

仪器设备

测量细胞膜生物大分子侧向扩散的FPR装置

蒋连伟 刘子遥

(北京医学院)

FPR (Fluorescence Photobleaching Recovery) 技术最初由 Peters 等人在 1974 年提出,以后由 Koppel 和 Axelrod 等在 1976 年加以改进^[1],最近几年又获得进一步发展。目前已经成为定量测定膜上生物大分子侧向扩散的重要手段。

从 1979 年起我们着手建立 FPR 实验室,1981 年初经测试模拟样品鉴定后,正式投入膜流动性研究。一年多来运转情况良好,性能稳定,测量结果可靠。现将此装置使用情况,介绍如下:

原 理

用适当的荧光探针标记细胞膜上的蛋白质或脂质分子,再用强激光束瞄准聚焦到膜上一个微区(小于 $10\mu^2$)进行瞬时照射,引起标记荧光猝灭(不可逆的光化学漂白)。激光束照射的延续时间(即漂白时间 τ_B)远小于膜上大分子的迁移特征时间(如扩散特征时间 $\tau_D = \frac{\omega^2}{4D}$, ω 为激光束半宽度, D 为扩散系数。一维均匀流动特征时间 $\tau_F = \omega/V$, V 为流动速度)。若以强度大大衰减的同一激光束监测漂白区,由于膜上大分子的侧向迁移,漂白区中荧光猝灭的大分子可移出区外,而周围的荧光标记大分子移入区内,呈现荧光恢复。对荧光恢复的动态特性加以分析得出的信息可供: (1) 鉴别迁移类型(二维随机扩散,一维定向流动,或二者混合)。(2) 测定迁移系数(D 或 V)。 (3) 测定非匀质样品中可动和不可动分子的比例,即非迁移部分的分数(例如膜上“不动”蛋白质的分数)。

监测样品的荧光恢复用 $F(t) \sim t$ 曲线表示, $F(t)$ 为漂白区在监测时刻 t 时的荧光强度。恢复曲线的形状与迁移类型、激光束截面特征以及漂白量有关。光束截面由光斑半宽度 ω 表征,可直接测量。漂白量由参量 K 表征,实验中 K 值可由下述方程定出:

$F(0) = F(i)K^{-1}(1 - e^{-K})$ (高斯型光束)
式中 $F(0)$ 为监测开始时刻的初始荧光强度, $F(i)$ 为漂白前的起始荧光强度。

在二维扩散情况下,荧光百分恢复(即“可动”部分分数)

$R(\%) = [F(\infty) - F(0)]/[F(i) - F(0)]$
式中 $F(\infty)$ 为足够长时间恢复后的荧光强度渐近值。

$$\text{扩散系数 } D = \frac{\omega^2}{4\tau_{1/2}} \gamma_D$$

$\tau_{1/2}$ 为扩散恢复半时间,即

$$F(\tau_{1/2}) = \frac{1}{2}[F(i) - F(0)] + F(0)。$$

$\gamma_D = \tau_{1/2}/\tau_D$ 为实验校正系数,取决于光束特征和 K 值。

实 验 装 置

我们目前采用点漂白式 FPR 装置,见方框图 1。

1. 根据荧光探针的特征,选用适当的漂白激光器。例如用 FITC 标记时, He-Cd 激光器是适用的。为使激光束能瞄准和聚焦在膜上的限定微区,我们设计了瞄准用激光器,位于漂白激光器之前并与之完全同光路,可在测量之前

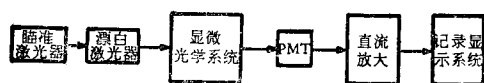


图 1 FPR 装置方框图

进行光束的瞄准和聚焦等，而不会使样品被漂白。瞄准激光器为小功率 He-Ne 激光器，输出 1—2mW，单模。漂白激光器为 He-Cd 激光器，输出 10—20mW， $\lambda = 441.6\text{nm}$ ，半内腔式，在反射镜 R-7m 时模式较接近单模。（均由北京朝阳激光器械厂提供）。

2. 显微光学系统是由一般生物显微镜或万用显微镜改装而成，见图 2。

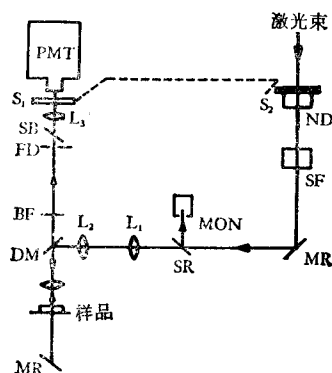


图 2 显微光学系统光路示意图

中性滤光器 ND 是根据监测光衰减因子而定的，适当的衰减因子可忽略监测过程中所引起的进一步漂白。本实验装置的衰减因子约在 10^{-3} — 10^{-4} 范围。空间滤光器 SF 可改善光束的模式，使光束截面更接近高斯分布。激光功率监测通过分束镜 SR 和 GG-2 型功率计（扬州电子仪器厂）实现。聚焦物镜（ $\times 45, 0.65\text{NA}$ ）前的辅助透镜 L_1 、 L_2 是为了保证聚焦点与样品共平面。我们用的漂白激光器半球镜腔的腰位于输出窗口，辅助透镜的位置应使光束腰与视场光栏 FD 对物镜共轭。二色镜 DM 与阻挡滤光器 BF 均采用多层介质膜（北京玻璃研究所提供），其光谱特性如图 3 所示。

光束半宽度 ω 对结果影响很大。为提高结果精确度，我们参考美国 Jacobson 实验室的方法，进行了 ω 的扫描测量。即利用扩展的高斯

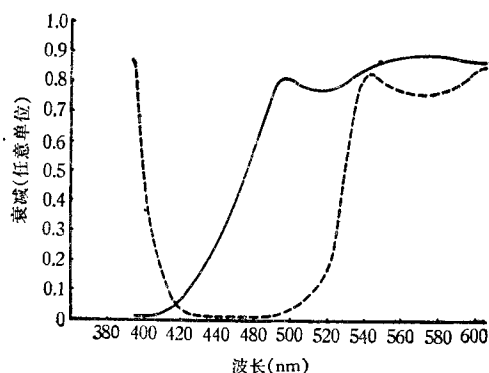


图 3 DM 和 BF 光谱特性
(实线为 45° 使用时，虚线为 90° 使用时)

光束的特点，在物镜产生的腰以下距离为 Z 处，用一小孔探测器跨过扩展的光束截面进行扫描，得到衰减为中心强度 e^{-2} 处的半径 $\omega(Z)$ ，根据扩展光束的转换公式

$$\omega(Z) = \omega_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda Z}{\pi \omega_0^2} \right)^2 \right]^{1/2}$$

求出聚焦光斑半径 ω_0 。同时，又采用以下二种方法与上述测量对照：（1）用扫描法测出原光束腰，经二次腰-腰转换求出最终经物镜聚焦的光斑半径。（2）用校正的目镜分划板进行比较法测量。这二种方法得到的光斑半径与前述 ω_0 比较，误差不大于 15%。

漂白时间 t_B 由自动延时电路和同步快门 S_1 、 S_2 控制。本实验装置控制漂白功率密度及 t_B ，使 K 值约在 1—5。

PMT 输出信号采用 F_{ZG-1A} 型直流前置放大器（南京六合无线电元件厂）进行放大，然后输入慢扫描示波器（如 SB-250 型超低频双线示波器或 SBR-1 型双线示波器）或数字电压表（如 DYJ-2A 型）进行显示和记录。本实验装置采用连续监测和直接显示系统得出漂白恢复曲线。监测过程中引起的漂白应小到可忽略程度，这可由 $F(i)$ 的稳定性来检查。对于某些样品在监测期间有较明显漂白时，应考虑非连续监测。这可通过脉冲电路及快门来实现。

模拟样品测试

为验证装置的精确性、稳定性和可靠性，进

行了模拟样品的测试。

1. 模拟样品的选择和制备

用 FITC 溶于不同体积比的甘油/水中，作为被测样品。根据 Stokes-Einstein 方程，FITC 在溶液中的扩散系数 D 是与粘度 η 成反比^[3]，因而根据相对粘度的测定，可以预测 FITC 在不同粘度溶液中的 D 值，以便检验装置的精确程度；其次，考虑到 FITC 是非特异标记膜蛋白的荧光探针，它在粘性溶液中的扩散能较好模拟大分子在有一定微粘度的细胞膜上的扩散^[4]。

将甘油和水按不同的体积比（见表 1）混合，配制成浓度为 $5 \times 10^{-6}M$ /升的 FITC 溶液，用流变粘度计测定其相对粘度。

2. 测试条件

用 He-Cd 激光作为漂白和监测光源，漂白功率 10mW，衰减因子 10^{-3} ，输出模式近似单模，可按高斯型光束处理。测量的死时间 τ_d （漂白结束和第一次测量之间的时间间隔），取 300ms。漂白时间 τ_B 取 0.1—0.2 秒。测试温度 24℃。

表 1 用 FPR 法测量 FITC 在甘油/水溶液中的扩散系数

甘 油 (体积)%	相对粘度	$D_{(\times 10^{-8}cm^2/s)}$ 平均值
80	5.2	0.50
70	3.1	0.84
60	1.7	1.3
50	1.0	2.0

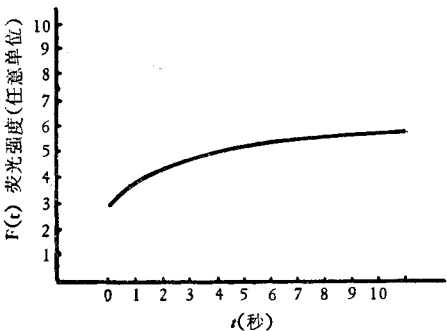


图 4 FITC 荧光漂白恢复曲线(甘油体积 80%)

$\tau_B = 0.2$ 秒, $\tau_d = 0.3$ 秒, $K = 1.9$, $\tau_{1/2} = 2.2$ 秒,
 $D = 0.52 \times 10^{-8}cm^2/秒$

3. 测量结果

图 4 是一条典型的荧光恢复曲线。由一系列实验曲线得出的数据和计算结果列于表 1。

结果表明, FITC 在不同粘度的溶液中的平均扩散系数 $\bar{D}$ 值随甘油含量和粘度的减少而增加, $\bar{D}$ 值与粘度 η 的反比关系符合较好。尤其是高粘度溶液, 实验值与理论值完全符合。

测定 FITC 在不同粘度溶液中的扩散系数表明, 该装置可有效地测定与细胞膜粘度有关的流动性参数——膜组份的扩散系数。迄今, 已使用该装置进行了一些流动性的研究^[5,6]。

讨 论

因为光束截面非理想的高斯分布导致在光斑测量中约 $\pm 15\%$ 的模糊度, 可能给实验结果带来 $\pm 30\%$ 的误差。又因为标记对扩散的影响以及测量中的某些困难会产生系统误差, 因此, 使用该技术测量时, 应力求获得稳定的重复的结果, 即进行流动性的比较测量或动态过程中流动性变化的测量, 而不必把重点放在扩散系数的绝对精确性上。

测试情况表明: (1) 仪器的死时间 τ_d 对测量结果有影响, 而缩短 τ_d 会导致仪器噪声电平上升, 抗干扰能力降低, 所以对 τ_d 的选取要适当。(2) 漂白时间 τ_B 也要选择适当。一般应满足 $\tau_B \leq \frac{1}{10}\tau_{1/2}$; τ_B 过大会使测量结果偏低。(3) 计算扩散系数 D 时, 对起始条件(决定漂白参量 K 的 $F(0)/F(i)$) 并不敏感。

最近几年 FPR 技术和设备又有改进和创新, 除上述 Spot Bleaching (斑点漂白法) 外, 还应用了 Pattern Bleaching (图案漂白法), 即光路中插进一个光栅^[7]。漂白区不是一个斑点而是周期性的条纹, 从而具有测量稳定性好, 对细胞损伤小, 灵敏度高等优点。此外, 应用了比较恢复法^[8], 即在与漂白点相对称的位置选一对应的非漂白点, 监测其荧光衰减来计算 D 值, 并与漂白点由荧光恢复计算的 D 值作对照。我们实验室正在对现有的 FPR 实验装置进行改进, 期望使上述诸方法统一于一个装置, 并配备

显微照相设备和数据处理用的微处理机。

本工作得到林克椿教授帮助和支持,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Koppel, D. E. et al., *Biophys. J.*, **16**, 1315, 1976.
[2] Cherry, R. J.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **559**, 289, 1979.
[3] Jacobson, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **433**, 215, 1976.

[4] Shinizky, M. et al.: *International Review of Cytology*, **60**, 121, 1979.
[5] 刘子遥、蒋连伟:《科学通报》, **27**(19), 1204, 1982.
[6] 蒋连伟、刘子遥、苏雅娴、李昭杰:《科学通报》, **27**(21), 1349, 1982.
[7] Smith, B. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **6**, 2759, 1977.
[8] Wey, C-L. et al.: *Biophys. J.*, **33**, 225, 1981.

[本文于 1982 年 3 月 9 日收到]

红外光谱测量中使用的变温装置

叶国辉 钮择玲 杨景文
(中国科学院生物物理研究所)

红外分光光度计测量某些样品,有时需要获得在不同温度下定性和定量方面的红外谱图信息以及动力学变化数据,这时需要使用变温装置(图 1)。

空度可达 0.5mmHg。

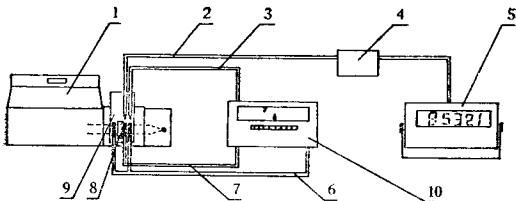


图 1 变温测量装置

1. 红外分光光度计 2. 指示温差电偶 3. 控温温差电偶
4. 放大器 5. 数字电压表 6. 窗口加热器 7. 窗片加热器
8. 测量用窗片 9. 变温装置 10. 自动温度控制装置

一、变温装置

主要由以下两部分组成: 变温装置, 自动温度控制装置。分别介绍如下:

1. 变温装置 我们在实验中所使用的变温装置是 SPECAC P/N20,000 变温池。可以连续调温。

调温范围: -190℃ 至 250℃ (83°K 至 523°K), 变温池, 其结构见图 2。

a) 在进行低温测量时, 将不同的冷却剂装入冷冻剂筒内, 可以获得不同的低温。见表 1。

为保持低温, 可通过抽气口, 抽真空。其真

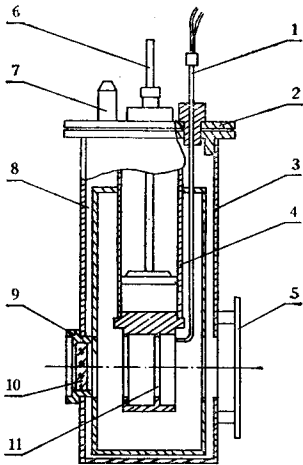


图 2 变温池结构图

1. 铜-康铜温差电偶 2. 密封盖 3. 外筒 4. 冷却剂筒 5. 安装架 6. 冷却剂装入口 7. 抽真空口 8. 真空腔 9. 密封罩 10. 窗口 11. 测量用窗片

表 1

冷 却 剂	温度℃	温度 °K
干冰和乙醚或干冰和丙酮	- 77.00	196.00
液态空气 (21% 氧)	- 147.00	126.00
液 态 氧	- 182.86	90.14
液 态 氮	- 195.80	77.20

在进行低温测量时, 由于筒内外的温差较