

蛋白质的修饰度成正比, 同时也与 R_i 成正比. 因而修饰 SpA 与磷脂膜的静电吸引力随 R_i 的增加而降低. 所以, 静电作用不是导致修饰 SpA 对膜亲和性增加的主要因素. 而当硬脂酸的修饰度增加时, 该蛋白质的疏水性增加, 其与磷脂膜的疏水相互作用增强. 因而可认为疏水作用是致使修饰蛋白质的膜亲和性增加的另一原因. 通过脂类分子的修饰改善蛋白质膜亲和能力的工作前人已有报道. Afzelius^[3]将活化的磷脂修饰到铁蛋白表面, 使得该蛋白质在脂质体中的密度与其修饰度成正比. Huang^[8]的研究结果表明, 棕榈酸修饰的 IgG 与脂质体的结合具有类似的特性.

与溶液状态的修饰 SpA 相比, 重组膜中具有对应 R_i 值的 SpA 的 IgG 相对结合能力有所下降, 这种现象不能完全用硬脂酸的修饰来解释, 而与 SpA 在膜中的嵌入作用有关. 前人的实验结果已表明, 当脂质分子修饰的功能蛋白质嵌入到脂质体的双层脂膜中时, 蛋白质会由于旋转自由度的限制及空间取向的阻碍而导致部分失活^[8]. 本文中, 嵌入到膜中的 SpA 除因上述因素而导致部分失活外, 嵌入过程的环境改变而导致的构象变化是其活性丧失的另一因素. 二级结构测试结果表明, 硬脂酸的修饰会

干扰 SpA 内维持其构象稳定的各作用力的平衡, 而使其构象改变. 当修饰蛋白质嵌入磷脂膜时, 蛋白质与膜间的疏水作用的加强, 可能会引起其二级结构的进一步变化, 从而导致其生物活性的降低.

参 考 文 献

- 1 McConnell H M, Watts T H, Weis R M *et al.* Biochim Biophys Acta, 1986; **864**: 95
- 2 Lu Bin, Wei Yu. J Colloid Interface Sci, 1993; **161**: 120
- 3 Afzelius P, Demant E J F, Hansen G H *et al.* Biochim Biophys Acta, 1989; **979**: 231
- 4 Lindmark R, Thoren-Tolling K, Sjoquist J. J Immunol Meths, 1983; **62**: 1
- 5 Truko I V, Yurkevich I S, Chashchin V L. Thin Solid Films, 1992; **210/211**: 710
- 6 陆 斌, 韦 钰. 生物物理学报, 1993; **9**: 541
- 7 Lapidot Y, Rappoport S, Wolman Y. J Lipid Res, 1967; **8**: 142
- 8 Huang A, Huang L, Kennel S J. J Biol Chem, 1980; **255**: 8015
- 9 Heckl W M, Losche M, Scheer H. Biochim Biophys Acta, 1985; **810**: 73
- 10 Maoz R, Sagiv J. J Colloid Interface Sci, 1984; **100**: 465
- 11 Morimoto K. J Biochem Biophys Meth, 1992; **24**: 107
- 12 Sjodahl J. Eur J Biochem, 1977; **73**: 343

Tb³⁺ 探针法研究蛇毒中纤溶组分的 Ca²⁺ 结合环境 *

夏文胜¹⁾ 卢景雯²⁾ 刘宏宇 刘清亮³⁾

(北京医科大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 采用 Tb³⁺ 作为荧光探针研究了皖南尖吻蝮蛇蛇毒中纤溶组分中钙离子的结合环境. 实验表明每个纤溶组分中含有一个高亲和点. 钙离子位于发色团色氨酸 (Trp) 附近, 并可能和苯丙氨酸 (Phe) 结合. 在不同波长的激发下能产生 Trp→Tb³⁺, Trp→Tb³⁺→Phe, Tb³⁺→Phe 和 Tb³⁺→Trp 之间的能量转移. Tb³⁺ 位于 Trp 附近并可能与 Phe 结合. 计算表明 Tb³⁺ 与 Trp 之间的距离约为 5.66 Å.

关键词 尖吻蝮蛇, 蛇毒, 纤溶组分 (FP), 荧光探针

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 北京医科大学与中国科学技术大学应用化学系联合培养的研究生; ²⁾ 通讯联系人;

³⁾ 中国科学技术大学应用化学系, 合肥 230026. 收稿日期: 1993-12-09, 修回日期: 1994-03-21

蛇毒是由成分很复杂的蛋白质组成, 金属离子在其中不少组分中起着极为重要的作用. 因此, 探讨金属离子的配位环境对深入研究结构及活性作用机理有很重要的意义. 一些生物大分子含有诸如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子, 由于后者有封闭的电子壳层, 很多现代的测量手段如荧光光谱、顺磁共振、核磁共振等的应用受到限制. 三价稀土离子具有与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 相近的离子半径, 更强的离子势, 因而可以取代 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子, 实现光谱学研究. 其中应用最广泛的是 Tb^{3+} 、 Eu^{3+} .

1 材料与方法

1.1 材料

Tb_4O_7 为光谱纯, Johnson Matthey Chemical Ltd 产品, 其它为国产分析纯试剂.

1.2 Tb^{3+} 溶液的配制

以尽量少的分析纯浓盐酸在加热条件下溶解 Tb_4O_7 , 调 pH 值至 6.0, 以标准 EDTA 标定.

1.3 纤溶组分 (FP) 样品的制备

选用皖南地区的尖吻蝮蛇参照文献 [1] 的方法分离出具有纤溶活性的组分. 电泳及紫外分光光度法 (UV) 检测表明为一纯蛋白. 酶活力测定参照文献 [2] 的方法进行.

1.4 原子吸收法测定

配制 0—10ppm 标准 Ca^{2+} (均添加 20% 的 SrCl_2 溶液) 作工作曲线, 测定 FP 中的 Ca^{2+} 离子含量.

1.5 圆二色谱 (CD) 的测定

将一定量的 FP 干粉溶于 0.02mol/L Tris-HCl (含 0.1mol/L NaCl) 缓冲液, 配制成 0.17mg/ml 的溶液, 以缓冲液为参比, 在 JASCO-500 型圆二色谱仪上测定 CD 谱, 石英池厚度为 0.1cm, 测试波长为 190—250nm.

1.6 荧光光谱的测定

样品均用 0.02mol/L Tris-HCl (含 0.1mol/L NaCl) 配制, 在日立-850 型荧光分光光度计上测试.

1.7 测试温度

均在 25℃ 室温下进行.

2 结果与讨论

2.1 FP 的荧光光谱

在 pH=7.3 和以 Tris-HCl 为缓冲液的情况下, 测得 FP 的发射光谱表明: FP 的内源荧光来源于 Trp 残基, 其最大波长 $\lambda_{\text{max}}=337\text{nm}$. 同样条件下, 游离的 Trp 残基的发射光谱最大波长 $\lambda_{\text{max}}=355\text{nm}$. 这样从游离的 Trp 到蛇毒大分子的 FP 间发生了 18nm 的蓝移. 这说明 FP 中的发色基团 Trp 残基位于疏水区, 即埋藏于分子内部.

2.2 FP 中金属 Ca^{2+} 的测定和乙二胺四乙酸 (EDTA) 对 FP 的荧光光谱及 CD 谱的影响

我们用标准工作曲线来测定 FP 中 Ca^{2+} 的含量, 结果得到 1mg/ml 的 FP 中含有 3.85ppm Ca^{2+} . 若分子量按 19 000 计算 [3], 得到每个 FP 分子中含有的 Ca^{2+} 离子数大于 1, 小于 2, 估计一个 FP 分子中有一个高亲和点和一个或几个低亲和结合位点. 图 1 为 EDTA 对 FP 的 CD 谱的影响. 结果表明 EDTA 对 FP 整个构象的影响不大 ($[\text{FP}] / [\text{EDTA}] \approx 450$), 利用 Chen 与 Yang [4] 的公式对图 1 中两个图谱进行计算, 结果列于表 1. 但是, 若向样品中添加 EDTA, FP 的荧光光谱则发生很大变化, 发射峰消失. 在 337nm 处检测的结果列于表 2 (此时 $[\text{EDTA}] / [\text{FP}] \approx 80$).

表 1 FP 的 CD 谱计算

样 品	% 构象		
	α 螺旋	β 折叠	无规卷曲
FP	17.65	34.08	48.27
FP+EDTA	15.63	31.57	52.80

表 2 EDTA 对 FP 荧光光谱的影响

$[\text{FP}] = 2.0 \mu\text{mol/L}$						
$[\text{EDTA}]$ /mol · L ⁻¹	0	1.6×10^{-6}	1.6×10^{-5}	1.6×10^{-4}	1.6×10^{-3}	1.6×10^{-2}
F_{337}	1.28	0.3	0.27	0.21	0.14	0.12

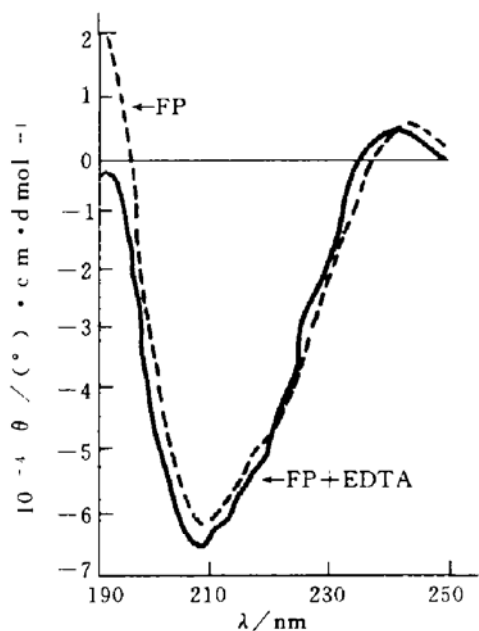


图1 FP和FP+EDTA的CD谱

[FP] = 0.17mg/mL, [EDTA] = 3.0mol/L.

从以上现象来看, EDTA对FP的荧光光谱影响很大, 但对CD谱的影响却不大. 这可能是 Ca^{2+} 离子位于色氨酸附近, EDTA可以络合 Ca^{2+} 而导致微环境的改变, 但不致于改变整个大分子的构象, 即肽链的骨架的改变不大. 因此, Ca^{2+} 对维持FP分子局部结构是相当重要的.

2.3 FP与Tb(III)结合的研究

Tb(III)是发荧光的稀土离子之一, 其中所有发射谱峰基本上都是由 $^5\text{D}_4$ 发出的. 一般仪器可观察到 $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ ($j=6, 5, 4, 3$)四个跃迁峰, 其中出现在545nm附近的 $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ 跃迁强度最大, 222nm为其主激发峰^[5]. 现已知的大部分含钙蛋白与Tb(III)结合均有荧光敏化现象^[6]. Tb^{3+} 滴定FP的荧光结果显示: 在 $[\text{Tb}^{3+}] / [\text{FP}] = 1$ 范围内, 545nm处检测的荧光强度变化呈一级动力学反应趋势, 其后则基本保持在一定值. 可以判断 Tb^{3+} 与FP分子的高亲和结合位点只有一个. 为进一步探讨 Tb^{3+} 与Trp之间的能量关系, 以283nm激发样品($\text{Tb(III)}-\text{FP}$), 在545nm处可测到 Tb^{3+} 敏化荧光, 表明发生了 $\text{Trp} \rightarrow \text{Tb}^{3+}$ 之间的能量传递; 同时也表明 Tb^{3+} 位于发色团Trp附近. 图2中分别以222nm、233nm激发Tb(III)-

EP均得到295nm、337nm两荧光峰. 337nm峰为FP中Trp残基峰, 表明 $\text{Tb(III)} \rightarrow \text{Trp}$ 之间能量转移的发生; 与前面 $\text{Trp} \rightarrow \text{Tb}^{3+}$ 相印证, 说明Trp与 Tb^{3+} 之间的距离很近, 以至于发生能量的相互转移. 295nm为新出现的峰, 且水的拉曼峰不在该区域, 这可能是由Phe残基所引起的. 其原因可能是: 在无 Tb^{3+} 结合的情况下, 有封闭的电子壳层的 Ca^{2+} 不利于Phe的共轭度增加且Phe本身的量子产率很小, 因而不出现Phe峰, 当FP与 Tb^{3+} 结合或 Tb^{3+} 取代FP中的 Ca^{2+} 后, Tb^{3+} 由于具有f轨道, 从而使Phe的电子能发生位移, 共轭度增加, 使量子产率增大, 波长位移了13nm左右. 因此, 若 Tb^{3+} 与 Ca^{2+} 能发生置换, 则 Ca^{2+} 位于Trp附近, 并可能与Phe结合. 这与CD及荧光光谱在Trp附近的结论是一致的.

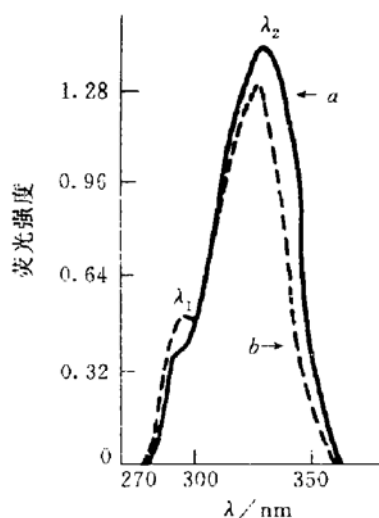


图2 222nm (a), 233nm (b)

激发FP的荧光光谱

$\lambda_1 = 295\text{nm}$, $\lambda_2 = 337\text{nm}$.

2.4 Tb^{3+} 与Trp之间距离的测定

根据Froster理论, 能量给予体和能量接受体间距离 r , 与能量转移50%所对应的临界能量转移距离 R_0 及能量转移效率 E 之间有如下关系:

$$r = R_0(E^{-1} - 1)^{1/6} \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{其中 } R_0^6 = 8.78 \times 10^{-25} \text{K}^2 \Phi_{\text{Trp}} n^{-4} J(\text{cm}^6) \dots \dots (2)$$

参照 Eisinger, 取向因子 K^2 为 $2/3$, 介质折射常数 n 为 $1.35^{[7]}$. J 为光谱重叠积分, 且

$$J = \int F(\nu)\epsilon(\nu) - d\nu / \int F(\nu)d\nu \dots\dots (3)$$

$F(\nu)$ 为能量给予体的荧光强度, $\epsilon(\nu)$ 为能量接受体的摩尔消光系数, ν 为波数 (cm^{-1}), E 为能量转移效率

$$E_{\text{obsd}} = [1 - (I/I_0)] \dots\dots\dots (4)$$

I , I_0 分别为有和没有能量接受体的发射荧光强度.

$$E = 1 - (1 - E_{\text{obsd}})^{1/2} \dots\dots\dots (5)$$

实验中求得 FP 的能量转移效率 E 为 6.2×10^{-2} . Φ_{Trp} 为没有能量接受体的能量给予体的量子产率, 实验中我们以水溶液中 Trp 的量子产率 $\phi=0.13$ 为标准^[8], 测得 $\Phi_{\text{FP}}=0.175$.

由于 Tb^{3+} 弱的 f 跃迁, 使得 Tb^{3+} 的吸收光谱难以测出, 依照文献 [9, 10] 的方法, 算得 J 的平均值为 $0.7 \times 10^{-19} \text{cm}^6 \cdot \text{mol}^{-1}$, 得到 R_0 为 $3.60 \text{\AA}$, 并计算出 $r=5.66 \text{\AA}$. 这说明 Trp 中与 Tb^{3+} 之间的距离很近, 因此可发生比较强的能量转移. 若 Tb^{3+} 取代的是 FP 中的 Ca^{2+} , 则

Ca^{2+} 与 Trp 之间距离也近似为 $5.66 \text{\AA}$.

参 考 文 献

- 1 Ouyang C F, Teng C M. Biochim Biophys Acta. 1976; 420: 298
- 2 Biggs R. Human blood coagulation. hasmostaris and thrombin. Oxford: Blackmell Scientific Pub, 1972: 429, 587, 602
- 3 王 淳, 徐 洵. 见: 全国止血栓及血栓第一次会议摘要. 西安, 1987, 西安: 西北大学出版, 1987: 75
- 4 鲁子贤, 崔 涛, 施庆洛. 圆二色性及旋光色散在分子生物学中的应用. 北京: 科学出版社, 1986: 87
- 5 区耀华, 王志刚, 周 昕. 生物物理学报, 1990; 6 (3): 300
- 6 杨盛斌, 杨 频. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16 (5): 354
- 7 Horrock W D, Jr Collier W E. J Am Chem Soc, 1981; 103: 2856
- 8 Chen R F. Anal Lett, 1969; 1: 35
- 9 Dale R E, Eisinger J, Blumberg W E. Biophys J, 1979; 26: 161
- 10 Horrocks W D, Jr Snyder A P. Biophys Res Comm. 1981; 100 (1): 111

萤火虫复眼光学模型重叠成象的研究与模拟*

吴梅英

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

P. D. MCINTYRE

(澳大利亚国防大学, 堪培拉)

摘要 以北京萤火虫复眼结构与生理参数为依据, 基于已知的梯度折射率透镜特征, 对复眼的整个光学系统进行模型化. 模型的尺寸与折射率分布依据实际晶锥的测量值. 通过对模型复眼的光线追迹, 证明北京萤火虫复眼是一个折射重叠型复眼. 重叠孔径以内入射的平行光线在视网膜水平形成一半宽度为一定值的模糊圈. 利用计算机光线追迹模拟了复眼的重叠成象过程, 随着象平面与晶锥近端距离的增加, 信号光线的数目也逐渐增加, 信噪比逐渐提高, 在视网膜水平达到最大值.

关键词 萤火虫复眼, 光学模型, 重叠成象

萤火虫复眼是 Exner (1891)^[1] 推导光学重叠型复眼理论的例子, 他发现了通过多个相邻小眼面光线集合所形成的正立象, 首次提出了光学重叠理论. 后来许多研究者也都先后观察到了这个正立象, 但这些是在角膜和晶锥后面

的组织被完全清除之后观察到的. 由于这个象位于后面的光感受器层, 那么这种重叠象的意

* 国家自然科学基金, 中国科学院视觉信息加工开放实验室和澳大利亚技工贸部资助.

收稿日期: 1993-12-26, 修回日期: 1994-07-22

ognized antigen with molecular weights of 51, 56, 67 and 73 kD. Immunohistochemical staining showed that the antigen mainly existed in the cytoplasm and on the membrane of breast cancer cell, and also could be observed in some other tumors, but no staining was detected in normal tissues. The AF9-recognized antigen may be a new tumor-associated antigen.

Key words breast carcinoma, tumor-associated antigen, monoclonal antibody

Application of PF Gel as New Carrier for the Immobilization of Enzyme. Li Yuanxun, Ye Qingling. (*Department of Chemistry, Hebei University, Baoding 071002*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (6): 523—527

PF gel-type resin has been synthesised by polycondensation of hydroquinone with formaldehyde in the presence of acidic solution. The gel-type resin is cheap and easy to produce, non-toxic, porous, hydrophilic, extremely stable. It is a effective carrier for the simple and rapid immobilization of various enzymes and proteins. The amounts of bound protein (BSA) and glycoamylase in one gramme of the dry carrier were 558mg and 330mg respectively, the activity recovery of 84% for immobilized glycoamylase was obtained. The conversion (%) for starch into glycoase, using immobilized glycoamylase is as high as 93%. A new kind of modified PF gel-type resins were synthesised by copolymerization of hydroquinone and some resorcin with formaldehyde. Thus PF and modified PF gel-type resins are superior carriers for immobilization of enzyme.

Key words phenolic-formaldehyde resin, hydroquinone-formaldehyde resin, immobilization, glycoamylase, bovine serum albumin (BSA)

Characterization of Modified Staphylococcal Protein A and Its Artificial Membrane on Substrate Surface. Lu Bin, Yie Ning, Wei Yu. (*Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210018*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (6): 528—532

A method is described for incorporation of water-soluble SpA into phospholipid monolayer using covalent SpA-stearate conjugates, and then transferring the monolayer on a pre-treated silica surface to form a SpA containing membrane. Stearic acid containing a reactive N-hydroxysuccinimide ester group is synthesized, and the derivative is reacted with SpA in a deoxycholate buffer. The modified SpA (m-SpA) has the solubility properties very similar to integral membrane proteins. The CD results show that the content of β structure in the m-SpA is increased in lower lipid coupling degree, but in higher modification the random coil content rapidly increased. After SpA is incorporated in the DPPA monolayer, unmodified SpA is readily ejected from the monolayer but m-SpA incorporates into the monolayer stably. The incorporation of the protein is proportional to the lipid coupling degree. The IgG binding ability of m-SpA decreases with the increase of the lipid coupling degree. The ability is further reduced about 20%—30% when m-SpA is incorporated in the membrane, which might be due to the incorporating procedure.

Key words SpA, lipid modification, conformation changes, artificial membrane, IgG binding activity

A Study of Combining Surroundings of Ca^{2+} in Fibrinolytic Principle of the Venoms in *Agkistrodon Acutus* Using Tb^{3+} as a Fluorescent Probe. Xia Wensheng, Lu Jingfen, Liu

Hongyu, Liu Qingliang. (*The National Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing Medical University Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 532—535

Tb (III) as a fluorescent probe was used to study the surroundings of metal ions in FP (fibrinolytic principle). There is a high affinity site of Ca^{2+} in every FP molecule and Ca^{2+} ions are located near the Trp. When Tb (III)-FP was excited by 222nm and 233nm, it is possible that energy transfer occurs as follows: $\text{Trp} \rightarrow \text{Tb}^{3+}$, $\text{Trp} \rightarrow \text{Tb}^{3+} \rightarrow \text{Phe}$, $\text{Tb}^{3+} \rightarrow \text{Phe}$, $\text{Tb}^{3+} \rightarrow \text{Trp}$. These results indicate that Phe may combine with Tb (III). The results of calculations indicate that the distance between Trp and Tb (III) is about 5.66 Å.

Key words agistrodon acutus, venoms, fibrinolytic principle (FP), fluorescent probe

A Study and Simulation on the Superposition Imaging in the Optical Modeling Compound Eye of Beijing Firefly. Wu Meiyong, McIntyre D. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 535—539

The dioptic system of compound eye of Beijing firefly was simulated on the basis of the real parameters measured from its structure physiology and its known GRIN lens properties. The size of the model and values of refractive index were based upon the measured values of actual compound eye. It was proved that the compound eye of Beijing firefly was a refracting superposition eye by the computer ray tracing model of the compound eye. Parallel light rays incident through the superposition aperture were focussed across the clear zone onto the retina and formed a blur-circle with a certain half-width value. The number of signal

light rays and the ratio of signal and noise were increased as the distance to the image plane from exocone proximal tip were increased. The maximum was at the retina level.

Key words compound eye of Beijing firefly, optical model, superposition image

Study of the Measurements with Acridine Orange in Protons Transportation of Lysosome H^+ -ATPase. Zhang Guojiang, Wang Jia, Yao Junlan, Liu Xiaoqi. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 539—543

The different range characteristics of acridine orange in absorption and fluorescence is dependent on its concentrations. The importance and mechanism as well as principles of choosing correct acridine orange concentration and rational amounts of lysosome in the assay of protons pumping are discussed. The obvious influences of the incubation time of acridine orange with lysosome and the K^+/H^+ exchange upon the measurements of proton transport are studied.

Key words acridine orange, lysosome, H^+ -ATPase, proton

Stains-all staining Assay for Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity. Zhang Jun, Lin Zhoukun. (*Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 544—546

A polyacrylamide gel electrophoresis-stains-all staining assay for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) activity in purified TdT and leucocytic homogenate of normal and leukemic patients has been developed. The results show that stains-all [(1-ethyl-2-[(3-(1-ethyl-naphtho