

蜗牛酶的制备和对酵母细胞壁的作用

中国科学院生物物理研究所三室

1974年本刊第1期曾将蜗牛酶的制备方法做过简单介绍,几年来相继收到许多单位来信或来访索取详细资料,为此我们把有关蜗牛酶的制备方法及其对酵母细胞壁的溶解作用等方面的内容刊登出来,供有关科技人员参考。

——编者——

蜗牛酶是存在于蜗牛消化液中的一类混合酶。其中包括纤维素酶、蛋白水解酶、果胶酶等二、三十种。它能溶解酵母和植物的细胞壁。1922年J. Giaja首先从大蜗牛(*Helix pomatia*)中制备了这种混合酶。近十年来,蜗牛酶作为溶解细胞壁的工具越来越广泛地用于细胞生物学的研究。例如用蜗牛酶溶解酵母细胞壁从中提取线粒体,用它处理植物细胞,去其细胞壁以便使细胞间能相互融合,从而培育成一个新的完整的杂交植株^[1]。

近年来我们从海南岛采集的褐云玛瑙螺(*Achatina fulica* Férussac)和广西灵山采集的环口螺(*Cyclophorus pyrostoma* Moellendorff)的消化液中制备了一批蜗牛酶,并进行了初步实验,现将结果简述如下。

一、蜗牛酶的制备

制备过程基本按Fogel等方法^[2,3]。蜗牛饥饿二天后,用水冲洗干净,轻轻敲碎外壳并小心

剥去。然后顺消化道剪开体壁剥离出消化道,从素囊和胃里抽出红棕色的消化液,每只褐云玛瑙螺平均可抽得1—1.5毫升,在0—5℃下离心(10,000转/分)10分钟。上清液经四号细菌漏斗过滤,滤液预冷到-20℃后进行真空干燥。此时蜗牛酶呈棕褐色,磨成粉末后分装于安瓶中。抽气封管,并在低温下保存。一毫升褐云玛瑙螺消化液中平均可得到100—130毫克干重蜗牛酶。100毫克干重蜗牛酶平均含蛋白质80—90毫克。

将褐云玛瑙螺和环口螺制备的蜗牛酶进行比较。两者的活力基本相似。

二、蜗牛酶对酵母细胞壁的溶解作用

1. 酵母的培养

实验所用酵母菌株都来自中国科学院微生物研究所。

都未见到有毒性作用,而且可以突破种系界线,利用免疫动物,大量提取免疫核酸,也没有输入异体细胞在体内迅速被破坏的缺点。为了提高治疗效果,避免肿瘤组织中存在组织抗原的影响,是否可通过纯化肿瘤抗原来免疫动物,得到专一的肿瘤免疫核酸来实现,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Delorme, E. J. et al.: *Lancet*, 2, 117, 1964.

- [2] Alexander, P. et al.: *Nature*, 213, p. 569, 1967.
- [3] Pilch, Y. H. et al.: *Cancer*, 26, 630, 1970.
- [4] Peter, J. et al.: *Cancer*, 4—6, p. 1219, 1971.
- [5] Han, T.: *Clin. Exp. Immunol.*, 14, p. 213, 1973.
- [6] Han, T.: *Cancer*, 33, 493, 1974.
- [7] Han, T. et al.: *Immunology*, 28, p. 127, 1975.
- [8] Pilch, Y. H. et al.: *Proceedings Sixty-Sixth Annual Meeting of the Amer. Asso. Cancer Res.*, 10, March, p. 238, 1975.

[本文于1977年12月5日收到]

酵母培养基用葡萄糖(1%)作碳源。每升含 CaCl_2 0.1 克, KH_2PO_4 1.0 克, FeCl_3 5 毫克, 葡萄糖 10 克, NaCl 0.5 克, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.7 克, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 克, 酵母浸出膏 5 克。在 25—28℃ 下静置培养 18 小时。约在对数生长期收集。在室温下离心(3,000 转/分)10 分钟。酵母细胞用蒸馏水洗三次。

2. 作用条件

下面的实验都是用褐云玛瑙螺制备的蜗牛酶进行的。溶解酵母细胞壁主要根据 Utter^[4] 的方法稍加修改。在蜗牛酶作用之前酵母细胞预先用 2-巯基乙胺(MEA)处理,以提高作用效果。具体步骤如下:

每克湿重酵母悬于 2.5 毫升含 0.04M 乙二胺四乙酸(EDTA)和 0.14M 2-巯基乙胺溶液中,30℃ 保温 15 分钟。然后,用台式离心机(3,000 转/分)离心 10 分钟。接着将处理的酵母细胞用蜗牛酶消化。每克酵母细胞悬浮在 4 毫升含有 30 毫克蜗牛酶、1.0M 山梨醇、0.02M 柠檬酸-磷酸(pH5.8)缓冲溶液中。在 30℃ 保温 40—60 分钟后即可形成球形体(Spheroplast)。

3. 鉴定方法

蜗牛酶溶解酵母细胞壁形成球形体的作用效果可用三种方法鉴定。

(1) 相差显微镜观察 正常酵母细胞与球形体很容易鉴别(见封二图 1, 2)。在蜗牛酶作用过程中可随时观察,以检查球形体的数量,但定量不易准确。

(2) 浊度测定 酵母细胞经蜗牛酶处理后,用四倍体积蒸馏水稀释。之后,用分光光度计在 600 毫微米波长测定浊度。在低渗条件下球形体破裂,浊度下降。因而测定浊度的变化可以反映酵母细胞壁受蜗牛酶作用的程度,但此法无法了解在低渗处理前球形体是否完整。

(3) 蛋白质的测定 酵母细胞经蜗牛酶处理后,在低温(0—5℃)下离心(3,000 转/分)以去掉含有细胞碎片的上清液。沉淀包括完整的球形体和被作用的酵母细胞。这部分经低渗

处理后离心,并用 Folin^[5] 法测定上清液中的蛋白含量。由此可估计酵母细胞经蜗牛酶处理后所形成完整球形体的数量。

4. 实验结果

在下列实验中一般都用 2·346 葡萄糖汁酵母(*Saccharomyces uvarum*)作为实验材料。现将结果简述如下:

(1) 2-巯基乙胺的作用 酵母预先用 2-巯基乙胺(MEA)处理,可提高蜗牛酶的作用效果。某些酵母菌株如 2·982 面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)如果不用 MEA 预先处理,就很难形成球形体。

用 MEA 处理 15 分钟或 30 分钟,得到的效果相似。

(2) 蜗牛酶作用的最适温度和 pH 蜗牛酶在 30℃ 或 37℃ 作用时均能得到理想的结果。作用介质的 pH 范围为 5.8—7.0。当对数生长期的酵母细胞用 30 毫克蜗牛酶/克湿酵母在 pH 5.8, 30℃ 保温 40—60 分钟,球形体形成率可达 80—90%。

(3) 不同酶浓度对形成球形体的影响 浓度合适的蜗牛酶能使大部分酵母细胞壁溶解形成球形体,如果酶的浓度过大又会进一步作用细胞膜使球形体破裂。因此,选择合适的蜗牛酶浓度对制备酵母细胞的球形体是很重要的(表 1)。从表 1 可看出,如果酶浓度过低(10 毫克蛋白/克湿酵母),浊度仅下降 76%,形成球形体的量较少(以蛋白含量计算为 38 毫克)。如果酶浓度过大(80 毫克蛋白/克湿酵母),浊度虽下降 90%,但形成的完整球形体也很少(以蛋白量计算仅为 8 毫克)。当酶浓度为 20—50 毫克蛋白/克湿酵母时结果比较理想,形成完整球形体的数量最多。

表 1 不同蜗牛酶浓度对 2·346 葡萄糖汁酵母作用的比较*

毫克酶蛋白/克湿酵母	10	20	30	40	50	80
毫克球形体蛋白/克湿酵母	38	40	49	43	44	8
浊度下降(%)	76	86	88	89	88	90

* 反应介质见作用条件

(下转第 47 页)

(上接第5页)

各种酵母株的最适酶浓度也不相同,例如对数生长期2·982面包酵母最适酶浓度为20—30毫克蛋白/克湿酵母。

三、蜗牛酶的保存和反复使用

将制备好的蜗牛酶干粉制剂分装于安瓶中抽气封管并在冰箱中存放。根据我们的经验在这样条件下保存的蜗牛酶几年之后仍能保持很高的活力。

为了节省蜗牛酶的用量,国外有人提出反复使用的办法^[6],步骤如下:酵母细胞经蜗牛酶作用形成球形体。离心以后上清液再用高速离心一次(105,000 g左右,20分钟)。除去沉淀后的上清液加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使其饱和度

达到65%(每100毫升加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 39.8克)并在5℃放置保存。当重新使用时可将上述存液进行离心(10,000g,5分钟)。沉下的蜗牛酶即可再度用于消化酵母细胞壁,据说,用这种方法处理,蜗牛酶可以反复使用6次。

参 考 文 献

- [1] Bhojwani, S. S.: *Nature: New Biology*, **239** (88), 29, 1972.
- [2] Fogel, S.: *Genetics*, **48**(3), 321, 1963.
- [3] Eddy, A. A.: *Proceedings of the Royal Society of London*, **149**, 937, 1958.
- [4] Utter, M. F.: *Journal of Bacteriology*, **88**(6), 1762, 1964.
- [5] 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》,1962年。
- [6] Schatz, G. et al.: *Methods in Enzymology*, **31**, 632, 1974.

[本文于1977年11月15日收到]

(上接第10页)

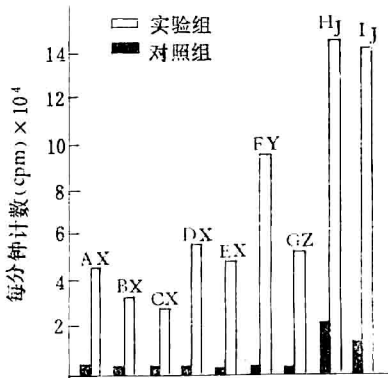


图4 双相混合淋巴细胞培养试验

表明,国产49型滤纸,对于各种细胞样品的放射性测定,在一定细胞数范围内(0.1×10^6 — 1×10^6 细胞,全血0.1—0.3毫升)线性关系良好。滤纸的抗张程度、吸水性能、透光度均较好。复管的稳定性也较满意,同位素标记的细胞样品用49型滤纸与国外同类滤纸GF/A相比效率无显著性差别,叠加实验说明滤纸吸收

光子的现象轻微,(仅降低1.7—6.4%)基本上达到同位素液体闪烁测量要求。

测量样品经生理盐水、三氯醋酸、无水酒精洗涤、固定、脱水、脱色抽滤后,游离同位素可洗去,对照管cpm值均接近本底要求,拣去样品滤片后,除个别外(如拣破纸片等)闪烁液可在本底水平,闪烁液可重复使用。

我们通过上述工作,初步认为:49型玻璃纤维滤纸在软 β 射线液体闪烁测量中,尤其是对细胞样品的直接定量测量,较为准确、快速、经济、简便。测量方法有一定的推广价值。

由于国产玻璃纤维滤纸在液体闪烁测量中的使用时间短,工作做得粗浅,尚有待今后工作中不断总结,加以提高。

参 考 文 献

- Schrier, B. K. et al.: *Methods in Cell Biology*, **13**, 105, 1976.

[本文于1977年10月19日收到]



图 1 正常 2·346 葡萄糖汁酵母细胞 ×3200

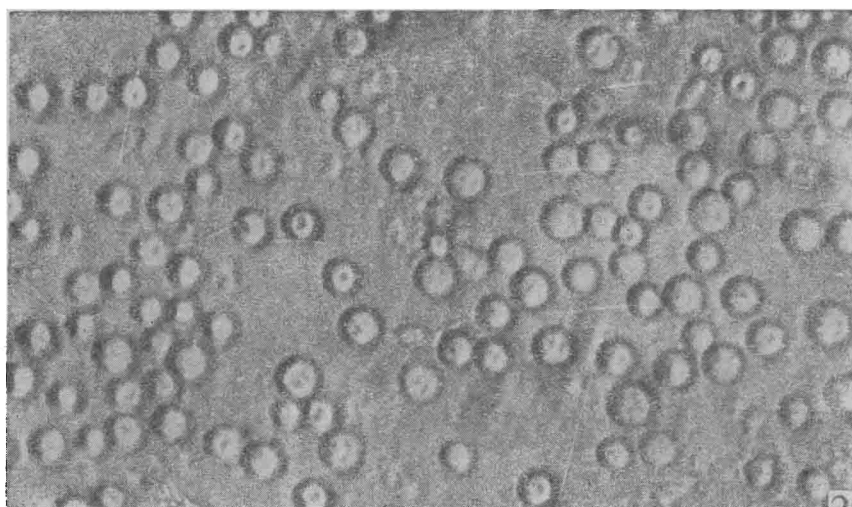


图 2 2·346 葡萄汁酵母球形体 ×3200