%以内。

二、F-ConA 在甘油薄层中的扩散

样品制备 用微量注射器把 24.2 μl, 浓度为 3 μM 的 F-ConA 甘油溶液滴于载玻片上, 然后将 22×22 mm² 的盖玻片覆盖其上, 从而使甘油薄层厚度为 50 μm。静置于干燥缸内 12 小时待用。

实验条件 氩离子激光器(中国科学院电子学研究所制)光强稳定度优于 2%, 波长 4.880Å, 单模, 光斑半径 1.7±0.04 µm(物镜 25×), 光漂功率≤1 mW, 光漂时间 100 ms, 温度 22℃。

* 由厉梅芳同志提供。

(11)

(12)

细胞生物学杂志

夷

] 建论模拟函数的拟合结果	理论模拟函数的拟合	结果
---------------	-----------	----

				• • • • • • • • • • • • •			
	理论*	I +**	I -**	Π +**	I -**	Ш +**	Ш -**
F _k (∞)	1.24542109	1.2473296	1.2442694	1.2455911	1.2453149	1.2452684	1.2448077
K	4	4.0141871	4.0138388	3.974357	4.0155391	3.9987009	3.9769457
τ _D	1	0.99786422	0.99692249	1.0139199	0.98897955	1.0038761	1.0153645
FI	0.24542109	0.24373988	0.2447569	0.24730898	0.2442914	0.24556856	0.24736814
IMMOBILE FRACTION %	50	49.820514	50.024337	50.085893	49.948824	50.015008	50.128024
BLEACH RATIO%	75.4579	75.538201	75.536235	75.311513	75.54583	75.450513	75.326362
MAX% DEVIATION	1	0.13890738 (t = 10)	0.1669034 (t=0.5)	0.10081036	0.12036675	0.078883312	0.18906662
$\frac{D \times 10^{8***}}{cm^2/s}$	0.25	0.25053509	0.2507713	0.24655678	0.25278581	0.24903472	0.246217
$F_k(t=0)$	0.49084218	0.48923598	0.48927529	0.49376974	0.4890834	0.49098974	0.49347277

* 理论曲线是按 Axelrod 所描述的(其中令 $F_k(\infty) = 1$ 、K = 4、 $\tau_D = 1$ s)单扩散曲线和荧光强度为 1 的不动组 分叠加而成,即其漂白前的原始荧光 $F_i = 2$

* I、I、II表示分别对 F_k(∞)、K 和 τ_D 偏离±20%来进行拟合,其中下标"+"为偏离+20%,"-"为偏 离-20%

*** 在计算扩散系数时假定了激光束腰ω=1×10-4 cm

表 2 图 3 所示实验曲线的拟合结果

i	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
t _i (秒)	2	4	6	8	10	15	20	40	60	80
F'_k (t _i)	50.3	57.5	60.6	63.0	64.5	67.0	68.0	69.4	70.2	70.4
$F_k(t_i)$	50.269632	57.379396	60.942933	63.079293	64.501904	66.590678	67.727996	69.565814	70.216778	70.549946

i:数据标号,F_k(t_i):实验荧光强度,F_k(i):理论拟合值

采用本方法对实验曲线进行理论拟合后,求得扩散系数 **D** = (0.51±0.15)×10⁻⁸cm²/s;拟合曲线和实验数据的最大偏差为 1.08%。典型的实验曲线及其拟合结果分别示于图 3 和表 2。

讨 论

从实验所得的荧光漂白恢复曲线求扩散系数,如果按照 Axelrod^[1]的理论,首先要确定荧光恢 复半时 $\tau_{1/2}$,即从实验曲线求出对应于荧光强度等于 $F(\tau_{1/2}) = [F_k(\infty) - F_k(0)]/2$ 的时间。实际 上 $F_k(0)$ 和 $F_k(\infty)$ 都是很难测到甚至是无法测到的,从荧光恢复曲线上只能估计出它们的近似值。 因为在实验中,漂白比测量光强 3~4 个数量级,为了防止漂白光损伤光电倍增管,必须有一个测量 的延迟时间 τ 。因此,在实验中无法测到 $F_k(0)$,而只能测得 $F_k(\tau)$ 。数据处理时,如用 $F_k(\tau)$ 代替 $F_k(0)$,势必对扩散系数的计算引入误差。而且由于记录仪的机械惯性,在快扩散情况下, $F_k(\tau)$ 本身的测量误差也很大。我们对因 $F_k(\tau)$ 代替 $F_k(0)$ 给扩散系数带来的影响进行了初步考察,发现 对于 K = 5、 $\tau/\tau_p = 0.1$ 时,引入扩散系数的误差约为 11.7%;如果 $\tau/\tau_p = 0.2$,则为 23.8%。据



图 2 FPR 实验数据的三元非线性优化法流 程图



图 3 F-ConA 分子在 76% 甘油浓度(V/V) 中的荧光源白恢复曲线

F_i=76.8; F_k(∞) = 71.581632; K = 2.3136177; τ_D = 1.7106009 s; D = 0.4223662×10⁻⁸ cm²/s; F_k(0) = 29.911711 拟合的最大偏差; 0.61468399(t = 15 s)

Jacobson 等人^[12]的报道, 在他们的实验中,由于 修正了这一延迟时间,使扩散系数由原计算出的 1.2×10⁻⁸cm²/s变为5.6×10⁻⁸cm²/s。表明这一因 素使计算得的扩散系数偏小78%。同样的理由,将 使实验测得的K偏小。对于扩散较快的情况,这一 因素的影响将变得相当严重。

对于慢扩散的情况, $F_k(\infty)$ 的影响较大。由于 $F_k(t)$ 随t的变化很慢,特别是K较大时则更甚。 根据我们用计算机计算的结果表明,在K=5时,为 了使 $F_k(t)$ 和 $F_k(\infty)$ 的偏差小于1%,测量时间需 达 τ_D 的108倍。在实验过程中,如当 t/τ_D 值较小 时就误认为荧光已基本恢复而中断实验,则将引进 较大的误差。计算表明,K=5时,若测量时间取10

τ_D, 引进的误差约 20.8%, 5 τ_D 时约为 34.5%。

由上述可知,合理的实验数据处理方法对于 FPR 实验是十分重要的。本文介绍了 FPR 实验 数据的三元非线性优化法。尽管非线性优化法有容易发散的困难,但是在我们的情况下,因变量 较少且在程序设计中注意了试解的选择和一维搜索,在实际应用中尚未发生过发散现象。

为验证本方法,我们考虑图1所示的理论模拟函数。结果表明,拟合值和模拟函数值之间的 偏差不到千分之二(见表1)。其次,从F-ConA在76%甘油浓度中的荧光漂白恢复实验来看,拟 合值和实验数据的最大偏差也仅为1.08%(见图3和表2)。由此求得的F-ConA的扩散系数为 0.51×10⁻⁸cm²/s。这和Jacobson^[12]经时间校正后琥珀酰F-ConA的扩散系数0.45×10⁻⁸cm²/s 很接近。可见本方法有较高的拟合精度。如果想进一步提高拟合精度,还可以通过改变拟合的控 制精度来获得。

在高斯光束的情况下,本方法漂白参量 K 的适用范围为 0≤K≤10。因此,对各 种不同漂白

1985年

量的数据一般都能适用。此外求扩散系数时,毋需求所谓限定参量 $\beta^{[8]}$,而可由 D = $\frac{\omega^2}{4\tau_p}$ 直接求

得。

此方法已被应用于测定林蛙卵表面受体的扩散系数[7]。

≱ 考 文 献

- [1] Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson and W. W. Webb, 1976, Biophys. J. 16: 1055-1069.
- [2] Peters. R., 1981, Cell biol. Internat. Reports. 5:733-760.
- [3] Vaz, W. L. C., Derzko, Z. I. & Jacobson, K. A., 1982, in Membrane Reconstitution, eds. Poste, G. & Nicolson, G. L. (Elsevier Biomedical Amsterdam), pp. 83-136.
- [4]张孔华,孙伟利,张伯新,1982,一台自制的激光漂白荧光恢复测量装置,细胞生物学杂志,4(3): 33-40。
- [5] 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。
- [6] 顾国彦,张孔华,徐成汤,1983,林蛙卵表面凝集素受体在卵割前和卵割时的运动,实验生物学报, 16:467—476。
- [7] 徐成汤,张孔华,顾国彦,1984, 激光光漂恢复技术测定林蛙卵第一次卵裂前卵表面的运动,实验生物学报,17:471-481。
- [8] Yguerabide, J., J. A. Schmidt. and E. E. Yguerabide, 1982. Biophys. J. 40:69-75.
- [9] Van Zoelen, E. J. J., L. G. J. Tertoolen, and S. W. de Laat, 1983, Biophys. J. 42:103-108.
- [10] 中川徹,小柳義夫,1982,最小二乘法によろ实验データ解析,东京大学出版会,95-99。
- [11] 席少霖,赵凤治,1983,最优化计算方法,上海科学技术出版社,27-60。
- [12] Jacobson, K., E. Wu, and G. Poste, 1976, Biochim. Biophys. Acta. 433:215-222.

以琼脂糖胶为载体的 DNA 分子杂交*

张志新 顾弥力 陆 溢 孙毓麟 (中国科学院上海细胞生物学研究所)

以硝基纤维素滤膜或二偶氮苄氧甲基纸 (diazobenzyloxymethyl paper,简称 DBM 纸) 为载体转移核酸分子,并以此载体进行分子杂 交是广为应用的生化技术之一^[1-2]。由于现在 使用的各种载体吸附核酸分子的能力都存在一 定的局限性,所以核酸分子转移杂交技术仍在 不断改进^[3-5]。尤其引人注目的是 Purrello 以 及 Tsao 等人利用琼脂糖(agarose) 胶进行核酸 分子杂交的报道,其杂交效果较为显著^[6-7]。最 近,我们采用和上述方法类似的杂交技术,直 接用琼脂糖胶替代硝基纤维 素滤膜或 DBM 纸 作为载体、DNA 电泳后不经过转移过程而是将 胶干燥,然后用放射标记探针在干燥胶上直接

进行分子杂交,同样获得了较好的结果。本文 以定量分析的方法进一步证明了杂交的专一 性,特别是对单拷贝基因 DNA 顺序的杂交显 示了高效、专一的特性。

材料和方法

一、实验材料

DNA 样品分别从经过小球菌核酸酶(micrococcal nuclease)水解的莱亨鸡红血球细胞核以及经过限制性 内切酶 ECoRI 水解的红血球 DNA 制备^[8]。质粒 pBR

^{*}本工作得到国家科委应用基础理论研究基金和 中国科学院研究费用资助。

^{**} 感谢: 周维影同志参加了部分技术工作。