

电势差。Gantt et al.^[15a,18] 还提出过红藻藻胆蛋白体的模型,示意几种藻蛋白环绕类囊体膜的情形。

我们从多管藻中提出的藻红素是水溶性的色素蛋白复合体,吸收峰在 566 nm, 539 nm, 495 nm 正好弥补了叶绿素不能吸收绿光之不足。在实验中也确实观察到在以氙灯为光源的模拟太阳光的照射下,在 Chl-BLM 体系中膜的一侧加入 R-藻红蛋白、R-藻红蛋白则吸附于 Chl-BLM 的表面(界面),在照光时,也起到采集光能并有效地传给叶绿素的作用。实际上即观察到 Chl-BLM 在有 R-藻红蛋白存在下,跨膜光生电动势的增涨。

对卟啉类染料,吸收光均在短波区(近紫),存在 R-藻红蛋白时也同样影响染料膜的光电势,只是加入在膜的还原侧或氧化侧不同时,电流方向有所改变,使光生电动势有所增涨或因相互抵消而有所减弱。这也说明色素蛋白参与光效应电子传递是有方向性的,这与色素的结构和与色素相结合的蛋白质的性质均有关,还有待进一步研究。

本工作得到田心棣教授的指导特此致谢。

参 考 文 献

[1] 上海植物生理研究所,北京植物研究所编著《光合作用

研究进展》科学出版社 1976 年。

- [2] 匡廷云等:《化学通报》1978 年,第 6 期,第 321 页。
- [3] Richard, P. F. Gregory.: *Biochemistry of Photosynthesis*, 2nd. Ed., 1977.
- [4] Tien, H. T.: *Brookhaven Symp. in Biology*, **28**, 105, 1977.
- [5] 梅镇安:《化学通报》1979 年,第 3 期,第 197 页。
- [6] Mueller, P. et al.: *Nature*, **194**, 979, 1962.
- [7] Strauss, G. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **17**, 425, 1973.
- [8] Calvin, M.: *Photochem. Photobiol.*, **23**, 424, 1976.
- [9] Cherry, R. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **40**, 19, 1969.
- [10] Tien, H. T.: *Bilayer Lipid Membranes (BLM) Theory and Practice*, Marcel Dekker Inc. New York, p 483, p 546, 1974.
- [11] 马金石等:《科学通报》1981 年,第 4 期,第 240 页。
- [12] 魏美德等:《太阳能学报》,1981 年,第 2 期,第 146 页。
- [13] Berns, D. S.: *Photochem. Photobiol.*, **24**, 117, 1976.
- [14] Lope, J. R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **597**, 433, 1980.
- [15] *Topics in Photosynthesis*, **3**, edited by J. Barber 1979, (a) Chapter 2, p. 45; (b) Chapter 4, p. 115,
- [16] Ilani, A. et al.: *J. Membrane Biol.*, **8**, 333, 1972.
- [17] Chang-Hwei Chen et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 3407, 1975.
- [18] Gantt, E. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **430**, 375, 1976.

[本文于 1980 年 12 月 2 日收到]

支原体膜蛋白的溶解及酶活性的研究

陈建文 蒋以文 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

生物膜主要由蛋白质和类脂组成。蛋白质和类脂在不同的支原体膜上比例各异。如莱氏衣原体膜上蛋白质为 57%,类脂为 32%。鸡败血症支原体膜上蛋白质占 80%,类脂占 19%。蛋白质(包括酶)在膜上起着重要作用。膜蛋白分为外周蛋白与内部蛋白。一般外周蛋白用中等强度缓冲液或 EDTA 可将它们全部或部分抽提下来。而内部蛋白在膜上与磷脂主要以疏

水相互作用,用去污剂或有机溶剂处理才能将膜蛋白溶解下来,但这样常使膜蛋白变性导致酶的失活。

有效地将膜蛋白溶解下来,而又不改变它的性质是研究膜蛋白的结构与功能,探讨膜蛋白与类脂相互作用的关键的一步。在莱氏衣原体膜上蛋白质大约 85—90% 是疏水蛋白。1971 年以来 Kazin^[1] 等曾用各种去污剂溶解莱氏衣

原体膜蛋白,探讨其对膜蛋白的溶解及对酶活性的影响。Hjerten^[2]等曾用非离子去污剂溶解莱氏衣原体及螺旋支原体膜蛋白,取得一定成效。关于鸡败血症支原体膜蛋白的溶解尚未见正式报道。本文对鸡败血症支原体 S_6 菌株提取的膜用 SDS (十二烷基磺酸钠) DOC (去氧胆酸钠) 和 TritonX-100 三种不同性质的去污剂分别进行溶解,并观察膜溶解过程中对 ATPase (腺三磷酸酶) 和 P-NPPase (对硝基苯酚磷酸酯酶) 活性的影响。

一、材料和方法

1. 菌株 鸡败血症支原体 S_6 菌株 (由农业部兽医药品监察所提供)。

2. 培养条件和膜的制备 除用重蒸水代替 1:20 β -缓冲液低渗破膜外,其它步骤参照前文^[3],最后膜悬浮在 1:20 β -缓冲液中, (β -buffer 0.05M Tris-HCl pH7.4, 0.15MNaCl, 0.01M β -巯基乙醇),使其蛋白浓度为 4 毫克/毫升,于 4℃ 冰箱保存备用。

3. 用去污剂溶解膜 本实验用 SDS、DOC 和 TritonX-100 三种去污剂(浓度为 0.5 毫克/毫升—16 毫克/毫升)和膜的悬浮液(最终浓度为 2 毫克/毫升)在 37℃ 水浴中保温 30 分钟(以下称之为反应液),留样测定浊度、蛋白浓度和酶活性,其余部分在 MSE-75 超速离心机 100,000×g 离心 1 小时,取上清液待用。

4. 蛋白浓度和浊度的测定 蛋白浓度按 Lowry 法测定,用牛血清白蛋白作标准,上清液中蛋白质含量用百分比表示即

$$\frac{\text{上清液蛋白质含量}}{\text{反应液蛋白质含量}} \times 100\%。$$

浊度是以水作对照,在 72 型分光光度计上测定 500nm 光吸收。

5. 酶活性的测定 P-NPPase 的活性测定根据 Ne'eman^[4] 方法,反应最终体积 1 毫升,其中含有 Tris-HCl 缓冲液 100 μ m pH 7.6, $MgCl_2$ 5 μ m 和对硝基苯酚磷酸二钠盐 10 μ m。当加入 50 微升膜反应液(或上清液)时为酶反应开始,反应混合液于 37℃ 保温 30 分钟,加入 2 毫升

冰冷的 5% 三氯醋酸的 Tris 溶液 (pH 7.6) 中止反应,蛋白的沉淀用离心除去,酶反应释放出的黄色对-硝基酚在 420 nm 处测定其光吸收, P-NPPase 的活性用每分钟、每毫克蛋白释放出的对-硝基酚的微克分子数表示。

ATPase 的活性测定主要根据 Pollack 等^[4]方法,反应液最终体积为 1 毫升,其中含有 $MgCl_2$ 1.25 μ m, NaCl 1.10 μ m Tris-HCl 缓冲液 50 μ m pH 8.0 和 β -巯基乙醇 0.6 μ m, ATP 1.25 μ m, 当加入 25 微升膜反应液或上清液即为反应开始,于 37℃ 反应 5 分钟,加入 1 毫升 10% 三氯醋酸中止反应,离心除去蛋白沉淀,释放的无机磷用抗坏血酸法测定, ATPase 的活性用每 30 分钟每毫克蛋白释放出的无机磷的微克分子数表示。

二、实验结果

1. 去污剂溶解膜蛋白的过程 我们比较了不同的去污剂溶解膜蛋白的有效程度。分别用浊度和上清液中可溶性蛋白的含量来表示,在膜悬浮液中加入相同含量不同性质的去污剂,浊度都有明显的下降,其中以 SDS 最甚, DOC 居中, TritonX-100 最差,从图 1 示出浊度的下降可以分为两个阶段,在去污剂浓度低于 2 毫克/毫升,浊度急剧下降,高于 2 毫克/毫升,浊度变化就较缓慢。

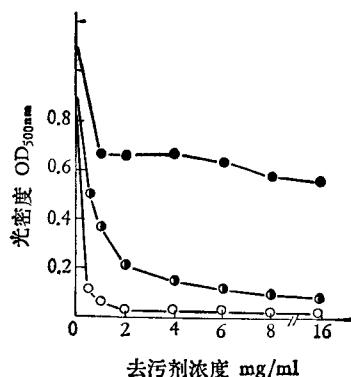


图 1 不同去污剂溶解膜蛋白浊度下降图

○—○ SDS ○—○ DOC ●—● TritonX-100

从图 2 可见,在同一浓度下,在 SDS 处理的上清液中蛋白含量最高, DOC 次之, TritonX-

100 最少, SDS 几乎可以溶解 100% 的膜蛋白, 这时的浊度也接近为零, 而 DOC 和 TritonX-100 的浓度即使高达 16 毫克/毫升, 上清液的蛋白浓度也只能分别为总蛋白的 68% 和 44% 左右, 如果去污剂从 2 毫克/毫升处划一界线, 同样可以看到左半图蛋白质含量急剧增加和右半图变化缓慢的两个部分。

2. 去污剂对酶活性的影响 鸡败血症支原体 S_o 株膜上含有 ATPase 和 P-NPPase 活性, 用各种去污剂的不同浓度溶解膜蛋白以后, 分别测定反应液和上清液部分的 ATPase 和 P-NPPase 活性。

图 3 示出, 即使在 SDS 1 毫克/毫升浓度下, ATPase 活性立即失去 90% 以上, 在上清液部分几乎测不出此酶活性, 非离子去污剂 TritonX-

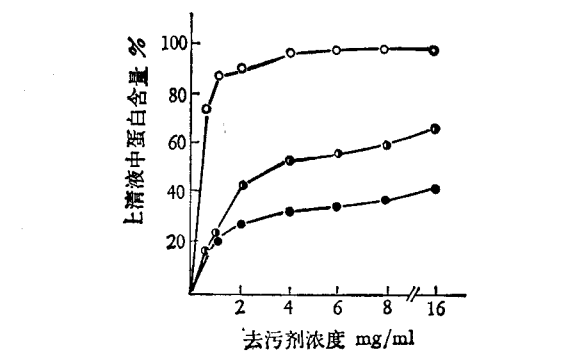


图 2 膜悬浮液经去污剂处理, 于 $100,000 \times g$ 离心 1 小时后上清液中蛋白质含量
○—○ SDS ●—● DOC ●—● TritonX-100

100 对 ATPase 的活性影响不大, 上清液部分的酶活性随去污剂浓度的增加而略有升高, 当 TritonX-100 浓度达 16 毫克/毫升时, 可溶性部

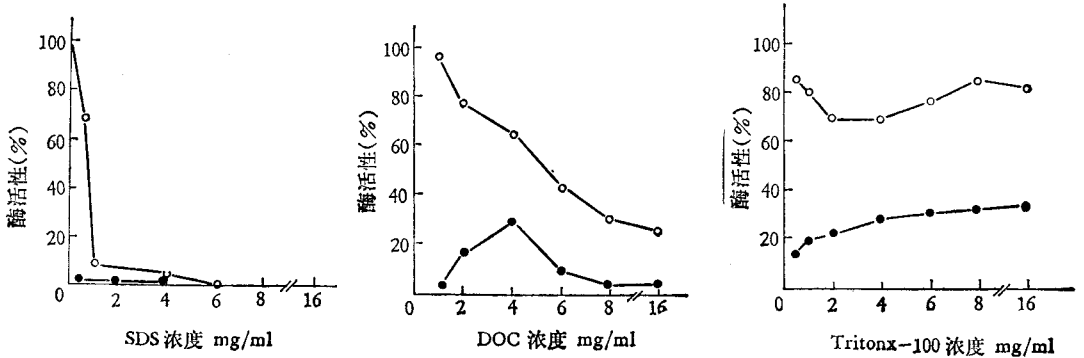


图 3 不同去污剂对 ATPase 活性的影响
○—○ 反应液 ●—● 上清液

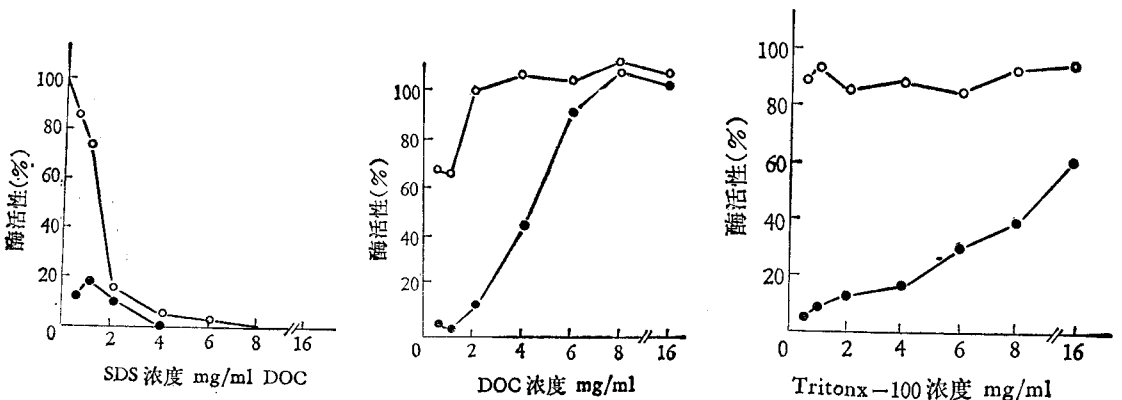


图 4 不同去污剂对 P-NPPase 活性的影响
○—○ 反应液 ●—● 上清液

分的 ATPase 活性为 40% 左右,用 DOC 溶解膜蛋白,高浓度的 DOC 会导致酶的失活,但是选用适当的浓度,可以在上清液部分测出一定量的酶活性。P-NPPase 显然比 ATPase 稳定,但较低浓度的 SDS 作用后仍然失活,DOC 和 TritonX-100 几乎不影响 P-NPPase 的活性,上清液部分的酶量随 DOC 的浓度而增加,当浓度为 6 毫克/毫升时可以回收 90% 以上的酶活性,而 TritonX-100 浓度为 16 毫克/毫升时也可得 60% 以上的酶活性。

三、讨 论

有关去污剂溶解膜的机制已有报道,Simons 等^[5]人认为:去污剂溶解膜的过程是逐步进行的,随着去污剂浓度的增加而最后导致膜的溶解,并分别形成蛋白质-去污剂和脂-去污剂复合微团。我们用强离子去污剂 SDS 能完全溶解支原体膜,但非离子去污剂 TritonX-100 以及阴离子去污剂 DOC 只能部分溶解。这可能是由于去污剂以单体形式嵌入到膜双层中去以后^[6],随去污剂浓度的增加只有一部分膜能解离成蛋白-脂-去污剂,蛋白-去污剂或脂-去污剂的复合微团,完成这过程的去污剂浓度,对鸡败血症支原体来说,大约在每毫升 2 毫克左右,即每毫克蛋白结合 1 毫克去污剂,这就是浊度急剧下降(图 1)和上清液中蛋白质浓度迅速上升的一段(图 2)。在到达一定浓度以后(2 毫克/毫升)再增加去污剂的浓度,上清液中蛋白质含量和浊度虽有变化,但都较缓慢^[7]。如果不考虑蛋白变性和酶失活的因素,就溶解膜的效果来说,SDS > DOC > TritonX-100。

用 EDTA 处理 *A. laidlawii* 膜,虽然能释放 11% 的总蛋白^[5],但并不含有 P-NPPase 和 ATPase 的活性,因此注意力集中到了去污剂,强离子去污剂比非离子去污剂就溶解膜蛋白的效果来说更为有效,但即使用低浓度的 SDS 也会导致酶的失活,这可能有三种原因:一是由于 Mg^{2+} -ATPase 的活性依赖于酸性磷脂^[8],而 SDS 在溶解膜的时候会引引起蛋白和脂的分离。二是相当量的 SDS 会和蛋白质结合,导致肽链的伸

展,破坏了酶分子的构象。三是如果一个酶分子是由数个亚基组成,那末 SDS 很容易打断亚基之间的次级键而引起酶分子的解体,导致酶的失活。DOC 广泛运用在线粒体和其它膜的分离上,但实验指出支原体膜 ATPase 的活性同样受 DOC 浓度的影响,在可溶性部分仍难以得到足够的酶量。P-NPPase 显然比 ATPase 稳定,它具有抗 DOC 的能力,在上清液中可以获得全部的活性,去污剂的少量激活现象可能是酶活性中心充分暴露的结果,也可能是去污剂本身和酶结合以后更加满足酶活性的要求。非离子去污剂 TritonX-100 溶解膜蛋白的效果较差,上清液部分只能测出少量的 ATPase 活性,但能测出 60% 以上的 P-NPPase 活性,以上结果可能暗示这两个酶在膜上有不同的位置或它们与膜结合的程度有所不同。Ne'emen 等^[9]人认为莱氏衣原体的 ATPase 和 P-NPPase 定位在膜的内表面,Munkres^[10]用组织化学方法证实,鸡败血症支原体 ATPase 定位在小疱部(bleb)。我们的实验虽不能指出鸡支原体 ATPase 和 P-NPPase 的具体定位,但根据 ATPase 依赖于脂和很难从膜上溶解下来的性质,估计它较紧密地和膜结合或较深地埋在膜内的疏水区,而 P-NPPase 较之 ATPase 与膜结合得比较松散。

综上所述,我们认为三种去污剂对膜的溶解作用以及对 ATPase、P-NPPase 活性的影响,以 DOC 较为适宜,尤其对 P-NPPase 最为合适,DOC 既能溶解出相当量的膜蛋白而仍保持一定酶活性。Ne'emen 等也曾用不同性质去污剂溶解莱氏衣原体膜并用凝胶过滤与免疫法研究膜蛋白性质,结果认为以 DOC 效果最适宜,Wroblewski 等用交叉免疫电泳研究莱氏衣原体膜和螺旋支原体膜上的蛋白。他们比较了 SDS、DOC、TritonX-100 以及 Tween 20 等去污剂,结果发现 DOC 虽然为阴离子去污剂,但对膜蛋白仅发生轻微变性或不发生变性,对莱氏衣原体膜上还原菸酰胺二核苷酸脱氢酶仍能保持酶活性,而 SDS 却导致该酶完全失活,因而选用 DOC 来溶解膜蛋白是比较适宜的。

参 考 文 献

- [1] Ne'emon, Z., et al.: *Biochem. Biophys. Acta* **249**, 169, 1971.
 [2] Wroblewski, H. KE, et al.: *Biochim Biophys Acta* **465**, 275, 1977.
 [3] 黄芬、王苏民等: 实验生物学报, 待发表。
 [4] Pollack, J. D., et al.: *J. Bacteriol.* **90**, 617, 1965.
 [5] Simons, K. A. et al.: *J. Mol. Biol.* **80**, 119, 1973.

- [6] Helenius, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **415**, 29, 1975.
 [7] Smith, P. F. et al.: *J. Bacteriol.* **100**, 1166, 1969.
 [8] Bevers, E. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **467**, 346, 1977.
 [9] Ne'eman, Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 54, 1975.
 [10] Munkres, M. et al.: *J. Bacteriol.* **93**, 1096, 1967.

[本文于 1980 年 11 月 27 日收到]

空间选通滤波对深度知觉的影响

姚 国 正

(中国科学院生物物理研究所五室)

资料表明: 深度知觉的主要信息来源是双眼视差^[1]。人的视觉系统中存在着空间谐波分解。视觉通路是多道的, 每个通道互相独立, 它们在功能上服从线性迭加原理^[2,3]。而双眼视差和空间频谱之间则是有联系的^[4]。

我们在用空间滤波方法分析立体图对的各种频率成份对深度知觉所起的作用及形成深度知觉的空间频率条件时曾指出^[5]: 双眼视差信息分布在各个频段上, 看来每个频率分量都包含着视差信息。既然如此, 那么是不是任意的一些频率分量的组合, 例如能量大的一些频率分量的组合, 也能产生深度知觉呢? 初步推测: 似乎能量大的频率分量对视差的贡献也大, 对产生深度知觉有利。但是事实是否如此? 再者, 经过滤波处理会产生许多变化, 得到的图形与原始的图形不尽相同, 这些变化对立体感有无影响?

本文用空间选通滤波方法对上述问题作了分析, 试图说明那些能量大的空间频率分量的组合能不能形成深度知觉; 同时探讨心理学因素对深度知觉的影响。

一、方法与结果

我们所采用的方法与以前一样^[5], 即: 在数字计算机上把圆锥体的一条母线 $x = 20z$ 的立体图对(母线长 200, 质地是规则的, 每 9 个

白点接 1 个黑点, 见图 1)分别进行离散的傅里叶变换, 得出其相应的空间频谱(周期取 250, 见图 2。在立体图对上 200 至 250 为空白区)。采用四个空间选通滤波器, 从立体图对的空间频谱中分别选出振幅大于振幅频谱最大值 10%、30%、50% 和 57% 的频率分量。对选通后的频谱作反傅里叶变换, 得到两张亮度分布图, 据此制成处理后的立体图对(图 3)。选通

表 1 选通滤波数据

图对号	选通幅度	选通频率分量百分数	视差点亮度	背景亮度	相对对比度	空白区亮度
1	>10%	48%	0.96	0.037	2500%	0.044
2	>30%	10%	0.76	0.053	1370%	0.088
3	>50%	6.8%	0.69	0.077	796%	0.116
4	>57%	4%	0.54	0.083	550%	0.132

注: 亮度均取平均值; 相对对比度

$$= \frac{\text{视差点亮度} - \text{背景亮度}}{\text{背景亮度}} \times 100\%$$

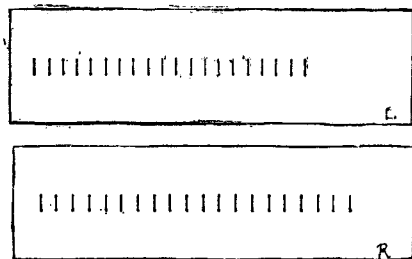


图 1 圆锥体母线 $x = 20z$ 的立体图对
 L——在左眼的投影, R——在右眼的投影