稳定性，二价阳离子对结合活性的影响等也有所不同。

有关甾体激素膜结合位点（膜受体?）的理化性质报道极少，目前还很难将它提纯，在这种情况下，用等电点聚焦电泳法测其等电点有一定困难。我们用离子交换层析法测定了大鼠脑突触质膜糖皮质激素膜结合位点的等电点，也为初步纯化 GCMBS，从而进一步研究其理化性质，加深对它的了解奠定了一定基础。

## 参 考 文 献


1 Allera A, Rao G S, Breuer H. *J Steroid Biochem*, 1980; 12: 259

2 Towle A C, Sze P Y. *J Steroid Biochem*, 1983; 18: 135

3 Savart M, Cabillic Y. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 813: 87

4 Koch B, Lutz-Bucher B, Briaud B *et al. J Endocrinol*, 1978; 79: 215

5 Fant M E, Harbison R D, Harrison R W. *J Biol Chem*, 1979; 254: 6218

6 Keller-Wood M E, Dallman M F. *Endocrine Rev*, 1984; 5: 1

7 Hua S Y, Chen Y Z. *Endocrinol*, 1989; 124: 687

8 巫凌刚，陈宜张. 中国药理学报，1989；10: 306

9 顾勤，邢宝仁，夏金辉，陈宜张. 生理学报，1990；42: 476

10 Yang V C, Langer R. *Anal Biochem*, 1985; 147: 148

11 赵永芳，周济兰，叶明. 生物化学与生物物理进展，1988；15: 470

12 Litwack G, Filler R, Rosenfield S A *et al. J Biol Chem*, 1973; 248: 7481

13 Parchman L G, Litwack G. *Arch Biochem Biophys*, 1977; 183: 374


# 用过碘酸氧化试验鉴定单抗抗糖表位特性


梅 筠 苏 新 李 红

（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100850）



## 提 要

过碘酸在酸性条件下能氧化糖蛋白中糖的连羟基而不改变多肽链结构。将这一特性与 ELISA 或免疫印迹试验结合起来建立了检测单抗是否抗糖表位的方法。



**关键词** 单抗，碳水化合物，糖蛋白，糖脂，过碘酸


过碘酸在酸性条件下能氧化糖蛋白中糖的连羟基而不改变多肽链结构[1]。Woodward 等[2]利用这一特性建立了检测单克隆抗体是否抗糖表位的方法。作者将此法加以改进，降低了免疫印迹试验的本底，显色更加清晰，提高了酶联免疫吸附测定法的（ELISA）灵敏度。

## 1 材料和方法

### 1.1 酶联免疫吸附测定（ELISA）

1.1.1 戊二醛处理酶标板[3] 用含 0.1% 戊二醛的包被液（0.05mol/L pH9.6 碳酸盐液）室温下处理酶标板 1h（100μl/孔），弃去，再用不含戊二醛的包被液（pH9.6）洗板 3 次，甩干后直接用于包被。

1.1.2 ELISA 用福氏 2a 痢疾杆菌经水萃取后的可溶性蛋白 4μg/ml 包被（100μl/孔），4℃冰箱过夜。次日用洗液（0.01mol/LpH 7.4PBS-Tween 20）室温浸泡 30min，洗板 5 次，用醋酸钠缓冲液（50mmol/L pH4.5）轻洗后，加入用醋酸钠缓冲液配制的不同浓度的过碘酸（0～20mmol/L）100μl/孔，室温避光 1h。用醋酸钠缓冲液轻洗后加入用 pH 7.4 0.01 mol/L PBS 液配制的 50 mmol/L 硼氢化钠 100μl/孔，室温作用 30min，以阻止过碘酸对醇羟基的氧化而形成过多的醛基，以及非


收稿日期：1991-04-15 修回日期：1991-09-04

特异性抗体对抗原的交联。这一步也可以用1% 的甘氨酸替代硼氢化钠。所用试剂均需新鲜配制。再洗板 5 次，加一抗，100μl/孔，37℃ 1h，洗板 5 次，加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 1:1000 稀释，稀释液为含 10% 小牛血清的洗液，37℃30min，最后加底物 TMB 和 $H_2O_2$，37℃ 30min 显色，1mol/L $H_2SO_4$ 终止反应，测 $A_{450}$ 值。

### 1.2 免疫印迹试验

SDS-PAGE 和转移电泳参考文献[4]方法进行。电泳抗原为 $F_{2a}$-12 痢疾菌，转移后的硝酸纤维素膜（NC）用 1.5% 酪蛋白封闭 1h，将膜切成 0.5mm 宽的小条，分两组，对照组用醋酸钠缓冲液漂洗与浸泡，实验组漂洗后浸泡在 0.1～20 mmol/L 的过碘酸溶液中，室温避光 1h，两组均用醋酸钠缓冲液漂洗，置 50 mmol/L 硼氢化钠溶液中，室温浸泡 30min，用 pH7.4PBS 洗 3 次，浸泡在一抗中室温过夜，次日漂洗 3 次，再封闭 10min 后。将小条浸泡在辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 中，1:1000 稀释，37℃30min，洗 3 次，加 0.06% DAB 10ml 和 30% $H_2O_2$ 5μl 显色后用大量自来水冲洗以终止反应。

## 2 结果与讨论

ELISA 结果显示，当一抗为抗脂多糖的单抗时，随着过碘酸浓度的递增，A 值逐渐降低，过碘酸为 2.5mmol/L 时，A 值趋于 0，即 2.5 mmol/L 过碘酸可以将脂多糖的连羟基全部破坏。当一抗为抗蛋白的单抗时，A 值基本不变（见图 1）。

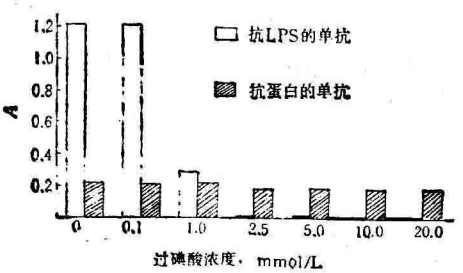


**图 1 过碘酸处理抗原后的 ELISA 结果**

免疫印迹试验的结果提示，随着过碘酸浓度的递增，抗脂多糖的单抗染色的 NC 条显色的区带数减少，且染色减弱（图 2-1,2,3,4 中的 A 条），在 5mmol/L 处区带完全消失（图 2-5 A 条）；而抗蛋白的单抗染色的 NC 条显色的区带在过碘酸处理下基本不变（图 2-B 条，见图 2）。

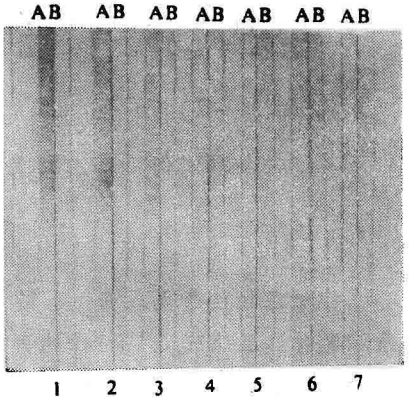


**图 2 过碘酸处理抗原后的免疫印迹结果**

A——抗脂多糖的单抗；B——抗蛋白的单抗过碘酸浓度（mmol/L）：1——0；2——0.1；3——1.0；4——2.5；5——5；6——10；7——20

上述结果表明，在酸性条件下 5mmol/L 的过碘酸可以将脂多糖的连羟基破坏，即改变了糖的抗原决定簇结构，但对蛋白的多肽链没有影响。利用这种方法可以鉴定单抗所针对抗原的性质。但并非所有糖类抗原决定簇都对过碘酸敏感，据报道，有些葡聚糖的抗原决定簇以及部分 O-乙酰化的唾液酸抗原决定簇对过碘酸的氧化不敏感[5,6]。高浓度过碘酸长时间作用可以破坏多肽中的氨基酸残基，尤以在碱性条件下这种作用明显[7]。尽管有例外，但绝大部分抗糖的单抗都是针对糖的非还原性末端的，且糖类抗原的羟基群一般对过碘酸氧化都较敏感。ELISA 试验中用戊二醛处理包被板可以提高抗原抗体的结合力，使反应的敏感性提高 2 倍[3]。本方法过碘酸的处理是在测定板及硝酸纤维素膜上直接进行，尤其适用于免疫印迹试验，可以直观地鉴定单抗所针对的抗原决定簇的性质。对于单抗制备早期阶段的筛选也是一种有效的方法。

## 参 考 文 献

1 Bobbitt J M. *Adv Carbohydrate Chem Biochem*, 1956; 11:1
2 Woodward M P. *J Immunol Methods*, 1985; 78:143
3 王小宁等. 单克隆抗体通讯, 1990;6(2): 5
4 金灵,苏新. 生物化学与生物物理进展, 1989;16(2):148
5 Niemann H, Watanabe K, Hakomori S *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1978; 81:1286
6 Cheresh D A. *Science*, 1984; 225:844
7 Clamp J R, Hough L. *Biochem J*, 1965; 94:17


# 铂支撑的碘-聚吡咯修饰双层脂膜的 I-V 特性*


邰子厚　　杨昌正

(南京大学配位化学国家重点实验室,南京210008)　　(南京大学化学系)



## 提　　要

首次在铂丝新生表面上形成了碘-聚吡咯双层脂膜，用循环伏安法研究了碘掺杂浓度对双层脂膜 I-V 特性的影响.用此法所得到的铂支撑双层脂膜十分稳定，可进一步用于生物传感器及分子电子器件的基础与应用研究.



**关键词**　自组装,双层脂膜,吡咯聚合,生物分子电子器件


自从 P. Mueller 等[1]于 1963 年成功地在两个水溶液之间形成双层脂膜 (bilayer lipid membrane, BLM) 以来,人们对 BLM 的电学性质与电化学特性进行了仔细的研究[2]，并与脂质体一起作为研究生物膜结构与功能(能量转换、物质运送、信息传递等)之间关系的模型体系. 近年来，随着分子电子器件 (molecular electronic devices, MED) 研究的逐步开展，又对用 BLM 构成诸如有机二极管开关，生物传感器和生物燃料电池等的可能性产生了极大的兴趣[3,4].

然而，在两个分隔的水相之间所形成的双层脂膜极不稳定，即使在合适的环境下它的寿命至多也不过几小时，很难用于实际. 为了提高它的稳定性,做了一些尝试,例如，在聚碳酸酯膜的微孔中形成的 BLM 可以在数天内保持稳定,用多糖衍生物覆盖BLM 表面以及通过类脂的聚合作用来增强 BLM 的稳定性等. 最近，H. T. Tien 研究小组相继发现：a. 双层脂膜成膜溶液中的吡咯可在脂膜和 $FeCl_3$ 水溶液的界面上化学聚合，所形成的聚吡咯-BLM 具有良好的导电性和很高的稳定性[5]; b. 在金属 (Pt、Ag、不锈钢等) 的新生表面上自组装而成的 BLM 稳定性甚好，寿命可达 36h 以上[6]. 从而,为进一步提高 BLM 稳定性,并将其用于生物传感器和分子电子器件的研制开辟了一个新的途径.

本文根据吡咯聚合过程中碘作为掺杂剂的原理[7]，首次在铂丝新生表面上形成碘-聚吡咯修饰的双层脂膜，并用循环伏安法研究了碘掺杂浓度对 BLM 的 I-V 特性的影响,因所得到的 BLM 十分稳定，可进一步用于分子电子器件的基础与应用研究.

## 1 材料和方法

### 1.1 成膜溶液的配制

**1.1.1** 用十二烷和丁醇 (3:1, V/V) 组成的混合溶剂配制 2% 卵磷脂 (Heath Mart Inc) 溶液 (A)，取溶液 (A)9.0ml与 1.0ml 重蒸吡咯相混,配制成含 10%(V/V) 吡咯的卵磷脂溶


* 国家自然科学基金资助项目.
收稿日期: 1991-05-03　　修回日期: 1991-09-20