

# 基于催化聚合的同步辐射 X 射线成像标签

诸颖 孔华庭 张继超 王丽华 胡钧 樊春海

(中国科学院上海应用物理研究所 物理生物学研究室 中国科学院微观界面物理与探测重点实验室  
上海同步辐射光源生物成像中心 嘉定园区 上海 201800)

**摘要** 同步辐射 X 射线显微成像具有极高的空间分辨率、很好的穿透深度和优秀的能量分辨,因而在纳米分辨细胞成像领域具有巨大的应用潜力。然而,目前 X 射线显微技术多用于细胞结构成像,而和该技术相适合的特异性识别细胞内重要生物靶标的分子探针仍较缺乏。本工作利用同步辐射 X 射线良好的能量分辨特点,经体外化学催化反应成功制备了同步 X 射线可见的成像标签,成像分辨率达到 30 nm。研究结果为进一步制备 X 射线敏感的分子探针,实现对细胞内生物分子的特异性识别和成像打下了良好的基础。

**关键词** 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐,催化,聚合物,同步 X 射线,成像标签

**中图分类号** TL99, O63

**DOI:** 10.11889/j.0253-3219.2017.hjs.40.060103

## Catalytic polymerization-based X-ray imaging tags

ZHU Ying KONG Huating ZHANG Jichao WANG Lihua HU Jun FAN Chunhai

(Division of Physical Biology & Bioimaging Center, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Jiading Campus, Shanghai 201800, China)

**Abstract Background:** With short wavelengths, long penetration depth and excellent energy resolution of X-rays, synchrotron-based X-ray microscopy (XRM) has demonstrated its great potential for nanoscale cellular imaging. However, despite of the high-quality sub-cellular morphological details provided by XRM, it lacks appropriate molecular probes capable of localizing cellular targets. **Purpose:** This study aims to perform the preparation of X-ray imaging tags. **Methods:** *In vitro* chemical catalytic reaction was introduced to get the X-ray imaging tags. **Results:** By exploiting the excellent energy resolution of X-rays, synchrotron-based X-ray imaging tags were prepared with the imaging resolution of 30 nm when observed by soft X-ray microscopy at Shanghai synchrotron radiation facility (SSRF). **Conclusion:** The results indicate high potential to design X-ray sensitive molecular probes for cell imaging.

**Key words** 3,3'-diaminobenzidine (DAB), Catalysis, Polymer, Synchrotron-based X-ray, Imaging tag

中国科学院重大科技基础设施开放研究项目、国家重点研发计划(No.2016YFA0400902)、国家自然科学基金(No.11675251、No.21390414)、中国科学院青年创新促进会(No.2016236)、上海市青年科技英才扬帆计划(No.17YF1423600)资助

第一作者: 诸颖, 女, 1981 年出生, 2008 年于中国科学院上海应用物理研究所获博士学位, 研究员, 研究方向为同步 X 射线显微成像  
诸颖、孔华庭、张继超为本文共同第一作者

通信作者: 樊春海, E-mail: fchh@sinap.ac.cn

收稿日期: 2017-04-13, 修回日期: 2017-04-21

Supported by Open Large Infrastructure Research of Chinese Academy of Sciences, National Key Research and Development Program (No.2016YFA0400902), National Natural Science Foundation of China (No.11675251, No.21390414), the Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (No.2016236), the Shanghai Sailing Program (No.17YF1423600)

First author: ZHU Ying, female, born in 1981, graduated from Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences with a doctoral degree in 2008, professor, focusing on synchrotron-based X-ray microscopy

ZHU Ying, KONG Huating, ZHANG Jichao contributed equally to this work.

Corresponding author: FAN Chunhai, E-mail: fchh@sinap.ac.cn

Received date: 2017-04-13, accepted date: 2017-04-21

显微成像技术是细胞生命科学发展的主要推动力之一。基于同步 X 射线的显微技术在细胞成像领域具有独特的优势<sup>[1-5]</sup>。由于 X 射线的波长在 0.1-10 nm 范围内,因此其天然就是一种超分辨显微成像技术,分辨率理论上能够达到数个纳米。另外,与电子束相比,X 射线对生物样品的穿透力更强,因此不需要经过切片等处理就能对完整细胞进行成像。更重要的是 X 射线显微成像技术具有很好的能量分辨,能精确分辨很多元素的吸收谱。因此,结合 X 射线敏感的成像探针,能够实现细胞内生物分子的高分辨识别和成像。

在光学显微成像中,荧光标签常被用来标记生物分子。在 X 射线成像中,同样可以利用 X 射线本身的特点来开发成像标签,从而应用于制备生物探针,实现对细胞内生物分子的识别和成像。目前,研究人员已经应用 X 射线对金属纳米颗粒的特征吸收,在纳米颗粒上连接抗体从而对特定生物分子进行识别并成像<sup>[6-8]</sup>。但是,细胞内含有大量竞争性生物分子,如何保证对感兴趣生物分子的标记特异性是一大瓶颈。因此,现阶段开发新型同步 X 射线可见的成像标签,实现对细胞内生物分子的精确识别和定位具有十分重要的意义。

本工作建立并优化了体外抗坏血酸过氧化物酶(Enhanced Ascorbate Peroxidase 2, APEX2)催化 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(3,3'-diaminobenzidine, DAB)分子聚合反应的体系,筛选了同步 X 射线成像能量,在 30 nm 分辨率下成功实现了对 DAB 聚合物的成像观测(图 1)。研究结果为其进一步应用于纳米分辨细胞成像领域打下了良好的基础。

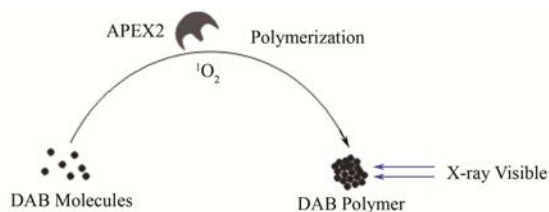


图 1 DAB 经催化反应聚合生成同步 X 射线可见的成像标签示意图

Fig.1 Schematic showing of dense DAB reaction product as an X-ray imaging tag.

## 1 实验材料

### 1.1 实验试剂

BL21 大肠杆菌感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;氨苄霉素、异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)和 10×磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)

购自碧云天生物技术有限公司;Luria-Bertani Agar (LB 培养基)粉末购自 ThermoFisher Scientific 上海公司;葡萄糖、NaCl、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、甘油购自国药集团化学试剂有限公司(上海);溶菌酶、2-巯基乙醇、咪唑、Non-Detergent SulfoBetaine-201 (NDSB-201)、30%过氧化氢和 DAB 购自 Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司;Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)琼脂糖柱购自德国 QIAGEN 公司;Cocktail 蛋白酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司;30 kDa 超滤管购自美国 Millipore 公司;氮化硅窗口购自上海昭沅仪器设备有限公司。

### 1.2 主要仪器

超纯水仪系统(Advantage A10): 美国 Millipore 公司;恒温摇床(TS211B): 上海天实验仪器制造有限公司;低速离心机(L535R): 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;超声破碎仪(Q700): 美国 QSonica 公司;高速离心机(CT15RE): 日本 HITACHI 公司;酶标仪(SynergyH1): 美国 Biotek 公司。

## 2 实验方法

### 2.1 APEX2 蛋白表达和纯化

pTRC-APEX2 质粒由 Alice Ting 赠予(Addgene plasmid # 72558),加入感受态细胞,冰上放置 30 min, 42 °C 热激,加入 LB 培养基, 37 °C、150 r·min<sup>-1</sup> 培养 1 h,取适量菌液涂布于氨苄抗性的 LB 琼脂糖平板上,培养过夜。

挑取单克隆,接种到 1 mL 氨苄抗性的 LB 培养基中, 37 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养过夜。将 1 mL 菌液接种到 500 mL 氨苄抗性的 LB 培养基中, 37 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养约 5 h,待菌液光密度(Optical Density, OD)值达到 0.6 时加 IPTG 至浓度为 420  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> 5-氨基乙酰丙酸, 18 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 诱导培养 16 h。离心收集菌体并超声裂解。使用 Ni-NTA 琼脂糖亲和柱纯化并洗脱 APEX2 蛋白。APEX2 蛋白的纯化步骤参照文献[9]。

### 2.2 体外催化 DAB 分子聚合反应体系的建立

室温条件下,将 DAB 水溶液和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别加到 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, DAB 终浓度为 0.4 mg·mL<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度为 10 mmol·L<sup>-1</sup>,混匀。加入 APEX2 蛋白,使最终浓度分别为 50 nmol·L<sup>-1</sup> 和 100 nmol·L<sup>-1</sup>,加入 96 孔板,在酶标仪 595 nm 波长下,每分钟读取吸光值,根据得到的曲线筛选该催化反应的最佳反应时间和 APEX2 浓度。

### 2.3 同步 X 射线成像

使用上述最佳反应条件在 EP (Eppendorf)管中催化 DAB 分子聚合。DAB 聚合物的 X 射线成像实验在上海光源 BL08U1 软 X 射线谱学显微线站进行, 实验方法为软 X 射线扫描透射成像。如图 2 所示, X 射线经波荡器引出, 经过平面光栅单色器单色化后由波带片聚焦到样品上, 然后由快速正比计数探测器(Photomultiplier Tube, PMT)探测透射光子。光子能量范围为 250–2 000 eV, 空间分辨率为 30 nm。DAB 聚合物悬液滴在氮化硅窗上, 干燥后放置在真空样品室中, 选取 X 射线入射能量为 525 eV。移动运动电机, 完成 DAB 样品的寻找、对焦, 然后进行软 X 射线成像, 成像步长为 30 nm×30 nm, 停留时间为 2 ms, 成像分辨率为 30 nm。

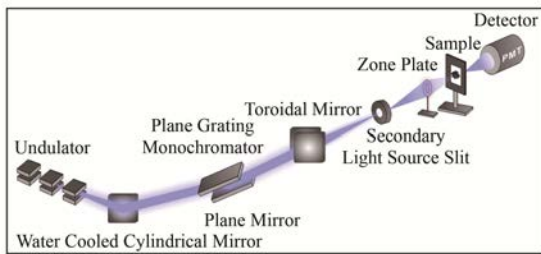


图 2 软 X 射线谱学显微光束线站示意图  
Fig.2 Schematic showing of the BL08U1 soft X-ray spectromicroscopy beamline.

## 3 实验结果

### 3.1 APEX2 蛋白表达与纯化

pTRC99A-APEX2 原核表达质粒在大肠杆菌中表达, 收集细菌细胞提取蛋白并纯化后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)结果显示在分子量 30 kDa 的位置有一条清晰的条带(图 3), 表明该质粒成功表达了 APEX2 蛋白且纯度较高, 可用于进一步实验研究。

### 3.2 体外催化 DAB 分子聚合反应体系的建立

进一步, 我们研究了 PBS 缓冲液中 APEX2 催化 DAB 分子聚合的浓度和时间依赖效应。结果显示, 加入 50 nmol·L<sup>-1</sup> APEX2 时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DAB 混合反应体系的光吸收值缓慢增加, 而加入 100 nmol·L<sup>-1</sup> APEX2 时, 该反应体系的光吸收值迅速增加, 15 min 即达到平台期, 且光吸收值是前者的数倍, 说明体系中加入 100 nmol·L<sup>-1</sup> APEX2 更有利于迅速得到大量的 DAB 聚合物(图 4)。因此, 接下来的体外催化实验中, 选择 100 nmol·L<sup>-1</sup> APEX2 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DAB 混合溶液反应 15 min 作为最佳反应条件。

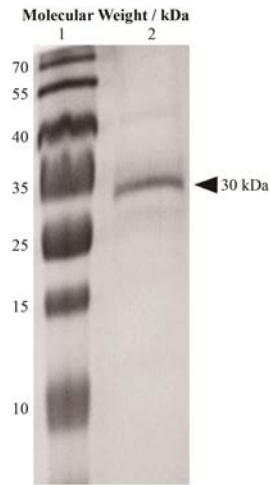


图 3 纯化的 APEX2 蛋白的 SDS-PAGE 图  
泳道 1: 蛋白 marker, 泳道 2: APEX2  
Fig.3 SDS-PAGE of purified APEX2.  
Lane 1: Protein marker, Lane 2: APEX2

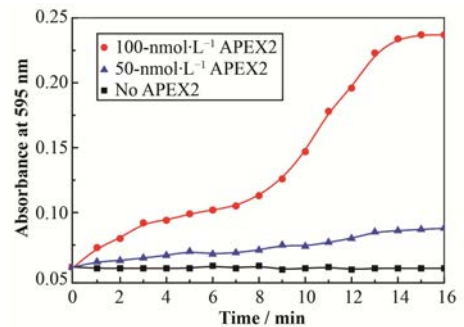


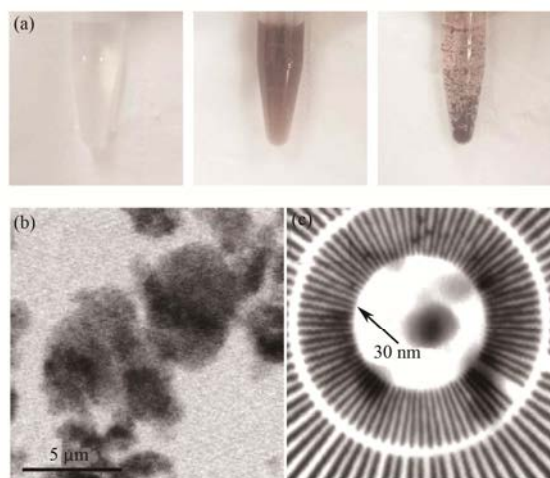
图 4 APEX2 催化 DAB 分子聚合的时间和浓度效应  
Fig.4 Time- and dose-dependent effects of APEX2 on catalyzing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent polymerization of DAB.

### 3.3 同步 X 射线成像

使用上述最佳反应条件在 EP 管中催化 DAB 分子聚合。反应过程中, 可见无色透明溶液逐渐变得浑浊, 最后聚合生成肉眼可见的颗粒(图 5(a))。在上海光源 08U1A 线站<sup>[4]</sup>对聚合物进行成像观测, 我们尝试了 284 eV、525 eV 和 710 eV 等多个能量, 发现 525 eV 能量下对聚合物能进行很好的成像(图 5(b)), 空间分辨率达到 30 nm(图 5(c)), 说明该聚合物具有良好的 X 射线吸收特性, 可以作为同步 X 射线成像标签用于进一步的分子探针设计及细胞成像研究。

## 4 讨论和结语

新的显微成像技术和与之相适合的分子探针对于更好地理解细胞生命过程具有十分重要的意义。在过去的几十年中, 荧光显微技术的出现结合荧光标记技术实现了对细胞内各种生物大分子的示踪, 给探究细胞的各种生命活动提供了革命性的手段。



**图 5** DAB 聚合物的同步 X 射线成像 (a) EP 管中 DAB 分子聚合过程成像, 左: 反应前, 中: 反应中, 右: 反应后, (b) 同步辐射 X 射线对 DAB 聚合物的成像, (c) 同步辐射 X 射线对标准靶的成像

**Fig.5** Synchrotron-based X-ray imaging of DAB polymer. (a) Generation of dense DAB product. Left: before the reaction, Middle: in progress, Right: after the reaction, (b) X-ray imaging of DAB polymer, (c) X-ray imaging of test star pattern sample

但是, 亚细胞结构和细胞内各种生物大分子大多处于 10–100 nm 尺度, 由于阿贝(Ernst Abbe)光学衍射极限的存在(200–300 nm), 传统的荧光显微技术很难对 100 nm 以下的细胞超微结构和细胞内重要生物分子进行成像观测<sup>[10]</sup>。免疫电镜技术可在极高的空间分辨率(<10 nm)下对感兴趣的生物分子进行成像, 但是由于电子的穿透深度较差(100–150 nm), 实验中需要对样品进行复杂的切片等预处理, 常导致结构信息的损失<sup>[11]</sup>。20 世纪 90 年代发展的超分辨荧光成像技术, 通过减小激光焦点的尺寸(以受激发射损耗显微技术(Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)为代表)或单分子定位和位置重构(以随机光学重建显微技术(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)为代表)的方法突破光学衍射极限, 实现了对细胞样品的纳米分辨成像。但是超分辨成像技术仍普遍存在成像速度慢、难以实现对多种生物分子同时标记等问题<sup>[12–13]</sup>。

基于同步辐射的 X 射线成像技术是纳米分辨细胞成像领域的“第三条道路”。该技术不需要经过复杂的样品预处理, 以纳米级空间分辨率对完整细胞进行成像。但是, 目前 X 射线显微技术多用于对细胞超微结构的高分辨成像<sup>[14–15]</sup>, 和该技术相适合的能够对细胞内生物分子进行特异性识别的分子探针仍较缺乏。本工作应用 X 射线具有良好的能量分辨的特点, 经体外化学催化反应成功制备了同步 X 射线可见的成像标签。相关研究结果为进一步制备 X

射线敏感的分子探针, 实现对细胞内生物分子的特异性识别和成像打下了良好的基础。

## 参考文献

- 1 Sakdinawat A, Attwood D. Nanoscale X-ray imaging[J]. *Nature Photonics*, 2010, **4**: 840–848. DOI: 10.1038/nphoton.2010.267.
- 2 Ade H, Zhang X, Cameron S, *et al.* Chemical contrast in X-ray microscopy and spatially resolved xanes spectroscopy of organic specimens[J]. *Science*, 1992, **258**: 972–975. DOI: 10.1126/science.1439809.
- 3 Zhu Y, Earnest T, Huang Q, *et al.* Synchrotron-based X-ray-sensitive nanoprobe for cellular imaging[J]. *Advanced Materials*, 2014, **26**: 7889–7895. DOI: 10.1002/adma.201304281.
- 4 Zhang L J, Xu Z J, Zhang X Z, *et al.* Latest advances in soft X-ray spectromicroscopy at SSRF[J]. *Nuclear Science and Techniques*, 2015, **26**(4): 040101. DOI: 10.13638/j.1001-8042/nst.26.040101.
- 5 Tian T, Zhang J C, Lei H Z, *et al.* Synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis of Fe, Zn and Cu in mice brain associated with Parkinson's disease[J]. *Nuclear Science and Techniques*, 2015, **26**(3): 030506. DOI: 10.13538/j.1001-8042/nst.26.030506.
- 6 Meyer-Ilse W, Hamamoto D, Nair A, *et al.* High resolution protein localization using soft X-ray microscopy[J]. *Journal of Microscopy-Oxford*, 2001, **201**: 395–403. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2001.00845.x.
- 7 Ashcroft J M, Gu W, Zhang T, *et al.* TiO<sub>2</sub> nanoparticles as a soft X-ray molecular probe[J]. *Chemical Communications*, 2008, **7**(21): 2471–2473. DOI: 10.1039/b801392f.
- 8 Niclis J C, Murphy S V, Parkinson D Y, *et al.* Three-dimensional imaging of human stem cells using soft X-ray tomography[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2015, **12**: 20150252. DOI: 10.1098/rsif.2015.0252.
- 9 Lam S S, Martell J D, Kamer K J, *et al.* Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling[J]. *Nature Methods*, 2015, **12**: 51–54. DOI: 10.1038/nmeth.3179.
- 10 Hell S W. Far-field optical nanoscopy[J]. *Science*, 2007, **316**: 1153–1158. DOI: 10.1126/science.1137395.
- 11 Leis A, Rockel B, Andrees L, *et al.* Visualizing cells at the nanoscale[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009, **34**: 60–70. DOI: 10.1016/j.tibs.2008.10.011.



- 12 Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, **19**: 780–782. DOI: 10.1364/OL.19.000780.
- 13 Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, **3**: 793–795. DOI: 10.1038/nmeth929.
- 14 Attwood D. Microscopy - nanotomography comes of age[J]. *Nature*, 2006, **442**: 642–643. DOI: 10.1038/442642b.
- 15 Schneider G, Guttman P, Heim S, *et al.* Three-dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy[J]. *Nature Methods*, 2010, **7**: 985–988. DOI: 10.1038/NMETH.1533.