

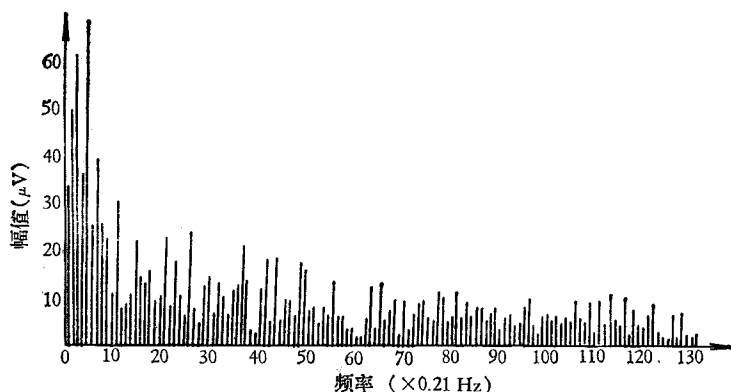


图3 散脑脑电图的频谱图

在家兔胸腹部交界处贴一电极,在后肢外侧贴一无关电极,用 RM-85 型多导生理记录仪描记体表电位曲线,作为对照;给家兔肌注 0.5 毫克乙酰胆碱后描记体表电位曲线,是为 Ach 记录;半小时后给家兔肌注 0.5 毫克去甲肾上腺素,再描记体表电位曲线,是为 ad 记录。从得到的频谱的幅频特性中可以看到,总的趋势是 ad 记录的高次波谱部分增强,低次波谱部分减弱,而 Ach 记录结果与此相反。Ach 记录在 0.05 赫及 0.2—0.25 赫处各有一个峰,且其幅值均大于 ad 记录,这两个频率分别相当于胃 (3c/分钟) 及肠 (12—15c/分钟) 的活动节律,而 ad 记录则在 1.5 赫及 11—12 赫处各有一个峰,且幅值均大于 Ach 记录。这两次频率分别相当于呼吸 (90c/分钟—平静时每分钟 40 次

左右,注 ad 后增至每分钟 90 次左右) 及心电的 QRS 间期 (0.06—0.15s) 的活动情况。

由此可见,一段体表电位瞬态反应的记录,经 FFT 处理后,其频谱具有很高的分析效能,可用以分辨出呼吸、心跳、胃、肠运动的各种情况。

合肥市精神病院李鸿烈、黄仙玉两同志提供脑电图,本所许冠荪同志协助记录动物体表电位,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 程乾生编著:《信号数字处理的数学原理》。
- [2] E. O. 布赖姆著:《快速富里叶变换》,上海科技出版社。

[本文于 1980 年 7 月 21 日收到]

蛋白质水溶液和脂界面上的超微弱发光

李庆国 翁渝民

(上海复旦大学)

近年来,由于光子计数技术的发展,在极弱光通量测量方面,有了突破。凭借这种技术,发现动植物有机体,在正常生理状态下(暗反应),它们的细胞、细胞器(如线粒体),以及动物的肝脏、血液、植物的根、茎、叶等均有光子释放。因为其光通量极弱,通常称为“超微弱发光”^[1-2]。其本质是由于机体内不饱和脂肪酸的氧化作用,产生了过氧化自由基,当它们复活时能释放出光子。Журавлёв 等人 (1972)^[2] 报道,蛋白质能增强脂的氧化发光效应。这种现象关系到

生物膜,在“暗反应”条件下,能否产生蛋白质分子的电子激发态问题,所以受到有关方面的注意。本文报道我们在这方面的实验研究工作。

材 料 和 方 法

实验中采用的非饱和脂肪酸为油酸 (E Merch Darmstadt)。色氨酸晶体、甘氨酸晶体、牛血清白蛋白 (BSA) 等均为市售生化试剂。

样品体系: 我们用蛋白质或氨基酸的水溶

液与油酸组成界面(不搅拌),使其类似于膜上双脂层的一层。界面上的脂层可以保护下面的蛋白液,不被微生物污染。将此体系置于37℃的温箱中培养,间隔一定时间或每天测量一次。测量时样品置于光子计数器的光电倍增管前。第二种样品体系是先将油酸与水混合,在CSF超声波发生器中,用大约3瓦/厘米²的功率作用10—15分钟,使之形成乳化液,然后再填加蛋白液,以便防止超声作用对蛋白分子结构的破坏。同时将色氨酸水溶液与油酸混合后进行超声乳化实验,结果形成了油滴分散于水相液中的乳状液^[3]。

测量仪器:由光电倍增管接受的光脉冲送至光子计数器^[4],由定标器作光脉冲记数。如图1。



图1 光子计数器方框图

以样品计数率 I 与暗噪声计数率 I_0 的比值 I/I_0 作为信号幅度的大小(以下称为信号强度)。

实验结果

室温条件下,油酸在空气中,也有较弱的光子发出,其信号强度通常在1.02—1.06之间。当温度升高至60℃,信号强度可增为1.50。

实验中先研究了色氨酸(Trp),水溶液与

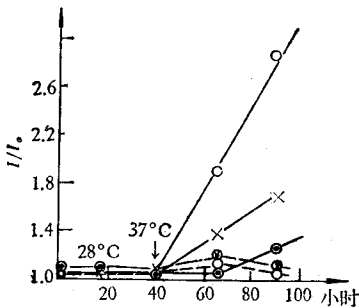


图2 色氨酸(Trp)水溶液和甘氨酸水溶液与油酸组成的双相界面上的化学发光

- · · · · : 0.1% Trp + 油酸
- ×-×-×: 0.05% Trp + 油酸
- : 0.01 Trp + 油酸
- : 5%甘氨酸 + 油酸
- ⊗-⊗-⊗: 水加油酸

纵轴 I/I_0 : I ——样品计数率 I_0 ——暗噪声计数率

油酸组成的双相界面上的化学发光。结果见图2。室温时(28℃)化学发光很少增加。温度升高至37℃时,随着保温时间延长,其发光强度增加很明显。例如0.1% Trp水溶液,在37℃时培养两昼夜后,信号强度可达2.8。这种增强效应与Trp浓度成正比。图上还给出了0.05%和0.01%两种浓度的色氨酸的实验结果。此图上还给出了另一种非芳香氨基酸甘氨酸的实验结果作为对照。当它以高至5%的浓度与油酸作用时,增强效应仍很微弱。水对油酸的化学发光无增强效应(图2)。

其次,我们研究了5% BSA水溶液与油酸组成的界面体系上的发光。室温时其发光强度与油酸无多大差别。而在37℃环境中培养约10小时后,信号强度可增至为1.6。在同样条件下,油酸的化学发光未见明显的增长(图3)。

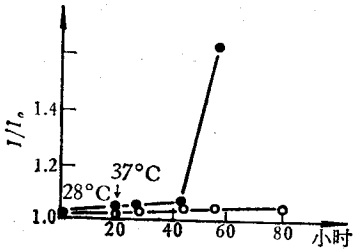


图3 ●—●—● 5% BSA水溶液与油酸组成双相界面时的化学发光, ○—○—○为油酸化学发光

图4是对乳化体系测得的结果。可以看出,BSA与油酸或Trp与油酸组成的乳状液,均有很强的发光,尤其是当Trp与油酸混合后进行超声的处理,发光强度有惊人的增长。

为了进一步了解增强效应的本质,分析了发光光谱。由于发光强度很低,不能用一般单色进行光谱分析。所以在可见区波段内,选用10种不同波长的干涉滤色片测定其光谱。另外,采用0.1% Trp水溶液与油酸组成的界面体系,在37℃培养数昼夜,发光强度达到5.1后的样品进行实验,以便获得更为精确的结果。测得的表观值依据滤色片透光率和光电倍增管光谱灵敏度参数进行了校正。见图5。在同一图上也给出了用同样方法在温度升为60℃时,

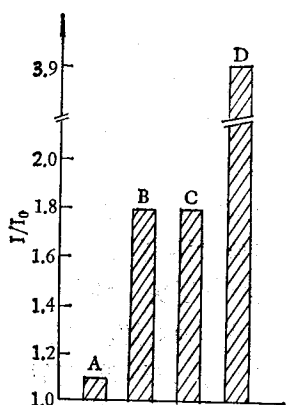


图4 蛋白水相液与油酸形成的乳化体系内超微弱发光

A、B、C 为油酸与水经超声作用形成乳化液后，加 BSA 溶液 (B)，加 Trp 溶液 (C) 和纯乳化油酸 (A) 半小时后的发光。D 为油酸与 Trp 溶液混合后，经超声作用，形成乳化液半小时后发光，37℃，BSA:1 微克/毫升，Trp: 0.025%，pH6.8 磷酸缓冲液，超声功率~3 瓦/厘米²。

所测得的油酸化学发光光谱。从图 5 可以看出，增强的化学发光光谱与油酸光谱基本相似，除了强度上有明显差别外，峰值位置无明显改变。

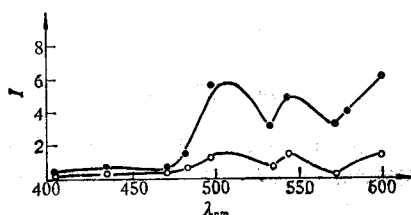


图5 用干涉滤色片测得的化学发光光谱

—·—·— 0.1% Trp 水溶液与油酸组成双相界面在 37℃ 时，培养三天后测定，○—○—○ 在温度为 60℃ 时的油酸发光光谱，测得数据经过了光电倍增管波长敏感系数和滤色片透光率的校正。

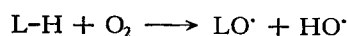
讨 论

在我们所研究的体系内，能提供高能化学产物的唯一反应是脂的自身锁链氧化反应，其次增强效应与温度的关系也是与油酸的氧化反应一致的。因此脂氧化形成的过氧化自由基是使界面上化学发光增强效应的主要因子。其次，界面上的增强效应，必然与界面膜上的某种作用有关。在乳化体系内，由于表面膜的增加，以及超声作用加速了过氧化自由基的形成，从

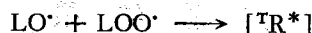
而使发光强度明显增长。此外，增强的发光光谱与油酸发光光谱一致，说明两种情况下的发光体是同一个，它必然是在油酸的氧化过程中产生的。增强效应与色氨酸浓度成正比，说明由于色氨酸极其灵敏的光学活性，即它的电子激发态与油酸氧化产物间的相互作用，将使发光增强。

关于不饱和脂肪酸的氧化产物与蛋白分子间的相互作用，近年来有不少报道。例如其氧化产物中的一种丙二醛与甘氨酸^[5]、核糖核酸酶^[6]以及血清蛋白^[7-8]等均具有很强的作用，并能对蛋白结构产生严重的伤害效应，因为这些氧化产物与蛋白作用时生成一种具有共轭结构的荧光产物——西佛碱 (Schiff base)^[5,8]。

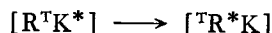
在脂和蛋白的界面体系内所发生的过程，大体可描述如下。先是由脂的锁链氧化，形成过氧化物自由基：



过氧化自由基的复活能形成处于三重激发态的氧化产物^[2]。



在无蛋白时， $[^3R^*]$ 在回至基态时释放出光子，不过效率很低。当它们与色氨酸 (T) 同处于一个体系中时，二者将形成化学键，处于结合体中。 $[^3R^*]$ 将使色氨酸氧化，使其产生原发自由基，再经过继发反应将产生处于三重态的激发产物 $[^3K^*]$ (如犬尿酸类)^[9]。在纯蛋白体系中 $[^3K^*]$ 是光致化学发光的发光体。但在结合体内，将产生自蛋白产物三重态至油酸氧化物三重态间的能量转移：



$[^3R^*]$ 在回至基态时释放出光子。此时的发光体与纯油酸氧化发光体是一致的。上述三重态—三重态间的能量转移问题已有多人阐明^[10-11]。在我们所研究的体系内，这种转移所要求的条件是能够满足的。

参 考 文 献

- [1] Arthur, I.W. Streler, B.: *A.B.B.*, 70, 507, 1957.

- [2] “Сверхслабое Свечение в биологии”, Москва, 1972.
- [3] 贝歇尔著 (北京大学胶体化学教研室译): 《乳状液理论与实践》, 1978 年。
- [4] 翁渝民等: 《复旦学报》(自然科学版), 1979 年, 第 2 期。
- [5] Chio, K. Tappel, A.: *Biochemistry*, 8, 7, 2821, 1969.
- [6] Chio, K. Tappel, A.: *Biochemistry*, 8, 7, 2827, 1969.
- [7] Pryor, W.: *Fed. Proc.*, 32, 8, 1862, 1973.
- [8] Tappel, A.: *Fed. Proc.*, 32, 8, 1870, 1973.
- [9] Nafidan, D. Sapezhinskii, I.: *Biophysics*, 22, 4, 591, 1977.
- [10] Gally, W. Stryer, L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 60, 1, 108, 1968.
- [11] Stryer, L.: *Science*, 162, 3853, 526, 1968.

[本文于 1980 年 2 月 22 日收到]

理化因子对发光细菌发光强度的影响

杨颐康 叶履平 胡天喜

(上海师范大学)

外界环境对细菌的影响可在细菌的生长和繁殖中反映出来。一般以菌数的变化或细菌的生长死亡作为指标, 这往往需要经过几个小时甚至几十个小时才能看出结果; 而外界环境对某一代谢过程的影响则有可能较快地测知。发光细菌的发光是细菌呼吸链上的侧支的作用, 是一种光呼吸的过程^[1], 其发光强度同样受外界环境(例如 pH 值、氧的浓度、温度、金属离子及各种有毒物质等)的影响。

我们利用闪烁计数器, 对此作了初步的探测。

一、材料与方法

菌种: 磷光发光杆菌 (*photobacterium phosphoreum*)^[2]。培养基: 甘油磷酸钙培养基, (甘油 1.0%, 牛肉膏 1.0%, 蛋白胨 2.0%, NaCl 3.0%, CaCO₃ 0.5%, pH 6.9)。菌液制备: 将菌种培养在上述固体斜面培养基上, 20°C 培养 24 小时。用 3% NaCl 溶液洗下斜面上的菌体, 制成细菌溶液。然后再用 3% NaCl 溶液稀释成所需要的浓度。取稀释的菌液 1.8 毫升, 加 0.2 毫升 3% NaCl, 铺于测量盘上作为对照。试验组则取 1.8 毫升菌液分别加入不同浓度的毒液 0.2 毫升铺样。紫外线照射的样品各组皆为 2 毫升菌液。在铺样后或铺样再经紫外线照射后的不同时间测量发光细菌的发光强度。发光强度以脉冲/分 (cpm) 或光强百分跌落表示之。

闪烁计数器: GP-1 型单道 γ 能谱仪的高压电源和定标器(上海电子仪器厂产品), 甄别阈取 1.0, 电压 900 伏, 移去闪烁晶体, 让光电倍增管的阴极面直接面对样品, 即可进行测量。

二、结 果

1. 紫外线对发光细菌发光强度的影响 波长为

2362 Å, 15 瓦的紫外灯, 与照射样品相距 21 厘米。样品分别以不同剂量照射, 并在照后不同时间测细菌的发光强度。

表 1 较低的 UV 剂量对发光细菌发光强度的影响

UV 照射的时间(分)	照后不同时间的光强跌落(%)				
	0 小时	1.0 小时	2.5 小时	5.0 小时	8.0 小时
0.5	100	108.44	128.95	66.40	0.56
1.0	100	85.98	74.80	0.17	0.01
2.0	100	67.40	32.97	0.09	0.00
4.0	100	60.52	27.24	0.01	0.00
6.0	100	50.16	28.01	0.01	0.00

表 2 较高剂量的 UV 对发光细菌发光强度的影响

UV 照射的时间(分)	照后不同时间的光强跌落 (%)			
	0 分	10 分	30 分	2.5 小时
10	100	41.38	65.92	0.43
15	100	21.17	38.60	0.35
20	100	4.74	33.05	0.15
25	100	1.18	0.78	0.02
30	100	0.40	0.13	0.00

由表 1 和表 2 可见, UV 照射后, 细菌保持发光能力的时间与照射时间(剂量)之间呈反相关关系, 即剂量越大, 保持发光的时间越短, 反之则越长。表 2 还可看到, 分别经紫外线照射 10、15、20 分钟的样品, 在照后 30 分钟, 光强跌落反而比照后 10 分钟少。这可能与