

共聚焦类仪器原位定量分析方法研究与应用

陈晨¹, 韦伟¹, 程力¹

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 在食品科学领域, 以广泛应用的高分辨率共聚焦激光显微镜 (Confocal laser scanning microscopy, CLSM) 和共聚焦拉曼光谱仪 (Confocal Raman microscopy, CRM) 为应用基础, 建立 CLSM 中荧光漂白恢复技术 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 定量分析方法学和 CRM 成分及键态的原位可视化与量化分析方法学。该案例研究了共聚焦类仪器在食品结构表征中的新实验方法和新应用, 新增了食品体系中单个特定分子 (包括脂质、蛋白、多糖等) 的流动性和稳定性的精准评价指标; 通过分解、拟合、重构拉曼化学指纹, 新增了实时环境条件下原位量化复杂食品成分的动态空间结构分析手段。

关键词: 激光共聚焦显微镜; 显微共聚焦拉曼光谱仪; 食品体系; 荧光漂白恢复技术

中图分类号: G482.0

文献标识码: A

Research and application of in-situ quantitative analysis method for confocal instruments

Chen Chen¹, Wei Wei¹, Cheng Li¹

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Confocal instruments widely used in food science include Confocal laser scanning microscope (CLSM) and Confocal Raman microscope (CRM), which were the basis of the development and application of methods. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and CRM in-situ visualization of components and bond states quantitative analyses were established. In this case, new methods and applications of confocal instruments in food structure characterization were studied. The case added an accurate evaluation index for the fluidity and stability of specific single-molecule (including lipids, proteins, polysaccharides, etc.) in the complex food system. Through decomposition, fitting and reconstruction of Raman chemical fingerprints, added analysis method for the dynamic spatial distribution of in-situ quantitative complex food components under real-time environmental conditions.

Keywords: confocal laser microscopy; confocal raman microscopy; food system; fluorescence

recovery after photobleaching

食品成分具有复杂的空间结构,食品结构对质地、感官特性和功能特性等研究非常重要。本案例研究共聚焦类仪器结构表征的新方法,探索研究结构特性的变化规律,拓展共聚焦类仪器应用领域。以高分辨率共聚焦激光显微镜(Confocal laser scanning microscopy, CLSM)和共聚焦拉曼光谱仪(Confocal Raman microscopy, CRM)为基础,深入探索结构精准解析的原位定量分析法。

1 共聚焦类仪器测试的主要问题

1.1 CLSM 未开展定量分析研究

CLSM 只有直观的图片结果供分析,CLSM 的荧光漂白恢复技术(Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)定量分析方法学在分子流动性重要指标表征上具有重大潜力,但是主要问题在于:常用荧光团的荧光特性、耐受性和光漂恢复特性差异巨大,生物样品体系中的测试方法参数空间巨大,定量指标的计算与分析受分子的自由扩散和互相作用等因素的影响巨大^[1]。

1.2 CRM 的适用面过窄

CRM之前仅进行单点的拉曼光谱谱带的定性及定量分析,仅利用表面增强拉曼(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)效应,大多用于快检食品有害小分子物质、食源性致病菌、重金属污染和真菌毒素等^[2]。将CRM用在高光谱成像和多维纳米级拉曼成像的结构分析可以极大的拓展其应用领域,但是存在诸多硬件限制,主要体现在显微平台的x, y, z步径精度低、检测器的灵敏度不足,无法提取生物类样品拉曼光谱中的弱信号;缺少重要数据支撑,主要体现在食品类的拉曼标准谱图库不全,无法区分复杂食品成分的特征化学键。

1.3 新测试方法能力生成不佳

多数实验技术人员对测试方法的体系化研究不足,对领域应用的深层次需求理解不够,没有发挥精密贵重仪器“高、精、深”的真正效益。多数实验技术人员缺乏对新测试方法分析和总结,缺少工具去探究能力生成路径,导致大型仪器设备的新测试方法应用较少、较散、较难。

2 共聚焦类仪器原位定量分析方法的研究

2.1 建立 CLSM 中荧光漂白恢复技术 FRAP 定量分析方法学

FRAP定量分析方法学原位准确测定乳液或空间网状结构中单个分子上特定成分(包括

脂质、蛋白、多糖等)的流动性,为乳液运载体系(包括芯材、油相和乳化剂等)的稳定性和功能因子在传递过程中的作用机理,为固态和半固态食品体系中溶质分子的运动及其迁移情况的研究提供新的表征手段^[3]。

1) 在常规 CLSM 的测试基础上,确定 FRAP 方法学中荧光团的荧光特性及耐受性。确定样本的背景、漂白和对照区域(点或条或是有效的几何形状)的像素点,高强度的荧光漂白激光功率,激光重复扫描次数和低强度的漂白恢复激光功率等,通过优化常规荧光团的 FRAP 的多参数变量,确定不同粒径在分子水平上的相对漂白区域,最大限度地减少漂白区域周围的荧光分子光漂白的现象。

2) 确定 FRAP 方法学中成像荧光恢复的条件。确定荧光分子在高强度激光淬灭后,荧光团的漂白恢复特性,并保持对照区域中的光漂白在最低限度。

3) 标准化FRAP表征参数。根据原理图1,优选双指数拟合法(生物样本),减少分子的自由扩散和相互作用等因素影响,计算出动力学的表征参数见表1。该特征参数值能够直观计算出被特异性标记的单个分子中特定成分的流动性指标^[4-5]。

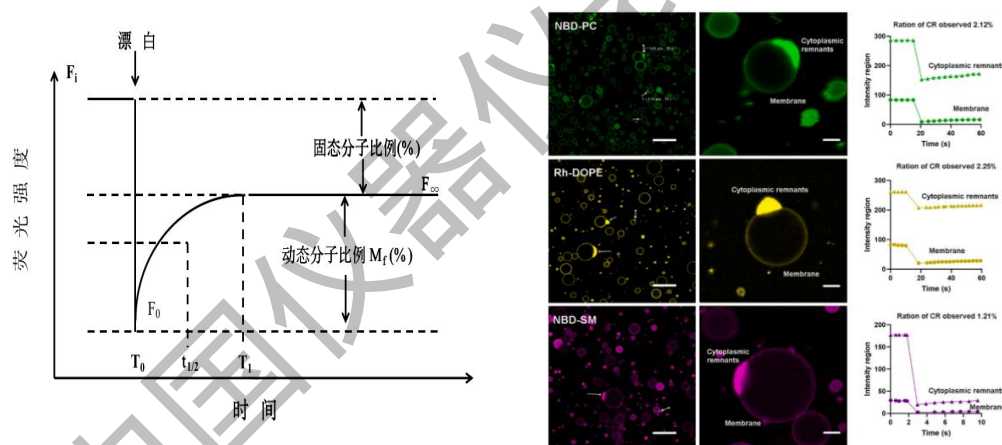


图1 FRAP原理示意图(以乳脂肪球膜NBD-PC、Rh-DOPE、NBD-SM计算为例)

表1 FRAP 动力学曲线参数表征及说明

参数名称	参数定义	参数意义
半衰期 $t_{1/2}$ (s)	指荧光恢复后的最大稳定值与漂白所达到的最小值之差的一半与最小值的和所对应的时间减去最小值所对应的时间值。	代表了荧光恢复速率的快慢。
动态分子比例 M_f (%)	$M_f = (F_{\infty} - F_0) / (F_i - F_0)$ 指荧光恢复后的最大稳定值与最小漂白值之间的差与漂白起始值与最小值之间的差	代表了所测特定成分的动态分子比例。

之比。

扩散系数	$K=1/(T_1 - T_0)$,	表征了每单位时间的均方位
$K (1/s)$	指对应于最大稳定值的对应时间和最小漂	移的量度, 代表了所测分子
	白值的对应时间之间差值的倒数。	扩散程度的物理量。

目前该方法已在乳脂肪球膜成分及乳液运载体系的功能因子传递、脂肪结晶对乳液消化性能的影响及机理研究、在蛋白质凝胶结构的保水机制研究、工艺条件下蛋白凝胶形成机理研究中等初步应用^[6-8]。

2.2 建立 CRM 成分及键态的原位可视化与量化分析方法学

CRM成分及键态的原位可视化与量化分析方法学, 从常规单点光束转变为矩阵扫描的测试方式, 准确测量焦平面的光谱定量指标, 弥补生物样品成分分布不均匀造成的光谱信号强弱差异性大的缺陷。将共聚焦拉曼光谱技术、显微成像技术和迭代曲线拟合算法结合, 转变成像数据生成模式, 弥补在荧光探针技术中未能有效标记的成分而无法获得结构分布的缺陷, 为原位量化食品的结构参数提供直观、无损、实时的表征手段^[9-11]。

1) 建立食品成分的标准拉曼光谱谱库, 包括水和氢键状态分析、碳水化合物中淀粉和纤维分析、蛋白质分析(酰胺带)、脂质分析(脂肪酸、三酰基甘油、胆固醇/胆固醇酯和复合磷脂)等大类。对于特殊功能成分, 可用标准物质和多维矩阵对体系中成分的进行原位定量分析。

2) 优化样品固定方式, 建立多维矩阵的空间位点, 通过NavMap和NavSharp的确定明场图像中各像素的最佳焦点, 通过CRM基础表征方法的测试, 获得矩阵区域内的每个空间位点的光谱映射。

3) 参照标准拉曼谱库, 单一且特定的化学特征峰优选夹峰法重构化学图像。生物或食品中拉曼特征峰重叠的波段或弱信号特征波段, 需先用校正算法 ICS (intensity correction system) 降低仪器噪声, 再通过如经典最小二乘法和高斯-洛伦兹混合函数等算法进行峰位固定和拟合, 将复杂和重叠的光谱分解成子峰, 通过拟合误差和决定系数获取准确的峰强、半高宽、峰面积等峰参数。结合矩阵点的空间位置和子峰光谱信息, 将成分的峰强、峰位或峰面积等作为像素, 用于各成分的含量和键态的定量化学图像分布。

目前该方法已在乳脂肪球膜成分和淀粉成分改性的研究中初步应用^[12-13], 见图 2。本案例根据研究组明确的测试需求, 拟在油炸食品体系吸油与调控理论研究、果蔬冷冻干燥特性的机理研究, 糙米的综合利用及米成分(功能性成分)改良研究等方向开展进一步应用研究。

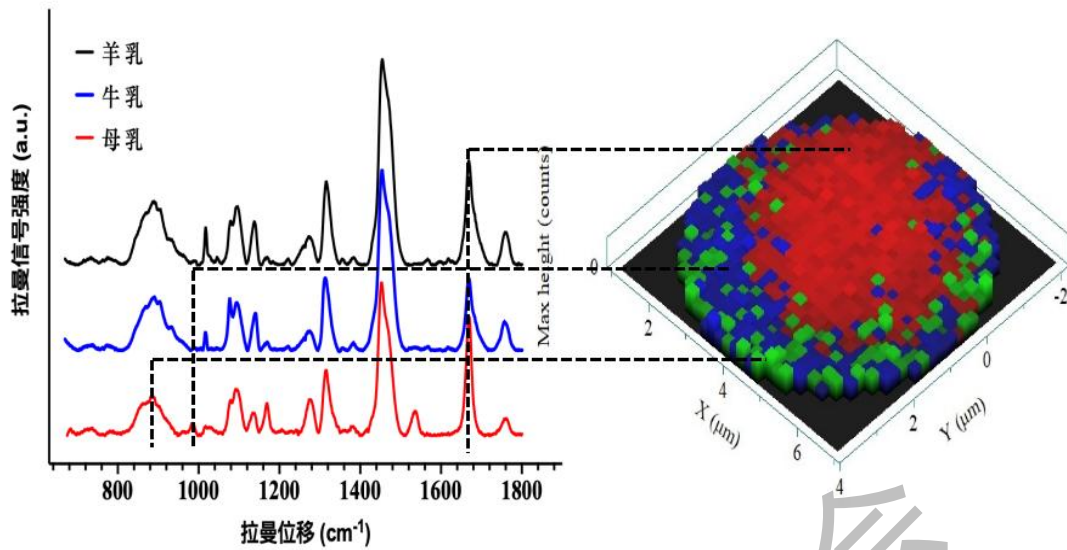


图2 CRM原位定量分析法在乳脂肪球的应用示意图(甘油三脂1730-1743 cm^{-1} ; 不饱和磷脂845-895 cm^{-1} ; 蛋白质the amide III' 936-990 cm^{-1})

2.3 共聚焦类仪器原位定量分析方法能力生成工具研究

综合比较知识图谱工具的数据库来源、查询速度、可视化速度和关联推理能力，前期优选 CiteSpace 软件。该软件可对江南大学图书馆中的 web of science、Elsevier ScienceDirect 等核心合集数据库以纯文本数据形式进行实体信息抽取和关系可视化^[14-15]，包括作者、来源出刊物、摘要、关键词和研究方向等三十多个实体点，例如图 3 和图 4。

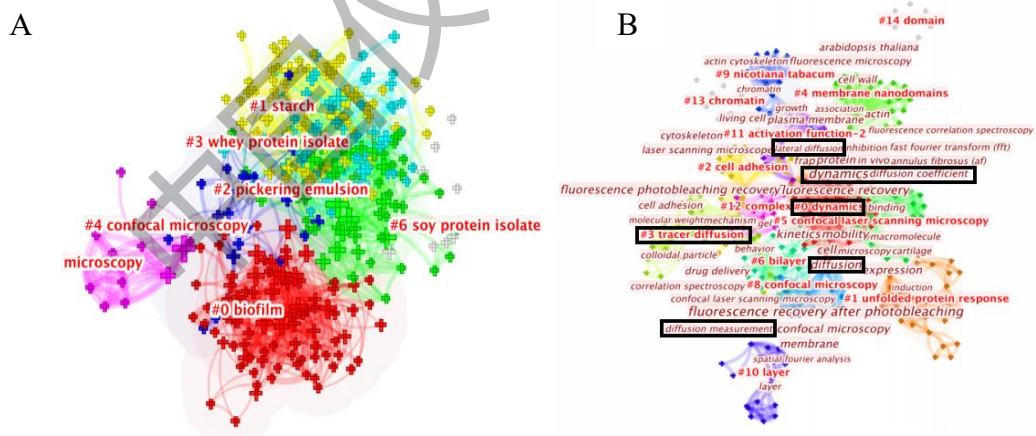


图3 Food和CLSM初级知识图谱

A

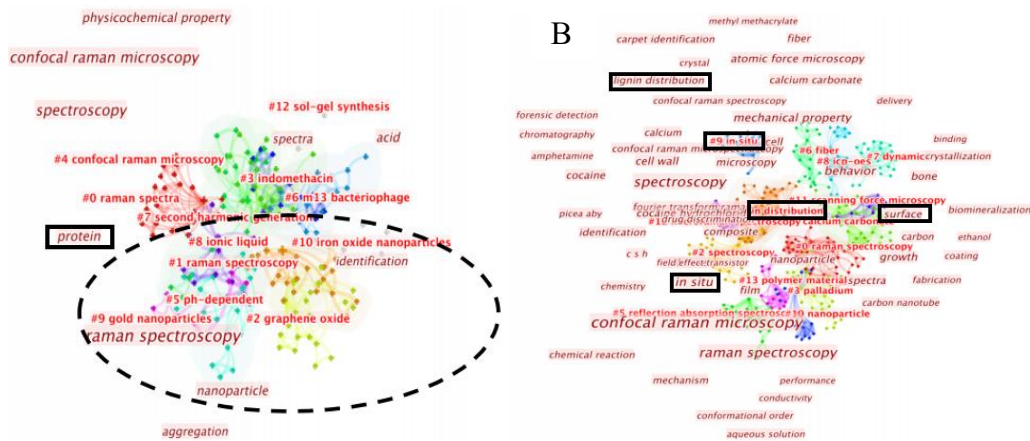


图4 Food和CRM初级知识图谱

基于以图3和图4为例的共聚焦类仪器的初级知识图谱，通过“领域迁移”和“方法融合”，直观、快速的找到新方法在各学科方向应用的可能性，并在推广应用中积累大量案例。例如，图3A将高被引论文中CLSM在蛋白，淀粉，生物膜，皮克林乳液等结构表征方向的应用可视化，在图3B查找到FRAP的多频关键词“Dynamic diffusion coefficient”，可以简单的推理得出FRAP中的动态扩散系数有应用于图3A中的相关研究方向的可能性。但是动态扩散系数有一系列具有相似性的参数（例如稳定性、流动性等），它们逻辑关联必需依靠其他知识图谱进行关联分析。图4A直观的发现CRM已经从核心区域的材料表征迁移到了边缘区域的蛋白质表征，提供了进一步去研究食品成分中水、碳水化合物、脂质等方向的思路，图4B直观显示多频关键词“compostite and distribution”，可以简单的推理出CRM可用于成分的结构及分布研究，其表征手段有应用于图4A中提示的研究方向的可能性。

3 结论

本案例以CLSM和CRM等共聚焦类仪器的长期实践为基础，重点突破结构表征方面的关键技术，提出测试方法领域的专用知识图谱，支撑食品化学及相关交叉领域全面应用，案例成果包括：

(1) CLSM原位定量分析方法研究：研究适用于常规体系的FRAP定量分析方法，对单个分子的荧光漂白和恢复区域（像素点）进行精准定位，形成“原位”测试能力；形成动力学曲线表征参数的标准化算法，实现“定量”分析。

(2) CRM原位定量分析方法研究：建立适用于食品学科的标准拉曼光谱谱库；通过多维度的矩阵点映射，准确计算界面区域内的各分子间相互作用的指标参数，实现“定量”分析；将矩阵内的空间位点“原位”关联至各成分的特征化学键，综合运用曲线拟合算法，重构CRM食品成分含量和键态的成像分布图。

(3) 新测试方法能力生成工具研究: 以共聚焦类仪器为代表, 构建体系化的测试方法知识图谱, 总结出“领域迁移”和“方法关联”的测试方法能力生成范式, 挖掘CLSM、FRAP、CRM、食品学科、可视化与量化的交叉研究热点, 拓展新方法的应用领域。

参考文献:

- [1] Kenworthy, A. K. Fluorescence recovery after photobleaching studies of lipid rafts[J]. *Lipid Rafts*, 2007, 398: 179-192.
- [2] Qi J, Li J, Shih W C. High-speed hyperspectral Raman imaging for label-free compositional microanalysis[J]. *Biomedical optics express*, 2013, 4(11): 2376-2382.
- [3] 陈晨, 韦伟, 李靖雯. 一种表征乳液分子特定成分流动性的方法: CN112781958B [P].2022-07-08.
- [4] Ellenberg J, Siggia E D, Moreira J E, et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis[J]. *The Journal of cell biology*, 1997, 138(6): 1193-1206.
- [5] Klein C, Pillot T, Chambaz J, et al. Determination of plasma membrane fluidity with a fluorescent analogue of sphingomyelin by FRAP measurement using a standard confocal microscope[J]. *Brain research protocols*, 2003, 11(1): 46-51.
- [6] 陈晨, 王霁月, 陆乃彦, 等. 磷脂强化乳脂肪体系对易氧化营养素包埋稳定性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(22): 10-16.
- [7] 陈晨, 李靖雯, 李丹, 等. 基于荧光漂白恢复技术检测乳脂肪球膜上生物分子的流动性[J]. *中国油脂*, 2022, 47(1):137-142.
- [8] Chen C, Li D, Li J, et al. Microstructure and biomolecules mobility of human milk fat globules by fluorescence recovery after photobleaching with confocal scanning laser microscope[J]. *Food Structure*, 2022, 31: 100251.
- [9] Li D, Zhu Z, Sun D W. Visualization of the in situ distribution of contents and hydrogen bonding states of cellular level water in apple tissues by confocal Raman microscopy[J]. *Analyst*, 2020, 145(3): 897-907.
- [10] Minamikawa T, Ichimura-Shimizu M, Takanari H, et al. Molecular imaging analysis of microvesicular and macrovesicular lipid droplets in non-alcoholic fatty liver disease by Raman microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 18548.
- [11] Wu L, Wang L, Qi B, et al. 3D confocal Raman imaging of oil-rich emulsion from

enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean powder[J]. Food chemistry, 2018, 249: 16-21.

[12] Chen C, Karrar E, Li D, et al. Chemical mapping of milk fat globules using confocal Raman microscopy: Comparison of different milk species and fat globule sizes[J]. International Dairy Journal, 2023: 105746.

[13] JIN J N, Cheng L, Chen C, et al. Synthesis, characterization, and application of starch-based adhesives modified with itaconic acid and N-hydroxyethyl acrylamide[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 196: 116524.

[14] 李华. 生物信息学工具知识图谱构建和新实体嵌入生成[D]. 吉林: 吉林大学, 2022.

[15] 陆鹏. 基于 Neo4j 的大数据组织检索研究与应用[D]. 南京: 东南大学, 2016.

中国仪器仪表学报