

技术与方法

生物薄试样 X 射线显微定量分析技术的有效性研究

丁 浩 钟慈声 凌诒萍

(上海医科大学基础医学部生物物理教研室, 上海 200032)

提 要

为了探讨生物薄试样的 X 射线显微定量分析 (EPMA) 技术的有效性, 本文对 Cliff-Lorimer 因子(k 因子)的计算值和 EPMA 测定值做了比较。结果显示生物试样中的一些主要元素如 Cl, K, Ca 的 Cliff-Lorimer 因子的计算值和 EPMA 测定值吻合得很好; 还对不同含硫蛋白质试样中元素硫浓度计算值与 EPMA 测定值, 及不同 Ca^{2+} 含量试样中 Ca^{2+} 浓度 EPMA 测定值与原子吸收光谱测定值做了比较。分别获得相关系数为 0.994 和 0.989。这些结果说明用 EPMA 分析生物薄试样的结果是可以信赖的。

关键词 Cliff-Lorimer 因子, X 射线显微定量分析, 电离截面

电镜 X 射线显微分析, 在观察细胞超微结构的同时, 能定性及定量测量其中元素的分布和变化, 给细胞生物学^[1-3]和分子生物学^[4]的研究提供了新手段。由于这一技术的应用有一定难度, 国内只在近年才见报导^[5]。我们在建立和推广这一技术的同时, 对其分析结果的可靠性即对该技术的有效性进行了实验性研究。

材 料 和 方 法

1. 初级和二元标样的制备 在甲醇溶液中将无机盐磨成粉末, 用有 formvar 膜的铜网小心捞取上清液, 使其上面有一层极薄的盐粒, 凉干备用。

2. 生物标样的制备 选高纯牛血清白蛋白, 先将其磨成细末。在高倍光学显微镜下, 用竹签将透明的蛋白质薄片挑至单孔铜网的中央, 压平。再用 Hitachi HUS-5GB 型真空镀膜仪喷碳厚 3—7nm, 于 60℃ 下烘焙过夜。

3. 含硫蛋白质试样的制备 选用牛血清白

蛋白 (BSA)、细胞色素 c (cytochrome c) 均为 sigma 公司产品。人血清白蛋白 (HSA) 为上海生物制品研究所产品, 制作方法同生物标样。

4. Ca^{2+} 试样的制备 用快速电动天平 (sartorius 2004MP, 精度为十万分之一克) 称取一定量的乙二醇双 (α -氨基乙基) 四乙酸 (EGTA), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 用去离子水完全溶解, 经超声波振荡后制成均匀的基质母液。各取一定量的基质母液并分别加入不同量的 CaCO_3 , 在碱性环境中 ($\text{pH} = 8.3$) Ca^{2+} 能完全解离且均匀分布。用微体积显微操纵仪将不同浓度的 Ca^{2+} 溶液滴至单孔铜网中央, 液滴直径为 2—4 μm , 样品于 60℃ 下烘焙过夜, 喷碳厚度 2—7nm。

5. X 射线显微定量分析 在 JEM 1200EX 透射电镜及 Link AN10000 能谱仪上进行, 加速电压为 80kV, 石墨样品台倾角为 35°, 水平式探头 (10mm²) 位于 2cm 处。常温下以 TEM

方式收谱, 样品台用冷阱抗污染。计数率控制在 1200 CPS 左右, 光斑直径为 3—4 μm 。采用 Link AN 10000 生物薄试样定量分析软件 Quantem/FLS 处理谱。元素浓度单位为 mmol/kg dry wt。

实验结果

1. Cliff-Lorimer 因子可靠性研究

我们分别对生物材料中常见元素相对于元素硫的 Cliff-Lorimer 因子进行了理论计算和

表 1 生物试样中常见元素相对于元素硫的 Cliff-Lorimer (k) 因子计算值

k 因子	Na	Mg	Al	P	S	Cl	K	Ca	Cr	Fe
k_{MM}	1.766	1.250	1.073	0.980	1.000	0.997	0.994	0.987	1.161	1.246
k_{WT}	1.766	1.250	1.073	0.980	1.000	0.997	0.994	0.987	1.160	1.245
k_G	1.748	1.239	1.067	0.978	1.000	0.999	1.000	0.995	1.179	1.271
k_K	1.766	1.250	1.073	0.980	1.000	0.997	0.994	0.987	1.161	1.246
k_{GC}	1.700	1.212	1.049	0.973	1.000	1.005	1.018	1.019	1.238	1.351
k_{RS}	1.696	1.210	1.048	0.972	1.000	1.005	1.020	1.020	1.242	1.357
k_L	1.698	1.211	1.048	0.972	1.000	1.005	1.018	1.019	1.239	1.352
k_Q	1.693	1.208	1.047	0.972	1.000	1.006	1.021	1.022	1.247	1.364
k_P	1.647	1.182	1.030	0.966	1.000	1.011	1.038	1.047	1.310	1.453
k_D	1.668	1.194	1.037	0.969	1.000	1.009	1.030	1.035	1.279	1.409
k_F	1.664	1.191	1.035	0.968	1.000	1.010	1.035	1.042	1.302	1.443
k_{SW}	1.650	1.190	1.035	0.965	1.000	1.009	1.037	1.051	1.355	1.550

MM = Mott 和 Massey WT = Worthington 和 Tomlin G = Gryzinski
K = Kolbenstvedt GC = Green 和 Cosslett RS = Rudge 和 Schwartz
L = Lotz Q = Quarles P = Powell
D = Drawin F = Fabre SW = Schreiber 和 Wims

表 2 生物材料中常见元素相对于元素硫的 Cliff-Lorimer (k) 因子 EPMA 测定值

元 素	Na	Mg	Al	P	S	Cl	K	Ca	Fe
K 因子	4.143	1.374	1.308	1.056	1.000	1.010	1.081	1.048	1.043

EPMA 实验测定。有关理论计算公式参阅文献 [6-10]。表 1 列出了各家的计算值。

在进行有关电离截面^[7]计算时, 引用的 Kolbenstvedt 公式已经过相对论校正; Powell 和 Schreiber 和 Wims 及 Quarles 公式是通过实验得到的经验公式, 不需要相对论校正; 对其余引用的公式均按 Goldstein 等人^[8]提出的方法进行了相对论校正。

按计算结果相接近的可粗略分成三组: k_{MM}, k_{WT}, k_G 和 k_K 值; k_{GC}, k_{RS}, k_L 和 k_Q 值; 以及 k_P, k_D 和 k_{SW} 值。

表 2 列出了生物试样中常见元素相对于元素硫的 Cliff-Lorimer 因子 EPMA 测定值。

将这些测定值同按三个典型公式, 即 Green

Cosslett^[11], Kolbenstvedt^[12] 和 Schreiber 和

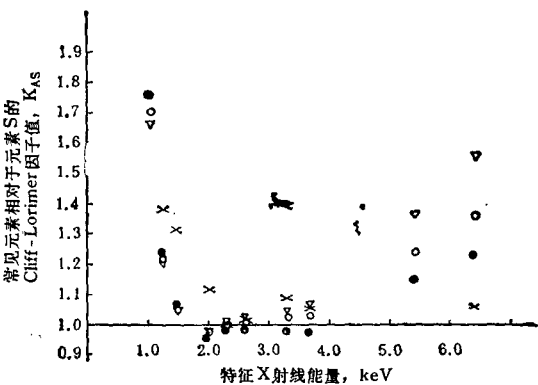


图 1 Cliff-Lorimer 因子测定值与计算值比较

×——本实验室测量值 o—— k_{GC}
●—— k_G ▽—— k_{SW}

Wims^[13] 公式得到的计算值比较,见图 1。

计算是按三种电离截面公式得到的。GC (○) = Green Cosslett, 我们对该公式进行了相对论校正; K(●) = Kolbenstvedt, 该公式适用于相对论电子, SW(▽) = Schreiber 和 Wims, 由实验得到, 无须做校正

比较结果表明: 生物试样中经常出现的原子序数 (z) 在 16—20 间的元素 Cl, K 和 Ca 的测定值同计算值吻合得很好; 原子序数 (z) 小于

16 的元素相对于元素硫的 Cliff-Lorimer 因子的测定值比计算值偏高; 元素 Fe (z = 26) 相对于 S 的 Cliff-Lorimer 因子的测定值低于计算值。

2. 利用不同含硫蛋白质试样进行有效性研究

表 3 为选择的 BSA, HSA cytochrome c 三种含硫蛋白质结构中元素 S 浓度的计算值和 EPMA 测定值。

表 3 三种含硫蛋白质中元素硫浓度 [S] 的计算值和 EPMA 测定值 ($\bar{x} \pm SD$ mmol/kg dry wt)

蛋 白 质	含硫氨基酸数/分子量	硫浓度计算值 [S]	硫浓度测定值 [S]	参考文献
BSA	CYS:35* MET:4 / 66296	588.27	578±43†	[14]
HSA	CYS:35 MET:2 / 66470	616.82	597±26†	[15]
cytochrome c	CYS:2 MET:2 / 11702	341.82	318±31†	[16]

* CYS = cysteine MET = methionine

以计算值为纵坐标 Y, EPMA 测定值为横坐标 x, 得到回归方程(图2)及相关系数 r 分别为:

$Y = 0.969x + 33.4, r = 0.994$

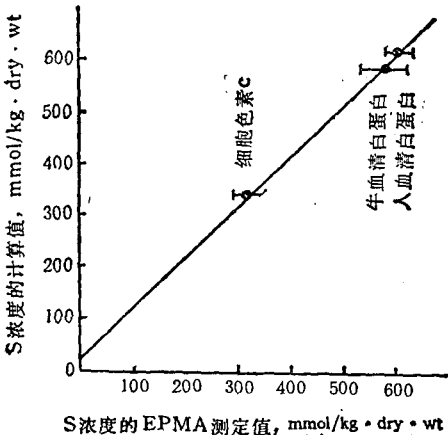


图 2 元素硫浓度的 EPMA 测定值与计算值的比较

3. 利用不同 Ca²⁺ 含量试样进行有效性研究

我们对五种不同浓度的 Ca²⁺ 溶液分别做了原子吸收光谱 (AAS) 分析和 X 射线显微定量分析测定, 见表 4。

以 EPMA 测定值为纵坐标 Y, 原子吸收光

表 4 Ca²⁺ 浓度的 EPMA 和 AAS* 测定值 ($\bar{x} \pm SD$ mmol/kg dry wt)

Ca ²⁺ 试样	0	1	2	3	4
EPMA 法测定值	3±2	48±4	117±8	301±31	423±55
原子吸收光谱测定值	0	54.16	160.92	311.10	406.32

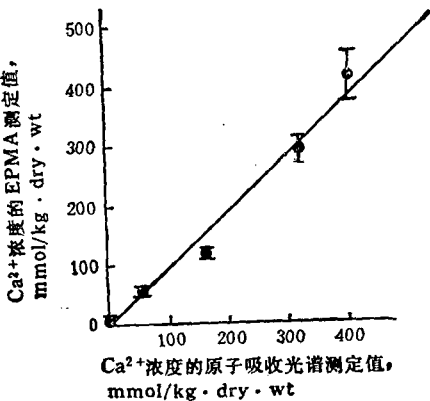


图 3 Ca²⁺-EGTA 溶液中, Ca²⁺ 浓度 EPMA 值与 AAS 值的比较

谱分析测定值为横坐标 x , 回归方程(图 3)和相关系数分别为:

$$Y = 1.067x - 16.46, r = 0.989$$

讨 论

在 X 射线显微定量分析中 Cliff-Lorimer 因子值是否可靠地决定着定量分析结果, 本文将该因子的测定值与计算值进行了比较以检验定量工作的有效性。实验表明, 生物试样中主要的一些元素如 Cl, K, Ca 相对于元素 S 的 Cliff-Lorimer 因子计算值和 EPMA 测定值吻合得很好, 这就为准确地定量测定生物试样中这些元素的含量提供了保证。实验还表明, 其它元素的 Cliff-Lorimer 因子的计算值与测定值存在着偏差, 显然这些偏差可能分别出自 Cliff-Lorimer 因子的理论计算和它的 EPMA 实验测定两个方面。这里试从这两个方面讨论引起偏差的原因。

进行 Cliff-Lorimer 因子计算时, 最主要的是准确地计算电离截面的大小。电离截面公式有各种各样, 大都在电镜加速电压 $< 30\text{ kV}$ 时适用。随着加速电压增大, 相对论效应导致运用这些公式计算时产生较大的误差。为此, Inokuti^[17] 和 Kolbenstvedt^[12] 曾先后依相对论量子力学推导出电离截面表达式。本文又依 Goldstein 法对电镜加速电压进行了相对论修正。依此, 修正了 Mott 和 Massey 电离截面公式并计算相应的 Cliff-Lorimer 因子同 Kolbenstvedt 修正法取得的结果完全一致。因此, 经过我们校正的电离截面公式基本能反映 K 壳层的电离过程。而在我们计算荧光产额 $\omega^{[8]}$ 、被测谱线分数 a 时^[9], 所引用的公式均有实验证明是可靠的^[9, 18]。在计算探测效率时, 我们采用了 Zaluzec^[10] 推荐的探头几何参数, 这可能是引起偏差的环节之一, 因为不同仪器这些几何参数可能各异, 目前还很难通过实验测定这些几何参数。

实际测定 Cliff-Lorimer 因子值时, 所用二元标样可能不能严格满足 Tixier 和 Philibert^[19] 薄膜条件。因此, 吸收和荧光效应不容

忽略。致使二元标样中原子序数 < 16 的元素以及元素 Fe ($z = 26$) 等相对于元素 S 的 Cliff-Lorimer 因子测定值偏高或低于计算值。欲对测定值进行吸收和荧光校正, 须测定分析区域内二元标样的厚度。但由于条件限制, 我们目前无法进行这方面的工作。

在含硫蛋白质试样的有效性研究中, 元素 S 的测定值与按结构得到的计算值之间的相关系数为 0.994; 回归直线斜率为 0.969, 表明二者具有良好的相关性。从具体数据来看, 三种含硫蛋白质 EPMA 测定值比计算值低 $10 \sim 20 \text{ mmol/kg dry wt.}$ 我们认为, 这可能与没使用冷冻样品台引起的“辐照损伤”有关。

含 Ca^{2+} 试样的有效性研究表明, 0 号、1 号、3 号 Ca^{2+} 试样的 EPMA 与 AAS 测定值很接近; 2 号、4 号 Ca^{2+} 试样存在偏差。我们认为, 2 号 Ca^{2+} 的 EPMA 测定所用的试样表面碳膜过厚, 导致出射的 X 射线吸收严重, 最后结果便反映出 EPMA 值偏小于 AAS 值。配制 4 号 Ca^{2+} 试样时, 溶液体积测量值偏小, 造成 AAS 值偏低。尽管如此, 不同含 Ca^{2+} 浓度样品的 EPMA 测定值同 AAS 值之间的相关系数亦达到 0.989。说明 EPMA 定量分析生物薄试样时, 其结果还是值得信赖的。

参 考 文 献

- 1 Wendt-Gallitelli M F. *Am J Physiol*, 1989; 256: H574
- 2 Ornberg R L, Kuijpers GA, Leapman R D. *J. Biol Chem*, 1988; 263(3): 1488
- 3 Somlyo A V *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85 (16): 6222
- 4 Lechene C. In: A P Somlyo ed. *Recent advances in electron and light optical imaging in biology and medicine*, New York: The New York Academy of Sciences, 1986: 270
- 5 凌治萍等. 上海医科大学学报, 1988; 15(4): 250
- 6 Goldstein JI *et al*. *SEM*, 1977; 1: 315
- 7 Bethe H. *Ann Phys*, 1930; 5: 325
- 8 Burhop EHS. *J Phys Rad*, 1955; 16: 625
- 9 Schreiber T P, Wims A M. *X-ray Spectrometry*, 1982; 11: 42
- 10 Zaluzec N. J. In: Hren J J *et al* eds. *Introduction to analytical electron microscopy*, New York: Plenum Press, 1979: 121

(下转第228页)

由图 4 计算的叶绿素 a/b 色谱峰面积比约为 2.4, 低于文献值 2.7^[2]。其原因可能与选取的检测波长和它们的荧光量子产额有关。文献报导, 在丙酮溶液中, 叶绿素 a 的量子产额 (0.24) 比叶绿素 b (0.09) 大得多^[2]。荧光量子产额高, 光声信号小。

4. 激光照射对叶绿素 a、b 比值的影响

在强激光照射下, 叶绿素光声信号的迅速降低, 是吸光色素受光照破坏所致, 在 610nm 波长下, 叶绿素 a、b 均有吸收, 为了解 a、b 组分对光致损伤的差异, 我们将受光照不同时间的叶绿素乙醇溶液经色谱柱分离后得到峰面积比, 其关系如图 5 所示。由图可见, 随着照射时间增加, a/b 峰面积比下降。初始 20min 内下降较快, 此后比较平缓。用 a/b 峰面积比的对数与照射时间作图, 20min 内呈一直线, 说明

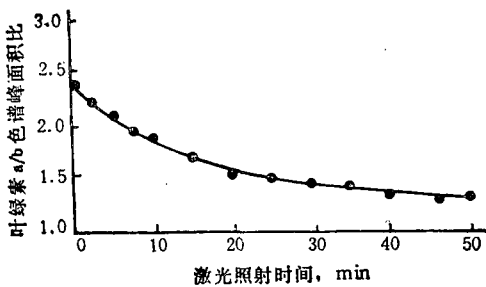


图 5 叶绿素 a、b 色谱峰面积比与激光照射时间的关系(激光能量 1.2mJ/脉冲)

a/b 比值的衰减符合指数规律, 叶绿素 a 比 b 更易于光致破坏。

叶绿素 a、b 在结构上均属于二氢卟啉同镁原子的络合物, 不同的是叶绿素 b 的 C-3 位是醛基而 a 的是甲基。叶绿素 a 的光稳定性差可能与其光合作用功能有关。高等植物光合作用中吸收光能的主要色素是叶绿素 a。叶绿素 b、胡萝卜素及叶黄素等为辅助色素, 主要协助捕捉光能, 并传递到含有特殊叶绿素 a 分子的反应中心, 以推动电子传递过程, 促进水的光解和 CO₂ 的固定。由于这些光稳定性差导致叶绿素 a 易受光破坏。

参 考 文 献

- 1 Balasubramanian D *et al.* *Can J Phys*, 1986; **64**:1132
- 2 梅镇安, 孙琦, 容寿榆编著. 光合作用. 北京: 北京大学出版社, 1987: 29—30
- 3 Carpentier R *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1984; **534**:228
- 4 Bules G *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1982; **452**:679
- 5 Rosencwaig A 著, 王耀俊等译. 光声学和光光谱学. 北京: 科学出版社, 1986: 261—264
- 6 左伯莉, 邓延倬, 曾云鹗. 应用激光, (待发表)
- 7 阎宏涛, 邓延倬, 曾云鹗. 光谱学与光谱分析, 1990; **10** (2): 27
- 8 左伯莉, 邓延倬, 曾云鹗. 光谱学与光谱分析, (待发表)
- 9 Easking K *et al.* *J Chromatogr*. 1977; **135**:217

[本文于 1990 年 3 月 21 日收到,
9 月 29 日修回]

(上接第 213 页)

- 11 Green M, Cosslett V E. *Proc Phys Soc*, 1961; **78**: 1206
- 12 Kolbenstvedt H. *J Appl Phys*, 1967; **38**: 4785
- 13 Schreiber T P, Wims A M. *Ultramicroscopy*, 1981; **6**: 323
- 14 Dayhoff M O *et al.* In: Dayhoff M O *et al.* eds, *Atlas of protein sequence and structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation, 1976: 267
- 15 Dayhoff M O *et al.* In: Dayhoff M O *et al.* eds, *Atlas of protein sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation, 1978: 306
- 16 Dayhoff M O *et al.* In: Dayhoff M O *et al.* eds, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation, 1972: D-14
- 17 Inokuti M. *Rev Mod Phys*, 1971; **43**: 297
- 18 Bambynek *et al.* *Rev Mod Phys*, 1972; **44**: 716
- 19 Tixier R, Philibert J. In: Mollenstedt G *et al.* eds, *Proc 5th int cong on X-ray optics and microanalysis*, Berlin: Springer Verlag, 1969: 180

[本文于 1990 年 4 月 16 日收到, 11 月 26 日修回]