

酶 (DNA 聚合酶 I 的克林诺夫片段) 促合成 Polyd(G-C)_n

张尚权, 包永德

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

本实验运用遗传工程菌株 Pcj155 高效表达的 DNA 聚合酶 I 成功地合成左旋 Z-DNA 的重要材料 polyd(G-C)_n。迄今为止,尚未发现有关这方面成功的报道。该酶的产量比国外报道的大肠杆菌和小球菌 DNA 聚合酶 I 的产量高 100 倍以上。同时发现 60—85% 硫酸铵沉淀的酶 (纯化部分 III) 合成多聚脱氧核苷酸的效率优于纯化部分 IV、V 的酶。这样就可以简化酶的纯化步骤。在最适反应条件下, Polyd(G-C)_n 的合成率较高,其合成片段大于国外文献报道的产品。产物及产物中 dG 与 dC 的光波特性、dG 与 dC 的比例亦符合要求。

一、材料与方 法

1. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的克林诺夫片段的纯化^[1]: E. coli Pcj155 (N483 Pcj55, 由郭礼和先生提供), 在 L、B 培养基中 30℃ 培养至菌体密度 (O. D._{590-600nm}) 近似于 0.35—0.5。45℃ 热诱导 2 小时, 4℃ 离心, 收集菌体→溶菌缓冲液 pH7.4 溶菌, Sinprep-150 超声破碎,→离心取上清 (I)→PEI 沉淀 (II)→硫酸铵分级沉淀: 60% 饱和硫酸铵沉淀, 取上清, 85% 硫酸铵沉淀, 沉淀物用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液溶解。每克菌体酶活力为 3×10^4 U (III)→BioRex 70 柱分离 (IV)→Sepharyl S-200 纯化 (V)。酶 (U) 的测定方法见 Peter setlow^[2]。

2. 利用上述纯化部分 III 酶, 以 Sigma 公司 Polyd(I-C)_n 为模板, 合成 Polyd(G-C)_n^[3]: 根据本实验酶反应动力学试验, (1) 50μl 反应混和液 60mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.4, 5mmol/L 氯化镁, 2mmol/L 2-巯基乙醇, 0.4mmol/L dGTP, 0.4mmol/L dCTP, 0.5 μg Polyd(I-C)_n, 3.6U 酶 (III)。混匀后 37℃ 反应 6 小时。(2) 将上述反应体系体积放大 10 倍, 85℃ 温育 10 分钟, 置冰浴冷却 30 分钟, 然后加 dGTP、dCTP 及酶 (III), 37℃ 反应 6 小时。(3) 将 (2) 反应体系体积放大 10 倍, 重复 (2) 实验操作步骤。抽提回收 Polyd(G-C)_n, 经 DU-7 扫描并计算实际回收率为起始模板的倍数。

二、结 果

根据方法 2 运用不同纯化部分的 DNA 聚合酶 I 的克林诺夫片段合成 Polyd(G-C)_n。相比较纯化部分 III 比 IV、V 的酶合成率高 80% 左右。在反应体系中运用 α-³²PdCTP 示踪测定及计算 Polyd(G-C)_n 的合成倍数为起始模板的 10 倍以上, 与方法 2 中的回收结果一致。

DU-7 扫描显示合成 Polyd(G-C)_n 的特征吸收波长为 255nm, Polyd(G-C)_n 分子量则达 2×10^4 碱基对, 比 Sigma 公司 Polyd(G-C)_n 大 10 倍左右。

根据 Aarom Bendich^[4] 的经典方法测定酶促合成 Polyd(G-C)_n 中的 dG 与 dC 的 Rf 值分别为 0.25、0.47。DU-7 扫描测定 G、C 光吸收, 其中最大吸收波长依次为 249nm 和 276nm。通过最大吸收波长时的吸收值计算 G 与 C 的碱基比为 1.08:1 (图表均略)。

三、讨 论

运用 Pcj155 菌株制备 DNA 聚合酶 I 的克林诺夫片段, 其未经进一步纯化的酶合成 Polyd(G-C)_n 量高于纯化部分合成的量。实验结果显示, 我们用 Sigma 公司的小于 5×10^2 碱基对的 Polyd(I-C)_n 为模板合成 Polyd(G-C)_n 的长度可达 2×10^4 碱基对。我们推测粗酶中可能存在一定量的解链酶 (Unwinding Proteinase)、拓扑酶 (Topoisomerase) 等, 这些酶的存在可能有利于 Polyd(G-C)_n 的合成。

根据本实验条件, 我们进行放大试验, 结果表明, 并不显示由于放大反应体系体积而影响合成率下降的趋势。因此本体系在合成其它组分的脱氧聚核苷酸方面亦可有广泛的应用前景。

林炳辉、褚云芳参加部分工作, 郭礼和和聂慧玲对本工作给予很大的支持与帮助, 特此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Chther M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 1983.

(下转第 388 页)

透析好的溶液上样于用上述缓冲液平衡的另一 DEAE-Sephadex 柱 (1.5 × 6cm), 用含 50mmol/L KCl 的上述缓冲液洗至柱流出液 280nm 处光吸收值小于 0.01, 换用含 150mmol/L KCl 的上述缓冲液洗脱, 收集洗脱出的蛋白, 4℃ 冰箱保存。表 1 总结了酶提纯的过程与结果。经过上述一系列步骤, 仓鼠肝 GSH-Px 被纯化 443 倍, 产率为 12%。

二、GSH-Px 的纯度鉴定

图 3 示纯化的仓鼠肝 GSH-Px SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。GSH-Px 呈现分子量约为 22000 的单一区带。表明该酶的纯化已达到电泳均一。

讨 论

谷胱甘肽过氧化物酶最早由 Mills 和 Randall 从红细胞中发现^[1], 以后人们又从牛、羊、人等红细胞以及大鼠肝^[4-7]中提纯了该酶, 并对它们的一些特性进行了研究。谷胱甘肽过氧化物酶广泛分布于机体各器官、组织和细胞中, 一般认为肝脏是该酶活力最高的器官^[8], 而仓鼠肝 GSH-Px 又较其他动物肝具有更高比活性^[2], 因此, 我们选择了仓鼠肝来提纯该酶。

Jean Chaudiere 用预先经腹腔注射 ⁷⁵Se 的仓鼠, 处死取肝, 经丙酮沉淀, Sephadex G-100 凝胶过滤, DEAE-Sephacel 滴定, DEAE-Sephacel 柱层析 CM-Bio-Gel 柱层析等步骤, 提取仓鼠肝 GSH-Px^[9], 其步骤繁琐, 设备及操作要求较高, 一般难以重复, 本实验选择了合适的条件, 采用反相和离子交换两种柱层析, 纯化了该酶, 步骤简单效果良好。

本实验方法继 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀后, 首先采用 Phenyl-Sephadex CL-4B 柱层析分离, 是为了避免大体积透析, 但此时 GSH-Px 并不

被吸附, 而随 30% (NH₄)₂SO₄ 洗下, 当洗脱液加少量 (NH₄)₂SO₄, 重新上柱于另一个 Phenyl-Sephadex CL-4B, GSH-Px 则被吸附, 30% (NH₄)₂SO₄ 不能洗下该酶。这一现象提示粗提液中可能有某种成分与 GSH-Px 并存, 影响其层析行为, 该成分可能对 Phenyl-Sephadex 的亲性和性优于 GSH-Px, 只有当该成分完全被吸附掉后, GSH-Px 才能较好地被 Phenyl-Sephadex 所吸附。

从不同动物不同组织提纯的 GSH-Px, 其催化性质相同, 并均由四个相同的亚基构成, 而其亚基分子量却不完全相同。如大鼠肝 GSH-Px 亚基分子量约 23500^[10], 肺约 21000^[7], 牛红细胞约 20000^[11], 兔肝约 18000^[12], 仓鼠肝约 23000^[9], 本实验结果为 22000, 与前文报道仓鼠肝亚基分子量基本相符。

参 考 文 献

- [1] Mills, G. C. and Randall, H. P.: *J. Biol. Chem.*, 1958, **232**, 589.
- [2] Tappel, M. et al.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, **B73**, 945.
- [3] Bradford, M.: *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248.
- [4] Awasthi, Y. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, 5144.
- [5] Nakamura, W. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, **358**, 251.
- [6] Little, C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 3632.
- [7] Chiu, D. T. Y. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, **445**, 558.
- [8] Tappel, A. L.: *Am J Clin. Nutr.*, 1974, **27**, 960.
- [9] Chaudiers, J. et al.: *Arch Biochem. Biophys.*, 1983, **226**, 448.
- [10] Yoshimura, S. et al.: *Bioem. Biophys. Acta*, 1980, **621**, 130.
- [11] L. Flohe, et al.: *Physiol. Chem.*, 1971, **352**, 151.
- [12] 韩珉等: «生物化学与生物物理学报», 1986, **18**, 436.

[本文于 1988 年 8 月 20 日收到]

(上接第 398 页)

80, 1830.

- [2] Peter. Setlow: *Methods in Enzymology*, 1974, **29**, 3.

- [3] Fritz M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1972, **67**, 375.
- [4] Aaron Bendich: *Methods in Enzymology*, 1957, **3**, 715.

[本文于 1988 年 8 月 22 日收到]