

胞里的生化反应。但激素与受体以非共价键结合,在实验过程中会发生移位或因受体蛋白变性而失去与激素结合的能力,而且标记的激素往往不能检测出刚合成的受体,因为它们尚未获得与激素结合的能力。对于已经结合激素的受体同样不能检查出来,理想的检查受体蛋白的方法必须不受上述因素的影响。用常规方法免疫得到的抗雌二醇-受体复合物的抗体,虽然对雌激素受体是特异的,但又与各种被试动物的生殖组织和肿瘤中的雌激素受体反应,由于这种抗体的异质性,对研究受体结构和功能以及受体蛋白在细胞内的定位等带来一定困难。相反利用杂交瘤技术得到的抗雌激素受体蛋白的单克隆抗体特异性强,可以用于研究不同种属间受体蛋白的异同,以及受体分子的结构和功能^[10]。人雌激素受体的单克隆抗体可以用它分析乳腺癌病人的雌激素受体,作为癌症预后和治疗的指标。

杂交瘤技术也已经用于小分子抗原,例如胰岛素、胸腺血清因子 (FTS)^[11] 等。将合成的 FTS 接到载体蛋白上免疫小鼠,然后取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,得到抗 FTS 的单克隆抗体,它与其它胸腺肽——胸腺素、促胸腺素片断 (TP₁)、泛素等无交叉反应。利用它作为探针可研究 FTS 在组织中的分布,特别是胸腺中的分布,也可以做成免疫吸附柱纯化 FTS 分子,或做成放射免疫测定箱作临床观察用。由于单克隆抗体的均一性及无限产生的特点,作为一种试剂可以标准化,因此进行放射免疫测定所用的常规血清将逐步为单克隆抗体取代。

单克隆抗体的优点在某种意义上又成了它的缺点^[12],由于这种同质纯抗体只能识别免疫原上一个单一的位点,它们不能与大多数抗原形成复杂的网络,因此单克隆抗体不能用在以沉淀反应为基本原理的检测方法,如双扩散、免疫电泳等;单克隆抗体具有局限的生物活性、固定的亲和性,不能识别具有同样决定簇的不同抗原,因此对单克隆抗体来说这种交叉反应性是无法用吸收的办法除掉;它们的反应也更多地受 pH、温度、抗原/抗体比例等的影响。

单克隆抗体技术在生物化学中的应用还处于起始阶段,但已显示出某些其他方法所不能达到的优点。特别是在蛋白质结构和功能、细胞表面分子的研究中将成为一个特有的工具。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. et al.: *Nature*, **256**, 495, 1975.
- [2] Paul, A. W. Edwards et al.: *Biochem. J.*, **200** (1), 1, 1981.
- [3] 沈倍奋等:《内部资料》, 1982.
- [4] Aage Haugen et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4124, 1981.
- [5] David, S. Secher et al.: *Nature*, **285**, 446, 1980.
- [6] Goodall, A. H. et al.: *Blood*, **59** (3), 664, 1982.
- [7] William, J. Gullick et al.: *Biochemistry*, **20**, 2173, 1981.
- [8] Jon Lindstrom et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 1, 1981.
- [9] Shigeaki Tanaka et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, (14), 8386, 1982.
- [10] Geoffrey, L. Greene et al.: *J. Steroid Biochem.*, **16**, 353, 1982.
- [11] Ohga, K. et al.: *Clin. Exp. Immuno.*, **47** (3), 1982.
- [12] Joseph, M. Davie et al.: *Pharma. Rev.*, **34** (1), 115, 1982.

[本文于 1983 年 5 月 11 日收到]

固氮酶催化乙炔还原的色谱测定

蔡 玉 奎

(福建物质结构研究所, 福州)

一般认为 ¹⁵N₂ 同位素示踪技术是研究固氮作用最可靠的方法。Dilworth^[1] 1965 年发现乙炔也是固氮微生物的一种底物, 报道了巴

氏梭菌粗提液能还原乙炔为乙烯。Hardy 和 Knight^[2] 最先用氢火焰离子化气相色谱法测定了还原反应的产物。此后, 这一方法便成了研

究固氮活性的有效方法。由于气相色谱法较之 $^{15}\text{N}_2$ 同位素示踪法具有简单、迅速,灵敏等优点,并能适应江河、湖泊、土壤测定的需要,得到了广泛的应用。

(一)

在固氮研究中,无论是土壤肥力调查,固氮资源开发以及对于固氮酶分子水平的结构与功能,底物反应动力学等的研究,都是一项工作量大的测试工作,需要测定成千上百个样品。固氮工作者在选择气相色谱条件时常常主要考虑它的快速,希望在尽量短的时间内完成一次测定,往往只注意乙炔、乙烯的测定,例如选用异氰酸苯酯/硅胶柱^[3]或 β 、 β 、氧二丙腈/硅胶柱(图1),就是为了在适当的色谱条件下,在一分钟或半分钟内就可完成一个乙炔、乙烯样品的测定。而忽视了当柱温超过 40°C 时,出现的峰1是甲烷、乙烯、乙烷三个组份的集合。由于许多生物系统固氮酶的组份比较纯,加以酶催化的专一性,一般情况下,乙炔还原产物只有乙烯,因此峰1也只能是乙烯,在这种特定的条件下进行快速筛选大量样品是可取的。

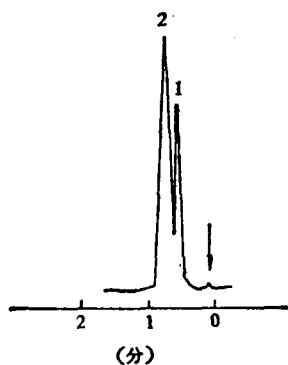


图 1

固定相: β 、 β 、氧二丙腈/硅胶 柱长: 2米 $\times$ 3毫米
柱温: 60°C 载气 N_2 , 20 毫升/分 检测器: 氢火焰
离子化 组份: 1. 甲烷、乙烯、乙烷 2. 乙炔

(二)

植物根际,土壤中的固氮微生物,以及陆地和海洋中的自生蓝藻等生态体系常常是比较复

杂的。测定渍水土壤异养固氮时,不同的土壤根际还原乙炔的能力不同,有些土壤有分解乙炔的现象,这可能是由于有分解乙炔的细菌在土壤和根际中栖息^[4],但分解乙炔生成什么?是有待研究的,用乙炔还原法研究固氮作用的工作者,用被还原的乙炔量按3.0的理论换算系数(被还原的乙炔/被固定的氮)估计固氮量。Hardy和Criswell等总结出各种固氮系统的平均系数约为3—4,但大部分土壤测定的系数比这个数值高,在灌水或嫌气条件下的土壤,可高达25^[5]。为此,在进行这些实验时必须注意 CH_4 与 C_2H_4 的分离,因为在沼泽地渍水土壤中存在的沼气菌,它能产生甲烷。如果在考察这种土壤的固氮微生物时,不注意甲烷的分离,那么由沼气菌产生的甲烷固氮菌还原乙炔产生的乙烯,这两个色谱峰的重叠,可能得出乙炔还原量增高的结论。在进行化学模拟生物固氮的研究时,把固氮酶活性中心模型物与缺陷型的棕色固氮菌突变种 UW-45 组合,测定乙炔还原活性时,可能因为使用微量的有机溶剂(二甲亚砜、二甲基甲酰胺、N-甲基甲酰胺等),还原产物中常常产生大量甲烷,或试验用的乙炔原料气(无论来自钢瓶或由碳化钙发生)都含有微量的甲烷杂质,影响测定结果,因此必须十分重视甲烷的分离。目前国外多用 porapak-R 高分子微球柱^[6],国产则用 GDX-502 高分子微球^[7](图2),这两种固定相都能在柱温高于室温时分离上述三组份,从而避免了在某些情况下由于甲烷的干扰

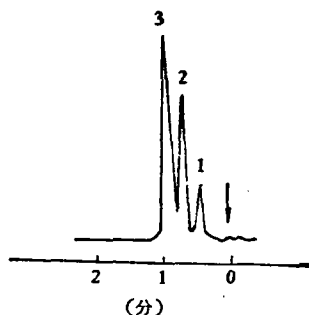


图 2

固定相: GDX-502 柱: 长2米 $\times$ 3毫米 柱温:
 40°C 载气: N_2 20毫升/分 检测器: 氢火焰离子化
组份: 1. 甲烷, 2. 乙烯、乙烷, 3. 乙炔

造成还原活性的假象。

(三)

近年来化学模拟生物固氮的研究十分活跃。钼酸钠的半胱氨酸络合物, 巯基化合物, 各种固氮酶活性中心的模型物, 以及我所在卢嘉锡教授指导下合成的钼铁硫网兜状原子簇化合物等, 在 NaBH_4 存在下都能催化乙炔还原为乙烯。这一体系常有少量副产物乙烷生成。因此测定这一体系的还原产物用以上的色谱柱均不准确, 因为这类色谱不能同时分离甲烷、乙烯、乙烷、乙炔等四组份。关于这四组份的色谱分离已有许多研究。Hardy 等^[8]曾用 20% 的乙基 N、N' 二甲基草酰胺, 涂于 100—120 目酸洗硅藻土的色谱柱, 分离这四组份, 但柱温要控制在 0°C , 而异腈酸丙脂/硅胶柱^[3], 在柱温 23°C 时, GDX-502 在柱温 26°C ^[7] 也可以达到同样的分离效果, 但这几种色谱柱要求低柱温, 而目前国产气相色谱仪还没有致冷装置, 低于室温的柱温较难控制。在高于室温时能分离这四组份的简易色谱柱有: Porapak-N^[9]、碳分子筛 (Carbosive)^[10]、国产碳多孔小球 TDX-01^[7]、1.5% Apiezon/氧化铝^[11] 等。其中 Porapak-N (图 3) 比较理想, 在 $60^\circ\text{—}90^\circ\text{C}$ 的柱温范围内选择适当的载气流量, 均可以使以上四组份得到很好的分离, 而且峰形对称, 重复性好; 乙烯峰比乙炔峰先出, 有利于微量乙烯的检出; 能在活性很低的固氮系统中灵敏地检出极微量的乙烯, 不致于因乙炔峰的拖尾而掩盖乙烯的检出。而碳分子筛、碳多孔小球 TDX-01 (图 4) 的出峰顺序相反; 乙炔峰先出, 乙烯后出, 适合于固氮活性极高的系统, 在大量乙烯存在下检出微量的乙炔。

乙炔还原的方法已成为固氮活性评价的普遍方法, 但乙炔被还原与氮被还原之间的关系是否平行, 活性中心是否一样, 都有待继续研究的。目前 $^{15}\text{N}_2$ 的还原仍是核对乙炔还原的根本方法。但由于 $^{15}\text{N}_2$ 同位素及质谱仪的昂贵, 而乙炔还原法在大量筛选调查固氮资源及研究固氮活性又有其优越性, 因此根据不同要求和实

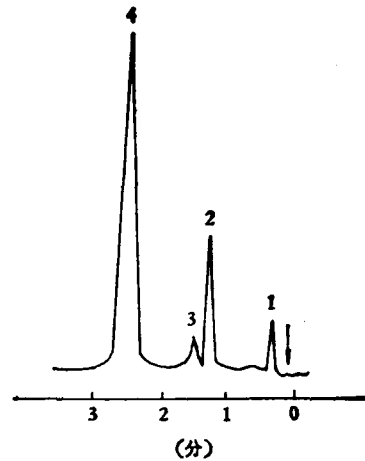


图 3

固定相: Porapak-N 柱尺寸: 2 米 $\times$ 3 毫米
柱温: 75°C 检测器: 氢火焰离子化
组份: 1. 甲烷, 2. 乙烯, 3. 乙烷, 4. 乙炔

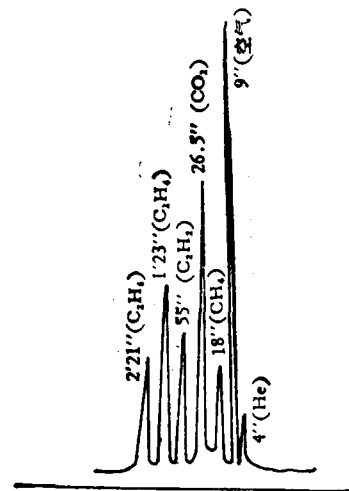


图 4

固定相: 碳多孔小球 TDX-01 (国产) (60/80 目)
柱尺寸: 0.5 米 $\times$ 3 毫米 柱温 191°C 载气: H_2 45
毫升/分 检测器: 热传导 桥流: 200 毫安

际工作条件, 选择适当的色谱柱以取得准确快速测定结果是必要的。

参 考 文 献

- [1] Dilworth, M. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 285, 1966.
- [2] Hardy, R. W. F. et al.: *J. Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 69, 1967.
- [3] N. L. James, et al.: *J. Chromatog. Sci.*, Vol. **8**, No. 8, 647, 1970.
- [4] Tatsuhiko matsuguchi (日): *Soil Science and Pla*

- nt Nutrition, Vol. 25, No. 3, 323, 1979.
- [5] A. Ayanaba, P. J. Bart.: *Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics*, 335, 1977.
- [6] J. R. Postgate: *method in microbiology*, Chapter VIII, 345, 1972.
- [7] 中国科学院化学研究所色谱组:《化学通报》, No. 3, 31, 1975.
- [8] Hardy, R. W. F. et al.: *Plant Physiol.*, 43, 1185,

1968.

- [9] 顾俭本等《植物生理学通讯》, No. 2, 50, 1982.
- [10] A. Zlatkis, H. R. et al.: *J. of Chromatographic Science*, Vol. 8, No. 7, 416, 1970.
- [11] 中国科学院大连化学物理研究所:《气相色谱法》, 第193—194页, 1978年科学出版社。

【本文于1983年6月14日收到】

RNA-DNA 杂交反应分析

陈建华

(上海同济大学医学系)

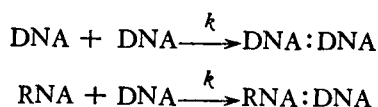
林元藻

(江西医学院宜春分院)

转录水平的调节是真核生物基因调控的主要方式,它对研究杂交反应有重要意义。RNA-DNA 杂交反应对于决定基因组中 DNA 序列和转录产物 RNA 的关系是很重要的手段。杂交体的形成有二种方式,即 DNA 驱动的反应和 RNA 驱动的反应,从中可以得到相互补充的信息。

一、DNA 驱动反应动力学

在 DNA 驱动反应中, DNA 是过剩的,而 RNA 是少量的,同时存在下列二种反应:



其中 k 是双分子反应常数,其大小由溶液的阴离子浓度、温度、核苷酸断片大小和 DNA 序列的复杂性决定。二种反应的 k 值实际上稍有差异,为简化计算可视为相同。单链 DNA 的减少速度如下:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^2 \quad (1)$$

C 是以每升中核苷酸的克分子数为单位 (mole/l) 的单链 DNA 的浓度, t 是杂交时间 (秒)。(1) 式积分,并代入初始值: $t = 0$, $C = C_0$ 得:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t} \quad (2)$$

或者

$$C = \frac{C_0}{1 + kC_0t} \quad (3)$$

$t = 0$ 时, DNA 全为单链,此时 C_0 是 DNA 总浓度。同样,单链 RNA 的减少速度为:

$$-\frac{dR}{dt} = kRC \quad (4)$$

R 是单链 RNA 的克分子浓度,将(3)式代入(4)式得:

$$-\frac{dR}{dt} = kR \left(\frac{C_0}{1 + kC_0t} \right)$$

或者

$$\frac{dR}{R} = -KC_0 \left(\frac{1}{1 + kC_0t} \right) dt$$

在 $t = 0$, $R = R_0$ 时,将上式积分得:

$$\ln \frac{R}{R_0} = \ln \frac{1}{1 + kC_0t}$$

即

$$\frac{R}{R_0} = \frac{1}{1 + kC_0t} \quad (5)$$

从(2)式和(5)式比较可知,在 DNA 过量的反应中, RNA 序列和 DNA 序列是以相同的速度杂交的。杂交速度仅依赖于 DNA 的起始浓度 C_0 ,故又可称之为 DNA 驱动的反应。分析 DNA 驱动的反应可得下列信息:

1. RNA 序列的 $C_0t_{1/2}$ 值表示 DNA 序列重复频率的类型

(2) 式中的 C/C_0 和(5)式中的 R/R_0 表