

技术与方法

小角 X-射线衍射相机及其在分子生物学中的应用*

周泰生 徐森根

(中国科学院上海生理研究所)

提 要

本文介绍了 Huxley-Holmes 双聚焦小角 X-射线衍射相机的光路、调试方法,以及在生物周期结构研究中的应用实例: 1. 对虾腹神经索髓鞘膜的片层结构; 2. 骨骼肌收缩系统的结构。

X-射线衍射是研究生物周期性结构的重要手段。由于生物样品对 X-射线的衍射能力很弱,要在较短时间内记录到清晰的 X-射线图样,就需要高强度 X-射线源和高效率 X-射线相机。用细聚焦旋转阳极靶 X-射线发生器,其辐射密度比静止靶 X-射线源高一个数量级。采用全反射镜-弯曲晶体单色器二维聚焦系统,

与小孔准直系统相比,曝光时间又可缩短一个数量级,且分辨率更高^[1]。

一、Huxley-Holmes 相机的光路原理

H-H 相机的光路系统由一块全反射镜和一块弯曲石英晶片组成(图 1)^[2]。入射的 X-射线先经过水平放置的弯曲的全反射镜,聚焦

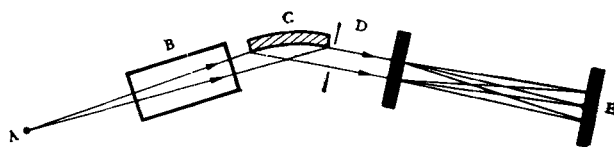


图 1 Huxley-Holmes 双聚焦小角 X-射线相机的光路示意图

A. X-射线点光源; B. 全反射镜片; C. 石英晶片; D. 狭缝;
E. 照相底片; A—C 为 L_1 ; C—E 为 L_2 。

成水平线,再经垂直放置的弯曲的晶体单色器,产生点状 X-射线焦斑。全反射镜用光学平面玻璃或镀金属的镜片制成。平面玻璃的入射光的全反射临界角约 3.5 毫弧度,而镀金镜片的临界角为 8 毫弧度,增大了入射孔径角,从而得到强得多的 X-射线。镀金镜片的临界角虽然较大,但易受辐射损伤,使用寿命短。我们采用镀铬镜片作为全反射镜片。因为镀铬镜片的临界角虽比镀金镜片的稍小,但能长期稳定地使

用。石英晶片用作 X-射线单色器。对波长为 $1.54 \text{ \AA}$ 的铜 K_{α} 线, θ 角等于 $13^{\circ}20'$ 时满足石英晶体 $10\bar{1}0$ 平面反射的 Bragg 条件。弯曲石英晶体到焦点的距离 (L_2) 和到 X-射线源的距离 (L_1) 之间遵循如下关系:

$$\frac{L_1}{L_2} = \frac{\sin(\theta - \delta)}{\sin(\theta + \delta)}$$

* 本文于 1986 年 10 月在中国生物物理学会的学术会议上宣读过。

$$\text{或 } L_2 = L_1 \frac{\sin(\theta + \delta)}{\sin(\theta - \delta)} \quad (1)$$

式中 δ 是石英晶体的切割平面与 $10\bar{1}0$ 平面的夹角。显然, 当 $\delta = 0^\circ$ 时 $L_2 = L_1$; 当 $\delta > 0^\circ$ 时 $L_2 > L_1$ 。为了获得较大的孔径角, 全反射镜和石英单色器配置在尽可能接近 X-射线光源处。为使焦平面上的衍射图样有足够的分辨率, 要求有较大的样品一底片间距离, 因而要求较大的 L_2 。因此, 石英晶片的切割角必须选取适当。我们用的相机切割角为 3° , 将

$$\delta = 3^\circ, \theta = 13^\circ 20'$$

代入式 (1), 若 $L_1 = 240$ 毫米, 则可求得

$$L_2 = 376 \text{ 毫米。}$$

假定样品放置在离单色器 120 毫米处, 这时样品一底片(焦平面)距离为 256 毫米。如果在焦平面上能清晰地分辨出离入射线中心 1 毫米处的衍射点, 那么最小可分辨的衍射角就相当于 Bragg 间距 $400 \text{ \AA}$ 。

二、H-H 相机的调试

使用 H-H 相机, 要获得清晰的衍射图样, 必须细心地调节相机的光路系统。现将我们实验室的调试方法扼要介绍如下: 1. 根据 H-H 相机的要求, 使用焦距大小为 $1 \times 0.1 \text{ mm}^2$ 的 X-射线为射线源, 在 6 度观察方向上的表观焦距大小为 $0.1 \times 0.1 \text{ mm}^2$ 。2. 调节相机的位置, 使其基板边缘与 X-射线光源在 6 度射出线的方向成 26.6 度角, 并使相机入射孔的中心对准光源线的中心。这时, 全反射镜—单色器的轴线就与光源线大体一致了。再细调相机的高度使全反射镜射出的 X-射线达到最强。3. 调节全反射镜下面的两根半圆形不锈钢棒, 使半圆

切面从水平方向开始, 逐渐转动, 在全反射镜后面的荧光屏上, 先出现两条分离的水平线, 继而半圆切面达到挡掉全部直射线的位罝, 使只留下全反射线(图 2)。然后, 弯曲全反射镜, 使全反射线聚焦。由于波长短于 K_{α} 线的辐射线(包括 K_{α} 线的高次谐波, K_{β} 线)不能全反射, 故凡通过全反射的 X-射线已部分单色化。4. 用显微镜观察单色器焦平面上的荧光, 一般会看到 K_{α_1} 和 K_{α_2} 线并存。仔细调节单色器的弯曲度和反射平面方向, 使右边的 K_{α_1} 达到最强, 而使左边的 K_{α_2} 线消失。但有时很难在保持 K_{α_1} 最强的条件下, 使 K_{α_2} 完全消失, 这时, 可调节左右方向的狭缝用来阻挡左边的 K_{α_2} 线, 要求对 K_{α_1} 的强度影响极小。5. 调节单色器后面的两对上下狭缝, 尽可能地消除各种残存的散射, 要求只保留单一的 K_{α_1} 线。如果不阻挡直射射线, 可同时利用直射射线和全反射射线, 形成很强的光源, 但其单色性、散射背景和垂直方向的分辨率都较差。

三、H-H 相机在生物材料周期性结构研究中应用的例子

我们使用日本理学 Ru-200 型旋转阳极靶高辉度 X-射线发生器作为 X-射线光源。铜靶, 6 度观察方向的表现焦距为 $0.1 \times 0.1 \text{ mm}^2$ 。衍射图样用 Agfa D10 或 Reflex 25 底片摄取。衍射图样的间距用读数放大镜测量, 精度估计为 2%。

1. 神经髓鞘周期的研究

有些生物膜系统以多层结构形式存在, 如神经髓鞘膜。神经髓鞘是包在髓鞘神经纤维外的同轴膜系统, 其径向重复单元有对称中心。

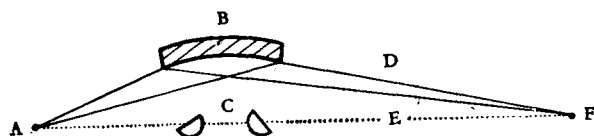


图2 遮挡直射装置示意图

- A. X-射线源; B. 全反射镜片; C. 半圆形不锈钢棒; D. 全反射线;
E. 可挡掉的直射射线; F. 全反射线聚焦点。

早年的研究已经确定, 周边神经髓鞘的单元间隔为 170—185 Å^[3], 中枢神经髓鞘的单元间隔为 150—160 Å^[4]。我们利用 H-H 相机测定了对虾神经纤维髓鞘的径向重复距离^[5]。对虾腹神经索新鲜样品的小角度 X-射线衍射图样有五对衍射线。其中属于重复周期为 153.6 Å 的四对尖锐的衍射线, 来源于神经纤维

髓鞘的径向重复周期结构 (图 3)。而 334.2 Å 反射可能是重复周期为 668.4 Å 的胶元纤维的第二级反射。经 4% 戊二醛和 2% 四氧化锇相继处理的样品的衍射图样, 显示神经纤维髓鞘的径向重复距离减小到 115 Å 左右 (图 4)。用电子显微镜观察, 测得重复距离为 85 Å。可见, 对样品的固定、染色等处理会导致对虾神经髓

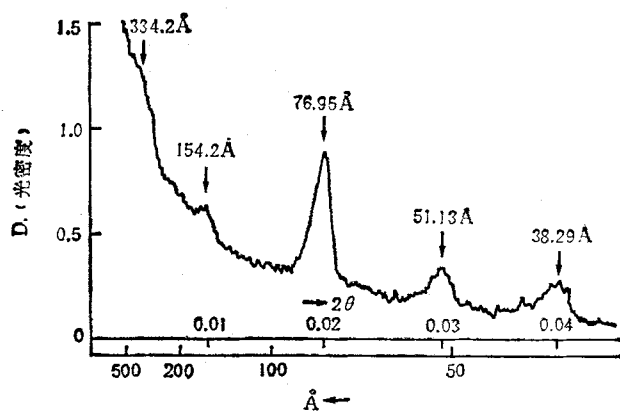


图 3 从新鲜对虾腹神经索小角 X-射线衍射底片得到的显微光密度扫描图
管压: 40kV; 管流: 25mA; 铜靶 K_α 线。样品—底片距离 300 mm。
重复周期为 154 Å。曝光时间: 6 小时。

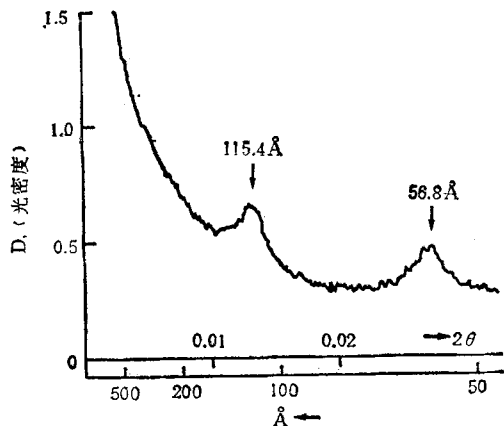


图 4 从经戊二醛和锇酸固定的对虾腹神经索小角 X-射线衍射底片得到的显微光密度扫描图
样品—底片的距离 300 mm。重复周期为 115 Å。
曝光时间: 6 小时。

鞘片层的严重收缩。

2. 对骨骼肌收缩系统结构的研究

骨骼肌细胞的肌原纤维由排列整齐的粗细

两组肌丝组成。粗肌丝主要包含肌球蛋白, 细肌丝主要包含肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白。图 5 是用 H-H 相机摄取的青蛙活缝匠肌的衍射图样, 所得结果和已经发表的大量结果相同^[1,6]。沿肌细胞长轴方向, 即子午线方向, 最显著的是肌球蛋白层线, 它来源于粗肌丝上肌球蛋白横桥的周期为 429 Å 的螺旋排列。在肌细胞横切面上, 粗肌丝排列成六角形点阵, 它相当于国际结晶学图表中的二维空间群 P₆, 因此在赤道方向可以看到相应于 (1.0) 和 (1.1) 平面的反射^[6] (见图 5 和图 6)。

关于肌细胞收缩的分子基础的研究, 近几十年来有过两次重要的进展。收缩的肌丝滑行模型的建立和钙离子对肌原纤维收缩的控制机理的阐明。这两次进展的取得, 小角 X-射线衍射起了重要作用。

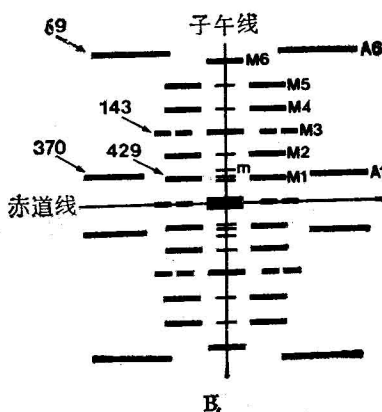
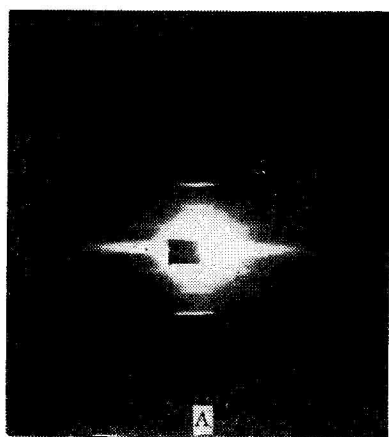


图 5 (A) 青蛙活缝匠肌子午线方向的衍射图样

样品—底片的距离 261 mm。曝光时间: 20 小时; 温度: 3—5°C。

(B) 衍射图样示意图

M_1, M_2 等表示肌球蛋白各级反射的层线。 A_1, A_6 表示肌动蛋白的第一、第六级层线。

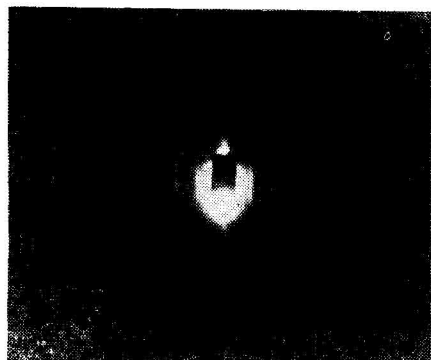


图 6 青蛙活缝匠肌赤道方向的衍射图样

样品—底片的距离 216 mm。曝光时间: 4 小时;
温度: 3—5°C。

参 考 文 献

- [1] Huxley HE, Brown W: *J. Mol. Biol.*, **30**, 383, 1967.
- [2] Haselgrove JC. et al.: *J. Sci. Instrum.*, **10**, 1035, 1977.
- [3] Robertson JD.: *JBBC*, **4**, 349, 1958.
- [4] Finean JB. et al.: *J. Mol. Biol.*, **7**, 672, 1963.
- [5] 徐森根, 范世藩: 《全国第一届显微和亚微结构研究学术会议论文摘要汇编》, p. 35, 1981.
- [6] Huxley HE.: *J. Mol. Biol.*, **37**, 507, 1968.

[本文于 1986 年 11 月 24 日收到]

(上接第 80 页)

素刺激下进行内部化作用并作进一步加工, 所以 β 亚基对内部化作用似乎是不必需的。研究各种疾病条件下, 胰岛素受体的结构、性质和功能, 以及受体 mRNA 和基因的结构、表达。也是研究受体和作用机制的重要手段, 这方面与临床相结合的研究占有相当的比例, 尽管十几年前就认识到胰岛素与受体相结合是其发挥生物功能的第一步, 但这种结合的细节实际上一直不清楚, 好几个实验室现在在研究二者相互作用亲和力的结构基础, 他们分离到 $\alpha\beta$ 和 $\alpha_2\beta_2$ 二种形式, 发现它们与胰岛素结合的动力学行为不同, 这可进一步研究受体在发挥生物功能过程中亚基之间的相互作用和亲和力调节的本质。以前提出的受体的负协同性理论将会受到检验。

长期来积累了许多关于胰岛素刺激细胞内许多酶

和蛋白发生变化的知识, 近年来都已深入到基因水平去研究这种变化的调节原理。如 GAPDH, ATPase, 磷脂酶C, 苹果酸酶, 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶, Calmodulin, 核糖体蛋白 S_b 等, 现在不是单纯研究胰岛素本身的作用, 而是在各种水平, 特别是受体和基因水平研究胰岛素与其他激素, 特别是生长激素或生长因子, 如 GH, EGF, IGF_I, IGF_{II}, 糖皮质激素的相互作用。此外, 一些非胰岛素物质, 如 vanadate, phorbol ester 的类胰岛素效应也引人注意。总之对胰岛素作用原理的研究已扩大到在许多生命现象(包括正常的和异常的癌变)的网络水平去研究, 同时也深入到最根本的基因水平去研究。

[中国科学院生物物理研究所 王志珍]