

dATP, 放化纯度经两种溶剂系统鉴定均大于 95% (图 1、2)。

3. ^3H -dATP 经 751 型紫外分光光度计测定为 6.35 微克分子, $\lambda_{\max}$ 为 260—261 毫微米, $\lambda_{\min}$ 为 225 毫微米, 与已知样品相同。

4. ^3H -dATP 放射性比度为 26.5 居里/毫克分子。

获得的 ^3H -dATP 配制成 50% 酒精水溶液, 按 1 毫居里/毫升的浓度包装, 贮存在 -20°C 冰箱中。

二、讨论: 据文献报道, 应用气液催化交换法制备氚标记脱氧腺嘌呤核苷三磷酸, 经核磁

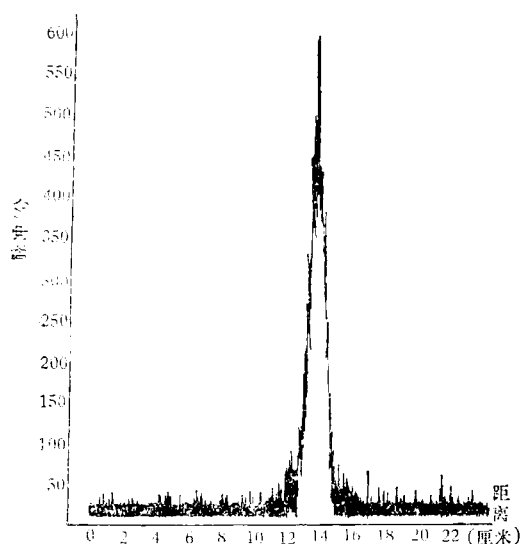


图 1 ^3H -dATP 放射性层析扫描谱
溶液系统: 异丁酸: 水: 氨: 0.1 M EDTA
(100:56:4.2:1.6)

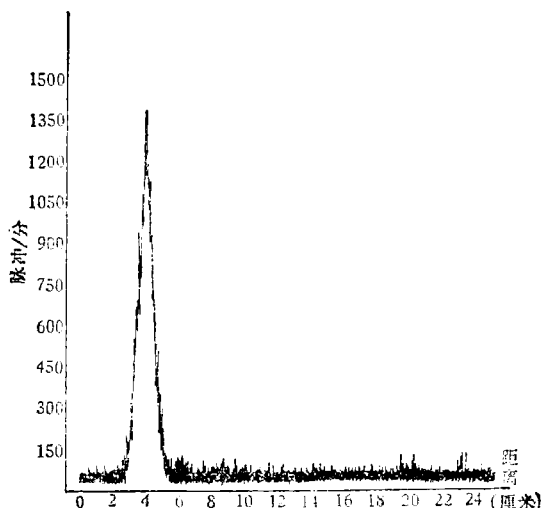


图 2 ^3H -dATP 放射性层析扫描图谱
溶液系统: 正丁醇: 丙酸: 水: 氨 (40:27:28:0.3)

共振测定, 氚标记位置在嘌呤环的第八位碳原子上^[2]。由于我们没有进行氚标记位置的研究工作, 对此不能肯定。

气液催化交换法显示了它在制备氚标记化合物中的长处, 至于其反应机理仍然有待研究。

参 考 文 献

- [1] Pri-Bar, I. and Buchman, O.: *Chem. Comm.*, 1631, 1970.
- [2] Evans, E. A. et al.: *J. Labelled Compounds*, 10 (14), 569—587, 1974.
- [3] Kuhn, R. and Hass, H. J.: *Angew. Chem.*, 67, 785, 1955.

[本文于 1979 年 5 月 21 日收到]

利用麦芽根抽提液降解 RNA 生产 5'-核苷酸

吴经才 陈青山 王炳权

(河北大学生物系) (原天津啤酒厂)

国内核苷酸生产目前多采用液体深层发酵或固体培养桔青霉得到 5'-磷酸二脂酶, 以降解核酸成为 5'-单核苷酸。啤酒厂有大量的副产物麦芽根, 其中含有降解 RNA 的各种酶类。用水浸泡麦根后, 将抽提液经过适当的热处理, 用

于降解 RNA 成 5'-核苷酸。降解液经一次阳离子交换树脂分离可以得到较高纯度的 5'-AMP。与桔青霉法比较, 麦根法具有工序少, 成本低和劳动卫生条件较好等优点。因此本法适合在啤酒厂综合利用生产核苷酸中推广使用。

材料和方法

一、材料 1. RNA: 北京田村腐乳厂生产。RNA 含量在 60% 以上。

2. 麦芽根: 天津啤酒厂麦芽车间的“二格”烘干麦根(烘干温度在 70℃ 以下)。

二、方法 1. RNA 含量测定: 用紫外吸收法^[1]。被测样品液经适当稀释测定在 260 毫微米处的吸收值 A_{260} 。空白对照为加沉淀剂除去 RNA 的样品液。样品液中的 RNA 含量用下式计算:

RNA 含量(微克/毫升)

$$= \frac{\text{样品 } A_{260} - \text{空白 } A_{260}}{0.022} \times \text{稀释倍数}$$

0.022 为每毫升含 1 微克 RNA 时在 260 毫微米处的吸收值^[2]。

2. 5'-核苷酸含量测定: 用过碘酸氧化法^[3]。被测样品稀释成每毫升含有 2—10 微克无机磷, 加入试剂使核苷酸中的 5'-磷酸定量地转变成无机磷, 再加定磷试剂使其产生蓝色, 测定在 660 毫微米处的吸收值 A_{660} , 利用无机磷标准曲线求出 5'-磷酸含量(微克/毫升)。空白对照条件相同, 只是改变加入试剂的顺序, 不使核苷酸的 5'-磷酸转变成无机磷。样品中的 5'-核苷酸含量用下式计算:

5'-核苷酸含量(微克/毫升)

$$= \frac{\text{样品含磷量} - \text{空白含磷量}}{31} \times 340 \times \text{稀释倍数}$$

其中: 31 为磷的原子量, 340 为四种核苷酸的平均分子量。

3. 麦芽根抽提液: 烘干的麦根放在纱布袋中用水冲洗干净, 淋去水分, 用 8 倍于麦根重量的水在室温下浸泡抽提 16—20 小时。挤出滤液, 放冷处保存。

4. RNA 的酶促降解: RNA 溶液和麦芽根抽提液需分别预热。即将 RNA 配成 1% 或 2% 的溶液用 NH_4OH 调节至 pH 6.0, 加热至 75℃; 麦芽根抽提液加热至 70℃, 并在此温度下维持 7.5 分钟。然后将 RNA 溶液和麦芽根抽提

液以 1:1 的体积比混合, 于 72—74℃ 下进行降解。保持 1.5—2 小时后升温至 90—100℃ 10 分钟, 以终止酶反应。再用 NH_4OH 调 pH 8.0—8.5, 离心分离除去碱不溶性杂质; 然后再用 HCl 调至 pH 3.0, 离心分离除去酸不溶性杂质。清液存放冷处供上柱使用。

结 果

一、降解时间与转化率的关系

反应系统的总体积为 200 毫升。RNA 溶液的浓度为 1% 或 2%。降解时, 容器口加玻璃塞以减少保温时水分的蒸发。每隔一定时间取出一定体积的降解液, 置 100℃ 水浴中煮沸 5 分钟, 终止酶的作用。冷却后定容到适宜体积, 离心, 除去沉淀, 取上清液测 5'-核苷酸含量, 计算转化率:

$$\text{转化率} = \frac{\text{降解后溶液中 5'-核苷酸(克)}}{\text{降解前溶液中 RNA(克)}} \times 100$$

降解时间与转化率间的关系, 从图 1 可以看到, 不论 RNA 的浓度为 1% 或 2%, 其最大转化率大致相同, 约为 65%, 在降解初期 5'-核苷酸生成速度较快, 随着时间的延长, 生成速度逐渐减慢, 降解 2 小时后 5'-核苷酸的生成甚微。

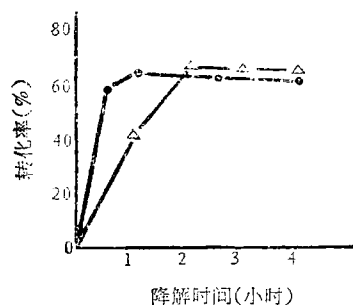


图1 RNA 转化的时间曲线

△—△ 1% RNA; ○—○ 2% RNA

二、麦芽根抽提液的热处理方式对转化率的影响

为了抑制抽提液中 3'-磷酸二脂酶、磷酸单脂酶、核苷酸及核苷脱氨酶等“旁路”酶的活力, 预热处理麦芽根抽提液是十分必要的。为了选择最佳条件, 我们采用三种不同的抽提方法及热处理方法, 它们对 RNA 的转化率的影响见表 1。

表 1 不同的抽提和热处理方式对麦根抽提液的
RNA 转化率的影响

抽提方式	热处理方式	5'-核苷酸含量 毫克/毫升	转化率(%)
50℃ 2小时	70℃, 7.5分钟	3.29	65.8
	70℃	3.07	61.4
	50℃	2.63	52.6
室温浸泡 16-20小时	70℃ 7.5分钟	3.62	72.4
	50℃	2.63	52.6

混合液中 RNA 浓度为 0.5%, 降解温度 72-74℃,
降解时间 1.5 小时

表 1 的数据表明,麦根在 50℃ 抽提或在室温下抽提,其转化 RNA 的能力相差不大。麦根抽提液的热处理方式对转化能力有影响。70℃ 热处理 7.5 分钟的抽提液转化能力最高,升温到 70℃ 即行降解的次之,升温到 50℃ 即行降解的最低。

三、5'-核苷酸的分离和鉴定

降解后,用阳离子交换树脂柱分离 5'-核苷酸。所用树脂为聚苯乙烯-二乙烯苯磺酸型。树脂在柱中经酸、碱再生,最后使成氢型,用两倍于树脂体积的 pH 1.5 的无离子水平衡后即可上柱分离使用。

上柱分离的降解液中 5'-核苷酸的浓度一般大于 6.5 毫克/毫升。上柱前降解液用盐酸调节 pH 到 1.5。上柱量约为树脂全交换量的 5%。流速为 1 毫升/平方厘米·分。上柱毕,用两倍于树脂体积的 pH 1.5 的无离子水洗柱,再用无离子水洗脱,洗脱流速为 1.5 毫升/平方厘米·分。定量收集洗脱液,测定其 pH,并取样用 pH 2.0 的稀盐酸稀释到一定体积,用紫外分光光度计测定 250、260、280、290 毫微米处的吸收值。从吸收光谱比值 (A_{250}/A_{260} , A_{280}/A_{260} , A_{290}/A_{260})。对照四种 5'-核苷酸的吸收光谱标准比值,以判断单核苷酸的洗脱情况。并用纸层析或纸电泳鉴定流出液成份。纸层析的溶剂系统为异丁酸: 1N NH_4OH : 0.1M EDTA = 100:40:16; 纸电泳液为 pH 3.0 的 0.05M 柠檬酸缓冲液。操作电压为 300 伏。图 2 为降解后混合 5'-核苷酸的上柱分离情况。上柱液 1400 毫升,含 5'-核苷酸 10.93 克。经过一次阳

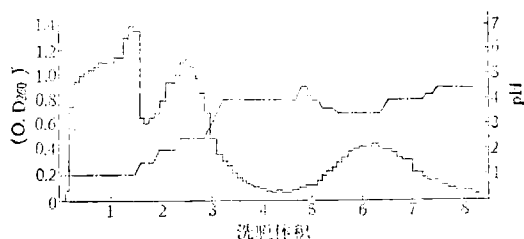


图 2 阳柱分离混合核苷酸的洗脱曲线及 pH 变化曲线
树脂: 聚苯乙烯-二乙烯苯磺酸型 200 目 $\times 8$
柱直径: 4.5 厘米,树脂层高 20 厘米
上柱混合核苷酸 1400 毫升 (7.9 毫克/毫升)
——: 混合核苷酸的洗脱曲线 —·—·—: pH 的变化曲线

离子树脂的分离, 5'-AMP (第一个出现的峰) 可与其它三种 5'-核苷酸分开, 经后处理得到 1.91 克 5'-AMP, 含量为 98.5%。分离得率 69% (其它 5'-核苷酸未做后处理提取), 提取之 5'-AMP 用纸层析及纸电泳分析只呈现 5'-AMP 单点, 在 pH 2 的 HCl 溶液中的光谱数值如表 2。

表 2 5'-AMP 的吸收光谱比值

吸收光谱比	A_{250}/A_{260}	A_{280}/A_{260}	A_{290}/A_{260}
标准 5'-AMP	0.85	0.22	0.03
样品 5'-AMP	0.83	0.22	0.03

讨 论

中桐義隆等人曾对大麦芽根中降解 RNA 的酶系做过研究^[1]。他们指出 Zn^{++} 浓度为 10^{-3} M 时对麦根中 5'-磷酸双酯酶类 (指降解 RNA 为 5'-核苷酸的有关酶) 的热稳定性有良好的保护作用。我们使用大麦芽根的水抽提液降解 RNA 时没有观察到 Zn^{++} 的这一作用。这可能是由于我们所用的麦根抽提液没有经过硫酸铵盐析精制, 其中尚含有保护酶类的金属离子。我们曾用含 EDTA 的水抽提麦根, 这种抽提液不具有转化 RNA 成 5'-核苷酸的能力。这说明金属离子对 5'-磷酸双酯酶类的转化作用是必要的, 也说明了麦芽根的水抽提液中含有保护和激活 5'-磷酸双酯酶类的金属离子。

为了减少底物对“旁路”酶的保护作用, 麦

根抽提液先经热处理再与 RNA 混合是必要的。热处理可以达到保留 5'-磷酸双酯酶并抑制其它“旁路”酶活力的目的。热处理的时间取决于温度高低。在适宜的温度范围内,温度高时热处理时间可相应缩短,反之则应延长。小试证明,麦根抽提液在 65℃ 热处理 15 分钟或 70℃ 热处理 7.5 分钟均较理想。大规模生产时,由于容量大、升温慢,热处理的最适条件要根据具体情况调整,既要防止加热破坏 5'-磷酸双酯酶,又要达到抑制其它酶的目的。

用麦根法降解 RNA 制取 5'-核苷酸,关键的问题是提高转化率。转化率低时,不仅得率低,而且使降解液中杂质增加,给后步的分离、纯化造成困难。遇此情况,可通过调节降解液

的 pH、低温存放或减压浓缩等方法除去部分杂质,可以相对改善上柱分离效果。

在小试基础上做过数次投料量为 2 公斤的 RNA 的生产性试验,证明按照上述工艺条件,麦根法与固体桔青霉法降解 RNA 生产 5'-AMP 的净得率相当。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所编:《核苷酸类物质的生产和应用》,科学出版社,1971 年。
- [2] 水野重树:核糖の分离,定量 I,化学と生物,3, 148, 1965。
- [3] Schmid, G.: Methods in Enzymology, 12, B, 230, 1968。
- [4] 中桐義隆等:发酵工學雜誌,46 (8), 605, 610, 616, 1968。

[本文于 1979 年 10 月 29 日收到]

用固定化 5'-磷酸二酯酶工业生产 5'-核苷酸*

袁中一 刘树煌 汪静英 马凤竹 陈远河** 钱习明

(中国科学院上海生物化学研究所)

自从固定化氨基酸化酶在日本获得工业应用以来,已引起各国广泛注意,至今已有近 10 个固定化酶在一些先进国家投入工业使用^[1-3]。我们自 1970 年开展固定化酶研究以来,已将我国染料工业中容易得到的“591 脂化物”——对-β-硫酸酯乙磺基苯胺 [p-(β-sulfate-ethylsulfonyl)-aniline, 简称 SESA] 作为双功能试剂,引入固定化酶领域。纤维素结合酶的反应方式见图 1。用这一手段制备的一些固定化的酶无论从活力回收或相对活力方面都较为满意^[4,5]。1972 年我们制得了葡聚糖凝胶共价结合的 3'-核糖核酸酶并小规模地用于工厂生产 3'-核苷酸^[6]。

目前国内外用于助鲜剂或药物的 5'-核苷酸^[7],大多应用桔青霉 (Penicillium citrinum) 产生的 5'-磷酸二酯酶水解核糖核酸生产。我们和上海啤酒厂、江门甘蔗化工厂协作,从 1975 年起试用固定化酶新工艺代替原有的用发酵液

降解核糖核酸的工艺,进行 5'-磷酸二酯酶的固定化方法及应用研究。首先,将桔青霉的发酵液经酒精沉淀制得 5'-磷酸二酯酶酶粉,然后通过偶联反应共价结合于重氮化的 ABSE-纤维素上。在 1976 年采用分批法进行了固定化酶每批降解 3.3 公斤纯核酸的扩大试验,结果提高了原发酵液利用率 20 倍,并表明使用固定化酶有优越性^[7]。从实际应用的要求出发,我们一方面解决了不经酒精沉淀的发酵液直接共价连接到载体上的问题,另一方面又简化了制备 ABSE-纤维素的工艺,从而使得固定化酶的制备过程,在经济和工艺二方面都适合工厂生产要求。随后于 1977 年底在江门甘蔗化工厂完成了生产试验。

桔青霉在 1000 升发酵罐内通风培养。当

* 本工作承广东江门甘蔗化工厂刘同昌、卢耀光及酿造车间核苷酸工段全体同志的密切配合,特此致谢。

** 上海啤酒厂。