

FRAP 实验中可能引起的细胞光损伤*

侯 愉

(美国纽约罗斯维尔派克肿瘤研究所)

FRAP 意指光猝灭后的荧光恢复, 或称荧光漂白与复现 (Fluorescence recovery after photo-bleaching)。此现象测定从仪器装置到方法的建立始于 1974 年前后, 至 1976 年后才正式用于测定细胞膜分子运动。早期做 FRAP 研究工作的, 主要有 D. Axelrod, K. Jacobson, J. Schlessinger, M. McConnell, M. Edidin 等人。近几年, 中国国内也研制了这种仪器, 建立了 FRAP 方法。

FRAP 方法是用来测定活细胞膜和人工膜的分子侧向扩散(或一维定向流动)的方法。其基本原理是: 用荧光染料标记欲测定的膜分子(蛋白质或脂质分子)后, 再用瞬时的强激光光束照射膜的一个小区(直径约为 2μ 的光斑), 使标记的荧光分子被破坏而永久失去荧光, 即称为光猝灭, 此时用荧光显微镜观察无荧光。由于被光猝灭后的膜分子和周围未被光猝灭的膜分子间的相互扩散; 使被光猝灭的分子扩散到光斑区外, 同时, 具有荧光的分子扩散到光斑区内, 因而, 在光猝灭的光斑区内又开始出现荧光。荧光复现的快慢与膜分子扩散的速度有关。如果有些光猝灭分子固定不动, 则不被周围的荧光分子取代。因此, 荧光的重现并不是百分之百。如果荧光复现是 95%, 就表示该类分子在膜上有 5% 不动或运动极为缓慢。所以, FRAP 方法不仅可测定膜分子的平面扩散速率, 还可测定膜分子的不动成份(图 1)。

根据 Axelrod 公式计算, 可以得出分子扩散系数 D ,

$$D = (\omega_s^2 / 4\tau_{1/2}) \gamma_D \text{ cm}^2 / \text{sec}$$

ω_s 为激光光束半径, 实验中可以测出;

$\tau_{1/2}$ 亦可测出, 则 D 值可以计算求得。如分子运动为流动型, 其速度为 V_0 。

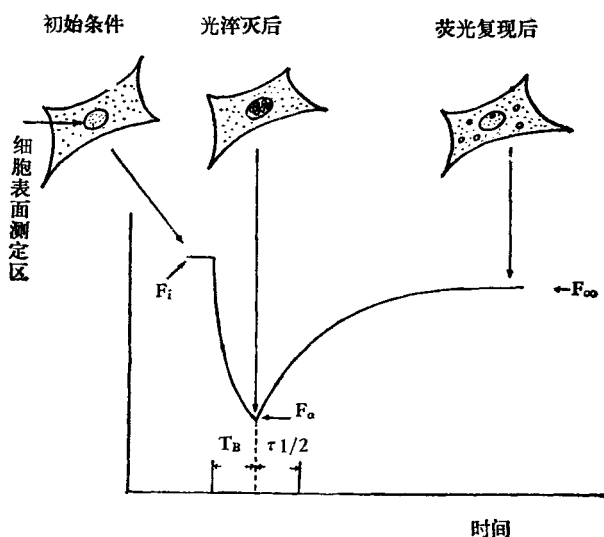


图 1 单个活细胞表面成份侧位传递的 FRAP 概念

F_i : 初始荧光强度; F_0 光猝灭后荧光强度; F_∞ 荧光复现后的荧光强度; T_B : 强激光猝灭的持续时间; $\tau_{1/2}$ 荧光半复现时间 (fluorescence recovery half-time)

$$V_0 = (\omega_s / \tau_{1/2}) \gamma_F$$

%R 表示荧光复现的百分数,

$$\%R = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0}$$

根据 Axelrod 计算, 迁移的扩散型和流动型二者 FRAP 荧光强度在座标上有不同的分布。用实测的荧光强度绘图, 近似其中之一种, 则表明分子运动主要为该种形式(图 2)。

为了证明 FRAP 方法的有效性和可信性, 需要作多种严格的对照实验, 以证明扩散率

* 本文系根据侯愉先生 1980 年在华期讲学内容整理而成。

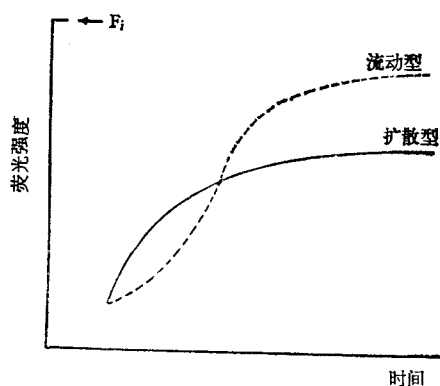


图2 膜表面分子运动的模式曲线

D 值确实代表分子运动速率,排除荧光染料本身有荧光复现的可能。如①用 F-ConA* 标记不动的琼脂糖颗粒,用 FRAP 方法求得扩散率 D 值;②细胞用 3% 戊二醛固定(使膜分子不活动),再用 FRAP 方法测其标记的荧光复现情况,结果 $\% R = 0, D = 0$ 。这表明光被猝灭后,本身不会再复现。因而证明 FRAP 法是有效和可用的。

FRAP 方法需使用一套激光显微装置,其主要部分为氩离子激光器,其谱线接近 495nm 和 514.5nm 两个波长。用约 1mW 功率的激光脉冲作光猝灭,并用中性滤片衰减 10^5 倍后,作为荧光复现观察光源。还需用一套装有散焦和聚焦透镜的光学系统、电子计时控制器、荧光显微镜及光电倍增管记录系统。

FRAP 方法使用的激光能量很大,用它照射细胞,细胞是否会受损伤,进而影响细胞生理、分裂及存活?另外光猝灭以后,分子运动会不会受到影响?1978年以来就这方面的问题有人作了一系列实验,目的是搞清楚究竟光猝灭本身对细胞有没有影响,测定的扩散率是否真正代表膜分子的运动情况。

光猝灭可能引起的细胞的损害有几个方面:①热的效应:温度的增高使细胞膜分子加快运动。②化学反应使细胞膜分子吸收能量以后,蛋白质之间产生交联(Cross linking),扩散率下降。③细胞渗透性发生改变等。最近几年,对于光照射后引起细胞膜蛋白质之间产生交联的问题,研究的比较多。以下论述光猝灭

后是否能引起光损伤,其机制如何。

在 FRAP 实验中,激光为单色光,所以它的照射是搭接性的特异性激发(bond-Specific excitation),即不是细胞膜的所有分子都受影响,而只是具有特定链的分子才可能受影响而被分解。在正常的 FRAP 实验中,温度升高为 0.03 度,对细胞正常生理或分子运动应无影响。关于荧光染料的光敏化剂作用,荧光分子受特定波长照射后,借着可能产生的单线态氧(Singlet oxygen),经过光氧化作用而产生聚合作用,从而把个别的分子结合起来,因而就可能对这些分子的运动产生影响。此外细胞本身有自发光,经吸收特定波长的照射光后,也可能产生光的损伤作用。

最近对交联的实验做的比较多。交联产生的机制是荧光染料经激光照射以后,发挥其光敏化剂作用,把膜上蛋白质的组氨酸氧化成中间产物,此中间产物和另一蛋白质的氨基结合,形成蛋白质间的交联。产生交联有几个因素,①配体分子的价数。四价即联结四个蛋白质分子。两价即联结两个蛋白质分子。所以应尽可能用低价的配体进行标记。②配体的浓度要低。③标记的时间要短,以便减少光敏化剂所引起的氧化作用,从而减少交联。

M. P. Sheetz 等(1979)用 F-ConA 标记红血球分离出来的细胞膜,经 488nm 激光照射,仍然用电泳法测定,结果有交联。同时发现短时间、高强度激光照射产生的交联比长时间、低强度所产生的少。

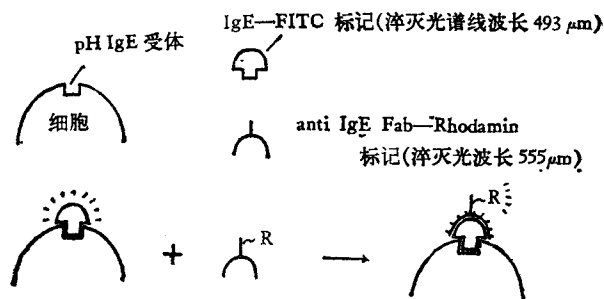


图3

* F-ConA 是以荧光染料 FITC 标记的刀豆素球蛋白。

D. E. Wolf 等(1980)检查了光猝灭时,细胞膜分子是否受到光损伤。他采用的是一种夹心标记法(见图3)。

FITC-IgE 与细胞膜上的 IgE 受体结合时,膜上呈现荧光(FITC 荧光),再与抗 IgE-Fab Rhodamine 结合,显示罗丹明荧光。在 λ_{ex} 555 μ m 下,FRAP 测出罗丹明荧光标记分子扩散率 D 值为 $2.8 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{sec}$,与 FITC 的标记分子扩散率 D 值相同。如在测定罗丹明前,先把 FITC-标记物以 λ_{ex} 493 μ m 光猝灭,再与 Anti-IgE Fab-Rhodamine 结合,测其扩散率 D 值,仍未改变,表明 λ 493 μ m 的光猝灭对 IgE 受体蛋白分子没有光损伤。

FRAP 方法测得的扩散率 D 值相差较大,这可能是由于个别细胞处在不同的分裂周期。

以下介绍我们做的这方面的工作。研究的目的是测定活的单细胞运动情况。将细胞培养在厚的盖玻片上。用玻璃刀划小格子,标记细胞。主要观察:(1)激光照射 24 与 48 小时后细胞的分裂与存活。(2)激光照射后,细胞渗透性的变化。(3)用 FRAP 法测定扩散率 D ,看其是否受到光猝灭的影响,即在同一光斑上连续猝灭。(4)用扫描电镜观察细胞形态的变化。光猝灭的直径为 1.5 微米。猝灭时间为 2 秒钟。光猝灭强度为 1 毫瓦。用 0.2% 台盼蓝测定膜的渗透性,结果表明并无变化。如果照射时间为 15 秒,猝灭光强度 1 毫瓦,很快能看出台盼蓝进入细胞,说明细胞膜已受到损伤。

表 1 是用三种不同的处理方法进行 FRAP 法测定,无论是常用的激光剂量或是万倍激光剂量,在扫描电子显微镜下观察,细胞形态均无改变(表 1)。

扩散率本身的动力学观察:即在细胞膜同一点测扩散率,连续三次光猝灭,如果是累积性的损伤,则测定的扩散率 D 应不一样。但三次的结果都一样,说明光猝灭本身并不影响分子的扩散率。

我们用组氨酸、叠氮化钠 (Sodium azide) 二苯基酰呋喃 (Diphenyl isobenzofuran) 及丁酰化的羟基甲苯等氧气阻断剂与猝灭剂等抑制剂

表 1

	1	2	3
I_B	75 毫瓦	0.7 毫瓦	7.5 毫瓦
T_B	10 秒	0.1 秒	1 秒
RD	10000 $\times$	1	100 $\times$
F_{IX}	40 分	17 分	15 秒

I_B : 光猝灭强度 RD : 相对强度 T_B : 光猝灭时间
 F_{IX} : 猝灭后到固定所需要时间

放在缓冲液中,测定扩散率 D ,结果说明,并无显著差异。

关于测定光猝灭后对细胞分裂和存活的影响,见表 2。

表 2

相对剂量 $\rightarrow$		0.2	1	100	1000
散焦光束	死亡	42%	63%	100%	100%
	生存	8%	12%	0	0
	分裂	50%	25%	0	0
聚焦光束	死亡	9%	57%	100%	100%
	生存	45%	0	0	0
	分裂	46%	43%	0	0
对 照	死亡	0	0		4%
	生存	0	0		30%
	分裂	100%	100%		66%

结果表明激光光束散焦后,引起较多的细胞死亡,可能是由于强光束引起的伤害(直径数微米)易于复原,并不致于造成死亡。而这种散焦后的照射遍及整个细胞,即核区也被照射,因而可能受到严重伤害。同时细胞产生的自发荧光成分,经散焦光照射后,也可能吸收能量因而造成伤害。

由上述可见: 1. 对光猝灭可能造成的细胞损伤,如果不影响细胞分子扩散率,则可不必考虑。因为我们目的是测定细胞膜分子在某个时期的扩散率(测定只需 4 小时)。2. 如果需测同一细胞不同时期的扩散率,即第一次测量后细胞需继续培养,再做以后的测量,这就需要考虑光猝灭是否造成了细胞损伤,是否还保持正常的生理机能。

[北京市肿瘤防治研究所范保荣、高家椿记录并整理]

[本文于 1981 年 12 月 31 日收到]