

激光扫描共聚焦显微镜在海洋生物学中的应用*

LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPE AND ITS APPLICATIONS IN MARINE BIOLOGY

吴长功 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

* 激光扫描共聚焦显微镜是以激光为光源,以照明点和探测点共轭光路为探测系统对自发荧光样品或可被荧光标记的样品进行共焦、实时、真彩色扫描的一种新型光学显微镜,目前在生物学各领域已得到广泛应用。在海洋生物学领域主要用于海洋动物发育生物学、胚胎学、受精细胞学及细胞分化的研究。本文对其原理、操作、优越性及在海洋生物学中的应用等内容进行了综述。

1 激光扫描共聚焦显微镜的原理

激光扫描共聚焦显微镜是以激光作为光源,通过激光孔及物镜的聚焦作用形成一个光点照射到样品上激发出荧光的一种光学显微镜。物镜的质量决定了共聚焦光学切片及图像的质量,有自发荧光或可被荧光染料标记的样品被激光激发而发出荧光通过光路经达到光电倍增管(PMT),PMT可以检测出发射光的波长及长度。其光学系统采用照明点和探测点共轭这一特殊结构,使分辨率和成像的质量大大提高。激光光点通过一个特殊的双面反射镜的移动以完成扫描样品的过程,同时在光学路径中PMT前方安装了孔径可调的共聚焦点孔,可使任何非焦平面反射来的光线被阻挡在PMT之外,不能参与图像的形成,使得共聚焦图像比一般荧光显微镜的图像的清晰度大大提高,取得更好的图像效果。

2 操作特点

随着激光扫描共聚焦显微镜制造技术的发展,其操作的自动化也越来越高。目前较为先进的MRC-1000型及MRC-1024型都已达到了操作的完全自动化,即利用先进的计算机和专门的软件使操作更加方便。从激发光、发射光滤片的选择到自动聚焦、图像处理、三维重组及有关数据的测量等等都可由计算机来完成。以美国Bio-Rad公司生产的MRC-1000型激光扫描共聚焦显微镜为例,在打开机器以后,其成像及

数据处理,三维图像的构建及动画均由公司专门设计的软件支持运行。对于有自发荧光或被荧光标记的活的或固定的样品,选择适当的激发光和发射光波长的滤片,以合适的激光光强进行激发,便可得到初步的图像,然后通过自动调焦、放大、图像背景灰度的调整及背景干扰色的消除,便可以得到较为满意的图像,这是操作的基础。其他如三维图像的获得,整体样品的光学切片,活体样品的生理生化成分的动态变化如 Ca^{2+} 、 H^{+} 等离子、特定蛋白质或酶的变化和定位等,都可通过适当的操作来完成。MRC-1000型配备的COMOS软件中包括以上操作的所有程序,如文件管理、三维图像的构建、真彩色和伪彩色显示、图像处理、激光波长的选择、实时动态测量及记录等,并配有专门的 Ca^{2+} 测量软件。以上仅列举了激光扫描共聚焦显微镜最常用的几种功能的操作程序,这些程序操作简单,迅速,使用非常方便,而且可以得到一般光镜及电子显微镜不易达到的结果。

3 优越性

激光扫描共聚焦显微镜既利用了普通光学显微镜及电子显微镜的优点,又克服了它们的许多缺点,同时更有自身的优势,并且具有特殊的图像处理系统的功能,现将其特性同光镜、电镜及一般图像处理系统加以比较。

3.1 与普通光学显微镜比较

与普通光学显微镜相比,激光扫描共聚焦显微镜的横向分辨率大大提高,且具有纵向分辨能力,利用共焦光路的深度探测能力对整体的样品进行光学切片,从而实现三维结构的重组和立体结构的分析,这种功能被形象地称作“显微CT”。另外,利用激光作光源并结合反射镜及点扫描特性,可以探测对比度低的

* 本项目受攀登计划B及中国科学院海洋研究所开放室资助;中国科学院海洋研究所调查研究报告第3339号。
收稿日期:1997-11-17

弱荧光样品的表面结构,而无需复杂的操作。在对活体的动态观察及细胞水平离子变化的动态测量中,激光扫描共聚焦显微镜可以真实地反映活细胞内部的生理生化的动态变化,并作出实时的记录。在快速测量和分析活细胞随时间及环境条件变化而发生的生理生化成分的改变及细胞原位杂交图像的计数等方面比普通光学镜具有明显优势。

3.2 与电子显微镜比较

激光扫描共聚焦显微镜虽然没有电子显微镜的放大倍数和分辨率高,但它可以对活的样品进行实时的跟踪观察、记录,对样品的自然动态特性反映真实,能够对样品进行无损伤的光学切片,并对每一层面的信息进行处理和分析,且操作方便,样品制备简单,视野较大,易于观察样品的整体动态变化,弥补了电子显微镜在宏观和动态实时研究等方面的不足,并克服了电镜在操作和样品制备等方面的缺点。

3.3 与一般图像处理系统比较

激光扫描共聚焦显微镜通过配以特殊的图像处理软件及高强度、高灵敏度的光学探测系统,使其图像处理功能更完备、更真实。尤其光学切片和深层结构观察分析定位功能更是一般图像处理系统所不具备的。由于目前该显微镜都配备有专门的图像处理软件,所组成的实时图像处理系统已完全可以取代一般图像处理系统。

4 应用及前景

激光扫描共聚焦显微镜由于其操作方便、样品制备简单、结果清晰度高、立体感强、尤其可以对活体进行直接观察、测量及光学切片而在生物学各领域得到越来越广泛的应用,特别是动物的发育生物学、胚胎学的活体研究及生理生化成分的动态变化的研究中有很大进展,在遗传学、神经生物学及生理学等方面也有着较广阔的应用前景。

4.1 在海洋动物发育生物学及胚胎学方面

4.1.1 细胞内 Ca^{2+} 及其他离子的变化 目前主要研究受精时卵子内 Ca^{2+} 的变化及作用。Stricker 等 1992 年在对海胆受精过程中 Ca^{2+} 波的变化研究中,使用 Ca^{2+} 特异荧光染料 Fluo-3 及 Ca-Green 对卵子在受精过程中卵内 Ca^{2+} 的分布变化进行了动态测量,结果表明精子进入卵子内部会引起卵子胞质内 Ca^{2+} 的迅速升高,受精过程还会引起卵子核内 Ca^{2+} 的升高并发生转移,正常卵裂之前会有第二次 Ca^{2+} 波出现,而在未受精卵中 Ca^{2+} 基本保持稳定状态,未有大的波

动。Shen 等 1993 年对海胆卵子受精过程中 Ca^{2+} 的来源及作用进行研究,认为卵内的 Ca^{2+} 波激发了精卵的结合,卵内 Ca^{2+} 的增加,一是由于卵外的 Ca^{2+} 通过卵膜内流,另外是卵内贮存 Ca^{2+} 的释放。Lindsay 等 1992 年在对锐脊单肢虾卵子受精过程的研究中也得出了相似的结论,与海胆不同的是对虾卵子内的 Ca^{2+} 波是由海水中的 Mg^{2+} 激活了卵子引起的,而与受精与否无关,受精卵和未受精卵在受海水激活后具有相同的 Ca^{2+} 变化过程,但卵子在正常海水中是单精受精,而在无 Mg^{2+} 人工海水中则是多精受精,说明 Mg^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 波在调节精子入卵及阻止多精受精上具有重要作用,这在动物的卵子激活中是比较特殊的,其激活机理有待于进一步研究。

4.1.2 卵子受精及胚胎发育过程的变化及细胞分化 主要研究卵子受精时的皮层反应及胚胎发育过程中主要的细胞器如纺锤体、内质网、高尔基体的变化及作用,以及卵裂球的定向分裂及分化问题。Whalley 等^[6]使用细胞膜荧光探针及共聚焦显微镜研究了海胆卵子受精后发生皮层反应时卵膜的恢复,认为在卵子皮层颗粒排出(胞吐)的同时,卵膜会立即恢复其完整的结构。而 Bi Guo-Qiang 等^[1]的研究则表明胞吐受 Ca^{2+} 的调节,且这种调节作用与卵膜的重新形成有关。Summers 等^[5]通过对海胆卵子卵裂的研究中认为海胆卵子的第 1 次卵裂既没有细胞的分化,也不能决定其未来发育的两侧对称轴。Malinda 等^[4]使用激光扫描共聚焦显微镜对海胆受精卵原肠形成进行了其三维结构随时间的变化的研究。在原肠形成过程中,原间充质细胞从植物极向胚胎赤道面定向迁移,尔后形成一环状结构,并进一步发育成幼体的骨骼。这些细胞在迁移过程中会不断伸出线状伪足,探测其周围的环境,且距赤道面越近,细胞迁移越快。定向细胞迁移在后口动物的发育、成体的伤口愈合、炎症反应以及肿瘤细胞的转移等方面都具有重要意义。Sardet 等 1992 年,Speksnijder 等 1993 年以及 Jaffe 等^[3]在对海鞘、海星等卵子在受精前后卵子的极性变化、内质网的结构变化及在受精卵内的再分布也有报道。在对虾的胚胎发育方面,只在锐脊单肢虾受精卵早期发育的研究上有一些报道。Hertzler 等 1992 年对锐脊单肢虾受精卵的卵裂特征及原肠形成进行了详细研究,使用显微注射和免疫荧光技术,利用共聚焦显微镜的光学切片和三维构建功能,对卵裂过程中中内胚层细胞的运动及纺锤体的旋转和位置变化进行细胞定位和三维重组,在对 2 细胞期进行荧光活体标记的结果表明,引起原肠作用的中内胚层细胞来自 2

细胞期卵裂球的植物极, 32 细胞期卵裂球表现出明显的左右对称特性, 原肠胚是在 64 细胞期的两个中内胚层细胞向囊胚腔内陷形成的。在对卵裂过程的活体观测中证实了卵裂球具有定向分裂的特性, 这对发育过程中一直未有定论的定向细胞分裂的问题有了明确的证据。Hertzler 等^[2]又对去除孵化膜后分离的锐脊单肢虾受精卵中内胚层细胞和原肠的形成进行研究, 仍然采用显微注射荧光指示剂及共聚焦活体观察技术发现中内胚层细胞可能是通过在植物极的定位而发生自动分化, 并在胚胎进一步的发育过程中具有信息指导作用。

4.2 在遗传学中的应用及前景

目前在核酸的分子杂交方面有广泛的应用前景。传统的原位杂交多是通过同位素标记及放射自显影技术对核酸进行研究, 实验操作复杂, 时间较长, 并有一定的毒性。使用荧光标记的方法及共聚焦技术, 可以对样品进行双色标记和探测, 使灵敏度和准确性大大提高, 这对小染色体原位杂交的定位特别有用。利用共聚焦显微镜光学切片及三维构建技术, 不仅可以看清标记样品的立体分布, 还可以对整体样品或厚切片中的核酸序列进行定位。原位杂交的荧光共聚焦技术操作简单、迅速, 结果更清晰准确, 适用性更广泛, 目前在生物学许多领域已得到广泛应用, 在海洋生物学方面虽然刚刚起步, 但应有较快的发展。

4.3 在神经生物学及生理学方面的应用及前景

研究神经轴突及细胞膜上的具有传导功能的物质的变化及定位。Mire-Thibodeaux 等 1993 年曾对海葵触手细胞内的 Ca^{2+} 在刺丝囊的释放过程中的调控机制进行过研究。认为刺丝囊中刺丝的释放同外界刺激物有关, 且释放的刺丝量的多少受 Ca^{2+} 水平的调节, 与刺丝囊-支持细胞复合体无关。目前 Ca^{2+} 作为在机体内的信息传导中具有重要作用的物质已被广泛研究, 并逐渐深入到 Ca^{2+} 的调控机理及影响因素等方面。共聚焦显微镜无疑是研究 Ca^{2+} 及神经递质、受体等很好的手段, 但目前在海洋生物学领域有关这方面

面的研究还比较少。

4.4 在海洋生物学其他方面的应用前景

在海洋藻类学研究中共聚焦显微镜也有着较为广阔的前景。由于海洋藻类多具有自发荧光的色素体或藻胆蛋白, 因此可以用共聚焦显微镜直接对这些物质进行分析, 研究这些自发荧光物质的空间分布变化及作用。另外同样也可以对海洋藻类的细胞学、发育及生殖生物学进行动态研究, 或测量细胞以及组织内的一些功能性物质的变化, 如植物生长点 pH 的梯度变化及作用等。在其他方面如生物体内的药物着靶、海洋生物的细胞化学及体细胞生理生化及结构特性的动态分析等都有广泛的应用前景。

根据共聚焦显微镜自身的特点, 其在如下几个方面具有较大的应用前景: 如形态学方面细胞内特异蛋白的定位及蛋白质不均匀性的研究, 检测细胞内部微管系统的运动变化, 检测受精卵及胚胎中纺锤体的旋转, 利用三维重组对减数分裂过程中染色体的运动变化进行研究, 原位分子杂交的研究及原位基因 mRNA 探测; 动态研究方面对细胞生命活动过程及受精卵发育过程中细胞内离子 (Ca^{2+} , H^+ 等) 的变化进行测量, 神经生物学方面, 刺激-反应细胞水平的研究, 尤其刺激后细胞内离子的变化及细胞膜电位的变化, 胚胎发育过程的动态变化及三维结构的重组等。

参考文献

- 1 Bi Guo-Qiang *et al.*. *J. Cell Boil.*, 1995, **131**(6): 1 747 ~ 1 758
- 2 Hertzler, P. L. and Clark, W. H. Jr.. *Dev. Biol.*, 1994, **164**: 333~ 344
- 3 Jaffe, L. A.. *Dev. Biol.*, 1994, **164**: 579~ 587
- 4 Malinda, K. M. and Ettenson, C. A.. *Dev. Biol.*, 1995, **172**: 552~ 556
- 5 Summer, R. G. *et al.*. *Dev. Biol.*, 1996, **175**: 177~ 183
- 6 Whalley, T. *et al.*. *J. Cell Boil.*, 1995, **131**(5): 1 183~ 1 192