

表1 光阑直径的标定

序号	显微光度法	万能工具显微镜法	序号	显微光度法	万能工具显微镜法
	相对直径(平均值 $\pm$ S.D.)	相对直径(平均值 $\pm$ S.D.)		相对直径(平均值 $\pm$ S.D.)	相对直径(平均值 $\pm$ S.D.)
1	30.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.31	9	10.89 $\pm$ 0.02	11.02 $\pm$ 0.04
2	25.66 $\pm$ 0.08	25.67 $\pm$ 0.09	10	9.98 $\pm$ 0.02	10.11 $\pm$ 0.04
3	21.74 $\pm$ 0.01	21.71 $\pm$ 0.00	11	9.26 $\pm$ 0.03	9.45 $\pm$ 0.00
4	17.80 $\pm$ 0.04	17.80 $\pm$ 0.07	12	8.18 $\pm$ 0.02	8.29 $\pm$ 0.04
5	15.39 $\pm$ 0.05	15.56 $\pm$ 0.11	13	7.37 $\pm$ 0.01	7.45 $\pm$ 0.00
6	13.67 $\pm$ 0.03	13.62 $\pm$ 0.00	14	6.27 $\pm$ 0.02	6.36 $\pm$ 0.00
7	12.56 $\pm$ 0.02	12.68 $\pm$ 0.04	15	5.67 $\pm$ 0.00	5.69 $\pm$ 0.04
8	11.84 $\pm$ 0.02	11.93 $\pm$ 0.04	16	4.67 $\pm$ 0.01	4.72 $\pm$ 0.00

表2 两种光阑测量结果比较

使用者	虹彩式光阑			固定式光阑		
	相对质量(KM)	标准差(S.D.)	相对标准差(C.V.)	相对质量(KM)	标准差(S.D.)	相对标准差(C.V.)
甲	20.55	1.08	5.26	20.69	0.41	1.98
乙	20.43	1.58	7.73	20.69	0.41	1.98

两种方法:(1)用精密万能工具显微镜测定光孔直径及其椭圆度;(2)用显微光度计测出各光阑下光通量的值,确定各光阑的面积之比及直径之比,就可求出其相对面积和相对直径(在测定细胞内物质相对质量时,可用相对面积代替实际面积)。必须注意保持在仪器量程范围内被测光强和仪器读数的线性关系,而且要调整好光路使最大测量光阑内的各部份照明光强和仪器读数都是均匀的。用以上两种方法测定16孔光阑的相对面积和相对直径,获得比较一致的结果(见表1)。

为了比较两种光阑对测量结果的影响,可以通过

甲、乙两人分别对同一个细胞测定50次,求得平均值、标准差、相对标准差。从表2可以看出:使用固定光阑时的相对标准差均小于使用彩虹式光阑的;从平均值看,用固定光阑时,甲乙两人测得的结果相同,但使用彩虹式光阑,其结果偏差较大。

由此可见,使用上述方法不但使光阑测量简便易行,而且可以较精确地测定出光阑的相对面积,有效地克服了在使用不同光阑时引起的系统误差,显著地提高了双区法、双波法在测量细胞内物质相对质量的准确度。

[本文于1984年4月11日收到]

一种简单而灵敏的蛋白质肽图分析方法

严家新 林 乔 王懋梁

(湖北省医学科学院病毒研究室,武汉)

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)已广泛用于多组分蛋白质体系的分离、纯化和分子量比较分析,而蛋白质肽图分析方法则能进一步在寡肽的水平上对蛋白质进行比较研究。部分揭示蛋白质氨基酸组成的异同。常规的肽图分析方

法所需样品量较大(n mole 或接近 mg 量)^[1,2],制备样品不仅步骤繁杂而且损耗量大,因而限制其广泛应用。1977年 Elder等^[3]对PAGE分离得到的凝胶小片中的蛋白质,直接用放射性碘标记,然后进行酶解、电泳-层析、放射自显影

而获得肽图。此法操作简便,灵敏度高,为微量级蛋白质的肽图分析提供了有效手段。

我们参照 Elder 等^[3] 方法,全部采用国产同位素、晶微纤维素薄膜和其他试剂、仪器,对甲型流感病毒粤防 77-38 株的血凝素(HA)和膜蛋白(MP)进行肽图分析。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 流感病毒 甲型流感病毒粤防 77-38 株接种于 10 日龄鸡胚尿囊腔,按 Skehel 等^[4] 方法增殖和纯化病毒,其蛋白含量约 0.3mg/ml。

(2) 电泳装置 垂直平板电泳槽(北京六一仪器厂产品);卧式平板电泳槽(浙江黄岩人民化工厂产品)。

(3) 同位素 Na^{125}I (北京原子能研究所产品,比活性 $>40 \text{ mCi/ml}$, 含还原剂 1 mg/ml)。

(4) γ -射线探测器 FH-408 型自动定标器和 FT-603 型 γ 射线井型闪烁探头(北京 261 厂产品)。

(5) 微晶纤维素薄膜, 20×20 厘米, 0.12 毫米厚(浙江黄岩人民化工厂产品)。

(6) 胰蛋白酶(上海生化所产品),经 $0.01N$ 盐酸预处理^[5]。其余化学试剂和溶剂均为分析纯。

2. 方法

(1) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 用 Laemmli^[6] 的不连续缓冲系统进行垂直平板电泳。分离胶浓度 10%, 浓缩胶浓度 3.6%, 凝胶厚 1mm。用于病毒结构多肽比较鉴定的样品液最终含 0.0625 M Tris-HCl(pH 6.8)、2% SDS, 5% β -巯基乙醇、10% 蔗糖和 0.001% 溴酚蓝。用于制备完整血凝素(HA)的样品,除不加 β -巯基乙醇外,其余成分完全相同。

(2) 蛋白质的 ^{125}I 标记 基本按 Elder 等^[3] 方法而略有修改。将染色后含 HA 和 MP 的凝胶小片分别用刀片切下,置于硅化试管中,先用 25% 异丙醇、后用 10% 甲醇充分洗去 SDS 和其他杂质。40—50℃ 烘干,依次加入下列试剂进行 ^{125}I 标记: 磷酸缓冲液 (0.5 M , pH 7.5)

$20 \mu\text{l}$, ^{125}I (45 mCi/ml) $10 \mu\text{l}$, 氯胺 T (3 mg/ml) $15 \mu\text{l}$ 。在 25℃ 左右反应 30—45 分钟,再加入偏重亚硫酸钠 (1 mg/ml) 0.5 ml 终止反应。15 分钟后,将凝胶小片移入塑料微量滴定板孔穴中;预先在孔穴周围钻许多小孔,并做成单个小吊篮;将小吊篮(连凝胶)依次放入盛有 10% 甲醇洗液的一排试管中,在每管中震荡 1—3 小时,直至洗液中 γ 射线强度低于凝胶中的 3% 时止。标记后的凝胶小片置硅化试管中于 40—50℃ 烘干待用。

(3) 标记蛋白质的酶解 将溶于 0.05 M NH_4HCO_3 缓冲液(pH 8.0)、浓度为 0.1 mg/ml 的胰蛋白酶 (>100 单位/mg) 0.5 ml , 加入盛有干燥标记凝胶的试管中, 37℃ 酶解 16—20 小时,取出上清液冻干。

(4) 蛋白质酶解肽段的分离 采用国产微晶纤维素薄膜,基本上按文献[2]方法操作。将酶解冻干样品溶于 $10—20 \mu\text{l}$ pH 4.4 电泳缓冲液中(吡啶:乙酸:丙酮:水 = 50:100:375:1975 V/V)。每次上样 $1—2 \mu\text{l}$ (约 $1 \times 10^5 \text{ cpm}$), 电压 400 V, 电流 15—20 mA, 通电 3 小时。电泳后,薄膜于 40—50℃ 烘干。第二相上行层析时间 5—6 小时(层析液为吡啶:正丁醇:乙酸:水 = 40:60:12:48, V/V)。层析结束后再将膜烘干,用 X 光片曝光 1—2 天进行放射自显影。

二、结果和讨论

1. SDS-PAGE 分离和纯化 HA 和 MP 将甲型流感病毒粤防 77-38 株结构多肽电泳图谱(图 1)与其他甲型流感病毒在 SDS-PAGE 系统中的电泳图谱^[4,7] 比较,可以确定各个结构多肽的位置。图 1 结果表明,HA 在还原条件下能断裂成 HA1 和 HA2; HA1 与 NA 等多肽的分子量很接近,HA2 和 MP 的分子量较接近。在非还原条件下,HA 不易断裂;完整 HA 以及 MP 与其他多肽间的区别都较大,电泳后形成的区带很容易彼此分开。因此,利用非还原条件下的 SDS-PAGE 可以得到含纯净 HA 和 MP 的凝胶小片,供 ^{125}I 标记用。

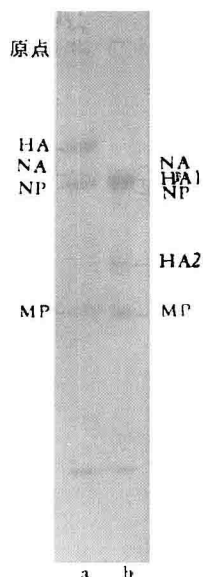


图1 粤防77-38流感病毒结构多肽的SDS-PAGE电泳图谱

2. 对凝胶上的蛋白质直接进行 ^{125}I 标记和胰蛋白酶酶解的效率 在上述的 ^{125}I 标记条件下, 被标记凝胶小片的 γ 射线强度一般为 $20-30 \times 10^6 \text{cpm}$, 比 Elder 等的相应结果要高。其酶解溶液冻干后的 γ 射线强度为 $12-20 \times 10^6 \text{cpm}$, 即凝胶中标记的蛋白质约有 60—70% 经酶解转入溶液, 其相对比例与 Elder 等^[3] 结果相似。

3. 粤防77-38流感病毒 HA 和 MP 的肽图 从图 2(a) 可见, 其中明确分辨的肽点约有 15 个。据类似毒株 HA 核苷酸序列分析的结果^[8] 推论, HA 基因含有 1,760 个核苷酸, 共编码约 570 个氨基酸。其中可被胰蛋白酶切割

的精氨酸和赖氨酸总共约有 54 个, 可被 ^{125}I 标记上的酪氨酸只有 20 个左右。由于酶解后个别肽段含有 2 个或 3 个酪氨酸, 最后只有 14—16 个肽段能被标记而显示出来。图 2(a) 所示的有很好重复性的结果与上述推论大体相符。

图 2(b) 为同一株病毒 MP 的 ^{125}I 标记肽图, 可明确分辨的肽点约有 5 个。从甲 3 型流感病毒 MP 核苷酸序列分析的结果^[9] 推论, MP 基因由 1,037 个核苷酸组成, 编码约 252 个氨基酸, 其中酪氨酸 5 个, 精氨酸和赖氨酸共约 30 个。经胰蛋白酶切割后仍应有 5 个肽点可显示出来。图 2(b) 的结果与此推论大体相符。

图 2(a) 和 2(b) 中都有 2—4 个额外的较模糊的斑点。据 Kroha 等^[10] 报道, ^{125}I 标记时, 在蛋白质对氯胺 T 的相对含量较低时, 其中组氨酸或苯丙氨酸可能有少量被标记上, 但标记的效率很低, 这可能是肽图上出现某些额外的模糊斑点的原因之一。

^{125}I 只能标记在酪氨酸上^[10], 凡不含酪氨酸的肽段用 ^{125}I 放射自显影法就无法显示出来, 因而本方法能分析的肽段数目比茚三酮法要少。但是换用切点不同的蛋白酶^[11], 或采用控制酶解条件的部分酶解法^[12], 可使肽点少的缺点得以克服。但这个缺点在某些情况下也是突出的优点^[13]: 例如在对分子量很大的蛋白质进行常规肽图分析时, 常常由于斑点太多而无法分辨, 而用 ^{125}I 标记的方法, 只让含酪氨酸的肽段显示

(下转第30页)

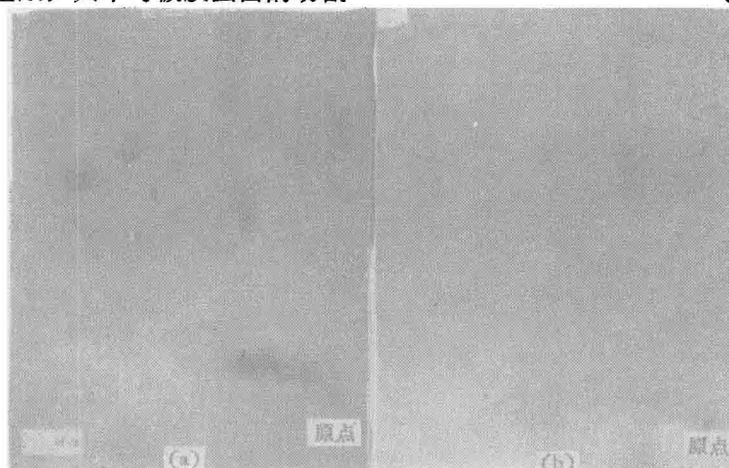


图2 甲型流感病毒粤防7738株的 ^{125}I 标记肽图

(a) HA 和 (b) MP

协同地发挥着抗脂质过氧化的作用(图4)。

此图只反映了 VE 作为自由基的清除剂的作用,而对其作为脂质过氧化作用的阻断剂的作用则未予表示。

因对 GSH-PX 的生化活性及它与有机过氧化物作用的研究大都限于简单的系统,而问题是发生在膜类脂疏水区的脂氢过氧化物如何被水溶性的 GSH-PX 系统还原。

Chiu 等 (1976)^[8] 在纯化酶的研究中根据 Se-GSH-PX 能与缬氨酸-琼脂糖相结合(疏水性结合),提出酶有一疏水区,以此解释 Se-GSH-PX 能接近膜的脂氢过氧化物。

最近 Purdy^[10] 研究发现膜中有磷酸脂解酶,它能水解磷脂的脂肪酸氢过氧化物,其水解速度远远大于目前已知的磷酸脂解酶。因此,氢过氧化物磷酸脂解酶可能是过氧化膜的修复系统的一部分。Tappel^[10] 由此提出,这个酶能使脂质过氧化作用形成的脂氢过氧化物,有效地被 GSH-PX 系统还原,它涉及到体内过氧化膜的修复作用,这是未来令人兴奋的一个研究领域。

参 考 文 献

- [1] Mills, G. C.: *J. Biol. Chem.*, **229**, 189, 1957.
- [2] Schwarz, K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3293, 1957.
- [3] Rotruck, J. T. et al.: *Science*, **179**, 588, 1973.
- [4] Flohé, L. et al.: *FEBS Letters*, **32**, 132, 1973.
- [5] Lawrence, R. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., **71**(4), 952, 1976.

- [6] 陈瓖,周玫:《生命的化学》, **3**(6), 16, 1983.
- [7] 陈瓖,周玫:《第一军医大学学报》, 3 卷增刊, 385, 1983.
- [8] Chiu, D. T. Y. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 558, 1976.
- [9] Stults, F. H. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 490, 1977.
- [10] Tappel, A. L.: *Free Radicals in Biology* (Ed. by Pryor, W. A.), Academic press, Vol. IV, p. 1—47, 1980.
- [11] Sunde, R. A. et al.: *Nutr. Rev.*, **38**(8), 265, 1980.
- [12] Nakamura, W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 251, 1974.
- [13] Flohé, L.: *Enzymologie und biologische Aspekte*, Klin. Wschr., **49**, 669, 1971.
- [14] Stadman, T. C.: *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 93, 1980.
- [15] Hawkes, W. C. et al.: *Fed. Proc.*, **58**, 820, 1979.
- [16] Sunde, R. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**(4), 1181, 1980.
- [17] Witting, L. A.: *Free Radicals in Biology*, (Ed. by Pryor, W. A.) Academic Press, Vol. IV, p. 295, 1980.
- [18] Prohaska, J. R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**(2), 437, 1977.
- [19] Pierce, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 27, 1978.
- [20] Granter, H. E. et al.: *Trace Elements in Health and Disease* (Ed. by Prasad, A. S.), Academic Press, p. 165, 1976.
- [21] Awasthi, Y. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**(13), 5144, 1975.
- [22] Chance, B. et al.: *Physiol. Rev.*, **59**(3), 527, 1979.

[本文于1984年2月7日收到]

(上接封3)

出来,这样得到的肽图,虽然只能反映一部分肽段情况,但由于斑点清晰,容易分辨,使结果十分明确,有一定的实用价值。此外,本法还具有以下一些优点:

1. 灵敏度高,样品用量少。在我们实验室中,总量 8—10 μg 纯化的流感病毒,经 SDS-PAGE 可同时获得纯化的 HA 和 MP 供标记用,每次标记的样品可供几十次肽图分析用。

2. 样品分离、纯化的步骤简单,易于标准化。待标记样 MP 在经固定、染色、干燥的凝胶中保存一年后,再进行 ^{125}I 标记和肽图分析,结果与新制备样品完全一致。

3. 同位素标记的方法简单、条件易于控制,

重复性好。标记后不必经凝胶柱层析,而只需简单地依次通过含有 10% 甲醇的一排试管洗涤即可除去游离的 ^{125}I ,这样可减少器皿污染,缩短操作时间,便于进行放射防护。

本工作曾得到中国科学院武汉病毒研究所同位素室李荣歧同志帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Watanabe, S. et al.: *Biochem. Genet.*, **5**, 541, 1971.
- [2] 张国娣等:《生物化学与生物物理进展》**6**, 64, 1983.
- [3] Elder, J. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 6510,

(下转第 26 页)

2'-联吡啶的能力弱些,它与联吡啶一样,更愿意选择以氧配位的第二个配体作为伙伴,以组成更稳定的混配络合物。这从表7中是一目了然的。

表7 M·Im·A 混配络合物的平衡常数

咪唑衍生物	A	$\Delta \log K_M$		
		Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
L-His	C ₂ O ₄ ²⁻		-0.56	
	Gly	-0.74	-0.68	-0.26
Hm	En	-1.04	-1.2~-1.4	-0.44
	Gly	-0.73	-0.65	-0.43
	En	-1.32	-1.49	-0.74

这里使我们联想到一个十分有意义的问题:在混配络合物中已经配位的第一个配体,影响着第二个配位体的存在。即它们按照上述各个原则,相互协同相互组合以求组成最稳定的混配络合物体系。它意味着在低分子络合物中就已经固有着“自我组织”(Self-Organizing)的能力^[27],这种能力与有机体中所存在的许多化学反应的高度特异性和选择性,甚至与生物体的相互识别不能没有一定的联系。事实上咪唑环作为组氨酸、组胺或嘌呤碱基的组成部分或活性基团,在生物体系中所表现的广泛的配位能力,在组成重要生物分子和呈现各种生物功能的能力,就是一个极好的佐证。

参 考 文 献 (上)

- [1] Eichhorn, G. L. (ed.): *Inorganic Biochemistry*, Vol. 1—2, Elsevier Amsterdam, 1973; *Advances in Inorganic Biochemistry*, Vol. 1—4, Elsevier Biomedical, New York, 1982.
- [2] Sigel, H. (ed.): *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 1—14 (to be continued), Marcel Dekker, New York and Basel, 1973—1984.
- [3] Huang, Z. X. (黄仲贤), and Williams, D. R.: *Inorganica Chimica Acta*, **56**, 41, 1981.
- [4] Huang, Z. X. (黄仲贤), and Kalvin Q. et al.: *Agents and Actions*, **12**, 536 (1982).
- [5] Huang, Z. X. (黄仲贤), and Williams D. R. et al.: *Polyhedron*, **1**, 153, 1982.

- [6] Marcus, Y.: *Coord. Chem. Rev.*, **4**, 273 1969.
- [7] Perrin, D. D.: *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, Part B, (IUPAC Chemical Data Series, No. 22), Oxford, Pergamon Pr., 1979.
- [8] Williams, D. R.: *Coord. Chem.* -20, (ed. Banerjee, D.), Pergamon Press, Oxford and New York, 1980.
- [9] Neuman, P. Z. and Sass-Kortsak, A.: *J. Clin. Invest.*, **46**, 646, 1967.
- [10] Fiabane, A. M. and Williams, D. R.: *The Principles of Bioinorganic Chemistry*, The Chemical Society, London, **56**, 1975.
- [11] Sarkar, B. and Kruck T. P. A.: in *Biochemistry of Copper* (eds. J. Paisach et al.), Acad. Press, New York, 1966.
- [12] Dewitt, R. and Watter J. I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3810, 1954.
- [13] Sharma, V. S. and Schubert, J.: *J. Chem. Educ.*, **46**, 506, 1969.
- [14] Sigel, H. and McCormick, D. B.: *Accounts Chem. Res.*, **3**, 201, 1970.
- [15] Sigel, H.: *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **14**, 394, 1975.
- [16] Perrin, D. D. et al.: *J. Chem. Soc.*, (A), 1755, 1967.
- [17] Sovago, I. and Gergely, A.: *Inorg. Chim. Acta*, **37**, 233, 1979.
- [18] Bhattacharya, P. K.: *J. Sci. Ind. Res.*, **40**, 382, 1981.
- [19] McDonald, C. C. and W. D. Phillips: *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2736, 1963.
- [20] Kida, S.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **32**, 981 (1959); **33**, 587, 1365, 2269, 1960.
- [21] Griesser, R. and Sigel, H.: *Inorg. Chem.*, **9**, 1238, 1970.
- [22] Sigel, H.: in *Coord. Chem.* -20, (ed. D. Banerjee), Pergamon Pr., Oxford and New York, 1980.
- [23] Leussing, D. L.: in *Met. Ions in Biol. Syst.*, **5**, 1, 1976.
- [24] Sigel, H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2750, 1974; **98**, 730, 1976; in *Adv. Soln. Chem.*, (eds. I. Bertini et al.), 149, Plenum, 1981.
- [25] Kato, M.: *Z. Phys. Chem.*, **23**, 391, 1960.
- [26] Jorgenson, C. K.: *Inorg. Chem.*, **3**, 1201, 1964.
- [27] Sigel, H.: *Inorg. Chem.*, **19**, 1411, 1980.

[未完待续]

(上接第30页)

- 1977.
- [4] Skehel, J. J. et al.: *Virology*, **44**, 396, 1971.
- [5] 华家桢等:《实用蛋白质化学技术》, P. 162, 上海科学技术出版社, 1982.
- [6] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680, 1970.
- [7] Oxford, J. J. et al.: *Virology*, **74**, 394, 1976.
- [8] Hauptmann, R. et al.: *J. Gen. Virol.*, **64**, 215, 1983.
- [9] Lamb, R. A. et al.: *Virology*, **112**, 1746, 1981.

- [10] Krohn, K. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **490**, 497, 1977.
- [11] Darveau, A. et al.: *J. Virology Methods*, **4**, 77, 1982.
- [12] Cleveland, D. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102, 1977.
- [13] Brand, C. M.: *J. Gen. Virol.*, **36**, 385, 1977.

[本文于1984年3月20日收到]