

图 2 单组分胰岛素聚丙烯酰胺凝胶电泳行为 (pH8.9)左为结晶胰岛素;中为 Mc-Insulin;右为图 1 中的 P-2。

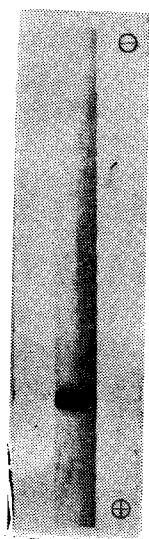


图 3 单组分胰岛素等电聚焦电泳行为

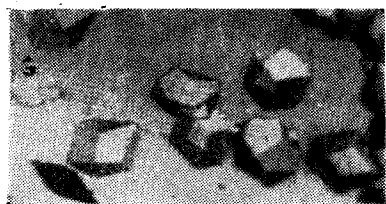


图 4 单组分胰岛素的结晶

(3) 结晶。Mc-Insulin 冻干粉 (5mg) 溶于 0.02 NHCl (0.5ml), 加入 0.15 毫升丙酮和 0.08 毫升 1% ZnCl₂, 摇匀后加入 0.25 毫升 0.2M 柠檬酸钠, 得清液, 在 20—25℃ 下放置 2—3 天,

可得漂亮的结晶 (见图 4)。

讨 论

用 QAE-Sephadex A-25 柱层析分离制备 Mc-Insulin 的效果往往取决于原料的质量。如果原料中含大分子的杂质较多, 尤其是胰岛素原含量较高时, 分离前需通过 Sephadex G-50 柱以除去大分子。一般可用 N 醋酸洗脱。另一方面, 原料的质量不好, 用 QAE-Sephadex A-25 柱分离时, 不溶物显著增加。我们也曾用 QAE-Sephadex A-25 和 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离纯化胰岛素, 但效果都不如用 QAE-Sephadex A-25 柱层析。

上述方法也适用于制备较大的量的 Mc-Insulin。我们曾用 8 × 12 厘米的 QAE-Sephadex A-25 柱, 一次可分离 2 克结晶胰岛素。效果仍然很好。

参 考 文 献

- [1] Schlichtkrull, J. et al.: *Horm. Metab. Res. Suppl.*, 5, 134, 1974.
- [2] Schlichtkrull, J. et al.: in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Hasselblatt, A. et al. eds.) 32(2), 754, 1975, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- [3] 张树政等: 《化学通报》, 1, 30, 1973.
- [4] 莽克强等编: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 1975年, 科学出版社。

[本文于1982年5月14日收到]

核酸蛋白检测仪性能与相关因素初探

邵 嘉 兴 田 湘 勇

(中国科学院新疆化学研究所, 乌鲁木齐)

柱层析具有一些独特的优点, 已成为有机化学, 生物化学和医学研究中一种普遍应用的分离手段。随着新型载体的诞生和检测方法的改进, 其应用范围还在扩大。此法可将样品物质按不同的分子量进行分离, 层析柱的末端检测则是获取分离结果的重要环节。物质在光的

作用下, 原子由较低电子能级向较高电子能级跃迁。由于电子能级间的跃迁具有较严格的选择规律, 吸收 $E = h\nu$ (h 为普朗克常数, ν 为光的频率, E 为能级差) 的能量, 所以物质对光的吸收也具有明显的选择性, 即不同的物质具有不同的光谱吸收峰。据此原理制成的核酸蛋

白检测仪正是层析柱末端检测的一种装置。

目前国内已有三个厂家生产这种仪器，产品的性能都在不断提高。

我们在参观了上海生化所研制的 73-4 型仪器后，也试制了四台，仪器的噪声小于 1%；热稳定后基线漂移 24 小时小于 5%；在散射光源、检测体积约 0.2ml 条件下，检测灵敏度为 0.03 O. D.。我们还就仪器的性能与相关因素间的关系做了一些最初步的探索，现在提出来与大家交换意见。

一、噪 声

仪器的噪声除了影响谱图的清晰度和计算误差外，更为重要的是它还直接影响着仪器的检测灵敏度，即样品的最低检测浓度，最低检测浓度即仪器产生足以观察和测量的峰形所需要的样品溶液的最低浓度。一般定义二倍于噪声的样品峰为足以观察并进行测量的最小峰形。对同一浓度的样品溶液，用低噪声仪器可以检测出，若检测仪器的噪声高，样品峰可能被噪声所淹没，无法检测，表现为仪器的灵敏度低。

仪器噪声的来源主要有二：一是由电源所引入的噪声；二是光电倍增管的热噪声。对于电源所引入的纹波噪声，我们使用如图 1 所示的整流滤波电路，对降低此噪声有较好的效果。光电倍增管的热噪声的成因是由于光阴极除在光能的作用下能发射电子流外，在热能作用下也能发射一定量的电子流，叫做 Joule-Thompson 噪声或暗电流。由于是热致发射，其电平就随温度的上升而上升。因此，光电倍增管的冷却是降低热噪声的重要环节，温度降低 13℃ 时，Joule-Thompson 噪声可降低一半。为降低热量的产生，流经高压分压器的电流不能太大。由于在热量传导中有： $T_1 - T_2 = PRT$ ，（ T_1 和 T_2 分别为热源和环境温度， P 和 RT 分别为热源功率和导热体的热阻）。显然，与导热体的横截面积成反比的热阻 R_T 越低越好。因此用导热性能良好的金属材料车制光电倍增管小暗室，且其壁宜厚不宜薄，并尽可能与仪器底板（温度最低）有良好的接触。此外，各电路元件的实际负荷留有余量，信号线正端接地，也都是降低热噪声的具体措施。

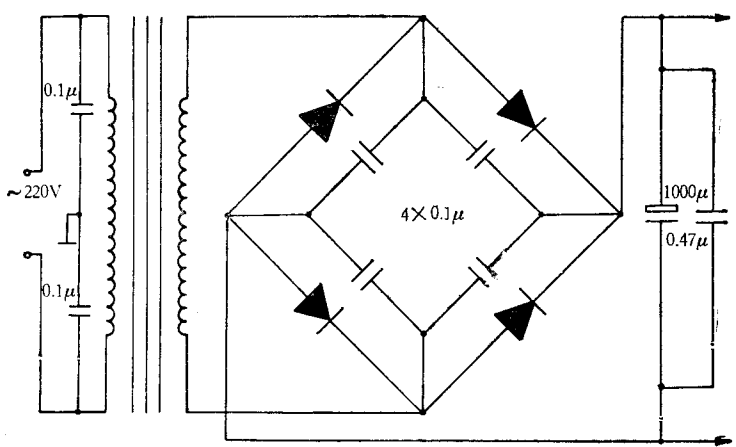


图 1

二、稳 定 性

柱层析一般所需时间较长，要求检测仪器能在较长时间内稳定工作，即要求其基线漂移小。造成基线漂移的原因也有二：一是电源电压波动；二是电路元件热稳定性差。由光电发

射第一定律：

$$I_k = S_k F_0 \quad (1)$$

式中 I_k 为光阴极的发射电流， S_k 和 F_0 分别是光阴极的光谱灵敏度（常数）和入射光强。对(1)式两端同取相对变化率得：

$$dI_k/I_k = dF_0/F_0 \quad (2)$$

由(2)式,入射光强 F_0 的任何变化完全表现为阴极发射电流的变化。电源电压的波动将造成光源强度的不稳定而引起基线漂移。

电源电压不稳定的第二个危害是造成光电倍增管倍增系数 M 的不稳定而引起基线漂移。光电倍增管各倍增级的二次发射系数 δ 都是其工作电压 V 的函数。对于常用的一定结构的光电倍增管,其总的倍增系数可表示为:

$$M = CV^{kn} \tag{3}$$

C 为常数, n 为倍增级数, k 取决于 $\delta-V$ 关系,通常取值于 0.7—1 间的常数。对(3)式取相对变化率得:

$$dM/M = kn dV/V \tag{4}$$

由(4)式,电源电压的相对变化将造成倍增系数 kn 倍的相对变化,引起更为严重的基线漂移。因此,提高仪器稳定性的重要途径是提高稳压电源的稳定度。要保证稳压电源的稳定度优于万分之一确实不易,我们给仪器增制了 25W、稳定度为百分之一的交流稳压器,保证了仪器的基线漂移 24 小时小于 5%。为保证仪器的稳定性,流经高压分压器的电流不能降得太低,一般应为输出电流的 20 倍左右,分压电阻阻值在 150K 左右为宜。

电源电压不稳所引起的基线漂移一般为蛇迹形漂移。电路元件热稳定性差所引起的漂移一般为单向漂移。它只能通过更换有关元件来解决。

三、灵敏度

在光源灯未加石英透镜,光源为散射光的情况下,光电倍增管的入射窗口与检测池间的距离 r 与仪器的灵敏度有较大关系。 r 越大,仪器的灵敏度越低。因此,在仪器的光路结构上,要尽可能地减小 r 。如果光源灯加上石英透镜,使入射光为平行光,就基本上不存在这个问题。

提高仪器灵敏度的第二个途径是光电倍增管各倍增级的电压偏置方式。一个有 9 级倍增极,各级的二次发射系数均为 $\delta = 4$, 级间传输效率均为 1 的光电倍增管,其总的倍增系数 $M = 4^9 = 262144$ 。如果使该管的单级倍增系数从第一级至第九级分别增加 2, 得到的倍增系数 M' , M 的增量 ΔM 以及 $\Delta M/M$ 如表 1 所示。显然,提高第一级的二次发射系数 δ_1 对于

表 1

各级 δ	M'	ΔM	$\Delta M/M$
$\delta_1 = 6$	393216	131072	0.5
$\delta_2 = 6$	294912	32768	0.125
$\delta_3 = 6$	270336	8192	0.03125
$\delta_4 = 6$	264192	2048	0.0078125
$\delta_5 = 6$	262656	512	0.0019531
$\delta_6 = 6$	262272	128	0.0004882
$\delta_7 = 6$	262176	32	0.000122
$\delta_8 = 6$	262152	8	0.0000305
$\delta_9 = 6$	262146	2	0.0000076

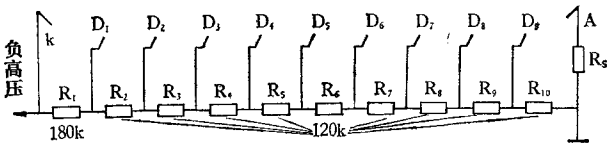


图 2 光电倍增管偏置电路

提高总倍增系数最为有效。由于各级的二次发射系数 δ 均随工作电压而增加,我们使用了图 2 所示的偏置电路。(图 2) $K-D_1$ 间的电压较其余各级高,提高了第一级的二次发射系数;阴极发出的电子受到更强的加速场的作用,对提高有效电子基数有利;此间电子运动的方向性加强后,又增强了仪器的抗干扰能力。如果有

适合的稳压管代替 R_1 ,使这一电压不受流经高压分压电阻电流波动的影响,益处更大。

四、灵敏区域

核酸和蛋白的吸收峰分别在 2600 Å 和 2800 Å 处,而光电倍增管却有一个较宽的光谱灵敏区,要使仪器能够检测 0—100% 的透过率

或 $\infty-0$ 的消光值,光源就须有较高的单色性。由朗伯-比尔定律:

$$E = \lg I_0/I = KCL \quad (5)$$

如果入射光 I_0 由特征光 I_{λ_0} 和杂色光 I'_0 组成,则有

$$E = \lg (I_{\lambda_0} + I'_0)/(I_{\lambda_0} + I'_0 - \Delta I_{\lambda}) \quad (6)$$

样品物质对入射光的吸收量 ΔI_{λ} 只能由特征光 I_{λ_0} 提供。随着样品浓度的增高,吸收量 ΔI_{λ} 也随之增大,当样品溶液的浓度增高到某值,接近 $\Delta I_{\lambda} = I_{\lambda_0}$ 时, (6) 式成为:

$$E = \lg (I_{\lambda_0} + I'_0)/I'_0 = G (\text{常数}) \quad (7)$$

此后,即使样品浓度再增高, E 值也不再有了变化了。 $G-\infty$ 区间称为死区或不灵敏区域。此时

在记录仪上出现平顶峰。光源的单色性越差, I'_0 所占的比例越大。死区就越宽。

在我们的试制工作中曾得到上海生化研究所章蔚娟,刘爱琴等同志的热情帮助,本所徐敬发同志负责完成了大部分机械加工工作,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 徐晓利:《生物化学工具》,人民卫生出版社,1980年8月版。
- [2] 史致德:《光电管与光电倍增管》,国防工业出版社,1981年1月版。
- [3] 刘培楠、梁植权等:《分析仪器及其在分子生物学中的应用》,科学出版社,1978年6月版。

[本文于1982年10月22日收到]

简易固相微量蛋白顺序仪

徐佐杰 俞鹤年

(上海生物化学研究所)

前文^[1]介绍了用 Edman 降解原理设计的固相蛋白质顺序测定仪。该仪器简便实用,但所需样品量较大(100—200 毫微克分子),往往不能满足超微量的测定。现改用 4-N, N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸苯酯(DABITC)试剂,并对原仪器中的管道系统重新设计,改进后的仪器可测定 10—30 毫微克分子的胰岛素 B 链及肌红蛋白 N 端的 20 个左右氨基酸残基的排列顺序。每天可鉴定 3—4 个氨基酸残基的顺序。具有结构简单成本低,操作维修方便之优点。

仪 器 与 试 剂

改进后的仪器所采用的各部件同原仪器,只是管道系统作如下改变:即将碱性的缓冲液管道和裂解用的三氟醋酸管道分别用二个贮液瓶的淋洗液(甲醇)隔绝,以避免生成盐。玻璃样品柱长度改为 4 厘米,并紧缩了各管道长度,详见图 1。

仪器所用试剂均同前文。另加 DABITC

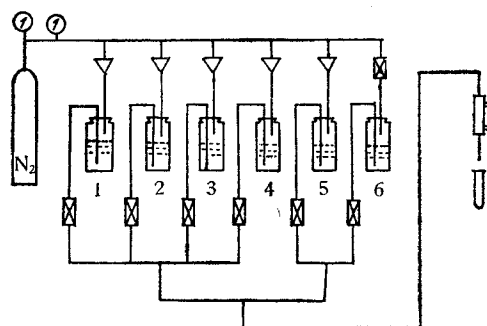


图 1 流程示意

1. 甲醇 2. 异硫氰酸苯酯 3. 有色试剂
4. 缓冲液 5. 三氟醋酸 6. 甲醇

试剂(为中国科学院上海生化所附属东风试剂厂产品)重结晶一次。裂解后的 DABTH-氨基酸用国产聚酰胺薄膜鉴定。

操 作 步 骤

1. 将 10—30 毫克(包括载体重量)待测样品装入玻璃柱。并将甲醇、异硫氰酸苯酯(溶于 DMF*, 浓度为 5%), DABITC 试剂(溶于 DMF,

* 二甲基甲酰胺。