

(3) 荧光染色 细胞或组织切片加入 ConA-FITC 液(含蛋白质约 0.1 毫克/毫升)适量, 37℃ 保温 30 分钟, 后用 0.1M PBS(pH8.0) 洗, 在荧光显微镜下拍片(图 1)。



图 1 小鼠 S₁₈₀ 腹水细胞荧光染色
(细胞因 ConA-FITC 的作用已凝集成团)

三、ConA-FITC 产率计算

产率 = $\frac{\text{产物蛋白质量(毫克)}}{\text{被 Sephadex G50 吸附蛋白质量}} \times 100\%$

实验结果

ConA 用量 (毫克)	Sephadex G50 吸附率(%)	F/P	凝集 效价	产率 (%)
10.2	82	1.20	1:1024	54.7
20	—	1.18	1:1024	77.8*
6	80	1.66	—	53.7
20	—	1.12	—	70.0*

* Sephadex G50 吸附率未测, 均按 80% 计算。

讨 论

一、我们利用 ConA 与葡萄糖基特异性结合的特性, 将其亲和吸附在 Sephadex G50 上, 并且在对 ConA 有稳定作用的溶液 (1.0M

NaCl) 中进行反应, 明显提高了结合物的质量与得率。本法有以下长处:

(1) ConA 吸附于 Sephadex G50 使之固相化, 保护了它与糖反应的基团, 使 ConA 在反应过程中性质稳定, 不易失活, 因而产物活性受加入 FITC 量、反应温度及时间等影响小。

(2) 被 Sephadex G50 吸附的 ConA 是有活性的分子, 原料中无活性或低活性的分子及反应中失活的分子, 均随溶液流出, 达到了分离的目的。

二、本法所得的 ConA-FITC 用于细胞, 组织切片的荧光染色及荧光显微镜照相记录, 效果满意。聚丙烯酰胺凝胶圆盘及板电泳所分离的糖蛋白区带, 用改良 Christopher 法染色^[3], 可得较明显荧光区带。

三、Sephadex-ConA 与 FITC 在 pH7.4 条件下进行反应, 生成的 ConA-FITC 用葡萄糖易于洗脱。如 pH 调到 9 以上, 反应后 Sephadex G50 上可见明显荧光, 但难以用糖洗脱。此时如用甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH3) 洗脱, 洗脱物立即加 NaHCO₃ 中和, 也可得活性较高的产品, 但得量低。

四、在亲和吸附固相化的基础上进行荧光标记的方法应可用于其他外源凝集素。

参 考 文 献

[1] Tkacz, J. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **105**, 1, 1971.
[2] Marshall, J. D. Jr. et al.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. (N. Y.)*, **98**, 898, 1958.
[3] Christopher, M. W. et al.: *J. Cell Biol.*, **74**, 264, 1977.

[本文于 1980 年 7 月 28 日收到]

核磁共振的去水峰实验技术

张 水 珍

(中国科学院生物物理研究所)

核磁共振 (NMR) 已成为化学工作者有力的分析工具, 在用质子谱测试生物样品时, 常因

水溶剂峰极大, 遮盖了欲观察信号。即使以重水作溶剂, 对于质子谱, 重水中未氧化的 HDO

信号也远远大于样品信号。这种很强和很弱信号系统进行长期累加,使模数转换器的精度变坏,谱线严重失真。为此,提出一种叫消除水峰的脉冲傅里叶变换谱 (WEFT)^[1]。

用图 1 定性地说其工作原理^[2]。 X', Y', Z' 是旋转坐标系,用大小箭头分别表示 HDO 和样品在 Z 方向的磁化强度分量 $M_{Z'}$ 。实际上,它们彼此很靠近,且大小悬殊,因而大信号覆盖

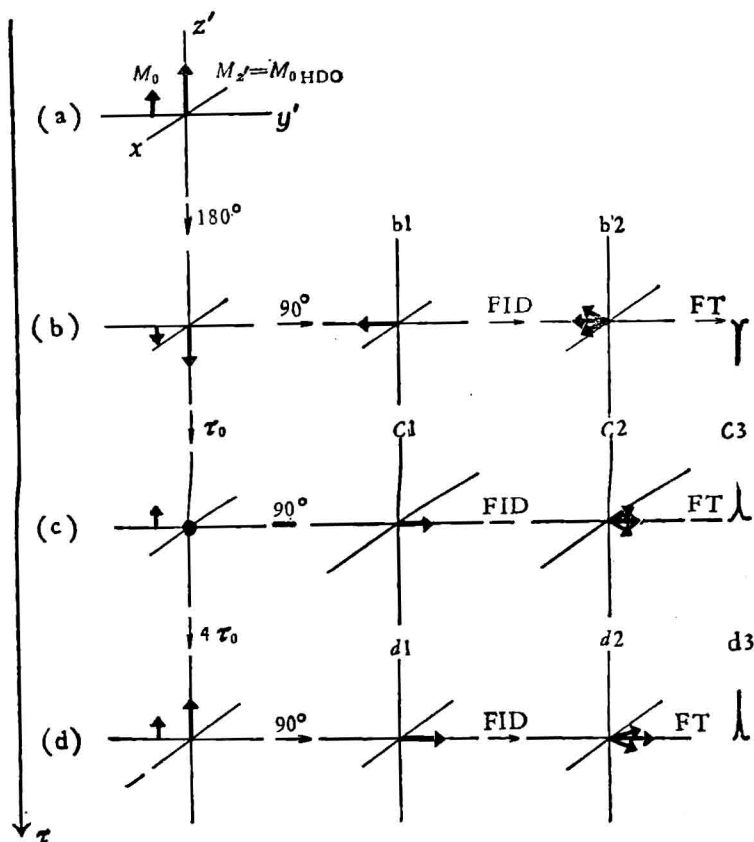


图 1 180°-τ-90° 脉冲序列的基本原理

了小信号。

在平衡时, $M_{Z'} = M_0$ 。如图 1a。在 x' 方向加 180° 射频脉冲。它使 M_0 绕 x' 轴转动 180°, 即 $M_{Z'} = -M_0$ 。如图 1b。由于存在弛豫过程, $M_{Z'}$ 要由 $-M_0$ 经过零点, 回复到 $+M_0$, 达到重新平衡。设由 $M_{Z'} = -M_0$, 到 $M_{Z'} = 0$ 这个过程所经历的时间为 τ_0 。 τ_0 和各质子共振峰的自旋——晶格弛豫时间 T_1 有关。对于 HDO T_1 为 3—15 秒。生物样品为几十到几百毫秒。二者弛豫时间相差较大, 这是本实验的前提条件。取 τ_0 是 HDO 达到 $M_{Z'} = 0$ 的时刻。可以想象, 由于样品 (生物分子) 的 T_1 很短, 在此时刻它们都已回复到平衡态, 即 $M_{Z'} = +M_0$ 。

如图 1c。紧接 τ_0 , 再加 90° 脉冲。那么, 这时只有样品的 $M_{Z'} = +M_0$ 倒向 Y' 。这就清除了 HDO 信号。在整个采样时间 AT 内, 只把接收到的样品信号经模数转换器送入计算机存储器。因样品信号极弱, 要进行 N 次累加。为使系统充分复原到平衡态, 要求有足够长的等待时间 PD 。取 $PD = 4\tau_0$ 。这样完整的脉冲序列为: 180°- τ_0 -90°- AT - $4\tau_0$ 。这就是反转恢复 (Inversion-recovery) 或 180°-τ-90° 法测 T_1 的脉冲序列。具体实验可按测 HDO 的 T_1 来做。关键在于精确地测定 τ_0 。它与样品浓度、pH 值、温度等有关。本实验在 Varian XL-100-15 谱仪上进行, 其步骤如下:

1. 把放大倍数放大些, 如置于 $8 \times 10 \pm$ 。
2. 样品预热到探头内的温度。
3. 用一般的 FT 程序双脉冲序列设计好 $180^\circ - \tau - 90^\circ$ 脉冲序列。
4. 进行一次采样及傅里叶变换 (FT)。

5. 进行相位校正。当 τ 选得较短时, 信号为负, 如图 1b3。当 τ 选得够长时, 信号为正, 如图 1d3。

6. 仔细地改变 τ 值。每个 τ 值重复一次步骤 (4), 必要时重复一次步骤 (5)。使得信号达到反向最小或零。例如, 本实验测得 $\tau_0 = 8$ 秒。据此定出 τ_0 及 $4\tau_0$ 。根据样品量, 定出累加次数, 进行常规实验。

图 2c 是 1, N⁶-乙撑腺嘌呤单核苷酸 (即 1, N⁶-εAMP), $PD = 8$, 浓度为 0.7mM, 5 毫米样品管, 样品高为 2—2.5 毫米。如果我们认定图中化学位移 δ 为 6.35 (单位 ppm 下同), 4.96, 4.63, 4.43, 4.07 的峰, 依次为核糖 1', 2', 3', 4', 5' 位置上的质子峰。 $\delta 4.07$ 这个双峰, 具有最大的包络面积。因而确信它包含着二个质子为 H_{2a} 和 H_{2b} 。其它峰可用自旋去偶技术, 明确其归属。具体做法是分别饱和 1' 和 4', 观察 2' 和 3' 峰形的变化。若照射 1' 且让其饱和, 则三重峰变为二重峰者是 2', 不变者为 3'。同理亦可饱和 4'。

图 2b 是用同样的样品, 在强磁场 250 兆周谱仪用连续波测试的。除了 1' 和 5' 上质子外,

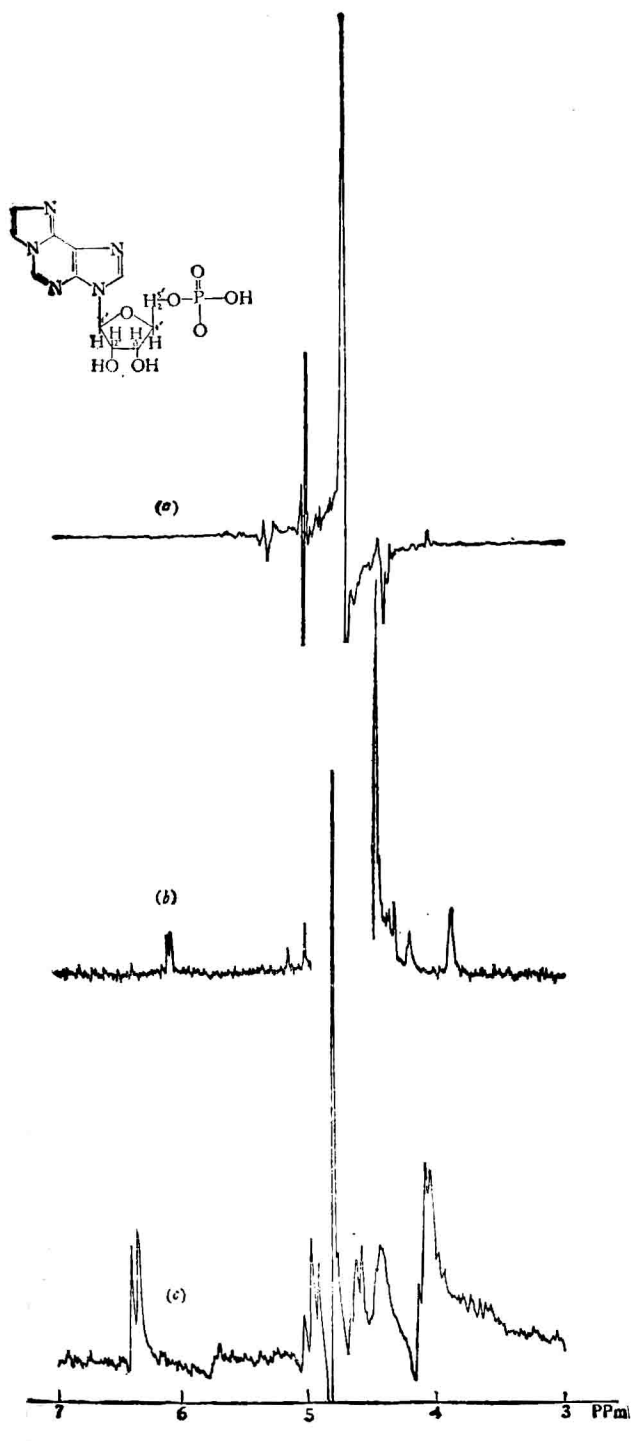


图 2 a: 当 τ_0 或 $4\tau_0$ 取值不适当时, 谱线完全失真, 因而无法获得有用信息

SPC WDT<HZ> = 1000
 TRU SPC WDT = 1024
 ACQ TIME<S> = 3.000
 PULS DLY<S> = 40.00
 PULS WD<US> = 23
 @PLS DLY<S> = 0.100
 @PLS WD<US> = 46
 TRANSIENTS = 30
 DATA LENGTH = 6144
 FT LENGTH = 8192
 HF IN

b: 使用连续波超导高磁场时, 由于大的溶剂峰, 部分有关信息被淹没。中间空白是大的 HDO 峰加旋转边带。

c: 用 WEFT 时, 1, N⁶-乙撑腺嘌呤单核苷酸中五个糖上的质子信息被揭露出来。图中左上角为样品分子式。

SPC WDT<HZ> = 1000 TRU SPC WDT = 1024
 ACQ TIME<S> = 3.000 PULS DLY<S> = 30.030
 PULS WD<US> = 23 @PLS DLY<S> = 8.000
 @PLS WD<US> = 46 TRANSIENTS = 30
 DATA LENGTH = 6144 FT LENGTH = 8192
 HF IN。

核糖区其它信息全被 HDO 淹没,所以连续波的强磁场谱线也无法解决这种类型的困难。

图 2a 是 τ_0 或 $4\tau_0$ 取值不当的情况。

本样品和图 2b 由张友吉同志提供,顺致谢意。

参 考 文 献

- [1] Patt, S. L. et al.: *J. Chem. Phys.*, **56**, 3182, 1972.
- [2] Breitmaier, E. et al.: *¹³C NMR Spectroscopy*, **49**, 1978.

[本文于 1980 年 5 月 3 日收到]

草酸铁钾化学光度计的制备与测定

张 茵 唐德江 陈春章

(中国科学院生物物理研究所)

辐射剂量学,特别是电离辐射剂量学,从基本概念到测量技术,均已发展成一门精密的科学。然而对光辐射剂量学则重视不够,研究较少。这表现在所用单位混乱,某些概念含糊不清等方面。但是,随着光化学、光生物学的发展,特别当涉及到光化学反应动力学及其机制的探讨时,所用光源强度的测定已是摆在人们面前的一个极其重要的课题。

一般说来,测定光强度的方法有三种:一、辐射计装置,如热电堆,真空热电偶等;二、光电装置;三、化学光度计系统。就操作的简单,测定的准确程度而言,化学光度计系统较前二者为优越。目前应用较多的液体化学光度计有:草酸铁钾化学光度计(适用波长范围 260 nm—360 nm),孔雀绿无色氰化物化学光度计(适用波长范围 220nm—330nm),一氯醋酸化学光度计(适用波长范围 <300nm),草酸双氧铀化学光度计(适用波长范围 250nm—440nm)等^[1]。本文只介绍草酸铁钾化学光度计的制备与测定方法。

对化学光度计的基本要求是:灵敏,准确,分析方法简单,在一定波长和一定光强度范围内,量子产额维持常数,基本不存在内滤片效应,温度系数低,暗反应小等。草酸铁钾化学光度计基本满足上述要求。

1929 年由于 Allmand 和 Webb 的研究使草酸铁钾化学光度计有了定量的资料。但今天

它成为人们广泛应用的化学光度计之一,主要归功于 Parker 及其同事在 1953 至 1959 年完成的研究工作^[2,3]。他们采用了邻二氮菲作为分析试剂,来测定草酸铁钾光解后生成的二价铁离子(Fe^{++}),因为 Fe^{++} 和邻二氮菲的络合物在 510nm 处有很强的吸收,克分子消光系数达 $1.11 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,因此使这种化学光度计具有极高的灵敏度,不仅可用来测量低光强度,亦可测量一次窄脉冲的闪光强度。同时,这个化学光度计的量子产额在 260nm 到 360nm 波段内基本是 1.2,故可用于测量紫外和近紫外波段内的光强度。

一、草酸铁钾化学光度计的制备

用 3 体积 1.5M 分析纯草酸钾和 1 体积 1.5M 分析纯三氯化铁混合,充分搅拌,生成草酸铁钾绿色沉淀;将沉淀物用热水重结晶三次,最后用 45℃ 热空气流干燥,即可得到含三分子水的草酸铁钾绿色结晶。以上操作均需在暗室安全灯下进行。草酸铁钾结晶易光解,因此应保存于暗处。

当测定 400nm 以下的光强度时,化学光度计溶液浓度为 0.006M;测量 400nm 以上的光强度时,浓度为 0.15M。0.006M 光度计溶液的配制是称取 2.947 克草酸铁钾晶体,溶于 800 毫升水中,加 100 毫升 1N H_2SO_4 ,最后用水稀释至 1000 毫升。0.15M 光度计溶液草酸铁钾