

志。电泳的时程取决于被分离蛋白的种类,一般为20—60分钟。

五、蛋白区带的染色及记录

取出微量凝胶及染色

电泳毕,将电泳毛细管迅速从电泳槽上取下,立即取出凝胶。取凝胶的方法,我们采用了5-毫升金属兽用注射器,在注射器上接上一只采血针头(针头尖端截去),于针头上套上一段3厘米长的中央钻有小孔的耐压橡皮管,针头插入橡皮管内约占全长的2/3左右(封三图V)。注射器预先吸入水,再将电泳毛细管插入橡皮管的末端,然后注水,借助水压把凝胶挤去。

凝胶取出后即投入1%氨基黑乙酸液(1克氨基黑溶于100毫升7.5%乙酸)固定并染色,染色时间5分钟。经染色的凝胶可放入7.5%乙酸内进行分色,一般于30分钟分色即能完成,蛋白区带的染色十分清晰,无须进行电泳分色。

若做某些同功酶研究,可将凝胶投入酶反应溶液中进行温育并显色。

凝胶的照相及扫描

染色后的凝胶可装入细玻璃管内,管中充注7%乙酸,光源从下向上照相。凝胶染色后显示的区带,可用光密度计扫描记录,从扫描图的峰面积可作相对量比较。

染色后的凝胶若要保存,应存于充有7.5%

乙酸细玻璃管内,并在管内滴入几滴1%氨基黑乙酸溶液,使溶液略带颜色,置于冰箱保存。

结 语

我们按上述方法对人血清白蛋白、马铁蛋白、人血清蛋白以及人体肝癌组织的乳酸脱氢酶同功酶进行了电泳分析,效果较好。以氨基黑染色,能检测20毫微克(ng)量的白蛋白及铁蛋白。0.0125微升人血清电泳后,经氨基黑染色,清晰可辨15条蛋白染色区带。按Dietz(1967)显示乳酸脱氢酶同功酶的方法,进行了微量乳酸脱氢酶同功酶分析(封三图VI, VII)。

本文介绍了在现有的聚丙烯酰胺盘状电泳的设备基础上略加改进、应用玻璃毛细管建立微量聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳技术,并初步应用于微量蛋白的分析研究。微量聚丙烯酰胺盘状电泳具有设备简单,耗材(包括测试样品及凝胶原料等)少,电泳时程短,染色快,分色简便等优点。唯一困难之处是要进行显微操作,但经过多次实践,就能应用自如。

应用梯度凝胶或于凝胶表面铺上Sephadex G-100或G-200就能解决一些特殊的微量分离问题。微量聚丙烯酰胺盘状电泳与荧光免疫技术、组化方法以及放射自显影术结合使用,将使我们的研究工作推进到新的水平。

[本文于1976年4月17日收到]

胞二磷胆碱发酵条件的初步摸索

中国科学院生物物理研究所二室二组

前 言

胞二磷胆碱(简称CDP-C)是生物体磷脂代谢的重要前体。它作为治疗脑损伤引起的意识障碍的生化药物,国外六十年代初期开始用于临床。国内近年来也开始应用。临床实践证明,它对头部外伤、脑手术引起的意识紊乱,有

较好的疗效。

胞二磷胆碱的制备方法,大体上有两种:一种是有有机合成的方法;一种是生物合成(或有有机合成和生物合成相结合)的方法。本文采用后一种方法:用有机合成的方法,以氯化胆碱为原料,合成磷酰胆碱;再以磷酰胆碱和胞一磷为原料,利用啤酒酵母发酵制备胞二磷胆碱。

我们采用啤酒生产中的六到八代酵母，用正交设计的方法，对发酵条件进行了初步摸索，找到了合成胞二磷胆碱产率较高的发酵条件。

材 料 和 方 法

- 1. 磷酰胆碱的制备：参阅参考资料[1]。
- 2. 5'-胞一磷：北京首都啤酒厂产品。
- 3. 酵母：北京首都啤酒厂生产中第六到八代酵母，经水洗后，再离心（4,000 转/分）20 分钟，酵母沉淀即可用于发酵。
- 4. 发酵过程：各次试验的 5'-胞一磷浓度约为 20 微克分子/毫升。其它各项试剂的浓度，按每次试验的不同要求配制。发酵液于 28℃ 下在旋转式摇床上摇动培养。
- 5. 胞二磷胆碱相对转换率的分析：发酵液置于沸水浴中煮沸 3 分钟，在台式离心机上 3,500 转/分离心 5 分钟。取 1 毫升上清液，加入 0.2 毫升 20% 三氯乙酸，再离心。取上清液约 10 微升点样，进行上行纸层析。纸层析溶剂为：1M 乙酸铵：95% 乙醇(1:1), pH7.5。层析完毕，用热风将滤纸吹干，在紫外灯下划出胞二磷胆碱及胞一磷、胞二磷、胞三磷、胞苷各物

质的紫外吸收点，剪下斑点并剪成细条。把胞二磷胆碱的斑点纸条放入一试管中，其它斑点纸条放入另一试管中，各加 3 毫升 0.01NHCl，置于 50℃ 水浴中浸泡 3 到 4 小时。用紫外分光光度计测定 280 毫微米的光密度。计算胞二磷胆碱的 O. D. 280 和各紫外吸收斑点 O. D. 280 之和的比值，求出胞二磷胆碱的相对转换率(下称转换率)。

6. 正交试验设计和数据处理：见参考资料 [2]。

结 果

1. 第一批正交试验

根据有关文献报道^[3,4]，我们首先考察了酵母量、pH、磷酸缓冲液浓度、葡萄糖浓度、磷酰胆碱浓度、反应液体积、甲苯等几个因素对胞二磷胆碱转换率的影响。我们用 $L_8(2^7)$ 表安排这个试验。反应进行 24 小时后，停止反应，测定转换率。试验计划和结果见表 1。反应过程中，于 6 小时和 12 小时分别取样，测其转换率。结果见表 2。

由表 1 的极差计算可见，影响转换率的主

表 1 第一批正交试验因素、位级和试验结果

单 因 素 位		酵母 (毫克/ 毫升)	pH	磷酸盐 缓冲液 (微克分子/ 毫升)	葡萄糖 (微克分子/ 毫升)	磷酰胆碱 (微克分子/ 毫升)	反应液 体积 (毫升)	甲苯 %	胞二磷 胆碱 O.D.280	总 O.D. 280	转 换 率 %
试 验 号											
1		1(200)	1(8.0)	1(300)	2(800)	2(80)	1(20)	2(2%)	0.120	1.104	11
2		2(400)	1	2(200)	2	1(50)	1	1(0)	0.492	1.222	40
3		1	2(7.5)	2	2	2	2(10)	1	0.697	1.242	56
4		2	2	1	2	1	2	2	0.451	1.378	33
5		1	1	2	1(600)	1	2	2	0.302	1.609	19
6		2	1	1	1	2	2	1	0.803	1.330	60
7		1	2	1	1	1	1	1	0.566	1.375	41
8		2	2	2	1	2	1	2	0.126	0.981	13
I = 位级 1 之和		127	130	145	133	133	105	198			总和=273
II = 位级 2 之和		146	143	128	140	140	168	75			
极差 R = 大数 - 小数		19	13	17	7	7	63	123			

要因素是甲苯、反应液体积、酵母量和磷酸缓冲液的浓度。不加甲苯的效果远比加甲苯的效果好；缩小反应体积、增加酵母量及提高磷酸缓冲液的浓度，有可能提高转换率。因素 pH 的两

个位级由于较近，需要进一步考察。

由表 2 可见，各试验管 24 小时的转换率远比 6 小时及 12 小时的转换率高。延长反应时间对提高转换率是可能的。

表 2 不同时间的转换率(%)

取样时间 试 验 号	6 小时	12 小时	24 小时
1	<1	3	11
2	25	28	40
3	22	20	56
4	25	25	33
5	9	8	19
6	43	42	60
7	18	15	41
8	6	5	13

2. 第二批正交试验

根据第一批正交试验结果,除把 5'-胞一磷的浓度固定外,也把磷酸缓冲液、葡萄糖和磷酰胆碱的浓度固定下来,变化四个因素,每个因素取三个位级。用 $L_9(3^4)$ 表安排本批试验。试验计划和结果见表 3。

由表 3 可见,延长反应时间及增加酵母量有可能提高转换率;反应液体积以 10 毫升为好。这与第一批正交试验结果是一致的。

3. 第三批正交试验

表 3 第二批正交试验因素、位级和结果*

单位 因素 试验号	pH	反应时间 (小时)	酵 母 (毫克/毫升)	反应液体积 (毫升)	胞二磷胆碱 O.D. 280	总 O.D. 280	转 换 率 %
1	1(8.0)	1(24)	3(500)	2(8)	0.860	1.087	79
2	2(7.5)	1	1(300)	1(10)	0.777	1.149	68
3	3(7.0)	1	2(400)	3(6)	0.616	1.045	59
4	1	2(18)	2	1	0.731	0.985	73
5	2	2	3	3	0.577	0.804	68
6	3	2	1	2	0.586	1.063	55
7	1	3(12)	1	3	0.189	1.077	18
8	2	3	2	2	0.489	1.050	47
9	3	3	3	1	0.749	1.171	64
I = 位级 1 之和	170	206	141	205			总和 = 531
II = 位级 2 之和	183	196	179	181			
III = 位级 3 之和	178	129	211	145			
极差 R = 大数 - 小数	13	77	70	60			

* 每个试验管中,除 5'-CMP 的浓度固定为 20 微克分子/毫升外,磷酸盐缓冲液浓度为 300 微克分子/毫升;葡萄糖的浓度为 800 微克分子/毫升;磷酰胆碱的浓度为 80 微克分子/毫升

为了确定起作用的主要因素及摸准用量,提高转换率,本着多安排因素和多安排位级的原则,在现有各因素的好位级周围继续考察。第三批正交试验用 $L_{18}(6^1 \times 3^6)$ 表来安排,因素、位级和结果见表 4。

由表 4 可见,因素 pH 也是影响转换率的重要因素。除偏酸的 pH 效果不好以外, pH 的其余位级对转换率的影响较小; pH 以外各因素的位级间极差已经不大。这表明,各个因素的好位级已基本清楚。

4. 第四批正交试验

本试验的目的,在于验证第三批正交试验得到各因素的好位级对转换率的影响。本批试验用 $L_{18}(2^1 \times 3^6)$ 来安排。试验因素、位级和结

果见表 5。

由表 5 可见,各因素的现有位级对转换率的影响基本同第三批正交试验结果,转换率也已经比较理想。从第四批试验推导出来的各因素的好位级,经重复验证,可以作为胞二磷胆碱发酵的条件。即:

pH 8.0

胞一磷 20 微克分子/毫升

酵母 550 毫克/毫升

磷酸盐缓冲液 200 微克分子/毫升

葡萄糖 1000 微克分子/毫升

磷酰胆碱 90 微克分子/毫升

MgSO₄ 20 微克分子/毫升

反应时间 24~32 小时

表 4 第三批正交试验因素、位级和结果

单 因 素 位 试验号	pH	酵 母 (毫克/ 毫升)	磷酸盐 缓冲液 (微克分子/ 毫升)	葡 萄 糖 (微克分子/ 毫升)	磷酰胆碱 (微克分子/ 毫升)	MgSO ₄ (微克分子/ 毫升)	反应时间 (小时)	胞二磷 胆碱 O.D. 280	总 O.D.280	转换率 %
1	1(7.0)	1(450)	3(400)	2(800)	2(80)	1(14)	2(24)	0.701	1.159	61
2	1	2(550)	1(300)	1(600)	1(60)	2(12)	1(20)	0.648	1.206	53
3	1	3(600)	2(200)	3(900)	3(100)	3(8)	3(28)	0.700	1.259	56
4	2(6.5)	1	2	1	2	3	1	0.158	0.988	16
5	2	2	3	3	1	1	3	0.656	1.354	48
6	2	3	1	2	3	2	2	0.360	1.112	33
7	3(7.5)	1	1	3	1	3	2	0.767	1.177	65
8	3	2	2	2	3	1	1	0.728	1.156	63
9	3	3	3	1	2	2	3	0.509	1.041	48
10	4(8.0)	1	1	1	3	1	3	0.808	1.301	62
11	4	2	2	3	2	2	2	0.761	1.155	66
12	4	3	3	2	1	3	1	0.725	1.237	59
13	5(9.0)	1	3	3	3	2	1	0.692	1.142	61
14	5	2	1	2	2	3	3	0.773	1.272	61
15	5	3	2	1	1	1	2	0.988	1.738	57
16	6(8.5)	1	2	2	1	2	3	0.687	0.993	69
17	6	2	3	1	3	3	2	0.927	1.718	54
18	6	3	1	3	2	1	1	0.786	1.263	62
I = 位级 1 之和	170	334	336	290	351	353	314	总和 = 994		
II = 位级 2 之和	97	345	327	346	314	330	336			
III = 位级 3 之和	176	315	331	358	329	311	344			
IV = 位级 4 之和	187									
V = 位级 5 之和	179									
VI = 位级 6 之和	185									
极差 R = 大数 - 小数	90	30	9	68	37	42	30			

反应液体积 10 毫升

反应温度 28℃

发酵反应可根据需要按此比例扩大。

讨 论

胞二磷胆碱是治疗意识障碍较好的药物。国内外有不少综述和报道。本文所述的发酵条件,可以在设备简单的条件下得到较高转换率的胞二磷胆碱。所用酵母是啤酒生产中的下脚料,这对开展综合利用,降低成本是有意义的。

用啤酒酵母发酵合成胞二磷胆碱,与酵母的生理状况很有关系。T. Tochikura 等人用自己培养的酵母经风干后,在几小时之内就可发酵合成较高产率的胞二磷胆碱。但我们用啤酒生产中的六到八代酵母,发酵合成胞二磷胆碱

需要 24 到 32 小时。不同代数的酵母,效果也不一样。如第三批正交试验采用六代酵母,得到的转换率为 70% 左右;第四批正交试验用八代酵母,得到的转换率为 80% 左右。所以文中推荐的发酵条件只做为参考。从作者感受说,正交试验是摸索多因素试验条件多快好省的方法。

由于发酵过程与酵母的生理状况有关,所以应该随时测定转换率来控制发酵时间。测定转换率应使用快速灵敏的方法。

在生物合成中,以磷酰胆碱为原料,利用啤酒酵母发酵合成胞二磷胆碱的方法较成熟,报道较多。近年来,有以氯化胆碱为原料,用啤酒酵母和汉森氏变异酵母 (*Hansenula jadinii*),合成胞二磷胆碱的报道^[5]。我们是从综合利用的角度出发,用啤酒生产中的淘汰酵母,发酵合成

表 5 第四次正交试验因素、位级和结果

单 因 素 位 试验号	pH	酵 母 (毫克/ 毫升)	磷酸盐 缓冲液 (微克分子/ 毫升)	葡 萄 糖 (微克分子/ 毫升)	磷酸胆碱 (微克分子/ 毫升)	MgSO ₄ (微克分子/ 毫升)	反应时间 (小时)	胞二磷 胆碱 O.D. 280	总 O.D. 280	转换率 %
1	1(7.5)	1(550)	1(200)	3(1000)	2(70)	2(17)	1(24)	0.382	0.498	77
2	1	2(450)	1	1(400)	1(90)	1(14)	2(28)	0.339	0.438	77
3	1	3(650)	1	2(700)	3(50)	3(20)	3(32)	0.544	0.650	84
4	1	1	2(400)	2	1	2	3	0.541	0.692	78
5	1	2	2	3	3	1	1	0.447	0.587	76
6	1	3	2	1	2	3	2	0.307	0.546	56
7	1	1	3(300)	1	3	1	3	0.450	0.659	68
8	1	2	3	2	2	3	1	0.493	0.601	82
9	1	3	3	3	1	2	2	0.465	0.554	84
10	2(8.0)	1	1	1	1	3	1	0.558	0.687	83
11	2	2	1	2	3	2	2	0.444	0.532	84
12	2	3	1	3	2	1	3	0.513	0.587	89
13	2	1	2	3	3	3	2	0.483	0.591	82
14	2	2	2	1	2	2	3	0.410	0.678	60
15	2	3	2	2	1	1	1	0.449	0.575	78
16	2	1	3	2	2	1	2	0.451	0.564	80
17	2	2	3	3	1	3	3	0.519	0.583	89
18	2	3	3	1	3	2	1	0.390	0.607	64
I = 位级 1 之和	682	468	494	408	489	468	460			
II = 位级 2 之和	709	468	430	486	444	447	463			
III = 位级 3 之和		455	467	497	458	476	468			
极差 R = 大数 - 小数	27	13	64	89	45	29	8			总和 = 1391

胞二磷胆碱。它的好处在于,菌种来源方便,不需自己培养。但这种方法要以有机合成的磷酸胆碱为原料,才能得到较高的转换率。在有条条件的情况下,应该摸索从氯化胆碱出发,一步合成高转换率的胞二磷胆碱。

参 考 资 料

[1] 上海实验生物研究所核酸研究组,上海药用辅料厂:

《生物物理与生物化学进展》,1975年,第1期,第19页。

[2] 俭济斌:《多因素试验正交选优法》,科学出版社,1976年。

[3] T. Tochikura, et al.: *J. Ferment. Technol.* **48**, 769, 1970.

[4] 宫内謙吉,内田一生,吉野宏: *Amino Acid and Nucleic Acid 発酵と代謝* **25**, 47, 1972。

[5] Y. Kariya, et al., *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* **54**, 3, 183, 1976.

[本文于1977年4月11日收到]