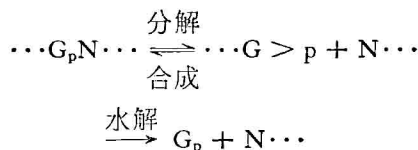


在核糖核酸酶 N_1 催化下 $G > p$ 的高温聚合反应

邹碧燕 陈常庆

(中国科学院上海生物化学研究所)

由于核糖核酸酶 N_1 (简称 N_1 酶)能催化下列反应,并且第二步水解反应的速度较慢,因此,它被广泛地用来合成链中含有一个鸟嘌呤



核苷酸的寡核苷酸片段^[1-3]。尽管有关 N_1 酶催化合成反应的最适 pH、酶浓度、供受体比例和浓度等条件都曾有人研究,一般是在 0℃左右的低温下反应。但温度变化对反应的影响却没有人涉及。内田等人曾经报道,在 pH7.0, 4℃条件下,用 N_1 酶(330 单位/毫升)催化 $G > p$ (1M)的自聚合,反应 10 天后可以得到 22.4% 的二聚、17.6% 三聚和 6.5% 的四聚等产物^[1]。我们用 N_1 酶进行这个反应时发现,当 $G > p$ 浓度为 1M, 酶浓度为 330 单位/毫升,在 pH7.8, 0℃下聚合时,达到最高产率的时间为 12 天,但比内田等人报道的低,正常的二聚物的产率为 11.3%,提高反应的温度,不仅可以提高聚合的速度,而且可以提高产率,例如在 30℃下反应 4—5 天,二聚即可达到最高产率(21.2—21.7%) (表 1 和图 1)。在所有实验中,二聚以上产物的产率都不高(表 1)。我们还发现,无论是低温或高温下用 N_1 酶催化 $G > p$ 的聚合反应,都有少量(2—4%)在柱层析中洗脱较快的(图 2 峰 2)副产物(表 1),它的纸层析 R_f 为 0.76(G_p 为 1, $G_p G_p$ 为 0.50),并且不能被 N_1 酶酶解。它经碱性磷酸单酯酶切去末端磷酸后,再用碱水解也得到 G_p 和 $G(1:0.85)$,因此,可能是 2'-5' 连接的异常二聚物。Podder 和 Tinoco 曾经报

道,用核糖核酸酶 T_1 (简称 T_1 酶)催化 $G > p$ 聚合时能得到少量的 2'-5' 连接产物^[6]。后来 Omori 等又发现,在 7M 脲素存在下,即使不加 T_1 酶,也能由 $G > p$ 生成少量的 2'-5' 连接产物。因此

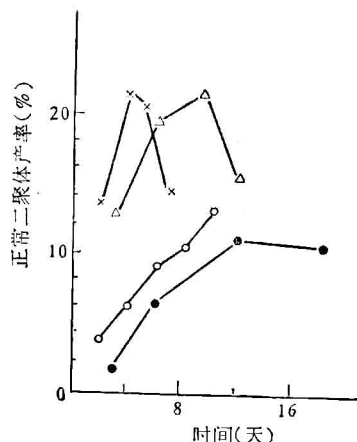


图 1 $G > p$ 在不同温度下的聚合反应比较

—●—: 0℃; —○—: 10℃;
—△—: 20℃; —×—: 30℃。

他们认为,曾经在 T_1 酶催化 $G > p$ 聚合反应中所发现的 2'-5' 连接产物,可能是在用 7M 脲素柱层析的分离纯化过程中,由 $G > p$ 经非酶反应产生的^[7]。我们曾经将分离得到的 $G_p G_p$ 用 0.1N HCl 37℃ 保温 1 小时,并经柱层析检查,未发现新的异常连接产物产生,仍得到单一的 $G_p G_p$ 洗脱峰,因而可以认为,我们所进行的由 N_1 酶催化的 $G > p$ 聚合反应,得到的 2'-5' 异常连接产物应该是在连接反应的过程中产生的。至于这究竟是酶促反应产物还是非酶反应产物,还需要进一步的实验加以肯定。

当 $G > p$ 同胞苷或尿苷以 3:1 比例反应时,尽管这时 $G > p$ 过量,但无论在 0℃或是

表 1 G>p 在不同温度下被核糖核酸酶 N₁ 催化聚合的产物

No.	温度 (°C)	时间 (天)	异常二聚物 (%)	正常二聚物 (%)	二聚以上产物 (%)
1	0	3	2.2	1.6	未测
2	0	6	2.2	6.6	未测
3	0	12	2.1	11.3	未测
4	0	18	2.4	10.8	2.5
5	10	2	2.7	3.9	0.35
6	10	4	2.8	6.3	0.7
7	10	6	2.6	9.3	1.1
8	10	8	3.1	10.9	2.3
9	10	10	2.9	13.3	1.3
10	20	3	3.2	12.8	1.8
11	20	6	2.9	20	5.7
12	20	9	3.1	22	2.6
13	20	12	3	15.3	2.1
14	30	2	3.6	13.7	1.2
15	30	4	4.2	21.7	未测
16	30	5	4	21.2	2.5
17	30	7	3.4	14.6	6.1

注：实验 3 和 17 为 0.2 毫克分子 G>p 反应，实验 4 为 0.3 毫克分子 G>p 反应，各产物的产率系按照柱层析中该产物峰的 A₂₆₀ 同总的上柱 A₂₆₀ 之间的百分比来计算。

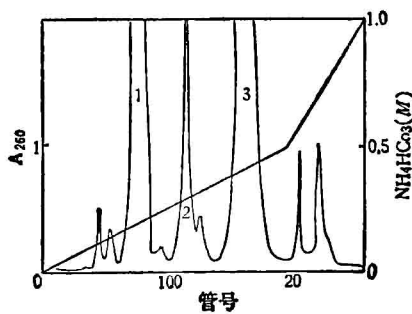


图 2 G>p 聚合产物的柱层析分离

DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 (HCO₃⁻ 型, 1×30 厘米)。先用 0—0.5M NH₄HCO₃ 直线梯度 (500 毫升) 洗, 再用 0.5—1M NH₄HCO₃ 直线梯度 (150 毫升对 150 毫升) 洗脱。流速为 5 毫升/15 分钟。峰 1 为 Gp、峰 2 为异常的 (Gp)₂、峰 3 为 GpGp。

30°C 下反应, 也同样主要得到 GpC 或 GpU, 进一步连接的产物 GpGpC 只有二核苷酸的 1/10, GpGpU 较高一些, 为 GpU 的 1/5 (表 2)。值得提出的是, 虽然 GpGp 的产率这时大大下降, 但异常的 (Gp)₂ 却变化不大, 而异常的 G-C 连接产物则完全没有发现, 其原因何在, 有待进一步研究。

此外, Fikus 等曾经报道, 用 T₁ 酶催化

表 2 G>p 同 C 和 U 的反应产物

核苷	温度 (°C)	时间 (天)	GpX (%)	GpGpX (%)	异常 (Gp) ₂ (%)	正常 GpGp (%)
C	0	6	35.6	1.1	2.1	3
	0	12	41.3	2.5	2.0	3.3
	30	2	20.7	2.6	4.2	4.9
U	30	4	34.8	7.4	2.5	9.5

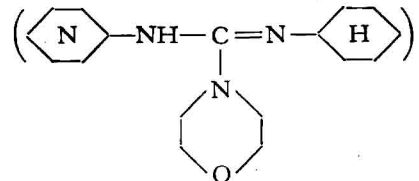
注：GpX 和 GpGpX 的产率是根据核苷的反应投量计算。GpGp 和异常 (Gp)₂ 的产率系根据总的 A₂₆₀ 减去核苷和 GpX、GpGpX 中的 X 的 A₂₆₀ 后的 A₂₆₀ 计算。

I>p 同尿苷连接时, 37°C 反应比 4°C 反应速度更快^[8], 但 Omori 等报道, 在 T₁ 酶催化 G>p 聚合反应时, 产率随温度的升高而降低^[7]。因此, 虽然升高温度有利于 N₁ 酶催化 G>p 的聚合反应, 但并不一定适于催化合成其它含鸟嘌呤核苷酸的寡核苷酸片段的反应, 这可能是因为存在片段的差异性。

实 验 部 分

一、材料与方法

3'-GMP 为上海试剂二厂提供; DCC 为本所东风生化试剂厂产品; 二环己基吗啉胍



用吗啡啉用 DCC 反应制备; 二乙氨基葡聚糖凝胶 A-25 为 Pharmacia 产品; 对照用 GpG 是由 BzG¹⁸(OBz)_p 同 HO¹⁸G¹⁸(OBz)₂ 用 DCC 缩合并去保护基后纯化得到; 碱性磷酸单酯酶为细胞生物研究所提供; 核糖核酸酶 N₁ 从粗糙链孢霉诱变株中提取, 由北京生物物理研究所二室提供。

5'-³²P 标记及同系层析条件按文献方法^[9]。pH2.7 电泳 (0.1M 甲酸缓冲液) 是在本所自制的小电泳仪上进行; pH7.5 (0.05M 磷酸缓冲液) 电泳是在 Shandon 高压电泳仪上进行。纸层析用新华 1 号滤纸, 溶剂为正丙醇: 浓氨水: 水 (55:10:35, 体积比), 下行展层。

二、G > p 铵盐的制备

参照 Smith 等人的方法^[10], 将 Gp 吡啶盐 8.65 克和吗啉胍 9.65 克溶于 45 毫升吡啶和 30 毫升水中, 减压浓缩至干, 用无水乙醇浓缩去水三次后, 加无水乙醚研磨, 得 Gp 吗啉胍盐粉状物, 重 18 克。将其溶于 65 毫升 2N NH_4OH , 65 毫升甲酰胺和 165 毫升叔丁醇中, 加入 29 克 DCC, 加热回流 2 小时。层析检查已环化完全。减压浓缩至 60 毫升左右。加入 60 毫升水和 40 毫升乙醚振摇, 滤去二环己基脲, 乙醚层弃去, 水层再用乙醚抽提三次后, 减压浓缩至干, 用无水乙醇浓缩去水三次, 滴入丙酮中沉淀, 离心, 丙酮洗涤, 干燥后, 得 G > p 吗啉胍盐 12 克。然后再通过铵盐型强酸阳树脂柱转换盐型即可得到 G > p 铵盐。

三、G > p 在 N_1 酶作用下的自聚合

G > p 铵盐 36 毫克 (0.1 毫克分子) 溶于 0.1 毫升 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.8) 中, 加入 33 单位 (11 微升) N_1 酶, 搅匀, 反应液成粘稠状。再加入约 5 微升氯仿, 在 0℃, 10℃, 20℃ 或 30℃ 下进行不同时间反应。反应过程中, 每天搅动 2 次。反应结束后, 加入 0.35 毫升 1% 二巯基丙醇和 0.35 毫升浓氨水, 37℃ 保温 30 分钟。减压浓缩至干, 加入 0.1N HCl 7 毫升, 再 37℃ 保温 1 小时, 用稀氨水中和到 pH7, 稀释, 共约 1020 A_{260} 单位, 上 DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 (HCO_3^- 型, 1×30 厘米)。先用 0—0.5M NH_4HCO_3 直线梯度 (各 500 毫升), 再用 0.5—1M NH_4HCO_3 直线梯度 (各 150 毫升) 洗脱, 30℃ 反应 5 天后产物的柱层析分离见图 2, 其余条件反应产物的柱层析分离图谱均与此类似, 各聚合产物的产率总结于表 1。峰 2 和峰 3 经减压浓缩去盐后, 再用 pH2.7 电泳去 N_1 酶并纯化。峰 3 产物能为 N_1 酶完全水解得到 Gp 和 G > p, 它用碱性磷酸单脂酶切去末端磷酸后再用碱水解得到 Gp: G = 1:1.02, 去末端磷酸产物经 5'- ^{32}P 标记后的同系层析位置与化学合成的 GpG 标记样品一致 (图 3), 证明峰 3 产物为 GpGp。峰 2 产物不能被 N_1 酶水解, 切去末端磷酸后再碱水解也得到 Gp: G = 1:0.85, 因

而峰 2 产物可能为 2'-5' 连接的 $\text{G}_2'\text{p}_5'\text{Gp}$ 。

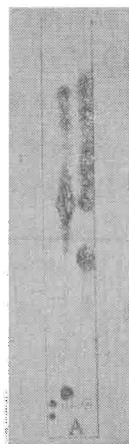


图 3A 标准的 ^{32}P GpG 和产物 GpGp 经 5'- ^{32}P 标记后 (分别为 1 和 2) 的同系层析图谱
a 为 ^{32}P GpG, b 为 ^{32}P GpGp, 由于多核苷酸激酶中含有少量的 3'-磷酸单脂酶, 因此少量 ^{32}P GpGp 被洗脱 3'-磷酸变成 ^{32}P GpG。



图 3B 产物 GpGp 经碱性磷酸单脂酶切去 3'-磷酸再 5'- ^{32}P 标记后的同系层析图谱
1. 标准的 ^{32}P GpG; 2. 样品。

四、G > p 同 C 和 U 的连接

胞苷 35 毫克 (0.14 毫克分子) 加热溶于 0.4 毫升 0.1M 磷酸缓冲液中, 冷却加入 144 毫克 G > p 铵盐, 搅溶, 再加入 N_1 酶 132 单位 (44 微升), 在 0℃ 或 30℃ 反应不同的时间。由于胞苷溶解度小, 有部分析出, 反应液呈白色粘稠状。其后的处理同上述 G > p 的聚合反应。其柱层析分离见图 4。各产物的产率见表 2。峰 1 为 GpC。电泳, 层析均一, R_m 0.31 (Gp 为 1), R_f 1.44 (Gp 为 1), 光谱比值 (pH2): A_{260} :

$A_{260} = 0.87$, $A_{270}:A_{260} = 1.03$, $A_{280}:A_{260} = 1.01$, $A_{290}:A_{260} = 0.68$, 碱水解后得 Gp:C=0.99:1。峰3为 GpGpC(纯度 69%), 需经 pH2.7 电泳进一步纯化, 纯化后样品纸层析 R_f 0.60, 纸电泳 R_m 0.56, 光谱比值 (pH2): $A_{250}:A_{260} = 0.92$, $A_{270}:A_{260} = 0.88$, $A_{280}:A_{260} = 0.81$, $A_{290}:A_{260} = 0.54$, 碱水

解后得 Gp:C = 1.87:1。

72 毫克 G > p 铵盐(0.2 毫克分子), 16 毫克尿苷(0.067 毫克分子)、66 单位(22 微升) N_1 酶在 0.2 毫升 0.1M 磷酸缓冲液中 30℃ 反应 4 天, 也能得到较好的 GpU 连接产率。结果见表 2。

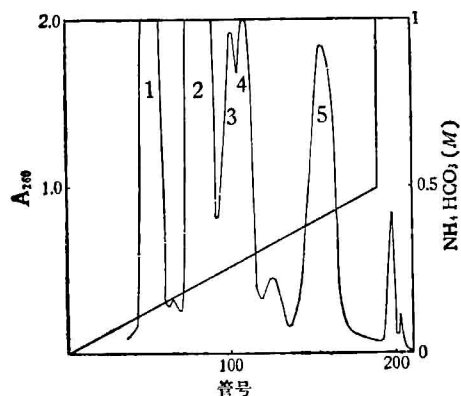


图 4 GpC 和 GpGpC 的柱层析分离

DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 (HCO_3^- 型, 1×30 厘米)。先用 0—0.5M NH_4HCO_3 直线梯度 (500 毫升对 500 毫升) 洗脱, 再用 1M NH_4HCO_3 洗脱。流速为 5 毫升/15 分钟, 峰 1 为 GpC, 峰 2 为 Gp, 峰 3 为 GpGpC, 峰 4 为异常的 (Gp)₂, 峰 5 为 GpGp。

参 考 文 献

- [1] Koike, T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **190**, 257, 1969.
- [2] Uchida, T. et al.: *J. Biochem.*, **81**, 1237, 1977.
- [3] Koike, T. et al.: *J. Biochem.*, **70**, 55, 1971.
- [4] 中国科学院生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 第 10 期, 第 127 页。
- [5] 中国科学院生物物理研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理进展》, 1980 年, 第 5 期, 第 40 页。
- [6] Podder, S. K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 569, 1969.
- [7] Omori, A. et al.: *J. Biochem.*, **76**, 117, 1974.
- [8] Fikus, M.: *Acta Biochem. Polonica*, **21**, 145, 1974.
- [9] 中国科学院生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 第 12 期, 第 29 页。
- [10] Smith, M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6204, 1958.

[本文于 1980 年 3 月 3 日收到]

猪肾的二种碱性磷酸酶

费如珍

(南京中医学院)

徐 愤

(南京医学院)

碱性磷酸酶是免疫酶技术中应用方便的一种酶制剂。我们从猪肾分离出碱性磷酸酶; 并证明猪肾中碱性磷酸酶有 A 和 B 两种。

材 料 和 方 法

1. 猪肾浸出液 宰后的新鲜猪肾, 立刻在冰下剥去包膜和脂肪组织。选取肾实质 3 公斤, 加蒸馏水 1 升, 分批捣碎, 加正丁醇 1 公斤, 再混匀, 10℃ 下放置过夜。第二天将匀浆 2000 转离心 45 分钟, 约得浸出液 1 升。肾残渣 -15℃ 冻存。

2. OH 型 DEAE 纤维素 DEAE 纤维素

装进层析柱, 依次用 0.5N NaOH 和蒸馏水洗净。用过的 DEAE 纤维素依次用 0.1N HCl、蒸馏水, 0.5N NaOH 和蒸馏水洗涤后可连续使用。

3. NaCl 平衡的 DEAE 纤维素 将 OH 型 DEAE 纤维素用 0.5 M NaCl 充分平衡, 再用蒸馏水洗去 NaCl。

4. 酶活性 洗出液的酶活性, 按照 King 和 Wootton^[1] 的方法检查, 即 0.10M Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液 (pH10) 1.0 毫升与 0.01M 磷酸酚二钠 1.0 毫升混和, 在 37℃ 水浴中平衡 3 分钟后加洗出液(用水 1:20 稀释)0.05 毫升, 混