

神经组织荧光扫描显微光度测定方法研究

李玉书 蔡翹

(军事医学科学院基础医学研究所,北京)

用荧光显微光度计测定神经元胞体或末梢荧光,目前流行的方法,是在显微观察下手动选择切片测区,以测定值减去背景光度值来代表测区的平均荧光强度^[1-3]。这一方法对技术和设备的要求不高,有利于推广应用。但是,当研究结构比较复杂的神经组织时,上述方法就难以保证样本的代表性;以为数不多的数据代表组织总体荧光值,难免有偏差。又由于多种因素影响,单次荧光显微测定值总有不容忽视的随机误差。此外,仅以平均荧光强度作为神经组织总体荧光的测定指标,也不够全面。作者在神经组织荧光的定量研究中,采用了多切片阔步扫描和数据直方图电子计算机校正、迭加、分析的方法,可避免流行方法在取样代表性和数值分析方面的不足。

一、技术和设备

1. 组织化学 采用 de la Torre 的 SPG 法^[4],诱发大白鼠颈上交感节恒冷箱切片(10 μ)荧光,条件除具体注明外作如下修改:反应温度为 105 $^{\circ}$ C、时间 3 秒。

2. 扫描显微光度计 Zeiss SMP 05 型,控制计算机为 PDP-12。用 10 μ 步度扫描台,有效测量孔径 0.8 μ 。光源为 HBO 100 直流高压汞灯,激发滤片 BG 12,色束分离镜 FL 450,阻断滤片 50/41。采用 ZnS·Cu 涂层(清华大学核能化工厂)为荧光标准,每次实验前校准仪器状态。

3. 数据处理 测量数据以每一切片荧光光度的原始直方图形式(0-255 强度级),由 PDP-12 传输到 TRS-80 微计算机,在 BASIC 程序下一次完成直方图校正、迭加和分析,并打印图形

和计算结果。

二、方法研究

1. 直方图校正及迭加

(1) 多切片阔步扫描 交感节大小约为 3 \times 1 \times 1mm,可制取 10 μ 厚切片数十张。为获得代表全节荧光的数据,应随机测定其中足够多的切片,每一切片应有足够多的测点。为此采用的多切片阔步扫描方式,即从每一交感节切片中分层抽取 10—15 片,在每一切片上各扫描大约 5,000 个测点,各点间距 10 μ 。扫描区总合可覆盖全节切片相当大的部分,是一种大规模系统抽样方式。

(2) 同节各切片间原始直方图的差异 同节不同切片荧光强度分布的差异是明显的(图 2a),只有足够多切片的总合直方图才能代表全节。但直接相加会抵消分布特征,因此有必要研究原始直方图的差异性质,以决定规范化方法。

造成切片间荧光强度差异的原因主要是切片厚度、浸浴在反应液中的时间、反应温度和加热时间等因素的变异。为研究上述各单项因素与切片荧光强度的关系,我们作了两组实验:

实验一: 某些组织化学条件对切片荧光强度的影响 将来自同一交感节的切片随机分配为每 5 片一组,单项改变各组切片的组化反应温度、加热时间或浸浴反应液时间,其他条件保持不变。组化反应后进行扫描测光,以每 5 片全部扫描点总平均光度为该组荧光强度。实验结果示于图 1a, b, c。结果表明,在本实验控制的波动范围(分别为 $\pm 2^{\circ}$ C、 $\pm 5''$ 和 $\pm 0.5''$)内,上述三个单项因素改变引起荧光强

度的波动均小于5%，且近似线性效应。

实验二：切片厚度与荧光强度的关系 将切片厚度分别定为5, 10, 15 和 20 μ ，每一厚度切5片。诱发并扫描测定每一切片平均荧光强度后，以双盲设计的上下表面聚焦法测定每一切片厚度。根据每张切片的荧光强度和实测厚度绘制散点图(图1d)。结果表明，在实验范围内，切片厚度与荧光强度呈正相关($r=0.95$, $p < 0.01$)。根据回归方程估计，由恒冷箱切片

机切片厚度波动所引起的荧光强度改变可达10%以上。

上述实验说明，同节各切片间原始直方图的差异主要是由于冰冻切片厚度波动造成的，在较小程度上与组化反应条件的波动也有关。在狭小范围内，这些影响均是线性或近线性的效应。由于这些影响因素的实际作用是彼此独立的，故其综合效应也是线性的^[7]，因而可用线性校正。

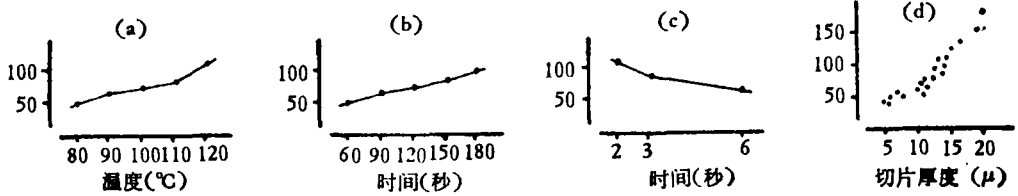


图1 影响组织化学 SPG 荧光的主要因素

纵座标均为荧光强度(相对单位)

- (a) 在其他条件不变时，反应温度改变对荧光强度的影响
- (b) 在其它条件不变时，加热时间改变对荧光强度的影响
- (c) 在其他条件不变时，浸浴反应液时间改变对荧光强度的影响
- (d) 切片厚度(实测厚度)与荧光强度的关系

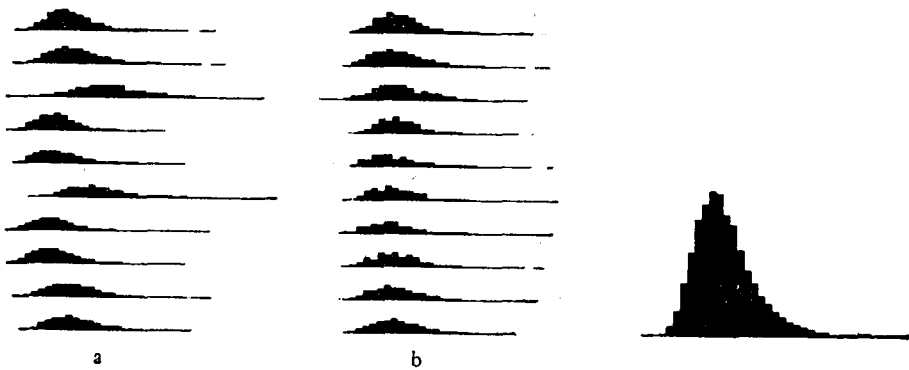


图2 来自同一交感节的十张切片的原始直方图迭加

横座标：荧光强度(相对单位)，纵座标：相对频数。图中未画出座标系。

a. 原始直方图 b. 校正直方图 c. 迭加直方图

(3) 原始直方图的迭加 一切片原始直方图的横座标乘以该切片的线性规范化因子，称为线性规范化校正。线性规范化因子定义为该切片平均荧光强度与全节总平均荧光强度之比。将来自同一交感节的若干个原始直方图作线性规范化校正，并将校正直方图迭置的计算机过程，即为直方图迭加。

图2为一交感节10张切片的原始直方图(a)及其校正(b)和迭加(c)结果。校正直方图具有近似的强度分布。迭加直方图则代表全交感节单胺荧光的强度分布，为进一步分析的依据。

(4) 切片样本数对迭加结果的影响 随着迭加样本数 n 加大，全节总荧光强度均值的变

异系数 *c.v.* 减小, 两次实验结果为: $n = 1$ (即未经迭加的原始直方图) 时, *c.v.* 为 22.1% 和 24.9%; $n = 5$, *c.v.* 为 6.8% 和 14.0%; $n = 10$, *c.v.* 为 3.1% 和 6.4%; $n = 15$, *c.v.* 为 4.4% 和 2.3%。这一实验结果提示, 从每一交感节抽取 10—15 切片, 得到的迭加直方图可比较稳定地代表全节荧光。

2. 直方图分析

(1) 背景荧光曲线拟合 进入光度计的荧

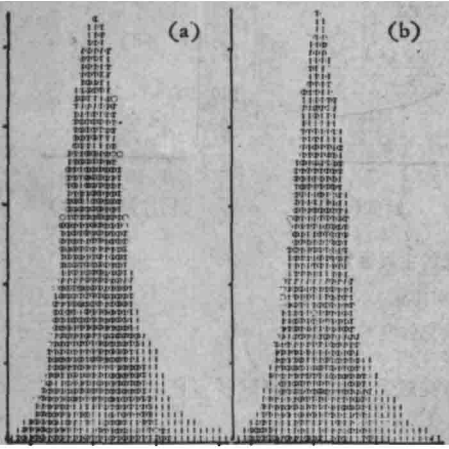


图 3 背景荧光的强度分布与正态分布的比较
-----: 背景荧光模拟标本的扫描光度直方图。

○ ○ ○ ○: 理论正态分布(高斯分布)

横座标: 荧光强度(相对单位), 纵座标: 频数

a. 成年大白鼠切断节后纤维二周的交感节切片, 经 SPG 法处理, 几乎无特异荧光, 其非特异荧光的强度分布基本符合正态分布。

b. 正常交感节切片经等渗溶液洗 3 次后, 结果与 a 相同。

光包括单胺特异荧光、组织非特异荧光和系统本底荧光, 后二者即背景荧光。背景荧光由于强度低, 故分布于直方图低强度侧, 但与特异荧光分布有部分重叠。为除去其中背景荧光部分, 须研究其分布状态。用单胺基本耗竭的切片标本可模拟背景荧光。图 3 为两种实验结果, 表明交感节背景荧光的强度分布基本符合正态分布。

正态分布的数学描述是高斯分布方程:

$$Y = \frac{N}{\sigma \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(X-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

对上式 X 座标行平方转换、 Y 座标行对数转换, 则正态曲线被直线化。因此, 只要在座标转换后用最小二乘法拟合直线, 再使座标逆转, 即可由直线方程计算出曲线方程参数 N 和 σ , 并完成背景正态曲线拟合^[8]。

(2) 特异荧光直方图 从迭加直方图中减去背景分布, 即得特异荧光直方图。为进行标本间相互比较, 可以背景分布原点为零点平移横座标。图 4 表示特异荧光直方图形成的过程, 从中可见背景分布的理论拟合与其实际分布是相当吻合的。

(3) 数值计算 可根据需要计算特异荧光平均强度、强度分布变异系数、任意强度范围的累计频数及荧光累计量占总量的百分比等。

3. 上述方法的应用

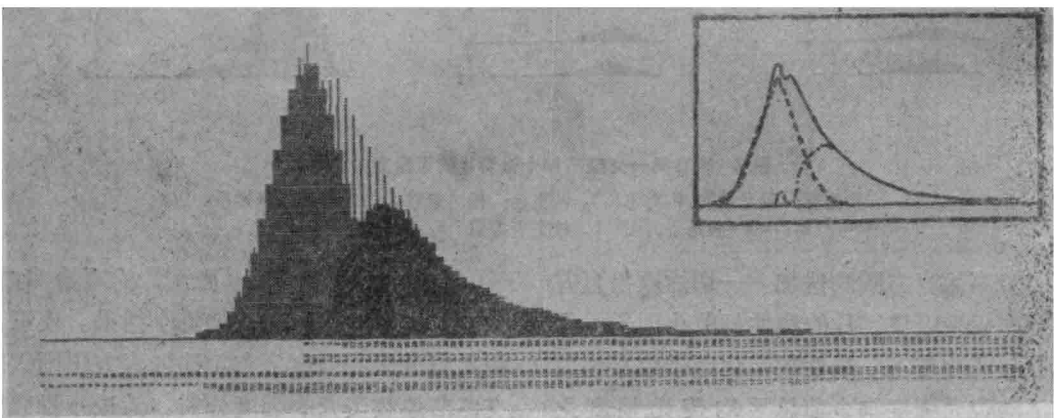


图 4 迭加直方图分析 (右上为本图轮廓)

全图为一交感节十个原始直方图的迭加直方图。其中以 |||| 表示的部分为背景荧光拟合曲线; ■ 表示从迭加直方图中减去背景分布所得到的特异荧光直方图。下方四列数字中, 下二列为迭加直方图横座标(荧光强度)和对应的绝对频数, 上二列为特异荧光直方图的平移后横座标(荧光强度)和对应的相对频数。

本程序人为地将组织总体荧光分布划分为弱、中、强三个组分,目的是估计实验条件下不同强度荧光成分的相对增减变化。表1列举了三只正常大鼠交感节荧光测定结果。

切断成年鼠交感节前神经一段时间后,显微镜下可观察到不同程度的胞体荧光减弱和膨体增生现象^[9]。为进行定量研究,本程序试以100光度以上的累计频数与总频数之比作为反映膨体增减的指标,称为V.指数(Varicosity,膨体)。这样规定的理由是膨体荧光常达100光度以上,而胞体荧光则一般低于此值。表2列举二只断右节前纤维一月后,大鼠交感节荧光测定结果;均以左侧节作为对照。

表1 正常成年大白鼠颈上交感节 SPG 荧光测定

交感节	平均胞体 荧光强度*	弱荧光分量	中荧光分量	强荧光分量
鼠1左	33.7	34.0%	44.4%	16.0%
右	29.3	34.2%	45.1%	15.8%
鼠2左	22.4	34.2%	36.3%	13.8%
右	20.6	29.1%	44.9%	16.5%
鼠3左	27.9	31.9%	45.7%	15.2%
右	30.0	30.0%	49.2%	15.6%

* 相对单位

表2 切断右侧交感节前神经后大白鼠颈上交感节 SPG 荧光测定

项 目	大鼠1: 手术侧 对照侧		大鼠2: 手术侧 对照侧	
	平均胞体荧光强度	30.4	29.8	37.2
V. 指数	1.06%	0.72%	3.14%	1.77%

表3 断右节前纤维一月并给药24小时颈上交感节 SPG 荧光测定*

项 目	大鼠1: 手术侧 对照侧		大鼠2: 手术侧 对照侧	
	平均胞体荧光强度	28.4	25.3	16.3
V. 指数	1.94%	1.62%	0.16%	0.31%

*处死前24小时腹腔注射 6-OH-DA100mg/kg

表2手术侧节未见胞体荧光减弱,提示在

显微镜下观察到的减弱现象,至少在一部分标本是明亮膨体荧光映衬下,可能产生的视错觉。膨体的增加表现为V指数增大。从表2可见鼠1增加不明显,鼠2较为明显,与镜下观察是一致的。6-OH-DA使胞体和末梢单胺水平迅速下降,表3鼠2的测定结果与此一致,手术侧节似更敏感;鼠1胞体荧光比未用药有所下降,两侧膨体差异比未用药减小,可能尚处于单胺含量下降的早期。

讨 论

在吸收光扫描显微光度法中,扫描的目的是提高分辨率以消除分布误差;扫描点孔径一般由扫描步距决定。而荧光测定则无分布误差的影响,因此以往很少使用扫描技术。作者使用扫描的目的是实现大规模系统抽样,为保证扫描面积足够大,采用10 μ 步距。选择小测点孔径的目的是使测定结果可分辨精细结构。考虑到交感节内主神经元直径一般在20 μ 左右,膨体直径约1 μ ,故0.8 μ 孔径结合10 μ 步距应能有效地采集信息。在一般情况下,从每交感节可取得数万个测点,这些测点实际上呈网格状三维分布,三轴上点间距离均为10 μ (因片厚也为10 μ),所以测定能具有代表性。

迭加是信号处理中常用的消除噪音的方法。广义地说,直方图也是信号,因此也可以用迭加处理来抵消随机误差,得到理想图形。然而,直方图不同于单一的信号,它实际上是由众多强度不等的信号构成的频数分布。只要若干分布都是来自同一总体,就具备了可以叠加的前提,而其中每一具体信号并不必须重复。换言之,直方图迭加只要求这些直方图来自同一标本,而不要求它们的具体测点重迭。在信号迭加中,信号“对准”的问题由计算机采样来解决,而本文直方图迭加中的“对准”程序是线性规范化。当然,规范化的结果不仅“对准”而且发生了座标的相对伸缩,使迭加直方图不致由于个别原始直方图的偏差过大而发生畸变。此外,与信号迭加相同,直方图迭加的次数也决定迭加的质量。上文已提及,10至15迭加能保

证结果的稳定性。

张双喜、彭善云参加技术工作，谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Lofstrom, A. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 415, 1976.
- [2] Bittiger, H. et al.: *Toxicology*, **8**, 63, 1977.
- [3] Krinke, G. et al.: *Experientia*, **34**, 1077, 1978.

- [4] Partanen, M. et al.: *Histochem. J.*, **12**, 49, 1980.
- [5] 董新文等:《生理学报》, **33**(1), 24, 1981.
- [6] de la Torre J. C. et al.: *Histochemistry*, **49**, 81, 1976.
- [7] 张世宾:《测量误差及数据处理》, p.128—143, 科学出版社, 1979.
- [8] Schipper, J. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **28**, 124, 1980.
- [9] 华仲慰:《军事医学科学院院刊》, **2**, 175, 1981.

[本文于1983年9月19日收到]

末端终止法测定非特异性降解的 DNA 片段的顺序

琦 祖 和

(中国医学科学院基础研究所生化室)

用末端终止法测定 DNA 顺序的方法之一是用限制性内切酶将被测 DNA 降解^[1,2],再与噬菌体 M₁₃DNA 重组、克隆。提取单链 DNA 做为模板,进行顺序测定。寻找一些非特异性的降解工具取代内切酶,有一定的经济价值,而且还可以扩大方法的应用范围。尤其在多酶切点的载体 M₁₃mp 系列出现后,更为 DNA 重组提供了方便。本文用酶法及超声波法切剪,得到了适合在 M₁₃mp₈ 载体中以平齐末端重组的片段。

一、材料与方 法

1. 材料 小牛胸腺 DNA 及质粒 PJDB Clone 71 DNA 均按常规方法纯化。ddNTP(双脱氧核苷三磷酸)为 P-L Bio-Chemicals 公司产品,酶制剂及其它试剂为 BRL 公司产品,细菌用培养基为 Difco 出品,α³²P-dATP 比活度 400 Ci/m mole 为 Amersham 出品。所有酶的反应条件均按厂家说明书。

2. 非特异性降解方法

(1) 酶法 DNase I 与 S₁ 核酸酶联合降解,每 μg DNA 用 0.5 ng DNase I(总体积 10 μl)在 37°C 保温 10 分钟短暂降解后,经酚提取,乙醇沉淀后,再用 40—100U 的 S₁ 核酸酶断链。停止反应后,取一部份进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电

泳,鉴定酶切情况,另一部份用 DNA 聚合酶 I 修整并标记末端,通过 Sepharose 4 B 柱层析分段收集用于克隆。

(2) 超声波剪切法 用 5mm 小头,功率 100 W 超声发生器对 200 μl 反应液(含 5—10 μg DNA)切剪 3—6 秒钟,乙醇沉淀。电泳鉴定并用 DNA 聚合酶 I 修整并标记末端,通过 Sepharose 4 B 柱层析分段收集用于克隆。

3. 载体 M₁₃mp₈DNA 的制备 用 CsCl-EB 超离心法纯化复制形双链 DNA。经 Sma I 消化制取线形载体并稀释到 10 ng/ml 备用。

4. 重组 将 50 μl 反应液(含 5 μg DNA),线形 M₁₃mp₈ 50 ng, ATP 1 mM, 10 倍连接缓冲液 5 μl, T₄ DNA 连接酶(1:10) 5 μl, 在 16°C 保温 24 小时。对照管分别不加 DNA 及连接酶。

5. 转染 宿主 *E. coli* K-12 JM103 经 200 mM CaCl₂ 处理。每 50 ml (OD₆₆₀ = 0.6—0.7) 的菌体悬浮于 3 ml 80 mM CaCl₂ 溶液中,取 0.3 ml 用于转染。转染后的菌液中加入 IpTG (24 mg/ml) 20 μl, x-Gal (20 mg/ml 二甲基甲酰胺溶液) 30 μl, 0.6% 琼脂 3 ml, 自发生长的宿主菌液 0.2 ml, 平皿培养 37°C 过夜。

6. 制备模板 取无色透明菌落于 5 ml 2YT 培养基中扩增,每 0.8 ml 上清液加 0.2 ml 20% PEG