

DNA 连接酶、RNA 连接酶、多核苷酸激酶和 DNA 聚合酶的同时分离纯化

刘佑国 宋桂云 韩子杰 刘中昌 王淑娟

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

本文报道从 T4amN82 噬菌体诱导的大肠杆菌 *E. coli*B 同时分离和纯化四种酶的一般方法。先用硫酸链霉素沉淀把 RNA 连接酶, DNA 连接酶与多核苷酸激酶和 DNA 聚合酶加以分离。然后用 DEAE 纤维素柱层析把 DNA 连接酶与 RNA 连接酶加以分离, 用 DEAE-Sephadex-A50 柱层析把多核苷酸激酶与 DNA 聚合酶加以分离。本文着重介绍 T4DNA 聚合酶的分离纯化。

T4RNA 连接酶, DNA 连接酶, 多核苷酸激酶和 DNA 聚合酶是遗传工程和其它分子生物学领域的重要工具酶。Wess 和 Richardson 等曾分别报道每一种酶的单独分离与纯化^[1-3]。1973 年 Panet 等从一批 T4 噬菌体感染的大肠杆菌中同时纯化 DNA 连接酶, 多核苷酸激酶和 DNA 聚合酶^[9]。T4DNA 连接酶和 RNA 连接酶的分离纯化国内已有报道^[5,6]。我们在上述基础上成功地同时分离纯化上述四种酶。

材 料 和 方 法

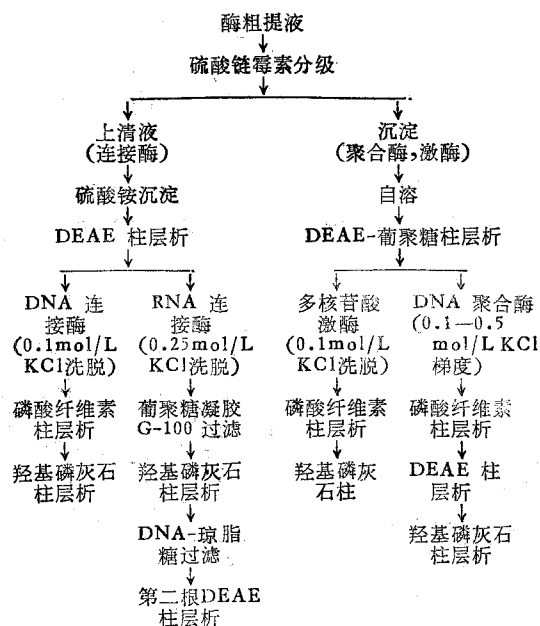
1. T4amN82 噬菌体感染的大肠杆菌按文献^[6]的方法制备。

2. DEAE-纤维素 52, 磷酸纤维素 P11, (Whatman 产品)。葡聚糖 G-100 和 DEAE-葡聚糖-A50, (Pharmacia 产品)。羟基磷灰石, DNaseI 和小牛胸腺 DNA, (生物物理所生化厂)。

3. 无载体 ^{32}Pi , (北京 401 所)。 ^3H -dATP, (上海原子能所)。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 按 Glynn 等^[7]的方法制备。 ^{32}PPi 的制备参照 Bergman 的方法^[8]。

实验步骤与结果

T4DNA 连接酶, RNA 连接酶, 多核苷酸激酶和 DNA 聚合酶的分离纯化如下:



一、粗酶液的制备 将 203 克 T4amN82 噬菌体感染的大肠杆菌 *E. coli*B 菌体悬浮于

800ml 缓冲液中, (缓冲液: 0.02mol/L Tris-HCl, pH7.6, 0.01mol/L 2-巯基乙醇, 0.001mol/L EDTA)。超声破碎, 然后 105000g 离心一小时, 收集上清液为粗酶液。粗酶液再用硫酸链霉素沉淀, 沉淀中含有多核苷酸激酶和 DNA 聚合酶, 上清液中含有 DNA 和 RNA 连接酶。

二、T4 DNA 聚合酶的分离纯化

1. 自溶 将上述粗酶液用硫酸链霉素沉淀物悬浮于 800ml 0.1mol/L 磷酸钾含 0.002mol/L 谷胱甘肽溶液中, pH7.5。再加入 1mol/L $MgCl_2$ 使最终浓度为 0.003 mol/L, 保温 37℃ 搅拌自溶, 每隔 15 分钟取 0.5ml, 4000r/min 离心, 将上清液稀释后测 A_{260} 值。同时再取适当量的上清液加入等体积的 1mol/L HClO₄ 作酸沉淀, 离心取上清液稀释后测 A_{260} 值。当酸沉淀后 A_{260} 值相当于沉淀前 A_{260} 值的 95% 时, 终止自溶, 离心除去变性蛋白, 收集上清液。

2. 硫酸铵沉淀 先加 10%(W/V) 的固体硫酸铵离心收集上清, 再补加 20%(W/V) 的硫酸铵, 离心收集沉淀。将沉淀溶于 120ml 0.1mol/L 磷酸钾, pH7.5, 0.002mol/L 谷胱甘肽溶液中, 再用 0.01mol/L 磷酸钾, pH7.5, 0.01mol/L 2-巯基乙醇 2000ml 缓冲液透析。

3. DEAE-葡聚糖 A-50 柱分离 将透析过的酶液上柱, (柱要用 0.01mol/L 磷酸钾, pH7.5, 0.01mol/L 2-巯基乙醇缓冲液平衡)。流速为 35ml/h, 接着用柱平衡液淋洗至 A_{280} 值

低于 0.03 时, 用 1000ml 平衡液含 0.1mol/L KCl 洗脱多核苷酸激酶, 洗脱流速为 60ml/h。接着用 1500ml 平衡液含 0.1—0.5mol/L KCl 作梯度洗脱, DNA 聚合酶在 0.26mol/L KCl 处开始洗脱下来, 见图 1。

图 1 中有两个酶活力峰, 第一个峰为多核苷酸激酶活力峰, 第二个峰为 DNA 聚合酶活力峰。将二种酶液分别合并进一步纯化。

三、DNA 聚合酶的进一步纯化

1. 磷酸纤维素 P11 柱层析 将合并的 DNA 聚合酶液 500ml 用 0.05mol/L 磷酸钾, pH6.5, 0.01mol/L 2-巯基乙醇溶液透析过夜, 然后上 P11 柱, 流速为 35ml/h。上样后用同种缓冲液淋洗, 接着用含 0.01mol/L 2-巯基乙醇, 0.05—0.4mol/L 磷酸钾缓冲液, pH6.5, 作线性梯度洗脱, 流速为 50ml/h, 洗脱在 0.26mol/L 盐浓度处合并酶活峰区。

2. DEAE-52 纤维素柱层析 将上述合并的酶液用 0.02mol/L 磷酸钾, pH7.4, 0.01mol/L 2-巯基乙醇缓冲液透析后上柱, 流速为 24ml/h。接着用同种缓冲液淋洗, 再用含 0.01mol/L 2-巯基乙醇, 0.02—0.15mol/L 磷酸钾溶液作梯度洗脱, 流速为 36ml/h。酶活在 0.076mol/L 磷酸盐浓度处, 合并酶活峰区。

3. 羟基磷灰石柱层析 将上述合并的酶液用 0.05mol/L 磷酸钾 pH7.5, 0.01mol/L 2-巯基乙醇缓冲液透析后上柱, 流速为 36ml/h, 接着用含 0.01mol/L 2-巯基乙醇, 0.05—0.4mol/L

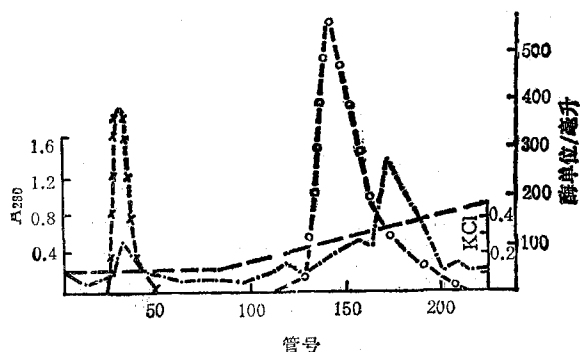


图 1 DEAE-葡聚糖 A-50 柱层析

柱体积: $3.5 \times 30\text{cm}$

—x— T4 多核苷酸激酶活力 —o— T4 DNA 聚合酶活力 —●— A_{280} 值 ——— KCl 浓度

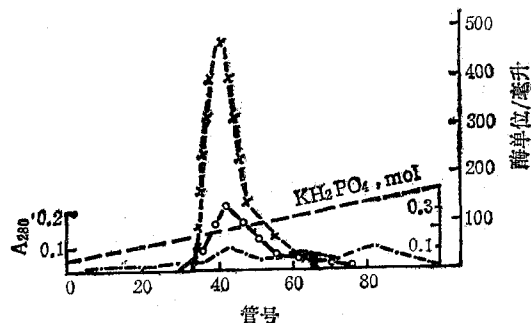


图 2 T4DNA 聚合酶羟基磷灰石柱层析

柱体积: $1.5 \times 14.5\text{cm}$

—x— DNA 聚合酶活力 —●— A_{280} 值 —o— 核酸外切酶活力 ——— 磷酸钾浓度

表1 DNA聚合酶纯化结果(自203克菌体)

步骤	项目	总活力单位 $\times 10^3$	总蛋白 OD ₂₈₀	比活 U/OD ₂₈₀	回收率 (%)
粗提液		5.5	691	798	100
DEAE-Sephadex A-50		4.46	343	1300	81
磷酸纤维素 P11		2.55	30.5	8347	46.2
DEAE		1.85	24.4	7599	33.6
羟基磷灰石 (HA)		0.81	7.9	10236	14.7

磷酸钾溶液 pH6.5, 作线性梯度洗脱, 合并酶活力峰。见图2。

将合并的 DNA 聚合酶液用 0.02mol/L 磷酸缓冲液 pH6.5, 0.01mol/L 2-巯基乙醇透析, 再用含 50% 甘油的同种缓冲液透析浓缩放 -20℃ 保存。经过上述的分离纯化得到的 DNA 聚合酶结果见表1。

四、T4DNA 聚合酶的活力测定方法

100 微升反应体积, 0.066mol/L 磷酸钾, pH 7.4, 0.01mol/L MgCl₂, 0.01mol/L 2-巯基乙醇, 0.00030mol/L dGTP, dTTP, dCTP, 和 0.00015 mol/L ³H-dATP, 40 微克 DNaseI 活化过的小牛胸腺 DNA 和酶液。37℃ 保温 30 分钟, 冰浴放置 5 分钟, 取样点于 Whatman 3MM 圆型滤纸片上, 用 10% 冷的 TCA 固定

10 分钟, 换 5% 的 TCA 漂洗四次, 每次漂洗 5 分钟, 用酒精和乙醚干燥, 红外灯下烤干, 用液体闪烁谱仪测 cpm, 在上述条件下掺入 10 个总核苷酸成不溶产物所需的酶量定义为酶的一个活力单位。

讨 论

DNA 聚合酶的蛋白峰和核酸外切酶活力峰重叠在一起。用 1μg pBR322 DNA 与 2—10 单位 DNA 聚合酶一起在 37℃ 保温 2 小时, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳查不出 DNA 超螺旋结构发生变化, 说明羟基磷灰石柱去掉了核酸外切酶的污染。

参 考 文 献

- [1] Weiss, B. et al.: *J. Biol. chem.*, 1968, **243**, 4543.
- [2] Last, J.A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, **174**, 167.
- [3] Richardson, C.C.: *Proc. Nucl. Acids Res.*, 1972, **2**, 815.
- [4] Goulian, M. et al.: *J. Biochem.*, 1968, **243**, 627.
- [5] 中国科学院上海实验生物研究所: 《微生物学报》, 1978, **18**, 3.
- [6] 北京生物物理所核酸组: 《生物化学与生物物理进展》, 1981, (4), 34.
- [7] Glynn, I.M. et al.: *Biochem. J.*, 1964, **90**, 147.
- [8] Bergman, F.H.: *Methods in Enzymology*, 1962, **5**, 708.
- [9] Panet, J.H. et al.: *Biochemistry*, 1973, **12**, 25.
- [10] 华陵等: 《化学试剂》, 1981, **1**, 8.

[本文于 1988 年 7 月 8 日收到]

信息服务

废毛发制胱氨酸培训班

胱氨酸是化工、医药及食品工业的辅料, 它是制“脱发再生剂”的主要原料, 又是治疗肝炎的重要药物。目前国内收购大有发展趋势。从废猪毛中每 100 公斤提取纯度为 91% 以上的胱氨酸精制品 6—7 公斤, 价值 500 元, 投资 300 元即可生产。两人操作每天盈利达百余元。学习三天结业并发结业证书。技术转让费面授: 单位 300 元, 个人 250 元。函授: 80 元(负责解答问题)。长年招生, 随到随学, 安排食宿费用自理。一般三天内包教包会, 达到独立操作水平。函授、面授均可, 如果通过函授不能生产, 可来京面授, 面授时减去函授费。对于贫困地区学员可给予一定优惠。若需全套培训项目简介请附一元邮资函索。若生产不成功时, 用户提出要求, 本所可派人前去指导生产, 直到生产拿出一定标准的产品为止(派人时路费、食宿费由用户负责支出)。(B65 号)。

[北京市星火技术研究所提供, 通信处: 北京 867 信箱 20816 组, 邮政编码: 100024 (来信咨询请附四角邮资)。乘车路线: 北京站乘 9 路汽车至呼家楼换 350 路到平房东口下车前行 400 米发明城内, 电话: 5009194。]