

以 10—15 毫克为宜。为了节省组织 Ag 蛋白质的用量,可以用其他容易获得的蛋白质溶液如 PS 稀释 Ag5 或 10 倍。然后加入 3% 磺柳酸制成不溶性固态 Ag,如此处理仍能得到同样的测定结果,见表 3。

在不溶性固态 Ag 上进行的二次 Ab-Ag 结合反应均需在 37℃ 保温 1 小时,实验证明其结果与在冰箱中放置 20 小时相同。以正常兔血清代替 RAHIgG 摸索洗涤条件,结果表明,温度稍高有利于洗涤,洗涤液中加入吐温-80 并不增加洗涤效果。确定的洗涤条件为 2.5 毫升 PBS, 37℃ 保温 10 分钟,共洗三次可得满意的结果,见表 3 中被测样品为正常兔血清项。

鉴于 Ab、Ag 结合反应是很复杂的反应,无论在 Ab-Ag 复合物的组织上或反应的亲和常数上都是不均一的。因此,与其他的免疫测定法一样,在测定中必须严格控制各种实验条件,并经常以测定的重复性及标准曲线检查数据的可靠性。

曾用本方法对 16 例克山病人的 20 份血清进行了抗心肌抗体的测定。所得结果与免疫荧光法测定结果完全相符,说明二者有类似的灵

敏度。免疫荧光的结果可与细胞形态相联系,而本方法可作定量比较。二者互相补充可得更完整的资料。

SARIGG-FA 中除了有抗体活性的 FA 外,尚含有相当一部分荧光标记的非抗体的 IgG。这部分非抗体荧光量视不同批抗血清而异,按图 2 及 3 估计所用的 SARIGG-FA 中非抗体荧光量约占总量的 60% 左右,此值稍低于文献报道值^[5]。由于测得的 Ab 量是基于反应前后荧光值的差异,故非抗体荧光量并不影响测定结果,但如进一步纯化有抗体活性的 IgG,去除非抗体 IgG,再以 FITC 标记之可得纯度更高的 SARIGG-FA,则应能进一步提高方法的灵敏度。

参 考 文 献

- [1] Steward, M. W.: *Immunochemistry*, 1974.
- [2] Minden, P., et al.: *J. Immunol.*, **102**, 832, 1969.
- [3] Kawamura, A.: *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications*, 1969.
- [4] Nairn, R. C.: *Fluorescent Protein Tracing* 3rd ed. 1969.
- [5] Tengerdy, R. P.: *Anal. Chem.*, **35**, 1084, 1963.

[本文于 1978 年 10 月 20 日收到]

γ-辐射聚合六甲基二硅氨烷于多孔 玻璃珠担体的填充柱用于毫微克 水平的前列腺素 F_{2α} 测定*

高 魁 雄 周 冠 中

(上海细胞生物学研究所)

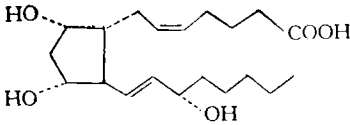
前列腺素 (Prostaglandin, 简称 PG) 是一类环化的 20 碳不饱和脂肪酸的总称。业已知道 PG 广泛分布于动物界,又存在于各种组织之中,起着非常奇妙的,变化多端的生理功能。例如,对平滑肌的收缩,对血流、血压、炎症、神经传导以及激素对靶细胞的作用等都密切相关。

此外,PG 对肿瘤发生和控制生育等问题也有密切关系。近年来,国际上这方面的研究进展很快,并已有不少报道和综述^[1-5]。

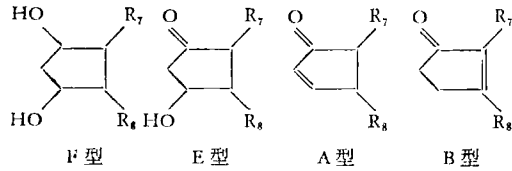
从人和动物中分离得到的 PG 有 20 多种,

* 本工作得到上海药品检验所张叔良、宋增明、王仲山等同志的协助。

它们的骨架基本相近,都是一个五碳环加上二条侧链,其中一条末端为一羧基,以 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 为例它的结构式为:



根据 PG 的五员环的特点和它上面的基团的不同,可以分为 E、F、A、B 四种类型



并可按侧链上的不饱和双链的数目作次级描述。

由于 PG 在组织中的含量极微(大约每克组织或每毫升体液中仅含一毫微克左右),因此定量测定十分困难。适合于生物样品中 PG 定量测定的方法主要有生物鉴定法、放射免疫测定和气液色谱(或色谱-质谱, GC/MS) 等。

关于 PG 的气液色谱 (GLC) 测定已有一些报道,但是即使采用灵敏度较高的氢火焰离子检测器时尚不能满足生物样品中低含量 PG 测定的要求^[6]。若采用先进的电子捕获检测器时,天然的 PG 中只有 B 型的才具有电子捕获特性^[7]。对于不能转变成 B 型的其他 PG (如 $\text{PGF}_{2\alpha}$), 必须制备成含有卤化物基团的衍生物之后才能测定。

为了用 (GLC) 法测定生物样品中的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的含量,最关键的一步是气液色谱条件的建立。使用电子捕获检测器时,要求一种吸附性十分小的、高效能的优质层析柱,与之相匹配,不然的话,毫微克水平的 PG 会被层析柱吸附殆而不出峰。此外,毫微克样品的衍生物制备的具体操作也很有讲究,如剩余卤化反应试剂清除不完全,也会造成实验的失败——PG 的峰被本底全部覆盖而毫无表示。

已知多孔玻璃珠 (CPG) 担体,几乎由纯 SiO_2 所构成,对测定甾体等高沸点化合物比常用的硅藻土担体具有某些优点^[8]。高剂量 γ -辐

射将六甲基二硅氨烷 (HMDS) 聚合到担体表面可以得到吸附性最小的层析柱^[9], $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的五氟苯酯衍生物,再经双-三甲基乙酰胺 (BSA) 处理后,具有良好的电子捕获性能和热稳定性^[10, 11]。本工作系将这几方面优点结合起来,以期用电子捕获检测毫微克水平的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的一种尝试。

材 料 与 方 法

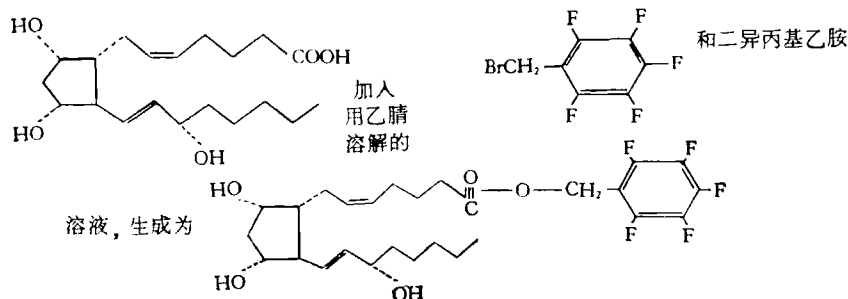
1. 色谱柱的制备 120—140 目的多孔玻璃珠 (CPG—10, 2023 埃, 比表面积 12.6 平方米/克), 经浓硝酸浸渍后用重蒸馏水洗至中性, 150 °C 以上烤干。取 50 克左右置于试管内, 加 HMDS 使液面刚好超过担体体积, 由抽气泵抽去担体中的小气泡, 用五十兆拉德 (rad) 的 γ -辐射处理 (由上海原子核所唐振新、叶元龙等同志送样至反应堆)。经如此高剂量的辐射处理后, 白色的 CPG 担体变成略带淡蓝色, 形成一层蜡状的 HMDS 的聚合物, 赋予 CPG 完全非极性表面的特性。随后用甲醇多次漂洗, 去除剩余 HMDS 及微颗粒。烘箱渐渐升温烤干, 并维持 100 °C 2 小时。稍冷后随即涂成 0.26% OV-17 (W/W) 的低固定剂担体。

用振荡器将上述担体装入 1.5 米长, 内径 3 毫米的硅化玻璃管中, 塞上石英棉、装于气相色谱仪上并充氮气 (柱出口放空)。柱温 100 °C 时注射 50 微升的 HMDS 进一步硅化整个柱子及层析系统, 2 小时后加温至 280 °C 老化 48 小时, 再接到检测器上。

2. $\text{PGF}_{2\alpha}$ 衍生物的制备 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (上海第九制药厂赠送的初步纯化的 $\text{PGF}_{2\alpha}$) 制备成毫微克水平的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的五氟苯酯 ($\text{PGF}_{2\alpha}$ -5F Benzyl)^[10], 其反应如下页。

经柠檬酸终止反应及去除剩余反应物后, $\text{PGF}_{2\alpha}$ -5F Benzyl 用 BSA 处理成为硅醚衍生物 $\text{PGF}_{2\alpha}$ -5F Benzyl-3TMS, 吹干后溶于环己烷作为标准于 GLC 分析鉴定。

毫微克水平的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ -5F Benzyl 衍生物制备于长 4 厘米、内径 2 毫米的细玻璃管中进行 (按上述反应原理参照文献 [11] 所叙述的步骤, 加入反应试剂), 每次反应时封管用按摩器振荡



以利反应,反应后启管再用氮气流吹干,并加乙酸乙酯后再吹干1—2次,每一步骤重复二次,最后加BSA直接进样分析。

本实验所用为GC-5A色谱仪、 ^{63}Ni 检测器,载气为最纯氮(99.99%)。

结果与讨论

先用氢焰离子检测器摸索了较适合的气相

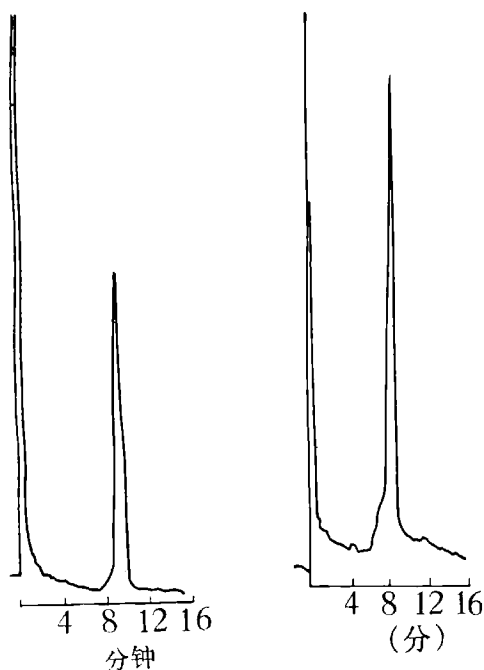


图1 毫克水平制备的PGF_{2α}-5F Benzyl-3TMS样品在氢焰离子检测器上的层析图谱

色谱条件: 载气流速 $\text{N}_2 = 40$ 毫升/分, $\text{H}_2 = 40$ 毫升/分, $A = 400$ 毫升/分, 柱温 250°C , 气化温 250°C , 检测温 250°C , 灵敏度 $10^2 \times 32$, 微克级进样, 记录仪1毫伏满刻度, 纸速2.5毫米/分。

图2 毫克水平制备的PGF_{2α}-5F Benzyl-3TMS样品在 ^{63}Ni 电子捕获检测器上的层析图谱

色谱条件: 载气流速 $\text{N}_2 = 40$ 毫升/分, 柱温 250°C , 气化温 270°C , 检测温 290°C , 灵敏度 $10^2 \times 8$, 进样约10毫微克/微升(环己烷), 记录仪1毫伏满刻度, 纸速2.5毫米/分。

层析条件,并验证了毫克水平PG样品的衍生物制备情况,其色谱行为见图1,取微克水平的PGF_{2α}-5F Benzyl-3TMS进样,作定性分析,呈一个对称的主峰。这说明经纯化后的PGF_{2α}纯度很好,衍生物转化成功。

由毫克水平PGF_{2α}制备的衍生物在电子捕获检测时的图谱,其出峰行为可以与氢焰离子检测得到的图谱相比较,当然灵敏度大大提高,取约10毫微克的PGF_{2α}衍生物进样,可以有很高的峰,但在峰的前部有一个小峰及一个无法分开的肩形成份(见图2)。

毫微克量PGF_{2α}制备成PGF_{2α}-5F Benzyl-3TMS后分别取0.43毫微克、0.215毫微克、

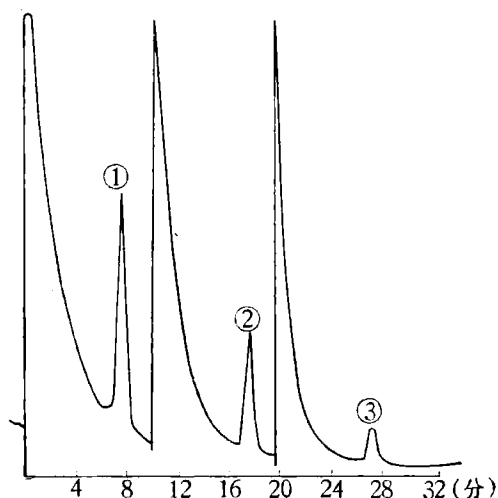


图3 毫微克水平制备的PGF_{2α}-5F Benzyl-3TMS样品在 ^{63}Ni 电子捕获检测器上的层析图谱

色谱条件: 载气流速 $\text{N}_2 = 60$ 毫升/分, 柱温 250°C , 气化温 270°C , 检测温 290°C , 灵敏度 $10^2 \times 32$, 图中峰(1)为0.43毫微克/微升进样(2)为0.215毫微克/0.5微升进样(3)为0.107毫微克/0.25微升进样 溶剂为BSA/环己烷(10%)记录仪1毫伏满刻度,纸速2.5毫米/分

0.107 毫微克三次连续进样图谱,见图 3 (这是从 86 毫微克 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 制备而成取的样品)。从图中可以看得出不同进样量的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 衍生物,其峰高也不同。

上述结果与 Wickramsinghe 等^[10, 11]的结果比较,证明上述方法所制备的色谱柱,性能上较好。能重复别人的结果,得到较好的图形。同时应该指出,我们的柱子做得较长,为 1.5 米,他们的为 0.77 米,我们能将固定剂涂得更薄,为 0.26% OV-17,他们为 3% OV-1; 因此我们所用的柱温较低,为 250℃,他们的柱温为 255℃。说明辐射聚合 HMDS 于 CPG 担体可使层析柱总的吸附性更小,柱效能可以提高,工作温度可以降低。这些对于测定前列腺素将是有益的。故用本方法制作的柱子将有希望用于测定生物样品中低含量 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 或推广适用于其它分析难度较高的高沸点极性化物。

用五氟苯溴制备毫微克水平的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 带有电子捕获性能的衍生物的方法,将对测定生物样品中的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量具有实用意义。

在毫微克水平制备 $\text{PGF}_{2\alpha}$ -5F Benzyl-3TMS 时,如果在操作过程中干燥条件操作不佳,或其

它卤化物清除不彻底,往往会造成实验的失败,致使结果不稳定,这是需要特别注意的。

参 考 文 献

- [1] Bergström, S. et al.: *Pharmacol. Rev.*, **20**, 1, 1968.
- [2] Speroff, L. et al.: *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **107**, 7, 1970.
- [3] Hinman, J. W.: *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 161, 1972.
- [4] Weeks, J. R.: *Ann. Rev. Pharmacol.*, **12**, 317, 1972.
- [5] Ramwell, P. W. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **180**, 1971.
- [6] Pace-Asciak, C. et al.: *J. Chromatogr.*, **56**, 1, 1971.
- [7] Jouvenaz, G. H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **202**, 1, 1970.
- [8] 高魁雄等:《生物化学与生物物理进展》,1978 年,第 4 期,第 15—17 页。
- [9] Urone, P. et al.: *J. Gas Chromatogr.*, **3**, 1, 1965.
- [10] Wickramsinghe, J. A. F. et al.: *J. Pharmac. Sci.*, **62**, 9, 1973.
- [11] Wickramsinghe, J. A. F. et al.: *Biochem. J.*, **141**, 1, 1974.

[本文于 1978 年 12 月 12 日收到]

木霉变异株 EA₃-867 发酵生产的 纤维素酶制剂中有害杂酶的分析

蒋 传 葵

(中国科学院上海生物化学研究所东风生物试剂厂)

纤维素酶是植物原生质体和体细胞杂交研究工作中不可缺少的工具酶。由于近年来我国这方面研究工作的广泛开展,对纤维素酶的需要越来越迫切,过去国内没有专门工厂生产,各研究单位都是自己以实验室规模制备的,既费力又费时,而且质量差异很大,常常影响工作的顺利进行。

中国科学院上海生物化学研究所东风生化

试剂厂在北京遗传所和上海植物生理研究所有关同志的帮助下,在上海植物生理研究所工作的基础上,开展了木霉变异株 EA₃-867^[1-8]小规模固曲发酵生产纤维素酶制剂的工作。几年来生产了丙酮粉和冷冻干粉两种类型产品,供应了一些单位,取得了良好的效果。

由于纤维素酶是一个复合酶,至今各组份还未完全搞清楚,而且制备过程中没有采用一