

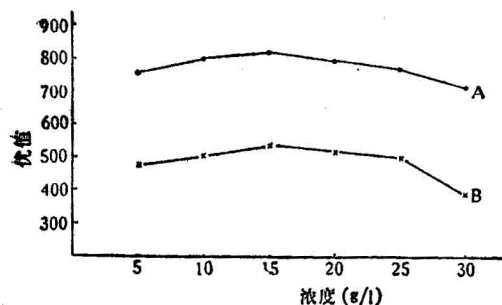


图4 最高优值点与 ppo 不同浓度的关系

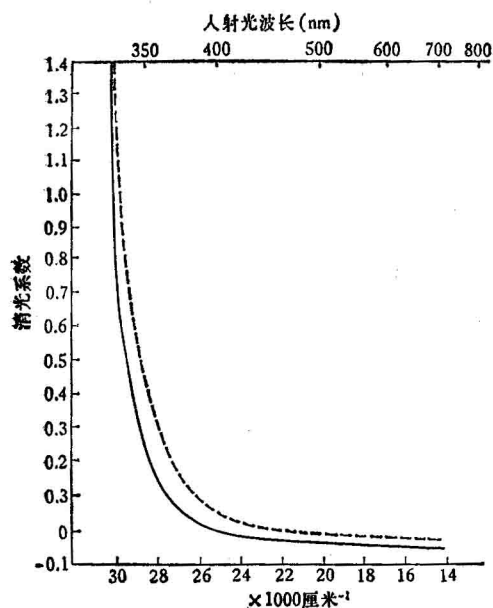


图5 op-115 和 Triton X-100 吸收光谱

---op-115 —Triton X-100

优值与 ppo 浓度的关系(图4)。

从图4可以看出,改变闪烁液中 ppo 的含量,对计数效率略有提高,但不明显。从经济效果和实验要求综合考虑,闪烁液中的 ppo 浓度一般用5克/升即可。

五、op-115 吸收光谱特性 闪烁剂的基本作用是从溶剂中吸收能量,发射有特征光谱的光子。因此,有必要测定 op-115 吸收光谱,鉴定它对闪烁剂所发出的特征光谱的吸收程度。

我们用由西德进口的紫外分光光度计在相同条件下对 op-115 和 Triton X-100 进行谱形分析,如图5所示,二者在可见近紫外波段内吸收光谱很相似。

小 结

1. 非离子型表面活性剂 op-115 与 Triton X-100 的性能指标很相似,可以作为液体闪烁计数的乳化剂。

2. 经我们及有关单位的测定,op-115 闪烁液的本底比 Triton X-100 高,这是由于化学发光所致,但随着混合液配置的时间延长会逐渐下降,24 小时后趋于稳定。在配制 op-115 闪烁液和制样时,应尽量避免阳光直射或日光照射。配好后最好不要马上测量,经一段时间的暗适应后使用较好。

3. op-115 略带微黄色,这对提高计数效率和对低水平测量有一定影响。今后应进一步研究有效的脱色工艺。

参 考 文 献

- [1] 孙耀琛、吴金水、张明融、王遗宝:《上海农业科技》,1980年,第1期,24—26页。
- [2] Fox, B. W.: *Techniques of Sample Preparation for Liquid Scintillation Counting*, p. 64, 1976.
- [3] Crook, M. A., Johnson, P.: *Liquid Scintillation Counting*, p. 202, 1974.
- [4] P. 贝歇尔著:《乳状液理论与实践》,1978年,8月。
- [5] 王云骏、华世豪:《用于液体闪烁技术的 op-115 的合成研究》,上海市农药研究所,1980年,6月。
- [6] 孙耀琛、吴金水、王遗宝:《非离子型表面活性剂 op-115 性能和指标》,上海农科院作物所,1980年。
- [7] 上海市农科院作物所:《非离子型表面活性剂 op-115 性能鉴定会资料汇编》,1980年,6月。

[本文于1980年7月9日收到]

乳 过 氧 化 物 酶 纤 维 素

徐 愤 丁国英 胡艾芳

(南 京 医 学 院)

乳过氧化物酶是蛋白质碘化工作中比较理想的试剂。Morrison 和 Hultquist^[1] 用 CG50-2 型树脂 (Na 型) 从乳汁中吸附过氧化物酶,再

依次用硫酸铵沉淀,CM-纤维素层析, Sephadex G100 层析等步骤,获得 A_{412}/A_{280} 比值为 0.9 的乳过氧化物酶。以后, Thorell 和 Johansson^[2]

用 CM-Sephadex 从乳汁中吸附过氧化物酶,再经硫酸铵分步沉淀和等电聚焦电泳纯化,得到 A_{412}/A_{280} 的比值为 0.8—0.9 的酶制品。David 和 Reisfeld^[3] 用 Sepharose 4B 为载体制备了固相乳过氧化物酶,并用于蛋白质的碘化标记。作者参照他们的工作,研制了一个分离乳过氧化物酶和制备其固相酶的方法。兹介绍如下:

1. 乳过氧化物酶的分离 新鲜牛奶 5 公斤,用等量蒸馏水稀释,加入 SE-Sephadex 10 克,用 0.1 NHCl 调整 pH 到 6.5,搅拌 4—5 小时(维持 pH 在 6.5)放置 4℃ 冰箱过夜,吸去上清液,收集底部的 SE-Sephadex 装进层析管中,用 0.01 M pH 6.5 磷酸钠缓冲液充分洗涤到滤出液澄清,再用 1 M NaCl (溶于 0.005 M 磷酸钠缓冲液 pH 7.5)洗脱。此时草绿色的过氧化物酶区带在洗脱液的前缘洗下。将有酶活性的各管溶液混和,依次对蒸馏水及 0.005 M 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5) 透析。此步所有酶溶液的 A_{412}/A_{280} 比值为 0.23—0.58。

将以上透析的粗酶溶液吸附在 SE-Sephadex

柱上,然后用 NaCl 浓度梯度洗脱,结果见图 1。根据加入样品的纯度,在 0.15 M—0.20 M NaCl 区间洗脱的酶溶液的 A_{412}/A_{280} 比值为 0.52—0.73,最高可达 0.82 以上。

将以上 SE-Sephadex 层析所得的酶溶液混和,对 pH7.5 的 0.005 M 磷酸钠缓冲液透析平衡后加在 DEAE 纤维素柱上(柱先用同样缓冲液平衡),再用盐浓度梯度洗脱。结果见图 2。所得酶溶液的 A_{412}/A_{280} 的比值为 0.70—0.80,最高可达 0.89。

2. 乳过氧化物酶纤维素 纤维素悬液的制备参照 Гурвич 的方法^[4] 先制备 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ^[5]。将结晶硫酸铜 13 克溶于 260 毫升水中,在沸水浴中搅拌滴加浓氨水(约 9 毫升)到上清液刚呈蓝色止,吸滤收集沉淀;用少量蒸馏水洗去沉淀中的母液。然后将所得的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 立即溶于

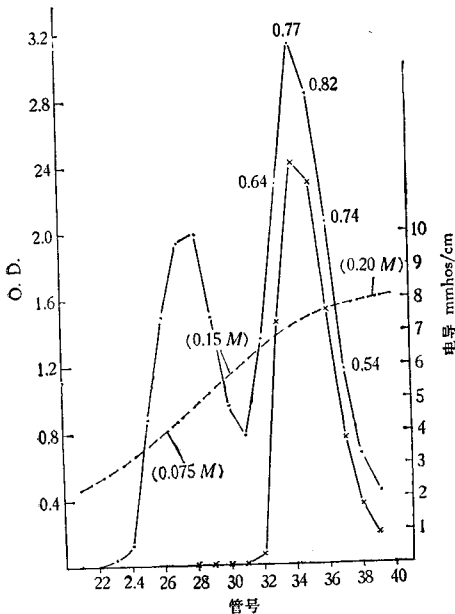


图 1 乳过氧化物酶的 SE-Sephadex 层析图谱
柱体积 140 毫升;样品 160 毫升,用含 0—0.6 M NaCl 的 0.005 M pH 6.5 磷酸缓冲液进行梯度洗脱;蛋白质浓度曲线上的数值指示该份溶液的 A_{412}/A_{280} 比值。O. D_{280} —·····; O. D_{412} —×—×—×; 电导——

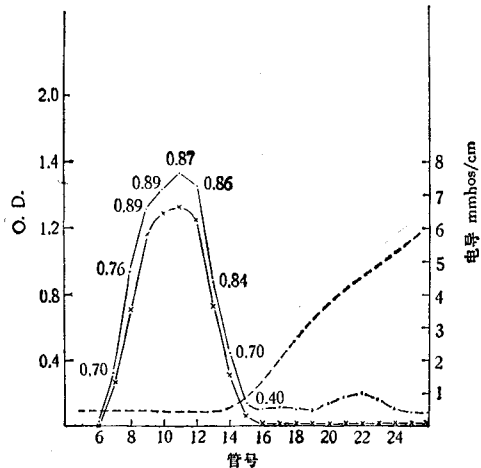


图 2 乳过氧化物酶的 DEAE 纤维素层析图谱
柱体积 100 毫升,样品 43 毫升,用含 0—0.6 M NaCl 的 0.005 M pH 7.5 磷酸钠缓冲液进行梯度洗脱,蛋白质浓度曲线上的数值表示该处洗脱液的 A_{412}/A_{280} 比值。O. D_{280} —·····, O. D_{412} —×—×—×, 电导——

120—150 毫升浓氨水中,再加入蔗糖 1 克和脱脂棉 3 克。待棉花溶解后,一边搅拌一边小心加入热水到 500 毫升,然后倾入到 4 升温水中,再加 15 升左右的水,放置;任纤维素下沉后吸去上清液。纤维素沉淀用 10% 硫酸中和,使混杂的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 溶解,离心,水洗,并用 0.1 M EDTA—钠溶液处理,再离心,水洗;将纤维素悬在蒸

表 1 人 IgG 的¹²⁵I 标记(乳过氧化物酶纤维素法)

样 品 号	1	2	3	4
乳过氧化物酶纤维素 1% 悬液	2 滴	2 滴	2 滴	2 滴
IgG 10 微克/10 微升	10微升	10微升	10微升	10微升
¹²⁵ I-NaI 0.25 毫居里/10 微升	10微升	10微升	10微升	10微升
*H ₂ O ₂ 2×10 ⁻⁴ M	10微升	—	—	—
*H ₂ O ₂ 2×10 ⁻³ M	—	10微升	10微升	10微升
▲分离后标记样品的计数 cpm	1,825,680	2,502,700	5,020,560	7,371,340

* 每次加 10 微升,中间间隔 10 分钟,反应总时间 30 分钟。

▲计数是用一般的井型探头测定,计数的样品量是原样品的 1/10,现已折算为总计数。

馏水中任其下沉。然后参照 Marsh 等^[6]的方法用 CNBr 活化。将所得的沉积纤维素(约 70 毫升),与 2 M Na₂CO₃, 140 毫升混合(pH11),然后在快速搅拌下加入溴化氰 6 克(溶于 6 毫升乙腈,临用前制备^[7]),反应混合物立即变成亮黄色;继续搅拌 5 分钟后,离心,吸去上清液。活化的纤维素依次用 0.1 M NaHCO₃ 蒸馏水, pH 7.5 磷酸盐缓冲液(0.01M 磷酸钠缓冲液—0.1 M NaCl)各洗二次后,悬在缓冲盐水中成 1% 悬液,加硫柳汞(1:10,000)防腐。存放在 4℃ 冰箱中。

乳过氧化物酶纤维素的制备系参照 David 和 Reisfeld 的条件^[3]。临用前取以上的活化纤维素悬液 2 毫升,用 pH 7.5 磷酸盐缓冲液洗净,最后吸去上清液,遗留纤维素悬液约 0.5 毫升,加 0.5% 乳过氧化物酶 100 微升,在冰浴中搅拌约 3 小时,离心,将纤维素用 pH7.5 磷酸盐缓

冲液洗三遍,然后悬在 5 毫升 pH8,0.2M 乙醇胺缓冲液中,在冰浴中搅拌 2 小时,再加 4℃ 放置过夜。用 0.1 M pH 7.5 磷酸盐缓冲液洗涤并悬成 2 毫升,存放 4℃ 待用。

表 1 是我们用自制的乳过氧化物酶纤维素进行 IgG ¹²⁵I 标记的结果。样品 4 的比强相当于 0.6 微居里/微克。

参 考 文 献

- [1] Morrison, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2847, 1963.
- [2] Thore, J. I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 363, 1971.
- [3] David, G. S. et al.: *Biochemistry*, **13**, 1014, 1974.
- [4] Гурвич, А. Е.: *Биохимия*, **26**, 934, 1961.
- [5] Von Ludwig Vanino: *Handbuch der Preparative Chemie*, Bd. 1, S503, 1925.
- [6] Marsh, S. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **60**, 149, 1974.
- [7] Blatt, A. H. (Ed.) *Organic Synthesis*, Col. Vol. 2, 104, 1955.

[本文于 1980 年 6 月 17 日收到]

《生物化学与生物物理学报》

增刊启事

为尽快发表研究成果,经批准,自今年下半年起,本学报由季刊改为双月刊,故将增加一期(13 卷第 5 期)。增发的一期不由邮局办理,改由本刊编辑部直接发行,特此启事增订及收费办法。

增刊一期拟于今年 11 月底出版,定价人民币 1.00 元。订购者(包括已向邮局办理今年全

年 13 卷 1—4 期的订户)请于 9 月底前,将订费由银行汇款(集体单位)或邮汇(私人订户)至上海市岳阳路 320 号中国科学院生化所《生物化学与生物物理学报》编辑部,并写明单位或个人的详细地址。报销收据将夹在增刊第 1 页一并寄上。

本刊 1982 年按双月刊出版,征订手续仍由邮局办理。

《生物化学与生物物理学报》编辑部

1981 年 3 月 19 日