

具有处理长时程 EEG 的能力,是能够较好地反映 EEG 的频谱特性。

在计算时,计算机对两道 EEG 信号连续作 A/D 转换,通过 FFT 运算可计算出 EEG 的功率谱。在未到达指定的累加次数 n 时,将每次计算的功率谱累加起来。当完成指定的累加次数后才开始进行分频带计算。将计算频谱中 2—3.75、4—7.75、8—12.75、13—19.75 和 20—30 的频率成分分别累加起来,除以标准定标信号的内存值,依次作为 δ 、 θ 、 α 、 β_1 和 β_2 各频带的值。将计算结果存入计算机内存存储器的另一区域中,作为一个时间段 EEG 频谱的代表值。再重复进行上述转换和计算,直到完成 8 个时间段 EEG 信号的分析 and 计算。

三、计算结果的显示

利用打印机可分别打印出两道 8 个时段 EEG 信号频谱的强度值,以及各种成分在总功率中所占的百分比(图 2)。

利用 X-Y 绘图仪,可将计算脑电的频率分布以直方图的型式绘于纸上(运用扩展字符语

句由计算机控制 X-Y 绘图仪)。这样可以更加清楚地观察不同时间 EEG 的变化(图 3)。

我们利用上述改进的计算方法,初步分析了脑室微量灌注去甲肾上腺素对兔遥测脑电活动的影响^[7]和人的自发脑电活动。实验结果表明,运用这种方法对 EEG 频谱分析具有准确、可靠、计算迅速、显示清楚和一目了然等优点。

参 考 文 献

- [1] Barlow, J. S.: *IEEE Trans Biomed. BME*, 26, 377, 1979.
- [2] Walter, D.O.: *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 24, 486, 1968.
- [3] Sciarretta, G. and Erculiani, P.: *ibid.*, 45, 674, 1978.
- [4] Glaser, E. M. and Ruchkin, D. S.: *Principles of neurobiological Signal analysis*, Academic Press, New York, p. 110, 1976.
- [5] J. S. 贝达特和 A. G. 皮尔:《相关分析和谱分析的工程应用》,国防工业出版社,68 页,1983。
- [6] Mattis, P. et al.: *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 52, 218, 1981.
- [7] 周菲等:《中国生理学会生理学会 1982 年神经生理专题讨论会论文摘要汇编》,22 页,1982 年。

[本文于 1984 年 1 月 19 日收到]

脂质体通透性的微型计算机测定

张 志 鸿

(复旦大学生物系,上海)

十多年来,人们对生物膜的结构,特别是动态结构,已有了相当多的了解,这是和对脂质体的研究分不开的。在研究膜的相变、流动性、膜上脂质和蛋白质的相互作用、金属离子等对膜的作用以及膜的重建等方面,都要用脂质体作为模型^[1]。近几年,脂质体又被作为“技术工具”受到多方面重视,尤其是作为药物、酶及遗传物质等的载体已形成一种新型的“给药系统”,步入了生物技术的领域^[2]。在这些研究中,脂质体的通透性是个很重要的参数,它和膜的结构密切相关,同时影响着膜的许多功能。

本文报道用“渗透收缩”法测定脂质体对水分子的通透性,实验装置中联机应用了微型计算机以进行实时处理,能快速、方便地打印出数据和曲线。

一、基本原理

目前,一般用 NMR 法或渗透收缩法测定脂质体对水分子的通透性^[3]。前者测定水分子的交换扩散;后者则是在非平衡流存在下测定水分子的通透。采用渗透收缩法的好处是不要复杂的仪器,操作简便。基本原理简述如下。

由磷脂双分子层构成的脂质体,对水的通透性比大分子的蔗糖或 K^+ 离子的要高 8—9 个数量级。可以认为它是遵循 *Boyl-van't Hoff* 定律的理想渗透计^[4],

$$V = K(1/C) + b \quad (1)$$

式中 V 是脂质体容积,其变化反比于悬液光密度的变化, C 是膜两边渗透压梯度(浓度单位), K 是与波长及渗透计浓度无关的常数, b 是渗透死容积。

当脂质体水悬液中加入高浓度蔗糖或 KCl 时,水分子将从脂质体内侧渗透至外侧,整个脂质体的容积变小,此即“渗透收缩”现象。此时,对于渗透计有^[5],

$$\frac{dV}{dt} = K_w SRT(C_i^0 - C_i^t) \quad (2)$$

K_w 是水分子通透系数, S 是膜所占据的面积, C_i^0 、 C_i^t 分别为膜内、外侧不通透性物质的浓度。这种容积的变化可用光散射大小或悬液的浊度变化来追踪^[6],

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{E^2} \frac{dE}{dt} \quad (3)$$

式中 E 是悬液的光密度。

如果用同样的脂质体样品比较各种处理,则悬液的最初光密度值 E 是一样的,因而测定了 $t = 0$ 附近的 $\frac{dE}{dt}$ 值亦就可以比较 K_w 值的大小。

二、测定方法

1. 脂质体的制备 称适量脑磷脂(上海市食品公司制药厂产),溶于氯仿中,配成 200mg/ml 浓度。取 0.2 ml 于圆底试管中,通 N_2 后溶剂挥发。注入 2ml 水(或低离子强度缓冲液 5mM $NaPO_4$), 50—60℃ 水浴中水化 15 分钟,然后在旋涡混合器中振荡约 5 分钟,至管壁无沾粘物。500 rpm, 1 分钟离心,以除去未分散之磷脂沉淀。所得脂质体悬液经干涉显微镜(日本 Olympus, BH2-NIC) 镜验,均系分散均匀的多层脂质体。

2. “渗透收缩”测定装置 悬液的光密度用

72 型分光光度计, 450 nm 波长处检测,光电池输出信号输至直流放大器,放大 1000 倍后经调零电路送至 A/D 转换器(美国、Mountain Computer Inc.),最后由 Apple II plus 微型计算机(RAM 48 K)处理。测定时,0.1ml 脂质体悬液加于 2 ml 比色皿中,从 5 ml 可调定量加液器中快速注入 2 ml 蔗糖(或 KCl) 溶液(磷脂终浓度约 $1 \times 10^{-3} M$),于是光密度随之变化,由计算机定时采样计算,显示并打印出整个光密度的经时变化曲线、 $dE/dt|_{t=0}$ 值及其它时刻的平均值。可调定量加液器浸于恒温水浴器中,用以进行温度效应的研究。

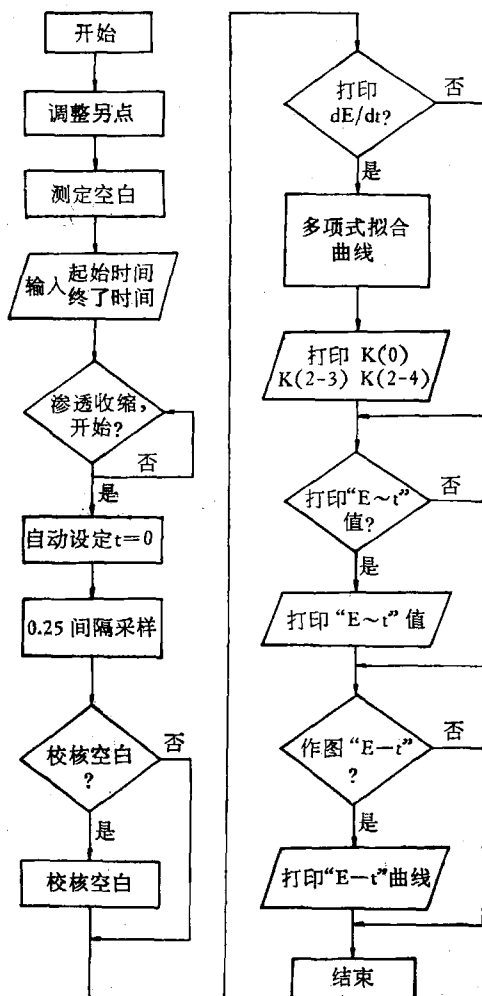


图 1 “渗透收缩”测定程序框图

3. 微型计算机处理 实验中,计算机每隔 0.25 秒(由循环程序选定)采样计算一次,运用

BASIC 语言, 由 $5\frac{1}{4}$ 英寸软磁盘经磁盘驱动器

器输入。测定程序框图参见图 1。它主要完成如下诸项功能: (1) 自动设定 $t = 0$ 时刻。当注入高渗液瞬间, 由输入信号的阶跃, 自动确定零时刻。(2) 自动校零, 因此, 每次不必进行精确的调零; 也不必精确调整空白。(3) 数据的优化处理。一般, 采样 50—60 次, 计算机对这些数据进行多项式拟合:

$$E = C_0 + C_1t + C_2t^2 + C_3t^3 + C_4t^4。$$

4. 打印机打印出 $\left. \frac{dE}{dt} \right|_{t=0}$ 值 ($K(0)$)、 $t = 2-3$ 秒及 $2-4$ 秒期间的 $\frac{dE}{dt}$ 平均值 ($K(2-3)$ 、 $K(2-4)$), 同时能打印出整个时间 (一般: 16 秒) 的光密度变化数值及曲线。

三、结果和讨论

由图 2 可见, 平衡时, 450 nm 波长处脂质体悬液的光密度变化倒数和 KCl 浓度变化倒数之间呈线性关系。这表明, 实验条件下, 脂

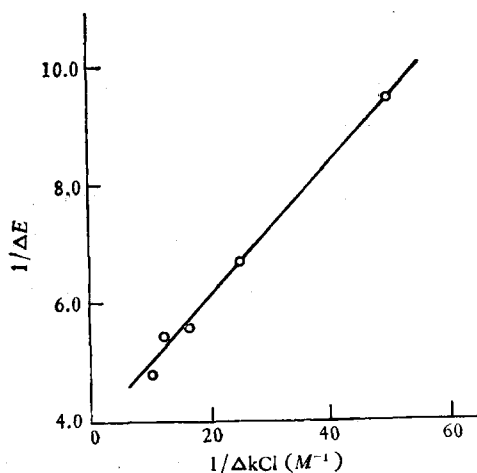


图 2 450 nm 时光密度变化倒数和 KCl 浓度变化倒数间的关系

```
DATE7/1 1984 LIPOSOME IN 50MM SUCROSE 35C
NO.      K(0)      K(2-3)      K(2-4)
6        .0210166125 .0109182322 9.60286949E-03
```

图 3 打印结果一例 (K 值量纲为秒⁻¹)

质体遵循 Boyle-van't Hoff 定律。图 3 为 35℃、50 mM 蔗糖高渗处理时之一例打印结果。

文献中, 常用“停流” (Stopped-flow) 分光光度计, 以保证加入高渗液后的快速混匀 (毫秒数量级)、提高时间分辨率, 因此在混和几百毫秒后即可读数记录。按我们目前的实验条件, 采用可调定量加液器手动快速加液, 预备实验表明, 这样的混和法死时间约 1—1.5 秒, 即 1.5 秒后整个悬液分布均匀。因此, 起始时间一般取大于 1.5 秒。在比较脂质体通透性数据时, 同时打印出 $K(0)$, $K(2-3)$ 、 $K(2-4)$ 。4—5 次测量时, $K(2-3)$ 的离差约 10%。另一个影响实验精度的是 A/D 转换器。本装置中的 A/D 转换器系 8 位, 输入 $\pm 5V$, 即 39mV 电压变化产生 1 个数字的改变; 渗透收缩中脂质体悬液光密度变化范围不是太大, 因此若要进一步提高数据的连续性, 须采用位数更高的 A/D 转换器, 或改用对数放大, 模拟开关等扩大信号动态范围电路。

渗透收缩法, 现已广泛应用于膜对各种物质的通透性^[6]、膜相变^[5]、敏感性脂质体^[7]等方面的研究。本实验装置及程序 (稍加修改) 亦可用于研究红细胞动态结构的“渗透休克”实验^[8]。

参 考 文 献

- [1] Chapman, D.: in *Membrane Structure and Function* (ed. by Bittar, E. E.), Vol. 1, 103, 1980.
- [2] Wilson, T. and Cave, L.: *Bio/Technology*, 1(2), 148, 1983.
- [3] Fettiplace, R. and Haydon, D. A.: *Physiol. Rev.*, 60(2), 510, 1980.
- [4] Bittman, R. and Blau, L.: *Biochemistry*, 11(25), 4831, 1972.
- [5] Blok, M. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 433(1), 1, 1976.
- [6] Bangham, A. D. et al.: in *Methods in Membrane Biology* (ed. by Korn, E. D.), Vol. 1, 1, 1974.
- [7] Kano, K. et al.: *Photochem. Photobiol.*, 34(3), 323, 1981.
- [8] 张志鸿: 《复旦学报》(自然科学版), 23(1), 1, 1984.

[本文于 1984 年 2 月 21 日收到]