

技术与方法

适用于细胞荧光测量的多道显微荧光计*

尚世铎 单锦安 郑东东 张 云 李素文

(北京师范大学分析测试中心, 北京 100875) (北京师范大学生物系, 北京 100875)

提 要

建立了由倒置荧光显微镜和光学多道分析仪(OMA)连接而组成的适用于细胞荧光测量的多道显微荧光计, 编制了数据处理程序。利用这一装置测量了单个细胞, 多细胞的荧光光谱和拓扑(topography)。和传统的显微荧光计相比, 该装置具有测量灵敏度和精度高、速度快等特点, 可用于进行活细胞动态过程的研究。

关键词 细胞荧光, OMA, 光谱, 拓扑

在显微荧光术中, 为了有效地激发细胞荧光, 一般使用强光源来激发^[1]。然而激发光源强度增加时, 细胞荧光的猝灭(光分解作用)速度亦随之增加。在某些场合下, 荧光甚至在短至 1s 的时间内就会大大减弱^[2]。由此可见, 在显微荧光术中, 如何减少测量时间以避免荧光猝灭对测量的影响是一个至关重要的问题。此外, 在研究活细胞的动态过程中, 往往要求仪器的时间分辨率在毫秒的量级以内^[3]。传统的显微荧光计(如 Leitz MPV II)采用机械扫描装置测量细胞荧光光谱和拓扑, 因而所需时间长(如扫描整个可见区需用 25s), 这样得到的信息不能反映细胞荧光在某一时刻的真实情况。显

然传统的显微荧光计难以满足快速测量的要求。我们利用光学多道分析仪具有多通道同时探测以及时间分辨率较高(32ms)的特点, 将其与显微镜联机, 为解决荧光的快速测量问题提供了一种方法。国外在七十年代初由 Kohen 等将光学多道技术应用于细胞荧光测量上, 从而发展了一种新的显微荧光术——多道显微荧光术(multichannel microfluorometry), 在此基础上建立了原位细胞生物化学(in situ cytochemistry)^[4,5]。

1 实验装置

实验装置如图 1 所示:

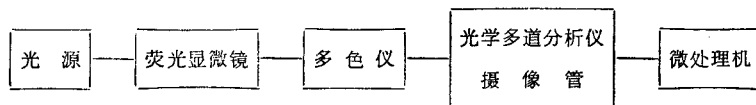


图 1 实验装置框图

光源: 200W 高压汞灯; 荧光显微镜: Leitz Diavert; 多色仪: 西德 B&M 公司 BM25 多色仪, 焦距 25cm, 150 线/mm、600 线/mm 光栅各一块; 光学多道分析仪摄像管: B&M 公司增强型硅靶摄像管, X 方向 500 道, 帧扫描时间 32ms, 灵敏度 15 光子/计数; 微处理机: B&M

公司 HEROS 型。

光学多道分析仪是光电技术和计算机技术结合起来的一种新型光学探测、处理仪器。它主要由摄像管(探测器)和微处理机组成。本

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1990-10-05 修回日期: 1991-01-10

装置所用的增强型硅靶摄像管的核心是一长为 12.5 mm, 宽为 10 mm 的集成硅片, 在水平方向上有 500 个光敏区域(由光敏二极管组成)。当入射光照射硅片靶面时, 引起光敏二极管放电。放电量和入射光强成正比。随后二极管由电子枪充电, 充电电流经前置放大器产生视频信号由计算机处理。

本装置使用倒置荧光显微镜, 以便于进行各种显微操作, 如显微注射等。适用于有关活细胞动态过程的研究工作。

我们对显微镜的目镜部分进行了改装, 使显微镜和光学多道分析仪在光路上连接起来。它既能用于目视观测, 也能将细胞荧光引入多色仪。此外, 考虑到测量中应能实现从光谱到拓扑方式的方便转换, 在多色仪中, 加入一可旋转的反射镜。在拓扑测量时, 将其转入光路。

为了有效地处理数据, 作者编写了一些应用程序。利用这些程序, 可以对磁盘上贮存的光谱文件进行校正、计算、打印结果以及统计等工作。图 2 给出一用于计算光谱比和多参数的程序流程图。

2 应用举例

2.1 光谱测量

2.1.1 单细胞荧光光谱

a. 固定细胞内 DNA、RNA 荧光光谱的同时测定

用吖啶橙(acridine orange)染固定的 HEP2 细胞样品。激发光波长 436nm, DNA 和 RNA 荧光发射波长分别为 530nm 和 640nm、多色仪入射狭缝宽约为 0.6mm。测量结果见图 3。

在用 Leitz MPV II 进行同类测量时, 需在光路中插入单色仪或连续干涉滤光片, 所需时间长且步骤较繁。而用本装置测量时, 可同时得到发射荧光光谱。

b. 免疫细胞内 Ca^{2+} 活化钙调素(CaM)荧光光谱的测定

采用三氟拉嗪(TFP)结合法^[6], 测量了单个免疫细胞内 Ca^{2+} 活化 CaM 的荧光光谱。激

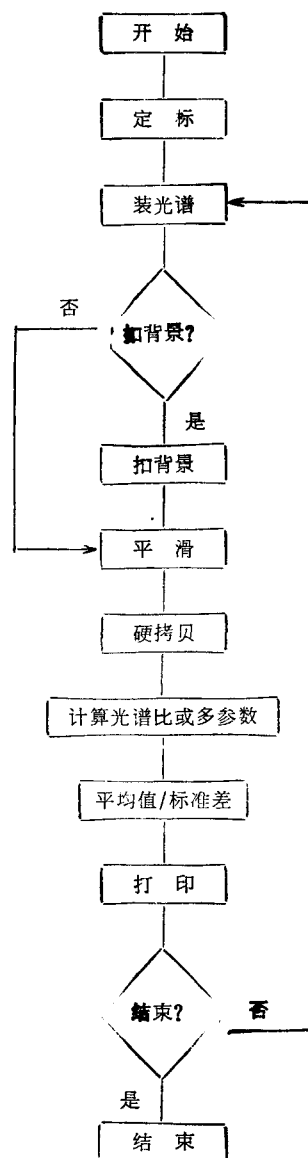


图 2 流程图

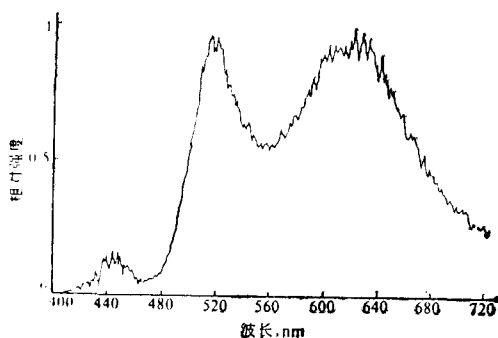


图 3 单细胞荧光光谱

发光波长为 365nm, TFP 荧光发射波长为 525nm. 测量结果见图 4. 图 4a 中由于细胞中钙活化 CaM 含量少,因而在 525nm 处荧光强度弱. 随着钙活化 CaM 含量的增加,荧光强度也增加,如图 4b,c.

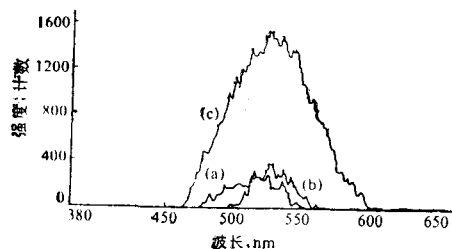


图 4 免疫细胞内 Ca^{2+} 活化钙调素(CaM)荧光光谱

2.1.2 多细胞荧光光谱

采用钙荧光探针 Indo-1 AM 标记活细胞,测量了活细胞群体内游离离子荧光光谱. 激发光波长为 365nm, Ca^{2+} 荧光发射波长为 405nm 和 480nm 测量结果见图 5. 根据 405nm 和 480nm 处荧光强度的比值,可以计算出细胞中游离钙离子浓度^[6].

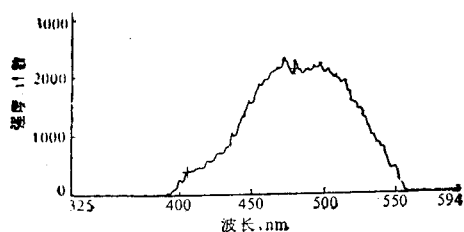


图 5 活细胞群体内游离离子荧光光谱

用 MPV II 测量钙离子荧光时,需手动调节连续干涉滤片,分别在 405nm 和 480nm 处进行测量. 显然这种方法重复精度低,费时费力. 而用本装置测量可以迅速地得到光谱比.

2.2 拓扑测量(Topographic measurement)

2.2.1 单细胞内核、质荧光拓扑的测定

由于 DNA 分子分布在细胞核中, RNA 分子主要分布在细胞质中,测定了吖啶橙染色的单个细胞的荧光分布,就可以得到核质比等形态参量. 这些参量的测定对于某些肿瘤的诊断有一定意义. 测量结果见图 6.

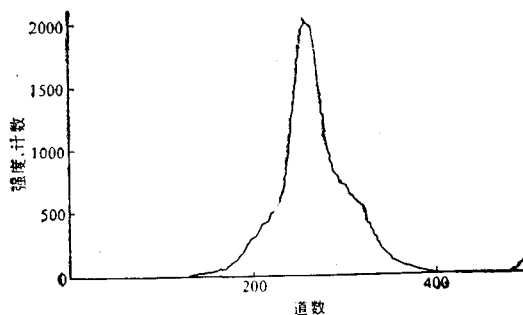


图 6 单个细胞荧光拓扑

2.2.2 蓝藻(Cyanobacteria)细胞荧光拓扑

的测定

蓝藻细胞荧光拓扑见图 7, 从图中可见细胞链上不同细胞荧光强度的差异. 蓝藻不仅光合作用效率高,而且它与某些水生植物的共生体具有固氮能力^[7]. 研究其荧光有一定的实用意义.

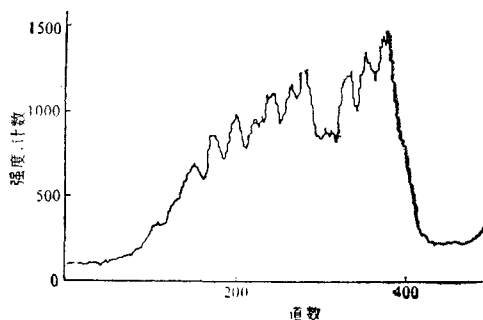


图 7 蓝藻细胞荧光拓扑

参 考 文 献

- 1 James J. *Light microscopic techniques in biology and medicine*. Netherlands Martians: Nijhoff Medical Division, 1976: 152—163
- 2 Meek G A, Elder H Y 主编,管订鹭译. 显微术中的分析与定量方法. 北京: 科学出版社, 1983: 36—57
- 3 Thorell B et al. *Medical Biology*, 1978; 56:386
- 4 Kohen E, Kohen C. *The intercellular transfer of molecules in tissue culture cells: A kinetic study by multichannel microfluorometry, differentiation and development*. Academic Press inc, 1978:411—417
- 5 Kohen E et al. *Examination of single cells by microspectrophotometry and microspectrofluorometry, techniques in cellular physiology*, 1981; P103:1—28
- 6 You J S et al. *Cell Research*, 1990; 1:89
- 7 Shi Ding ji, David O Hall. *Plants Today*, January-February 1988/5