

体外重组得到了重组质粒 pCB。重组质粒带有四环素、氨基苄青霉素和卡那霉素耐药标记,分离纯化的 pCB 质粒具有转化活力。琼脂糖凝胶电泳图谱说明 pCB 质粒包含有质粒 pBR 322 和 pCR1 DNA 片段,其分子大小应为 pBR322 DNA 分子和 pCR1 DNA 分子量之和,电镜观察也与电泳结果相符,证明质粒 pCB 是质粒 pBR 322 和质粒 pCR 1 的重组体。

近年来, DNA 重组技术已有大量报道^[4],我们在构建重组质粒 pCB 时,作了一些改进。质粒分离纯化主要采用了 Clewell^[5] (1972) 报道的方法得到清裂解液,结合甲酯化白蛋白硅藻土柱分离得到较为纯化的质粒 DNA,方法比较简便。Mandel^[6] (1970) 用 CaCl_2 处理受体菌得到感受态细菌,这一方法已在 DNA 重组工作中普遍采用。但因在 H1 生长培养基中,受体菌生长较差。近年来文献中已有报道用 LB 培养基代替 H1 培养基^[7]。我们用 PBY 培养基也得到了较好的转化效果。转化过程完成后,细菌

在含抗菌素浓度较低的 PBY 培养基中扩增 24 小时,这样不但能减少带非重组质粒的细菌的比例,而且可以扩增带重组质粒的转化体。我们认为这对带重组质粒的转化体的选出是有利的。总之,本文报道的质粒重组方法简便,效果较好。

电镜照片由我所戴培梓同志制作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Bahl, C. P., Mariani, K. J. et al.: *Gene*, **1**, 81—92, 1976.
- [2] 敖世洲,王二力、高美华、沈卫英:《生物化学和生物物理学报》,待发表。
- [3] Tanaka, T., Weislum, B.: *J. Bacteriol.*, **121**, 354—362, 1975.
- [4] Sinsheimer, R. L.: *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 415—438, 1977.
- [5] Clewell, D.B.: *J. Bacteriol.*, **110**, 667—676, 1972.
- [6] Mandel, M., Higa, A.: *J. Mol. Biol.*, **53**, 159—162, 1970.
- [7] Cohn, R. H. et al.: *Cell*, **9**, 147—161, 1976.

[本文于 1979 年 5 月 18 日收到]

用 T_4 RNA 连接酶连接两个四核苷酸 AGAG 和 pGUCU

申同健 杨岐生 陆传宗

(中国科学院生物物理研究所)

自从发现 T_4 RNA 连接酶催化寡核苷酸片段之间的连接反应^[1-3]以来,它在核酸合成方面的应用日益广泛。由于它催化合成的产率较高,没有显著的逆向降解反应,不要求模板,所以是很有希望的工具酶。然而,迄今为止,用它成功地连接的核糖核酸片段,接点处的核苷酸多半是腺嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸^[1-4],含有鸟嘌呤核苷酸的例子较少。

在我们合成酵母 tRNA^{ala} 第 42—49 核苷酸片段工作中,需要将四核苷酸 AGAG 和 pGUCU 相连接,接点两侧的核苷酸恰好都是鸟嘌呤核苷酸。当时还未见用 T_4 RNA 连接酶成功地连

接此种接点的报道。我们在初步工作中发现,在通常 T_4 RNA 连接酶的反应条件^[1-4]下不能有效地连接这个接点,而当降低反应温度后连接却进行得相当顺利,可以获得较高的产率。

材 料 和 方 法

四核苷酸 AGAG^[5],四核苷酸 GUCU^[6]均由本室三、四组提供。 T_4 RNA 连接酶先后由本室、上海连接酶制备组、北京大学和北京连接酶制备组提供。 T_4 多核苷酸激酶由上海细胞研究所、上海生物化学研究所提供。 γ - ^{32}P -ATP 按 Schendel 法^[7]制备,比放射性在 10^8 — 10^9 cpm/

μmole 范围内,由本室提供。

$^{32}\text{pGUCU}$ 制备 120 微升反应液中,含 $10\text{D}_{50}\text{GUCU}$, 60 nmole $\gamma\text{-}[^{32}\text{p}]\text{-ATP}$, 0.1M tris-HCl 缓冲液 (pH7.6), 10 mM MgCl_2 , 20mM DTT (二巯基赤藓醇) 和 50 单位 T_4 多核苷酸激酶。37°C 保温 15 分钟后,全部点在 Whatman 3MM 滤纸上,室温下行层析 18 小时,层析系统为正丙醇:浓氨水:水 = 55:10:35 (V/V) 或 95% 乙醇:1M 乙酸铵 = 6:4 (V/V), 滤纸吹干,叠在 X-光底片上曝光 15—30 分钟,对照底片将纸上移动最慢的放射性区带剪下,用重蒸水洗脱(若用乙醇-乙酸铵层析则须先在水乙醇中浸泡去盐),减压蒸干即得 $^{32}\text{pGUCU}$ 。

同系层析 层析板为 20 厘米 $\times$ 10 厘米及 20 厘米 $\times$ 5 厘米,按文献^[8]制备。展层系统或按 Brownlee 的混合物 C^[8],但把水解时间延长至 1 小时,或按 Wu. R 的同系混合物 6^[9] 制备。染料为 1% 的品红、二甲苯蓝和橙黄 G 的混合溶液。

AGAG 和 $^{32}\text{pGUCU}$ 的连接反应 除另外注明外,实验反应条件是: 5 微升反应液中,含有 10 nmole AGAG, 0.2 nmole $^{32}\text{pGUCU}$, 50mM tris-HCl 缓冲液 (pH 8.6) 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0.1 微克/微升牛血清白蛋白, 0.1 mM ATP 和 0.2 单位 T_4 RNA 连接酶, 7°—10°C 保温 24 小时。对照管不加 RNA 连接酶。

连接产物接点 5'-侧核苷酸的鉴定 即毗邻分析。将层析板上产物点纤维素粉取下,用 95% 乙醇洗去尿素,用尽量少 1.5M NH_4HCO_3 洗脱产物,减压抽干去盐。0.3N NaOH 37°C 水解 18 小时,取适量碱解液样品点在滤纸上走电泳。(pH 3.5 0.03M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 20 伏/厘米 2 小时) 电泳后在紫外灯下标出紫外吸收点,对 X-光底片曝光 2—3 天,或直接测定纸上各段放射性。

底物 5'-末端核苷酸鉴定 将层析板上底物 ($^{32}\text{pGUCU}$) 点同上处理。

实验及结果

连接产率与温度和时间关系 37°C 反应

AGAG 和 pGUCU 的连接效果很差,甚至无法检出连接产物;改用较低温度则产率有显著提高。如图 1 所示, 10°C 保温 24 小时产率可达 70—80%; 室温 (22°C 左右) 反应速度虽快,但产率稍低。图 2 表示 24 小时内的产率和温度的关系。

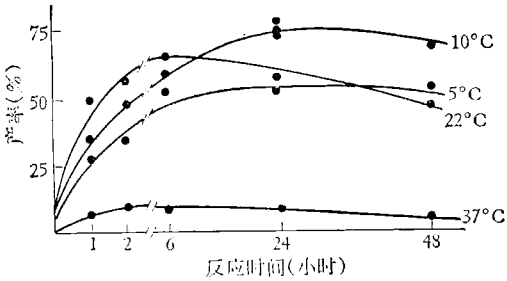


图 1 不同温度下反应时间与产率关系

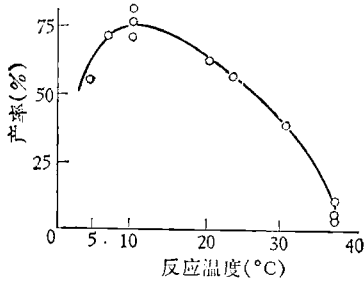


图 2 不同温度下 24 小时连接产率

pH 与连接产率的关系 文献报道 RNA 连接酶反应最适 pH 为 7.5—8.0, 后又发现 pH 8.2—8.3 对提高合成产率有利。在我们实验条件下,连接产率以 pH 8.6 最高, pH 7.0 与 9.0 产率相似, 整个 pH-产率曲线的不对称表现相当明显 (图 3)。

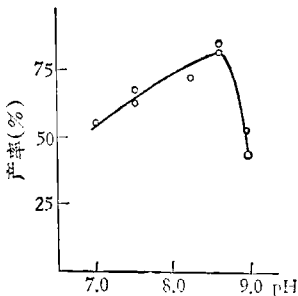


图 3 pH 对连接产率的影响

Mg⁺⁺、Mn⁺⁺ 离子及盐类对产率的影响

已知 RNA 连接酶绝对需要 Mg⁺⁺[5]。对两个四核苷酸的连接, Mg⁺⁺ 浓度在 10—50 mM 间对产率无大影响。加入 Mn⁺⁺ 不能提高产率, 也不能代替 Mg⁺⁺ (表 1)。

表 1 MnCl₂ 对连接反应的影响

MgCl ₂ mM	0	0	10	10	10
MnCl ₂ mM	—	30	—	10	30
连接产率%	—	0.9	81.3	71.0	66.9

表 2 盐类对连接产率的影响

盐	相 对 产 率 %			
	0	0.01M	0.04M	0.10M
NH ₄ HCO ₃	100	90.2	88.1	62.8
NaCl	100	90.1	—	60.8
CH ₃ COONH ₄	100	83.3	73.9	98.3

由表 2 可见, 几种盐类对反应都有不利的影响, 其中尤以乙酸铵为甚。

RNA 连接酶量的影响 在我们所使用的底物浓度范围内, 酶量超过 0.08—0.1 单位/5 微升产率不再随酶量增加而增加, 酶量大于 0.8 单位/5 μl 产率则明显下降, 这主要由于降解变得严重所致。由于酶制剂中难免杂有微量降解酶, 所以不宜过分提高酶量。通常对于每 n mole ³²pGUCU 底物, 我们加入酶量为 10 单位。

底物 ³²pGUCU 浓度对连接产率的影响

由图 4 可见, 产物随 ³²pGUCU 浓度增加而增加, 但按产率计算则底物浓度以 40—100 μM 为佳。

连接产物的鉴定 酶反应混合物保温后, 同系层析板上出现新的移动较慢的放射性点, 就是连接产物。不加酶的对照管保温后不出现此点, 其位置如图 5 所示。有时 ³²pGUCU 制品中残留少许 γ-[³²p]-ATP, 或贮存时有些降解, 则在板上端相当二甲苯蓝位置和底物点上方分

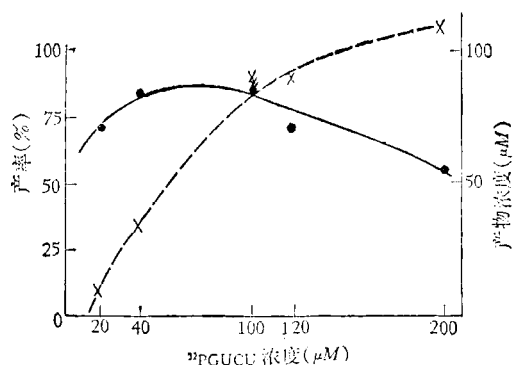


图 4 ³²pGUCU 浓度与连接产率的关系

[随 ³²pGUCU 浓度增加, AGAG、ATP 及连接酶量亦相应有所增加]

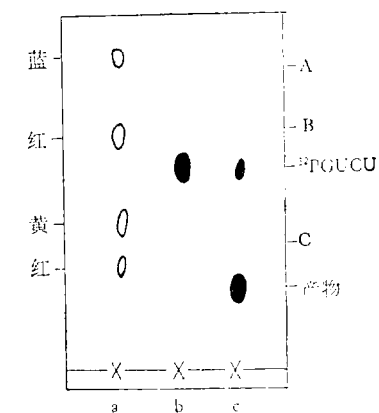


图 5 连接产物同系层析图

a. 指示染料 b. 对照(不加酶)放射性点位置
c. 反应混合物放射性点位置。

别出现放射性点(相当图 6A、B 位置)。由于酶制剂中杂酶的作用底物和产物有时也会稍有降解, 在底物和产物点上方分别出现放射性点(相当图 5B、C 位置)。这些杂点在位置、强度上都很容易与产物、底物区分开, 不致影响实验结果的分析。

产物连接点核苷酸的鉴定结果如图 6 所示。产物碱解后电泳只得到一个放射性点, 位置与 GMP 重合, 可见接点的 5'-侧是 GMP。底物碱解后电泳也只得到一个放射性点, 与 GDP 部分重合而稍超前, 为进一步检定, 用 T₄ 多核苷酸激酶与 γ-[³²p]-ATP 和 3'-GMP 反应制备了少许 ³²pGp。将它与底物碱解物同时电泳, 结果二者放射性点位置完全重合(图 7)。可见底物 ³²pGUCU 的 5'-端确是 GMP。以上结果证明

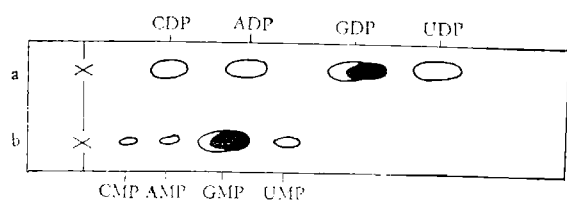


图6 连接点分析电泳图

a. 底物降解, 加四种 Dp 为载体。 b. 产物降解, 点样量较多, 加 ^{32}P -GMP 为载体。其它小紫外吸收点是同系混合物中 RNA 降解产生的单核苷酸。

黑色点表示放射性点位置, 圈表示紫外吸收点位置。

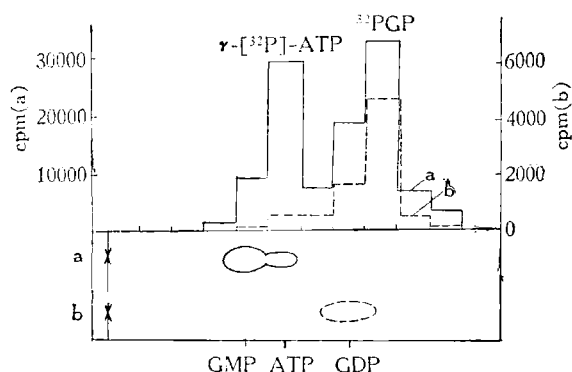


图7 底物降解产物与 $^{32}\text{PpGp}$ 电泳位置比较

a. 为制备 $^{32}\text{PpGp}$ 样品, b. 为底物降解物, 加入 GDP 为载体。

上图折线表示纸上各段实测放射性

下图为纸电泳紫外吸收点的位置

连接产物的接点 5', 3' 两侧都是鸟嘌呤核苷酸, 也就是说, T_4 RNA 连接酶确实将两个四核苷酸 AGAG 和 pGUCU 通过 G-G 接点连接起来了。

讨 论

核糖核酸人工合成工作中, 鸟嘌呤核苷酸间的连接一向颇为困难。过去常用的工具酶如多核苷酸磷酸化酶, RNase T_1 , RNase N_1 等催化 G-G 连接的产率都很低。工作结果表明, T_4 RNA 连接酶可以将两个寡核苷酸片段通过 G-G 相连接, 且产率较高。

实验中发现较低温度下的连接效果远较文

献所报道的 37°C 为佳。这可能与所连接片段和接点的结构特点有关, 也可能与 RNA 连接酶作用特点有关, 甚至可能仅仅是由于低温延缓了酶的失活速度, 从而增加了酶的有效作用时间。

由 AGAG 和 pGUCU 所连接的产物, 从层析位置和接点分析看, 都与 AGAGGUCU 八核苷酸相符。因为所用的磷供体 $^{32}\text{PpGUCU}$ 3'-末端未予保护, 为防止其自身连接, 受体一般过量 40-50 倍。若将其 3'-端适当保护, 可望大幅度降低 AGAG 的浓度^[3]。我们现用的连接酶尚杂有微量降解酶。如能将其除净, 则可试用更高的酶量进行反应, 连接产率还可能进一步提高。

本工作所用 AGAG 由谷成珍、蒋美岩、陈伟仪同志参与制备, GUCU 由仲如、高波宁同志制备, γ - ^{32}P -ATP 由华陵、王贵海等同志提供, 谨此一并致谢。

注: 本工作完成后, Vhlenheck 报道低温可能对连接反应有利 (*Biochem.*, **17**, 2069, 1978) 并得知日本在人工合成 tRNA^{m⁶} 工作中也有通过 G-G 连接的二个寡核苷酸片段 (Ohtsuka, E. et al.: *Nucleic Acids Res.*, Special publication, **3**, 117, 1978)。

参 考 文 献

- [1] Walker, G. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72** 122, 1975.
- [2] Kaufmann, G. and Iittaner, U. Z.: *ibid.*, **71**, 3741, 1974.
- [3] Kaufmann, G. and Kallenbach, N. R.: *Nature*, **254**, 1975.
- [4] 中国科学院上海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, 10 期, 193 页。
- [5] 中国科学院生物物理研究所二室核酸合成组: 《四核苷酸 ApGpApGp》, (待发表)。
- [6] 中国科学院生物物理研究所二室核酸组: 《四核苷三磷酸 GpUpCpU 的合成》, (待发表)。
- [7] Schender, R. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 8319, 1973.
- [8] Brownlee, G. G.: *Determination of Sequences in RNA*, p251, North-Holland Publ. Co., 1972.
- [9] Jay, E. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **1**, 331, 1974.

[本文于 1979 年 10 月 8 日收到]