

γ 射线辐射预聚甲基丙烯酸酯的低温 光引发聚合及其应用

李朝顺 张钰华

乔宝义

(北京大学, 北京 100871)

(中国科学院微生物学研究所, 北京 100080)

摘要 采用 ^{60}Co γ 射线预辐射技术, 以甲基丙烯酸酯为主要材料制备预聚液, 然后采用低温光引发聚合, 包埋生物组织, 做出电镜超薄切片, 观察生物组织的精细结构。

关键词 预辐射, 低温光引发聚合, 超薄切片, 甲基丙烯酸酯

在透射电镜的生物样品制备方法中, 超薄切片技术是最常用的基本方法。整个切片制备过程比较复杂, 其中包埋剂的发展和包埋技术的改进尤为重要。利用 ^{60}Co γ 射线辐射预聚甲基丙烯酸酯制备包埋剂, 采用低温光引发聚合包埋微生物, 通过电镜切片观察其包埋效果。由于甲基丙烯酸丁酯(BMA)与甲基丙烯酸甲酯(MMA)或甲基丙烯酸乙酯(EMA)的结构相似, 所以采用相同的预辐射和低温光引发条件进行包埋试验。在BMA单体试验基础上试验不同比例的BMA与MMA或EMA的混合体系的辐射预聚和光引发聚合, 使聚合物块的硬度与所包埋微生物的软硬程度基本上匹配, 以得到良好的电镜切片。

实 验

1. 药品与仪器

BMA、MMA、和EMA均为CP级, 使用前用5%NaOH水溶液洗涤, 再用无水硫酸钠干燥, 避光保存。

丙酮、苯、钨酸晶体, AR级; 戊二醛固定液。

生物样品 HALLOBACTERIA-F8。

^{60}Co γ 射线源, $46 \times 10^{10} \text{ kBq}$; 280 nm、360 nm的紫外光源; -20°C 、 -4°C 冰箱; 半导体点温计; 乌氏粘度计; Super Nova-超薄切片机; CEM 902电镜。

2. 步骤

(1). BMA单体的 ^{60}Co γ 射线辐射聚合 对BMA单体, 在室温条件下开口(空气中)辐射不同剂量。然后分别测其粘度变化。BMA单体在 N_2 条件下封管, 室温条件下分别辐射不同剂量, 然后测其粘度变化。

(2). 低温光引发聚合 用明胶胶囊分别封装上述空气中辐射和通 N_2 中辐射的预聚液, 在 0°C 条件下用 $\lambda = 280 \text{ nm}$ 的紫外光引发聚合。空气中辐射的预聚液在不同条件下的紫外光引发聚合。

(3). 混合体系的预辐射与低温光引发聚合 取BMA、MMA、EMA单体, 以不同比例混合, 经 γ 射线在空气预辐射, 再封装在明胶胶囊内低温光引发聚合, 制得预聚液RC。

(4). 超薄切片的制作与观察^[3] 取微生物 HALLOBACTERIA-F8, 经戊二醛-锇酸双重固定, 用丙酮分级脱水, 用预聚液 RC 进行渗透, 替换丙酮, 转移到明胶胶囊中, 加上 RC, 封口后放在冰箱中进行进一步低温光引发聚合, 待完全聚合成固体后取出切片, 以铜网为支持膜, 用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色法, 在透射电镜下观察拍照。

结果与讨论

1. BMA 单体的预辐射聚合

主要以粘度来反映聚合情况, 样品经过 ^{60}Co γ 射线照射后, 以苯做溶剂, 25°C 条件下用乌氏粘度计测定其粘度, 此时聚合物的分子量和粘度遵循下列公式^[2]: $\log \bar{M}\eta = (4.221 + \log [\eta])/0.70$

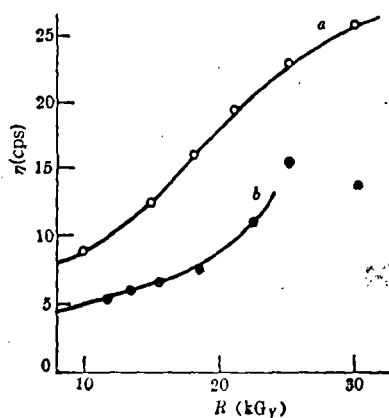


Fig 1. Plots of η (cps) against R (kGy) for irradiated systems (a) N_2 (b) Air

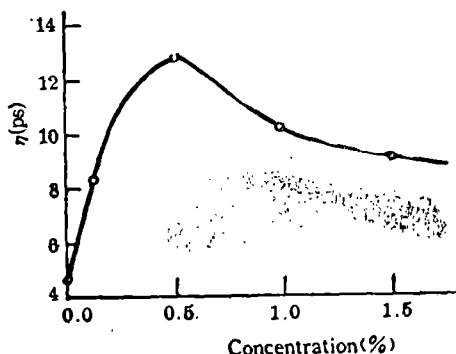


Fig 2. Relationship between η (ps) and concentration of DMpT for UV-ray initiated system

氧是自由基的阻聚剂, 有氧存在时, 在同样的环境温度和剂量下, 体系的粘度比 N_2 封管体系的粘度低(见图 1)。实际上开口辐照的样品受环境因素影响较大, 但同时也使被辐照体系产生长寿命的自由基潜体——过氧化物, 使其作为低温光引发聚合的引发剂。

2. 预聚液的低温光引发聚合

比较 N_2 封管预辐照的样品和开口辐照后的样品, 在 0°C 条件下同时用紫外光引发, 前者没有聚合成固体, 而后者完全聚合成固体, 两者的差别在于前者经 ^{60}Co γ 射线预聚合后体系中没有过氧化物产生, 在较低温度时不能被紫外线引发进行自由基聚合反应; 而后者体系中存在的过氧化物被紫外光引发进行自由基的聚合反应。值得注意的是, 在紫外光引发聚合反应过程中, 体系应该被密封在胶囊中, 不能漏气, 以免空气中的氧气阻碍低温光引发自由基聚合反应。在这两步被照过程中, 氧的作用很特殊, 预聚合时需要氧而形成过氧化物, 在光引发自由基反应时又要克服氧的阻聚作用。

向 BMA 单体中加入过氧化物 BPO, 封装在胶囊中进行低温光引发聚合, 与 ^{60}Co γ 射线辐照的预聚液(在开口条件下)在同样条件下低温光引发聚合比较, 结果后者引发聚合成固体而前者没有, 其原因是 BPO 分解的活化能为 126 kJ/mol ^[4,6], 而后者体系中形成的过氧化物分解的活化能在 42 kJ/mol 左右, 这是后者能完成低温光引发聚合反应的根据。

为了使光引发聚合能在更低的温度下进行, 试验了敏化剂 N,N -二甲基-间-甲苯胺(DMpT)对聚合反应的影响。如图 2 中所示, 其中 DMpT 一方面作为紫外引发的敏化剂, 同时作为还原剂

催化过氧化物的分解。分析曲线变化的原因,若 DMpT 浓度过低,敏化和催化反应效率都低;若 DMpT 浓度过高,被其中和的过氧化物较多,由此导致引发反应的自由基含量的减少,同样降低引发效果。当然温度对所需要 DMpT 的含量也有影响,若在 0 °C 光引发含有过氧化物的预聚液,则勿需加入 DMpT。

光引发反应过程中,长波($\lambda = 360 \text{ nm}$)的紫外光比短波($\lambda = 280 \text{ nm}$)的紫外光引发效果更好。同时聚合反应的速度与温度有关,温度越低,完成反应所需要的时间越长。

3. RC 的制备与微生物的包埋

用 BMA 单体经开口条件下的辐射预聚合和低温光引发聚合包埋微生物,因其聚合物包埋块软而生物材料较硬,切片时树脂与生物材料会出现剥离等现象,因而得不到较好的切片。经试验,以 BMA 为主体,用 EMA 或 MMA 来调节其硬度,得到较好的包埋效果,切片的厚度小于 60 nm。

低温光引发聚合反应引起生物组织结构的损伤较小, ^{60}Co γ 射线预辐射技术避免了被包埋的生物组分与 γ 射线的相互作用,使生物组织结构免受 γ 射线的破坏。生物样品被封装在胶囊中被树脂所包围,在光引发聚合反应中,波长为 360 nm 的紫外光首先被生物样品周围的树脂吸收,而自由基的链反应却扩散到整个体系,这样就减少了紫外光对生物样品的破坏。即使光线照射到样品本身,可是由于光线能量较低,被包埋的样品所受到的破坏只在其表面,它内部的结构仍然保持良好。另外某个化学键的断裂,不会影响其电镜观察下的精细结构。

低温光引发聚合的速度较慢,整个反应过程中体系的温度保持不变,避免了热聚合反应(如环氧树脂包埋剂)中由于大量聚合热的放出造成对生物样品的精细结构的破坏。

图 3 给出了 HALLOBACTERIA-F 8 超薄切片的电镜图片,其切片厚度在 50 nm 左右,由图片中可以清楚地看到微生物的三层膜结构和细胞内一些中间体的结构。

总之,采用 γ 射线预辐射技术,结合低温光引发聚合制备超薄切片,为细胞的形态学和生物组织的抗体免疫反应的研究提供一种新的方法。为超低温光引发聚合提供一个研究的方向,同时为辐射化学、光化学与生物学的结合开辟新的应用领域。



Fig 3. Micrograph of microbe, embedded in RC resin at -20°C
magnification: 77400 times

参 考 文 献

- 1 Chapiro A. Radiation Chemistry of Polymeric Systems. John Wiley and Sons, Inc. 1962
- 2 Shultz A R et al., J. Polymer Sci., 1956, 22: 495
- 3 Carlemalm E et al., J. Microscopy, Pt 2, 1982, 126: 123
- 4 Liu Yu-Ming et al., The 2nd Japan-China Bilateral Symposium on Radiation Chemistry, Osaka region, 1985
- 5 Ma Xiaohua et al., The 2nd Japan-China Bilateral Symposium on Radiation Chemistry, Osaka region, 1985
- 6 李承华. 辐射技术基础. 原子能出版社, 1988

(稿件收到日期: 1991 年 8 月 12 日)

(下转第 231 页 See p 231)

COMPARISON OF ESTIMATION INDIVIDUAL BIOLOGICAL DOSE TO ACCIDENTAL RADIATION BY CHROMOSOME ABERRATIONS AND MICRONUCLEI

Bai Yushu Guan Shurong Zhang Xiuxia

(Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing 100088)

ABSTRACT Biological doses of 5 cases exposed to ^{60}Co γ -ray were estimated by the curves of relationships between radiation dose and chromosome aberrations and micronuclei of peripheral blood lymphocytes. The results indicated that biological dose estimated by "dic. + r." and micronuclei were quite approximate to the physical dose at early phase of post irradiation. Specially, in 3 cases of uniform doses, the doses estimated by "dic. + r." were nearly identical to the physical dose. At the same time, it was showed that dose estimated by micronuclei were higher than those of "dic. + r." doses.

KEYWORDS ^{60}Co γ -ray, Accidental radiation, Chromosome aberrations,
Micronucleus, Biological dose

(上接第 222 页 Continued from p 222)

THE POLYMERIZATION OF ^{60}Co γ -PREIRRADIATED METHACRYLATES AT LOW TEMPERATURE BY UV-RAY AND ITS APPLICATION

Li Chaoshun Zhang Yuhua

(Beijing University, Beijing 100871)

Qiao Baoyi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

ABSTRACT The method of gamma-ray preirradiation has been used to make resin with methacrylates being the main materials. After preirradiation, the resin was irradiated at low temperature to polymerize by UV-ray and the biological materials were embedded in the polymeric block at the same time. Then it was sectioned into superthin sectionings by ultramicrotome cutter. The superfine structures of the embedded biological materials were observed under electron microscopy.

KEYWORDS γ -Preirradiation, UV-ray initiate, Superthin sectioning