

首届粤港生物物理学术研讨会 论文集



1999.06.14-16.广州

广东省生物物理学会 · 香港生物物理学会
主办单位：中山医科大学 · 华南师范大学

首届粤港生物物理学术研讨会

会议组织机构及成员名单

一、顾问委员会(Consultative Committee)

- 谢先德 研究员 (广东省科协主席、俄罗斯科学院院士)
杨福愉 院 士 (中科院生物物理所生物大分子国家重点实验室研究员)
刘耕陶 院 士 (中国自由基生物与医学会副主任、中国医科院药物研究所教授)
赵南明 教 授 (中国生物物理学会理事长、清华大学生命科学与工程学院院长)
刘颂豪 教 授 (广东省科协副主席、广东省生物物理学会名誉理事长、
原华南师范大学校长)
吴云鹏 教 授 (重庆市科协主席、原重庆大学校长)

二、执行委员会(Executive Committee)

- 主 席: 谭润初 教授 (广东省生物物理学会理事长、中山医科大学)
副主席: 张东才 教授 (Donald Choy Chang, Professor)(President of Biophysical Society
of Hong Kong, Hong Kong University of Science and
Technology—香港科技大学)
邢 达 教授 (广东省生物物理学会常务理事、华南师范大学)
委 员: 袁凯瑜 陈仲本 章之蓉 申 洪 吴伟康 刘振声 熊建文 李 琳

三、学术委员会(Academic Committee)

- 主 席: 黄耀熊 教授 (广东省生物物理学会副理事长、暨南大学)
副主席: 徐是雄 教授 (Sze-Yong Zee) (Vice president of Biophysical Society of Hong
Kong, Hong Kong University—香港大学)
陈小章 教授 (Hsiao-Chang Chan, The Chinese University of Hong Kong —
香港中文大学)
委 员: 周簾声 陈 瑗 梅曼彤 梁碧玲 郭祀远 李韶山

四、秘 书 处 (Secretariat)

- 秘书长: 郭周义 (华南师范大学激光生命科学研究所)
贺奇才 (中山医科大学物理教研室)
秘 书: 李晓原 王怡振 李平阳
(中山医科大学物理教研室)

首届粤港生物物理学术研讨会

大会主席致辞

首届粤港生物物理学术研讨会于一九九九年六月十四至十六日举行。大会的主办单位中山医科大学、华南师范大学的领导给予了大力的支持，同时大会也得到广东省科协的关怀。今天到会的嘉宾有广东省科协主席、院士谢先德教授，有中山医科大学学校领导、华南师范大学学校领导。同时我们邀请了中国科学院院士、中科院生物物理所生物大分子国家重点实验室杨福愉教授，中国工程院院士、中国医科院药物研究所刘耕陶教授参加大会并做学术报告，我们表示衷心感谢！

在世纪之交，在大力倡导科学创新的时代，我国生物物理学的发展面临新的挑战与机遇。为适应这一新的形势，粤、港及来自外省的生物物理学术领域的专家、学者，今天聚集于广州，共同研讨、交流，为促进我国生物物理学研究与教学新的发展做出更大的贡献。

籍此大会开幕之际，我们再一次感谢省科协、中山医科大学及华南师范大学学校领导的大力支持和热情主办，使得本届大会能顺利举行。同时，热烈欢迎粤、港及来自外省的同仁们到会交流。

让我们充分利用这几天时间，开展研讨、交流信息、密切科学研究与教学的联系、促进往来。

祝大会圆满成功！

广东省生物物理学会理事长
中国生物物理学会常务理事

谭润初

一九九九年六月十四日

首届粤港生物物理学术研讨会

论文目次

一、大会报告:

1. 展望 21 世纪的分子生物学 ----- 杨福愉 (1)
2. 氧化应激 (oxidative stress) 与神经退行性疾病 ----- 刘耕陶 (5)
3. 生命科学研究的动态信息成像方法 ----- 邢达 (6)
4. Dynamic redistribution of calmodulin in living cells during cell division:
An *in vivo* study using a GFP-calmodulin fusion protein technique ----- 张素才等 (9)
5. 显微激光散射技术及对单个活态细胞的无扰在位实时测量 ----- 黄耀熊等 (13)
6. Functional expression of sperm ion channels and receptors in *Xenopus* oocytes ----- 陈小章等 (23)
7. Fabrication of DNA chips for diagnostic and environmental applications -----
----- Michael M. Yang (27)
8. 氧化应激与心力衰竭 ----- 吴伟康等 (31)

二、分组报告

A 组: 分子生物物理、自由基生物医学

1. 酶水解鲨软骨微结构及其粘多糖电学特性 -----
----- 肖凯军 郭祀远 李琳 蔡妙颜 李冰 栗燕莹 (37)
2. 循环伏安技术电诱导棕色固氮菌成为抗氮阻遏菌株的研究 -----
----- 黄河清 翟文景 林庆梅 张凤章 谢维虎 孙耀东 (41)
3. UV-B 诱导水稻幼苗 DNA 形成 CPDs 的 ELISA 测定 ----- 李韶山 王小菁 刘颂豪 (45)
4. 利用激光共焦扫描显微镜的 GFP 荧光成像 ----- 于彦华 郭周义 邢达 (46)
5. 钠离子对三螺旋 DNA 分子 poly(dT). Poly(dA).poly(dT)呼吸模式的影响 -----
----- 孟耀勇 刘颂豪 (49)
6. 2D Trosy-noesy of ^{15}N labeled proteins ----- Guang ZHU, Youlin XIA, Konghong Sze, etc (50)
7. 细胞凋亡过程中的钙信号研究 ----- 蒲咏梅 张素才 (53)
8. 四逆汤对急性心肌梗死犬心酶、SOD、MDA 的影响及其相关性分析 -----
----- 程超 钟佛添 吴伟康 罗汉川 (57)
9. 神经酰胺在介导 UVB 诱发 NIH 3T3 细胞凋亡中的作用 ----- 丁振华 陈桂明 刘斐球 (64)
10. 腹腔注射云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮产生的影响 ----- 庞战军 陈瑗 周玫 (68)
11. 铁核结构对马脾铁蛋白释放铁动力学的研究 -----
----- 林庆梅 黄河清 肖志群 孔波 童丽 陈晶 曾骥 (72)
12. 固氮酶铁蛋白单钼铁硫簇($\text{Mo}_9\text{Fe}_6\text{S}$)的理化特性研究 ----- 黄河清 (76)
13. 显微激光散射技术对不同氧化状态下地贫红细胞的研究 -----
----- 李平阳 王江成 谭润初 李永龙 贺奇才 黄耀熊 (80)
14. 调节源口服液对脑血栓患者血液流变学及红细胞膜流动性的影响 -----
----- 高佩琦 许艳 赵永波 高倩萍 马波 朱翔 陈丽娜 (84)

B 组: 光生物物理、生物信息及生物控制论

1. 叶绿体的超弱发光初步研究 ----- 李德红 唐永红 何永红 邢达 (87)
2. 作物不同品种的超弱发光观测比较 ----- 李德红 邢达 罗明珠 廖飞熊 谭石慈 (88)
3. 动物创伤组织和肿瘤组织超弱发光的图象探测研究 -----
----- 何永红 唐永红 钟雪云 谭石慈 邢达 (89)

4. 植物在应激反应中的超微弱发光	唐永红 何永红 谭石慈 邢达	(93)
5. 植物的超微弱发光及其光谱分析	唐永红 谭石慈 李德红 邢达	(94)
6. 生物系统的超微弱光子辐射的光谱分布特性及其在 21 世纪的应用	朱延彬 郭周义 马俊富 李韶山	(95)
7. A New Area related to Learning and Memory in the mammalian Brain	Si Yun Shu(舒斯云), Xinmin Bao(包新民), Shengxiu Li(李胜修), Dongbin Niu(牛东滨), Chong Xu(徐重), Yaoyu Li(李耀宇), Jianxin Zeng(曾建新), and Zhang Kuihua(张魁华)	(96)
8. 云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 MnSOD 基因表达的调控	虎战军 陈瑗 周玫	(101)
9. 云芝多糖对巨噬细胞谷胱甘肽过氧化物酶基因表达的影响	虎战军 陈瑗 周玫	(105)
10. 云芝多糖增强小鼠腹腔巨噬细胞 M-CSF 的表达与分泌	虎战军 陈瑗 周玫	(109)
11. 激光腔内照射治疗仪的设计	王怡振 黄耀熊 王之光 刘小星	(113)
12. 电子供体及受体对棕色固氮菌表达固氮活性能力的影响	黄河清 孙耀东 张凤章 林庆梅	(116)
13. 生物体系一氧化氮反应的量子化学研究	廖兴汉 方允中	(120)
C组: 生物物理探测技术		
1. 光子密度波在正常及异常乳房组织中传输的模拟研究	邓小元 邢达	(127)
2. 红外生物光子的探测技术初探	马俊富 朱延彬 郭周义 李韶山	(131)
3. 激光共焦扫描显微镜的等清晰度三维构像研究	郭周义 朱延彬	(136)
4. 人体不同类型胆结石的激光喇曼光谱研究	刘刚 邢达 孟耀勇	(138)
5. 牙组织的喇曼光谱测量	刘刚 邢达 孟耀勇	(141)
6. 一种新的肿瘤早期诊断方法	何永红 唐永红 谭石慈 邢达	(142)
7. FCLA 辅助的超声动力学荧光肿瘤诊断方法	何永红 唐永红 谭石慈 邢达	(146)
8. 服用镇痛药物小动物三维行为的检测和评定	杨初平 熊建文 吴开华 周晓声 杨冠玲 何振江	(149)
9. 大肠癌组织结构的体视学诊断参数研究	申 洪	(153)
10. 鼻咽癌及癌旁组织超微结构的形态定量研究	杨兴龙 申洪 宗永生	(156)
11. 大鼠视网膜缺血眼底镜下形态学变化的观察	过贵元 申洪	(160)
D组: 环境与辐射生物物理		
1. 评价放射治疗计划优劣方法的新进展	孙颖 梁碧玲	(163)
2. 磁场对植物油磷酸酯水化的作用	郭祀远 蔡妙颜 郑必胜 冯苏 阮天恩	(168)
3. 微波辐射影响大豆油过氧化值的机理探讨	李琳 张桂英 蔡妙颜	(172)
4. 磁共振技术在生物医学中的应用进展	曾仁端 赵明	(177)
5. 强超声波辐照鱼卵对仔鱼存活率和生长的影响	章之蓉 谢瑞生 翁少萍 何家林	(179)
6. 超声处理水、磁场处理水和激光处理水对过氧化氢酶、脂肪酶及胰蛋白酶活力的影响	翁少萍 章之蓉 黄晖 谢瑞生 何家林	(183)
7. 声驯化鱼应用研究	章之蓉 谢瑞生 李俊	(186)
8. 超声波对鱼消化酶活性影响的初探	陈廷超 邓红权 章之蓉	(190)
9. 超声对斑节对虾杆状病毒的影响	翁少萍 何建国 章之蓉 钟蔚 邓敏 谢瑞生	(195)
10. 超声波与药物协同杀菌作用的实验研究	黄晖 章之蓉 王培军 谢瑞生	(203)
11. 声响驯鱼仪	章之蓉 谢瑞生 翁少萍 何家林	(208)
12. 超声波对鱼类发育生长的影响	章之蓉 谢瑞生 陈廷超	(210)
13. 超声波对鱼类血清蛋白质电泳的影响	章之蓉 谢瑞生 何家林	(213)

展望 21 世纪的分子生物学*

杨福愉

(中国科学院生物物理所生物大分子国家重点实验室 北京 100101)

我们正处在知识爆炸的时代,有人估计,人类知识的积累大约 5 年左右就翻一番。生命科学当前更是日新月异、突飞猛进。20 世纪下半叶以来分子生物学的兴起、发展与其一系列惊人的成就,使生命科学的面貌一新,成为当代自然科学最引人注目的一颗明星。分子生物学的兴起是物理学、化学渗透生物学研究的结果,反过来,今天它的成就又向数学、物理、化学以及技术科学提出了许多新问题,形成了很多新的研究领域。生命科学已经并将不断对人类社会产生巨大的影响。正在运行的人类基因组计划标志着生命科学已进入大科学时代,是当前全球关注的一个热点。1997 年宣布的体细胞克隆绵羊——多莉的成功是 20 世纪自然科学最激动人心的科研成果之一。美国科学信息研究所出版的 Science Watch 每年都要公布一次全世界最热门的研究项目(Hottest research)。1995 年,1996 年除各有一项外全为生命科学;1997 年所列的 16 项(包括遗传学、基因组学、生化、分子生物学、逆向病毒学、细胞生物学等)则全被生命科学所囊括。这从一个侧面反映了生命科学的时代已经来临,21 世纪无疑将是生命科学的世纪。

1 分子生物学将继续繁荣

从 50 年代分子生物学兴起以来,接连不断的惊人成就引人注目,短短的半个世纪产生了巨大的影响,而且看来还将继续保持其繁荣的势头,这在科学史上也是罕见的。

分子生物学的最重要的成就在于阐明生命本质的一致性。通过分子水平的研究发现无论是构成生命(从最低级、最简单的单细胞生物到最复杂最高等的人)的基本组成(蛋白质、核酸、糖等),还是遗传信息的物质基础(DNA、RNA)、含义(遗传密码)和流向(中心法则)以及能量转换的机理等等基本上都是相同的,从而使生物的多样性与生命本质的一致性在分子水平上获得了统一。这也为基因在不同个体,甚至在不同种属之间的转移成功提供了理论基础,并取得了很大的经济效益和开辟了更广阔的应用前景。分子生物学的成就大大推动了生命科学各分支学科的发展从而改变了整个生命科学的面貌。展望 21 世纪生命科学将继续对生命现象的研究不断予以深入和扩大,向最基本的和最复杂(如脑的活动、发育、免疫等等)的两极发展。作为生命科学发展主流的分子生物学在这两方面的研究中仍将继续保持其繁荣的势头。下面仅就几个方面谈点看法。

2 几个值得注意的研究领域

2.1 生物大分子功能的三维结构基础

要深入了解生物大分子的功能必须解析其三维结构,虽然用 X 射线衍射晶体分析法测定

*本文系作者根据在 1998 年中国科学院第九次院士大会生物学部报告会所作报告的内容整理补充而成。

第一个蛋白质—肌红蛋白的三维结构是在 1959 年完成的,但此后由于测定的周期较长,完成高分辨测定的蛋白质数目的增加十分缓慢。通过技术的明显改进,90 年代才开始有较大幅度的增长,1993 年正式提出结构生物学(Structural Biology)的时代已经到来。从 1999 年 1 月国际生物大分子精细结构数据库提供的资料来看,蛋白质、肽、病毒已达 7963,核酸为 633,糖只有 12。对生物大分子复合体三维结构的测定日益引起人们的兴趣,蛋白质/核酸复合物已达 366,其中较突出的是 1997 年宣布的有关核小体(Nucleosome)核心颗粒精细结构测定的完成(分辨率 2.8Å)。每个细胞平均含有 2500 万这样的颗粒。每一核小体的盘状核心含 8 个组蛋白形成的八面体,外绕 146 碱基对组成的 DNA。这一杰出的成就对了解基因转录、DNA 的复制与修复的动态过程都是很重要的。染色质是由核小体串成的,下一个目标将是在原子水平阐明染色质在基因表达过程中的作用。

在蛋白质三维结构测定方面,需要指出的是膜蛋白精细结构的解析仍然是一个十分困难的问题。如上所述,精细结构已经解析的蛋白质已达 8000 左右,但其中膜蛋白仅有 20 个左右。膜蛋白约占细胞中蛋白质的 20—25% (其中大部分为内在膜蛋白,如受体,离子通道,离子泵,运载体,膜酶等等)。显然,如果膜蛋白高分辨率三维结构解析不能有新的突破,将会影响对细胞功能的全面了解。这是结构生物学当前面临的一个挑战,但机遇与风险并存,这是一个值得投入的探索领域。

2.2 蛋白质折叠与‘构象病’

蛋白质在行使其生物功能时必须具有特定的三维结构。蛋白质折叠是具有一定氨基酸序列的多肽链逐步折叠形成蛋白质的特定空间结构,从而表现其功能的过程,这不仅包括新合成的肽链的折叠问题,也牵涉到诸如蛋白质在细胞中跨膜运送前后的去折叠和再折叠过程。这些方面虽然已进行了大量的工作仍然是一个有待解决的问题。

与蛋白质折叠有关而且是近几年比较引人注意的是‘构象病’假说的提出。这要追溯到 1972 年美国 Prusiner 对巴布亚新几内亚土著居民的 Kuru 病以及在羊群中时见的瘙痒病的研究。这两种病都在脑中发现海绵状病灶,又都找不到病原物,经过 10 年研究,1982 年 Prusiner 声称这一类疾病的病原物是一种不含核酸的蛋白质(称为 Prion,蛋白质性质的感染粒子)。后来,又发现疯牛病、人克雅氏病也可能与此有关。一般病原物必需在寄主体内自我繁殖,Prion 仅仅是一种不含核酸的蛋白质,它何以能作为病原物? 通过研究,未染病的健康动物也有正常的 Prion 存在,只有在一定条件下受某些因素影响才导致正常的 Prion 转变为能染病的 Prion,两者化学组成相同但构象有差异,前者以 α 螺旋为主,后者则 β 折叠占有很大的比例。正常的 Prion 可能由于不稳定而发生构象变化,从而形成一种与蛋白质折叠过程中的中间物很类似的、能染病的 Prion。因此,Prusiner 认为不是核酸而是 Prion 是病原物,致病机制是通过蛋白质—蛋白质的相互作用。这一见解是对中心法则的又一挑战,从而使他获得了 1997 年诺贝尔生理或医学奖。但迄今对 Prion 是否是病原物仍然有不同的看法,看来在这一有争议的领域里还有很多值得进一步探索的问题。

2.3 结构基因组学的研究

全世界注目的人类基因组计划正在进行。最近将人类基因组核苷酸序列(约 30 亿碱基对)的测定称为“序列基因组学(Sequence Genomics)”这一计划预期 2005 年完成。今年有些公司宣布在技术上有重大创新,这一计划可能会提前完成。我国在这方面也已逐步增加投入。南方和

北方两个人类基因组研究中心已相继宣告成立。据估计人类基因组中只有 60,000~100,000 个基因可以表达。它们乃是决定和左右人类一切性状的基本遗传单位。研究这些基因的功能是“功能基因组(Functional Genomics)”的主要研究任务。为了深入探讨这些基因所表达的蛋白质的功能,必须解析它们的三维结构,有人称之为“结构基因组学(Structural Genomics)”。虽然蛋白质三维结构测定速度日益加快(据统计,全世界每天解出高分辨率三维结构的蛋白质已达 4-5 个),但面对需要测定如此众多蛋白质的三维结构的确是一个挑战。

日本在这方面的战略措施是大力投入核磁共振(NMR)中心的建设。目前应用 NMR 测定蛋白质三维结构只能限于分子量小于 35ku 的对象,但 900 兆核磁共振仪正在研制中,届时有可能将测定蛋白质的分子量增加一倍左右,这使它在结构基因组学的研究方面将发挥更大的作用。

美国对此则酝酿采取另一种方针,1998 年年初在 Argon 国家实验室进行两天会议研讨后,与会科学家不倾向于将人类基因组所表达的如此众多的蛋白质的三维结构逐一加以解析,而认为应致力于测定具有典型结构的一系列蛋白质的精细结构,从而建立一个更全面的蛋白质结构分类库。据估计,自然界的蛋白质约有 1000 种左右的折叠类型(fold),但迄今已测定三维结构的所有蛋白质的折叠类型只有 370 种。因此,在现有基础上如能再将蛋白质折叠类型增加一倍左右,则人类基因组所表达的蛋白质通过生物信息学(Bioinformatics)研究,按折叠类型就可以先将它们大致分类,从而对其三维结构有一个基本了解。如有必要可以再作深入的解析。这一战略的关键在于选择有可能增加新的折叠类型的一系列蛋白质(估计 10,000 个左右)进行三维结构的测定。因此,与会科学家建议也要象人类基因组计划那样组织起来进行大协作才有可能完成如此巨大的工程。由于人类基因组可表达的蛋白质中约有 20-25% 是膜蛋白(20,000 左右)。如前所述,它们的结晶和测定的难度很大,因此完成这些蛋白质三维结构测定任务目前仍然是一个难以估计的问题。

2.4 信号跨膜转导通路的互联

信号跨膜转导(Signal transduction)是当前细胞生物学、分子生物学的热门研究领域之一。细胞膜的受体是将细胞外各种信号导入细胞内的重要枢纽。许多外源性生物活性分子(如激素,生长因子等等)都是通过与受体结合继而经过系列变化转换产生第二信使,后者又诱发系列生化反应最终产生生理效应。迄今比较明确的至少有 5 条以上信号跨膜转导通路。每一条通路都有很多组分参予。更重要的是各条通路既有相对的独立性,又相互联系(或称“crosstalk 串话”),这就增加了研究信号跨膜转导的复杂性,既要对每一通路加以详细分析,又要考虑各条通路之间的相互联系,在分析基础上加以综合。在今后相当一段时间内,这方面的研究仍将是一个热门领域。

2.5 真核细胞内蛋白质和细胞器的运送

在细胞中蛋白质主要是在细胞质核糖体中合成的。为数众多的蛋白质合成以后分送到细胞各部分(细胞核,线粒体,内质网,高尔基,溶酶体等等)进行补充或更新,有的则分泌至胞外。由于细胞各部分都有特定的蛋白质组份,因此,合成的蛋白质必须定向地、准确无误地进行运送才能保证细胞活动的正常进行。蛋白质从合成部位是怎样能定向地运送至一定部位的?就定位于亚细胞结构或细胞器内的蛋白质来说,它们又是如何跨膜运送的?跨膜之后又是依靠什么信息来进行识别,从而选分到达各自岗位的?这些都有待于不断探索。关于靶向运送

的信息,有些蕴藏于信号肽,有些则内含于运送蛋白质分子本身的某些片段,后来又发现一些分子量较小的蛋白质也参与了作用。

近几年,由于光钳技术的应用,可以观察到线粒体、溶酶体等以分子马达为动力在细胞内可以沿着微管来回移动。在这方面神经元是一个很好的研究模型体系。由于蛋白质的合成只在细胞体(cell body)中进行,合成后必须输往轴突和突触末端部分。因此,蛋白质和细胞器的运送对神经元的功能和生物发生具有重要的作用,这方面的研究刚起步不久,估计会有较多的发展。

3 今后的展望

1997年国际生物化学与生物物理学报(Biochim. Biophys. Acta)在纪念创刊50周年的专集中预测今后50年中分子生物学将在下列几方面取得突出的成就:

- 1) 完成胰岛素转导通路的全部解析及阐明它与其它信号转导通路的互联。
- 2) 在原子水平上阐明染色质在基因表达中的作用。
- 3) 膜蛋白和核糖核酸(RNA)三维结构的测定。
- 4) 基因治疗的研究。

科学发展的预测是很困难的,但上述观点可以作为参考。

4 我国分子生物学研究的现状和制定发展战略的几点思考

我国分子生物学的研究近20年以来也不断取得明显的进展,但从总体上来讲,由于种种原因与国际先进水平的差距有进一步扩大的趋势。

最近又开始酝酿制定我国科技中、近期的发展战略。在大力贯彻“科教兴国”的大好形势下,这方面的工作就显得格外重要。要加速科技的发展,人才是关键,投入是保证。此外,落实基础研究的政策也十分重要。基础研究有其自身的含义和发展规律。它的特征可归纳为探索性、不确定性和长期积累性。但一旦突破对认识自然、社会进步和人类生活会产生巨大的影响。这从分子生物学近半个世纪以来的发展也能充分说明这一点。与应用基础、应用与开发研究相比较,任何国家对基础研究的投入比例总是比较小的。但这方面如果不给予足够与稳定的支持,对从事这方面探索的科技人员又不能提供宽松的环境,就必然影响基础研究的健康发展,继而影响国家科学的整体水平与国民经济的持续发展。在制定发展战略的具体内容前,希望在这方面能有充分的讨论以取得共识,使这一重要工作具有扎实的思想基础。

参考文献

- 1 The Hottest Research of 1997 in Science Watch 1998,9(2):1.
- 2 Herklots, H.: A matter of biochemistry: A short history of scientific discovery. Biochim. Biophys. Acta 1997, 1335(50th Anniversary Supplement):43.
- 3 Hirokawa, N.: Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science 1998, 279:519-526.
- 4 Pennisi, E.: Taking a structured approach to understanding proteins. Science 1998, 279:978-979.
- 5 Rost, B.: Marrying structure and genomics. Structure 1998, 6:259-263.
- 6 Shapiro, L. et al.: The Argonne structural genomics workshop: Lamaze class for the birth of a new science. Structure 1998, 6:265-267.
- 7 Luger, K. et al.: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature 1997, 389:251-260.

氧化应激 (oxidative stress) 与神经退行性疾病

刘耕陶 (中国医学科学院药物研究所)

随衰老神经退行性疾病如老年性痴呆 (AD)、帕金森氏病 (PD) 等的发病率增多, 不仅严重影响老年人的生活质量, 而且给社会带来很大负担。虽然 AD 和 PD 是两种性质不同的疾病, 其确切的发病机制目前尚不清楚, 但许多事实表明, 氧自由基 (ROS) 损伤 (氧化应激, Oxidative Stress) 在 AD 和 PD 发病的机理中起重要作用。超氧阴离子、羟自由基及过氧化氢等 ROS 日积月累的堆积和损伤与神经退行性疾病的发病缓慢和不断加重有关系。新近的证据又支持 ROS 与兴奋性氨基酸二者在神经细胞变性的机理中相互交叉地起作用。氧自由基损伤与帕金森氏病的关系由于分布于纹状体的多巴胺能神经元经受多巴胺代谢产生的氧自由基 (经 MAO-B 的催化及自身氧化) 或外源性氧自由基如注射 MPTP 后产生的毒性代谢物的损伤而出现退行性变, 已是世界各国公认的事实。

AD 病理生化改变的特征之一是脑内有 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 斑块的沉积和神经纤维缠绕成团。 $A\beta$ 是如何产生的, 目前尚不清楚, 但 $A\beta$ 一旦形成便不断对神经细胞产生毒性损伤和引起细胞凋亡。其损伤机理则是由 ROS (H_2O_2) 介导的。

核因子 κB (NF- κB) 是一种 DNA 结合蛋白的转录因子, 普遍存在于许多细胞内, 脑细胞内尤为丰富。在没有被刺激的细胞内, NF- κB 与一种抑制性蛋白 $I\kappa B\alpha$ 相结合而形成一种异寡二聚体复合物, 存在于胞浆内, 不呈现生物活性。当这些细胞受刺激后, NF- κB 与 $I\kappa B$ 解聚, NF- κB 能解离出来, 进入细胞核, 与目标基因启动子区的特异序列相结合, 激活与炎症反应有关的基因的表达, 产生与炎症和免疫有关的细胞因子, 造成损伤包括细胞凋亡。

许多因子能激活 NF- κB , 使无活性的 NF- κB 复合物能解聚, 如细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、蛋白激酶 C 活化因子、氧自由基、病毒、 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 等等, 而细胞因子和 $A\beta$ 等的作用都是由氧自由基介导的。反过来, NF- κB 活化所诱导产生的蛋白质又可抑制细胞凋亡, 故在细胞内形成一种“生-死”的平衡。目前普遍认为, 神经退行性疾病 PD, AD 都与细胞凋亡过多有关, 也与炎症细胞因子的慢性损伤有关。

可见, 细胞内和细胞外 ROS 不单纯仅仅是损伤因子, 特别是低水平 ROS 在细胞能耐受而不产生主要的不可逆性损伤情况下, 可作为信号传导而最终改变核基因的表达。依照 ROS 所激活的基因不同, 可导致退行性变过程的加强或抑制。例如, 炎症性细胞因子和细胞粘附因子会加重 ROS 诱发的损伤过程, 而新产生的抗氧化酶可抑制此过程, 其中真核细胞内起关键作用的调节因子即是 NF- κB , 而 NF- κB 的激活与抑制则可能开辟药物治疗的新途径。

许多实验证明, 抗氧化剂对多巴胺能神经元和 $A\beta$ 损伤脑神经细胞均有明显保护作用, 临床研究报道抗氧化剂维生素 E 在缓解 AD 和 PD 病情方面亦有疗效。因此, 研究氧自由基引起神经细胞凋亡的分子机制以及从抗氧化剂中寻找防治 AD 和 PD 的新药, 目前在国内外已成为一个新的途径和策略。

生命科学研究的动态信息成像方法*

Imaging methods of life activities in the research of life
science

邢 达

华南师范大学激光生命科学研究所

广州 510631, Tel: 020-85211436, Fax: 020-85213411,

e-mail: xingda@scnu.edu.cn

二十一世纪将是信息和生命科学的时代,而激光生命科学是此两大领域结合的一门新兴交叉学科,其基本研究内容是激光光子与生物体的分子、细胞、组织、器官等个体和群体各层次的相互作用现象及其机制,揭示与生命活动过程有关的物理过程、演化规律及外界条件的诱导作用,对推动生命科学的研究具有极其重要的意义。根据最近的研究动态,激光生命科学领域最有希望的一个新生点就是利用光学和激光技术,发展生命科学研究的形态学方法,即:生命过程动态信息的高灵敏度成像,包括从单功能分子、亚细胞、细胞到组织的多种光与生物分子作用信息的成像,从而实现生物学研究方法从集合到个体(单分子);从离体到活体;从静态到动态的变革。这些新的物理方法的引入不但能使生物学的研究手段发生革命性变革,同时也促进生物学基础理论和光子学技术的发展,并具有巨大的生物学和医学应用背景。

1、生物代谢自发光子信息的高灵敏度光学成像及在生物医学领域的应用

目前已经发现,在生命活动的过程中,任何生物体或细胞都自发地辐射出一种极其微弱的光子流,强度在 $10-10^3$ 光子/cm².Sec; 波长推测在 180-800 nm。生物的超弱发光广泛存在于动植物中,反映生物体本原的与生命活动过程有关的信息。一些初步研究表明,生物超弱发光与生物系统代谢、生物体中生化反应过程密切相关,特别是与生物体内的生理和病理状态有内在联系。生物超微弱发光是生物体中生化反应过程的产物,是研究生命活动过程动力学的重要手段。一些实验已经表明,可能在临床诊断医学和环境监控等方面有重要应用。此领域可能的研究内容包括:

- 生物光子学方法在医学中的应用基础研究--异常病变及肿瘤的早期诊断(细胞异常增长与生物光子发射的关系);
- 动植物生理活动的直接光学观测和生长调控过程的实时检测;
- 生物超微弱发光的光谱学研究:生物光子发射与代谢生化反应动力学过程的标记;
- 生物超微弱发光机理及在病理诊断中的应用:人体表面及各部组织的超微弱光子

发射；生物超微弱发光光谱在特殊诊断医学（如健康程度和人体器官老化程度诊断等）中的应用；

- 生物超微弱发光在食品检验和生物指示方面的应用；

2、光与生物分子相互作用信息的荧光寿命成像技术研究

荧光显微成像可以给出细胞的荧光强度显微像，这个图象反映了细胞内的染色剂及染色抗体的分布，然而这个信息只是定性的，因为某一点的荧光强度，不仅取决于染料的空间分布，而且受染料所处微环境参数的影响，因此，为了确定染料的空间分布，必须了解荧光量子产额的时间分布，这一点可通过荧光寿命的测量来实现。

荧光寿命成像技术是国际上 90 年代初兴起的一门新技术，其目的在于通过样品微环境内荧光寿命的测量以反映样品微环境与微结构的不同，将荧光寿命测量和显微测量技术结合起来，既具有高的时间分辨率，又具有高的空间分辨率，还能进行活体测量。和普通荧光成像不同，荧光寿命成像技术是通过逐点计算样品所发出荧光的寿命，以荧光寿命进行成像。由于荧光寿命受染色剂所处微环境的许多生物物理参数如离子（钙，钠等），pH 值，氧压强，溶液疏水性及淬灭剂（如碘化物，丙烯酰胺）等因素的影响，因此荧光寿命成像可以反映这些参数在样品中分布。

荧光寿命成像是时间分辨荧光光谱学的一个很好的补充。在生物学的研究中常存在这样一些物质，它们的荧光光谱非常类似，难以通过分析荧光光谱将它们分辨开，但它们的荧光寿命一般不同，因此对那些荧光光谱类似的物质，可借助于荧光寿命成像来对它们研究。荧光寿命成像技术的另一个突出优点在于，由于荧光寿命是系统本身所固有的，一般不受诸如激光或荧光强度波动，荧光染色剂分布不均匀，染色剂的光漂白以及其它影响荧光强度的因素的影响，因此它能给出染色剂及其微环境参数的定量分布。可能的研究内容包括：

- 生物细胞微环境参数成像
- 染色体分子结构及组分的研究
- 蛋白质分子结构的研究
- 临床诊断医学的应用

通过人体组织的荧光寿命成像进行癌症的早期诊断工作研究

3、反映生物超前病变信息的拉曼光谱学成像技术

喇曼光谱以其极强的指纹能力在生物医学上有着潜在的应用前景。目前喇曼光谱技术已能够很好地区分肿瘤和正常组织。然而这一技术还没有真正地应用在临床医学上，其主要原因是喇曼光谱其固有的抽象性、复杂性和基础性，难以让医务工作者所接受。如今流行的 B 超、CT 核磁共振这些诊断技术都是以图象形式出现，图象以其形象、直观、方便更能让诊断技术得到广泛应用。所以发展光谱成像技术是光谱技术走向应用的关键所在。麻省理工学院(MIT)科学家已经充分认识到这一点，其光谱实验室的大部分力量都投入到这方面。目前他们利用光谱成像技术已经给出了内窥镜所不能发现的早期结肠癌的光谱图象。国内尽早地进入这一领域有助于我们的研究达到世界前沿水平。研究内容包括：

- 喇曼光谱学成像技术在诊断医学中的应用基础研究
- 细胞内的表面增强喇曼光谱的研究

- 医用喇曼光谱成像系统的研制
- 异常病变及肿瘤的早期诊断 (微量物质荧光光谱分析);
- 生物分子拉曼光谱学及拉曼光谱学成像;

4、血氧饱和度的脑功能成像

大脑功能的成像检测在神经生物学领域具有极其重要的意义。现有的成像方法主要为功能型核磁共振成像 fMRI(functional Magnetic Resonance Imaging)和基于同位素指示剂的正电子发射层析成像 PET(Positron Emission Tomography)。近红外光学功能成像 fNIRI(functional Near Infrared Imaging)是 90 年代国际神经生物学界最热门的研究课题之一。最近国外的研究表明, 大脑功能的近红外光学成像可以使人们对大脑的基本功能, 如对运动, 视觉, 听觉的反应等, 能够通过计算机是实时测量并显示形象, 直观的结果。此种研究手段的开发不仅可用于检测和诊断大脑功能, 还可用于发现某种超长大脑功能, 其科学意义也十分重大。

5、反映生物分子光吸收信息的光声光谱学成像技术

光声光谱是建立在光声效应的基础上的, 它和其它光谱一样反映了物质与光场相互作用特性, 光声信号的产生过程是一个光, 热, 声, 电的能量转移过程。光声光谱的灵敏度很高, 很小的吸收也能被微音器检测。光声光谱学最有希望的应用之一就是研究生物体系, 因为生物体中大部分待研究材料不可能或很难用其他化学方法研究, 更重要的是要保持生物样品的自然状态。另外, 用普通光谱学技术对生物样品进行研究时, 遇到的最严重的是光散射, 而这点在光声光谱中几乎不存在困难, 因为光声光谱中只有吸收的光能才转化成为声场。

光声光谱技术仍处于发展阶段, 其应用前景已受到高度重视, 由于其特点是样品可不经预先处理就可进行光声光谱信号的幅度与相位测定, 操作简单, 又可以进行在体测量, 同时通过声场空间定位的研究可进行剖面深度的断层分析。这为早期检查和诊断一些特殊疾病提供了一个新的工具。

- 生物大分子光声光谱学的基础研究
- 生物组织中弱声场的空间定位方法
- 生物组织光声光谱断层成像技术及系统研究
- 通过光声光谱成像进行癌症的早期诊断研究

6、光子学技术在分子生物学中的应用

- 荧光探针技术, 包括: 荧光标记 (微量元素离子); 荧光免疫标记 (蛋白分子); 基因标记 (GFP 在基因表达和定位方面的应用); 荧光原位杂交 FISH 技术。
- 高分辨光学成像技术 (近场光学探测技术; 图像信息增强技术; 激光共焦断层扫描技术; 三维重组技术)
- 生物活体细胞内功能分子的单分子识别和活性观测; 活细胞内微量元素离子的物理效应
- 细胞微管和微丝骨架动力学研究

Dynamic redistribution of calmodulin in living cells during cell division: An *in vivo* study using a GFP-calmodulin fusion protein technique

Don Choy CHANG, Pin LU¹ and Chao-Jun LI²

Biology Department, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Hong Kong.

Abstract

Recent studies have suggested that Ca^{2+} signaling plays an important role in regulating key steps in cell division. Using confocal microscopy, we have demonstrated that a localized elevation of free Ca^{2+} is closely associated with the onset of cytokinesis (Chang and Meng, 1995. *J. Cell Biol.* 131: 1539-1545). In order to extend this study to down stream components of calcium signaling, we have now fused the gene for calmodulin (CaM) with that for green fluorescent protein (GFP), expressed the spontaneously fluorescent chimera GFP-CaM in HeLa cells, and imaged its distribution during mitosis. We observed that GFP-CaM undergoes a dynamic redistribution during cell division. Specifically, we found evidence that translocation of a sub-membrane fraction of CaM is involved with cell cleavage. At late anaphase, a localized elevation of GFP-CaM was found at the cell cortex beneath the membrane at the equator where the cleavage furrow was to appear. The timing of this cortical CaM elevation coincided with the onset of cytokinesis. These findings suggest that, in addition to Ca^{2+} ions, CaM may also play an active role in regulating cytokinesis.

Introduction

Cell division is a precisely regulated process involving a number of different cellular signals. Besides the well-known cyclin-dependent kinase system, second messengers like Ca^{2+} and cyclic AMP are also thought to be involved (for reviews, see Hepler, 1994; Means, 1994; Whitaker and Patel, 1990). Using the zebrafish embryo as a model system, we have demonstrated that a localized Ca^{2+} signal is closely associated with the onset of cytokinesis (Chang and Meng, 1995). These findings strongly suggest that Ca^{2+} signal plays an important role in regulating the cell division process.

A natural question that follows is whether the down stream molecules of the Ca^{2+} signaling pathway may also play an active role in such a regulation mechanism. The major intracellular calcium receptor is calmodulin (CaM). The binding of Ca^{2+} to CaM enables it to activate various target enzymes and thereby regulate many physiological process (for reviews, see Wang et al, 1985; Vogel, 1994). The involvement of CaM in cell cycle regulation has been suggested in earlier studies (Means, 1994). Thus, we would like to examine in detail the dynamic redistribution of CaM during the initiation of cytokinesis.

In this study, we used GFP (green fluorescent protein) to label CaM by fusing their genes together. GFP is a natural fluorescent protein discovered in the jellyfish *Aequorea victoria* (for reviews, see Cubitt et al, 1995). When the cloned gene of GFP (Prasher et al, 1992) was expressed in *E. coli* or other animal cells, it gave rise to an endogenous fluorescent protein, without requiring added converting enzymes or substrates (Chalfie et al, 1994). Later, the fluorescent properties of GFP were further enhanced by selected mutation at the chromophore (Heim et al., 1995). Since then, GFP has been widely used as a marker gene in many cell or molecular biology studies (for reviews, see Cubitt et al, 1995). In order to study the dynamic distribution of CaM in the living cell, we have constructed a GFP-CaM fusion

¹ P. LU's current address is Dept. of Physiol. Sci., Univ. of New Castle Upon Tyne, United Kingdom

² C.J. LI is on leave from Dept. of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

gene (Li et al., 1999). When this gene was expressed in HeLa cells, its gene product, the GFP-CaM fusion protein, had the expected fluorescent properties. Using such a fusion protein as our probe, we were able to study the *in vivo* distribution of CaM over the entire cell division process.

Results

The GFP-CaM fusion gene was constructed by linking the S65T-GFP gene at the N-terminal of the CaM gene with a 21 base pairs linker. After the GFP-CaM fusion gene was introduced into HeLa cells, many cells were found to express this gene and produce the fluorescent protein. The presence of this protein can be observed easily using a conventional epi-fluorescence microscope equipped with a FITC filter set. But in order to examine the detailed distribution of the GFP-CaM fusion protein, it is far better to use a confocal microscope. This is particularly important for studying HeLa cells at mitosis, since these cells usually become round-up during cell division.

Expression of the fusion gene did not appear to affect the normal cell cycle or interfere with the cell division process. Fig.1 shows the typical distribution of the GFP-CaM fusion protein in cells at different mitotic stages. Each image represents a projection of multiple confocal images taken at different depth of the cell. Thus, the image shows the distribution of GFP-CaM fusion protein over the entire cell. Also, to identify the specific mitotic stage of the cell, we stained the chromosomes with a fluorescent dye, Hoechst 33342, and recorded the image using a separate fluorescence channel.

As expected, the distribution of GFP-CaM in HeLa cells was dependent on the mitotic stage of the cell. At interphase, the distribution of GFP-CaM protein within the cytoplasm was more or less uniform. (Figs. 1a-1b). When the cells entered metaphase, however, GFP-CaM became concentrated at the polar regions of the mitotic spindle (Fig.1c-1d). At anaphase, the cells started to become elongated; the high density GFP-CaM spots migrated with the spindle poles and moved toward the opposite side of the cell (Fig.1e-1f). Later, following cell division at telophase, a high concentration of GFP-CaM protein was found to remain at the spindle poles. But in addition, fiber-like structures containing high density of GFP-CaM protein were also found at the midzone region between the two daughter cells (Fig.1g-1h).

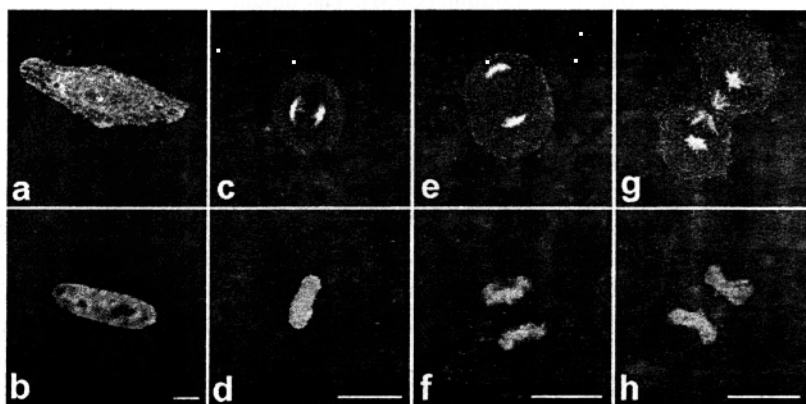


Figure 1. Upper panels (a, c, e, g), confocal images showing GFP-CaM distribution in HeLa cells at various mitotic phase. Lower panels (b, d, f, h), paired images showing the structure of chromosome in the above cells as revealed by Hoechst 33342. (a, b) interphase; (c, d) metaphase; (e, f) anaphase; and (g, h) telophase. Bar, 10 μ m

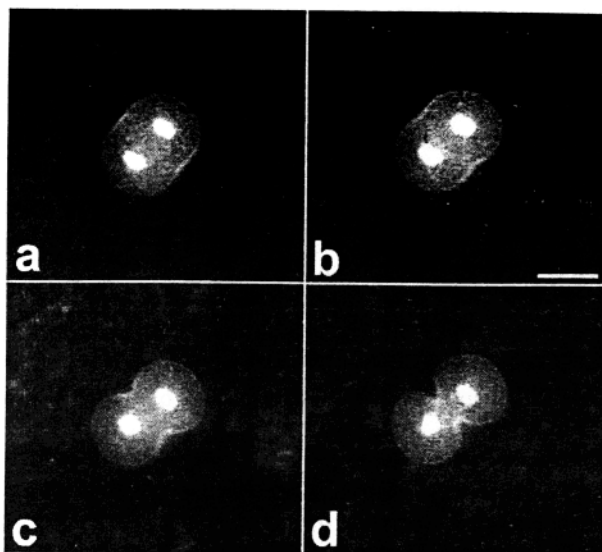


Figure 2. Time-dependent measurement of GFP-CaM distribution in a living HeLa cell undergoing cytokinesis. Panels (a-d) represent a series of GFP-CaM images obtained at different time (t) starting from late anaphase. (a) t = 0; (b) 2; (c) 6; and (d) 10 min. Bar, 10 μ m. (Reproduced from: Li et al., 1999).

Previously, distribution of CaM in 3T3 cells had been examined using an immunostaining method (Welsh, et al, 1979). Since CaM is a relatively small protein, it is susceptible to redistribution during the fixation and detergent treatment normally required in the immunostaining procedure. Using the GFP-CaM probe, we can examine the distribution patterns of CaM in living cells. In addition to the high concentration of GFP-CaM found at the spindle poles, we found a dense layer of GFP-CaM at the cell cortex underneath the cell membrane in the living mitotic cells (Fig.2a). This layer of GFP-CaM was relatively thin (less than 1 μ m thick). This sub-membrane fraction of GFP-CaM was apparently not strongly bound to cytoskeleton. When the mitotic cells were treated with 0.2 % of Triton-X100 for 1.5 min before fixation, this sub-membrane fraction of GFP-CaM could no longer be observed (data not shown). Interestingly, the distribution of this sub-membrane fraction of GFP-CaM was found to undergo a dynamic change during cytokinesis. In late anaphase, before the cytokinesis process started, the concentration of GFP-CaM at the sub-membrane layer was generally low. Yet, a slightly higher concentration of cortical GFP-CaM can be seen at the equator (Fig.5a). At the beginning of cytokinesis, a cleavage furrow began to appear at the equator of the dividing cell. The density of GFP-CaM was found to elevate at the cell cortex underneath the emerging furrow (Fig.5b). As the cytokinesis process progressed further, the localized elevation of GFP-CaM at the cleavage furrow region became even more apparent (Figs.5c and 5d). This observation suggests that, a localized increase of cytosolic CaM may be part of the signal transduction mechanisms required for the formation of the cleavage furrow.

Discussion

Calmodulin is the major receptor of cytoplasmic Ca^{2+} ; it is known to play important roles in regulating many physiological functions. Although involvement of CaM was implicated in the regulation of cell cycle (Whitaker and Patel, 1990; Means, 1994), so far there has been a lack of detailed information about the redistribution of CaM in response to cell division. The results reported in this paper provided the first observation suggesting that the distribution of CaM is closely associated with the process of cytokinesis.

In our earlier study using zebrafish embryo as a model system, we found that a

localized elevation of free Ca^{2+} was associated with the initiation of cytokinesis (Chang and Meng, 1995), suggesting the Ca^{2+} signal is required for triggering cell division. The important question then was: How does the Ca^{2+} signal regulate the cytokinesis process? Our working hypothesis was that the calcium signal may activate the actomyosin contractile band in the cleavage furrow by a mechanism analogous to that found in smooth muscle (Mabuchi and Takano-Ohmuro, 1990; Satterwhite and Pollard, 1992; Chang and Meng, 1995). When the Ca^{2+} concentration is elevated near the equator, increased amount of free calcium ions will bind to CaM and activate a CaM-dependent enzyme called "myosin light chain kinase (MLCK)". Once activated, MLCK will phosphorylate the Ser-19 site of the light chain of myosin II (MLC) (Yamakita et al., 1994). Such phosphorylation will in turn promote the growth of the contractile band by inducing aggregation of actin and myosin filaments (Mabuchi and Takano-Ohmuro, 1990), and trigger the cleavage furrow contraction.

Part of this hypothesis can be tested by examining the distribution of CaM during cell division. If this hypothetical mechanism is correct, a significant amount of CaM must be available near the cleavage furrow when the contractile band is to be formed during cytokinesis. Results of our GFP-CaM measurements not only indicate that this is indeed the case, but also suggest something that is even more interesting. We observed a localized increase in the concentration of CaM at the cell cortex underneath the cleavage furrow; the timing of this cortical CaM elevation was found to coincide with the onset of cell cleavage (See Fig.2). These observations suggest that, CaM may be more than a passive component in the Ca^{2+} signaling transduction pathway in regulating cell division. Just like Ca^{2+} ions, the localized release of which represents an intracellular signal, a localized aggregation of CaM may represent a second signal that is also required for initiating the cytokinesis process. In such a way, the process of cell division can be more precisely regulated.

Acknowledgements

We thank Drs. Roger Heim and R.Y. Tsien for providing the GFP construct. This work was partially supported by RGC grants HKUST 572/95M and HKUST 6199/97M.

References:

- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-805.
- Chang, D. C., and C. L. Meng. 1995. A localized elevation of cytosolic free calcium is associated with cytokinesis in the zebrafish embryo. *J. Cell Biol.* 131:1539-1545.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, and R. Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochem. Sci.* 20:448-455.
- Heim, R., A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. *Nature (Lond.)*. 373:663-664.
- Hepler, P. K. 1994. The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* 16:322-330.
- Li, C.J., Heim, R., Lu, P., Tsien, R.Y. and Chang, D.C. 1999. Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique. *J. Cell Sci.* 112:1567-77.
- Mabuchi, I., and H. Takano-Ohmuro. 1990. Effects of inhibitors of myosin light chain kinase and other protein kinases on the first cell division of sea urchin eggs. *Dev. Growth & Differ.* 32: 549-566.
- Means, A. R. 1994. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. *FEBS Letters*. 347:1-4.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Presendergast, and M. J. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111:229-233.
- Satterwhite, L.L., and T.D. Pollard. 1992. Cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:43-52.
- Vogel, H. J. 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem. Cell Biol.* 72:357-376.
- Wang, J. H., C. J. Pallen, R. K. Sharma, A. M. Adachi, and K. Adachi. 1985. The calmodulin regulatory system. *Curr. Top. Cell. Regul.* 27:419-436.
- Welsh, M. J., J. R. Dedman, B. R. Brinkley, and A. R. Means. 1979. Tubulin and calmodulin. Effect of microtubule and microfilament inhibitors on localization in mitotic apparatus. *J. Cell Biol.* 81:624-634.
- Whitaker, M., and R. Patel. 1990. Calcium and cell cycle control. *Development*. 108:525-542.
- Yamakita, Y., S. Yamashiro, and F. Matsumura. 1994. In vivo phosphorylation of regulatory light chain of myosin II during mitosis of cultured cells. *J. Cell Biology*. 124:129-137.