

光致漂白荧光恢复技术及其进展

张 孔 华 徐 成 汤

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

提 要

本文概述了荧光漂白恢复 (FPR) 技术的基本原理、方法、现状和最新进展。其次论述了影响 FPR 测量的若干因素及 FPR 对细胞的影响。

1972 年 Singer 和 Nicolson 提出细胞膜的“流动镶嵌模型”指出,膜是流动的。业已证明,生物膜的多种重要功能都与膜的流动性密切相关。因此定量测定膜分子的侧向扩散运动已成为研究生物膜的一个重要课题。

Frye 和 Edidin(1970) 用细胞融合技术最先证明了膜蛋白有侧向扩散运动现象。而正式以定量方法测量细胞膜表面分子侧向运动始于 1974 年。Poo 和 Cone(1974) 用吸收光漂白法 (Absorption bleaching) 测定了视网膜视杆外节盘膜中视紫红质的扩散系数。Peters 等 (1974) 用异硫氰基荧光素 (FITC) 标记红细胞膜蛋白,用微荧光光解法 (Fluorescence Microphotolysis, 简称 FM) 测定了其扩散系数。此方法经过改进成为荧光漂白恢复测定法 (Fluorescence photobleaching recovery, 简称 FPR)。Axelrod 等 (1976) 首先提出 FPR 的理论及定量分析的关系式。1976 年后国外许多实验室相继建立了 FPR 装置,主要应用于测定细胞膜中脂类和蛋白质的运动。已发表的文献有百篇以上,而且召开了 FPR 技术应用于细胞生物学的国际讨论会。国内的一些单位于 1982 年前后也开展了 FPR 工作。

的荧光标记分子产生不可逆的光化学漂白,随即用衰减 10^3 — 10^4 倍的弱光束监测漂白区域荧光恢复的过程,获得荧光漂白恢复动力学曲线。从曲线的形状,可以确定输运过程的类型,并可计算出扩散系数 (D) 或流动速度 (V)。其次可测定出异质样品如细胞表面上荧光标记分子的可动及不可动组份的比例。这一比例具有一定的生物学意义。

显示荧光恢复采用“荧光百分数” $f_k(t)$ 曲线,典型的 $f_k(t)$ 理论曲线如图 1 所示。在低漂白极限时分别给出了不同的输运过程(扩散、流动或两者混合)的 FPR 曲线。曲线表明扩散恢复是一个斜率逐步递减的单调曲线;流动恢复曲线呈 S 形,而扩散和流动混合的情况较为复杂。

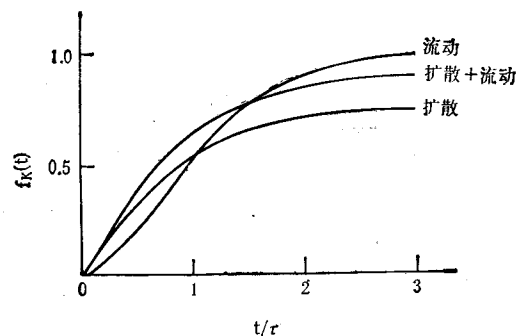


图 1 典型的 $f_k(t)$ 理论曲线

一、FPR 技术的原理与实验方法

FPR 技术的基本原理^[1] 用一束强激光脉冲,使细胞表面微区域(小于 10 平方微米)上

实验方法 FPR 装置由光学和电子学两部分、并以落射式荧光显微镜为中心组装而成。

利用荧光探针的高灵敏度和特异性标记样品。根据选用荧光探针的光学特性,选择一定波长的激光器作为激发光源。微弱的荧光信号由高灵敏度的光电倍增管或光子计数器检测。FPR系统使用微计算机实时控制实验程序和数据采集,并由微机对实验曲线进行理论拟合。

FPR 方法的可聚焦光斑直径约 1 微米,可检测灵敏度 200—2000 荧光分子/ μm^2 ,测量的有效扩散系数范围在 10^{-6} — $10^{-12}\text{cm}^2/\text{s}$ 。

二、FPR 技术的进展

近十年来,FPR 与其它新技术的结合,使 FPR 的方法与设备又有了显著的改进和创新,为生物学研究提供了一些新的研究手段和分析手段^[2-7]。经归纳大致有下列几方面:

1. 荧光图象漂白及其调制检测

Smith 和 McConnel (1978) 最先报道了荧光图象漂白恢复技术 (Fluorescence Redistribution after Pattern Photobleaching, 简称 FRAPP), 用于测定细胞膜表面分子一维或二维的运动。基本方法是在光路中插入一个掩膜,经光漂使漂白区域形成周期性荧光图象,结合象的付里叶变换用于数据分析。荧光图象漂白方法可克服细胞移动的影响,特别适用于测量很慢的扩散运动,测量范围在 10^{-9} — $10^{-13}\text{cm}^2/\text{s}$ 。同时,还可以检测非扩散运动。1985 年我们曾用激光漂白荧光图象的微光电视,实时观察和记录了林蛙第一次卵裂时卵表面的运动^[8]。

Koppel (1979) 提出一种新的多点分析法 (Multipoint analysis), 通过伺服控制振镜,使聚焦光束对漂白区作顺序扫描,以此监测光漂后荧光探针的重新分布,从而提高了实验灵敏度。以后 Koppel 和 Sheetz (1983) 又把荧光图象漂白技术与激光扫描方法结合起来,可以同时测量快的和慢的扩散运动,这一方法扩大了 FPR 测量的范围。

Lanni 和 Ware (1982) 研制了一种荧光漂白恢复的调制检测装置。用固定光栅进行光漂,然后驱动光栅匀速平移,对样品扫描,这样便会在荧光恢复测量过程中产生一个周期性荧

光信号的调制。扩散系数是通过光电流交流组份调制幅度的衰减时间来计算。这方法的测量对样品运动是不灵敏的,数据偏差通过标准方法予以直接修正。

2. 连续微荧光光解法

Peters 等 (1981) 在原有的 FM 方法基础上提出了连续微荧光光解法 (Continuous Fluorescence Microphotolysis, 简称 CFM)。用均匀光斑对荧光标记细胞微区连续地照射,监测其荧光信号的衰减,于是在照射区内荧光粒子数和分布会产生两个竞争过程:不可逆光分解的荧光耗尽和扩散的补充,由此可求出光反应的速率和扩散系数。在 CFM 方法中,可展现扩散详细过程,有较高的信噪比。由于测量光束强度高于 FPR 几个数量级,因此,高强度和长时间辐照可能会引起膜蛋白光化学交联。

3. FPR 用于测定旋转运动

Smith 等 (1981) 使用改进的 FPR 装置测定膜分子的旋转运动。此方法的定量基础是十分简单的,利用平面偏振光对发色团的光化学破坏可引起膜系统中分子定向选择,然后用监测光束测定发色团跃迁偶极子的各向异性分布。Johnson 和 Garland (1981) 在 FPR 的基础上,结合长寿命三重态探针,用荧光耗尽消偏法 (Depolarization of Fluorescence Depletion) 测定了膜蛋白的旋转扩散系数 D_R 。其方法主要点是采用了声光调制器和泡克尔盒,用于调制激光强度和偏振面。测量灵敏度高。

4. FPR 象增强分析法

Kapitza 等 (1984) 发展了一种新的实验方法: FPR 的象增强分析法 (简称 VIEDO FPR), 此方法允许定量检测二维荧光强度分布的变化。实验系统主要使用了微通道板象增强器和象分析器处理,特别适用于微弱荧光。Salmon 等 (1984) 也使用 VIEDO FPR 测定了标记海胆受精卵的 Tubulin 的扩散运动。

三、影响 FPR 测量的几个主要因素

1. 激光模式和光斑尺寸的影响

荧光恢复曲线的形状,不仅与运输的类型

有关,还依赖于激光束截面特征和漂白量。非理想的高斯分布会引起光斑测量中 $\pm 15\%$ 的模糊度,由此可能引起扩散系数 $\pm 30\%$ 的测量误差^[1]。由于 D 正比于 W^2 (W 为光束半宽度),应对光斑尺寸进行实际测量。Schneider 和 Webb (1981)发展了亚微米的光束测量^[9],这些方法已应用于 FPR 测量。其次,光漂时间 T_B 的选择应满足 $T_B \leq 0.1\tau_{1/2}$ ($\tau_{1/2}$ 为荧光恢复的半时间),过大会使 D 值偏小。

2. 漂白和测量光束的重合性

在 FPR 测量过程中,引起扩散系数的一个系统误差是测量光束相对于漂白光束的位移,Barisas (1980) 已提出位移的 d 值不能大于 $0.3W$ ^[10]。究其原因,是中性衰减片的楔角和机械地移动引起两个光斑的不重合。为了解决光斑重合问题,可使用分光干涉技术固定分离漂白光束和测量光束,这样光束不重合性仅为 6 弧秒。另一方法是使用声光调制器,以不同的占空比衰减激光束的平均强度。

3. $F_k(0)$ 、 $F_k(\infty)$ 和 $\tau_{1/2}$ 的不确定性

这三个参数的不确定性会引起 FPR 计算的误差。因为在实验中要直接选取 $F_k(0)$ (初始荧光) 和 $F_k(\infty)$ (为时间 t 趋于 ∞ 时荧光恢复的强度)的值是很困难的,这些不确定性主要受 FPR 仪器本身的限制。例如仪器测量死时间,测量过程中细胞运动或激光束的漂移等等。为此,Yguerabider 等 (1982) 发展一种线性的 FPR 数据分析^[11]。通过倒易函数的线性拟合求取 $\tau_{1/2}$,最后计算 D 值。Van Zoelen 等 (1983) 在 Yguerabider 的基础上,发展了采用一个任意参考荧光强度 $F_{ref}(t)$ 来取代 $F_k(0)$,从而消除了 $F_k(0)$ 的不确定性^[12]。我们在 FPR 数据处理时,则采用了多元非线性优化法,对 $F_k(\infty)$, K 和 τ_D (K 为漂白参量; τ_D 为特征扩散时间)进行拟合,已应用于 FPR 数据的计算^[13]。

4. 化学恢复的影响

在 Axelrod 的 FPR 理论中,一个重要假设是光漂中的荧光化学恢复是可忽略的,否则 FPR 理论和数学分析就不能适用。Johnson 和 Vanderkool 等人都对 FPR 作了严格对照试验

和控制化学恢复实验^[14,15],以排除荧光染料荧光恢复的可能性,并证明 FPR 方法是有效的。

四、FPR 对细胞的影响^[3,4,16]

在 FPR 实验中,光漂的激光功率密度约为 10^4W/cm^2 ,因此,细胞表面是否会在强激光漂白下发生潜在光损伤,并引起严重的人工产物。对于这问题尚有争议,许多人已作了一系列实验对比进行解释和论证,大部分实验已倾向于 FPR 方法是可信的,可以避免光漂引起的人为影响。FPR 对细胞的影响有以下几方面:

1. 热效应

根据典型的 FPR 实验参数条件,可能产生热的温升速率为 10^5°C/sec ,由于水的高热传导,热量可很快地被耗散,在 10^{-6}sec 内达到热稳态。Axelrod 用热传导方程从理论上计算出典型的光漂剂量使细胞表面温升不会大于 0.03°C ,荧光恢复过程期间的温升仅为 10^{-5}°C 。Jacobson 等人 (1978) 用显微镜和扫描电镜观察,已证明 FPR 不会改变细胞膜形态以及膜的渗透性。同时,他还证实用各种猝灭剂和抑制剂对单线态氧或自由基(系光损伤中间产物)进行猝灭或抑制,结果表明它们不会影响 FPR 的结果。

2. 光化学效应

光化学损伤可能引起膜蛋白的光交联。Leppock 等 (1978),Sheetz 和 Koppel (1979) 用 FITC 标记红细胞和 BHK 细胞,发现在低强度的剂量下,过长的光漂时间,使细胞标记的发色团吸收光,最终分解蛋白,引起交联,使扩散率下降。Sheetz 和 Koppel 又提出等剂量的较高强度和减小光漂时间会减小损伤。Wolf 等 (1980) 提出使用两个不同染料 (Fluorescein 和 Rhodamin) 标记同一个细胞表面,用 FPR 方法测定扩散率均获得相同的结果。如果在测定之前,先用光猝灭一种染料也不会影响另一种荧光染料的测量,从而证实光漂不会对细胞表面有光损伤的影响。

为了证实 FPR 的可靠性,在一些实验中,用不同方法测定同一样品并进行类比印证。

Wey 等人(1981)的实验证明 FPR 测定视紫红质受体的扩散系数与吸收光谱法测定的值是一致的。Koppel 和 Sheetz (1981) 用细胞融合方法和 FPR 方法同时测量红细胞蛋白的扩散系数,结果表明它们的 D 值是相同的, FPR 并不会改变红细胞蛋白的侧向流动。

3. 配体的影响

扩散系数的测定是依赖于细胞表面荧光标记分子浓度的梯度变化,因此,外源标记物显然不如内源膜组分。有实验已证明交联作用与标记物发色团的价数、浓度和作用时间有关。在 FPR 实验中应尽可能使用低价配体,限制标记浓度,标记时间要短,以减少光交联。

综上所述, FPR 技术迅速的发展,使其方法渐趋完善和可信,已发展成为定量测定生物膜流动性的方法之一。目前, FPR 技术已广泛应用于测量各种系统的平移扩散,例如:生物膜和人工膜,溶液中蛋白质分子和化学工业中分子聚合过程的动力学变化等方面。

本文承蒙顾国彦教授指教,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Axelrod, D. et al.: *Biophys. J.*, **16**, 1055, 1976.

- [2] Jacobson, K. et al.: *Fed. Proc.*, **42**, 72, 1983.
 [3] Koppel, D. E.: *Techniques in the Life Sciences*, (J. Metcalfe and T. R. Hasketh, Eds.), Vol. **B4**, Lipid and Membrane Biochemistry, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1982.
 [4] Koppel, D. E.: *Fast Methods in Physical Biochemistry and Cell Biology* (R. I. Sha'afi and S. M. Fernandez, Eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 339—367, 1983.
 [5] Koppel, D. E. and Sheetz, M. P.: *Biophys. J.*, **43**, 175, 1983.
 [6] Kapitza, H. G. et al.: *Biophys. J.*, **45**(2, Pt), 89, 1984.
 [7] Salmon, E. D. et al.: *J. Cell. Biol.*, **99**, 2157, 1984.
 [8] 张孔华等:《第三次生物膜学术讨论会论文摘要》, **P**, 20, 1985.
 [9] Schneider, M. B. and Webb, W. W.: *Appl. Optics*, **20**, 1382, 1981.
 [10] Barisas, B. G.: *Biophys. J.*, **29**, 545, 1980.
 [11] Yaguerabide, J. et al.: *Biophys. J.*, **40**, 69, 1982.
 [12] Van Zoelen, E. J. J. et al.: *Biophys. J.*, **42**, 103, 1983.
 [13] 徐成汤等:《细胞生物学杂志》, **7**, 166, 1985.
 [14] Jacobson, K. et al.: *J. Supramol. Struct.*, **5**, 565, 1976.
 [15] VanderKool, J. M. et al.: *J. Cell. Biol.*, **100**, 435, 1985.
 [16] Schlessinger, J. and Elson, E. L. (G. Ehrenstein and H. Lecar, Eds.), *Methods of Experimental Physics*, Academic Press, New York, pp. 197—227. 1981.

[本文于 1986 年 8 月 12 日收到]

(上接第 80 页)

三、讨 论

McAb 的分离和纯化常用经典的多克隆抗体的方法,如盐析和 DEAE 离子交换柱层析二步法或亲和层析法^[5,6]。我们认为,前者纯化步骤繁琐,所需时间长,因 McAb 是针对单一抗原决定簇,分子空间结构极微小的改变就可能影响其活性,随着提取时间的延长,活性也有丧失。样品易被稀释,提取后的产品往往需要浓缩;亲和层析法,虽有特异性强的优点,但某些抗原用此法不易得到纯化的 McAb。我们改用 FPLC 系统一步纯化 McAb,结果较满意(图 1)。

FPLC 系统,其运转由微机操作,完全按操作者设计的指令进行,实验结果重复性好。免

疫活性实验证实 McAb 经 MonoQ 柱,抗体活性丧失较少,与文献报道基本一致^[7],即分离后的蛋白活性仍保持在 90—100%。

参 考 文 献

- [1] Cooper, E. H. et al.: *Clinical Chemistry*, **29**(9), 1635, 1983.
 [2] Pharmacia FPLC Application File: *Analysis of Protein in Body Fluids* AF Printed in Sweden by Offsetcenter, 1984-1.
 [3] 何忠效等:《等电聚焦》,科学出版社,1985。
 [4] 吕植等:《解放军医学杂志》, **6**, 17, 1981。
 [5] Goding, J. W.: *Monoclonal Antibodies Principles and Practice*, p. 98, Academic Press, 1983.
 [6] Schneider, C. et al.: *J. Biochem.*, **257**(18), 1096, 1982.
 [7] Clezardin, P.: *J. Chromatography*, **319**, 67, 1985.

[本文于 1986 年 10 月 28 日收到]