

# 紫膜表面电荷数的测量\*

王光毓 胡坤生\*\* 张衡涛

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 以  $CAT_{12}$  为自旋探针, 用 ESR 自旋标记法测量了不同表面 pH 时酰化前后紫膜表面负电荷密度. 以酰化所屏蔽的表面电荷数为标准, 计算了表面 pH4—11 时单位菌紫质紫膜两侧的总负电荷数. 结果表明: 表面 pH5—9 时为 9, 表面  $pH \geq 10$  及表面  $pH < 5$  时增大. 结果有力支持了膜表面 5 个二价阳离子结合位点的模型.

**关键词** 紫膜, 菌紫质, 酰化, ESR, 表面电荷数

紫膜 (PM) 表面有极性磷脂和带电氨基酸而使紫膜表面有很高密度的不对称负电荷, 这种不对称电荷结构模型对紫膜的结构功能有重要意义. 许多实验方法给出了紫膜表面电荷数. R. Jonas 等在综述<sup>[1]</sup>中总结了这一进展. 指出在表面 pH5—9 时, 单位菌紫质 (bR) 的紫膜表面总负电荷数为 19, 当阳离子结合后将显著降低. 遗憾的是大部分实验值在 pH7 时在 2 到 11<sup>[1, 2]</sup> 之间波动. 虽然有利于阳离子结合在紫膜表面的模型, 但由于大部分实验测量方法依赖于 Couy-Chapman 理论, 因而所测值不可避免地受所取离子强度不同和膜表面电荷分布不均匀的影响而使各实验值不同, 不能有力地支持阳离子结合的模型. 详细的原因 R. Jonas 等<sup>[1]</sup>也有分析. 表明这种差别是各测量系统本身不能克服的. 为了避免这种影响, 我们在实验中以酰化所屏蔽的表面电荷数作为标准. 通过比较同一测量条件下专一性酰化表面赖氨酸前后紫膜表面电荷密度的变化, 就可推知修饰赖氨酸对紫膜表面电荷密度的贡献, 由此可以较为准确地推知紫膜表面电荷数.

紫膜表面电荷数的测定依据 Gouy-Chapman 扩散双层理论<sup>[3]</sup>. 对于 KCl, 在 25 °C,

$$\sigma = C_i^{1/2} \text{Sinh}(\Psi_i/51.38)/136.65 \quad \dots \quad (1)$$

其中,  $\sigma$  为膜表面电荷密度,  $\Psi_i$  为膜表面电位,  $C_i$  为 KCl 浓度. 由于绝对零点表面电位

难以确定, 在实验中取 KCl 浓度为零时为零电位, 得出不同盐浓度时的电位  $\Psi_i$ . 按 Boltzman 关系式<sup>[3]</sup>,

$$\Psi_i = (RT/ZF) \ln P_i/P_0 \quad \dots \quad (2)$$

$P_i, P_0$  为两个不同 KCl 浓度下  $CAT_{12}$  [4-(十二烷基二甲胺)-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧自由基] 在紫膜中的分配比, R, F, Z, T 分别为气体普适常数、法拉第常数、 $CAT_{12}$  所带电荷及绝对温度.

结果表明: 离子强度增大时所测紫膜表面负电荷密度值也增大. 表明离子强度对测量值有影响. 尽管如此, 不同 KCl 浓度时膜表面负电荷密度  $\sigma$  与酰化前后紫膜表面负电荷密度差  $\Delta\sigma (= \sigma_a - \sigma_0)$  的比值  $\sigma/\Delta\sigma$  不变, 不受离子强度的影响.

表面 pH 可能影响膜表面电荷密度. 考察同一浓度下不同表面 pH 时膜表面负电荷密度测量值  $\sigma_a$ , 发现表面 pH5—9 时紫膜及酰化紫膜表面负电荷密度变化不大, 表面  $pH \geq 10$  及表面  $pH < 5$  时膜表面负电荷密度增大.

在同一测量系统中, 紫膜表面负电荷密度与单位面积表面电荷数成线性关系. 表面 pH5—9 时由于消除了  $H^+$  和  $OH^-$  的干扰, 紫膜酰化前后结构变化也很小可以忽略不计<sup>[4]</sup>,

\* 中国科学院重大基金资助项目, \*\* 通讯联系人.

收稿日期: 1993-12-02, 修回日期: 1993-12-29

因此紫膜表面负电荷密度的增大完全由于酰化屏蔽赖氨酸正电荷所致. 屏蔽的正电荷数平均为  $N_s = 4$ , 酰化赖氨酸所贡献的负电荷密度  $\Delta\sigma = \sigma_s' - \sigma_u'$ ,  $\sigma_s'$  和  $\sigma_u'$  分别为表面 pH5—9 时酰化紫膜和未酰化紫膜表面负电荷密度. 不同表面 pH 时未酰化紫膜表面负电荷数  $N_u$  为:

$$N_u = (\sigma_u / \Delta\sigma) N_s \dots\dots\dots (3)$$

结果列于表 1:

**表 1 表面 pH4—11 时单位 bR 紫膜表面负电荷数**

表面 pH	4	5	6	7	8	9	10	11
$N_u$	11	9	9	9	9	9	10	13
$N_i$	12	19	19	19	19	19	—	—

注:  $N_i$  为无结合阳离子时紫膜表面电荷估计值.

由表 1 知表面 pH5—9 时紫膜表面负电荷数为 9, 表面  $\text{pH} \geq 10$  时由于表面赖氨酸去质子化作用而增大 (赖氨酸,  $\text{p}K_a 10-10.5$ ). 表

面 pH4 时与估计值接近, 暗示此时二价阳离子已被 8 个氢离子取代<sup>[1]</sup>. 由于采用了酰化所屏蔽的电荷数作为标准, 从而定量地给出了较为准确的结果. 表面 pH5—9 时所测值低于 19, 表明紫膜表面确有 5 个二价阳离子结合位点.

**致谢:** 感谢施桦、王伟、贾文英、呼俊改对实验的支持.

### 参 考 文 献

- 1 Jonas R, Koutalos Y, Ebrey T G. Photochem Photobiol, 1990; **52** (6): 1163—1177
- 2 Butt H J, Biophys J, 1992; **63**: 578—572
- 3 Mclaughlin S. Curr Topic Memb Transp, 1977; **9**: 71—144
- 4 Maeda A, Takeuchi Y, Yoshizawa T. Biochemistry, 1982; **21**: 4479—4483

## 科技消息

### 多功能信号发生器

由中国科学院生物物理所研制的多功能信号发生器是一种由微处理机控制, 以数字电路为基础再以数-模转换器和模-数转换器产生各种波形的新型通用数字化仪器. 它能产生周期数可预置的正弦波、三角波、锯齿波、阶梯波、占空比可变的矩形波以及由键盘置入的任意波形. 它是一台瞬态记录仪, 可将外信号采入并重放. 它可产生基本序列、逆重复序列、延迟序列以及多电平序列的伪随机信号. 它是一台时序发生器, 可产生 8 路可编程时序波形. 它还可以作为一台逻辑分析仪, 对 8 路时序信号进行采样及回放. 该信号发生器的一个特点是它产生的波形不仅周期数可设置, 而且在一个波串结束后停止一段时间 (也可以不停, 即产

生连续波) 再重复产生相同的波串, 重复的次数可设定. 它的另一个特点是每一个波串的开始若干周期和结束的若干周期, 其波幅包络可按线性函数方式递增或递减, 这种包络线波形对于生物声学研究尤其有用. 该仪器还有 CENTRONIC 接口, 可将波形送到微计算机. 信号频率在 1—1MHz 之间可调, 输出幅度在 0—±5V 之间可调. 综上所述, 这种仪器可广泛应用于生物、医学、生理、电子、计算机、自控、脉冲通信、雷达等领域.

[中国科学院生物物理研究所科龙公司 傅培云]

suppressor gene p53 mutation in human esophageal cancer. It was found that there were point mutation, insertion and deletion frameshift mutation of p53 gene in human esophageal cancer. Intron 5 and 8 sequences of p53 gene in human and Rhesus monkey were sequenced and in monkey they are 81 and 92 nucleotides respectively.

**Key words** PCR, tumor suppressor gene, tumor

**Quantum Calculation for the Coordination Modes of Substrates Binding on Nitrogenase Active-Center.** Liu Aimin, Zhou Taijin, Zhang Hongtu, Wan Huilin, Cai Qirui (Tasi Khirui). (*Department of Chemistry and Institute of Physical Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 171

EHMO studies of  $N_2$  and  $C_2H_2$  coordination-activation led to the conclusion that the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase might be able to give a special treat to its special substrate, i. e.  $N\equiv N$ . The exogenous substrates except  $N_2$  are apparently not to get into the cage of the active-center and/or to manoeuvre as freely as  $N\equiv N$  inside the cage with the proposed structural settings.

**Key words** nitrogenase, FeMo-cofactor, EHMO approach, coordination

**Measurement of Surface Charge Numbers of Purple Membrane.** Wang Guangyu, Hu Kunsheng, Zhang Hengtao. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 173

The pH-dependent surface charge densities of the acetylated and the native purple membrane were determined by the ESR spin lable

method. The spin probe is  $CAT_{12}$ . The number of surface charges shielded by acetylation was adapted as a criterion to calculate the surface charge numbers on both sides of the purple membrane from surface pH 4—11. The result shows that the total surface negative charge numbers are 9 per bacteriorhodopsin at surface pH 5—9 but increases both above surface pH 9 and below surface pH 5. It supports strongly the model based on five divalent cation binding sites on the surface of purple membrane.

**Key words** purple membrane, bacteriorhodopsin, acetylation, ESR, surface charge number

**The Expression of p53, Rb and c-myc Gene mRNA in Human Primary Brain Tumor.** Tan Deyong, Lin Xi, Sun Zhilin. (*Department of Biochemistry West China University of Medical Science, Chengdu 610041*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 175

21 human primary brain gliomas and 11 human meningiomas were examined with RNA dot blot hybridization for the expression of p53, Rb and c-myc gene. It was found that the level of p53 gene expression is lower in 48.4% (15/31) of the tumors tested than that of normal brain tissues; the level of Rb gene expression is lower in 21.9% (7/32) for the tumors tested than that of normal tissues; and the level of c-myc gene expression is higher in 71.9% (23/32) for the tumors tested than that of normal tissues. Interestingly, in 13 of the tumors tested, the level of p53 gene expression is lower and the level of c-myc gene expression is higher. These results suggested that the expressive decrease of p53 gene and the expressive increase of c-myc gene are relative to the generation of human primary brain tumor.