

解,这样就要求用更灵敏的方法测定 RNase。为此我们采用 CGGA 片段与 ^{32}PCp 为底物进行测定,确实发现有轻微的降解。可以设想,随着酶纯化方法的改进,可以接近做到以 CGGA 单加 ^{32}PCp 为底物时降解很少(图 5)。但是若换另一片段进行连接,可能又会出现比较严重的降解。看来随着连接片段的增长,对酶的质量和测定 RNase 方法的要求,会越来越高,因此深入研究酶的纯化和检测 RNase 的方法就十分必要。但在另一方面对酶的使用条件必须给予充分的重视,尤其是连接产率方面,也许对不同片段的连接,需要不同的连接条件,才会得到高的连接率。

2. 二种方法测得酶活力的换算: RNA 连接酶测活有二种方法,一种为腺三磷—焦磷酸(ATP-PPi)交换法(简称交换法)^[10],另一种为标准法^[11];前者有快速、方便的优点,但所测得的为交换单位。标准法测定较为繁琐,需要制备底物,测得为连接单位。但由于测活条件限制不严,不同作者所得的结果不好比较;例如有的用 5:1,有的用 50:1^[11]。我们研究了这二个

测活方法^[10],通过试验确定了一个统一的测活条件,以及二种测活方法的比值,即交换单位:标准单位=20:1。这样,在测活中不论采用那一个方法,都可以有一个相互换算的标准。

参 考 文 献

- [1] Silber, R. V. G. Malathi et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 69, 3009, 1972.
- [2] Ohtsuka, E. et al.: *Nucleic Acid Research, Special No. 3*, 1978.
- [3] Collaboration Group of Nucleic Acid Synthesis, *Joint Symposium on Nucleic Acid & Protein*, 1979.
- [4] 人工合成核酸协作组1979(内部资料)。
- [5] Wang Guihai, et al.: *Joint Symposium on Nucleic Acid & Protein*, 1979.
- [6] Last, J. A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 174, 167, 1976.
- [7] Higin, N. P. *Nucleic Acid Res.*, 4, 3175, 1977.
- [8] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸组:《微生物学报》, 1978 年, 18, 210—219.
- [9] Bergmann, F. H. *Methods in Enzymology*, 5, 708, 1962.
- [10] 华陵等:《化学试剂》, 1980 年, 第一期。
- [11] Weiss, B. et al.: *J. Biochem. Biol.*, 243, 4543, 1968.

[本文于 1980 年 7 月 16 日收到]

人工板形双分子脂膜的制备及其厚度和电特性的测定

孙纹琦 陈玉玲 谈曼琪

(中国科学院生物物理研究所)

近年来采用各种不同的材料和不同的技术获得了人工双分子脂膜。这种人工膜如用不同的手段加以修饰,还可模拟各种生物膜的功能。在人工双分子膜上所进行的试验已得到许多在整体实验或某些离体实验所不能获得的结果,因而它已成为研究生物膜功能的一种有效手段。

不同的作者由于他们的研究目的不同,所选取的材料和形成方法也各有不同,但所形成的人工双分子脂膜都有以下类似天然膜的基本特征,如:能在水介质中形成厚度为 100 Å 左

右的脂双层;膜的两边可以是不对称的介质;有类似于天然膜液态烃的特性;膜上可附加其他材料,使其改变原有的特性而适合于各种生物膜的研究,诸如机械性的改变,电性的变化,产生光电效应以及具有对物质的主动运输特性等。

人工双分子脂膜的形成液可以用有机溶剂直接从生物材料中提取,如由大脑中提取的脑磷脂与含蛋白脂质的混合脂;大豆中的磷脂,以及植物叶中的叶绿体提取液等^[1]。也可以是溶于有机溶剂的双亲性脂,这种脂是纯化的脂或

者是其它人工合成的脂。有机溶剂多用 C_6-C_{16} 的烷类。用这类的脂溶液在水中形成的双分子脂膜,一般分为球形与板形两类。板形脂膜的形成方法又可分为黑脂膜形成法^[2]与由单分子膜再形成双层脂膜的方法^[3];同一种形成方法中所用的装置也各有不同,这取决于不同的实验目的。

我们采用黑脂膜形成技术,获得了氧化胆固醇双分子脂膜。测定了膜的厚度,并测定了膜的直流电阻以及充放电特性。

材料与方法

将氧化胆固醇或氧化胆固醇与磷脂的混合液溶于正辛烷中作为形成液。氧化胆固醇的制备是将市售的胆固醇溶于乙醇,进行再结晶;再结晶所得的纯化的胆固醇溶于正辛烷中;在沸点($\sim 125^\circ\text{C}$)下通氧回流 $5\frac{1}{2}$ —6 小时,最后

得无色的溶液置于冰箱中一个月后待用。人工双分子脂膜的形成装置见图 1。在两个有机玻璃槽中盛 0.1N 的 NaCl 或 KCl 溶液,两槽的壁上各有一直径为 5 毫米的小孔,此带有小孔的两壁间紧夹一疏水的有良好绝缘性能的聚四

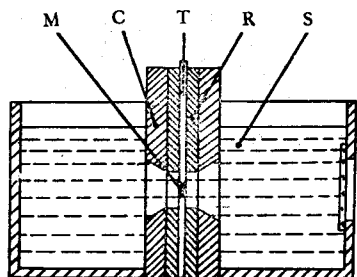


图 1 人工双分子脂膜的形成装置

S: 0.1N 的 NaCl C: 溶液槽 R: 密封垫片
T: 聚四氟乙烯膜 M: 形成脂膜的小孔

氟乙烯或聚脂薄膜,厚度约为 $50-100\mu$, 薄膜上有直径为 1—2 毫米的小孔。当未引入膜形成液时,两槽溶液可流经小孔而相通。水溶液的液面应超过小孔 5 毫米。用微量注射器把形成液注入液面下的小孔中,然后在实体显微镜下观察孔中所形成的脂膜的厚度变化(用一般

的白炽灯或显微镜灯作观察光源;实体显微镜可观察到由小孔上的脂滴所反射的光)。根据光的干涉原理,一束光入射到在水中的脂膜上,产生的反射光的干涉条件是 $d = \frac{\lambda}{4}$, λ 为入射

光的平均波长, d 为薄膜的厚度,白光的平均波长为 5000Å 左右,所以当薄膜的厚度等于或小于 1000Å 时,就不能产生反射光的干涉现象。当脂滴开始变薄时在实体显微镜中可见到一系列彩色条纹的变化;当脂滴变薄到 1000Å 时在脂膜的边缘产生黑色斑点,继而扩大,直至全部变黑。这表明此时的膜厚度已达 1000Å 以下。此后肉眼不能见到其继续变薄的过程。若膜稳定不破,即可认为双分子膜已经形成。在膜的周缘有一圈较厚的非双分子区称为“P—G”边界^[4]。在显微镜下可观察到此“P—G”圈与中间的黑区之间有明显的界线。我们还用透射光观察形成过程,根据“P—G”边界的变化来判断双分子膜的形成与面积,其结果与用反射光观察的结果一致。

氧化胆固醇在 $10-30^\circ\text{C}$ 都能形成双分子膜,但温度对变薄的速度有很大影响。有的膜可稳定五小时以上。氧化胆固醇与卵磷脂混合所形成的双分子膜,在低于 15°C 时变薄过程常因凝固而中止。

结果与讨论

1) 人工双分子脂膜厚度的电镜测定:

用电镜可直接测量膜的厚度。为便于制备供电镜观察的样品,可用另一种较简单的形成双分子脂膜的装置。图 2 中所示为一片厚度为

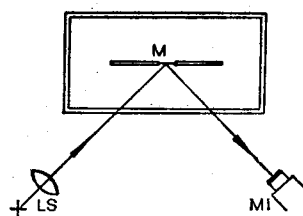


图 2 供电镜观察用的人工双分子脂膜的形成装置(俯视图)

M: 双分子脂膜 MI: 实体显微镜 LS: 光源

100 μ 左右的聚脂膜,中间打一直径小于 2 毫米的圆孔,然后浸入盛有 0.1N 的 KCl 溶液的容器中,用上述的形成方法把形成液—氧化胆固醇注入小孔,以显微镜灯作观察光源,用实体显微镜观察脂滴的变薄过程,待小孔上形成了双层脂膜并稳定 20 分钟后,加入 1 毫升的 10% 的 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$,同时以磁力搅拌器搅拌,约 5 分钟后,再加入约 2 毫升的饱和 KMnO_4 ,并继续搅拌 15 分钟;静置 5 分钟后,将固定好的双分子脂膜(附在聚脂薄膜上)从溶液中取出,在空气中晾干(或储于干净的容器中过夜或数日),用 EP812 树脂包埋后置于 60 $^\circ\text{C}$ 温箱内固化约 24 小时,经超薄切片后在 JEM-7 型电镜下观察,如图 3 所示。从照片上可见到三层结构:两条最浓的深色线为脂的亲水基团部分;其中间的浅色区为烃链部分;此三层的总厚度约为 80—120 $\text{\AA}$ 。可认为脂膜为双分子层。用电镜法测量的双分子脂膜的厚度也有一定的误差,这是与所用的固定剂与固定技术有关,另外切片所取的角度不同也影响膜厚度的准确估算^[4,5]。

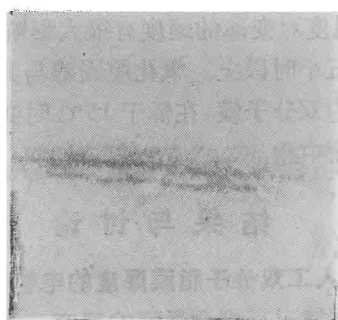


图 3 氧化胆固醇双层脂膜的电镜图
(16,000 $\times$ 5)

2) 人工双分子脂膜的电特性测量:

除直接测量脂膜的厚度外,电特性测量也是判断其是否已形成双分子层的一个参数。因烃链具有很高的电阻,故测量其电特性时必须使用高输入阻抗的测量装置,并注意屏蔽和绝缘。测量装置如图 4 所示。在膜的两侧溶液槽中插入一对对称的去极化的甘汞电极;电极间电位差不大于 1 毫伏。通过一组与之串联的高电阻对膜两端加电压,并用高输入阻抗静电计

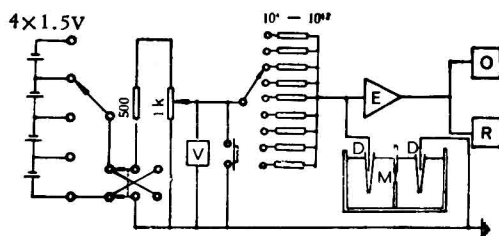


图 4 人工双分子脂膜电特性测量装置线路图

V:电压表 O:示波器 R:记录仪 E:静电计
D:电极 M:人工双分子脂膜

测量通过膜的电压降。根据欧姆定律,用分压比的方法测得人工膜的电阻值。用氧化胆固醇所形成的人工双分子脂膜其电阻值在 10^9 — 10^{11} 欧姆之间。这与所形成的人工膜的双分子区面积有关。为了统一起见,一般用归一化的电阻(欧姆·厘米²)来表示,即 $R_M = R_m \cdot A$; R_m 为实测的电阻值, A 为双分子膜的面积(以厘米²表示)。故我们所形成的氧化胆固醇双分子脂膜的电阻在 10^8 — 10^9 欧姆·厘米²之间。当膜两端的电压降超过 80 毫伏时,黑区(双分子层区)的面积产生明显的变化;此变化在一定的电压范围内有某种程度的可逆现象;继续加大电压则膜被击穿;击穿电压为 150—250 毫伏。用此装置可以测得膜的充放电特性曲线(图 5)。在已知膜电阻的情况下,用下列所熟知的 RC 放电回路公式不难求得膜电容 C 值:

$$\frac{E_t}{E_0} = e^{-\frac{t}{RC}}$$

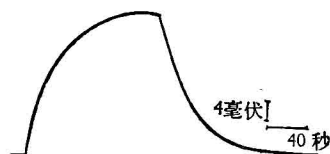


图 5 氧化胆固醇双分子脂膜的充放电特性曲线

图中标的短横线为 40 秒,短纵线为 4 毫伏

E_0 为放电前 ($t = 0$) 时膜两端的稳态电压,

E_t 为放电时间 t 时的电压值,

$$R = \frac{R_m R_i}{R_m + R_i},$$

R_m 为实测的膜电阻值,

R_i 为所用的串联电阻值。

C 与面积有关。为了统一,一般用 $\mu\text{f}/\text{cm}^2$ 来表示膜的电容,故膜的电容 $C_M = C/A$ 。我们根据氧化胆固醇所形成的双分子膜的充放电特性曲线计算出其电容为 $0.3-0.8 \mu\text{f}/\text{cm}^2$ 。

膜电阻和膜电容与双分子层区的面积的准确测量有关。一般是根据双分子层的直径来计算面积。为此,要求小孔尽可能地圆,否则就必须用其它方法精确地计算^[6]。在每次形成双分子膜时尽可能地控制注入等量的形成液,使膜在几何形状上有良好的重复性。另外,小孔的边缘必须光滑,而且要求膜周缘无气泡。

美国密执安州立大学生物物理系田心棣教授在华

工作时对此工作给予热情的帮助和有益的讨论;我所沈莉莉同志在电极方面曾给予大力帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Tien, H. T.: *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1974.
- [2] Mueller, P., et al.: *Recent Progress in Surface Science*, Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1964, p. 379.
- [3] Montal, M.: *Methods in Enzymology* (XXXII), *Biomembranes*, Part B. (ed. S. Fleischer and C. Packer), Academic Press, New York, p. 545.
- [4] Venvergaert, P. H. J. Th. and Elbers, P. F.: *J. Mol. Biol.*, 58, 431, 1971.
- [5] Henn, F. A., et al.: *J. Mol. Biol.*, 24, 51, 1967.
- [6] White, S. H.: *Biophys. J.*, 10, 1127, 1970.

[本文于 1980 年 12 月 27 日收到]

会议简讯

中美蛋白质学术讨论会在沪举行

由中国科学院、中国医学科学院和美国俄克拉荷马医学研究基金会联合主办的中美蛋白质学术讨论会于 1981 年 5 月末在上海举行。出席会议的美方代表 14 人,中方代表 28 人,会上美方提出论文 13 篇,中方提出 11 篇。这些论文将以文集形式发表。内容包括:蛋白质的晶体结构和生物功能;胰岛素及其类似物的研究;类胰岛素多肽激素的结构,功能与进化;糖蛋白的结构与功能;免疫学和蛋白质;细胞表面蛋白受体;

血液凝结蛋白;蛇毒中磷酸脂酶、纤维蛋白酶及其他蛇毒蛋白的研究;酶的结构、功能和催化机制;生物氧化机制;血红蛋白变种;血清脂蛋白;体液抑癌因子及淋巴细胞活素等近期研究进展。与会代表还就共同感兴趣的研究课题进行了讨论和交流。会后美方代表在北京进行了参观访问和学术交流。

(刘蓉供稿)

中国生物物理学会召开 科学普及会议

1981 年 5 月 26 日至 29 日中国生物物理学会在京召开了科学普及会议。参加会议的有科研与教学人员近三十人,报刊出版单位、电台、电视台编辑人员约四十人。会上双方座谈交流,取得了较好的效果。

通过座谈,大家加深了对普及生物物理学知识的认识。近年来这方面的科学普及工作有了良好的开端,如获得全国科普一等奖的《自然的启示》(王书荣编著)和获得北京科普创作奖的《仿生学漫谈》(王谷岩编著)等的出版,但生物物理学这门新学科,总的来看还不为人们所了解,而在从事这一学科的不同专业科

学工作者之间,彼此也缺乏认识。因此,为了促进生物物理学的发展,加强学科间的渗透,积极推动这一学科的普及工作十分必要。

在座谈中,许多专业工作者分别就自己所熟悉的或研究的生物物理学的一些重要领域或课题,作了深入浅出的解说或介绍。这既加深了不同专业工作者之间的了解,又向编辑人员作了宣传普及工作,为他们考虑选题提供了方便。会议期间,各宣传出版单位向有关专业人员积极开展了组稿工作,共组稿约百篇。

为了建立专业工作者与宣传出版工作者之间的长期联系,促进交流,以推动科学普及工作不断深入,与会组织了联谊会。

(会议秘书组)