



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94101001.5

[51]Int.Cl⁶

C12N 19/88

[43]公开日 1995年8月16日

[22]申请日 94.2.7

[71]申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101北京市朝阳区大屯路15号生物物理研究所

[72]发明人 陆传宗 宋兰芝 徐秀璋
严敏官 候桂珍 房月华

[74]专利代理机构 北京科龙专利事务所
代理人 韩小雷

C12N 1/20

// C12N 9/88, C12R 1:19

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 一种从大肠杆菌中制备多核苷酸磷酸化酶的方法

[57]摘要

本发明为一种单独使用溶菌酶从自选大肠杆菌中提取多核苷酸磷酸化酶的方法, 主要过程是将大肠杆菌、溶菌酶溶于缓冲溶液中, 水浴温育一定时间后离心分离, 上清液经多次提纯分离, 得到大量的多核苷酸磷酸化酶。此方法, 每 100 克菌体可得到 1—3 万单位的多核苷酸磷酸化酶, 重复性好, 适合大规模生产。

权 利 要 求 书

1、一种从大肠杆菌中制备多核苷酸磷酸化酶的方法，其特征在于将经培养的每100克大肠杆菌菌体溶于含有 10^{-2} — 10^{-4} EDTA的 0.01—0.1M Tris—Hcl (PH7-8) 的缓冲液中，搅拌下加入0.25-1g溶菌酶，在0-39℃恒温水浴下温育30-60分钟，在冷冻离心机中，以8000-12000转/分的转速离心20-60分钟，上清液经纯化可得到2-3万单位的多核苷酸磷酸化酶。

2、如权利要求1所述的方法，其特征在于所述的纯化步骤是加入硫酸链霉素；冰浴放置离心去沉淀；加入硫酸铵，冰浴放置，离心收集沉淀；经DEAE—纤维素柱层析，得到高浓度的多核苷酸磷酸化酶。

3、如权利要求1所述的方法，其特征是其中大肠杆菌菌株为大肠杆菌B型菌株。

说 明 书

一种从大肠杆菌中制备多核苷酸磷酸化酶的方法

本发明为一种从大肠杆菌中制备多核苷酸磷酸化酶的方法，特别是涉及一种用溶菌酶破碎细胞的方法从大肠杆菌中大规模提取多核苷酸磷酸化酶。

现代科学发现，多核苷酸磷酸化酶在多种生物体中都广泛的存在着，目前要想得到大量的此酶都要从细菌中提取，但是，不同的菌中多核苷酸磷酸化酶的含量差别很大，而且用不同的破碎方法提取的酶量差别也很大。现有的技术中，如用超声波、玻璃砂细菌磨、细胞破碎器等，一般每100克菌体只能得到100-3000单位的多核苷酸磷酸化酶，产量低，且不稳定，有时甚至没有什么活力。传统的观念认为不能单独的用溶菌酶破碎方法提取可合用的酶，他们认为溶菌酶含有大量的裂解酶而不适宜用做制备多核苷酸磷酸化酶。

本发明的目的是提供一种利用含有丰富的多聚核酸酶的大肠杆菌，采用单独使用溶菌酶破碎细菌的工艺制备大量的多核苷酸磷酸化酶的方法。

本发明的方法是将经培养的100克菌体溶于含有 10^{-2} — 10^{-4} EDTA的0.01—0.1M Tris—HCl (PH6-8)的缓冲液中搅拌下，加入0.25-1g溶菌酶，在0-39℃恒温水浴下温育30-60分钟，在冷冻离心机中，离心20-60分钟，8000-12000转/分，上清液经纯化可得到2-3万单位的多核苷酸磷酸化酶。

本发明的方法中所述的纯化可以包括加入硫酸链霉素，冰浴放置，离心去沉淀；加入硫酸铵，冰浴放置、离心去沉淀；加入硫酸铵，冷浴放置，离心、收集沉淀；用DEAE—纤维素柱层析用不同浓度的NaCl Tris缓冲液洗脱分离，得到高浓度的多核苷酸磷酸化酶洗脱液。

所述方法中的菌体选用的是大肠杆菌B型菌种，它含有丰富的多聚核酸酶，且多核苷酸磷酸化酶的含量高，适合做生产此酶的菌株，与其它菌种比较，多核苷酸磷酸化酶的产量明显有大幅度提高。

如表1.

菌种	多核苷酸磷酸化酶的活力(单位/100克)
大肠杆菌1.183	100—2000
青霉素酰化酶	2000—5000
大肠杆菌B型	15000—30000

所述方法中的溶菌酶是由上海东风试剂厂提供的，从鸡蛋蛋白中提取的。

本发明用溶菌酶破碎细菌的方法，每100克菌体可得到2-3万单位的多核苷酸磷酸化酶，重复性很好，层析分析中，活力峰与蛋白峰吻合，适合大规模生产。

下面结合实施例对本发明做进一步描述。

实施例

将100克大肠杆菌菌体溶于含有 10^{-3} EDTA的0.02M Tris—HCl (PH8.0)缓冲液中，搅拌下加入1g溶菌酶(25000单位/1g)，在37℃恒温水浴温育50分钟，在冷冻离心机中离心30分钟(9000转/分)去除碎片；取出清液加入10%的硫酸链霉素(按5%体积)，冰浴中放置10分钟，离心30分钟(9000转/分)除去沉淀；取上清液加入硫酸铵，至35%的饱和度，于冰浴中静置30分钟，离心30分钟(9000转/分)；取上清液再加入硫酸铵，至60%的饱和度，于4℃的冰箱中放置过夜后离心30分钟(9000转/分)；将得到的酶蛋白沉淀物在4℃搅拌下溶于前面所述的缓冲液中，对相同缓冲液进行透析，直到无硫酸根离子；将透析好的粗酶液上到用含0.001M EDTA的0.02M Tris-HCl (PH8)缓冲液平衡好的DEAE-Cellulose-32柱子上，分别用0.1M NaCl, 0.2M NaCl, 0.35M NaCl的0.001M EDTA, 0.02M Tris-HCl (PH8)的缓冲液洗脱，从0.35M NaCl浓度的洗脱液中可得到2.8万单位的多核苷酸磷酸化酶。