

- 36:787.
- [5] Evans R. M. 1988, *Science*, **240**:889.
- [6] Dolle P, et al., 1990, *Development* (Cambridge, UK) **110**:1133.
- [7] Zhang X-K, et al., 1992, *Nature*, **355**:441.
- [8] Kliewer S. A. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1448.
- [9] Yang-Yen H. F. et al., 1991, *New Biol.* **3**:1206.
- [10] Kamei Y. et al., 1996, *Cell*, **85**:403.
- [11] Liu Y. et al., 1996, *Molecular Cellular Biology*, **16**:1138.
- [12] Delia D. et al., 1992, *Blood*, **79**:1291.
- [13] Lotan R. et al., 1995, *N. Engl. J. Med.* **332**:1405.
- [14] Liu Min, et al., 1996, *J. Biological Chemistry*, **271**:317.
- [15] Orfanos C. E. et al., 1987, *Drugs*, **24**:459.

细胞激光微操作系统*

李银妹 楼立人 操传顺 崔国强 王浩威 鲁润龙 朱俊

(中国科学技术大学物理系、生物系 合肥 230026)

很多生物样品是透明的或半透明的,激光可以不破坏物体的表层而作用于其内部,为活体研究提供了一种非接触式、远距离、且无菌操作的可能。利用能量密度为每平方微米千微焦的激光微束形成具有 PN 量级力的梯度力场可以对单个细胞的组织结构施加影响。这为细胞、亚细胞的活体研究开辟了一个具有重大实际应用价值的全新领域。

利用光的热学效应为主的光场能够对细胞或细胞器进行加工;用光的力学效应能够对细胞或细胞器进行捕获和搬运。我们称前者为光刀,后者为光镊。

光镊是继光刀之后在生命科学中得到重要应用的一项实验技术,是一种用以操作和研究活体细胞的得力工具。通常光镊指的是单光束梯度力光阱^[1]。它是一束高度会聚的激光束,作用在透明微粒上,若微粒的折射率大于周围的介质,此微粒将受到光场的作用力而被束缚在光束焦点附近。这种光镊可以直接用来捕获选定的细胞,并保持其正常的生命活动,进而可实现对此单个活体细胞的显微操作^[2]。光镊的问世为时不久,已受到科学界的广泛注意,被誉为打开了单个活体细胞研究的大门。

我们研制的“细胞激光微操作系统”就是将光镊和光刀这两种各具特色的工具结合于一

体,使它们的功能互相补充,互相配合,相得益彰,完成单一技术无法实现的功能。本系统利用光镊与光刀非机械接触式的作用,对细胞施行显微操作和显微加工,利用它们空间和时间上的高度定位控制对生物体造成的损伤和干扰,从而达到改变其生物性状的目的^[3]。

一、系统总体结构及各组成部分功能

系统的总体结构如图 1 的框图所示。

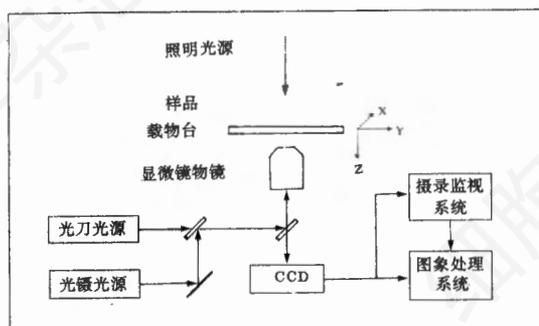


图 1 结构框图

* 国家科委、安徽省科委、国家基金委、中国科学院资助。

本系统中 Nd:YAG 激光器的研制得到了中国科学技术大学物理系吴鸿兴、郭大浩、夏小平和齐开国等老师的指导,在此深表感谢。

本系统以一台经过改建的 37XB 型倒置生物显微镜为中心,通过激光通道引入两束激光,它们通过显微镜物镜会聚于载物台上的样品处,分别形成单光束梯度力光阱和高密度的光刀。显微图象通过摄像通道由一台高灵敏度黑白 CCD 摄像机接收并输入大屏幕监视器显示,与此同时将图象送入计算机进行图象采集处理。下面分别介绍系统各组成部分及功能。

1. 多功能显微镜的设计及改造

在本系统中,显微镜除了完成对生物标本的成像观察外,同时提供对激光的显微成像,还承担作为光镊激光束的会聚透镜和作为光刀激光束的聚焦透镜的功能,所以显微镜在整个系统中占有重要地位。

我们选择具有较大的操作空间的倒置生物显微镜,是为了便于与其他常规生物技术组合运用。根据系统功能的要求对倒置显微镜进行了改造,在保留显微摄影及其他功能的基础上加设了激光和摄像通道,配用 40 倍长工作距离物镜。长工作距物镜虽然在显微分辨率上略低一些,但获得了较大的工作空间,为应用提供了极大的方便。

2. 近红外半导体激光光镊

根据光镊的基本原理和单光束梯度力阱的特点,考虑到生物粒子因为对光的吸收而受到伤害和显微观察视场效果等因素,在已实现 632nm、780nm 和 830nm 几种波长激光捕获的情况下,对于本系统我们选用 780nm 作为光镊激光波长。因为单管大功率 780nm 半导体激光器不仅具有近似高斯光束特性的 TEM₀₀ 基模输出,而且具有体积小、使用灵便、稳定性好和造价较低的优点,是低功率捕获十分理想的光镊光源。由于 780nm 半导体激光的自发辐射光有一部分落在可见光的红光范围内,所以用它作为光镊光源既具有不干扰视场、热损伤小的优点,还能兼作靶的目标指示(其观察中产生的问题将在动态监测中详述)。

3. 530nm 锥形激光光刀和楔形光刀的研制

刀要求其锐利。作为激光光刀应具备功率密度高、作用范围小、时间短的特点。目前固体 Nd:YAG 脉冲激光光源是比较理想的选择,它的脉冲时间宽度可达纳秒量级,能量密度为 $13^3 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$,器件较小,技术也相对成熟。

(1) 锥形光刀的研制 通常激光束沿光轴方向为一光锥体,刀口即为锥状体顶端的圆形光斑,按其形状我们称之为锥形光刀。

我们研制的 Nd:YAG 激光器主要从适用性考虑,采用了染料被动调 Q 技术,BBO 晶体腔内倍频,短腔设计使整个器件结构紧凑、调整方便。1. Q64 μm 激光基模输出,波形光滑无噪声,染料调 Q 脉宽达到约 8ns。光束发散角 = 0.537mrad(D=2.5 总能量的 50%)。脉冲频率设置为 1 次/秒或单次外触发,以方便光路调整和对生物样品作用能量的控制。

(2) 楔形光刀的研制 为了满足微米量级不同形状大小粒子的研究,我们尝试研制一种楔形的光刀。基本方法是,在激光进入显微镜的外光路中加一柱面镜,使激光在光轴方向为一楔状。楔形的顶端即刀口为一线形,我们形象地称之为楔形光刀。

光刀的刀口的锐利程度一般受到光束衍射极限的限制。如对几 μm 至几十 μm ,锥形光刀需要逐点地连续切割,要求激光器有非常高的调节精度,最好采用高重复频率的脉冲激光器件。而用楔形光刀只需调节单次脉冲的能量就能对 10—20 μm 的样品实现一次性切割,所以楔形光刀拓宽了对 μm 量级不同形状粒子的研究,对器件要求相对也低。在光路中设置可调节的装置,根据要求选择不同刀形使之能够满足微米级不同尺寸粒子的研究。

4. 实时显示动态监测装置^[4]

由于本系统是操作一个生命活体实现某种运动。这里同时包含着两种运动形式:一种是光镊操纵生物体的机械运动,如使粒子悬浮、移动,光刀作用细胞的反应过程;另一种是被作用生命活体自身的运动,如细胞的游动、生长与繁殖以及在液体中的布朗运动。这些运动中都包

含了在时间上的延续、微米级空间上的操作和变化。为捕捉和记录分析这一瞬息变化着的动态过程,本系统采用 CCD 摄像机通过显微镜摄像通道对显微视场进行摄像,并经过一台多功能 J25 录像机记录后送入监视器屏幕实现动态监测。

动态监测装置的另一个重要功能在于把通过目镜的观察直接转移到了监视屏上,对长时间工作观察提供了更有利的条件。同时,它还把对光刀、光镊的跟踪定位展现在屏幕上观察,避开了在目镜中观察时对观察者眼睛的伤害。

系统的空间分辨率取决于 CCD 靶面的解像度及系统(光和电)放大率。MTV-1881CB 型黑白 CCD 摄像头具有较高的解像度:795(水平)×596(垂直)Pixel,最低照度:0.02Lux,使用 40 倍物镜时系统放大率为 1000 倍,可分辨最小距离小于 1 μ m。

录像机提供了对图象的记录和再现功能,其暂停慢放等功能赋予整个系统 0.02s 的时间分辨率有利于对一个动态过程的认识和分析。本研究中一例细胞膜被光刀损伤后自行修复过程测得费时约 0.1 秒,便是这一功能的有效应用。

5. 图象处理系统

由于大多数的生物样品近乎透明,视场中目标和背景反差小,人眼难以分辨,利用图象处理软件所具有的功能对图象进行计算、分析处理,可以从同一幅图象中获取更多有用的细节信息。

本系统使用一台带有 GRANDVIDEO 多媒体视卡的 386DX PC 机,视频卡的输入端直接接到显微镜摄像头的视频输出口,能够有选择地采集视频图象或者定时定量采集图象,采集的图象以文件形式存于磁盘中提供以后观察和使用。

二、系统的主要技术参数

1. 光镊 波长:780nm 焦斑直径:2 μ m

(40×物镜)

功率(激光器输出):0—40mW

连续可调

捕获悬浮粒子尺寸:约 1—40 μ m

阱位:0—20 μ m 可调

2. 光刀 波长:530nm 作用时间:<8ns

刀形:锥形(切口直径约 1 μ m)

楔形(切口约 1×10 μ m)

光镊与光刀耦合精度:<1 μ m

3. 系统分辨率 1 μ m 系统放大倍数:

1000 倍

时间分辨率:0.02秒

4. 视频实时监控、记录,图象采集和基本处理功能。

三、初步生物应用研究

几年来,我们在研制“细胞激光微操作系统”的同时,开展了对类别不同、形状各异、从一微米到几十微米的活体细胞和细胞器的捕获、分选、切割、打孔等工作,进行了细胞融合,染色体切割,转基因等实际应用研究。作为应用研究一例,图 2 展示了利用“细胞激光微操作系统”实现的对选定的一对烟草原生质体的融合过程。用该系统进行细胞融合较电融合,PEG 融合等方法最大优点就是对融合的细胞具有主动选择性,损伤小,而且便于后期分离和培养。这些初步探索,表明了光镊与光刀耦合后的“细胞激光微操作系统”可以作为一台活体细胞显微外科手术仪,在普通生物学、细胞生物学、分子遗传免疫及细胞工程学、基因工程等领域发挥广泛的作用。由于细胞生物学与医学密切相关,也必将为医学理论与实践开拓出前所未有的应用。还可以用于其他微米粒子的研究。

四、细胞激光微操作系统的 特点及其应用前景

1. “细胞激光微操作系统”与传统显微机械操作相比具有以下特点:

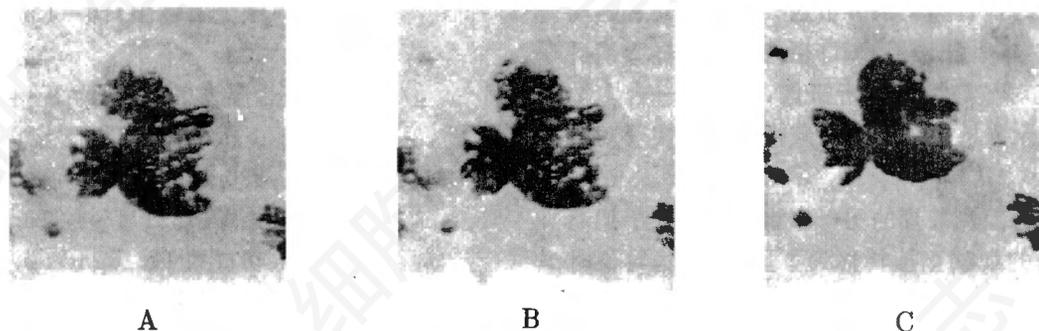


图2 激光诱导烟草原生质体融合

- A. 光镊捕获细胞 a 使其与 b 紧密接触。
 B. 光刀对两细胞接触处进行光击穿, 1 个脉冲细胞破损, 细胞质迅速汇融。
 C. 30 秒种后细胞融合情形。

① 远距离、非机械接触以及无菌操作保证了细胞的活性。

② 克服了以往单细胞操作中细胞难以被固定和易受机械损伤这两个致命的弱点。

③ 光镊与光刀的联合作用可实现目标细胞的分选、显微加工和加工后提取的功能。

④ 光刀类型多样且能量连续可调, 可适应生物样品的多样性。

⑤ 实时显示动态监测具有较高的空间和时间分辨能力, 同时具有图象处理功能。

⑥ 减轻了传统显微操作本身的复杂程度, 因而能使实验者把注意力集中于一个完全暴露于视野中的细胞形态和实验过程。本系统的设置还便于光镊与其他机械显微工具组合, 进行活体加工。

2. 系统与目前国际上同类产品 The ACAS Series^[6]的相关功能相比有以下特点:

① The ACAS Series 的主要功能在于对粘附细胞进行分析, 其筛选方法是被动地把不需要的细胞去除, 而留下靶细胞。而我们的系统是通过光镊主动进行操作, 实现靶细胞分选。

② ACAS 系列的激光光源只有一个, 光镊、光刀是一束激光单独分时应用, 不能同时实现光镊、光刀功能。我们的系统把分别用作光镊、光刀的两束激光耦合起来, 既可单独使用, 又可耦合使用, 功能更加强大。

③ ACAS 系列最新产品 ACAS Ultima™ 增加了染色体切割功能, 而“细胞微操作系统”既可实现染色体的切割, 又可同时进行分选与回收。

以上特点对于研究活体动态过程极为重要, 目前还没有其他技术与之相媲美! “细胞激光微操作系统”是我国自己研制的第一台研究活体细胞的显微操作仪, 它是细胞生物学、分子生物学及生物医学研究的重要手段。我们预期这种新的实验手段将会在激光生物工程和未来的生命科学研究中发挥重要作用。

摘 要

光镊的发明使得对单细胞的操作成为现实, 利用耦合光刀与光镊, 建立“细胞激光微操作系统”, 可为研究细胞这一特殊的生命形式提供一种切实可行的手段。本文介绍“细胞激光微操作系统”的设计思想和工作原理, 以及系统各部分组成及其功能, 讨论了系统的特点、性能、应用范围和初步生物学应用研究, 并与国际上同类产品的相关功能进行了比较。

关键词: 光镊 光刀 细胞 微操作系统

参 考 文 献

- [1] Ashkin, A., 1986, *Opt. letter*, 11: 288.

- [2] 李银妹等,1993,生物化学与生物物理进展, 20:49-52.
[3] 李银妹等,1993,量子电子学,10:161-163.
[4] 李银妹等,1992,激光生物学,1:170.

- [5] 产品说明书: MERIDIAN, The ACAS Series, 1994 Meridian Instruments, (Hong Kong)Ltd.

研究工作

家蚕(*Bombyx mori*)5龄幼虫丝腺染色质在核基质上的结构

周丛照 钱信果 刘兵 李振刚

(中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230027)

家蚕(*Bombyx mori*)丝腺是研究真核基因表达调控的理想模型之一。家蚕幼虫发育至5龄,丝腺的生长速度加快,但其细胞数量自胚胎期停止分裂后一直保持不变,而只是发生核内有丝分裂,形成多倍体,此时丝腺细胞核呈高度分枝状态而充满整个细胞。较蚁蚕而言,5龄第6日的中丝腺(middle silkgland, MSG)和后丝腺(posterior silkgland, PSG)的大小分别增长86,000倍和57,000倍,核内DNA达到 10^5 至 10^6 个拷贝(单位体积内的DNA量提高约10倍)。尽管丝腺中丝蛋白(silk proteins)基因进行组织特异性高效表达,并不存在其组织特异性扩增,而是整个基因组同步大量复制^[1]。这些高度多线化的染色体结构如何?由于大量的基因正在活跃表达,因此它们所在的染色质区域应处于松弛状态,这些染色质如何保持有条不紊地高效复制和转录?

核基质是广泛存在于真核细胞中的一种三维网架体系,它不仅参与了真核生物的DNA复制、RNA的合成和调控以及hnRNA的加工,而且与染色体的功能构建、有丝分裂、甾类激素作用、病毒复制和致癌作用有关^[2]。MAR(matrix association regions)通过与核基质上的一些MAR结合蛋白(MAR-binding proteins)特异性紧密结合而将染色质分隔成拓扑

学限制性的区域(DNA loop)。这些DNA loop的大小从1kb至300kb不等^[3],而且在不同的真核生物中大小不同。Marilley和Gassend-Bonnet在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)中发现,rRNA基因所在的一个复制子既是一个转录单位,又是一个DNA loop区^[4];酵母的复制起点ARS(artificial replication sequences)就是MAR^[5];这说明DNA loop不仅是真核染色体包装的一个结构单位,同时也与复制子和转录单位之间存在某种对应关系。

材料与方 法

1. 家蚕解剖及细胞核的分离纯化

家蚕品种(苏春)由安徽省农业科学院蚕桑研究所提供,在本实验室人工饲养至5龄第三天,沿背部解剖后分别取出中丝腺和后丝腺(由于前丝腺太小,而且与丝蛋白基因的合成和表达无关,因此未加研究),去除内脏及杂物,回收剩下的蚕体作为丝腺的参照组。于25mmol/L柠檬酸中玻璃匀浆后依次经RSB-0.25mol/L蔗糖(RSB:10mmol/L NaCl,10mmol/L Tris,pH 7.4,3mmol/L MgCl₂,1mmol/L PMSF)和RSB-2mol/L蔗糖密度梯度离心后即得细胞核,以RSB-0.25mmol/L蔗糖洗涤数次而纯化之。

2. 核基质结合DNA片段的分离及其电泳

高度纯化的细胞核重悬于IS buffer(100mmol/L NaCl,50mmol/L KCl,5mmol/L MgCl₂,20mmol/L