

泛的是落射光明场照明。

落射荧光垂直照明器结构见图 1。由激发光源发射的光通过激发滤片投射到一块与光轴呈 45° 角的双色束分离器上,激发光被反射到物镜中(此时物镜的功能作为聚光器),并聚集在样品上。样品产生的荧光以及由物镜透镜表面和盖玻片表面反射的激发光同时进入物镜,返回到双色束分离器(对短波长的激发光有很强的反射能力,但能通过较长波长的发射荧光),使激发光和荧光分开,残余激发光进一步被阻断滤片吸收。用不同的激发滤片/双色束分离器/阻断滤片的组合,即可满足不同荧光反应产物的需要。

物镜 透射光暗场照明时,一般用低倍到中倍的干物镜。落射光照明时,因为样品的照明和荧光的收集是由同一个物镜来实现的,荧光光度术的效率与所用物镜的数值孔径的 4 次方呈正比,此时用数值孔径大的浸没(水浸或油浸)物镜为好。

阻断(次级)滤片 为截断型滤片,使长于某种波长的光通过(又称长波通滤片),选择的截止波长应不使激发光通过。另一种为窄带干涉滤片。如果使用连续干涉滤片就可测定荧光的发射光谱。

光度计系统 测量光阑位于样品中间影象的平面上,用于限定样品测定的范围。根据被测样品的形状和大小可选用不同大小的圆形或矩形测量光阑。观察目镜用于观察样品的像和测量光阑,调节物台使被测样品移至测量光阑内。测定时,滑动反射镜移出光路,使光进入光电倍增管。近代的细胞荧光光度计,测量光阑作为一个照明光点叠加在样品的像上,所以通过目镜就能对测定的样品定位。荧光的相对强度用数字电压表显示。为了防止长时间激发光照射样品而引起的荧光消退,可先用长波长透射光找到被测样品,然后关闭透射照明光路,打开落射激发光的快门,在不到 1 秒钟的时间内照射样品。

二、细胞荧光光度术的方法学

1. 测定生物医学样品

(1) 原发荧光 未经任何处理的生物样品被光激发后,本身即可发射荧光。如弹性和胶原纤维,含 NADH(还原型辅酶 I)的细胞质等。

(2) 诱发荧光 经化学反应使组织中的物质转换为荧光物质。如生物单胺类经甲醛或醋酸激发形成异喹啉醌类或 β -咔啉等荧光物质。

(3) 荧光染料染色荧光 组织用荧光染料染色而发出的荧光。如吖啶黄或副品红与 DNA 作用所产生的荧光。

(4) 酶诱发荧光 通过酶催化反应,使某些物质转换为荧光产物。如细胞内的酯酶可使不发荧光的荧光素二醋酸转换为荧光素。

(5) 免疫荧光 荧光染料和抗体以共价键结合,这种经标记的抗体和相应的抗原形成抗原-抗体复合物,经光激发后发射荧光,用以辨认未知抗原。

2. 定量测定的原理 具有荧光发色团的物质被光激发后,发射荧光。荧光强度(F)和荧光发色团的浓度(C)的关系如下:(根据 Boehm 和 Sprenger)

$$F = I_0 Q (1 - e^{-Kcd})$$

F ——发射荧光强度, I_0 ——入射光强度;
 Q ——荧光量子产额; K ——荧光发色团克分子消光系数; C ——荧光物质的浓度, d ——物体的厚度,公式中,用稳定的激发光源 I_0 保持不变。一定的荧光物质在恒定的环境条件下, Q 值

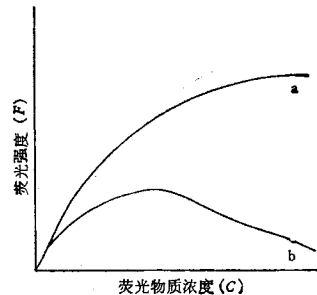


图 2 荧光物质浓度与荧光强度的关系

曲线 a—表示在没有重吸收情况下二者的指数函数关系;
曲线 b—发生重吸收时二者间的关系。

是个常数。因此荧光强度(F)随着荧光物质浓度(C)的增加而增加(图2)。只有在荧光物质浓度较低时, F 和 C 呈近似直线关系,这就是定量测定的基础。当荧光物质浓度增加而出现荧光重吸收现象时, F 和 C 间就不呈线性关系。

3. 应用细胞荧光光度术中要注意的几个问题:

(1) 原发荧光与非特异性荧光 为了降低样品的原发荧光(自然荧光)和非特异荧光。对测量准确性的干扰,可选用荧光较强的特异性荧光染料进行染色,或是在染色前后用强的激发光照射样品。

(2) 荧光消褪 光激发时有些荧光物质的荧光强度会降低,这种现象称为荧光消褪。荧光消褪的程度与激发光的强度和激发时间的长短有关。因此,为了使其降至最小的程度,最好采用较低强度的光激发并缩短激发时间。

(3) 内滤波效应 荧光物质的发射光谱与吸收光谱重叠时,发射的荧光就被荧光物质自身吸收,这种现象称为自滤波效应,其结果使荧光强度降低和发射光谱向长波方向偏移。此时可通过选择适宜的阻断滤片使之离开重叠区。如图3所示。

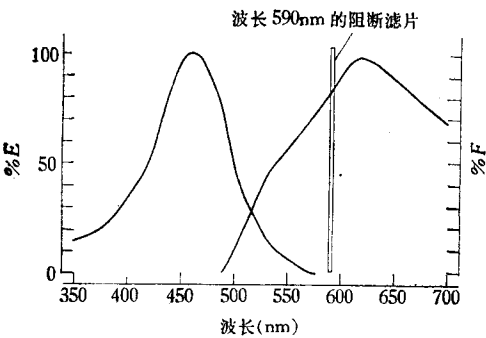


图3 吖黄素染色的肝细胞核吸收光谱(左)及荧光发射光谱(右,未校正)

波长590nm的阻断滤片置于重吸收范围以外

(4) 荧光猝灭 任何引起减少荧光量子产额导致荧光强度降低的现象都称为荧光猝灭。被激发的荧光物质分子通过碰撞或非碰撞方式将能量转移,或以非辐射方式释放能量。影响

猝灭的因素有荧光物质的浓度、温度、粘度及猝灭剂等。在细胞荧光光度术中,由于荧光染料分子牢固地结合在大分子上,不存在碰撞条件,所以碰撞猝灭不是重要的干扰因素。

(5) 荧光标准和仪器的校正 细胞荧光光度计的测定值表示荧光的相对强度,该测定值随着测量条件(如光电倍增管、高压电源、光路系统和记录器中各因素)的变化而改变。因此,必需用标准荧光样品来校正细胞荧光光度计。不易产生荧光消褪的铀玻璃片常被用来作为荧光标准,这种标准片使用简单,对温度变化不敏感,在几小时的测定时间内,能成功地补偿由于灯的温度、滤片、光电倍增管及其他电子装置而引起的变化。

4. 染色材料制备的方法:

(1) 材料 凡能做成涂片、印片、冰冻切片的任何组织、细胞及细胞悬液均可进行荧光染色。

(2) 固定 将湿的或空气干燥后的制片浸在固定液(一般用甲醇:甲醛:冰醋酸=85:10:5 v/v的混合液,或用乙醇、乙醇-乙酸固定液,固定液中切忌重金属存在)中。固定时间要合适,太长会减少染料的摄取和降低细胞附着于玻片表面,时间太短细胞不能充分固定,很快分解。

(3) 染色 DNA 样品在进行经典的孚尔根反应和雪夫型试剂染色时,必需预先进行酸水解。嵌入型染料如溴化乙锭(EB)和碘化丙锭(PI)则不需酸水解。蛋白质染色可用磺胺黄素或异硫氢荧光黄(FITC)。

三、应 用

1. 测定细胞内化学成份的含量 DNA、RNA、组蛋白、总蛋白、精氨酸、赖氨酸、糖元和巯基的测定,主要是利用特定的荧光染料与被测定物质进行特异性的结合,并在一定的浓度范围内呈化学计量学关系,从而可根据荧光强度来测定物质的含量。

2. 免疫荧光的定量测定 免疫荧光的广泛应用要求对免疫荧光进行定量处理,视觉半

定量的方法只有在荧光强度相差二倍时,才能判断出来,而细胞荧光光度计能客观的记录细微的荧光变化。

3. 神经传递介质的细胞荧光光度测定 用甲醛蒸气或乙酸处理冰冻干燥的组织,可使生物胺、儿茶酚胺、5-羟色胺和多巴胺等产生荧光。由于每种生物单胺的荧光发射光谱不同,所以用细胞荧光分光光度计分别测定激发光谱和发射光谱,就可鉴别某种生物单胺的存在与否。

4. 酶的动力学研究 细胞荧光光度术特别适用于活细胞或没有固定的组织切片酶的动力学研究,例如通过测定还原型辅酶 I 结合到蛋白质的荧光变化来分析氧化酶体系的变化。

5. 微体积的显微荧光光度测定 免疫化学和酶化学研究常需要测定包含在微滴、微毛细管或人工基质微球中微小体积的荧光反应产物。细胞荧光光度计能准确的测定直径为 1—50 微米大小“微池”中的荧光。

6. 双荧光法或双色荧光法 在同一个细胞中测定二种或二种以上的物质如 DNA 和免

疫荧光、DNA 和 RNA、DNA 和蛋白质、孚尔根 DNA 和血红蛋白,也可在同一个细胞核中同时测定 DNA 含量和放射自显影银粒的数目。

目前限制细胞荧光光度术发展的主要问题是缺少特异性并且符合化学计量学的荧光染色方法。随着新的荧光染料的发现,细胞荧光光度术在生物学和医学上的应用将会有更大的发展。

参 考 文 献

- [1] 59175 部队:《荧光显微术》,上海科学技术情报研究所,1976.
- [2] Fukuda, M. et al.: *Cytophotometry and its Biological Application*, Gustav Fischer Verlag, 1978.
- [3] Pleom, J. S.: in *Analytical and Quantitative methods in Microscoph* (G. A. Meek and H. Y. Elder Ed.), Cambridge Univ. Press, 1977.
- [4] Ruch, F. et al.: in *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, (V. Neuhoff Ed.), Vol. 14, *Micromethods in Molecular Biology*, Springer Verlag Berlin-Hedelberg New York, 1973.
- [5] Prenna, G. et al.: *Histochemical J.*, 6, 259, 1974.

[本文于1982年7月1日收到]

核酸序列资料的微型计算机处理

乐树云 江寿平 贾继萍

(中国科学院上海生物化学研究所)

DNA 分子的顺序测定和分析是分子生物学研究中基本问题之一。近几年来由于 Sanger^[1] 和 Maxam, Gilbert^[2] 等人建立简便而快速测定 DNA 顺序方法,使测定和分析的工作有了迅速地发展。自第一个完整的 DNA 分子(噬菌体 ϕ X174 DNA) 的序列被测定以来,人们已经积累了大量的 DNA 分子序列资料。序列数据量大,而且不断增多,因此,科学工作者进行了利用电子计算机来储存比较、分析,处理已获得的核酸序列信息的工作^[3]。为了在国内开展这方面的研究,我们进行了关于核酸序列资料的微型计算机管理系统的软件开发工作,并已经取

得了初步成果^[4]。现将管理系统中关于在核酸序列中检索任意指定的片段核酸序列的工作简要报道如下:

管理系统文件是在 TRS—80 微型机上实现的。首先完整的 DNA 分子序列可以通过管理系统中核酸序列数据输入文件输入到计算机的内存(如果用户需要永久保存,可将数据资料储存在软磁盘中)由于使用了外存贮器,输入的序列长度不受机器内存容量的限制。被检索的任意指定的片段序列可由键盘输入。对于各种不同专一性的限制性核酸内切酶识别的序列已经须先存贮在软磁盘中。一旦需要构造 DNA 序