

图5 ^{125}I -胸腺激素 T_1 与淋巴细胞结合关系

- a. 乳过氧化物酶法标记的 ^{125}I -胸腺激素 T_1 比放射性 3.41 微居里/微克。
- b. 氯胺 T 法标记的 ^{125}I -胸腺激素 T_1 比放射性 4.9 微居里/微克。

讨 论

Polis^[8], Morrison^[12-13]和 Thorell^[7]等先后报道从牛乳中制备高纯度乳过氧化物酶的方法, $A_{412\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值可达 0.8—0.9。Thorell 认为乳过氧化物酶 $A_{412\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值在 0.5—0.65 即可用于标记实验, 一般碘标记蛋白质需用的酶量很少, 因此对实验室小量制备, 立即使用或短期低温保存, 十分方便。

我们主要基于 Thorell 1971 年制备乳过氧化物酶的方法, 简化了其中用等电聚焦纯化的一步, 改用 CM-纤维素层析, 制备的酶从 $A_{412\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值和等电聚焦纯度鉴定, 证明可以用于蛋白质的碘标记试验。

在 CM-纤维素层析时我们采用氯化钠直线浓度梯度洗脱, 此法比较易得到高比值的酶;

低比值部分如再重复一次 CM-纤维素层析, 比值可以从 0.4 左右提高到 0.8。

该酶稳定性较差, 在水中或低浓度缓冲液中比值易下降, 因此要获得高比值的酶, 关键是保持牛乳的新鲜度, 低温操作和一定的盐浓度。高比值的酶可制成硫酸铵糊, 低温 (-20°C) 保存或带盐冻干, 使用前透析去盐。

参 考 文 献

- [1] Hunter, W. H. et al.: *Nature*, **194**, 495, 1962.
- [2] Marchalonis, J.: *Biochem. J.*, **113**, 299, 1969.
- [3] Hamlin, J. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 21, 1974.
- [4] Sodoyez, J. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4268, 1975.
- [5] Mednieks, M. I. et al.: *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 267, 1978.
- [6] 金以丰等: 《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 12 卷, 2 期, 133 页。
- [7] Thorell, J. I. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **251**, 363, 1971.
- [8] Polis, B. D. et al.: *Methods in Enzymology*, **2**, 813, 1955.
- [9] Wrigley, C. W.: *Methods in Enzymology*, **22**, 559, 1971, Academic Press.
- [10] Hooper, J. A. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **249**, 125, 1975.
- [11] 金以丰等: 《南京大学学报》(自然科学版), 1979 年, 1 期, 115 页。
- [12] Morrison, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2847, 1963.
- [13] Morrison, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **228**, 767, 1957.

[本文于 1980 年 6 月 5 日收到]

一种简易的固相蛋白质顺序测定仪

徐佐杰 戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所)

据了解目前不少单位正向国外订购此类仪器, 这将耗费许多宝贵的外汇。本文介绍的固相蛋白质顺序测定仪, 材料全部国产, 造价只千元, 而性能与国外同类产品不相上下, 如果能加以推广, 在国家经济较困难的情况下, 就可以节省下许多外汇。

—— 编 者

随着我国蛋白质化学结构研究的需要, 我们最近试制了一台半自动蛋白质顺序测定仪

(图1), 结构简单, 经济实用, 维修方便。通过对胰岛素 B 链和肌红蛋白标准样品的分析表明, 能

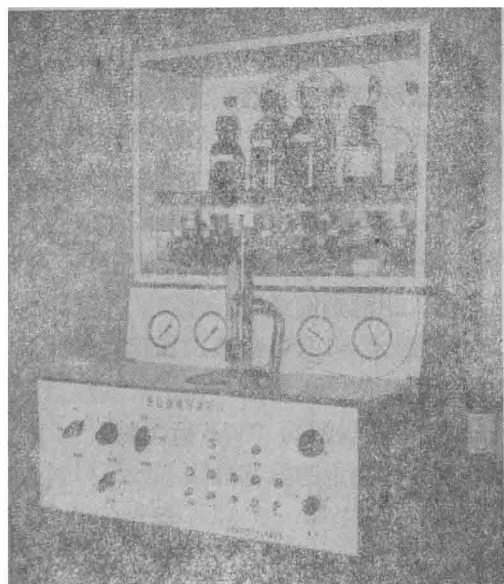


图 1 仪器外形

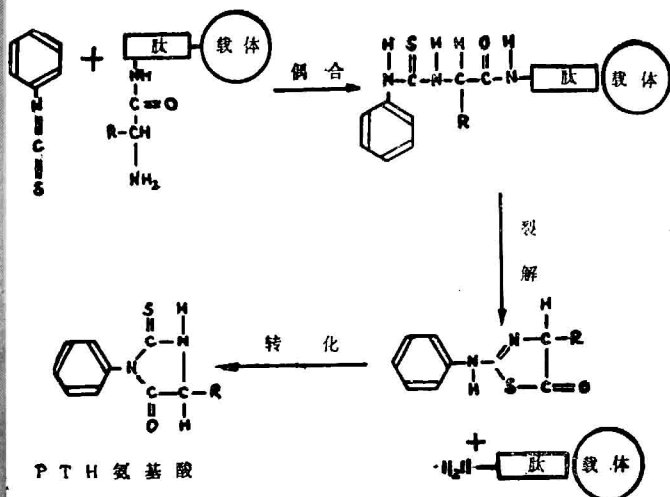


图 2 肽链的 Edman 降解

测定全部胰岛素 B 链及肌红蛋白 N 端 32 个的氨基酸残基顺序。平均每天可进行 4—5 个氨基酸顺序的分析;样品用量在 100—200 毫微克分子,达到进口的 LKB 固相蛋白质顺序仪的水平;整个仪器造价不到一千元,低于进口仪器价格的百分之一;仪器所用的材料全部为国产,因而适合于国内推广。

仪器与试剂

该仪器采用 Edman 降解原理,将待分析的样品先与固相树脂连结,然后进行偶合、裂解、转化等步骤(图 2)。使 N 末端氨基酸残基逐一降解下来,最后生成 PTH 氨基酸衍生物在硅胶薄板层析上鉴定。

仪器的操作系统见图 3。盛高纯氮的钢筒除用以保护试剂及溶剂外,又同时作为动力源,以代替结构复杂的微量泵。除试剂三氟醋酸(TFA)的管道单独用手控阀供给氮压外,其余各试剂及溶剂之间的管道均用单向球阀隔绝。试剂、溶剂之输送由各手控阀控制,调节方便,可计滴,也可计流量。反应温度由小型恒温循环水泵控制。裂解反应后的嘧啶酮氨基酸衍生物用 10 毫升试管收集,其余含反应副产物的洗

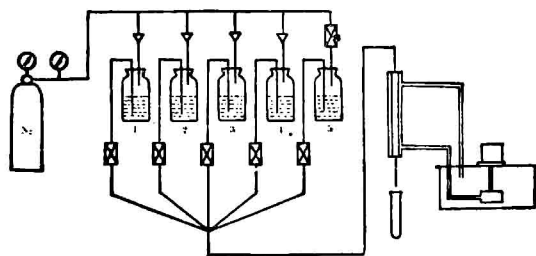


图 3 仪器系统图

1. 甲醇 2. 二氯乙烷 3. 缓冲液 4. 异硫
氰酸苯酯 (PITC) 5. 三氟醋酸 (TFA)

脱溶剂均贮集于废液瓶。

仪器所用之单面球阀、小型恒温循环泵及各试剂的瓶口密封接头等由上海生化所工厂加工制作。手控阀门采用针形阀结构,取聚四氟乙烯(F₄₀₅)为材料,由上海塑料十四厂加工。四氟塑料管内径为 0.2 毫米,由上海塑料研究所定制。玻璃柱长 15 厘米,内径 2.0 毫米。

仪器所用试剂:二甲基甲酰胺(DMF)为上海试剂一厂分析纯产品,重蒸一次。N-甲基吗福啉为英国 Koch-Light 产品,重蒸一次。三氟醋酸为北京化工厂产品,分析纯。异硫氰酸苯酯(PITC)为上海东风试剂厂产品,重蒸一次。甲醇为上海试剂一厂产品分析纯。吡啶及二氯乙烷为上海试剂一厂产品,重蒸一次。硅

基玻璃连结,肽链中N端的 α -氨基及赖氨酸的 ϵ -氨基将与载体共价偶合,经Edman降解后仍将留在载体上,因此胰岛素B链的N末端苯丙氨酸与第29位的赖氨酸不能测定。此外,第30位的丙氨酸位于29位的赖氨酸之后,不再与载体连结,也不属测定范围。其余全部PTH氨基酸层析点清晰。图4a及4b为第25—28位PTH氨基酸的层析图谱。

肌红蛋白N末端附近32个氨基酸残基的顺序测定如下:

[Val]-Leu-Ser-Glu-Glu-Glu-Trp-Glu-Leu-Val-Leu-His-Val-Trp-Ala-[Lys]-Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Asn-Ile-Leu-Ile-Arg-Leu

N末端的Val及第16位的Lys情况与胰岛素B链相同,不能检测。图5列举第29、30、32位肌红蛋白中PTH氨基酸的层析图谱。至32步顺序测定时,仍可辨认出层析点位置为PTH-Leu。之后层析点变浅,杂点也相应增多。第31位系PTH-Arg,用溶剂系统III另作检

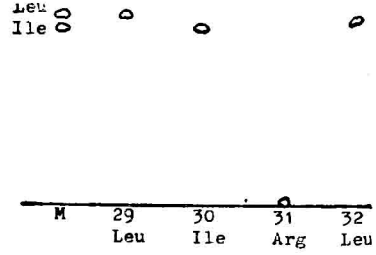


图5 肌红蛋白29、30、32位PTH氨基酸层析图谱

测。

目前,我们正在配合有色异硫氰酸苯酯试剂进一步设法提高分析灵敏度,以便测定超微量(确10nm)的蛋白质样品。

此仪器试制过程中,罗珊珊、张耀时、俞鹤年等同志提出宝贵意见;慕见凤同志作部分PTH氨基酸层析鉴定;王如棠等同志配合加工零件;特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Laursen, R. A., Horn, M. J. and Bonner, A. G., *FEBS Letters*, 21, 67, 1972.

[本文于1981年1月23日收到]

快速而稳定的放射免疫试剂——抗体覆盖的含A蛋白金色葡萄球菌

陈一新 曹和赣 梅志寿 李 萍
(江西省工业卫生研究所)

沈森局 孟福珍 王小丹
(江西省医学科学研究所)

放射免疫分析所用抗体吸附剂,品种很多,各有利弊。近几年陆续报道含A蛋白的Cowan I型葡萄球菌是良好的抗体吸附剂^[1-3]。经过筛选,我们找到了含有丰富的A蛋白“799”型金色葡萄球菌。用北京化工厂产皮质醇放射免疫试剂和上海生物制品研究所产HCG放射免疫试剂为模板,将热灭活甲醛处理的菌体,以非离子型去污剂处理之后,用它吸附抗原-抗体复合物,使复合物与游离抗原分离。我们参照Matali的方法^[4],用处理了的细菌和抗血清混合,将抗体覆盖在葡萄球菌菌体A蛋白上,再将其与待

测抗原和标记抗原结合,进行放射免疫分析取得成功,反应可在30分钟内完成。这种抗体覆盖的葡萄球菌制备很容易,且性能稳定,易保存。

材 料 和 方 法

一、抗原和抗血清 ¹²⁵I-皮质醇,皮质醇标准品和兔抗皮质醇血清是北京化工厂生产。¹²⁵I-HCG, HCG标准品是上海生物制品研究所生产,抗HCG血清是北京动物研究所赠送。