

用同步辐射 X-射线荧光分析法研究感病烟草单细胞内微量元素变化

李晓薇^{1*} 盛毅¹ 马晓东¹ 李重九¹ 杜中¹ 黄宇营²

(1 中国农业大学, 北京 100094)

(2 中国科学院高能物理研究所, 北京 100039)

摘要 用同步辐射 X-射线荧光分析(SRXFA)技术分析植物单细胞的微量元素, 研究病毒侵染植物后植物单原生质体内微量元素的相对变化。用果胶酶和纤维素酶分离烟草叶肉细胞原生质体, 经 3% 戊二醛固定 30 min 后, 置于杜乐膜上, 干燥后用同步辐射 X-射线荧光法分析。X-射线流强大于 80 mA 时, 停留取谱时间 20 min, 可从烟草单个原生质体中检测到 Cl, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Co, Ni, As, Ti 和 Ge。流强低于 80 mA 时, 只可检出 Cl, Ca, Fe, Cu, Ti 和 Ge。结果表明烟草被烟草花叶病毒感染后, Ca, Fe 离子的强度下降, Cl, Cu, Ge 离子变化不显著。其他离子因响应值过低无法比较。

关键词 同步辐射 X-射线荧光分析; 烟草原生质体; 烟草花叶病毒; 微量元素

中图分类号 O 657. 34

Using Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence Spectrometer to Study Trace Element Changes in Single Tobacco Protoplast Infected by TMV

Li Xiaowei¹ Sheng Yi¹ Ma Xiaodong¹ Li Chongjiu¹ Du Zhong¹ Huang Yuying²

(1 China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100039, China)

Abstract The feasibility of using the energy dispersion synchrotron radiation X-ray fluorescence (SRXFA) for analyzing trace elements in tobacco protoplasts was demonstrated. Protoplasts were isolated from tobacco leaves, fixed by 3% glutaraldehyde for 30 min, then put on Dular film. After drying, protoplasts were analyzed by SRXFA. Acquisition time lasting 20 min, Cl, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Co, Ni, As, Ge and Ti were detected in single protoplast when beam intensity was higher than 80 mA; while current was lower than 80 mA, only Cl, Ca, Fe, Cu, Ge and Ti could be detected. Our data show that, after protoplasts were infected by tobacco mosaic virus, the concentrations of Ca and Fe had a significant decrease compared with health protoplast, and Cl, Cu and Ge did not change.

Key words synchrotron radiation X-ray fluorescence; tobacco protoplast; tobacco mosaic virus; trace elements

收稿日期: 2002-02-25

国家自然科学基金资助项目(39970501)

* 李晓薇, 高级实验师, 研究方向为药理及药物分析。北京圆明园西路 2 号

生物样品中微量元素的含量可用仪器法或化学方法测定, X-射线荧光分析(XFA)是最重要的方法之一, 然而因其灵敏度的限制, 目前仍无法分析单细胞中的微量元素及含量^[1-3]。与传统 X 光源或电子束激发的 X-射线分析相比, 同步辐射光源具有高强度、高极化性和天然准直等特点, 不但使同步辐射 X-射线荧光分析(SRXFA)灵敏度和空间分辨率大幅度提高, 而且其分析光斑可集中在 10 μm 的范围内, 能够检测微区内含量极低的样品。由于同步辐射 X-射线荧光分析没有韧致辐射, 几乎不损伤样品, 特别适合生物样品的分析。这一方法越来越受到生物界的重视。小区域内用同步辐射 X-射线荧光分析法研究生物样品的微量元素已有报道^[4-13], 但多见于动物组织和细胞。为了去除植物细胞壁中微量元素的干扰, 应采用原生质体为分析对象, 其检测难度较大, 尤其单个原生质体的检测未见报道。本研究采用同步辐射 X-射线荧光分析法, 分析烟草单个原生质体中微量元素的变化。从烟草单个原生质体中检测到 Cl, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Co, Ni, As, Ti 和 Ge。烟草被烟草花叶病毒感染后, Ca, Fe 离子的强度下降, Cl, Cu, Ge 离子变化不显著。这些变化的机理有待进一步研究。

由于微量元素在生理生化反应中起着重要作用, 研究植物单原生质体中微量元素的检测方法, 对植物生理生化和病理研究有重要意义。本研究发现了感病植物与健康植物细胞内微量元素的变化, 也为植物病害防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV), 普通三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Sam sun), 纤维素酶、果胶酶(诺和诺德公司), 杜乐膜(杜邦公司)。

1.2 仪 器

同步辐射 X-射线荧光装置, 配有 AXIL 数据处理软件(北京正负电子对撞机国家实验室研制)。

1.3 实 验 方 法

1.3.1 烟草叶肉细胞原生质体的提取 提取方法参照[15]做如下改动: 选择被病毒侵染的烟草叶片退绿部位和健康烟草(均为 80 日龄)叶片, 撕去下表皮, 切成 2 mm 小条, 置于小烧杯中。在小烧杯中置 5 mL 新配置的经过滤灭菌的酶液, 酶液内含 2% 纤维素酶, 0.5% 果胶酶及 0.6 mol·mL⁻¹ 甘露醇。将撕去下表皮的 1 g 鲜叶在酶液上平铺一层, 无表皮的一面向下接触酶液。放置于摇床上摇动 30 min (25℃ 避光, 速度 120 次·min⁻¹)。更换酶液, 除去酶液中的破碎细胞。再加入等量的过滤灭菌酶液, 释放原生质体, 经 200 目尼龙沙网过滤, 进一步除去杂质, 转入离心管。加入 5 mL 20% 蔗糖溶液, 离心(500 r·min⁻¹) 3 min, 取上浮原生质体置离心管中, 加入 5 mL 1 mmol·mL⁻¹ 的磷酸缓冲液(5 mL, pH 7.4)混匀后离心(500 r·min⁻¹) 3 min, 弃去上清液, 再洗涤 2 次后, 保存在缓冲液中备用^[5]。

1.3.2 原生质体的固定 将市售 25% 戊二醛配置成 3% 水溶液, 并调 pH 值为 7.0。将原生质体离心(500 r·min⁻¹) 3 min, 去上层缓冲液, 加入等体积戊二醛, 静置 30 min 后, 离心(500 r·min⁻¹) 3 min, 去上层固定液, 用 1 mmol·mL⁻¹ 的磷酸缓冲液洗涤 3 次, 保存在 4℃ 冰箱, 备用。

1.3.3 原生质体的制片 在塑料幻灯片架上, 将杜乐膜粘贴牢固, 并使其平整无皱缩。用 1% 盐酸浸泡 24 h, 软毛刷沾洗涤液清洗, 无菌去离子水冲净, 吹干。用微量注射器吸取固定好的原生质体, 滴于膜表面, 在无菌室中晾干。薄膜上的原生质体保存备用。

1.3.4 同步辐射 X-射线荧光分析条件的探讨 选择完整的原生质体用同步辐射 X-射线荧光仪进行测量, 累积成 1 个 X-射线荧光光谱(XRF 谱)。在不同束流强度下, 采用不同停留取谱有效时间, 探讨最佳分析条件。

1.3.5 感病烟草原生质体中微量元素的变化 用所选的分析条件分别测量健康叶片原生质体和感病叶片原生质体, 用 AXL 软件处理数据。将各元素的峰面积归一化, 比较感病烟草与健康烟草原生质体中不同元素的变化。

2 结果与讨论

烟草叶肉原生质体的固定与制片是同步辐射 X-射线荧光分析中重要环节。一般显微分析中样品的固定仅限于结构及形态的稳定, 未考虑细胞内外离子的运输与传递。本研究选择戊二醛做固定剂, 使细胞能瞬间死亡, 尽量保持其离子能停留在胞内, 即杀死原生质时其质膜不破损。与动物细胞不同, 植物细胞有细胞壁。为了避免细胞壁上离子的影响, 分析时除去了细胞壁。但去壁后, 植物原生质体处于不稳定状态。用戊二醛处理时间长短直接影响固定效果。经多次实验得出固定时间 30 min 为最佳。此外制片时液斑也是影响测量结果的重要因素, 液滴尽量小(约 1.5 mm × 1.5 mm), 内含细胞原生质体应完好无损, 且使原生质体以个体的形式单独存在, 不互相重叠。所用的杜乐膜应充分洗净, 避免本底干扰同步辐射 X-射线荧光检测。

经同步辐射 X-射线荧光仪分析, 单原生质体的 XRF 谱见图 1。

用 AXL 软件处理数据, 得到细胞中微量元素的种类, 以及用峰面积表示的各元素的响应值。改变流强和测量时间, 探讨最佳分析条件。由于植物细胞内微量元素含量非常低, 所以进行同步辐射 X-射线荧光光谱检测时, 束流的强度及采样时间是至关重要的。当流强低于 80 mA 时, 可检出 Cl, Ca, Fe, Cu, Ge 和 Ti, 其他元素信噪比太小, 淹没于噪声中。分析的取谱时间由 500 s 增加到 1 000 s, 仍

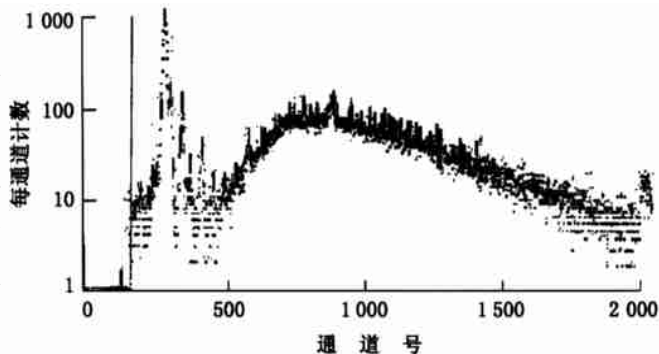


图 1 烟草原生质体 XRF 光谱图

无法获得满意的结果。当流强为 80~90 mA, 停留取谱时间为 20 min 时, 除以上元素外, 检出了 Mn, Zn, Cr, Co, Ni, As。故用该条件分析健康及感病原生质体, 各重复 5 个样品, 结果见表 1。

表中 Ar 与样品无关, 来自空气; Cl, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn 为植物所需营养元素; Cr, Co, Ni, As 为污染元素, 此外还检测到 Ge 和 Ti, Ge 的信号很强。由于本身含量低, 或者由于响应值低, Mn, Zn, Cr, Co, Ni, As 信号很弱, 有些样品中未检出。

为比较健康细胞和感病细胞中微量元素的差别, 对各样品元素峰面积归一化, 计算它们在总峰面积中的相对百分比, 结果见表 2。

表1 健康与感病烟草细胞中的微量元素峰面积

元素	健康样品					感病样品				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Cl	315	323	347	138	408	141	286	186	71	151
Ar	29 224	20 549	28 526	28 322	23 243	24 214	29 971	25 524	25 217	28 015
Ca	2 798	3 117	3 863	3 210	2 598	1 800	2 631	2 086	1 218	2 697
Ti	750	706	379	337	683	135	890	401	1 679	267
Cr	116	91	85	140	276	88	193	26	—	125
Mn	67	51	36	22	—	110	116	—	—	85
Fe	4 082	1 841	5 538	1 352	1 436	577	661	738	704	998
Co	66	83	—	41	46	741	89	150	93	196
Ni	—	74	68	13	109	300	136	572	113	244
Cu	171	458	201	261	132	877	225	263	190	265
Zn	32	1 553	—	2	196	14	14	716	33	—
Ge	2 300	2 271	2 419	2 145	2 643	2 574	2 231	2 041	1 310	2 081
As	366	264	123	294	98	132	320	—	351	370

表2 健康与感病烟草细胞中的微量元素相对峰面积比例

元素	健康样品					感病样品				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Cl	0.78	1.03	0.83	0.38	1.28	0.44	0.76	0.57	0.23	0.43
Ar	72.54	65.48	68.6	78.07	72.94	76.38	79.37	78.05	81.4	78.93
Ca	6.95	9.93	9.29	8.85	8.15	5.68	6.97	6.38	3.93	7.6
Ti	1.86	2.25	0.91	0.93	2.14	0.43	2.36	1.23	5.42	0.75
Cr	0.29	0.29	0.21	0.39	0.86	0.28	0.51	0.08	—	0.35
Mn	0.17	0.16	0.09	0.06	—	0.35	0.31	—	—	0.24
Fe	10.13	5.87	13.32	3.73	4.51	1.82	1.75	2.26	2.27	2.81
Co	0.16	0.26	—	0.11	0.14	2.34	0.23	0.46	0.3	0.55
Ni	—	0.24	0.16	0.04	0.34	0.95	0.36	1.75	0.37	0.69
Cu	0.42	1.46	0.48	0.72	0.41	2.77	0.6	0.8	0.61	0.75
Zn	0.08	4.95	—	0.01	0.61	0.04	0.04	2.19	0.11	—
Ge	5.71	7.24	5.82	5.91	8.29	8.12	5.91	6.24	4.23	5.86
As	0.91	0.84	0.3	0.81	0.31	0.42	0.85	—	1.13	1.04

从表中可以看出,由于个体之间的差异,无论健康细胞还是感病细胞,各样品同种元素的相对百分比之间存在很大差别;但是与健康样品相比,感病样品中Ca, Fe 相对含量明显减少,经 t 测验,显著水平达 0.05; Cl, Cu 相对含量变化不显著。由于 Mn, Zn 测量数值很低,无法进行对比分析,有待于进一步改进分析方法。Ca, Fe 离子下降的原因和机理有待进一步研究。

得益于同步辐射 X-射线荧光光谱技术的发展,本文首次用同步辐射 X-射线荧光法初步研究了病毒侵染植物后植物单原生质体内微量元素的相对变化。单细胞或原生质体中微量元素的绝对含量以及某些含量低、响应值低的元素分析,有待于进一步改进实验方法。

同步辐射光源是宽带谱,我们采用的是 SR 白光激发,这样有利于样品的多元素分析。若利用单色器,则可以对感兴趣的元素进行选择激发,提高激发效率,减小谱线干扰,突出待测元素。

以上我们初步探讨了植物单细胞内微量元素的同步辐射 X-射线荧光分析法。从中可以看出这种方法在植物生理生化和病理研究中具有巨大潜力, 并将随着研究的深入得到更加广泛的应用。

参 考 文 献

- 1 程介克, 刘锦春主编 痕量分析 北京: 化学工业出版社 1993 329~ 366
- 2 李绍连, 彭隆祥, 徐锡萍, 等 电镜射线显微分析仪测使人肝细胞癌中铜锌铁铝的含量 湖南医科大学学报, 1994, 10
- 3 吕文英 茶叶中几种微量元素的测定与研究 微量元素与健康研究, 2001, 51~ 53
- 4 吴应荣, 潘巨祥, 李光成, 等 同步辐射 TXRF 用于细胞元素的初步研究 核技术, 1997, (B)
- 5 Zelentsov E L, Moroz T N, Kolmogorov Yu P, et al The elemental SRXRF analysis and mineral composition of human salivary stones Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2001, (470): 417~ 421
- 6 Baryshev V B, Kondratyev V I, Trubina S V, et al Analytical testing of the SRXRF experimental station Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2001, (470): 426~ 430
- 7 Chankina O V, Kovalskaya G A, Poutzenogii K P, et al SRXRF determination of the multielement composition of the hair and blood of the children of Tundra Nenets population Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2001, (470): 448~ 451
- 8 Carvalho M L, Pinheiro T, Barreiros m A, Casaca C, et al Amalgam components Drift in teeth-toxicity risks: A preliminary approach Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 1998, (136—138): 913~ 918
- 9 Gorchakov V N, Dragun Gr N, Kolmogorov Y P, et al The using of SR XRF for estimation of macro-and microelement Contents of biological objects at the clay treatment Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2001, (470): 437~ 440
- 10 Gonchar A, Kolmogorow Yu, Dikalova A, et al Analysis of trace elements responsible for antioxidant protection by SRXFA method Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2002, (470): 405 ~ 408
- 11 Pinheiro T, carvalho M L, Casaca C, et al Microprobe analysis of teeth by synchrotron radiation: environmental contamination Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 1999, (158): 393 ~ 398
- 12 Gonchar A, Komogorow Yu, Dikalova A, et al Analysis of trace elements responsible for antioxidant protection by SRXFA method Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2001, (470): 426~ 430
- 13 kolmogorov Yu, Kovaleva V, Gonchar A. Analysis of trace elements in sapphire of healthy people, hyperplasia and breast cancer patients with XRF method Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2000, (448): 457~ 460
- 14 Rokita E, korbas M, Muteaers P H A, et al Voigt (Micro-PIXE studies on gallium incorporation in mineralized tissue) Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 2002, (181): 529~ 532
- 15 许智宏, 卫志明主编 植物原生质体培养和遗传操作 上海: 科学技术出版社 1997 11~ 18