生物活性物质的电致化学发光分析*

陈国南　段建平　庄惠生
（福州大学化学,福建,福州，350002

电致化学发光分析是在化学发光的基础上发展起来的一种新的分析方法，它是化学发光与电化学相互渗透的产物。因此不但可以利用电化学分析的特长，而且可以发挥化学发光分析的优点，具有高灵敏，高选择，易于实现连续自动分析等特点，越来越引起人们的注意，已成为国际上光，电分析工作者感兴趣的新课题。电致化学发光是利用电化学手段，通过电极给含有化学发光物质的体系施加适当的电压或电流，使其中某些成份在电极上产生氧化还原反应，从而产生了某种具有化学活性的物质，该物质能与发光物质反应并提供足够的能量，致使发光物质的基态电子跃迁到激发态，当激发态电子回到基态时便发出一定波长的光，或利用电极提供能量直接使发光物质进行氧化还原反应，并生成某种稳定的中间产物，该产物迅速分解导致发光。因此电致化学发光分析是基于电解过程中所产生光的强度的测量。由于电致化学发光比通常的化学发光具有更高的灵敏度，因此可以发展成为高灵敏度的分析方法。这种新技术与通常的化学发光法比较有其独特的优点，表现在以下几个方面：

1、可以通过电极电位的控制及改变波型发生器所发出的波型，达到控制化学发光反应过程的目的，提高分析的选择性，并能为化学发光反应机理的研究提供更多有用的信息。
2、具有极高的灵敏度及很宽的动力学响应范围。
3、一些特别不稳定的化学发光试剂或中间产物可以在电极表面现場产生，并尽快产生反应。
4、有可能用电化学的方法修饰某些无化学发光活性的化合物，使之能直接参与化学发光反应，扩大了化学发光法可检验物质的范围。
5、易于与其他技术，如流动注射，高效液相色谱等联用。

本文将对近年来生物活性物质的电致化学发光分析的进展作简要介绍。

1、电致化学发光生物传感器及核酸探针；
2、电致化学发光免疫分析；
3、 吲哚、色氨酸及其衍生物的电致化学发光检测；
4、 N-(β-carboxyl-propionyl)luminol 的电致化学发光及其应用；
5、某些生物活性肽的电致化学发光；
6、 Hemin 的电致化学发光及其应用；
7、酪氨酸及其某些代谢物的电致化学发光检测。
8、

参 考 文 献

1. A. W. Knight, Trends in Anal. Chem., 18, 47(1999).
2. R. D. Gerardi, N. W. Barnett, S. W. Lewis, Anal. Chim. Acta, 378, 1(1999).
3. S. R. Mikkelsen, Electroanalysis, 8, 1(1996).

The electrogenerated chemiluminescent analysis for bioactive compounds

G. N. Chen　J. P. Duan　H. S. Zhuang
(Department of Chemistry, Fuzhou University, Fujian, Fuzhou, 350002)

* 国家自然科学基金（296750003）及福建省自然科学基金（B9810006）资助项目

需要全本请访问 www.ertongbook.com

首套基于脑内信号光学成像系统的研制及对猫视皮层功能的研究

寿天德
（复旦大学脑科学研究中心和立人实验室，生命科学学院，上海 200433）

基于脑内部信号的光学成像技术（optical imaging technique based on intrinsic signals）是近年国际上出现的一种新的在位脑功能成像方法。它利用兴奋脑区血红蛋白含氧量等生理特性变化引起光照反射率的变化，来记录皮层的功能分布。该方法无毒，又具有目前几种在位脑成像技术中最高的空间分辨率（100μm），是研究脑功能的有力武器。

我们自行研制的国内首套光学成像系统（Optical imaging system based on intrinsic signals)由视觉刺激器、光源、数字式面扫描摄像机和图象处理系统组成。给动物视觉刺激以诱发视皮层反应，同时摄取该暴露的视皮层对 640nm 波长光源照射的光反射图，通过叠加平均等图像处理，以获得理想的视皮层功能图。使用这一系统，在猫视皮层 17 区的方位功能图研究中，我们观察到：分别用相互垂直的光栅刺激所获得的功能图空间上呈镶嵌互补状，方位柱空间周期约为 1mm 该图在刺激后 3.0 秒左右最为清晰；兴奋脑区随光栅的空间位置不同而变化，与已知视网膜－皮层拓扑投射关系相符；皮层下不同深度获得的功能图空间分布相似。直接证实了视皮层的方位功能柱结构在活体上的存在，表明该系统一能可靠地进行脑皮层功能构筑的研究。

关于视皮层细胞强方位选择性（形状知觉的神经基础）产生的机制，主要分成两种学说，兴奋性输入说和皮层内抑制说，科学家争论了 30 多年。为从整体上阐明这一问题，我们首次采用脑光学成像结合整体动物皮层灌注给药方法，研究了猫视皮层方位选择性的起源。结果显示，施加 $GABA_A$ 受体拮抗剂荷包牡丹碱（bicuculline）时，低剂量使视皮层方位功能图更清晰；中剂量使方位功能图变模糊；而高剂量却使方位功能图消失，同时脑电出现显著的癫痫样棘波，说明 GABA 能皮层内抑制机制对维持皮层适度兴奋性和产生方位选择性是必须的。然而，若此时再加入皮层内主要兴奋性氨基酸—— 谷氨酸的非 NMDA 受体拮抗剂 CNQX 或 NMDA 受体拮抗剂 AP5，则皮层兴奋性降低，脑电棘波消失，方位功能图重新出现，虽然此时皮层内抑制作用已不存在。说明皮层内抑制机制不是产生方位选择性的充分条件，对视皮层的兴奋性输入才是产生方位选择性的根本原因。因此我们得出结论：总体上，大部分视皮层细胞的方位选择性产生主要来源于兴奋性输入，而皮层内抑制机制可能对方位选择性起修饰作用。

植物光敏色素信号转导的研究进展

王小菁

（华南师范大学生物系，广东省植物发育生物工程重点实验室，广州， 510631）

光敏色素是一种易溶于水的二聚体色素蛋白质。每个单体有两个组成部分：生色团和蛋白质。光敏色素有两种类型：红光吸收型 Pr）和远红光吸收型（Pfr），前者的吸收高峰在 660 nm，而后者的吸收高峰在 730 nm。Pr 和 Pfr 在不同光谱作用下可以相互转换。Pfr 是生理激活型，Pr 是生理失活型。

光敏色素蛋白质由多基因编码，拟南芥中至少存在 5 个光敏色素基因，分别为 *PHYA, PHYB, PHYC, PHYD, PHYE*。不同基因编码的蛋白质有各自不同的时间、空间分布，有不同的生理功能。光敏色素蛋白质有不同的功能区域， N 末端是与发色团连接的区域，与决定光敏色素的光化学特性有关； C 末端与信号转导有关，两个蛋白质单体的相互连接也发生在 C端。

近年来，对原核生物信号转导二元组分系统的深入了解大大推进了植物光敏色素信号转导和作用机理的研究。 Kehoe 和 Grossmm（1996）从蓝色细菌 *Fremyeka diplosiphond* 的 *rcaE*基因测序中发现，这个基因编码的蛋白质与细菌二元组分系统的 HPK 以及高等植物光敏色素有同源性。Yeh 等人（1997）将与光敏色素类似的，能编码 78 个氨基酸多肽链的基因称为蓝色细菌光敏色素 1（Cph1），并对其下游、与 *CPH1* 相邻的 *RCP1* 基因进行了研究。通过比较，发现 Cph1 比植物的光敏色素小，在 N 端缺少 60-100 个氨基酸，在 C 端的序列也少近了一半；C 端具有保守的 HPK 转移模块序列。进一步的实验发现，在大肠杆菌中表达的 Cph1 可与光敏色素生色团在体外进行装配，组合后的 Cph1 有光转换的特性，具有 HPK 的性质，受光调节可以发生自动磷酸化。*RCP1* 编码 147 个氨基酸的蛋白质，它具有二元组分系统的 RR 区域，含有天冬氨酸接受模块。如果将 Cph1 和 Rcp1 连接在一起，Rcp1 可接受 Cph1 传递来的磷酸基团。如果 Rcp1 的天冬氨酸位点发生突变，磷酸的转移就不能发生。说明在蓝色细菌中， Cph1 和 Rcp1 完成了典型的细菌二元组分系统的功能，以此实现光信号的转导。

植物光敏色素比 Cph1 多了一个 PAS 序列，这一序列与信号转导以及蛋白质之间的相互作用有关。Yeh 和 Lagarias（1998）以酵母表达系统获得了燕麦和绿藻的光敏色素蛋白，经过体外与生色团的装配得到完整的光敏色素。对其进行的一系列生化测定证明，高等植物的光敏色素的 Pr和 Pfr 都具有激酶的特性，可以进行磷酸化，并受光调节。研究者认为，高等植物的光敏色素是从蓝色细菌 Cph1 进化而来的，Cph1 具有细菌二元组分的 HPK，而高等植物的光敏色素则是丝氨酸／苏氨酸激酶。于是，寻找光敏色素的直接作用底物对阐明它的信号转导途径和作用机理尤为重要。Quail 实验室的工作（1999）已发现了 *PIF3* 基因，它编码一个与 phyA、phyB 发生相互作用的转录调节因子。他们还克隆了 SPA1 基因，由它编码的蛋白质位于细胞核中，与蛋白激酶有同源序列，直接控制 phyA 表达，是一个负调节因子。

激素分泌节律与光周期

吴从愿　　北京协和医院内分泌科

激素同人的一生，包括卵子和精子的生成、受精卵着床、胎儿分化发育、分娩、性成熟、衰老和物质代谢的关系至为密切。为适应一年四季周而复始和 24 小时外环境光周期的改变而呈现的激素分泌节律，是人类能更好地生存和繁衍后代的重要生理特征之一。

一、激素节律分泌的类型

根据节律分泌频率间隔时间的长短，可分为近似一年、季节性、近似一月、近似昼夜、超日、白天、夜间和超速 8 种类型，其中以昼夜节律分泌与光周期关系最为密切。

二、激素分泌的昼夜节律

许多激素例如：(1)松果体的褪黑素（MEL）；(2)下丘脑的促肾上腺皮质素释放素（CRH）、促性腺激素释放素（GnRH）、生长激素释放素（GHRH）和生长抑素（SS）；(3)腺垂体的促肾上腺皮质激素（ACTH）、促卵泡素（FSH）、促黄体素（LH）、生长激素（GH）和泌乳素（PRL）；(4)神经垂体的催乳素（OT）和血管加压素（OT）；以及(5）腺垂体的相应靶腺如肾上腺皮质的皮质醇（F）、睾丸的睾酮（T）和卵巢的雌二醇（E_2）等均有明显的昼夜节律分泌。正常分泌节律的出现、保持、消失及频率和幅度的改变具有重要的生物学意义。

三、昼夜节律与光周期

光周期是调节激素昼夜节律的重要外环境因素。松果体分泌的 MEL 与环境光照周期同步。光线刺激视网膜产生的神经冲动经视交叉上核、胸髓、颈上神经去甲肾上腺素调节后纤维到达松果体抑制 MEL 的分泌；黑暗或无光照时，抑制作用解除，MEL 分泌增加。分泌（GnRH）和 GHRH 的下丘脑及分泌 ACTH、LH 和 FSH 等的腺垂体均存在 MEL 受体。光周期通过刺激或抑制 MEL 的分泌等，在下丘脑和腺垂体的水平上调节 F、T、E_2 及 GH 等节律分泌，从而影响生殖、性成熟、生长发育和衰老等生理过程。

总之，研究光周期与激素节律分泌的关系不仅有助于进一步揭示生命的奥秘、早期诊治内分泌功能紊乱和延缓衰老，而且可为陆海探险和太空遨游的人身健康提高保险系数。

光合放氧机理研究进展

徐春和　于勇
（中国科学院上海植物生理研究所上海 200032）

光合放氧是绿色植物的重要功能之一。它还与生物环境的改善和生物的进化有着十分密切的关系。光合放氧发生于植物光合膜上两个光能转换机构中的光系统 II。进行光合放氧的光系统 II 放氧复合体除了光系统 II 核心复合体外，还包括 17、23和 33 kD 外周多肽。与光系统 I 相比，由于水的氧化还原电位较正（0.8V），且光氧化水释放氧气是由单一光子驱动的单价变化的四个氧化还原反应组成，循环往复，过程复杂，这就成为顺利进行光系统 II 光能转换的负担，也是叶绿素 a 荧光主要来自光系统 II 的主要原因之一。

国内有关单位在研究光合放氧方面通力协作，追赶世界上先进小组的研究步伐，取得了一些初步的成绩。

一，光合放氧的核心：锰分子簇及周围微环境

光氧化水释放氧气的四闪周期反应发生于位于光系统 II 的氧化侧的四个锰组成的分子簇。由于光系统 II 三维结构迟迟不能确定，大大影响了对锰与周围微环境氨基酸残基关系的认识。现有用 DPC 抑制光合放氧的实验表明蛋白质骨架上的两个羧基和两个组氨酰与锰分子簇高亲和行地成键。 80 年代以来，国际上通过化学方法合成各种锰簇模型复合物，再用 4K 时 EPR 的多线谱等物化手段加以验证，研究十分活跃。但与活性结果尚有差距。国内福建物构所与植物所在锰簇模型物合成和量化新结构模型方面也有令人瞩目的新结果。

二，与光合放氧有关的两个次级电子供体 Y_Z 、 Y_D

这是两个连接快速光化学反应和氧化水释放氧气慢反应的酪氨酸残基。结构上对称。他们的 EPR 线形一致，表明其氧化还原特性相似。但两个信号的衰减速度不同。Y_Z 的延续几十微秒到几十毫秒、Y_D 的延续几十分钟到数小时。表明两者参与光能转换的功能不同。我们分析了衣藻光系统 II 的计算机模型，发现两者的疏水性有显著差别。 Y_D 周围微环境较为疏水。Y_D 的氧化还原特性可以受疏水小分子的影响。国际上最近有人发现 pH 可以影响的氧化还原特性。这就意味着 Y_D 附近有质子等的通道。

三，影响光合放氧的其他因素以及放氧外周多肽

自 80 年代起，Cl^-、Ca^{++} 被确认为影响光合放氧的重要辅助因素。 17 kD 外周多肽被确认为与 Cl^- 结合有关、23 kD 外周多肽被确认为与 Ca^{2+}、 Cl^- 结合均有关。33kD 外周多肽与光系统 II 核心复合体结合的更紧，17、23 kD 外周多肽更容易用各种方法洗脱。17、23 kD 外周多肽被洗脱后， Cl^-、Ca^{++} 对光合放氧的影响可由外加加以恢复。

早有人发现碳酸氢根与光系统 II 电子传递有关。最近 Klimov 等肯定（1）在光系统 II 的氧化侧有碳酸氢根作用位置（这也是我们多年来主张的），（2）光系统 II 受碳酸酐酶的影响。我们最近将发表的生化结果表明碳酸酐酶 （1）

需要全本请访问 www.ertongbook.com

位于光系统 II 的氧化侧，(2) 与锰分子簇无直接关系。

最近 33kD 外周多肽的生化研究十分活跃。Barber 等电镜的结果发现两个 33kD 外周多肽明显突出于光系统 II 双聚体上。33kD 外周多肽呈椭圆型，N 端与 C 端十分靠近。N 端的第 16~18 个氨基酸残基与 C 端的第 236~247 个氨基酸残基在蛋白结合和放氧中起着重要作用。我们发现 33kD 外周多肽中唯一的高保守的色氨酸 241 在蛋白结合和放氧中起着重要作用。

四，光合放氧中氧释放途径和质子释放途径

水进入光合放氧位置以及氧和质子释放到介质环境的途径和方式可以影响放氧的速率。我们曾发现用闪光测定的周期变化与通过溶氧测定的氧释放周期变化在数量上不一致。隐示氧气释放需在一定时间通过一段距离。质子释放及蛋白的运动的关系是人们关心的又一问题。

五，光合放氧与环境胁迫的关系

90 年代，Murata 等发现渗透调节物质（如甜菜碱）可以促进光合放氧。由于放氧外周多肽凸出于类囊体膜内腔侧，理论上更易受环境介质的影响。渗透调节物质的作用依赖于分子间电相互作用。我们发现渗透调节物质只对一部分作用于放氧外周多肽的处理有保护作用，对依赖疏水作用的处理无作用。表明外周多肽与光系统 II 核心复合体间的联系有不同分子力的参与。环境胁迫可以影响这些分子力，影响光合放氧。

六，光合放氧与进化的关系

最近，植物所的研究发现 33kD 外周多肽位置有分子量相近的蛋白酶存在。同样的结果也为其他人所关注。人们还注意到，在进化关系上，光细菌没有放氧机构，低等植物的外周多肽在种类和分子量上都较高等植物的简单。光合放氧与进化的关系将构成光合放氧的又一课题。

增敏化学发光体系的建立及其应用

杨晓林黄岚　李振雪刘红王申五

北京医科大学人民医院，北京 100044

分子杂交技术及免疫测定技术为检测及分析核酸和蛋白质这二种重要的生物大分子提供了强有力的手段。但以往采用的放射性同位素标记技术存在半衰期过短、污染环境等诸多不足，近几年来陆续出现了一系列非放射性标记及检测手段。本研究的目的，就是立足于国内现有条件，建立一套高灵敏度的增敏化学发光检测系统。并在此基础上建立与之相关的分子杂交及免疫测定技术，并将其实际应用于医学临床及基础研究中，以推动非放射性分子杂交及免疫分析技术的发展。

其具体方法是将自行研制的发光液与国外同类产品进行对比实验；并建立化学发光分子杂交系统和化学发光免疫测定系统。实验结果表明：两种发光液具有相同的检测限（0.2pgHRP/sample），而自行研制的发光液具有更底的本底（分别为7RLU/0.1S和27RLU/0.1S）、更宽的线性范围(分别为0.2-819.2pgHRP/sample和0.2-204.8pgHRP/sample）、更好的稳定性(5-25分钟间的变异系数分别为5%和24.4%）；其斑点杂交灵敏度达1pg目的DNA；其分析血清T3、T4时的检测限分别为0.04μg/L和2.90μg/L。具此，我们认为：自行研制的发光液的总体技术性能高于国外同类产品；化学发光分子杂交的灵敏度基本达到放射性同位素^{32}P的水平；化学发光免疫测定技术与常规放免法基本相当。

《第五届全国光生物学学术讨论会》兰州， 2000年8月

光学椭偏成像法用于内分泌激素检测的研究

赵子彦　　靳刚*　王战会*　李新华
山东省医学科学院山东省抗衰老研究中心　济南250062
*中国科学院力学研究所　北京100080

本文将报导内分泌激素检测的一种新方法，即采用一种物理光学法一光学椭偏显微成像技术，利用内分泌激素和它的抗体的特异结合自然属性，并结合生物固体芯片技术而实现的。

光学椭偏显微成像技术是近几年发展起来的一种新型超薄膜及表面结构显示技术，它的工作原理是将传统的光学椭偏技术和ＣＣＤ摄像、计算机采样和图像处理技术相结合，对检测表面具有很高的灵敏度（厚度分辩率达0.5纳米，横向分辩率优于3微米以上），可以定量地显示单层生物大分子层及生物分子之间相互作用所引起的生物分子层的厚度分布和变化。

根据激素与其相应抗体的特异性结合原理，将激素抗体吸附在硅片表面形成对其相应激素具有特异敏感性的感应表面，再与含有相应激素的溶液进行反应。当激素抗体与相应激素发生特异性结合后，形成复合物，使固体表面的分子膜层变厚；或者说：激素抗体与相应激素发生特异性结合使得表面生物分子面密度增加。反应前后的感应表面的分子膜层，由光学椭偏显微成像进行检测。可以清晰地分辨反应前后感应表面所发生的变化。根据校对曲线，还可以进行定量测量。由于本方法仅利用了生物分子的自然属性，和非接触的弱光测量，在生化检测中，具有操作简便快速，不需要任何添加剂、无放射性污染和测量结果直观等优点。

本研究中，已经对人生长激素和皮质酮:BSA进行了检测，并以免疫球蛋白(IgG)和它的抗体(Anti-IgG) 相结合作了初步定量分析。研究结果显示，椭偏光学显微成像技术具有对生物分子层表面厚度分布测量的高灵敏度，可以有效地显示激素抗体和相应激素（蛋白质激素：生长激素和与血浆白蛋白结合的肾上腺皮质激素：皮质酮）分子膜层及其分子之间的相互作用，并且可以定量地显示表面膜层厚度的变化与分布，具有定量测量的潜力。试验中,激素与其相应抗体的分子反应时间和反应时的温度，对于低浓度的激素检测具有关键性的影响，在室温条件下，将反应时间延长到 18小时，低浓度的人生长素（ 0.004IU/ml ）和皮质酮:BSA（ 0.05ug/ml ）均能明显地观测到。此技术在内分泌学临床检验及研究中具有潜在的应用前景。

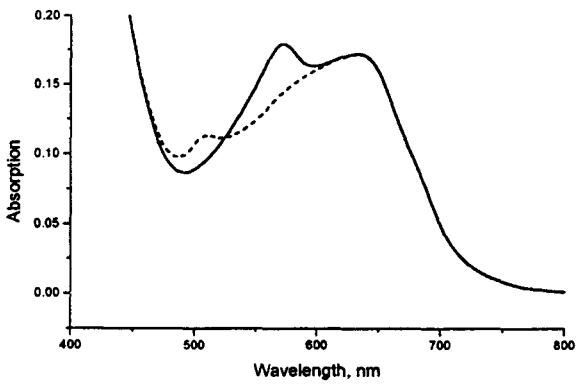
此研究得到国家自然科学基金委（ 69678027 ）和中国科学院的资助，谨致谢意。

关键词：椭偏光学显微成像，生长激素，皮质酮

层理鞭枝藻藻红蓝蛋白α-亚基的体外重组

邓明刚、王鲁、赵开弘
[a]华中科技大学生命科学与技术学院；[b]武汉大学生命科学学院，武汉

藻胆蛋白（phycobiliproteins）是存在于蓝藻、和红藻中的光合作用捕光复合物的功能色素蛋白，共价结合在藻胆蛋白 Cys 残基上的线性四吡咯——藻胆色素（phycobilins）及其与脱辅基蛋白的相互作用决定它们的颜色，使得藻胆蛋白具有特定的光谱性质。根据藻胆蛋白光谱性质和在光合作用能量传递中的作用，可以将藻胆蛋白分为三类：别藻蓝蛋白（简称 APC）、藻蓝蛋白（PC）、藻红蛋白（PE），在某些缺乏 PE 而具有异形胞的蓝藻中还存在与 PE 集光功能类似的藻红蓝蛋白（PEC）。藻红蓝蛋白操纵子共有 B、A、C、E、F 五个基因，其中 pecA 编码 PEC α 亚基脱辅基蛋白（PecA）. pecE 与 pecF 编码脱辅基蛋白与辅基色素共价连接反应所需的重组酶（PecE 和 PecF）。层理鞭枝藻中的 PEC 由 α 亚基（简称 α-PEC）和 β 亚基组成，分离提纯的 α-PEC 具有高效可逆光致变色，为了利用该高效可逆光致变色性质开发高效可逆光致变色蛋白质材料，我们正在人工设计 α-PEC，本工作报道人工设计 α-PEC 的初步结果。



见图，当由大肠杆菌过度表达得到的 PecA、PecE、PecF 蛋白和藻蓝胆素（PCB）混合 4 小时后，可以看到 PCB 的吸收变化到 565nm、和 640nm（光谱—）。640nm 是 PCB-PecA 重组蛋白的吸收，而 565nm 是重组生成的 α-PEC 的吸收。进一步用 570nm 光辐射样品，可以看到 565nm 吸收变到 505nm 吸收（光谱--—），光谱—减去光谱--—得到差示光谱……，等同于 α-PEC 的可逆光致变色，这表明体外重组得到了天然的 α-PEC。

本工作由国家自然科学基金和武汉市晨光计划资助。

细胞色素 b_{559}不同氧化态对 PS II 放氧核心复合物二级结构的影响*

杜林方（四川大学生物系，成都 610064）
李荣，徐春和，沈允钢（中国科学院上海植物生理研究所）
陆卫，沈学础（中国科学院上海技术物理研究所国家红外物理重点实验室）

光系统 II(PS II）是类囊体膜上存在的多亚基色素蛋白复合物之一，负责催化水的氧化释放分子氧和质体醌的还原，在光合作用的电子传递过程中起着非常重要的作用[1]。近来的研究表明：具有放氧功能的最小 PS II 单位是由 43 kD 和 47 kD 的反应中心核心天线 CP43 和 CP47 叶绿素 *a* 结合蛋白、34 kD 和 32 kD 的反应中心 D2 和 D1 蛋白、9 kD 和 4.5 kD 亚基组成的细胞色素 b_{559} (Cyt b_{559}) 以及 33 kD 锰稳定蛋白和另外 3 种小分子多肽构成[2]。高度纯化的 PS II 反应中心复合物除 D1 和 D2 蛋白外，还含有 Cyt b_{559}[3]。Cyt b_{559} 具有不同氧化还原电位形式，或处于 Em = 370 mV 的高电势(HP)，或处于 Em =60～80 mV 的低电势(LP)，且在一定条件下 HP 与 LP 之间可相互转变。尽管在低温条件下 Cyt b_{559} 可作为 $P680^+$的电子供体，也可被重组醌后的反应中心 D1-D2-Cyt b_{559} 光还原，但 Cyt b_{559} 的确切生理功能不清楚，确切的化学计量关系有差异，Cyt b_{559}/P680 比值为 1 或 2。由于付立叶变换红外光谱仪的发展和计算机辅助解析方法的开发，红外技术用于蛋白质二级结构研究得到促进。

我们运用付立叶变换红外光谱(FTIR)技术，对具有放氧活性的 PS II 核心复合物中蛋白质结构进行了分析，利用差谱和曲线拟合的方法，定量考察了 PS II 核心复合物中蛋白质二级结构中 α一螺旋，β一折叠的含量随 Cyt b_{559} 的氧化态的变化规律。结果表明，Cyt b_{559} 处于高电势(HP)，或处于低电势(LP)，并导致核心复合物的结构发生明显的改变。

光系统 II 核心天线 CP43 与 33 锰稳定蛋白邻近的证据*

杜林方赵晟李世崇刘亚楠　郑洪武
（四川大学生命科学学院，成都 610064）

光系统II (PS II)颗粒是定位于植物类囊体膜上的复杂的色素蛋白复合体，具有利用太阳光的能量来裂解水、释放分子氧并还原质体醌的功能，它由二十余种蛋白多肽组成。其中，被称为锰稳定蛋白的 33 kD 水溶性外周蛋白，具有稳定位于水裂解酶催化部位的锰复合物和维持水裂解酶天然构象等重要作用； CP47 和 CP43 是存在于 PSII 反应中心核心复合物中的叶绿素 *a* 结合蛋白，可将激发能传递给反应中心，而具有核心天线的功能。由于无法得到核心复合物的单晶并进行 X-衍射结构分析，迄今，人们对 33 ku 蛋白、CP43 和 CP47 的结构及其在放氧复合物中如何连接尚不清楚。尽管利用去垢剂增溶 PS II 颗粒可分离到不同的反应中心复合物，并借助二维电镜重构术对不同 PS II 制剂中多肽相对空间结构进行分析，但是，由于 PS II颗粒组分多、空间结构关系复杂，人们对 PS II 中不同色素蛋白之间的相邻关系了解不多。而化学交联法是一种研究复杂蛋白质复合物中各蛋白质亚基相对空间位置的有效方法，我们使用交联剂 EDC 对菠菜 PSII 颗粒进行交联处理，借助免疫化学技术对交联产物进行了鉴定，首次揭示核心天线 CP43 与 33 ku锰稳定蛋白相邻近。

EDC 处理 PS II颗粒的交联反应要受样品浓度、反应温度、EDC 浓度和反应时间等因素的影响。适宜的样品浓度、较低的 EDC 浓度 (0.1%-0.4 %) 和适当的处理时间 (10min)，交联处理后的 PS II 颗粒的放氧活性几乎不受影响。借助温和电泳分离叶绿素蛋白质复合物，考察交联处理对 PS II 颗粒中色素蛋白的影响，交联处理后，出现新的色素蛋白带，并随处理的 EDC 浓度加大而变深；游离色素带浓度减弱。表明处理使色素蛋白交联，在去垢剂增溶时掉下的游离色素较少。

经 EDC 处理的 PS II颗粒中，CP47 和 CP43 核心天线、24 ku 蛋白、18 ku 蛋白明显减弱；有新的蛋白带出现（49 ku、56 ku、63 ku、78 ku 和 94 ku）。并随处理时 EDC 浓度的加大，出现新带的数目增多和含量增加，尤其以 EDC 浓度 0.2 %、0.3 %的交联效果最为显著。使用特异抗血清进行免疫印迹分析交联产物。结果显示： 94 ku 蛋白带具有分别与抗 33 ku蛋白抗体和抗 CP43 抗体发生免疫反应的活性,说明 94 ku 带是 33 ku 和 CP43 蛋白的交联产物。至于 78 ku 蛋白带很可能是 Enami 等的 80 ku 的 A 带,为 CP47 和 33 ku 交联产物；而 63 ku 蛋白带可能是 Enami 等的 B 带 ，为 LHC II 交联产物。

由于 33 ku 锰稳定蛋白参与了与水裂解相关的锰复合物的稳定，调节 PS II 对钙的需求 ，是 PS II 放氧复合物中最重要的组分之一，因此，它在空间位置上与诸多蛋白靠近的事实可作为其功能上与其它蛋白质互作的又一佐证。

教育部霍英东基金、教育部跨世纪人才基金、国家自然科学基金（批准号： 39770071)资助项目。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

生物光色素系统光循环过程的随机过程描述

董凤琴谈国太杨俭华
（首都师范大学物理系北京 100037）

菌紫质和血红蛋白等一类生物光色素，受光激发后将发生光循环，并随之产生一系列中间态产物。研究这些光循环过程的随机特性，将对这类过程的分子机制揭示，以及参与这些过程的光色素分子，在纳米器件方面的应用研究具有重要价值。

由随机过程理论可知，一个生物光色素光循环过程包含随机过程所具的特性，即它具有参数集和状态空间，在参数点上随机变量的取值属于该状态空间。但，它们不是一个简单的随机过程。而是由多个简单随机过程组成的复杂过程，即表现在：一个光循环具有多个中间态，每个中间态都是一个随机过程，它们具有多个参数集。每一个这样的随机过程可同时存在，之间互不独立，可以互相转换，并通过过程间的转换构成多支路和多循环。因此，生物光色素系统的光循环过程是一个复杂的随机过程。现设，$\alpha=\{(\alpha_1,\alpha_2,\alpha_3,\ldots,\alpha_p)/\alpha_1\in A1,\alpha_2\in A2,\alpha_3\in A3\ldots\alpha_p\in Ap\}$ 。其中 $(\alpha_1,\alpha_2,\alpha_3,\ldots,\alpha p)^T$ 为参数向量，A1, A2, . . . Ap 为相应的参数集，则对具有 n 个中间态的光循环过程，可表达为：

$$STA(n)=(m_1(\alpha),m_2(\alpha),m_3(\alpha),\ldots m_n(\alpha))^T;$$

定义， $M=(m_1(\alpha),m_2(\alpha),m_3(\alpha),\ldots m_n(\alpha))^T$ 为状态过程向量。向量 M 中各分量 $m_i(\alpha)$ 代表中间态过程，它们定义在状态空间 Ω 上，$\Omega:[0,N_0]$（N_0 为体系总分子数或浓度）。因此若 $m_i(\alpha)$ 在第 k 次抽样取值 $\omega_k\in\Omega$ 时，$m_i(\alpha,\omega_k)$ 就是多参数随机过程。这样，可获得如下几点：

i．一个复杂的生物光色素的光循环过程，可用一个状态过程向量 M 来表达，这个向量的各分量是由光循环的各中间态随机过程组成；

ii．构成状态过程向量的各中间态随机过程，具有共同的参数和共同的参数集，它们分别是温度、时间、PH 值、离子强度等等。它们都是连续变量。在实际测量时，往往选择一个参数研究，其它参数则控制在一定的范围里；

iii. 对时间参数，不同的中间态随机过程有不同的时间起始点；无论用 δ 形式或非持续光源激发，还是用持续光源激发，它们的时间参数集都可以是无限集。但具体的讨论都是在有限集上进行的；

iv. 所有的中间态随机过程共享一个状态空间， $\Omega:[0,N_0]$ 。也可用概率空间 $\Omega:[0,1]$ 作为状态空间。

由此可见，应用状态过程向量，再结合状态转移概率和中间态概率定义（另文发表），就可对生物光色素系统光循环的复杂随机过程，进行较充分的描述。

菠菜中内周天线 CP43、CP47 的超快光谱特性*

贺俊芳 [1]王水才 [1]张舒 [1]　贺锋涛 [1]
单际修 [2]李良璧 [2]匡廷云 [2]
[1]中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态室　　西安　710068
[2]中国科学院植物所　　北京　100093

以 514.5nm，82MHz，120ps 的锁模 Ar 激光器作激励光源，采用超快荧光光谱技术对从菠菜中分离纯化的内周天线 CP43 和 CP47 进行研究。实验中，为避免激光热效应对样品造成损伤，采用冷却循环的样品池，冷却物为冰水混合物；采用低温下快速(~2ns 上升时间)、高增益(10^6 电流增益)的光电倍增管 RC 31034A 和信号平均微处理器 Boxcar 4400 对样品所发出的荧光进行接收和处理。

采用这套荧光光谱装置对内周天线 CP43 和 CP47 进行研究，获得了它们的动力学三维荧光光谱。CP43 的荧光光谱范围为 640~780nm，最大峰位于~680nm 处，在~650nm 和~715nm 处有两个小的"肩峰"；CP47 的荧光光谱范围为 630~775nm，最大峰位于~690nm 处。采用自己编写的数据处理软件对数据进行优化拟合，认为 CP43 在 680nm 处的荧光寿命为 3.543ns；CP47 在 690nm 处的荧光寿命为 3.222ns。内周天线只包含有叶绿素 a 分子和 β-胡萝卜素分子，β-胡萝卜素分子的吸收光谱位于 400~550nm 波段，而在此波段，叶绿素 a 分子的吸收非常小，几乎为零，因此内周天线 CP43 和 CP47 在 514.5nm 激光激励下，最先受激发的分子只能是 β-Car。叶绿素 a 分子的吸收光谱在蓝区和红区均有，CP43 和 CP47 的荧光光谱位于红区，依据吸收光谱与荧光光谱的镜像对称性，内周天线所发出的荧光是从 Chla 分子发射的。由此说明，β-Car 起了吸收光能和传递能量的作用。光系统Ⅱ中的光化学反应只能在反应中心进行，而在外周天线和内周天线中一切色素分子都进行吸收光能和传递能量的作用，不具备进行光化学反应的能力。因此在光激励下，内周天线中的 Chla 分子处于 π－π激发态，处于激发态的电子可以发射荧光，也可以进行系间窜越到三重态。经理论计算认为，CP43 和 CP47 中 Chla 分子的荧光发射效率分别为 38.3%和 40.6%，β-Car→Chla 的能量传递速率常数约为 $9.6\times10^{11}s^{-1}$ 和 $1.3\times10^{12}s^{-1}$。

本论文由国家重点基础研究专项经费资助（编号：G1998010100）

重金属 Co^{2+}离子对植物光系统 II 结构与功能的影响*

李世崇　　杜林方

(四川大学生物系生化教研室，成都 610064)

植物光系统 II (PS II) 负责水的氧化和质体醌的还原，在光合作用的电子传递过程中起着非常重要的作用，它还维持着人类生存环境中大气层的氧气平衡。光系统 II 结构与功能研究是近年来光合作用研究的热点之一。除采用不同去垢剂处理 PS II 颗粒制备多肽组分不同、化学组成不同和活性不同的反应中心复合物外，外加不同试剂，考察它们对 PS II 电子传递链的影响，对于认识 PS II 电子传递过程、弄清辅助因子(Ca^{2+}、Cl^-、Fe^{2+})与 PS II 功能的关系也是十分必要的。重金属污染是当今人类面临的一个最为严重的环境问题，它们对植物的影响不容忽视。光合作用是植物特有的功能,尽管有 Cu^{2+} 和 Zn^{2+}等重金属离子影响植物光合电子传递链的研究报道，但人们尚不清楚它们确切的作用部位和作用机理，至今还未见有重金属 Co^{2+}离子对 PS II 水裂解酶结构与功能影响的研究工作。我们研究了 Co^{2+}离子对 PS II 颗粒放氧活性、多肽组成和 Signal II 信号的影响，以确定 Co^{2+}离子的作用部位，了解 PS II 结构与功能的关系。

低浓度的 Co^{2+}离子处理 PS II 颗粒，可使放氧活性降低，表明 PS II 活性受到抑制，抑制程度与浓度相关，在毫摩尔浓度水平上 Co^{2+}可抑制 PS II 的水裂解放氧活性。外加 15 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 并不能减轻 Co^{2+}对 PS II 颗粒的抑制，表明 Co^{2+}对 PS II 中与放氧活性相关的 Ca^{2+}结合部位无作用。

用 SDS-PAGE 检测，PS II 颗粒经 1mmol/L $CoCl_2$ 作用后,可引起 24 kD 和 18 kD 蛋白部分失去，且随着 Co^{2+}浓度的增加 24 kD 和 18 kD 丢失得更多；却对 33kD 锰稳定蛋白无影响，即使在 300 mmol/L $CoCl_2$ 也不丢失。表明处理后 PS II 颗粒的多肽组分发生明显变化，主要是与 PS II 中 24 kD 和 18 kD 两种水溶性外周多肽的丢失，此过程与处理时金属离子的浓度相关。

在自由基信号区，Co^{2+}处理的与未处理的 PS II 颗粒具有相同的暗条件下的 EPR 信号(Signal II_{slow})，这表明处理对 Signal II_{slow} 没有影响，D 仍然处于完全氧化的状态。Co^{2+}处理的 PS II 颗粒中照光时与暗条件下的 EPR 信号差不多,未能检测到 Signal II_{fast} 信号，这表明 Z 受到损害，它的氧化受到抑制；一个新的自由基信号出现，说明样品仍能发生原初电荷分离反应。这表明：Co^{2+}作用于 PS II 的电子传递链，阻止氧化侧 Z→P680 的电子传递。处理的 PS II 颗粒若经 EDTA 反复洗涤，可检测到 Signal II_{fast} 信号，但其强度只有 Tris 洗涤的 PS II 颗粒的 70 %左右。说明 Co^{2+}离子对 Z 到 P680 电子传递的抑制是可逆的，在 Co^{2+}被除去后，抑制作用也随之解除。

*国家自然科学基金(39770071)、四川省青年科技基金资助课题。

优化培养基增加层理鞭枝藻藻胆蛋白产量

李月　邓迎峰　周明　赵开弘武汉大学生命科学学院　武汉 430072

藻胆蛋白是蓝藻和红藻藻胆体的组成部分,是光合作用集光复合体的组成部分,一般可以分为：别藻蓝蛋白（APC）、藻蓝蛋白(PC)、和藻红蛋白（PE）等，在某些缺乏PE而有异形胞的蓝藻中存在充当PE天线捕光功能的藻红蓝蛋白(PEC)。藻胆蛋白可用于天然食用色素、化妆品色素和制药行业。特别是本工作研究的层理鞭枝藻（简称 *M. laminosus*）含有PEC，从中提取的PEC α亚基具有高效可逆光致变色性质，具有重要的应用开发前景。提高藻胆蛋白的含量及藻的生长速率不仅可获得高价值的蛋白资源，还可以提高蛋白质分离纯化的效率。我们研究了不同浓度的镁、钾、铁、氮等对层理鞭枝藻藻胆蛋白含量的影响，同时也尝试用葡萄糖、蔗糖代替原培养基中的土壤浸出液并检测其影响。

层理鞭枝藻采用中科院水生所SE培养基培养。对照实验即按此培养基培养层理鞭枝藻，优化培养基时则改变相应组分的浓度。镁浓度通过改变$MgSO_4$浓度，钾浓度通过改变KCl浓度，铁通过改变EDTA－$FeCl_3$的浓度，氮通过改变$NaNO_3$的浓度实现。藻培养的其它条件：pH 8.0、光照强度1000 lux、温度37℃、搅拌、通空气。培养5周后收集。取0.2～0.3克（干重）藻，用5ml无水甲醇抽提两次，除去叶绿素。每克藻加0.5体积20mmol/L磷酸钾缓冲液(pH8.0)，反复冻融几次后用超声波破碎细胞，离心取上清并测其体积。上清液适当稀释后，避光下用723型可见分光光度计测330～800nm的光谱图。藻胆蛋白含量的测定根据下列公式计算藻胆蛋白的含量：

$$PEC\ (mol/L) = 14.5\times10^{-7}A_{575} - 9.09\times10^{-7}A_{618}$$

$$PC\ (mol/L) = 14.4\times10^{-7}A_{618} - 6.02\times10^{-7}A_{652} - 3.47\times10^{-7}A_{575}$$

$$APC\ (mol/L) = 0.640\times10^{-7}A_{575} + 12.2\times10^{-7}A_{652} - 2.65\times10^{-7}A_{618}$$

我们发现当培养基中镁离子浓度为3.6 mmol/L时，PEC、PC、和APC三种蛋白的产量较大提高,每克藻(干重)分别含50.2、106.0、11.9 mg 钾离子浓度为10.7mmol/L时，PEC、PC、APC的含量达到最大，分别为21.1、38.5、24.9mg/g 铁离子浓度为5.5 mmol/L时分别为32.2、58.0、14.8 mg/g ；氮浓度为11.8 mmol/L时，分别达到74.7、100.9、31.9 mg/g，同时藻生长量也提高了2.3倍。它们的产量比对照都有不同程度的增加（PEC增加了69%～498%, PC 173%～652%, APC 95%～423%）。用低浓度的葡萄糖和蔗糖作为碳源也可增加藻的生长量特别是PEC的产量。

菠菜光系统 II 天线组分 CP29 的分离及其性质*

李晓鹏　杜林方**　梁厚果
四川大学生物系，成都 610064)

光合作用中的光反应是由天线色素吸收并传递给反应中心的激发能所驱动的。光系统 II (PS II)的天线系统具有高度复杂的结构，并随环境条件(SI/SII态转变、热胁迫和冷胁迫)而改变。它由核基因组 *Lhcb* 基因编码的叶绿素 *a/b* (Chl *a/b*)结合蛋白所组成。它们分别是主要的捕光色素复合物 II (LHC II)和至少 4 种次要的捕光色素亚复合物(CP29、CP26、CP24 和 CP22)[1]。与 LHC II 相比，几种次要的亚复合物的发现较晚。近来的研究表明，它们含有β-胡萝卜素和叶黄素，定位于 LHC II 与 PS II 核心复合物(PS IICC)之间[2]，不仅在激发能的传递中起着桥的作用，而且参与叶黄素循环，分散过多的激发能，对抗光抑制，起着保护反应中心的作用，其中的 CP29 和 CP22 更靠近 PS II 核心复合物[3]。最近有文献报道，CP29 可以象 LHC II 一样被磷酸化，CP29 的磷酸化可能与植物对冷胁迫的抗性相关。但迄今文献中采用温和电泳和超速离心的方法分离这些亚复合物，它们常混杂在一起，难以进一步研究单一组分的结构和功能；人们对这些色素蛋白的构象未知、结合的色素分子的数目多少意见不一、色素分子的分布仍不很清楚，对它们在 PS II 中的空间位置及与反应中心组分的作用方式了解的更少。我们采用离子交换柱层析法纯化了菠菜 CP29，对其性质进行了研究。

菠菜放氧的 PS II 核心复合物经 0.8 mol/L Tris (pH 8.0)洗涤后，用温和的非离子去垢剂 DM 和高浓度的 $LiClO_4$ 增溶，再经 DEAE-Toyopearl-650S 离子交换柱层析分离，可分离得到毫克量的叶绿素 CP29 色素蛋白复合物。SDS-PAGE 显示一条 30 kD 蛋白质带。根据 Arnon 法和 Markwell 法的结果表明，每个蛋白质分子结合有 7～8 个分子的叶绿素 *a* 和 2～3 个分子的叶绿素 *b* (Chl *a*/ Chl *b* 的比值为 2.57)。

室温条件下，CP29 红光区最大吸收峰在 677.2 nm 处，蓝光区最大吸收峰在 468 和 436 nm 两处；677.2 和 436 nm 吸收峰来自 Chl *a*，而 468 和 640 nm 吸收峰来自 Chl *b*，且 468 nm 峰值远低于 436 nm 峰值，485 nm 处的肩峰属类胡萝卜素。以 436 nm 波长激发(激发 Chl *a*)，最大荧光发射峰为 681 nm，另外在 740 nm 处有一弱峰，可能是主发射峰的振动副带。可见光圆二色谱中，662 和 681 nm 的正负双重信号峰及 408、444 和 472 nm 是 Chl *a* 的贡献，496 和 458 nm 分别是 Chl *b* 峰和类胡萝卜素峰；640～700 nm 间的“W”型结构表明 CP29 中色素与色素之间存在相互作用[4](Q_y 转换)。上述结果表明其处于较为天然的状态。

CP29 复合物远紫外区圆二色谱中，210 和 220 nm 处的双负峰为α螺旋的贡献，根据 CD 谱用 Chen-Yang 的方法，计算结果表明菠菜 CP29 复合物的蛋白质二级结构中α螺旋占 34.5%，β折叠占 5%。

选择目前唯一克隆出 cDNA 的大麦 CP29，采用 Chou-Fasman 的方法对大麦 CP29 的氨基酸二级结构倾向性因子进行分析计算，结果表明 CP29 有 3 个跨膜α螺旋区：helix I (99～127)、helix II (151～169)、helix III (201～230)，在第 56～98 位的插入片段中，有一段约 13 个氨基酸残基的α螺旋(78～90)。此外，还有少量β折叠(128～134，246～254)和一些β转角。其余肽段均为无规卷曲构象。推算出大麦 CP29 复合物的蛋白质中α螺旋占 36%，β折叠占 5.4%，这与由圆二色谱计算的菠菜 CP29 复合物的结果相近。

*国家自然科学基金(39770071)、教育部霍英东基金资助课题。

类菌紫质蛋白在膜上聚集状态研究

孙庆安　李庆国　张志鸿

复旦大学生理和生物物理系，上海 200433

唐琳　胡钧

中国科学院上海原子核研究所，上海 201800

前已报导，自西藏扎北湖分离得的一株嗜盐菌 H.sp.xz515，也具有质子泵功能。但从中分离得的紫红膜与 H.salinarum 中的紫膜的吸收特性有明显差异，并且在这两种质子泵中，质子在膜上的运行规律也有明显区别．此外，XZ515 与 BR 的同源性也仅为 56％．因此一个很有趣的问题是，在紫红膜上视黄醛蛋白的排列状态是否也与 BR相同。

本项研究用两种实验方法研究了在嗜盐菌 H.sp.xz515 中视黄醛蛋白在膜上的聚集状态．首先用光强度与蛋白质分子光学性质的相互关系，验证了在紫红膜中也存在着光协同性相互作用．从而有理由推断，紫红膜上视黄醛蛋白分子也是以多聚体形式存在于膜上的。进一步又用原子力显微镜的拓扑观察证明了三聚体结构的存在，并在此基础上排列成平面六方晶阵．本文实验结果将有助于说明在分子间螺旋侧链上非极性残基间的范德华相互作用对于稳定三聚体结构有重要作用。

需要全本请访问 www.ertongbook.com