

二次离子显微镜及其在生物医学中的应用

徐 学 红

(武汉大学生物系细胞生物学教研室, 武汉 430072)

提 要

二次离子显微镜是由离子源激发样品表面原子产生二次离子, 通过质谱仪将不同原子产生的离子分离并在显示系统上成像, 以确定不同元素在样品中的分布图。较高的图像分辨率 ($0.5-1\mu\text{m}$) 和极高的灵敏度 (浓度低于 $10^{-19}\text{g}/\mu\text{m}^3$) 使得生物样品含有极低浓度甚至是痕迹量的元素分析成为可能。目前, 二次离子显微镜已广泛应用于细胞生物学、核医学、植物生理学和人类病理学等领域。

关键词 二次离子显微镜, X 光显微分析, 放射自显影, 元素定量分析, 元素图像定位

二次离子显微分析术 (secondary ion mass microanalysis, SIMM) 又被称为 secondary ion emission microanalysis 或 secondary-ion microscopy 或 secondary-ion mass analysis 或 ion-emission microscopy 或 analytical ion microscopy 等, 本文中统称二次离子显微镜 SIMM。

SIMM 有三个特征, 一是能对同位素进行原位分析, 二是具有较高的分辨率和极高的灵敏度, 三是能同时鉴别两种以上的元素。SIMM 图像显示的直径为 $250\mu\text{m}$, 切片厚度 $1-2000\text{nm}$ (样品表面 $1-6000$ 个原子层), 中心分辨率为 $0.5\mu\text{m}$, 边缘分辨率为 $1\mu\text{m}$ 。无论是稳定的还是放射性的, 天然的还是人工的, 高原子序数还是低原子序数, 只要它在生物样品中是以结合状态或非离子溶解状态存在, SIMM 就能显示出它们在表面微体积 (近似为表面) 的分布图像^[1]。自 1960 年 R. Castaing 和 G. Slodjan 研制出 SIMM 以来, 已被广泛应用于生物组织和细胞中各类元素的定位分析和作用机理的研究 (请参阅 Castaing R *et al.* 1960, *Proc Eur regional conf on electron microscopy*)^[2]。

1 SIMM 的结构与原理

以几千伏高压的离子束即初级离子 (primary ions, PI) 为探针聚焦于组织切片表面, PI 轰击的结果使得样品表面原子被激发, 一些原子以离子的形式发射出去即二次离子 (secondary ions, SI) 见图 1。SI 被聚集成离子束, 通过质谱仪并依其荷质比 (mass/charge ratio)

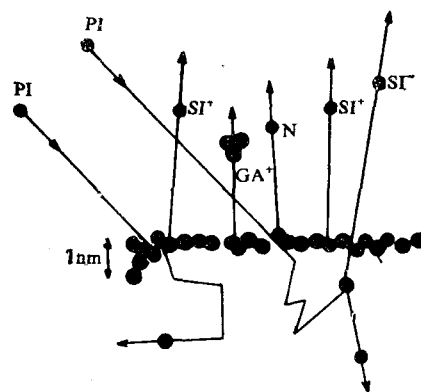


图 1 二次离子激发示意图

二次离子又分为中性原子 (N)、正电荷离子 (SI^+)、负电荷离子 (SI^-) 和原子团 (GA) 离子

将其分离,最后由光学系统成像。

随着表面原子被激发为 SI,样品表面遭到破坏(大约 10nm 厚度的损伤)。因为大多数 SI 是由表面 2—3 层原子产生的。

SIMM 主要由四个部分组成:离子枪(ion gun)作为轰击源产生 PI;静电透镜(electrostatic lens),集结来自样品表面 SI;磁棱镜(magnetic prism),用以选择分离离子;检测显示系统(detection-display system)(图 2)。

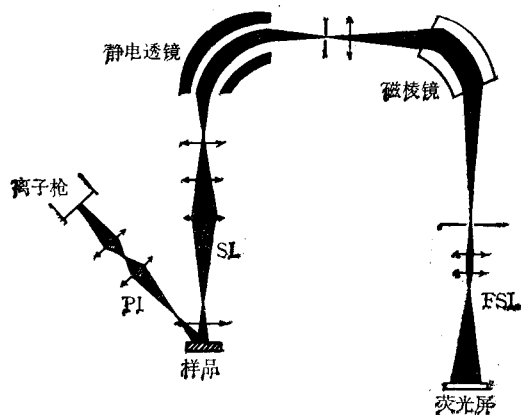


图 2 SIMM 的结构示意图

PI 为初级离子, SI 为二次离子, FSI 为选择分离后的二次离子

1.1 PI 源 用以产生不同的离子,通常为 O_2^+ , Ar^+ 或 N^+ 。PI 通过 12kV 的电压聚集,并被双聚静电透镜系统(double-condenser electrostatic lens system)加强,以大约 45° 角聚焦于样品表面,一般轰击面直径为 $500\mu m$ 。

1.2 静电透镜 样品表面激发出的 SI 带有全部的图像信息,有带正电荷的,有带负电荷的,还有中性原子共三种类型。通过 4.5kV 的电压及静电透镜聚集成离子束,进入磁棱镜。

1.3 磁棱镜 SI 通过磁棱镜或质谱仪(mass spectrometer)依其荷质比,形成一组 SI 束,调节孔径,只允许某种元素的离子束通过。磁棱镜除了能选择不同的离子外,还能保证图像质量。离子通过磁棱镜后被折射 90° ,并依其冲量被一狭缝(slit)选择,高能离子被静电反射镜(electrostatic mirror)除去,选择后的离子再被折射 90° 回到原来的光路,进入检

测显示系统,这样就排除了高能离子对成像的干扰。一般磁棱镜的质量分辨力(mass resolving power)为 300 级,即能选择 1—300 的每一个质量单位。

1.4 检测显示系统 由于荧光屏或胶片对离子的反应很弱,所以利用离子-电子图像转换器(ion-to-electron image converter)将离子分布图转换成电子图像。最后调节质谱仪,即可得到样品表面不同元素激发离子的分布图像。最新研制的配件,如静电分析器(electrostatic analyzer)能增加质量分辨力,在样品直径 $10-50\mu m$ 区域的质谱能达到 5000 级的分辨率。用微通道板(microchannel plate)不用离子-电子转换器可直接显示离子图像。最新式的 SIMM 备有计算机图像处理系统,使其应用更加方便(请参阅 Chassard-Bouchaud C. 1989, *Proc 3rd Beijing conf exhib instru analy*, Beijing)。

2 SIMM 的功能

2.1 分辨率 在直径为 $250\mu m$ 的成像面积上,表面分辨率为 $1\mu m$ (中心为 $0.5\mu m$);深度分辨依获得 SI 所激发的体积大小而定,一般为 $1-1000nm$ 。也就是说,对于已知浓度的元素,为获得足够的离子,所激发的原子层为 $1-6000$ 层,因此一般假定 SIMM 显示的为表面元素的分布图像。在通常的 PI 轰击条件下,样品的激发率(sputtering rate)为 $1-10$ 层/s,所以曝光一秒钟所记录下来的图像仅为样品表面很薄的一层(约 $0.3-1nm$)。在上述条件下,图像的空间信息(spatial imformation) $\geq 125^2\pi \approx 50000$ 个图素(pixels)。

2.2 灵敏度 在影响灵敏度众多的因素中,成像元素的离子化率(ionization ratio)和仪器的有效收集率(collection efficiency of the instrument)是最重要的两个因素。

由于被激发的原子能形成带电荷的离子和中性原子,而非电荷化形式不能为质谱仪所检测,因此灵敏度在很大程度上依赖于离子化率(τ)。 $\tau = N(A^+)/N(A)$, $N(A^+)$ 为激发成正

离子的 A 原子数, $N(A)$ 为激发成不带电荷(原子)和带电荷离子的 A 原子总数。各种元素的 τ 值依其离子化电势 (ionization potential) 和电子亲和力 (electron affinity) 有很大差异。例如, O_2^+ 轰击下激发的二次正电荷离子 Na^+ 的 τ 值高达 0.8, 其它一些低离子化势的元素也与之相似, 而金元素的 τ 值却非常低 (10^{-6})。对二次负电荷离子来说, 高电子亲和力的元素 τ 值都非常高。

对于正电荷离子, 仪器的有效收集率定义为 $\eta = n(A^+)/N(A^+)$, $n(A^+)$ 为同一时间由同一区域到达检测器的离子化 A 原子的数量。 η 与仪器本身有关, 常用的 SIMM η 为 5%。在应用领域中, 灵敏度定义为 $\tau_0 = \tau\eta$ 。一般的 SIMM 由于仪器背底很低, τ 值可达百分之百。

被激发原子的总数 $N = n(A^+)/[\tau_0(A)C_A]$ 其中 C_A 为 A 原子的浓度。使用图像转换器, 一个离子可产生 4—5 个电子, 每个电子可激活胶片数个银卤化物结晶, 而转换器的量子产量 (quantum yield) 为 0.8。如果使用标准胶片放大 110 倍, 胶片每 μm^2 大约需 1 个电子撞击, 要达到胶片 0.7 的光学密度, 每 μm^2 样品图像转换器必须收集 3000 个激发离子^[1,12]。对于激发的元素来说, 在上述情况下, 如 Na^+ , $\tau_0 = 5 \times 10^{-2}$, $C_{Na} = 10^{-2} g/ml$ 必须激发 N 个原子 [$N = 3 \times 10^3 / (5 \times 10^{-2} \times 10^{-2}) = 6 \times 10^6$], 这相当于一个平方微米一个原子层的原子数。如果仪器的激发效率为一个原子层每秒, 则 Na 元素的分布图像仅需曝光 1 秒钟。对于 Na 元素来说, 在浓度为 $3 \times 10^{-6} g/ml$ (3ppm) 时, 要在显示器上得到相同的离子数需激发 3×10^3 个原子层, 或者说需激发样品大约 $1 \mu m$ 深。

2.3 定量分析精确度 (precision in a local quantitative analysis) 从理论上说, 元素 A 原子的浓度 $C_A = n_A / [\rho v \tau_0]$, 其中 ρ 为 A 原子的密度, v 为样品激发的体积。但定量分析条件是非常复杂的, 因为必须测定 τ_0 的精确值, 而很多因素对其都有影响, 除了前面提到的 τ 和 η 之外, 还有被分析元素的性质及它在样品中存在的化学形式和 PI 的性质等^[1,3]。在 PI 轰击样

品表面时, 被激发的原子有时以原子团 (group of atoms, GA) 离子的形式存在如 A^{2+} , A^{3+} 或 AB^+ 等, 特别是有机物有时形成 $C_nH_m^+(n, m = 1, 2, 3, \dots)$, 由于质谱仪是以荷质比来分离不同离子, 因此在 $^{56}Fe^+$ 和 $^{40}Ca^{16}O^+$ 具有非常相近的荷质比值时, 就带来误差, 从而影响 τ_0 值。近几年设计的具 5000 级质量分辨力的 SIMM 在很大程度上解决了这个问题。

如果我们要在测量中得到一定的精确度 (precision, p) p%, 那么在检测器收集到的 n_A^+ 离子至少等于 $10^4 / P^2$, 由于 $n_A^+ = N \tau_0 C_A$ 则 $P^2 = 10^4 / [N \tau_0 C_A]$ 。一般认为 $1 \mu m^2$ 的样品表面约有 10^7 个原子, 被测定元素的浓度为 $C_A = 10^{-2} g/ml$, $\tau_0 = 10^{-3}$, 因而得到 $P^2 = 10^4 / [10^7 \times 10^{-2} \times 10^{-3}] = 100$, 也就是说在以上条件下, 达到精确度 10%, 仅需激发一个原子层。在相同条件下, 要得到精确度 3%, 要激发的原子数 $N = 10^4 / [9 \times 10^{-2} \times 10^{-3}] \approx 10^8$ 个原子, 大约是 10 个原子层^[4]。

3 SIMM 在生物、医学上的应用

3.1 生物样品制备 用作 SIMM 研究的样品要求表面必须平整且等电势, 样品制备依组织不同而不同。将样品以传统电镜制片方法处理, 超薄切片 $2 \mu m$, 置于纯金的样品载物台上即可在 SIMM 下观察^[5]。

由于 SIMM 可以检测所有元素和同位素, 因而被广泛应用^[11-13]。

3.2 在医学上的应用 在稀土元素对人类影响方面用 SIMM 做了大量工作。Meignan 等模拟大气污染, 将 Tm 和 Ce 以气溶胶的形式通过呼吸道注入小鼠体内, 而后取肺 (靶器官) 进行检测, 发现 Tm 在吸入后分布于肺巨噬细胞和肺 I 型细胞的溶酶体中。Ce 的贮存, 随吸入后所经过的时间长短而不同, 吸入后 8 天分布于肺泡壁上, 60 天后全部浓积于肺巨噬细胞中^[6]。Berry Galle 等人证明 Al, In, Be 进入体内后, Al 和 In 主要分布于肾小管细胞的溶酶体中, 而 Be 存在于某些肾小管细胞的核仁中^[6,7]。人们知道, Al 元素能在体内贮积, 已

有一百多年了,但它的毒理作用尚不清楚。随着香烟的燃烧,Al元素通过呼吸道进入人体,利用 SIMM 对嗜烟者新鲜骨样进行检查发现,Al 大量分布于完全钙化的骨组织表面^[1]。经常吸入 Al 粉尘的工人,可患早老性痴呆(Alzheimer)症,在这类病人的大脑皮层中发现有 Al 的高浓度贮积^[11]。

一些抗癌或其它药物如 5- 氟尿嘧啶, 17- 羟-11 脱氧皮质甾酮衍生物常常带有 F, Br, Li, Pt, Au 等元素,由于它们在生物体内的浓度很低,所以必须用有效的手段才能证明它们在细胞内的存在,用 SIMM 已确定 5- 氟尿嘧啶存在于癌细胞核仁中^[12]。另外,在核医学领域中,核素在细胞内的定位和碘在甲状腺中的代谢动力学研究, SIMM 都有潜在的应用前景。

3.3 在生物学上的应用 1988 年 Schumann 等用含天然 ^{14}N 的培养基培育羽扇豆种子,在取材之前又用 ^{15}N 培育若干天,取根尖用 SIMM 观察发现,在维管柱和皮层之间 ^{15}N 的分布非常明显,大约含有总氮量的 5%,而维管柱含有的 ^{15}N 极低,从而证明 Casparian 带阻碍可溶性物质由皮层向维管柱扩散的作用^[13]。Hindie 等将地塞米松(dexamethasone)以 F 标记,然后将其加到培养基中培养人类成纤维细胞,用 SIMM 发现,这种药物分布于细胞核中,说明它主要是在基因转录或 DNA 合成时起作用。将 ^{14}C 标记的脱氧腺苷加到培养的人类成纤维细胞中,发现它分布于细胞核仁中,说明 DNA 和 RNA 可能同时存在于核仁中(请参阅 Chassard-Bouchaud C, Galle P *et al* 1989, *Proc 3rd Beijing conf exhib instrum anal*, Beijing)^[12]。

对含有金属元素 Zn, Fe, Co, Cu 等的生物大分子(酶、维生素和蛋白质)来说,研究它们在细胞内的代谢,以及在离体条件下的动力学, SIMM 都有很高的应用价值。

SIMM 与其它显微分析方法的比较

在细胞生物学及分子生物学中,生物活性

分子的检测及其在亚细胞水平上的分布是一个非常重要的问题。在这个领域中有三种常用的方法,电子探针 X 光显微分析法(electron probe X-ray microanalysis, XRM)显微放射自显影术(microautoradiography, MAR)和 SIMM 法。

这三种方法各有其优缺点,从下面对比中可以看出 SIMM 占有一定的优势。首先, SIMM 可以测定从三种氢同位素到超铀元素的全部元素,目前这是生物组织显微定位分析元素的唯一方法,而 MAR 法仅能检测放射性同位素, XRM 则只能检测原子序数(Z)大于 5 的元素,而且对 $Z < 11$ 的元素(生物体中最重要的元素如碳、氮、氧、氟等的原子序数都低于 11)检测灵敏度较低,一般不超过 100—1000 ppm,而用 SIMM 最低可达到 0.01 ppm ($10^{-20}\text{g}/\mu\text{m}^3$)^[14]。其次, XRM 法不能测定同位素,而 SIMM 法能同 MAR 法一样测定同位素,并有以下几个优点:①元素分布图像能快速得到,而 MAR 法则需几个星期至几个月;②可以显示出几种放射性同位素分别标记的几种生物分子的分布图;③由于 SIMM 可以测定长半衰期和非放射性同位素,因而第一次在人类体内以稳定同位素标记的检测成为可能^[9]。

当然, SIMM 法也有它自己的局限性。由于离子本身的特性,元素分布图像很难达到超微结构的水平,因此目前很多工作是用三者结合法进行的。总之,生物样品的元素定量分析仍是十分困难的。

参 考 文 献

- 1 Galle P. *J Nucl Med*, 1982; 23(1): 52
- 2 Castaing R, Slodzian G. *J Microsc*, 1960; 1: 395
- 3 Burns-Bellhorn M S, File D M. *Analyt Biochem*, 1979; 92: 213
- 4 Morgan A E. *J Microsc Spectrosc Electron*, 1980; 5: 221
- 5 Meignan M, Berry J P, Escaig F *et al. Phys Med Biol*, 1984; 29(8): 927
- 6 Galle P. *CR Acad Sc Paris*, 1981; 292: 91
- 7 Berry J P, Escaig F. *CR Acad Sc Paris*, 1987; 304: 239
- 8 Boocock G, Popplewell D S *et al. Radiat Res*, 1970; 42: 381
- 9 Haines J W, Peiest N D. *Radiat Environ Biophys*, 1984; 23: 133

(下转第 36 页)

已是灵敏度很高的标记率了。

3.2 灵敏率及分辨率 Dig-配基标记检测系统是免疫酶促化学反应或荧光检测,它们既特异又快速,并且有显著的放大作用。无论是滤膜或原位杂交,所需时间周期短且安全,克服了生物素系统的二个缺点,灵敏度和放射性标记相近,对于 Southern 印迹可检出同源 DNA 0.1pg。

3.3 特异性 通过一系列试验,异源性 DNA 即使提高 10^4 — 10^5 倍,也得不出阳性反应。

3.4 改善标记及检测体系的手段 对于标记反应来说,提高标记效率可以采取如下措施:(1)适当延长标记时间,尤其是标记分子量较高的 DNA 或其纯度不太高或探针片段是从琼脂糖凝胶回收时;(2)提高模板 DNA 量,但应该注意在微克级水平比毫微克级水平合成产率的提高相对较低;(3)保持模板 DNA 量和标记反应时间一定,扩大反应体系,合成探针的量增加;(4)Dig-dUTP/TTP 合适的比例,以 35% 为宜;(5)一定的 DNA 纯度;(6)沸水浴变性比干热变性效果好;(7)乙醇沉淀回收标记片段时加入一定载体 DNA 或酵母 tRNA 或糖原可以减少已标记的探针 DNA 的丢失,沉淀用盐溶液以 4mol/L LiCl₂ 效果最佳,而醋酸铵最好不要使用,因为它将导致标记好探针难于重新悬浮。对于杂交过程,则与放射性标记杂交法没有什么大区别,但对于滤膜杂交来说,结果的好坏还与滤膜的生产厂家、规格、型号有关,且专门的封阻试验也必不可少。检测体系:该过程最关键的是有效的封阻,另外,提高结合抗体浓度也可以适当提高信号强度并减少抗原和抗体反应时间,也可以适当延长显色过程利于结果的观察。但是时间延长后,本底有可能加深。至于结果的观察,可以干膜保存或浸湿

密封保存或摄影记录。考虑到西德柏林格尔曼哈姆公司已有各种配套试剂盒出售,为了更充分地利用,使用过的杂交液可重复使用多次,可先标好探针以更好地安排时间;尼龙膜可在脱色之后,洗掉探针反复使用多次;杂交过的膜煮掉探针后可以用于放射性探针检测,便于比较,反之亦然。另外欲获得较好的效果,在脱去探针之前杂交膜最好避免干燥。

4 应用及展望

目前地高辛配基检测体系已广泛用于核酸研究分析的各个方面,如 Southern 印迹检测特定基因组序列^[5]、进行 RFLP 分析用于基因诊断^[6]、基因表达^[7]、菌落或噬菌斑原位杂交^[8]、固定细胞及中期染色体原位杂交^[9]以及生物体液中病毒 DNA 序列的检测。该体系正在发展为 SP6 及 T7RNA 多聚酶酶促 RNA 标记以及末端转移酶寡核苷酸标记。光敏地高辛配基标记检测体系也在探索之中,此外,这一技术也应用于检测 DNA 标记物及测序,为人类染色体连锁图谱的构建及基因图谱分析也都发挥了重要作用。

衷心感谢刘国仰教授的悉心校阅。

参 考 文 献

- 1 Feiberg A P *et al.* *Anal Biochem*, 1983; **132**:6
- 2 Feiberg A P *et al.* *Anal Biochem*, 1984; **137**:266
- 3 马凤森,生物化学与生物物理进展,1989;**16**: 101
- 4 Boehringer Mannheim. *Genius Nonradioactive DNA labeling and Detection kit*, Cat. No. 1093657
- 5 Kimpton C P *et al.* *J of Virological Methods*, 1989; **24**:335
- 6 刘国仰等,中国医学科学院学报,1990;**12**:120
- 7 Tautz G *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1989; **17**:4405
- 8 Biochemica Boehringer Mannheim. *Dig-DNA labeling and detection nonradioactive application manual*, p28—31
- 9 Heino P *et al.* *J of Virological Methods*, 1989; **26**:331
- 10 Hallegot P H, Galle P. *Radiat Environ Biophys*, 1988; **27**: 67
- 11 Galle P. *La Recherche*, 1986; **17**: 766
- 12 Galle P, Berry J P. *Scan Electron Microsc*, 1983; **11**: 827
- 13 Schaumann L, Galle P, Thellier M *et al.* *J Histochem Cytochem*, 1988; **36**(1): 37
- 14 Galle P. *Ann Phys Fr*, 1985; **10**: 287

(上接第 40 页)