

胞二磷胆碱的发酵合成及其纯化*

侯立向 赵 鼎

(中国科学院生物物理研究所)

胞二磷胆碱 (Cytidine Diphosphate Choline, 简称 CDP-Choline, 结构式及分子组成见图 1), 是卵磷脂生物合成的重要中间产物^[1,2]。卵磷脂是细胞膜的重要组成成分。它的代谢正常与否, 直接影响细胞的透性、能量代谢及蛋白质生物合成等许多生物学功能。1963 年, 胞二磷胆碱开始用于临床。实践证明, 它对脑损伤引起的意识障碍及其它神经系统疾病都有较好的疗效, 国内外已有不少综述^[3-5]。

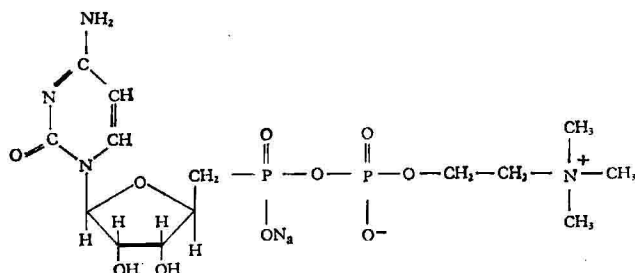


图 1 胞二磷胆碱的分子结构及分子组成

胞二磷胆碱可用化学合成法来制备^[6,7]。但自 Tochikura^[8,9] 报道了利用酵母发酵制备胞二磷胆碱以来, 发酵制备法显出具有产率高、成本低及操作简便等优点。

我们利用啤酒生产中的下脚料湿酵母等为原料, 得到了适于工业生产的胞二磷胆碱的合成条件。同时, 我们对文献^[8,10]报道的分离纯化方法进行了改进。成品经检定, 适于药用。

一、材料和方法

1. 试剂和材料

(1) 磷酸胆碱 北京化工厂试制产品。

(2) 胞一磷 北京首都啤酒厂产品。

(3) 活性炭 15—20 目, 北京光华木材厂产品。

(4) 717 强碱性阴离子交换树脂 交联度为 8, 16—50 目, 经碱和酸处理成 $[\text{Cl}^-]$ 型, 水洗至中性, 备用。

(5) 浓缩胞二磷胆碱用强碱型阴离子交换树脂 100—150 目, 经酸和碱处理成 $[\text{OH}^-]$ 型, 水洗至中性备用。

试验中其它药品为市售商品。

2. 方法

(1) 反应转换率的测定^[11]

(2) 胞二磷胆碱含量测定 用分析天平称取样品 20 毫克左右, 用 0.01N 盐酸定容至 5 毫升, 取其 1 毫升用 0.01N 盐酸稀释至 200 毫升, 测出样品的总光密度 (280 毫微米)。再用分析天平称取大致相同重量的样品, 120℃ 烘烤四小时, 测其水分。计算出样品干重。按下式计算百分含量:

$$\text{样品含量}\% = \frac{O.D_{280} \times 200 \times 5 \times 510}{12.7 \times 10^3 \times 1,000} \times \frac{1}{\text{样品干重(克)}} \times 100\%$$

式中: 510 为胞二磷胆碱钠盐的分子量;

* 本所张其玖、袁家珪、魏西平同志曾参加部分工作; 本所张友吉、叶粹全; 张水珍同志帮助核磁测定; 感光所明阳福同志帮助红外测定; 首都啤酒厂张长平、孙乐怡、陈月芬、韩月兰、纪美英同志参加中试; 北京药检所周淑平、卞学婉同志对本品的药检工作给予很多帮助。在此一并表示谢意。

12.7×10^3 为胞二磷胆碱的克分子消光系数^[12]。

$O.D_{280}$ 为样品紫外分光光度计波长 280 毫微米处的光密度读数。

(3) 溶液中胞二磷胆碱的克数

$$= \frac{O.D_{280} \times \text{稀释倍数} \times \text{总体积} \times \text{分子量}}{12.7 \times 10^3 \times 1,000}$$

(4) 溶液中胞二磷胆碱的百分浓度

$$= \frac{\text{溶液中胞二磷胆碱的克数}}{\text{溶液体积}} \times 100\%$$

(5) 各步提纯的回收率：由测定每步的总 $O.D_{280}$ 与离心合并液(反应液离心上清液同两次 0.85% 氯化钠洗菌体的离心上清液的合并液)的总 $O.D_{280}$ 之比求得。

(6) 活性炭的处理及吸附量的估算：市售活性炭用水浸泡，滤去水分，加入 3—4 倍炭体积的 2N 氢氧化钠，过夜；次日用水洗至中性，滤去水分，加入 3—4 倍炭体积的 2N 盐酸。用时用水洗至 pH 2.0，备用。

活性炭吸附胞二磷胆碱的量，随炭的种类、批号和使用程度的不同而有所差别。所以使用时应对其吸附量进行估算，即取一定体积的活性炭，使其吸附胞二磷胆碱接近于饱和。当流出液的浓度不超过上柱液浓度的 5% 时，吸附率可达 99% 以上。此时每毫升活性炭吸附胞二磷胆碱的量，作为估算活性炭用量的依据。一般情况下为 900—1000 $O.D_{280}$ /毫升活性炭。

(7) 蛋白含量的测定^[13]

二、实验结果

1. 胞二磷胆碱的合成

前文^[11]给出了用酵母泥发酵合成胞二磷胆碱的条件，配方为：磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液，pH 8.0，200 微克分子/毫升；胞一磷，20 微克分子/毫升；磷酰胆碱，90 微克分子/毫升；葡萄糖，1,000 微克分子/毫升；硫酸镁，20 微克分子/毫升；酵母泥，550 毫克/毫升。上述反应液置于 28℃ 水浴中培养 28 小

时。这个反应系统，虽然可以得到胞二磷胆碱的转换率在 80% 左右，但有两个明显的缺点，其一是反应时间较长；其二是磷酰胆碱的用量较大，它是另一底物胞一磷的 4.5 倍。为克服这两个缺点，我们做了反应时间与转换率之间关系及降低磷酰胆碱用量两个实验。

(1) 反应时间与转换率之间的关系 我们用啤酒生产中的 4 代、6 代和 8 代酵母泥，分别进行发酵试验。发现各代酵母反应到 20 小时，胞二磷胆碱的转换率较高；反应时间延至 36 小时，转换率并无明显下降[图 2]。

(2) 降低磷酰胆碱用量 经多次实验证明，当胞一磷为 20 微克分子/毫升时，磷酰胆碱的用量可为 30 微克分子/毫升，并不影响转换率[表 1]。这样，反应液中磷酰胆碱与胞一磷的反应比例，由通常的 45:20^[8,10]，降至 30:20。

2. 胞二磷胆碱的纯化

从发酵液中提取胞二磷胆碱，各个实验室的做法虽然不尽相同，但大体上都要经过离心去菌体，调酸、调碱去蛋白，活性炭吸附洗脱，离子交换树脂吸附，分部洗脱，浓缩等步骤。这些步骤对实验室来说，可得到满意的结果，但对工

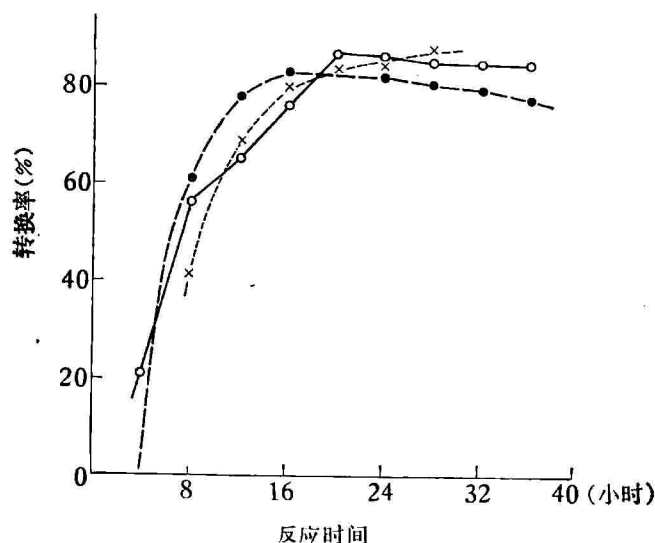


图2 反应时间与转换率之间的关系

反应液组成为：磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 200 微克分子/毫升，pH 8.0；胞一磷 20 微克分子/毫升；磷酰胆碱 45 微克分子/毫升；葡萄糖 1,000 微克分子/毫升；酵母泥 500 毫克/毫升。反应液总体积 12,000 毫升。不同时间取样，测其转换率并对反应时间作图

...x... 6 代酵母；—○— 8 代酵母；—●— 4 代酵母

表 1 不同磷酸胆碱浓度对转化率的影响

反应液*中磷酸胆碱浓度 (微克分子/毫升)	转化率%
90	85
60	84
45	82
35	83
30	83
20	75

* 反应液组成: 除了磷酸胆碱浓度按表中所示浓度变化外, 其他各项均采用前文^[14]给出的浓度, pH8.0, 反应液总体积 100 毫升, 反应时间 20 小时。

业生产来说,就显得繁琐,使回收率较低。为了适应生产的需要,我们对这些步骤进行了研究比较,得到了如图 4 所示的提纯步骤。这一步骤已用于投料 1 公斤胞一磷的制备水平。

(1) 两种炭柱洗脱剂的比较 反应液经去细胞及调酸调碱去蛋白后,使其通过活性炭柱时,胞二磷胆碱及胞一磷,胞苷等可吸附在活性炭上。其余杂质如无机盐、糖、蛋白等不吸附或吸附较少,从柱中流出,达到初步提纯的目的。这是多数作者所采用的方法。但把胞二磷胆碱等核苷酸类物质从活性炭柱上洗脱下来,很多作者用 I 型洗脱剂^[8,10],有的作者^[14]报道过 II 型洗脱剂的效果较为满意,我们初步比较了这两种洗脱剂的洗脱效果(表 2)。

由表 2 可见,洗脱剂 II 与洗脱剂 I 比较,洗脱效果差不多,但含杂质量要少一倍。

(2) 用 717 阴树脂初步分离胞二磷胆碱 发酵液通过炭柱处理,虽然去除了大部分杂质(表 9),但胞二磷胆碱并未与胞一磷等核苷酸分开,还含有一些蛋白及其它杂质。当炭柱洗脱液通过一根 717 阴树脂柱(Cl⁻型)后,可达

到去除胞一磷的效果(图 3)。从 717 柱的直接流出液和柱的水洗液(收集 2/3 柱体积)所得胞二磷胆碱可达电泳纯,总回收率在 80—90%(表 3)。

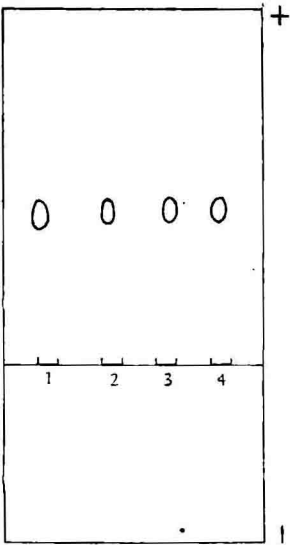


图 3 炭柱洗脱液经 717 阴柱(Cl⁻型)后,各部分的电泳情况

硼酸缓冲液 0.05 克分子浓度 pH 9.2, 20 伏/厘米, 90 分钟

1)胞二磷胆碱对照样品; 2) 717 阴树脂柱的流出液; 3)水洗第一个 1/3 柱体积部分的流出液; 4) 水洗第二个 1/3 柱体积部分的流出液

(3) 经“717”阴柱流出的胞二磷胆碱的再纯化 经“717”阴柱流出的胞二磷胆碱,虽已达到电泳纯,但由此得到的干粉含量,用紫外分光光度法测定,含量仅在 80% 左右。说明还有杂质,必须再纯化。将胞二磷胆碱吸附在阴树脂柱上,选用适当的盐溶液洗脱,然后加乙醇使其沉淀,就可得到更纯的产品。

A. 阴柱吸附浓缩前,“乙醇沉淀”步骤的必

表 2 两种不同洗脱剂的洗脱效果*

洗脱剂	洗 脱 剂 配 比	洗 脱 效 果				
		上样 O.D. ₂₈₀	洗脱 O.D. ₂₈₀	洗脱体积	含杂质量 (以 O.D. ₄₇₀ 计)**	洗脱效率
I	95%乙醇:水:氨水=50:45:5	19.0×10 ⁴	15.7×10 ⁴	665 毫升	0.06	82%
II	95%乙醇:水:氨水=600:400:6.5	19.0×10 ⁴	16.7×10 ⁴	570 毫升	0.03	88%

* 取两根大小相同的柱(3.0×25 厘米),各装入 200 毫升颗粒活性炭。每根炭柱各上 1,700 毫升调 pH 2.5 的上清液, O.D.₂₈₀ 为 19.0×10⁴。流出液经检查无紫外吸收物质,即紫外吸收物质全部吸附在活性炭柱上,再分别用洗脱剂 I 和洗脱剂 II 洗脱。

** 两种洗脱液均呈黄色,但程度不同,故用 O.D.₄₇₀ 计。

表 3 炭柱洗脱液经 717 阴柱后,胞二磷胆碱的回收情况*

步 骤		体 积 (毫升)	总 O.D ₂₈₀ (× 10 ⁴)	胞二磷胆碱回收率%	注
炭柱洗脱液		860	30	100	含胞二磷胆碱 26.7×10 ⁴ O.D ₂₈₀
717 柱直接流出液		780	18.70	70	
水 洗	第一个 1/3 柱体积 部分流出液	100	2.60	9.7	
	第二个 1/3 柱体积 部分流出液	100	1.02	3.8	
	第三个 1/3 柱体积 部分流出液	115	0.1	0.4	

* 发酵液 (转换率 89%) 经去菌体, 调酸调碱后, 使其在活性炭柱上吸附。用乙醇, 氨水洗脱剂洗脱后, 得到 860 毫升洗脱液, 总 O.D₂₈₀ 为 30×10⁴。此洗脱液通过 300 毫升 717 阴树脂 (Cl⁻ 型)。胞二磷胆碱洗脱回收情况如表所示。

要性: 将 717 阴柱流出液, 直接上阴柱, 吸附量只有 740 O.D₂₈₀/毫升树脂; 如将 717 阴柱流出液减压浓缩至小体积, 加入乙醇, 使胞二磷胆碱析出, 再用水溶解使成 0.6% 溶液上柱, 吸附量可增加一倍以上 (表 4), 由此柱洗下的胞二磷胆碱浓度较高, 给直接获得产品创造了条件。

B. 不同离子型树脂的吸附效果: 在实验中我们观察到不同离子型树脂吸附效果不同。用阴树脂吸附胞二磷胆碱时, 有的作者^[8]采用 Cl⁻ 型阴树脂, 有的作者^[17]用 HCOO⁻ 型阴树脂, 也有的作者^[10]用 OH⁻ 型阴树脂。我们对各型树脂的上柱条件进行了比较 (表 5), 得到: OH⁻ 型阴树脂上柱液用氨水调 pH 8.0 时, 每毫升树脂的

吸附量较大。

C. 洗脱剂的浓度选择: 吸附在阴柱上的胞二磷胆碱, 可用氯化钠溶液洗脱下来。洗脱时, 如果氯化钠溶液浓度低, 则洗脱液的体积大, 胞二磷胆碱的浓度低, 在酒精中不易沉出; 如果氯化钠溶液浓度高, 氯化钠在酒精中也会析出 (表 6)。

由表 6 可见, 氯化钠浓度在 3% 时在 10 倍体积的酒精中并无结晶析出。用此浓度氯化钠洗脱吸附了胞二磷胆碱的阴柱, 洗脱体积和洗脱效率与用较高浓度的氯化钠作为洗脱剂比较, 效果差别不大 (表 7)。

(4) 胞二磷胆碱分离纯化步骤 在上述试

表 4 乙醇沉淀时阴柱吸附胞二磷胆碱吸附量的影响

处 理	柱型/pH	树脂体积	上柱液浓度	吸 附 量
胞二磷胆碱去乙醇氨水后, 不经乙醇沉淀直接上柱	OH ⁻ /pH 8.0	70 毫 升	95 O.D ₂₈₀ /毫升	740 O.D ₂₈₀ /毫升树脂
胞二磷胆碱去乙醇氨水后, 经乙醇沉淀再溶于水上柱	OH ⁻ /pH 8.0	70 毫 升	154 O.D ₂₈₀ /毫升	1570 O.D ₂₈₀ /毫升树脂

表 5 不同上柱条件对胞二磷胆碱吸附量的影响*

树脂型及树脂量	上 柱 条 件	上柱液浓度	流出液浓度 上柱液浓度 %	吸附量 O.D ₂₈₀ 毫升树脂
Cl ⁻ 型/68 毫升	0.005 克分子浓度 tris-HCl 缓冲液 pH 9.1	0.4%	4.6	488
HCOO ⁻ 型/68 毫升	0.005 克分子浓度 tris-HCl 缓冲液 pH 9.1	0.4%	1.5	752
OH ⁻ 型/68 毫升	用稀氨水调 pH 8.0	0.6%	2.4	1680

* 样品为经过“717”阴柱 (Cl⁻ 型)“滤过”的胞二磷胆碱溶液, 经减压浓缩, 乙醇沉淀的胞二磷胆碱干粉, 又溶于水配成表中所示浓度上柱。

表 6 不同浓度的氯化钠溶液在加入 5 和 10 倍酒精后氯化钠析出情况

氯化钠溶液浓度 加入乙醇后,氯化钠析出情况	1M (5.80%)	0.9M (5.22%)	0.8M (4.64%)	0.7M (4.26%)	0.6M (3.48%)	0.5M (2.90%)	...	0.1M (0.58%)
加入 10 倍乙醇	+++	+++	++	+	—	—	...	—
加入 5 倍乙醇	—	—	—	—	—	—	...	—

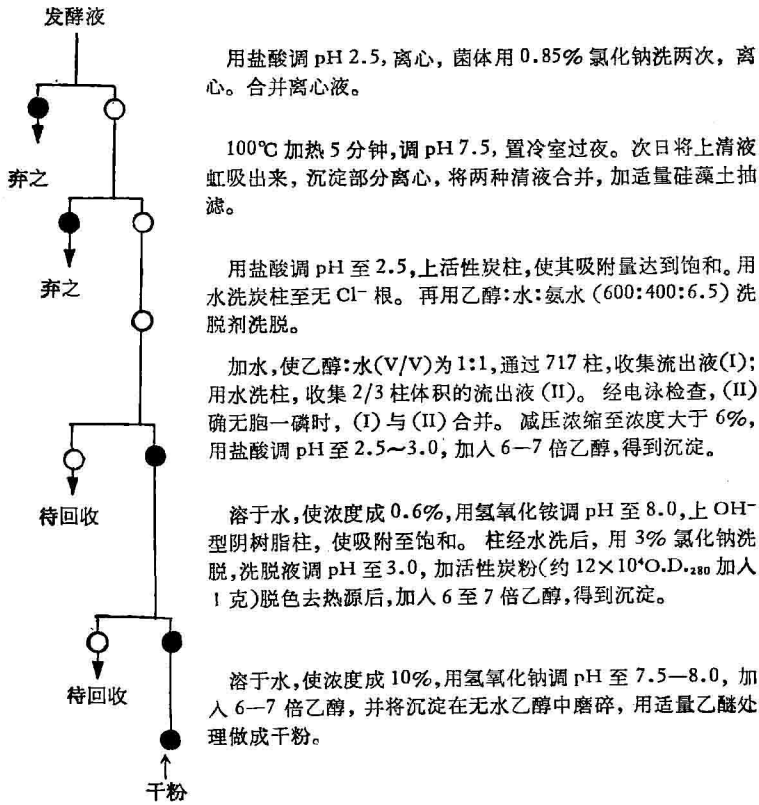


图 4 胞二磷胆碱分离纯化示意图

—○— 表示清液; —●— 表示沉淀物

表 7 不同浓度的氯化钠溶液对胞二磷胆碱的洗脱效果*

氯化钠浓度	树脂量	吸附的胞二磷胆碱量	洗脱体积	洗脱效率	注
4%	70 毫升	$8.6 \times 10^4 \text{O.D.}_{280}$	60 毫升	91.5%	
3%	70 毫升	$8.6 \times 10^4 \text{O.D.}_{280}$	66 毫升	92%	可作为洗脱剂
2%	70 毫升	$8.6 \times 10^4 \text{O.D.}_{280}$	94 毫升	92%	

* 本试验所用样品为经 717 柱、浓缩得到的干粉, 用水溶解配成 0.6% 溶液, 用氢氧化铵调 pH 至 8.0。三根柱均为 1.5×25 厘米的阴树脂柱, OH^- 型。胞二磷胆碱在柱上均吸附良好。

验基础上,得到图 4 所示的操作步骤。

(5) 胞二磷胆碱提纯过程中的回收率及杂质去除情况 用上述步骤制备的胞二磷胆碱, 各步回收率及杂质(蛋白质)的去除情况分别见表 8 和表 9。

3. 胞二磷胆碱的鉴定

本品用下述方法鉴定, 证明确为胞二磷胆碱:

(1) 紫外分光光度法测定 pH2 时最大吸收处波长为 280 毫微米, 最小吸收处波长为 241

毫微米。光密度比值: 280 毫微米/260 毫微米 = 2.08; pH7 时最大吸收处波长为 272 毫微米, 最小吸收处波长为 250 毫微米。光密度比值: 250 毫微米/260 毫微米 = 0.86; 280 毫微米/260 毫微米 = 0.99。上述数据基本符合胞二磷胆碱紫外吸收光谱的有关标准值。pH2 和 pH7 时的紫外吸收光谱也与标准样品相同(图 5 和图 6)。

(2) 核磁共振图谱 以水为溶剂将本品配成 0.1 克分子浓度, pH 2.5 时的 ³¹P 核磁共振谱

表 8 胞二磷胆碱提纯过程中各步回收情况(以其中一批为例)

步 骤		体 积 (毫升)	稀释倍数	O.D. ₂₈₀ 读数	总 O.D. ₂₈₀ × 10 ⁴	回 收 率 (%)		注
						对前步	总回收	
1	投料(胞一磷)	—	—	—	—	—	—	投料胞一磷 74 克, 转化率 87%
2	发酵液离心上清液	16,200	500	0.315	256	100	100	包括二次洗菌体所得的离心上清液
3	调 pH 至 7.5 后的离心上清液	16,640	500	0.284	236	93	93	
4	炭柱洗脱液	10,320	—	—	(187)*	79	73	* 实测数未得到, 此数据由统计平均而得
5	717 阴柱滤过流出液	12,980	500	0.230	150	92	59	
6	减压浓缩后, 经乙醇沉淀, 又将沉淀溶于水	350	10,000	0.424	148	99	58	
7	阴柱浓缩, 用 3% 氯化钠溶液洗脱	670	1,000	0.210	140	95	55	
8	胞二磷胆碱干粉	—	—	—	—	—	—	47 克(含量为 96%)

表 9 胞二磷胆碱提纯过程中杂质(蛋白质)的去除情况(以其中一批为例)

步 骤		体 积 (毫升)	蛋白质 (微克/毫升)	总蛋白 (克)	残留蛋白 (%)	注
1	发酵液离心, 两次洗菌体离心上清合并液	35,320	2,440	86	100	
2	调 pH 至 7.5 后, 上清液	32,050	2,250	72	84	
3	炭柱洗脱液	26,260	374	9.8	11.4	
4	717 柱过滤后的浓缩液	2,090	1,425	3.0	3.4	
5	阴柱浓缩, 用 3% 氯化钠洗脱, 洗脱液经乙醇沉淀后, 沉淀物溶于水	2,340	380	0.89	1.04	
6	干粉(89 克)	—	—	0.225	0.25	每克干粉含蛋白 2.5 毫克即 0.25%

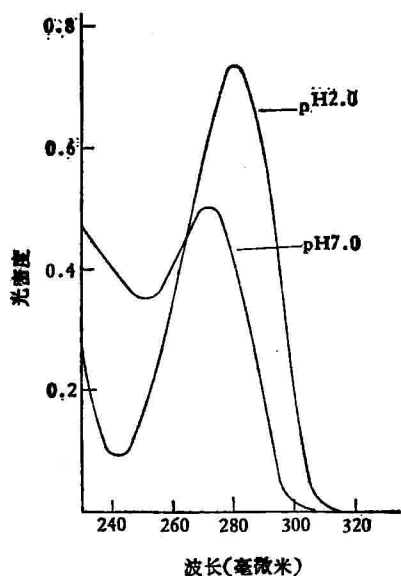


图5 本品 pH2 和 pH7 的紫外吸收光谱

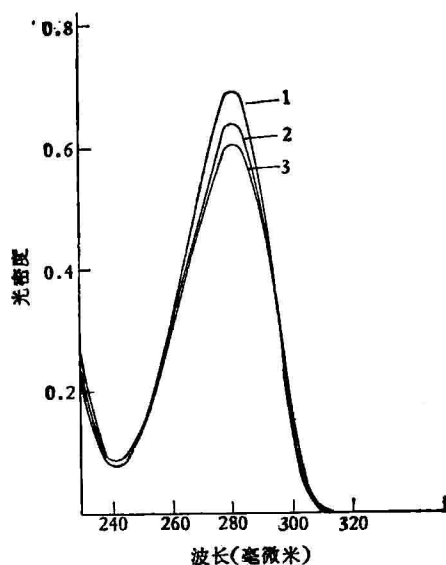


图6 本品 pH2 时的紫外吸收光谱与标准样品的比较
1, 3 为本品; 2 为标准样品

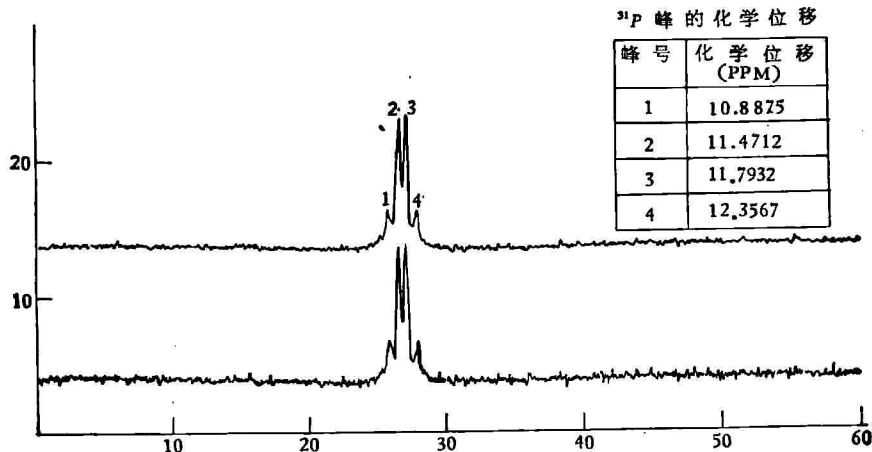


图7 本品 ³¹P 核磁共振谱
(外标: 85% H₃PO₄; 频率: 36.4302 兆赫; 仪器型号: SXP₄₋₁₀₀)

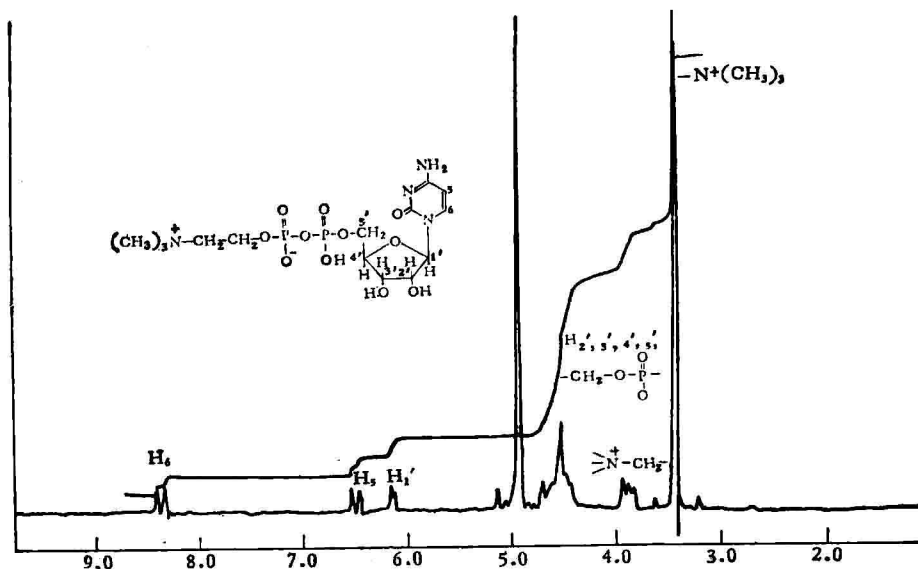


图8 本品 ¹H 核磁共振谱 (PD3.5)

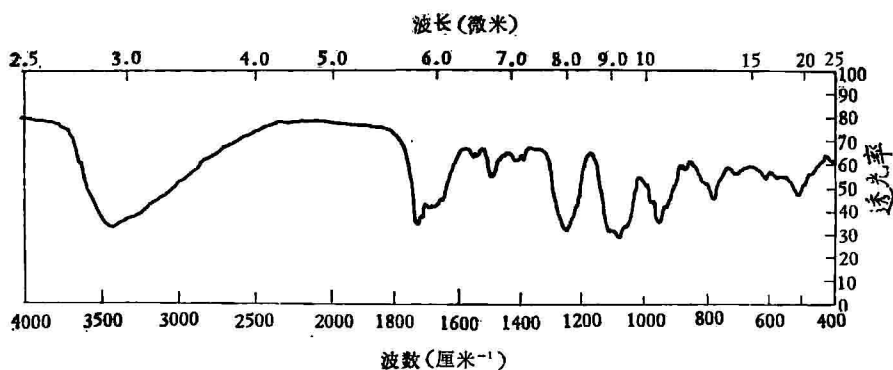


图9 本品红外光吸收光谱(溴化钾压片)

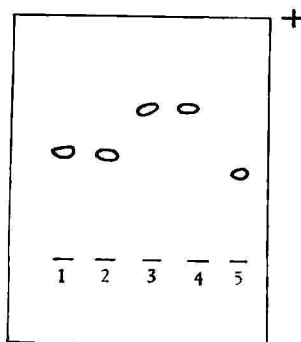


图10 本品电泳图谱

硼酸缓冲液 0.05M, pH 9.2, 20 伏/厘米, 90 分钟
1. 标准品; 2. 本品; 3. 胞一磷; 4. 本品水解液 (1N 盐酸 100°C 2 小时); 5. 胞苷

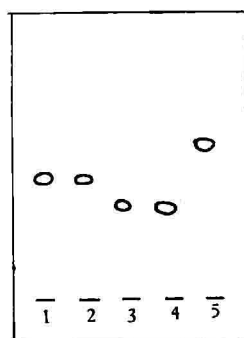


图11 本品层析图谱

溶剂系统: 异丙醇:浓氨水:水 (7:1:2)
1. 标准品; 2. 本品; 3. 胞一磷; 4. 本品水解液 (1N 盐酸 100°C 2 小时); 5. 胞苷

见图7。由图可见,本品是典型的AB系统,证明它确为二磷化合物。图8为本品的¹H核磁共振谱,与仲町秀雄^[12]的结果一致。

(3) 红外吸收光谱 本品用溴化钾压片的红外吸收光谱见图9。由图可见,与胞二磷胆碱的已知图谱^[16]一致。

(4) 本品经纸层析和纸电泳,并与已知样品对照,位置相同,详见图10和图11。

三、讨论

自1970年 Tochikura 报道了以葡萄糖做能源,啤酒风干酵母发酵制备胞二磷胆碱以来,发酵法生产胞二磷胆碱越来越受到人们的重视。但大多数作者都采用风干酵母。我们利用啤酒生产中淘汰的酵母,离心后不经风干合成胞二磷胆碱也获得了成功。反应的主要底物——磷酸胆碱,也比大多数作者的用量少三分之一,转

换率一般都能达到80%左右。可见,有条件的地方,都可综合利用啤酒酵母来生产这一救灾及战备中都急需的药物。

从发酵时间与转换率之间的曲线(图2)来看,酵母的代数不同对转换率影响不大,反应时间20小时可达最高转换率,延长到36小时转换率并无明显变化,因此缩短了反应时间。

活性炭用于提纯胞二磷胆碱,可除去大量蛋白及其它盐类。但是,一般还有20—25%的东西不能被洗脱下来。现在还未找到一个理想的洗脱剂,可把被活性炭吸附的核苷酸类物质全部洗下。用乙醇氨水从活性炭上洗下的胞二磷胆碱有时仅是吸附量的60—70%。这可能与选择的活性炭及其吸附的饱和程度有关。据我们的经验,吸附的饱和程度越高,洗脱效率越好。

胡兆庆等人^[15]采用“过滤法”,即用阴离子

交换树脂吸附有机合成胞二磷胆碱反应液中未反应的胞一磷,使胞二磷胆碱从柱中流出,获得了好结果。我们把这一方法用于发酵法制备胞二磷胆碱的提纯,效果也很好。但胞二磷胆碱的回收率难以达到百分之百。其原因可能在于胞二磷胆碱在 717 Cl⁻ 型阴树脂上也有部分离子交换作用及非极性吸附。为了提高回收率,掌握好树脂用量是较为重要的。如树脂用量少了,杂质(胞一磷)去除不好;用量多了,被树脂极性吸附及非极性吸附的部分也多。所以通过试验,合理确定“717”树脂用量就很必要。在我们的试验条件下,每毫升 717 Cl⁻ 型阴树脂吸附胞一磷量约按 200 O.D.₂₈₀ 计算较为适宜。

在用阴柱吸附浓缩胞二磷胆碱时,它的吸附受其它离子的影响较大。这可能是由于胞二磷胆碱分子内胆碱基团及磷酸基团的 PK_a 值分别大于 12 及小于 2^[6],在较广的 pH 范围内不带电荷或带电荷较少^[17]所造成的,所以,在用阴柱吸附浓缩胞二磷胆碱时,显著地受其它离子的干扰而不易被吸附。操作时应尽量避免其它杂离子的混入。如调 pH 过碱时,作者建议不要用酸往回调,用 H⁺ 型阳树脂较好。

参 考 文 献

- [1] Kenndy E. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **222**, p. 193, 1956.
- [2] Weiss S. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, **231**, p. 53, 1958.
- [3] 胡秉诚等:《国外医学参考资料(神经病学神经外科学分册)》1977 年,第 4 期,第 166 页。
- [4] 陈德高:《生物化学与生物物理进展》,1979 年,第 2 期,第 24 页。
- [5] Shimamoto K. et al.: 武田研究所报, **34**, 2, 1975.
- [6] Kenndy E. P.: *J. Biol. Chem.*, **222**, p. 185, 1956.
- [7] 上海细胞生物学研究所核酸研究组等:《生物化学与生物物理进展》1975 年,第 1 期,第 19 页。
- [8] Tochikura T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 763, 1970.
- [9] Tochikura T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 769, 1970.
- [10] 上海师范大学等:《生物化学与生物物理学报》1976 年,第 8 卷,第 199 页。
- [11] 中国科学院生物物理研究所二组:《生物化学与生物物理进展》1977 年,第 4 期,第 15 页。
- [12] 仲町秀雄等:武田研究所报, **34**, 3, 353, 1975.
- [13] Lowry O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [14] Mandeles S. et al.: *Anal. Biochem.*, **17**, 540, 1966.
- [15] 胡兆庆等:《生物化学与生物物理进展》,1975 年,第 4 期,第 18 页。
- [16] 矢敷孝司等:武田研究所报, **26**, 44, 1967.
- [17] Sugino Y.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **40**, 425, 1960.

[本文于 1978 年 6 月 14 日收到]

科技消息

功能性哺乳动物基因移植成功

据报道,美国斯坦福大学的科学工作者 P. Berg 等,已经成功的把家兔的血红蛋白 β 链的基因嵌接在 SV-40 DNA 中形成一个重组 DNA 分子,然后用这种重组 DNA 去侵染非洲绿猴的培养细胞株,侵染的重组 DNA 取代了细胞内的合成机器,合成病毒的核酸和蛋白质,包括由嵌入的兔血红蛋白 β 链基因指导合成的兔血红蛋白 β 链。这种培养细胞株来源于非洲绿猴的肾脏,它们在正常情况下是不生产血红蛋白的,尤其不会生产家兔的血红蛋白。

这是把 DNA 重组技术首次用于将具有生物功能的基因从一种哺乳类动物移植给另一种哺乳动物细胞取得成功的实例。虽然大约在 5 年前,其他学者 (O. Wiseley McBride 和 Harvey Ozer) 曾经证明与仓鼠细胞的染色体共同温育以后的小鼠细胞可以获得合成仓鼠酶的能力,估计这是由于仓鼠的基因在一段染色体上进入了小鼠细胞的结果。一些研究者目前正使用染色

体作为媒介实现基因的传递以进行遗传研究。例如染色体上基因排列图谱。两个不同物种通过细胞融合技术形成杂交体是进行基因传递的普通技术,然而 DNA 重组方法的优点是特异性更强,目前已有方法分离和复制特定的基因以嵌接在适当的载体上进行传递,而用其它方法来选择特定的基因进行传递则要困难得多。

这项工作的意义显然在于有朝一日将可以用类似的技术通过遗传工程更换有缺陷的、或增补缺失的基因,例如,镰刀细胞贫血病就是由于血红蛋白 β 链的基因有缺陷。由于 SV-40 病毒能在一些动物中引起肿瘤(虽然还不是人),因此病毒 DNA 显然不是进行基因更换疗法的合适载体。然而不管如何,这种基因传递的方法必将大大地促进分子生物学中如哺乳细胞内基因表达的调控这类基本问题的研究。

(摘自“Science”, 202, p. 610, 1978)