

必须采用直标样品, 否则间标样品引起的非特异性结合的阳性细胞遮掩了真正的阳性细胞, 以致于无法区分出阳性细胞的信号。

3.6 染色时要选择好合适的抗体稀释度, 必要时做不同稀释度的染色比较。稀释度过高过低均得不到阴、阳细胞界线分明的图形。

3.7 我们除了分析人外周血样品外, 也分析了人胎儿胸腺、脾脏^[5,6]、儿童扁桃体等的活细胞样品, 得出的结论和测试外周血一样。

鉴于以上考虑我们认为在流式细胞计免疫荧光样品测量中采用直接标记样品更为合适。

参 考 文 献

- 1 Vernon T O, Alexander N G, Lubert S. J Cell Biol, 1982; **93**: 981
- 2 宋平根, 李素文主编, 流式细胞术的原理及应用, 北京: 北京师范大学出版社, 1992; 7
- 3 陈英玉, 马树梭, 刘 白等. 上海免疫学杂志, 1992; **12** (1): 47
- 4 陈英玉, 刘 白, 马树梭等. 中华微生物免疫学杂志, 1993; **13** (2): 127
- 5 刘 白, 马树梭, 陶家平等. 北京医科大学学报, 1991; **23** (2): 86
- 6 刘 白, 马树梭, 宗淑贞等. 中国免疫学杂志, 1992; **8** (3): 2 (4)

The Direct and the Indirect Immunofluorescent Labeling on Immune Measurement of Flow Cytometry. Wen Houjin, Tao Jiaping (Analysis and Computer Center, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract The direct and the indirect fluorescent labeling are two different staining methods in immunofluorescent measurement. In flow cytometer measurement, in general, the direct labeling has little nonspecific binding and disturbance, and the experiment data is easy to process. However, because of the magnifying function, the indirect labeling has much nonspecific binding and serious disturbance. It is difficult to distinguish the specific signals from non-specific ones, it is easy to cause confusion in data processing. By comparing samples, the direct labeling is suggested better than the indirect labeling in flow cytometer measurement.

Key words direct labeling, indirect labeling, flow cytometry, fluorescent labeling

固定化过氧化物酶丝素膜的制备及其性质

张雨青 周玉珍

(苏州蚕桑专科学校, 苏州 215151)

摘要 家蚕丝素经高浓度的中性盐氯化钙溶解后, 制成了固定化过氧化物酶丝素膜。对这种酶膜的活性和理化特性作了分析。结果表明这种酶膜的活性高, 酶促反应温度范围宽, 最适 pH5.0—7.0, 热稳定性也较游离酶好。这与用溴化锂溶解丝素后制成的固定化过氧化物酶膜相仿。因此, 用这种方法制成的丝素膜同样是一种良好的固定化酶的生物材料。

关键词 丝素, 固定化酶, 过氧化物酶, 固定化过氧化物酶丝素膜, 家蚕

家蚕蚕丝具有独特的分子结构、优异的机械性能, 良好的吸湿和保温性能, 长期以来一直在轻纺工业中占重要的地位。近些年来, 家蚕丝蛋白在医用材料如手术缝合线等、医疗诊

断如由固定化酶和固定化抗体丝素膜组成的生物传感器、高级化妆品如丝素膏、日常用品如

收稿日期: 1994-03-12, 修回日期: 1994-05-23

牙膏和生物钓鱼线等领域正在得到开发与利用。然而,家蚕丝心蛋白(丝素)在通常情况下不易溶解,只能在强酸或强碱的条件下或在某些高浓度中性盐或在某些金属络合物中溶解。在强酸或强碱中虽能溶解,但高分子量的丝素已成为小分子丝素肽或氨基酸,只能用作普通化妆品或食品的原料。而用高浓度的中性盐如溴化锂或氯化钙溶解后制得水溶性丝素的红外结构和分子量范围与天然的家蚕后部丝腺中的丝素相仿。日本朝仓和出村等人用溴化锂溶解丝素后制成的固定化酶膜已有多篇报道^[1-3]。我们对过氧化物酶(POD)在溴化锂溶解后制得的丝素膜中固定化及其酶膜性能也进行了分析。为了弄清用不同中性盐溶解后制得的丝素酶对酶的固定化及其酶膜性能的影响,我们首次用高浓度中性盐氯化钙处理后制成了固定化过氧化物酶丝素膜,并对其活性和理化特性作了分析,为今后酶电极的制作和医用材料等的开发打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

辣根过氧化物酶(peroxidase, EC 1.11.1.7, 250U/mg)为上海东方试剂厂的产品;4-氨基安替比林为CP级,由上海试剂一厂生产;氯化钙为CP级;过氧化氢和其它试剂均为分析纯。

1.2 丝素水溶液的制备

家蚕蚕茧用0.5%碳酸钠水溶液在100℃中脱胶0.5h,接着重新用这种溶液脱胶一次。脱胶后的蚕丝用蒸馏水反复漂洗后,用日本大和真空冷冻干燥器干燥。由此制得的脱胶丝素用氯化钙乙醇水溶液溶解,具体的操作步骤和方法按文献[4]进行。丝素经氯化钙溶解后需纯化脱盐,脱盐的方法按文献[5]进行。脱盐后获得的丝素水溶液浓缩至2.5%左右以供酶膜制备用。

1.3 酶膜的制备

称取一定量的过氧化物酶溶于磷酸缓冲液(pH7.0),然后与水溶性丝素液充分混合,浇

铸在塑料模上,放置在25℃,相对湿度60%的条件下干燥48h,干燥后的酶膜用80%甲醇溶液浸渍30s,就可用于过氧化物酶活性分析。

1.4 酶膜的活性测定

游离POD和固定化POD丝素膜的活性用沃辛通法测定和计算^[6]。POD催化底物过氧化氢还原反应,放出氧,以4-氨基安替比林为氧化还原指示剂,使反应溶液或酶膜变成红色,在日立200-20型紫外分光光度计上用510nm波长测定POD活性。在测定酶膜活性时,应把厚度为20—30μm的丝素膜切成1.0cm×3.0cm的长方块,然后平直地夹住在作者自制的吸收池架上分析测定。

2 结果与分析

2.1 家蚕丝素膜中过氧化物酶的固定化

表1列出了不同的POD含量在丝素膜中的固定化及其活性得率(回收率)。从表1可知,丝素膜中的POD为 5.8×10^{-3} mg/g膜时,POD活性为254.3U,其活性得率达97.3%。

表1 丝素膜中POD的固定化及其活性得率

	POD量/mg·g ⁻¹	POD活性/U	活性得率/%
	0.29	20.5	7.8
	0.15	41.3	15.8
	2.93×10^{-2}	135.4	51.9
	1.45×10^{-2}	180.2	69.0
	5.8×10^{-3}	254.3	97.3
对照	游离酶	261.0	100.0

注:表中数值均为5次测定的平均值。

2.2 反应温度对酶膜活性的影响

酶促反应的温度对丝素膜中固定化POD的活性影响如图1所示。可以发现,POD经丝素膜固定化后,最适反应温度的范围明显加宽,在50—60℃之间。即使加温至70℃,游离酶的活性不足10%时,固定化酶的活性仍达80%。这说明POD经丝素固定后,就是在高温下仍能保持其大部分的活性。

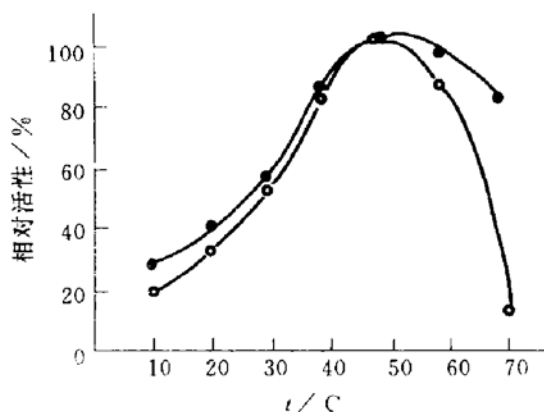


图1 反应温度对固定化酶丝素膜的活性影响

○—○: 游离酶; ●—●: 经 CaCl_2 处理后制成的固定化 POD 丝素膜. 最高活性为 100%. 每个数据为 3 次测定的平均值.

2.3 pH 对酶膜活性的影响

如图 2 所示, 游离 POD 的最适 pH 值在 7.0, 而 POD 经丝素固定化以后, 最适 pH 值向酸性方向偏移, 且最适范围显著加宽为 pH5.0—7.0.

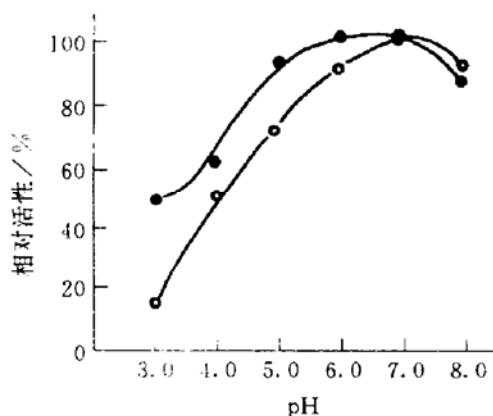


图2 pH 对丝素膜中固定化酶的活性影响

○—○: 游离酶; ●—●: 经 CaCl_2 处理后制成的固定化 POD 丝素膜. 以最高活性为 100%. 在 25°C 下测定.

2.4 酶膜的热稳定性

固定化 POD 丝素膜在磷酸缓冲液 (pH7.0) 中按图 3 指定的温度在水浴中保温 15min 后, 取出酶膜用磷酸缓冲液冲洗数次, 然后用吸水纸吸干, 立即置于 25°C (pH7.0) 的吸收池中测定酶的活性. 在 60°C 保温 15min

后, 游离 POD 活性已下降到原来水平的 60%, 固定化酶的活性仍达 90%; 当游离酶在 70°C 保温后下降到 30%, 固定化酶仍保持 80%. 这说明 POD 经丝素固定化以后在高温下较稳定, 不易失活.

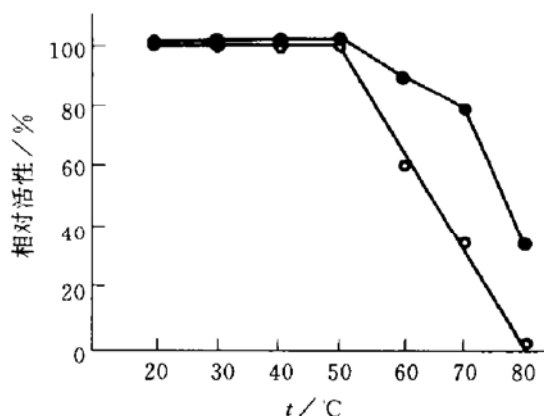


图3 过氧化物酶的热稳定性

最高活性定为 100%, 图中数据为 3 次测定的平均值. ○—○: 游离酶; ●—●: 固定化酶.

2.5 甲醇中浸渍时间对酶膜活性的影响

过氧化物酶和丝素水溶液混合后经干燥制成的酶膜, 需经固定化处理, 否则, 酶易从丝素膜中渗漏. Miyairi 等^[8]报道用乙醇处理能使丝素膜不溶于水, 并固定住酶, 但浸渍时间太长需 30min. 我们采用朝仓等报道的方法用 80% 甲醇固定. 这样, 酶膜浸渍后既不溶于水, 酶又不易失活. 我们对酶膜在甲醇中浸渍时间的长短作了调查, 结果如图 4 所示. 短时间

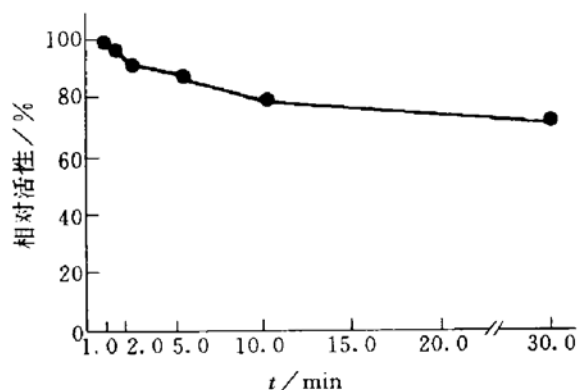


图4 固定时间对固定化 POD 丝素膜活性的影响

最大活性为 100%, 每个数值为重复 3 次测定的平均值.

(0.5—1.0min) 浸渍, 活性最高. 以后, 随着浸渍时间的延长, 酶膜活性就逐步下降. 另外, 我们还对 POD 丝素膜作了活性渗漏试验, 结果表明即使在 25℃ 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 中浸渍 5h, 也未发现酶膜中有任何 POD 的渗漏.

3 讨 论

日本学者应用中性盐溴化锂溶解丝素后, 制成了固定化葡萄糖苷酶、脂酶^[3]、葡萄糖氧化酶等丝素膜, 并应用于生物传感器. 由于溴化锂价格较贵, 制成酶膜的费用大. 本文试用氯化钙溶解丝素, 然后制成固定化过氧化物酶丝素膜. 试验结果表明, 用这种方法制成的固定化过氧化物酶的丝素膜的性质与我们用溴化锂溶解后制成的固定化 POD 丝素膜性质基本相仿 (未发表的资料), POD 经这二种丝素膜固定化后都大大地改善了其对热和 pH 的稳定性. 稍有不同的是后者最适酶促反应温度为 50℃, 而前者为 50—60℃; 前者最适 pH 为 7.0—8.0, 而后者为 5.0—7.0. 两者对热的稳定性相仿, 都是在较高温度下不易失活. 这些结果表明用氯化钙溶解后制成的丝素膜同样是一种较好的固定化酶生物材料. 今后我们将继续进一步研究在医用材料方面的应用, 至于能否适用于生物传感器, 我们将另作深入的探讨.

致谢 感谢本校吴友良教授和贡成良老师对本工作的大力支持.

参 考 文 献

- 1 Asakura T, Yoshimizu H, Kuzuhara A *et al.* J Seric Sci

Jpn, 1988; **57**: 203

- 2 Demura M, Asakura T. Biotechnol Bioeng, 1989; **33**: 598
- 3 Demura M, Xomura T, Hiraide T. SEN-I GAKKAISHI, 1990; **46** (9): 391
- 4 Asakura T, Nakayama N. SEN-I GAKKAISHI, 1989; **45** (6): 252
- 5 张雨青. 实验室研究与探索, 1994; **40** (2): 74
- 6 Bruno S 著. 钱嘉渊译. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 276—278
- 7 Miyairi S, Sugiura M, Fukui S. Agric Biol Chem, 1978; **42** (9): 1661

Preparation of the Peroxidase-Immobilized Fibroin Membrane and Its Characteristics.

Zhang Yuqing, Zhou Yuzhen (*Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151, China*).

Abstract The aqueous solution of the silk fibroin from silkworm *Bombyx mori* cocoons was obtained by treatment of the neutral salt (CaCl₂). Peroxidase (POD) was immobilized in the silk fibroin membrane. Activity and characteristics of the POD-immobilized fibroin membrane were analysed. The results show that the activity of the POD-immobilized membrane is high; Optimum pH range for the enzyme membrane, being at pH5.0—7.0, was widened in comparison with the free enzyme; and its thermal stability was good.

Key words fibroin, peroxidase, immobilized enzyme, POD-immobilized fibroin membrane, silkworm

在 96 孔板中进行抗脂质过氧化的微量测定*

孙士勇 徐 波 李秋菊 李润沼

(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 以 Fe²⁺/半胱氨酸诱导大鼠肝微粒体为基本模型, 根据硫代巴比妥酸 (TBA) 反应原理, 优化不同反应条件, 建立了一种在 96 孔板上进行抗脂质过氧化测定的一步反应方法. 该方法的灵敏度不低于