

人 C-反应蛋白的等电点的测定

吴蔚 宋晓国 丁玉珍*

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

人 C-反应蛋白 (CRP) 等电点的最早报道为 1954 年 Wood 等用自由电泳法测定为 4.82。我们在 1983 年用等电聚焦法测定^[2]为 5.2, 但在 pH 4.7 及 6.6 处亦有两条区带。后来看到 Laurent 等用滴定曲线法^[3]测 CRP 的 pI 为 6.3 ± 0.2, 但在 pH 7.2—8.5 间; 4.0—5.0 间亦有其等电点区, 后者可能为酸变性 CRP 的等电点。我们也用此法测定自制的并纯化了了的 CRP^[2]等电点, 所得曲线与报道相似, 但由于滴定曲线与样品槽在比较宽的 pH 范围内均非常接近, 交点 (即等电点) 不易读出, 因而我们改用了聚焦-免疫双向电泳法, 得到比较满意的结果。测得人 CRP 的等电点为 5.7—6.0, 在 pH 7.2—8.5 或 4.0—5.0 间, 均无区带出现。

材料与方 法

一、材料

1. 仪器 LKB 2117 Multiphor 电泳仪表面电极

又会使红细胞变形甚至溶血影响结合率。

6. 微孔滤膜孔径小于 0.3 μm, 过滤困难, 甚至微孔堵塞, 使数据偏高; 孔径大于 0.45 μm, 可能丢失部分膜碎片。根据我们的实验结果, 0.45 μm 孔径较适宜。此外还必须选用均一的薄膜, 并在使用前用洗涤介质中充分浸透。

用本法测定正常人和肝癌病人红细胞的钠泵数量, 结果可靠, 方法简便, 可作为研究各种病理条件下钠泵数量改变的指标。

参 考 文 献

- [1] Lindonmauer, G. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 248, 1291, 1973.

(LKB Multiphor Electrode 2117-111) 数字式 pH 计(Beckman Model 3500 Digital pH Meter)

2. 凝胶 (1) 含 2.5% 自制 Ampholine, pH 3.5—9 (由本所蒋滋慧教授赠与) 及谷氨酸, 天门冬氨酸, 赖氨酸和精氨酸各 2mM 的聚丙烯酰胺凝胶 (T = 6%, C = 2.3%)。

(2) 1% 琼脂糖凝胶, 内含 5mM EDTA 钠盐及兔抗人 CRP 血清 0.82ml/20ml 凝胶。

3. 电极缓冲液 73.2mM Tris-24.9mM 巴比妥-5mM EDTA 钠盐, pH8.6。

二、方法

1. 滴定曲线法 在制作凝胶平板模型的有机玻璃盖板上预先粘一条 8.5 × 0.1 × 0.1cm 的狭长有机玻璃条, 使制成的样品槽与长边平行, 位于两长边中间, 起点距短边 1cm 处。此模型板为 LKB 聚焦电泳仪的配件之一。以凝胶 1 制成

* 中国人民解放军总医院风湿科。

- [2] Skou, J. C.: *Physiol. Rev.*, 45, 596, 1965.
[3] Allen, J. C. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 42—46, 1969.
[4] Jerry, D. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 60, 609, 1972.
[5] Furukawa, H. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 76, 499, 1980.
[6] Schmalzing, G. et al.: *Life Science*, 29, 371, 1981.
[7] Dunhan, P. B. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 58, 94, 1971.
[8] Hoffman, J. F. et al.: in "Proceeding of the First International Symposium on Metabolism and Membrane Permeability of Erythrocytes and Thrombocytes, Vienna, 420, 1968.
[9] Matsui, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 147, 1966.

[本文于 1985 年 4 月 8 日收到]

13 × 11.5 × 0.2cm 的凝胶块。待胶凝固后, 取去盖板, 进行电泳。电流方向与样品槽垂直, 但不加样品。阳极为 1M H₃PO₄, 阴极为 1M NaOH, 功率 13W。电泳时间 1.5 小时, 至电泳降至最低时停止。电泳温度 2℃。电泳完毕后切去浸泡磷酸及氢氧化钠滤纸条及它们所接触的凝胶部分。用表面电极测量每一厘米凝胶的 pH。将凝胶转 90°, 在样品槽中加样 (CRP 70 ~ 100 μg/70 μl), 仍用浸泡 1M H₃PO₄ 及 1M NaOH 的滤纸条分别作为正、负极, 进行第二向电泳。电流方向与样品槽平行, 电压 700V, 电泳时间 30 分钟。

2. 聚焦-免疫双向电泳法 按常规分析聚焦电泳法在含 2.5% Ampholine (pH 3.5—9) 的聚丙烯酰胺凝胶 (T = 6%, C = 2.3%) 中进行。样品量约 100 μg CRP (用 3 个加样滤纸片吸收)。在 400V, 2℃ 电泳 150 分钟, 此时电流降至最低。用表面电极测量每一厘米凝胶的 pH。切出一条聚焦电泳的凝胶作第二向电泳, 其余按常规方法固定, 考马氏蓝染色及脱色。另外在冷却至约 50℃ 的 1% 琼脂糖 (凝胶 2) 溶液中加入兔抗人 CRP 抗血清, 混匀后迅速倾在置于水平台的玻璃板 (11.5 × 9cm) 上, 待凝固后, 在长边一侧切去 1.5cm 胶条。在距琼脂糖凝胶 3mm 处, 平行地放一条已聚焦电泳完毕的胶条。此 3mm 的沟由未加抗血清的 1% 琼脂糖补足, 进行第二向免疫电泳。以聚焦电泳胶的一边作为阴极, 含抗血清的琼脂糖一边作为阳极。电解缓冲液见上节。电压 2.5V/cm, 2℃ 电泳 24 小时。

在上述两种电泳完毕后, 按常规方法固定、漂洗、染色及脱色。

结果与讨论

滴定曲线法测等电点 我们按 Righetti 法^[4]测定了纯化的人 CRP 的滴定曲线, 7 次实验的等电点平均为 6.55 ± 0.35, 与 Laurent 等^[3]的 6.3 ± 0.2 基本符合。在 pH 4.0—5.0 间, 我们也观察到有酸变性 CRP 的等电点, 平均值为 4.36 ± 0.46 和 5.40 ± 0.25。另外在 pH 7 ~ 8

间, 我们也看到了在此 pH 范围内的蛋白质迁移率很低, 接近样品槽 (图 1)。用滴定曲线法测 CRP 的等电点并不理想, 因为整个曲线除了在酸性 pH 时, 其余均与样品槽非常接近, 较难测得其交点 (即等电点)。我们曾把第二向电泳时间延长至 2 小时, 情况亦未见改善。但在同样条件下所作的 BSA 的滴定曲线较好, 两次测定等电点平均为 4.86, 与文献报道的 4.7 和 4.9^[5] 符合。这是否与 CRP 具有与一般球蛋白不同的五盘环结构 (Pentraxin) 有关, 不能作出定论。

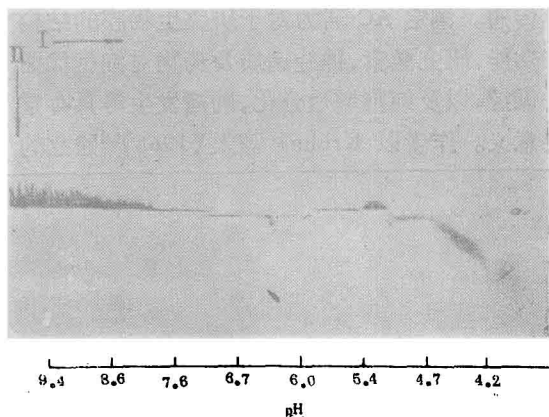


图 1 人 CRP 的滴定曲线

I: 第一向, 聚焦电泳 (IEF) II: 第二向, 凝胶电泳

聚焦-免疫双向电泳测等电点 用此法对人 CRP 做了三次试验, 两次试验结果均较好, 聚焦电泳区带集中在 pH 5.7—6.0 间, 第二向免疫电泳, 主要呈现一个主峰 (图 2), 说明在聚焦电泳时, CRP 虽在 0.3 pH 单位内集中出现了多条区带, 但在第二向免疫电泳中主要出现一个峰, 显示了我们的 CRP 样品是比较纯的。至于多条区带的出现, 可能由于分子间存在的电荷或构象的细微的差异。这种现象在其他蛋白质中也存在^[6]。至于在 > pH 6 的免疫电泳图谱中还出现一个小峰, 但它与主峰完全融合, 根据抗原同一性鉴定的原则 (Antigen identity)^[7], 应与主峰 CRP 为同一抗原。

此外, 在 pH 4.0—5.0, 7.2—8.5, 均未出现类似在滴定曲线中的等电点区, 故在第二向免疫电泳中也未见沉淀峰。能否说在滴定曲线中

腺苷酸环化酶活力测定

张林华 刘秉文 吴兆锋 蓝天鹤

(华西医科大学生物化学教研室,成都)

腺苷酸环化酶 (AC; E. C. 4.6.1.1) 是位于细胞膜上的一种复杂的酶系统,它通过鸟苷酸调节蛋白^[1],与膜表面激素受体相偶联,催化细胞内 ATP 生成 cAMP,介导外部信息的跨膜传递。测定 AC 活力对于研究生物膜的结构与功能,研究激素,神经递质及药物对细胞代谢的调控,以及细胞增殖分化,肿瘤发生等具有重要意义。作者以 Krishna 等人 (1968)^[2]建立的

方法为基础,综合有关改进方法,建立了一种简便的 AC 放射分析法,并对 cAMP 的分离效果及影响酶活力的若干因素进行了探讨。

一、材料与方 法

1. 材料

³H-ATP: 比放射性为 31ci/mmmole; ³H-cAMP: 比放射性为 23ci/mmmole, 放化纯度

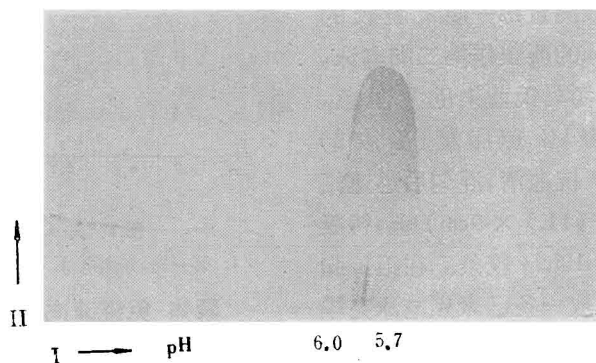


图 2 人 CRP 的聚焦-免疫双向电泳

I: 第一向,聚焦电泳 II: 第二向,免疫电泳

出现的现象可能是一种假象,值得注意。

滴定曲线法测定人 CRP 的等电点,曲线与加样槽交点不易分辨,测得的 pI 值不够明确,且在 pH4.0—5.0, 7.2—8.5 间均有等电点区,结果不够满意。用聚焦-免疫双向电泳法测人 CRP 的等电点为 5.7—6.0,在 pH4.0—5.0, 7.2—8.5 间均无等电点区。说明我们提纯的人 CRP 纯度较高,同时也可以看到 CRP 分子的微小不均一性的存在。

参 考 文 献

[1] Wood, H. F. et al.: *J. Exp. Med.*, 100, 71, 1954.

- [2] 吴 蔚等,《上海免疫学杂志》,4(2), 65, 1984.
- [3] Laurent, P. et al.: *Electrophoresis*, 4, 316, 1983.
- [4] Righetti, P. G. et al.: *J. Chromat.*, 166, 455, 1978.
- [5] Malamuol, D. and Drysdale, J. W., *Analyt. Biochem.*, 86, 620, 1978.
- [6] Smyth, C. J. et al.: *Scand. J. Immunol.*, 17, Suppl. 10, 233, 1983.
- [7] Axelsson, N. H. and Bock, E. *Scand. J. Immunol.*, 17, Suppl. 10, 177, 1983.

[本文于 1985 年 5 月 9 日收到]