

一步的研究. 富含 AU 序列作为转录后调控的底物是肯定的, PKC 激活剂 (cyclohexin-mide, NaF) 甚至于 IL-1 β 、IL-7 都能通过富含 AU 序列来稳定 mRNA, 但 TNF α 诱导的 GM-CSF mRNA 的稳定性, 不依赖于富含 AU 序列.

综上所述, GM-CSF 基因 5' 非转录区包含对转录作用正调控与负调控的成分, 以及可诱导的能结合核蛋白的区域, 而这些核蛋白的表达是细胞特异或刺激因子特异的^[14]. 位于基因下游非翻译区的 mRNA 3' 端有一富含 AU 的序列, 可能不利于 mRNA 的稳定性, 从而在转录后水平上对 GM-CSF 的表达进行负调控^[7].

参 考 文 献

- Miyatake S, Otsuka T, Yokota T *et al.* EMBO J, 1985; **4**: 2561
- Nickel M, Cohen R B, Pluznik O H. J Immunol, 1990; **145**: 840
- Kaushansky K, O' Hara P J, Berkner K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **83**: 3101
- Nimer S, Franzer J, Richards J *et al.* Mol Cell Biol, 1990; **10**: 6084
- Nimer S, Morita E A, Martis M J *et al.* Mol Cell Biol, 1988; **8**: 1979
- Nimer S. New Biol, 1991; **3**: 997
- Kaushansky K. J Immunol, 1989; **143**: 2525
- Shannon M F, Gamble J R, Vadas M A. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 674
- Shannon M F, Occhiodoro F S, Ryan G R *et al.* Colloq INSERM, 1989; **179**: 73
- Kuczek E S, Shannon M F, Pell L M *et al.* J Immunol, 1991; **146**: 2426
- Miyatake S, Seiki M, Yashida M *et al.* Mol Cell Biol, 1988; **8**: 5581
- McClaffrey P G, Jain J, Jamieson C *et al.* J Biol Chem, 1992; **267**: 1864
- Schreck R, Baeurle P A. Mol Cell Biol, 1990; **10**: 1281
- Kelso A, Metcalf D. Advances in Immunology, 1990; **48**: 69
- Cockerill P N, Shannon M F, Bert A G *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 2466
- Angel P, Imagawa M, Chiu R *et al.* Cell, 1987; **49**: 729
- Curran T, Franz A B R J. Cell, 1988; **55**: 395
- Bohjanen P R, Petryniak B, June C H *et al.* Mol Cell Biol, 1991; **11**: 3288
- Multer J C, McCrory W A, Wilson M *et al.* Enzyme, 1991; **44**: 203
- Bickel M, Iwai Y, Pluznik D H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 10001

超声在生物技术中应用的研究进展

冯 若 赵逸云* 李化茂** 王 进

(南京大学声学研究所, 南京 210093)

摘要 超声波应用于生物技术是一个比较新的研究领域. 许多研究发现, 在有酶或细胞参与的情况下, 一些过程可在超声作用下被激活. 一般来说, 较低强度的超声波可以通过改进反应物的质量传输机制, 提高酶及固定酶的催化活性或加速细胞的新陈代谢过程. 文中举例讨论了近年来超声在生物技术中应用的研究进展及前景.

关键词 超声, 空化, 生物技术

作为一种机械能量形式, 超声技术已广泛用于工业、化学与化工、医疗等领域^[1]. 生物技术是当前最为引人注目的前沿学科之一, 它的广阔发展与应用必将会极大地影响与改变人类的社会生活. 因此, 探索各种科学技术向生物

技术领域渗透的可能性, 正引起广大科技工作

* 云南大学化学系, 昆明 650091.

** 吉安师专物理系, 吉安 343005.

收稿日期: 1993-10-22, 修回日期: 1994-01-14

者的兴趣. 本文将对超声用于生物技术的进展做一论述.

1 超声与媒质相互作用机制及其在生物技术中的意义

通常将超声与媒质相互作用机制分为机械(力学)机制、热学机制和空化机制^[2].

1.1 机械(力学)机制

超声波在媒质中传播, 意味着超声波在其传播空间内使媒质质点进入振动状态. 为描述这种振动状态, 可选用质点的振动位移、速度、加速度及声压等参量.

例如频率为 1MHz, 声强为 2W/cm² 的平面超声波在水中传播时, 由声学原理可算出, 水的质点振动位移、速度、加速度及声压幅值分别为 0.25 μ m、0.16m/s、10⁶m/s² 及 2.4 atm (2.4 $\times$ 10⁵Pa).

倘若超声对媒质作用引起的效应是与上述一个或几个力学量有关, 我们便可把产生效应的机制归结为机械机制.

1.2 热学机制

超声波在媒质内传播过程中, 其能量不断地被传播媒质吸收而变成热能, 从而使媒质的自身温度升高. 通过简单计算证明^[3], 如用 10W 声功率辐照 50ml 水的绝热系统, 辐照 2min 后可使水温升高 5.7 $^{\circ}$ C. 倘若与此同时, 超声还导致媒质产生某种效应, 而且如果采用其他加热方法可获得同样的温升与效应, 那么我们则有理由说, 产生该效应的机制是热学机制.

1.3 空化机制

广义而言, 超声空化是指超声激活气(汽)泡的各种动力学表现. 这些表现可能是较为有规律而缓和的(在较低声强作用下), 称为稳态空化; 也可能是很激烈而短暂的(发生在较高声强下), 称为瞬态空化^[4].

瞬态空化泡绝热收缩至崩溃瞬间, 泡内可呈现 5000 $^{\circ}$ C 以上的高温和几百个 atm 的高压, 遂导致自由基及声致发光等现象, 并伴有强大的冲击波(对均相液体媒质)或射流(对非均

相媒质)等.

我们知道, 发生生化反应的温度范围较窄, 因此超声致热不应是生物技术中的主要激活原因, 尽管它也可能会有重要的贡献. 从另一方面讲, 热失活却可能是酶变性的重要机制, 正因为如此, 生物技术过程一般都是在等温条件下完成^[5].

超声波(即使其强度较低)辐照, 由于它的机械机制作用, 使液体媒质质点运动增强, 质量传输加速. 在生物技术中, 这个过程可以在边界层、膜(人工及天然的)、细胞壁附近及胞液中观察到.

倘若在稳态空化气泡附近存在有酶或细胞, 它们将会在微声流作用下受到较大的切向力作用, 这一点对于超声波在生物技术中的应用也具有重要的意义.

瞬态超声空化过程可以破坏细胞并使酶变性, 因此在一般生物技术中不希望瞬态空化现象发生.

2 超声在生物技术中的应用进展

许多研究表明, 适当的超声辐照可以增强酶的活性, 促进酶的固定化过程, 提高多肽的两相酶合成及加速细胞新陈代谢等. 特举例讨论如下.

2.1 有关超声辐照可增强酶活性、促进酶催化反应的研究已有不少报道.如在生产低乳糖含量的酸牛奶时, 超声可激活 β -半乳糖酶, 使乳糖水解, 这样生产的酸牛奶, 乳糖含量明显下降. 该技术是使乳糖水解后的牛奶发酵, 或同时再添加 β -半乳糖苷酶和某种细菌, 使用超声辐照可使乳糖水解过程得到改善. 如不用超声时, 乳糖浓度只减少 39%—51%, 而加超声作用时, 乳糖浓度可减少 71%—74%^[6]. 文献^[7]报道, 使用 30kHz, 0.5W/cm² 的超声波辐照 1min, 可使溶于二异丙醚(diisopropylether)中的苯乙醇腈(mandelonitrile)酶的分解速度提高 10 多倍. 这一结果是通过测量样品的消光度而观测到的. 测量结果如图 1 所示.

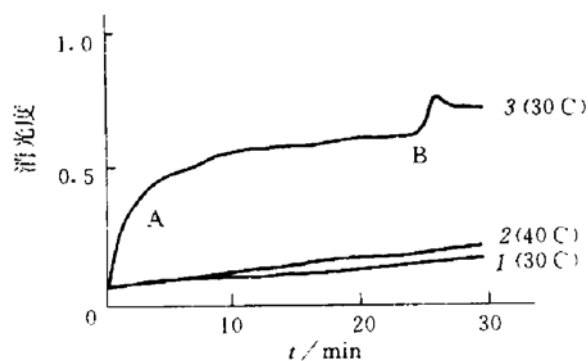


图1 苯乙醇腈分解为苯(甲)醛和HCN过程中苯(甲)醛消光度随时间的变化

图中曲线1和2为未经超声辐照的情况, 分别在30°C与40°C下测得。曲线3则为经超声辐照的情况(30°C), 在曲线的A段测量之前, 超声辐照1min; 25min之后(对应B点), 再作超声辐照15s。从两组曲线的变化斜率之比可知, 超声辐照使酶的活性增加14倍。

超声激活固定化酶也是一个富有成果的研究领域。如以酪蛋白作底物, 用20kHz的超声波辐照固定于琼脂胶上的 α -胰凝乳蛋白酶, 可使其活性提高2倍^[8]。人们认为此过程的机理是超声促进酪蛋白透入载体的结果。类似的结果还在用7MHz超声波辐照固定于多孔聚苯乙烯上的 α -淀粉酶时观察到^[9]。在此较高频率下, 空化难以发生, 则人们认为其机理主要是声流的作用。超声激活固定化葡萄糖淀粉酶, 可使其活性增大2.5倍, 从而加速了淀粉水解成葡萄糖的反应。这一技术已在由淀粉生产葡萄糖中得到了推广应用。

2.2 一般认为, 辐照声强不宜过高, 否则会使酶失活。但也有例子表明, 只有用较高声强

表1 由酵母合成对映异构甾醇

酶源	转化率/%	对映异构体的转化率/%
全酵母	9.5	19
超声辐照的酵母	41.9	83.9

辐照时, 才能提高酶的活性。如使用20kHz, 40W/cm²的超声波辐照酵母(在悬浮液状态下)2h, 作为甾醇环化酶可使角鲨烯环化率明

显提高, 从而可以廉价地合成出克量级的对映异构的甾醇。见表1中数据所示。

2.3 我们知道, 利用酶催化使天然化合物结构发生变化过程中, 常会遇到许多困难, 而这些困难往往可以通过使酶固定来予以解决。但是一般的合成聚合物没有固定酶的能力, 不能作为酶的基底。为使它获得这种能力, 必须要进行活化。活化的办法是通过给聚合物键合一个官能团(如醛)而使其结构改变。这一过程可以借助于超声辐照来实现。

最近的研究表明^[10], 使用频率为21kHz, 功率为100W的超声波, 在充氮气条件下辐照50min(40°C), 可使聚苯乙烯与其它可聚合的单体发生共聚作用。通过适当选择单体, 如缩水甘油异丁烯酯(GMA), 即可使聚苯乙烯获得很好的固定胰凝乳酶的能力。

2.4 超声乳化和混合还可用于多肽的两相酶合成。例如用木瓜酶合成甘-苯丙二肽时, 与机械搅拌相比, 超声辐照可使二肽的产量明显提高。

表2中给出了利用38kHz超声波在37°C下辐照12h时的一组实验数据^[11]。

表2 二肽的合成产率

(%)		
有机相	机械搅拌的产率	超声辐照下的产率
二乙醚 (diethyl ether)	71	89
石油醚 (petroleum ether)	12	62

注: 合成条件: 75%水, 有机溶剂25%, 37°C, 12h。

表中实验数据表明, 在石油醚有机溶剂中, 超声辐照可使二肽合成产率比机械搅拌下的产率提高5倍以上。

2.5 适当的超声辐照可以加速细胞的生长速度。如采用低功率超声辐照液体培养基, 可提高藻类细胞的生长速度和产率, 从而可使由这些细胞产生的蛋白质产量提高3倍^[12]。

文献[13]的报道表明, 使用2.8W的超声波, 以每10分钟辐照5s的方式进行周期性处

理, 以提高由胆甾醇氧化成为胆甾烯酮的产量. 图 2 给出了超声辐照与机械搅拌的实验结果.

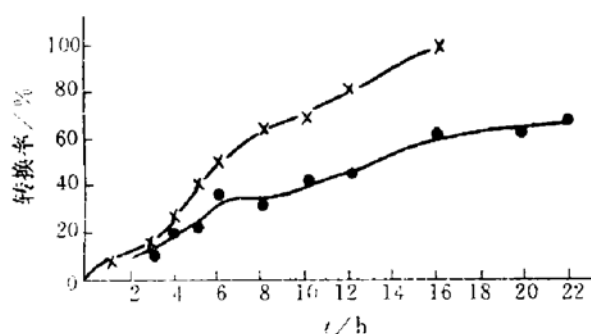


图 2 胆甾醇 (1g/L) 微生物氧化成胆甾烯酮的曲线

●—● 机械搅拌 ×—× 超声辐照 (26℃).

由图 2 可见, 反应 4h 之后, 机械搅拌与超声辐照的反应曲线明显分开. 这表明, 低强度的超声激活作用, 只有在处理较长时间之后才变得明显起来.

另一个例子是在超声作用下, 由发面酵母

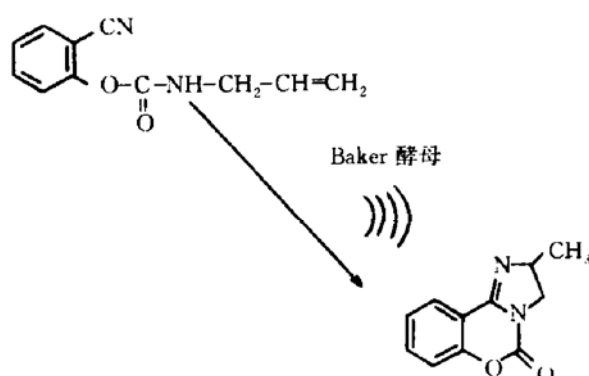


图 3 超声作用下由发面酵母合成咪唑并耦合杂环反应

))) : 示超声波作用.

表 3 发面酵母合成咪唑并耦合杂环的实验结果

底 物	产 物 / %	
	无超声作用	有超声作用
对照 (control)	32	80
NH	34	78
NMe	27	86
NPh	30	79

合成咪唑并耦合杂环的实验. 利用超声 (50W) 在 0—5℃ 温度下, 辐照细胞 90min, 其反应式与实验结果示于图 3 与表 3^[14].

此外, 较为有价值的发现是, 低强度超声有助于离解抗原-抗体络合物. 这一发现已在亲和色谱中用于纯化酶^[15].

超声技术是一种简单而廉价的技术, 然而它在生物技术中的作用是其他技术不可取代的, 其价值是重大的. 生物技术中的超声作用如何, 取决于超声辐照剂量. 低强度超声在生物技术中的应用已显示出令人鼓舞的前景. 为广泛开拓其应用领域, 有关超声波与酶或细胞相互作用的跨学科的基础研究无疑是十分重要的.

参 考 文 献

- 1 冯 若. 见: 曲钦岳主编. 当代百科知识大词典. 南京: 南京大学出版社, 1989: 556—558
- 2 冯 若. 见: 周永昌、郭万学主编. 超声医学. 北京: 科学技术文献出版社, 1989: 43—58
- 3 Mason T J, Lorimer J P, Bates D M. Ultrasonics, 1992; **30** (1): 39
- 4 冯 若, 李化茂. 声化学及其应用. 合肥: 安徽科技出版社, 1992
- 5 Sinisterra J V. Ultrasonics, 1992; **30** (3): 180
- 6 Toba T, Hayasaka I, Taguchi S *et al.* J Sci Food Agric, 1990; **52**: 403
- 7 Zeng Mingsun, Uwe Faust. 14th ICA Proceeding, 1992; C6—5
- 8 Ishimori Y, Kurabe I, Suzuki S. J Molec Catal, 1981; **12** (2): 253
- 9 Rosenfeld E, Schmidt. Archives of Acoustics, 1984; **9**: 105
- 10 Jiang Bo, Chen Xian. 14th ICA Proceeding, 1992; CP-31
- 11 Tadasa K, Yamamoto Y, Shimoda I *et al.* J Faculty Agric Shinsu University, 1991; **26**: 1
- 12 Bioprocessing Technology, Technical Insights, USA, 1989
- 13 Bar R. Biotechnol Bioeng, 1988; **332**: 655
- 14 Kamal A, Rao M V, Rao A B. J Chem Soc Perkin I, 1990; **10**: 2755
- 15 Schellenberger A, Schmidt P, Posenfeld E *et al.* J Ger DD, 1985; **218**: 386

ratory of Pharmaceutic Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210008). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 497—500

The expression of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene is finely regulated at the levels of both transcription and post-transcription. The transcriptional regulation involves some *cis*-active elements, such as the CATT (A/T) repeat sequence, GC-rich sequence, CK-1, CK-2, κ B specific sequence and inducible CsA-sensitive enhancer, which are all located in the 5'-untranscriptional region of the hGM-CSF gene. At the post-transcriptional level, a 62bp AU-rich sequence located at 3'-untranslation region of the mRNA is related to the stability of hGM-CSF mRNA. These mechanisms can up or down regulate the production of hGM-CSF when the cells receive the signals from the stimuli of cytokines and other stimulating factors.

Key words hGM-CSF gene, transcriptional regulation, post-transcriptional regulation

The Advance of Application of Ultrasound to Biotechnology. Feng Ruo, Zhao Yiyun, Li Huamao, Wang Jin. (*Institute of Acoustics Nanjing University, Nanjing 210093*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 500—503

The application of ultrasound to biotechnology is one of the new interesting research fields. A number of studies has shown that some biochemical processes can be activated by ultrasound in the presence of enzymes and cells. Generally, lower intensity ultrasound can increase the activity of enzymes and immobilised enzymes or improve the metabolism of cells by the improvement of mechanism of mass-transfer of substrates. The advance and future of

applications of ultrasound to biotechnology is discussed by some examples given.

Key words ultrasound, cavitation, biotechnology

The Advances in Red Blood Cell Glycophorins Research. Mao Jianping, Sun Zhixian. (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 504—508

Glycophorin (GP or sialoglycophorin)-A, B, C and D constitute a group of red blood cell (RBC) transmembrane proteins. GPA carried the M- and N-blood group antigens. GPB represents the Ss_s and U antigens. GPC and GPD exhibit the Gerbich receptors. Some homologous peptide sequences exist in four of the GPs, but extensive similarities are within GPA and GPB family, GPC and GPD family as well. Because of its abundant sialic acid content, GPA plays a critical role in preventing and minimizing interactions of RBC to RBC, and of RBC to other cells in circulation. Binding of a ligand specific for GPA induces profound changes in membrane material behavior. GPC has a important role in regulating RBC shape, membrane deformability and membrane mechanical stability. The functions of GPA and GPC are associated with band 3 and 4.1 proteins respectively.

Key words erythrocyte, glycophorin, transmembrane protein

Secondary Structure Formation: Framework Model of Protein Folding Initiation. Hu Hongyu, Du Yucang, Lu Zixian. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 508—513

Framework model emphasizes that secondary