

士奇两同志的大力支持下收集的,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Blundell, T. L. and Johnson, L. N.: *Protein Crystallography*, p. 420, Academic Press, 1976.
[2] Blundell, T. L.: *Adv. Protein Chem.*, 26, 279,

1972.

- [3] 北京胰岛素结构研究组:《中国科学》, 1974年, 6期 591页。
[4] 胰岛素结构研究组:《中国科学》(试刊), 1972年, 1期, 1页。

[本文于1980年4月9日收到]

蛙视杆细胞外段盘膜内视紫红质分子的侧向扩散检测

胡坤生 马万禄 谈曼琪

(中国科学院生物物理研究所)

赵 东 坡

(山东省中医药研究所)

脊椎动物视杆光感受器分外段和内段(图1);在外段中,大约90—95%的膜区是由许多独立的盘膜堆积成的。因种类不同,盘膜数约为500—2000个。盘膜的化学组分中类脂大约占视杆外段干重的40%,蛋白质占60%,而其中80%的蛋白质为视紫红质。蛙视杆外段长约50微米,直径6—7微米,其精细结构已有详细的综述^[1]。

根据生物膜结构的流动镶嵌模型,生物膜的基本结构是功能蛋白质分子浮动镶嵌于类脂双分子层中^[2]。具有双亲性基团(亲水基和疏

水基)的类脂分子在水解质中由于其结构特性可形成有序的溶致近晶相液晶,因此视紫红质分子在盘膜的类脂双层中可进行旋转扩散和侧向扩散运动。

膜内类脂和蛋白分子运动,曾用多种方法测定。如 R. A. Cone (1972) 和 P. K. Brown (1972), 用高速闪光光度法测定了视紫红质在蛙视杆外段盘膜里的旋转扩散^[3,4]; H. Trauble (1972) 和 P. Devaux (1972) 用自旋标记脂探针测到一些人造膜和天然膜的侧向扩散系数为 $1-6 \times 10^{-8}$ 厘米²/秒; L. D. Frye (1970) 和 M. Edidin (1973) 用荧光标记测得膜中蛋白的侧向扩散为 $5 \times 10^{-11}-2 \times 10^{-9}$ 厘米²/秒;还有人用显微分光光度术测量了蛙和大鲵鱼(mudpuppy)视紫红质分子在盘膜中的侧向扩散,在20℃时,其扩散系数为 10^{-9} 厘米²/秒数量级^[3,4]。

我们用显微分光光度法测定了室温下和47—48℃温度处理后视紫红质分子在盘膜中的侧向扩散,并考察蛙离体眼球经温度处理后的早期感受器电位的R₂峰值在47℃达到最大值的原因^[5]。现将结果,介绍如下:

材 料 和 方 法

实验材料为北京产黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*)

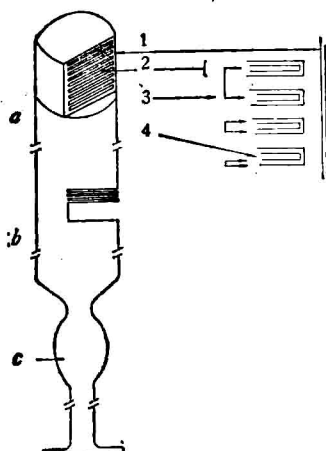


图1 脊椎动物视杆细胞模式图

a. 外段 b. 内段 c. 核部

1. 原生质膜 2. 盘膜 3. 细胞质空间 4. 盘腔

culata) 和济南产的金线蛙。实验前将蛙暗适应 10 小时以上后,取出眼球,切开,去掉水晶体,然后用棉签从眼杯中沾出视网膜,立即加 6% 的蛙任氏溶液数滴。如需温度处理时则将带有视网膜棉签立即置于 47—48℃ 的此种溶液中 5 分钟。然后从棉签挤出一小滴带视杆外段的溶液于载玻片上,加盖玻片后置于显微分光光度计 (opton SMP-05 型) 载物台上观察。用 710nm 的光选出新鲜完整而平躺着的视杆外段,放在视野中央处,使由场控控制的漂白光束的长轴和由测控控制的测量光束长轴与视杆的长轴三者相一致。将视杆外段的 $\frac{1}{2}-\frac{1}{3}$ (3 微米左右),用波长 500nm 的光 (蛙视紫红质的吸收峰值) 进行漂白,时间 2 秒。单色仪出射狭缝

为 0.5 毫米,漂白光比测量光强 1000 倍以上。对漂白区马上进行测量,测量光波长不变,只是把狭缝调到 0.02 毫米,其半波宽为 0.74nm (测量光弱至测量过程中没有明显的视紫红质分子漂白)。测量光为 $2 \times 30\text{nm}$ 左右的矩形截面。在漂白前首先测量暗适应视杆外段的透过率,测量时间为 2 分钟。记录不同时间漂白部分和未漂白部分的透过率。测量前后应观察细胞的位置,确保整个测量过程中,视杆细胞外段无移动,否则测量结果无效。

结果与讨论

在 18—25℃ 温度范围内共测量蛙视杆外段 44 个,结果如表 1。
从表 1 可见,黑斑蛙视杆外段有侧向扩散

表 1 蛙视杆外段盘膜视紫红质分子的侧向扩散

温度范围	样品	测量数量	有侧向扩散			无侧向扩散		侧向扩散不明显	
			数量	百分数	达平衡的时间	数量	百分数	数量	百分数
21—25℃	视杆细胞 (黑斑蛙)	19	18	94.7%	50 秒—70 秒			1	5.3%
18—20℃	视杆细胞 (金线蛙)	25	18	72%	50 秒—75 秒	5	20%	2	8%

的占 94.7%,金线蛙的视杆外段有侧向扩散的占 72%。
测量未漂白区的结果表明,透过率随时间上升,漂白区情况与此相反。这说明未漂白的

视紫红质分子和漂的视紫红质分子之间有侧向扩散^[1],且两者的透过率均在 50—75 秒之间达到平衡。为排除个体差异的影响,我们测量了同一青蛙的两个视杆外段,一个测量漂白区,另一个测量未漂白区,其结果与上述相同。图 2 为一视杆外段漂白区透过率的测定结果。

黑斑蛙与金线蛙的实验结果有较大差异,这可能是由于实验时已进入金线蛙冬眠季节,使其视杆外段盘膜的流动性受影响。
在 47—48℃ (恒温水浴) 处理后测得结果如表 2。

共测量黑斑蛙的视杆外段 5 个,无侧向扩散的占总数的 60%;共测量金线蛙视杆外段 13 个,无侧向扩散的占总数的 92.3%。经 47—48℃ 处理后的蛙视杆外段,虽然在低于处理温度的室温下进行测定,但侧向扩散大大降低,甚至不明显。这说明经温度处理后侧向扩散降低的不

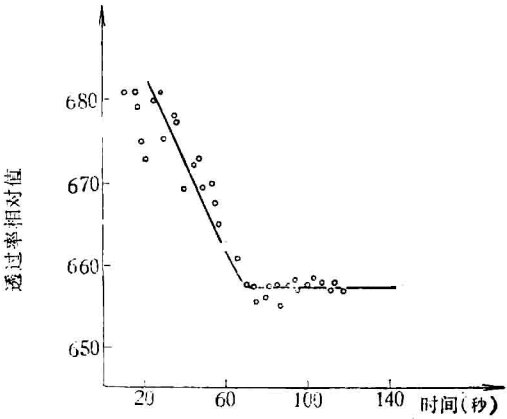


图 2 漂白区的透过率与时间的关系 (一个视杆外段, 18℃)

表2 温度处理下蛙视杆外段盘膜中
视紫红质分子的侧向扩散

处理温度	样品	测量 数量 (个)	有侧向扩散		无侧向扩散	
			数量 (个)	%	数量	%
47—48℃	视杆细胞 (黑斑蛙)	5	2	40	3	60
47—48℃	视杆细胞 (金线蛙)	13	1	7.7	12	92.3

可逆性,以及早期感受器电位的 R_2 峰值在 47℃ 处理后达最大值并不是由于流动性的增加,而可能是由于膜类脂双层分子的物理状态发生了变化,此变化不利于视紫红质分子的侧向扩散,但有利于光电转换。

根据视紫红质分子在盘膜内二维扩散方程式可求得^[3]扩散系数 D :

$$D = 0.69bL^2/\pi^2t_{1/2}$$

b : 与蛙视杆外段有关的几何因子 ($= 2.7 \pm 1.0$)

$t_{1/2}$: 达到扩散平衡所需时间的一半

L : 蛙视杆外段直径 ($= 7$ 微米左右)

据上式计算,我们的实验 (18—25℃) 结果是:

$$D = (3.0 \pm 2.1) \times 10^{-9} \text{ 厘米}^2/\text{秒}$$

$$t_{1/2} = 31 \pm 6 \text{ 秒}$$

此结果与国外报道的结果基本一致。M. M. Poo 和 R. A. Cone 得到的 $D = (3.5 \pm 1.5) \times 10^{-9} \text{ 厘米}^2/\text{秒}$ ^[3]。P. A. Lieberman 和 G. Entine 得到的 $D = (5.5 \pm 0.6) \times 10^{-9} \text{ 厘米}^2/\text{秒}$ ^[4]。

从我们获得的侧向扩散系数值可见,在正常温度范围内,视紫红质分子在盘膜脂介质内有高度的流动性。这种流动性与视紫红质分子在盘膜中的结构状态以及类脂本身的结构状态有关。视杆外段结构上的有序性和高度的流动性这种液晶态结构特性与视觉功能有很大的关系,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Cohen, A.: *Handbook of Sensory Physiology* (Springer, Heidelberg, New York, 1972), Vol. VII/2, pp. 63—110.
- [2] Singer, S. J. and Nicolson, G. L.: *Science*, 175, 720, 1972.
- [3] Poo, M. M. and Cone, R. A.: *Nature*, 247, 438, 1974.
- [4] Lieberman, P. A. and Entine, G.: *Science*, 185, 457, 1974.
- [5] 蔡浩然、马万禄、张允芝:《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 第 10 卷, 第 1 期。

[本文于 1980 年 4 月 23 日收到]

染料对蛋白质光致化学发光的增强效应

翁渝民 李庆国 王克华

(复 旦 大 学)

1960 年 Конев 等人用光子计数技术发现^[1],在室温条件下蛋白质经紫外辐照后,发光能持续数分钟甚至数小时,其本质是化学发光(又称为光致长期间后发光)。它与蛋白质在紫外辐照后所产生的一系列物理和化学过程有关。其后继续有人报道这方面工作^[2,3,4]。1966 年 Сапезинский^[5] 等人报道,染料对蛋白质化学发光有增强效应。但增强效应的机理不很清楚。本文拟报道我们这一方面的工作结果。

实验材料和方法

实验用的染料曙红-Y 为市售产品。牛血清白蛋白(BSA)为市售电泳单点纯生化试剂。

用两个移液器使测量样品组成流动体系。先用一移液器将被辐照的蛋白溶液泵至测量皿中,测量皿置于光电倍增管光阴极前。测试完毕再用另一移液器将其泵出。辐照结束至开始测量的最小间隔为 12 秒。紫外辐照采用 120