

致 谢

本文是在黄碧霞教授的精心指导下完成的。

黄教授忘我的工作热情、严谨的治学态度、不断创新的学术思想、和认真求实的工作作风已深深地铭记在我心，必将激励我更好地投入到今后的学习与工作中去。在整个论文的进展过程中，我不仅得到了黄教授多方面呕心沥血的指导和生活上无微不至的关怀，同时也得到了一个科学工作者和教育工作者良好素质的榜样。

在论文即将完成之际我要向我的导师表示衷心的感谢和深深的敬意。

感谢十二系的岳军教授在百忙之中为我的实验工作所作的精心指导，他渊博的知识、踏实的工作作风和谦和的为人给学生留下了深刻的印象。

实验过程中，得到了李碧琳副教授、陈树榆教授、何友昭副教授、淦五二老师、芮蕾老师、李前荣老师、安徽地质实验研究所的徐洛高工和科大经济技术学院的时亮老师等诸位老师的热情帮助，在此一并表示我最诚挚的谢意。

感谢蔡继宝、谭庶欣、张延华、秦亭等同学给予我的帮助，在此谨向他们表示我良好的祝愿和诚挚的谢意。

感谢我的安大老师及同学多年来对我的关心与帮助。

最后感谢我的家人对我的支持与鼓励。

摘 要

本论文工作运用采用 HPLC 与 ICP-AES 联用的方法、HPLC 与 ICP-MS 联用的方法、红外光谱(IR)、凝胶层析(GPC)、火焰原子吸收光谱(FAAS)、紫外光谱(UV)等多种手段对金属离子与生物体系的结合形态进行了系统而深入的研究,分别对以下两种体系进行了研究,即银—明胶体系和稀土元素—细胞质膜体系。
(具体作了以下几方面的工作:

1 以鱼明胶体系为对象、借助于红外光谱研究了银离子、卤化银与明胶的键合特性。结果表明 Ag^+ 主要与明胶中蛋氨酸残基的硫醚键配位;明胶中的蛋氨酸在物理成熟的过程中不稳定,易被氧化为蛋氨酸亚砷。通过凝胶层析、紫外、及火焰原子吸收光谱,我们得到了明胶中蛋白及 Ag^+ 的分子量分布曲线。结果表明明胶中的 Ag^+ 不与明胶大分子蛋白 γ 组分结合,而主要与小分子蛋白或肽结合。

2 以天然生长的植物为对象,研究了稀土元素与细胞质膜的键合作用。采用离心分离的方法获得细胞质膜后,再用去污剂 SDS (十二烷基磺酸钠) 溶解质膜成分。将所得到的富质膜组分样品进行排阻高效液相色谱分离。用 ICP—MS 和 ICP —AES 分别检测级分溶液中的稀土元素含量和钙含量。研究结果表明在根细胞质膜上存在有 La、Ce、Pr 和 Nd 等元素并且这些元素集中分布在与蛋白无关的磷脂组分中;质膜上的 Ca 一部分是与与蛋白无关的磷脂结合,另一部分与与蛋白有关的磷脂结合。这个实验结果说明与蛋白无关的磷脂是质膜上 La^{3+} 等稀土离子与 Ca^{2+} 共同的结合配体。此外,我们还研究了土壤施加混合稀土对生物膜上 Ca 分布的影响,研究结果表明稀土元素与 Ca 竞争膜磷脂上的结合位点,从而影响了膜上的 Ca^{2+} 转运机制,导致了 Ca 在细胞中分布的改变。

✓ 关键词: 明胶, 银, 细胞质膜, 磷脂, 稀土元素, 钙

Abstract

Many coupled methods of HPLC-ICP-AES、HPLC-ICP-MS、infrared spectroscopy、UV Spectroscopy and gel filtration—flame atomic absorption were used for studying chemical morphology of Ag in gelatin or REEs and Ca in plasma membrane.

1 Photographic gelatin is one of the most important materials for silver halide emulsion. Gelatin is a natural biological macromolecular material with a polypeptide link structure, which can combine metal elements with various group which may result in different physiological activity. It is becoming more important to study the chemical combination forms in photographic gelatin. In the present work, Ag binding forms in photographic gelatin were studied. From IR spectroscopy, we know Ag binded $-SCH_3$ of methionine. And the molecular distribution of Ag were explored by GPC/spectrophotometry. The results show that Ag^+ coordinates with gelatin protein and exists in small molecular protein or peptide mainly.

2. Plasma membranes of cells of soybean roots were prepared by centrifugation method and solubilized by SDS. Plasma membrane components-enriched sample was chromatographed on size exclusion column. Rare earth element contents or calcium contents of fraction solutions were determined by ICP-MS or by ICP-AES. Experimental results showed that there was lanthanum in plasma membranes of cells of soybean roots and it combined the part of phospholipids which isn't related with proteins. And Ca can combined the part of phospholipids too. In addition, the effects of added REEs mixtures in soil on distribution of Ca in biological membrane was also researched. The results indicate that REEs compete with Ca^{2+} at some Ca^{2+} binding sites located in membrane phospholipids, which may have effect on activity of membrane Ca^{2+} transport mechanisms and induce the changes of distribution of Ca^{2+} in cell.

Key Words: Gelatin, Silver, Cell Plasma Membrane, Phospholipids, Rare Earth Elements, Calcium

第一部分 综述

第一章 明胶

一 明胶概述

明胶是胶原蛋白经不完全降解转化而得到的、由十八种氨基酸组成的多肽链的天然生物大分子物质。1871年 Maddox^[1]首次将明胶引入 AgX 感光乳剂体系制出明胶 AgBr 干板以来,明胶在感光材料生产中取得了难以取代的特殊地位。

明胶作为感光材料,特别是 AgX 感光材料的重要基质原料,具有其他天然或人工合成的高聚物所不可替代的独特性质和作用。从乳剂制备、化学成熟、涂布、曝光直至显影加工的各道工序,明胶都起着十分重要的作用^[2-11]。

二 鱼明胶^[12]

鱼明胶是明胶的一种,具有明胶的通性。但由于它来源于深水鱼类(硬骨鱼)的皮,所以与一般的动物皮胶和骨胶又有差别。鱼明胶在其蛋白组分上、氨基酸成份上与普通的牛明胶的不同分别见表 1-1 和表 1-2 所示。

表 1-1. 明胶蛋白组分的相对含量

样品	相对含量 (%)							
	α_1	α_2	$\alpha_1+\alpha_2$	α_1/α_2	β_{11}	β_{12}	$\beta_{11}+\beta_{12}$	γ
鱼明胶	13.3	54.3	67.6	1:40	23.8	8.6	32.4	/
牛骨胶	40.4	17.9	58.3	1:0.44	15.8	15.1	30.9	10.6

从表 1-1 可知在鱼明胶中主要蛋白是分子量小的 α 组份, β 组份较少,几乎不含分子量最大的 γ 组份;而在骨明胶中 α 组份占优势, γ 组份较少,还有部分 β 组份。因此鱼明胶分子量小于骨胶,且其分布明显窄于骨胶。

表 1-2 明胶氨基酸残基的相对含量 (%)

氨基酸	鱼明胶	牛骨胶
丙氨酸	124	114
精氨酸	55	51
天冬氨酸	37	45
半胱氨酸	--	--
谷氨酸	77	71
甘氨酸	334	325
组氨酸	9	5
羟脯氨酸	54	86
异亮氨酸	10	11
亮氨酸	20	25
赖氨酸	35	34
蛋氨酸	13	6
苯丙氨酸	11	13
脯氨酸	106	135
丝氨酸	65	37
苏氨酸	26	18
色氨酸	--	--
酪氨酸	2	3
缬氨酸	22	22

从表 1-2 可清楚地看出鱼明胶中羟脯氨酸残基的含量大约只有牛骨胶的 2/3，而鱼明胶中的蛋氨酸残基含量较高，是牛骨明胶中蛋氨酸残基含量的 2 倍。正是鱼明胶在组成上的特点决定了它具有不同于一般骨明胶的特性。据报道以鱼明胶制备乳剂可得到粒径 $<0.1\mu\text{m}$ 的 AgX 粒子^[13]，从而提供了一种制备纳米粒子乳剂的新途径。

第二章 卤化银纳米粒子保护性载体

§ 2.1 卤化银照相体系中明胶的保护作用

在卤化银照相体系中明胶作为保护性载体具有至关重要的作用，主要表现在以下方面。

一 物理成熟阶段

1. 卤化银成核过程中明胶防止卤化银核的聚结；
2. 阻止卤化银颗粒生长；
3. 对卤化银颗粒大小分散度的影响

在一定明胶浓度范围内，明胶浓度对乳胶颗粒大小的分散度有明显影响。浓度小时，乳胶颗粒大小很不均匀，颗粒平均尺度增大；反之，颗粒大小较均匀。

4. 对卤化银晶形的影响

明胶是卤化银微晶生长的晶形调变剂。无明胶存在时，获得的卤化银呈球形，晶体颗粒的大小有限。在有明胶的情况下，当明胶浓度自 0.75 升至 1.5% 时，卤化银晶核总数增多，颗粒变小。当明胶浓度进一步增加时，核的大小和总数均不变，晶体呈片状。

这样，为了控制卤化银颗粒的形状、大小和大小均一性，需要在有保护性胶体的存在下沉淀卤化银。虽然有多种人工合成的高聚物可作为保护性胶体，但用得最多的却是明胶。

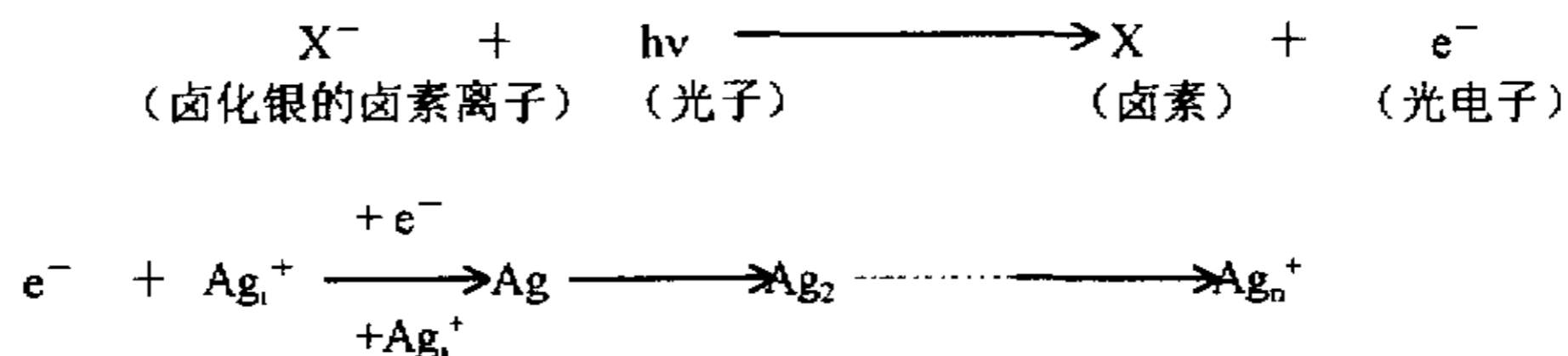
二 化学成熟阶段

在化学成熟过程中通常要加入化学增感剂以达到增感的目的。化学增感作

用和增感剂之间的作用在很大程度上与明胶间的反应有关，也可能与明胶杂质有关。因为明胶（或其杂质）与增感剂离子的作用影响了这些离子在乳剂中的真实浓度从而影响了化学成熟过程。

三 曝光时明胶的卤素受体作用

曝光时的作用过程示意图：



Ag_n^+ 为可显潜影的最小单位， $n \geq 4$

为了防止光作用产生的光电子再与光解产生的卤素 X 复合导致光敏度降低，就需要有卤素受体，而明胶具有很强的吸卤能力。

四 对潜影的稳定作用—阻止潜影衰退

没有明胶的卤化银乳剂中的潜影寿命只有几秒钟，有明胶时却长得多。

五 影响乳剂的显影作用

阻碍照相乳剂显影，影响影像银的结构。其作用机制尚未完全达成共识，但人们发现，明胶的存在一方面减小了卤化银表面上吸附的显影液的浓度，这可能是明胶阻碍显影的重要原因。另一方面，由于它可以键合银离子而减少了颗粒表面游离的银离子的浓度。还发现显影时明胶的存在与否影响显影的部位：无明胶时，显影迅速遍及整个颗粒；有明胶时，显影从颗粒表面确定部位（潜影核）开始，最终形成可见影像。对生成的 Ag 的结构有明显影响：有明胶时，生成的 Ag 更多的是丝状的、自然色调、高覆盖率；无明胶时，生成的 Ag 呈密集形、棕色、低覆盖率。王越的工作进一步表明：即使有明胶存在，明胶的存在状态也影响显影银的形貌^[4]。

§ 2.2 明胶对卤化银纳米粒子的保护作用

目前对卤化银纳米粒子的研究对明胶提出了新的研究课题。纳米尺度的卤化银体系由于具有超高的信息记录和储存容量、高反差、高分辨率、高解像力等许多传统乳剂所不具有的优良特征而逐渐受到人们的重视，并且已在航空摄影^[15]、全息照相^[16]、微缩胶卷^[17]、光刻技术^[18]等众多领域得到越来越广泛的应用。其中，超细粒子卤化银乳剂的制备一直是感光科学研究中引起人们广泛关注的课题之一。

一 对于一般的动物骨明胶，必须是在相当高的胶银比（10:1），即相当低的银含量时才能制备出较稳定的纳米卤化银乳剂^[19]。银的相对含量一旦增加，骨胶对颗粒长大的抑制作用减弱。

二 在骨明胶—高聚物（如 PVA）体系的共同保护作用下，当胶银比较低（如 7.6:1）时，也可获得稳定的、平均粒径约为 20nm 的卤化银颗粒^[19]。

三 以鱼明胶作为保护性介质利用直接反应法可以在一个比较宽的胶银比值范围内获得稳定的、粒度较均匀的、平均粒度小于 20nm 的卤化银颗粒^[20]。而且胶银比值低至 4:1 时仍能获得粒度良好的卤化银乳剂。

以上研究结果表明照相明胶对于卤化银纳米粒子的制备起着十分重要的保护作用。不同种类的明胶在保护能力上的差异可能是由于其组成和结构上的不同所致，因而需进一步深入研究明胶中不同组分与卤化银之间的作用机制。这将有助于我们理解和拓展纳米卤化银粒子的性质与应用，从而在根本上解释卤化银成像过程中的复杂机理问题。

§ 2.3 明胶对卤化银颗粒的保护作用与卤化银对明胶的吸附有关

一 有关吸附层的认识

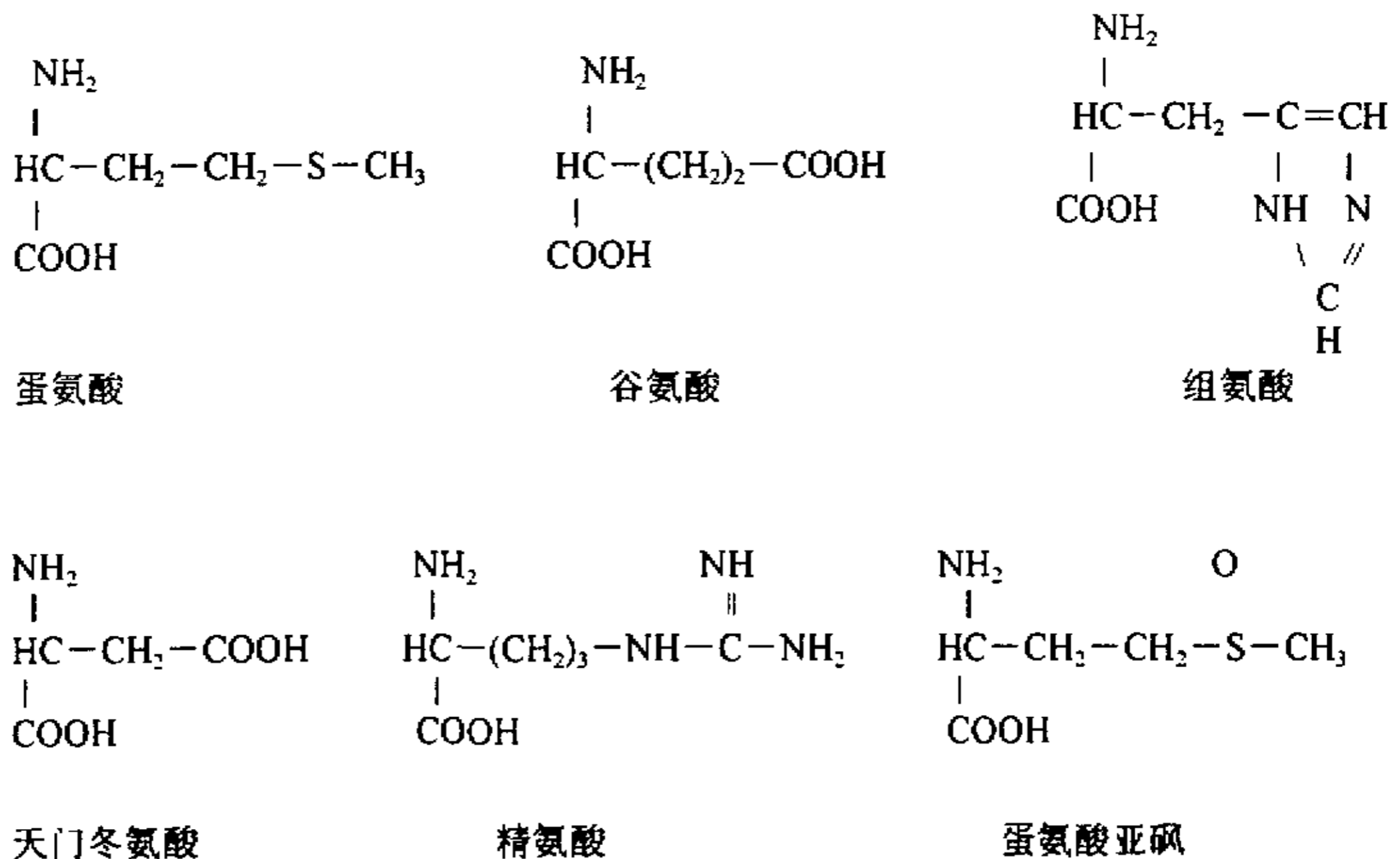
1. 卤化银微晶大约 $0.01-1\ \mu$ 直径范围, 即 $100-10000\text{Å}$ 。原纤维肌直径约 20Å , 前者大约是后者的 $5-500$ 倍以上, 卤化银颗粒被明胶大分子维系。
2. H. Borginon^[21]认为被卤化银颗粒吸附的明胶层是明胶的分子以一些基团附着在卤化银表面上, 明胶蛋白链的其余部分伸向四周环境。因此所吸附的明胶层的厚度随链的长度而增加。在明胶中有非极性区和极性区, 非极性区主要包括甘氨酸, 脯氨酸和羟脯氨酸。极性区由极性更大的一些氨基酸构成, 极性区与吸附有关不是不可能的。虽然有人发现在明胶水解后, 大部分天门冬氨酸还处于被吸附状态。
3. Pouradier^[22]等研究表明明胶分子量自 $30,000$ 增至 $190,000$ 时, 被吸附的明胶量从 $0.95\ \text{g/g AgBr}$ 增至 $1.9\ \text{mg}$ 。在等电点所吸附的明胶量最多, 盐的进入减少了静电作用, 明胶分子变得更小, 因而吸附的更多。
4. Berendson^[23]认为吸附量与明胶浓度和胶银比有关。
5. 明胶的吸附在很大程度上是不可逆的, 这意味着用水洗不下来。

二 明胶的保护作用与明胶组分

明胶被卤化银颗粒吸附可能有以下三种途径: 主要是明胶与卤化银颗粒间的化学键, 另外还有静电吸附以及疏水部分的吸附。

1. 认为吸附力的本质是明胶与 Ag^+ 的键合^[24]。与卤化银中 Ag^+ 键合有关的明胶基团是: 在低 PH (略酸性) 下, 只有蛋氨酸的硫醚基对 Ag^+ 有足够的亲和力; PH 高一些时羧基也可以; 在更高 PH 时, 终端氨基、组氨酸的咪唑基团也可以与 Ag^+ 键合。在整个 PH 范围内, 蛋氨酸均能与 Ag^+ 键合。不同的明胶与 Ag^+ 的键合能力不同, 这种差别与明胶的氧化程度有关, 这是由于氧化程度不同, 其中未受损的蛋氨酸残基含量不同所致。H. Borginon^[25]他们还

测出了蛋氨酸被卤化银吸附的吸附热。Zimkin^[26]发现将被吸附的明胶水解后，留在卤化银上的明胶中天门冬氨酸很丰富，因而他们认为是形成了这样的环状化合物：羧基（天门冬氨酸）—银离子—亚氨基（肽键）。也就是说通过这些残基明胶被吸附在 AgBr 上，但这并未获得其他太多的支持，因为天门冬氨酸与 AgX 的吸附热检测不出，这意味着它们之间的吸附作用不明显。至于为什么在 Zimkin 的实验中未发现硫醚基团和谷氨酸，我们认为这与其采用的具体实验方案有关。Zimkin 用羧肽酶、氨肽酶于室温下水解非键合的氨基酸后，用 50℃ 水反复冲洗微晶；卤化银吸附的氨基酸是将卤化银晶体置于 6N HCl 中在 100℃ 恒温 30h 得到后再进行测定的。我们知道蛋氨酸性质较不稳定，在高温或氧化剂存在条件下，蛋氨酸极易被氧化为蛋氨酸亚砷（Metsox）和蛋氨酸砷（Metson）。在上述实验操作步骤中蛋氨酸极有可能因高温而被全部或部分氧化掉，这就是为什么 Zimkin 在实验中未发现硫醚基团的可能原因。至于谷氨酸，可能是其残基与 Ag^+ 生成的七环化合物是不稳定的缘故。其中相应的氨基酸结构式为：



- 带正电的明胶基团可吸附在卤素位点，这种作用是静电的，很弱，未得到足够的重视。
- 在明胶大分子中还有些疏水侧链可吸附到卤化银表面的疏水部分，如丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸等。

第三章 实验方案的设计

关于银离子或卤化银与明胶的键合作用已有不少报道。H. Borginon^[25]通过测定蛋氨酸被卤化银吸附的吸附热,从而得出了在 pH 为 3 时, Ag^+ 主要与明胶中的蛋氨酸残基键合的结论。M.De Clercq 通过计算 Ag^+ 与相关配体的稳定常数^[27-28]而提出 Ag^+ 与明胶之间的反应应主要归结于 Ag^+ 与明胶中蛋氨酸残基的作用。上述关于 Ag^+ 与明胶作用的研究均未能给出关于结构方面的直接信息。红外光谱 (IR) 是鉴定化合物和测定分子结构最有效的方法之一,特别在研究氨基酸或其它相似配体与金属离子的键合方面能提供十分有用的信息^[29-31]。本文选择用红外光谱 (IR) 这一手段研究明胶组分与银离子或卤化银的键合特性, IR 分析特征性强,能很灵敏地反映出结构上发生的变化,并具有样品的用量少、不破坏样品、分析速度快的特点。为了比较全面地研究乳剂中卤化银与明胶的结合特点,本文同时进行了红外光谱分析和化学形态的研究。具体实验方案如下:

一 氨基酸与银离子的键合特性研究

首先了解氨基酸简单体系与银离子的键合情况,目的是为理解明胶体系的红外谱特征提供必要的背景知识。明胶是由十八种氨基酸所组成的复杂体系,我们选择其中的蛋氨酸、组氨酸、精氨酸作为研究对象,不仅是因为它们在明胶中的含量较高,且重要的是它们所具有的含硫基团、咪唑基等最有可能与银离子有较强的结合力。再考虑到蛋氨酸极易被氧化为蛋氨酸亚砷,我们又研究了亚砷与 Ag^+ 的光谱特征,以此来测定在乳剂制备过程中引起的明胶中蛋氨酸形态的变化。

二 明胶与银离子的键合特性研究

银离子与明胶基团的配位情况及其与不同种类的明胶 (骨明胶与鱼明胶)

键合特性的比较。

三 明胶体系与卤化银的键合特性研究

研究卤化银—鱼明胶乳剂中卤化银与明胶键合的特性及其在乳剂制备过程中随着物理成熟时间的改变明胶红外光谱的变化情况。

四 银离子在明胶中结合形态的研究

用凝胶层析法对明胶中银离子的分子量分布进行测定，并结合红外结果对银在明胶中的存在形态进行深入探讨。

第二部分 银与明胶的键合特性及结合形态研究

第一章 银与明胶的键合特性的红外光谱研究

一 试剂与仪器

1. 实验试剂

AgNO₃ 照相级 北京化工厂

KBr AR 上海化学试剂公司

KI AR 上海化学试剂公司

DL-蛋氨酸、DL-蛋氨酸亚砷、L-组氨酸、L-精氨酸均为生化试剂

骨明胶 法国惰胶

鱼明胶 美国 Norland Products Inc.

2. 实验设备

FT-IR 红外光谱仪 Perkin-Elmer 2000

蠕动泵 RDB-7 型 江苏沙洲仪表仪器总厂

电动搅拌机 江苏东台县安丰电器厂

稳压器 CZ-63 型 上海金山五金厂

调压器 上海电压调整器厂

二 实验步骤

1. 样品的制备

(1) 键合银的氨基酸及蛋氨酸亚砷样品的制备

分别准确称取氨基酸及蛋氨酸亚砷 0.2000g, 加入 2ml 3mol / l 的 AgNO₃ 溶液, 混合均匀后于 35℃ 水浴中恒温 1h, 取出置于 4℃ 的干燥器中脱水、干燥。

(2) 骨明胶膜样品的制备

准确称取 8g 骨明胶, 加入 32ml 去离子水溶胀 0.5h, 置于 37°C 水浴中恒温溶解 1h 后取出, 冷却至室温后制成膜样品。

(3) 鱼明胶膜样品的制备

准确称取 5g 鱼明胶, 加入 15ml 去离子水溶胀 0.5h, 置于 30°C 水浴中恒温溶解 1h 后取出, 冷却至室温后制成膜样品。

(4) 外加银的骨明胶膜样品的制备

按下述方法制备胶银比(质量比)为 7.6: 1 的膜样品: 准确称取 8g 骨明胶, 加入 20ml 去离子水溶胀 0.5h, 置于 37°C 水浴中恒温溶解 1h, 将 12ml 0.8mol/L AgNO_3 溶液在 1min 内等速加入到胶液中, 同时不断搅拌, 上述溶液再保温 9min 后取出, 冷却至室温后制成膜样品。

(5) 外加银的鱼明胶膜样品的制备

按下述方法制备胶银比(质量比)为 7.6: 1 的膜样品: 准确称取 5g 骨明胶, 加入 10ml 去离子水溶胀 0.5h, 置于 30°C 水浴中恒温溶解 1h, 将 5ml 1.2mol/L AgNO_3 溶液在 1min 内等速加入到胶液中, 同时不断搅拌, 上述溶液再保温 9min 后取出, 冷却至室温后制成膜样品。

改变 AgNO_3 溶液的浓度制备胶银比为 2: 1 的膜样品。

(6) 乳剂的膜样品制备

a. 溶液的配制

底液的配制: 称取 2.5g 鱼明胶, 加入 32.5ml 去离子水, 在室温下充分溶胀后, 置于 30°C 恒温水浴中。

补加液的配制: 称取 1g 鱼明胶, 加入 10ml 去离子水, 在室温下充分溶胀, 备用。

AgNO_3 溶液(0.8mol/L)的配制: 准确称取 6.7949g AgNO_3 于小烧杯中, 加入适量去离子水溶解后, 转移至 50ml 容量瓶中, 加去离子水定容。

KBr / KI 混合液(KBr/I 0.8mol/L, 其中 KBr 0.76mol/L, KI 0.04mol/L)的配制: 称取 4.5221g KBr 和 0.332g KI 于小烧杯中, 加入适量去离子水溶解后, 转移至 50ml 容量瓶中, 加去离子水定容。

b. 乳化过程

在中速搅拌下将 12ml AgNO_3 溶液和 12ml KBr+KI 溶液以 15ml/min 的流

速等速地加入到底液中，反应液温度为室温，底液温度为 30°C 。乳化时间为 10min。乳化结束后，加入补加液，搅拌均匀，冷冻静置，加入 20 克 10%F-11 沉降剂、1.75ml 10%醋酸，搅拌， $4-5^{\circ}\text{C}$ 下静置 30 分钟使其沉降完全。倾去上层清液，用 $4-5^{\circ}\text{C}$ 去离子水洗三次，每次 20 分钟。然后加入 2.275ml 1% Na_2CO_3 溶液，于 30°C 下复溶，加水至 50ml。

c. { 成熟过程取样（暗室操作）

成熟时间为 90min，成熟温度为 55°C ，每隔 15min 取一次样制成膜样品。上述样品均在保干器中保存至干透。

2. 红外光谱的测定

用 FT-IR 光谱仪在室温下测定上述样品的红外谱图。该仪器的分辨率为 2cm^{-1} ，测量范围为 400cm^{-1} 至 4000cm^{-1} 。

三 结果

1. 蛋氨酸、组氨酸、精氨酸及蛋氨酸亚砷的红外谱图分别示于图 1-1 至图 1-4 中。

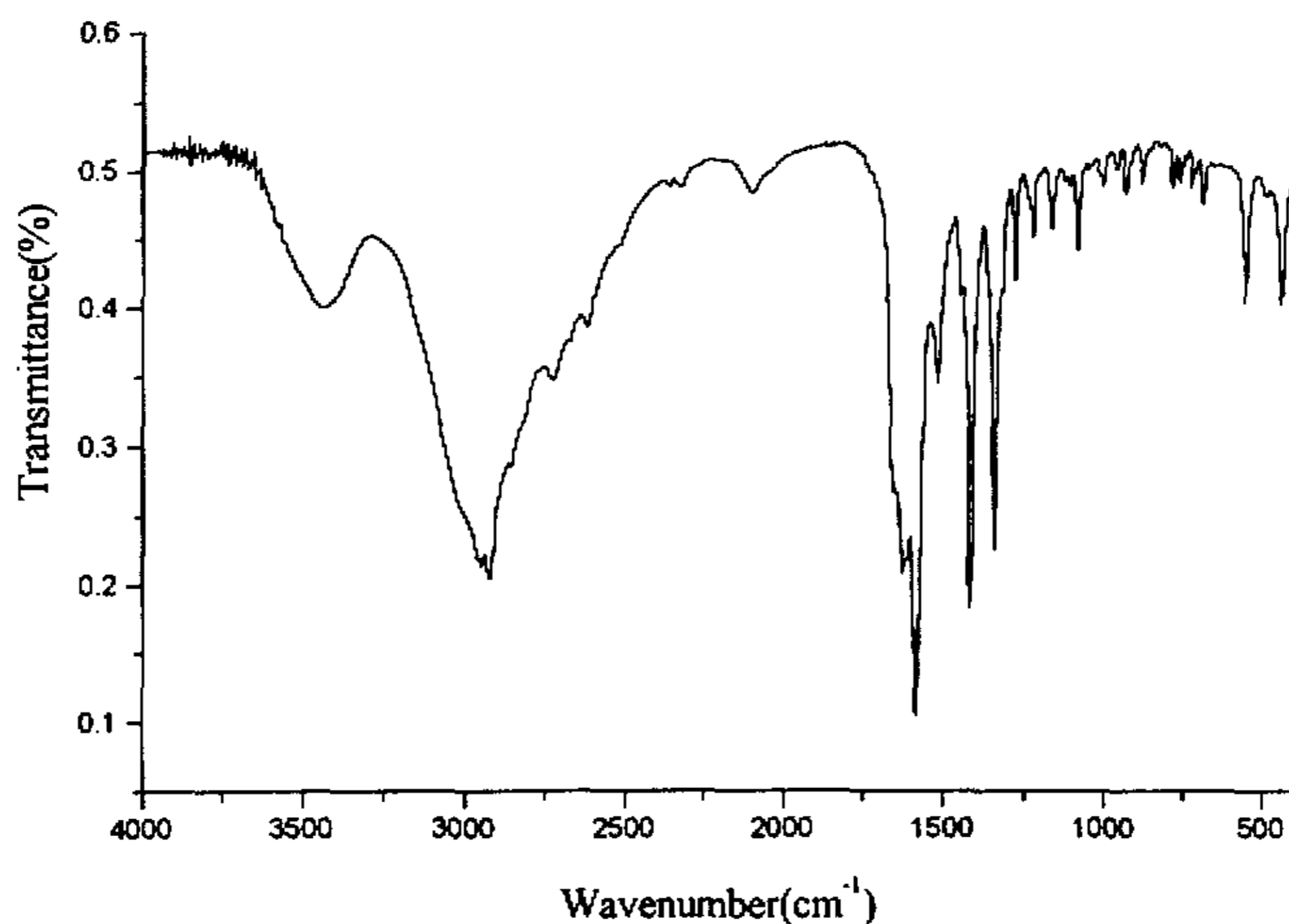


图 1-1 蛋氨酸的红外光谱

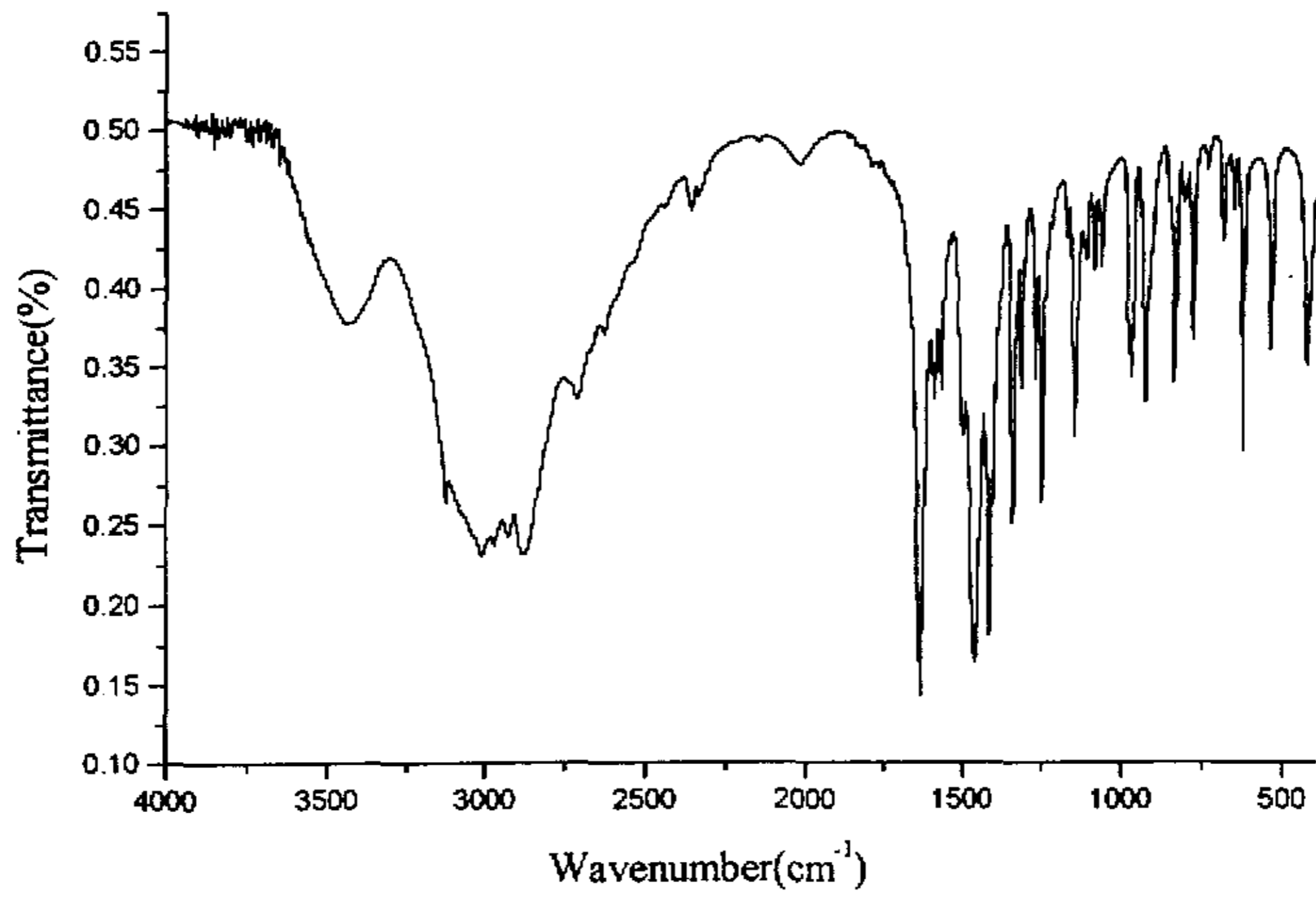


图 1-2 组氨酸的红外光谱

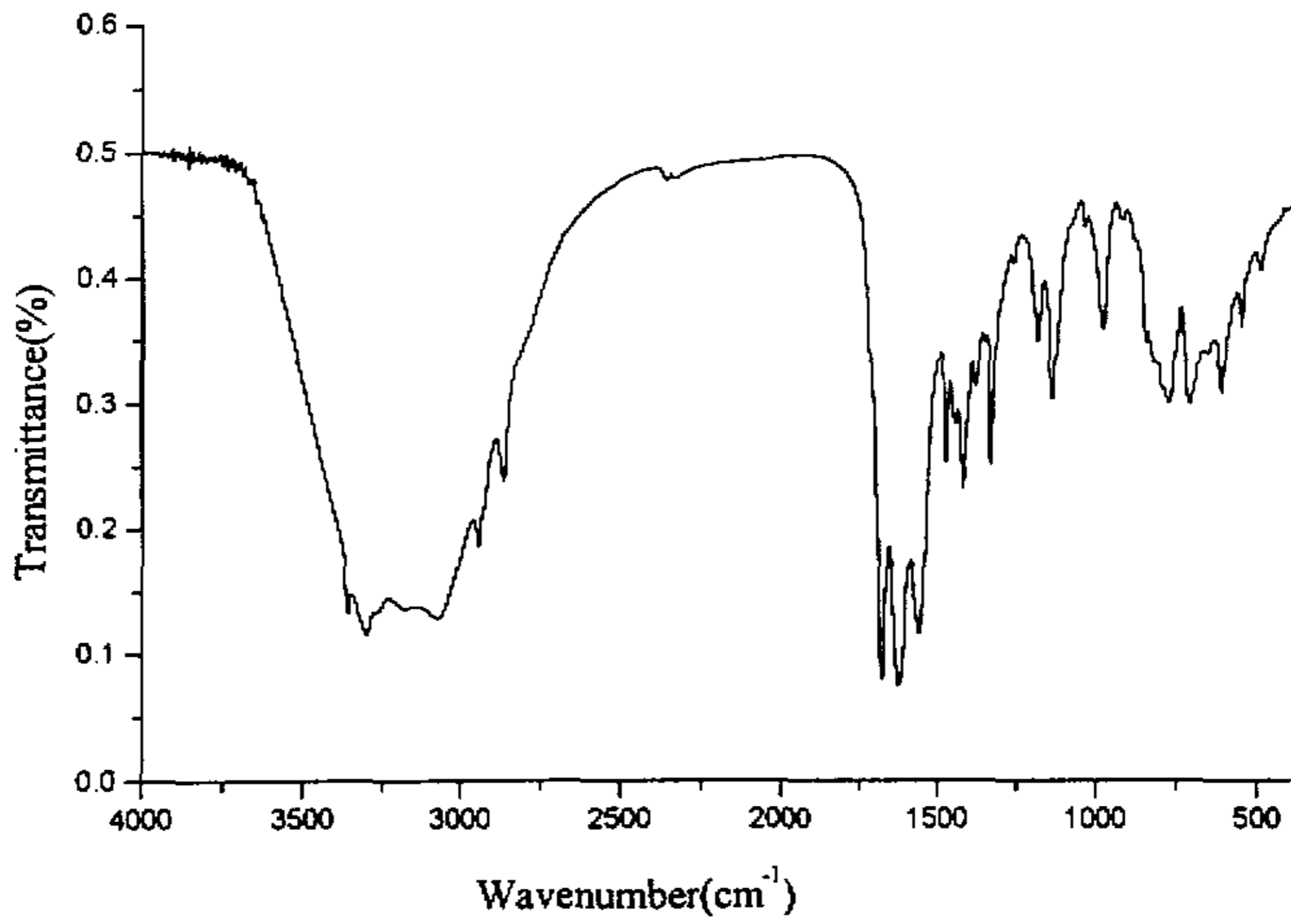


图 1-3 精氨酸的红外光谱

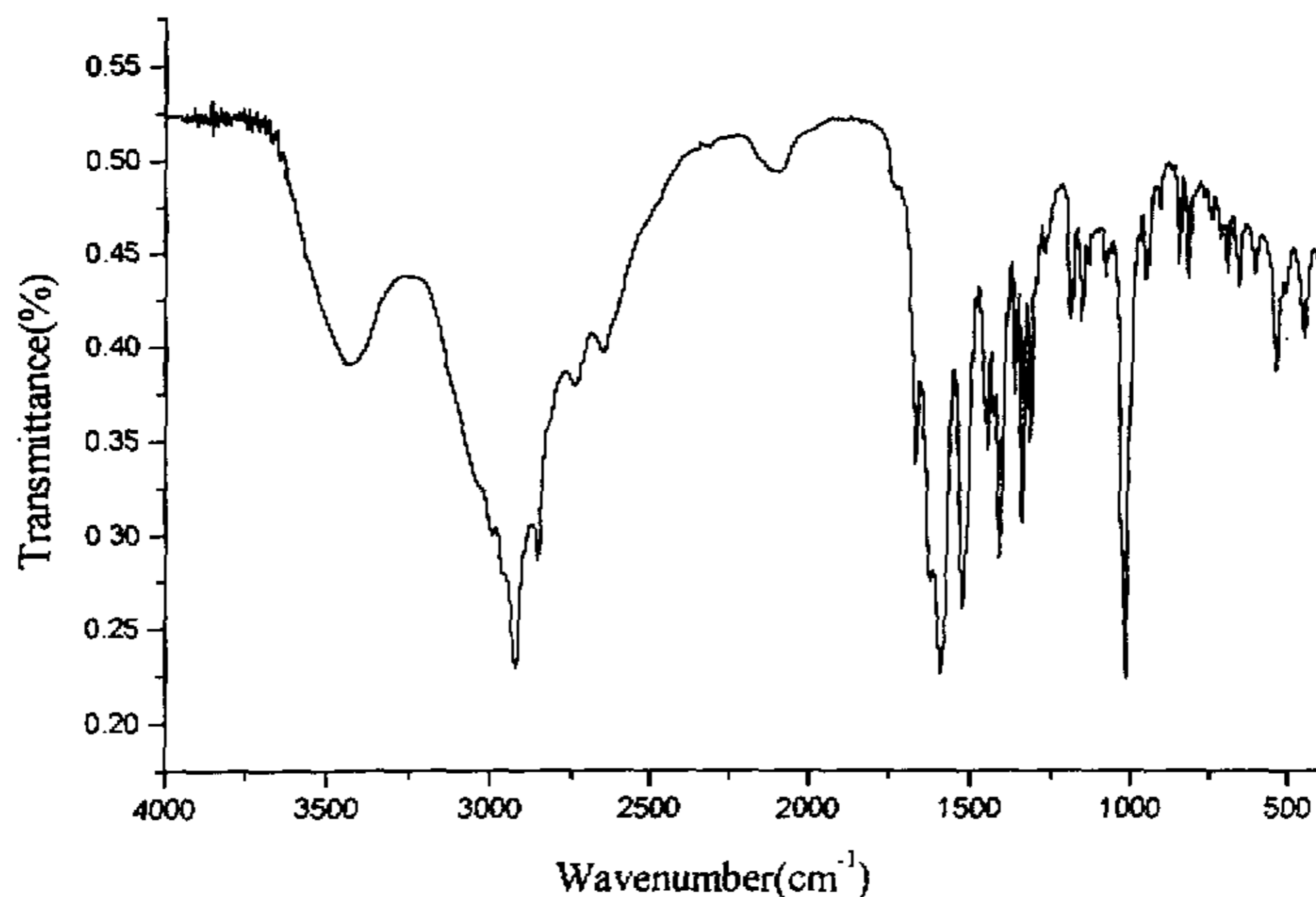


图 1-4 蛋氨酸亚砷的红外光谱

2. 银离子—氨基酸的红外光谱特征

蛋氨酸、组氨酸、精氨酸与 Ag^+ 的红外光谱结果如表 1-3 至表 1-5 所示。

表 1-3 Ag 对蛋氨酸 IR 光谱的影响

样品	frequency (cm^{-1})		interpretation ^[31]	$\Delta \nu$ (cm^{-1})
	不含 Ag	含 Ag		
蛋氨酸	3438.7	3441.9	N—H str	+3.2
	2918.1	2917.5	C—H sym str.	-0.6
	1650.8	1654.4	NH_2 def/ γ NH_3^+	+3.6
	1623.3	1623.0	N—H def.	-0.3
	1580.9	1580.9	COO^- asym. str.	0
	1514.9	1514.6	N—H def.	-0.3
	1414.2	1414.4	COO^- sym. str.	+0.2
	1340.5	1339.9	C—H sym bend	-0.6
	1221.0	1222.6	N—H def.	+1.6
	1161.4	1161.6	NH_3 rocking	+0.2
	1080.0	1078.1	CH_3 rocking	-1.9
	928.8	925.5	CH_3 rocking	-3.3
	877.5	875.1	CH_3 rocking	-1.2
	684.9	681.9	C—S sym str	-3.0

表 1-4 Ag 对组氨酸 IR 光谱的影响

样品	frequency (cm ⁻¹)		interpretation ^[33-34]	$\Delta \nu$ (cm ⁻¹)
	不含 Ag	含 Ag		
组氨酸	3441.0	3444.2	N-H str	+3.2
	1634.5	1635.3	NH ₂ def/ $\gamma_{\text{NH}_3^+}$	+0.8
	1590.9	1590.9	COO ⁻ asym. str	0
	1568.2	1567.8	COO ⁻ asym. str	-1.6
	1464.8	1462.6	C-H asym. bend	-2.2
	1415.4	1415.5	COO ⁻ sym. str	+0.1
	1314.7	1315.2	C-H bend + ring str	+0.5
	1251.1	1251.5	ring str	+0.4
	1171.3	1171.6	ring str	+0.3
	1146.8	1147.4	ring str	+0.6

表 1-5 Ag 对精氨酸 IR 光谱的影响

样品	frequency (cm ⁻¹)		interpretation ^[35]	$\Delta \nu$ (cm ⁻¹)
	不含 Ag	含 Ag		
精氨酸	3298.7	3376.2	N-H str	+77.5
	2944.8	2923.9	C-H sym. str	-20.9
	1677.9	1673.0	C=N def	-4.9
	1627.8	1635.3	NH ₂ def/ $\gamma_{\text{NH}_3^+}$	+7.5
	1558.7	1556.1	COO ⁻ asym. str	-2.6
	1473.9	1469.5	CH ₂ def	-4.4
	1421.2	1382.7	COO ⁻ sym. str	-38.5
	1332.6	1365.9	CH ₂ wag	+33.3
	1185.2	1180.5	N-H wag	-4.7
	1137.8	1106.8	N-H wag	-31.0

蛋氨酸的—SCH₃基与 Ag⁺可能有较强的配位能力,若二者发生键合,生成的 S—Ag 键不仅在 380nm 附近^[36]有吸收峰的出现,而且还会引起 C—S 键伸缩振动及—CH₃变形振动频率的变化。本文利用 C—S 键伸缩振动及—CH₃变形振动频率是否发生了较明显的变化来判断 Ag⁺与 S 原子的配位。表 1-3 显示银的加入使蛋氨酸的 C—S 伸缩振动及—CH₃变形振动频率分别减少了 3.0 和 3.3cm⁻¹,大于红外仪的分辨率 2cm⁻¹,说明 Ag⁺与蛋氨酸的硫醚基上的 S 原子发生了键合。组氨酸的咪唑基在 pH 较高时可与 Ag⁺键合,咪唑基的红外吸收峰位于表 1-4 中 1315 cm⁻¹、1250 cm⁻¹、1170 cm⁻¹和 1146 cm⁻¹附近,加入 Ag⁺后,咪唑基振动频率的变化均小于 2cm⁻¹,可以认为组氨酸的咪唑基与 Ag⁺没有发生明显的键合作用。图 1-4 中在 1675 cm⁻¹附近有一很强的吸收峰,这是精氨酸胍基上 C=N 的变形振动频率^[35]。在加入 Ag⁺后该振动频率减少了 5cm⁻¹(如表 1-5 所示),说明

了 Ag^+ 与精氨酸的胍基有较强的键合能力。

除了上述特殊基团，不同的氨基酸共同具有的基团是 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COOH}$ ，这两种基团也可能与 Ag^+ 有配位能力。与这两种基团相关联的红外谱带在 3400cm^{-1} 、 1620cm^{-1} 、 1580cm^{-1} 和 1410cm^{-1} 附近^[37]。 3400cm^{-1} 、 1620cm^{-1} 分别是氨基的伸缩振动和 $-\text{NH}_2$ 变形振动， 1580cm^{-1} 和 1410cm^{-1} 分别对应于羧基的不对称伸缩振动和对称伸缩振动。当加入 Ag^+ 时，如表 1-3 所示，蛋氨酸位于 3440cm^{-1} 的谱带增加了 3.2cm^{-1} ，而位于 1580cm^{-1} 和 1410cm^{-1} 附近的谱带几乎没有变化，这说明 Ag^+ 与蛋氨酸的 $-\text{NH}_2$ 发生了键合，而与 $-\text{COOH}$ 没有配位。组氨酸的情况与蛋氨酸类似， Ag^+ 与其氨基键合而不与羧基键合。表 1-5 是精氨酸 Ag^+ 的红外光谱结果，当加入 Ag^+ 时，精氨酸的 $-\text{NH}$ 伸缩振动频率从 3300cm^{-1} 增加到 3376cm^{-1} ，变化了 76cm^{-1} ；位于 1560cm^{-1} 和 1410cm^{-1} 的羧基的不对称伸缩振动和对称伸缩振动频率也分别变化了 2.6cm^{-1} 和 38cm^{-1} ，说明 Ag^+ 与其氨基和羧基均有强烈的键合作用。精氨酸与银的键合特征与蛋氨酸和组氨酸相比有很大的差异，显然这是因为其胍基结构的存在引起的。

3. 银离子—明胶的红外光谱特征

银离子—骨明胶及银离子—鱼明胶的红外光谱结果分别示于表 1-6 至表 1-7。

表 1-6 Ag 对骨明胶 IR 光谱的影响

样品	frequency (cm^{-1})		interpretation	ΔP (cm^{-1})
骨明胶	不含 Ag	胶银比 (7.6:1)		
	3324.3	3323.2	N-H str	-1.1
	2964.1	2959.8	C-H sym. str	-4.3
	1652.7	1653.3	C=O str (Amide I)	+0.6
	1556.8	1550.6	N-H def. + C-N str (Amide II) COO ⁻ asym. str	-6.2
	1454.9	1450.2	C-H asym bend (CH_3)	-4.7
	1403.7	1399.6	COO ⁻ sym. str	-4.1
	1338.2	1337.3	C-H sym bend (CH_3)	-0.9
	1282.4	无	C-H bend	
	1240.0	1240.2	C-N str + N-H bend (Amide III) ring str	+0.2
	653.8	568.7	C-S sym str	-85.1

表 1-7 Ag 对鱼明胶 IR 光谱的影响

样品	frequency (cm ⁻¹)		interpretation	ΔP (cm ⁻¹)
	without added Ag	7.6: 1		
鱼明胶	3290.0	3309.4	N-H str	+19.4
	2940.9	2940.2	C-H sym. str	-0.7
	1652.7	1652.7	C=O str (Amide I)	0
	1540.8	1541.8	N-H def. + C-N str (Amide II) COO ⁻ asym. str	+1
	1454.4	1449.2	C-H asym bend (CH ₃)	-6.2
	1403.9	1396.2	COO ⁻ sym. str	-7.7
	1338.4	1335.1	C-H sym bend	+3.3
	1241.9	无	C-N str +N-H bend (Amide III) ring str	
	1082.3	1080.1	CH ₃ rocking	-2.2
	1031.7	1034.6	CH ₃ rocking	+2.9
	666.4	567.0	C-S sym str	-99.4

明胶是由氨基酸残基通过肽链构成的蛋白质大分子，其中也含有部分游离的氨基酸，因此明胶的红外光谱不仅具有蛋白质肽键的特征谱带，同时还有氨基酸的相关谱带（如羧基）。与肽键有关的谱带有酰胺 I 带（1660 cm⁻¹ 附近）、酰胺 II 带（1570 cm⁻¹ 附近）和酰胺 III 带（1300 cm⁻¹ 附近）^[38]。银离子—骨明胶的红外结果如表 1-6 所示，Ag⁺ 的加入使得 3324 cm⁻¹ 附近的—NH 伸缩振动减少了 1.1 cm⁻¹，低于 2 cm⁻¹，所以 Ag⁺ 与骨明胶的 N 原子没有发生键合；位于 1560 cm⁻¹、1403 cm⁻¹ 分别变化了 6.2 cm⁻¹、4.1 cm⁻¹，1560 cm⁻¹ 是酰胺 II 带和羧基的不对称伸缩振动的重合谱带，因为 Ag⁺ 与 N 原子没有发生键合，酰胺 II 带的频率不会发生明显的变化，所以上述谱带的变化应归结于羧基的不对称伸缩振动的变化，是 Ag⁺ 与骨明胶中带侧链羧基的氨基酸（如骨明胶中含有的较丰富的谷氨酸）的—COOH 了发生键合而引起的。Ag⁺ 的加入使得 650 cm⁻¹ 附近的 C—S 伸缩振动减少了 85 cm⁻¹，变化的幅度很大，所以加入的 Ag⁺ 主要与骨明胶中的蛋氨酸残基的硫醚基配位。组氨酸咪唑基的谱带(1240 cm⁻¹) 在加入 Ag⁺ 后，未发生明显的变化，说明在我们的骨明胶溶液（pH 为 4）中，其咪唑基没有与 Ag⁺ 发生键合。虽然 Ag⁺ 可引起精氨酸光谱明显的改变，但在骨明胶中我们没有观察到其特征吸收峰，因而无法断定骨明胶中的精氨酸是否与 Ag⁺ 作用。

银离子—鱼明胶的红外光谱结果如表 1-7 所示，胶银比为 7.6: 1 的鱼明胶

位于 1403cm^{-1} 变化了 7.7cm^{-1} , 是因为 Ag^+ 与鱼明胶中带侧链羧基的氨基酸的 $-\text{COOH}$ 发生键合而引起的。 Ag^+ 的加入使得鱼明胶 $\text{C}-\text{S}$ 伸缩振动减少了 99cm^{-1} , 因为鱼明胶中的蛋氨酸含量高, 与 Ag^+ 的键合能力大, 所以鱼明胶 $\text{C}-\text{S}$ 伸缩振动的移动比骨明胶的 85cm^{-1} 要大。与骨明胶一样的是, 加入的 Ag^+ 主要与鱼明胶中的蛋氨酸残基的硫醚基配位。此外, Ag^+ 的加入使胶银比为 7.6: 1 的鱼明胶位于 3300cm^{-1} 附近的 $-\text{NH}$ 伸缩振动增加了 19.4cm^{-1} , 所以 Ag^+ 与鱼明胶的 N 原子发生了键合作用, 这是令人十分感兴趣的结果。为什么在骨明胶中没有 $\text{Ag}-\text{N}$ 键的生成而 Ag^+ 与鱼明胶中的 N 原子却发生了配位, 我们认为可能有以下几种原因: (1) 由于鱼明胶的主要组分是一条单链, 其侧链基团 (如蛋氨酸的甲硫基) 能充分暴露出来, Ag^+ 优先与蛋氨酸的硫醚基键合后, 可以再与相邻的 N 原子键合, 生成了 $\text{N}-\text{Ag}-\text{S}$ 稳定的六元环结构; (2) 是精氨酸的存在引起的, 精氨酸的 $-\text{NH}$ 伸缩振动位于 3298cm^{-1} , 与鱼明胶 (3290cm^{-1}) 十分相近, 且精氨酸的 $-\text{NH}$ 对 Ag^+ 有较强的亲和力。虽然在两种明胶中, 精氨酸的含量十分接近 (分别为 55% 和 51%), 但也可能是存在空间结构的不同引起的; (3) 在鱼明胶中可能存在含有氨基结构的、可与 Ag^+ 键合的特殊物质。其中准确的机理值得我们进一步的深入探讨。

生物体内的金属离子对配位给体的结合倾向经常受软硬酸碱的制约。在明胶介质中提供这些配体的有蛋白质、肽及氨基酸, 对于软的 Ag^+ , 最倾向于与软的 S 原子结合, 因而它最容易与蛋白质、肽的蛋氨酸残基的硫醚键部位键合。

4. 银离子—蛋氨酸亚砷的红外光谱特征

银离子—蛋氨酸亚砷的红外光谱结果如表 1-8 所示。

图 1-4 蛋氨酸亚砷的红外光谱图, 在 1016cm^{-1} 处有一非常强的红外峰, 是 $\text{C}-\text{SO}-\text{C}$ 骨架振动引起的蛋氨酸亚砷的特征峰^[38]。 Ag^+ 的加入使 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动由 3424cm^{-1} 增加到 3443cm^{-1} , 变化了 19cm^{-1} , 比蛋氨酸 (3.2cm^{-1}) 大的多; 位于 1650cm^{-1} 附近的 $\text{N}-\text{H}$ 变形振动频率增加了 98.7cm^{-1} , 说明 Ag^+ 与蛋氨酸亚砷氨基的结合能力更强。位于 1580cm^{-1} 和 1410cm^{-1} 的羧基的不对称伸缩振动和对称伸缩振动在加入 Ag^+ 后, 前者减小了 4.4cm^{-1} , 后者则变得很弱, 这说明 Ag^+ 与 $-\text{COOH}$ 之间发生了键合作用。而 Ag^+ 与蛋氨酸的 $-\text{COOH}$ 却没有这种作用。蛋氨酸亚

砷的 C—S 不对称伸缩振动在加入 Ag^+ 后由 821.3cm^{-1} 增加到 832.8cm^{-1} , 增加了 11.5cm^{-1} , 说明 S—Ag 键的生成。值得注意的是, 位于 1650cm^{-1} 附近的 N—H 变形振动频率的变化幅度最为明显, 因而我们可以借助该谱带判断明胶中蛋氨酸存在形态的变化与否。

表 1-8 Ag 对蛋氨酸亚砷 IR 光谱的影响

样品	frequency (cm^{-1})		interpretation	$\Delta \nu$ (cm^{-1})
	without added Ag	with added Ag		
蛋氨酸亚砷	3424.7	3443.5	N—H str	+18.8
	2921.2	2924.9	C—H sym. str	+3.7
	1668.4	1767.1	NH_2 def/ γNH_3^+	+98.7
	1623.3	1623.0	N—H def	-0.3
	1590.1	1585.7	COO^- asym. str	-4.4
	1523.0	1513.9	N—H def.	-9.9
	1446.3	1456.0	C—H asym. bend	+9.7
	1409.8	无	COO^- sym. str	
	1342.2	1353.0	C—H sym bend	+10.8
	1158.3	1133.7	C—SO—C ske.	-24.6
	1016.2	1020.1	CH_3 rocking	+3.9
	1080.0	1078.1	CH_3 rocking	-1.9
	956.5	940.1	CH_3 rocking	-3.3
	851.2	863.5	CH_3 rocking	+12.3
	821.3	832.8	C—S asym str	+11.5

此外我们还发现了一个有趣的、有意义的结果, Ag^+ 对蛋氨酸亚砷的某些振动的影响与其对蛋氨酸的影响很不相同, 甚至是相反的。如 Ag^+ 使蛋氨酸的 C—H 对称伸缩和 C—H 不对称伸缩振动都减少了 0.6cm^{-1} , 而它却使蛋氨酸亚砷的上述振动分别增加了 3.7cm^{-1} 和 10.8cm^{-1} 。另外, Ag^+ 使蛋氨酸位于 1161.4cm^{-1} 的 $-\text{CH}_3$ 变形振动增加了 0.2cm^{-1} , 位于 877.5cm^{-1} 的 $-\text{CH}_3$ 变形振动减少了 2.4cm^{-1} , 而它却使蛋氨酸亚砷相应位置上的振动分别减少了 24.6cm^{-1} 和增加了 10.8cm^{-1} 。

5. 卤化银—鱼明胶乳剂的红外光谱特征

卤化银—鱼明胶乳剂的红外光谱在物理成熟过程中的变化如下表所示。

表 1-9 卤化银—鱼明胶乳剂的红外光谱特征

样品	frequency (cm ⁻¹)				
	15min	30min	45min	60min	75min
鱼明胶乳剂	3307.3	3307.3	3306.6	3307.5	3306.9
	1652.7	1651.5	1651.0	1654.6	1654.6
	1541.0	1540.1	1538.9	1542.8	1542.8
	1455.0	1455.1	1454.1	1453.6	1453.0
	1405.6	1404.8	1408.2	1407.9	1407.4
	1338.3	1337.4	1336.6	1336.8	1336.8
	1182.0	1179.0	1181.4	1181.0	1181.4
	1125.7	1125.0	1125.6	1125.5	1125.5
	1035.6	1034.8	1035.4	1035.4	1035.3
	852.4	829.2	831.2	830.2	829.2

鱼明胶中的蛋氨酸含量较高，且蛋氨酸性质不稳定，在乳剂制备的物理成熟阶段，可能会随着时间的增加被部分氧化成蛋氨酸亚砷。蛋氨酸形态的这种变化会在红外谱图反映出来。所以我们可以借助红外谱图考察卤化银—鱼明胶乳剂中蛋氨酸的形态变化。表中的数据说明在物理成熟的 45min 至 60min 时，鱼明胶位于 1651.0 cm⁻¹ 的频率增加至 1654.6 cm⁻¹，我们知道该谱带是 N—H 变形振动，当蛋氨酸被氧化为亚砷时，蛋氨酸亚砷 NH₂ 基与 Ag⁺ 的结合能力比蛋氨酸强，Ag⁺ 与蛋氨酸亚砷 NH₂ 基的键合使得 N—H 变形振动有增加的趋势。通过红外光谱的振动频率的变化我们可以判断在乳剂制备的物理成熟过程中明胶中的蛋氨酸被氧化为了蛋氨酸亚砷。

结 论

在乳剂制备的物理成熟初期明胶中的蛋氨酸的存在形态发生了变化，红外光谱可以很灵敏地检测出这一形态变化。

蛋氨酸具有的还原性和卤素受体的双重作用对于照相明胶有着十分重要的意义，当蛋氨酸被氧化为亚砷时，其还原性有所下降，用这种明胶制备出的乳剂的性能大大降低。因而在乳剂的制备过程中我们应采取适当的制备工艺防止蛋氨酸被氧化，同时还应采用较方便的方法来监控蛋氨酸的存在形态。李迅等^[39]曾应用氨基酸分析仪测定明胶中的蛋氨酸及其亚砷的含量。用氨基酸分析仪测定明胶中的亚砷，制样复杂、分析步骤繁琐且耗时较长；本文采用的红外光谱制样简单、对样品无破坏性，可以很灵敏地检测出蛋氨酸的存在形态发生的变化。

参考文献

1. Peter Koepff, "Production History of Gelatin Industry", 王师俊译, 明胶科学与技术, 1987, 114, 7(3)
2. 中国感光研究会编, "感光过程理论基础", P70, 1983
3. A. G. Ward & A. Coutts, The Science and Technology of Gelatin, 1971
4. "明胶生产工艺及设备" 编写组编, "明胶生产工艺及设备", 中国轻工业出版社, P7, 1996
4. 中国科学技术大学化学物理系编, "明胶化学" 讲义
6. 江逢霖, 谢璠, "照相化学", 复旦大学出版社, P2, 1994
7. 王静德, 任乃容, 明胶科学与技术, 8(3), 119, 1988
8. Sc. J. Beersmans, S. H. Horginon, Photogr. Korrep., 12, 177, 1962
9. W. Timson, A. Steigman, et al., Photogr. Sci. Eng., 10, 281, 1966
10. H. Borginon, J. Photogr. Sci., 15(14), 207, 1967
11. 彭必先, 陈丽娟, 明胶科学与技术, 14(2), 57, 1994
12. R. E. Norland. Fish Gelatin Marine Colloids Biotechnology, VI (1968)
13. Mori Tomoo, Tsubaki Yasuo. Japan Patent 7, 287, 334 [95/287334]
14. 王越, 中国科大硕士论文, 2000
15. a. 蔡俊良, 感光材料, 1995, (1): 8
b. 俞浩清, 摄影与空中摄影学, 北京测绘出版社 (1985)
16. 松下昭, 平井纪觉著, 孙万林, 王宏成译, 全息照相术的原理及实验, 科学出版社
17. 基什著, 蒋泽廉等译, 微缩技术, 北京测绘出版社 (1984)
18. 祖绍其等编, 衍射光栅, 机械工业出版社 (1986)
19. 崔兴品, 中国科学技术大学化学物理系, 硕士学位论文(1998)
20. 宋磊, 硕士学位论文, 中国科学技术大学应用化学系, 1999
21. Berendsen R., Borginon H., J. Photogr. Sci., 1968, 15: 194
22. Pouradier, Photogr. Sci. Eng., 17(5), 434, 1973
23. Berendsen R., Borginon H., J. Photogr. Sci.,
24. Curme H. G., Natale C. C., J. Phys. Chem., 1964, 68(10): 3009

25. Borginon H., J. Photogr., 1980,28:111
26. Zimkin E., Klyuchevich V., j. Photogr., 1968,16:154
27. Clercq M., Rolin D., J. Photogr. Sci., 1994,42:117
28. Clercq M., Rolin D., J. Photogr. Sci., 1995,43:197
29. Kotharl V.M., Inorg. Chem., 1969,8(11):2276
30. Segnini D., Curran C, Spectrochimica Acta, 1960,16:540
31. Carlson R.H., Inorg. Chem., 1966,5(2):268
32. Mcauliffe C.A., Inorg. Chem., 1966,5(11):1996
33. Cordes M., Walter, J.L., Spectr. Acta, 1968,24A:237
34. Garfinkel D., Edsall J.T. J Amer. Soc., 1958, 80(15):3807
35. Mukerji S., Tanusree K. Materials Chemistry and Physics, 1998,57:72
36. El-Etri M.W., Scovell W.M., Inorg. Chem., 1990,29:480
37. In Introduction to the Spectroscopy of Biological Polymers, edited by Jones D.W., Academic Press (1976), Chapter 2
38. Parker F.S., Application of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine, Adam Hilger(London), 1971
39. 李迅, 彭必先, 感光化学与光化学, 1993,(11):40

第二章 明胶中银的结合形态研究

本章采用凝胶层析—分光光度法对 Ag^+ 在明胶中的分布进行深入探讨。

凝胶层析^[1-3]又叫凝胶分子筛，它主要是利用具有三维空间网状结构的凝胶的分子筛作用，根据被分离物质的分子大小不同进行分离的。把适当的凝胶颗粒装填到玻璃管中制成的层析柱，于柱内加入预分离的物质，然后用大量洗脱液洗脱。由于被分离物质各组分的分子大小和形状不同，在洗脱过程中分子量最大者因不能进入凝胶网孔而沿凝胶颗粒的空隙最先流出柱外，分子量最小的物质则因进入凝胶网孔而受阻滞，流出缓慢，致使最后流出柱外。

样品洗脱过程中某一组分的洗脱体积为：

$$V_e = K_d V_i + V_0$$

V_0 — 凝胶颗粒之间的空隙的总容积，即外水体积；

V_i — 凝胶颗粒内部空隙的总容积，即内水体积；

K_d — 某一体系在凝胶颗粒固定相和洗脱液流动相之间的分配系数，只与被分离物的大小和凝胶的交联度有关。对同一凝胶而言， K_d 是被分离组分分子大小的函数，分子大小不同，从而 V_e 不同。

对同一类型化合物来说，洗脱体积与组分分子量之间符合关系式：

$$V_e = K_1 - K_2 \lg M$$

式中 K_1 、 K_2 为常数， M 为分子量。从此式可以看出分子量 M 大的组分洗脱体积 V_e 小，先流出柱外；分子量小者，洗脱体积大，后流出来，这样物质可根据分子量的不同得到分离。

一 试剂与仪器

1. 试剂

凝胶分子筛 Sepharose 4B (瑞典)

洗脱液 0.2mol/l NaNO_3 (分析纯 NaNO_3 配制)

试样溶液 0.5% 骨明胶溶液及鱼明胶溶液

2. 仪器

B—2 型蠕动泵上海统一生化仪器厂

BS—160A 自动部分收集器上海沪西仪器厂

SHIMADZU UV—2100 分光光度计

WFX—120 原子吸收分光光度计

3. 装置及参数

表 1-10 凝胶层析工作条件

层析柱	柱长: 950mm 内径: 13mm
	固定相: Sepharose 4B 分子筛凝胶
流动相	0.2mol / l NaNO ₃
	流速: 2ml / 20min.
分离温度	室温
进样体积	1.0 ml 样品
洗脱液收集	每 20min 收集一管

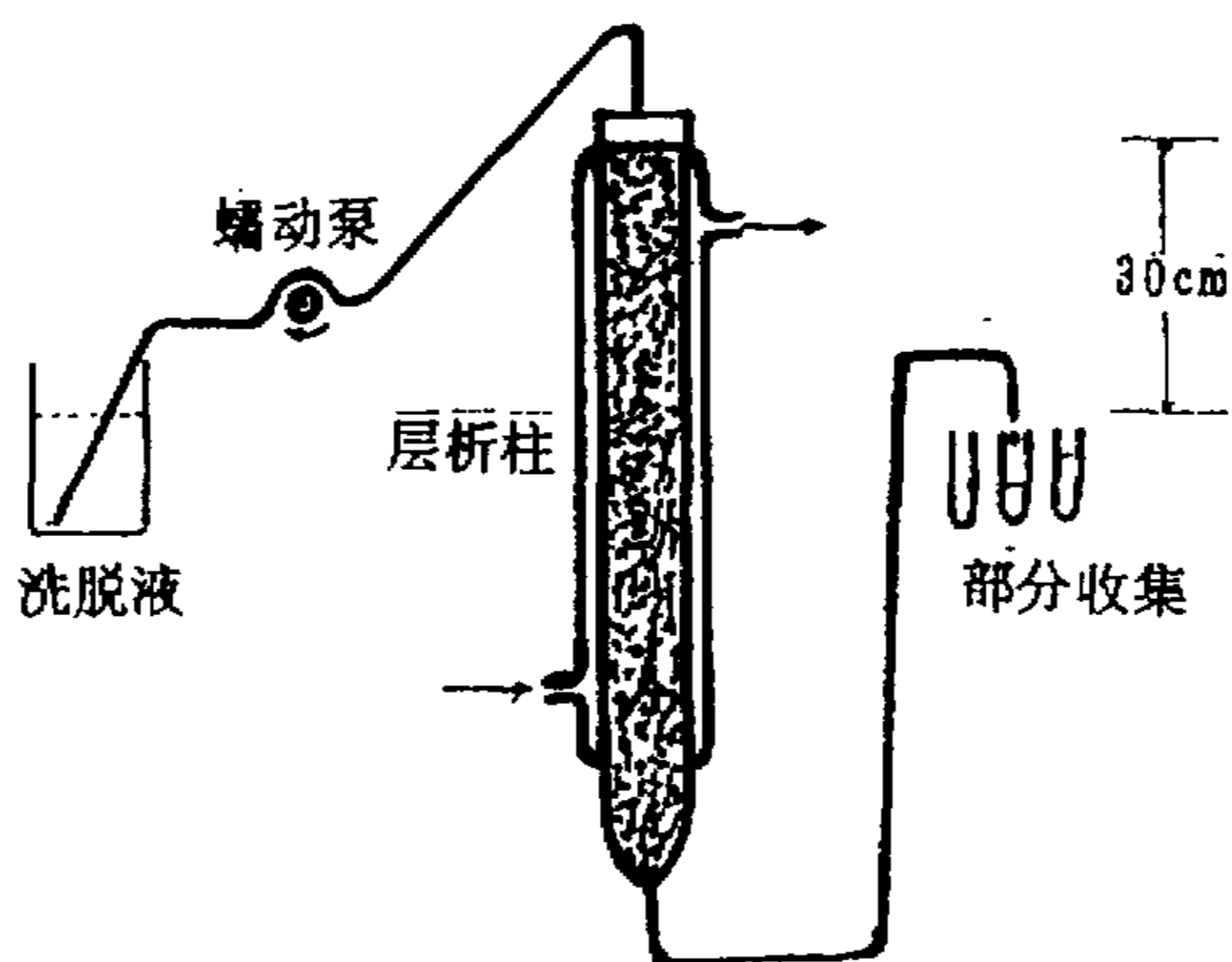


图 1-5 凝胶层析装置

二 实验程序

1. 明胶样品的配制

准确称取明胶 250mg, 加入约 30ml 0.4mol / l NaNO_3 溶液于室温下溶涨 0.5h, 补加 NaNO_3 溶液至 50ml 摇匀, 于 60℃ 水浴中恒温 1h, 取出摇匀, 冷却至室温, 得样品浓度为 0.5%。

2. 凝胶分离

移取样品液 1ml 在柱斗贴壁进样, 待样品全部进入凝胶层, 通过蠕动泵恒压打入洗脱剂, 洗脱速度约 6ml / h, 洗脱时间为 25 至 30h。

3. 分部收集洗脱液

用 10ml 玻璃管收集洗脱液, 每 20min 走一管, 每管 2ml 样品收集液。

4. 蛋白质紫外吸收的测定

于 230nm 波长处测每管明胶收集液的紫外吸收值, 依次作出明胶蛋白分子分布图。

5. 收集液银含量的测定

用火焰原子吸收分光光度计测每管收集液中的银含量并作出银分布图。

三 结果与讨论

1. 骨明胶蛋白的层析分布和银的分布

图 1-6(a)是骨明胶的层析分布和银的分布。实验结果表明骨明胶中的银不与分子量最大的 γ 蛋白组分结合, 而是与中等和小分子量的蛋白或肽结合, 且以于小分子蛋白或肽结合为主要存在形式。

2. 鱼明胶蛋白的层析分布和银的分布

由鱼明胶蛋白的层析分布图 (图 1-6(b)) 可以看出, 鱼明胶是由中等和小分子量蛋白组成的体系, 不含有大分子量的 γ 蛋白组分, 这与前人的研究结果一致。鱼明胶中的 Ag^+ 与中等分子蛋白和小分子蛋白或肽结合, 而且主要与小分子蛋白或肽结合。此外鱼明胶中有相当一部分的 Ag^+ 与非蛋白组分结合。

以上实验结果表明不管是骨明胶还是鱼明胶中的 Ag^+ 都主要以与小分子蛋

白或肽配合态存在，进入中等分子量蛋白中的相对较少，几乎不与分子量最大的 γ 蛋白键合。可能的原因是： Ag^+ 的电荷/半径较小，离子半径较大，属于软酸，优先与 S 原子配位^[9]，进入蛋白大分子中的倾向较小，所以 Ag^+ 主要与对 Ag^+ 亲和性较强的小分子蛋白或肽中的蛋氨酸中的 S 原子键合。

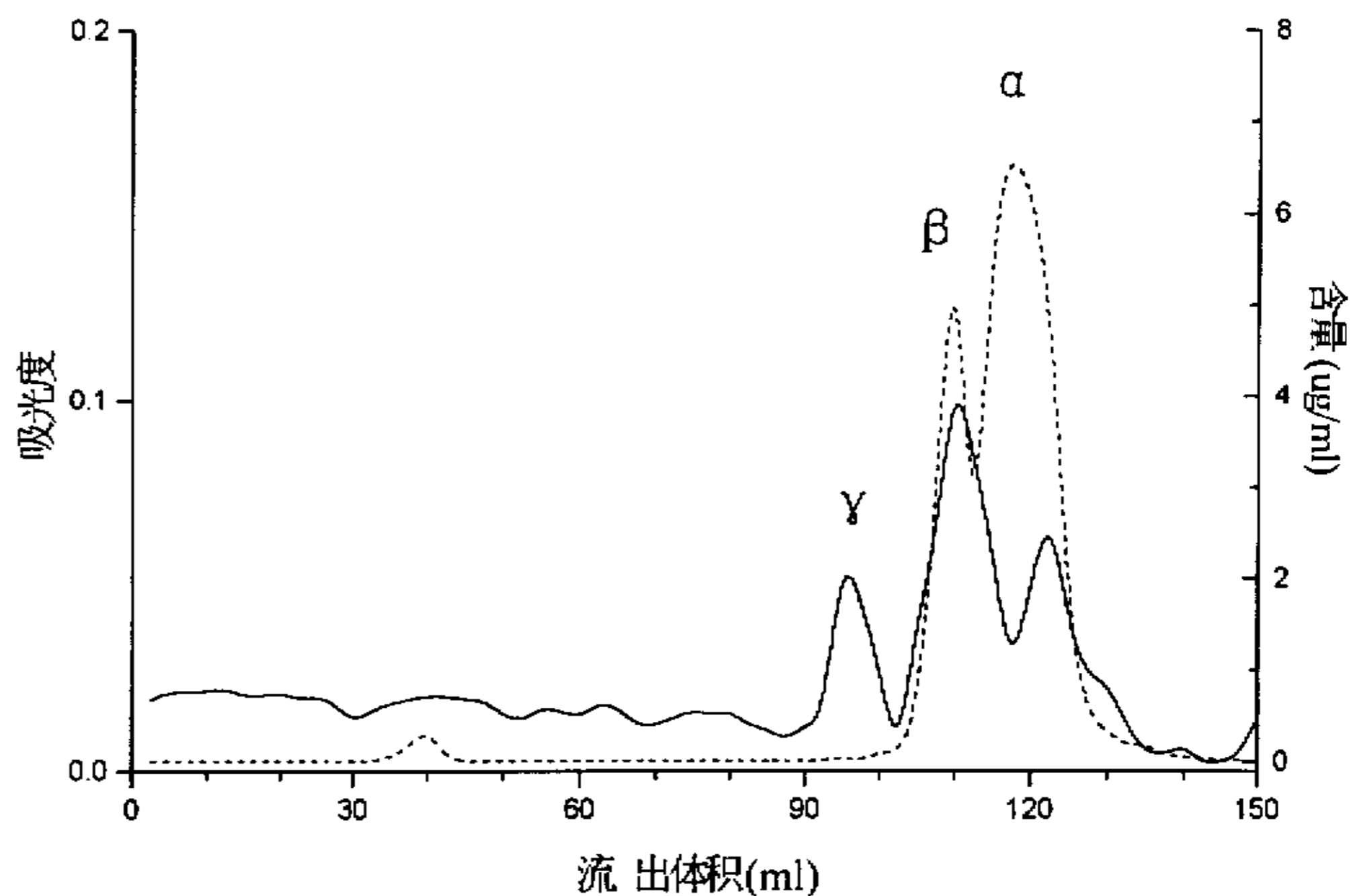


图 1-6(a) 骨明胶蛋白与银分布
— 蛋白分布 --- 银分布

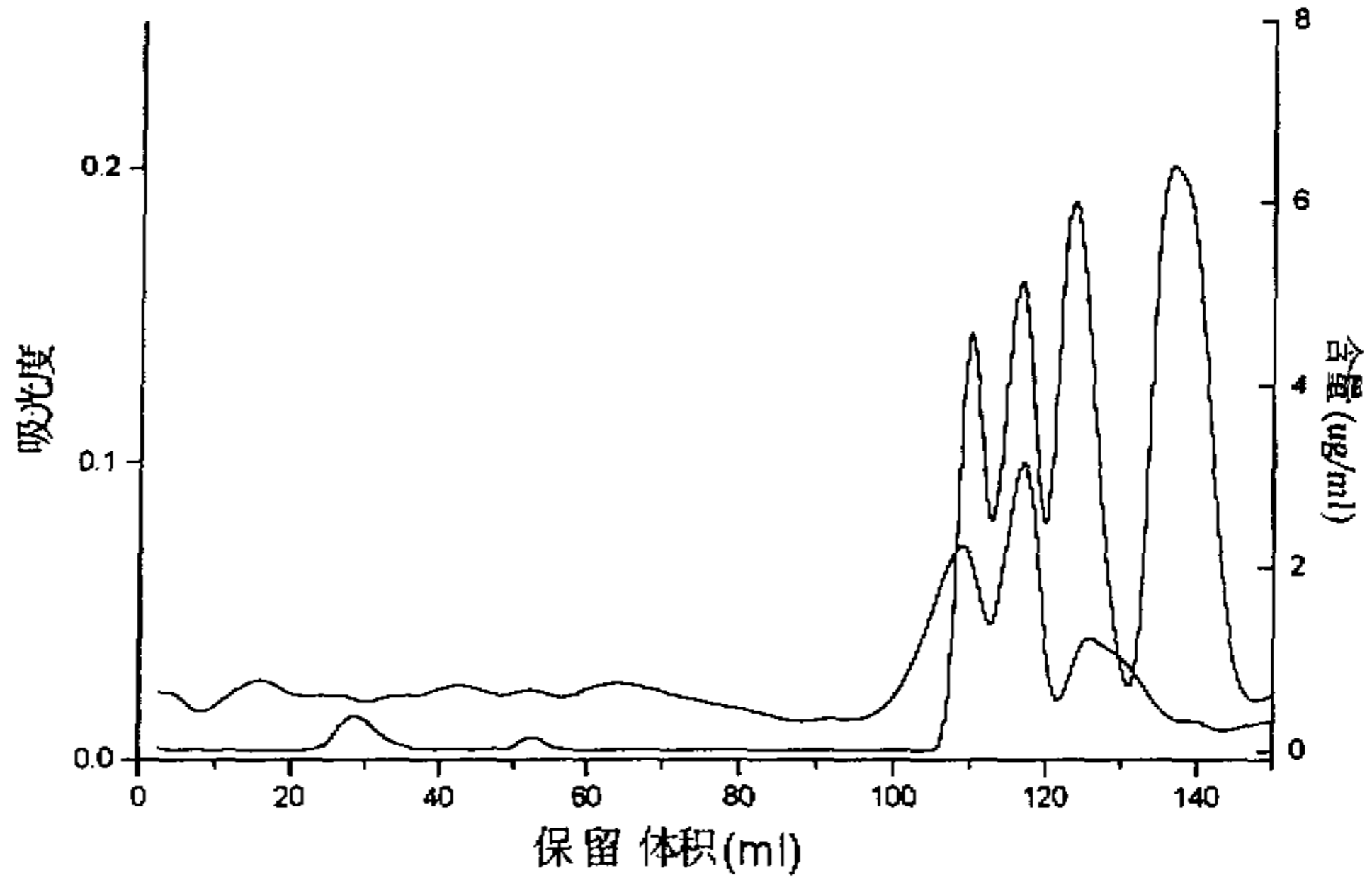


图 1-6(b) 鱼明胶蛋白与银分布
— 蛋白分布 --- 银分布

结 论

由于鱼明胶中无大分子量的 γ 蛋白组分^[10], 而以分子量小的 α 组份居多, α 组份的侧链基团能充分显露; 且鱼明胶的蛋氨酸含量比骨明胶高得多, 能更快更好地吸附在晶体表面。此外, 根据我们的实验结果, 鱼明胶中还存在着可以与 AgX 晶体强烈键合的特殊物质, 因此鱼明胶比骨明胶具有更强的吸附能力, 保护性强, 应用鱼明胶在卤化银纳米乳剂制备中作为保护性分散介质, 可有效控制粒子的尺度大小、分布与晶型^[10]。

我们的实验结果从成分及分子量分布上解释了鱼明胶对卤化银纳米粒子的保护机制, 这就为制备纳米卤化银粒子用鱼明胶作为载体提供了一个有力的理论依据

参考文献

1. 生化技术导论, 中山大学生物系生化微生物学研究室编, 人民教育出版社, 1978,203
2. 张龙翔编, 生化实验方法和技术, 高等教育出版社, 1981,398
3. 陶慰孙编, 蛋白质分子基础, 高等教育出版社, 1981,54
4. C.R.洛,亲和色谱导论, 科学出版社,1983,19, [英]
5. 华家柱编, 实用蛋白质化学技术,上海科学技术出版社,1979,215
6. 黄明智, 明胶科学与技术, 1982.2(4),191
7. 尹屹梅, 中国科大应化系硕士论文,1994
8. 明胶化学,中国科大化学物理系编
9. M.N.修斯, 生物无机化学, 农业出版社, 1986
10. 宋磊, 中国科大应化系硕士论文,1999

第三部分 稀土元素与细胞质膜的键合特性 及其对 Ca^{2+} 分布影响的研究

第一章 前言

生物体内普遍存在稀土元素，尽管它们含量甚微，但已发现其具有多种生物效应^[1-5]。遗憾的是目前的研究尚不能证明稀土元素对生物体是否必需或有毒。为了从本质上搞清稀土代谢及其影响机制，需要深入研究稀土与细胞膜的作用以及稀土能否通过细胞膜进入细胞并与细胞其进一步作用等一系列问题。

一 生物膜结构——流动镶嵌模型^[6]

各种细胞器的膜和核膜、质膜在分子结构上都是一样的，它们统称为生物膜。生物膜是以磷脂为主的脂质和蛋白质组成的体系，磷脂双分子层（或称脂双层）构成生物膜的基本骨架，蛋白质镶嵌在磷脂双层内。脂双层具有流动性，其脂类分子可以自由地移动，膜脂的运动带动了膜蛋白的运动，这就是 S.J.Singer^[6]提出的生物膜结构的流动镶嵌模型（如图所示）。

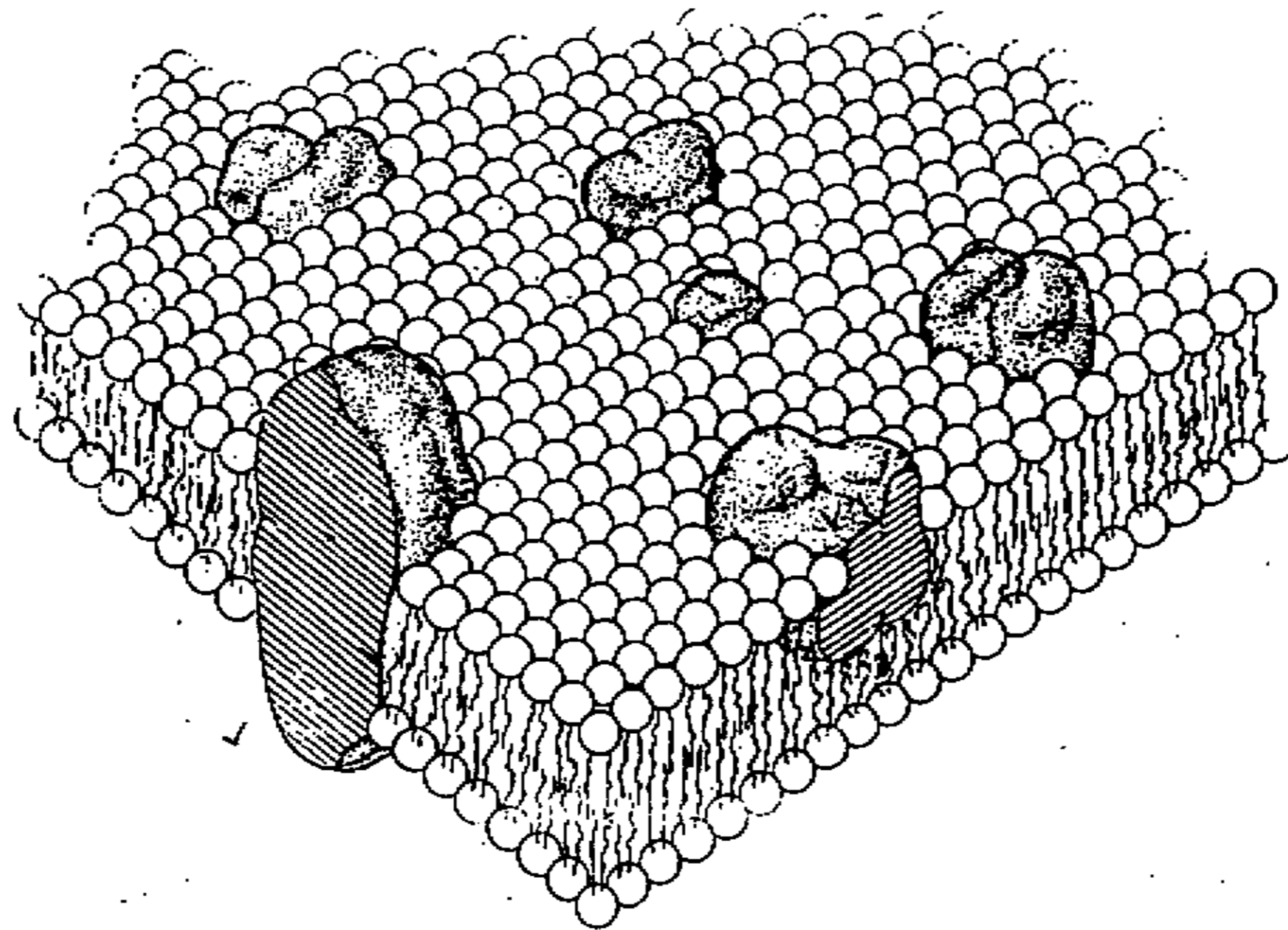


图 2-1 生物膜结构图

蛋白质一般具有亲水表面，可以与脂双层膜的两侧极性基团结合，成为膜的外周蛋白；嵌入膜内的蛋白质有一个疏水的肽链表面。大部分膜蛋白与磷脂间没有相互作用，但一部分膜蛋白的确能够通过不同的方式相互影响。例如，有的磷脂能够改变蛋白的构象^[1]；有些磷脂与蛋白紧密结合成脂蛋白，从而构成完整的功能复合物（如光合膜）。

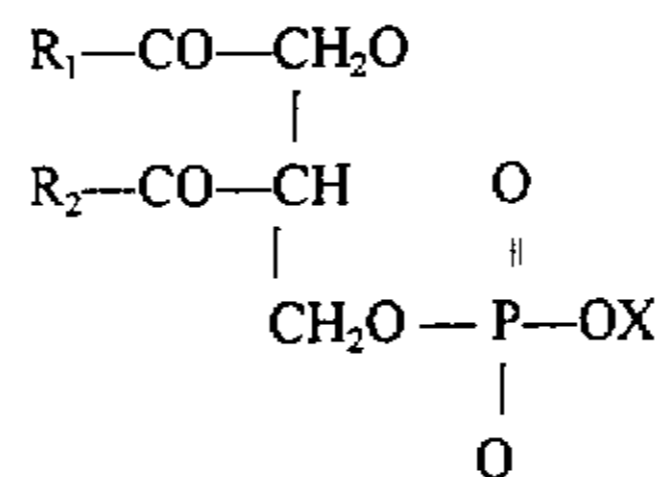
二 磷脂

1. 磷脂的组成与结构

表 2-1 磷脂的种类及特点

取代基 (X)	磷脂名称	特点
H	磷脂酸 (PA)	具负电性，含量低，重要的中间代谢产物
$-\text{CH}_2(\text{COO}^-)\text{CH}(\text{N}^+\text{H}_3)$	磷脂酰丝氨酸 (PS)	生理 PH 时电中性，分布广，主要脂类物质之一
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	磷脂酰胆碱 (PC)	电中性，分布广，植物中主要脂类物质之一
$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	磷脂酰甘油 (PG)	具电负荷，分布广，植物中主要脂类物质之一
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3$	磷脂酰乙醇胺 (PE)	生理 PH 时电中性，分布广，植物中主要脂类物质之一
$-\text{C}_6\text{H}(\text{OH})_3$	磷脂酰肌醇 (PI)	具电负荷，分布广，通常含量较低
磷脂酰甘油	二磷脂酰甘油 (DPG)	具电负荷，存在于线粒体膜

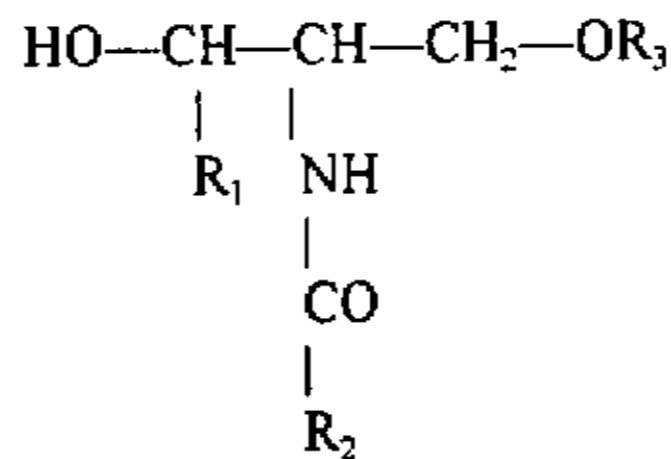
磷脂广泛存在于生物体中，几乎所有生物细胞内都含有磷脂。磷脂有甘油磷脂和鞘磷脂两类。前者是由甘油骨架、非极性的长链脂肪酸及极性的磷酸盐所组成，其化学结构通式如下：



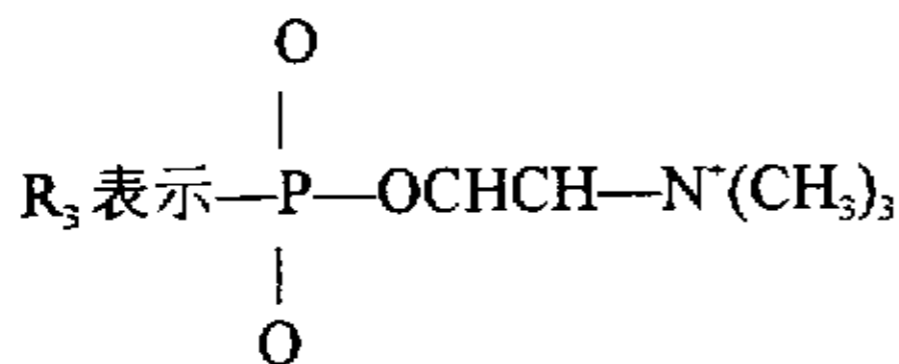
其中 R_1 、 R_2 分别表示 $C_{16} \sim C_{22}$ 的饱和或不饱和脂肪酸，它们主要包括软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻油酸和花生烯酸等。大多数磷脂上与 C_1 相连的 R_1 是饱和脂肪酸，而 R_2 是不饱和脂肪酸，即至少含有一个或一个以上双键。 X 表示与磷酸羟基相连的不同取代基并由此构成了不同类型的磷脂。

植物组织中常见的甘油磷脂是 PC、PE、PG，在某些组织中 PI 也有较高含量^[8]。

鞘磷脂是由神经酰胺的羟基与磷酸胆碱构成的磷酸二酯，其结构式如下：



其中 R_1 表示 $-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ ； R_2 表示 $C_{14} \sim C_{24}$ 的脂肪酸链烃；



鞘磷脂主要分布在脑、神经组织和红细胞膜中，植物中含量很少。

2. 磷脂的性质与作用

磷脂是一类双亲性分子，具有含磷酸根的亲水头部和两条疏水性的脂肪酸长链，这种性质对于它们在形成膜的双层结构方面极其重要。细胞中的磷脂主要分布在生物膜上。生物膜是细胞进行各种生命活动的重要结构基础，磷脂的种类、组成决定了膜的性质与功能从而影响细胞的正常功能。

磷脂双分子层的膜结构中间存在着由脂肪酸碳氢链构成的疏水层，使细胞内水溶性分子不会外溢，起着通透屏障作用。

磷脂脂肪酸碳氢链的长度和不饱和度影响着膜的流动性^[9]，而膜的流动性与细胞的各种生理功能密切相关。磷脂结构与组成上的变化会改变膜的流动性^[10]，从而影响膜蛋白质的活性。

此外, 磷脂也参与了多种生物过程, 在物质运输、能量储存、细胞信息传递方面起重要作用。

3. 磷脂的提取、纯化与检测

提取磷脂一般常见的方法有物理法、有机溶剂提取法。有机溶剂提取法是实验室常用的一种较精细的分离方法, 实验仪器及操作方法都较为简单^[12]。用有机试剂提取磷脂的方法最早由 Folch^[13]提出, 经过多人的改进和创新后, 目前是人们普遍采用的方法。

磷脂从细胞内提取出来后, 虽已除去了大量与制备理化性质差别较大的杂质, 仍剩余与制备理化性质相近或类似的物质, 必须进一步纯化。薄层色谱(TLC)^[14-15]是纯化磷脂最传统的方法, 它由最初的一维已发展成二维^[16]、高效薄层色谱^[17-18]等多种形式。因其存在步骤繁琐、耗时过长等缺点, 现已被分析快速、分离效果更好的高效液相色谱(HPLC)^[18-19]所取代。HPLC 分离磷脂通常采用的检测方法有折光率检测(RID)^[20]、火焰离子化检测(FID)^[21]、光散射检测(LSD)^[22]、紫外(UV)^[23-24]检测等。折光率检测、火焰离子化检测、光散射检测不灵敏且不适于梯度洗脱技术, 应用很有限。因为磷脂的甘油骨架上存在不饱和脂肪酸, 且由于功能基团如羰基、羧基、磷酸盐、氨基及季氨基的存在, 磷脂在 210nm 附近有很强的吸收^[25], 紫外检测灵敏度高、对样品无破坏性且操作方便, 通常我们用 200—210nm 之间的吸收检测磷脂。但这种吸收并不是磷脂特有的因此为了鉴别磷脂除了利用吸收光谱, 通常还采用不依赖于紫外吸收的其他方法(如磷的检测)。值得注意的是有很多试剂如氯仿在 200nm 附近具有吸收, 我们必须使用在 200nm 附近透明的试剂, 目前应用最多的两种体系是乙腈—甲醇—水^[26]和正己烷—异丙醇—水^[27]。乙腈—甲醇体系对于磷脂酰胆碱和鞘磷脂分离十分有效, 但对其它的几种磷脂的分辨率不是很高; 正己烷—异丙醇体系几乎能将所有磷脂分开, 因此本文选用后者作为分离的洗脱液。

磷脂检测方法还有质谱法^[28]、比色法^[29]、荧光法^[30]等。

4. 稀土与膜磷脂的作用

· 磷脂含有磷酸根，因而对稀土元素具有潜在的、强烈的亲和力。Rajas^[30]发现 $^{147}\text{Pm}^{3+}$ 能吸附在人造磷脂酰丝氨酸上。Akutsu^[31]发现 La^{3+} 可与人造膜的磷脂胆碱结合。Uyesaka^[32]利用 ESR 进行的研究表明稀土在未受伤的细胞膜上仅仅或至少与脂双层键合。EL-Fakahany^[33]利用 EM 和 EDAX 分析证明稀土不能进入健康活细胞。Laszlo^[34]用同位素法在注射过 $^{140}\text{La}^{3+}$ 的老鼠细胞中也没有发现 $^{140}\text{La}^{3+}$ 。但也有研究结果表明 La^{3+} 可进入鸡胚胎心室细胞^[36]， ^{130}Tm 可积累在肌肉细胞内^[37]。Nagahashi^[38]用 EM 研究植物根细胞中稀土的分布后指出，稀土元素只分布于质膜之外。综上所述，稀土元素能否通过质膜进入健康的活细胞至今尚未定论。

外界物质首先作用与细胞的本质部位是细胞质膜，细胞质膜也是控制物质在细胞内外分布的关键。细胞膜的基本成分是蛋白质、磷脂、糖脂和胆固醇，在这些结构中含量最多的是磷脂，生物体内的磷脂也主要分布在生物膜上。本文以天然生长的植物为对象，研究了其细胞质膜的稀土元素的结合形态，特别是与磷脂有关的稀土元素。毫无疑问，研究与磷脂有关的稀土元素为进一步了解稀土元素与细胞膜的作用、更好地理解稀土元素的生物效应将提供重要的信息。

第二章 大豆根细胞质膜上稀土元素的研究

细胞质膜是包裹细胞器的外膜,它的成分和结构对细胞的通透性因而对细胞的生理功能有着十分重要的影响。

1974年 G. Nagahashi^[38]用电子显微镜观察了 La 在根细胞中的分布,只在细胞质膜之外发现有 La 的存在,也就是说在细胞质及细胞器中未发现 La。蔡继保^[39]用离心分离技术制备了天然生长的大豆根质膜样品并发现质膜上结合有稀土元素。尽管这样,仍有研究表明 La 等稀土元素会影响质膜的通透性^[40-42],从而影响了细胞内物质的含量,甚至影响了细胞内的生化过程。例如 L. Gill^[43]观察到 La 使进入细胞内的 Ca 量减少。黄碧霞等^[44]也曾观察到在稀土含量较高的土壤中培育的豆根中水溶性 Ca 含量较低。

质膜基质主要由磷脂,蛋白,糖脂和胆固醇等成分组成,在数量上尤以磷脂含量最高。这些物质带有含氧基团,如磷酸根,羧基和羟基等,因而这些物质与稀土离子有较强的亲和力。虽然这些质膜成分对稀土离子有较强的亲和力,但生物体系是复杂的,进入根中的稀土能否通过重重“障碍”到达质膜尚不清楚。本文以大豆根为样品,研究了质膜上的稀土。

一 材料与方 法

1. 试剂

Mes(超纯)、2-巯基乙醇(Biotech.)和 Triton-X 100 PMSF 和 SDS 为生物技术纯,购买于 AMRESCO。Tris(超纯)、DTT(超纯) 分别从 USA 和 Canada 购得。PMSF 和 SDS 为生物技术纯,NaCl 为光谱纯。HNO₃ 为超纯,HCl 和 HClO₄ 为优级纯,分析纯的正己烷与异丙醇为经二次蒸馏后使用。其余试剂为分析纯。所用水溶液均用新制得的石英亚沸蒸馏水配制。

2. 仪器

2.1 高压液相色谱仪及工作条件

色谱仪 Varian LC-5060 型 HPLC 色谱仪(USA)

色谱柱 Varian Micro-Pak Si-5 (15cm×4mm I.D.)

洗脱液 hexane-isopropanol (3:4, v/v)—H₂O

流速 1ml/min

2.2 排阻高压液相色谱及工作条件

色谱仪 Varian LC-5060 型 HPLC 色谱仪(USA)

色谱柱 葡聚糖 G4000SW 凝胶柱(30cm×7.7mmI.D.)

淋洗液含 0.1% (v/v)Triton-X 100, 1mM 2-巯基乙醇和 25mM Tris-HCl(pH7.2);

流速 1ml/min

级分溶液体积为 1ml。

2.3 ICP-AES TJA 公司 Atomscan Advantage 仪 (美国)

2.4 ICP-MS TJA 公司 POEMS 仪 (美国)

2.5 SHIMADZU UV—2100 分光光度计 (日本)

3. 样品来源

用安徽省农科院提供的六青黄豆种在安徽合肥没有或施加了混合稀土的土壤中盆栽, 培育长到有 5 片叶子时进行采样, 清洗、吸干、剪碎、称重后置于-10℃的冰箱中冷藏备用。

4. 供试土壤

供试土壤中各种稀土元素含量^[45]及长乐稀土微肥中主要稀土元素氧化物的百分含量分别列于表 2-2 和表 2-3 中。

表 2-2 供试土壤中稀土元素含量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb
40.1	85.1	8.5	35.1	6.7	1.3	5.7	0.8
Df	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	Y	Sc
5.3	1.0	3.4	0.5	3.0	0.5	27.3	12.3

表 2-3. 长乐稀土硝酸盐微肥中主要稀土氧化物含量 (%)

La_2O_3	CeO_3	Pr_6O_4	Nd_2O_3
19.78	4.66	1.86	5.40

5. 纯磷脂的制备与 SEC 分离

用有机溶剂程序^[46]从大豆根中提取磷脂粗品, 具体步骤如下图所示:

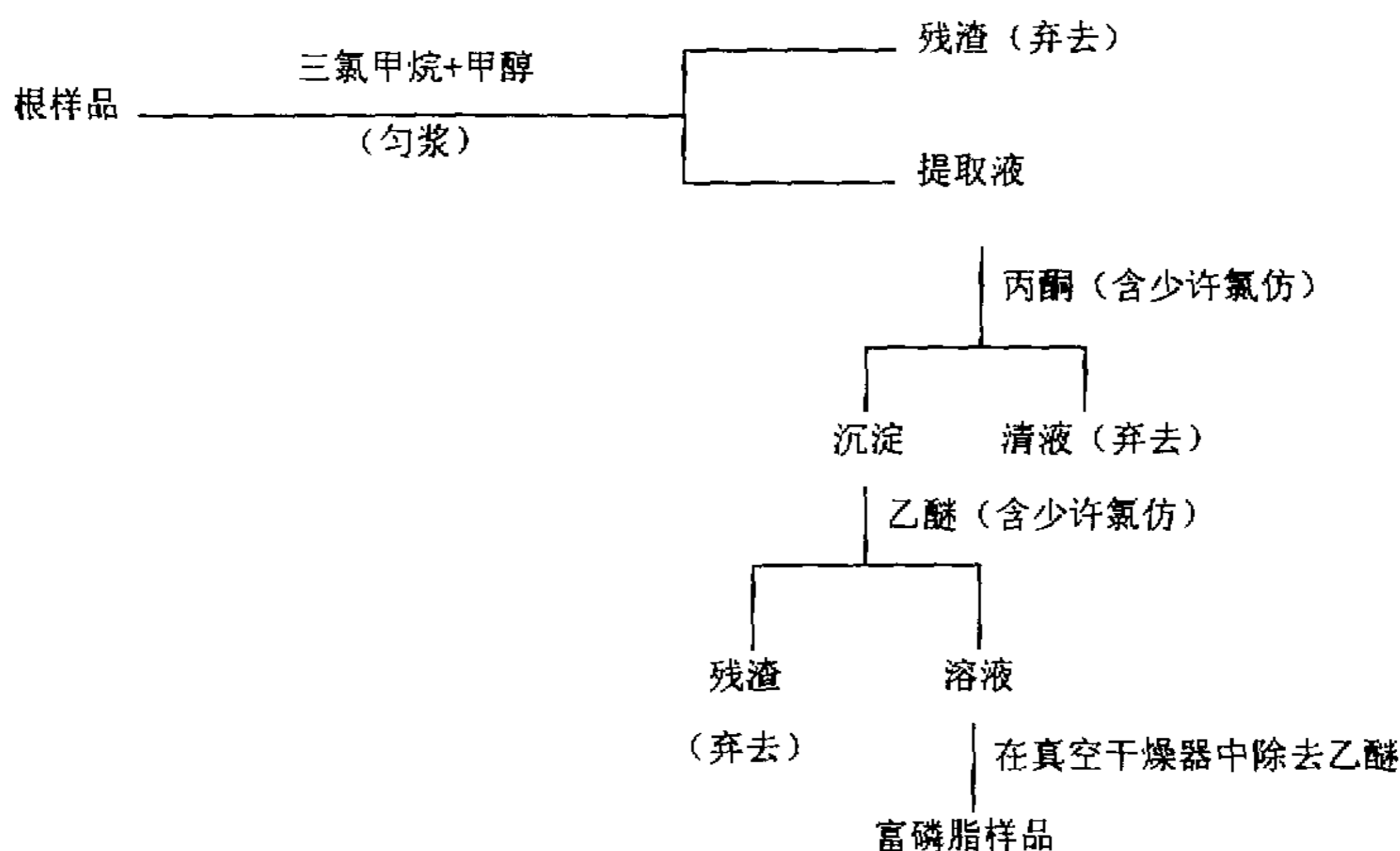


图 2-2 磷脂有机溶剂提取分离图

将上述得到的粗磷脂样品在 Micro-Pak Si-5 柱上用 hexane-isopropanol-water 作为淋洗液进行 HPLC^[46]分离, 于 210nm 检测流出积分的紫外吸收并测定积分液的 P 分布。将既是紫外吸收峰又对应 P 峰的各个级分进行合并, 并在 N_2 气流下蒸干, 用 1ml 4%SDS 溶液溶解干渣, 所得溶液进行 SEC HPLC 分离。100ul 的样品溶液注入 SEC 系统并用 25mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.2)淋洗。缓冲溶液中还含有 0.1%(v/v) Triton-100 和 1mM 2-Mercaptoethanol., 以 1.0ml/min 的流速进行淋洗。检测级分溶液的 P 含量, 以确定磷脂级分。

6. 细胞质膜的制备与 SEC 分离

应用 William J. Hurkman^[47-48]的方法制备和溶解质膜。主要程序是：用 40ml 缓冲液与 10g 鲜根匀浆，缓冲液含 3mM EDTA、25mM Tris-Mes(pH7.2)和 0.25M 蔗糖。匀浆液在 Beckman J2-21m rotor 中以 3000g 转速离心 5 分钟，弃去沉积物，上清液于 13,000g 离心 15 分钟并弃去沉积物。上清液再于 13,000g 离心，得到的上清液在 HITACHI 55-72 rotor 中于 80000g 离心 30 分钟，将得到的沉积物悬浮在 20ml 缓冲液中，其组成为 1mM Tris-Mes(pH7.0) 和 0.25M 蔗糖。取 18ml 上述悬浮液注入线性梯度中，该梯度液由 20ml 22%、26ml 30%和 26ml 40%的蔗糖溶液组成。上述蔗糖溶液还含有 1mM EDTA(pH7.2) 和 1mM DTT。

梯度(系列)于 80,000g 离心 2 小时，在 30-40%的蔗糖界面处收集粗质膜级分。取 5ml 粗质膜级分悬浮在 10ml SDS 缓冲液中，该缓冲液组成为 4%(w/v)SDS、2%(v/v)2-mercaptoethanol、20%(w/v)glycerol、2mM PMSF 和 100mM Tris-HCl(pH8.5)。将上述混合物于 80℃加热 5 分钟并不时进行搅拌，然后在 4000rpm 下离心 30 分钟后弃去不溶物，将此质膜组分的上清液与纯磷脂样品在相同的分离条件下进行 SEC 层析分离，在 280nm(或 230nm)处进行紫外吸收检测并测定级分溶液的稀土元素和 Ca 含量。

7. 元素测定

级分溶液的 P 元素和 Ca 元素用 ICP-AES 测定，稀土元素用 ICP-MS 测定。级分溶液中的有机物会干扰测定，因此分析前均用消化的方法予以去除，即将级分溶液干燥后每份干渣用 20ml 超纯 HNO₃ 处理，在红外辐射加热板上于 90℃保温 16 小时，再加入 3 滴优级纯 HClO₄，于 180℃左右加热 20 分钟，直至样品完全消化，然后加热至近干并用 3%的 HNO₃ 溶液溶解干渣，最后用 ICP-AES 或 ICP-MS 进行元素测定。

二 结果与讨论

本文的实验结果示于图 2-3 至图 2-4 中。图 2-3 是纯磷脂样品经 SEC 分离后级分溶液的 P 分布图，图中在保留时间为 2 分和 8 分的级分出现了 P 峰。因为磷脂的基本成分之一是磷酸盐，因而本文中 P 的分布可以认为就是磷脂组分的分布。这样，显然图中与 P 峰对应的保留时间分别为 2 分和 8 分的二个级分是与磷脂或含磷脂的复合物有关的级分。图 2-4 是质膜样品 SEC 图。由于质膜样品是在与纯磷脂样品完全相同的条件下进行 SEC 分离的，因此可以认为图 2-4 中保留时间为 2 分和 8 分的这二个级分是与磷脂或磷脂复合物有关的，这一结论通过 P 分布的测定得到确证（此图未给出）。因为生物膜中有的磷脂与蛋白质紧密结合，从而构成具有稳定结构的复合物，为了鉴别这类磷脂，本文进一步研究了经 SEC 分离后各级分溶液的紫外吸收光谱特征。图 2-4 中在保留时间为 8 分的级分出现了具有蛋白质特征的 A₂₈₀ 和 A₂₃₀ 紫外吸收峰（A₂₃₀ 图未给出），这意味着保留时间为 8 分的级分不仅与磷脂有关，而且还与蛋白有关。所以图 2-4 中保留时间为 2 分的级分是与磷脂有关的级分；而保留时间为 8 分的级分则是与磷脂—蛋白复合物有关的级分。图 2-4 (b) 是质膜样品中 La、Ce、Pr、Nd 的 SEC 图。

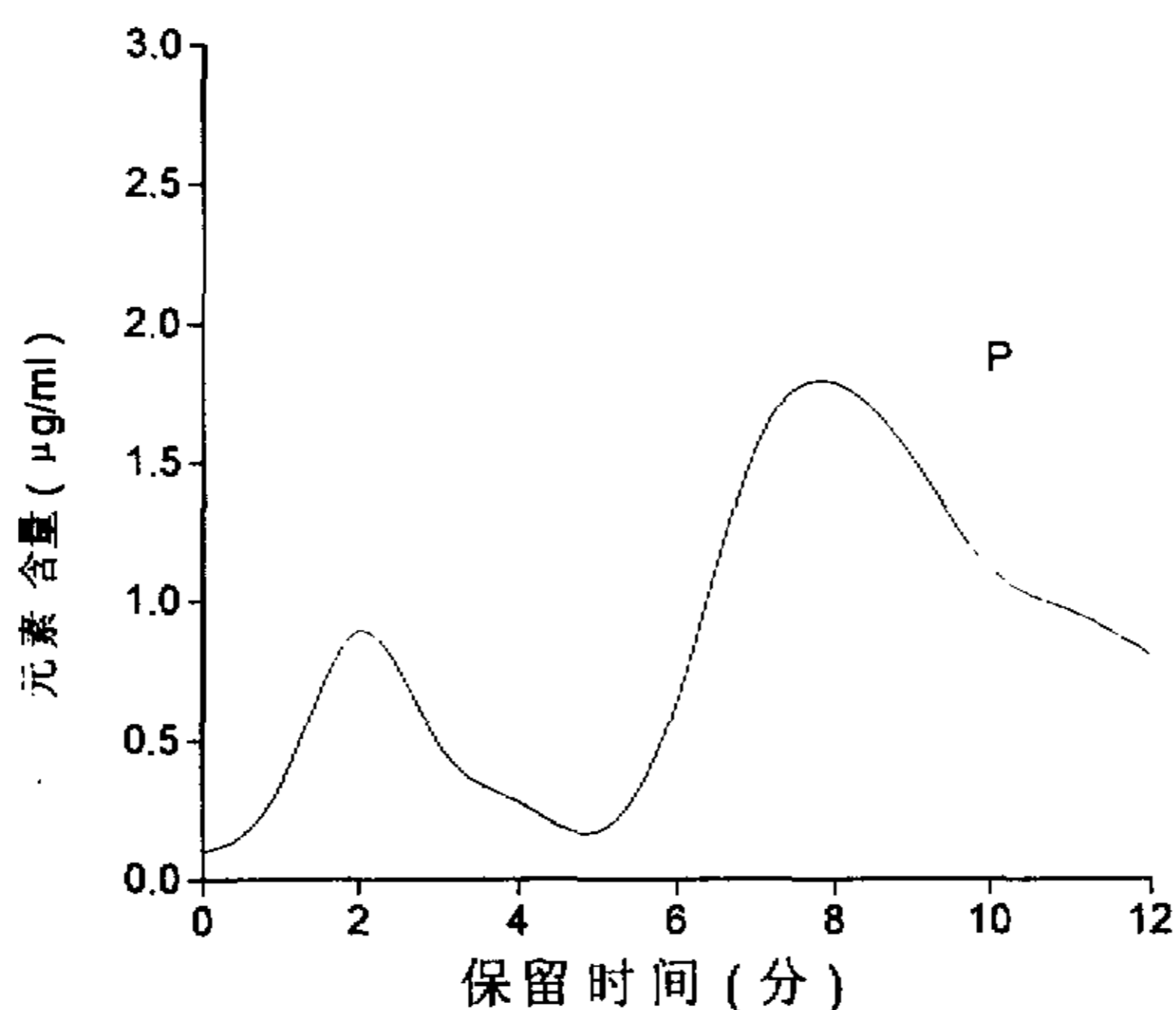


图 2-3 纯磷脂样品 SEC 图

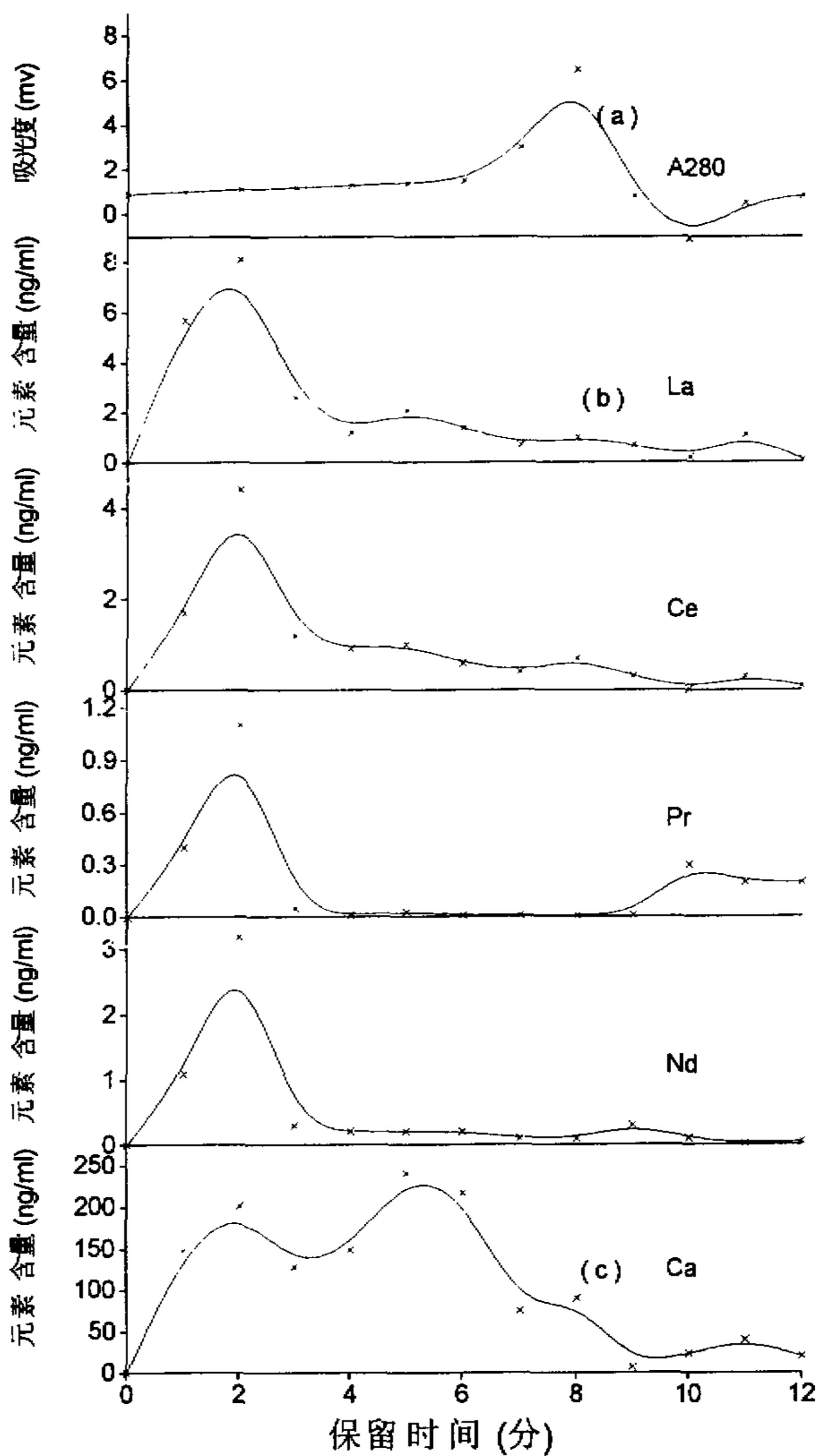


图 2-4 细胞质膜组分 SEC 图

由图可知 La、Ce、Pr 和 Nd 等稀土元素只在保留时间为 2 分的级分有峰出现，这说明质膜上存在有 La、Ce、Pr 和 Nd 等元素并且这些元素集中分布在保留时间为 2 分的级分中，即与蛋白无关的磷脂组分中；由于 La^{3+} 的离子半径与 Ca^{2+} 接近，而 La^{3+} 的电荷/离子半径比值大于 Ca^{2+} ，因而与含氧配体键合的能力也比 Ca^{2+} 强。这样在生物体中 La^{3+} 很可能与 Ca^{2+} 竞争结合配体。为此，本文还研究了质膜上 Ca^{2+} 的分布，如图 2-4 (c) 所示。将 Ca 的色谱图与 La、Ce、Pr 和 Nd 的色谱图进行比较，发现质膜上 Ca 的分布与上述稀土元素不尽相同，Ca 峰不仅出现在保留时间为 2 分的组分中，而且还出现在保留时间为 8 分的组分中。也就是说，质膜上的 Ca 一部分是与与蛋白无关的磷脂结合，另一部分是与与蛋白有关的磷脂结合。这个实验结果说明与蛋白无关的磷脂是质膜上 La^{3+} 等稀土离子与 Ca^{2+} 共同的结合配体，这意味着二者会竞争这种结合配体，也就是说 La 等稀土元素对这种形态的 Ca 有着潜在的影响。由于这个缘故，如果土壤中稀土元素含量过高时（例如土壤被稀土元素严重污染），稀土元素有可能过多地与 Ca 竞争质膜上的这一结合配体，从而影响膜基质的成分乃至细胞质膜的性能。

结论

采用 SEC 分离技术可将磷脂分为分子量不同的二类，即与蛋白无关的分子量较大的磷脂组分和与蛋白有关的分子量较小的磷脂组分。细胞质膜上的 La、Ce、Pr 和 Nd 等稀土离子集中分布在与蛋白无关的磷脂中； Ca^{2+} 既与不含蛋白的磷脂结合，又与含蛋白的磷脂相结合。

参考文献

- 1 Strum J.M., *Ultrastruct Res.*, 1977, 59:126
- 2 Hepler P.K., et al., *J. Cell Biol.*, 1985, 100: 1363
- 3 Smith J.B., Smith L., *Biosci. Rep.*, 1984, 4:777
- 4 Schroeder H. A., Mitchener M., *J. Nutr.*, 1971, 101:1431
- 5 杨频, 魏春英, *化学通报*, 1996, 7:4
- 6 Singer S.J., Nicolson G.L., *Sci*, 1972, 175:720
- 7 沈仁权, 顾其敏, *生物化学教程*, 高等教育出版社, 1993
- 8 Whitman C.E., Travis R.L., *Plant Physiol.*, 1985, 79:494
- 9 Akutazu H., Nagamori T., *Biochem.*, 1991, 30:4510
- 10 Li Xinmin, *Nijiazuan, J. Rare Earth*, 1995, 13:212
- 11 张延昆, *日用化学工业*, 1997, 6:26
- 12 苏拔贤, *生物化学制备技术*, 科学出版社, 1994
- 13 Folch J., Sloane-Stanley G.H., *J. Biol. Chem.*, 1957, 226:497
- 14 Christie W.W., *Z. Lebens.-Unters.-Forsch.*, 1985, 181:171
- 15 Gillfillan A.M., Chun A.J., Smart D.A., Rooney S.A., *J. Lipid Res.*, 1983, 24:1651
- 16 Bowyer D.E., King J.P., *J. Chromatogr.*, 1977, 143:473
- 17 Macala L.J., Yu R.K., Audu S., *J Lipid Res.*, 1983, 24:1243
- 18 Samet J.M., Friedman M., Henke D.C., *Anal. Biochem.*, 1989, 182:32
- 19 Nissen H.P., Kreysel H.W., *J. Chromatogr.*, 1983, 276:29
- 20 Van Kessel W.S.M.G., Tieman M., Demel R.A., *Lipids*, 1981, 16:58
- 21 Privett O.S., Erdahl W.L., Dougherty K.A., Stolyhwo A., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1973, 50:516
- 22 Juaneda P., Rocquelin G., Astorg P.O., *Lipids*, 1990, 25:756
- 23 Yandrasitz J.R., Gerard Berry, Stanton Segal, *J. Chromatogr.*, 1981, 225:319
- 24 Chen S.S., Kou A.Y., *J. Chromatogr.*, 1982, 227:25
- 25 Van Kessel W.S.M., Hax W.M.A., Demel R.A., Gier J.D., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1977, 486:524
- 26 Jungawala F.B., Evans J.E., McCluer R.H., *Biochem. J.*, 1976, 155:55

- 27 Hax W.M.A., Geurts W.S.M. van Kessel, *J Chromatogr.*, 1977, 142:735
- 28 Ma Yee-Chung, Kim Hee-Yong, *Anal. Biochem.*, 1985, 226:293
- 29 Yandrasitz J.R., Gerard Berry, Stanton Segal, *Anal. Biochem.*, 1983, 135:239
- 30 Bernhard W.B., Creutzburg H., Postle A.D., Arning A., Carrera I.M., *Anal. Biochem.*, 1994, 220:172
- 31 Rajas E., Lettvin J.Y., Pickard W.F., *Nature*, 1966, 209:886
- 32 Akutsu H., Seelig J., *Biochem.*, 1981, 20:7366
- 33 Uyesaka N., Kamino K., *J. Membr. Biol.*, 1976, 27:283
- 34 EL-Fakahany E., Lopez J.R., Richelson E.J., *Neurochem.*, 1983, 40:1687
- 35 Laszho D., Ekstein D.M., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1952, 13:559
- 36 Peeters G.A., Osami Kohmoto, Barry W.H., *Am. J. Physiol.*, 1989, 256:C361
- 37 Brigs R.J., Drath D.B., *J. Cell Biol.*, 1975, 67:566
- 38 I G. Nagahashi, W.W. Thomson and R.T. Leonard. *Science*, 1974, 183:620.
- 39 蔡继保, 中国科大硕士论文, 1999
- 40 常江, 镧对稻和麦根组织细胞膜通透性的影响和对营养元素吸收和积累的影响, *植物生理通报*, 1991, 27 (1): 17.
- 41 Evans C.H., *Calcium in Drug Actions*, 1988, 527:88
- 42 李新民, 倪家缙, 陈建文, 黄芬. *生物物理学报*, 1996, 12(1):51-55
- 43 Donald L. Gill, Evelyn F. Grollman and Leonard D. Kohn. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 25(1):184-192.
- 44 黄碧霞, 谢小梅, 蔡继宝, 徐洛, *稀土*, 1999, 20 (5): 45-48.
- 45 方能虎. 中国科学技术大学博士学位论文. 1998
- 46 野岛庄七, 永林克孝, *脂质*, 曹仓书店, 1969:61
- 47 Chen S.F., Chan P.H., *J. Chromatogr.*, 1985, 344:297
- 48 William J. Hurkman, Charlene K. Tanaka., *Plant Physio*, 1986, 81, 802-806.
- 49 Frances M. Dupont, William J. Hurkman. *Plant Physio.*, 1985, 77, 857-862.

第三章 土壤施加稀土对 Ca 在细胞中分布影响机制的探讨

一 引言

Ca^{2+} 在细胞功能的调控中起着十分重要的作用^[1]。我们^[2]曾就土壤施加 La 后对大豆根中 Ca 分布的影响进行过研究以了解稀土在植物体中产生的生理效应,发现土壤施 La 后 Ca 在根中的总含量降低,水溶性 Ca 含量降低,但细胞壁中的 Ca 含量几乎不变。

质膜是包裹各种细胞器而使细胞内部与外界环境分隔的生物膜,它是调节物质在细胞内外分布的关键部分。质膜及其他生物膜的基本成分是蛋白质、磷脂、糖脂和胆固醇^[3],在质膜上磷脂的数量是最多的。磷脂双分子层构成了生物膜的基本骨架,主要起通透屏障作用;而嵌入在磷脂双分子层中的膜蛋白或其复合物形成的转运机制控制着物质(例如 Ca^{2+})在细胞内外的交换。膜上的转运机制受许多因素的影响,其中金属离子的作用是一个不可忽视的重要因素。稀土元素是典型的金属元素,根据上文研究结果,质膜上 La^{3+} 等稀土离子与 Ca^{2+} 均可与蛋白无关的磷脂键合,这个研究结果提示可能稀土元素与细胞质膜结合从而改变了质膜的通透性。这与 Gill 等^[4]的研究结果是吻合的。他们发现当培养介质中含有 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{La}^{3+}$ 时,进入细胞的 Ca^{2+} 就减少一半,这意味着培养液中的 La^{3+} 会抑制通过质膜流入细胞的 Ca^{2+} 量。

本章着重研究了土壤施加混合稀土对生物膜上 Ca 分布的影响,并就土壤施用稀土元素后影响 Ca 在细胞中分布的可能机制进行了探讨。

二 材料与方法

1. 生物膜组分的提取与 SEC 分离

采用本文提出的方法进行生物膜的提取和分析。各种生物膜的基质主要都是由脂类和嵌合蛋白组成,不同的只是各种成分的比例随膜的种类而异。膜脂

质和膜蛋白都具有亲水性和疏水性，因此都溶于 SDS 溶液。这样为了提取各种膜成分就无需象提取质膜那样对样品的匀浆液进行离心分离，而直接用 SDS 溶液提取即可(但同时可能有非膜成分的两性分子也被提取出来)。主要程序如下：用 20ml 缓冲液与 10g 鲜根匀浆，此缓冲液含有 25mM Tris-HCl(pH8.5)、20mM Na_2SO_3 和 0.15M NaCl。匀浆液于 4000rpm 离心 30 分钟，然后置于 4℃ 冰箱中过夜。将不溶物悬浮在 20ml SDS 缓冲液(组成与上述相同)，继而在 4000rpm 离心，弃去不溶物，所得到的生物膜组分的上清液用于 SEC 分离、紫外吸收检测和 Ca 元素测定，分离条件和元素测定条件同于质膜样品。

其余均同于上一章。

三 结果与讨论

本文的实验结果示于图 2-5 中。图 2-5 是生物膜组分的 SEC 图。由于生物膜组分样品是在与纯磷脂样品完全相同的条件下进行 SEC 分离的，因此可以认为图 2-5 中保留时间为 2 分和 8 分的这二个级分是与磷脂或磷脂—蛋白复合物有关的。图 2-5 的结果说明了土壤施加稀土微肥后稀土元素与 Ca 的竞争结合对生物膜上 Ca 分布的影响。图 2-5 (a) 和图 2-5 (b) 分别是土壤未施加稀土和土壤中施有 6g 混合稀土/ m^2 时生物膜组分 Ca 的 SEC 图。比较图中的 Ca 分布曲线可以看出：根施稀土使得保留时间为 2 分、与蛋白无关的磷脂组分中的 Ca 量明显减少；而保留时间为 8 分、与蛋白有关的磷脂组分中的 Ca 含量基本不变。显然，根施稀土对与这部分磷脂相结合的 Ca 几乎没有影响。

我们的实验结果表明质膜上的 La、Ce、Pr 和 Nd 等元素键合在膜的磷脂双层上，这个结果与 Uyesaka^[5]用 ESR 方法观察的结果完全一致。作为生物膜基本骨架的磷脂双分子层，其中只有一小部分磷脂与蛋白质紧密结合为具有稳定结构和特殊生理功能的复合物^[6]，本文的研究结果表明稀土元素 La、Ce、Pr 和 Nd 等不易进入这种结构；而作为脂双层基本结构的大部分磷脂并不与蛋白直接发生作用，它们游离的极性头基团暴露在外，与水相直接接触， La^{3+} 等稀土离子易与这部分磷脂游离的极性头键合。由于 La^{3+} 等稀土离子与 Ca^{2+} 的离子半径近乎相等，而 Ln^{3+} 的电荷/离子半径比值比 Ca^{2+} 的大，因而它们与磷脂结合的能力高于 Ca^{2+} 。

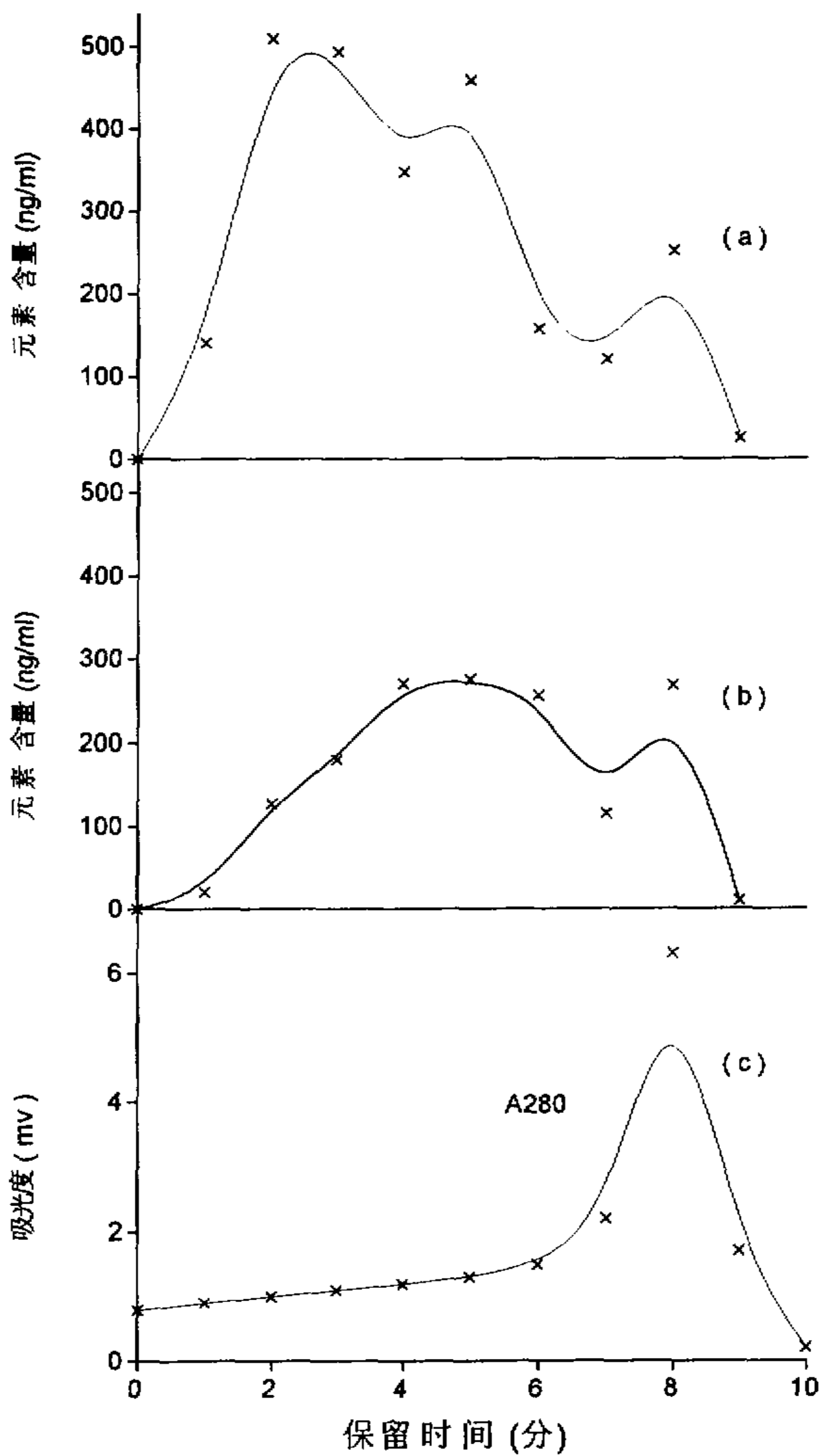


图 2-5 生物膜组分中 Ca 的 SEC 图

这样在土壤施加稀土微肥后,在质膜磷脂上稀土离子与 Ca^{2+} 会竞争结合位点。稀土离子的电荷比 Ca^{2+} 高,因而它们与 Ca^{2+} 的竞争键合会导致膜电阻、膜电位的改变^[7]。而膜电位的改变直接影响了质膜上钙的调控机制。

质膜上有多种 Ca^{2+} 调控机制,它们是维持细胞内 Ca^{2+} 分布的关键。虽然其中的 Ca^{2+} -ATP 酶(也称钙泵)是决定胞质内 Ca^{2+} 浓度以及整个细胞 Ca^{2+} 含量的关键^[8],但是这种机制的转运功能是借助于膜蛋白-磷脂复合物实现的^[9],也就是说这个调节机制是与蛋白磷脂复合物有关的。其转运活性不受质膜两侧膜电压差的影响^[10]。然而质膜上另外一种重要的 Ca^{2+} 调节机制—镶嵌在脂双层中的蛋白形成的 Ca 离子通道,它的调节作用主要受膜电位控制^[10]。膜电位的改变引发钙通道蛋白的构象发生变化,决定钙通道呈开放或关闭态,从而控制 Ca^{2+} 的运输。阳离子与膜磷脂的作用会引起膜电场的强烈改变^[11],膜电场的改变引发钙通道蛋白的构象发生改变,从而阻断钙通道的运输。上文已指出稀土元素在质膜上的结合位点主要是与蛋白无关的磷脂,稀土离子通过磷氧基团与这部分膜磷脂相键合^[12],会引起磷脂双分子层结构及表面电荷密度发生改变^[13],从而引起膜电阻、膜电位^[7]及膜流动性的改变^[14],膜磷脂与膜性质发生的这些改变导致膜上相关的 Ca^{2+} 调控机制(如 Ca 离子通道)的变化,使得膜对 Ca^{2+} 的通透性受到影响,最终导致 Ca^{2+} 在细胞中的分布发生改变。

综上所述,我们认为土壤施用稀土引起的 Ca 在细胞中分布的改变与稀土元素和膜磷脂的键合影响了质膜上的钙调控机制有关。细胞内 Ca^{2+} 的分布由质膜上存在的多种 Ca^{2+} 调控机制决定,但稀土元素可能主要影响其中的 Ca 离子通道调节机制。

结论

土壤施用稀土会影响膜上 Ca 的分布,但对两类不同结合形态的 Ca 影响不同。主要影响与蛋白无关的膜磷脂相结合的 Ca,而对与蛋白-磷脂结合的 Ca 无明显影响。这表明根施稀土会改变生物膜的成分,从而改变膜的结构、性质,对 Ca 的吸收产生一定的影响,这种影响可能是通过质膜上 Ca 离子通道调节机制的改变而实现的。

参考文献

- 1 Carafoli, E. In: Richardson, C.C. ed. *Annu. Rev. Biochem.*, Annual Reviews Inc, Palo Alto, California, 1987,56:395-434
- 2 黄碧霞, 谢晓梅, 蔡继保, 徐洛. 根施 La 对大豆幼苗根中 Ca、K 分布的影响. *稀土*, 1999, 20(5):45-48
- 3 Geoffrey.Zubay, *Biochemistry*, Wm. C. Brown Publishers, Third Edition, 1993, P175.
- 4 Gill, D.L., Grollman, E.F., Kohn, L.D. Calcium transport mechanism in membrane vesicles from guinea pig brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256:184-192
- 5 Uyesaka, N., Kamino, K., Ogawa, M., et al. Lanthanum and some other cation-induced changes in fluidity of synaptosomal membrane studied with nitroxide stearate spin lables. *J. Membr. Biol.*, 1976, 27:283-295
- 6 Singer, S.J.; Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972, 175:720-731
- 7 杨频, 魏春英. 稀土与细胞、器官、组织的作用及其生理效应. *化学通报*, 1996, (7):14-17
- 8 张云, 薛绍白. 钙和细胞功能. *细胞生物学进展*. (郑国倡, 翟中和主编), 1991, 2:160-210
- 9 Warren, G.B.; Birdsall, N.J.M.; Lee, A.G.; et al. Lipid substitution. Functional complexes of single species of phospholipid and a purified calcium transport protein. *Membr. Proteins Transp. Phosphorylation* (Azzone, G.F.; et al. eds), Proc. Int. Symp., 1974, 1-12
- 10 孙大业, 郭艳林, 马力耕. *细胞信号转导*. 科学出版社, 1998, 94
- 11 Lis, L.J.; Lis, W.T.; Parsegian, V.A.; Rand, R.P. Adsorption of divalent cations to a variety of phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry*, 1981, 20:1771-1777
- 12 Hauser, H., Hinckley, C.C., Krebs, J., et al. The interaction of ions with phosphatidylcholine bilayers. *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 468:364-377
- 13 Barton. P.G. The influence of surface charge density of phosphotides on the binding of some cations. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243(14):3884-3890
- 14 李新民, 倪家缙, 陈建文, 黄芬. 钆对兔肌质网膜脂与膜蛋白的影响. *生物物理学报*, 1996, 12(1):51-55

附 录

申请硕士学位期间发表论文情况

1. 郑志侠, 黄碧霞等, 稀土元素对 Ca 在细胞中分布影响机制的探讨, *稀土* (已接受发表)
2. 黄碧霞, 蔡继宝, 芮 蕾, 郑志侠, 大豆根细胞质膜上的稀土元素, *稀土*, 2001,22(3).(出版中)
3. 黄碧霞, 宋磊, 岳军, 郑志侠, Study of Fish Gelatin as Carrier of Silver Halide Nanoparticles, *化学物理学报*. (投稿中)