

生物样品超弱发光图象的探测与分析

王维江 邢达 谭石慈 李德红

(华南师范大学激光生命科学研究所 广州 510631)

摘 要

介绍了生物超弱发光图象探测系统及其原理。利用该系统对与黄化绿豆芽叶绿体形成相应的光诱导超弱发光(UWL)图象进行了实时观察。认为,叶绿体在生物超弱发光中起重要作用,但植物的超弱发光不是叶绿素本身直接受光照射后的瞬发荧光。另外,对几种不同生物样品的超弱发光图象进行了探测。实验表明,对应生物的不同生长代谢阶段及不同部位有不同的超弱发光强度。利用这种探测和分析,可以得到一种无损探测生物的生理、生化状态及变化过程的直观、灵敏的实用方法。

关键词: 超弱发光 象增强器 CCD 装置 叶绿素 黄化绿豆芽 紫罗兰

生物的超弱发光(Ultra - weak Bioluminescence, UWL)强度极低,要求有极高灵敏度的光电探测系统,此外还要求极低的噪声和极高的稳定性。80年代后期发展起来的光纤微通道板象增强技术给生物UWL的研究提供了新的探测方法,使对UWL的研究进入到一个新的阶段。可探测到 $10^0 - 10^7$ photons/cm².s的UWL图象,同时可得到发光强度及其二维分布信息。1989年R. Q. Scott等人^[1]利用单光子计数系统对处于有丝分裂状态的黄豆芽在黑暗的状态下,预先不经光照或化学及其它方式诱导的UWL进行了图象探测。实验图象显示,在有丝分裂旺盛的区域辐射最强。这表明,光子计数成像技术能够提供有用的形态学信息。1991年德国生物物理学家B. Schauf等^[2]利用PIAS系统(Photon - counting Image acquisition system, Hamamatsu),对黄瓜幼苗的超弱光子辐射进行了图象探测,结果表明,整个黄瓜幼苗都发出强度超过探测器噪声的光子,但是光子辐射并不是均匀分布的,而是在下胚轴和根部的光子辐射明显高于噪声水平,特别是在根尖处发光最强。结论还认为,黄瓜幼苗的光子辐射源不是在根尖处,而是在处于下胚轴和根部的所谓过渡区(Transition zone)中。根尖的发光是由于光子从过渡带经光波导传至根尖处而引起的。1995年日本的稻场文男研究小组^[3]对大豆、小豆幼苗的UWL及人手、足的UWL进行了图象探测。

本研究小组在95年成功地利用自行研制的UWL图象探测系统对一些生物样品的UWL图象进行了探测^[4],图象的清晰程度很好。实验得出,生物光诱导的UWL遵从双曲线衰减规律。本文在此研究的基础上进一步开展了对UWL的研究,提供了叶绿素在UWL中的作用的实验依据。另外,对与细胞分裂、生长等代谢变化有关的UWL图象进行了探测和分析,获得了有用的形态学信息。

1 UWL 图象探测系统

图1是我们实验室自行研制的UWL图象探测系统原理图。整套装置放置在暗室里,样品室内壁涂黑,样品放在三维可调平台上。光电探测系统是以微通道板象增强器为核心的超高灵敏度成像系统。该系统是由变焦物镜(相对孔径1:1.8,焦距为50mm)、微通道板象增强

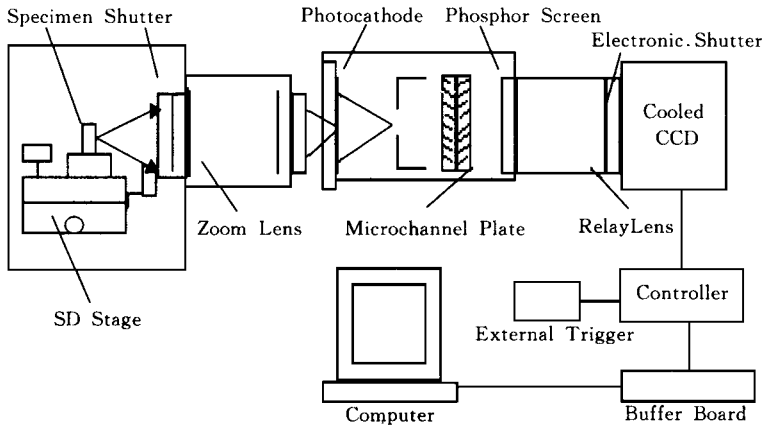


Fig. 1 Schematic diagram of ultra-weak bioluminescent image detecting system.

器 (Japan, Hamamatsu C3100)、中继镜 (相对孔径 1: 1.4)、背向照明 CCD 探测系统 (Princeton Instrument inc. TE/CCD - 512T KB)、控制器以及计算机等部分组成。

生物样品经变焦物镜成象在微通道板象增强器的光阴极上, 光阴极的光敏波长在 330 - 930nm 范围内, 透过输入窗口在象增强器光阴极上的光子由于光电效应转换成电子图象, 电子透镜将电子图象耦合到微通道板上, 在象增强器微通道板的每一个光纤通道内, 电子经过不断的撞击, 每个入射电子便会产生 $10^2 - 10^6$ 个电子, 并保持图象的空间分布信息不丢失, 从微通道板出射的电子撞击荧光屏, 重新激发出光子图象, 再经中继镜投射到致冷 CCD (-58) 的成象面上, 数据经控制器采集到计算机里, 由计算机对图象进行显示并配合软件进行图象处理。

2 实验结果与讨论

实验中我们分别对暗室中培养时间、条件相同的黄化绿豆芽从见光 10 分钟到 3 小时, 中间间隔 10 分钟, 在相同的实验条件下的 UWL 图象进行了探测。图 2 只是选取了一棵黄化绿豆芽放在实验室普通光下 3 小时, 然后在白光 (60W) 诱导 2 分钟后, 黑暗中延迟时间为 10 秒, 温度为室温 27, 采集时间 30 秒的 UWL 图象 (B) (加了灰度标尺) 及对应的在微光照射下所获得的外形图 (A)。图 3 是根据黄化绿豆芽见光不同时间探测的 UWL 平均强度所作的对比折线图。从图中可以看出, 从不见光的黄化苗开始到见光培养 3 小时后, 随着见光培养时间的延长, 其光诱导的延迟发光强度也随之加强。而且, 从见光 40 分钟开始可看到有较明显的 UWL 图, 从见光 1 小时后 UWL 强度的变化趋缓。

图 4 是一棵黑暗中生长 7 天, 见光生长 1 天胚轴上部及茎部已开始变绿, 胚轴下部未变绿的绿豆芽的不同部位经白光诱导 2 分钟后, 黑暗中经过约 10 秒延迟, 采集时间 30 秒的 UWL 图象 (B) 及在微光照射下所获得的外形图 (A)。图 5 是选取与图 4 中几个不同部位对应的 UWL 相对强度图。从图中可以看出, 生物不同部位的 UWL 强度不同, 胚芽平均发光最强, 胚轴上部、子叶发光较强, 而未变绿的胚轴下部与根部发光强度接近本底

根据以上的实验结果, 我们认为, 植物的 UWL (延迟发光) 与细胞中叶绿体的形成和含量有很大关系。而且, 叶绿素在其中扮演了一个重要角色, 因为光在某一过程中要发生作用, 它

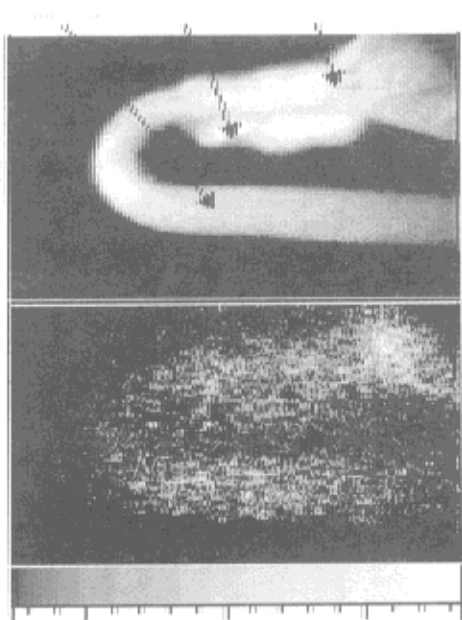


Fig. 2 The image of a mung bean seedling (A) taken under a weak illumination and its light induced ultra - weak bioluminescent (UWL) image (B) . Before experiment the mung bean seedling had grown in darkness for 4 days and then grew in light for 3 hours.

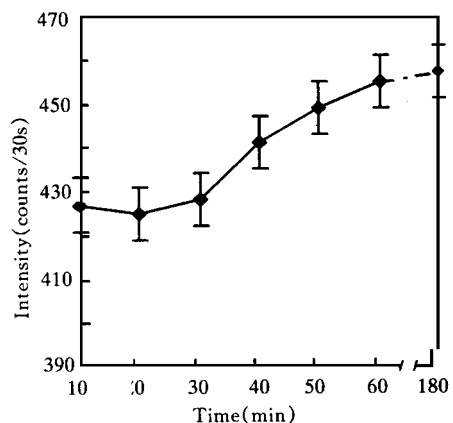


Fig. 3 The comparisons of UWL intensities emitted by the mung bean seedlings which had grown in darkness for the same time but then respectively grew in light for different period of time.

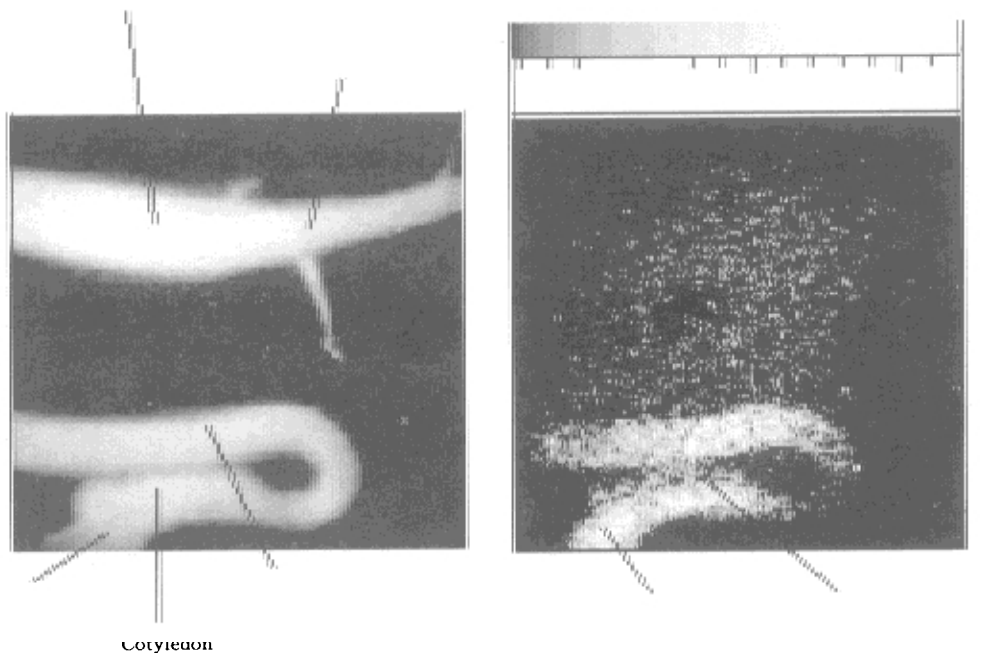


Fig. 4 The image of a mung bean seedling (A) taken under a weak illumination and its UWL image (B). Before experiment the mung bean seedling had grown in darkness for 7 days and then grew in light for about 1 day.

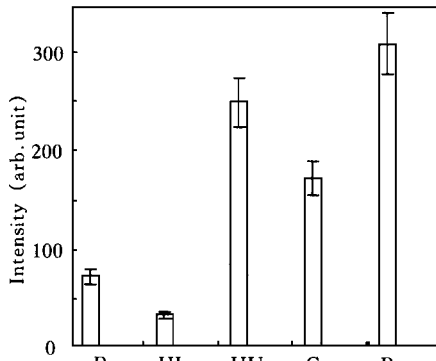


Fig. 5 The relative UWL intensities (arb. units) in the different parts of the mung bean seedling. (refer to Fig. 4) R - radicle, HL - hypocotyl (lower part), HU - hypocotyl (upper part), C - cotyledon, P - plumule.

首先要被吸收。从叶子光合作用的作用光谱^[5]证明,叶绿素是真正吸收推动光合作用的光能的色素。叶绿素是光合作用的光反应中心及与其相联系的电子传递反应的部位。

生物系统的 UWL 包含自发的发光和外因诱导的发光两大成分。关于光诱导的 UWL 机制很复杂。有人认为^[6],含有生物大分子、水和氧的生物系统在光的作用下,可以产生多种自由基,尤其是过氧自由基,经过演变,它们最后生成单线态氧、激发态羰基,后两者的退激发构成了光诱导的生物系统的低水平发光。

我们认为,植物的延迟发光途径之一可能是由原初电子受体与在反应中心通过吸收光而形成的氧化型叶绿素进行逆反应而产生的。叶绿素的这种逆还原使它返回到激发单线态而不是基态^[7]。因此,从激发单线态可以发出光来。但是,叶绿素只有在活性叶绿体中才表现出这种延迟发光,这种发光可以延迟半小时^[8]。而在失活植物中的叶绿素并不具有这种性质,这可从图 6 看出。

图 6 所示是一片花生幼叶在实验时经开水将其下半部迅速(约 2 秒)烫一下,然后再经白光诱导的 UWL 图(B),左边是与其对应的在微光照射下所获得的外形图(A)。实验中单从外表看不出叶子上部与下部有任何区别,但它们光诱导的延迟发光却截然不同。这说明延迟发

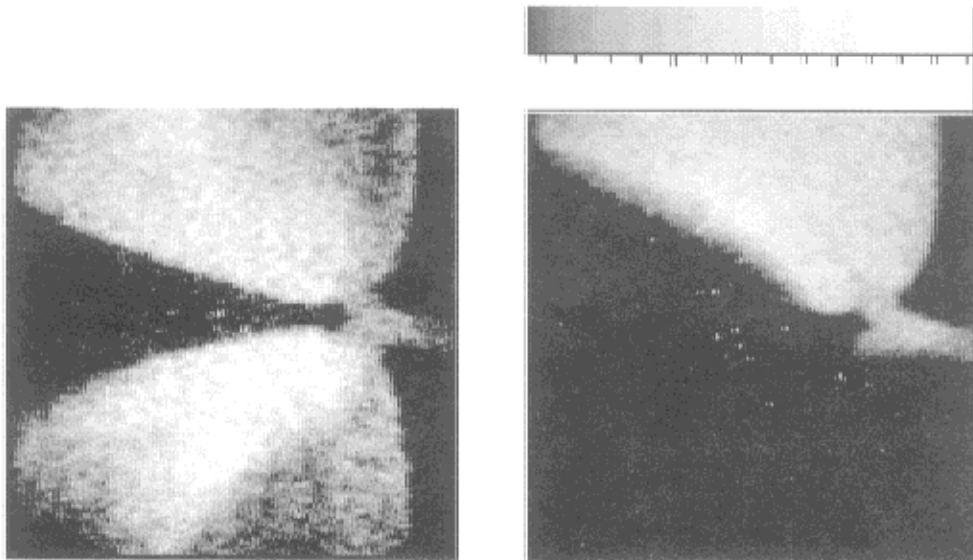


Fig. 6 (A) The image of a piece of peanut leaf taken under a weak illumination. The lower part of the leaf had been quickly boiled to death before experiment. (B) The UWL image of the leaf.

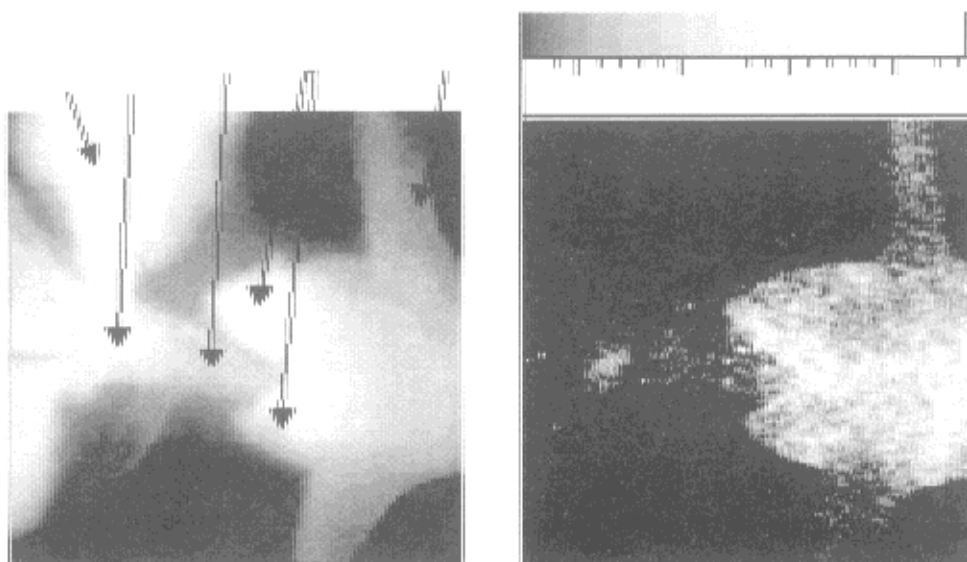


Fig. 7 The image (A) of a violet taken under a weak illumination and its UWL image (B).

光不是叶绿素分子本身直接受激发光照射后所发的“瞬发荧光”(寿命约 10^{-9} s), 而和植物受光照射后在其体内所发生的一系列光生物化学反应有关。通常认为一个光化反应的全过程大致可以分为二个阶段:原初光化反应和继发光化反应。在原初光化反应过程所形成的产物中, 大多数是具有高度化学活性的中间产物, 如自由基, 离子或其他不稳定产物。不稳定产物继续进行化学反应, 直至形成稳定的产物, 这就是继发光化反应。植物光诱导的超弱发光可能就是继发光化反应的结果。

实验中, 我们还对另外一些生物样品的 UWL 图进行了探测。图 7(A) 左边是一朵处于盛花期的紫罗兰花, 在面向物镜的一侧剥掉一片花瓣, 使其子房和花蕊能够成像到 CCD。图 7(A) 右边是两朵处于花蕾期(剥掉花萼后)的紫罗兰花。图 7(B) 是将上述三朵紫罗兰花经白光照射诱导后黑暗中延迟 10 秒采集时间 20 秒的 UWL 图象。

从图中可以看出, 处于盛花期的紫罗兰花瓣发光很弱, 而处于花蕾期的紫罗兰花发光很强, 比叶子发光还要强。从图中还可以看出, 处于分裂活跃期的子房发光也较强。这说明 UWL 还与生物的生长、代谢快慢, 特别是与细胞分裂的活跃程度有密切关系。花蕾和子房处于细胞分裂、生长代谢的活跃期, 所以它们的发光很强。而处于盛花期的花瓣其细胞分裂、生长都缓慢, 因此发光也较弱。这一点在图 2、图 4 中也表现得很明显, 处于豆芽生长点的部位发光较强, 而用于能量储存和供给的子叶发光相对较弱。

注意到在细胞分裂、生长旺盛区域的代谢变化与 UWL 的关系, DNA 可能是 UWL 的另一源泉。Popp 等^[9]认为正是 DNA 分子形态的变化导致了细胞超弱发光的不同。而且他们指出由光诱导的生物系统发光的双曲线和振荡衰减是由于在不同发展阶段的 DNA 内进行光子的受激储存的结果。

根据生物 UWL 图象, 我们可以检测生物的新陈代谢过程和程度, 可以判断生物的生理状态和生化反应的剧烈程度。它是一种直观、灵敏的无损探测方法。具有重要的理论意义和应用前景。

进一步的研究包括:1. 研究生物 UWL 与生物的生理生化反应过程的关系;2. 利用高空间分辨率的增强型 CCD 对动植物的自发发光进行探测;3. 从光谱学角度探讨生物 UWL 的本质及应用。

参考文献

- 1 R. Q. Scott, M. Usa, and H. Inaba: *Applied Physics B*, 1989, 48: 183 - 185.
- 2 B. Schauf, L. M. Repas and R. Kaufman: *Photochemi. & Photobio.*, 1992, 55(2): 287 - 291.
- 3 宇佐史, 稻场文男: *Optronics*, 1995, 6: 136 - 140.
- 4 谭石慈, 邢达: *科学通报*, 1997, 42(6): 643 - 646.
- 5 F.B. 索尔兹伯里, C. 罗斯: 《植物生理学》, 1981, 科学出版社, 213.
- 6 沈恂, 傅世密, 张月敬等: *生物物理学报*, 1988, 4(2): 102 - 103.
- 7 K. C. 史密斯: 《光生物学》, 科学出版社, 沈恂等译, 1984.
- 8 周禾, 杨起简: *北京农学院学报*, 1995, 10(2): 88.
- 9 M. Rattemeyer, F.A. Popp, W. Nagl: *Naturwissenschaften*. 1981, 68: 572 - 573.

THE DETECTION AND ANALYSIS ON THE ULTRA - WEAK BIOLUMINESCENT IMAGES OF SOME LIVING SPECIES

Wang Weijiang Xing Da Tan Shici Li Dehong

(*Laser Life Scientific Insti., Shouth China Normal Univ., Guang Zhou, 510631*)

ABSTRACT

In this paper our detecting system which includes image intensifier and cooled CCD are introduced. Using such system we have studied some light induced ultra - weak bioluminescent (UWL) images corresponding to the development of chloroplast in a etiolated mungbean seedling. Also, the characteristics of some UWL images of different living species are analyzed. From the results we conclude that chlorophyll in a plant plays a great important role in the process of UWL. Nevertheless this UWL does not conform the same mechanism with the luminescence directly coming from chlorophyll excited by light. In the light of the living species at the different stages of metabolism or in the different parts of a plant gives the different UWL intensities, so we can get a sensitive and non - invasive powerful method to detect the information coming from the processes of the physiological and biochemical changes in living systems.

Key Words: Ultra - weak bioluminescence Image intensifier CCD
Chlorophyll Etiolated mungbean seedling Violet

本文于 1997 年 4 月 16 日收到。