

病毒。这是一个超分子水平的结构进行自组织和自装配的一个例子。运用X射线衍射,对烟草花叶病毒的空间结构已作了精细的分析,特别是对于多肽链的空间构型已接近于较彻底的阐明。这样就有可能提出较完整的模型,来澄清蛋白质与RNA的相互关系以及蛋白质亚单元间的相互关系。这样也就有可能,使人们对于这种超分子结构、并具有初步的能表示简单的生命活动的病毒体,从其原子组成到有初级的、原始的生命结构,经过自组织、自装配的认识得以逐步加深。物理学家K. Mendelssohn (1975),从物理学观点对于生命提出了如下设想:如果把蛋白质分子制成为晶体,这样的组装就看不出有什么生命。但必须从另一种组装形式来考虑,如果短程力、键角等的相互作用,对物质的装配很恰当,那就可能会出现生命现象。他又说,对于生命来说应该重视两个特性。一是分子要有适当的种类搭配和相互有适当的空间关系,使能提供成为具有长程序电子流的“容器”。其次是提供电子流容器中的原子本身结构不一定需要特殊构型,但要求电子流能保持共振状态。这样可能会出现生命现象。这是物理学家对生命的一种简化概念。

每种结构都应该有与它相对应的程序设计(programming)。对这种程序(programme)的分

析,首先要看结构如何组织起来和稳定性如何。对生物大分子的结构程序的分析,已很不易,要分析细胞结构的程序,就更难。无论是研究静态和动态结构,必须先把一些概念搞清楚。根据计算机技术的观点,结构无非是硬件(hardware),而程序则是软件(software),后者可以说是一个指令,好象把一套程序(指令组)输入到计算机内那样。就在这样情况下,一种结构按照程序设计来进行自组织和自装配,至于稳定性如何,那要由程序来决定。生物物理学不仅要研究生物的结构和功能及其物理性质,还要探讨结构的程序和程序设计。

近年来,关于非平衡过程热力学对描述生命系统的意义,开展了讨论。Prigogine等提出了耗散结构的理论,这是热力学关于探讨结构、稳定性和熵涨落的一种新的尝试。特别是最近关于表面热力学的研究,不仅对物理化学,也对细胞生物学带来了重要的启发。对表面的自组织以及空间和时间性耗散结构的讨论,也对人很有启发。

总起来说,生物物理学是一门具有重要理论和实际意义的边缘学科,它与其他兄弟学科一起,共同承担着加深对物质的认识和揭露生命的奥秘的重要任务。这个任务是艰巨的,而发展前途又是广阔的。

金属螯合亲和层析在肽与蛋白质研究中的应用

奚 国 良

(中国科学院上海药物研究所)

亲和层析是分离各种生物活性物质的重要技术。近年来,从亲和层析中又发展了一种新技术,称作金属螯合亲和层析(Metal Chelate Affinity Chromatography, MCAC)这项技术已证明是一种十分有用的分离纯化方法,不仅适用于蛋白质或肽,也适用于能可逆地螯合金属离子的其它一些用别种分离方法难以奏效或十分费时的物质的分离,值得重视。

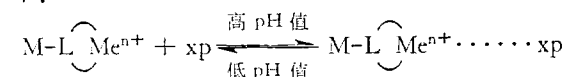
一、原 理

金属螯合亲和层析,从原理上讲,与亲和层析不同之处在于它不是基于床基质对被分离物质的生物亲和力,而是被分离物质对金属离子的不同亲和力,即共价地偶合到不溶性基质上的不是具有生物亲和力的配基,而是一种具有螯合重金属离子能力的配基。重金属离子如

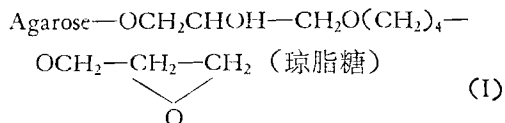
Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等与这种结合于不溶性基质上的配基螯合后,尚有过剩的结合能力。利用不同的蛋白质、肽或其它物质对重金属离子的不同的亲和结合能力,便能将它们分离,纯化。

早已证明组氨酸、半胱氨酸能与 Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 在近中性溶液中形成稳定的复合物。因此,牢固地固定于床基质上的 Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 便能与这两种氨基酸或含有这两种氨基酸的肽与蛋白质的显露于外的咪唑或巯基相结合。同样,周期表中的一些过渡金属离子如铬、汞、钴、镍等也能与这两种氨基酸结合,同样可以用来分离肽或蛋白质。

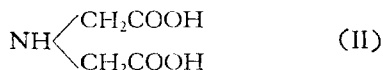
金属螯合亲和层析的原理可形象地图示如下:



上图中, M 表示凝胶类基质, L- 为具有螯合能力的配基, Me^{n+} 代表金属离子, x 为蛋白质或肽中与金属离子有亲和力的部分, xp 则为蛋白质或肽。在具体应用上,凝胶基质一般是环氧活化的琼脂糖 (Sephacrose 4B, 6B) 衍生物 (I), 螯合配基用亚氨基二乙酸 (II), Me^{n+} 一般是



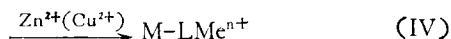
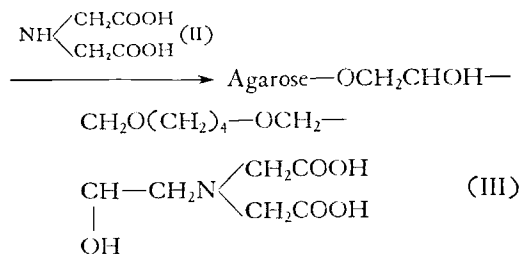
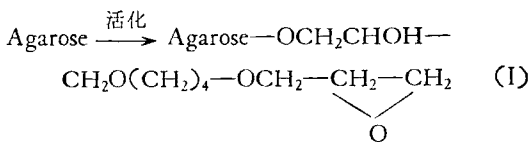
Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 。将 (II) 偶合至琼脂糖衍生物 (I) 上,再以



金属离子处理即能生成含有金属离子的床基质,后者与肽或蛋白质的结合能力取决于层析溶液的 pH 值,在 pH 值较高时,结合比较牢固,但其选择性却随之降低,而在较低 pH 值时,会可逆地解离。一般,上样时的 pH 值近乎中性,随后通过逐渐降低 pH 值或增加离子强度,或在洗脱液中加入 EDTA 即可逐一洗脱被吸附样品。

二、螯合凝胶的制备

可按下列式制备^[1]:



琼脂糖环氧活化衍生物 (I) 已有商品。(III) 与 (IV) 制法如下: 将亚氨基二乙酸 (II) 2 克溶于 10 毫升 2 M Na_2CO_3 中, 加至 15 毫升干燥的琼脂糖衍生物 (I) 中, 所得的悬浮物加热到 65°C, 搅拌 24 小时, 然后滤集凝胶, 以蒸馏水充分洗涤。生成的双-羧甲氨基衍生物 (III) 每克干凝胶含 630 μM 双羧甲氨基 (氮用凯氏法测定, 羧基用滴定法测定)。再将氯化锌溶液 (1 毫克/毫升) 或硫酸铜溶液 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1 毫克/毫升) 通过含有 (III) 的柱 (1 $\times$ 3.6 厘米)。若使用氯化锌溶液, 层析柱需用 Zn^{2+} 完全饱和 (洗脱液检出 Zn^{2+} 即示已饱和), 但若使用硫酸铜溶液, 则仅使柱上部约 60% 长度受处理已足够, 不可全柱通过硫酸铜溶液, 否则样品洗脱液中会有 Cu^{2+} 污染。每毫升螯合凝胶约能结合 20 μM Cu^{2+} 。

以上是螯合凝胶的一般制备方法, 在各个分离实例中, 处理方法及柱长可随实验条件适当变化。

三、分离纯化实例

(一) 人血浆 α_2 -SH 糖蛋白 (Human plasma α_2 -SH glycoprotein) 的纯化

人血浆 α_2 -SH 糖蛋白 (下称 α_2 -SH) 由 J. Heremans (1960) 首先分离得到。分子量约为 50000—55000, 但它的结构迄今未能测出, 生理作用也未彻底弄清。C. J. Van Oss 等 (1974) 观察到 α_2 -SH 具有调理素 (opsonin) 的性质。J.

R. Dikron (1975) 证明了这个蛋白质是成年人与胎儿骨质的一种成份,而且,在外伤性病人血清中其含量显著偏低。因此,有必要得到一定量纯品以进行结构测定及深入的生理功能研究。但用以前的经典技术往往难以获得高纯度的样品,因为人血浆中有一个分子量及其它各项性质与之十分相似的 α_2 -Zn 糖蛋白,极难彼此分开。

Lebreton 等^[2] 近来试用金属螯合亲和层析纯化 α_2 -SH 取得了迄今最满意的结果。

在进行金属螯合亲和层析前先将正常人血清用 1.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,继之以 CM Sepharose CL-6B 柱进行离子交换层析(缓冲剂为 0.025 M 乙酸, pH 5.0, 含 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 2 mM MnCl_2 与 50 mM ϵ -氨基正己酸),制得粗品 α_2 -SH。

金属螯合亲和层析的凝胶基质为环氧活化的 Sepharose 6B 衍生物。泡胀后取 30 毫升加到 20 毫升 2 M Na_2CO_3 中(含 4 克亚氨基二乙酸二钠)。将此悬浮液加热到 65°C 再搅拌 24 小时,过滤后以蒸馏水充分洗涤。所得螯合基质装柱后再以 ZnCl_2 水溶液(1 毫克/毫升)。(柱: 1.5 × 12 厘米,流速 40 毫升/小时, Zn^{2+} 离子螯合后以 0.05 M Tris-HCl 缓冲剂 (pH 8.0, 含 0.15 M NaCl) 平衡,随即将粗品 α_2 -SH 上样(26 毫克/2 毫升),用分步洗脱法洗脱组份。

洗脱结果如图 1 所示,组份 II 经免疫电泳及凝胶电泳测定是纯品,回收率高达 85%。

由于应用了金属螯合亲和层析这一新技术,仅一次层析便取得了前所未有的满意结果,首次得到了足够量的纯样品,为今后进一步研究其化学结构及生理作用创造了必要的条件。

(二) 人的成纤维细胞干扰素 (Human Fibroblast Interferon) 的纯化

多年来,曾用多种方法尝试纯化从不同组织中得到的干扰素,但三年前用经典技术仅获得少量不含其它杂质蛋白的样品,可是活性回收率极低,仅 8%,而且不能大量制备。其后,利用了干扰素的疏水性,又试验了其他多种纯化方法才得到了较大量的纯品。但即使这些方

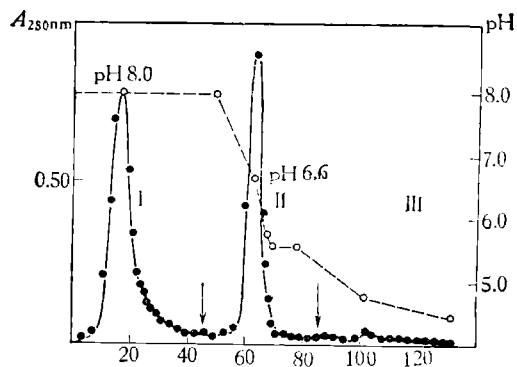


图 1 人血清粗品 α_2 -SH 的金属螯合亲和层析

条件: 柱 1.5 × 12 厘米;粗品: 26 毫克/2 毫升;分步洗脱:
(1) 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 含 0.05 M NaCl;
(2) 0.1 M 磷酸钠, pH 6.5 含 0.8 M NaCl;
(3) 0.1 M 乙酸钠, pH 4.5 含 0.8 M NaCl;
流速: 20 毫升/小时。

法合并应用最高比活性也只是 8×10^7 单位/毫克。

最近,Edy 等^[3]利用了螯合金属亲和层析纯化人的成纤维细胞干扰素,使用的凝胶基质为环氧活化的琼脂糖 Sepharose 6B 衍生物,偶合配基为亚氨基二乙酸二钠盐,金属离子为 Zn^{2+} (ZnCl_2 , 1 毫克/毫升)。配基与凝胶螯合方法基本上与 Porath^[1]的一般方法相同。但加热温度改为 56°C,搅拌时间为 18 小时。15 毫升环氧活化的 Sepharose 6B 结合 2 克亚氨基二乙酸钠。偶合后余留的环氧基可加入 1 M 乙醇胺在 56°C 下培育 4 小时使之阻断。其后的处理过程均同上述一般方法。

人的成纤维细胞干扰素从具有二倍体的成纤维细胞培养得到。比活性为 $10^{4.6}$ 单位/毫克。上述样品在近中性的缓冲剂中通过 Zn^{2+} 螯合的层析柱,然后在恒定的高离子强度条件下,进行 pH 值递降梯度洗脱。(详见图 2 说明)。

pH 梯度洗脱所得图形(图 2)如下,图中黑点构成的主峰为干扰素。

应用锌螯合亲和层析纯化干扰素活性回收率可达 62%,比活性高达 $10^{8.5}$ 单位/毫克,比起粗品活性提高了约 3100 倍。而且,操作方便,柱小。这些优点都是别的纯化方法不可比拟的。由于采用了金属螯合亲和层析,提供了大量的纯品,大大促进了干扰素在化学结构及生物功

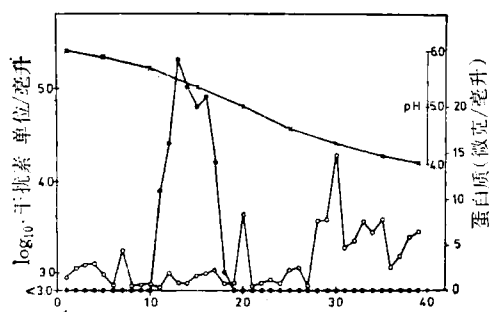


图2 人的成纤维细胞干扰素 pH 梯度洗脱

柱: 0.9×11 厘米。样品: 100 毫升粗干扰素。
洗脱: 先用 0.02 M 磷酸钠、钾缓冲液 pH 7.2, 加 0.15 M NaCl, 再用同种缓冲液加 1.0 M NaCl, 最后用 0.05 M 柠檬酸/磷酸缓冲液, pH 6.7, 含 1 M NaCl。上述处理后, 用二种缓冲剂(100 毫升 0.05 M 柠檬酸钠/磷酸, pH 6.2, 含 1 M NaCl 与 100 毫升 0.05 M 柠檬酸/磷酸, pH 4.0, 含 1 M NaCl) 进行 pH 梯度展开。收集: 每管 5 毫升。
×—× pH 值; ○—○ 蛋白质; ●—● 干扰素。

能方面的深入研究。

(三) 人乳胆铁质 (Lactoferrin) 的分离纯化

胆铁质是人乳中一种能结合铁离子的蛋白质。60 年代初由 B. Johansson (1960)、B. Blanc (1961) 等几乎同时分离得到, 分子量约为 80000, 每分子能结合 2 个铁原子。人乳中胆铁质的存在对哺乳婴孩有重要意义, 由于它在体内体外均能结合 Fe^{2+} , 能有效地阻止一些铁依赖性微生物的生长。

目前商业样品含有 20% 的杂质, 而且纯化步骤十分繁复。BoLonnardal^[4] 等近年来利用胆铁质对金属特有的亲和力, 尝试以金属螯合亲和层析作为分离纯化的手段, 纯化商业制剂, 同时从人乳蛋白分离纯化胆铁质。由于胆铁质除了能结合铁离子外尚能结合铜离子, 而且与铜螯合的凝胶复合物较之铁形成的复合物更为稳定, 所以他选用了铜螯合金属亲和层析。凝胶基质是环氧活化的琼脂糖 Sepharose 4B 衍生物。制备法及 Cu^{2+} 处理均按 Porath^[1] 所述一般方法。柱规格为 3.2×5.5 厘米, 床体积 44 毫升, 仅将柱的上部约 2/3 长度以 Cu^{2+} 处理即可, 以免洗脱液中有 Cu^{2+} 污染。装柱后以 Tris-乙酸缓冲剂 (pH 8.2, 含 0.05 M NaCl) 平衡。

1. 商业胆铁质的纯化 含量为 80% 的

商业胆铁质上样到上述铜螯合柱中, 然后以分步洗脱法洗脱, 起洗缓冲剂 pH 8.2, 洗脱组份以免疫电泳法检查证明含有许多其它蛋白质, 但不含胆铁质, 然后以 pH 4.0 的缓冲剂洗脱, 层析图形如图 3 所示。所得组份用同样方法检查, 证明是胆铁质纯品。

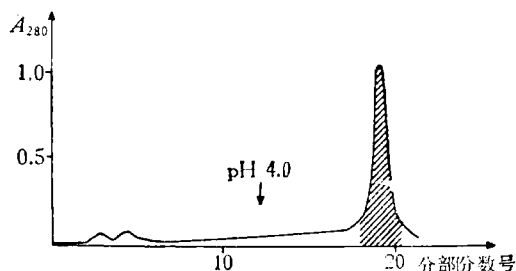


图3 商业胆铁质用金属螯合亲和层析纯化

层析柱 (3.2×5.5 厘米) 以 0.05 M Tris-乙酸, pH 8.2 平衡, 用相同缓冲剂, pH 4.0 洗脱。

2. 人乳中胆铁质的分离纯化 人乳提取物粗品在上述同样的铜螯合柱上层析, 起始缓冲剂 pH 8.2, 随后以 pH 值递降梯度洗脱直至 pH 2.8, 实验结果见图 4。将标以斜线的峰位收集后以凝胶电泳检查发现除胆铁质外尚有三个组份 (图 6 左), 分泌免疫球蛋白 (Secretory IgA), 血清白蛋白 (HSA) 及 α -胆铁质 (α -La)。前二个组份与胆铁质一样地吸附与解析 (图 5), 但 SA 可通过调节 pH 梯度将其分离, 而 SIgA 分子量为 370,000, 远远大于胆铁质, 可方便地再用凝胶过滤法 (Sephadex G 150) 将其分开。

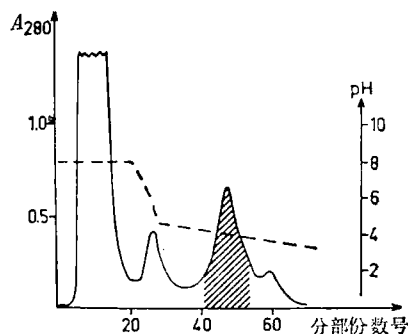


图4 人乳蛋白的金属螯合亲和层析

柱 (3.2×5.5 厘米) 以 0.5 M Tris-乙酸 (pH 8.2) 平衡; 用 500 毫升 Tris-乙酸 (pH 8.2) 及 500 毫升 Tris-乙酸 (pH 2.8) 进行梯度洗脱。

与其它分离胆铁质的方法相比, 本法有下述优点: (1) 样品纯度高, 以凝胶电泳 (图 6

右)或免疫电泳^[6]检查都显示是纯品;(2)柱容量大,每毫升凝胶可吸附样品 700 毫克,上样 200 毫克只需 5 厘米左右一根短柱,既省时又省料;(3)回收率几近定量,在其它几个组份中几乎不含可检查出来的胆铁质;(4)柱再生十分容易,只需以 CuSO_4 溶液重新通过一次即可再次上样。

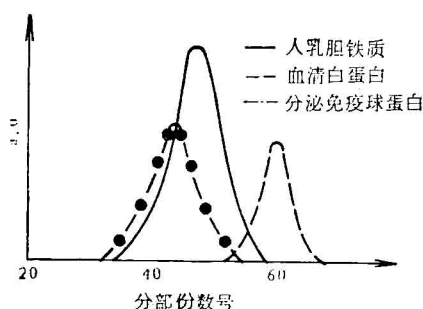


图 5 图 4 中标以斜线的峰位组份的免疫电泳

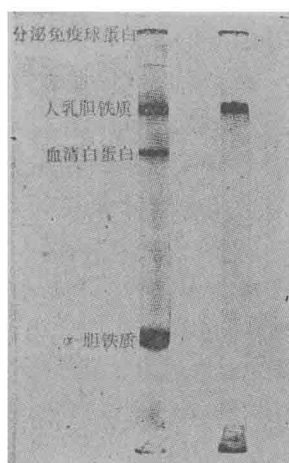


图 6 人乳胆铁质纯化前后的凝胶电泳图

小 结

通过以上介绍,可将金属螯合亲和层析操

作程序归纳为(1)泡胀及洗涤需要量的环氧活化的琼脂糖(Sephrose 4B, 6B)衍生物,过滤待用;(2)将亚氨基二乙酸钠溶解于约 2M 的 Na_2CO_3 中(0.2 克/毫升),再将其加到上述滤干的凝胶中;(3)保温 65°C ,使之偶合约 24 小时;(4)过滤,以蒸馏水充分洗涤;(5)装柱,然后将相应的金属离子溶液(1 毫克/毫升 ZnCl_2 或 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)以约 10 厘米/小时的流速通过(若用 Cu^{2+} ,只需通过全柱的 2/3 左右即可);(6)上样,再以至少 10 倍体积的起始缓冲剂平衡及洗脱不吸附物质;(7)用递增离子强度或递减 pH 值的缓冲液进行梯度洗脱,必要时可在其中加入 50 mM 的 EDTA 溶液用来洗脱吸附较强的组份。

本法的主要特点是:(1)设备简易,材料易得,环氧活化的琼脂糖已有商品(Pharmacia 公司)。此外,只需几种简单试剂;(2)操作方便,时间短(本法实际上只是一次柱层析;又因柱效高,容量大,所需层析时间自然较少);(3)回收率很高,一般达 80% 以上,有的几近定量回收;(4)样品纯度高,而且因层析条件温和,时间少,所以整个过程中没有蛋白质变性或水解现象发生。

参 考 文 献

- [1] Porath, J. et al.: *Nature*, **258**, 598—599, 1975.
- [2] Lebreton, J. P.: *FEBS Letter*, **80**, 351—354, 1977.
- [3] Edy, V. G.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 5934—5935, 1977.
- [4] Bolonnerdal, J.: *FEBS Letter*, **75**, 89—92, 1977.
- [5] Scheidegger, J. J.: *Int. Arch. Allergy*, **7**, 103—110, 1955.
- [6] Scheidegger, J. J.: *Int. Arch. Allergy*, **7**, 103—110, 1955.

[本文于 1979 年 10 月 29 日收到]

遗传密码中的概率与信息问题

王 身 立

(复旦大学遗传研究所)

60 年代国外应用人工合成的、包含一定核苷酸序列的 RNA 作为模板,控制多肽的合成,

从模板 RNA 中核苷酸成份与多肽中氨基酸成份对应关系的分析,阐明了遗传密码,解读了大