

# 红宝石激光显微照射在细胞生物学中的应用

梁 宏 陆仲康 刘福全 张雪琴 王兰岚 邓燕华

(中国科学院遗传研究所)

**提要:** 利用 XJX-2 型红宝石激光显微仪对模式组织和大豆胞株, 小家鼠及兔 2-细胞期胚胎等动植物细胞进行了激光显微照射的生物学试验。在利用生物细胞天然发色团或进行活体染色的基础上, 对供试的几种动植物细胞产生了有效的选择性损伤。

## Application of ruby laser microbeam irradiation in cell biology

Liang Hong Lu Zhongkong Liu Fuquan Zhang Xueqin Wang Lanlan Deng Yanhua

(Institute of Genetics, Academia Sinica)

**Abstract:** Study of laser microbeam irradiation of biological model tissue and the living cells of plants as well as animals such as soybean cell line, protoplast of mesophyll cells in tobacco, Chinese Hamster Ovary Cell Line (CHO), the 2-cell stage embryos of mouse and rabbit, have been carried out by using XJX-2 ruby laser microbeam system. On the basis of using either natural chromophore or vital staining, the effective and selective destructions in living cells of plants and animals tested were produced successfully.

激光通过显微镜聚焦, 能获得亚微米大小的光点, 这一特性对诸如染色体、核仁、线粒体、叶绿体和细胞表面等细胞器已可能进行细胞显微外科手术。近十多年来, 国内外一些研究者致力于发明多种激光微束照射仪并利用激光显微照射这一新技术开展令人振奋的新试验, 已取得了可喜的进展<sup>[1~10]</sup>。本文试验目的是为建立显微照射的实验程序, 对所用的 XJX-2 型红宝石激光显微仪及其对模式组织和几种动、植物细胞进行显微照射测定必要的参数, 为进一步开展细胞显微外科手术提供依据。

## 一、试验材料和方法

本试验所用 XJX-2 型红宝石激光显微仪由吉林市光机实验厂制造。激光器最大输出能量为 588 毫焦耳。进行显微照射试验时, 把样品放在载物台上, 先用氦-氖激光定位, 在指定部位发射 6943 埃波长的红宝石激光。红宝石激光有 3% 的能量透过干滤光片, 用不同工作电压测定能量并换算成输出总能量。

收稿日期: 1980 年 7 月 29 日。

能量密度的测定是使用4倍目镜对不同工作电压与各物镜(3.2倍、10倍、16倍、40倍)组合下的入射能量,并根据样品经激光辐照后产生的损伤光斑的面积进行计算。

试验材料有以下几种:(1)模式组织,由特制的薄膜如琼脂糖等组成,薄膜溶液含有0.05%的快绿染料,薄膜固定在载片上,不加盖片。(2)中国地鼠卵巢细胞株(CHO)细胞染色体分裂相制片。(3)CHO培养细胞,经胰酶消化后在无菌条件下注入培养小室,照射前用烟鲁绿活性染料染色。(4)SB-1野生型大豆细胞株,制备成细胞悬液用烟鲁绿染色,然后注入培养小室准备照射。(5)烟草叶肉细胞原生质体。取幼嫩叶片,撕去下表皮用1%的纤维素酶液处理,制备成原生质体悬浮液。然后注入培养小室中,准备照射。(6)小鼠2-细胞期胚胎,培养液是用改良的Whitten氏液,用亚甲蓝溶液(0.05毫克/毫升培养液)染色后,再移入新鲜培养液内进行激光显微照射。(7)家兔2-细胞期胚胎,培养液用PBS+50%兔血清溶液,染色和照射方法同小鼠。

## 二、试验结果和讨论

### 1. 激光对模式组织的损伤

模式组织的试验为生物学试验提供了可供参考的实验依据和参数。这种方法对于初级效应是热性质时是非常有用的,因为模式组织的性质对于热效应引起温度的局部增高而使之凝结易于观察和测量。如果初级效应是光化学性质时是不合适的<sup>[4]</sup>。

图1表示模式组织上产生明显激光损伤效应的典型光斑,一种弹坑似的凹陷。这与Leppard<sup>[10]</sup>报导的“管子效应”基本相符。

### 2. 激光对动、植物细胞的显微照射

我们首先用红宝石激光显微照射CHO细胞染色体分裂相固定制片,结果在染色体上形成小的颜色变淡的损伤光斑(见图

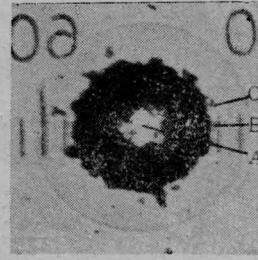


图1 激光微束产生的典型光斑  
A—气化部分, B—严重损伤部分,  
C—次严重损伤部分

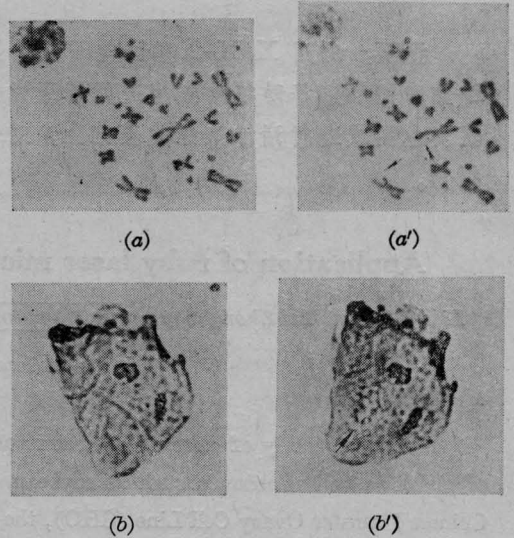


图2 红宝石激光微束照射在CHO细胞上引起的损伤

(a)、(a') 为染色体片,箭头表示照射后的损伤光斑  
(b)、(b') 为培养的细胞,箭头表示照射后的损伤光斑

2(a), (a'))。当然,固定制片的染色体因低渗处理而比存活细胞的大许多倍,而实际上红宝石激光产生的最小光斑约为2~3个微米。激光显微照射CHO培养细胞的情景见图2(b), (b')。照射后在细胞中产生一明显可见的损伤光斑。

SB-1大豆细胞株培养细胞在光斑直径为2.10微米,能量0.82毫焦耳,能量密度0.24毫焦耳/微米<sup>2</sup>情况下进行辐射,从图3(a)、(a'); (b)、(b'); (c)、(c')可见三种损伤情况:一种是损伤光斑中央发白,外圈黑色镶边;第二种是整个光斑呈明显的黑点凝聚,细

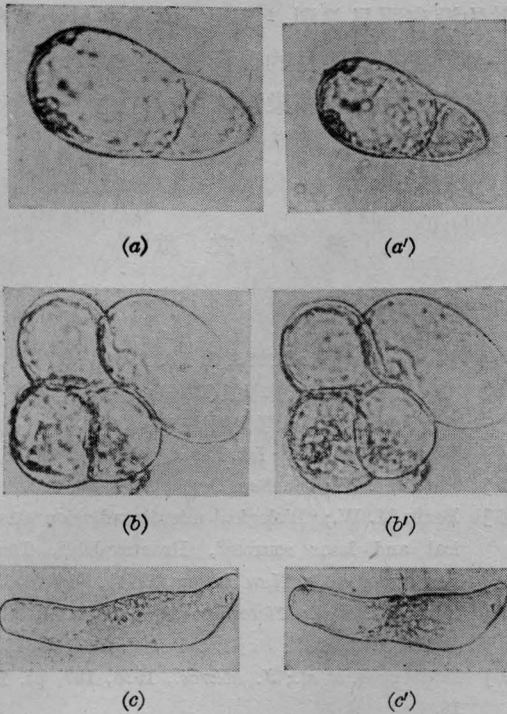


图3 红宝石激光微束照射在大豆细胞株悬浮细胞上引起的损伤光斑

(a)、(b)、(c) 为照射前的细胞；(a')、(b')、(c') 为相应的细胞在照射后出现的损伤光斑(箭头表示)。

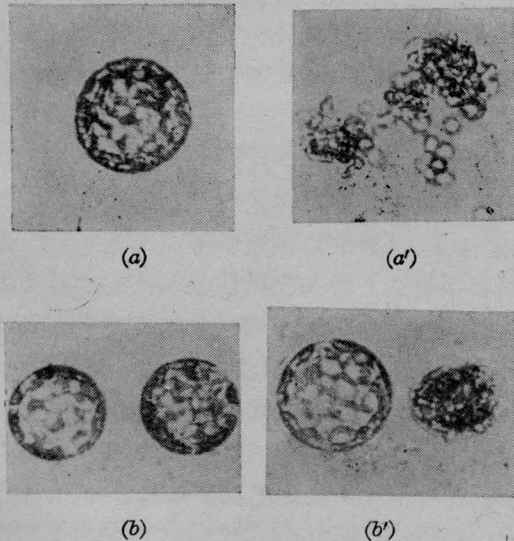


图4 红宝石激光微束照射在烟草叶肉细胞原生质体上引起的损伤

(a)、(b) 分别是照射前的细胞，(a') 为(a)经高能量(1300伏)照射后出现的炸裂现象，(b') 为(b)经照射后开始凝聚。

胞收缩；第三种是在长形细胞的细胞壁上击穿成裂口。

烟草叶肉细胞原生质体在相同的条件下，辐射后原生质体发生凝聚(图4(b)、(b'))。如果用高能量(4.22毫焦耳)辐射，原生质体如图4(a)、(a')所示出现炸裂现象。这显然因为原生质体具有自然发色团，叶绿体能充分吸收6943埃的红光波段的能量而引起的。

小家鼠和兔2-细胞期胚胎在能量密度为0.14毫焦耳/微米<sup>2</sup>的辐照后，可以有效而有选择性地破坏一个卵裂球而不影响另一个卵裂球的正常发育。同时，胚胎的透明带是完整无损的，这在哺乳动物胚胎早期发育中

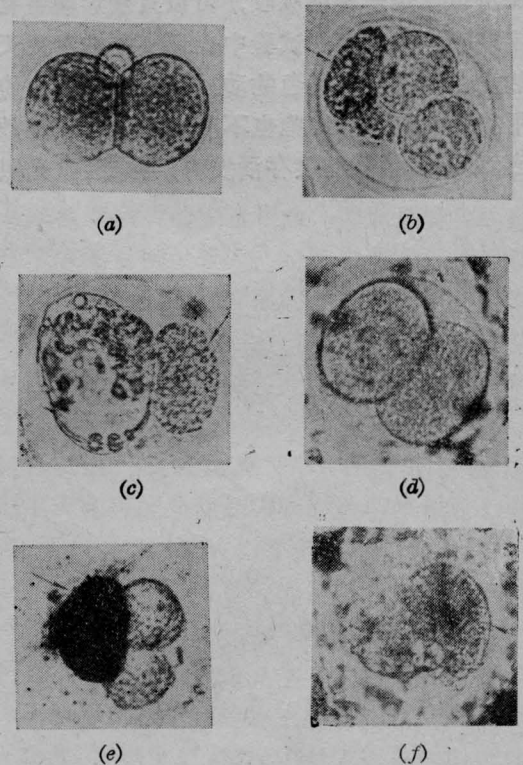


图5 红宝石激光微束在小鼠和兔2-细胞期胚选择性破坏后的发育

(a)为正常小鼠2-细胞期胚，一个卵裂球经激光破坏后，另一个卵裂球继续分裂成二个细胞(b)并继续发育直至胚泡期(c)；(d)为正常兔2-细胞期，一个卵裂球经激光破坏后，另一个卵裂球继续分裂成二个细胞(e)并继续发育直至桑椹胚(f)。(箭头表示经激光照射的卵裂球)

是重要的。实验结果表明, 2-细胞期胚胎经激光显微照射后, 未受损伤的另一个卵裂球在体外培养下按正常发育时相发育到桑椹胚(兔)或胚泡期(鼠)(图5)。

为使激光显微照射技术在细胞生物学应用中得到一定的生物学效应, 必须发生光的吸收, 因而必须有天然的或人工的发色团。红宝石激光被蓝、绿发色团所吸收, 这些人工发色团中已经采用的活性染料有烟鲁绿和亚甲蓝等, 具有天然发色团的叶绿素也能吸收红光。所以, 波长和发色团的正确结合是激光显微照射实验成功的关键。Berns等<sup>[4]</sup>认为在激光波长里如果没有相应的发色团, 就不可能有吸收峰值, 因为激光的高功率或高能量也仅是一种弱吸收, 可以直接影响生物学效应。在我们的试验中也证实了本身无天然发色团又没有染色的动、植物细胞, 即使使用很高能量, 对细胞也不产生可见的损伤效应, 细胞通常能继续存活发育, 与未经激光照

射的没有明显差别。因此, 在激光显微照射时必须根据试验目的选择适宜的能量密度, 特定的活性染料和染料浓度, 才能产生预期的生物学效应。

### 参 考 文 献

- [1] 吉林医科大学数理教研组等;《吉林医科大学学报》, 1976, No. 1, 21.
- [2] 鄂 征等;《激光》, 1978, 5, No. 1, 34.
- [3] 梁 宏等;《研究工作年报(1979)》, 中国科学院遗传研究所编辑, 北京大学出版社出版, 1980.
- [4] Berns M. W. *et al.*; *Int. Rev. Cytol.* 1972, **33**, 131.
- [5] Berns M. W.; *Int. Rev. Cytol.*, 1974, **39**, 383.
- [6] Berns M. W.; "Biological microirradiation classical and laser sources", Prentice-Hall, Inc., Englewood cliffs, New Jersey (1974).
- [7] Cremer C. *et al.*; *Microscopia Acta*, 1974, **75**, 331.
- [8] Daniel J. C. *et al.*; *Exptl. Cell Res.*, 1965, **39**, 475.
- [9] Isenberg G. *et al.*; *J. Micros.*, 1976, **107**, pt. 1, 19.
- [10] Leppard G. G. *et al.*; *Photochem. Photobiol.*, 1966, **5**, 631.