

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

瓦石英汞灯全光辐照，用充水的石英烧瓶兼作滤热和聚焦透镜。样品与光源距离为 25 厘米，辐照 1 分钟后与染料混合，浓度为 2 毫升。0.2% BSA 水溶液 (pH6.8) 加 1 毫升 $10^{-5}M$ 染料液。

用光子计数器测试^[6]。经计数率仪转换后由电子电位差计(上升最大时间为 1 秒)记录发光过程动力曲线。测量化学发光光谱时，将上述样品体系紧贴于单色仪入口狭缝处，并将狭缝开至最大(3 毫米)，用定标器累计每一波长时的总发光脉冲数。

用自己装配的荧光光谱仪^[7]测量荧光光谱和磷光光谱。用滤片体系滤出 240—280 毫微米的谱线作为激发光。接受单色仪的 350 毫微米输出光谱其宽度不超过 5 毫微米。测得的表观光谱经过预先标定的仪器参数逐点进行校正。作磷光测量时，样品置于金属槽中，然后置于盛液氮(77°K)的石英杜瓦瓶内。样品溶剂为磷酸缓冲液 (pH6.8)，从冰冻样品表层接受磷光。作磷光寿命测量时，用电动开关迅速遮断光源，用电位差计记录磷光衰减曲线，然后将其转换为对数形式，求得衰减至 $1/e$ 原强度时所需时间即 τ 值。测量时间的最大误差不超过 0.5 秒。

实验结果

图 1 为 BSA 水溶液辐照 1 分钟后加入曙

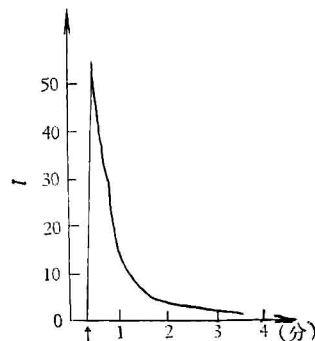


图 1 0.2% BSA 水溶液经紫外辐照后加入曙红-Y 化学发光衰减曲线

曙红浓度: $1.10^{-5}M$ 。纵轴: 发光强度(相对单位); 横轴: 时间, 0 时刻表示辐照停止时间, 箭头表示加入染料后, 开始测量时间

红-Y 染料液后记录的化学发光衰减曲线。它是由两个指数式曲线叠加而成:

$$I = A_1 e^{-K_1 t} + A_2 e^{-K_2 t}$$

图 2 是这种衰减曲线的半对数形式, 它明显地形成两条直线。说明至少有两种与发光直接有关的光化产物。其中一种周期较短, 占发光总强度的 90% 以上; 另一种周期较长。此种反应与纯蛋白化学发光衰减曲线相似^[3], 说明经染料增强的化学发光与纯蛋白的化学发光动力学衰减规律相似。

为了研究增强效应机理, 首先测定了曙红染料和曙红与 BSA 结合体中曙红的吸收光谱(图 3)。从此图可见, 在混合体系中, 曙红的吸收峰向长波方向移动。这种移动通常说明曙红

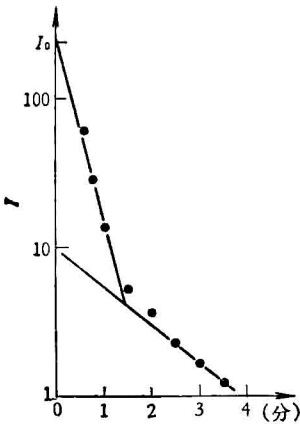


图 2 0.2% BSA 水溶液紫外辐照后加入 $1.10^{-5}M$ 曙红-Y 化学发光半对数衰减曲线

纵轴: 发光强度(相对单位)对数值
横轴: 时间

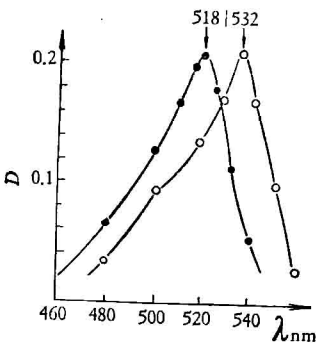


图 3

—○— 曙红-Y $1.10^{-5}M$ 水溶液吸收光谱
●—●— BSA 与曙红混合体系中曙红吸收光谱, BSA 浓度 0.2%, 曙红浓度 $1.10^{-5}M$

与 BSA 形成了络合物。荧光光谱的测定结果(图 4)也反映了同样的结果。在混合体系中,曙红的荧光峰位也向长波方向移动。

然后测量了增强后的化学发光光谱。由于发光强度很低,采用了极宽的单色仪狭缝(3 毫米),测量精度上受到了一定限制,但测得的峰

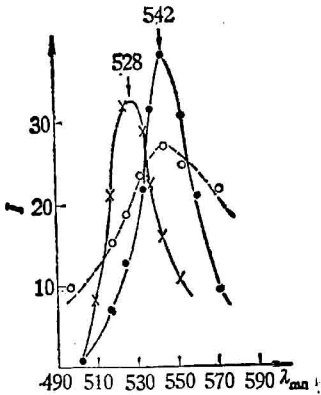


图 4

×—×—× 曙红-Y 荧光光谱
·—·—· BSA+曙红-Y 体系中曙红荧光光谱
○····· BSA 辐照后加曙红化学发光光谱

位却与曙红-BSA 络合物中曙红荧光峰位完全一样。这一点说明了在增强的化学发光中,光子亦是从曙红的单重态能级上发射的。

由于蛋白质的磷光在 400—500 毫微米波段内,而曙红的吸收在 460—540 毫微米波段内,二个波段间有较大的覆盖,在络合物内有可能产生自蛋白质三重态至染料单重态间的激发能共振转移。为此研究了在低温下(77°K)蛋白质有染料和无染料存在时的磷光特性。从图 5 可以看出,在络合物内,BSA 的磷光显著猝灭;在纯蛋白磷光峰位处的磷光强度仅约为纯蛋白的 16%。这种猝灭可被看做是蛋白质三重态至染料单重态间的激发能的转移。从同一图上还见到在络合物内染料荧光明显增强,也说明确实存在这种能量转移。

为了进一步研究上述能量转移过程,测定了磷光寿命的变化。图 6 示磷光衰减曲线。其测定结果列于表 1。可以看出,在纯 BSA 体系内磷光发射寿命包含有酪氨酸和色氨酸两种组份。在仅有酪氨酸磷光发射波段内如在 λ 为

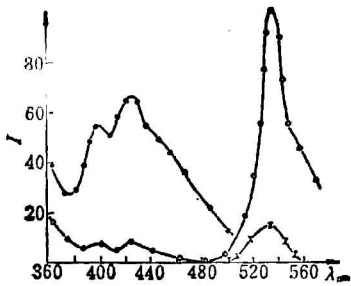


图 5 曙红-Y-BSA 络合物和曙红低温发光光谱

·-·-· BSA 磷光光谱 ○-○-○ 络合物光谱
×-×-× 曙红光谱 77°K, pH6.8 磷酸缓冲液
BSA: 0.5 毫克/毫升, 曙红: $0.5 \times 10^{-5} M$

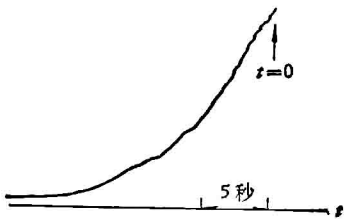


图 6 BSA 磷光衰减曲线

77°K, BSA: 1 毫克/毫升, pH6.8 磷酸缓冲液

表 1 BSA 和曙红-BSA 络合物磷光衰减寿命 τ

λ (毫微米)	BSA (秒)	曙红-BSA 络合物(秒)
385	2.3	2.5
411	5.4	2.6
428	5.5	4
445	5.3	4 3.8
466	5.3	3.8

BSA: 0.5 毫克/毫升 曙红: $0.5 \times 10^{-5} M$, 溶剂: pH 6.8 磷酸缓冲液

385 毫微米处,酪氨酸磷光寿命 $\tau = 2.3$ 秒^[8]。而在仅有色氨酸发射的波段区 $\lambda > 390$ 毫微米处,色氨酸磷光寿命 $\tau = 5.3$ 秒^[8]。在络合物内,磷光寿命发生明显变化。主要是色氨酸的磷光寿命缩短,如在 λ 为 428 毫微米,445 毫微米和 466 毫微米处,τ 值均降低了 1 秒多。这是因为在三重态能级上有更长寿命的激发电子,它具有较大的能量转移机率。其结果使平均寿命缩短。其次是酪氨酸的发光寿命保持不变,如在 λ 为 385 毫微米处。第三个特征是在两种氨基酸发射的波段的重叠区如 λ 为 411 毫微米

处,此时由于色氨酸的激发分子发生了能量转移,因而从原来为色氨酸的磷光寿命转变为酪氨酸的寿命。这说明,能量转移主要是在色氨酸三重态能级上发生;能量转移发生后,络合体内酪氨酸磷光发射特征更显著,而在通常情况下,在含有色氨酸和酪氨酸的蛋白内,酪氨酸的发光特性不易显现出来^[8]。

讨 论

在我们所研究的由染料增强的化学发光体系中,光能的吸收体是蛋白,而最后的发光则是在染料的单重态能级上发生的。我们的实验还证明,在蛋白的三重态与染料的单重态能级间存在能量转移。在络合体内三重态至单重态的能量转移,应是按偶极-偶极作用方式^[9],因为具备了这种转移所必需的条件。如同处于络合体内,供体和受体的距离很近,其次是能量供体的荧光光谱与能量受体的吸收光谱有很大部分重叠。我们研究过另一种染料 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS),发现它在 $10^{-5}M$ 浓度内,没有增强效应。虽然已经知道 ANS 也能与 BSA 形成络合物^[10],但由于它的长波长吸收区在 350—

360 毫微米波段,不与蛋白质的磷光区重叠,故不产生能量转移。在纯蛋白体系内由于三重态产生猝灭效应,以及自三重态至单重态能级跃迁的禁戒性,使化学发光效率很低。但在染料参与的体系内,由于能量转移作用,使染料的单重态能级上发生发光跃迁,故发光效率明显提高。

实验表明,在既含有色氨酸又含有酪氨酸的一类蛋白质中,上述方法是揭示含有酪氨酸发光组分的又一种方法。

参 考 文 献

- [1] Конев, С. Катибников, М.: *Биоф.*, 4, 638, 1961.
- [2] Сапежинский, И. Силаев, Ю.: *Биоф.*, 12, 1, 38, 1967.
- [3] Nařdan, D. Sapezhinskii, I.: *Biophys.*, 22, 4, 591, 1977.
- [4] Nařdan, D. Sapezhinskii, I.: *Biophys.*, 23, 1, 21, 1978.
- [5] Сапежинский И. Силаев Ю. и др.: *Биоф.*, 4, 3, 427, 1966.
- [6] 翁渝民等:《复旦学报》, 1979 年, 第 2 期。
- [7] 李庆国:《1978 年上海生化年会论文(摘要)汇编》。
- [8] Miller, J. *Progress in Biophysics*, 28, 41, 1974.
- [9] Stryer, L.: *Science*, 162, 3853, 526, 1968.
- [10] Daniel, E. Weber, G.: *Biochem.*, 5, 6, 1893, 1966.

[本文于 1980 年 7 月 14 日收到]

电离辐射后动物造血组织内 DNA 的变化

郑秀龙 吴德林 刘巧年 赵 芳

(第二军医大学)

造血组织骨髓及脾脏内 DNA 的变化是辐射损伤最敏感的指标之一,研究 DNA 变化及其与细胞数量间的关系,对阐明造血组织的辐射损伤和修复有益。

我们对受照家兔的骨髓、大白鼠的脾脏以及小白鼠的骨髓 DNA 变化及其与细胞数间的关系,³H 胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)的掺入进行了观察。

1. X 线 500 伦照后对 DNA 含量的影响

雄性家兔 28 只经 X 线 500 伦照射不同时间后,分组杀死,取右后肢股骨骨髓称重;按 Burton 二

苯胺法^[1]测定 DNA 含量。结果是照后第一天 DNA 含量即明显下降,第三天降至最低,只是正常的 39.7%,照后第七天 DNA 含量略有回升,15 天后恢复到接近照前值。

2. γ 线 700 伦照后对脾重和 DNA 的影响

雄性大白鼠 52 只, γ 线 700 拉德照射后不同时间,分组杀死,称体重、脾重,测定脾内 DNA 含量。正常大白鼠平均脾重为 0.71 ± 0.06 克, DNA 含量为 11.8 ± 0.3 毫克/克湿脾或 8.2 ± 0.8 毫克/脾。照射后鼠体重逐渐下降,4 天后降至正常的 78.2%,而脾重在照后 1 天即明