

图4 大豆两品种在1%NaCl溶液中发光强度比较  
·——·早熟4号; ······文丰7号

可看出2种浓度对籽粒萌发的影响大致相等。

c. 大麦籽粒在1.5%NaCl中与0.5%NaCl中萌发时的超弱发光差异显著,即1.5%浓度的NaCl对籽粒萌发已造成较大影响。但是大麦在2%浓度的NaCl中萌发时的发光值却有部分升高的现象,与0.5%NaCl中萌发发光值比较差异不显著,这是否与作物达到临界盐碱度时的“闪光现象”有关<sup>[1]</sup>。

### 3 讨 论

我们试图通过超弱发光与作物抗逆性关系的试验研究,进一步了解作物发光的规律,以便协同其他抗逆指标,为农作物抗性鉴定提供一种新的方法。为此,我们对几种作物抗冷、抗旱、抗盐碱与超弱发光的关系做了观察研究。

在空气、温度、水分、pH值正常情况下,各类作

物籽粒萌发时其超弱发光表现较强,如果受到不利条件的影响,作物的吸水萌动受到抑制,超弱发光强度显著降低,这使我们认识到超弱发光与植物生命活动密切相关。

不同抗性品种的籽粒萌发时表现出品种间差异,这为抗性品种鉴定提供一种可能性。在逆境条件下,抗性品种比对照品种表现出较强的发光值,在蒸馏水中,两者发光差异不显著。随着逆境条件的增加,不同抗性的品种表现出不同的敏感点,这将有助于我们寻找作物抗性鉴定的指标。

我们对已知的抗性品种进行对比试验,而抗性品种分为高抗、中抗、低抗、弱抗。因此,要进行超弱发光的定量分析,还需进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 杨起简. 大豆、小麦、玉米的超弱发光与干旱条件下种子萌发的关系, 生物化学与生物物理进展, 1989; 16 (6): 452
- 2 胡天喜. 血清的超弱发光与疾病诊断. 生物化学与生物物理进展, 1988; 15 (1): 18
- 3 Colli L. Further measurement on the bioluminescence of the seedlings. Experiment, 1955; 11/12: 479
- 4 Тарусов Б Н, Журавлев А И. Сверхслабые свечения в биологии. Москва: Издательство «Наука», 1972; 36
- 5 耿庆汉. 玉米遗传育种学. 北京: 科学出版社, 1979; 36—40

## 实心球形羟基磷灰石的理化性能及蛋白质分离\*

韩 铠\*\* 郑海容

(中国科学院化工冶金研究所, 北京 100080)

**关键词** 球形羟基磷灰石, 制备, 性质, 蛋白质分离

羟基磷灰石(HAP)常用作分离蛋白质、酶和核酸等生物大分子的介质。球形羟基磷灰石(S-HAP)的制备方法多为喷雾干燥法和惰性基核包覆法<sup>[1-4]</sup>。我们用新建立的一种湿化学反应——成形法制备实心、均质的S-HAP。其要点是:将含钙盐、磷酸盐、羟基提供剂和成形剂等的混合液置于水浴或微波场中加热反应而得。它是集水解、均相沉淀、成形和改性于同一过程的全新方法,一步反应即获得S-HAP,方法细节将另行发

表。本文报道了其理化性能及S-HAP层析柱作微克和毫克量级蛋白分离情况。

\* ‘七五’国家高技术研究发展计划生物技术领域课题。

\*\* 通讯联络人。

收稿日期: 1992-03-27 修回日期: 1992-05-02

## 1 实验方法

**1.1 试剂** a. 去离子水: 电导率为  $0.25\mu\text{scm}^{-1}$ , 经  $1.5\mu\text{m}$  孔径滤板过滤后使用; b. 牛血清白蛋白 (BSA): 中科院东方仪器生化部; c. 溶菌酶 (Ly) 和 细胞色素 c (c=cyt. c): 中科院上海生化所; d. 其它无机试剂皆为分析纯。

### 1.2 Ca/p 摩尔比的测定方法

钙: EDTA-Mg 返滴定法、铬黑 T 为指示剂。磷: 磷钒钼黄分光光度法, 420nm 测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 物理性能测试

**2.1.1 晶形结构:** X 射线衍射分析结果见图 1. 本法所得粗晶 RAW-HAP (a) 即为 HAP 结构, 而市售国内产品如 SW-HAP (b) 则含有杂晶如  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  等. 本法最终产物 DHTP-HAP (c) 与 Bio-Rad 某产品的  $2\theta/\text{D}$  谱图相同. 但谱线较其更强而锐;  $2\theta/\text{D}$  和强度 I (%) 与所公布的 HAP 的标准数值相符。

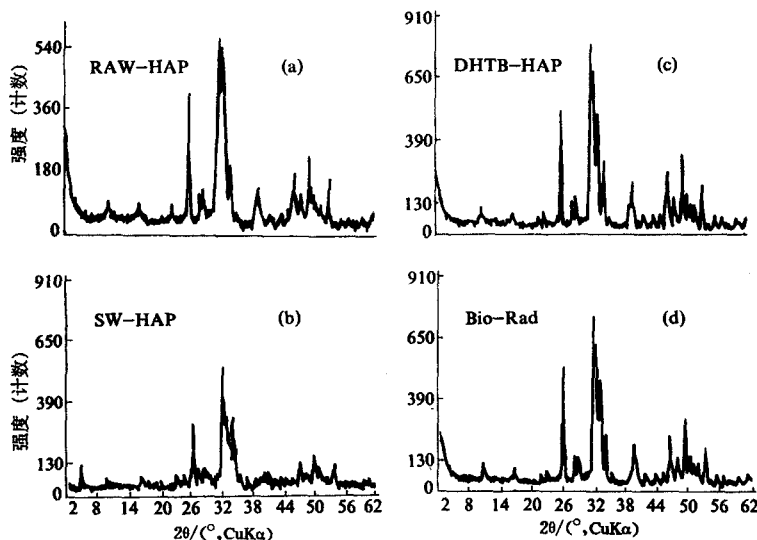


图 1 不同 HAP 的 X 射线衍射图

**2.1.2 傅立叶红外分析及热重分析结果皆证实 RAW-HAP 即与市售国内非球形产品相当。**

### 2.2 化学组分测定

**2.2.1 Ca/P 摩尔比测定** RAW-HAP 的 Ca/P 即可达 1.41—1.51, DHTB 的 Ca/P 为 1.60—1.61; 市售国内产品的 Ca/P 在 1.35—1.51 之间, 所用的 Bio-Rad 产品为 1.53 左右. Ca/P 值表明本法产品不但外观是球形, 其晶形结构较非球形的国内产品更典型, 这与 X 射线衍射结果一致。

### 2.3 颗粒性质

**2.3.1 粒度分布** 库尔特粒度计测定结果表明 (图 2), 无论是水浴法还是微波法加热, 也无论是粗晶还是最终产物, 粒度分布较窄。

**2.3.2 球形度** 扫描电镜照片图 3 表明, DHTB-HAP 有较好球形度, 较喷雾干燥法所得 S-HAP 更圆、更匀<sup>[6]</sup>。这对改善层析柱流动性非常有益。市售 HAP

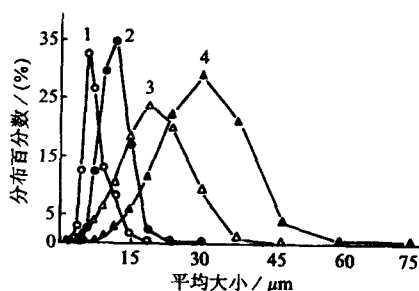


图 2 HAPs 的粒度分布

1. 微波法制得的 S-HAP; 2. 水浴法制得的 S-HAP; 3. Bio-Rad 的非球形 HAP;
4. Sw-HAP 市售国产非球形 HAP

多为片状、菱形或棱柱状结晶。

**2.3.3 其它颗粒性质** 压汞法测得 S-HAP 的比表面为  $99.6\text{m}^2/\text{g}$ , 孔容为  $1:1\text{ml}/\text{g}$ , 平均孔径为 442

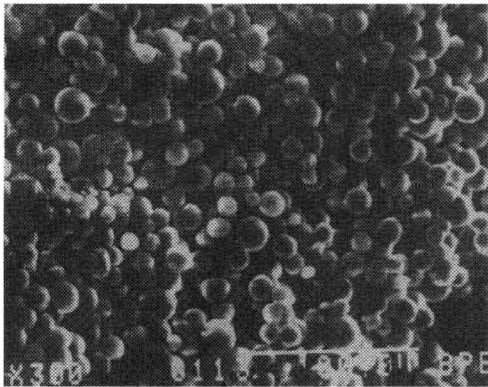


图3 扫描电镜显微照片图

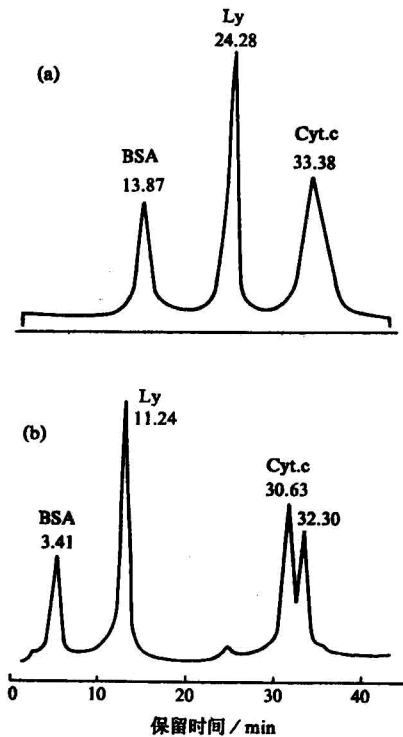


图4 微克量级蛋白质的HPLC梯度淋洗色谱图  
色谱仪: HP-1090; 柱: 4.6mm (I. D) × 150mm, 10—15μm S-HAP;

进样量, BSA, Ly 和 cyt. c 各 30μg; 流速: 0.5ml/min; 系统压力: 约 2.4MPa; 温度: 30.0 ± 0.5°C; 梯度淋洗:

A 液: 0.01mol/L PBS + 0.3m mol/L CaCl<sub>2</sub> (pH6.8)

B 液: 0.5mol/L PBS + 0.003m mol/L CaCl<sub>2</sub> (pH6.8);

B% 0 20 40 80 100 100

(a) 0 8 15 18 28 45 (累计时间, min)

(b) 0 15 15 18 28 45 (累计时间, min)

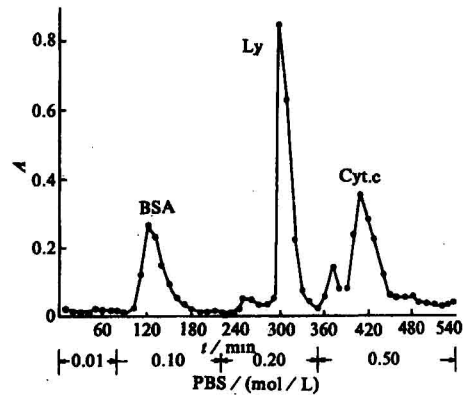


图5 毫克量蛋白质低压分步淋洗色谱图

Å, 堆密度为 0.563 g/ml.

## 2.4 蛋白质分离

2.4.1 动态饱和和吸附容量 对 BSA, Ly 和 cyt. c 的吸附容量分别为每克干介质 29.52, 13.52 和 41.26mg.

## 2.4.2 蛋白质分离

a. 高压液相色谱—梯度淋洗分离, 结果见图 4.

由图 4 看出, 本法 S-HAP 具有良好分离性能, 若选择合适梯度, 可将 cyt. c 中还原型和氧化型分开. 测得 BSA, Ly 和 cyt. c 的表观塔板数分别为 3 030, 14 300 和 6 602. 峰对称性好, 色谱柱运行 53 次分离性能仍无明显的变化.

b. 敞口低压层析——分步淋洗分离, 结果见图 5. 色谱条件为:

柱: 敞口玻璃柱, 10mm (I. D) × 100mm; 20—30μm S-HAP;

进样量: BSA, Ly 和 cyt. c 各为 5mg; 温度: 27°C

流速: 0.5ml/min; 系统压力: 0.8m 液柱压

由图 5 看出, 毫克量级的 BSA, Ly 和 cyt. c 用 S-HAP 柱可得到良好分离, 其回收率分别为 85%, 99.6% 和 88.3%. 进样量各为 10mg 时, 试验得到类似结果.

上述性质及分离实验表明, 本法所制得的 S-HAP 是一种很有希望的, 可用作分析、分离生物大分子的层析介质.

致谢: 中国科学院化学所红外分析组, 生物物理所扫描电镜组, 本所六室、颗粒室和五室同志提供了相应测试数据.

## 参 考 文 献

- 1 门间, 英毅. アバタイトの合成と化学. 触媒, 1985; 27 (4): 237—243

- 2 井上千也,小野晃. 喷雾热分解法による水酸アパタイトの合成. 窯業協会誌, 1987; 95 (8): 759—763
- 3 Anon. LKB 仪器选用指南. 1985, p. 11
- 4 Majumder K, Ramesh N. A new polymer supported packing material as a substitute of Hydroxylapatite; Purification of Topoisomerases. *chromatographia*, 1987; 24: 400—402
- 5 杉原久夫, 佐藤苍, 户高航等. 缩合リン酸化合物カウのリン酸カルシウムの生成. 石膏と石灰, 1987; 210: 34—42
- 6 Kadoya T, Isobe T, Ebihara M *et al.* A new spherical hydroxyapatite for high performance liquid chromatography of proteins. *J Lig Chrom*, 1986; 9 (16): 3543—3557

## 人单个核细胞亚群化学发光的研究\*

张学军

(上海医科大学华山医院皮肤科, 上海 200040)

**关键词** 化学发光, T 细胞, B 细胞, 单核细胞, 单个核细胞

人外周血淋巴细胞化学发光 (Ly-CL) 测定已相继报道<sup>[1,2]</sup>。然而常规分离的淋巴细胞中包括 T 细胞、B 细胞和少数单核细胞, 均为外周血单个核细胞 (PBMC)。研究 PBMC 亚群细胞在 Ly-CL 中所作贡献有无差别, 对 Ly-CL 测定的实际应用价值有重要意义。本文从人 PBMC 中分离 T 细胞、B 细胞和单核细胞, 比较这些细胞的化学发光特性。

### 1 材料与方 法

**1.1 试剂** 刀豆蛋白 A (ConA), 购自 Sigma 公司。植物血凝素 (PHA), 购自广州医学工业所。葡萄球菌蛋白 A (SPA), 购自武汉生物制品所。酵母多糖和 luminol 均购自 Sigma 公司。酵母多糖临用前用正常人血清调理, 制成调理酵母多糖 (OZ)。EM-H 培养基, 内含的 Eagle 培养基和 Hepes 分别购自 GIBCO 和上海生化所。淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品, 比重 1: 0.77。其余试剂均为分析纯。

**1.2 细胞分离** 参照文献进行<sup>[3,4]</sup>。简言之, 正常人肝素抗凝血分离 PBMC 后, 用 EM-H 培养基稀释细胞, 倾入无菌平皿, 37℃ 30min, 轻取未粘附细胞, 再用橡皮轻刮, 收集单核细胞。未粘附细胞过尼龙毛柱, 回收 T 细胞和 B 细胞。上述细胞均置 4℃ 保存备用。

MGG 染色检查 PBMC 和单核细胞纯度, PBMC 中淋巴细胞 94% ± 1.5%, 单核细胞 6% ± 2%, 粒细胞 1% ± 0.5%; 单核细胞中纯度 ≥ 92%。ANAE 染色检查

T 细胞纯度 ≥ 96%, 免疫荧光测定 Smlg 检查 B 细胞纯度 ≥ 81%。台盼蓝检查化学发光测定前的细胞活力均 ≥ 95%。

**1.3 细胞化学发光测定** 参照前文<sup>[1]</sup>。37℃ 循环水使 FT-632 生物化学光度计 (北京核仪器厂) 样品室温度稳定在 37 ± 0.5℃。取 2 × 10<sup>6</sup>/ml 细胞悬液 1ml, 加 luminol 0.2ml (终浓度 0.1mol/L), 37℃ 培育 10min, 测细胞自发性化学发光 (本底) 1min。加 ConA 或 PHA, SPA 和 OZ (终浓度分别为 75mg/L, 100mg/L, 75 mg/L 和 350mg/L), 分别连续测定 PBMC 化学发光 (PBMC-CL), T 细胞化学发光 (T-CL), B 细胞化学发光 (B-CL) 和单核细胞化学发光 (Mo-CL) 的化学发光强度 5—15min。结果取自 4 份标本的纯峰值 (纯峰值 = 峰值 - 本底)。

### 2 结 果

#### 2.1 PBMC-CL 与 T-CL, B-CL 和 Mo-CL 比较

在细胞、luminol 和 ConA 浓度相同的情况下, PBMC-CL, T-CL, B-CL 和 Mo-CL 所表达的化学发光动力学特征基本相同, 但化学发光强度明显不同 (图 1)。

\* 本文在安徽医科大学工作期间完成并得到安徽省教委资助。

收稿日期: 1992-04-04 修回日期: 1992-07-27