

2. 人肉瘤病毒 这是一种呈 20 面体对称的小病毒, 重构时有两个方向的观察面就够了。病毒直径为 560 Å, 有 420 个亚单位排列在 $T=3$ 的 20 面体表面晶格上, 以 5, 6 邻体形成 72 个形态单位^[5]。图 5 (a)、(b)、(c) 分别是这种病毒的电镜照片。注意: 亚单位在电镜照片上(白)与计算机重构象(黑)正好相反。

傅氏变换三维重构技术是在 60 年代末才发展起来的。1968 年 De Rosier 等首次用计算机重构了 T_4 细菌噬菌体尾鞘象。因为尾鞘是螺旋性对称结构, 只需要一个观察面就可以得到三维重构的全部信息。尾鞘外层由 42 个亚单位组成, 因而一张照片就相当于 21 张从等空间角度观察到的照片, 大大简化了重构步骤。随后, James Lake (1970) 把这种方法应用到切片的电子显微照片上, 重构了核糖核蛋白体的结构^[6]。从那时以来, 用傅氏变换法已构成的生物大分子还有烟草花叶病毒^[7]、血蓝蛋白^[8]、肌丝^[9]、细菌鞭毛、各种球状病毒^[10]以及谷氨酰胺合成酶。

总之, 电镜技术在分析生物材料的结构方面起着十分重要的作用。

虽然目前 X 衍射技术分辨率很高(1 Å), 但

是, 只适用于能长成晶体的生物样品, 又由于晶体生长条件不易掌握等原因, 使 X 衍射技术的应用受到限制。而电子显微照片进行象重构技术比 X 衍射技术更为迅速、也更加省事。如果今后找出新的样品制备方法, 减轻辐射损伤, 并研究出重构非对称性物体的方法, 可以断定, 电镜中的三维重构技术与 X 衍射技术相互配合下, 必将对生物科学作出重要的贡献。

参 考 文 献

- [1] Crowther, R. A. et al.: *Proc. Roy. Soc. Lond. A*, **317**, 319, 1970.
- [2] Unwin, P. N. T.: *J. Mol. Biol.*, **87**, 657, 1974.
- [3] Henderson, R. P. N. T. Unwin: *Nature*, **257**, 58, 1975.
- [4] De Rosier, A. Klug: *ibid.*, **217**, 130, 1968.
- [5] Crowther, R. A.: *ibid.*, **226**, 421, 1970.
- [6] Lake, J. A. *ibid.*, **227**, 1032 1970.
- [7] Unwin, P. N. T. A. Klug: *J. Mol. Biol.*, **87**, 641, 1974.
- [8] Melloma, J. E., A. Klug: *Nature*, **239**, 146, 1972.
- [9] Wakabayashi, T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **93**, 477, 1975.
- [10] Crowther, R. A.: *Phyil. Trans. Roy. Soc. (Ser. b)*, **261**, 221, 1971.

[本文于 1979 年 9 月 20 日收到]

用核磁共振研究生物活组织 (一)

许 健 生

高 联 佩

(中国科学院生物物理研究所) (清 华 大 学)

1946 年 F. Bloch 等物理学家为研究中子等基本粒子的特性, 发现了核磁共振 (NMR) 现象, 从而把波谱学推进到射频区。开始, NMR 仅是物理学家的工具, 但很快就被应用于有机化学, 极大地推动了有机化学的发展。五十年代后期, 它又扩展到生物学的研究领域, 从而对 NMR 技术本身也提出了更高的要求。七十年代以来, 引入了超导磁体、傅氏变换和计算机, 使核磁共振在生物学中的应用得到迅速发展, 成为生物物理学的一个重要分支。目前在生物学

中应用 NMR 的研究对象日趋广泛, 从大分子、细胞到活组织、器官甚至部分人体都得到应用。研究内容也更丰富, 从结构到代谢途径, 从静态到动态, 从鉴定生物制品到医学临床诊断等。

用 NMR 研究生物对象, 有三方面的突出优点:

1. 研究生物分子结构长期以来一直以 X 射线衍射为主要工具。它有较高分辨率, 但也有较多的局限性。如要求研究对象为晶体, 而大量生物分子目前还无法长成晶体, 而且生命活

动不是在晶体状态下进行的。又如X射线的灵敏度也因生物样品中含有大量氢原子而变得很低(因为灵敏度正比于被研究元素的原子量)。虽然它在提供静态结构知识方面是一种极为重要的手段,却不能作动态观察。而NMR则可对溶液状态的样品进行研究,弥补了这个缺点。高分辨率的 ^1H NMR谱以及 ^{13}C 、 ^{31}P NMR谱都可对生物体中大量的轻元素进行测定;它能提供动态知识,研究液态物质,研究生物分子的挠性(flexibility)和活性(mobility),进行动力学追踪。这些特点都使NMR成为研究生物分子结构的有力工具。

2. 生物体内各种反应及其控制非常复杂,传统的生化分析方法,简化的试管系统虽能提供一部分重要知识,但如何直接观察完整活组织中的生物分子状态,却是生物化学家和生理学家面对的难题。而NMR技术则提供了一种有效的方法。

3. NMR技术为医学诊断提供了一种非破坏性的检测方法,可用来检测器官的病变(如心脏、大脑);监视移植器官的状况(如肾脏)。可用 ^1H 谱来研究机体中含水的特性(许多细胞含水达70%),近年来发展的自旋成像技术,可以根据活组织中质子密度的差异,观察活体内部水的分布。最近,国外已制成大孔径超导磁铁。接近于可容纳成人整体,采用自旋成像技术,获得了人腕、人胸的横截面造影,这是一项很重要而又有前途的技术。此外,NMR技术没有X射线具有的有害副作用,对医学诊断更为有利。

正因为NMR具有上述独特优点,近年来活组织(包括活细胞及完整器官)的NMR研究发展迅速,已有一些综合报道^[1-3]。国际上不少研究中心都在从事这方面工作*。

在生物、医学的NMR研究中,经常采用 ^1H 谱, ^{31}P 谱和 ^{13}C ,这些都各有其特点。过去大量研究用的是 ^1H 谱(称为PMR),因为质子在生物体中广泛存在,且 ^1H 谱灵敏度和分辨率都高。但若研究对象的分子量愈来愈大时,对 ^1H 谱的解释工作会愈来愈困难,而无法研究大

多数的生物大分子。这是因为一般都从活组织提取生物分子纯化后,在最大溶解度处作NMR研究之故。分子量增加后,共振峰数和宽度都增加,分子的溶解度降低,会使讯噪比降低,而难以解读谱线。故用PMR研究生物分子时,分子量一般在50,000以下;研究完整活组织的困难就更大。因此,人们转而研究 ^{13}C 和 ^{31}P 谱。关于 ^{31}C 谱,将在本文后面讨论。这里,先着重介绍 ^{31}P 谱的优点及其应用。

自从1974年英国牛津大学的D.Hoult等^[4]首先利用 ^{31}P NMR技术识别肌肉中的重要磷酸化合物以来,人们已能在肌肉收缩过程中跟踪这些化合物的变化。应用 ^{31}P NMR研究生物活组织,特别是研究肌肉,有如下优点:(1)ATP等少数含磷化合物对活组织的功能起着重要作用。利用 ^{31}P 谱可以了解活组织的能源及其代谢状况;(2)所有活组织中的磷都是 ^{31}P ,因而能相对迅速地获得 ^{31}P 谱而无须过长的累加时间,一般5—10分钟即可;(3)NMR技术无破坏性,得以研究完整活组织,从而在生理条件下测定组织内部的动力学参量。此外, ^{31}P NMR对活组织的研究还发现了一组经典生化方法未能检测出的化合物,其中包括甘油-3-磷酸胆碱。

下面介绍有关肌肉的 ^{31}P NMR的四方面工作:

一、正常完整肌肉的磷谱

完整肌肉提供了一种相当详细的 ^{31}P NMR谱线。可以说明NMR技术能为生物化学家提供部分信息。图1是一个例子。从左到右的共振峰分别为(I)次甲基二磷酸;(II)磷酸-糖;

* 重要的研究中心包括:

T. Glonek: Univ. of Illinois Medical Center

B. Chance: Univ. of Pennsylvania, School of Medicine

R. Damadian: Downstate Medical Center, The State Univ. of New York

E. Fossel: Harvard Medical School

D. Hollis: Medical Center, The John Hopkins Univ.

D. G. Gadian: Univ. of Oxford

D. R. Wilkie: University College, London.

(III)无机磷酸 (Pi); (IV) 为一组新发现的磷酸二脂化合物,它在蟾蜍和青蛙中很丰富,在鲍鱼中则没有; (V) 磷酸肌酸(在鲍鱼中则为磷酸精氨酸); 右面是 ATP 的 γ , α 和 β 峰。

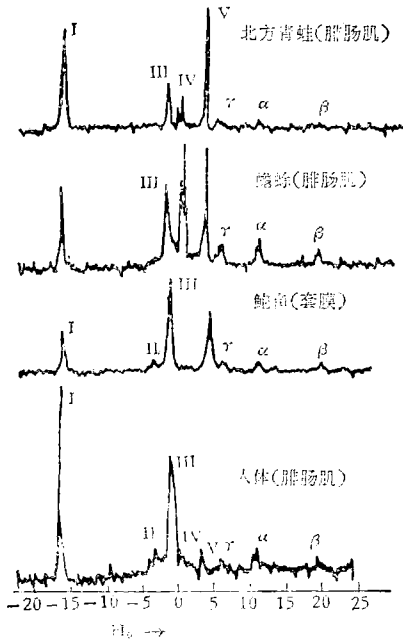


图1 几种完整肌肉的 ^{31}P NMR 谱^[5]

累加时间为30分钟;外标准为次甲基二磷酸,对于直径1毫米的毛细管内;温度28℃;化学位移尺度是相对于85%的无机磷酸而言。箭头所指方向为磁场强度 H_0 增加的方向。各峰识别符号见正文说明

通过一系列试验已经断定^[6,7],新发现的磷酸二脂化合物有两种:一种是甘油-3 磷脂酰胆碱,另一种成份目前尚未知。此外甘油-3 磷脂酰胆碱的分布也因生物的种类、活组织的状态(正常或病态)的不同而异。在同一动物的不同类肌肉中含量也不同。如在脊椎动物中(人、蛙、蟾蜍),此化合物含量高;在无脊椎动物鲍鱼中含量则为零。夏天的蛙含量高,而冬季的蛙含量为零。在同一动物中,慢颤动的红色肌肉和心肌中的含量,比快颤动的白色肌肉中含量高。另外,无论是动物(鸡)还是人的营养不良患者肌肉中的含量都很高。可以认为,这种化合物的含量可能与肌肉的氧化和产生能量的代谢途径有密切关系。这说明 NMR 技术对诊断疾病将成为一种重要手段。

^{31}P NMR 谱除能判定特定的代谢物是否存在外,还显示了各峰的其他特征,如谱线加宽的情况,弛豫时间及其它参量等。P.J. Seeley 等^[8]对人体腓肠肌中的磷酸讯号进行了分析。在一般情况下,磷酸提供的是单一窄峰,而人体腓肠肌提供的则是一个叠加的双峰。他们认为,这可能代表各种不同氢离子浓度的磷酸库。

值得注意的是,如果把肌肉 NMR 谱中 ATP 的讯号与简单溶液中的 ATP 共振讯号相比较,按 γ , α 和 β 的顺序分别位移 -0.8 , -0.4 和 -2.1 ppm。对于其它化合物如磷酸肌酸和磷酸糖,则没有这样的位移。根据位移以及偶合常数和线宽等参量,可以认为^[5,9],这是由于肌肉中的 ATP 与 Mg^{2+} 离子形成了复合物。而水溶液中的 Mg-ATP 的 NMR 讯号,恰好与观察到的完整肌肉的 ATP 讯号是一致的。

二、对肌肉收缩的研究

由于应用 ^{31}P NMR 谱,通过一次测量就能在相当短的时间内获得关于各种细胞内磷酸化合物的知识,因此这种方法对研究功能不同的肌肉颇有用处。有人把青蛙两种功能的肌肉 ^{31}P NMR 谱,进行对比。一个样品用咖啡碱处理,使肌肉产生收缩;另一个未处理,作为对照。图2(A)为把样品装在试管后,立即测得的 ^{31}P 谱。肌肉中磷酸肌酸含量高,窄单峰在 3.2 ppm 处,而 ATP 的三个共振峰亦可见于 6 , 11 和 19 ppm 处。此时磷酸糖 (-3.7 ppm) 和无机磷酸 (-1.7 ppm) 浓度很低。测毕,加入咖啡碱,使肌肉收缩 45 分钟,再测定 ^{31}P NMR 谱,如图 2 (B)。此图说明,磷酸肌酸已完全耗尽,而 ATP 的共振峰也几乎看不见。与此相反,磷酸糖和无机磷酸讯号却显著加高。

图 2 (C) 所示为对照样品,另一条腓肠肌的 ^{31}P 谱线。由图可见,磷酸肌酸和 ATP 的共振峰较高;磷酸糖和无机磷酸的浓度比实验开始时增高,但比 (B) 的水平却仍低得多。

图 2 中显示的这些明显变化说明,可以用 ^{31}P NMR 谱来研究活组织中的代谢过程。上述结论虽略嫌琐碎,但却是用一般生化方法不易得到的信息。

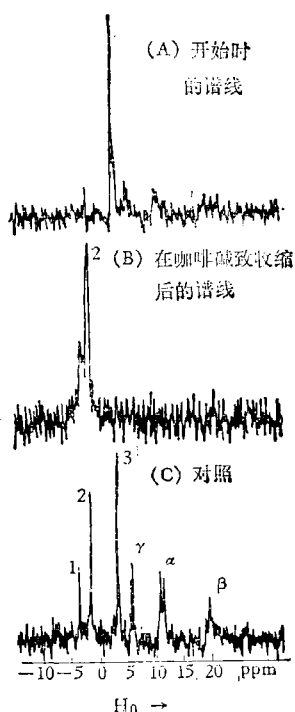


图2 31℃下,咖啡碱使肌肉收缩对³¹P谱的影响
杀死青蛙,取出两条腓肠肌。(A)对其中一条立即测定,在头15分钟得到的³¹P谱。(B)测毕,加入如下溶液: 115m M NaCl, 2.5m MKCl, 2.0mM CaCl₂和20 mM的咖啡碱, pH 7.2。让肌肉收缩45分钟后测得的谱线。(C)在此以后,对另一条作对照的腓肠肌测得的谱线。(B)和(C)的试验条件与(A)的相同

三、正常肌肉与病态肌肉内的代谢状况

取下人体肌肉后,肌肉内的代谢过程将引起³¹P谱连续变化,因而测量完整肌肉的³¹P谱作为时间的函数,就能观察组织内部的代谢过程。

图3(A)是一正常人四头肌磷酸化合物浓度与时间的函数关系。开始时浓度约为10mM的磷酸肌酸,随时间增长而呈线性降低,约在50分钟时达到2.3 mM,即起始值的29%,随后降低速率减小。另一方面,P_i则从10 mM起始值开始维持一线性增长率,在50分钟后其增长率开始下降。ATP的浓度开始为一恒定值,在维持时间T_m处,开始按反S型曲线下降。将ATP的水平部分与急剧降落部分的切线交点定义为T_m。在本例中,T_m出现在48分钟处。只要有足够的磷酸肌酸,可通过代谢

过程再生出消耗了的ATP,ATP的浓度曲线就会维持在一定水平上。此外,磷酸糖的浓度开始时迅速增加,然后较慢慢地增加。

图3(B)是一组类似的时间函数,样品取自一病人身上的肌肉。患者已有神经肌肉疾病的症状。T_m值约为20分钟,大为缩短了。

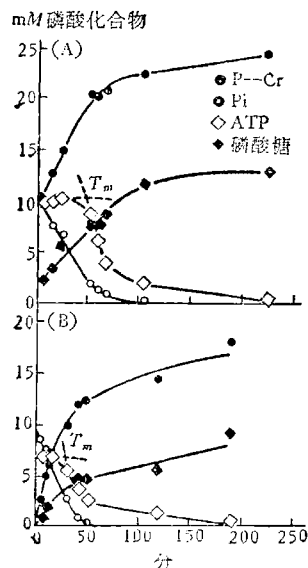


图3 人体肌肉中磷酸化合物浓度与时间的关系

- (A) 正常的四头肌。ATP开始下降的那点,定义为维持时间T_m;
(B) 杆肌病的四头肌。

四、代谢物的区域化

X射线衍射和电子显微镜对横纹肌的结构提供了丰富的知识。但是,对肌肉内迅速扩散的分子在空间的分布则知之甚少,这些分子为细胞提供原料并催化其许多反应。了解这类空间分布,对检验以前根据体外试验所提供出的有关细胞代谢及其控制的理论是必要的。如糖原代谢酶——磷酸化酶在细胞内与一些代谢物结合,使酶的活性受到控制。因此静止肌肉中,磷酸化酶的活力很低。但肌肉收缩时,活力可增加千倍以上。要把静止肌肉的低活力与测得的结合常数及代谢物的总浓度统一起来,就可断定磷酸化酶附近的某些配位体的浓度与肌浆中的平均浓度是不同的。因此,细胞内的代谢物划分成了不同区域,这对磷酸化酶或其它酶如磷酸果糖激酶的控制可能起着重要的作用。

^{31}P NMR 能对完整组织中含磷代谢物的浓度和环境提供重要信息。下面试举两例。

牛津大学的一些工作者将大白鼠股外肌切出后,观察在缺氧条件下 ^{31}P NMR 谱线随时间的变化。结果见图 4。由图可见,随着时间的增长,磷酸肌酸被消耗,共振峰值降低,峰下面积亦减小;同时,无机磷酸的量增多,峰变宽、变高。共振频率也有变化。这是缺氧时乳酸增多, pH 环境变化所致。

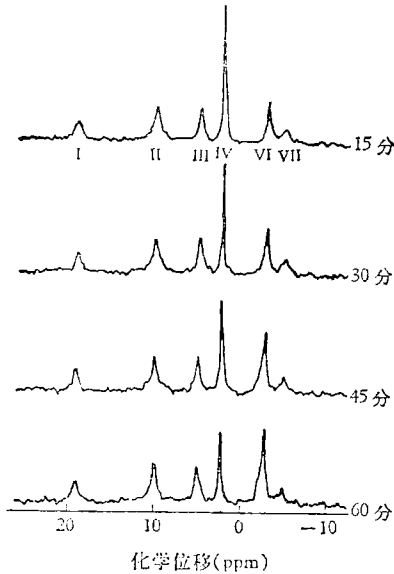


图 4 大白鼠股外肌切出后作为时间函数所记录的 ^{31}P NMR 谱

实验中肌肉置于 15°C 的 Tris 溶液中。每一谱线代表 2 秒钟间隔一次的 400 次扫描累加,谱线右边时间代表扫描到 200 次时的时间。图中 I、II、III 为 ATP 的 β 、 α 和 γ 峰; IV 为磷酸肌酸峰; VI 为无机磷酸峰; VII 为磷酸糖的共振峰

他们进行的另一组试验是,将切出的大白鼠股外肌浸于 pH 5.2 的醋酸中 20 分钟,改变细胞内 pH 值,测得的谱线变化更为明显(图 5)。图中无机磷酸的共振峰逐渐分裂为很清楚的两个部分。一个峰代表原来 pH 7.0 的环境,另一峰则代表 pH 5.8 的环境。随着时间的增长,低 pH 区的成份逐渐增多,最后在 53 分钟时达 P_i 总量的 35%。同时, 6-磷酸葡萄糖的共振峰也发生类似的变化,但没有 P_i 的变化那么明显。

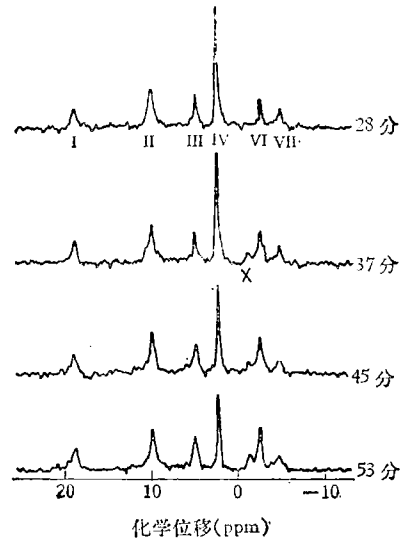


图 5 肌肉内无机磷酸的区域化

大白鼠股外肌 ^{31}P 谱作为时间的函数。每隔 2 秒扫描一次,累加 200 次。谱旁所给时间为扫描达 100 次时的记录。图中 X 的新峰是处于低 pH 环境中的无机磷酸。其他峰如图

作者在实验中严格控制金属离子的因素,也没发现无机磷酸与蛋白质结合影响共振峰的证据。因此认为,无机磷酸和 6-磷酸葡萄糖共振峰的变化,是由于这两种化合物处于两种不同 pH 值环境的区域所引起的。其中高 pH 的区域,醋酸离子能够渗透进去;低 pH 的区域则不能渗透进去。而 ATP 和磷酸肌酸则无此现象。

上述研究成果中,最重要的是代谢物的区域化和代谢成份甘油 3-磷脂酰胆碱的发现。

参 考 文 献

- [1] Gadian, D. G.: *Contemp. Phys.*, 18, 351, 1977.
- [2] Dwek: *NMR in Biology*, 1977.
- [3] Research News, *Science*, 202, 958 (1 Dec), 1978.
- [4] Hoult, D. F. et al.: *Nature*, 252, 285, 1974.
- [5] Burt, C. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 251, 2584, 1976.
- [6] Burt, C. T. et al.: *Science*, 195, 145, 1977.
- [7] ———: *Biochem.*, 15, 850, 1976.
- [8] Seeley, P. J. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, 4, 62, 1976.
- [9] Labotka, R. J. et al.: *J. Supramol. Struct.*, 3, 125, 1975.

(待续)