

在凝胶中加入 6M 尿素, RNA 区带紧密, 从而大大提高电泳的分辨率, 图谱十分清晰。同时, 加入尿素的凝胶在较低温度下才凝固, 使 RNA 易于回收。

凝胶的浓度对 RNA 分辨率有明显的影响。在琼脂糖为 0.5—2.0% 的区间内, 胶浓度较低则高分子量的 RNA 有较高的分辨率, 而胶浓度较高时, 则中等和低分子量的 RNA 分离的较好。

本法用正丁醇-BDH 回收核酸。因 BDH 在盐的水溶液中与带负电荷的核酸形成复合物, 并借助 BDH 的十六烷基的疏水能力进入醇层, 当水相盐浓度增高时, 此复合物再转移到

水相中并发生解离, 再用氯仿即可把 BDH 从水相中除去。BDH 的引入, 使核酸的回收变得简单、有效。

参 考 文 献

- [1] Langridge, J. et al.: *Anal. Biochem.*, **103**, 264, 1980.
- [2] Locker, J.: *Anal. Biochem.*, **98**, 358, 1979.
- [3] Hurst, R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **444**, 75, 1976.
- [4] Lewandowski, L. J. et al.: *J. Virol.*, **7**, 434, 1971.
- [5] Dudov, K. P. et al.: *Anal. Biochem.*, **76**, 250, 1976.

[本文于1982年1月28日收到]

Trichoderma sp. 纤维素酶内源抑制剂的进一步纯化与特性

齐义鹏* 陈一平

(中国科学院成都生物研究所)

雷克健

(中国科学院生物物理研究所)

最近十多年开展起来的微生物酶内源抑制剂的研究具有重大意义^[1,2]。目前, 发现了十多种酶都有抑制剂^[2]。我们从 *Trichoderma* sp. 867 培养液中曾得到纤维素酶的内源抑制剂粗粉^[3]。本文报道它的进一步纯化和某些理化性质。

一、材料和方法

1. 材料: 起始材料为桔黄色抑制剂粗粉, 其半抑制剂量 (I_{50}) 为 $1.3-1.4 \times 10^{-6} \text{mM}$ 。纤维素酶为提纯 40 倍的灰白色粉末^[3]。Sephadex G-25、蓝色葡聚糖均系 Pharmacia 公司产品, Ampholine 为 LKB 公司生产, 其余所用试剂均系 AR 级。

2. 方法:

1. 凝胶过滤: 抑制剂用 Sephadex G-25 在 LKB 柱层析系统上进行纯化, 或用国产蛋白核酸检测仪记录洗脱过程。柱体积 $1.6 \times 100 \text{cm}$, 预先用 0.05%、pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液平

衡。以蓝色葡聚糖和重铬酸钾标定柱参数。

将 0.5 克抑制剂粗粉溶于 5.0 毫升洗脱液中, 离心, 取上清液 3.0 毫升上柱。同一缓冲液洗脱。流速 $3.2-4.0 \text{ml 分}^{-1}$ 。分部收集, 合并具有抑制活力的组分, 冷冻真空干燥, 得干粉即为纯化样品, 供以下实验应用。

2. 抑制活力测定: 用 3,5 二硝基水杨酸 (DNS) 法^[3]测抑制剂对纤维素酶水解羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 的抑制作用。

3. 分子量测定: 采用上述凝胶过滤法^[4]。为消除凝胶对样品的滞留, 洗脱改用 30% 醋酸 (HAC)。以折分后的胰岛素(四川医学院制药厂生产) A、B 链和酶解胰岛素后的两个片段以及催产素(成都制药三厂生产)为测定分子量的标准。

胰岛素折分^[5]: 称样 5.0 毫克, 加巯基乙醇 100 微升, 尿素 0.48 克, 0.02M pH8.3 磷酸缓

* 现为武汉大学病毒系教师

冲液 1.0 毫升。抽气,在 100℃下加热 15 分钟,取出立即上柱。

胰岛素酶解^[6]: 称样 5.0 毫克,加 0.02 M pH8.0 磷酸缓冲液 1.0 毫升,胰凝乳蛋白酶 100 毫克,25℃保温 2 小时。取出离心,用上清液立即上柱。

4. 电泳

1) 聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 不连续盘状电泳^[7]: 浓缩胶 3.0%, pH6.7; 分离胶 10% pH8.9。电极缓冲液为 pH8.3、0.05% 的 Tris-HCl。加纯化样品(含量 200 微克),同时作酶样对照。电泳条件: 200—300V, 4.1mA 管⁻¹, 2.0 小时。取出用 12% 三氯醋酸 (TCA) 固定,考马斯亮蓝染色。

2) 高压电泳: 在 56 × 3.5cm 的 Whatman No.1 滤纸条上加纯化样品 20 微升(含量 1.0 毫克),以 pH 6.5 的吡啶-HCl 为缓冲液。电压 4000V, 29mA, 15 或 45 分钟。取出用茚三酮染色。

5. 紫外吸收光谱: 紫外 (UV) 扫描在日立 556 双波长双光束紫外分光光度计上进行。配粗样和纯化样品各 2.0mg ml⁻¹, 扫描范围 $\lambda_{250-100nm}$

6. 等电点测定: 用 LKB 110 毫升柱等电聚焦仪测定^[8]。蔗糖梯度 5—50%。重液中加 pH3.5—10 的 Ampholine 2.7 毫升,纯化样品 10 毫克。阴极液在下,阳极液在上。电压 600V, 聚焦 24 小时。分部收集 2.0 毫升、管⁻¹。并同时记录流出液的紫外吸收值。用雷磁 25 型酸度计测每管 pH。并作 Ampholine 空白对照,以排除背景干扰。

7. 氨基酸组成: 称粗样和纯化样品各 1.0 毫克,加 5.7N 重蒸盐酸 1.0 毫升,100℃水解 24 小时,真空干燥,用日立 835 型氨基酸自动分析仪测定。

二、实验结果

1. 抑制剂的纯化

粗样在凝胶过滤时,用 0.05% pH 7.5 的 Tris-HCl 洗脱,出现三个峰;用 30% 的 HAC

洗脱只有一个峰(图 1)。多次实验结果相同。用下式计算各峰的分配系数 (K_d):

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

发现, Tris-HCl 洗脱时,其活力峰 (71 管) $K_d > 1.0$,表明凝胶对样品有滞留效应。30% HAC 洗脱,滞留现象消除,活力峰 (51 管) $K_d = 0.49$ 。层析行为正常。间隔测定各收集管的抑制活力,得到的抑制曲线有两个活力峰 (43 管, 51 管)。活力峰 2 正好与 30% HAC 的洗脱峰相重叠(图 1)。

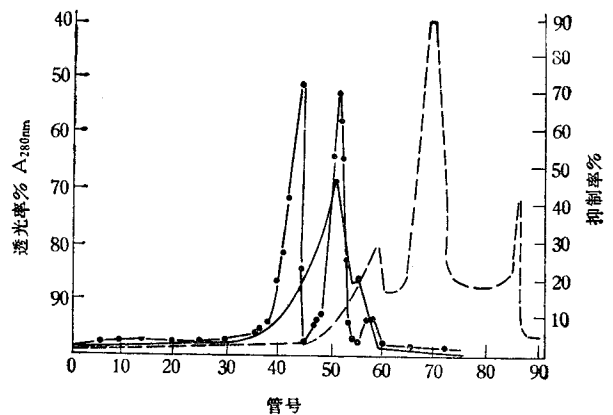


图 1: 抑制剂在 Sephadex G-25 柱上的层析图谱及其抑制活力

——Tris-HCl 洗脱曲线; ---30% HAC 洗脱曲线
- · - · - 抑制活力曲线。活力测定条件: 100r·ml⁻¹ 纤维素酶 0.2ml, 洗脱液 0.2ml, 0.8% CMC-Na 2.0 ml, pH4.0, 50℃, 10 分; 显色, 530nm 比色, 活力峰: Tris-HCl 洗脱的为 71 管; 30% HAC 洗脱的为 43 和 51 管

纯化样品在 PAG 电泳中向正极移动(因电泳 pH 为 8.3), 得到一条带,酶样有 7 条带(图 2); 高压电泳时,纯化样品向负极移动(因电泳 pH 为 6.5),也只得到一个斑点(图 2)。

将样品凝胶电泳后的胶柱切成 12 小段,加 1.0 毫升缓冲液搅碎,测定每段的抑制活力。发现其活力峰与染色带一致(图 3)。

2. 抑制剂的某些理化性质

抑制剂粗样和纯化样的 UV 吸收光谱稍有差异。粗样在 λ_{280nm} 有最大吸收,消光系数 $E_{cm}^{1\%} = 10.1$; 而纯化样品为一单调下降曲线,其 λ_{280nm} 处的 $E_{cm}^{1\%}$ 为 4.3 (图 4)。

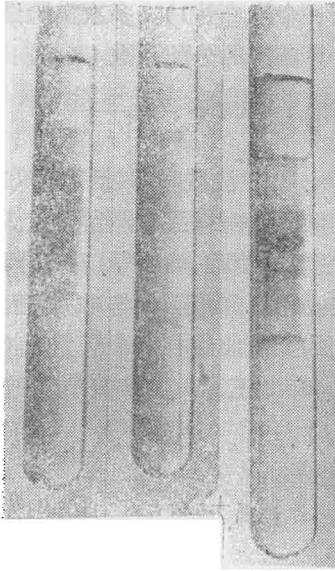


图 2 抑制剂的电泳图谱

左: 酶的 PAG 电泳; 中: 抑制剂的 PAG 电泳;
右: 抑制剂的高压电泳(时间: 45 和 15 分)

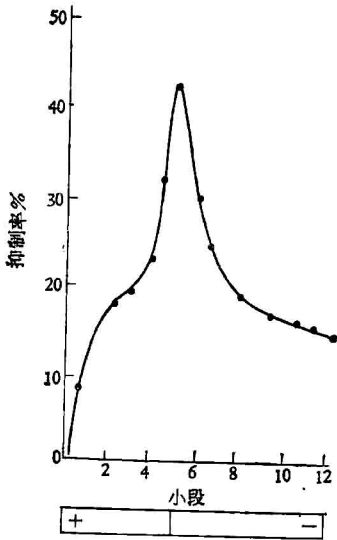


图 3 抑制剂的 PAG 电泳与相应的抑制活力

条件: 同图 1

通过凝胶过滤法测定, 以标准样品的分子量 (MW) 对数对 K_d 值作图, 得到一条直线。由此查出抑制剂的 MW 为 2850 道尔顿(图 5)。

用蔗糖等电聚焦法测定抑制剂的等电点 (pI) 时, 发现一个主峰和一个较明显的小峰。其 pI 分别为 6.7 和 6.3, 由于未测抑制活力, 不能确定哪一个是活力峰(图 6)。

抑制剂以甘氨酸 (Gly) 为主要成分(图 7),

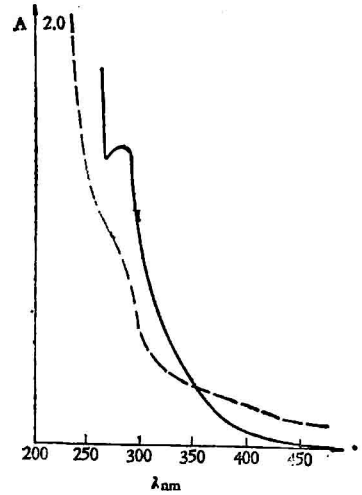


图 4 抑制剂的 UV 吸收光谱

——粗样 ——纯化样

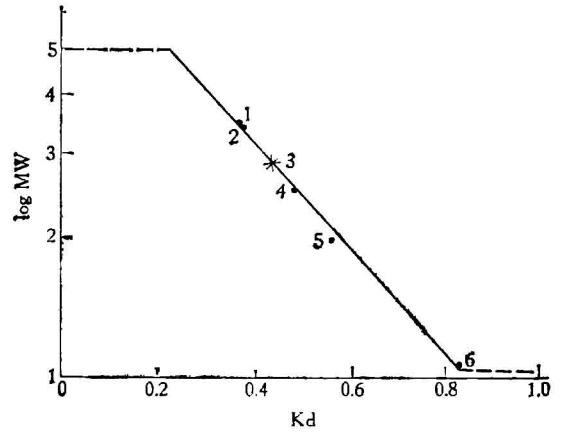


图 5 凝胶过滤法测抑制剂的分子量

1. 胰岛素 B 链, 2. 胰岛素 30 肽, 3. 抑制剂, 4. 胰岛素 A 链, 5. 胰岛素 16 肽 6. 催产素

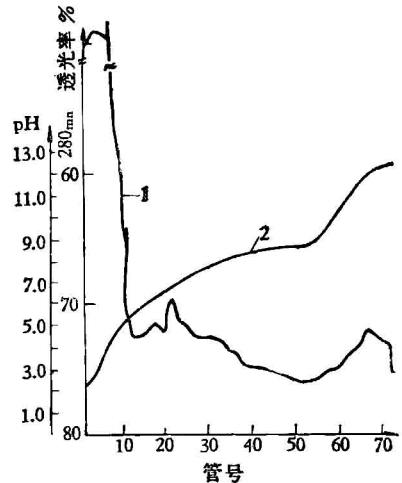


图 6 蔗糖等电聚焦法测抑制剂的等电点

1. 抑制剂 UV 吸收曲线, 2. pH 梯度

表 1 抑制剂粗样与纯化样品氨基酸组成的比较

样 品	粗 样		纯 化 样 品			
水解条件	HCl		HCl		HCl+ 草酸+巯基乙醇	
氨基酸	nM	比值 $\times 10^{-3}$ *	nM	比值 $\times 10^{-3}$ *	nM	比值 $\times 10^{-3}$ *
未知 1	0.27	7.0	0.85	14.0	1.51	29.0
未知 2	0.23	6.0	1.44	29.0	0.99	18.0
未知 3	0.83	23.0	3.25	53.0	2.56	47.0
未知 4	0.66	18.0	2.54	42.0	1.65	30.0
Asp	0.26	7.0	0.25	4.1	0.20	3.7
Thr	0.07	2.0	0.11	1.8	0.09	1.7
Ser	0	0	0.20	3.2	0.15	2.8
Glu	0.30	8.1	0.35	5.7	0.26	4.7
Gly	30.06	1000	60.89	1000	5437	1000
Ala	0.37	10.2	0	0	0	0
Cys	0.09	2.5	0.17	2.7	0.16	3.0
Val	0.39	10.8	0.48	8.1	0.41	7.6
Met	0.11	3.0	0.11	1.8	0.07	1.3
Ile	0.14	3.9	0	0	0.27	4.8
leu	0.17	4.6	0	0	0	0
Tyr	0.33	9.0	0.26	4.3	0.26	4.7
Phe	0.34	9.1	0.32	5.3	0.30	5.6
lys	0.09	2.5	0.08	1.4	0.07	1.3
回收率%	3.0		5.0		4.4	

* 以 Gly 为 1 的比值

而纤维素酶含 17 种氨基酸,二者有显著差异。此外,抑制剂还含有 4 种含氨基的未知物质和其他 13 种氨基酸。比较粗样和纯化样氨基酸含量的差异,发现,经纯化后, Gly 含量增加近一倍,4 种未知物质含量增加 3—4 倍,相反,其他氨基酸的含量大都略有下降。如以 Gly 含量为 1.0,计算 4 种未知物和其他氨基酸的比值,

此现象更为显著,氨基酸回收率由 3.0% 提高到 4.4—5.0% (表 1)。说明: (1) 通法纯化,提高了抑制剂的纯度; (2) Gly 和 4 种含氨基的未知物质是此抑制剂的特征性物质; (3) 其他氨基酸只含痕迹量,可能是杂质。

三、讨 论

凝胶过滤时,以 0.05% Tris-HCl 洗脱有三个峰,用 30% HAC 洗脱只一个峰,大概这是由于其中的杂环类疏水物质,在 Sephadex 上产生的滞留的缘故。30% HAC 洗脱消除了此滞留现象,层析行为正常。这就说明,此抑制剂是由分子量相等、紫外吸收特性一致、电泳行为相同但含杂环类基团不同的三种物质组成。从抑制活力曲线看出,此抑制剂正好与洗脱峰相重叠。此外,在洗脱峰前,也还有另一个抑制活力峰,它没有紫外吸收、分子量稍大。然而,我们进行详细研究的只是前者。

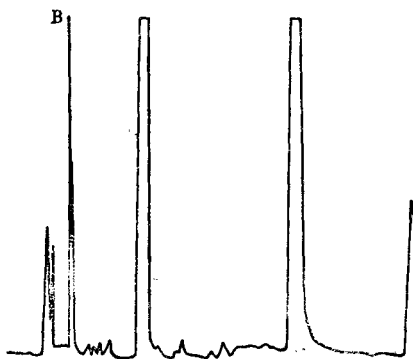


图 7 抑制剂的氨基酸组成分析

左: 4 种未知物质, 中: Gly; 右: 氨基酸

测分子量时,由于小肽难以购置,故用胰岛素进行拆分^[5]和降解^[4]。多次拆分效果较好。A 链洗脱体积平均为 137.4 毫升, B 链为 156.9 毫升,而胰岛素本身恰好在 V_0 处出现。我们按顾嘉琨等法^[4]降解胰岛素,得到三个峰,洗脱体积分别为: A 峰 136.7 毫升, B 峰 167.6 毫升, C 峰在 V_i 处出现,相似于他们的 I、II、V 峰,分别应为 30 肽、16 肽和 5 肽。由此得到的标准曲线,可查出抑制剂的分子量。

在抑制剂的化学组成方面,纯化样和粗样比较, Gly 和 4 种含氨基物质的含量增高,其他氨基酸的含量降低,只含痕迹量,可能是杂质。正是由于这些微量氨基酸,特别是酪氨酸和苯丙氨酸含量的悬殊,导致了粗样和纯化样紫外吸收的微弱差异。

根据以上结果,初步认为,纤维素酶具紫外

吸收的这一内源抑制剂,可能是一组理化性质极其相似、含多聚 Gly 的结合肽。

参 考 文 献

- [1] L. Lorond: *Methods in Enzymol.*, XIV, part B. Academic press, 678, 1976.
- [2] A. M. Безбородов: *Прикладная Биохим. микроб.*, 14(1), 5, 1978.
- [3] 齐义鹏:《纤维素酶及其应用》,四川人民出版社,1980.
- [4] 鲁子贤:《生物化学与生物物理学进展》,1974 年,1 期,42 页。
- [5] LKB: *SDS and Conventional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor Application Note* 306, 1976.
- [6] 顾嘉琨,鲁子贤等:《生物化学与生物物理学报》,1964 年,11 卷,365 页。
- [7] 莽克强:《聚丙烯酰胺凝胶电泳》,科学出版社,1975.
- [8] LKB: *Preparation Electrofocusing in Density Gradients, Application Note*, 219, Review, 1979.

[本文于 1982 年 3 月 29 日收到]

(上接第 45 页)

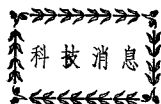
本文认为是由于矽尘使肺上皮细胞线粒体破坏, ATP 酶丢失或不能装配到膜上,使肺上皮细胞供能不足,导致上皮细胞死亡,成纤维细胞增生。因此在矽肺发病过程中,生物膜能量偶联问题,值得重视。

参 考 文 献

- [1] 殷玲豫:《生物化学与生物物理进展》,1982 年,1 期,44—47 页。

- [2] Gregg, C. T.: *Methods in Enzymology*, Vol. 10, 181, Estabrook, R. W. (ed)). Academic Press New York, 1967.
- [3] Schneider, W. E.: *J. Biol. Chem.*, 161, 193, 1945.
- [4] P. 康德拉:《分子生物学方法》(李申德译),科学出版社出版,1977 年,92—96 页。
- [5] Summer, J. B.: *Nature*, 100, 413, 1944.
- [6] 刘树森等:《生物化学与生物物理学报》,1976 年,8(4) 卷,313 页。
- [7] Mevel-Ninio, M. T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 376, 485, 1976.

[本文于 1981 年 3 月 30 日收到]



欧洲分子生物学实验室领先建立核苷酸序列数据库

海德堡欧洲分子生物学实验室 (EMBL) 领先宣布建立核苷酸序列数据库,要求各期刊以便于计算机阅读的统一格式向 EMBL 数据库提供序列分析数据。EMBL 规定的统一格式与期刊报道中常用格式有所不同,期刊中一般强调序列与转译成氨基酸时读码格式的对应性。而 EMBL 则要求输入数据库的序列数据

以 10 个或 15 个核苷酸分段的格式书写,以减少计数可能引起的失误和便于计算机检索。目前分子生物学杂志已同意 EMBL 的建议。核酸研究杂志表示基本同意,但需讨论细节,自然杂志正在研究此建议。

“Nature” 296, 596. (情)

1982-4-15.