

利用牛肝过氧化氢酶结晶 测定电子显微镜的放大倍数*

李 钦 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

为了将电子显微镜的性能维持在最佳状态,电镜的放大倍数至少要每月校正一次,最好是经常校准。新生产的电子显微镜在出厂前要测定在各种条件下的放大倍数曲线,以供用户使用。在使用电子显微镜过程中,由于电源电压的漂移、样品的差异、载网的弯曲以及电镜参数的变化等原因,均能引起放大倍数曲线的漂移,因此要经常校准放大倍数。

测定电子显微镜放大倍数的方法很多,一般是用光栅制成复型观察标本(2000条/毫米)来测量低倍放大倍数,用聚苯乙烯小球(直径880埃到5570埃)测量较高放大倍数^[1,2]。近年来,由于蛋白质分子观察技术的进展,较多地利用牛肝过氧化氢酶结晶的晶格间距来测定电子显微镜的放大倍数。它可用于几千倍到五十万倍的测量。因为在生物学研究中经常使用的放大倍数也是这个范围,而且牛肝过氧化氢酶易长成大单晶,抗辐射性较强,能重复多次使用,操作也比较简单,不必进行内标记,所以是一个较理想的方法,国外已有不少报道^[1,3]。我们在进行蛋白质分子的电子显微镜观察中,开始利用牛肝过氧化氢酶结晶校准放大倍数,也为一些电子显微镜的生产和应用单位提供了校准放大倍数的电镜标本,使用效果很好^[4]。本文介绍我们对牛肝过氧化氢酶结晶进行的电子显微镜观察及利用它校准电子显微镜放大倍数的方法。

材 料 与 方 法

本工作中使用的牛肝过氧化氢酶结晶系匈牙利布达佩斯出品的结晶悬液,活力为2,000单位/毫克。在进行电子显微镜观察前用偏振光显微镜观察结晶样品为棒状结晶。在正交偏

光下,该结晶具有双折射现象。

电子显微镜样品的制备在室温下进行。用细滴管吸取少量牛肝过氧化氢酶结晶连同母液,滴于预先置有火棉胶-碳膜的铜网上,过剩的溶液用滤纸吸去,自然干燥十分钟左右。然后将2%磷钨酸溶液(先用1MKOH调pH达到pH7.0)滴在样品上,对酶分子进行负染色。1至2分钟后,用滤纸将染液吸去,稍干,放在干燥器中备用。

所用试剂均为分析纯等级。

用日立Hu-11A型电子显微镜进行观察,加速电压50KV,电子放大10,000倍至60,000倍。

结 果

图版I-1为负染的牛肝过氧化氢酶结晶的电子显微镜照片。从照片中可以看到结晶内整齐排列的酶分子。因为是用磷钨酸负染的,所以酶分子呈现白色的晶格线(Lattice Lines)排列。图版I-2为在较高放大倍数下拍摄的该结晶的局部电子显微镜照片。这时可以很清楚地看到酶分子的有序排列情况,呈现规则的晶格线,与人造光栅极为类似。从图版I-2b可以看到结晶内分子呈有序排列。我们还用光学处理技术得到更清晰的牛肝过氧化氢酶结晶的照片(图版I-2c),可见到结晶中酶分子呈相间排列。

为了分析图版I-2中晶格线排列的周期性,我们进行了牛肝过氧化氢酶结晶的电子显微镜底片的激光光学衍射处理,得到了酶结晶

* 电子显微镜观察在中国科学院生物中心电镜室进行;激光光学衍射工作在中国科学院物理研究所三室郑海同志协助下进行,一并在此表示谢意。

的光学衍射图(图版 I-3)。所使用的激光衍射仪的波长为 $6,320 \text{ \AA}$, 由氦氖激光器产生。当样品具有电镜能分辨的重复的有规则结构时, 可把电子显微镜照像底片作为衍射光栅, 用激光光学衍射方法证明其结构的规律性^[1,4,5]。图版 I-3a 和图版 I-3b 分别是图版 I-2a 和图版 I-2b 的激光衍射图。从图版 I-3a 可以看到, 在垂直方向对应于原点出现两个对称的衍射斑点, 这表明在图版 I-2a 中酶分子排列成的晶格线是呈周期性排列的。因此可以用这些晶格线做为标准光栅来测定电子显微镜的放大倍数。因为晶格线中的单个分子未显示出来, 所以衍射点少。图版 I-3b 出现 8 个对称的衍射点, 是因为在图版 I-2b 中得到了单个分子的排列图象, 这些分子在三维空间上都是有序的, 出现的衍射点也多。

图 1 是计算电子显微镜放大倍数的图示。根据文献报道, 牛肝过氧化氢酶的晶格线的间距, 即从一层分子到另一层分子的距离为 84.4 \AA ^[2,6]。因此可用这个间距为尺度, 在不同放大倍数下照像, 从底片上量得晶格像的长度, 再除以 84.4 \AA , 即得放大倍数。为了减少测量误差, 一般量 10 层分子的距离做为 L (毫米)。这时, 电镜放大倍数 K 与 L 就有下列关系:

$$K = \frac{L}{844} \times 10^7 (\text{倍})。$$

用这样的方法可以校准或绘制放大倍数曲线。当放大倍数较低时, 直接从底片来量 L 有困难, 可将电镜照片进行光学放大后再量 L 长度。

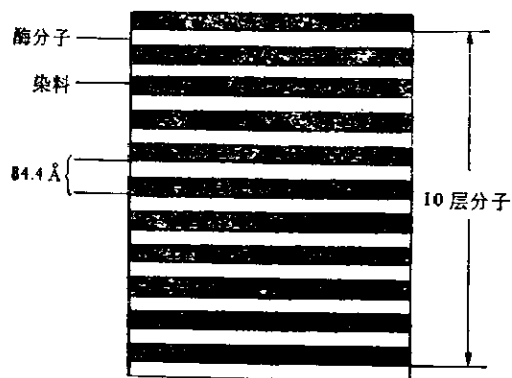


图 1 计算电子显微镜放大倍数的图示

我们采用上述方法计算了所使用的 Hu-11 A 电子显微镜的放大倍数, 证明该电镜的放大倍数曲线是准确的。我们还在中国科学院北京科学仪器厂正在调试的新电子显微镜上拍摄了牛肝过氧化氢酶结晶的照片(图版 I-4a), 用这种方法绘制新电镜的放大倍数曲线。从图版 I-4b 中可以看到, 在酶分子的晶格线中能分辨出单个的椭球状酶分子。我们曾用这个样品对许多台从不同国家进口的高分辨率电子显微镜进行了放大倍数校准, 均取得较好效果。图版 I-4a 是在日立 H-500 型电子显微镜上拍摄的照片。

讨 论

1. 利用牛肝过氧化氢酶结晶的晶格间距来校准电子显微镜的放大倍数是一个较好的方法。该法具有制样简单, 样品可较长时间应用, 操作方便, 结果准确等优点。而且如能拍到清晰的蛋白质分子图象, 也标志该电镜的综合性指标是比较理想的。因此除用做校准放大倍数外, 也可做为检验电子显微镜综合性指标的样品。这个方法在高分辨率电子显微镜观察中是比较适用的。

2. 关于牛肝过氧化氢酶结晶的负染方法, 我们试用了磷钨酸和乙酸双氧铀, 但以 2% 磷钨酸 (pH 7.0) 为好。所得照片较清晰, 与文献报道的基本一致。我们也观察了未经负染的牛肝过氧化氢酶结晶, 测得的晶格间距与染色的一致, 说明该染色法对晶格间距没有影响, 不影响测量准确度。但是未负染的反差低, 照片不清晰。

3. 为了便于与文献报道的结果比较, 我们使用了国际上通用的匈牙利布达佩斯出品的牛肝过氧化氢酶结晶。目前我国上海东风生化试剂厂已生产牛肝过氧化氢酶的精制干粉。这个酶较易结晶^[6-8], 如结晶样品来源有困难, 可以自己制备结晶。

(下转第 143 页)

(上接第 145 页)

参 考 文 献

- [1] Geoffrey, A. M.: *Practical Electron Microscopy For Biologists*, 2nd Ed., A Wiley-Interscience Publication, London, New York, 1976, p. 317—321, 407—409.
- [2] 東昇: 电子显微镜の世界, 岩波书店, 1973, 董炯明译: 电子显微镜的世界, 科学出版社, 北京, 1977, 第 81—98 页, 第 129—130 页。
- [3] Stasny, J. T., R. C. Burns, B. D. Korant, and R. W. F. Handy: *J. Cell Biol.*, **60**: 311—316, 1974.
- [4] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 生物化学与生物物理学报, **10**(4):349—354, 1978。
- [5] Kiselev, N. A., F. Ya. Lerner and N. B. Livanova.: *J. Mol. Biol.*, **86**: 587—599, 1974.
- [6] Kiselev, N. A., C. L. Shpitzberg and B. K. Vainshtein: *J. Mol. Biol.*, **25**: 433—441, 1967.
- [7] McPherson, A., and A. Rich: *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**: 23—27, 1973.
- [8] 李钦: 微生物学通报, **5**(5):32—38, 1978.