

TM₄ 之后和 TM₅ 之前, 和 D₂R 基因相当一致. 因此, 这三个基因起源一个共同的原始基因^[18]. 基因的这些差异反映出: 这些基因在从一个共同的前基因分化过程中可能有的基因内含子增多了, 而有的基因内含子丢失了. 内含子丢失在 G 蛋白偶联受体家族中很重要, 因为内含子丢失的过程使得基因在复制过程中可能通过某些修饰作用而复制出具有新功能作用的基因, 使得同一受体家族中的受体不仅成员增加了, 而且功能的复杂性也增加了^[4].

目前, 利用分子生物学和 PCR 技术, 虽然克隆到 5 个不同的多巴胺受体亚基, 比较了它们的 cDNA 结构上的差异和分布, 通过转染细胞研究了各自的药理学作用和功能. 但至今对于多巴胺受体亚基的多样性的生物学意义了解很少. 可以预料到, 随着对多巴胺受体家族进一步的深入研究; 将会对这些亚基有更丰富的了解并且可望寻找到一些有特殊作用的新药.

参 考 文 献

- 1 Kebabian J W, Greengard P. *Science*, 1971; **164**: 1346
- 2 Onali P, Olianas M C, Gessa G L. *Mol Pharmacol*, 1985; **28**: 138
- 3 Sibley D R, Monsam Jr. *TIPS*, 1992; **13**: 61
- 4 O'Dowd B F. *J Neurochem*, 1993; **60**: 804
- 5 Giveli O, Bunzow J, Grandy D *et al.* *Eur J Pharmacol*, 1991; **207**: 277
- 6 Bunzow J R, Vna Tol H M, Grandy G K *et al.* *Nature*, 1988; **336**: 783
- 7 Dulbecco R. *Encyclopedia of human biology*, J. San Diego: Academic Press INC, 1991: 81—92
- 8 Sokoloff P, Giros B, Martres M P *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 146
- 9 Giros B, Martres M P, Pilon C *et al.* *Biochem. Biophys. Res Commun*, 1991; **176**: 1584
- 10 Snyder L A, Roberts J L, Sealfon S C. *Neurosci Lett*, 1991; **122**: 37
- 11 O'Malley K L, Armon S, Tang L *et al.* *New Biologist*, 1992; **4**: 137
- 12 Meador-Woodruff J H, Mansour A, Bunzow J R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 7625
- 13 Grandy D K, Litt M, Allen L *et al.* *Am J Hum Genet*, 1989; **45**: 778
- 14 Gelernter J, Kennedy J A, Van Tol H M *et al.* *Genomics*, 1992; **13**: 208
- 15 O'Dowd B F, Nguyen T, Tirpak A *et al.* *FEBS Lett*, 1990; **262**: 8
- 16 Dearth A, Gingrich J A, Falardeau P *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 72
- 17 Sunahara R K, Niznik H, Weiner D M *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 80
- 18 Grandy D K, Marchionni M A, Makam H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 9762

电荷耦合器件荧光成象及生物学应用

胡坤生

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 冷却慢扫描电荷耦合器件照相机附在荧光显微镜上组成了一个系统, 可把一系列成象进行贮存, 通过标记颗粒的位置、强度以及强度分布的差别, 在每幅象上可区分 500 个荧光点. 荧光点的运动可以跟踪, 通过分析可区分不同的运动方式. 在活细胞表面, 已观察到受体有直接扩散, 随机扩散和局部随机扩散三种运动方式. 电荷耦合器件的高灵敏度使观察过程中只产生少量的漂白. 现介绍这系统的测量原理和它在生物学上的应用.

关键词 电荷耦合器件, 荧光成象, 侧向扩散, 运动跟踪, 细胞融合

膜蛋白(如受体)在膜中侧向运动的研究, 对详细了解细胞过程的变化是十分重要的^[1,2].

测量膜上分子侧向运动, 最主要和常用的方法是荧光漂白恢复方法. 其基本原理是用强激光

脉冲使细胞表面某区域(直径为微米数量级)中带荧光的分子漂白,由于区域外的荧光分子的侧向扩散,使这区域中的荧光强度慢慢恢复,其恢复的速率取决于侧向扩散的速度,从而测定了膜中分子的侧向扩散系数(D)。尽管荧光漂白恢复方法已得到了很多有价值的结果,但它存在一些缺点和局限性。首先需用强激光照射膜的局部表面,它对膜有破坏作用。另外此方法得到的膜上分子侧向扩散的信息是大量分子扩散的平均结果。它仅能区分膜上的可动和不可动的成分。若扩散系数小于 $10^{-12}\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 就认为是不可动的分子,它难以区分不同的运动方式即不能了解膜上的分子是如何运动的。另一个局限性是此方法的测量范围是在微米数量级以上,它不能测量小于微米范围内的分子运动。

为了克服荧光漂白恢复方法存在的缺点和局限性,目前在Cherry实验室发展了一种新的技术,使用了一个慢扫描的电荷耦合器件(CCD)照相机,它附在荧光显微镜上。如果细胞表面的有关成分能够有效地进行荧光标记,通过CCD照相机可把荧光成像(每幅荧光象可包含多至500荧光点)贮存在计算机里,通过不同时间的荧光成像分析,就可以跟踪每个荧光点(即每个分子颗粒)的运动轨迹,从而观察到每个分子颗粒的运动速度和运动方式^[3]。从实验结果可以看到,细胞膜表面的受体具有多种的运动方式^[4],大致可分为三种方式:a. 随机扩散方式, b. 直线扩散方式, c. 局部的随机扩散方式。后两种扩散方式很可能在荧光漂白恢复方法中不能检测到。至于为什么会有不同的运动方式,还待进一步研究。CCD照相机荧光数字成像可测量到 $10^{-14}\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 的分子扩散,因此荧光漂白恢复法认为不运动的分子很可能是可以运动的。

1 电荷耦合器件荧光成像的基本原理

CCD是一种灵敏的固体成像装置。一般来说,CCD的有效成像面积为 $1-2\text{cm}^2$,光照射到CCD后产生电子,由此产生的电荷可以

检测和放大并可用数字表达。现在商品生产的CCD的模式有 576×384 像素, 512×512 像素, 1024×1024 像素等。CCD具有低噪声,宽的动力学范围,极好的线性和缺少几何变形。因此它特别适合于低光水平的成像^[5],低光水平的成像避免了强光对生物样品的漂白和破坏。为了降低暗电流,在测量时要冷却CCD,当冷却到 -60°C 时,其暗电流为1个电子/(像素·秒)。如果测量必须进行较长时间的曝光,需用液氮来冷却CCD至 -120°C 。

细胞膜表面的受体(或蛋白)首先用不同的荧光探针进行标记。在观察其荧光时,不同的荧光探针要用不同的激发光源。例如diI荧光探针激发光源为50W的汞灯, R₁₈荧光探针则用100mW氩离子激光器为激发光源。

在进行测量前,首先要用带有CCD照相机的荧光显微镜对细胞表面成像,用A/D将图象数字化。荧光点在细胞表面的位置首先要确定下来,每幅象上可同时分布500个荧光点。由于显微镜的分辨限比分子颗粒还小,所以观察到的荧光点比真实的分子颗粒大,它是一个强度具有高斯分布的荧光点,荧光强度的最大位置可作为分子颗粒的位置。每个荧光点的强度峰值和高斯强度分布的差别也可以鉴别这些不同的分子颗粒,因此同一个荧光标记的分子颗粒可同时用坐标位置和荧光强度以及它的分布来鉴别。每个单一荧光点的强度分布可用非线性最小二乘法进行拟合。如果背景强度为 Z_0 , 荧光峰值强度为 Z_n , 荧光点的宽度为 W_n , 荧光点的坐标为 (X_n, Y_n) , 则强度分布为:
$$f(x, y) = Z_0 + Z_n \exp\{-[(x - X_n)^2 + (y - Y_n)^2]/W_n^2\}.$$

测量时,有时会有二个或多个荧光点靠近在一起,可用两种不同的方法来处理。第一种情况是当另一个点正好处于匣子(box)的外边,这时可以把围绕这点的像素放大到两点可以区分开来。第二种情况是当另一个点处在匣子的里边,则可将匣子的大小放大到这点可以自动的拟合。

在分析荧光点时,要把不是荧光探针特异

标记的分子,即一些人为的点区分开来.可以根据以下几种方法自动地把这些伪迹分开. a. 峰宽,宽的点是伪迹,很窄的点是噪声,荧光探针标记的分子颗粒的峰宽有一定的范围. b. 峰宽误差,峰宽的分布不好表示伪迹或荧光点重叠产生的多峰. c. X^2 检验的高值表示为伪迹.

每个荧光点的位置可以定位精确到 ~ 0.1 象素,当用 $40\times$ 物镜时,可定位在 25nm 之内. Cherry 实验室采用的 CCD 模式是 576×384 象素.

由于 CCD 成象灵敏度高,曝光在低水平上进行,通常曝光时间取 10s . 荧光点运动的跟踪是通过每幅象之间的荧光点之间的关系来进行的,一般来说,每 $1-2\text{min}$ 记录一幅图象. 为了把某幅象中的某荧光点(通常一幅象中有几十至几百个荧光点)与一定时间间隔后的下一幅象中的相应的点相联系起来,荧光点的跟踪要绝对正确,否则会分不清楚或引起错误地跟踪. 这里引入了最大几率公式. 对于每对坐标,在下一幅象里,其附近的点的几率为:

$$P = \exp\{-[\Delta R/R_e]^2\} \times \exp\{-[\Delta Z]^2/Z_n\}$$

这里 ΔR 是位置的变化, R_e 是预先估计的位置变化值. ΔZ 是峰值强度的变化, Z_n 是这点的平均峰值强度. 最大几率的一些点被选中. 很明显,为了达到最大几率,坐标上的变化不能偏离估计的值太大,峰值强度变化也不能太大. 跟踪时,有时会产生跟踪点的消失. 如产生凝聚,内吞或从膜上分离开去. 这些点可以通过规定最小的几率来自动取消跟踪. 最后一幅象测量结束后,要重新测量细胞位置有没有变化. 通过一幅一幅图象的测量和分析就可以跟踪每个荧光点即被标记的分子颗粒的运动轨迹,从中计算出它们的运动速度和了解它们的运动方式.

2 电荷耦合器件成象的生物学应用

2.1 受体分子颗粒的侧向扩散

受体分子颗粒的侧向扩散是在成纤维细胞

(D_{532})上进行的,细胞通过培养,长成成熟细胞,但不能太老化,其细胞形状如图1所示:

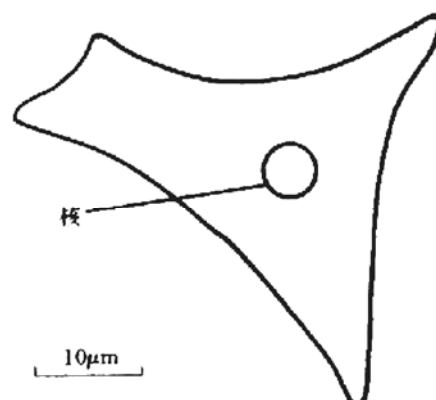


图1 D_{532} 上皮成纤维细胞模式图

2.1.1 低密度脂蛋白(LDL)受体的侧向扩散

图2是荧光探针 R_{18} 标记的LDL结合到 D_{532} 成纤维细胞受体上的一幅图象. 图上存在着数百个荧光点. 图3是某些 R_{18} 标记的LDL受体分子颗粒在成纤维细胞表面上的运动轨迹跟踪,总共跟踪了20幅图象. 分子颗粒的运动轨迹可分成: a. 随机扩散, b. 直线扩散, c. 局部的随机扩散.

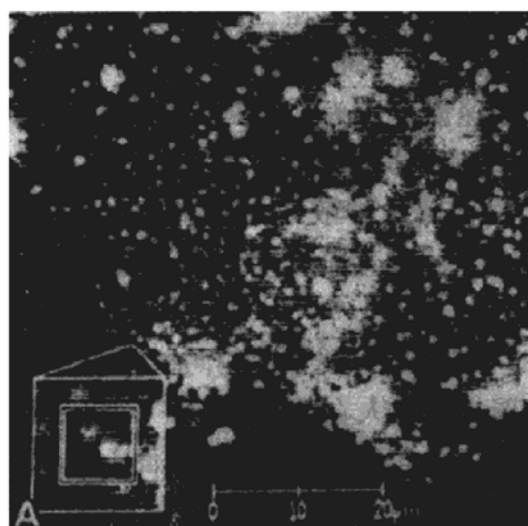


图2 R_{18} 标记的LDL受体的
数字荧光成象

插图A表示放大三倍的象,中间的小方框是13象素的成象面积.

如果 $\langle r_n^2 \rangle$ 表示平均平方位移, $n\delta t$ 表示时

间间隔 (n 为图象之间的间隔数, δt 是每幅图象跟踪之间的时间). 对于随机扩散 $\langle r_n^2 \rangle = 4D(n\delta t)$ D 为扩散系数, 对于直线扩散 (若平均运动速度为 v) $\langle r_n^2 \rangle = v^2(n\delta t)^2$

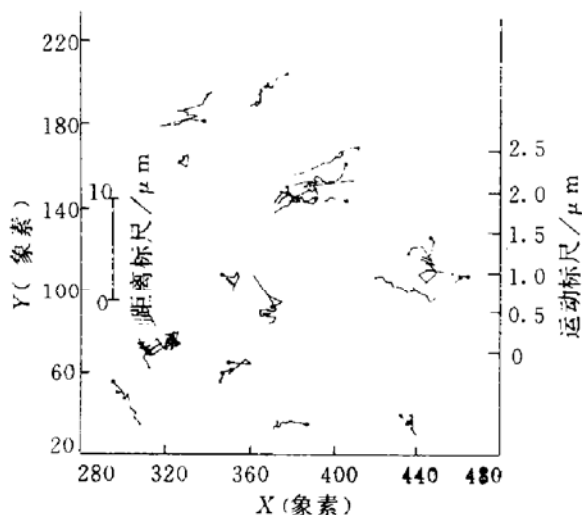


图3 R_{18} 标记的 LDL 颗粒在成纤维细胞上扩散

对于局部随机扩散则比较复杂, 分子颗粒的平方位移不能超过最大值 $R_{\max}^2$ 可以给出如下方程式:

$$\langle r_n^2 \rangle = R_{\max}^2 [1 - \exp(-4Dn\delta t/r_{\max}^2)]$$

从荧光点中选出三种有代表性的运动方式, 可用以上公式得到很好的拟合. 其 LDL 受体扩散速度分别为: 直线扩散 $(0.26 \pm 0.08) \text{ nms}^{-1}$, 随机扩散 $0.3 \times 10^{-13} - 3 \times 10^{-13} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 局部随机扩散 $0.6 \times 10^{-13} - 11.0 \times 10^{-13} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 其局部运动的半径范围是 $0.2 - 1.1 \mu\text{m}$.

2.1.2 流感病毒受体的侧向扩散

图4是本人在英国的工作, 它为 R_{18} 标记流感病毒结合到成纤维细胞表面上的扩散. 它与 LDL 受体相同, 也具有三种不同的运动方式. 其扩散速度为 $10^{-12} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 数量级.

2.2 流感病毒和红血球融合成象

荧光探针 R_{18} 标记到病毒膜上, 在高浓度时, 它的荧光被猝灭. 如果病毒与红血球发生融合, 探针的稀释导致了猝灭的降低, 荧光强度就增加. 用 CCD 照相机数字荧光成象能够

观察荧光标记的病毒与红血球的融合过程. 也可研究流感病毒与红血球融合以及溶血之间的相互关系^[6,7].

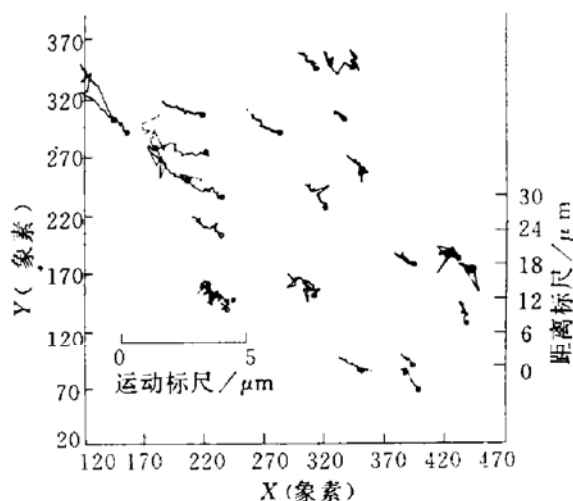


图4 R_{18} 标记的流感病毒颗粒在成纤维细胞上的扩散

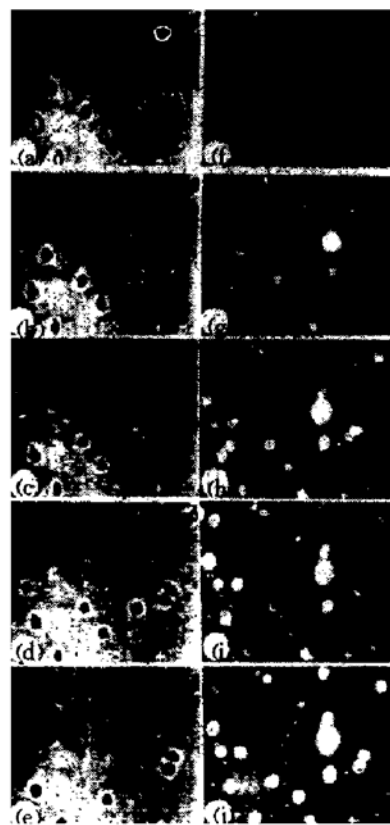


图5 红血球和病毒的融合和溶血过程

pH5.2 混合后的时间为: (a) 3min, (b) 8min, (c) 11min, (d) 14min, (e) 30.5min; (f) 2.5min, (g) 7.5min, (h) 10.5min, (i) 13.5min, (j) 30min, (a) — (e) 亮场, (f) — (j) 荧光.

图 5 表示病毒与红血球在 pH5.2 时的融合 (荧光), 以及溶血 (亮场) 的动态过程。

因此通过 CCD 照相机荧光数字成象就可以直观而清楚地了解融合的动态过程, 通过荧光与亮场的相互比较也可了解融合与溶血之间的相互关系。仅仅一个病毒颗粒的融合就足以引起单个红血细胞的溶血, 但融合和溶血之间存在着明显的时间延迟, 所以用溶血来检查融合事件的动力学是不理想的方法。融合过程一般小于 10min, 溶血发生在 30min 以内, 也不是每个融合的红细胞都会产生溶血。

参 考 文 献

- 1 Axelrod D. J Membrane Biol, 1983; **75**: 1
- 2 Peters R. FEBS Letter, 1988; **234**: 1
- 3 Morrison I E G, Anderson C M, Cherry R J. Biochem Soc Trans, 1990; **18**: 938
- 4 Anderson C M, Georgiou G N, Morrison I E G *et al.* J Cell Sci, 1992; **101**: 415
- 5 Hiraoka T, Sedat J W, Agard D A. Science, 1987; **238**: 36
- 6 Hoekstra D. Biochemistry, 1984; **23**: 5675
- 7 Georgiou G N, Morrison I E G, Cherry R J. FEBS Letter, 1989; **250**: 487

简 讯

首届全国生物化学发光会议胜利结束

近年来发光分析技术在生物医学、环境和农、牧业等领域进展神速, 越来越多的学者认识到了这种技术的广阔前景。我国生物学、化学和物理学界的工作者已在各自领域中进行了多年努力探索, 都认为有必要联合攻关、互相取长补短。1994 年 5 月 18 日至 20 日, 中国生物物理学会光生物专业委员会、中国化学学会分析化学分会和中国物理学会发光分科学会, 在江苏无锡市共同举办了首届全国生物化学发光学术交流会。

这次会议不仅是三个学科的成功会师, 也是近年来发光分析科研与应用的高水平成果检阅。会议共交流论文 82 篇, 复盖了发光分析的主要领域, 重点讨论了下面六个专题: a. 发光及荧光免疫分析法; b. 基因的发光标记及分子杂交; c. 发光法分析自由基、活性氧及抗氧化剂; d. 生物超微弱发光及生物发光; e. 发光试剂与药盒; f. 发光分析仪器。代表们毫无保留地贡献了各自的经验和信息。在较高的层次上进行了跨学科的融合交流。

本次会议到会近 90 人, 其中 35 岁以下青年代表有 30 余人, 占与会者的三分之一以上。他们是发光分析的未来和希望, 展现了我国生物化学发光领域的雄厚潜力和光明前程。

EG&G Berthold 公司生物分析部主任 Anselm Berthold 博士专程到会祝贺。他介绍了先进国家中发光分析技术的进展和应用, 特别提到由于放射性同位素半衰期短、污染处理费用高昂, 欧、美、日等国的发光分析技术获得了长足的发展。数十种发光分析报告单已被临床医生当做诊断根据, 多种发光分析方法已被美国 FDA 批准, 投入临床应用。

这次会议开得热烈紧凑。代表们根据多年实践体会和国际动向, 坦诚地交换了具体设想, 认真讨论了

发展目标。针对目前国内发光分析的主要问题, 专门组织了发光探测仪器和试剂药盒的生产开发研讨会。陕西师范大学化学系、北京大学化学系、华东师范大学生物系、无锡原子能研究所、医科院天津放射医学研究所、军事医学科学院、华西师范大学应用化学系、福州大学化学系和南京江苏中医院介绍了各自研制的试剂和药盒; 北京瑞利光学仪器公司、上海计量局仪器厂、陕西师范大学化学系、中科院生物物理所和空军总医院介绍了所研制的各类发光探测仪器。代表们都认为应该加强发光仪和发光试剂药盒的统筹规划, 初步探讨了由中国生物物理学会牵头、集中协调、联合攻关, 并争取与国际接轨的战略构想。

会议确定我国生物化学发光分析的发展方针是: 主攻生物医学的应用; 加强环保监测的推广; 促进农、牧业中的开发。同时积极扩展国际交流, 有效地提高国际竞争能力。

会议决定在北京和上海分别建立南、北两个常设业务点, 负责发光试剂和药盒的代销和信息交流。北京点暂由医科院基础所吴元德教授主持 (通讯地址: 100730, 北京市东单三条 5 号, 电话 (01) 5134466 转 273); 上海点由华东师范大学生物系胡天喜教授主持 (通讯地址: 200062, 上海市中山北路 3663 号, 电话 (021) 2577577 转 2425)。

会议提出有关各学会不再分别召开本学科的生物化学发光学术交流会, 而是继续联合组织类似的发光分析会议。初步决定第二届全国生物化学发光学术交流会于 1996 年由陕西师范大学组织, 在西安召开。衷心地欢迎更多的同行, 特别是临床医生和免疫学界, 分子生物学界的人士积极参加。

plasm. activates the special transcription factors to attach the *cis*-elements existing on the upstream of ISGs in nucleus and then induces gene expression. The paper reviewed mainly on the signalling pathway and the products which play antiproliferative action of ISGs expression.

Key words interferon (IFN), IFN-stimulated genes (ISGs), IFN-stimulated response elements (ISRE), antiproliferation

cDNA Cloning of Dopamine Receptors. Xing Cheng. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 418—421

Molecular cloning studies on five types of dopamine receptors were summarized. The five types of dopamine receptors are members of family of the G protein-coupled receptors, and divided into two classes by pharmacologic and biochemical criteria: (a) D₁R and D₅R mediating the activation of adenylyl cyclase through G protein (G_s) and (b) D₂R, D₃R, D₄R, inhibiting the activation of adenylyl cyclase through the G protein (G_i). The gene structure, distribution of their mRNA in the brain and location on chromosomes between the two classes of dopamine receptors were compared.

Key words dopamine receptors, cDNA cloning of dopamine receptors, dopamine receptor genes

Fluorescence Digital Imaging Using a Charge-Coupled Device Camera and Its Biological Applications. Hu Kunsheng. (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 421—425

A system, using a cooled slow-scan charge coupled device camera attached to a fluorescence microscope, allows a series of images to be stored, up to 500 fluorescent spots (labelling particles) per image can be identified by position and intensity. The movement of the spots can be traced. The tracking method allows the mobility to be analysed. The receptors of influenza virus and low density lipoprotein on fibroblast have three different types of motion: random motion, directed motion and motion limited to a domain. The high sensitivity of the system leads to short exposures and little photobleaching during the observations. The measurement principle of this system and its biological applications were described.

Key words charge-coupled device, fluorescence imaging, lateral diffusion, motion track, cell fussion

Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Some Tumors. Xiu Bo, Yu Xin, Li Huifang, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 426—429

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a specific mitogen on endothelial cells and promotes angiogenesis. It has been identified that VEGF is very closely linked to the growth of solid tumors. With Dot blot technique, expression of the VEGF mRNA in cancers of stomach, kidney, bladder and colon are investigated. The results showed that the expression of the VEGF mRNA is higher in tumors than in peritumors. There is significant expression of VEGF mRNA in SGC-7901 cells after adding TPA 4h. Human bladder carcinoma cell line BIU-87 transfected with antisense N-ras exon 1 DNA fragment inhibit VEGF