

因素,所用的抗体稀释度必须为 1:5000。

此外,由图 1 可见,1:10 抗体稀释度时,抗体与 ^{125}I -AFP 结合率达 82%,说明在实验条件下,所用标记抗原量,确实是过量的。(即完全可以将 1:5000 抗体结合成复合物而被沉淀。

2. 在此条件下,每次制备标准曲线均能获得满意结果。经我们一年多的研究及临床应用,证明这种新的 AFP 简易微量方法稳定可靠,值得推广。

3. 用 4 个不同浓度的标准血清各做 14 或 15 次重复性研究,结果良好。若将各血清平均值按图 3 作图可获一条直线。这也说明一个标本或标准倍比稀释时,可得到良好的稀释曲线。本直线延长,相交于纵轴处,正好也是下一个稀释度 (25ng/ml)。

4. 与竞争法做相关性测验 用 24 个不同浓度样品,同时用本法及竞争法测定。结果见图 4。两法的相关系数 $r = 0.91$, 回归方程式是: $\bar{y} = 15.1 + 1.1x$ 。说明两法用结合百分率表示的相关性密切。由此结合率绘制剂量反应曲线后二者结果完全相同有 18 个样品,4 个相差在 20ng/ml 以内,2 个在 50ng/ml 以内。

5. 此法比原法^[5]节省试剂 5 倍,一个人半日可完成 50 份标本。本法还可用于监测胎儿的生长是否正常。本法也同样可用于羊水、腹

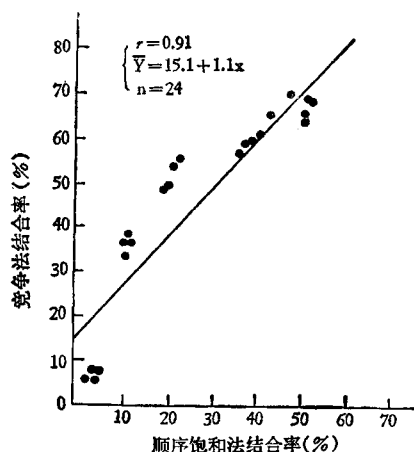


图 4 竞争与顺序饱和法相关性测验

水、尿等其它体液的监测。经实验证明,只要 ^{125}I -AFP 符合要求 (与抗体结合率大于 40%,而非特异结合小于 10%),不论上海生物制品研究所生产的,还是北京化工厂或北京 401 所生产的 AFP 试剂盒,都能获得满意结果。它是目前 AFP 放射免疫检测肝癌最新的方法。

参 考 文 献

- [1] Brummund, W. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 105, 25, 1980.
- [2] 袁振铎等:《北京医学》, 3, 6, 1981.
- [3] 袁振铎等:《肿瘤防治研究》, 9, 11, 1982.
- [4] 袁振铎等:《生物化学与生物物理进展》, 1, 52, 1983.
- [5] Braek, D. J. H. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 82, 101 (No. 1/2), 1978.

(本文于1983年2月23日收到)

高效液相色谱分离多肽

郑如玉 刘锦慧

(中国科学院动物研究所)

生物活性多肽的结构、性能和生理作用是当代生物化学研究活跃的领域之一。从生物材料或合成多肽中分离出纯的多肽就愈来愈显得重要。

过去一般都用柱层(包括离子交换、凝胶色谱等),纸层和电泳等技术分离多肽,但这些方法分离效果不高,速度慢,灵敏度低、回收率也较低。近年来,离子对反相高效液相色谱被成

功地用来分离生物材料中的肽、鉴定和纯化合成的肽、分离蛋白降解产物等。不仅可进行分析而且还可以进行克量肽的制备。它的优点是分离效果好,速度快,样品容量大,回收率高^[1-12]。

用反相高效液相色谱,在流动相中加入疏水性离子对试剂(如十二烷基硫酸钠、磷酸己烷等)可以增加肽在 ODS 固定相上的保留时间,从而改善分离,但它们不易去除,给进一步生物测定和结构鉴定带来麻烦。磷酸、醋酸及其盐类、甲酸、磷酸四丁胺,三氟乙酸及苦味酸盐等亲水性离子对试剂与肽形成亲水离子对络合物,明显地改变肽在非极性固定相上的保留时间,被成功地用来分离肽的混合物^[3-8]。

本文采用三氟乙酸和磷酸为离子对试剂分离多肽,并用来鉴定和少量制备几种合成的生物活性小肽。具有分离效果好,速度快(一般在廿分钟以内),灵敏度高(几个微克即可检测),产品进一步处理方便等优点。

一、材料和方法

FLC-350 型高效液相色谱仪, UVIDEC-100-II 型紫外分光光度计。

色谱柱系 4.5 × 250 毫米不锈钢柱。天津试剂二厂生产粒度为 10 μ m 的十八烷基键合固定相 YWG-C₁₈H₃₇, 用匀浆法装柱。

流动相是由所要求量的三氟乙酸或磷酸和新鲜的重蒸水配制成水溶液后测 pH, 用前和所需量的甲醇混合,经减压脱气。

用微量注射器进样。在 210nm 或 220nm 检测。

所用试剂全为分析纯。重蒸水。多肽除 (Gly)₄ 和内啡肽是商品外,其它都是有关实验室合成的。它们有: Val-Val, P_{Glu}-HisOH、Ala-Gly-Gly、促甲状腺素释放激素 TRH (P_{Glu}-His-ProNH₂)、促黄体素释放激素 LRH (P_{Glu}-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyCO-NH₂)、胰岛素 B 链 C 端的胃蛋白酶限制性酶解产物五肽 (Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala)。

二、结果与讨论

1. 流动相中三氟乙酸和甲醇含量的影响:

流动相中三氟乙酸含量愈高,肽的保留值愈少。含甲醇比不含甲醇更能洗脱多肽。这符合一般流动相极性对洗脱影响的规律(见表 1)。

2. 反相离子对色谱分离几种小肽:

表 1 流动相中 TFA 和甲醇含量对保留值的影响

样 品	流动相 保留时间 (秒)	0.02%TFA	含 20% 甲醇的 0.02%TFA	0.05%TFA	含 20% 甲醇的 0.05%TFA
TRH		1080	500	937	358
(Gly) ₄		278	260	251	222
(Gly) ₆		298	270	251	
Val-Val			414	524	320

图 1 表明,以含 20% 甲醇的 0.02% 三氟乙酸水溶液为流动相,在 ODS 柱上能完全分离 (Gly)₄, Val-Val, P_{Glu}-His-ProNH₂ 和 Ala-Gly-Gly 等几个小肽。

从图 2 可见, TRH、Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala 和 LRH 在 ODS 柱上,以含 50% 甲醇的 0.1% 磷酸水溶液为流动相能得到完全分离。

甲硫氨酸-内啡肽 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) 和亮氨酸-内啡肽 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) 在结构上只有一个氨基酸不同,它们在 ODS 柱上(以含 20% 甲醇的 0.02% 三氟乙酸为流动相)的保留时间分别为 38 分和 52 分。分离得非常好。

上述例子说明,用三氟乙酸和磷酸为亲水

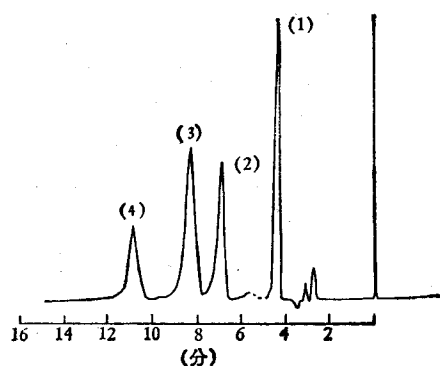


图1 三氟乙酸体系分离多肽

柱: 4.5×200 毫米不锈钢柱; 固定相: YWG- C_{18} $10\mu m$; 流动相: 甲醇: 0.02% 三氟乙酸水溶液 (pH 2.55) = 20: 80V/V; 流速: 1 毫升/分; 柱压: 60 公斤/厘米²; 纸速: 5 毫米/分; 检测: UV210nm $\times 0.08a$, u. f. s; 样品: (1) (Gly)₄ 1.2 微克 (2) Val-Val 0.58 微克 (3) PGLu-His-ProNH₂ 0.48 微克 (4) Ala-Gly-Gly 1.9 微克。

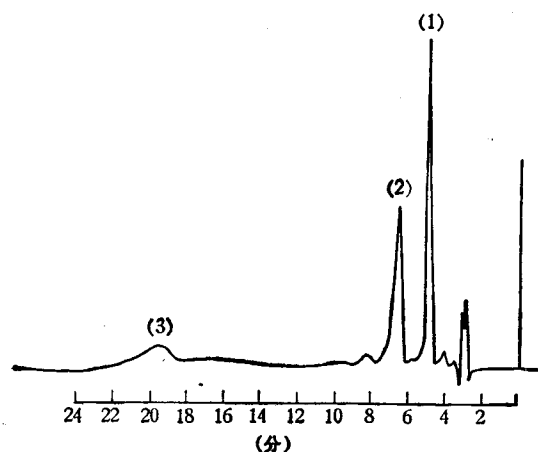


图2 磷酸体系分离多肽

柱: 4.5×250 毫米不锈钢柱; 固定相: YWG- C_{18} $10\mu m$; 流动相: 甲醇: 0.1% 磷酸水溶液 (pH = 2.28) = 1:1 V/V; 流速: 1 毫升/分; 柱压: 75 公斤/厘米²; 纸速: 5 毫米/分; 检测: UV220nm $\times 0.04a$, u. f. s; 样品: (1) TRH (PGLu-His-ProNH₂); (2) Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala; (3) LRH (PGLu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly CONH₂)₂。

性离子对试剂, 反相高效液相色谱分离多肽是有效的。

3. 应用:

(1) 图3是胰岛素B链C端用胃蛋白酶限制性酶解的产物, 主要是五肽 Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala, 含有少量六肽 Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala, 说明胃蛋白酶切割得较好。

(2) 图4和5分别表示, 经过实验室多次

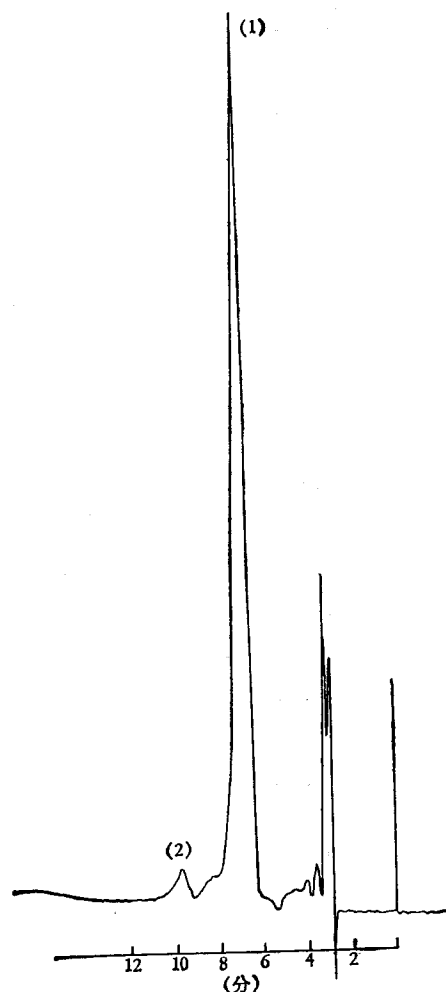


图3 Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala 的分离

色谱条件同图2 样品:

1. Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala 2. Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

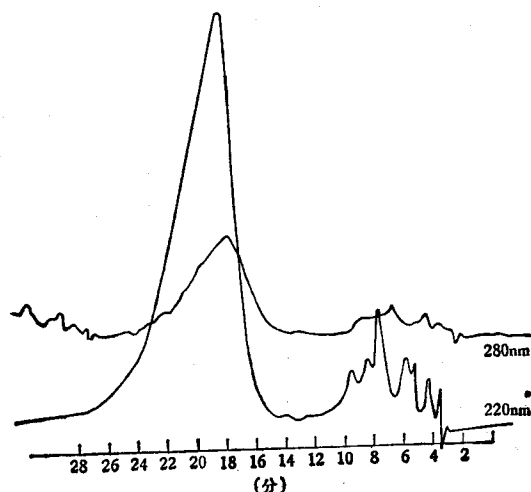


图4 层柱纯 LRH 的 HPLC 图

检测: UV220nm $\times 0.16$; UV280nm $\times 0.16$; 样品: 层柱纯 LRH; 进样量: 30 微克; 其它色谱条件同图2。

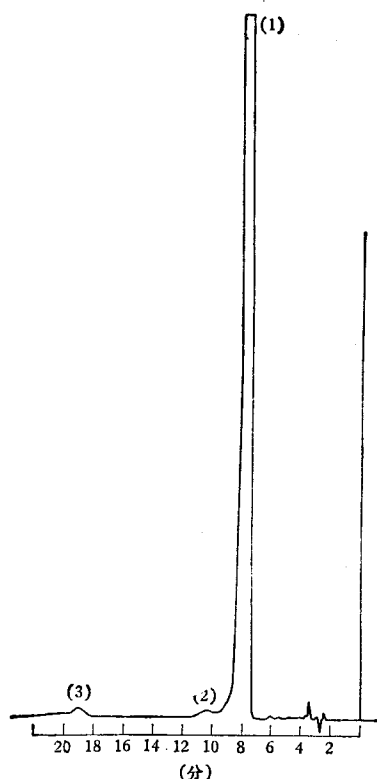


图5 结晶纯 PGlu-HisOH 的 HPLC 图

流动相: 甲醇: 0.05% 三氟乙酸水溶液 (pH2.48) 20: 80V/V; 流速: 1.2毫升/分; 检测: UV210nm×0.08a; 样品: PGlu-HisOH, 2.5 微克。

z

其它色谱条件同图 1。

柱层纯化或结晶的 LRH 和 PGlu-HisOH 在高效液相色谱上分离,有些仍可分出不少杂质。所以,高效液相色谱是有效的纯化方法。

(3) 图 6 是 LRH 商品的色谱图,它含较多杂质。图 7 是实验室制备的 TRH 粗品的色谱图。说明本文所用的方法可作为合成多肽过程及其最后产品的检测手段。

(4) 在内径 4.5 毫米柱上制备某些多肽,每次进样量五百微克,分离能力并不降低。收率大于 75%。在研究激素时,用这样的制备量重复几次就可得到足够的样品量供活性试验用。

4. 讨论:

本文所采用的三氟乙酸和磷酸亲水性离子对试剂,除分离效果好外,它们在低紫外区均无

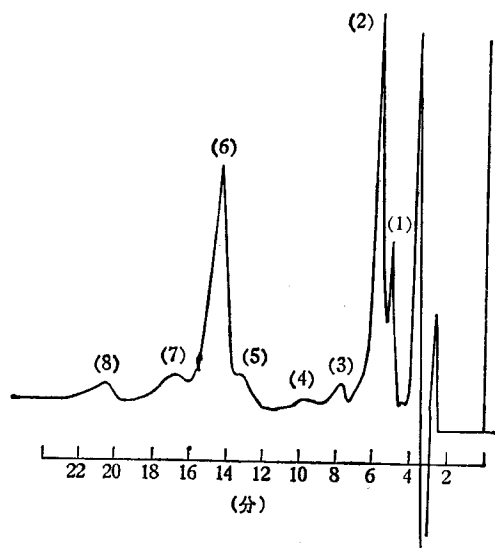


图6 商品 LRH 的 HPLC 图

柱: 4.5×250 毫米不锈钢柱;其它色谱条件同图 1。
样品: LRH 粗品;(8)号峰是 LRH,其它都是杂质。

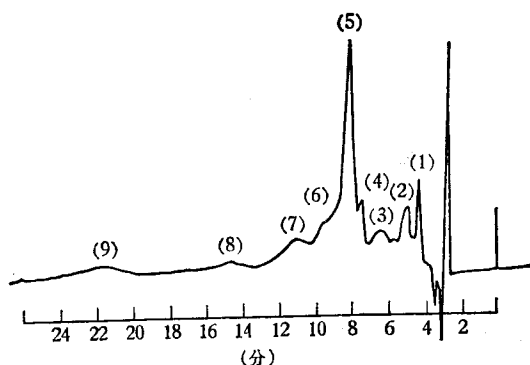


图7 TRH 粗品的 HPLC 分离

柱: 4.5×250 毫米不锈钢柱;其它条件同图 1。
样品: TRH 粗品;5 号峰是 TRH,其它都是杂质。

吸收,可在 210—220nm 检测,以提高灵敏度。特别需要指出的是,对于有些在 254nm 和 280 nm 均无吸收的多肽(如 TRH),采用这两个体系更显出其优越性。三氟乙酸易于挥发,用低温干燥就可以完全去除。便于产品进一步生物测定和结构鉴定。磷酸虽不易挥发,但对生物测定没有影响。

游源英、廖方正、曹泳清、董明辉和王志珍等同志提供合成多肽样品,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Hearn, M. T. W., *J. Liquid Chrom.*, **3**, 1255, 1980.
[2] Krummen, K., *J. Liquid Chrom.*, **3**, 1243, 1980.
[3] Bishop, C. A. et al.: *J. Liquid Chrom.*, **4**, 661, 1981; 599, 1981.
[4] Hearn, M. T. W. et al.: *J. Liquid Chrom.*, **4**, 1725, 1981; **4**, 1745, 1981.
[5] Medermott, J. R.: *J. Chrom.*, **222**, 371, 1981.
[6] Gyula Vigh, *J. Chrom.*, **236**, 51, 1982.
[7] Kemp, M. C., *J. Liquid Chrom.*, **4**, 587, 1981.
[8] Patricia Stricker, M., *J. Liquid Chrom.*, **4**, 1765, 1981.
[9] Bohlen, P.: *J. Chrom.*, **205**, 65, 1981.
[10] Bishop, C. A., *J. Chrom.*, **192**, 222, 1980.
[11] Ohare, M. J., *J. Chrom.*, **171**, 209, 1979.
[12] Rivier, J. E., *J. Liquid Chrom.*, **1**, 343, 1978.

〔本文于1983年2月23日收到〕

高灵敏度($10^{-15}M$)的 cGMP 放射免疫测定法

——A 蛋白 为 分 离 试 剂

贺师鹏 葛韵琴 张孙曦 魏莫愁

(北京医学院生物物理教研室)

1972 年 Steiner 首次创立了 cAMP 及 cGMP 的放射免疫测定法^[1],接着 Cailla^[2]及 Brooker^[3]先后又建立了 cAMP 的琥珀酰化及 cGMP 的乙酰化方法,因此把测量灵敏度提高了 40—100 倍,使 cGMP 的测量灵敏度达到 $10^{-15}M$ 水平。用这种方法能成功地测量某些 cGMP 含量极低的生物样品,如肝细胞,脂肪细胞等。

本文详细报道 cGMP 的抗血清, ^{125}I -TME-ScGMP 的制备,以及用 A 蛋白做分离剂的 cGMP 的放射免疫测定方法。

材 料 和 试 剂

(1) cGMP, ScGMP, TME-ScGMP。(2) EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl Carbodiimide-HCl)。(3) 反应缓冲液: 50 mM, pH 4.75 醋酸钠缓冲液(内含 4mM EDTA)。(4) T. N. E. T. 缓冲液(50mM pH7.4 tris-HCl 缓冲液, 0.9% NaCl, 50mM E. D. T. A., 0.02% NaN_3 , 0.05% Triton X-100)。(5) 5% A 蛋白: 每支干品(上海生研所产品),用 2ml T. N. E. T. 缓冲液悬浮, 3000r.p.m 离心 10 分钟,弃上清,沉淀再用 2ml T. N. E. T. 缓冲液洗一

次。最后将沉淀悬浮在 6ml T. N. E. T. 缓冲液(内含 2mg BSA/ml T. N. E. T.) 中。

方 法 和 结 果

一、免疫抗原 (BSA-ScGMP) 的合成

依 Steiner 方法^[4],将 50 mg ScGMP 溶于 3ml 蒸馏水中,用 $0.2M Na_2HPO_4$ 调 pH 至 5.4,然后加 100mg BSA,使其全溶。速加 50mg EDC,不断搅拌,此时溶液 pH 为 5.8,小心用 $0.2M Na H_2PO_4$ 调 pH 至 5.4。将反应液在室温暗处放 18 小时后再装入透析袋内,冰箱透析 48 小时。透析液是 10mM pH7.4 的 pB 液(内含 0.15M NaCl)。透析期间更换几次透析液。透析完毕取出产品,分装,冷冻干燥后备用。

充分透析后的产品,再过 Sephadex-G 25 柱,流出液只出现一个蛋白峰,无小分子峰。将透析产品和柱层析产品分别做紫外吸收曲线,得图 1A、B。两产品的特征吸收光谱完全一样,产品具有 BSA, ScGMP 紫外吸收特性,又不同于 BSA 和 ScGMP,其中差异最显著的是最小吸收的波长,BSA 在 $2510 \text{ \AA}$, ScGMP 在 2220