

经验交流

无 3' 磷酸酶活性的 T₄ 多核苷酸激酶的批量改进纯化法

韩紫杰 刘佑国 陈 慎 华 陵 宋桂云 王淑娟 刘仲昌

(中国科学院生物物理研究所,北京)

T₄ 多核苷酸激酶是核酸研究中常用的一种工具酶。然而普通的核苷酸激酶,如 T₄am122 和 T₄amE10 等噬菌体所产生的激酶均含有 3' 磷酸酶活性^[1],不能应用在要求 3' 端有磷的实验中。从双突变 T₄ PseT1 噬菌体所产生的激酶没有 3' 磷酸酶活性,能用于使核苷酸 5' 羟基末端磷酸化的同时又无损于 3' 末端磷。Cameron 等^[2] 1978 年报道了这种激酶的纯化方法及性质。我们在为人工合成酵母 tRNA^{Ala} 制备大量 PseT1 感染激酶时,曾对 Cameron 及 Richardson^[3] 制备方法进行了若干改进,用以批量纯化无 3' 磷酸酶活性的 T₄ 多核苷酸激酶精制品,结果大大减低了损耗,提高了产率。现将几个主要方面的改进和效果报道如下。

1. 改进最适 pH 值

Richardson 法纯化激酶采用不同 pH^[3],对 DEAE 纤维素柱和磷酸纤维素柱采用 pH7.5 (磷酸缓冲液),对羟基磷灰石柱采用 pH7.0。我们将缓冲液 pH 全部改为 7.7,结果使制备酶回收率提高三倍,损耗率降低十七倍。详见表 1。

表 1 pH 值改进前后酶回收率比较

纯化步骤	Richardson*		改进前		改进后	
	pH 值	回收率 (%)	pH 值	回收率 (%)	pH 值	回收率 (%)
硫酸铵沉淀		100		100		100
DEAE 纤维素 (DE-52)	7.5	64.8	7.5	42.7	7.7	86
磷酸纤维素 (P ₁₁)	7.5	38.1	7.5	34.4	7.7	80
羟基磷灰石 (HA)	7.0	25.7	7.0	20.5	7.7	79

* 根据文献 [3]。

2. 改进分离技术

Richardson 法分离激酶时,对 DEAE 纤维素柱用 0.05 M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 直接洗脱,对磷酸纤维素柱和羟基磷灰石柱分别用含 KCl (0.05 M, 0.1 M 和

0.25 M) 的 0.05 M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 和不同浓度的磷酸缓冲液 (0.1 M, 0.2 M, 0.3 M 和 0.5 M, pH7.0) 进行阶段洗脱。我们将层析柱的洗脱条件分别改为: DEAE 纤维素柱用 0.07 M 磷酸钾 (pH7.7) 直接洗脱;磷酸纤维素柱用含 0—0.8 M KCl 的磷酸缓冲液 (pH 7.7) 进行线性梯度洗脱;羟基磷灰石柱用 0.02—0.08 M 磷酸缓冲液 (pH7.7) 进行线性梯度洗脱。既简化了分离程序,又减少了损耗,提高了回收率。改进后的总效果,见表 2。

表 2 无 3' 磷酸酶的 T₄ 多核苷酸激酶纯化结果 (120 克菌体)

纯化步骤	总活力 ×10 ⁵	总蛋白 O.D ₂₈₀	比活性 u/O.D ₂₈₀	回收率 (%)
硫酸铵沉淀	1.4	2800	50	100
DEAE 纤维素 (DE-52)	1.2	82	1463	86
磷酸纤维素 (P ₁₁)	1.12	6	18500	80
羟基磷灰石 (HA)	1.1	—a*	—a	79

*: —a 表示难以测出 O.D₂₈₀ 吸收值。

3. 简化酶活性测定方法

Richardson 法中酶活性的测定相当繁杂,酶和试剂用量大。我们采用纸片法测定酶活,简化操作过程,反应体积减少为 Richardson 法的四分之一,而检测灵敏度不变。现将此法简述如后。用 75 微升反应体积,内含 67 m M Tris-HCl (pH7.6), 10 m M MgCl₂, 10 m M 2-巯基乙醇, 20 nmoles 碱解法制备的 5'-OH-RNA, 5 nmoles [γ -³²P] ATP (0.5—1 × 10⁵ cpm/nmoles) 和酶。37℃ 下保温 30 分钟,冰水冷却终止反应。取样 50 微升点于 Whatman 3 号滤纸圆片上,浸泡于冷的 10% TCA 中 5 分钟,再用 5% TCA 漂洗 4 次,酒精、乙醚干燥,热风吹干,最后测纸上吸附的酸不溶产物的 cpm。Richardson 法需将样品多次沉淀,离心,并用抽滤法收集沉淀在玻璃滤纸上,用 6 ml 0.01 N HCl 分成三次洗涤,再测 cpm,步骤多,操作繁杂。用改进后的方法测定出酶的线性区为 0.0125—0.125 单位,与 Richardson

法测定的线性区 (0.05—0.5 单位)^[3]是一致的。

4. 用更灵敏的方法检测 RNase 和 3' 磷酸酶活性

采用四核苷酸 CGGA 为底物,用被检测激酶标记 ³²P, 所得产物进行薄层同系层析和放射自显影以观察其标记效率,同时检测出激酶内含有微量的 RNase 及 3' 磷酸酶活性。具体检测过程如下: 酶反应体系: 10 微升反应液内含 70 mM Tris-HCl pH7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-巯基苏糖醇, 1 nmoles CGGA, 1.5 nm-

oles [γ -³²P]ATP, 1.6-3.2 单位 T₄ 多核苷酸激酶, 37℃ 保温 30 分钟后, 点样于纤维素薄层层析板上 (DEAE 纤维素: 微晶纤维素为 2:15)。用同系混合液 2 号^[4], 在常温下层析 4 小时, 取出吹干, 放射自显影, 测定各点位置, 再分别测定各点 cpm, 并计算 CGGA 上酶标记率及由于 RNase 引起的降解率, 如图 1 所示。从图中看出: 无论加激酶 1.6 单位或 3.2 单位, 酶的标记率均大于 100%, 而降解活性仅为 1.8—3.2%。从图 1 中 (4) 很清楚可见无 3' 磷酸酶活性。显然, 经过改进, 不但酶回收率提高了, 而且酶的质量也是令人满意的。

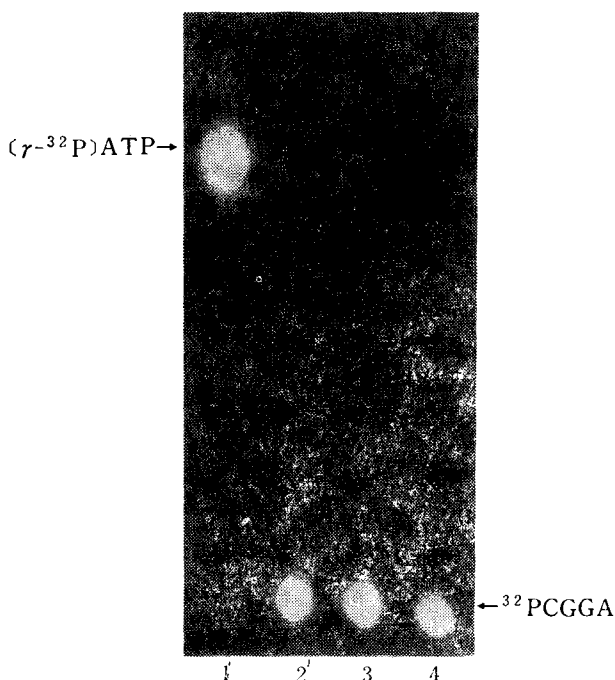


图 1 T₄PNKase 使 CGGA 5'-OH 磷酸化放射自显影图

放射自显影点为 CGGA 磷酸化产物; 自左至右为: 1. [γ -³²P]ATP; 2. 1.6 单位 T_{4am}122 感染细胞提取的普通激酶; 3. 3.2 单位 T_{4am}122 感染细胞提取的普通激酶; 4. 3.2 单位 T_{4Pse}T1 感染细胞提取的无 3' 磷酸酶活性的双突变种激酶。

参 考 文 献

- [1] Cameron, V. and Uhlenbeck, O. C.: *Biochemistry*, **16**, 5120, 1977.
- [2] Cameron, V., Soltic, D. and Uhlenbeck, O. C.: *Nucl. Acids Res.*, **5**, 825, 1978.
- [3] Richardson, C. C.: in *Procedures in Nucleic Acid*

Research (Cantoni, G. L. and Davies, D. R. ed.) Vol. 11, 815—823, 1972, Harper and Row, New York.

- [4] Siberklang, M., et al.: *Nucl. Acids Res.*, **4**, 4091—4108, 1977.

[本文于 1986 年 7 月 15 日收到]