

$2 \times 10^8$  光单位/g 胶时,即  $4 \times 10^8$  光单位/g 胶,产生的光强度反而降低,即酶活性降低。可见当固定两种酶时,二者比例适当可提高酶的活性。

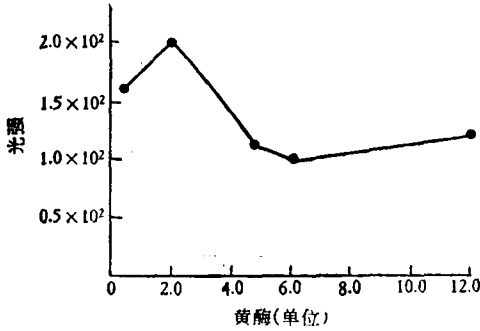


图3 荧光素酶浓度固定、黄酶量不同的偶联酶系统对发光分析的影响

荧光素酶浓度为  $2 \times 10^8$  光单位/g 胶, NADH 的量为  $10^{-12}M$ 。

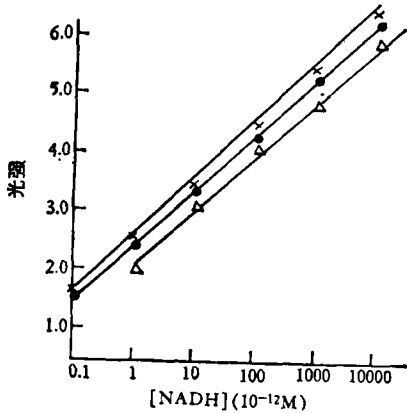


图4 黄酶浓度固定、不同荧光素酶浓度的偶联酶系统对发光分析的影响

荧光素酶浓度: ( $\Delta$ — $\Delta$ ),  $4 \times 10^7$  光单位/g 胶, ( $\times$ — $\times$ ):  $2 \times 10^8$  光单位/g 胶, ( $\bullet$ — $\bullet$ ):  $4 \times 10^8$  光单位/g 胶

## 四、结 论

细菌发光系统分析中,可将细菌荧光素酶、黄酶固定在 CNBr 活化的琼脂糖 4B 上, CNBr 的量以 100mg/g 琼脂糖胶效果最好。活化的琼脂糖 4B 与酶偶联,在  $22^\circ C$ , 2 小时条件下回收率以及酶活性均为最高。偶联过程加入一定量的 BSA 可防止酶的多位点结合以避免酶失活。当荧光素酶、黄酶同时固定在琼脂糖 4B 上成为偶联酶系统时,其浓度以每克琼脂糖  $4B 2 \times 10^8$  光单位荧光素酶、2 单位黄酶为最适条件。

本文承林克椿同志审阅,谨表谢意。

## 参 考 文 献

- [1] Philip, E. S.: In *Bioluminescence and Chemiluminescence* (eds. by Deluca, M. A. and McElvoy, W. D.), p. 275, Academic Press. New York, 1981.
- [2] Jeanne, F. et al.: *Analytical Biochemistry*, 110, 43, 1981.
- [3] Baldwin, T. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 250, 2763, 1975.
- [4] March, S. C. et al.: *Analytical Biochemistry*, 60, 149, 1974.
- [5] Jablonski, E. et al.: in *Methods in Enzymology*, V. 57 p. 202, Academic Press, New York, 1978.
- [6] Jerker, P.: In *Methods in Enzymology* V. 34, 13, 1974.
- [7] Jerker, P. et al.: in *Methods in Enzymology*, V. 44, 19, 1976.

【本文于1983年9月27日收到】

## 茶花蜂蜜中糖类的分析\*

竺安 贺玉珍 于海妮 沙逸仙

(中国科学院化学研究所,北京)

何慧珠

(中国科学院感光化学研究所,北京)

茶树是我国南方大面积种植的主要经济作物,花期长,流蜜量大,是晚秋的丰富蜜源之一,适于放养越冬蜂。我国有茶树两千万亩,油茶

树五千万亩,如都用来养蜂产蜜和王浆,将是一

\* 中国医学科学院天津血液研究所许丹枫、徐丽珠同志参加部分工作。

大资源。但长期以来由于蜜蜂幼虫食用茶花或油茶花蜜后成批死亡,给养蜂生产带来困难,使茶花蜜这一资源得不到充分利用。因此有必要查明茶花蜜(以下简称茶蜜)中使幼虫致死的成分。

蜂蜜的主要成分是糖类和水分,还有少量的矿物质,皂甙,维生素和生物碱等。糖类的分析以色谱法为主,包括气相色谱(GC)<sup>[1,2]</sup>、高效液相色谱(HPLC)<sup>[3,4]</sup>,以及薄层色谱(TLC)和纸色谱法<sup>[5,6]</sup>。Echigo等<sup>[7]</sup>用GC分离并鉴定了蜂蜜中的十一个糖组分。

Siddiqui等<sup>[8]</sup>用活性炭柱色谱和纸色谱,纸电泳法分离出至少10种双糖,又从另一种蜂蜜中分离并鉴定了十一种三糖<sup>[9]</sup>。1982年Mohamed等<sup>[10]</sup>分析利比亚蜂蜜,其中含有阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和棉子糖。

本文用HPLC,GC,活性炭柱色谱,纸色谱和质谱等方法对茶蜜(不包括油茶花蜜)进行分离和鉴定,确定了其中含有果糖,葡萄糖,三种双糖,以及棉子糖和水苏糖。三糖与四糖的含量特别高是它不同于寻常蜂蜜之处。(根据初步分析结果,油茶蜂蜜也具有这一特点,但三糖与四糖的含量与茶蜜不同。)用分离出的寡糖级分喂幼虫即使之死亡,而用单糖级分(包括皂甙和咖啡因)喂幼虫却能使生长正常。检验表明茶蜜没有明显毒性<sup>[11]</sup>。茶蜜用酸完全水解后得到葡萄糖、果糖和半乳糖,而市售蜂蜜以酸水解则只得前二者。如用半乳糖喂幼虫,其腹部饱胀<sup>[12]</sup>,则也造成死亡。棉子糖和水苏糖都含有半乳糖。所以引起幼虫死亡的原因是它们不能消化和利用茶蜜寡糖中的半乳糖,而不是含有其他毒素。半乳糖对人并无毒性,因此茶花蜂蜜是值得开发的资源。

## 一、实验方法

### 1. 仪器及主要试剂

高压液相色谱仪:美国LDC公司Constametric IIG型高压泵,Refracto Monitor示差折光检测器, $\phi 4 \times 150$ 毫米不锈钢柱,内填Polygosil 60-5NH<sub>2</sub>(西德Macherey-Nagel),粒度5微

米。

气相色谱仪 英国Pye-106型,氢焰离子化检测器,DP-80电子积分器。

荧光光谱仪 日立204A型。

无水乙醇、及肌醇等溶剂及一般试剂均为分析纯。

硼氢化钠、三氟乙酸(比利时Aldrich,分析试剂)。

葡萄糖(英国BDH);半乳糖(瑞士Fluka);棉子糖,水苏糖(荷兰Packard-Becker);2,3,4,6-四-O-甲基葡萄糖(西德Ferak)。

茶花蜂蜜、荆条蜂蜜、椴树蜂蜜(中国农业科学院养蜂研究所提供)。

固定液OV-225(美国Chrompack);ECNSS-M(美国Applied Science Laboratories)。

层析纸:Whatman 3号,28×30厘米。

### 2. 制备分离

a. 茶蜜糖结晶(I)的制备 10克茶蜜加20毫升无水乙醇,搅拌成糊状,倾出乙醇,重复此操作一次,最后加60毫升无水乙醇,用玻璃棒边搅边磨擦器壁,直到绝大部分蜂蜜成为固体粉末为止。减压抽滤后,用10毫升无水乙醇洗涤并抽干,得到白色粉末。置于有硅胶的保干器中继续减压抽干,得茶蜜结晶4.6克。

b. 茶蜜中寡糖的分离 茶蜜3克加6毫升水,滤去絮状物,滤液置于 $\phi 15 \times 300$ 毫米活性炭柱顶端,依次用水、5%及10%以上的乙醇洗脱,可分别得到单糖、双糖和三糖加四糖级分。后者浓缩成糖浆状以后,用无水乙醇使成白色粉末(II)析出,再用纸色谱分离。

c. 纸色谱 展开剂 正丁醇:吡啶:水=6:4:3。

显色剂 苯胺4毫升加二苯胺4克,加丙酮200毫升及85%磷酸30毫升。在纸上每隔2.5厘米点加若干II的水溶液,共10个点。在同一方向展开二次,展开距离约25—26厘米。晾干后,隔一定距离裁取窄条共3—4条,喷上显色剂,稍干后置于110℃烘箱中1至2分钟取出,根据显色斑点位置,裁下未显色纸上的三

糖及四糖部分,用水浸出并蒸干,得到三糖(III)和四糖(IV)级分。

### 3. 水解和衍生化

a. 茶蜜的水解 20 毫克茶蜜加 2 毫升 2N 硫酸,在 80℃ 水浴中加热 8 小时。冷却后,滤去棕黑色残渣,滤液用饱和氢氧化钡溶液中和至 pH 5—6,放置过夜,以 4000 转/分离心 20 分钟。吸出上清液,为清亮淡黄色,浓缩后供分析用。

级分 III 和 IV 的水解是在 0.5N 三氟乙酸中于 100℃ 加热 40 分钟。

b. 全甲基化 按照 Hakomori<sup>[13]</sup> 方法,用 dimsyl 阴离子试剂和碘甲烷使糖分子上的羟基全部甲基化。III, IV 和标准寡糖的用量为 2—4 毫克。

c. 甲基化寡糖的水解 3b 的产物加 2N 三氟乙酸 0.4 毫升,封于玻璃管中,在 110℃ 加热 2 小时。冷却后开封管,用氮气吹干。

d. 还原 3c 的产物加入约 5 毫克硼氢化钠及 0.5 毫升 1N 氨水,再加蒸馏水至总体积为 1 毫升左右。在室温下反应 1 小时,然后在 50℃ 水浴中反应 40 分钟。滴加冰乙酸至反应终止(无气泡发生)。加入 1 毫升无水甲醇,在 50℃ 水浴上通干燥氮气吹干。重复此操作四次,以除尽硼酸。

e. 乙酰化 3d 的产物加入约 1 毫升乙酸酐,封管,110℃ 反应 3 小时。冷却并打开封管后在 50℃ 水浴加热并以氮气吹干。用二氯甲烷溶解,生成物供色谱分析用。

### 4. 分析测定

a. 液相色谱 流动相:乙腈:水=65:35,流速 1.0 毫升/分,分析寡糖。

b. 液相色谱 流动相:乙腈:水=83:17,流速 0.8 毫升/分,分析单糖。

c. 气相色谱 固定相 3% ECNSS-M/Chromosorb W AW DMCS,80—100 目。柱温 190℃,气化温度 300℃,检测温度 250℃。

d. 定量 HPLC 用外标法按峰高定量。GC 用积分器测量峰面积。用内标法定量,以肌醇为内标。

## 二、结果与讨论

### 1. 茶蜜及其水解产物的分析

a. 纸色谱:分离结果见表 1。

表 1 茶蜜纸色谱的 R<sub>f</sub> 值

|       | 果糖   | 葡萄糖  | 半乳糖               | 棉子糖  | 水苏糖  |
|-------|------|------|-------------------|------|------|
| 标准物   | 0.62 | 0.58 | 0.53              | 0.28 | 0.14 |
| 茶蜜中组分 | 0.63 | 0.59 | 0.52* 0.48* 0.37* | 0.29 | 0.14 |

\* 以下的实验证明这些是双糖,而不是半乳糖

从显色深度可知茶蜜中含有较多的三糖与四糖。

b. HPLC (4a), 优质蜜如荆条蜜只有单糖和双糖,茶蜜中含有三种双糖,但量很少,而有较多的三糖与四糖。

HPLC (4b) 表明茶蜜中的单糖组分为果糖和葡萄糖,但水解后则出现了半乳糖,表明半乳

表 2 蜂蜜分析结果(重量%)

| HPLC 条件<br>类型 | 4a   |      |     |     | 4b    |       |      |     |     |
|---------------|------|------|-----|-----|-------|-------|------|-----|-----|
|               | 含量 % | 组成 % | 单糖  | 双糖  | 三糖    | 四糖    | 果糖   | 葡萄糖 | 半乳糖 |
| 茶蜜            | 43.7 | 少量   | 5.5 | 8.7 | 25.6* | 16.0* | —    |     |     |
| 椴树蜜           | 75   | 未定量  | —   | —   |       |       |      |     |     |
| 市售蜜           | 68   | 未定量  | —   | —   |       |       |      |     |     |
| 茶蜜水解物         |      |      |     |     | 16.9  | 32.3  | 15.0 |     |     |

以茶蜜量为 100%

\* 因在两种不同的条件下测定,所以果糖加葡萄糖的量与总单糖量略有差别。

表 3 蜂蜜完全水解后的单糖组成分析

| 蜂蜜  | 测定方法 | 单糖百分含量* |      |      |      |
|-----|------|---------|------|------|------|
|     |      | 果糖      | 葡萄糖  | 半乳糖  | 合计   |
| I   | GC   | 17.5    | 31   | 14.6 | 63.1 |
| I   | HPLC | 16.9    | 32.3 | 15.0 | 64.2 |
| 荆条蜜 | HPLC | 51.0    | 30.4 | —    | 81.4 |
| 椴树蜜 | HPLC | 42.2    | 38.8 | —    | 81.0 |

\* 以水解前蜂蜜的量为 100%。

糖仅存在于寡糖中,定量结果见表 2。

c. 茶蜜水解物的 GC 茶蜜经水解(3a)并还原(3d)及乙酰化(3e)后,用 GC(4c)测定。

GC 分析结果与 HPLC 分析结果符合很好(表 3)。

果糖还原后生成葡糖醇和甘露糖醇,因此需要区分原有的与新生成的葡糖醇,并在定量时予以校正。

根据 HPLC, GC 和纸色谱的结果,可以认为对单糖的鉴定是可靠的。

d. 纸色谱点样 蜂蜜很粘,点样十分困难。经活性炭柱分离得到的粉末状级分 II 的水溶液则可以方便地在一张纸上一次点样 100 毫克。经分离后可得 III 约几毫克,IV 约十几毫克。

## 2. 三糖和四糖的鉴定

从茶蜜离析的 III 和 IV 在 HPLC 显示为单峰,其保留时间与直接分析茶蜜时(条件 4a)的相应组分一致。经过 3a 或 3c 条件水解后, HPLC 分析的结果都是含有 Fru, Glc 和 Gal。经与棉子糖和水苏糖的水解产物对照后,可以判断 III 的组成是 1Fru, 1Glc, 1Gal, 而 IV 的组成是 1Fru, 1Glc 和 2Gal。

将 III, IV, 棉子糖和 2, 3, 4, 6-四-O-甲基葡萄糖和 2, 3, 4, 6-四-O-甲基半乳糖经甲基化,水解和乙酰化(后二者不经甲基化)后, GC 分析结果见表 4。

从表上的结果可以初步判断 III 的结构是 Gal 1 → 6 Glc 1 → 2 Fru (棉子糖),而 IV 的结构是: Gal 1 → 6 Gal 1 → 6 Glc 1 → 2 Fru (水苏糖)。

$\alpha = 0.59$  峰比  $\alpha = 0.72$  峰还大,棉子糖也是如此。表中 2, 3, 5-Fuc 是否因衍生过程中发生副反应而来还有待研究。

组分 IV 与水苏糖的快原子轰击质谱(FAB-MS)分析结果见表 5。

由表可知,IV 的主要质谱峰的质量数与水苏糖是完全一致的,但相对强度偏高。

以上结果表明,茶花蜂蜜中含有较大的棉子糖与水苏糖。这两种富含半乳糖的寡糖是

表 4 甲基化乙酰化糖的主要 GC 峰相对保留值  $\alpha$

| $\alpha$ / 糖 | 棉子糖   | III*  | IV    | 文献值 <sup>[14]</sup> | 推断结构               |
|--------------|-------|-------|-------|---------------------|--------------------|
| 峰 1          | 0.588 | 0.625 | 0.594 | 0.59                | 2,3,5-Fuc          |
| 2            | 0.746 | 0.802 | 0.755 | 0.72                | 1,3,4,6-Glc (+Man) |
| 3            | 1.27  | 1.32  | 1.24  | 1.24                | 2,3,4,6-Gal        |
| 4            | 2.46  | 2.56  | 2.41  | 2.44                | 2,3,4-Glc          |
| 5            |       |       | 3.30  | 3.31                | 2,3,4-Gal          |

色谱条件: 4c; 死时间(甲烷) 17 秒;以 2, 3, 4, 6-G/c 的净保留时间 323 秒为 1.00

\* 由于色谱仪的温度控制器突然控制精度下降, III 的各组分保留时间都略有加长。

表 5 水苏糖及 IV 的快原子轰击质谱

| m/c | 判 断                     | 相对强度 |      |
|-----|-------------------------|------|------|
|     |                         | 水苏糖  | IV   |
| 667 | 4X + H                  | 8.8  | 17.5 |
| 649 | 4X + H-H <sub>2</sub> O | 1.8  |      |
| 505 | 3X + H                  | 37   | 70   |
| 487 | 3X + H-H <sub>2</sub> O | 11.2 | 16.9 |
| 343 | 2X + H                  | 10.8 | 22.7 |
| 325 | 2X + H-H <sub>2</sub> O | 36.4 | 57   |
| 163 | X + H-H <sub>2</sub> O  | 100  | 100  |

注: X 为己糖残基, 4X 表示四糖, 3X 表示三糖, 依此类推。nX 的分子质量数为  $m = 180n - 18 (n - 1)$ 。

使蜜蜂幼虫致死的因素。水苏糖存在于蜂蜜中过去还未曾见有报道<sup>[15-19]</sup>。

致谢: 中国农业科学院养蜂研究所提供蜂蜜样品并提出有益的建议; 本所英新芳同志帮助测定甲基化糖的红外光谱, 在此深表谢意。

本文所用缩略符号

Glc: 葡萄糖或葡萄糖醇;

Gal: 半乳糖或半乳糖醇;

Fru: 果糖;

Man: 甘露糖或甘露糖醇;

Fuc: 夫糖;

2, 3, 4-Glc 2, 3, 4-三-O-甲基葡萄糖(乙酸酯), 并依此类推。

## 参 考 文 献

- [1] Lehnherdt, W. F.: *J. Chromatog.*, **34**, 471, 1968.
- [2] Albersheim, P. et al.: *Carbohydr. Res.*, **5**, 340, 1967.
- [3] Yasui, Takeshi et al.:  
«日本食品工业学会志», **27**, 358, 1980.
- [4] Linder, J. C. et al.: *J. Chromatog.*, **105**, 125, 1975.
- [5] Lee, K. Y. et al.: *ibid.*, **174**, 187, 1979.
- [6] Quach, R.: et al.: *ibid.*, **174**, 195, 1979.
- [7] Echigo, Takashi et al.: *Tamagawa Daigaku Noga-kubu Kenkyu Hokoku*, No. 9, 115, 1970.
- [8] Siddiqui, I. R. et al.: *J. Apicult. Res.*, **6**, 139, 1967.
- [9] idem, **7**, 51, 1968.
- [10] Mohamed, M. A. et al.: *J. Food Qual.*, **4**, 185, 1982.
- [11] 范正友等: «蜜蜂茶花蜜中毒原因及其防治措施的初步报告», 全国蜜蜂茶花蜜中毒学术讨论会论文, 1982年6月, 杭州。
- [12] 中国农业科学院养蜂研究所: 未发表材料。
- [13] Hakomori, S.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205, 1964.
- [14] Janssen, P. E.: *J. Chem. Commun (Arrhenius Laboratory, Stockholm)*, **8**, 21, 1976.
- [15] Siddiqui, I. R.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **25**, 285, 1970.
- [16] Borukh, I. F. et al.: *C. A.* **85**: 76514W, 1976.
- [17] Marletto, F. et al.: *Apic. Mod.*, **70**, **35**, 1979, *C. A.* **91**: 106746S, 1979.
- [18] Lombard, A.: *C. A.* **91**, 87721, 1979.

[本文于1983年9月2日收到]

# 羊垂体促黄体素 (LH) mRNA 在兔网织红红细胞溶胞物系统中翻译的研究

曹泳清 王 宾 叶良素·陈幼珍

(中国科学院动物研究所内分泌室, 北京)

高等哺乳动物垂体前叶合成并分泌两种与生殖有密切关系的激素, 它们是促黄体素(LH)和促滤泡素(FSH)。其合成一方面受丘脑下部促黄体素释放激素(LH-RH)的控制, 同时也受性甾体激素的控制。例如雌二醇主要是控制促性腺激素的 $\beta$ -亚单位的合成<sup>[1]</sup>。近年来有人报道<sup>[2]</sup>, 用 Sephadex G-100 纯化 LH, 发现有分子量超过 100,000 的具有 LH 免疫结合活性的大分子, 并且在血液中也有分子量大于 32,000 的 LH 分子。本研究采用正交试验法, 建立了羊垂体 LH mRNA 体外蛋白质翻译系统, 并对其翻译产物作了鉴定, 实验结果表明, 在翻译产物中除了分子量为 32,000 的 LH 分子外, 也有分子量超过 100,000 的 LH 分子。

## 一、材料和方法

### 1. 材料 羊垂体(冬季屠宰时摘取), 用液

氮冷冻, 在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。<sup>35</sup>S-甲硫氨酸和 <sup>14</sup>C-标准蛋白是 Amersham 产品; 小球菌核酸酶 15,000 单位/ml; 蛋白 A (Staphylo-coccus aureus) BRL 产品; Oligo d(T) 纤维素 Sigma 产品; X 光感光胶片(天津市感光胶片厂产品)。

**2. 羊垂体多聚(A) RNA 的分离** 羊垂体总 RNA 的制备用 SDS-酚法<sup>[3]</sup>稍加改进, 即以冷冻的 10 克组织, 加适当比例的溶液 I (0.5% SDS, 0.025M Na<sub>2</sub> EDTA, 0.075M NaCl 调 pH 至 8.0) 和溶液 II (用溶液 I 饱和酚并调 pH 至 8), 室温打碎并匀浆 2 分钟。将提取所得总 RNA 经 Oligo d(T) 柱 2 次层析<sup>[4]</sup>, 收集第 2 峰即为多聚(A) RNA。

**3. 兔网织红细胞溶胞物的制备**<sup>[5]</sup> 选用 2.5—2.7 公斤年青公兔, 每天注射盐酸苯胍 25mg/只, 共 4 天, 使兔贫血, 分离出血球并使其破裂; 将放出的溶胞物分装收集, 保存于