

下降得稍陡些,这是由于我们所取的电子密度曲线在电激励区出口处突降为零引起的,这些应在今后的工作中继续探索。

参 考 文 献

1 陈丽吟 *et al.*. 光学学报, 1985; 5(2): 135

2 Akida Toshimitsu. *IEEE J. Quant. Electr.*, 1979; QE-15(3): 162
 3 Foster H. *Opt. and Laser Technology*, 1972; (6): 121
 4 Nagai Haruhiko. *IEEE J. Quant. Electr.*, 1982; QE-18(3): 416

(收稿日期: 1986年10月6日)

一种检测蛙卵卵裂卵表面运动的荧光图像漂白法

张孔华 徐成汤 吴直江 吴立丹

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

A fluorescence pattern photobleaching method for measuring movement of frog egg surface during egg cleavage

Zhang Konghua, Xu Chengtang, Wu Zhijiang, Wu Lidan
 (Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai)

Abstract: This paper describes the principle of fluorescence pattern photobleaching technique and the experimental method, which has been applied to measure the movement of frog egg surface during the first cleavage.

一、引 言

荧光漂白恢复 (Fluorescence Photobleaching Recovery, FPR) 技术是采用强激光瞬时漂白荧光标记的细胞膜微区, 然后用弱激光记录被漂白区域中荧光恢复的过程, 获得荧光漂白恢复动力学曲线, 由此计算扩散系数或流动速度^[1]。我们曾于1981年研制了FPR装置, 并用于测定了林蛙卵表面受体的运动, 以了解膜运动与细胞分裂的关系^[2,3]。由于FPR测量范围小于 $10\mu\text{m}^2$ 的微区而难于了解卵表面大区域的流动变化。鉴于上述原因, 我们在原有的FPR技术基础上, 扩大测量区域, 采用了图像漂白技术。Smith等人曾用荧光图像漂白恢复法测定了膜表面分子的扩散运动^[4,5]。根据我们的实际情况, 结合微光电视 (Low Light Level TV), 初步研制成激光漂白荧光图像检测的实验装置, 为观察和记录林蛙卵裂时卵表面的运动提供了一种新的方法。

二、原 理

荧光图像漂白方法的原理如图1所示。平行激光束照射掩膜, 使掩膜的像经过显微镜的光学系统

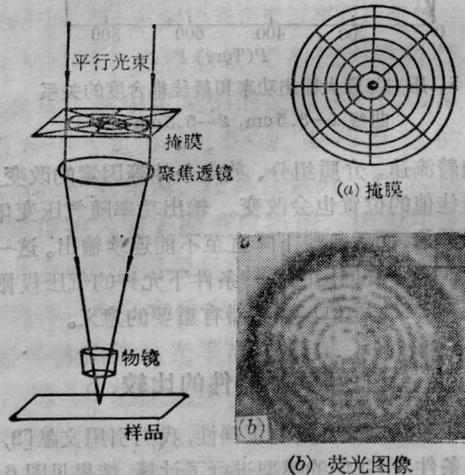


图1 荧光图像漂白的原理图

投影到细胞表面上。强激光的瞬时照射，使细胞表面上荧光标记分子产生不可逆的光化学漂白而形成有规则的荧光图像，用衰减 $10^2 \sim 10^3$ 倍的弱光束照射细胞表面，所产生的微弱荧光图像通过硅靶增强 (SIT) 摄像管摄像显示于监控电视上并进行照相记录，以观察细胞表面的动态变化。

在图 1 中，(a) 为光漂用的掩膜，(b) 为掩膜投影到 FITC 标记的蛙卵表面上漂白的荧光图像。

三、实验方法

激光漂白荧光图像检测的实验装置主要由激光漂白荧光图像的光学系统和微光电视组合而成，如图 2 所示。

以氩激光 (360 型，南京电子管厂) 的 488 nm 谱线作为激发荧光及漂白脉冲的光源。一束单模的激光束经 5 倍扩束器直接进入落射式荧光显微镜 (Leitz Ortholux 2) 的背部。掩膜位于显微镜落射照明器的场光阑位置上，这样，掩膜的像经过显微镜的光学系统投影到荧光标记的细胞表面上，所以它的激光受照区不再是一个微区光斑，而是一个缩小的掩膜荧光图像。掩膜的精缩尺寸与显微镜的放大倍数有关，而掩膜的几何形状和检测精度可根据样品和实验要求事先设定制作。打开快门，经强激光照射后在细胞表面上形成一个漂白的荧光图像，退出掩膜，把衰减 $10^2 \sim 10^3$ 倍的中性片移入光路，以监测荧光图像的变化。由于激光有良好的相干性，在显

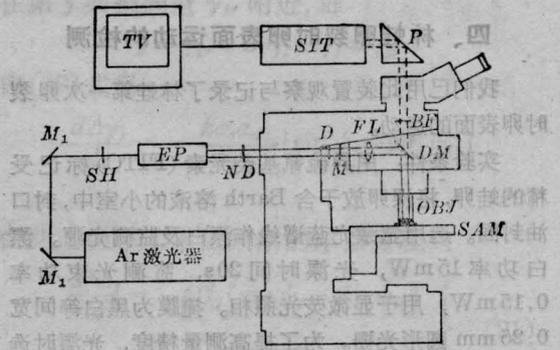


图 2 荧光图像漂白的检测装置

M_1 —反射镜； SH —快门； EP —扩束器； ND —中性衰减片； D —散射板； M —掩膜； FL —聚焦透镜； OBJ —物镜； SAM —样品； DM —二向色镜； BF —抑制片； P —棱镜； SIT —硅靶增强器； TV —监视器；实线为激发光，虚线为发射荧光信号

微镜的视场中常常出现斑纹和条纹，它们以背景的形式叠加在微弱的荧光图像上，影响图像的分辨率和对比度，所以在监测荧光图像时必须在光路中移进散射板以抑制条纹的出现，使物镜视场照明均匀，取得良好的效果。

样品平面上荧光图像信号通过物镜、二向色镜、抑制滤片和反射棱镜输入象增强器 (SIT)。SIT 附加在显微镜物镜的焦平面上，与观察目镜共焦。它采用了一级增强系统 (1013 器件，电子工业部第卅一所提供)，检测灵敏度可达 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ Lx。

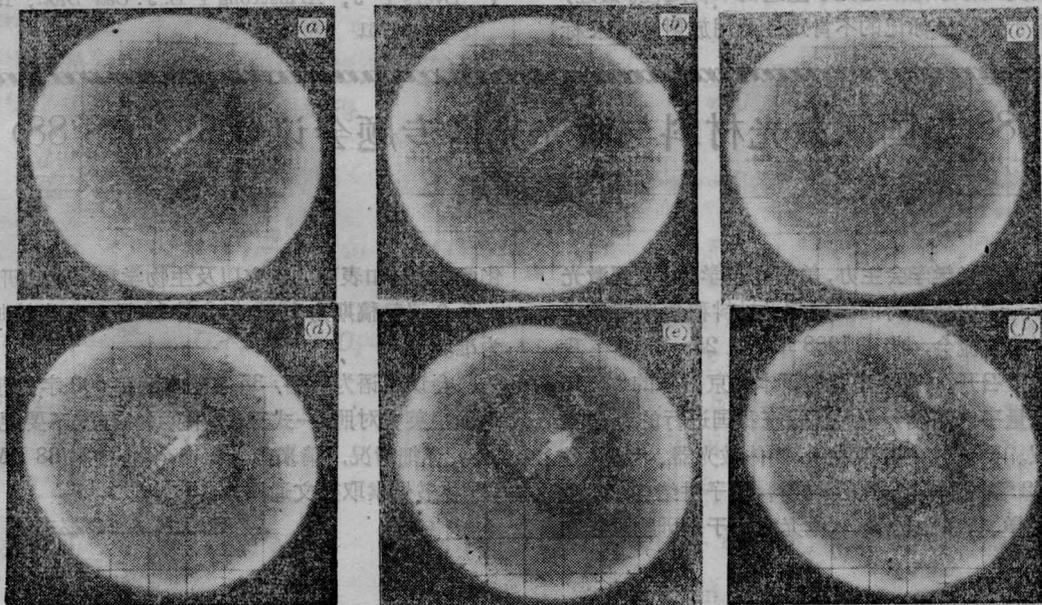


图 3 林蛙卵裂时表面的运动

四、林蛙卵裂时卵表面运动的检测

我们已用此装置观察与记录了林蛙第一次卵裂时卵表面的运动。

实验条件: 用异硫氰基荧光素 (FITC) 标记受精的蛙卵, 将裸卵放于含 Barth 溶液的小室中, 封口油封固。选用氩激光蓝谱线作漂白及监测光源。漂白功率 15 mW, 光漂时间 20 s, 监测光束功率 0.15 mW, 用于显微荧光照相。掩膜为黑白等间宽 0.25 mm 圆形光栅。为了提高测量精度, 光漂时选用 25 倍物镜, 这样投影在蛙卵平面上光栅条纹间距约为 19.2 μm 。为了观察蛙卵的全貌, 一俟光漂结束即转换成 6.3 倍物镜。照相机实时地摄取荧光图像的变化, 照相记录软片为 ILFORD ASA 400。

实验结果: 林蛙卵裂时, 卵表光栅荧光图像随卵裂产生一系列变化(图 3 照片(a)~(f)), 每张照片相隔 2 分钟。胞质分裂初期, 荧光图像变化尚不明显(见图 3 (a)、(b))。以后在与分裂沟长轴平行的方向上出现收缩, 在垂直于分裂沟方向上出现扩张, 而分裂沟端二侧的细胞膜向沟端移动, 呈“V”字形(见图 3 (c)~(f))。

五、结 语

以前检测卵表面的运动是用碳粒子沉积卵表面作为标志物的^[9], 这一方法不能肯定碳粒子是否能牢固地粘着在卵表面而不受卵表面微绒毛扰动的影响。荧光图像漂白法避免了上述的不肯定性。最近, 有人鉴于碳粒子标记的不肯定性而用放射性碘来标

记卵表面的蛋白^[10], 这种标记是以共价键来完成的, 所以用放射自显术是可以检测卵表面的运动, 但放射自显术不能连续观察一个卵的连续变化, 而本方法能够检测同一个卵的连续变化。其次, 激光漂白时可能对卵产生瞬时的刺激而引起卵表面的运动, 经扫描电镜检查未发现光漂会对卵的形态有可见的损伤。

此外, 本方法的另两个优点是: 细胞的相对位移对检测不存在有害的影响; 检测灵敏度较高, 特别适用在微弱的荧光下, 用于研究细胞形态及其功能, 如与显微注射、单克隆抗体技术结合就可以观察特异标记分子在细胞表面或细胞内分子运动。不足处是荧光图像质量受象增强管的分辨率和灵敏度的限制。同时, 我们期望引入计算机, 通过图像处理, 对细胞荧光图像作出定量分析, 这在生物、医学研究领域内有着广阔的应用前景。

本文承蒙顾国彦教授的指教, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Jacobson K *et al.*. *Fed. Proc.*, 1983; **42**(1): 72
- 2 顾国彦 *et al.*. 实验生物学报, 1983; **16**(4): 467
- 3 徐成汤 *et al.*. 实验生物学报, 1984; **17**(4): 471
- 4 Smith B A, McConnell H M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; **75**(6): 2759
- 5 Smith A *et al.*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; **76**(6): 5641
- 6 Yoneda M. *et al. J. Cell Sci.*, 1982; **54**: 35
- 7 Byers T J, Armstrong P B. *J. Cell Biol.*, 1986; **102**: 21761

1988 年国际激光材料与激光光谱专题会议 (LM & LS '88)

征文通知

由中国光学学会主办, 美国光学学会、美国激光和电子光学协会支持的国际激光材料和激光光谱学专题学术交流会, 将于 1988 年 7 月 25~27 日在我国上海市召开。该会是继在日本东京召开的“第 16 届国际量子电子学会议”之后, 在我国进行的专题卫星会议。会议讨论内容为: 1. 固体激光器、半导体激光器; 2. 激光和非线性光学材料、量子阱结构; 3. 激光光谱学、非线性光学; 4. 激光应用于基础物理学和

化学、材料和表面的研究以及生物学和医学的研究。

会议截稿期为 1988 年 2 月 10 日, 以当地邮戳为准。

会议用语为英语, 35 字的提要 and 500 字的摘要均须中英文对照, 一式三份, 中英文分页, 不要混行。

详细情况, 请来函上海市 8211 信箱 '88 LM & LS 秘书处索取征文通知。

'88 LM & LS 秘书处