

文章编号: 1000- 0615(2000)03- 0275- 05

鲈鱼鱼精中 5' - 脱氧核苷酸的分离工艺

吴汉民, 张芝芬, 娄永江, 韩素珍
(宁波大学食品科学研究所, 浙江 宁波 315211)

摘要: 论述了用桔青霉 *Penicillium citrinum* M71 菌株, 经液体培养制得的 5' - 磷酸二酯酶降解鲈鱼鱼精 DNA 成 5' - 脱氧核苷酸的分离工艺。分离采用 201×8 阴离子交换树脂, 具体条件为: 柱床高 105mm, 柱床直径 45mm, 样品浓度 213mg·mL⁻¹, 洗脱流速 0.5mL·cm⁻²·min⁻¹。分离结果表明, 采用 0.005M HCl+ 0.04M NaCl 作洗脱剂, 流速为 0.7mL·cm⁻²·min⁻¹时, 四种 5' - 脱氧核苷酸组分能完全被洗脱下来, 且呈一个大峰, 同其它成分分开, 再先后采用 0.001 8M HCl、0.002 8M HCl、0.036M NaCl(pH6.0)、0.005M HCl+ 0.02M NaCl 作洗脱剂时, 则能分别将 dCMP、dAMP、TMP、dGMP 完全分离。

关键词: 鲈; 鱼精; 脱氧核苷酸; 分离

中图分类号: S985 文献标识码: A

Separating and processing technique of 5' - Deoxymononucleotides from fish spermary of chub mackerel

WU Han min, ZHANG Zhi fen, LOU Yong-jiang, HAN Su zhen
(Food Science Institute, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The process of digesting DNA - Na obtained from fish spermary of chub mackerel into 5' - Deoxymononucleotides by using 5' - phosphodiesterase from *Penicillium citrinum*, M71 was studied. The 201×8 anion exchange resin was used in the separation. The conditions for setting samples are height of column bed 105mm, diameter of column bed 45mm, sample concentration 213mg·mL⁻¹ and eluting flow-rate 0.5mL·cm⁻²·min⁻¹. The results of the separation indicated 5' - deoxymononucleotides components could be fully eluted as a whole peak by the eluting agent, 0.005 M HCl and 0.04M NaCl. And the use of a few modified eluting agents, i. e. 0.001 8M HCl, 0.002 8M HCl, 0.036M NaCl(pH6.0) and 0.005M HCl+ 0.02M NaCl could bring about perfect and respective elution of dCMP, dAMP, TMP and dGMP.

Key words: chub mackerel; fish spermary; deoxymononucleotide; separating

国外常用 Dowex- 1 及 Dowex- 2 和 Amberlite IR- 400 或 IR- 410 来分离四种脱氧核苷酸, 也有用 Dowex- 50, 但应用最多的仍是 Dowex- 1, 交联度 8% ~ 10%, 并用甲酸及甲酸铵溶液洗脱^[1]。美国和日本曾用 Dowex- 1×3 甲酸盐的交换树脂层析分离 5' - 脱氧核苷酸, 但不仅成本高, 而且四个脱氧核苷酸的分离图形中部分洗脱峰两边不达底线, 导致 TMP 产出率低^[2]。国内分离 5' - 脱氧核苷酸不仅分离不完善, 而且峰间重叠现象严重, 致使脱氧核苷酸的产出率很低, 特别是 TMP 仅仅用了峰尖部分, 造

收稿日期: 1999- 12- 16

基金项目: 农业部渔业局资助项目(鲈鱼鱼精中 5' - 脱氧核苷酸的分离工艺研究)

作者简介: 吴汉民(1934-), 男, 教授。Tel: 0574- 7604368

成TMP长期依赖进口^[2]。本文寻求四种脱氧核苷酸完全分离的工艺条件,为生产提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

核酸酶 P₁ 采用桔青霉素 *Penicillium citrinum* M71 菌株,经液体培养制得,对 RNA 酶活大于 300 单位,对 DNA 酶活大于 100 单位。

鲑鱼鱼精由舟山水产食品厂提供。

DNA 钠盐,自制,纯度 90%, 酶解率 92.0%~98.3%。

标准品: dCMP、dAMP、TMP、dGMP (Sigma)。

201×8 树脂(氯型) 国产,粒度 200~400 目。

玻璃层析柱,自制。

1.2 方法

DNA-Na 的纯度测定见参考文献[3]。

dNMP 紫外吸收定量测定见参考文献[3]。

工艺流程: 鱼精 DNA-Na- 配成 1% (W/V) 溶液——100℃沸水浴热变性 10min——速冷——72±0.5℃酶解 1.5h——升温至 100℃, 10 min——速冷——过滤——调 pH8~9——过滤——滤液(测酶解率)——上 201×8 柱(同时脱氧核苷等穿漏)——洗脱液 1(dCMP 下)——洗脱液 2(dAMP 下)——洗脱液 3(TMP 下)——洗脱液 4(dGMP 下)。

2 结果与讨论

2.1 阴柱上柱率与回收率

标准 5'-脱氧核苷酸的上柱率高达 99.0%~99.8%, 而其回收率为 88.4%~93.0% (表 1), 这与 5'-脱氧核苷酸的组成结构与负电荷有关, dGMP 的回收率最低, 这表明鸟嘌呤与阴离子交换树脂之间具有较强的结构亲和性。

2.2 混合标准脱氧核苷酸的柱层析图谱

0.005M HCl 洗脱液, 流速 0.80mL·cm⁻²·min⁻¹, 结果分成 dCMP+ dAMP 与 TMP+ dGMP 两大部分, 见图 1(A)。采用 pH5.0 的 0.04M NaCl 洗脱液, 流速同前。结果仍分成两大部分, 但过渡区更接近基线, 见图 1(B)。用 0.005M HCl+ 0.04M NaCl 洗脱, 流速 0.70mL·cm⁻²·min⁻¹ 结果四个脱氧核苷酸合在一个峰里, 图形较好, 见图 1(C)。用 DNA 酶解液代替标准脱氧核苷酸混合物, 同样得四个脱氧核苷酸合一的大峰。

A 柱床: 4.8cm×0.9cm; 四种单核苷酸标准样品: 2mg·mL⁻¹, 40mg; 洗脱条件: 0.005M HCl, 流速 0.80mL·cm⁻²·min⁻¹

B 柱床: 5.0cm×0.9cm; 四种单核苷酸标准样品: 2mg·mL⁻¹, 40mg; 洗脱条件: 0.04M NaCl, pH5.0, 流速 0.80mL·cm⁻²·min⁻¹

C 柱床: 5.0cm×0.64cm; 四种单核苷酸标准样品: 2mg·mL⁻¹, 40mg; 洗脱条件: 0.005MHCl~0.04M NaCl, 流速 0.70mL·cm⁻²·min⁻¹

表 1 阴柱上柱率与回收率

Tab.1 Retentivity and recovery of sample about anion exchange column

标准样品	上柱率 (%)	回收率 (%)
dCMP	99.82	91~93
dAMP	99.50	91~92
dTMP	99.02	88~90
dGMP	99.80	84~87
平均	99.50	

2.3 脱氧核苷酸的彼此分离

先后用 0.001 7M HCl, 0.003M HCl 及 0.003M HCl+ 0.002M NaCl 洗脱浓度为 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合标准脱氧核苷酸溶液 40mg, 结果见图 2(D), dCMP 与 dAMP 基本分开, dAMP 与 TMP 也能分开, 但 TMP 与 dGMP 重叠比较多。改用 0.001 7M HCl, 0.003M HCl, 0.004M NaCl (pH4.8), 0.003 6M NaCl (pH4.8) 及 0.02M NaCl+ 0.005M HCl 洗脱, 则基本能分开, 但各组分之间过渡期太长, 见图 2(E)。

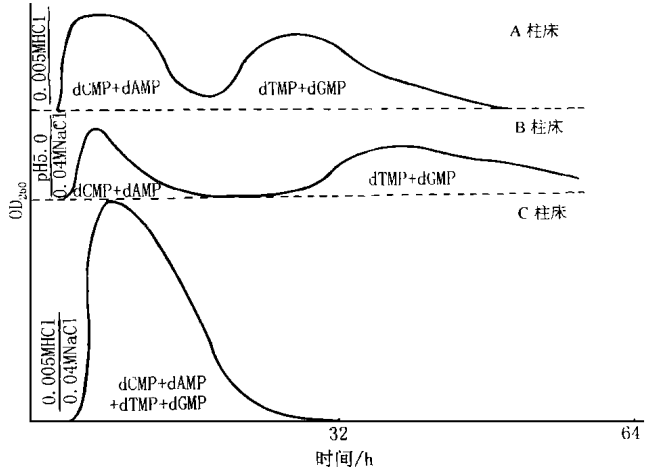


图 1 混合标准脱氧核苷酸层析图

Fig. 1 The separation graph of column chromatography of standard samples

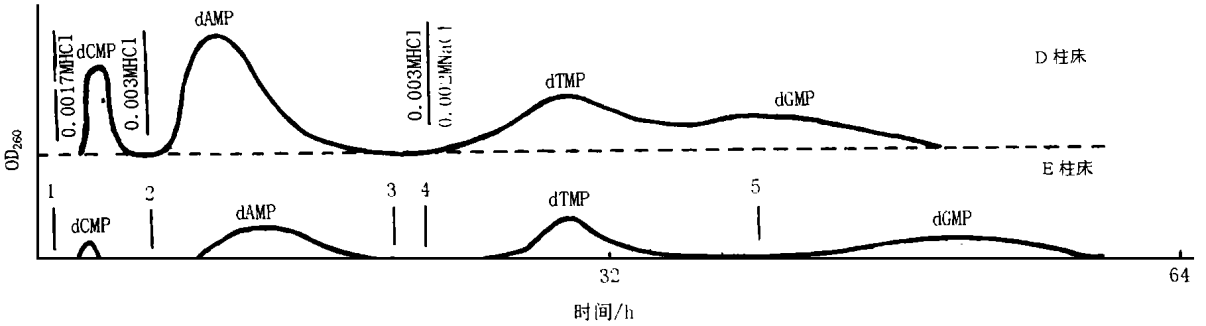


图 2 脱氧核苷酸的分离层析

Fig. 2 The separation graph of column chromatography of deoxymononucleotides

D 柱床: 8.1cm × 0.9cm (树脂: 208 × 8 Cl 型); 四种单核苷酸标准样品: $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 35mg; 洗脱条件: 0.001 7MHCl, 0.003 M HCl, 0.003 M HCl+ 0.002M NaCl, 流速 $0.80\text{mL} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$

E 柱床: 11.1cm × 0.9cm (树脂: 208 × 8 Cl 型); 四种单核苷酸标准样品: $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6.35mg; 洗脱条件: 流速 $0.40 \sim 0.60\text{mL} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$

对 DNA 钠盐酶解液用 0.001 7M HCl, 0.003M HCl, 0.036M NaCl (pH4.8) 及 0.036M HCl+ 0.005M NaCl 洗脱, 结果得图 3(F), 它比图 2(E) 分离效果好一点, 但 TMP 峰形很扁。若在 dAMP 洗脱前洗脱液同图 3(F), 但流速比其增高 $0.1\text{mL} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$, 并在 dAMP 后加 0.004M NaCl (pH4.8), 亦即增加阴离子竞争强度, 则 TMP 的峰形上升, 但 TMP 与 dGMP 中间过渡期很长, 峰形还是很扁, 见图 3(G)。再改变柱床, 则分离峰形有所改善, 见图 3(H), 但 TMP 与 dGMP 仍未完全分开。最后用 201 × 8 (Cl 型, 200~400 目), 洗脱系统改为 0.001 8M HCl, 0.002 8M HCl, pH6.0- 0.036M NaCl 和 0.005M HCl- 0.02M NaCl 能很好地分离鱼精 DNA- Na 酶解成的产物 dCMP、dAMP、TMP 和 dGMP, 其上柱率达 96%, 阴柱得率分别为 15.89%、24.80%、23.94% 与 20.60%, 总阴柱收率为 85.23%, 见图 3(I)。

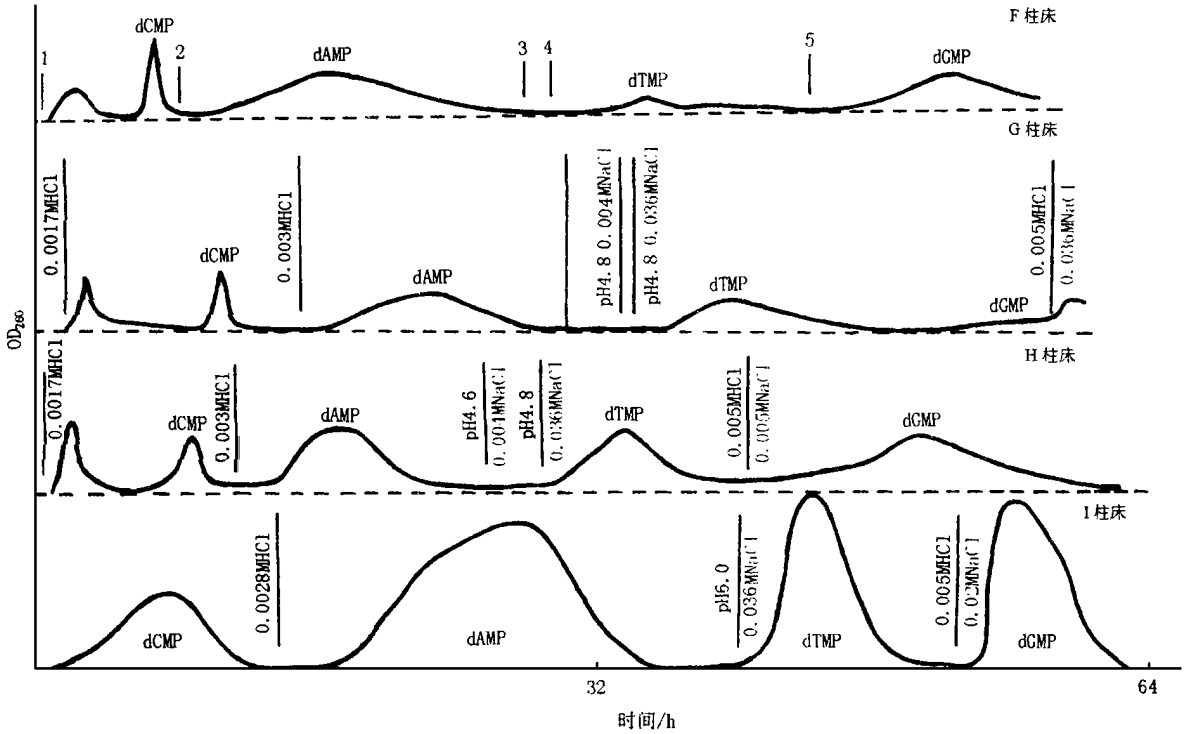


图3 鱼精 DNA- Na 酶解液中脱氧核苷酸的分离层析图

Fig. 3 The separation graph of column chromatography of enzymolysis solution of sperm DNA- Na

F 柱床: 14cm × 0.9cm (树脂: 208 × 8 Cl 型); 鱼精 DNA- Na 酶解液: 1mg · mL⁻¹, 12mg; 样品流速: 0.70mL · cm⁻² · min⁻¹; 洗脱流速: 0.70mL · cm⁻² · min⁻¹

G 柱床: 14cm × 0.9cm (树脂: 208 × 8 Cl 型); 鱼精 DNA- Na 酶解液: 1mg · mL⁻¹, 12mg; 样品流速: 0.80mL · cm⁻² · min⁻¹; 洗脱流速: 0.80mL · cm⁻² · min⁻¹

H 柱床: 8.8cm × 0.9cm (树脂: 208 × 8 Cl 型); 鱼精 DNA- Na 酶解液: 1mg · mL⁻¹, 273mg; 样品流速: 0.60mL · cm⁻² · min⁻¹

I 柱床: 10cm × 4.5cm (树脂: 208 × 8 Cl 型); 鱼精 DNA- Na 酶解液: 1.9992mg · mL⁻¹, 750mg; 样品流速: 0.10mL · cm⁻² · min⁻¹; 洗脱流速: 0.53mL · cm⁻² · min⁻¹

2.4 标准脱氧核苷酸纯度

表2 标准脱氧核苷酸纯度

Tab. 2 Purity of standard deoxymononucleotides

种类	称重 (mg)	体积 (mL)	稀释倍数	分子量	ϵ	OD _{260nm}	实际含量**	纯度 (%)***
5' - dCMP	12.2	10	100	307.2	6.3	0.230	11.215	92.0
5' - dAMP	7.1	10	50	375.2	15.3*	0.407*	4.991	70.3
5' - TMP	12.0	10	100	322.2	9.0	0.268	9.594	80.0
5' - dGMP	16.4	10	100	391.2	11.7	0.406	13.576	82.8

注: * pH7.0, 其余为 pH2.0; ** 脱氧核苷酸实际含量 (mg) = $\frac{OD_{260} \cdot M \cdot D \cdot V}{\epsilon}$; *** 纯度 (%) = $\frac{\text{单核苷酸实际含量}}{\text{单核苷酸称量值}} \times 100$.

2.5 样液上柱率与加样流速等关系

可见, 在柱大小一定, 上样量与交换树脂量基本相同情况下, 加样速度慢, 样品充分吸着, 上柱率高。洗脱时间与高径比有关, 在交换容量范围内, 高径比越低, 树脂中样品较集中, 洗脱就快, 但高径比过低, 致使四种脱氧单核苷酸难以完全离。实验证明: 一般小柱H: D= 9: 1, 大柱H: D= 3: 1为宜, 高径比较大, 即使增大流速洗脱时间还是较长。

表3 上柱率与加样流速关系

Tab. 3 Relation between retaining in column and velocity of sample

分组	样品流速 (mL/min)	洗脱流速 (mL/min)	高径比	上柱率 (%)	洗脱时 (h)
1	1.92	5.2	2.74	94.52	27
2	1.40	8.3	3.29	96.29	31
3	1.30	8.6	2.33	96.50	25

注: 采用H: D= 11cm×3.5cm 玻璃柱。

2.6 标准品与成品紫外吸收光谱特性比较

表4 光谱特性比较

Tab. 4 Comparison of spectrum properties

光谱特性	dCMP		dAMP		TMP		DGMP	
	标准品	成品	标准品	成品	标准品	成品	标准品	成品
pH2.0								
λ_{\max} (nm)	281	281	260	261	270	269	257	2
λ_{\min} (nm)	245	244	232	232	236	236	200	2

从上表可见, 其紫外吸收光密度比值基本相符。

表5 光谱法定性鉴定

Tab. 5 Qualitative identification by using spectrum method

项目	$\hat{5}$ -dCMP		$\hat{5}$ -dAMP		$\hat{5}$ -TMP		$\hat{5}$ -dGMP	
	1	2	1	2	1	2	1	2
浓度(mg·mL ⁻¹)	1.1215	0.258	1.6925	0.529	0.9594	0.862	1.3576	0.638
稀释倍数	100	100	100	111.5	100	102	100	100
OD260	0.230	0.040	0.654	0.185	0.268	0.239	0.406	0.215
pH2 OD250	0.130	0.001	0.481	0.135	0.171	0.131	0.377	0.096
OD280	0.573	0.157	0.222	0.061	0.245	0.191	0.287	0.165
OD290	0.419	0.133	0.073	0.020	0.109	0.067	0.215	0.119
OD250/OD260	0.564		0.735	0.730	0.638	0.548	0.929	0.447
OD280/OD260	2.187		0.339	0.330	0.914	0.779	0.707	0.767
OD290/OD260	1.822		0.116	0.108	0.407	0.284	0.530	0.553

注: 1—标准脱氧单核苷酸; 2—试验品。

3 结论

用201×8树脂(200~400目, 氯型)收集酶解液中的混合脱氧单核苷酸, 洗脱液用0.005M HCl-0.04M NaCl, 较为理想。

在201×8树脂(规格同前)上, 用0.0018MHCl、0.0028MHCl, 分别洗出dCMP和dAMP, 后用pH6.0的0.036M NaCl洗涤, 很好地将TMP洗下, 最后用0.02M NaCl和0.005M HCl的溶液将dGMP洗下, 此工艺条件再现性好, 具有实际生产指导意义。

参考文献:

- [1] 吴铁双(译). 核酸生物化学[M]. 北京: 科学出版社, 1973. 74~75.
- [2] 吴汉民. 从鱼精巢中提取高聚Na-DNA的研究[J]. 浙江水产学院学报, 1983, 2(2): 83~92.
- [3] 北京师范大学生物系生物化学教研室. 基础生化实验[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979. 202~204.