

释了在一张有多个色谱峰的色谱图上, 由 k 值大的色谱峰求得的 H 值明显地大于由 k 值小的色谱峰求得的 H 值这一现象.

3.4 结论

在逆流色谱柱中, 速率方程主要包括 H_1 和 H_5 的偶和项、 H_2 和 H_6 的偶和项以及与流动相线速度成正比的两相界面传质阻力项 H_7 , 影响峰展宽的因素主要有管径、容量因子、质量传递系数、流动相液滴直径和线速度等, 较小的管径、较小的容量因子、较大的质量传递系数、较小的流动相液滴直径和线速度有利于提高柱效率.

参 考 文 献

1 Ito Y, Weinstein M A, Aoki I *et al.* The coil planet centrifuge. *Nature*, 1966; **212**: 985~ 987

2 张天佑. 逆流色谱技术. 北京: 北京科学技术出版社, 1991: 1~ 366

3 Ito Y, Conway W D. High-speed countercurrent chromatography. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996. 225~ 263

4 Fedotov P S, Maryutina T A, Pukhov-skaya V M *et al.* Influence of kinetic properties of extraction systems on the separation and preconcentration of some elements by countercurrent chromatography. *J Liq Chromatogr*, 1994; **17** (16): 3491~ 3506

5 Armstrong D W, Bertrand G L, Berthod A. Study of the origin and mechanism of band broadening and pressure drop in centrifugal countercurrent chromatography. *Anal Chem*, 1988; **60**: 2513~ 2519

6 Menet J M, Rolet M C, Thiebaut D *et al.* Fundamental chromatographic parameters in countercurrent chromatography: Influence of the volume of stationary phase and the

flow-rate. *J Liq Chromatogr*, 1992; **15** (15& 16): 2883~ 2908

7 Heftmann E. Chromatography: a laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic methods. 3rd. New York: Van nostrand reinhold company, 1975. 34~ 42

8 Kim L S, Tian Z Q, Li X N *et al.* Centrifugal countercurrent partition chromatography with helical coil rotor. *J Chromatogr*, 1989; **483**: 359~ 368

Analysis of Dynamics in Countercurrent Chromatography. ZHAO Yonghong, KIM Lock Song (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing* 100101, China).

Abstract Dynamics in countercurrent chromatography, a kind of liquid-liquid chromatography without solid matrix, is very different to that in other liquid-liquid chromatography. Dynamics in countercurrent chromatography was analyzed and the rate equation that fits countercurrent chromatography was derived out. Some experiments were done to measure H (plate height) of two kinds of CCPC (centrifuge countercurrent partition chromatography) columns. The results of both theoretical deriving and experiments reveal that the diameter of column, capacity factor, mass transfer coefficient, the average diameter and velocity of mobile phase droplets are main factors that determines H . Mathematics analysis is given.

Key words countercurrent chromatography, dynamics, centrifuge

重组镰孢菌细胞色素 P-450nor 的性质研究

刘德立

(华中师范大学生物系, 武汉 430070)

祥云弘文

(筑波大学应用生物化学系, 茨城 305, 日本)

摘要 纯化的重组镰孢菌细胞色素 P-450nor (recombinant fusarium oxysporum cytochrome P-450nor,

rF•P-450nor) 用于动力学研究. 测得米氏常数 K_m (NO) 和 K_m (NADH) 分别为 0.128 mmol/L 和 0.208 mmol/L. V_{max} (N_2O) 为 $11\ 363\ min^{-1}$. 光谱吸收特性研究表明: rF•P-450nor 具有典型的血红蛋白的特性, 在 413 nm 有最大吸收峰. 加入还原剂 $Na_2S_2O_4$ 时, 最大吸收峰前移至 405 nm. 与 CO 结合后, 再加入还原剂 $Na_2S_2O_4$ 时, 在 450 nm 处表现最大吸收. 与 NO 结合后, 最大吸收峰移至 430 nm 附近. 这些光谱特征的变化与天然的 F•P-450nor 完全一致.

关键词 细胞色素 P-450nor, 动力学研究, 光谱吸收, 一氧化氮还原酶

真核生物细胞色素 P-450 通常是膜结合性蛋白. 在机体内具有单加氧酶的作用, 并参与机体解毒、甾体激素合成等重要的生理反应. 但最近的研究发现: 缙孢菌细胞色素 P-450nor 是一种可溶性细胞色素 P-450. 在真菌的反硝化作用中起着一氧化氮还原酶的作用. 这种细胞色素 P-450 能直接利用 NADH 为电子供体, 还原 NO 生成 N_2O , 催化过程不需要其他蛋白因子参加. 并称之为——一氧化氮还原酶细胞色素 P-450 (P-450nor)^[1,2]. 由于缙孢菌细胞色素 P-450nor 具有特殊的生理功能, 引起了人们的极大关注. 特别是在厌氧条件下, 直接利用 NADH 还原 NO 生成 N_2O 的能力为酶学研究提出了新的课题, 即 N—N 键的形成机理和电子传递方式. 到目前为止, 对天然缙孢菌细胞色素 P-450nor 已作了较为深入的研究工作, 包括酶的分离纯化和性质研究^[1]、热力学和动力学研究^[3,4]、以及 X 射线衍射分析等^[5]. 与此同时, 用基因工程方法克隆并测定了 F•P-450nor 基因序列, 并在大肠杆菌中表达成功^[6~8]. 本文报道纯化的重组缙孢菌细胞色素 P-450nor 的性质和动力学特性的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

含有缙孢菌细胞色素 P-450nor 基因的重组质粒 pCW55 转化 *E. coli* JM109, 构建重组 P-450nor 基因工程菌在本室完成. IPTG、NADH 等为 Singma 公司产品. MonoQ 柱 (HR5/5) 和 FPLC 系统 LCC-500PLUS 为 Pharmacia 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 表达培养: 培养方法参照文献 [7].

挑单菌落接种于 10 ml LB 培养液 (含 100 mg/L Amp) 中, 37℃ 振荡培养过夜. 取 5 ml 前培养物接种于 1L LB (含 100 mg/L Amp) 中大量培养. 当 A_{550} 达 0.6 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 转至 30℃ 诱导培养 24 h. 离心 ($6\ 000\times g$, 4℃, 15 min) 收集细胞.

1.2.2 rF•P-450nor 的分离纯化: 分离纯化方法参照文献 [1], 并做适当改进. 所有分离纯化步骤均在 4℃ 进行. 纯化的 rF•P-450nor 用于动力学特性研究.

1.2.3 NOR 活性测定: 酶活力测定按文献 [9] 进行. 酶活力单位定义为: 每分钟还原 NO 生成 1 μ mol N_2O 所需的酶量.

1.2.4 动力学常数的测定: 采用 Lineweaver-Burk 作图和二次作图法, 分别计算 K_m (NO), K_m (NADH) 和 V_{max} .

1.2.5 光谱吸收特征: 纯化的 rF•P-450nor 用分光光度计 (Shimadzu UV 2100) 测其吸收曲线, 并自动作图. 分别测定加入 NO, 或加入还原剂 $Na_2S_2O_4$, 或加入 CO 后再加入还原剂时, 吸收光谱的变化曲线.

1.2.6 蛋白质测定: 蛋白质定量测定按 Lowry 法进行^[10].

2 结果与讨论

2.1 rF•P-450nor 的纯化

大肠杆菌表达的 rF•P-450nor 粗品比活力仅为 0.046 U/mg. 经 MonoQ 柱纯化后, 比活达到 55.20 U/mg, 纯化了约 1 100 倍. SDS-PAGE 检测为单一谱带. 纯化方法另文发表.

2.2 K_m 和 V_{max} 的测定

纯化的 rF•P-450nor (终浓度 4.0 nmol/L) 用于酶活性测定. 在 NADH 饱和浓度

(5 mmol/L) 下, 分别用不同的 NO 浓度 (77、110、132、165 $\mu\text{mol/L}$) 测其反应速度. 在固定 NO 浓度 (110 $\mu\text{mol/L}$) 的条件下, 用不同的 NADH 浓度 (5.0、1.0、0.6 mmol/L) 测其反应速度. 双倒数法 ($\frac{1}{V} - \frac{1}{[NO]}$) 作图 (图 1), 并取截距二次作图 (图 2). 计算结果表明: $K_m(\text{NO})$ 和 $K_m(\text{NADH})$ 分别为 0.128 mmol/L 和 0.208 mmol/L, $V_{\max}(\text{N}_2\text{O})$ 为 11 363 min^{-1} .

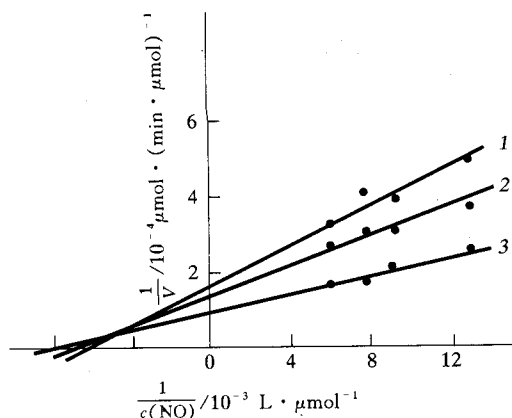


图 1 rF·P-450nor 的动力学曲线

1: 0.6 mmol/L NADH, 2: 1.0 mmol/L NADH, 3: 5.0 mmol/L NADH.

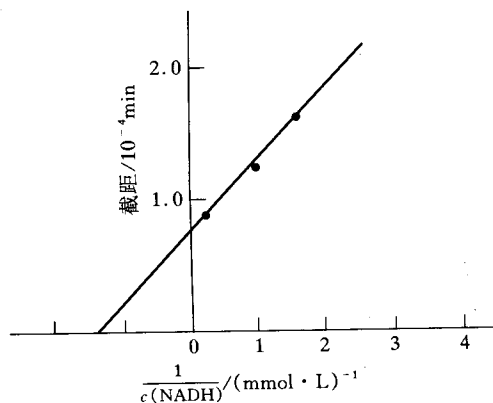


图 2 双倒数曲线的截距二次作图

2.3 光谱吸收特性

图 3 表示 rF·P-450nor 的光吸收特性. 纯化的 rF·P-450nor 在 413 nm 处有最大吸收峰.

这是含 Fe 血红素蛋白的特征吸收峰. 当加入还原剂 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 后, rF·P-450nor 的最大吸收峰前移到 405 nm 处, 先加入 CO 与 rF·P-450nor 反应后, 再加入还原剂 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 时, 最大吸收峰在 450 nm 处. 这是所有细胞色素 P-450 的典型特征. 当加入 NO 时, 最大吸收峰后移到 430 nm 附近, 且在 540 nm 处有一小的吸收峰. 光谱特性的改变表明 NO 确实与 rF·P-450nor 发生了结合. rF·P-450nor 的这些光吸收特征与天然的 F·P-450nor 一致^[1].

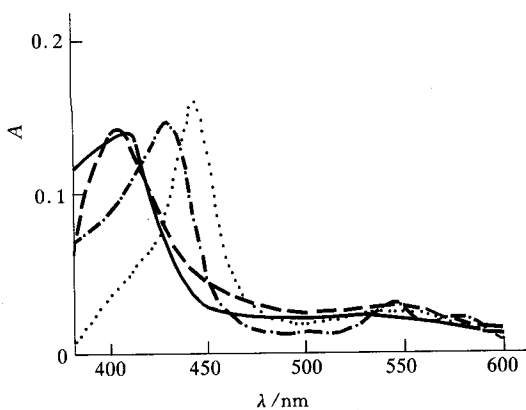


图 3 纯化的 rF·P-450nor 光吸收特性

—: 纯化的 rF·P-450nor 的吸收曲线; ----: 加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 后 rF·P-450nor 的吸收曲线;: 与 CO 结合后, 再加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 时的吸收曲线; - · - · - ·: 与 NO 结合后的吸收曲线.

致谢 本研究工作在筑波大学 Dr. Shoun 实验室完成. 曾得到 Dr. Tomura 的热情帮助, 在此一并致谢.

参 考 文 献

- 1 Nakahara K, Tanimoto T, Hatano K *et al.* Cytochrome P-450 55A1 (P450 dNIR) act as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 8350~8355
- 2 Shoun H, Tanimoto T. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 11708~11712
- 3 Shiro Y, Kato M, Iizuka T *et al.* Kinetics and thermodynamics of CO binding to cytochrome P-450nor. *Biochemistry*, 1994, **33**: 8673~8677

- 4 Shiro Y, Fujii M, Iizuka T *et al.* Spectroscopic and kinetic studies on reaction of cytochrome P-450nor with nitric oxide. J Biol Chem, 1995, **270**: 1617~ 1623
- 5 Nakahara K, Shoun H, Adachi S *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of nitric oxide reductase cytochrome P-450nor from *Fusarium oxysporum*. J Mol Biol, 1994, **239**: 158~ 159
- 6 Tomura D, Obika K, Fukamizu A *et al.* Nitric oxide reductase cytochrome P-450 gene, CYP 55, of the fungus *Fusarium oxysporum* containing a potential binding-site for FNR, the transcription factor involved in the regulation of anaerobic growth of *Escherichia coli*. J Biochem, 1994, **116**: 88~ 94
- 7 Obika K, Tomura D, Fukamizu A *et al.* Expression of the fungal cytochrome P-450nor cDNA in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Comm, 1993, **196**: 1255~ 1260
- 8 Kizawa H, Tomura D, Oda M *et al.* Nucleotide sequence of the unique nitrate/nitrite-inducible cytochrome P-450 cDNA from *Fusarium oxysporum*. J Biol Chem, 1991, **266**: 10632~ 10637
- 9 Usuda K, Toritsuka N, Matsuo Y *et al.* Denitrification by the fungus *Cylindrocarpum tonkinense*: Anaerobic cell growth and two isozyme forms of cytochrome P-450nor. Appl Envir Microbiol, 1995, **61**: 883~ 889
- 10 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, **193**: 265~ 275

Study on the Properties about Recombinant *Fusarium oxysporum* Cytochrome P-450nor.

LIU Deli (Department of Biology, Huazhong

Normal University, Wuhan 430070, China); Hirofumi Shoun (Department of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Japan).

Abstract Purified recombinant *Fusarium oxysporum* cytochrome P-450nor (rF•P-450nor) was used for spectroscopic and kinetic studies. K_m and V_{max} were determined. K_m (NO) and K_m (NADH) were 0.128 mmol/L and 0.208 mmol/L respectively. V_{max} for N₂O was 11 363 min⁻¹. The spectroscopic study indicated that: rF•P-450nor has the typical characteristics of a heme protein, and has the maximum absorbance at 413 nm. After added Na₂S₂O₄, the maximum absorption peak was moved to 405 nm. After added CO and Na₂S₂O₄, the absorption peak was at 450 nm. When combined with NO, the absorption peak was moved to 430 nm. These spectrum characteristics were the same as those of the native F•P-450nor.

Key words cytochrome P-450nor, kinetic study, spectrum absorbance, nitric oxide reductase

博莱霉素-Ce (III) 对 DNA 的切断机理初探*

黄德盈¹⁾ 杨 铭²⁾ 王 夔

(北京医科大学天然药物和仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 根据外切核酸酶 III 酶解博莱霉素-Ce (III) [BLMA5-Ce (III)] 作用过的双链直线型 DNA 时, 酶解速率明显增大, 酶解产物除 5'-dAMP、5'-dGMP、5'-dCMP 和 5'-dTMP 4 种单核苷酸外, 还有其他成分存在的实验事实, 推测出 BLMA5-Ce (III) 在 DNA 双链的特定部位沿 5'→3' 的方向切断磷酸二酯键, 使 DNA 的双链上形成多个暴露的 3'-OH 末端。

关键词 脱氧核糖核酸, 博莱霉素 A5, 铈 (III), 外切核酸酶 III

* 国家自然科学基金资助课题。 ¹⁾ 客座研究人员 (中南民族学院化学系, 武汉 430074)。

²⁾ 通讯联系人 (北京医科大学 261 信箱, 北京 100083)。 收稿日期: 1996-04-02, 修回日期: 1996-07-29