

升),有少量沉淀析出,抽滤(或离心)除去沉淀,用少量水洗沉淀一次¹⁾,合并滤液,再加入 13 毫升 1 M 醋酸钡和等体积低温冰冷 95% 乙醇(约 835 毫升),有大量 IDP 钡盐沉淀析出。立即离心收集 IDP 钡盐沉淀,用冰冷的 50% 乙醇洗三次(每次约 500 毫升),95% 乙醇和丙酮各洗一次后,在无水氯化钙上真空干燥到恒重。得 5'-IDP 钡盐 11.7 克(产率 83%)。

产品的鉴定

纸层析:(点样 50 微克)纯

水份: 7.95—8.25%

钡: 30.9—31.5%

含量: 95—97%

$E_{260}^{1\%} = 7,400$,按 $5'-IDP\text{Ba}1\frac{1}{2} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (685)

计算

在 pH 6 的比值:

250 毫微米/260 毫微米 = 1.61

280 毫微米/260 毫微米 = 0.26

290 毫微米/260 毫微米 = 0.05

参考资料

- [1] 靳传富等:《生物化学与生物物理进展》1975 年,第 4 期,第 25 页。
- [2] 日本特许公报 昭 47-3,157; cA76(1972), p139046g.
- [3] 日本特许公报 昭 46-21,587; cA75(1971), p130076p.
- [4] Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.: *Method in Enzym.*, 3, 873, 1957.

[本文于 1977 年 5 月 3 日收到]

1) 沉淀干重约 1.3 克,含 IDP 钡盐仅 35%。

固相酶生产核苷酸的扩大试验 获得良好结果

中国科学院上海生物化学研究所固相酶组

由广东江门甘蔗化工厂、上海啤酒厂和中国科学院上海生物化学研究所组成的固相 5'-磷酸二酯酶协作组,于 1976 年 12 月在江门甘蔗厂酿造车间核苷酸工段进行了固相酶降解核糖核酸的扩大中间试验。在几年来的小试验基础上,终于在一个月內获得良好的结果,显示了利用固相酶改革核苷酸生产工艺的优越性,为固相酶在工业生产中的应用展示了美好前景。

用物理、化学方法,把溶于水的酶固定在固体支持物上,就可以使酶获得不溶于水的特性。这样制得的固相酶容易与反应混合物分离,可反复使用。因此,自 60 年代以来,在实验室推广使用之后不久,便迅速引起各国的广泛注意。近年来,已有少数几个固相酶在个别国家的生产中使用,其他大量的固相酶尚处在研究阶段^[1]。

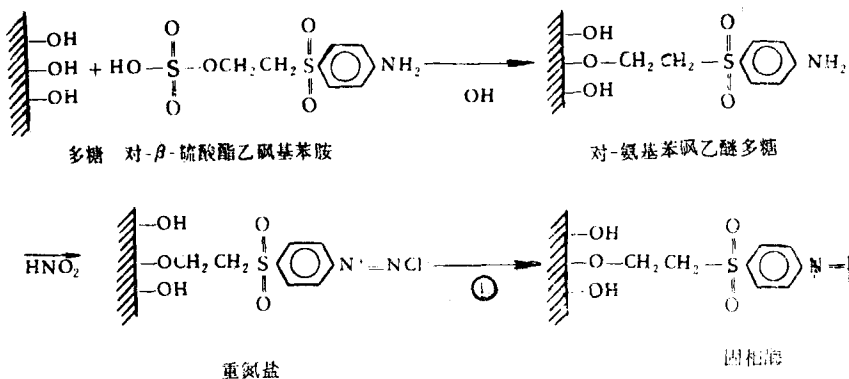
在核苷酸工业中,我国大多数工厂采用桔青霉发酵产生的 5'-磷酸二酯酶降解核酸获得

5'-核苷酸。为了促进我国工业的现代化,生化所固相酶组在向工厂学习的基础上,结合我国的具体情况,自行设计,将染化行业中广泛使用的 591 对位脂化物(对-β-硫酸酯乙砒基苯胺,简称 SESA)连接到葡聚糖凝胶、琼脂、淀粉和纤维素上,制得了一系列带有芳香氨基的多糖衍生物。这些载体经重氮化后可以偶联酶,其反应如下(见下页)。

我们已用此方法制备了葡聚糖凝胶-3'-核糖核酸酶、葡聚糖凝胶-5'-磷酸二酯酶^[2]、纤维素-胰蛋白酶和交联琼脂-青霉素酰胺酶。国内使用类似方法还制备了纤维素-葡萄糖淀粉酶^[3]。

这次扩大试验中的固相 5'-磷酸二酯酶的制备过程如图 1。

桔青霉经过深层发酵,除去菌体得 120 立升发酵液,加入预冷至 10℃ 的工业酒精,达到



酒精最终浓度为 70%，沉淀的酶糊经吹干得 180 克酶粉（活力为 15 万单位/克），活力回收为 80%。打浆度为 35 度的蔗渣-芒秆纤维素（干重为 4.2 公斤）经碱处理后，用 4.2 公斤 SESA 的水溶液进行醚化反应，制得 17.5 公斤湿重的（干重为 2.98 公斤）ABSE-纤维素。其中 16.45 公斤湿重的 ABSE-纤维素经过重氮化处理后，和 180 克酶粉的水溶液在 pH 7.0—7.5 进行偶联反应，得到 25 公斤湿的固相酶。固相酶活

力为 280 单位/克。活力回收约为酶粉活力的 20—25%。

固相酶降解核酸采用缸式搅拌反应器。装置如图 2。

具有夹套及搅拌器的降解缸 (1) 中先放入预先煮沸并调 pH 7.0 的核酸溶液（含纯 RNA 3.3 公斤），加入无离子水使核酸最终浓度为 0.5%，加入 $ZnSO_4$ 溶液，使 Zn^{2+} 离子浓度为 $5 \times 10^{-4} M$ ，总体积为 750 升。开始搅拌，调 pH 到

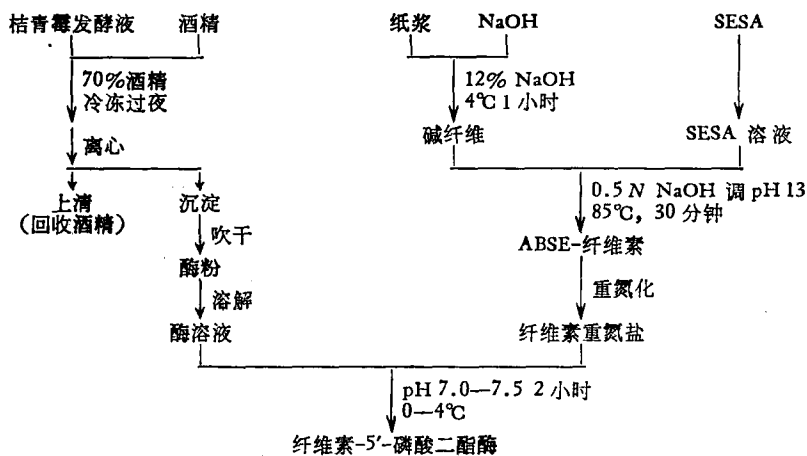


图 1 固相 5'-磷酸二酯酶制备过程

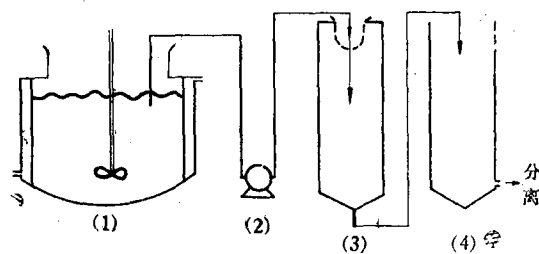


图 2 固相酶降解核酸的装置

(1) 降解缸——容量 1000 升；搅拌 40—50 转/分钟；夹套内可通蒸汽和冷水；(2) 塑料泵；(3) 核苷酸贮缸；(4) 沉淀缸

5.1，并向夹套通蒸汽，当温度达到 55°C 后开始计时。定时取样，测定降解液中核苷酸含量，待降解率达到平衡后（10 小时左右），向夹套通自来水冷却，停止搅拌。固相酶在 10—15 分钟内沉在缸底。用塑料泵 (2) 抽出上层降解液至贮缸 (3)，在贮缸入口处用双层尼龙丝袋（80—100 目）过滤回收随降解液逸出的固相酶，大部分固相酶仍留于降解缸。当开始一批新的降解时，回收的固相酶重新投入降解缸，相继加入无

离子水、核酸和 $ZnSO_4$ ，并调 pH 5.1，夹套通蒸气，加热至 $55^{\circ}C$ 。如此反复周转，进行一批又一批的降解。

每批降解液(约 660 升)冷却后，用氨水调 pH 至 7.0，再用 HCl 调 pH 1.5，然后压入沉淀缸(4)中，分离除去沉淀。每三批降解液合并后，相当于 10 公斤纯核酸的降解液，静置一天后，上清液送生产岗位进行离子交换分离及最后精制。

这次扩大试验的结果如下：

每批用 25 公斤固相酶(来自 120 升桔青霉发酵液制得的 180 克 5'-磷酸二酯酶酶粉和 4.2 公斤干重的蔗渣-芒秆纤维素、4.2 公斤 SESA)在 $55^{\circ}C$ 或 $65^{\circ}C$ 下，降解 3.3 公斤 RNA 配成的 0.5% 溶液(约 660 升)，10 小时左右降解完毕。22 天内共降解 39 批核酸，共降解纯核酸 129 公斤，平均降解率为 75.8%，每三批降解液合并后按江门甘化厂现有生产规模进行常规分离与精制。从离子交换柱分离以及精制得率、产品质量方面看，固相酶法与现有工艺类似。

试验中还发现，发酵液活力的高低，会影响酶粉的获得，也影响固相酶提高效率的程度。

一个月的扩大试验证明，固相酶是促进生产的好手段。与现有工艺相比，具有明显的优点：

(1) 成本下降 现有的发酵液工艺，一般采用核酸溶液中加入 10—15% 体积的发酵液，降解结束后极难回收酶，故需要煮沸降解液杀酶，再分离精制核苷酸。本次试验所用固相酶来自 120 升上海发酵液，按原工艺可降解 1,200 升 0.5% RNA，即只能降解 6 公斤纯核酸。

与发酵液只能用一次相比，固相酶则可以多次使用。固相酶在 22 天中反复降解 39 批，共降解纯 RNA 129 公斤。即比原有的 120 升发酵液提高效率 20 倍。光从桔青霉发酵这一点来说，就意味着可以少发酵 20 次，节省原材料和劳动力，成本明显下降。

(2) 核酸降解率稳定 现有工艺中，各批核酸的降解率往往随桔青霉发酵的好坏，发生较大的波动。发酵液的酶活力不高时，即使延

长降解时间也无法使降解率提高。

固相酶对核酸的 39 批平均降解率为 $75.8 \pm 3.2\%$ 。固相酶可以通过控制降解时间，使核酸降解率稳定在 75—80%。

(3) 生产正常 现有工艺常因桔青霉发酵缸连续染菌或发酵不正常而使整个生产停顿。

固相酶工艺则可以集中在一年的某一段时间进行发酵及制备一大批固相酶，贮备起来(体积比发酵液小得多)，从而保证全年生产可以有计划，稳定地进行。从这次试验看，一份固相酶至少可降解 39 批，假如一天降解一批的话，全年只需制备 10—11 份固相酶，就足以保证生产正常进行。

(4) 利于核苷酸的分离和精制 发酵液降解时带进了培养基的残留成分和桔青霉的代谢产物，而固相酶则可除去这些杂质。按理固相酶降解会改进离子交换树脂柱的分离及精制的得率。但是，由于分离精制的工艺路线长，影响的因素多，这次扩大试验又是在积累了 3 批降解液后再分离精制，因此难作精确的比较。从固相酶降解液的最后产品得率与质量看，固相酶法与现有工艺相同。

(5) 设备要求不高 利用原有设备，在现有工艺上稍作修改便符合要求，制备固相酶的过程也较简单，完全可以在江门甘化厂以及类似的生产核苷酸的工厂进行。

固相 5'-磷酸二酯酶及其在核苷酸生产中的应用尚未见国外报道，从扩大试验看，固相酶工艺有很多优越性。在“抓纲治国”的战略决策指引下，我们正在为尽早建立我国第一个较大规模的固相酶工艺而努力。我们深信，随之而来的是更多的固相酶生产工艺在我国工业战线上出现。

参 考 资 料

- [1] 袁中一、刘树煌、袁静明编：《固相酶的亲和层析》，1975 年，科学出版社。
- [2] 上海啤酒厂、中国科学院上海生化所编：《固相酶和分子筛在核苷酸生产中的应用》，1971 年。
- [3] 黎青期等：《微生物学报》1973 年，第 13 卷，第 1 期，第 31 页。

[本文于 1977 年 5 月 17 日收到]