

膜蛋白侧向扩散运动的测定

胡 坤 生

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

根据生物膜流动镶嵌模型, 生物膜的基本结构是功能蛋白质分子浮动镶嵌于类脂双分子层中^[1]。带有双亲性基团(亲水基和疏水基)的类脂分子在水解质中由于其结构特性可形成有序的溶致近晶相液晶, 蛋白质分子嵌于双层膜内, 它处于液晶态环境里, 具有快速扩散的可能性。在合适的条件下, 蛋白质分子在膜中可进行快速的自由旋转扩散和侧向扩散运动。由于膜中蛋白质分子之间的相互作用、微丝、微管、中间纤维等细胞骨架的作用以及其它组分的作用使蛋白质扩散运动受到限制或不能自由运动。

自从 1970 年 Fry 和 Edidin 首先用细胞融合法证实膜蛋白的侧向扩散运动以来^[2], 已有不少技术方法用于测量蛋白质分子在膜中的扩散运动。Cone 在 1972 年用瞬间二向色性方法测量了视紫红质分子的旋转扩散运动^[3]。1974 年 Poo 和 Cone 用光漂白恢复法测量了视紫红质分子的侧向扩散运动^[4]。1974 年 Peters 首先采用荧光漂白恢复法测量了红细胞内蛋白分子在膜中的侧向扩散运动^[5]。1975 年 Thomas 等用饱和转移顺磁共振法测量了肌肉蛋白的旋转扩散运动^[6]。1976 年 Cherry 用三线态探针的闪光光解偏振法测量了红细胞带 3 蛋白的旋转扩散运动^[7]。1978 年 Poo 用原位电泳法测量了蛋白质分子在膜中的侧向扩散运动^[8]。膜蛋白运动的研究能够提供有关膜成份的流动性与功能之间的相互关系以及给出一些结构信息。

我在前文中已介绍了用闪光光解偏振法测量蛋白质分子在膜中的旋转扩散运动^[9]。本文主要是介绍一些测量蛋白质分子在膜中侧向扩

散运动的方法, 原理以及测量结果。

一、光漂白恢复法 (photobleaching recovery)

视紫红质分子含有一个内在生色团视黄醛, 在暗适应状态下为 11-顺视黄醛形式, 它通过席夫碱基与视蛋白相连结。受光激发时, 视紫红质分子通过一系列光循环中间体, 最终产物是全反视黄醛和视蛋白。在游离状态下, 视紫红质分子一经漂白, 不会再恢复为视紫红质分子。视紫红质的吸收峰值为 500nm, 漂白之后, 500nm 的峰值消失。利用以上视紫红质分子存在的特性, 就可以用光漂白恢复法测量它的侧向扩散运动。测量方法如下: 强光照射部分视杆外段中的视紫红质分子, 使其漂白, 保持其它部分的视紫红质分子不被漂白, 然后在显微分光光度计中观察和测量漂白部分在 500nm 波长上的光吸收随时间的变化过程。视紫红质分子在视杆外段盘膜中均匀地分布, 若视紫红质分子不能进行侧向扩散运动, 则被漂白的视紫红质分子与没有被漂白的视紫红质分子之间不可能进行分子的交换。若用 500nm 波长的光分别测量漂白部分和未漂白部分视紫红质的吸收, 则漂白部分吸收很少, 未漂白部分的吸收较大, 并且不会随时间而变化。但实验结果表明, 无论漂白部分还是未漂白部分其 500nm 的吸收都随时间而变化: 被漂白部分 500nm 的吸收随时间而增加, 未被漂白部分 500nm 的吸收随时间而下降, 说明被漂白的视紫红质分子与未被漂白的视紫红质分子之间有侧向扩散运动。Poo 等人测量了青蛙和蝶螈视杆外段中视紫红质分子的侧向扩散运动^[4], 结果如图 1 所

示。

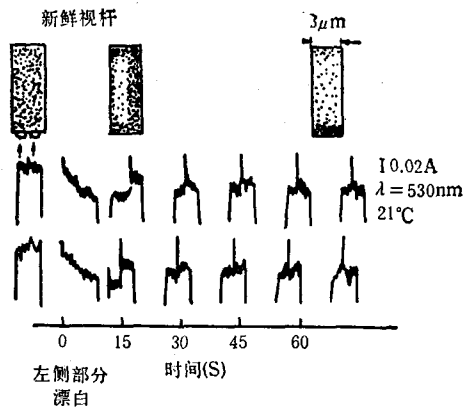


图 1 视杆外段盘膜中视紫红质分子的侧向扩散运动
箭头表示每次测量吸收的位置，黑点表示未被漂白的视紫红质分子。曲线表示不同时间分别在漂白和未被漂白区中测出的 500nm 的吸收。

实验结果表明，被漂白视紫红质分子和未被漂白的视紫红质分子进行重新分布，在一分钟内达到新的平衡状态。扩散系数 D 可从下列一级近似公式算出：

$$D = (0.69bL^2)/\pi^2 t_{1/2}$$

式中 L 为视杆外段盘膜的直径， $t_{1/2}$ 是分子达到平衡状态所需时间的一半， b 为校正因子。计算得到青蛙视紫红质分子和蝶螈视紫红质分子的侧向扩散系数分别为： $D_{\text{青蛙}} = (3.5 \pm 1.5) \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ， $D_{\text{蝶螈}} = (3.9 \pm 1.2) \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 。几乎在同时 Liebman^[10] 也用光漂白恢复法测量了青蛙和蝶螈的视紫红质分子的侧向扩散系数，其结果为： $D_{\text{青蛙}} = (5.5 \pm 0.6) \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ， $D_{\text{蝶螈}} = (4.7 \pm 0.9) \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ，Poo 与 Liebman 的结果虽有些差别，但仍处于他们给出的误差范围之内。1981 年我们也曾用光漂白恢复法测量了温度对蛤蚧视杆外段中视紫红质分子侧向扩散运动的影响^[11]。经 45℃ 温度处理后，蛤蚧盘膜视紫红质分子最不利于运动。

二、融合后的荧光重新分布法 (fluorescence redistribution after fusion)

Frye 和 Edidin 用细胞融合法观察到抗原在细胞膜内的侧向扩散运动以后，Fowler 和

Branton^[12] 1977 年用细胞融合法原理测量了红细胞膜中标记的蛋白质分子的侧向扩散运动。Koppel 等人^[13] 1981 年进一步观察到荧光标记分子在融合过程中的重新分布时间过程。图 2 表示了其原理。

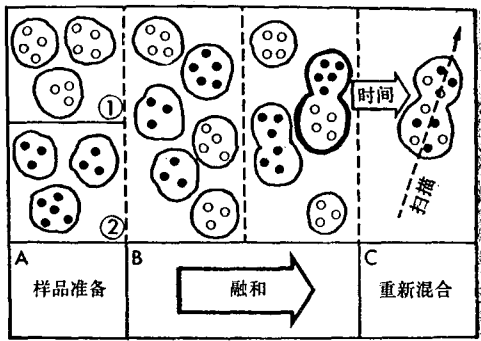


图 2 融合后荧光恢复法测量蛋白质分子侧向扩散运动示意图
●表示荧光标记的分子

把准备好的细胞样品一分为二，取其中的一份样品进行蛋白分子的荧光标记，另一部分样品不进行荧光标记，如图 2A 所示。把这两部分细胞混合在一起，加入仙台病毒之类的细胞融合剂，在短时间内就会出现细胞间的融合现象，50% 左右荧光标记的细胞可以与没有标记荧光的细胞融合，如图 2B 所示。标记荧光的膜上蛋白质分子与未被标记荧光的蛋白质分子在融合细胞上通过扩散而逐渐混合最终达到均匀平衡地分布，通过一定时间间隔的荧光强度扫描，可观察荧光强度在细胞中的分布随时间而变化的过程，从中计算出蛋白分子在细胞中的侧向扩散系数。

三、原位电泳法 ("In Situ" electrophoresis)

细胞或细胞器固定于载玻片上或其它器皿内，当加上一个外电场时，则由于蛋白质分子本身带有电荷，它们在电场作用下将在膜上移动，如蛋白质分子带负电荷，则在电场作用下，将向正极移动，在一定的电场强度和一定时间之后，蛋白质分子在膜中具有不对称的浓度分布，在正极一边的浓度明显大于另一边的浓度。外加电场撤除之后，蛋白质分子通过扩散再次变成

膜内均匀对称分布。这种由于扩散达到对称分布所需的时间与侧向扩散的速度有关。从时间过程中可计算出蛋白质分子的侧向扩散运动速度。测量方法有两种：(1) 荧光标记蛋白质分子，通过荧光显微镜观察和测量荧光在膜中重新均匀分布的时间过程^[4]。(2) 直接用冰冻刻蚀电镜观察蛋白质分子颗粒在膜中重新分布的时间过程^[15]。图 3 表示了原位电泳法测量蛋白质分子侧向扩散运动的原理。

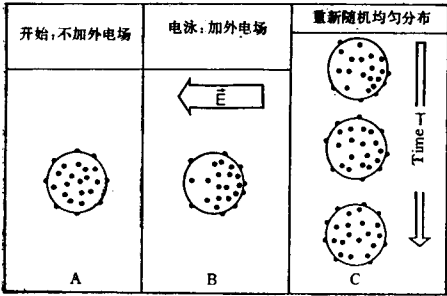


图 3 原位电泳法测量蛋白质分子侧向扩散运动

A: 外电场打开之前, 蛋白质颗粒在膜中随机均匀分布。B: 在外电场作用下, 蛋白质分子在膜中不对称排列, 大部分蛋白质分子集中在膜的右边。C: 外电场撤除后, 由于蛋白质分子的侧向扩散运动, 蛋白质分子再次随机均匀分布。

四、荧光漂白恢复法 (Fluorescence recovery after photobleaching)

荧光漂白恢复法测量蛋白质或脂分子侧向扩散运动的装置如图 4 所示。

功率为 1 瓦左右的蓝色或绿色连续光激光器用作光源, 平面镜 M 可改变光线的方向, 空间滤片 SF 改善光线的波前, 二块光线分裂器 BS 保证了漂白光线和测量光线同轴, 光漂白图形 P 放置在显微镜的后焦平面上, 二向色性片 DM 使光线转向并由透镜聚焦到样品上, 从样品发射的荧光透过二向色性片 DM, 一部分通过 M₅ 进入显微镜目镜以便观察, 另一部分进入光电倍增管 PMT, 用于测量荧光随时间的变化。

荧光漂白恢复法的基本点是: (1) 为了测量侧向扩散运动, 测量成份(包括蛋白或脂)要进行荧光标记。(2) 测量样品置于荧光显微镜

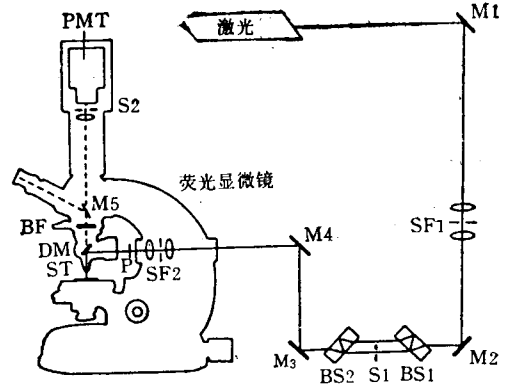


图 4 荧光漂白恢复实验装置图

M: 平面镜, SF: 空间滤片, BS: 光线分裂器, S: 快门, P: 图形, DM: 二向色性镜, ST: 载物台, BF: 阻挡滤片, PMT: 光电倍增管

下, 以便选择单个细胞。(3) 用合适波长强光照射细胞局部小面积 (一般控制在细胞表面积的 1%) 只要光照范围内有 2000 个荧光载体 (fluorophores), 就有可能测量到荧光信号。(4) 荧光载体可以快速和不可逆地光解。漂白后, 光强度立即衰减到测量光水平, 测量光强度只及漂白光光的 $1/10^4$ 或 $1/10^5$ 。因为荧光载体的光解, 与原来的荧光信号相比, 荧光信号降低。如果既没有整个细胞的运动, 也没有细胞成份的侧向扩散, 荧光信号保持不变。若研究的细胞成份可以侧向扩散, 则荧光载体从周围环境进入光照射区, 使荧光信号增加。从荧光恢复过程, 可知其扩散常数。测量光束强度要低到记录荧光信号过程中光解可忽略不计。用这个方法能测量到的扩散常数范围为 10^{-6} 到 10^{-12} cm^2s^{-1} 。

假定光漂白期间 t_b 内有不可逆的一级反应, 漂白的速率常数由 $\alpha I(r)$ 给出, I 是光漂白强度, r 是 X-Y 膜平面里的位置, $r = 0$ 表示在中心位置。对于分子的运输过程来说, t_b 是很短的时间。漂白期间, 未漂白分子的浓度与漂白速率常数以及本身的浓度有关。在恢复开始时 ($t = 0$), 荧光浓度为:

$$C(r, 0) = C_i \exp(-\alpha t_b I(r)) \quad (1)$$

对于高斯分布的光束截面, 其强度轮廓 $I(r)$ 可

以表示为:

$$I(r) = (2P_0/\pi W^2) \exp(-2r^2/W^2) \quad (2)$$

P_0 为漂白用的激光功率, W 是聚焦激光束的 e^{-2} 半径。

对于均匀分布的光束截面来说

$$I(r) = \begin{cases} P_0/\pi W^2 & \text{当 } r \leq W \\ 0 & \text{当 } r > W \end{cases} \quad (3)$$

这里 W 是光束截面的半径。

Axelrod 等人^[16]对于高斯分布和均匀分布的光束截面都作了具体分析, 因实际应用的多为高斯分布光束, 以下仅考虑恢复过程只有扩散过程时的高斯分布方程。

$$F_K(t) = F_K \nu K^{-\gamma} \Gamma(\nu) P(2K/2\nu) \quad (4)$$

F_K 和 $F_K(t)$ 表示漂白前和漂白后时间 t 时的荧光强度。 $\nu = (1 + 8D_L t/W^2)^{-1}$, $\Gamma(\nu)$ 是 γ 因子, $P(2K/2\nu)$ 是 χ^2 几率分布, K 是光漂白的量。定义:

$$f_K(t) = [F_K(t) - F_K(0)]/[F_K(\infty) - F_K(0)] \quad (5)$$

典型的荧光恢复曲线表示在图 5 中。

图中 $F_K(t < 0)$ 为漂白前的荧光强度, $F_K(t = 0)$ 为光漂白后立即记录到的荧光强度, $F_K(\infty)$ 是恢复恒定后的荧光强度。 $t_{1/2}$ 是荧光恢复到一半所需的时间。从图中可得:

$$F_K(t_{1/2}) = F_K(0) + \frac{F_K(\infty) - F_K(0)}{2} \quad (6)$$

在实际应用中, 用下列近似表达式得到侧向扩散系数 D_L :

$$D_L = (W^2/4t_{1/2})r \quad (7)$$

r 是与漂白的程度和光束分布有关的参数, 在典型的情况下 $r = 1.3$ 。

一般情况下荧光恢复不到漂白前的水平,

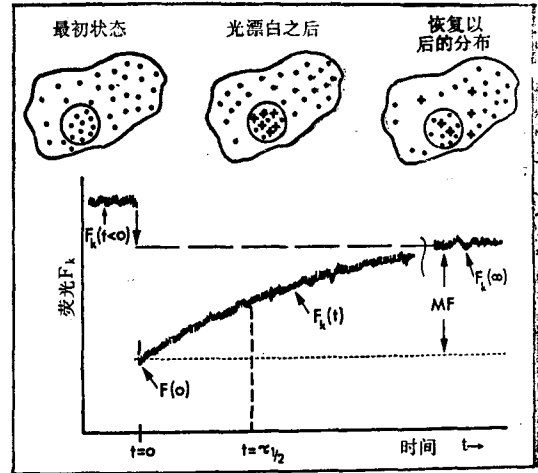


图 5 荧光漂白恢复法测量侧向扩散运动原理图

图中被漂白的荧光标记的载体用 + 表示, 未被漂白的标记荧光的载体用 ● 表示。○ 表示激光照射在样品上的部分

因为细胞内存在着可动分子和不可动分子 (指在测量时间范围内)。可动分子比例 MF 表示为:

$$MF(\%) = \frac{F_K(\infty) - F_K(0)}{F_K(t < 0) - F_K(0)} \times 100\% \quad (8)$$

不可动分子比例为 $100\% - MF$

第一次荧光恢复到稳定状态后, 再给第二次漂白, 就可以完全恢复到第一次漂白后的稳定状态。荧光漂白恢复方法中的强光会不会破坏细胞组织? 局部地区的温度能升高多少? 由于不能直接测量, 只有一些估计量, 其结果差别很大。荧光漂白恢复方法测量视紫红质分子在盘膜中的侧向扩散运动的结果与光漂白恢复法得到的结果相符^[17], 说明强光漂白并不影响膜中分子的自由扩散运动。

表 1 测量膜蛋白侧向扩散运动的方法

技术	光漂白恢复法	荧光漂白恢复法	融合后荧光重分布法	原位电泳法
原理	蛋白质分子漂白后吸收随时间而变化的依赖关系	蛋白分子漂白后荧光强度随时间变化的依赖关系	细胞间融合后带荧光的蛋白分子达到再分布的时间依赖关系	电场作用下蛋白分子非均匀分布撤除电场后重新分布的时间依赖关系
应用	视紫红质分子在视杆盘膜中侧向扩散运动	测量较大膜(天然和人工)中蛋白分子侧向扩散运动, 也可用于液体表面膜, 液晶和细胞质在细胞内运输	测量细胞原生质膜中的侧向扩散运动	测量细胞原生质膜以及线粒体内膜中的侧向扩散运动

为了便于了解各种膜蛋白侧向扩散运动的测量方法、原理以及应用,在表 1 中作了总结。一些膜蛋白分子侧向扩散运动的测量结果如表 2 所示:

表 2 实验得到的侧向扩散系数

蛋白种类	侧向扩散系数 (cm^2s^{-1})	测量温度 ($^{\circ}\text{C}$)	测量方法	不可动蛋白分子 比例(%)	文 献
红细胞血影内在蛋白	$<3 \times 10^{-12}$	20	荧光漂白恢复法	—	[5]
视杆外段视紫红质分子	$2-6 \times 10^{-9}$	20	光漂白恢复法	—	[8]
成纤维细胞荧光素 SCN 标记的蛋白分子	2.1×10^{-10}	22—24	荧光漂白恢复法	60	[18]
成肌细胞荧光素 SCN 标记的蛋白分子	2.2×10^{-10}	23	荧光漂白恢复法	30—50	[19]
肌管细胞中乙酰胆碱受体蛋白	$4-5 \times 10^{-11}$ $7-16 \times 10^{-11}$	22 35	荧光漂白恢复法	75 75	[20]
成纤维细胞表面糖蛋白	$<5 \times 10^{-12}$	—	荧光漂白恢复法	<10	[21]
成纤维 3T3 细胞中激素受体	$3-5 \times 10^{-10}$	23	荧光漂白恢复法	40—85	[22]
异核体表面抗原	2×10^{-10}	37	融合法	—	[2]
红细胞内在蛋白	4×10^{-11}	37	融合法	—	[12]
胚肌肉 CoA 受体	5.1×10^{-9}	22	原位电泳法	—	[23]

角度。扩散系数和粘滞度之间有如下关系:

侧向扩散运动:

$$\eta = KT/a\pi D_L r \quad (11)$$

旋转扩散运动:

$$\eta = \frac{KT}{8\pi r^3 D_r} \quad (12)$$

T 为绝对温度, r 为有效半径。

在基本相同的条件下,对视紫红质分子的侧向扩散运动和旋转扩散运动作比较,由旋转扩散运动得到的粘滞度为 $0.7-6P^{[3]}$,由侧向扩散运动得到的粘滞度为 $1-4P^{[4]}$ 。两者之间符合得很好。菌紫质分子和红细胞带 3 蛋白的测量也得到类似的结果。

参 考 文 献

- [1] Singer, S. J. and Nicolson, G. L.: *Science*, 1972, 175, 720.
- [2] Frye, L. D. and Edidin, M.: *J. cell sci.*, 1970, 7, 319.
- [3] Cone, R. A.: *Nature New Biol.*, 1972, 236, 39

(下转第 31 页)

五、侧向扩散运动和旋转扩散运动的比较

无论是闪光光解偏振法还是饱和共振转移顺磁共振法测量蛋白分子在膜中的旋转扩散运动都是在溶液中进行的。侧向扩散运动的测量则一般在单细胞上完成。同时能够测量侧向扩散和旋转扩散运动的蛋白质分子只有少数几个。如视紫红质分子,菌紫质分子和红细胞带 3 蛋白分子。定义 D_L 和 D_r 为侧向扩散运动和旋转扩散运动的扩散系数, η_L 和 η_r 分别由侧向扩散运动和旋转扩散运动得到的介质粘滞度。根据布朗运动和流体动力学得到侧向扩散的方程式

$$\bar{r}^2 = 4D_L t \quad (9)$$

r 是时间为 t , 扩散系数为 D_L 时的平均扩散半径。旋转扩散的方程式:

$$\bar{Q}^2 = 2D_r t \quad (10)$$

Q 表示时间为 t , 扩散系数为 D_r 时的旋转

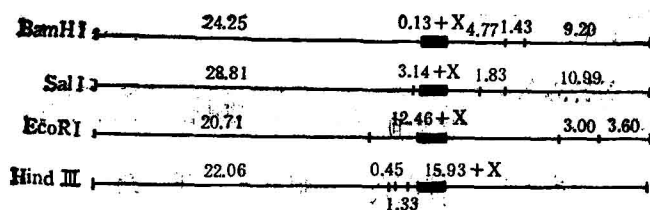


图 4 λ -FN8B₂ 的限制性酶切图谱

图中细线表示载体 DNA, 粗线表示 FN cDNA 片段(插入片段)

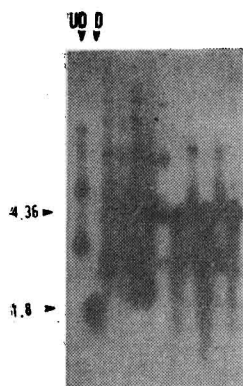


图 5 吸印转移法分析结果

D: 酶解的重组质粒

UD: 未经酶解的重组质粒

纤维素滤膜上, 结果如图 5 所示。从图 5 中我们可以看出 1.8 kb 的 FN cDNA 片段已经被克隆到 pBR322 质粒上。

由此, 我们可以进一步对此 FN cDNA 片段进行精细分析, 并且还可利用其转化癌细胞以了解 FN 基因对癌细胞的影响, 研究癌细胞回复突变后细胞内 FN 增多的机制。

(上接第 27 页)

- [4] Poo, M. and Cone, R. A.: *Nature*, 1974, 247, 438.
- [5] Peters, R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 367, 282.
- [6] Thomas, D. D., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1975, 72, 1729.
- [7] Cherry, R. J. et al.: *Nature*, 1976, 263, 349.
- [8] Poo, M. et al.: *J. Cell Biol.*, 1978, 76, 483.
- [9] 胡坤生: 《生物化学与生物物理进展》1986, (5), 14.
- [10] Liebman, P. A. and Entine, G.: *Science*, 1974, 185, 457.
- [11] Tan Man-qi, Hu Kun-sheng, Zhao Dong-po: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1981, 68, 277.
- [12] Fowler, V. and Branton, D.: *Nature*, 1977, 268, 23.
- [13] Koppel, D. E. and Sheetz, M. P.: *Nature*, 1981, 293, 159.
- [14] Poo, M.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981, 10, 245.

此工作是作者在日本理化学研究所分子肿瘤学研究室进修时完成的。本文是在林培懋先生指导下列写的, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Kornblihtt, A. R. et al.: *EMBO J.*, 1984, 3 (1), 221.
- [2] Umezawa, K. et al.: *FEBS Lett.*, 1985, 186(1), 31.
- [3] Hynes, Richard O. et al.: *J. Cell Biol.*, 1982, 95, 369.
- [4] Kornblihtt, Albert R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 3218.
- [5] Matsuura, H.: *Biochemistry*, 1985, 24, 6517.
- [6] Yamada, K. M.: *Annu. Rev. Biochem.*, 1983, 52, 761.
- [7] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics*, C. S. H. 1980.
- [8] Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, C. H. S. 1982.
- [9] Rigby, P. W. J.: *J. Mol. Biol.*, 1977, 113, 237.
- [10] Grunstein, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 75, 3961.
- [11] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 1975, 98, 503.
- [12] Okayama, H. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1985, 5, 1136.
- [13] Fiers, W. et al.: *Nature*, 1978, 273, 113.
- [14] Reddy, V. B. et al.: *Science*, 1978, 20, 494.
- [15] Okayama, H. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1983, 3, 280.
- [16] Beck, E. et al.: *Gene*, 1982, 19, 327.

[本文于 1987 年 3 月 18 日收到]

- [15] Sowers, A. and Hackenbrock, C. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 78, 6246.
- [16] Axelrod, D. et al.: *Biophys. J.*, 1976, 16, 1055.
- [17] Wey, L-L. et al.: *Biophys. J.*, 1981, 33, 225.
- [18] Edidin, M. et al.: *Science*, 1976, 191, 466.
- [19] Schlessinger, J. et al.: *Science*, 1977, 195, 307.
- [20] Axelrod, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1976, 73, 4594.
- [21] Schlessinger, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1977, 74, 2909.
- [22] Schlessinger, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1978, 75, 5353.
- [23] Poo, M. et al.: *Biophys. J.*, 1979, 26, 1.

[本文于 1987 年 4 月 3 日收到]