

动态光散射法研究病毒颗粒的聚集*

秦安慰 苏兆众 何曼君 王 玮

(复旦大学, 上海) (华东化工学院, 上海)

提 要

用动态光散射法对细小病毒 (H-1) 在 5℃、20℃ 和 35℃ 下, pH 从 5.0 到 11 范围内的光子相关光谱进行了测量。实验结果表明该病毒在 pH > 8.5 时会形成明显的聚集。这和电镜观察结果相吻合。为了提高细小病毒的病毒探针等效能, 应选择 pH < 8 的缓冲液并贮藏在低温下为宜。

动态光散射, 又称准弹性光散射 (quasi-elastic light scattering, 简称为 QELS), 近年来广泛应用于研究悬浮粒子, 乳液粒子以及高聚物分子的大小、形状和在液体中的扩散特性^[1]。与此同时, 其在生物科学领域中的应用也不断得到开拓, 比如用于研究 t-RNA 的动态特性和电介质溶液中蛋白质构象的变化^[2,3]。本工作是采用 QELS 方法来观察细小病毒 (H-1) 颗粒在不同酸碱值体系中的聚集现象。

理 论 简 介

QELS 方法所研究的粒子的大小一般在几个毫微米到几个微米。在这个尺寸范围内, 粒子因为和周围液体介质分子的碰撞而发生无规运动, 并因此引起散射光光强的涨落。这种随时间变化的信号在光谱上反映为散射光的频率较之入射光的频率有一展宽, 其 1/2 半高宽度为 Γ 。对于合成高分子和生物大分子来说, 这种展宽很小, 通常只有几千赫。所以, 只有在激光和光子相关技术产生以后才有可能对这样小的频移进行测量。现在, 以激光作光源, 将散射光经数字相关器处理后即可得到粒子在液体中的扩散系数并进而导出其他有关的信息。因此, 这种方法也称作光子相关光谱法 (photon correlation spectroscopy, 简称为 PCS)。

对单分散粒子体系来说, 其自相关函数为

$$C(t) = B[1 + A \exp(-\Gamma t)]$$

式中 B 是基线值, A 是和信号的空间相干程度有关的常数。 Γ 和粒子在液体中的平动扩散系数 D 有如下关系。

$$\Gamma = Dq^2$$

q 是波矢, 其值为 $(4\pi n/\lambda_0) \sin \frac{\theta}{2}$, 其中 λ_0 是入射光在真空中的波长, n 是溶液的折射率, θ 是散射角。对球状粒子来说

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d}$$

式中 k 是玻尔兹曼常数, T 是绝对温度, η 是溶剂的粘度, d 是粒子的直径。从上述关系式中可知, 通过 PCS 方法可以得到粒子在溶液的扩散系数, 并进而求得粒子的尺寸。但是, 对于非球状的粒子以及非单分散体系, 情况就复杂多了, 用上述方法处理得到的只是等效粒径及各种大小粒子尺寸的平均值。

对多分散体系来说, 不同尺寸的粒子有其不同的自相关函数, 对应于不同的频移。测量所得的自相关函数 $g(t)$ 实际上是体系中各组分的自相关函数的叠加, 可以表示为

$$g(t) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma$$

$G(\Gamma)$ 是体系中各组分的 Γ 归一化后的分布函

* 中国科学院科学基金资助的课题。

数。显然,倘若能求得 Γ 的分布函数,就可以得到粒子的尺寸的分布。从实验测得的 $g(t)$ 求 Γ 的分布函数 $G(\Gamma)$ 是一个求病态的拉氏逆变换的数学问题,不易处理。现在常用的算法程序有 EST 和 CONTIN 等^[4],通过提高实验精度和谨慎处理数据,还是可以得到合理的结果的。

人们知道,细小病毒(H-1)在碱性环境中会形成聚集体并影响其作为生物探针的效率^[5]。和分散的病毒颗粒相比较,病毒聚集体在溶液中的扩散速度将大大减小,和其对应的 Γ 亦小。所以通过测量在不同 pH 中病毒的 Γ 值的分布就可能知道在不同 pH 下病毒聚集的情况。因此可通过光散射测量来选择合适的 pH 条件使病毒发挥最佳的探针功能。

材料与 方法

细小病毒(H-1)^[6]增殖于离体培养的新生儿肾脏细胞 NB-E^[7]。待细胞裂解和反复冻融后,经 0.4 微米微孔滤膜过滤取得病毒粗制液。为了提高样品丰度,尽可能除去蛋白碎片,将病

毒粗制液在 50000 转/分速度下离心 2 小时,除去上层轻液,然后加入 TE 缓冲溶液(Tris 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L)重复离心一次。取重液,调至不同 pH 值并再以 16000 转/分离心 3 小时,除尘,取中间层转移至散射池作为试样。

光散射实验系在华东化工学院的 Brookhaven 公司制造的广角激光散射光度计上进行的,所用相关器型号是 BI-2030。光源是氩离子激光器,所用波长是 514.5nm。所测量的散射角是 90 度。测量温度分别是 5℃、20℃ 和 35℃,温度变化不大于 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。实验时,自相关函数的基线理论值和实验值之间的差别严格控制在小于 0.1%。实验所得的相关函数经由 Brookhaven 公司提供的解谱程序 MSDILT 分析处理从而求得病毒颗粒聚集体的尺寸分布。

结果和 讨论

图 1 至图 12 是采用 MSDILT 程序解谱所得到的病毒颗粒尺寸和其相对强度的分布图。纵坐标代表强度,单位是任取的。其中,图 1 到

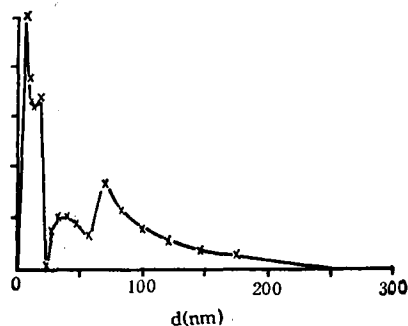


图 1 pH = 5.0

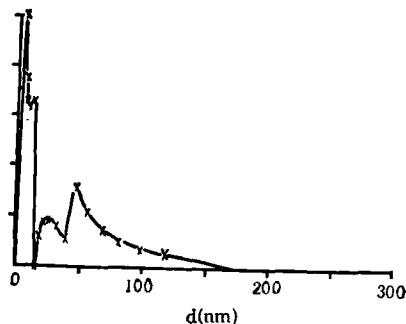


图 7 pH = 5.0 空白样品

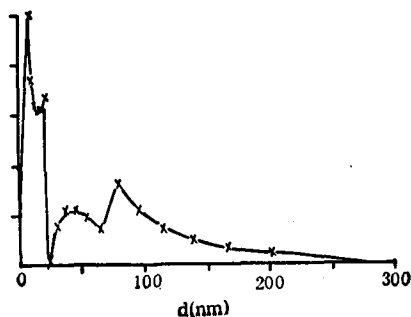


图 2 pH = 6.5

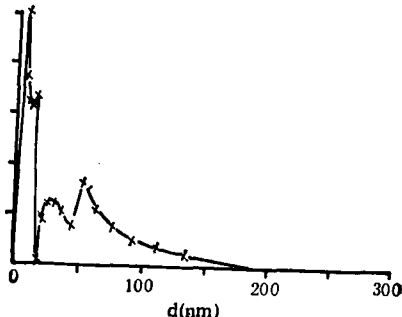


图 8 pH = 6.5 空白样品

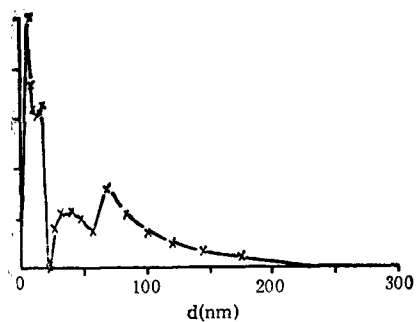


图 3 pH = 7.0

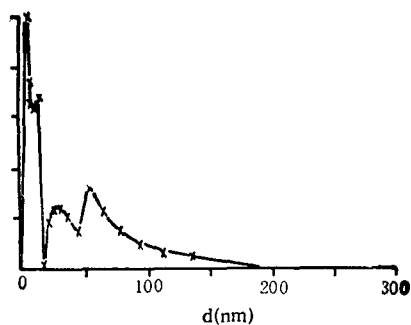


图 9 pH = 7.0 空白样品

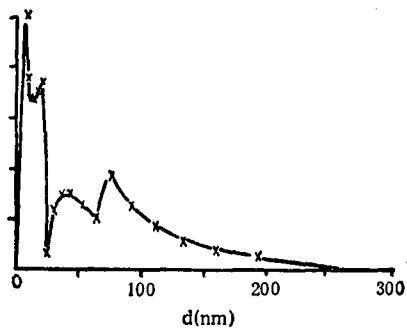


图 4 pH = 8.2

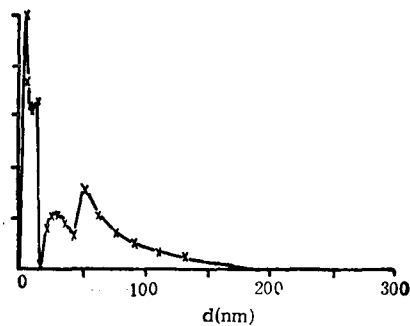


图 10 pH = 8.2 空白样品

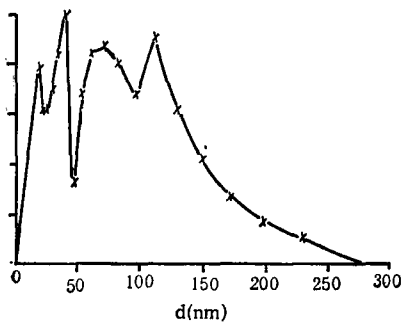


图 5 pH = 9.5

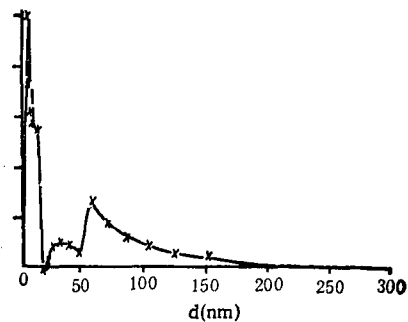


图 11 pH = 9.5 空白样品

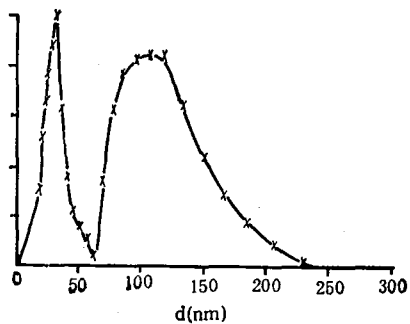


图 6 pH = 11.0

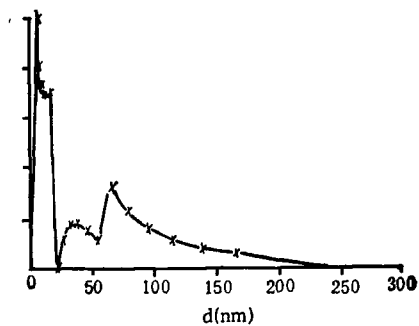


图 12 pH = 11.0 空白样品

图 6 是 20℃ 时,不同 pH 下含有病毒试样及少量未除尽杂质(主要来自细胞和培养基)的样品的粒子尺寸的强度分布,图 7 到图 12 是相对应的只含少量杂质的空白试样的图。可以清楚地看到,空白试样中各种粒子的相对强度随 pH 值的变化改变不大,反映了杂质的粒径随 pH 的变化并没有产生很大的改变。而在样品组中则可以看到,在 pH 值较小时候,病毒粒子相对强度变化也不大,但当 pH 值大于 8.5 时,大粒子成分的相对强度迅速增大,反映了病毒粒子在高 pH 值下产生了聚集。

用 PCS 方法得到的粒子尺寸分布是用散射光光强进行权重的尺寸分布。对同一种物质来说,大粒子的散射光强度远大于小粒子的散射光强度,所以这种分布和通常采用的重量或数目权重的尺寸分布是不一样的。一般来说,散射光强可以表达为

$$I = Kcd^3P(\theta)$$

式中 K 是光学常数, c 是浓度, d 是粒径, $P(\theta)$ 是和粒子形态有关的结构因子,它是散射角 θ 的函数。所以假如知道上述有关参数的话,可将强度权重的尺寸分布转换成数均或重均分

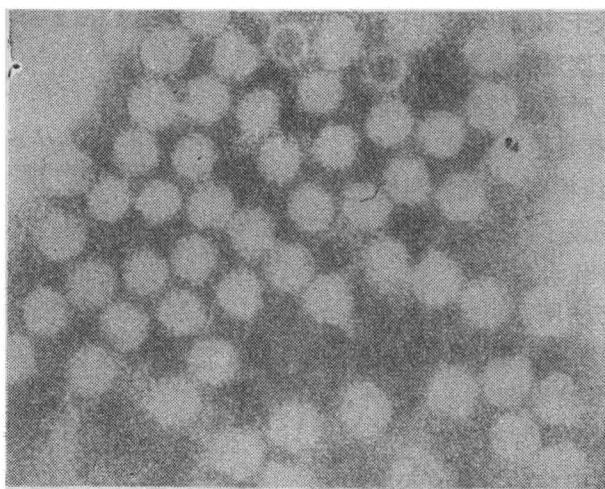


图 13 pH = 8.0 时的细小病毒 (H-1) 的电镜照片
放大倍数 300K。

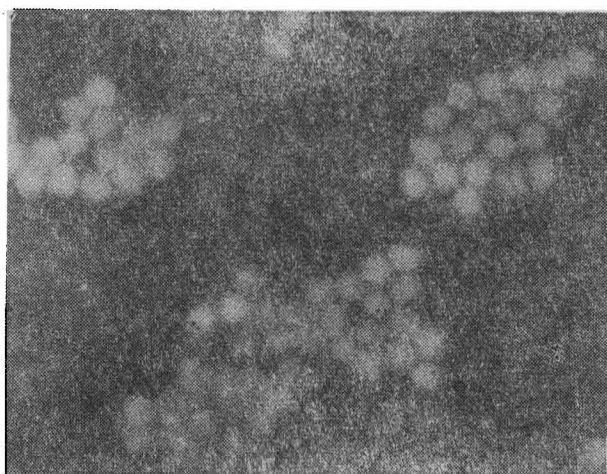


图 14 pH = 9.5 时的细小病毒 (H-1) 的电镜照片
放大倍数 180K。

布。从我们的电镜照片中(图 13、14)可知,病毒缔合后的形状不是十分规则的,很难找到一个恰当的结构因子来描述。所以,在本实验中直接采用强度权重的粒径分布以及和其对应的强度平均粒径 $\bar{d}$ 。不过,尽管无从知道随着 pH 的变化粒径不同的分子数目的确切变化,从分布图上还是可以清楚地看到,随着 pH 值的增高,大粒子的相对强度增大,也就是聚集的病毒粒子数目增多,尺寸变大。

图 15 是强度平均粒径 $\bar{d}$ 随 pH 变化曲线。从图中可以看到,在 pH 值低于 8.5 时, $\bar{d}$ 变化不大,当 pH 值大于 8.5 时, $\bar{d}$ 值增加迅速,并又很快趋于平衡,当 pH 值大于 10 后 $\bar{d}$ 变化不大。从图 15 中还可以看到温度对病毒聚集程度的影响。总的趋势是温度高时聚集较温度低时严重,而且这种趋势在 pH 高时更为明显,这可以从比较 5℃ 和 20℃ 的曲线得到。随着温度上升,这种变化又变得不明显了,这可以由比较 20℃ 和 35℃ 两条曲线得出。

本工作表明 QELS 方法所得到的结果和电镜观察结果一致,指出了细小病毒(H-1)颗粒会在高 pH 值的环境中形成聚集体。此外, QELS 方法还可以给出粒子尺寸的分布,描述了病毒颗粒的离散程度。由此,为了最大地发挥细小病毒的病毒探针效能,可选用 pH 值小于 8 的缓冲液,并将病毒悬浮液保存于低温。

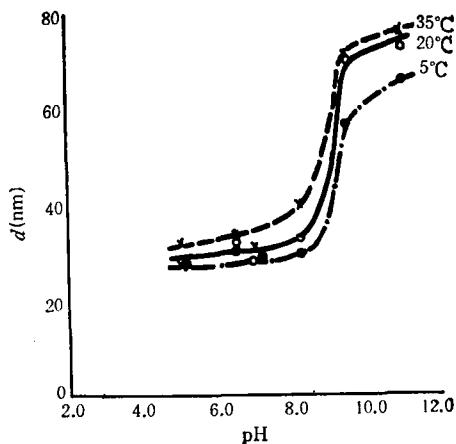


图 15 不同温度下强度平均粒径 $\bar{d}$ 和 pH 值的关系

参 考 文 献

- [1] Degiorgio, V. et al.: *Light Scattering in Liquids and Macromolecular Solutions*, Plenum Press, New York, 1980.
- [2] Patkowski, A. et al.: *J. Colloid and Interface Sci.*, 1978, **63**(2), 235.
- [3] Herpigny, B. et al.: *NATO Adv. Study Inst. Ser., Ser. B*, 1981, **73** (Scattering Tech. Appl. Supramol. Nonequilib. Syst.), 825.
- [4] Weiner, B. B. et al.: *ACS Symposium Ser.*, 1987, **332**, 48.
- [5] Gierthy, J. F. et al.: *Virology*, 1974, **60**, 549.
- [6] Shein, J. M. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, **109**, 495.
- [7] Rhode, S. L.: *J. Virology*, 1976, **17**, 659.

[本文于 1987 年 4 月 17 日收到]

《研究快报》投稿须知

1. 本刊“研究快报”专栏只刊登重要的或能反映最新进展的科研成果简报;

2. 来稿内容要具体,要给出重要的实验结果和主要的数值;

3. 文字应简明扼要,全文勿超过 1300 字。请用 16 开 400 格(20×20)稿纸(勿用红格纸)、用钢笔工整书写清楚,一式两份;

4. 一般不附图。如必须附极少数的图,请按出版要求绘制好,否则不能按时刊出;

5. 请另纸打印给出英文标题和第一作者姓名的汉语拼音;

6. 来稿请附单位推荐信,并应附一位同行专家的初审意见书。

符合上述要求的稿件,经审查通过后半年内可刊出(退改所需的时间除外),刊登后赠本刊一册,不付稿酬;审查未通过的稿件,两个月内负责退稿。

《生物化学与生物物理进展》编辑部