

基酸的位置均清晰可信(图 2)。

三、小 结

Edman 降解法迄今仍是最有效的测定顺序方法,自动液相仪及固相仪的设计与应用以及 HPLC 用于检测 PTH-氨基酸等,使顺序分析技术有了很大发展,而 DABITC 试剂的引入,进一步提高 Edman 降解法的可靠性,它与 PITC 相比主要的不同在于 DABTH-氨基酸在可见光区测定,而 PTH-氨基酸在紫外光区,后者在极低浓度下无法消除一系列具有相似吸收波长的杂质背景。此外它还具有下列优点:(1)高灵敏性:使用手工顺序法样品量只需 2—10nmol,可测定 20—30 个残基,此 PITC 法所需的样品量低 10—20 倍。若用自动顺序仪则可低至 pmol 水平。(2)有效性:应用 DABITC 试剂用于手工顺序法可测定 20—30 个残基,对于研究小肽的实验室来说,无需仪器也可进行顺序研究。(3)精确性:能直接鉴定所有的氨基酸包括 Asn、Gln, Trp, 磺基丙氨酸, Ser, Thr。(4)简易性:若以手工测定,无需任何特殊仪器,只需使用极小的聚酰胺薄膜($2.5 \times 2.5\text{cm}$)。若应用自动顺序仪,也无需对仪器本身作任何改进。

参 考 文 献

- [1] Edman, P.: *Arch. Biochem.*, **22**, 475, 1949.
- [2] Laursen, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **20**, 89, 1966.
- [3] Hartley, B. S.: *Biochem. J.*, **119**, 805, 1970.
- [4] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, **153**, 607, 1976.
- [5] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, **153**, 77, 1976.
- [6] Chang, J. Y.: *Biochem. J.*, **163**, 517, 1977.
- [7] Chang, J. Y.: *Ph. D. Thesis*, The Australian National University, Canberra, 1977.
- [8] Chang, J. Y.: *FEBS Letters*, **91**, 63, 1978.
- [9] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Letters*, **93**, 205, 1978.
- [10] Chang, J. Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **578**, 175, 1979.
- [11] Laursen, R. A.: *Acta Chem. Scand.*, **10**, 761, 1971.
- [12] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Letters*, **78**, 147, 1977.
- [13] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Letters*, **84**, 187, 1977.
- [14] Robinson, P. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **242**, 659, 1971.
- [15] Wilson, K. J. et al.: *FEBS Letters*, **108**, 98, 1979.
- [16] Wilson, K. J. & Hughes, G. J.: *International Conference on Solid-phase Methods in Protein Sequence Analysis*, **1—4**, October 1979 (Heidelberg, Germany), 1980.

[本文于 1980 年 10 月 31 日收到]

动 态 光 散 射 技 术

江 寿 平

(中国科学院上海生物化学研究所)

一、引 言

传统的光散射技术是测量分子大小和形状的重要方法之一。但随着激光的应用,能够测量大分子溶液的光散射的频率分布和微弱的散射光。这些散射光的频率位移极小,用传统的光学系统不能分辨,从而出现了一个新的光混频技术—拍频光谱学。它适合于准弹性光散射现象的研究,又称之动态光散射技术,已成功地

应用到物理、化学和生物科学研究中。对于生物高分子和其它大分子的研究,动态光散射技术是很吸引人的。利用动态光散射法不仅能获得分子大小和形状等资料,还可获得平动和转动扩散系数,某些动力学和热力学参数等静态和动态信息。同时,它比传统的光散射法更迅速、更准确,而且所需测量样品还少。但目前还没有商品仪器,它的装置要求也较高,还不普遍。本文仅就动态光散射简单原理、实验装置和它

在分子生物学中的一些应用作个简介。

二、原 理

在溶液中,大分子无规的运动,导致浓度的涨落,当光照射它时,产生了散射光的频率分布。这散射光谱的宽度是可测量的,从它可直接计算平动扩散系数。为了得到散射光的光谱,简单起见,仅考虑一个球形大分子平动的情形。依照 Wiener-Khintchine 定理,散射光功率谱 $I(\omega)$ 和自相关函数 $C(\tau)$ 是福里哀变换关系。

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} C(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau \tag{1}$$

自相关函数 $C^*(\tau) = C(-\tau)$ 是溶液中大分子浓度涨落特征寿命的度量。自相关函数 $C(\tau)$ 和散射场 E 的关系是

$$C(\tau) = \langle E_s(t) E_s(t + \tau) \rangle \tag{2}$$

(2) 式中的方括号表示时间平均。对 N 个独立散射中心,进入检测器总的散射场是

$$E(t) = \sum_{j=1}^N A_j e^{i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}_j} e^{-i\omega_0 t} \tag{3}$$

式中 A 是电场振幅, $\mathbf{r}_j$ 是相对于共同原点的位置,而 $\mathbf{K} = \mathbf{K}_0 - \mathbf{K}_s$ (图 1)。

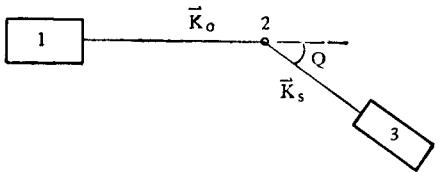


图 1 散射实验示意图
1. 激光器, 2. 散射中心, 3. 检测器

把(3)式代入(2)式得

$$C(\tau) = N A^2 e^{i\omega_0 \tau} \langle e^{-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}(t)} e^{i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}(t+\tau)} \rangle \tag{4}$$

通过利用各态历经假设,扩散方程和其它一些假设而得到相关函数。

$$C(K, \tau) = N A^2 e^{i\omega_0 \tau} e^{-K^2 D \tau} \tag{5}$$

这个自相关函数可直接测量,等价的信息是包含在频率谱内。相应于(5)式的功率谱,可通过福里哀变换得到。

$$I(\omega) = N A^2 \left[\frac{DK^2/\pi}{(\omega - \omega_0)^2 + (DK^2)^2} \right] \tag{6}$$

于是散射光有一个半宽 $\Delta\omega_{1/2} = DK^2$ 的洛伦兹频率分布, D 是平动扩散系数。 $\Delta\omega_{1/2} = \frac{1}{\tau}$, τ 是相关时间。

在溶液中加入一电场时,分子以一定的漂移速度移动,这个谱的多普勒位移和在溶液中带电分子的速度成正比。在沿 X 轴电场作用下的大分子溶液光散射的功率谱表示如下

$$I(\omega) = N A^2 \left[\frac{DK^2}{(\omega - \omega_0 + K_x u E)^2 + (DK^2)^2} \right] \tag{7}$$

上式表明散射光的洛伦兹线型在电场 E 的作用下,位移了一个角频率 $\Delta\omega = K_x u E$ 。 u 是电泳迁移率, K_x 是 K 在 X 轴上投影。

三、实 验 装 置

动态光散射(或准弹性光散射)的实验安排有: ① 自拍频方法。在检测器上,散射光同本身混频。② 外差拍频方法。在非线性检测器上,入射光和散射光进行混频。③ 滤波方法。是在散射池和检测器之间用干涉仪或衍射光栅。而检测和处理散射光强度自相关函数的方法也可分为三种: ① 光电流谱分析, ② 光电流相关和 ③ 光子相关。动态光散射的实验装置的方框图表示于图 2。

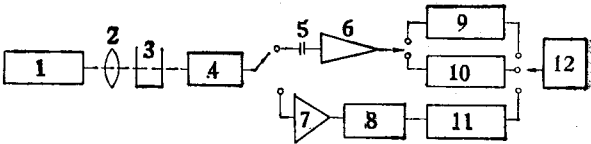


图 2 动态光散射实验装置

- 1. 激光器 2. 透镜 3. 样品池 4. 光电倍增管 5. 电容
- 6. 放大器 7. 宽带放大器 8. 波高辨别器 9. 频谱仪
- 10. 模拟相关器 11. 数字光子相关器 12. 计算机

外差拍频激光光散射装置和电泳装置结合而组成电泳激光光散射仪。电泳光散射的分辨率定义为多普勒位移对扩散控制宽度的比,

$$R = \frac{K_x u E}{DK^2}$$

由上式可见,分辨率随着电场强度的加大而增大。当电场垂直于入射光和小散射角度条件下,电泳光散射的分辨率最大。

四、应 用

动态光散射能获得有用的动态的和结构的信息。这个技术不仅成功地应用于各种天然和合成多肽,蛋白,核酸和其它大分子,也应用到核蛋白体,病毒,细胞和肌肉纤维等。以下仅举一些应用动态光散射的例子。

牛血清白蛋白曾用电泳光散射同时测量它的扩散系数和迁移率,研究了电荷和盐浓度对它迁移率的影响。用动态光散射方法得到人血纤维蛋白的扩散系数是 $1.50 \pm 0.09 \times 10^{-7}$ 厘米²/秒和牛的纤维蛋白是 $1.53 \pm 0.05 \times 10^{-7}$ 厘米²/秒相似。测得溶菌酶的平动扩散系数 $D_{20,w}^T = 1.06 \pm 0.1 \times 10^{-7}$ 厘米²/秒和转动扩散系数 $D_{20,w}^R = 16.7 \pm 0.8 \times 10^6$ 秒⁻¹,并研究了溶菌酶的化学变性。对核糖核酸酶的物理化学性质用动态光散射方法进行了研究。牛胰核糖核酸酶在 pH2.2 条件下,使它的浓度由 1.0—11 毫克/毫升范围内变化,对每一浓度,在十个不同的温度进行测量,温度范围是 4.5℃—79.8℃。除了最高的三个温度(60.8,70.2 和 79.8℃)外,没有观察到平动扩散系数和温度有关,而在最高的这三个温度,随着浓度增加而扩散系数稍减小,这或许是由于聚合作用。测量表明,热伸展产生在 40—60℃ 之间,在整个这范围,扩散系数减低 20.8%,这相应于增加了流体动力学的半径,于是这酶分子变得稍大些。此外还获得熵和焓的变化值, $\Delta S = 179.6$ 卡/克分子和 $\Delta H = 57.9$ 千卡/克分子。用动态光散射法研究了 ATP 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用,在一定的温度范围内,没有 ATP 存在时,这个酶随着温度增加而解离,在 22℃ 时,解离了 15—25%;在有 ATP 存在时,温度于 14—28℃ 之间,观察到这个酶产生了和温度有关的构象变化,而不是解离。但温度超过 28℃ 时,不管 ATP 存在与否,是经历着聚合反应。此外还对牛谷氨酸酶, α -胰凝乳蛋白酶,核糖核酸酶等的聚合作用和变性进行研究。

用动态光散射对小牛胸腺 DNA 做了很多研究工作,研究它的转动运动,弛豫时间是 10—

15 微秒。除了这个快的弛豫时间外,还有一个慢的弛豫时间 0.5—18 毫微秒,这相应于在溶液中 DNA 线圈的全部变形。用电泳光散射观察了由 0.01 到 0.1M 离子强度的小牛胸腺 DNA,在低离子强度时,迁移率与离子强度平方根成线性关系,而在高离子强度时,则接近一定值,其结果和一般电泳一致,研究了小牛胸腺 DNA 同 F₁ 和 F₂ 组蛋白的复合物,得到它的内模弛豫时间和复合物大分子扩散系数,列于表 1。由表 1 中可见, F₁ 的效应是减小 D , 增大 τ_{int} 这意味着使分子更伸展。F₂ 则有相反的作用,使分子结构变得更紧密。因此认为 F₂ 促进了 DNA 超螺旋的形成,而 F₁ 引起 DNA 更伸展。也用动态光散射技术,对酵母苯丙氨酸 tRNA 进行研究,在 0.1M 离子强度,有 10^{-3} MMg⁺⁺ 离子存在时,观察到最大的构象变化,但在同样的离子强度和 10^{-2} MMg⁺⁺ 离子时,没有观察到构象变化。此外也测定了 tRNA 聚合成二聚体时的平衡常数。

表 1 DNA 和 DNA-组蛋白复合物的平动扩散系数和内模弛豫时间

系统	$D_{20} \times 10^8$ (厘米 ² /秒)	$\tau_{int} \times 10^4$ (秒)
DNA	1.6	5.0
组蛋白 F ₁ -DNA	1.0	9.5
组蛋白 F ₂ -DNA	2.6	2.8

用动态光散射对各种病毒进行了研究,测定了烟草花叶病毒 (TMV) 的平动和转动扩散系数各为 3.4×10^8 厘米²/秒和 350秒⁻¹。其它一些病毒的平动扩散系数列于表 2。

表 2 病毒的平动扩散系数和分子量

病 毒	T ₄	T ₅	T ₇	R ₁₇	PM ₂	BSV
$D_{20,w} \times 10^8$ (厘米 ² /秒)	2.95	3.97	6.03	15.37	6.50	12.46
分子量 $\times 10^6$	192.5	109.2	50.4	4.02	47.9	8.81

此外,也用光散射技术来研究噬菌体 T₄D 的头部和尾部的自装配动力学,在 22℃ 时,测到头部和尾部缔合的双分子速率常数是 1.02×10^7 克分子⁻¹秒⁻¹。

由上述的一些应用可见光散射技术, 不仅能获得分子的大小和形状, 而且可测量平动和转动扩散常数, 迁移率等分子的物理化学性质, 它可跟踪溶液中生物大分子的变性过程, 研究聚合和解离和分子之间相互作用的过程。可得到构象变化的有关信息和某些热力学和动力学数据。因此动态光散射是研究溶液中生物分子的一个很有力的工具, 它已发挥和将进一步发挥它的作用。

阮康成、朱林福、张宇, 于德源和杨慧儒等同志参加了本文讨论。

参 考 文 献

- [1] Berne, B. J. et al.: *Light Scattering*, Interscience, New York, 1974.
- [2] Flygrae, W. H. et al.: *Molecular Electro-Optics*, part 1, (Chester T. O'Konski, ed.) Marcel Dekker, INC., New York and Basel, 1976, p. 321.
- [3] Chu, B.: *Laser Light Scattering*, Academic Press, New York, 1974.

- [4] Cummins, H. Z. and Swinney, H. L.: *Light beating Spectroscopy*, in *Progress in Optics*, Vol. 8, Wolf, E. Ed., North-Holland, Amsterdam, 1970, 135.
- [5] Schurr, J. M.: *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 4(4), 371, 1977.
- [6] Ware, B. R. et al.: *Chem. Phys Lett*, 12, 81, 1971.
- [7] Birnboim, M. H. et al.: *Polym. Rept.*, 13, 203, 1972.
- [8] Dubin, S. B. et al.: *J. Chem. Phys.*, 54, 5158, 1971.
- [9] Wang, C. C. et al.: *Biophysical Chemistry*, 439, 1980.
- [10] Gabler, R. et al.: *Biophys. J.*, 15, 747, 1975.
- [11] Schmitz, K. S. et al.: *Biopolymers*, 12, 1543, 1973.
- [12] Wun, K. L. et al.: *Biopolymers*, 14, 111, 1975.
- [13] Olson, T. et al.: *J. Mol Biol.*, 102, 193, 1973.
- [14] Dubin, S. B. et al.: *J. Mol Biol.*, 54, 547, 1971.
- [15] Camerini-Otero, R. D. et al.: *Biochemistry*, 13, 960, 1974.
- [16] Benbasat, J. A. et al.: *J. Mol. Biol.*, 95, 335, 1975.

[本文于 1981 年 3 月 22 日收到]

植物病毒研究中的一些血清学技术

朱本明 徐伟军 熊立民

(中国科学院上海生物化学研究所)

血清学技术也称为免疫学技术, 近十余年来在植物病毒研究中应用较多, 进展较快^[1]。

1928 年 Purdy 首先报道了由患花叶病的烟草植株所得汁液, 包含一种特异的专一性抗原, 而在健株和其他病毒侵染的烟草中却不存在。这些特异的专一性抗原就是植物病毒本身^[2]。

病毒由蛋白质外壳和核酸芯子组成, 病毒的抗原活性部分是外壳蛋白。大多数血清学试验取决于病毒蛋白, 而侵染性试验则由病毒核酸决定。Bawded^[3] 和 Stanley^[4] 指出: 侵染性和血清学活性并不必然有联系^[3,4]。植物病毒血清学研究主要对象是病毒蛋白。

植物病毒血清学技术应用很广, 由于血清反应特异性强和灵敏度高, 可以检测出感病植

物中的微量抗原, 因此可用于植物病毒病的早期诊断和大规模检测种子或块茎中的病毒。如马铃薯 X 病毒。利用已知病毒抗血清可鉴别病毒和了解病毒不同株系之间关系。用血清学技术还可以研究病毒质粒的结构及增殖和在被感染植物组织中的病毒分布, 测定一个病毒制剂中病毒核酸或蛋白质含量和媒介昆虫带毒率。这些方法灵敏、快速、简便、准确, 可用于植物病毒病的综合防治, 在农业生产上具有很大的实用价值。

进行血清学测定, 首先要纯化病毒, 制备出植物病毒抗血清。这些方面可参考有关文献^[2, 5]。下面介绍我们在植物病毒研究中应用的一些血清学技术。