

经 $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 脱保护基后, 并经 0.1N HCl 37°C 1 小时开环, 最后用 A-25 柱层析分离(图 3), 峰 6 为 CCAp, 共 201 A_{260} 单位 (9.4%, 纯度 90% 以上), 微量杂质可用 pH3.5 电泳纯化除去。所得的 CCAp 层析 (溶剂 II) 和电泳 (pH3.5) 均一, $R_f 0.56$ ($A_p = 1$), $R_{m1.1}$ ($A_p = 1$), 并能为牛胰核糖核酸酶完全酶解得 Cp: $A_p = 2:0.88$ 。光谱比值 (pH ~ 2): $A_{250}/A_{260} = 0.69$, $A_{270}/A_{260} = 1.12$, $A_{280}/A_{260} = 1.02$, $A_{290}/A_{260} = 0.70$, $\lambda_{\text{最大}} 271 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{最小}} 238 \text{ nm}$ 。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 10 期, 127 页。
- [2] 人工合成核酸协作组: 中国科学, 1978, 679, *Scientia Sinica* 21, 687, 1978.
- [3] 中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 12 期。
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 10 期, 143 页。
- [5] Lohrmann, R. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 819, 1966.

[本文于 1979 年 12 月 25 日收到]

聚 肌 胞 的 制 备*

(一) 适于工厂生产的大肠杆菌多核苷酸

磷酸化酶的提取纯化方法

李楠茜 李幼华 黎高沃

(中国科学院生物物理研究所二室)

雷珍妮 宋穗梅 刘同昌**

(广东江门甘蔗化工厂生化制药车间)

1967 年 A. K. Field 等^[1]首次合成双链多聚肌苷酸: 多聚胞苷酸 (polyI: C, 简称聚肌胞)。这种人工合成的双链核糖核酸, 在培养细胞或动物体内可以诱生干扰素, 是一种高效、广谱的干扰素诱导剂。它比干扰素易于得到, 价格低廉, 可以治疗许多种病毒病。

为了使一般生化厂、药厂能批量生产聚肌胞, 我们将 1973 年生物物理所二室核酸组建立的可用于合成聚肌胞的多核苷酸磷酸化酶 (PNPase) 的提取纯化方法^[2], 做了一些改进。现介绍如下:

材 料

一、大肠杆菌 大肠杆菌 1.183 (中国科学院微生物研究所菌种保藏组编号) 在牛肉膏、蛋白胨、琼脂斜面, 37°C, 14—16 小时生长。经活化数次的菌体接种到三角烧瓶摇床培养。

培养液为: 0.5% 蛋白胨、0.3—0.5% 牛肉膏、0.5% 酵母膏、0.5% NaCl, 用 6N NaOH 调 pH 至 7.2—7.4, 15 磅 30 分钟灭菌。14—16 小时后, 接种到种子罐 (50 立升)。培养液同上。通风量 14 升/分钟, 培养 10 小时后转入 700 立升大罐, 培养条件同种子罐。全部培养均在 37°C 进行。

培养的时间长短很重要, 因为这关系菌体生长情况, 而菌体的生长健壮与否直接影响 PNPase 的活力。实验结果表明, 以生长对数前期的菌体最好。工厂所用的检查办法是: 在培养过程中, 每隔二小时取样, 涂片, 染色做镜检。当培养到 16 小时左右, 终止培养。

发酵液经 3000 转/分钟离心, 400 公升发

* 本工作获得中国科学院 (1978—1979) 科技成果二等奖。——编者

** 参加这项工作的还有周润、蔡金盛、伍雪萍同志。

酵液可得 3.5—4.0 公斤菌体。用相当于菌体体积三倍的 0.9% KCl 洗涤, 去除杂质。收集灰褐色的菌体即可提取 PNPase。菌体在 -20℃ 保存一年左右, 提取的 PNPase 活力与新鲜菌体提出者一样。

酶活性的测定 根据 I. Fuwa 等^[3]研究 M. Lysodeircticus PNPase 的结果, 我们发现在 30 分钟内, 对大肠杆菌 PNPase 的聚合活性也有很好的线性关系。测活系统为: 0.12M Tris-HCl pH9.0 缓冲液 0.5 毫升; 12 mM MgCl₂ 0.15 毫升; 3M KCl 0.5 毫升; ADP (4.5 毫克/毫升) 1.0 毫升; PNPase 溶液 0.1 毫升, 用蒸馏水稀释至总体积为 3.0 毫升, 37℃ 保温 30 分钟, 加入 10% HClO₄ 3 毫升, 终止反应。对照管的 ADP 于终止反应后加入。反应终止后的溶液在室温放置 10 分钟, 3000 转/分钟离心 10 分钟, 倾去上清液, 用 5% HClO₄ 3 毫升洗涤沉淀。离心条件同前。沉淀再用 3 毫升 95% 乙醇洗涤共两次。离心后, 沉淀溶于 3 毫升 0.1M Tris-HCl pH8.0 缓冲液。充分搅动后, 静置 10 分钟, 离心。上清液 1 毫升, 加 4 毫升蒸馏水。测定 257nm 的吸收值, 此时吸收值为 1.0 时, 定为一个酶活力单位。

二、树脂 DEAE-纤维素 (上海东风生化试剂厂出品) 用水浸泡一昼夜, 倾去仍悬浮的细微颗粒后, 先后用 1N NaOH, 蒸馏水, 1M HCl-NaCl 混合液分别处理。再用蒸馏水洗至 pH5—6。用 0.02M Tris-HCl, 0.001M EDTA, pH8.0 缓冲液平衡。

玻璃粉 硬质玻璃经球磨机粉碎, 过 300 目筛, 收集 300 目以下的玻璃粉, 用 2N HCl 洗涤去除杂质, 自来水洗至中性, 0.02M Tris-HCl, 0.001M EDTA pH 7—8 缓冲液浸洗; 50—70℃ 烘干。

硫酸链霉素 华北药厂出品。

硫酸铵 北京化学试剂厂生产。分析纯。

三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 四川自贡化工研究院试剂厂生产。

ADP 广东江门甘蔗化工厂生化制药车间

生产。电泳纯度 80% 以上。

方 法

一、菌体的破碎 培养好的菌体, 用处理好的玻璃粉适量, 调成稠糊状。于 15℃ 左右的室内, 用研钵 (或球磨机) 研磨 20—30 分钟。磨碎的菌体溶于 0.1M Tris-HCl, 0.001M EDTA pH8.0 缓冲液中, 充分搅拌, 使成均匀悬浮液, 在 K₈₀ 冷冻离心机, 0—5℃, 3000 转/分钟离心 30 分钟。离心除去玻璃粉后, 上清液为酶粗提液。

二、硫酸链霉素沉淀核酸类物质 按粗酶液体积的 1/20 在搅拌下加入 10% 硫酸链霉素溶液, 放置 30 分钟。3000 转/分钟离心 30 分钟, 收集上清液。

三、硫酸铵分段沉淀 经硫酸链霉素沉淀除去核酸后的酶液, 按体积计算出加入固体硫酸铵的量, 在搅拌下缓缓加至 0.35 饱和度, 再继续搅拌 10 分钟, 放置 1—2 小时。0—5℃, 3000 转/分钟离心 30 分钟, 收集上清液。继续在搅拌下加入固体硫酸铵使成 0.6 饱和度, 静置过夜。3000 转/分钟离心 30 分钟, 沉淀部分收集后溶于 0.02M Tris-HCl, 0.001M EDTA, pH7.0 缓冲液 (第一部分)。未沉淀部分的溶液于冰浴中静置 3—4 日, 吸去上清液, 收集自然沉降物, 溶于 0.02M Tris-HCl, 0.001M EDTA, pH7.0 缓冲液 (第二部分)。

酶液第一部分及第二部分分别对相同的 Tris-HCl 缓冲液搅拌下透析, 换透析液 4—5 次, 至无 SO₄²⁻。

四、DEAE 纤维素柱层析 透析后的酶液第一部分, 上 6 × 20 厘米的 DEAE-纤维素柱, (柱先用 0.02M Tris-HCl, 0.001M EDTA, 0.1M NaCl pH8.0 缓冲液洗至流出液在分光光度计上 280 nm 读数小于 0.015), 然后依次用 0.1M NaCl, 0.23M NaCl, 0.35M NaCl 分段洗脱。流速 100 毫升/小时, 酶在 0.35M NaCl 部分洗脱下来。收集酶活力 10 单位/毫升的酶液。

酶液第二部分同上法进行 DEAE-纤维素

柱层析。

结果与讨论

用以上方法酶收率在 60% 以上, 所得一、二两部分酶活力最高峰部分均为 32—35 单位/毫升。

国内外文献报道 PNPase 的提取与纯化工部全部在 0—4℃ 的冷室内进行。现在江门甘化厂生产 PNPase 是在 10—15℃ 的室内进行, 除静置第二部分酶液在冰水浴内; 离心分离硫酸链霉素沉淀下的核酸、玻璃粉、0.35 饱和度沉淀出的蛋白质以及 0.6 饱和度沉淀 PNPase 的离心条件是 0—5℃ 外, 均无须低温条件。提取与纯化出的 PNPase, 活力适用于聚合反应。

玻璃粉研磨破碎菌体, 经比较, 与细菌磨破

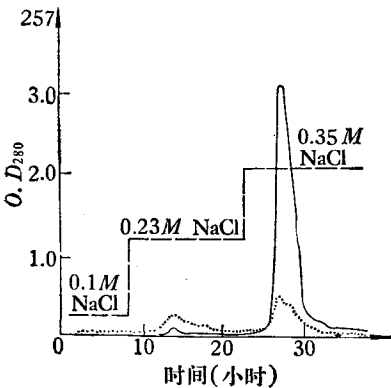


图 1 离心分离出的酶蛋白

(I) DEAE-纤维素柱层析图——酶活力 蛋白质

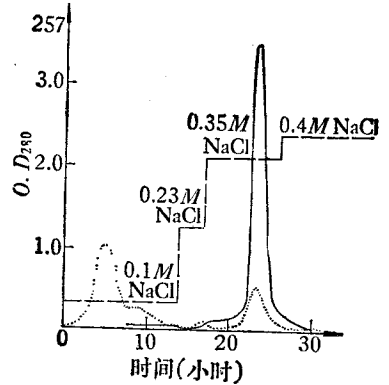


图 2 自然沉降的酶蛋白

(II) DEAE-纤维素柱层析图——酶活力 蛋白质

碎菌体所得 PNPase 活力相同。这就解决了细菌磨每次研磨量少, 不能适应工厂大量生产的需要。

经冷冻离心的酶液 I 与不经此步骤的酶液 II, 均得到相同活力单位的 PNPase, 这表明生产单位无高速冷冻离心机设备, 也可制备出可用的 PNPase。

PNPase 在 0.35M NaCl, 0.02M Tris, 0.001M EDTA (pH8.0) 缓冲溶液中, 在 10—15℃ 是稳定的, 放置数日不失活。

参 考 文 献

- [1] Field, A. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 1004, 1967.
- [2] 谌章群等: «大肠杆菌多核苷酸磷酸化酶的提取、纯化» (未发表), 1973 年。
- [3] Fuwa, I. et al.: *J. Biochem.*, **59**, 95, 1966.

《线粒体的分离与活性测定》

本书介绍的方法是结合实际工作经验编写的, 因此比较实用。内容包括: 一、线粒体的分离——分别介绍了动物、植物及酵母线粒体的分离方法。二、形态鉴定——介绍了相差显微镜与电镜两种鉴定方法。三、活性测定——介绍测定的主要指标与方法, 并举

出了若干实例。本书附录中也就蜗牛酶的制备、简法制备己糖激酶及放射性磷的处理方法作了简介。(本书由生物物理所线粒体小组编写; 每册三角。需用此书者可与该组联系。)