

参 考 文 献

- 1 饶欣欣, 王惠媛, 吴小林等. 生化药物杂志, 1991; 1: 21
- 2 Maeda H, Ueda M, Morinaga T *et al.* J Med Chem, 1985; 28: 455
- 3 Ogino T, Inoue M, Ando Y *et al.* Int J Peptide Protein

Res, 1988; 32: 153

- 4 Misra H P, Fridovich I. Arch Biochem Biophys, 1977; 181: 308
- 5 Snyder S L, Sobocinski P Z. Anal Biochem, 1975; 64: 284
- 6 Brahms S, Brahms J. J Mol Biol, 1980; 138: 149

芽孢杆菌 O 74 碱性纤维素酶的 纯化和性质研究

王 冬 宋桂经 高培基

(山东大学微生物系, 济南 250100)

摘要 对芽孢杆菌 (*Bacillus*) O74 菌株产生的纤维素酶经过 Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-25 和疏水相互作用 Agarose 4B 三种层析方法, 分离纯化到一个仅具有内切 β -葡聚糖酶 (CMC 酶) 活性的纯组分. 提纯后酶的比活力提高了 27.9 倍, 总回收率为 40%. 分子量和等电位点分别为 52 500 和 4.1. 酶在 pH 4—12 范围内均具有较高活性. 其最适反应温度为 50℃, 最适反应 pH 为 7.0, 属于反应 pH 范围较广泛的耐碱性纤维素酶. 除 Hg^+ , Ag^+ , Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 等少数离子及少数表面活性剂、助剂对酶活性有一定影响外, 酶活性相当稳定, 符合洗涤剂用酶的条件.

关键词 分离纯化, 纤维素酶, 碱性

大多数真菌、细菌产生的纤维素酶一般只能在中性偏酸性范围内发挥作用, 对这一类酶的分离、纯化和性质研究, 现已取得了重大进展. 近年来, 产碱性纤维素酶的微生物菌种选育和酶的工业化应用工作越来越引起人们的重视^[1]. 特别是将碱性纤维素酶应用于洗涤剂中, 国外已达产业化水平, 使加酶洗涤剂增加了新品种. 这其中被选为生产用菌种的微生物一般为耐碱性细菌, 其生长条件不象嗜碱性细菌那样严格, 所合成的耐碱性酶除在 pH 9 以上具有酶活外, 在中性及弱酸性环境下也能保持相当活性, 从而使酶的适用范围更广泛. 对于这一类微生物及酶性质的研究, 国外已做了一定的工作^[2], 国内尚未见正式报道. 我们曾分离得到一株产碱性纤维素酶的芽孢杆菌 *Bacillus* O74, 其在较好发酵条件下的酶活性水平高于国外文献报道的菌株^[1,3]. 本文对该

菌株合成的耐碱性纤维素酶进行了纯化, 并进行了酶学性质研究. 为将来实际应用的需要, 特对其在有洗涤剂成分存在条件下的性质进行了初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 粗酶液 将经过 3000r/min 离心所得芽孢杆菌 *Bacillus* O 74 发酵液上清, 加入 3 倍体积的冷无水乙醇, 充分沉淀后, 再经 3000r/min 离心, 将所得沉淀自然风干. 需要时, 加入 pH 6.8 0.02mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液至原发酵液体积, 溶解沉淀, 即得粗酶液.

1.1.2 层析用凝胶 Sephadex G-100,

DEAE-Sephadex A-25 和苯基交联琼脂糖 Agarose 4B 均为瑞典 Pharmacia 公司产品。

1.1.3 电泳用品 聚丙烯酰胺凝胶电泳用丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵和四甲基乙二胺为上海生化试剂厂产品；等电聚焦电泳用两性载体 Ampholine 为 Pharmacia 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化 三种层析用凝胶柱分别为 $\Phi 1.5\text{cm} \times 120\text{cm}$, $\Phi 2.6\text{cm} \times 30\text{cm}$ 和 $\Phi 2.0\text{cm} \times 25\text{cm}$ 。三种层析用洗脱液分别为 pH 6.8, 0.02mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$; pH 9.0, 0.01mol/L Tris-HCl (梯度洗脱时添加终浓度为 2mol/L 的 NaCl) 和 pH 6.0, 0.05mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (NaCl 梯度为 4—0mol/L)。上样酶液事先用相应起始洗脱液透析 24h 以上。用 HD-85-5A1 核酸/蛋白检测仪 (浙江永嘉电器厂) 检测 280nm 处光吸收。洗脱速度为 15ml/h, 每收集管收集酶液 5ml。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 圆盘电泳分离胶、浓缩胶浓度分别为 7% 和 3.5%—4%, 电极缓冲液为 pH 8.3 Tris-Gly 缓冲液, 考马斯亮蓝染色。

1.2.3 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳 板状电泳, 凝胶浓度 T 为 25%, C 为 3%, 含 pH 3—6 两性载体 5%。蛋白样品 2 μl , 电泳时间: 100V 为 15min, 200V 为 15min, 450V 为 60min。用考马斯亮蓝 R-250 染色。对照组以同样方法电泳。以标准蛋白等电点位置推算出待测酶蛋白等电点。

1.2.4 凝胶过滤法测酶蛋白分子量 用 Sephadex G-100 层析 ($\Phi 1.6\text{cm} \times 100\text{cm}$) 测定。以外插法测定酶蛋白分子量。

1.2.5 纤维素酶活性测定 见文献 [4]。

1.2.6 可溶性蛋白测定 按 Folin-酚^[5]法测定。

1.2.7 酶稳定性测定 见文献 [6]。

2 结 果

2.1 酶的纯化

2.1.1 Sephadex G-100 层析 粗酶液 5ml 上

柱层析, 结果见图 1。

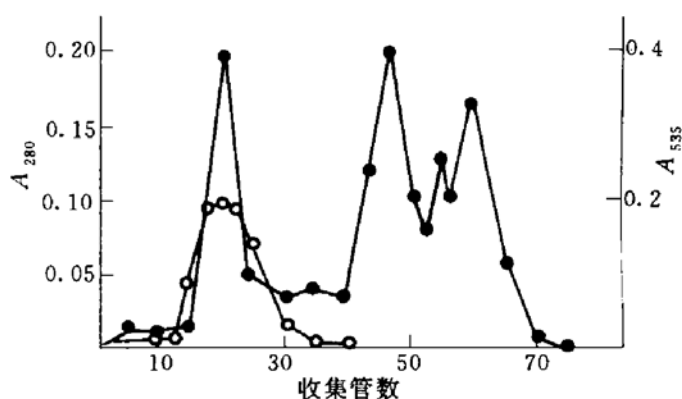


图 1 Sephadex G-100 柱层析图谱

●—● A_{280} ; ○—○ CMC 酶活性, CMC 酶活以 A_{535} 表示。

2.1.2 DEAE-Sephadex A-25 层析 将由 Sephadex G-100 层析流出的、具有 CMC 酶活性的第 12—28 管收集液合并、浓缩, 透析好后上 DEAE-Sephadex A-25 层析, 结果如图 2 所示, 只出现单蛋白峰, 且 CMC 酶活性都集中于此峰中。

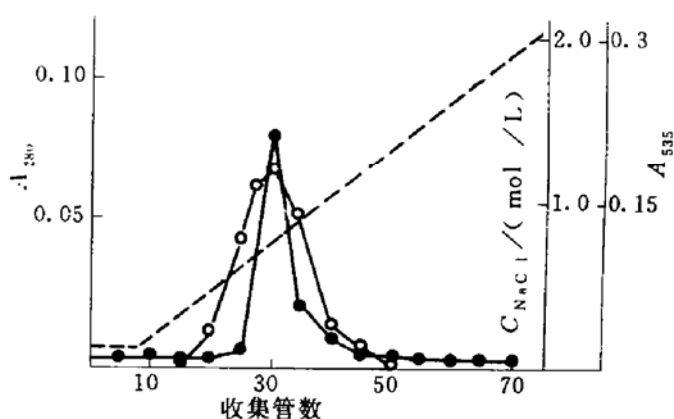


图 2 DEAE-Sephadex A-25 层析图谱

●—● A_{280} ; ○—○ CMC 酶活性; ---- NaCl 梯度。CMC 酶活以 A_{535} 表示。

2.1.3 疏水相互作用层析 将从 DEAE-Sephadex A-25 柱流出的第 28—35 管收集液合并、浓缩, 透析好后上苯基交联琼脂糖凝胶 Agarose 4B 层析, 结果见图 3。仍只出现单蛋白峰, CMC 酶活力集中于此峰中。将第 12—18 管收集液合并, 即为纯化好的 CMC 酶液 (图 1—3 中碱性棉花酶活和 β -葡萄糖苷酶活均

在误差范围内,故未在图中标出)。

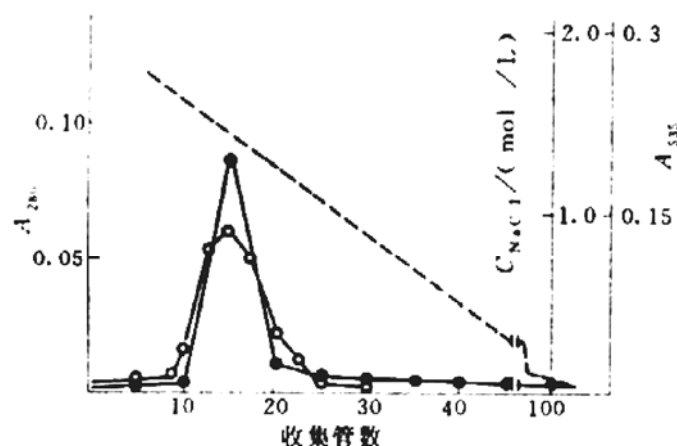


图3 疏水相互作用层析图谱

●—● A_{280} ; ○—○ CMC 酶活性; ---- NaCl 梯度。
CMC 酶活以 A_{535} 表示。

经过以上三种不同类型柱层析纯化后,得到一个纯 CMC 酶蛋白组分(图4),整个纯化步骤见表1。

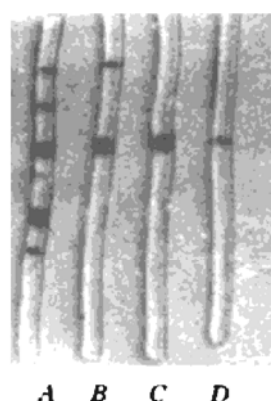


图4 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

A: 粗酶液; B: 过 Sephadex G-100 后酶液;
C: 过 DEAE-Sephadex A-25 后酶液; D: 过
Agarose 4B 后酶液。

表1 酶的纯化

	总活力 /U	总蛋白 /mg	比活力 /(U/mg)	提纯 倍数	回收率 /%
粗酶液	1500	5300.4	0.283	1	100
Sephadex G-100	868	909.1	0.905	3.2	57.9
DEAE-Sephadex A-25	630	83.7	7.53	26.6	42
疏水层析	595	75.3	7.90	27.9	40

2.2 纯化 CMC 酶部分性质研究

2.2.1 酶的分子量测定 以凝胶过滤法测定,酶蛋白分子量为 52 500 (与 SDS 凝胶电泳法测定结果相同)。

2.2.2 等电点测定 用聚丙烯酰胺等电聚焦电泳测定酶蛋白等电点为 4.1。

2.2.3 最适反应温度和 pH 分别在 30—70℃ 和 pH 4.0—12.0 范围内测定 CMC 酶活性,如图5所示,酶反应最适温度为 50℃,最适 pH 为 7.0。酶在 pH 9.0 和 10.0 处还能保持最适 pH 处酶活性的 80% 和 70% (50℃ 时),表现了对碱性环境较强的耐受性。

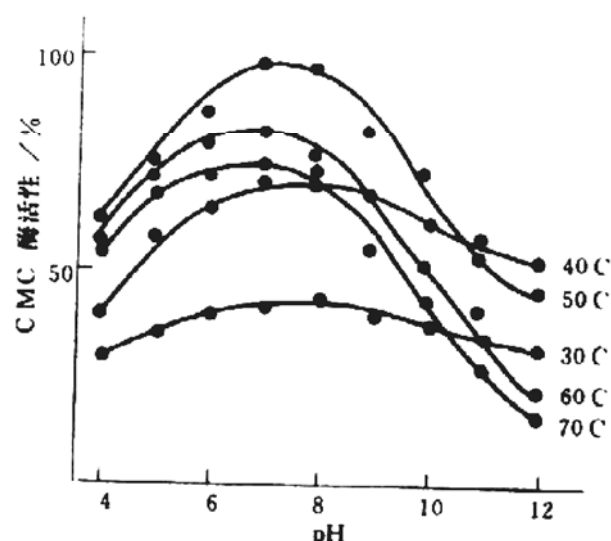


图5 最适反应温度和 pH

2.2.4 酶的稳定性

a. 热稳定性: 分别测定了酶在 pH 7.0 和 10.0 处对热的稳定性。将酶在不同温度下处理 10h, 再测定残存的酶活性, 结果表明无论在 pH 7.0 还是 pH 10.0 在 40℃ 以下酶活性能保持 90% 以上; 50℃ 时, 酶活性分别能保持 75% 和 60%; 65℃ 时, 酶活性只能分别保持 30% 和 5%。

b. pH 稳定性: 测定了酶在 50℃ 时的 pH 稳定性。以 pH 7.0 处不经预处理的酶液活性为 100%, 其余经不同 pH 预处理 2h 后残余酶活力折合为百分数表示, 如图6所示。

结果表明, 在 50℃ 条件下, 酶在 pH 6.0—10.0 范围内均较稳定, 在预处理 2h 后,

残余酶活性均在 80% 以上。

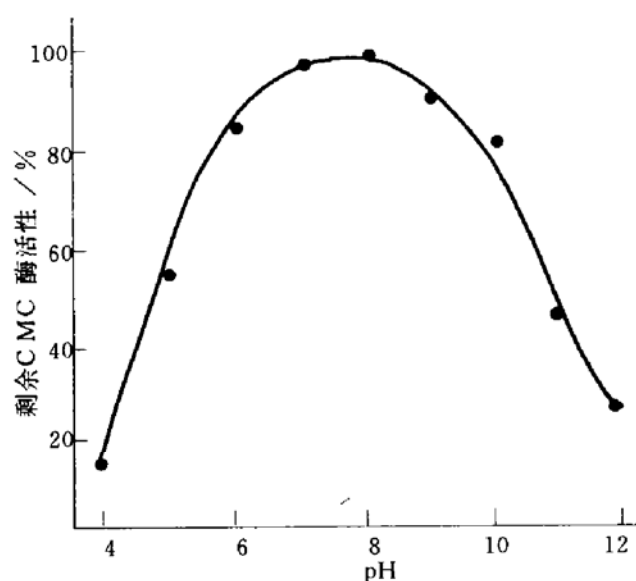


图 6 酶 pH 稳定性

2.2.5 金属离子对酶活性的影响 在适当浓度酶液中加入不同浓度的金属离子 (除 KCl, NaCl 浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 外, 其余为 $10\mu\text{mol/L}$), 在 45°C 保温 10min 后, 分别测定酶活性, 结果见表 2。结果表明, Hg^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} , Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶有较强的抑制作用, 而 Na^+ , K^+ 对酶有一定的激活作用。

2.2.6 表面活性剂对酶活性的影响 在适当浓度的酶液中加入终浓度分别为 0.05% (W/V) 的表面活性剂: 十二烷基苯磺酸钠 (LAS), 链烷烃聚氧乙烯醚硫酸盐 (AES), RCOOH, RCOONa, 聚氧乙烯醚 (AE0.9), 烷基酚聚氧乙烯醚 (T_x-10), 椰子油酸烷基醇酰胺 (6501), 30°C 保温 10min 后, 测定酶活性。结果如表 2 所示, AES, LAS 和 RCOONa 对酶活性有一定抑制作用, 其它表面活性剂影响较小。

2.2.7 几种助剂对酶活性的影响 在适当浓度的酶液中分别加入终浓度为 0.1% (W/V) 的助剂: 三聚磷酸钠, Na_2SO_4 , NaCl, $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_4$, 焦磷酸钾和 Na_2SiO_3 。 30°C 保温 10min 后测定酶活性。结果表明, NaCl, Na_2SO_4 对酶活性无影响, 三聚磷酸钠对酶活性有一定的抑制作用, 而其它助剂对酶活性有较强的抑制作用 (表 2)。

表 2 金属离子、表面活性剂和助剂对酶活性的影响 (%)

金属离子	酶活	表面活性剂	酶活	助剂	酶活
KCl	105	LAS	30	三聚磷酸钠	72
NaCl	118	AES	28	Na_2SO_4	100
ZnCl_2	74	RCOOH	88	NaCl	100
MnSO_4	92	RCOONa	35	NaB_2O_4	50
FeCl_3	56			焦磷酸钾	52
FeSO_4	88	AE0.9	90	Na_2SiO_3	60
CuSO_4	72	T_x-10	89	对 照	100
CaCl_2	86	6501	85		
AgNO_3	2	对 照	100		
HgCl_2	0.08				
MgSO_4	10				
对 照	100				

3 讨 论

经过对菌株 *Bacillus* O 74 耐碱性纤维素酶的分离纯化, 得到一个纯 CMC 酶组分, 它不能水解天然棉纤维, 酶的比活性提高了 27.9 倍, 总回收率为 40%。

耐碱性纤维素微生物所合成的纤维素酶一般也可分为嗜碱性的和耐碱性的。如 Fukumori 等^[7]曾对 *Bacillus* sp. No. 1139 所合成的碱性纤维素酶进行过纯化, 得到一个最适反应 pH 为 9.0 的 CMC 酶组分, 它在中性 pH 以下活性很低。而 Kawai 等^[8]纯化的碱性 CMC 酶组分, 最适 pH 近中性, 酶反应范围较广泛。到目前为止, 还未见分离到碱性 $\beta-1, 4$ -葡聚糖纤维二糖水解酶 (CBH) 和 β -葡萄糖苷酶 (βGln) 组分的报道。

碱性 CMC 酶最适 pH 虽然在中性范围内, 但其最大特点是作用范围广, 特别是在 pH 9.0 以上仍能保持 80% 以上的活性 (50°C 以下), 这是一般 CMC 酶所不具备的。关于酶合成遗传学工作, Fukumori 等^[9]曾对 *Bacillus* sp. N-4 菌株的 CMC 酶基因进行了研究, 其碱基序列与一般 CMC 酶基因有所不同, 但其功能还不清楚。值得注意的是耐碱性 (包括嗜

碱性)纤维素酶的等电点和分子量与一般CMC酶基本相同。碱性CMC酶究竟是由完全特殊的基因编码,还是由一般CMC酶基因编码,然后经过特殊翻译后修饰才具有了对碱性环境的抗性,还有待进一步的工作去阐明。

近年来,碱性纤维素酶正在被应用于洗涤剂工业中。它能使棉纤维的非结晶区结构蓬松,使封闭在纤维间隙中的污物得以释放出来,同时又不破坏织物的牢固性,其作用机理虽然完全不同于传统表面活性剂型洗涤剂,但在洗涤剂中添加碱性纤维素酶可大大提高对织物的洗涤效果。本文对酶在洗涤剂主要成分(表面活性剂和助剂)存在条件下的酶活性进行了初步研究,结果表明酶在此条件下基本稳定,具备洗涤剂用酶的基本条件。有关碱性纤维素酶洗涤剂洗涤性能的工作,将在以后陆续报道。

参 考 文 献

- 1 Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y. *Can J Microb*, 1984; **30**: 774
- 2 Horikoshi K, Akiba T. *Alkalophilic Microorganisms*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1982: 126
- 3 Fukumori F, Toshiaki K, Horikoshi K. *J Gen Microb*, 1985; **131**: 3339
- 4 川合修次. 公開特許, 1985; 昭 64—37285: 18
- 5 Folin O, Rosebrough N J, Farr A L. *J Biol Chem*, 1951; **193**: 265
- 6 张树政. 酶学研究技术. 北京: 科学出版社, 1987: 136
- 7 Wood T M, McCrae S I. *Adv Chem Ser*, 1979; **181** (10): 181
- 8 Kawai S, Okoshi H, Ozaki K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1988; **52** (6): 1425
- 9 Fukumori F, Sashihara N, Toshiaki K. *J Bacteriology*, 1986; **168** (2): 479

石蜡包埋组织的 DNA 提取及其在免疫球蛋白基因重排分析中的应用*

张建中

(国防科工委五一四医院病理科, 北京 100101)

朱元晓 王建安 郑建强

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 基因重排分析在淋巴瘤诊断中具有重要意义。文章应用改良 DNA 提取方法, 从 30 例淋巴增生性病变石蜡包埋组织获得的 DNA 虽有不同程度的降解, 但适于 PCR 扩增 Ig 重链基因重排分析; 约 1/3 病例提出高分子量 DNA, 可用于 DNA 印迹杂交。因此, 石蜡包埋组织同样可为某些疾患, 如淋巴瘤疑难和罕见病例的回顾性分子病理学研究提供基因诊断的 DNA 来源。

关键词 石蜡包埋组织, DNA 提取, 基因重排分析, 淋巴瘤

近年来, 免疫球蛋白 (Ig) 和 T 细胞受体 (TCR) 基因重排分析给淋巴瘤的诊断提供了新手段。由于 DNA 印迹 (Southern blot) 杂交分析基因重排技术要求从新鲜标本中提取完整的 DNA, 因而限制了其在临床上某些病例的应

用。自从 Goelz 等^[1]报告了石蜡包埋组织 DNA 提取的改良方法以来, 特别是 PCR 技术的引进, 使得借助石蜡包埋标本分析基因重排成为

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-05-05, 修回日期: 1993-07-02

Preparation and Properties of Long Half-Life Recombinant Human Superoxide Dismutase.

Luo Xunyi, Wang Jingyi, Xie Bangtie, Li Zhanqing, Liu Xiaolin, Chen Xiaosui. (*Laboratory of Molecular Biology, Naval General Hospital, Beijing 100037*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 234

Recombinant human Cu/Zn SOD (rhCu/Zn SOD) obtained from *E. coli* was covalently linked with an amphipathic molecule poly-(styrene-co-maleic acid) butyl ester (SMA) via amide linkage. When 42% free amino groups of the enzyme were modified, 88% remained enzyme activity was obtained. The results of circular dichroism of rhCu/Zn SOD and SMA-rhCu/Zn SOD indicated that the structure of the modified rhCu/Zn SOD was scarcely changed. Its biological half-life in blood was prolonged 22 times, and its abilities to resist pepsin and trypsin were increased significantly.

Key words rhCu/Zn SOD, chemical modification of protein, SMA, genetic engineering

Purification and Properties of the Alkaline CMCase Derived from *Bacillus sp.* O74.

Wang Dong, Song Guijing, Gao Peiji. (*Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 237

An alkaline CMCase was partially purified from the culture medium of *Bacillus sp.* O74. The enzyme was purified 27.9 fold by sephadex G-100 gel filtration, ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. The enzyme was characterized by demonstration of optimum activity at 50 °C and pH 7.0, and its molecular weight of 52 500 determined by gel filtration. The pH range of the enzyme showing the activity is

from pH 4 to 12, and at pH 9 and 10, it can keep 80% and 70% of the maximum activity respectively. The enzyme was stable in the presence of the most metal ions, surface active agents and auxiliaries.

Key words purification, cellulase, alkaline

Extraction of DNA From Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues for the Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement.

Zhang Jianzhong, Zhu Yuanxiao, Wang Jianan, Zheng Jianqiang. (*Department of Pathology, Kegongwei Hospital, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 241

Gene rearrangement analysis plays an increasing important role in the diagnosis of lymphomas. The possibility of detecting immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues was examined. 30 cases of lymphoid lesions, only 11 have been extracted with high molecular DNA which could be used in southern blot, and others showed DNA degradation in some degree. The degraded DNA could also be used in antigen receptor gene analysis after amplified by polymerase chain reaction. DNA analysis using paraffin-embedded tissues has potential clinical and research applications in detecting gene abnormalities in rare and difficult cases of lymphomas in which fresh specimen was not available.

Key words paraffin-embedded tissues, extraction of DNA, gene rearrangement analysis, lymphoma

Amplification, Cloning and Identification of Full-Length Coding Sequence for Human Myelin Basic Protein. Chen Junjie, Wang Ruohan, Cheng Hanhua, Chen Pu, Li Changlong.