

用 FPR 方法研究鸡胚细胞质膜和鸡卵黄球膜蛋白质的侧向扩散

蒋连伟 刘子遥 苏雅娴 李昭杰

(北京医学院) (中国科学院生物物理研究所,北京)

过去几年中应用荧光漂白恢复 (FPR) 方法对细胞膜上蛋白质的流动性进行了若干研究^[1,2]。该方法在细胞膜研究中已引起重视。膜上大分子迁移的信息特别有助于了解细胞膜在生长和分化过程中的动态变化,因而对于诸如细胞恶变过程或“细胞重建”^[3]过程的研究有重要意义。

细胞重建的实验结果表明,受精未孵育莱亨鸡胚的胚下表层卵黄球(其中包含大量卵黄颗粒),在离体培养下可逐步重建成核和细胞。为了分析卵黄球膜在细胞重建过程中的变化和比较重建细胞与鸡胚细胞质膜的性质,本文首先研究鸡胚细胞(成下层细胞)质膜和重建细胞之前的卵黄球膜蛋白质分子的侧向扩散。

一、方 法

膜蛋白质分子以适当的荧光探针标记,使已知强度的激光束准直聚焦到细胞膜上一定区域,照射期间引起标记荧光漂白(不可逆的光化学猝灭),经过短时间漂白后,随即以强度大大衰减的同一激光束监测漂白区域的荧光。由于膜上蛋白质分子的侧向迁移,漂白区中荧光猝灭的蛋白质分子可移出该漂白区,周围荧光标记分子可迁移到该区域内,呈现荧光恢复。

1. 荧光探针 本实验采用异硫氰荧光素 (FITC) 为荧光探针,其吸收峰约 492 nm,发射峰约 517 nm。FITC 对膜上不同种类的蛋白质的标记无特异性。使用的浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,用量为

$$\text{FITC (V)}/\text{细胞(V)} = 1.5 \sim 1.6(V)/2(V),$$

探针原液浓度小或用量过少都可能影响细胞标记率。

2. 细胞制备与标记^[4,5] 取受精未孵育莱亨鸡胚的胚下表层卵黄 0.75 毫升悬浮于 2 毫升 0.9% NaCl 溶液中,取鸡胚细胞 0.5 毫升放入 2 毫升 0.9% NaCl 溶液中,分别用玻璃小匀浆器匀浆 5 次。将胚下表层卵黄球样品分成三、四等份,每管再加 0.9% NaCl 溶液至 4—6 毫升。将胚细胞样品分成二等份,每管加 0.9% NaCl 至 3—4 毫升。置于冰箱内 (4℃) 使卵黄球和鸡胚细胞自然下沉,或采用蔗糖梯度离心处理。弃去上浮液,分别取下沉的卵黄球和胚细胞。若为离心处理,还应以 0.9% NaCl 洗一次。将胚细胞和卵黄球分别用 2 毫升 pH 8.0 的 PBS 缓冲液(含 NaCl)悬浮,然后以 FITC 标记 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 室温, 15—25 分钟),标记后立即用 PBS 缓冲液洗去游离的荧光染料,再以适量的 PBS 液悬浮待用。

本文 1981 年 8 月 29 日收到。

3. 实验参量的确定^[6,7] 监测样品所得到的荧光漂白恢复用 $F(t) - t$ 曲线给出, $F(t)$ 为漂白区在监测时刻 t 的荧光强度. 由恢复曲线可定出 $F(i)$, $F(\infty)$, $F(0)$. 恢复半时间 $\tau_{1/2}$ 由下式定出:

$$f_k(\tau_{1/2}) = [F(\tau_{1/2}) - F(0)]/[F(\infty) - F(0)] = \frac{1}{2}.$$

光束半宽度 ω 用扫描法确定. 我们还列出 $F(0)/F(i)$ 与漂白参量 K 的关系表, 对每条恢复曲线可方便地确定其 K 值. 本实验所使用的漂白激光功率及漂白时间使 K 值控制在 1.5—5.0 的范围, 校正常数 r_D 在 1.1—1.4 的范围.

二、实验结果

1. 对 FITC 标记的受精未孵育鸡胚细胞质膜和鸡胚卵黄球膜, 在相同的条件下进行了 FPR 的多次重复测量 (大于 50 次) 对于每一条恢复曲线所给出的参量, 可求出膜上蛋白质二维扩散的扩散系数 D 及膜上“可动”蛋白质的分数 R ^[7].

图 1 表示鸡胚细胞质膜在一次测量中得到的典型荧光恢复曲线. 表 1 列出了 D 和 R 的测量结果 ($\bar{D}$ 和 $\bar{R}$ 表示平均值). 温度对扩散有较明显的影响, 一些膜蛋白质扩散的温度系数 Q_{10} 已有报道^[8,9]. 本文给出的是 $t \approx 25^\circ\text{C}$ 时的结果.

2. 对 FITC 标记的受精未孵育鸡胚细胞质膜进行下述比较测量 不同的单个鸡胚细胞质膜, 膜上不同微区, 同一点连续二次漂白测量. 部份测量结果列在表 2 中.

表 1 鸡胚成下层细胞质膜和胚下表层卵黄球膜的测量结果 (D 和 R 的平均值, $t = 25^\circ\text{C}$)

	鸡胚细胞	卵黄球
$\bar{D}$ ($\times 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s}$)	2.2 ± 0.4	10.0 ± 1.3
$\bar{R}$ (%)	59 ± 8	78 ± 6

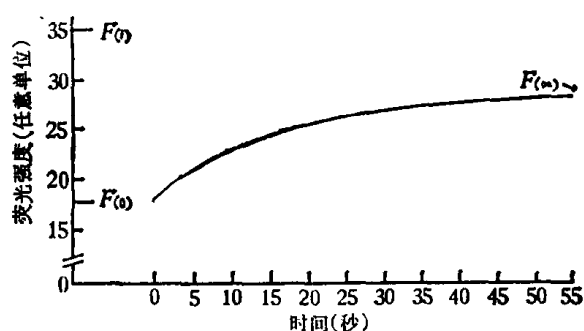


图 1 鸡胚成下层细胞质膜蛋白质的荧光漂白恢复曲线

$t = 25^\circ\text{C}$, $\omega = 0.93\mu\text{m}$, $t_B = 1.0\text{s}$, $K = 1.6$,
 $\tau_{1/2} = 11\text{s}$, $D = 2.2 \times 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s}$, $R = 65\%$

表 2 鸡胚成下层细胞质膜的比较测量 ($t = 25^\circ\text{C}$)

细 胞	位 置	第 一 次 漂 白		第 二 次 漂 白	
		$D(\times 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s})$	$R(\%)$	$D(\times 10^{-10}\text{cm}^2/\text{s})$	$R(\%)$
细胞 I	(1)	3.1	48	3.0	64
	(2)	2.4	48	2.6	51
细胞 II	(1)	2.9	65	3.1	78
	(2)	1.9	64	2.1	81
细胞 III	(1)	2.7	53	2.4	57
	(2)	2.6	50	3.0	70

三、讨 论

对于膜上蛋白质分子流动性的认识正在逐步深入。我们认为主要与细胞的分化和代谢过程有关。细胞分化过程中膜上蛋白质与外界化学环境产生有效的分子间相互作用,与膜内细胞骨架间特定的结合,蛋白质的组装和定位,以及膜结构的变化等都需要膜上蛋白质有合适的流动性。因此,可以预期分化程度较高的细胞膜的流动性较低,而胚细胞尤其是未分化细胞膜的流动性相对地较高,且在解育过程中流动性应有变化。我们所采用的一种样品是受精未解育、分化较差的鸡胚细胞(成下层细胞)质膜,其侧向扩散的测量结果证实了上述看法。得到的 D 值(25℃)约为 $2.2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ (见表1),比报道的一些成长已分化细胞膜的 D 值^[2,4,6]高。下层细胞质膜的这一结果与下述因素有关:1)膜上蛋白质与细胞骨架的结合和在膜上的定位相对而言是不稳定和不完全的;2)膜上特异蛋白少,膜较平坦,形成聚合体而影响扩散的可能性较小^[9];3)膜外尚未形成明显的“细胞外衣”,蛋白质扩散不会受林立的粘多糖分枝的阻碍。

对于另一种样品胚下表层卵黄球的FPR测量,给出其侧向扩散系数约为 $1.0 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ (表1),比鸡胚成下层细胞质膜蛋白质的 D 值约高出4倍而较接近单纯蛋白质在人工膜(如脂质体)上的扩散(10^{-8} — $10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$)。这种差异表明细胞重建之前的卵黄球膜是一种较简单的膜,膜平坦,在结构上有序性差,双脂层的微粘度低。膜蛋白的组份较简单,浓度亦较低,定位的稳定性较差。

由测得的荧光恢复分数 $\bar{R}$ (表1),可得到二种样品膜蛋白的“不动”分数分别约为41%和22%。后者较低与上述卵黄球膜的结构和功能较简单是相一致的。

表2中的测量结果指出:1)不同单个细胞质膜的 D 和 R 值有一定的起伏。这与样品制备过程以及实验环境对细胞影响的个体差异有关;2)同一细胞膜上不同位置的 D 和 R 有不均匀性,这与漂白微区处于细胞表面平坦区或非平坦区有关,与不同区块膜脂流动性不均匀有关,还可能与膜上标记蛋白质的成份及排布的不均匀性有关;3)单个细胞膜上同一微区,二次连续漂白测量所得 D 值有重复性,但连续漂白后标记蛋白质的“不动”部份逐次猝灭,“不动”分数相对减小,因而所测 R 值逐次增大。

致谢:本工作承贝时璋教授指导并承审阅全文;林克椿教授对本工作始终给予鼓励和关心;Poo, M-m.教授曾与我们进行了十分有益的讨论;在此一并致以深切谢意。

参 考 文 献

- [1] Shinitzky, M. et al., *Intern. Rev. Cytol.*, 1979, 60: 121—147.
- [2] Cherry, R. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 559: 289—327.
- [3] 贝时璋等, 百科知识, 1981, 1: 46—49.
- [4] David, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, 77: 2043—2045.
- [5] Frye, L. D. et al., *J. Cell Sci.*, 1970, 7: 319—335.
- [6] 蒋连伟、刘子遥, 中华物理医学杂志, 1980, 2: 235—239.
- [7] 刘子遥、蒋连伟, 科学通报, 27 (1982) 19: 1204.
- [8] Wey, C-I. et al., *Biophys. J.*, 1981, 33: 225—232.
- [9] Poo, M-m., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981, 10: 245—276.