

表2 汞盐纯化  $\text{NAD}^+$  的复验

| 操 作 步 骤         | 溶液体积 | $\text{Hg}^{2+}$ 浓度(%) | 乙醇浓度(%) | 沉淀中 $\text{NAD}^+$ 量<br>(mg) | 回收率(%) |
|-----------------|------|------------------------|---------|------------------------------|--------|
| 初始溶液            | 32   |                        | —       | 265                          | —      |
| 加 20% 乙酸汞 0.8ml | 32.8 | 0.49                   | —       | 4.7                          | 1.8    |
| 再加 95% 乙醇 8ml   | 40.8 | 0.39                   | 18.6    | 7.0                          | 2.6    |
| 再加乙酸汞 2.4ml     | 71.2 | 0.9                    | 48.2    | 250                          | 94.3   |
| 乙醇 28ml         |      |                        |         |                              |        |

表3  $\text{NAD}$  制备过程各步情况

| 步 骤       | 体积 (ml) | $\text{NAD}^+$ (mg) | 回收率(%) | $A_{340\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ | 纯度(称重法) |
|-----------|---------|---------------------|--------|-------------------------------------|---------|
| 2kg 酵母抽提液 | 4000    | 320                 | 100    | 0.076                               | —       |
| 阳离子柱层析洗脱液 | 160     | 290                 | 90.6   | 0.206                               | —       |
| 第一次汞盐纯化   | 20      | 260                 | 81.3   | 0.250                               | —       |
| 第二次汞盐纯化   | 15      | 225                 | 70.3   | 0.255                               | 70.3%   |

们经过试验,发现乙酸汞与  $\text{NAD}^+$  有类似  $\text{AgNO}_3$  的反应。乙酸汞与  $\text{NAD}^+$  发生即时反应,生成  $\text{NAD}\cdot\text{Hg}$  盐,它不再是 ADH 的底物,所以以酶法检测时  $A_{340\text{nm}}$  无改变。

由表1的数据可知, $A_{260\text{nm}}$  有吸收的杂质与  $\text{NAD}^+$  可在不同  $\text{Hg}^{2+}$  与乙醇浓度时分步沉淀。乙酸汞最终浓度达 0.5% 时,较低浓度的乙醇(18.5%)使杂质沉淀,继续增加乙醇浓度可使大部分  $\text{NAD}$  沉淀,在乙酸汞与乙醇的最终浓度分别达 0.5% 与 50% 时,绝大部分  $\text{NAD}^+$  以及其他  $A_{260\text{nm}}$  有吸收物质均已沉淀析出,最终上清液中的  $A_{260\text{nm}}$  仅是初始溶液的 0.4%,  $\text{NAD}^+$  的回收率 > 90%。

前节介绍的  $\text{NAD}^+$  制备的汞盐纯化步骤是通过上述实验(表1)确定的。表2验证了这一条件的条件,这一步的  $\text{NAD}^+$  回收率 > 90%。从  $A_{340\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$  由 0.20 增至 0.25 (表3),提示所得  $\text{NAD}^+$  纯度大于

65%<sup>[4]</sup>。重复一次操作,此比值达 0.255,纯度提高为 70% (表3),最后得到白色粉状物。若要达到更高的纯度,可参照文献4的方法精制。

表3是一次典型的提取过程。本法的特点是很小的操作体积,简便的方法和较好的回收率,适合大量生产一般纯度的  $\text{NAD}^+$ 。

## 参 考 文 献

- 1 Kornberg A. *Method in Enzymology*. New York: Acad Press, 1957; 3:876
- 2 上海东风生化试剂厂. 生物化学与生物物理学报, 1965; 5 (5): 535.
- 3 Okunuki K, Hagihara B, Sekuzu I et al. *J Biochem*, 1955; 42(2):389
- 4 季钟煜. 生物化学与生物物理进展, 1982; (6): 53

[本文于 1989 年 8 月 19 日收到]

## 会议简讯

## 生物发光和化学发光学术讨论会在苏州召开

1990 年 5 月 22—24 日由中国生物物理学会光生物专业委员会和中国物理学会发光分科学会联合举办的生物发光和化学发光学术讨论会在苏州举行,参加会议的代表 100 多人,其中中青年科学工作者包括研究生过半数,代表来自全国 16 个省市,交流的论文达 120 篇(宣读了 64 篇),论文的内容覆盖面广,有生物发光、生物的超微弱发光、细胞化学发光、体表发光、化学发光和荧光标记、化学及荧光免疫分析及测量发光的仪器仪表等。从人数、论文数来看,比 1987 年苏州光生物学会会议增加了 4 倍,说明生物发光和化学发光这一新兴学科已在我国生根,并得到了迅速发展。

研讨的论文有几项特别引人注目:(1) 国际上研究得极少的淋巴细胞化学发光,尤其是人血淋巴细胞的发光,我国已经展开,对发光机理作了初步的探索,临床应用也有进展;(2) 发光法分析活性氧(自由基)和抗氧化剂(自由基的清除剂),它具有灵敏、快速、简便、价廉、能测自由基发生发展早期时相的特点,虽然方法还不甚成熟,但已显示出苗头,可部分地取代 ESR 法,成为 ESR 法的一项重要辅助手段。用发光法筛选出一部分抗自由基和抗氧化药物,尤其是中草药和饮料,具有中国自己的特色,并用所选药物作器官缺血、重灌损伤、衰老的防护药之用;(3)  $\text{Eu}^{3+}$  标记的时间

# 组合式电渗析装置

韩刚毅

韩刚正

(济南军区军事医学研究所, 济南 250014)

(开封医药专科学院附二院)

**关键词** 电渗析, 组合式电渗析装置

从大分子样品溶液中去除小分子盐类成分主要是利用膜分离技术。其原理是利用样品溶液中溶质分子的大小、形状和性质等的差别对各种薄膜表现出不同的可透过性而达到分离的目的。主要包括透析法、超滤法、反渗透法和电渗析法等。其中电渗析法是在透析膜的两侧加电极, 使可透过膜的与不可透过膜的带电溶质在电场中相对移动而彼此分开的方法。这种方法用于大分子溶液的脱盐和纯化具有快速简便的优点。本实验室根据上述原理及实际工作需要, 研制出一套组合式电渗析装置, 具体制作方法如下:

用有机玻璃制作成具有齿状凹槽的一组框板, 取其中三块平行间隔地夹着两张透析膜, 在其外侧对称地夹上两个电极半槽, 组成一套以两张透析膜隔成的三组槽室(图1)。更换中间的槽框厚度, 可以改变样品

槽容量。

在做电渗析时, 在中心室内放入待去盐的样品液, 两侧电极室内放入蒸馏水或缓冲液, 分别在正负电极通直流电。在电场作用下, 中心室内样品液中较小的阳离子透过膜移向阴极槽内, 阴离子移向阳极槽内, 较大分子量的带电物质被透析膜阻留在样品槽内, 从而实现了电渗析去盐作用。

根据本实验室实际应用结果说明, 在电极槽内加入低离子强度的缓冲液比仅加蒸馏水的渗析效果要好些。通电条件可以选择, 以实际使用的样品槽计算, 槽的每平方厘米面积施加电流 10—30mA。电压选在 80—300V 范围。电流不可太高, 以免产热太多导致对蛋白质的不良影响。如温度升高明显, 可在两侧电极槽内加入冰块, 以增强冷却效果。透析液更换次数和时间由温度和 pH 变化情况以及盐离子透析效果而定。通常可 15—30min 换一次透析液, 在 1—3h 内即可将样品中的盐除净。应当注意到, 在去盐的样品溶液中蛋白质浓度不可太高, 否则随着电渗析过程中容易发生蛋白质沉淀。

这套电渗析装置由于采用了框板组合式结构, 因此可以通过更换不同厚度的框板, 在一定范围内调整样品处理量。并且, 增减框板上齿状凹槽的数目, 可以同时处理多个样品。有助于满足实验室操作标准化和规范化的要求。

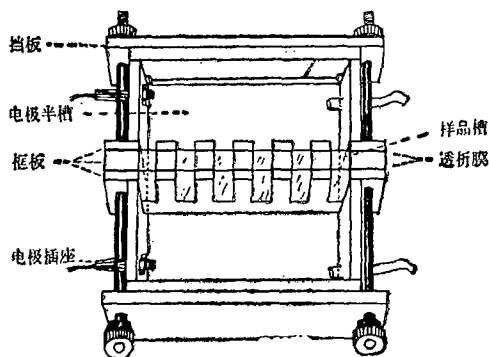


图1 组合式电渗析装置结构示意图

[本文于 1989 年 8 月 24 日收到]

分辨荧光免疫分析法, 我国已兴起, 仪器、试剂已研制成功, 并在临床上试用, 取得了可喜的结果, 填补了国内空白; (4) 化学发光法测定人体的微量元素、维生素、某些抗氧化酶(如 SOD、GSH-PX、CAT) 的含量和活性。协同化学发光新体系测量微量元素 Cu、Co、Fe 属于新发现, 具有灵敏度高、抗干扰能力强、稳定性好的特性; (5) 难度较大的生物超弱发光研究已在不少单位展开, 已用此指标测试血清发光诊断疾病, 气功师运气发光, 辐照食品、药品的检验等; (6) 我国发光仪器、

发光试剂的研制和生产逐渐趋向于配套和多样化, 为发光分析的基础研究和应用提供了强有力的武器。会议期间参展的厂家与专家磋商, 拟研制出质量更高、更适合生物医学应用的发光计。

很可喜的是一些研究较成熟的体系, 例如吞噬细胞的化学发光、萤火虫荧光素酶体系测 ATP, 临床上已展现出应用的前景。

生物发光和化学发光是一门多学科嫁接的边缘科学。本次学术讨论会有生物学、化学、物理学、数学、计(下转第 406 页)

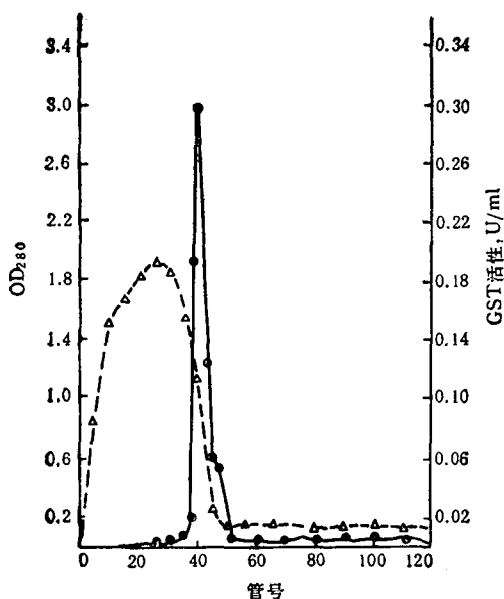


图1 人胎盘 GST 亲和层析图  
—·—酶活性, —△—OD<sub>280</sub>

### 三、讨 论

本文对胎盘 GST 纯化方法做了简化。将 6B-GSH 亲和层析提前至离心后第一步,以去除红细胞对 GST 的抑制作用<sup>[9]</sup>,并可去除大量杂蛋白。Radulovic 等报

表2 纯化人胎盘 GST 的两种方法比较

| Mannervik 方法    |       | 本文方法      |       |
|-----------------|-------|-----------|-------|
| 步骤              | 纯化倍数  | 步骤        | 纯化倍数  |
| 1.超离心上清液        | 1.0   | 1.超离心上清液  | 1.0   |
| 2.Sephadex G-25 | 0.86  | 2.亲和层析    | 46.8  |
| 3.DEAE 层析       | 3.2   | 3.DEAE 层析 | 863.1 |
| 4.CM 层析         | 19.3  |           |       |
| 5.亲和层析          | 353.6 |           |       |
| 6.Sephadex G-75 | 477.2 |           |       |

道,亲和洗脱液中加入 GSH 可保持 GST 活性。使用不含 GSH 的洗脱液, GST 回收率仅为 2.7%,加入 GSH 则回收率上升至 75%。而加入 DTT (二硫苏糖醇) 等巯基试剂可维持 GSH 的还原状态<sup>[9]</sup>。本文在

(上接第 404 页)

算机学、医学和农学多学科的研究人员参加,学科之间相互渗透,研究人员相互配合,这也正是本学科能迅速发展,并很快取得一些阶段性成果的原因所在,尤其是年轻的研究生参加学术讨论,他们工作认真,思路敏捷,对新事物特别敏感,使学术讨论气氛活跃,交流特别深入。

发光分析应用研究毕竟是新的技术,还有许多理

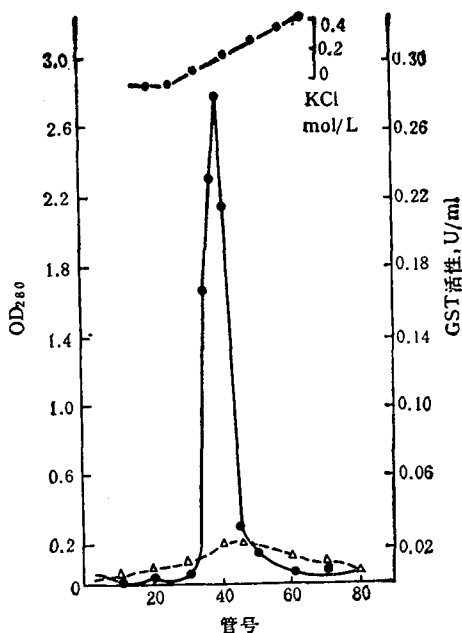


图2 人胎盘 GST 的 DEAE 纤维素柱层析图  
—·—酶活性, —△—OD<sub>280</sub>, ···—电导率

DEAE 层析时亦注意到这一点。另外在梯度洗脱时,模仿高效液相法,快速加大 KCl 的浓度梯度,使酶活性峰更为集中,得到较好的纯化结果。

本文由刘建功、芦振敏同志协助离心,特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 Meister A et al. *Ann Rev Biochem*, 1983;52:711
- 2 Simmons D C et al. *Anal Biochem*, 1977; 82:334
- 3 Habig W H et al. *Method in Enzymology*, 1981; 77:28
- 4 Polidoro G. *Biochemical Pharmacology*, 1980; 129: 1681
- 5 Sato K et al. *Gann*, 1984; 75:149
- 6 Rushmore T H et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 143:98
- 7 Mannervik B et al. *Method in Enzymology*, 1981; 77:231
- 8 Guthenberg C. *Acta Chimica Scandinavia*, 1979; B33:595
- 9 Radulovic L L et al. *Biochem Biophys Commun*, 1985; 28:75
- 10 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72:248

[本文于 1989 年 8 月 3 日收到]

论问题没有搞清,影响因素也较多,许多代表反映,本技术不够稳定。会议就技术、试剂、仪器诸方面进行了深入讨论。

本次学术讨论会是成功的,许多代表纷纷要求加入主办的两个学会。根据代表们的要求,执委会决定两年以后将再度开会,作更广泛、更深入地讨论。

(胡天喜、陈纪)