

5'-(5-I-Inol)-pT · NH₄ 的分离: 上述缩合反应的混合物加 7M NH₄OH 76 毫升水解 3 小时, 脱去乙酰基; 过滤, 滤液用乙醚萃取三次; 收集水层并减压浓缩至干, 干燥物溶于 40 毫升水; 在 DEAE-Sephadex A-25 柱 (HCO₃⁻型) 上进行分离。上柱后分别用 0.12M、0.2 M 和 0.25 M NH₄HCO₃ 溶液分级洗脱, 收集 0.25 M 洗脱液中最大紫外吸收 (268 毫微米) 和最小吸收 (250 毫微米) 的分部, 浓缩至干, 并反复用甲醇溶解, 抽干, 除尽 NH₄HCO₃, 得浅黄色 5'-(5-I-Inol)-pT · NH₄ 97 毫克, 产率一般在 6—9%。

经 5'-蛇毒磷酸二酯酶酶解和紫外吸收光谱的鉴定证明所合成的产物是 5'-(5-碘吡啶酚-[3])胸腺嘧啶核苷酸 5'-(5-I-Inol)-pT。吸收光谱如图 1 所示, 吸收高峰在 268 毫微米, 低

峰在 250 毫微米, 高低峰光密度之比值为 1.26, 与文献值相符。产物经高压电泳分析 (0.05M, pH 7.5 磷酸缓冲液, 4000 伏/45 毫安, 45 分钟), 纯度为 94%。

我们采用直接缩合的方法, 和氧氯化磷的方法相比, 省略了吡啶酚的磷酸氯化, 核苷的三苯甲基化和去三苯甲基等反应, 因而步骤较少, 反应的无水条件要求也较低, 反应中无可干扰磷酸二酯酶测定的磷酸单酯酶底物 (5-碘吡啶酚磷酸单酯) 的生成。但本方法可能生成焦磷酸、靛蓝等副产物。这是有待改进的。此外, 我们还曾观察到乙酰化产物的水解时间缩短为 40 分钟时产量高一倍。

参 考 文 献

- [1] Tsou, K. C. et al.: *Cancer Res.*, **33**, 2215, 1973.
- [2] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组等: 《生物化学与生物物理学报》, 1975 年, 7 期, 157 页。
- [3] Lu, H. M. et al.: *Int. J. Cancer*, **26**, 31, 1980.
- [4] 史博之等, 中华医学检验杂志 **3**, 75, 1980.
- [5] Tajima, K. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **45**, 2608, 1972.
- [6] Agarwal, K. L. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 2754, 1971.
- [7] Robiger, D. J. et al.: *J. Heterocyclic Chem.*, **7**, 307, 1970.
- [8] Su, H. C. F. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 1187, 1960.
- [9] Ohtsuka, E. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 2195, 1967.

[本文于 1981 年 1 月 25 日收到]

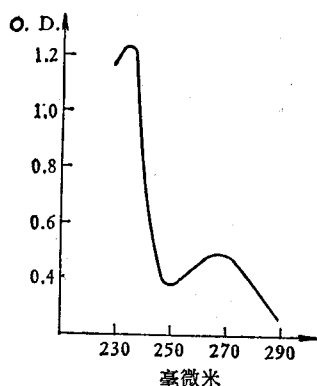


图 1 5'-(5-I-Inol)-pT 溶液 (0.023 毫克/毫升) 的紫外吸收光谱

小角激光光散射法(SALS)及其在生物学中的一些应用

胡世如 徐 懋

(中国科学院化学研究所)

纪极英 辛淑敏

(中国科学院生物物理研究所)

小角光散射法 (SALS) 于本世纪六十年代初, 首先由美国物理化学家 R. S. Stein 提出^[1], 随后在合成高分子材料的结构研究中得到了广

泛的应用^[2]。此法给出的结构信息在 1,000—100,000 Å 之间, 可与 X 光散射、光学显微镜和电镜等技术相互补充。通过 SALS 方法的观察,

可以提供有关高分子的聚集状态、结构单元的大小和形状,光学性质上的各向异性等,以及跟踪高分子的结晶、形变过程等。

近年来,学者们认为,液晶性质对维系生命机体的结构和功能起着十分重要的作用。因此,七十年代以来 SALS 方法也开始用于蛋白质、核酸等生物材料的液晶中介相和固态结构特征的研究,取得了一些可喜的成果^[3]。本文就 SALS 方法的原理及其在生物学中的应用作一简要介绍。

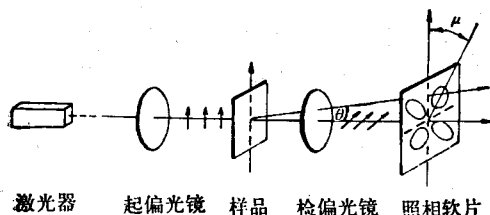


图1 照相法 SALS 原理示意图

θ 为散射角, μ 为方位角, 箭头表示偏光镜的偏振方向, 样品轴向通常为取向方向

一、SALS 原理简介

原理如图 1 所示^[4]。以氢-氙气体激光器做光源获得极强的相干单色光(波长为 6328 Å), 激光器功率大都在 2 毫瓦左右。入射光经起偏光镜垂直照射到样品表面上, 散射光经检偏光镜后, 用照相软片记录, 即可获得光散射图形。图 2 (见图版 II) 给出的是合成高分子材料—低密度聚乙烯球晶的光散射图^[5]。图 2 中 H_V 即指起偏光镜与检偏光镜的偏振方向正交, 且前者为垂直方向, V_V 则指上述二偏光镜的偏振方向均为垂直方向。

实际测定中, 对多种影响因素的修正, 还需要增加一些辅助的元件。目前已有由计算机程序控制的全自动光电记录式 SALS 实验装置问世^[6]。

为了将光散射图形与高分子的结构特征联系起来从而得到更多的信息, Stein 等人前人的基础上提出用模型法理论来讨论高分子球晶和棒晶的光散射问题。

球晶的光散射理论指出, 均匀各向异性圆球的光散射强度与圆球的半径、径向及切向极化率的大小等参数有关, 给出如图 2 所示的光散射特征。这在合成高分子材料的研究中用得最多。但是, 对许多生物大分子来说, 棒状结构为其主要特征。理论处理表明棒晶结构的散射图象的重要特点是散射光强随散射角的增大而单调下降^[7], 不像球晶散射那样出现极大值。对取向无规的互不相干的棒状晶体系来说, 散射花样的伸展方向直接取决于棒内体无光轴与棒轴间的相对取向状况; 此外根据散射光强的分布状况还可以计算棒的大小^[8]。

在一些理论中还考虑了粒子间的干涉、界面折射、多次散射等因素对光散射的影响^[5,9]。在实际测定中, 往往通过选择适当的样品厚度(10—80 微米)使透光率达 80% 左右, 以减少多次散射等因素的影响。研究固体薄膜时, 在其表面滴加折射率相近而又不破坏样品状态的浸渍液以消除表面散射光的干扰。

许多生物大分子样品往往具有较强的旋光性, 它对散射图形的影响必须十分注意^[10]。当样品厚度足够薄时, 旋光对背景散射的贡献较小。另外, 对消除杂质干扰和光路中的漫反射的吸收等也应予以注意。

二、在生物学中的应用

1. 合成多肽

多聚-L-苯基谷氨酸(PBLG)是人们研究较早而又广泛的一种合成多肽。六十年代初期 Robinson 观察到 PBLG/氯仿体系浓溶液具有液晶性质^[11]。Wilkes 最先采用 SALS 方法对多种合成多肽进行了研究^[12], 观察了浓度、温度的影响。植松等人发现^[13], 溶液浓度大于 20% (重量比) PBLG 胆甾型液晶可以具有两种内部取向状况不同的棒状结构。在不良溶剂中(见图版 II 图 3(A)与(B)), 散射体圆的光轴方向与棒的长轴方向成平行或垂直的状况, 给出 X 字形 H_V 散射图; 然而在良溶剂中(图 3 中(C)与(D)), 散射体圆的光轴方向与棒的长轴方向成 45° 夹角, 给出十字形 H_V 散射图形, 如图 3 所

示。进而,还可用 SALS 方法对 PBLG 溶液凝固所成固体膜的聚集态结构进行研究^[12]。E. Iizuka 研究了 PGA (多聚谷氨酸) 和 PELG (多聚乙基-谷氨酸) 在水或有机溶剂中液晶性质^[14]。

总之,许多学者把对合成多肽液晶性质的研究看作是研究天然的生物材料的液晶性质的过渡。

2. 胶原

与人工合成的具有 α 螺旋构象的 PBLG 类不同,胶原是属于天然来源的多肽类,具有三重螺旋结构。不同纯化方法制备的胶原固体膜的光散射研究发现,酸法 (CA) 得到的样品中具有棒状结构,且比 PBLG 大。而碱法 (CB) 则没有形成棒状结构^[12]。微弱的 H_v 散射表明,此时仅形成一些较小的各向异性微区(图 4, 见图版 III)。电镜的观察也证实,只有 CA 法胶原膜的表面具有束状条纹, CB 膜表面是光滑的。Kawai 等人^[8]则详细讨论了不同制备方法获得的变性、改性胶原膜的织态结构的光散射特征。

Chien 等人曾应用 SALS 方法研究了家兔角膜基质的结构形态^[3], Bettalhein 等则观察了牛眼的角膜基质^[15]。Chien 认为,光散射特征表明家兔角膜基质的结构单元具有束状特征,其结构就是由胶原纤维原 (fibril) 的条束组成的。图 5 (见图版 III) 即是 100 个不同部位的 H_v 光散射图组成的“极图 (Pole figure)”。与双折射或光轴方向的极图相比,它的好处在于可以同时给出单元大小、光轴方向、各向异性等情况。根据不同部位的光散射特征,可以判断形态结构。例如角膜 IV 区的光散射细节如图版 IV 上图 6 (A) 所示,可以由光散射理论推知,该区或中存在着胶原纤维束组成的扇形球晶结构(图 6(B))。理论估算直径为 20 微米,扇形角 ϕ 为 1° — 15° 。进一步比较发现,牛与家兔不同,牛的角膜基质中没有发现束状结构特征^[16]。无疑,这对了解哺乳动物的视觉结构特征是有意义的。

3. 脱氧核糖核酸(DNA)

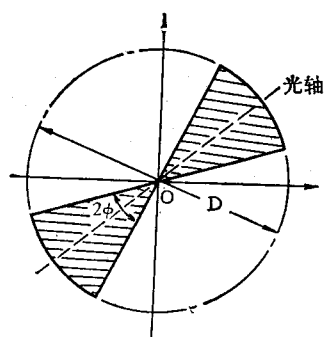


图 6(B) 扇形球晶结构物理模式
 2ϕ —扇形角 D —直径

有关具有双螺旋结构的 DNA 的光散射研究的报道尚不多,其液晶性质及其影响因素的研究无疑是十分重要的。本文作者曾用 SALS 等方法探讨了浓度、温度、pH 值,特别是电离辐射对鱼精 DNA 的水溶液的液晶性质的影响。

例如,当 DNA/ H_2O 溶液浓度达到 3% 左右, H_v 散射呈现圆对称形,说明此时已成各向异性液体了。随着浓度的进一步增大 ($>20\%$), 溶液光散射图呈十字形 H_v 图和 X 字形 V_v 图, 见图版 IV 图 7(a)。在偏光显微镜下此时可以看到边界清晰的彩色花纹结构,如图 7(b) 所示。Iizuka 只观察到了较低温度时的光散射情况^[17]。Wilkes 对小牛胸腺 DNA 的观察,部分结果与我们的类似^[12]。根据上述光散射理论,由图 7 可知,当溶液浓度大于 20% 以上 (约 30—40%) 时鱼精 DNA- H_2O 溶液中双螺旋链束组成棒状微区,微区中体圆的光轴与棒轴成 45° 角,其相关距离 (微区) 的大小在微米的数量级。

此外,光散射的研究还表明,加热、加酸和电离辐射等因素都会不同程度的减弱鱼精 DNA 的液晶性质^[18]。

三、结 语

生物高分子由于链内或链间相互作用而往往形成螺旋构象,并显示出类似刚性棒的特征。因此,在生物高分子的溶液薄膜中会存在一些各向异性的微区,其尺寸达到可见光的波长大小。

小(微米级)。这就使得人们有可能利用 SALS 方法来研究这些体系中的形态结构,包括各种因素(如温度、溶剂种类, pH 值、辐射等)对结构形态影响,进而研究生物高分子结构与功能的关系。这个方面,有人做了有益的尝试,还有许多课题有待人们去开发。

参 考 文 献

- [1] Stein, R. S. Rhodes, M. B.: *J. Appl. Phys.*, **31**, 1873, 1960.
- [2] Higgins, J. S., Stein, R. S.: *J. Appl. Cryst.*, **11**, 346, 1978.
- [3] Chang, E. P. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **343**, 615, 1974.
- [4] 胡世如, 张建国:《塑料》, 1978 年, 第 1 期, 第 1 页。
- [5] Mattson, J. S. et al.: *Computers in Polymer. Sciences* (Computers in Chemistry and Instrumentation, Vol. 16), Marcel Dekker Inc., Chapter 10, (Ed. by A. Misra, R. S. Stein) 1977.
- [6] Chu, W. H. Horne, D. E.: *J. Polymer Sci., Phys.*

- ed., **15**, 303, 1977.
- [7] Rhodes, M. B. Stein, R. S.: *J. Polymer Sci.*, **A-2**, **7**, 1539, 1969.
- [8] Moritani, Masahiko et al.: *Polymer J.*, **2**, 74, 1971.
- [9] Prud'homme, R. E. Stein, R. S.: *Eur. Polymer, J.*, **13**, 365, 1977.
- [10] Picot, C. Stein, R. S.: *J. Polymer Sci.*, **A-2**, **8**, 1491, 1970.
- [11] Robinson C.: *Tetrahedron*, **13**, 219, 1961.
- [12] Wilkes, G. L. et al.: *Structure and Properties of Polymer Films* (Ed. R. W. Lenz, R. S. Stein). p. 36—68, Plenum press, New York, London, 1973.
- [13] Junji Watanebe, et al.: *Polymer Bulletin*, **1**, 67, 1978.
- [14] Iizuka, E.: *Advances in Polymer Science*, Vol. **20**, Springer-Verlag Berlin, pp. 79—107, 1976.
- [15] Bettalheim, F. A. Kaplan, D.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **313**, 268, 1973.
- [16] Kaplan, D., Bettalheim, F. A.: *Exp. Eye Res.*, **13**, 219, 1972.
- [17] Iizuka E.: *Polymer J.*, **9**, 173, 1977.
- [18] 纪极英, 辛淑敏, 胡世如, 徐懋: 待发表工作。

[本文于 1980 年 7 月 26 日收到]

植 物 病 毒 的 纯 化

陈作义 朱本明

(中国科学院上海生物化学研究所)

现在已经知道有六、七百种植物病毒病,在农业生产上造成严重损失。肯定病原,才能采取及时的综合防治措施。因此,植物病毒的纯化在植物病毒研究和病毒病害防治上都有重要意义。现结合我们在植物病毒研究中一些病毒纯化的实例,介绍有关方法和技术。至于一般方法,可参考其他综述,专论^[1-6]。

一、植物病毒纯化的一般原理

植物病毒寄生于植物细胞内。利用病毒与寄主细胞内组分的差异,在不使病毒损伤和失活情况下选择各种不同的技术手段,可把病毒从植物细胞中分离出来,并进一步制备成高纯度、具活性的病毒制剂。

由于大多数病毒的外表面主要由蛋白质组

成,因此,一些提纯蛋白质的技术可用于病毒纯化。同时,病毒具有一定的大小、形状和密度,利用它们的沉降性质可使其与盐类、其它蛋白质和许多细胞组分分开。

二、选择适宜的寄主植物

一种植物病毒往往有多种寄主,它在不同寄主中的繁殖情况不相同,甚至可有很大差异。最好选择一种病毒含量高寄主成分又容易除去的寄主植物。

一般来讲,系统感染的植物中病毒含量高。新近发病表现出症状的幼嫩植物,较老的久经感染的植物,具有更高的病毒含量,同时色素较少。施肥适当,在 20—25°C 阴湿条件下生长的寄主植物,往往含病毒量高,寄主细胞组分易除

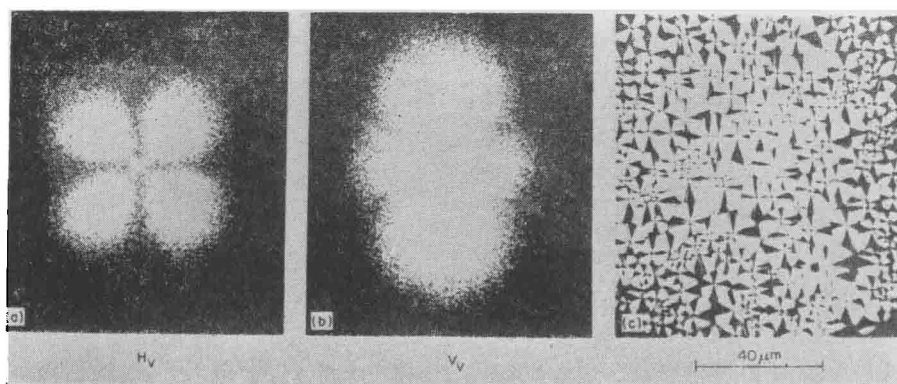


图2 聚乙烯球晶的光散射图形及相应的偏光显微镜照片
(a)、(b) 为光散射的 H_V 、 V_V 散射图 (c) 为偏光显微镜照片

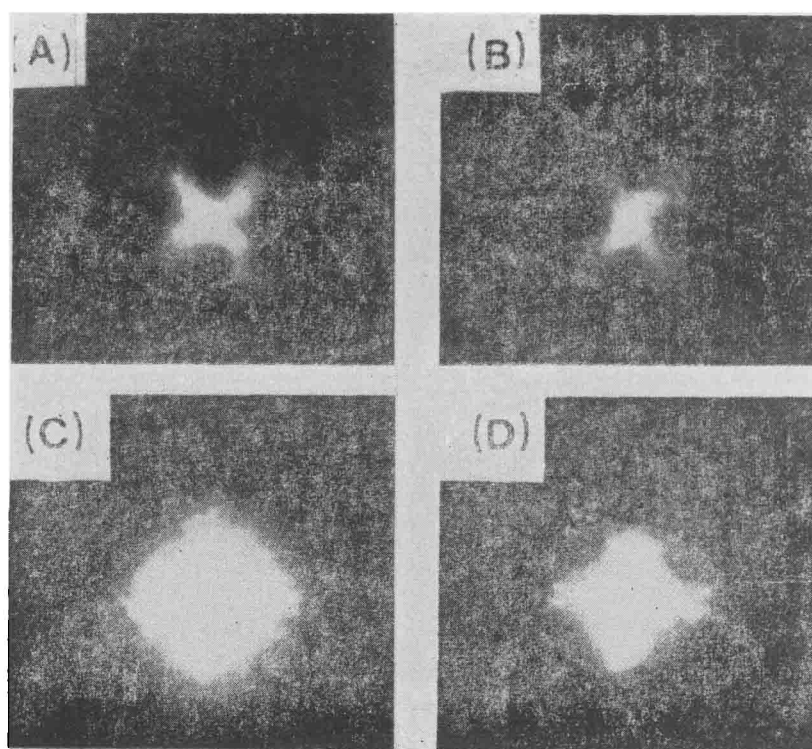


图3 PBLG 胆甾型液晶态的 H_V 光散射特征的溶剂依赖性
(A) 丙酸苄酯, 70°C; (B) 二甲基甲酰胺, 70°C;
(C) 氯仿, 25°C; (D) 二氯化乙烯, 25°C

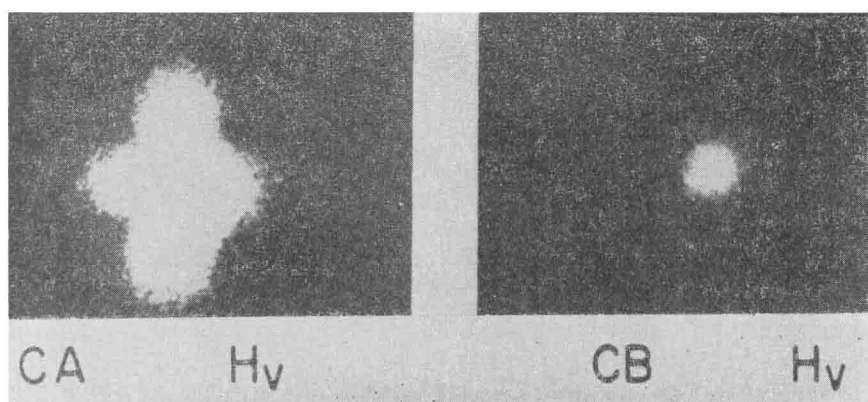


图 4 不同制备方法获得的胶原膜的光散射 H_v 图的比较

CA——酸法 CE——碱法

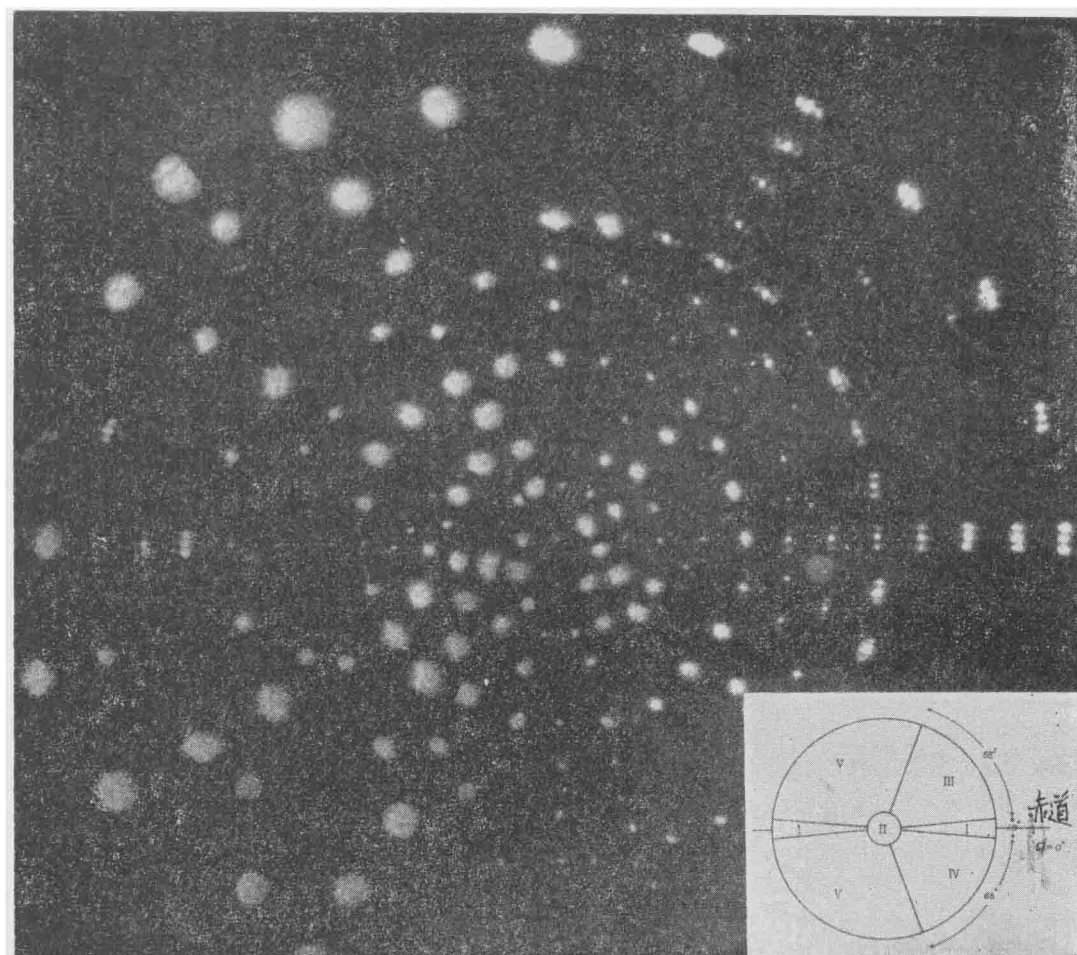


图 5 家兔角膜基质的光散射图

右上角为角膜基质的区域划分图(赤道指耳与鼻的轴线)

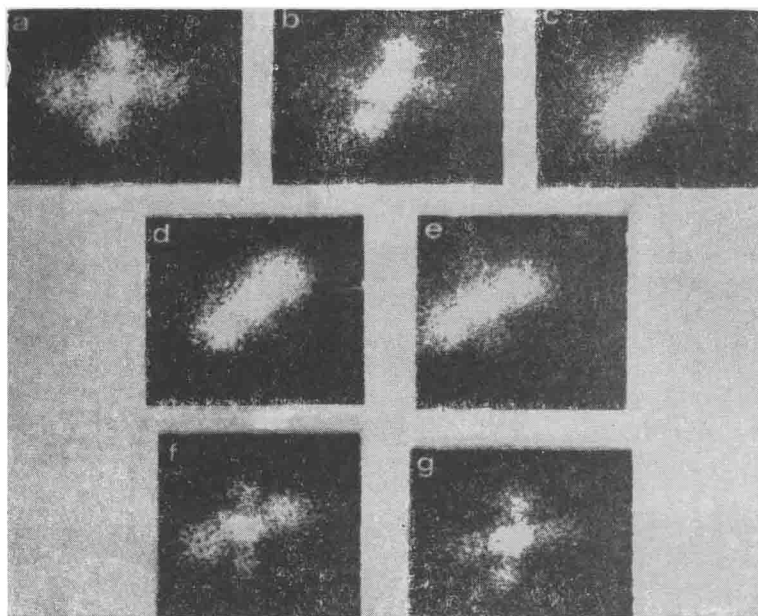


图 6(A) 典型的扇形球晶(图 5 第 IV 区域的细节)

光散射特征起偏振方向与光轴夹角分别为 $a = 0^\circ = H_v$, $b = 14^\circ$, $c = 45^\circ$, $d = 45^\circ$, $e = 60^\circ$, $f = 75^\circ$, $g = 90^\circ = V_h$, V_h 与 H_v 的偏振方向恰恰相反

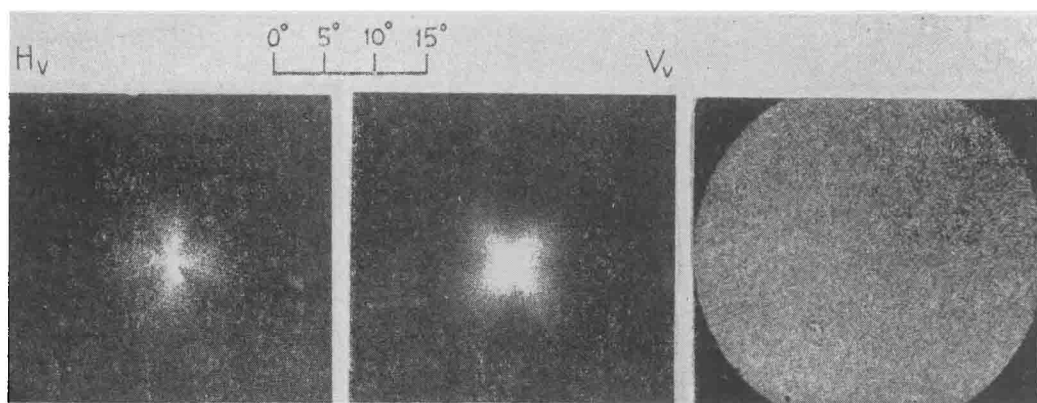


图 7 DNA/H₂O 浓溶液 ($C \sim 30\%$, 重量比)的棒状结构光散射特征

a. 光散射特征图 b. 偏光显微照片(300 $\times$)