

图1 HPNS (两个样品)薄层层析谱
(箭头分别为点样线和前沿线)

载体: 硅胶 GF (试销产品, 上海荧光化学厂 1960 年生产)。

溶剂系统: 醋酸乙酯、甲醇 (3:1 体积/体积)。

碘标记及与蛋白结合试验: 粗产品经 401 所同位素研究室初步试验, 碘标记比度最高为 1,600 微居里/微克。碘化酯与肌红蛋白结合, 最高结合率为 30%。

通过上述分析鉴定, 此试剂各项指标合乎要求, 质量良好, 可供有关单位试用。

四、讨 论

J. Rudinger 等人得到的初产品熔点为 120—122℃, 含有少量对羟基苯丙酸, 须用异丙醇、水混合溶剂精制, 方能得到纯品, 熔点: 129℃。本厂采用醋酸乙

酯和适量的石油醚分步结晶方法, 得到的 HPNS 白色结晶熔点为 131—132℃, 无须再用异丙醇、水精制, 手续简便, 质量较好。

N-羟基琥珀酰亚胺, 熔点为 90—95℃, 在真空干燥器中放置, 发现熔点有变化, 此现象有待进一步研究。但不影响下步合成。

氢化反应时间较长。如条件许可, 改为中压氢化, 可能效果更佳。

用对羟基苯甲醛为原料, 经四步合成 HPNS 试剂, 产品质量较好, 但总收率较低, 有待进一步改进。

主要参考文献

- [1] Pandya, K. C. et al.: *Proc. Ind. Acad. Sci.*, 4A, 140, 1936.; C. A. 30, 8149, 1936.
- [2] Schmir, G. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 2228, 1959.
- [3] Anderson, G. W. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 1839, 1964.
- [4] Rudinger, J. et al.: *Biochem. J.*, 133, 538, 1973.

[本文于 1979 年 6 月 25 日收到]

定量“指印分析”用高压电泳仪

周 德 明

(中国科学院动物研究所)

A. M. Katz (1959) 采用过一种高压电泳装置, 是借助有机溶剂散热的。美国 Savant 仪器公司生产的高压电泳仪, 属于这一类型。D. Gross (1961) 等研制的强制冷却型, 散热效率好, 可用较高的电压, 适于做快速定性分析; 又因为可容纳大面积滤纸, 还适于做双向电泳分析或“指印分析”(一种纸层析和纸电泳相结合的分析法的简称)。

前些年我们自行研制了一台高压电泳仪, 工作要求是要做定量的“指印分析”。这要求电泳槽能容纳大面积的滤纸外, 还要保证电泳时滤纸的工作面积不能接触任何固体物。后一点市售的 Katz 式仪器也难做到, 因为仪器中滤纸是靠一个 A 型支架来支撑的。潘家秀等 (1962) 介绍过一种克服困难的办法, 但操作过于麻烦, 而且滤纸利用率只有 40%。此外, 因缓冲液一相高, 一相低, 往往对样品造成冲刷, 影响分离效果。针对上述问题, 我们一一采取了对策, 成功地解决了大面积滤纸的水平张挂问题, 满足了定量“指印分析”的要求。关于“指印分析”法在分子生物学研究中的应用, 请参见 V. M. Ingram (1963) 的著作。

此外, 我们的仪器也能用于核酸解码的研究工作。请参见 F. Sanger (1965) 的介绍。

仪器的结构与特点

仪器由高压整流器与电泳槽两个主要部件组成。

一、高压整流器:

由图 1 可见 220 伏交流电先经调压器 B_1 控制, 然后输送到升压器 B_2 , 它所输出的交流高压经四个小型二极管 (如用晶体二极管代替, 可省去图中的灯丝变压器) 所组成的桥式电路整流。最后, 经 π 形滤波后输出 0—3 千伏 100 毫安直流。满载时其脉动系数不大于 3.5%。

电路中的千伏表可以指出整流器输出的高压千伏值, 也可以用来测定工作时电泳滤纸上的电势梯度伏/厘米值。

二、电泳槽:

图 2 是工作时电泳槽的纵剖视图。由图 2 可见, 电流经馈电电极 13 输送到碳电极 4, 再经缓冲液池中

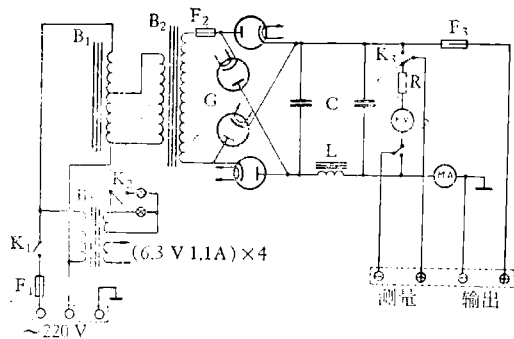


图1 高压电泳电源线路

F_1 (保險絲)	2A	M	50mA	L	10H 50mA	B_1	500W
F_2	0.25A	K	300 μ A	C	1 μ F 4KV	B_2	2.2KV 100mA/220V
F_3	0.1A	R	10M2W	G	2Z10	B_3	(0.3V11A) $\times 5/220V$

图 2 电泳槽纵剖视图

的两个滤纸桥与使电流与电泳滤纸 19 接通。借助于一对滤纸夹 8 的重量而使滤纸水平地张挂在两条平行的玻璃棒 7 上。玻璃棒相距 40 厘米,在它们的正上方各有一个测量电极 14,由它们将滤纸上相距 40 厘米两点间的电势差回输到高压整流器去。由那里的 KV 表指示出工作时滤纸上的电势梯度伏/厘米值。

在滤纸的上面 1 厘米处, 密布着铜质镀银的冷却水管系统 15。借助于有机溶剂在它和滤纸间的对流, 由管中的水流吸收掉滤纸上所产生的热量。

槽体用聚氯乙烯硬板粘合而成,是双层壁隔热的。电和水部经盖上引入。盖和槽上时,有密封环10保证其密闭性。我们采用重蒸的120号汽油作散热介质。

三、仪器的特点:

1. 槽内引入了一对测量电极, 经转换开关 K , 与 KV 表相连, 可随时精确指示出工作时滤纸上的电势梯度伏/厘米值。这有利于稳定实验条件, 提高实验的重复性。

2. 解决了水平地张挂大面积滤纸（工作面积为 40 厘米×30 厘米，沿其长边作电泳，第二向留作层析）的问题，因而防止了电泳时样品受到缓冲液液流的冲刷；同时使此仪器适于做定量分析用。

3. 滤纸利用率高,在 90% 以上。

以上特点都是市售的仪器所不兼备的。

四、仪器的分辨能力

“指印法”的分辨力取决于电泳分辨力和层析分辨力两项的综合（某 pH 值下的电泳与何种溶剂系统配合效果好，往往靠经验取

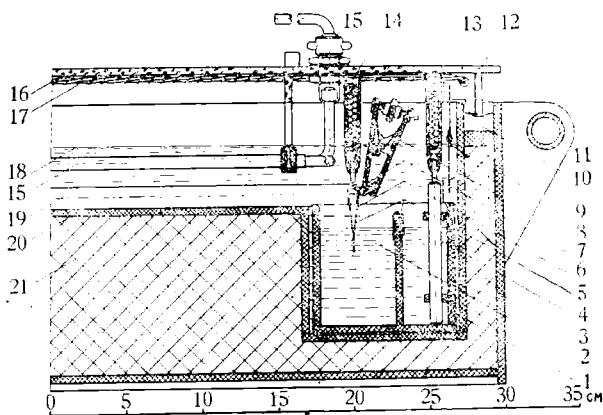


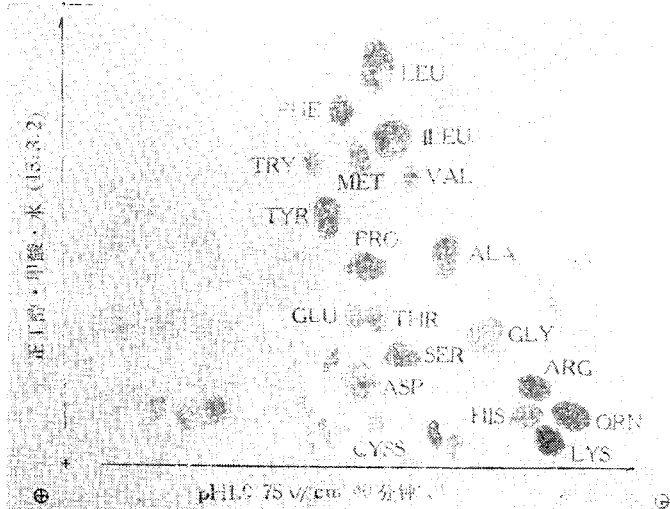
图 2 电泳槽纵剖视图

1. 缓冲液池 2. 缓冲液 3. 槽体外壁 4. 碳电极
5. 滤纸电桥 6. 玻璃纸 7. 玻璃棒 8. 滤纸夹
9. 支撑杆 10. 密封环 11. 提柄 12. 盖 13. 锁
电电极 14. 测量电极 15. 水管系统 16. 电线
17. 螺接管 18. 直溜加氢溶剂油 19. 电泳滤纸
20. 槽体内壁 21. 加热盘 22. 电极

得)。现仅就电泳分辨力略加讨论。在电泳中有以下关系式:

$$UH_t = S$$

其中 U 是荷电粒子的电泳迁移率,即在标准电场强度 (1 伏/厘米) 下物质的电泳速度,它由物质本身性质决定。 H 是电场强度 (伏/厘米)。 t 为电泳时间。 S 是电泳距离。如果仅考虑电泳效应,从理论上讲,只要两种物质的电泳迁移率有差异 (ΔU),又经历足够长时间,这两种物质就能拉开足够的距离 ($\Delta U H t = \Delta S$)。但是实际上并不这么简单。由于扩散作用,滤纸上样品斑点的直径随时间的延长而不断扩大。而且分子量越低的物质其扩散系数 D 越大 (在氨基酸约为 10^{-5} 厘米²/秒



3

(下转第38页)

四、磷酸钾缓冲液浓度对酶活性的影响

γ 铝胶吸附及洗脱; 25 mM 磷酸钾的缓冲液 B 洗脱的酶液比经 Sephadex G-25 脱盐后的酶活性低, 羟基磷灰石柱层析 150 mM 磷酸钾的缓冲液 B 洗脱的酶液比透析后测得的活性低得多可能磷酸钾对酶活性有可逆性抑制作用。

根据 AMP 掺入 tRNA 的初速度与磷酸钾浓度的关系求得抑制常数 K_i 为 26 mM (图 5)。

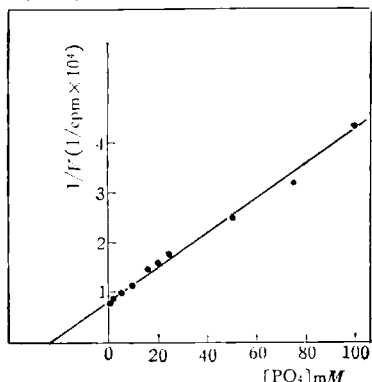


图 5 tRNA 核苷酸转移酶的反应初速度的倒数与磷酸缓冲液浓度的关系

五、ATP 浓度的影响

测活时, 为节省放射性 ATP, 用时又能得到高比强, 所以把 ATP 浓度定为 0.17 mM, 较 Deutscher 所用的浓度 0.5 mM 为低。这可能是测得的酶活性偏低的原因。为校正这一偏差, 测定了 ATP 浓度对酶活性的影响。结果表明, Mg^{++} 浓度为 5 mM 时, ATP 浓度在 2 mM 以下, 酶活性随 ATP 浓度增大而增加。ATP 为 0.17 mM 时的酶活性是 0.5

mM 时的 1/2—1/3。而 2 mM 时酶活性为 0.17 mM 时的 3—4 倍。表中所列的酶活力是校正值, 层析图谱则未经校正。

六、tRNA 核苷酸转移酶的稳定性

兔肝 tRNA 核苷酸转移酶宜低温保存, 经反复冻、融, 几乎不损失活性, 这对直接保存水溶液酶制剂很有利。

讨 论

从 γ 铝胶处理得到的酶, 上 DEAE 纤维素柱前用 Sephadex G-25 脱盐代替了超滤浓缩, 节省了时间, 且酶活无损失。羟基磷灰石柱流下的酶液, 因蛋白浓度低, 体积较大, 又无超滤设备, 故省掉了 Sephadex G-100 柱层析, 透析后直接上磷酸纤维素柱, 仍得到较好的结果。

磷酸纤维素柱层析图谱表明, RNase 活力峰与 tRNA 核苷酸转移酶活力峰有部分交叉, 但是从两个峰的相对位置可以判断, 当梯度变缓后可以分开。

这三种柱层析在所用的盐浓度下, 都能选择性地吸附所需的酶蛋白, 所以可用较小的柱体积而获得较多的总蛋白。同时实验结果说明, 上柱的先后次序和上柱酶液及柱平衡液的盐浓度与酶的纯化效果和收率的大小有关。

本工作得到张其玖同志的指导。北京大学生物系学员洪文清同志参加了部分工作。在此一并致谢。

(下转第 60 页)

(上接第 86 页)

左右, 在蛋白质约为 10^{-6} 厘米²/秒至 10^{-7} 厘米²/秒, 差 1 至 2 个数量级。由此可见, 靠延长电泳时间通常并不能提高电泳的分辨力。特别是在分离低分子量物质时, 这种做法往往适得其反。正确的办法是提高电场强度, 压缩分离时间。而且分离的物质分子量越低越要采用高电压。但因受到仪器的散热效率和绝缘条件等限制, 实际上电压也不能一味提高。就电源来说, 采用小型电子二极管 (如 6Z19—电视机中的阻尼二极管) 只能做到 3 千伏, 这在我们的仪器中可以构成 75 伏/厘米的电场强度。如采用高压硅堆作整流元件, 制造 6 千伏、10 千伏的高压电源并不太困难。

现以一组茚三酮反应显色物的分离为例, 直观地看一下本仪器的分辨能力 (见图 3)。

样品是东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*)

的血淋巴液 (除去蛋白质后取适量样品点于滤纸的一角)。采用甲酸:乙酸:水 = 15:10:75, pH1.9 的酸性缓冲液, 以 75 伏/厘米的电场强度, 沿滤纸的长边电泳 40 分钟。取出晾干后用正丁醇:甲酸:水 = 15:3:2 的溶剂系统进行上行纸层析, 展层一次。茚三酮显色。对照有关文献[1,2], 将初步确认之斑点标出。其他斑点可能是这种昆虫体液中的肽或氨基酸衍生物。

由图 3 可见, 本仪器的分辨能力比较令人满意。

参 考 文 献

- [1] 陈丽筠:《生化学报》, 1958 年, 第 1 卷, 第 19 期。
- [2] Smith, L.: Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. II, p. 45, 4th Ed., London, 1976.

[本文于 1978 年 12 月 12 日收到]