

长叶车前花叶病毒(上海分离物)外壳蛋白中 硫硫键的阴极溶出伏安法测定

宋 鸿 铨 汪 乃 兴

(复旦大学化学系)

长叶车前花叶病毒上海分离物(简称 HRV_{sh}) 是烟草花叶病毒群长叶车前花叶病毒的一个新发现的分离物^[1]。正像研究其他蛋白一样,测定其中的巯基或硫硫键是研究这种新的病毒蛋白的一个重要内容,其常用的方法有分光光度法等^[2]。但在生物化学研究中常会遇到样品极其稀罕的问题,因此要求分析方法具有更高的灵敏度。为此,我们采用高灵敏度的阴极溶出伏安法^[3],在取样量仅 40 微克的条件下测定了这个新发现的病毒外壳蛋白中的巯基数。

实 验

一、仪器与试剂材料: 仪器及试剂均参见文献^[3]。HRV_{sh} 由复旦大学生物系提供,浓度为 0.394 毫克/毫升的水溶液。

二、操作步骤: 取浓度为 0.394 毫克/毫升的 HRV_{sh} 水溶液 0.1 毫升于电解池中加入 1M NaOH 溶液 0.1 毫升,小火加热,加热时须加盖,以便达到回流目的。待溶液近干时加入 1M NaCl 溶液 1.0 毫升,继加水至 10.0 毫升,将电解池置于电极架上通氮除氧。以选定的实验条件^[3],即电积电位为 -0.35 伏(vs. Ag-AgCl),电积时间 2 分钟,随后静置 15 秒,以 100 毫伏/秒的速度扫描溶出,在电位为 -0.95 伏处得一溶出电流峰,其高度为 h 。在同一份溶液中加入浓度为 $1.45 \times 10^{-5} M$ 的硫离子标准溶液 0.1 毫升,重复上述电积、溶出的实验步骤,得溶出电流峰高度为 H 。图 1 为阴极溶出电流电压曲线。由此便可计算结果。

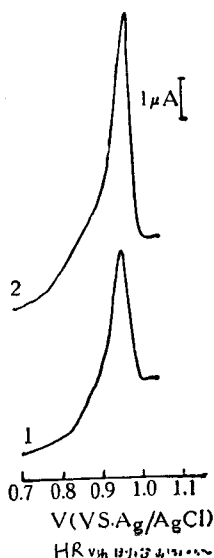


图 1 HRV_{sh} 的溶出曲线

1. HRV_{sh} 2. 在 HRV_{sh} 中加入 $S^{2-} 1.45 \times 10^{-5} M$ 0.1 毫升于 10.0 毫升原溶液中

实验结果与讨论

1. HRV_{sh} 外壳蛋白中硫硫键数目的测定
HRV_{sh} 的分子量为 18000^[1],测定试液中所含 HRV_{sh} 的量为 0.0394 毫克,其摩尔浓度为 $2.2 \times 10^{-7} M$ 。所测得硫离子浓度可以从

$$C = \frac{C_s V_s h}{H(V + V_s) - hV}$$

公式中求出。其中 C_s 、 V_s 分别为加入硫离子标准溶液的浓度与体积, V 为电解池中试液原体积。五分平行试样得硫离子浓度分别为 $2.4 \times 10^{-7} M$, $2.5 \times 10^{-7} M$, $2.9 \times 10^{-7} M$, $2.8 \times 10^{-7} M$, $2.9 \times 10^{-7} M$, 平均结果为 $2.7 \times 10^{-7} M$ 。由于在蛋白质中的甲硫胺在上述条件下不生成

无机硫^[4],故比较 HRV_{sh} 的浓度($2.2 \times 10^{-7}M$)和测得硫离子浓度(平均 $2.7 \times 10^{-7}M$),便可推断 HRV_{sh} 中只有一个巯基。由经典的分光光度法测得也只有一个巯基。两者结果相符。

2. 方法验证 为间接验证上述方法的可靠程度,还测定了有已知数值的牛血清中的硫硫键的数目。牛血清的分子量以 66500 计算,牛血清测定试液中的浓度为 $1.5 \times 10^{-8}M$,五份平行试样测得硫离子浓度分别为 $4.9 \times 10^{-7}M$, $5.1 \times 10^{-7}M$, $4.8 \times 10^{-7}M$, $5.3 \times 10^{-7}M$, $4.7 \times 10^{-7}M$,平均结果为 $5.0 \times 10^{-7}M$ 。比较牛血清的浓度 $1.5 \times 10^{-8}M$ 与测得硫离子的浓度,便可知道相应的硫硫键数目分别为 16、17、16、18 和 16。由平均浓度 $5.0 \times 10^{-7}M$,计算所得的硫硫键数目为 17。与文献值 17^[5]完全相符。

结 论

本文以阴极溶出伏安法测定了 HRV_{sh} 病毒外壳蛋白中的硫硫键,取样量仅 40 微克,连同前处理在内时间只要 30 分钟,所得结果与经典的分光光度法也相符合。由此可见用此法测定蛋白质中的硫硫键具有灵敏、快速、简捷的优点,是一种值得在生化研究中推广的方法。

参 考 文 献

- [1] 郁操国、孙玉昆、王鸣岐:《病毒学报》,印刷中。
- [2] George, L. Ellman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70, 1959.
- [3] 宋鸿鑑、汪乃兴:待发表。
- [4] M. Toporek 著,程崇道译:《生命之化学基础》,230页,徐氏基金会出版,1977。
- [5] Harrop, B. S. and Gruen, L. C.: *Anal. Biochem.*, **42**, 398, 1971.

[本文于 1980 年 7 月 14 日收到]

氧 瓶 燃 烧 装 置 的 改 进

本刊于 1979 年第 2 期曾刊登《氧瓶燃烧法制备 ³H 生物样品》一文,不少单位对这项技术和装置很感兴趣。最近生化所五室同志改用高频电火花枪来引燃样品,取代原来的聚光点燃装置,既简化了装置又保证操作的安全。

具体操作:将燃烧瓶略为倾斜以缩短电火

花与黑纸蕊的距离,然后用电火花枪在燃烧瓶外直接对准黑纸蕊上端轰击,使样品引燃;其余各操作步骤不变。电火花枪是市场出售 GHZ-3 型高频电火花真空测定仪,由江苏扬中县万太中学校办工厂生产。

[上海生物化学研究所景冲、苏妙根]

更 正

本刊 1980 年第 6 期《茶叶中咖啡碱的快速测定法》一文中:

“微热 20 分钟” 应为 “微沸 20 分钟”

“加蒸馏水 20 毫升” 应为 “2 毫升”

本刊 1981 年第 2 期《大鼠脑突触体 (Na-K) ATPase 活力的微量测定方法》一文中:

48 页左 12 行 “L. Musbek” 应为 “L. Muszbek”

24 行 “均匀一毫升” 应为 “均为一毫升”

49 页 表 “Piμ moles/克蛋白质·小时” 应为 “Piμ moles/毫克蛋白质·小时”