

应用 ImageMasterTM 图象分析系统计算原生质体活力

蔡伟明 王六发 李雪梅 刘承宪

(中国科学院上海植物生理研究所 200032)

植物原生质体的活力高低是代表原生质体样品质量的重要指标之一^[1], 它也反应了用于游离原生质体的原始植物材料本身的质量高低。原生质体活力高证明所用的原始材料质量高, 原生质体活力低说明这种材料质量低。因此估算样品中原生质体的活力, 是原生质体培养、原生质体融合、基因转化等涉及原生质体的各项生物工程中的常规工作。可是原生质体的计数却是十分费力。为了克服这一困难, 我们试图借用 Pharmacia 公司的 ImageMasterTM 图象分析系统来完成这一过程。

ImageMasterTM 图象分析系统是针对分析蛋白质电泳的 1-D 和 2-D 凝胶图象专门设计的。我们这里是将一个个的原生质体假设为蛋白电泳 2-D 凝胶图象中的斑点, 从而得以利用这一图象分析系统来完成原生质体的计数。

但是原生质体的图象是非均一的斑点, 用 ImageMasterTM 图象分析系统的常规手段计数会有很大的误读。因此本文还特别针对这一问题, 在 ImageMasterTM 图象分析系统的凝胶分析软件包可能操作的范围内, 建立尽量简便的计算程序。

原生质体材料

从人工气候室中生长 4—6 周的普通烟草(革新一号)的叶片, 经过酶解(1% OnozukaR-10 + 0.2% Pectinase + 6 mM/L CaCl₂ · 2 H₂O + 0.5 mol/L 甘露醇, pH 5.6)得到的原生质体, 用荧光染料(最终浓度为 0.01% 荧光素双乙酸酯 fluorescein diacetate(FDA)的 0.5 mol/L 甘露醇溶液)处理。经 25℃ 保温 10 min, 再用 0.5 mol/L 甘露醇洗涤后用于镜检^[1,2]。

活力计算方法

首先在显微镜下, 拍摄分别用可见光和紫外光作为光源的同一视野里的用 FDA 处理过的原生质体。这样就得到了一张含有全部原生质体和一张只含有有活力原生质体的照片。以它们中有活力的原生质体占总观察的原生质体百分数来表示原生质体的活力^[1]。原生质体的计数可通过以下方法进行。

以上两张照片的底片可以直接使用 ImageMasterTM 桌面光密度计(DeskTop densitometer)进行扫描, 得到它们的原始图象(图版图 1、2)。把这一扫描结果传送到计算机让 ImageMasterTM 软件来分析。

图版图 1 是发荧光原生质体的照片的底片图象。这里发光的原生质体在图象中呈黑色, 图象背景浅色。因此我们就直接用“背景消除(Substract Background)”和“光滑图象(Smooth Image)”命令对图象预处理, 使它变得尽可能清晰。然后在连续完成“Manual Detect”、“Make Gel Image”、“Detect All Spots (Low Sensitivity)”、“Edit Gel Spots”和“All Spot Crosshairs”指令后, 得到检测结果(图版图 3)。ImageMasterTM 系统读出 111 个有效斑点(原生质体)。由于这张图象中的原生质体各斑点本身比较均匀, 系统的误读较少。但还是有些例外, 同时有些斑点较浅, 因此必须进行人工复核。利用纠正斑点检测常规过程中的“Make Spot Crosshair”和“Erase Spot Crosshair”功能, 最终确定原生质体斑点(图版图 4)。由此得到 119 个有活力原生质体。

图版图 2 是可见光下观察的总的原生质

体的照片的底片图象。这里图象背景比原生质体深。因此需首先采用“*Invert Image*”功能，将底片图象转换成正片图象。然后，用上述复核前的同样过程来检测原生质体的数目，得到结果图(图版图5)计算机读到528个斑点，并认为481个点有效。而实际上这张图象中的原生质体各斑点本身非常不均匀。细胞核、叶绿体等严重影响着自动检测。另外各种碎片也会引起误读。经过比较研究，我们选择了以下较为省力的检测方法。我们引进了一张空白带边的底片图象(图版图6)作标准。用它的斑点图象和总的原生质体正片带边图象组成一个匹配组。用它们相应的边上齿孔斑点作为界标的斑点。然后将它们进行匹配。再利用“*Cancel Unmatched Spots*”功能消除总的原生质体正片带边图象中和标准斑点图象未匹配的斑点，在完成“All Spot Crosshairs”指令后，得到结果(图版图7)。在此基础上，用“*Make Spot Crosshair*”来进行人工复核确定真正的原生质体，得到结果(图版图8)。计算机

算出复核后的斑点数为173个。这就是总的原生质体数。

将119个有活力的原生质体数除以173个总的原生质体数，得到的69%，就是这个样品中原生质体的活力。

本文通过一个实际的例子，显示了用ImageMaster™图象分析系统来计算原生质体的活力。这一系统提供了图象放大、切割、清析、自动检测斑点、自动计数和复核校对等各项功能。我们还设计了通过和引进的空白标准匹配消除大量误读的操作程序。利用这些手段可以大大地提高工作效率，同时也可以保证计算的准确度。另外，这个方法还可以用于其他方面的细胞计数。

参 考 文 献

- [1] 上海植物生理学会，1985，植物生理学实验手册，pp. 13—14，上海科学技术出版社。
- [2] 孙勇如和安锡培，1991，植物原生质体培养，pp. 56—57，科学出版社。

绿鸟 生命科学器材信息查询系统正式发行

“绿鸟 生命科学器材信息查询系统”软件是运行于 windows 界面下的器材信息大全，该软件经过半年的试用，得到有关单位好评，因此将于 1997 年元月正式发行。目前由五个数据库组成：

1. 厂商名录：收录了国内外二百多家生产、经销生命科学仪器和试剂的厂商的联系地址、电话、传真、邮编、产品介绍等信息，2. 仪器设备：将生命科学所使用的一千多种仪器分为二十多个大类，介绍其生产厂家、型号、规格性能、参考价格等。3. 分析测试：收录各单位大型仪器提供技术服务的信息。4. 维修指南：各厂家以及各单位对社会提供维修服务的信息。5. 器材调剂：各单位可供调出的闲置器材信息。

以上信息将不断更新、扩充，做到全面、及时、准确地反映当今的市场动态，成为沟通供需双方的桥梁。该软件图文并茂，界面美观，操作方便，可供有关单位的科技人员、器材采购人员、实验室管理人员、研究生等使用，也可供科技部门领导、厂家商家了解情况时作参考。

运行环境：在 windows 和中文之星环境下或中文 windows 下运行，占用 3 M 左右硬盘。

此软件是免费软件，可通过 Internet 的匿名 ftp 方式下载，其地址是：
earth.shnet.edu.cn，路径：/coming/bird/。

没有联网的用户，可以来电来函索取。每套软件共两张软盘，收软盘成本费及邮寄费共 30 元(以后数据更新不再收费)。

另外，各单位如有信息需要录入，也请与我们联系。

联系人：朱建 中科院上海细胞所 200031 电话：64336169 E-mail:equ@ipsunm.shcnc.ac.cn