

通过重组保留或去除与致病性和宿主范围有关的基因,置换携带表面糖蛋白密码的基因,创造新的流行株,给疫苗研究提供新的可能性。流感病毒基因组及其产物结构与功能的研究,还为分子流行病学提供基础。此外,对流感病毒复制与转录过程的认识,可为进一步发现具有临床用途的抗病毒物质提供资料。

参 考 文 献

- [1] Hirst, G. K.: *Virology*, 55, 91, 1973.
[2] Palese, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,

73, 2142, 1972.

- [3] Hinshaw, V. S. et al.: *Virology*, 84, 51, 1978.
[4] Palese, P.: *Cell*, 10, 1, 1977.
[5] Desselberger, U. et al.: *Virology*, 88, 394, 1978.
[6] Skehel, J. J. et al.: *Nature (London)*, 247, 87, 1978.
[7] Almond, J. W. et al.: *Virology*, 92, 416, 1978.
[8] Rott, R.: *Arch. Virol.*, 59, 285, 1979.
[9] McGeoch, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, 73, 3045, 1976.
[10] Scholtissek, C. et al.: *Negative Strand Viruses and the Host Cell*, pp. 19, 1978.
[11] Hay, A. J. et al.: *Br. Med. Bull.*, 35, 471, 1979.

[本文于1980年2月11日收到]

用核磁共振研究生物活组织(二)

许健生 高联佩

(中国科学院生物物理研究所) (清华大学)

一、完整心脏的研究

用 NMR 研究心脏集中在三个方面: 1. 缺氧条件下产生的化学变化; 2. 心肌缺氧坏死的预防药物和预防措施的作用机制; 3. 寻找一种测定心肌坏死的部位和范围的非破坏性方法。

Hollis 等从一个兔身上取出心脏^[1], 作为样品。正常心肌如同一般横纹肌一样, 无机磷共振峰高度和位置能反映能量库的消耗情况, 并且与心脏细胞内的 pH 值有关。夹住左前下行

冠状动脉使心脏局部缺血时, 测得的无机磷峰分裂为两部分。一个代表 pH7.4 的正常心肌, 一个代表 pH6.6 的梗死心肌(图1)。接着截断冠状动脉的主脉, 使整个心脏缺氧。每隔5分钟测试一次, pH 中性区的 Pi 峰逐渐减小到零, 而 pH 酸性区的 Pi 峰则迅速增强, 最后 pH 值达到 6.4。

因为心脏缺氧区的能量供应主要依靠糖酵解。糖酵解产生大量乳酸, 导致 pH 值降低。这有可能打开一条新途径, 即根据 Pi 峰的形状估计冠心病区的范围。

随着自旋成像技术的迅速发展, 已制成了能容纳部分人体的大磁铁, 成功地获得了人胸的 ¹H 像^[2]。人们也设想用 ³¹P NMR 获得一个心脏的三维象, 以便迅速而无损伤地确定心肌梗死的部位和范围、区别带斑痕陈旧心肌梗死和急性心肌梗死。

用 NMR 谱研究心脏灌流, 可以了解一个收缩周期中的能量代谢过程。初步结果表明, 肌红蛋白在收缩期和舒张期与氧结合较多, 在静止期则结合较少; 细胞色素 aa₃ 在收缩期还原型较多, 在静止期则氧化型较多。

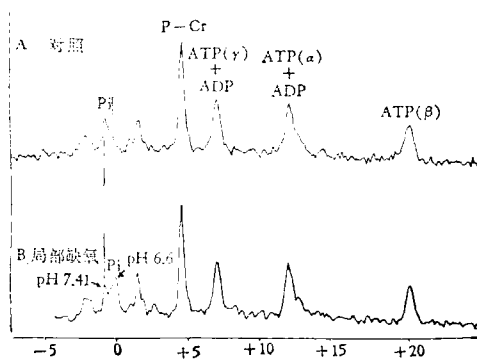


图1 心脏局部缺血的 ³¹P NMR 谱直接观测到 Pi 峰分裂成两部分, 正常区和酸性区

二、肾脏移植的研究

器官移植面临一个严重问题是术后的成活率低,一些器官在移植后被排斥,并不是由于免疫因素引起的,而是因所用器官在术前已变质。美国宾州大学和英国牛津大学协作,用 ^{31}P NMR对大鼠的肾脏移植手术,进行了研究,获得有意义的结果。

他们把新切下的大鼠肾脏,在 4°C 保存,所得NMR谱说明,随着时间延长,ATP减少,而 P_i 增多。但在1小时内细胞内的pH变化不大,这可能是温度较低,糖酵解缓慢的缘故。

在上述试验完成后,他们又把这个离体肾脏与一只活大鼠的动静脉连接起来,灌流并进行NMR测量^[3],结果ATP很快重新被合成。因此它提供了鉴定移植肾脏的一种非破坏性方法。用NMR测定肾脏的pH值以及它重新合成ATP的能力,可以判断一个移植肾脏是否适用,这种技术不仅可以用在术前对器官的选择,也可以监护术后移植器官的功能。

类似于对心肌梗死的测定,也可以用 ^{31}P NMR谱来测定脑血管遭到意外损伤后大脑的生理条件。

三、肾 上 腺

嗜铬性颗粒是肾上腺髓质的贮存单元,泡囊内含有肾上腺素和ATP,浓度是4:1。此外,

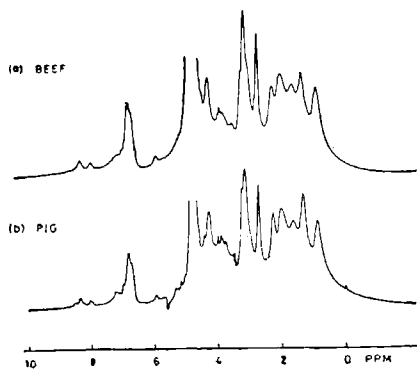


图2 牛和猪肾上腺切片的 ^1H NMR谱

从右到左各峰代表:嗜铬粒蛋白;(1—2ppm);脂族肾上腺素(~ 3 ppm);芳香族肾上腺素(6.7 ppm);和ATP(5.8, 8.0, 和8.3 ppm)的共振峰。

有嗜铬蛋白质的“溶液”。

1974年以来人们利用NMR的 ^{31}P 和 ^1H 研究肾上腺,比较了嗜铬性颗粒及其可溶部分的谱腺。图2是牛津大学 Daniels 等获得的一种肾上腺的 ^1H NMR谱^[4,5]。

上述结果说明,肾上腺素与ATP的比值为4:1,ATP和肾上腺素谱线变宽;并且它们的化学位移往高场(B_0 增加)方向移动(相对于游离的成分)说明,它们和分子量较大的分子结合而引起变化,其附近存在某种环电流,当肾上腺素被释放后,就能得到狭窄的,其化学位移与游离肾上腺素一样的共振峰。嗜铬粒蛋白A的谱线,与无规结构的谱线是吻合的。

人们利用NMR谱研究,第一次为嗜铬蛋白质“溶液”提供了一个结构模型。几种成分按下列顺序形成了较短的互相交叉的链条:蛋白质(谷氨酸)—金属或肾上腺素—ATP—肾上腺素—蛋白质—这种结合使各成分的渗透压降低,这种链条是分岔的,全部浸泡在一种较薄的胶体中,这种无规卷曲的酸性蛋白质使胶体稳定而不产生沉淀。

四、活细胞的研究

1. 红血球 R. B. Moon 等用 ^{31}P 谱观察了红血球内的代谢物和pH值变化^[6](图3)。根据兔红血球内2,3-二磷酸甘油酸中2-磷酸甘油酸和3-磷酸甘油酸化学位移之差断定,红血球经一氧化碳处理后,其pH由正常值下降至6.89。红血球被存放一段时间后,其中的2,3-

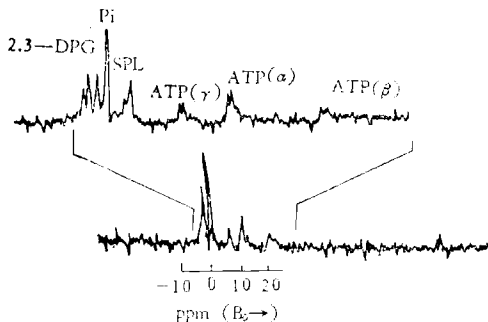


图3 完整的人红血球的 ^{31}P NMR谱

外参考 H_2PO_4^- (85%)在0 ppm处。2,3-DPG: 2,3-二磷酸甘油酸; Spl: 血清蛋白磷脂。

二磷酸甘油酸含量将减少;但是,经过肌苷和丙酮酸在 25℃ 保温后,这种成分的含量又恢复。

用 NMR 研究红血球近几年有一重要成果,即红血球内的游离 Mg^{2+} 浓度的测定。细胞内游离 Mg^{2+} 的浓度很低,用一般生化方法测定很困难。例如,人们利用腺苷酸反应的平衡方法测得的游离 Mg^{2+} 浓度小于 0.134 mM;但用游离载体法测得的值则为 0.4mM。这两个值都不是在生理条件下测得的,相差很大。

1978 年^[7]人们利用 NMR 方法测定细胞内游离 Mg^{2+} 浓度。图 3 和图 4 画出了红血球的两个 ^{31}P 谱。根据这些谱线获得自旋耦合常数等参量可以断定:红血球细胞内游离 Mg^{2+} 浓度,在供氧条件下为 0.25 mM;在缺氧条件下为 0.67 mM。结果令人满意,这是目前用一般方法做不到的。

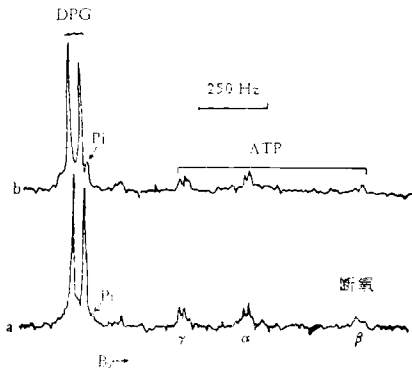


图 4 人的红血球的 ^{31}P 谱

DPG: 二磷酸甘油酸,其高场旁小峰为 P_i 峰,实验过程中 P_i 峰未改变,说明细胞是稳定的。

2. 蛙类的胚胎 实践证明^[8]可以用 NMR 来监测蛙类受精的卵胚胎发育过程的若干阶段,直到能游泳、能进食的蝌蚪的变化。

根据谱线分析,可得出如下结论:(1)在自发运动阶段以前,三磷酸核苷的含量基本稳定不变,后期逐渐减少;(2)无机磷从未受精阶段到游泳阶段增加了几十倍;(3)胚胎中卵黄高磷蛋白的含量比卵黄脂磷蛋白高,而在发育过程中前者消耗快。

可以设想,用 NMR 既能研究蛙胚胎的发育,进而也可能研究其它动物甚至人的胚胎的

发育过程。

需指出人们已经用 NMR 的 1H 谱、 ^{13}C 谱和 ^{31}P 谱研究植物的生长过程,例如植物发芽及光合作用等的生理过程。特别是可以在试管内观察一些霉菌和浮游生物整个生命周期中各种代谢的变化。

3. 大肠杆菌 1977 年以来,人们用 ^{31}P 和 ^{13}C 的 NMR 谱对大肠杆菌进行研究,获得了能够鉴定各种成分的谱线。

图 5 是大肠杆菌,在缺氧条件下的糖酵解的 ^{31}P NMR 谱,是时间的函数,据此人们测定了细胞内外的 pH 值以及各种代谢物在细胞内的浓度。根据 ^{31}P 谱研究贝尔实验室得到如下结论^[9]:

(1) 增加葡萄糖,可使细胞膜内外产生 pH 梯度;(2) 糖酵解率与细胞内的 pH 值有关系,细胞内的 pH 接近 7.2 时,糖酵解率急剧下降;(3) DCCI (二环己基碳二亚胺)能阻止 NTP 水解并抑制 ΔpH 产生;(4) FCCP 羧氰-对-三氟甲氧苯胺使 ΔpH 和 NTP 的水平显著下降。因此,可以断定,糖酵解产生的 ATP 被膜中的

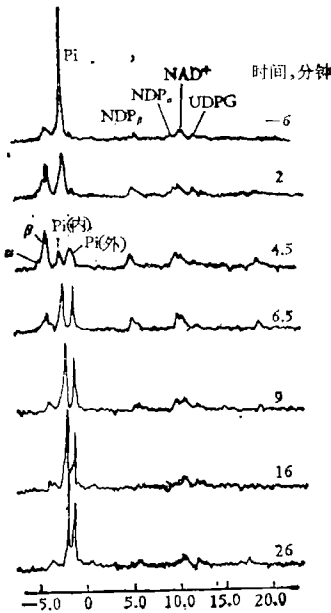


图 5 大肠杆菌在缺氧条件下的 ^{31}P NMR 谱

在 0 分钟时加葡萄糖, P_i 单峰,随后分裂成两个峰,说明细胞内外建立了 pH 值的差。NDP: 磷酸核苷;UDPG: 尿苷二磷酸葡萄糖; NAD^+ : 辅酶 1; F1DP: 果糖二磷酸。

ATP 酶水解, 因而产生一个 ΔpH , 而 DCCI 和 FCCP 则能使 ATP 酶促进 ATP 水解, 因而使 ΔpH 消除。

还可以用 ^{13}C 谱来研究大肠杆菌, ^{13}C NMR 谱研究有机物质的分子结构, 是 1H NMR 谱的一种有价值的辅助工具, 因为 ^{13}C 的分辨率比 1H 谱好, 便于直接观察有机分子的脊结构; 有些含 C 而不含 1H 的功能集团可以用 ^{13}C 来观察。但是, ^{13}C 谱的缺点是: 富集度太低, 它的 NMR 谱的灵敏度比 1H 谱低 6000 倍, 70 年代以来, 实验技术改进很大, ^{13}C 谱已逐步被广泛应用。 ^{13}C NMR 谱的重要参量是化学位移和自旋——晶格弛豫时间 T_1 , 但不包括自旋——自旋弛豫时间 T_2 , 因至今 T_2 的测量还太困难。

贝尔实验室用大肠杆菌, 在 90.5 赫兹观察 ^{13}C NMR 谱, 研究了在 $[1-^{13}C]$ 葡萄糖中缺氧保温细胞的糖酵解过程, 他们获得如下几点结论: (1) 在缺氧条件下, 葡萄糖的 β 异构体消耗得比 α 异构体快得多; (2) 糖酵解过程的中间产物为果糖二磷酸, 作为最后产物则有乳酸, 琥珀酸, 乙酸, 丙氨酸和缬氨酸; (3) 缬氨酸合成的主要途径是通过丙氨酸的缩合; (4) C 主要是通过乙酰辅酶 A 进入到三羧酸循环的。

上面的例子说明, ^{13}C NMR 谱为在生理条件下, 研究细胞的代谢途径, 以及代谢的动态过程提供了一种前所未有的方法。这种方法既简便又迅速。这也是 ^{31}P 谱共有的优点。可是 ^{13}C 谱的化学位移更大, 加上生物分子中含 C 很普遍, 如能克服 ^{13}C 谱的弱点(富集度太低等), 它将成为生物分子测定的有力工具。

4. 哺乳动物完整细胞的研究 由于高分辨率 ^{31}P NMR 谱能够在生理条件下同时测定细胞内的 pH 值和磷酸代谢物的成分, 及其变化的过程, 1978 年贝尔实验室^[10]研究了哺乳动物的完整细胞, 如 Ehrlich 腹水肿瘤细胞、淋巴细胞、Friend 红白血病细胞和 HeLa 细胞, 图 6 和 7 是两种典型的曲线。

根据这些曲线以及必要的辅助实验, 他们获得几点结论: (1) 糖酵解过程: 在 Ehrlich 细胞, 红白血病细胞, HeLa 细胞中: $ATP/ADP \sim$

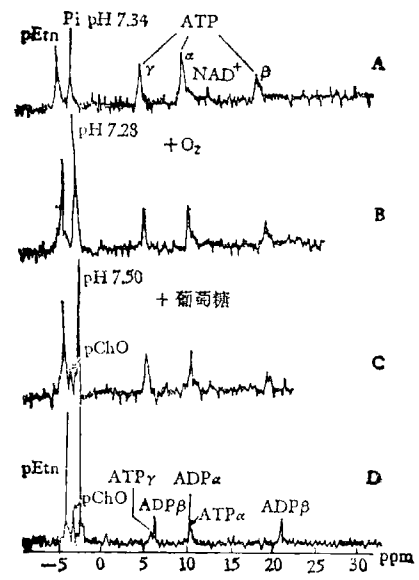


图 6 淋巴细胞的 ^{31}P NMR 谱

(A) 几种代谢物的 ^{31}P NMR 谱, pEtn: 磷酸乙醇胺, NAD^+ : 辅酶 I (B) 加氧后的谱线, 没有明显的改变; (C) 加葡萄糖后, 出现新峰 Pcho: 磷酸胆碱; (D) 过氯酸提取液。

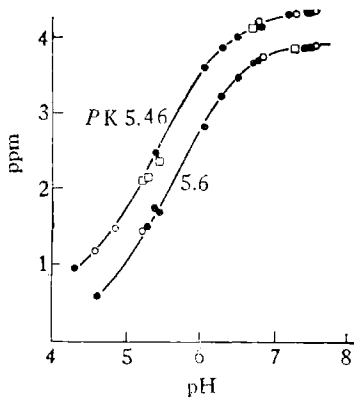


图 7 淋巴细胞提取液、磷酸酯区两个主共振峰的滴定曲线, 与活细胞滴定曲线的比较

● 提取液, □ 提取液加 pEtn,
○ 活细胞在不同 pH 环境中。

1, 在淋巴细胞中则比值大得多, 磷酸胆碱, 磷酸乙醇胺以及它们的甘油酯化合物, 在这些细胞中含量多。(2) 淋巴细胞(图 7)和 Erlich 细胞内外无 pH 值差: (3) 提取过程中 ATP 遭到了破坏。

以上只是一些初步的结果。长期以来, 人们掌握鉴定肿瘤细胞的明确指标很少。这里获得了几种肿瘤细胞鉴定指标, 可能很有意义。

遗憾的是目前还没有相应的正常细胞的数据。

5. 大鼠肝细胞 1978 年贝尔实验室还用 ^{31}P NMR 谱^[10]研究了生理条件下大鼠肝细胞线粒体内和胞液之间的 pH 值差(ΔpH)。

他们获得一组曲线,曲线中 P_i 不是一个简单的单峰。在高场边有一小突起,说明线粒体和胞液之间可能存在 ΔpH , 因为已知缬氨霉素能使分离的线粒体内膜两边的 ΔpH 增加^[12], 因此他们在分离的完整大鼠肝细胞中加入缬氨霉素,然后在不同的时间,观察到这个小突起分裂出另外一个 P_i 峰,而且两个 P_i 峰拉得愈来愈开,说明线粒体膜内外的 ΔpH 增加了,这主要是因为胞液的 pH 从 7.1 下降到 6.91,而线粒体内的 pH 值保持不变所引起的。

相反,加解偶联剂 FCCP 以后,或停止供氧、或用氮代替氧以后,已分开了的 P_i 峰会逐渐合并成一个峰。说明线粒体膜内外的 ΔpH 减小了。

上述对肝细胞线粒体的研究证明, ^{31}P NMR 第一次为生理条件下,直接观察线粒体膜内外的 ΔpH 提供一个重要方法,这组实验结果是重要的,对于氧化磷酸化的化学渗透学说认为线粒体膜内外存在 H^+ 梯度,提供了有力的实验支持,对研究生物能问题极有帮助。而生物细胞的能量究竟是怎样获得的,在生物分子的运动、传输和光合作用过程中,都牵涉到这个问题。

结 语

近十多年来 NMR 技术的发展是很快的,磁场强度提高了约 4 倍,灵敏度提高了至少 20 倍,因此,70 年代后 NMR 就大踏步地进入到分子生理学的领域,上述二篇连载的综述,主要报道了 ^{31}P NMR 在活组织、活细胞及活器官研究方面的进展。

参 考 文 献

- [1] Hollis, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**(4), 1086, 1977.
- [2] Damadian, R.: *Physiol. Chem. and Phys.*, **9**, 97, 1977.
- [3] Schr, P. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**(1), 195, 1977.
- [4] Daniels, A. et al.: *Proc. Roy. Soc. London. B*, **187**, 353, 1974.
- [5] Dwek, R. A. (ed): *NMR in Biology*, p. 277, 1977.
- [6] Moon, R. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 7276, 1973. Henderson, T. O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 2487, 1974.
- [7] Gupta, R. K. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6172, 1978.
- [8] Colman, A. et al.: *Europ. J. Biochem.*, **61**, 387, 1976.
- [9] Ugurbil, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**(5), 2244; **75**(8), 3742, 1978.
- [10] Navon, G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**(2), 891, 1978.
- [11] Cohen, S. M. et al.: *Nature*, **273**, 554, 1978.
- [12] Pudem, E. et al.: *Europ. J. Biochem.*, **40**, 431, 1973.

[本文于 1979 年 5 月 29 日收到]

X 光电子能谱及其在生物学中的应用

田 佩 珠

(中国科学院生物物理研究所)

X 光电子能谱(简称 XPS)或化学分析电子能谱(简称 ESCA)是以测定物质电子结构为基础的urface谱学方法^[1-3]。自 1967 年问世以来,发展迅速。目前已是谱学领域中最活跃的分枝之一。它已广泛地用于物理、化学、微电子学和材料科学研究等方面,但在生物科学中的

应用还不普遍。众所周知,许多生物或生命过程是在液—固或气—固界面上进行的,因此在原子或分子水平上了解生物体系表面与界面的化学组成和结构对分子生物学研究来说是至关重要的,而 XPS 在这方面将有其独特的用处。

本文目的是通过对 XPS 基本原理的介绍和