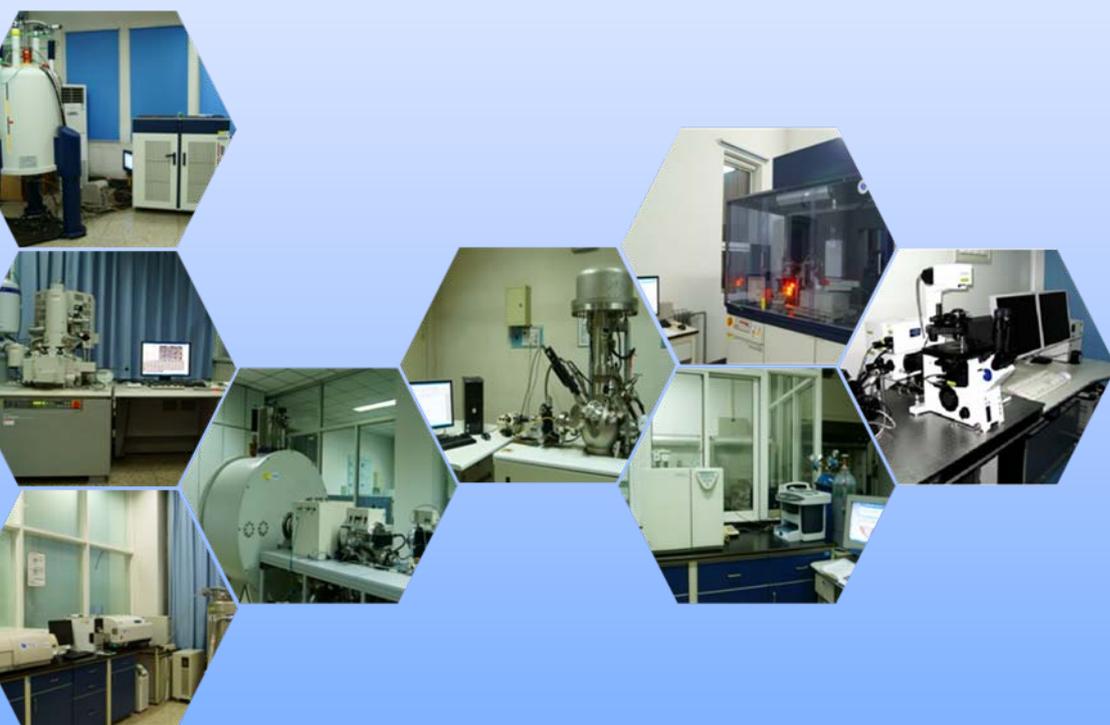




中国科学院化学研究所
INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

分析测试中心通讯

第7期



分析测试中心 主办
2017年3月30日

目 录

评述

共聚焦显微镜中荧光团的共定位	1
----------------------	---

新技术应用

辉光放电-电喷雾离子源 (GD-ESI) 的研发及应用	15
一种新型普适半原位 XPS 样品转移装置的研制与应用	27
固体异核化学位移二维谱 HETCOR 简介	31

典型应用案例

多晶与单晶 X-射线衍射联合表征晶体择优生长方向	35
含氟化合物的核磁碳谱表征	39

测试技术与技巧

低温透射电镜技术的应用	45
Flash EA 1112 元素分析仪 CHN 分析应用新发现	55
冷冻扫描电镜技术的应用	59
单晶测试技巧之改变测试温度	67

数据处理技巧

红外光谱分析蛋白质的二级结构	70
晶体结构中的置换无序现象	77

分析测试中心动态

《分析测试中心通讯》征稿启事	83
----------------------	----

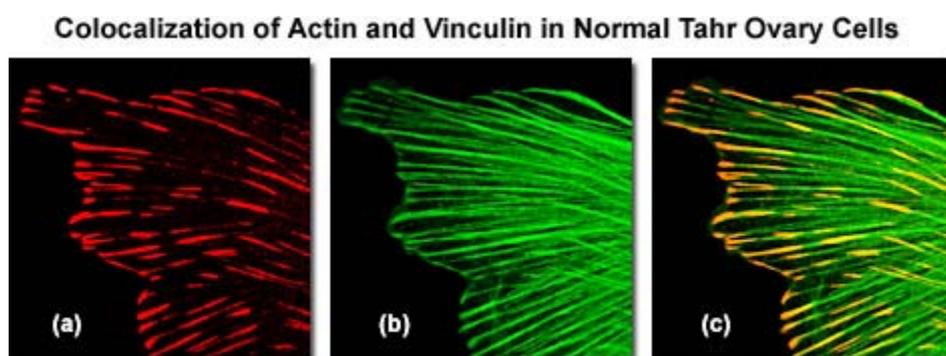


共聚焦显微镜中荧光团的共定位

▶ 刘美蓉编译

(分析测试中心光谱组 Tel: 010-82613026 Email: mrliu@iccas.ac.cn)

在多标荧光样品图像中，因两个或多个荧光团在显微结构中距离很近，经常会有发射信号叠加，这种效应就称为共定位。目前，高特异性合成荧光团和经典免疫荧光技术的应用、精密光切技术的应用、共聚焦和多光子显微镜提供的数字图像处理技术等大大提高了生物样品中共定位检测的能力。



● 图 1

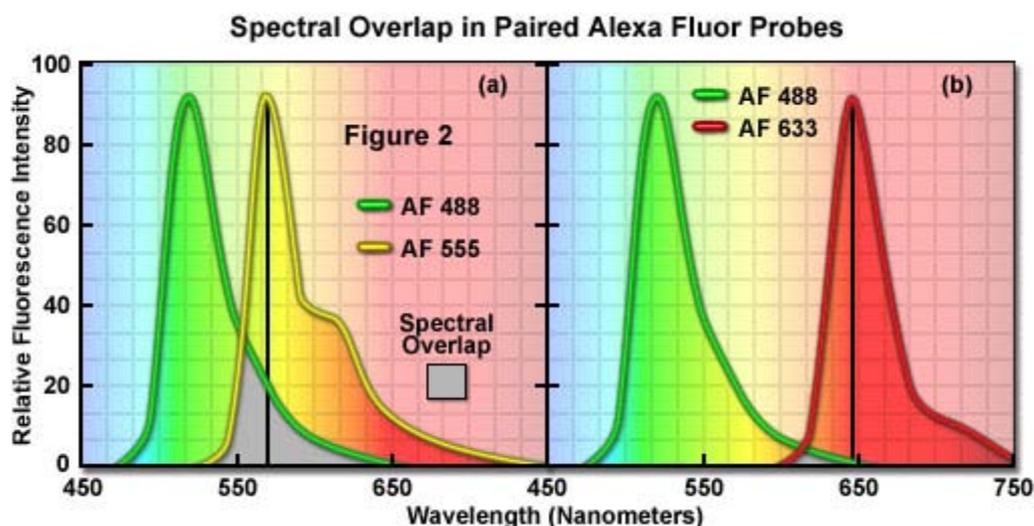
共定位在生物表述上是这样定义的：两个或多个不同的分子位于样品上同一个物理位置。对显微镜中看到的组织切片、单个细胞或亚细胞器官，共定位意味着不同的分子连接到同一个受体上；在数字图像方面，这个术语指的是不同荧光分子发射的颜色分享图像中的同一个像素。在共聚焦显微镜中，样品被记录成含有很多像元的多维阵列数字图像，每个像元代表一个三维像素。像元的尺寸（或检测单元）由物镜的数值孔径、照明波长以及共焦检测针孔直径等决定。因此，在一个样品中两个荧光探针的共定位，比如发绿光的 Alexa Fluor 488，发橘红色光的 Cy3，在图像中就是由含有红色和绿色两者贡献的像素表示（经常产生各种各样的橘色和黄色）。

举一个例子，图 1 的一系列图表明了骨骼肌动蛋白和黏着斑蛋白侧向光学平面上的共定位（激光扫描共聚焦显微镜中的 XY 面）。这些共定位点可作为肌动蛋白丝的成核位点，也可作为外部介质、质膜和肌动蛋白骨架之间的交联剂。

图 1 (a) 是 Alexa Fluor 568 通道 (目标对象是黏着斑蛋白), 由 543nm 的氩氦激光器激发; 而 Figure 1 (b) 是 Alexa Fluor 488 通道 (目标对象是丝状肌动蛋白), 由 488nm 的氩离子激光器激发; Figure 1 (c) 是前面两幅图的叠加, 表明两种荧光信号在丝状肌动蛋白纤维末端的共定位。

必须指出的是, 共定位并不指的是具有相似发射光谱的荧光团出现在合成图像的同一个像素上。准确的共定位分析只有在荧光团的荧光发射光谱足够分离且滤色片 (或光谱狭缝宽度) 正确设置的情况下才有可能。荧光团发射光谱之间的大量叠加或滤色片组合的不正确使用, 都可能导致光谱串色, 这种情况下共定位的测量就没有意义。为了避免产生共定位假象, 荧光团必须与照明光源的光谱认真匹配 (共聚焦中是激光线), 来获得最大激发效率, 同时在发射光谱之间保持一定的分离度。在大多数情况下, 对共定位分析来说, 荧光团的选择对获得满意结果极为重要。

在图 2 中, 对 Alexa Fluor 染料家族的光谱叠加作了比较, 这在共定位实验中是很有用的。为了比较, 所有的发射光谱都做了归一化, 叠加区域用灰色阴影显示。在图 2(a) 中, 绿色荧光染料 Alexa Fluor 488 和橙黄色荧光染料 Alexa Fluor 555 在峰波长处显示很明显的分离, 人眼也很容易能够区分。然而, 光谱叠加 (灰色阴影区域) 表明在 Alexa Fluor 555 的发射峰上很明显有 Alexa Fluor 488 的发射光谱 (用一条黑线标示, 从发射峰到横坐标)。当 Alexa Fluor 488 的荧光发射强度明显比 Alexa Fluor 555 的荧光发射强时, 荧光信号这么高程度的串色使得荧光探针的分离很难。很多因素都会导致这种情况发生, 比如荧光团标的物浓度的巨大差异。因此, 在共定位实验中, 这些探针的组合就应该避免, 或只有当图像在多通道共焦模式采集下才可以使用, 这样可以降低或消除串色。



● 图 2

Alexa Fluor 探针之间的光谱叠加程度会随着探针发射峰之间的距离增加而下降，如 Figure2 (b) 所示。在这种情况下，Alexa Fluor 488 和深红色染料 Alexa Fluor 633 与 Figure2 (a) 比较，重叠区域明显降低。这两种染料人眼都很容易区分，光谱重叠程度低在共定位实验中可使串色最小化，如每个探针的浓度相似的话，应该可以产生较好的结果（注意：深红色的荧光染料 Alexa Fluor 633 在低浓度时通过显微镜目镜很难观察到）。Alexa Fluor 633 可被红色氩氦激光器的 633nm 线最有效的激发，也可被黄色氩氦激光器的 594nm 激发。或许，在 Alexa Fluor 染料发射的可见光区域，最好的光谱分离是 Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 647 的结合（图中未显示）。实际上，在这些染料之间没有光谱重叠，即使样品含有过量的 Alexa Fluor 488，应该也没有串色。具有这些特点的荧光探针是共聚焦显微镜分析共定位的理想选择。

在共聚焦显微镜中，测定共定位的能力受限于光学系统的分辨率及用于照明样品的入射光波长。宽场荧光和共聚焦显微镜理论分辨率约为 200nm，但在实际上，由于各种原因这个数降到 400nm 和 600nm 之间，原因包括显微镜光路未完全对准、光学折射率波动、光学像差及样品制备的不合适。然而，对于一个已经完全调好的共聚焦显微镜来说，两个荧光分子是否连接到同一个目标对象上，或者它们是否定位在同一个器官上受光学分辨率影响。共定位的许多实验是围绕高特异性的合成探针和抗体进行的，标记目标是容易区分的局部的、明确的细胞结构。

对于厚度小于 $5\ \mu\text{m}$ 的样品，比如贴壁细胞或很薄的组织切片，在常规的宽场荧光显微镜下，定量的共定位分析一般是可以的。然而，对于厚样品，图像应以具有一定轴向尺寸的光学切片来记录，来分析看起来共定位的荧光团是否真正位于同一个侧向焦平面上，或在 Z 轴上他们是否彼此叠加。厚样品的荧光团共定位分析应通过获得薄的光学切片来进行，可用激光扫描共聚焦显微镜、或转盘共聚焦显微镜或多光子显微镜。多光子显微镜经常用单个近红外激光，在物镜焦点处的特定区域激发双标样品的两个荧光团。这些技术将荧光发射局限在仅位于焦平面上的荧光团，这样大大降低了光漂白和背景噪音。

共定位的软件分析

样品中荧光团共定位的程度是通过比较一幅图上每个像素位置的颜色值测定的。分析的第一步就是要显示进行共定位测量的图，一般以两个独立通道的合成图显示。当分析多标样品时，在一次计算中，只能处理两种伪彩，但所有伪彩排列之后都可以配对用于共定位分析。由于传统上使用氩离子激光器、氩-氩离子激光器及氩氦激光器，这些激光器能够有效地激发在蓝色和绿色区域有强烈吸收的荧光团，因此选择红绿颜色对作为共聚焦荧光颜色。此外，人眼对绿色和红色色调更为敏感。

图像的共定位分析一般经常用散点图表示 (scatterplot)，这个图将两套数据关联起来。散点图以二维图的形式描述了一幅图或一个感兴趣区域每个像素处一个通道对另一个通道的强度值 (见图 3 和图 4)。作图时其中一个通道 (通常是绿色) 作为 x 轴，而另一个通道 (通常是红色) 作图时作为 y 轴，在横坐标和纵坐标上强度范围是 $0\sim 4095$ 。因此，合成图的每个像素点都有一对强度值。分析每一对强度值产生的分布图案，能够识别荧光团的共定位、区分背景、串色、光漂白等。

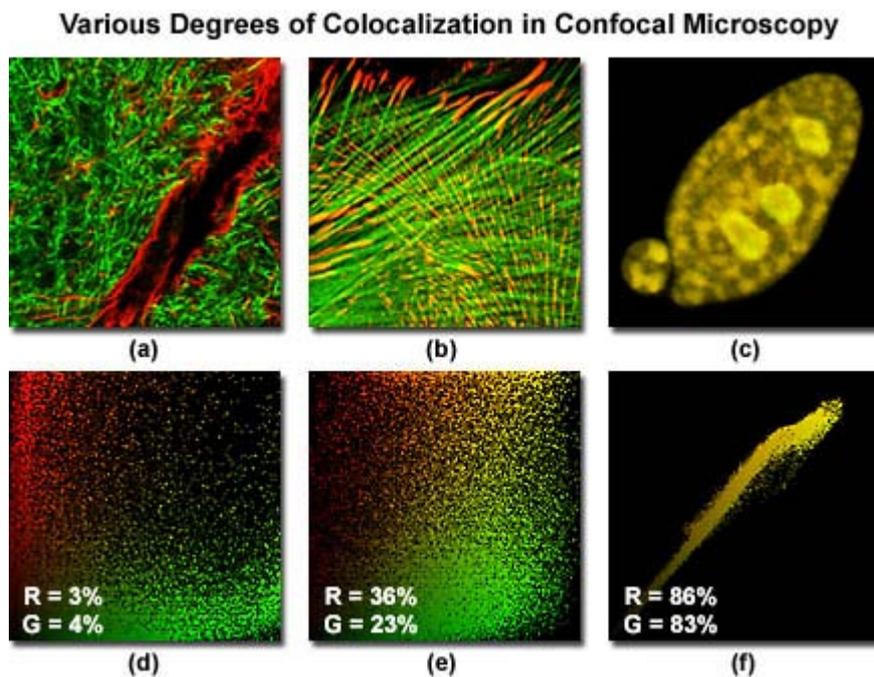


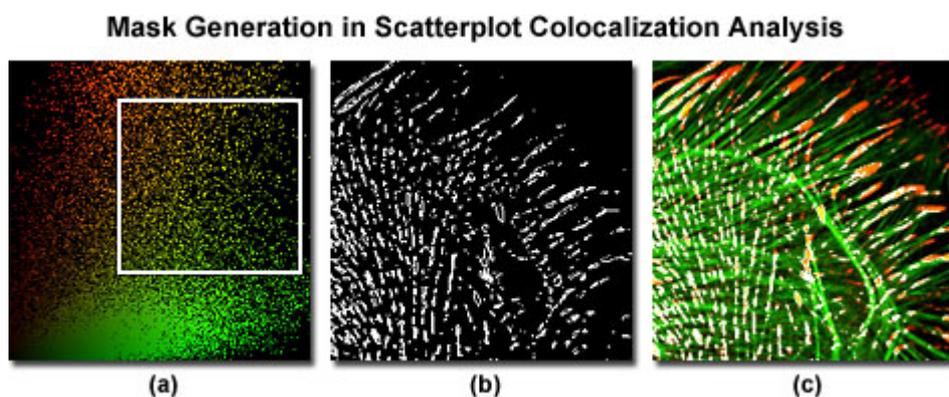
图 3 描述了共聚焦的三个合成图(伪彩为红色和绿色),以及对应的散点图,三个样品荧光团共定位的程度不同。每个通道中强度很低的像素位于靠近散点图的(0,0)处,而越亮的像素分散得越远。在连接红色通道和绿色通道的散点图中,纯的红色和绿色的像素点往往会团聚在轴位置。而共定位的像素(如果有的话)看起来是彩色的,具有黄色和橙色的色调(取决于共定位的程度),落在 $y=x$ 位置附近,也就是散点图的右上角。

图 3a 显示的样品为鼠脑冠状位海马切片,用 Alexa Fluor488 标记神经纤维, Alexa Fluor568 标记神经胶质原纤维酸性蛋白, GFAP。在图 3b 中,印度鹿鹿皮肤成纤维细胞用 Alexa Fluor568 染色,标记对象是黏着斑蛋白,同时用 Alexa Fluor488 与鬼笔环肽作用,标记对象是纤维状的肌动蛋白。而表达了荧光蛋白 DsRed 和 EYFP 的兔肾上皮细胞,定位在核上,在图 3c 中描述。相关的散点图直接位于样品图像的下面,例如图 3d 是图 3a 的散点图,两个通道共定位的程度在每个散点图的左下角用白色字母和数字表示。图 3a 共定位程度相对较小(只有百分之几),在图 3b 和图 3c 中共定位程度逐渐增加,共定位系数分别是 30%和 85%。

共聚焦显微镜及配件制造商提供的软件可对荧光团共定位进行散点图分析。

图 4 显示了一系列分析图，这个图是印度鹿鹿皮肤成纤维细胞，用 Alexa Fluor568 染色（标记对象是黏着斑蛋白，红色通道），同时用 Alexa Fluor488 染色（标记对象是纤维状肌动蛋白，绿色通道）。在散点图中选择一个感兴趣区域进行分析，在图 4a 中用白颜色的长方形为这个感兴趣区域设定了信号的阈值，大多数共定位分析软件都可以进行这种功能分析。

感兴趣区域的水平边界和垂直边界应该排除背景信号，背景沿着散点图的 x 轴和 y 轴团簇。只有被包括在所选择区域边界内的像素信号才能进行共定位分析。样品上重叠的像素区域很容易转变成共定位二元阈值像(图 4b)，这个图还可以和共聚焦图叠加在一起，做一个共定位 map. 图 4c 显示的共定位 map 图用白颜色显示了共定位区域，对大多数软件这个颜色很容易变成其他颜色，相对于原来的伪彩，对比度更高一些。



● 图 4

正如上面所讨论的，在共聚焦图中对荧光团共定位的定量测定，可通过散点图和感兴趣区域的信息获得。从整个散点图的信息，可获得很多变量值。Pearson's 系数就是用于分析整个散点图的诸多变量中的一个，为描述两幅图之间重叠程度，在识别一幅图像和另一幅图像的匹配程度上，Pearson's, R(r) 系数是标准技术之一。Pearson's 相关系数根据下面方程计算：

$$R_r = \frac{\sum_i (S1_i - S1_{aver}) \cdot (S2_i - S2_{aver})}{\sqrt{\sum_i (S1_i - S1_{aver})^2 \cdot \sum_i (S2_i - S2_{aver})^2}} \quad (1)$$

S1 是第一个通道每个像素的强度值, 而 **S2** 是第二个通道每个像素的强度值。**S1(average)** 和 **S2(average)** 分别是第一个通道和第二个通道平均像素强度值。在 Pearson's 系数里, 原始像素强度值减去平均像素强度值。结果, 系数值范围从 -1 到 1, -1 表示图像的像素之间完全没有重叠, 而 1 表示完美的图像重叠。Pearson's 相关系数只解释了两个图像之间形状的相似性, 而与图像像素强度值无关。然而, 当把这个系数值应用到共定位分析时, 潜在的负值难以解释, 需要用另一种方法解释结果。

用于计算另一相关系数的较简单的技术, 需要去掉原始像素强度值和平均像素强度值这个差减项。正式定义为 Overlap 系数 (R), 这个值范围从 0 到 1, 在图像分析中对强度变化不敏感。Overlap 系数定义为:

$$R = \frac{\sum_i S1_i \cdot S2_i}{\sqrt{\sum_i (S1_i)^2 \cdot \sum_i (S2_i)^2}} \quad (2)$$

分子是两个通道强度的乘积和, 只有当同一个像素的两个通道值与共定位相关时, 分子才会给出一个很有意义的值 (两个通道的像素强度值都大于 0)。因此, 方程 (2) 的分子与共定位的像素数成正比。同理, Overlap 方程的分母正比于图像两个通道组分的像素数, 而不考虑共定位是否存在 (注意: 组分定义为通道 1 和通道 2 红颜色和绿颜色的图或像素阵列)。Overlap 系数的一个主要优点就是对一个图像上各种组分的信号强度差相对不敏感, 信号强度差经常是由荧光团的浓度差、光漂白、量子效率变化及非等效的电子通道设置等产生的。

使用 Overlap 系数最重要的缺点是: 通道之间组分像素数比例会强烈影响 Overlap 系数值。为了减少这种依赖性, Overlap 系数分成两个不同的子系数, 看 $k(1)$ 和 $k(2)$, 以两个独立的参量来表达共定位的程度。

$$R^2 = k_1 \cdot k_2 \quad k_1 = \frac{\sum_i S1_i \cdot S2_i}{\sum_i (S1_i)^2} \quad k_2 = \frac{\sum_i S1_i \cdot S2_i}{\sum_i (S2_i)^2} \quad (3)$$

Overlap 系数 $k(1)$ 和 $k(2)$ 描述了通道之间强度的差异, $k(1)$ 对通道 2 (绿色信号) 强度差敏感, 而 $k(2)$ 线性依赖于通道 1 像素的强度值。因此, 现在描述的方程能够说明重叠度, 也能解释颜色通道之间的强度差异。在图像的共定位区域, 为了估计其中一个颜色通道对整个共定位荧光的贡献, 定义了另外一套共定位系数 $m(1)$ 和 $m(2)$ 。

$$m_1 = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i} \quad m_2 = \frac{\sum_i S2_{i,coloc}}{\sum_i S2_i} \quad (4)$$

共定位系数 $m(1)$ 用于描述通道 1 对共定位区域的贡献, 而共定位系数 $m(2)$ 用于描述通道 2 对共定位区域的贡献。注意, 如 $S2(i)$ 大于 0 时, 变量 $S1(i, coloc)$ 等于 $S1(i)$; 对于变量 $S2(i, coloc)$ 也是这样的。相对于每个荧光通道的总荧光量来说, 这些系数正比于 merge 图像中每个荧光通道共定位荧光团的荧光量。即使当两个荧光通道的信号强度明显在不同的档次, 共定位系数 $m(1)$ 和 $m(2)$ 也能测定。

另一对共定位系数可对散点图上定义的感兴趣区域内像素强度范围进行计算。系数 $M(1)$ 用于描述通道 1 荧光团对共定位区域的贡献, 系数 $M(2)$ 用于描述通道 2 荧光团对共定位区域的贡献。

$$M_1 = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i} \quad M_2 = \frac{\sum_i S2_{i,coloc}}{\sum_i S2_i} \quad (5)$$

式中, 如 $S2(i)$ 位于感兴趣区域阈值范围内, $S1(i, coloc)$ 等于 $S1(i)$; 如 $S2(i)$ 代表的像素在感兴趣区域阈值外, $S1(i, coloc)$ 等于 0。相似地, 如 $S1(i)$ 位于感兴趣区域阈值范围内, $S2(i, coloc)$ 等于 $S2(i)$; 如 $S1(i)$ 代表的像素在感兴趣区域阈值外, $S2(i, coloc)$ 等于 0。换句话说, 对每一个通道来说, 分子代表这个通道所有像素 (且每个像素在另一个通道也有强度值) 的强度和, 而分母代表这个通道的所有像素的强度和。相对于每个通道的总荧光量来说, 这些系数与每个通道共定位对象的的荧光量成正比。

大多数商业共定位分析软件都能计算上面所描述的参数, 包括 Pearson's 相关系数、总 overlap 系数以及 $k(X)$, $m(X)$ 和 $M(x)$ 共定位系数。此外, 许多分析

软件包含的算法可进行背景校正，产生整幅图的散点图，且可在一个双通道合成图或共聚焦图的感兴趣区域进行计算。从这些软件中获得的最重要的数据就是共定位系数，这意味着信号之间重叠的相对程度。例如，通道 1 的荧光团共定位系数为 0.75 意味着通道 1 中含有通道 2 组分的强度值占通道 1 总的强度值是 75%。这是一个相对比较高的共定位程度。同样地，对通道 2 共定位系数为 0.25 意味着明显降低的共定位。

共定位分析中的假象及样品考虑

共定位分析遇到的一个最重要的问题就是由发射光谱叠加、自荧光（主要存在于组织样品）、非特异性抗体或合成荧光染料染色引起的光谱串色。荧光共振能量转移对于光谱有叠加的共定位荧光团来说也是一种潜在的假象。当观察标记有绿色、红色荧光探针的样品时，任何这样一种假象都能产生看起来是黄色或橙色的像素，但这种颜色并不来自共定位。

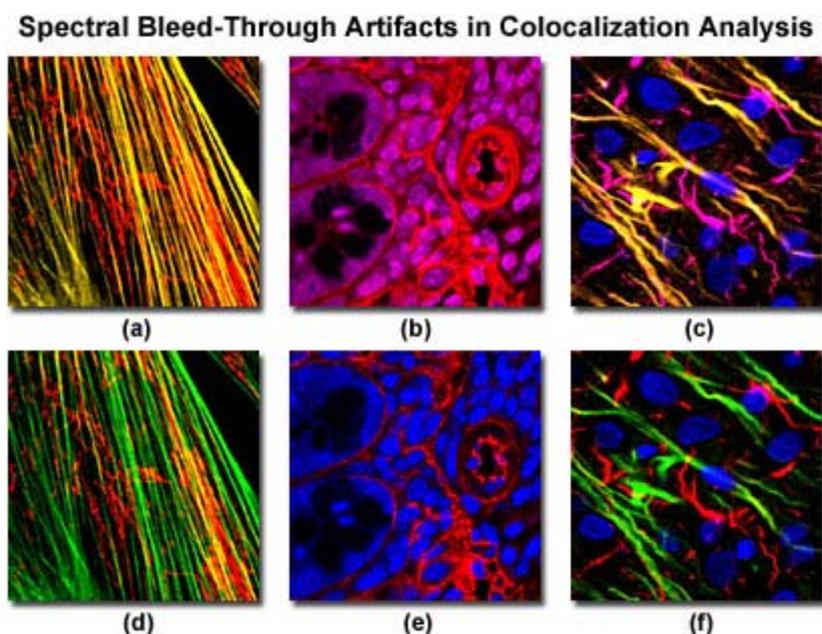
当对两种或两种以上荧光染料标记的样品进行成像时，最常见的问题就是荧光串色问题。例如，当用传统的绿色和红色荧光探针荧光素和罗丹明进行双标时，串色只有用最优的荧光滤色镜组才能降低，但绝不会完全去掉。这是因为这样一个事实：这些染料都有很宽的吸收和发射光谱，光谱之间有明显的重叠。因此，激发荧光素的氩离子激光器的 488nm 线也能激发罗丹明，尽管激发程度较低。而且，在为罗丹明预设的光电倍增管通道或宽场滤色镜套组中也会检测到荧光素的荧光发射，甚至在没有共定位的地方，产生看起来是黄色或橙色的像素。要用这些染料或类似染料进行共定位实验时，串色问题必须完全消除。

传统荧光染料中与串色相关的问题经常可通过使用新的经生物改善的、更亮的合成探针克服，比如 Alexa Fluor 系列或 Cy 系列染料。这些专门设计的有机分子表现出很窄的发射光谱（与传统探针相比）、与弧光灯和激光线相匹配的较大的吸收系数、较高的量子产率、降低的光漂白，且荧光发射对环境变量的依赖性较低。此外，这些先进探针的激发光谱线横跨大约 400nm，从紫外到近红外有一个很宽的选择，以匹配照明光源，使得发射光谱叠加最小。

自发荧光（对甲醛固定的组织样品尤为显著）产生的问题在表现上与串色类似。有自发荧光的样品激发后经常会在其他通道检测出荧光发射，使得到的照片看起来有共定位荧光团。如用抗体和合成荧光团对背景过度染色，也会在两个荧

光团非特异性标记明显的地方产生看起来像共定位的图像。这个假象可以通过认真地制备样品、用合适的 control 监测实验方案来避免或明显降低。

只有当所有的串色、自发荧光、非特异性荧光问题都消除掉后，共定位的研究才是准确的。在激光扫描共聚焦显微镜中，最有效的方法就是利用序列激发，并用窄的带通发射滤色片或窄的狭缝宽度（光谱型）收集发射荧光。同时，应该检查单标的 control 样品，以确保完全消除了串色，未染色的 control 在监测自荧光方面是很有效的。



● 图 5

激光扫描共聚焦显微镜中各种样品串色的问题及其校正如图 5 中显示。图 5 (a) 中的纤维原细胞，Alexa Fluor 488 绿色荧光串色进入 Mito Tracker 红色通道，当样品用 488 激光和 543 激光同时扫描时，会产生黄色的肌动蛋白丝。序列扫描和检测（图 5d）消除了串色影响。同样地，在用 Cy3 和核探针 DRAQ5 对老鼠大肠厚切片进行同时扫描时（图 5b），也会发生串色。序列扫描可以去掉串色假象（图 5e），而串色假象会造成虚假的共定位。

当多标样品用两种以上的激光扫描时，串色问题在好几个通道都会观察到，图 5 (c) 和图 5 (f) 显示了鼠脑的一个厚切片，用 Alexa Fluor 488 标记神经丝、用 Alexa Fluor 568 标记神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)，用 DRAQ5 染核。当样品同时用 3 个激光扫描时（图 5c），串色会在第二和第三个通道发生，在样品的中

间丝里就意味着有可能的共定位。然而，若开始用序列扫描并收集数据时，神经丝只出现在它们各自的通道里(图 5f)，消除了这些结构中荧光团共定位的可能。荧光共振能量转移(FRET)，理论上可以测量位置离得很近的两个荧光团的距离，也是监测共定位的一个潜在有用的工具。然而，在共定位分析中这个现象经常会导致一些假象，除非在实验的设计过程中，对 FRET 的一些参数做了很好地理解并认真进行了考虑。尤其是在第一个荧光团的发射光谱和第二个荧光团的激发光谱重叠的地方，研究者应该特别关注。这些样品中的能量转移表现为：第一个荧光团的荧光发射意外地降低同时伴随着第二个荧光团的荧光发射意外地增加。紧密相关的荧光团之间的相互作用可导致发射荧光信号的淬灭，这与环境条件有关。

共定位分析中许多潜在的问题都可通过仔细关注样品制备技术来规避。正如上面讨论的，荧光探针应该选择发射光谱分离比较大的且具有最小叠加的组合。如果可能的话，选择绿颜色的具有窄发射的荧光团（比如 Alexa Fluor 系列或量子点）及红颜色的在深红区或近红外区有发射的荧光团。原发性和继发性抗体必须检测交叉活性及非特异性背景染色。合成荧光团及标记的继发性抗体的浓度应该优化以确保相似的亮度，尤其是当对象丰度根本不同时。影响荧光团亮度的因素包括激发效率、量子产率、消光系数、浓度及环境因素，如 pH 值、离子浓度、疏水性及粘性。对每一个荧光团都应单独制备 control 样品，在不染色的情况下，分别分析串色和自荧光。仔细注意着色过程中的微小细节，就会降低使用图像处理软件恢复数字图像的必要性。

共定位分析的实际情况

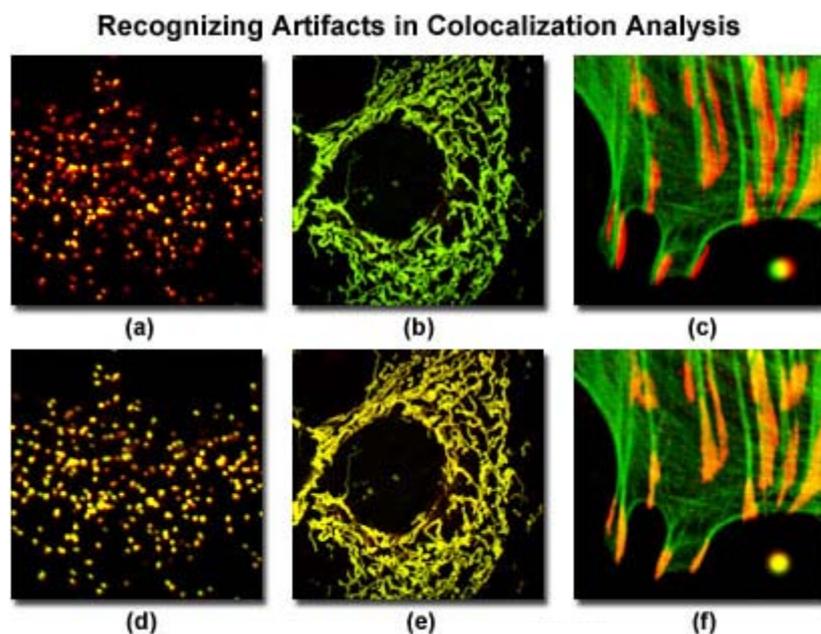
在分析复杂的荧光图像时，使用伪彩色组合很有用，这在上面已经讨论过了。通常，选择两个彩色通道，最常用的是绿色和红色。因此，叠加区域显示黄色。其他颜色对，比如蓝色、绿色（产生青色），蓝色、红色（产生紫色）也会用到，但因为反射的蓝光对人眼灵敏度低，这些颜色对在实际观察中很少使用。但在许多情况下，尤其是三色图像，不可避免会使用蓝色伪彩色。

采集图像及显示参数方面，应该采用一种标准以便使合成图对每一个荧光信号显示同样的动态范围和补偿。事实上，标准的共聚焦显微镜操作将这种方法视为日常样品分析方法。两个图像 merge 时，如果收集到的光子足够，叠加的红色

和绿色信号就会产生明确的亮黄色。在光子极少的实验中，共定位荧光团会产生暗黄色，而对背景具有相同贡献的绿色和红色会显示棕色。

每一个通道的 offset 和 gain 都应该单独调节(设置背景为 0, 饱和为 4095), 以便每一个荧光团都显示在完整的 12 位范围里。然后, 对每个图像进行单独处理。尽管这是采集和显示多色图像的一个很方便的方法, 但样品中两个信号的实际相对强度没法测定, 因为每个信号的采集都是为了满足整个 12 位的图像深度。因此, 某一个颜色通道相对信号强度的分析要求各个通道以同样的采集参数配置, 比如光电倍增管电压、增益和补偿等。

如果图像采集和图像处理技术没有平衡好, 在 merge 的彩色图中, 就会由于采集过程光电倍增管不合适的 Gain、offset 配置及图像处理过程中强度直方图的极端拉伸而对共定位做出不准确的解释。举个例子, 如果 offset 值过高, 就会发生很明显的颜色分离, 在低 offset 值下, 在同样的结构下, 观察到的对比度就降低。对于一些关键应用, ratio 成像技术可用于区分两个信号是共定位还是只是部分叠加。



● 图 6

对完全校准好的荧光成像系统, 当用不同的滤色镜组时, 样品上一个点在检测器上精确成像为一个点, 也就是像素对像素。然而, 不同颜色的通道 merge 时, 物镜的色差校正不够、滤镜光路没有完全对准都会使得荧光信号之间的记录有差

错。对具有复杂图案的图像或明暗信号相混的图像，这个可能就检测不到。会得出这样的结论：在结构中的信号分布要么是明显不同，要么是部分叠加的。

在 merge 图像的处理过程中，位移问题可用许多软件包通过 panning 操作恢复原始记录。通过 panning 操作校正一系列不同颜色图的过程中，需要样品上有一个固定的参考点，这个参考点在每一层图上都有。如不存在多标的样品参考点，就将多色的荧光微球稀释后加入样品中，用盖玻片进行封装前，在每个视野中都会有几个珠子。对于一些苛刻的应用，几个带通二色镜和发射滤色片可与不同的激光器或荧光团特定的激发滤色片一起使用。这种滤光镜组的配置一般用在共聚焦显微镜中，当对颜色校正要求苛刻时，也可用于宽场荧光显微镜。

图 6 显示了上面讨论的几个常见问题，多标样品（注意：图 6 中所有荧光团都只显示绿色和红色两种伪彩）经常会妨碍共定位的准确分析。用增强黄色荧光蛋白融合过氧化酶转染人类女性骨肉瘤上皮细胞，目标对象是缩氨酸序列（发绿色荧光），随后用免疫荧光的方法，用二次抗体标记 Alexa Fluor568（发红光），目标对象是过氧化酶膜蛋白（PMP-70），显示在图 6（a）和图 6（d）中。图 6（a）中的背景太黑，致使标记的黄色荧光蛋白强度降低。这种错误使共定位分析发生偏移，对绿色通道中重叠的像素人为产生了较低的检测量。合适的图显示在图 6（d），显示了明显较高的共定位程度。

猕猴肾上皮细胞的线粒体网络用 EYFP 和 HcRed1 荧光蛋白（此蛋白含有缩氨酸序列，目标对象是线粒体）转染。成像过程中，非常亮的 EYFP 大大地遮盖了 HcRed1 发射的荧光信号，当检测通道的电压、增益和补偿值接近时，HcRed1 发射的荧光信号比 EYFP 要弱几乎 100 倍（图 6（b））。调整 HcRed1 通道 PMT 的值可平衡荧光蛋白的发射强度以克服这种差异，共定位程度明显增加（图 6（e））。图 6（c）显示几个叠加通道重合不好，图中显示的是塔尔羊卵巢细胞，用 Alexa Fluor488 耦合鬼笔环肽染色（目标对象是绿色丝状肌动蛋白），用 Alexa Fluor568 二次抗体染色，目标对象是粘着斑蛋白抗体（粘着斑）。肌动蛋白丝末端应该与样品中粘着蛋白共定位，但在图 6（c）中，他们没重合好，正如在图像右下角用红色和绿色荧光团标记的微球重合不好一样。采集完图像后，进行图像处理可将通道对齐，恢复图像的位置（也就是球的位置），为共定位分析提供了很好的样本。

结论

当研究荧光团共定位时，要考虑的最重要的一点是：确保样品标记的质量最好。抗体和合成荧光团都应进行特异性的分析和选择，背景要低、没有交叉活性。为了降低串色影响，发射光谱分得比较开的荧光探针组合最适合做共定位实验。要做合适的 control 实验，包括用每个探针单独标记样品及未标记的只有自发荧光的样品，都应该制备，而且在真正的实验条件下细致地观察串色。样品制备好后，仪器和软件参数都要关注。有一点很重要，要记住：样品制备得不好并不能通过数字图像处理技术克服。在大多数情况下，优化染色条件会节省大量的时间，最终产生较好的结果。

进行共定位分析还取决于仪器的配置要求，需要最高质量的消色差显微镜物镜，这对于降低色差是很必要的，色差会影响共定位的定量计算。许多生产商引进了平场复消色差物镜，这种物镜对色差在整个可见光范围内（400–700nm）进行校正，可明显有助于荧光显微镜的定量研究。所有的荧光发射滤色片都应该用与荧光团发射光谱匹配的带通透射来优化。这是控制样品中其他荧光团串色最重要的考虑之一。如果在 control 样品中检测到串色（用单一探针染色或未染色只有自发荧光），用装有 AOTF (acousto-optic tunable filter) 的显微镜进行多通道序列扫描会产生最优的结果。

参考文献：

1. Olympus Microcopy resource center
2. HandBook of Biological Confocal Microscopy (THIRD EDITION)

James B.Pawley

新技术应用

辉光放电-电喷雾离子源 (GD-ESI) 的研发及应用

► 王振鹏^{1,2}, 谢晓波³, 辛 斌^{1,2}, 王光辉^{1,2}, 赵镇文^{1,3}

(1、北京质谱中心; 2、分析测试中心质谱组; 3、活体分析实验室)

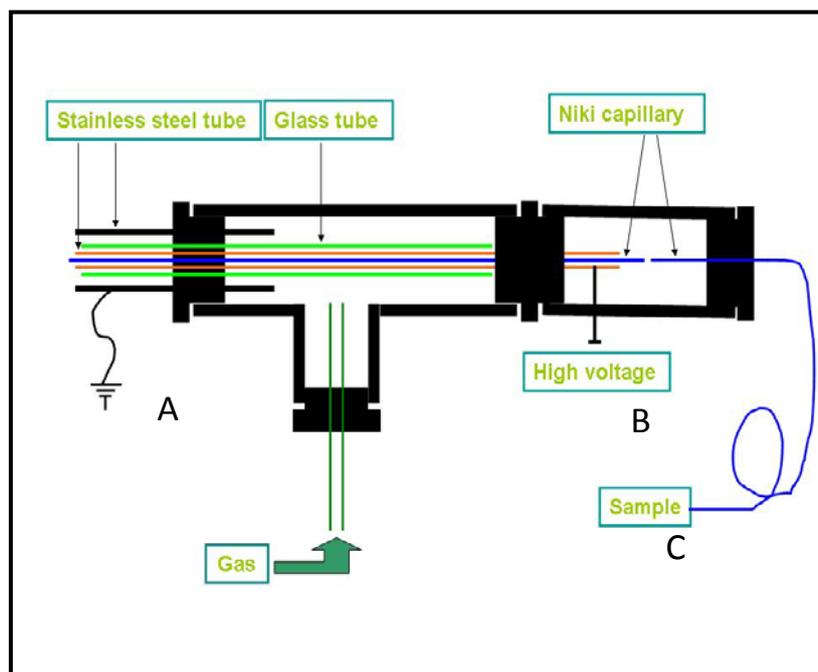
Tel:010-62554495 Email:wang_82713@iccas.ac.cn)

~~~~~

常压敞开式电离源由于其操作的方便性, 现已成为近些年质谱离子源研发的热点方向之一。到目前为止, 已研发出来的各种常压敞开式电离源, 包括 APCI、ESI、DART、EESI 等, 在有机化合物鉴定、蛋白质分析、农残兽残分析、药物研发等领域有着广泛的应用。但这些离子源主要不足在于广谱通用性差, 分析不同类物质时需要切换离子源, 比较繁琐, 限制了测试样品的能力。为了解决现有常压敞开式离子源存在的这些问题, 我们将辉光放电电离及电喷雾电离二者结合, 构造了“辉光放电-电喷雾离子源 (GD-ESI)”, 两种电离方式相互弥补, 极大地扩展了现有离子源的测试样品能力。

### 1、GD-ESI 离子源的设计与制造

GD-ESI 离子源示意图见图 1-1。只有 B 电极接正或负高压, 该离子源为辉光放电电离离子源; 只有 C 处毛细管连接正或负高压, 该离子源为电喷雾电离离子源。由此可见, 新型离子源可以通过简单转换实现辉光放电与电喷雾两种分析方式之间的转换。分析时, 样品由处于中心处的石英毛细管导入, 简单方便。



● 图 1-1 GD-ESI 离子源结构示意图

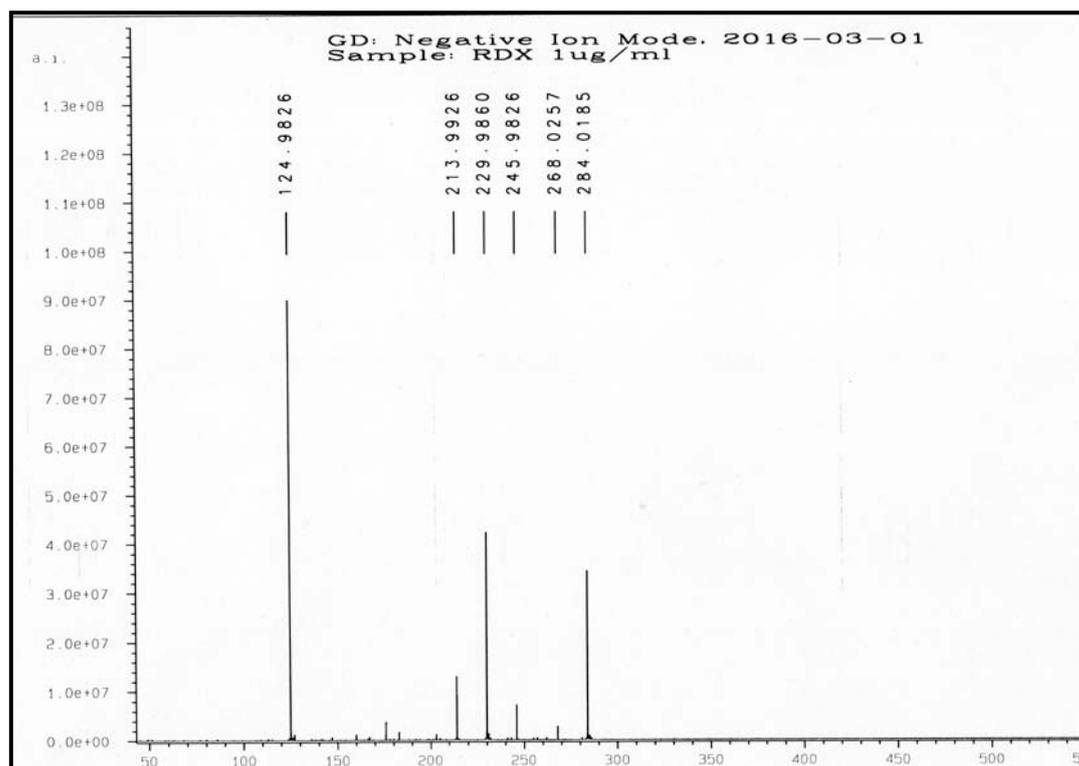
当使用辉光放电电离离子源时，通过大量实验发现氩气在通过 GD-ESI 离子源前端会被 GD-ESI 离子源辉光电离产生大量离子。这些氩气离子与从中央石英毛细管喷出的样品溶液中的气态样品分子反应，产生样品分子离子或准分子离子，从而实现辉光放电电离，电离过程如下：



## 2 GD-ESI 离子源的应用

### 2.1 GD-ESI 源分析炸药类样品

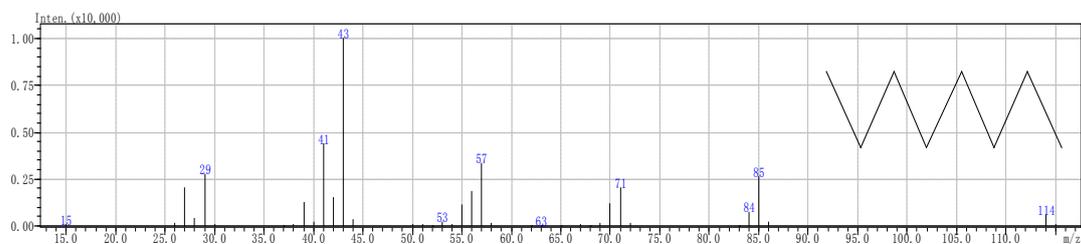
常见检测爆炸物的质谱检测方法是 GCMS 检测法，但是这种方法存在样品前处理复杂，灵敏度不高，检测时间长等缺点。为了解决这些问题，我们考察了 GD-ESI 离子源分析爆炸物类样品的性能。图 2-1 是 RDX 使用 GD-ESI 离子源 GD 负离子模式分析做出的高分辨质谱图。质谱图中，284.0185 为 RDX 样品分子吸附上一个硝酸根  $[\text{NO}_3]^-$  离子后得到的准分子离子峰即  $[\text{M} + \text{NO}_3]^-$ 。

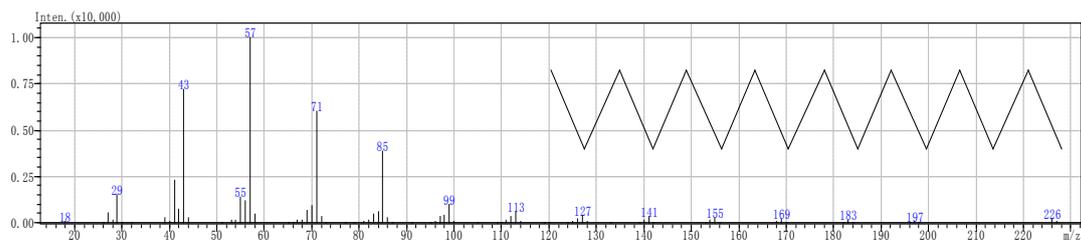


● 图 2-1 RDX 样品高分辨质谱图

## 2.2 GD-ESI 离子源分析饱和直链烷烃类样品

现在市售的质谱仪离子源中唯有 EI 源质谱仪可以检测烷烃类化合物，但是 EI 质谱仪检测烷烃类化合物存在一个先天缺陷，由于 EI 离子源的电离能太高把烷烃分子全部电离成碎片离子看不到分子离子峰不能确定样品的分子量。而且把烷烃样品全部电离成彼此相差 14Da 的碎片离子，即便分子量相差很多的烷烃样品，最终做出的 EI 源质谱图也是非常相似的，例如：八碳饱和直链烷烃和十六碳饱和直链烷烃标准 EI 源质谱图非常相似，见图 2-2(摘自 NIST 14 版标准谱图库)。





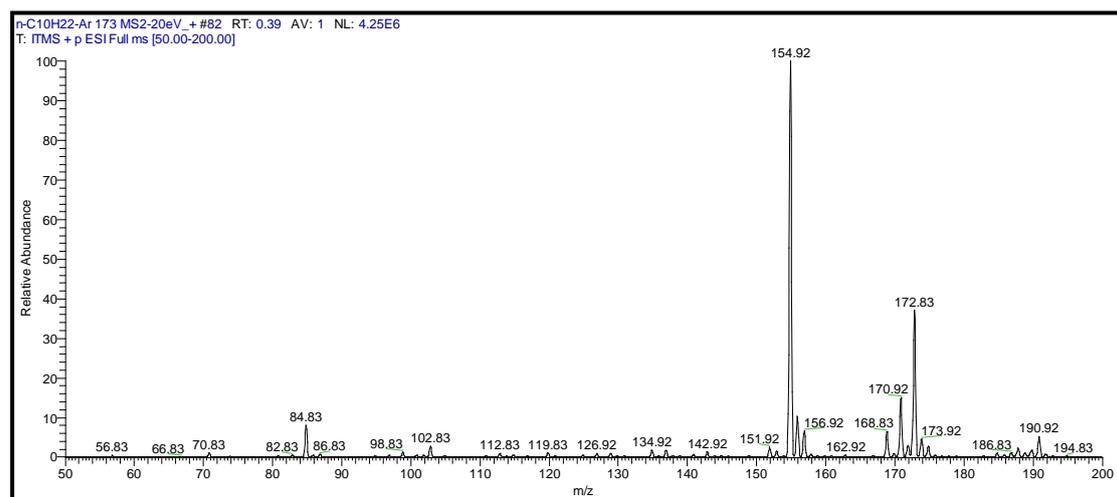
● 图 2-2 八碳饱和直链烷烃和十六碳饱和直链烷烃的标准 EI 源质谱图

我们考察了利用 GD-ESI 离子源 GD 正离子模式分析烷烃类样品的性能。使用的直链饱和正构烷烃标准品见表 2-2。

表 2-2 直链饱和正构烷烃标准品

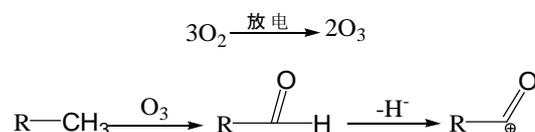
| 序号 | 样品名称     | 分子式            | 分子量<br>(Da) | 结构式        |
|----|----------|----------------|-------------|------------|
| 1  | 戊烷       | $C_5H_{12}$    | 72          |            |
| 2  | 己烷       | $C_6H_{14}$    | 86          |            |
| 3  | 庚烷       | $C_7H_{16}$    | 100         |            |
| 4  | 辛烷       | $C_8H_{18}$    | 114         |            |
| 5  | 癸烷       | $C_{10}H_{22}$ | 142         |            |
| 6  | 12 碳正构烷烃 | $C_{12}H_{26}$ | 170         |            |
| 7  | 14 碳正构烷烃 | $C_{14}H_{30}$ | 198         |            |
| 8  | 16 碳正构烷烃 | $C_{16}H_{34}$ | 226         |            |
| 9  | 18 碳正构烷烃 | $C_{18}H_{38}$ | 254         |            |
| 10 | 19 碳正构烷烃 | $C_{19}H_{40}$ | 268         |            |
| 11 | 石蜡       | $(CH_2)_n$     | 500         | $(CH_2)_n$ |

用分析纯的正戊烷作溶剂将样品稀释 10 倍，癸烷 GD-ESI 离子源辉光放电电离正离子模式低分辨 (LTQ MS) 质谱图见图 2-3。

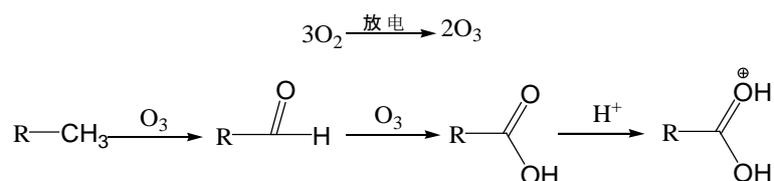


● 图 2-3 癸烷 GD-ESI 离子源正离子模式低分辨质谱图

从图 2-3 中可以清晰的看到 155Da 和 173Da 两个丰度最高的离子峰。这两个峰的质量数与癸烷的分子量分别相差 13Da 和 31Da。利用经典质谱碎裂原理并结合实际样品的电离环境推断 155Da 离子峰是癸烷被氧化成醛并失去一个氢负离子产生的准分子离子反应式为：

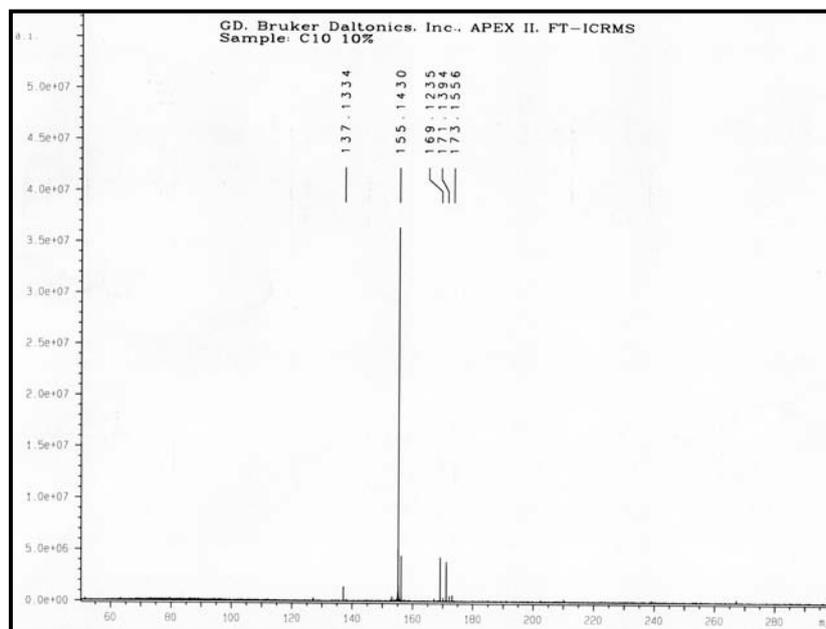


173Da 离子应为癸烷被氧化成醛以后进一步被氧化成羧酸并加上一个氢质子产生的准分子离子反应式为：



为了进一步验证推论正确性，把 GD-ESI 离子源与 FT-ICR MS 高分辨质谱仪相连。对 155 和 173 两个峰进行高分辨分析确定其元素组成，数据见图 2-3。通过高分辨质谱分析计算得出 155Da 离子的元素组成为  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}$ 、173 离子的元素组成为  $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_2$ ，与推测的结果吻合。为了进一步确保结果准确，再利用固相微萃取针对 GD-ESI 离子源 GD 正离子模式喷出的样品直接收集，然后把固相微萃取针迅速扎入 GCMS 气相色谱质谱联用仪进行分析。通过 GCMS 分析得出 158Da 离子峰对应的物质是癸烷被氧化后产生的十碳醛，而 173Da 离子则是在醛的基础上进一

步被氧化而产生的十碳羧酸。发现这个规律后再分别去分析其他的烷烃质谱图，发现每张图中都有 $[M+13]^+$ 和 $[M+31]^+$ 的准分子离子峰，而且这些峰都是图中的基峰分辨率也非常高，从而可以得出结论：利用 GD-ESI 离子源 GD 正离子模式分析饱和烷烃类化合物可以得到非常强的准分子离子峰，直接确定烷烃样品的分子量。



● 图 2-4 癸烷高分辨质谱图

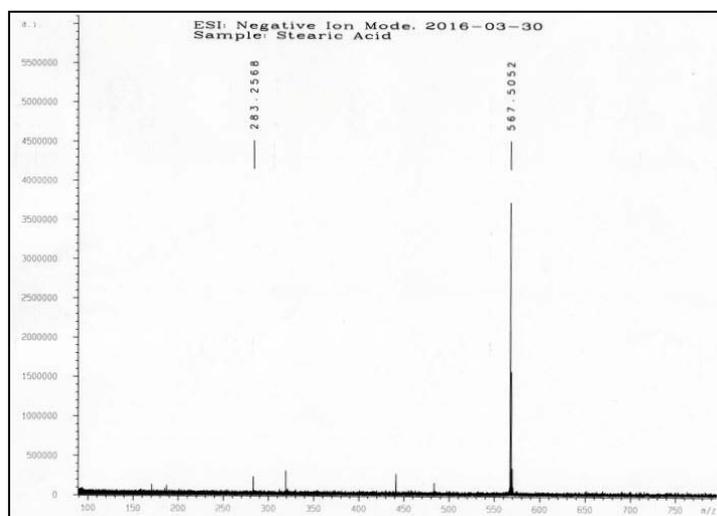
### 2.3 对中等极性样品的检测

利用 GD-ESI 离子源 GD 负离子模式分析中等极性化合物，首先选用长链羧酸类物质作为实验样品见表 2-3。

表 2-3 长链羧酸类样品

| 序号 | 样品名称 | 分子式               | 分子量(Da) | 结构式 |
|----|------|-------------------|---------|-----|
| 1  | 癸酸   | $C_{10}H_{20}O_2$ | 172     |     |
| 2  | 油酸   | $C_{18}H_{34}O_2$ | 282     |     |
| 3  | 软脂酸  | $C_{16}H_{32}O_2$ | 256     |     |
| 4  | 硬脂酸  | $C_{18}H_{36}O_2$ | 284     |     |

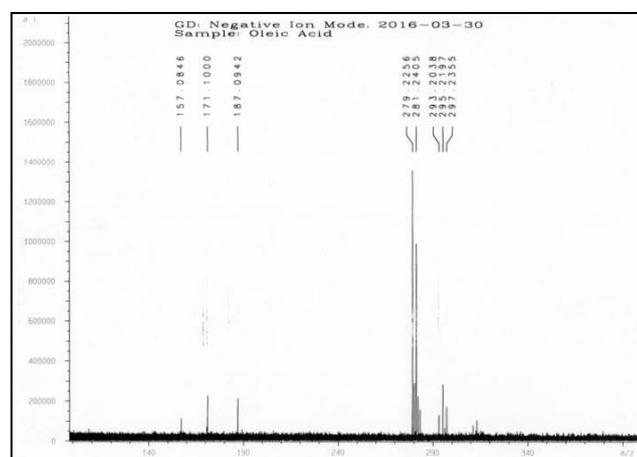
把 GD-ESI 离子源与 FT-ICR MS 质谱仪相连。用甲醇、水 (1/1, V/V) 混合溶剂把样品稀释 100 倍进行实验。实验发现当 GD-ESI 离子源为 ESI 负离子模式时可以检测到各种脂肪酸的  $[M-H]^-$  和  $[2M-H]^-$  准分子离子峰, 见图 2-5。



● 图 2-5 硬脂酸 GD-ESI 离子源 ESI 负离子模式质谱图

为了提高检测灵敏度向样品溶液中加入各种离子化试剂, 结果发现在 ESI 负离子模式下用质子海绵作离子化试剂仪器检测到样品的  $[M-H]^-$  离子峰信号强度最强, 其次是在 ESI 正离子模式下氨水做离子化试剂的效果, 仪器可以检测到  $[M+NH_4]^+$  的准分子离子峰。向油酸样品溶液中加入 10% (V/V) 的氯仿时, 在 ESI 负离子模式下可以检测到  $[M+Cl]^-$  准分子离子峰。

把 GD-ESI 离子源设置成 GD 负离子模式, 氦气作反应气。可以检测到脂肪酸的  $[M-H]^-$  峰, 见图 2-6。

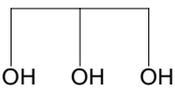
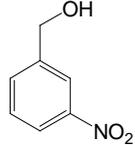
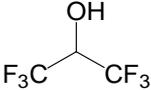
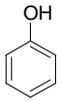
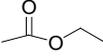
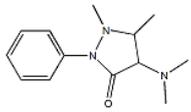
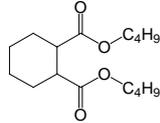
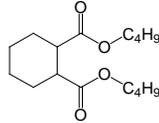


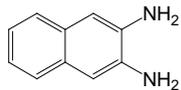
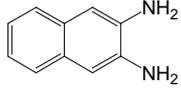
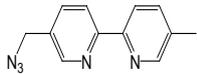
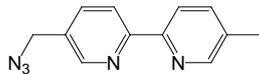
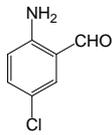
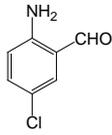
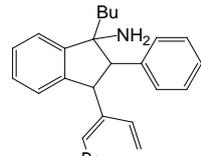
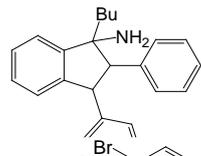
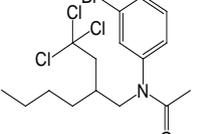
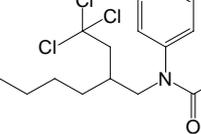
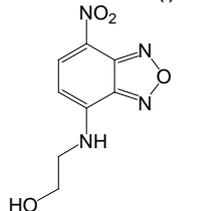
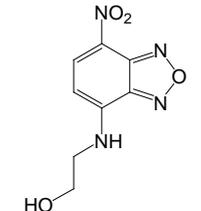
● 图 2-6 油酸 GD-ESI 离子源 GD 负离子模式质谱图

## 2.4 GD-ESI 离子源对醇、酚、醛、酮、酯、聚乙二醇 (PEG) 及含杂原子的有机小分子化合物的分析

为了进一步验证 GD-ESI 离子源分析有机小分子化合物的能力, 选用醇、酚、醛、酮、酯、PEG 和含有杂原子的有机小分子化合物样品对 GD 离子源进行实验, 实验样品见表 2-4。

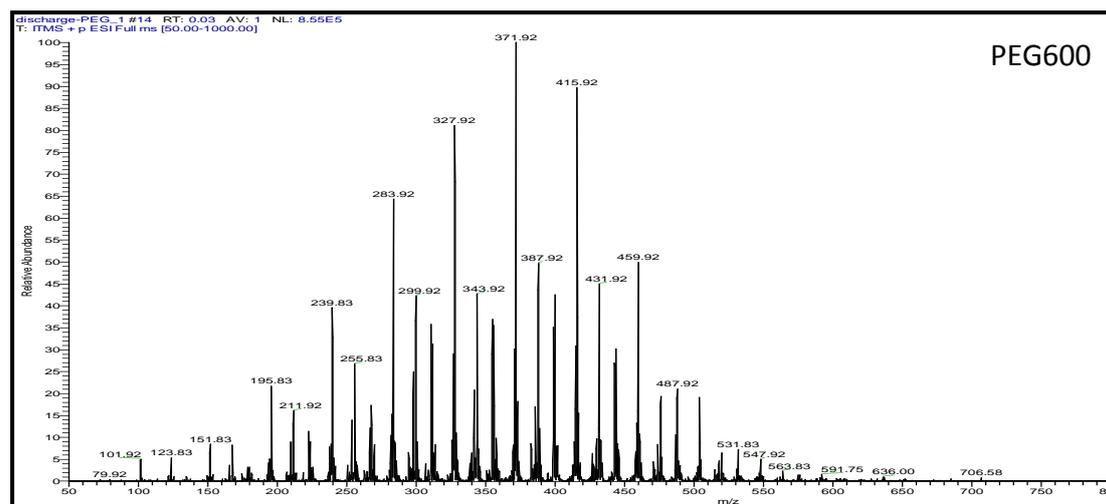
表 2-4 实验所用各种有机小分子

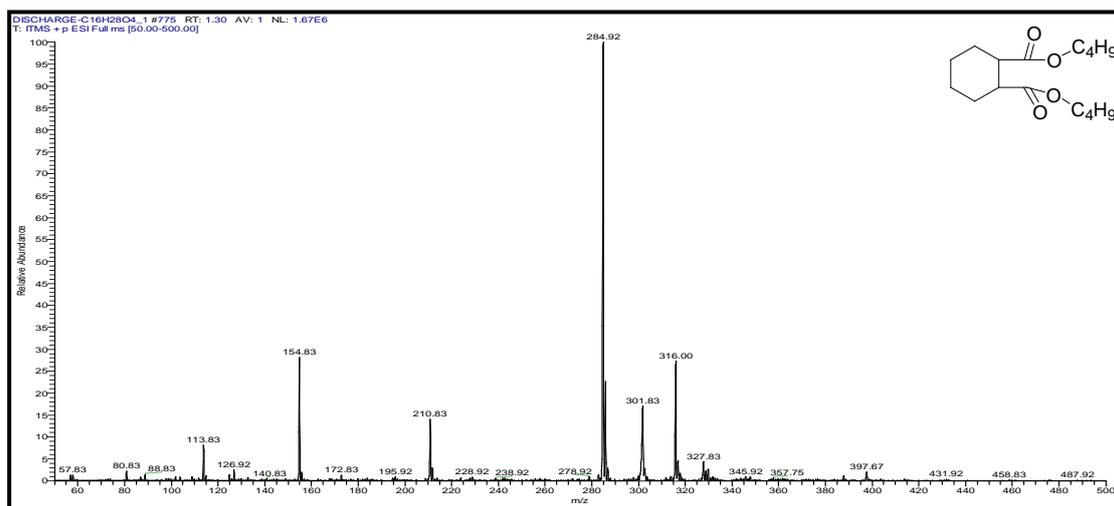
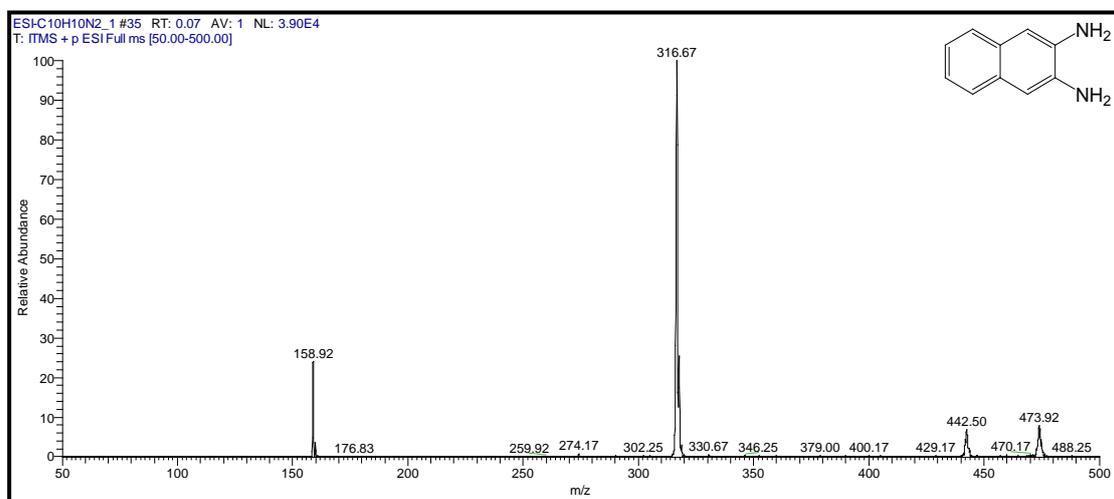
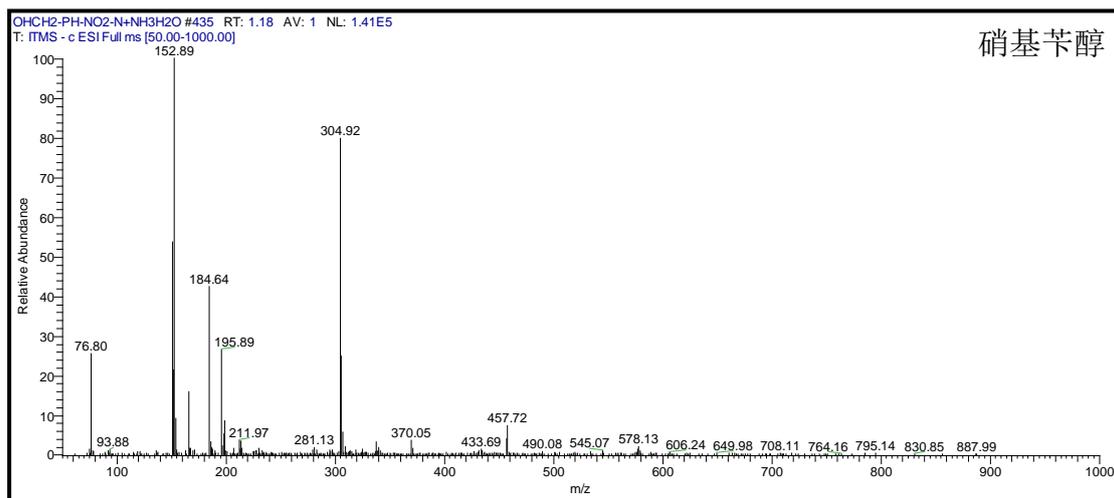
| 序号 | 样品名称                                                                                | 分子式                                              | 分子量<br>(Da) | 结构式                                                                                   |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | 甲醇                                                                                  | CH <sub>4</sub> O                                | 32          | —OH                                                                                   |
| 2  | 乙二醇                                                                                 | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>     | 62          |    |
| 3  | 甘油                                                                                  | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>     | 92          |    |
| 4  | 硝基苄醇                                                                                | C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>    | 153         |   |
| 5  | 六氟异丙醇                                                                               | C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> FO                 | 168         |  |
| 6  | 苯酚                                                                                  | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O                  | 94          |  |
| 7  | PEG600                                                                              | (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub>   | 600         | (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub>                                        |
| 8  | 丙酮                                                                                  | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O                  | 58          |  |
| 9  | 戊二醛                                                                                 | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O                  | 100         |  |
| 10 | 乙酸乙酯                                                                                | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>     | 88          |  |
| 11 | 三乙胺                                                                                 | C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N                 | 101         |  |
| 12 | 氨基吡啉                                                                                | C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O | 231         |  |
| 13 |  | C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>   | 284         |  |

|    |                                                                                    |                      |     |                                                                                      |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 14 |   | $C_{10}H_{10}N_2$    | 158 |   |
| 15 |   | $C_{13}H_{11}N_3$    | 209 |   |
| 16 |   | $C_7H_6ClNO$         | 155 |   |
| 17 |   | $C_{25}H_{27}N$      | 341 |   |
| 18 |   | $C_{15}H_{21}BrClNO$ | 427 |   |
| 19 |  | $C_8H_8N_4O_4$       | 426 |  |

用色谱纯丙酮将各种样品溶解成浓度约 1mg/ml 的溶液待测。

首先将 GD-ESI 源与 LTQ MS 质谱仪相连接分析待测样品。使用 LTQ MS 质谱仪检测样品得到的质谱图见图 2-7。





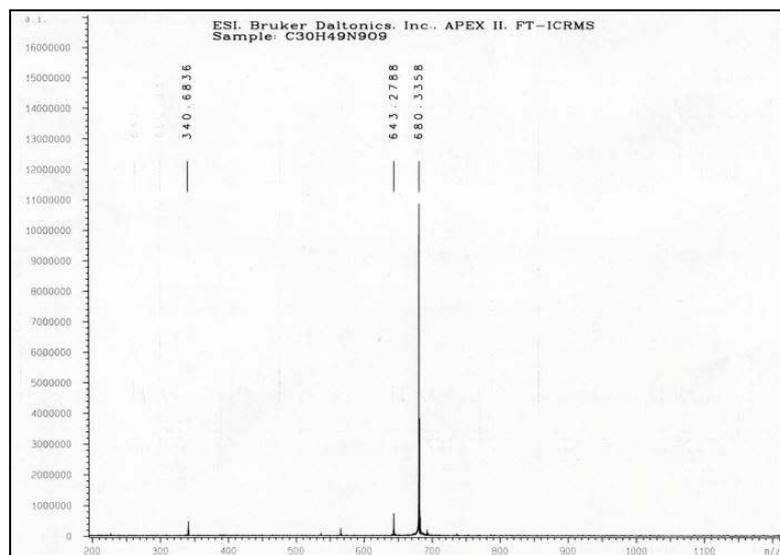
● 图 2-7 GD-ESI 离子源分析的部分含杂原子小分子化合物质谱图

由上面所列出的质谱图可以看出 GD-ESI 离子源可以检测的小分子化合物范

围非常广泛。而且，检测灵敏度和准确性都很高。

## 2.5 GD-ESI 离子源对肽类生物小分子化合物的分析

GD-ESI 离子源也能分析氨基酸、多肽类样品。使用 GD-ESI 离子源在 ESI 正离子模式下分析胸腺五肽纯净样品测试 GD-ESI 离子源的检测能力。将 GD-ESI 离子源与 FT-ICR MS 质谱仪相连，把 GD-ESI 离子源调整为 ESI 正离子模式。所检测到的样品质谱图见图 2-8。



● 图 2-8 GD-ESI 离子源 ESI 正离子模式分析胸腺五肽质谱图

从图 2-8 中可以明显看到只有 340、643 和 680 三个质谱峰，在这三个峰中 680 质谱峰的丰度是其他三个峰的 10 倍多，而 680 这个峰就是胸腺五肽的  $[M+H]^+$  准分子离子峰。GD-ESI 离子源的 ESI 正离子模式对肽类化合物有非常好的分析效果。

## 3、小结

GD-ESI 离子源因结合辉光放电电离与电喷雾电离，具有非常普适的电离能力。GD-ESI 离子源对炸药类样品有很高的检测灵敏度。GD-ESI 离子源与传统商品化的离子源相比最大的优势在于分析饱和直链类样品时，不但能检测到碎片峰还能看到准分子离子峰，能够直接确定样品的分子量。GD-ESI 离子源对含有杂原子的样品同样具有很强的电离能力。GD-ESI 离子源不但具有 GD 分析功能还有 ESI 分析功能，当分析肽类样品时可以把 GD-ESI 离子源转换为 ESI 电离模式，这样就可以轻松分析肽类样品。



## 一种新型普适半原位 XPS 样品转移装置的研制与应用

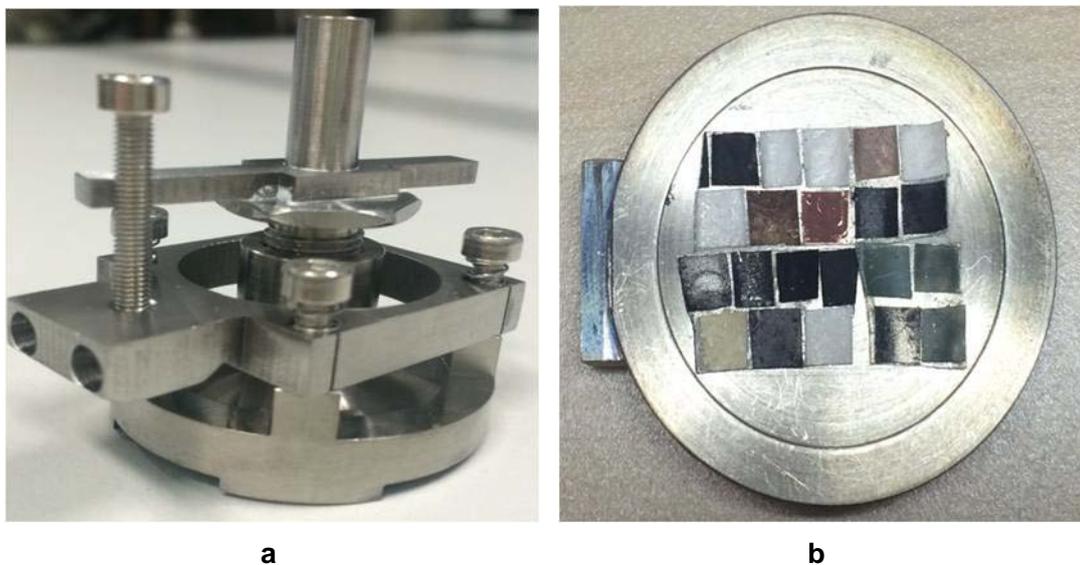
► 赵志娟 章小余 袁震

(分析测试中心光电子能谱组 Tel: 010-62553516 Email: xyiuzhang@iccas.ac.cn)

~~~~~

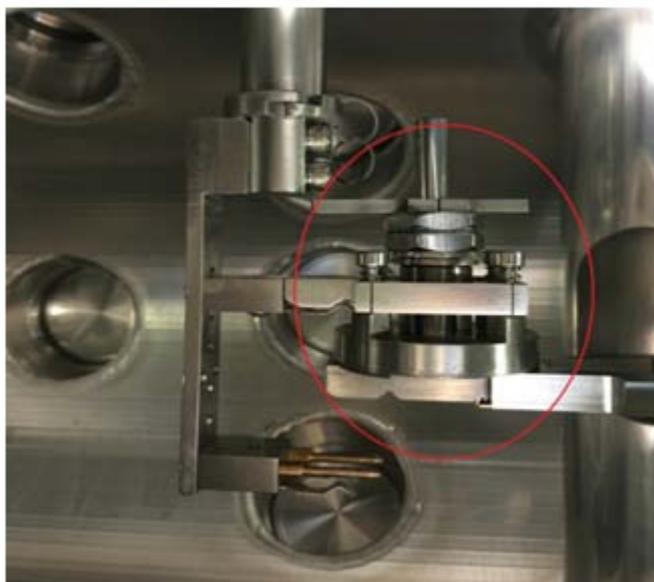
半原位 XPS 样品转移装置是针对一些表面比较敏感（如易氧化、易潮解）或者要求比较苛刻（如 UPS 样品）的特殊样品所研制的，目的是保护样品从手套箱中制备完成到进入能谱仪的整个过程不接触大气，避免在样品转移过程中外界环境对样品表面状态造成影响，保证科研数据测试的准确性和有效性。

本组自主研制的第一代半原位 XPS 样品转移装置(专利号:201620925237.5)于 16 年初投入使用，初期应用效果良好，但经过一段时间的实际使用后，我们发现半原位 XPS 样品转移装置存在一些不足：比如样品托放置样品区域较小，单次只能进样 4-6 个；其次样品罩配备的旋塞阀较重，不仅增加了整体装置的重量且使重心偏移，而且将其悬挂在仪器进样室的样品停放台时，若操作不当易造成脱离样品托的风险，因此我们对第一代装置进行了升级改进。新一代的半原位 XPS 样品转移装置最大的创新点是在样品罩上做了全新设计，特别研制了可连接真空气路的内部抽气开关（见图 1a），完全取代之之前使用的较为笨重的旋塞阀，在保证样品区域维持真空密封的同时很大程度上减轻了整体装置的重量，而且操作起来更简便易行。此外，在保留与能谱仪进样杆相匹配的特征外，进一步扩展了样品托可承载样品的区域面积（单次可放置样品数 20 个左右，见图 1b），大大提高了进样及测试效率。由于新设计的样品托相较于第一阶段在尺寸上扩大了将近两倍，考虑到仪器用样品托实际可利用的空间以及重量上的局限，我们对装置的各部件材质也进行了改进，由常规的不锈钢材质改为钛合金材质，保证了整体装置的重量均在能谱仪停放台及样品传送杆承重限度的范围内。



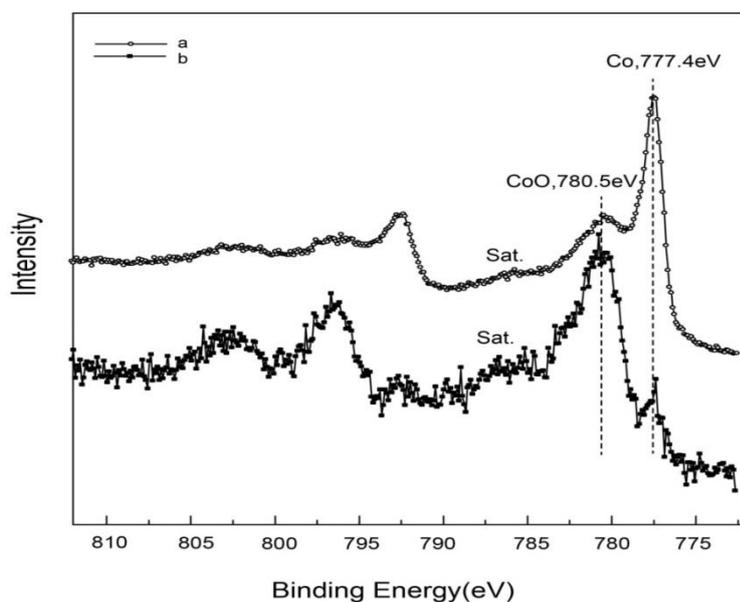
● 图 1 改进后的新型半原位 XPS 样品转移装置实物图 (a 图为样品罩, b 图为样品托)

经过升级改进后的第二代半原位 XPS 样品转移装置整体结构更小巧轻便,易于操作,在放入谱仪进样室时,利用样品罩的独特设计,配合样品停放台与进样杆的同时双向对接,可以很好的固定半原位装置,如图 2 所示。待仪器腔室预抽至一定真空时,将样品停放台上旋适当的距离即可实现样品罩与样品托的分离,保证了样品后续的真空中传递与半原位测试。



● 图 2 新型普适半原位 XPS 样品转移装置送入能谱仪进样室的示意图

为了验证新型装置的有效性,我们选取了石墨炔上负载钴纳米催化剂的样品来进行 XPS 测试。图 3 是石墨炔上负载钴纳米粒子样品的钴的 XPS 谱图,其中 a 线代表采用半原位装置进样测得的 Co2p 谱图, b 线代表采用标准样品托常规进样测得的 Co2p 谱图。通过对比分析发现,采用常规进样方式测试,合成催化剂表面 Co 元素结合能为 780.5eV,对应 Co^{2+} ,表明 Co 元素基本全部被氧化,这归咎于在常规转移过程中样品不可避免接触大气环境,由于样品表面敏感极易与空气(主要是氧气)发生作用从而改变表面的真实状态;而采用半原位装置重新进行测试,保证从样品制备出来到送入仪器测试的整个过程都不接触空气,XPS 结果显示催化剂表面的 Co 元素主要为 0 价的金属 Co(结合能为 777.4eV),还有少量的 Co^{2+} ,这反映了样品更真实的接近原位的表面化学状态,与学生的预期结果吻合。



● 图 3 石墨炔上负载的钴纳米粒子样品的钴的 XPS 谱图

上述实验有力证明了我们新型半原位装置的有效性。该套装置已于 16 年 9 月底投入使用,目前已取得很好的应用效果。该装置已申请了实用新型专利,可普遍适用于其它 250 型号的电子能谱仪器上。

考虑到所内科研项目对于敏感材料(如锂电池、金属负载型催化剂等)原位测试的需求,我们自主研发的新型普适半原位 XPS 样品转移装置对于此类样品的

原位 XPS 测试有重要的应用意义,可以帮助课题组获得敏感样品更准确有效的实验数据。该装置的设计不仅能扩展 X 射线光电子能谱技术的应用范围,更好地为科研提供服务,而且对其它真空系统仪器原位测试也有着借鉴意义。

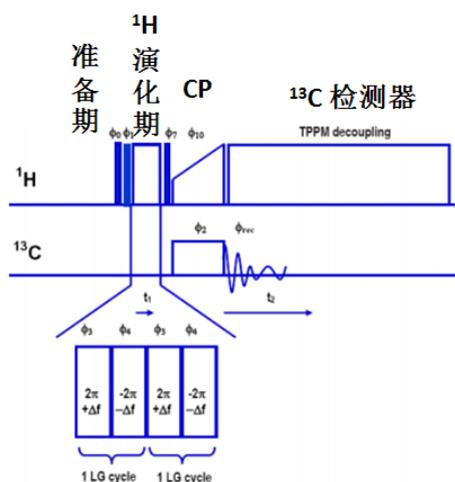
固体异核化学位移二维谱 HETCOR 简介

► 武宁宁 向俊锋

(分析测试中心核磁组 Tel: 010-62627946 Email : jfxiang@iccas.ac.cn)

固体核磁共振波谱是化学领域结构鉴定的重要分析工具之一，既可以对固态晶体物质的结构分析，又可以完成对非晶物质的结构分析。其中，一维谱 NMR 技术提供分子官能团的定性和定量信息，多维谱能够得到更多反映分子间的结构、空间和耦合等信息。借助一维和多维核磁技术组合，人们可以得到非常精细的分子立体结构。尽管目前液体核磁共振的多维核磁技术，如液体二维、三维和多维核磁发展成熟，被广泛应用于有机分子、生物大分子等构象和构型方面的研究工作，但由于固体材料存在化学位移各向异性、偶极-偶极耦合和核四极矩耦合等相互作用造成谱线增宽，使其灵敏度和分辨率远低于液体 NMR，这极大的阻碍了固体核磁多维技术的发展。随着仪器硬件和技术的不断发展，研究固体材料结构、分子间相互作用、共混复合材料相容性和原子核间距离测量等^[1-3]的二维谱技术日渐完善。

异核化学位移相关谱（HETCOR, **H**eteronuclear **C**orrelation）为反映固态高分子中不同种类原子核间距离和相互作用等信息的重要手段之一，如 ^{13}C - ^1H / ^{27}Al - ^1H 和 ^{31}P - ^1H 之间等。以 ^{13}C - ^1H 为例，在空间相关异核化学位移二维实验中（基于空间相关的碳氢偶极耦合），可以在 ^1H 演化期内通过 FSLG、PMLG 或 DUMBO 等脉冲序列，间接维上实现氢的高分辨率，此技术通过分析分子间相互作用，可有效推测固体材料的微观结构信息。通常，相关谱图中 F1 维代表氢核的共振频率（常表示为化学位移，单位 ppm），F2 维代表杂核的共振频率。



● 图 1. 二维碳-氢异核相关脉冲序列简化图（摘自布鲁克固体核磁用户手册）

如图 1 所示，是二维碳-氢异核相关脉冲序列简化图。由于 HETCOR 实验是基于 CP 的基础上演化的脉冲序列，我们可以通过调整碳-氢的接触时间（p15）区分不同程度异核偶极耦合的相互作用，即长的接触时间可以看到更多长程耦合信息。反之亦然。

K.R. Graham 等人^[2]文中通过短的接触时间（1 或 2ms）归属了纯化合物的谱峰，长的接触时间（8ms）解决了异质结混合中移动分子间相互作用，即固体核磁二维 ^{13}C - ^1H HETCOR 核磁测试利用通过空间 ^{13}C 和 ^1H 核局部紧邻的偶极-偶极耦合与各向同性化学位移相关，得到了不同化学性质的共轭聚合物与富勒烯分子内、分子间相互作用的直接信息。

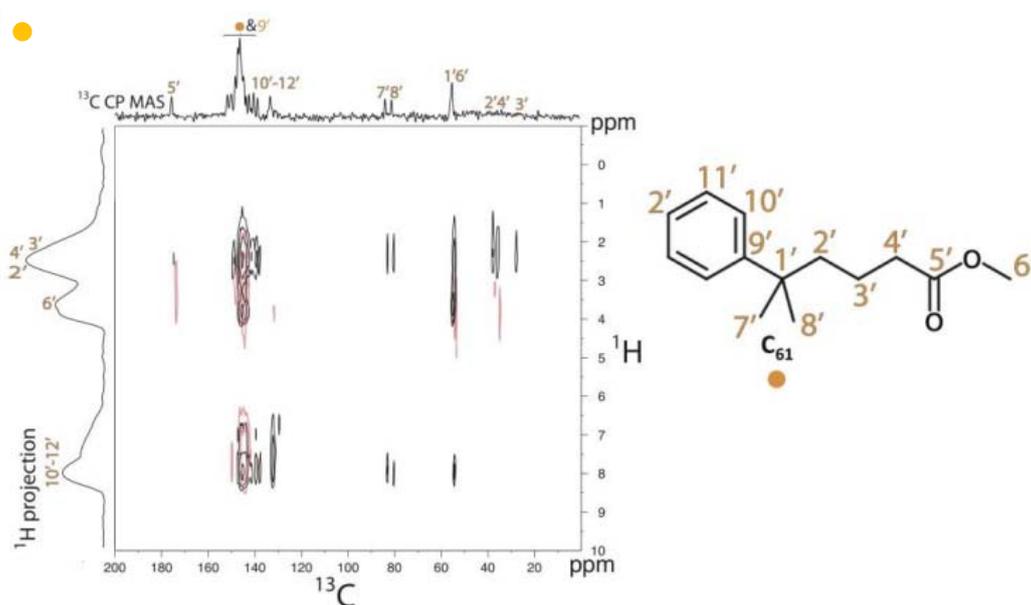
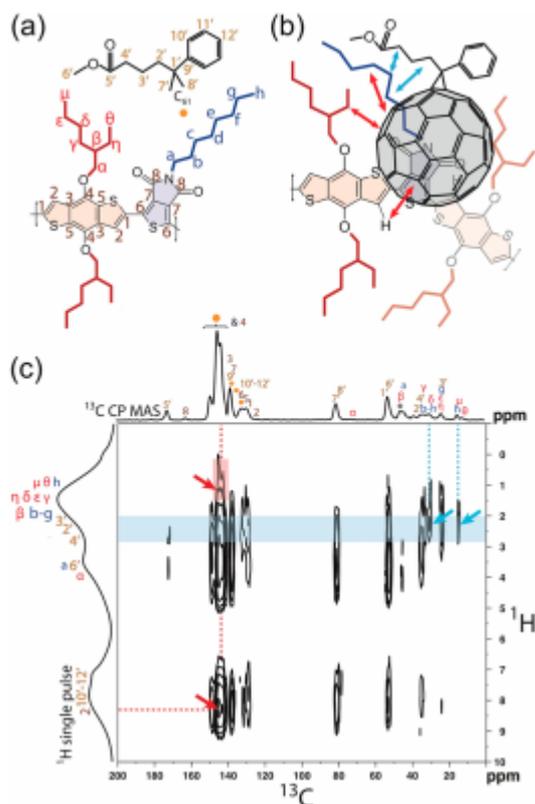


图 2. PC_{61}BM 的固体核磁共振二维 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 异核相关谱，转速 12.5 kHz，CP 接触时间 p15=2ms(黑线)，8ms(红线) (摘自 K.R. Graham, C. C. Justin, J. P. Jahnke, M. N. Idso, et al, Importance of the Donor: Fullerene Intermolecular Arrangement for High-Efficiency Organic Photovoltaics[J]. J. Am. Chem. Soc.2014, 136, 9608-9618.)

图 2 中从接触时间为 2ms 的黑色相关线中不仅显示了分子间化学键的相关信号，也得到了分子间距离接近的空间偶极相关信号：当 p15=2ms， PC_{61}BM 中羰基碳 $\text{C}5'$ (~173ppm) 与亚甲基 $\text{H}4'$ (~2.4ppm) 信号之间存在较弱的相关信号，当 p15=8ms 时， $\text{C}5'$ (~173ppm) 与 $\text{H}6'$ (3~4ppm) 信号之间存在较强的相关信号。后者较长的接触时间，证明了与羰基 $\text{C}5'$ 与 $\text{H}6'$ 的空间距离比与 $\text{H}4'$ 的距离较远。当接触时间为 2ms 时，得到芳环中 $\text{C}10'$ - $\text{C}12'$ 除了与 $\text{H}10'$ - $\text{H}12'$ 因化

学键相连存在较强的相关信号外，与烷基区域 H6', H7', H8' 之间存在空间上邻近的弱偶极相互作用。结合图 2 中分子式，化合物 **PC₆₁BM** 的谱峰得到了归属。



●图 3. (a) **EH/C8** 和 **PC₆₁BM** 的分子结构; (b)示意图: 显示红色和蓝色箭头表明共轭聚合物和 **PC₆₁BM** 分子间的相互作用与 **2D NMR** 的强度相关一致; (c)共混物(**EH/C8** 与 **PC₆₁BM**)的固体核磁共振二维 ¹³C{¹H} 异核相关谱, 转速 12.5 kHz, p15=8ms (摘自 K.R. Graham, C. C. Justin, J. P. Jahnke, M. N. Idso, et al, Importance of the Donor: Fullerene Intermolecular Arrangement for High-Efficiency Organic Photovoltaics[J]. J. Am. Chem. Soc.2014, 136, 9608-9618.)

图 3c 直接的反应了 **EH/C8** 与 **PC₆₁BM** 分子间的相互作用: **C₆₀** 富勒烯基团 (140-148ppm) 的 ¹³C 信号分别与聚合物中乙基 (~1.2ppm)、芳环 (~8.3ppm) 的 ¹H 信号之间有强烈的相关信号 (红色箭头, 相关信号强度与相互作用程度成正相关); 聚合物骨架中 **BDT** 单元中 2 号碳上的 ¹H 原子与 **TPD** 邻近。特别是, 图 3c 中乙基基团的类型和位置影响了靠近聚合物骨架的 **PC₆₁BM** 部分的局部结构: 线性 **C8** 烷基链中碳原子 Cb-f 和 Ch (分别对应 31ppm 和 14ppm) 与 **PC₆₁BM** 功能性官能团中 H2'-H4' (2~3ppm) 的氢原子存在强烈的相关信号 (蓝色箭头)。

结合文中的 **2D NMR** 信息，从而建立了 **PC₆₁BM** 分子与聚合物骨架和线性烷基链相互作用的证据：**PC₆₁BM** 与 **EH/C8** 共混物中的 **TPD** 存在优先相互作用，如图 3b 所示。

随着我们仪器功能的不断升级，以上功能通过一步步探索已初步实现，欢迎有需求的课题组来探讨并开展更多材料微观结构的研究工作。

致谢

感谢布鲁克王秀梅博士提供的技术帮助。

主要参考文献：

- [1] B. J. van Rossum, C. P. de Groot, V. Ladizhansky, S. Vega, H. J. M. de Groot, A Method for Measuring Heteronuclear (¹H-¹³C) Distances in High Speed MAS NMR[J]. J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 3465-3472.
- [2] K.R. Graham, C. C. Justin, J. P. Jahnke, M. N. Idso, et al, Importance of the Donor: Fullerene Intermolecular Arrangement for High-Efficiency Organic Photovoltaics[J]. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 9608–9618.
- [3] D.P. Burum and A. Bielecki, An Improved Experiment for Heteronuclear Correlation 2D NMR in Solids[J]. J. Magn. Res., 1991, 94, 645-652.

典型应用案例

多晶与单晶 X-射线衍射联合表征晶体择优生长方向

► 孙杨 梁同玲

(分析测试中心 X 射线衍射组 Tel: 010-62628187 Email: sy0471103@iccas.ac.cn, ltl@iccas.ac.cn)

结晶是重要的传质分离单元操作，广泛应用于化工过程。为了得到特定需求的结晶产品，需要控制影响晶体性质的相关技术指标，如晶型（即晶体的微观堆积方式）、晶体的宏观外形和晶粒度的分布等。

在制药和材料领域，同样的分子结构却存在多种晶型，即所谓的“多晶型”现象，是一个重要的研究方向，因为不同的晶型常常导致最终产品的物理性能和药效上有差异。本组在单晶测试中曾经遇到过一个多晶型的案例，同一个化合物能结晶出 3 种颜色形貌有差别的晶体，通过对每一种晶体都进行了数据收集和结构解析，得到了如下表 1 的测试结果。可以看出，3 种晶型的空间群差别较大，表明分子堆积结构差别较大，这个结果为科研人员进一步研究 3 种晶型的固态性质奠定了结构基础。

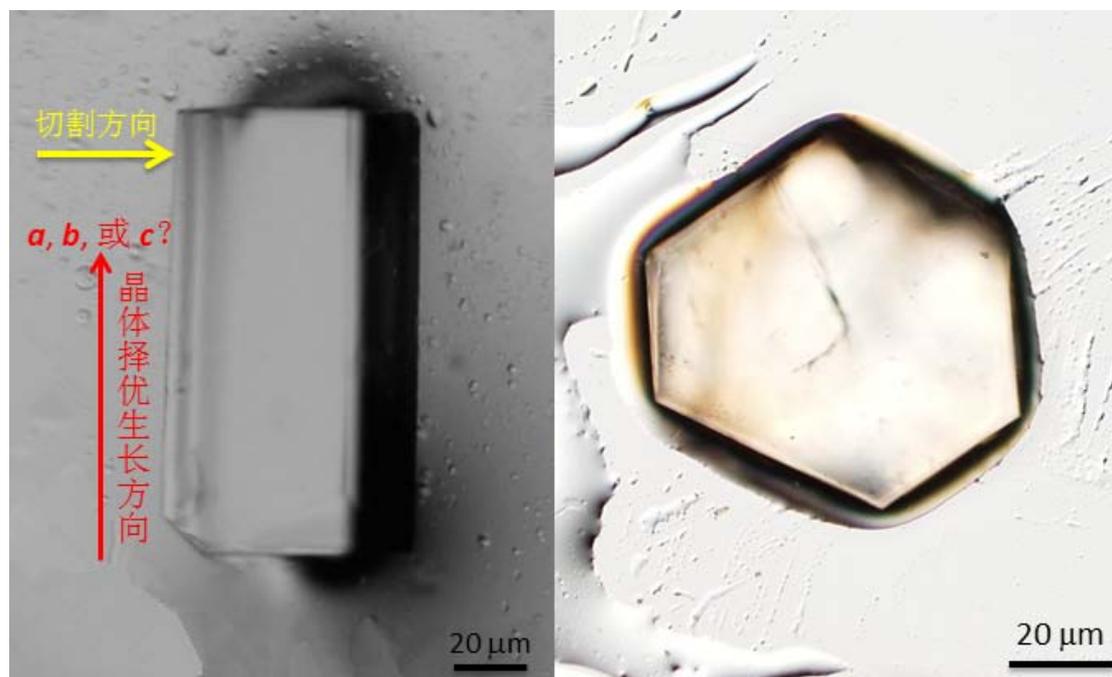
表 1. 多晶型测试结果

多晶型编号	晶体颜色	晶体外型	空间群
I	黄色	薄片	$P2_12_12_1$
II	橙红色	块体	$P2_1/c$
III	橙黄色	块体	$P-1$

除了多晶型外，即使同种晶型（即微观结构完全相同）的晶体，其宏观外形也可能有差异，因为晶体外形的变化除受其微观结构影响外，还与晶体的生长环境有很大关系。因而，虽然晶体外形是晶体微观结构对称性的外在反映，但是，不同工艺流程生产的晶体外形还是可能存在多种变化，并且影响主体密度、机械强度、粒子的流动性、聚合性和混合特性及后续工艺(如过滤、清洗和干燥)的效率。在某些溶液场合，晶体外形还会影响再溶解性，如果是药物晶体，则影响到它的药效。近年来，一些制药、农药化肥和颜料等专业化工过程开始关注寻找预测和控制晶型及晶体外形的方法。

同种晶型，也即微观结构完全相同，但是晶体外形不同，会导致晶体的性质不同，这是因为不同外形的晶体外露的晶面不同，而不同晶面上的原子分布情况必然不同，所以会引起的晶体性质的差异。那么，如何知道这些外露晶面上的原子分布情况呢？答案是需要进行两方面的测试：第一是晶体微观结构测定，也就是确定晶胞参数 a 、 b 、和 c （注意 a 、 b 、 c 是向量）的大小和方向，以及晶胞内的原子坐标；第二是测定外露晶面相对 a 、 b 、和 c 的取向，也即晶面的 Miller 指数。比如，如果某个外露晶面的指数是 (100)，那么就on知道这个晶面的法向即为 a ，根据晶胞中的原子坐标，可以进一步得到该晶面上的原子分布。在基础研究中，测定晶体的外露晶面指数对深入探讨晶体生长机理和调控晶体宏观性质有重要的意义。

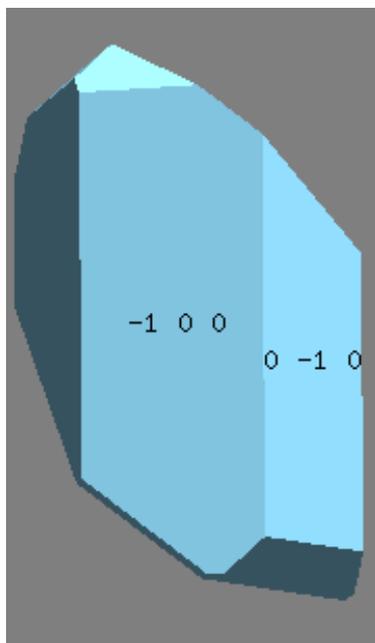
在本文中，研究人员经实验培养得到单晶，晶体外观呈六棱柱形状，如图 1 所示。在研究过程中，研究人员想要确定晶体宏观上沿六棱柱的择优生长方向相应于微观上晶胞的 a 、 b 、或 c 的方向。我们采用单晶与多晶 X-射线衍射联合表征的方法，最终确定了晶体择优生长方向。



● 图 1. 晶体的六棱柱外观照片（左），以及切割后的截面照片（右）。

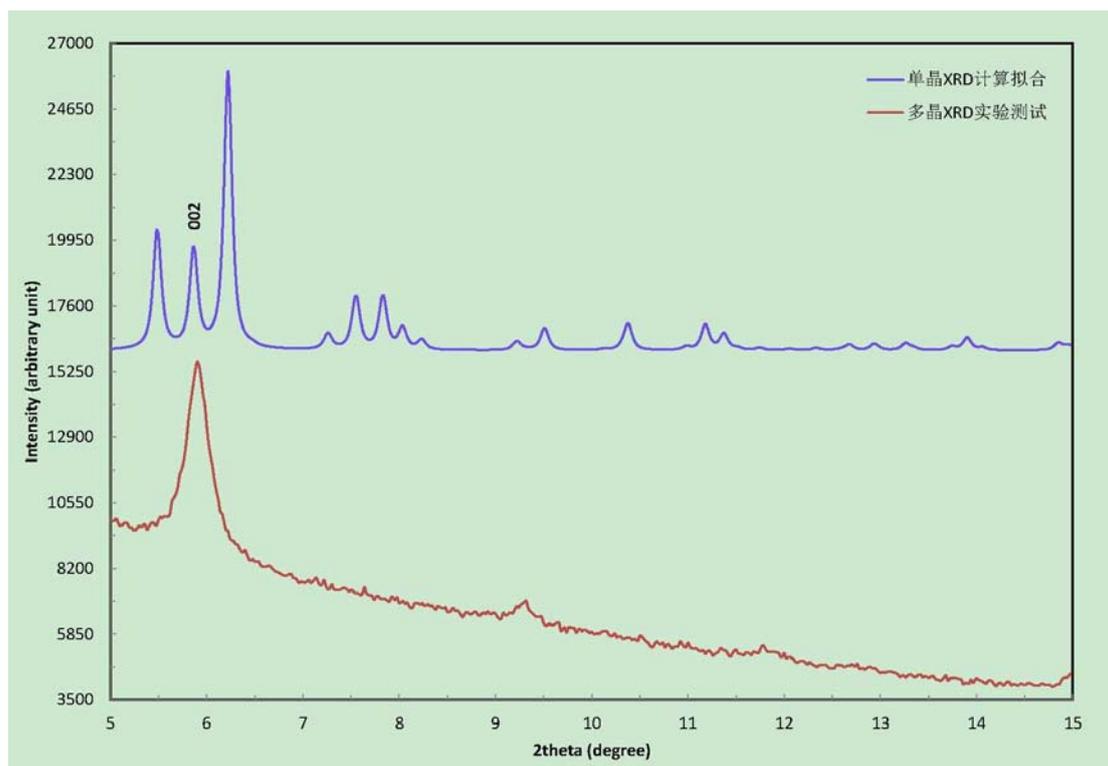
首先采用单晶 X-射线衍射方法，获得取向矩阵，然后通过 Rigaku R-Axis (crystal shape measurement) 软件，拟合出晶体外形，如图 2 所示。由于单晶

测试要求晶体尺寸在一个合理的范围内,因此需要对研究人员提供的晶体进行切割,故拟合得到的晶体外形与晶体六棱柱的外观照片存在一些差异,但是有 2 个晶面,即 $(-1\ 0\ 0)$ 和 $(0\ -1\ 0)$ 晶面,可以清晰看到,据此可基本推断出晶体沿六棱柱的择优生长方向相应于晶胞的 c 方向。



- 图 2. 采用单晶 X-射线衍射方法拟合得到的晶体外形图,以及两个晶面的 Miller 指数。

为了进一步验证这一结论,我们又进行了多晶 X-射线衍射测试。具体方法为:沿棱柱方向将晶体切下一片很薄的六方片状晶体,参看图 1 所示;然后将此薄片状晶体水平放置于零背景单晶硅样品架进行测试,采用的测试几何为 Bragg-Brentano 反射法,扫描方式为 θ/θ 对称扫描,测试中样品保持水平不动。测试结果显示(参看图 3),在全部扫描范围内,只有 $2\theta = 5.91^\circ$ 处有一个强衍射峰,表明切割的薄片状晶体强烈择优。通过与单晶衍射计算拟合得到的图谱比对(参看图 3),可以看出,该衍射峰的指数为 002,据此推断图 1 右侧照片拍摄的六方晶面为晶体的 (001) 晶面,即研究人员欲知的晶体沿棱柱择优生长方向相应于晶胞的 c 方向。



● 图 3. 单晶 XRD 计算拟合曲线与多晶 XRD 实验测试曲线对比图。

综上所述，通过单晶与多晶 X-射线衍射联合表征的方法，确定了晶体的择优生长方向为 c 方向。

致谢：

晶体照片在分析测试中心光谱组完成拍摄，并由王春儒组秦玉、李永健提供。

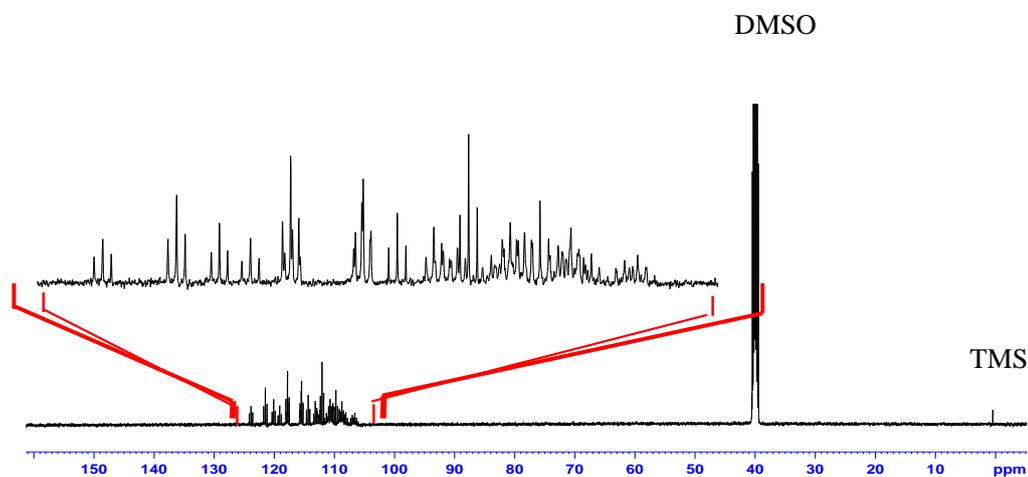
含氟化合物的核磁碳谱表征

► 崔洁 向俊锋

(分析测试中心核磁组 Tel: 010-62627946 Email: jfxiang@iccas.ac.cn)

含氟化合物由于其独特的物理和化学性质，广泛应用于材料、药物、有机化学等相关领域，有关含氟化合物的结构-性能关系研究一直是众多科学家感兴趣的课题。在化学所内，已经有多个课题组从事与氟相关的研究工作。但是含氟化合物的核磁结构表征常常成为拦路虎，很多同学不时咨询含氟化合物的氢谱和碳谱解析。图 1 为一个全氟代辛烷(200mg/ml 溶于氘代 DMSO 溶液中)的过夜碳谱，从分子结构角度来看，通常认为这个化合物的碳谱非常简单，至多只有 8 个谱峰。但实际上，采集了 15 个小时的图谱上有了数十个谱峰，完全颠覆了以往我们对碳谱的认知，原因何在？

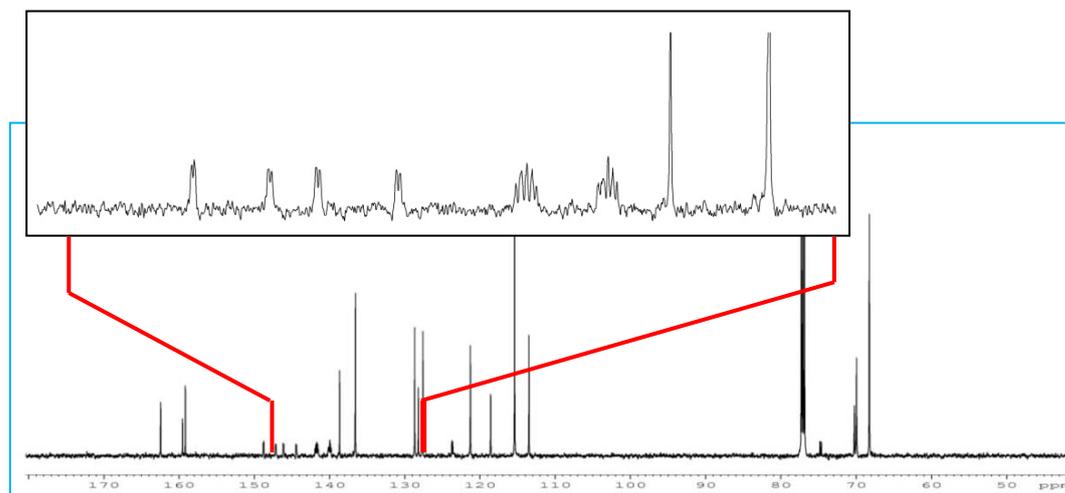
众所周知， ^{19}F 的天然丰度为 100%，磁旋比为质子的 94%，加上其电负性在所有元素中排最前面，它与其它原子核在一起时，往往表现出很强的自旋-自旋耦合。氟原子的核自旋量子数为 1/2，所以氟与相邻的质子和碳原子耦合时，其特点与质子类似，裂分周围相邻的原子核。加上其弛豫时间足够长，可以把自旋-自旋裂分给分辨出来。而且，氟原子的长程自旋-自旋耦合常数数值也不小，特别在碳谱中，它能提供远程的连接信息。但是这种较强的耦合，造成 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 以及杂核 NMR 谱中出现多重谱峰，造成谱峰严重重叠，给结构解析带来极大困难。



● 图 1. 全氟代辛烷的碳谱

(常规测试 ^{13}C NMR, AVANCE III 500 核磁谱仪, 采样 28000 次, 样品浓度 200mg/ml)

碳氟单键耦合常数 $^1J_{\text{CF}}$ 在 162Hz 到 280Hz 之间, 其大小主要受周围的环境所影响。多键耦合常数也比较大, 如芳环体系 $^1J_{\text{CF}}$ 、 $^2J_{\text{CF}}$ 、 $^3J_{\text{CF}}$ 和 $^4J_{\text{CF}}$ 数值一般在 245Hz、20Hz、8Hz 和 3Hz 范围, 因此含 ^{19}F 化合物 ^{13}C NMR, 特别是含多个 ^{19}F 原子的化合物, 图谱非常复杂 (如图 1 所示), 解析难度大。如下图 2 所示常规方法采集的碳谱, 含有众多难以指认的谱峰, 其原因就是结构含有四氟取代苯, 氟与碳的单键和多键耦合, 让图谱变得异常复杂。与该化合物结构相关的工作投稿于 Chem Comm 杂志上, 审稿人认为碳谱过于复杂, 需要清晰指认。为此科研人员希望我们能够帮助解决问题。

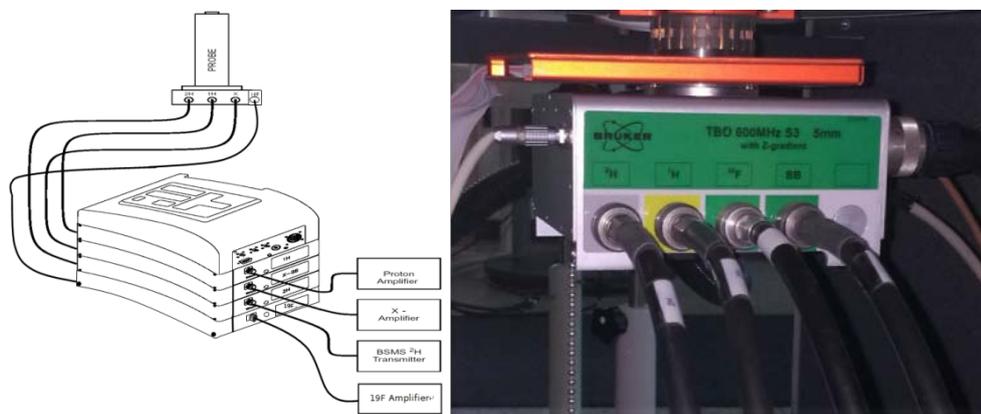


● 图 2. 范青华组样品常规碳谱

根据核磁图谱, 结合分子结构, 审稿人提及的碳谱中包含有多个谱峰, 可能源于化合物结构中所含的多个 ^{19}F 耦合没有消除所致。为了得到理想的碳谱, 除了对质子去耦外, 还需要考虑同时对 ^{19}F 去耦。

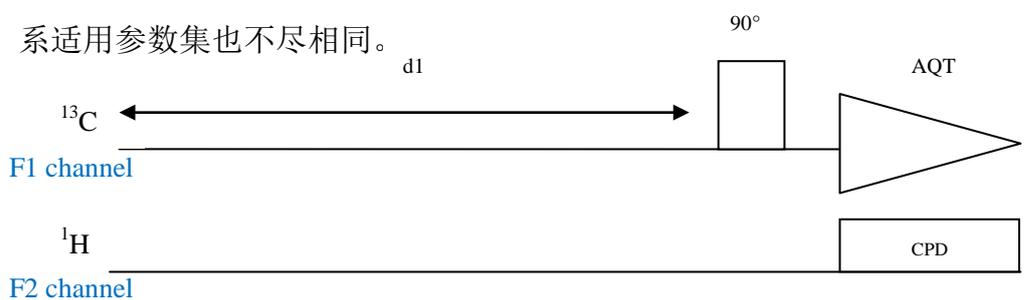
传统意义上的碳谱, 往往只涉及两个通道: ^1H 和 ^{13}C 通道, 即双共振实验。但是对于碳谱中需要对 ^1H 和 ^{19}F 同步去耦实验, 其技术相比于常规的碳谱更为复杂, 两种核同时去耦在技术上实现起来有一定难度, 国内可成功实现此项技术的科研机构也屈指可数。首先, 它要求仪器除了氘通道外, 还具备三个独立的通道 (具体包括三个频率产生单元, 三个功率放大器 (两个高频和一个低频) 以及三

个前置放大器(两个高频和一个低频), 如 ^1H 、 ^{19}F 和 ^{13}C 通道, 分别发射与接收相应频率段的信号, 仪器具有了这样的硬件条件, 才具与实现此技术的基础。核磁室购置的 TBO 三共振正相探头(如图 3 所示), 配有四个通道: ^2H 、 ^1H 、 ^{19}F 、BB (^{15}N - ^{31}P), 独立的 ^{19}F 通道, 可实现 ^1H 和 ^{19}F 同步去耦。

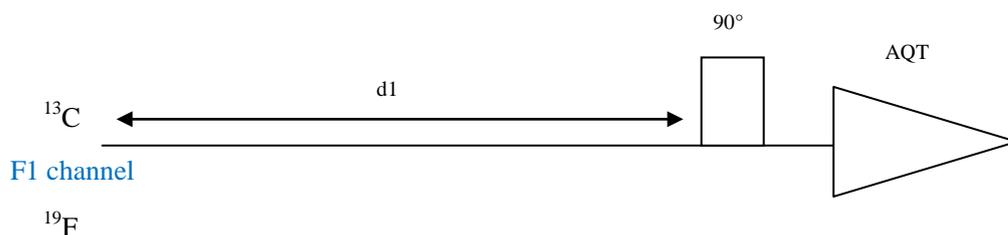


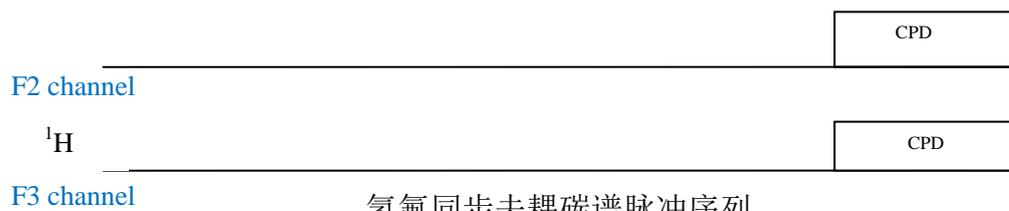
● 图 3. 四通道 TBO 探头

^1H 和 ^{19}F 同步去耦实验, 将现有的两通道实验扩展到三通道, 脉冲序列也需要改进, 具体如图 4 所示。它涉及三种核, 三个通道同时进行实验, 对应的参数项增加。与去耦实验相关的去耦核的中心频率、去耦方法、去耦功率、去耦脉宽、去耦时间间隔。 ^1H 、 ^{19}F 的谱图范围相差大, 参数也分别设置。不同于其他常规的一维谱, ^1H 和 ^{19}F 同步去耦实验需在氢谱和氟谱的基础上, 根据实际出峰范围、谱峰宽度, 设置相关去耦参数, 反复的优化, 得到简化的谱图, 因此, 不同的体系适用参数集也不尽相同。



常规碳谱脉冲序列



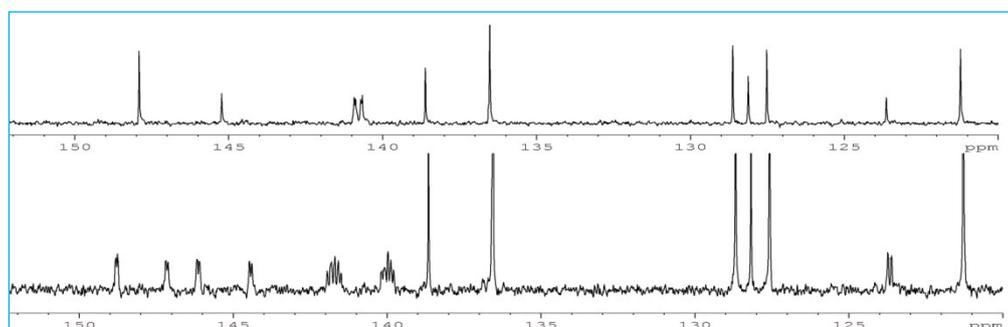


氢氟同步去耦碳谱脉冲序列

● 图 4. 碳谱脉冲序列图

(常规对氢去耦碳谱 (上) 和氢氟同步去耦碳谱 (下))

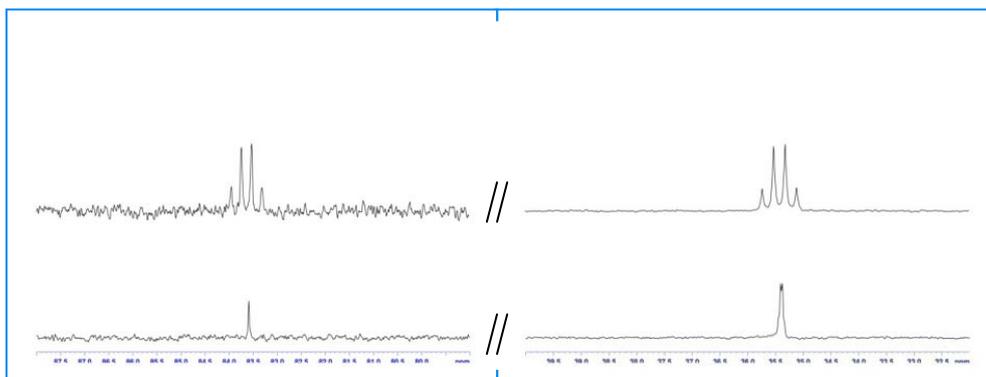
首先, 图 2 中的化合物, 进行 ^1H 和 ^{19}F 同步去耦实验条件的摸索, 经过十几个小时的仪器硬件匹配与参数调整, 最终得到了非常清晰、简洁的碳谱 (图 5 所示)。



● 图 5. 范青华组样品去耦效果

(常规对氢去耦碳谱 (下) 和氢氟同步去耦碳谱 (上))

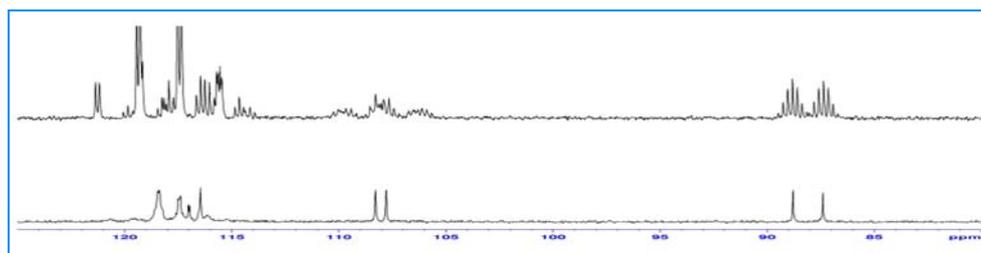
此外, 我们把这个技术继续在其它已知化合物上进行多次尝试 (如图 6), 在来自多个课题组的几十种化合物上得到了很好的验证。



● 图 6. 罗三中组样品去耦效果

(常规对氢去耦碳谱 (上) 和氢氟同步去耦碳谱 (下))

之后, 帮助解决了一些未知含氟化合物的核磁表征工作, 大大的简化了谱图 (如图 7), 对结构解析起到了一定帮助。



● 图 7. 张志杰组未知结构的含氟化合物

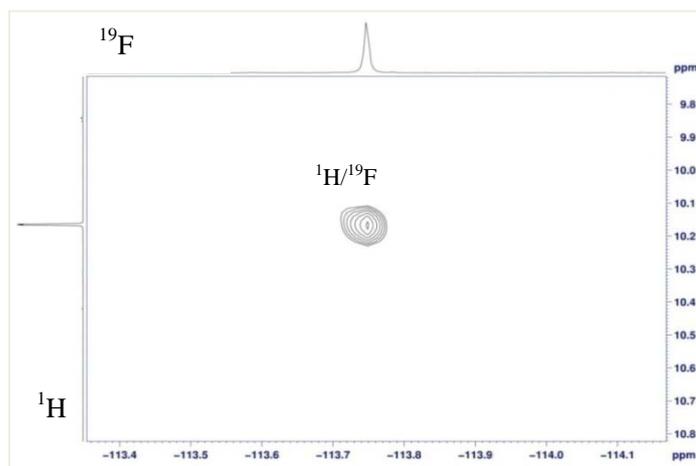
(常规对氢去耦碳谱 (上) 和氢氟同步去耦碳谱 (下))

经过近一年时间摸索与尝试, 已经建立起氢氟同步去耦方法, 广泛的应用到了所内外的多个体系研究中, 帮助解决的几类与含氟化合物表征相关的解析问题: 1、 ^{19}F 的耦合作用导致 ^{13}C NMR 谱峰严重重叠; 2、 ^{19}F 的耦合作用导致邻近 ^{13}C NMR 谱峰消失; 3、 ^{19}F 的耦合作用导致 ^1H NMR 谱峰重叠; 4、 ^1H 的耦合作用导致 ^{19}F NMR 裂分复杂; 5、 ^{13}C NMR、 ^1H NMR 归属不清的情况下, 将去耦前后的谱图进行比较, 根据耦合常数及裂分模式, 帮助结构分析。

此外, 除氢氟同步去耦碳谱、对氟去耦氢谱及对氢去耦的氟谱外, $^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{13}\text{C}$ 其他相关实验, 如氢氟二维相关谱、氟碳二维相关谱也会为结构解析提供无可替代的作用。如下图 8 所示, 我们在上面工作基础上发展出的 ^1H 、 ^{19}F 空间相关谱 (HOESY) 为同分异构体的指认提供了最直接证据, 确定了最终结构为结构 A。HOESY 的成功实现, 为 ^1H 、 ^{19}F 、 ^{13}C 其他相关谱 (COSY、HMBC、HSQC、...) 的建立提供了可能性。

结构 A

结构 B



● 图 8. ^1H - ^{19}F HOESY (heteronuclear NOE spectroscopy) 为同分异构体指认提供最直接证据

但我们在实际测试中也遇到了一些实验技术无法解决的难题。目前, AVANCE 600 核磁谱仪中, ^{19}F 通道的最大允许功率无法完全覆盖 ^{19}F 的谱峰范围(近千 ppm), 不能被全部激发 ^{19}F , 导致去耦不完全, 因而去耦效果并不理想。在测试中已经遇到多次, 此为仪器硬件所限, 需仪器硬件升级才能完全实验。但不管怎样, 我们摸索出的 ^1H 、 ^{19}F 与其它杂核相关的技术为我们研究含氟化合物提供了新的测试技术, 相信在所里的支持下, 我们将为化学所的科研工作提供更高质量的支撑。

参考文献:

1. Zhi-Xiong Liu, Yu Feng, Hui Chen, Yan-Mei He and Qing-Hua Fan, Chem. Commun., 2016, 52, 2269--2272
2. William R. Dolbier, Guide To Fluorine NMR For Organic Chemists, John Wiley & Sons, Inc., 2009
3. Teodor Parella, Pulse Program Catalogue: 1D & 2D NMR Experiments, Bruker BioSpin GmbH., 2010
4. Peter Ziegler, Advanced NMR Methods User Manual, Bruker Biospin Corporation, 2010

致谢

感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工!

低温透射电镜技术的应用

▶ 梁丽荣 关波

(分析测试中心电镜组 Tel: 010-62588935 Email: guanbo@iccas.ac.cn)

1. 低温透射电镜技术概述

低温透射电镜技术是在低温下（通常在 90K）将液相样品中的水或其它溶剂快速冷冻固定后，在低温环境下使用透射电镜进行观察的技术。低温透射电镜实验要求样品在制样、传输和观察整个过程中都保持在低温状态（通常低于 100 K），相对于常温透射电镜，其优势有：1)快速冷冻制样技术将样品固定在玻璃态的冰层中，避免了水或溶剂结晶对样品结构的破坏，能够保持液相中有机分子自组装体和化学反应中间体的微观结构，避免了样品干燥引起的结构变化；2)高分子及化学反应体系常常具有非平衡态结构，快速冷冻制样技术能够保持住非平衡态结构，进而得以观察；3)低温条件能够尽可能保持有机和高分子等软物质材料的微观结构，显著减少电子束对样品的损伤。

2. 系统组成及操作流程

分析测试中心电镜组利用现有仪器（Leica EM GP 全自动载网投入冷冻仪、Gatan 626 单倾冷冻传输样品杆、Jem-2011 透射电镜等），开展了低温透射电镜工作。具体操作流程如下：



Leica EM GP/EM HPM 100



Gatan 626

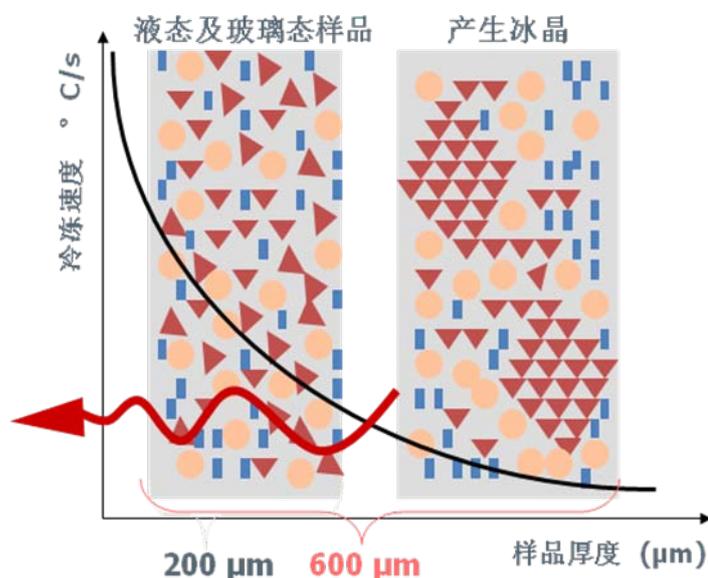


Jem-2011

2.1 冷冻制样

冷冻制样的关键是要在载网上得到厚度合适的玻璃态的冰层。冷冻环境下，样品中溶剂（水）的粘性会显著提高，在极高的粘性下，所有样品组分包括水都被完全固定，不能移动。但是，当水分子结晶形成冰晶，就会破坏样品的结构，因此，要阻止冰晶形成，使得水成为玻璃态(vitrified)，或者称之为非结晶态冰（无定形冰）。

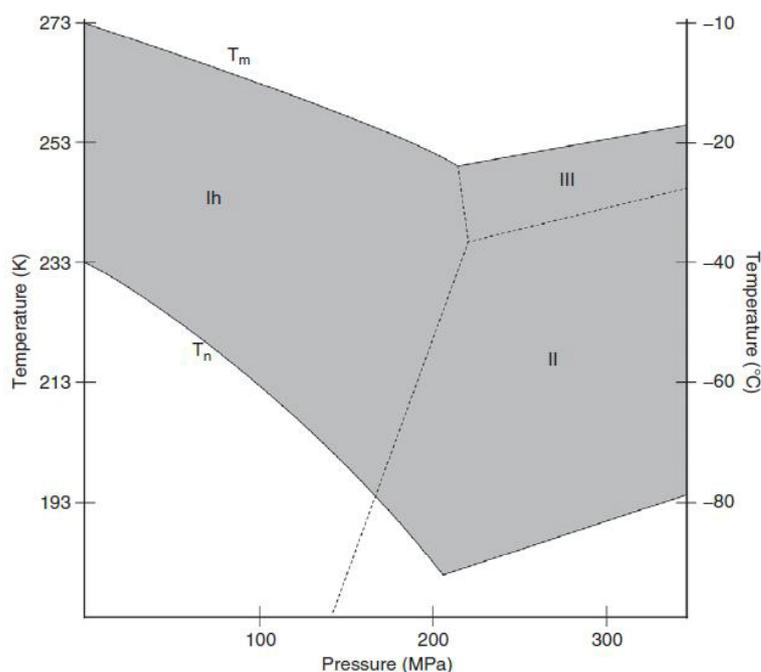
水结晶的条件包括：（1）温度必须低于熔点（常压下水容易形成过冷水，从 231 K 开始结晶）；（2）具有晶核；（3）有足够的能量，高于重结晶温度(常压下，纯水的重结晶温度约为 136K, 低于这一温度，水分子没有足够的能量进行分子重排，从而无法结晶)；(4)有足够的时间分子重排。纯水在 231 K~136K 的温度范围内经过一定的时间可以结晶形成冰晶，所以要得到玻璃态的冰，就需要降温时迅速通过这一温度范围，即要求快的冷冻速率和尽可能窄的结晶温度范围。



● 图 1.冻冷速率随样品厚度的变化图

对于一定的样品而言，水的热扩散率和样品厚度决定了样品的冷冻速率^[1,2]。在常压情况下，只有当冷冻速率大于 5×10^5 K/s，才有足够的时间提取热量防止冰晶产生。同时，水的热扩散率很差，对于较长距离，热量无法有效释放(图 1)。例如，对于 600 μm 厚的含水样品，即使其表面冷冻速率达到理论临界冷冻速率

($> 5 \times 10^5$ K/s)，在距离样品表面 $150 \mu\text{m}$ 处，冷冻速率也会降低到低于 1000 K/s。因此，在常压下，很难形成较厚的玻璃态的冰层。20 世纪 70 年代，Moor 引入了高压冷冻固定法^[3,4,5,6]。增加压力到一定程度可显著降低水分子的成核温度，缩短水的结晶温度区间（图 2），从而增加了冷冻固定样品的厚度。



● 图 2.水的相图^[7]

在常压下， 100nm 厚水膜可以被有效玻璃化冷冻^[8]，满足此条件的样品可以选择投入式快速冷冻制样法。高压条件下，可以有效固定 $200 \mu\text{m}$ 以下的厚水膜^[1,9,10]，适合此条件的样品可以选择高压冷冻技术制样法。

2.1.1 投入式快速冷冻制样

投入式快速冷冻制样是液相样品进行冷冻固定的基本方法，是将样品快速插入到液态乙烷中(90K ，以液氮冷冻)，使样品中的水/其他溶剂快速冷冻(冷冻速度可达 $10,000 \text{K/s}$)固定于电镜载网上，此过程中水和其它溶剂不结晶成为玻璃态(vitrified)，能够最大限度的保持样品的结构。这种制样方法要求样品大小、厚度、粘度等不能太大，否则可能会出现样品脱落，电子束无法穿透样品，不能通过自动吸附过程得到厚度合适的样品薄膜等情况。

在投入式快速冷冻技术中，采用将载网以自由落体的形式快速投入到冷冻剂中的方式，是因为成功的冷冻固定取决于冷冻过程是否能够迅速通过水结晶的温度范围，要求冷冻速度太快以至于水来不及结晶。冷冻剂选择的是在液氮“水浴”环境中的液化乙烷。乙烷的比热比氮气的比热更大，冷冻速度更快；乙烷的沸点比氮气高，在液氮“水浴”环境中可以液化，得到一个更加稳定且快速的冷冻环境。

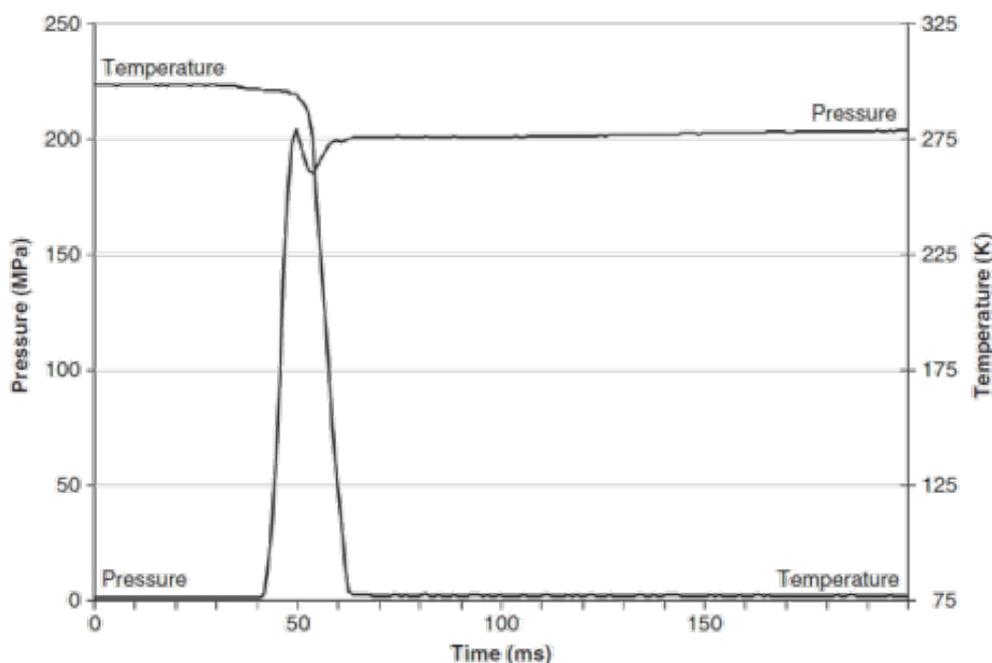
具体操作步骤为：将载网（一般选用 GiG-C321 型号的微筛阵列碳支持膜）置于一个温度/湿度可控的环境仓中，温度可在 279K- 335K 之间调节，湿度可在大气湿度到 99% 调节（图 3a, 3b）。在电镜载网上滴加样品悬液后（通常 3 μ L，图 3a），通过滤纸自动吸附过程吸走一些样品留下适量样品形成电子束能够穿透的薄膜，然后载网被快速投入液态乙烷中进行冷冻（图 3c）。在投入冷冻完成后，将载网快速转移到样品盒并保存在液氮中，用于后续观察。



● 图 3.a)在可控的样品环境仓内向载网上滴加样品 b) 可编程的参数设定 c)液化乙烷的头部液化装置

2.1.2 高压冷冻制样

在常压下，技术改进并不能帮助玻璃化冷冻更厚的样品。而高压条件下，降低了水的结晶温度范围和临界降温速率，使得到的有效玻璃化厚度更大。因此要制备尺寸较大、粘度较高的样品，需要通过加压来实现。



● 图 4. Leica EM HPM100 型高压冷冻仪冷冻曲

从 Leica EM HPM100 型高压冷冻仪冷冻曲线图^[11]中，我们可以看出，在 10 ms 内，压力升高至 200MPa，一旦达到所需压力值，温度开始下降（从 310K 开始），当温度降至晶核形成温度（181K）直到温度低于约 136K，这一温度区间内，冰晶可以形成。对于 200 μm 厚的样品，样品中心区域通过这一温度区间大约需要 30ms，压力平均值 204.5MPa。

高压冷冻方法是目前唯一能够将玻璃化的厚达 200 μm 的冷冻固定方法。由于高压冷冻的样品较厚，无法直接进行透射电镜观察，因此在冷冻固定后，需要使用冷冻超薄切片机在冷冻状态下超薄切片，制得适合透射电镜观察的样品方可进行冷冻透射电镜观察。高压冷冻固定技术由于样品冷冻固定的时间必须要足够快（小于 50 毫秒），所以局限是对样品的大小有限制（直径：1-2mm，最大厚度：200 μm ）^[7]

2.2 冷冻传输

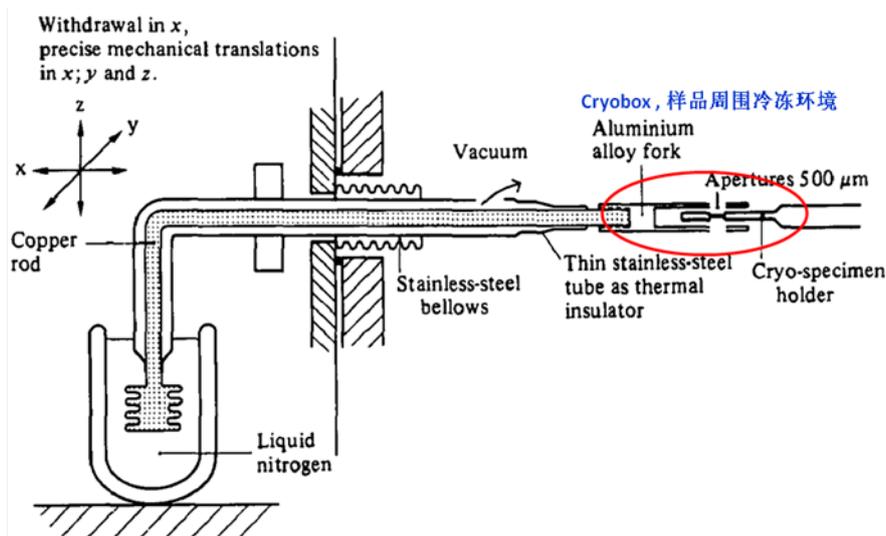
将制得的冷冻透射样品，在液氮中转移至低温样品装载装置，置于冷冻样品杆上，样品固定好之后，快速的将样品杆拔出转移到透射电镜中。在样品转移和观察中保持在低温环境（通常低于 100K）。

冷冻传输系统保证了样品从装入样品杆到进入电镜的整个过程中都处于一个低温并且相对洁净的环境中，避免样品在转移过程中因为温度的改变被破坏或者因为暴露在大气中被污染。

2.3 低温透射电镜样品的测试

目前，分析测试中心电镜组是利用冷冻传输样品杆在透射电镜 Jem-2011 上实现低温透射电镜样品的测试，可以满足一部分样品的测试需求，但是由于这台电镜为普通透射电镜，所以样品的漂移稳定性较差，而且无法使用低剂量技术致使很多样品的冰层容易破坏，所配置相机成像的衬度也有限，很多低衬度样品无法进行观察。为了获得高分辨率、高衬度的结果，分析测试中心今年将引进一台专门的低温透射电镜（Cryo-TEM），与普通透射电镜相比，专业的低温透射电镜的极靴是冷冻型极靴，即在极靴部分增加了一个冷冻盒（图 5）。冷冻盒可以保持样品周围的低温环境，既减少了样品上冰(晶)沉积引起的污染，也大大减少了样品的漂移，同时配备高性能相机，显著提高成像的衬度和速度。

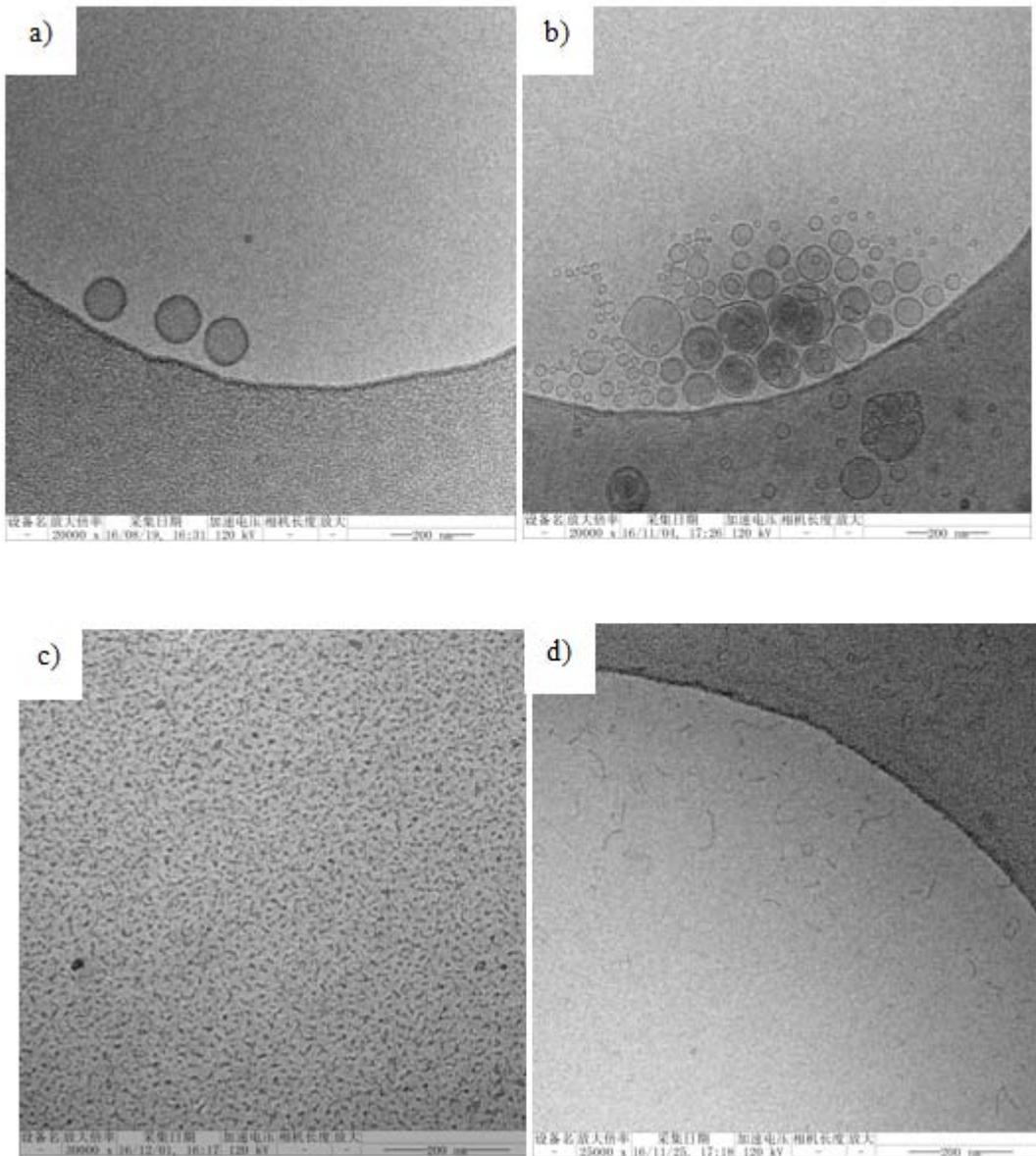
具体地，低温透射电镜的特点包括：（1）分辨率更高，可以得到更好的高分辨成像；（2）可以使用较低的电子束，精确控制电子剂量使冰层不被打坏；（3）漂移稳定性好，可以长时间的有效采集数据并进行三维重建；（4）可选择过滤特定的能量，去除杂散/背底信号，提高衬度，提高信噪比；（5）可通过增加相位板、高性能相机等配件进一步提高样品衬度及空间分辨率。



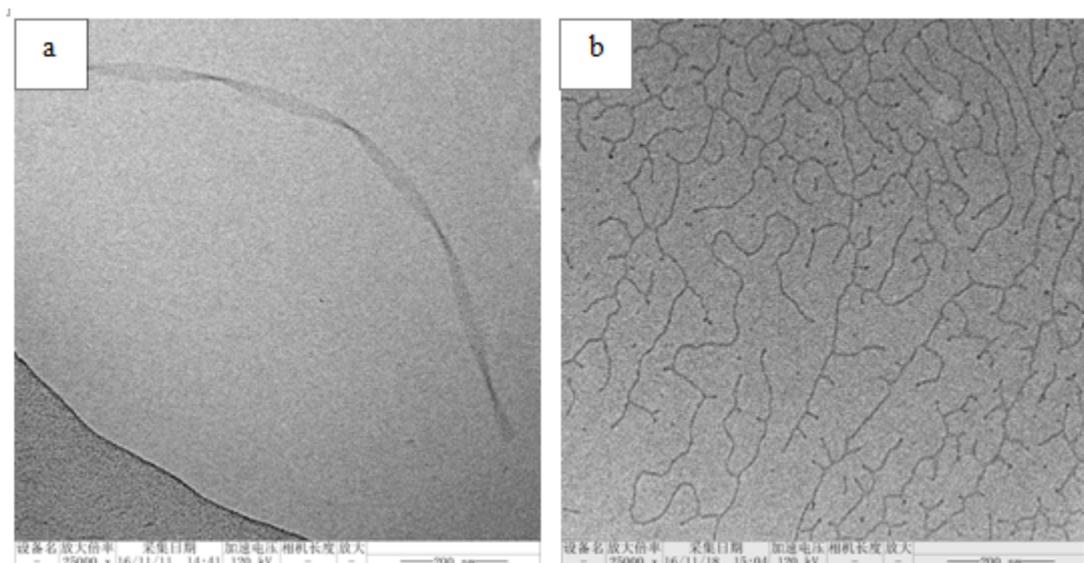
● 图 5. 低温透射电镜的冷冻极靴示意图

3. 低温透射电镜应用实例

胶束体系对于浓度、pH、添加剂种类等液相环境条件的变化非常敏感，如果是干燥状态其结构与有液相完全不同，因此必须用低温透射电镜表征其结构。通常情况下，胶束有球状、囊泡状、棒状、层状、六角束状、洋葱状、蠕虫状等多种形状，图 6 是分析测试中心电镜组用现有的低温透射电镜系统观察得到的囊泡及球状、棒状、短线状胶束的透射电镜图，可以看出应用冷冻透射电镜技术，囊泡、胶束的结构被原位的真实呈现出来，可清晰地观察到囊泡的完整性、分布、大小、融合等情况，而在普通电镜条件下，干燥后的囊泡的形状、结构很容易发生变化。



● 图 6. 应用分析测试中现有的低温透射电镜系统得到的透射电镜图 a) 囊泡 b) 融合囊泡 c) 球状、棒状胶束 d) 线状胶束



● 图 7.应用分析测试中现有的低温透射电镜系统得到的透射电镜图 a)带状聚合物 b)线状聚合物

同样，低温透射电镜也能够有效保持聚合物在液相的形态，如图 7 是应用我们现有的低温透射电镜系统得到的带状、线状聚合物的电镜图，可清晰地观察到聚合物的形态及聚集状态。

目前，低温透射电镜在生物大分子的成像尤其是蛋白结构的解析方面已经取得了诸多突破的成果，相信在化学分子材料领域也会展现很好的应用前景。

参考文献

- [1] Studer, D.; Michel, M.; Wohlwend, M.; Hunziker, E.B. and Buschmann, M.D. *J. Microsc.* **1995**, *179*, 321.
- [2] Shimoni, E.; Muller, M. *J. Microsc.* **1998**, *192*, 236.
- [3] Moor, H. *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. Berlin: Springer-Verlag, 1987.
- [4] Moor, H.; Bellin, G.; Sandri, C. and Akert, K. *Cell Tissue Res.* **1980**, *209*, 201.
- [5] Moor, H.; Hoehli, M. **1970**, *1*, 445.
- [6] Riehle, U. and Hoehli, M. “*Freeze-Etching Technique and Applications*” Paris: Soc. Franc. Microsc. Elect, 1973.

- [7]Kanno, H.; Speedy, R. J. and Angell, C. A. *Science*, **1975**, *189*, 880.
- [8]Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. and Schultz, P. *Quart. rev. biophys.* **1988**, *21*, 129.
- [9]Sartori, N.; Richter, K. and Dubochet, J. *J. Microsc.* **1993**, *172*, 55.
- [10]Semmler, K.; Wunderlich, J.; Richter, W. and Meyer, H. W. *J. Microsc.* **1998**, *190*, 317.
- [11]Dimitri, Vanhecke.; Werner, Graber.; Daniel Studer. *Methods in cell biology.* **2008**, 88.

致谢

感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工！

Flash EA 1112 元素分析仪 CHN 分析应用新发现

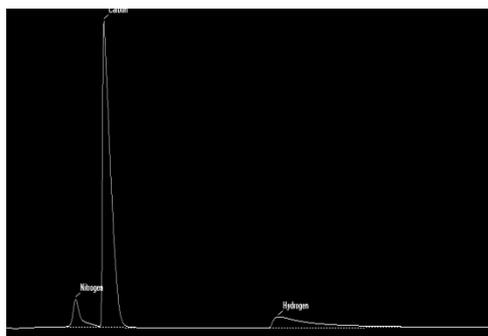
► 宗文杰

(分析测试中心元素分析组 Tel: 010-62554625 Email: wjzong@iccas.ac.cn)

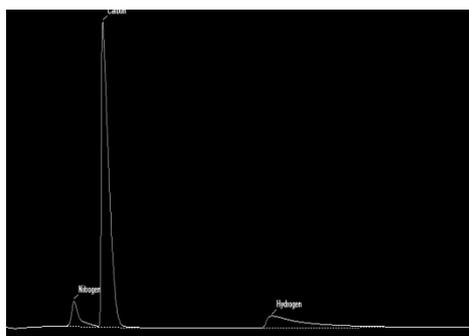
Flash EA 1112 元素分析仪在 CHN 的测试中，仪器升温稳定后，开始做条件化的样品，用以调整整个仪器的测试体系。体系是否完全符合测试要求，一方面通过直接观察色谱峰中 N_2 峰与 CO_2 峰是否完全分离，另一方面通过数据判断。

由于 Flash EA 1112 元素分析仪使用年限较长，调整仪器达到正常测试状况的时间逐渐延长，解决好这个问题，不仅可以减少条件化样品的次数，提高分析测试效率，更主要的是保障分析数据的准确。

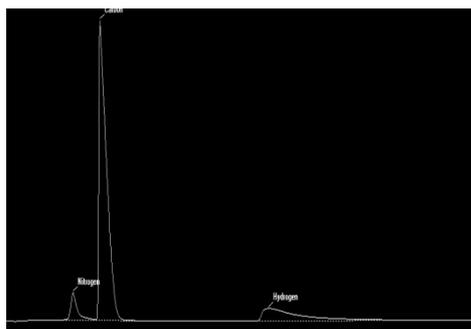
通常情况下，CHN 测试色谱峰图（图一至图四）：



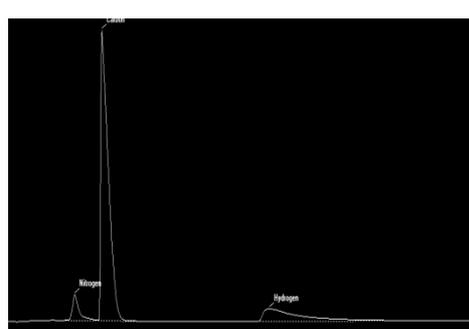
● 图一



● 图二



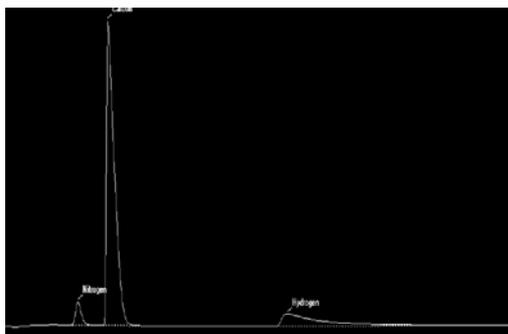
● 图三



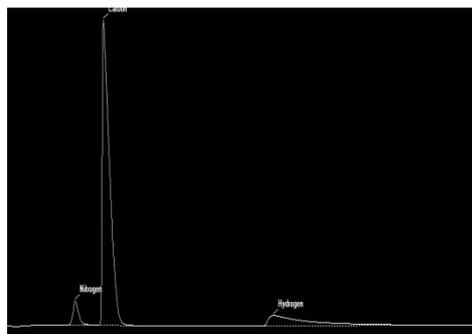
● 图四

以上 4 个色谱峰图，是测试前样品 1#-4# 没有采取任何措施的色谱峰图，很明显看出 N_2 峰有明显拖尾现象，虽然 N_2 峰的拖尾现象逐次略有好转，但要完全达到 N_2 峰不拖尾现象，还要做多次这样的条件化样品，才能达到正常分析测试要求。

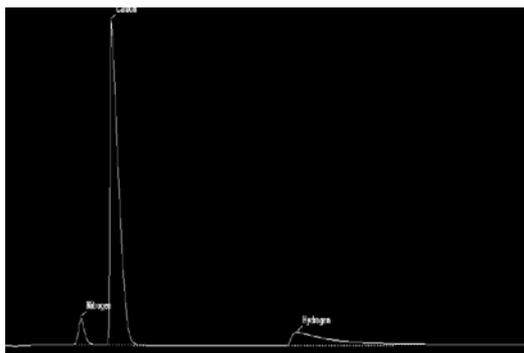
针对以上这种情况，通过多次反复试验，采取仪器升温稳定后，将氧气出气口打开，排放一定量的氧气，然后开始进行条件化样品的测试，发现第一次的条件化样品 N_2 峰拖尾现象就有了明显改观，只需要 5 次的条件化样品，就可以进行正常的分析测试。图五至图八是排放氧气后 1#-4# 条件化样品的色谱峰图：



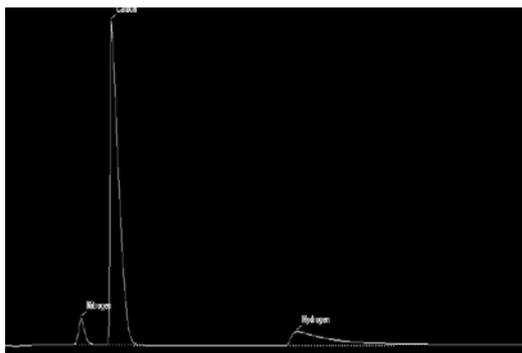
● 图五



● 图六

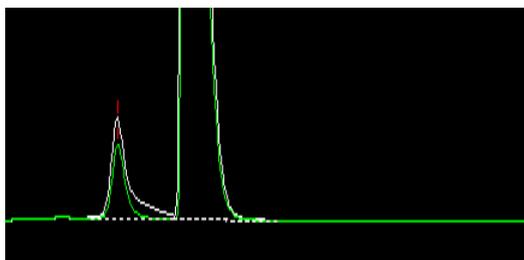


● 图七

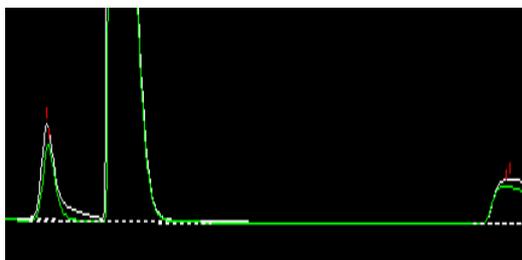


● 图八

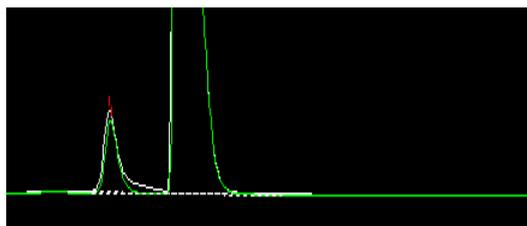
将不排放氧气与排放氧气后的样品的色谱峰图一一对应作比较，见图九至图十二，更能清晰看出 N_2 峰的不同。白色图为没有排放氧气的样品的色谱峰图，绿色为排放氧气后的样品的色谱峰图。白色较绿色的 N_2 峰有明显的拖尾现象。



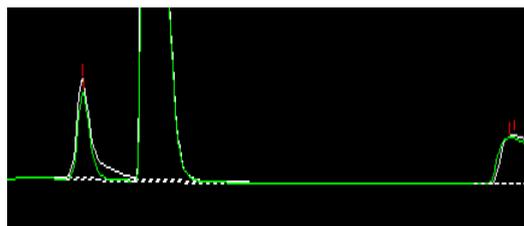
● 图九



● 图十

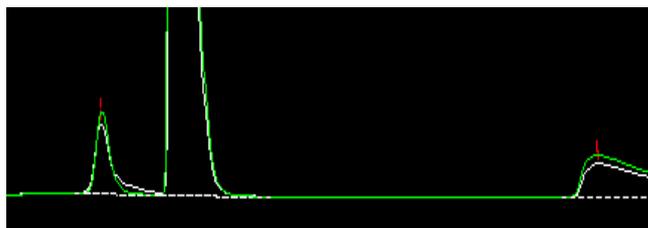


● 图十一



● 图十二

我们再对同一天相邻的 2 次样品,不排放氧气与排放氧气的色谱峰图做一比较,见图十三:



● 图十三

白色图为没有排放氧气的样品的色谱峰图,绿色为排放氧气后的样品的色谱峰图。可以看出,即便是相邻 2 次的样品排放氧气之后的 N_2 峰的色谱峰图明显好于不排放氧气的色谱峰图。

以上是通过观察样品 N_2 峰的色谱峰的拖尾情况进行正确的分析判断,在数据上也得到了证实(见下表分析数据)。

不排放氧气的测定数值:

	Sample name	Filename	Nitrogen	Carbon	Hydrogen
	乙酰苯胺标准值		10.36	71.09	6.71
1	乙酰苯胺	20161209-000-01	15.61623955	71.1492844	6.721208096
2	乙酰苯胺	20161209-000-02	15.47349072	71.0651779	6.611742025
3	乙酰苯胺	20161209-000-03	13.78824997	71.1668707	6.547723772
4	乙酰苯胺	20161209-000-04	13.60725307	71.0622386	6.713963018
5	乙酰苯胺	20161209-000-05	14.14739132	71.2812347	6.766943703

从以上数据可以看出,在不排放氧气的情况下,由于 N_2 峰的拖尾现象,导致 N 的百分含量比理论值高出 3%-5%,需要在做多次这样的条件化样品才能够达到准确分析测试的要求。

排放氧气后的测定数值:

	Sample name	Filename	Nitrogen	Carbon	Hydrogen
	乙酰苯胺标准值		10.36	71.09	6.71

1	乙酰苯胺	20161213-200-01	10.68967533	70.5003128	5.736080647
2	乙酰苯胺	20161213-200-02	10.25130463	71.0369034	6.383642673
3	乙酰苯胺	20161213-200-03	10.29098892	70.6849899	6.480526257
4	乙酰苯胺	20161213-200-04	10.32500458	70.8800812	6.430068970
5	乙酰苯胺	20161213-200-05	10.25322914	70.7223282	6.646811485

从数据上看排放氧气后的 N 的数值只第一次的分析数据高于理论值+0.32 外，其余全部在 0.30%之内。

通过以上实验，充分证明 Flash EA 1112 元素分析仪，在 CHN 的测试中，待仪器升温稳定后，采取在氧气出口处排放一定的氧气量的方法，能够起到缩短 N₂ 峰与 CO₂ 峰完全分离的时间，提高了分析测试效率，保障了分析数据的准确可靠。

冷冻扫描电镜技术的应用

▶ 刘扬 关波

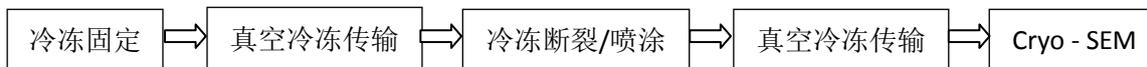
(分析测试中心电镜组 TEL: 010-62588935 Email: guanbo@iccas.ac.cn)

1. 冷冻扫描电镜概述

常规扫描电镜要求所观察的样品无水,而一些样品在干燥过程中会发生结构变化,致使无法观察其真实结构。冷冻扫描电镜技术能够对含水(溶剂)样品进行成像和分析,实现对于液态样品(如乳液、囊泡等)及不耐电子束损伤样品的微观形貌的观察。在冷冻扫描电镜观察前,液态样品经过低温冷冻固定、断裂、镀膜(喷金/喷碳)等制样处理后,再通过冷冻传输系统将其置于电镜内的冷台(温度可至-185℃)即可进行观察。其中,快速冷冻技术可使水在低温状态下呈玻璃态,减少冰晶的产生,从而不影响样品本身结构,冷冻传输系统保证样品传输过程中保持低温状态,整个系统从制样到观察都在低温下进行,尽可能保持样品在液相中的原位结构。

2. 系统组成及流程

冷冻扫描电镜系统包括冷冻固定、冷冻断裂、升华及导电性喷涂等制样设备,冷冻传输装置及扫描电镜的冷台,样品首先经过高压冷冻或液氮泥方法进行冷冻固定,然后在冷冻条件下传输到真空溅射仪中进行断裂,露出样品新鲜的断裂面,并根据样品情况进行升华防止表面被冰包覆,之后进行导电性喷涂,至此制样完成,通过冷冻传输系统将样品置于扫描电镜的冷台进行观察。分析测试中心电镜组现有的冷冻扫描电镜系统包括高压冷冻仪 Leica EM HPM100、冷冻传输样品杆 Leica EM VCT100、离子溅射仪 Leica EM ACE600、自制的液氮泥冷冻装置、冷冻扫描电镜用的冷台。



高压冷冻仪

Leica EM HPM100

冷冻传输样品杆

Leica EM VCT100

离子溅射仪

Leica EM ACE600

冷冻扫描电镜冷台

液氮泥冷冻装置

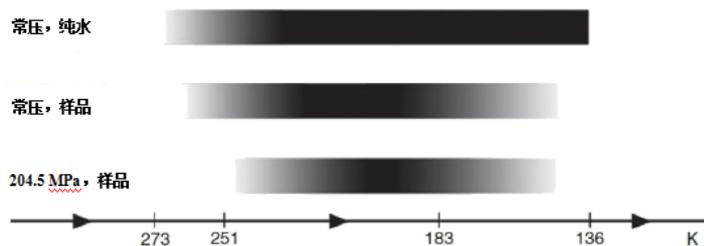
Nitrogen slush freezer

2.1 冷冻固定

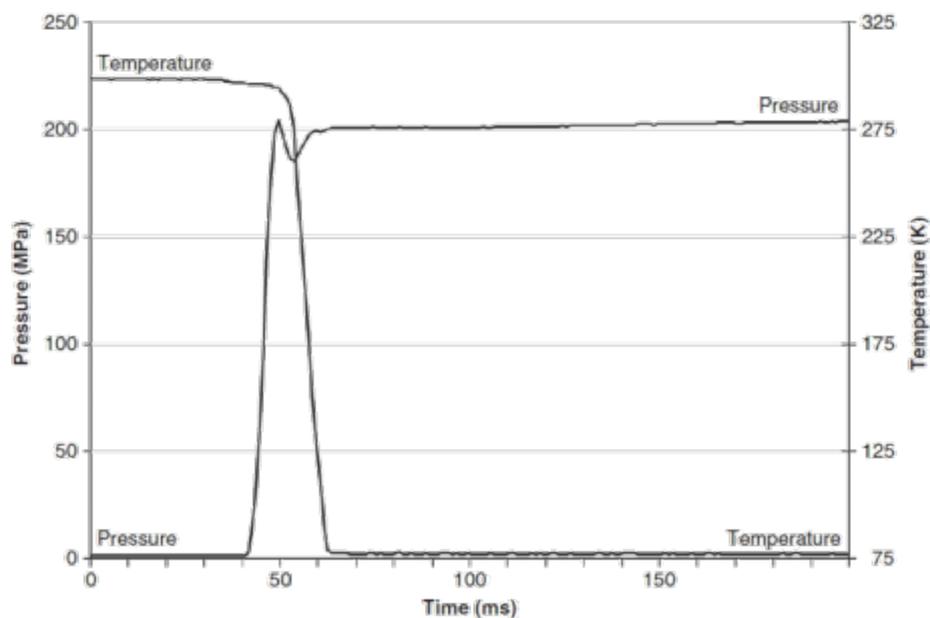
2.1.1 高压冷冻固定

冷冻固定的目标是在低温下使液态样品中的水不结晶而呈玻璃态，这样既能将样品在液相的状态固定，又避免了水结晶引起样品结构的破坏。因此，冷冻固定的关键是要阻止冰晶形成，冷冻固定是否成功，取决于冷冻过程迅速通过一个温度范围，即水开始结晶的温度到开始重结晶的温度区间，此区间受环境压力、样品浓度等因素的影响。如图 1^[1]所示，第一行是常压下的纯水，从 273 K 开始结晶，因考虑到过冷水的作用，所以从 231 K 开始结晶，当温度低于重结晶温度 136 K 时，结晶过程停止。第二行是常压下的样品，通常样品包含溶质会降低样品的熔点（与溶质浓度有关系），同时提高重结晶温度，使得结晶的温度区间减小。第三行是施加 204.5 MPa 压力的样品，可以看出，施加高压会进一步降低样品的熔点且提高重结晶的，所以结晶的温度区间进一步减小。

因此，可用高压冷冻的方式将液态样品进行快速冷冻固定，具体如图 2^[1]所示，在 10ms 内，压力由常压瞬间升高至约 200 MPa，同时用液氮使样品温度迅速下降，当通过水的结晶区间，直到温度低于约 136 K 后，即形成玻璃态的水。对于 200 μm ^[3]厚的样品，样品中心区域通过这一温度区间大约需要 30 ms。



● 图 1. 冷冻固定时，溶质浓度和压力对水结晶温度区间的影响示意图



● 图 2. 高压冷冻仪冷冻曲线

具体操作流程如下，用移液枪将待测样品滴入冷冻样品夹片的下片，下片中有凹槽，可储存一定量的液体样品，然后盖上夹片上片，组成一个三明治结构，上下两片的材质均为铜镀金，之后将载有样品的整个夹片置于绿色的固定片上，推入高压冷冻仪中即可进行高压冷冻固定（图 3），每次进行一次高压冷冻，仪器会生成一条冷冻曲线，根据曲线中达到目标压力和温度的时间可初步判断冷冻固定的效果。



● 图 3. 高压冷冻仪样品装载图

2.1.2 液氮泥冷冻固定

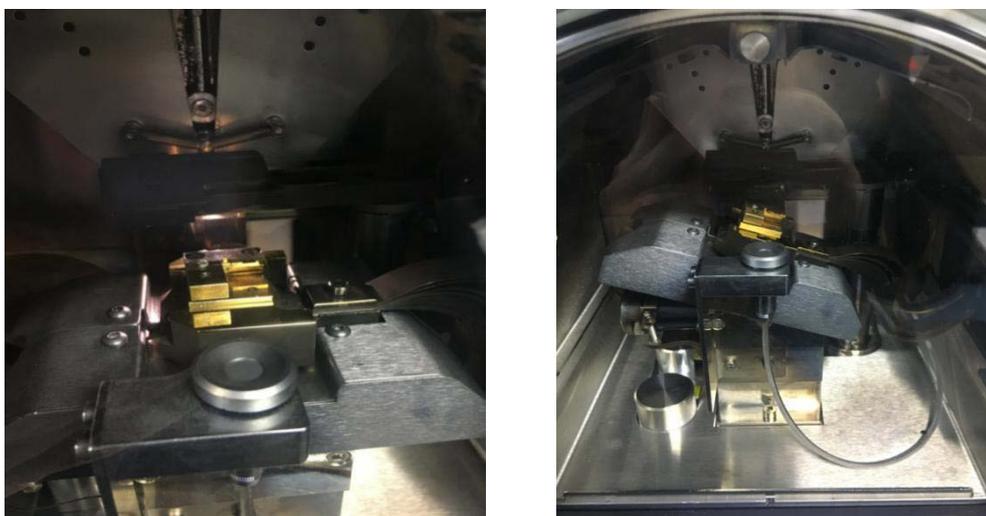
高压冷冻固定的方法虽然能较好的使水固定在玻璃态，但是高压会影响某些样品的微观结构，而且高压冷冻仪价格昂贵。还可应用液氮方式进行冷冻固定，即将液氮置于真空中，在一定的负压下（通常约 200Pa）^[3]，液氮由液态逐渐变为固态，形成液氮泥。由于莱顿弗罗斯特效应（指液体不会润湿炙热的表面，而仅仅在其上形成一个蒸汽层的现象），当直接将样品放入液氮中时，样品周围的液氮会立即沸腾，将样品包裹在绝缘的氮气中，从而使样品不能立即降温，水成为结晶态。而将样品置于液氮泥中，由于液氮泥不存在沸腾现象，所以样品不会收到莱顿弗罗斯特效应的影 响，可迅速降温通，使得水分子来不及重排成晶体，从而形成玻璃态的水。如果是液体样品，可用夹片装载样品直接投入到液氮泥中进行冷冻固定，固体样品则可直接用低温胶粘在样品台上投入液氮泥中进行固定。

2.2 冷冻断裂/喷涂

将应用高压冷冻或液氮泥冷冻固定的样品在液氮中转移至冷冻样品台装载装置中，在其中将冷冻好的样品装载于冷冻传输样品杆上。然后通过冷冻传输样品杆将载有样品的样品台转移至 EM ACE600 溅射仪中（图 4）。应用溅射仪中的刀对样品进行冷冻断裂，露出样品新鲜的断面，对于有些样品，在 173K 下进行升华，避免样品被水包裹覆盖，之后进行导电性喷涂，避免在扫描电镜观察过程中放电现象的发生。（图 5）。



● 图 4. 冷冻样品传输至溅射仪



● 图 5. 冷冻断裂及喷涂

2.3 冷冻扫描电镜观察

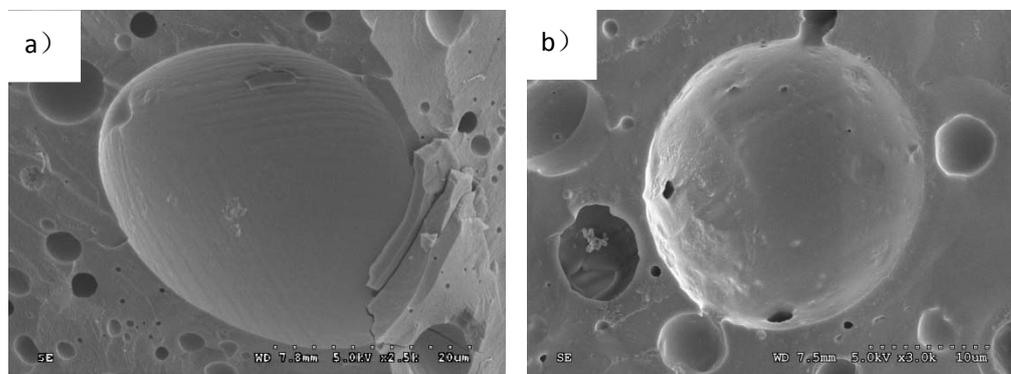
通过冷冻传输样品杆将断裂、喷涂好的样品转移至扫描电镜的冷台，冷台是由液氮降温经铜带导温来控制温度（123K），在扫描电镜观察时，通常应用较低的加速电压和较小的束流，以减弱放电现象和电子束对样品的损伤。由于整个传输及观察过程都保持在低温状态，所以尽可能的保持了样品在液相的原位结构。

3. 冷冻扫描电镜的应用实例

3.1 微乳液

图 6 为微乳液样品分别经高压冷冻和液氮泥冷冻固定，并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图，可以看出冷冻方法能够保持乳液中液滴

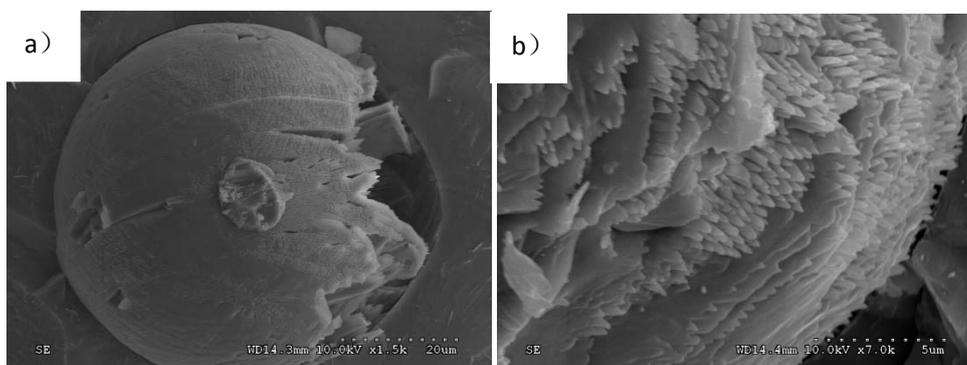
的结构，液滴大小不一， $2\ \mu\text{m}$ 至 $20\ \mu\text{m}$ 。但是应用高压冷冻方法制得的样品，液滴呈椭球型，可能是由于液滴受高压挤压而变形所致，而应用液氮泥制样得到的样品液滴呈球形，保持了其本来的形貌。



● 图 6. 微乳液样品经 a) 高压冷冻固定 b) 液氮泥冷冻固定得到的冷冻扫描电镜图

3.2 纳米片稳定的水包油体系

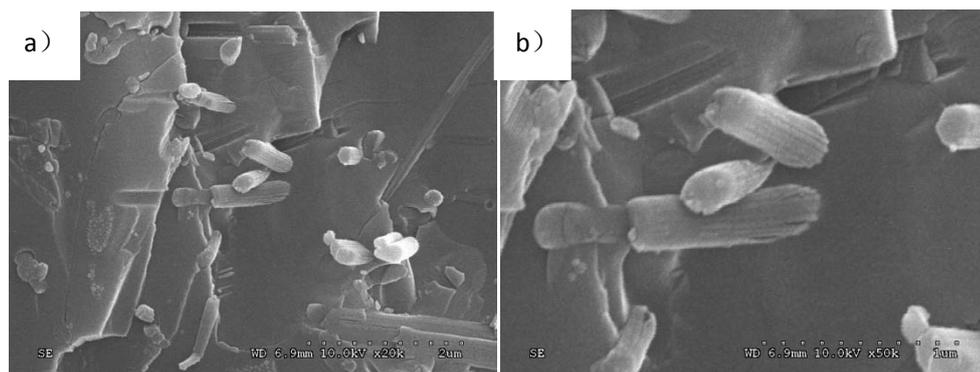
图 7 为用纳米片稳定的微乳液经液氮泥冷冻固定、并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图，可以看出纳米片包覆在油滴表面，并且沿一定的方向排列，据此可以得出纳米片在水包油稳定体系中的存在状态，从而推断稳定机理。



● 图 7. 纳米片稳定的水包油体系的冷冻扫描电镜图 a) 放大倍数 1.5K b) 放大倍数 7k

3.3 磷脂、二肽分子自组装体

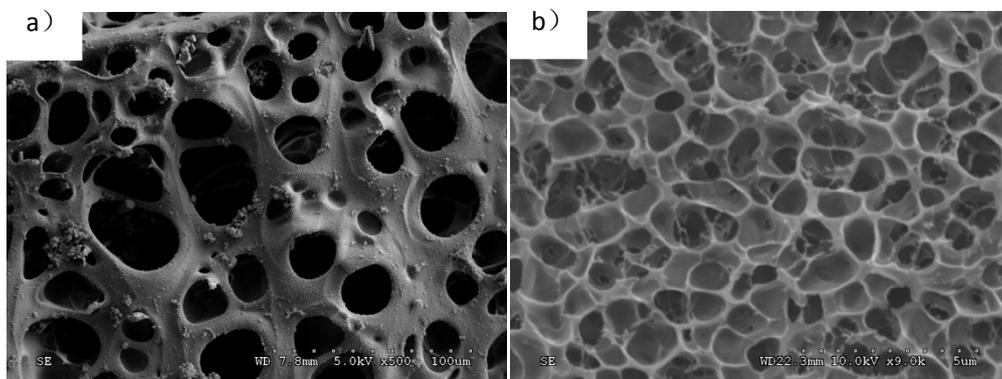
图 8 是磷脂、二肽分子自组装体经液氮泥冷冻固定并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图，可以看出分子组装成棒状结构，棒的粗细在 500nm ，每根棒又是由多根纤维组成。



● 图 8. 磷脂、二肽分子自组装体的冷冻扫描电镜图

3.4 水凝胶

图 9 是水凝胶分别经过冷冻干燥之后在常温扫描电镜上观察到的形貌图和经液氮冷冻固定并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图。可以看出冷冻干燥的水凝胶孔径较大且稀疏，可能是由于水分在真空中挥发后样品因为没有水分的填充导致孔塌陷。而未经过可以看出孔径很小且密集，因为真空干燥的水凝胶在冷冻固定的时候有水分填充，不会导致样品塌陷，因此冷冻扫描电镜的方法保持了水凝胶本身的结构。



● 图 9. a) 经过真空干燥过后的水凝胶常规电镜图 b) 液氮冷冻固定的水凝胶冷冻扫描电镜图

参考文献

[1] Dimitri, Vanhecke.; Werner, Graber.; Daniel Studer. *Methods in cell biology*. 2008, 88.151

[2] Pederson, R. C.; Miller, C. D.; Arvidson, J. M.; Blount, K.; Schulze, M. *Advances*

in Cryogenic Engineering Materials. New York: Springer US, 1998.

[3] Kanno,H.; Speedy, R.J. and Angell, C.A. *Science*,**1975**,*189*, 880.

致谢

感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工！

感谢分析测试中心袁震老师在冷冻扫描电镜实验过程中对于排除仪器故障的帮助！

单晶测试技巧之改变测试温度

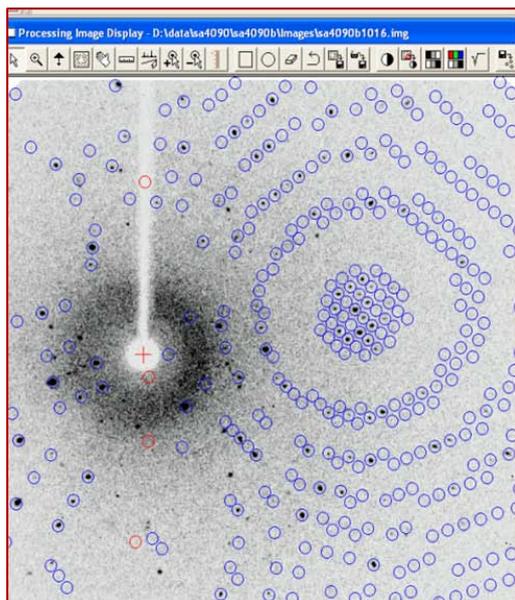
► 梁同玲

(分析测试中心 X 射线衍射组 Tel: 010-62658187 Email: ltl@iccas.ac.cn)

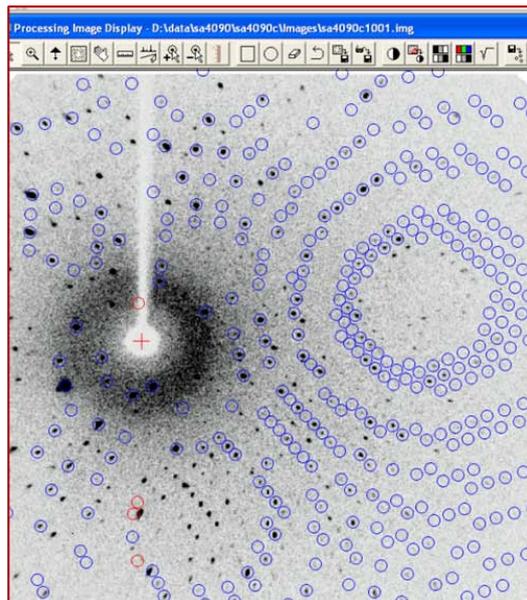
一般来说,单晶测试在仪器、晶体及其他测试条件相同的情况下,温度越低,原子的热运动越小,晶体衍射强度越强,最后结构解析的结果越好,所以单晶样品能在低温下测试尽量在低温下测试。但是,有些样品在低温下会被“冻坏”,表现为衍射照片的杂点明显增多,并最终导致结构解析不理想。在这种情况下,通过改变温度,甚至关闭低温附件,改为在室温测试,常常可以“绕开”低温引发的问题,并获得较为理想的结构解析结果。

以下案例是上述情况中的一个典型案例。样品是无色块状晶体,显微镜下观察晶体非常透亮,质量很好。在低温下测试的过程中,晶体始终无色透亮,从肉眼上无法分辨晶体是否有变化。在低温数据收集的过程中,发现衍射照片上有很多杂点(参看图二,没有被蓝色小圈包住的黑点为杂点),虽然晶胞修正结果、积分效果,以及数据还原结果都还勉强可以,但是最后的结构解析却很不理想。表现为拟合的一致性因子(参看表一的 R indices)很高,很多原子的温度因子出现了不正常的非正定。

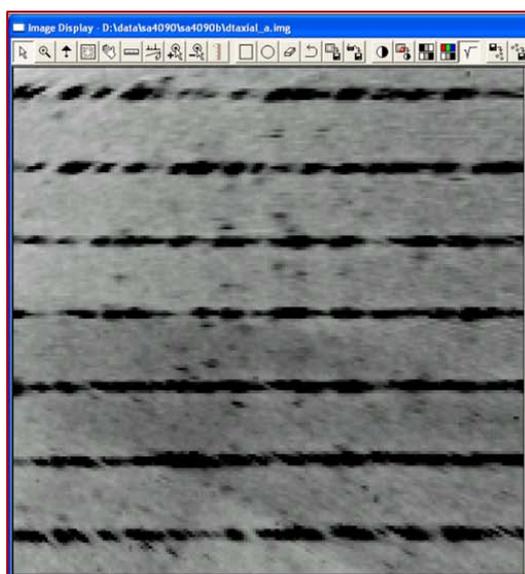
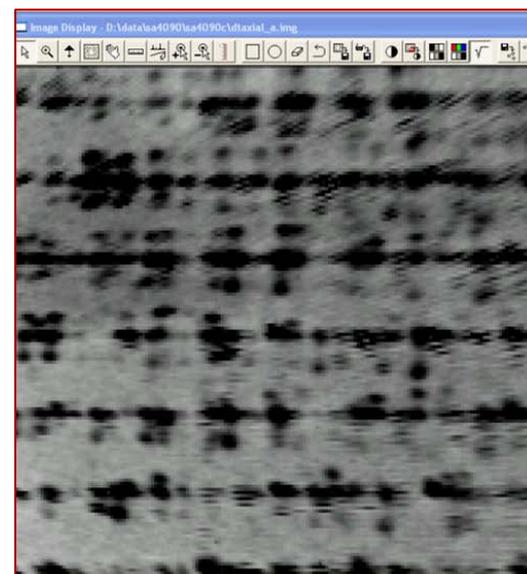
为了解决低温数据结构解析不理想的问题,我们改变了测试温度,重新在室温下进行了数据收集,发现衍射照片的杂点明显减少(参看图一,没有被蓝色小圈包住的杂点很少)。进一步,我们发现是低温引发了 a^* 方向出现了杂点(参看图三和图四的对比),而 b^* 和 c^* 方向上的衍射点则基本不随温度变化。



● 图一 室温测试数据积分图



● 图二 低温测试数据积分图

● 图三 室温测试 a^* 方向上的衍射点● 图四 低温测试 a^* 方向上的衍射点

表一 低温和室温下测试的主要晶体学参数对比表

temperature crystal data	Low Temperature	Room Temperature
Crystal system	triclinic	monoclinic
Space group	P-1	P2/c
Unit cell dimensions	$a=19.45 \text{ \AA}$ $b=18.32 \text{ \AA}$ $c=23.20 \text{ \AA}$ $\alpha=92.28^\circ$ $\beta=107.90^\circ$ $\gamma=89.51^\circ$	$a=19.35 \text{ \AA}$ $b=18.26 \text{ \AA}$ $c=23.04 \text{ \AA}$ $\alpha=90^\circ$ $\beta=108.01^\circ$ $\gamma=90^\circ$
Rmerge	0.096	0.057

mosaicity	3.78	0.66
R indices [$I > 2\sigma(I)$]	0.166	0.066

通过对室温数据进行结构解析（参看表一），发现在两个温度点下，晶胞参数的 α 角度变化较大，其余则变化很小，晶系发生了改变，低温下的三斜晶系变成了室温下的单斜晶系，很自然地，空间群也差别很大，室温数据的拟合一致性因子（R indices）降低到了合理范围，所有原子的温度因子也正常了。

综上所述，通过改变测试温度，我们成功解决了低温数据结果不理想的问题。如果进一步探讨原因，我们推测可能是晶体在低温下产生了新的低温相，或者只是部分室温相的空间取向发生改变，从而引发了 a^* 方向上的大量杂散衍射点，干扰了指标化，使得对称性从单斜下降为三斜，并导致随后的数据积分和还原不理想，进而导致结构解析出现问题。由于送样人的目的只是为了得到合理的分子结构，对低温引发的晶体学问题并无兴趣，因此对这一问题的深入探索没有进行。

数据处理技巧

红外光谱分析蛋白质的二级结构

▶ 丁丽萍 刘美蓉

(分析测试中心光谱组 Tel: 010-62566250 Email: npns@iccas.ac.cn)

红外光谱是测定蛋白质二级结构相对含量的重要手段之一。蛋白质在红外光谱中有很多特征吸收带,其中酰胺 I 带($1600-1700\text{cm}^{-1}$),包含了蛋白质丰富的二级结构信息,如 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角、无规则卷曲结构等,因此酰胺 I 带常用来解析蛋白质的二级结构。为了准确地定量分析蛋白质的二级结构,需要对红外光谱进行处理,采用基线校正, Gaussian 去卷积,二阶导数拟合,然后根据峰面积计算各二级结构的比率。

蛋白质分子红外光谱的另一个区域——酰胺 III 带 ($1220-1330\text{cm}^{-1}$),可以区分蛋白质二级结构中的 α 螺旋与无规则卷曲两种结构,是酰胺 I 带分析的补充;但其光谱强度较酰胺 I 带弱很多。酰胺 I 带和酰胺 III 带峰位对应蛋白质二级结构的归属见表 1。

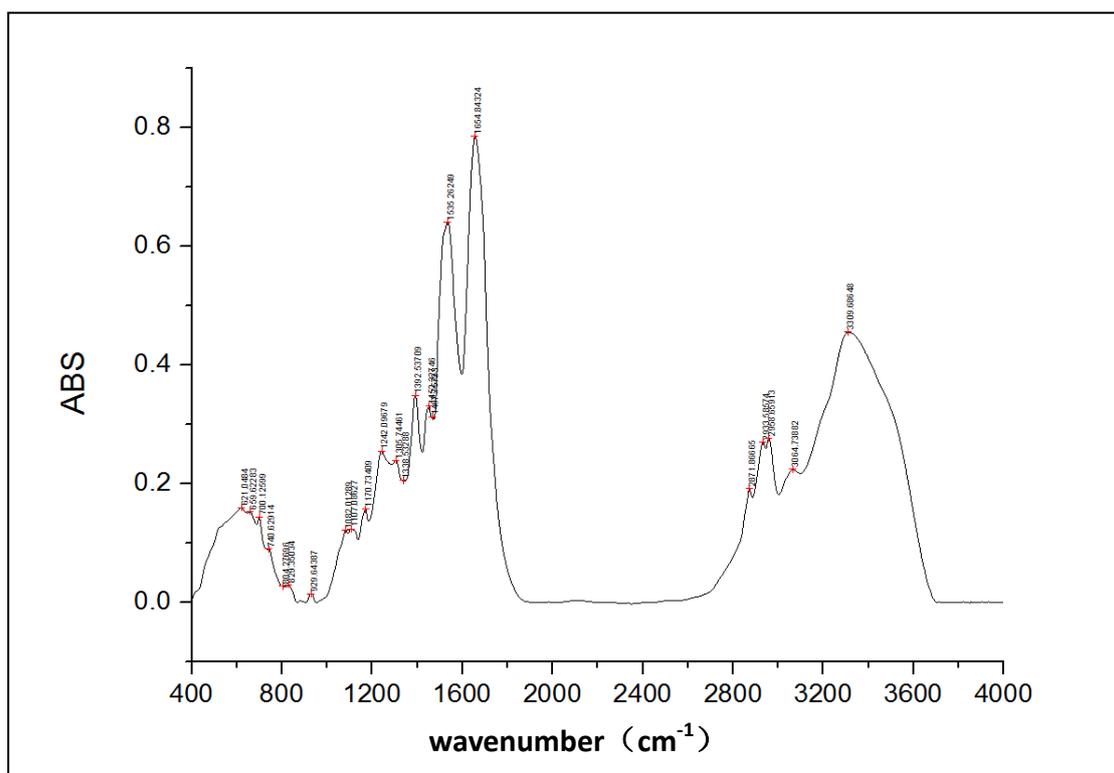
表 1、酰胺 I 带和酰胺 III 带峰位对应蛋白质二级结构

二级结构	酰胺 I 带波数/ cm^{-1}	酰胺 III 带/ cm^{-1}
α 螺旋	1646-1661	1295-1330
β 折叠	1615-1637	1220-1250
β 转角	1665、1670、1675、1683、1688、1694	1270-1295
无规则卷曲	1637-1648	1250-1270
有时不确定	1670-1695	

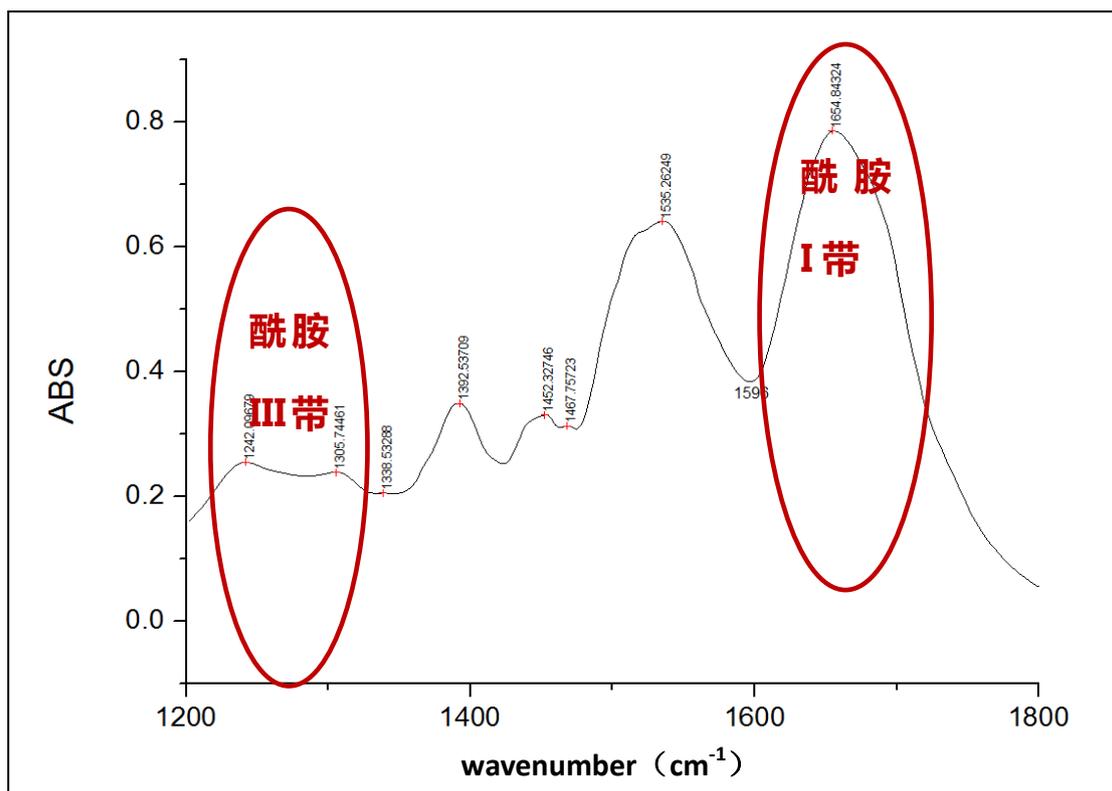
下面以牛血清蛋白(简称 BSA)的红外光谱为例,进行具体说明。由红外软件 OPUS 对红外光谱进行基线校正、Gaussian 去卷积、二阶导数处理。二阶导数谱中 y 的极小值为原红外吸收谱中吸收峰尖的中心位置, y 的极大值为原红外吸收谱中峰谷的中心位置,具体步骤参见《分析测试中心通讯》第一期的《红外光谱数据处理——导数光谱》。再通过 Origin 软件进行分峰拟合,选用高斯模型,

从而得到各子峰的面积。

在 BSA 的红外数据中(见图 1-a), 1654cm^{-1} 归属于酰胺 I 带 $1600\text{-}1700\text{cm}^{-1}$, 1242cm^{-1} 和 1305cm^{-1} 归属于酰胺 III 带 $1220\text{-}1330\text{cm}^{-1}$ (见图 1-b)。通过对 BSA 红外数据的二阶导数分析(见图 2)可知, 在 $1220\text{-}1330\text{cm}^{-1}$ 区域不仅有 2 个吸收峰还有 1 个红外吸收峰, 其中心位置为 1239cm^{-1} 、 1270cm^{-1} 、 1303cm^{-1} 。同样在 $1600\text{-}1700\text{cm}^{-1}$ 区域的 1654cm^{-1} 红外吸收峰由 3 个吸收峰组成, 其中心位置分别为 1633cm^{-1} 、 1660cm^{-1} 、 1694cm^{-1} 。



(a)

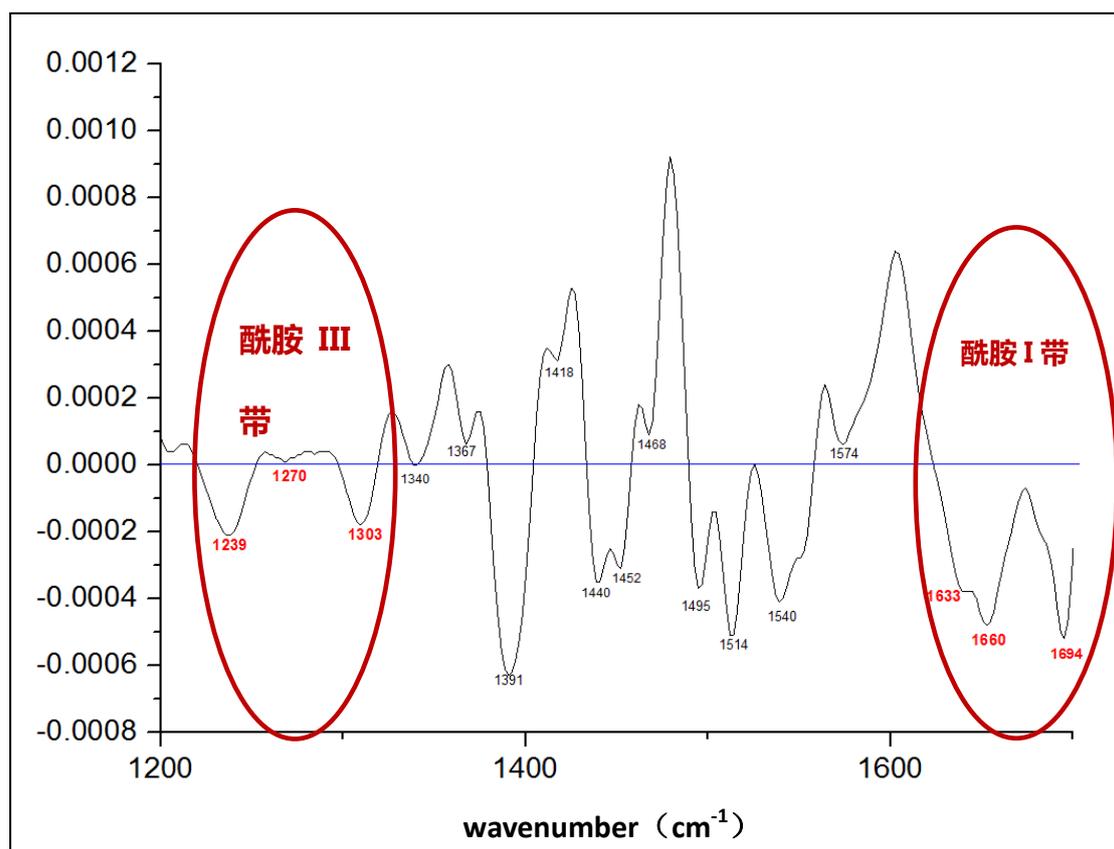


(b)

- 图 1、BSA 的红外光谱（溴化钾压片、BRUKER-TENSOR 27、分辨率为 4 cm⁻¹、扫描 32 次）。

(a) 测量范围 400-4000 cm⁻¹

(b) 包含酰胺 I 带和酰胺 III 带的 1200-1800 cm⁻¹ 处的红外谱图



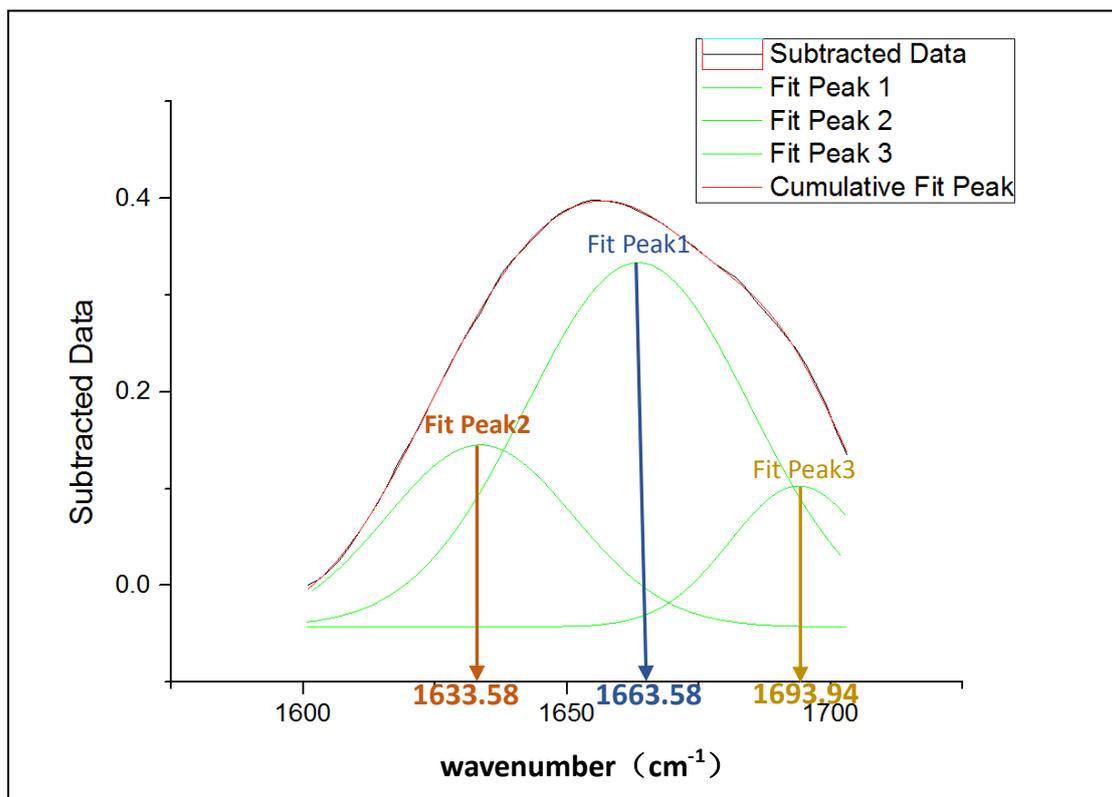
● 图 2、BSA 红外光谱 ($1200-1700\text{cm}^{-1}$) 的二阶导数。

通过对 $1600-1700\text{cm}^{-1}$ 区域的 1654cm^{-1} 和 $1220-1330\text{cm}^{-1}$ 区域的 1242cm^{-1} 、 1305cm^{-1} 进行分峰拟合，分别得到 2 组吸收峰，拟合峰的中心位置分别为 1633cm^{-1} 、 1663cm^{-1} 、 1693cm^{-1} （见图 3c）和 1239cm^{-1} 、 1270cm^{-1} 、 1303cm^{-1} （见图 4e）。对比二阶导数的信息与拟合峰位的中心位置，除拟合峰 1663cm^{-1} 对应二阶导数信息为 1660cm^{-1} ，其余 5 个峰完全吻合。考虑到仪器分辨率为 4cm^{-1} 的因素，可以认为拟合峰 1663cm^{-1} 与二阶导数信息基本吻合。

表 1 为酰胺 I 带和酰胺 III 带峰位对应蛋白质二级结构，拟合 2 组吸收峰 1633cm^{-1} 、 1663cm^{-1} 、 1693cm^{-1} 和 1239cm^{-1} 、 1270cm^{-1} 、 1303cm^{-1} 分别归属于 β 折叠、 α 螺旋、 β 转角和 β 折叠、 β 转角、 α 螺旋。

很多资料表明：蛋白质二级结构的定量分析运用较多的是红外光谱的酰胺 I 带信息，而酰胺 III 带较少。在本文分析中，单独用酰胺 I 带计算和用酰胺 I 带和 III 带共同计算对应二级结构的各子峰面积（见图 3d 和图 4f）占相应总面积的比例，从而得到了两组二级结构的信息（表 2）。通过对比这两组分析结果，采用

酰胺 I 带和 III 带光谱信息定量分析的 α 螺旋结果与文献更为相符。



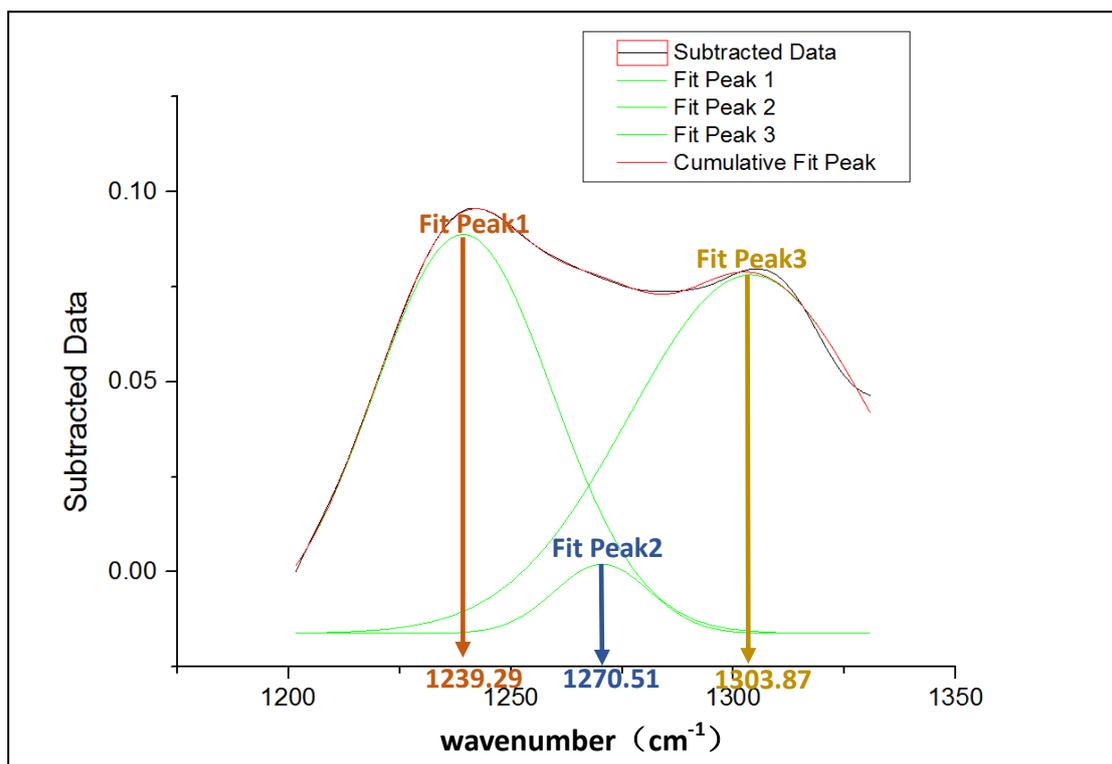
(c)

Parameters				
		Value	Shared	Standard Error
Peak1(Gaussian)	y0	-0.04293	0	0.01109
	xc	1663.50718	0	26.37133
	A	20.04375	0	54.12895
	w	50.0204	0	76.94892
Peak2(Gaussian)	y0	-0.04293	0	0.01109
	xc	1633.58726	0	31.09759
	A	8.36248	0	41.33745
	w	41.79328	0	19.6581
Peak3(Gaussian)	y0	-0.04293	0	0.01109
	xc	1693.93671	0	1.75971
	A	4.76777	0	13.53959
	w	30.76616	0	14.53609

Reduced Chi-sqr = 3.93441286245E-6
 COD(R²) = 0.99978517494158
 Iterations Performed = 108
 Total Iterations in Session = 108
 Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-6 was reached.

(d)

● 图 3、BSA 红外光谱酰胺 I 带拟合图谱 (c) 和拟合信息 (峰位、峰面积) (d)。



(e)

Baseline was subtracted

Parameters		Value	Shared	Standard Error
Peak1(Gaussian)	y0	-0.01619	0	0.0027
	xc	1239.28891	0	0.38388
	A	5.25822	0	0.28143
	w	47.06347	0	1.56704
Peak2(Gaussian)	y0	-0.01619	0	0.0027
	xc	1270.50985	0	0.87834
	A	0.49017	0	0.17267
	w	25.37769	0	2.94395
Peak3(Gaussian)	y0	-0.01619	0	0.0027
	xc	1303.87206	0	0.68037
	A	6.45444	0	0.37082
	w	64.27913	0	2.34996

Reduced Chi-sqr = 1.29490199158E-6
 COD(R²) = 0.99789378542893
 Iterations Performed = 25
 Total Iterations in Session = 25
 Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-6 was reached.

(f)

●图 4、BSA 红外光谱酰胺 III 带拟合图谱 (e) 和拟合信息 (峰位、峰面积) (f)。

表 2 BSA 二级结构的含量

二级结构	含量 (%)		
	分析酰胺 I 带	分析酰胺 I 带和 III 带	文献
α 螺旋	60.42	58.40	53.2
β 折叠	25.21	30.01	6.8
β 转角	14.37	10.50	14.1
无规则卷曲	0	1.09	25.9

参考文献:

- 1、Byler DM, Susi H. Biopolymers,1986,25;469
- 2、Kauffmann E, Darnton NC, Austin RH, et al. J.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2001,98;6646
- 3、王建华、卫亚丽、文宗河、何建川, 化学通报, 2004, 7; 482

致谢

感谢王树研究员课题组孙含同学提供样品。

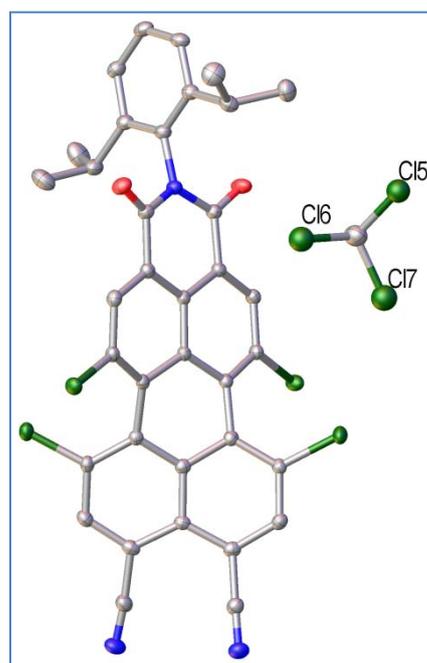
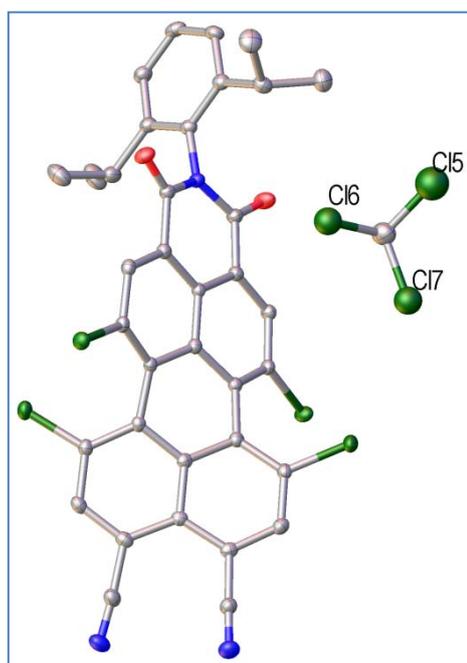
晶体结构中的置换无序现象

► 梁同玲 王林

(分析测试中心 X 射线衍射组 Tel: 010-62658187 Email: ltl@iccas.ac.cn)

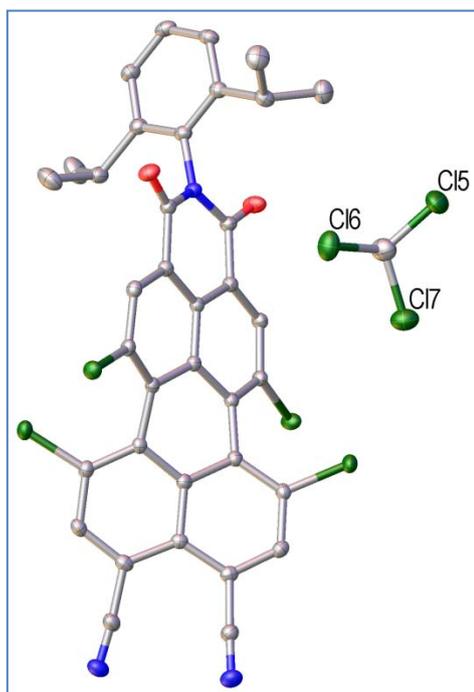
在晶体生长中，溶剂分子常常会同产物分子共同结晶，而溶剂分子呈现无序也很常见。一般地，无序类型有两种，位置无序和置换无序。所谓位置无序，是指 1 个溶剂分子分布在独立区中的多个位置，导致每个位置的占有率都小于 1，但是把每个位置的占有率加合起来等于 1；置换无序是指不同种类的溶剂分子占据在独立区中的同一个位置，导致每种溶剂分子的占有率都小于 1，但是把每种溶剂分子的占有率加合起来等于 1。相对而言，置换无序比较少见，本文列举两个置换无序的案例。

案例一的样品为有机分子，结晶于单斜晶系，晶胞参数如下： $a = 12.515(3)\text{\AA}$ ， $b = 20.330(4)\text{\AA}$ ， $c = 13.580(3)\text{\AA}$ ， $\beta = 107.00(3)^\circ$ ，空间群为 $P2_1/n$ 。经过结构解析后发现，产物分子的结构与合成人员预测的一致，参看图 1 和图 2 中的左侧分子。但是，晶体结构中还包括溶剂分子，从残余电子密度峰的位置看可能是 CHCl_3 分子，参看图 1 和图 2 中的右侧分子。

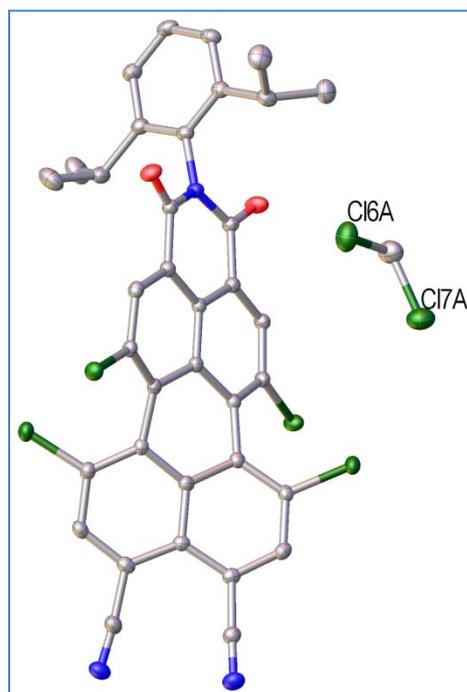


●图 1 氯原子占有率为 1 的修正效果图 ●图 2 氯原子占有率自由修正的效果图

当把溶剂分子按照一个完全占据的 CHCl_3 分子进行修正，即固定 CHCl_3 的占有率为 1 时，发现 C15 的温度因子明显大于 C16 和 C17（图 1），表明 C15 的位置处可能有无序，而 C15 附近也没有较高的残余电子密度峰，因此应该不是 C15 的位置无序导致的，置换无序的可能性较大。将 C15、C16 和 C17 的占有率自由修正发现 C15 的占有率仅为 0.5，且其温度因子变为正常大小了，而 C16 和 C17 的占有率均为 0.9（图 2）。如果是一个 CHCl_3 分子无序的话，那么 3 个 Cl 原子的占有率应该相等，而 C15 的占有率却明显小于 C16 和 C17，因此选取一个 CHCl_3 分子无序的模型是不合理的。由于合成人员在培养晶体的过程中还使用了 CH_2Cl_2 溶剂，由此推测可能是 CHCl_3 和 CH_2Cl_2 两种溶剂出现了置换无序。 CH_2Cl_2 的两个氯原子刚好分别位于 C16 和 C17 附近，而 C15 的位置只是 CHCl_3 的 1 个氯原子占据。按照这个置换无序模型，最终的精修结果是， CHCl_3 的占有率为 0.58，而 CH_2Cl_2 占有率为 0.42。这个模型意味着，58% 的晶体是 CHCl_3 占据此位置（图 3），剩余 42% 的晶体是 CH_2Cl_2 占据同一位置（图 4）。



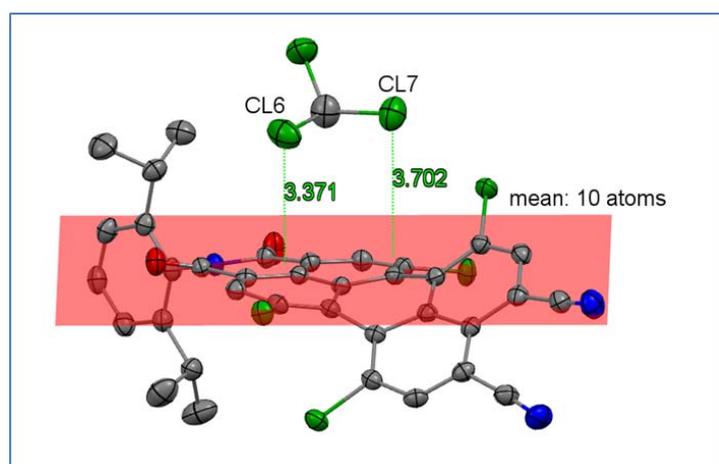
● 图 3 溶剂为 CHCl_3 的结构图



● 图 4 溶剂为 CH_2Cl_2 的结构图

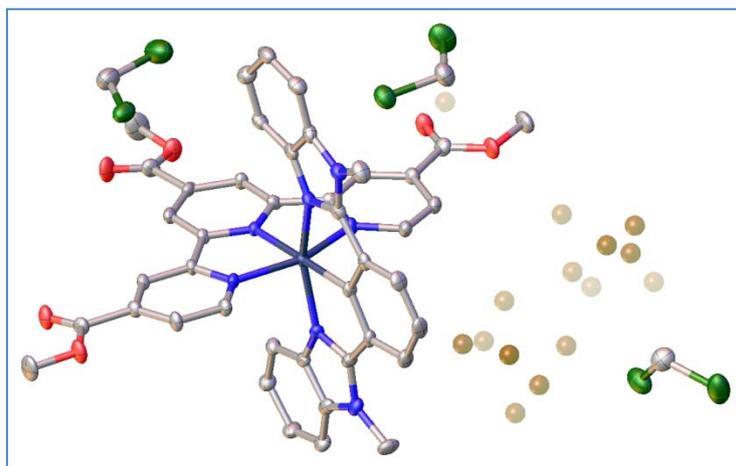
进一步考察这个无序结构，发现从空间对称性的角度看， CH_2Cl_2 的两个 Cl 原子 C16A 和 C17A 可能出现 3 种空间取向，第一种取向是现有位置 C16 和 C17，

另外两种可能的取向分别是位置 Cl5 和 Cl6，以及位置 Cl5 和 Cl7，为什么后两种取向没有出现呢？其原因可能是，产物分子存在大 π 键，且距离 Cl6 (Cl6A) 和 Cl7 (Cl7A) 较近，分别为 3.371Å 和 3.702Å (图 5)，因此，选择第一种取向使得 CH₂Cl₂ 的两个 Cl 原子与主体分子间存在更强的 Cl... π 分子间相互作用。

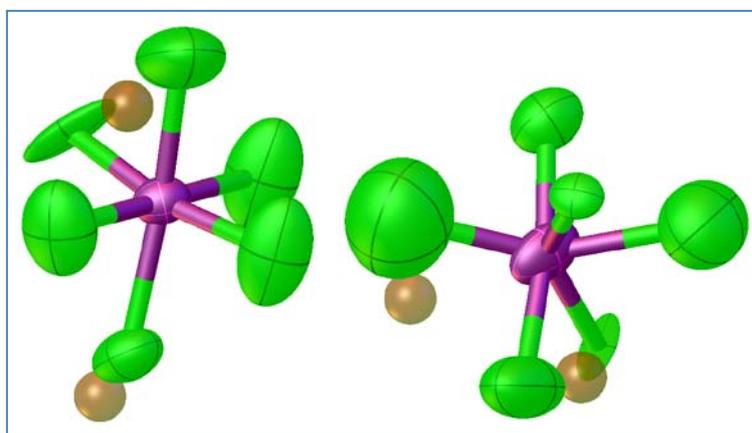


● 图 5 氯原子与 π 键平面距离示意图

案例二的样品为金属钕配合物，结晶于三斜晶系，晶胞参数如下： $a = 12.163(3)\text{Å}$ ， $b = 13.716(3)\text{Å}$ ， $c = 18.215(4)\text{Å}$ ， $\alpha = 105.644(2)^\circ$ ， $\beta = 94.048(2)^\circ$ ， $\gamma = 115.759(2)^\circ$ ，空间群为 $P-1$ 。化合物的组成为钕离子 (+2价)，配体 (-1价)，以及1个抗衡阴离子PF₆⁻。通过结构解析，得到的钕离子和配体的结构正常，参看图6，结构中还存在3个没有无序的CH₂Cl₂溶剂分子。图6中的残余电子密度峰 (即金色小球) 显示1个抗衡阴离子PF₆⁻可能分布在2个位置上，即PF₆⁻出现了位置无序。按照这样的无序模型处理后，虽然在精修中加入了温度因子和键长键角的限制，但是PF₆⁻的部分原子的温度因子仍然较差，有些键长键角也不合理，参看图7，另外，结构精修的一致性因子R1仍然较高，参看表一。

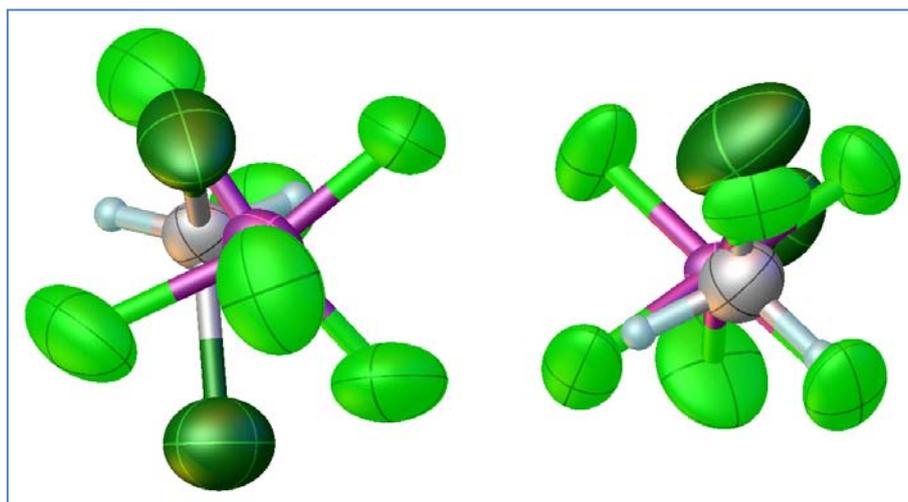


●图 6 没有指认 PF_6^- 离子的配合物结构图



●图 7 PF_6^- 位置无序结构图

通过仔细分析发现，虽然对 PF_6^- 离子做了位置无序处理，即将 1 个 PF_6^- 离子裂分于 2 个位置上，但是，每个位置上都有两个较高的残峰，参看图 7 中的金色小球。考虑到培养单晶使用的溶剂为 CH_2Cl_2 ，因此，推测剩余的残峰归属于无序的 CH_2Cl_2 分子。于是，这个无序模型进一步改进为 PF_6^- 离子和 CH_2Cl_2 分子的位置无序加置换无序。当在结构精修中引入这个双重无序模型后，对 PF_6^- 和 CH_2Cl_2 的键长键角无需施加任何限制，结构就自然合理，参看图 8，且最终的一致性因子 R1 也明显下降，见表一。

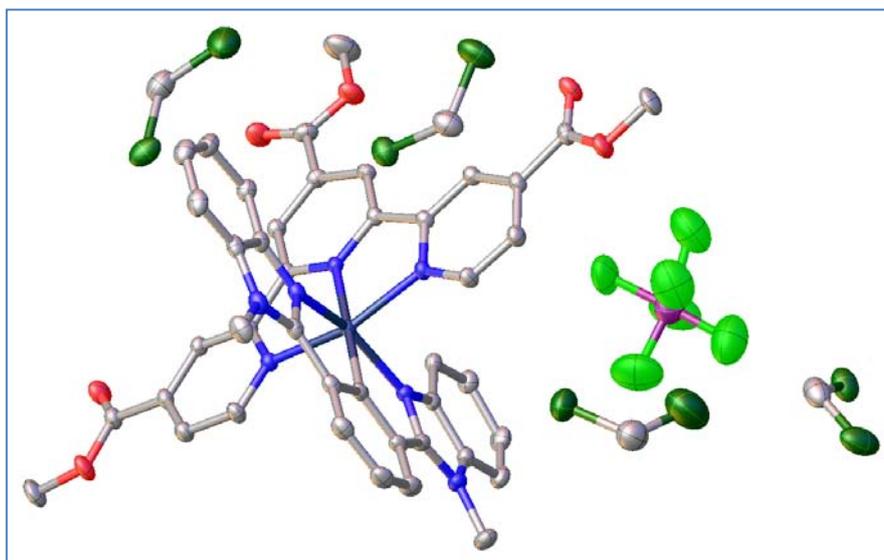


● 图 8 PF_6^- 离子和 CH_2Cl_2 分子的位置无序加置换无序结构图

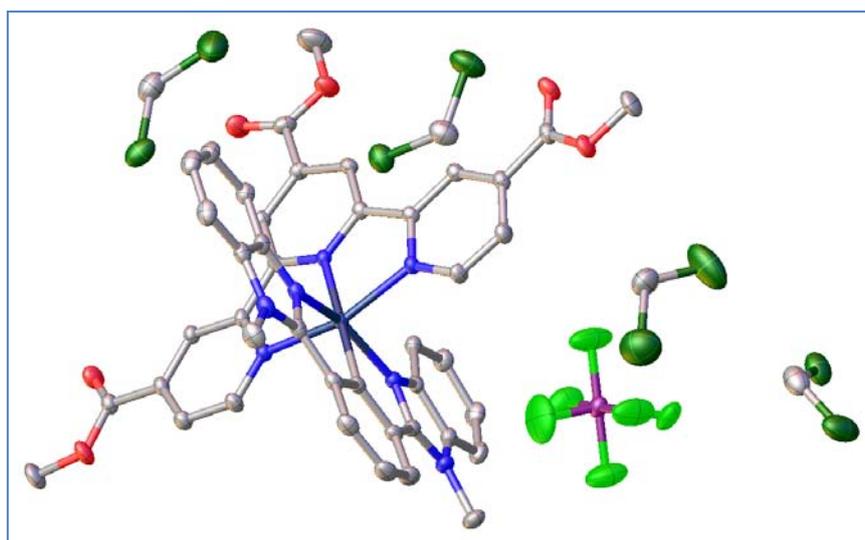
表一：置换无序处理前后主要晶体学参数对比表

	R indices	Largest diff. Peak ($e/\text{\AA}^3$)	C-C bond length precision (\AA)	Chemical occupancy
只引入位置无序，未引入置换无序的模型	R1 = 0.1011	5.395	0.0101	0.60 : 0.40
既引入位置无序，又引入置换无序的模型	R1 = 0.0688	1.454	0.0066	0.53 : 0.47

如何理解这个双重无序模型呢？首先，1 个 PF_6^- 离子和 1 个 CH_2Cl_2 分子分别呈现位置无序，且分布于两个同样的位置上，其次，在每一个位置上，既出现 PF_6^- 离子，又出现 CH_2Cl_2 分子，即所谓的置换无序，根据精修的占有率比例为 0.53 : 0.47，可以画出示意图，如下图 9 和图 10。图 9 显示的是第一无序部分，即 53% 的晶体是 PF_6^- 离子和 CH_2Cl_2 分子依次占据 2 个无序位置，图 10 显示的是第二无序部分，即剩余 47% 的晶体是 CH_2Cl_2 分子和 PF_6^- 离子依次占据这 2 个同样的无序位置。



●图 9 晶体结构独立区中的第一无序部分



●图 10 晶体结构独立区中的第二无序部分

综上所述，本文列举了溶剂分子置换无序的两个案例。案例一的溶剂只存在置换无序，没有位置无序，且溶剂分子的空间取向呈确定性，其原因是溶剂分子与主体分子间存在 $\text{Cl}\cdots\pi$ 分子间相互作用；案例二的抗衡阴离子和溶剂分子出现了位置无序加置换无序的双重无序，原因是晶体堆积较松散，空位较大所致。

注：所有分子结构图中，C 原子：灰色，O 原子：红色，N 原子：蓝色，Cl 原子：深绿色，F 原子：亮绿色，Ru 原子：深蓝色。为简洁起见，H 原子没有标出。

分析测试中心动态

《分析测试中心通讯》征稿启事

《分析测试中心通讯》由分析测试中心主办，以促进测试技术的应用为理念，提供深度的科研支撑为宗旨，设置了评述、典型应用案例、测试技术及技巧、数据处理技巧、仪器的功能介绍和分析测试中心动态等栏目。为了进一步提升《分析测试中心通讯》的水平和作用，现向广大读者征稿，欢迎您的来稿，分享科研中的点滴！

联系人：丁丽萍 电话：010-62566250 邮箱：npns@iccas.ac.cn



顾问： 唐亚林 何圣贵

主编： 向俊锋

编辑： 丁丽萍

编委： 关 波 刘美蓉 郝 项

宗文杰 赵镇文 赵志娟

