



中华人民共和国国家标准

GB 19645—2010

食品安全国家标准

巴氏杀菌乳

National food safety standard

Pasteurized milk

2010-03-26 发布

2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB 19645-2005《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》以及GB 5408.1-1999《巴氏杀菌乳》中的部分指标，GB 5408.1-1999《巴氏杀菌乳》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与GB 19645-2005相比，主要变化如下：

——将《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》分为《巴氏杀菌乳》、《灭菌乳》、《调制乳》三个标准，本标准为《巴氏杀菌乳》；

——修改了“范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——修改了“感官指标”；

——取消了脱脂、部分脱脂产品的脂肪要求；

——增加了羊乳的蛋白质要求；

——将“理化指标”中酸度值的限量要求修改为范围值；

——取消了“兽药残留指标”；

——取消了“农药残留指标”；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；

——修改了“微生物指标”的表示方法；

——取消了“食品添加剂”的要求；

——修改了“标识”的规定。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 19645-2005。

食品安全国家标准

巴氏杀菌乳

1 范围

本标准适用于全脂、脱脂和部分脱脂巴氏杀菌乳。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 术语和定义

3.1 巴氏杀菌乳 pasteurized milk

仅以生牛（羊）乳为原料，经巴氏杀菌等工序制得的液体产品。

4 技术要求

4.1 原料要求：生乳应符合GB 19301的要求。

4.2 感官要求：应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色泽	呈乳白色或微黄色。	取适量试样置于50mL烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有乳固有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、无沉淀、无正常视力可见异物。	

4.3 理化指标：应符合表2的规定。

表2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
脂肪 ^a /(g/100g)	≥ 3.1	GB 5413.3
蛋白质/(g/100g)		GB 5009.5
牛乳	≥ 2.9	
羊乳	≥ 2.8	

表 2 (续)

项 目	指 标	检验方法
非脂乳固体/(g/100g) \geq	8.1	GB 5413.39
酸度/(°T)		GB 5413.34
牛乳	12~18	
羊乳	6~13	
^a 仅适用于全脂巴氏杀菌乳。		

4.4 污染物限量：应符合GB 2762的规定。

4.5 真菌毒素限量：应符合GB 2761的规定。

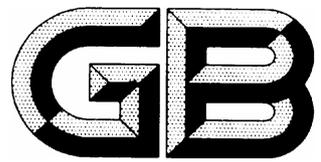
4.6 微生物限量：应符合表3的规定。

表 3 微生物限量

项 目	采样方案 ^a 及限量(若非指定,均以CFU/g或CFU/mL表示)				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数	5	2	50000	100000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	1	5	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	0	0/25g(mL)	-	GB 4789.10 定性检验
沙门氏菌	5	0	0/25g(mL)	-	GB 4789.4
^a 样品的分析及处理按GB 4789.1和GB 4789.18执行。					n:同一批次产品应采集的样品件数;
					c:最大可允许超出m值的样品数;
					m:微生物指标可接受水平的限量值;
					M:微生物指标的最高安全限量值。

5 其他

5.1 应在产品包装主要展示面上紧邻产品名称的位置,使用不小于产品名称字号且字体高度不小于主要展示面高度五分之一的汉字标注“鲜牛(羊)奶”或“鲜牛(羊)乳”。



中华人民共和国国家标准

GB 25190—2010

食品安全国家标准

灭菌乳

National food safety standard

Sterilized milk

2010-03-26 发布

2010-12-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB 19645-2005《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》及GB 5408.2-1999《灭菌乳》中的部分指标，GB 5408.2-1999《灭菌乳》中涉及到本标准的指标以本标准为准。

本标准与GB 19645-2005相比，主要变化如下：

——将《巴氏杀菌、灭菌乳卫生标准》分为《巴氏杀菌乳》、《灭菌乳》、《调制乳》三个标准，本标准为《灭菌乳》；

——修改了“范围”的描述；

——明确了“术语和定义”；

——修改了“感官指标”；

——取消了脱脂、部分脱脂产品的脂肪要求；

——增加了羊乳的蛋白质要求；

——将“理化指标”中酸度值的限量要求修改为范围值；

——取消了“兽药残留指标”；

——取消了“农药残留指标”；

——“污染物限量”直接引用GB 2762的规定；

——“真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；

——取消了“食品添加剂”的要求；

——修改了“标识”的规定。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 19645-2005。

食品安全国家标准

灭菌乳

1 范围

本标准适用于全脂、脱脂和部分脱脂灭菌乳。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 术语和定义

3.1 超高温灭菌乳 ultra high-temperature milk

以生牛（羊）乳为原料，添加或不添加复原乳，在连续流动的状态下，加热到至少132℃并保持很短时间的灭菌，再经无菌灌装等工序制成的液体产品。

3.2 保持灭菌乳 retort sterilized milk

以生牛（羊）乳为原料，添加或不添加复原乳，无论是否经过预热处理，在灌装并密封之后经灭菌等工序制成的液体产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 生乳：应符合GB 19301的规定。

4.1.2 乳粉：应符合GB 19644的规定。

4.2 感官要求：应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色泽	呈乳白色或微黄色。	取适量试样置于50mL烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有乳固有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、无沉淀、无正常视力可见异物。	

4.3 理化指标：应符合表2的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
脂肪 ^a /(g/100g) ≥	3.1	GB 5413.3
蛋白质/(g/100g)		
牛乳 ≥	2.9	GB 5009.5
羊乳 ≥	2.8	
非脂乳固体/(g/100g) ≥	8.1	GB 5413.39
酸度/(° T)		
牛乳	12~18	GB 5413.34
羊乳	6~13	
^a 仅适用于全脂灭菌乳。		

4.4 污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.5 真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.6 微生物要求：应符合商业无菌的要求，按 GB/T 4789.26 规定的方法检验。

5 其他

5.1 仅以生牛（羊）乳为原料的超高温灭菌乳应在产品包装主要展示面上紧邻产品名称的位置，使用不小于产品名称字号且字体高度不小于主要展示面高度五分之一的汉字标注“纯牛（羊）奶”或“纯牛（羊）乳”。

5.2 全部用乳粉生产的灭菌乳应在产品名称紧邻部位标明“复原乳”或“复原奶”；在生牛（羊）乳中添加部分乳粉生产的灭菌乳应在产品名称紧邻部位标明“含××%复原乳”或“含××%复原奶”。

注：“××%”是指所添加乳粉占灭菌乳中全乳固体的质量分数。

5.3 “复原乳”或“复原奶”与产品名称应标识在包装容器的同一主要展示版面；标识的“复原乳”或“复原奶”字样应醒目，其字号不小于产品名称的字号，字体高度不小于主要展示版面高度的五分之一。



中华人民共和国国家标准

GB 19301—2010

食品安全国家标准

生乳

National food safety standard

Raw milk

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB 19301-2003《鲜乳卫生标准》及第1号修改单。

本标准与GB 19301-2003相比，主要变化如下：

- 标准名称改为《生乳》；
- 增加了“术语和定义”；
- “污染物限量”直接引用GB 2762的规定；
- “真菌毒素限量”直接引用GB 2761的规定；
- “农药残留限量”直接引用GB 2763及国家有关规定和公告；
- 修改了“微生物指标”。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GBn 33-1977、GB 19301-2003。

食品安全国家标准

生 乳

1 范围

本标准适用于生乳，不适用于即食生乳。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 术语和定义

3.1 生乳 raw milk

从符合国家有关要求的健康奶畜乳房中挤出的无任何成分改变的常乳。产犊后七天的初乳、应用抗生素期间和休药期间的乳汁、变质乳不应用作生乳。

4 技术要求

4.1 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色泽	呈乳白色或微黄色。	取适量试样置于50mL烧杯中，在自然光下观察色泽和组织状态。闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味。
滋味、气味	具有乳固有的香味，无异味。	
组织状态	呈均匀一致液体，无凝块、无沉淀、无正常视力可见异物。	

4.2 理化指标：应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
冰点 ^{a、b} /(°C)	-0.500~-0.560	GB 5413.38
相对密度/(20°C/4°C) ≥	1.027	GB 5413.33
蛋白质/(g/100g) ≥	2.8	GB 5009.5
脂肪/(g/100g) ≥	3.1	GB 5413.3
杂质度/(mg/kg) ≤	4.0	GB 5413.30
非脂乳固体/(g/100g) ≥	8.1	GB 5413.39
酸度/(°T) 牛乳 ^b 羊乳	12~18 6~13	GB 5413.34
^a 挤出 3h 后检测。 ^b 仅适用于荷斯坦奶牛。		

4.3 污染物限量：应符合 GB 2762 的规定。

4.4 真菌毒素限量：应符合 GB 2761 的规定。

4.5 微生物限量：应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

项 目	限量[CFU/g(mL)]	检验方法
菌落总数 ≤	2×10^6	GB 4789.2

4.6 农药残留限量和兽药残留限量

4.6.1 农药残留量应符合 GB 2763 及国家有关规定和公告。

4.6.2 兽药残留量应符合国家有关规定和公告。

荧光探针技术

YINGGUANG TANZHEN JISHU

主编/黄晓峰 张远强 张英起



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

荧光探针技术

YINGGUANG TANZHEN JISHU

黄晓峰 张远强 张英起 主 编



人民军医出版社

People's Military Medical Press

北 京

图书在版编目(CIP)数据

荧光探针技术/黄晓峰,张远强,张英起主编. —北京:人民军医出版社,2004.5
ISBN 7-80194-133-0

I. 荧… II. ①黄…②张…③张… III. 荧光-探针 IV. TH776

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 091164 号

策划编辑:姚 磊 加工编辑:钱黎晓 责任审读:李 晨
版式设计:赫英华 封面设计:吴朝洪 责任监印:李润云
出 版 人:齐学进

出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店
通信地址:北京市复兴路 22 号甲 3 号 邮编:100842

电话:(010)66882586(发行部)、51927290(总编室)

传真:(010)68222916(发行部)、66882583(办公室)

网址:www.pmmp.com.cn

印刷:北京天宇星印刷厂 装订:京兰装订有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:28.25 字数:873 千字

版次:2004 年 5 月第 1 版 印次:2004 年 5 月第 1 次印刷

印数:0001~3000

定价:78.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

电话:(010)66882585、51927252

内 容 提 要

本书共分 24 章,对目前所见的荧光探针,分别以研究领域为主题进行了全面论述,对于有多种用途的荧光探针,则在不同章节进行侧重叙述。每章之中,按探针最相近的性质或应用分节论述。全书不仅进行了理论知识的论述,更突出了实用的特色,科技人员可根据书中提供的具体方法进行操作、独立完成实验。本书可供医学、生物学、材料科学等各领域的科技人员参考,并可作为研究生教材。

(说明:作者可提供本书的更详尽的图、表、彩图、各种探针的分子式、分子量、CAS 编号/名称、结构式等内容,需要者请与作者直接联系订购。联系方式:张远强,(710032)西安市第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室,电话 029—83374508,电子信箱 zhangyq@fmmu.edu.cn)

责任编辑 姚 磊 钱黎晓

主 编 简 介

黄晓峰 副教授,硕士研究生导师。1986年毕业于安徽蚌埠医学院医疗系,1991年第四军医大学组织胚胎学专业研究生毕业,1997年第四军医大学病理学专业博士研究生毕业。主要从事肿瘤病理学及其超微结构病理诊断。从1997年开始从事激光扫描共聚焦显微镜、荧光标记物在生命科学中的应用和研究等工作。熟练掌握荧光探针原理及其标记技术,以第一作者发表科研论文60余篇,参加编写专著5部。相应论文分别发表于《中华医学杂志》、《科学通报》、*Chin Sci Bulletin*, *Chin Sci J*, *World J Gastroenterology*, *American J Acupuncture*,《华人消化杂志》等核心期刊和源期刊。其中两篇被国际著名的《科学引文索引》(SCI)收录,其余被国外著名检索刊物《化学文摘》(CA)等收录,并被国内外学者引用30余次。“组织蛋白酶D和嗜铬颗粒素在人原发性肝细胞癌的表达意义”研究被收入1999年《中国肿瘤临床年鉴》,并在中国科协首届学术年会作报告。多项科研成果获奖。

张远强 教授,1974年毕业于第四军医大学军医系,1984年病理专业研究生毕业。博士研究生指导教师。现任组织学与胚胎学教研室主任,中国解剖学会组织学与胚胎学专业委员会副主任委员,中国解剖学科普专业委员会副主任委员,中国生理学会消化、内分泌、生殖、代谢专业委员会委员,全军解剖与组织胚胎学专业委员会副主任委员,陕西省解剖学会副理事长,美国生殖研究学会委员、《解剖学报》、《中国组织化学与细胞化学杂志》、《中华男科学》、《细胞与分子免疫学杂志》、《第四军医大学学报》、《军医大学学报》(英文版)编委。四度赴香港大学解剖学系和动物学系进修学习,并获Crouch Foundation奖学金。在香港大学学习期间对运动神经元疾病模型小鼠中枢神经系统神经肽的分布和发育生物学进行了系统研究,在国外发表论文数篇。近10年来,通过免疫组织化学和原位杂交技术对胰腺内生物活性物质及其受体的合成、分布、物质共存进行系统研究,该成果获国家科技进步三等奖。另在心血管系统调节肽、免疫器官肽能神经支配及与免疫细胞相互关系的研究中有一些新的发现,获得全军科技进步二等奖一项,三等奖五项。现正致力于生殖生物学的研究,以探讨新的生物活性物质对生殖细胞发育分化的影响,已取得重要结果,该研究受到国家自然科学基金、全军医药卫生“九五”、“十五”科研基金及国家计生委基金资助。20世纪80年代以来发表科学论文100余篇,被SCI收录18篇。主编及参编专著10部,其中两部在国外出版。

张英起 教授,博士研究生指导教师,1962年8月出生,1983年7月第四军医大学本科毕业,1991年7月获第四军医大学医学博士学位。现任第四军医大学生物技术中心主任、教授、博士研究生导师;中国医学生物技术协会理事;中国生物化学与分子生物学学会工业生化委员会委员;全军生物技术专业委员会委员;陕西省生物化学学会副理事长兼秘书长。长期从事生物化学与分子生物学、生物技术的教学与科研工作。发表学术论文50余篇。

前言

在生物医学和生命科学的研究中,光学探针起重要作用。在许多领域光学探针已经取代放射性同位素标记技术成为标准的研究工具,在检测速度和易用性方面都具有无可比拟的优点。随着激光扫描共聚焦显微镜在国内的引进和广泛应用,以及流式细胞仪和荧光显微镜在国内的普及,对各种荧光标记物的需求和了解日益迫切。而目前国内系统介绍荧光探针及其应用的书籍很少。本书从基本理论开始,系统论述了目前可获得的各种荧光标记物及其应用范围,并附有详细的参考文献,十分方便查阅。本书不仅提供了研究细胞骨架、细胞内各种重要细胞器的探针,而且对目前热门研究领域的活性氧、一氧化氮(包括一氧化氮合成酶)各种离子和离子通道、信号转导、受体研究、细胞凋亡、核酸和基因组学以及蛋白组学应用的探针都进行了详细介绍。对分子信标以及荧光原位杂交的应用和进展也进行了论述。还详细讨论了探针检测使用的超敏检测技术、荧光探针负载和校准技术。本书共分 24 章,分别以研究领域为主题进行论述,对于有多种用途的荧光探针,则在不同章节进行侧重叙述。每章之中,按探针最相近的性质或应用分节论述。本书不仅进行了理论知识的论述,更突出了实用的特色,使科技人员可根据书中提供的具体方法进行操作、独立完成实验。

作者可提供各章节更详尽的图、表和文中图片的彩图、各种探针的分子式、分子量、CAS 编号/名称、结构式等内容、与荧光探针染色标记密切相关的组织学和细胞生物学常用技术。联系方式:张远强,(710032)西安市第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室,电话 029—83374508,电子信箱 zhangyq@fmmu.edu.cn。

图片除注明者外,其余引自分子探针公司网上资料,在此深表感谢。

由于荧光探针发展迅速,每年都有大量新的探针和检测方法出现,限于作者学术水平,书中缺点、错误在所难免,希望广大读者批评指正,以利再版时修正。

编者

目 录

第 1 章 荧光探针发展简史	(1)
第一节 荧光染色和荧光探针	(1)
第二节 染料的合成及荧光染料的早期应用	(2)
第三节 荧光探针在活细胞中的应用和发展	(3)
第四节 体内荧光探针	(3)
第 2 章 荧光技术概述	(4)
第一节 荧光产生过程	(4)
第二节 荧光光谱	(4)
第三节 荧光检测	(5)
第四节 荧光团的荧光输出量	(6)
第五节 荧光的环境敏感性	(7)
第 3 章 荧光探针的性质及滤光片的选择	(9)
第一节 荧光探针的性质	(9)
第二节 滤光片的选择	(11)
第三节 荧光抗衰减剂的选择	(11)
第 4 章 荧光探针及其染色技术	(13)
第一节 荧光探针负载(染色)原则及注意事项	(13)
第二节 常用的染色方法	(15)
第三节 常用荧光探针的染色方法	(16)
第四节 荧光探针的校准	(17)
第 5 章 测定细胞活性的荧光探针	(19)
第一节 细胞活性和细胞毒性检测	(19)
第二节 活细胞探针	(21)
第三节 死细胞探针	(23)
第 6 章 膜荧光探针	(25)
第一节 膜脂和膜探针	(25)
第二节 膜流动性测定	(26)
第三节 荧光基团标记的磷脂	(26)
第四节 阴离子膜探针	(31)
第五节 阳离子膜探针	(36)
第六节 其他非极性和双亲性膜探针	(41)
第 7 章 细胞器荧光探针	(45)
第一节 线粒体探针	(45)
第二节 溶酶体、酵母菌液泡和其他酸性细胞器的探针	(53)

第三节	内质网和高尔基复合体探针	(59)
第 8 章	Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 和其他金属离子荧光探针	(64)
第一节	Ca ²⁺ 测定	(64)
第二节	紫外光激发的荧光 Ca ²⁺ 探针	(66)
第三节	可见光激发的荧光 Ca ²⁺ 探针	(69)
第四节	荧光 Ca ²⁺ 探针交联物	(76)
第五节	水母素(Aequorin): 一种生物性发光 Ca ²⁺ 探针	(78)
第六节	荧光 Mg ²⁺ 探针	(80)
第七节	Zn ²⁺ 和其他金属离子荧光探针	(81)
第八节	螯合剂、校准缓冲液、离子载体、细胞负载试剂	(86)
第 9 章	Na⁺、K⁺、Cl⁻ 和其他离子探针	(93)
第一节	荧光 Na ⁺ 和 K ⁺ 探针	(93)
第二节	Cl ⁻ 、磷酸根、亚硝酸根和其他阴离子检测	(96)
第 10 章	pH 荧光探针	(103)
第一节	pH 探针概述	(103)
第二节	近中性 pH 应用的探针	(104)
第三节	酸性 pH 使用的探针	(108)
第四节	pH 探针交联物	(110)
第 11 章	酶底物	(114)
第一节	酶底物及其参考标准	(114)
第二节	糖苷酶检测	(119)
第三节	代谢磷酸酯(盐)和多磷酸酯(盐)酶的检测	(129)
第四节	肽酶和蛋白酶检测	(135)
第五节	氧化酶底物,包括 Amplex Red 试剂盒	(143)
第六节	其他酶底物	(147)
第 12 章	活性氧和一氧化氮探针	(152)
第一节	活性氧和一氧化氮	(152)
第二节	活性氧的产生和检测	(155)
第三节	一氧化氮研究探针	(163)
第 13 章	信号转导探针	(167)
第一节	信号转导概述	(167)
第二节	钙调节研究试剂	(167)
第三节	蛋白激酶、蛋白磷酸酶和核苷酸结合蛋白探针	(169)
第四节	脂类代谢和信号转导的探针	(177)
第 14 章	入胞作用、受体和离子通道探针	(186)
第一节	追踪受体结合、入胞作用和出胞作用的探针	(186)
第二节	神经递质受体探针	(202)
第三节	离子通道和载体探针	(206)
第四节	二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)试剂光转化的荧光探针	(209)
第 15 章	荧光原位杂交技术的原理及应用	(211)

第一节	荧光原位杂交原理	(211)
第二节	荧光原位杂交的发展	(212)
第三节	荧光原位杂交的优点	(213)
第四节	荧光原位杂交的应用	(214)
第五节	荧光原位杂交的荧光探针	(231)
第六节	荧光原位杂交的特殊需要	(231)
第七节	荧光原位杂交展望	(234)
第 16 章	细胞形态和流体测量的荧光示踪剂	(237)
第一节	示踪剂的选择	(237)
第二节	进行长时间细胞标记的膜通透性反应性示踪剂	(238)
第三节	极性示踪剂	(241)
第四节	荧光亲脂性的示踪剂	(248)
第五节	荧光和生物素化的葡聚糖	(252)
第六节	进行示踪的 FluoSpheres 和 TransFluoSpheres 微球	(257)
第七节	蛋白质交联物	(261)
第 17 章	超敏检测技术	(264)
第一节	检测方法概述	(264)
第二节	酪胺酰胺信号放大(TSA)技术	(267)
第三节	酶标记荧光(ELF)信号放大技术	(271)
第四节	藻胆蛋白	(276)
第五节	荧光微球	(285)
第 18 章	笼锁化合物探针	(290)
第一节	笼锁基因及其光解作用	(290)
第二节	不同用途的笼锁探针	(292)
第三节	笼锁化合物探针的实验方法	(296)
第 19 章	细胞骨架蛋白荧光探针	(298)
第一节	细胞骨架的概念、结构和作用	(298)
第二节	细胞骨架荧光探针	(304)
第三节	微管蛋白和其他细胞骨架蛋白探针	(309)
第 20 章	细胞凋亡的荧光检测方法	(314)
第一节	用核酸染料进行凋亡研究	(314)
第二节	用 ChromaTide 核苷酸检测 DNA 链断裂	(316)
第三节	使用 Annexin V 交联物进行凋亡分析	(317)
第四节	基于蛋白酶活性的凋亡分析方法	(319)
第五节	使用线粒体染料进行凋亡分析	(321)
第六节	使用自由基探针进行凋亡分析	(321)
第七节	使用离子探针进行凋亡分析	(322)
第八节	使用酯酶底物进行凋亡分析	(322)
第九节	测定 ATP : ADP 比率的凋亡分析方法	(323)
第十节	针对细胞凋亡不同阶段的检测方法	(323)

第 21 章	核酸检测和基因组学技术使用的荧光探针	(326)
第一节	核酸染料	(326)
第二节	寡核苷酸和核酸的标记	(339)
第三节	溶液中核酸的检测和定量	(348)
第四节	在电泳凝胶和毛细管进行核酸检测和定量	(353)
第五节	核酸杂交的检测	(358)
第六节	细胞核和染色体复染剂和 Nissl 染料	(372)
第七节	DNA 结构、DNA 结合和 DNA 损伤分析	(376)
第 22 章	蛋白质检测和蛋白组学技术应用的荧光探针	(381)
第一节	蛋白质检测概述	(381)
第二节	溶液中蛋白质的定量和选择性纯化	(381)
第三节	在凝胶中、印迹上和毛细管电泳中检测总蛋白的氨基酸组成	(386)
第四节	在凝胶中和印迹上特殊蛋白质检测的多元蛋白组学	(394)
第五节	进行肽分析、序列分析和合成的试剂	(403)
第六节	荧光探针在蛋白质研究中的应用	(404)
第 23 章	激光扫描共聚焦显微镜荧光探针的选择和应用	(409)
第一节	概述	(409)
第二节	激光扫描共聚焦显微镜常用的荧光探针	(409)
第三节	激光扫描共聚焦显微镜中荧光探针的使用	(412)
第 24 章	钙荧光探针负载、校准及其应用	(418)
第一节	概述	(418)
第二节	荧光钙探针负载和校准方法	(418)
第三节	荧光钙探针高时间空间分辨率成像	(428)
主要参考文献		(431)

第1章 荧光探针发展简史



第一节 荧光染色和荧光探针

一、荧光染色

某些物质吸收了与它本身的特征频率相同的光量子后,其原子中的电子被激发到较高的能级,从而产生吸收光谱。有些物质,当用紫外线照射时,它吸收了某种波长的光后还会发射出各种颜色和不同强度的光;而当紫外线停止照射后,这种光也随之消失,这种光称为荧光(fluorescence)。荧光的波长比吸收的紫外线的波长要长些。由于物质的分子结构不同,所吸收的紫外线和所发射的荧光的波长也不同。被这些物质吸收的紫外线称为激发光,产生的发射光即荧光。荧光的颜色多为红、蓝、绿或黄等,荧光是发光体分子中原子的核外电子由高能级回跳到低能级所产生的辐射,因此是冷光。

物质的荧光有两种。一种是自发性荧光,即组织在短波长光照射下自行发射出的荧光。组织中的蛋白质和脂类在紫外线照射下能发出微弱的淡蓝色荧光。另一种荧光是诱发荧光,即组织与荧光色素结合后,经一定波长的光线照射后发出的荧光。常用的是诱发荧光,能产生荧光的生物染色剂称为荧光染料(荧光色素)或荧光探针,组织或细胞的荧光染色只有在配备了适当光源的荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜下才能显示和观察。

荧光染色的优点是灵敏度高。非荧光染料的浓度通常要在1/100以上才能使组织细胞染上肉眼可见的颜色,而荧光染料如荧光黄在 10^{-5} 的浓度染色后,用紫外线就可激发出肉眼可见的荧光。荧光染料的应用浓度在 $10^{-4} \sim 10^{-5}$,即可达到理想的染色效果。

二、荧光的发射原理

分子都含有电子,电子在不停地运动着。根据量子理论,运动着的电子可以处于一系列不连续的

能量状态(即能级)中,电子遵守一定的规则,可以从一个能级向另一个能级跃迁,并伴随着与能级差相对应的特定能量的吸收或释放。一般情况下,电子总是处于能量最低的能级(基态)。在一定的条件下,电子可吸收能量(如光能,热能,电能,机械能等)跃迁到较高能级(激发态),这个过程叫激发。处于激发态的电子是不稳定的,它总是要跃迁回到基态,并将多余的能量释放出去。跃迁方式可能是辐射跃迁,也可能是非辐射跃迁。以非辐射方式跃迁时,能量大多转化成热能,而以辐射方式跃迁时,能量转化成相应波长的光,这个过程叫发射。

跃迁到激发态的电子,大多处于单重激发态。如果电子直接从单重激发态以辐射方式跃迁到基态,由于单重激发态很不稳定,半衰期很短,发射持续的时间也很短,这种发射光,叫荧光,其寿命较短。1838年, Brewster首先描述了荧光现象,但荧光一词,是由Stokes在1852年提出的。处于激发态的电子还可能先弛豫到三重激发态,再以辐射方式跃迁到基态,由于三重态的半衰期较长,发射持续的时间也较长,其发射光叫磷光,寿命较长。

三、荧光与荧光物质的分子结构

荧光染料和非荧光染料在结构上都含有发色团和助色团,在单色光照射下都有吸收。但为什么只有荧光染料才发射荧光呢? 主要与荧光染料的分子结构特征有关。同时也不是所有单色光都能激发荧光染料辐射出荧光。荧光染料要发生荧光,物质分子必须具备电子吸收光谱的特征结构;激发光必须具备合适的能量;这些物质还必须具有高的荧光效率。荧光效率即荧光量子产率,它可用物质所发射出的荧光量子数和所吸收激发光的量子数的比值表示,此值往往小于1。荧光量子产率=发射荧光的量子数目/吸收激发光的量子数目,如罗丹明B在

乙醇中的荧光量子产率为 0.97, 荧光黄在水中的荧光量子产率为 0.65。而许多吸光物质的荧光量子产率很低, 不能产生荧光。因为这些物质吸收了发光的能量后, 再把这部分能量释放出来时, 大多用于同类分子或其他分子碰撞时的消耗, 以热能的形式释放, 因此无荧光发射。

有机化合物分子中具有 π 电子共轭结构者, 其荧光效率随着 π 电子共轭程度的增加而增大, 所发生的荧光光谱也将向长波长方向移动。任何有利于提高 π 电子共轭程度的结构改变, 都能提高荧光效率, 或使荧光波长长移。荧光物质的分子结构, 具有刚性结构和平面结构的 π - π 共轭体系。分子不会以 C-C 单键自由旋转(刚性), π - π 共轭体系必须是共平面的, 否则无法形成大的共轭体系。在共轭体系中处于激发态的 π 电子有宽广的离域(π 电子的活动度)范围, 其在激发态时具有一定的稳定性, 能够维持 10~8s, 为使能量向荧光转化提供必要的时间。非荧光染料虽然也有 π - π 共轭体系, 但不具备刚性

结构和共平面的 π - π 共轭体系, 因此不发荧光。

四、荧光探针

在生物染色剂中, 有一类可被紫外线或蓝紫光(短波长光)激发而发射荧光的染料, 称为荧光染料(荧光色素), 现在应用的一些染料也可被长波长光线激发, 这些荧光色素常统称为荧光探针。常用的荧光染料大多数属于吖啶类, 如吖啶橙、吖啶黄、罗丹明、荧光黄钠等, 还有金胺-O、樱草素等。按其化学反应性可将荧光染料分为三类。①碱性荧光染料: 含碱性助色团, 在酸性溶液中电离, 荧光色离子为阳离子。吖啶类染料如吖啶黄能与 DNA 和 RNA 结合而染色。主要是嵌入 DNA 的双螺旋结构。溴化乙啶也是通过嵌入 DNA 而染色, 在紫外线照射下发红色荧光。②酸性荧光染料: 含有酸性助色团, 在碱性溶液中电离, 荧光色离子为阴离子。③中性荧光染料: 由酸性荧光染料和碱性荧光染料混合而成的一种复合染料。

第二节 染料的合成及荧光染料的早期应用

染料最早是应用在丝、麻、棉等纺织品的印染上, 我国古代自黄帝时代到周朝初期(公元前1122~前225年)已相当发达。此时人类在染色剂和染色方面已经积累了一些知识。在 1714 年, Leeuwenhoek 首先应用天然染色剂研究肌肉组织, 用番红花九浸染切片, 得到了较好的结果。当时人们使用的全是从动植物和矿物中提炼的天然染料如靛青、朱砂、胭脂红等。1856 年, William Perkin 首先合成了一种煤焦油染料—苯胺紫(mauve, aniline purple)。从此开始了人工合成染料的时代。此后, 一些化学家采用 Perkin 的方法, 以氟化苯胺作原料, 相继合成了其他很多染料。1859 年合成了蔷薇苯胺(品红), 也称为复红。随后又合成了副品红、甲紫或龙胆紫、结晶紫、甲基绿、孔雀绿、亮绿、藏红 O、亚甲蓝、倍花青和各种偶氮染料(如碱性棕)。随后, 这些染料逐渐商品化并应用于组织标本、血液标本、细菌标本的染色, 新的染色方法随之建立。

这个时期生产的具有荧光性的染料, 包括氧杂蒽和吖啶(氧杂蒽的衍生物)。派若宁 Y、罗丹明 B、荧光黄、曙红 Y、赤藓红等, 都是很有名的吖啶类染料。一些早期的吖啶类染料, 有碱性染革黄棕、吖啶黄、吖啶橙、吖啶黄素等。有些染料, 如金胺 O、亮磺黄素、中性红和副品红等, 来源于其他试剂。

尽管 20 世纪初就有很多荧光探针可供使用, 但

人们真正用过的却很少。组织学家、细胞学家和细菌学家喜欢染色能力很强的红色、蓝色和绿色染料, 而这些染料在溶液中大多没有荧光或荧光很弱。只有派若宁 Y 和曙红 Y 等红色染料是例外。吖啶类染料通常把细胞染成黄色, 因而不大常用。碱性品红(含有副品红和品红碱的混合物)在 1863 年被 Waldeyer 引进组织学研究以后, 就成为一种重要的细胞核染料, 它对于细菌学, 特别是对于用以证明结核杆菌这类耐酸微生物体的 Ziehl-Neelsen 法的发展起过重要影响。甲紫是 Weigert 和 Ehrlich 分别在 1881 年和 1882 年引入微生物技术中的, 它在 1884 年就成了 Gram 染色液的主要成分。

直到荧光显微镜研制 20 多年后的 1930 年代初期, 吖啶类和其他荧光探针才用于固定细胞和组织的荧光显微术。Krause 的《显微技术大全》收录了其他很多染料, 但对吖啶类染料却未提及。这部在其他方面都很有参考价值的著作中, 关于荧光显微镜的章节, 也只提到了其在观测组织切片自身荧光中的应用。当时的显微镜学家还没有认识到荧光探针能提高染色组织的观察灵敏度和清晰度。

虽然荧光探针通常被用于固定组织和细胞的染色, 但在其他方面也得到应用。人们知道, 在水溶液中, 荧光黄会产生很强的黄绿色荧光, 即使用水稀释到 16×10^{-6} 倍, 其钠盐仍可产生浅绿色的荧光。

Ehrlich 用它来显示眼内液体的流动。1906年,荧光素在美国成为第一个用于地下水示踪的荧光探针。

第三节 荧光探针在活细胞中的应用和发展

1885年,Ehrlich用亚甲蓝作为第一个重要的活体染料,并阐明了它对神经组织的亲和性。吖啶染料是治疗锥虫病的有效药物。Ehrlich用吖啶黄素对付老鼠体内的这种原生动物,并取得显著效果。这种染料也因其能影响锥虫而被称为“锥黄素”。显微镜学家用明视野显微镜观察了这类染料和微生物体的结合。Provazek把各种荧光探针和药物(如萤光黄,曙红,中性红,奎宁等)加到纤毛豆形虫的培养液中,并用荧光显微镜观察了细胞的染色荧光。这种实验方法的基本目的是把各种类型的物质(不管是染料还是无色药物)引入细胞,假定它们服从一定的分布规律并在一定的条件下富集在细胞的特定成分中,那么它们在荧光显微镜的暗视野中就可以突出显示细胞的部分结构。1914年,荧光探针引入荧光显微术中,标志着实验细胞学向前迈了一大步。Provazek首次描述了活体荧光探针。以前,曾有人用活体染料,包括荧光探针,实验原生动物,但只限于用明视野显微镜观察。1932年

匈牙利药物学家把几种不同的荧光探针注入预先感染了锥虫的啮齿动物体内,创立了活体荧光探针技术。荧光显微镜下的血涂片观察表明,染料和核酸及带血锥虫的基本部分有特异结合。20世纪30年代由于对化学疗法特别感兴趣,人们作了各种努力,试图确定染料在什么位置和动物及人体内的疟原虫结合。人们在荧光显微镜下发现,在所实验的各种荧光探针中,米帕林(奎时因,quinacrine,即阿的平)在注射后的10min内能被循环淋巴液选择吸收。把吖啶黄素加到成纤维细胞培养液中,在显微镜下可看到,实验浓度下它能阻止细胞的分裂。Reynolds(1985)曾用荧光吖啶碳花青染料标记脂蛋白,在体外研究动脉粥样硬化形成过程中脂蛋白的代谢。通过这些研究,人们明白某些氨基吖啶能优先与细胞核成分结合。对这种结合机制的研究,导致了染料对核酸的亲力的发现。这种强相互作用已为体外及低pH区固定细胞中的纯化核酸所阐明。

第四节 体内荧光探针

在Ehrlich阐明荧光黄能示踪眼内液体的流动之后,Thiel将裂隙灯显微镜加以改进,以观察眼内染料的荧光。荧光显微镜用的光源是经聚光镜会聚的透射光,对大多数不透明的活器官标本无法观察。1929年,Ellinger和Hirt对荧光显微镜作了重大改进,在这种荧光显微镜中,光源的垂直入射光直接通过侧边的透光管,经物镜会聚于样品上,发射的荧光沿透光管返回到观察者眼中。别的基本部件还有相应的滤光片和一个浸在水中的物镜。这台被称作“体内活体显微镜”的仪器,可以认为是第一台落射荧光显微镜。他们用这种显微镜观察了动物体内注入荧光探针后的肾脏的微循环。荧光黄和吖啶黄素的稀溶液被用于研究尿液形成的生理学。其他很多科学家对体内活体荧光显微镜产生了兴趣,并实验了各种荧光探针,如亮碱性染革黄棕G、吉耳曼宁S、樱草灵黄、rheonin A、噻唑黄、硫黄素(thiofla-

vine)等。1930年,人们用这种荧光新技术观察了活体皮肤、肝脏、肾脏、结膜和肾上腺。为满足生物学研究的需要,活体荧光探针必须在等渗、无毒和无淬灭剂条件下使用。近年来,由于现代落射荧光显微镜、显微荧光扫描仪、高灵敏摄像机、数据实时采集器等现代化仪器和方法的应用,微循环的体内活体显微术又重新受到欢迎。有人在将低密度脂蛋白(LDL)进行酰化,然后与一种荧光探针二十八烷基吖啶碳花青结合,当肝窦内皮细胞摄取这种LDL后,便可用荧光显微镜进行鉴定。研究人员将荧光标记的LDL经门静脉注入大鼠体内。1周后处死大鼠,取出肝脏标本进行常规组织学检查,并用大鼠内皮细胞单克隆抗体进行免疫组织化学染色。结果发现:在正常肝实质组织中,肝窦内皮细胞出现荧光,而大血管内皮未出现荧光染色,说明仅肝窦内皮细胞能摄取乙酰化的LDL。

第2章 荧光技术概述

荧光探针使研究人员可以高度敏感性和选择性地检测复杂生物分子包括活细胞中的特定成分。本章

概述了荧光技术的基础内容。

第一节 荧光产生过程

某些称为荧光团或荧光染料的分子(通常为芳烃杂环聚合物, polyaromatic hydrocarbons or heterocycles)荧光的产生经过三个步骤。即激发、激发态寿命和荧光发射。荧光探针是设计用来进行生物标本特定区域内定位或对特定刺激反应的荧光团。荧光探针和其他荧光团荧光产生过程如下,见图 2-1。

提供,由荧光团吸收后产生激发性电子单重态(singlet state, S_1')。这一过程是荧光与化学发光的区别,化学发光的激发态是由化学反应造成的。

二、激发态寿命

激发态存在的时间有限,一般为 $(1\sim 10)\times 10^{-9}$ s。在此期间,荧光团发生构象变化,并可能受到分子相互作用的影响。这个过程有两种重要结果。首先, S_1' 的能量部分散失,产生一种弛豫的单激发态(relaxed singlet excited state, S_1),从此处产生荧光发射。随后,并非所有最初通过吸收作用激发的分子都能通过荧光发射返回基态(S_0)。其他过程如碰撞引起的淬灭、荧光能量传递(转移)和系统间过渡也可使 S_1 减少。荧光量子产率是发射的荧光光子数与吸收光子数的比率。

三、荧光发射

光子能量 $h\nu_{EM}$ 发射后,返回荧光团基态 S_0 。由于在激发态寿命过程中能量损耗,光子能量降低,因此波长比激发态光子 $h\nu_{EX}$ 更长。用 $(h\nu_{EX}-h\nu_{EM})$ 表示的能量或波长的不同称为 Stokes 移位。Stokes 移位是荧光技术敏感性的基础,因为使发射光子可在较低的背景背景下检测,可与激发光子清楚分开。

第二节 荧光光谱

和荧光发射光谱。在同时检测两个或多个不同荧光团的应用中,这些光谱的带宽(bandwidth)是非常重要的参数。除极少数例外,单一荧光团在稀溶液中的荧光激发光谱与它的吸收光谱一样。在同样条件下,荧光发射光谱不依赖于激发波长,而是依赖于激

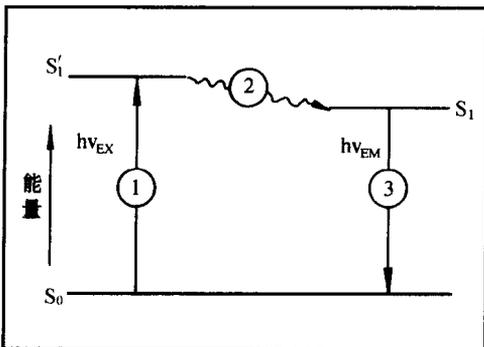


图 2-1 荧光产生 Jablonski 模式图

注: $h\nu_{EX}$ 激发能量; $h\nu_{EM}$ 发射能量

一、激发

光子能量 $h\nu_{EX}$ 由外部光源如白炽灯、激光器

完整的荧光过程是循环的。除非荧光团在激发态被不可逆地破坏,即一种称为光漂白的现象,否则同样荧光团可被重复激发和检测。对于溶液中的多原子分子,图 2-1 的 $h\nu_{EX}$ 和 $h\nu_{EM}$ 表示的不连续的电子跃迁,用等同的光谱代替,分别称为荧光激发光谱

发态寿命过程中激发能量的部分损耗。发射强度与 在激发波长的荧光激发光谱的振幅成正比(图2-2)。

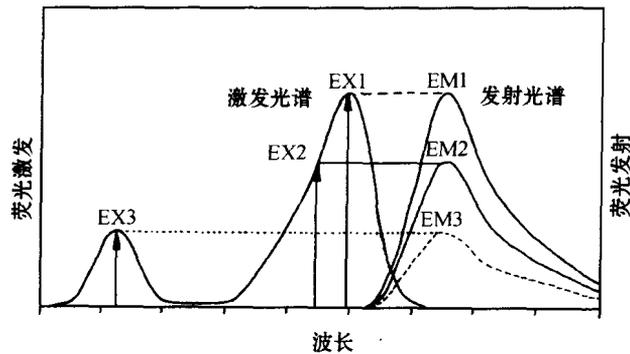


图2-2 荧光发射强度与激发光谱的振动关系

注:三种不同波长(EX 1, EX 2, EX 3)荧光团的激发不改变发射图形,但产生荧光发射强度(EM 1, EM 2, EM 3)的变化,与激发光谱的振幅对应

第三节 荧光检测

一、荧光仪器

从前面的讨论可以看出,荧光检测系统四种基本要素包括:激发光源;荧光团;将发射光子与激发光子分离的波长滤片;记录发射光子和产生记录输出的检测器,可记录为电信号或摄影图像。不论如何应用,这四种要素的兼容性是进行最优化荧光检测的基础。

荧光仪器主要有四种类型,每种都可提供不同的信息。分光荧光计(spectrofluorometer)和微孔板读数仪(microplate reader)测定大量样品(μl 至 ml)的平均特性。荧光显微镜可分辨出直径 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以下目标的二维或三维空间结构。荧光扫描仪(fluorescence scanner)可分辨较大目标如电泳凝胶、印迹和层析图(chromatogram)的二维空间结构。流式细胞仪(flow cytometer)测定流体中每个细胞的荧光,可在大样品中进一步分类识别和定量。如细胞的分选和定量。

每种仪器都可产生不同的测定假象,但可以满足荧光探针的不同需要。例如,在荧光显微镜检查时,光漂白是常见的问题,但在流式细胞测定时并不是主要干扰,因为单个细胞在激发光束的时延(dwelling time)很短。

二、荧光信号

荧光强度的定量依赖于与吸光率同样的参数,Beer-Lambert定律定义为摩尔消光系数、光路长度(optical pathlength)和溶质浓度的乘积,并依赖于荧光量子产率和染料、激发光源强度、仪器的采集性能。在稀溶液或悬液中,荧光强度与这些参数成正比。Kubista等(1994)报道当样品吸光率在 1 cm 光路长度超过约 0.05 ,则关系变为非线性,测量就会被人工假象扭曲,如自身吸收(self-absorption)和内部滤波效应(inner-filter effect)。因为荧光定量依赖于仪器,因此在不同的时间或使用不同的仪器配置时,必须用荧光参考标准进行校准(Schwartz和Fernandez-Repollet,1994;Sisken,1989)。为满足这些需要,可使用荧光显微镜和流式细胞仪校准的高精确度荧光微球参考标准(参考本书相关部分),还有一系列用于荧光分光光度计校准的现成的荧光标准溶液。

分光荧光计相当灵活,可测定激发和发射波长的连续变化。激光扫描显微镜和流式细胞仪则需要单一固定波长激发的探针。在现代仪器中,激发光源通常是氩离子激光器的 488 nm 谱线。如图2-3所示,荧光发射信号(S1)与Rayleigh散射激发光

(EX)很容易通过大的荧光 Stokes 移位(即 A1 和 E1 的间隔)而分开。用一种以上荧光探针标记的生物样品,其信号分离问题更复杂。另外的光学信号,如图 2-3 中的 S2,可能是背景荧光或来自第二种荧光探针的信号。

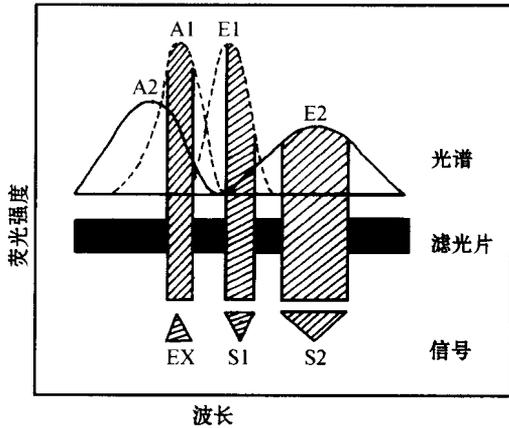


图 2-3 混合荧光团的荧光检测

注:在 A1 和 A2 重叠吸收带的激发(EX)产生两种发射光谱分别为 E1 和 E2 的荧光信号;光学滤片分离定量的发射信号 S1 和 S2

三、背景荧光

荧光检测的敏感性可受到背景信号的严重干扰,可能是来源于样品的固有成分。在酵母菌细胞和植物细胞中,可看到红色的叶绿素荧光。这种荧光定义为自发荧光。另外,某些试剂,尤其是戊二醛固定剂可能是自发荧光的来源,但经氢硼化物处理后,其自发荧光可降低或消除。未结合的或非特异性结合的探针也可产生背景荧光,这种荧光定义为试剂背景。通过选择降低 E2 相对于 E1 的透射的滤片可将自发荧光的检测降至最低,也可通过选择

具有更长吸收和发射波长的荧光探针来降低背景荧光,通过时间分辨发光技术(见第 17 章超敏检测技术)也可消除自发荧光。尽管缩窄荧光检测带宽可增加 E1 和 E2 分辨率,但也影响检测的总体荧光强度。大多数细胞、组织和生物液的自发荧光引起的信号失真,通过使用超出自发荧光范围的长波长激发光(500 nm 以上)激发可消除自发荧光。为避免短波长自发荧光的干扰,常选用 Cy5 的长波长进行激发。而且,在更长波长,致密介质如组织的光散射大大降低,激发光的穿透性更大。

四、多色荧光标记实验

多色标记实验可使用两种或更多的探针同时检测不同的生物化学功能。该技术主要应用包括流式细胞术、DNA 测序、荧光原位杂交、荧光显微镜检查。只有达到多种发射光谱的最大分离(图 2-3 的 E1 和 E2),才能容易进行信号分离和数据分析。因此,窄带宽的荧光团,如 Alexa Fluor 染料和 BODIPY 染料,尤其适合多标记使用(Metzker 等, 1996)。多色荧光标记时,染料的最佳结合应在一致的激发波长显示强的光吸收,而发射光谱则出现很好的分离(图 2-3)。但令人遗憾的是,不容易发现具有大的消光系数光吸收和大 Stokes 移位相结合的染料(Haugland, 1990)。

五、比率测定

在某些情况下,如钙探针 fura-2, indo-1, pH 探针 BCECF、SNARF、SNAFL, 荧光离子探针的游离和离子结合形式,具有不同的发射或激发光谱。使用这种探针时,光学信号(图 2-3 的 S1 和 S2)的比率,可用来监测结合平衡并计算离子浓度。比率测量可消除光漂白、探针负载和留存变化以及设备因素(照明稳定性)引起的数据失真(Silver, 1998)。进一步讨论可参考离子探针的负载和细胞内校准部分。

第四节 荧光团的荧光输出量

一、不同染料的比较

目前作为荧光探针使用的荧光团提供的波长范围、Stokes 移位和光谱带宽可满足仪器的需要,并可进行多色荧光标记实验。特定荧光团的荧光输出依赖于吸收和发射光子的功效,以及经受重复激发/发射循环的能力。吸收和发射功效大多数根据吸收的

摩尔消光系数(ϵ)和荧光量子产率(QY)进行量化。在特定的环境条件下,二者都是常数。在单一波长(通常为最大吸收波长) ϵ 值特异的,而 QY 是全荧光光谱图形的总光子发射的度量。每个染料分子荧光强度与 ϵ 和 QY 的乘积成正比。目前常用的重要荧光团中,这些参数的范围如下: ϵ 5 000 ~ 200 000 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, QY 0.05 ~ 1.0。藻胆蛋白如 R-藻

红蛋白(phycoerythrin),每个蛋白具有多个荧光团,因此比低分子质量荧光团具有更大的消光系数($2 \times 10^6 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

二、光漂白

在高强度照射条件下,激发荧光团的不可逆破坏或光漂白成为限制荧光检测能力的因素。Song等(1996)已经对荧光黄光漂白的几种光化学反应途径进行了详细的描述。某些途径包括邻近染料分子之间的反应,在标记生物标本的反应比在游离染料的稀溶液中的反应更复杂。在所有情况下,光漂白都起源于三重激发态,是从单重态(singlet state) (S_1' ,图2-1)经由称为系统间过渡(intersystem crossing)的激发态过程产生的。

克服光漂白最有效的方法是使检测敏感性最大化,降低激发强度。检测敏感性通过弱光检测设备如CCD摄像机、高数值孔径物镜和与满意的信号分离兼容的最宽的发射带滤片,可使检测敏感性增强。替换实验中光不稳定性荧光团也有效果。Alexa Fluor 488染料是一种重要的荧光黄替代物,其光稳定性比荧光黄显著提高,而且可与标准荧光黄滤片兼容。抗衰减剂如SlowFade和ProLong产品(见本书第3章第三

节荧光抗衰减剂的选择)也可用来降低光漂白作用,但通常不适合活细胞。一般情况下,要预测这些对策的必要性和有效性很困难,因为光漂白速度与荧光团环境有关(Song等,1995;Benson等,1985)。

三、信号放大

最直接的增强荧光信号的方法是增加可检测荧光团的数量。荧光信号可使用以下方法放大:使用卵白素-生物素或抗体-半抗原二级检测技术;酶标二级检测试剂与荧光底物结合(Chao等,1996;Larison等,1995);使用含有多个荧光团的探针如藻胆蛋白和FluoSpheres荧光微球(参见本书相关章节);其他超敏检测技术(见第17章)。

通过单纯增加探针浓度的方法往往达不到预期的效果,反而常造成探针化学和光学性质的显著改变。重要的是要注意通过大量渗透性方法负载的探针,有效细胞内浓度通常比细胞外孵育的浓度高10倍以上。而且,蛋白质或膜标记的增加最终可导致蛋白质沉淀或膜通透性的极大改变。每个蛋白质用多于4~6个荧光团标记,其特异性降低,结合的亲和力也降低。此外,重度标记后,荧光团的荧光反而会因为自身淬灭而下降。

第五节 荧光的环境敏感性

荧光光谱和量子产率通常比吸收光谱消光系数更依赖于环境。例如,一个荧光黄标记与蛋白质结合可使荧光黄的QY降低约60%,但 ϵ 仅降低约10%。在两个邻近荧光团或荧光团与周围环境其他成分的相互作用可产生环境敏感的荧光。

一、荧光团-荧光团相互作用

荧光淬灭可定义为一种降低荧光量子产率而不改变荧光发射光谱的双分子过程,可能是由于瞬时激发态相互作用引起(碰撞淬灭, collisional quenching)或由无荧光基态荧光团的形成造成。自身淬灭是一个荧光团被另一个荧光团淬灭,因此常在高负载浓度发生或标记密度过高时出现。DQ底物(见本书第11章酶底物部分)是重度标记的高度淬灭的生物高聚物(biopolymer),Jones等(1997)发现DQ底物在酶裂解后荧光强度大大增强。Chen等(1988)进行的羧基荧光黄自身淬灭研究显示,淬灭的机制包括向无荧光二聚体产生的能量传递(转移)。荧光共振能量传递(fluorescence resonance en-

ergy transfer, FRET)是一种高度距离依赖的激发态相互作用,此处一个荧光团的发射与另一个荧光团的激发耦合。某些激发的荧光团相互作用形成激发态二聚体(excimer),使发射光谱特征改变。因为它们都依赖于邻近荧光团的相互作用、自身淬灭、FRET和激发态二聚体形成,因此可被用来监测大量分子装配或破碎的过程,如膜融合、核酸杂交、配体受体结合、多肽水解。

二、其他环境因素

影响荧光性质的其他环境因素很多,最常见的包括三方面:溶剂极性(溶剂包括细胞内部区域、蛋白质、膜和其他生物分子结构);淬灭剂的接近度(proximity)和浓度;水性介质的pH。荧光光谱对溶剂可能有强依赖性。这种特点在使用具有大激发态偶极子力矩(excited-state dipole moment)的荧光团时常可观察到,在极性溶液中可导致荧光光谱移位至更长波长。代表性荧光团包括氨基萘类(aminonaphthalenes),如氟硅酸钠(prodian)、badan和dan-

syl. 是有效的环境极性(如蛋白质内部)探针(Macgregor 和 Weber, 1986)。

探针与目标物的结合可显著影响其荧光量子产率。具有高荧光量子产率的探针, 当与特定的目标物结合时, 试剂背景低。这种染色最好的例子是超敏核酸染料如 SYBR、SYTO、PicoGreen、RiboGreen 和 OliGreen(参阅本书核酸探针部分)。相似的, 荧光酶底物是无荧光的, 直到被酶裂解才转化为荧光产物, 因此可敏感检测酶的活性。

外来淬灭剂, 最普遍的是顺磁性的物质, 如 O_2 和重金属原子如碘化物可以浓度依赖的方式降低荧光量子产率。如果淬灭是由碰撞作用引起的, 如荧光团和淬灭剂互相接近时发生的情况, 可得出它们的相互扩散速度。许多荧光团也可被蛋白质淬灭。如 NBD、荧光黄、BODIPY 染料, 这种作用显然是由于与芳香氨基酸残基的电荷转移(charge-transfer)相互作用造成的(Emans 等, 1995)。因此, 针对这些荧光团的抗体是有效和高度特异性的荧光淬灭剂。

荧光团如 BCECF 和羧基 SNARF-1 具有很强的 pH-依赖的吸收和荧光发射特点, 可作为生理 pH

探针。荧光黄和羟基香豆素(伞形酮)也是这种荧光团。结构上, pH 敏感性是由于荧光团 π 电子系统的重构(reconfiguration)引起的, 可在质子化作用时发生。BODIPY 荧光团缺乏蛋白水解的可电离的取代基, 可作为一种等效物替代荧光黄在需要 pH 不敏感探针的场合应用。

三、荧光团环境敏感性的改变

荧光团的环境敏感性可通过结构修饰而转化, 得到一种想要的探针特异性。Sjoback 等(1995)将荧光黄的 3 和 6 羟基转化为乙酸酯形成荧光黄二乙酸酯(乙酰乙酸盐)。这种衍生物使荧光黄采取无荧光的内酯构象, 可测定低 pH(图 2-4)。在合适的 pH 条件下, 酯酶将乙酸酯裂解后释放荧光阴离子荧光黄。其他水解酶的荧光底物可通过用其他适当的功能基团取代乙酸酯产生(见本书第 11 章酶底物部分)。而且, 与荧光黄不同, 荧光黄二乙酸酯是无电荷的, 因此具有某种程度膜通透性。这种性质形成了非侵入性方法的重要基础, 可将极性荧光探针以膜通透性的前体形式负载入细胞, 这种前体被细胞内酯酶裂解后活化。

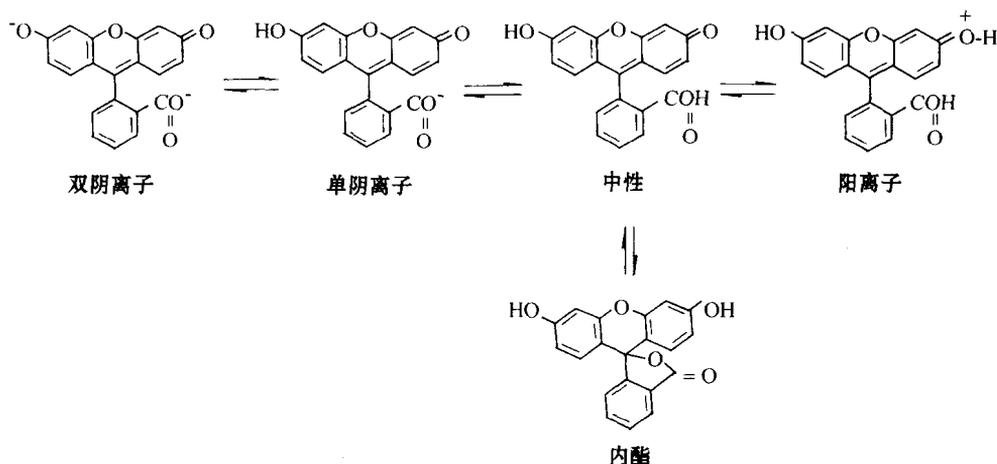


图 2-4 荧光黄的电离平衡

第 23 章 激光扫描共聚焦显微镜荧光探针的选择和应用



第一节 概 述

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种新型高精度显微镜系统,辅以各类荧光探针或荧光染料与被测物质特异性结合,不仅可观察固定的细胞、组织切片,还可对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态地观察和检测(Davin,1989)。荧光探针的发展非常迅速,目前仅美国分子探针公司就可提供几千种荧光探针(Haugland,1996)。通常每项检测内容或被测物质都有几种或几十种有关的或特异的荧光探针。

一、选择荧光探针的一般考虑

选择合适的荧光探针是有效地进行实验并获取理想实验结果的保障。荧光探针的选择主要从以下五个方面考虑:①仪器所采用激光器的类型:应根据仪器采用激光器的类型进行探针选择。如我校购进的 LSCM(Bio-Rad 1024,美国 Bio-Rad 公司产品)采用氩/氦离子激光器,激发波长为 488nm,568nm,647nm,可激发多种荧光探针。②荧光探针的光稳定性和光漂白性:在进行荧光定量和动态荧光监测时,要求荧光探针有较好的光稳定性越高越好,也可通过减少激光扫描次数或降低激光强度的方法,来减轻光漂白的程度。但在进行膜流动性或细胞间通讯检测时则需要荧光探针既有一定的光稳定性又要

有一定的光漂白性。③荧光的定性或定量:仅做荧光定性或仅是观察荧光动态变化时,选择单波长激发探针,无需制作工作曲线。做定量测量时最好选用双波长激发比率探针,利于制定工作曲线。④荧光探针的特异性和毒性:尽量选用毒性小、特异性高的探针。⑤荧光探针适用的 pH:大多数情况下,细胞的 pH 在生理条件范围,但当 pH 不在此范围时,考虑适用该环境 pH 的荧光探针是有必要的。同时应注意染液自身的 pH 值会影响带电荷的荧光探针与胞内组份之间的结合,因此在染液的配备时需加以考虑。

二、使用荧光探针的注意事项

不同的荧光探针在不同标本的效果常有差异,除综合考虑以上因素以外,有条件者应进行染料的筛选,以找出最适的荧光探针。此外,许多荧光探针是疏水性的,很难或不能进入细胞,需使用乙酰羟甲基酯(acetoxymethyl,AM)形式,也就是荧光探针与 AM 结合后变成不带电荷的亲脂性化合物易于通过质膜进入细胞,在细胞内荧光探针上的 AM 被非特异性酯酶水解,去掉 AM 后的荧光探针不仅可与细胞内的靶结构或靶分子结合且不易透出质膜,从而能有效的发挥作用。

第二节 激光扫描共聚焦显微镜常用的荧光探针

LSCM 检测内容 and 应用范围非常广泛,以下仅简单介绍 LSCM 常用的检测内容及其荧光探针。

一、细胞内游离钙

美国分子探针公司提供的钙荧光探针有 20 多种,LSCM 常用的有 Fluo-3、Rhod-1、Indo-1、Fura-2 等,前两者为单波长激光探针,利用其单波长激发特

点可直接测量细胞内 Ca^{2+} 动态变化,为钙定性探针;后两者为双波长激发探针,利用其双波长激发特点和比率技术,能定量细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为钙定量探针。这些探针需使用其 AM 形式。Fluo-3 与 Indo-1、Fura-2 等探针相比,它的荧光发射峰波长较长,荧光选择性强,自身无荧光,与游离钙结合后才发出荧光,能有效地避免非特异性染色。Fluo-3 不需要紫

外光激发,避免了紫外光对活细胞样品的损伤,不需制作工作曲线,还能够在测钙的同时检测细胞的其他参数(Haugland,1996)。如需定量细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 可联合使用 Fluo-3 和 Fura Red2,两者联合使用既具有双波长激发探针的优点又具有单波长激发探针的优点。Fura Red2 是一种独特的 Ca^{2+} 荧光探针,荧光强度随着 Fura Red2 和 Ca^{2+} 结合的增加而减少,即荧光强度与游离钙浓度成反比,与 Fluo-3 正好相反。因此,Fluo-3 和 Fura Red2 联合使用,不仅可提供一种定量细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的比率方法,还可增加 $[Ca^{2+}]_i$ 检测的灵敏度。

定量细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 也可用双波长激发探针 Indo-1 和 Fura-2。由于这些探针需用比率技术,因此又称为钙比率探针。例如,Indo-1 荧光探针经 320~360nm 波长紫外光激发后细胞内游离的 Indo-1 发出 485nm 荧光,与 Ca^{2+} 结合的 Indo-1 发出 405nm 荧光,两者的比值与细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 成线性关系,此比值与工作曲线相比即可得出细胞内游离钙的浓度。钙比率探针在溶液中均有荧光,测量时需洗去细胞外液探针,而进入细胞后的探针其 AM 被分解后不能透出膜。由于这些探针要用紫外光作激发光源,会造成细胞的损伤,还会增加潜在的自发荧光,而且荧光发射峰波长也较短,需提高发光强度,因而其使用受到一定的限制。

二、DNA 和 RNA

核酸的荧光探针有 50 多种(Haugland,1996),用于 LSCM 的主要有吖啶橙(Acridine Orange, AO)、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)。两种染料既可标记 DNA 又可标记 RNA,如为获得单独的 DNA 或 RNA 分布,染色前可用 RNA 酶或 DNA 酶处理细胞。PI 不能进入完整的细胞膜,故不能标记活细胞内的 DNA 和 RNA。其他较常用的荧光探针还有 Hoechst 33258, Hoechst 33342、7-氨基放线菌素 D (7-aminoactinomycin D, 7-AAD)、色霉素 A3 (Chromomycin A3)、噻唑橙(Thiazole orange)等。其中 Hoechst 33258 和 Hoechst 33342 为 DNA 特异性荧光探针,它们以非嵌入形式结合在 DNA 的 A-T 碱基区,可对活细胞的 DNA 进行荧光染色,但需紫外光激发。7-AAD 和色霉素 A3 也是 DNA 荧光探针,能以非嵌入的方式与 DNA 的 G-C 碱基对结合。噻唑橙则是 RNA 荧光探针。

三、膜电位

以往测定膜电位多用微电极直接插入法测量,

不仅操作麻烦,而且对细胞也是一种损伤。LSCM 则可利用荧光探针在细胞膜内外分布的差异测出膜电位,不但可以观察细胞膜电位的变化结果,更重要的是可以用于连续监测膜电位的迅速变化(Ehrenberg 等,1988)。膜电位荧光探针根据其膜电位变化反应速度的快慢分为快、慢两类探针(Haugland,1996),各类均有 10 多种。快反应染料对膜电位的变化可在数毫秒内作出反应,适用于测量膜电位快速变化的细胞,如神经细胞、心肌细胞等;而慢反应染料的反应速度则相对较慢(几秒或几分钟)。但快反应染料的电位敏感性较低,产生的荧光变化较小,一般膜电位每变化 100mV 时荧光强度变化 2%~10%;而慢反应染料的电位敏感性较强,膜电位变化幅度为 1mV 时荧光强度变化 1%~2%。DiBAC4(3)为最常用的膜电位荧光探针(Brauner 等,1984),DiBAC4(3)为带负电荷的阴离子慢反应染料。该探针本身无荧光,当进入细胞与胞浆内的蛋白质结合后才发出荧光,测量时要求细胞浸在荧光染料中。当细胞内荧光强度增加即膜电位增加示细胞去极化;反之,细胞内荧光强度降低即膜电位降低示细胞超极化。罗丹明 123 主要用于线粒体膜电位测量(Grousselle 等,1982)。罗丹明 123 是一种亲脂性阳离子荧光探针,当线粒体膜内侧负电荷增多时,荧光强度增加,与 DiBAC4(3)的表示形式相反。

四、pH 值

正常细胞胞浆内的 pH 一般在 6.8~7.4,而某些细胞器如溶酶体的 pH 则在 4.5~6.0。根据检测对象 pH 的不同将荧光探针分为用于偏中性和酸性两类(Haugland,1996)。常用于偏中性 pH 即细胞胞浆 pH 检测的荧光探针有 SNARF 类(SNARF-1、SNARF-calcein)、SNAFL 类(SNAFL-1、SNAFL-calcein)、BCECF 等,这些探针均为疏水性探针,需使用其 AM 形式。FITC-dextran 则适用于 pH 4~6 (Ohkuma 等,1982),如溶酶体 pH 的检测,该探针也不能透过质膜,但可通过细胞胞饮作用进入溶酶体,因此应选择分子质量稍小的葡聚糖(Dextran)。

五、细胞内活性氧

活性氧(active oxygen species)可影响细胞代谢,与蛋白质、核酸、脂类等发生反应,有些反应是有害的,因此测量活性氧在毒理学研究中有一定的意义。根据检测活性氧的不同可选择不同的荧光探针。常用荧光探针有二氯二氢荧光黄二乙酸盐(2,7-Dichlorodi-

hydrofluorescein diacetate, H2DCFDA), 其原理是不发荧光的 H2DCFDA 进入细胞后能被存在的过氧化物、氢过氧化物等氧化分解为二氯荧光黄 (dichlorofluorescein, DCF) 而产生荧光, 其反应灵敏到 10~12 mol/L 水平, 荧光强度与活性氧的浓度呈线性关系。

六、细胞间通讯

LSCM 可采用荧光光漂白恢复 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 技术检测细胞缝隙连接通讯 (Grazul Bilska 等, 1994), 该方法的原理是一个细胞内的荧光分子被激光漂白或淬灭, 失去发光能力。而邻近未被漂白细胞中的荧光分子可通过缝隙连接扩散到已被漂白的细胞中, 荧光可以逐渐恢复。由于光漂白过程是不可逆的, 因此可通过观察已发生荧光漂白细胞其荧光恢复过程的变化量来判断细胞缝隙连接的通讯功能。采用 FRAP 技术检测细胞间通讯常用荧光探针是 6-羧基荧光黄乙酰乙酸盐 (6-carboxyfluorescein diacetate, CFDA)。需用其酯化形式 CFDA-AM。该技术可用于研究胚胎发生、生殖发育、神经生物学、肿瘤发生等过程中缝隙连接通讯的基本机制和作用。由于某些毒性物质尤其是促癌物可影响缝隙连接介导的物质运输, 因此该方法也可用于鉴别对缝隙连接作用有潜在毒性的化学物质。

七、细胞膜流动性

采用荧光光漂白恢复 (FRAP) 技术还可对细胞膜流动性进行研究 (Yguerabide 等, 1982)。利用 NBD-C6-HPC 荧光探针标记细胞膜磷脂, 然后用高强度的激光束照射活细胞膜表面的某一区域 (1~2 μm), 使该区域的荧光淬灭或漂白, 再用较弱的激光束照射该区域。可检测到细胞膜上其他地方未被漂白的荧光探针流动到漂白区域时的荧光重新分布情况。荧光恢复的速率和程度可提供有关的信息, 如用于观察细胞受体介导内吞过程中膜磷脂流动性的变化情况。NBD-C6-HPC 在温度稍高时可能会进入细胞内, 因此荧光染色和测量时应在低于常温的环境下进行。

八、细胞亚微结构 (细胞器探针)

一般的光学显微镜由于分辨率有限, 在观察细胞器结构时受到一定的限制, 而 LSCM 可获得较一般普通光学显微镜分辨率高的细胞内线粒体、高尔基复合体、内质网、溶酶体等细胞器图像, 同时还可动态观察活细胞状态下细胞器的形态学变化情况,

此外还可通过光学切片即断层扫描技术进行三维重建, 显示细胞器的空间关系及其变化。适用于线粒体的荧光探针较多 (Haugland, 1996), 如 Mitotracker、DA SPMI、DA SPEI、JC-1、罗丹明 123 等。高尔基复合体常用的荧光探针有 NBD 酰基鞘氨醇 (ceramide)、BODIPY 酰基鞘氨醇。内质网主要用 Dil、DiOC6(3)。溶酶体的荧光探针有 DAMP、neutral red。有报道选用 NBC-PC 标记细胞膜、Mitotracker 标记线粒体、Hoechst 33342 标记细胞核 DNA, 同时显示细胞的三部分结构。

九、标记抗体、配体等常用的荧光探针

LSCM 不仅可用免疫荧光分析固定的细胞或组织切片, 还可用于分析活细胞, 得到特异性抗体或其他荧光免疫探针识别靶分子的表达、定位、分布变化等信息 (Farina 等, 1998)。标记抗体、配体或蛋白质等较通用的有异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC), 在碱性条件下 FITC 的异硫氰酸基与免疫球蛋白的自由基经碳酰胺化而形成硫碳胺基键, 成为标记荧光免疫球蛋白, 即荧光抗体。一个 IgG 分子上最多能标记 15~20 个 FITC 分子。但 FITC 易产生光漂白现象, 发射带较宽, 故在用于双标记时会和其他染料的发射带重叠, 且带负电荷, 对 pH 值的变化较敏感, 因而限制了其在活细胞检测中的应用。目前较 FITC 优越且备受推崇的荧光探针是 Bodipy 类 (Haugland, 1996), 它可用于标记蛋白质、核苷酸、葡聚糖、酶类、脂肪酸、各类受体的配体等, 其光稳定性好, 发射带窄, 和其他荧光探针的重叠更小, 利于多重标记。Bodipy 的亲脂性好, 在不同 pH 值条件下较稳定, 从而有利于用于生物膜、受体、细胞骨架蛋白等活细胞动态方面的研究。

十、检测酶活性的荧光探针

LSCM 除了具备荧光显微镜检测荧光酶细胞化学的作用以外, 在检测活细胞酶活性动态变化方面有着无可比拟的优势。通过对细胞施与不同的处理因素可检测细胞内相应的酶被激活或灭活的动态变化过程。有的酶荧光探针是自身就可发出荧光、有的是与酶结合后发出荧光、有的则是被酶分解后发出荧光。例如用荧光探针 monochlorobimane (MCB) 测量细胞中的谷胱甘肽转移酶 (GST), MCB 与 GST 结合后才可发出荧光。由于 GST 能保护细胞免受自由基损害和化学损伤, 因此该方法可用于

细胞毒理学、细胞抗药性等方面的研究。

以往记录荧光信号的仪器主要有荧光显微镜、荧光分光光度仪、流式细胞仪等。与这些仪器相比, LSCM 不仅可广泛用于荧光定性、定量测量, 同时具备细胞断层扫描、三维图像重建、活细胞动态荧光监测、荧光光漂白恢复、激光显微外科等方面的功能 (Tamotsu 等, 1997)。此外, LSCM 还可用于多重荧光染色的检测, 如同时观察细胞膜、细胞器、细胞核结构, 也可同时检测细胞内游离钙和 pH 或膜电位

等的动态变化, 如 Bio-Rad 1024 LSCM 有三个检测器可进行三色的同步标记和检测。总而言之。LSCM 可进行多参数、多功能的研究, 且快速准确、自动化程度高, 是检测组织细胞荧光信号的最为新颖和先进的技术手段。

LSCM 是检测生物荧光信号的最新技术。不仅广泛用于荧光定性、定量测量, 还可用于活细胞动态荧光监测、组织细胞断层扫描、三维图像重建、共聚焦图像分析、荧光光漂白恢复、激光显微切割手术等。

第三节 激光扫描共聚焦显微镜中荧光探针的使用

一、概 述

本节主要叙述荧光探针的种类、注意事项、应用技巧、操作规程以及荧光探针使用的一般建议, 尤其着重介绍用于 LSCM 的荧光探针。

关于荧光和荧光技术的叙述可参考本书的有关章节, 也可在专门的使用手册中找到详细的资料 (Johnson, 1996)。一些公司 (如 Molecular Probes) 的 Web 页上可查阅到相应荧光探针的光谱、使用注意事项、材料的安全数据表 (Material Safety Data Sheets, MSDS) 以及荧光探针商品目录的最新更新版本。一些 LSCM 应用的荧光探针 (Brelje 等, 1993; Wells 和 Johnson, 1994; Tsien 和 Waggoner, 1995; 一些激光激发的探针可从以下网址查询: <http://flosun.salk.edu/fcm/fluo.html>) 和一些新的染料不断被开发出来 (Patterson 等, 1997; Millard 等, 1997)。

在以下的叙述中, 所选用例子中应用荧光探针, 提供的相关资料可能并不全面, 必要时, 详细的操作步骤请查阅相应文献。另外, 本章讨论的荧光探针仅涉及单光子激发的共聚焦显微镜, 对于一些在多光子激发时激发光谱相似, 但在单光子激发时, 其激发光谱不同的荧光探针应特别注意 (Xu 等, 1996)。多光子激发的 LSCM 是一种用途广泛的新技术。多光子激发 LSCM 采用短波长、高强度脉冲的红外线 (IR) 照射标本。在焦点上, 光子的密度足够高, 可保证荧光团可同时吸收 2 个或 2 个以上的光子。与单光子激发情况相似, 吸收了 IR 光子能量的荧光团, 则通过发射光子再回到基态。与单光子 LSCM 相比, 其激发局限于很小的区域, 因此光漂白作用和发生其他光化学反应 (包括笼锁化合物的释放) 的范围也大大缩小了。此外, 因为所有的发射光线都是由很局限的区域内产生的, 因此不需要采用针孔来

消除来自焦点以外的光线。从原则上将采集的发射光的量大大增加。多光子技术的简要描述可查阅 IMR 的 Web 页 (<http://www.bocklabs.wisc.edu/imr/facility/2p.htm>)。另外, 还应注意一些紫外光 (UV) 激发的荧光探针, 如 Indo-1 也可通过这种方法激发, 而不需使用 UV 照射, 也不要 UV 滤光片校正。这种方法确实具有一定的局限性: 对于给定的荧光探针, 采用多光子激发, 其空间分辨率比应用单光子激发的 LSCM 低。而且, 样品中如存在吸收激发波长的 UV 发色团, 可能产生高温造成标本的损伤。然而, 目前这一技术广泛应用的主要障碍是仪器的耗费十分昂贵, 尤其是模式-锁激光器 (mode-locked laser) 的消耗。

1. 购买荧光探针的一般考虑 购前最好先通过荧光探针供应商了解所要使用荧光探针的特点。在一些公司的荧光探针包装附件材料非常详细, 提供荧光探针使用和操作的描述。在购买荧光探针前, 最好能查阅出版的文献资料。不要仅仅依赖供应商引述的一些参考文献。这些文献可作为入门的参考, 但最好能检索到与你的研究内容密切相关的文献, 而且应尽量找到最新的文献。通过应用特定的检索指标 (如 Medline 中的 "CAS NO") 查找荧光探针文献。"CAS NO" 指的是化学文摘号 (Chemical Abstracts number), 是用 "惟一的" 5~9 个数字来代表一种特定的化学物质。该数字常分配给这种化合物的天然形式, 偶尔其盐类形式也被分配给单独的 CAS NO。CAS 号也被分配给一类物质, 如葡聚糖。对于酶类, 则以 Enzyme Commission of the International union of Pure and Applied Chemistry 分配的酶的 EC 编号开始。在老的条目中, RN (登记号) 字段就是 CAS 号。特定的数据库可利用一些检索条目进行检索。索引 (Index) 是数据库记录引用条目的一部分 (如, "AU" 指作者)。Medline 中有用的索

引除“CAS NO”外,还包括“CH”(化学名)、“XCH”(准确的化学名),EC 编号可用来查找其“CAS”号,如查找“CAS NO EC2.7.1.2”检索的是葡萄糖激酶的文献。以完全的方式可显示所有的索引内容,包括“CAS NO”和 EC 编号。其他数据库,如 Biosis,可使用化学名作为关键词进行检索,但没有特定的化学名索引。总之,在购买荧光探针前,一定要确定你购买探针的目的,并根据需要进行购买。

2. 定义和概念 荧光团 (fluorophore)、荧光染料 (fluorochrome, fluorescent dye, fluor) 指的都是产生荧光的分子。荧光探针常常是指与另一个分子结合的荧光团,尽管有时也指荧光团本身。荧光团可能发生的荧光强度是其光量子产率 (Q_f , 无单位,典型的为 0.05~1.0) 与其摩尔激发系数 (ϵ , $\text{cm}^1 \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 典型的为 $10^4 \sim 2 \times 10^5$) 的乘积。如藻红蛋白与其他多种荧光团每蛋白单位的激发系数为 $10^6 \text{ cm}^1 \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 Q_f 可由荧光团吸收光子和发射光子的比率算出,这里 ϵ (荧光团的 1 mol/L 溶液通过 1cm 光路的光吸收作用) 指的是在单波长下的光吸收,通常在这种情况下,其光吸收作用最大,被定义为 ϵ_{max} 。

二、探针选择

考虑以下几方面:①一般情况下,选择的荧光探针应与要研究的结构有密切的关系,可提供较强的荧光信号,光漂白作用缓慢并无毒性。在用于 LSCM 的荧光探针,还要考虑激光的激发波长、探针的激发和发射光谱和用于采集的共聚焦显微镜滤片组的设定等。选择可被 LSCM 激光器的激光波长所激发的荧光探针,荧光探针的最大吸收波长(差不多在所有情况下,荧光探针的激发光谱与其吸收光谱相同),应在激光波长上或尽量靠近其波长范围。激发波长不一定正好位于荧光探针的最大吸收波长处,只是对于一定的荧光探针来说,在最大波长处激发其激发系数最大。②应注意检查荧光探针在溶剂系统中的发射光谱,选择的溶剂系统与要用的溶液近似。许多荧光探针的最大激发/发射光谱是使用非生理性溶剂测得的,许多荧光探针的发射光谱随着探针环境的不同而成函数改变。激发光谱较少受影响,但也有例外,如 Nile Red 的激发和发射光谱随着溶剂极性的降低,偏移到更短的波长范围。③选择荧光强度较强的荧光探针。与单独使用光量子产生率作为测量指标完全不同,使用荧光强度作为指标非常重要。如荧光黄 ($\epsilon \approx 70\,000$, $Q_f \approx 0.9$) 和 Cy5 ($\epsilon \approx 200\,000$, $Q_f \approx 0.3$) 光量子产生率差别很大,

但其荧光强度几乎相同。在采集时,降低光度学的增益 (gain) 有利于降低噪声。尽管荧光探针的实际 Q_f (在某种程度上,还包括其 ϵ) 依赖于实验条件。在分析情况下得到的较高的 Q_f 和 ϵ 数值,在实际应用中常很难达到。④当在同一实验中要应用 2 种或 2 种以上的荧光探针时,注意它们的激发和发射光谱应尽量分开,避免发生发射光谱的重叠。“渗透 (bleedthrough)”指的是在较长的波长通道中检测到某些短波长荧光探针信号的情况。渗透现象可做某种程度的补偿。例如,可从一幅图像中经加权减去另一幅图像,但成功率不高 (Brelje 等, 1993)。⑤通过校正相应的荧光滤片,以适当的效果采集荧光探针的发射光谱。应注意“通用”的滤片组可能与你使用的荧光探针的光谱并不匹配。还应注意通过光学部分 (包括滤片) 的移动或替换可显示不同的荧光探针图像。如选择不当,也可能造成你观察到的结果,其实并不是实验结果的真实再现。⑥如组织在探针应用后需要固定,应选择那些能够耐受固定剂的荧光探针。否则,在固定过程中,荧光将被洗脱。如,标准的葡聚糖不容易固定,在固定过程中将被洗脱,但葡聚糖赖氨酸固定的变型可有残留。

三、荧光探针到达后的保存

荧光团可能对空气、水、温度和 (或) 光线敏感。一些以混合物形式运送的荧光团时间过长将发生降解 (如水解)。①注意维护你的所有荧光探针。在荧光探针到达后,应注意填写其 MSDS 的化学名、生产 (供应) 商、商品目录号、分子质量和储存条件等。②在订购荧光探针前确定荧光探针必须的储存条件,最好能在冰箱内找到一个放置干燥器的空间。储存探针,首先应在容器周围包裹银箔,但不要包裹帽部。留出一定的距离使得你在每次打开容器时,不必每次都打开银箔。而且反复的打开和再包裹可能造成银箔的损坏,导致漏光。并可在容器上贴上白色标签,写上荧光探针的名称和收到日期等内容。③不要机械地将所有荧光探针都在冰箱冷冻储存,某些荧光探针和含有荧光探针的成分是不可冷冻的。如荧光低密度脂蛋白 (LDL) 复合物和碱性磷酸酶标记的链亲和素等。④在荧光探针到达后,要检查荧光探针的纯度,尤其是向新的供应商定货时。探针的纯度在不同的制造厂家间差别很大,有时在同一厂家的不同批号间也存在差别。

四、将荧光探针制备成溶液

通常荧光探针的水溶液不稳定 (易引起水解作

用),其水溶液比其干品形式对光和热更为敏感。通常最好是将吸水性的探针以干品保存,在使用前再制备成溶液。并将溶液避光保存。①处理和用荧光探针时养成双手带手套的习惯。因为许多荧光探针是致突变剂或潜在的致突变剂(可与核酸结合),如 DAPI(4',6-二氨基-2-苯基的吲哚),PI(碘化丙锭),因此处理时应特别注意。另外,一些溶剂,如 DMSO 可增加分子对皮肤和其他组织的穿透性。②是应用新鲜配制的缓冲液,陈旧的缓冲液其染色效果常常不佳。③对于某些化合物(如某些肽类和蛋白质的盐类形式,或某些核苷酸衍生物),其确切的分子质量不知道,其浓度应在制备好溶液后加以确定。可通过测量其吸光度和使用激发系数来计算其浓度。即使用 Beer 定律, $c=A/\epsilon b$,此处 A 为吸光度(无单位), ϵ 为吸光系数(激发系数,单位 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),b 为光路长度(1cm),c 为溶液浓度(mol/L)。④可通过轻度改变 pH 值,加入少量温和的去垢剂,和(或)通过强烈机械搅拌,使荧光探针变成水溶液。可通过应用温和的碱性缓冲液,如 0.1 mol/L 的碳酸氢盐改变 pH 值。加入少量去垢剂(如,Pluronic(tm) F-127,一种非离子去垢剂,或 Triton X-100)。但应注意这些方法可降低染色效果,也不主张在去垢剂溶液中长期保存。当然,通过用吸管来回抽打、振荡器搅拌、超声乳化和中等度加热(40~50℃)也可制备荧光探针溶液。⑤将溶液抽真空 1~2min,可除去溶液中的溶解氧。注意溶液要避光,并且保证溶液能暴露于真空条件下(如应松开容器的帽)。对于挥发性的溶剂不建议使用该方法。⑥检查荧光探针溶液是否存在不溶性颗粒。如果有不溶性颗粒,可通过 12 000g,离心 5min,而后用 Whatman 2 # 滤纸过滤除去。或将溶液经 0.22 μm 微孔滤膜加压过滤。⑦离子探针的校准(正)液必须无重金属离子。重金属离子,如锰,将影响探针的亲力和荧光强度。金属螯合剂,如钙离子螯合剂 TPEN,有时可用来去除不想要的金属离子。应注意近来在缓冲液成分中发现大量的金属杂质,应确保缓冲液盐类的高纯度或有效的去除了金属离子。⑧用于负载探针乙酰甲基酯(AM)形式的缓冲液应不含血清,也不应含有任何初级或次级胺。因为血清中常含有酯酶和脂肪族的胺,可裂解 AM 型酯化物影响探针的负载。

五、探针溶液的储存

①脂溶性的探针常可在冷冻状态,以浓缩的储存液形式,安全保存很长时间。常为 1~5mmol/L

的有机储存液。工作液可在使用前,通过适当的缓冲液或溶液稀释储存液而制备,常用浓度为 1~5 $\mu\text{mol/L}$ 。因需要反复冻融探针母液来制备工作液,这样增加了探针在空气和湿度中暴露的机会。因此,可将母液分装成若干等份后储存,每次应用时融化快,节省时间,并可防止反复接触空气等不良因素。②应用时应让储存液完全融化,不应只使用先融化的一部分,而把余下的部分重新冻结。先融化的部分通常含有探针的浓度比仍处于冻结的部分高。溶液完全融化后,应重新混匀,并检查是否存在沉淀或聚集物(如浑浊度)。在打开溶液前,应先让溶液复温到室温条件下。③蛋白质性探针(如标记的抗体)在储存过程中可产生聚集,这些聚集物可引起非特异性染色。相似的,某些探针在冷冻过程中还可发生沉淀,如 PI。这些聚集物可通过离心除去。用离心上清液染色,可使非特异性染色得到控制。在探针溶液复温到室温下,检查是否有沉淀存在,如有沉淀存在,可通过超声乳化、涡流混合重新溶解这些荧光染料。④许多探针的 AM 形式(如 fluo-3, rhod-2)非常容易水解。任何储存不当或储存期在 6 个月以上荧光探针溶液,在使用前都应进行分解状况鉴定。确定荧光探针的 AM 形式是否水解,可在比色杯中,用 DMSO 储存液稀释到 2~10 $\mu\text{mol/L}$,在比色杯的缓冲液中含有 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 钙测定液,而后测定其荧光强度。而后将钙浓度增加到 5 $\mu\text{mol/L}$,再测定其荧光强度。因为只有荧光探针的水解形式可与钙结合,如荧光强度增强,提示可能出现了 AM 的水解。探针的酸性(水解)形式无法透过细胞膜进行扩散。可购买这些探针的小包装,并将这些探针适当保存。⑤应用前应检查探针的纯度。某些探针在储存过程中可发生分解;如,标记的葡聚糖时间过长时,将释放出少量游离染料,如释放的游离染料多,在应用前必须进行再纯化。异硫氰酸盐如 FITC 也会发生变质。⑥如用闪烁瓶储存探针溶液,注意某些染料可与帽里面的金属箔起反应。还应注意某些染料与玻璃比与塑料的结合更容易,因此玻璃储存容器对探针溶液的储存,并非总是最好的。

六、做好背底检查

在应用 LSCM 时,造成人工假象的一个重要因素可能是自发荧光,它使图像的信噪比降低。生物学自发荧光通常是由激发波长短于 500nm 的光线引起。然而,某些标本(如含有大量叶绿素或卟啉的标本)在红外光照射下将产生荧光。自发荧光的性

质和程度也依赖于标本制备的情况 (Bacallo 等, 1995)。

- ① 避免用乙醛固定, 尤其是使用戊二醛固定时, 标本将产生自发荧光。用苦味酸和过碘酸盐也会产生自发荧光。假如必须乙醛固定, 在染色前, 用 0.1% 的氢硼化钠 (用 pH8.0 的 PBS 配制) 洗涤 30min 可降低自发荧光 (Bacallo 等, 1995)。
- ② 通过仔细选择滤过截留物 (cutoff), 或选用长波长探针, 可减低或去除自发荧光。缩窄通带 (bandpass) 可降低探测的荧光强度, 使用远红区 (high-red) 荧光团更好的。但应注意, 长波长的使用, 可影响分辨率, 并引起光学反应 (Cullander, 1994)。
- ③ 在图像采集前尽可能多地减低或去除来自于游离的或非特异性结合的荧光探针 (“试剂背底”) 产生的荧光信号。如, 由于 fluo-3 (或其他的荧光团衍生物) 的泄漏造成的 “试剂背底” 可通过向其外部培养液中加入抗荧光团的抗体消除。在图像采集前, 应该用适当的缓冲液 (如, 溶解探针的溶液) 冲洗细胞或组织, 可洗去与样品结合不紧密或非特异性结合的探针。
- ④ 当应用比率探针 (ratiometric probe) 时, 为计算在任何点上的比率, 必须进行背底荧光校正。
- ⑤ 在所有的准备步骤后, 都应检测标本的自发荧光。如前所述, 固定可引起自发荧光, 加热、加入某些缓冲液、固定时间过长和许多其他因素等也可引起自发荧光。

七、标 记

主要讨论 LSCM 所使用荧光探针的注意事项。

- ① 经过反复实验确定用于探针负载的最佳温度、孵育时间和探针浓度。无论如何, 应尽量使用较少的荧光染料, 在室温下进行负载 (而不是在样品的最佳的生理温度)。如离子探针的葡聚糖交联物较少发生区室化或渗漏, 但应通过侵入性过程负载入细胞, 对于被测定的离子常有较低的亲和性。抗体标记物的合适浓度应通过实验确定, 在大多数情况下, 浓度为 5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Ausubel, 1995)。
- ② 离子探针 (如, pH 和钙离子) 应在介质中进行校正, 那些介质与实验所用的介质非常类似。进行原位 (穿透细胞) 校正通常是最好的方式。对于 SNARF-1, 一种 pH 测定的比率探针, 可通过使用一种离子载体或其他穿透剂, 使细胞内和已知外部培养基的 pH 达到平衡进行原位校正。用于穿透细胞的试剂包括 A-23187、ionomycin、尼日利亚菌素、洋地黄皂甙和皂角 (素) 甙。
- ③ 当应用离子探针的 AM 酯形式时 (如, BCECF、fluo-3、rhod-2), 应检查探针的区室化 (compartmentalization) 现象。离子探针常以 AM 酯形式负载入细胞, 进入细胞后被胞浆内的酯酶裂解形成

荧光指示剂, BCECF [2', 7'-双-(2-羧乙基)-5-(6)-羧基荧光黄] 则是以这种方式进行的。如果 AM 酯易位 (translocate) 至细胞内小区, 仍可转化为荧光形式, 然而这种幽避指示剂 (sequestered indicator) 对胞浆内离子水平的变化不再有反应。

- ④ 增加离子探针的浓度可对离子进行缓冲, 并干扰细胞的功能。在特定系统中探针负载的 “剂量依赖” 曲线可用来确定最大允许负载浓度。典型的探针细胞内浓度为 30~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。
- ⑤ 在应用前, 应确保探针完全混合/溶解在探针的工作液中。将非挥发性的探针溶液抽真空 1~2min 除去溶解氧, 并检查是否存在不溶性颗粒。
- ⑥ 常规的细胞或组织染色对荧光探针的染色有影响, 有时可使荧光淬灭。
- ⑦ 在染料负载后, 用缓冲液洗涤标本, 将与细胞膜非特异性结合的染料洗去。
- ⑧ 最后, 还应记住探针可能以意外的方式能参与细胞的生化反应。如, 罗丹明 123 是一种 P 糖蛋白底物。

八、荧光信号的检测

- ① 应注意采用最小的激光强度来激发。
- ② 采集图像时, 不要使激发强度饱和, 也注意不要在探测阈值之下。尽管在图像采集后, 仍可进行反差调节, 使某些特定的结构更容易看到, 但图像的信息量是相同的。相似的, 超过饱和状态的情况下, 无论其真实的信号强度多强, 总是被记录为最大的像素值 (即 255)。
- ③ 增加标记物的量 (即加入更多的探针, 但注意应在淬灭浓度之下) 可使检测的荧光强度增强, 但注意并不呈线性关系。
- ④ 不要用过强的照明强度过度激发探针。在点扫描共聚焦显微镜激光强度可能很容易引起探针的激发饱和, 尤其是具有长衰减时间的荧光探针, 如嵌二萘 (pyrene)。检测的荧光强度与荧光探针的浓度不再呈函数关系 (Pawley, 1995), 信噪比降低。照明强度的增强也引起光漂白
- ⑤ 使用多种荧光探针时, 检查荧光从较低的通道向较高通道的渗透。如渗透不能避免, 确定其发生的位置 (即在较高通道中检测到的由较低通道荧光探针所标记的结构)。假如可能, 在同一部位, 也使用较低的波长采集第一幅图像, 再用较长的波长采集第二幅图像, 最后, 使用两种波长采集第三幅图像。将第一幅和第二幅图像合并, 而后与第三幅图像比较, 这样可以确定渗透发生的部位。
- ⑥ 当使用两种或多种荧光探针进行荧光双标或多标时, 较短波长荧光探针的发射光谱与较长波长荧光探针的激发光谱重叠, 则可发生荧光共振能量传递 (fluorescence resonant energy transfer, FRET) (Chapple

等,1988)。如果荧光探针光谱足够靠近的话(根据荧光探针光谱特征不同,范围为10~100Å),较短波长荧光探针的激发态可与邻近的较长波长探针的基态耦合并激发它。换言之,较短波长荧光探针激发的波长,却是较长波长荧光探针的发射波长。⑦要注意残留的未标记探针和造成人工假象的荧光碎片存在的可能性。高强度的照射和细胞酯酶可引起某些探针裂解,裂解产物本身可产生荧光。如线粒体染色所用的罗丹明B己烷基酯,可用绿色波长的光激发,最大发射波长为578nm,它可被激发光裂解,其裂解产物也可发出荧光,其波长范围在荧光黄的波长范围内。⑧不要混淆检测和分辨率。分辨率受到激发光线波长的限制,那就是即使200nm的脂质体,用可见光也无法分辨。然而如果其荧光发射强度足够却能被检测到。类似的,肉眼在夜晚可发现星星,但却不能分辨星轮(stellar disk)。它们看起来来源于同一点。对于脂质体来说,就是无法将完整的脂质体与其标记的片段分开。但却可以检测到。

九、光漂白

如果增加每一像素的激发强度和(或)采集时间,全部荧光信号(图像的亮度)可增强。但在实际应用中,光化学反应(包括光漂白)的存在,使标本受光照射的量受到限制。光漂白是由于受到光线的过长时间的照射,而引起的荧光不可复性的破坏,与分子氧的存在有关。①开始图像采集前,在标本的非关键部位检查光漂白的速率。在采集关键的图像前,调整好激光的强度和增益。②在固定标本过程中使用抗氧化剂或荧光抗衰减剂。尽管这决不是惟一的好的光保护剂(Biloh和Sedat,1982),但对于LSCM来说,用10% PBS配制的0.1% p-苯二胺(PDA)和用缓冲液配制的90%的甘油是良好的抗衰减剂(Schuman等,1989)。然而,p-苯二胺有致毒性,应用时应特别注意防护。对于活标本,抗氧化剂如维生素C(0.1~1.0mg/ml或更高浓度)可作为还原剂在培养液中使用。但也应注意,最初的标记和衬染可能影响抗衰减剂的性能。③在活体标本制备过程中,为使光漂白作用降到最低,在能够耐受的情况下,应降低氧分压或氧浓度。例如,可在培养液中通入氮气或氩气。在培养液中加入耗竭氧的酶(如Oxyrase)也有一定作用。④在某些共聚焦显微镜,软件的放大("zoom"增大)可使光漂白速率增加。假如扫描更小范围(更大的zoom值)和扫描整幅图像(zoom=0)所用的时间相同,则较小的图像

单位区域内受到的光照强度(分配的总能量)比整幅图像单位区域内受到的光照强度要高,因此在zoom值增大(即受照范围缩小)时,更容易产生光漂白。避免产生这种现象的一种方法是先在zoom为零的情况下,采集整幅图像,而后再对此数字图像进行放大。⑤在较厚的标本进行Z扫描图像采集时,据认为荧光探针的分布可能多少有些不均匀,其荧光强度随距标本表面的距离迅速下降,因此考虑沿"反方向"进行图像采集。即先采集最大深度(离标本表面最远)的图像,而后再依次向标本表面移动采集。在点扫描LSCM,在整个标本都可发生光漂白,而不是仅仅发生在图像采集的光学切面上。假如从标本的顶(上)部开始采集的话,最深处的标本切面可能在图像采集前就已发生光漂白,而无法得到相应的图像。从深处开始采集,而后逐步移向表面,因为最表面的切面,其荧光标记强度也较强,可经受较长时间的光照,对光漂白有一定耐受作用。⑥根据光毒性确定最好应用哪种荧光探针。如长波长钙离子指示剂钙绿-1比fluo-3的光毒性小。

十、环境影响因素

探针的环境对荧光有强烈影响,包括溶剂的极性(包括任何膜或膜包结构的内部和分子内部的区域)、pH和荧光淬灭物质的存在(包括荧光探针本身)。淬灭是分子的相互作用引起的光量子产生量的降低。①许多探针的发射光谱依赖溶剂的极性。在某些情况下,探针在水中完全无荧光。尼罗河红(Nile red)、乙锭同二聚体(ethidium homodimer)、碳菁、NBD、PI、EB和二苯基己三烯(DPH)对极性高度敏感。在水溶液中,其光量子产生量低,当它们进入疏水环境与水隔绝后,或与活质分子结合后,其荧光强度大大增强。②某些探针的激发和发射光谱依赖于溶剂的极性,如尼罗河红。③为获得最大的荧光强度,固定标本用pH敏感的探针进行染色时,如使用荧光黄和某些荧光黄衍生物,应用适当pH值的水溶性介质封片,对于荧光黄其pH值为8或8以上。荧光黄的pK_a约为6.4,当其介质变为酸性时,其荧光发射急剧下降。几乎其所有衍生物都显示一定的pH敏感性。④对于储存时间过长的探针溶液或培养液,不要想当然认为其pH保持不变,而应进行测试。如在冷冻后Tris缓冲液的pH增加。如在室温下制备的pH8.0的缓冲液,在4℃时,其pH值增加到8.5。⑤探针溶液和培养液的pH影响染色效果、探针的稳定性和荧光的发射强度。⑥带有芳香族氨基酸残基的蛋白质可使某些荧光团的



荧光淬灭,特别是荧光黄和 NBD(7-硝基亚苄基-2-氧(oxa)-1,3-重氮)。这种影响在某些情况下可部分消除,如在进行生物素化抗体标记结束后,用荧光黄标记的卵白素与生物素结合,可使荧光强度大大增强(Emans 等,1995)。^⑦当荧光探针的浓度太高时,可发生自我淬灭或浓度淬灭,当多种荧光探针标记同一部分时也会发生淬灭。对于荧光黄来说,每一抗体分子可结合 2~4 个荧光团。

十一、仪器因素

仪器本身的因素也可影响信噪比、分辨率、图像的整体质量。以下对某些因素进行讨论。^①使用折射指数与你要观察的标本折光指数相近的封片液封片。否则图像的质量将因折光指数不相配而受到严重影响。如用水浸镜采集含水(活)的标本图像时,使用了观察固定组织的镜油封片。提高分辨率,注意折光指数的相配是非常关键的。^②使用低放大倍数和高数值孔径(NA)的物镜,采用软件放大(即在 Bio-Rad 公司的 LSCM 中增大“zoom”值)而不是通过采用更高倍数和相应 NA 的物镜。采集的光线强度随着 NA 的平方而增加,随着放大倍数的平方而降低。明确地,一个 60 倍,NA 为 1.4(60×/1.4)的物镜比 100×/1.4 的物镜更可取。高放大倍数的物镜,主要是由于光线要穿过大量的光学元件,因此得到的图像也更“暗”。^③将显微镜的光学部分和探测器校正以适应要检测的荧光探针。UV 探针需要 UV 物镜和 UV 反射镜(Wells 和 Johnson,1994)。许多老的系统使用对远红外区(high red)敏感性差的光电倍增管(PMT),其光学部分不能阻断或足够地修正远红波长(Cullander,1994)。^④共聚焦滤光片应与使用的荧光探针相配。理想的发射滤片的带宽 80%~90%应处于荧光探针发射光谱的范围内。^⑤检查所使用的所有光学系统校正情况,所有与成像有关的因素(物镜、滤光片等)都应使用得当。对于双标或三标图像,应用荧光微球在合适的波长进行检测是一种方便的方法,可检查各通道的情况。简单地说,就是将来自于不同通道的图像进行重叠,

观察它们是否可准确叠加。这部分内容在荧光探针和研究用化学物手册(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals)有详细描述(Haugland,1996)。^⑥如果存在出乎意料的模糊或无图像,应沿着样品光路逐步检查,寻找引起故障的可能机械原因。一般检查包括物镜的内光阑、光闸和(或)缝隙是否部分或全部关闭、光路中是否存在阻断光线的滤光片等。^⑦用常规方式激发时,如寻找感兴趣的结构,可能出现红色的标记较暗的情况。人视觉的最高上限为 750~770nm,视网膜对 650nm 以上光线的敏感性较差。由某些远红外荧光团(如花青类,Cy5 等)发射的荧光的大部分是肉眼看不见的。换句话说,在某些情况下,用肉眼通过普通荧光显微镜对荧光强度进行准确评价是不可能的。然而,大多数 LSCM 能检测的红色范围远比人眼要广泛得多。^⑧在标本制备和观察的过程中,避免漫不经心的沾染荧光性物质。加拿大香脂、不同种类的透明指甲抛光剂、某些环氧树脂和某些用于防止锋利工具(如剃刀)锈蚀的机油都有荧光。

十二、以 FITC 作为 LSCM 探针的例子

FITC 是一种应用最为广泛的用于制备标记物的荧光探针。其主要优点是光量子产生量高,良好的光吸收作用和荧光强度高。在交联后,其发射光谱不发生显著偏移;具备良好的水溶性;非特异性结合低;其最大激发波长为 490nm,与氩离子激光的波长 488nm 非常接近;其化学性质研究充分,其使用的许多操作步骤都可在文献中找到;使用标准的共聚焦显微镜滤光片可获得良好的检测效果。然而,其不足之处也非常明显:其荧光对 pH 和极性溶剂敏感;其发射光谱与生物学自发荧光的波长范围重叠;可迅速地产生光漂白;在交联后易引起荧光淬灭;其发射光谱的尾部非常长,在多标记实验时,容易渗透至较长波长的通道。当然,FITC 在 LSCM 是一种有用的荧光探针,但研究者应知道这些局限性的重要性。



天津市科协资助出版

靶向生物 荧光探针制备技术

费学宁 等著



科学出版社

靶向生物荧光探针制备技术

费学宁等 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是关于生物荧光探针结构和设计原理、荧光探针分子的设计合成、荧光探针的生物标记技术及应用的一本专著,汇集了作者近年来在靶向生物荧光探针制备技术领域的一些主要研究成果。书中以生物荧光探针靶向标记原理为主线,系统阐述了荧光染料和功能量子点的设计合成、有机荧光染料探针分子的功能性修饰、荧光探针生物标记技术及应用等方面的科学问题及技术问题。本书内容丰富、资料翔实,内容涉及多交叉学科,为靶向生物荧光探针的构建设计、制备技术以及相关技术研究提供参考。

本书适合高等院校材料科学与工程、化学化工等专业本科生和研究生学习,对相关领域的同行也有一定的参考意义。

图书在版编目(CIP)数据

靶向生物荧光探针制备技术 / 费学宁等著. —北京:科学出版社,2013

ISBN 978-7-03-037160-7

I. ①靶… II. ①费… III. ①荧光探头-制备 IV. ①O482.31

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 050456 号

责任编辑:周巧龙 张 星 / 责任校对:邹慧卿

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:王 浩

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京佳艺恒彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年3月第一版 开本:B5(720×1000)

2013年3月第一次印刷 印张:23 1/4

字数:454 000

定价:98.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

目 录

前言

第 1 章 生物荧光探针	1
1.1 荧光探针的定义及分类	1
1.1.1 有机小分子荧光探针	1
1.1.2 纳米荧光探针	4
1.1.3 基因荧光探针	5
1.2 荧光探针的特性	6
1.2.1 荧光探针的选择原则	6
1.2.2 影响荧光探针性质的因素	8
1.3 荧光探针的结构及设计原理.....	10
1.3.1 荧光探针结构	10
1.3.2 荧光探针设计原理	10
1.4 生物荧光探针应用研究进展.....	11
1.4.1 荧光探针在组织学中的应用	12
1.4.2 荧光探针在微生物学中的应用	13
1.4.3 荧光探针在药学方面的应用	15
1.4.4 荧光探针在活细胞标记中的应用	16
1.4.5 荧光探针在活体成像中的应用	17
1.4.6 荧光探针在肿瘤标记中的应用	18
参考文献	20
第 2 章 肿瘤常用检测方法及荧光标记技术	23
2.1 肿瘤的特征.....	23
2.1.1 肿瘤的形态学特征	24
2.1.2 肿瘤标志物	28
2.2 肿瘤的常用检测方法.....	38
2.2.1 肿瘤的临床诊断	38
2.2.2 肿瘤影像学诊断	39
2.2.3 肿瘤的内镜诊断	41
2.3 生物荧光标记技术.....	45
2.3.1 有机荧光染料探针	46

2.3.2	无机荧光量子点	63
2.3.3	掺杂染料的复合荧光纳米颗粒	69
2.3.4	用于肿瘤成像的磁性纳米微粒	73
2.3.5	多功能性荧光纳米粒子	74
2.3.6	荧光蛋白	75
	参考文献	82
第3章	菁染料荧光探针分子的设计、合成	89
3.1	菁染料探针的合成及应用进展	89
3.1.1	TO系列荧光染料探针分子的合成及应用	90
3.1.2	YO系列荧光染料探针分子的合成及应用	93
3.1.3	吡啶 C ₂ 类菁染料	96
3.1.4	其他甲川类菁染料的研究进展	106
3.2	嵌入式菁染料的合成及光谱性能	114
3.2.1	嵌入式菁染料 TO 的液相合成	114
3.2.2	嵌入式菁染料 TO 的固相合成	125
3.2.3	TO-COOH(5c) 单晶	132
3.2.4	TO、YO 及其衍生物的光谱特性	135
3.3	吡啶类荧光菁染料的合成及光谱特性	138
3.3.1	吡啶 C ₃ 类菁染料的合成及光谱研究	138
3.3.2	吡啶-噻啉三甲川类菁染料	142
3.4	吡啶桥基苯乙烯菁染料的设计合成	148
3.4.1	吡啶桥基苯并噻啉-噻啉(吡啶)苯乙烯菁染料的合成及光谱研究	155
3.4.2	吡啶桥基苯并噻啉-吡啶苯乙烯菁染料的合成及光谱研究	172
3.5	吡啶[3,2-b]吡啶苯乙烯菁染料的合成及光谱研究	181
3.5.1	吡啶吡啶化合物的特性及应用	181
3.5.2	荧光探针 2QICZ, 6QICZ 和 6IICZ, 2IICZ 的合成及光谱研究	184
3.6	荧光探针分子 TICQ 和 TIC1 的合成、表征及光谱特性	196
3.6.1	中间体的合成及表征	196
3.6.2	荧光染料 TICQ 和 TIC1 的合成及表征	197
3.6.3	中间体结构表征	199
3.6.4	染料 TIC1 的光谱性质	199
3.6.5	染料 TICQ 的光谱性质	202
	参考文献	207
第4章	功能性荧光量子点设计、制备及微观运输机制	215
4.1	核壳结构量子点理论分析	216

4.1.1	核壳结构量子点基本理论	216
4.1.2	CdS/ZnS 核壳结构量子点电子结构和光学性质	218
4.1.3	CdSe/ZnS 核壳结构量子点电子结构和光学性质	221
4.1.4	CdS/CdZnS 核壳结构量子点电子结构和光学性质	223
4.1.5	ZnTe _{1-x} Se _x /ZnSe 核壳结构量子点类型调控	227
4.2	功能性量子点的水相制备	233
4.2.1	ZnSe 量子点的制备	233
4.2.2	II 型半导体异质核壳结构量子点的制备	237
4.2.3	CdTe/CdS 包核量子点	241
4.2.4	Cu 掺杂的 CdSe 量子点	246
4.2.5	量子点-菁染料复合染料探针	252
4.2.6	复合探针微观输运变化过程研究	259
	参考文献	260
第 5 章	有机荧光染料探针分子的改性及光谱性能	264
5.1	壳聚糖对荧光染料的改性	264
5.1.1	壳聚糖的性质及应用	264
5.1.2	壳聚糖对菁染料的改性	267
5.1.3	壳聚糖修饰咪唑桥基苯乙烯类荧光染料的合成与表征	274
5.1.4	壳聚糖修饰 CdTe/CdS 纳米量子点的合成与表征	276
5.1.5	壳聚糖改性荧光探针的光谱特性	277
5.2	树枝状聚合物支载的荧光染料复合探针	279
5.2.1	树枝状聚合物	280
5.2.2	树枝状聚合物对嵌入式菁染料的修饰	290
5.2.3	树枝状聚合物-杯芳烃支载荧光染料复合体系	300
5.3	叶酸对荧光染料的改性	304
5.3.1	叶酸改性 TO-NH ₂ (TO-NH ₂ -folate) 的制备及光谱	305
5.3.2	TO-COOH-CTS-folate 的制备及表征	308
5.3.3	Cy ₃ -CTS-folate 的制备、表征及光谱特性	310
	参考文献	313
第 6 章	荧光探针生物标记	317
6.1	荧光探针与牛血清白蛋白的作用特性	317
6.1.1	荧光染料与牛血清白蛋白的作用研究	317
6.1.2	荧光探针对 BSA 的标记特性	319
6.1.3	量子点与牛血清白蛋白的作用关系	330
6.2	荧光探针与 DNA 作用	333

6.3	荧光探针的肿瘤标记成像	335
6.3.1	荧光探针标记肿瘤细胞研究	337
6.3.2	荧光探针的活体靶向标记	342
	参考文献	347
第7章	荧光探针检测系统与实例	349
7.1	激光扫描共聚焦显微镜	349
7.1.1	激光扫描共聚焦显微镜的基本原理	349
7.1.2	激光扫描共聚焦显微镜在肿瘤检测中的应用	351
7.2	流式细胞仪	353
7.2.1	流式细胞仪的原理	353
7.2.2	流式细胞仪的荧光测量及数据显示	354
7.2.3	流式细胞仪在肿瘤检测中的应用	356
7.3	活体动物荧光成像技术	357
7.3.1	活体动物荧光成像系统的原理	357
7.3.2	活体动物荧光成像一般步骤	358
7.3.3	活体动物荧光成像系统在荧光探针研究中的应用	358
7.4	荧光相关光谱	360
7.4.1	仪器结构及原理	360
7.4.2	荧光相关光谱应用	360
	参考文献	362

第 1 章 生物荧光探针

1.1 荧光探针的定义及分类

当紫外光照射到某些物质时,这些物质会发射出不同颜色和不同强度的可见光,当紫外光停止照射时,这种光线也随之消失,这种光线称为荧光。利用某些物质被紫外光照射后所产生的能够反映出该物质特性的荧光,进行该物质的定性分析和定量分析的方法,称为荧光分析。

荧光分析方法由于灵敏度高、选择性好、所需试样量小,在分析化学,尤其是生物分析中被广泛应用。由于大多数生物分子本身荧光较弱或基本无荧光,检测灵敏度较差,使得荧光探针检测技术的应用成为客观可能。荧光探针技术指人们用强荧光的标记试剂或光生成试剂对待测物进行标记或衍生,生成具有高荧光强度的以共价或非共价结合的物质,从而实现对待测物质的定性定量分析。随着生物技术的不断发展,荧光探针技术已经在核酸、蛋白质、细胞检测免疫分析等领域得到了重要应用,并表现出快速、灵敏、高通量和易实现自动化等特点。尤其是近年来发展起来的荧光化学传感器和分子信号系统,其应用已深入到药理学、生理学、环境科学、信息科学、生命科学等多个领域。

荧光探针是指在紫外-可见-近红外区有特征荧光,并且其荧光性质(激发和发射波长、强度、寿命、偏振等)可随所处环境的性质,如极性、折射率、黏度等改变而灵敏改变的一类荧光物质。按照制备方法可将荧光探针分为化学荧光探针和基因荧光探针两种。其中,化学荧光探针是指通过化学方法合成的一类荧光探针,包括有机小分子探针和纳米荧光探针;而基因荧光探针是指可遗传、可由 DNA 编码及蛋白质组成的一类荧光探针,如荧光蛋白(GFP、YFP、DsRed 等)。

1.1.1 有机小分子荧光探针

按用途分,主要有细胞活性探针、膜荧光探针、细胞器探针、细胞骨架探针、核酸探针、胞内离子探针、pH 探针、电位敏感探针、活性氧探针、笼锁化合物探针。

按照化学结构分,有苯系衍生物、萘系衍生物、吡啶衍生物、喹啉衍生物、香豆素衍生物、茚类衍生物和苯并五元杂环类衍生物等。

1) 苯的衍生物

具有共轭不饱和长链的苯系衍生物,如 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(diphenyl-

hexatriene, DPH, 图 1-1) 及其衍生物 TMA-DPH [*N,N,N*-trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl) phenylammonium *p*-toluenesulfonate, 图 1-2], 是一类很好的疏水性膜探针, 当它们从极性介质中转入膜或卵磷脂中时便可发出很强的荧光。

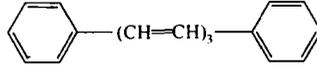


图 1-1 DPH 结构式

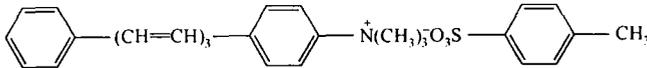


图 1-2 TMA-DPH 结构式

2) 吡啶衍生物

吡啶衍生物(pyridine derivative)作为探针主要为 *N*-取代(图 1-3)或 4-取代苯乙烯基吡啶(图 1-4)结构, 它们在水中几乎没有荧光, 但与脂或膜材料结合后荧光量子产率增加, 因为该分子中存在正电荷, 因此还可用于表面电荷的测定。

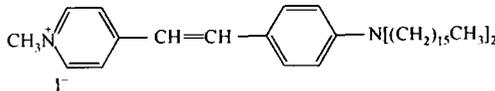


图 1-3 神经元示踪器 DIA

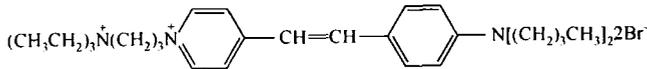


图 1-4 细胞膜标记物: *N*-(3-三乙基铵丙基)-4-[4-(二丁基氨基)苯乙烯基]吡啶二溴盐

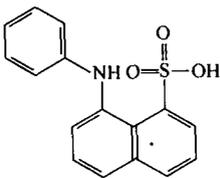


图 1-5 1,8-ANS(*N*-苯基-1-萘胺-8-磺酸)结构式

3) 萘的衍生物

萘磺酸(naphthalene sulfonic acid)的氨基取代衍生物, 如 1,8-ANS 及其盐类(图 1-5), 对环境极性变化异常敏感, 在极性溶剂中几乎无荧光, 但在非极性溶剂中可产生强荧光, 可作为膜和蛋白质的检测探针。含硝基萘的衍生物是缺氧细胞膜的功能探针, 它们本身无荧光, 但当硝基被还原成氨基时, 该分子可

发出强荧光。

4) 苯并五元杂环类衍生物

苯并五元杂环类衍生物, 如苯并咪唑及吲哚等都是常用于穿透细胞膜的荧光探针, 并用于 DNA 染色。常用作荧光探针的苯并五元杂环类衍生物的结构式如图 1-6 所示。

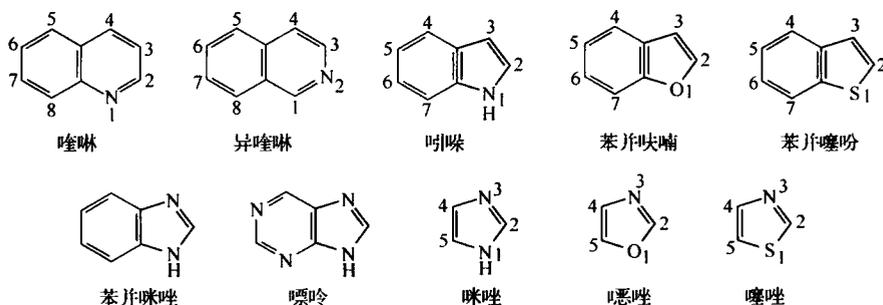
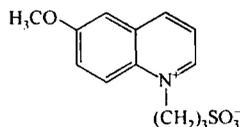
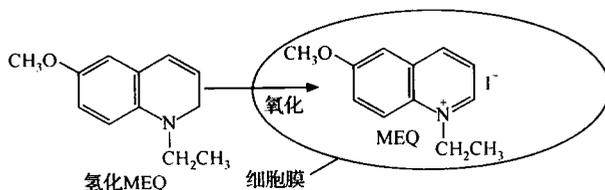


图 1-6 常用作荧光探针的苯并五元杂环类衍生物

其中, *N*-取代喹啉衍生物或 6-甲氧基喹啉都具有良好的水溶性和膜渗透性, 如 6-甲氧基-*N*-(3-磺酸丙基)喹啉鎓 (SPQ) (图 1-7), 可成为膜微囊和细胞检测的理想探针。以 6-甲氧基-*N*-乙基喹啉鎓碘化物 (MEQ) 为例, 氢化 MEQ 是一种膜透过物, 可进入细胞并在细胞内发生氧化反应生成荧光指示剂 MEQ, 从而实现对该细胞的检测, 传递过程示意图如图 1-8 所示。

图 1-7 6-甲氧基-*N*-(3-磺酸丙基)喹啉鎓 (SPQ)图 1-8 6-甲氧基-*N*-乙基喹啉鎓碘化物 (MEQ) 实现细胞内传递过程示意图

5) 香豆素衍生物

香豆素 (coumarin) 本身就是一个很好的荧光试剂。其 7-羟基衍生物, 如 7-羟基-4-甲基香豆素 (图 1-9), 有比香豆素更强的荧光。7-羟基香豆素及其衍生物可作为生理 pH 测定的探针, 其酯则可作水解酶的底物。

6) 芘类衍生物

芘 (pyrene) 本身可直接用作膜的结构探针。芘的 1, 3, 6, 8 位磺酸基和羟基取代衍生物 (图 1-10) 对环境很敏感, 可作为蛋白质、核酸和抗体探针。

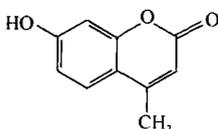


图 1-9 7-羟基-4-甲基香豆素

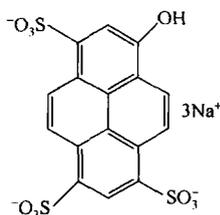


图 1-10 8-羟基苝-1,3,6-三磺酸三钠盐

7) 其他结构类型

除了以上常用的荧光探针之外,还有一些多环芳烃衍生物,如荧光素、罗丹明、氟化硼络合二吡咯等也常用作荧光探针(其结构式详见第2章)。

1.1.2 纳米荧光探针

作为一种新型的荧光探针,纳米荧光探针所特有的量子尺寸效应和小尺寸效应使之呈现出许多与同质单个分子或大块物体不同的光学性质,因此,纳米材料作为荧光探针用于分析化学的研究引起了人们的广泛关注。

目前研究最多的是半导体纳米微粒,它是由数目极少的原子或分子组成的纳米尺度范围内的具有半导体性质的微粒,也称为量子点。量子点标记作为一种新的标记方法,具有荧光发光光谱较窄、量子产率高、不易漂白、激发光谱宽、颜色可调、光化学稳定性高及不易分解等诸多优点,在生物化学、分子生物学、细胞生物学、基因组学、蛋白质组学、药物筛选、生物大分子相互作用等研究中有较好的应用前景。尽管在许多性质上量子点要优于传统有机染料,但在实际应用中还存在着一些必须解决的问题。目前很多研究主要集中在如何解决量子点的生物安全性等问题上。通过一些生物安全性好的材料对其进行包裹,如脂质体、高分子纳米颗粒及二氧化硅等,可制成复合型纳米荧光探针^[1]。

1) 脂质体

脂质体是由球形的磷脂分子簇形成的双层脂膜,可以采用不同脂类制备。根据不同的制备构成和脂质组成,它们的直径从 50 nm 到 1000 nm 不等。脂质体大致可划分为小单层脂质体(20~200 nm)和大单层脂质体(200~1000 nm)。由于独特的双层结构,脂质体已成功地用作载体运送选取的药物到巨噬细胞。脂质体能够有效地被巨噬细胞吞噬,研究表明,无论在体外还是体内,脂质体都能运送药物到达巨噬细胞,但是脂质体的稳定性需要进一步研究和改善。

2) 高分子荧光纳米颗粒

纳米高分子复合材料是近年来高分子材料科学发展迅速的新领域。纳米复合材料是将两种或两种以上的材料复合在一起,进行优势互补,以谋求最佳的综合性

能。高分子荧光纳米微球,是以聚丙烯酰胺类、聚甲基丙烯酸酯类、聚苯乙烯为微粒主体,表面键合或吸附,如菁染料、罗丹明(rhodamine)、荧光素(fluorescein,如FITC等)等荧光物质的荧光纳米微球。

单个纳米粒子可以键合多个荧光染料分子,从而导致荧光强度增强。但荧光染料分子并没有被高分子材料包覆和保护,仍然受外界氧化或光漂白的影响,同时荧光的稳定性也没有提高。后来通过染料分子与聚合物链的共价作用,将染料分子进行掺杂,或将染料分子物理吸附进入交联的粒子中。这些方法经常导致低的掺杂效率,且对染料的保护不够,因此使得染料探针在工作环境中从粒子中泄漏、猝灭和光漂白。此外高分子荧光纳米颗粒作为荧光探针使用还存在以下问题,如一般高分子介质材料的密度较小,在制备过程中进行分离洗涤、离心沉淀比较困难,导致所制备的微粒尺寸较大;另外,高分子纳米颗粒在水溶液中容易发生凝聚现象。

3) 核壳型荧光二氧化硅纳米颗粒

核壳型荧光二氧化硅纳米粒子是由荧光的内核、可生物修饰的硅壳以及修饰在硅壳表面的生物分子构成,具有明显核壳结构的一类新型纳米颗粒。作为外壳的纳米二氧化硅具有很好的生物相容性,易于表面改性和标记,且具有好的机械和化学稳定性,尺寸易于控制并具有优异的光学透光性和低荧光背景等。其内核材料可以是荧光染料、量子点以及荧光蛋白等,这些内核材料可以包裹或连接到二氧化硅形成的外壳中,如包含着稀土配合物的纳米粒子、包裹着若干染料分子的荧光纳米颗粒等。用多个发光分子组成的纳米颗粒是一种集成的先进方法。

1.1.3 基因荧光探针

基因荧光探针是指荧光蛋白和藻红蛋白。荧光蛋白多适用于标记肿瘤细胞、病毒、基因等,通常使用的是绿色荧光蛋白(GFP)、增强绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(DsRed)等。作为标记物,基因荧光探针可以反映基因表达水平或与融合蛋白的亚细胞定位;作为指示剂,基因探针的荧光变化可以反映出相关环境因子和蛋白质间相互作用的改变;作为报告基因,GFP发光不需要底物的特性,使其在研究胚胎及动物个体转基因和监测基因转移效率时有极大的优势。利用直接注射GFP标记裸鼠中的肿瘤细胞后进行荧光检测,不仅标记了肿瘤性状,同时也能检测到癌细胞的转移;作为融合标记,大部分GFP的成功应用以及与其他基因的融合,可监测蛋白质的分布和命运。主要方法是将目的蛋白基因与GFP基因融合,然后在特定的细胞或组织中表达。这主要是因为融合蛋白能保持原有的功能,而GFP能使其发光。GFP已被用于大部分细胞器的定位,包括血细胞薄膜、神经核、内质网、高尔基器、分泌小泡、线粒体、过氧化物酶体、液泡和吞噬小体等的定位分析。

1.2 荧光探针的特性

理想的生物荧光探针应该具有以下特点^[2]:第一,荧光探针的荧光必须与生物样品的背景荧光易于区别;第二,荧光探针必须不干扰研究的主体;第三,荧光探针主要用于生物活体或在天然生物条件下的体外样品的研究,因此荧光探针的毒性、使用的 pH 范围及生物相容性等方面必须符合生物体的正常机能要求。

然而,在标记过程中,生物荧光探针的荧光性质会受到生物主体诸多因素的干扰;另外,荧光探针的引入不可避免地会对检测体系的原有状态产生或多或少的影响。例如,抗体上标记荧光染料后,如果每个抗体上结合的荧光基团超过 4 个,一般会降低抗体的亲和力。

1.2.1 荧光探针的选择原则

1) 荧光的定性或定量

定性研究一般选择单波长激发探针,而定量研究最好选择双波长激发的比率探针,以利于制作标准曲线。

2) 荧光探针的特异性和毒性

根据实验目的,尽可能地选择毒性小、特异性高的探针。不是所有荧光探针都具有特异性,要实现荧光探针的特异性一般需要两部分:荧光团和对目标靶点具有特别专一性识别作用的特定配体或是化学官能团。受体配体的相互作用一般包括抗原-抗体、生物素-抗生物素、酶-底物、叶酸-叶酸受体等。

3) 荧光探针适用的 pH

一般情况下,荧光探针要适合于生理条件下的 pH 环境要求。当探针用于非生理条件时,应根据 pH 要求作出相应选择,同时,配制溶液时也应该注意这个问题。

4) 激发波长与发射波长

电子跃迁时吸收或发射的能量受到电子能级的制约,只能吸收或发射一定波长范围内的光。荧光探针大多是含有共轭双键体系的有机化合物,共轭双键使其容易吸收激发光,其激发波长大多处于近紫外区或可见光区,发射波长多处于可见光区。激发波长和发射波长决定了使用光源的选择。例如,如果染料的激发波长处于紫外区,则必须使用紫外光源。常用的光源有汞灯(其主要峰值在 366 nm、405 nm、436 nm、546 nm 和 575 nm),氙灯(连续光),氩离子激光器(458 nm、488 nm 和 514 nm),氩-氦激光器(488 nm、568 nm 和 647 nm)和氦-氖激光器(543 nm、594 nm 和 633 nm)。

染料的发射波长总是大于其激发波长,两者的差值称为斯托克斯(Stokes)位

移。不同结构的有机染料,相应的 Stokes 位移差别较大。染料的 Stokes 位移越大,其激发光谱和发射光谱的重叠就越少,有利于提高其分辨率。

5) 荧光强度

荧光强度决定了染料检测的灵敏度。其本身取决于染料的摩尔吸光系数和荧光的量子产率,在确定的条件下,两者为定值。摩尔吸光系数反映了染料吸收激发光的能力,而量子产率反映了染料将吸收的辐射能转化为荧光的效率。当荧光探针与细胞结合或生物分子结合时,其量子产率应接近或大于 0.4,否则没有实用价值。

6) 荧光寿命

荧光寿命即激发态寿命,是指分子在激发态的平均停留时间。若分子受激后迅速弛豫,则可实现多次激发,因此荧光寿命短时可提高灵敏度。大多数荧光探针的荧光寿命在纳秒级,如荧光素为 4ns。特别长的荧光寿命对于高灵敏度检测也很有意义。例如,利用稀土离子配合物的长寿命荧光而建立的时间分辨荧光测量技术,可极大地提高检测的灵敏度。所谓时间分辨荧光测量技术,就是采用时间延迟技术在激发后延迟一段时间,等短寿命的散射光和自身本底荧光等干扰信号衰减后,再测量荧光探针特异的荧光信号,这样可大大排除干扰信号,同时提高检测的特异性和灵敏度。

7) 光稳定性

提高激发光的强度固然可以提高信号的强度,但是激发光的强度超过一定限度时,光吸收就趋于饱和,并不可逆地破坏激发态分子,这就是光漂白现象。对于流式细胞仪,光漂白的问题并不严重,因为光源照射细胞的时间很短;但对于荧光显微镜等,光源需长时间照射样品,否则光漂白现象会严重影响测量。解决光漂白问题最直接的方法就是提高测量的灵敏度,以降低光照的强度。

在荧光定量和动态荧光监测时,要选择光稳定性较高的荧光探针,同时在实验时通过减少扫描次数或降低激光强度来减少光漂白的程度;但是,在利用荧光漂白后恢复(FRAP)等原理检测膜的流动性或细胞间的通信时,所选的荧光探针则需两者同时兼备。

8) 荧光量子产率

荧光量子产率可用物质所发射出的荧光量子数和所吸收激发光的量子数的比值表示,此值往往小于 1,如罗丹明 B 在乙醇中的荧光量子产率为 0.97,荧光黄在水中的荧光量子产率为 0.65。而许多吸光物质的荧光量子产率很低,不能产生荧光。因为这些物质吸收了激发光的能量后,再把这部分能量释放出来时,其中大部分用于同类分子或与其他分子碰撞时的消耗,以热能的形式释放,所以无荧光发射。

1.2.2 影响荧光探针性质的因素

荧光探针的荧光强度与其结构有密切的关系,强荧光物质往往具备如下特征^[3]:

(1) 具有大的共轭 π 键结构:发生荧光(或磷光)的物质,其分子都含有共轭双键(π 键)体系。共轭体系越大,离域 π 电子越容易激发,荧光越容易产生。大部分荧光物质都具有芳环或杂环,芳环越大,其荧光峰越移向长波长方向,且荧光强度也较强。同一共轭环数的芳族化合物,线性环结构者的荧光波长比非线性者要长。共轭效应使荧光增强的原因,主要是由于共轭效应增大了荧光物质的摩尔吸光系数,有利于产生更多的激发态分子,从而有利于荧光的发生。

(2) 具有刚性的平面结构:实验发现,多数具有刚性平面结构的有机分子具有强烈的荧光,且荧光量子产率高。因为这种结构可以减少分子的振动,使分子与溶剂或其他溶质分子的相互作用减少,同时也就减少了碰撞失活的可能性。

(3) 取代基团为给电子取代基:取代基的性质(尤其是发色基团)对荧光体的荧光特性和荧光强度均有强烈的影响。给电子基团,如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NR}_2$ 等的引入可使探针分子的荧光增强。因为产生了 p - π 共轭作用,增强了 π 电子共轭程度,从而使最低激发单重态与基态之间的跃迁概率增大。吸电子基团,如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{C}=\text{O}$ 、卤素等,会减弱荧光强度甚至出现猝灭荧光。卤素取代基随原子序数的增加而使探针的荧光降低。这可能是由重原子效应使系间跨越速率增加所致。在重原子中,能级之间的交叉现象比较严重,容易发生自旋轨道的相互作用,因此增加了由单重态转化为三重态的速率。另外,取代基的空间障碍和分子的立体异构现象对荧光强度也有影响。

此外,有机染料的荧光光谱和量子产率是受环境影响的,这也是很多染料具有探针作用的基础。影响荧光探针荧光性质的环境因素主要有^[4]以下几种。

(1) 溶液的 pH:荧光探针是否发射荧光,辐射何种荧光与其在溶液中的存在状态有关,如 1-萘-6-磺酸呈一价离子时无荧光,呈负二价离子时才能发射蓝色荧光。荧光探针中含有酸性或碱性助色团,溶液的酸碱性对其电离产生影响,如 1-萘酚-6-磺酸在 pH 6.4~7.4 的溶液中会发生蓝色荧光,当 pH 低于 6.4 时则不发生荧光。不电离的荧光探针在各种 pH 溶液中都可发生荧光。pH 不仅影响有机试剂的电离,而且对金属络合物的组成也会产生影响。因此,pH 可对金属络合物的荧光性质产生较大影响。

(2) 温度:荧光探针的荧光量子产率和荧光强度通常随溶液温度的降低而增加,如荧光黄的乙醇溶液在 0°C 以下,每降低 10°C ,荧光量子产率增加 3%,冷至 -80°C 时,荧光量子产率接近 100%,反之则减弱。温度升高,分子热运动加剧,分子碰撞概率增加,使处于激发态的 π 电子难以维持稳定的时间,导致荧光的猝灭。

一般在 20℃ 时,温度引起的荧光猝灭作用就有表现,随着温度的升高,猝灭作用加剧。当温度在 20℃ 以下时,荧光量子产率随温度变化不明显,因此进行荧光染色过程中,应注意温度的控制。

(3) 分解作用:当激发光源能量过大时,可使荧光探针分子中的共价键发生断裂,导致分子结构破坏,大部分激发能被消耗,因此无荧光发射。因此实际应用中,在满足镜下观察的最高灵敏度条件下,应选择适当的激发强度(功率)。

(4) 溶剂性质:溶剂的性质对荧光探针的荧光强度有明显影响。同种荧光探针在不同的溶剂中,其荧光光谱的波长和强度都有差别。一般是荧光峰的波长随着溶剂的介电常数增大而增大,如 8-羟基喹啉在乙腈、丙酮、氯仿中的荧光量子产率随着溶剂极性的降低(介电常数降低)而依次递减。如果溶剂和荧光探针形成了复合物,或溶剂使荧光探针的电离状态改变,则荧光的波长和强度都会发生很大变化,如在苯胺或萘胺的稀溶液中加入少许盐酸使其形成盐酸盐,其荧光会消失。

(5) 荧光探针的浓度:浓度对荧光强度的影响更明显。在稀溶液中,荧光强度与荧光探针的浓度呈线性关系;浓度增加到一定程度时,荧光强度保持恒定,即使探针浓度继续增加,荧光强度也不发生变化;若探针浓度再继续增加,荧光强度将随着浓度的增加而减弱。荧光染料探针的应用浓度一般为 $10^{-3} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

(6) 荧光探针和其他生物分子的结合:有些染料结合到生物分子上后,其荧光强度比探针水溶液中的强度值要明显增强。例如,核酸探针碘化丙锭(PI)在与核酸结合后,荧光增强约 20 倍;膜探针二苯基己三烯(DPH)与膜结合后荧光也大大增强。溶剂的极性对染料的荧光有很大的影响,特别是那些激发态分子具有很大偶极矩的染料。氨基萘类染料丹磺酰就是一个典型的例子。氢离子探针,如 BCECF 和 SNAFL 等,其激发或发射光谱对 pH 很敏感,可用于监测 pH。当标记中要求染料对 pH 不敏感时,则可选用对 pH 不够敏感的染料,如 BODIPY 类染料。

(7) 染料分子间的相互作用:大多数染料都有浓度依赖式的自身荧光猝灭现象,即浓度高时荧光反而减弱。荧光猝灭是指由于分子间的相互作用,降低了荧光量子产率而不改变荧光发射光谱的一种双分子作用过程。其机理可能是激发态分子以非辐射方式将能量传递给邻近分子而不能发射荧光。有些激发态分子还可相互作用形成激发态二聚体(excimers),使发射光谱发生位移。这种性质可以运用于双波长发射比例测量法。

(8) 荧光的猝灭:荧光物质的分子从第一激发单重态向基态跃迁是一种释放能量的过程,其能量的释放有荧光发射(辐射跃迁)和非荧光两种形式。前者是进行荧光分析所必需的,后者与荧光发射形式竞争能量,导致原来能够发荧光的物质分子不能发出荧光,这种现象即为荧光猝灭现象^[5]。荧光分子的荧光猝灭是由内部因素和外部因素同时作用造成的。内部因素主要是分子从激发态回到基态以非

辐射跃迁形式释放能量,而外部因素则包含多方面,常见的作用因素包括:①光照射,它是导致荧光猝灭的最常见因素,会促进激发态分子与其他分子相互作用而引起碰撞猝灭;②荧光物质的分子与外部分子(或离子)形成非荧光的络合物;③共振能量的转移;④溶剂种类、pH;⑤温度。外源性的猝灭剂,如氧分子,以浓度依赖的方式猝灭染料的荧光。通常情况下,猝灭是由碰撞引起的,这时通过研究猝灭剂对染料荧光的猝灭作用,可获得猝灭剂与荧光基团的亲和性及其扩散速率的信息。蛋白质也可猝灭许多荧光团的荧光,如荧光素或 NBD 的抗体是有效而特异的荧光猝灭剂。荧光探针的浓度大于 1 g/L 时,常发生荧光的自猝现象,这是由于被激发的分子在发生荧光前和未激发的分子碰撞或由于荧光探针分子间缔合而形成二聚体或多聚体。

考虑到以上因素,在进行荧光探针实验时,除注意合适的 pH、溶剂、温度等条件外,染料溶液最好新鲜配制,配高浓度的储存液,在临用前稀释,避免染料溶液因储存时间过长而失效。另外,利用荧光探针对环境的敏感性,可以设计所需要的探针。例如,对 pH 敏感的荧光素在 6-羟基上连上半乳糖,得到的二半乳糖苷荧光素(FDG)是检测 β -半乳糖苷酶活性的特异性探针。这是因为 FDG 的荧光很弱,而经过 β -半乳糖苷酶的作用后生成的荧光素具有很强的荧光。

此外,为了减少生物荧光探针应用过程中测量的误差,还应遵循以下原则:尽量减少细胞损伤和副产物的生成;尽量减小探针的浓度;使探针的分布局限在感兴趣的部位;研究细胞内环境对探针的具体影响,采取相应的措施加以克服。

1.3 荧光探针的结构及设计原理

1.3.1 荧光探针结构

一般来说,荧光探针主要由三部分构成,分别为识别基团(receptor)、连接臂(relay)和荧光团(fluorophore)。识别基团是可以和检测底物特异性结合的基团;荧光团是发出光学信号的信息源;连接臂用以连接识别基团和荧光团^[6]。

1.3.2 荧光探针设计原理

基于荧光探针的结构,荧光探针的主要设计原理也是被广泛接受的 3R (receptor-relay-reporter)思想。

1) 受体

受体(receptor)是为实现对目标物种的选择性识别而设计的结构单元。受体的设计对荧光探针的选择性起着非常重要的作用,决定着探针的性质和性能。受体定义为一种由共价键结合的有机单元,其结构中的相关部分可以通过弱相互作用

用或被不同的离子或小分子选择性地结合,形成两分子或多分子的超分子体系。最常见的受体有冠醚、杯芳烃、环糊精、环状多铵盐类和胍类等,它们与识别物种间通过配位作用力、氢键、静电引力、范德华力、 π - π 重叠 (stacking) 相互作用力、偶极-偶极相互作用等不同形式的作用力相互结合。受体的广泛研究大大丰富了荧光探针的种类,研究者可以方便地将性能优越的受体直接或间接(改造后)地引入到探针的体系中,从而设计出新的荧光探针。

2) 荧光团

荧光团是发出光学信号的信息源,是将识别信息转换成荧光信号的报告器(reporter)。荧光团的选择直接影响识别信号的表达。一般而言,不同的荧光团具有不同的发射波长、不同的荧光量子产率及不同的 Stokes 位移。设计探针时,可以根据实际检测的不同需要而选择不同类型的荧光团。常见的荧光团有萘酰亚胺类、罗丹明类、香豆素类、氟硼吡咯类、菁染料类等有机荧光染料,此外,还有量子点和功能纳米粒子等。

3) 连接臂

连接臂(relay)是连接受体和荧光团的桥梁。受体识别底物后,连接臂把识别信息按照某种传递机制传递给报告器,从而推动信号响应。传递机制直接决定着信号的性能,从而影响整个识别事件的表达。目前,探针设计时应用较多的受体与荧光团的连接方式主要有共价键连接和置换式。

通常来说,我们选用已知的荧光团和受体,基本可以预测目标探针的选择性和荧光性能。值得注意的是,荧光探针的设计是一个系统工程,探针的整体设计占有非常重要的作用。相同的受体连接在不同的荧光团上,可能产生完全不同的选择性;相同的受体和荧光团通过不同的连接臂连接,也可能产生完全不同的选择性;相同的荧光团在不同环境中(溶剂、温度、pH 等),荧光性能也可能差别很大。也正是因为探针设计的多样性和不可准确预测性,大大激发了科研工作者追求未知世界的兴趣。

1.4 生物荧光探针应用研究进展

生物荧光探针靶向标记是将荧光染料分子(成像试剂)用适当的配体修饰,通过配体-受体等相互作用,在特定区域产生高的富集,从而实现生物的特异性标记。

从 1856 年 William Perkin 偶然制得苯胺紫(mauve, aniline purple)作为第一个人工合成的染料开始,很多化学家纷纷开始了对染料近乎狂热的研究。短短 55 年间,就出现了大批实用的染料。1880 年,德国人 Grubler 开了一个小工厂,实验并为生物学家和医学家提供最需要的染料。这些新染料被科学家用于组织标本、

血液标本、细菌标本的染色,并建立了新的染色方法。那个时期生产的很多染料都具有很强的荧光,也就是说已经有很多荧光探针可供使用,但是真正被人们用过的却很少。当时的组织学家、细胞学家和细菌学家喜欢染色能力很强的红色、蓝色和绿色染料,而这些染料在溶液中大多没有荧光或荧光很弱。1863年碱性品红被引进组织学研究,成为一种重要的细胞核染料,它对于细菌学,特别是对于用以证明结核杆菌这类耐酸微生物体的 Ziehl-Neelsen 法的发展产生过重要影响。1881年龙胆紫被引入微生物技术中,并在1884年就成为 Gram 染色液的主要成分。1885年, Ehrlich 用亚甲基蓝作为第一个重要的活体染料,阐明了其对神经组织的亲和性。此外,他还把许多其他染料引进该领域,如著名的三酸混合物(甲基绿、酸性品红、橙 G)等。

在20世纪30年代初,随着荧光显微镜的研制,吖啶类和其他荧光探针才开始用于固定细胞核组织的荧光显微术。此外,荧光探针在其他方面也得到了应用。例如,荧光素在水溶液中会产生很强的黄绿色荧光,即使稀释 1.6×10^6 倍,其钠盐仍有浅绿色荧光,被用来显示眼内液体的流动;1906年,荧光素首次被美国用于地下水示踪的荧光探针;1924年,人们发现肿瘤内源性卟啉在紫外灯照射下可发出荧光;1942年,研究人员利用静脉注射卟啉在肿瘤中发现荧光;1948年,荧光素被应用于脑瘤的研究;20世纪80年代,人们合成了可穿透更深组织的近红外荧光染料等成像试剂。

近年来,由于现代倒置荧光显微镜、显微荧光扫描仪、数码成像采集系统等先进设备和方法的应用,荧光探针的研究得到了迅猛发展。荧光探针已经不仅局限于有机染料,还出现了有机荧光蛋白、量子点、染料掺杂纳米二氧化硅、多功能纳米粒子等,靶向生物荧光探针的应用领域也更加广阔。

1.4.1 荧光探针在组织学中的应用

1929年之前,荧光显微镜还只局限于对组织和细胞自发荧光(卟啉、天然细胞质蛋白和叶绿素等)的观察,以及用荧光探针检测活的原生动物。皮肤病学家 Sigwald Bommer 首次报道了荧光探针在固定组织切片中的应用,他用吖啶黄的稀溶液浸染皮肤切片,观察到细胞核有特征的黄绿色荧光,并为所观察到的细胞核荧光提出了可能的细胞化学机理。

年轻的病理学家 Herwig Hamperl 和荧光显微术专家 Max Haitinger 合作,为荧光显微术的发展树立了又一座里程碑。他们检测了65种不同的荧光探针对福尔马林固定的动物组织冰冻切片的染色性能,以观察哪些荧光探针能产生特异的荧光。据此,他们推荐出35种适用于正常组织及病理组织的荧光探针。Herwig Hamperl 进一步研究了石蜡包埋组织,描述了许多荧光探针的特异亲和性并提出了一些新的染色方法。

此时,荧光探针定义为能和个别组织特异结合而又不干扰其他组织成分自身荧光的荧光化合物。为了和细胞等天然的自发荧光物质相区别,人们也曾称荧光染料为次级荧光体,相应地把这种染色过程称为次级染色,把像吡啶这样的自荧光物质称为初级荧光体。而现在所有的荧光探针,不管其染色性能和对天然荧光的影响如何,都统称为荧光探针。

后人在 Herwig Hamperl 和 Max Haitinger 研究的基础上,将其方法应用于各自的领域并改进了染色方法。很明显,次级荧光体在组织和细胞中以显著的反差和灵敏度产生明亮的颜色。这种荧光探针的新方法在组织形态学上的最初应用主要集中在植物学、神经系统、病理学、细胞学等领域。

组织光学成像也是量子点的一大优势。水溶性量子点外包装生物分子,增加其生物兼容性,可使量子点进入组织进行长时间光学成像,这是众多荧光染料分子所不能比拟的。由于血脑屏障的存在,脑组织中荧光可视成像一直是神经科学研究的难点,量子点却可以突破这个屏障进入脑组织。例如,量子点与 TAT(一种细胞敏感的缩氨酸)连接后,通过动脉进入脑内,几分钟内就标记到脑组织上而不受血脑屏障的影响,用低功率的紫外灯就可以使整个鼠脑的荧光清晰可见。组织学数据显示,除了内皮细胞外,TAT 连接的量子点都可到达脑组织,未连接 TAT 的量子点则不能进入^[7]。这一实验证实量子点进入脑组织成像是完全可能的,这为脑内药物靶向递呈研究和神经科学及开发人工智能提供了强有力的工具。

1.4.2 荧光探针在微生物学中的应用

早在 1917 年人们就利用结核菌自身能产生荧光的特性,用荧光显微镜观察到了结核菌的存在。20 年后,Cologne 大学卫生研究所的 Hagemann 首先报道了微生物体的荧光染色,他分别用小檗碱(berberine)和樱草灵(primulin)对麻风杆菌和病毒进行染色。其他被证实有用的荧光探针还有硫黄素 S(thioflavine S)和媒染桑色素(mordanted morin)。为了检测结核菌,人们试图找到一种比 Ziehl-Neelsen 法更灵敏的染色方法。最后人们终于发现,对涂片进行酸-醇处理后,金胺 O(auramine O)的效果很好,它能使染色的有机体产生亮黄色荧光。通过 Richards 的工作,这一技术在美国得以推广,他研究了染色机理并得出结论:金胺 O 对结核菌的特异性染色,是由于它与细菌细胞壁上的耐酸成分微酸菌的结合。当时结核病仍然是世界性的一种主要的高死亡率传染病,实验检测仍然部分依赖于卡宝-金胺 O 染色法,并常用罗丹明或吡啶橙进行复染色。

荧光量子点也被用于微生物学方面的研究,如将荧光量子点用于大肠杆菌竞争机制的研究^[8],结果显示,直径 3~4 nm 的亲水性量子点能进入竞争性细胞,但不能进入非竞争性细胞。通常人们用免疫荧光抗体技术(IFA)来检测水资源中的微生物。然而,不同的水样都含钝化颗粒或海藻细胞,这些物质都有很强的自发荧

光,并且与荧光标记的原生动物细胞的发光特性非常相似。此外,人们还将量子点用于环境微生物的检测^[9]。他们用交联链霉亲和素的两种不同颜色的量子点 QD 605 和 QD 565 分别标记隐孢子虫(*cryptosporidium parvum*)和蓝氏贾第鞭毛虫(*giardia lamblia*),在荧光显微镜下观察,分别显红色和绿色,克服了传统标记方法的缺点。量子点具有极高的灵敏度和荧光稳定性,能够进行定量检测,有望在环境微生物学领域成为新的研究热点。

随着环境微生物学的不断发展,利用微生物来处理废水的活性污泥法在废水处理中发挥了重要作用。自活性污泥法诞生一个多世纪以来,污泥膨胀问题就一直是困扰污水处理厂正常运行的一个普遍性难题。污泥膨胀出现的复杂性、区域性和生物多样性都为相关的早期预警和问题的解决造成了极大的困难^[10,11]。

传统的微生物菌群结构分析方法包括显微镜观察、分离培养、依据形态结构特征和生理生化特征进行分类鉴定等。这些方法能从活性污泥中分离和鉴定大量细菌,并对微生物的多样性和动力学进行分析,但此类方法非常耗时,不足以反映微生物在环境中的真实情况,存在一定的局限性。针对传统的微生物分析方法存在的问题,废水处理领域的研究者开始尝试将荧光原位杂交(*fluorescent in situ hybridization*, FISH)技术用于引起污泥膨胀的丝状菌菌群、脱氮细菌菌群、除磷菌菌群、产甲烷菌菌群等的分析,并取得了初步的成功。

FISH 作为微生物数量和特性考察手段,具有种属特异性,即只与目标细菌的 16SrRNA 或 23SrRNA 结合,通过结合的探针可以鉴定微生物的种类。与其他可以将微生物量化的方法(如定量聚合酶链式反应,即 PCR)相比,FISH 技术可以同时考察微生物群落的结构和数量信息。研究表明,FISH 技术对特定微生物种群定性和定量时,获得结果快,可自动读取、保存和回顾载物片信息,灵敏度高、选择性好、取样易且少,并能提供较多的物理参数。

FISH 技术最初是将放射性标记的 DNA 或 28SrRNA 杂交到细胞制备物上,通过放射自显影技术(*microautoradiography*, MAR)检测杂交位点,该技术可在不破坏细胞完整形态的情况下在细胞内检测核酸序列。1988 年, Giovannoni 等^[12]首次将 FISH 技术应用到细菌学的研究中,使用放射性标记 rRNA 寡核苷酸探针检测微生物。随着荧光标记技术的发展,放射性材料被非同位素染料代替。1989 年, Delong 等^[13]首次将荧光标记寡核苷酸探针用于检测独立的微生物细胞。与放射性探针相比,荧光探针具有分辨力强、安全性高、检测步骤少的优点^[14]。在伸展性 DNA 纤维(*extended DNA fiber*)上进行 FISH 标记,能将分辨率提高到与常规分子生物学技术 Southern Blot 分析相当的水平。近几年,由于 FISH 技术的灵敏性和快捷性,该技术已成为微生物系统发育学、微生物生态学、微生物诊断学和环境微生物学研究的有力工具。

FISH 技术所用探针的标记方法有直接标记法和间接标记法^[15]。间接标记法是指将标记物(如地高辛、生物素)连接到探针上,再利用偶联有荧光染料的亲和素或抗体进行检测的方法。直接标记法是用荧光染料直接对核苷酸进行标记,该方法的探针标记种数不受限制,比间接标记操作简单,但不如间接标记探针灵敏,不过靶序列片段较大时(数百 kb^①),测量结果仍较可靠。

近年来,基于量子点和染料的共振能量转移在生物标记领域得到广泛研究^[16,17]。Willard 等^[18]通过连有 CdSe-ZnS 量子点的血清蛋白供体和连有链霉亲和素的四甲基之间特定的相互作用,证明不同蛋白质分子之间的黏附作用可通过量子点供体标记的蛋白质和有机染料标记的蛋白质之间的荧光共振能量转移(FRET)观察得到,增强的受体染料分子荧光来源于量子点的发射光谱。Hohng 等^[19]观察了量子点和有机染料 Cy₅之间的单分子 FRET,进一步利用单分子之间的 FRET 获得了两对双链 DNA 交叉连接模型的单分子构象变化信息。Chan 等^[20]在量子点和核酸探针上分别连接生物素、亲和素,利用生物素和亲和素之间强烈的作用将量子点和核酸探针偶联,在荧光显微镜下发现该探针能够特异性地识别鼠脑部组织的 mRNA。由此可见,FRET 对探测生命体内的反应机理极为有用。此外,借助具有 FRET 特性的靶向识别探针可能成为对刻画污泥膨胀过程关键菌微观性状及异变过程实现实时监控的有力手段。

本课题组承担的国家自然科学基金资助项目“靶向胞吞荧光探针表达污泥膨胀关键菌特性机制及膨胀预警模型”以微丝菌为研究对象,依据微丝菌嗜摄和胞内储存长碳链脂肪酸(LCFA)物质的特性,采用 LCFA 修饰具有 FRET 特性的有机染料-量子点复合探针,以之标记微丝菌时,微丝菌将修饰过的复合探针摄食进入菌体,完成“胞吞”过程,再通过探针荧光信号定性定量表达微丝菌基本性状及空间分布,从而探求微丝菌特异性识别的新途径;设计了一种荧光量子产率高、化学稳定性好、抗光漂白性及荧光背景干扰的远红外 FRET 荧光染料-无机量子点复合标记寡核苷酸探针;研究了微丝菌的代谢和生理生态特性与污泥膨胀现象的内在作用规律,探求了活性污泥丝状菌膨胀早期行为特征及预警调控机制。

1.4.3 荧光探针在药学方面的应用

药物靶点和药物筛选的研究非常重要,且难度高、工作量大。将荧光探针技术与芯片技术相结合可能创造超高通量分析各种靶分子的技术平台,可实现高通量且并行地研究生物分子与药物的相互作用,为药物作用机制的研究提供重要的方法和信息。

通常,一种有效的药物往往需要和数个不同的靶分子结合才能发挥其效用,同

① 1kb=1000 碱基对。

时还要避开其他一些靶点以避免其副作用。荧光探针既能与细胞表面脂质蛋白受体相连,又能与核内的 DNA 相连,在药物开发应用方面,可利用荧光探针跟踪记录药物分子在作用过程中的位置,在临床前期阶段就能推测出其可能引起的其他作用。

目前研究较多的量子点技术以其独特的标记特点,在今后生物分子检测技术发展中发挥重要作用,为 DNA 检测(DNA 芯片)、蛋白质检测(蛋白质芯片)和探索蛋白质-蛋白质之间(抗原-抗体、配体-受体、酶-底物)的反应原理研究提供更先进的手段,同时也将推动生物显像技术和生物制药技术的发展,在疾病的诊断和治疗方面发挥积极的推动作用^[21]。

1.4.4 荧光探针在活细胞标记中的应用

20 世纪初叶之前,药物学家和实验治疗学家就对荧光探针能导致微生物发光的性质表现出浓厚的兴趣,并认识到这种发光是光致发光。吡啶染料是治疗锥虫的有效药物,因此也被称为“锥黄素”。原生动物学家 Provazek 是用荧光显微镜研究染料和活细胞结合的第一人。他把各种荧光探针和药物(如荧光素、曙红、中性红、奎宁等)加到纤毛豆形虫的培养液中,并观察细胞的染色荧光。他掌握了这种实验方法的基本特点,其目的是把各种类型的物质引入细胞,不管是染料还是无色药物,假定它们服从一定的分布规律并在一定的条件下富集在细胞的特定成分中,以便它们在荧光显微镜的暗视野中照亮细胞的部分结构。

1932 年,匈牙利药物学家把几种不同的荧光探针注入预先感染了锥虫的啮齿动物体内,开创了体外活体荧光探针技术之先河。

荧光显微镜下的血涂片观察表明,染料和核酸及带血锥虫的基本部分有特异结合。20 世纪 30 年代由于当时对化疗特别感兴趣,人们作了各种努力,试图确定染料在什么位置与动物及人体内的疟原虫结合。荧光显微镜下观察发现,在所实验的各种荧光探针中,啶吡因(即阿的平)在注射 10 min 后能被循环淋巴液选择吸收。把吡啶黄素加到纤维细胞培养液中,显微镜下可看到,实验浓度下它能阻止细胞的分裂。

通过这些研究,人们明白某些氨基吡啶能优先和细胞核成分结合,对这种结合机理的研究导致染料对核酸亲和力的发现。这种强相互作用已为体外及低 pH 区固定细胞中的纯化核酸所阐明。

量子点标记技术已被应用在固定细胞的荧光成像方面^[22],而活细胞成像中大多局限在细胞膜受体定位和细胞质的研究中。2004 年,Chen 等^[23]首次将量子点与标记分子复合物通过转染进入细胞核,在实验中他们将量子点与 SV40(猴病毒 40) T 抗原核定位信号(NLS)结合,并经转染进入活细胞,通过荧光成像系统监测到复合物从细胞质到细胞核的运动过程,经 1 周时间的培养观察没有发现其对细

胞有负面影响,长时间观测可以看到复合物堆积在细胞核中。这一工作首次将量子点用在细胞核中进行长时程观测生物现象,提供了一种新的无细胞毒性成像技术来研究细胞核的交换机制及过程,使细胞核的研究工作提高到可视化程度。量子点颜色的可调性,使其可实现同一细胞的多色标记。有研究表明^[24],可同时用发红色荧光的量子点标记细胞核、发橙黄色荧光的量子点标记高尔基体、发绿色荧光的量子点标记微管,经单一波长的光激发后,三种颜色同时显现,这是一般的常用标记物和荧光染料所无法做到的,足以看到量子点生物应用的广阔前景。

量子点在活细胞成像中的应用除细胞核外,还被用于细胞内源蛋白^[25]、表皮蛋白^[26]、细胞内组分^[27]及细胞内外受体运输途径的研究^[28]。量子点进入细胞的途径也可以不经修饰而通过转染技术由磷脂脂质体包裹直接进入,这种技术增加了量子点的水溶性和生物兼容性;脂质体中的量子点非常稳定,甚至经过 90 min 的光照射后荧光强度仍保持在正常的数量级。这种脂质体包裹的量子点除了在活细胞中应用外,还可以用于组织和生物大分子中。

1.4.5 荧光探针在活体成像中的应用

作为另一个重要的应用领域,荧光探针被用作磁共振成像(MRI)、X 射线扫描、放射性成像等成像技术的对比剂,用于生物活体成像。

1929 年,海德堡(Heidelberg)大学的药物学家 Philipp Ellinger 和解剖学家 August Hirt 合作,对荧光显微镜做了重大改进,在动物体内注入荧光探针以观察取出后的肾脏微循环。在这种荧光显微镜中,光源的垂直入射光直接通过侧边的透光管经物镜会聚于样品上,发射的荧光沿透光管返回到观察者眼中。其他基本部件还包括相应的滤光片和一个浸在水中的物镜。这台被称为“体内活体显微镜”的仪器,可以认为是第一台落射荧光显微镜。荧光素和吖啶黄素的稀溶液曾被用于研究尿液形成的生理学。第二次世界大战期间,Hirt 企图用体内活体荧光显微镜观察人体内的组织,竟然进行了非人道的活体实验。

科学家对体内活体荧光显微镜的兴趣逐渐增加,并实验了各种荧光探针,如亮碱性染革黄棕 G(phosphine G)、樱草灵黄(primulin yellow)、噻唑黄(thiazole yellow)、硫黄素(thioflavine)等。在 20 世纪 30 年代,人们用这种荧光新技术观察了活体皮肤、肝脏、肾脏、结膜和肾上腺。为满足生物学的需要,活体荧光探针必须在等渗、无毒和无猝灭剂的条件下使用。近年来,现代落射荧光显微镜、显微荧光扫描仪、高灵敏摄像机、数据实时采集器等现代化仪器和方法的应用,使微循环的体内活体显微术又重新受到欢迎。

Byron 等^[29]还将表面不同修饰层的量子点注入裸鼠体内,经循环实验发现,表面不同修饰的量子点在体内的半衰期也不同,利用表面材料,可确定量子点在体内的位置。实验结果表明,在体内 4 个月后,这些量子点仍能发出荧光。

1.4.6 荧光探针在肿瘤标记中的应用

肿瘤的诊断和治疗问题是人类共同关注的焦点问题。光学成像技术在敏感的肿瘤诊断,尤其是在肿瘤的早期诊断阶段有着巨大潜力,是一项灵敏、非侵入性、非电离性、临床应用安全且花费相对便宜的技术^[30]。国内外在荧光探针与癌细胞相互作用以及对肿瘤特异性诊断方面开展了广泛的研究。

(1) 荧光染料探针靶向标记成像。荧光染料探针被公认为是对肿瘤细胞进行标记的简便有效的途径之一,受到国内外科学家的广泛关注^[31-33]。叶酸分子偶联的荧光体通过叶酸受体的特异性作用进入肿瘤细胞,使肿瘤组织明显区别于临近正常组织。与放射成像技术相比,荧光成像无创伤,也使患者免受粒子辐射。

(2) 超顺磁氧化铁磁共振成像。超顺磁氧化铁纳米粒子在磁共振成像领域得到了广泛应用^[34]。

(3) 量子点探针靶向标记成像。与有机荧光染料相比,量子点具有吸收光谱宽、发射光谱窄且对称、荧光发射光谱与受体分子吸收光谱的重叠程度可以根据量子点尺寸大小进行调节等特点,还具有荧光量子产率高、发射光强、稳定性好、荧光寿命长且不会发生光漂白等优良特性,因此在生物光学中得到广泛应用^[35,36]。高性能的多功能量子点与先进的光学成像技术相结合,为实时、动态地监测细胞内和生物活体内的分子活动提供了强有力的实验手段,为揭示生命活动规律及研究疾病的发生、诊断和治疗提供了新技术新方法,极大地促进了生命科学的发展。

量子点作为光学对比剂结合荧光成像系统可进行肿瘤的定位,实时监测肿瘤细胞的生长和转移,为肿瘤动力学的研究及指导癌症手术提供了帮助^[37]。研究者首次实现了用量子点同时在活体内定位和成像^[37],如图 1-11 所示。他们用 ABC triblock 聚合物纳米颗粒层和聚乙二醇包被量子点,并将其附着在单克隆抗体上,此抗体连接物可以和前列腺肿瘤细胞上的前列腺特异性抗原结合。这种量子点注

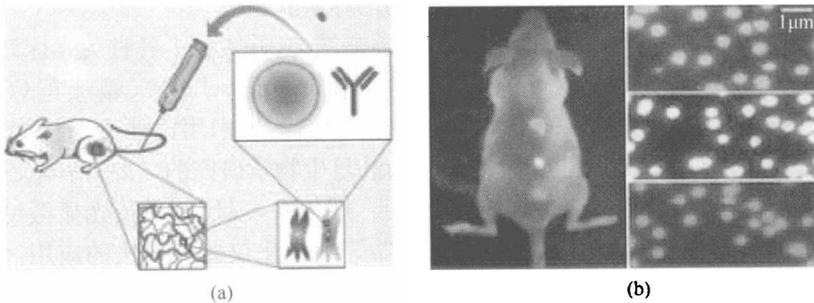


图 1-11 量子点在体成像

(a) 量子点动物活体实验流程; (b) 量子点在活体动物内的多色标记成像

射进入有前列腺肿瘤的裸鼠循环系统后,就会聚集到肿瘤细胞周围,荧光成像检测可得到在体肿瘤细胞敏感的多色荧光图,获得肿瘤大小和定位的信息。他们还用未结合抗体的量子点“被动”地定位肿瘤,发现尽管量子点可以从肿瘤血管上“渗漏”出来并在肿瘤上聚集,但这个过程比结合了抗体的量子点聚集要慢很多,效果也差。这种特别设计的量子点在较宽范围的 pH 和盐条件下是稳定的,能适应于复杂的体内实验。

在利用量子点进行小鼠的淋巴瘤细胞成像过程中^[38],量子点可通过内吞作用进入小鼠淋巴瘤细胞。量子点标记物在细胞中很稳定,不会影响细胞的活动和功能。被量子点标记的淋巴瘤细胞经尾静脉注入小鼠体内,5天后用荧光显微镜和流式细胞仪结合组织切片观察,量子点标记物在外周血中的浓度约为 10%,7天后,在鼠的肝、肾、脾、肺中仍可以观察到约 20% 的标记细胞的初始量子点。

在肿瘤转移的研究中,通过量子点标记、多光子激发和光谱成像,观察到了肿瘤细胞转移到肺组织中的五个入口^[39],如图 1-12 所示。

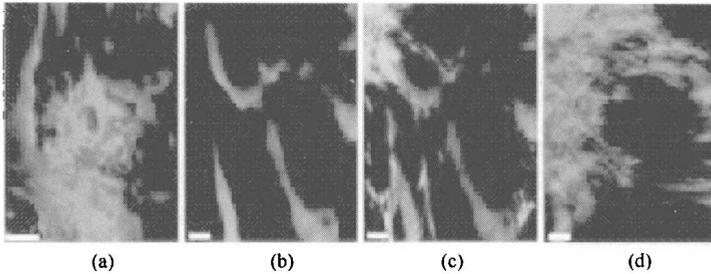


图 1-12 用量子点进行的血管成像

(a) 被标记的右旋糖苷从肿瘤血管中溢出到组织间隙致使血管成像模糊;(b) QD 407 作为血管标记显示出血管内外明显的界限;(c) QD 407 标记的血管(蓝色)和 GFP 标记的血管周的细胞(绿色)同时显像;(d) QD 660 标记的血管和 SHG 标记的胶原质同时显像(标尺,50 μ m)

量子点还可用于检测肿瘤的血管变化。肿瘤组织周围血管丰富,细胞生长迅速,通常所用荧光试剂不能在体实时对多种组织成像,而多色量子点标记技术可以应用到肿瘤细胞、肿瘤血管及周围区域的边界研究中,从而应用于肿瘤早期诊断和治疗。将量子点、多光子成像技术和表达绿色荧光蛋白的转基因老鼠结合研究肿瘤血管周围的细胞和组织^[40],可以实时成像,并可从血管周围的细胞和组织中区分出肿瘤血管。此外,量子点还被成功地用于检测干细胞由骨髓补充到肿瘤脉管系统的过程,这为多功能的量子点用于肿瘤病理生理学研究开辟了一条道路。

近红外荧光由于能穿透组织进行深层组织成像且自发荧光背景较低,在肿瘤研究中已日益受到关注。目前,已制备出可发射近红外荧光的量子点,并用于多种疾病的前哨淋巴结(SLN)的定位标记成像,如非小细胞肺癌、食道癌等癌症和胸膜

部位疾病等^[41-43]。在鼠的前肢皮下和猪的腹股沟皮下注射近红外荧光量子点作为肿瘤细胞淋巴示踪^[44],通过近红外荧光成像系统观察到量子点被引流到前哨淋巴结,该方法是确定癌症是否扩散到身体其他部分的第一步,也是最关键的一步。近红外荧光量子点成像系统可同时显现外科手术区域和淋巴液排泄途径及节点,提供实时可视化成像来指导定位和外科切除术^[45,46],克服了许多现有技术的局限性。

荧光探针技术具有灵敏度高、特异性强、基于分子活动特征直观检测早期病变等优点,通过设计合适的荧光探针,荧光探针成像技术可以用来定量研究具有代谢活性的肿瘤细胞,进行微转移瘤和小型残留病灶的早期检测,追踪免疫细胞的迁移和新生血管的形成过程,以及进一步用于非侵入式监测肿瘤发生、演进和治疗过程中的微观响应等现象。肿瘤的靶向标记与成像已成为荧光探针技术最重要的应用领域。

参 考 文 献

- [1] 叶张梅. 纳米二氧化硅包裹绿色荧光蛋白作为生物荧光探针的研究. 上海:上海大学,2011.
- [2] 李楠,物理,王凤翔,等. 荧光探针应用技术. 北京:军事医学科学出版社,1998.
- [3] 陈国珍,黄贤纠,郑朱梓. 荧光分析法. 2版. 北京:科学出版社,1990.
- [4] 黄晓峰,张远强,张英起. 荧光探针技术. 北京:人民军医出版社,2004.
- [5] 刘爱平. 细胞生物学荧光技术原理和应用. 合肥:中国科技大学出版社,2007.
- [6] 徐林. 多功能荧光探针的设计、合成与性能研究. 上海:华东理工大学,2012.
- [7] Santra S, Yang H, Stanley J T, et al. Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS; Mn/ZnS quantum dots. *Chemical Communications*, 2005, 25: 3144-3146.
- [8] Li W, Xie H, Xie Z, et al. Exploring the mechanism of competence development in escherichia coli using quantum dots as fluorescent probes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 58(1): 59-66.
- [9] Zhu L, Ang S, Liu W T. Quantum dots as a novel immunofluorescent detection system for cryptosporidium parvum and giardia lamblia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 597-598.
- [10] Martins A M P, Pagilla K, Heijnen J J, et al. Filamentous bulking sludge: A critical review. *Water Research*, 2004, 38(4): 793-817.
- [11] 吴昌永,彭永臻,彭轶. A²O 工艺中的污泥膨胀问题及恢复研究. *中国环境科学*, 2008, 28(2): 1074-1078.
- [12] Giovannoni S J, Delong E F, Olsen G J, et al. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(2): 720-726.
- [13] Delong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 1989, 243(4896): 1360-1363.
- [14] 邢德峰,任南琪,王爱杰. FISH 技术在微生物生态学中的研究及进展. *微生物学通报*, 2003, 30(6): 114-119.
- [15] 费学宁,曹阳,郝亚超,等. 荧光原位杂交技术在活性污泥菌群识别中的研究进展. *化学通报*, 2011, 74(6): 520-527.

- [16] Britton J, Antunes E, Nyokong T. Fluorescence studies of quantum dots and zinc tetraamino phthalocyanine conjugates. *Inorganic Chemistry Communications*, 2009, 12(9): 828-831.
- [17] Lunz M, Bradley A L, Chen W Y, et al. Förster resonant energy transfer in quantum dot layers. *Superlattices and Microstructures*, 2010, 47(1): 98-102.
- [18] Willard D M, Carillo L L, Jung J, et al. Cdse-ZnS quantum dots as resonance energy transfer donors in a model protein-protein binding assay. *Nano Letters*, 2001, 1(9): 469-474.
- [19] Hohng S, Ha T. Single-molecule quantum-dot fluorescence resonance energy transfer. *Chem Phys Chem*, 2005, 6(5): 956-960.
- [20] Chan P M, Yuen T, Ruf F, et al. Method for multiplex cellular detection of mrnas using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(18): E161.
- [21] 张兵波. 疾病诊断用功能化量子点荧光探针的研究. 天津: 天津大学, 2009.
- [22] Michalet X, Pinaud F, Bentolila L, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, 307(5709): 538-544.
- [23] Chen F, Gerion D. Fluorescent CdSe/ZnS nanocrystal-peptide conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells. *Nano Letters*, 2004, 4(10): 1827-1832.
- [24] tanke H J, Dirks R W, Raap T. Fish and immunocytochemistry: Towards visualising single target molecules in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(1): 49-54.
- [25] Giepmans B N G, Deerinck T J, Smarr B L, et al. Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using quantum dots. *Nature Methods*, 2005, 2(10): 743-749.
- [26] Howarth M, Takao K, Hayashi Y, et al. Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase//*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(21): 7583-7588.
- [27] Shan G Y, Li D, Feng L Y, et al. Encapsulation of CdSe/ZnSe quantum dots by liposome complexes. *Chinese Journal of Chemistry*, 2005, 23(12): 1688-1692.
- [28] Hasegawa U, Nomura S M, Kaul S C, et al. Nanogel-quantum dot hybrid nanoparticles for live cell imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 331(4): 917-921.
- [29] Ballou B, Lagerholm B C, Ernst L A, et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjugate Chemistry*, 2004, 15(1): 79-86.
- [30] Santra S, Dutta D, Walter G A, et al. Fluorescent nanoparticle probes for cancer imaging. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2005, 4(6): 593-602.
- [31] Jiang G, Wang S, Yuan W, et al. Highly fluorescent contrast for rewritable optical storage based on photochromic bishienylethene-bridged naphthalimide dimer. *Chemistry of Materials*, 2006, 18(2): 235-237.
- [32] 林元华, 王建飞, 南策文, 等. 用于分子识别的荧光标记探针的研究进展. *材料导报*, 2005, 18(11): 6-8.
- [33] Wu Y, Peng X, Fan J, et al. Fluorescence sensing of anions based on inhibition of excited-state intramolecular proton transfer. *The Journal of Organic Chemistry*, 2007, 72(1): 62-70.
- [34] Choi H, Choi S R, Zhou R, et al. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. *Academic Radiology*, 2004, 11(9): 996-1004.
- [35] Liu J, Zhao W, Fan R L, et al. Investigation of the nonspecific interaction between quantum dots and immunoglobulin g using rayleigh light scattering. *Talanta*, 2009, 78(3): 700-704.
- [36] Bharali D J, Lucey D W, Jayakumar H, et al. Folate-receptor-mediated delivery of inp quantum dots for

- bioimaging using confocal and two-photon microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(32): 11364-11371.
- [37] Gao X, Cui Y, Levenson R M, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(8): 969-976.
- [38] Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, et al. Applications of t-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 314(1): 46-53.
- [39] Voura E B, Jaiswal J K, Mattoussi H, et al. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nature Medicine*, 2004, 10(9): 993-998.
- [40] Stroh M, Zimmer J P, Duda D G, et al. Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu *in vivo*. *Nature Medicine*, 2005, 11(6): 678-682.
- [41] Soltesz E G, Kim S, Laurence R G, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2005, 79(1): 269-277.
- [42] Kim S, Lim Y T, Soltesz E G, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature Biotechnology*, 2003, 22(1): 93-97.
- [43] Jain R K, Stroh M. Zooming in and out with quantum dots. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(8): 959-960.
- [44] Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, et al. Quantum dots as photosensitizers? *Nature A-Z index*, 2004, 22(11): 1360-1361.
- [45] Parungo C P, Ohnishi S, Kim S W, et al. Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2005, 129(4): 844-850.
- [46] Morgan N Y, English S, Chen W, et al. Real time *in vivo* non-invasive optical imaging using near-infrared fluorescent quantum dots. *Academic Radiology*, 2005, 12(3): 313-323.

2.3 生物荧光标记技术

荧光标记方法是一种最有效且快捷的生物标记方法之一,它是利用荧光物质通过化学或物理作用与待测组分结合,形成复合物并经过荧光检测,得到定性和定量信息的一种技术^[21]。荧光标记技术起源于20世纪40年代,用荧光标记抗体来检测相应的抗原。随着现代医学、分子生物学的发展和各种先进荧光检测技术及仪器[如流式细胞仪(FCM)、激光共聚焦扫描显微镜(LSCM)等]的应用,荧光标记作为一种非放射性的标记技术因其操作简便、稳定性高、灵敏度高和选择性高等特点受到广泛重视,并取得迅速发展。不仅可以应用于恶性肿瘤的识别、药物和氨基酸等多种物质的测定,而且在核苷酸标记和微生物分析等领域也有广泛应用。在酶促反应、免疫反应和蛋白质的生物合成等许多生命化学过程中具有十分重要的意义。

荧光探针是指能够将分子间及分子离子间的相互作用通过荧光特性变化直接反映出来的分子或复合体。目前常用的荧光探针主要有有机荧光染料、量子点、染料掺杂纳米二氧化硅、磁性纳米粒子、多功能纳米粒子、荧光蛋白等。它们在生物标记中具有用量少、检测准确、灵敏度高等优点,因此常用于标记抗原抗体和核酸,还可以检测蛋白质的活性点位、研究DNA碱基损伤修复以及药物分子的化学反应活性,尤其在肿瘤的识别过程中起到了重要的作用。

受体介导的肿瘤靶向成像就是以肿瘤细胞表面特异性或过度表达的受体为靶点,以受体对应的配体或配体结合物为载体,利用受体和配体的特异性反应,将靶向探针递送至受体表达阳性肿瘤细胞的一种成像系统。该成像技术可增强探针的选择性,成为肿瘤生物标记的研究热点。作为介导细胞内化的特异性受体之一,叶酸受体(folate receptor, FR)能够将叶酸(folate, FA)及其复合物摄取入真核细胞胞浆,亲和力高($K_d=1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)。由于FR在部分人体肿瘤,如卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌、结直肠癌、鼻咽癌和肾细胞癌等细胞表面都有过量表达,而在正常组织的表达又高度保守,因此利用FR进行肿瘤特异性显像和治疗受到广泛关注。虽然其他靶向物质(抗体或配体)也能起到靶向运输蛋白质、脂质体、病毒、反义核酸、基因治疗试剂、药物、成像试剂、中子俘获治疗(NCT)药物的作用,但与之相比,FA在癌症定位成像中有独特的优点。细胞对抗体、激素和其他配体的内化作用是为了从其表面清除此配体(如一旦某种激素通过其受体发出信号,它必须被破坏以防其不断发信号),因此大部分靶向配体被内化并被送至溶酶体。与此相反,由于FA是维持细胞功能的基本物质,因此其被细胞吸收,而连接在FA上的待运物质不会被运至溶酶体,而是留在细胞内吞腔或释放到胞液中。有些情况下连在FA上的物质甚至出现在细胞核内,但绝不会被吸收或破坏。另

外,FA 相对分子质量小、低毒、稳定、容易修饰及 FA 复合物在受体阴性组织中的清除速率快等特点也使之在肿瘤靶向成像中得到广泛应用。近年来,本课题组对叶酸受体介导的靶向肿瘤光学成像技术中的荧光探针进行了深入研究。

2.3.1 有机荧光染料探针

荧光染料探针是一种广泛使用的荧光标识剂(又称为荧光探针),具有检测速度快、重复性好、用样量少、无辐射等优点。利用荧光探针可测定 RNA 和 DNA 的结构、研究 DNA 碱基损伤修复、辨别蛋白质分子中氨基的状态和蛋白质分子的活性区、检测皮摩尔级的蛋白质、区分不同构象的核酸以及有关药物的化学反应活性。

2.3.1.1 用于荧光标记染料的基本特征

由于染料本身性能的不同,导致不同染料在生物分析过程中表现出较大的差异,并不是所有的荧光染料都能作为荧光探针应用在生化分析与生物检测领域,因此,可用于生物标记的荧光染料应该具有以下大部分或全部特征。

(1) 较高的荧光量子产率。荧光量子产率的高低是衡量一个荧光染料优秀与否的重要因素。荧光量子产率高的染料,在相同情况下能有效地提高检测的灵敏度,使检测限达到最低。不过一些利用“OFF-ON”原理设计的分子探针,其荧光量子产率可以很低。

(2) 较长的最大吸收和发射波长。由于生物体内存在很多的共轭小分子,如嘌呤、嘧啶、各种氨基酸、蛋白质分子等,它们在紫外区域都有吸收和发射,如果荧光染料的吸收波长在紫外或者较短波长区域,会由于背景荧光的影响而降低荧光探针自身的灵敏度,并且某些干扰分子的自发荧光会掩盖探针的发射光谱,容易使检测的结果出现偏差。此外,紫外激发光照射在生物组织内造成的散射光也对荧光的检测灵敏度产生影响。

(3) 较高的环境稳定性。生物标识及生化检测中复杂的外部环境,要求荧光染料本身在光照、酸碱条件,以及较高温度下化学性质稳定,即染料不会发生明显的光褪色现象,光谱不会在酸碱条件稍微改变的状况下发生较大的波动,当然也不应该在稍高的温度下迅速热分解。

(4) 较好的细胞穿透能力和细胞内的溶解能力。染料分子既要有一定的油溶性又要有一定的水溶性,油溶性的提高有助于染料分子穿透细胞膜,水溶性的增加有助于染料分子在细胞内很好地分散。染料分子的这两种性质可以通过引入适当的亲水性或亲油性基团来获得。

(5) 对生物体细胞组织没有或仅有极小的毒性。因为荧光探针只对特定的靶标分子起作用,不会由于自身结构而对细胞内其他活性组织产生破坏,所以作为荧

光探针重要组成部分的荧光团应尽量不干扰细胞的正常生理功能。

(6) 具有良好的溶解性。染料在大部分溶剂中应该具有较好的溶解性,从而有效抑止自身的聚集,有利于生物分子的标识与检测。

2.3.1.2 用于肿瘤标记的荧光染料分类

常用于肿瘤标记的荧光染料种类很多,主要有吡啶(acridine)、菲啶(phenanthridine)类染料、荧光素(fluorescein)类、罗丹明类(rhodamine)、噻嗪(thiazine)类染料、BODIPY(boron dipyrromethene difluoride)染料、二氟烷硼类、二苯乙烯(stilbene)类、萘酰亚胺(naphthalimide)类、芴(flourene)类荧光染料、菁类染料(cyaninedyes)等。

1) 荧光素类染料

荧光素类染料是最常用的荧光探针,如图 2-11 所示。这类探针具有相对高的荧光吸收、较好的光稳定性、高的荧光量子产率、良好的水溶性以及吸收发射波长可从可见光到近红外区,其活性基团易于被标记分子中的一 NH_2 , —OH, —SH 等结合,常应用于蛋白质、核酸等物质的分析。但是由于染料中羟基和氨基的存在,使得该类染料对 pH 敏感,在应用于离子或生物分子探针时,对工作环境的酸碱性有特定的要求。荧光素类标记试剂包括标准荧光素及其衍生物,如异硫氰酸荧光素(FITC)、羟基荧光素(FAM)、四氯荧光素(TET)等。其中 FITC 是应用最为广泛的一种荧光素衍生物,常用于杂交探针、Edman 降解蛋白质测序及抗体的标记。FAM、TET 等在标记技术中主要用于 DNA 自动测序和核酸探针等。但荧光素类衍生物有共同的缺点,即容易光致褪色、光猝灭率高、pH 敏感性强和发射波谱宽等。表 2-2 列出了常用的以荧光素为母体结构的荧光探针^[22]。

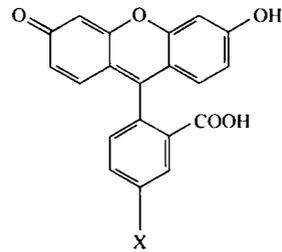


图 2-11 荧光素的分子结构

2) 罗丹明类染料

罗丹明类染料(rhodamine dye)是生物技术中常用的蛋白质分析染料之一。这类探针大部分含有异硫氰基、磺酰卤基等活性基团,在标记反应中活性基团大多与— NH_2 结合。罗丹明衍生物量子产率低,但发射波长较长,受样品背景干扰相对较少。以罗丹明为母体,可以发展一系列激发波长在红外或近红外区域的荧光探针,如表 2-3、表 2-4 和表 2-5 所示。在罗丹明类荧光化合物中(图 2-12、图 2-13 和图 2-14),包括得克萨斯红(Texas red)这一类长波长的荧光探针(母体结构为罗丹明 101),适合 Ar-Kr 激光器的 568 nm 光谱线或 He-Ne 激光器的 594 nm 光谱线激发,比四甲基罗丹明(tetramethyl rhodamine)和丽思胺罗丹明 B(lissamine rhodamine B)的波长更长,荧光量子产率更高^[22]。与荧光素类衍生物相比,罗丹

明类染料具有更强的光稳定性、更高的荧光产率和更低的 pH 敏感性。

表 2-2 常用的以荧光素为母体的荧光探针

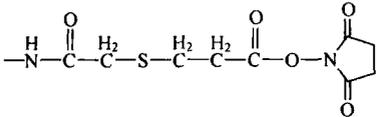
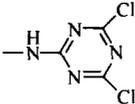
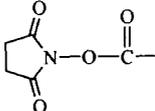
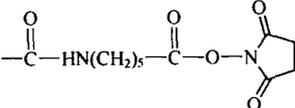
X	名称
$-N=C=S$	5-异硫氰酸荧光素
	5-荧光素琥珀酰亚胺酯
	5-(4,6-二氯三嗪基)氨基荧光素
	5(6)-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯
	6-[荧光素-5(6)-甲酰氨基]-己酸

表 2-3 以罗丹明 B 为母体结构的荧光探针

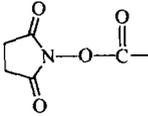
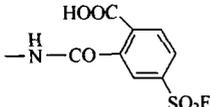
R ₁	R ₂	R ₃
$-CH_3$	$-COO$	
$-CH_3$	$-COO$	$-N=C=S$
$-C_2H_5$	$-COO$	$-N=C=S$
$-C_2H_5$	$-COO$	
$-C_2H_5$	$-SO_3$	$-SO_2F$
$-C_2H_5$	$-SO_3$	$-SO$
$-C_2H_5$	$-SO_2F$	$-SO_3$

表 2-4 以罗丹明 Q 为母体结构的荧光探针

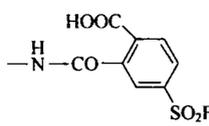
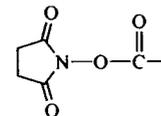
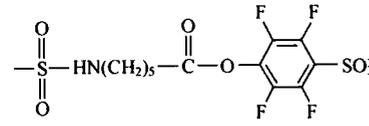
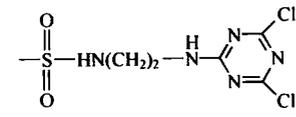
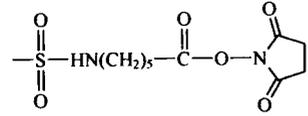
R ₁	R ₂
-COOH	
-O ₃ SH	-SO ₂ F
-SO ₂ F	HSO ₃ ⁻

表 2-5 以罗丹明 101 为母体结构的荧光探针

R ₁	R ₂
-COOH	
HSO ₃ ⁻	
HSO ₃ ⁻	-SO ₂ Cl
HSO ₃ ⁻	
-SO ₃	
-COOH	-N=C=S

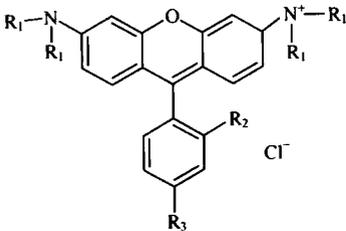


图 2-12 2-罗丹明 B

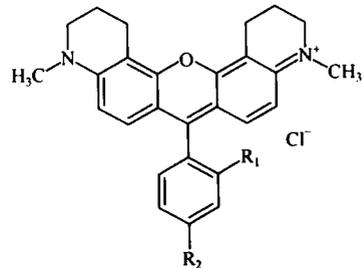


图 2-13 罗丹明 Q

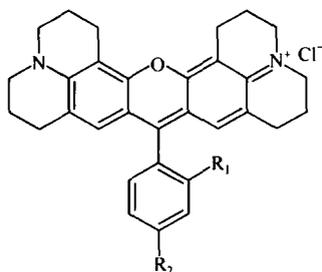


图 2-14 罗丹明 101

荧光素和罗丹明同属于咕吨类染料,它们的缺点也表现为 Stokes 位移较小,对环境因素,如 pH 的依赖性很强,与某些生物大分子结合后荧光猝灭严重,可达 60%~90%。由于尚未找到更合适的替代品,它们仍然是生物医学上应用最广泛的荧光物质。

3) 香豆素类

香豆素类(coumarins)染料的母体本身并无荧光,但其荧光的有无或强弱与母体分子上取代基的种类和位置有很大的关系(图 2-15),如羟基香豆素在紫外灯下大多能显出蓝色荧光,在碱溶液中荧光会明显增强。以香豆素为母体结构的荧光探针如表 2-6 所示。取代后的香豆素衍生物特别是给电子基团的取代,将增加其荧光量子产率^[22]。此类染料 Stokes 位移较大,光照稳定性较好,而且由于染料分子的体积比较小,能较容易地穿透细胞。其不足之处是吸收发射波长较短(<400 nm),且分子中的不饱和和内酯结构在碱性溶液中会渐渐水解生成顺邻羟桂皮酸盐,加热后可进一步不可逆地转化为反邻羟桂皮酸盐(稳定状态),因此香豆素在碱性条件下是不稳定的。大多数的香豆素荧光染料为黄色,带有绿色荧光。

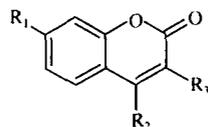


图 2-15 香豆素类染料荧光团的结构

表 2-6 以香豆素为母体结构的荧光探针

R ₁	R ₂	R ₃
-NH ₂	-CH ₃	H
-N(CH ₂ CH ₃) ₂	H	
-N(CH ₃) ₂		H
-N(CH ₃) ₂	-CH ₃	-N=C=S
-OH	H	
-OCH ₃	H	

4) 氟化硼络合二吡咯甲川类

氟化硼络合二吡咯甲川 (boradiazaindacenes difluoro-bora-dipyrromethenes, boron-dipyrromethene, BODIPYs 或 BDPs, BODIPY) 类荧光探针是由分子探针公司开发的, 其结构式如图 2-16 所示。常用以替代那些有部分缺陷的传统荧光探针, 普遍具有荧光产率高、pH 敏感性低(无离子变化)、光稳定性强及发射波谱窄的优点, 因此已被广泛应用, 并逐渐替代荧光素类 (fluoresceins)、四甲基罗丹明类 (tetramethyl rhodamines) 及得克萨斯红类染料, 如 BODIPY FL 可代替荧光素类染料, BODIPY R6G 可代替罗丹明 6G, BODIPY TMR 可代替四甲基罗丹明, BODIPY TR 可代替得克萨斯红。这些 BODIPY 类荧光探针具有与被替代物类似的光谱特征, 能共用同样的光过滤器与激发光源, 但更具优点。该类荧光探针种类很多, 通过改变 BODIPY 类母体结构中的取代基即可得到不同光谱性质的荧光探针, 发射光谱几乎能覆盖整个可见区域, 通用性很强。

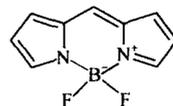


图 2-16 氟化硼络合二吡咯甲川 (BODIPY) 类荧光探针

5) 萘酰亚胺类荧光染料

萘酰亚胺 (naphthalimide) 具有较大的共轭体系, 其分子结构中一端为较强的吸电子基团, 另一端有较强的给电子基团, 如图 2-17 所示。这样的结构中电子容易受激发跃迁而产生荧光, 使得该类化合物表现出良好的荧光性能。

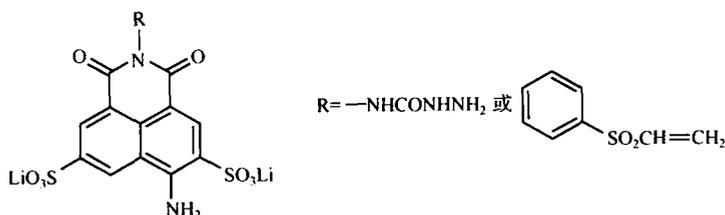


图 2-17 萘酰亚胺的结构式

1,8-萘酰亚胺类荧光染料能与 DNA 相互作用, 是一种 DNA 嵌入剂, 稳定性好且量子产率较高, 是很有用的生物标记用荧光染料。其 4 位 -NH₂ 等给电子基团的衍生物大都具有强烈的荧光。含酰肼和乙烯磺活性基团的萘酰亚胺染料, 在适合的 pH 和温度下, 对微生物着色有专一选择性, 由于其无毒, 可用于细胞内染色。但是其波长较短, 可调范围较小。如果 R 是给电子基团(如氨基)则可以很好地促使光谱波长红移。另外, 萘酰亚胺类染料的摩尔吸光系数较低, 染料的颜色较浅。

6) 芪类荧光染料

芪类荧光染料母体(图 2-18)本身荧光不强, 但是其含有给电子基团衍生物的

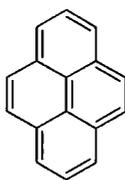


图 2-18 苝的母体结构

荧光量子产率可达 0.5 以上。其中的 α 位是反应活性位点，可以与含羰基的化合物反应，引入活性基团。由于该染料分子为平面结构，在溶剂中有很强的积聚效应，并在 470 nm 附近出现长波长的荧光发射，这个性质常被用来设计成苝基缔合物荧光探针，另外苝的平面性也使得其比较适合作为 DNA 的嵌入型探针。苝染料极其稳定，长时间接受光照或酸碱都不会引起结构的变化，但其最大吸收波长过短 (< 370 nm)，

荧光受生物体内各种物质干扰强烈，溶解性不理想，通常是引入特定的取代基来提高苝的溶解度。

7) 含四吡咯基团类荧光染料

含四吡咯 (tetrapyrrole-based) 基团类荧光染料包括卟啉 (porphyrin) 与酞菁 (phthalocyanine) 类 (图 2-19)，它们属于近红外荧光染料。卟啉主要用于研究生物大分子，如 DNA 和蛋白质的结构、性能与功能，并通过荧光标记技术测定其性能和结构的改变。卟啉与 DNA 有三种作用模式：静电作用、嵌入作用及堆积作用。与卟啉相比，酞菁染料对光、氧、热有较好的稳定性，应用于疾病诊断与组织造影方面。这类染料的缺点是溶解度较差、体积较大，在生物检测应用时会影响生物分子的生理性能。

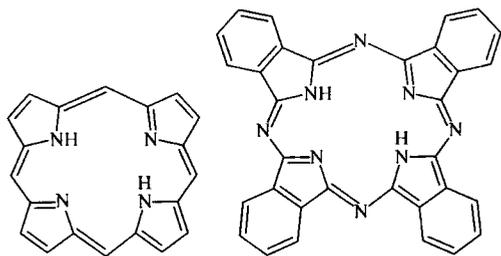


图 2-19 卟啉与酞菁的母体结构

8) 噻嗪和噁嗪类染料

噻嗪和噁嗪类染料均含有可用来进行标记的氨基活性基团，目前常用的这类染料主要有耐尔蓝、亚甲基蓝、噁嗪 750 (图 2-20) 等。噻嗪类和噁嗪类荧光探针发射波长在近红外区，具有分子较小、易合成等优点，但其不足之处在于荧光量子产率偏低。

9) 苯乙烯类荧光染料

苯乙烯类荧光染料由杂环碱季铵盐和芳环通过乙烯基连接而成，其结构通式如图 2-21 所示。它一般由杂环季铵盐和取代芳香醛在碱催化下脱去一分子水得到，常用的碱性催化剂有三乙胺、吡啶、哌啶等。

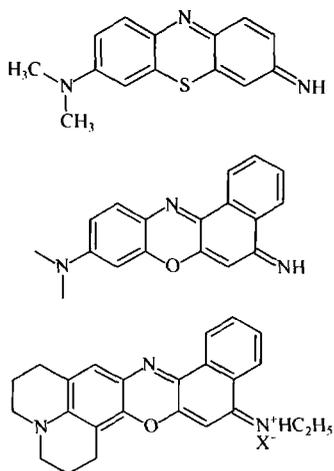


图 2-20 耐尔蓝、亚甲基蓝及曙红 750 的分子结构示意图

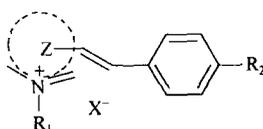


图 2-21 苯乙烯类荧光染料的结构式

在吖啶中滴加盐酸, 蒸干水得到杂环季铵盐, 将其与二甲氨基苯甲醛在乙醇中加热回流 2 h, 冷却过夜, 抽滤得到苯乙烯类荧光染料^[23], 如图 2-22 所示。它可作为 pH 敏感荧光染料定性检测酸性细胞系。

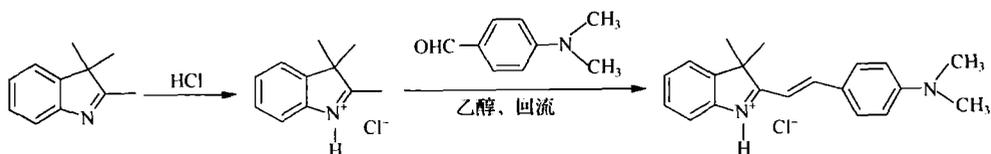


图 2-22 苯乙烯荧光染料的合成

苯乙烯类荧光染料具有荧光量子产率较高、光学性质较好等特点, 若在其结构中引入较大的共轭结构, 如咪唑环等, 可使该类荧光染料的光学稳定性增强、荧光量子产率增加、最大发射波长红移, 易于应用于生物标记中。

10) 菁类荧光染料

菁类荧光染料的一般结构是分子两端含有两个氮原子中心, 其中一个带有正电荷, 它们之间通过一个含奇数个碳原子的共轭甲川链相连。这种结构特征被认为是一种推拉电子体系, 并且是菁染料成为发色团的结构基础。如图 2-23 所示,

根据甲川链上电荷存在形式的不同,菁染料可分为以下几种类型^[24]:阳离子多甲川类——菁和半菁染料(1),阴离子多甲川类——铷菁染料(2),中性多甲川类——吩菁染料(3),两性离子型方酸菁染料(4)。

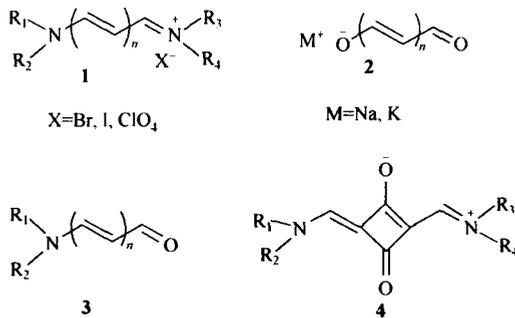


图 2-23 菁染料的结构通式

一般来说,菁染料稳定存在的形式是全反式的构型。某些条件下也会发生光致异构化,得到一些顺式的构型。这种构型的形成可以通过一些新技术来研究,如闪光光解、瞬态吸收和皮秒时间分辨光谱等。

其中 2,3,3-三甲基-3*H*-吡啶类碳菁染料是一类重要的阳离子多甲川菁染料,由两端的吡啶环与共轭的甲川链连接在一起构成,根据甲川链上碳原子个数的不同,分为一甲川、三甲川(Cy₃)、五甲川(Cy₅)等,其结构通式如图 2-24 所示。通过改变 *n*、R₁、R₂ 即可形成各种不同结构的 3*H*-吡啶菁染料。根据甲川链两端的母核是否相同,将其分为对称和不对称菁染料;按染料的溶解性能,吡啶菁染料可分为水溶性和非水溶性两类,染料的水溶性已成为目前某些生物应用荧光探针的必要条件之一。

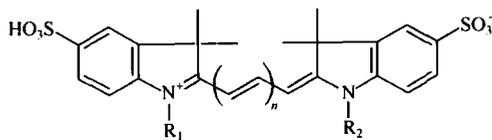


图 2-24 一种菁染料的典型结构

菁染料作为荧光探针与现有的其他荧光标记试剂,如罗丹明、荧光素等相比更具优越性,光谱范围广、摩尔吸光系数大、无荧光背景、荧光量子产率高、灵敏度好以及具有与 ds-DNA 的高度亲和力等特征,使得菁染料正逐步取代传统的荧光标记染料成为新一代标记染料。在近红外荧光标记染料中,菁类染料扮演着最重要的角色。一般来说,这类染料的最大吸收波长和最大发射波长都超过了 600 nm,并且可通过改变中间共轭碳链的长短(如 Cy₃、Cy₅、Cy₇等)在极广的范围内调节其

光谱性质;它们具有很高的摩尔吸光系数,并且可以方便地引入水溶性基团(如羧基、磺酸基和羟基);同时中间的甲川链可用刚性的芳香环或芳香杂环取代,从而更大地提高了其光谱性能,具有广泛的应用价值。此类染料最大的缺点是光稳定性稍差,多甲川结构容易在光照下氧化断裂,导致染料分解。另外,此类染料荧光量子产率通常不高,也影响了其自身的广泛应用。

菁染料类型众多,其吸收波长分布在 350~1200 nm,光谱分布在从可见光到远红外区的广泛区域中,具有很大的可比性及选择性。菁类染料及其衍生物吸光能力强且能发出强的荧光,可作为荧光探针与生物分子生成共价键。在激光或荧光发射器作用下检测其与生物分子键合后的活性衍生物,能同时进行多色或多参数分析。这类染料对于简化操作、降低成本极为有利,且可提高一个复杂的混合体系中不同被标识成分的测定速率;具有相对的光稳定性,不会在荧光显微镜下迅速猝灭;可作为简单有效的偶合试剂;类型多样,通过结构的改变可使其具有不同的水溶性,而且所带电荷也可改变;相对分子质量相对较小(在 1000 以下),对被标记分子的连接与功能不会产生位阻效应;对肿瘤细胞比对正常细胞更具亲和力^[25],将其与抗癌化学药物分子结合,将在癌细胞的早期识别及癌症治疗疗效评价中得到广泛的应用。

菁类染料通常由两个杂环体系及中间的次甲川链组成,目前研究比较活跃的肿瘤标记菁类染料主要有两大类,一类是噻唑橙(thiazole orange, TO)、噻唑黄(oxazole yellow, YO)系列及其二聚体染料,另一类是多甲川系列菁染料^[26]。前一类 TO、YO 系列染料采用的是非共价键标记方式,靠正负电荷的亲合力作用相互结合。这类嵌入式探针以其标记速度快、接近生理 pH 条件、对生物分子的功能活性影响小等优点,成为目前研究比较活跃的一类典型标记菁染料。它们在未与核酸结合时不发光,检测时无背景干扰,这是以往染料所缺乏的。当与 DNA 结合后,尤其是与 ds-DNA 结合时,其荧光强度增大 1000 倍以上;与 RNA 相结合时,其荧光强度增大到 3000 倍以上。该染料对肿瘤细胞比对正常细胞更具亲和力,将在癌细胞的早期标记中得到广泛应用。而多甲川系列菁染料(图 2-25)带有活性基团(琥珀酰亚氨基或异硫氰基),能和生物分子以化学键合的方式结合。多甲川系列菁染料大多属于近红外荧光染料,它们的吸收和发射光谱区位于 550~1200 nm 处。改变结构中所接的活性基团种类及位置,可得到光谱荧光特性不同的菁染料荧光探针。

部分菁染料在水溶液中易于缔合,其吸收光谱产生红移,吸收光谱最大值与单体的吸收光谱最大值相差 100 nm 左右。缔合物的形成会降低染料单体的荧光强度,但当染料分子与生物大分子发生作用后可使染料的单体形式得到稳定修饰,荧光强度也得以显著增强^[27]。在强激光照射下易发生光漂白是有机类荧光染料最

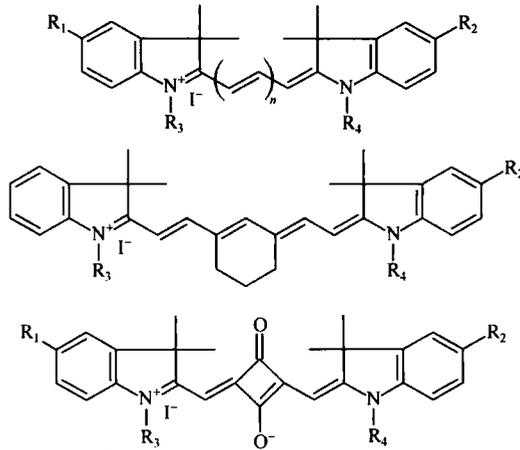


图 2-25 几种多甲川菁染料的母体结构

普遍的缺陷。

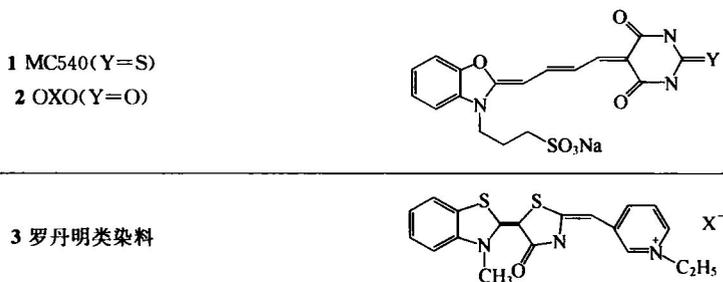
2.3.1.3 荧光染料探针分子标记变异细胞的研究进展^[28]

在变异细胞的识别中,不同结构的荧光染料因其性质不同,标记的方式也不同。某些荧光染料因其自身对某类细胞具有识别性,能选择性地进入并标识,可直接用于变异细胞的识别。而大多数荧光染料不具备对特定器官及组织的选择性,这类染料在标记细胞前必须与生物活性载体,如蛋白质、抗体、肽、脂类等结合,利用生物活性物质之间的选择性,达到选择性识别变异细胞并定位的目的^[29]。

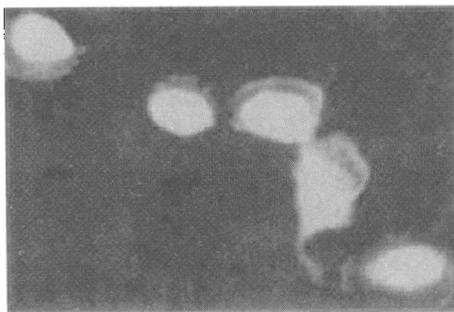
1) 直接用于变异细胞标记的荧光染料

不同结构的荧光染料,如菁染料,因其性质不同,作用也不相同。某些菁染料,如部花菁(又称份菁)及氧代菁,因其自身对某类细胞具有辨识性^[30],能选择性地进入标识癌细胞或作为光毒剂杀死癌细胞,可直接用于变异细胞的标记或作为辐射敏化剂用于固体肿瘤的治疗中。

MC540 是目前应用广泛的电位传感器(表 2-7,1),对于白血病细胞可选择性地辨识,因此可用于早期白血病的诊断及治疗。文献报道的 MC540 衍生物 OXO(表 2-7,2)等都表现出良好的功能。此外一系列新型改性罗丹明类染料作为抗癌试剂取得了较好的效果,其中效果最好的荧光染料分子结构如表 2-7,3 所示。经动物实验表明,这类染料对结肠癌细胞(CX1)具有选择性^[31]。

表 2-7 文中涉及的用作探针的荧光染料^[31]

羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)是一种可穿过细胞膜的荧光染料,可作为良好的细胞标记物。其进入细胞后不可逆地与细胞内的氨基结合,并偶联到细胞蛋白质上。当细胞分裂时,CFSE 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中,且对细胞的正常生理活动没有影响。通过激光共聚焦扫描显微镜观察可见,CFSE 标记的 ECV304 细胞发出绿色荧光,荧光集中分布于细胞质、细胞核和细胞膜上(图 2-26)。细胞核的荧光最强,细胞膜次之^[32]。作为细胞的标记物,CFSE 被研究者广泛应用于细胞移植的体内检测、细胞增殖实验、细胞分选实验及细胞分裂周期的估算等研究中,并可作为一种理想的细胞示踪剂。

图 2-26 CFSE 标记的 ECV304 细胞荧光分析($\times 600$)

荧光染料 Hoechst 33 342 是一种脂溶性 DNA 结合染料,可穿过细胞膜与 DNA 结合,其激发光为 350 nm,在 424~444 nm 可以检测到发射光峰值,可应用于细胞周期研究方面。研究发现,某些癌细胞和干细胞可以将进入细胞的 Hoechst 33 342 排出细胞外,利用流式细胞仪可以将这些不着色的细胞加以分离^[33],许多组织中都可分离得到这种细胞,因此提供了利用该方法分离干细胞的可能性。

很多研究都旨在开发具有肿瘤靶向性的分子荧光探针,通过荧光成像来描述在注射后短时间内分子探针在生物体内的分布。用 Cy₅ 探针标记 IGROV1(卵巢

癌)肿瘤,可检出注入小鼠腹腔中的 IGROV1 不定向节点,而肺癌中的不定向节点只能在解剖后成像^[34]。而通过静脉注射将吡啶类菁染料 TIKS 注入动物体内进行活体检测^[35],由体表可检测到体内 1.5 cm 深的荧光,染料在肿瘤组织中的浓度要高于周围的正常组织 3.6 倍左右。荧光强度与染料在体内的浓度成比例,用光学仪器扫描体表,根据染料分布差异可以在周围正常组织中测出肿瘤结点的位置。注射 5 h 后,染料在正常组织及肿瘤组织中的浓度都达到最大值,然后逐渐减小,7 天后,染料从肿瘤及正常组织中完全消失。

用活性表氯醇和偶氮红合成的新型水溶性荧光探针 1-(2,3-环丙基氧)-2-苯偶氮基-8-乙酰胺基-萘-3,6-双磺酸盐 [1-(2,3-epoxypropoxy)-2-phenylazo-8-acetylamino-naphthalene-3,6-disulfonic acid sodium salt,EPANS],在碱性条件下可用于标记组氨酸且无需繁杂的分离过程。这种方法已经被成功用于人体血清中组氨酸的检测^[36]。带标记单元(羰基酰胺)的新型水溶性荧光体 PVP[poly(*N*-vinylpyrrolidone)]对 DNA 有较好的亲和性,可穿透进入 PC12 细胞并发出荧光。较好的发光性使其成为标记生物大分子及细胞很有前途的一种荧光探针^[37]。

2) 荧光染料与某些生物活性载体形成共价络合物后用于变异细胞的标记

大多数荧光染料不具备选择性,必须与生物活性载体相连接,利用生物活性物质之间的选择性,达到选择性识别变异细胞并定位的目的。例如,将染料与抗体或某些蛋白质载体相结合用于肿瘤的检测,已广泛用于许多抗癌药物。因为染料分子要明显小于载体分子,所以其主要优点在于能实质性地保留生物载体组织的特定选择性。选择性标识的优点显而易见,共轭配位体的高选择性及亲和力使化合物的用量大为降低,产生高的信噪比,提高灵敏度,便于检测。

(1) 与抗体相结合。

抑癌基因编码蛋白 P53 基因是用于控制细胞增长的,它的改变会导致细胞增殖速度加快,而癌细胞组织是快速分裂的超增殖细胞。P53 的表达、结构及功能异常与 50% 的癌症(如肺癌、胰腺癌、乳腺癌、皮肤癌等)发生有一定关系。因而对 P53 基因的检测和研究对于癌症的早期诊断是极其重要的。Askari 等^[38]提出将菁染料 Cy₅ 与抗体结合制成生物芯片,用于 P53 肿瘤抑制基因的检测及癌症的治疗。检测过程针对反 p53 单性抗体与其辅助 Cy₅ 标记 p53 抗原间形成络合物,应用完整的光电微芯片检测。Cy₅ 标记的抗原附着于对应的抗体上,通过染料-抗体共轭系统,不仅可检测到反 p53 抗体的存在,而且可以定量得到其在生物体中的浓度,对于癌症的预防及治疗有较大意义。

但抗体用作标识物有些缺点,它们的免疫源及等离子体半衰期会受到影响。而用分子较小的肽代替抗体或抗体片段可以消除这些缺点,因为肽配位体是非免疫性的,且对受体具有高的亲和力及选择性,因而具有较高的药用价值。

(2) 与肽相结合。

Samuel 等^[39]提出了染料-肽共轭体系用于肿瘤的诊断影像及治疗。同时还可用于定位治疗,激光辅助的外科手术以及诊断动脉粥样硬化、血栓等。结构中一般都含有氨基、羧基等官能团,以便和生物分子键合。光谱范围为 350~1300 nm 的菁染料具有良好的生物相容性、较高的摩尔吸光系数和荧光量子产率,与药物相匹配,可使肿瘤组织被辨识,而没有离子辐射的副作用。选择合适的有生物相容性的有机溶剂,可有效防止染料的荧光猝灭。例如,1%~50%二甲亚砜(DMSO)可以阻止染料聚集从而有效地保留荧光,并使肿瘤组织得以检测。

2001 年德国柏林大学 Becker 等^[40]用肽-花菁染料共轭体系,应用于肿瘤光学成像。当将吡啶三碳菁染料-肽共轭络合物注入活体肿瘤组织中时,络合物会在肿瘤组织中积累,使得肿瘤组织的荧光迅速增强,应用 3~24 h 后,其荧光强度比正常组织高出 3 倍多,表明其优异的靶向标记性能可选择进入神经分泌系统的肿瘤细胞中。经活体测试,若将染料与不同的肽配位体结合,可应用于许多不同领域的癌症诊断。

3) 利用胺衍生物或叠氮基将荧光染料引入细胞表面

文献报道采用胺衍生物改性 DNA 与活性染料结合制备的荧光 DNA 杂交探针,可大幅度提高细胞标记灵敏度,是传统结合方法难以比拟的^[41]。

美国加利福尼亚大学伯克利分校 Bertozzi 领导的课题组提出了将对照试剂引入细胞表面的方法^[42,43]。由于细胞表面存在许多糖蛋白,制备的 *N*-乙酰脲基甘露糖胺或 *N*-乙酰丙酮醇通过代谢途径进入细胞表面,如图 2-27 所示。

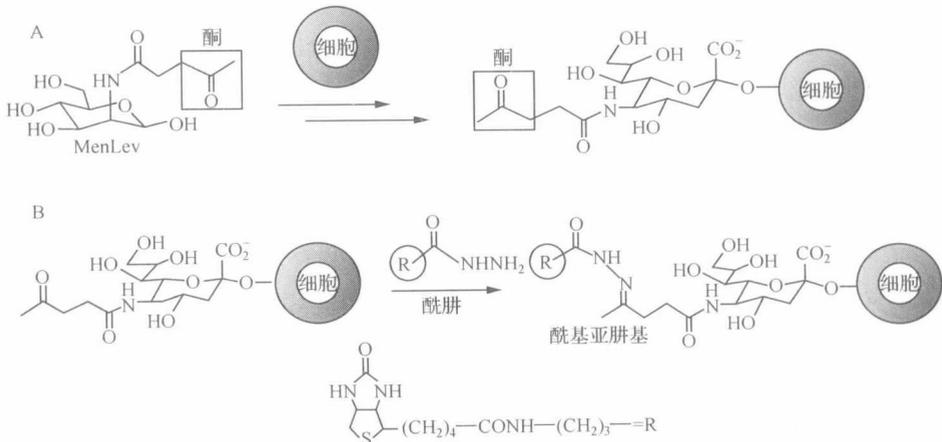


图 2-27 *N*-乙酰脲基甘露糖胺引入细胞表面

向变异细胞表面过量表达的唾液酸引入叠氮基,荧光素与细胞表面的叠氮基发生 Standinger-Ligation 反应,使荧光染料引入细胞表面,从而表达细胞变异信

息,具有很强的定向性,如图 2-28 所示。

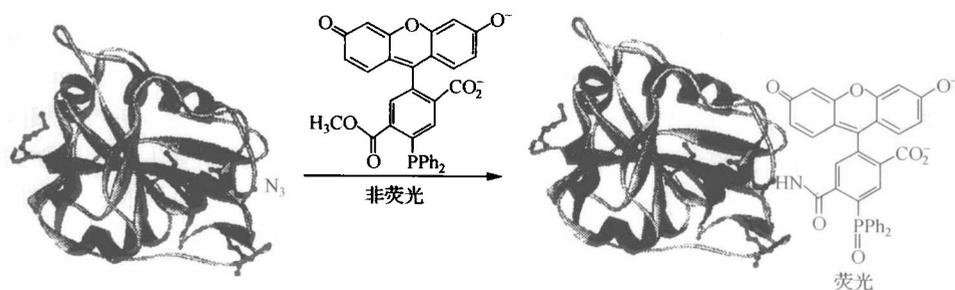


图 2-28 荧光素与叠氮基发生 Staudinger-Ligation 反应

该反应化学选择性很高,含有活性基团的染料分子可以定向作用于含叠氮基的细胞表面,不因细胞或组织中的功能基团存在而产生干扰,从而增强了荧光探针的靶向性。这种研究为荧光染料作为探针分子对癌细胞的早期识别提供了一种新思路。

增强荧光探针与人体组织的相容性、靶向性,提高探针检测的灵敏度及降低毒性是开发荧光探针的重要内容。近年来,生物活性多糖修饰的荧光染料得到了科学家的关注,将荧光染料连接到壳聚糖上,以增强荧光探针同人体组织的相容性和靶向性,提高灵敏度并降低毒性。

4) 其他方法

为了观察 α_1 -肾上腺素受体在活细胞中的动态行为,研究者用绿色荧光染料 BODIPY-FL 标记 α_1 -肾上腺素受体激活剂苯肾上腺素(PE),通过微量缩合反应合成具有荧光的新化合物——BODIPY-FL-PE^[44]。Westernblot 实验表明 BODIPY-FL-PE 与 PE 一样具有激活 α_1 -肾上腺素受体的能力和使胞外信号调节激酶(ERK)激活的药理作用。这种药理特性可以用于肾上腺素受体行为观测,为进一步研究活细胞中肾上腺素受体的动态行为提供了有利的工具。

有报道利用 Cy₅ 标记的细菌探针 EUB338 和 FITC 标记的变形链球菌探针 BC73 与模式菌株和牙菌斑样品荧光原位杂交,应用流式细胞仪监测杂交后的荧光强度和荧光计数^[45]。EUB338 是一种细菌通用探针,可以用于细菌总数的计数和比较探针的特异性。BC73 是一种变形链球菌的特异性探针,能够特异性地与变形链球菌 rRNA 结合。探针 BC73 与唾液链球菌 *S. mitis* 15 914 的 rRNA 结合,相对于与变形链球菌 *S. mutans* 10 449 的 rRNA 结合,荧光强度相差 7 倍,说明探针 BC73 有足够的特异性,能够将变形链球菌从其他链球菌中区别开来。此方法计数时间短、重复性好,作为一种新的研究手段,将在龋病的流行病学研究和龋病的风险预测等研究中有较好的应用。

另有研究表明:胺改性 DNA 和活性染料结合制备的荧光 DNA 杂交探针,其标记灵敏度是传统结合方法难以比拟的^[41]。目前基于分子标记荧光对比剂开发出一种用于检测入侵癌症的高灵敏近红外光学图像系统,可用于乳腺癌及淋巴结肿瘤诊断及成像。其定位的准确性高,可用于指导临床活体组织检查^[46]。

每种有机荧光染料与生物分子的连接都需要特定的方法,对测量的光学系统也有严格要求。对荧光染料分子进行设计改造修饰可以改变其在生物标记过程中的应用性能,因此对其进行修饰,是不断满足生物检测新方法新技术要求的重要途径。针对这些问题,研究者对荧光染料的改性及修饰进行了大量的研究。本课题组也针对部分重要的有机荧光染料的合成及改性进行了系统研究,详见第3章和第5章。

2.3.1.4 FR 介导的用于肿瘤成像的荧光染料探针分子^[47]

菁染料按甲川链的数目可分为 Cy₃ 至 Cy₇, 不对称的多次甲基菁染料的发射波长为 700~900 nm, 在近红外范围内生物分子自身荧光较弱, 可避免背景干扰而获得较高的分析灵敏度, 且具有较好的生物相容性。

NIR2 就是一种能够标记 FR 的近红外荧光染料。Tung 等^[48] 不仅制备了叶酸荧光探针复合物 FA-EDBEA-NIR2, 还制备了其他类似的叶酸近红外染料复合物, 用于检测叶酸受体阳性的人口腔上皮癌 KB 细胞和叶酸受体阴性的人纤维肉瘤 HT1080 细胞。他们获得与上述实验相同的结果, 表明该类叶酸偶联的近红外复合物对叶酸受体阳性肿瘤具有良好的选择性成像作用。

Tung 等^[48] 在偶联剂二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)/*N*-羟基琥珀酸亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)作用下, 将叶酸分子与亲水基 2, 2'-(乙撑)双(乙胺)[2, 2'-(ethylenedioxy)-bis(ethylamine), EDBEA]相连, 通过其氨基结构与近红外荧光染料 NIR2 的 NHS 酯反应, 即可得到叶酸荧光探针复合物 FA-EDBEA-NIR2, 如图 2-29 所示。FA-EDBEA-NIR2 复合物最大激发波长和最大发射波长分别为 665 nm 和 686 nm。生物实验结果显示, 该复合物对叶酸受体阳性的卵巢癌 OVCAR3 细胞有良好的成像作用, 而对叶酸受体阴性的人肺癌 A549 细胞则不能成像。用荷 OVCAR3 裸鼠进行的体内动物实验结果显示, 使用该复合物后, 肿瘤组织在体成像清晰, 定位准确。

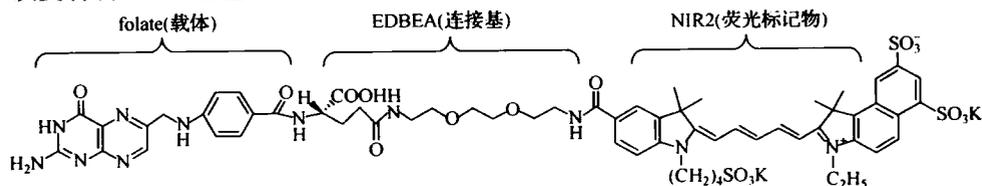


图 2-29 FA-EDBEA-NIR2 复合物的化学结构式

有相关报道对 2-(2-羟基苯基) 苯并咪唑类及 2-(2-羟基苯基) 萘并咪唑类荧光化合物的合成与性能进行了探讨^[49], 化合物结构式如图 2-30 所示。研究表明, 这类化合物是具有激发态分子内质子转移 (ESIPT) 特性的荧光化合物, 具有 Stokes 位移大、荧光量子产率高、能与过渡金属形成比较稳定的配合物等优点, 可作为新型功能荧光探针的特色荧光团。

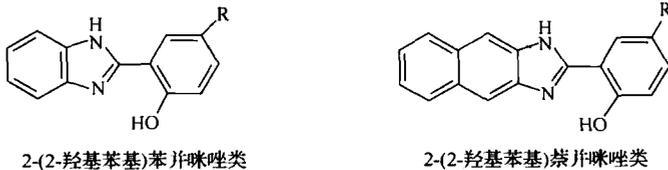


图 2-30 2-(2-羟基苯基) 苯并咪唑类及 2-(2-羟基苯基) 萘并咪唑类荧光化合物

实验结果表明, 用叶酸修饰的花菁染料来标记肝癌细胞^[50], 过量表达 FR 的癌细胞由于对叶酸有亲和性作用, 表现出荧光增强现象, 荧光保留时间延长, 并增强其对肝癌细胞标记的靶向性。Kennedy 等^[51] 采用叶酸修饰花菁染料作为荧光探针, 对变异的肿瘤细胞进行光学成像。研究表明, 含有 FR 的肿瘤细胞显示出明亮光度, 而正常组织几乎无荧光。该法可将邻近的正常组织与肿瘤细胞区分开来。

有研究者^[52] 利用叶酸与 *N*-三甲基壳聚糖复合物结合菁染料 TOTO (图 2-31) 标记 KB 细胞中的 pDNA 取得了较好的结果。通过叶酸活性酯与壳聚糖上的氨基反应, 可使叶酸与壳聚糖偶联^[53]。将异硫氰基荧光素与叶酸偶联壳聚糖进行化学嫁接, 以离子交联法制成具有荧光的叶酸偶联壳聚糖纳米粒, 并与肝癌 HepG2 细胞进行体外细胞实验。结果表明, 所制得的纳米粒粒径为 290 nm, 形态规则, 细胞荧光效果明显。

本课题组近年来致力于采用叶酸和壳聚糖修饰染料制成复合探针, 以实现肿瘤组织的靶向识别研究。例如, 通过叶酸连接 4-甲基喹啉衍生物后再接苯并噻唑, 实现了叶酸对 TO 的修饰, 制成叶酸-TO 复合探针并用于荷乳腺癌肿瘤细胞的裸鼠活体实验, 取得了满意的结果, 所用 TO 结构式如图 2-32 所示。结果表明叶酸-TO 复合探针对叶酸受体表现出良好的亲和性, 详见第 5 章^[54-56]。

有研究者用开环易位聚合 (ROMP)、铜催化偶极点击反应和钌催化的双羟基化反应合成了容易与叶酸和染料 (吡啶菁绿) 结合的双亲性聚合物^[57]。这种共聚物有较好的水溶性, 在水相介质中形成具有纳米尺寸的自组装结构。共聚物的乙二醇化提高了水相介质中自组装结构的稳定性以及活体中肿瘤病灶的选择性。此外, 荧光纳米粒子可以有效且选择性地 在肿瘤中积累, 而在正常细胞中的积累较少。

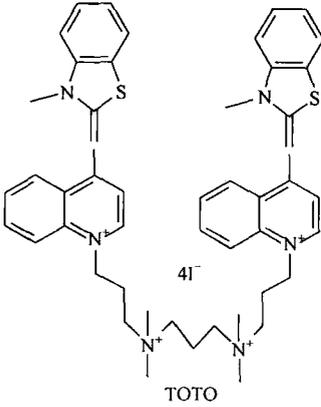


图 2-31 TOTO 结构式

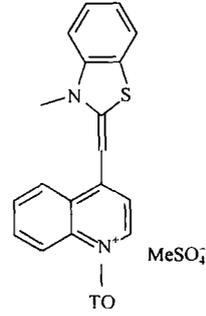


图 2-32 TO 结构式

目前,相对于其他用于肿瘤光学成像的方法,荧光染料标记是一门较为成熟的技术,但是单纯的荧光染料还不能满足活体细胞研究的需要,其灵敏度及光稳定性有待进一步提高,且荧光染料的生物毒性在活体细胞研究及活体成像中的应用中也存在一定的局限性。

2.3.2 无机荧光量子点

2.3.2.1 量子点的基本特性

量子点(quantum dots, QDs)又称为半导体纳米晶(semiconductor nanocrystal),是一种直径为 1~100 nm,能够接受激发光产生荧光的半导体纳米颗粒。量子点可以解释为粒径小于或接近激子玻尔半径的半导体纳米晶粒,是半导体界于分子和晶体之间的过渡态,具有独特的量子尺寸效应和表面效应,表现出优良的荧光纳米效应。

1) 量子点的结构

目前研究较多的主要是 CdX(X=S, Se, Te),量子点的粒径很小,生物标记中最常用的 CdSe 量子点尺寸通常由 1.8 nm 变化到 7.0 nm,小于激子玻尔半径,产生量子限域效应。量子点晶体的电子能级是其粒子尺寸的函数,晶粒直径越小,其 HOMO-LUMO 能级差就越大,在电子跃迁发射荧光时,其光能越大、波长越短。因此,通过改变量子点的粒径可以使同一组成的量子点发射不同颜色的荧光。不同尺寸的 CdSe/ZnS 量子点(直径为 2~8 nm),其发射的荧光几乎可以覆盖整个可见光区。

2) 近红外量子点的基本特性

与传统可见光量子点相比,近红外量子点对深层组织和器官的检测具有更高

的灵敏度和对比度,因而促进了活体动物实时荧光成像技术的发展并越来越受到人们的重视。近几年,研究者成功制备了各种近红外量子点,并从溶解性、光学特性、安全性等方面对其进行优化,而后通过将近红外量子点与各种靶向性配体连接实现对肿瘤组织的定位,推动了活体无损荧光成像技术在肿瘤诊断、治疗和监测中的发展。

近红外量子点与可见光量子点对细胞标记的原理相同,近红外量子点对活细胞的标记主要有两种方法。一种是通过与细胞的特异性蛋白结合进行标记,另一种是通过受体介导的内吞作用使近红外量子点被摄取到细胞质中,实现对活细胞的标记。用转铁蛋白修饰的 CdTe/CdS 量子点标记子宫颈癌(HeLa)细胞,并以未修饰的 CdTe/CdS 量子点和牛血清白蛋白(BSA)偶联的 CdTe/CdS 量子点作为对照,结果在用转铁蛋白修饰的 CdTe/CdS 量子点标记的 HeLa 细胞中能检测到持久稳定的荧光信号;而在用后两种量子点标记的 HeLa 细胞中均未检测到荧光信号,表明转铁蛋白修饰的近红外量子点能通过受体介导的内吞作用被特异性摄取到细胞质的囊泡结构中,从而实现对接活细胞的标记^[58]。

3) 三元合金量子点

对于三元合金量子点,虽然粒径相同但是组成不同也可得到不同发射波长的荧光量子点^[59]。Nie 等合成了合金型纳米晶 CdSeTe 量子点,通过调控粒子的组成和内部结构可以连续地调节其荧光性质。另外,这种合金型纳米晶显示出非线性的光学特性,其发射波长高于单独的 CdSe 和 CdTe,处在近红外区^[59,60],具有很高的穿透性,因此可以作为生物体内组织标记的材料。合金型量子点的荧光性能可媲美目前商用的核/壳结构纳米材料^[61,62],尤其是在蓝光短波长区合金纳米晶具有明显的优势。Weller 小组还进一步合成了 CdHgTe 纳米晶,获得了较强的近红外荧光。钟新华等^[61]开发了一种有效的高温合成策略,通过将 Zn 和 Se 加入到预先制好的 CdSe 纳米晶中,制备了一系列高质量的 $Zn_xCd_{1-x}Se$,其发射光谱范围为 460~630 nm。 $Zn_xCd_{1-x}Se$ 纳米晶组成的改变引起可见光谱发射光谱的改变,随着 Zn 含量的增加,发射波长逐渐蓝移。他们还合成了高发光组成可调的 $Zn_xCd_{1-x}Se$ 合金纳米晶,其高度稳定性及荧光是基于其较大的粒子尺寸、较高的结晶度、坚硬的晶体结构、较低的相互扩散和空间组成波动。有研究者还通过纳米尺度上的合金化合合成了一系列高性能的 ZnCdSe、ZnCdS 合金纳米晶^[62]。另外通过设计、合成 Type-II 核/壳结构可获得单独的核/壳材料所不能达到的近红外波长荧光。合成的高性能纳米荧光材料被成功用于 DNA 的超灵敏检测。

2.3.2.2 量子点的优越性

量子点具有可通过改变本身的尺寸和组成调节其荧光发射波长的特点,同时具有激发光谱宽而连续、吸光系数大、荧光强度高、荧光发射峰窄而对称且无长波

拖尾等优点。这样就允许同时使用不同光谱特征的量子点,而发射光谱不出现交叠现象,从而实现一元激发多元发射的同时标记方法,使生物分子的多组分同时检测成为可能。此外,由于量子点具有光稳定性好和耐光漂白等特点,它可以经受反复多次的激发而无显著量子产率损失,可克服有机荧光染料容易发生光漂白的缺点。这为研究细胞中生物分子之间长时间相互作用提供了有力工具。这些独特的光学特性,使量子点有望成为一种理想的荧光标记物,应用于分子生物学和生物工程领域的实时、动态、超灵敏、多色和多组分检测^[63]。

近年来出现的量子点新技术开辟了分子成像的新领域。量子点的色彩非常丰富、光强度高、光化学稳定性好,几乎不会发生光漂白作用,因此可以用于长时间的生物荧光探测;荧光寿命长(20~50 ns),可以将荧光信号从其他荧光剂发出的背景荧光中区分开来,从而提高了探测的灵敏度。激发光谱宽且连续分布,因此可以用各种不同波长的激光进行激发;发射光谱峰狭窄且对称、单色性好且颜色可调,可以在一定光谱范围内分辨多种量子点的光谱特征。结合上述优点,在实际应用中可以使用多个量子点对细胞和生物分子进行荧光标记,并可采用单个激发光源实现同时探测;荧光波长可以根据量子点尺寸的大小进行精确地调节;能够承受多次的激发和光发射,有持久的稳定性。

量子点以其优异的光学性质在生物化学、分子生物学、细胞生物学、基因组学、蛋白质组学、药物筛选、生物大分子相互作用等研究中有较大的应用前景。将其作为荧光探针用于生物分子的标记和检测,从而在细胞定位、信号转导、胞内组分的运动和迁移以及临床诊断等研究中发挥巨大作用,是其在生物科学中最有前途的应用之一^[64]。

2.3.2.3 量子点在生物医学研究中的应用

1) 荧光标记探针与成像技术

已经报道的量子点(QDs)在这个领域的应用,大部分集中于荧光探针识别和成像方面。例如,生物大分子之间的相互作用、细胞及其组织的单色和多色荧光标记、生物体组织和在体光学成像等。

(1) 生物大分子之间的荧光探针识别。

有报道用巯基丙酸修饰 CdSe/ZnS 量子点,然后分别将 3' 或 5' 巯基衍生的两段不互补的 DNA 固定到量子点上,制得两种 DNA 功能化的量子点,再将它们和与这两段 DNA 互补的 DNA 片段混合,即可进行杂交组装^[65]。采用传统的交联法,得到 QD/IgG 键合物,进一步的实验结果表明特异的抗体能够识别 IgG 的纤维碎片,导致 QDs 的聚集,而在牛血清白蛋白中,QDs 主要以单个粒子的形式分散,这说明被附着的免疫分子能够识别特异性的抗体或抗原。

另有报道通过静电作用修饰 CdSe/ZnS 量子点,其表面的麦芽糖键合蛋白仍

然能够结合到直链淀粉亲和树脂上,用水溶性的麦芽糖取代直链淀粉,结合以后,光致发光的量子产率从未结合前的 10% 提高到了 20%~30%^[66-70]。将带正电荷的工程强化融合蛋白或抗生物素蛋白(avidin)组装到经二氢硫辛酸修饰的 QDs 上,则可以通过抗原-抗体或 avidin-biotin(生物素)之间的特异性作用,进行荧光免疫检测。

将 CdSe/ZnS 量子点与检测抗体连接,然后采用非均相夹心法在微阵列芯片上形成抗体-抗原-检测抗体结合体,用激光共聚焦扫描法检测这一结合体的荧光信号,可以实现微阵列芯片上的免疫分析,用类似的方法还可以进行 DNA 标记检测实验。有报道采用荧光原位杂交方法,用 CdSe/ZnS 标记的寡聚核苷酸探针进行了染色体异常或突变的研究^[71]。

由以上结果可见,QDs 用作生物医药探针的荧光标记物是非常理想的,其稳定性好,荧光杂质少,连接于抗体/蛋白质或 DNA 后不损害其生物活性,特异性高;进一步的研究结果表明,这些 QDs 标记的高质量探针可以应用于细胞的单色或多色成像。

(2) 单细胞的单色或多色荧光标记与成像。

有研究者用量子点示踪单个的氨基乙酸受体(GlyRs),分析活细胞中的这种受体在毫秒到分钟范围内在神经元膜上的侧向动力学,并表征了 QDs-GlyRs 通过扩散到达多种突触的 GlyRs^[72]。另有报道通过体外活细胞实验发现,结合到 QDs 上的转铁蛋白分子仍然是有活性的,能够被细胞表面的受体识别而被吞噬^[73]。将两种不同粒径的量子点通过硅烷化修饰后,其中一个通过尿素或乙酸根的静电作用标记纤维原细胞(fibroblast)核,另一个采用 biotin-avidin 作用方式标记 F-肌动蛋白纤丝(F-actin filaments)。采用一元激发、二元发射的方式,成功地观测到标记结果,并且重复扫描以后,几乎没有发生荧光漂白现象,但是要得到较强的荧光,需要重复 biotin 与 avidin 之间的相互作用,且非特异性吸附也比较严重^[74]。也有研究者将 biotin-avidin 相互作用改为链霉亲和素-生物素环肽作用,使以上问题得到了很好的解决^[75]。他们还利用链霉亲和素-生物素相互作用,成功地进行了人乳腺癌 SK-BR-3 细胞表面 Her2 及细胞核的多色标记成像^[76]。另外,有文献报道分别用绿色和橙色 QDs 标记同一细胞细胞质中的线粒体及细胞核中的蛋白质,简单的荧光成像就可以明显地观察到两种标记。有报道采用内吞和细胞表面蛋白的选择性标记,研究了 HeLa 和 *D. discideum* 细胞的长时间多色成像。发现标记 QDs 很长一段时间后,细胞的生长和发育都没受到影响。这意味着将 QDs 应用于细胞及生物体生长和发育的长时间研究的可能^[77]。另有研究者研究了 CdSe/ZnS 标记天花粉蛋白(TCS)的光谱性质及其酶活性变化,以及 QDs-TCS 在靶细胞内的分布。结果表明,标记后酶的活性没有改变;QDs-TCS 能够进入细胞,并且在靶细胞核周围呈聚集分布^[78]。

(3) 生物体组织的荧光成像和在体观察。

对单细胞进行观察,只能了解生物体系外有限的一部分信息,而更多更重要的问题需要通过活体研究才能解决,因此能否成为一类真正有价值的生物荧光标记物,关键还要看其能否应用于活体研究。QDs强的抗光漂白能力及一元激发、多元发射的特点为活体研究提供了得天独厚的优势,因此也吸引了越来越多的注意力。

研究者将不同的组织靶向多肽与不同颜色的量子点连接,用 PEG 同多肽竞争连接到 QDs 表面,以此来阻止量子点在体内循环过程中的非特异性团聚^[79]。再将量子点通过静脉注射的方法注入老鼠体内,5 min 后做组织切片,在特定的组织内观察到了相应的量子点对应的荧光。将经类酯类物质修饰后的胶束量子点注射入早期胚胎的个体细胞中,进行世系跟踪(lineage-tracing)的胚胎遗传学实验。结果发现,只有注射了量子点的细胞后代中才能观测到量子点的特征荧光,而没有注射的细胞后代则看不到。

有报道采用多光子成像技术,用量子点进行了活老鼠皮肤脉管系统的成像,并测量了血流速度和毛细血管波动^[80]。有人正在研究用 QDs 示踪活老鼠体内肿瘤细胞的生长。体内成分对光的吸收和散射,使得近红外荧光成像成为生物体在体研究观察的首要选择^[76]。某些 QDs 的发射光可以到达近红外光区,而且 QDs 的荧光特点使它们有应用于这一方面的可能^[81,82]。研究者将发射波长为 752 nm 的水溶性 QDs 应用于冠状动脉系统的近红外荧光成像,其主要是利用了 QDs 宽的光吸收范围和高的吸收截面,只需要一定的白光即可成功地进行成像^[82]。但是由于其相对较大的粒径,使得肾脏难以及时将其排出体外,从而不可避免地会导致很强的背景荧光,而且组成成分多有毒,如果长期保留在体内,其毒害影响也还没有研究清楚。

2) 基于荧光共振能量转移的 QDs 在生物大分子相互作用中的应用^[79]

荧光共振能量转移(FRET)是指当一个荧光分子(又称为供体分子)的荧光光谱与另一个荧光分子(又称为受体分子)的激发光谱相重叠时,供体荧光分子转换的发射能诱发受体分子发出荧光,同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减^[83]。QDs 的光谱性质使其在 FRET 的应用中具有很多优势。例如,其宽的吸收光谱使得供体 QDs 的激发波长的选择有很大灵活性;QDs 发射光谱狭窄,在红外光谱区没有拖尾,这可以大大减少其与受体发射光谱的重叠;可以选择受体发射光谱相对于供体激发光谱有很大红移的供体-受体对等。因此这方面的研究日趋增多。将可以作为糖受体的大肠杆菌麦芽糖键合蛋白(MBP)配位到 QDs 上,得到 QDs-MBP,然后将 β -cyclodextrin-Cy_{3.5} 荧光团猝灭剂键合到 MBP 的糖受体位置,可以观察到经过一步或两步 FRET 而引起的 QDs 荧光猝灭。添加麦芽糖取代 MBP 上的猝灭剂, QDs 的荧光恢复,因此其有可能应用于麦芽糖的定量检

测^[84,85]。他们还用 QDs-MBP 作为基于 FRET 生物传感纳米组装的内部骨架,进行了有关的研究^[86]。

有研究者通过 FRET 研究了在 QDs 表面进行调节聚合反应以及 DNA 复制的动力学过程^[87]。另有报道将 biotin-BSA 与 QDs 结合,然后将其与四甲基罗丹明标记的 streptavidin (SAv-TMR) 作用,观察到了 QDs 与 TMR 之间的 FRET^[88]。也有研究者通过 BSA 与 anti-BSA 之间的特异性相互作用,观察到了分别发绿光和红光两种 QDs 之间的 FRET^[89]。基于 FRET 的 QDs 在生物大分子相互作用中的应用提供了一种新的进行杂交传感材料构建方法,为更加灵敏地进行 DNA、蛋白质、核酸的分析与检测提供了新的手段。

子宫颈癌是高发肿瘤之一,世界各国都在积极开发早期诊断及治疗的方法。目前,量子点已经被成功地应用在细胞水平的肿瘤成像上。Nida 等^[90]将与量子点连接的表皮生长因子受体与抗生长因子抗体形成共轭对来探测子宫颈癌前期生物学标志物,经过适当地控制,观测到准确标记的生长因子受体,结合光学成像技术,可以显示子宫颈癌在分子水平的变化。这一技术有助于在肿瘤转移之前对患者进行必要的治疗。

量子点还可用于检测肿瘤的血管变化。肿瘤组织周围血管丰富,细胞生长迅速,通常所用荧光试剂不能在体实时对多种组织成像,而多色量子点标记技术可以应用到肿瘤细胞、肿瘤血管及周围区域的边界研究中,从而应用于肿瘤早期诊断和治疗。Stroh 等^[91]将量子点、多光子成像技术和表达绿色荧光蛋白的转基因实验鼠结合起来研究肿瘤血管周围的细胞和组织。结果证实这些纳米荧光晶体可以实时成像,并可从血管周围的细胞和组织中区分肿瘤血管。他们还利用量子点标记成功地检测到了干细胞由骨髓补充到肿瘤脉管系统的过程,这为多功能的量子点用于肿瘤病理生理学研究开辟了一条道路。

3) 叶酸介导的量子点在肿瘤成像中的应用

有研究用叶酸包裹 InP-ZnS 量子点并用于生物成像^[92],该探针可在叶酸受体过量表达的 KB 细胞中累加,而在无叶酸受体的细胞系中不被吸收。研究者利用具有纳米量级空间分辨率的近场光学显微镜,结合量子点荧光强度高和稳定性好的特点对人胃腺癌 SGC-7901 细胞膜表面叶酸受体 (FR) 特异性结合进行成像探测,获得了叶酸受体在 SGC-7901 细胞膜表面上的分布,以及细胞内化外源性叶酸过程中叶酸受体在细胞膜表面的分布变化,成像的光学分辨率达到 120 nm。实验结果表明,特异性结合的叶酸受体在 SGC-7901 细胞膜表面的分布,绝大部分是以聚集体的形式存在。随着 SGC-7901 细胞内化叶酸量的增加,叶酸受体在细胞膜表面的分布密度逐渐降低,经过 120 min 左右趋于稳定^[93]。

Schroeder 等^[94]用叶酸修饰的脂质体包裹量子点和未修饰的脂质体包裹量子点分别对过量表达叶酸受体的小鼠和人肿瘤细胞进行标记。研究发现只有叶酸修

饰的脂质体包裹量子点才能被肿瘤细胞所吸收、内化,且吸收、内化过程被游离叶酸所抑制,而叶酸受体非过量表达的细胞系没有吸收,表明吸收、内化过程受叶酸-叶酸配体相互作用的控制。

研究者制备了具有良好粒径分布和荧光性能的叶酸修饰的人血清白蛋白(human serum albumin, HAS)/量子点纳米粒(FA-HSA/QDsNPs),平均粒径仅为82.2 nm,表面具备亲水性,符合逃避体内巨噬细胞吞噬的条件,可以有效到达肿瘤组织,对人结肠癌 HT-29 细胞有较强的靶向性^[95]。FA-HSA/QDsNPs 表面偶联的叶酸分子可以和肿瘤细胞膜表面高表达的 FR 作用,使其具有主动靶向作用;可以通过受体介导途径高效地富集于 FR 丰富的肿瘤细胞,为构建一种针对肿瘤细胞的实用抗肿瘤药物靶向载体提供了基础。

尽管在性质上量子点要远优于传统生物标记物,但在实际应用中还存在着一些必须解决的问题。首先,是量子点合成理论(如胶体化学、结晶化学和表面化学理论)的不完善;其次,对半导体量子点在生物环境中的相容性及其他行为(如细胞毒性)还需进一步深入研究,许多用于制备量子点材料的物质有很强的毒性,如 Cd^{2+} 可能从 CdSe 或 CdSe/ZnS 量子点中缓慢释放出来,产生不良影响。虽然量子点可以附加保护性的包覆层,但目前对包覆层长时间的稳定性及对生物环境的综合影响了解还不多。许多研究表明,体内量子点毒性除存在时间效应外,还存在剂量效应。所以,不仅要研发低毒或无毒的功能性量子点,还应确定量子点应用于临床治疗和诊断的可接受剂量。各方面的研究都表明,量子点的稳定性影响其潜在的毒性。因此,设计合成出稳定性高的无毒量子点意义深远。

本课题组^[96,97]结合量子点及有机染料的特点,在量子点-4-甲基喹啉衍生物上连接苯并噻唑的衍生物,设计合成了量子点-有机染料(TO)复合探针,并研究其光学特性。研究表明,复合探针中量子点的发射波长发生了蓝移,有机染料 TO 的发射波长发生红移,与蛋白质结合后的荧光强度要强于两种物质单独与蛋白质结合的荧光强度,从而使得此复合探针有望实现双波长检测和电子能量转移在生物定位方向的研究。

2.3.3 掺杂染料的复合荧光纳米颗粒

1) 染料掺杂荧光纳米颗粒

染料掺杂荧光纳米颗粒是一类由功能性的内核、可生物修饰的硅壳以及修饰在硅壳表面的生物分子构成,具有明显核壳结构的新型纳米颗粒。其功能性的内核是荧光染料,该类型的纳米颗粒采用油包水(W/O)反相微乳液方法成核,通过硅烷化试剂在微乳液中水解形成三维网状结构的硅壳进行包壳,采用不同的硅烷化试剂可以制备出表面带有不同官能团的核壳型生物纳米颗粒,并可以对纳米颗粒的表面进行各种生物大分子的修饰,如肽片断、抗体、生长因子、核酸链等,从而

实现对特异性细胞和生物分子的识别、分离和检测。同时,硅壳纳米颗粒又具有分散性好、合成条件温和、可重复合成及细胞毒性小等优点,从而使其在生物学领域得到广泛的应用。以无机金属配合物联吡啶钌化合物为内核材料制备核壳荧光纳米颗粒,并利用基于核壳荧光纳米颗粒的荧光标记法成功地对 DNA 进行了超灵敏的检测。在此工作的基础上,无机金属配合物联吡啶钌化合物荧光纳米颗粒的发展进一步深化,通过调整可以发生共振能量转移的三种荧光染料的浓度比例,合成了一系列颜色不同的荧光纳米颗粒,更是为生物免疫检测、芯片技术的突破和发展提供了有效的工具。这些纳米颗粒有望完成蛋白质、核酸、细胞或者活体的多色定位及成像等。有研究者制备出了钌吡啶荧光纳米颗粒,结合纳米技术、生物技术与荧光标记技术,建立了一种基于生物荧光纳米的新型荧光标记方法,并将其用于对系统性红斑狼疮患者外周血中 SmIgG+B 淋巴细胞的选择性识别^[98]。

2) 染料掺杂纳米粒子的概念

染料掺杂纳米粒子是由有机染料分子分散到聚合物或者二氧化硅网状结构内部构成的。染料分子掺入到二氧化硅网络内部可以保护其免受周围环境的干扰,使得染料掺杂的纳米粒子与染料分子本身相比具有更好的光化学稳定性,同时在每一个粒子内部由于染料分子数量增加可以产生信号增强效应。在制备染料掺杂纳米粒子方面应用到了许多聚合物材料。由于聚合物的高疏水性,染料分子与聚合物之间存在很强疏水作用,可以防止染料分子泄漏。也由于聚合物交联反应,孔隙较少,有效地阻止了氧气扩散,降低了光褪色效应。然而,这些染料掺杂的聚合物粒子的水溶性和生物相容性都较差,因此它们不适合做生物分析应用。

二氧化硅不受细菌侵袭,其纳米粒子不随环境 pH 的变化而发生溶胀或者孔隙改变,此外,二氧化硅是生物相容性很好并且非常通用的固定生物分子的底衬材料,因此,在研制高效纳米荧光探针方面,二氧化硅被证明是与聚合物相比更适于作为纳米粒子的壳材料。二氧化硅是化学惰性的,因此不会影响发生在内核表面的氧化还原反应。壳是光学透明的,并可以阻止化学反应过程中的凝结,因此可以制备出高浓度、高分散的纳米粒子(图 2-33)。二氧化硅壳也可以充当稳定器,限制外界环境对核心粒子的干扰。

光褪色和热致降解是减少染料使用寿命的主要因素。通过将染料分子封装到化学和热稳定的二氧化硅壳层内部,可以大大降低染料的光褪色和光降解。使用二氧化硅的另外一个优势是通过二氧化硅表面羟基的修饰可以容易地引入氨基、硫醇、羧基和丙烯酸甲酯等特定官能团,这些修饰有利于将纳米粒子溶入到非极性溶剂、玻璃表面或者聚合物基体内。

在适当的合成条件下,将大量有机染料分子包埋进单独的二氧化硅粒子中(每个粒子内可能含有上万个染料分子),制成染料掺杂二氧化硅纳米粒子。与其他荧光探针相比,其具有很多优势^[99,100]:① 高发光强度,该纳米粒子含有大量的荧光

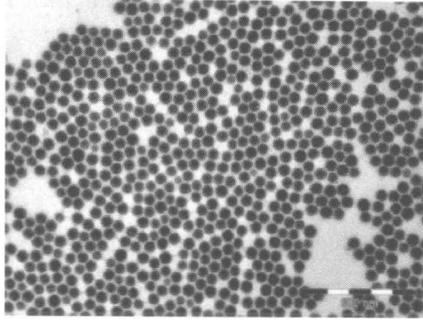


图 2-33 联吡啶钌染料掺杂硅纳米粒子的透射电镜图像

染料,被激发时会产生强烈的发射信号。2009年,有研究者用菁染料 Cy_5 合成染料掺杂纳米粒子,测得在最佳负载量 2% 时,其荧光强度比游离的染料强 165 倍^[101]。

② 优异的光稳定性,由于硅胶基质的保护作用,使掺杂的染料分子免受环境中的氧化作用且荧光持久,为生物分析提供了精确的量度。

③ 水溶性好、表面易于修饰、与生物体结合效率高,二氧化硅对水中粒子具有的理想分散性作用,可在二氧化硅表面修饰功能基团,使其作为具有广泛生物相容性和生物分子固定的多用基质来应用。

④ 尺寸均匀并可调,粒径比细胞更小(小 2~3 个数量级),更适于细胞成像应用。

生物可降解聚合物纳米颗粒是一类由可在生物机体内降解的材料形成的纳米颗粒,它们包裹活性物质,使其与周围介质相隔离以避免过快降解,并能在需要时释放活性物质。例如,聚乙烯亚胺(PEI)纳米颗粒、壳聚糖纳米颗粒、聚赖氨酸纳米颗粒、聚乳酸-乙醇酸(PLGA)纳米颗粒和脂质体纳米颗粒等。聚合物纳米颗粒具有良好的储藏稳定性和生物相容性,因此,在包括化学、药学、化妆品、表面涂装、农业以及生物化学等多个领域中得到应用。在医药领域,对聚合物纳米颗粒的研究主要集中在药物的控制释放和靶向修饰,聚合物纳米颗粒载体能增强药效、降低药物毒性、改变药物的体内过程。近年来,基于阳离子脂质体的基因载体也实现了反义寡核苷酸在细胞核内的高效表达以及携带 P53 抑癌基因用于裸鼠体内肿瘤的治疗。

3) 染料掺杂纳米粒子的合成

大多数关于制备荧光纳米粒子的方法都是基于物理吸附或者共价键合来连接荧光团和载体的。大部分染料存在于粒子的表面,当环境改变时很不稳定。离最低吸附量差的较远,染料的解吸限制了这种粒子的应用。近年来,应用微乳化技术,将苯乙烯、非离子型表面活性剂和染料分子溶解于水中,然后加入交联剂(二乙烯苯)和亲水性共聚单体氨基甲基丙烯酸乙酯(AEMH),合成了染料(芘)掺杂的聚苯乙烯纳米粒子,其发射强度是相同浓度染料分子本身的 40 倍。用纳米尺寸的

二氧化硅空心球封装染料分子,这种纳米粒子在与蛋白质连接后可以用作免疫分析的标记物。

4) 染料掺杂纳米粒子的生物应用

生物结合纳米粒子在很多方面具有非常重要的应用,如 DNA 杂化、免疫测定、受体介导内吞、组织切片的时间荧光成像,以及应用在活体细胞成像领域的荧光标记。

荧光纳米粒子是非常新颖的生物标记探针,在生物分析中能够提供高度放大的可检测信号。一般来讲,生物样品的识别和检测都是通过荧光染料标记技术实现的。在众多荧光材料中,有机染料因其较高的量子产率而经常被使用。但是染料分子极易光褪色,所得到的荧光信号不稳定。相反,染料掺杂的纳米粒子内部含有大量的染料分子,并且由于二氧化硅壳层的保护,使其具有优良的光稳定性。因此,它是生物样品识别领域内理想的荧光探针。

染料掺杂二氧化硅纳米粒子已经用于肿瘤细胞的活体成像。研究者将其用于标记人类白血病、肝癌细胞株、人类口腔癌、肺癌细胞等^[102]。2001年, Tan 等^[103-105]用 60 nm 钌吡啶染料掺杂二氧化硅纳米粒子标记人类白血病。2004年, Tan 等^[106]报道了一种用 FITC-APTS 掺杂二氧化硅纳米粒子标记肝癌细胞株的方法。2005年, Santra 等^[107]开发了表面含有伯胺基的 FITC 掺杂二氧化硅纳米粒子。他们通过亚胺偶联反应将 FITC 掺杂二氧化硅纳米粒子与叶酸分子共价结合,用该纳米粒子靶向标记人类鳞状癌细胞(SCC-9),并用激光共聚焦扫描显微镜确定。他们利用叶酸固定化结合物与肿瘤细胞表面叶酸受体的亲和力进行成像,用带氨基功能化的纳米粒子(不带叶酸)与人真皮纤维细胞进行控制实验,结果未能实现有效的细胞标记,这表明叶酸结合物纳米粒子可用于标记肿瘤细胞。他们结合叶酸的染料掺杂二氧化硅(DDSNs)靶向标记两种细胞:人类患肺腺癌(A-549)和人真皮纤维细胞。大量的标记实验显示,与正常的纤维细胞相比,A-549 细胞同预期的一样过量表达叶酸受体。激光共聚焦扫描成像清楚地显示结合叶酸的 DDSNs 被 A-549 细胞内化。而用带氨基功能化的纳米粒子(不带叶酸)与人真皮纤维细胞进行控制实验,未能实现有效地细胞标记,表明叶酸结合物纳米粒子可用于标记肿瘤细胞。

染料掺杂纳米粒子在光学上比单独的染料更稳定,体积相对量子点也更大一些,从几十纳米到几百纳米。关于染料掺杂纳米粒子的研究与应用已有很多报道,然而非特异性结合与纳米粒子聚集仍是阻碍和减缓纳米材料在生物分析和超灵敏检测中应用的关键因素。尽管在纳米粒子表面修饰上已经做了很多工作,使其具有水溶性、化学稳定性和生物相容性,但仍需要更多的研究来改善纳米粒子的表面性能,减少非特异性结合,促进随后与生物部分的连接,改善纳米粒子与靶细胞的结合动力学及亲和力。为了获得良好的信号再现性及灵敏度,还需要提高掺杂技

术来避免染料泄漏和荧光猝灭。用于活体研究之前还需研究其长期的生物相容性和生物毒性。随着对染料掺杂二氧化硅纳米粒子研究的深入及性能的进一步优化,其作为一种优异标记试剂在生物分析及生物成像中必将得到广泛的应用。

2.3.4 用于肿瘤成像的磁性纳米微粒

超顺磁氧化铁纳米粒子(super paramagnetic iron oxide nanoparticle, SPIO)以其在生物体组织内存在很高的特异性分布及安全性好等特性,在磁共振成像领域得到了广泛应用。传统的细胞磁标记技术依赖于磁性微球(尺寸在几百纳米到微米之间)的表面修饰及其与细胞的识别作用,尽管这种磁标记方法已经成功地用于细胞的体外分离,却不适于体内应用。因为采用传统方法得到的磁标记细胞在体内很容易被网状内皮系统识别并清除,因此,对于体内应用需要采用不同的细胞磁标记方法。一种行之有效的方法是利用磁性氧化铁粒子的液相内吞作用(fluid phase endocytosis)或受体介导内吞作用(receptor-mediated endocytosis)实现细胞对磁性粒子的内吞(internalization),从而达到细胞磁标记的目的。

目前有很多研究者将叶酸连接到磁性纳米粒子表面,用于研究FR过量表达的肿瘤细胞。例如,有研究者将荧光蛋白标记的超顺磁氧化铁纳米粒(SPIO)与叶酸的共轭化合物 Folate-FITC-IO 用于细胞及肿瘤的显像研究中,发现纳米粒内化发生在FR阳性的细胞中,胞吞过程是有效和迅速的,KB细胞在Folate-FITC-IO培养1h后,有97.5%细胞摄取^[108]。

有研究者合成了表面有不同相对分子质量的聚乙二醇(PEG)和叶酸(FA)的超顺磁氧化铁纳米粒子(SPIO)^[109]。这种SPIO-PEG-FA纳米粒子分散性好,在各种pH溶液中都具有较好的稳定性。常温下,用于SPIO-PEG-FA的超顺磁材料具有缺乏磁滞和剩磁的特性。即使在较高浓度下,巨噬细胞对SPIO-PEG-FA的吸收也比非立(抗癌药)静脉注射低。通过流式细胞仪分析在试管中磁共振成像可观察到SPIO-PEG-FA在靶细胞(KB细胞)中的内在化。通过活体磁共振成像可知,注入造影剂前后阳性KB细胞肿瘤的信号改变要显著低于阴性HT-1080细胞肿瘤。这些结果都显示了SPIO-PEG-FA具有靶向FR的特性。

另有研究者证明了一种独特的将层层自组装方法与树形分子化学结合的手段,使 Fe_3O_4 纳米粒子(NPs)功能化以用于靶特异性和肿瘤细胞成像^[110]。带正电的 Fe_3O_4 纳米粒子NPs(直径8.4 nm)是由 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的控制共沉淀合成的,通过静电层层自组装,用含双分子层的聚苯乙烯磺酸钠盐和叶酸(FA)-异硫氰酸荧光素(FI)-第五代功能化的聚(胺)树枝状化合物修饰(G5. NH_2 -FI-FA),之后再通过乙酰化反应来中和G5枝状化合物表面残余的氨基。结合流式细胞仪、共聚焦显微镜、透射电子显微镜和磁共振成像研究显示, Fe_3O_4 /PSS/G5. NHAc -FI-FA纳米粒子NPs可以特异性靶向过量表达FR的肿瘤细胞。常用靶向分子如表2-8

所示。

表 2-8 常用靶向分子^[111]

靶向分子	用途
转铁蛋白	与肿瘤细胞上的转铁蛋白受体结合
抗 CD-20 单抗	特异结合非霍奇金淋巴瘤
RCD 序列	与整合素家族结合
乙肝病毒 L 抗原蛋白	特异识别人肝脏细胞
核定位信号	结合核孔复合体, 帮助入核
叶酸	与肿瘤细胞膜受体结合, 容易入胞
特异靶向肽	噬菌体展示技术为寻找与靶细胞/组织快速结合的短肽提供快速有效的途径
表皮生长因子	特异结合肿瘤细胞

磁性纳米生物材料在生物医学领域已表现出独特的优势, 具有潜在的应用前景。由于铁氧化物具有生物安全性, 且能定期排出体外, 而镍、钴等磁性材料则具有一定的生理毒性, 因此目前在生物医学中应用最多的磁性纳米粒子类型是 Fe_3O_4 和 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 。

目前大多数研究还处于动物实验阶段, 仍存在诸多问题: ① 增强磁性纳米微球粒径的控制; ② 提高并调控表面功能化铁氧化物纳米粒子耐极端环境条件的稳定性或可用性; ③ 降低成本, 简化生产步骤, 以期大规模临床应用; ④ 将功能化的磁性纳米粒子与传统的检测分析方法相结合, 进一步拓宽磁性纳米材料在生物医学领域的研究。

2.3.5 多功能性荧光纳米粒子

磁共振成像和光学成像是生物医药成像中两种重要的技术, 对各种疾病的诊断起着至关重要的作用。然而这两种成像方式均存在优缺点, 单一的技术很难满足实际应用的需要。因此, 多模式成像方法在生物医药研究、临床诊断和治疗等方面的应用日益增多。近年来, 科学家将荧光染料、磁共振造影增强剂及磁性分离的磁性纳米粒子相结合, 合成了荧光-磁性双功能复合纳米粒子, 其有望在生物、医药领域得到应用^[112-115]。

荧光-磁性双功能纳米复合物的制备方法主要有: 用荧光物质的硅壳覆盖磁性核, 用荧光物质功能化的聚合物包覆磁性纳米粒子, 用带电荷的荧光化合物包覆离子稳定剂保护的磁性核, 用荧光标记的脂质双层材料覆盖磁性纳米粒子, 磁性核通过空间间隔试剂共价结合荧光物质, 用半导体壳直接覆盖磁性核, 将磁性掺杂入量子点, 将磁性纳米粒子和 QDs 封装在聚合物或硅基中。

有研究将核/壳结构的量子点和纳米 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 同时包埋入纳米微球, 得到新型

的、可用于构建一系列纳米生物器件的磁性荧光双功能材料。并进一步将叶酸修饰到材料的表面,制成具有优异的荧光、磁和细胞识别能力的三功能纳米微球,将它们应用于 HeLa、MCF-7 上皮组织癌细胞的识别取得了初步成功,为进一步地进行多种靶细胞的同时可视化识别与分选奠定了基础。三功能纳米微球表面可随意改变固定化的分子以满足生物分析、生物医学成像、诊断和药物的组合筛选的需要^[116]。

有研究者将超顺磁氧化铁纳米粒子表面共价结合双功能聚乙二醇(PEG),然后再与叶酸结合,形成 NP-PEG-FA 复合物作为靶向磁共振对比增强剂,可用于检测表面过量表达 FR 的肿瘤细胞^[117]。NP-PEG-FA 复合物被靶向细胞吸收的量比单纯用 PEG 和葡聚糖修饰的非靶向纳米要显著高出很多,NP-PEG-FA 可以有效地靶向到表面过量表达 FR 的肿瘤细胞。其中 PEG 的作用是增加在肿瘤细胞中的吸收率,减少在巨噬细胞中的吸收率。

最近,有研究者合成了集荧光、热敏感和磁响应三种功能于一体的磁性微球。例如,在 $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{SiO}_2$ 纳米粒子表面形成一层交联的热敏感性聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PANIPAM),然后用 NaOH 作为刻蚀剂,将三明治结构中磁性核和 PANIPAM 间的硅层部分分解掉,形成 PANIPAM 微胶囊,再用 3-氨丙基三乙氧基硅烷使磁粒表面氨基化,通过控制温度将 FITC 染料负载进入 PANIPAM 胶囊中,将 FITC 共价结合在磁粒表面,合成了具有荧光、热敏感和磁响应的磁性微球^[118]。

此外,已有研究将稀土氧化物纳米晶(非重金属)用于叶酸受体介导的荧光及磁双模式肿瘤细胞成像。例如,有报道将 Y_2O_3 纳米晶(YONC)与荧光 Eu^{3+} 和顺磁 Gd^{3+} 杂质原位掺杂并与叶酸结合,制成多功能复合纳米探针^[119]。研究表明,多组分掺杂稀土氧化物纳米晶具有独特的双模式对比成像性能,且无毒性和肿瘤靶向能力,在细胞成像中具有良好的应用前景。

多功能纳米粒子用于肿瘤的标记成像,使得各种标记技术有机结合,不仅可以扬长避短,而且使各种技术的优势相得益彰,在肿瘤的标记、诊断乃至治疗中都将会有更加广泛的应用。

2.3.6 荧光蛋白

2.3.6.1 绿色荧光蛋白

1) 2008 年诺贝尔化学奖简介

日本科学家下村修(Osamu Shimomura)、美国科学家马丁·沙尔菲(Martin Chalfie)和美籍华裔科学家钱永健(Roger Y. Tsien)(图 2-34)因在发现和研究绿色荧光蛋白方面的贡献而分享了 2008 年的诺贝尔化学奖。他们的工作不但对化学、生物学、医学等领域具有重要的意义,而且与人们的日常生活密切相关,对于提

高人类的生活品质以及进一步改善人类的健康有十分重要的意义。绿色荧光蛋白特别突出的应用是对肿瘤细胞的标记,使得科学家能观测到肿瘤细胞的生长、入侵、转移和新生等具体过程。

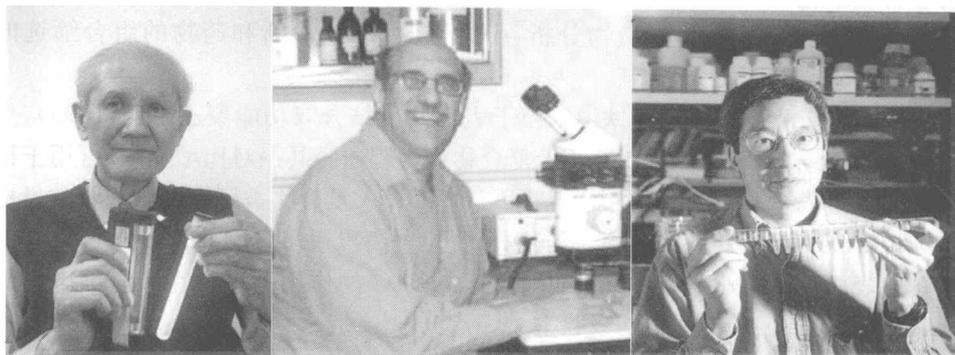


图 2-34 2008 年诺贝尔化学奖获奖者
从左至右依次为下村修、马丁·沙尔菲、钱永健

下村修 1962 年在北美西海岸的水母中首次发现了一种在紫外线下发出绿色荧光的蛋白质(图 2-35),即 GFP(green fluorescent protein),被誉为“生物发光研究第一人”。随后,马丁·沙尔菲在利用 GFP 作为生物示踪分子方面做出了贡献。钱永健祖籍中国浙江,1952 年出生于纽约著名的科学世家。他的主要贡献是利用水母发出绿光的化学物质来观察和研究实验室内进行的生物反应,让科学界更全面地理解 GFP 的发光机理,并对 GFP 进行了改造,通过改变其氨基酸排序合成出了能吸收、发射不同颜色(蓝色、蓝绿色、黄色)光的荧光蛋白,为同时追踪多种生物细胞变化的研究奠定了基础。他的多色荧光蛋白技术使同一时间追踪多种不同生物细胞变化过程成为现实,同时也为细胞生物学和神经生物学带来了一场革命。



图 2-35 绿荧光水母——通过体内绿色荧光蛋白发光

2) GFP 性质

GFP 能够自发发出荧光,它是第一个由生命自我复制、表达,并能够按照设计自动标记靶蛋白的特异性荧光探针。GFP 的独特之处在于它的受激发无种属特异性,产生荧光无需底物或辅助因子,并且与 GFP 融合表达的蛋白质在细胞内仍能发挥正常功能。现在已经证实,GFP 是生物发光过程中能量转移的最后受体,可接受来自动物体内荧光素酶、氧化荧光素酶激发态复合物或转移钙依赖光蛋白释放的能量,从而发出绿色荧光。

1996 年, Yang 和 Ormo 两个研究小组分别独立发表有关 GFP 立体结构的成果,进一步揭开了绿光的秘密。原来 GFP 像是一个灯笼,有一个圆桶的外壳,保护中心发光的荧光绿光芯。所有 GFP 都有一个由三条氨基酸链组成的内在荧光基团。从结构上看,GFP 的折叠方式非常特殊,11 条 β 桶状结构绕成一个圆柱体,1 条 α 螺旋缠绕在圆柱体的轴位置,生色团附在 α 螺旋上,包埋于中心(图 2-36)。另一种平面的 GFP 表达方式如图 2-37 所示,其中编号 1~11 的箭头代表 β 折叠,编号为 a、b、c、d 的部分代表 α 螺旋。

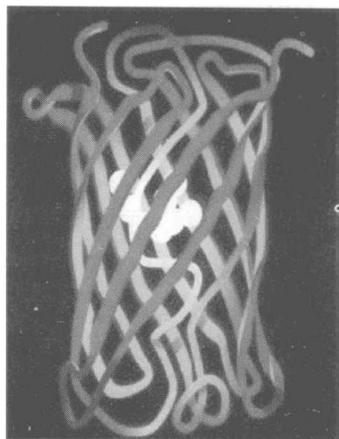


图 2-36 GFP 的三级结构

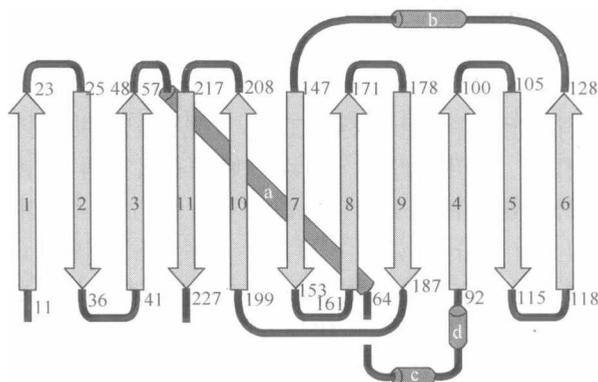


图 2-37 GFP 结构的另一种表达方式

GFP 控制光的部位是其自身的一部分,仅有氨基酸构建而成,该部位含有一段三个氨基酸组成的特殊序列:丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸(有时丝氨酸会被相似的苏氨酸取代)。当蛋白质链折叠时,这段短片段就被深埋在蛋白质内部,然后发生一系列化学反应:甘氨酸与丝氨酸之间形成化学键,生成一个新的闭合环,随后这个

环会自动脱水。最终,经过大约 1 h 的反应,周围环境中的氧气供给酪氨酸一个化学键,形成一个新的双键并合成荧光发色团。蛋白质链形成一个圆柱形罐头,子链的一部分直接从中间穿过,发色团刚好在罐头盒的中间,它被保护起来以免受周围环境的影响。

GFP 是酸性蛋白,呈球柱状结构,直径为 3 nm,长约 4 nm,相对分子质量为 27 000~30 000,含有 238 个氨基酸。来自不同动物的荧光蛋白的结构、性质不尽相同,目前研究较为深入的是来自多管水母科(Aequorea)和海紫罗兰科(Renilla)

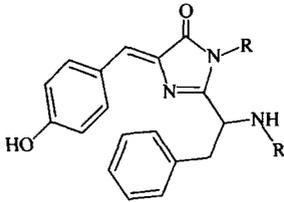


图 2-38 GFP 中的生色基团

的绿色荧光蛋白,即 Aequorea GFP 和 Renilla GFP。两种 GFP 有不同的激发光谱,Aequorea GFP 在 395 nm 具有最高吸收峰,肩峰为 473 nm; Renilla GFP 在 498 nm 具有强烈光吸收,肩峰为 470 nm。两种 GFP 发射光谱基本相同(508~509 nm)。这说明两种蛋白质含有相同的生色团,如图 2-38 所示。

由于 GFP 相对分子质量小,其融合不影响结合蛋白的生物学功能,转染的细胞可以继续传代。因此可以用来作为一种直观、方便、有效的报告基因。将 GFP 与细胞内特定蛋白构建成融合蛋白基因,当融合蛋白在细胞中表达时,使特定蛋白得到荧光标记。各种细胞都能表达,因而作为活细胞的分子探针,GFP 连接上目的基因后转染细胞,使用荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜等仪器便可以观察分析目的基因的生物学功能与特性。GFP 定位与免疫组化技术定位是目前广泛应用的蛋白质定位方法,而 GFP 技术相比后者优点更多。

3) GFP 的应用

GFP 是研究当今生物学的重要标识工具,发光标记有助于科学家观察蛋白的运动、位置及相互作用。利用化学技术发明更好的有机染料,与钙质结合明显改变荧光,可以观察活体细胞内钙离子信号的流动和变化,追踪细胞内的钙水平,并在基因上改变让水母发光的分子,如图 2-39 所示。科学家还找到了为钙质“上妆”方法,促使染剂无需注射、不损害研究细胞,而直接穿透细胞壁。钙离子在生物体内起到维持神经冲动调节、肌肉收缩和传导及调节酶的活性等作用。实验室中将 GFP 运用到生化分析方面,可依据生物发光现象检测超微量钙元素的存在。

在近几年的生命科学研究中,GFP 已经成为跟踪活细胞内基因表达及蛋白质定位的标记物,成为基因转录调控、时相表达、蛋白质定位、转基因动物、细胞骨架等研究的有效手段。GFP 在组织中表达产生内在自发的荧光,从而可以标记一些正常的细胞学过程,借助激光共聚焦显微镜等高分辨率的显微荧光光学仪器就可以监控、研究这些动态的过程。多色荧光蛋白技术又称为荧光探针技术,GFP 在医学和生物化学方面得到了广泛的应用。它能够使人们直接看到细胞内部的运动

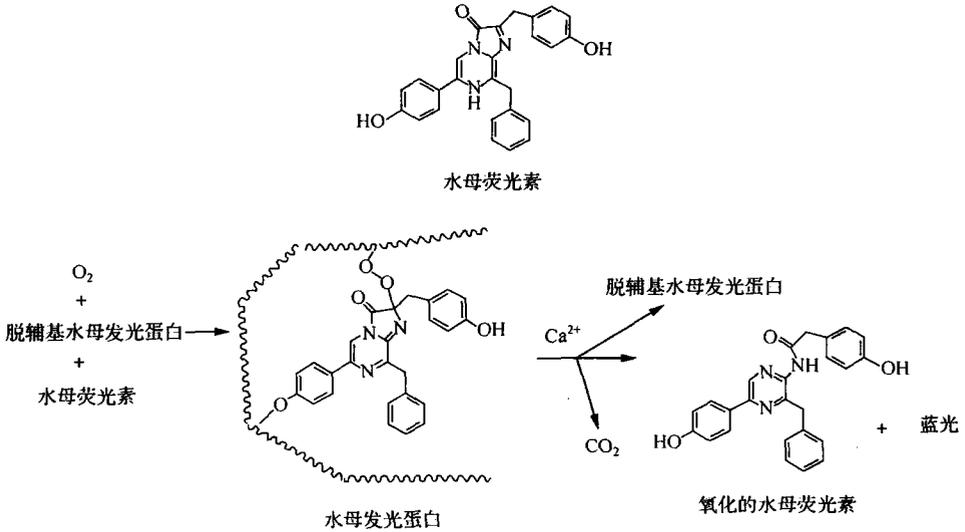


图 2-39 GFP 的应用示意图

情况,其特别突出的应用是在癌症研究的过程中。

GFP 作为新一代报告基因,已经广泛应用于生物医学的各个领域。同以往常用的报告基因 LacZ、CAT、荧光素酶基因及其他抗生素基因相比,GFP 不需要任何外源性底物和辅助因子,无毒、稳定、无污染,而且可以在紫外光或蓝光激发下直接观察。目前肺癌、前列腺癌、黑色素瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌和脑癌的原位 GFP 肿瘤的整体荧光成像模型已建立^[120]。1999 年,Matz 等从印度洋、太平洋地区的珊瑚虫中分离出 6 种与 GFP 同源的荧光蛋白,并鉴定了它们的光谱性质。其中来源于 *Discosoma* sp. 的红色荧光蛋白发射波长较长,灵敏度与信噪比均比 GFP 高,为基于 GFP 的体内研究提供了一个很好的互补工具。利用荧光蛋白的特点,将其引入细胞或者转基因动物体内,能够在体地、非侵入地、动态地纵向研究生物过程。

分子成像技术的发展使对小动物肿瘤模型实时、非侵入在体成像成为可能。而其中光学成像的众多独特优点,使得光学成像对于小动物肿瘤研究,通过活体荧光成像系统和荧光显微镜直接观察肿瘤中血管的生成情况,以及机体与肿瘤的相互作用等成为可能。

已经建立了高表达绿色荧光的转基因小鼠模型,利用 DsRed 标记的 B16 肿瘤细胞接种至野生型 C57 小鼠皮下,将 DsRed 标记的 B16 肿瘤细胞接种至 GFP 转基因小鼠皮下,建立了荧光标记小鼠肿瘤模型,利用该模型、活体荧光成像仪和荧光显微镜建立了可在整体和细胞水平直接观察肿瘤的生长及肿瘤与宿主的相互作用的技术^[121]。

日臻完善的以荧光报告蛋白为基础的荧光成像技术可展示活体动物肿瘤血管发生与肿瘤细胞的移行和转移,并且 GFP 能直观地观察到外源基因在活体细胞中的表达,不需外源物质参与,且对细胞无毒性^[122],能较快筛选基因修饰的细胞。因此,荧光成像技术正在成为联系基础研究和临床应用的重要纽带。同时,随着分子基础疾病的深入研究及显像技术的日益进步,将会出现新的成像技术。

4) GFP 目前存在的不足

(1) 检测灵敏度还有待提高,而且其荧光信号强度方面的非线性性质使得定量非常困难。

(2) 新生 GFP 折叠和加工成为具有荧光活性形式的过程十分缓慢,使得某些快速过程,如转录的激活过程,还难以用该方法进行研究。

(3) 紫外激发对某些 GFP 有光漂白和光破坏作用,导致荧光信号快速丧失。

(4) 多数生物具有微弱的自发荧光现象,并有着类似的激发和发射波长,这些荧光背景会影响某些 GFP 的检测。

2.3.6.2 藻胆蛋白

海藻是海洋生物资源的重要组成部分,蓝藻、红藻、隐藻和少数甲藻中存在一类色素复合蛋白-藻胆蛋白(phycobiliprotein),它易溶于水,按光谱特性可分为红色的藻红蛋白(phycoerythrin)、蓝紫色的藻蓝蛋白(phycoeyanin)和孔雀蓝色的异藻蓝蛋白(allophycocyanin),并有报道称其中以藻红蛋白为主。获得藻胆蛋白的主要途径是从海藻中提取分离藻胆蛋白。目前已知的提取方法主要有反复冻融法、化学试剂处理法、溶胀法和超声波法等。

目前研究表明,藻胆蛋白的生物活性主要表现在以下三个方面:①作为荧光探针,藻胆蛋白荧光探针可以分为单一性与非单一性两种,分别可以与一个或多个单抗共价结合用于疾病的检测诊断。更重要的是,藻胆蛋白作为荧光探针具有荧光强度高、可长期保存,且无明显衰减等许多传统荧光染料无法比拟的优越性。②光敏作用,作为新型光动力药物,藻胆蛋白在光动力治疗癌症方面显示出了很好的前景。藻红蛋白介导的光动力反应能够有效地抑制肿瘤细胞 DNA 合成并杀伤癌细胞。③抗肿瘤活性,藻胆蛋白抗肿瘤活性研究广泛。例如,R-藻蓝蛋白能抑制 HL-60 细胞的生长,且存在浓度效应和时间效应;R-藻红蛋白能将 Hela 细胞周期阻滞在 G2/M 期,抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡等。最近研究表明藻胆蛋白还具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抗病毒等功能,但研究有待进一步深入^[123]。

藻胆蛋白是一类具有独特光学性质的新型荧光标记物,具有传统荧光染料无法比拟的优越性:①在含水环境中高度可溶,非特异性结合的影响小;②所发荧光不为其他生物物质自发猝灭;③藻胆蛋白的吸光度和荧光量子产率很高,并且与环境的 pH 无关,有利于提高灵敏度;④藻胆蛋白的荧光激发和发射的 Stokes

位移较大;⑤藻胆蛋白易于与其他分子结合形成多种交联体,可以用位于可见光区的单一激发光激发,发射不同颜色的荧光。目前,藻胆蛋白和生物素、亲和素和各种抗体结合成的荧光抗体均已用于细胞、病毒表面抗原检测和生物大分子分析。用 CNBr 活化的琼脂糖凝胶小珠作为固相载体,应用藻胆蛋白荧光标记物对血清可溶性抗原检测的结果表明,藻胆蛋白免疫荧光法具有荧光强度高、可长期保存且无明显衰减等特点。

藻胆蛋白荧光探针的出现为荧光检测技术注入了新的活力,它克服了人工合成荧光素价格高、合成中产生有毒物质及长期保存后同蛋白质结合能力减弱甚至消失等缺点。因此,近年来藻胆蛋白作为标记物,与生物素、亲和素、DNA 分子和各种单克隆抗体结合制成荧光探针,可以用于荧光显微镜检测、荧光免疫检测、双色或多色荧光分析、研究分子间相互作用,以及高通量药物靶标分子筛选,在临床诊断和生物工程研究中有广泛用途^[124]。

用流式细胞技术检测以藻蓝蛋白处理的宫颈癌细胞(Hela)的细胞周期时发现,藻蓝蛋白可使 Hela 细胞由 S 期、G 期和 M 期向 DNA 合成静止期(G₁期)转变,这说明藻蓝蛋白可减弱肿瘤细胞中的 DNA 合成。研究发现藻蓝蛋白影响细菌脂多糖(LPS)诱发高含量前列腺素(prostaglandin E₂, PEG₂)的 RAW264.7(鼠巨噬细胞)时,能选择性地抑制环加氧酶 2(cyclo-oxygenase-2, COX-2)的活性,降低肿瘤细胞 PEG₂ 的含量,从而引起细胞凋亡。他们还看到 COX-2 在正常组织中表达水平很低,COX-2 活性和前列腺素含量的升高意味着许多疾病,其中包括许多炎症和癌变的发生。特别是在肿瘤细胞中,高水平前列腺素是抑制肿瘤细胞凋亡,使其不断增殖的一个主因。从现有文献结论可以推测,藻胆蛋白的抗氧化活性可能是引起其他生物活性的诱因^[125]。然而由于藻胆分子的相对分子质量很大,难以标记小分子及细胞内抗原或受体。

荧光蛋白的出现把 FRET 在生物领域内的应用推向了一个新的时代。但荧光蛋白也有一些缺陷^[126]:①受其结构特点和敏感性所限,荧光蛋白经常不能用来进行单细胞分析;②荧光蛋白相对较大,限制了其空间分辨率;③荧光蛋白在接受激发光时,除发生 FRET 外,还可以发生光化学变化,导致荧光蛋白发生颜色变化;④荧光蛋白需要几个小时装配形成最终的荧光形式,从而限制了其在最终装配以前研究动力学变化的能力。而即使是生物体内提取出的绿色荧光蛋白,它的核心发光物质仍是有机分子。

FR 介导的肿瘤靶向成像技术,如荧光染料、染料掺杂二氧化硅纳米粒子、量子点、磁纳米粒子等,在用于肿瘤靶向成像方面都表现出良好的光学性能和独特的应用优势。然而大部分研究都仅局限于试管实验,仅有少量的研究是基于动物的活体肿瘤成像,要将其真正用于肿瘤组织的早期成像诊断还需要克服很多挑战。尽管有很多研究称叶酸偶联物在小鼠体内未表现出明显的细胞毒性,但仍需要在

其他动物模型中做更多的实验,乃至最终在人体中进行,系统地研究其生物毒性。严格控制荧光标记技术中叶酸偶联物的电荷、作用剂量、尺寸、包被试剂、暴露时间,尽可能降低或避免其产生的毒性,增加其生物兼容性,是荧光标记技术在生物应用中的关键所在。用于肿瘤成像的荧光标记技术,尤其是纳米材料,要实现其在生物医学领域的深入应用,除了在合成技术上不断优化,以期获得性能更加优异的标记技术(如稳定性强、荧光产率高、生物适应性强等),还应该进一步完善其生物安全性评价的研究。为了检测叶酸偶联物在生物体内的长期毒性及遗传毒性,建立可靠、高效、快速的毒性检测方法很有意义。

另外,还需不断开发高灵敏度和良好光稳定性的荧光标记物,尤其是近红外荧光标记物,因其具有穿透力强、易激发及检测灵敏度高等特点,而成为实现生物体内深度组织荧光标记、成像和检测的有效工具,并将有助于更好地实现荧光标记物的活体靶向示踪、实时动态成像,为生物荧光成像技术带来了新的活力。

此外,表面修饰技术是保护荧光标记物的荧光特性、提高水相分散性和获得合适的表面功能化的关键步骤。研究高效制备 FA 复合物的方法、提高 FA 复合物的稳定性、体内靶向性等是今后要解决的主要问题之一。

参 考 文 献

- [1] 卫生部. 2006 年中国卫生事业发展情况统计公报. 2007.
- [2] 肖红,徐秋霞. 关于肿瘤特征的描述. 河南预防医学杂志,1997,8(4):238-239.
- [3] 王祥麒,陈素美. 肿瘤病学. 北京:人民军医出版社,2006.
- [4] 高源. 用于检测肿瘤标记物并结合光动力学疗法实现靶向治疗的荧光探针. 济南:山东师范大学,2011.
- [5] 张晓鸽,陈思伊. 肿瘤生物标志物在肿瘤个性化治疗中的意义. 中国医药科学,2012,2(5):47-48.
- [6] 许杰. 联合检测肿瘤标志物在肺癌诊断中的临床价值. 石河子:石河子大学,2008.
- [7] Paez J G,Janne P A,Lee J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science Signalling*,2004,304(5676):1497-1500.
- [8] Nicholson R,Gee J,Harper M. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer*,1990,37(4):S9-15.
- [9] Valtola R,Salven P,Heikkil P, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-c are associated with angiogenesis in breast cancer. *The American Journal of Pathology*,1999,154(5):1381-1390.
- [10] Shimizu K,Kubo H,Yamaguchi K, et al. Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Science*,2005,95(4):328-333.
- [11] Dreys J,Zirrgiebel U,Schmidt-Gersbach C, et al. Soluble markers for the assessment of biological activity with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK), a vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced colorectal cancer from two phase i trials. *Annals of Oncology*,2005,16(4):558-565.
- [12] Roy E J,Gawlick U,Orr B A, et al. Folate-mediated targeting of t cells to tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*,2004,56(8):1219-1231.

- [13] Paulos C M, Turk M J, Breur G J, et al. Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56(8): 1205-1217.
- [14] Alberg A J, Selhub J, Shah K V, et al. The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2000, 9(7): 761-764.
- [15] Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: A review. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132(8): 2350S-2355S.
- [16] Sudimack J, Lee R J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 41(2): 147-162.
- [17] 黄英男, 吴昊, 沈锡中. 叶酸受体在肿瘤靶向诊断和治疗中的应用. *复旦学报(医学版)*, 2012, 39(1): 74-79.
- [18] Urano Y, Asanuma D, Hama Y, et al. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nature Medicine*, 2008, 15(1): 104-109.
- [19] 华积德. 肿瘤的临床诊断. *现代肿瘤医学*, 1997, 5(1): 47-50.
- [20] 王兴文. 临床肿瘤诊断与治疗. 天津: 天津科学技术出版社, 2009.
- [21] Fei X, Gu Y. Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(1): 1-7.
- [22] 郁美娟, 孟庆华, 任吉存, 等. 基于生命体系中氨基键合标记的荧光探针研究进展. *染料与染色*, 2004, 41(3): 137-144.
- [23] Yao H, Yamashita M, Kimura K. Organic styryl dye nanoparticles: Synthesis and unique spectroscopic properties. *Langmuir*, 2008, 25(2): 1131-1137.
- [24] 王丽. 生物荧光标记用染料的研究. 大连: 大连理工大学, 2010.
- [25] Hu B, Wang Y, Chen X, et al. Synthesis and photophysical properties of tetrafluorophenyl-modified carbazole oligomers. *Tetrahedron*, 2010, 66(38): 7583-7589.
- [26] Waggoner A S. Cyanine dyes as labeling reagents for detection of biological and other materials by luminescence methods. *Google Patents*, 1997.
- [27] 高志宇, 刘燕刚, 陈妍. 生物荧光标记染料的研究进展. *影像技术*, 2001, 2: 10-16.
- [28] 费学宁, 刘丽娟, 张宝莲, 等. 荧光染料探针分子对变异细胞的识别. *化学进展*, 2006, 18(6): 801-807.
- [29] Bowen B P, Woodbury N W. Toto binding affinity analysis using single-molecule fluorescence spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, 78(6): 582-586.
- [30] Kohler O, Seitz O. Thiazole orange as fluorescent universal base in peptide nucleic acids. *Chemical Communications*, 2003, 23: 2938-2939.
- [31] 赵红莉, 袁慧慧, 蓝闽波. 染料在荧光探针及光动力疗法中的应用. *感光科学与光化学*, 2003, 21(3): 212-222.
- [32] 陈蕾蕾, 陈军浩, 孙雪梅, 等. 荧光染料 CFSE 作为细胞标记的特性研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(2): 140-141.
- [33] 朱海英, 张朵, 谢东甫, 等. 荧光染料 Hoechst33342 与干细胞研究. *生命的化学*, 2005, 25(001): 52-53.
- [34] Texier I, Josserand V, Garanger E, et al. Luminescent probes for optical in vivo imaging. *International Society for Optics and Photonics*, 2005.

- [35] Voropai E, Samtsov M, Chalov V, et al. Fluorescence of the polymethine dye tiks and diagnostics of cancer. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2001, 68(3): 468-472.
- [36] Li X, Ma H, Nie L, et al. A novel fluorescent probe for selective labeling of histidine. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 515(2): 255-260.
- [37] Wu Z, Gong S, Li C, et al. Novel water-soluble fluorescent polymer containing recognition units: Synthesis and interactions with PC12 cell. *European Polymer Journal*, 2005, 41(9): 1985-1992.
- [38] Askari M, Alarie J P, Moreno-Bondi M, et al. Application of an antibody biochip for p53 detection and cancer diagnosis. *Biotechnology Progress*, 2008, 17(3): 543-552.
- [39] Achilefu S, Dorshow R B, Bugaj J E, et al. Cyanine and indocyanine dye bioconjugates for biomedical applications. US Patents, 2001.
- [40] Becker A, Hennesius C, Licha K, et al. Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(4): 327-331.
- [41] Cox W G, Singer V L. Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. *Biotechniques*, 2004, 36(1): 114-123.
- [42] Deshler J O, Highett M I, Schnapp B J. Localization of xenopus vgl mRNA by vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science*, 1997, 276(5315): 1128-1131.
- [43] Lemieux G A, Yarema K J, Jacobs CL, et al. Exploiting differences in sialoside expression for selective targeting of MRI contrast reagents. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(17): 4278-4279.
- [44] 吕志珍, 徐明, 张幼怡. 苯肾上腺素荧光标记物的合成及其生物活性的鉴定. *北京大学学报(医学版)*, 2004, 36(6): 623-625.
- [45] 陈罕, 凌均荣, 刘建伟. 荧光标记寡核苷酸探针检测变形链球菌. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(B06): 16-17.
- [46] Chen Y, Intes X, Chance B. Development of high-sensitivity near-infrared fluorescence imaging device for early cancer detection. *Biomedical Instrumentation and Technology*, 2005, 39(1): 75-85.
- [47] 费学宁, 刘丽娟, 朱森, 等. 叶酸受体介导的肿瘤靶向光学成像技术. *化学进展*, 2011, 23(8): 1728-1736.
- [48] Tung C H, Lin Y, Moon W K, et al. A receptor-targeted near-infrared fluorescence probe for in vivo tumor imaging. *ChemBioChem*, 2002, 3(8): 784-786.
- [49] Sakata M, Shirakawa Y, Kamata N, et al. Synthesis and antibacterial activity of some new s-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazine derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2000, 37: 269-271.
- [50] Moon W K, Lin Y, O'loughlin T, et al. Enhanced tumor detection using a folate receptor-targeted near-infrared fluorochrome conjugate. *Bioconjugate Chemistry*, 2003, 14(3): 539-545.
- [51] Kennedy M D, Jallad K N, Thompson D H, et al. Optical imaging of metastatic tumors using a folate-targeted fluorescent probe. *Journal of Biomedical Optics*, 2003, 8(4): 636-641.
- [52] Zheng Y, Cai Z, Song X, et al. Receptor mediated gene delivery by folate conjugated n-trimethyl chitosan in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 382(1): 262-269.
- [53] 金鑫, 张阳德, 王吉伟, 等. 荧光标记的叶酸修饰壳聚糖纳米载体研制. *中南大学学报(自然科学版)*, 2010, 41(1): 161-165.
- [54] Fei X, Gu Y, Ban Y, et al. Thiazole orange derivatives: Synthesis, fluorescence properties, and labeling cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(2): 585-591.

- [55] Fei X, Yang S, Zhang B, et al. Solid-phase synthesis and modification of thiazole orange and its derivatives and their spectral properties. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 2007, 9(06): 943-950.
- [56] Fei X, Gu Y, Wang Y, et al. Targeted thiazole orange derivative with folate: Synthesis, fluorescence and in vivo fluorescence imaging. *Molecules*, 2010, 15(10): 6983-6992.
- [57] Miki K, Oride K, Inoue S, et al. Ring-opening metathesis polymerization-based synthesis of polymeric nanoparticles for enhanced tumor imaging in vivo: Synergistic effect of folate-receptor targeting and pegylation. *Biomaterials*, 2010, 31(5): 934-942.
- [58] 崔思思, 陈海燕, 胡育筑, 等. 近红外量子点在体内分析中的应用. *药学进展*, 2009, 33(1): 18-23.
- [59] Bailey R E, Nie S. Alloyed semiconductor quantum dots: Tuning the optical properties without changing the particle size. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(23): 7100-7106.
- [60] Rogach A, Harrison M, Kershaw S, et al. Colloidally prepared CdHgTe and HgTe quantum dots with strong near-infrared luminescence. *Physica Status Solid(b)*, 2001, 224(1): 153-158.
- [61] Zhong X, Han M, Dong Z, et al. Composition-tunable $Zn_xCd_{1-x}Se$ nanocrystals with high luminescence and stability. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(28): 8589-8594.
- [62] Zhong X, Feng Y, Knoll W, et al. Alloyed $Zn_xCd_{1-x}S$ nanocrystals with highly narrow luminescence spectral width. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(44): 13 559-13 563.
- [63] 赵薇, 张志凌, 庞代文. 量子点荧光标记技术在生物医学领域的应用. *化学传感器*, 2008, 28(1): 8-14.
- [64] 谢海燕. 基于量子点的生物医学功能纳米材料的制备与应用. 武汉: 武汉大学, 2004.
- [65] Mitchell G P, Mirkin C A, Letsinger R L. Programmed assembly of DNA functionalized quantum dots. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(35): 8122-8123.
- [66] Mattoussi H, Mauro J M, Goldman E R, et al. Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(49): 12142-12150.
- [67] Goldman E R, Balighian E D, Mattoussi H, et al. Avidin: A natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(22): 6378-6382.
- [68] Goldman E R, Anderson G P, Tran P T, et al. Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(4): 841-847.
- [69] Goldman E, Balighian E, Kuno M, et al. Luminescent quantum dot-adaptor protein-antibody conjugates for use in fluoroimmunoassays. *Physica Status Solid(b)*, 2002, 229(1): 407-414.
- [70] Mattoussi H, Mauro J, Goldman E, et al. Bioconjugation of highly luminescent colloidal CdSe-ZnS quantum dots with an engineered two-domain recombinant protein. *Physica Status Solid(b)*, 2001, 224(1): 277-283.
- [71] Pathak S, Choi S K, Arnheim N, et al. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(17): 4103-4104.
- [72] Dahan M, Levi S, Luccardini C, et al. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science Signalling*, 2003, 302(5644): 442-445.
- [73] Chan W C W, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, 281(5385): 2016-2018.
- [74] Bruchez Jr M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, 281(5385): 2013-2016.

- [75] Wu X, Liu H, Liu J, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker HER2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology*, 2002, 21(1): 41-46.
- [76] Seydel C. Quantum dots get wet. *Science*, 2003, 300(5616): 80-81.
- [77] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M, et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature Biotechnology*, 2002, 21(1): 47-51.
- [78] 张春阳, 马辉, 丁尧, 等. 量子点标记天花粉蛋白的研究. *高等学校化学学报*, 2001, 22(1): 34-37.
- [79] Akerman M E, Chan W C W, Laakkonen P, et al. Nanocrystal targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(20): 12617-12621.
- [80] Larson D R, Zipfel W R, Williams RM, et al. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*, 2003, 300(5624): 1434-1436.
- [81] Gao X, Nie S. Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(9): 371-372.
- [82] Frangioni J V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(5): 626-634.
- [83] Clapp A R, Medintz I L, Mauro J M, et al. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(1): 301-310.
- [84] Mamedova N N, Kotov N A, Rogach A L, et al. Albumin-cdte nanoparticle bioconjugates: Preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect. *Nano Letters*, 2001, 1(6): 281-286.
- [85] Niemeyer C M. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, 40(22): 4128-4158.
- [86] Medintz I L, Clapp A R, Mattoussi H, et al. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nature Materials*, 2003, 2(9): 630-638.
- [87] Patolsk Y F, Gill R, Weizmann Y, et al. Lighting-up the dynamics of telomerization and DNA replication by CdSe-ZnS quantum dots. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(46): 13 918-13 919.
- [88] Willard D M, Carillo L L, Jung J, et al. CdSe-ZnS quantum dots as resonance energy transfer donors in a model protein-protein binding assay. *Nano Letters*, 2001, 1(9): 469-474.
- [89] Wang S, Mamedova N, Kotov N A, et al. Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates. *Nano Letters*, 2002, 2(8): 817-822.
- [90] Arts H J G, Willemse P H B, Tinga D J, et al. Laparoscopic placement of pap catheters for intraperitoneal chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 1998, 69(1): 32-35.
- [91] Stroh M, Zimmer J P, Duda D G, et al. Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo. *Nature Medicine*, 2005, 11(6): 678-682.
- [92] Bharali D J, Lucey D W, Jayakumar H, et al. Folate-receptor-mediated delivery of inorganic quantum dots for bioimaging using confocal and two-photon microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(32): 11 364-11 371.
- [93] 钟丽云, 廖陶陶, 蔡继业. 近场光学显微镜结合量子点标记人胃腺癌 SGC-7901 细胞靶点的观察. *激光生物学报*, 2008, 16(6): 731-736.
- [94] Schroeder J, Shweky I, Shmeeda H, et al. Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 2007, 124(1): 28-34.
- [95] 傅晓源, 陈富韬, 张浩伟, 等. 量子点在叶酸偶联白蛋白纳米粒靶向肿瘤细胞研究中的应用. *中国现代*

医学杂志,2008,18(23): 3418-3420.

- [96] Fei X, Jia G, Wang J. Synthesis and Stokes shift of water-soluble CdTe/CdS core-shell structure quantum dots. *Chalcogenide Letters*, 2010, 7(1): 83-87.
- [97] Fei X, Gu Y, Wang J, et al. Preparation and fluorescent properties of a complex probe based on inorganic QDs and organic dye. *Journal of Luminescence*, 2011, 131(2): 291-296.
- [98] 何晓晓, 王柯敏, 谭蔚泓, 等. 基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法及其在细胞识别中的应用. *科学通报*, 2001, 46(16): 1353-1356.
- [99] Yao G, Wang L, Wu Y, et al. Fluorodots: Luminescent nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385(3): 518-524.
- [100] Zhao X, Bagwe R P, Tan W. Development of organic-dye-doped silica nanoparticles in a reverse microemulsion. *Advanced Materials*, 2004, 16(2): 173-176.
- [101] Nooney R I, Mccahay C M N, Stranik O, et al. Experimental and theoretical studies of the optimization of fluorescence from near-infrared dye-doped silica nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(4): 1143-1149.
- [102] Santra S, Zhang P, Wang K, et al. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(20): 4988-4993.
- [103] Santra S, Wang K, Tapeç R, et al. Development of novel dye-doped silica nanoparticles for biomarker application. *Journal of Biomedical Optics*, 2001, 6(2): 160-166.
- [104] Qhobosheane M, Santra S, Zhang P, et al. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst*, 2001, 126(8): 1274-1278.
- [105] He X, Duan J, Wang K, et al. A novel fluorescent label based on organic dye-doped silica nanoparticles for hepG liver cancer cell recognition. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004, 4(6): 585-589.
- [106] Santra S, Liesenfeld B, Dutta D, et al. Folate conjugated fluorescent silica nanoparticles for labeling neoplastic cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2005, 5(6): 899-904.
- [107] Santra S, Dutta D, Moudgil B. Functional dye-doped silica nanoparticles for bioimaging, diagnostics and therapeutics. *Food and Bioproducts Processing*, 2005, 83(2): 136-140.
- [108] Choi H, Choi S R, Zhou R, et al. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. *Academic radiology*, 2004, 11(9): 996-1004.
- [109] Chen T J, Cheng T H, Hung Y C, et al. Targeted folic acid-PEG nanoparticles for noninvasive imaging of folate receptor by MRI. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2008, 87(1): 165-175.
- [110] Wang S H, Shi X, van Antwerp M, et al. Dendrimer-functionalized iron oxide nanoparticles for specific targeting and imaging of cancer cells. *Advanced Functional Materials*, 2007, 17(16): 3043-3050.
- [111] 王晓文, 唐劲天. 磁感应纳米基因靶向治疗方法的研究与展望. *中国微创外科杂志*, 2009, 9(6): 509-511.
- [112] Gao J, Zhang W, Huang P, et al. Intracellular spatial control of fluorescent magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(12): 3710-3711.
- [113] Zhang Y, Wang S N, Ma S, et al. Self-assembly multifunctional nanocomposites with Fe₃O₄ magnetic core and CdSe/ZnS quantum dots shell. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2008, 85(3): 840-846.
- [114] Bertorelle F, Wilhelm C, Roger J, et al. Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles; Intra-

- cellular uptake and use in cellular imaging. *Langmuir*, 2006, 22(12): 5385-5391.
- [115] Mandal S K, Lequeux N, Rotenberg B, et al. Encapsulation of magnetic and fluorescent nanoparticles in emulsion droplets. *Langmuir*, 2005, 21(9): 4175-4179.
- [116] Xie H Y, Zuo C, Liu Y, et al. Cell-targeting multifunctional nanospheres with both fluorescence and magnetism. *Small*, 2005, 1(5): 506-509.
- [117] Sun C, Sze R, Zhang M. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2006, 78(3): 550-557.
- [118] Wang G P, Song E Q, Xie H Y, et al. Biofunctionalization of fluorescent-magnetic-bifunctional nanospheres and their applications. *Chemical Communications*, 2005, (34): 4276-4278.
- [119] Setua S, Menon D, Asok A, et al. Folate receptor targeted, rare-earth oxide nanocrystals for bi-modal fluorescence and magnetic imaging of cancer cells. *Biomaterials*, 2010, 31(4): 714-729.
- [120] Hoffman R M. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. *Lancet Oncology*, 2002, 3(9): 546-556.
- [121] 高冉, 刘学丽, 冯娟, 等. 荧光标记技术在肿瘤模型研究中的应用. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(5): 59-61.
- [122] Yang M, Baranov E, Wang J W, et al. Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(6): 3824-3829.
- [123] 季宇彬, 徐博慧, 高世勇. 藻胆蛋白主要生物活性研究进展. *中国药理通讯*, 2009, 26(2): 23-24.
- [124] 苏忠亮, 程江峰, 梁成伟, 等. 藻胆蛋白的活性及应用研究进展. *安徽农业科学*, 2009, 36(30): 13 006-13 007.
- [125] 王庭健, 林凡, 赵方庆, 等. 藻胆蛋白及其在医学中的应用. *植物生理学通讯*, 2006, 42(2): 303-307.
- [126] Selvin P R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(9): 730-734.

第 7 章 荧光探针检测系统与实例

随着现代医学、分子生物学以及信息技术的发展,各种先进荧光检测技术及仪器为荧光探针研究和应用提供了重要保障。常用于分子荧光成像检测的仪器有激光扫描共聚焦显微镜、流式细胞仪、活体成像系统及荧光相关光谱等。

7.1 激光扫描共聚焦显微镜

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)利用激光点作为荧光的激发光并通过扫描装置对标本进行连续扫描,通过空间共轭光阑(针孔)阻挡离焦平面光线而成像的一种显微镜。是现代最先进的细胞生物学分析仪器之一。它是在荧光显微镜成像的基础上加装激光扫描装置,使用紫外光或可见光激光荧光探针,利用计算机进行图像处理,激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态,也可以用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量,配合焦点稳定系统可以实现长时间活细胞动态观察。目前,在形态学、生理学、免疫学、遗传学等分子细胞生物学领域得到广泛应用。

7.1.1 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理

一个完整的激光扫描共聚焦显微镜系统由几个主要的硬件(图 7-1)和一些成像分析软件组成。硬件包括表面荧光显微镜、激光光源及冷却系统、定位扫描装置、分辨系统、计算机控制系统、显示器和图像输出打印设备,软件由三维图像分析系统和三维图像文件管理系统构成。

激光扫描共聚焦显微镜以单色激光作为光源,并用附设光源针孔(pinhole)使光源成为点光源。除此之外,在检测器前方也有一个检测针孔,点光源对标本内焦平面上的每一检测针孔后的光电点扫描,标本上的被照射点在检测针孔成像,由倍增管或冷电耦合器件逐点或逐线接受,迅速在计算机监视器屏幕上形成荧光图像。光源针孔与检测针孔的位置相对于物镜焦平面是共轭的,焦平面上的点同时聚焦于光源针孔和检测针孔,焦平面以外的点不会在检测针孔成像(图 7-2),这就是所谓的“共聚焦”。这样得到的共聚焦图像是标本的光学横断面,克服了普通显微镜图像模糊的缺点^[1,2]。

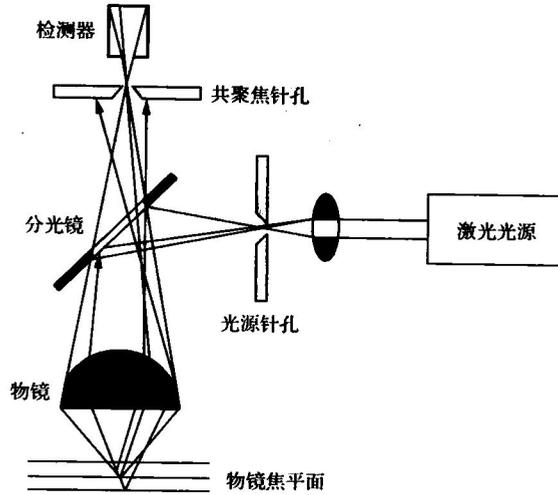


图 7-1 激光扫描共聚焦显微镜的原理图

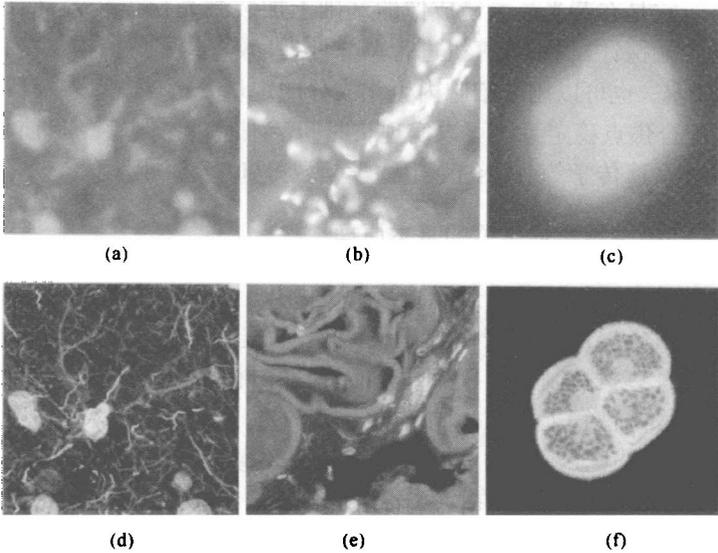


图 7-2 普通显微镜(上部)和激光扫描共聚焦显微镜(下部)成像比较
(a)和(b)为大鼠脑海马组织厚切片的胶质纤维酸性蛋白(红色)、神经微丝(绿色)和 Hoechst 33342 细胞核染色(蓝色);(c)和(d)为大鼠肺动脉平滑肌厚切片与 Alexa Fluor 568 偶合(红色), 丝裂原与 Oregon Green 488 偶合(绿色);(e)和(f)为向日葵花粉自发荧光

7.1.2 激光扫描共聚焦显微镜在肿瘤检测中的应用

1) 肿瘤细胞的三维重建

激光共聚焦显微镜能以 $0.1\ \mu\text{m}$ 的步距沿轴向对细胞进行分层扫描,得到一组光学切片,经 A/D 转换后作为二维数组储存。这些数组通过计算机进行不同的三维重建算法,可作单色或双色图像处理,从而组合成细胞真实的三维结构^[2],如图 7-3 所示。旋转不同角度可观察各侧面的表面形态,也可从不同的断面观察细胞内部结构,测量细胞的长宽高、体积和断层面积等形态学参数。激光共聚焦显微镜的三维重建广泛用于各类细胞骨架和形态学分析、染色体分析、细胞程序化死亡的观察、细胞内细胞质和细胞器的结构变化分析和探测等方面。在肿瘤细胞的标记中可更加直观地观察荧光染料探针对肿瘤细胞标记情况,包括探针与各细胞器的结合等。

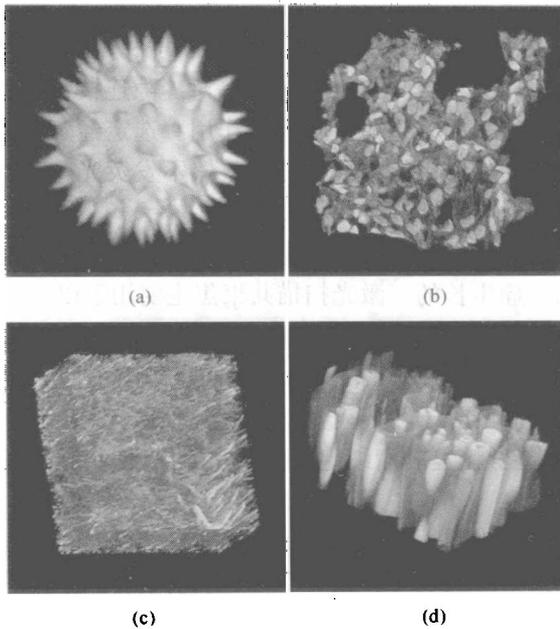


图 7-3 共聚焦显微镜三维构建

(a) 向日葵花粉表面自发荧光;(b) 大鼠肺组织($16\ \mu\text{m}$ 厚);(c) 大鼠脑部标本经荧光探针标记并通过 30~45 个光学切片组成三维图像;(d) 蕨根薄片自发荧光^[3]

2) 肿瘤细胞定量荧光测定

激光共聚焦显微镜对荧光标记肿瘤细胞分层扫描,单独测定,经积分后能得到细胞荧光的准确定量,可进行肿瘤细胞的定量分析,测定细胞内容酶体、线粒体、

DNA、RNA、酶和结构性蛋白质等物质的含量和分布。常用于肿瘤细胞识别、单个活细胞水平的 DNA 损伤及修复的定量分析等。

3) 肿瘤细胞内钙离子 pH 和其他离子的动态分析

细胞内离子测量广泛用于肿瘤研究、组织胚胎学、细胞生物学和药理学等领域。通过一些专用荧光探针,可对细胞内钙离子、钠离子及 pH 等作荧光标记,并对它们进行比率值和浓度梯度变化测定。由于细胞内钙离子为传递信息的第二信使,对细胞生长分化起着重要作用,通过单标记或双标记对细胞内钙离子和其他离子的荧光强度和分布精确测定,测定样品达到毫秒级的快速变化。借助光学切片功能可以测量样品深层的荧光分布以及细胞光学切片的生物化学特性的变化。通过不同时间段的检测可测定细胞内离子的扩散速度,了解它对肿瘤启动因子、生长因子等刺激的反应。

4) 肿瘤细胞胞间通信和膜的流动性

细胞中缝隙连接介导的胞间通信在细胞增殖和分化中起着重要作用。通过测量细胞缝隙连接分子的转移,可以研究肿瘤启动因子和生长因子对缝隙连接介导的胞间通信的抑制作用及细胞内钙离子、pH 等对缝隙连接作用的影响,并监测环境毒素和药物在细胞增殖和分化中所起到的作用。选定经荧光染色后的细胞,借助于光漂白作用或光损伤作用使细胞部分或整体不发荧光,实时观察检测荧光的恢复过程,可直接反映细胞胞间通信结果。

细胞与细胞间的通信是肿瘤研究的重点之一,癌基因和化学物质是通过影响细胞间通信来启动肿瘤生长的。激光扫描共聚焦主要用于以下三方面来研究细胞间通信:①可从形态学上观察细胞与细胞间连接的形态变化和某些紧密连接的变化,即某些连接蛋白、黏附因子等的变化,从而阐明细胞间通信的形态学基础;②测量由细胞缝隙连接介导的分子转移;③可通过这些研究观察某些药物对肿瘤细胞间通信的影响,找出能够恢复肿瘤细胞间的正常通信,抑制肿瘤细胞无限制生长的抗肿瘤药物。

近年来关于肿瘤细胞凋亡分子机制的研究已有了很大的突破。细胞凋亡的信号传递途径及其调控涉及大量的酶级联反应、生物大分子的空间移位等。而激光扫描共聚焦显微镜以其定量、定时、定位的优点,结合众多荧光探针的应用,成为研究细胞凋亡分子水平变化的有力手段^[3]。

研究人员^[4]应用激光扫描共聚焦显微镜同时检测前列腺癌中基质金属蛋白酶(MMPs)和其作用底物的表达情况。可以清晰地观察 MMP-7 和层粘连蛋白(LN)可共同表达于前列腺癌细胞及基质中的基底膜、血管平滑肌和神经纤维;MMP-9 和Ⅳ型胶原主要表达于细胞外基质中的基底膜。应用激光扫描共聚焦显微镜和免疫荧光双重标记技术能对蛋白质进行精确的定位研究。

· 研究人员^[5]探讨荧光染料羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(5,6-carboxy-

fluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)在作为细胞标记时的特性。应用激光共聚焦扫描显微技术,观察CFSE在细胞中的准确定位、对细胞增殖的影响,以及细胞在增殖过程中荧光强度的变化,可以观察到CFSE进入细胞后定位于细胞膜、细胞质和细胞核中。

激光扫描共聚焦显微镜的生物应用依赖于荧光团的激发和发射波长,不同的荧光团应选择激光扫描共聚焦显微镜不同的激发波长。目前的激光扫描共聚焦显微镜一般具备400~650 nm的激发波长范围,对于普通的荧光染料均可激发。使用中应注意荧光团的光漂白和光稳定性。

7.2 流式细胞仪

流式细胞仪(flow cytometry, FCM)是以流体带动细胞或粒子,对其特性进行检测的一种分析技术。它是集电子技术、计算机技术、激光技术、流体理论于一体的检测仪器。流式细胞仪是测量染色细胞标记物荧光强度的细胞分析仪,是在单个细胞分析和分选基础上发展起来的对细胞的物理或化学性质,如大小、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等进行快速测量并可分类收集的新技术。FCM以其快速、灵活、大量、灵敏和定量的特色,应用于基础研究和临床实践各个方面,包括细胞生物学、肿瘤学、血液学、免疫学、药理学、遗传学及临床检验学等,在各学科领域中发挥着重要的作用。

7.2.1 流式细胞仪的原理

待测样本的细胞悬液,在鞘液的包围和约束下,细胞排成单列由流动室喷嘴高速喷出,形成细胞液柱。当液柱通过检测区,在入射的激光束照射下产生前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC),它们分别反映细胞大小和颗粒度,根据这些特性可以将细胞分类。经一种或几种特殊荧光标记的样本,在激光束的激发下所产生的特定荧光,可被光学系统检测并输送到计算机进行分析,得到细胞相应的各种特性。

流式细胞仪主要由流动室及液流驱动系统(fluidics system)、光学系统(包括激光光源及光束形成系统)、信号检测器(detector)与存储、显示(screen)、分析系统和细胞分选系统(filters)五部分构成,如图7-4所示。

流动室是流式细胞仪的核心部件。流动室由石英玻璃制成,单细胞悬液在细胞流动室里被鞘液包裹通过流动室内的一定孔径的孔,检测区在该孔的中心,细胞在此与激光垂直相交,在鞘液约束下细胞成单行排列依次通过激光检测区。流动室里的鞘液流是一种稳定流动,控制鞘液流的装置是在流体力学理论的指导下由一系列压力系统、压力感受器组成。只要调整好鞘液压力和标本管压力,

程度上减少了不同实验动物之间的个体差异以及传统检测方法的误差所造成的对实验结果的影响。

活体生物光学分子成像技术实现了将分子及细胞生物学技术从体外研究发展到生物体内的跨越,为研究人员设计、开发新型荧光探针以及探针在生物医学中的应用研究提供了技术支持。

7.4 荧光相关光谱

荧光相关光谱(fluorescence correlation spectroscopy, FCS)技术是一种利用荧光强度随时间的涨落进行分析检测的荧光光谱技术,也是一种重要的单分子检测技术,在反应动力学研究、活体细胞分析、疾病早期诊断以及药物筛选等方面发挥着重要作用。

7.4.1 仪器结构及原理

荧光相关光谱通常用来研究可自由扩散的荧光分子。在一个处于平衡状态的溶液中,一个微小区域内的荧光分子数量可由溶液中荧光分子的浓度和区域的体积所决定。由于荧光分子的随机扩散以及分子间的化学反应,该区域内的荧光强度会随时间变化,即产生荧光涨落现象。可对于一个仅含有一种荧光团的体系进行平移扩散系数的测定,也可用于测定具有多个扩散系数的组分其各自的扩散系数。常见的有单光子激发荧光和双光子激发荧光。单光子激发荧光由于激发光聚焦点之外的照射区域仍有较强的荧光信号,所以常规荧光检测方法的信噪比非常低。此时,通常使用激光共聚焦荧光显微镜进行荧光相关光谱的测定。双光子激发荧光的荧光更集中于激发光焦点附近。对于相同直径的激发光束,双光子激发可得到更小的激发空间,同时大大降低背景荧光强度,所以双光子激发荧光的荧光相关光谱检测无需使用共聚焦方式。一个典型的荧光相关光谱仪器结构包括光源、共聚焦光学系统、检测器和数据采集及控制系统等部分(图 7-11)。激光器产生的激发光经双色镜反射进入显微镜物镜,并聚焦于样品上,产生的荧光经同一物镜收集后穿过双色镜和发射滤光片,用透镜聚焦穿过置于焦点处的针孔进入单光子计数器检测。采用单光子激发时,很多荧光分子在短波长激光照射下会发生光漂白,而双光子激发技术使荧光分子在很短的时间间隔里吸收两个相同频率的光子后被激发到高能级,经过一个弛豫过程后发生自发跃迁,辐射出频率略低于 2 倍入射光频率的荧光光子^[13]。

7.4.2 荧光相关光谱应用

Shimizu 等^[14]采用荧光相关光谱技术以及花菁类染料发展了一种双链 DNA

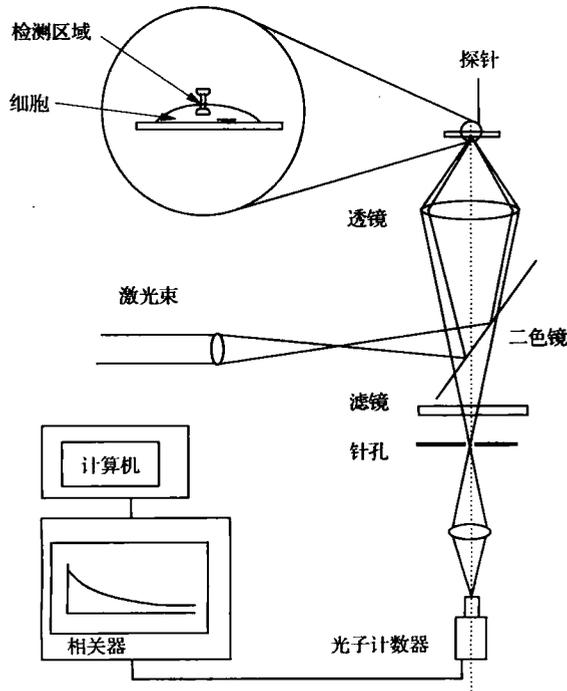


图 7-11 荧光相关光谱仪器结构示意图

链长度的测定方法。由于在 DNA 测定之前通常需要进行 PCR 扩增,而荧光团与双链 DNA 的共价连接步骤烦琐、耗时,为简化流程,研究者使用嘧啶黄二聚体 (YOYO) 嵌入双链 DNA 以进行荧光标记。由于不同长度的双链 DNA 在溶液中的扩散系数不同,因此嵌入的 YOYO 的扩散时间会表现出明显的差异,并导致荧光相关光谱产生显著的不同。通过测定荧光团的扩散时间,即可得到其所嵌入的双链 DNA 的长度。此方法可用于测定长度在 50~1500 个碱基对 (base pair, bp) 的双链 DNA 所含碱基对的具体数目。

荧光相关光谱可对分子间的相互作用进行检测,包括分子构象变化检测、化学反应动力学分析以及大分子之间结合状况的测定等。研究者^[15]用 MR121 标记具有发卡 (hairpin) 结构的寡聚核糖核苷片段 (HP), 标记后的 RNA 与 AtGRP7 蛋白反应形成结合物并进行荧光相关光谱的测定。实验结果说明, RNA 与 AtGRP7 蛋白的结合反应包括两个步骤,即 RNA 发卡结构的打开 (HPfolded 转变为 HPunfolded) 以及 RNA 与 AtGRP7 蛋白的结合 (HPunfolded 转变为 HPbound), 结合之后的 RNA 构象灵活性显著下降。

随着生命科学和信息技术的发展,荧光相关光谱技术的日趋完善,荧光相关光谱单分子检测方法在生物分子相互作用、活细胞分析、疾病早诊、蛋白质、肽及酶研

究以及高通量筛选等方面将发挥巨大的研究潜力。光学成像技术和设备的不断涌现,应用范围的不断扩大,为新型荧光探针的构建以及在生物医学成像方面提供了技术保证。

参 考 文 献

- [1] 任小则,宋峰,庞雪芬. 激光扫描共聚焦显微镜的使用及其在医学研究领域中的应用. 中国科技信息, 2009,(11): 237-238.
- [2] Claxton N S, Fellers T J, Davidson M W. Laser scanning confocal microscopy. Olympus. Available online at <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>, 2006.
- [3] 张鹏,毕明刚. 激光扫描共聚焦显微技术及其在神经,肿瘤相关研究中的应用. 医疗卫生装备, 2010, 31(002): 43-45.
- [4] 王心蕊,周洪澜,王健伟,等. 激光共聚焦显微镜观察免疫荧光双重标记的前列腺癌内基质金属蛋白酶及其作用底物的表达. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31(006): 960-961.
- [5] 陈蕾蕾,陈军浩,孙雪梅,等. 荧光染料 CFSE 作为细胞标记的特性研究. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(2): 140-141.
- [6] 徐彩霞,项鹏,陈蕊,等. 绿色荧光蛋白标记骨髓间质干细胞示踪技术在体外构建组织工程骨中的应用研究. 生物医学工程学杂志, 2011, 28(1): 121-124.
- [7] 孔珺,邱涵,余敏,等. 亲水性修饰的量子点的结构对荧光性能的影响研究. 化学学报, 2012, 70(006): 789-795.
- [8] 方文彦,闵元增,徐迈,等. 表面修饰的金纳米棒的生物相容性和细胞摄取研究. 中国科学技术大学学报, 2011, 41(5): 428-431.
- [9] Estevez M C, Donoghue O, Meghan B, et al. Highly fluorescent dye-doped silica nanoparticles increase flow cytometry sensitivity for cancer cell monitoring. Nano Research, 2009, 2(6): 448-461.
- [10] 王心怡,居胜红,李聪,等. 兔外周血内皮祖细胞的多功能分子影像探针标记及其在肿瘤模型中的活体示踪. 东南大学学报(医学版), 2012, 30(6): 886-892.
- [11] 田新华,魏峰,林晓宁,等. Tat-聚乙二醇修饰明胶-硅氧烷纳米粒跨血脑屏障研究. 生物医学工程学杂志, 2012, 29(3): 486-490.
- [12] 倪庆纯,重韩,威杨,等. 利用小动物活体成像技术快速评价药物的抗肿瘤作用研究. 今日药学, 2012, 22(6): 321-323.
- [13] 许潇,李娜,李克安. 荧光相关光谱的原理,技术及应用. 现代仪器, 2008, 14(5): 1-5.
- [14] Shimizu M, Sasaki S, Tsuruoka M. DNA length evaluation using cyanine dye and fluorescence correlation spectroscopy. Biomacromolecules, 2005, 6(5): 2703-2707.
- [15] Schüttpehl M, Schöning J C, Doose S, et al. Changes in conformational dynamics of mRNA upon GRP7 binding studied by fluorescence correlation spectroscopy. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(29): 9507-9513.

现代食品微生物学

Modern Food Microbiology

吴祖芳 主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

现代食品微生物学

吴祖芳 主 编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代食品微生物学 / 吴祖芳主编. — 杭州: 浙江大学出版社, 2017. 1
ISBN 978-7-308-16199-2

I. ①现… II. ①吴… III. ①食品微生物—微生物学
IV. ①TS201.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 214554 号

现代食品微生物学

吴祖芳 主 编

责任编辑 石国华
责任校对 金 蕾 秦 瑕 王安安 潘晶晶
封面设计 刘依群
出版发行 浙江大学出版社
(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)
(网址: <http://www.zjupress.com>)
排 版 杭州星云光电图文制作有限公司
印 刷 杭州日报报业集团盛元印务有限公司
开 本 787mm×1092mm 1/16
印 张 30.5
字 数 750 千
版 印 次 2017 年 1 月第 1 版 2017 年 1 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-308-16199-2
定 价 68.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行中心联系方式: 0571-88925591; <http://zjdxcbbs.tmall.com>

内容提要

食品微生物学在现代食品加工、保鲜、资源开发与利用、人类卫生与健康等方面将起到越来越重要的作用。本教材首先通过对微生物学在相关产业中的重要地位以及对人类生存环境与健康影响的介绍,巩固微生物学基础知识及基本原理和方法;其次,讲授当今食品微生物学技术发展中的新概念、新方法及其在食品科学与技术中的应用。主要内容包括食品微生物基础知识与理论,食品微生物菌种资源及获取,微生物菌种的改造技术,微生物发酵培养基设计与灭菌技术,微生物发酵过程优化与控制,以及食品微生物的分析检测技术及研究进展等。着重介绍现代食品微生物学研究的系统方法与新成果及进展,食品中微生物的利用及控制的基本原理和方法以及国内外最新研究进展等。本课程能为食品科学与工程、食品工程和食品加工与安全等专业的硕士研究生从事及食品微生物学有关的基础理论研究、产品开发设计以及在食品、生物或农业环保等产业应用等工作,提供较好的知识基础与专业技能。

教材编写委员会

- | | | |
|-------|---------------------|----------------|
| 主 编 | 宁波大学 | 吴祖芳(教授、博导、博士) |
| 副 主 编 | 浙江工商大学 | 顾 青(教授、博导、博士) |
| | 大连工业大学 | 杜 明(教授、博导、博士) |
| | 湖南农业大学 | 蒋立文(教授、博导、博士) |
| | | 周 辉(副教授、硕导、博士) |
| | 集美大学 | 倪 辉(教授、硕导、博士) |
| | 宁波大学 | 翁佩芳(教授、硕导) |
| | | 张 鑫(讲师、博士) |
| 参编人员 | 苗英杰(宁波大学讲师、硕导) | |
| | 曹荣安(黑龙江八一农垦大学讲师、博士) | |
| | 白 冰(沈阳农业大学讲师、硕导、博士) | |

前言

随着现代生物技术的快速发展,微生物学在生命科学(医学)、农业、工业及环境治理等行业发挥着越来越重要的作用;而食品微生物学与现代食品加工、保鲜、食品资源开发与利用及人类健康与卫生等方面密切相关,也是高等院校食品相关专业研究生等培养的重要专业基础课程。然而,国内设有食品专业硕士点包括兼有食品科学与工程重点学科的高校,其食品科学与工程专业的硕士生课程“现代食品微生物学”长期以来没有一本通用性强、内容系统全面的教学参考书供学生基础理论的学习与研究时借鉴,影响了专业教学效果与学生科研能力的培养。

本教材首先通过对微生物学在相关产业中的重要地位以及对人类生存环境与健康影响的介绍,简要论述了微生物学的基本原理与方法,巩固基础理论知识;其次,讲授当今食品微生物学技术发展中的新概念、新方法及其在食品科学与技术中的应用。教材主要内容包括食品相关的微生物菌种改造技术、微生物菌种分离筛选及设计方法,微生物学的基础与应用的研究进展,微生物发酵过程培养基设计与发酵过程优化和控制,食品微生物的分析检测技术,微生物在食品中的利用与食品中微生物的控制等。教材注重介绍现代食品微生物学研究的系统方法与新成果及进展,特别是食品中微生物利用及控制的基本原理和方法及国内外最新研究进展。本教材为食品科学与工程、食品工程和食品加工与安全等专业的硕士研究生从事与食品微生物学有关的基础理论研究、产品开发设计以及在食品、生物或农业环保等产业开展应用等工作,提供较好的知识基础与专业技能。

本教材的编写特色是内容全面,涉及的食品微生物学研究领域包括基础微生物学、食品微生物利用与控制以及食品微生物检测等,内容表达上强调重基础但更注重研究进展及目前面临的科学问题(包括传统发酵食品加工也是如此),对研究生创新能力等的培养具有重要作用。

作者根据多年的研究生教学实践,结合现代研究生知识与能力素质的观察,在整个教材编写过程中力求将理论基础与研究进展相结合,既稳固现代微

生物学的基础理论,又充分结合微生物学发展的最新研究成果,目的是使不同专业知识背景的研究生巩固微生物基础知识,强调对学生科研思路的培养及研究方案的设计能力等。本教材的编写充分利用本领域专任教师在食品科学与工程专业硕士研究生课程“食品微生物学研究进展”中多年积累的课堂教学经验,以及在食品微生物学基础及食品科学与工程领域的多年科研实践,努力做到理论与实践的充分结合。

本教材内容第一篇由吴祖芳、周辉完成,第二篇由吴祖芳、倪辉、周辉和蒋立文完成,第三篇由顾青和吴祖芳完成,第四篇由杜明完成,第五篇由吴祖芳和蒋立文完成,第六篇由吴祖芳、翁佩芳、张鑫和杜明完成。协助参加本书编写工作的还有宁波大学苗英杰讲师(第七章第五节),沈阳农业大学食品学院白冰讲师(第八章),黑龙江八一农垦大学食品学院曹荣安(第十四章第五节),同时宁波大学食品生物技术实验室研究生杨阳、袁树昆、李若云、张庆峰、白政泽、曹红等对菌种的整理和内容校对等付出了辛勤劳动,一并感谢。

本教材的适用对象范围为食品科学与工程、食品工程、食品加工与安全等专业的硕士研究生,从事食品科学与工程领域的研究人员等。本教材无疑是食品相关专业的硕士研究生、从事食品微生物相关研究的科研院所或企业等研究人员进行课题研究思路确立、研究方法设计等十分重要的参考书。

编者

2015年12月于宁波大学

目 录

第一篇 食品微生物学概论与理论基础

第一章 绪 论	(1)
第一节 食品微生物学研究对象	(1)
一、微生物分类	(1)
二、食品微生物常见种类	(1)
第二节 微生物学技术与产业	(4)
一、微生物与农业	(5)
二、微生物与食品产业	(7)
三、微生物与资源利用	(10)
四、微生物与环境	(12)
五、微生物与能源	(15)
第三节 微生物和食品加工、食品质量与安全及控制的关系	(19)
一、微生物在传统发酵食品中的应用	(19)
二、微生物技术在食品质量与安全控制中的应用	(21)
第四节 现代食品微生物学研究内容	(22)
一、食品微生物学的研究内容	(22)
二、现代食品微生物学的任务	(23)
第二章 食品微生物学基础原理	(30)
第一节 微生物形态与功能	(30)
一、原核微生物	(30)
二、真核微生物	(37)
第二节 微生物的营养	(42)
一、微生物的营养物质	(42)
二、微生物的营养类型	(45)
三、微生物对营养物质的吸收方式	(46)
第三节 微生物的生长	(46)
一、细菌的生长繁殖	(47)
二、真菌的生长繁殖	(47)
三、微生物的同步培养	(49)
四、微生物的连续培养	(50)

五、环境因素对微生物生长的影响	(51)
第四节 微生物的代谢	(57)
一、微生物的能量代谢	(58)
二、微生物的分解代谢	(65)
三、微生物的合成代谢	(67)
四、微生物代谢的调节	(69)
五、微生物的次级代谢	(71)
第五节 微生物的遗传	(72)
一、遗传的物质基础	(73)
二、基因突变	(78)
三、基因重组和杂交过程	(81)
四、微生物与基因工程	(81)

第二篇 食品微生物菌种选育与发酵技术

第三章 食品微生物菌种资源与微生物筛选技术	(83)
第一节 食品微生物菌种资源及用途	(83)
一、概 述	(83)
二、常规食品微生物菌种特性及用途	(83)
三、食品微生物菌种资源库	(88)
第二节 微生物菌种的分离与筛选技术	(89)
一、概 述	(89)
二、传统菌种分离与筛选技术	(89)
三、食用菌的分离与鉴定方法	(93)
四、微生物分离检测的发展	(93)
五、微生物菌种的保藏	(98)
第三节 微生物菌种分离筛选研究实例	(99)
一、蛋白酶产生菌种的筛选及应用技术	(99)
二、产海洋活性物质的微生物筛选方法	(103)
三、产组胺微生物的分离与筛选	(105)
四、细菌素产生菌的选育与发酵技术	(106)
五、一种乳酸菌的分离与筛选	(111)
第四章 食品微生物菌种改造途径与方法	(116)
第一节 食品微生物菌种改造的必要性	(116)
一、食品发酵对菌种的要求	(116)
二、菌种选育的有益效果	(116)
三、菌种改造的一般流程	(117)

第二节 微生物菌种选育的基本遗传操作·····	(117)
一、自发突变·····	(118)
二、人工诱变·····	(118)
三、杂交育种·····	(122)
四、基因工程育种·····	(125)
第三节 菌种选育的策略·····	(127)
一、随机突变结合定向筛选育种·····	(127)
二、代谢工程育种·····	(127)
三、合成生物学育种·····	(130)
第四节 菌种改造研究实例·····	(135)
一、鸟苷生产菌改造实例·····	(135)
二、青蒿素的生物合成及高产菌种构建·····	(138)
第五章 微生物发酵与过程优化技术·····	(152)
第一节 培养基设计与灭菌技术·····	(152)
一、培养基的种类与配制·····	(152)
二、培养基的灭菌·····	(155)
第二节 微生物发酵的影响因素分析·····	(157)
一、微生物培养基·····	(157)
二、温 度·····	(159)
三、pH·····	(162)
四、供氧对发酵过程的影响·····	(164)
第三节 微生物发酵过程优化技术·····	(166)
一、概 述·····	(166)
二、发酵过程优化的基本特征·····	(166)
三、发酵过程优化的主要内容及步骤·····	(167)

第三篇 食品微生物学研究新技术

第六章 食品微生物代谢组学与蛋白质组学研究·····	(170)
第一节 微生物代谢组学原理方法与应用·····	(170)
一、代谢组学技术概况·····	(170)
二、代谢组学技术原理与方法·····	(171)
三、代谢组学技术在食品中的应用实例·····	(175)
四、代谢组学技术在微生物分类与发酵工艺优化等方面的应用·····	(178)
第二节 蛋白质组学在食品微生物中的应用研究进展·····	(179)
一、蛋白质组学概述·····	(179)
二、蛋白质组学的主要技术·····	(179)

三、蛋白质组学在食品微生物中的应用研究进展	(183)
第七章 分子生物学技术在食品微生物中的应用	(188)
第一节 基因组学与食品微生态的研究	(188)
一、基因组及测序技术介绍	(188)
二、食品加工与营养健康的微生态研究	(194)
第二节 微生物的群体感应	(205)
一、微生物群体感应的概念	(205)
二、细菌群体感应的分子机制	(206)
三、群体感应系统的干扰	(208)
四、细菌群体感应的应用	(209)
五、细菌群体感应亟待解决的问题	(211)
第三节 微生物功能基因的挖掘及其应用	(211)
一、功能基因的概念	(211)
二、微生物功能基因的挖掘	(212)
三、以酶为例探究功能基因的挖掘策略	(212)
四、功能基因的挖掘在食品中的应用	(214)
第四节 分子生物学技术在乳酸菌等微生物检测鉴定中的应用	(214)
一、基于 rDNA 序列的分子标记技术	(215)
二、基于 DNA 指纹图谱技术	(217)
第五节 微生物信息网络化	(218)
一、生物数据库	(218)
二、数字图书馆	(235)
三、电子刊物	(236)

第四篇 食品微生物学分析技术

第八章 食品微生物的检测方法	(242)
第一节 食品微生物的分析	(242)
一、微生物的传统分析技术	(242)
二、微生物的快速检测技术	(244)
第二节 食品微生物代谢产物分析技术	(258)
一、色谱技术	(258)
二、质谱检测技术	(260)
三、电子鼻技术	(261)
四、酶联免疫技术	(262)
五、PCR 技术及应用	(263)
六、磁性纳米材料技术	(265)

第五篇 食品微生物的利用

第九章 益生菌及利用研究	(269)
第一节 益生菌的概念与功能	(269)
一、益生菌的分类	(269)
二、益生菌的功能	(270)
第二节 益生菌的应用开发研究	(271)
一、益生菌在食品中的应用	(271)
二、益生菌在饲料中的应用	(273)
三、益生菌在临床上的应用	(273)
第三节 益生菌菌株及益生菌制品的研究进展	(274)
一、益生菌菌株研究的趋势	(275)
二、益生菌产品的研究趋势	(275)
第十章 蔬菜发酵制品及乳酸菌的利用	(277)
第一节 发酵蔬菜制品分类及原料的选择	(277)
一、泡菜	(277)
二、酸菜	(278)
第二节 蔬菜发酵的微生物及发酵原理	(278)
一、蔬菜腌制过程中的主要微生物及其变化	(279)
二、蔬菜腌制的四个阶段	(282)
第三节 蔬菜发酵的微生物代谢产物及分析	(283)
一、蔬菜腌制过程中糖的变化	(283)
二、蔬菜腌制过程中氨基酸的变化	(286)
第四节 蔬菜发酵工艺	(287)
一、四川泡菜的生产工艺	(288)
二、韩国泡菜(辣白菜)	(289)
三、酸菜的生产工艺	(292)
第五节 蔬菜发酵与质量控制技术进展	(292)
一、接种乳酸菌发酵蔬菜技术	(293)
二、发酵蔬菜生产中的常见质量问题	(296)
三、蔬菜发酵质量控制技术	(297)
第十一章 海洋食品资源与微生物应用技术	(301)
第一节 海洋鱼类发酵——鱼酱油生产技术与质量控制	(301)
一、鱼酱油简介	(301)
二、鱼酱油研究现状	(302)
三、鱼酱油发酵工艺技术与品质的形成及标准	(302)

第二节 海洋微生物利用与生物活性物质的开发	(309)
一、概 述	(309)
二、海洋活性物质与微生物	(310)
第十二章 其他发酵食品中微生物的利用	(336)
第一节 红曲的发酵法生产	(336)
第二节 生物防腐剂的微生物发酵法生产	(337)
一、乳酸链球菌肽	(337)
二、曲 酸	(338)
三、纳他霉素	(338)
第三节 发酵乳制品的生产	(339)
一、发酵乳制品概述	(339)
二、乳酸菌种类	(340)
三、发酵乳制品及高效发酵剂生产一般流程	(341)
第四节 发酵肉制品的生产	(342)
一、发酵肉制品概述	(342)
二、发酵肉制品的种类及主要微生物	(342)
三、发酵肉制品的加工流程及加工技术进展	(344)
第五节 发酵米制品的生产	(346)
一、发酵米制品概述	(346)
二、主要发酵米制品及进展	(346)
第六节 微生态制剂	(347)
一、微生态制剂概述	(347)
二、微生态制剂的主要微生物	(348)
三、微生态制品发展趋势	(349)

第六篇 食品中微生物的控制技术

第十三章 食品中微生物的控制原理	(351)
第一节 食品生产中栅栏因子的运用	(351)
一、栅栏技术简介	(351)
二、栅栏技术在食品保藏中的应用	(353)
三、栅栏技术的展望	(356)
第二节 食品的传统保藏技术	(357)
一、食品传统保藏技术简介	(357)
二、食品传统保藏技术类型	(357)
第三节 食品保藏的生物技术	(364)
一、食品的天然防腐剂	(364)

二、食品微生物的拮抗作用	(366)
第十四章 食品工业消毒杀菌技术	(370)
第一节 食品的热处理技术	(370)
一、影响微生物耐热性的因素	(370)
二、食品热处理的类型	(371)
第二节 食品化学杀菌技术	(375)
一、食品化学杀菌技术原理	(375)
二、化学杀菌剂的类型	(375)
第三节 食品非热物理杀菌技术	(378)
一、食品非热物理杀菌技术简介	(378)
二、食品非热物理杀菌技术分类及进展	(379)
第十五章 食品生产加工中微生物控制的应用	(390)
第一节 生物胺的微生物来源途径及控制	(390)
一、生物胺的来源及种类	(390)
二、食品中组胺的研究进展	(391)
三、生物胺的检测	(394)
四、生物胺的控制	(395)
第二节 水产品贮藏、加工与保鲜中亚硝酸盐的控制	(396)
一、亚硝酸及盐类的来源途径	(396)
二、水产品中亚硝酸盐的控制	(397)
第三节 果蔬采后微生物病害和加工过程危害成分产生途径及控制	(398)
一、果蔬采后的微生物危害性	(398)
二、果蔬采后贮藏保鲜的微生物控制技术	(401)
三、蔬菜发酵中亚硝酸盐的产生途径及控制	(403)
第四节 酒类发酵生产产品质量安全及控制	(407)
一、果酒生产赭曲霉毒素的产生途径及控制	(407)
二、啤酒生产中甲醛的来源途径及控制	(412)
三、黄酒生产中氨基甲酸乙酯的产生途径及控制	(413)
第五节 畜禽产品的加工与保鲜技术的应用	(416)
一、乳品加工中的微生物控制技术	(416)
二、肉品加工中的微生物控制技术	(430)
三、蛋品加工中的微生物控制技术	(437)
附录 微生物菌株名称	(457)

第二章 食品微生物学基础原理

第一节 微生物形态与功能

微生物的个体是肉眼看不见的,除病毒以外,它们都是细胞生物。在有细胞构造的微生物中,按其细胞尤其是细胞核的构造和进化水平上的差异,可将它们分为原核微生物和真核微生物两大类。本章将阐述原核微生物细胞的结构与功能、真核微生物细胞的结构与功能等。

一、原核微生物

原核微生物是指一大类细胞核无核膜包裹,只有核区的裸露 DNA 的原始单细胞生物,包括真细菌和古生菌两大类群。真细菌与古生菌的区别主要体现在分子水平上,而不是在结构上。真细菌的细胞膜含有由酯键连接的脂类,细胞壁含有肽聚糖(无壁的支原体除外)。真细菌包括细菌、放线菌、蓝细菌、支原体、立克次氏体和衣原体等。古生菌细胞膜含由醚键连接的类脂,细胞壁不含有肽聚糖,而是由假肽聚糖或杂多糖、蛋白质、糖蛋白构成。

(一)细菌的细胞形状和大小

常见的细菌基本形态有球状、杆状和螺旋状,分别称为球菌、杆菌和螺旋菌。

球状的细菌称为球菌(coccus,复数 cocci),杆状的细菌称为杆菌(bacillus,复数 bacilli),不同杆菌的形态差别很大。一般同一种杆菌的形态相对稳定。在观察杆菌形状时,要注意菌体的长和宽的比例、形状,菌体两端形状以及排列情况。一些形状介于球状和杆状之间的短杆状中间体称为球杆菌(coccobacilli),如大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*,简称大肠杆菌)。螺旋菌(spirillar bacterium)菌体呈弯曲状或扭转呈螺旋状圆柱形,两端钝圆或细尖,与螺旋体不同,螺旋菌的细胞比较坚韧。螺旋菌可分为两类,逗号状细菌称为弧菌(vibrio),而菌体较长、有两个以上的弯曲、捻转呈螺旋状的称为螺菌(spirillum,复数 spirilla)。

细菌细胞的大小通常以微米(μm)为单位。球菌的个体大小以直径表示,而杆菌、螺旋菌的个体大小则以“宽度 \times 长度”表示;不同种类的细菌大小差异很大,一般球菌的平均直径为 $1\mu\text{m}$ 左右,杆菌长为 $1\sim 5\mu\text{m}$,宽 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$;大部分原核生物的直径在 $0.5\sim 2.0\mu\text{m}$ 之间。

细菌的大小以生长在适宜温度和培养基中的青壮龄培养物为标准。不同种细菌大小不一,同种细菌也因菌龄和环境因素的影响,大小有所差异。但在一定范围内,各种细菌的大小相对稳定而具有特征,可以作为鉴定细菌的依据之一。在实际测量菌体大小时,培养条件、制片时固定的程度、染色方法和显微镜的使用方式等,对测量结果都有一定影响。因此,测量细菌大小时,各种因素和操作都应一致,以减少误差。

(二) 细菌的细胞结构

细菌是单细胞微生物,形体虽小,但其结构较为复杂,细菌的细胞一般包括细胞壁、细胞膜、细胞质(细胞浆)、核质体、核蛋白体(核糖体)和内含物等(图 2-1)。

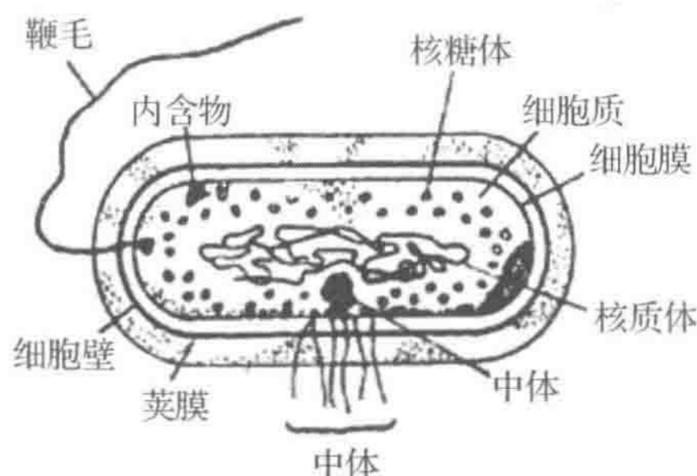


图 2-1 细菌的细胞结构

1. 细胞壁

细胞壁包在细胞膜外表面,是一层无色透明、质地坚韧而富有弹性的构造。它厚度为 $10\sim 80\mu\text{m}$,占细胞干重的 $10\%\sim 25\%$ 。通过特殊染色方法或质壁分离法,可在光学显微镜下看到细胞壁的存在,或用电子显微镜,则清晰可见。

(1) 细胞壁的主要功能

①维持菌体固有形状。各种形态的细菌失去细胞壁后,均变成球形。用溶菌酶除去细菌细胞壁后剩余的部分称为原生质体或原生质球。原生质体的结构与生物活性并不会因失去细胞壁而发生改变,因而细胞壁并不是细菌细胞的必要结构。

②具有足够的强度,具有保护作用,使细胞免受机械性外力或渗透压的破坏。细菌在一定范围的高渗溶液中,原生质收缩,但细胞仍可保持原来形状;在低渗溶液中,细胞膨大,但不致破裂,这些都与细胞壁具有一定坚韧性及弹性有关。

③起渗透屏障作用,与细胞膜共同完成细胞内外物质变换。细胞壁有许多微孔($1\sim 10\text{nm}$),可允许可溶性小分子及一些化学物质通过,但对大分子物质有阻拦作用。

④协助鞭毛的运动。细胞壁是某些细菌鞭毛的伸出支柱点。如果将细胞壁去掉,鞭毛仍存在,但不能运动,可见细胞壁的存在是鞭毛运动的必要条件。

⑤细胞壁的化学组成与细菌的抗原性、致病性,以及对噬菌体的特异敏感性有密切关系。细胞壁是菌体表面抗原的所在地。革兰氏阴性菌的细胞壁上有脂多糖,具有内毒素的作用,与致病性有关。

⑥与横隔壁的形成有关。细胞分裂时,其中央部位的细胞壁不断向内凹陷,形成横隔,即将原细菌细胞分裂为两个子细胞。此外,细胞壁还与革兰氏染色反应密切相关。

(2) 细胞壁的化学组成

细胞壁的化学组成相当复杂。由于细胞壁的化学成分不同,用革兰氏染色法将所有细菌分为革兰氏阳性菌(G^+ 菌)与革兰氏阴性菌(G^- 菌)两大类。两大类细菌细胞壁的化学组成与结构有很大差异(图 2-2)。

① G^+ 细菌细胞壁的化学组成。 G^+ 菌的细胞壁较厚($20\sim 80\text{nm}$),其主要成分是肽聚糖(又称黏肽)和磷壁酸。肽聚糖有 $15\sim 50$ 层,含量很高,一般占细胞壁干重的 $50\%\sim 80\%$;

磷壁酸含量也较高(占10%~50%);一般不含类脂质,仅抗酸性细菌含少量类脂(占1%~4%)。

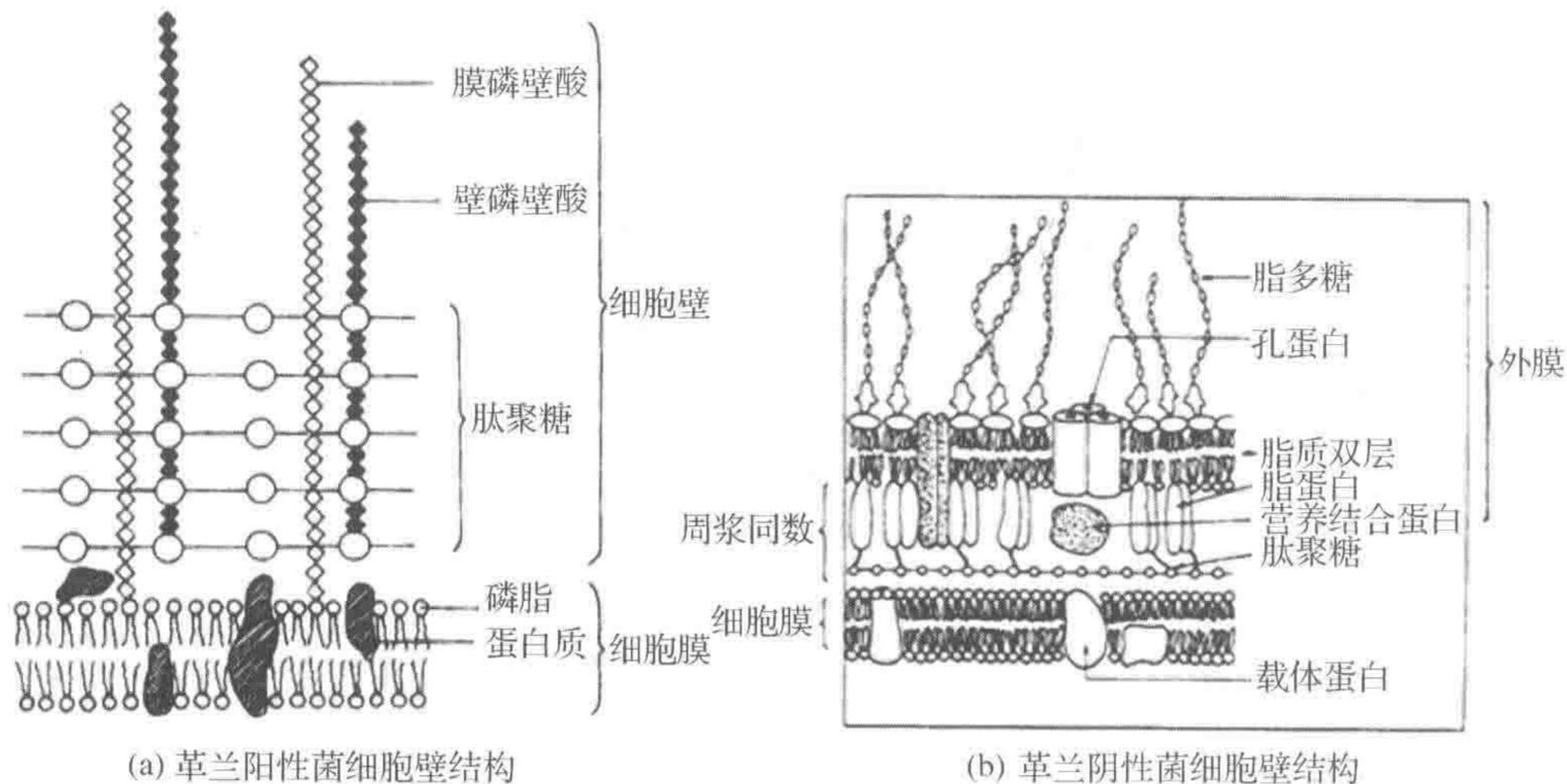


图 2-2 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁构造的差异

② G^- 细菌细胞壁的化学组成。 G^- 细菌的细胞壁较薄(10~15nm),其结构与化学组成比 G^+ 菌复杂。肽聚糖层较薄(仅2~3nm),有1~3层,仅占细胞壁干重的5%~20%;在肽聚糖的外层还有由外膜蛋白(脂蛋白、孔蛋白、非微孔蛋白等)、磷脂(脂质双层)和脂多糖三部分组成的外膜,构成多层结构,占细胞壁干重的80%以上;不含有磷壁酸。

(3) 缺细胞壁细菌

虽然细胞壁是细菌细胞的基本结构,但在自然界长期进化和在实验室菌种的自发突变中都会产生少数缺壁细菌;此外,还可用人工诱导方法通过抑制新生细胞壁的合成或对现有细胞壁进行酶解,而获得人工缺壁细菌。

①L型细菌:是专指那些在实验室或宿主体内通过自发突变而形成的遗传性稳定的细胞壁缺损菌株。

②原生质体:是指在人工条件下用溶菌酶除尽原有细胞壁或用青霉素等抑制新生细胞壁合成后,所留下的仅由细胞膜包裹着的脆弱细胞。通常由 G^+ 细菌形成。原生质体必须生存于高渗环境中,否则会因不耐受菌体内的高渗透压而胀裂死亡。不同菌种或菌株的原生质体间易发生细胞融合,因而可用于基因重组育种。

③原生质球:是指经溶菌酶或青霉素处理后,还残留了部分细胞壁(尤其是 G^- 细菌的外膜层)的原生质体。通常由 G^- 细菌形成。原生质球在低渗环境中仍有抵抗力。

④支原体:是在长期进化过程中形成的、适应自然生活条件的无细胞壁的原核微生物。因其细胞膜中含有一般原核生物所没有的固醇,故即使缺乏细胞壁,其细胞膜仍有较高的机械强度。

2. 细胞膜

细胞膜又称质膜,是一层紧贴于细胞壁内侧,由磷脂和蛋白质组成的柔软而富有弹性的半渗透性膜。

(1) 细胞膜的化学组成

细胞膜主要由磷脂(占 20%~30%)、蛋白质(占 50%~70%)以及少量的糖类(占 1.5%~10%)组成。在电子显微镜下观察时,细胞膜呈两暗层夹一亮层的“三明治”式结构,这是因为细胞膜的基本成分是由两层磷脂分子整齐地排列而成的,其中每一个磷脂分子由一个带正电荷且能溶于水的亲水头(磷酸端)和一个不带电荷、不溶于水的疏水尾(烃端)所构成(图 2-3)。

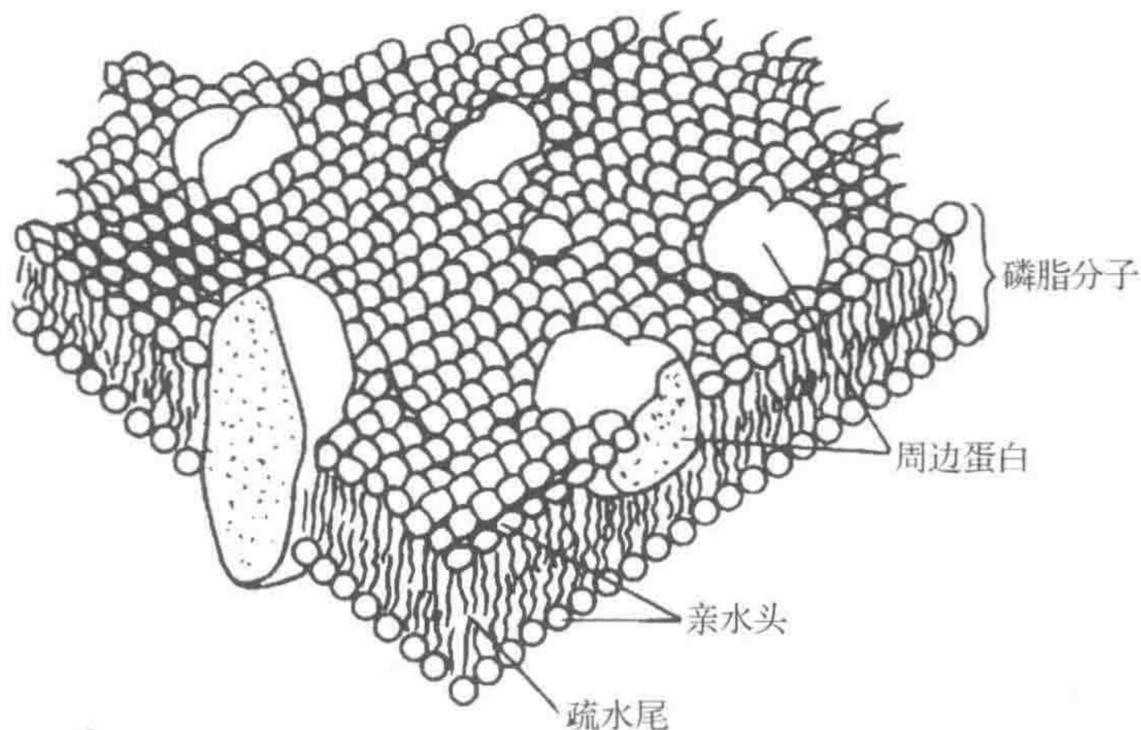


图 2-3 细胞膜结构

(2) 细胞膜的结构

目前学术界普遍认同的细胞膜的结构是在 1972 年由 Singer 和 Nicolson(1972)提出的细胞膜液态镶嵌模型。该模型的中心内容是细胞膜具有流动性和镶嵌性。其要点是:①膜的基本结构是磷脂双分子层,两层磷脂分子的亲水头朝向膜两侧表面,疏水尾相向,在膜的内层,双层的磷脂分子整齐对称排列;②磷脂双分子层通常呈液态,具有流动性,磷脂分子和蛋白质分子在细胞膜中的位置不断发生变化;③蛋白质以不同程度镶嵌在磷脂双分子层中,周边蛋白存在于膜的内侧或外侧表面做横向运动(“漂浮”运动),而整合蛋白存在于膜的内部或由一侧嵌入膜内或穿透全膜作横向移动(犹如沉浸海洋的“冰山”移动);④膜两侧各种蛋白质的性质、结构以及在膜中的位置不同(穿过全膜的、不对称地分布在膜一侧或埋藏在膜内的),因此,具有不对称性。

(3) 细胞膜的功能

①选择性地控制细胞内、外的物质(营养物质和代谢废物)的运送、交换。因为细胞膜上有转运系统(渗透酶等),能选择性地携带各种物质穿过细胞膜。②维持细胞内正常渗透压。③是合成细胞壁和荚膜(肽聚糖、磷壁酸、脂多糖、荚膜多糖等)的基地。因为细胞膜中含有合成细胞壁所需要的脂质载体与有关细胞壁和荚膜的合成酶。④是细菌产生代谢能量的主要场所。由于原核生物的呼吸链与细胞膜结合,则细胞膜上含有呼吸酶系与 ATP 合成酶,如 NADH 脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶等电子传递系统及氧化磷酸化酶系,因此,细菌的细胞膜相当于真核细胞的线粒体内膜。⑤与鞭毛的运动有关,因为鞭毛基体着生于细胞膜上,并提供其运动的能量。

3. 细胞质和内含物

细胞质是细胞膜包围的除核之外的一切无色、透明、黏稠的胶状物质和一些颗粒状物质的总称。原核生物的细胞质不流动,这是它与真核细胞的明显区别。

(1)细胞质的化学成分:化学成分随菌种、菌龄、培养基的成分不同而异。基本成分是水(约占80%)、蛋白质、核酸、脂类和少量的糖类、无机盐等,这些成分或以可溶性状态存在,或以某种方式结合成一些种类不同、大小不一的颗粒状结构。此外,细胞质中有许多细胞内含物和多种酶类及中间代谢产物。

(2)细胞质的内含物:细胞质中大小较大的颗粒状结构被称为内含物,主要包括核糖体、各种贮藏物、质粒等。不同种类细菌的内含物有较大差别。其化学组成及功能详见基础微生物学教程。

(3)细胞质的功能:细胞质构成细菌的内部环境,含有丰富的可溶性物质和各种内含物,在细菌的物质代谢及生命活动中起十分重要的作用。细胞质中还含有多种酶系统,是细菌合成蛋白质、脂肪酸、核糖核酸的场所,同时也是营养物质进行同化和异化代谢的场所,以维持细菌生长所需要的环境。

4. 核质体

核质体又称核质、核区、原核、拟核或核基因组,是指原核生物所特有的无核膜结构、无固定形态的原始细胞核。因细菌属于原核生物,无核膜包裹,不具典型的核,因此是结构不完全的拟核。在高分辨率电镜下可见核质体为一巨大紧密缠绕的环状双链DNA丝状结构,无核膜,分布在细胞质的一定区域内,所以称其为核区。在正常情况下,一个细胞内只含有一个核质体。快速生长的细菌细胞中,由于DNA的复制先于细胞分裂,因此一般有2~4个核。细菌除在DNA复制的短时间内呈双倍体外,一般均为单倍体。

(1)核质体的化学成分:其化学成分是一个大型的环状双链DNA分子,一般不含组蛋白或只有少量组蛋白与之结合。DNA由四种碱基、核糖、磷酸组成,长度为0.25~3.00mm。例如,大肠杆菌细胞长度约 $2\mu\text{m}$,其DNA丝的长度却是1.1~1.4mm,分子量为 $3\times 10^9\text{u}$,含有 $4.7\times 10^6\text{bp}$ 个碱基对,足可携带4288个基因,以满足细菌生命活动的全部需要。

(2)核质体的生理功能:①核质体是蕴藏(负载)遗传信息的主要物质基础。②通过复制将遗传信息传递给子代。在细胞分裂时,核质体直接分裂成两个而分别进入两个子细胞中。③通过转录和翻译调控细胞新陈代谢、生长繁殖、遗传变异等全部生命活动。

(3)质粒:在许多细菌细胞中还存在核质体DNA以外的共价闭合环状(简称CCC)的超螺旋双链DNA分子,称为质粒。质粒分布于细胞质中或附着在核染色体上,从细胞中分离的质粒大多有三种构型,即CCC型、开环型(简称OC)和线型(简称L),其大小范围一般为1~1000kb。每个细菌体内中可含1~2个或多个质粒。

(三)细菌的特殊结构

不是所有细菌都具有的细胞构造称为特殊构造,包括糖被、鞭毛、菌毛和芽孢等。

1. 糖被

包被于某些细菌细胞壁外的一层厚度不定的透明黏液性胶状物质称为糖被。糖被按其有无固定层次、层次厚薄又可细分为4种类型:微荚膜、荚膜、黏液层和菌胶团。

(1)荚膜的化学组成:荚膜的化学组成因菌种而异,多数为多糖,少数为多肽或蛋白质,也有多糖与多肽复合型的。此外,荚膜含有大量水分(约占90%)。多糖按组分不同可分为

同质多糖和异质多糖,前者由一种单糖组成,如 α -D-葡聚糖、 β -D-葡聚糖、果聚糖、聚半乳糖,后者由两种或两种以上的单糖组成。

(2)荚膜的功能:①保护菌体免受干燥的损害;保护致病菌免受宿主白细胞的吞噬;防止细胞受化学药物(如抗生素等)和重金属离子的毒害,以及噬菌体的侵袭。②贮藏养料。当营养缺乏时,作为碳源和能源被细菌利用。③表面附着作用。例如唾液链球菌(*S. salivarius*)和变异链球菌分泌己糖基转移酶,使蔗糖转变成果聚糖(荚膜),它可使细菌黏附于牙齿表面,细菌发酵糖类产生乳酸,引起龋齿。④堆积某些代谢废物。⑤荚膜是某些致病菌的毒力因子,与致病力有关。如有荚膜的S-型肺炎链球菌毒力强,失去荚膜后致病力降低。⑥荚膜为主要表面抗原,具有特异的抗原性,同种细菌的荚膜因其组分不同而得以分型,用于菌种的鉴定、分型和分类。例如肺炎链球菌可根据多糖成分的不同分为70多个血清型。方法是以细菌与各型诊断血清混合,若型别相同,即可见荚膜膨大,称为荚膜膨胀试验。

(3)荚膜的应用与危害:在食品工业中,可利用野油菜黄单胞菌的黏液层提取胞外杂多糖—黄原胶,作为食品较理想的增稠剂等;一些益生乳酸菌,如干酪乳杆菌(*L. casei*)、长双歧杆菌(*B. longum*)、嗜热链球菌(*S. thermophilus*)等在生长代谢过程中能分泌一种荚膜多糖或黏液多糖,统称为胞外多糖(Exoysaccharides, EPS),近年来研究发现EPS具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节及降血压等主要生理功能。此外,EPS还具有改善发酵乳流变学特性、黏度和质地,防止乳清析出的作用,故利用高产EPS的益生乳酸菌替代添加的稳定剂或增稠剂,既可以提高产品稳定性,又可以生产功能性发酵乳制品。在制药工业中,利用肠膜明串珠菌可将蔗糖合成为大量荚膜物质葡聚糖的特性,提取葡聚糖用于大量生产右旋糖酐,作为代血浆的主要成分,亦可用于生产葡聚糖生化试剂。但是,肠膜明串珠菌是制糖工业的有害菌,常在糖液中繁殖,使糖液变得黏稠而难以过滤,因而降低了糖的产量。产荚膜细菌的污染还可造成面包、牛奶和酒类及饮料等食品的黏性变质。

2. 鞭毛

某些细菌在细胞表面着生有一根或数十根细长、波浪状弯曲的丝状物,称为鞭毛。鞭毛长度可超过菌体若干倍,一般为 $10\sim 20\mu\text{m}$,甚至可达 $70\mu\text{m}$,直径为 $0.01\sim 0.02\mu\text{m}$,因此必须依赖电子显微镜才能观察到。在光学显微镜下需采用特殊鞭毛染色法,利用染料对鞭毛成分的特殊亲和力,使鞭毛加粗后才能观察到。

(1)鞭毛的化学组成:细菌鞭毛主要由分子量为 $(1.5\sim 4.0)\times 10^4\text{u}$ 的鞭毛蛋白组成,这种鞭毛蛋白是一种良好的抗原物质(H抗原)。此外,也含有少量的糖类和脂类。经研究证明,鞭毛蛋白的氨基酸组成与动物横纹肌中的肌动蛋白相似,这可能与鞭毛的运动性有关。

(2)鞭毛的结构:细菌的鞭毛结构由基体、鞭毛钩、鞭毛丝三部分组成(图2-4)。具体构造参见基础微生物学教程。

(3)鞭毛的类型:细菌鞭毛的有无、数量及着生方式由细菌的遗传特性决定,这些特性也是细菌分类、鉴定的重要依据。根据鞭毛在菌体表面的着生位置和数目,可将其着生方式分为三个主要类型:分别为单生鞭毛[如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)等]、丛生鞭毛(如荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌等)和周生鞭毛(如普通变形杆菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等)。

(4)鞭毛的功能:鞭毛的生理功能是运动,这是原核生物实现趋性的最有效方式。根据引起趋性环境因子的种类,分为趋向性、趋避性、趋化性、趋光性、趋磁性和趋氧性。

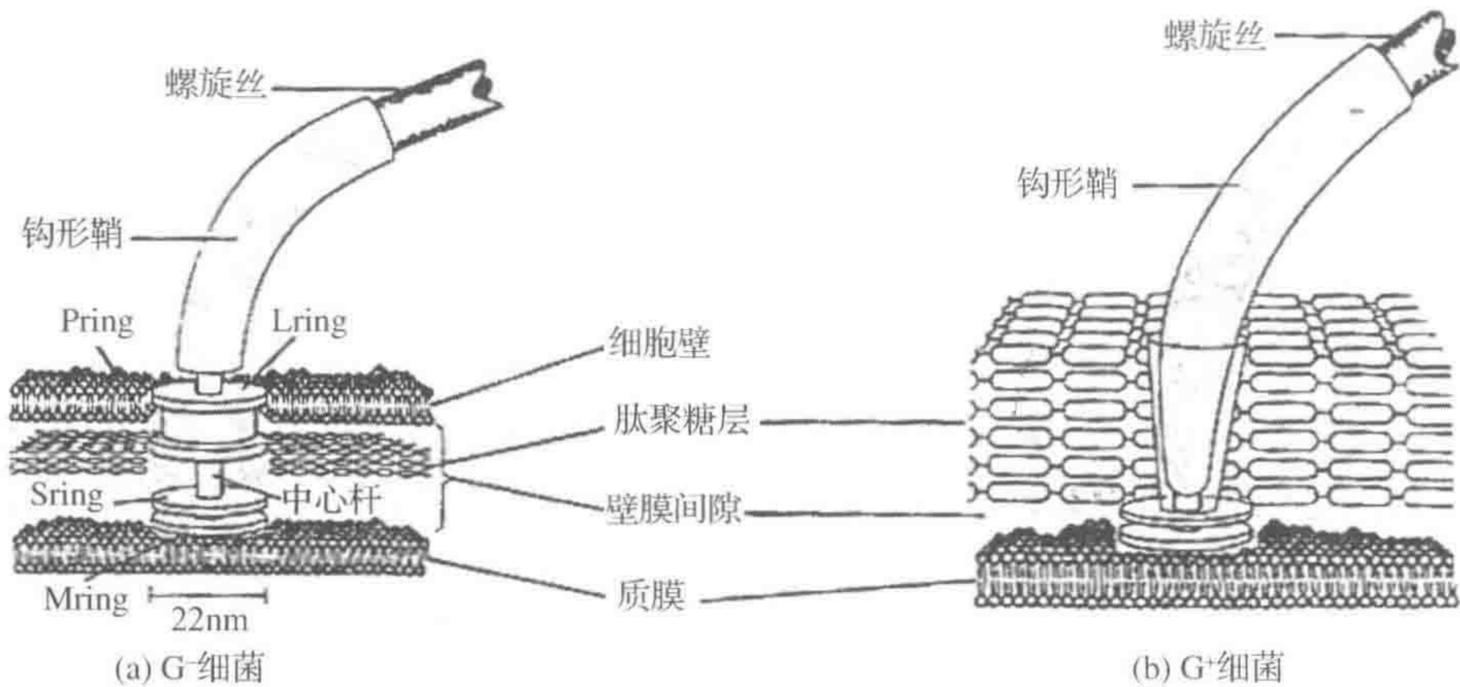


图 2-4 细菌的鞭毛结构

3. 菌毛

菌毛又称纤毛。它是长在菌体表面的一种比鞭毛更细、短直、中空、数量较多的蛋白质丝状物。菌毛的结构较鞭毛简单,无基体等复杂构造,着生于细胞膜上,穿过细胞壁后伸展于体表,直径一般为 $3\sim 10\text{nm}$,由许多菌毛蛋白亚基围绕中心作螺旋状排列,呈中空管状。许多 G^- 细菌、少数 G^+ 细菌和部分球菌的菌体上着生菌毛。每个菌体一般有 $250\sim 300$ 根菌毛,其数目、长短与粗细因菌种而异。如大肠杆菌每菌有 $100\sim 200$ 根菌毛。

菌毛的功能是使菌体附着于物体表面。有菌毛者尤以 G^- 致病菌居多,它们借助菌毛黏附于宿主呼吸道、消化道或泌尿道等的上皮细胞上,进一步定殖和致病。例如淋病奈氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)能黏附于人体泌尿生殖道的上皮细胞上,引起性疾病。大量实验证实菌毛的黏附作用与致病力有关,若此类菌失去菌毛,同时也失去致病力。

4. 性毛

性毛又称性菌毛,其构造和成分与菌毛相同,但比菌毛粗而长,略弯曲,中空呈管状。性菌毛一般多见于 G^- 细菌的雄性菌株中,每菌仅有少数几根。性菌毛是由质粒携带的一种致育因子的基因编码,故性菌毛又称F菌毛,带有性菌毛的细菌称为 F^+ 菌或雄性菌。性菌毛能在雌雄两株菌接合交配时,向雌性菌株传递DNA片段。即雄性菌通过性菌毛与雌性菌接合,将雄性菌中质粒的DNA输入雌性菌中,使雌性菌获得某些遗传性状。

5. 芽孢

某些细菌在其生长发育后期,细胞质脱水浓缩,在细胞内形成一个圆形或椭圆形,对不良环境条件具有较强抗性的休眠体,称为芽孢。由于细菌芽孢的形成都在胞内,故又称为内生孢子,以区别于放线菌、霉菌等形成的外生孢子。带有芽孢的菌体称孢子囊,未形成芽孢的菌体称为营养体或繁殖体。由于一个营养细胞仅能形成一个芽孢,而一个芽孢萌发后仅能生成一个新营养细胞,故芽孢不具有繁殖功能。芽孢的类型、化学组成及结构特点等详见基础微生物学教程。

6. 伴孢晶体

少数芽孢杆菌如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)在形成芽孢的同时,会在芽孢旁形成一颗菱形或斜方形的碱溶性蛋白晶体,称为伴孢晶体(δ 内毒素)。由于伴孢晶体对鳞翅目、双翅目和鞘翅目等200多种昆虫的幼虫有强烈毒杀作用,故国内外大量生产苏云金

杆菌制成的生物农药——细菌杀虫剂。有的苏云金杆菌还产生 3 种水溶性的苏云金素(α 、 β 、 γ 外毒素)和其他杀虫毒素。近年来,国内外正在研究将苏云金杆菌的毒素蛋白基因转入农作物细胞内,此种转基因农作物能不断释放毒素,抵御害虫侵袭,而且对人畜无害,亦不会污染环境。

(四)细菌的繁殖方式

细菌一般进行无性繁殖,多数细菌以二等分裂方式繁殖,这称为裂殖。如果裂殖形成的两个子细胞大小相同则称为同形裂殖。有少数细菌在陈旧培养基中生长,偶尔产生两个大小不等的子细胞,则称为异形裂殖。多数细菌繁殖属同形裂殖,即为对称的二等分裂方式繁殖。

二、真核微生物

凡是细胞核具有核膜、核仁,能进行有丝分裂,细胞质中存在线粒体或同时存在叶绿体等细胞器的微小生物,称为真核微生物。真菌主要包括单细胞真菌(酵母)、丝状真菌(霉菌)和大型子实体真菌(蕈菌)。其中酵母菌和霉菌占有很大比例。真核细胞比原核细胞更大、更复杂,而真核微生物已发展出许多由膜包裹的细胞器,如内质网、高尔基体、溶酶体、微体、线粒体和叶绿体等,尤其是已进化出有核膜包裹着的完整的细胞核,其中存在的染色体由双链 DNA 长链与组蛋白和其他蛋白密切结合,以更完善地执行生物的遗传功能。

(一)酵母菌

酵母菌(Yeast)不是分类学上的名称,而是一类以出芽繁殖为主要特征的单细胞真菌的统称。酵母菌与人类的关系极其密切。酵母菌及其发酵产品极大改善和丰富了人类生活。例如乙醇和酒精饮料的生产,馒头和面包的制造,甘露醇和甘油的发酵,维生素和有机酸的生产,石油和油品的脱蜡,均离不开酵母菌;从酵母菌体中可提取核酸、麦角甾醇、辅酶 A、细胞色素 C、凝血质和维生素 B₂ 等生化药物;酵母菌以通气方式培养可生产大量菌体,其蛋白质含量可达干酵母的 50%,且蛋白中含有丰富的必需氨基酸,常用于生产饲用、药用或食用单细胞蛋白(single cell protein, SCP)。由于酵母菌的细胞结构与高等生物单个细胞的结构基本相同,并且具有世代时间短、容易培养、单个细胞能完成全部生命活动等特性,因此,近年来酵母菌已成为分子生物学、分子遗传学等重要理论研究的良好材料。例如,啤酒酵母中的质粒可作为外源 DNA 片段的载体,并通过转化而完成组建“工程菌”,从而在基因工程方面发挥重要作用。

酵母菌也给人类带来危害。腐生型酵母菌能使食品、纺织品及其他原料腐败变质;少数嗜高渗酵母,如鲁氏酵母(*Saccharomyces rouxii*)、蜂蜜酵母(*S. mellis*)可使蜂蜜、果酱腐败;有的酵母菌是发酵工业的污染菌,影响发酵产品的产量和质量。有的酵母菌与昆虫共生,如球拟酵母属(*Torulopsis*)存在于昆虫肠道、脂肪体及其他内脏中。也有少数种(约 25 种)寄生,引起人或其他动物的疾病。其中最常见的是白假丝酵母(*Candida albicans*, 旧称白色念珠菌),可引起人的皮肤、黏膜、呼吸道、消化道以及泌尿系统等多种疾病,如鹅口疮、阴道炎等;新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)可引起慢性脑膜炎和轻度肺炎等。

酵母菌通常分布于含糖量较高和偏酸性环境中,如水果、蔬菜、花蜜以及植物叶子上,尤其是葡萄园和果园的上层土壤中较多,而油田和炼油厂附近土层中可分离到能利用烃类的酵母菌。

1. 酵母菌的细胞形态与大小

酵母菌为单细胞结构生物,其细胞直径一般比细菌粗 10 倍,为 $(2\sim 5)\mu\text{m}\times(5\sim 30)\mu\text{m}$,有些种长度达 $20\sim 50\mu\text{m}$,最长者达 $100\mu\text{m}$ 。例如,典型的啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, 又称酿酒酵母)的细胞大小为 $(2.5\sim 10.0)\mu\text{m}\times(4.5\sim 21)\mu\text{m}$,长者可达 $30\mu\text{m}$ 。故用 400 倍的光学显微镜就能清晰看见酵母菌的形态。各种酵母菌有其一定的形态和大小,但也随菌龄、环境条件(如培养基成分)的变化而有差异。一般成熟的细胞大于幼龄细胞,液体培养的细胞大于固体培养的细胞。有些种的细胞大小、形态极不均匀,而有的种则较均匀。

酵母菌细胞的形态通常呈球形、卵圆形或椭圆形,少数呈圆柱形或香肠形、柠檬形、尖顶形、三角形、长颈瓶形等。

2. 酵母菌细胞结构

酵母菌具有典型的细胞结构(图 2-5),有细胞壁、细胞膜、细胞核、细胞质及其内含物。细胞质内含有线粒体、核糖体、内质网、微体、中心体、高尔基体、纺锤体、液泡及贮藏物质等,此外,有些种还有出芽痕(诞生痕),有些种还具有荚膜、菌毛等特殊结构。酵母菌的细胞结构组成部分介绍详见基础微生物学教程。

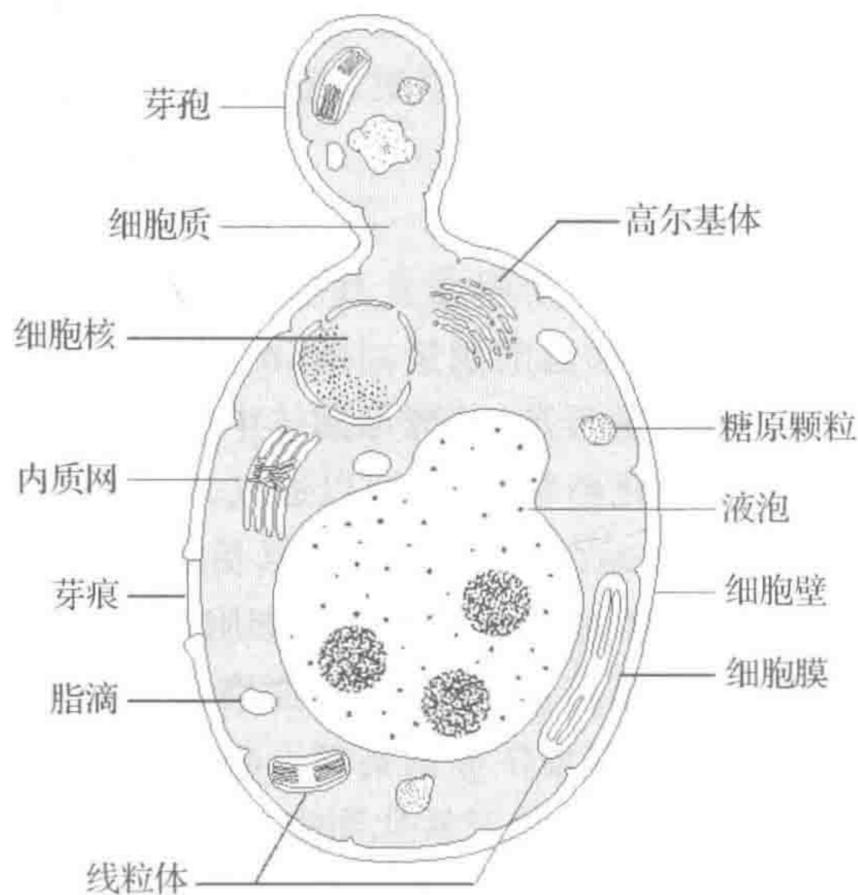


图 2-5 酵母菌的细胞结构

3. 酵母菌的繁殖方式和生活史

酵母菌有无性和有性两种繁殖方式,其中以无性繁殖为主,无性繁殖中又以芽殖多见,少数为裂殖和产生无性孢子。酵母菌有性繁殖主要是产生子囊孢子,凡能进行有性繁殖的酵母菌称为真酵母,只能进行无性繁殖的酵母菌称为假酵母。

个体经一系列生长、发育阶段后而产生下一代个体的全部过程就称为该生物的生活史或生命周期。各种酵母菌的生活史可分为以下三个类型(图 2-6):①营养体既可以单倍体(n)也可以二倍体($2n$)形式存在,酿酒酵母为此种类型的典型代表;②营养体只能以单倍体的形式存在,八孢裂殖酵母为此种类型的典型代表;③营养体只能以二倍体形式存在,路氏酵母(*Saccharomyces ludwigii*)为此种类型的典型代表。

4. 酵母菌的培养特征

(1) 酵母菌的菌落特征

多数酵母菌为单细胞的真菌,其细胞均呈粗短形状,在细胞间充满着毛细管水,故在麦芽汁琼脂培养基上形成的菌落与细菌相似。酵母菌的菌落表面光滑、湿润、黏稠,质地柔软,容易用接种针挑起,多数呈乳白色或奶油色,少数为红色(如黏红酵母和玫瑰色掷孢酵母等),多数不透明,一般有酒香味。酵母菌的菌落比细菌显得较大而厚(凸起),这是由于酵母菌个体细胞比细菌大,细胞内颗粒较明显,细胞间隙含水量相对较少,以及酵母菌不能运动等特点所致。有的酵母菌的菌落因培养时间较长,会因干燥而皱缩。此外,凡不产生假菌丝的酵母菌,其菌落更为隆起,边缘十分圆整;而能产大量假菌丝的酵母,则菌落较平坦,表面和边缘较粗糙。菌落的颜色、光泽、质地、表面和边缘形状等特征都是酵母菌菌种鉴定的依据。

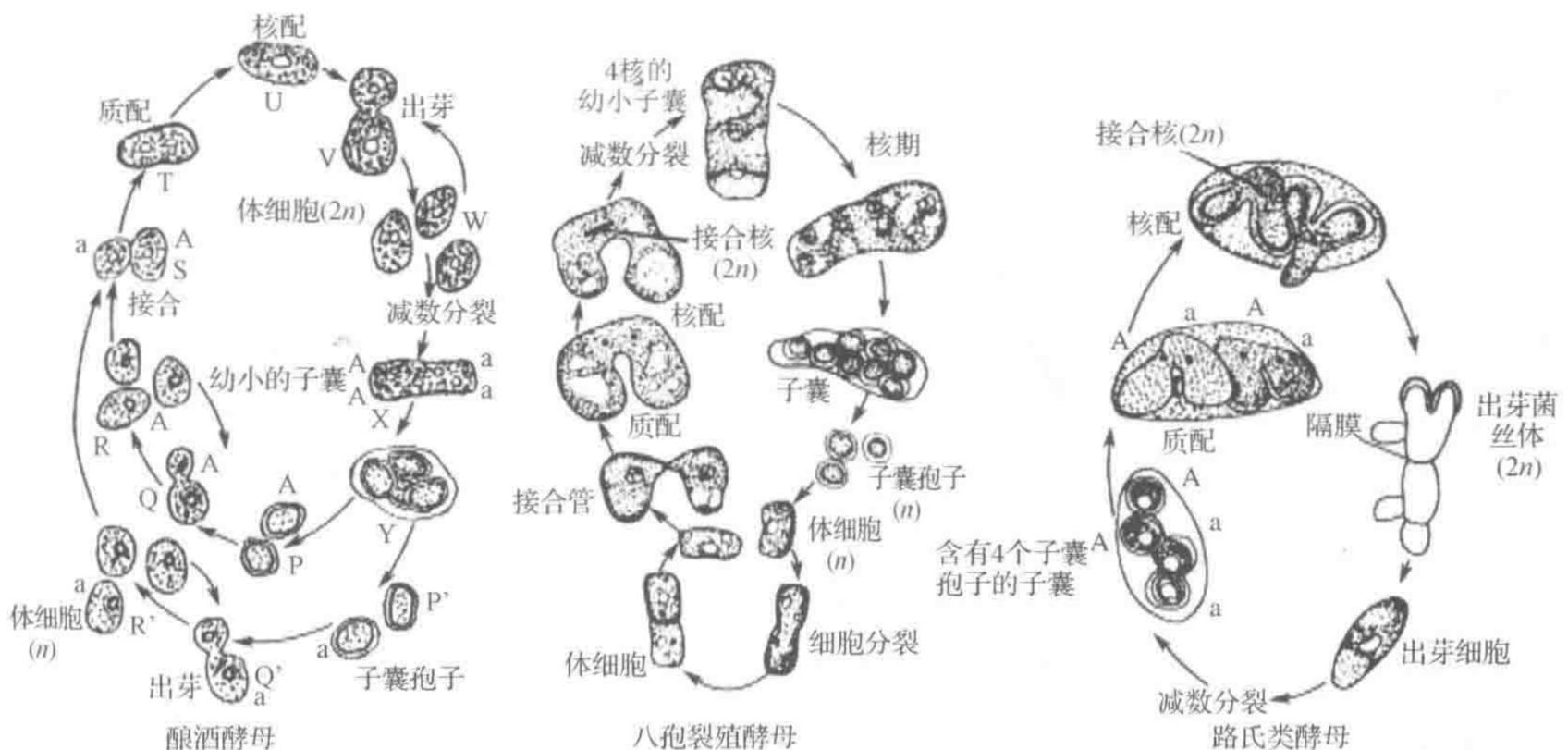


图 2-6 酵母菌的生活史

(2) 酵母菌的液体培养特征

在液体培养基中,不同酵母菌的生长情况不同。有的生长于培养基的底部并产生沉淀;有的在培养基中均匀悬浮生长;有的则在培养基表面生长并形成菌膜、菌醭或壁环,其厚度因种而异。有假菌丝的酵母菌所形成的菌醭较厚,有些酵母菌形成的菌醭很薄,干而变皱。菌醭的形成与特征具有分类、鉴定意义。上述生长情况反映了酵母菌对氧气需求的差异。

(二) 霉菌

霉菌是丝状真菌的统称。凡是生长在固体营养基质上,形成绒毛状、蜘蛛网状、棉絮状或地毯状菌丝体的真菌,统称为霉菌。霉菌意即“发霉的真菌”,通常指那些菌丝体比较发达而又不产生大型子实体的真菌。在地球上,几乎到处都有霉菌的踪迹。

霉菌与工农业生产、医疗实践、环境保护和生物学基本理论研究等方面都有密切关系,是人类认识和利用最早的一类微生物。可以用来生产各种传统食品。如酿造酱油和食醋,制酱、腐乳、干酪等。在农业中可用于发酵饲料、植物生长刺激素(赤霉素)、杀虫农药(白僵菌剂)等的生产,在发酵工业中可用于酒精、有机酸(柠檬酸、葡萄糖酸、延胡索酸等)、抗生素

(青霉素、头孢霉素、灰黄霉素等)、酶制剂(糖化酶、蛋白酶、纤维素酶等)、维生素(硫胺素、核黄素等)、生物碱(麦角碱、胆碱等)、真菌多糖等的生产。此外,霉菌作为基因工程的受体菌,在理论研究中具有重要价值。如粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)被作为研究遗传学的理想材料而应用于生化遗传学的研究。一些能分解各种复杂有机物(尤其是纤维素、半纤维素和木素)的霉菌,在自然界物质转化中具有重要作用,被人类用于生物质能源的研究。

但同时霉菌也给人类的生产和生活带来危害。首先霉菌可以引起工农业产品的霉变,造成谷物、果蔬、纺织品、皮革、木器、纸张、光学仪器、电工器材和照相胶片等发霉变质。霉菌还可引起植物病害,引发人和动物疾病,不少致病真菌可引起人和动物的浅部病变(如皮肤癣菌引起的各种癣症)和深部病变(如既可侵害皮肤、黏膜,又可侵犯肌肉、骨骼和内脏的各种致病真菌)。霉菌还能产生多达 100 多种的真菌毒素,多种真菌毒素可致癌,严重威胁人和动物的健康。

1. 霉菌的细胞形态

(1) 菌丝

菌丝是真菌营养体的基本单位,它由硬壁包围的管状结构组成,内含可流动的原生质。菌丝的宽度一般为 $3\sim 10\mu\text{m}$,由细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核、细胞器和内含物所组成。菌丝是由霉菌的孢子萌发而形成。根据菌丝中是否具有隔膜可将霉菌的菌丝分为无隔膜菌丝和有隔膜菌丝两种。

①无隔膜菌丝:菌丝内无隔膜,整个菌丝就是一个长管状的单细胞,细胞质内含有多个细胞核,常被称为多核单细胞。在菌丝生长过程中只有细胞核的分裂和原生质量的增加,而无细胞数目的增多。接合菌亚门和鞭毛菌亚门的霉菌菌丝属于此种类型,如接合菌亚门、接合菌纲、毛霉目中的根霉属(*Rhizopus*)、毛霉属(*Mucor*)、梨头霉属(*Absidia*)等。

②有隔膜菌丝:菌丝内有隔膜,其将菌丝分隔成多个细胞,整个菌丝由多个细胞组成,每两节中间的一段菌丝称菌丝细胞,每个细胞内含有一个或多个细胞核。隔膜上有一个或多个小孔相通,使细胞之间的细胞质相互流通,进行物质交换。在菌丝生长过程中,细胞核的分裂伴随着细胞数目的增多。子囊菌亚门(除酵母外)、担子菌亚门和多数半知菌亚门的霉菌菌丝属于此种类型,如分属于半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目中的青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和木霉属(*Trichoderma*)等。

(2) 菌丝体的分化形式

当霉菌孢子落在适宜的固体营养基质上后,就发芽产生菌丝,菌丝继续生长并向两侧分枝。由许多分枝菌丝相互交织而成的群体称为菌丝体。霉菌菌丝体在功能上有一定的分化,密布于营养基质内部主要执行吸收营养物功能的菌丝体称为营养菌丝体;伸出培养基长在空气中的菌丝体则称为气生菌丝体;部分气生菌丝体生长到一定阶段,可以分化成为具有繁殖功能、产生生殖器官和生殖细胞的菌丝体,称为繁殖菌丝体。在长期进化过程中,为了适应环境和自身生理功能的需要,霉菌菌丝体可分化出许多功能不同的特化形态,如营养菌丝体可形成假根、匍匐菌丝、吸器、附着胞、附着枝、菌核、菌索、菌环、菌网等;气生菌丝体可形成各种形态的子实体。

①匍匐菌丝:又称匍匐枝,是指根霉属的霉菌营养菌丝分化形成的具有延伸功能的匍匐状菌丝。每隔一段距离在其上长出伸入基质的假根和伸向空间生长的孢子囊梗,新的匍匐菌丝再不断向前延伸,以形成蔓延生长的菌苔。

②假根:假根是指根霉属真菌延伸的菌丝,在蔓延到一定距离后,即在基物上生成的根状菌丝,其功能是固着和吸收营养物质。

③吸器:由一些植物寄生真菌,如锈菌、霜霉菌和白粉菌等从营养菌丝上产生出来的旁枝,侵入植物细胞内后分化成的指状、球状、丝状或丛枝状结构,用以吸收寄主细胞的养料。

④菌核:是由霉菌的菌丝团组成的一种外层色深、坚硬的休眠体,同时它又是糖类和脂类等营养物质的储藏体。其内层疏松,大多呈白色。它对外界不良环境具有较强的抵抗力,在适宜条件下可萌发出菌丝,生出分生孢子梗、菌丝子实体等。

⑤子实体:子实体是指在其内部或表面产生无性或有性孢子,具有一定形状和构造的菌丝体组织。它是由真菌的气生菌丝和繁殖菌丝缠结而成的产生孢子的结构,其形态因种而异。结构简单的子实体有:曲霉属和青霉属等产生无性分生孢子的分生孢子头(或分生孢子穗);根霉属和毛霉属等产生无性孢囊孢子的孢子囊;担子菌产生有性担孢子的担子。结构复杂的子实体有:产生无性孢子的分生孢子器、分生孢子座和分生孢子盘等结构,能产生有性孢子的子囊果。

2. 霉菌的繁殖方式和生活史

在自然界中,霉菌以产生各种无性或有性孢子来繁殖,一般以无性繁殖产生无性孢子为主要繁殖方式。根据孢子的形成方式、孢子的作用及自身特点,可将霉菌的繁殖方式分为多种类型。由于不同种属的霉菌产生孢子的方式、孢子的形态或产生孢子的器官不同,所以霉菌孢子的形态特征和产孢子器官的特征是霉菌分类、鉴定的主要依据。

(1) 无性繁殖

霉菌的无性繁殖是指不经过两个性细胞结合,而直接由菌丝分化产生子代新个体的过程。无性繁殖所产生的孢子称为无性孢子。霉菌常见的无性孢子有孢囊孢子、分生孢子、节孢子和厚垣孢子等(图 2-7)。菌丝不具隔膜的霉菌一般形成孢囊孢子和厚垣孢子;菌丝具隔膜的霉菌多数产生分生孢子和节孢子,少数能产生厚垣孢子。

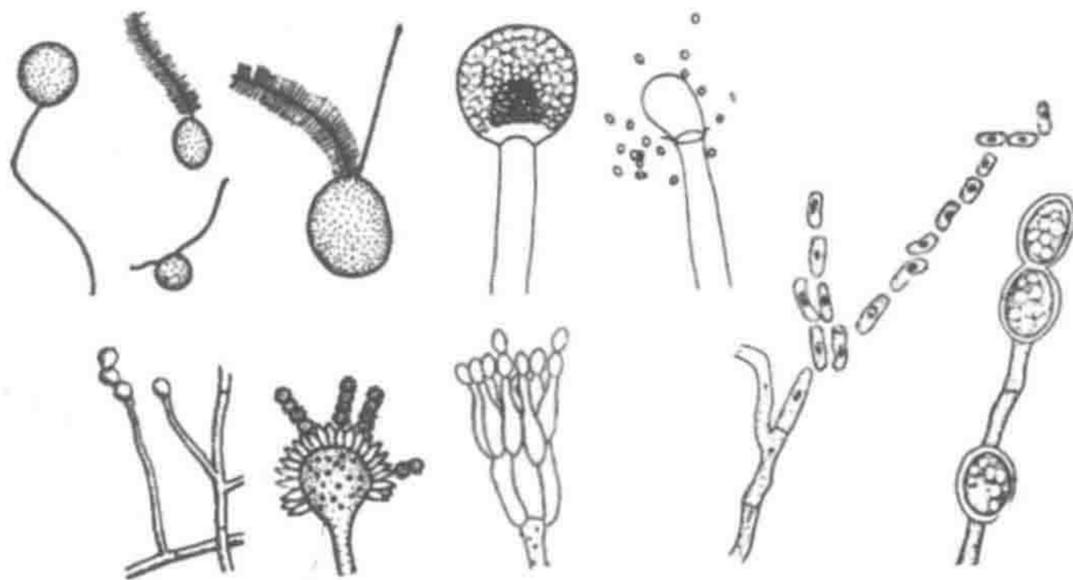


图 2-7 霉菌的无性繁殖方式

(2) 有性繁殖

霉菌的有性繁殖是指经过两个性细胞结合,一般经质配、核配和减数分裂而产生子代新个体的过程。有性繁殖所产生的孢子称为有性孢子。霉菌常见的有性孢子有卵孢子、接合孢子和子囊孢子。一般无隔膜菌丝的霉菌产生接合孢子,有隔膜菌丝的霉菌产生子囊孢子。

担孢子是大型子实体真菌——担子菌(蘑菇、木耳等)产生的有性孢子。它是一种外生

孢子,经过两性细胞质配、核配后产生。因为它着生于担子上,故称担孢子。担子菌的特化菌丝形成各种子实体,如蘑菇、香菇等子实体呈伞状,由菌盖、菌柄和菌褶等组成,菌褶处着生担子和担孢子。

(3) 霉菌的生活史

霉菌的生活史是指霉菌从一种孢子萌发开始,经过一定的生长发育阶段,最后又产生同一种孢子为止所经历的过程,它包括有性繁殖和无性繁殖两个阶段。在霉菌的生活史中,许多真菌以无性繁殖方式为主,即在适宜条件下,孢子萌发后形成菌丝体,并产生大量的无性孢子,进行传播和繁殖。当菌体衰老,或营养物质大量消耗,或代谢产物积累时,才进行有性繁殖,产生有性孢子,渡过不良环境后,再萌发产生新个体。有的霉菌在生活史中只产生无性孢子,例如,半知菌亚门中的某些青霉、交链孢霉等。

霉菌典型的生活史如下:菌丝体(营养体)在适宜条件下产生无性孢子,无性孢子萌发形成新的菌丝体,如此重复多次,这是霉菌生活史中的无性阶段;霉菌生长发育的后期,在一定的条件下开始有性繁殖阶段,即在菌丝体上形成配子囊,经过质配、核配形成双倍体的细胞核后,经过减数分裂产生单倍体孢子,孢子萌发成新的菌丝体。

3. 霉菌的培养特征

霉菌的细胞呈丝状,在固体培养基上有营养菌丝和气生菌丝的分化,气生菌丝间没有毛细管水,故它们的菌落与细菌和酵母菌的不同,而与放线菌的接近。霉菌的菌落较大,一般比细菌的菌落大几倍到几十倍。有少数霉菌,如根霉、毛霉、脉孢菌在固体培养基上呈扩散性生长至整个培养皿基质,看不到单独菌落。多数霉菌的生长有一定局限性,菌落直径为1~2cm,质地一般比放线菌疏松,呈现或紧或松的蜘蛛网状、绒毛状、棉絮状或地毯状;菌落外观干燥,不透明,与培养基的连接紧密,不易用针挑取。菌落最初常呈浅色或白色,当长出各种颜色的孢子后,相应呈现黄、绿、青、棕、橙、黑等各色,这是由于孢子有不同形状、构造与色素所致。有些霉菌的营养菌丝分泌水溶性色素,使培养基也带有不同的颜色。菌落正反面的颜色、边缘与中心的颜色常不一致。各种霉菌在一定培养基上和一定条件下形成的菌落大小、形状、颜色等相对稳定,故菌落特征是鉴定霉菌的重要依据之一。

第二节 微生物的营养

微生物在生命活动中,需要不断从外部环境中吸收所需要的各种物质,通过新陈代谢获得能量,合成细胞物质,同时排出代谢产物,使机体正常生长繁殖。凡能满足微生物机体生长繁殖和完成各种生理活动所需要的物质称为营养物质。营养物质是微生物生命活动的物质基础,而微生物获得与利用营养物质的过程称为营养。学习和掌握微生物的营养理论及规律,是认识、利用和深入研究微生物的必要条件,尤其对有目的地选用、改造和设计符合微生物生理要求的培养基,以便进行科学研究或用于生产实践具有极其重要的作用。

一、微生物的营养物质

营养物质是微生物生存的物质基础,而营养是微生物维持和延续其生命形式的一种生理过程。微生物所需要的营养物质因种类和个体的不同而有千差万别,微生物需要的化学

元素主要由相应的有机物和无机物提供,小部分可以由分子态的气体提供。根据营养物质在微生物细胞中生理功能的不同,可将它们分为碳源、氮源、无机盐、生长因子(生长因素)和水 5 大类营养要素。

(一)水分

水是微生物细胞不可缺少的组成成分,微生物各种各样的生理活动中必须有水参加才能进行。水在细胞中的生理功能主要有:①作为细胞原生质胶体的主要成分。②具有溶剂与运输介质的作用,即营养物质必须先溶解于水中才能被微生物吸收和利用,以及营养物质的吸收和代谢产物的排出都必须通过水来完成。③参与细胞内一切生化反应,并作为代谢过程的内部介质。④水是热的良导体,有利于散热,可调节细胞的温度。⑤水的比热容高,能有效吸收代谢过程中放出的热,降低热能,使菌体温度不致过高。因此,水是微生物生长不可缺少的物质。

(二)碳源

在微生物生长过程中,凡是为微生物提供碳素来源的营养物质称为碳源。其主要生理功能是构成微生物细胞物质和代谢产物,并为微生物生命活动提供能量。碳源物质在细胞内经过一系列复杂的化学变化,成为微生物自身的细胞物质(如糖类、脂类、蛋白质等)和代谢产物。同时,大部分碳源物质在细胞内生化反应过程中还能为机体提供维持生命活动所需的能源。因此,碳源物质通常也是能源物质。但是有些以 CO_2 作为唯一或主要碳源的微生物生长所需的能源则并非来自碳源物质。

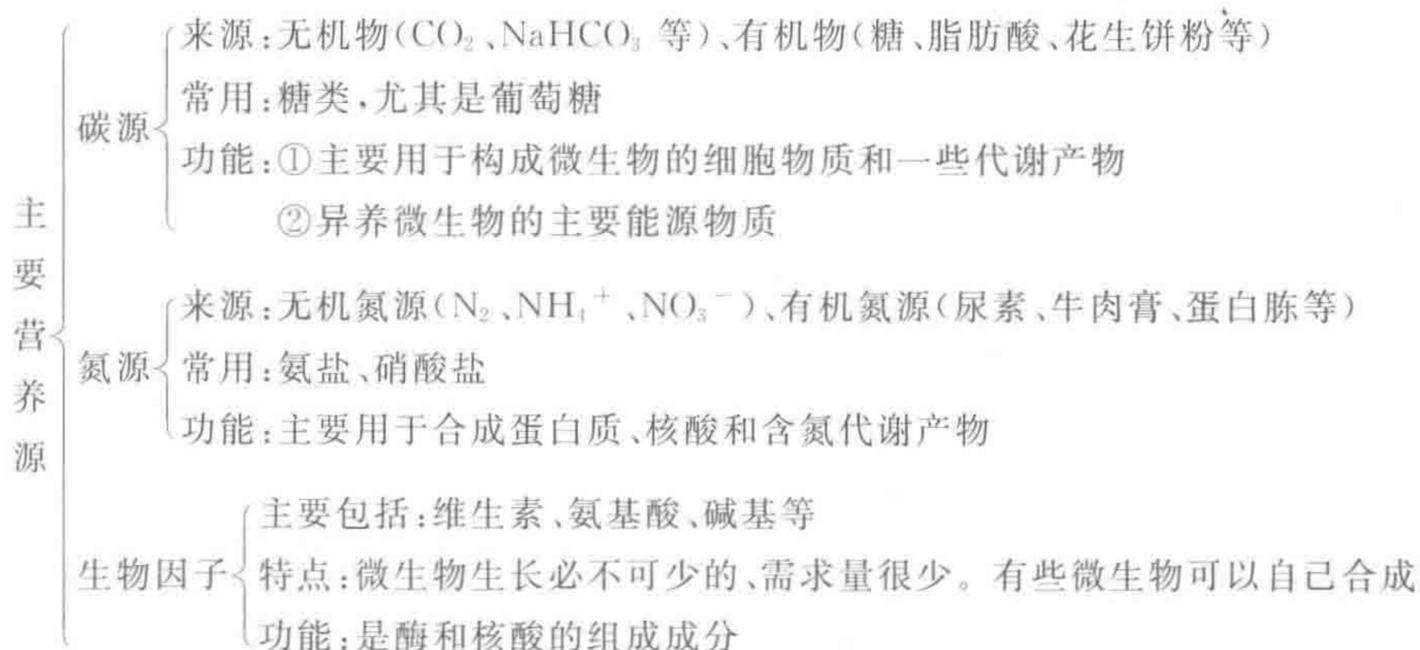


图 2-8 微生物生长所需主要营养源

微生物能够利用的碳源种类很多(图 2-8),既有简单无机碳化物,如 CO_2 和碳酸盐等,也有复杂的有机物,如糖类及其衍生物、脂类、醇类、有机酸、烃类、芳香族化合物等。

多数微生物(如异养微生物)都以有机物作为碳源和能源,其中糖类是微生物最好的碳源。但微生物对不同糖类的利用也有差别。例如,在以葡萄糖和乳糖或半乳糖为碳源的培养基中,大肠杆菌首先利用葡萄糖,然后利用乳糖或半乳糖。凡是能被微生物直接吸收利用的碳源(如葡萄糖)称为速效碳源。反之,不能被微生物直接吸收利用的碳源(如乳糖或半乳糖)称为迟效碳源。其次是脂类、醇类和有机酸等。有少数微生物(如自养微生物)能利用 CO_2 或碳酸盐作为唯一碳源或主要碳源,将 CO_2 逐步合成细胞物质和代谢产物。这类微生物在同化 CO_2 的过程中需要日光提供能量,或者从无机物的氧化过程中获得能量。

葡萄糖和蔗糖是实验室中常用的碳源。发酵工业中为微生物提供的碳源主要是糖类物

质,如饴糖、谷类淀粉(玉米、大米、高粱米、小米、大麦、小麦等)、薯类淀粉(甘薯、马铃薯、木薯等)、野生植物淀粉,以及麸皮、米糠、酒糟、废糖蜜等。为了解决发酵工业用粮与人们食用粮、畜禽饲料用粮的矛盾,已广泛开展了以纤维素、石油、CO₂和H₂等作为碳源和能源来培养微生物的节粮代粮研究工作,并取得了显著成绩。

(三)氮源

氮元素是组成微生物细胞内的蛋白质和核酸的重要成分。在微生物生长过程中,凡是构成微生物细胞或代谢产物中氮素来源的营养物质都被称为氮源。其生理功能是用于合成细胞物质和代谢产物中的含氮化合物(如蛋白质和核酸)。

氮源物质包括蛋白质及其不同程度的降解产物(胨、多肽、氨基酸等)、尿素、尿酸、铵盐、硝酸盐、亚硝酸盐、分子态氮、嘌呤、嘧啶、脲、胺、酰胺、氰化物(图2-8)。不同微生物对氮源的利用差别很大。固氮微生物能以分子态氮作为唯一氮源,也能利用化合态的有机氮和无机氮。多数微生物(如腐生细菌、肠道菌、动植物致病菌、放线菌、酵母菌和霉菌等)都能利用较简单的化合态氮,如铵盐、硝酸盐、氨基酸等,尤其是铵盐和硝酸盐几乎可被所有微生物吸收利用。蛋白质需要经微生物产生并被分泌到胞外的蛋白酶水解后才能被吸收利用,如一些霉菌和少数细菌具有蛋白质分解酶,能以蛋白质或蛋白胨作为氮源。有些寄生型微生物只能利用活体中的有机氮化物作为氮源。

实验室中常用的氮源有硫酸铵、硝酸盐(硝酸铵、硝酸钾、硝酸钠)、尿素及牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、多肽、氨基酸等。发酵工业中常用鱼粉、蚕蛹粉、黄豆饼粉、花生饼粉、玉米浆、酵母粉等作氮源。凡是能被微生物直接吸收利用的氮源称为速效性氮源,例如铵盐、硝酸盐、尿素等水溶性无机氮化物易被细胞吸收后直接利用;玉米浆、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏等的蛋白质降解产物——氨基酸也可通过转氨作用直接被机体利用。饼粕中的氮主要以大分子蛋白质的形式存在,需进一步降解成小分子的肽和氨基酸后才能被微生物吸收利用,故属迟效性氮源。速效性氮源有利于菌体的生长,迟效性氮源有利于代谢产物的形成。发酵工业中,将速效性氮源与迟效性氮源按一定比例制成混合氮源加入培养基中,以控制微生物的生长时期与代谢产物形成期的长短,达到提高产量的目的。

(四)无机盐

无机盐是指为微生物生长提供的除碳源、氮源以外的各种必需矿物元素。其生理功能是:①构成细胞的组成成分,维持生物大分子和细胞结构的稳定性;②参与酶的组成,作为酶活性中心的组分,以及作为酶的辅助因子和激活剂;③调节并维持细胞渗透压、pH和氧化还原电位;④作为某些自养微生物的能量物质和无氧呼吸时的氢受体。

凡是微生物生长所需浓度在 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ mol/L(培养基中含量)范围内的矿物元素称主要元素,它包括磷、硫、镁、钙、钠、钾、铁等金属盐类。它们各自的生理功能如图2-9所示。

凡是微生物生长所需浓度在 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ mol/L(培养基中含量)范围内的矿物元素称微量元素,它包括锌、锰、钼、硒、钴、铜、钨、镍、硼等。微量元素有的参与酶蛋白的组成,或者作为许多酶的激活剂。如果微生物在生长过程中缺乏微量元素,会导致细胞生理活性降低,甚至使其停止生长。由于微生物对微量元素的需要量极微,无特殊原因,培养基中不必另外加入。值得注意的是,许多微量元素都是重金属,过量供应反而有毒害作用,故供应的微量元素一定要控制在正常浓度范围内,而且各种微量元素之间要有恰当的比例。

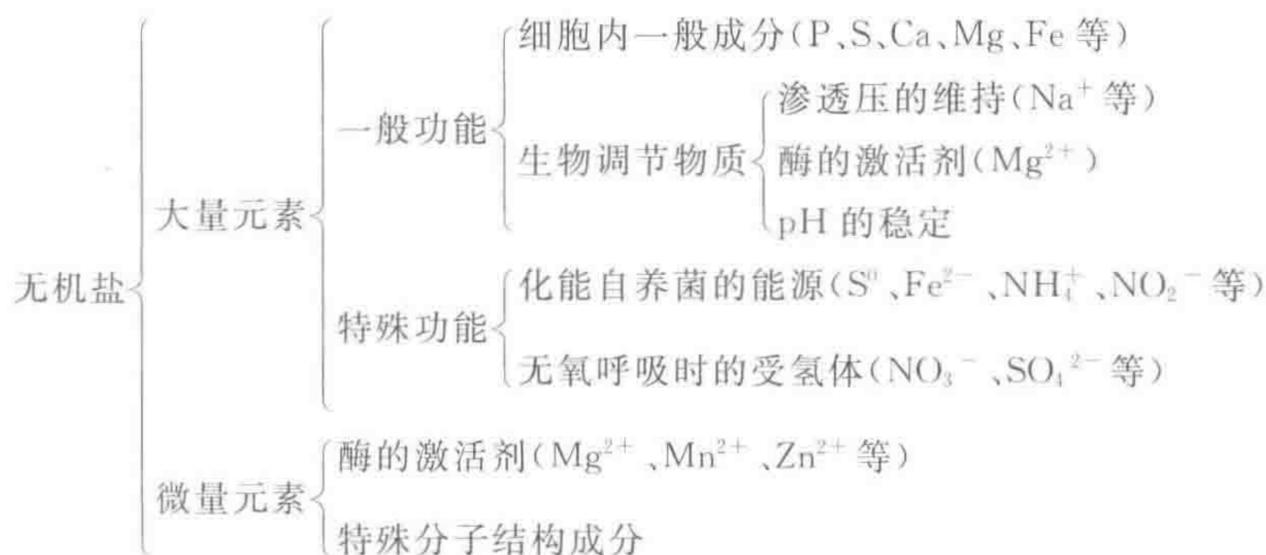


图 2-9 微生物生长所需无机盐分类

(五) 生长因子

生长因子是指微生物生长不可缺少、本身又不能合成或合成量不足以满足机体生长需要的微量有机化合物。各种微生物需求的生长因子的种类和数量不尽相同。根据生长因子的化学结构及其在机体内的生理作用,可将其分为维生素、氨基酸、嘌呤或嘧啶三大类。

1. 维生素类

维生素是最先被发现的生长因子。虽然一些微生物能合成维生素,但许多微生物仍然需要外界提供才能生长。其主要生理功能是作为酶的辅基或辅酶的成分,参与新陈代谢。

2. 氨基酸类

许多微生物缺乏合成某些氨基酸的能力,必须在培养基中补充这些氨基酸或含有这些氨基酸的短肽才能使微生物正常生长。不同微生物合成氨基酸的能力相差很大。有些细菌,如大肠杆菌能合成自身所需的全部氨基酸,不需外源补充;而有些细菌,如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)能合成所需的大部分氨基酸,仅需补充色氨酸。还有些细菌合成氨基酸的能力极弱,如肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)需要 17 种氨基酸和多种维生素才能生长。

3. 嘌呤、嘧啶及其衍生物

嘌呤和嘧啶也是许多微生物所需要的生长因子。其主要生理功能是作为合成核苷、核苷酸和核酸的原料,以及作为酶的辅酶或辅基的成分。多数微生物,尤其是营养要求严格的乳酸细菌生长需要嘌呤和嘧啶。有些微生物不仅缺乏合成嘌呤和嘧啶的能力,而且不能将它们正常结合到核苷酸上。因此,对这类微生物需要供给核苷或核苷酸才能使它们正常生长。

二、微生物的营养类型

营养类型是根据微生物生长所需要的主要营养要素,即碳源和氮源的不同而划分的微生物类型。由于微生物种类繁多,其营养类型比较复杂,根据碳源、能源和电子(氢)供体性质的不同,可将绝大部分微生物分为光能自养型、光能异养型、化能自养型和化能异养型四大类型(表 2-1)。

表 2-1 微生物的营养类型

营养类型	能源	氢供体	基本碳源	实 例
光能无机营养型 (光能自养型)	光	无机物	CO ₂	蓝细菌、紫硫细菌、绿硫细菌、藻类
光能有机营养型 (光能异养型)	光	有机物	CO ₂ 及简单 有机物	红螺菌科的细菌(即紫色无硫细菌)
化能无机营养型 (化能自养型)	无机物*	无机物	CO ₂	硝化细菌、硫化细菌、铁细菌、氢细菌、硫黄细菌等
化能有机营养型 (化能异养型)	有机物	有机物	有机物	绝大多数细菌和全部真核微生物

* 指 NH₄⁺、NO₂⁻、S、H₂S、H₂、Fe²⁺ 等。

三、微生物对营养物质的吸收方式

环境中的营养物质只有被吸收到细胞内才能被微生物逐步利用。微生物在生长过程中不断产生多种代谢产物,必须及时排到细胞外,以免在细胞内积累产生毒害作用,这样微生物才能正常生长。根据物质运输过程的特点,目前一般认为,除原生动物外,其他各大类有细胞的微生物对营养物质的吸收主要有简单扩散、促进扩散、主动运输、基团转位 4 种方式。而膜泡运输则是原生动物的一种营养物质运输方式。

第三节 微生物的生长

微生物在适宜条件下,不断从环境中吸收营养物质转化为构成细胞物质的组分和结构,当个体细胞的同化作用超过了异化作用,即大分子的合成速度超过大分子分解速度时,细胞原生质的总量(质量、体积、大小)增加则称为生长。生长达到一定程度(体积增大),由于细胞结构的复制与再生,细胞便开始分裂,这种分裂若伴随着个体数目的增加,即称为繁殖。如果异化作用超过同化作用,即大分子分解超过大分子合成,细胞便趋于衰亡。在个体、群体形态上、生理上都会发生一系列由量变到质变的变化过程,称为发育。由此可见,微生物的生长与繁殖是两个不同,但又相互联系的概念。生长是一个逐步发生的量变过程,繁殖是一个产生新的生命个体的质变过程。高等生物的生长与繁殖两个过程可以明显分开,但对低等单细胞生物而言,由于个体微小,这两个过程是紧密联系很难划分的过程。因此在讨论微生物生长时,常将这两个过程放在一起讨论,这样微生物生长又可以定义为在一定时间和条件下细胞数量的增加,这是微生物群体生长的定义。

在微生物的研究和应用中,只有群体生长才有意义。凡提到“生长”时,一般均指群体生长,这一点与研究大型生物有所不同。微生物的生长繁殖是其自身的代谢作用在内外各种环境因素相互作用下的综合反映,因此,有关生长繁殖数据即可作为研究各种生理、生化和遗传等问题的重要指标。同时,有益菌在生产实践中的各种应用,以及对腐败菌、病原菌引起的食品腐败和食物中毒发生的微生物的控制,也都与其生长繁殖紧密相关。因此有必要学习微生物生长繁殖规律与影响其生长的环境因素,以及控制其生长繁殖的方法。

一、细菌的生长繁殖

(一)细菌生长繁殖的条件

1. 营养基质

细菌的生长要满足六大营养要素,即适宜的水分、碳源、能源、氮源、矿物质,以及必需的生长因子等。如果营养物质不足,机体一方面降低或停止细胞物质合成,避免能量的消耗,或者通过诱导合成特定的运输系统,充分吸收环境中微量的营养物质以维持机体的生存;另一方面机体对细胞内某些非必要成分或失效的成分,如细胞内贮存的物质、无意义的蛋白质与酶、mRNA 等进行降解,以重新利用。例如在氮源、碳源缺乏时,机体内蛋白质降解速率比正常条件下的细胞增加了 7 倍,同时减少 tRNA 的合成和降低 DNA 复制的速率,导致生长停止。

2. 温度

细菌在生长过程中均有其各自的最低、最适和最高生长温度范围,它们在最适温度下生长最快,超过最高或低于最低生长温度就会停止生长,甚至死亡。多数细菌最适温度在 20~40℃ 之间。

3. 氢离子浓度(pH)

培养基的 pH 对细菌的生长繁殖影响很大。多数细菌生长的最适 pH 为 6.5~7.5。细菌生长过程中由于分解各种营养物质产生的酸性或碱性代谢产物使培养基变酸或变碱而影响其生长,因此需要向培养基内加入一定量的缓冲剂。

4. 渗透压

细菌在一定浓度的等渗溶液中才能生长繁殖。如将细菌置于高渗或低渗溶液中,则会因失水或膨胀而死亡。但一般细菌比其他生物对渗透压的改变有较大适应力。

5. 呼吸环境

根据细菌不同的呼吸类型,要有适宜的呼吸环境。将好氧菌置于厌氧环境中就不能生长。有些细菌需要在环境中加入一定浓度的 CO₂ 或 N₂ 才能生长或旺盛生长。

(二)细菌群体的生长规律

将少量单细胞微生物纯培养菌种接种到新鲜的液体培养基中,在最适条件下培养,以细菌数量的对数或生长速率为纵坐标,以生长时间为横坐标,绘制成的曲线称为细菌的生长曲线。每种细菌都有各自的典型生长曲线,但它们的生长过程都有共同规律。根据细菌生长繁殖速率的不同,可将曲线大致分为迟缓期、对数期、稳定期与衰亡期 4 个阶段。微生物分批培养生长曲线的不同阶段特点及原因分析详见基础微生物学教程。

研究生长曲线对于细菌的研究工作和生产实践有指导意义。在研究细菌的代谢和遗传时,需采用生长旺盛的对数期的细胞;在发酵生产方面,使用的发酵剂最好是对数期的种子接种到发酵罐内,几乎不出现迟缓期,控制延长对数期,可在短时间内获得大量培养物(菌体细胞)和发酵产物,缩短发酵周期,提高生产率。

二、真菌的生长繁殖

(一)真菌生长繁殖的条件

1. 营养基质

真菌对营养要求不高,一般只要供给碳源和氮源即可生长繁殖。多数真菌是异养菌,能

利用多种碳水化合物,如单糖、双糖、淀粉、维生素、木素、有机酸和无机酸等,并能够利用多种含氮有机物,如蛋白质及其水解产物(蛋白胨,氨基酸),也可从含氮无机物中获得氮源,如硫酸铵、硝酸盐、氮化物等。

2. 温度

真菌的生长繁殖温度一般比细菌低,多数真菌最适温度范围为 $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。部分真菌在 0°C 以下停止生长,但某些真菌仍可生长繁殖,引起冷藏食品的腐败或霉坏。

3. 湿度

真菌生长繁殖要求的湿度较高,除水分外,空气的湿度对真菌的生长影响很大,因为多数真菌在高湿度下才能形成繁殖器官,相对湿度应在90%以上,便于真菌的繁殖。

4. pH

环境中的酸碱度是真菌生长繁殖的重要条件,多数真菌喜在酸性环境中生长。它们在 $\text{pH}3\sim 6$ 之间生长良好,而在 $\text{pH}2\sim 10$ 之间也可生长。

5. 呼吸环境

多数丝状真菌是好氧菌,在有充足氧气的环境中才能生长繁殖,但酵母菌是典型的兼性厌氧菌,既可在有氧时进行生长繁殖,又能在无氧条件下进行发酵。

丝状真菌在液体培养基中的生长方式在发酵工业生产中十分重要,因为它影响发酵中通气性、生长速率、搅拌能耗和菌丝体与发酵液的分离难易等。在液体培养基中丝状真菌基本以均匀的菌丝悬浮的方式生长,但大多数情况以松散的菌丝絮状或堆积紧密的菌丝球的沉淀方式生长。接种量的大小、接种培养物是否凝聚以及菌丝体是否易于断裂等综合因素决定着丝状真菌是丝状悬浮生长还是沉淀生长。丝状真菌生长通常以单位时间内细胞的物质质量(主要是干重)的变化表示。

(二)丝状真菌的群体生长规律(非典型生长曲线)

将少量丝状真菌纯培养物接种于一定容积的深层通气液体培养基中,在最适条件下培养,定时取样测定菌丝细胞物质的干重。以细胞物质的干重为纵坐标,培养时间为横坐标,即可绘出丝状真菌的非典型生长曲线。丝状真菌的非典型生长曲线与细菌的典型生长曲线有明显差别。前者缺乏对数生长期,与此期相当的只是培养时间与菌丝干重的立方根呈直线关系的一段快速生长期。根据丝状真菌生长繁殖后的细胞干重的不同,可将曲线大致分为迟缓期、快速生长期和生长衰亡期3个阶段。

1. 生长迟缓期

造成生长迟缓的原因有两种:一是孢子萌发前的真正的迟缓期,另一种是生长已开始但却无法测量。对真菌细胞生长迟缓期的特性目前缺乏详细研究。

2. 快速生长期

此时菌丝体干重迅速增加,其立方根与时间呈直线关系。因为真菌不是单细胞,其繁殖不以几何倍数增加,故而无对数生长期。真菌的生长常表现为菌丝尖端的伸长和菌丝的分枝,因此受到邻近细胞竞争营养物质的影响。尤其在静置培养时,许多菌丝在空气中生长,必须从其邻近处吸收营养物质供生长需要。在快速生长期中,碳、氮、磷被迅速利用,呼吸强度达到顶峰,代谢产物(如酸类)可出现或不出现。静置培养时,在快速生长期的后期,菌膜上将出现孢子。

3. 衰亡期

真菌生长进入衰亡期的标志是菌丝体干重下降。一般在短期内失重很快,以后则不再变化。但有些真菌会发生菌丝体自溶。这是其自身所产生的酶类催化几丁质、蛋白质、核酸等分解,同时释放氨、游离氨基酸、有机磷和有机硫化物等所致。处于衰亡期的菌丝体细胞,除顶端较幼细胞的细胞质稍稍稠密均匀外,多数细胞都出现大的空泡。

此期生长的停止由下列两种因素之一所导致。一是在高浓度培养基中,可能因为有毒代谢产物的积累阻碍了真菌生长。如在高浓度碳水化合物的培养基中可积累有机酸,而在含有机氮多的培养基中则可能积累氨;多数次级代谢物质如抗生素等,也是在生长后期合成。二是在较稀释的营养物质平衡良好的培养基中,生长停止的主要因素是碳水化合物的耗尽。当生长停止后,菌丝体自溶裂解的程度因菌种的特性和培养条件而异。

丝状微生物包括丝状真菌和放线菌。上述丝状真菌的非典型生长曲线对描述放线菌群体的生长规律同样适用。

三、微生物的同步培养

微生物个体生长是微生物群体生长的基础。但群体中每个个体细胞都处于不同的生长阶段,因而它们的生长、生理和代谢活性等特性不一致,从而出现生长与分裂不同步的现象。同步培养是使微生物群体中不同步的细胞转变成能同时进行生长或分裂的群体细胞的一种培养方法。以同步培养方法使群体细胞都处于同一生长阶段,并同时分裂的生长方式称为同步生长。通过同步培养方法获得的细胞称为同步培养物。同步培养物常被用于研究微生物生理、遗传特性和作为工业发酵的种子。同步培养方法很多,可归纳为机械筛选法与环境条件诱导法。

(一)机械筛选法

这是一类根据微生物细胞在同一生长阶段的细胞体积、大小与重量完全相同或它们与某种材料吸附能力相同的原理,用密度梯度离心分离法、过滤分离法和膜洗脱法收集同步生长的细胞设计的方法。其中前两种方法较有效和常用。

1. 滤膜洗脱法

根据硝酸纤维素滤膜能与其相反电荷的细菌细胞紧密吸附的原理,将细菌悬浮液通过垫有硝酸纤维滤膜的过滤器,不同生长阶段的细菌均吸附于膜上,然后翻转滤膜置于滤器中,再用无菌培养基流过过滤器,以洗去未结合的细菌,而后将滤器放入适宜条件下培养一段时间,其后仍将培养基经过过滤器,这时新分裂产生的细胞被视为小细胞被洗下,分步收集并通过培养即可获得满意的同步细胞。

2. 密度梯度离心分离法

将不同步的细胞悬浮在不被该细菌利用的蔗糖或葡聚糖的不同梯度溶液中,通过密度梯度离心将大小不同细胞分成不同区带,每一区带的细胞大致处于同一生长时期,分别取出培养,即可获得同步生长细胞。

3. 过滤分离法

将不同步的细胞培养物通过孔径大小不同的微孔滤器,从而将大小不同的细胞分开。选用适当孔径的微孔滤膜,只使个体较小的刚分裂的细菌通过滤膜,分别将滤液中的细胞取出培养后获得同步培养物。

(二)环境条件诱导法

这是一类根据细菌生长与分裂对环境因子要求不同的原理,通过控制环境温度、培养基成分或影响其生长周期中主要功能的代谢抑制剂等诱导细菌同步生长而设计的方法。

1. 控制温度

通过最适生长温度与允许生长的亚适温度交替处理可使不同步生长细菌转为同步分裂的细菌。在亚适温度下细胞物质合成照常进行,但细胞不能分裂,使群体中分裂准备较慢的个体赶上其他分裂较快的细胞,再换到最适温度时所有细胞都同步分裂。

2. 控制培养基成分

培养基中的碳源、氮源或生长因子不足,可导致细菌缓慢生长直至生长停止。将不同步的细菌在营养不足的条件下培养一段时间,然后转移到营养丰富的培养基中培养,就能获得同步细胞。或将不同步生长营养缺陷型细胞在缺少主要生长因子的培养基中饥饿一段时间,令细胞都不能分裂,再转到完全培养基中就能获得同步生长细胞。

此外,还有加入代谢抑制剂、控制光照和黑暗、加热处理等方法获得同步分裂细胞。应该明确指出,保持同步生长的时间因菌种和条件而变化。由于同步群体内细胞个体的差异,同步生长最多只能维持2~3代又很快丧失其同步性而变为随机生长。

四、微生物的连续培养

(一)连续培养的概念

分批培养(又称密闭培养)中的培养基为一次性加入,不补充也不再更换,随着微生物的活跃生长,培养基营养物质逐渐消耗,有害代谢产物积累,其对数生长期难以长期维持。当微生物以分批培养方式培养至对数期的后期时,在培养容器中以一定速度连续流入新鲜培养基,同时利用溢流方式,以同样速度不断流出培养物(菌体和代谢产物),使培养容器中细胞数量和营养状态达到动态平衡,其中的微生物可长期保持在对数期的平衡生长状态与恒定的生长速率上,这就是连续培养。连续培养如用于生产实践,就称为连续发酵。连续培养可分为恒化培养和恒浊培养两种方式。

(二)连续培养的类型

1. 恒化器

恒化器是通过控制某种限制性营养物质的浓度和培养基的流速,来保持细胞生长速率恒定和培养液的流速不变,并使微生物始终在低于其最高生长速率的条件下进行生长繁殖的连续培养装置。培养基中某种限制性营养物质通常被作为控制细胞生长速率的生长限制因子,如氨基酸、氨和铵盐等氮源,或是葡萄糖、麦芽糖等碳源,或者是无机盐、生长因子等物质。恒化器连续培养可获得低于最高菌体产量的稳定细胞浓度的菌体,主要用于研究与微生物生长速率相关的各种理论。

2. 恒浊器

恒浊器是通过光电系统不断调节培养液的流速,以控制培养基的浊度恒定,进而保持菌体细胞浓度(或密度)恒定的连续培养装置。当培养基的流速低于微生物生长速率时,菌体密度增高,超过预定值时通过光电系统的调节,加快培养液流速,使浊度下降;反之亦然,以此达到恒定密度的目的。在发酵生产中,为了获得大量菌体或与菌体生长相平行的某些代谢产物(如乳酸、乙醇等)时,均可利用恒浊器的连续发酵。

(三)连续培养的特点

微生物能在比较恒定的环境中以恒定的速率生长,有利于研究生长速率(或营养物质)对细胞形态、组成和代谢活动的影响,可筛选出新的突变株;连续培养在生产上可缩短生产周期,减少非生产时间(包括简化装料、灭菌、出料、清洗发酵罐等单元操作),提高设备利用率,便于自动化生产,减轻劳动强度。缺点:营养物质利用率和产物浓度一般低于分批培养,且容易因杂菌污染以及菌种发生变异而导致微生物衰退。

五、环境因素对微生物生长的影响

微生物通过新陈代谢与周围环境因素相互作用。当环境条件适宜时,微生物进行正常的新陈代谢,生长繁殖。当环境条件不太适宜时,微生物的代谢活动就会发生相应的改变,引起一些变异(如形态变异);环境条件改变过于激烈时,可导致其主要代谢机能发生障碍,生长受到抑制,甚至死亡。因此,掌握微生物与周围环境的相互关系,一方面能创造有利条件,促进有益微生物的生长繁殖;另一方面,可利用对微生物不利因素,抑制或杀灭病原菌。对微生物有影响的环境因素,可分为物理、化学、生物三类,本章重点介绍理化因素对微生物生长的影响。

(一)温度

温度是影响微生物生长繁殖最重要的物理因素。温度的变化对各种类型微生物的代谢过程产生影响,从而改变其生长速率。温度对微生物生长的影响具体表现在:①影响酶的活性。每种酶都有最适的酶促反应温度,温度变化影响酶促反应速率,最终影响细胞物质合成。在一定温度范围内,酶活性随温度的上升而提高,细胞的酶促反应与生长速率加快。一般温度每升高 10°C ,生化反应速率增加一倍。②影响细胞膜的流动性。温度升高,流动性加大,有利于营养物质的运输;反之,温度降低,流动性降低,不利于物质运输,因此温度变化影响营养物质的吸收与代谢产物的分泌。③影响物质的溶解度。物质只有溶于水才能被机体吸收或分泌,除气体外,温度上升,物质的溶解度增加;温度降低,物质的溶解度降低,最终影响微生物的生长。④影响机体生物大分子的活性。核酸、蛋白质等对温度较敏感,随着温度的升高会遭受不可逆的破坏。

1. 微生物的温度类群

根据最适生长温度范围不同,可将微生物分为低温型(专性嗜冷菌、兼性嗜冷菌)、中温型(嗜温菌)和高温型(嗜热菌、超嗜热菌)三个生理类群。每个类群又可分为生长温度三基点,即最低、最适和最高生长温度。

整体来看,微生物可以在 $-10\sim 95^{\circ}\text{C}$ 范围内生长,极端温度下限为 -30°C ,极端温度上限为 $105\sim 150^{\circ}\text{C}$ 。微生物在温度三基点内都能生长,但生长速率不同。只有在最适生长温度时,其生长速率才最高,代时才最短。当低于或高于最低或最高生长温度时,微生物就停止生长,甚至死亡。

(1)低温型微生物

在 $-10\sim 20^{\circ}\text{C}$ 能够生长,最适生长温度在 $10\sim 15^{\circ}\text{C}$ 的微生物称为低温型微生物。可分为专性嗜冷菌和兼性嗜冷菌两种。前者最适生长温度为 15°C 左右或更低,最高生长温度为 20°C ,最低温度为 0°C 以下,甚至在 -12°C 还能生长,此类菌分布于地球两极地区。后者最适生长温度为 20°C 左右,最高生长温度为 30°C 或更高,此类菌分布于海洋、深湖、冷泉和冷

藏食品中。如假单胞菌、乳酸杆菌和青霉菌等兼性嗜冷菌于低温(0~7℃)下生长,则引起冷藏食品变质。

嗜冷微生物能在低温下生长的机理:①由于酶活性在低温下更高,能更有效地起催化作用,而温度达到30~40℃时会使酶失去活性;②细胞膜中不饱和脂肪酸含量较高,在低温下细胞膜仍保持半流动状态而能履行正常功能,即保证膜的通透性,有利于营养物质运输。

(2) 中温型微生物

能在10~45℃生长,最适生长温度在20~40℃的微生物称为嗜温微生物。可分为室温菌和体温菌两种。前者最适生长温度约为25℃,土壤微生物和植物病原菌均属于室温菌,它们在腐生环境中生长;后者最适生长温度约为37℃,温血动物和人体中的病原菌,以及引起食品腐败变质菌类和发酵工业用菌种均属于体温菌,它们在寄生环境中生长。嗜温性微生物最低生长温度不能低于10℃,若低于10℃则不能启动蛋白质合成过程,许多酶功能受到抑制,从而抑制嗜温微生物的生长。

(3) 高温型微生物

凡是在45℃或45℃以上温度的环境中能够生长,最适生长温度在50~60℃的微生物称为嗜热微生物。可分为专性嗜热菌和兼性嗜热菌两种。前者在37℃不能生长,55℃生长良好;后者在37℃能够生长,55℃生长良好。此类微生物主要分布于温泉、堆肥、发酵饲料、日照充足的土壤表面等中。例如,芽孢杆菌属和梭状芽孢杆菌属中的部分菌类、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)等都是在55~70℃中生长的类群。有的细菌可在近100℃的高温中生长。在罐头工业中嗜热菌常给食品杀菌带来麻烦,但在发酵工业中,如能筛选到嗜热菌作为生产菌种,可以缩短发酵时间,防止杂菌污染。工业上常用的德氏乳酸杆菌就属于此类,其最适生长温度为45~50℃。

嗜热微生物能在高温下生长的机理:①菌体内的酶和蛋白质更抗热,尤其蛋白质对热更稳定。如嗜热脂肪芽孢杆菌的 α -淀粉酶经持续24h加热70℃后仍保持酶的活性。②能产生多胺、热亚胺和高温精胺,以稳定核糖体结构和保护大分子免受高温的损害。③核酸也具有较高的热稳定性结构,其鸟嘌呤(G)+胞嘧啶(C)的含量变化很大。tRNA在特定的碱基对区含较多的G+C,因而有较多的氢键,可增强热稳定性。④细胞膜中含有较多的饱和脂肪酸与直链脂肪酸,可形成更强的疏水键,从而能在高温下仍保持膜的半流动状态而能履行正常功能。⑤在较高温度下,嗜热菌的生长速率较快,合成生物大分子物质迅速,能及时弥补被热损伤的大分子物质。

嗜热微生物的生长曲线独特,其迟缓期和对数期非常短。它们生长速度较快,有些嗜热菌在高温下的增代时间仅10min,进入稳定期后迅速死亡。故嗜热微生物的生理代谢比嗜温或嗜冷微生物代谢要快得多。

2. 微生物生长速率和温度的关系

微生物生长速率与温度的关系常以温度系数 Q_{10} 来表示,即温度每升高10℃微生物的生长速率与未升高温度前的微生物生长速率之比。多数微生物的温度系数 Q_{10} 值为1.5~2.5,即在一定的温度范围内,温度每升高10℃,微生物生长速率增快1.5~2.5倍。

3. 低温对微生物的影响

微生物对低温具有很强的抵抗力。多数微生物所处环境温度降到最低生长温度时,新陈代谢活动减弱到最低程度,最后处于停滞或休眠状态。这时,微生物的生命活动几乎停

止,但仍能在较长时期内维持生命;有少数微生物在低于生长温度时(如冰冻情况)会迅速死亡。同时,也有少数嗜冷菌能在一定低温条件下缓慢生长。当温度上升到该微生物生长最适温度时,又开始正常生长繁殖。

4. 高温对微生物的影响

(1) 高温对微生物影响的原理

微生物对高温比较敏感,如果超过其最高生长温度,一般会立即死亡。高温对微生物的致死作用主要因蛋白质、核酸与酶系统等重要生物高分子的氢键受到破坏,导致菌体蛋白质凝固变性;核酸发生降解变性失活;破坏细胞的组成;热溶解细胞膜上类脂质成分形成极小的孔,使细胞内容物泄漏,从而导致死亡。

不同微生物对热的敏感程度不同,部分微生物对热的抵抗能力较强,在较高温度下尚能生存一段时间。凡是在巴氏杀菌的温度下(63°C , 30min)尚能残存,但不能在此温度下正常生长的微生物,称为耐热微生物。与食品有关的耐热菌主要有芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、乳杆菌属、链球菌属、肠球菌属、微球菌属、节杆菌属和微杆菌属等的一些种。

(2) 微生物耐热性大小的表示方法

不同微生物因细胞结构的特点和细胞组成性质的差异,它们的致死温度各不相同,即它们的耐热性不同。食品工业中,微生物耐热性的大小常用以下几种数值表示。

①热致死温度(thermal death point, TDP):是指在一定时间内(一般为 10min)杀死悬浮于液体样品中的全部微生物所需要的最低温度。

②热力致死时间(thermal death time, TDT):是指在特定条件和特定温度下,杀死样品中一定数量微生物(通常为 99.99%)所需要的最短时间。

(二) 水分

1. 水分活度的概念

水分是微生物生命活动的必要条件。微生物细胞的组成不能缺少水分,因为细胞内所进行的各种生物化学反应均以水分为溶媒,在缺水环境中微生物的新陈代谢受到阻碍,最终造成死亡。

由于食品中的绝对含水量包括游离状态和结合状态存在的水分,前者能被微生物利用,而后者不能被利用,故食品中含有的水分不用绝对含水量(%)表示,而是利用水分活度(也称水分活性)表示在食品中可被微生物实际利用的自由水或游离水的含量。水分活度用 A_w 表示,其定义是:在相同温度和压力下,食品的蒸汽压与纯水蒸气压之比。因此 A_w 最大值为 1,最小值为 0。

水溶液与纯水的性质是不同的。纯水中加入溶质后,溶液分子之间的引力增加,冰点下降,沸点上升,蒸汽压下降。溶液中溶质越多,蒸汽压下降得越低。如果用可溶性物质加入培养基或食品中,配制各种不同 A_w 的培养基,然后分别接种微生物,在培养过程中观察微生物生长状况,凡是 A_w 低的基质,微生物生长不良。若基质的 A_w 低于微生物生长的最低 A_w 时,微生物就停止生长。

2. 微生物生长需要的水分活度

不同种类的微生物生长的最低 A_w 值有较大差异(表 2-2),即使是同一类群的菌种,其生长繁殖的最低 A_w 值也各不相同。

表 2-2 各种微生物生长的最低 A_w 值

细菌	最低 A_w	真菌	最低 A_w
大肠杆菌	0.93~0.96	黄曲霉	0.90
沙门氏菌	0.94	黑曲霉	0.88
枯草芽孢杆菌	0.95	酿酒酵母	0.94
八叠球菌	0.91~0.93	假丝酵母	0.94
金黄色葡萄球菌	0.90	鲁氏酵母	0.60
嗜盐杆菌	0.75	耐旱真菌	0.60

各种微生物生长繁殖的 A_w 范围在 0.99~0.60。在 A_w 接近于 1 的食品内,微生物会很好生长,当 A_w 低于一定界限时,微生物的生长会受到抑制。由表 2-2 可见,在细菌、酵母菌和霉菌三类微生物中,细菌对 A_w 要求较高,除嗜盐细菌以外, A_w 均大于 0.90,当 A_w 低于 0.90 时几乎不能生长。多数酵母菌生长所需要的 A_w 在 0.87~0.91,但个别耐高渗酵母(如鲁氏酵母)在 A_w 为 0.60 时还能生长。多数霉菌所需要的 A_w 比细菌和酵母菌低,其最低 A_w 为 0.80,个别霉菌(如双孢旱霉)在 A_w 为 0.65 时还能生长。随着 A_w 的降低,微生物的代谢活动减弱,当 A_w 降至小于 0.65 时,一般微生物停止生长繁殖。

3. 高渗透压食品的水分活度

渗透压对微生物的影响亦可从水分活度的改变上来认识。通过加糖或加盐提高渗透压的食品,其浓度愈高,食品的 A_w 愈小。能引起高糖食品变质的微生物只是少数酵母和丝状真菌,它们生长的最低 A_w 都比较低,但生长缓慢,因而引起食品变质过程亦缓慢。但由于霉菌是好氧菌,可用嫌气方法控制其生长。

(三) 渗透压

微生物细胞膜为半渗透性单位膜,能调节细胞内外渗透压的平衡,从而使微生物在不同渗透压环境中发生不同渗透现象。①如果将微生物细胞置于等渗溶液(0.85%~0.90% NaCl 溶液)中,则微生物的代谢活动正常进行,细胞保持原形;②如将微生物细胞置于低渗溶液中,因有压力差,水分迅速进入细胞内,使细胞吸水而膨胀,因有细胞壁的保护,很少发生细胞破裂现象。但在 5×10^{-4} mol/L $MgCl_2$ 低渗溶液中,细胞易膨胀破裂而死亡。生产实践上利用低渗原理破碎细胞。③如将微生物置于高渗溶液中,细胞内的水分渗透到细胞外,则细胞原生质因脱水收缩而发生质壁分离现象,造成细胞代谢活动呈抑制状态甚至导致细菌死亡。总体来说,低渗对微生物的作用不太明显,而高渗对其生长有明显影响。

食品中形成渗透压的主要是食盐和食糖物质。多数细菌不能在较高渗透压食品中生长,仅能在其中生存一个时期或迅速死亡。虽有少数细菌能适应较高渗透压,但其耐受力远不如霉菌和酵母菌;多数霉菌和少数酵母能耐受较高的渗透压。生产实践中,利用一般微生物不耐高渗的原理,用盐腌和糖渍法保存食品。例如,以 5%~30% 食盐浓度腌渍蔬菜,以 30%~60% 糖制作蜜饯,以及用 60% 的糖制成炼乳等。

1. 嗜盐微生物

凡是能在 2% 以上食盐溶液中生长的微生物称为嗜盐微生物,根据在不同食盐浓度的食品中的生长情况将它们分为以下 3 种类型。

(1) 低度嗜盐细菌:此类菌适宜在含 2%~5% 食盐的食品中生长。如多数嗜冷细菌,假单胞菌属、无色杆菌属、黄杆菌属和弧菌属中的一些种,多发现于海水和海产品中。

(2) 中度嗜盐细菌: 此类菌适宜在含 5%~18% 食盐的食品中生长, 如假单胞菌属、弧菌属、无色杆菌属、芽孢杆菌属、四联球菌属(如嗜盐四联球菌)、八叠球菌属和微球菌属中的一些种, 其中最典型的是盐脱氮微球菌和腌肉弧菌。

(3) 高度嗜盐细菌: 此类菌适宜在含 20%~30% 食盐的食品中生长, 如盐杆菌属、盐球菌属和微球菌属中的一些种, 它们都能产生类胡萝卜素, 常引起腌制鱼、肉、菜发生赤变现象和盐田的赤色化。此类菌又称极端嗜盐菌, 只有当 NaCl 近于饱和时才能生长。嗜盐菌特异性地需要 Na^+ , 因为它们的细胞壁靠 Na^+ 稳定, 许多酶的活性也需要 Na^+ 。

除个别菌种外, 嗜盐细菌生长速度都较缓慢, 嗜盐杆菌的代时为 7h, 嗜盐球菌为 15h。

2. 耐盐细菌

能在 10% 以下和 2% 以上食盐浓度的食品中生长的细菌称耐盐细菌, 如芽孢杆菌属和球菌类几个属中的一些种。它们与嗜盐菌不同, 虽能耐较高浓度的盐分, 但高盐分并不是其生长所必需的。如葡萄球菌能在 10% 的 NaCl 溶液内生长, 但它正常生长并不需要这么高浓度的盐分。

3. 耐糖微生物

能在含高浓度糖的食品中生长的微生物, 属于细菌的仅限于少数菌种, 例如肠膜明串珠菌等, 其余多数为酵母和霉菌。耐受高糖的酵母常引起糖浆、果酱、浓缩果汁等食品的变质; 耐受高糖的霉菌常引起高糖分食品、腌制品、干果类和低水分粮食的变质。

常见耐糖酵母有鲁氏酵母、罗氏酵母、蜂蜜酵母、意大利酵母、异常汉逊氏酵母、汉逊德巴利氏酵母、膜醭毕赤氏酵母等; 耐糖霉菌有灰绿曲霉、匍匐曲霉、咖啡色串孢霉、乳卵孢霉、芽枝霉属和青霉属等。

(四) 辐射

辐射是能量通过空间或某一介质进行传递的过程。辐射主要有紫外线辐射、电离辐射等。

1. 紫外线辐射

紫外线波长范围为 130~400nm, 其中以 200~300nm 紫外线杀菌作用最强, 因为蛋白质和核酸分别在波长约 280nm 和 260nm 处有较高吸收峰, 它们因分子结构被破坏而变性失活。紫外线的杀菌机制是诱导核酸形成胸腺嘧啶二聚体, 导致 DNA 复制和转录中遗传密码阅读错误, 妨碍蛋白质和酶的合成, 轻则发生细胞突变, 重则造成死亡。此外, 紫外线还可使分子氧变为臭氧, 臭氧不稳定, 分解放出氧化能力极强的新生态 $[\text{O}]$, 与生物体活性成分发生氧化反应, 破坏细胞物质结构而将其致死。

紫外线穿透能力很差, 不能透过不透明物体, 即使是一层玻璃也会滤掉大部分紫外线, 因而只能用于物体表面或室内空气的灭菌。不同种类和生理状态的微生物对紫外线抗性有较大差异。一般抗紫外线的规律是: 干细胞 > 活细胞(湿细胞), 芽孢和孢子 > 营养细胞, G^+ 球菌 > G^- 杆菌, 产色素菌 > 不产色素菌。紫外线对灭活病毒特别有效, 但其他微生物细胞因有 DNA 修复机制, 其灭活作用受到影响(参见第四章第二节“物理诱变剂”部分)。

使用紫外灯杀菌时, 根据 $1\text{W}/\text{m}^2$ 计算剂量。若以面积计算, 30w 紫外灯对 15m^2 的房间消毒, 照射 20~30min, 有效距离为 1m 左右。紫外线对生物组织有刺激作用, 人的皮肤和眼睛接触紫外线后, 会引起红肿疼痛症状, 臭氧会损害呼吸道黏膜, 在使用时要注意防护。

2. 电离辐射

电离辐射主要有 X 射线、 α 射线、 β 射线、 γ 射线。由于这些波长极短 ($<100\text{nm}$) 和能量较高的射线均能引起被作用物质的电离, 故称电离辐射。

α 射线是带有阳电荷的氦原子核的一股射流, 具有很强的电离作用, 但穿透力很弱。 β 射线是中子 \rightarrow 质子时放出带负电荷的射线, 电离作用不太强, 但穿透力比 α 射线强。 γ 射线是由放射性同位素钴 (^{60}Co)、铯 (^{137}Cs)、磷 (^{32}P) 等发射出的高能量、波长极短的电磁波, 穿透力较强, 射程较远, 可致死所有生物。电离辐射对微生物的致死作用并不是对细胞组分的直接破坏, 而是辐射诱发细胞内物质电离, 产生反应活性高的游离基, 后者再与细胞内的生物大分子反应而使细胞失去活力。其作用机制是引起环境和细胞中吸收能量的水分子发生电离, 产生 H^+ 离子和 OH^- 离子, 后者再与液体中的氧分子结合, 产生具有强氧化性的过氧化物 (如 H_2O_2), 作用于细胞蛋白质、酶、DNA, 使蛋白质和酶的巯基 ($-\text{SH}$) 氧化, 发生交联和降解作用, 导致细胞蛋白质变性和酶失活, DNA 和 RNA 发生较大损伤和突变, 直接影响 DNA 复制和蛋白质的合成, 从而造成细胞损伤或死亡。

辐射剂量以戈瑞 (Gy) 表示, 即每公斤被照射物质吸收 1J 的能量为 1Gy。

电离辐射灭菌的特征是被灭菌物品的温度不升高, 因此又称冷灭菌。现已用于不耐热食品的杀菌处理。电离辐射除了用于杀菌外, 还有杀虫、抑制发芽、改良品质等作用。

根据食品保藏的目的不同, 所采用的照射方法有三种。①辐射消毒: 采用适当剂量照射, 杀灭食品中的病原菌, 相当于巴氏杀菌。②辐射防腐: 采用适当剂量照射, 杀死变质菌类, 延长食品保藏期。③辐射灭菌: 采用高剂量照射, 杀灭食品中的一切微生物。

辐射杀菌的 D 值与热力杀菌的 D 值概念不同。前者表示杀灭食品中 90% 的微生物所需要的辐射剂量, 或菌数减少一个对数周期所需要的辐射剂量。

影响辐射效果的因素很多, 主要是微生物的种类, 一般抗电离辐射的规律是: G^+ 菌 $>$ G^- 菌, 芽孢 $>$ 营养体, 酵母菌 $>$ 霉菌, 霉菌 = 细菌营养细胞, 病毒 $>$ 其他微生物类群。非孢子菌、孢子菌和病毒的辐射致死剂量分别为 $0.5\sim 10\text{kGy}$ 、 $10\sim 50\text{kGy}$ 和 $10\sim 200\text{kGy}$ 。

此外微生物的数量、照射时间、氧气、食品的组分和水分、食品的物理状态和包装等都会影响辐射杀灭效果。一般微生物在干燥条件下比在含水环境中更耐电离辐射, 而且在有 O_2 情况下辐射杀菌作用要强于无 O_2 情况。在厌氧条件下, 同种微生物则需较高剂量灭活。同种微生物在不同的基质中所要求的致死剂量差异很大, 因此在辐射处理不同食品时, 杀死微生物所需的辐射剂量差别很大。

(五) 氢离子浓度

1. 微生物生长的 pH 范围

与温度的三基点相类似, 微生物存在最低、最适和最高生长 pH。

根据微生物最适生长 pH 不同, 可将之分为嗜碱微生物和嗜酸微生物。凡是最适生长 pH 偏于碱性范围内的微生物, 称嗜碱微生物, 例如硝化细菌、尿素分解菌、根瘤菌和放线菌等; 有的不在碱性条件下生活, 但能耐碱条件, 称耐碱微生物, 如链霉菌等。凡是最适生长 pH 偏于酸性范围内的微生物, 称嗜酸微生物, 例如硫杆菌属、霉菌和酵母菌等; 其中有的不在酸性条件下生活, 但能耐酸条件, 称耐酸微生物, 如乳酸杆菌、醋酸杆菌、肠杆菌和假单胞菌等。嗜酸微生物在酸性环境中, 细胞膜可以阻止 H^+ 进入细胞。嗜碱微生物在碱性条件下, 可以阻止 Na^+ 进入细胞。

一般而言,多数酵母菌和霉菌喜在偏酸性环境(pH5左右)生活,而多数放线菌则喜在偏碱性环境(pH8左右)生活,多数细菌喜在近中性环境(pH7左右)生活,即适应低pH的能力为霉菌>酵母菌>细菌。在最适pH时,微生物生长繁殖最旺盛。在最低或最高pH环境中,微生物虽能生存和生长,但生长非常缓慢且容易死亡。

2. pH对微生物的作用

①影响微生物对营养物质的吸收。pH引起细胞膜电荷的变化,影响膜的渗透性和膜结构稳定性,以及影响营养物质的溶解度和解离状态(电离度或离子化程度)。②影响代谢反应中各种酶的活性。只有在最适pH时,酶才能发挥最大催化作用,从而影响微生物的正常代谢活动。③不同pH还可引起代谢途径的变化。④pH的变化引起细胞一些成分的被破坏。细胞内的叶绿素、DNA和ATP易被酸性pH破坏,而RNA和磷脂则对碱性pH敏感。⑤影响环境中有害物质如消毒剂的电离度,从而影响消毒剂对微生物的毒性。不利的pH环境使细胞对很多毒剂更为敏感。

(六)氧化还原电位

氧化还原电位又称氧化还原电势(Eh)。环境中Eh与氧分压有关,氧气浓度越高,Eh越高;Eh也受pH的影响,pH低时,Eh高;pH高时,Eh低。标准氧化还原电位(Eh')是pH=7时测得的氧化还原电位。电子从一种物质转移到另一种物质,在这两种成分之间产生的电位差可用仪器测量。常用伏(V)为单位表示Eh的强度。氧化能力强的物质具有较高的Eh,还原能力强的物质具有较低的Eh。在自然环境中,Eh'的上限是+0.82V(环境中存在高浓度O₂),Eh'的下限是-0.42V(富含H₂的环境)。

不同微生物生长所需要的Eh不一样。一般好氧菌在Eh+0.1V以上均可生长,以Eh为+0.3~+0.4V时为适宜;厌氧菌在Eh+0.1V以下生长,如厌氧梭菌需要大约-0.2V才能生长,有一部分厌氧菌可在-0.05V生长;兼性厌氧菌在+0.1V以上进行有氧呼吸,在+0.1V以下时进行发酵;微好氧菌如乳酸杆菌和乳酸乳球菌等,在Eh稍偏低时,+0.05V左右生长良好。

好氧菌在代谢活动时不断消耗培养基中的O₂,并产生抗坏血酸、硫化氢、含巯基(-SH)化合物等还原性物质而使Eh下降。如H₂S可使Eh降至-0.30V。可向培养基中加入高铁化合物等氧化剂和通入氧气或空气,维持适当的Eh,以培养好氧菌;向培养基中加入还原剂,如抗坏血酸、硫化氢、铁、含巯基的二硫苏糖醇、半胱氨酸和谷胱甘肽等可以降低Eh,以培养厌氧菌。

食品中的Eh高低受食品成分的影响,也受空气中氧气的影响。肉中含有的巯基化合物(半胱氨酸、谷胱甘肽等)和蔬菜、水果中含有的还原糖(葡萄糖、果糖等)、抗坏血酸等还原性物质可降低Eh。例如,整块肉的表面Eh值为+0.3V,深层Eh值在-0.2V左右,而搅碎的肉Eh值在+0.2V,所以能在其表面生长的为好氧菌,深部为厌氧菌。植物的汁液Eh值在+0.3~+0.4V,故植物性食品易被好氧菌引起变质。由于霉菌是专性好氧菌,可采用缺氧方法防止食品和粮食的霉变。在密闭容器中加入除氧剂(铁粉、辅料和填充剂)或在真空包装中充入N₂,能抑制好氧菌的生长,但不能抑制厌氧菌和兼性厌氧菌的生长。

第四节 微生物的代谢

代谢是指生物体内各种化学反应的总和,它主要由分解代谢与合成代谢两个过程组成。

分解代谢是指细胞将营养物质降解成小分子物质的过程,并在这个过程中产生能量。合成代谢是指细胞利用简单的小分子物质合成较复杂大分子物质的过程,在这个过程中要消耗能量。合成代谢所利用的小分子物质来源于分解代谢过程中产生的中间产物或环境中的小分子营养物质。合成代谢与分解代谢既有明显的差别,又紧密相关。分解代谢为合成代谢的基础,它们在生物体中偶联进行,相互对立而统一,决定着生命的存在与发展。合成代谢为吸收能量的同化过程,分解代谢为释放能量的异化过程。

一、微生物的能量代谢

(一)微生物的呼吸作用

微生物的生命活动需要的能量来源于微生物的呼吸作用。微生物的呼吸作用是在细胞内酶的催化下,将某种营养物质或同化过程中合成的某些物质氧化,并释放能量,以供给细胞生长所需要的物质和生活所需的能量。因此,呼吸作用包括一系列生物化学反应和能量转移的生物氧化还原过程,亦被称为“产能代谢”或“生物氧化”。

既然微生物的呼吸是氧化和还原过程,在生物氧化过程中,则无论在有氧或无氧情况下,必须有一部分物质被氧化,同时另一部分物质被还原。在微生物细胞中,生物氧化的方式有三种:①物质中加氧,如葡萄糖加氧被彻底分解为 CO_2 和 H_2O ;②化合物脱氢,如乙醇脱氢为乙醛;③失去电子,如 Fe^{2+} 失去电子变成 Fe^{3+} 。

根据最终电子受体(氢受体)的不同,可将微生物的呼吸作用(生物氧化)分为有氧呼吸、无氧呼吸与发酵三种类型。

1. 有氧呼吸

有氧呼吸是指微生物在氧化底物时,以分子氧作为最终电子受体的生物氧化过程,通过有氧呼吸可将有机物彻底氧化并释放出大量能量,能量的一部分储存在 ATP 中,一部分则以热的形式散发。许多异养微生物以有机物作为氧化基质进行有氧呼吸获得能量,而这种呼吸作用必须有脱氢酶、氧化酶以及电子传递系统参与。

以葡萄糖为基质的有氧呼吸可分为两个阶段。第一阶段是葡萄糖在细胞质中经糖酵解途径(EMP 途径)生成丙酮酸;第二阶段是在有氧条件下,丙酮酸进入三羧酸循环(TCA 循环),通过一系列氧化还原反应最后转化为 CO_2 和 H_2O 。在 EMP 途径和 TCA 途径中,脱下的氢或释放出的电子经过电子传递链的传递作用,最后传递到 O_2 ,于是葡萄糖被彻底氧化, O_2 被还原,最终产物为 CO_2 和 H_2O 。需氧菌和兼性菌在有氧条件下可以进行有氧呼吸,同时释放大量的能量。

2. 无氧呼吸

无氧呼吸是指以无机氧化物作为最终电子受体的生物氧化过程。有少数微生物(厌氧菌和兼性厌氧菌)以无机氧化物(如 NO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 CO_2 等)为最终电子受体,进行无氧呼吸。在无氧呼吸过程中,从底物脱下的氢和电子经过呼吸链的传递,最终由氧化态的无机物受氢(电子),并伴随氧化磷酸化作用产生 ATP。底物也可被彻底氧化,但与有氧呼吸相比,产生的能量较少。例如,硝酸盐还原细菌,在无氧条件下葡萄糖被彻底氧化时,以 NO_3^- 作为呼吸链的最终电子受体,在硝酸盐还原酶的作用下,将 NO_3^- 还原成 NO_2^- , NO_2^- 在亚硝酸盐还原酶作用下可再进一步还原成 NO 、 N_2O 直至 N_2 。这是一种异化硝酸盐还原

作用,又称反硝化作用。作为这类无氧呼吸的氧化基质的一般为有机物,如葡萄糖、乙酸等,它们可被彻底氧化成 CO_2 和 H_2O ,并有 ATP 的合成。

3. 发酵

(1)狭义的发酵概念是指在无氧条件下,微生物在产能代谢中最终电子受体是被氧化基质本身所产生的,而未被彻底氧化的中间产物,即有机物既是被氧化的基质,又作为最终电子受体,而且作为最终电子受体的有机物是基质未被彻底氧化的中间产物。在此种发酵过程中,一般由底物脱下的电子和氢交给 NAD(P) ,使之还原成 NAD(P)H_2 ,后者将电子和氢交给作为最终电子受体的中间代谢产物(有机物),完成氧化还原反应,电子的传递不经过细胞色素等中间电子传递体,而是分子内部的转移。由于发酵作用对有机物的氧化不彻底,发酵结果是积累有机物,且产生能量较少。

(2)广义的发酵是在有氧或无氧条件下,利用好氧或兼性厌氧、厌氧微生物的新陈代谢活动,将有机物氧化转化为有用的代谢产物,从而获得发酵产品和工业原料的过程。它包括好氧呼吸、厌氧呼吸和发酵三个方面的过程。因此,微生物中的狭义发酵和工业生产中广义发酵概念的含义是有区别的。

(二)不同呼吸类型的微生物

在呼吸和发酵过程中,根据微生物的呼吸作用不同,所含的呼吸酶系统是否完全,最终电子受体是否是氧,以及微生物与分子氧的关系不同,可将它们分成好氧菌、厌氧菌、兼性厌氧菌、微好氧菌和专性好氧菌五种呼吸类型。

1. 耐氧菌

耐氧菌在有氧条件下进行厌氧生活,生长不需要氧,分子氧对它们也无毒;它们没有呼吸链,细胞内有超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶,但无过氧化氢酶;靠专性发酵获得能量。乳酸菌多数是耐氧菌。例如乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)以及肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)等。

2. 厌氧菌

一般有厌氧菌和专性厌氧菌之分。这类菌只能是无氧或低氧化还原电位的环境下生长,分子氧对它们有毒,即使短期接触空气,也会抑制其生长甚至使之死亡;它们缺乏完整的呼吸酶系统,即细胞内缺乏 SOD 和细胞色素氧化酶,多数还缺乏过氧化氢酶等抗氧化酶,主要靠发酵、无氧呼吸、循环光合磷酸化或甲烷发酵等提供所需能量。常见的厌氧菌有梭菌属、拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、消化球菌属(*Peptococcus*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)等。其中多数产甲烷细菌是极端厌氧菌。

3. 兼性厌氧菌

这类菌在有氧或无氧条件下均能生长,但有氧情况下生长得更好,它们具有需氧菌和厌氧菌的两套呼吸酶系统,细胞含 SOD 和过氧化氢酶;在有氧时靠有氧呼吸产能,无氧时借发酵或无氧呼吸产能。许多酵母菌、肠道细菌、硝酸盐还原菌(如脱氮小球菌),人和动物的病原菌均属此类菌。例如,啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在有氧时进行有氧呼吸,得到细胞产量;在无氧时进行乙醇发酵而用于酒类酿造。肠杆菌科的各种细菌包括大肠杆菌、产气肠杆菌和普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)等都是常见的兼性厌氧菌。

4. 微好氧菌

这类菌只能在较低的氧分压(1~3kPa,正常大气压中的氧分压为 20kPa)下才能正常生长,它们具有完整的呼吸酶系统,通过呼吸链并以氧为最终氢受体而产能。例如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、发酵单胞菌属(*Zymomonas*)、氢单胞菌属(*Hydrogenomonas*)以及少数拟杆菌属的种等属于此类菌。在摇瓶培养时,菌体生长于液面以下数毫米处。

5. 专性好氧菌

这类菌必须在高浓度分子氧的条件下才能生长,它们具有完整的呼吸酶系统,细胞含 SOD 和过氧化氢酶,通过呼吸链并以分子氧作为最终氢受体,在正常大气压下进行好氧呼吸产能。多数细菌、放线菌、真菌属于此类菌。大规模培养好氧菌时,应设法获得更多的空气。一般实验室和工业生产上常用摇瓶振荡或通气搅拌的方法供给充足的氧气。

(三)化能异养微生物的生物氧化

微生物在生命活动过程中主要通过生物氧化反应获得能量。生物氧化是发生在活细胞内的一系列氧化还原反应的总称。生物氧化的类型包括有氧呼吸、无氧呼吸与发酵。多数微生物是化能异养型菌,只能通过降解有机物而获得能量。葡萄糖是微生物最好的碳源和能源,这里以葡萄糖作为微生物氧化的典型底物,它在生物氧化的脱氢阶段中,可通过 EMP 途径、HMP 途径、ED 途径、TCA 循环完成脱氢反应,并伴随还原力[H]和能量的产生。葡萄糖在厌氧条件下经 EMP 途径产生丙酮酸,这是多数厌氧和兼性厌氧微生物进行葡萄糖无氧降解的共同途径。丙酮酸以后的降解,因不同种类微生物具有不同的酶系统,使之有多种发酵类型,可产生不同的发酵产物,即由 EMP 途径、HMP 途径、PK 途径、双歧途径、ED 途径、TCA 循环等代谢途径产生的主要发酵产物,如酒精、甘油、乳酸、丙酸、丁酸、柠檬酸、谷氨酸等。

1. EMP 途径

EMP 途径(embden-meyerhof-parnas pathway)又称糖酵解途径或二磷酸己糖途径。生物体内葡萄糖被降解成丙酮酸的过程称为糖酵解,这是多数微生物共有的基本代谢途径。糖酵解产生的丙酮酸可进一步通过 TCA 循环继续彻底氧化。通过 EMP 途径(图 2-10),1 分子葡萄糖经 10 步反应转变成 2 分子丙酮酸,产生 2 分子 ATP 和 NADH₂ 分子。

在 EMP 途径终反应中,2NADH₂ 在有氧条件下,可经呼吸链的氧化磷酸化反应产生 6ATP;而在无氧条件下,则可将丙酮酸还原成乳酸,或将丙酮酸脱羧成乙醛,后者还原为乙醇。

EMP 途径的特征性酶是 1,6-二磷酸果糖醛缩酶,它催化 1,6-二磷酸果糖裂解生成两个三碳化合物,即 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮。其中磷酸二羟丙酮在丙糖磷酸异构酶作用下转变为 3-磷酸甘油醛。2 个 3-磷酸甘油醛经磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶作用下生成 2 分子丙酮酸。丙酮酸是 EMP 途径的关键产物,由它出发在不同的微生物中可进行多种发酵。EMP 途径是连接 TCA 循环、HMP 途径和 ED 途径等其他重要代谢途径的桥梁,同时也为生物合成提供了多种中间化合物。此外,还可通过 EMP 途径的逆过程合成单糖。

由 EMP 途径中的关键产物丙酮酸出发有多种发酵途径,并可产生多种重要的发酵产品,下面介绍乙醇、甘油、乳酸、丙酸和丁醇等常见的几种发酵类型。

(1) 酵母的酒精发酵

① 酵母 I 型发酵:酵母菌在无氧和酸性条件下(pH3.5~4.5)经 EMP 途径将葡萄糖分

解为丙酮酸,丙酮酸再由丙酮酸脱羧酶作用形成乙醛和 CO_2 ,乙醛作为 NADH_2 的氢受体,在乙醇脱氢酶的作用下还原为乙醇。

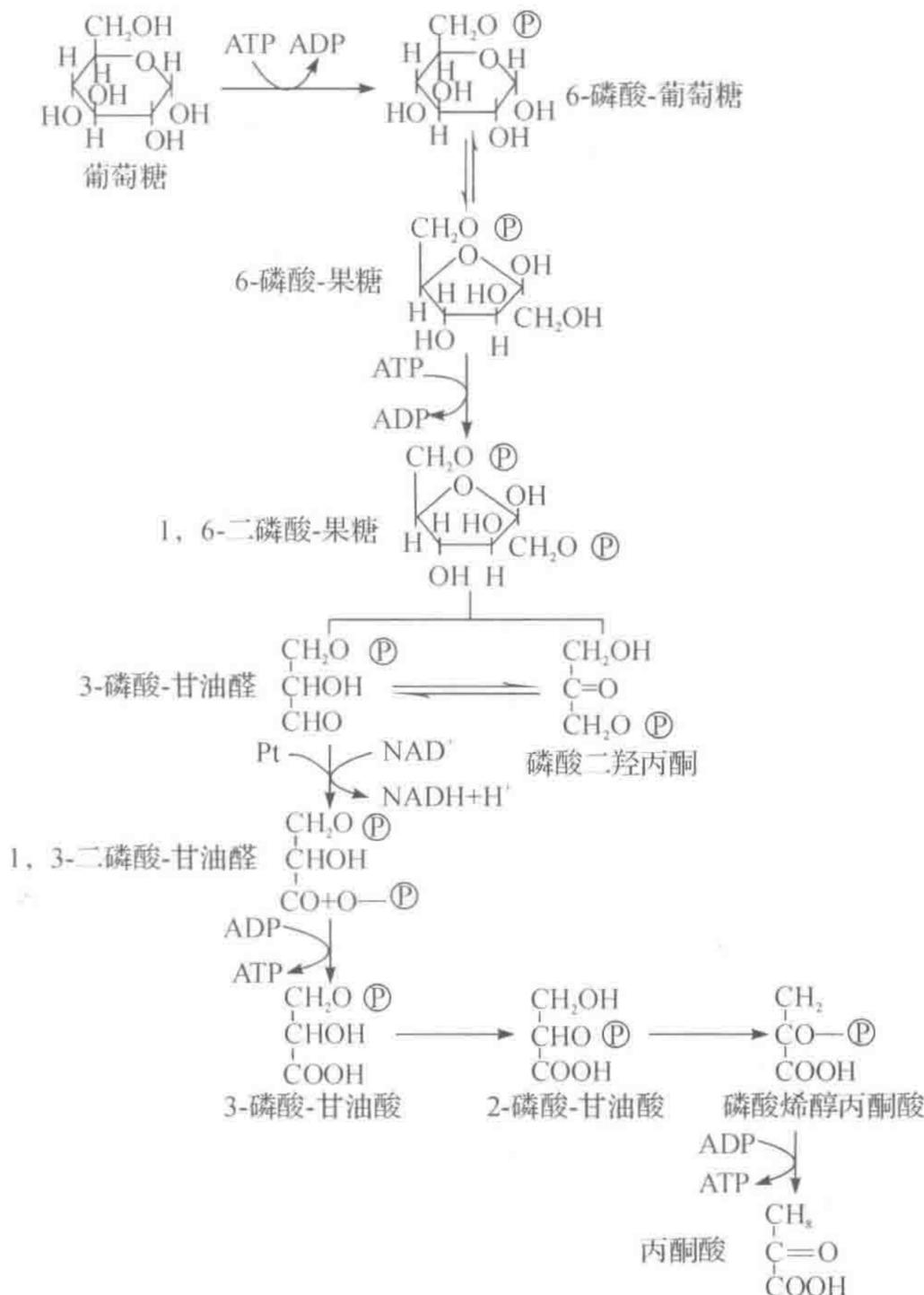


图 2-10 EMP 代谢途径

酵母菌是兼性厌氧菌,在有氧条件下丙酮酸循环彻底氧化成 CO_2 和 H_2O 。如果将氧气通入正在发酵葡萄糖的酵母发酵液中,葡萄糖分解速度下降并停止产生乙醇。这种抑制现象首先由巴斯德观察到,故称为巴斯德效应。在正常条件下,酵母菌的酒精发酵可按上式进行,如果改变发酵条件,还会出现其他发酵类型。

②酵母 II 型发酵:当发酵液中有亚硫酸氢钠时,它可以和乙醛加成生成难溶性硫化羧基乙醛。迫使磷酸二羟丙酮代替乙醛作为氢受体,生成 α -磷酸甘油。后者在 α -磷酸甘油脱氢酶的催化下,再水解脱去磷酸生成甘油,使乙醇发酵变成甘油发酵。

③酵母 III 型发酵:在偏碱性条件下($\text{pH}7.6$),乙醛不能作为氢受体被还原成乙醇,而是两个乙醇分子发生歧化反应,一分子乙醛氧化成乙酸,另一分子乙醛还原成乙醇,使磷酸二羟丙酮作为 NADH_2 的氢受体,还原成 α -磷酸甘油,再脱去磷酸生成甘油,这称为碱法甘油发酵。这种发酵方式不产生能量。

应注意的是采用该法生成甘油时,必须使发酵液保持碱性,否则由于酵母菌产酸使发酵液 pH 降低,使第 III 型发酵回到第 I 型发酵。由此可见,发酵产物会随发酵条件变化而改变。酵母菌的乙醇发酵已广泛应用于酿酒和酒精生产。

(2) 同型乳酸发酵

葡萄糖经乳酸菌的 EMP 途径,发酵产物只有乳酸,称同型乳酸发酵。在 ATP 与相应酶的参与下,一分子葡萄糖经两次磷酸化与异构化生成 1,6-二磷酸果糖,后者随即裂解为 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮,磷酸二羟丙酮转化成 3-磷酸甘油醛后经脱氢作用而被氧化,其释放的电子传至 NAD^+ ,使之形成还原型 NADH_2 。后者又将其接受的电子传递给丙酮酸,在乳酸脱氢酶作用下还原为乳酸。在乳酸发酵中,作为最终电子受体的是葡萄糖不彻底氧化的中间产物——丙酮酸。发酵过程中借基质水平磷酸化生成 ATP,是发酵过程中合成 ATP 的唯一方式,为机体提供可利用的能量。所谓基质水平磷酸化是指在被氧化的基质上发生的磷酸化作用。即基质在其氧化过程中,形成某些含高能磷酸键的中间产物,这类中间产物可将其高能键通过相应酶的作用转给 ADP,生成 ATP。葡萄糖经乳酸菌的 EMP 途径氧化,开始时消耗 ADP,后来产生 ATP,总计每分子葡萄糖净合成 2 分子 ATP。

进行同型乳酸发酵的微生物,有乳酸乳球菌乳酸亚种、乳酸乳球菌乳脂亚种、嗜热链球菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种(旧称保加利亚乳杆菌)、嗜酸乳杆菌等。乳酸发酵广泛应用于食品和农牧业中。泡菜、酸菜、酸牛奶、乳酪以及青贮饲料等都是利用乳酸发酵的发酵制品。由于乳酸菌的代谢活动积累乳酸,酸化环境,抑制其他微生物的生长,能使蔬菜、牛奶、青贮饲料等得以保存。近代工业多以淀粉为原料,经糖化后,利用德氏乳酸杆菌(*L. delbrueckii*)进行乳酸发酵生产纯乳酸。

(3) 丙酸发酵

葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸,丙酮酸羧化形成草酰乙酸,后者还原成苹果酸、琥珀酸,琥珀酸再脱羧产生丙酸。丙酸菌发酵产物中还常有乙酸和 CO_2 。丙酸菌多见于动物肠道和乳制品中。工业上常用傅氏丙酸杆菌和薛氏丙酸杆菌等发酵生产丙酸。丙酸细菌除利用葡萄糖外,也可利用甘油和乳酸进行丙酸发酵。

(4) 丁酸型发酵

能进行丁酸型发酵的微生物主要是专性厌氧的丁酸梭菌、丙酮丁醇梭菌和丁醇梭菌。

①丁酸发酵:丁酸梭菌能进行丁酸发酵,其葡萄糖发酵产物以丁酸为主,还可产生乙酸、 CO_2 和 H_2 等。葡萄糖经 EMP 途径产生的丙酮酸,在辅酶 A 参与下生成乙酰 CoA,再生成乙酰磷酸,在乙酸激酶的催化下,可将磷酸转移给 ADP,生成乙酸和 ATP。由 2 分子丙酮酸产生的 2 分子乙酰 CoA 还可缩合生成乙酰 CoA,并进一步还原生成丁酸。

②丙酮丁醇发酵:丙酮丁醇梭菌能进行丙酮丁醇发酵,它是丁酸发酵的一种。其葡萄糖的发酵产物是以丙酮、丁醇为主,还有乙酸、丁酸、 CO_2 和 H_2 。丙酮和丁醇是重要的化工原料和有机溶剂。丙酮丁醇梭菌具有淀粉酶,发酵生产可以淀粉为原料。淀粉分解为葡萄糖,葡萄糖经 EMP 途径降解为丙酮酸,丙酮酸生成乙酰 CoA,进而合成丙酮和丁醇。丙酮来自乙酰乙酸的脱羧,而丁醇来自丁酸的还原。在丙酮、丁醇发酵过程中,前期发酵主要产生丁酸、乙酸,后期发酵随着 pH 下降,转向积累大量的丙酮、丁醇。

③丁醇发酵:丁醇梭菌能进行丁醇发酵,其葡萄糖主要发酵产物是丁醇、异丙醇、丁酸、乙酸、 CO_2 和 H_2 。异丙醇由丙酮还原而成。

(5) 混合酸发酵

能积累多种有机酸的葡萄糖发酵称为混合酸发酵,又称甲酸发酵。大多数肠道细菌,如大肠杆菌、伤寒沙门氏菌、产气肠杆菌等均能进行混合酸发酵。先经 EMP 途径将葡萄糖分

解为丙酮酸,在不同酶的作用下丙酮酸分别转变成甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸、 CO_2 和 H_2 等。

2. HMP 途径

HMP 途径(hexose-monophosphate-pathway)又称单磷酸己糖途径或磷酸戊糖支路。这是一条能产生大量 NADPH_2 形式还原力和重要中间代谢产物而并非产能的代谢途径。葡萄糖经 HMP 途径而不经 EMP 和 TCA 循环可以得到彻底氧化。

HMP 途径可概括为三个阶段。①葡萄糖分子通过几步氧化反应产生 5-磷酸核酮糖和 CO_2 ;②磷酸核酮糖发生同分异构化而分别产生 5-磷酸核糖和 5-磷酸木酮糖。③上述各种磷酸戊糖在没有氧参与的情况下,发生碳架重排,产生了磷酸己糖和 5-磷酸甘油醛,后者可通过以下两种方式进行代谢。一种方式是进入 EMP 途径生成丙酮酸,再进入 TCA 循环进行彻底氧化,许多微生物利用 HMP 途径将葡萄糖完全分解成 CO_2 和 H_2 。另一种方式是通过二磷酸果糖醛缩酶和果糖二磷酸酶的作用而转化为磷酸葡萄糖。

HMP 途径一次循环需要 6 分子葡萄糖同时参与,其中有 5 分子 6-磷酸葡萄糖再生,用去 1 分子葡萄糖,产生大量 NADPH_2 形式的还原力。具有 HMP 途径的多数好氧菌和兼性厌氧菌中往往同时存在 EMP 途径。单独具有 HMP 途径的微生物少见。HMP 途径和 EMP 途径中的一些中间产物可以交叉转化和利用,以满足微生物代谢的多种需要。

3. PK 途径

PK 途径(phospho-pentose-ketolase pathway)又称磷酸戊糖解酮酶途径。

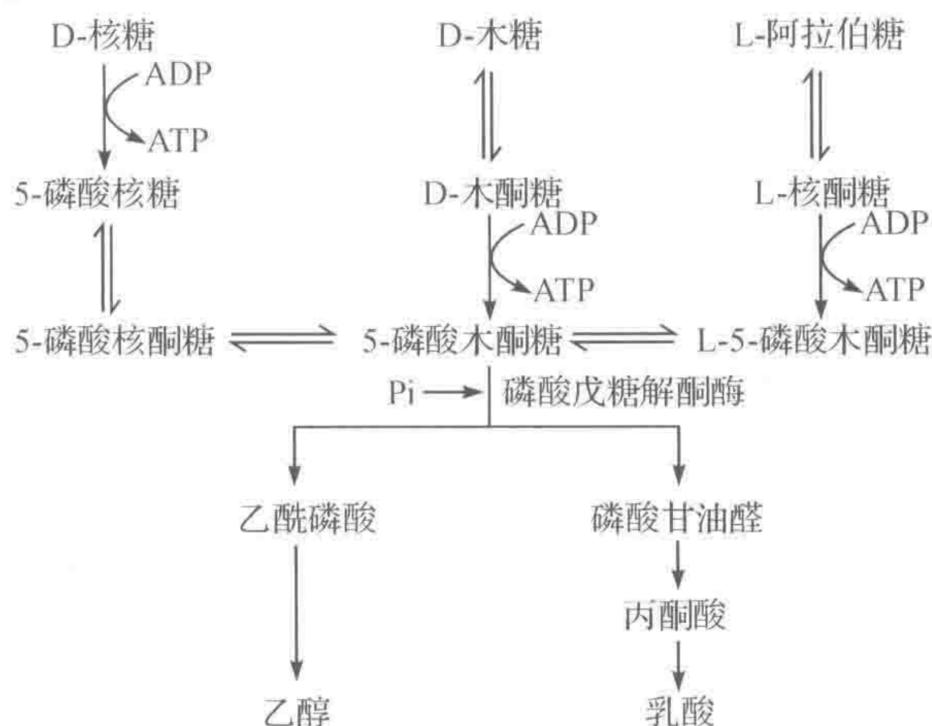


图 2-11 PK 代谢途径

该途径从葡萄糖到 5-磷酸木酮糖均与 HMP 途径相同,然后又在这条途径的关键酶——磷酸戊糖解酮酶的作用下,生成乙酰磷酸和 3-磷酸甘油醛。肠膜明串珠菌分解葡萄糖的典型异型乳酸发酵途径如图 2-11 所示。

通过 PK 途径将 1 分子葡萄糖发酵产生 1 分子乳酸、1 分子乙醇和 1 分子 CO_2 ,并且只产生 1 分子 ATP 和 1 分子 H_2O 。明串珠菌属中的肠膜明串珠菌肠膜亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)、肠膜明串珠菌葡萄糖亚种(*L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*)、肠膜明串珠菌乳脂亚种(*L. mesenteroides* subsp. *cremoris*)和乳酸杆菌属中的短乳酸杆菌(*Lactobacillus brevis*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)、甘露乳杆菌(*L. manitopoenum*)和番茄乳杆菌(*L. lycopersici*)等乳酸菌可通过 PK 途径进行异型乳酸发酵。因为它们既缺乏 EMP 途径

中的关键酶——果糖二磷酸醛缩酶和异构酶,又缺乏 HMP 途径的转酮——转醛酶系,而具有磷酸戊糖解酮酶,故其葡萄糖的降解依赖于 HMP 途径的变异途径——PK 途径。微生物利用不同糖类虽然都进行异型乳酸发酵,但其发酵途径和产物稍有差异。例如,肠膜明串珠菌肠膜亚种通过 PK 途径利用葡萄糖时发酵产物为乳酸、乙醇、 CO_2 ,而利用核糖时的发酵产物为乳酸和乙酸,利用果糖的发酵产物为乳酸、乙酸、 CO_2 和甘露醇等。此外,根霉(*Rhizopus*)亦可进行异型乳酸发酵。

4. 双歧途径

双歧途径(bifidum pathway)是两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、长双歧杆菌(*B. longum*)、短双歧杆菌(*B. breve*)、婴儿双歧杆菌(*B. infantis*)等双歧杆菌分解葡萄糖的非典型异型乳酸发酵途径,这是 EMP 途径的变异途径。双歧杆菌既无醛缩酶,也无 6-磷酸葡萄糖脱氢酶,但有有活性的磷酸解酮酶类,这是双歧途径的关键酶。在双歧途径中,从 2 分子葡萄糖到 2 分子 6-磷酸果糖均与 EMP 途径相同,其中,1 分子 6-磷酸果糖在第一个关键酶——6-磷酸果糖磷酸酮酶(磷酸己糖酮酶)的作用下裂解生成 4-磷酸赤藓糖和乙酰磷酸,乙酰磷酸由乙酸激酶催化为 1 分子乙酸;另 1 分子 6-磷酸果糖则与 4-磷酸赤藓糖反应生成 5-磷酸木酮糖,5-磷酸木酮糖在第二个关键酶——磷酸木酮糖磷酸酮酶(磷酸戊糖解酮酶)的催化下分解成 2 分子 3-磷酸甘油醛和 2 分子乙酰磷酸,2 分子 3-磷酸甘油醛在乳酸脱氢酶催化下生成 2 分子乳酸,而 2 分子乙酰磷酸被乙酸激酶催化为 2 分子乙酸。通过双歧途径可将 2 分子葡萄糖发酵产生 2 分子乳酸和 3 分子乙酸,并产生 5 分子 ATP。

5. ED 途径

ED 途径(enrner-doudoroff pathway)又称为 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸(KDPG)裂解途径。它是少数缺乏完整 EMP 途径的细菌所特有的利用葡萄糖的替代途径。在 ED 途径中,6-磷酸葡萄糖首先脱氢产生 6-磷酸葡萄糖酸,继而在脱水酶和醛缩酶的作用下,产生 1 分子 3-磷酸甘油醛和 1 分子丙酮酸,然后 3-磷酸甘油醛进入 EMP 途径转变成丙酮酸。1 分子葡萄糖经 ED 途径最后生成 2 分子丙酮酸、1 分子 ATP、1 分子 NADPH 和 NADH_2 。

ED 途径的特点是:①葡萄糖经快速反应获得丙酮酸(仅 4 步反应);②6 碳的关键中间代谢产物是 KDPG;③特征性酶是 KDPG 醛缩酶;④特征性反应是 KDPG 裂解生成丙酮酸和 3-磷酸甘油醛;⑤产能效率低,1 分子葡萄糖经 ED 途径分解只产生 1 分子 ATP。

6. 三羧酸循环

三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle)简称 TCA 循环。是指由糖酵解途径生成的丙酮酸在有氧条件下,通过一个包括三羧酸和二羧酸的循环逐步脱羧、脱氢,彻底氧化生成 CO_2 、 H_2O 和 NADH_2 的过程。它是生物体获得能量的有效途径,在多数异养微生物的氧化代谢中起关键作用。

从图 2-12 可知,丙酮酸脱羧后,形成 NADH_2 ,并产生 2C 化合物乙酰 CoA(CH_3COSCoA),它与 4C 化合物草酰乙酸经 TCA 循环的关键酶——柠檬酸合成酶作用,缩合形成 6C 化合物柠檬酸。通过一系列氧化和转化反应,6C 化合物经过 5C 化合物阶段又重新回到 4C 化合物——草酰乙酸,再由草酰乙酸接受来自下一个循环的乙酰 CoA 分子。

TCA 循环中的某些中间代谢产物是各种氨基酸、嘌呤、嘧啶和脂类等生物合成前体物,例如乙酰 CoA 是脂肪酸合成的起始物质; α -酮戊二酸可转化为谷氨酸,草酰乙酸可转化为天冬氨酸,而且这些氨基酸还可转变为其他氨基酸,并参与蛋白质的生物合成。TCA 循环

也是糖类、脂肪、蛋白质有氧降解的共同途径,例如脂肪酸经 β -氧化途径生成乙酰 CoA 可进入 TCA 循环彻底氧化成 CO_2 和 H_2O ;又如丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等经脱氨基作用后,可分别形成丙酮酸、草酰乙酸、 α -酮戊二酸等,它们都可进入 TCA 循环被彻底氧化。因此,TCA 实际上是微生物细胞内各类物质的合成和分解代谢的中心枢纽。

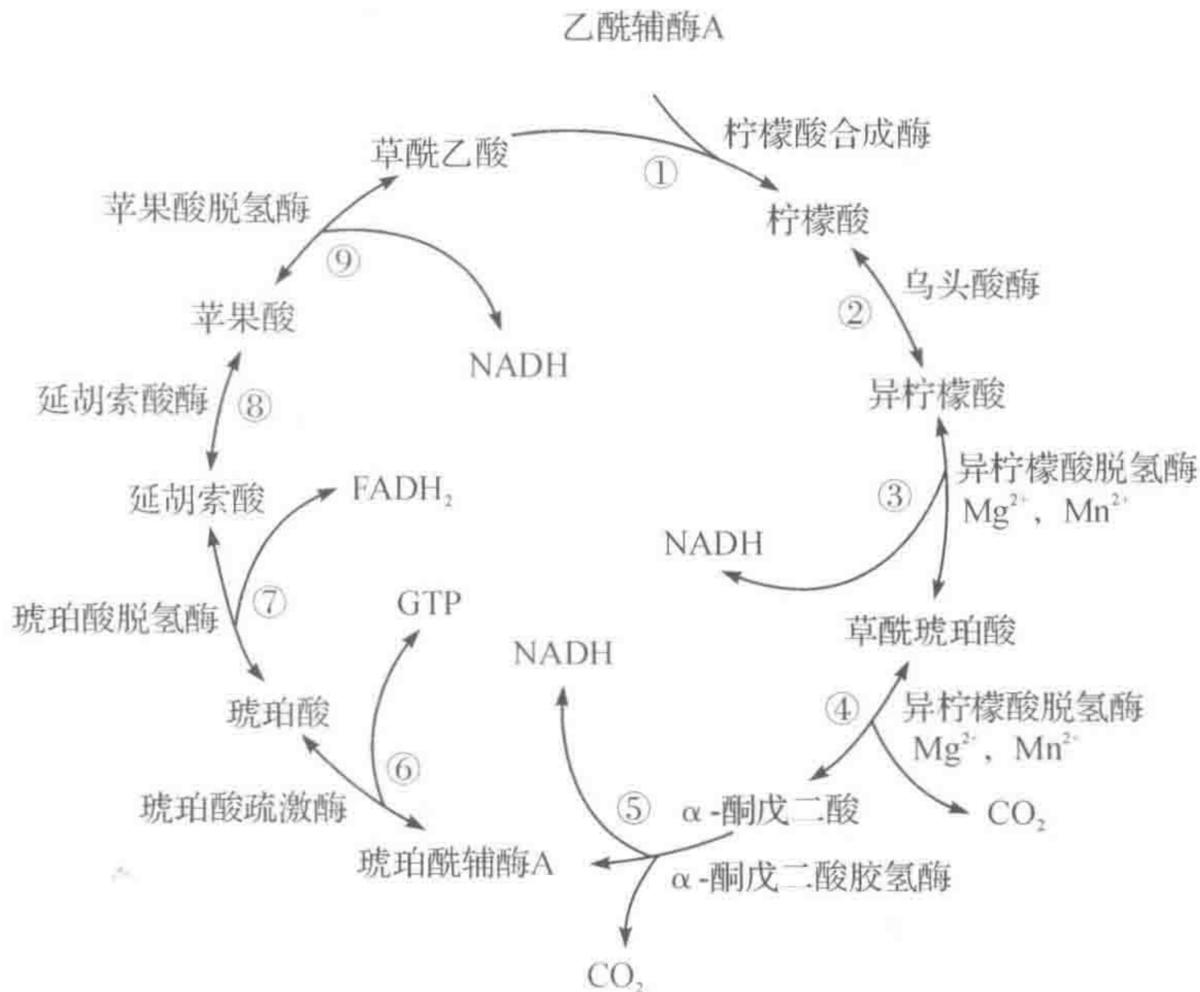


图 2-12 三羧酸循环途径

二、微生物的分解代谢

微生物的代谢活动与动植物食物的加工和贮藏有密切的关系,食品中含有大量糖类、淀粉、纤维素、果胶质、蛋白质和脂肪等物质,可作为微生物的碳素和氮素来源的营养物质。如果环境条件适宜,微生物就能在食品中大量生长繁殖,造成食品腐败变质,同时人们利用有益菌的代谢活动生产发酵食品、药品和饲料等。

微生物对大分子有机物的分解一般可分为三个阶段:第一阶段是将蛋白质、多糖、脂类等大分子营养物质降解成氨基酸、单糖及脂肪酸等小分子物质;第二阶段是将第一阶段的分解产物进一步降解为更简单的乙酰辅酶 A、丙酮酸和能进入 TCA 循环的中间产物,在此阶段会产生能量(ATP)和还原力(NADH 及 FADH_2);第三阶段通过三羧酸循环将第二阶段的产物完全降解成 CO_2 ,并产生能量和还原力。由于分解代谢释放的能量供细胞生命活动使用,因此微生物体内只有进行旺盛的分解代谢,才能更多地合成微生物细胞物质,并使其迅速生长繁殖。可见分解作用在微生物代谢中十分重要。

(一)蛋白质和氨基酸的分解

蛋白质的降解产物通常是作为微生物生长的氮源物质或生长因子。由于蛋白质是由氨基酸以肽键结合组成的大分子物质,不能直接通过菌体细胞膜,故微生物对蛋白质不能直接吸收利用。微生物利用蛋白质时,先分泌蛋白酶至细胞外,将蛋白质水解成为短肽后透过细胞,再由细胞内的肽酶将短肽水解成氨基酸后才被利用。

1. 蛋白质的分解

蛋白质在有氧环境下被微生物分解的过程称为腐化,这时蛋白质可被完全氧化,生成简单的化合物,如 CO_2 、 H_2 、 NH_3 、 CH_4 等。蛋白质在厌氧的环境中被微生物分解的过程称为腐败,此时蛋白质分解不完全,分解产物多数为中间产物,如氨基酸、有机酸等。

蛋白质的降解分两步完成:首先在微生物分泌的胞外蛋白酶的作用下水解生成短肽,然后短肽在肽酶的作用下进一步被分解成氨基酸。根据作用部位的不同,肽酶分为氨肽酶和羧肽酶。氨肽酶作用于有游离氨基端的肽键,羧肽酶作用于有游离羧基端的肽键。肽酶是一种胞内酶,在细胞自溶后释放到环境中。

微生物分泌蛋白酶种类因菌种而异,其分解蛋白质的能力也各不相同。一般真菌分解蛋白质能力强,并能分解天然蛋白质,而多数细菌不能分解天然蛋白质,只能分解变性蛋白以及蛋白质的降解产物,因而微生物分解蛋白质的能力是微生物分类依据之一。

分解蛋白质的微生物种类很多,好氧的如枯草芽孢杆菌、马铃薯芽孢杆菌、假单胞菌等,兼性厌氧的如普通变形杆菌,厌氧的如梭状芽孢杆菌、生孢梭状芽孢杆菌等。放线菌中不少链霉菌均产生蛋白酶。真菌如曲霉属、毛霉属等均具蛋白酶活力。有些微生物只有肽酶而无蛋白酶,因此只能分解蛋白质的降解产物,不能分解蛋白质。例如乳酸杆菌、大肠杆菌等不能水解蛋白质,但可以利用蛋白胨、肽和氨基酸等。故蛋白胨是多数微生物的良好氮源。

在食品工业中,传统的酱制品,如酱油、豆豉、腐乳等的制作也都利用了微生物对蛋白质的分解作用。近代工业已能利用枯草芽孢杆菌、栖土曲霉、放线菌中的费氏放线菌等微生物生产蛋白酶制剂。

2. 氨基酸的分解

微生物利用氨基酸除直接用于合成菌体蛋白质的氮源外,还可分解生成氨、有机酸、胺等物质作为碳源和能源。氨被利用合成各种必需氨基酸、酰胺类等,有机酸可进入三羧酸循环或进行发酵作用等。此外,氨基酸的分解产物对许多发酵食品,如酱油、干酪、发酵香肠等的挥发性风味组分有重要影响。

不同微生物分解氨基酸能力不同。例如,大肠杆菌、变形杆菌属和绿脓假单胞菌几乎能分解所有的氨基酸,而乳杆菌属、链球菌属则分解氨基酸能力较差。由于微生物对氨基酸的分解方式不同,形成的产物也不同。微生物对氨基酸的分解方式主要是脱氨作用和脱羧作用。

(二)脂肪和脂肪酸的分解

脂肪是自然界广泛存在的重要脂类物质。脂肪和脂肪酸作为微生物的碳源和能源,一般被微生物缓慢利用。但如果环境中还有其他容易利用的碳源与能源物质时,脂肪类物质一般不被微生物利用。在缺少其他碳源与能源物质时,微生物能分解与利用脂肪进行生长。由于脂肪是由甘油与三个长链脂肪酸通过酯键连接起来的甘油三酯,因此,它不能进入细胞,细胞内贮藏的脂肪也不可直接进入糖的降解途径,均要在脂肪酶的作用下进行水解。

1. 脂肪的分解

脂肪在微生物细胞合成的脂肪酶作用下(胞外酶对胞外的脂肪作用,胞内酶对胞内脂肪作用),水解成甘油和脂肪酸。

脂肪酶广泛存在于细菌、放线菌和真菌中。如细菌中的荧光假单胞菌、黏质沙雷氏菌(又名灵杆菌)、分枝杆菌等,放线菌中的小放线菌,霉菌中的曲霉、青霉、白地霉等都能分解

脂肪和高级脂肪酸。一般真菌产生脂肪酶能力较强,而细菌产生脂肪酶的能力较弱。脂肪酶目前主要用于油脂、食品工业中,常被用做消化剂并用于乳品增香、制造脂肪酸等。

2. 脂肪酸的分解

多数细菌对脂肪酸的分解能力很弱。但是,脂肪酸分解酶系诱导酶,在有诱导物存在情况下,细菌也能分泌脂肪酸分解酶,而使脂肪酸分解氧化。如大肠杆菌有可被诱导合成脂肪酸的酶系,使含 6~16 个碳的脂肪酸靠基团转移机制进入细胞,同时形成乙酰 CoA,随后在细胞内进行脂肪酸的 β -氧化。

脂肪酸的 β -氧化是脂肪酸分解的一条主要代谢途径,在原核细胞的细胞膜上和真核细胞的线粒体内进行,由于脂肪酸氧化断裂发生在 β -碳原子上而得名。在 β -氧化过程中,能产生大量的能量,最终产物是乙酰 CoA。乙酰 CoA 直接进入 TCA 循环被彻底氧化成 CO_2 和水,或以其他途径被氧化降解。

3. 甘油的分解

甘油可被微生物迅速吸收利用。甘油在甘油酶催化下生成 α -磷酸甘油,后者再由 α -磷酸甘油脱氢酶催化产生磷酸二羟丙酮。磷酸二羟丙酮可进入 EMP 途径或其他途径被进一步氧化。

三、微生物的合成代谢

微生物的合成代谢包括初级代谢产物(如糖类、脂类、蛋白质、氨基酸、核酸、核苷酸等)的合成代谢与次级代谢物(如毒素、色素、抗生素、激素等)的合成代谢。本节重点介绍单糖、氨基酸与核苷酸的生物合成。

(一) 单糖的合成

微生物在生长过程中,需不断将简单化合物合成糖类,以构成细胞生长所需的单糖和多糖。糖类的合成对自养和异养微生物的生命活动十分重要。单糖的合成主要有卡尔文循环(光合菌、某些化能自养菌)、乙醛酸循环(异养菌)、EMP 逆过程(自养菌、异养菌)、糖异生作用、糖互变作用。下面主要介绍由 EMP 逆过程及糖异生作用合成单糖。

1. 由 EMP 逆过程合成单糖

单糖的合成一般通过 EMP 途径逆行合成 6-磷酸葡萄糖,而后再转化为其他糖,故单糖合成的中心环节是葡萄糖的合成。EMP 途径中大多数的酶促反应是可逆的,但由于己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶三个限速酶催化的三个反应过程都有能量变化,因而其可逆反应过程另有其他酶催化完成。

(1)由丙酮酸激酶催化的逆反应由两步反应完成。丙酮酸激酶催化的反应使磷酸烯醇式丙酮酸转移其能量及磷酸基生成 ATP,这个反应的逆过程就需吸收等量的能量,因而构成“能障”。为了绕过“能障”,另有其他酶催化逆反应过程。首先由羧化酶催化,将丙酮酸转变为草酰乙酸,然后再由磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶催化,由草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸。这个过程中需消耗两个高能键(一个来自 ATP,另一个来自 GTP),而由磷酸烯醇式丙酮酸降解为丙酮酸只生成 1 个 ATP。

(2)由己糖激酶和磷酸果糖激酶催化的两个反应的逆行过程。己糖激酶(包括葡萄糖激酶)和磷酸果糖激酶所催化的两个反应都要消耗 ATP。这两个反应的逆行过程:1,6-二磷酸果糖生成 6-磷酸果糖及 6-磷酸葡萄糖生成葡萄糖,分别由两个特异的果糖-2-磷酸酶和葡萄糖-6-磷酸酶水解己糖磷酸酯键完成。

2. 由糖异生作用合成单糖

非糖物质转变为葡萄糖或糖原的过程称为糖异生作用。非糖物质主要有生糖氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸等)、有机酸(乳酸、丙酮酸及三羧酸循环中各种羧酸等)和甘油等。糖异生的途径基本上是 EMP 途径或糖的有氧氧化的逆过程。例如,异养菌以乳酸为碳源时,可直接氧化成丙酮酸,丙酮酸经 EMP 途径的逆反应过程合成葡萄糖、代谢物对糖异生具有调节作用。糖异生原料(如乳酸、甘油、氨基酸等)的浓度高,可使糖异生作用增强。乙酰 CoA 的浓度高低决定了丙酮酸代谢流的方向,如脂肪酸氧化分解产生大量的乙酰 CoA,可抑制丙酮酸生成草酰乙酸,使糖异生作用加强。

(二)氨基酸的合成

微生物细胞内能生物合成所有的氨基酸,其生物合成主要包括氨基酸碳骨架的合成,以及氨基酸的结合两个方面。合成氨基酸的碳骨架主要来自糖代谢(EMP 途径、HMP 途径和 TCA 循环)产生的中间产物,而氮有以下几种来源:①直接从外界环境获得;②通过体内含氮化合物的分解得到;③通过固氮作用合成;④硝酸盐还原作用合成。此外,在合成含硫氨基酸时,还需要硫的供给。氨基酸的合成主要有三种方式。①氨基化作用:指 α -酮酸与氨反应形成相应的氨基酸。例如,谷氨酸的生物合成就是 α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的催化下,以 NAD(P)^+ 为辅酶,直接吸收 NH_4^+ ,通过氨基化反应合成的。②转氨基作用:在转氨酶(又称氨基转移酶)催化下将一种氨基酸的氨基转移给酮酸,生产新的氨基酸的过程。例如,在转氨酶催化下谷氨酸的氨基转移给丙氨酸,使前者生成 α -酮戊二酸,后者生产丙氨酸。③以糖代谢的中间产物为前体物合成氨基酸:21 种氨基酸除了通过上述两种方式合成外,还可通过糖代谢的中间产物,如 3-磷酸甘油醛、4-磷酸赤藓糖、草酰乙酸、3-磷酸核糖焦磷酸等经一系列生化反应而合成。

(三)核苷酸的合成

核苷酸是核酸的基本组成单位,由碱基、戊糖、磷酸所组成。根据碱基成分可将核苷酸分成嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸。嘌呤核苷酸的全合成途径由磷酸核糖开始,然后与谷氨酰胺、甘氨酸、 CO_2 、天冬氨酸等代谢物质逐步结合,最后将环闭合起来形成次黄嘌呤核苷酸(IMP),并继续转化为腺嘌呤核苷酸(AMP)和鸟嘌呤核苷酸(GMP)。

从 IMP 转化为 AMP 和 GMP 的途径,在枯草芽孢杆菌中,分出两条环形路线,GMP 和 AMP 可以互相转变;而在产氨短杆菌中,从 IMP 开始分出的两条路线不是环形的,而是单向分支路线,GMP 和 AMP 不能相互转变。而核苷酸的全合成途径受阻时,微生物可从培养基中直接吸收完整的嘌呤、戊糖和磷酸,通过酶的作用直接合成单核苷酸,所以称为补救途径。嘌呤碱基、核苷和核苷酸之间还能通过分段合成相互转变。

嘧啶核苷酸的生物合成是由小分子化合物全新合成尿嘧啶核苷酸,然后再转化为其他嘧啶核苷酸。脱氧核苷酸的生物合成是由核苷酸糖基第二位碳上的一OH 还原为 H 而成,是一个耗能过程。不同微生物的核苷酸脱氧过程可在不同水平上进行。大肠杆菌脱氧过程是在核糖核苷二磷酸的水平上,而赖氏乳杆菌在核糖核苷三磷酸的水平上进行。DNA 中的胸腺嘧啶脱氧核苷酸是在形成尿嘧啶脱氧核糖核苷二磷酸后,脱去磷酸,再经甲基化生成。

四、微生物代谢的调节

(一)微生物代谢的调节

微生物细胞从环境中不断地吸收营养物质,然后进行分解和合成作用,以满足生长和繁殖的需要,这些分解和合成反应都是在酶的作用下进行的,受到酶的调节。微生物代谢的调节主要依靠酶合成调节与酶活性调节方式控制参与调节的有关酶的合成量和酶的活性。

1. 酶合成的调节

酶合成的调节是通过调节酶的合成量进而调节代谢速率的调节机制。酶的合成受基因和代谢物的双重控制。一方面,酶的生物合成受基因控制,由基因决定酶分子的化学结构;另一方面,酶的合成还受代谢物(酶反应底物、产物及其结构类似物)的控制和调节。当有诱导物时,酶的生成量可以几倍乃至几百倍地增加。相反地,某些酶反应的产物,特别是终产物,又能产生阻遏物,使酶的合成量大大减少。

(1) 诱导作用

凡能促进酶生物合成的现象称为诱导,该酶称为诱导酶。它是细胞为适应外来底物或其结构类似物而临时合成的一类酶,例如*E. coli*在含乳糖培养基中所产生的 β -半乳糖苷酶和半乳糖苷渗透酶等。能促进诱导酶产生的物质成为诱导物,它可以是酶的底物,也可以是底物结构类似物或是底物的前体物质。有些底物类似物比诱导物的作用更强,如异丙基- β -D-硫代半乳糖在诱导 β -半乳糖苷酶生成方面比乳糖的诱导作用要大1000倍。

(2) 阻遏作用

凡能阻碍酶生物合成的现象称为阻遏。阻遏可分为末端代谢产物的阻遏和分解代谢产物的阻遏两种。

①末端代谢产物的阻遏:是指由代谢途径末端产物的过量积累而引起的阻遏,例如,在*E. coli*合成色氨酸中,色氨酸超过一定浓度,有关色氨酸合成的酶就停止合成。

②分解代谢物阻遏:是指培养基中同时存在两种分解代谢底物(两种碳源或氮源)时,微生物细胞利用快的那种碳源(或氮源)阻遏利用慢的那种碳源(或氮源)的有关酶合成的现象。分解代谢物的阻遏作用,并非是快速利用的碳源(或氮源)本身直接作用的结果,而是通过碳源(或氮源)在其分解过程中所产生的中间代谢物所引起的阻遏作用。例如,将*E. coli*培养在含有乳糖和葡萄糖的培养基上,优先利用葡萄糖,并于葡萄糖耗尽后才开始利用乳糖,其原因是葡萄糖分解的中间代谢产物阻遏了分解乳糖酶系的合成。

总之,在代谢途径中某些中间代谢物或末端代谢物的过量积累均会引起阻遏关键酶在内的一系列酶的生物合成,从而更彻底地控制代谢和减少末端产物的合成。

(3) 酶合成的调节机制

酶合成的诱导和阻遏现象可以通过J. Monod和F. Jacob(1961)提出的操纵子假说解释。操纵子由细胞中的操纵基因和临近的几个结构基因组成。

结构基因能够转录遗传信息,合成相应的信使RNA(mRNA),进而再转移合成特定的酶。操纵基因能够控制结构基因作用的发挥。细胞中还有一种调节基因,能够产生一种胞质阻遏物,胞质阻遏物与阻遏物(通常是酶反应的终产物)结合时,由于变构效应,其结构改变,且操纵基因的亲和力变大,而使有关的结构基因不能转录,因此,酶的合成受到阻遏。诱

导物也能与胞质阻遏物结合,使其结构发生改变,减少与操纵基因的亲和力,同时使操纵基因恢复自由,进而使结构基因进行转录,合成 mRNA,再转译合成特定的酶。

2. 酶活性的调节

酶活性的调节是通过改变已有酶的催化活性来调节代谢速率的调节机制。这种调节方式分为激活和抑制两种。

(1) 激活作用

激活是指在分解代谢途径中较前面的中间产物激活参与后面反应的酶的活性,以促使反应加快。例如,粪肠球菌的乳酸脱氢酶活力被 1,6-二磷酸果糖所促进,粗糙脉孢霉的异柠檬酸脱氢酶活力被柠檬酸所促进。

(2) 抑制作用

抑制主要是反馈抑制,当代谢途径中某末端产物过量时可反过来抑制该途径中的第一个酶(调节酶)的活性,以减慢或中止反应,从而避免末端产物的过量积累。例如大肠杆菌在合成异亮氨酸时,当末端产物异亮氨酸过量而积累时,可反馈抑制途径中第一个酶——苏氨酸脱氨酶的活性,从而 α -酮丁酸及其以后的一系列中间代谢物都无法合成,最后导致异亮氨酸合成的停止,避免末端产物过多积累。细胞内的 EMP 途径和 TCA 循环的调控也是通过反馈抑制进行的。

反馈抑制是酶活性调节的主要方式,其特点是使酶暂时失去活性,当末端产物因消耗而浓度降低时,酶的活性又可恢复。因此,酶活性的调节比酶合成的调节要精细、快速。

(3) 酶活性的调节机制

①变构调节:是指某些末端代谢产物与某些酶蛋白活性中心以外的某部分可逆地结合,使酶构象改变,从而影响底物与活性中心的结合,进而改变酶的催化活性。能够在末端产物的影响下改变构象的酶,称为变构酶。末端产物与活性中心的结合是可逆的,当末端产物的浓度降低时,末端产物与酶的结合随之解离,从而恢复了酶蛋白的原有构象,使酶与底物结合而发生催化作用。

变构酶的作用程序:专一性的代谢物(变构效应物)与酶蛋白表面的特定部位(变构部位)结合→酶分子的构象变化(变构转换)→活力中心修饰→抑制或促进酶活性。

②修饰调节:又称共价调节,在某种修饰酶催化下,调节酶多肽链上一些基团可与某种化学基团发生可逆的共价结合,从而改变酶的活性。在共价修饰过程中,不同酶的催化作用使酶蛋白某些氨基酸残基上增、减基团,酶蛋白处于有活性(高低活性)和无活性(或低活性)的互变状态,从而调节酶的活化或抑制。修饰调节是微生物代谢的重要调节方式,有许多处于分支代谢途径,对代谢流量起调节作用的关键酶属于共价调节酶。目前已知有多种类型的可逆共价调节蛋白:磷酸化/去磷酸化,乙酰化/去乙酰化,腺苷酰化/去腺苷酰化,甲基化/去甲基化等。示例如下:

原核细胞中:低活性状态←(腺苷酰化)酶←谷氨酰胺合成酶→(去腺苷酰化)酶→高活性状态。

真核细胞中:低活性状态←(去磷酸化)酶←丙酮酸脱氢酶→(磷酸化)酶→高活性状态。

共价修饰与变构调节区别:共价修饰对酶活性调节是酶分子共价键发生了变化,即酶的一级结构发生了变化;而在变构调节中酶分子只是单纯的构象变化。另外,共价修饰对调节信号具有放大效应,其催化效率比变构调节要高。

除上述调节之外,酶活性还受到多种离子和有机分子(抑制剂或激活剂)的影响,尤其是特异的蛋白质激活剂和抑制剂在酶活性的调节中起重要作用。

五、微生物的次级代谢

(一)次级代谢与次级代谢产物

一般将微生物从外界吸收各种营养物质,通过分解代谢与合成代谢,生成维持生命活动所需要的物质和能量的过程,称为初级代谢。初级代谢产物是指微生物生长繁殖所必需的代谢产物。如醇类、氨基酸、脂肪酸、核苷酸以及由这些化合物聚合而成的高分子化合物(多糖、蛋白质、脂类和核酸等)。与食品有关的微生物初级代谢产物有酸类、醇类、氨基酸和维生素等。次级代谢是相对于初级代谢而提出的一个概念,是指微生物在一定的生长时期,以初级代谢产物为前体物质,通过支路代谢合成一些对自身的生命活动无明确功能的物质的过程。由次级代谢产生的与微生物生长繁殖无关的产物即为次级代谢产物。它们大多数是分子结构比较复杂的化合物,如抗生素、生物碱、毒素、色素、激素等。与食品有关的次级代谢产物有抗生素、毒素、色素等。

1. 抗生素

抗生素是生物在代谢过程中产生的(以及通过化学、生物或生物化学方法所衍生的)以低微浓度选择性地作用于他种生物机能的一类天然有机化合物。已发现的抗生素大部分为能选择性地抑制或杀死特定的某些种类微生物的物质,因此也曾称为抗菌素,是现代医疗中经常使用的重要药物。抗生素主要来源于微生物,特别是某些放线菌、细菌和真菌。如灰色放线菌产生链霉素,金色放线菌产生金霉素,纳他链霉菌(*Streptomyces natalensis*)产生纳他霉素等。霉菌中点青霉和产黄青霉产生青霉素,展开青霉和里青霉产生灰黄霉素等。一些细菌如枯草芽孢杆菌产生枯草菌素、乳酸乳球菌(旧称乳酸链球菌)产生乳链球菌素(nisin)等。

2. 毒素

某些微生物在代谢过程中,能产生某些对人和动物有毒害的物质,这些物质称为毒素。能产生毒素的微生物在细菌和霉菌中较为多见。细菌产生的毒素可分为外毒素和内毒素两种,而霉菌只产生外毒素,为真菌毒素。细菌外毒素是某些病原细菌(主要是 G^+ 菌)在生长过程中合成并不断分泌到菌体外的毒素蛋白质;真菌毒素是某些产毒霉菌在适宜条件下产生的能引起人或动物病理变化的次级代谢产物。外毒素的毒性较强,但多数不耐热(金黄色葡萄球菌肠毒素、黄曲霉毒素除外),加热 70°C 毒力即被减弱或破坏。能产生外毒素的微生物包括病原细菌和霉菌中某些种,如破伤风芽孢杆菌、肉毒梭菌、白喉杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌等 G^+ 菌,霍乱弧菌、绿脓杆菌、鼠疫杆菌等 G^- 菌,以及黄曲霉、寄生曲霉、青霉、镰刀酶等。内毒素即 G^- 菌细胞壁的脂多糖(LPS)部分,只有在菌体自溶时才会释放出来。内毒素毒性较外毒素弱,但多数较耐热,加热 $80\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、1h才被破坏。能产生内毒素的病原菌包括肠杆菌科的细菌(如致病性大肠杆菌、沙门氏菌等)、布鲁氏杆菌和结核分枝杆菌等。

3. 色素

许多微生物在培养过程中能合成一些带有不同颜色的代谢产物,即色素。色素或积累于细胞内,或分泌到细胞外。根据它们的性质可分为水溶性色素和脂溶性色素。产生的水溶性色素使培养基着色,如绿脓菌色素、蓝乳菌色素、荧光菌的荧光素等。有的产生脂溶性

色素,使菌落呈各种颜色,如黏质沙雷氏菌的红色素,金黄色葡萄球菌的金黄色素等。还有一些色素,既不溶于水,也不溶于有机溶剂,如酵母和霉菌的黑色素和褐色素等。真菌和放线菌产生的色素更多。有的色素可用于食品,如红曲霉属(*Monascus*)的紫红色素等。

4. 激素

某些微生物能产生刺激动物生长或性器官发育的一类生理活性物质,称为激素。目前已经发现微生物能产生 15 种激素,如赤霉素、细胞分裂素、生长刺激素等。生长刺激素是由某些细菌、真菌、植物合成,能刺激植物生长的一类生理活性物质。已知有 80 多种真菌能产生吲哚乙酸,例如,真菌中的茭白黑粉菌能产生吲哚乙酸;赤霉菌(禾谷镰刀菌的有性世代)所产生的赤霉素是目前广泛应用的植物生长刺激素。

(二) 次级代谢的调节

1. 次级代谢与初级代谢的关系

次级代谢与初级代谢关系密切,初级代谢的关键性中间产物往往是次级代谢的前体。比如糖降解过程中的乙酰 CoA 是合成四环素、红霉素的前体物;次级代谢一般在菌体对数生长后期或稳定期进行,但也会受到环境条件的影响。质粒与次级代谢关系密切,其遗传物质控制着多种抗生素的合成。

2. 初级代谢对次级代谢的调节

初级代谢与次级代谢均有代谢调节的控制,但由于次级代谢产物是以初级代谢产物为母体衍生出来的,因此次级代谢必然会受初级代谢的调节控制。如青霉素的合成会受到赖氨酸的强烈抑制,而赖氨酸合成的前体 α -氨基己二酸可以缓解赖氨酸的抑制作用,并能刺激青霉素的合成。这是因为 α -氨基己二酸是合成青霉素和赖氨酸的共同前体。如果赖氨酸过量,它会抑制这个反应途径中的第一个酶,减少 α -氨基己二酸的产量,从而进一步影响青霉素的合成。

3. 碳、氮代谢产物的调节

次级代谢产物一般在菌体对数生长后期或稳定期合成。这是因为在菌体生长阶段,被快速利用的碳源或氮源分解产物阻遏了次级代谢酶系的合成。只有在对数生长后期或稳定期,这类碳源或氮源被消耗殆尽之后,阻遏作用解除,次级代谢产物才得以合成。如葡萄糖分解物阻遏了青霉素环化酶的合成,使它不能将 α -氨基己二酸—半胱氨酸—缬氨酸三肽转化为青霉素 G。

4. 诱导作用及产物的反馈阻遏或抑制

次级代谢也有诱导作用。例如,巴比妥虽不是利福霉素的前体物,也不参与利福霉素的合成,但能促进利福霉素 SV 转化为利福霉素 B。同时,次级代谢产物的过量积累可反馈阻遏关键酶的生物合成或反馈抑制关键酶的活性。例如,青霉素的过量积累可反馈阻遏合成途径中第一个酶的合成量;霉酚酸的过量积累能反馈抑制合成途径中最后一步转甲基酶的活性。

第五节 微生物的遗传

微生物遗传学是研究和揭示微生物遗传变异规律的一门学科。遗传性和变异性是微生物最基本的属性之一。所谓遗传性就是在一定环境条件下,微生物性状相对稳定,能把亲代

性状传给子代,维持其种属的性状,从而保持物种的延续。在某些条件下,由于微生物遗传物质的结构变化,而引起某些相应性状发生改变的特性,称为变异性。这种变异性是可遗传的。遗传性和变异性的关系:遗传中有变异,变异中有遗传。遗传和变异是一对既互相对立,又同时并存的矛盾。没有变异,生物界就失去进化的材料,遗传只能是简单的重复;没有遗传,变异不能积累,变异就失去意义,生物也就不能进化。

研究微生物的遗传变异具有重大的理论与实践意义。对微生物遗传变异特性的深入研究,特别是随着各种微生物基因组全序列测定的完成,使人们在基因组水平全面深刻认识微生物遗传变异规律及其多样性,从而有目的定向利用丰富的微生物资源,创造出更多具有生产性能优良的菌种,使之在相同发酵或培养条件下,达到优质高产,更好地造福于人类。

一、遗传的物质基础

20世纪50年代前后,人们以微生物为研究对象,用三个著名的实验证明了DNA才是一切生物遗传变异的物质基础。

(一)三个经典实验

1. 经典转化实验

1928年,细菌学家 F. Griffith 以肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) (旧称肺炎双球菌)为研究对象进行转化实验。肺炎链球菌是一种球形细菌,常成双或成链排列,可使人患肺炎和小白鼠患败血症致死。它有两种不同菌株,一种为有荚膜的致病菌株,菌落表面光滑,故称 S 型菌株;另一种不形成荚膜,菌落外观粗糙,称为 R 型菌株。将加热杀死的 S 型细菌注入小鼠体内后,小鼠并不死亡,也不能从小鼠体内分离出肺炎球菌;但是将加热杀死的 S 型细菌和少量活的 R 型细菌一起注入小鼠体内,却意外发现小鼠死亡,并从死小鼠体内分离出活的 S 型细菌(图 2-13)。对这一现象的合理解释是:在 S 型细菌细胞内可能存在一种具有遗传转化能力的物质,它能够通过某种方式进入 R 型细胞,并使 R 型细菌获得表达 S 型荚膜性状的遗传特性。1944年, O. T. Avery、C. M. MacLeod 和 M. McCarty 从热死的 *S. pneumoniae* 中提纯了几种有可能作为转化因子的成分,并深入到离体条件下进行转化实验。从活的 S 型菌株中抽提各种细胞成分(DNA、蛋白质、荚膜多糖等),而后对各种生化组分进行转化试验。其实验结果是转化组分中有较完整的 DNA,使实验组的小鼠均患败血症而死亡。这表明只有 S 型菌株的 DNA 才能将肺炎链球菌的 R 型菌株转化为 S 型;而且 DNA 纯度越高,其转化效率也越高,甚至只取用 6×10^{-8} g 的纯 DNA 时,仍保持转化活力。这有力地说明了 S 型菌株转移给 R 型菌株的绝不是遗传性状(指荚膜多糖)本身,而是以 DNA 为物质基础的遗传信息。

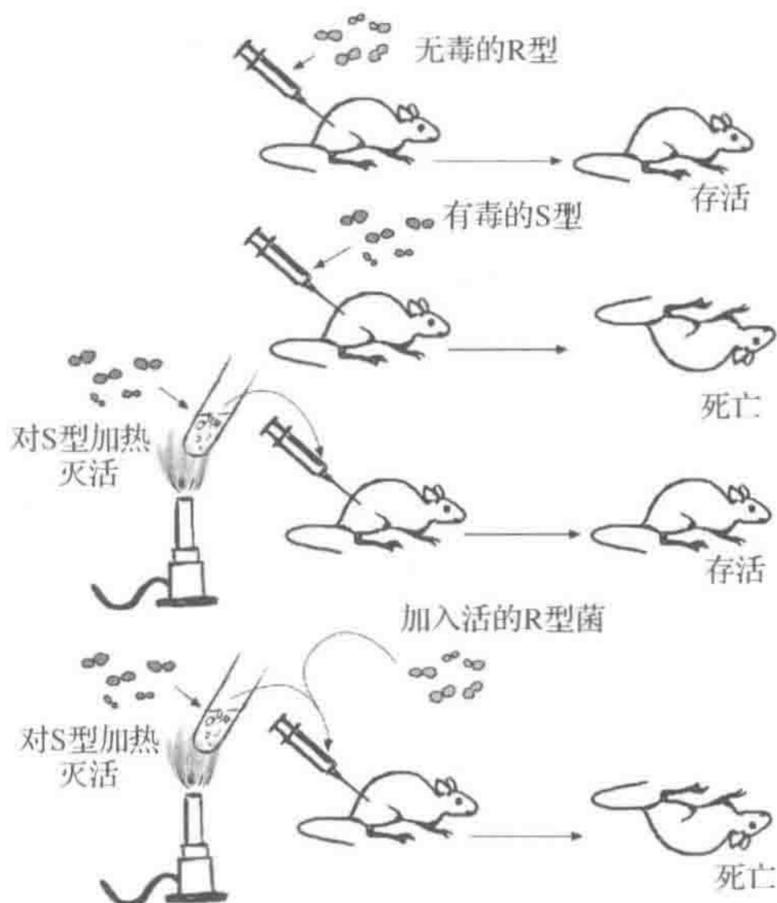


图 2-13 肺炎链球菌转化试验

2. 噬菌体感染实验

1952年, A. D. Hershey 和 M. Chase 发表了证实 DNA 是噬菌体的遗传物质基础的著名实验——噬菌体感染实验(图 2-14)。首先, 将大肠杆菌(*E. coli*)培养在以放射性 ^{32}P 作为磷源或以放射性 ^{35}S 作为硫源的组合培养基中, 从而制备出含 ^{32}P -DNA 核心的噬菌体或含 ^{35}S -蛋白质外壳的噬菌体。接着, 将这两种不同标记的病毒分别与其宿主大肠杆菌混合。由图 2-14 可见, 在噬菌体感染过程中, ^{35}S 标记的实验组多数放射活性留在宿主细胞的外面, 其蛋白质外壳未进入宿主细胞; ^{32}P 标记的实验组多数放射活性进入宿主细胞的里面。由此可知, 进入宿主细胞的是 DNA。虽然只有噬菌体的 DNA 进入了宿主细胞, 但却有自身的增殖、装配能力, 最终会产生一大群既有 DNA 核心, 又有蛋白质外壳的完整子代噬菌体。这充分证明, 在噬菌体的 DNA 中, 存在着包括合成蛋白质外壳在内的整套遗传信息。

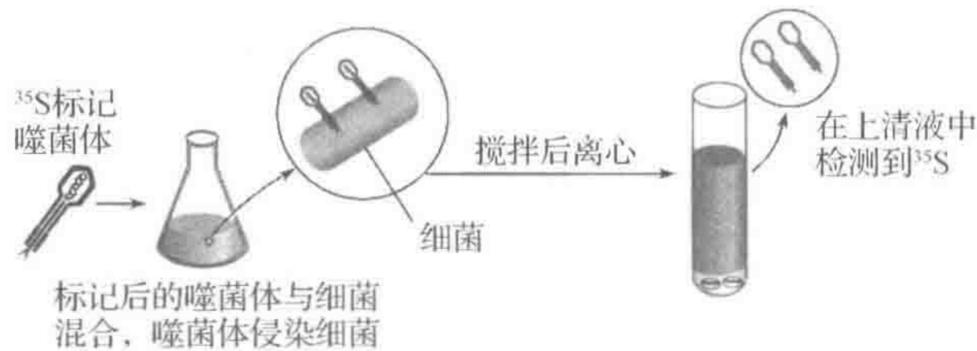


图 2-14 噬菌体感染试验

3. 植物病毒的拆分和重建实验

为了证明核酸是遗传物质, H. Fraenkel-Conrat 在 1956 年用含 RNA 的烟草花叶病毒 (TMV) 进行著名的植物病毒的拆分和重建实验。将 TMV 置于一定浓度的苯酚溶液中振荡, 使其蛋白质外壳与 RNA 核心相分离。结果发现裸露的 RNA 也能感染烟草, 并使其患典型症状, 而且在病斑中还能分离到完整的 TMV 粒子。当然, 由于提纯的 RNA 缺乏蛋白质外壳的保护, 故感染频率比正常 TMV 粒子低些。实验中, 还选用了另一株与 TMV 近缘的霍氏车前花叶病毒 (HRV), 其外壳蛋白的氨基酸组成与 TMV 只存在 2~3 个氨基酸的差别。试验的过程是这样的: ①用表面活性剂处理 TMV, 得到它的蛋白质; ②用弱碱处理 HRV 得到它的 RNA; ③通过重建获得杂种病毒; ④TMV 抗血清使杂种病毒失活, HRV 抗血清不使它失活, 证实杂种病毒的蛋白质外壳来源是 TMV, 病毒重建成功; ⑤杂种病毒感染烟草产生 HRV 所特有的病斑, 说明杂种病毒的感染特性是由 HRV 的 DNA 所决定, 而不是二者的融合特征; ⑥从病斑中再分离得到的子病毒的蛋白质外壳是 HRV 蛋白质, 而不是 TMV 的蛋白质外壳。以上实验结果说明杂种病毒的感染特征和蛋白质的特性是由它的 RNA 所决定, 而不是由蛋白质所决定, 遗传物质是 RNA。

(二) 遗传物质存在的七个水平

1. 细胞水平

在细胞水平上, 真核微生物和原核生物的大部分 DNA 都集中在细胞核或核质体中。

2. 细胞核水平

真核生物的细胞核与原核生物细胞的核区都是该种微生物遗传信息的最主要装载者, 被称为核基因组、核染色体组或简称基因组。除核基因组外, 在真核生物(仅酵母菌的 $2\mu\text{m}$ 质粒例外, 在核内)和原核生物的细胞质中, 多数还存在一类 DNA 含量少、能自主复制的核外染色体。原核细胞的核外染色体通称为质粒。

3. 染色体水平

不同微生物的染色体数差别很大,如米曲霉单倍体染色体数为 7,大肠杆菌为 1,啤酒酵母为 17。原核微生物如细菌一般为单倍体(1 个细胞中只有 1 套染色体),真核微生物如啤酒酵母的营养细胞及霉菌的接合子为二倍体(1 个细胞中含有 2 套功能相同的染色体)。

4. 核酸水平

多数生物的遗传物质为双链 DNA,只有少数病毒,如大肠杆菌的 ϕ X174 和 fd 噬菌体等为单链 DNA。双链 DNA 有的呈环状(如原核生物和部分病毒),有的呈线状(部分病毒),而有的细菌质粒 DNA 则呈超螺旋状(麻花状)。真核生物的 DNA 总与缠绕的组蛋白同时存在,而原核生物的 DNA 却单独存在。

5. 基因水平

基因是生物体内具有自主复制能力的最小遗传功能单位。其物质基础是一条以直线排列、具有特定核苷酸序列的核酸片段。众多基因构成了染色体,每个基因长度大体在 1000~1500bp 范围。从基因功能上看,原核生物的基因是通过操纵子及其调节基因共同构成的调控系统而发挥作用,每一操纵子又包括结构基因、操纵基因和启动基因(又称启动子或启动区)。结构基因是决定某一多肽链结构的 DNA 模板;操纵基因与结构基因紧密连锁并通过与相应阻遏物的结合与否,控制是否转录结构基因;启动基因既是 DNA 多聚酶的结合部位,又是转录的起始位点。操纵基因和启动基因不能转录 mRNA。调节基因能调节操纵子中结构基因的活动。调节基因能转录出自己的 mRNA,并经转译产生阻遏物(阻遏蛋白),后者能识别并附着在操纵基因上。由于阻遏物和操纵基因的相互作用可使 DNA 双链无法分开,阻碍了 RNA 聚合酶沿着结构基因移动,使结构基因不能表达。

6. 密码子水平

遗传密码是指 DNA 链上决定多肽链中各具体氨基酸的特定核苷酸排列顺序。遗传密码的信息单位是密码子,每一密码子由 mRNA 上 3 个核苷酸序列(三联体)组成,除决定特定氨基酸的密码子外,还有不代表任何氨基酸的“无意义密码子”(如 UAA、UAG 和 UGA 仅表示转译中的终止信号)。

7. 核苷酸水平

核苷酸单位(碱基单位)是一个最低突变单位或交换单位,基因是遗传的功能单位,密码子是信息单位。在多数生物的 DNA 中,均只含腺苷酸(AMP)、胸苷酸(TMP)、鸟苷酸(GMP)和胞苷酸(CMP)4 种脱氧核苷酸,但也有少数例外。

(三) 微生物的基因组

基因组(genome)是指存在于细胞或病毒中的所有基因,它通常是指单倍体细胞的全部一套基因。由于现在发现许多非编码的 DNA 序列具有重要功能,因此目前基因组的含义实际上是指细胞质编码基因与非编码的 DNA 序列组成的总称,包括编码蛋白质的结构基因、调控序列,以及目前功能尚不清楚的 DNA 序列。不同生物的 DNA 长度,即基因组的大小各不相同,一般可用 bp(base pair,碱基对)和 Mb(mega bp,百万或兆碱基对)为单位表示基因组大小。真核与原核微生物的基因组都比较小,最小的大肠杆菌 MS2 噬菌体只有 3000bp,3 个基因(通常以 1000~1500bp 为 1 个基因计)。微生物基因组随种类不同而表现出多样性,下面分别以大肠杆菌和啤酒酵母为代表介绍常见微生物的基因组。

1. 大肠杆菌的基因组

大肠杆菌基因组为双链环状的 DNA 分子,其长度是菌体长度的 1000 倍,所以 DNA 分子是以紧密缠绕成较致密的不规则小体(拟核)形式存在于细胞中,其上结合有类组蛋白蛋白质和少量 RNA 分子,在细胞中基因组执行着复制、重组、转录、翻译以及复杂的调节过程。1997 年由 Wisconsin 大学的 Blattner 等人完成了大肠杆菌全基因组的测序工作。

大肠杆菌基因组的大小为 4.7×10^6 bp,4288 个基因,与其他原核微生物的基因数基本接近,说明这些微生物的基因组 DNA 绝大多数是可编码的序列,不含有内含子。大肠杆菌总共有 2584 个操纵子,基因组测序推测出 2192 个操纵子,如此多的操纵子结构可能与原核基因表达大多采用转录调控有关。此外,由 16S rRNA、23S rRNA、5S rRNA 这 3 种 RNA 组建了核糖体,它们在核糖体中的比例为 1:1:1。多数情况下结构基因在基因组中是单拷贝的,但是编码 rRNA 的基因 *rrn* 是多拷贝的,大肠杆菌有 7 个 rRNA 操纵子,7 个 *rrn* 操纵子中就有 6 个分布于 DNA 的双向复制起点 *oric* 附近,这有利于 rRNA 的快速装配,以便在急需蛋白质的合成时短时间内大量生成核糖体。原核生物基因组存在一定数量的重复序列,但与真核生物相比少得多,而且重复的序列亦较短,一般为 4~40bp。

2. 啤酒酵母的基因组

1996 年由欧洲、美国、加拿大和日本共 96 个实验室的 633 位科学家共同首次完成了啤酒酵母这一真核生物的全基因组的测序工作。该基因组大小为 13.5×10^6 bp,5800 个基因分布在 16 个不连续的染色体中,其 DNA 与 4 种主要组蛋白(H_2A 、 H_2B 、 H_3 、 H_4)结合构成染色体。染色体 DNA 上有着丝粒和端粒,没有操纵子结构,但有内含子序列。啤酒酵母的基因组最显著的特点是高度重复,如 tRNA 的基因在每个染色体上至少有 4 个,多则 30 多个,总共约有 250 个拷贝(大肠杆菌约 60 个拷贝),tRNA 的基因只位于 XII 号染色体的近端粒处,每个长 9137bp,有 100~200 个拷贝。此外,啤酒酵母基因组中有许多较高同源性的 DNA 重复序列。如此高度重复的序列是啤酒酵母的一种进化策略,如果少数基因突变失去功能,则可不影响其生命活动,并能适应复杂多变的环境。

真核微生物和原核微生物的基因组差别较大。前者一般无操纵子结构,但存在大量非编码序列和高度重复序列,由于基因有许多内含子(非编码序列),从而使编码序列变成不连续的外显子(可编码序列)状态;后者有操纵子结构,但绝大多数原核微生物不含有内含子,遗传信息的编码序列是连续的,而且重复序列较少。

(四)原核微生物的质粒

1. 质粒定义

质粒是游离并独立存在于染色体以外,能进行自主复制的细胞质遗传因子,通常以共价闭合环状(简称 CCC)的超螺旋双链 DNA 分子形式,存在于各种微生物细胞中。

2. 质粒的主要特性

(1)可自主复制和稳定遗传。质粒能在细胞质中自主复制,并能将质粒转移到子代细胞中,可维持许多代。

(2)为非必需的基因。质粒携带某些核基因组中所缺少的基因,控制细菌获得某些对其生存非必需的性状,失去质粒的细菌仍可存活。但在特殊条件下赋予细菌特殊功能,使其得到生长优势。例如抗药性质粒和降解性质粒,能使宿主细胞在相应药物或化学毒物环境中生存,并在细胞分裂时稳定传给子代细胞。

(3)可转移。某些质粒可以较高的频率($>10^{-6}$)通过细胞间的接合、转化等方式,由供体细胞向受体细胞转移。

(4)可整合。在一定条件下,质粒可以整合到染色体 DNA 上,并可重新脱落下来。

(5)可重组。不同质粒或质粒与染色体上的基因可以在细胞内或细胞外进行交换重组,并形成新的重组质粒。

(6)可消除。如果质粒的复制受到抑制而核染色体的复制仍继续进行,则引起子代细胞不带质粒。质粒消除可自发产生,也可用一定浓度的吖啶橙染料或丝裂霉素 C、溴化乙啶、利福平、重金属离子以及紫外线或高温等处理消除细胞内的质粒。

3. 质粒的种类

根据质粒所编码的功能和赋予宿主的表型效应,可将其分为以下几类。

(1)F 质粒:又称致育因子(F 因子)。其大小约 100kb,这是最早发现与大肠杆菌接合作用有关的质粒。携带 F 质粒的菌株称为 F^+ 菌株(相当于雄性),无 F 质粒的菌株称为 F^- 菌株(相当于雌性)。F 质粒整合到宿主细胞染色体上的菌株称之为高频重组菌株(简称 Hfr)。由于 F 因子能以游离状态(F^+)和以与染色体相结合的状态(Hfr)存在于细胞中,所以又称之为附加体。当 Hfr 菌株上的 F 因子通过重组回复成自主状态时,有时可将其相邻的染色体基因一起切割下来,而成为携带某一染色体基因的 F 质粒,如 F-lac、F-gal 等,因此将这些携带不同基因的 F 质粒统称为 F' ,常用 F' 表示带有 F' 质粒的菌株。

(2)抗性质粒:又称抗性因子(R 因子),简称 R 质粒,主要包括抗药性和抗重金属两大类。带有抗药性质粒(如 R1 质粒)的细菌对氯霉素、链霉素、磺胺、氨基青霉素和卡那霉素具有抗性,R 质粒能使细菌对金属离子(如砷、砷、汞、镍、钴、银、镉等)呈现抗性。

(3)细菌素质粒:Col 质粒含有编码大肠杆菌素的基因,其编码的产物是一种细菌蛋白,只杀死其他近缘肠道细菌且不含 Col 质粒的菌株。由 G^+ 菌产生的细菌素也由质粒基因编码,例如乳酸乳球菌(旧称乳酸链球菌)产生的乳酸链球菌素(Nisin)以及枯草芽孢杆菌产生的枯草菌素,均能强烈抑制某些 G^+ 菌的生长,故可用作食品的生物防腐剂。

(4)毒性质粒:许多致病菌携带的毒性质粒均含有编码毒素的基因。例如,致病性大肠杆菌含有编码肠毒素的质粒,产生的肠毒素能引起腹泻;苏云金杆菌含有编码 δ 内毒素(伴孢晶体)的质粒,产生的 δ 内毒素对多种昆虫有强烈毒杀作用;根瘤土壤杆菌携带一种 Ti 质粒(又称诱瘤质粒),是引起双子叶植物冠瘿瘤的致病因子,经过改造的 Ti 质粒可广泛应用于转移及植物载体;发根土壤杆菌携带一种 Ri 质粒,是引起双子叶植物患毛根瘤的致病因子。Ri 质粒在功能上与 Ti 质粒有广泛的同源性,也可用于转基因植物载体。

(5)代谢质粒:又称降解性质粒。它携带有编码降解某些复杂有机物的酶的基因。带有代谢质粒的细菌(如假单胞菌)能将有毒化合物,如苯、农药、辛烷和樟脑等降解成能被其作为碳源和能源利用的简单物质,从而使它在污水处理等方面发挥重要作用。每一种具体的质粒常以其降解的底物而命名,如 XYL(二甲苯)质粒、OTC(辛烷)质粒、CAM(樟脑)质粒等。此外,代谢质粒中还包括一些能编码固氮功能的质粒。例如根瘤菌中与结瘤和固氮有关的基因均位于共生质粒中。

(6)隐秘质粒:上述质粒均具有某种可检测的遗传表型,但隐秘质粒不显示任何表型效应,它们的存在只有通过物理方法,例如用凝胶电泳检测细胞抽提液等方法才能发现。

4. 质粒在基因工程中的应用

少数质粒(如 F 因子或 R 因子等)可在不同菌株间发生转移,并可表达质粒多携带的基因信息。根据这一特性,通过转化作用,利用细菌质粒作为基因的载体,将人工合成或分离的特定的基因片段导入受体细菌中,使受体细菌产生人们所需的代谢产物,故质粒已成为重要的基因载体而应用于基因工程中。

二、基因突变

基因突变简称突变,泛指细胞内(或病毒粒子内)遗传物质的分子结构或数量突然发生了可遗传的变化。基因突变可自发或经诱导产生。狭义的突变专指基因突变(点突变),包括一对或几对碱基的缺失、插入或置换;而广义的突变则包括基因突变和染色体畸变。染色体畸变又包括染色体的缺失、重复、插入、倒位和易位。

(一)基因突变的类型

1. 碱基变化与遗传信息的改变

不同碱基变化引起遗传信息的改变不同,主要有以下四种类型:

原序列	5'-AUG	CCU	UCA	AGA	UGU	GGG-3'
	Met	Pro	Ser	Arg	Cys	Gly
同义突变	5'-AUG	CCU	UCA	AGA	UGU	GGA-3'
	Met	Pro	Ser	Arg	Cys	Gly
错义突变	5'-AUG	CCU	UCA	GGA	UGU	GGG-3'
	Met	Pro	Ser	Gly	Cys	Gly
无义突变	5'-AUG	CCU	UCA	AGA	UGA	GGG-3'
	Met	Pro	Ser	Arg	stop	
				缺失一个碱基 A		
移码突变	5'-AUG	CCU	UCA	AG↑U	GUG	GG-3'
	Met	Pro	Ser	Ser	Val	

同义突变是指因为某个碱基的变化虽然使密码子发生了改变,但是由于密码子的简并性,并未使产物氨基酸发生变化。错义突变是指碱基变化引起了产物氨基酸的变化。例如编 A 氨基酸的密码子变成编 B 氨基酸的密码子。如果碱基发生变化,代表某种氨基酸的密码子变成终止密码子(UAA、UAG、UGA),使蛋白质合成提前终止。例如三联密码子中,1 对碱基的突变使原编码氨基酸的密码变成非氨基酸密码。移码突变是指由于缺失或插入了 1~2 个碱基,使得此处之后的碱基序列发生了改变,其后翻译的氨基酸序列亦全部变化。

2. 表型变化

表型指某一生物体所具有的一切外表特征和内在特性的总和,是其基因型在合适环境条件下通过代谢和发育而得到的具体体现。基因型又称遗传型,是某一生物个体所含有的全部遗传因子即基因组所携带的遗传信息。从筛选菌株的实用目的出发,常用的表型变化的突变类型可分为以下几种:

(1)营养缺陷型:从自然界分离到的任何微生物在其发生营养缺陷突变前的原始菌株称野生型菌株,简称野生型。如果以 A 和 B 两个基因表示其对这两种营养物质的合成能力,则野生型菌株的遗传型应是 $[A^+ B^+]$ 。野生型菌株发生突变(自发突变或诱发突变)后形成的带有

新性状的菌株,称突变型菌株,简称突变株。野生型菌株由于发生基因突变而丧失了某种(或某些)酶,随之失去了合成某种(或某些)生长因子(如碱基、维生素或氨基酸)的能力,因而成为必须从培养基或周围环境中获得这些生长因子才能正常生长繁殖的菌株,这类突变株称为营养缺陷型突变株,简称营养缺陷型。A 营养缺陷型的遗传型用 $[A^- B^+]$ 表示,而 B 营养缺陷型的遗传型用 $[A^+ B^-]$ 表示。此类菌株可在加有相应营养物质的基本培养基平板上生长并检出。例如,大肠杆菌的野生型菌株有合成色氨酸的能力,基本培养基上缺乏色氨酸能正常生长。如果该菌株成为色氨酸营养缺陷型,则无法再在基本培养基上正常生长,而必须添加色氨酸才能生长。营养缺陷型经回复突变或重组后产生的菌株称原养型菌株,简称原养型。其营养要求在表型上与野生型相同,遗传型均用 $[A^+ B^+]$ 表示。营养缺陷型可作为重要选择性遗传标记,广泛用于遗传学、分子生物学、遗传工程的研究和育种工作中。

(2)抗性突变型:指野生型菌株因发生基因突变而产生的对某化学药物或致死物理因子产生抗性的一种变异类型。抗性突变型作为重要选择性遗传标记,在加有相应药物或用相应物理因子处理的培养基平板上,只有抗性突变株能生长,从而较容易地被分离筛选。

(3)条件致死突变型:某菌株或病毒经基因突变后,在某种条件下具有致死效应,而在另一种条件下没有致死效应的突变类型。常见的条件致死突变型是温度敏感突变型,用 T_s 表示。例如,大肠杆菌的某些菌株在 42°C 下是致死的,但能在 37°C 下得到 T_s 突变株。引起 T_s 突变的原因是:突变使某些重要蛋白质的结构和功能发生改变,导致在某一特定温度下具有功能,而在另一温度(一般为较高温度)下丧失功能。条件致死突变型亦可作为选择性标记。

(4)形态突变型:形态突变型是指形态发生改变的突变型,包括引起微生物个体形态、菌落形态、颜色的变化,以及影响噬菌体的噬菌斑形态的变异,一般属非选择性突变。例如,细菌的鞭毛或荚膜的有无,霉菌或放线菌的孢子有无或颜色变化,菌落表面的光滑、粗糙以及噬菌斑的大小或清晰度等的突变。

(5)抗原突变型:指由于基因突变引起的细胞抗原结构发生的变异类型。

(6)产量突变型:由于基因突变引起的代谢产物产量有明显改变的突变类型。若突变株的产量显著高于原始菌株称正变株,该突变株称正突变株,反之则称负突变。

(二)突变率

某一细胞(或病毒粒子)在每一世代中某一性状发生突变的几率称突变率。为方便起见,突变率可用某一单位群体在每一世代(即分裂 1 次)中产生突变株的数目来表示。例如, 10^{-6} 的突变率意味着每 10^6 个细胞在分裂成 2×10^6 个细胞过程中,平均产生 1 个突变株。

$$\text{突变率} = (\text{突变细胞数} / \text{分裂前群体细胞数}) \times 100\%$$

据测定,一般基因的自发突变率为 $10^{-9} \sim 10^{-6}$,转座突变率为 10^{-4} ,无义突变或错义突变的突变率约为 10^{-8} 。由于突变率很低,因此要筛选出突变株犹如大海捞针,所幸的是可以利用检出营养缺陷型的回复突变株(即野生型菌株的表型)或抗药性突变株的方法达到目的。

(三)基因突变的特点

基因突变一般有以下 7 个共同特点:

(1)自发性。指即使不经诱变剂处理也能自发地产生突变。

(2)不对应性。指突变性状与引起突变的原因之间无直接对应关系。如抗药性突变不

是因为接触了某种药物(如青霉素)才发生的,而是在接触前突变就已发生,加入抗生素只是将相应的突变株选择出来。

(3)稀有性。通常自发突变的几率很低($10^{-9} \sim 10^{-6}$)。

(4)独立性。引起各种性状改变的基因突变彼此是独立的,某基因的突变率不受他种基因突变率的影响。

(5)诱变性。自发突变的频率可因诱变剂的诱变作用而显著提高(提高 $10 \sim 10^5$ 倍),但并不改变突变的本质。

(6)稳定性。基因突变是遗传物质结构的改变,因而突变后的新遗传性状是稳定的可遗传的,但新突变后的基因仍可以再发生突变。

(7)可逆性。野生型菌株某一性状某次发生的突变称为正向突变,这一性状也可发生第二次突变,使其又恢复原来的性状,这第二次相反的突变称回复突变。突变后的某一性状可以相同的几率回复到原有性状,即回复突变的几率与突变几率相同。突变可以回复的具体含义是,野生型菌株可以通过突变,成为突变型菌株;相反,突变型菌株会再次发生突变而成为野生型状态。

(四)诱发突变机制

诱发突变是指人为的理化因子的刺激使微生物的性状发生了可遗传的变化。凡是能使突变率显著高于自发突变频率的物理、化学和生物因子统称为诱变剂。

诱发突变的机制包括碱基的置换、移码突变和染色体畸变三种方式。

(五)自发突变机制

自发突变是指没有人工参与下(不经诱变剂处理)微生物所发生的突变。称它为自发突变绝不意味着这种突变没有诱变原因。自发突变的机制目前了解较多的有下面三种。

(1)射线和环境因素的诱变效应:低剂量的诱变因素、长时期综合诱变效应常使微生物发生自发突变。如宇宙空间中各种短波的辐射或高温以及自然界普遍存在的低浓度诱变物质的作用等均可引起微生物自发突变。

(2)微生物自身有害代谢产物的诱变效应:微生物在培养过程中,菌体本身产生有害的代谢产物(H_2O_2 、酸、碱),可作为内源性诱变剂对菌体自身遗传物质产生影响。

(3)互变异构效应:已知只有 5-溴尿嘧啶的分子结构由酮式转变为烯醇式时,才能引起突变。由于 A、T、C、G 四种碱基的第 6 位上不是酮基(T、G),就是氨基(C、A),所以 T 和 G 可以以酮式或烯醇式状态存在;而 C、A 则可以氨基式或亚氨基式状态存在。因为平衡一般倾向于酮式或氨基式,故 DNA 双链结构中,一般总是以 A:T 和 G:C 碱基配对形式出现。只是在偶然情况下,T 和 G 会以稀有的烯醇式状态出现,因而在 DNA 复制到达这一位置的瞬间,通过 DNA 多聚酶的作用,在其相对位置上,就不出现 A 和 C,而是 G 与 T;同理,如果 C 和 A 以稀有的亚氨基形式出现,在 DNA 复制到达这一位置的瞬间,则在新合成的 DNA 单链的与 C 和 A 相应的位置上就不出现 G 和 T,而是 A 和 C。这可能就是发生相应的自发突变的原因。据统计,碱基对发生自发突变的几率为 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ 。

(六)艾姆氏试验

由于生物的遗传物质都是核酸,故凡能使核酸结构发生改变的因素都可影响生物学功能。例如有些化学物质会引起 DNA 结构损伤并对生物具有致突变、致畸变和致癌变(简称“三致”)作用。由于癌变效应主要出现于人类等高级哺乳动物中,以及产量性状等非选择性

突变难以检出,故根据生物化学统一性的原理,人们设计选用了细菌为模型,以了解各种有害物质引起人类和动物“三致”的原因。艾姆氏试验(Ames test)是一种利用细菌营养缺陷型的回复突变来检测环境或食品中是否存在化学致癌剂的简便有效方法。Ames test测定潜在化学致癌物的方法如下:①将不同浓度的试验药品与从老鼠肝脏抽提的酶混合。这是因为许多化学药品本身在动物体外无诱变作用,而必须在肝脏中与酶接触,经代谢变化后才有诱变作用。②将上述混合物适当保温,以圆滤纸片吸取不同浓度的试样制成试验滤纸片。③以基本培养基倒成平板,将鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸缺陷型突变株涂布于平板上,再将不同浓度的滤纸放入平板中央,同时做一空白对照。④经培养后在基本培养基上滤纸片周围长出的菌落即为营养缺陷型的回复突变株,而营养缺陷型突变株在空白对照平板上滤纸片周围未长菌落。分析计算试验药品是否具有诱变作用,以及最有效的诱变浓度。

供试验用的营养缺陷型突变株应具备两个条件:①不含DNA修复酶,使其在诱变时无法修复因碱基变化而引起的突变,使试验结果较准确;②大部分为单点突变的营养缺陷型菌株。因此只要根据营养缺陷型突变株在诱变剂(化学药品)的作用下是否回复突变而成为野生营养型菌株的现象,即可了解该化学药品是否为致癌物,试验结果表明,化学物质对细菌的诱变性与其对动物的致癌性成正比,即95%左右的致癌物质有诱变剂的作用,而90%左右的非致癌物质没有诱变剂的作用。

目前,艾姆氏试验已广泛用于检测食品、饮料、药物、饮水和环境等试样中的致癌物,此法具有快速(约3d)、准确(符合率>85%)和费用低等优点;而采用动物试验检测药物的致癌性具有周期长、费用高和人工需要量大等缺点。

三、基因重组和杂交过程

两个不同性状个体内独立基因组的遗传基因,通过一定途径转移到一起,经过遗传分子间的重新组合,形成新的稳定基因组的过程,称为基因重组或遗传重组,简称重组。重组是遗传物质在分子水平上的杂交,因此,与一般在细胞水平上进行的杂交有明显区别,但是细胞水平上的杂交必然包含了分子水平上的重组。在真核微生物中,基因重组可通过有性杂交、准性杂交来实现;而在原核微生物中,基因重组必须在特殊条件下进行,即通过转化、转导、接合、原生质体融合和溶源转变实现基因重组。因此,微生物的遗传基因可以通过以下5种途径重组:①两个不同性细胞或体细胞结合,促使整套染色体交换的基因重组,如真菌的有性杂交或准性杂交。②细胞间不接触,仅涉及个别或少数基因的重组。例如受体细胞接受供体细胞内抽提的DNA而进行的基因重组(转化),以及供体细胞的基因通过噬菌体的携带转移到受体细胞中进行的基因重组(转导)。③细胞间暂时沟通,使供体菌的核基因组片段传递给受体菌(接合)。④由噬菌体提供遗传物质,使寄主细胞获得完整噬菌体的核酸的基因重组(溶源转变)。⑤双亲细胞的原生质体融合,促使部分染色体基因重组,如细菌、酵母菌、霉菌的原生质体融合。

四、微生物与基因工程

自20世纪70年代以来,随着分子生物学、分子遗传学与核酸化学等基础理论的发展,产生了基因工程这一遗传育种新领域。DNA的特异切割、DNA的分子克隆和DNA的快速测序这三项关键技术的建立,为基因工程技术的发展奠定了坚实基础。

(一)基因工程定义

基因工程又称遗传工程,也称体外 DNA 重组技术,是 20 世纪 70 年代初发展起来的一个遗传育种新领域。它是根据需要,用人工方法取得供体 DNA 上的基因,经过切割后在体外重组于载体 DNA 上,再导入受体细胞,使其复制和表达,从而获得新表现型的一种分子水平的育种技术。这种使 DNA 分子进行重组,再在受体细胞内无性繁殖的技术又称为分子克隆。利用这种分子水平的杂交技术可以完成超远缘杂交,并且更具定向性。通过基因工程改造后获得的具新性状的菌株称为工程菌。近年来,工程菌已应用于发酵生产中,利用基因工程菌可以大量发酵生产胰岛素、干扰素、疫苗、抗体等贵重的药用蛋白。本节仅对基因工程技术作基础性介绍,具体内容可参考相关专著。

(二)基因工程的基本操作

基因工程的基本操作步骤包括:目的基因(即外源基因或供体基因)的分离,DNA 分子的切割与连接,优良载体的选择,目的基因与载体的体外重组,重组载体导入受体细胞,重组受体细胞的筛选和鉴定,外源基因在“工程菌”或“工程细胞”中的表达,“工程菌”或“工程细胞”的大规模培养、检测以及一系列生产性能试验等。

基因工程的操作方法将在第四章介绍。

(三)微生物与基因工程的关系

微生物本身和微生物学在基因工程中占据了十分重要的地位,甚至无法取代,可以说一切基因工程操作都离不开微生物,这可从以下 5 个方面得到充分证实:①载体:充当目的基因的载体主要由病毒、噬菌体和细菌、酵母菌中的质粒改造而成;②工具酶:基因工程中具有“解剖刀”和“缝衣针”作用的千余种特异工具酶,多数从微生物中分离纯化获得;③受体:作为基因工程中的受体细胞,主要使用容易培养和能高效表达目的基因各种性状的微生物细胞和微生物化的高等动、植物单细胞株;④微生物工程:为了大规模表达各种基因产物,实现商品化生产,常将外源基因表达载体导入酵母菌中以构建“工程菌”或“工程细胞株”,而要进一步发挥其应有的巨大经济效益,就必须让它们大量生长繁殖和发挥生物化学转化作用,这就必须通过微生物工程(或发酵工程)的协助才能实现;⑤目的基因的主要供体:尽管基因工程中外源基因的供体生物可以是任何生物对象,但由于微生物在代谢多样性和遗传多样性等方面具有独特优势,尤其是嗜极菌(即生长于极端条件下的微生物)的重要基因(如可抗高温、高盐、高碱、低温等的基因)的优势,为基因工程提供了极其丰富而独特的外源基因供体库。

参 考 文 献

- [1]董明盛,贾英民. 食品微生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2006.
- [2]李阜棣. 微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [3]刘慧. 现代食品微生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2006.
- [4]江汉湖,董明盛. 食品微生物学(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社,2010.

第四篇 食品微生物学分析技术

第八章 食品微生物的检测方法

第一节 食品微生物的分析

人们生活水平的提高和食品安全意识的增强,对食品安全提出了更高的要求,食品安全已成为全球关注的焦点。食品微生物分析技术的发展和其在食品安全检测中的应用也越来越受到人们的重视。食品微生物检测方法为食品检测必不可少的重要组成部分。首先,它是衡量食品卫生质量的重要指标之一,也是判定被检食品能否适用的科学依据之一;其次,通过食品微生物检验,可以判断食品加工环境及食品卫生情况,能够对食品被细菌污染的程度作出正确的评价,为各项卫生管理工作提供科学依据,提供传染病和食物中毒的防治措施;再次,食品微生物检验是贯彻“预防为主”的卫生方针,可以有效地防止或减少食物中毒和人畜共患病的发生,保障人们的身体健康。同时,它对提高产品质量,避免经济损失,保证出口等方面具有政治上和经济上的重大意义。

一、微生物的传统分析技术

食源性疾病主要是由微生物和化学药物所引起的,其中微生物引起的食源性疾病占一半以上的比例。食品中的微生物污染成为食品安全的首要问题。微生物污染存在食品生产、加工、储存、运输、销售到食用的整个过程的每个环节中,对人体产生严重的危害。常规的检验大多通过培养基培养目标微生物,然后利用电子计数器或放大镜观察计数的方式,来确定食品是否受到此微生物的污染。生活中一般常见的微生物传统分析技术有活细胞标准平板计数法(SPC)、最近似数测定方法(MPN)、染色还原技术、直接显微计数法四种基本方法。

(一)活细胞标准平板计数法(SPC)

平板菌落计数法又称活细胞标准平板计数法(SPC),是目前测定活细胞和食品产品中菌落形成单位数应用最广泛的方法,它能够判定食品被微生物污染的程度及卫生质量,也可观察微生物在食品中生长繁殖的动态。常规的标准平板计数法是将一部分食品混合或均质化,在适当的稀释液中进行梯度稀释,然后涂布或者倾注到适宜的琼脂培养基上,在适当温

度下培养一段时间后,使用电子计数器对可见的菌落进行计数。计数时,根据待检样品的污染程度,做10倍递增系列稀释,制成均匀的系列稀释液,使样品中的微生物细胞分散开,使之呈单个细胞存在(否则一个菌落就不只是代表一个细胞),选择其中2~3个稀释液,使至少一个稀释度的平皿中培养基内,经恒温培养后,由单个细胞生长繁殖形成菌落,统计菌落数(菌落形成单位:CFU),根据其稀释液倍数和取样接种量即可换算出样品中的活菌数(单位:CFU/克或毫升)。

由于菌落总数是在普通营养琼脂上,37℃有氧条件下培养的结果,故厌氧菌、微需氧菌、嗜冷菌和嗜热菌在此条件下不生长,有特殊营养要求的细菌也受到限制。因此,SPC法所得结果实际上只包括一群在普通营养琼脂中生长、嗜中温的需氧和兼性厌氧的细菌菌落的总数。由于自然界这类细菌占大多数,其数量的多少能反映样品中细菌总数,而且所测结果是活菌数,能更真实反映样品中的细菌总数,故用SPC法测定食品中含有的细菌总数已得到了广泛认可,被广泛用于生物制品检验(如活菌制剂)、发酵剂、食品、饮料和饮用水等的含菌数量或污染程度的检测。菌落总数可作为判定食品清洁程度(被污染程度)的标志,通常越干净的食品,单位样品菌落总数越低,反之,菌落总数就越高。因此,细菌菌落总数测定对检样进行卫生学评价提供了依据。平板菌落计数法一般用于某些成品检测、生物制品检验、土壤含菌测定及食品、水污染程度的检验。以下面实验为例。

实验用品用到的菌种:大肠杆菌和枯草芽孢杆菌;培养基用的是牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。准确称取待测样品10g(mL),放入装有90mL无菌水并放有小玻璃珠的250mL三角瓶中,用手或置摇床上振荡20min,使微生物细胞分散均匀,静置20~30s,即成 10^{-1} 稀释液;再用1mL无菌吸管,吸取 10^{-1} 稀释液1mL,移入装有9mL无菌水的试管中,吹吸3次,让菌液混合均匀,即成 10^{-2} 稀释液;再换一支无菌吸管吸取 10^{-2} 稀释液1mL,移入装有9mL无菌水的试管中,吹吸3次,即成 10^{-3} 稀释液;以此类推,连续稀释,制成 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 等一系列稀释菌液;用稀释平板计数时,待测菌稀释度的选择应根据样品来确定。样品中所含待测菌的数量多时,稀释度应高,反之则低。

(二)最近似数测定方法(MPN)

在最近似数测定方法中,食品样品的稀释液的准备类似于SPC法。将三个连续等分量样品或稀释梯度的试液转移到9个或15个有适宜培养基的试管中,这分别称为3试管或5试管法。最初样品中微生物的数量通过查阅标准MPN表获得,这实际上是统计学上的一种方法,通常MPN法的结果高于SPC的结果。MPN法的优点如下:

- (1)这种方法相对比较简单;
- (2)与SPC法相比较,不同实验室得到的结果更加可靠,相似率较高;
- (3)特殊微生物群体可以通过适当的选择性培养基进行测定;
- (4)这是一种测定粪大肠菌群含量的方法。

这种方法的缺点就是玻璃器皿使用量大(特别是5试管法),并且缺乏观察微生物菌落形态的机会,精确度低。

MPN多用于大肠菌群的检验,其原理是选择适当稀释倍数的稀释液,接种在特定的液体培养基中培养,再检查培养液是否有该生理群微生物的生长。根据不同稀释度接种管的生长情况,用统计学方法求出每克食品中该生理群微生物的数量。选择稀释度范围的原则是最低稀释度的所有重复都要有菌生长,而最高稀释度则要求全部重复无菌生长。

(三) 染色还原技术

在利用染色还原技术估测相关产品中活菌数量时,通常使用两种染色剂:亚甲基蓝(methylene blue,又称美蓝)和刃天青(resazurin)。进行染色还原实验时,食品上清液加入任何一种染色剂标准溶液,亚甲基蓝会从蓝色还原为白色,而刃天青则从暗蓝色还原为粉红色或白色,染色剂还原的时间与样品中微生物的数量成反比。

对牛奶样品中 100 种培养物进行亚甲基蓝和刃天青还原反应,除 2 个例外,两种染色剂在细菌数目和染色还原时间上都非常一致。在一项用刃天青还原反应快速检验牛肉腐败的研究中,刃天青被还原为无色,而且结果与 SPC 法显著相关。鲜肉样品中细菌的 SPC 值 $> 10^7$ CFU/g,可以在 2h 内检测出来。用采自羊畜体表面的样品进行实验,刃天青法在 30min 内可被 18000CFU/m² 的菌体所还原。染色还原技术很早就应用于乳品厂中,用来估测鲜牛乳的微生物学质量。它具有简单、快捷、经济等优点,而且只有活细胞才对染色剂有明显的还原能力。其缺点是所有微生物对染色剂的还原程度各不相同;它不适用于含还原酶的食品,除非使用特殊的方法处理样品。

(四) 直接显微计数法(DMC)

直接显微计数法是最简单的方法,DMC 法由以下几部分组成:将食物样品涂片或在显微镜的载玻片上培养,用适当的染色剂染色,用显微镜(油镜)观察并计数。DMC 法广泛应用于乳品厂,用来估测生牛奶和其他奶制品的微生物学质量,这种特殊方法最初是由 Breed 发明的(Breed 计数)。这种方法包括:在显微镜载玻片上 1cm² 范围内涂布 0.01mL 样品,经过对样品的固定、脱脂、染色,则可计算微生物或菌落的数量,在这个过程中还包括校正显微镜。这种方法还可用于其他食品,如干燥食品和冷冻食品的微生物快速检测。

DMC 法的优点是快速,简便,可以观察细胞形态,而且有助于提高荧光探测器的效率。其缺点是:由于这是一种显微镜方法,因此容易造成操作人员疲劳,无论活细胞还是死细胞都会被计入在内,食品颗粒通常不能与微生物区别开,单细胞和菌落无法清楚地区分,有些细胞由于染色不好而可能不被计入,因此 DMC 法总是比 SPC 法的菌数多。尽管存在上述缺点,DMC 法仍是检测食品中微生物数量最快的方法。

利用血球计数板在显微镜下直接计数,是一种常用的微生物计数方法,此方法是将菌悬液(或孢子悬液)放在血球计数板载玻片与盖玻片之间的计数室中,在显微镜下进行计数,由于计数室盖上盖玻片后的容积是一定的,所以根据在显微镜下观察到的微生物细胞数目来计算单位体积内微生物的总数目。

二、微生物的快速检测技术

常规检测手段由于过程烦琐、检测时间长,需要大型实验室的专业人员操作,数据不够准确,这往往无法满足现代化食品工业以及食品安全快速检测的需求。如何快速、实时和现场检测食品微生物污染成为目前亟须解决的技术问题。近年来,许多快速检测方法,如 PCR 技术、基因芯片技术、ATP 生物发光技术等,以其简便、快速、高通量、高灵敏度等特点,在食品质量与安全控制领域得以广泛研究与应用(张香美,2010)。

(一) 免疫学技术

免疫学检测技术是应用免疫学理论而设计一系列测定抗原、抗体、免疫细胞及其分泌细胞因子的实验方法,其基本原理是利用抗原、抗体间能发生特异性免疫反应以检测病原。

1. 免疫荧光技术(IFIT)

免疫荧光技术是将不影响抗原、抗体活性的荧光色素标记在抗体(或抗原)上,与其相应抗原(或抗体)结合后,形成的免疫复合物在一定波长光激发下可产生荧光,借助荧光显微镜可检测或定位被检抗原。目前免疫荧光技术可用于沙门氏菌、葡萄球菌毒素、*E. coli* O157和单核细胞增生李斯特氏菌等快速检测。

(1) 荧光抗体法(FA)检测技术

荧光抗体法自1942年创立发展以来,广泛地应用于医学诊断和食品微生物检测。特定抗原的抗体与荧光物质结合而发出荧光。当抗体与抗原发生反应时,抗体—抗原复合体发出荧光,利用荧光显微镜检测。荧光标记物通常是罗丹明B、荧光异氰酸盐和荧光异硫代异氰酸盐;荧光异硫代异氰酸盐应用最为广泛。用于快速检测细菌的荧光抗体技术主要有两种方法。直接法是利用抗原与特异的带有荧光物质抗体结合;间接法中同源抗体并不与荧光物质结合,而是利用同源抗体的抗体(抗抗体)与荧光物质相连(抗原被同源抗体包围,同源抗体又被其抗抗体包围,从而发出荧光)。在间接法中标记物可以检测同源抗体的存在,直接法中标记物可以检测抗原的存在。利用间接法不需要为每一待测的微生物制备荧光抗体。如果用H免疫血清,FA技术就不需要沙门氏菌的纯培养物。同时通过流式细胞仪,针对细胞表面不同抗原,可以同时使用多种不同的荧光抗体,对同一细胞进行多标记染色。如研制成的抗沙门氏菌荧光抗体,用于750份食品样品的检测,结果表明与常规培养法符合率基本一致。

(2) 荧光标记噬菌体技术

荧光标记噬菌体技术是根据噬菌体特异性侵染宿主菌的原理,选用一种合适的染色剂将噬菌体的核酸染色标记,然后用标记过的噬菌体侵染相应的宿主菌,噬菌体吸附在其宿主菌表面后,随即将标记过的核酸注入宿主细胞,随着越来越多的噬菌体核酸的注入,细胞内荧光随着荧光素的增多而增强,借助荧光显微镜便能判定宿主菌的存在,从而实现病原菌的检测。

此技术经改良后将荧光染料YOYO-1更换为灵敏度较高且对噬菌体结构和功能都无破坏性的SYBRgold核酸染料来标记沙门氏菌噬菌体P22,成功地检测到了沙门氏菌LT2株,同时与DAPI、EB、YOYO-1等核酸染料作对比,结果显示SYBRgold染剂是实验效果最好的核酸染料;后人又将SYBRgreen I和SYBRgreen II用于大肠杆菌、沙门氏菌以及李斯特菌的检测,均成功检出,且灵敏度较高,该方法完全能用于实际生产中微生物的检测。

多数噬菌体与宿主呈一一对应关系,虽特异性极高,但宿主范围较窄,且噬菌体与宿主作用的裂解机理尚不明确,有待进一步研究,所以该技术在实践中的应用相对较少。但是荧光标记噬菌体技术,检测周期短,能区分死活细菌,准确性好,检测前无需将各细菌纯化,预增菌后即可用于检测,整个过程可在8h内结束,且多个细菌检测可同步进行,因此该项技术在食源性致病菌的检测中有着广阔的发展前景。

2. 酶免疫技术(EAI)

酶免疫技术是利用抗原、抗体反应高度特异性和酶促反应高度敏感性,通过肉眼或显微镜观察及分光光度计测定,达到在细胞或亚细胞水平上示踪抗原或抗体部位,及对其进行定量的目的。根据抗原、抗体反应是否需要分离结合和游离酶标记物而分为均相和非均相两种类型。非均相法较常用,包括液相与固相两种免疫测定法。非均相酶固相免疫测定法即

ELISA 在目前应用最为广泛。利用 ELISA 法检测大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)内毒素,发现 ELISA 技术具有灵敏、快速的特点。此外,ELISA 法还可用于食品介导病毒检测。利用双抗夹心 ELISA 检测食品中大肠杆菌 O157:H7,该法稳定性、重复性良好,对纯培养菌液检出限为 10^5 CFU/mL,具有良好敏感性及特异性。用被检样品直接包被 ELISA 板固定加酶标抗体作用一段时间后,加入底物显色后终止反应,可以使用沙门氏菌特异性单克隆抗体 CB8 和 de7 直接检测沙门氏菌。目前已成功应用于蛋品、鲜奶、肉制品中沙门氏菌检测,与传统方法相比,其敏感性和特异性均达到理想效果。此法在 6h 内即可检测出浓度为 10^4 CFU/mL 副溶血弧菌,且与其他菌株均无交叉反应。

3. 免疫印迹技术

免疫印迹技术又称转移印迹技术,是一种将蛋白质凝胶电泳、膜电泳、抗原抗体反应相结合的免疫分析技术。其借助高分辨率 PAGE 电泳将混合蛋白质样品有效分离成许多蛋白区带,分离后蛋白经电泳转移至固相支持物,通过与特异性抗体结合,即可定性或定量检测靶蛋白。免疫印迹技术综合 SDS-PAGE 高分辨率及 ELISA 高敏感性和高特异性,是一种有效分析手段,目前应用于酵母和真菌检测,以及进出口食品的禽流感病毒检测。

4. 免疫层析技术

免疫层析技术将免疫学原理与层析原理相结合,借助毛细管作用,样品在条状纤维制成膜上泳动,其中待测物与膜上一定区域配体结合,通过酶促显色反应或直接使用着色标记物,在短时间内(20min 内)便可得到直观结果。免疫层析按其原理可分为两类:一类以酶促反应显色为基础,以显色高度来定量;另一类则使用着色标记物,如乳胶颗粒、胶体硒、胶体金及脂质体等,层析时,标记物与待测物被相应配体捕获而浓集显色,以纤维膜上显色条有无或多少来定性或定量。目前在检验微生物时常用的是免疫胶体金技术。罗立新等选用柠檬酸钠改良法制备胶体金,测定其最适结合蛋白浓度为 $28\mu\text{g/mL}$,构建免疫层析检测试剂和检测方法,检测冷冻猪肉、牛奶、冰激凌及不同稀释度的产单核李斯特菌标准样品,灵敏度达 87.5%,具有良好重现性。

5. 免疫磁珠分离技术

免疫磁珠分离技术是将免疫学反应高度特异性与磁珠特有磁响应性相结合的一种新免疫学技术。

(1) 原理

利用人工合成的内含铁成分,可被磁铁磁力所吸引,外有功能基团,可结合活性蛋白质(抗体)的磁珠,作为抗体的载体。当磁珠上的抗体与相应的微生物或特异性抗原物质结合后,则形成抗原—抗体—磁珠免疫复合物,这种复合物具有较高的磁响应性,在磁铁磁力的作用下定向移动,使复合物与其他物质分离,而达到分离、浓缩、纯化微生物或特异性抗原物质的目的,然后再对磁珠上的微生物进行鉴定(张小强,2009)。

(2) 应用

① 金黄葡萄球菌的检测。国内陈伶俐等将人 IgG 结合到磁珠上,用该磁珠对样品中的金黄葡萄球菌进行了快速分离检验(纪勇,2011)。取适量免疫磁珠,加入金黄葡萄球菌菌液中,磁场下分离磁珠,将分离前后的菌液及磁珠涂平板,并用大肠杆菌、白葡萄球菌等作对照。结果用此磁珠分离后,只有金黄葡萄球菌的浓度有明显的降低。对磁珠所涂平板的菌落进行鉴定,证明为金黄葡萄球菌。应用此法分离检验此菌,富集速度快,灵敏度高,效果好。

② *E. coli* O157 : H7 的检测。Fratamico 等将兔抗 *E. coli* O157 : H7 多克隆抗体连接到羊抗兔 IgG 包被的磁珠上,从食物增菌培养液中快速分离 *E. coli* O157 : H7 菌株,再将带菌的磁珠接种到培养基上,加入荧光素标记的 *E. coli* O157 : H7 抗血清,在荧光显微镜下观察,此法的敏感性为 10 个菌/mL 增菌培养液。庞惠勇等应用斑点免疫层析法(DicA)和免疫磁珠法(IMBS)对腹泻病人和家禽(畜)粪便中的 *E. coli* O157 : H7 菌株进行检测,同时以直接分离培养法作对照,结果 DicA 法阳性率为 10.34%(假阳性率为 8.41%);IMBS 法检出率为 1.92%,而直接分离培养法检出率为 0.24%。IMBS 法较直接分离培养法检出率显著提高。两法结合用于检测 *E. coli* O157 : H7,具有快速、省时和灵敏度高等优点。

③ 沙门氏菌的检测。Blackburn 等将用生物素标记的抗沙门氏菌多价多克隆抗体连接到链霉亲和素包被的磁珠上,以此试剂检测从不同食物中提取的活沙门氏菌。此法的敏感性可达 10^5 CFU/g 食物,总的检测时间从 5d 减少至 1~2d。Lnk 等应用抗沙门氏菌 C 群(O 抗原 6 和 7)单克隆抗体包被磁珠的方法检测沙门氏菌(O : 6,7),采用直接和间接 ELISA 法测定结合到磁珠表面上的细菌或其游离的抗原。吸附到磁珠上的完整细菌也可用吖啶橙染色后,用显微镜检查。此法的敏感性为 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL 样品。Widjoatmodjio 等应用抗沙门氏菌 A、B、C1、C2、D 和 E 血清的特异性单克隆抗体,通过羊抗体 IgG 或 IgM 连接到二氧化铬的磁珠颗粒上,直接检测粪便中的沙门氏菌。用免疫磁珠分离技术从乳及乳制品、肉类和蔬菜中分离出沙门氏菌,其检测限为 10~20 个/g 细菌。

④ 副溶血性弧菌的检测。张凡非等采用免疫磁珠法分离海水海泥和蛤肉中副溶血性弧菌。他们将磁珠与副溶血性弧菌免疫血清混合,制备免疫磁珠,用于分离样品中的细菌。分离出的菌株接种平板并进行常规鉴定,结果此法较一般的培养分离法极大地提高了检出率(张凡非,2004)。

⑤ 幽门螺杆菌的检测。Takako 等应用 IMBS 和 PCR 联合的方法分离感染幽门螺杆菌(*H. pylori*)的小鼠胃肠及粪便样品中的 *H. pylori* 菌株。结果表明,胃肠样品经 IMBS 法的分离率不高于直接培养法,但粪便样品经 IMBS 法分离后,不经培养,用 PCR 法仍能检测出 *H. pylori* 菌株。

食品受到污染后,致病微生物所占比例往往很小,常规检验方法多先用选择性增菌培养基进行增菌,鉴定需要时间很长。而免疫磁珠能够利用磁性表面抗原或抗体特异性吸附需检测的致病菌,并利用磁场对致病菌进行富集,从而可以实现致病菌的快速检测,具有分离速度快,效率高,操作简便,仪器设备简单,亲和吸附特异及高敏感性等特点,而且易于和现有的检测方法进行整合。免疫磁珠技术与其他检测手段的联用适宜于快速检测食品中致病菌,是目前食品中微生物检测研究的重点。制备大小适宜、表面活性基团丰富的磁珠是免疫磁珠制备的关键,随着应用的不断发展,这一方法将成为食品微生物检测的一个发展趋势。

6. 酶联荧光免疫分析技术(ELFIA)

酶联荧光免疫分析技术是在酶联免疫吸附分析基础上发展而成的一种快速检测微生物方法。其基本原理是首先将已知抗体吸附于固相载体,加入待测样本,样本中抗原与固相载体上抗体结合,然后酶标抗体再与样本中抗原结合;加入酶反应底物,底物被酶催化为带荧光产物,产物量与标本中受检物质量直接相关,然后根据荧光强度进行定性或定量分析(张冲,2010)。ELFIA 法可用于测定抗原,也可用于测定抗体。目前已经有商品化的荧光酶标分析仪,如法国生物梅里埃公司生产的荧光酶标分析仪就是建立在 ELFIA 原理上的自动检

测系统,该仪器已被应用于食品致病微生物的检测中。利用自动酶联荧光免疫分析系统检测冻肉中沙门氏菌来验证该法的灵敏度和特异性,与常规细菌培养法比较,该方法在 155 份样品中,检出沙门氏菌阳性 10 例,阴性 145 例,而常规细菌培养法检测出酶联荧光免疫分析技术法阳性样本中 9 例呈阳性,其余 146 例皆为阴性。因此该法用于冻肉沙门氏菌检测灵敏度为 100%、特异性为 99%。

(二)分子生物学技术

1. 基因探针技术

基因探针技术又称分子杂交技术,细胞核酸 DNA 和 RNA 是一类可以传递遗传信息的大分子,利用其可作为检测的标靶。标靶通常是一个特异性的核酸序列,利用具有同源性序列的核酸单链在适当条件下互补形成稳定的 DNA RNA 或 DNA DNA 链的原理,采用高度特异性基因片段制备基因探针来识别细菌。基因探针技术是利用 DNA 分子的变性、复性以及碱基互补配对的高度精确性,对某一特异性 DNA 序列进行探查。它是利用同位素、生物素等标记的特定 DNA 片断,决定探针的特异性;用放射性同位素或生物素标记探针,使杂交试验同时具有高度的敏感性。在典型的探针操作中,未知生物体的 DNA 片段通过限制性内切核酸酶获得。经过电泳分离条带后,转移到硝酸纤维素膜上,并与标记探针杂交。温和地洗去 DNA 探针后,采用放射自身显影方法来检测是否存在杂交产物。

一个标准的探针可以检测到的最少细菌数目在 $10^6 \sim 10^7$,当探针 DNA 应用于食品中时,由于每毫升中可能只有一个目标微生物存在,所以必须通过一个浓缩富集的过程,以使细胞达到一定数量,以提供足够的 DNA 用于检测。当初始的细胞数目为 10^8 时,采用放射性探针可以在 10~12h 获得结果。当需要富集培养时,需要的时间为富集培养时间加上探针检测时间,一般为 44h 或更久。目前利用 DNA 探针技术检测食品中的微生物已取得了不少重要成果,如用 DNA 探针技术检测食品中的大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌等。

2. PCR 技术

PCR 技术是利用 DNA 聚合酶具有的以单链 DNA 为模板,寡聚核苷酸为引物,沿 5'→3'方向掺入单核苷酸的特性,在体外适宜条件下扩增位于两段已知序列之间的 DNA 片段(高晓平,2008;蒋志国,2008)。在 DNA 聚合酶催化的一系列反应中,两端序列互不相同的引物分别与模板 DNA 两条链上的各一段序列互补,进行 PCR 反应时,摩尔数大大过量的引物及 4 种脱氧核糖核苷酸(dNTP)参与下对模板 DNA 加热变性,然后将反应物冷却至某一温度,这一温度可使引物与它的靶序列发生退火,退火引物在 DNA 聚合酶作用下得以延伸。重复进行变性、退火和 DNA 延伸这一循环,前一轮扩增的产物又充当下一轮扩增的模板,目的 DNA 以 2^n 方式积累,使皮克(pg)水平的起始物达到微克(μg)。由于 PCR 灵敏度高,理论上可以检出一个细菌的拷贝基因,因此在细菌的检测中只需短时间增菌甚至不增菌,即可通过 PCR 进行筛选,节约了大量时间。目前,利用 PCR 技术已经可以实现耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌、耐万古霉素肠球菌、耐多药结核分枝杆菌等常规难以快速检测的多种菌的快速检测。基于分子生物学的检测技术能够在约 1h 从鼻孔中检测出耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌,约 4h 从直肠样本中分离出肠球菌的耐万古霉素 A 和 B 基因。新型焦磷酸实验可以在一天之内从分枝杆菌阳性株肉汤培养基上直接得到耐多药结核分枝杆菌的结果。

3. 基因芯片技术

基因芯片也称 DNA 微阵列,是由核酸的分子杂交衍生而来的,它是利用原位合成法或将已合成好的一系列寡核苷酸以预先设定的排列方式固定在固相支持介质表面,形成高密度的寡核苷酸的阵列,样品与探针杂交后,再通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描,对每一探针上的荧光信号做出比较和检测,并用计算机系统分析,从而迅速得出所要的信息。利用单碱基延伸标签反应对包括副溶血性弧菌在内的 8 种常见致病菌进行检测,反应灵敏度可达到 0.1pg,可快速灵敏地检测食源性致病菌,并为食源性疾病的诊断和防治提供了一定的依据。基因芯片是一种高通量的核酸分子杂交技术,可同时对上千个基因进行快速分析,几小时内即可得出检测结果,是目前鉴别食品有害微生物最有效的手段之一,该方法为食源性致病菌多个毒力、药敏基因的同步化、快速检测等提供了一个有利的平台。但是,当食品样品的成分比较复杂时,芯片检测基因组 DNA 灵敏度就会下降;食品样品中病原菌含量较少时,也面临同样的问题。基因芯片检测技术所需仪器和耗材昂贵,且操作过程对工作人员要求较高。

基因芯片以其高灵敏度、高通量的特点逐渐成为致病菌检测研究的热点,但普通的基因芯片在杂交反应结束后还需要使用荧光扫描系统进行结果分析,这就给配备简单的实验室在使用上造成了一定的困难。为了解决这一问题,开发了一种新的芯片技术——可视芯片技术(朱许强,2011)。其原理是在酶的催化作用下产生的沉淀,沉积在芯片表面,使芯片的厚度发生变化,致使反射在芯片上的光的波长发生改变,由此可以通过芯片上颜色的变化来观察实验结果。可视芯片对区分不同的序列有很好的准确性,检测的浓度可以达到 5pmol/L,同时可视芯片特异性高,准确性好,在混合检测中无交叉反应的情况出现。

可视芯片依赖于引物的扩增和探针的特异性结合,设计和筛选有效的、特异性强的引物和探针是建立可视芯片检测技术的关键,但这具有一定的难度;在理论上如果可视探针产生蓝色的杂交信号则即为阳性信号,但在实际检测中,背景和其他没有发生杂交反应的位点也可能产生沉淀的堆积而造成表面颜色的改变。可视芯片检测技术虽然还不够完善,但其既有基因芯片快速、准确、高效、高通量的特点,又可以摆脱昂贵的基因芯片实验设备的限制,因此已成为国内外研究的热点。

4. 核酸恒温扩增技术

PCR 技术在反应过程中需不断变换温度,应用时不够方便,于是恒温扩增技术应运而生。核酸恒温扩增技术是在恒定温度下实现 DNA 或 RNA 分子数目增加的技术,其中应用较广泛的是环媒恒温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)。其基本原理是采用 4 条特异引物及一种具有链置换活性 DNA 聚合酶,在 65℃ 左右对核酸进行扩增,短时间扩增效率可达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝。利用 LAMP 法可以快速检测志贺氏菌属和肠道侵袭性大肠埃希氏菌,扩增反应可在 2h 内完成。同时利用 LAMP 技术在几种常见致病分枝杆菌中能快速、特异性检测出结核分枝杆菌。

(三) 代谢技术

1. ATP 生物发光法

ATP 是所有生物生命活动的能量来源,普遍存在于各种活细菌细胞中,并且含量相对稳定,细菌细胞死亡后几分钟内 ATP 便被水解消失,故 ATP 与活菌量直接相关。ATP 生物发

光技术的原理是荧光素酶在 ATP 和 O_2 以及 Mg^{2+} 存在的情况下,催化荧光素氧化脱羧,将化学能转化为光能,释放出光量子。在一定的 ATP 浓度范围内,其浓度与发光强度呈线性关系。利用这一原理,可从待测食品中提取 ATP,通过测定荧光强度即可确定活菌浓度。

目前 ATP 生物发光法已被用于食品中微生物的快速检测,在 HACCP 管理中也被广泛用于关键控制点检测。ATP 生物发光法可用于肉及肉制品杂菌污染的测定、饮料中的微生物测定、啤酒酵母的活性测定、海洋食品和调味品的微生物检测等。自动 ATP 生物荧光技术在欧洲和北美的乳品工业中已广泛应用于生乳活菌数检测、UHT 乳活菌数检测、设备清洁度的评估及成品货架期的推算等。

利用 ATP 生物发光方法检测食品包装中污染的解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的芽孢,最低检测限分别为 1.4×10^2 CFU/mg 和 1.0×10^3 CFU/cm²。在粉状食品中用 ATP 生物发光方法对苏云金芽孢杆菌的芽孢进行检测,检测限为 $7.9 \times 10^0 \sim 3.2 \times 10^1$ CFU/mg,而 PCR 检测限为 614 CFU/mg。ATP 生物发光方法与热激活相结合,在 20min 内就可以完成对存活的细菌芽孢数量的测定。经过过滤和用特殊培养基复苏,在 $10 \sim 30$ CFU/mL 甚至更广的范围内,ATP 生物发光方法与菌落平板计数方法保持着较好的线性相关性。目前,对 ATP 生物发光原理的自动发光器进行改进,以实现进样自动化,提高进样的准确率,该方法可同时检测 50 个~100 个样品,重复性好,变异系数仅为 8.1%。

生物发光法无需培养微生物过程,且荧光光度计是便携式的,使用方便、操作简便,适合现场检测,在几分钟内即可得到检测结果,是目前检测微生物最快的方法之一。但该方法存在着容易受到外界因素的干扰、不能定性鉴别微生物种类、对于某些样品的直接检测灵敏度仍然达不到要求等缺点。因此,选取合适的 ATP 提取剂,降低外界因素的干扰,增强对微生物的特异性识别,提高检测灵敏度成为改善该方法的关键。目前,新型 ATP 提取剂的研制已经取得了巨大的进步。同时,将其他新技术与 ATP 生物发光法结合成为一种潮流,例如免疫磁分离与 ATP 生物发光技术相结合的 IMS/ATP 技术既降低了外界因素的干扰,对微生物也具有特异性识别能力,同时又极大提高了检测灵敏度。

2. 电阻抗技术

阻抗微生物学这一概念源自微生物生长在培养基中会引起分子浓度和电导率的变化。电阻是指一个交流电路中的表观阻值,相当于直流电路中的真实电阻,当微生物在培养基中生长时,它们将低电导率的物质代谢成较高电导率的产物,因此降低了培养基的电阻。通过测量液体培养基的电阻而得出的生长曲线,对不同菌属和菌株具有良好的重现性(唐佳妮, 2010)。

阻抗法是通过测量微生物代谢引起的培养基电特性变化来测定样品中微生物含量的一种快速检测方法。在培养过程中,微生物的新陈代谢作用可使培养基中电惰性的的大分子底物,如碳水化合物、蛋白质、脂肪等营养物质代谢为电活性的小分子产物,如氨基酸、乳酸盐、醋酸盐等。随着微生物的生长和繁殖,培养基中的电惰性分子逐渐被电活性物质取代,从而使培养基的导电性增加,电阻抗降低。微生物的起始数量不同,出现指数增长期的时间也不同。通过建立两者之间的关系,检测培养基的电特性变化来推算出微生物的原始菌量。此外,由于不同的微生物在培养基中的代谢活性有所不同,因此阻抗法能够为微生物菌种鉴定提供有利依据。因为电阻抗技术具有检测速度快、灵敏度高、准确性好等优点,阻抗微生物学在食品工业中得到了广泛的应用,主要体现在食品微生物质量控制的许多领域,诸如原料

质量估测、加工工艺评估、成品质量检测、产品货架期预测等。该法目前已经用于细菌总数、霉菌、酵母菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等的检测。

3. 放射测量技术

放射测量法(RM)是一种物理、化学诊断新技术。它主要用于血培养基中微生物的检验。RM的原理是根据细菌在生长繁殖过程中可利用培养基中的 ^{14}C 标记的碳水化合物或盐类的底物,代谢产生 $^{14}\text{CO}_2$,然后通过仪器测量 $^{14}\text{CO}_2$ 的含量增加与否,来确定样品中是否有细菌存在。如向培养基中加入 ^{14}C 标记的葡萄糖,当样品中有细菌时,含 ^{14}C 的葡萄糖可被生长的细菌摄取吸收,经过代谢被利用,结果可能出现以下两种情况:一是 ^{14}C 进入细菌体内被标记,此时可用放射测量仪检测细菌的放射性,由此可直接证明标本中的细菌存在,并根据放射性强弱间接确定所含细菌的数量;二是如果以气态的 $^{14}\text{CO}_2$ 释放出,可用氢氧化季铵盐捕获 $^{14}\text{CO}_2$,以细菌生长测量仪检测放出的 $^{14}\text{CO}_2$,这样可快速、准确地检测出样品中是否有细菌及其细菌的量。这一方法已用于测定食品中的细菌,具有快速、准确度高和自动化等优点。

4. 微热量计技术

微热量计技术(microcalorimetry)是通过测定细菌生长时热量的变化进行细菌的检出和鉴别。这是利用微小热量的变化,对底物降解过程焓的变化进行测量。微生物在生长过程中产生热量,虽然产生的量很小,但仍能通过灵敏的微热量计进行测量。用微热量计对微生物计数时,温谱图必须与绝对微生物细胞数呈相关性,一旦建立了参考温谱图,食品样品温谱图便可与之相比较而得到微生物的绝对数量。

有间歇式和连续式两种类型量热仪,大部分早期研究都是用间歇型的仪器进行的,显微量热仪测定的热力学变化是由分解活动产生的(缪佳铮,2011)。在微生物研究中应用最广泛的显微量热仪是 Calvet 仪器,它的灵敏度很高。将其作为一个快速的检测方法,研究主要集中于利用该仪器对食源性病原微生物进行定性和性质研究。显微量热仪的检测结果随着微生物的培养时间、接种量、发酵底物以及其他相关因素的变化而变化。但这一方法用于鉴定酵母的实用性受到了怀疑,如果通过应用连续型显微量热仪,酵母可被鉴定出来。这一方法已被用于研究罐装食品的腐败,辨别常黏附性大肠杆菌,检测金黄色葡萄球菌的存在与否以及估测牛肉酱中的细菌。

5. 接触酶测定技术

接触酶测定技术是通过计算一个含有接触酶的纸盘,在盛有 H_2O_2 的试管中的漂浮时间来估计菌数。接触酶与 H_2O_2 之间产生生化反应,放出氧气,使纸盘由试管底部浮到表面。当样品中接触酶含量高时(表明接触酶阳性细菌含量高),纸盘上浮的时间短(以秒计)。大多数腐败微生物是嗜冷性细菌。而大多数嗜冷细菌接触酶呈阳性,故可以用接触酶反应来估计食品中的嗜冷性菌群。

(四) 仪器分析技术

1. 气相色谱法(GC)

自从 1903 年茨维特发现色谱,气相色谱(GC)分析技术因为其分析速度快,分离效能较其他分析仪器较高,选择性较好等诸多优点,被企业科研和工业研究广泛应用在环境污染监测、物理分析、药物检测、食品农药残留及工业产品检测等诸多领域。气相色谱法检测微生物原理主要是依据不同微生物化学组成或其产生代谢产物各异,利用上述色谱检测可直接

分析各种体液中细菌代谢产物,细胞中脂肪酸、蛋白质、氨基酸、多肽、多糖等,以确定病原微生物特异性化学标志成分,协助病原诊断和检测。气相色谱应用的原理是将微生物细胞经水解、甲醇分解、提取及硅烷化、甲基化等衍生化处理后,使之分离尽可能多化学组分供气相色谱仪进行分析。不同微生物所得到色谱图中,通常大多数峰呈共性,仅有少数峰具有特征性,可被用以进行微生物鉴定,大量分析检测各种常见细菌、酵母菌、霉菌等。目前顶空气相色谱法也已广泛应用,通过检测培养基或食品密封系统顶部的微生物挥发性代谢产物 CO_2 ,来分析和鉴定微生物。特别是用于分析食品中的酵母菌、霉菌、大肠菌群和乳酸菌的污染程度,以及对沙门氏菌的筛选,对评价食品品质和安全性具有非常重要的意义。该方法具有灵敏度高,检测快速,在 $10^1 \sim 10^8 \text{ CFU/mL}$ 范围内线性好等优点。此外,热裂解气相色谱(Py-GC)在分析细菌方面具有化学分类学价值,可用于实验室检测或鉴定细菌。该法是利用细菌热裂解产生的特有生物标记物,如 2-呋喃甲醛、吡啶二羧酸等,进行细菌检测和鉴定,根据细菌裂解产物的图谱分析,即可进行菌种鉴定。

2. 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法(HPLC)是继气相色谱法之后在经典柱层析法基础上发展的以液体做流动相的色谱方法,在食品安全指标快速检测中的表现尤为出色。高效液相色谱法的原理、方法和仪器的组成基本与气相色谱相同。高效液相色谱法因所用固定相颗粒细而规则,能承受高压,加上使用高压输液设备和高灵敏度的检测器,使其分离效率、分析速度和灵敏度都远远高于经典的液相色谱。与气相色谱相比,高效液相色谱法不要求样品易挥发,只要求样品为溶液,不受样品沸点、热稳定性和相对分子质量等限制。因此高效液相色谱法适用范围远远超过气相色谱法。尤其是高效液相色谱法是在高压条件下溶质在固定相和流动相之间进行的一种连续多次交换过程,它借溶质在两相间分配系数、亲和力、吸附力或分子大小不同引起排阻作用的差别使不同溶质得以分离。它融合了液相和气相两种色谱分析方法的优点,因而功效更明显,在食品检测中应用越来越广泛。

3. 毛细管电泳(CE)技术

毛细管电泳技术泛指以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,依据样品中各组分之间淌度和分配行为差异而实现分离的一类分离技术。毛细管电泳是 20 世纪 80 年代以来发展最快的仪器分析之一,使电泳技术进入了一个崭新的时代——高效毛细管电泳(HPCE)时代,它已成为生物化学和化学分析中最受瞩目,发展较快的一种分离、分析的新技术。HPCE 能用于氨基酸、手性分子、维生素、农药、无机离子、有机酸、染料、表面活性剂、肽和蛋白质、糖类、低聚核苷和 DNA 片段,甚至于整个细胞和病毒粒子的分离分析。利用 CE 可以对粪肠球菌、化脓链球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌 5 种细菌进行分离,不同发育阶段菌体细胞对应着不同特征峰,且大多数细菌在电泳后仍能保持活体状态,活体细菌在线检测可为微生物分析提供新的快速分析方法。

4. 质谱技术

质谱法是应用电磁学原理,分离和鉴定离子化了的分子或原子质量的一种物理方法。质谱技术检测和鉴定微生物主要基于质谱图中是否存在特异性生物标记物分子离子。不同微生物具有不同质谱图,即微生物指纹图谱,采用新型质谱软电离方法可获得微生物质谱图,将实验得到质谱图与已被编入质谱指纹图库中已知微生物指纹图谱进行比对,即可达到检测和鉴定微生物的目的(吴多加,2005)。

5. 微生物自动检测仪

全自动微生物分析系统是一种由传统生化反应及微生物检测技术与现代计算机技术相结合,运用概率最大近似值模型法进行自动微生物检测的技术,可鉴定由环境、原料及产品分离的微生物,无需经过微生物分离培养和纯化过程,就能直接从样品检出特殊的微生物种类和菌群来。全自动微生物分析系统还能同时进行 60 个~200 个样品的分析。采用传统常规鉴定方法与全自动微生物分析系统可以对 11 株革兰阴性菌和 3 株革兰阳性菌进行生化鉴定。应用全自动微生物分析系统进行病原菌鉴定时间平均为 4h~6h,比传统方法鉴定时间缩短,其方法的鉴定符合率为 100%,全自动微生物分析系统具有操作简便、鉴定快速、准确可靠、高度自动化等特点,适用于各类细菌的检验和鉴定,同时也是快速鉴定食品中致病菌的较好方法。

6. 流式细胞技术

流式细胞术(flow cytometry,FCM)是一种对高压液流中的单列细胞或其他生物微粒进行快速分析和分选的技术,可以在一秒钟时间内快速分析上万个细胞,能同时从一个细胞中测得荧光、光散射和光吸收等多个参数,从而获取细胞 DNA 含量、细胞体积、蛋白质含量、酶活性、细胞膜受体和表面抗原等许多重要参数,并且可以根据这些参数将不同特征的细胞分开。流式细胞仪产生于 20 世纪六七十年代,最初应用于临床医学和科学研究,经过数十年的发展完善,现代流式细胞术已经广泛地应用于从基础研究到应用实践的各个方面,在细胞生物学、微生物学、分子生物学、医学、食品科学等领域,发挥着重要的作用。微生物研究中,流式细胞术已经成为一种不可替代的研究技术,在微生物(酵母、细菌等)快速检测中发挥重要的作用。

FCM 实质上是让悬浮的细胞通过流通导管依次到达检测器。薄片状液留下的射流装置用于确定通过检测器的细胞的速率和轨线,并检测细胞属性,是发射荧光、吸收荧光还是对光发生散射。可测量细胞的 1~3 个或更多个属性,然后根据测得的这些属性,通过流式分拣将细胞分类。流式细胞仪主要由细胞流动室(包括样品管、鞘液管)、激光聚焦区、检测系统、数据处理系统等 4 部分组成,其工作原理是将被检测对象制备成一定浓度细胞(微粒)悬液,经荧光染色后,放入流式细胞仪样品管中,细胞在气体压力下进入鞘液管,在鞘液约束下,细胞(微粒)排列成单列从流动室喷嘴高速喷出成为细胞(微粒)液粒,经荧光染色后细胞经激光聚焦区时受激光激发,产生散射光和荧光信号,通过一些波长选择通透性滤光片,可将不同波长散射光和荧光信号区分而将单个细胞(微粒)液滴分离,并由计算机进行图像及数据处理。该仪器已被用于 DNA 含量、染色体组成及细胞表面标记等物质测定。

(1) 流式细胞仪结构及工作原理

流式细胞仪主要由液流系统、光源和光学系统、检测系统、分析系统和分选系统等部分组成。

①液流系统。流式细胞仪只能检测单列的细胞或生物颗粒,液流系统的主要作用是将细胞或生物样品包裹在液滴中形成连续的单列细胞,用于接下来的光学检测。液流系统的核心部件是双层管构成的喷嘴,内层的样品管与贮放样品室相连,细胞悬液在高压作用下从样品管喷射出形成单列细胞;高压鞘液从外层的鞘液管中从四周流向喷孔,包围在样品外周后形成包裹细胞样品的连续液流,从喷嘴射出。鞘液的高速流动形成的聚合力,将待检测细胞限制在液流的轴线上。

②光源和光学系统。经特异性荧光染色的细胞样品需要特定波长的光照激发才能发出荧光,用于检测。光源和光学系统的作用是将特定波长激发光照射到样品流上,并将通过样品的散射光和样品发出的荧光收集并投射到检测器上。现代流式细胞仪的光源一般是激光器和弧光灯,多个光源的组合能够产生所需的特定波长范围的光线。为使细胞得到均匀照射,激光光斑直径应和细胞直径相近,需要通过透镜将激光光束会聚到特定直径,色散棱镜和光栅用来选择特定波长的激光。光线经过样品液滴后会发​​生光线散射和荧光的发射,这部分光路中使用了多种滤光片和二向反射镜,有选择性地使某一滤长区段的光线通过或反射,从而将各色荧光分开,送入相应的检测器,用于同时探测不同波长的荧光信号。

③检测系统。通过样品的散射光和样品发出的荧光需要经过光电转换转变成电信号才能被测量并分析,这部分工作由检测系统完成,其核心是各种检测器和放大电路,检测器通常是光电倍增管(photomultiplier tube, PMT),可以将接收到的光线转换成电信号同时进行增益。放大电路可以进一步将微弱的电信号放大增强,传递到分析系统,根据光电信号的强弱和分析目标的不同可选用线性放大器和对数放大器对信号进行放大。

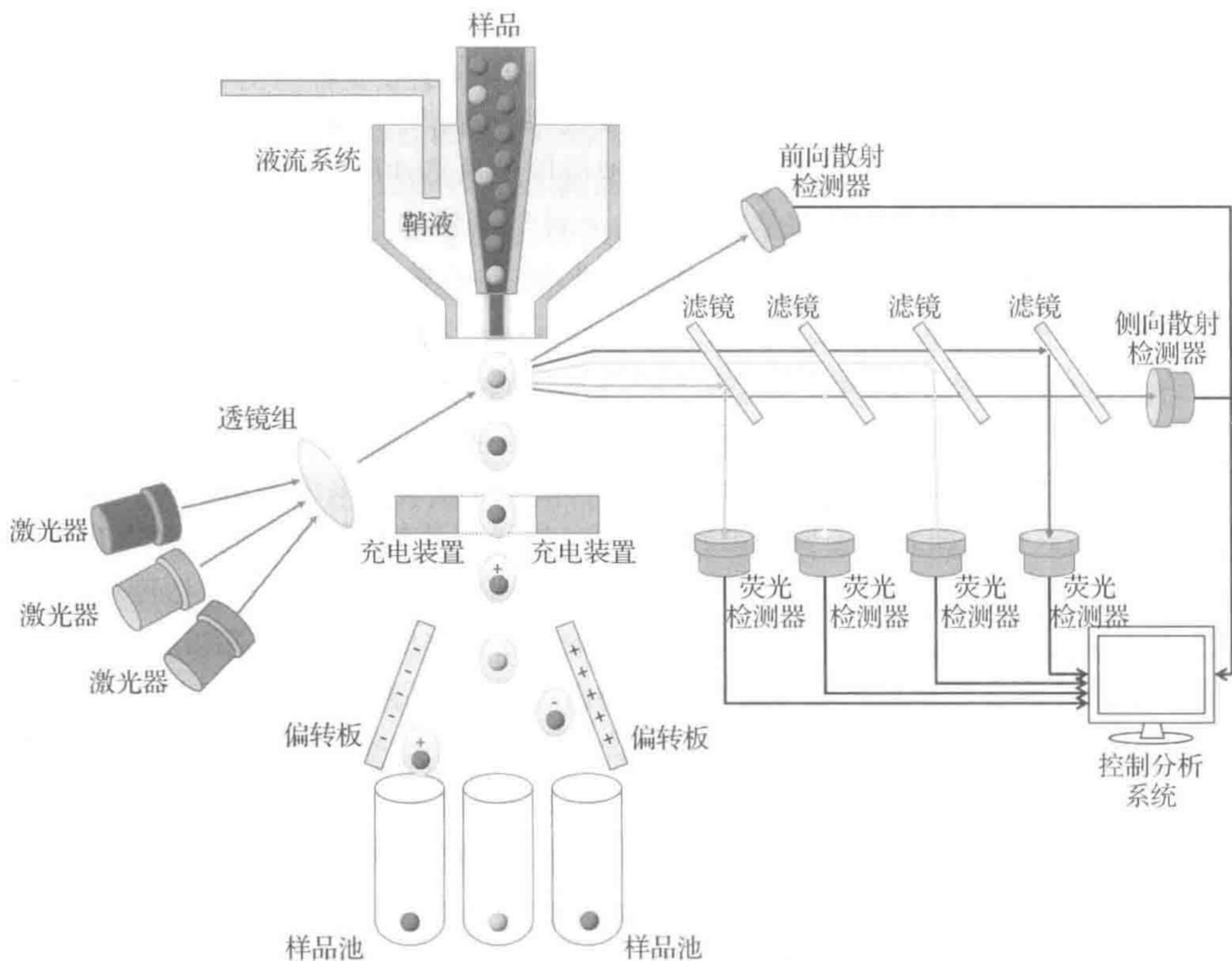


图 8-1 流式细胞仪结构组成及工作原理

④分析系统。放大后的电信号被送往分析系统进行数据处理,现代流式细胞仪的分析系统通常是电子计算机。多通道的检测器输出的电信号,经过模拟—数字转换器输入到计算机中,编译成数据文件,存贮于计算机以备调用分析。计算机的存储和计算能力很强,可对同一细胞的多个参数进行实时存储分析,能够配合流式细胞仪每秒上万个细胞的通量进行实时分析,同时可以根据设定的参数控制分选系统将符合特定条件的细胞分选出来。存贮于计算机内的数据还可以在实测后脱机重现,进行数据处理和分析,并给出结果。

⑤细胞分选系统。细胞分选系统可以将符合特定条件的细胞从细胞流中筛选出来。由喷嘴射出的液流在流体聚合力作用下形成单列细胞流,并进一步被分割成一连串包含单个细胞的小液滴,细胞液滴经过光学系统后,其光信号被检测系统捕捉并输入分析系统进行分析。分析系统根据事先设定的参数判定是否分选该细胞,对符合条件的液滴发出分选信号,而后充电电路将给选定的细胞液滴充上电荷,携带细胞的带电液滴通过静电场时将发生定向偏转,落入相应的收集器中,完成分选。

(2) 细胞参数测量原理

流式细胞仪可同时对同一细胞的多个参数进行测量,获得的信息主要来自细胞经过光学系统时产生的散射光信号和荧光信号。

①散射光信号。散射光是由于细胞及其内部结构的不均匀,使通过的光线的传播方向发生改变,而不改变光的能量,因此激光束通过细胞后将向四周散射光线,散射光的波长和入射光的波长相同。散射光的强度及空间分布与细胞的大小、形态、膜结构和胞内结构密切相关,特定的细胞对光线具有特征性的散射,散射光信号可用于区分不同的细胞。在流式细胞术测量中,常用的是两种方向的散射光测量,与入射光线方向一致的散射光称为前向散射光(FSC),与入射光线呈直角的称为侧向散射光(SSC)。通过测量这两种散射光可以得到很多关于细胞形态和结构的信息。一般来说,前向散射光的强度与细胞的大小有关,随着细胞截面积的增大而增大,对于球形细胞在小角度范围内,前向散射光基本上和截面积大小呈线性关系;侧向散射光与细胞亚结构如细胞膜、胞质、核膜等的性质相关,能对细胞内较大颗粒给出灵敏反映,对侧向散射光的测量可获取有关细胞内部精细结构的颗粒性质的有关信息。

在实际应用中,散射光测量通常是流式细胞术首先进行的必要步骤,通过散射光反映的细胞特性,可以从复杂的细胞样品中筛选出特定的细胞群体,以备进一步分析。

②荧光信号。荧光是指某些物质经特定波长的入射光照射,吸收光能后进入激发态,并发出比入射光的波长更长(能量较低)的出射光的现象。细胞内只有少部分物质和染料能够发出荧光,因此荧光信号要比散射光信号弱很多。流式细胞仪检测的荧光通常分为两种,一种是细胞自身的荧光,一种是细胞经人工标记后结合的荧光染料发出的特征荧光。

自发荧光信号多来自于血红素、核黄素、花青素、叶绿素等细胞色素物质,在荧光染料存在的测量中,通常被视为噪声信号,会干扰特异性染料荧光信号的分辨和测量。特征荧光来自于各种荧光染料,特征荧光可以通过染色、探针结合、免疫结合等方式标记到特定的细胞和亚细胞结构上,用于反映相应的细胞特性。特征荧光的测量能够反映如细胞周期、表面标识、细胞抗原、细胞受体、核酸含量等细胞状态信息,是流式细胞仪分析和筛选特定细胞的主要参考。现代流式细胞仪已能够同时测量多达10种以上的不同荧光信号,并将符合条件的细胞分选出来,用于后续研究。

(3) 在食品科学领域的应用

①检测细菌和真菌数量。基于流式细胞仪高压液流产生单列细胞流的技术特点,流式细胞仪可以被用于细胞数的绝对定量,在食品科学领域,经常被用于检测细菌和真菌的总数,适用于液态食品、水、饮料、酒类等多种样品和产品。流式细胞仪计数菌体的过程通常需要经过膜过滤、离心技术对样品进行前处理,除去影响检测的基质,使样品达到FCM可检测状态。通过散射光特性,可以区分不同类型的菌体,通过特异性的染料标记,达到计数特

定的菌体,区分活菌和死菌等目的,因此流式细胞仪可以在一次运行中检测几种不同类型的菌体样本及其数量。相对于荧光定量 PCR 等间接检测的方法,流式细胞术具有简便、直接的优势,不需要依赖标准曲线,直接“数”出特定类型的细胞和菌体,能检出单个细胞和微生物。相对于平板计数等经典方法,流式细胞术更加灵活、快速、准确,并且不需要耗时的增菌过程,在几十分钟内得到准确的结果。

②监测酵母生理状态。酵母菌是现代食品工业中非常重要的微生物。其中酿酒酵母是与人类关系最密切的一种酵母,是发酵中最常用的生物种类,人类利用酿酒酵母的历史非常悠久,传统上它用于制作面包和馒头等食品及酿酒,在科学研究领域它是重要的真核模式生物,在现代食品工业中它是重要的发酵菌种。酿酒酵母是第一个完成基因组测序的真核生物,人们对其生化过程及细胞周期研究较为深入。

研究发现,酵母同步化培养体系中,气体交换率、CO₂ 产量、乙醇产量的变化均与细胞周期相对应,如 CO₂ 的产量最高时细胞数量也最大,此时细胞代谢活动也最旺盛。流式细胞术在研究酵母的细胞周期方面具有极大优势,它能够监测酿酒酵母细胞周期过程中的生理生化变化以及与发酵有关的各项参数的变化,研究其细胞生长动力学,利于优化生物工艺过程。在酿酒工业等领域,流式细胞术已经可以用于实时监测整个工艺过程,并对其进行优化及质量监控。

③监测细菌生理状态。细菌在医药和食品工业中占有重要地位,工业生产中常用的细菌有:乳酸杆菌、醋酸杆菌、枯草芽孢杆菌、棒状杆菌、短杆菌、假单胞菌、小球菌等,可用于生产乳酸、醋酸、氨基酸、核苷酸、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、维生素、肌苷酸等产品。放线菌是一类主要呈菌丝状生长和以孢子繁殖的细菌,在医药和食品工业中占有重要地位,约 70% 的抗生素是由各种放线菌所产生的,另外放线菌还能产生各种酶制剂(蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶等)、维生素(B₁₂)和有机酸等。

流式细胞术已成为研究细菌生长繁殖及其生理生化状态的重要工具,对细菌细胞周期、生理活性的研究还有利于优化合理工艺过程的策略,改进生产工艺。流式细胞仪可用于鉴别特定的细菌菌种,通过特异性的核酸荧光探针或抗体,流式细胞仪能够分辨和分析特定的细菌菌种,并通过分选系统将细菌从混合培养体系中分离出来。与传统分离鉴定方法相比,流式细胞术使鉴定和分离过程合二为一,在保持特异性的同时,大大提升了菌种筛选效率。流式细胞术能够测定处于各个细胞周期的菌体数量,以及细胞膜状态和膜通透性等多种参数,方便研究物料、培养基成分以及发酵产物等对菌种生长能力和生理代谢的影响,辅助设计验证合理的生产工艺流程。

随着流式细胞术自身性能的持续提升和应用领域的不断扩展,这一技术在医药和食品科学领域正在发挥着越来越重要的作用,必将推动食品科学基础研究和工业生产技术向更加深入和广阔的方向发展。

(五)其他检测技术

1. 生物传感器技术

生物传感是指对生物活性物质的物理化学变化产生感应。从广义上讲,生物传感器是一种与传感器相连的生物感受元件的组成设备。它通过物理、化学换能器捕捉目标物与敏感元件之间的反应,然后将反应的程度用离散或连续的数字电信号表达出来,从而得出被分析物的浓度。生物传感器是一种精致的分析器件,它结合一种生物的或生物衍生的敏感元

件与一只理化换能器,能够产生间断或连续的数字电信号,信号强度被分析成比例。生物传感器在分析生物技术领域具有重要用途。它是一个典型的多学科交叉产物,结合了生命科学、分析化学、物理学和信息科学及其相关技术,能够对所需要检测的物质进行快速分析和追踪。生物传感器的出现,是科学家的兴趣和科学技术发展及社会发展需求多方面驱动的结果,经过 30 多年的发展,已经成为一个涉及内容广泛、多学科介入和交叉、充满创新活力的领域。20 世纪 90 年代以后,生物传感器的市场开发获得显著成绩。传感器的应用领域已渗透到国民经济的各个部门及人们的日常文化生活中。生物传感器特异性强、灵敏度高,能对复杂样品进行多参数检测,可应用于微生物快速检测。

(1) 光学传感器

将细胞固定于传感器表面,由于厚度的变化,光发生折射,光学传感器可以检测到此微小变化。单模双电波导、表面等离子体共振(SPR)、椭圆率测量法、单模双电波导、光纤波导、干扰仪等已被用于致病菌的检测。用共振镜(波型偶合)可以检测金黄色葡萄球菌,检出限为 8×10^6 cells/mL,检测时间为 5min。而利用纯银金属滤膜可检测 1.7×10^5 cells/mL 大肠杆菌,全过程需 15min。这种方法简便、快速、成本较低,但只适用于检测能产生荧光素的细菌,且灵敏度不高(刘霞,2010)。

(2) 生物发光传感器

随着对能表达荧光素酶的噬菌体研究的深入,生物发光传感器的应用越来越广泛。将标记有荧光素酶的基因转入噬菌体的染色质,再把噬菌体感染目标细菌,目标细菌即具有发光能力得以用该法检测。采用 TM4 抗生素检测结核杆菌,灵敏度为 10^1 cells/mL,检测时间 2h。另有一种灵敏度较好的生物传感系统,可以检测沙门氏菌和大肠杆菌,噬菌体专一性地裂解相应的细菌宿主,利用生物发光即可检测所释放的细胞内容物中的 ATP,根据 ATP 与菌体数量的线性关系测定目的微生物的数量。如果以腺苷酸激酶代替 ATP 作为细胞标记物,检测限可降低至 10^3 cells/mL。生物发光传感检测方法的特异性好,能区分活菌体和死菌体。但不足之处在于检测时间太长,灵敏度不高。

(3) 压电免疫传感器

压电免疫传感器的设计思路是在石英晶体电极(金或银)表面固定上一层抗体或抗原活性物质,在液相中通过免疫反应,固定的抗体(或抗原)分子能识别其相应的抗原(抗体)。并特异性结合形成免疫复合物,沉积在电极表面,导致电极表面质量负载的改变。免疫反应前后为晶体振荡频率的变化,根据石英晶体振荡频率的变化量可计算出被测物质的量。最早将压电传感器应用于免疫测定时,是在有塑料涂层的石英晶体表面结合牛血清白蛋白,用于测量其抗体,所得的灵敏度与传统被动凝聚法相似。石英晶体免疫传感器检测沙门氏菌,线性范围为 $10^6 \sim 10^8$ cells/mL,检测时间为 45min。以一种能特异性结合目的抗原的人工合成多肽对晶体进行再生后可重复使用 12 次以上。用石英晶体免疫传感器还可以检测病毒,并且和 ELISA 方法比较,其特异性好、敏感性高、迅速又经济。压电免疫传感器由于有利于进行生命体活动的研究,因此成为生物传感器的研究热点之一。

(4) 表面等离子体共振生物传感器

表面等离子体共振是一种物理光学现象。利用光在玻璃界面处发生全内反射时的消逝波可以引发金属表面的自由电子产生表面等离子体。在入射角或波长为某一适当值的条件下,表面等离子体与消逝波的频率、波数相等,两者将发生共振,入射光被吸收,使反射光能

量急剧下降,在反射光谱上出现共振峰(即反射强度最低值)。当紧靠在金属薄膜表面的介质折射率不同时,共振峰位置将不同。利用 SPR 技术光学生物传感器,通过抑制酶活性来检测牛奶中的 β -内酰胺、抗生素残留和磺胺甲嘧啶。将 SMZ 共价固定在修饰过的羧甲基右旋糖苷金片上,制备 HBS 缓冲液,用含有已知浓度 SMZ 的样品构建标准曲线。将能够与 SMZ 结合的多克隆抗体加入到样品中,SPR 检测器固定化表面用以测定没有结合的抗体数量。

生物传感器从其最初的设想开始就是为了利用生化反应的专一性,高选择性地分析目标物。但是,由于生物单元的引入,生物结构固有的不稳定性、易变性,人们作出了一系列的努力与设想,来提高生物传感器的性能。生物传感器阵列为复杂体系中多种组分的同时测定提供了一种直接、简便的解决方法。目前,国外市场上已有可同时测定 16 种组分的固定式分析仪,这一技术的发展方向是功能的多元化和仪器体积的微型化,即在尽可能小的面积上排列尽可能多的传感器。人们正尝试用干涉、三维高速立体喷墨、光刻、自组装和激光解吸等技术实现这一目标。可见,应用生物传感器微阵列实现多参数的同步检测,正成为生物医学以及食品安全检测的主流。

2. 微阵列技术

阵列是对事物有序排列,根据样品点大小,阵列可分为大阵列和微阵列。大阵列样品点直径大于 $300\mu\text{m}$,一般用胶膜扫描仪显像检测;而微阵列样品点直径小于 $200\mu\text{m}$,必须用特定自动仪和显像设备显像检测。一个非常简单的微芯片可由一固体表面上(例如尼龙膜、玻璃载片或硅芯片)附上少量的来自已知菌属的单链 DNA 构成。当许多未知菌属的单链 DNA 与这一 DNA 芯片接触时,互补菌株就会结合到芯片的特定位点上。由于微阵列样品点很小,因而单个微阵列可容纳数千个甚至上万个样品,这样就大大提高检测效率。目前微阵列有 DNA、RNA、抗体、蛋白质微阵列等,以 DNA 微阵列用途最广泛。DNA 微阵列是将载物玻璃片和膜上作为探针的 DNA 寡聚核苷酸及 cDNA,使其与荧光标记的靶 DNA 相杂交,再扫描显像并测定杂交微阵列中各样品点荧光高度,最后统计分析所得数据。DNA 微阵列已用于快速检测病原细菌,如爱德华氏菌属、亚硝化单胞菌、分枝杆菌、葡萄球菌、大肠杆菌 O157、李斯特氏菌等。

第二节 食品微生物代谢产物分析技术

一、色谱技术

色谱技术是几十年来分析化学中最富活力的领域之一。作为一种物理化学分离分析的方法,色谱技术是从混合物中分离组分的重要方法之一,能够分离物化性能差别很小的化合物。当混合物各组成部分的化学或物理性质十分接近,而其他分离技术很难或根本无法应用时,色谱技术愈加显示出其实际有效的优越性。色谱技术最初仅仅是作为一种分离手段,直到 20 世纪 50 年代,随着生物技术的迅猛发展,人们才开始把这种分离手段与检测系统连接起来,成为在食品、生化药物、精细化工产品分析等生命科学和制备化学领域中广泛应用的物质分离分析的一种重要手段。目前几乎在所有的领域都涉及色谱法及其相关技术的应用,色谱技术的应用日益普遍,色谱技术在科学研究和工业生产中发挥着越来越重要的作用。

(一) 薄层色谱技术

薄层色谱(TLC)是一种快速、简便、高效、经济、应用广泛的色谱分析方法。薄层色谱的特点是可以同时分离多个样品,分析成本低,对样品预处理要求低,对固定相、展开剂的选择自由度大,适用于含有不易从分离介质脱附或含有悬浮微粒或需要色谱后衍生化处理的样品分析。TLC广泛地应用于药物、生化、食品和环境分析等方面,在定性鉴定、半定量以及定量分析中发挥着重要作用。常规的TLC法存在展开时间长、展开剂体积需求大和分离结果差等缺点。高效薄层色谱法是近年来迅速发展的一种高效、快速、操作简便、结果准确、灵敏度高和重现性好的薄层色谱新技术,已广泛用于各个领域。

薄层色谱法:TLC分离的选择性主要取决于固定相的化学组成及其表面的化学性质。常规薄层色谱的固定相为未改性的硅胶、氧化铝、硅藻土、纤维素和聚酰胺等,平均颗粒度 $20\mu\text{m}$,点样量 $1\sim 5\mu\text{L}$,展开时间 $30\sim 200\text{min}$,检测限 $1\sim 5\text{ng}$ 。以正相色谱占主导地位,设备简单,所需资金投入少;不足之处是分离所需时间长,有明显的扩散效应。方法操作简便、准确、可靠。

高效薄层色谱法(HPTLC):采用更细、更均匀的改性硅胶和纤维素为固定相,对吸附剂进行疏水和亲水改性,可以实现正相和反相薄层色谱分离,提高了色谱的选择性。 C_2 、 C_8 和 C_{18} 化学键合硅胶板为常见反相薄层板。高效板厚平均 $100\sim 250\mu\text{m}$ 、点样量 $0.1\sim 0.2\mu\text{L}$,展距 $3\sim 6\text{cm}$,展开时间 $3\sim 20\text{min}$,最小检测量 $0.1\sim 0.5\mu\text{g}$,较常规TLC可改善分离度,提高灵敏度和重现性,适用于定量测定。

薄层色谱法配以荧光检测方式是检测黄曲霉毒素的常用方法。虽然自20世纪70年代后期,高效液相色谱法逐渐得以应用并迅速发展,但两者相比,薄层色谱法具有抗干扰能力强、简便易行、离线检测可反复测试等优点。在检测灵敏度方面,HPTLC的荧光检测方式可达 pg 级乃至更低;在检测速度上,两者则各有所长。据估算,用HPLC和HPTLC定量测定一个样品,分别需要约 25min 和 1.5h ;但当两者同时检测40个样品时,HPLC需要约 15h 而HPTLC仅需 3h 。综上所述,TLC法迄今仍在真菌毒素检测方面占据主导地位。经典TLC法大多采用液-液萃取等作为净化方法,不仅耗时长,而且由于净化效果不佳而导致展开时需采用双相展开以排除杂质干扰。采用MFC净化后,仅用单相展开即可达到分离测定的目的,不仅节省了工作时间,而且进一步减少了有毒有害溶剂的用量,提高了工作效率。

(二) 气相色谱与液相色谱技术

食品微生物发酵或食品样品受各种微生物污染后产生众多的代谢产物,其中的小分子量的挥发性化合物存在相当大的比例,包括酒类、各种风味发酵食品或由于食品腐败引起的影响食品感观的各种化学成分,气相色谱分析成为最常用的分析手段。其检测特点及基本原理在上一节已有介绍。随着科技的不断发展,气相色谱技术也不断更新,新的仪器、新的检测方法和数据分析法都得到了广泛的使用。

高效液相色谱法在食品微生物的检测中有着较广泛的应用,依据不同微生物的化学组成或其产生的代谢产物,利用HPLC法检测可直接分析各种液体中微生物代谢产物,也可确定病原微生物特异性化学组分的检测,从而确定被检测食品是否存在微生物超标等情况。该技术具有完全自动化、灵敏度高、经济等优点,可以大大节省工作量,在实验和诊断中得到了广泛应用。相关内容在上节已有介绍。

(三) 色谱与质谱联用技术

色谱是利用混合物中各个物质在色谱固定相和流动相之间不同的分配作用使不同的组分在两相间反复分配从而实现混合物分离的方法,其在分析化学、有机化学、生物化学的领域有着广泛的应用。质谱法是将物质粒子电离成粒子,通过适当的稳定或变化的电磁场将它们按照空间位置、时间先后等方式实现质荷比分离,通过检测其强度来进行定性定量分析的方法。在众多的分析方法中,质谱法被认为是一种同时具备高特异性和高灵敏度的普适性方法。色谱—质谱联用充分发挥了色谱的分离作用和质谱高灵敏度的检测功能,可以实现对混合物更准确的定量和定性分析,同时也简化了样品的前处理过程,使样品制备更加简便。色谱—质谱联用包括气相色谱—质谱联用(GC-MS)和液相色谱—质谱联用(LC-MS),这两种方法互为补充,适用于不同性质化合物的分析。气质联用技术是最早商品化的联用仪器,适用于小分子、易挥发、热稳定、能气化的化合物,其质谱仪器的电离源一般采用电子轰击电离源。液质联用主要适用于大分子、难挥发、热不稳定、高沸点化合物的分析,主要包括蛋白质、多肽、聚合物等。

1. GC-MS 在食品微生物代谢产物研究中的应用

GC-MS 在微生物代谢产物研究中,首要的任务是对代谢物分离鉴定方法的建立与优化。使用 GC-MS 技术以及可快速鉴定代谢物的方法,可检测 1000 多种化合物,且重现性的误差仅在 6% 以内。利用本方法还可以鉴定酿酒酵母在工业连续发酵与批次发酵时中心碳代谢流物质、氨基酸等胞内代谢产物,将这些代谢组信息与转录组、脂质组相结合,可对酵母发酵过程形成系统性的认识。在考察不同菌种对环境压力的应激反应时,发现原始酵母在抑制剂作用下会强化蛋白分解,导致氧化应激、产生大量活性氧自由基,而耐抑制型酵母中高含量的嘧啶可对细胞起保护作用;酵母的单倍体与双倍体细胞,在乙醇压力下的代谢差异明显减弱,且单倍体的代谢更易受乙醇压力的影响,而这种目标代谢物检测可作为筛选高产菌株的有效途径。GC-MS 对多种化合物具有较强、较灵敏的分析能力,故对于鉴定比较微生物不同菌株之间的代谢物差异、同一菌株在不同生长环境下的代谢变化具有特殊的意义。这一分析技术因其高效、高通量、高分辨率的特点成为药品分析、环保监测、农药残留检测食品微生物及其代谢产物等领域重要的检测手段。

2. LC-MS 在食品微生物代谢产物研究中的应用

HPLC-MS 技术是一种普适性的分析技术,近年来获得了迅速的发展,在食品分析检验方面具有十分广阔的应用前景。比如利用高效液相色谱与大气压化学电离质谱联用(HPLC-APCI-MS)可以检测玉米食品和玉米种子中的玉米烯酮霉素,与用荧光检测器检测方法比较,用 APCI-MS 作为检测器比前者灵敏度提高了很多,对玉米烯酮霉素的检测限下降为 $0.12\mu\text{g}/\text{kg}$ 。并且由于质谱的高灵敏度,还可以对粗提物中的玉米烯酮霉素进行定量检测。该方法中玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇和雪腐镰刀菌烯醇标准溶液的提取离子峰面积与标品浓度分别在 $3\sim 4500\text{ng}/\text{mL}$ 、 $8\sim 5000\text{ng}/\text{mL}$ 范围内呈良好的线性关系,加标实验中三种毒素平均回收率在 $70.9\%\sim 93.7\%$,检出限分别为 5、10 和 $12\text{ng}/\text{g}$,RSD 均小于 10%,具有很好的精密度。

二、质谱检测技术

近期快速发展起来的质谱(MS)凭借其诸多优点已成为一种新型分子水平技术。一个

微生物的质谱鉴定实验,包括样品的采集和制备,整个过程不到 10min。此外,质谱还是一种通用技术,它可以检测到所有类型的病原体,包括病毒、植物细菌、真菌及其孢子、寄生原生动物,并且需要样品量很少,可少于 10^4 个微生物。

目前采用质谱检测和鉴定微生物主要基于质谱图中是否存在特异性生物标记物的分子离子。因此,不同微生物具有不同的质谱图,即微生物指纹图谱。采用新型的质谱软电离方法,如基质辅助激光解吸电离(MALDI)和电喷雾(ESI),可获得微生物的质谱图。最近人们提出了一种基于生物信息学策略的微生物质谱鉴定方法。当对应生物体的基因序列已知时,可根据可能表达的蛋白质序列来预测质谱图中是否存在蛋白生物标记物。如利用 FTICR-MS/MS(傅里叶变换回旋共振质谱)通过推断氨基酸序列和蛋白质组数据库搜索可以实现对完整蛋白的鉴定。样品经提取、分级和处理后,采用该方法,利用高分辨率的二级 FTICR 质谱分析和 MALDI-MS 可以从完整的孢子中发现主要生物标记蛋白,即小的酸溶性孢子蛋白(SASP)。

MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱)是一种强大的分析工具,其优点是灵敏度高,分析时间短,解吸完整分子的质量高达 500000u,在快速鉴定检测微生物方面有很多潜在的应用,如食品中致病菌的检测等。如利用 MALDI-TOF-MS 可以研究多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的全细胞的质量指纹图。在所研究的革兰氏阴性菌都有一系列质量数相差 129 的质谱峰,经推测是肽聚糖逐步失去戊糖或谷氨酸的产物,而革兰氏阳性菌中没有观察到这些离子,这可以作为 MALDI-TOF-MS 鉴定革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的指标。同时,以大肠杆菌为试验对象,可以考察不同基质和蛋白提取溶液对质谱图中峰强度的影响。

三、电子鼻技术

电子鼻是能够模拟人类嗅觉系统的一种人工智能电子仪器,是适用于许多条件下测量一种或多种气味物质的气体敏感系统。电子鼻系统主要由气敏传感器阵列、信号预处理单元和模式识别单元三部分组成。气敏传感器阵列由具有广谱响应特性、较大的交叉灵敏度以及对不同气体有不同灵敏度的气敏元件组成,相当于人类鼻子的嗅觉受体细胞。工作时气敏元件对接触的气体能产生响应,并产生一定的响应模式。信号预处理单元对传感器阵列的响应模式进行预加工,以达到消除噪声、补偿漂移、压缩信息和降低信号(随样品)起伏的目的,完成提取特征、放大信号的任务。模式识别对信号预处理单元所发出的信号做进一步的处理,完成对气体信号定性和定量的识别,包括数据处理分析器、智能解释器和知识库,相当于人类的大脑。理论上,每种气味都有其特征响应谱,根据特征响应谱可区分不同的气味。

在食品工业中,酒、饮料、漱口水等产品的品质一直依靠专家的主观评定,这种方法与卷烟产品的感官评定一样,存在很多弊端,因此人们期待一种更加准确、客观、快速的评价方法。电子鼻技术能识别酒类的特异性挥发物,能识别酒精、烈性酒、葡萄酒和啤酒,其识别率可达 95%。同样地,电子鼻技术也能够实时、准确地检测饮料所散发的气味,可对可乐、橙汁、雪碧等常见饮料进行快速、实时的区分,其识别率高达 95.2%。另外,电子鼻在乳制品识别中也有应用,主要包括不同保质期牛奶的识别、不同产地不同风味奶酪的鉴别、细菌检测和生产过程监控等。

采用电子鼻还可以识别仓储害虫和发霉的粮食,无论虫量多少、虫子死活,它们的气体样本与标准气体样本都有明显的差异,从而能快速检测出粮食是否受到害虫的侵蚀。霉变的粮食含有对人、畜有害的霉菌毒素。谷物在发生霉变过程中会产生霉味、腐败味、酸败味或甜味等气味,这些气味的主要成分是由微生物作用产生的羟基类、醛基类、硫化物等化合物。用电子鼻技术所得数据结合径向基函数(RBF)神经网络进行分析,对发霉粮食的识别正确率可达 92.19%,而电子鼻系统对猪肉新鲜度的识别率也能达 95%。

四、酶联免疫技术

酶联免疫法 ELISA 技术自 20 世纪 70 年代出现开始,就因其高度的准确性、特异性、适用范围宽、检测速度快以及费用低等优点,成为检验中最为广泛应用的方法之一。随着蛋白质分离纯化技术和基因工程技术的不断发展,各种高纯度抗体、抗原和抗体复合物得以制备,单克隆抗体技术的应用,使得该诊断检测技术在特异性、灵敏度和客观性方面都有了大幅度的提高,并且在自动化免疫技术的推进之下进一步具有了精确的定量分析能力,已成为一种应用最为广泛和发展最为成熟的生物检测与分析技术。目前已广泛应用于临床医学、生物学和分析化学等领域。至于其在食品领域中的应用,也出现了很多报道。

ELISA 的分类至今尚无统一的标准。它的基本原理是将已知抗体或抗原结合在某种固相载体上,并保持其免疫活性,测定时将待测样品和酶标抗体或抗原按不同步骤与固相载体表面吸附的抗体或抗原发生反应,用洗涤的方法分离抗原抗体复合物和游离物,然后加入底物显色,进行定性或定量测定。随着该技术在检测分析领域的广泛应用,有些学者根据有关的文献及试剂的来源、标本的情况和检测的具体条件,提出以下几种常用的测定方法:①测定抗体的间接法;②测定抗原的双抗体夹心法;③测定抗原的竞争法,竞争法的特点是反应重复性与完成性好,是目前使用较广泛的测定方法;④捕获法测 IgM 抗体;⑤ABS(avidin biotin system)-ELISA 法;⑥PCR-ELISA 法;⑦斑点免疫酶结合试验(DIA)等。研究者可根据自身的条件和要求,灵活地设计适当的 ELISA 测定方法。它的一般操作是:①固相载体的准备:最常用的是聚苯乙烯微量反应板,规格有 40 孔、72 孔、96 孔,孔板成凹型。应用方便,参加反应的溶液用量少,适用于大规模检测。②抗原或抗体的包被:将抗原或抗体吸附到固相载体的过程称为包被或载体的致敏。③固相载体的封闭:固相载体包被 Ag(或 Ab)后,载体表面可能因残留未吸附蛋白质的活性部位而吸附抗体或酶标抗体,引起试验误差;因此需要先用封闭液封闭,以降低非特异性吸附。④固相载体的洗涤:洗涤是在整个酶联免疫吸附测定的操作过程中不可缺少的一个步骤,每加一层反应结束后均要洗涤固相载体板,目的在于防止重叠反应引起的非特异性吸附。

目前发现能引起人中毒的霉菌代谢产物至少有 150 种以上,常见的产毒性真菌有曲霉菌属、青霉菌属和镰刀菌属等,其中最常见且研究最多的是黄曲霉毒素、赭曲霉毒素等。按 ELISA 法可大大提高样品阳性检出率,在扫描仪上可直接测出数据,这对于酱油系列产品的厂家质量控制以及卫生机构的质量监测提供了快捷的方法,使进一步修改酱油的 AFTB1 限量标准成为可能。目前,市场上出现了在食品中渗入罂粟壳等毒品,危害人民身体健康,现有方法如比色法、极谱法、色谱法和免疫分析法无法有效监测样品,而酶联免疫测定方法灵敏度高,特异性强,操作方便,能快速监测。

基因工程和蛋白质工程的发展,为生物酶标分析技术提供了新的技术思路和模式,弥补

了其在实际应用中存在的一些缺陷和技术局限性,使其具有更为广泛的检测范围、更高灵敏度与特异性和更精确的定量能力,从而使 ELISA 技术以新的姿态出现在食品监测领域中。总之,随着科学技术的发展,检测技术日新月异,ELISA 技术比传统的检测技术具有灵敏度高、特异性好、快速、方法操作简单、样品处理量大、适用范围宽、检测费用低、易商品化等优点,因此可以肯定,ELISA 在食品领域必将得到广泛的应用。

五、PCR 技术及应用

聚合酶链式反应(polymerase chain-reaction, PCR)是美国科学家 Mullis 于 1983 年发明的一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法。故聚合酶链式反应 PCR 又叫体外选择性扩增 DNA 或 RNA 技术,就是模板 DNA、引物以及 4 种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)在 DNA 聚合酶的催化作用下所发生的酶促集合反应,由变性—退火—延伸 3 个步骤组成,应用该技术能在短时间内对特定 DNA 序列作百万倍扩增。

目前常用的 PCR 种类有定性 PCR 和荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 是把荧光基团加入普通 PCR 反应体系中,利用荧光信号积累检测整个 PCR 反应的进程,通过标准曲线对未知物进行定量。荧光定量 PCR 比常规 PCR 技术自动化程度更高、特异性更强,其应用也更广泛。PCR 技术也存在一些缺点:食物成分、增菌培养基成分和其他微生物 DNA 对 Taq 酶具有抑制作用,可能导致检验结果假阴性;操作过程要求严格,微量的外源性 DNA 进入 PCR 后可以引起无限放大产生假阳性结果,扩增过程中有一定的装配误差,会对结果产生影响等等。

(一)EMA-PCR

EMA(ethidium bromide monoazide)是一种荧光插入型的核酸(DNA)结合染料。这种染料最显著的特点是当样品中死、活细胞共同存在时,它能够选择性地与死细胞中的 DNA 共价结合。由于活菌的细胞膜比较完整,EMA 不能渗透到活菌细胞内部;但在细菌死亡之后,细胞膜遭到破坏,EMA 能够很容易地渗透到细胞内部,嵌插到 DNA 分子的双螺旋上。有研究表明,死亡的细菌暴露于 EMA 染液中仅需 1min,EMA 便可透过细胞壁或细胞膜,插入 DNA 的双螺旋,发生共价交叉偶合作用,使其不能发生扩增反应,从而导致死细胞内部的 DNA 在接下来的 PCR 扩增过程中被抑制。

大量研究表明,EMA 与 PCR 相结合的检测技术,能够有效地抑制样品中死细胞 DNA 的扩增,更精确地检测到样品中的活菌细胞。例如有人利用 EMA-PCR 技术检测死、活类志贺邻单胞菌共存的菌液,发现 EMA 能够抑制志贺邻单胞死菌 DNA 的扩增,无假阳性的出现。EMA-PCR 与传统 PCR 相比,其最大优势在于在扩增时具有选择性,能够抑制 PCR 对死菌中的 DNA 扩增,只扩增其活菌的 DNA。但是,EMA 选择死活菌的能力仍然受到一些质疑,EMA 对微生物 PCR 扩增体系的影响还有很多地方尚不明确,例如,EMA 会抑制处于损伤状态的非死亡菌的扩增、EMA 自身会对 DNA 产生破坏等。但 EMA 与 Q-PCR 相结合的方式,无疑为食品中微生物的检测提供了一个新思路,既能够弥补基于 DNA 水平的 PCR 法无法选择活死细胞的扩增不足,又具有常规 PCR 检验的高灵敏度、高特异性,因而具有较大的实用和推广价值。

(二)RT-PCR

RT-PCR 就是将 RNA 的反转录(RT)和 cDNA 的聚合酶链式扩增(PCR)相结合的一种新

的扩增方法。首先在反转录酶的作用下,将 mRNA 反转录合成 cDNA,即用引物与 mRNA 杂交,然后由 RNA 依赖的 DNA 聚合酶(反转录酶)催化合成相应互补的 cDNA 链,最后再以反转录合成的 cDNA 为模板,借助 PCR 技术扩增合成目的片段。其最大优点在于,利用了只有活菌的 DNA 才能转录出 RNA 的原理,用 RNA 反转录出 cDNA 作为扩增的目标片段,以解决死菌 DNA 带来的假阳性问题。

利用 QRT-PCR(real-time quantitative reverse transcription PCR)方法可成功检测出处于活的非可培养状态与饥饿状态的霍乱弧菌。基于 RNA 水平的 PCR 技术检测结果,可以显示细菌当前的代谢活性,进而可以对细菌的代谢活性作出科学的评估。RT-PCR 技术已经广泛地应用于临床医学、分子生物学和微生物学等领域,一度被称为活菌检测的金标准,但仍有一些不确定因素限制了 RT-PCR 的使用,如样品的选择、靶点 RNA 的选择、逆转录体系的选择、扩增方式的差异等。但 RNA 作为生物活性的标志,RT-PCR 不仅能够有效地区分死活菌,其检测结果还能作为菌体代谢的活性指标,因此,RT-PCR 有着极其重要的研究价值。

(三)PCR-DGGE

由于食品成分的复杂性和微生物代谢途径的多样性,食品中微生物鉴定是一件重要但复杂的工作。现在可通过分子生物学的方法在分子水平上分析食品中微生物群落结构和检测微生物群落动态变化。

原理:应用分子生物学分析技术已成为对传统检测技术的有力支持,采用 PCR-DGGE(多聚酶链式反应结合变性梯度凝胶电泳指纹分析技术)方法可以分析检验 rRNA 的基因,根据电泳条带的多寡和条带的位置能够揭示微生物群体的多样性,将分离的各指纹图谱条带切下进行扩增测序或者直接与类群专一性探针杂交进行分析,则可以得到更为详细的遗传信息。近年来微生物生物化学分类的一些生物标记,例如呼吸链泛醌、脂肪酸和核酸开始被用于环境样品中微生物的种群分析,其中以 16S rDNA 的基因测序为基础的分子生物学技术已经成为分析自然环境中微生物种类的重要工具(杨佐毅,2006)。

目前在细菌分类学及菌种鉴定研究中最有用和最常用的分子是 rRNA,rRNA 约占细胞中 RNA 总量的 75%~80%,编码 rRNA 的 DNA 序列中 G+C 含量较高,通常可达 53%~54%,真核生物有 5.8S,1.8S,28S,5S,四种 rRNA,而原核生物只有 5S,16S,23S 三种 rRNA,其中 16S rRNA 基因大小适中(约 1.5kb),不但含有高度保守的基因片段,而且在不同的菌株间也含有变异的核酸片段,因此其应用最为普遍。分析时可利用恒定区序列设计引物,将 16S rDNA 进行 PCR 扩增或对 16S rRNA 进行 RT-PCR 扩增,产生长度相同但序列有异 DNA 片段混合物,然后利用可变区序列的差异对不同菌属、菌种的细菌进行分离。

方法:采用 PCR-DGGE 进行食品微生物检测时,首先要提取食品样品中的 DNA,利用保守的基因片段如细菌中的 16S rRNA,真菌中的 18S rRNA 或 26S rDNA 或等基因片段作为模板,在一对特异性引物的作用下对样品中微生物中的 rDNA 进行 PCR 或 RT-PCR 扩增,核酸扩增后电泳获得的指纹图谱包含了与多种微生物相对应的一系列条带,可以将这些条带进一步纯化和进行序列分析鉴定出微生物的种类。

应用:RT-PCR-DGGE 方法可用于检测食品中的活泼微生物,通过对特异 rDNA 序列或目的基因的分析可以检测发酵过程中存在的微生物。PCR-DGGE 指纹分析技术可应用于微生物发酵研究和发酵食品风味和质构分析,例如对我国传统白酒发酵和中药材种质资

源进行研究。这一技术还可用于检测某些名优食品中的微生物种类从而判断其地理来源和产品质量。

Orphan 等通过扩增水样中微生物群落总 DNA 的 16S rDNA 片段并克隆建库分析了高温油田微生物群落结构的组成;余跃惠等基于 16S rDNA V3 高可变区的 PCR-DGGE 图谱分析结合条带割胶回收 DNA 进行序列分析,对新疆油田注水井和相应采油井微生物群落的多样性进行了比较并鉴定了部分群落成员(余跃惠,2007)。程海鹰等采用 PCR-DGG 分析了在高温、高压和厌氧条件下富集培养的油藏内源微生物。这些研究探讨了油藏微生物的种群多样性,为内源微生物采油提供了清晰的生态学背景,从而为内源微生物提高石油采收率的机理研究提供更多理论依据。但是目前还没有利用该技术对油藏微生物进行指导分离(程海鹰,2005)。

六、磁性纳米材料技术

功能化微纳米磁性材料是 20 世纪 80 年代出现的一类新型纳米材料,主要包括磁性纳米粒子以及基于磁性纳米粒子制备的磁性微球等。因其具有比表面积大、在溶液中分散性好、吸附速率快以及有磁响应性等特点,越来越多地被应用于食品微生物检测领域。

其中,以功能化微纳米磁性材料为吸附剂的磁固相萃取(MSPE)样品前处理技术已被广泛应用于各类复杂样品基质中待测物的富集与纯化,可有效提高待测物的富集效率,简化富集、净化过程,缩短样品前处理时间。为进一步提高净化效率,研究人员建立了基于生物识别元件和磁性材料的磁亲和固相萃取法(MASPE)。通过将可特异性结合待测物的生物识别元件(如抗体、适配子、酶、受体和抗原)偶联在磁性材料表面制备磁亲和固相萃取材料,以分散固相萃取模式净化、富集样品中的待测物,使其在具有 MSPE 优点的同时,大大提高了吸附的特异性。与传统的亲和固相萃取柱(SPE)相比,MASPE 的吸附剂表面积大,在溶液中分散性好,提高了吸附效率,同时避免了过柱操作步骤。

此外,生物识别元件功能化微纳米磁性材料作为标记物、载体及吸附剂在生物传感器检测中的应用亦日趋活跃。生物传感器由生物识别元件和各类信号转换器组成,可实现对靶向目标物的分析和检测,具有灵敏度高、选择性优良、操作简便及可连续在线分析等优点。将微纳米磁性材料的优点与生物传感器结合,可有效提高生物传感器设计的灵活性及检测灵敏度。当检测真菌毒素时,纳米磁性材料作为生物识别元件,在各个检测方法中都有应用。磁性微纳米材料在色谱仪器分析方法中的应用首先结合色谱仪器分析法进行定量检测的表面修饰抗体或适配子的磁亲和固相萃取吸附剂,有效简化了富集、净化流程,缩短了前处理时间,提高了净化效率。

(一)磁性微纳米材料在常规免疫学检测方法中的应用

免疫分析方法是生物样品中毒素残留检测常用的筛查方法,具有简单、灵敏、快速及经济适用等特点。生物识别元件功能化磁性微纳米材料在免疫学检测方法中的应用有以下两种形式。一种是以抗体功能化磁性微纳米材料为吸附剂建立 MASE 前处理方法,洗脱液用酶联免疫吸附法(ELISA)检测。如用 AFB1 抗体修饰的亚微米磁珠富集酱油中的 AFB1 并结合 ELISA 方法检测。该检测方法操作简单,灵敏度高且与国标中有机溶剂提取法相比,有机溶剂使用量少。

另一种则是以磁性粒子作为抗体的固相支持物,在磁性粒子表面进行酶联免疫吸附检测

法(mp-ELISA)。与传统 ELISA 方法不同,微纳米磁性材料粒径小,表面积大,偶联容量高,溶液中分散性好,能增加反应面积,大大提高抗原抗体的反应效率。与此同时,超顺磁性使其在反应或洗涤后可在外加磁场作用下固定在孔板表面,实现与剩余反应物或洗脱液的有效分离,减小基质干扰,操作简便。如在赭曲霉毒素 A(OTA)多抗标记的磁珠表面进行藻红荧光蛋白标记的 OTA 与样品中 OTA 的竞争免疫学反应后,将磁珠上荧光蛋白标记的 OTA 洗脱,用流式细胞仪定量,并将该方法用于小麦或麦片中 OTA 的检测,LOD 为 $0.15\mu\text{g/L}$ 。

(二)磁性微纳米材料在电化学生物传感器中的应用

电化学生物传感器是由生物识别元件与电化学转换器(电位型或电流型的电极)组成的,利用电流或电势作为检测信号的分析仪器。其检测技术简单、灵敏度高。由于可有效提高分析灵敏度,近年来纳米颗粒标记的生物材料在电化学生物传感器中的应用引起了国内外科研工作者的广泛关注,但其仍存在如下缺陷:生物分子分离过程复杂;缺乏快速、简便、高效的生物分子固定方法;抗体、抗原等生物活性分子在电极表面的固定量少,且易脱落,致使检测灵敏度低、线性范围窄;检测后电极表面的免疫复合物不易去除,使传感器界面不能更新,无法反复使用等。而将磁性纳米材料与生物识别元件相结合应用于不同电化学传感器中可有效弥补以上的不足,改进传感器的性能。在磁场作用下,偶联有抗体、抗原等生物分子的磁性纳米粒子可方便地实现快速分离富集、靶向定位及从电极表面移除等,从而缩短分析时间、实现电极表面的快速更新。此外,利用微纳米磁珠可偶联大量生物分子的优点可使检测信号增强,电子传递的化合物加快,从而大幅度提高电化学检测灵敏度。基于上述特点,磁性纳米材料在电化学生物传感器领域具有重要的意义及广阔的应用前景。

如以 DNA 适配子为生物识别元件,超顺磁性纳米粒子为其载体,碱性磷酸酶(ALP)为信号转换元件的电化学传感器。利用电极背面的磁铁,表面偶联有 OTA 适配子的纳米磁珠被组装在工作电极表面。检测时,在反应孔中加入含 OTA 的样品及 ALP 标记的 OTA,与磁珠上的适配子进行竞争结合后洗去未结合反应物。再加入无电化学活性的萘磷酸,其在 ALP 催化作用下可转变成具活性的萘酚,再用差分脉冲伏安法(DPV)检测萘酚含量。由于磁珠表面存在大量生化反应位点及电化学检测方法的引入,该方法可实现对样品中 OTA 的简便、灵敏、快速的检测。在葡萄酒中的加标回收实验表明,其检测限为 $0.11\mu\text{g/L}$,相对标准偏差(RSD)低于 5%,重复性好。与传统的烦琐电极修饰过程相比,该方法简便地利用外加磁场即可将生物分子快速富集至电极表面。此外,该电极在 4°C 存放 4 周后检测能力无变化。

值得指出的是,基于电化学检测的微流控芯片生物传感器在真菌毒素检测中的应用可极大地缩短分析耗时。微流控芯片检测是以微管道网络为结构特征,在芯片上设计各功能单元,形成进样、反应、分离、检测于一体的快速、高效、低能耗的高集成度微型分析装置,易于实现高通量自动化大规模检测。将磁性材料与微流体器件结合,使磁珠与样品的混合、反应、分离及电极检测在微流控芯片上完成,可使微流控检测兼具磁珠的操控简易性。目前真菌毒素的磁珠微芯片检测均基于在抗体功能化磁珠表面进行的酶标真菌毒素与样品中真菌毒素的竞争 ELISA 反应。

(三)磁性纳米材料在光学生物传感器中的应用

光学生物传感器由生物识别元件和光学转换器组成,具有高灵敏度、宽线性范围、简单操作、快速、高活性的发光反应等优点。将磁性材料应用于光学生物传感器能有效避免样品

或反应体系中可发光干扰物及未结合标记物对检测的影响。

光学免疫传感器根据标记与否可分为有标记和无标记两种类型。表面等离子体共振 (SPR) 属于无标记类型, 该方法与免疫法相结合, 具有特异性好、灵敏度高的优点。将表面偶联抗体的磁性纳米粒子通过磁场固定在 SPR 传感器表面, 通过测定共振角的变化检测 OTA, 检测限为 $0.94\mu\text{g/L}$ 。

标记型光学免疫传感器是更为常用的光学传感器类型, 但传统的荧光标记技术耐光性差、光强度较弱。因此, 近年来建立了一些改进的荧光标记技术, 并被应用于真菌毒素的检测。为提高传统荧光标记物的荧光强度、增强抗光漂白性, 研究人员将大量有机荧光染料分子用纳米颗粒包裹或通过化学键交联在纳米颗粒内部, 以期得到性能更佳的新型荧光纳米材料。比如可以通过合成掺杂大量罗丹明分子的二氧化硅纳米粒子作为荧光标记物, 再在其表面偶联抗体 AFB_1 (anti- AFB_1 - SiO_2 -RB) 作为识别元件, 并以 AFB_1 -BSA 修饰的磁性纳米颗粒作为免疫探针, 检测时将两者与样品混合发生竞争免疫反应。由于免疫探针带磁性, 所得识别元件——免疫探针复合物可方便、快速地通过磁分离、清洗及重悬等步骤进行净化、富集。所得免疫复合物可用 ELISA 微孔板读取仪或程序注射流系统 (SI) 两种方法进行荧光检测: 前者 LOD 为 $0.2\mu\text{g/L}$; 后者 LOD 为 $0.1\mu\text{g/L}$ 。

电化学发光免疫检测法 (ECLIA) 是一种既具有电化学发光法的灵敏高、背景信号低及可简单地通过调节电极电压进行控制等特点, 又具有免疫学检测的高选择性的检测方法, 适于食品等复杂基质中痕量物质的快速分析。量子点 (QD) 是一类以碲化镉、硒化镉、硫化镉等为主要成分的具有电化学发光和光致发光特性的新型纳米荧光材料。与传统有机荧光标记物比较, 其荧光强度较高、稳定性好、激发波长较宽, 越来越多地被用于目标分子的标记和检测。

综上所述, 基于表面偶联容量大、可在液相中分散以及易于操控等优良特性, 生物识别元件功能化磁性微纳米材料在真菌毒素检测中的应用日益增多, 有效简化了真菌毒素的检测流程、缩短了检测时间并提高了检测灵敏度。其应用方法有多种, 各种方法都具有优缺点。因此, 应依据检测要求、检测条件等具体情况选择适当的方法测定待测样品。磁性材料应用于样品前处理中并结合色谱法检测, 定量准确、灵敏度高, 但是需要昂贵的仪器, 有机试剂用量较大, 危害环境及实验人员健康; 在常规免疫学检测中, 酶联免疫吸附检测法具有灵敏、简单、快速等特点, 但干扰因素较多, 对检测结果造成一定影响; 在生物传感器检测中, 与常规的 ELISA 方法相比, 利用 EIS、微流控等技术的免疫传感器具有特异性强、检测时间短、检测范围大及可以实现在线检测、操作简单等优点。但是, 目前已报道的基于磁性微纳米材料的真菌毒素免疫传感器在再生性、稳定性、使用寿命等方面的研究较少, 限制了它的实际应用及商业化前景, 需要进一步加强。此外, 将生物识别元件偶联至磁性材料表面易造成识别元件的亲合力下降, 影响富集效率及传感器检测灵敏度。因此, 研究与固相界面偶联对生物识别元件活性影响的机制, 对制备生物识别元件功能化磁性微纳米材料具有重要的意义。

虽然目前生物识别元件功能化磁性微纳米材料在真菌毒素检测中的研究已取得了一定的成果, 但与化学合成的传统 SPE 材料相比, 生物识别元件制备流程复杂、费用昂贵且无法重复利用等缺陷限制了其应用。因此, 开发稳定性高、可重复使用、成本低, 同时兼具特异识别能力的新型识别元件, 并将其用于功能化修饰磁性微纳米材料是识别元件功能化磁性微

纳米材料的重要发展方向之一。表面分子印迹磁性材料以分子印迹聚合物为识别元件,兼具识别特异性和高稳定性,制备相对简单,可有效降低检测成本,有望成为真菌毒素检测的重要工具。

思考题

1. 食品微生物的生物检测技术有哪些,这些技术的检测原理如何?
2. DGGE 技术的优势和劣势分别是什么?
3. 微生物的仪器检测技术有哪些,请比较这些技术的优缺点。
4. 请举例说明流式细胞技术在微生物分析中的原理及应用。

参 考 文 献

- [1]陈诺,唐善虎,岑璐伽,等. 多重 PCR 技术在食品微生物检测中的应用进展[J]. 中国畜牧兽,2010,37(10):72—75.
- [2]程海鹰,肖生科,汪卫东,等. 变性梯度凝胶电泳方法在内源微生物驱油研究中的应用[J]. 石油学报,2005,6:82—85,89.
- [3]高晓平,韩颖,黄现青. 食品病原微生物分子检测技术研究进展[J]. 粮食与油脂,2008(9):47—48.
- [4]纪勇. 用于溶藻弧菌快速检测的免疫磁珠技术的研究[J]. 厦门:集美大学,2011.
- [5]蒋志国,杜琪珍. 食品病原微生物快速检测技术研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(3):165—170.
- [6]缪佳铮,张虹. 仪器分析方法在食品微生物快速检测方面的应用[J]. 食品研究与开发,2009,30(3):166—119.
- [7]刘霞,李宗军. SPR 传感器在食品微生物检测中的应用[J]. 食品科学,2010,31(9):201—205.
- [8]余跃惠,张凡,向廷生,等. PCR-DGGE 方法分析原油储层微生物群落结构及种群多样性[J]. 生态学报,2005(2):237—242.
- [9]唐佳妮,吕元,张爱萍,等. 阻抗法的研究进展及其在食品微生物检测中的应用[J]. 中国食品学报,2010,10(3):185—191.
- [10]吴多加,李凤琴. 在食品微生物检测和鉴定中应用的一种质谱新技术[J]. 中华预防医学杂志,2005,39(5):361—363.
- [11]杨佐毅,李理,杨晓泉,等. PCR-DGGE 指纹分析技术在食品微生物检测中的应用[J]. 食品工业科技,2006,27(2):201—203.
- [12]张冲,刘祥,陈计峦. 食品中微生物检测新技术研究进展[J]. 食品研究与开发,2011,32(12):212—215.
- [13]张凡非,杉山宽治,西尾智裕,等. 利用免疫磁珠法分离环境及食品中产生 TDH 副溶血性弧菌的研究[J]. 中国卫生监督杂志,2004,1:7—9.
- [14]张小强,赵晓蕾,周鑫,等. 免疫磁性微球的制备及其应用于食品微生物检测的研究进展[J]. 化工进展,2009,28(8):1427—1430.
- [15]张香美,刘焕云. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(11):1669—1672.
- [16]朱许强,冯家望,王小玉,等. 应用可视芯片技术检测食品中常见产毒微生物的方法研究[J]. 华南农业大学学报,2011,32(3):68—72.



陕西师范大学
SHAANXI NORMAL UNIVERSITY

研究生教育教学改革研究项目
(研究生优质课程项目)

生物实验室安全及大型仪器应用

激光共聚焦显微镜技术

主讲教师 李忠岐

生命科学学院实验教学中心





1

激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

2

激光扫描共聚焦显微镜的结构

3

激光扫描共聚焦显微镜工作原理

4

激光共聚焦显微镜使用操作方法

激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

传奇的认知科学家和人工智能先驱

Marvin Minsky

1957年，Marvin Minsky提出了共聚焦显微镜技术的某些基本原理，获得了美国的专利。





激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

- ◆ 1967年，Egger和Petran成功地应用共聚焦显微镜产生了一个光学横断面。
 - ◆ 1977年，Sheppard和Wilson首次描述了光与被照明物体的原子之间的非线性关系和激光扫描器的拉曼光谱学。
 - ◆ 1984年，Biorad为公司推出了世界第一台商品化的共聚焦显微镜，型号为SOM-100，扫描方式为台阶式扫描。
 - ◆ 1986年MRC-500型改进为光束扫描，用作生物荧光显微镜的共聚焦系统。
 - ◆ 1987年White和Amos在英国《自然》杂志发表了“共聚焦显微镜时代的到来”一文，标志着LSCM已成为进行科学研究的重要工具。
 - ◆ 随后Zeiss、Leica、Meridian、Olympus等多家公司相继开发出不同型号的共聚焦显微镜，产品的性能不断改进和更新，应用的范围也越来越广。
-



激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

目前激光共聚焦显微镜的发展类型：

- ◆ 高分辨与超高分辨率激光共聚焦显微镜
 - ◆ 转盘式激光共聚焦显微镜
 - ◆ 双光子激光共聚焦显微镜
 - ◆ 白激光共聚焦显微镜
 - ◆ 激光共聚焦显微镜+扫描电镜结合
-



激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

激光扫描共聚焦显微镜的发展背景

激光扫描共聚焦显微镜（Laser scanning confocal microscope）是20世纪80年代中期发展起来并得到广泛应用的高新技术，它是激光、电子摄像和计算机图像处理等现代高科技手段与传统的光学显微镜结合产生的先进的细胞分子生物学分析仪器，在生物及医学等领域的应用越来越广泛，已经成为生物医学实验研究的必备工具。

传统荧光显微镜使用荧光物质标志细胞中的特定结构，不仅图像与背景的对比如增强，而且由于许多荧光显微镜的光源使用短波长的紫外光，大大提高了分辨率($\delta=0.61 \cdot \lambda/NA$)。缺点：

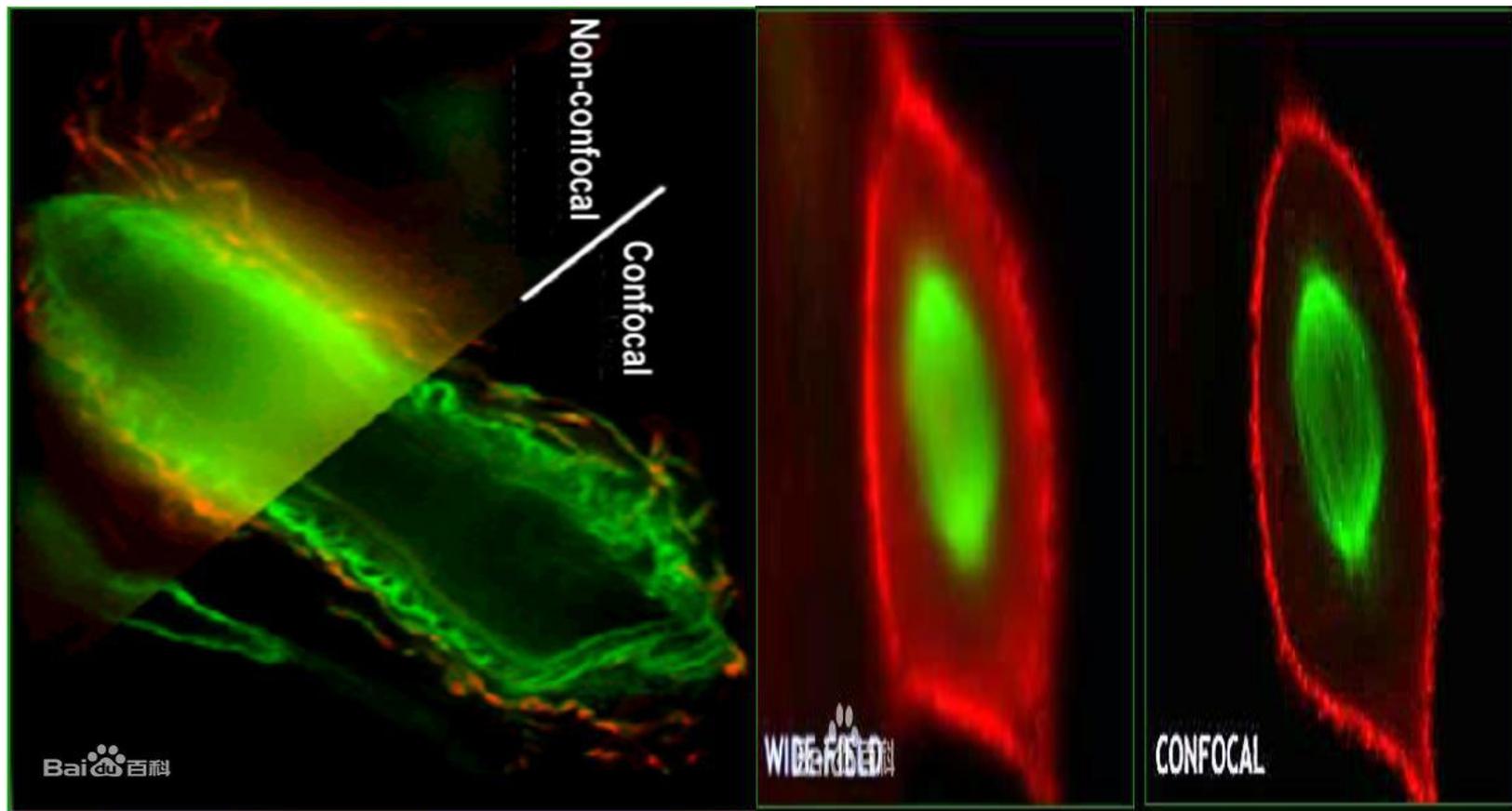


激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

- ❖ **1、** 观察的荧光标本稍厚时，焦平面以外的荧光结构模糊、发虚，分辨率大大降低。原因是假若荧光标记的结构在不同层次上都有分布，且重叠在一起，荧光显微镜不仅从焦平面上收集光量，而且来自焦平面上方或下方的散射荧光也被物镜所接收
 - ❖ **2、** 荧光具有强散射性，造成图像实际清晰度不高
 - 3、** 荧光漂白很快，荧光图像的拍照有困难
 - 4、** 若荧光滤片选配不当，多荧光标记样品易形成光谱交叉，图像串色现象。
-

激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

共聚焦与普通荧光显微镜图像对比





激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

激光扫描共聚焦显微镜是在传统光学显微镜基础上用激光作为光源（方向性好，单色性好，亮度高，偏振性，光谱不连续性），采用共轭聚焦原理和装置（图像清晰度高），并利用计算机对所观察的对象进行数字图像处理观察、分析和输出。其特点是可以对样品进行断层扫描成像（轴向和侧向分辨率高），观察和分析细胞的三维空间结构。不仅可观察固定的细胞、组织切片,还可以对活细胞的结构、分子、离子及生命活动进行实时动态观察和检测，是形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具，极大地丰富了人们对细胞生命现象的认识。



激光扫描共聚焦显微镜的发展历史

激光扫描共聚焦显微镜的局限性

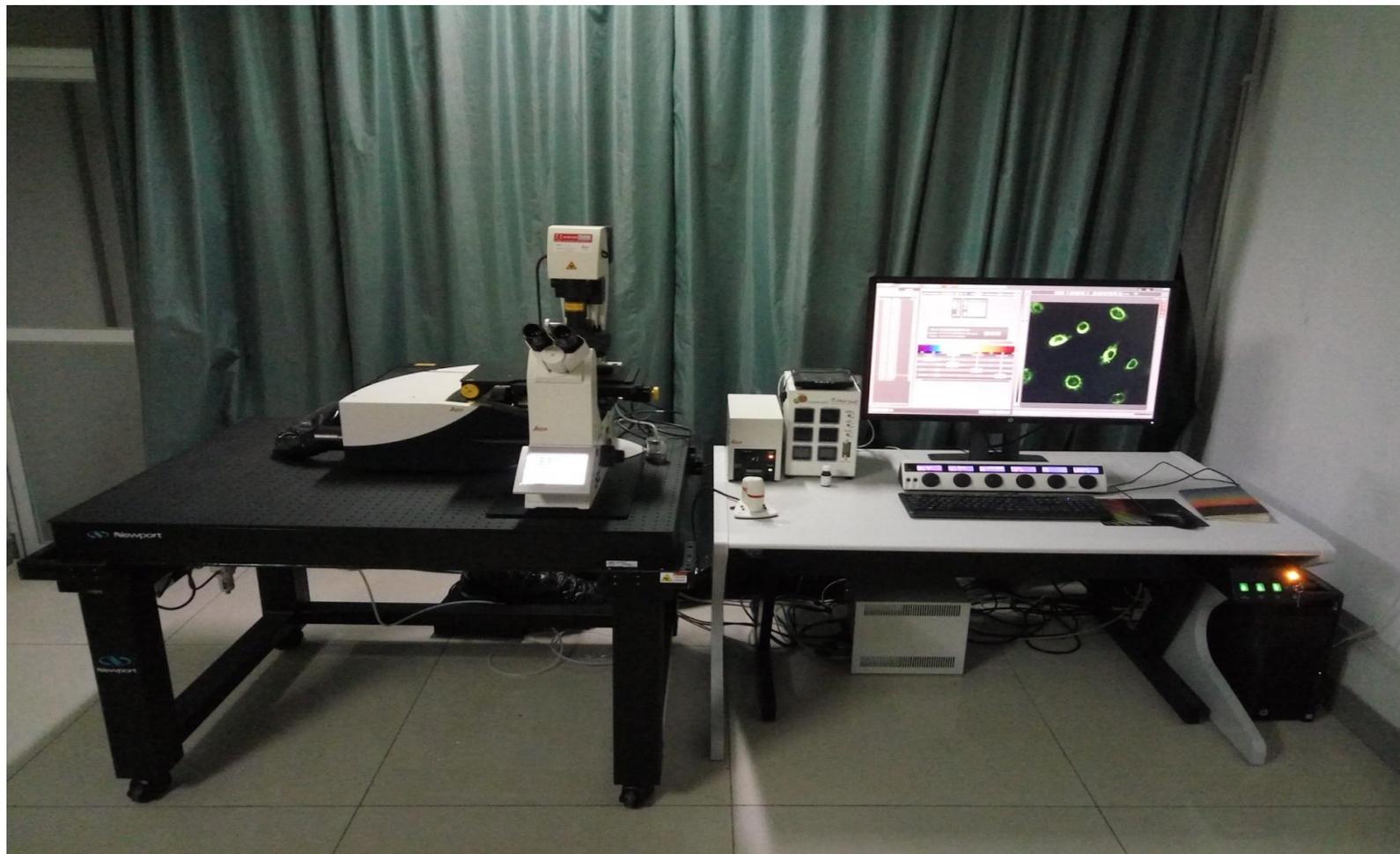
1、标记染料的光漂白：

为了获得足够的信噪比必须提高激光的强度；而高强度的激光会使染料在连续扫描过程中迅速褪色

2、光毒作用：

在激光照射下，许多荧光染料分子会产生单态氧或自由基等细胞毒素。

Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构

激光扫描共聚焦显微镜主要由以下几部分组成：

1、激光光源

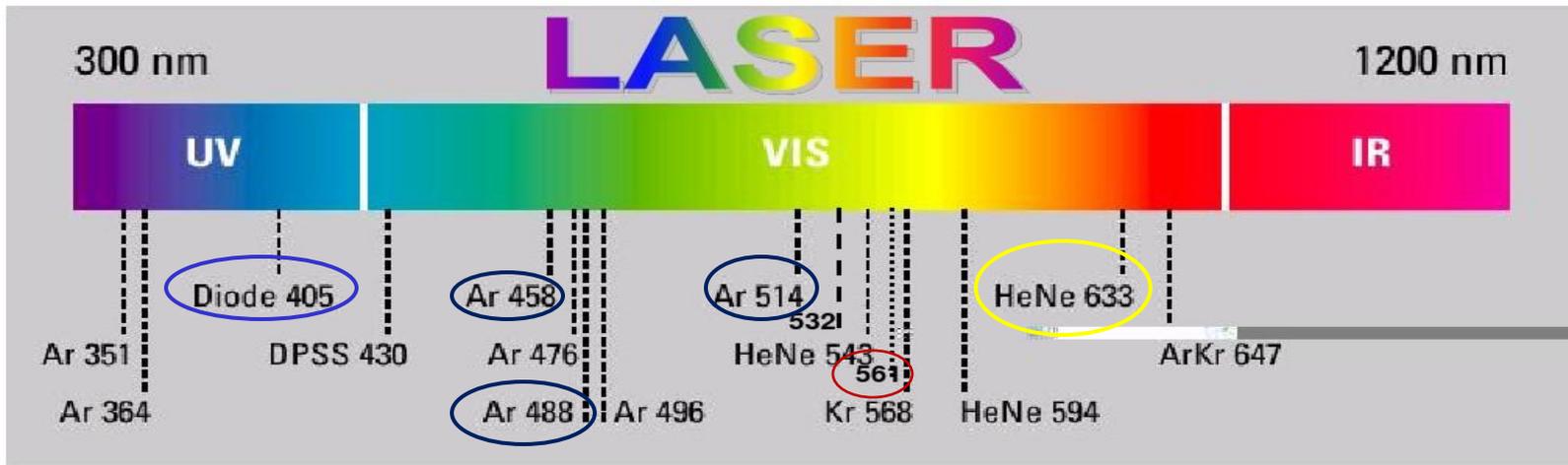


Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构



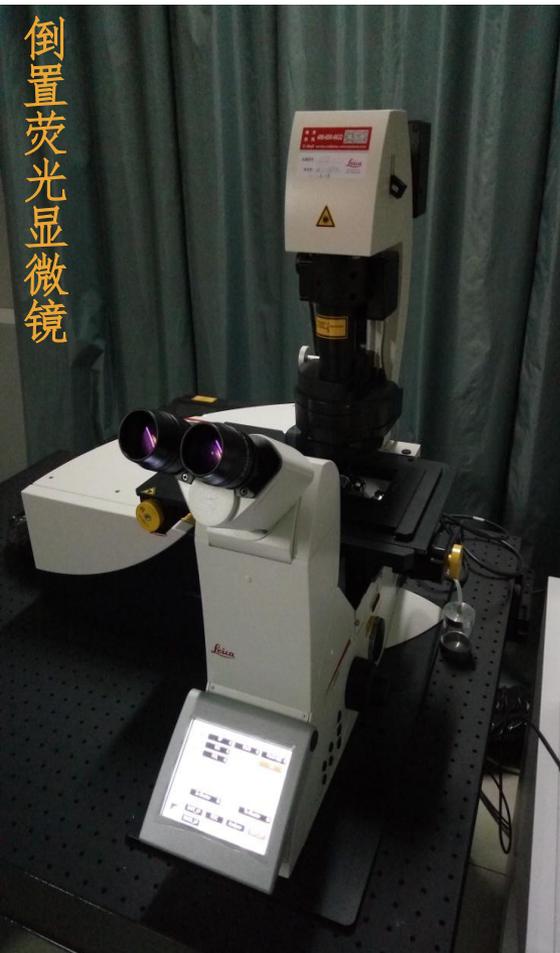
Living up to Life

激光



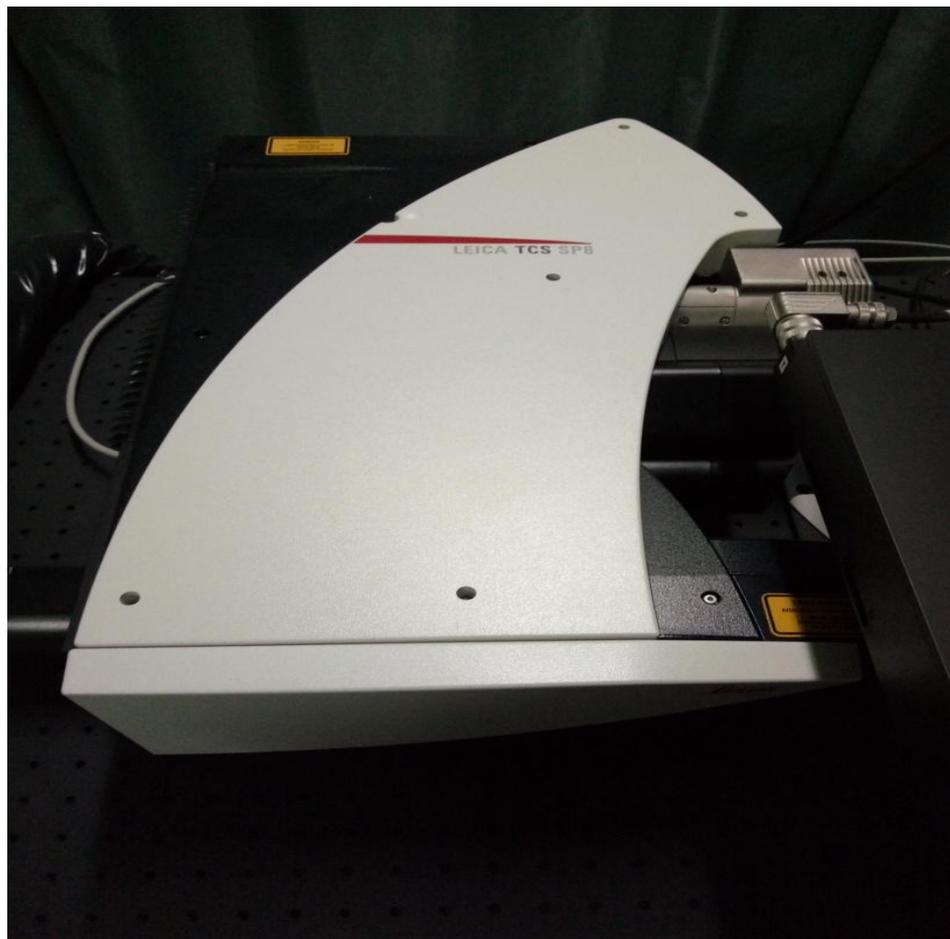
Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构

2、荧光显微镜系统



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构

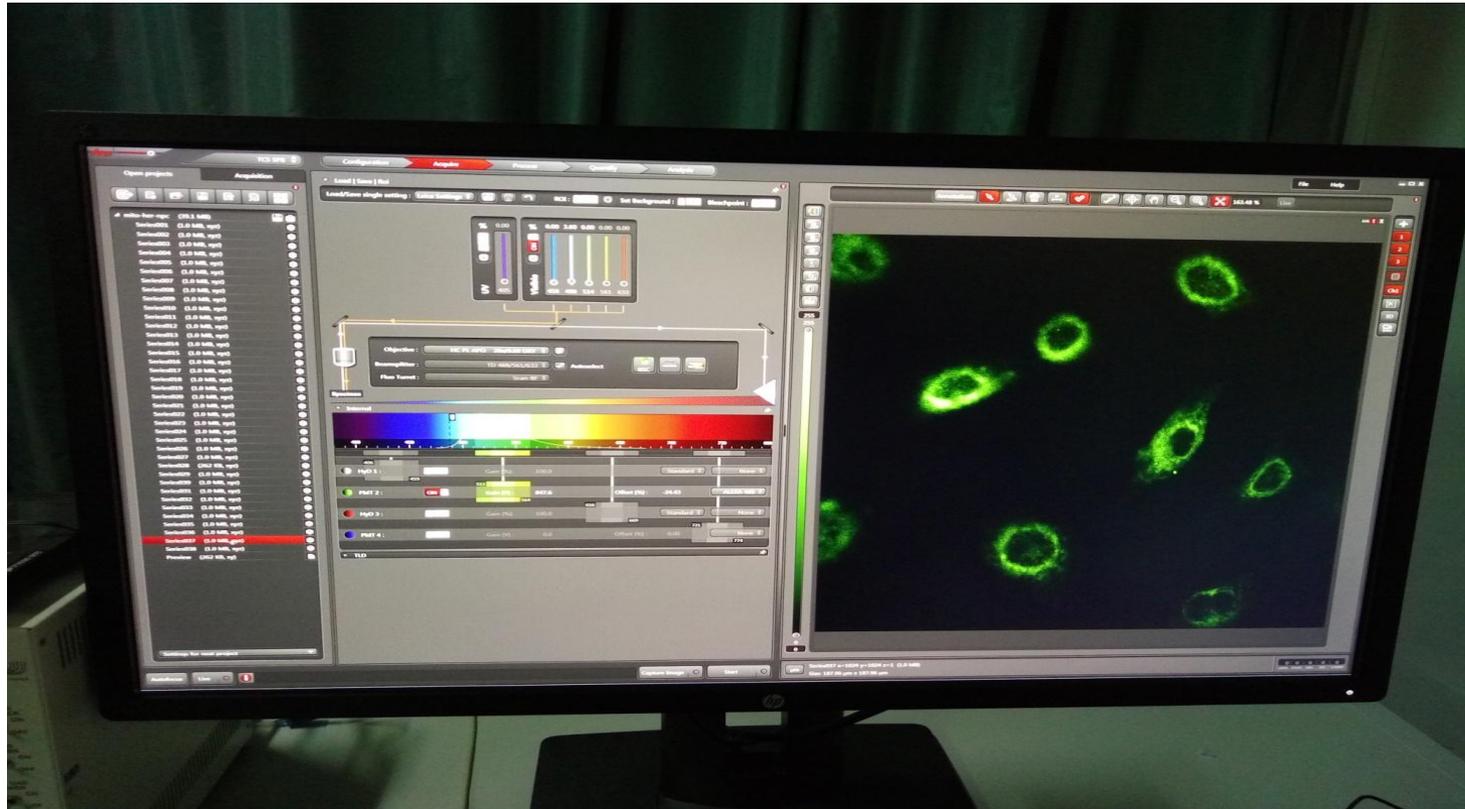
3、扫描与检测器（针孔光栏、分光镜、发射荧光单色器和检测器）



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构

4、光学装置

5、计算机存储和处理及控制系统



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜的结构

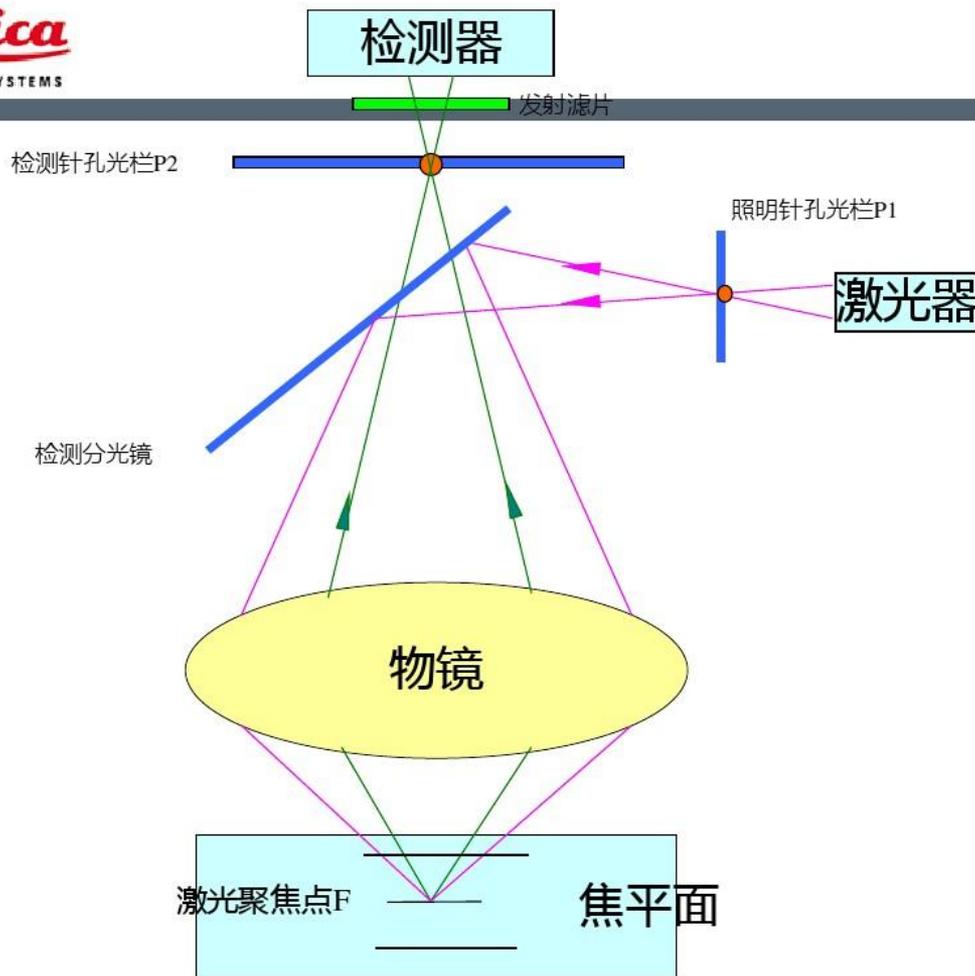
细胞孵育箱



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理

Leica
MICROSYSTEMS

Living up to Life



由激光器发射的一定波长的激发光（点光源），由物镜聚焦于样品的焦平面上，样品上相应的被照射点受激发而发射出的荧光，通过检测针孔光阑后，到达检测器并成像。这样由焦平面上样品的每一点的荧光图像组成了一幅完整的共焦图像，称为光学切片。在激光扫描过程中，某一瞬间只有焦平面上的被扫描点同时聚焦于照明针孔光阑和检测针孔光阑并被检测器记录，



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理



激光扫描共聚焦显微镜技术

Living up to Life

原理小结:

Confocal 利用放置在光源后的**照明针孔**和放置在检测器前的**探测针孔**实现**点照明**和**点探测**，来自光源的光通过照明针孔发射出的光聚焦在样品焦平面的某个点上，该点所发射的荧光成像在探测针孔内，该点以外的任何发射光均被探测针孔阻挡。照明针孔与探测针孔对被照射点或被探测点来说是共轭的，因此被探测点即为**共焦点**，被探测点所在的平面即为**共焦平面**。计算机以像点的方式将被探测点显示在计算机屏幕上，为了产生一幅完整的图像，由光路中的扫描系统在样品焦平面上**扫描**，从而产生一幅完整的共焦图像。只要载物台沿着Z轴上下移动，将样品新的一个层面移动到共焦平面上，样品的新层面又成像在显示器上，随着Z轴的不断移动，就可得到样品不同层面连续的光切图像。

Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理



激光扫描共聚焦显微镜技术 Bringing up to Life

- 分辨率

- 1. 光学分辨率

- 只与物镜的数值孔径NA和检测波长有关

- xy分辨率比传统显微镜小1.4x

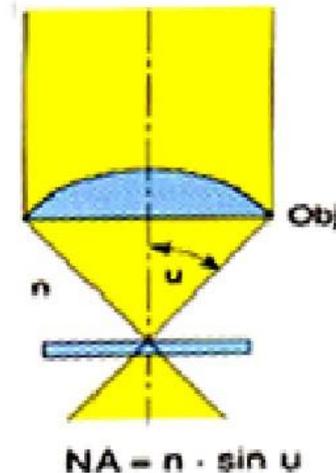
- 传统显微镜: $R_{xy} = 0.61\lambda / NA$ (0.25 μm)

- Confocal: $R_{xy} = 0.4\lambda / NA$ (0.18 μm)

- 2. 采样分辨率

- 固定物镜倍率下, Zoom相同时, 无论采样密度大小, 采样面积是固定的。

- 理论上, 固定面积下, 采样密度越高, 即采样点越多, 图像越细腻。但是, 采样密度越高, 扫描一幅图像的速度越慢, 荧光强度越低, 样品也越容易被淬灭。



提高显微镜光学分辨率的方法：

- 1、降低波长 λ 值，使用短波长光源。
 - 2、增大介质 n 值以提高 NA 值（ $NA = n \sin u / 2$ ）。
 - 3、增大孔径角 u 值以提高 NA 值。
 - 4、增加明暗反差。
-

Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理



激光扫描共聚焦显微镜技术

Living up to Life

- 图像亮度
 1. 与物镜NA有关。

物镜镜像亮度与数值孔径的平方呈正比，与总放大率的平方呈反比。

$$L = NA^2 / M^2$$
，NA大小相同，倍率越高，镜像亮度越低
 2. 与pinhole大小有关。 $M^2 = (M_1 \times M_2)^2$

Pinhole大小的选择
理论上，最佳Pinhole=Airy Disk=1
 3. 与激发光强度有关。
 4. 与接受发射荧光波长的带宽有关

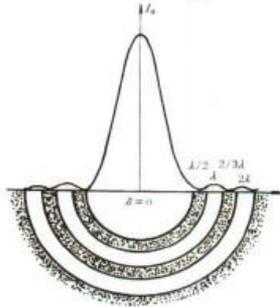
Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理



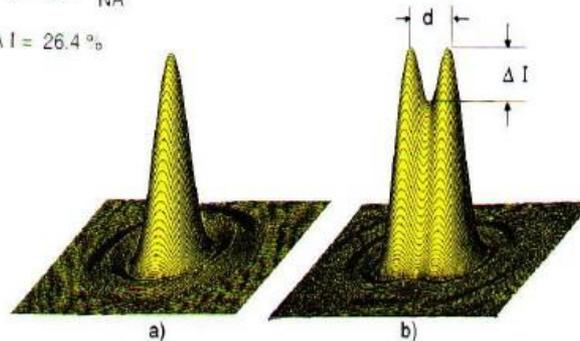
Living up to Life

激光扫描共聚焦显微镜技术

- **Pinhole**（探测针孔）大小影响：
 - 1) 图像的亮度
 - 2) 光学切片的厚度
- **Pinhole**大小的选择
理论上，最佳**Pinhole**=**Airy Disk**=1



$$d = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$
$$\Delta I = 26.4\%$$



实际上，应根据样品标记的实际情况来选择**Ph**的大小。



Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理

激光扫描共聚焦显微镜测样的两个重要参数：最大激发光波长和发射光波长

1、荧光的概念：

- ❖ 某些物质被一定波长的光照射时，会在较短时间内发射出波长比入射光长的光（入射光的一部分能量被该物质吸收，使得发射出来的光较原来的光能量低、波长长），这种光就称为荧光。
-

2、荧光的产生

- ❖ 光照射到某些原子时，光的能量使原子核周围的一些电子由原来的轨道跃迁到了能量更高的轨道，即从基态跃迁到第一激发单线态或第二激发单线态等。第一激发单线态或第二激发单线态等是不稳定的，所以会恢复基态，当电子由第一激发单线态恢复到基态时，能量会以光的形式释放，所以产生荧光。
-

Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理

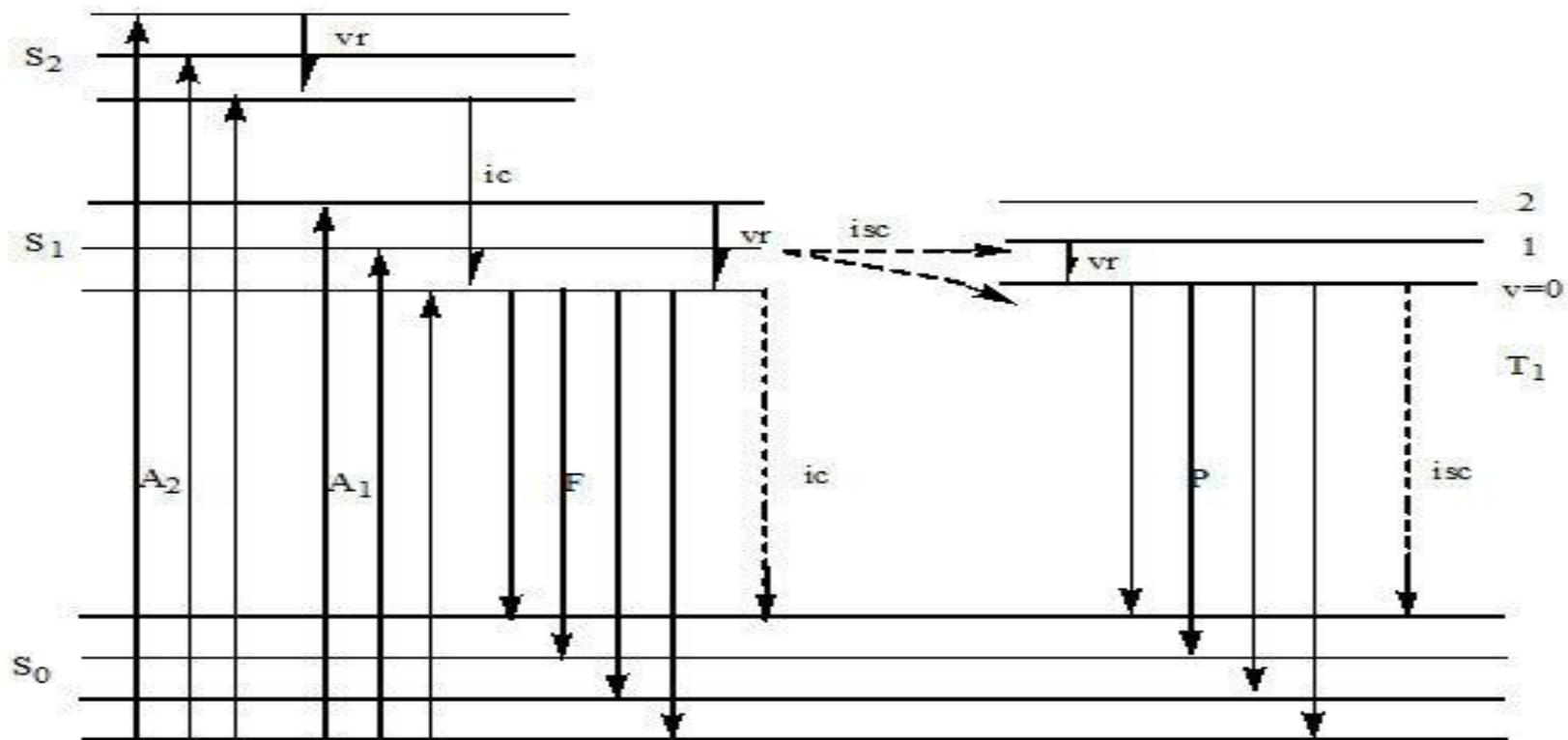


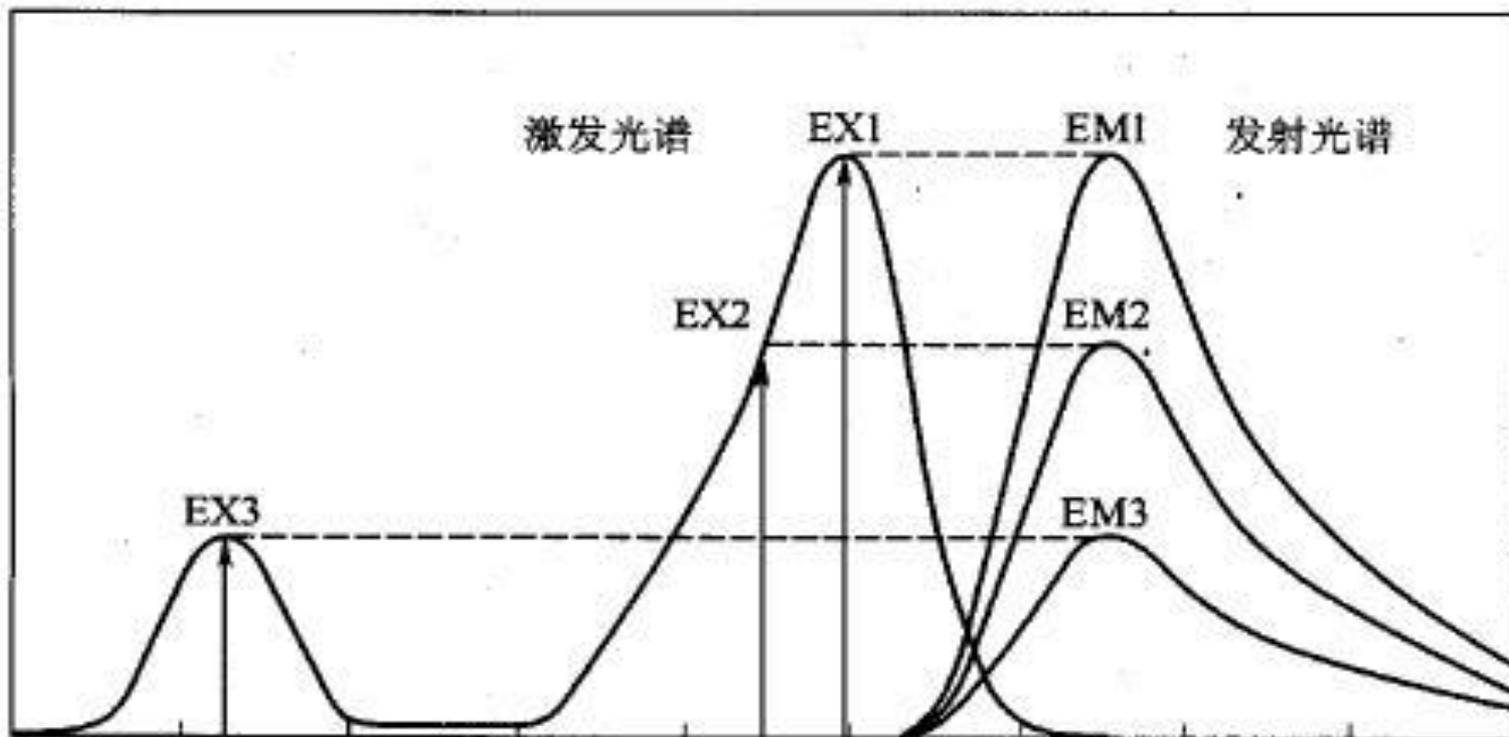
图 1-1 荧光的产生

F: 荧光; P: 磷光; A₁, A₂: 吸收; ic: 内转换;
isc: 系间串跃; vr: 振动松弛

Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理

3、激发光谱与发射光谱

吸收强度越大，被激发到高能级的粒子数越多，则向下跃迁产生的荧光越强

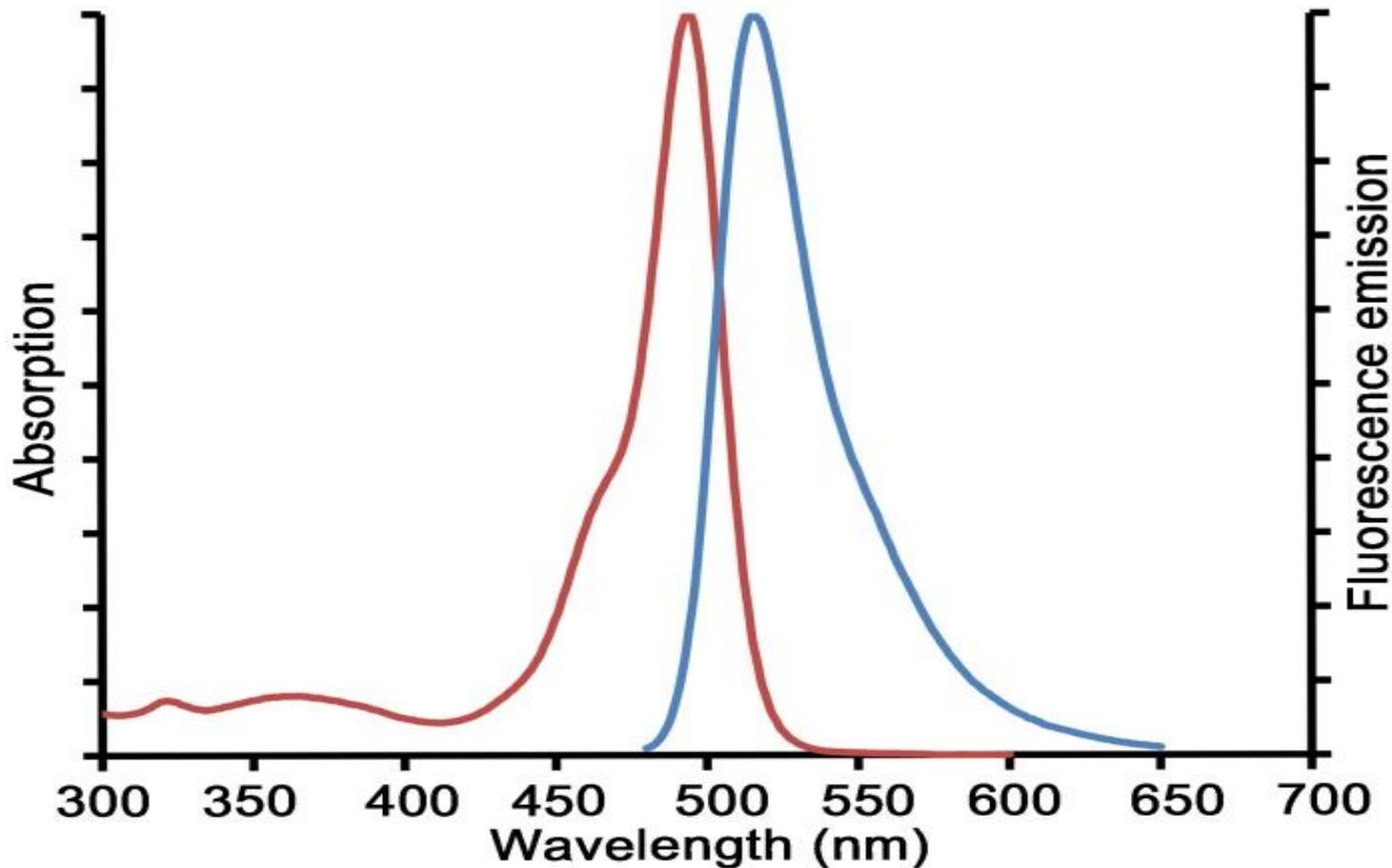


荧光探针激发与发射波长 Stokes 位移示意

Leica SP8型激光扫描共聚焦显微镜工作原理

钙离子浓度探针: **Fluo-4 AM**

最大激发波长**494nm**, 最大发射波长**516nm**





样品要求

- ❖ 1、样品经荧光探针标记；
 - ❖ 2、固定的或活的组织；
 - ❖ 3、固定的或活的贴壁培养细胞应培养在**Confocal**专用小培养皿或盖玻片上；
 - ❖ 4、悬浮细胞，甩片或滴片后，用盖玻片封片；
 - ❖ 5、载玻片厚度应在**0.8~1.2mm**之间，盖玻片应光洁，厚度在**0.17mm**左右
 - ❖ 6、标本不能太厚（**1-2mm**），如太厚激发光大部分被消耗，而物镜直接观察到的部位不能被充分激发；
 - ❖ 7、尽量去除非特异性荧光信号；
 - ❖ 8、封片剂多用甘油：**PBS混合液（9：1）**
-



激光扫描共焦显微镜的应用

- 1、形态结构观察：**在不损伤细胞的前提下对活的组织、细胞或者细胞器的形态结构进行观察，这种功能对于细胞培养、转基因研究尤为重要。这可以说是L S C M最大的优势
 - 2、细胞物理化学测定：**对细胞形状、周长、面积、平均荧光强度等参数进行测定；对细胞的溶酶体、线粒体、内质网、细胞骨架、结构性蛋白质、**DNA**、**RNA**、酶和受体分子等细胞内特异结构的含量、组分及分布进行定量、定性、定位测定。
-

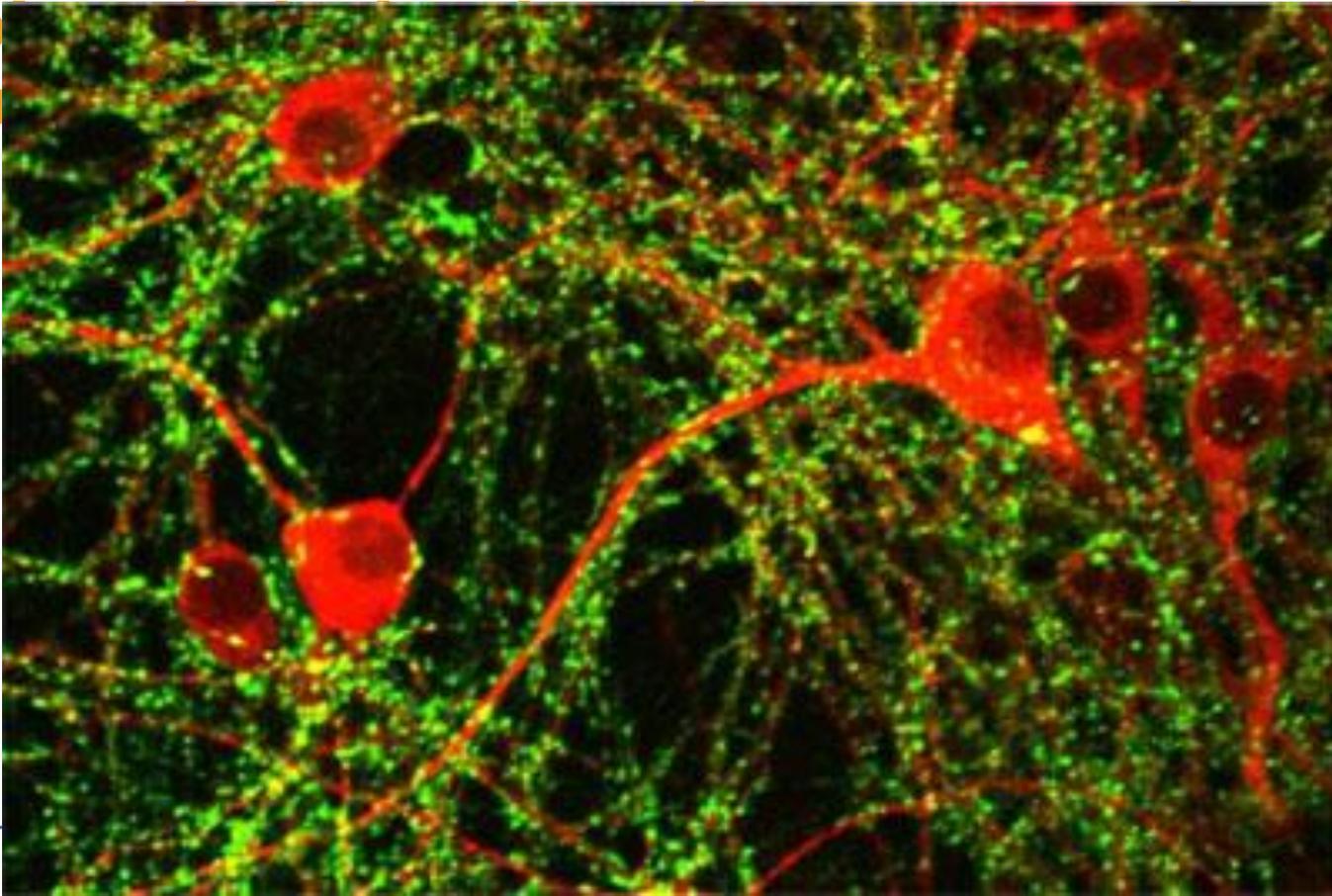


激光扫描共焦显微镜的应用

- 3、动态观察和测量：**观察和测量细胞内 **pH** 和多种离子 (**Ca²⁺**、**K⁺**、**Na⁺**、**Mg²⁺**) 在活细胞内的浓度及变化。
 - 4、三维图像的重建：**可以对样品的立体结构分析，直观地进行形态学观察,并揭示其结构的空间关系。
 - 5、荧光漂白恢复：**可通过观察已发生荧光漂白细胞其荧光恢复过程的变化量来分析细胞内蛋白质运输、受体在细胞膜上的流动和大分子组装等过程。
 - 6、长时程观察细胞迁移和生长**
-

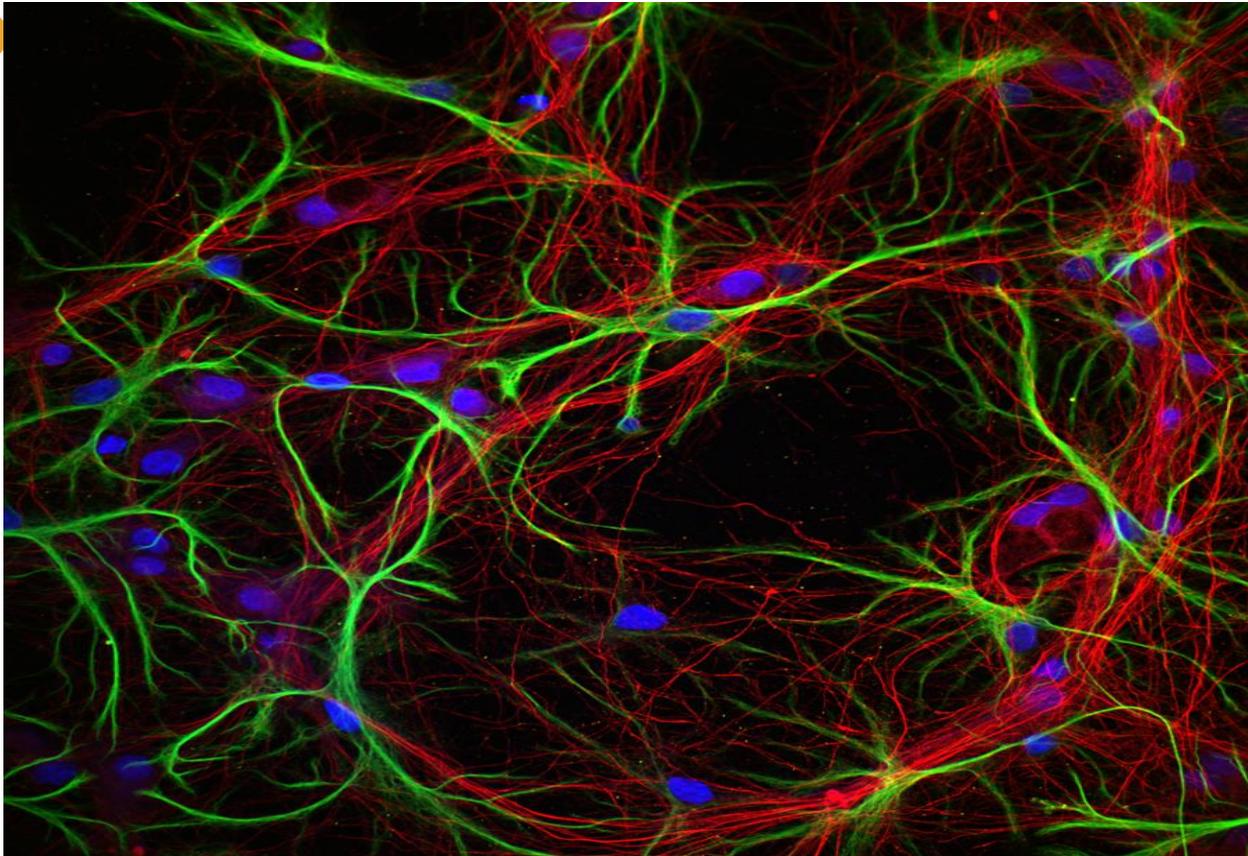
共聚焦图片赏析

Live hippocampal neurons stained with Lucifer Yellow. (Courtesy of Elena Popugaevu, St. Petersburg State Po
Ru



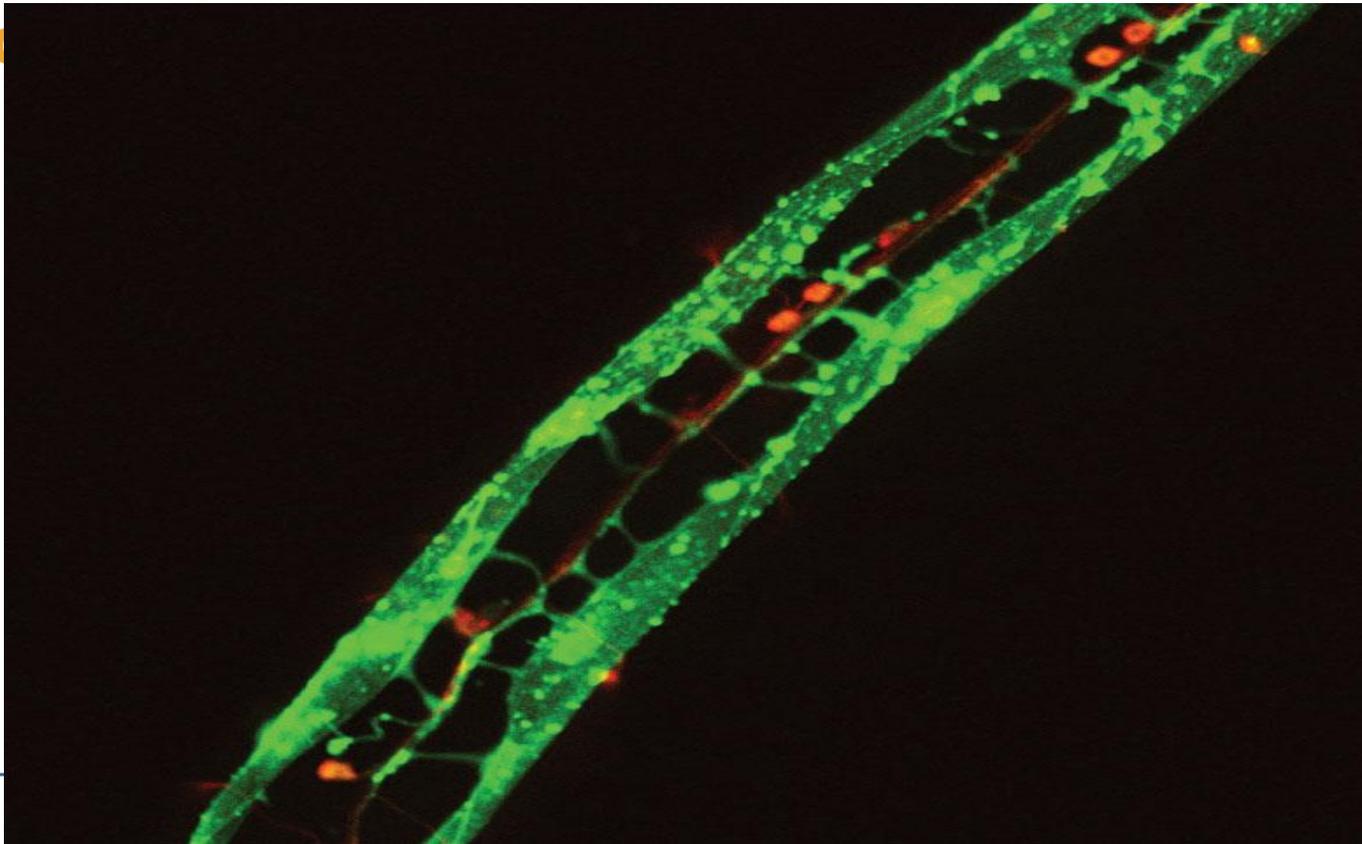
共聚焦图片赏析

Neuro filament (red), Glia Cells (Green),
and Nuclei (Blue) in a Rat
Hip



共聚焦图片赏析

C. elegans motor neurons and muscle arms.
The figure shows the C. elegans strain, trIs30, expressing YFP in body wall muscles (green) and DsRED2 in the ventral nerve cord.



共聚焦图片赏析

Hippocampal Mouse Neuron Labeled with GFP
Taken Using
a 40X, 0.8 NA
Objective. Excitation Wavelength: 488nm.

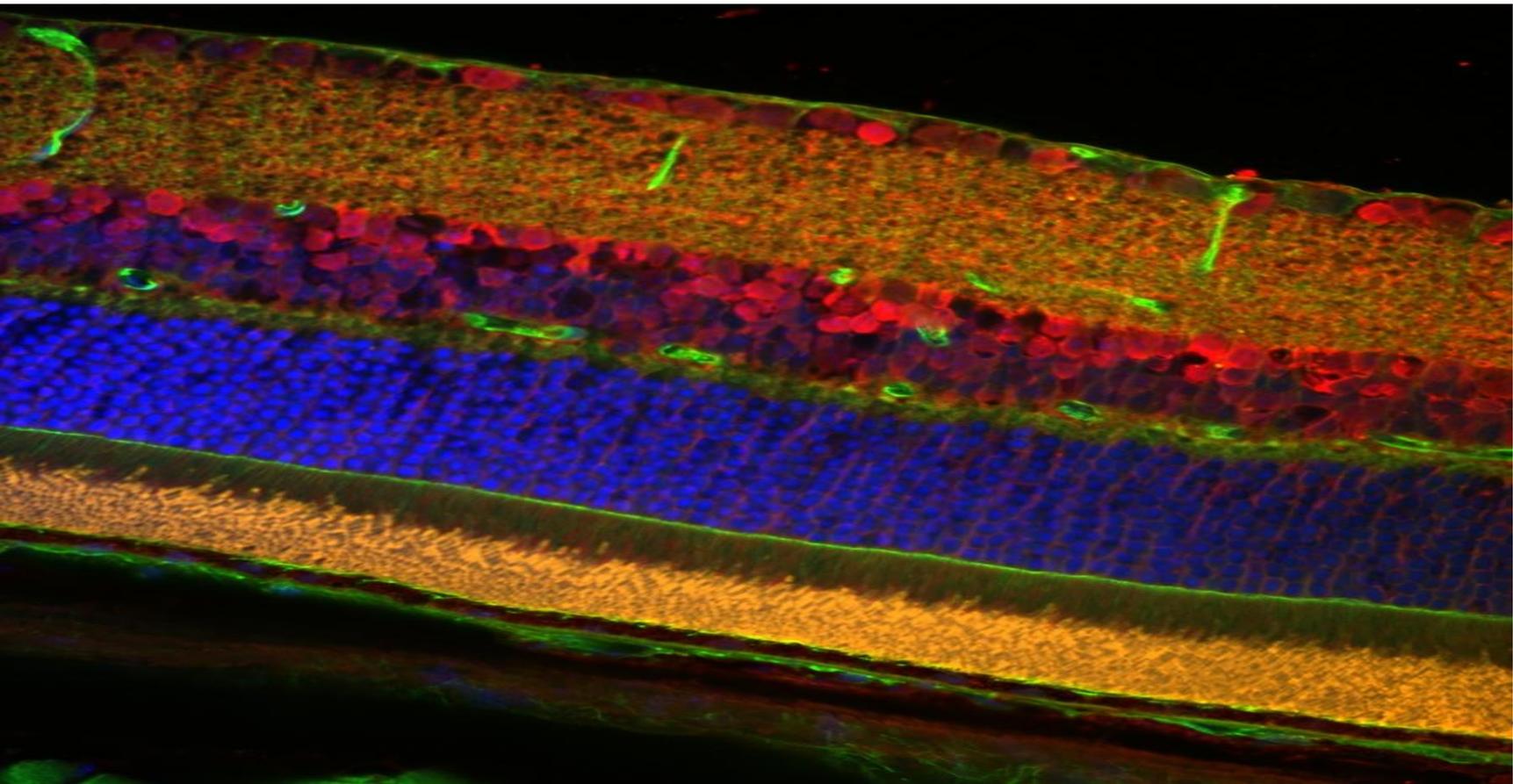
Image
Harbo
course:
the n
system



共聚焦图片赏析

Confocal Image of Cell Layers a Mouse Retina Sample

Courtesy of Robert Fariss, Biological Imaging

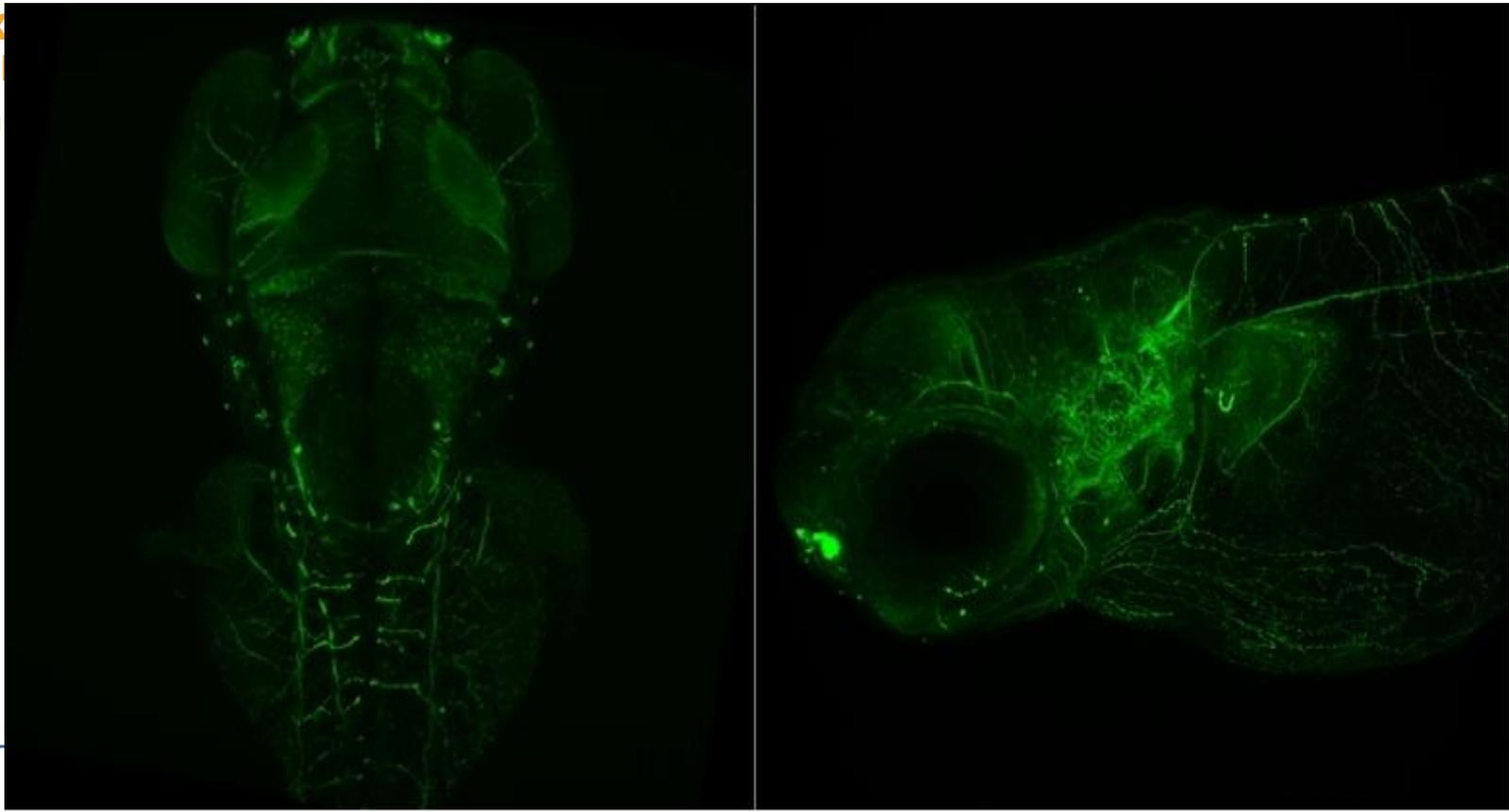


共聚焦图片赏析

Maximum projection (dorsal and lateral, respectively) of zebrafish embryos, 48 hrs postfertilization, showing developing neurons. Neurons are labeled with Alexa 488 against acetylated tubulin. The fluorophore was excited using a 488 nm laser and imaged with an Olympus

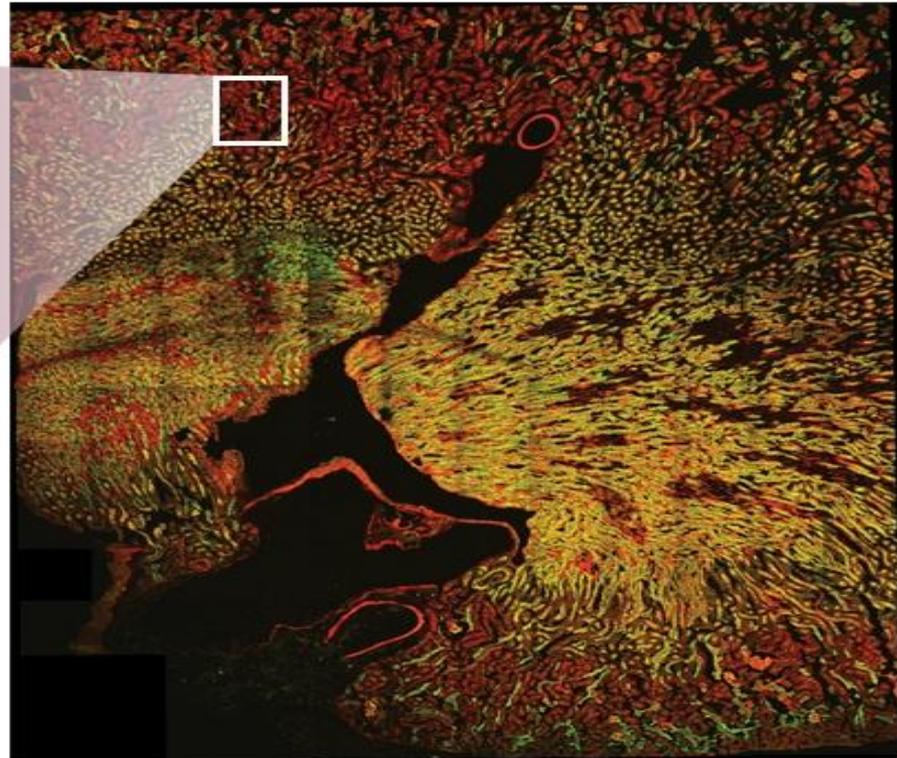
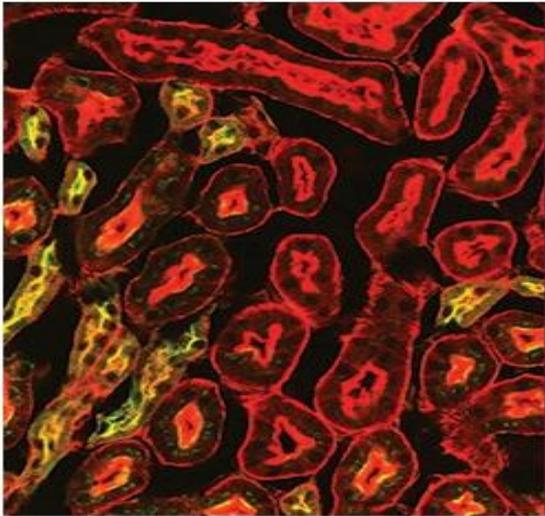
20X

Sch



共聚焦图片赏析

An image of a mouse kidney. The large image to the right was created by stitching together many individual images obtained using our confocal microscopy system. A single frame is shown in the zoom to highlight the level of contrast



共聚焦图片赏析

This image of a fly head was created by stitching six images together using the ThorImageLS[®] software.



激光共聚焦显微镜使用操作方法

一、开机

- 1、打开电脑桌右侧的“PC Microscope”圆形按钮
- 2、输入用户名和密码登录
- 3、依次打开“Scanner Power”及“Laser Power”两个圆形按钮，然后将“Laser Power”按钮右侧的激光开关钥匙（Laser Emission）顺时针旋转 90度至“ON”位置



激光共聚焦显微镜使用操作方法

4、打开荧光电源



EL6000 荧光电源

- 1.电源开关;
- 2.使用时间显示;
- 3.光闸;
- 4.光强控制

激光共聚焦显微镜使用操作方法

5、双击电脑显示屏桌面上的“LAS AF”图标启动徕卡共聚焦软件。



LAS AF 图标

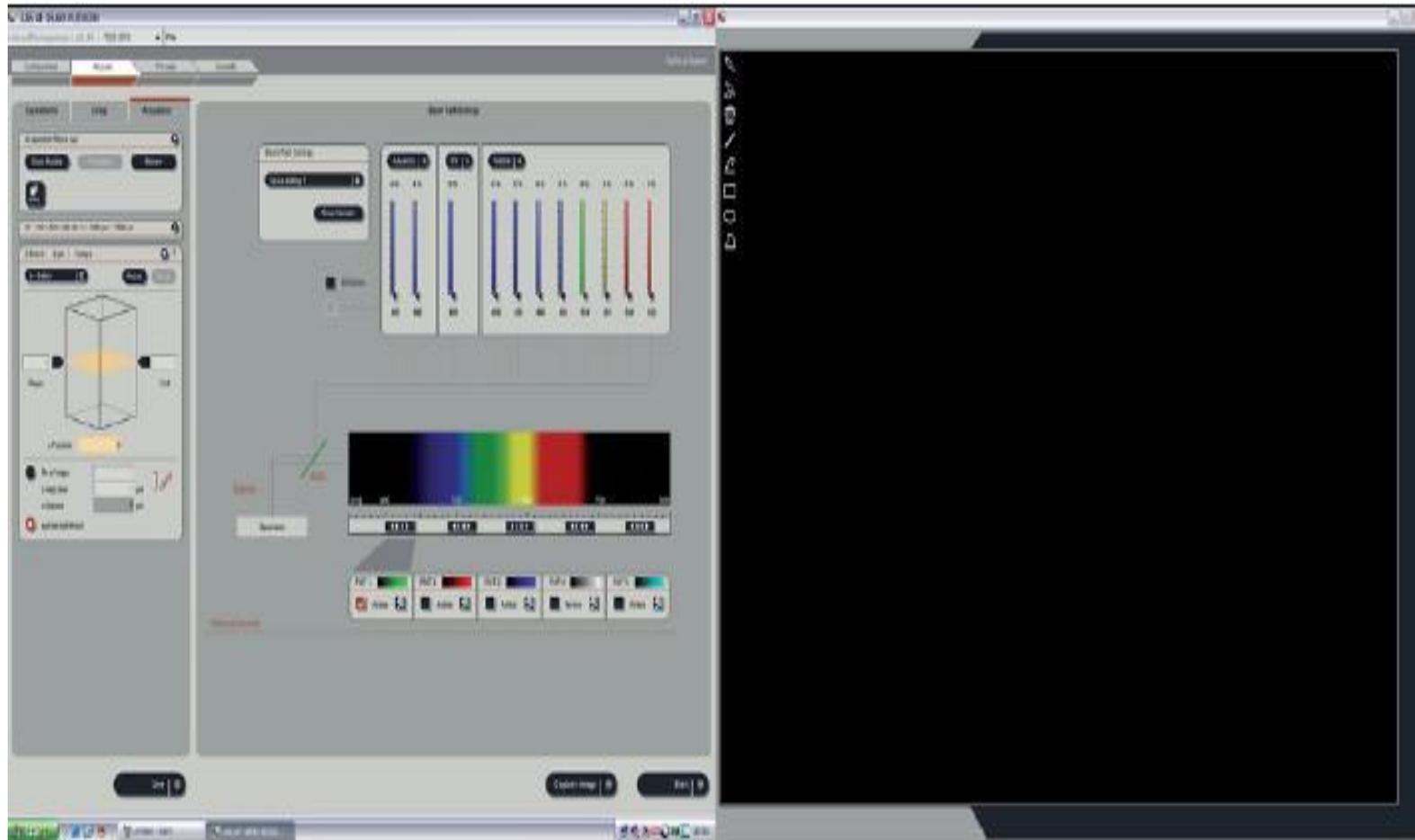
激光共聚焦显微镜使用操作方法

6、点击“OK”以打开软件。



激光共聚焦显微镜使用操作方法

7、系统自检完毕后，显示 LAS AF 基本界面。



二、在显微镜下观察样品

- 1、将样品置于载物台上，选择合适的物镜，选择合适的视野，调节焦距和亮度，直至观察到明亮清晰的图像。
- 2、倒置荧光显微镜相关功能开关和按钮说明

AP - 孔径光栏 (明场)

FD-视场光栏

INT- 明场或荧光光照强度

TL/IL- 投射光和反射光转换

ChangTL- 明场模式转换

(BF、DIC、POL)

FLUO - 转换荧光

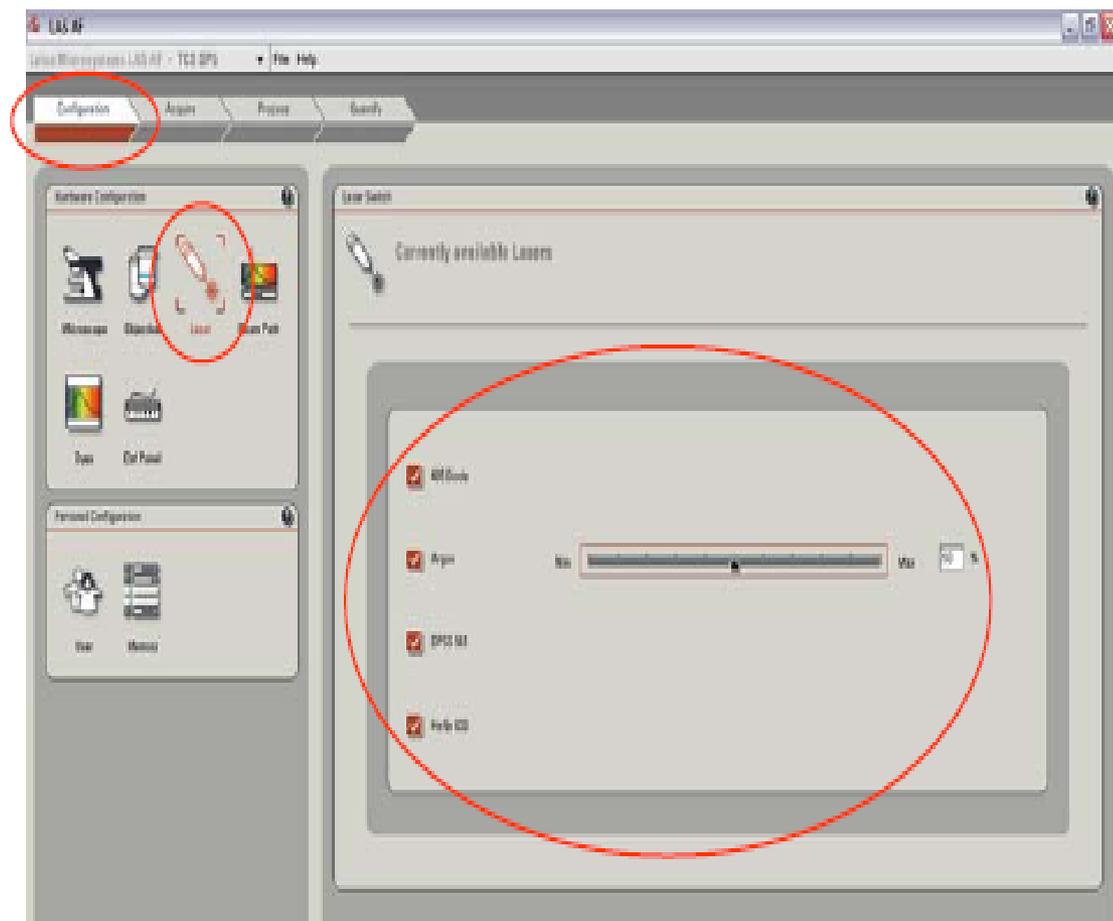
ChangCB- 荧光滤块转换

SET- 焦平面设置

DRY/IMM- 干油镜转换

三、采集共聚焦图像采集方法

1. 点击工具栏下方的“Configuration”，再点击“Laser”，打开所需激光。如需使用Ar离子激光，拖动滑块调节激光输出功率。



激光共聚焦显微镜使用操作方法

2. 选择扫描模式

在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择扫描模式 (Acquisition Mode)，默认模式为 xyz 扫描，是最常用的扫描模式，可用于 xy 扫描和 z 轴层切(xyz 扫描)。还可在下拉菜单中选择由 x, y, z, t (时间)以及 λ (波长)组合而成的多维扫描模式。



点击并在下拉菜单中选择扫描模式

激光共聚焦显微镜使用操作方法

3. 点击“Acquire”进行光路设置

调用已有的设置：选择“Load/Save single setting”下拉菜单中已有的设置 (激光及其输出功率、分光镜、检测波长范围、PMT gain 及 offset)，常用的荧光染料都已包含在内。选择某一设置后，可按样品的实际情况对参数进行优化,并以新的名称保存。

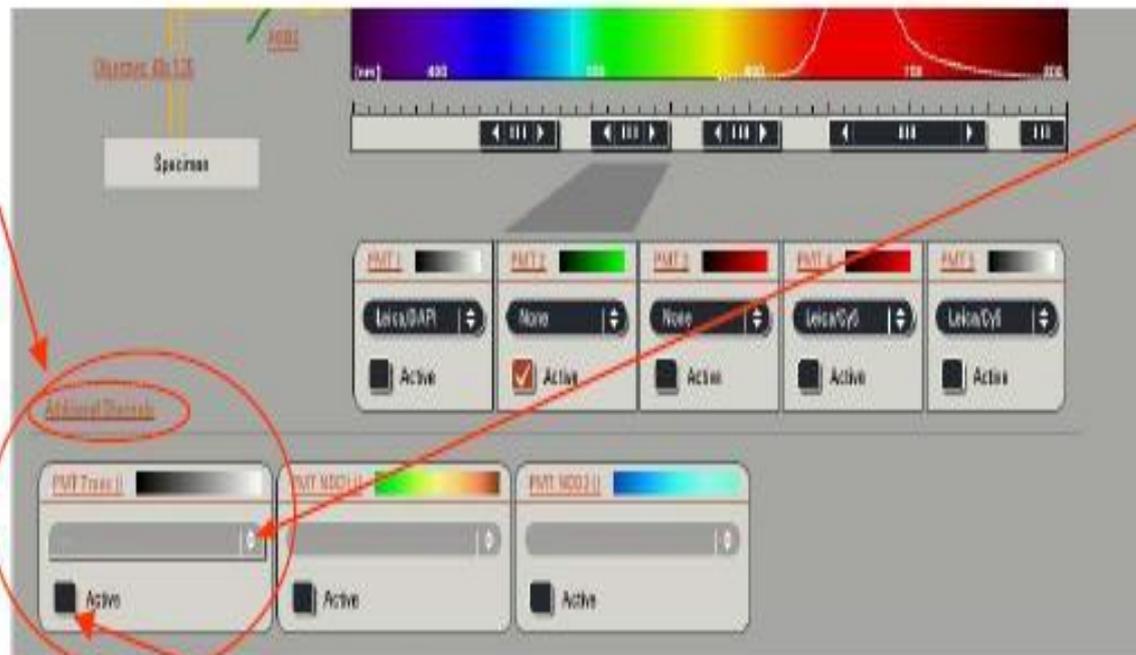
The screenshot shows the LAS AF software interface with several red annotations pointing to specific features:

- Acquire**: The main control button at the top left.
- Load/Save single setting**: A dropdown menu for selecting existing configurations.
- Power sliders**: A set of sliders for adjusting laser output power.
- PMT detection range sliders**: Sliders for adjusting the detection range of each PMT, with a note that double-clicking shows wavelength range values.
- PMT color palette**: A color bar representing the PMT detection range, with a note that clicking changes the current selection.
- Fluorophore list**: A list of pre-saved fluorescent dyes with checkboxes to activate them.
- System status**: A red checkmark icon indicating that the required PMT is activated.

激光共聚焦显微镜使用操作方法

4. 透射光检测器的选择

单击“Additional Channels”以显示透射光检测器 (PMT Trans), 选择观察方法(BF、DIC等)。点击并在下拉菜单中选择。



点击并在下拉菜单
中选择观察方法



点击(✓)以激活透射光检测器

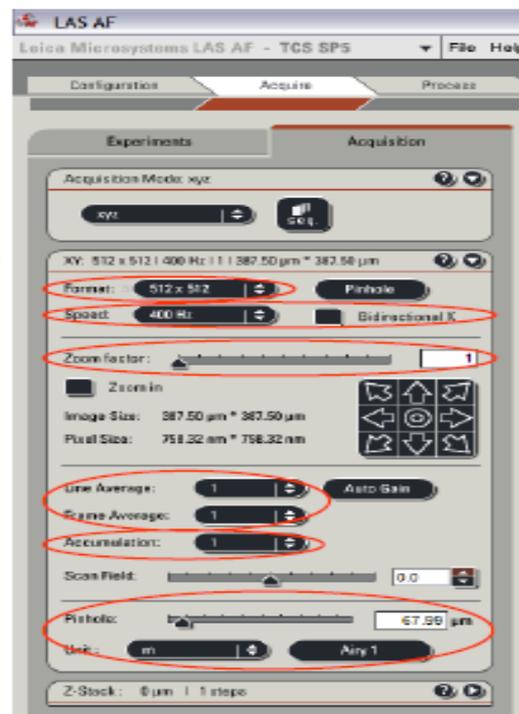
激光共聚焦显微镜使用操作方法

5、设置扫描参数

在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中设置扫描参数，包括分辨率 (format)、扫描速度(speed)、针孔大小 (pinhole size)、线平均 (line average)、面平均(frame average)、累加(accumulation)及放大倍数 (zoom)等。



单击箭头以显示完整菜单



各参数设置界面

激光共聚焦显微镜使用操作方法

6、预览图像

点击“Live”以设定的扫描参数预览图像，图像将显示在右侧的显示屏上。

7、优化扫描参数

预览图像时，调节z轴位置找到最适合观察的焦平面，并调节PMT的电压值(Smart gain)及偏移值(Smart offset)，或激光输出功率，使图像达到最佳。可通过控制面板上相应旋钮调节以上参数，图像调至满意后，单击“Stop”终止预览过程。



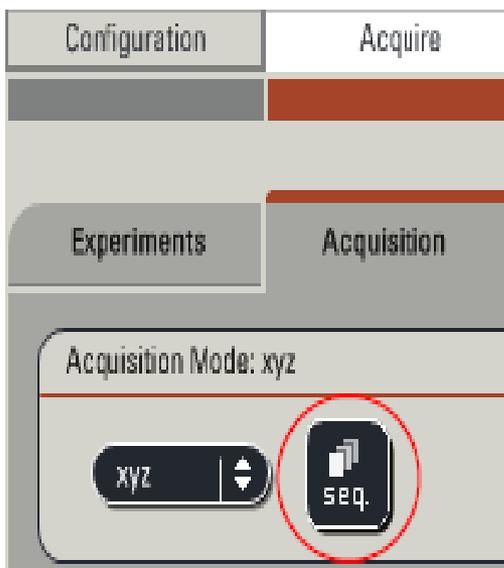
8、采集图像

对于单通道染色，或多通道染色同时扫描，单击“**Capture Image**”采集图像。对于序列扫描，或多维图像扫描，单击” **Start**”进行图像采集。

四、序列扫描

如果样品采用两种或以上荧光染料标记，为避免串色对实验结果的影响，可采用序列扫描的方式。

1、单击“Acquisition”中的“seq”按钮，如图 4-1，软件界面中将出现如图 4-2 的序列扫描菜单，可通过“+，—”添加或者减少扫描序列。





激光共聚焦显微镜使用操作方法

2、调用所需的单一采图设置，预览并优化参数至满意后，
点击

“Scan1”将参数定义至第一扫描序列。

3、同法定义“Scan 2”及更多的序列。

4、点击“Start”进行序列图像的采集。

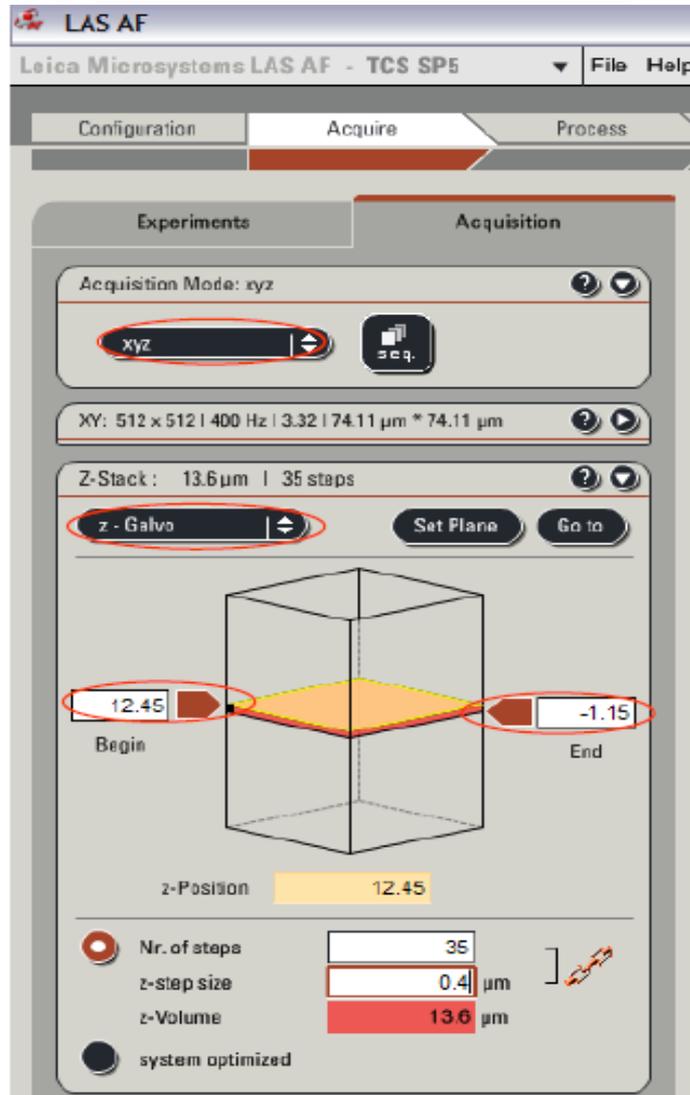
5、可保存序列扫描的设置以便将来调用。

五、z 轴层切 (xyz 扫描)

z 轴层切用于观察样品中目标的空间分布。

- 1、xyz 扫描模式为默认采图模式。如图 5-1。
 - 2、设置采图参数，方法同前。
 - 3、点击“Live”进行图像预览。用控制面板的“Z-Position”旋钮调节 z 轴至层切所需的起点，点击“Begin”上方的黑色箭头定义层切起点(箭头变为红色表示已定义)；调节 z 轴至层切所需的终点，点击“End”上方的黑色箭头定义层切终点。
 - 4、点击“Stop”终止图像预览。
 - 5、此时 xyz 层切菜单中显示的“z-step size”(相邻两个光切面的间距)和“Nr. of steps”(层切数目)为系统的优化值(“system optimized”)。也可点击“Nr. of steps”左侧的按钮，然后对相邻光切面间距或层切数目进行自定义。
 - 6、点击“Start”进行 xyz 图像的采集。
 - 7、采图完毕后，应点击“Begin”和“End”上方的红色箭头，使其变为黑色，将层切数目改为 1，重新处于未定义状态。
-

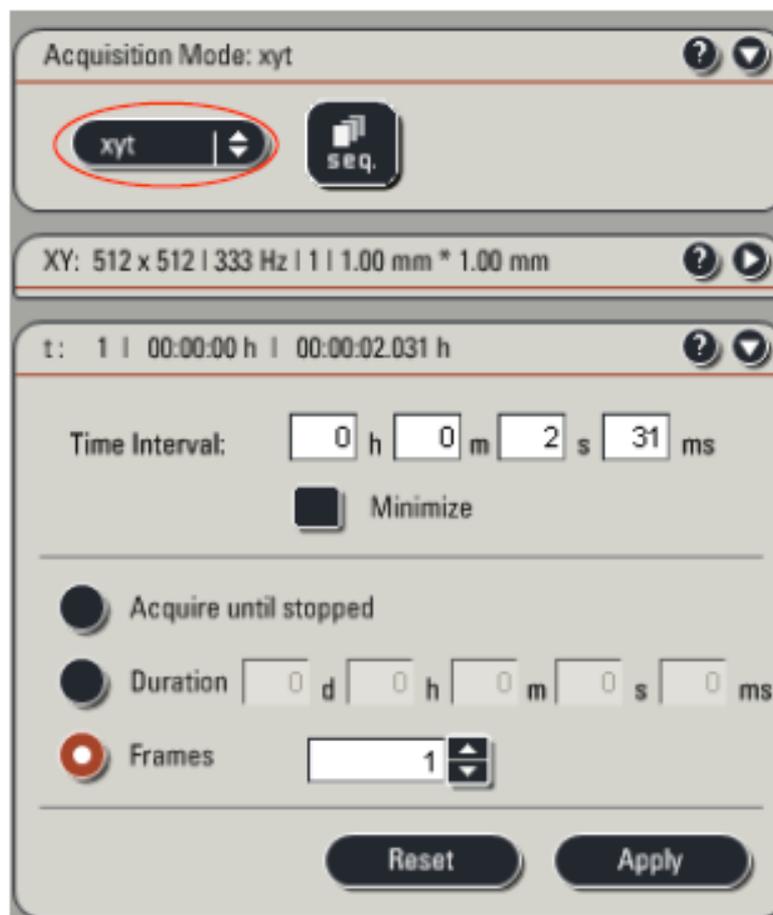
激光共聚焦显微镜使用操作方法



六、时间序列扫描 (xyt 扫描)

时间序列扫描多用于活细胞成像，记录动态过程。

- 1、在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择 xyt 扫描模式后，将出现 xyt 扫描菜单，如图 6-1。
- 2、设置采图参数，方法同前。
- 3、定义“Time Interval”，即采集相邻两帧图像所需的时间间隔，也可选择最小值“Minimize”。





激光共聚焦显微镜使用操作方法

4、按采图需要选择 “Acquire until stopped”、 “Duration” 或 “Frames”。

若选择 “Acquire until stopped”，则图像将持续采集，直至手动终止。

若选择 “Duration”，可定义采图所需的总时间。

若选择 “Frames”，可定义所需的图像帧数。

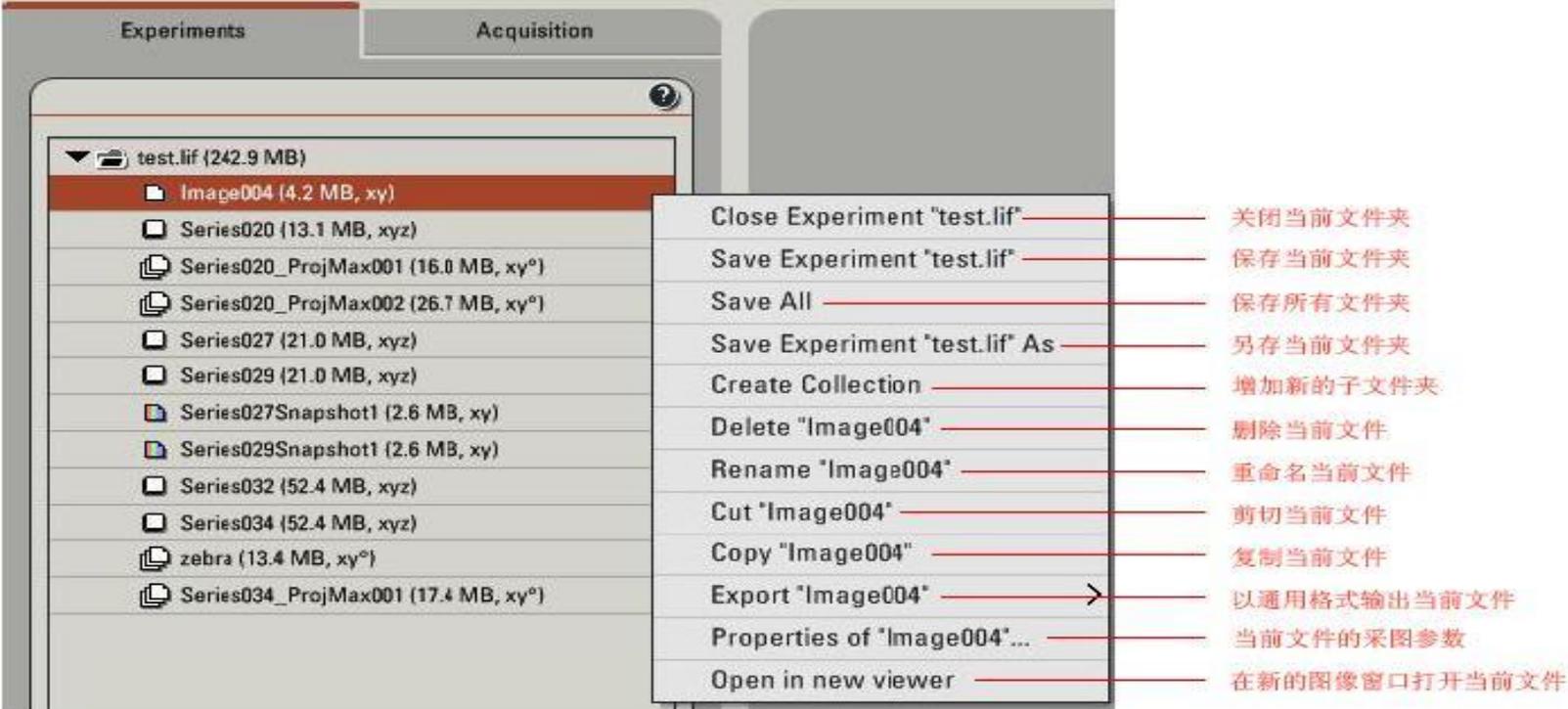
5、点击 “Apply”确定。

6、点击 “Start”进行时间序列图像的采集。

激光共聚焦显微镜使用操作方法

七、图像文件的保存及输出

1、图像文件的操作：“Acquire”的” Experiment”下显示采集的所有图像文件名称，右键点击图像文件名，可进行多种操作。



The screenshot displays a software interface with two tabs: "Experiments" and "Acquisition". The "Experiments" tab is active, showing a file tree. The root folder is "test.lif (242.9 MB)". Underneath, there is a list of files and folders, including "Image004 (4.2 MB, xyz)", "Series020 (13.1 MB, xyz)", "Series020_ProjMax001 (16.0 MB, xyz)", "Series020_ProjMax002 (26.7 MB, xyz)", "Series027 (21.0 MB, xyz)", "Series029 (21.0 MB, xyz)", "Series027Snapshot1 (2.6 MB, xyz)", "Series029Snapshot1 (2.6 MB, xyz)", "Series032 (52.4 MB, xyz)", "Series034 (52.4 MB, xyz)", "zebra (13.4 MB, xyz)", and "Series034_ProjMax001 (17.4 MB, xyz)". A context menu is open over the "Image004" file, listing various actions. Red lines connect each menu item to its corresponding Chinese translation on the right.

Menu Item	Chinese Translation
Close Experiment "test.lif"	关闭当前文件夹
Save Experiment "test.lif"	保存当前文件夹
Save All	保存所有文件夹
Save Experiment "test.lif" As	另存当前文件夹
Create Collection	增加新的子文件夹
Delete "Image004"	删除当前文件
Rename "Image004"	重命名当前文件
Cut "Image004"	剪切当前文件
Copy "Image004"	复制当前文件
Export "Image004"	以通用格式输出当前文件
Properties of "Image004"...	当前文件的采图参数
Open in new viewer	在新的图像窗口打开当前文件



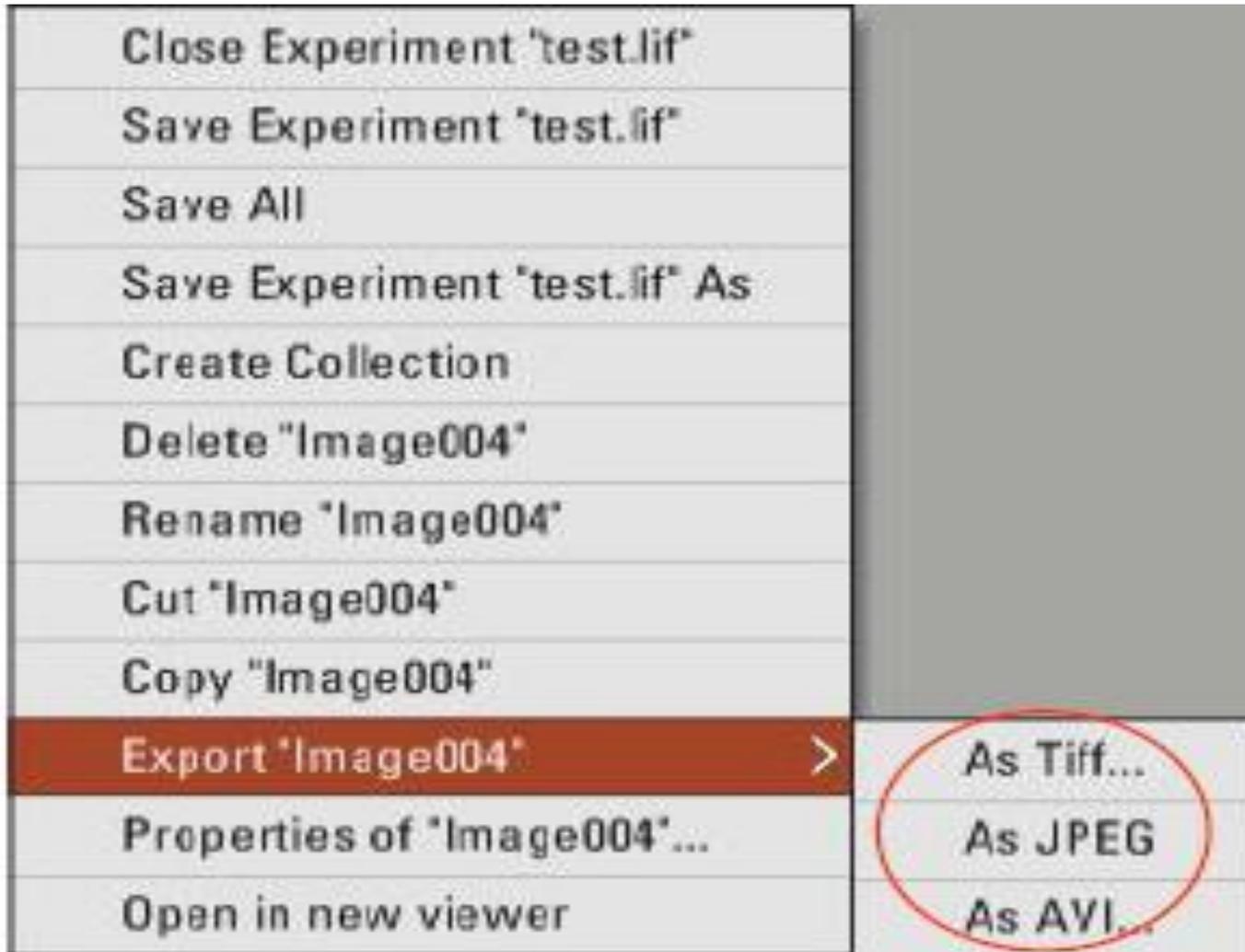
激光共聚焦显微镜使用操作方法

文件保存:右键点击图像文件名, 选择并点击”Save Experiment test.lif As”保存到新创建的文件夹。

2、图像文件的输出: 右键点击图像文件名, 选择 ”Export Image ***”进行图像输出, 可输出成图片(.tiff 或 jpeg), 三维或多维图像还可输出成电影(.avi)。如图 7-2。

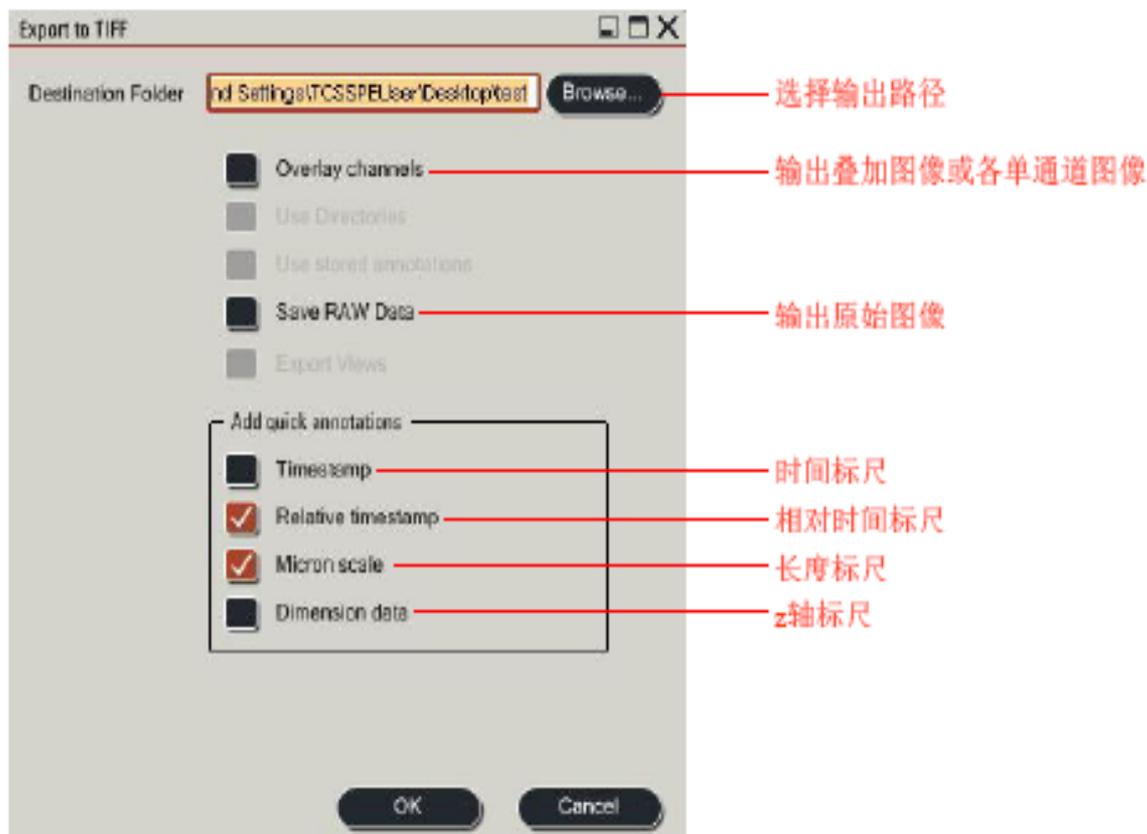
所得文件可用其他图像浏览软件打开, 选择输出路径, 输出叠加图像或各单通道图像。

激光共聚焦显微镜使用操作方法



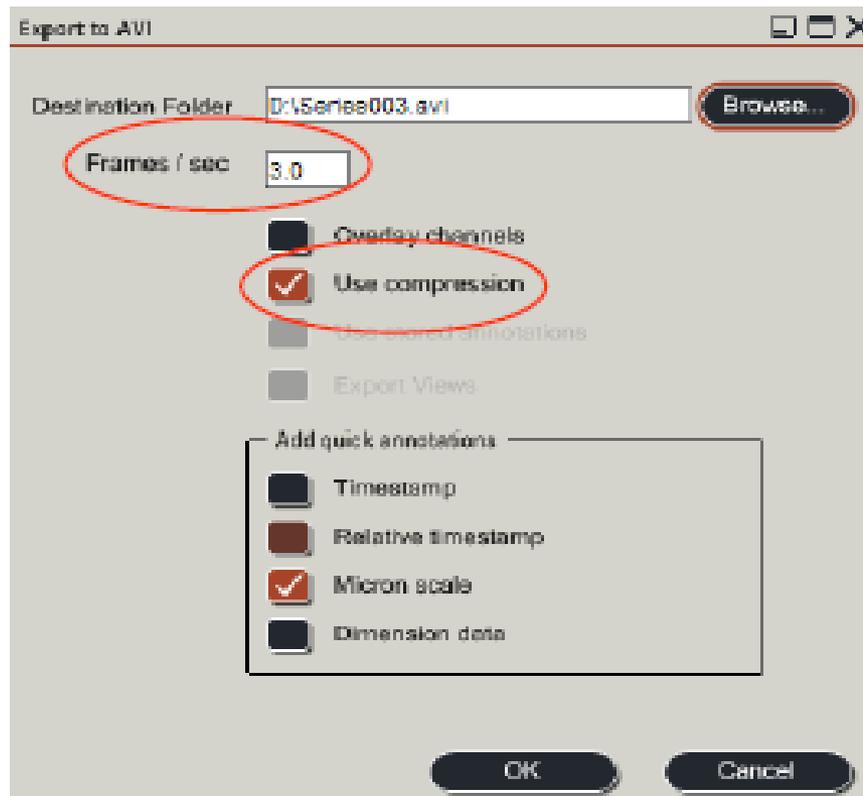
激光共聚焦显微镜使用操作方法

选择” As Tiff”或” As JPEG”，出现下图的对话框，可选择输出路径、输出方式（Use Directions为荧光或透射光图像，Overlay channels为叠加图像）、所需标尺等。确定后，点击” OK”，即可将图像输出至指定路径。



激光共聚焦显微镜使用操作方法

选择” **As AVI**”，出现下图对话框，除可选择路径、标尺等参数外，还可设定 avi 电影的播放速度 (Frame/sec)，以及是否进行压缩 (Use compression)。



八、实验结果的上传及下载

打开桌面上的浏览器图标，进入“陕西师范大学大型科学仪器开发管理平台”，输入用户名、密码，登陆。点击“数据保存”，浏览并上传数据（压缩数据），如下图。

激光共聚焦显微镜使用操作方法

陕西师范大学 大型科学仪器开发管理平台
生科·药用资源与天然药物化学教育部重点实验室

平台首页 仪器预约 预约列表 仪器培训 成果展示 交流平台 网络课堂 数据下载 仪器维修 中心网站

推荐仪器

- 激光共聚焦扫描显微镜
- 液相色谱仪6 (双三元)
- 液相色谱仪5 (半制备)
- 液相色谱仪4 (DAD+U...)
- 液相色谱仪3 (UV+Flu)
- 液相色谱仪2 (UV)
- 液相色谱仪1 (DAD+U...)
- 微透析、电化学分析系统
- 荧光分光光度计
- 流式细胞仪
- 细胞分析/计数仪
- 超微量微孔板分光光度计
- 全自动化学发光图像分...
- 蛋白互作分析
- 轮转切片机
- 荧光体视显微镜

用户登录

zhongqili1

.....

登录 注册

公告通知

- 全自动化学发光图像分析系统培训
- 3111仪器平台正常预约使用
- 3111仪器平台暂停使用预约
- 真空冷冻干燥机和大容量高速离心机...
- 激光共聚焦显微镜技术培训报名通知
- 正置荧光显微镜免费试用
- 超微量微孔板分光光度计维修结束
- 实时荧光定量PCR使用通知
- 数字PCR培训通知
- 关于化学发光检测仪(单孔)投入使用...

最新预约

点此查看预约信息 本年度: 4580人次 本月: 222人次 本日: 4人

预约人	仪器编号	仪器名称	预约时间段	预约状态	受理人
杨旭	20102954	超微量微孔板分光光度计	2017-11-13 10:37 至 2017-11-13 11:00	自主测样	系统受理
IQBAL JA...	15173475	微量快速核酸定量仪	2017-11-13 09:36 至 2017-11-13 09:54	自主测样	系统受理
IQBAL JA...	1607823s	实时荧光定量PCR 2016 (...)	2017-11-13 09:47 至 2017-11-13 11:55	自主测样	系统受理
卢芳芳	16102615	正置荧光显微镜	2017-11-13 10:06 至 2017-11-13 11:30	自主测样	系统受理

激光共聚焦显微镜使用操作方法



陕西师范大学

大型科学仪器开发管理平台（生科）

平台首页 仪器预约 预约列表 仪器培训 成果展示 交流平台 网络课堂 数据下载 仪器维修 中心网站

当前位置：首页 > 我的数据

我的数据

* 文件描述：

* 选择文件：

浏览...

未选择文件。

上传

取消

⚠ 数据上传须知：

- 1、单次上传数据大小必须在4M以下；
- 2、个人存储空间为20M，请及时清理；
- 3、多文件上传时建议打包后再上传；
- 4、禁止上传与实验无关的数据，一经发现该用户将被删除！

编号	文件名称	文件描述	文件大小	上传时间	删除
1	20170612.rar		189539790	2017-6-12 11:46:49	删除

Copyright © 2015 陕西师范大学生命科学院实验中心 All Rights Reserved

版权所有：陕西师范大学生命科学院实验中心 联系电话：85310546

蔡德翠 15991262362 黄爱霞

九、关机

- 1、保存已采集的图像。
 - 2、关闭显微镜荧光电源。
 - 3、若使用过油镜，需用无水乙醚与无水乙醇混合液 (体积比 7: 3) 或无水乙醇清洁镜头。
 - 4、关闭 LAS AF 软件。
-



激光共聚焦显微镜使用操作方法

- 5、将电脑桌右侧 “Laser Power”按钮右侧的激光开关钥匙 (Laser Emission)逆时针旋转90 度至 “On-0”位置。
 - 6、关闭 “Scanner Power”按钮
 - 7、在电脑上进行图像数据的输出。注意：使用空白光盘刻录，不得使用任何其他形式的移动存储介质。
 - 8、下机并关闭电脑后，关闭 “PC Microscope”按钮。
 - 9、风扇停止后(关闭激光开关钥匙约 5 分钟后) ，关闭 “Laser Power ”按钮
-



激光共聚焦显微镜使用操作注意事项

使用激光共聚焦显微镜必须注意以下几点：

- 1、用户穿实验服进入激光共聚焦显微镜室，不得佩戴金属首饰,特别是不准携带手机操作仪器，进入房间后须先穿上鞋套，并冲洗拖把备用。
 - 2、检查空调工作是否正常，仪器工作温度应保持在 $18-22^{\circ}\text{C}$ 的恒温状态，注意实验前开启除湿机。
 - 3、严格按照仪器开关机顺序和使用规程操作仪器，不得随意更改操作程序。
-



激光共聚焦显微镜使用操作注意事项

- 4、具有高度的责任意识，严禁携带无关人员或默许他人进入仪器平台，确保大型仪器安全和工作环境稳定。
 - 5、不得注视激光束，也不能爆漏在激光辐射中。
 - 6、实验数据及时保存并上传至指定的下载区域并及时下载，管理员会定期对存储的数据进行清理，如遇设备或网络故障无法上传、下载数据时，及时告知管理员，以防实验数据丢失，否则造成的损失自负。
 - 7、严禁使用自带存储设备考取实验数据，一经发现，立即取消用户该仪器使用权限。
-



激光共聚焦显微镜使用操作注意事项

- 8、测试结束后，镜头回归最低倍数，在软件中关闭激光器，关闭金属卤素灯开关。整理台面，设备归位。
 - 9、每次使用后，要做好清洁工作，及时清理物镜、目镜等易污染的光学部件。用提前准备好的拖把清理地面，严禁使用带水的拖把擦地板。
 - 10、认真填写实验记录，记录试验开始及结束的时间，试验前、中、后的仪器状况，有问题及时报告管理人员，否则出现的仪器故障或损坏由当次用户负责并永久取消使用权限。
-



激光共聚焦显微镜使用操作注意事项

11、未经管理员同意，不得将使用权转借他人。一经发现，立即取消用户该仪器使用权限。

12、用户经培训并考核合格后由管理员授予其自主测样权限。



Thank You !



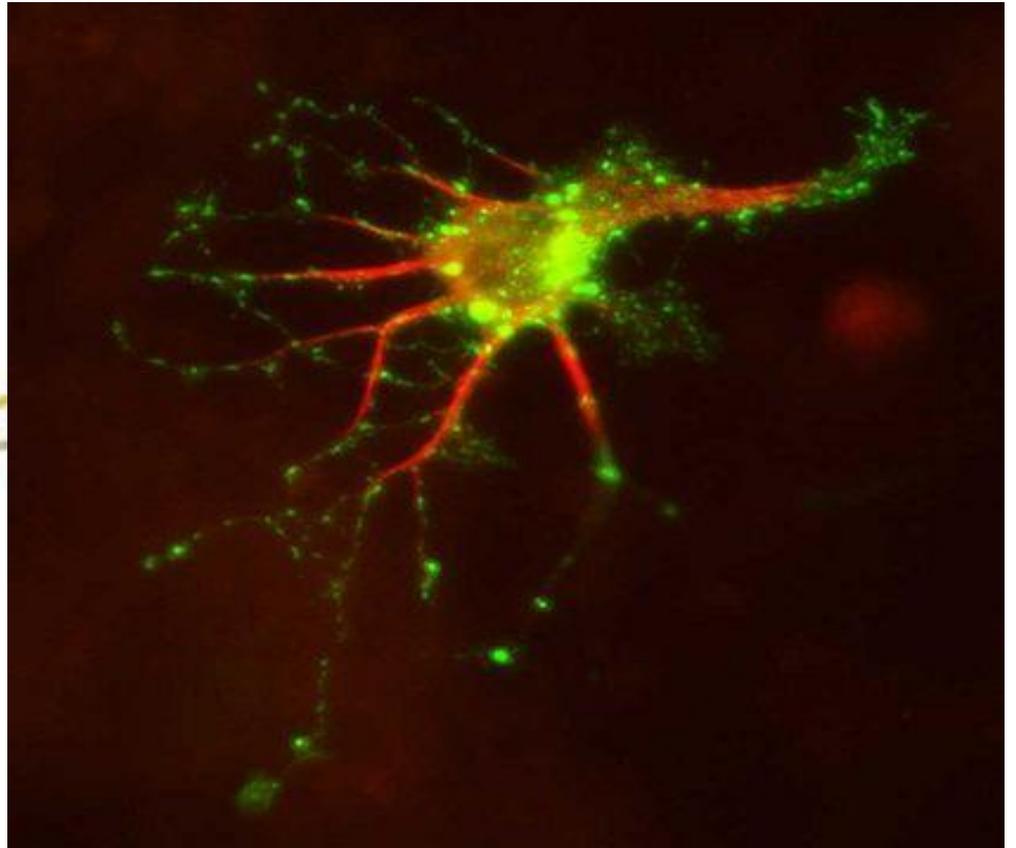
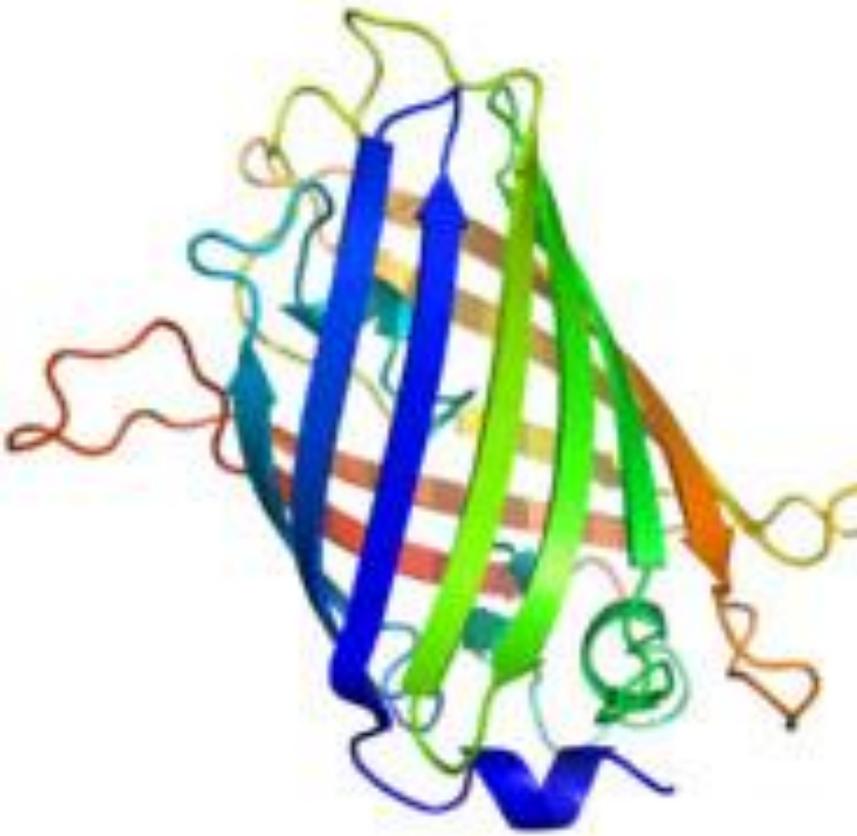
荧光光谱的原理及应用

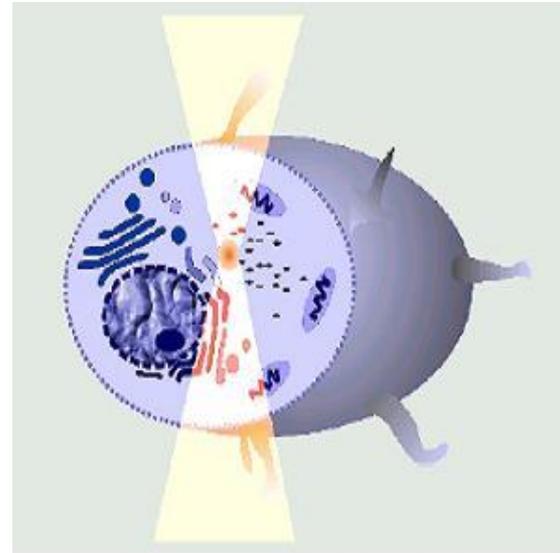
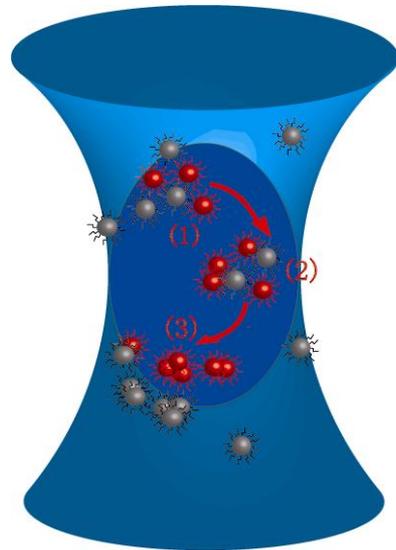
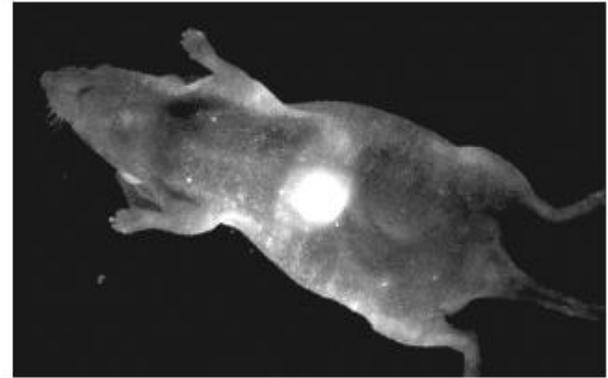
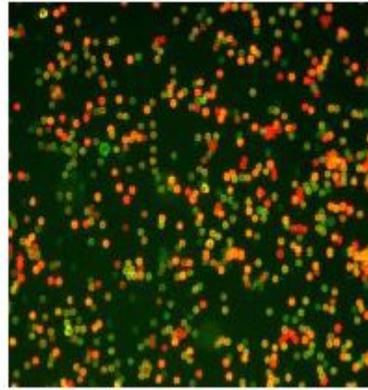
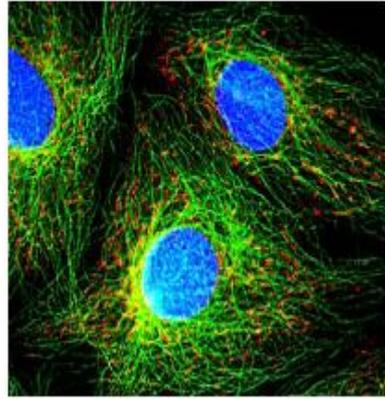
荧光是指一种**光致发光**的冷发光现象。

当某种常温物质经某种波长的入射光（通常是紫外线）照射，吸收光能后进入激发态，并且立即退激发并发出比入射光的的波长长的出射光（通常波长在可见光波段）；而且一旦停止入射光，发光现象也随之立即消失。具有这种性质的出射光就被称之为荧光。



磷光是一种缓慢发光的光致冷发光现象。当某种常温物质经某种波长的入射光（通常是紫外线）照射，吸收光能后进入激发态（具有和基态不同的自旋多重度），然后缓慢地退激发并发出比入射光的波长长的出射光，而且与荧光过程不同，当入射光停止后，发光现象持续存在。发出磷光的退激发过程是被量子力学的跃迁选择规则禁戒的，因此这个过程很缓慢。





主要内容

1

荧光光谱的基本原理

2

荧光光谱仪的原理、操作及数据处理

3

荧光光谱的应用

4

参考资料

荧光光谱的基本原理

一、分子能级与跃迁

分子能级比原子能级复杂；

在每个电子能级上，都存在振动、转动能级；

激发： 基态 (S_0) \rightarrow 激发态 (S_1 、 S_2 激发态振动能级)：吸收特定频率的辐射；量子化；跃迁一次到位；

失活： 激发态 \rightarrow 基态：多种途径和方式(见能级图)；速度最快、激发态寿命最短的途径占优势；

第一、第二、 \dots 电子激发 单重态 S_1 、 S_2 \dots ；

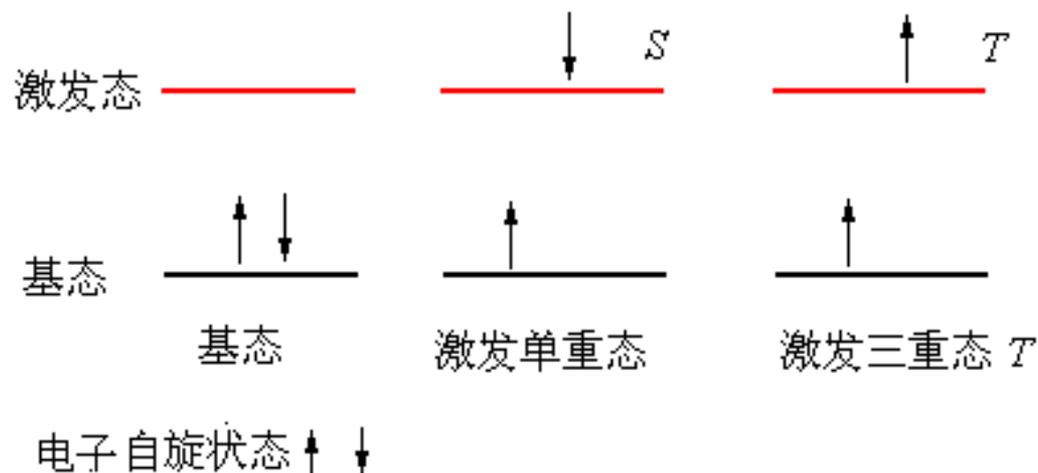
第一、第二、 \dots 电子激发 三重态 T_1 、 T_2 \dots ；

电子激发态的多重度

电子激发态的多重度：

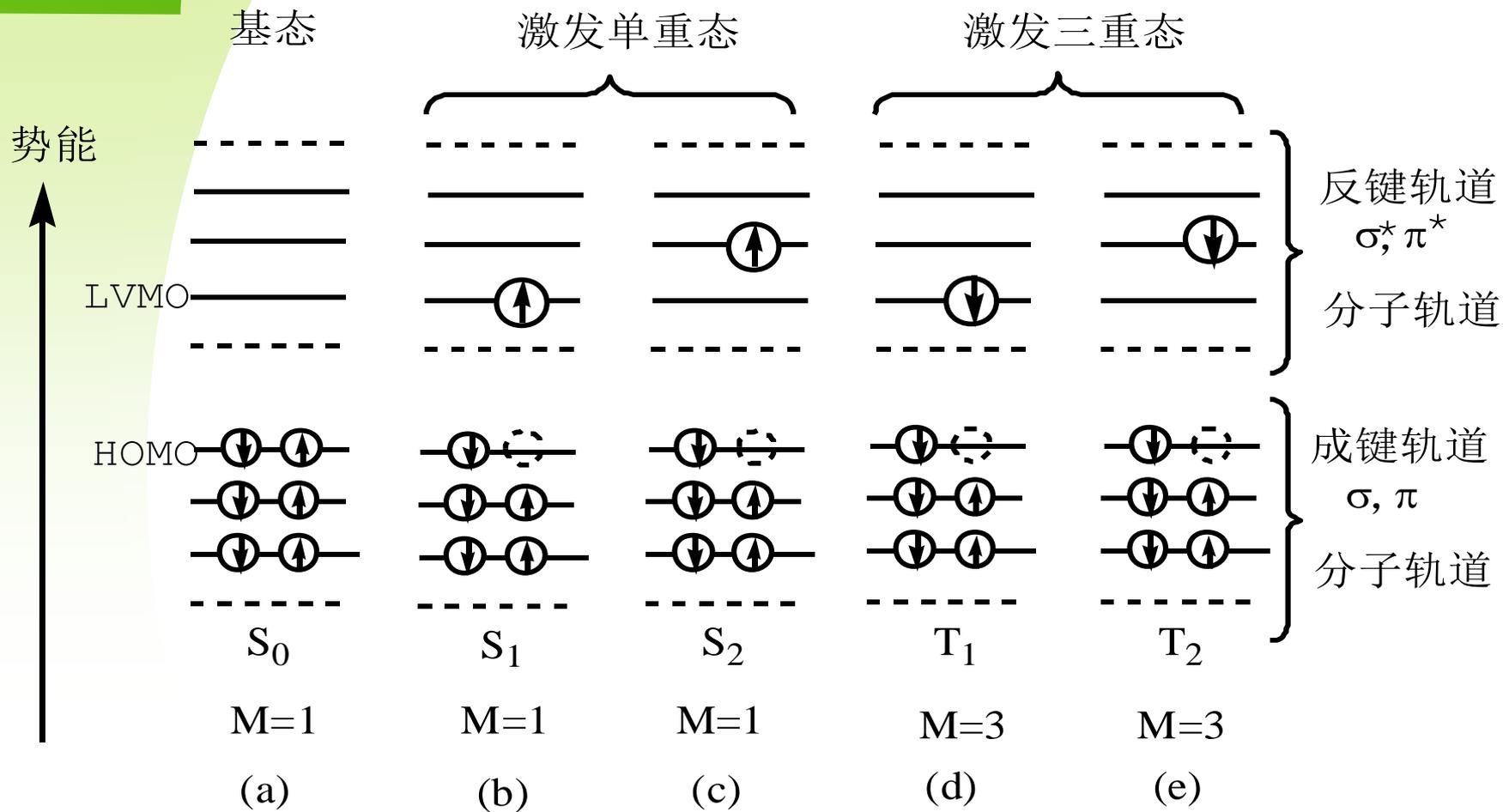
$$M = 2S + 1$$

S 为电子自旋量子数的代数和(0或1)；



单重态： 一个分子中所有电子自旋都配对的电子状态。

三重态： 有两个电子的自旋不配对而平行的状态。**激发三重态能量较激发单重态低。**



跃迁规则

Franck-Condon原理:

在电子跃迁完成的瞬间，分子中原子核的构型是来不及改变的。

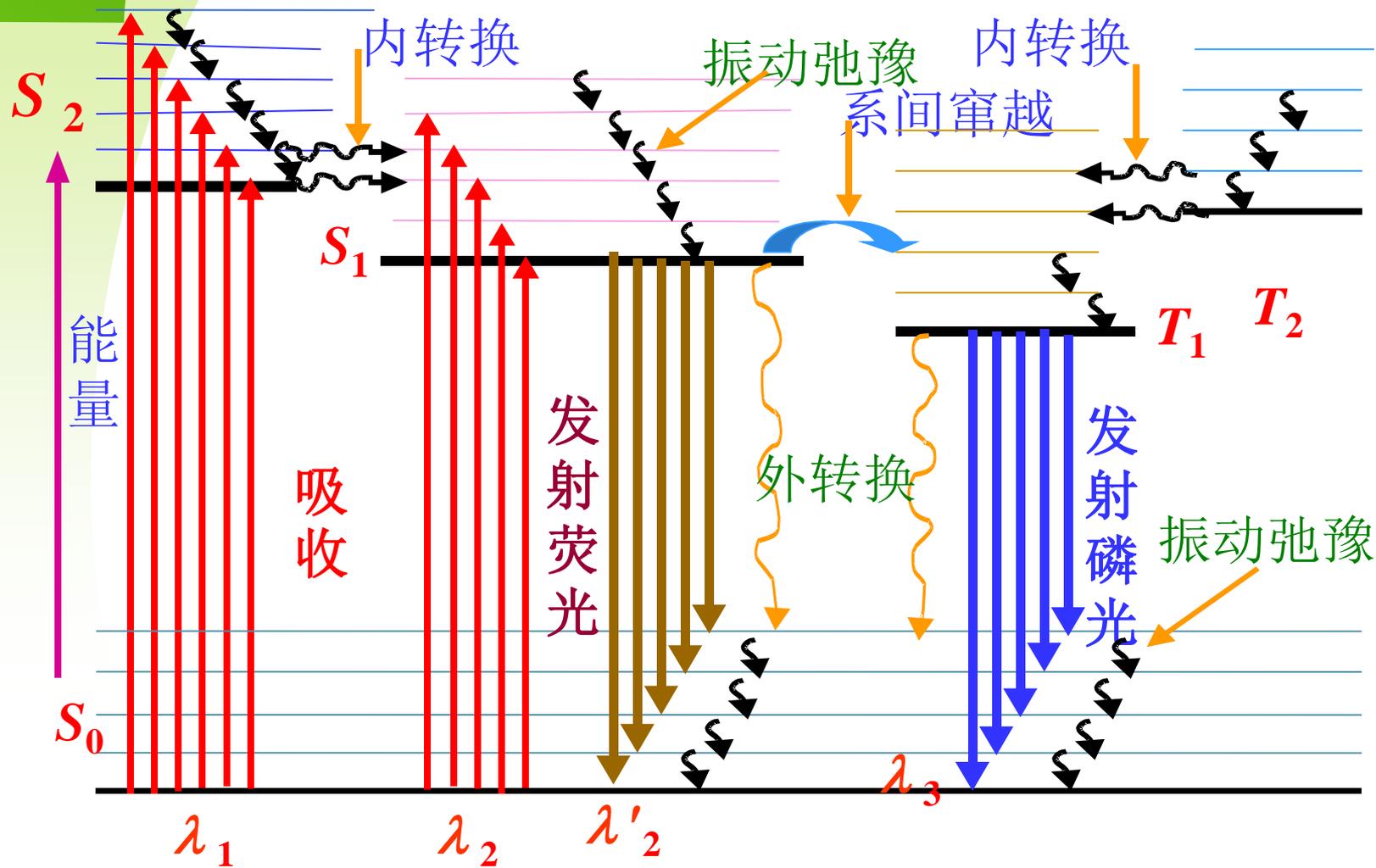
跃迁前后原子核的构型没有发生改变、跃迁过程中电子自旋没有改变、跃迁前后电子的轨道在空间有较大的重叠和轨道的对映性发生了改变的跃迁是允许的；（ $S_0 \rightarrow S_1$ 允许跃迁）

跃迁过程中电子自旋发生了改变、跃迁前后电子的轨道在空间不重叠或轨道的对映性未发生改变的跃迁是禁阻的。

（ $S_0 \rightarrow T_1$ 禁阻跃迁）

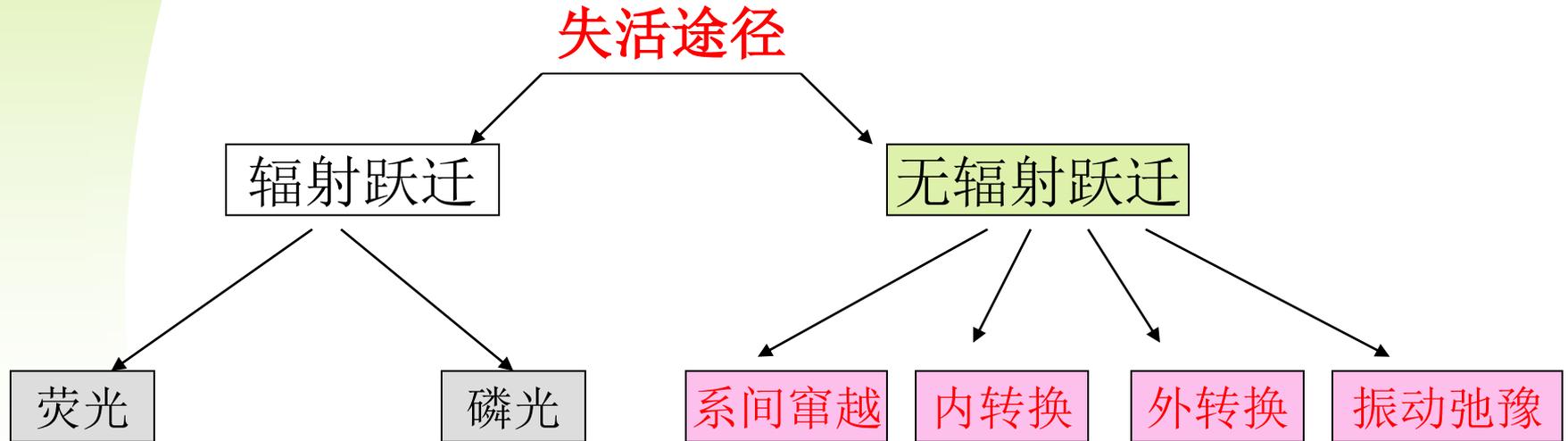
- ❖ 单重态能级间的跃迁符合光谱选律，跃迁概率大。分子通过吸收辐射而直接被激发到三重态的跃迁是**禁阻**的，概率很小。

雅布隆斯基分子能级图



失活的途径

电子处于激发态是不稳定状态，容易返回基态，在这个过程中通过辐射跃迁(发光)和无辐射跃迁等方式失去能量，这个过程就称为失活。



激发态停留时间短、返回速度快的途径，发生的几率大。

无辐射跃迁失活的途径

振动弛豫：同一电子能级内以热量交换形式由高振动能级至低相邻振动能级间的跃迁。发生振动弛豫的时间一般为 10^{-12} s。 **激发态分子常常首先发生振动弛豫。**

内转换：多重度相同的电子能级中等能级间的无辐射能级跃迁。

通过内转换和振动弛豫，高激发单重态的电子跃回第一激发单重态的最低振动能级。

无辐射跃迁失活的途径

外转换：激发分子与溶剂或其他分子之间产生相互作用而转移能量的非辐射跃迁；

外转换使荧光或磷光减弱或“猝灭”。

系间窜越：不同多重态，有重叠的转动能级间的非辐射跃迁。

改变电子自旋，禁阻跃迁，通过自旋—轨道耦合进行。含有重原子的分子中（如I、Br等），系间窜跃最常见。

辐射跃迁失活的途径

荧光发射：电子由第一激发单重态的最低振动能级→基态（多为 $S_1 \rightarrow S_0$ 跃迁），发射波长为 λ'_2 的荧光； $10^{-7} \sim 10^{-9}$ s。

由图可见，发射荧光的能量比分子吸收的能量小，波长长；

$$\lambda'_2 > \lambda_2 > \lambda_1 ;$$

磷光发射：电子由第一激发三重态的最低振动能级→基态（多为 $T_1 \rightarrow S_0$ 跃迁）；发射波长为 λ_3 的磷光； $10^{-4} \sim 100$ s。

电子由 S_0 进入 T_1 的可能过程：（ $S_0 \rightarrow T_1$ 禁阻跃迁）

$S_0 \rightarrow$ 激发 \rightarrow 振动弛豫 \rightarrow 内转换 \rightarrow 系间窜越 \rightarrow 振动弛豫 $\rightarrow T_1$

发光速度很慢，光照停止后，可持续一段时间。

磷光仅在很低的温度或黏性介质中才能观测到，因此磷光很少应用于分析

荧光产生的过程：

- (1) 处于基态最低振动能级的荧光物质分子受到紫外线的照射，吸收了和它所具有的特征频率相一致的光线，跃迁到第一电子激发态的各个振动能级；
- (2) 被激发到第一电子激发态的各个振动能级的分子通过无辐射跃迁降落到第一电子激发态的最低振动能级；
- (3) 降落到第一电子激发态的最低振动能级的分子继续降落到基态的各个不同振动能级，同时发射出相应的光量子，这就是荧光；
- (4) 到达基态的各个不同振动能级的分子再通过无辐射跃迁最后回到基态的最低振动能级。

荧光光谱与磷光光谱

荧光光谱

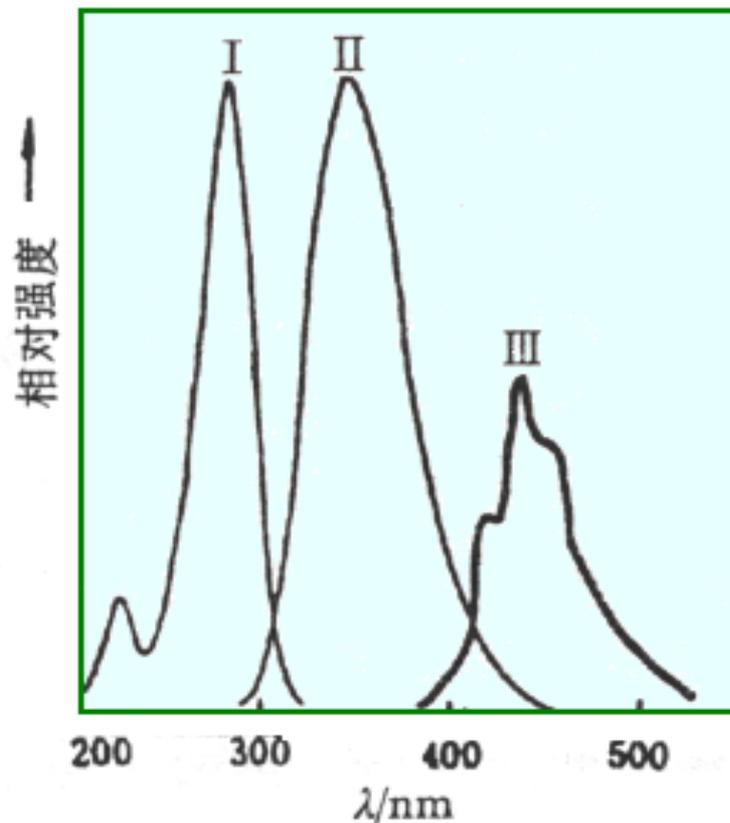
固定激发光波长物质发射的荧光强度与发射光波长关系曲线，如右图中曲线**II**。

荧光本身则是由电子在两能级间不发生自旋反转的辐射跃迁过程中所产生的光。

磷光光谱

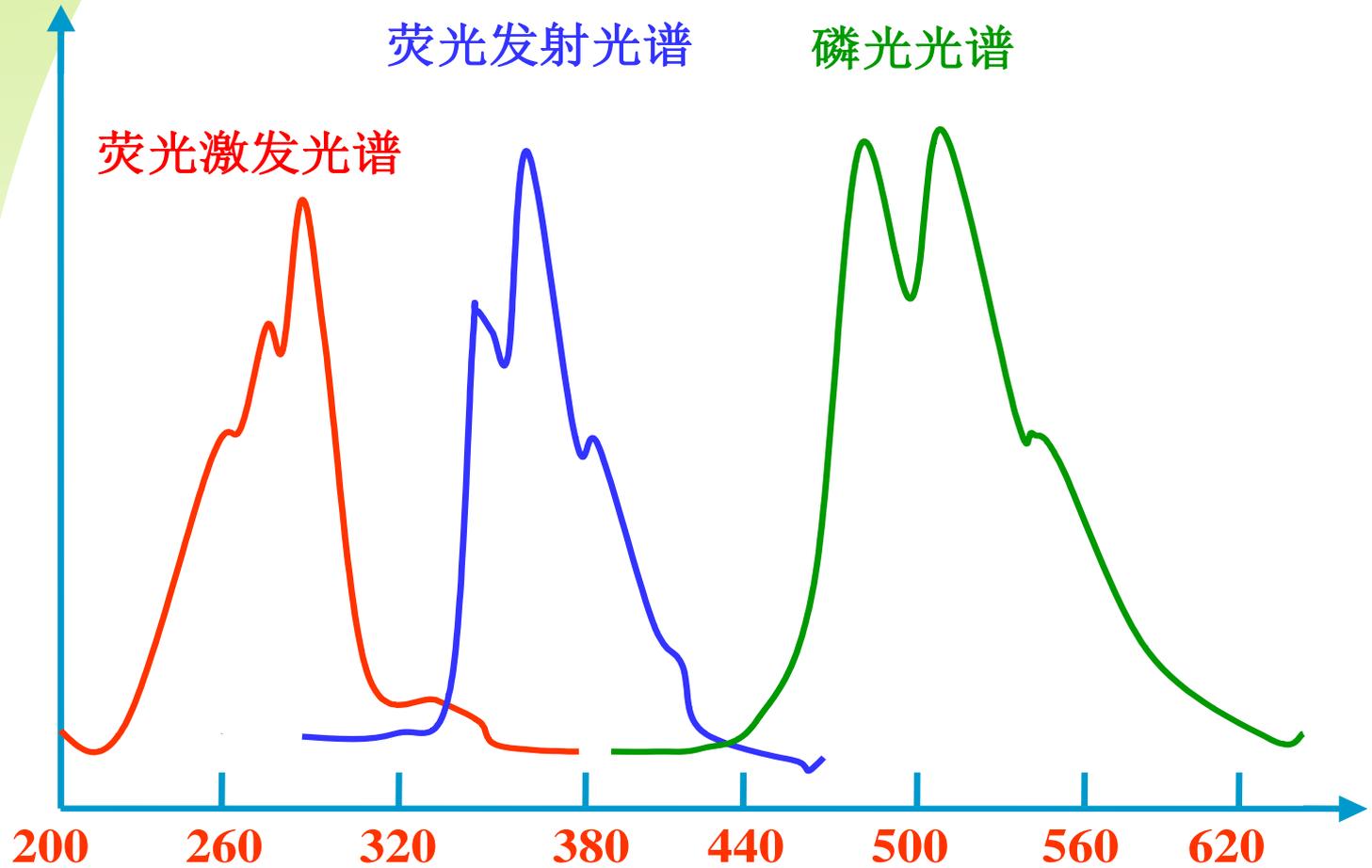
固定激发光波长物质发射的磷光强度与发射光波长关系曲线，如右图中曲线**III**。

磷光本身则是由电子在两能级间发生自旋反转的辐射跃迁过程中所产生的光。



萘的激发光谱 (I)、荧光 (II) 和磷光 (III) 光谱图

光谱图



室温下菲的乙醇溶液荧（磷）光光谱

二、主要光谱参量

吸收光谱

化合物的吸收光强度与入射光波长的关系曲线。

激发光谱

固定发射波长(一般将其固定于发射波段中感兴趣的峰位), 扫描出的化合物的发射光强度(荧光/磷光) 与入射光波长的关系曲线。

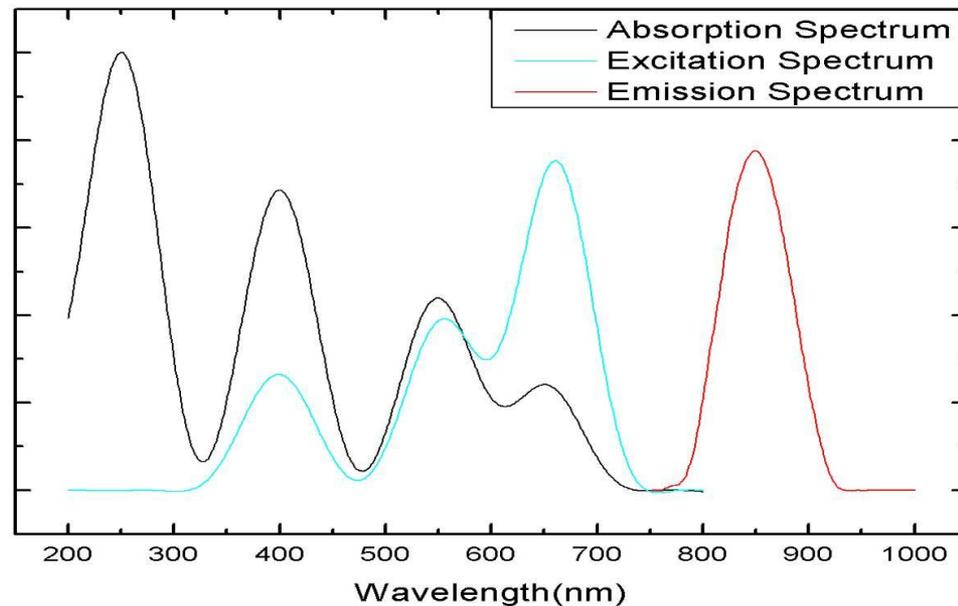
发射光谱

固定激发波长(一般将其固定于激发波段中感兴趣的峰位), 扫描出的化合物的发射光强度(荧光/磷光) 与入射光波长的关系曲线。

主要光谱参量

吸收光谱反映出的是物质的基态能级与激发态能级之间所有的允许跃迁。通常状态下的物质的表观颜色大部分时候取决于其吸收特性。

激发光谱则反映的是基态与所有与该荧光发射有关的能级之间的跃迁。其所呈现的关系比吸收光谱要有选择性，但有时候又不如吸收光谱来的直接。



激发光谱与发射光谱的关系

a. Stokes位移

激发光谱与发射光谱之间的波长差值。荧光的波长总是大于激发光的波长。这是由于发射荧光之前的振动弛豫和内转换过程损失了一定的能量。

b. 发射光谱的形状与激发波长无关

电子跃迁到不同激发态能级，吸收不同波长的能量(如能级图 λ_2, λ_1)，产生不同吸收带，但均回到第一激发单重态的最低振动能级再跃迁回到基态，产生波长一定的荧光(如 λ'_2)。

c. 镜像规则

通常荧光发射光谱与它的吸收光谱（与激发光谱形状一

斯托克位移

产生斯托克位移的主要原因：

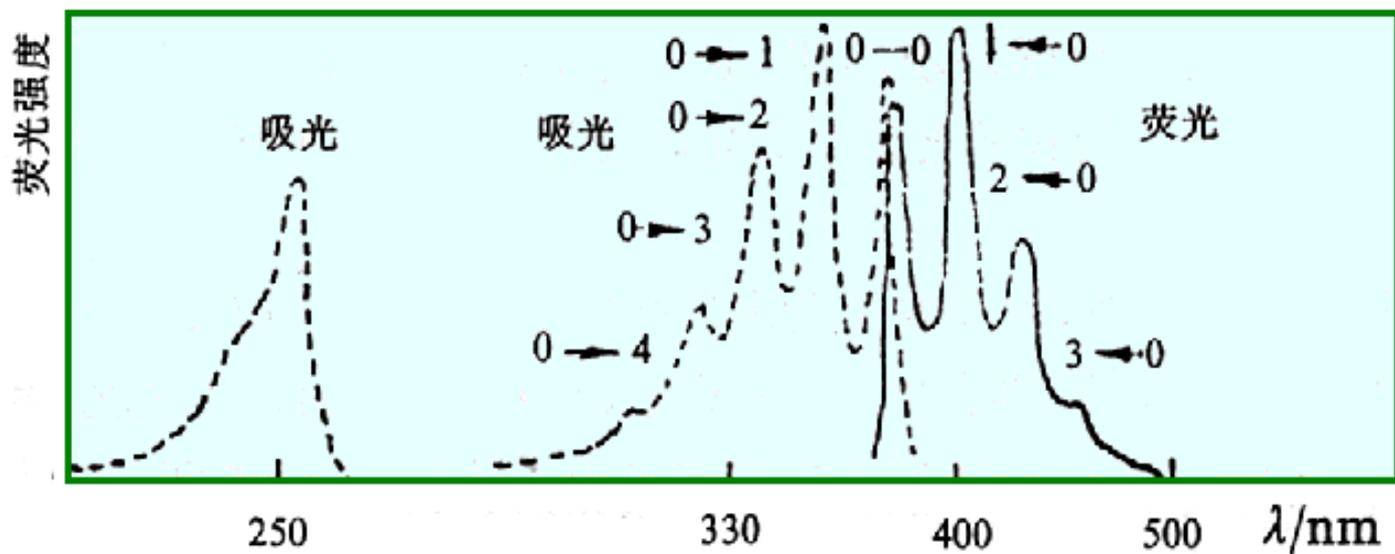
- 1. 跃迁到激发态高振动能级的激发态分子，首先以更快的速率发生振动弛豫（其速率在 $10^{13}/\text{s}$ 数量级），散失部分能量，达到零振动能级，一般从零振动能级发射荧光；
- 2. 激发态形成后，其分子的构型将很快进一步调整，以达到激发态的稳定构型，这又损失了部分能量；
- 3. 发射荧光的激发态多为 (π, π^*) 态，这种激发态较基态时有更大的极性，因此将在更大程度上为极性溶剂所稳定，使激发态的能量进一步降低。

❖ 关于激发光的波长 λ_1 :

- ① 决定荧光物质是否能够产生吸收并发射出荧光；
- ② 能够使荧光物质产生吸收并发射出荧光的激发光的波长并不具有唯一性；
- ③ 在保证激发的前提下，不同激发波长处的荧光发射光谱相同，但荧光强度不同。
- ④ 在进行荧光测定时，须选择激发光波长以保证荧光强度最大。

镜像规则

荧光发射是光吸收的逆过程。荧光发射光谱与吸收光谱有类似镜像的关系。但当激发态的构型与基态的构型相差很大时，荧光发射光谱将明显不同于该化合物的吸收光谱。

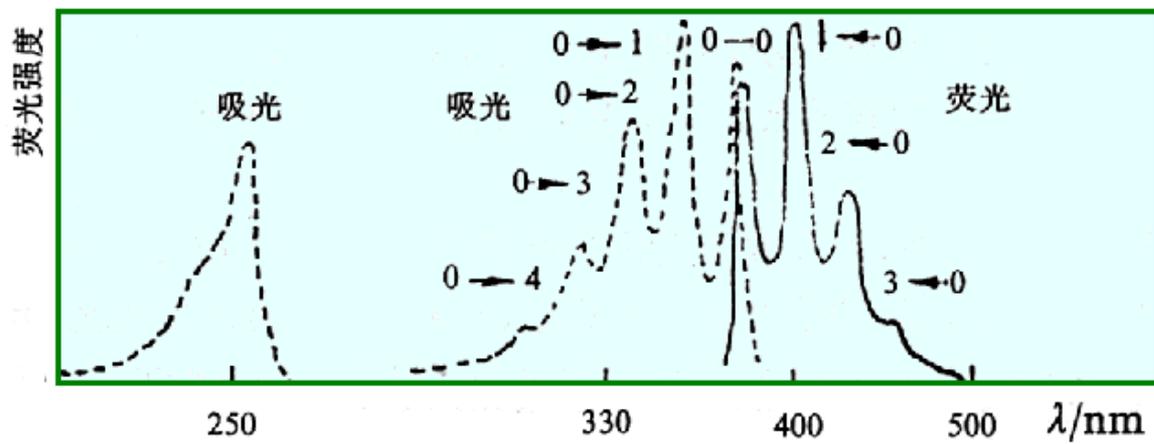
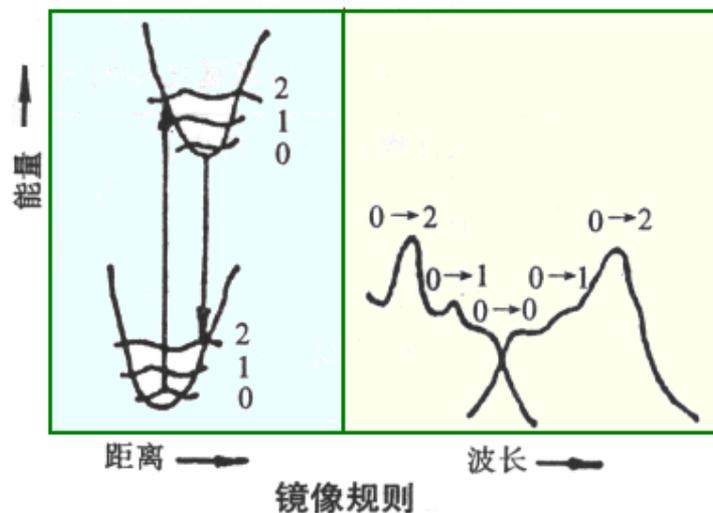


茴的乙醇溶液的荧光光谱(右)和吸收光谱(左)图

镜像规则的解释

基态上的各振动能级分布与第一激发态上的各振动能级分布类似；

基态上的零振动能级与第一激发态的零振动能级之间的跃迁几率最大，相反跃迁也然。



茴的乙醇溶液的荧光光谱(右)和吸收光谱(左)图

三、荧光的产生与分子结构的关系

1. 分子产生荧光必须具备的条件

- (1) 具有合适的结构；
- (2) 具有一定的荧光量子产率。

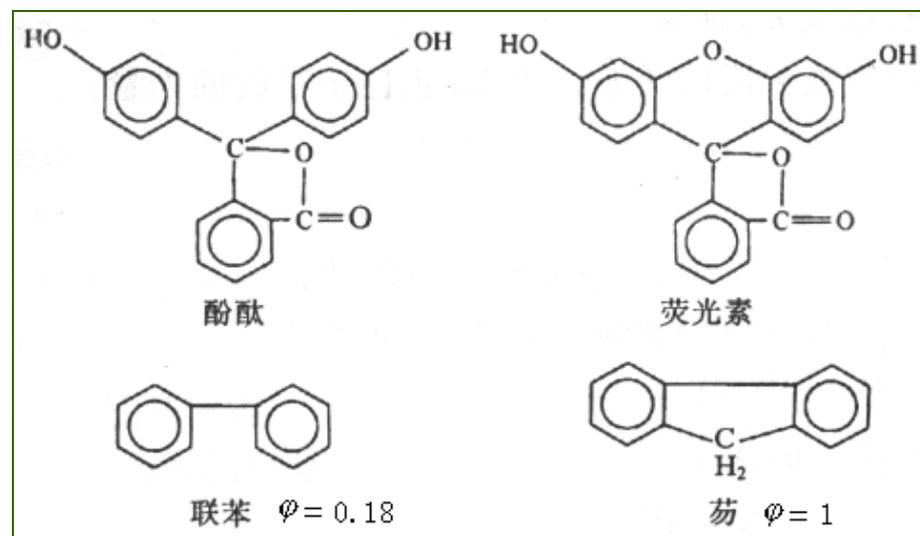
1. 化合物的结构与荧光

(1) 跃迁类型： $\pi^* \rightarrow \pi$ 的荧光效率高，系间跨越过程的速率常数小，有利于荧光的产生；

(2) 共轭效应：提高共轭度有利于增加荧光效率并产生红移

(3) 刚性平面结构：可降低分子振动，减少与溶剂的相互作用，故具有很强的荧光。

(4) 取代基效应：芳环上有供电基，使荧光增强。



化合物	相对荧光强度	荧光波长/nm
C_6H_6 (苯)	10	270~310
C_6H_5COOH	3	310~390
$C_6H_5NO_2$	0	
$C_6H_5CH_3$	17	270~320
C_6H_5OH	18	285~365
$C_6H_5OCH_3$	20	285~345
$C_6H_5NH_2$	20	310~405
C_6H_5CN	20	280~360
C_6H_5Cl	7	275~345
C_6H_5Br	5	290~380
C_6H_5I	0	

2 荧光量子产率 Φ

❖ 物质分子发射荧光的能力用荧光量子产率（ Φ ）表示：

$$\Phi = \frac{\text{发射荧光的分子数}}{\text{激发态的分子数}} = \frac{\text{发射的光子数}}{\text{吸收的光子数}}$$

❖ Φ 与失活过程的速率常数 k 有关：

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ec} + k_{ic}}$$

凡是使荧光速率常数 k_f 增大而使其他失活过程（系间窜越、外转换、内转换）的速率常数减小的因素（环境因素和结构因素）都可使荧光增强。

四、影响荧光强度的外部因素

1. 溶剂的影响

- 溶剂极性增加，有时会使荧光强度增加，荧光波长红移。
- 若溶剂和荧光物质形成氢键或使荧光物质电离状态改变，会使荧光强度、荧光波长改变。
- 含重原子的溶剂（碘乙烷、四溴化碳）使荧光减弱，磷光增强。
- 溶剂**粘度**减小时，可以增加分子间碰撞机会，使无辐射跃迁增加而荧光减弱。故**荧光强度随溶剂粘度的减小而减弱**。由于温度对溶剂的粘度有影响，一般是温度上升，溶剂粘度变小，因此**温度上升，荧光强度下降**。

2.温度的影响

荧光强度对温度变化敏感，温度增加，分子运动速度加快，分子间碰撞的几率增加，外转换去活的几率增加，荧光效率降低。例如荧光素钠的乙醇溶液，在0℃以下，温度每降低10℃， ϕ_f 增加3%，在-80℃时， ϕ_f 为1。

3 pH值的影响

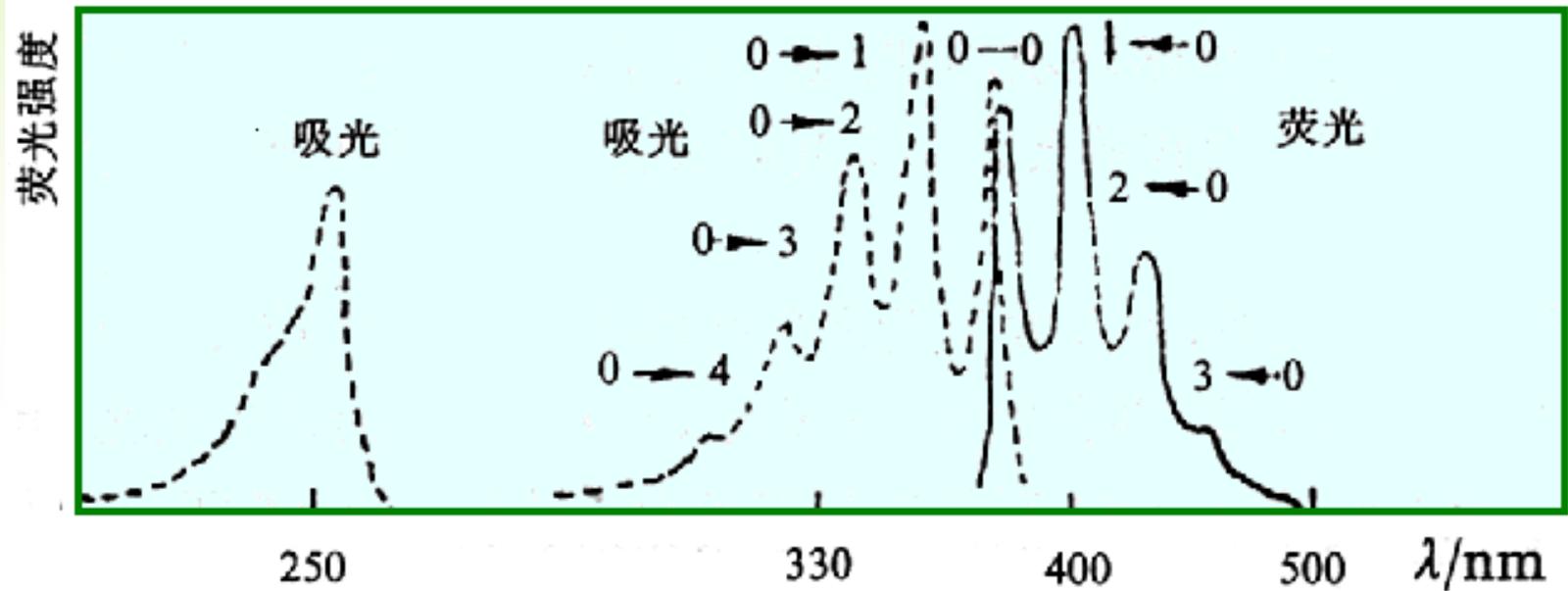
含有酸性或碱性取代基的芳香化合物的荧光与pH有关。pH的变化影响了荧光基团的电荷状态，从而使其荧光发生变化。

化合物	相对荧光强度
$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	18
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	0
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	20
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+$	0

4.内滤光作用和自吸现象

内滤光作用：溶液中含有能吸收激发光或荧光物质发射的荧光，如色胺酸中的重铬酸钾；

自吸现象：化合物的荧光发射光谱的短波长端与其吸收光谱的长波长端重叠，产生自吸收；如蒽化合物。



蒽的乙醇溶液的荧光光谱(右)和吸收光谱(左)图

5. 荧光熄灭剂

荧光熄灭是指荧光物质分子与溶剂分子或溶质分子相互作用引起荧光强度降低的现象。引起荧光熄灭的物质称为荧光熄灭剂(quenching medium)。如卤素离子、重金属离子、氧分子以及硝基化合物、重氮化合物、羰基和羧基化合物均为常见的荧光熄灭剂。

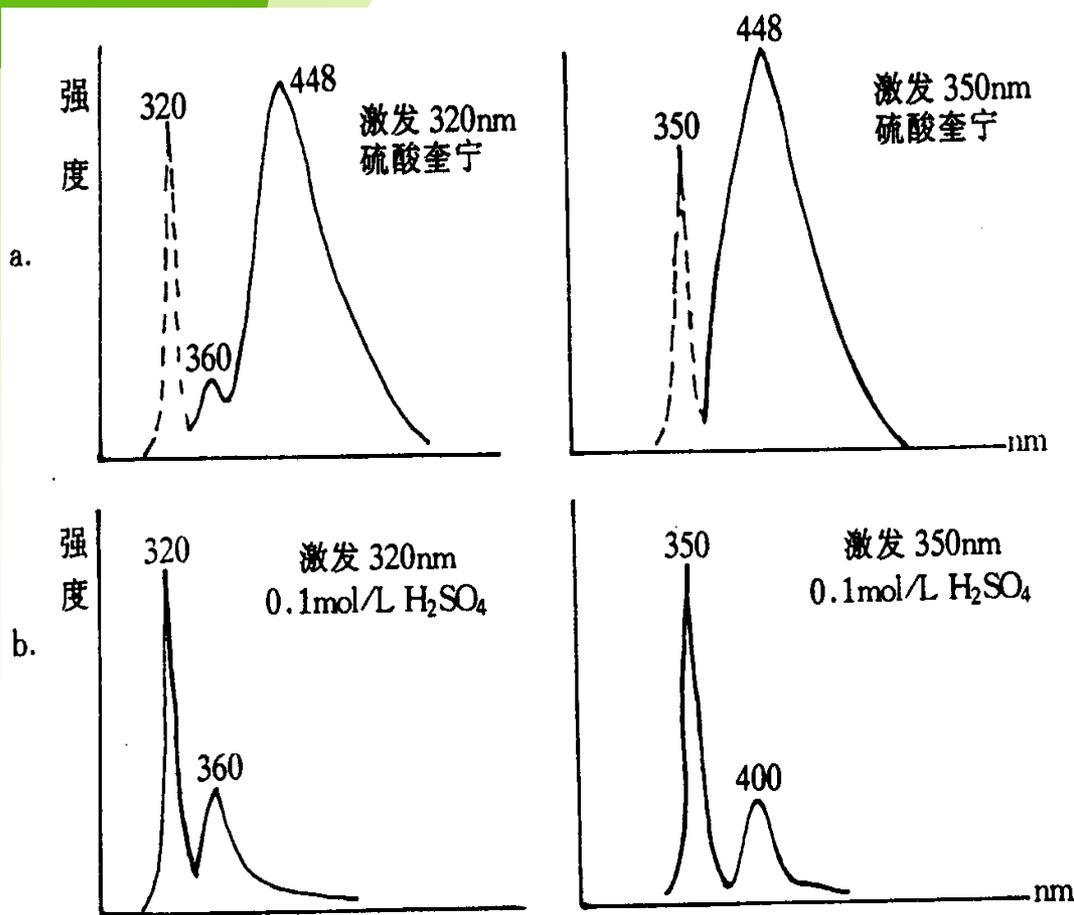
6、散射光

小部分光子和物质分子相碰撞，使光子的运动方向发生改变而向不同角度散射。

瑞利光：光子和物质发生弹性碰撞，不发生能量交换，只是光子运动方向发生改变。其波长与入射光波长相同。

拉曼光：光子和物质发生弹性碰撞，发生能量交换，光子把部分能量转移给物质分子或从物质分子获得部分能量。从而发射出比入射光稍长或稍短的光。

散射光对荧光测定有干扰，尤其是波长比入射光波长更长的拉曼光，与荧光波长接近，对测定的干扰大，必须采取措施消除。拉曼光的干扰主要来自溶剂，当溶剂的拉曼光与被测物质的荧光光谱相重叠时，应更换溶剂或改变激发光波长



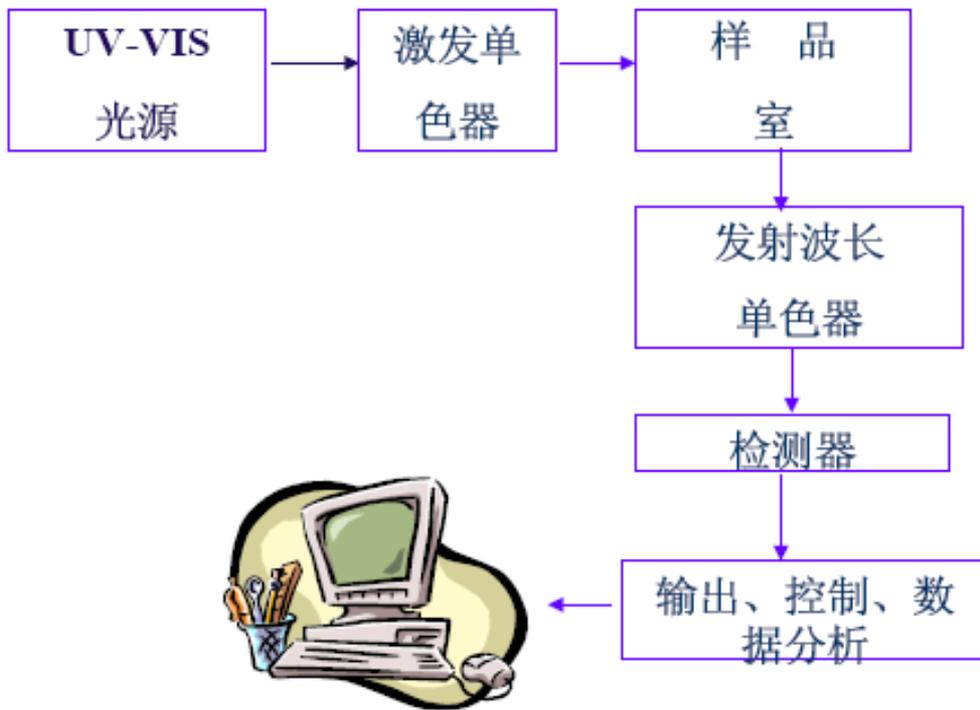
a:320nm或350nm为激发光，
荧光峰总是在448nm。

b:将空白溶剂分别在320nm及
350nm激发光照射下测定荧光，
激发光波长为320nm时，拉曼
光波长是360nm，360nm的拉
曼光对荧光无影响；当激发光
波长为350nm时，拉曼光波长
是400nm，400nm的拉曼光对
荧光有干扰，因而影响测定结
果。

硫酸奎宁在不同波长激发下的荧光与散射光谱

荧光光谱仪的原理、操作及数据处理

荧光光谱仪的基本原理



特殊点：有两个单色器，光源与检测器通常成直角。

光源：

高压氙灯发出的光线强度大，而且是连续光谱，通用性较好，但氙弧灯热效应大，稳定性较差，对电压稳定性要求较高。

高功率连续可调激光光源是一种新型荧光激发光源。激光的单色性好、强度大。激光光源近年来应用日益普遍。

❖ 单色器：

第一单色器——选择激发光波长 λ_1 （ $>250\text{nm}$ 的紫外光），称为激发单色器。

第二单色器——选择(测量)发射光（荧光）波长 λ_2 ，与激发光入射方向垂直，称为荧光单色器。

❖ 样品池：

采用低荧光材料，通常为四面透光的石英池。

❖ 检测器：

光电倍增管。

样品准备

液体

1. 溶液样品尽量使用透明的玻璃化溶液，避免在这种汇聚式光路中由于比色皿中溶液的前后吸收不均导致的光谱失真问题。
2. 为安全起见，对于使用挥发发性剧毒溶剂的测试，一定要有合适的防护。
3. 易挥发、易变质的溶液最好现配现测。
4. 液体样品一般放在带盖石英比色皿（与紫外测试所用比色皿不同，为侧面全透明型）中进行测试。

测试准备

由于物质的发射特性和吸收特性是紧密相关的，所以提前做好吸收谱可以有效缩短荧光测试的摸索时间。

对于不知道相关特性的样品，吸收谱的测试比荧光光谱的测试要容易很多。

所以，建议大家先测一下样品的吸收谱，并从中找出感兴趣的吸收峰和特性，在荧光测试时以便参考。

1. 开机

电源——灯源

2. 荧光光谱

固定激发光的波长，选择合适的荧光光谱波长范围、滤光片、光路狭缝、扫描速度等测量不同荧光波长处荧光的强度，得到荧光光谱，即**荧光强度—荧光波长图**。

3. 激发光谱

在荧光最强的波长处固定荧光波长，选择合适的激发光谱波长范围、滤光片、光路狭缝、扫描速度等测量随激发光波长的改变而变化的荧光强度，得到荧光激发光谱。即**荧光强度-激发光波长图**。

4. 荧光光谱

在荧光最强的波长处固定激发波长，选择合适的荧光光谱波长范围、滤光片、光路狭缝、扫描速度等进行发射谱的扫描。

5. 重复3、4步循环扫描得到理想的光谱图。

6. 保存数据

7. 关机

激发波长一定要小于发射波长。

光源——电源

光路狭缝和扫描速度的选择

如果光路狭缝太大，荧光信号太强，容易超出仪器检测范围，损伤仪器；如果狭缝开的太小，荧光信号又太弱，检测比较困难，所以要选择大小合适的狭缝。

如果扫描太快，容易跳峰，忽略特征性的峰信号；扫描太慢则浪费时间。所以只要能扫描得到平滑的光谱曲线就可以了。

荧光光谱的应用

1. 定量依据与方法

(1) 定量依据

荧光强度 I_f 正比于吸收的光量 I_a 和荧光量子效率 φ :

$$I_f = \varphi I_a$$

由朗伯-比耳定律: $I_a = I_0(1 - 10^{-\varepsilon l c})$

$$I_f = \varphi I_0(1 - 10^{-\varepsilon l c}) = \varphi I_0(1 - e^{-2.3\varepsilon l c})$$

浓度很低时, 将括号项近似处理后:

$$I_f = 2.3 \varphi I_0 \varepsilon l c = Kc$$

(2) 定量方法

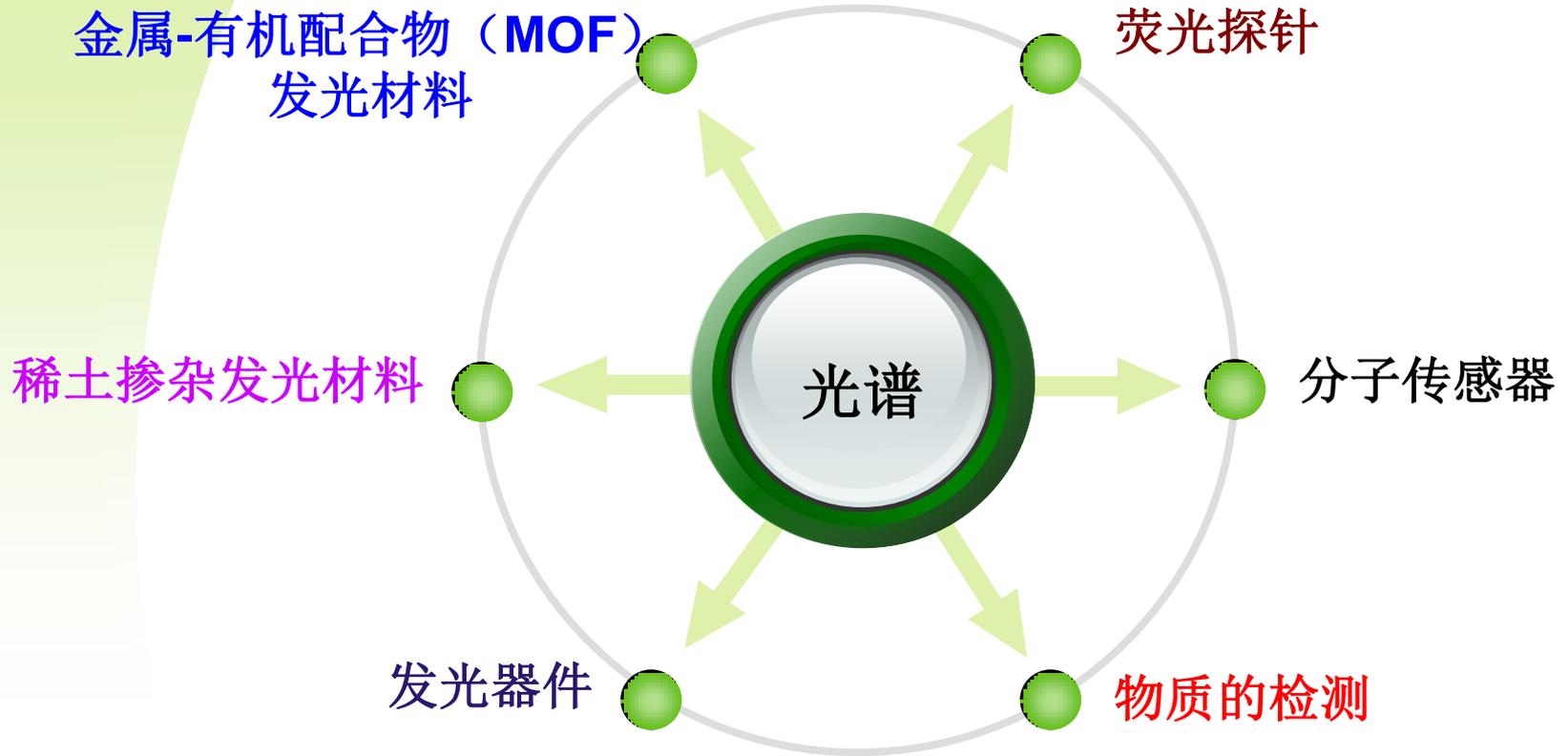
标准曲线法：

配制一系列标准浓度试样测定荧光强度，绘制标准曲线，再在相同条件下测量未知试样的荧光强度，在标准曲线上求出浓度；

比较法：

在线性范围内，测定标样和试样的荧光强度，比较；

2、荧光光谱的应用



(1) 无机化合物的分析

与有机试剂配合物后测量；可测量约60多种元素。

铍、铝、硼、镓、硒、镁、稀土常采用荧光分析法；

氟、硫、铁、银、钴、镍采用荧光熄灭法测定；

铜、铍、铁、钴、钼及过氧化氢采用催化荧光法测定；

铬、铈、铀、碲采用低温荧光法测定；

铈、铊、铋、钒、铀采用固体荧光法测定

(2) 生物与有机化合物的分析

见表

表 某些无机物的荧光测定法

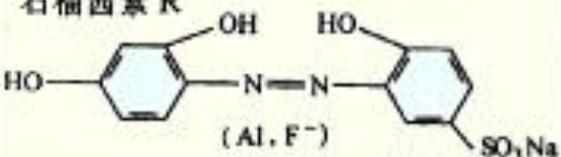
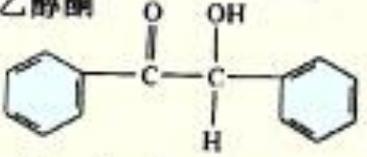
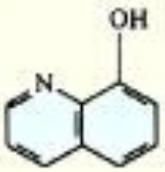
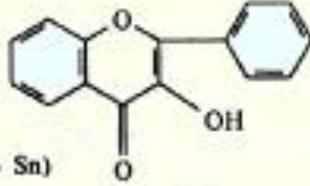
离子	试 剂	λ/nm		检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	干 扰
		吸 收	荧 光		
Al^{3+}	石榴茜素 R  (Al, F^-)	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F^- , NO_3^- , Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
F^-	石榴茜素 R - Al 配合物 (熄灭)	470	500	0.001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	二苯乙醇酮  (B, Zn, Ge, Si)	370	450	0.04	Be, Sb
Cd^{2+}	2-(邻-羟基苯)-间氮杂氧	365	蓝色	2	NH_3
Li^+	8-羟基喹啉  (Al, Be 等)	370	580	0.2	Mg
Sn^{4+}	黄酮醇  (Zr, Sn)	400	470	0.008	F^- , PO_4^{3-} , Zr
Zn^{2+}	二苯乙醇酮	—	绿色	10	Be, B, Sb, 显色离子

表 某些有机化合物的荧光测定法

待测物	试剂	激发光波长	荧光波长	测定范围
		nm	nm	$c/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})$
丙三醇	苯胺	紫外	蓝色	0.1 ~ 2
糠醛	萘酮	465	505	1.5 ~ 15
萘		365	400	0 ~ 5
苯基水杨酸酯	N, N'-二甲基甲酰胺 (KOH)	366	410	$3 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
1-萘酚	$0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$	紫外	500	
四氧嘧啶(阿脉)	苯二胺	紫外(365)	485	10^{-10}
维生素 A	无水乙醇	345	490	0 ~ 20
氨基酸	氧化酶等	315	425	0.01 ~ 50
蛋白质	曙红 Y	紫外	540	0.06 ~ 6
肾上腺素	乙二胺	420	525	0.001 ~ 0.02
胍基丁胺	邻苯二醛	365	470	0.05 ~ 5
玻璃酸酶	3-乙酰氧基吡啶	395	470	0.001 ~ 0.033
青霉素	α -甲氧基-6-氯-9-(β -氨基乙基)-氨基氮杂萘	420	500	0.0625 ~ 0.625

荧光探针

荧光探针：

与蛋白质或其他大分子结构 非共价相互作用而使一种或几种 荧光性质发生改变的小分子物质。可用于研究大分子物质的性质和行为。

目前常用的荧光探针有荧光素类探针、无机离子荧光探针、荧光量子点、分子信标等。

荧光探针除应用于核酸和蛋白质的定量分析外，在核酸染色、DNA电泳、核酸分子杂交、定量PCR技术以及DNA测序上都有着广泛的应用。

荧光探针

过渡金属配合物很多能实现较强的红外波段宽带发射，可以有效避开组织体的吸收，可以穿透组织体实现红外成像，克服同位素原子示踪对人体的伤害；寿命处于 μs 量级，可以用于较大分子的形变和转动扩散研究，当然，结合其特有的发射波段也能对活体环境中的许多扩散和转变过程进行研究。

荧光探针

稀土离子是一类核酸探针的检测试剂。

在水溶液中仅有Tb(III)和Eu(III)发出荧光，与DNA配合后仍保留荧光性能，可特异识别核苷酸。

Tb(III)和Eu(III)与一些小分子配体配合，由于配体本身性质、中心离子-配体成键及溶剂等因素影响，使配合物的激发态寿命达到ms级，并发出窄而强的荧光。

Tb(III)和Eu(III)与小分子的配合物探针通过共价键与靶DNA共价结合后多用于实时定量荧光PCR反应产物的分析及杂交测试。

该类探针要求稀土配合物易于合成并且足够稳定，同时荧光发射强度大。Nurmi等用Tb(III)和Eu(III)标记的探针进行实时同步扩增及前列腺特异抗原的测定，信噪比要高于传统的TaqMan探针，而循环阈值则降低。

荧光探针

量子点荧光探针是由 II-IV 族和 III-V 族元素组成的半导体纳米颗粒，将核酸连接到量子点的表面，做成探针，通过体外杂交常规荧光 (FISH) 分析，发现染色体的异常及变异，可取代一些有机荧光染料进行生物分子检测。研究较多的有 CdSe、CdTe、ZnS 等。

荧光探针

量子点探针较传统的有机荧光染料具有一定的优越性：

首先，荧光光谱范围宽，通过改变纳米晶体材料和尺寸，获得的激光诱导荧光光谱范围在400nm~2 μ m；

其次，荧光光谱范围可调，稳定性好，荧光寿命长，且可用单一波长的激发光源同时激发不同大小尺寸的量子点，得到不同荧光发射波长的检测信号，相对于有机荧光染料的单一光源激发得到单一荧光发射信号，降低了实验成本并简化了分析步骤。

总之，量子点荧光探针用于生物荧光标记，是一个具有广阔应用前景的领域。

荧光探针技术在高分子科学中的应用

利用荧光探针来研究高分子的链结构及高分子材料物化参数

通过荧光探针来研究高分子光化学与光物理问题

通过荧光探针研究高分子体系的聚合反应过程

利用荧光探针研究特殊环境的物理化学性质

荧光探针法测定胶束，囊泡等特殊环境的微极性和微黏度

荧光探针法测定胶束的聚集数

荧光探针研究高分子溶液的Sol-Gel过程和凝胶化点的测定

.....

参考书目：高分子光化学导论——基础和应用 吴世康著 科学出版社 2003-10出版

问题

- 1.分子失活的途径有哪些？
- 2.影响荧光的主要因素有哪些？
- 3.荧光的应用有哪些方面？