是否激活。与电泳迁移率变化分析方法相比，一方面避免了核蛋白抽提过程中因应激效应(如冷刺激)所造成的假阳性结果，另一方面，对于CREB这类在非激活状态下仍可与DNA序列产生结合的TFs而言[2]，以磷酸化状态来判定它是否活化更为简捷。④精确反映活化细胞的比率：大多数情况下刺激因素对细胞的激活作用具有剂量—时间依赖性，这与单一细胞的激活程度及激活细胞的数量即占群体细胞的比率有关。

我们应用ICC技术对LPS刺激后ECV-304内多种信号分子的激活进行了筛选研究[3]，为今后相关工作的深入开展打下了坚实的基础。总之，ICC技术是一种特异、敏感、经济而又操作简便的方法，可以广泛地应用于信号转导研究。

关键词：免疫细胞化学技术；转录因子
中图法分类号：R392.31 文献标识码：B

参考文献：

[1] 蔡文琴，王伯弥云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994.78—80.
[2] Goldman P S, Tran V K, Goodman R H. The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation[J]. Recent Prog Horm Res, 1997, 52(1): 103—119.
[3] 单佑安，刘小华，罗向东，等. LPS直接作用于血管内皮细胞激活信号分子的研究[J]. 西北国防医学杂志，2001，22(1)：2—5.

(编辑 谢义霞)

经验交流

文章编号：1000-5404(2003)04-0364-02

显微摄影的几点体会

Experiences in microphotography

孙建森[1]，周利军[2]，糜建红[1]，姚 远[1] (第三军医大学：[1]基础医学部解剖学教研室；[2]预防医学系卫生毒理学教研室，重庆 400038)

在医学形态学研究领域中所得到的照片质量是决定实验结果可靠性的重要依据，尤其对一些细微结构的显示，显微摄影以其独特的直观性、可视性使结果更具说服力[1]。

目前许多单位都有自己的显微照相系统，怎样使这些仪器设备更好地为医学科研服务，充分发挥其作用，获取清晰、满意的图片，下面以Olympus Bx—50生物显微镜、PM—AD照相系统为例介绍我们的一些体会。

1 照相显微镜结构简介，见图1

1.1 视度校正

通过调节摄影目镜来完成。视力存在个体差异，同一个人两眼视力也不尽相同，在拍摄前进行视度校正调节是必不可少的步骤。方法是用一只眼(左眼或右眼)通过调节摄像目镜上的屈光调节环，使目镜视野中心的“十”字由单线变成清晰的双线，见图2。同时要注意在拍摄过程中要保持用同一侧眼进行观察，不可左、右眼互用，若要更换还需重新调节。

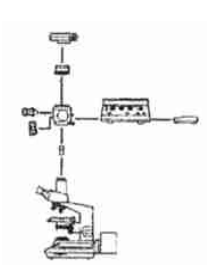


图1 显微镜结构简介

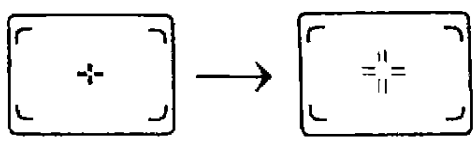


图2 视度校正

1.2 柯勒氏照明系统调节

柯勒照明系统的调节是保证获得完美、清晰照片必不可少的步骤，有些操作者往往忽略了该步调节，以至于所得到照片有偏光、偏色等不良结果。方法是通过调节轴中心螺丝钉来完成：①放置标本于载物台；②10× 物镜聚焦；③关小孔径光栅和视场光栅，此时视野出现多边形影像；④升降聚光镜，调清多边形边缘；⑤调节轴中心螺丝钉使多边形置于视野中心，见图3；⑥打开光栅。光栅的大小以刚刚超出视野边缘为佳，见图4，太大会产生散射光从而影响照片质量，太小视场周边会不清晰，造成照片周围曝光不足。



图3 轴中心调节



图4 光栅调节

1.3 标本焦距的调节

1.3.1 瞳距调节 合适的瞳距便于进行视野选取、观察以及准确地聚焦，在长时间操作中可减轻眼睛的疲劳。

作者简介：孙建森(1966—)，男，河南省许昌县人，实验师，主要从事显微摄影及图像分析方面的研究。电话：(023)68752225

收稿日期：2001-10-20；修回日期：2002-05-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.2　屈光度调节　①左、右眼无视差, 视度调节环置于"0"; ②有视差则要转动目镜上调节环以较正左、右眼的视度差。

1.3.3　焦距调节　通过粗调及微调来使组织切片清晰聚焦。与生活摄影一样, 显微摄影也存在焦深(同生活摄影的景深)。所谓焦深是指组织结构在清晰范围内的上下距离。低倍物镜由于放大倍率小, 焦深就长, 比较容易聚焦。相反高倍物镜的焦深就小, 聚焦相对比较困难, 在操作时一定要小心谨慎, 以便准确聚焦。摄像时要以摄像目镜聚集清晰为准。

2　摄影照片反差的调节

组织切片制备的优劣决定着照片质量的好坏。这就要求在制作组织片时一定要注意制作的每一个环节, 尤其要注意染色及封片等环节, 以保证制作出结构清晰、干净、无气泡、反差强烈、透明度良好的组织片。但通常情况下组织片总存在不同程度的问题, 拍摄时可通过以下调节进行弥补:

2.1　设置孔径光栅

孔径光栅的设置应满足公式(1)的要求:

公式(1): NA 聚光镜=(0.6~0.8)·NA 物镜。　NA 为数值孔径数, NA 值越大空间分辨率越高, 物镜的 NA 值取决于所购显微镜的档次的高低, 物镜的 NA 值在镜头上有所标识(BX50 生物显微镜各物镜的 NA 值 10× 为 0.25、20× 为 0.4、…)。在进行显微摄影时, 聚光镜孔径光栅开合的位置应该在物镜 NA 值的基础上再乘以 0.7 为最佳, 这样可使组织片达到最佳的反差效果。开得太大会降低照片的反差, 太小会使图象分辨率降低。其计算方法为: 例如用 20× 物镜拍摄时, 聚光器 NA 值应调到 0.4×0.7=0.28 的位置。以获得最佳的效果。若组织片制备效果不好, 还可通过进一步缩聚光镜 NA 值以及进一步缩小视场光栅等办法来提高照片的反差[2]。

2.2　色温的调节

进行彩色摄影时此调节是获得高质量照片必不可少的步骤: 打开电源, 加 LBD 蓝色滤镜, 将组织片放置于载物台, 色温表设置到"D"(日光型)。旋转载物台移动旋纽, 选取组织片空白处进行调节, 调整显微镜电压至对应于色温表"D"的黄色三角形指示灯亮, 完成色温调节。

3　显微照片的放大倍率

多数情况下, 科研工作者所关心的是摄影照片的放大倍率, 而拍摄冲扩等工作由辅助或专业人士去完成。目前国内期刊所载照片的放大倍率仍有很多作者以肉眼观察倍率来代替, 实际上观察倍率与摄影倍率是不同的概念[3,4]。

3.1　显微镜观察的放大倍率

M=物镜倍率×目镜倍率。

3.2　显微照片的放大倍率

照片的放大倍率取决于物镜的倍率、摄影目镜的放大倍率以及用胶片所冲扩照片尺寸的放大倍率。

物镜倍率乘以摄影目镜倍率所得为胶片的放大率。而照片的实际放大倍率应通过胶片放大倍率乘以胶片扩放成照片的放大倍率(Fe)来计算。135 胶片扩放成照片的放大倍数(Fe)通过公式(2)来计算:

公式(2): Fe=×/36 mm

36 mm 为 135 底片长边的长度, × 代表所扩放照片长度的毫米数。如 4 英寸照片约为 101.6 mm, 5 英寸约为 127.0 mm。

例如计算用 20X 物镜, 3.3 倍摄影目镜拍摄的 135 胶片扩放成 5 英寸照片的放大倍率(MF)计算方式是: MF=20×3.3×127/36=233。相同物镜 5X 摄影目镜所拍照片倍数: MF=20×5×127/36=353。表 1 是常用摄影照片的放大倍率, 可供查阅。

表 1　显微镜照片放大倍数计算表

物镜倍数	摄影目镜倍数	装置系数	图象倍数	底片放大倍数×			
(mo)	×(mp)	×(mi)	=(ml)	3	4	5	6 英寸
				76.2	101.6	127.0	152.4 mm
				2.12	2.82	3.53	4.23 倍数
4×	3.3×	1	13.2	28	37.2	46.6	55.8
10×	3.3×	1	33	70.0	93.1	116.5	139.6
20×	3.3×	1	66	140	186.2	233.0	279.2
40×	3.3×	1	132	28	372.2	466.0	558.4
100×	3.3×	1	330	700	930.6	1 165.0	1 396.0
4×	5×	1	20	42.4	56.4	70.6	84.6
10×	5×	1	50	106.0	141.0	176.5	211.5
20×	5×	1	100	212.0	282.0	353.0	423.0
40×	5×	1	200	424.0	564.0	706.0	846.0
100×	5×	1	500	1 060.0	1 410.0	1 765.0	2 115.0

4　显微摄影的其他环节

滤色片的应用: 彩色摄影一般加蓝色滤片 LBD(Bx50 已内置于底座), 一般认为 9 V 电压加 LBD 滤片可使灯丝色温达到 1 400 K, 接近日出或日落时的色温(1 800 K), 从而使日光型彩色胶片得以最佳的色温补偿; 而黑白胶片应加绿色滤片(IF550), 该滤片可使黑白胶片分光感度与人眼的接近。

组织玻片及摄影胶片的选择: 显微摄影所用玻片要求是正规厂家的合格产品, 厚度: 载玻片 0.9~1.4 mm, 盖玻片 0.17 mm, 玻片厚度同样影响照片质量。胶片选用日光型如 ISO/ASA 为 100/210 的胶卷, 在荧光拍摄时应选 200/240 以上的高感度胶片, 以获得更佳的感光效果。

熟练掌握拍摄操作键, 正确设置倒易率失效补尝以获得准确的曝光时间。倒易率失效补尝(Reciprocity)可根据胶片的型号, 从照相装置所带表中查取(Fuji100, Kodak100 均为 1)。

请图片社合作正确印制照片: 把自己的要求告知图片社, 或者是拿样品到图片社参照冲扩。同时彩色摄影照片建议使用平纹像纸, 这样效果更佳, 不满意时建议进行调色。

关键词: 显微摄影; 放大倍率; 显微镜

中图法分类号: R814.43　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Rose C. Teach yourself digital photography in 14days[M]. Boston: Hayden, Macmillan Computer Publishing, 1997. 6—8

[2] 杨天祝. 常用显微摄影技术的简要体会[J]. 河北医科大学学报, 1999, 20(3): 191—192

[3] 王发辉. 显微镜照片放大倍数计算与注明方法的探讨[J]. 动物学杂志, 1966, 1(1): 36

[4] 曹兴午. 显微摄影照片放大倍数计算[J]. 中华医学检验杂志, 1993, 16(2): 113

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net