

2013年安徽省核学会学术年会

核农学研究进展 暨同位素在生物光谱中的应用

报告人：黄青

中国科学院合肥物质科学研究院 技术生物与农业工程研究所

E-Mail: huangq@ipp.ac.cn



安徽，合肥
2013. 12. 27

报告内容

一、核农学研究进展：辐射（离子束）诱变的应用、基础和方法

- 1.应用：辐射(离子束)诱变育种研究进展
- 2.基础：辐射(离子束、等离子体)作用效应、过程和机理研究
- 3.方法：基于光谱成像的诱变机理研究及突变株筛选

二、同位素在生物光谱学中的应用

- 1.同位素应用简介
- 2.生物应用举例：同位素示踪，核磁共振及成像
- 3.生物振动光谱中的应用

三、展望

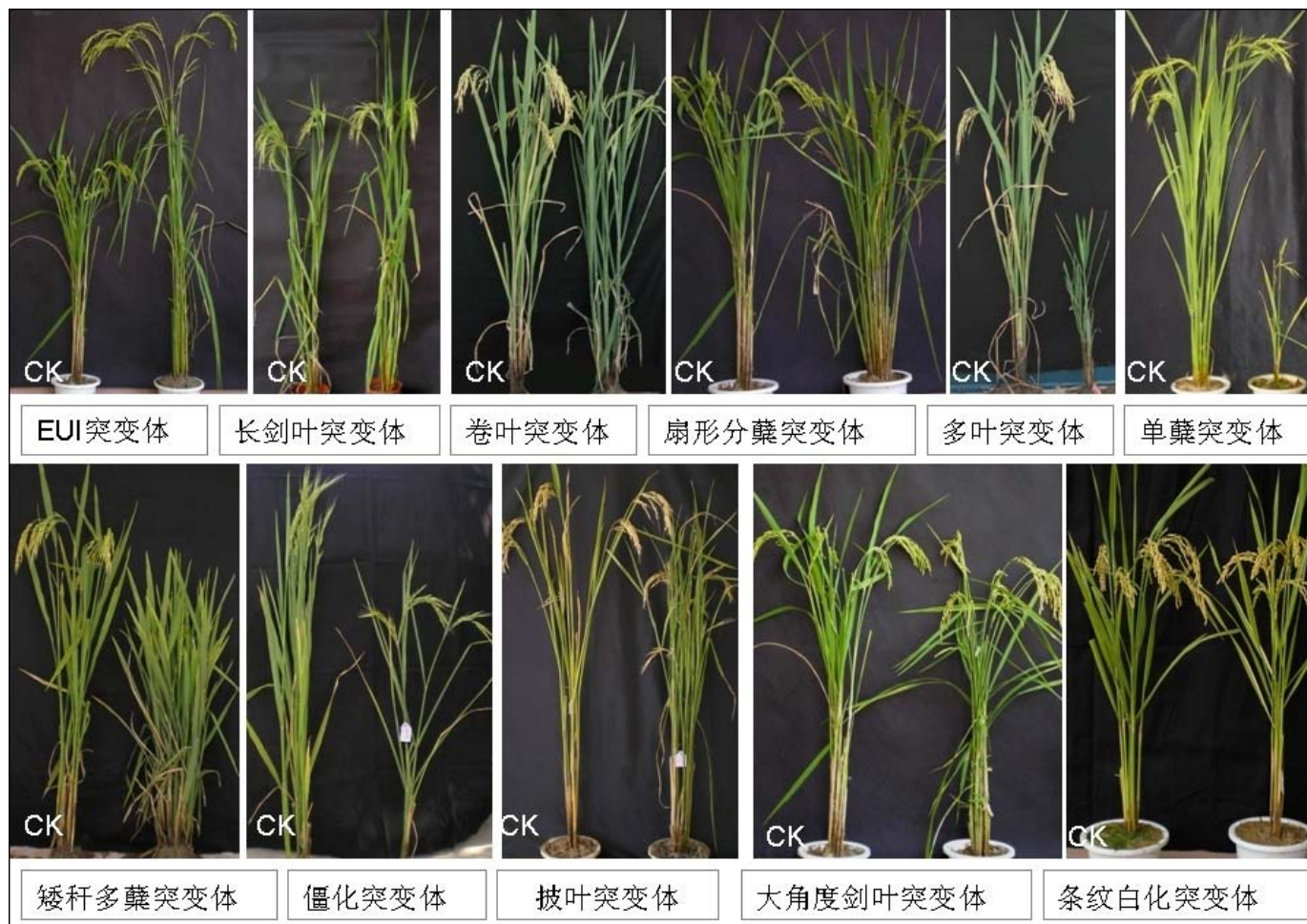
离子束育种生物技术



离子束育种生物技术我国科研人员自创、具有自主知识产权技术，并已发展成为一门新兴的交叉学科。现在，离子束生物技术的应用取得了丰硕的成果，仅中科院和安徽省离子束生物工程重点实验室一家，就育成农作物新品种36个，大面积推广。

(技术生物所)

离子束应用-水稻突变体

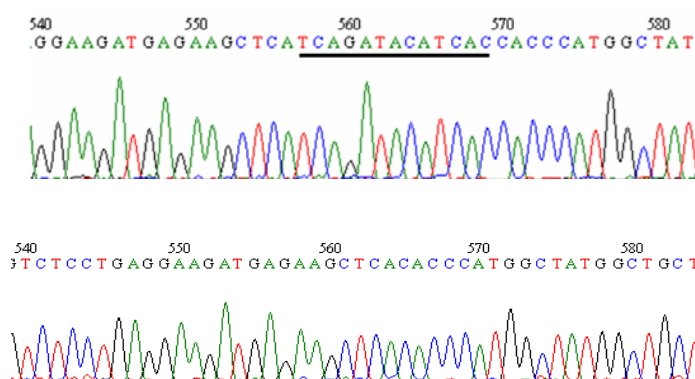


建立了水稻测序品种日本晴和9311突变体库和高效选择技术。为基因遗传和功能研究以及新品种提供种质资源。

(技术生物所)

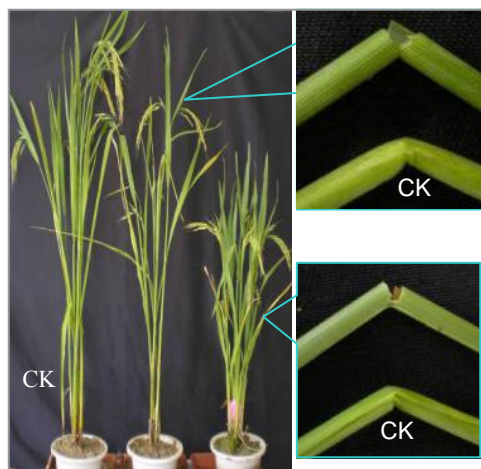
离子束应用-水稻突变体

脆秆水稻基因：细胞壁合成突变基因-*tsbc1*

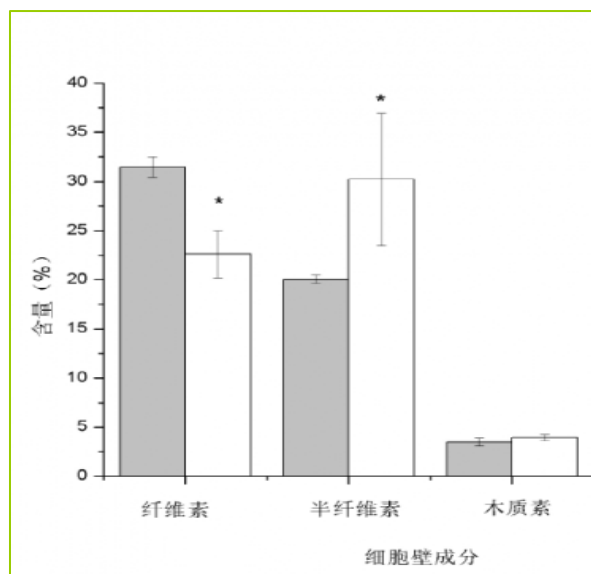


克隆 *tsbc1* 定位于水稻第8染色体，外显子上存在13bp的缺失。

脆秆水稻与对照品种



高秆和矮秆脆茎突变体



茎秆成分变化

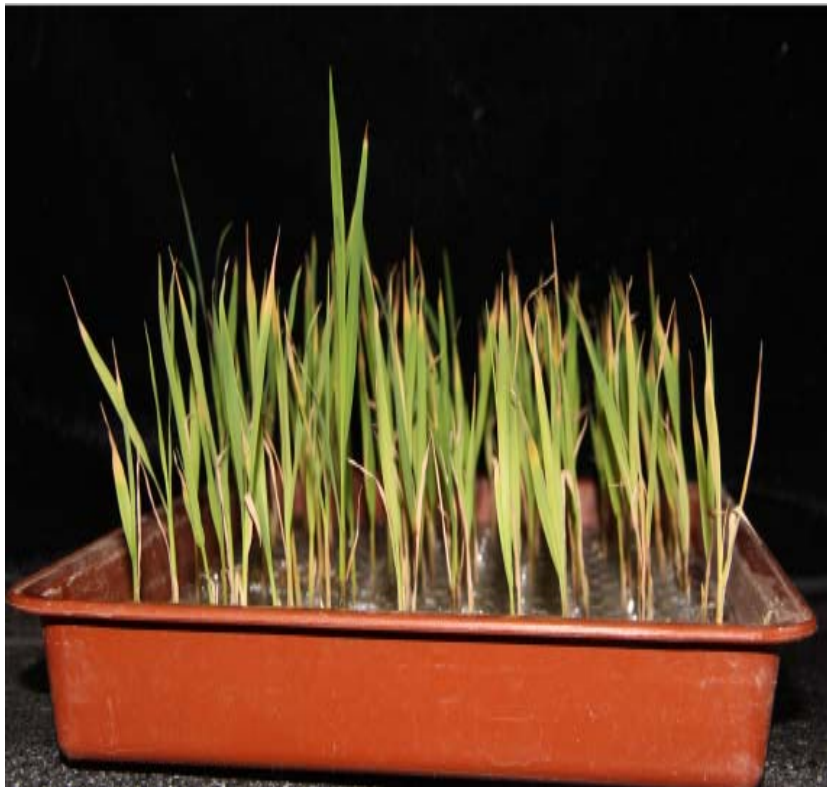


脆秆水稻秸秆均长5.2cm，对照为30.5cm。油耗降低15%。

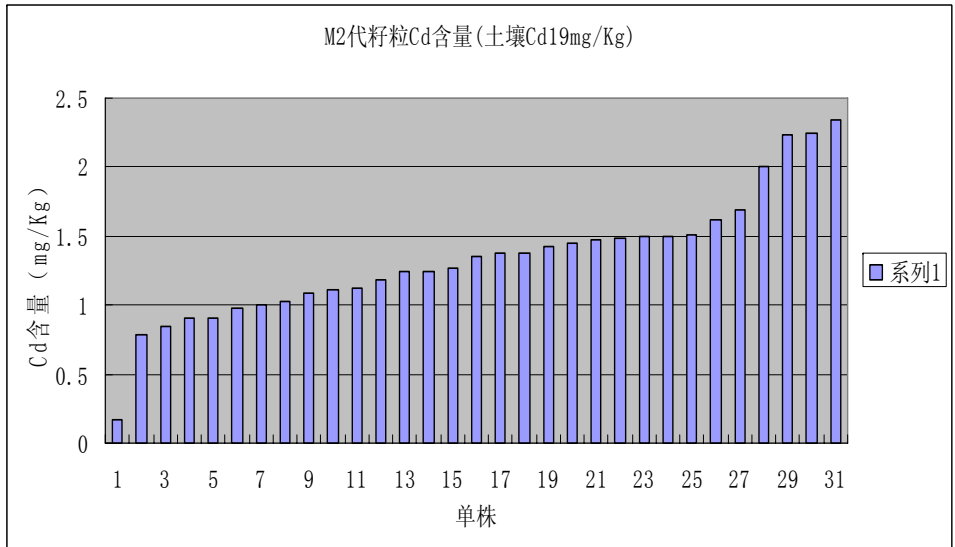
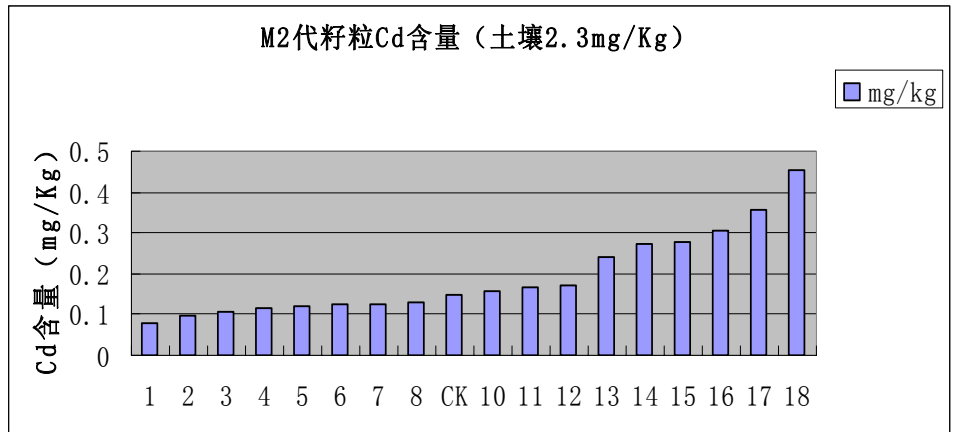
(技术生物所)

离子束应用-水稻突变体

低镉吸收或耐镉水稻突变体筛选



(技术生物所)



最低Cd含量较CK低8倍为0.168mg/Kg(国标0.2)

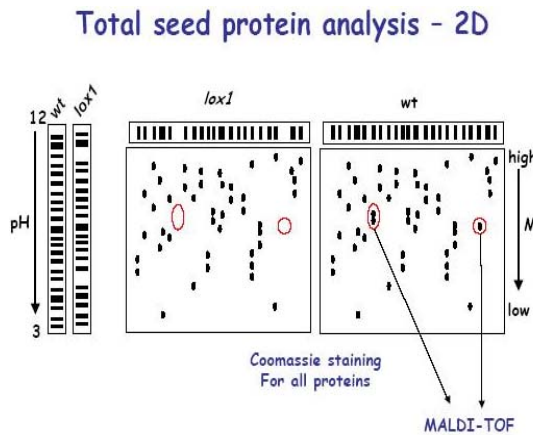
离子束应用-水稻突变体

水稻Lox1和Lox3突变体功能验证：种子衰老、抗虫性

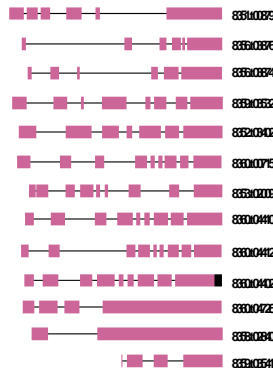
人工老化1297和1377储藏特性差异

名称	加速老化 (T 43±2℃, RH85%)		
	0	10天	20天
1377	91	0	0
1297	99	92	67

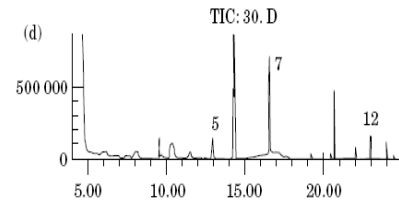
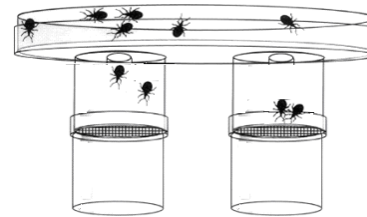
lox1攻击脂肪粒的膜脂卵磷脂，启动脂肪代谢



Structure of the LOX Gene Family



水稻Lox1定位克隆 (hr3)



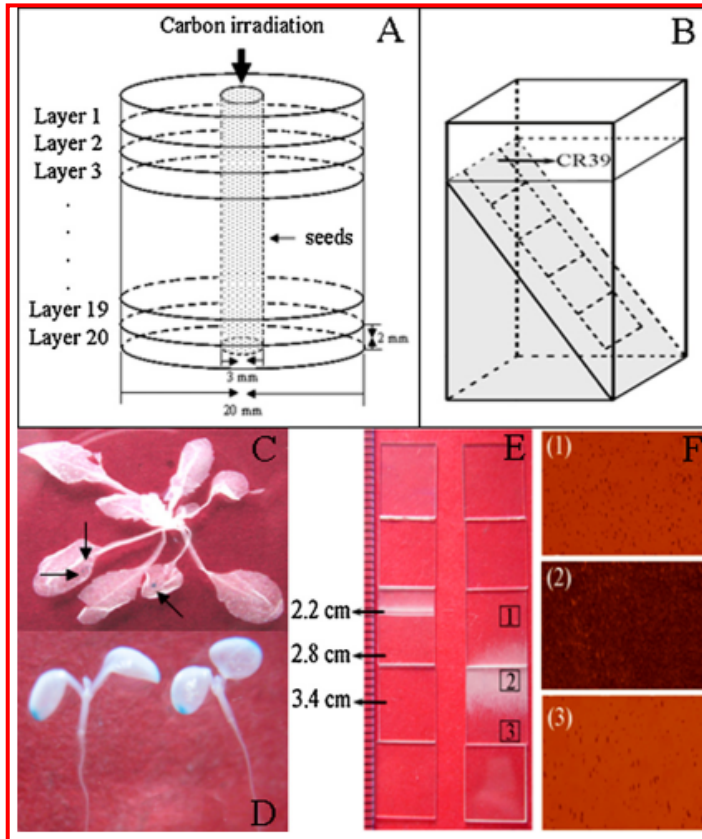
戊醛分子是Lox3缺失稻谷引诱仓储害虫初期性害虫玉米象和后期性害虫拟谷盗的化学信息物质。



(技术生物所)

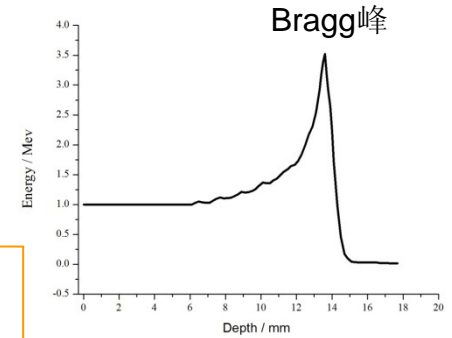
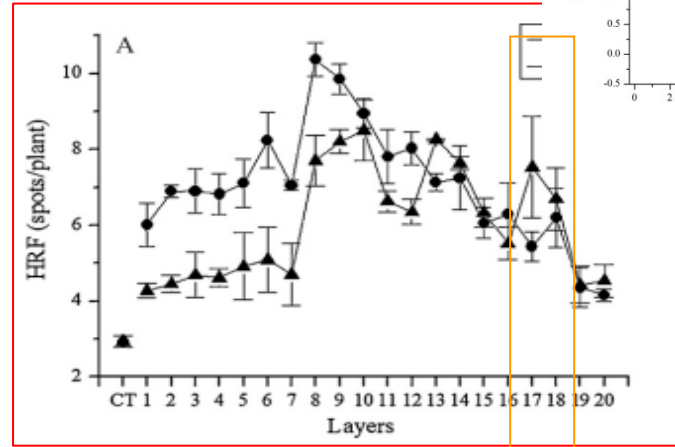
基础研究-离子束生物学效应和机制

碳离子径迹生物效应的分布

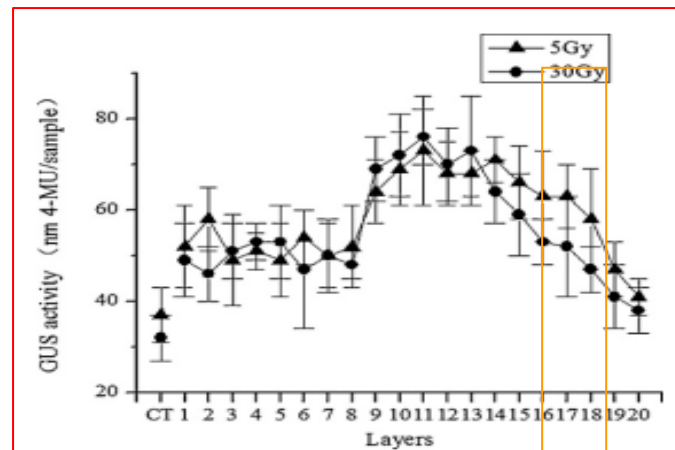


同源重组频率（上图）和AtRAD54基因表达水平（下图）沿着辐射径迹的变化
(技术生物所)

(DNA)



C12的入射深度与能量沉积



细胞和活体的差异

基础研究-电离辐射低剂量刺激效应

低剂量辐射刺激效应研究(辣椒, 生菜, 萝卜, 豇豆等)

发芽势、发芽率、幼苗高度、主根长度

辐射源: ^{60}Co γ 射线

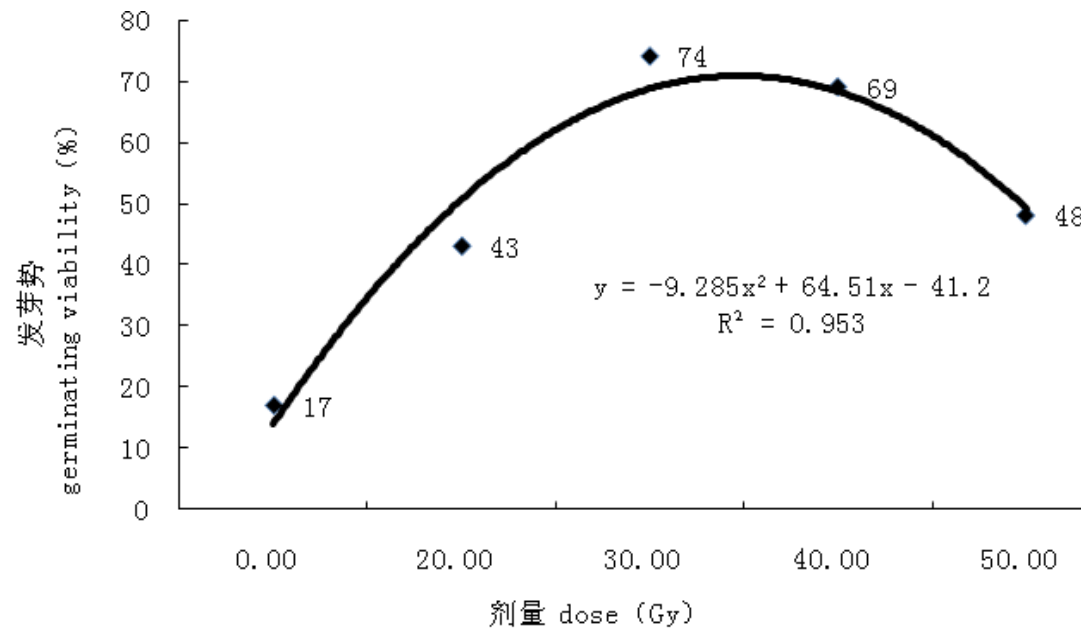


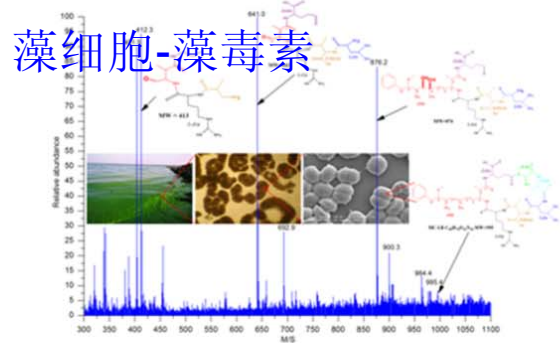
图1 ^{60}Co γ 射线低剂量辐照对发芽势的影响
Fig.1 Effect of ^{60}Co γ rays irradiation on germinating viability

(安农大-章铁教授提供)

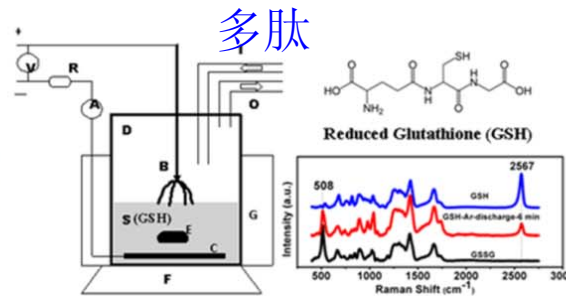
基础研究-辐射作用的原初物理化学过程



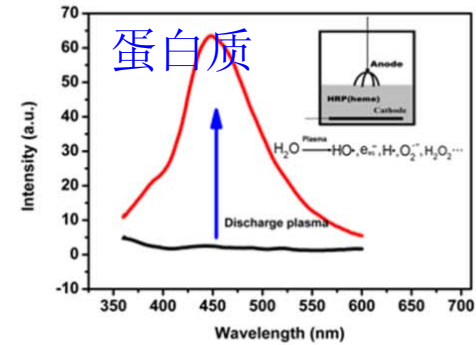
间接作用
(蛋白质)



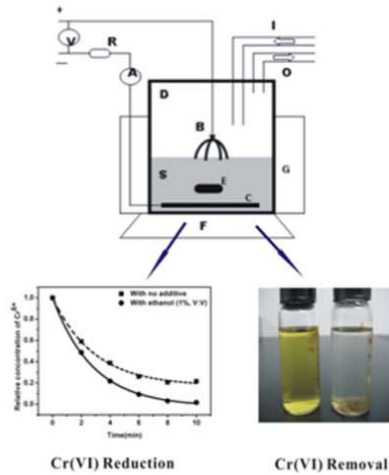
Water Res., 2012, 46, 6554-6562



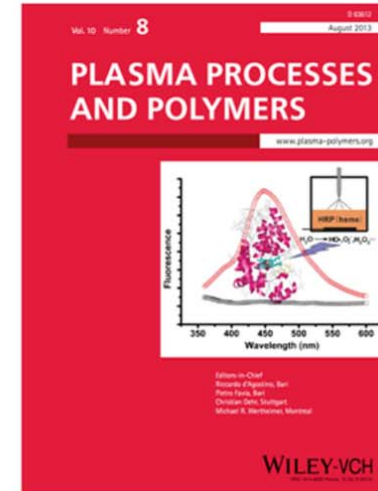
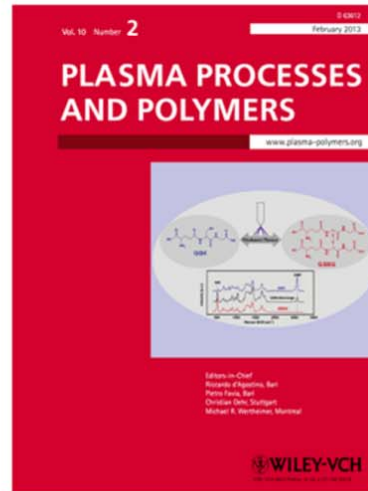
Plasma Process. Polym., 2013, 10, 181-188



Plasma Process. Polym., 2013, 10, 731-739



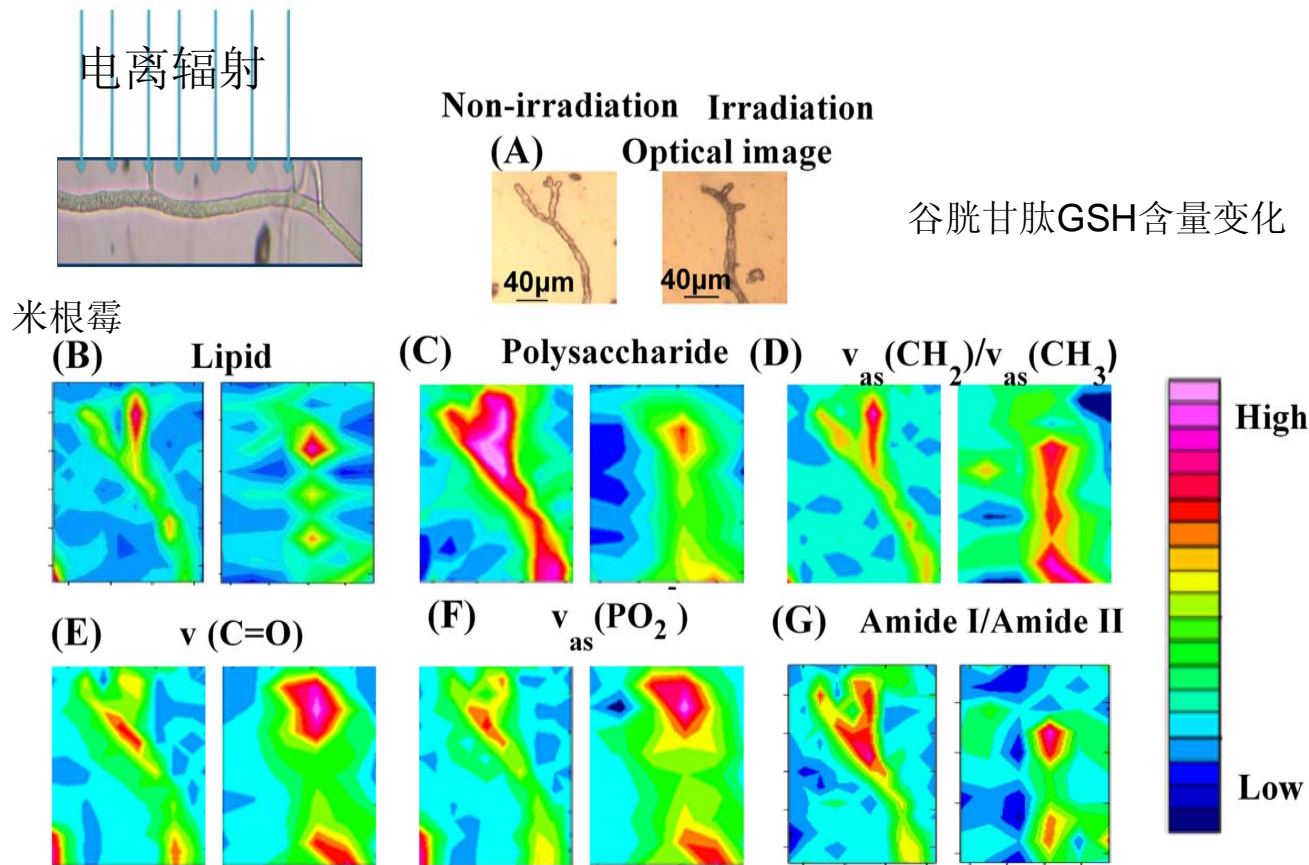
Environ. Sci. Technol., 2011, 45, 7841-7847



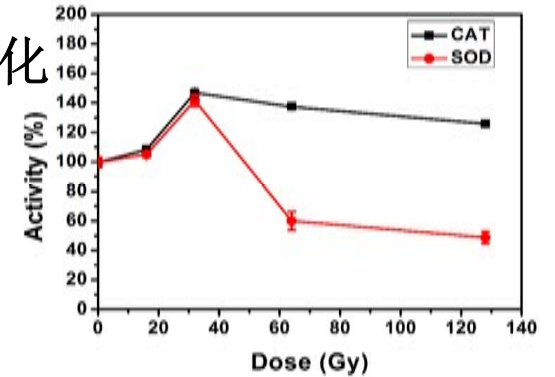
(我们课题组)

方法研究-辐射诱变机理的光谱成像分析

光谱显微成像技术研究微生物化学成分在空间和时间上的变化



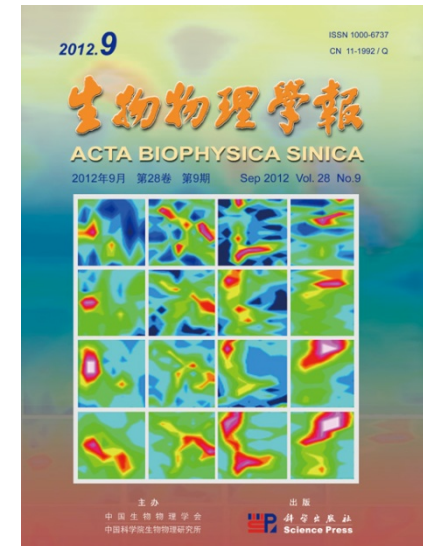
谷胱甘肽GSH含量变化



抗氧化蛋白酶含量变化

(J. Mol. Struct. 2013, 1031, 1-8)

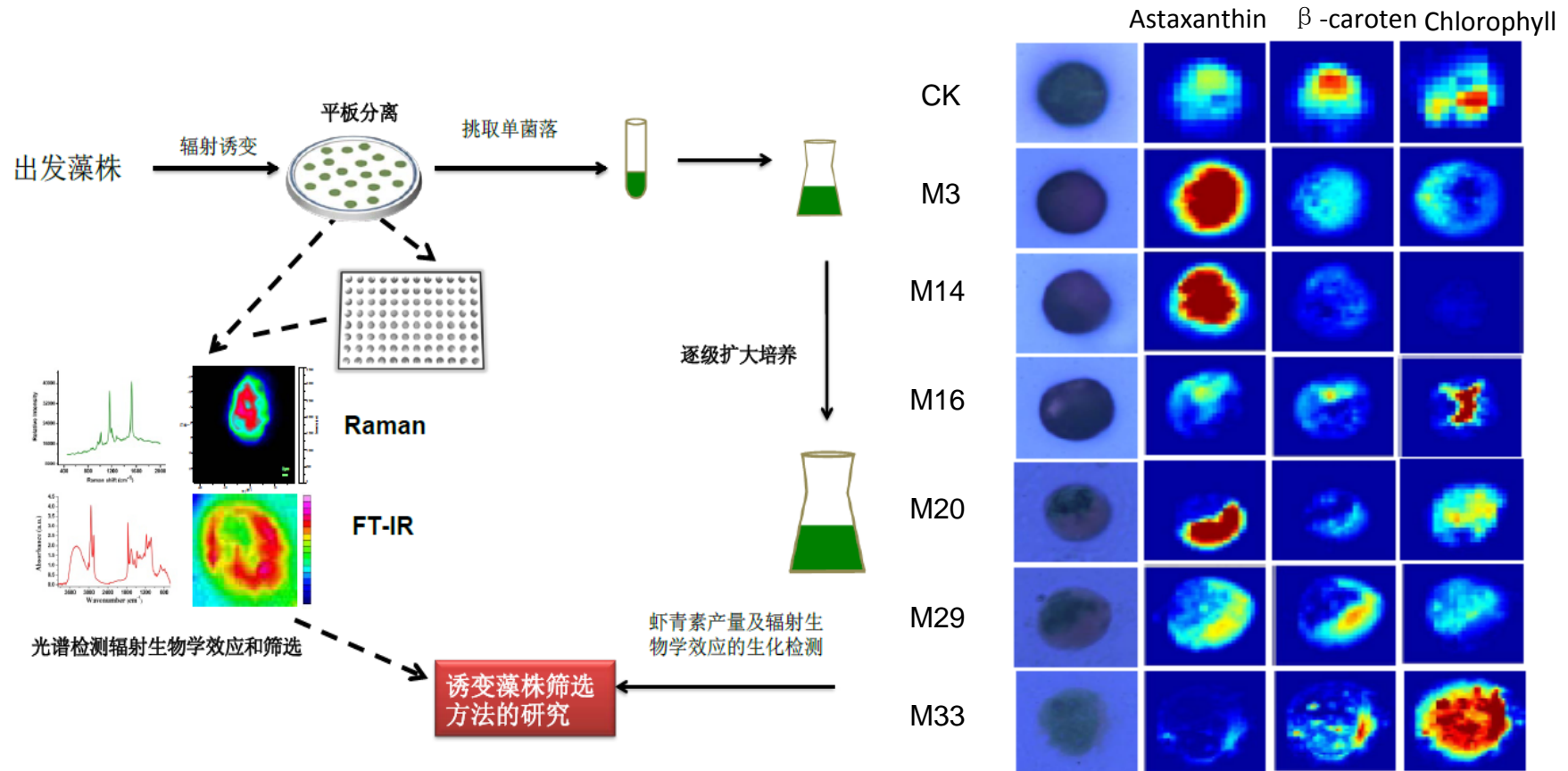
(我们课题组)



《生物物理学报》邀请
综述 (2012第九期)

方法研究-辐射诱变育种光谱筛选方法

雨生红球藻不同突变株光谱成像及光谱筛选指标

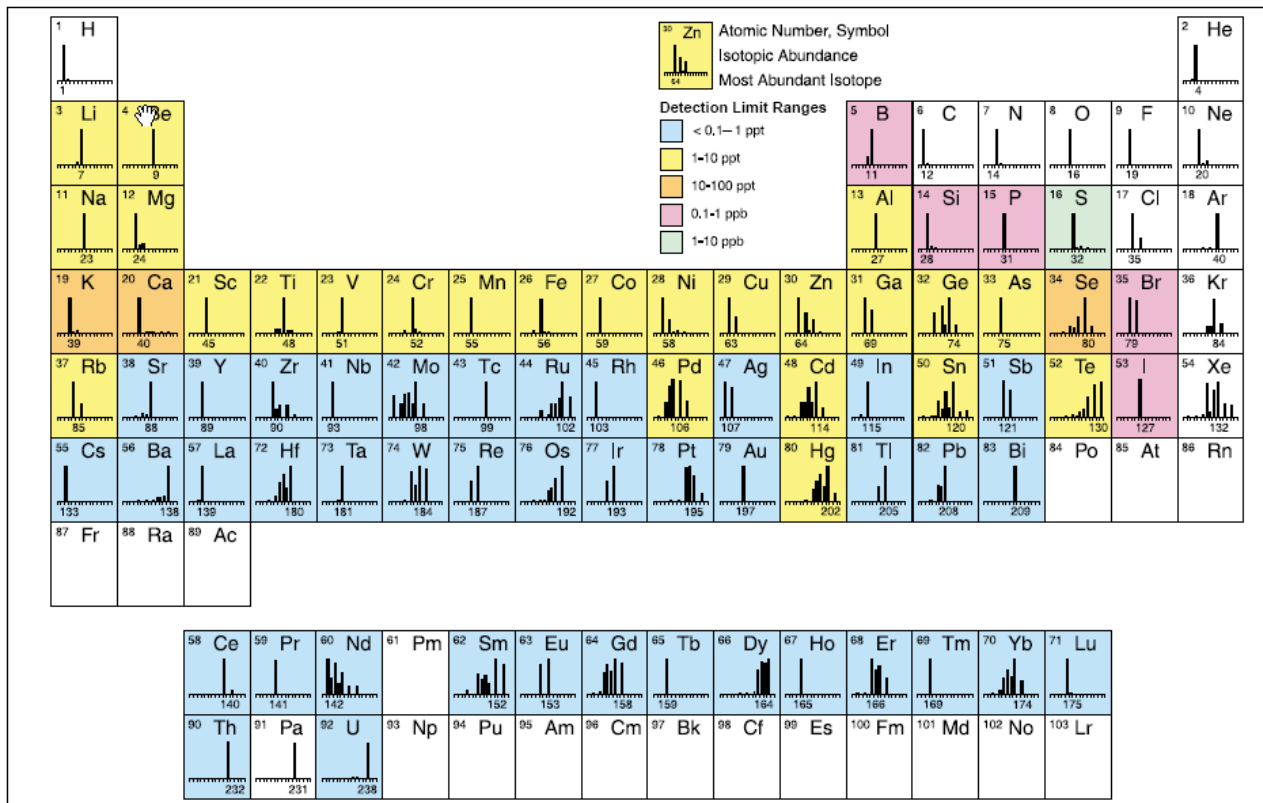


通过光谱强度分析可以选出产虾青素高的雨声红球藻突变株

(我们课题组)

同位素应用

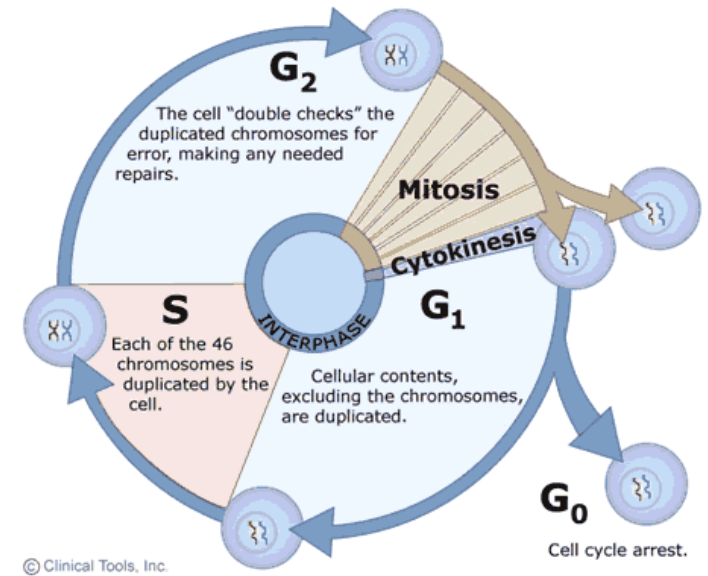
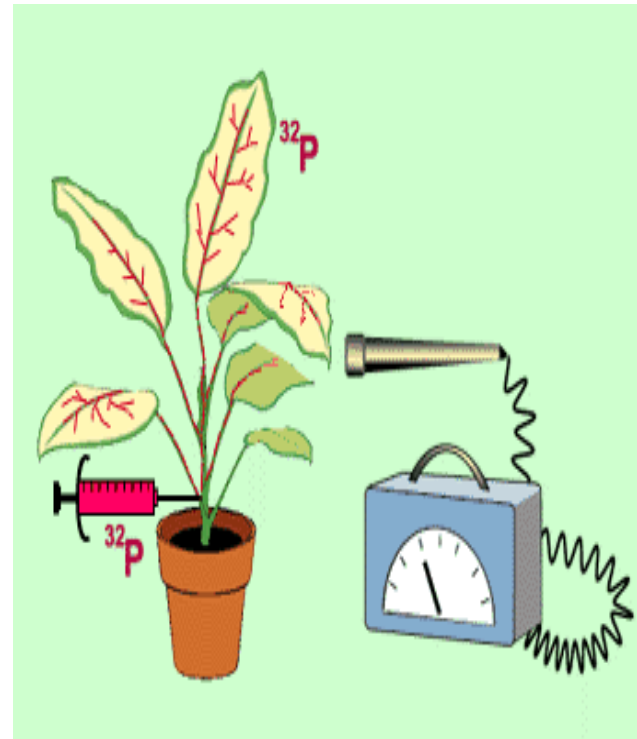
两类同位素（核素稳定性）： 1. 稳定同位素； 2. 放射性同位素



1. 在工业上的应用: 同位素示踪、同位素监控、辐射加工方面
2. 在农业上的应用: 辐射育种、示踪技术、食品辐照保藏
3. 在医学上的应用: 核医学诊断、癌症放射性治疗
4. 其它...

同位素生物应用举例1：同位素示踪

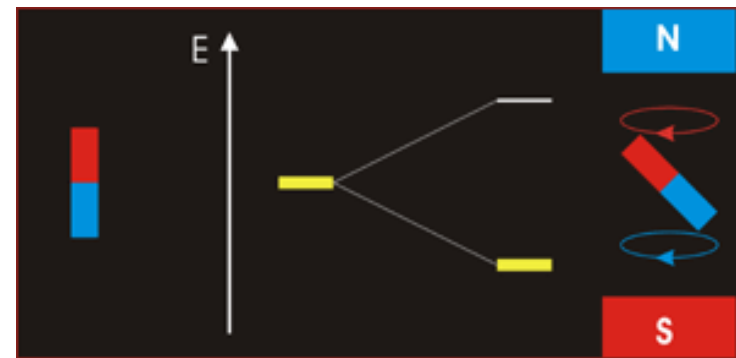
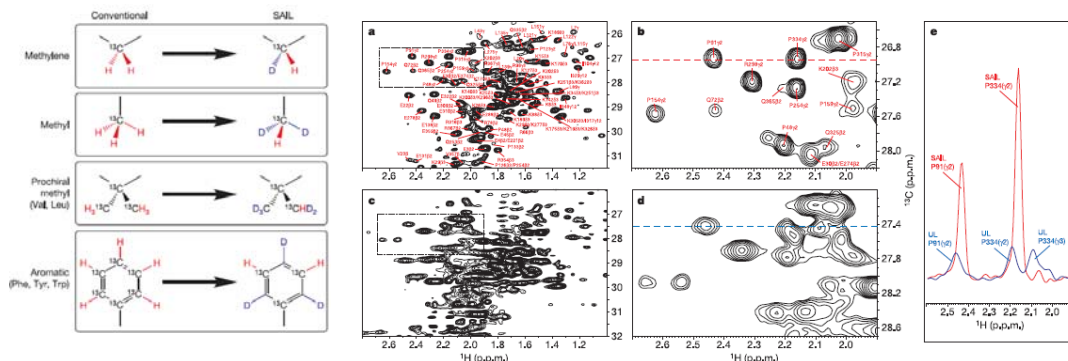
1923年，Hevesy 将豆科植物浸泡在含有天然放射性核素铅盐溶液中，研究植物吸收铅的机制(分布和转移)。结果发现：铅全部被吸附在根部。



利用放射自显影技术显示标记细胞，通过统计标记有丝分裂细胞百分数的办法来测定细胞周期。通常使用的是 ^3H 或者 ^{14}C 标记的TDR。

同位素生物应用举例2：核磁共振

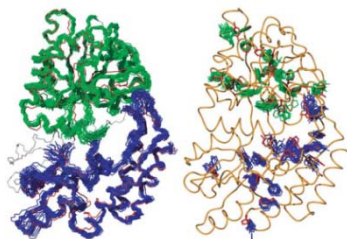
核自旋 $I=0$ 的核素，没有核磁矩，不会发生核磁共振核自旋 I 不为0的核素是核磁共振可研究的对象NMR中应用最广泛的是 $I=1/2$ 的核素，如 ^1H ， ^2D ， ^{15}N ， ^{13}C 和 ^{31}P 。



Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations

Nature,2006,vol440,p52

K. Wüthrich



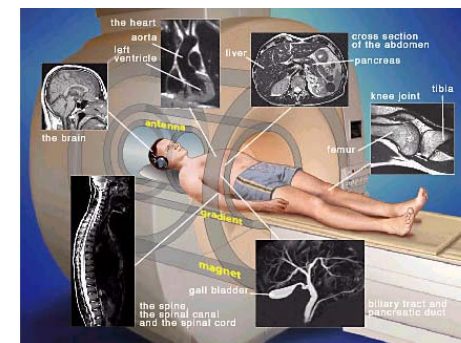
S. P. Mansfield



P. C. Lauterbur



MRI



2002年诺贝尔化学奖

2003年诺贝尔生理学 and 医学奖

同位素生物应用举例3：生物光谱

同位素在振动光谱中应用

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_e}{\mu}}$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

分子振动光谱的同位素效应：当分子中的某一原子被其同位素取代化，分子的力常数 k 不变，但其约化质量 μ 发生变化，从而使其特征振动频率 ν (或特征波数)发生变化。

广泛应用于振动光谱峰的指认。

$$\frac{\omega_e}{\omega_e'} = \sqrt{\frac{\mu'}{\mu}} \quad \Rightarrow \quad \omega_e - \omega_e' = \left(\sqrt{\frac{\mu}{\mu'}} - 1 \right) \omega_e$$

早期工作

MARCH, 1938

JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS

The Isotope Effect in the Vibration Spectrum of CCl_4

C. K. WU AND G. B. B. M. SUTHERLAND

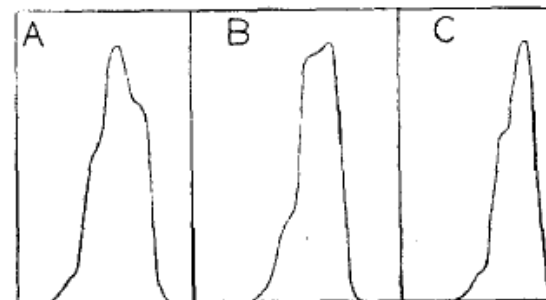
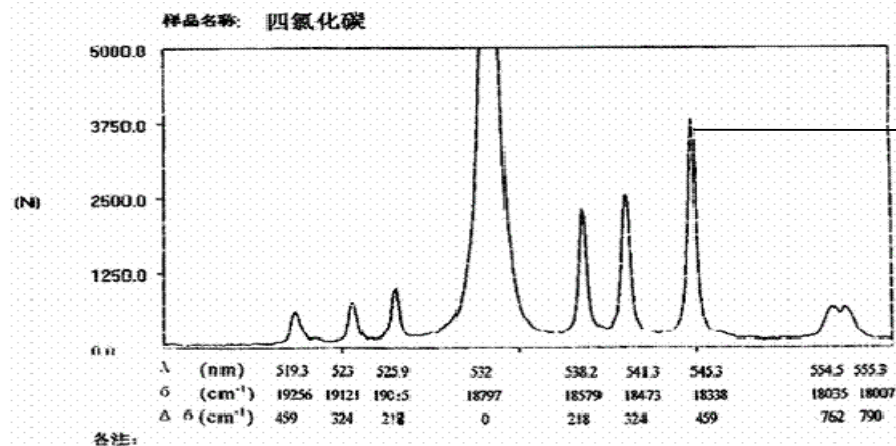
Laboratory of Physical Chemistry, Cambridge, England

(Received October 19, 1937)



吴钰铠

The fine structure in certain of the Raman lines of CCl_4 observed by Langseth and interpreted by him as being due to a lack of symmetry in the four carbon valencies has been shown to be accountable for as a purely isotopic effect. Rosenthal's general theory of the isotope effect in molecules of this type has been applied to the case of CCl_4 in an attempt to differentiate between two types of potential function which have been proposed for this molecule. The fine structure patterns predicted on the different theories have been worked out. Unfortunately the existing experimental data are not sufficiently good to allow a decision to be made as to which is the better function.



在生物振动光谱分析的应用



T.G.Spiro

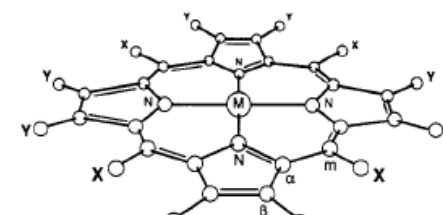
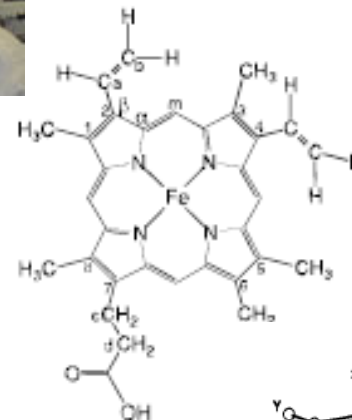
《Biological applications of Raman spectroscopy》

J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 12638–12646

Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum Heme Labeling in Myoglobin

Songzhou Hu,[†] Kevin M. Smith,[‡] and Thomas G. Spiro^{*,†}

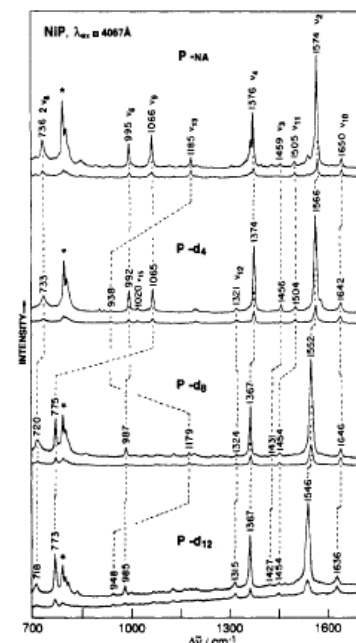
Contribution from the Departments of Chemistry, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544, and University of California, Davis, California 95611



Consistent Porphyrin Force Field. 1. Normal-Mode Analysis for Nickel Porphine and Nickel Tetraphenylporphine from Resonance Raman and Infrared Spectra and Isotope Shifts

Xiao-Yuan Li,[†] Roman S. Czernuszewicz,[†] James R. Kincaid,[‡] Y. Oliver Su,[†] and Thomas G. Spiro^{*,†}

Department of Chemistry, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544, and Department of Chemistry, Marquette University, Milwaukee, Wisconsin 53233 (Received: December 20, 1988)



Consistent Porphyrin Force Field. 2. Nickel Octaethylporphyrin Skeletal and Substituent Mode Assignments from ¹⁵N, Meso-d₄, and Methylene-d₁₆ Raman and Infrared Isotope Shifts

Xiao-Yuan Li,[†] Roman S. Czernuszewicz,[†] James R. Kincaid,[‡] Paul Stein,[§] and Thomas G. Spiro^{*,†}

Department of Chemistry, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544, Department of Chemistry, Marquette University, Milwaukee, Wisconsin 53233, and Department of Chemistry, Duquesne University, Pittsburgh, Pennsylvania 15282 (Received: December 20, 1988)

我的一些相关工作

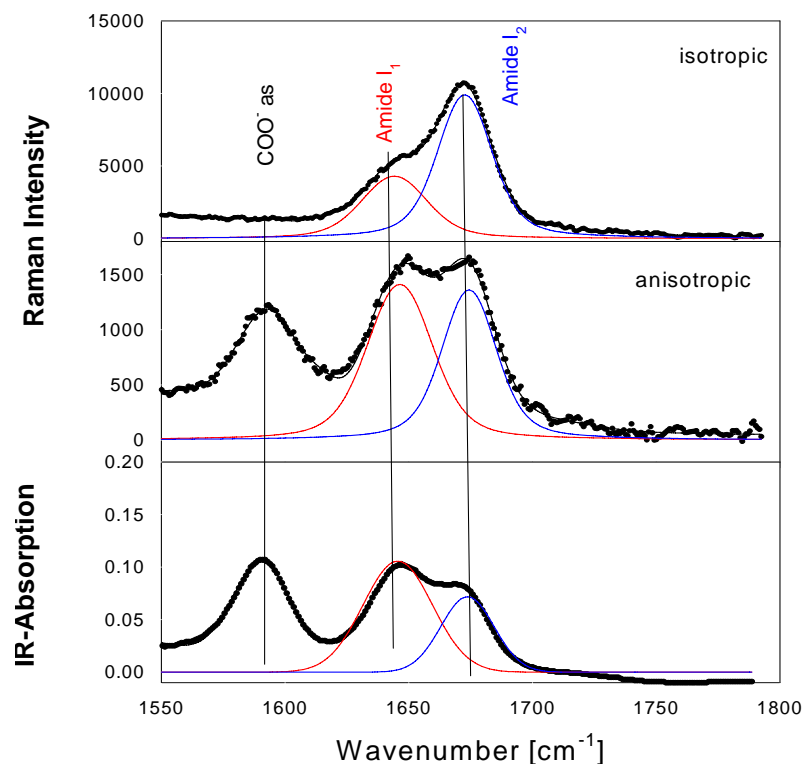
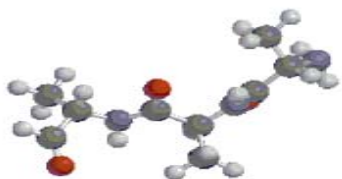
J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 9628–9633

Dihedral Angles of Trialanine in D₂O Determined by Combined FTIR and Polarized Visible Raman Spectroscopy

Reinhard Schweitzer-Stenner,^{*,§} Fatma Eker,[†] Qing Huang,[§] and Kai Griebenow[§]

Contribution from the Departments of Chemistry and Biology, University of Puerto Rico, Rio Piedras Cc

Received May



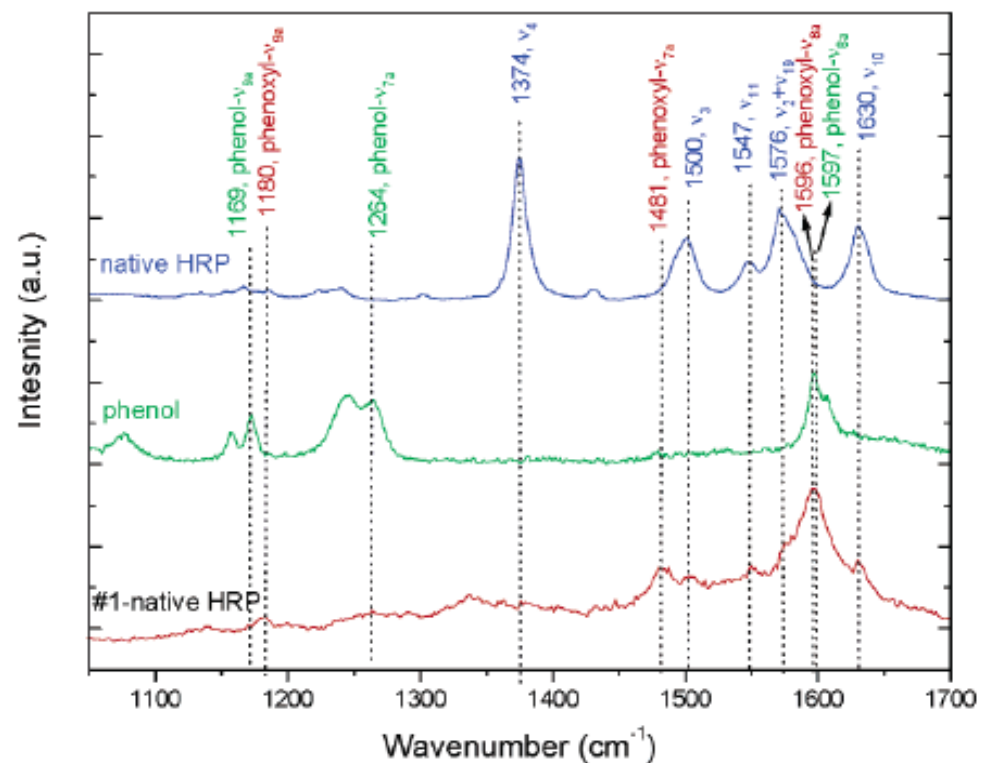
J|A|C|S

ARTICLES

Published on Web 01/15/2005

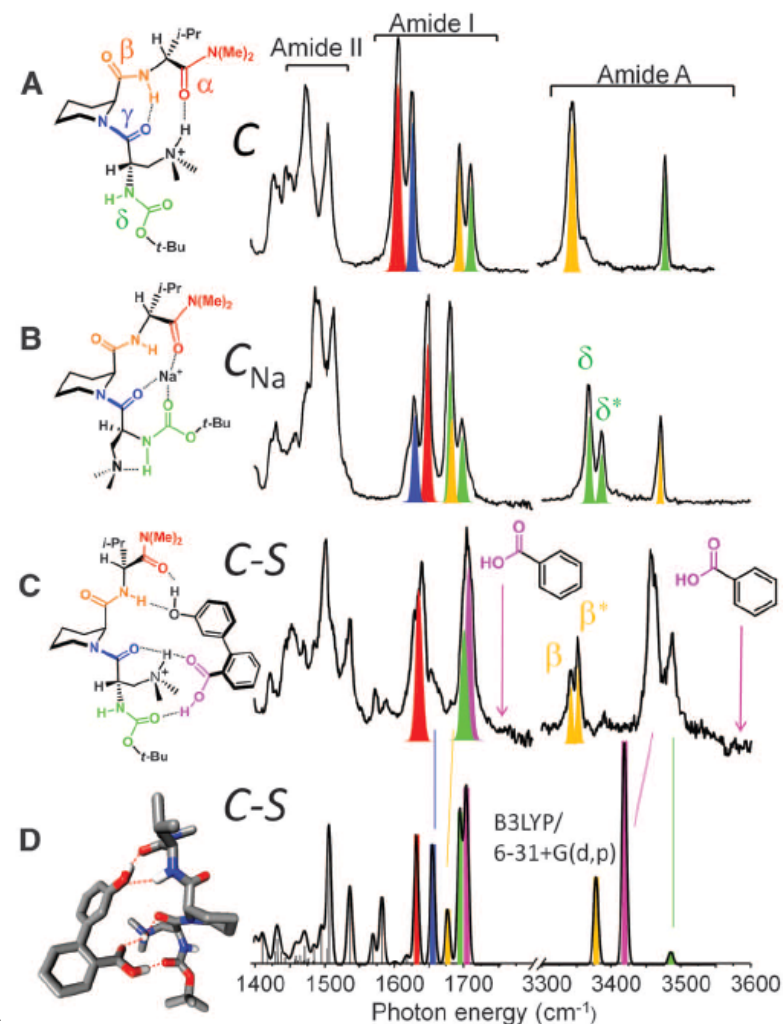
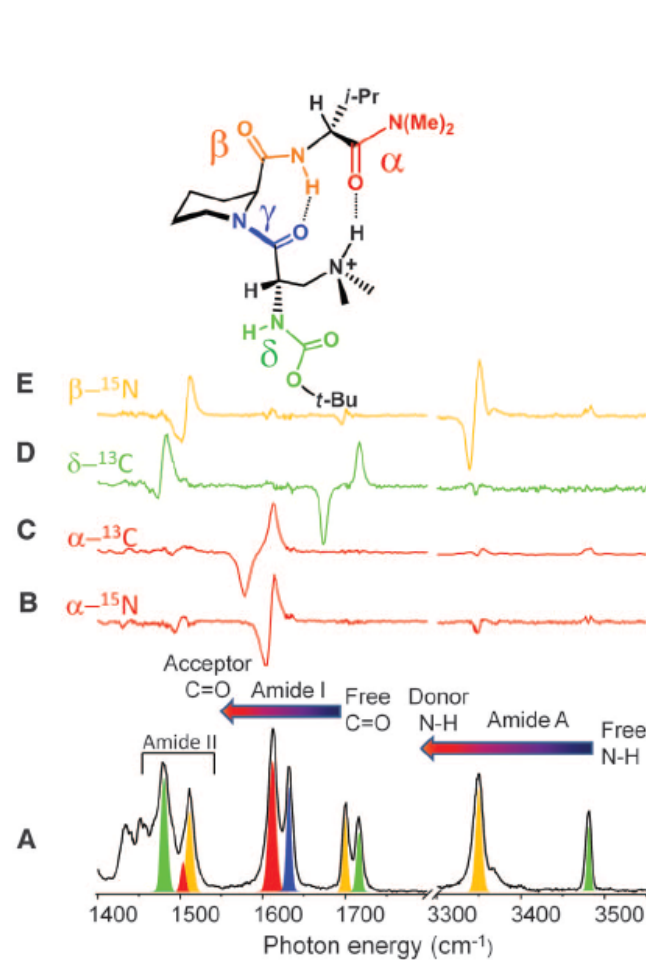
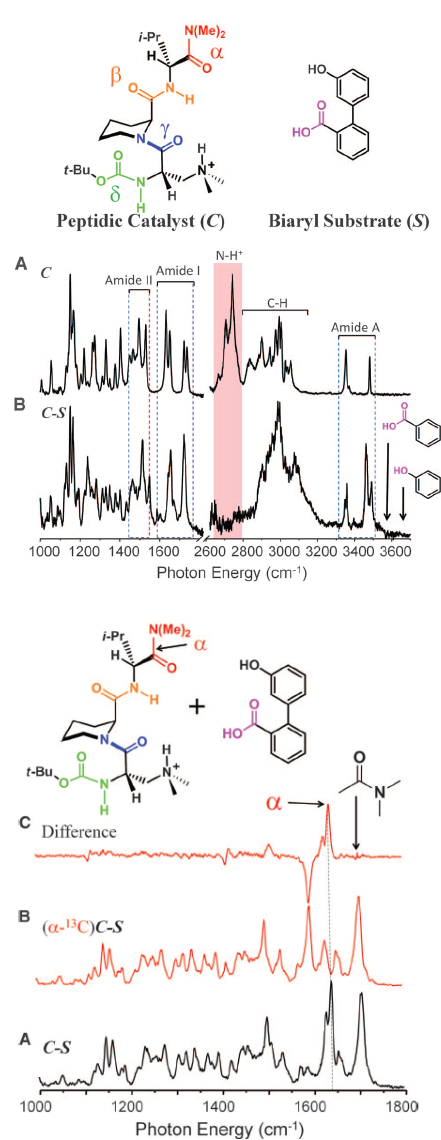
Inactivation of Horseradish Peroxidase by Phenoxy Radical Attack

Qing Huang,^{†,||} Qingguo Huang,[‡] Roger A. Pinto,[§] Kai Griebenow,^{||}
Reinhard Schweitzer-Stenner,^{*,†} and Walter J. Weber, Jr.^{*,‡}



最近研究新进展: 结构、作用

同位素标记红外光谱研究分子之间相互作用

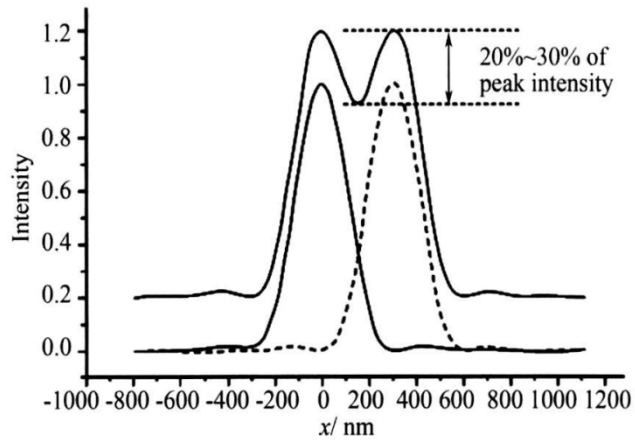


C: peptide catalyst
S: biaryl substrate

同位素标记确定基团的相应峰，
研究非共价键配合时的结合方式

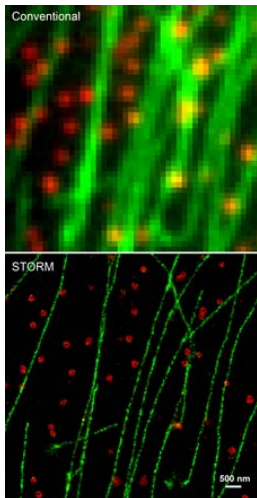
Determination of Noncovalent Docking by Infrared Spectroscopy of Cold Gas-Phase Complexes

最近新进展: 单分子、超空间分辨成像



瑞利判据: 光强叠加处最小值低于最大值处的20%~ 30%时刚好被分辨

记录单个荧光分子的光子并通过
PSF 数字化计算出中心位置

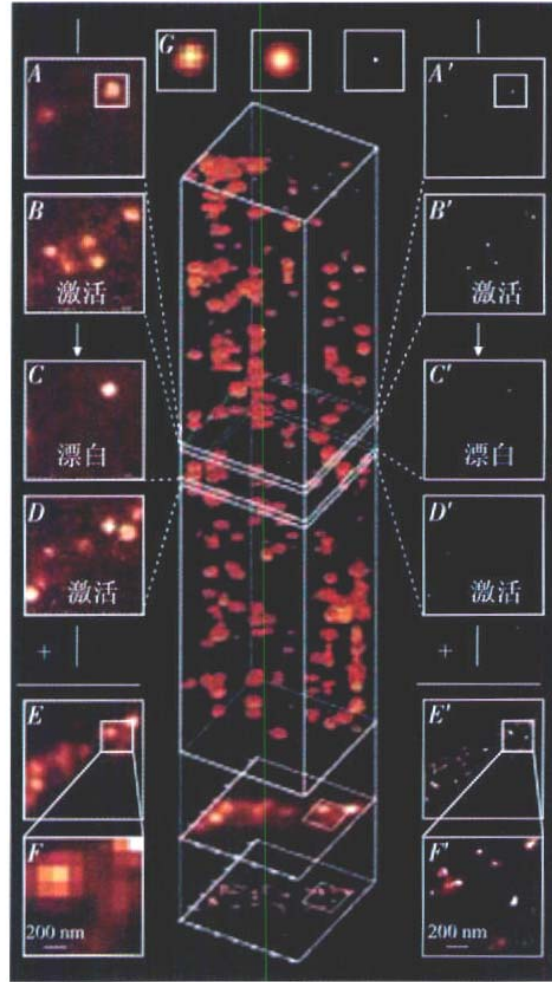


其核心思想:
one molecule at a time

“单分子”

庄小威: STORM

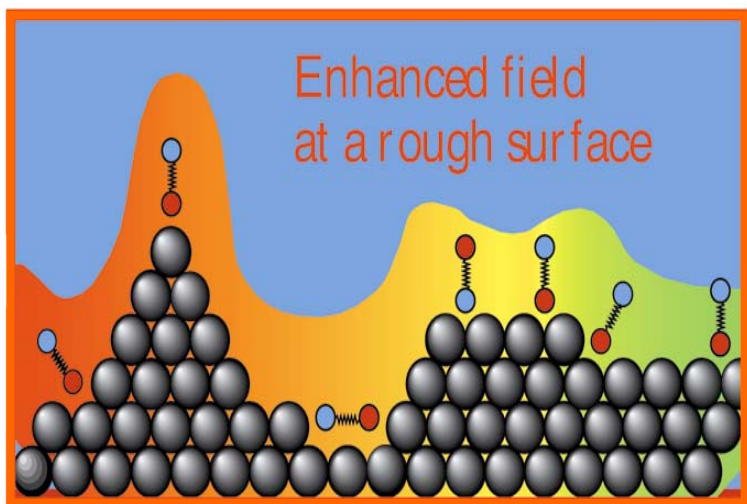
PALM (Photoactivated Localization Microscopy) (Betzig、Lippincott-Schwartz)



A, B, C, D, E, F 展示了实际实验过程及得到的原始数据; A', B', C', D', E', F' 展示了用高斯拟合确定荧光分子的中心, 叠加产生了超分辨率图像;

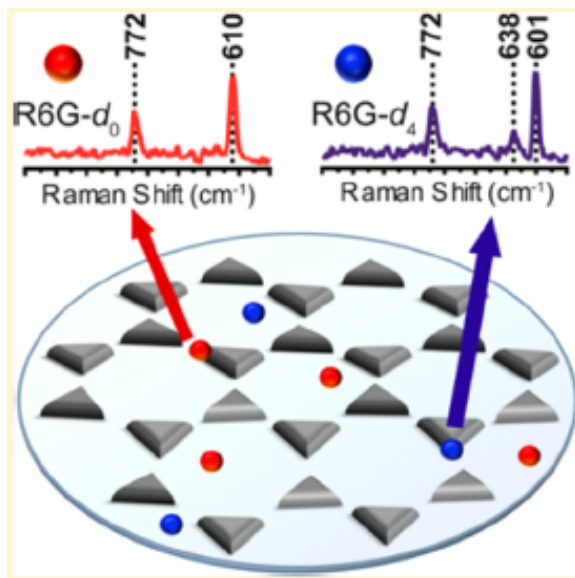
Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science, 2006, 313(5793): 1642~1645

表面增强拉曼光谱 (SERS)



单分子检测 $> 10^{12}$ (10^{14})

- 需要纳米级结构（粗糙表面或纳米粒子）
- 激发局域的表面等离子体共振
- 分子所处的表面的局域电场得到增强

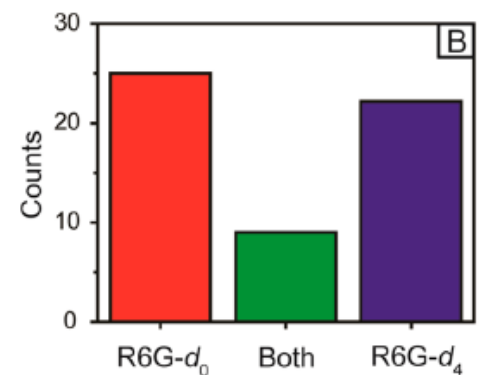
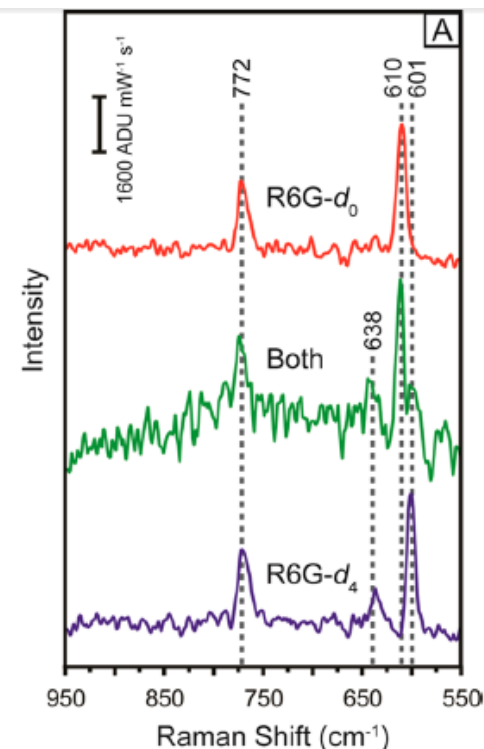


红色表示同时无同位素R6G的SERS谱

紫色是同位素取代的R6G的SERS谱

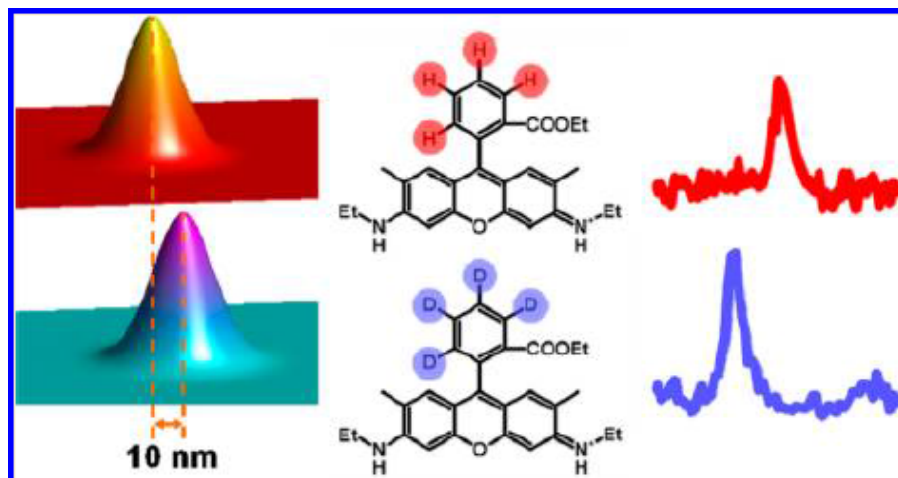
绿色表示同时含两种分子时的SERS谱

探测表明没有两种分子同时存在的情况，证明是单分子的SERS



Single Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy without Nanogaps

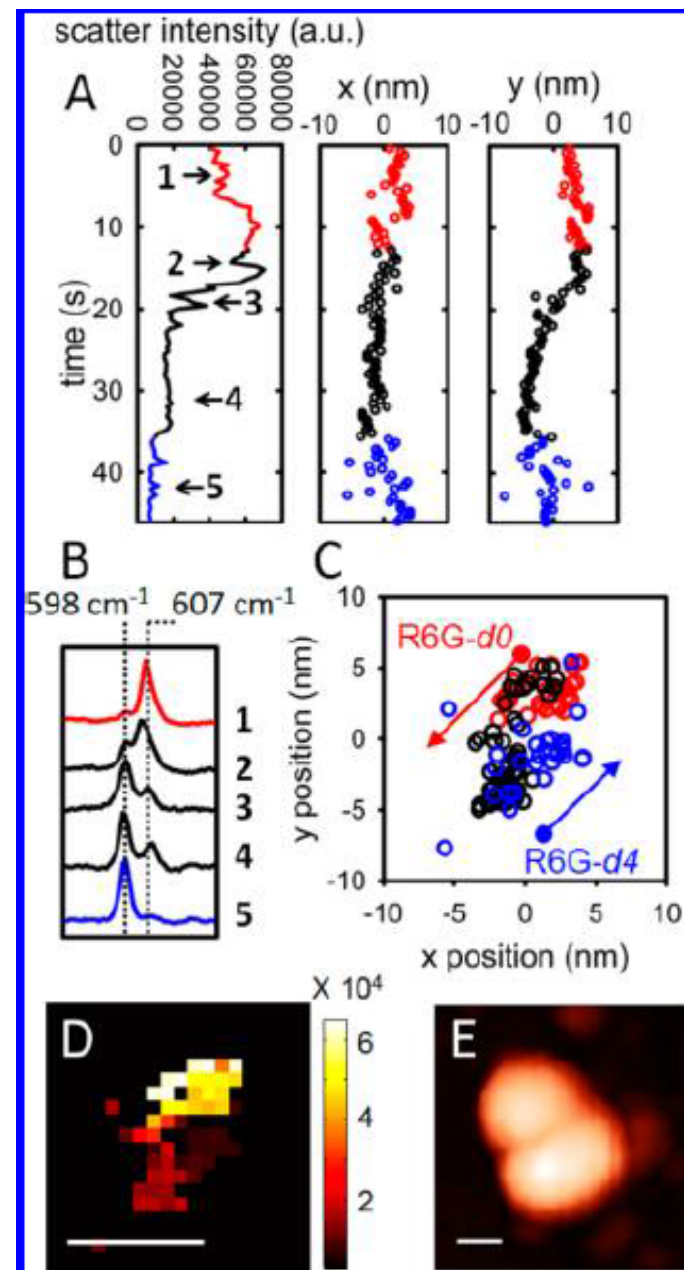
同位素标记SERS成像



R6G-d0 (red), R6G-d4 (blue)

B D取代H后，引起SERS峰偏移

根据SERS信号区别来定位区分同位素取代和未取代的分子,C是根据区域信号强度扫描得到的成像图D, E是AFM对照



Super-Resolution SERS Imaging beyond the Single-Molecule Limit: An Isotope-Edited Approach

展望

1、核农学发展：

- 应用推广
- 辐射诱变机理和筛选方法

2、同位素应用：

- 生物谱学：光谱、核磁共振、同位素质谱
- 其它方面...

谢谢！
祝各位新年快乐！

