Wiadomości Botaniczne **39**(1/2): 21–30, 1995

MAPOWANIE PIERWIASTKÓW W MATERIALE BIOLOGICZNYM METODĄ MIKROANALIZY RENTGENOWSKIEJ

Elemental mapping in biological material by using X-ray microanalysis

Rafał BUTOWT, Dariusz J. SMOLIŃSKI

Summary. The energy-dispersive X-ray microanalysis is a commonly used technique to analyse the elements composing a biological sample, on an electron microscope level.

The characteristic features of the technique embrace high sensitivity (10^{-16}-10^{-18}g) and wide detectability of elements with the atomic numbers that range from Z10 to Z<93.

The technique serves the dot microanalysis of samples that have diameter of at least 10–100 nm and the elemental mapping of bigger samples, for example whole cells, that involves recording of the analysed element from every picture element (pixel) of the picture.

Analog dot maps are created when the X-ray signal is recorded directly on photographic plate on which the microscope picture of the analysed area is present.

Digital maps are created when the X-ray signal is transformed into the digital one and then sent to a computer. Digital recordings are the conditions of the computer picture processing; that is, using various optical filters, eliminating the background, rejecting the weakest signals; moreover assigning different range of grey colour or different pseudocolours to the areas that differ in the amount of a given element.

Digital maps of resolution either 128*128 or 256*256 are derived into qualitative or quantitative ones. Quantitative mapping calls for standards of which the analysed element content is known. It also offers a wider data processing concerning every pixel.

However, the time of measurment in this method is prolonged in comparison to qualitative mapping. Digital mapping is especially useful in the analysis of the biological sample because the method of picture processing enables multiplication of gathering and summing up the X-ray signals coming from the same area. In comparision to the dot analysis, mapping has a great disadvantage; namely it is necessary to expose a sample to a relatively long-term electron beam bombardment in a columna of the electron microscope. During this exposure the biological sample may undergo the structural and chemical changes.

X-ray mapping is a great advantage from the point of view of a wide range of biological materials analyses; for example, in the analysis aiming at determining the distribution of some products from cytochemical reactions like Karnovsky-Roots reaction which detect acetylcholinesterase activity or locates affinity for elements exogenous inserte inside a cell.

Key words: elemental mapping, X-ray mapping, X-ray microanalysis, biological specimen.

Mgr Rafał Butowt, mgr Dariusz J. Smoliński, Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Biologii ,Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87–100 Toruń

WPROWADZENIE*

Analiza składu chemicznego próbki biologicznej na poziomie mikroskopu elektronowego jest istotnym rozszerzeniem możliwości tego urządzenia. Powszechnie stosowaną metodą słu-

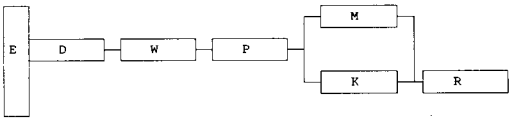
* Polskojęzycznym wprowadzeniem do metody mikroanalizy rtg jest praca [3].

żącą temu celowi jest mikroanaliza rentgenowska (MAR, ang. X-ray microanalysis). Metodzie tej poświęcono dotychczas szereg prac monograficznych i przeglądowych [3 oraz literatura tam zawarta, 12, 14].

Generalnie rzecz biorąc MAR polega na detekcji charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego, emitowanego przez atomy badanej próbki w wyniku ich interakcji z elektronami wiązki pierwotnej mikroskopu elektronowego [3]. Poszczególne pierwiastki wykazują maksima emisji promieniowania rtg przy charakterystycznych dla siebie energiach (zwykle rozpatruje się zakres energii 1–20 keV). Określane są one jako linie charakterystyczne. Fizyczną podstawą emisji promieniowania rtg są przejścia elektronowe między wewnętrznymi powłokami atomów analizowanej próbki.

Stosuje się dwa podstawowe systemy mikroanalizy: system energo-dyspersyjny (ang. EDS) i system falowo-dyspersyjny (ang. WDS) [16]. W rozpatrywanym w niniejszej pracy systemie energo-dyspersyjnym jednorazowy pomiar dostarcza informacji o obecności pierwiastków co najmniej od liczby atomowej Z10 do Z<93, z minimalną czułością rzędu 100–500 ppm [15].

Typowy system EDS obejmuje krzemowo-litowy detektor, wzmacniacz, procesor analogowo-cyfrowy oraz komputer z odpowiednimi urządzeniami wejścia-wyjścia (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat blokowy energo-dyspersyjnego systemu mikroanalizy rtg. (E – mikroskop elektronowy; D – detektor; W - wzmacniacz; P – procesor analogowo-cyfrowy; K – komputer; M - monitor; R – drukarka).

Fig. 1. Block diagram of the X-ray energy-dispersive microanalysis system. (E – electron microscope; D – detector; W – amplifier; P – analog-digital processor; K – computer; M – monitor; R – printer)

Korzystając z MAR można uzyskać dwojakiego rodzaju informację. Po pierwsze dotyczyć ona może składu pierwiastkowego określonego „punktu" próbki (ang. dot microanalysis). Efektem pomiaru jest wówczas pojedyncze spektrum rentgenowskie analizowanego obszaru (Ryc. 5). W ultracienkich skrawkach biologicznych „punkt" stanowi faktycznie obszar, którego średnica zbliżona jest do średnicy mikroskopowej wiązki elektronowej [14].

Drugim sposobem zbierania informacji przy wykorzystaniu MAR jest mapowanie rozmieszczenia danego pierwiastka w wybranym obszarze próbki (ang. X-ray mapping). W tym przypadku nie uzyskuje się pojedynczego spektrum rentgenowskiego, lecz obraz złożony z jasnych punktów. Porównując go z mikroskopowym obrazem analizowanego obszaru, uzyskuje się informację na temat rozmieszczenia w nim określonego pierwiastka. Techniki mapowania rozwijają się niemalże od początku stosowania MAR. Do chwili obecnej wypracowano trzy podstawowe metody mapowania [25]:

– punktowe mapowanie analogowe,
– jakościowe mapowanie cyfrowe,
– ilościowe mapowanie cyfrowe.

Z pośród wyżej wymienionych metod najwcześniej wprowadzono mapowanie analogowe. Najlepiej rozwiniętą formą mapowania jest natomiast technika ilościowa, której rozwój datuje się od połowy lat 80-tych.

Mapowanie materiału biologicznego dostarcza wiedzy na temat przestrzennego rozmieszczenia pierwiastków występujących w materiale *in vivo*, jak i wprowadzonych eksperymentalnie [18, 22]. Możliwe jest w ten sposób na przykład szybkie lokalizowanie w komórce miejsc wiążących metale toksyczne takie jak Pb czy Cd. Technika ta stwarza ponadto możliwości kontroli rozmieszczenia produktów niektórych reakcji histochemicznych i immunocytochemicznych.

Mapowanie jest formą wizualizacji przestrzennej wyników wielu automatycznie przeprowadzanych pomiarów punktowych. Oddzielne pomiary punktowe wykonane na badanym skrawku w dostatecznie dużej liczbie, mogą dostarczyć zbliżonej informacji. Wymaga to jednak przeprowadzenia wielu tysięcy takich pomiarów i przez to niezwykle długiego czasu pracy.

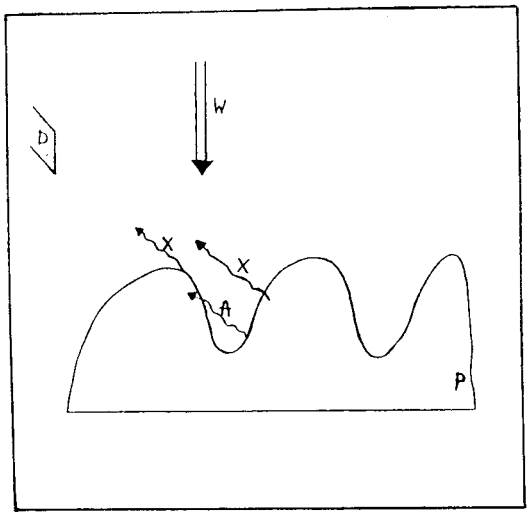
MAPOWANIE PUNKTOWE
(ang. dot mapping)

Mapy punktowe są mapami analogowymi. Powstają one, gdy obecność promieniowania rtg o ściśle określonej energii ujawnia się na ekranie mikroskopu w postaci jasnych kropek w trakcie skanowania wiązką elektronową preparatu [25]. Na przykład przy mapowaniu Ca rejestrowane jest promieniowanie o energii 3.69 +/-0.02 keV (tzw. okienko energetyczne dla Ca), które odpowiada linii charakterystycznej K_a tego pierwiastka. Pojedyncza jasna kropka na ekranie odpowiada fotonowi promieniowania rtg o energii mieszczącej się w obrębie okienka dla Ca [3]. Jest to jednocześnie czynnik zniekształcający wyniki, ponieważ rejestrowane są także fotony rentgenowskiego promieniowania tła (ang. white radiation, continuum).

Mapowanie każdego pierwiastka, niezależnie od tego czy wykonuje się mapę analogową czy cyfrową, wymaga uprzedniego zaznaczenia okienka energetycznego obejmującego którąś z linii charakterystycznych danego pierwiastka. Fakt, że okienko stanowi pewien przedział energii a nie pojedynczą jej wartość (choć konkretnej linii charakterystycznej przypisuje się jednoznaczną wartość energii promieniowania rtg), jest spowodowany gausowskim kształtem maksimów energetycznych w spektrum.

Obszary próbki, w których ilość kropek przypadających na jednostkę powierzchni jest znaczna, wykazują wysoką zawartość mapowanego pierwiastka [4].

Podstawową zaletą map analogowych jest duża szybkość ich otrzymywania. Mapy te posiadają jednak szereg ograniczeń. Wynikają one między innymi z faktu, że muszą być zapisywane i przechowywane na kliszy fotograficznej. Uniemożliwia to ich obróbkę i komputerowe przetwarzanie. Poza tym powstają one zazwyczaj jako efekt jednokrotnego przejścia wiązki przez analizowany obszar, czyli z tzw. pojedynczej ramki. Obniża to czułość metody dla pierwiastków występujących w próbce w niewielkich stężeniach. Problemem są także próbki o urozmaiconej powierzchni, gdyż czynnik ten powoduje częściową absorpcję powstającego promieniowania rtg



Ryc. 2. Absorpcja promieniowania rtg na powierzchni próbki. (D – detektor; P – próbka; X – promieniowanie rtg docierające do detektora; A – promieniowanie rtg zaabsorbowane).

Fig. 2. Absorption of X-ray radiation on the surface of the sample (D – detector; P – sample; X – X-ray radiation getting to a detector; A – X-ray absorbed radiation).

[12] (Ryc. 2). Mapy analogowe powstają ponadto pojedynczo, tzn. w czasie analizy określonego obszaru można mapować w nim jednocześnie tylko jeden pierwiastek.

MAPOWANIE JAKOŚCIOWE
(ang. qualitative digital mapping)

Mapy jakościowe w odróżnieniu od punktowych map analogowych, tworzą obrazy o zapisie cyfrowym [2, 25]. Wiąże się to z zastosowaniem procesora analogowo-cyfrowego oraz komputera do przechowywania i analizy danych [15, 20]. Komputer kontroluje również skanujący ruch wiązki elektronowej wzdłuż preparatu. Umożliwia to odniesienie informacji pochodzącej z określonego fragmentu obrazu mikroskopowego do konkretnego piksela na monitorze komputera. Informację pierwotną stanowi sygnał rentgenowski o energii określonej szerokością wyznaczonego wcześniej okienka energetycznego. Sygnał ten jest następnie zamieniany na sygnał napięciowy i wzmacniany. Ostatecznie w

procesorze ulega on konwersji na sygnał cyfrowy, który umieszczany jest w pamięci operacyjnej komputera [3].

Każdemu pikselowi na monitorze komputera odpowiada różna ilość sygnałów pierwotnych. Umożliwia to podzielenie pikseli na kilka klas i przyporządkowanie każdej z nich odpowiedniego poziomu szarości. Zwykle stosuje się 16-, 32 – lub 64-stopniową skalę szarości. W ten sposób powstaje czarno-biały obraz, który można w dowolnym czasie poddać komputerowej analizie (Ryc. 4). Możliwe jest między innymi osłabianie lub wzmacnianie sygnałów, filtrowanie ich zgodnie z określoną funkcją matematyczną jak i wykonywanie innych opcji charakterystycznych dla typowego analizatora obrazu [11]. Na przykład zastosowanie filtru typu „Laplace" powoduje, że każdemu pikselowi o jasności E, przypisuje się nową wartość jasności E' wyliczaną z jasności otaczających pikseli wg następującej funkcji:

E' = – A-B-C-D+9E-F-G-H-I

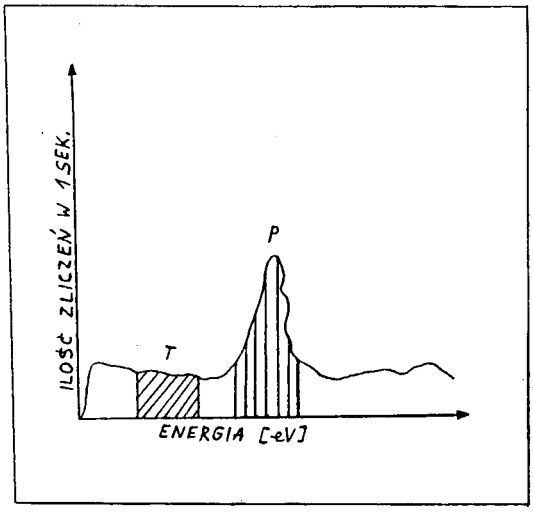
układ pikseli na ekranie

A B C
D E F
G H I

Operacja taka prowadzi do podkreślenia konturów poszczególnych fragmentów obrazu.

Obecnie dostępne jest specjalistyczne oprogramowanie (np. program MicroEDS firmy Dapple kompatybilny z komputerami IBM PC) umożliwiające między innymi jakościowe i ilościowe mapowanie sygnałów pochodzących ze spektrometrów EDS. Poważnym mankamentem starszych systemów EDS (np. LINK 10000AN firmy Oxford Instruments) jest zazwyczaj brak kompatybilności z powszechnie obecnie przyjętym standardem IBM PC.

O rozdzielczości map cyfrowych decyduje ilość wykorzystywanych pikseli. Najczęściej uzyskuje się mapy 8-bitowe o rozdzielczości 128*128 pikseli. W celu obrazowego pokazania uzyskanych wyników, poszczególnym pikselom zamiast poziomów szarości przypisuje się konkretne barwy (tzw. pseudokolory) [15]. Różne barwy są zatem odpowiednikiem obszarów o różnej zawartości analizowanego pierwiastka [20]. Technika komputerowa umożliwia także

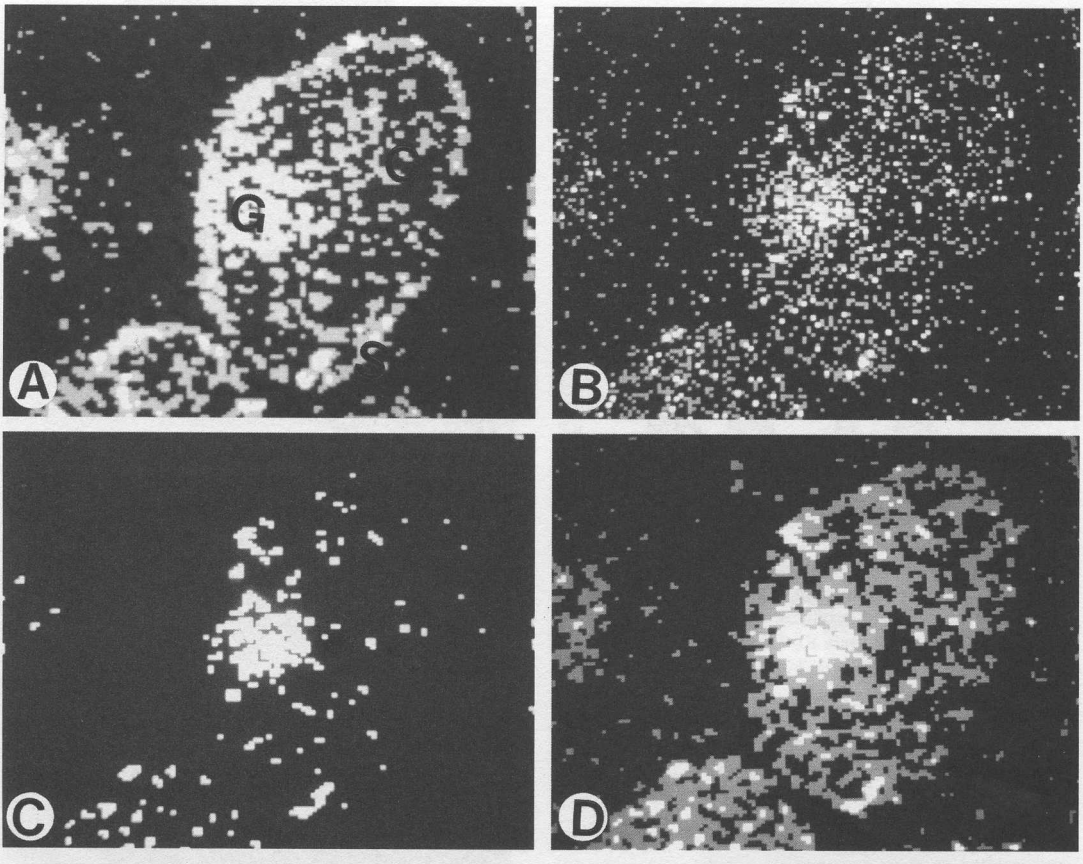


Ryc. 3. Ryc. 3 Schemat punktowego spektrum rentgenowskiego. Obszar zaznaczonego maksimum odpowiada okienku energetycznemu hipotetycznego pierwiastka. (P – pik dla hipotetycznego pierwiastka; T – promieniowanie tła).

Fig. 3. Diagram of the dot X-ray spectrum. Marked area of the peak correlates with the energy band of a hipothetic element. (P – peak for a hipothetic element; T – background radiations)

generowanie map rozkładu dwóch pierwiastków jednocześnie. W takim przypadku prócz barw charakterystycznych dla jednego i drugiego pierwiastka, stosuje się także barwy mieszane oznaczające współistnienie obydwu pierwiastków w danym obszarze [25].

Mapy jakościowe powstają jako efekt komputerowego sumowania wielu pojedynczych ramek (wielu przejść wiązki przez ten sam obszar) dla analizowanego obszaru. O ilości wykonywanych ramek decyduje eksperymentator. Duża ilość ramek wiąże się z długim czasem oczekiwania, lecz podnosi czułość analizy dla pierwiastków o niskiej zawartości w próbce. W takim przypadku istotna jest też możliwość jednoczesnego tworzenia mapy dla tła i następnie odejmowania jej od mapy pierwiastka [5, 19] (Ryc. 3). Procedura taka niweluje w pewnym stopniu wpływ promieniowania tła, które jest zawsze obecne w wybranym okienku energetycznym pierwiastka oprócz właściwego maksimum energetycznego. Mapa dla tła powstaje jednak

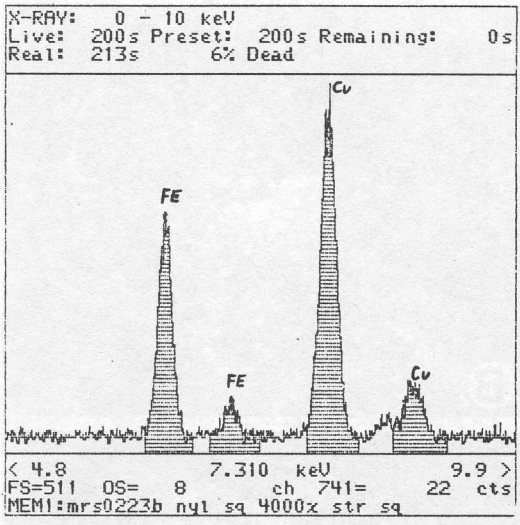


Ryc. 4. A. Elektronicznie przetworzony obraz mikroskopowy ziarna pyłku *Chlorophytum elatum* R. Br., w którym analizowano rozmieszczenie fosforu (pow. 3000). Obszary o dużej gęstości elektronowej odpowiadają jasnym punktom obrazu. Widoczny jest zarys ziarna oraz jądro generatywne. Jądro wegetatywne nie było widoczne. (G – jądro generatywne; C – cytoplazma; S – sporoderma) B. Mapa rozmieszczenia fosforu wykonana dla linii K_a o energii 2.01 keV. Mapa jest 8-bitowa, o rozdzielczości 128*128 pikseli. Jasne piksele odpowiadają obszarom o podwyższonej zawartości fosforu. Obraz nie przetworzony. C. Mapa B, na której wykonano operację zmniejszenia jasności każdego piksela o 50% jasności maksymalnej. D. Mapa B po zmniejszeniu jasności pikseli o 20% i „wygładzeniu".

Fig. 4. A. Computer processed microscopic image of *Chlorophytum elatum* R. Br. pollen grain, in which phosphorus location was analysed (mag. 3000). Areas of high electron density match bright dots of the image. The shapes of grain and generative nucleus are visible. Vegetative nucleus is not visible. (G – generative nucleus; C – cytoplasm; S – sporoderm) B. The map of the phosphorus distribution is made for K_a line of energy 2.01 keV. It is a 8-bit map of resolution 128*128 pixels. Bright pixels match the areas where the amount of phosphorus is higher. The image is not processed. C. Map presents pixels of which brightness was decreased to 50% of the maximum. D. Map presents pixels of which brightness was decreased to 20% and smoothed.

przy innej energii aniżeli energia okienka analizowanego pierwiastka (Ryc. 3). Może być zatem również źródłem błędów, ponieważ natężenie rentgenowskiego promieniowania tła może być różne w zależności od energii tego promieniowania [19].

Cechą charakterystyczną zapisu cyfrowego jest możliwość tworzenia kilku map jednocześnie dla tego samego obszaru. Na przykład energo-dyspersyjny system mikroanalizy LINK ISIS (firmy Oxford Instruments) umożliwia jednoczesne zapisywanie 32 map, przy czym czas

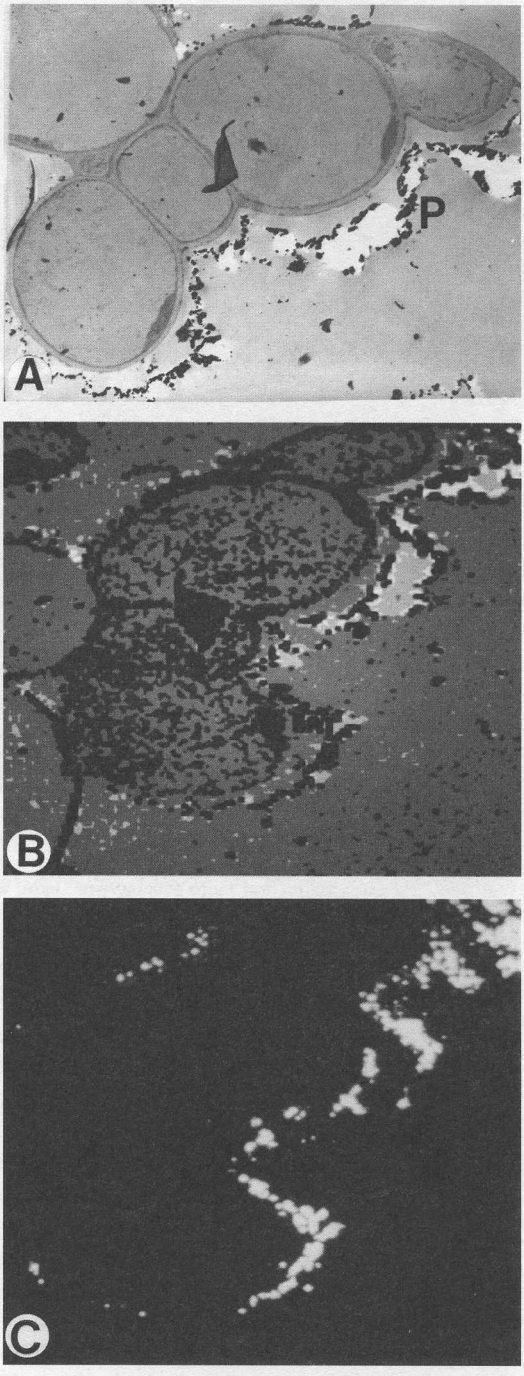


Ryc. 5. Punktowe spektrum rentgenowskie produktu reakcji Karnovsky-Roots w komórkach szparkowych *Marchantia polymorpha* L. W skład produktu reakcji wchodzi żelazo (Fe) linia K_a 6.400 keV, linia K_b 7.059 keV i miedź (Cu) linia K_a 8.041 keV, linia K_b 8.907 keV.

Fig. 5. Dot X-ray spectrum of Karnovsky-Roots reaction product in guard cells of *Marchantia polymorpha* L. The composition of the reaction product include iron (Fe) line K_a 6.400 keV, line K_b 7.059 keV and copper (Cu) line K_a 8.041 keV, line K_b 8.907 keV.

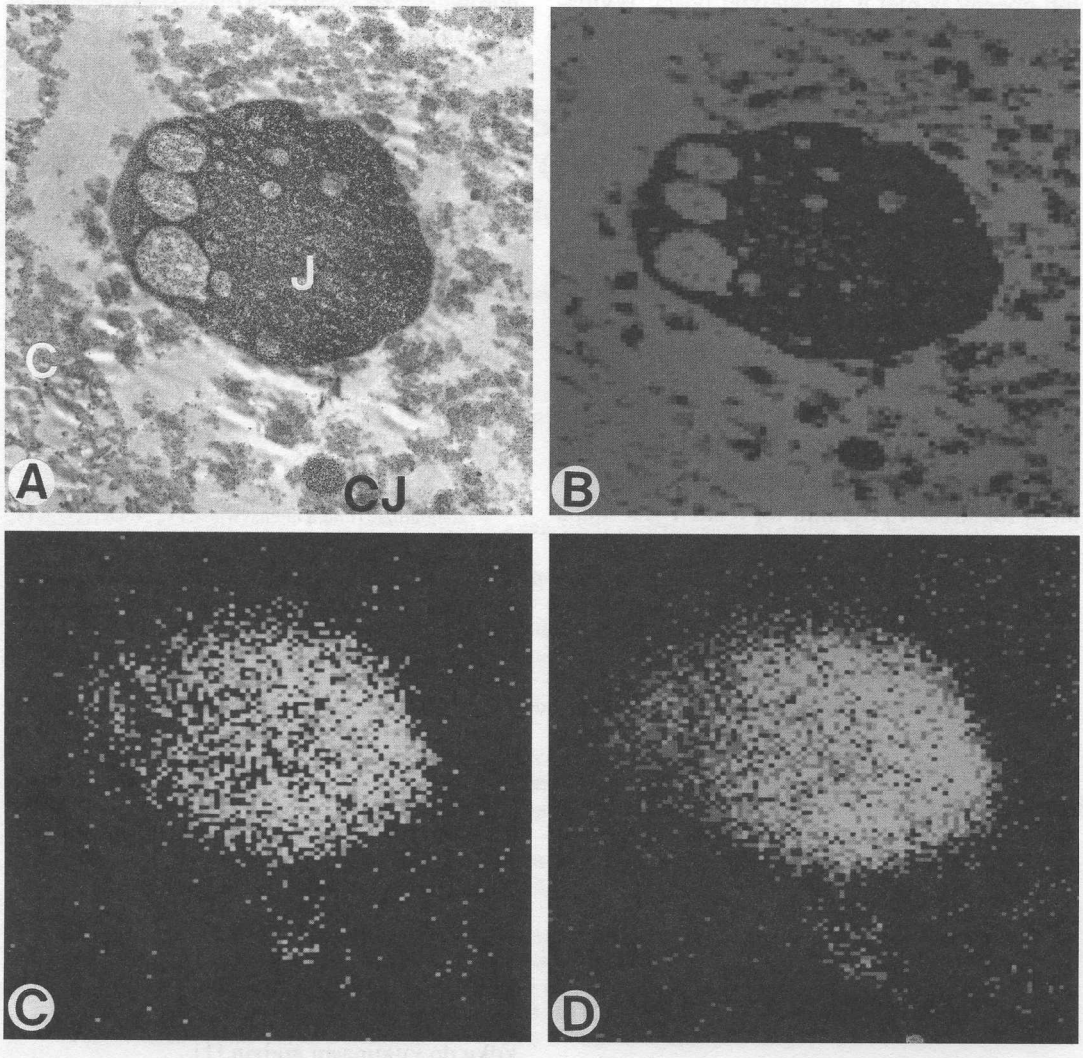
przejścia wiązki przez pojedynczą ramkę wynosi tylko 4 s [25].

Prócz mapowania pierwiastków występujących w komórce *in vivo*, metoda ta jest szcze-



Ryc. 6. A. Obraz z transmisyjnego mikroskopu elektronowego komórek szparki *Marchantia polymorpha* L. po reakcji Karnovsky-Roots (pow. 3500). Elektronowo gęsty produkt reakcji gromadzi się w pobliżu ściany komórek szparkowych (P-produkt reakcji). B. Elektronicznie przetworzony obraz komórek szparkowych, po ustawieniu siatki pod kątem 40° w celu wykonania mapy rentgenowskiej. C. Mapa rozmieszczenia miedzi wykonana dla linii K_a o energii 6.400 keV. Mapa jest 8-bitowa, o rozdzielczości 128*128 pikseli.

Fig. 6. A. Transmision electron microscopy image of the *Marchantia polymorpha* L. guard cells after Karnovsky-Roots reaction (mag. 3500). Electron dense product of reaction locates near the wall of guard cells (P – product of the reaction). B. Computer processed image of guard cells after setting of the angle of 40° in order to get X-ray map. C. Distribution of copper made for K_a line 6.400 keV. It is a 8-bit map of resolution 128*128 pixels.



Ryc. 7. A. Obraz z transmisyjnego mikroskopu elektronowego fragmentu jądra i cytoplazmy z widocznym jąderkiem i ciałem jądrowym mejocytów modrzewia *Larix decidua* Mill. po reakcji wysrebrzania (pow. 9000). (C – cytoplazma, CJ – ciało jądrowe, J – jąderko) B. Elektronicznie przetworzony obraz po ustawieniu siatki pod kątem 40° w celu wykonania mapy rentgenowskiej. C. Mapa rozmieszczenia srebra dla linii L_n. Białka srebrochłonne zlokalizowane są głównie na terenie jąderka, oraz w ciele jądrowym. D. Mapa rozmieszczenia srebra dla linii L_a. Dla tego silniejszego wtórnego promieniowania rentgenowskiego srebra widać wzrost sygnału z jąderka i ciała jądrowego.

Fig. 7. A. Transmision electron microscopy image of both a fragment of a nucleus and cytoplasm with a visible nucleolus and nuclear body of larch meiocytes *Larix decidua* Mill., after the silver reaction (mag. 9000). (C – cytoplasm; CJ – nuclear body; J – nucleolus) B. Computer processed image after setting a grid at the angle of 40° in order to obtain X-ray map. C. Distribution of silver for L_n line. Silver stained proteins are located mainly in both the nucleolus area and the nuclear body. D. Distribution of silver for L_a line. The increase of signals both from the nucleolus and the nuclear body are visible under the incresed secondary X-ray radiation.

gólnie przydatna do określania rozmieszczenia produktów niektórych reakcji cytochemicznych. Produkt takiej reakcji powinien zawierać pierwiastek normalnie w komórce nie występujący

lub obecny w niej w niewielkiej ilości. Wymaganiom tym odpowiada np. reakcja Karnovskiego-Rootsa, za pomocą której lokalizuje się aktywność acetylocholinesterazową [8]. Nierozpuszczalnym produktem tej reakcji jest żelazocyjanek miedziowy ($Cu_2[Fe(CN)_6]$). Punktowe spektrum rentgenowskie elektronowo gęstego produktu reakcji potwierdza, że mamy tu do czynienia z właściwym produktem reakcji (Ryc. 5). Mapowanie Fe lub Cu w skrawkach poreakcyjnych pozwala ustalić rozmieszczenie tego związku w analizowanym obszarze.

Korzystając z metody Karnovskiego-Rootsa stwierdzono podwyższoną aktywność acetylocholinesterazową w komórkach szparkowych *Marchantia polymorpha* L. [6, 17]. Potwierdzeniem lokalizacji produktu tej reakcji jest mapa rozmieszczenia miedzi wykonana przy użyciu energo-dyspersyjnego systemu mikroanalizy typu LINK 10000AN (firmy Link Analitycal, England), którą pokazano na rycinie 6.

Mikroanalizę rtg wykorzystać można również do badania rozmieszczenia nieenzymatycznych, srebrochłonnych białek jądrowych. Białka takie (głównie białka jąderkowe) posiadają zdolność do wiązania i redukowania jonów srebra [13]. Mapując rozmieszczenie uprzednio wprowadzonych do komórki jonów srebra, ustala się zatem rozmieszczenie wiążących je białek (Ryc. 7).

MAPOWANIE ILOŚCIOWE
(ang. quantitative digital mapping)

Mapy ilościowe, podobnie jak mapy jakościowe, zapisywane są w sposób cyfrowy. Są one konsekwentnym rozwinięciem mapowania jakościowego, prowadzącym do uzyskania pełniejszej informacji o składzie chemicznym próbki [25]. Różnice między tymi dwiema technikami mapowania wynikają przede wszystkim z podstawowych założeń analizy ilościowej [3, 16].

Badania ilościowe wymagają bowiem użycia standardów o znanej zawartości lokalizowanego pierwiastka. Spektrum rentgenowskie pochodzące ze standardu jest zapamiętywane przez komputer i służy jako ilościowy wzorzec porównawczy w stosunku do spektrum otrzymywanego z każdego piksela obrazu. Konieczne jest również wprowadzenie do komputera wzorców kształtu widm mapowanego pierwiastka, rejestrowanych w różnych warunkach (tzw. profili). Stężenie pierwiastka w obrębie obszaru odpowiadającego pojedynczemu pikselowi wyliczane jest najczęściej wg metody Halla z następującego wyrażenia [7]:

$$Cx = Ip/Is \times Cs$$

gdzie:

Cx – stężenie pierwiastka w próbce
Cs – stężenie pierwiastka w standardzie
Ip – intensywność promieniowania rtg dla pierwiastka w próbce
Is – intensywność promieniowania rtg dla pierwiastka w standardzie (miarą intensywności są powierzchnie odpowiednich pików)

Wyliczenie powyższej zależności wymaga dokładnego wyznaczenia powierzchni piku jak i odpowiadającego mu tła, zarówno dla próbki jak i standardu.

Wyrazem pełniejszego przetwarzania sygnałów w porównaniu z pomiarami jakościowymi są takie czynności jak usuwanie tzw. maksimów ucieczki (ang. escape peak), rozwijanie nakładających się pasm (dzięki „odwołaniu się" do odpowiednich profili), czy statystyczna analiza wyników [5, 18, 19]. W związku z tym przetwarzanie informacji odnoszącej się do pojedynczego piksela trwa przeciętnie 1 s lub dłużej. Całkowite czasy mapowania ilościowego są rzędu od kilku do kilkunastu godzin [1].

Odpowiednio długie czasy rejestrowania sygnałów narażają próbkę biologiczną na uszkodzenia i przesunięcia w trakcie kolejnych przejść wiązki elektronowej. Przesunięcia próbki kompensowane są automatycznie w oparciu o zapamiętany wzorzec, który stanowi elektroniczny obraz mapowanego obszaru przed pomiarem [21]. Dokładna analiza ilościowa wymaga również uwzględnienia przez oprogramowanie poprawek wynikających z rodzaju zastosowanego holderu, siatek i żywicy do zatopienia preparatów.

Sprawą o fundamentalnym znaczeniu w przypadku mapowania mikrometrowej grubości

skrawków w SEM jest wprowadzenie współczynników korygujących wpływ pozostałych pierwiastków tworzących próbkę oraz fluorescencji i absorbcji promieniowania rtg (tzw. metoda ZAF). Źródłem błędów w trakcie mapowania w SEM może być, podobnie jak w przypadku map analogowych, szorstka i nierówna powierzchnia próbki. Zapobiega się temu wygładzając próbki lub wprowadzając do oprogramowania współczynniki korygujące ten błąd [9].

Nie mniej ważny jest również sposób przygotowania próbki. Najkorzystniejsze są te procedury, które w jak największym stopniu minimalizują dyfuzję i wypłukiwanie mapowanych pierwiastków [24].

Efektem mapowania ilościowego jest obraz złożony z kilku nakładanych komputerowo barw, przy czym każdej z nich odpowiada konkretne stężenie lokalizowanego pierwiastka. Oznaczane w materiale biologicznym stężenia mieszczą się w granicach 50–500 mM na kg suchej masy. Wyniki pomiarów ilościowych uzyskiwane techniką mapowania zbliżone są do uzyskiwanych z pojedynczych pomiarów punktowych [23].

PODSUMOWANIE

Mapowanie pierwiastków przy wykorzystaniu pochodzącego z próbki charakterystycznego sygnału rentgenowskiego jest jedną z technik tworzenia obrazu na poziomie mikroskopu elektronowego. Otrzymywany tą metodą obraz jest, w przeciwieństwie do klasycznego obrazu mikroskopowego w TEM lub w SEM, specyficzny pierwiastkowo. Pełne wykorzystanie wynikających stąd informacji stało się możliwe po wprowadzeniu do powszechnego użycia komputerów klasy IBM PC, umożliwiających wyrafinowane cyfrowe przetwarzanie otrzymywanego obrazu. Ten kierunek rozwoju analitycznej mikroskopii elektronowej jest silnie związany ze stopniem zaawansowania techniki komputerowej. Obecnie używanym standardem w tym zakresie jest IBM PC 486/50. Na przykład funkcjonujący w tym standardzie program Techbase umożliwia tworzenie trójwymiarowych map ilościowych o rozdzielczości 64*64*64 piksele [10].

Równocześnie wzrasta szybkość przetwarzania informacji dotyczącej pojedynczego piksela, a zatem maleje ogólny czas procesu mapowania. Jest to szczególnie ważne dla materiału biologicznego, ponieważ jest on czuły na długotrwałe bombardowanie elektronami. Między innymi produkowany w latach 80-tych EDS LINK 10000AN wymagał około 2–3 minut do zarejestrowania pojedynczej ramki mapy jakościowej, natomiast wprowadzony na początku lat 90-tych EDS LINK ISIS zużywa na tę operację jedynie 4 sekundy.

LITERATURA

[1] Baumann O., Walz B., Somlyo A. U., Somlyo A. P. 1991. Electron probe microanalysis of calcium release and magnesium uptake by endoplasmic reticulum in bee photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 741–744.

[2] Buravkov S. V. 1989. Digital image processing in the x-ray microanalysis. *Citologia* **31**(10): 1251–1255.

[3] Butowt R., Bednarska E. 1993. Mikroanaliza rentgenowska w badaniach biologicznych. *Post. Biol. Kom.* **4**: 403–420.

[4] Chaubal R., Reger B. J. 1992. Calcium in the synergid cells and other regions of pearl millet ovaries. *Sex. Plant. Repr.* **5**: 34–46.

[5] Fiori C. E., Leapman R. D., Swyt C. R., Andrews S. B. 1988. Quantitative x-ray mapping of biological cryosections. *Ultramicrosc.* **24**(2–3): 237–249.

[6] Górska-Brylass A., Smoliński D. J. 1992. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase activity in stomata of *Marchantia polymorpha L.* W: L. Megias-Megias M. I. Rodriguez-Garcia A. Rios J. M. Arias (red.), *Electron Microscopy 92*, Servicio de Publicationes, Granada. **3**: 439–440.

[7] Hall T. A. 1971.The microprobe assay of chemical elements. W: G. Oster (red.), *Physical Techniques In Biochemical Techniques*, Academic Press, New York, ss. 393–394.

[8] Karnovsky M. J., Roots L. 1964. A „direct-coloring". tiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 219–221.

[9] Marshall A. T., Patak A. 1993. Use of ultra thin window detectors for biological microanalysis. *Scann.Microsc.* **7**: 677–691.

[10] Marschallinger R., Hock V., Topa D. 1993. A method for the 3-D reconstruction of chemically zoned minerals from microprobe scanned serial sections. *Eur. Microsc. Anal.* **26**: 5–7.

[11] Materka A. 1991. Elementy cyfrowego przetwarzania i analizy obrazów. PWN Warszawa-Łódź, ss. 218.

[12] Morgan A. J. 1985. X-ray Microanalysis in Electron

Microscopy for Biologists. Oxford University Press, ss. 281.

[13] Ploton D., Menager M., Adnett J. J. 1985. Simultaneous ultrastructural localization of Ag-NOR (nucleolar organizer region) proteins and ribonucleoproteins during mitosis, in human breast cancerous tissues. *J. Cell Sci.* **77**: 239–256.

[14] Przełęcka A. 1984. Skaningowy mikroskop elektronowy w badaniach biologiczno-medycznych. W: T. Warmiński (red.), *Materiały I Krajowej Szkoły na Temat Mikroskopii Elektronowej*, Jabłonna 1983.

[15] Reed S. J.B. 1993. Electron microprobe analysis. Cambridge University Press, ss. 326.

[16] Robards A. W., Wilson A. J. 1993. Procedures in Electron Microscopy. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, ss. 1231.

[17] Smoliński D. J., Górska-Brylass A. 1994. Acetylcholinesterase activity in stomata of *Marchantia polymorpha* L. *Cell Biol. Int.* **18**(5): 539.

[18] Somlyo A. P., Somlyo A. V., Shuman H., Stewart M. 1979. Electron probe analysis of muscle and X-ray mapping of biological specimens with a field emission gun. *Scan. Electron. Microsc.* **2**: 711–716.

[19] Statham P. J. 1977. Deconvolution and background subtraction by least squares fitting with prefiltering of spectra. *Anal. Chem.* **49**: 2149–2154.

[20] Statham P. J., Jones M. 1980. Elemental mapping using digital storage and colour display. *Scanning* **3**: 168–171.

[21] Statham P. J. 1988. Pitfalls and advances in quantitative elemental mapping. *Scanning* **10**(6): 245–255.

[22] Ulshafer R. J. 1989. Zinc content in melanosomes of degenerating RPE as measured by X-ray mapping. *Prog. Clin. Biol. Res.* **314**: 131–139.

[23] Wong J. G., Wilkinson L. E., Chen S. W., Izutsu K. T., Johnson D. E., Cantine M. E. 1989. Quantitative elemental imaging in the analitycal electron microscope with biological applications. *Scanning* **11**(1): 12–21.

[24] Zierold K. 1993. Rapid freezing techniques for biological electron probe microanalysis. W: D. C. Sigee, A. J. Morgan, A. T. Sumner, A. Warley (red.), *X-ray microanalysis in biology: experimental techniques and applications*. Cambridge University Press, ss. 101–116.

[25] (1992) A guide to x-ray mapping in biology. Published by Oxford Microanalysis Group, High Wycombe England, ss. 52.