

ysis, 20, 41, 1971.

- [3] 中国科学院生物物理所一室二组:《生物化学与生物物理进展》, 1975年, 第1期, 第27页。
- [4] Marmur, J. and Doty, P.: *J. Mol. Biol.*, 5, 109, 1962.
- [5] Bergey' S.: *Manual of Determinative Bacteriology* (Ed. by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons), Baltimore, Williams & Wilkins 8th ed, 1974.

[6] Szybalski, W. et al.: *Nucleic Acid Res.*, Band 2, S 332, 1971.

[7] Fasman, G. D.: *Handbook of Biochem. and Mol. Biol.*, 3rd, *Nucleic Acids* Vol. II, Cleveland Ohio, 1976.

[本文于1980年8月30日收到]

从 T₄ 噬菌体突变体感染的大肠杆菌细胞中分离纯化 T₄ RNA 连接酶

中国科学院生物物理研究所二室核酸组生化试剂厂
中国科学院细胞生物研究所三室核酸组
中国科学院生物化学研究所二室核酸组
北 京 大 学 生 物 系

RNA 连接酶首先由 Silber 等^[1]从感染 T₄ 噬菌体的大肠杆菌中发现和分离纯化。这个酶需要 ATP 作为辅助因子, 不仅能催化连接 5' 端磷酸 3' 端羟基的寡核苷酸片段成环状分子, 而且还能把二个寡聚核苷酸片段在 5' 端磷酸, 3' 端羟基间连接起来。一些实验室利用此特性, 把它作为连接核苷酸片段的重要工具。如大塚荣子等在人工合成大肠杆菌甲酰甲硫氨酸 tRNA 中, 先后报道用 RNA 连接酶把化学法合成的核苷酸小片段, 连接成不带稀有碱基的 17 核苷酸, 20 核苷酸, 21 核苷酸等^[2]。我国人工合成核酸协作组, 也使用我们制备的 RNA 连接酶把核苷酸小片段连接成 10 核苷酸, 12 核苷酸, 19 核苷酸^[3]以及 41 核苷酸^[4]。这个酶也可用于较长核苷酸片段的连接, 例如 Kaufman 曾报道用 RNA 连接酶连接苯丙氨酸 tRNA 二个半分子成完整分子。生物物理所二室也用这个酶把拆开的二个酵母丙氨酸 tRNA 半分子连接成完整分子^[5]。另外 RNA 连接酶也能把 3' 5' 二磷酸的单核苷酸加接到另一核苷酸片段上, 因而可以利用以 ³²P 在 3' 端标记。值得注意

的是 RNA 连接酶还可用于无模板的脱氧核糖核酸的连接。

关于这个酶的分离纯化, 国外已有报道^[6,7], 而国内仅有的一篇报道^[8], 且缺少每步纯化的数据, 为此, 将我们几年来分离纯化此酶的工作, 总结成文, 报道如下。

材 料 和 方 法

1. 菌株和噬菌体 大肠杆菌 E. coli B (上海植生所噬菌体组提供), 大肠杆菌 CR₆₃, T₄Am N₈₂ × AmE₁₀rcgA (美国纽约州立大学金祖怡教授提供)。

2. DEAE-纤维素 52, 磷酸纤维素 P-11 (Whatman 产品) 葡聚糖 G-100 (Pharmacia 公司产品) 羟基磷灰石与 DNA-琼脂糖 (生物物理所生化试剂厂)。

3. 无载体 ³²P (北京 401 所提供), ³H poly (A) (上海细胞所二室提供)。

4. 大肠杆菌碱性磷酸单酯酶 (上海细胞所提供), 3' 磷酸甘油酸激酶与磷酸甘油酸脱氢酶, 牛血清蛋白 (生物物理所生化试剂厂产品)。

5. CpGpGpA (上海有机所 824 组 提供)。

6. poly (A₂₀) 与多核苷酸激酶 (生物物理所二室和生化试剂厂提供)。

7. β-巯基乙醇, 二巯基赤鲜醇 (BDH 产品)。

8. 超声波发生器 (中国科学院物理所制造), 液体闪烁计数器 YS-1 型 (生物物理所产品)。

9. ³²P Pi 的制备: 按照 Bergman 方法进行^[1], 放射性转化率一般大于 70%, 比强为 10⁸ cpm/μmol。

10. [γ-³²P]ATP 的制备: 按照 Glynn 和 Chappell 方法进行, 产品比强一般可达 4×10⁹ cpm/μmol。

11. 焦磷酸法测定连接酶以及酶单位定义, 参照 Weiss 等^[11]; 测定时酶量在 0.01—0.1 单位时, 线性关系好。

12. RNA 连接酶的标准法测活, 参照 Silber 等^[1]。以 [5'-³²P]poly (A₂₀) 为底物, 反应系统为: Tris-HCl pH7.6, 0.05 M, MgCl₂ 0.01M; 二巯基赤鲜醇 0.65mM, ATP 0.01 mM; 牛血清蛋白 0.005%; [5'-³²P]poly (A₂₀) 0.1 n mol RNA 连接酶 200 毫单位, 总体积为 100 微升, 37℃保温 30 分钟。酶单位定义为: 37℃保温 30 分钟后能催化 1 n mol ³²P 转变为抗碱性磷酸单酯酶的酶量定为 1 活力单位。

13. RNase 测定 以 ³H poly (A) 为底物, 在与连接反应相同的系统中与酶作用, 然后用纸片法测定酸不溶的 ³H-poly (A) 量, 与不加酶的空白试验比较, 其间的放射性差数, 即表示酶中 RNase 杂有情况。

14. 蛋白测定, 以 O. D₂₈₀ 表示。

结 果

1. T.RNA 连接酶的分离纯化

(1) 大肠杆菌菌体制备 采用 M₉ 培养基, 37℃振荡培养, 菌细胞数达 10⁹/毫升时, 进行噬菌体感染, 感染幅度为 4—5:1, 感染后继续振摇 60—90 分钟, 然后立即冷却, 用 17000 转/分连续离心收集菌体, 收集后的菌体存放于

-20℃的冰箱中保存。

(2) 粗酶液提取 取制备好或贮存的菌体 170 克, 先解冻, 并悬浮在缓冲液 A (Tris-HCl pH 7.6 0.05 M, 0.0001 M EDTA β-巯基乙醇 0.01M) 中, 体积与菌重比为 4:1, 用玻璃匀浆器制成匀浆液, 再用超声破碎 3.5—4 分钟, 离心 (17000 转/分) 30 分钟, 所得上清液即为粗酶液。

(3) 硫酸链霉素沉淀 取上述粗酶液, 按体积加入 1% (W/V) 的硫酸链霉素, 进行沉淀。在加入时, 先把按 1% 计算得的量配成 5% 水溶液, 然后边滴加边搅拌, 在 45 分钟内加完后再继续搅拌 15 分钟, 10,000 转/分离心 20 分钟, 留取上清液。

(4) 硫酸铵沉淀 取上述上清液, 按体积用 55% 饱和度的硫酸铵量, 进行沉淀。硫酸铵须预先研细, 然后边搅拌边加入, 于半小时内加完, 再继续搅拌半小时, 并在 -4℃ 冰箱中存放过夜, 使之沉淀完全。第二日, 用 10,000 转/分离心 20 分钟, 弃去上清液, 把沉淀溶于含 0.1 M KCl 的缓冲液 A, 然后对缓冲液 A 进行透析。

(5) DEAE-纤维素 (DE-52) 柱层析 柱体积为 1200 毫升。上样前先用缓冲液平衡。洗脱前用三个柱体积缓冲液 A 淋洗。接着用含 0—0.5 M KCl 缓冲液进行梯度线性洗脱, 出现

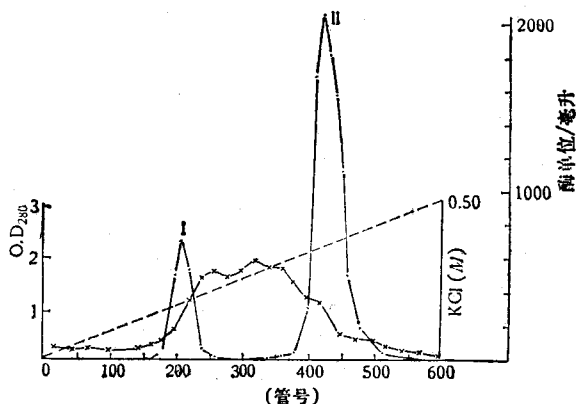


图 1 DEAE-纤维素 (DE-52) 柱层析图

柱体积: 6.0×36 厘米, 用含 0—0.5 M KCl 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱, 洗脱液总体积为 7000 毫升, 流速 10 毫升/3.5 分。每份 10 毫升。

—X—X—X—X—O.D.₂₈₀ - - - - - 酶活力
 - - - - - KCl 浓度

二个活力峰(图 1),第一个峰为 DNA 连接酶,第二个峰为 RNA 连接酶;收集第二峰,用 55% 饱和度的硫酸铵沉淀浓缩,再用 0.1M KCl 缓冲液 A 溶解,经透析即得浓酶液。

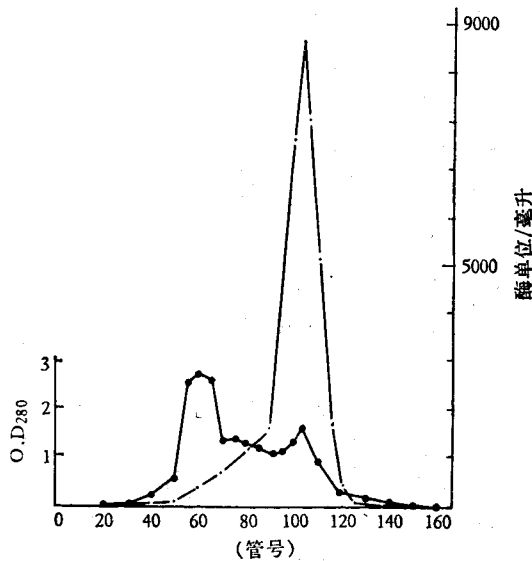


图 2 葡聚糖凝胶 G-100 柱层析图

柱体积: 4.5×60 厘米, 用缓冲液 B 平衡及洗脱, 流速 5 毫升/10 分。

—x—x—x—O.D.₂₈₀ - - - - - 酶活力

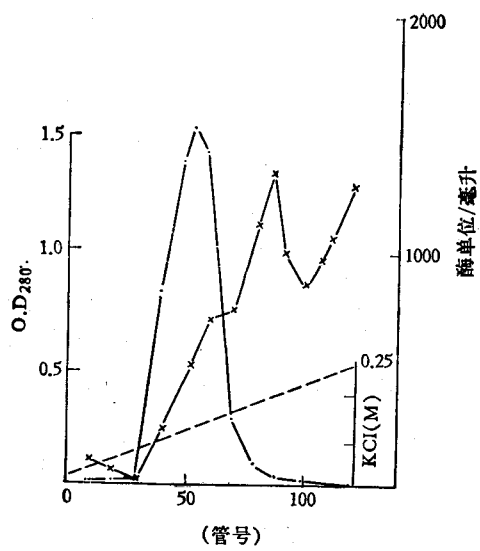


图 3 羟基磷灰石柱层析图

柱体积: 2.2×24 厘米, 用缓冲液 C 平衡、淋洗, 以 0.02—0.25 M 磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱。流速为 3.5 毫升/15 分, 洗脱总体积 600 毫升。

—x—x—x—O.D.₂₈₀ - - - - - 酶活力
- - - - - KCl 浓度

(6) 葡聚糖凝胶 G-100 过滤 柱体积 1000 毫升 (4.5×60 厘米) 经缓冲液 B (缓冲液 A 中加 10% 甘油, 50 μ M ATP) 平衡洗脱。得一活力峰(图 2) 收集之, 再对缓冲液 C (磷酸钾缓冲液 20mM, pH 7.4, 50 μ M ATP, 10% 甘油) 透析。

(7) 羟基磷灰石柱层析 柱体积 50 毫升。用缓冲液 C 平衡。磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 收集活力峰, 共得 62 毫升 (图 3)。

(8) DNA-琼脂糖柱层析 柱体积 550 毫升, 用缓冲液 B 洗脱, 收集活力峰, 总活力为 14,000 单位, O.D.₂₈₀ 为 11.3 (图 4)。

(9) DEAE-纤维素浓缩柱 柱体积 2.5 毫升 (1.0×3.2 cm), 经缓冲液 A 平衡后上样, 再用缓冲液 A 淋洗, 用含 0.6 M KCl 缓冲液 A 洗脱, 共得 20 毫升酶液, 最后对含 50% 甘油的缓冲液透析浓缩, 得最后产品的体积为 6.5 毫升, 比活为 3238 单位/O.D.₂₈₀, 酶浓度为 2100 单位/毫升。自硫酸铵沉淀以下各步纯化的结果总结于表 1。

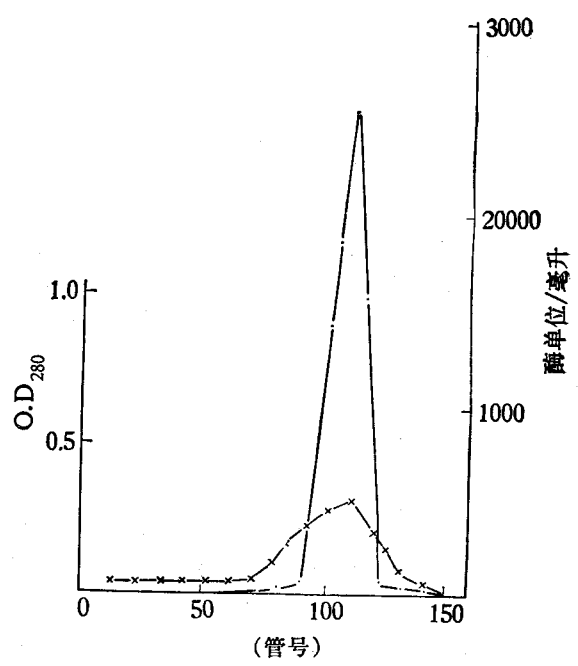


图 4 DNA-琼脂糖柱层析图

柱 4.2×40 厘米, 经缓冲液 B 平衡后, 用缓冲液 B 洗脱, 流速 17 毫升/小时。

—x—x—O.D.₂₈₀ - - - - - 酶活力

表 1 T,RNA 连接酶的纯化结果

步 骤	总活力 ×10 ⁴	总蛋白 (O.D ₂₈₀)	比活单位 /O.D ₂₈₀	回收率%
硫酸铵沉淀	3.84	5326	18	100
DEAE-纤维素柱	3.34	549.4	51	87
葡聚糖 G-100 柱	2.4	184	130	63
羟基磷灰石柱	1.5	42	357	39
DNA-琼脂糖柱	1.4	11.3	1239	37
DEAE-纤维素浓缩 柱与甘油反透析	1.36	4.2	3238	36

2. 酶中 RNase 的检查

采用二种底物进行试验,第一种为 ³H-poly (A),用纸片法(操作见“材料和方法”)。几批酶产品测定的结果见表 2。可以看出,用 poly (A)为底物已看不到 RNase,但在连接试验中,

表 2 以 ³H poly (A) 为底物测定 RNA 连接酶内的 RNase

连接酶 产品批号	空白(不加 酶保温) poly (A) 的 cpm	加酶保温后的 poly A		降解率 %
		加酶量	cpm	
79116	16902	8.2 单位	17660	0
79116	12267	21.5单位	12131	1
79319	21995	7.2单位	21958	0
80312	36245	12单位	36824	0

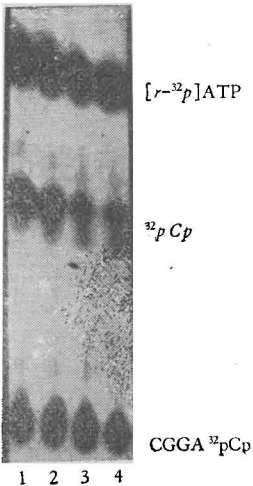


图 5 T,RNA 连接酶连接 CGGA + ³²PCp 连接产物的同系层析图

反应系统总体积 100 微升含 Tris-HCl pH 8.6, 0.05M, MgCl₂ 0.01M 二巯基赤藓醇 0.01M, ATP 1.5mM, 牛血清蛋白 10 微克/毫升, ³²PCp 0.8n mol, CGGA 1 n mol [γ -³²P]ATP, 1.5n mol, 待测样品的 RNA 连接酶, 1 号管为 0.2 单位, 2 号管为 0.5 单位, 3 号管为 0.75 单位, 4 号管为 1.0 单位。

尤其是连接较长的寡核苷酸片段时,仍发现产物中有被降解的杂点,因此再用另一种底物,四核苷酸 CGGA 与 ³²PCp。反应条件、产物分析检查方法与寡聚核苷酸片段连接的相同,结果如图 5 所示。从图 5 可以看出,在 ³²PCp 与 CGGA 连接反应中,除连接产物外,有痕迹量的降解杂点,但降解率在 2% 以下。另外聚丙烯酰胺凝胶电泳也呈现一条带(图 6)。

讨 论

1. 酶的质量与使用 我们分离纯化的 RNA

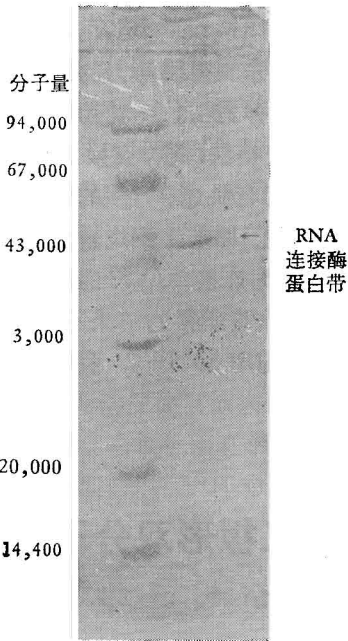


图 6 RNA 连接酶蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

聚丙烯酰胺 10%, SDS 0.1%,酶蛋白加样量 10 微克(按 1O.D₂₈₀ 为1毫克折算)电泳条件: 电泳液 Tris 6 克/升, 甘氨酸 28.8 克/升, SDS 0.1%, pH8.3, 电压: 150伏, 时间: 5—6 小时,标准样品蛋白系 pharmacia 公司提供。用汤马氏兰 0.05%染色。

连接酶主要在人工合成酵母丙氨酸 tRNA 中使用,因此要求对 RNase 掺杂量越少越好,连接产率越高越好。在检查 RNase 时,用 ³H-poly (A) 为底物测不出 RNase 活力(表 2),因此在连接片段上使用很好。但随着连接片段的加长,所含核苷酸种类的不同,在连接中出现降

解,这样就要求用更灵敏的方法测定 RNase。为此我们采用 CGGA 片段与 ^{32}PCp 为底物进行测定,确实发现有轻微的降解。可以设想,随着酶纯化方法的改进,可以接近做到以 CGGA 单加 ^{32}PCp 为底物时降解很少(图 5)。但是若换另一片段进行连接,可能又会出现比较严重的降解。看来随着连接片段的生长,对酶的质量和测定 RNase 方法的要求,会越来越高,因此深入研究酶的纯化和检测 RNase 的方法就十分必要。但在另一方面对酶的使用条件必须给予充分的重视,尤其是连接产率方面,也许对不同片段的连接,需要不同的连接条件,才会得到高的连接率。

2. 二种方法测得酶活力的换算: RNA 连接酶测活有二种方法,一种为腺三磷—焦磷酸(ATP-PPi)交换法(简称交换法)^[10],另一种为标准法^[11];前者有快速、方便的优点,但所测得的为交换单位。标准法测定较为繁琐,需要制备底物,测得为连接单位。但由于测活条件限制不严,不同作者所得的结果不好比较;例如有的用 5:1,有的用 50:1^[11]。我们研究了这二个

测活方法^[10],通过试验确定了一个统一的测活条件,以及二种测活方法的比值,即交换单位:标准单位=20:1。这样,在测活中不论采用那一个方法,都可以有一个相互换算的标准。

参 考 文 献

- [1] Silber, R. V. G. Malathi et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 3009, 1972.
- [2] Ohtsuka, E. et al.: *Nucleic Acid Research, Special No. 3*, 1978.
- [3] Collaboration Group of Nucleic Acid Synthesis, *Joint Symposium on Nucleic Acid & Protein*, 1979.
- [4] 人工合成核酸协作组1979(内部资料)。
- [5] Wang Guihai, et al.: *Joint Symposium on Nucleic Acid & Protein*, 1979.
- [6] Last, J. A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 167, 1976.
- [7] Higin, N. P. *Nucleic Acid Res.*, **4**, 3175, 1977.
- [8] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸组:《微生物学报》, 1978 年, **18**, 210—219.
- [9] Bergmann, F. H. *Methods in Enzymology*, **5**, 708, 1962.
- [10] 华陵等:《化学试剂》, 1980 年, 第一期。
- [11] Weiss, B. et al.: *J. Biochem. Biol.*, **243**, 4543, 1968.

[本文于 1980 年 7 月 16 日收到]

人工板形双分子脂膜的制备及其厚度和电特性的测定

孙纹琦 陈玉玲 谈曼琪

(中国科学院生物物理研究所)

近年来采用各种不同的材料和不同的技术获得了人工双分子脂膜。这种人工膜如用不同的手段加以修饰,还可模拟各种生物膜的功能。在人工双分子膜上所进行的试验已得到许多在整体实验或某些离体实验所不能获得的结果,因而它已成为研究生物膜功能的一种有效手段。

不同的作者由于他们的研究目的不同,所选取的材料和形成方法也各有不同,但所形成的人工双分子脂膜都有以下类似天然膜的基本特征,如:能在水介质中形成厚度为 100 Å 左

右的脂双层;膜的两边可以是不对称的介质;有类似于天然膜液态烃的特性;膜上可附加其他材料,使其改变原有的特性而适合于各种生物膜的研究,诸如机械性的改变,电性的变化,产生光电效应以及具有对物质的主动运输特性等。

人工双分子脂膜的形成液可以用有机溶剂直接从生物材料中提取,如由大脑中提取的脑磷脂与含蛋白脂质的混合脂;大豆中的磷脂,以及植物叶中的叶绿体提取液等^[1]。也可以是溶于有机溶剂的双亲性脂,这种脂是纯化的脂或