

# FPR 实验装置的微机化\*

徐成汤 张孔华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

## 提 要

微机化荧光漂白恢复实验装置具有对 FPR 实验过程实时自动控制、实验数据自动采集以及对实验数据进行三参量非线性理论曲线拟合的功能。所采用的微型计算机是 IBM PC/XT。

荧光漂白恢复 (Fluorescence Photobleaching Recovery, 简称 FPR) 实验装置是根据 Axelrod<sup>[1]</sup> 1976 年建立的 FPR 理论而设计的。在国内外生物学研究领域, 这一装置已广泛应用于细胞膜流动性的研究<sup>[2]</sup>。我们实验室于 1981 年也建成了该装置<sup>[3]</sup>。测定了鼻咽癌细胞膜表面受体的扩散系数<sup>[4]</sup>; 研究了林蛙卵表面受体的运动方式<sup>[5,6]</sup>; 并且建立了计算机三参量非线性理论曲线拟合的数据处理方法<sup>[7]</sup>。为了进一步提高实验的重复性和精确度, 必须提高对荧光强度和时间的测量精度及其重复性。为此我们对实验系统用 IBM PC/XT 微型计算机进行全盘微机化作了尝试。实现了实验过程的实时微机控制、实验数据自动采集及对实验数据进行三参量非线性理论拟合。

## 设计思想与实验方法

FPR 实验方法的基本原理是: 用一强激光脉冲(功率密度约为  $10^4-10^5 \text{W/cm}^2$ ) 照射荧光标记的细胞表面微区(约  $10 \mu\text{m}^2$ ), 使该区的荧光分子产生瞬时漂白。由于细胞表面分子的运动, 微区外的荧光分子会进入漂白区, 使该区的荧光强度得以恢复。这一荧光恢复过程可以通过监测光束(强度为漂白光束的  $10^{-3}-10^{-4}$  倍)来监测。根据 FPR 理论, 这一恢复过程的理论函数是一个带有三个参量的非线性无穷级

数函数<sup>[1]</sup>。由此可求得细胞表面分子的扩散系数或流动速度。

### (一) 实验系统

实验系统示于图 1。从氩离子激光器 Ar-

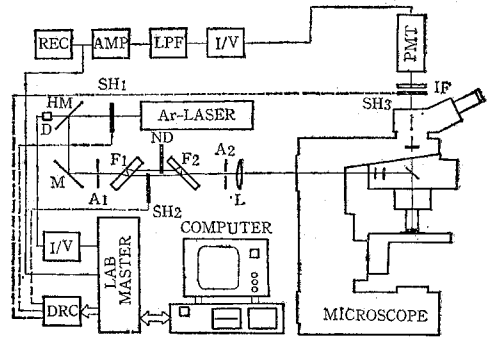


图 1 实验系统图

REC 记录仪; AMP 放大器; LPF 低通滤波器; I/V 电流-电压转换器; PMT 光电倍增管; SH1, SH2, SH3 快门; IF 干涉滤光片; HM 半透镜; D 光电检测器; M 反射镜; F1, F2 平板玻璃; ND 中性衰减片; A1, A2 小孔; L 透镜; DRC 驱动电路; Lab Master 实验主控器; COMPUTER 计算机; MICROSCOPE 显微镜; Ar-LASER 氩离子激光器

LASER (南京电子管厂 360 型) 发出的激光束经快门 SH1, 半透镜 HM, 反射镜 M, 分束器(由 F1, F2, SH2 和 ND 组成), 小孔 A2, 匹配透镜 L 进入显微镜 (Leitz Otholux II) 落射至样品。由样品产生的荧光则经快门 SH3, 干涉滤光片 IF 进入光电倍增管 PMT。PMT

\* 本文摘要曾在中国细胞生物学学会第三次会议上发表。

输出的光电流经 I/V 转换器,低通滤波器 LPF,放大器 AMP,再经 Lab Master 内的 A/D 转换器进入计算机。

通过半透镜 HM 的参考光经光电检测器 D, I/V 转换器,通过 Lab Master 内的 A/D 转换器也进入计算机。这一光路用于补偿激光强度的变化。

三个快门 SH1, SH2, SH3 的动作由计算机经 Lab Master 和驱动电路 DRC 来控制。用于进行实验过程的程序控制。

REC 是模拟量记录仪。用于实时监视。

## (二) 硬件环境

本系统所需的硬件环境为:

- IBM PC/XT 微计算机。
- 两个软磁盘。其中 B 盘用于存放数据文件。

- Lab Master (TECMAR 公司出品)。内含 12 位 16 路单端或 8 路差分输入的 A/D 转换器, 12 位 2 路 D/A 转换器, 一个 AM9513 系统时间控制器和一个 8255 并行接口。

- IBM 80CPS 打印机。
- FWX-4675 X-Y 绘图仪(古田电声设备厂)。

## (三) 软件

本实验系统的基本软件有

- 实验控制用主程序
- 实验过程控制和数据采集子程序
- 数据处理程序

### (1) 主程序

其主要功能为:

- a) 接受用户对实验条件的设置。
- b) 通过调用手工测量子程序,可以手工控制实验系统和测量荧光及参考光的强度,以便于实验系统的调试和样品的选择。

- c) 通过调用实验过程控制和数据采集子程序,可使实验过程自动进行,并自动采集实验数据。

- d) 打印和保存实验参数和原始数据。

由于实验样品是多样的,对于不同样品,实验参数及条件往往是大相径庭的。因此该主程

序是用解释 BASIC 编写的,以获得较好的样品适应性。

### (2) 实验过程控制及数据采集子程序

该子程序是本实验系统的重要部分。它程序地控制实验系统各部分协调工作,完成实验过程的实时控制,采集实验数据进入计算机,使之形成数据文件,以备数据处理程序调用。由于实验结果强烈地依赖于时间的测量精度,所以该子程序采用宏汇编语言编写。通过主程序调用实现实验自动进展。

根据 FPR 实验的要求,需要测量的有漂白前样品的原始荧光  $F_i$  和漂白后在不同时刻的荧光  $F_k(t)$ 。为使在理论曲线拟合时有足够多的数据,我们在漂白后 50 个不同时刻对荧光值进行测量,该实验点子数被预置入计数器 COUNTER。一般,样品的荧光都较弱且有明显的起伏,为此在每一时刻前后都对荧光和参考光各测十次,取其平均值,即从时刻  $t$  前 180 ms 起每间隔 40ms 测量一次,直到时刻  $t$  后 180ms 为止共测十次。然后对这十次测量值取时间平均值,其对应的时刻就是十次测量时间的平均值  $t$ 。此外还进行了激光强度补偿。为了避免光电倍增管被漂白光损伤,在漂白期间必须关闭光电倍增管,并在漂白前后各设一时间延迟,以匹配快门的机械响应。由于在我们的系统中,扩散系数等结果是通过理论曲线的拟合来求取的,根本不需要测量漂白后初始荧光值  $F_k(0)$ <sup>[7]</sup> (实际上,这一值也是无法测得的),所以时延的宽容量较大,相应降低了对快门的要求。为了适应较宽的扩散系数测量范围,恢复期荧光测量的时间间隔必须是可变的。为此在程序设计中设置了两个实时计时器 TIMER1 和 TIMER2 (包含在 AM9513 中),分别预置漂白后进行第一次荧光测量的时刻及其以后的测量时间间隔。它们的改变是通过主程序用键盘进行的。为了使快速的电子测量装置和慢速的机械动作相匹配,在调用 A/D 子程序前后都插入了宏延时 DELAY,以保证系统的正常动作。另外原始数据文件是二进制的,这既可加速文件的存取,又可在一张盘片上容

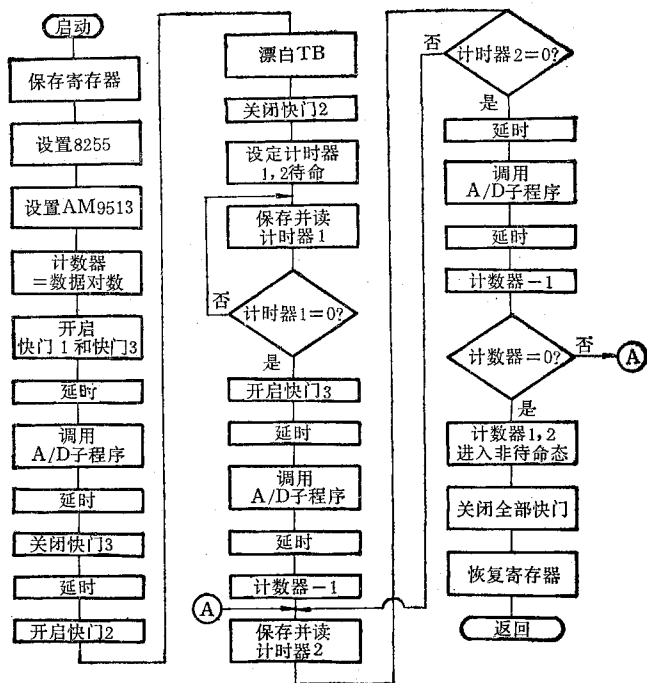


图2 实验过程控制和数据采集子程序流程图

纳更多的数据文件。

子程序的流程示于图2。

### (3) 数据处理程序

数据处理分两步进行。首先对数据进行预处理。其主要任务是对原始数据进行统计学处理,并对激光强度变化进行补偿,打印出中间数据,且在绘图仪上给出实验曲线,以供用户判断,并为以后的理论曲线拟合提供中间数据文件。第二步对经预处理的数据按 Axelrod 理论给出的理论函数进行三参量非线性拟合,以最终求出扩散系数、不动分量、漂白率和漂白后初始荧光强度等值。关于这部分的详细内容已发表过<sup>[7]</sup>,在此不再赘述。有所改进的是,因被拟合的理论函数是一个无穷级数函数,在求函数值时要花费较多的时间,因此拟合程序是用编译语言编写的,以尽量缩短拟合时间。为了使用方便,数据输入有两种方式:键盘方式和文件方式;而且试解也不再需要用户选取,计算机能自动选取。下面略叙计算机如何自动选取试解。我们在前面已经谈到,被拟合的理论函数是带有三个参量的无穷级数函数。这三个参量

分别是 i) 当时间  $t$  趋于  $\infty$  时  $F_K(t)$  的渐近值  $F_K(\infty)$ ; ii) 漂白参量  $K$ , 它和漂白前的原始荧光  $F_i$  和漂白后的初始荧光  $F_K(0)$  有关,它们之间的关系满足  $K \cdot F_K(0)/F_i = 1 - e^{-K}$ ; iii) 特征扩散时间  $\tau_D$ 。在拟合时,用户根据实验数据,经验地估计这三个参量的值,以此作为试解输入给计算机,计算机通过迭代能求得在给定控制误差下的拟合参量  $F_K(\infty)$ 、 $K$  和  $\tau_D$ 。由这三个参量通过理论函数值的计算就能得到一条和实验数据吻合最佳的曲线。由此可知确定试解本身就不是一件很简单的工作,对于一个没有经验的用户就更麻烦了。所以我们在数据处理程序中增设了试解自动选取部分。其原理如下:

a)  $F_K(\infty)$ : 取最后 5 个  $F_K(t)$  的平均值作为  $F_K(\infty)$  的试解。

b)  $K$ : 对最初 4 个  $F_K(t)$  进行一次线性拟合,并把该直线外推到  $t = 0$  时的值作为漂白后初始荧光  $F_K(0)$  的试解,通过解方程  $K \cdot F_K(0)/F_i = 1 - e^{-K}$ , 求得  $K$  的试解。

c)  $\tau_D$ : 用插入法求出对应于荧光恢复幅

值一半的时间  $THALF$ 。把  $V_D = 1/\tau_D = 1.3/THALF$  的值作为第三个参量的试解。

经理论曲线拟合后,打印出扩散系数、不动分量、漂白率和漂白后初始荧光等结果;并在绘图仪上给出实验点子和拟合的理论曲线,以供用户检验拟合效果。

## 结 果

为了验证实验系统数据采集的准确性,我

们用异硫氰基荧光素标记的伴刀豆球蛋白 A (F-ConA) 溶于甘油中作为样品,分别测得由计算机采集的与用记录仪直接记录的 FPR 曲线,分别示于图 3.a 和 3.b。可以看出经 A/D 转换后由计算机采集的曲线和记录仪记录的模拟曲线是一致的。

为验证理论曲线拟合程序及实验系统(包括光学系统),我们测定了  $0.394 \mu\text{mol/L}$  浓度经异硫氰基荧光素标记的琥珀酰化伴刀豆球蛋白

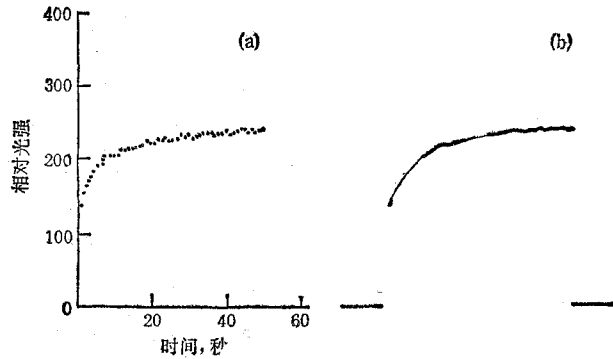


图 3 由计算机和记录仪得到的 FPR 曲线的比较

(a) 计算机曲线 (b) 记录仪曲线

白 A (FS-ConA) 在 76% 甘油浓度 (V/V) 溶液中的扩散系数。

样品制备方法: 同文献[7]。

实验条件: 激光波长  $4880 \text{ \AA}$ , 单模, 光斑束腰为  $1.66 \mu\text{m}$  (物镜 25 倍), 光漂功率  $< 3 \text{ mW}$ , 光漂时间  $150 \text{ ms}$ , 温度  $22^\circ\text{C}$ 。

实验点子和理论拟合曲线示于图 4。其中“●”为实验点;实线是理论拟合曲线。对 6 条曲线进行统计,求得扩散系数为  $(0.433 \pm 0.041) \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

## 讨 论

1 从图 3 可以看到由计算机采集的 FPR 曲线和由记录仪直接记录的曲线是一致的。从而验证了计算机实验数据采集部分。

2 FS-ConA 在 76% 浓度 (V/V) 甘油溶液中的扩散系数经本系统测得为  $(0.433 \pm 0.041) \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。这和 Jacobson<sup>[8]</sup>测得的

们用异硫氰基荧光素标记的伴刀豆球蛋白 A (F-ConA) 溶于甘油中作为样品,分别测得由计算机采集的与用记录仪直接记录的 FPR 曲线,分别示于图 3.a 和 3.b。可以看出经 A/D 转换后由计算机采集的曲线和记录仪记录的模拟曲线是一致的。

为验证理论曲线拟合程序及实验系统(包括光学系统),我们测定了  $0.394 \mu\text{mol/L}$  浓度经异硫氰基荧光素标记的琥珀酰化伴刀豆球蛋白

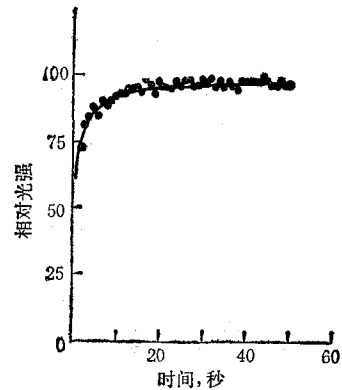


图 4 FS-ConA 的 FPR 实验点及理论拟合曲线

$0.45 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  是一致的。说明我们的实验系统是可信的。

3 虽然目前国内外生产的激光器都带有稳光系统,光强度的稳定度可达 1—2%,但是这一指标一般都是在激光器的光输出口处测得的,而在各实验系统中,光路都是有一定长度 (下转第 59 页)

过氧化物酶催化的放射碘化法<sup>[5]</sup>, 可显示 7 条区带 ( $\alpha_2$ ,  $\alpha\delta$ ,  $\delta_2$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  和  $\delta$ ), 而且影像清晰。但其操作步骤较多, 需转速 40000g 的超速离心机, 有时放射自显影长达 27 天<sup>[11]</sup>。及后, 大多常用 PAS 试剂染色或 GAR-HRP 检测法<sup>[6]</sup>。前法不够灵敏, 所需点样量大, 人红细胞溶血液 30 $\mu$ l 仅显出 GP 的个别区带, 改用红细胞膜点样 35 $\mu$ l, 始获满意结果。一般 PAS 染色只见有五条区带, 有时 PAS-4 区带不清楚 (详图 1)。后一方法, 作者等也曾多次试用, 它虽勿需同位素标记, 但图谱中会出现少数非特异性区带。此外, 两法还存有一共同缺点, 即显色后无论凝胶或印迹的硝酸纤维素膜均须避光保存, 而且在进行图谱摄影时, 其 GP 区带的淡红色 (PAS 试剂) 或紫灰色 (GAR-HRP 法) 将给反差造成一定困难。

结合本文实验结果, 我们认为免疫印迹是检测人红细胞膜 GP 的一种简易而实用的方法。因为除转渍仪 (Transblotter) 和 <sup>125</sup>I-蛋白 A 外, 所需设备药品均属一般生化实验室常用。每次测定只需洗涤红细胞 0.025—0.05ml。红细胞溶血液可在 -20 $^{\circ}$ C 长时间冻存, 重现性仍好。方法的特异性较高, 可反映人类和非人灵

(上接第 63 页)

的。由于室内的灰尘、气流及温差等因素, 随光路的延伸光稳定度将有所下降。考虑到这一点, 我们在系统中对激光强度的变化进行了补偿, 从而进一步提高了实验数据的可信性, 并相应地降低了对激光器和实验室条件的要求。而且组成实验曲线的每一实验点还经过了十次平均, 有利于提高实验曲线的信噪比。

4 由于漂白后到打开光电倍增管进行数据采集的延迟时间是由计算机产生的, 有足够高的精度, 保证了时间测量的精确度。而这一因素对于扩散系数的准确性有着极为重要的意义。关于这一点, 我们以前<sup>[7]</sup>曾讨论过。

5 在程序设计中考虑了人机会话、手动控

长类动物红细胞 GP 的电泳行为差异<sup>[12]</sup>, 并能检出人红细胞的各种 GP 变种<sup>[8]</sup>, 区带清晰。其放射自显影易于保存和翻印成照片。本法的实验流程不太长, 耗费亦不高。

本文的部分工作是作者在美国纽约爱因斯坦医学院生化系及内科血液病研究室访问期间完成, 曾得到 Blumenfeld, O. O. 和 Nagel, R. L. 两教授的支持和指导, 谨此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Anstee, D. J.: *Semin. Hematol.*, 1981, 18, 13.
- [2] Blumenfeld, O. O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 2727.
- [3] 卢义钦等: 《生命的化学》, 1986, 6(5), 6.
- [4] Steck, T. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 2135.
- [5] Boxer, D. H. et al.: *Biochem. J.*, 1974, 137, 531.
- [6] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 4350.
- [7] Blumenfeld, O. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 5544.
- [8] Lu, Y. Q. et al.: *Blood*, 1987, 69, 618.
- [9] Johnson, D. A. et al.: *Gene Anal. Techn.*, 1984, 1, 3.
- [10] 刘俊凡等: 《中国免疫学杂志》, 1988 (待发表)。
- [11] Vengelen-Tyler, V. et al.: *Transfusion*, 1981, 21, 1.
- [12] Lu, Y. Q., Liu, J. F. et al.: *Biochem. Genet.*, 1987, 25, 477.

[本文于 1988 年 1 月 20 日收到]

制以及在给出实验数据的同时, 还给出实验曲线、理论拟合曲线, 这对使用、维护实验系统提供了很大的方便。

## 参 考 文 献

- [1] Axelrod, D. et al.: *Biophys. J.*, 1976, 16, 1055.
- [2] Peters, R.: *Cell Bio. Int. Rep.*, 1981, 5, 733.
- [3] 张孔华等: 《细胞生物学杂志》, 1982, 4(3), 33.
- [4] 孙伟利: 《实验生物学报》, 1982, 15, 209.
- [5] 顾国彦等: 《实验生物学报》, 1983, 16, 467.
- [6] 徐成汤等: 《实验生物学报》, 1984, 17, 471.
- [7] 徐成汤等: 《细胞生物学杂志》, 1985, 7(4), 166.
- [8] Jacobson, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 433, 215.

[本文于 1987 年 12 月 15 日收到]