

新型快速显微多道分光光度系统及其应用

籍涛¹, 陈光炜², 陈文心², 黄耀熊²

(1. 中山大学物理教研室, 广东 广州 510089; 2. 暨南大学生物医学工程研究所, 广东 广州 510632)

摘要:介绍一种新型快速显微多道分光光度系统。利用倒置显微镜、衍射光栅、线阵 CCD 等构成的显微多道分光光度系统, 可对微区样品在 350nm - 800nm (波长分辨率为 0.2nm) 光谱波长范围内进行快速光谱检测, 最快检测时间为 1ms。利用该系统进行的人血红细胞内血红蛋白测量分析表明, 系统具有高灵敏度、快速、无扰、在位、多光谱显微测量的特点, 可在生命科学研究中动态监测细胞生命过程的变化。

关键词: 显微分光光度; 多道; 光谱; 单个活细胞

中图分类号: Q6-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)03-0599-06

显微分光光度技术是一种将光学显微镜和分光光度技术相结合, 在完整细胞水平上对细胞内成份进行定性、定量或局部定位分析的先进技术。它把定性细胞化学方法推进到数值化局部定量的研究范围。利用该技术可对生物组织、细胞、细胞产物及细菌、寄生虫等进行光密度测量、光谱吸收测量、荧光光度测量^[1-3]。面对研究对象的代谢成份极为复杂、形态各异, 传统的显微分光光度系统由于采用单通道光学检测系统, 检测时间长, 难以进行时间分辨要求较高的光谱检测, 而且仪器体积庞大, 结构复杂, 操作不便^[4-6]。近年来, 也有一些专业厂家研制出新型显微多道分光光度系统 (如 Zeiss 的 MCS Diode Array Spectrometer for Microscopy)。这些系统使用二极管阵列作为检测器, 可使检测时间加快到 20ms, 光谱波长检测范围 360nm - 780nm, 最小检测区域 5 μ m。但是, 由于采用二极管阵列, 其空间分辨率受到很大限制。因此, 此类显微分光光度系统的波长分辨率仅在 ~2.5nm 量级^[7]。为此, 我们研究开发出一种采用线阵电荷耦合器件 (Charge Coupled Device - CCD) 结合数字信号处理技术构成的显微多道分光光度检测装置。可对微区样品在 350nm - 800nm 光谱波长范围内进行快速光谱检测 (最快检测时间为 1ms) 的同时, 波长分辨率可达 0.2nm。由于具有检测波长全范围内光谱一次快速成像、分辨率高、积分时间可调、信噪比高、体积小、便于操作等特点, 以及 Windows 操作环境下的系统软件和计算机强大的数据处理能力, 可实现快速、准确、多功能的显微样品分析。

1 工作原理

我们所研制的显微多道分光光度系统建于一倒置显微镜 (Nikon TE300) 上, 其基本结构如图 1 所示。显微镜卤钨稳流光源 (100W) 光束通过孔径大小可调的光阑 1 后, 经透镜聚焦后

收稿日期: 2001-02-12

基金项目: 广东省自然科学基金 (批准号: 980692) 和国务院侨办重点攻关项目基金资助项目

作者简介: 籍涛, 博士, 电话: (020)87331426, E-mail: ji-tao@263.net.

通讯作者: 黄耀熊

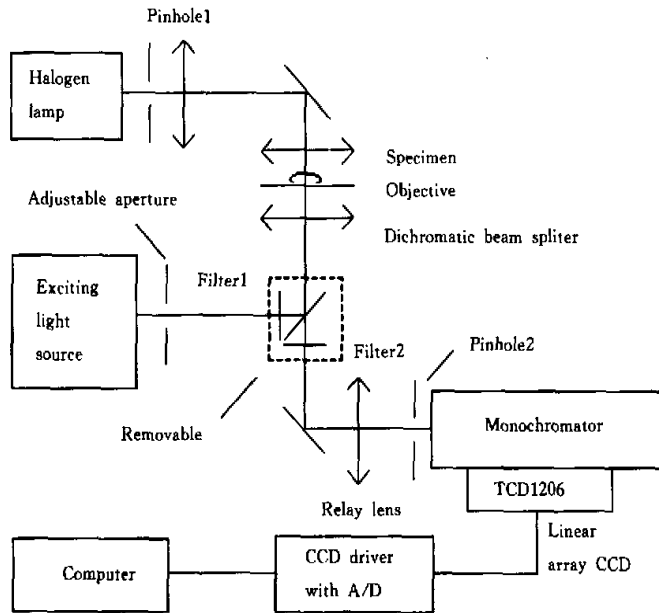


Fig.1 Optic diagram of multi-channel micro-spectrophotometer

照射到样品上。其对应孔像直径在 $1\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 范围内可调。物镜收集的样品透射光通过中间接力透镜,再经检测光阑 2 入射至分光器。分光器由反射光栅 (1200 线/mm) 构成,它将光谱展开于 CCD 检测器感光像元上。检测光阑位于显微镜物镜与中间接力透镜所成放大像平面上。显微镜放大倍数可在 $20\sim 200$ 倍之间变化,检测光阑直径为 0.2mm 至 2.5mm 共 6 种可选,其对应检测样品微区直径范围在 $1\mu\text{m}\sim 125\mu\text{m}$,根据测量需要选择。

若进行荧光检测时,高稳定度高压汞灯 (Nikon HB-10104AF) 激发光经限制光阑,窄带通滤光片,再经色光分离滤光片 (dichromatic beam splitter) 将激发光反射到被检样品上,使被检样品激发荧光。物镜将收集的荧光传到目镜和其它输出端口,进行观察和测量。带通滤光片进一步滤除激发光,避免过强激发光进入检测光路,而引起 CCD 检测器饱和。

本系统使用线阵 CCD (Toshiba TCD1206) 作为多道光谱检测器。CCD 器件具有光谱范围宽、量子效率高、转换线性好、分辨率高等优点。且有自扫描输出功能,是一种优良的多道光谱检测器^[1]。本系统用 TCD1206 CCD 元件主要性能参数如下:像元尺寸 $14\mu\text{m}\times 14\mu\text{m}$;像元数 2160 个;光谱响应范围 $300\text{nm}\sim 1100\text{nm}$;动态范围 1700;饱和曝光量 $0.037\text{lx}\cdot\text{s}$,最高数据率 2MHz 。同步数据采集卡由 A/D 转换器、静态存储器、地址产生电路、数据总线接口电路 (ISA 总线) 及 A/D 启动、数据读写控制电路等构成。同步数据采集工作受线阵 CCD 驱动器发出的同步信号控制,从而保证了 A/D 转换时间总是在 CCD 输出信号的最平坦部位,因而采集的数据比较稳定。系统微型计算机 (CPU Intel Celeron 366) 读取 A/D 转换数据,并进行实时数字信号处理。由于 TCD1206 CCD 最高数据率为 2MHz ,系统完成单次全光谱 ($350\text{nm}\sim 800\text{nm}$) 检测最短时间为 1ms 。

系统软件采用 Borland 公司的 Delphi5 软件开发系统编写,在 Microsoft Windows2000/

98/NT多任务操作系统下运行。使用虚拟设备驱动程序(Vxd)和Win32 Driver Model(WDM)技术实现计算机对CCD硬件系统的控制和数据采集。采集到的信号数据经计算机滤波、校正,按不同分析计算方法,可进行各种显微样品快速分析应用。

2 系统主要性能检测

2.1 波长检测范围和准确度

分光器将350nm-800nm(色散率为15nm/mm)波长范围的光谱展开于约3厘米长的TCD1206线阵CCD检测器上,TCD1206 CCD有2160个像敏单元(单个像敏元尺寸 $14\mu\text{m}\times 14\mu\text{m}$),故单个像敏元所接收的波长范围约为0.2nm,为系统的波长分辨率。利用波长为488nm、514nm、632.8nm单色激光和波长为589.0nm及589.6nm的钠灯光进行波长准确度校正,实验证明本系统光栅分光光路展开光谱线性度好,波长准确度高。TCD1206 CCD在小于350nm和大于800nm波长范围内,光谱响应效率低,同时卤钨灯的短波发射能量也比较低,所以在此波段内TCD1206 CCD的光谱检测的信噪比低,光谱测量结果准确度差。而使用有增强器的制冷CCD(Cooled CCD),和在180nm-1000nm波长范围内发射能量变化较小的高强度连续氙灯光源,将可扩展本系统的实用光谱检测范围。

2.2 光度线性度、光度准确度和光度重复性

使用国际标准定量测定血红蛋白法,即氰化高铁血红蛋白测定法对系统进行光度线性度定标。套装氰化高铁血红蛋白标准液(卫生部上海生物制品研究所),浓度分别相当于血红蛋白5.0、10.0、15.0和20.0g/dl,以去离子水为空白,取4支不同浓度标准液依次置于显微镜载物台上系统光路中(光径1mm)重复测量十次。十次结果求平均得吸收光谱曲线。选取540nm处波长,绘浓度吸收度曲线。实验结果表明系统光度线性度关系较好,光度准确度小于0.5%,光度重复性小于0.3%。

2.3 降噪处理

在信号采集过程中不可避免会出现噪声干扰,噪声的存在影响准确观察、分析和计算光谱信号,极大地限制了光谱检测的速度。只有经过快速有效地排除噪声干扰才能获得有用的信息。CCD多道检测系统中,噪声主要来自光源、背景辐射、CCD检测器、A/D转换电路等,噪声的形式有随机噪声和固定噪声两种。软件噪声滤波是微机化测试仪器的一大优势。对于固定噪声可通过软件校正和扣除本底除去。对于随机噪声,在光谱信号变化较慢的情况下,采用取样平均法可明显提高CCD多道检测器信噪比,N次采样平均后,信噪比提高 \sqrt{N} 倍^[9]。此外,利用CCD器件的积分特性,还可在不同检测条件下,通过计算机软件控制选取合适的CCD积分时间,来获得较好的信噪比^[9]。

但是,有些样品的吸收光谱信号变化很快,必须进行快速检测。在快速光谱检测时,由于受采样时间的限制,无法进行多次重复采样,此时利用中值滤波算法,可以在滤除随机噪声的同时能够较好地保留信号的细节^[10]。为此,本系统在可进行多次采样平均测量的基础上,利用Intel公司提供的Intel CPU芯片专用数字信号处理函数实行快速中值滤波算法,使其可实现快速高信噪比采样。

在检测中,采用铈镨玻璃滤光片(didymium glass filter,日本Shimadzu分光光度计定标用)的吸收光谱分别对各种采样分析方法作比较。图2(a)所示为A/D采集CCD单次测量

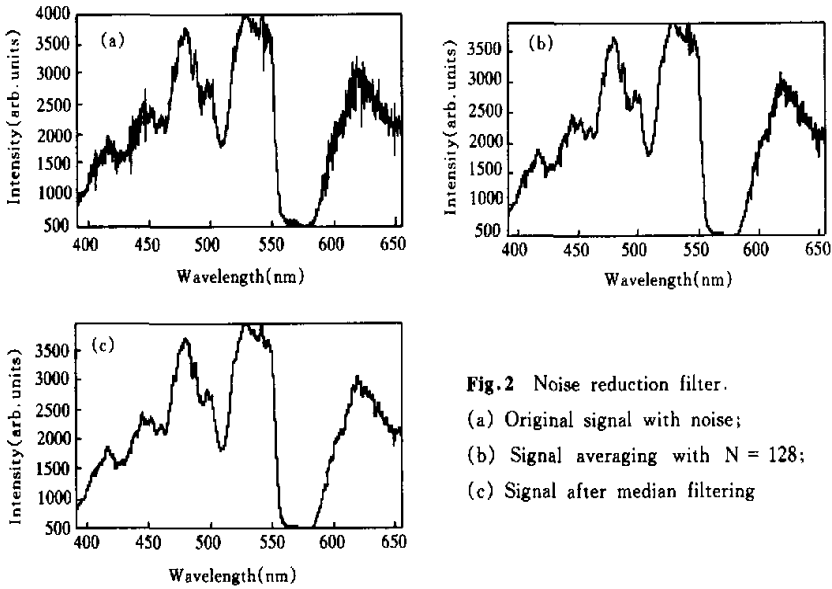


Fig.2 Noise reduction filter.

- (a) Original signal with noise;
 (b) Signal averaging with $N = 128$;
 (c) Signal after median filtering

吸收光强曲线,图 2(b)为连续 128 次测量数据迭加平均后曲线,图 2(c)为单次测量数据进行中值滤波后曲线。由此可见,经单次采样再加中值滤波算法的方式可取得经 128 次连续采样后迭加平均所得的相同效果。所以,本系统所采用的中值滤波算法可以较好地实现单次快速检测的要求。

3 生物样品检测

3.1 材料

人血红细胞:取自健康人静脉血。血样以肝素钠抗凝,3000r/min 速度下离心 10 分钟,去除白细胞及血小板,将压积红细胞用生理盐水以 1:15000 比例稀释,使得显微镜视野中红细胞间距为 7 或 8 个红细胞直径。

3.2 测量方法

调节光阑 1 使入射光斑直径约为 $10\mu\text{m}$,一次仅有一个红细胞被照射。选用 $40\times$ 物镜,光阑 2 直径取 0.2mm ,考虑到中间接力透镜 ($2\times$),实际检测微区直径为 $2.5\mu\text{m}$,则可对单个红细胞(正常直径约为 $7\mu\text{m}$)内部进行吸光度测量。调节显微镜,选定单个红细胞某一局域,设定合适的 CCD 积分时间,进行测量。分别测定单个红细胞透射光强 $I_e(\lambda)$,邻近细胞间液体透射光强 $I_i(\lambda)$ 及 CCD 元件暗电流产生的暗输出 $I_d(\lambda)$,然后按下式计算红细胞对应波长的吸光度 $A(\lambda)$:

$$A(\lambda) = \text{Log} \frac{I_e(\lambda) - I_d(\lambda)}{I_i(\lambda) - I_d(\lambda)}$$

再在样品池中加入蒸馏水,使红细胞发生溶血现象,选择单个红细胞进行动态吸收光谱测量。

3.3 检测结果

所测得的健康人血红细胞吸收光谱曲线如图3所示。图中采用单次测量, CCD积分时间取200ms, 经中值滤波得吸收光谱曲线。由图3可见在420nm、540nm、575nm波长附近处, 有明显血红蛋白吸收峰, 其吸收光谱与相关文献报导相符合^[11]。

图4所示的是, 当红细胞发生溶血时, 选择单个红细胞, CCD积分时间取200毫秒连续采集2秒钟, 测得的红细胞在此时间段溶血过程中的吸光度变化光谱。图中可见在2秒内, 随时间轴由后向前, 各谱线不但相应的吸收峰逐渐减弱, 而且波形也稍有变化。此结果不但显示了本技术可实现对全谱吸收光谱毫秒级快速检测, 而且还进一步证明, 活细胞样品, 其吸收光谱随生命的进程是一个变化过程, 故吸收光谱的快速检测是必要的和有重要意义的。

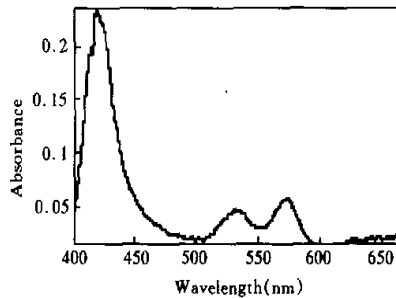


Fig.3 The spectrum of hemoglobin in red blood cell

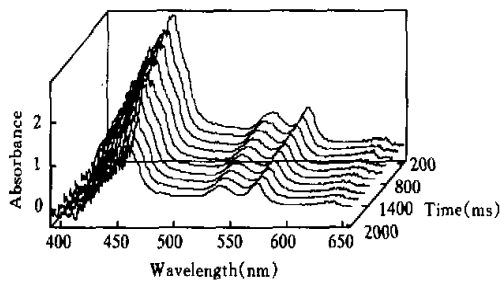


Fig.4 The dynamic spectra of single red blood cell

4 结 论

本技术借助由反射光栅组成的分光器和线阵 CCD 等方法, 发展出一新型快速显微多道分光光度技术和系统, 实现了宽频光谱的高空间(波长)和高时间分辨率的一次快速采样测定, 并利用中值滤波处理算法, 获得了较高的信噪比, 可对微小样品进行快速、无扰、多光谱显微测量。对红细胞吸收光谱随时间快速变化情况的监测, 证明了本技术有望成为对单个活态细胞研究的强有力的新手段。它对细胞内成份及其动态变化的定性定量快速检测的特性, 与其它用于单细胞研究的手段如显微激光散射技术具有很好的互补性^[12]。利用它的这些特性, 可在生命科学研究中动态监测单个细胞各水平层次上生命过程的变化。如可进行单个活态细胞内分子随生理生化等条件变化的动态研究; 细胞凋亡过程的检测; 伴随细胞离子通道的开、合过程细胞排出(分泌)物的监测; 多分子探针单个活细胞荧光检测; 病理分析、法医分析和微小样品的多组分分析, 以及显微快速生物事件的光谱分析等。进一步的研究和应用实验正在进行。

参考文献:

- [1] Kohen E, Gatt S, Schachtschabel A, et al. Multiprobe fluorescence imaging and microspectrofluorimetry of cell transformation and differentiation: implications in terms of applied biochemistry and biotechnology[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 29(3):191-205.
- [2] Kavanagh KY, Murphy EJ, Harmey M, et al. Microspectrophotometric analysis of respiratory pigments using a novel fibre optic dip probe in microsamples[J]. *Physiol Meas*, 1999, 20(3):303-11.
- [3] Meyer B, Schaller C, Frenkel C, et al. Distributions of local oxygen saturation and its response to changes

- of mean arterial blood pressure in the cerebral cortex adjacent to arteriovenous malformations[J]. *Stroke*, 1999, 30(12):2623-30.
- [4] 胡匡祐, 李子孝, 等. XFG-01型显微分光光度计的研制[J]. 中国生物医学工程学报, 1983, 2(4):243-248.
- [5] John EN, William JT, John WC. A computerized microspectrophotometer using fibre optic for transmission and detection of light[J]. *Journal of Microscopy*. 1984, 133(3):313-322.
- [6] 舍英, 伊力奇, 呼和巴特尔. 现代光学显微镜[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 164-183.
- [7] 产品说明书. MCS Diode Array Spectrometer for Microscopy Zeiss公司. 德国
- [8] Kenneth LR. Spectrophotometer Based on a Charge-Coupled Device Photoarray Detector[J]. *Anal Chem*, 1980, 52:916-920.
- [9] 杨经国, 冉瑞江, 杜定旭, 等. 取样平均法提高 CCD 多道探测器信噪比[J]. 光谱学与光谱分析, 1993, 13(6):7-12.
- [10] 谢国明, 牟水阁. 医学实验室光谱仪信号处理方法[J]. 分析仪器, 1998, 4:43-45.
- [11] Tsujita K, Shiraishi T, Kakinuma K. Microspectrophotometry of nitric oxide-dependent changes in hemoglobin in single red blood cells incubated with stimulated macrophages[J]. *J Biochem Tokyo*, 1997, 122(2):264-70.
- [12] 黄耀熊. 显微激光散射技术及对单个活细胞的无损在位实时测量[J]. 科学通报, 2000, 45:1532-1535.

A NOVEL FAST MULTI-CHANNEL MICRO-SPECTROPHOTOMETER

Ji Tao¹, CHEN Guang-wei², CHEN Wen-xin², HUANG Yao-xiong²

(1. Department of physics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China;

2. Institute of Biomedical Engineering, Ji Nan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: A novel fast micro multi-channel spectrophotometer is developed based on an inverted microscope with monochromator, linear array CCD, and a personal computer. This system can obtain absorption spectrum from a micro region of $1\mu\text{m}$ in diameter in the range of wave length from 350nm to 800 nm with resolution of 0.2nm within 1ms. The spectrum of hemoglobin in red blood cell, and the time course of the absorption spectrum of single red blood cell during hemolysis process obtained by the system show that the new spectrophotometer is of the ability of performing non-invasive, in situ, multi-channel measurement with high sensitivity and high speed. It is suitable for monitoring the instant molecular change of a single intact cell in response to the variation of its physiological and biochemical conditions.

Key Words: Micro-spectrophotometer; Multi-channel; Spectrum;

Single intact cell