

简便最可靠的方法,避免过多纯化步骤。

几年来,我们实验室曾先后采用过电洗脱法,HPA 吸附法,玻璃粉及玻璃纤维吸附法等,但效果都不甚满意。近年来采用夹心式 DE-81 纸电洗脱法,取得相当满意的效果。我们认为此法兼有简便、快速、回收率高,样品纯度好等优点。我们用此法回收的 DNA 进行多种限制性内切酶酶解、缺口翻译标记³²P 以及重组 DNA 的连接反应等,都取得好的结果。DE-81 是容易购到的一种离子交换型纤维素纸,另外不需任何特殊设备与材料。因此作者认为这是一种值得推广的切实可行方法。

参 考 文 献

- [1] Thuring, R. W. J. et al.: *Anal. Biochem.*, **66**, 213, 1975.
- [2] Wheeler, F. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **78**, 260, 1977.
- [3] Maxam, A. M. et al.: *Methods in Enzymology* (Grossman L. and Moldave K., eds.), Vol. 65, Part 1, 499—560, 1980. Academic Press, New

York.

- [4] Wu Ray et al.: *Methods in Enzymology* (Wu R. ed.), vol. 68, 176—182, 1979, Academic Press, New York.
- [5] Vogelstein, B. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **76**, 615, 1979.
- [6] Blin, N. et al.: *FEBS Letter*, **53**, 84, 1975.
- [7] Smith, N. O. *Methods in Enzymology* (Grossman L. and Moldave K. eds.), vol. 65, 371, 1980, Academic Press, New York.
- [8] Ledebroer, A. M. et al.: *B. B. A.*, **520**, 498, 1978.
- [9] Zassenhaus, H. P. et al.: *Anal. Biochem.*, **125**, 125, 1982.
- [10] Girvitz, S. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **106**, 492, 1982.
- [11] Winberg, G. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **8**, 253, 1980.
- [12] Dretzen, G. et al.: *Anal. Biochem.*, **112**, 295, 1981.
- [13] David, B. Danner.: *Anal. Biochem.*, **125**, 139, 1982.
- [14] Southern, E.: *Methods in Enzymology* (Wu R. ed.), vol. 68, 152, 1979. Academic Press, New York.
- [15] Hayward, G. S. et al.: *J. Molecular Biol.*, **63**, 397, 1972.

[本文于1983年10月17日收到]

几种生物大分子的激光拉曼光谱

孙永泰 朱克莉

(中国科学院生物物理所,北京)

第一个生物大分子——溶菌酶的激光拉曼光谱发表于1968年。两年后 R. C. Lord 等用浓溶菌酶水溶液实验,对其大部分拉曼谱带作了指认。1970年 Rimai 等人发表了胡萝卜素、番茄红素、番茄组织和视网膜中视蛋白的共振拉曼光谱。随后十年,拉曼光谱在生物学领域中应用发展极其迅速,对各种生命物质进行了广泛研究。

激光拉曼光谱用于生物学研究最突出的优点是水对谱图的干扰甚少,而大部分生命现象却发生在水溶液中;拉曼光谱的谱带丰富,可获得较多信息;此外还有样品用量少,可测量各种物理状态下的样品。它可以补充和扩展其它技

术(如X射线衍射、核磁共振、荧光、圆二色性)的信息,目前它已成为分子生物学的有用工具。

本文介绍我们获得的五种拉曼光谱,其中溶菌酶、胰岛素、二棕榈酰磷脂酰胆碱的拉曼光谱,国外已发表^[1-3]。 μ_2 RNA 和眼镜蛇细胞毒素的图谱未见报道。在第二部份,我们还就几年来在实验中摸索到的一些经验,作一介绍。

一、生物大分子的拉曼光谱

1. 材料和方法

溶菌酶:二次重结晶(上海东风试剂厂),用重蒸水溶解,浓度100mg/ml,以4000转/分

高速离心除去不溶物。

胰岛素(上海东风试剂厂),以 pH2 的盐酸溶解,浓度为 50mg/ml,高速离心除去不溶物。

μ_2 RNA: 由 μ_2 RNA 噬菌体提取,分子量为 1.1×10^6 ,浓度约为 20mg/ml,生物物理所张继仁提供。

眼镜蛇细胞毒素(生物物理所七室桂路路提供): 用重蒸水溶解,浓度 50mg/ml。

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, 美国 SIGMA 公司产品),经超声波分散呈乳状物,浓度为 100 mg/ml。

谱图由 JYT-800 三单色器拉曼光谱仪记录,激光波长 5145 Å,功率 380—400mW,狭缝宽度 700—1000 微米,扫描速度 0.4—1 波数/秒,灵敏度 3×10^3 光子数/分,时间常数 1 秒。

溶菌酶、胰岛素、 μ_2 RNA 使用 0.3cc 液体池。蛇毒、DPPC 使用平底毛细管,光束沿毛细管的轴方向照射,用量为 10 微升。

谱仪配置 NiColet 1180 计算机作信号平均(累加),累加 4—10 次。眼镜蛇细胞毒素为单次扫描。

2. 结果与讨论

(1) 溶菌酶、胰岛素与蛇毒的拉曼光谱

a) 主链构象 研究蛋白质获得的主要信息是它们的主链构象(α 螺旋、 β 折叠、无规卷曲),

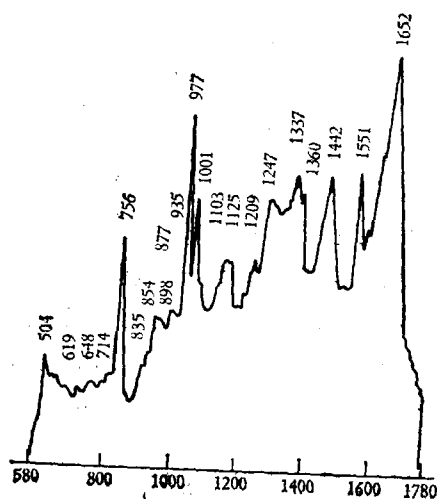


图 1 溶菌酶的拉曼光谱

它的特征主要反映在酰胺基团的振动频带上。拉曼灵敏的酰胺带是酰胺 I 和酰胺 III, 根据这些谱带所在的具体位置, 可以判断蛋白质的 α 螺旋、 β -折叠或者无规卷曲以及环境对结构的影响^[4], 各种结构的谱带具体位置如表 1。

表 1 多肽、蛋白质构象的酰胺 I 和酰胺 III 带的位置

	酰 胺 I	酰 胺 III
α 螺旋	$1654 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ 强	$1285 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$ 弱
β -折 叠	$1670 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ 强	$1235 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ 强
无规卷曲	$1665 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ 强	$1246 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ 强

1976 年 Lippert 等利用聚赖氨酸在不同条件下有不同的主链构象, 定量地测定了多种蛋白质的结构, 结果与 X 射线衍射、圆二色性、旋光色散相一致^[5]。

溶菌酶是一种胺酯酶, 具有抗菌素的特性, 它的一级和三级结构, 酶的活性中心等, 已研究得比较清楚。由图 1 可见它的主链构象谱带集中在酰胺 I (1652 cm^{-1}) 和酰胺 III (1247 cm^{-1})。酰胺 I 受水的干扰较大, 不易观察。酰胺 III 成一宽峰, 中心在 1247 cm^{-1} , 相应于无规卷曲, 在 1235 cm^{-1} 和 1285 cm^{-1} 附近都能看到峰肩。它们分别相应于 α 螺旋和 β -折叠结构。

天然 Zn-胰岛素由六个单体组成。由图 2 可见, 它的酰胺 III 主峰在 1269 cm^{-1} , 这主要是 α 螺旋构象的贡献, 亦有少量的 β 折叠成分; 1239 cm^{-1} 带则相应于无规卷曲。

眼镜蛇细胞毒素的酰胺 III 主峰在 1256 cm^{-1} , 据此可以推断它为无规卷曲及少量的 α 螺旋。 1235 cm^{-1} 附近的谱带很强, 表明它有相当多的 β -折叠结构。它的酰胺 I 主峰在 1674

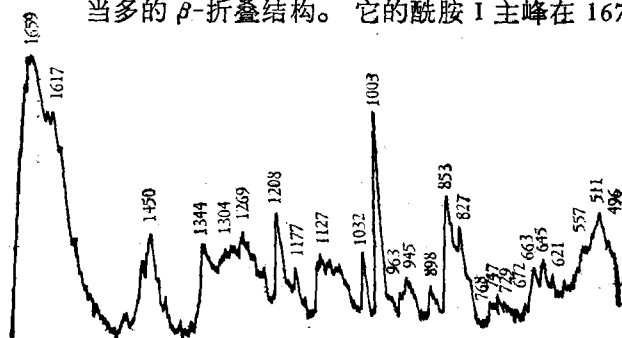


图 2 胰岛素的拉曼光谱



图3 蛇毒的拉曼光谱

cm^{-1} , 而且很强, 亦表明有大量的 β 折叠结构存在(见图3)。

b) 侧链环境 蛋白质的某些残基的侧链谱带对环境变化灵敏。如酪氨酸、色氨酸、组氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸。根据酪氨酸的 850cm^{-1} 和 830cm^{-1} 两峰的强度比, 可以判断残基“暴露”在分子的表面抑或是“埋藏”在分子的内部^[6]。

两种类型的残基数计算公式如下:

$$\text{“暴露” } I_{850}/I_{830} \approx 1.25$$

$$\text{“埋藏” } I_{850}/I_{830} \approx 0.5$$

$$N_b + N_e = 1$$

$$0.5N_b + 1.25N_e = I_{850}/I_{830}$$

N_b , N_e 分别为“埋藏”和“暴露”的残基分数。

1361cm^{-1} 带是“埋藏”色氨酸残基的特征。 D_2O 溶液中 1386cm^{-1} 的出现表明有“暴露”色氨酸存在^[7]。

溶菌酶分子包含 129 个氨基酸, 其中只有 3 个酪氨酸, 谱带很弱, I_{850}/I_{830} 接近 1。在水溶液中, 两个酪氨酸残基“暴露”在分子表面, 一个残基“埋藏”在分子的内部。图 1 中尖锐的 1360cm^{-1} 带表明分子包含有“埋藏”的色氨酸。

胰岛素单体有 4 个酪氨酸残基, $I_{850}/I_{830} \approx 1.2$, 它的 4 个残基都“暴露”在分子表面。

眼镜蛇细胞毒素含有三个酪氨酸残基, 按上述方法计算, 有两个“埋藏”在分子的内部, 一个“暴露”在分子的表面。

c) 侧链构型 胱氨酸、蛋氨酸的二硫键, 碳硫键振动频率给出它们的几何构型^[8]。

溶菌酶、胰岛素、蛇毒的 S—S 键振动频率分别为 504cm^{-1} , 511cm^{-1} 和 510cm^{-1} , 它们都属于扭曲式-扭曲式-扭曲式结构。

(2) μ_2 RNA 的拉曼光谱(图 4)

核酸的拉曼谱带主要来自硷基, 根据谱带特征可以鉴别硷基的存在, 如 $G607\text{cm}^{-1}$, $A720\text{cm}^{-1}$, $C + U 780\text{cm}^{-1}$ 。

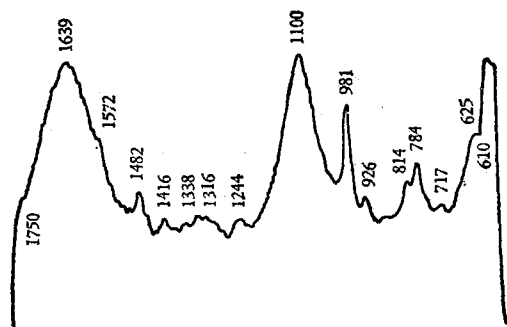


图4 μ_2 RNA 的拉曼光谱

不同的主链构象(A、B、C型)有不同的一O—P—O—基团振动频率, 它们通常在 $750-850\text{cm}^{-1}$ ^[9]。A型结构的RNA频率为 814cm^{-1} 。因此, μ_2 RNA 属于A型构象。磷酸基团的另一振动频率为 1100cm^{-1} , 它来自一 PO_2^- 基团的伸缩振动, 814cm^{-1} 带与 1100cm^{-1} 带强度之比反映核酸主链的有序度。完全有序比值为 1.66, 完全无序比值为零^[10]。

3. DPPC 的拉曼光谱(图 5)

$10-300\text{cm}^{-1}$ 区, 它们是纵向声子模式, 是整个 C—C 链的风琴式运动, 频率反比于全反式键的数目, 这些谱带对构象很敏感。但是, 低频带较难观测。另外, 分散体或囊泡并不能表现出这些谱带。 $1000-1150\text{cm}^{-1}$ 区为 C—C 伸缩振动模式, 又称骨架光学模式, 它由三个带组成(1064cm^{-1} , 1090cm^{-1} 和 1133cm^{-1}), I_{1133} 和 I_{1090} 之比常用来推测全反式键的比例和链内的纵向秩序^[3]。实际上 1090cm^{-1} 带由扭曲式旋转异构体产生, 1133cm^{-1} 带由反式旋转异构体产生, 链内的纵向秩序起源于全反式结构, 扭曲式结构影响其有序度。 $2800-2900\text{cm}^{-1}$ 为 C—H 伸

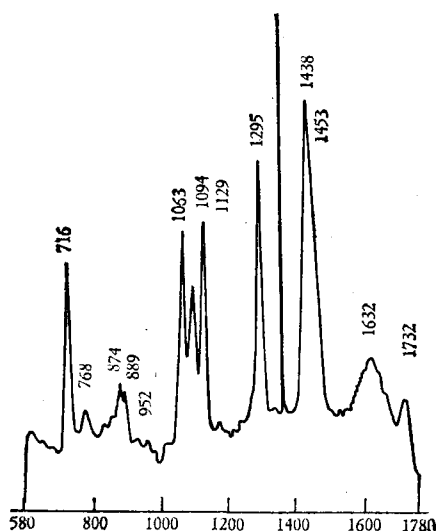


图5 DPPC 的拉曼光谱

伸缩振动区,次甲基的对称伸缩振动为 2850cm^{-1} , 不对称伸缩振动为 2890cm^{-1} , 因此根据带的形状和强度可以用来推测链间秩序。

其它谱带, CH_2 卷曲振动 1290cm^{-1} ; CH_2 弯曲振动 1450cm^{-1} ; 极性头基 C—N 伸缩振动 720cm^{-1} , —O—P—O—基团伸缩振动 757cm^{-1} , — PO_2^- 基团伸缩振动 1100cm^{-1} 。

二、实验技术讨论

拉曼光谱实验中常遇到如荧光干扰、稀溶液的灵敏度低、光效率低等问题,需要作很大努力才能得到可用的谱图。

1. 荧光干扰 荧光一般比拉曼强几个数量级,微量的荧光污染就能影响拉曼效应的观测,轻则基线严重倾斜,重则信号全部淹没。这种荧光干扰与物质本身的荧光不同,它的峰很宽,往往在几百至上千波数范围,实验时检测系统的灵敏度不能开得足够大检测信号,也无法用太大的激光功率来获得较强的散射。

解决这一问题的办法是样品要经过严格的“净”化,如多次重结晶,层析等。干扰不十分严重时,可以在激光下照射几十分钟,荧光现象会减至可接受的程度。

2. 样品的光学非均匀性 总的拉曼散射=丁铎尔散射+瑞利散射+拉曼散射。为了提高

光效率,溶液需先离心除去悬浮质点,样品中注意防止微气泡产生。人工膜、细胞等分散体,光束前面的样品会遮挡散射光,应尽量让入射光束靠近液体池的前沿。

3. 灵敏度低 生物大分子的信号弱,浓度要较高,通常为 5—30%。来源困难的样品要尽量增加光效率,减少用量。透明和半透明液体使用平底毛细管效果很好。平底毛细管是将毛细管的封闭底端磨成光学平面,激光束沿毛细管轴向射入,这样,5—10 μl 的样品就可以有 10 mm 左右光程,大大增加了光效率。

提高灵敏度的方法有以下几种:

1) 照明 激光束要严格聚焦,与样品池入射光学面垂直,并与狭缝平行。

2) 成象 收集透镜要准确聚焦,对准,使象尽量进入狭缝。

3) 扫描速度 慢速扫描有利于光子计数器使用较高的灵敏度和长的时间常数,相反,因光子计数器来不及响应,峰变得矮而宽。

4) 狭缝宽度 生物大分子的分子直径大部在胶体范围,散射光束所成的像并不像真溶液那样细而清晰,要使用较宽的狭缝才可能获得高的光效率。三单色器谱仪比双单色器谱仪增加了光栅、反射镜的衰减,造成灵敏度进一步下降。所以使用三单色器谱仪时亦要求较宽的狭缝。由于散射光经过三次分光,分辨率仍然很高,低频部分瑞利散射亦很少。

5) 计算机应用 大部分生物大分子的拉曼信号比噪声水平高不了多少,使用计算机作信号平均(累加)可以提高灵敏度。因信号在固定频率处有峰值,可以累加起来,而噪声是随机的,在某一位置上有时为正,有时为负,相互抵消,从而提高了信-噪比。信号/噪声与扫描次数的关系如下,

$$\text{信号/噪声} = N/\sqrt{N} = \sqrt{N}$$

N 为扫描次数。

某些荧光较强的样品,基线严重倾斜,无法对整个图谱(如 $400\text{—}1800\text{cm}^{-1}$)扫描,利用计算机分段累加,调平基线,然后将几个片段接上,即可获得一个完整的谱图。由图 3 可见,未使

用计算机的蛇毒图谱,分为基线倾斜两个部分。而胰岛素, μ_2 RNA 因使用分段累加、计算机调平基线的办法,图谱成为一整体,看不到断开的地方,亦无需通过描图将其连接起来。

参 考 文 献

- [1] Lord, R. C. et al.: *J. Mol. Biol.*, **50**, 509, 1970.
- [2] Nai-Teng Yu, et al.: *J. Mol. Biol.*, **70**, 117, 1972.
- [3] Gaber, B. P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **465**, 260, 1977.
- [4] Frushous, B. C. et al.: *Advances in Infrared and*

Raman Spectroscopy, Vol. I, Chap. 2. 35, 1975.

- [5] Lippert, J. L. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7075, 1976.
- [6] Siamwiza, M. N. et al.: *Biochemistry*, **14**, 4870, 1975.
- [7] Kitagawa, T. et al.: *Biopolymers*, **18**, 451, 1979.
- [8] Sugeta, H. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 3407, 1973.
- [9] Erburth, S. C. et al.: *Biopolymers*, **14**, 247, 1975.
- [10] Thomas, G. J.: *Vibration. Spectra Struct.*, **3**, 239, 1975.

[本文于1983年12月26日收到]

细胞电泳技术的临床应用

孙 玲

(北京铁路总医院免疫室)

1928年 Abramson 应用细胞电泳技术对血细胞膜结构开始了探讨。后来 Larcan 和 Zeiller 等人^[1]也对各种血液成份以及癌细胞,特别对血小板在凝集、粘附、血栓形成中的作用与表面结构及电荷密度变化的关系等进行了研究。国内有人利用细胞电泳技术,对诊断肿瘤细胞免疫反应,活血化瘀等中医理论的探讨作了一些工作^[2]。目前应用细胞电泳技术,对细胞膜的研究已从细胞水平进入到分子水平。尤其自 Caspary 和 Field 1970 年把这一技术与免疫反应相结合,建立起研究免疫反应的一项新技术,它可检测免疫活性细胞的致敏程度^[3]。这对传染病、自身免疫性疾病,组织配型,以及肿瘤早期和定位的特异性诊断的研究开创了一个新局面。本文简要介绍细胞电泳技术在临床应用方面的进展。

一、淋巴细胞膜标志的研究^[4,5]

通常免疫活性细胞的膜标志,可用生物学、化学,以及物理学等方法进行区分。近年来应用细胞电泳方法研究细胞膜标志,发现当测量

一定数量血淋巴细胞时,就可把两个同质性群体划出两个不同的图相,一个是慢泳动速度的小群体,代表着B淋巴细胞,另一个是快泳动速度的主要群体,代表着T淋巴细胞。

应用细胞电泳检查先天性无胸腺小鼠各免疫器官时,发现只有慢泳动速度的淋巴细胞单一群体。在人类先天性胸腺发育不全综合症(Digeorge Syndrome)患儿的末梢血中,只有一个慢泳动速度的B淋巴细胞群体,而在低 γ 球蛋白血症(Bruton type Hypogammaglobulinemia)患者血中,只有一个快泳动速度的T淋巴细胞群体,这些人和鼠体中均可获得的相同结果,提示细胞电泳可区分淋巴细胞群体,同时通过对动物的研究也有助于对人类免疫现象的了解。

Sabolovic 等测量细胞电泳时,也同时作了其它细胞膜标志的研究^[6]。如表面免疫球蛋白,羊红细胞受体、补体受体以及植物血凝素和刀豆素A反应性等试验,发现这些膜标志的检查结果与细胞电泳测量所得的结果密切相关,证实了细胞电泳技术,可作为免疫活性细胞膜标志研究方法之一,并已应用于临床。