

酶的超滤浓缩装置

中国科学院北京植物研究所 七室生化组
修 配 组

常用的“沉淀法”和“去除溶剂法 (solvent removal)”浓缩酶蛋白,由于有“相态”的变化而容易使酶变性,对于大体积酶溶液的浓缩也较困难。用各向异性膜加压超滤法(简称超滤法),在其可筛分的范围内可进行分离并且没有“相态”的变化,这样可避免酶的变性,还可在较短时间内进行大体积稀溶液的浓缩。超滤法还具有设备简单、经济和操作方便等特点。超滤的应用范围很广,可用于蛋白质、核酸和酶的脱盐、大分子稀溶液的浓缩、分离、纯化和无蛋白培养基的制备等方面。应用在工业方面,如处理发酵液回收酶,回收干酪乳浆蛋白和大豆乳浆蛋白等,国外已处在中间试验或进入实用阶段。实验室用的超滤器及各种孔径的超滤膜已有商品出售。

遵照毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,我们自行设计、制作了超滤器和醋酸纤维素超滤膜,用于固氮酶 Mo-Fe 蛋白溶液的浓缩脱盐,效果良好。这种超滤器和超滤膜制作简单,造价低廉,在一般实验室条件下都能制作,现介绍如下。

超滤器的构造

超滤器的类型很多。我们设计的这种超滤装置(图1)适用于实验室规模浓缩蛋白溶液,通过连续加样达到稀溶液浓缩和脱盐的目的。

超滤器由盖、筒身、筒底三部分组成(图2,3)。为了便于焊接,盖用金属制成,盖上有加样口和连接压缩气钢瓶的进气口,通过螺旋结构和橡胶垫圈使盖和筒身之间保持密封。筒身和筒底由有机玻璃制成,筒身

管壁厚度为4毫米。筒身底部装有一硬塑料环,密封在玻璃毛细管中的铁棒(磁搅棒)位于此环上。滤膜、



图1 全套超滤装置

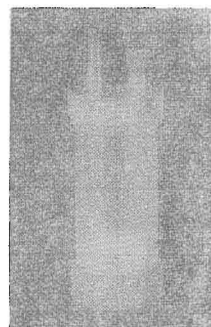


图2 超滤器

另外一个可能,瘤细胞与免疫脾细胞接种于宿主体内后,宿主有可能对此产生反应,释放出大量的巨噬细胞,后者再从免疫脾脏细胞获得某些免疫因子,使巨噬细胞有力地杀伤瘤细胞,从而达到了对瘤细胞的部分或全部的抑制。

此外,在腹水型肝癌抑制实验和 S-180 肉瘤抑制实验1中,均用杂种动物,在这些实验中,未经免疫的正常小鼠脾脏细胞也对瘤细胞的生长具有一定的抑制作用。然而,在 S-180 肉瘤抑制实验2—6的纯种动物5次实验中,其未经免疫的正常小鼠脾脏细胞却没有

抑制瘤细胞生长的能力。可能,杂种动物实验中免疫脾细胞组对瘤细胞生长的抑制,除了上述专一性作用外,还包括一部分非专一性的作用。杂种动物个体之间存在着同种异体组织抗原差异性,所以,未经免疫的正常脾脏细胞可能起着非特异性地刺激宿主免疫机构的作用。当然,由于在 S-180 肉瘤抑制实验2—6中采用的是纯种动物,它排除了同种异体组织抗原差异性的干扰作用,所以,免疫脾脏细胞对瘤细胞生长的特异性抑制作用就更加明显了。

[本文于1974年10月7日收到]

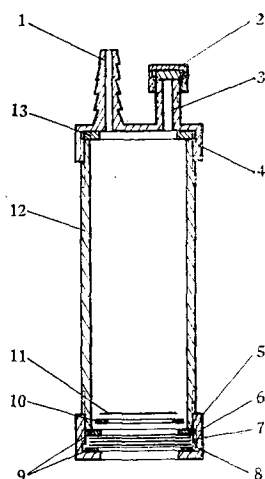


图3 超滤器剖视图

- 1—进气口；2—加样口盖；3—加样口；
4—盖；5—有机玻璃底筒；6—超滤膜；
7—尼龙布；8—支持板；9—橡胶垫圈；
10—塑料环；11—磁搅拌棒；12—有机玻璃筒身；13—橡胶垫圈

尼龙布、支持板装在筒身与筒底之间，筒身和筒底通过螺旋结构和橡胶垫圈保持密封。支持板为带有小孔的塑料板或不锈钢板。

工作压力由压缩气(氮或氩)钢瓶通过减压阀自进气口供给；压力受减压阀控制。

超滤器安装在磁力搅拌器上，由磁力搅拌器带动超滤器内的铁棒转动。滤出液直接收集在结晶皿内。

各向异性醋酸纤维素超滤膜

各向异性醋酸纤维素超滤膜是一种半透膜，由一层薄而致密的“皮肤层”(扫描电镜观察其厚度为1微米)，和较大孔径的海绵状支持层所组成；膜的孔径由皮肤层决定，一般在10—200埃之间。这种各向异性的结构，使膜具有较快的透水性和抗堵塞性；在1—4公斤/厘米²工作压力下，可将溶质分子与溶剂或其他溶质分子部分分离。

1. 制膜材料

成膜剂：二醋酸纤维素(上海红旗厂出品，批号720101，结合酸54.5—56%，粘度500厘泊)。

溶剂：丙酮，它影响制膜液的粘度。

添加剂：甲酰胺，是影响膜性能的重要因素。

2. 制膜液的配制

在一密闭容器内加入25克醋酸纤维素、100毫升丙酮、80毫升甲酰胺，间歇搅拌使其溶解(防止丙酮过量挥发)。待醋酸纤维素完全溶解后，用二层粗棉布、一层尼龙布在3公斤/厘米²压力下加压过滤(可用超滤器压滤)。所得滤液为淡黄色清亮粘稠液，需在室温下静置脱除气泡，约12小时后，滤液内之小气泡完全

消失，即可用于制膜。制膜液最好新鲜配制，以免时间过长而变性(成为棕红色)，影响制膜质量。

3. 制膜方法

(1) 制膜工具 表面平滑的玻璃板数块，最好是特制的刨光玻璃；刮膜刀，可选用表面平直的玻璃管，或用玻璃板、金属板等制成，刀面要窄而平滑，刀或玻璃管的两端缠绕细铜丝(直径0.27毫米)以控制膜的厚度(经“蒸发”和“浸水”后，实际厚度为0.14—0.17毫米)。

(2) 制膜条件 制膜最好在恒温恒湿的房间内进行。我们在密闭小房间内，用电炉加热控制温度，用电炉煮沸水控制湿度，效果也较好。室温控制在20±1℃，相对湿度控制在75—80%；成膜时冷浸水的温度，则用冰块控制使其保持在4—5℃。

(3) 刮膜 将制膜液倒在玻璃板一端，用刮刀均匀刮膜，刮制13厘米×25厘米的膜约需5秒钟，刮膜后蒸发5秒钟立即把带膜的玻板浸入冰水中，一小时后把膜从玻板上取下。膜远离玻板的一面为正面，取膜前必须加以标记，在使用时必须将正面朝向被超滤的溶液，以免膜很快被堵塞。制成的膜贮存在0.02%的叠氮化钠(NaN₃)水溶液中备用。

膜刮好后在空气中停留的时间为蒸发时间，蒸发时间越长，膜孔径越小，过滤水的流速也越小。粘稠溶液的表面溶剂的蒸发最强，使醋酸纤维素分子浓缩形成致密的表层，从而阻碍了底层溶剂的挥发。在冷浸过程中溶剂和添加剂进一步被漂洗出来，醋酸纤维素分子形成凝胶而沉积下来，在表层这种沉积作用最强，使表层的结构更致密，进而阻碍底层醋酸纤维素分子的沉积，有利于形成较大孔径的底层。这样，就构成了表层(皮肤层)和底层(支持层)结构不同的各向异性的超滤膜。在压滤过程中，由于在膜表面的“浓差极化”现象，使滤出速度逐渐降低，溶液越浓这种现象越严重；因此，必须使用搅拌装置以减少浓差极化，使滤出速度保持一定。

4. 不同孔径的膜的制备

在控制室温、湿度、蒸发时间、冷浸温度和冷浸时间等条件不变的情况下，改变甲酰胺与醋酸纤维素、丙酮的配比，可制备不同孔径的膜。例如，二醋酸纤维素25克、丙酮100毫升，而甲酰胺的量分别为35毫升、80毫升、100毫升(代号CA35，CA80，CA100)时，随着甲酰胺量的增加，膜的孔径增大，水流速增加(见表1)。

应用情况

这套装置已应用于固氮酶Mo-Fe蛋白的浓缩和脱盐。由于Mo-Fe蛋白对氧的高度敏感性，我们采用压缩的高纯氩或高纯氮气作为工作压力，以使Mo-Fe蛋白保持在厌氧条件下。用CA80膜，其有效面积为6厘

表1 不同孔径的膜的性能

代 号	厚 度 (毫米)	水 流 速 ¹⁾ (毫升/厘米 ² /小时)	分子量截止值 ²⁾ (保留 80—100%)
CA35	0.14—0.16	6	11,700(细胞色素 c)
CA80	0.14—0.16	40	68,000(牛血清清蛋白)
CA100	0.14—0.16	65	81,000(肌激酶)

1) 在工作压力为 3 公斤/厘米²的条件下,下同;

2) 用不同分子量的标准蛋白配成 0.1% 水溶液,使用不同代号的超滤膜进行压滤,滤出液与待滤液在 280 毫微米比色,滤出液与待滤液的光密度之比小于 20% 时,则为该膜可截留的蛋白;被该膜所截留的蛋白分子中,临界蛋白分子量称为该膜的分子量截止值。¹⁾我们用六种标准蛋白进行试测: 细胞色素 C, 分子量 11,700; 胃蛋白酶, 分子量 35,000; 卵清蛋白, 分子量 48,000; 牛血清清蛋白, 分子量 68,000; 肌激酶, 分子量 81,000; γ 球蛋白, 分子量 200,000。表 1 中列举了三种膜的实验结果。

米², 压力为 3 公斤/厘米², 在磁搅拌条件下, 经 DEAE 柱 (Tris-HCl, 0.025 M; NaCl, 0.25 M) 两次纯化的 3 毫克/毫升的 Mo-Fe 蛋白, 在 8 小时内 100 毫升可浓缩至 10 毫升, 蛋白浓度由 3 毫克/毫升浓缩至 30 毫克/毫升; 通过不断加入 0.025 M 的 Tris-HCl 缓冲液压滤, NaCl 的浓度由 0.25 M 降低到 0.04 M 以下, 从而使 Mo-Fe 蛋白结晶。活性测定的结果, 浓缩前后酶比活不变, 电泳迁移率不变, 表明超滤法对酶活性无不良影响。

讨 论

影响膜性能重复性的因素很多。由于醋酸纤维素性能不够稳定, 用不同批号的原料制成的膜, 性能也不同。例如, 用上海群力塑料厂产品批号 73-2 仿-9、结合酸 50.47%、粘度 219 厘泊的二醋酸纤维素, 制成的 CA80 膜, 水流速为 20 毫升/厘米²/小时; 而用红旗厂产品批号 720101、结合酸 54—56%、粘度 500 厘泊的二醋酸纤维素, 制成的 CA80 膜, 水流速为 40 毫升/厘米²/小时。而且, 随着甲酰胺配比增加, 水流速的增加也较大。一般选用结合酸 54—56% 的二醋酸纤维素为原料, 则制成的膜性能较好。制膜过程中室温、湿度、蒸发时间、冷浸温度和冷浸时间等都影响膜的性能; 用同一制膜液, 当成膜条件不同时, 所制备的膜性能也会有很大差异, 故为得到较好的性能重复性, 必须尽可能使上述诸条件恒定。我们采用同一批材料, 在条件恒定的情况下制备的五批超滤膜, 水流速相差 ± 3 毫升/厘米²/小时, 其分子量截止值相近似。

参 考 资 料

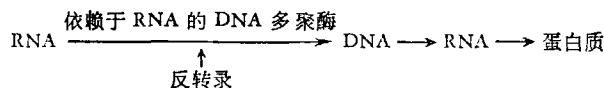
- Van Oss, C. J.: Progress in Separation and Purification **3**, 97, 1970.
 Van Oss, C. J.: Separation Sci., **5**, (1), 63, 1970.
 Blatt, W. F.: Methods in Enzymology, **XXII**, 39, 1971.
 Wang, D. I. C.: Membrane Sci. and Tech., **98**, 1970.

[本文于 1975 年 1 月 3 日收到]

转录 反转录

有机体的遗传信息一般都编码在由缠绕成双螺旋的两条长链所组成的脱氧核糖核酸 (DNA) 分子上, 由四个码编成, 这四个码是不同的化学单位, 叫做碱基。在正常细胞中要合成某种蛋白质, 遗传信息是以 DNA 为模板, 根据碱基互补的原则合成与它对应的单链分子核糖核酸 (RNA), 然后再从 RNA 链译成特定的蛋白质分子。即由 DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ 蛋白质。由 DNA $\rightarrow$ RNA 称为“转录”, 由 RNA $\rightarrow$ 蛋白质称为“翻译”。

反转录是遗传信息以 RNA 为模板合成 DNA, 即同上述信息的转移从 DNA $\rightarrow$ RNA 这一经典过程相反, 因此称“反转录”。例如, 在 RNA 肉瘤病毒进入机体后, 通过依赖于病毒 RNA 的 DNA 多聚酶, 以病毒 RNA 为模板合成 DNA, 然后再以 DNA 为模板合成病毒的 RNA。即:



从 RNA $\rightarrow$ DNA 这一步叫做反转录。

