

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的纯化 及其反转录活性的研究

蔡发兴 于喜源 张桂琴

(中国科学院微生物研究所)

程振起* 魏西平 赵 鼎

(中国科学院生物物理研究所)

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 在基因表达、遗传工程及核酸的序列分析研究中是一种必不可少的工具酶,此酶在四种脱氧核苷三磷酸存在下不仅有以 DNA 为模板,聚合一定链长的 DNA 片断的性质,而且还具有从 3' 和 5' 端降解 DNA 的外切酶活性^[1,2,3]。

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 在一定条件下具有反转录活性,即以 m-RNA 为模板,四种脱氧核苷三磷酸为底物,可反转出互补 DNA (C-DNA)。有人利用枯草杆菌蛋白酶,将大肠杆菌 DNA 聚合酶降解成二个片段,其中较大的片段失去 5'-端外切酶活性,而仍保留 DNA 聚合酶活性和反转录活性^[4,5]。

我们从大肠杆菌 B 株中,分离纯化了 DNA 聚合酶 I,并对其聚合活性和反转录活性进行了测定和研究。

一、材料和方法

材料 大肠杆菌 B,由微生物所发酵车间生产。四种脱氧核苷三磷酸 (dATP、dCTP, dGTP 和 dTTP),脱氧核糖核酸酶 I (DNase I),寡聚胸腺嘧啶核苷酸 [oligo (dT)20—40] 均由西德 Boehringer Mannheim GmbH 公司生产。³H dATP 和 ³H dTTP, ³H-poly A 为上海原子核研究所产品。小牛胸腺 DNA 由生物物理所九室提供。DEAE 纤维素 (DE₅₂) 和磷酸纤维素 (p-70) 均为英国 Whatman 公司产品。羧基磷灰石按 Tiselias · A 等方法制备^[6]。

方法 小牛胸腺 DNA 的活化 将小牛胸腺 DNA (1.5 毫克/毫升) 溶于 50 m M Tris-HCl pH 7.4, 5m M MgCl₂ 及 500 微克/毫升牛血清蛋白的缓冲液中,溶解后,用 DNase I (3 微克/毫升) 在 37℃ 水浴中,保温 15 分钟,再于 77℃ 加热 5 分钟破坏 DNase I。在冰浴中速冷,置冰箱备用。

DNA 聚合酶 I 的活性定义 37℃ 保温 30 分钟, 10 n Mole 四种脱氧核苷三磷酸掺入到 DNA 中,即为一个活性单位。酶的比活即 1 毫克酶蛋白所含的酶活单位。

酶的活性测定 反应体积 100 微升,含 10 微升缓冲液 (1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ pH 7.4, 0.1 M MgCl₂, 10 m M 巯基乙醇), 40 微升活化小牛胸腺 DNA (1.5 毫克/毫升) 各加 1 微升的 dCTP、dGTP 和 dTTP (均为 10 m M 浓度) 1 微升 ³H dATP (3025 cpm/nMole/微升), 酶量根据需要加入,然后加水至 100 微升, 37℃ 保温 30 分钟后,取 50 微升反应液点于直径为二厘米的 Whatman 3mm 纸上,用 10% 三氯醋酸 (TCA) 固定 20 分钟,用 5% TCA 洗二次,(每次 10 分钟)然后用乙醇、乙醇:乙醚 (1:1)、乙醚各洗一次,干燥后,放入装有 7 毫升 0.4% BBOT 甲苯闪烁液瓶中,用英国 NE8312 液体闪烁仪测量放射性。

DNA 聚合酶中核糖核酸酶的测定 反应

* 题目组负责人。

体积 100 微升, 含 50 微升缓冲液 (50 m M Tris-HCl pH 7.4, 20 m M $MgCl_2$ 10 m M、DTT, 1 微升 3H poly A, 3 单位 DNA 聚合酶 I。37℃ 保温 60 分钟后, 冷却, 点样, TCA 处理, 测量同前。

反转录活性的测定 反应体积 100 微升含 50 微升缓冲液 (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M $MgCl_2$, 10 m M DTT) 2 微升 poly A (1.2 毫克/毫升) 或鱼精蛋白 m-RNA (1 毫克/毫升), 5 微升寡聚 (dT) 20—40 (0.3 毫克/毫升), 4 微升 3H dTTP (3025 cpm/n Mole/微升) 或 3H dATP 及其它三种脱氧核苷三磷酸, 酶量根据需要而定, 最后加水至 100 微升。37℃ 保温 45 分钟, 反应后, 点样, TCA 处理, 测量等方法与聚合酶活性测定相同。

二、DNA 聚合酶的纯化^[4,7,8,9]

除提取步骤中指出外, 全部操作均在 0—4℃ 进行。所用菌体为 100 克, 离心均用 MSE 冷冻高速离心机, 10,000 转/分。

(1) 大肠杆菌 B 的破碎 取保存在 -20℃ 大肠杆菌 100 克, 放在 4℃ 过夜融熔, 加入 65 毫升 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.01 M EDTA 缓冲液。用冰盐浴冷却, 分三批用超声波破碎。菌体破碎过程中, 最高温度不超过 12℃, 菌体破碎后, 按每克菌体 5 毫升补加缓冲液, 搅匀, 离心 10 分钟。取上清 580 毫升 (分部 I), 用 Folin-酚法测定蛋白浓度。

(2) 链霉素沉淀 用蒸馏水将分部 I 按每毫升 10 毫克蛋白稀释。然后滴加 42 毫升 5% 硫酸链霉素 (使用前配制), 边滴加边搅拌, 45 分钟内滴加完毕。静置 10 分钟, 离心 30 分钟, 取沉淀溶解在 134 毫升的 50 m M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.5 缓冲液中, 用玻璃匀浆器匀浆助溶。(分部 II)

(3) 自溶 取分部 II 134 毫升, 加入 0.8 毫升 0.5 M $MgCl_2$, 调至 $MgCl_2$ 浓度为 3 m M。在 30℃ 水浴上保温, 定时 (相隔 1 小时) 取样 1 毫升, 离心 10 分钟, 取上清测定 1 N $HClO_4$ 沉淀后 260 毫微米处紫外吸收值, 一般待 $HClO_4$

沉淀后的上清相当于沉淀前紫外吸收值的 90% 即可。冰水浴中冷却后, 离心 10 分钟, 取上清 110 毫升。(分部 III)

(4) 硫酸铵沉淀 向分部 III 110 毫升上清中加入 0.2 M 谷胱甘肽 0.55 毫升, 0.2 M EDTA 0.55 毫升, 混匀后加入固体硫酸铵 33 克, 边加边搅拌, 一小时内加完, 静置 30 分钟, 离心 30 分钟, 取沉淀, 溶解在 15 毫升 20 m M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.4 缓冲液中。(分部 IV)

(5) DEAE 纤维素柱层析 (分部 IV 经纤维素柱层析后, 可除掉核酸物质) 处理好的 DEAE-纤维素柱 ($\phi 0.4 \times 16$ 厘米), 先用 0.2 M K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH 6.5, 10 m M 巯基乙醇缓冲液充分平衡, 然后将 15 毫升样品上柱, 收集上柱流出液, 并用平衡缓冲液洗柱, 共收集吸收峰 280 毫微米处流出液 35 毫升, 相对 20 m M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 6.5, 10 m M 巯基乙醇缓冲液透析过夜, 中间更换二次透析液。离心 10 分钟, 取上清液 90 毫升。(分部 V)

(6) 磷酸纤维素柱 P 70 层析 处理好的磷酸纤维素柱 ($\phi 0.8 \times 20$ 厘米) 用 20 m M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.5 10 m M 巯基乙醇缓冲液平衡, 将上述 90 毫升样品液上柱, 用 150 毫升平衡缓冲液洗柱, 然后用 250 毫升以 20 m M—200 m M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 6.5, 10 m M 巯基乙醇缓冲液进行梯度洗脱, 分部收集 5 毫升/管 /15 分钟。按材料和方法中叙述的测定各分

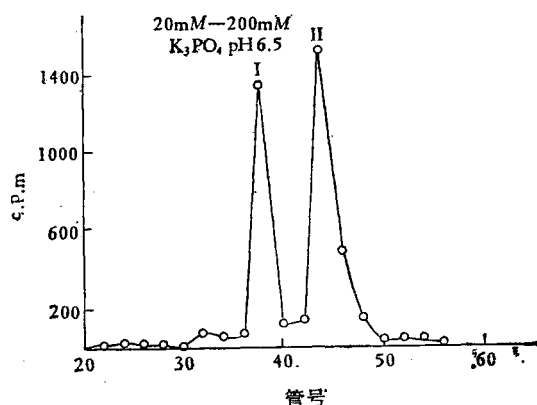


图 1 P70 柱梯度洗脱 DNA 聚合酶曲线
峰 II 为完整的 DNA 聚合酶 I 的分子,
峰 I 为 DNA 聚合酶 I 的片段部分。

部的酶活。结果见图 1。(分部 VI)

(7) 羟基磷灰石柱层析 羟基磷灰石柱 ($\phi 0.6 \times 10$ 厘米) 用 20 m M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.5, 10 m M 巯基乙醇缓冲液 200 毫升平衡, 分部 VI 的活性峰, 相对 2 立升上述缓冲液透析 20 小时。上柱流速 1 毫升/15 分钟, 上柱后, 先用 50 m M $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$, pH 6.5 10 m M 巯基乙醇缓冲液洗脱, 然后用 0.25 M 上述磷酸钾缓冲液洗脱, 流速 0.5 毫升/10 分钟, 收集活性分部。用含 10 m M 巯基乙醇 20 m M pH 6.5 磷酸钾缓冲液透析过夜, 用 Folin-酚试剂法定蛋白浓度。按材料和方法中所叙述的测定酶的比活, 居在 2,000—5,000 单位/毫克。

三、结果与讨论

1. DNA 聚合酶 I 活力测定

在上述酶的纯化过程中, 由硫酸铵沉淀一步起, 以下每一步得到的酶液, 用 Folin-酚试剂法测定蛋白浓度, 并以活化的小牛胸腺 DNA 为模板、四种脱氧核苷三磷酸 (其中 dATP 为 ^3H 标记) 为底物, 测定 DNA 聚合酶的活性。各分部收率见表 1。

表 1 E. coli DNA 聚合酶 I 的纯化

	蛋白总量 (mg)	蛋白浓度 (mg/ml)	比活 (μ /mg)	产率 (%)
硫酸铵沉淀	112.5	7.5	209	100
DEAE 纤维素 52 柱层析	58	0.65	393	97
磷酸纤维素 P-70 柱层析	2.3	0.3	2000	20
羟基磷灰石柱层析	0.6	0.1	3000	8

在测定 DNA 聚合酶活性时, 一般用缓冲液 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.02 M 巯基乙醇 (1 毫克/毫升牛血清蛋白), 将原酶液稀释 50—100 倍, 所用酶量在 0.01—0.2 单位之间。在测定最后一步所得 DNA 聚合酶活性时, 我们同时与进口的同种 DNA 聚合酶 I 进行, 比较测定, 结果表明二种制剂的比活在同一个水平。

为了进一步确定 DNA 聚合酶 I 的性质, 在

表 2 抑制剂对 DNA 聚合酶 I 的抑制程度

抑 制 剂	抑 制 程 度 (%)
放线菌素 D	91
-dG. dC. dT	87

注: 反应体系及测定过程见本文中方法部分, 所加入放线菌素 D 的浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$

最后的酶制剂测活反应体系中, 平行加入放线菌素 D (0.1 毫克/毫升), 使之与 DNA 模板中的碱基 G 结合, 从而抑制 DNA 聚合酶的作用。从表 2 可以看出加入放线菌素 D, 可抑制 DNA 聚合酶活性 91%。另外, 从反应体系中减去三种脱氧核苷三磷酸, 也可抑制酶活 87% (见表 2)。

从图 1 可知, 经磷酸纤维素柱梯度洗脱纯化 DNA 聚合酶时, 可得到二个活性峰, 峰 II 为完整的 DNA 聚合酶 I 的分子, 而峰 I 是由于在酶的纯化过程中 DNA 聚合酶受到蛋白酶的作用, 降解成的大片段^[9], 它仍具有 DNA 聚合酶的活性, 而失去了 5' 端外切酶的活性。由此可知在纯化 DNA 聚合酶 I 的过程中, 只要操作得当, 同时也可以得到在核酸序列分析中重要的工具酶——失去 5' 端外切酶活性的 DNA 聚合酶。

2. 用 ^3H poly A 作底物测定酶制剂中核糖核酸酶的活性, 结果表明 DNA 聚合酶 I 的制剂中不含有任何核糖核酸酶的活性 (见表 3)。

3. DNA 聚合酶 I 反转录活性的测定 我们除测定了以活化的小牛胸腺 DNA 为模板的聚合酶活性外, 并分别以真核 m-RNA 或 poly A 为模板, 寡聚 (dT) 为引物, 相应的脱氧核苷三磷酸 (其中一种为 ^3H 标记) 为底物测定了此酶制剂的反转录活性。

我们测定 DNA 聚合酶 I 的反转录活性实验是以 poly A 为模板, 寡聚 (dT) 为引物, ^3H TTP 为底物, 测定其反转录活性。DNA 聚合酶 I 反转录活性的最适条件是: 反应温度为 23℃, 反应时间为 45 分钟, 几种二价金属离子对此酶反转录活性刺激程度及最适浓度为

表3 DNA 聚合酶 I 的核糖核酸酶活性的测定

试验	试 验 一			试 验 二		
	+DNA 聚合酶 I 脉冲数/分	对 照 脉冲数/分	$\frac{+DNA 聚合酶 I}{对照\%}$	+DNA 聚合酶 I 脉冲数/分	对 照 脉冲数/分	$\frac{+DNA 聚合酶 I}{对照\%}$
处理 [³ H] polyA	10066	10383	97	10450	10774	97

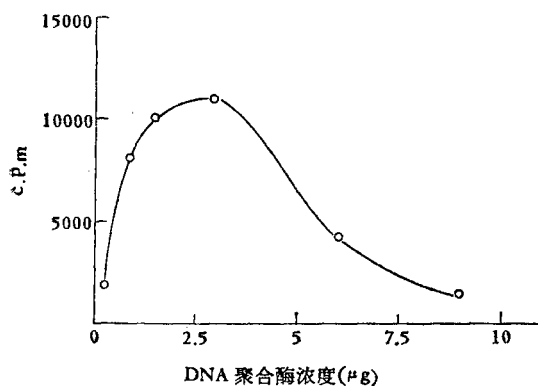


图2 酶量浓度曲线

反应体系中加入的模板为鱼精蛋白 m-RNA (1mg/ml)
其它成份见本文中方法部分

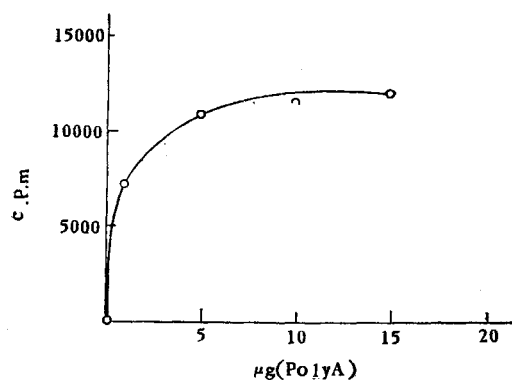


图3 poly A 量变化曲线

反应体系中加入酶量为 2.5 单位,其它成分见方法部分

Mg^{++} (1—2 m M) > Hg^{++} (6m M) > CO^{++} (1 m M) > Ca^{++} (有抑制作用)。在模板与底

物量固定条件下,酶量应适量,不宜过多,酶量过多,反转录活性明显下降(图2)。这可能是此酶的外切酶活性增加之故。经测定,DNA 聚合酶中不含有核糖核酸酶活性,因此反应体系中酶量过多反转录活性下降不是因为核糖核酸酶降解模板所致。模板 poly A 的量一般为 10 微克(图3)。

经聚丙烯酰胺凝胶电泳测定以真核 mRNA 为模板时的反转录产物分子大小一般在 100 个核苷酸长度^[10]。此酶反转录产物的大小受到该酶的外切酶活性所限制,不能反转录出相当于模板长度的产物,因此大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的反转录功能不能代替 AMV 反转录酶。

参 考 文 献

- [1] Kornberg, A. *Science* **163**, 1410, 1969.
- [2] Delucia, P. et al., *Nature* (London) **224**, 495, 1969.
- [3] Kelly, R. B. et al.: *Nature* (London) **224**, 495, 1969.
- [4] Setlow, Peter.: *Methods in Enzymology. Nucleic acids and protein synthesis*, Part E **29**, 3, 1974.
- [5] Proudfoot, N.: *FEBS Lett.*, **38**, 179, 1974.
- [6] Tiselius, A. et al.: *Arch. Biochem Biophys.*, **65**, 132, 1956.
- [7] Jorin, T. M.: *J. Biol. Chem.*, **224**, 2996, 1969.
- [8] Richardson, C. C. et al.: *J. Biol Chem.*, **239**, 222, 1964.
- [9] Setlow, P. *J. Biol. Chem.*, **247**, 224, 1972.
- [10] 林万录等,待发表。

[本文于 1981 年 4 月 15 日收到]

科技消息

在膜的核磁共振研究中应用石英板铺磷脂膜技术

对平行束喷射(PBS)技术进行改进,可将磷脂双层膜涂铺在石英表面。具体方法是磷脂混合物用氮气流雾化喷涂到石英板上。这样改进的好处是不出现光谱异常现象,而用别的方法由于脂双层不是在一个方

向而引起的谱异常。

(摘自 *J. Biochem. Biophys.*, **4**(3/4):
135, 1981)