

从青霉菌丝体中提取核糖核酸的研究

李士坤 谭天伟*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 文中研究了从青霉菌丝体中提取纯化核糖核酸的工艺条件。采用盐碱法破碎细胞, 调抽提液 pH 值至 4.6 以沉淀部分蛋白质, 然后用中性蛋白酶 ASI. 398 处理分级沉淀后的上清液, 详细考察了蛋白酶用量、反应温度、初始 pH 值和反应时间对核酸纯度的影响。酶解液经截留相对分子质量为 6.0×10^4 的超滤膜过滤后, 核糖核酸的纯度和得率分别是 72.1% 和 0.42%。

关键词: RNA; 青霉菌丝体; 提取; 纯化

中图分类号: TQ464.6

核糖核酸(RNA)及其衍生物是医药工业和食品工业的重要原料。RNA 经核酸酶降解和脱氨酶糖化, 变成具有强烈增鲜效果的肌苷酸(IGP)和鸟苷酸(GMP), 同时获得的尿嘧啶核苷酸和胞嘧啶核苷酸可作为生产治疗癌症、冠心病、病毒性药物药物的原料^[1]。

各种微生物中 RNA 的质量分数不同, 在谷氨酸短杆菌中为 7%~10%, 在酵母中为 4%~8%, 在柠檬酸菌中占 1.5%, 在青霉菌中占 4.7% 左右^[1]。目前, 利用酵母^[2-6]、谷氨酸菌^[7]提取 RNA 的研究多有报导, 而对于以青霉菌丝体为原料提取 RNA 研究得较少。我国是青霉素生产大国, 大量青霉菌丝体被作为废弃物, 既造成环境污染, 又增加了企业的负担。如能从这部分废菌丝体中分离得到高纯度的 RNA, 便可实现其再利用。本实验使用盐碱热法进行细胞破碎^[8], 重点研究 RNA 的分离纯化工艺。

1 材料与设备

1.1 材料

青霉素菌丝体, 华北制药集团倍达公司提供, 含水 81%; 皂土, 化学纯, 上海市四赫维化工有限公司; 中性蛋白酶 ASI. 398, 酶活性 25.01×10^{-9} mol/s, 江苏无锡酶制剂厂。

收稿日期: 2004-11-28

基金项目: 国家 863 项目(2002AA601280)和国家自然科学基金项目(20136020, 50373003)

第一作者: 男, 1977 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

1.2 主要仪器与设备

SHA-B 型水浴恒温振荡器, 金坛市华峰仪器有限公司; TDL-5-A 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; pHB-4 型酸度计, 上海雷磁创益仪器仪表有限公司; UV-2000 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

2 实验方法

2.1 工艺流程

青霉菌丝体 细胞破碎 抽提液 等电点沉淀蛋白质 离心后取上清液 蛋白酶分解蛋白质 沉淀核酸 乙醇洗涤 干燥 产品

2.2 盐碱法抽提工艺^[8]

取 30 g 湿菌体置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 0.3% 的氢氧化钠溶液 90 mL 和 2.4 g 氯化钠, 60 下于水浴恒温振荡器中破壁 3 h, 摇床转速 180 r/min。抽提结束后调 pH 值至 7.0, 离心(3 600 r/min) 15 min, 其上清液即为核酸抽提液。

2.3 皂土对核糖核酸酶的抑制作用

细胞破碎前向菌悬液中加入皂土, 皂土与干菌体的质量比分别是 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 其他条件同 2.2。取核酸抽提液调 pH 值至 2.5, 离心 10 min 后收集 RNA 沉淀, 用 10 mL 质量分数为 95% 乙醇洗涤一次, 60 下真空干燥。

$$\text{RNA 得率} = \frac{\text{干燥产品中 RNA 的质量}}{\text{干菌体质量}} \times 100\%$$

2.4 分级沉淀

用 6 mol/L 盐酸调节核酸抽提液的 pH 值至 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.9, 静置 15 min, 离心(3 600 r/

min) 10 min, 杂蛋白沉淀于离心管底部。上清液中核酸沉淀方法同 2.3。

2.5 加入中性蛋白酶 AS1.398 水解蛋白质

主要考察了蛋白酶加入量、pH 值、温度和水解时间等因素对核酸纯度的影响。取分级沉淀离心后的上清液, 用 6 mol/L 的盐酸调节至所需 pH 值, 加入一定量的蛋白酶在一定温度下反应一段时间。反应结束后迅速置于冰水中冷却, 调酶解液 pH 值至 3.0 以中止反应, 酶解液中核酸沉淀工艺同 2.3。

2.6 分析方法

2.6.1 核酸纯度测定 定磷法^[9]。

2.6.2 蛋白质含量测定 考马斯亮蓝法^[10]。

2.6.3 蛋白质相对分子质量的测定 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[11]。

2.6.4 RNA 相对分子质量的测定 琼脂糖凝胶电泳法^[12]。

3 结果与讨论

3.1 皂土对 RNA 提取的影响

本工艺细胞破碎的温度为 60 , 而在 30 ~ 70 之间磷酸单酯酶和磷酸二酯酶活性较高^[4], 会使 RNA 降解成 3'-核苷酸和 5'-核苷酸, 核苷酸为小分子, 不能随 RNA 沉淀下来, 从而降低 RNA 得率。故有必要加入核糖核酸酶抑制剂, 以减少 RNA 的损失, 不同皂土加入量对 RNA 提取的影响如图 1 所示。当皂土与干菌体的质量比为 4 % 时, 核酸得

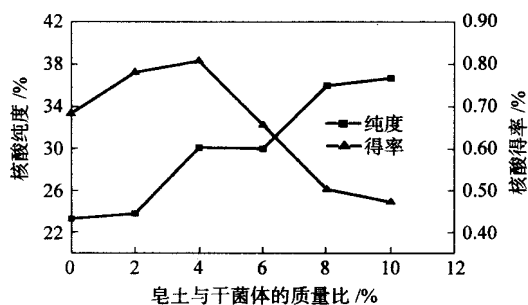


图 1 皂土对 RNA 提取的影响

Fig. 1 Effect of benzolite on RNA extraction

率由不加时的 0.68 % 增加至 0.80 %, 核酸纯度由 23.3 % 增加至 30.5 %; 再加大皂土用量时核酸纯度可继续提高至 36.0 %, 核酸得率反而下降。皂土用量过多时将吸附蛋白质和核酸, 核酸得率降低, 但皂土对蛋白质的吸附能力更强, 使得调 pH 值至 2.5 时与核酸共沉淀的蛋白质减少, 核酸纯度仍然增加。综合考虑纯度和得率, 皂土与干菌体的质量比取

4 %。

3.2 分级沉淀除去蛋白质

青霉菌丝体中的 RNA 质量分数较低 (约 4.0 %), 破壁后抽提液中存在大量的蛋白质, 采用一步沉淀法所获得的 RNA 纯度很低, 杂蛋白质含量高, 难以达到产品要求。在实验过程中发现, 当将核酸抽提液 pH 值调至 5.0 以下时才开始出现絮状沉淀, 同时参考 G. Andreu 等人^[3]的研究, 在 pH4.0 ~ 5.0 间调不同的蛋白质等电点, 沉淀部分蛋白质后再提取核酸, 结果见表 1。由表 1 可知, 分级沉淀能显著提高核酸纯度, 调 pH4.6 离心后再调上清液 pH 值至 2.5, 所得 RNA 的纯度最高, 达到 52.5 %, 比直接调 pH 值至 2.5 提高 30 %。通过测定核酸含量, 发现分级沉淀得到的蛋白质中含 6.1 % 的核酸, 导致分级沉淀时的核酸得率比直接沉淀下降了 0.1 %。

表 1 分级沉淀的结果

Table 1 Results of fractional precipitation

pH 值	2.5	4.3	4.5	4.6	4.7	4.9
核酸纯度 / %	22.5	50.9	51.2	52.5	44.6	45.0
核酸得率 / %	0.53	0.41	0.47	0.43	0.46	0.44

3.3 中性蛋白酶 AS1.398 水解蛋白质的工艺参数研究

抽提液中的核酸以核蛋白的形式存在, 只有解聚核蛋白才能获得高纯度的核酸。实验室常用苯酚、氯仿、异戊醇等有机溶剂使蛋白质变性, 从而破坏蛋白质与核酸的结合, 然而有机溶剂毒性大, 且大量使用导致成本过高, 不利于工业化生产。本实验采用中性蛋白酶 AS1.398 处理分级沉淀后的上清液, 上清液中蛋白质的量即底物的量固定, 分析结果时直接考察核酸纯度而没有计算蛋白质的水解率。

3.3.1 反应时间的影响 调上清液 pH 值至 7.5, 中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比为 0.2 %, 在 40 的水浴中酶解, 分别反应不同时间, 结果如图 2 所示。从图 2 中可以看到, 加入中性蛋白酶后核酸纯度显著提高, 由 57.0 % 增加至 66.8 %, 反应 10 min 以后核酸纯度增加不明显, 表明中性蛋白酶 AS1.398 在 10 min 内可充分降解蛋白质。通过测定核酸产品中的蛋白质质量分数, 发现酶解后核酸中蛋白质相应地降低了 9.8 %。

3.3.2 反应温度的影响 调上清液 pH 值至 7.5, 中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比为 0.2 %, 在 40 的水浴中酶解, 分别反应不同时间, 结果如图 2 所示。从图 2 中可以看到, 加入中性蛋白酶后核酸纯度显著提高, 由 57.0 % 增加至 66.8 %, 反应 10 min 以后核酸纯度增加不明显, 表明中性蛋白酶 AS1.398 在 10 min 内可充分降解蛋白质。通过测定核酸产品中的蛋白质质量分数, 发现酶解后核酸中蛋白质相应地降低了 9.8 %。

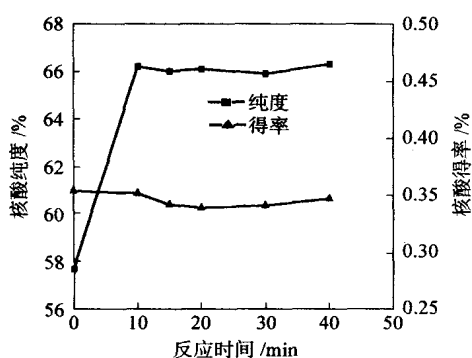


图 2 反应时间对核酸纯度的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on purity of RNA

分别在不同温度下反应 20 min, 结果如图 3 所示。

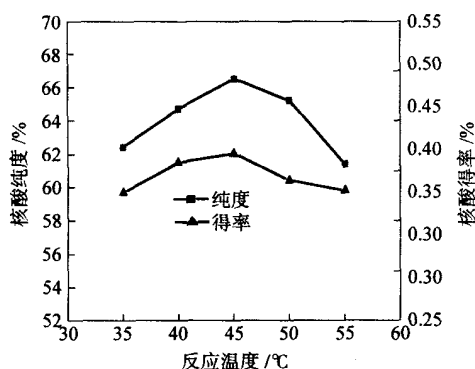


图 3 反应温度对核酸纯度的影响

Fig. 3 Effect of temperature on purity of RNA

从图 3 中可以看到,在 40~50 之间蛋白酶活性较高,与厂家所给最佳温度范围(35~45)略有差别。在 35~45 范围内核酸的纯度和得率随着温度的升高而增加,表明蛋白酶的酶活在此温度范围内逐渐增加,超过 45 后酶活下降。

3.3.3 反应 pH 值的影响 上清液的 pH 值分别为 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比为 0.2%, 在 40℃ 水浴中反应 20 min, 结果如图 4 所示。从图 4 可知, pH 值为 8.0 时核酸纯度低, pH 值在 7.0~7.5 时蛋白酶活性较高, 处于厂家所给的最佳 pH(6.5~7.5) 范围内。

3.3.4 中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体质量比的影响 上清液 pH 值为 7.5, 中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比分别为 0.05%、0.1%、0.2%、0.4%, 在 40℃ 水浴中反应 20 min, 结果见图 5。从图 5 可知, 当中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比为 0.05% 时, 水解速率低, 反应 20 min 后纯度仅为 57%; 当中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比

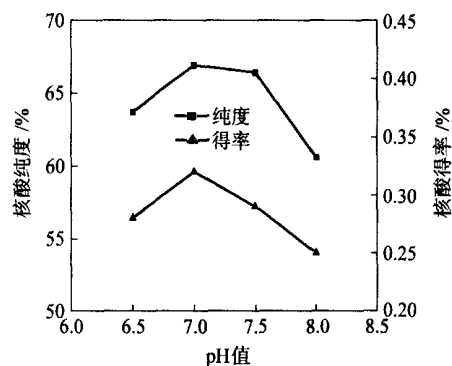


图 4 pH 对核酸纯度的影响

Fig. 4 Effect of pH value on purity of RNA

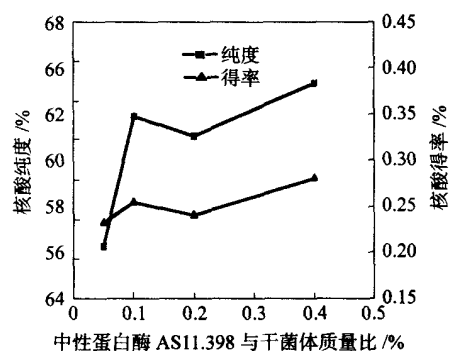


图 5 中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比对核酸纯度的影响

Fig. 5 Effect of amount of AS1.398 on the purity of RNA

超过 0.1% 时, 水解速率高, 20 min 后核酸纯度达 64% 以上, 所以中性蛋白酶 AS1.398 与干菌体的质量比取 0.1%~0.2% 即可。

3.4 中性蛋白酶 AS1.398 酶解后超滤

抽提液经蛋白酶酶解后, 其中的大分子蛋白质被降解成小分子的蛋白质、多肽或氨基酸。经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 酶解液中一部分蛋白质的相对分子质量在 $1 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 之间, 大部分蛋白质的相对分子质量超过 10×10^4 ; 经琼脂糖凝胶电泳分析, 酶解液中 RNA 的相对分子质量在 $6 \times 10^4 \sim 15 \times 10^4$ 之间。

为进一步提高核酸的纯度, 对酶解液进行超滤。本文选用了不同截留相对分子质量 (MWCO) 的超滤膜加以比较, 将酶解液浓缩一倍后再沉淀核酸, 结果见表 2。由表 2 可知, 使用 MWCO 为 1.0×10^4 和 3.0×10^4 的超滤膜处理后核酸纯度变化不大, 通过测定原液和透过液中的蛋白质浓度, 发现蛋白质的透过率很低, 分别为 3.5% 和 5.2%; 经过 MWCO

表 2 超滤与未超滤结果的比较

Table 2 Comparison between results with and without ultrafiltration

截留相对分子 质量 $\times 10^{-4}$	未超滤	1.0	3.0	6.0	10.0
核酸纯度/ %	66.4	66.8	68.5	72.1	61.8
核酸得率/ %	0.55	0.52	0.49	0.42	0.29

为 6.0×10^4 的超滤膜处理后核酸纯度增加至 72.1 %, 此时蛋白质透过率为 25.6 %; 经过 MWCO 为 10.0×10^4 的超滤膜处理后核酸纯度下降, 实验发现在透过液中也有核酸沉淀, 纯度为 65.1 %, 得率 0.17 %, 此时超滤膜孔径过大, 在除去蛋白质的同时, 部分 RNA 也透过了超滤膜, 因此纯度和得率均降低。上述结果与酶解液中 RNA 相对分子质量的分布是一致的。故选择 MWCO 为 6.0×10^4 的超滤膜。

4 结论

在核酸抽提过程中加入皂土可有效抑制核糖核酸酶的活性, 提高核酸得率; 分级沉淀能除去抽提液中大部分蛋白质, 显著提高核酸纯度, 且操作简单成本低; 为进一步除去与核酸紧密结合的蛋白质, 尝试将蛋白酶酶解和超滤相结合, 取得了较好的效果, 核酸纯度和得率分别是 72.1 % 和 0.42 %。此工艺通用性强, 为核酸纯化提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] 陈陶声. 氨基酸及核酸类物质发酵生产技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1993, 317 - 348
- [2] 黄明育. 优质核糖核酸生产工艺 [J]. 工业微生物, 1993, 23(3): 32 - 36
- [3] Andreu G, Benaiges M D, Lopez J, *et al.* A simple method for RNA extraction from yeast [J]. Biotechnol & Bioeng, 1988, 32(7): 927 - 929
- [4] 张淑桂, 钱敏, 王光灿, 等. 稀碱法提取酵母 RNA 的正交实验研究 [J]. 云南化工, 1994, 10(2): 10 - 12
- [5] 廖鲜艳, 李永仙, 李崎, 等. 啤酒酵母胞内 RNA 提取的研究 [J]. 酿酒, 2002, 29(2): 84 - 85
- [6] 毛宁, 洪智勇, 张岩芳, 等. 利用啤酒酵母提取 RNA 的氨法工艺研究 [J]. 药物生物技术, 2000, 7(1): 35 - 37
- [7] 段作营, 于瑞嵩, 毛忠贵, 等. 谷氨酸菌体中核酸类物质的提取 [J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(4): 322 - 324
- [8] 陈晔. 棉籽水解蛋白和菌体核酸的制备 [D]. [学位论文]. 北京: 北京化工大学, 2003, 49 - 62
- [9] 杨健雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002, 35 - 36
- [10] 杨健雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002, 40 - 42
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999, 304 - 316
- [12] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 布伦特 R, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999, 333 - 338

Extraction of RNA from waste *Penicillium* biomass

LI Shi-kun TAN Tian-wei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The conditions of extraction and purification of RNA from waste *Penicillium* biomass were studied. A salt and alkali method was used for cell disruption, the pH value of extraction solution was adjusted to 4.6 to precipitate part of protein, and the supernatant after fractional precipitation was treated with neutral protease AS1.398. The amount of AS1.398 neutral protease, reaction temperature, initial pH value and the hydrolytic time were explored. Then the hydrolysate was treated with ultrafiltration membrane (MWCO is 6.0×10^4), and the purity and the yield of RNA was 72.1 % and 0.42 %, respectively.

Key words: RNA; *Penicillium*; extraction; purification

(责任编辑 云志学)