

电子显微镜初步观察到噬菌体 T₇ 具有一个六角形的头和一个短小的尾部(图 2 见封三)。

噬菌体 T₇ DNA O. D.₂₆₀/O. D.₂₈₀ 为 1.79。260 毫微米吸收最高, 230 毫微米吸收最低(图 3)。从 600 毫升溶菌液中大约得到 5 μ moles 的 DNA-磷。

噬菌体 T₇ DNA 在 0.1 $\times$ SSC 溶液中测定的“熔解”曲线, 如图 4 所示, 表现为典型的 DNA “熔解”曲线。单一的转化温度 T_m 值为 74 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。根据 Mandel, M 和 Marmur; J

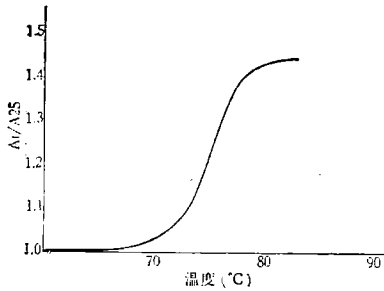


图 4 噬菌体 T₇ DNA 在 0.1 SSC 溶液中的熔解曲线示意图

的公式 $\text{GC}\% = (\text{T}_m - 53.9) \times 2.44$ 标出噬菌体 T₇ DNA GC 含量的百分比为 49%。比 Wyatt 所提出的 48% 稍高一些。

噬菌体 T₇ DNA 的葡聚糖凝胶电泳呈现单一的带(图 5 见封三), 表明所抽提的 DNA

分子是均一的。电子显微镜观察也表明抽提的 T₇ DNA 为线型大分子(图 6 见封三)。用 EcoRI 和 BamHI 限制性内切酶消化, 其谱带不变, 说明 T₇ DNA 上无 EcoRI 和 BamHI 切点。

实验结果表明, 分离纯化的噬菌体 T₇ 及其脱氧核糖核酸, 经鉴定其紫外吸收性质与 Davison 等所报道的有关噬菌体 T₇ 及其脱氧核糖核酸性质一致。此外, 我们检验了经上述方法制备的噬菌体 T₇ 贮存液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 情况下放置长时间效价都维持在 10¹⁰ 左右。这样的噬菌体贮存液在用培养皿测定效价时, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下经 2—3 小时就形成清晰的针尖状噬斑, 若放置过长则会变成巨大的连斑, 无法计数。

参 考 文 献

- [1] Misra, D. N. & Sinha, R. K.: *Virology*, **39**, 183, 1969.
- [2] Davison, P. F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **5**, 643, 1962.
- [3] Richardson, C. C.: *J. Mol. Biol.*, **15**, 49, 1966.
- [4] Mandel, M. and Marmur, J.: *Methods in Enzymology* 12, Part B. P. 195, 1968.
- [5] Kleinschmidt, A. K.: *Methods in Enzymology*, **21**, p. 419, 1971.
- [6] Wyatt, G. R. and Cohen, S. S.: *Biochem. J.*, **55**, 774, 1953.

[本文于 1979 年 1 月 5 日收到]

大型电泳仪改装光学衍射仪

杨振藩 惠虎雄 管汀鹭

(中国科学院生物物理研究所)

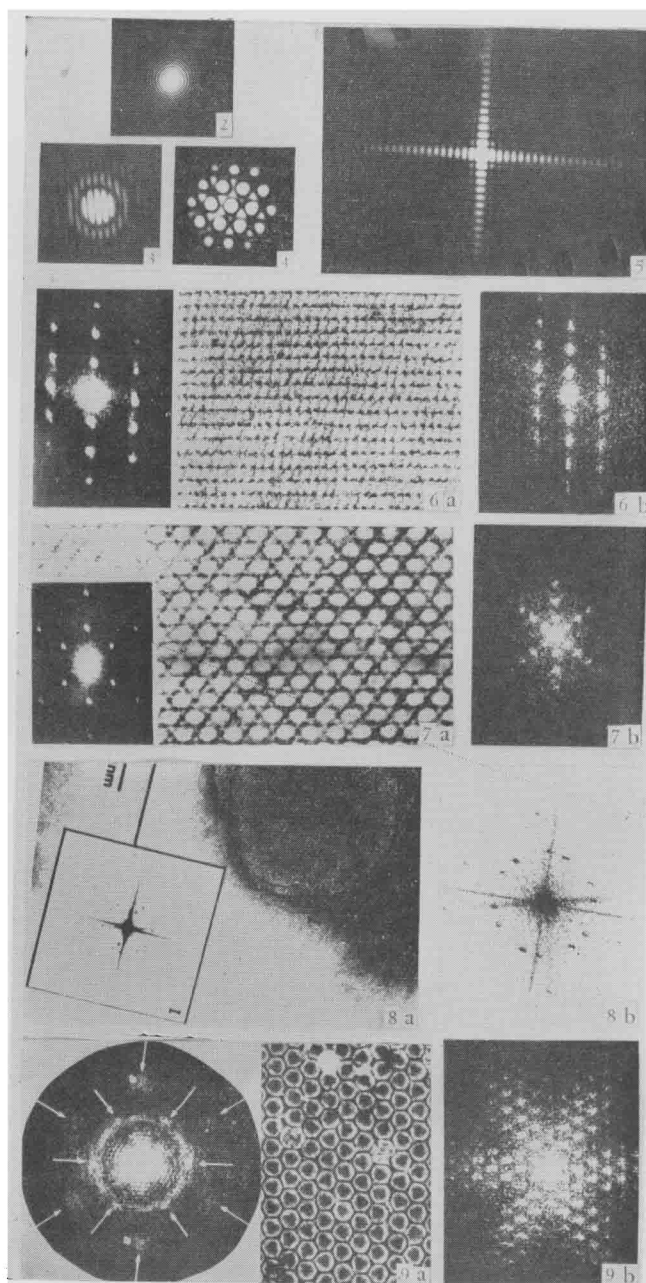
在 30 年代, 大型电泳仪原属于尖端设备, 50 年代降为一般贵重仪器, 70 年代已趋于被淘汰。现在经过改装, 恢复了“青春”。这样既发挥了老设备的作用, 又节省了外汇, 更重要的是争取了时间, 很快地开展了新的研究工作。为实现科学技术现代化, 必须掌握现代化的研究手段, 更新旧的仪器设备, 必然有不少旧的仪器设备会闲

置起来。如何使它们“返老还童”, 在新的长征中发挥作用? 本文介绍的经验, 可供参考。

——编者

前 言

光学衍射的原理和 x 射线衍射原理相似。当光线射到空间一系列散射点上时, 每个点都成为一个球面散射波源, 如果这些散射点是有



- 1) 图 2 铝板单孔的光学衍射图
- 2) 图 3 双孔的光学衍射图
- 3) 图 4 六孔梅花状的光学衍射图
- 4) 图 5 方孔的光学衍射图
(可见到多级衍射点)
- 5) 图 6a^[2] *Echinus esculantns* VLB处理的海胆卵类晶切片及其光学衍射图
图 6b 翻拍图6(a)后得到的光学衍射图
- 6) 图 7a^[2] 同图 6(a), 不同切面的切片及其光学衍射图
图 7(b) 翻拍图 7(a) 所得到的光学衍射图
- 7) 图 8(a)^[3] *E. Coli* 外层膜中的基质蛋白及其光学衍射图
图 8(b) 翻拍图 8(a) 后得到的光学衍射图
- 8) 图 9(a)^[4] 黎豆病毒及其光学衍射图
图 9(b) 翻拍图 9(a) 后得到的光学衍射图

规则的周期性分布的,而且它们的间距与入射光的波长有相同的数量级时,只要满足 $2 d \sin \theta = n \lambda$ (n 为整数),则这些散射波之间会因干涉而产生衍射图形。对于光衍射仪来说,散射点之间的距离(d)和衍射图上与之对应的衍射点距离(R)互为倒数,用公式表示: $Rd = \lambda L$

这里 λ 为所采用的光波长, L 为照相机长度。

从 60 年代中期开始,光学衍射仪就应用于电子

显微术上。由于电镜本身性能的迅速提高,仪器分辨本领已达到 $1.4 \text{ \AA}$ (埃);然而在生物学研究中,因为受样品制备技术的限制,使电镜观察生物样品的分辨率一般限制在 $20 \text{ \AA}$ 左右。为了充分发挥仪器的性能,提高生物学研究中的电镜技术,除了改进样品制备技术以外,还迫切需要发展电镜照片的图像处理技术,而光学衍射技术就是其中一种。

1964 年,英国剑桥 MRC 一个实验室的 Klug 和 Berger^[1] 首先用光学衍射技术成功地分析了生物样品的电镜照片中存在的周期性重复结构,从此,光学衍射仪便与电镜技术紧密地结合在一起了。目前国外的很多电镜室都配备有较好的光学衍射仪,而国内的电镜室几乎没有这种装置。根据我所电镜技术发展的需要,我们把一台 FOKAL-B 大型电泳仪改装成光学衍射仪,效果很好。

仪器的改装

FOKAL-B 大型电泳仪的光路如图 1 所示,它包括(1)照明部分(光源、聚光镜、狭缝和光栏)(2) Schlieren 透镜部分(准直镜、聚焦镜),(3)相散照相部分(相板、照相镜、柱状镜),(4)暗盒(即照相机和观察窗)。改装成光学衍射仪我们主要利用了它的光学座, Schlieren 透镜部分及

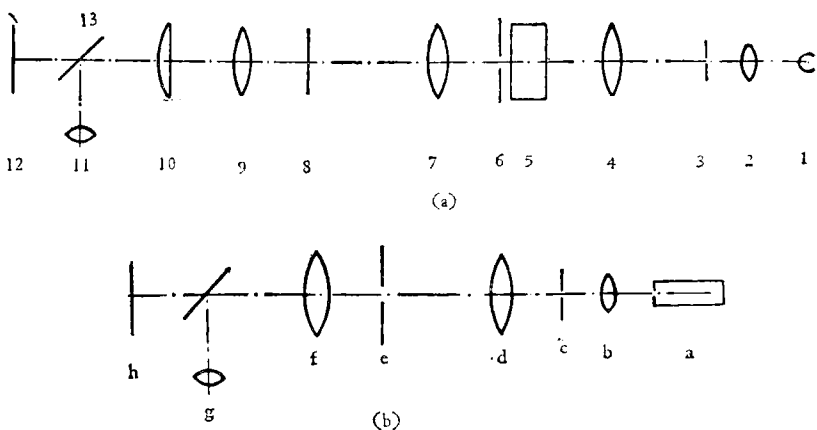


图 1 大型电泳仪与光学衍射仪光路比较

大型电泳仪 (a): 1.光源灯 2.聚光镜 3.光栏 4.准直镜 5.样品池 6.光栏 7.聚焦镜 8.相板 9.照像镜 10.柱状镜 11.观察窗 12.照相机 13.反射镜
光学衍射仪 (b): a.激光光源 b.扩束镜 c.针孔(光栏) d.准直镜 e.样品架 f.衍射镜 g.观察窗 h.照相机 i.反射镜

照相机,此外改装并增加了一些部件。光学衍射仪的光路如图 1(b) 所示,它主要包括照相部分,衍射部分与照相记录部分。下面介绍主要的改装工作:

1. 照明部分 (1) 光源: 这台大型电泳仪是 50 年代的产品,它的光源是钨灯和钠灯(单色光),由于灯的功率较小,光路较长,摄制衍射图所需要的曝光时间长达二小时以上。这对光源的机械稳定性要求极高,加上光源单色性与相干性差,衍射图也不理想,工作效率低。

我们改用了国产氦氖激光器(上海玻璃仪器一厂,2 毫瓦,波长 63.2 微米)作光源,把光源装在一个垂直、水平、角度均可调节的光源架上。这时曝光时间大大缩短,若采用国产 21 定 135 胶片记录照相,曝光时间一般在 $1/1000$ —1 秒之间。因而,对电源的机械稳定性要求不高,同时工作效率大大提高。

(2) 扩束透镜: 激光光束的直径只有 2 毫米左右,照明面积太小,不适合作电镜图片的直接照明光源。为了扩大照明面积,须在激光光源与准直镜之间加一普通光学显微镜低倍接物镜头(3—5×)作扩束透镜,使光束照明的区域的直径增至 30 毫米左右。扩束透镜离准直镜的距离应为扩束透镜的焦长加上准直镜的焦长。

(3) 针孔光栏: 为了除去杂散光的干扰和增加衍射图的分辨率, 在扩束透镜的后焦面(也是准直透镜的前焦面)上加一个普通电镜用的钼片光栏($50-100\ \mu$)。光束通过针孔后产生小孔衍射环, 中心光点直径约为 15 毫米, 正好可以照亮要作衍射的电镜照片部分。扩束镜与针孔均安于同一支架上, 支架可在光轨上滑动, 并且其垂直、水平、方位都可调节, 对准很方便。

2. 衍射部分 (1) 镜头: 光学衍射仪利用了大电泳仪原来的准直镜与聚焦镜(二个镜头 $\phi: 11.4$ 厘米, $f: 120$ 厘米), 这两个透镜的焦距很长, 作为衍射仪的透镜很理想。准直镜在两种仪器上的功能相同, 把发散光束变成平行光。原来的聚焦镜在衍射仪上变成了衍射镜。在没有样品时, 平行光经衍射镜在其后焦面上形成针孔的像。当在两个透镜之间放入样品(即电子显微负片)时, 照在样品上的平行光发生散射, 有规则的结构散射光经衍射镜形成规则分布的衍射点, 而无规律的结构则形成随机分布的杂散点或“噪声”。这两透镜都是复合透镜, 在调整光路时应尽可能使它们位于同一轴上。为了减少反射面的数目, 我们把原来作为隔水用的两块平面玻璃拆去了。

(2) 样品架: 采用了电泳仪上原有的样品池架, 但在它的遮光板位置上换了一块薄铝板, 并且在相当于透镜光轴的地方钻一个直径约 10 毫米的圆孔, 再加一层有机玻璃夹板来直接夹住电子显微镜底片(有机玻璃上也有同样大小的圆孔, 固定后与铝板上的圆孔刚好重合), 夹板松开后, 可以自由选择底片上的任意部位。

3. 照相记录部分 把电泳仪的相板、照相镜与柱状镜都取下, 将原来的相机移到衍射镜的后焦面处, 就可以记录衍射图。借用原有的观察窗来观察放大的衍射图或调节照相的焦距。

结果与讨论

仪器安装、调整完毕以后, 我们用规则孔形

(如单孔、双孔、5、6、7 孔、方孔、铜网等)样品, 及文献上翻拍的样品作了试验, 并分别得到了它们的光学衍射图(图 2—9, 见图版 II), 以后又用生物样品的电镜照片作了试验, 证明改装后的光路基本可达到要求。

图 2—5 (见图版 II)分别为单孔、双孔、六孔和方孔的光学衍射图。由图上可见到衍射花样是均匀对称的分布。图 4 上有些孔不圆是因为进行衍射的样品本身的孔形不圆所致。

我们还用文献翻拍片作样品来摄制其光学衍射图, 并与文献上已有的光学衍射图进行了比较, 结果所得的衍射图基本相同。图 6—9^[4-6] (见图版 II) 是进行比较的一部分图形(注意衍射图放大倍数不同)。

光学衍射仪属于精密光学仪器, 制作不易, 价格昂贵, 过去曾有人用不同的光学仪器进行了改装, 收到一定的效果。如 1967 年 Gall. J. G^[5] 把一架普通光学显微镜改装成一台光学衍射仪, 同期 Markham^[6] 曾利用 Spenco 超速离心机的光路改装成光学衍射仪。现在我们选择了大型电泳仪来改装成光学衍射仪, 因为它有以下优点: 首先是它的准直镜与聚焦镜的焦距都很长(120 厘米)、质量也很好, 而这些正是得到高分辨率衍射图的重要条件。再有, 大型电泳仪自身带有一条光轨, 因而在光学元件改动之后便于调整光路。此外, 电泳仪中的光源、两个透镜, 样品的位置在光学衍射仪中均保持原位, 所以改装不必大拆大动, 需要时, 还可恢复为电泳仪进行自由界面电泳实验。当然由于透镜保持原位未作彻底改动, 因此不便于复合透镜完全精确的合轴。至于我们的衍射照片上噪声比文献照片的强, 可能是多次翻拍过程中底片的缺陷所致。总之这些不足之处是有待克服的。

目前, 我们国内的大型电泳仪为数不少, 但因仪器过时, 使用的却不多。如果稍作改装, 便可作为光学衍射仪来处理电镜照片。同时仪器再稍作改进, 还可进行电镜图片的光学滤波处理。这样不仅能挖掘该仪器的潜力, 又可节省添购光学衍射仪的外汇。

在考虑改装时得到中国科学院物理研究所同志的支持。钼制针孔由院科仪厂提供。在此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Klug, A. & Berge, J. E.: *J. Mol. Biol.*, **10**, 564, 1964.

- [2] Starling, D. et al: *J. ultrastruct. Res.*, **51**, 261, 1975.
[3] Steven, A. C.: *J. Cell. Biol.*, **72**; 292, 1977.
[4] Horne, R. W.: *J. ultrastruct. Res.*, **51**, 223, 1975.
[5] Gall, J. G.: *Cell Sci.*, **2**, 163, 1967.
[6] Markham, R.: *Methods in Virology*, Vol. (4), London Press, 1968.

[本文于 1979 年 11 月 26 日收到]

电子显微镜周期图象的光学清晰法

董碧珍 郑师海 潘少华

(中国科学院物理研究所)

李 钦

(中国科学院微生物研究所)

在生物有机体中的部分结构以及生物高分子晶体是周期性排列的,人工合成的生物分子的晶体的排列也是周期性的,它们的电子显微镜图象即使是最好的也总是带有无规分布的“噪声”,例如生物样品切片时损伤、染色颗粒、底片颗粒等。

我们运用光学原理对生物材料中周期结构的电子显微镜图片,用几种方法进行了处理,显著地提高了图象质量。

我们的光学系统分两种。一种是由透镜焦点列阵组成的非相干光学系统,它的分辨率优于国外灯泡列阵组成的相应系统。另一种是利用光学衍射原理所组成的“相干光模拟计算机”系统。为了使无规“噪声”相互平均而减弱,从而使周期性的结构得到突出地显示。我们从理论上较深入地分析了“相干光模拟计算机”中空

间滤波器制作的形式,以便为提高质量给出较大的改进余地,可期望达到比国外相应系统更好的效果。这种系统还可以得到结构图象的衍射图。这些衍射图对分析结构很有用。

我们利用上述两种系统处理了牛肝过氧化氢酶结晶和红曲霉葡萄糖淀粉酶结晶的电子显微镜图象,均得到较为满意的结果。

图 1 至图 3(见图版 III) 分别是非相干光系统和相干光系统处理的牛肝过氧化氢酶结晶的电子显微镜照片。

参 考 文 献

- [1] Fraser, R. D. B. MillWARD, G. R.: *J. Ultrastructure Research*, **31**, 203, 1970.
[2] Warreh, R. C. Hicks, R. M.: *J. Ultrastructure Research*, **36**, 861, 1971.
[3] J. W. Gocelman: "Introduction To Fourier Optics".

相当于“指痕”及序列分析技术。此法的适用性和可靠性已被 5SRNA 的分析证实。具体方法如下:用 $5\mu\text{g}$ RNA, 半消化后,在离体情况下用 T_4 噬菌体诱导的多核苷酸激酶把消化所得的片断在 5' 端用 ^{32}P 标记,然后用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳,再用无载体电泳洗脱,所得 10 毫微克级的标记片段分别用 RNase T_1 及 RNase A 降解,降解产物再次用 T_4 激酶进行 ^{32}P 标记,此时就可以把这些长片段的核苷酸序列以“指痕”方式读出。

(摘自“Anal. Biochem.”, **93**, 321—8328, 1979)

科技消息

利用离体标记方法测定

毫微克量级 RNA 序列

目前发展的一些直接从聚丙烯酰胺凝胶上读出 RNA 序列的方法并不总能提供理想的结果。这里报道的离体情况下用初级及次级 5' 标记相结合的方法,它