

蛋白质分子的电子显微镜观察与制样技术

龚祖埙

(中国科学院上海生物化学研究所)

近十几年来，人们通过电子显微镜这一工具，观察了多种携带生命信息或在生命过程中起重大作用的生物高分子——核酸和蛋白质分子的形态。这是人们在了解自然界，认识客观世界的里程上又向前迈进了一步。由于现代科学的进步，通过发展人的感觉器官之一——视觉，直接看到了被唯心主义者弄得神秘莫测的生命现象具有真正的物质基础，充分证实了客观世界，从无机界到有机界，一直到生命世界的物质性。正如无产阶级的伟大导师恩格斯所指出的：“世界的真正的统一性是在于它的物质性，而这种物质性不是魔术师的三两句话所能证明的，而是由哲学和自然科学的长期的和持续的发展来证明的。”因此，应用电子显微镜观察生物高分子的科学成果也为辩证唯物主义提供了有力的武器。当然在这一领域内，无论从根本方法上或在具体技术上，甚至在结果解释上

都还存在不少的问题。例如，所观察的生物高分子常常受到各种制样条件的影响，同时又脱离了它起作用时所存在的错综复杂的环境，而作为单一的、静态的化合物而加以研究等等。列宁指出：“所以辩证唯物主义坚决认为，日益发展的人类科学在认识自然界的这一切里程碑都具有暂时的、相对的、近似的性质”“唯物主义者认为世界比它的显现更丰富、更生动、更多样化，因为科学每向前发展一步，就会发现它的新的方面。”

生物高分子，主要指蛋白质和核酸，其分子量一般在数万以上。某些蛋白质，特别是某些复酶，其分子量可达数十万，甚至数百万。如大肠杆菌的 α -酮戊二酸脱氢酶其分子量为2,300,000。大肠杆菌的丙酮酸脱氢酶分子量达4,000,000，根据计算，球状蛋白的分子直径与分子量有如下的关系：

表1 球状蛋白质分子的分子量与分子直径的关系

蛋白分子量	△ 1,500	△ 3,500	12,000	55,000	400,000	3,500,000	12,000,000
蛋白分子直径(埃)	15	20	30	50	100	200	300

△者应属多肽范围

脱氧核糖核酸和核糖核酸均是链状高分子。脱氧核糖核酸的分子量也在百万以上。双链核酸1埃长度的平均质量为196—197道尔顿。如果脱氧核糖核酸的分子量为 2×10^6 ，则其分子长度可达 10^5 埃，即10微米左右。由此可见，要观察到单个蛋白质或核酸分子的形态和大小，并不要求分辨率极高的电镜。目前，透射式电镜的分辨率最佳已达2埃左右，因此完全应能观察到巨大的生物高分子，而且还应能看

到分子中的细节，如原子或基团的排列等情况。过去电镜所以不能观察到这些大分子，或者仅能观察到它们的粗糙轮廓，主要的限制还是在于制样技术方面所遇到的一系列困难。随着电镜技术及制样技术的日益发展，这些问题或多或少获得了解决，但是电镜的高分辨本领和制样技术的限制，特别是生物样品的制样技术方面的差距目前仍然存在。在蛋白质和核酸分子样品之间，它们既有共同的问题，也有各自的特

点。关于核酸分子的制样技术和电镜观察，前文已有介绍^[1]，本文将对蛋白质分子的电镜观察和样品制备技术予以论述。

一、观察蛋白质单个分散分子的困难

生物样品的电子散射力很低，这是由构成生物物质的主要元素碳、氢、氧、氮等本质所决定。如果不经过样品的特殊处理，如金属投影或染色等制样技术，样品的反差极弱，要分辨一般的生物组织结构已有很大困难，而要观察到单个数百埃甚至数十埃的蛋白质分子则根本不可能。采取一般的点样方法，当样品在干燥时，极易聚合成堆，这就需要找到使蛋白质分子能很好地分散于支持膜上的条件，因此要求蛋白质溶液具有适当的浓度、盐离子强度和 pH 值。在样品干燥时，蛋白质溶液中一般存在的无机盐类会以结晶状态析出，这也给制样和观察带来困难。在制备样品时，尚需尽量避免分子的变形和变性，所以还需考虑适当的温度和温和的制样条件。

蛋白质分子从形态上可以粗分为纤维状和球状两大类。所谓球状蛋白也并不具有真正的球状形态，它常常是由不同数目的亚基聚合成为近于球状的立方体、八面体、十二面体或廿面体等。每一种都有两个以上的对称轴，目前尚无法使蛋白质分子在支持膜上定向，因而同一分子由于取向不同，在观察时，可以得到不同的形态。分子的结构愈复杂，对称轴和对称面愈多，就会出现愈多的各不相同的分子形态，因而给观察结果的解释带来一定的困难。随着电镜的分辨本领和制样技术的不断发展和提高，结合其它的物理化学方法和生物化学方法，对蛋白质的结构，特别是对亚基的数目和排列，亚基和分子的聚合及解离特性，分子的对称性等的了解，使得上述一些困难，在不同程度上得到克服，所以近年来应用电镜技术来研究蛋白质分子的形态，特别是对大量酶蛋白分子的形态结构，亚基的组成及分子的对称性方面的研究获得较大的进展，取得了一些较为重要的结果，对研究酶

蛋白和分子的结构与功能之间的关系开辟了一条新的途径。就蛋白质分子的制样技术而论，主要可分为负染技术和分子云母复型技术两种。

二、负染技术

1. 负染技术在观察蛋白质分子方面的进展

应用负染技术，首先观察了铁蛋白的单个分子，属于早期的工作，尚有血蓝蛋白的分子形态和已形成晶体的酶蛋白质分子形态的电镜观察。Östen-Leven 在 1962 年报道了细胞色素 c 的分子形态研究。近年来，由于负染技术的进一步改进，对分子结构细节的观察不断获得新的结果，从而建立了一些新的概念，如对铁蛋白分子的蛋白质外壳结构的观察续有报道。Easterbrook 根据电镜观察及其它化学研究的证据，建立了一个由 20 个相同的亚基构成的 12 面体的模型。Hall 应用云母分子复型技术曾观察到血纤维蛋白原分子具有串珠状形态，Köpper 应用负染技术进一步观察了血纤维蛋白原分子的串珠结节部分，发现其为一个五角形的十二面体，根据其三根对称轴的不同位置，可以表现出不同的形态和分子大小。Dourmashkin 等报道了免疫球蛋白 A (IgA) 的单体具有丫状的形态，而其二聚体则有从下端联结的 X 形态，当与有双功能基团的半抗原结合时，可形成两个二聚体侧向聚合的四聚体。抗体球蛋白 G (IgG) 与半抗原组成的复合物则为一叁聚体，由 3 个半抗原分子联结 3 个 IgG 分子组成一个三角形。从蓝绿藻中分离到的 C-藻青昔在电镜的高倍放大照片上可以清晰地看到由 6 个球状单体组成的六角形的六聚物，直接证实了用其它物理方法研究而提出的六聚体结构的假设。血球凝集素是血淋巴蛋白质一个组成部分，含量约 5%，分子量为 400,000。电镜观察到其分子为十分均匀的六角形的环状结构，直径约 100 埃，中间有 20—40 埃的空心，这一结构与动力学的研究结果一致。应用负染技术还观察了肌肉结构蛋白——纤维肌动蛋白及肌球蛋白的形态。

大部分由亚基聚合的蛋白质分子应和简单

的病毒蛋白外壳一样，是一种自动装配体系。这样的蛋白质分子的高级结构完全是由亚基的特性和数目所决定。从分子进化来讲，多亚基结构在功能上具有进化的意义，它能增加结构的稳定性和促进功能的有效性，特别反映在空间反应的效能和协同配合的动作方面。因此很自然地导致近年来对酶蛋白分子的电镜研究日益增多，以期了解更多的结构和功能上的关系。由电镜观察而提出的分子结构模型，绝大部分均能和用其它物理的、物理化学的或生物化学的方法研究结果相互印证和补充。例如， α -门冬氨酸 β 脱羧酶的分子量为675,000，其超离心沉降常数为19S，当在pH8时，分子解离为6S的亚基，大小为原分子的1/6，并由两个多肽链构成。电镜观察到这一酶的分子是一个由6个两聚体组成的直径约150埃的四面体。Valeutive等对从大肠杆菌(*E.coli*)分离得到谷氨酰胺合成酶的电镜观察提供了十分清晰的图象，可以看到12个相同的亚基排列成双层六角形环饼，每一层由6个亚基组成[图1(见铜版III, 1)]。从酶动力学研究了解到在加入二价阳离子后，谷氨酰胺合成酶从松弛型转化为紧张型，电镜观察到其转化过程为：起始是2—10个，以后逐步增多的酶分子环饼面对面聚合成管状结构。从大肠杆菌分离的复酶 α -酮戊二酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶均由三个不同的酶组成，前者为 α -酮戊二酸脱氢酶，二氢硫辛酸转琥珀酰酶及二氢硫辛酸脱氢酶，后者是丙酮酸脱氢酶，二氢硫辛酸转乙酰酶及二氢硫辛酸脱氢酶。这两个复酶的分子结构以及它们的组成均经电镜的观察研究，并提供了相对应的亚基结构模型，而且了解到，无论在结构或在催化机制上，二氢硫辛酸转乙酰酶及二氢硫辛酸转琥珀酰酶均起关键的作用。

一些研究者应用负染技术还研究和观察了其它多种酶蛋白分子的亚基结构，并对其功能作了相应的探讨(表2)。

其中丙酮酸羧基酶的电镜图片也非常清晰，很有说服力[图2(见铜版III, 2)]，谷氨酰胺脱氢酶的分子结构，分子间的直线聚合和由

此形成的二度类晶体及三度晶体的结构，分子的自动装配和酶活力中心的研究较为深入^[2]。从上述例子中，可以看到由于负染技术的发展，使生物高分子(包括病毒)的电子显微镜研究获得很大的进展，也使电子显微镜成为研究生物高分子的四级结构和病毒蛋白外壳表面结构的有力工具。

2. 负染染色剂及负染方法

所谓负染，是指样品反差的增加，不是由于样品本身的密度或厚度改变所引起，而是由于样品被包埋在一层电子致密的物质薄层里(含有重金属原子的电子染色剂)。因而在电镜照片上，刚好和正染相反，在黑色的背景中呈现出“白色”的样品。

负染用的染色剂需要一系列合适的性质。为了增加反差首先要求高的密度，在染色剂分子中常含有重金属原子，一般讲，密度愈高，则它和样品间的反差愈好，样品的可分辨程度也将愈高。但作为一个优良的染色剂，除了密度高以外，尚需要在水中有好的溶解度。此外，样品在负染干燥后，染色剂化合物不应形成颗粒性结构或以结晶析出，同时还需要有较高的熔点，以避免染色剂在电子束轰击下挥发。目前使用比较广泛的染色剂有：磷钨酸、磷钨酸钠、甲酸铀、醋酸铀、草酸铀以及硅钨酸钠等。其中磷钨酸及磷钨酸钠为最常用，甲酸铀及醋酸铀通常在低于蛋白质等电点染色时使用，而草酸铀则相反，在高于蛋白质等电点时染色是很优良的染色剂，由于它的分子小，更易渗透到蛋白质分子的狭小缝隙中，因而能提供如磷钨酸和磷钨酸钠所不能分辨的亚基结构细节。

负染的方法非常简单，不需要复杂的仪器和繁琐的操作，这是它的优点之一。主要可分为点样法及喷雾法两种。

喷雾法是先使等体积的蛋白质溶液(浓度从每毫升数百微克至数毫克)和用1克分子的氢氧化钾调至pH7左右的2%的磷钨酸溶液混合(或其它染色剂)，注入玻璃制的微粒喷雾器内，然后用压缩空气或压缩氮气将其喷至支持膜上，干燥后立即观察。喷雾法的优点在于喷

表 2 几种蛋白质分子的电子显微镜观察

蛋白质名称	分子量	分子大小(埃)	分子形态	亚基数	参考资料
铁蛋白外壳	480,000	105	球状12面体	20	<i>J. Ultrast. Res.</i> 33 , 442, 1970.
血纤蛋白原	330,000	400	串珠状长分子		<i>J. Biophys. Biochem. Cytol.</i> 5 , 11, 1959.
血纤蛋白原结节		50~60	球状12面体		<i>Nature</i> 212 , 1608, 1966.
免疫球蛋白A			Y型		<i>J. Mol. Biol.</i> 56 , 208, 1971.
C-藻青素			六角形环饼	6	<i>Arch. Biochem. Biophys.</i> 110 , 511, 1965.
血球凝集素	400,000	100	六角形环饼		<i>J. Mol. Biol.</i> 32 , 467, 1968.
固氮酶钼铁蛋白	280,000	90×90×40	四方体	4	<i>J. Cell. Bioc.</i> 60 , 311, 1974.
胶原	285,000	3,000×15	纤维状长分子		<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.</i> 42 , 801, 1956.
肌球蛋白	500,000	1,600×20	分叉长分子		<i>ibid.</i> 58 , 1611, 1967.
原肌球蛋白	53,000	400	棒状分子		生物化学与生物物理学报. 5 , 7, 1965.
付肌球蛋白	210,000	1,400	长棒状分子	2	同上
细胞色素c	13,000	40×28	e型		<i>Arch. Biochem. Biophys. Suppl.</i> 1 , 301, 1962,
血红蛋白	67,000	64×55×50	立方体	4	<i>Fifth. Intern. Congr. E. M.</i> II , 7—2, 1962.
α门冬氨酸β脱羧酶	675,000	150	四方体	6个二聚体	<i>Biochem.</i> 9 , 2620, 1970.
谷氨酰胺合成酶	592,000	140	双层六角形环饼	12	<i>ibid.</i> 7 , 2143, 1968.
E. coli α-酮戊二酸脱氢酶	2,300,000		多面体		<i>The Enzymes</i> I , 213, 1970.
E. coli丙酮酸脱氢酶	4,000,000	300	多面体		同上
E. coli二氢硫辛酸转琥珀酰酶	1,000,000	120	四方体	8	同上
E. coli二氢硫辛酸转乙酰酶	960,000	120	四方体	8	同上
丙酮酸羧基酶	660,000	150	四方体	4	<i>Biochem.</i> 5 , 3111, 1966.
脂肪酸合成酶	2,300,000	210×250	椭圆形		<i>Proc. Natl. Acad. Sci. N. Y.</i> 63 , 1377, 1969.
精氨酸脱羧酶	850,000		5角形环饼	5	<i>J. Biol. Chem.</i> 243 , 1678, 1968.
肌肉磷酸化酶A	400,000	55×110×120	双V字型	四聚体	<i>J. Mol. Biol.</i> 86 , 587, 1974.
肌肉磷酸化酶B	185,000	110×110	8字型	二聚体	<i>ibid.</i> 62 , 537, 1971.
色氨酸酶	220,000	100×90×100	立方体	4	<i>J. Biol. Chem.</i> 242 , 5591, 1967.
谷氨酸脱氢酶	312,000	133×20	团饼状	6	<i>J. Mol. Biochem.</i> 55 , 167, 1971.

至支持膜上的喷点极小,因此迅速蒸发干燥,可避免染色剂在蒸发过程中凝结成块。由于碳膜极不亲水,在使用点样法时,染色剂溶液常常不能均匀分布于整个支持膜的表面,而结成浓度较高的染色区,在电子束轰击下,很易蒸发污染电镜,并使支持膜破裂,使用喷雾法可以避免这一缺点。但应用喷雾法时,蛋白质溶液必须先和磷钨酸溶液混合,所以要求合适的pH,以便在混合时,不使蛋白质发生沉淀。蛋白质溶液的盐离子浓度也不能太高,以免无机盐类在样品干燥时析出。

点样法的步骤更为简单,先把蛋白质溶液用白金耳或滴管点于支持膜上,半分钟或一分钟,用滤纸吸去,立即用蒸馏水洗2—3次,然

后再将中性的1%磷钨酸(或其它染色剂)点于样品之上,一、二分钟后,用滤纸边缘将染色剂溶液吸去,此时在灯光下,能看到残余染色剂溶液成一薄层,均匀分布于整个支持膜上,一般染色效果较好,也有在点样后,即将碳膜直接漂浮于染色剂的表面,同样可得到负染的效果。点样法的最大缺点在于支持膜的不亲水性,以致染色剂溶液不能均匀分布于支持膜上,有时甚至极难沾上,但这一困难在蛋白质分子的研究中,并不最为突出,因为蛋白质本身能增加溶液和支持膜之间的亲合力,所以在制备样品时,也有在样品中加入血清白蛋白(从0.0001%到0.5%的浓度)以增加支持膜的亲水性。采取下列措施,也可达到同样的目的。1. 在磷钨酸溶液中

加入微量蔗糖，以增加染色剂在干燥过程中的粘度及对支持膜的附着力，蔗糖将略为减弱反差，但在一定程度上可抑制磷钨酸的结晶和形成较大的颗粒性的结构。2. 在点样前，先将支持膜用四氯化碳溶液洗涤，也可增加支持膜的亲水性。

火棉胶支持膜对分辨率有一定影响，在负染以后，还会呈现一些无规则的结构，因此，目前对观察分子样品的高分辨工作，大都使用单一的碳膜来代替其它的支持膜，特别是应用微筛膜时，当样品位于微筛火棉胶或碳膜的空洞染色剂薄层内时，分辨程度能相对提高，细节格外清楚。Marchalonis 在样品中加入石棉细纤维，用以加固微筛膜的孔，同时石棉还具有 7.3 埃和 3.65 埃的晶格，对于观察分子样品，一般要求高放大倍数时，正适合于校正放大倍数之用。

在观察蛋白质分子样品时，电镜要求调整到最佳性能。同时使用抗污染，消象散，低温冷却等装置对提高分辨率均有益处。在观察样品时，电子束电流不宜太大，照相时放大倍数一般在 5 万倍以上。

3. 负染的分辨极限及存在的问题

负染方法虽然把电子显微镜的制样技术提高到一个新的水平，但是应当指出，在这一方法中，也还存在不少问题。首先是目前广泛使用的染色剂，由于其密度对反差的限制以及染色剂本身尚存在颗粒性结构，其大小在 7 埃左右，因而使样品的细节分辨程度不能超过 15—20 埃的水平。此外，某些可溶性蛋白质在负染以后，也很难显示它的完整结构，原因在于这些蛋白质分子具有所谓“开放性”结构，即它们完全能被磷钨酸等染色剂所渗透，因而如像沉入黑色染缸之中，和周围环境一样不能区分，这就在一定程度上限制了应用负染技术对蛋白质分子研究的可能性。鉴于这一原因，负染技术目前在病毒研究中最为成功，因为不仅病毒体积较大，而且蛋白质外壳亚基结构紧密，所以染色剂就不能完全入内。当样品被包埋在染色物质中后，在干燥过程中，染色剂将逐渐代替水溶液，占据原来后者存在的位置，从而避免了在这一

过程中最易发生的由于表面张力的变化而引起样品的损伤，所以从理论上讲，负染对样品带来的损伤是比较小的，产生假象的可能性也不大，有些作者在讨论结果时，也不予注意。实际上，样品在负染以后，也可能发生一些改变，Anderson 指出，染色剂常常不是均匀分布于整个支持膜上，而是有区域性的，在每一区域内，边缘表面曲率较大，由于张力的关系，位于边缘的颗粒常要比位于中心部位的大一些。同时中心部分染色较浓，因而对样品的渗透程度也可能厉害一些。上面已经提及，在很多情况下，特别在高放大倍数时，染色剂所形成的薄膜常具有颗粒性结构，这些结构有时和样品的表面结构非常相似，极易造成假象，而在使用火棉胶支持膜时，经磷钨酸负染后，也会出现一些无规则的“花纹”。最后由于蛋白质分子在支持膜上随机取向，它所呈现的形态也会有所不同，目前也有使用样品倾斜装置，使样品倾斜不同角度来观察形态变化，以校正和比较建立的分子模型。所有上述的一些情况，加上关于负染极限的考虑，在解释细节时，特别在解释小于 20 埃的细微结构时应当慎重。

三、分子云母复型技术

1. 分子云母复型技术的成功和缺点

Hall^[3] 所发展的云母复型技术与其较早期提出的投影转移技术极为相似，综合了投影及一级复型技术。但就其本质来讲，所获得的观察样品并非复型，而仅仅从云母表面转移到支持膜上而已，所以也有称之为拟复型技术。云母复型技术在某些方面颇为成功地克服了制备单分子样品的困难。如用金属投影方法解决了样品的反差问题，用挥发性盐解决了蛋白质缓冲液中的无机盐结晶问题，应用微粒喷雾器和新鲜分开的云母表面解决了制样技术中比较关键的分子分散的问题。云母的强亲水性使喷到其表面的溶液立即分散，不易聚成颗粒，加上使用浓度很稀的样品，避免了分子间的相互作用和聚合，较易获得分离的单个自由分子。但这一技术也存在着较严重的缺点，首先是由于依靠

金属投影来增加反差，因而仅能观察到分子的外形和大小，而分子的内部结构，在一般情况下易被金属掩盖住，所以无法看到。对于分子大小的测定，特别是不对称的棒状或纤维状长分子的宽度测定存在一定的困难，所以这一技术近年来有逐步被负染技术淘汰的趋势，但是对于观察一些纤维状分子（因直径过细，负染后不易观察和分辨细节）及具有所谓“开放性”结构的分子，仍然是一种有用的方法。在个别情况下，也能观察到特殊的分子内部结构，如肌球蛋白分子的双头分叉形态。应用云母复型技术观察过的蛋白质分子有血红蛋白、血纤维蛋白原、原胶原、肌球蛋白、胃蛋白酶、原肌球蛋白及副肌球蛋白等 [图 3, 图 4 (见铜版III, 3—4)]。

2. 分子云母复型技术的具体实验步骤

(1) 将适当厚度的云母片，划成 4 平方厘米左右的小块，然后将其中间分开，放入有盖培养皿内，培养皿底部垫一层洁净滤纸，注意新鲜分开的云母片内表面不使受污。

(2) 将要观察的蛋白质溶于易挥发的缓冲液内，通常使用为醋酸铵或碳酸铵溶液，也可两者混合使用。在研究和观察过程中，应不断调整溶液的 pH 值、离子强度及蛋白质的浓度，使蛋白质分子在溶液内达到最佳分散状态。蛋白质溶液一般在 0.01—0.2 毫克/毫升比较适当。

(3) 用压缩空气或压缩氮气将 2 毫升左右的蛋白质溶液从微粒喷雾器中喷至新鲜分开的云母表面上，培养皿离开喷雾器不宜太近，以避免落至云母表面的喷点过大，一般距离约半公尺左右，在喷雾时，培养皿下面或后边可放置一温度不太高的电灯，以便较清楚地观察喷雾情况，随时调整喷雾距离及压缩空气的压力，同时还可使溶液更快蒸发。在样品中尚可加入适量的聚苯乙烯小球或烟草花叶病病毒等标准样品，以便在电镜观察时，作为样品喷点的指示，聚焦及校正投影角之用。

(4) 将已喷有样品的云母片迅速置于真空喷镀器内，用铂或铂铱合金等蒸发粒子较细的重金属进行投影。分子样品，特别是纤维状蛋白质分子，直径较细，为了观察及计算方便，投影

角要求较小， h/L 值一般在 1/5 至 1/10 左右。投影金属的厚度要适中，过厚则会影响样品的分辨程度，过薄则反差不够，同时从云母表面剥离时也易发生困难，也有在金属投影后，再垂直投下一层厚约 25—30 埃的一氧化硅薄膜，从我们的经验来看，一氧化硅层可以免去。

(5) 在上述投影后的云母表面上滴上 1% 的火棉胶醋酸异戊酯溶液，转动云母片，使火棉胶溶液均匀分布于整个表面，多余溶液用滤纸吸去，火棉胶溶液浓度太低时 (1% 以下)，剥离比较困难，但观察时透明度较好。待火棉胶溶液干后 (可在灯下略加烘烤，但温度不能太高)。用刀片将火棉胶膜划成小块，再用镊子夹住云母片，倾斜一定角度，徐徐放入洁净的蒸馏水中进行剥离。一般在金属投影后立即进行剥离，比较容易。有时小块膜会自动脱下，漂浮于水面，在其它情况下，可用镊子略加挑拨，使其脱下，再用洁净铜网捞起。

当样品在电镜下观察时，必须注意，电子束电流不宜太大，因为支持膜直接捞在铜网上面，所以受到电子束轰击后，极易产生热移动。也可以在观察前，在很小的放大倍数时，用较强的电子束把整个支持膜轰击数秒钟，进行“老化”，这样由于受热均匀，产生热漂移的可能性就可减少。

四、应用电子显微镜测定蛋白质的分子量及分子量分布

在利用电镜直接观察蛋白质分子的基础上，可以测定蛋白质的分子量及分子量分布。蛋白质分子量的测定主要依靠测定渗透压、粘度、扩散、光散射及超离心沉降等物化方法，但这些方法都有一定的限制，特别是分子量极大时，准确度就要降低。而电镜研究则相反，分子愈大，观察愈容易，测量误差也愈小，利用作图法^[4]，还可作出分子大小、分子长度或分子量的分布统计图，在这一方面电镜技术还具有明显的优点，因为任何其它物化方法，都只能获得一个平均的统计数字。

球状蛋白的分子量 M 可从下式计算中得到

$$M = \frac{4}{3} N \cdot \rho \cdot \pi r^3$$

式中, N 为阿弗加德罗常数

ρ 为蛋白质分子密度

r 为球蛋白分子的半径

对于纤维状长分子, 虽然在计算分子直径方面尚存在一定困难, 但分子长度的测量可以比较准确。

$$M = N \cdot \rho \cdot \pi r^2 l$$

式中, $N \rho$ 意义同上

r 为分子半径

l 为分子长度

目前, 应用电镜技术来对一般高聚物或生物高分子进行分子量的测定虽有一些报道, 但还不是应用很广。这主要由于制样技术比较困难, 远不如使用测定分子量的一般物化方法简便。为了测定分子量, 必须首先要在电镜下观

察到蛋白质的分散分子, 这本身就是要求大量的实验来进行探索的课题, 其次, 分子体积的估计, 蛋白质密度的计算, 都是比较近似的, 所以用电镜来测定分子量的数据也并不十分精确, 它可以用作和其它方法测得的数据进行比较, 但不能作为绝对的依据, 因为尚需考虑到在制样过程中分子可能产生的形变; 蛋白质肽链的卷缩、松散和变性; 纤维状长分子可能发生断裂; 分子的聚合和解离以及蛋白质亚基的解离和聚合等情况。

参 考 资 料

- [1] 徐有成、戴培华、龚祖埙: 生物化学与生物物理进展, 2, 9, 1975。
- [2] R. Josephs, et al.: Protein-Protein Interactions, 1927, p. 57.
- [3] C. E. Hall, Proc. Nat. Acad. Sci., 42, 801, 1956.
- [4] 彭加木、龚祖埙、熊立民、曹天钦: 生物化学与生物物理学报, 5, 7, 1965。

[本文于 1975 年 9 月 9 日收到]



激 光 在 农 业 基 础 研 究 中 的 应 用

激光技术的应用, 将使农业基础研究工作提高到一个新的水平。其应用有以下几个方面:

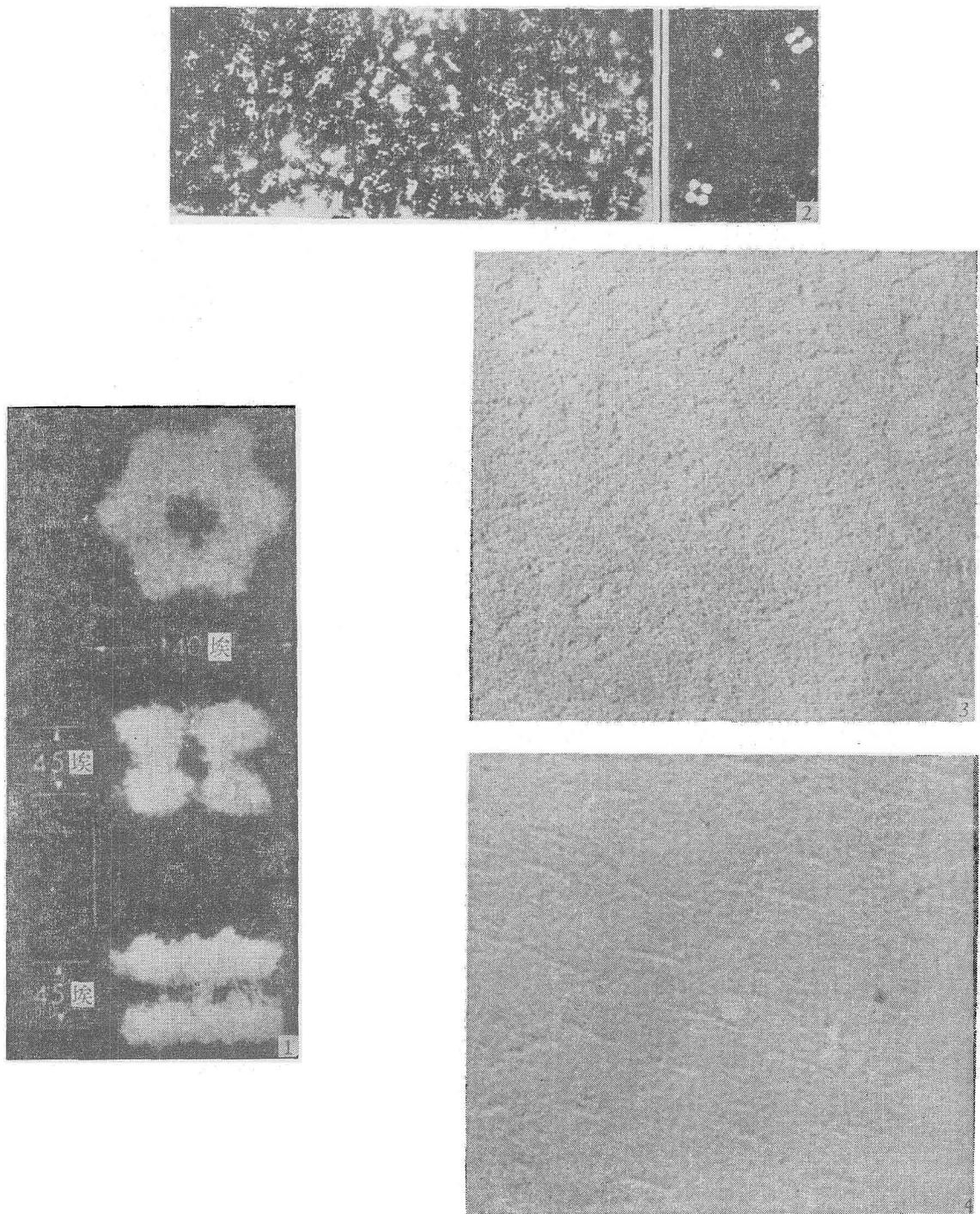
一、超微量分析技术 由于激光束可聚焦成面积很小的光点, 能量又可控制, 当激光照射到样品时, 可引起散射、吸收等光学现象。以激光作光源的拉曼光谱目前已成为一种测定有机体, 如单细胞乃至细胞核中所含的元素种类及其精确含量的超微量分析技术, 其灵敏度目前已达到 10^{-14} 至 10^{-16} 克。

二、微束照射技术 长期以来, 细胞学与遗传学研究者就希望设法能给细胞甚至染色体动手术, 但由于其结构精细, 一般工具无法进行, 但用氩离子激光器在显微镜的配合下, 则可用来对细胞、或染色体进行局部分解。国外曾用氩离子激光器, 经聚焦后只有 0.25 微米的光点, 使包含有遗传信息的染色体在结构上和功能上被部分切除, 并借之将蛋白质或 DNA 破坏。以

研究它们对遗传的影响。为遗传育种提供了新的手段。

三、全息显微技术 全息照相术是利用激光所具有的干涉与衍射特性来记录和重现物体的波, 亦即能够记录和重现物体的全部信息。全息照相重现的象是物体的真实写照, 不仅显示出物体的立体特性, 而且也显示出物体的超精细结构部分。在农业基础研究中具有重要意义。例如从连续拍摄影像喷洒杀虫剂过程所得的全息片, 可看到任何部位的细节及害虫的死亡过程, 从而可以精确掌握杀虫剂对害虫的效果, 为改进药剂的质量、喷洒方法和有利时间提供各种数据。

总之, 目前激光技术在农业上的应用还仅处于开始发展的阶段, 随着激光技术的发展以及对激光与植物相互作用机理的进一步深入了解, 激光技术在农业上将起着越来越大的作用。



铜 版 III

图 1 谷氨酰胺合成酶分子的电镜图 上图为正面;中图及下图为两个侧面

图 2 丙酮酸羧基酶分子的电镜图 右侧为局部放大

图 3 河蚌原肌球蛋白分子的电镜图 $\times 124,000$

图 4 河蚌副肌球蛋白分子的电镜图 $\times 80,000$