

产率降低。

我们多次的实验结果是每 1000ml 培养物可获得 500 μ g M13mp9 DNA。足以满足 DNA 序列测定之用。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **143**, 161, 1980.
[2] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5463, 1977.
[3] Joachim Messing: *Methods in Enzymology*, Vol. 101

20, Academic Press, New York, 1983.

- [4] Holmes, D. S. *Analytical Biochemistry*, **127**, 428, 1982.
[5] 卜明等:《生物化学与生物物理进展》, **1**, 65, 1983.
[6] Wu Ray et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 68 175 Academic Press, New York, 1979.
[7] Larry Simp: Dideoxy chain terminating method of DNA Sequence analysis, in "Genes and Antigens of Parasites" a laboratory manual (ed. by C. M. Morel), 1984.
[8] 孙晋武:《微生物通报》, Vol. **10**(5) 6, 1983.

[本文于 1986 年 6 月 27 日收到]

学术动态

第六届国际支原体学术会议简况

1986 年 8 月 26 日至 8 月 31 日第六届国际支原体学术会议在美国亚拉巴马州伯明翰市召开。这次会议有美、英、法、加拿大、以色列、西德、日本、中国等 24 个国家的代表参加,共计 200 人左右。会上有 89 篇论文分别以大会报告、分组报告、专题报告等方式进行,同时还展出科学墙报 160 多篇(我国展出 5 篇)。会议内容主要包括:支原体基因结构与功能;支原体致病性的实验动物模型;支原体膜的结构与功能;支原体膜抗原;支原体病毒;植物及昆虫支原体;支原体致病性的分子基础;快速测定支原体感染;人肺炎支原体致病性的研究等等。会议期间还组织专题讨论会,如:研究支原体的基因工程技术、尿素支原体及螺旋支原体的致病性、支原体污染细胞培养液、ELISA 方法讨论等。笔者仅就参加会议期间所了解的有关支原体膜的结构与功能以及猪肺炎支原体有关研究情况作一简要介绍。

1. 支原体膜的结构与功能

这一问题包括支原体膜脂结构与分子性质的研究,例如支原体膜脂与脂质体类脂交换动力学,结果表明,脂质体可改变支原体膜上类脂的组成。在支原体细胞培养液中若加入钙离子,可导致支原体膜脂形成六角形 II 结构。³¹P-NMR 与 ¹H-NMR 研究莱氏衣原体膜上糖脂相变行为,发现莱氏衣原体细胞培养基中加入油酸,膜上单葡萄糖甘油二酯含量可控制膜脂从脂双层向六角形 II 转变。超灵敏 DSC 实验发现,莱氏衣原体细胞、细胞膜及膜磷脂制备的脂质体与完整莱氏衣原体细胞及细胞膜的相变曲线有一定的差别。这一实验结果对前人工作结果提出了修正。副流感病毒与支原体细胞膜融合时,受膜上固醇及磷脂组成的影响。外源脂肪酸对莱氏衣原体膜电位的影响,结果表明,棕榈酸、油酸及亚油酸均可使膜电位降低,其中以亚油酸作

用最为显著。冰冻断裂电子显微镜研究莱氏衣原体膜上糖脂相变行为,发现单葡萄糖甘油二酯在高温时可由脂双层转变为六角形 II 结构。莱氏衣原体膜上糖脂鉴定,发现有糖磷脂存在等。

支原体膜上 ATP 酶的分子性质一直为大家所注意。有人将莱氏衣原体 B 菌株膜上 (Na⁺-Mg²⁺)-ATP 酶分离纯化后,重组于不同磷脂脂质体上,结果发现,ATP 酶重组活性在 PC 及 PE 脂质体上比 PS 和 PG 脂质体上为高。鸡败血支原体膜上存在两种 ATP 酶,即在 pH7.0 时为 ⁺H-ATP 酶,而在碱性 pH 时具有 ⁺Na-ATP 酶活性。用免疫学技术发现鸡败血支原体膜上与膜脂结合的 ATP 酶具有类似 F₀-F₁ATP 酶的性质。猪肺炎支原体膜上 ATP 酶为镁离子激活,DCCD、寡霉素均不能抑制,只有 NBD 与 Quercetin 才有抑制作用。此外还有人采用基因工程技术研究支原体膜上 ATP 酶的结构与性质。

2. 猪肺炎支原体致病性的研究

猪肺炎支原体是引起猪喘气病的病原体,全世界广泛流行,在农业上造成很大损失,至今尚无有效防治措施。会议反映出对猪肺炎支原体致病性的研究日益受到重视。从诊断、治疗以及寻找致病性抗原均开展了一些工作。在诊断方面,采取血清学方法,包括 ELISA、间接血凝实验、猪喘气病早期诊断血清学反应等等。

猪肺炎支原体致病性的分子基础,近年来不少人认为致病性与膜上抗原物质有关,有人采用单克隆抗体技术鉴定猪肺炎支原体膜上表面抗原,探讨抗原与膜脂相互作用及抗原的免疫特性。用凝胶电泳,免疫吸附等技术鉴定猪肺炎支原体膜抗原性质,探讨不同类型抗原与致病性的相关性。用单克隆抗体技术发现 (下转第 76 页下)

N^{咪唑}-2, 4-二硝基苯-L-组氨酸的简便制备法

王国俊 戎积圻

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

N^{咪唑}-2, 4-二硝基苯-L-组氨酸 (N^{im}-DNP-His) 是 DNP 法测定蛋白质结构^[1]时的对照样品之一; 也有用做组氨酸多肽合成中咪唑基保护中间体^[2]。

制备 N^{im}-DNP-His 的早期报道均极简略^[3,4], 后来有人用 N^α-cbz-His^[5] 及 N^α-Boc-His^[6] 的方法。但均不适于大量制备之用。

我们的经验证明 Sanger 法中生成的 NaF 和 NaCl 很难与产物分离, 这或许是早期报道极为简略的原因。我们在试验中发现: DNP-乙酰组氨酸很难溶于饱和 NaCl, 但可溶于浓盐酸。因此借浓盐酸法和无水乙醇法等步骤, 可以简便地制得合格的 N^{im}-DNP-L-His 产品。现介绍如下:

4.3 克 N^α-乙酰-L-组氨酸^[7]和 8.4 克碳酸氢钠溶于 80 毫升水中, 加入 160 毫升含 7.4 克二硝基氟苯 (FDNB) 乙醇溶液, 室温振摇五个小时, 反应即告完成。减压蒸去乙醇, 水溶液用乙醚抽提除去过量 FDNB, 用盐酸酸化至 pH 2—3, 过滤除去沉淀, 浓缩到 20 毫升, 得 6.3 克 N^{im}-DNP-乙酰组氨酸, 取 3 克溶于 14 毫升浓盐酸, 过滤除去无机盐, 用等体积水稀释, 回流 2.5 小时, 以脱去乙酰基。经脱色后,

减压蒸发到干, 残留物溶于 15 毫升无水乙醇中, 滤除无机盐, 蒸发到干, 再溶于 8 毫升热冰醋酸, 冷后用三乙胺调至 pH3, 加乙醚析出粗制 N^{im}-DNP-His, 过滤收集, 得 2.2 克。用 7 毫升冰醋酸重结晶后得 1.7 克 N^{im}-DNP-L-His·1.7HCl (产率 47%)。产物经纸层析、光谱吸收^[5]和元素分析鉴定合格。

元素 (C、H、N) 分析由中国科学院上海药物研究所有机微量分析室分析, 氯离子由本厂陆之贤同志分析。谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》, 第一版, 科学出版社, 北京, p. 95, 1962年。
- [2] Fridkin, M. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 17, 517, 1977.
- [3] Margoliash, E.: *Nature*, 175, 294 1955.
- [4] Gerard, B. et al.: *Chromatog. Review*, Vol. 2, P63, P92, 1960.
- [5] Siepmann, E. and Zahn, H.: *Biochim Biophys. Acta*, 82, 412, 1964.
- [6] Chillemi, F. and Merrifield, R. B.: *Biochemistry*, 8, 4344, 1969.
- [7] Marshall, R. et al.: *J Amer. Chem. Soc.*, 78, 4636-1956.

[本文于 1986 年 8 月 12 日收到]

(上接第75页)

猪肺炎支原体膜上一种抗原为疏水蛋白, 并与脂膜紧密结合, 这种膜蛋白可能在猪肺炎支原体细胞感染寄主时起重要作用。此外对猪肺炎支原体细胞基因结构与功能的研究也开始进行了探讨。

这次会议总的印象是, 支原体基因结构与功能、支原体膜脂与膜蛋白相互作用仍为当前研究的前沿课

题。单克隆抗体技术已得到广泛应用。支原体膜蛋白的分离鉴定、膜上致病性抗原的探讨, 将为今后寻找分子疫苗提供重要途径。我国在上述研究领域的工作仍十分薄弱, 与国外实验室比较存在较大差距, 今后应引起足够重视, 大力加强这方面的工作。

[中国科学院生物物理研究所 黄芬]