

表 2。

表 2 说明, (1) E F. 本身对羊红细胞电泳有直接致缓作用, 致缓率达 20.8%。(2) 淋巴细胞与 E F. 温培后, 降低了 E F. 对羊红细胞的致缓作用。(3) 正常人及癌病人的淋巴细胞对 E F. 的这种作用有着明显的差别。癌病人的淋巴细胞作用小于正常人的淋巴细胞的作用。与癌病人的淋巴细胞温培后的 E F., 再与羊红细胞温培, 羊红细胞的电泳迁移率的致缓率为 13.12%, 而与正常人的淋巴细胞温培后的 E F., 再与羊红细胞温培, 羊红细胞电泳迁移率的致缓率为 1.81%。二者有显著差异。

参 考 文 献

- [1] Field, E. J., & Caspary, E. A.: *Lancet*, ii, 1337, 1970.
- [2] Hans Ludwig Jenssen: *JENA REVIEW*, 6, 274, 1978.
- [3] 上海第一医学院: 《细胞电泳》, 1977 年。
- [4] Dickson, J. P., Caspary, E. A., & Field, E. J.: *Br. J. Cancer*, 27, 99, 1973.
- [5] Caspary, E. A., & Field, E. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 122, 182, 1965.
- [6] Pritchard, J. A. V., et al.: *Br. J. Cancer*, 27, 1, 1973.
- [7] Dyson, J. E. D., and Corbett, P. J.: *Br. J. Cancer*, 38, 401, 1978.
- [8] Becht, H.: *J. Immunol.*, 101(1), 18, 1968.

[本文于 1981 年 8 月 26 日收到]

血红蛋白构象的毫微秒荧光研究

连少辉 阮康成 江寿平 王 晶*

(中国科学院上海生物化学研究所)

利用毫微秒荧光技术研究生物大分子的构象^[1], 在我国是一个有待发展的领域。最近我们用自己研制的 BIAS-100 型毫微秒脉冲荧光计^[2], 通过测定荧光探针 1.8ANS 和脱辅基血红蛋白复合物 (ANS-Apohemoglobin) 的荧光寿命来研究牛血红蛋白分子中血红素结合区域的构象, 以及溶液的 pH、脲对该区域构象的影响, 取得了一些结果。现介绍如下。

一、材料和方法

牛高铁血红蛋白、氯高铁血红素是中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂产品, 1.8ANS 是 Serva 公司产品经重结晶, 其它试剂均为国产分析纯级, 无离子水为重蒸水。

1. 脱辅基血红蛋白是用 Famelli^[3] 的酸性丙酮方法由结晶牛高铁血红蛋白制备得到, 浓度为 $5 \times 10^{-4} M$ (以牛血清蛋白为标准, 用 751 分光光度计在 280nm 处测其光密度, 经计算求得)。

2. 脱辅基血红蛋白和血红素的结合是采用 Famelli^[3] 方法。

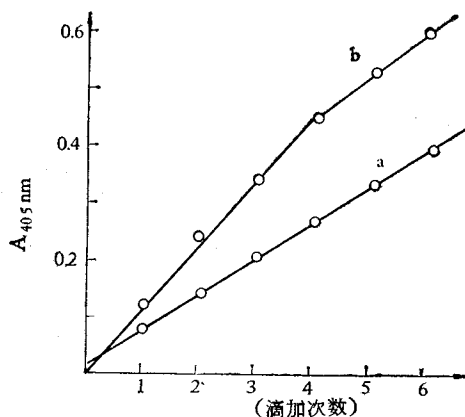


图 1 脱辅基血红蛋白与血红素的结合

(1) 在 pH7.0、0.1M 磷酸缓冲液 2.7ml 中逐次加入 $1 \times 10^{-4} M$ 的氯高铁血红素溶液 100 μ l, 在 405nm 处测其吸收值(图 1 曲线 a)。

(2) 在 2.7ml $1 \times 10^{-5} M$ 脱辅基血红蛋白的 pH7.0、0.1M 磷酸缓冲液中逐次加入 $1 \times 10^{-4} M$ 氯高铁血红素 100 μ l, 在 405nm 处测其吸收值(图 1 曲线 b)。

* 在南京肉联厂工作。

3. 1.8ANS 和脱辅基血红蛋白的结合,参照 Weber^[4] 的方法在 pH7, 0.1M 磷酸缓冲液中进行。脱辅基血红蛋白的浓度为 $5 \times 10^{-4}M$, 1.8ANS (1.8ANS-Mg, 分子量 = 322) 的浓度为 $2.2 \times 10^{-3}M$ 。结合后溶液呈现很强的荧光。

4. 氯高铁血红素对 ANS-脱辅基血红蛋白中 ANS 的置换。在 2.5ml ANS-脱辅基血红蛋白溶液中 (浓度为 $1 \times 10^{-5}M$) 逐次加入 $6 \times 10^{-4}M$ 氯高铁血红素溶液 10μ , 用 Hitach 204 型荧光分光光度计观察荧光强度变化 (图 2)。荧光波长为 465nm, 激发波长为 320nm。

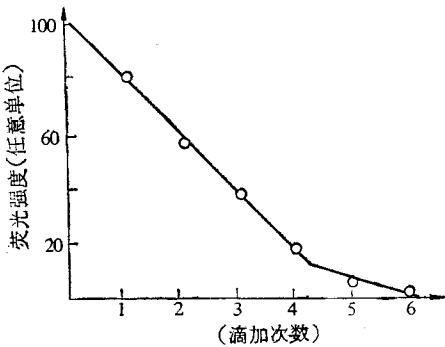


图 2 氯高铁血红素对 ANS-脱辅基血红蛋白中 ANS 的置换

二、荧光寿命的测定

测定 ANS-脱辅基血红蛋白 (在 pH 为 7, 0.1M 磷酸缓冲液、pH 为 4, 0.1M 磷酸-柠檬酸缓冲液、和 pH 为 10, 0.1M 硼酸-NaOH 缓冲液以及在 1、2、3M 脲溶液中的) 的荧光寿命, 仪器用 BIAS-100 型毫微秒脉冲荧光计^[2]。

测定时, ANS-脱辅基血红蛋白的浓度为 $1 \times 10^{-5}M$ 。荧光衰减曲线见图 3 至图 8, 图中的窄脉冲均是 BIAS-100 型毫微秒脉冲荧光计

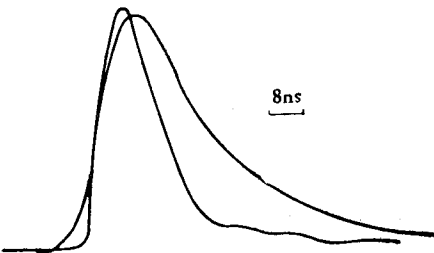


图 3 ANS-脱辅基血红蛋白在 pH7 0.1M 磷酸缓冲液中的荧光寿命 $\tau = 21.8ns$

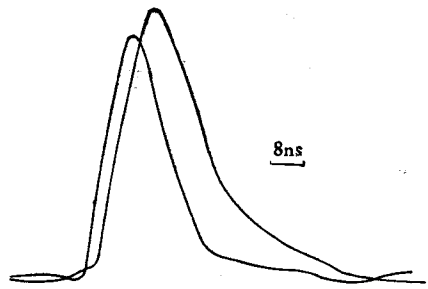


图 4 ANS-脱辅基血红蛋白在 pH4 时的荧光衰减 $\tau = 13.9ns$

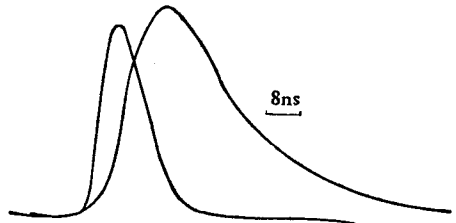


图 5 ANS-脱辅基血红蛋白 pH10 时的荧光衰减 $\tau = 22.6ns$

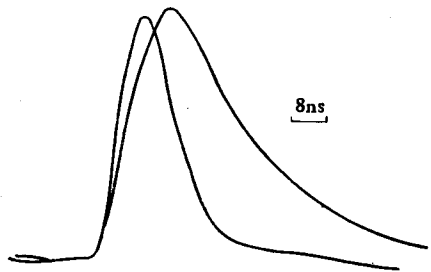


图 6 ANS-脱辅基血红蛋白在 1M 尿素中的荧光衰减 $\tau = 23.5ns$

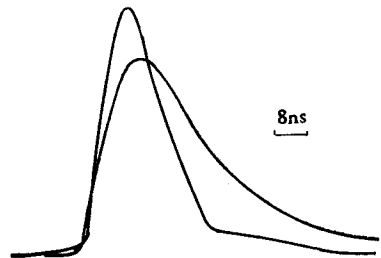


图 7 ANS-脱辅基血红蛋白在 2M 尿素中的荧光衰减 $\tau = 20.8ns$

中激励光脉冲, 宽脉冲是荧光衰减曲线。

荧光寿命的计算系根据荧光寿命的定义求出, 即求出荧光强度降到激发时最大荧光强度的 $1/e$ 时所需要的时间 τ 。由于激发光脉冲本身也有一定的衰减时间, 用 $\tau_{光}$ 表示, 因此由毫

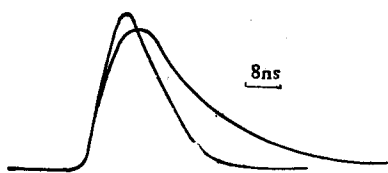


图8 ANS-脱辅基血红蛋白在3M 尿素中的荧光衰减
 $\tau = 16\text{ns}$

微秒脉冲荧光计测得的样品荧光衰减曲线求出的 τ 实际是光脉冲衰减和样品荧光衰减的总和用 τ_1 表示,根据矩方法^[1],可由下式求出样品的荧光寿命 τ : $\tau^2 = \tau_1^2 - \tau_{\text{光}}^2$

三、结 果

用 Famelli 方法制得的脱辅基血红蛋白具有和血红素结合的能力,因此可以证实它是有活性的,并具有血红蛋白的构象特征。

ANS 和脱辅基血红蛋白在各自独立存在的情况下,荧光非常微弱,但按 Famelli 方法混合后,即呈现强烈荧光。另外,ANS-脱辅基血红蛋白复合物中 ANS 的结合位置可以认为就是血红蛋白分子中血红素的结合位置。这可以从在 ANS-脱辅基血红蛋白溶液中滴加氯高铁血红素,荧光逐渐减弱,以至消失的现象得到证实。另外,在血红蛋白溶液中加入 ANS 后荧光不见增强,也说明 ANS 不能和血红蛋白结合,进一步证明 ANS 和脱辅基血红蛋白的结合位和血红素的结合位置是一样的。

1.8ANS 是极性荧光探针,可用来探测它与生物大分子结合部位的极性强弱和疏水性。ANS 的荧光寿命,量子产率依赖于其周围介质的极性(见表1)^[1]。随介质极性的减弱,ANS 荧光寿命增长,量子产率增高,因此 ANS 是探测血红蛋白中血红素结合部位构象特征的理想探针。

表 1

溶剂	水	甲醇	乙醇	丙三醇	二噁烷	丁醇	辛醇
τ (ns)	0.55	6.05	8.85	10.20	11.80	10.90	12.30
ϕ	0.04	0.20	0.36	0.47	0.50	0.51	0.64

ANS-脱辅基牛血红蛋白在 pH7.0, 0.1M 磷酸缓冲液中的荧光寿命长达 21.8ns,可以推知,在血红蛋白分子中,血红素结合部位的疏水性非常强,而极性非常弱,这和至今为止的对血红蛋白分子构象研究的结论是完全一致的^[5]。

脲是蛋白的变性剂,它可以破坏蛋白分子中的氢键、盐键等,使蛋白的分子构象发生变化。加入不同浓度的脲,ANS-脱辅基牛血红蛋白的荧光寿命发生明显变化。2M、3M 脲使荧光寿命明显缩短,说明形成血红素结合区域疏水特性的次级键已受到相当程度的破坏,致使该区域的疏水性明显减弱,极性明显增加。当脲的浓度超过 4M,荧光已经非常微弱,致使在我们的仪器灵敏度的范围内已无法测其荧光寿命。但当脲的浓度为 1M 时,荧光寿命却延长了 2ns,可见低浓度脲是有利于血红素结合区域疏水口袋的形成,使疏水性更强些。

pH 为 4 和 10 时,ANS 的荧光寿命分别为 13.9ns 和 22.6ns,说明溶液的 pH 值对蛋白分子的构象是有相当影响的; pH4 时荧光寿命缩短,说明在此条件下血红蛋白分子中血红素结合区域的疏水性变弱,极性增强。但在 pH10 时荧光寿命反而比在中性介质中延长 1ns,说明此时血红蛋白的分子中血红素结合区域的疏水性更强了。

四、讨 论

从表 1 中可以看出,ANS 的量子产率既随着介质极性减弱而增高,又随着荧光寿命的延长而增高。在 1M 脲中,ANS 的荧光寿命比无脲存在时延长约 2ns,可以推断,此时 ANS 的量子产率应有所增加,但实际上荧光强度比在 pH7, 0.1M 磷酸缓冲液中低 3%。这很可能是脲对 ANS 和脱辅基血红蛋白结合常数有影响,致使 ANS-脱辅基血红蛋白分子数减少,荧光减弱。这个现象正说明了毫微秒荧光技术较传统的稳态荧光方法有更大的优越性。若用稳态荧光方法,测定 1M 脲中的 ANS-脱辅基血红蛋白的正确的量子产率,必须参考结合常数的变化,否则就会得出量子产率降低,血红素结合

区域极性增强、疏水性减弱的错误结论。而ANS和脱辅基血红蛋白结合常数的测定是相当麻烦的。而在毫微秒荧光技术中,荧光寿命与荧光物质分子的多少、荧光标记物的结合常数大小都是无关的,因此就不会产生上述问题。

Stryer 指出^[6] ANS和脱辅基血红蛋白的亲合能力在pH低于5时有明显的减弱。在pH10时,ANS-脱辅基血红蛋白荧光较pH7时,减弱了24%,而荧光寿命却有所延长,量子产率增加,因此我们认为在pH10时ANS-脱辅基血红蛋白的结合力发生很大的变化。

在ANS和脱辅基血红蛋白的结合反应中,ANS是过量的,但我们并没有除去过量的ANS,

这是因为ANS在水中的量子产率仅0.004,荧光寿命仅0.55ns,因此,它对ANS-脱辅基血红蛋白的荧光寿命的影响是完全可以忽略的。

参 考 文 献

- [1] Yuerabid. J.: *Methods in Enzymology*, 26, Part C, 498, 1972.
- [2] 阮康成、江寿平等:《毫微秒脉冲荧光计》《生物化学与生物物理学报》(待发表)。
- [3] Famelli.: *Biochemi. Biophys. Acta*, 30, 608, 1958.
- [4] Weber, G.: *J. B. C.*, 239, 1424, 1964.
- [5] A. 怀特等:《生物化学原理》, (中译本), 科学出版社, 1979年, 第118页。
- [6] Stryer, L.: *J. Mol. Biol.*, 13, 482, 1965.

[本文于1981年8月26日收到]

细胞电泳观察 ADP 对血小板和红细胞表面的作用

施永德 梁子钧 步燕芳 唐镇生 肖保国 吕传真

(上海第一医学院)

血小板是止血和血栓形成的主要成分和激发因素之一^[1]。随着血小板生理功能研究的进展,有关它在心肌梗塞和动脉硬化性脑梗塞等病发作中的作用,已逐步引起注意^[2]。研究血小板功能常用聚集、粘附和比浊等方法^[3],但至今用细胞电泳观察ADP对血小板和红细胞表面的作用,以及观察血小板表面电荷变化对其粘聚行为间的关系的报道甚少。本文报道我们就这个问题所作的探讨。

方 法 和 结 果

1. 血小板和红细胞悬液制备

用硅油化器皿采血,肝素抗凝,300 × g离心10分钟,上清液即含丰富血小板血浆。用自身血浆稀释之,获取含2万个/立方毫米浓度的血小板悬液。为了平行观察红细胞的作用,在其中加入适量红细胞,使其浓度为5000个/立方毫米。

2. ADP 浓度的选择和电泳观察方法

将正常人和脑梗塞病人血小板血浆中,加入ADP(西德Boehringer Mannheim产品)使之最终浓度为0.5, 1, 2, 4, 30, 75和150微克/毫升。作用10分钟测定血小板电泳减缓率。

减缓率 = $\frac{t_{ADP} - t_0}{t_0} \times 100\%$, 式中 t_{ADP} 示ADP

作用下血小板电泳时间, t_0 为无ADP的电泳时间。系采用梁子钧等设计的细胞电泳装置^[5]。为了同时观察血小板和红细胞两者的电泳时,采用两个电子计时器^[6]间隔记时。血小板和红细胞各观察10个,记录它们在静止层上往返33微米所需时间。各种ADP浓度作用10分钟后的电泳减缓率见图1。与正常人比较,脑梗塞病人在较低浓度时就出现减缓。在4—30微克/毫升时,两者有较大区别,故本文采用这一区间的浓度。在高浓度时两者均达最大减缓。

3. ADP 作用时间的选择