

我们在尝试用化学方法开环的过程中,对反应温度及反应时间与开环的关系做了一系列的实验,发现温度越高,开环反应要求的时间越短.由于反应试剂是酸性的,温度太高或时间太长、都会引起肽链断裂,因此我们选用了反应温度 35℃、反应时间 24 小时为反应最佳条件.这样可以保证在开环过程中肽链不断裂的前提下获得高效率的开环.我们曾选用胰岛素 A 链、胰岛素 B 链和溶菌酶等样品,按上述条件进行开环试验,均未发现肽链有断裂现象.

### 参 考 文 献

[1] Kennech, A. W. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 261—286, 1981.

- [2] Morris, A. R.: *Nature*, 286, 447—52, 1980.  
[3] Podell, D. N., Abreham, G. N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 176—185, 1978.  
[4] L. R. Croft.: *Handbook of Protein Sequence analysis*, (2nd. ed) Chichester, New York, Brisbane, Toronto, p. 113—116, 1980.  
[5] Chang, J. Y.: *Biochem. J.*, 153, 607—611, 1967.  
[6] Chang, J. Y.: *FEBS, Lett.*, 93(2), 205, 1978.  
[7] Tarr, G. E.: *Methods Enzymol.*, Vol. 47, p 335—57, 1977.  
[8] Peterson, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 247, 4866—4871, 1972.  
[9] Marshall, E.: *Methods in Protein Sequence Analysis*, Humana Press, Clifton, New Jersey, p. 40—41, 1982.  
[10] Fujinami, H. et al.: *Nippon Joze Kyokai Zasshi*, 78(6), 466—474, 1983.  
[11] 同文献[9], p. 189—203.

【本文于 1984 年 11 月 21 日收到】

## 甾体激素受体的提纯倍数与其纯度的关系

季 钟 煜      黄 均 蓉

(中国科学院上海生物化学研究所)

甾体激素受体是一类具有特殊生理功能的蛋白质.存在于生物体内的各种甾体激素受体,各自接受其专一性甾体激素的信息,例如雌激素受体只能与雌激素相结合,与孕激素等其它甾体激素不能结合.同时,这种受体的含量,极为稀少,据估计,靶细胞(受体含量最多的组织)匀浆内的受体只占总蛋白的十万分之一<sup>[1]</sup>.因此,若不经十万倍的提纯,就不能得到单一组分的纯受体,这和酶要经上千倍的纯化<sup>[2]</sup>相比,受体的提纯就显得更加艰巨.

以上所指千倍万倍,就是生化分离技术中提纯倍数的惯用语,它说明原材料经过一系列分离后,其中所含的受体已被提纯了若干倍的意义.但提纯倍数不能表示出受体的百分纯度.因此,在研究提纯甾体激素受体时,必需注意这一问题.

### 一、比 活

甾体激素受体是用同位素甾体激素的示踪方法测定的.一分子受体(R)只能与一分子激素(H)结合成一分子复合物(RH),以每分钟衰变值(dpm)或 p mol 表示此 RH 数量(即 R 数量).故 dpm/mg 蛋白或 p mol/mg 蛋白称为受体比活.

### 二、提 纯 倍 数

组织匀浆经生化分离,测定出受体的比活,提纯倍数就是这一步与起始步的比活之比值.分离过程中,随着杂蛋白的逐渐除去,受体比活值会逐渐升高,例如牛子宫细胞液内的雌激素受体,经过两步分离后,已提纯 3,200 倍(见表 1).

表 1 牛子宫雌激素受体的提纯<sup>[3]</sup>

| 步 骤            | n mol/mg              | 提纯倍数 |
|----------------|-----------------------|------|
| 1.胞液 (cytosol) | $8.59 \times 10^{-4}$ | 1    |
| 2.肝素琼脂糖        | $1.3 \times 10^{-2}$  | 15   |
| 3.雌二醇琼脂糖       | 2.74                  | 3200 |

但是,提纯倍数为—相对值,它只说明在应用某一方法时,这一组织内的受体的提纯程度,其提纯倍数愈大,受体愈纯。至于用不同方法或不同组织所得的提纯倍数,相互之间就不能比较其纯度之高低。

### 三、百分纯度

百分纯度是表示物质的纯净程度。迄今,有些专家已用明确数字标明受体的百分纯度<sup>[4-7]</sup>,但他们都省略了演算方法。多数文献仍沿用提纯倍数表示法,读者要作一番算术演算后,才能知道其纯度百分率。

百分纯度是指单位量(体积或重量)内受体蛋白与其总蛋白量之比值 (即百分纯度 =  $\frac{\text{单位量内的受体}}{\text{单位量内的总蛋白}} \times 10^2\%$ ),式中总蛋白(mg/ml)可用一般方法测定(如 Lowry 法)。而糖衣炭(DCC)法则可测定复合物(RH)的 dpm/ml 值;按一分子激素只与一分子受体结合为原则,此 dpm/ml 代表受体(R)量。至于受体的分子量(MW),和其它大分子物质一样,理论上必为一常数,当其尚未提纯为单一组份,其一级结构为未确定时,仍可应用蛋白质分子量的一般测定方法,把含有受体的样品,和一系列已知分子量的标准蛋白质,从凝胶过滤、聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳、SDS 凝胶电泳以及超离心等分析数据中比较出受体分子量的万位数和千位数。再根据实验用标记化合物的比度(A Ci/m mol),就不难算出受体的化学量。现将计算法介绍于下:

因  $1\mu\text{Ci} = 2.22 \times 10^6 \text{ dpm}$  和  $1\text{m mol} = A \times 10^6 \mu\text{Ci}$ , 测定值 dpm/ml 可写成

$$\frac{\text{dpm/ml}}{2.22 \times 10^6} \quad (\text{单位: } \mu\text{Ci})$$

$$= \frac{\text{dpm/ml}}{A \times 2.22 \times 10^{12}} \quad (\text{单位: m mol})$$

$$= \frac{\text{dpm/ml}}{A \times 2.22 \times 10^{12}} \times \text{MW} \quad (\text{单位: mg})$$

$$\text{故 百分纯度} = \frac{\text{受体}}{\text{总蛋白}} \times 10^2\%$$

$$= \frac{\frac{\text{dpm/ml}}{A \times 2.22 \times 10^{12}} \times \text{MW}}{\text{mg/ml}} \times 10^2\%$$

$$= \frac{\text{dpm/mg}}{A} \times \text{MW} \times 0.45 \times 10^{-10}\%$$

(1)

有些文献则以 p mol 表示受体量,此时可用下式演算:

因实验用标记化合物的比度为:

$$A \text{ Ci/m mol} = \frac{A \times 2.22 \times 10^{12}}{10^9} \text{ dpm/p mol},$$

$$\text{故 } 1\text{p mol} = A \times 2.22 \times 10^3 \text{ dpm},$$

此时测定值 p mol/ml 可写成

$$\text{p mol/ml} \times A \times 2.22 \times 10^3 \quad (\text{单位: dpm/ml})$$

$$= \frac{\text{p mol/ml} \times A \times 2.22 \times 10^3}{A \times 2.22 \times 10^{12}}$$

(单位: m mol)

$$= \text{p mol/ml} \times \text{MW} \times 10^{-9} \quad (\text{单位: mg})$$

故

$$\text{百分纯度} = \frac{\text{p mol/ml} \times \text{MW} \times 10^{-9}}{\text{mg/ml}} \times 10^2\%$$

$$= \text{p mol/mg} \times \text{MW} \times 10^{-7}\% \quad (2)$$

在提纯雌激素受体时,因其分子量为  $7 \times 10^4$ ,实验用  $^3\text{HE}_2$  比度为 40Ci/m mol,故上述两个公式可分别简化成  $\text{dpm/mg} \times 0.0785 \times 10^{-6}\%$  和  $\text{n mol/mg} \times 7\%$ 。这样即可比较出用各种方法获得的受体纯度(见表 2)。

值得指出:一切甾体激素受体的百分纯度,都可用此演算公式进行计算(见表 3);第二,从百分纯度公式中,设受体纯度为 100%,就可推算出纯受体的比活(见表 4);第三,将此纯受体比活与样品在提纯过程中求得的各步比活——相比,也可算出各步受体的百分纯度。故

表 2 雌激素受体的提纯倍数与纯度(提纯至亲和层析)

| 比                 | 活      | A Ci/mmol | MW( $10^4$ ) | 提纯倍数  | 纯度(%) | 文 献   |
|-------------------|--------|-----------|--------------|-------|-------|-------|
| dpm/mg ( $10^4$ ) | 8.5    | 90        | 5            | 1166  | 0.2   | [ 8 ] |
|                   | 13.4   | 83        | 7            | 7882  | 0.5   | [ 9 ] |
|                   | 26.9   | 58        | 7            | 4661  | 1.4   | [10]  |
|                   | 292.9  | 87        | 4            | 24864 | 6     | [11]  |
|                   | 140    | 48        | 7            | 4460  | 9     | [12]  |
|                   | 638    | 60        | 7            | 25700 | 33    | [13]  |
|                   | 1555.5 | 60        | 7            | 19900 | 80    | [14]  |
| p mol/mg          | 899    |           | 7            | 1730  | 6.3   | [ 2 ] |
|                   | 897    |           | 15           | 767   | 13.5  | [ 4 ] |
|                   | 2782   |           | 7            | 12300 | 19    | [15]  |
|                   | 15500  |           | 7            | 15585 | 108.5 | [16]  |
|                   | 2740   |           | 7            | 3200  | 20    | [ 3 ] |

表 3 其它甾体激素受体(提纯至亲和层析)

| 受 体               | 比 活                        | A Ci/mmol | MW( $10^4$ ) | 提纯倍数 | 纯度(%) | 文献    |
|-------------------|----------------------------|-----------|--------------|------|-------|-------|
| 孕激素受体 ( $R_P$ )   | $463 \times 10^6$ cpm/mg   | 96        | 8.5          | 2572 | 37    | [17]  |
|                   | $142.5 \times 10^6$ dpm/mg | 48        | 11           | 2150 | 14    | [ 5 ] |
| 糖皮质激素受体 ( $R_G$ ) | 3.4n mol/mg                |           | 8.9          | 7000 | 30    | [ 6 ] |
|                   | 9.2 n mol/mg               |           | 9            | 8776 | 83    | [ 7 ] |

表 4 纯甾体激素受体的比活

| 受 体               | n mol/mg | 文献   |
|-------------------|----------|------|
| 雌激素受体 ( $R_E$ )   | 16.666   | [14] |
| 孕激素受体 ( $R_P$ )   | 9.375    | [5]  |
| 糖皮质激素受体 ( $R_G$ ) | 11.1     | [6]  |
| 雄激素受体 ( $R_A$ )   | 10.9     | [18] |
| 雄激素受体 ( $R_A$ )   | 16.6     | [19] |

本文介绍的公式对用同位素示踪方法计算其它受体蛋白的纯度是有普遍意义的。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Hubert, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 3143, 1978.  
 [ 2 ] Bucourt, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 8221, 1978.  
 [ 3 ] Monchamont, B. et al.: *Biochemistry*, **21**, 6916, 1982.  
 [ 4 ] Greene, G. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 5115, 1980.  
 [ 5 ] Kuhn, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4220, 1975.  
 [ 6 ] Lustenberger, P. et al.: *J. Steroid Biochem.*, **14**,

- 697, 1981.  
 [ 7 ] Govindan, M. V. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **108**, 47, 1980.  
 [ 8 ] Chong, M. T. et al.: *Cancer Res.*, **40**, 3172, 1980.  
 [ 9 ] Al-Nuaimi, N. et al.: *J. Endocr.*, **81**, 119, 1979.  
 [10] Ratajczak, T. et al.: *J. Steroid Biochem.*, **13**, 439, 1980.  
 [11] Coffey, A. I. et al.: *J. Steroid Biochem.*, **14**, 1229, 1981.  
 [12] Sica, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 6543, 1973.  
 [13] Puca, G. A. et al.: *J. Steroid Biochem.*, **12**, 105, 1980.  
 [14] Puca, G. A. et al.: *Pharmacological Modulation of Steroid Actions*, 1980, p. 49.  
 [15] Richard-Foy, H. et al.: *Res. on Steroids*, **8**, 159, 1979.  
 [16] Sica, V. et al.: *Biochemistry*, **18**, 2369, 1979.  
 [17] Renoir, J. M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **127**, 71, 1982.  
 [18] Foekens, J. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1279, 1982.  
 [19] Chang, C. H. et al.: *Biochemistry*, **21**, 4102, 1982.

[本文于1984年8月18日收到]