

最佳投加量。pH 值一般在 8~9 时生成铁氧体的速度较快, 去除效果也较好。搅拌时间以 10~20 分钟较为适宜(搅拌速度约 200~300 转/分)。

3. 据文献报道, 铁氧体法在 60°C 左右的反应温度下进行效果较好(本实验证明生成铁氧体的速度快, Fe^{2+} 最佳投加量低), 为此, 对于常温下的含汞废水采取了加热措施或增加设备代替废水加热^[1]。但随之增加了热能消耗及相应的工艺设备和管线。因而运行费用也提高了。我们通过实验摸索, 针对实际废水, 找到了一定的合理工艺条件, 促进缓慢氧化过程速度加快, 几乎可以达到 60°C 条件下铁氧体法的同样效果。这对于降低经济成本和促进该方法的广泛应用是较为有利的。

4. 该方法形成的沉渣为强磁性的铁氧体, 由于比重大(约为 5), 粒径大(约为 0.01~0.1 μ), 沉降效果很好。但仍有极微量的细小颗粒悬浮于水面。由于铁氧体法所得沉渣均为铁磁性微粒, 因而, 若同时采用磁分离器等设备加以辅助, 则处理效果将更好、更安全可靠。在日本, 已将磁分离器作为铁氧体法的二级处理设备应用于电镀废水及清扫工厂洗烟废水的处理流程中^[2]。在我国, 对于重金属废水的处理, 亟待改变继续沿用混凝沉淀法、硫化钠法等古老且落后方法的现状, 应尽快研究采用铁氧体-磁过滤法这种先进的技术。

5. 实验说明, 铁氧体法产生的沉渣脱水容易(含水率可低于 50%), 体积小, 干渣的重量为废水重量的 0.1~0.2%, 干渣体积为废水体积的万分之三到四, 这比起混凝沉淀法产生的沉渣(含水率在 95% 以上, 脱水困难, 体积为废水体积的 1/400~2%) 容易处理得多。特别是其化学性质稳定, 不易造成二次污染, 有利于储存, 也便于进一步采用水泥固化法加以适当处置。

参 考 文 献

- [1] 高田幸路, 化学装置(日本), 19, 8, 91 (1977).
- [2] 池田豊, 化学装置(日本), 17, 7, 87 (1975).
- [3] 蔡起华等, 环境科学, 1, 39 (1979).
- [4] 日本电气株式会社, 公开特许公报, 昭 49-83257.

碘(^{131}I)标记人体纤维蛋白原的研制—— 乳过氧化物酶法

王 衍 真

一、引 言

人体纤维蛋白原是血液的组成成份。利用放射性碘标记的人体纤维蛋白原, 可以检测人的肢体和深部器官的血栓。

为了保持碘标记纤维蛋白原的生物活性, 需要寻找适当的标记方法。1972年 Krohm^[1]

等人比较了用一氯化碘法, 氯胺T法及电解法制备的碘标记狗纤维蛋白原的化学特性, 认为一氯化碘法标记的 ^{125}I -纤维蛋白原的化学特性变化最小, 保持了原有的生物活性。但引进了非放射性碘, 因此产品的比度低。1974年 Krohn 等人^[2]建立了酶催碘标记狗纤维蛋白原的方法。

酶法是 Marchalonis^[3]在 1969 年为了获得碘标记免疫球蛋白首先建立的。以后被用于标记促性腺激素^[4], 多肽激素和蛋白^[5,6]。用酶法制备的放射性碘标记化合物不仅放射性比度高, 而且保持了较高的免疫活性和生物活性。我们根据国内具体条件, 用酶法标记了人体纤维蛋白原, 建立了适宜的标记条件。

二、材 料 和 方 法

1. 材 料

1) 乳过氧化物酶悬浮液, 分子量 77500^[7]。西德产品, 10 毫克/2 毫升, 0°C 保存, 用前用 0.05 M pH 7.4 P. B. 溶液稀释成 1 毫克/毫升溶液备用。

2) 人纤维蛋白原: 美国 Sigma 产品, 含蛋白 66%, 凝固度约 90%, 专用于制备标记化合物。用前用 0.055 M 柠檬酸钠溶液配成 5 毫克/毫升溶液, 于 4°C 冰箱保存。

3) 过氧化氢(H_2O_2): 丹东塑料助剂一厂产品, H_2O_2 含量 30%。取 5 微升含 H_2O_2 30% 的原液, 加 50 毫升双重蒸馏水配成 1 毫摩尔(mM)的溶液, 于 4°C 冰箱保存, 一周内使用。用前取此溶液 5 微升加 5 毫升 pH 7.4、0.05 M P. B. 溶液, 配成 1 微摩尔(μM)溶液备用。

4) 半胱氨酸($\text{HSCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$), 分子量: 121.15, 取 30.28 毫克半胱氨酸加重蒸馏水 50 毫升, 配成 5 毫摩尔(mM)的半胱氨酸溶液。

5) 磷酸缓冲液(P.B.), pH 7.4、0.05 M。2.906 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 加 0.2964 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 溶解在 200 毫升双重蒸馏水中。

6) 磷酸缓冲盐水(P. B. S.), pH 7.4、0.05 M。2.906 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 加 0.2964 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 溶解在 200 毫升生理盐水中。

7) 凝血酶: 首都医院生化室提供。

8) 放射性碘溶液: 本所产品, pH 7~9, 含 $\text{Na}_2\text{SO}_3 \leq 1.5 \text{ mg/ml}$ 。碘化钠(^{131}I)溶液放射性浓度 > 70 毫居里/毫升。

2. 方 法

1) 乳过氧化物酶催化标记 室温下(22°C)在 10×40 mm 聚乙烯管(或玻璃管)里反应, 反应物经过电磁搅拌器不停搅拌混合。在反应瓶内依次加入 50~100 微升 pH 7.4、0.05 M P. B., 250 微克纤维蛋白原溶液(50 微升), 1~5 微克乳过氧化物酶, 2 毫居里放射性碘化钠溶液, 混合均匀后立即加入 1 微摩尔 H_2O_2 溶液 1~10 微升, 开始反应 1~2 分钟后加 5 毫摩尔半胱氨酸溶液 500 微升终止反应。再加入 2% KI 溶液 100 微升, 混合均匀上柱分离。

2) 分离产品 反应物经过葡聚糖凝胶(Sephadex G 50~75)达到分离纯化。预先用蒸馏水泡胀 Sephadex G 50(粗)过夜, 次日装入 1×30 cm 柱, 再用 0.05 M, pH 7.4 磷酸

缓冲盐水(P. B. S.)淋洗平衡,并用 1% 牛清白蛋白保护好。反应物转移到柱顶上,再用 0.05 M P. B. S. 淋洗,流速 1 毫升/分钟。流出液第 8~12 毫升为产品峰,第 22~26 毫升是游离的 I⁻峰。

3) 碘的利用率和产品纯度测定 用玻璃毛细管吸取少量反应物在 Whatman 3 号滤纸(20 × 2 cm)2.5 cm 处点样(原点),冷风吹干。在推进剂为正丁醇:乙醇:0.5 N 氨水=5:1:2(V/V)层析系统里,室温下上行层析分离。当前沿移动 10 cm (大约 2 小时)时,取出纸条吹干,在放射性薄层扫描仪上测量,描绘出放射性层析图谱。根据各峰的放射性计数可以计算碘的利用率和产品的放化纯度。

$$\text{碘利用率} = \frac{\text{峰 1 放射性计数}}{(\text{峰 1} + \text{峰 2} + \text{峰 3}) \text{放射性计数}} \times 100\%$$

$$\text{放化纯度} = \frac{\text{峰 1 放射性计数}}{(\text{峰 1} + \text{峰 2}) \text{放射性计数}} \times 100\%$$

4) 放射性碘标记纤维蛋白原生物活性的测定 放射性碘标记纤维蛋白原的生物活性取决于它的凝固度。本实验是利用猪的凝血酶测量碘标记人纤维蛋白原的凝固度。在 10 × 40mm 玻璃管中加入 0.5 毫升正常人血浆和 0.5 毫升生理盐水,再加入 0.1 微居碘标记纤维蛋白原,摇匀后加 30~50 微升凝血酶,再摇匀,室温放置 15 分钟。然后在井型 γ 计数器测出 30 秒内每管总的计数,再拨离凝块,取出清液用滤纸吸掉残留在凝块上的清液,测量管内凝块的计数。二者比的百分数即为碘标记人纤维蛋白原的凝固度。

$$\text{凝固度} = \frac{\text{凝块放射性计数}}{\text{总放射性计数}} \times 100\%$$

三、结果与讨论

为了建立乳过氧化物酶催化标记纤维蛋白原的适宜条件,本实验着重对影响酶催反应

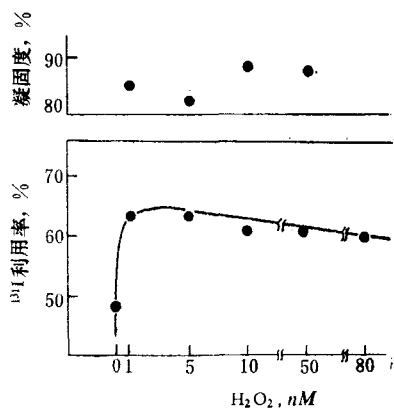


图 1 乳过氧化物酶催化标记纤维蛋白原反应中 H₂O₂ 用量与碘利用率及凝固度的关系

反应条件: 纤维蛋白原 250 微克, pH 7.4, P. B. 100 微升, 1 微克酶, 1 毫居里¹²⁵I, 室温 22°C, 反应 5 分钟, 总体积 180 微升。

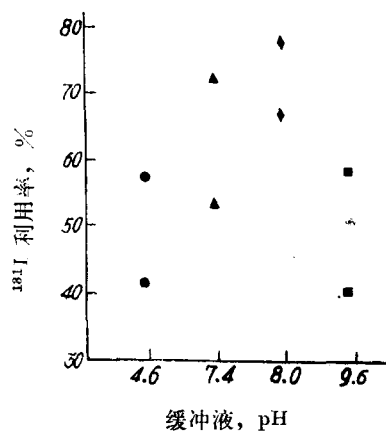


图 2 乳过氧化物酶催化标记纤维蛋白原的反应 pH 对碘利用率的影响

反应条件: 纤维蛋白原 250 微克, ¹²⁵I 400 微居, 酶 1 微克, H₂O₂ 10nM, pH 7.4, 总体积 135 微升, 21°C 反应 5 分钟。
● 醋酸缓冲液; ▲ 磷酸缓冲液; ◆ 硼酸缓冲液; ■ 巴比妥缓冲液。

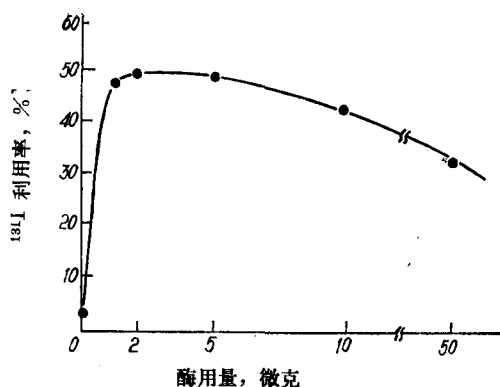


图 3 酶催化标记纤维蛋白原反应中乳过氧化物酶用量与碘利用率的关系

反应条件: 250 微克纤维蛋白原, 0.5 毫居 ^{125}I , H_2O_2 5 nM, 22°C, 反应 5 分钟, pH 7.4 P.B. 缓冲液, 总体积 150 微升。

从图 3 可见酶的用量在 1~5 微克, 碘利用率达到最高值。因此当反应物为 250 微克纤维蛋白原, 2 毫居碘和 1~10 nM H_2O_2 时较合适的酶用量为 1~5 微克。由于乳过氧化物酶本身也是蛋白质, 在标记过程中也会被碘化, 所以应尽量减少酶的用量。

表 1 酶催化碘化纤维蛋白原反应中温度与碘利用率及凝固度的关系

反应温度, °C	2	10	20	30	40
^{125}I 利用率, %	80.0	79.0	85.5	83.5	85.0
产品凝固度, %	90.0	89.5	88.5	88.0	90.5

反应条件: 150 微克纤维蛋白原, Na^{125}I 360 微居里, 1 微克酶, H_2O_2 1 nM, pH 7.4, P. B. 缓冲液, 反应 5 分钟, 总体积 100 微升。

从表 1 可以看到酶催化碘标记反应的温度从 20~40°C 都可以, 本实验选择在常温(约 20°C)下反应。

表 2 乳过氧化物酶催化碘标记纤维蛋白原反应中反应时间与碘利用率的关系

反应时间, 分	0.5	1	5	10
碘的利用率, %	41.5	52.0	50.0	51.0

反应条件: 250 微克纤维蛋白原, 5 微克酶, 0.7 毫居 Na^{125}I , H_2O_2 5 nM, 22°C, pH 7.4, P. B. 缓冲液, 总体积 150 微升。

酶催化碘标记反应的时间是从 H_2O_2 加入后开始的。反应时间一般在 1 分钟时就达到较高的碘的利用率, 可参见表 2。本实验反应时间选择 1~2 分钟。

乳过氧化物酶催化标记纤维蛋白原的反应混合物经纸层析分离后, 在放射性薄层扫描仪上测量的图谱见图 4。实验中放射性碘的利用率为 50~80%。

反应混合物经过 Sephadex G50(粗)分离后, 得到的碘标记纤维蛋白原经纸层析分离后在放射性薄层扫描仪上测量的图谱见图 5。产品的放化纯度 $97 \pm 1\%$ 。

的 H_2O_2 用量、时间、温度、酶量及 pH 值进行了试验。由于人体纤维蛋白原主要的生理功能是参加血液凝固, 所以要求碘标记人纤维蛋白原保持较高的凝固度。

从图 1 可见, 酶催化标记纤维蛋白原所用的 H_2O_2 用量在 1~50 nM 之间均能获得较高的碘利用率。并且产品的凝固度达到 83% 以上。本实验采用的 H_2O_2 用量为 1~10 nM。

从图 2 可见乳过氧化物酶催化标记反应中比较合适的缓冲液 pH 值在 7.4~8。因为产品用于人体, 淋洗产品选用 pH 7.4 P. B. S. 为了与淋洗液一致并保证蛋白的稳定性所以本实验选择 pH 值为 7.4 的 P. B.

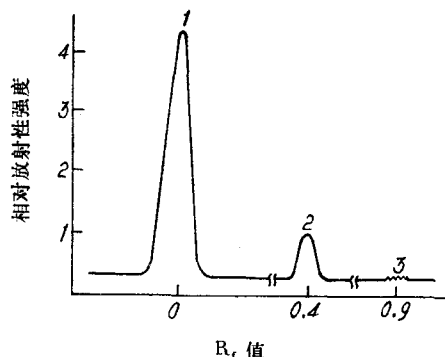


图 4 碘标记纤维蛋白原反应混合物
纸层析放射性薄层扫描图
1——放射性碘标记纤维蛋白原 $R_f=0$;
2——游离的放射性负价碘离子 $R_f=0.4$;
3——放射性碘酸盐 $R_f=0.9$ 。

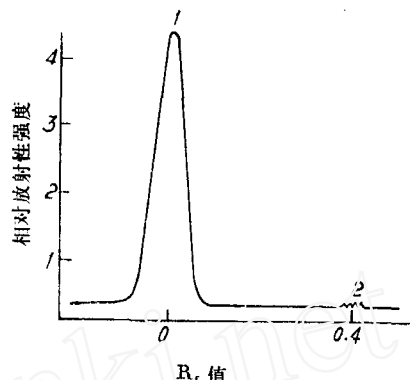


图 5 碘标记纤维蛋白原产品
纸层析放射性薄层扫描图
1——碘标记纤维蛋白原 $R_f=0$;
2——放射性负价碘离子 $R_f=0.4$ 。

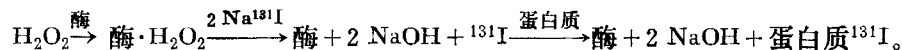
表 3 列出了酶法和氯胺 T 法制备的放射性 ^{131}I -纤维蛋白原性质的比较。氯胺 T 法的标记条件是参照了蛋白质标记的适宜条件^[8]。发现酶法碘标记纤维蛋白原的活性比氯胺 T 法碘标记纤维蛋白原活性高。前者的凝固度为 84.6%，后者凝固度为 71%。因为氯胺 T 法氧化反应较激烈，容易使蛋白质分子聚合变性，降低了生物活性。两种方法制备的碘标记物在生理盐水中水解都较快，每天 3.3% 左右。而在 1% 牛清白蛋白溶液中水解速度只有 0.6%。

表 3 酶法和氯胺 T 法标记纤维蛋白原性质的比较

方 法		酶 法	氯 胺 T 法
碘 利 用 率, %		50~80	57~80
产 品 凝 固 度, %		84.6±3.4	71±8
体 外 水 解, %	在 P. B. S. 中	3.3	3.4
	在牛清蛋白中	0.6	/

本工作获得的碘标记纤维蛋白原具有 84.6±3.4% 的凝固度与 Krohn 等人^[2]标记的狗 ^{125}I -纤维蛋白原具有 83±2.5% 凝固度在误差范围内是一致的。获得产品的放射性比度为 4~5 微居/微克。理论计算的当每个分子上去一个碘原子时的放射性比度为 4.7 微居/微克。

乳过氧化物酶在碘标记反应中起了重要作用。一般认为反应机理是酶首先与过氧化氢形成络合物，然后将 $^{131}\text{I}^-$ 氧化成 ^{131}I ，在乳过氧化物酶催化作用下使蛋白质碘化。反应式如下：



为了减少由于酶自身碘化而造成的影响，一方面应尽量降低酶的用量，另一方面将酶偶联到某些载体上，形成不溶性固相乳过氧化物酶。近几年国外已采用固相酶催化标记蛋

白^[9,10]。酶/H₂O₂体系在催化反应中H₂O₂是不可缺少的。由于酶的高效催化作用, H₂O₂的用量减少到毫微摩尔水平。因而整个反应条件是温和的。

产品保存在1%的牛清白蛋白溶液中, 于4°C冰箱存放是稳定的。每天脱碘是0.6% (见表3)。冷冻干燥的碘标记纤维蛋白原于4°C冰箱存放, 很少脱碘。

在酶催标记蛋白反应系统中不能含有叠氮化钠(NaN₃), 否则能抑制酶的催化作用。

参 考 文 献

- [1] K. Krohn et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 404 (1972).
 [2] K. Krohn et al., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **25**, 315 (1974).
 [3] J. J. Marchalonis et al., *Biochem. J.*, **113**, 299 (1969).
 [4] Y. Miyachi et al., *J. Clin. Endocrinol.*, **34**, 23 (1972).
 [5] J. I. Thorell et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, **251**, 363 (1971).
 [6] M. Morrison et al., *Biochemistry*, **9**, 2995 (1970).
 [7] D. R. Phillips et al., *Biochemistry*, **10**, 1766 (1971).
 [8] F. C. Greenwood et al., *Biochem. J.* **89**, 114 (1963).
 [9] C. C. Kuenzle et al., *Experientia*, **29**, 800 (1973).
 [10] G. S. David, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 464 (1972).

1-苯基-3-甲基-4-苯甲酰基吡唑啉酮-[5] 对 UO₂²⁺ 的萃取

万明高 陈金榜

(北 京 大 学)

由于1-苯基-3-甲基-4-苯甲酰基吡唑啉酮-[5] (以下简称 PMBP) 合成较容易, 萃取能力强, 稳定性较好, 所以 PMBP 对金属萃取的研究工作在六十年代蓬勃开展起来^[1-4]。

本文研究 UO₂²⁺/NaClO₄-HClO₄ ($\mu=0.1$)/PMBP-C₆H₅CH₃ 萃取体系: 确定了萃合物的组成为 UO₂A₂; 求出萃取反应 UO₂²⁺ + 2 A⁻ = UO₂A_{2(O)} 的平衡常数 $K=1.4 \times 10^{15}$ (莱登法) 或 $K=1.7 \times 10^{15}$ (徐光宪法); 测定了水相各级络合物(UO₂A⁺, UO₂A₂)的络合常数 $\beta_1=3.0 \times 10^5$, $\beta_2=6.0 \times 10^{11}$ (莱登法); $\beta_1=8.2 \times 10^5$, $\beta_2=3.7 \times 10^{11}$ (徐光宪法)。

实 验 部 分

1. 试剂 PMBP 为北京试剂厂出品, 在氯仿-石油醚中重结晶后沸点为 91.5~92°C。其它试剂均为分析试剂。

2. 实验方法 萃取平衡实验在 25±0.5°C 及一系列具有磨口玻塞的平衡管中进行。萃取平衡后, 分别取出定量的水相及有机相, 用铀试剂Ⅲ比色法测定两相中铀(VI)的含量。每点的数据均重复两次或两次以上。

数据处理与结果

1. 萃合物组成的确定

用 PMBP 萃取 UO₂²⁺ 时, 萃取反应可表示为