

ATP:RNA 腺苷酰转移酶的纯化及其应用

戚德芳 潘铁城 曹功杰 祁国荣

(中国科学院上海生物化学研究所)

绝大多数真核细胞 mRNA 的 3'-端带有一段多聚腺苷酸即 poly(A) 的结构,在基因工程的研究中经常以这样的 mRNA 作为模板,以寡聚(dT)₁₂₋₁₈ 作为引物,通过反转录酶的作用得到互补于该 mRNA 的 DNA (即 cDNA),再经克隆增殖等技术可得到相当量的基因,从而能进一步进行各种研究。近年来这些技术也常用于病毒 RNA 基因组的研究。Devos^[1,2] 等人利用 ATP:RNA 腺苷酰转移酶使 3' 端无 poly(A) 的病毒 RNA 基因加上一段 poly(A),以此作模板再通过反转录克隆等技术,从了解 DNA 入手进而弄清了 RNA 病毒的一级结构和分子的其它特征。Wittig^[3] 也利用此酶使 *E. coli* tRNA^{gly} 的 3' 端加上 poly(A),从而得到 cDNA,通过测定 cDNA 的排列顺序而确定了 *E. coli* tRNA^{gly} 的一级结构。

我们从 *E. coli* B/r 菌株纯化了 ATP:RNA 腺苷酰转移酶,并利用该酶使蓖麻蚕后部丝腺体 t-RNA、酵母 t-RNA 及新疆大麦条纹花叶病毒 poly(A)⁻-RNA 等的 3' 端接上 poly(A) 片段,测定了所连接的 poly(A) 的长度,并以各种 poly(A) 化的 RNA 为模板经反转录酶作用得到了相应的 cDNA。

一、材料与方法

³H-dTTP(34ci/mmmole) 由中国医学科学院放射医学研究所提供;³H-ATP(~15ci/mmmole) 由北京原子能研究所提供;四种脱氧核苷三磷酸、Y-tRNA 以及 oligo(dT)₁₂ 系本所东风生化试剂厂产品;BSMV-poly(A)⁻-RNA 是中国科学院微生物研究所谢德贞等提供^[4];RMV-RNA 由孙玉昆同志赠送;*E. coli* B/r 购自北京微生物研究所;水稻胚 mRNA 由陈克勤同志赠送。

1. ATP:RNA 腺苷酰转移酶的制备

E. coli B/r 菌株的培养与酶的制备主要参考 Sippel^[5] 的方法。酶的整个制备过程(见图 1)都在 4℃ 进行。缓冲液 A:0.05M Tris-HCl

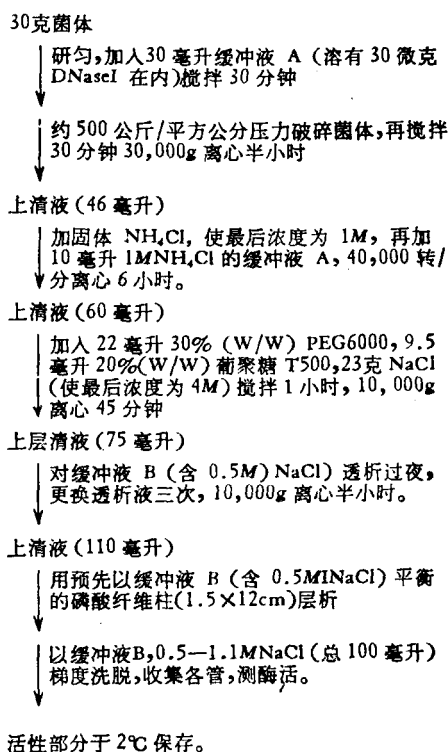


图1 ATP:RNA 腺苷酰转移酶的制备

注: 本文采用下列简写:

BSMV-XJ: 新疆大麦条纹花叶病毒

RMV-RNA: 长叶车前花叶病毒 RNA

AMV: 鸟类成髓细胞增生症病毒

poly(A)⁻-RNA: 3'-端不含 poly(A) 的 RNA

poly(A)⁺-RNA: 3'-端含 poly(A) 的 RNA

oligo(dT): 寡聚胸苷酸

S-tRNA 及 S-5sRNA 蓖麻蚕后部丝腺体 tRNA 及 5S-RNA

Y-tRNA: 酵母 tRNA, DNaseI: 脱氧核糖核酸酶 I

B.B.: 溴酚蓝

x.c.: 二甲苯蓝

(pH7.9), 10mM MgCl₂, 0.2M KCl, 1mMEDTA, 4mMDTT, 5% 甘油; 缓冲液 B: 0.025M Tris-HCl(pH7.9), 1mM EDTA, 5% 甘油。

酶的活性测定按 Sippel^[5] 的方法加以简化, 将 ³H-ATP 转成能被 DE81 滤纸吸附的 ³H-poly(A) · RNA, 50 微升反应体积中含有 50mM Tris-HCl(pH7.9), 10mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 5mMDTT, 0.3M NaCl, 0.2mM ³H-ATP(10μci), 约 10 微克 RNA 及一定量的酶。37℃ 保温 10 分钟后, 将全部反应液转至 DE81 滤纸片上, 然后以 5% Na₂HPO₄ 洗纸片五次, 每次每片 4 毫升, 再以蒸馏水洗二次, 干燥后进行放射性计数。在同样条件下以不加酶作对照。

2. poly(A)⁺-RNA 的制备

以 ATP:RNA 腺苷酰转移酶作用于不同来源的 RNA, RNA 的浓度为 50—200 微克/毫升, 37℃ 保温 10 分钟后, 加入三倍体积的乙醇于 -20℃ 放置一小时以上, 10,000 转/分离心 10 分钟, 沉淀溶于 0.2 毫升含有 0.5M KCl 的 10mM Tris-HCl(pH7.5) 缓冲液中, 使通过 oligo(dT) 纤维素柱(0.5 × 2 厘米) 进行纯化, poly(A)⁺-RNA 吸附在柱上, 而 3'-端未连接 poly(A) 的 RNA 则不被吸附。再以每次 0.3 毫升含 0.5M KCl 的 10mM Tris-HCl(pH7.5) 洗柱二次, 最后用 10mM Tris-HCl(pH7.5) 缓冲液洗脱, 每 0.3 毫升收集一管, 将有放射性各管合并, 再经 Sephadex G-50 柱(0.7 × 20 厘米) 去盐, 合并具有放射性各管, 真空浓缩至干。

poly(A)⁺-RNA 的反转录及 cDNA 的合成按潘铁城^[6]等人的方法进行。

二、结果与讨论

1. 酶的纯化及其作用特性

Sippel^[5] 指出, ATP:RNA 腺苷酰转移酶对离子交换剂的磷酸基团有非常高的亲合力, 而且在较高盐浓度时这种亲合力不被破坏, 在低盐浓度时此酶易以无活性的凝聚体形式沉降, 因此制备时, 一定要维持较高的盐浓度。利用此酶的这种特性, 使得它在 0.5M NaCl 条件下能与绝大多数可溶性蛋白分开。我们用磷酸纤

维素将酶吸附, 然后用 0.5M—1.1M NaCl 进行梯度洗脱, 0.75M—0.85M NaCl 洗脱部分为酶的活性峰。经测定, 制剂中不含有 RNase 活力, 其对一、二价金属离子的要求亦与文献报道相同, 但我们发现 4% 的乙醇可使酶的活性丧失 50% 左右。

我们选用了几种 RNA, DNA 以及人工合成的多聚物作为引物, 观察酶的反应情况, 结果如表 1。从此表可见单链 RNA 是酶的有效引物, 而双链 RNA、DNA 以及人工多聚物不能作为引物使 AMP 聚合。

表 1 使用不同引物时 ³H-AMP 的参入

引 物	参入%*
S-tRNA	100
S-5sRNA	88
Y-tRNA	132
RMV-RNA	100
BSMV-XJ Poly(A) ⁻ -RNA	100
ds-RNA	0
ds-DNA	0
poly-dT	0

* 以 S-tRNA 参入的 ³H-AMP 的 cpm 为 100%。

2. RNA 3'-端所连接的 poly(A) 的长度

我们采用了两种 RNA(BSMV-XJ poly(A)⁻-RNA, Y-tRNA) 进行 poly(A) 化反应, 用 oligo(dT)-纤维素层析柱分离以便除去未接上 poly(A) 的 RNA, 然后用 Sephadex G-50 去盐, 即可得到带有 poly(A) 的 RNA, 再用 ³²P-pCp 作 3' 端标记, 以 RNaseA 和 T₁ 酶共同作用, 最后用凝胶电泳分离测定 RNA 所带的 poly(A) 的长度^[4]。图 2 (见封 2 左下) 即为用 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 poly(A) 长度的放射自显影结果。据此可推算出两种经 poly(A) 化的 RNA, 均连接上 40 个以上的 AMP 残基。我们以水稻胚 mRNA 作对照, 而且与未经 poly(A) 化反应的 BSMV-XJ poly(A)⁻-RNA 进行比较, poly(A) 化以后连接的 AMP 残基数与 mRNA 3' 端带有的多聚腺苷酸数相当, 但 BSMV-XJ poly

(A)⁻-RNA 的 3' 端所带的 AMP 残基在 10 个以下^[4]。这说明 3' 端含有游离 OH 基的单链 RNA 能在此酶的作用下接上 poly(A) 片段,也说明 ATP:RNA 腺苷酰转移酶能使 poly(A) 链沿 3' 端方向延伸。

3. poly(A)-RNA 的反转录

只有 3' 端具有 poly(A) 的 RNA, 在 oligo (dT)₁₂ 引物存在下才能经过反转录酶的作用生成与之互补的 DNA, 我们将经酶作用连接了 poly(A) 片段的 RNA 及未经酶作用的 RNA, 分别进行反转录反应, 结果 (表 2) 表明未经 poly(A) 化的 RNA 基本上不能进行反转录反

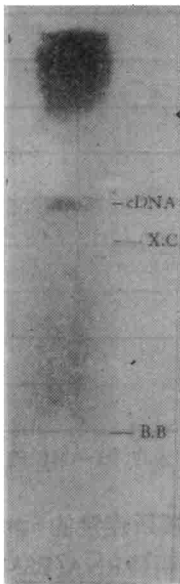


图 3 poly (A) 化后的酵母 tRNA 的 cDNA 的放射自显影
10% 聚丙烯酰胺凝胶 600V, 5mA 3.5 小时。

表 2 一些 RNA 的反转录作用

RNA	³² P-dAMP 参入 cpm
Y-tRNA	470
poly (A)-Y-tRNA	15370
S-tRNA	550
poly(A)-S-tRNA	15050
BSMV-Poly(A) ⁻ -RNA	4220
BSMV-poly(A) ⁺ -RNA	25870

应,而经此酶作用后连接上 poly(A) 的 RNA 在反转录酶作用下,都能使 ³²P-dAMP 有较高的参入,其中 BSMV-XJ poly(A)⁻-RNA 也参入了部分 dAMP,这可能是由于其 3' 端具 10 个以下 AMP 残基。我们用凝胶电泳鉴定了与 Y-tRNA 互补的 DNA 长度。图 3 说明,Y-tRNA-cDNA 含 70 个核苷酸残基。

参 考 文 献

[1] Devos, R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **62**, 401, 1976.
[2] Devos, R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **447**, 319, 1976.
[3] Wittig, B. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1165, 1978.
[4] 谢德贞等:《大麦条纹花叶病毒(新疆株)中多聚腺苷酰 RNA 含量,感染活性及多聚腺苷酸链长分布的测定》(待发表)。
[5] Sippel, A. E.: *Eur. J. Biochem.*, **37**, 31, 1973.
[6] 潘铁城等:《生物化学与生物物理学报》, **15**, 2, 1983.

[本文于 1983 年 6 月 28 日收到]

一种简易的制备和纯化质粒 DNA 的方法

王 年 何永山* 蔡良琬

(中国医学科学院,基础医学研究所,北京)

近年来随着遗传工程的飞速发展,DNA 重组技术被广泛应用,许多实验室在制备一定纯度、产量较高、方法简便的质粒 DNA 方面作了许多工作。国外大多数实验室普遍采用 CsCl 等

密度梯度超离心法^[1,2], 但国内受仪器限制,应用较少。我们比较了 PEG 沉淀质粒 DNA^[3,4,5],

* 吉林省地方病第一防治研究所进修人员。

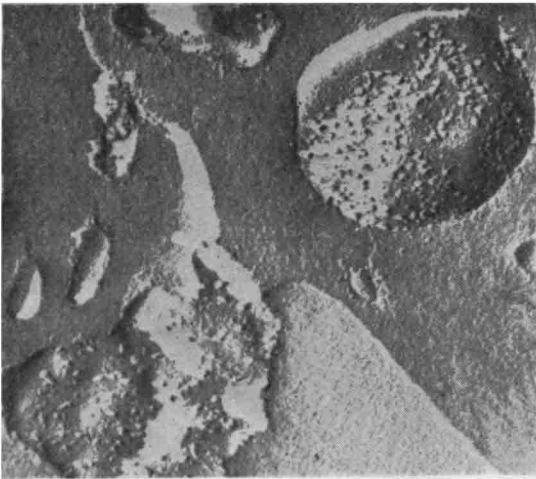


图1 鸡败血支原体 S₀ 菌株细胞膜冰冻断裂复型
膜的断裂面与完整细胞相似 (×100,000)

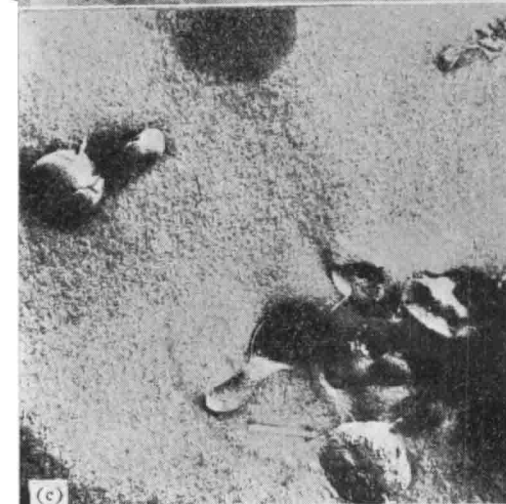


图2 鸡败血支原体 S₀ 菌株细胞膜
冰冻断裂复型电镜图

- a. 对照, 经 50℃ 保温 18 小时
(×27,500)
- b. 用链霉蛋白酶 E 水解(0.5 毫克/
毫升) 50℃ 保温 18 小时
(×29,700)
- c. 用链霉蛋白酶 F 水解(1 毫克/
毫升) 50℃ 保温 18 小时
(×40,900)

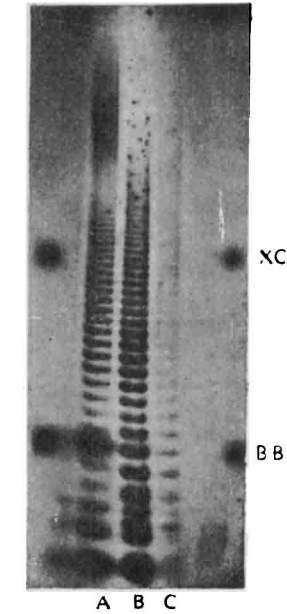


图2 Poly(A) 片段长度的
放射自显影

A: 水稻胚 mRNA
B: Poly(A)-BSMV-RNA
C: Poly(A)-Y-tRNA
20% 聚丙烯酰胺凝胶 22ν/
cm·bmA 17 小时