

大肠杆菌中依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶的提取

上海实验生物研究所三室细胞研究组

在细菌和其他动植物细胞中都普遍存在着一种以 DNA 作为模板,利用四种核糖核苷三磷酸作为底物来合成 RNA 的酶,这种酶叫做依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶[E. C. 2. 7. 7. 6]。从细菌中提取这种酶的方法不少,但以 Chamberlin 和 Berg 以及 Burgess 的方法使用最为普遍。我们主要参照 Burgess 氏的方法以大肠杆菌 K 12 (*E. coli* K 12) 中提取 RNA 聚合酶,并稍加改变。

材料与方 法

1. 溶液配制

缓冲液 I: 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5; 0.01 M $MgCl_2$; 0.2 M KCl; 0.01 M β -巯基乙醇; 0.1m M EDTA; 5% 甘油。

缓冲液 II: 0.01 M Tris-HCl, pH 7.9; 0.01 M $MgCl_2$; 0.1m M EDTA; 5% 甘油; 0.01 M β -巯基乙醇。

缓冲液 III: 0.05 M Tris-HCl, pH 7.9; 0.1m M EDTA; 5% 甘油; 0.01 M β -巯基乙醇。

储存液: 0.01 M β -巯基乙醇; 0.01 M Tris-HCl, pH 7.9; 0.01 M $MgCl_2$; 0.1 M KCl; 0.1m M EDTA; 50% 甘油。

所有缓冲液都用重蒸馏水配制。

2. 菌体培养

将大肠杆菌 K 12* 接种在每升含有 16 克蛋白胨、10 克酵母浸出液和 5 克 NaCl 的培养基中,于 37°C 用摇床小量培养,或用发酵罐大量培养。离心收集对数生长期的菌体,储存于一 40°C 冰箱中备用。

3. RNA 聚合酶的提取

所有操作均在 4°C 进行。

(1) 菌体的破碎和 DNase 处理 取 150 克冰冻的大肠杆菌 K 12,用 200 毫升缓冲液 I 溶解,然后加入新鲜配制的 DNase 2 毫升(1 毫克/毫升缓冲液 I),用 MSE 超声波破碎器分批破碎菌体。每次操作菌液 50 毫升,超声处理 6 分钟(频率 20 千周,工作电流 ± 1.7 安)。菌体的破碎情况可用相差显微镜和电镜检定。待菌体破碎之后再加入 DNase 2 毫升,在 4°C 之下继续酶处理 2—4 小时。

经上述处理的菌体先用低速离心除去粗的细胞碎片,再用 MSE-40 离心机, No. 2406 转头,于 30,000 转/分离心 90 分钟以进一步除去细胞碎片和核糖核蛋白体。也可不经过低速离心,直接用 30,000 转/分一步去除细胞碎片和核糖核蛋白体沉淀。

(2) 硫酸铵分级沉淀 在冰浴中每 100 毫升上述高速离心上清液加 23.1 克固体硫酸铵,使达到 33% 饱和度,同时滴加 1 N NaOH,使溶液不低于 pH 7。在冰浴中继续搅拌 30 分钟之后,用 MSE-40 离心机, No. 2406 转头,于 20,000 转/分离心 20 分钟,收集上清液。每 100 毫升这种 33% 饱和度的上清液中再加 10.75 克固体硫酸铵,使达到 50% 饱和度。继续搅拌 30 分钟之后离心收集沉淀。然后将沉淀悬浮于

* 菌种由上海植物生理研究所微生物室提供。菌体培养得到上海植物生理研究所和上海药物研究所抗菌素室同志热情帮助,特此致谢。

结果和讨论

200 毫升 42% 饱和度硫酸铵的缓冲液 II 中,轻轻搅拌 45 分钟,使沉淀完全分散后再同样离心收集沉淀。最后将此含酶沉淀溶解在 300 毫升缓冲液 II 中,以便上柱分离。

(3) DEAE-纤维素柱层析 将上述酶液缓慢地上预先用缓冲液 II 平衡好的 DEAE-纤维素柱 (Whatman DE-11, 2.5×50 厘米; 或 Whatman DE-52, 3×15 厘米)。待酶液充分吸附在柱上之后,先用 50 毫升左右的缓冲液 II 洗涤,再用缓冲液 II + 0.13 M KCl 洗涤至流出液 O. D. 280 毫微米 < 0.1 。最后用缓冲液 III 加 0.23 M KCl 洗脱,收集 O. D. 280 毫微米 ≥ 1.5 的含酶部分。

(4) RNA 聚合酶的储存 在冰浴中向上述含有 RNA 聚合酶的缓冲液 III 的洗脱液里加入 1.5 倍体积的饱和硫酸铵。轻轻混匀后静置 30 分钟,于 12,000 转离心 30 分钟,收集含酶沉淀。

沉淀溶解于一定量的储存液中,置冰箱保存备用。也可注入安瓿瓶,充氮封管后于 -20°C 较长时间保存。

4. RNA 聚合酶的活力测定

RNA 聚合酶测活系统的总体积为 0.25 毫升,其组成为: 0.04M Tris-HCl, pH7.9; 0.01M MgCl_2 ; 0.1mM EDTA; 12mM β -巯基乙醇; 0.15 M KCl; 0.5 毫克/毫升牛血清白蛋白; 0.8 mM K_2HPO_4 ; 0.15 mM UTP, GTP, CTP 和 ATP (其中一种核苷三磷酸带标记,我们曾分别采用过 ^{14}C -ATP 和自己合成的 ^{32}P -GTP 和 ^{32}P -ATP); 50 微克左右小牛胸腺 (或鼠肝) DNA 和一定量的酶液。

上述反应系统于 37°C 水浴温育 15 分钟,立即取出置于冰浴中终止反应。取一定量反应液滴在 Whatman No. 3 滤纸上,先用 10% TCA 和 0.01 M 焦磷酸钠洗涤五次,然后用 5% TCA 和 0.01 M 焦磷酸钠洗涤五次,再用 95% 酒精洗三次,最后用无水乙醚洗一次,烘干后加 0.4% PPO 和 0.01% POPOP (以甲苯为溶剂)闪烁液 5 毫升,在液体闪烁计数器上测定。

1. 菌体培养和破碎

无论用摇床小量培养的菌体,还是用发酵罐大量培养的菌体所提取的 RNA 聚合酶都具有活力。用发酵罐大量培养的菌体,在 -40°C 低温冰箱中保存半年以上,仍可提取得到具有相当活力的 RNA 聚合酶。超声波破碎菌体的时间需要摸索,破碎时间太短,酶的释放不完全,破碎时间太长则会引起酶活力的降低。我们用相差显微镜和电镜检查菌体的破碎情况,结合酶活力的测定,选择了适当的破碎时间,结果较为满意。

2. DNase 处理和 DEAE-纤维素柱的分离

在生物体内进行 RNA 合成时, RNA 聚合酶以 DNA-RNA-RNA 聚合酶复合物形式存在。因此要提取依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶,首先就得除去 DNA 才能使 RNA 聚合酶释放出来。Chamberlin 和 Berg 等采用硫酸链霉素和硫酸鱼精蛋白来除去 DNA,每次操作不易重复;又费时间,往往还会引起失活。Burgess 则在实验一开始就采用 DNase 处理来除去 DNA,这样可以降低抽提物的粘度,防止在高速离心时引起酶的损失,也可缩短高速离心的时间。我们在超声波破碎这一步时就加了一半量的 DNase,这样可降低酶抽提物的粘度,提高超声波破碎效率。另一半 DNase 待超声破碎结束后再加入。为使 DNase 在 4°C 能充分作用,我们将酶处理的时间延长至 2—4 小时左右。用这种方法抽提所得的 RNA 聚合酶的 O. D. 280 毫微米/O. D. 260 毫微米 ≥ 1.5 ,而且酶液有明显的模板依赖性。这两点均足以说明 DNase 处理起到了去除 DNA 的作用。

我们曾先后采用过三种 DEAE-纤维素来分离 RNA 聚合酶 (Whatman DE-11; Whatman DE-52; 上海有机化学研究所产 DEAE-纤维素),其中以 Whatman DE-52 分离效果最佳。树脂的分离效果与树脂的型号有关,即使是同型号的不同批号或同一批树脂处理条件不同,分离效果也不相同。DEAE-纤维素的预处理时

间宜短,尤其是酸的处理时间不可太长,否则树脂易于老化,丧失分离能力。

上柱的酶液浓度不宜过高,假若酶液浓度

太高,会使酶在柱上的吸附不牢而很快流出,或者在洗脱时提早出现,影响分离效果。DEAE-纤维素柱层析分离和酶活力分布如图 1 所示。

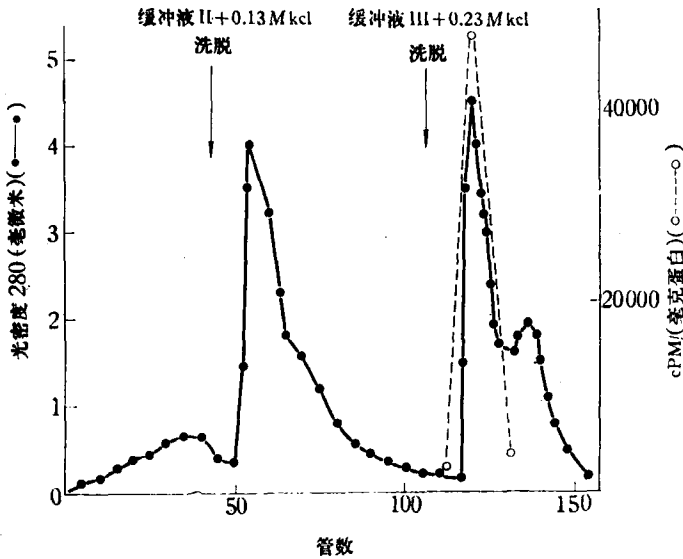


图 1 RNA 聚合酶的 DNA-纤维素柱层析分离及酶活力分布

我们发现 DEAE-纤维素树脂吸附一定量酶液之后,流速逐渐减慢,此时可用玻璃棒轻轻搅动柱上 1/3 部分树脂即可改善流速。

3. RNA 聚合酶的检定

用上述方法获得的大肠杆菌 K12-RNA 聚

合酶,其 O. D. 280 毫微米/O. D. 260 毫微米 ≥ 1.5 , 具有显著的模板依赖性(表 1)。一定量的酶所合成的 RNA 量,在一定范围内与反应系统中的 DNA 量呈直线关系。

我们的 RNA 聚合酶对核苷三磷酸底物有

表 1 RNA-聚合酶活力的测定

	实 验 1		实 验 2		两 次 试 验 平均活力(%)
	总 CPM	活力 (%)	总 CPM	活力 (%)	
(1) 全套* + DNA	9300	100	8940	100	100
(2) 全套 - DNA	0	0	0	0	0
(3) 全套 + 利福霉素 + DNA	170	1.83	480	5.37	3.60
(4) 全套 + 放线菌素 + DNA	480	5.16	260	2.91	4.04
(5) 全套 - GTP - CTP - UTP + DNA	880	9.46	280	3.13	6.30
(6) 全套 - GTP - CTP - UTP - DNA	0	0	0	0	0
(7) 全套 + DNA - RNA 聚合酶	0	0	0	0	0

* 全套: 即含有测定 RNA 聚合酶所需的全部试剂。

明显的依赖性(表 1)。Ohasa 等(1972)报道,在大肠杆菌碎片中有 poly A 聚合酶的活力。表 1 第(6)项说明,在测定 RNA 聚合酶的反应系统中缺乏 GTP、CTP、UTP,而只具有 ^{14}C -ATP,则没发现有 ^{14}C -AMP 的参入,这说明我们的 RNA 聚合酶制剂不具有 Poly A 聚

合酶活力。表 1 第(5)项中,在缺乏 GTP、CTP、UTP 而具有 ^{14}C -ATP 和 DNA 模板的情况下,所具有的少量 ^{14}C -AMP 参入,可能是在我们所用的小牛胸腺 DNA 模板中有连续的胸腺嘧啶片段组成,它可以用来作为指导多聚腺嘌呤核苷酸的合成。

RNA聚合酶的专一性抑制剂——利福霉素 (Rifomycin) 和 DNA 模板的专一性抑制剂——放线菌素 D (Actinomycin-D) 对我们从大肠杆菌 K 12 中提取的 RNA 聚合酶具有强烈的抑制作用(表 1)。这和 Burgess (1971) 以及 Wells 的报道一致。

Burgess 认为, 经 DEAE-纤维素柱层析分离后收集起来的酶蛋白中, 仅仅 10—20% 是 RNA 聚合酶, 在凝胶电泳图谱上除 β' 、 β 、 α 和 ω 这几条 RNA 聚合酶亚单位带之外, 还有几条杂蛋白带。我们提得的 *E. coli* K 12-RNA 聚合酶的凝胶电泳图谱也证实了这一点。

McConnell 和 Bonner (1972) 发现在 RNA 聚合酶中, 有多核苷酸磷酸化酶的污染, 这种酶不需要 DNA 模板, 而用核苷二磷酸作底物合

成 RNA。由于在测定 RNA 聚合酶所用的核苷三磷酸底物中难免会有核苷二磷酸的污染, 因此在测定 RNA 聚合酶活力时, 往往会产生由多核苷酸磷酸化酶引起的不依赖于 DNA 模板的“假参入”。这种现象只要在 RNA 聚合酶测活系统中加入一定量的磷酸氢二钾即可避免。

4. 储存

我们先后采用两种办法将 RNA 聚合酶储藏起来。一种办法将酶溶解在储存液里, 于 4℃ 冰箱中保存, 二、三个月后酶活力就开始有所下降。另一种办法将酶溶解在储存液里, 置安瓿瓶中充氮气后保存于 -20℃ 冰箱中, 则在二、三个月之内酶活力没有明显降低。看来充氮和低温对 RNA 聚合酶的保存是适宜的。

[本文于 1977 年 1 月 5 日收到]

红细胞冷冻保存的研究 (一)

——慢速冷冻糖液洗涤法

中国科学院生物物理所三室
北京市输血站
北京医学院附属人民医院

二十世纪四十年代初期 Woodcock、Florio 等人曾探索过血液的冷冻保存问题, 但未能引起人们的重视。1949 年 Polge 和 Smith^[1] 等发现甘油对精子的冷冻有保护作用。翌年 Smith^[2] 应用甘油作保护剂冷冻保存红细胞试验成功。这个重要发现使冷冻保存血液的工作迅速发展起来, 并有大量的工作报告, 但一直未解决去除保护剂的方法。

1956 年 Tullis^[3] 使用 Cohn 分离器将解冻的红细胞与甘油分开, 从而使冷冻红细胞最早应用于临床。但由于方法过分复杂, 未能得到大量推广应用。1963 年 Huggins^[4] 利用红细胞的可逆聚集反应, 设计出红细胞脱甘油的糖液

洗涤法之后, 才使冷冻红细胞 (简称“冷冻血液”) 开始逐渐在临床广泛应用^[5,6]。

由于“冷冻血液”能半永久(几年以至 10 年以上)的保存(目前通用的 ACD 血液在 4—6℃ 保存有限期仅三周), 因此它不仅解决了输血工作中长期存在的供需不平衡的矛盾, 而且有利于备战, 能时刻储备大量的备战用血。例如, 美帝国主义曾将“冷冻血液”用于侵越战争和第四次中东战争抢救伤员的输血。此外, 它有利于推行“成份输血法”¹⁾, 使宝贵的血液得到最合理、最有效的利用。“冷冻血液”输血基本上可

1) 指将血液各种成份(如红细胞、白细胞、血小板、血浆等)分开保存, 根据病人需要, 分别输用。