

$$T = \frac{R_1 C_1}{V I_1} V I_2 \left(1 - \frac{V_{ces}}{V I_2} \right)$$

参 考 文 献

式中 V_{ces} 为 BG_1 的共发射极饱和压降。本仪器中斜坡上升时间,由调节积分电容 C_1 的数值控制在 60—600 秒。

此装置还可用于其他光化学研究,如观察毫秒至微秒范围内光激励吸收变化过程,荧光变化动力学,以及延迟发光动力学过程。

- [1] Porter, G.: *Techniques of Organic Chemistry*, (ed. Friess, S. L. et al.), Wiley, New York, 1963, Vol. 8, 1055—1106.
- [2] Witt, H. T.: *Naturwiss*, **42**, 72, 1955.
- [3] Fenton, J. M. Pellin, M. J.: *FEBS Letters*, **100**, 1, 1979.

[本文于 1980 年 8 月 29 日收到]

氨 肽 酶 M 的 简 易 制 法

俞鹤年 顾涵英 罗超权

(中国科学院上海生化所)

氨肽酶 M 是近年来新发展的酶制剂,它较之其它氨肽酶稳定,使用广泛,对于蛋白质、多肽和酶的结构功能的研究是极为有用的工具酶^[1-3]。

已有文献方法^[4]繁琐。为了尽可能立足于国内现有物质条件,因陋就简生产高产优质的氨肽酶 M,我们对其离心纯化,酶解,离子交换纤维素分离,透析去盐,产品的鉴定等方面作了改进和简化。自 1974 年本所东风正式投产以来,取得高产优质的效果,满足了科研工作的需要^[2-3]。

一、材 料

猪肾:从屠宰场取得新鲜猪肾,经 -20°C 速冻。三羟甲基氨基甲烷(简称 Tris,下同),结晶胰蛋白酶、L-亮氨酸- β 萘胺盐酸盐,均为本所东风厂产品。Visking 透析袋 20/32, SERVA 产品。DEAE 纤维素,上海有机所实验厂产品。薄层层析硅胶,浙江黄岩荧光化学厂产品。其它试剂均为化学纯以上规格。

二、生产流程和酶产品的鉴定

1. 生产流程 猪肾 3 公斤以 9 升 0.1M pH7.3 Tris 盐酸盐缓冲液制成匀浆;在 0°C 搅动

12 小时;2500 转(德制 Stock 离心机)离心 15 分钟。上清液以浓醋酸调 pH 至 5,再在 2500 转离心 30 分钟;弃上清液。沉淀部分以上述缓冲液稀释至 6 升。缓慢加入 2 升甲苯,于 $38-40^{\circ}\text{C}$ 搅拌保温 30 分钟,再在 2°C 搅拌过夜。2500 转离心 1 小时,可见四层:上层为甲苯,第二层呈米黄色糊状(即微粒体层),再下一层为水溶液,底部为少量沉淀。使用连接水泵的滴管先吸去甲苯,然后穿过糊状层吸去水溶液。刮出含酶的第二层糊状层,约 2000 毫升,悬浮于 pH7.3, 0.01 M Tris 盐酸缓冲液,最终体积为 3000 毫升;加结晶胰蛋白酶 2.1 克,置于 $37-40^{\circ}\text{C}$,保温 4 小时后,冷却至 4°C 。加固体硫酸铵至 20% 饱和度,2500 转离心。上清液再加固体硫酸铵至 80% 饱和度。于 2500 转离心得沉淀。酶沉淀以蒸馏水稀释 3 倍体积,装于透析袋内,在 0°C 对蒸馏水透析去盐。并对 0.02 M pH7.3 磷酸缓冲液透析平衡。上清液在 DEAE 纤维素柱 (3×50 厘米)上吸附,氯化钠分级洗脱,层析图谱见图 1。0.2M 氯化钠洗脱的酶活力峰约 100 毫升,立即对过饱和硫酸铵溶液反透析 24 小时;析出沉淀在盒式小离心机 3500 转离心 30 分钟后,倾去上清液。酶沉淀悬浮于 10 毫升饱和硫酸铵溶液,以离子交换水稀释至

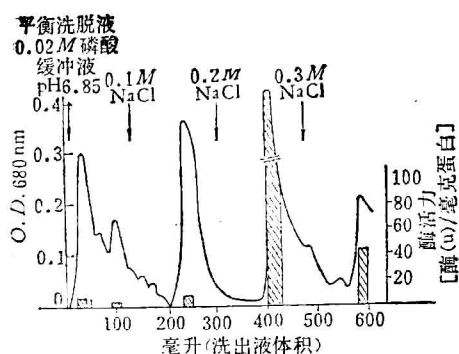


图 1 DEAE-纤维素柱层析分离氨基酶 M

——; Folin 试剂显色 680nm O.D 值^[6];
 酶活力: 5 毫升/每分钟流速收集。

50% 饱和度; 放置 30 分钟, 再在小离心机上 3500 转离心 30 分钟; 弃沉淀, 上清液再加硫酸铵至 80% 饱和度, 离心 30 分钟, 所得沉淀, 经透析去盐, 真空冻干, 可得洁白絮状干粉 150 毫克左右 (见表 1)。

表 1 猪肾中氨基酶 M 的提取

提纯过程	总活力 (单位)	比活力[u/毫克]* 对 L-亮氨酸-β-萘胺	纯化 倍数
1. 匀浆抽提 pH5 沉淀	311,000	1.8	1.0
2. 甲苯, 胰蛋白酶处理 20—80% 硫酸铵饱和 度沉淀	137,600	6.3	3.5
3. 经 DEAE-纤维素 柱分级层析	54,200	22.0	10.0
4. 50—80% 硫酸铵 饱和度沉淀经透析 去盐, 制成干粉	34,200	228.0	103.0

* 提纯过程中酶蛋白浓度测定使用紫外光谱方法^[6]

2. 产品鉴定 (1) 酶活力测定 参照 Green 方法^[5]。底料为 0.2% L-亮氨酸 β-萘胺盐酸的甲醇溶液。酶溶液: 每毫升含 20 微克氨基酶 M, 0.2M、pH7.4 Tris-HCl 缓冲液, 测活时, 在 0.5 毫升底料中加入 1 毫升酶溶液, 在 37℃ 反应 15 分钟后, 用 15% 高氯酸 0.5 毫升停止反应。冷却后依次加入 0.2% 亚硝酸钠 0.5 毫升, 0.5% 氨基磺酸铵 0.5 毫升, 各作用 10 分钟; 再加 0.05% N-甲萘基盐酸二氯乙烯 1 毫升, 放置半小时显色; 在 570 毫微米波长比色。在上述条件下, 每分钟释放出 1 微克 β-萘胺的酶定为 1 酶单位 (U)。经本所东风生化试剂厂

出厂规定, 合格产品酶活力为 200 单位/毫克蛋白。

(2) 酶自溶性检验 250 微克氨基酶 M 干粉溶于 2 毫升、0.2M、pH7.4 硼酸缓冲液, 在 37℃ 保温 24 小时后, 取 5—10 微升, 进行硅胶薄层层析, 以醇:水 = 6:4 为溶剂系统展层, 展层后经 0.1% 茚三酮丙酮溶液显色, 无明显的显色点产生, 表明基本上不形成酶自溶物。或者把酶保温液蒸干, 直接以茚三酮溶液反应显色^[6]; 比较保温前后酶液的显色物基本上不增加。(见表 2)

表 2 氨基酶 M 产品自溶性检查

茚三酮溶液显色 O.D. 570nm ^[6]	方法	透析去盐	Sephadex G-50 柱层析去盐
37℃ 保温时间			
0		0.600	1.780
24		0.680	5.200

二、结果和讨论

(1) 用普通制备离心机 (约 2500g) 代替高速 (12000g) 离心机, 节省人力, 还可缩短时间 5—10 倍。但在用胰蛋白酶酶解后使用 2500g 离心, 所得离心沉淀体积比文献所述增大二倍多。所以文献报道的酶解条件不完全适用, 为此摸索了最适的酶解条件为 37—40℃, 酶解 4 小时 (见图 2), 胰蛋白酶浓度为 0.7 毫克/毫升 (见表 3)。使氨基酶 M 从微粒体层上得到足够的释放。

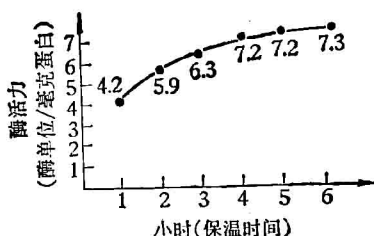


图 2 酶解时间曲线 (保温时间)

试验条件: 1. 悬浮液内温度 37—40℃; 2. 胰蛋白酶量 50 毫克; 3. 每个样品为 50 毫升微粒体, 以 0.2M、pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液稀释至最终体积为 70 毫升。

表3 不同量的胰蛋白酶对氨肽酶M释放的影响

编号	名称	胰蛋白酶量 (毫克)	酶活力 单位/毫克蛋白
1		15	4.7
2		30	3.9
3		50	6.3
4		75	5.4
5		100	8.4

试验条件: 1. 保温1小时; 2. 每个样品为50毫升微粒体, 以0.2M, pH7.4 Tris-HCl缓冲液稀释至最终体积为70毫升; 3. 悬浮液内温度为37—40℃

说明: 从表中看出随着胰蛋白酶用量的增加, 酶活力的释放也增加。因胰蛋白酶较贵, 为降低成本, 我们选用[编号3] 50毫克胰蛋白酶/70毫升的条件(即0.7毫克/毫升)。这和文献所述0.64毫克/毫升条件相近。

(2) Visking 20/32 透析袋透析去盐, 代替Sephadex G-50 柱层析法去盐。透析时产生的杂质沉淀可离心去除, 使中间产品再一次纯化。(见表2)

(3) 国产 DEAE 纤维素分级层析代替 DEAE-Sephadex A-50 梯度层析, 操作简便, 主要活力峰集中(图1)。活性部分以过饱和硫酸铵反透析缩短了浓缩过程, 可防止一般浓缩方法(如以电风扇吹干透析袋中的样品溶液)。易

长霉的弊病。经50—80% 硫酸铵分级后, 酶回收率占处理前酶活力62%。

我们将猪肾投料量增至9公斤, 使用DEAE-纤维素大柱(6×110厘米)也获得成功, 产量超过50毫克/公斤猪肾, 最高可得66毫克/公斤猪肾以上。

本文介绍的氨肽酶M制法具有方法简便, 生产流程短, 得率高, 成本低, 节省人工等优点。

工作中曾得到本所曹天钦、戚正武、谭佩辛、鲁子贤、屈贤铭、陆应钰的指导; 黄中祥、葛根发参加部分工作, 蒋传炎参加产品分析鉴定, 一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Delange, R. J. et al.: *The Enzymes* (Ed. Boyer, P. D.), Vol. 3, New York and London, Academic Press, 101, 1971.
- [2] *PRC-FRG, Joint Symposium on Nucleic Acid and Proteins* (Peptide, Synthesis Group) Abstracts, Shanghai, 49, 1979.
- [3] 张先扬等: 《生物化学与生物物理学报》, 1978年, 4期 309页.
- [4] Peleleiderer, G.: *Methods in Enzymology* (Ed. Perlman, G. E. et al.), Vol. 13, New York and London, Academic, Press, 514, 1970.
- [5] Green, M. N.: *Arch. Biochem. Biophysics*, 57, 458, 1955.
- [6] 潘家秀等: 《蛋白质化学技术》, 科学出版社, 1962年.

[本文于1980年3月24日收到]

乙基氯汞-胰岛素衍生物 1.5Å 分辨率强度分析

赵宝光 毕汝昌

(中国科学院生物物理研究所)

在蛋白质晶体学中, 一般用实验的同晶置换法获得中等分辨率的蛋白质晶体结构, 然后用数学方法, 即结构修正方法进一步提高分辨率^[1]。目前, 用同晶置换法获得的蛋白质结构的最高极限分辨率约为1.8Å。这就是我国胰岛素晶体结构分析所达到的水平^[2,3]。为了探讨进一步提高此法所得结果的分辨率的可能性, 我们对乙基氯汞-胰岛素衍生物 1.9Å—1.5Å 壳层强度数据进行了分析。

乙基氯汞-胰岛素是一个质量很好的重原子衍生物, 在三方二锌猪胰岛素 1.8Å 分辨率结构分析中起着首要的作用。我们用普通的R3晶体、按原来的浸泡条件^[4]制备了乙基氯汞-胰岛素衍生物。在PW1100四圆衍射仪上, 用CuKα辐射和一般条件($\omega/2\theta$ 扫描, 峰宽1.32°, 步长0.267°, 速度0.04°/秒)收集了1.9Å—1.5Å壳层的hKi0反射。用胰岛素晶体和衍生物晶体分别测得了854和834个强度数据。其中