

ST-EPR 波谱低场参数的一种修正方法

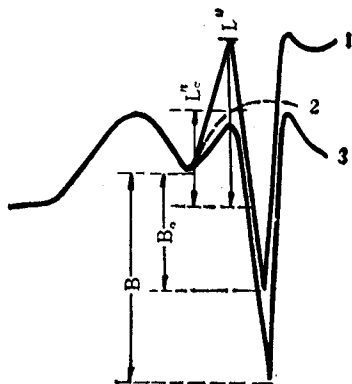
卢景霁

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

饱和转移电子顺磁共振 (ST-EPR) 技术, 特别适合于研究运动速率很慢的生物体系。其旋转相关时间 τ_c 达 10^{-7} — 10^{-3} 秒。1976 年 Thomas 等提出: 检测二次谐波异相吸收信号, 可以获得对慢运动速率变化灵敏的 ST-EPR 波谱, 并给出了按照 ST-EPR 波谱低场、中场和高场的诊断参数 L''/L 、 C'/C 和 H''/H 推断 τ_c 值的函数曲线。实验证实, 低场参数 L''/L 灵敏度高, 对应的信号幅度大, 便于测量, 常为研究者采用。本文研究了低场参数的修正。

将 Thomas 等的方法应用于研究快、慢分子运动同时存在的体系, 例如脂质体与 Na^+ - K^+ ATPase 重组体系, 却遇到波谱的诊断参数难以测量的困难。因为脂-蛋白质重组体系的 EPR 和 ST-EPR 波谱, 常常是对应于两种不同运动速率的波谱, 即强固定化作用谱和弱固定化作用谱的叠加。快运动成分的波谱“干扰”慢运动成分的波谱, 故难以获得真正的慢运动的信息。

本文通过实验提出, 脂质体与 Na^+ - K^+ ATPase 重组体系 ST-EPR 波谱低场参数的修正方法。它依据: ①ST-EPR 波谱记录的是样品的二次谐波异相 (90° 相移) 吸收信号。快运动体系 ($\tau_c < 10^{-6}$ 秒) 的二次谐波的异相信号和同相信号谱形相似, 含有正峰 A 和负峰 B, 且峰高之比 $K = |A/B|$ 为常数。②实验以脂质体与 Na^+ - K^+ ATase 重组体系自旋标记过程中的第一次上清液作快运动成分的模式。它的 EPR 波谱的低场峰刚好和重组体系弱固定化的低场峰位置对应, 且峰宽近似相等。而上清液的 ST-EPR 波谱的正峰刚好重叠于重组体



系的 ST-EPR 波谱 L'' 峰上, 形成“干扰”。上清液的 ST-EPR 波谱的负峰 B 可以直接从重组体系的谱图上量出。从而可以算出快运动成分对慢运动成分波谱的“干扰”程度。

因此得到修正公式如下: $L'_0 = L'' - KB_0$, 附图加以说明。图中曲线 1 和 3 分别是重组体系和上清液的 ST-EPR 波谱的低场部分, 曲线 2 是修正后得到的反映重组体系慢运动成分形成的 ST-EPR 波谱的 L'_0 峰。 L'' 和 L'_0 分别为修正前后重组体系 ST-EPR 波谱的低场参数, K 为上清液的 $|A/B|$ 值, 其测试条件, 除放大倍数外, 都与重组体系 ST-EPR 波谱的测试情况相同。 B_0 是重组体系 ST-EPR 波谱低场负峰高度。由于扣除了快运动成分的贡献, 从 ST-EPR 波谱中可以获得较为准确的反映慢运动的波谱参数。用 L'_0/L 代替 L''/L , 再查对 Thomas 等曲线, 得到对应的 τ_c 值。

但是从脂-蛋白质重组体系的 ST-EPR 波谱上测量的 L'' 值并非是真的峰点 L'' 值, 而且负峰 B_0 小于真实的负峰 B, 它们是引入修正

(下转第 51 页)

小麦高分子量谷蛋白亚基的分离 纯化及其抗血清的某些性质

李育庆 赵志安 顾其敏

(复旦大学生物学系,上海)

普通小麦种子蛋白中醇溶蛋白和谷蛋白各约占 45%,谷蛋白在分子量 75 千道尔顿(KD)至 150 KD 之间的一组亚基称为高分子量谷蛋白亚基(在 SDS 凝胶电泳上一般可分辨出 3 至 6 条带)。它们影响小麦的面团形成和烘烤性质。

我们从宁麦三号种子中按 Shewry, P. R. 等人(*Biochim. Biophys. Acta* 788:23—34,1984)的方法抽提出总谷蛋白并用乙烯基吡啶封闭巯基,电泳分析发现高分子量谷蛋白共有 4 个亚基,分子量分别为 104, 92, 83 和 76 KD。通过 Sephadex G-100 与 CM-纤维素柱层析,得到纯化的 104 KD 亚基。并用 SDS 凝胶电泳纯化了 76 KD 亚基。氨基酸组成测定结果如下表,与国外已发表的高分子量谷蛋白亚基的数据基本一致,但 Gly 稍高, Glx 的含量稍低。

由于谷蛋白溶解度差,较难获得纯的抗原,

同时其本身抗原性差,因而到目前为止,有关小麦谷蛋白的抗血清研究报导甚少。我们用这两个提纯的亚基分别免疫新西兰家兔,用免疫双扩散法测定 76 KD 亚基的抗血清效价达 1/16;而 104 KD 亚基的抗血清则效价很低,要用 ELISA 法才能测出。当用 76 KD 亚基的抗血清与辣根过氧化酶联羊抗兔 IgG 一起用 ELISA 间接法测定时,可检测到低至 600 pg 的抗原;用酶联免疫电泳转移(EITB)技术检测电泳分离的抗原区带时,抗血清稀释至 1/200,000 时仍能给出正的信号,与大肠杆菌总蛋白没有交叉反应。以上结果进一步说明了 76 KD 亚基的抗血清具有较高的效价。它可用于小麦谷蛋白特别是高分子量谷蛋白亚基的结构同源性研究,也可用于筛选表达基因库以分离高分子量谷蛋白亚基的基因。

高分子量谷蛋白亚基的氨基酸组成*

	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
104 KD	2.2	3.0	8.8	27.2	14.7	18.2	4.2	1.9	0.4	1.5	4.6	4.0	3.1	2.2	2.5	1.5
76 KD	5.6	3.6	8.6	20.6	11.7	20.1	4.9	3.4	0.2	2.0	6.9	2.0	2.2	2.2	3.6	2.8

*数据未经水解破坏校正。数字指100个氨基酸残基中该残基的数目。Cys 与 Trp 没有测定。

[本文于 1987 年 4 月 17 日收到]

误差的主要来源。实际上上述两个误差可以部分地互相抵销,因为前者使 L'' 偏小,后者使 L'' 偏大,综合的结果使得误差约在 10% 左右。而分析 Thomas 等曲线,可以看到 L''/L 变化约 4 倍时, τ_c 值才改变一个量级。所以本文修正方法引入的误差不会过分地影响测量结果的分析。但对 τ_c 达 10^{-7} 秒的快运动体系,上述修正公式不适用。

[本文于 1987 年 4 月 29 日收到]