

们的经验,由于释放酶量不完全,产率比超声破碎及研磨为低,但具简便省时的优点,一般二天便可完成。离心只要一个低速冰冻离心机,因此设备较差的实验室更宜采用。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院生物物理研究所三室三组:《生物化学与生物物理学报》,1978年,第10卷,第1期,第71—76页。
[2] Wilson, G. A., Young, F. E.: *J. Mol. Biol.*, **97**,

123, 1975.

- [3] Thomas, M. & Davis, R. W.: *J. Mol. Biol.*, **91**, 315, 1975.
[4] Polisky, B. Greene, P. et al.: *Proc. natl. Acad. Sci.*, **72**, 3310, 1975.
[5] Smith, L. A. et al.: *Federation Proceedings*, **36** (3) 908, 1977.
[6] Greene, P. J.: *Nucleic Acid. Res.*, **5**, 2373, 1978.
[7] Smith, David I. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **3**, 343—353, 1976.

[本文于1979年3月9日收到]

兔肝 tRNA 核苷酸转移酶的提纯和部分性质

朱 榴 琴 韩 玉 珉

(中国科学院生物物理研究所)

在体外有 ATP、CTP 存在时, tRNA 核苷酸转移酶能有序地在缺少 CCA 末端的 tRNA 分子上加上 -C-C-A, 使 tRNA 分子具有接受氨基酸的功能。所以我们能够利用 tRNA 此种功能将标记的或者修饰的核苷酸引入完整的 tRNA 分子或 tRNA 的 3' 端的片段上, 以便于研究 tRNA 的结构和功能。此外通过它与 tRNA 形成的络合物, 还可以研究酶蛋白和核酸的相互作用。

国外已有人从多种材料中提纯到该酶的报道^[1-4], 但国内未见。Deutscher^[1] 从兔肝提取纯化此酶, 工作比较系统, 结果较好。

我们结合现有条件对 Deutscher 方法作了若干修改, 取得相近的结果。现介绍如下。

材 料 和 方 法

一、材料 DEAE 纤维素采用 Whatman DE-22, 磷酸纤维素, 采用 Whatman P-11。羟基磷灰石和 γ 型铝胶自制^[9]。

混合酵母 tRNA 上海东风生化试剂厂制品, 经部分纯化后使用。

其它试剂均为分析纯。

二、方法 1. tRNA 核苷酸转移酶活性测定 反应液总体积 100 微升, 其中各组份的

浓度为: 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.4), 50 mM; $MgCl_2$, 5 mM; tRNA-C-C, 75 微克/100 微升; $[H^3]$ ATP, 0.17 m M, 比强 $4 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ cpm/毫微克分子, 酶量在 0.5 单位以下。

反应混合物 37°C 保温 5 分钟后, 置冰水浴中冷却。取 50 微升点样后用纸片法洗, 干燥后用液闪计数器测放射性强度。对照样品不加酶。上述反应条件下, 每分钟掺入 1 毫微克分子 AMP 到 tRNA-C-C 分子上所需的酶量。定为一个活力单位。

2. RNase 测定 反应总体积 50 微升。其中甘氨酸缓冲液 (pH 9.4), 50 mM; $MgCl_2$, 5 mM; $[H^3]$ oligo A 5 微升; 酶适量。37°C 保温 30 分钟后, 冰水浴冷却, 取 40 微升点在 Whatman 3MM 滤纸上, 用 TCA 漂洗, 干燥并计数。以酸沉淀的 $[H^3]$ oligo A 的减少量表示 RNase 活力的相对大小。

3. 缓冲液 缓冲液 A: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM β 巯基乙醇; 5% 甘油。

缓冲液 B: 10 mM 磷酸钾, pH 7.5; 1 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM β 巯基乙醇; 5% 甘油。

tRNA 核苷酸转移酶的制备

一、酶的纯化 除柱层析在 4—8℃ 低温室中进行外,其它操作均在冰水浴中进行。离心转速均为 9000 rpm。(MSE 高速 18 型,250 毫升 × 6 离心头)。

1. 细胞破碎和抽提 正常新鲜兔肝,弃去结缔组织,称取 250 克,加 500 毫升冰冷的缓冲液 A,在组织搅碎器上高速搅 30 秒钟,静止片刻,吸出上层悬液,剩余部分重复上述步骤一次。合并两次的浆液,离心 15 分钟,得上清液 960 毫升。沉淀部分再用 500 毫升缓冲液 A 抽提,离心得上清液 550 毫升。合并两次上清液,即为粗提取液。总酶量为 36000 单位。

2. 硫酸铵分级沉淀 向粗提液中慢慢加入固体硫酸铵,离心并收集 50—70% 饱和度的沉淀,用 100 毫升缓冲液 A 溶解它。再对缺 $MgCl_2$ 和甘油的缓冲液 A 透析。

透析后的酶液离心 30 分钟,以便除去透析时产生的沉淀,得到淡棕色透明的酶液 225 毫升,加入 10 毫升甘油,以备纯化。

硫酸铵沉淀可除去约 90% 蛋白和大量的核酸,使 A_{280}/A_{260} 比值由 0.88 增加到 1.35,总活性回收率为 75% 左右。

3. γ 型氢氧化铝凝胶吸附及分步洗脱 在上述酶液中加入 82 毫升铝胶悬浮液(24 毫克/毫升)搅拌 30 分钟后离心 15 分钟。沉淀部分用 5mM 磷酸钾的缓冲液 B(以下简称 5mM 缓冲液 B)洗两次,每次约 200 毫升,离心收集沉淀,最后用 25mM 缓冲液 B 洗脱酶三次,每次用 60 毫升,合并三份洗脱液。

将合并的 25mM 缓冲液 B 的酶液用 Sephadex G-25 柱脱盐。用 5mM 缓冲液 B 平衡柱及淋洗酶。收集盐浓度在 5mM 以下的蛋白峰部分。通过吸附及洗脱比活性提高 10 倍。活性回收率达 70%。

4. DEAE 纤维素柱分离 将上述酶液上到预先用 10mM 缓冲液 B 平衡的 DEAE 纤维素柱上,流速约 1 毫升/分钟。上样毕,用 10mM 缓冲液 B 淋洗至流出液的 $A_{280} = 0.11$ 。

用 30mM 缓冲液 B 洗脱,图谱见图 1。

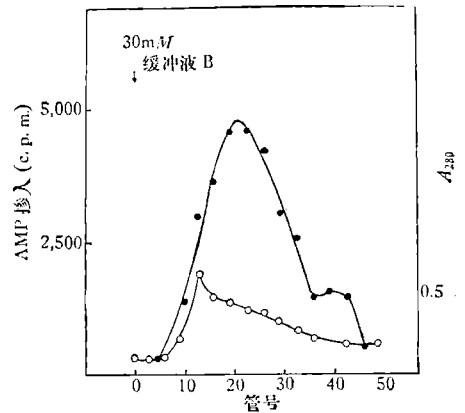


图 1 DEAE 纤维素柱层析

柱 18×250 毫米,流速 1 毫升/分,每 5 分钟收集

一管。酶活性测定用 10 微升酶液。■

—●—tRNA 核苷酸转移酶活性 —○— A_{280}

5. 羟基磷灰石柱层析 上一步所得酶液,上到用 30mM 缓冲液 B 平衡的羟基磷灰石柱,再用 30mM 缓冲液 B 淋洗至流出液的 $A_{280} = 0.081$,用 150mM 的缓冲液 B 洗脱酶,见图 2。

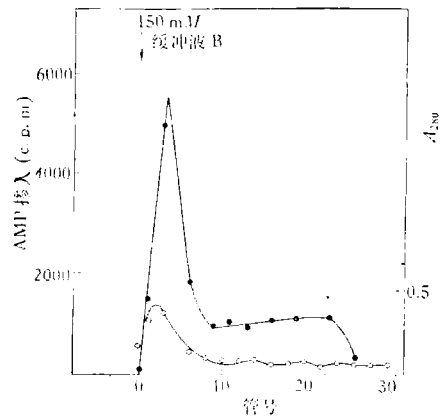


图 2 羟基磷灰石柱层析

柱 13×35 毫米,流速 3 毫升/5 分钟,酶活性

测定用 10 微升酶液。

—●—tRNA 核苷酸转移酶活性 —○— A_{280}

合并第 1—8 管,总体积 26 毫升。对缺 $MgCl_2$ 的缓冲液 B 透析。

羟基磷灰石对此酶专一吸附性强,纯化作用好,回收率达 80%。

6. 磷酸纤维素柱层析 羟基磷灰石柱得到透析后的酶液上到预先用与透析液相同的缓冲

液平衡的磷酸纤维素柱上,用平衡缓液淋洗过夜,淋洗液总体积 76 毫升。然后用 40 毫升含 0—0.20M KCl 的平衡缓冲液线性梯度洗脱。最后用 20 毫升 0.2M KCl 的平衡缓冲液继续洗脱。见图 3。

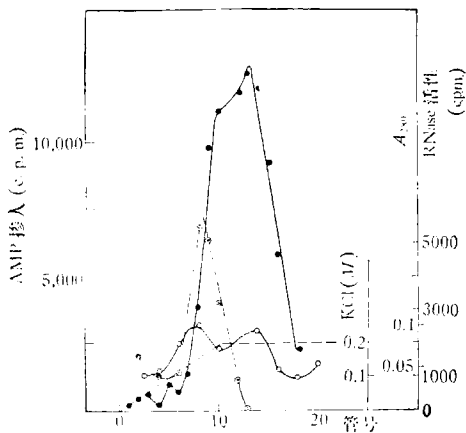


图 3 磷酸纤维素柱层析

柱: $\phi 6 \times 105$ 毫米; 流速 0.3—0.4 毫升/分;
酶活性测定时用 10 微升酶液。

—●— tRNA 核苷酸转移酶活性; —○— A_{280} ;
—○— RNase 活性; KCl 浓度

根据 RNase 活性在各管的分布,可将 tRNA 核苷酸转移酶分成三部分: (1) 8—10 管酶活性较高,但有 RNase; (2) 11—15 管为无 RNase 污染的 tRNA 核苷酸转移酶高峰部分; (3) 16—17 两管为无 RNase 的稀酶部分。图 3 可知 RNase 在 KCl 浓度低于 0.2M 时被洗脱下来,而 tRNA 核苷酸转移酶在 0.2M 时才被洗脱,两者可以较好分开。羟基磷灰石柱的酶液中约 80—90% 的蛋白在磷酸纤维素柱上不被吸附,所以经过此柱后,比活性提高约 10 倍。

通过以上各步纯酶回收率为 9.1%,浓度为 300 单位/毫升。纯化倍数约为 18000 倍(见表 1)。

tRNA 核苷酸转移酶的
纯度鉴定及其性质

一、纯度鉴定和分子量测定 SDS 不连续凝胶电泳,酶量 8 微克得到单一的蛋白带。根据迁移率测得酶的分子量为 45000,与文献报道的 45000—48000 相近^[1]。

二、RNase 活性测定 如图 3 所示,磷酸纤维素洗脱的酶活力高峰及峰的后半部分酶量为 2 单位时,未测得 RNase 活力。

三、KCl 浓度对 tRNA 核苷酸转移酶活性的影响 在测活反应中,KCl 浓度达 0.2M 时,测得的活性比无 KCl 时低 1 倍,可见 KCl 对 AMP 掺入 tRNA 3' 末端起抑制作用。根据 AMP 掺入初速度随 KCl 浓度变化的关系,求得抑制常数 $K_i = 0.13M$ (图 4)。

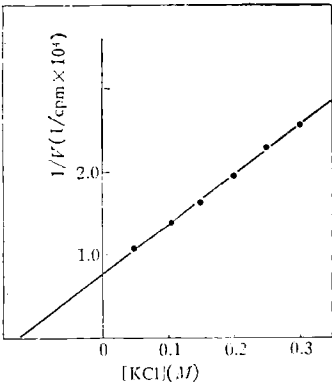


图 4 tRNA 核苷酸转移酶反应初速度的倒数与 KCl 浓度的关系

表 1 兔肝 (250 克) 提纯 tRNA 核苷酸转移酶

步 骤	总活性 (酶单位) $\times 10^{-2}$	总蛋白 (毫克) $\times 10^{-2}$	比活性 (酶单位/毫克蛋白)	A_{280}/A_{260}	纯化倍数	酶活收率%
匀浆 (9000 rpm 上清)	362.4	732	0.48	0.88	1	100
硫酸铵沉淀	276	90	3.00	1.35	6.0	76
r 铝胶分步洗脱	197	6.17	32.0	1.40	64	55
DEAE 纤维素分步	135	0.60	226	1.45	450	37
羟基磷灰石柱分步	110	0.13	880	1.60	1800	30
磷酸纤维素柱层析	1	25.3	0.010	2530	18700	7.0
	2	40.9	0.0045	8993		11.3
	3	1.9	0.0017	1133		0.5

四、磷酸钾缓冲液浓度对酶活性的影响

γ 铝胶吸附及洗脱; 25 mM 磷酸钾的缓冲液 B 洗脱的酶液比经 Sephadex G-25 脱盐后的酶活性低, 羟基磷灰石柱层析 150 mM 磷酸钾的缓冲液 B 洗脱的酶液比透析后测得的活性低得多可能磷酸钾对酶活性有可逆性抑制作用。

根据 AMP 掺入 tRNA 的初速度与磷酸钾浓度的关系求得抑制常数 K_i 为 26 mM (图 5)。

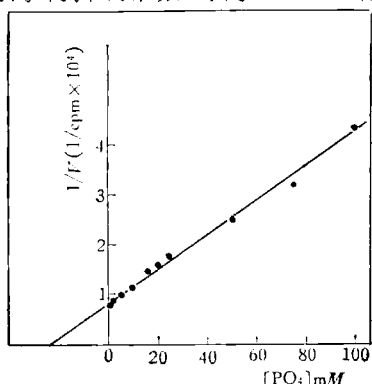


图 5 tRNA 核苷酸转移酶的反应初速度的倒数与磷酸缓冲液浓度的关系

五、ATP 浓度的影响

测活时, 为节省放射性 ATP, 用时又能得到高比强, 所以把 ATP 浓度定为 0.17 mM, 较 Deutscher 所用的浓度 0.5 mM 为低。这可能是测得的酶活性偏低的原因。为校正这一偏差, 测定了 ATP 浓度对酶活性的影响。结果表明, Mg^{++} 浓度为 5 mM 时, ATP 浓度在 2 mM 以下, 酶活性随 ATP 浓度增大而增加。ATP 为 0.17 mM 时的酶活性是 0.5

mM 时的 1/2—1/3。而 2 mM 时酶活性为 0.17 mM 时的 3—4 倍。表中所列的酶活力是校正值, 层析图谱则未经校正。

六、tRNA 核苷酸转移酶的稳定性

兔肝 tRNA 核苷酸转移酶宜低温保存, 经反复冻、融, 几乎不损失活性, 这对直接保存水溶液酶制剂很有利。

讨 论

从 γ 铝胶处理得到的酶, 上 DEAE 纤维素柱前用 Sephadex G-25 脱盐代替了超滤浓缩, 节省了时间, 且酶活无损失。羟基磷灰石柱流下的酶液, 因蛋白浓度低, 体积较大, 又无超滤设备, 故省掉了 Sephadex G-100 柱层析, 透析后直接上磷酸纤维素柱, 仍得到较好的结果。

磷酸纤维素柱层析图谱表明, RNase 活力峰与 tRNA 核苷酸转移酶活力峰有部分交叉, 但是从两个峰的相对位置可以判断, 当梯度变缓后可以分开。

这三种柱层析在所用的盐浓度下, 都能选择性地吸附所需的酶蛋白, 所以可用较小的柱体积而获得较多的总蛋白。同时实验结果说明, 上柱的先后次序和上柱酶液及柱平衡液的盐浓度与酶的纯化效果和收率的大小有关。

本工作得到张其玖同志的指导。北京大学生物系学员洪文清同志参加了部分工作。在此一并致谢。

(下转第 60 页)

(上接第 86 页)

左右, 在蛋白质约为 10^{-6} 厘米²/秒至 10^{-7} 厘米²/秒, 差 1 至 2 个数量级。由此可见, 靠延长电泳时间通常并不能提高电泳的分辨力。特别是在分离低分子量物质时, 这种做法往往适得其反。正确的办法是提高电场强度, 压缩分离时间。而且分离的物质分子量越低越要采用高电压。但因受到仪器的散热效率和绝缘条件等限制, 实际上电压也不能一味提高。就电源来说, 采用小型电子二极管 (如 6Z19—电视机中的阻尼二极管) 只能做到 3 千伏, 这在我们的仪器中可以构成 75 伏/厘米的电场强度。如采用高压硅堆作整流元件, 制造 6 千伏、10 千伏的高压电源并不太困难。

现以一组茚三酮反应显色物的分离为例, 直观地看一下本仪器的分辨能力 (见图 3)。

样品是东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*)

的血淋巴液 (除去蛋白质后取适量样品点于滤纸的一角)。采用甲酸:乙酸:水 = 15:10:75, pH1.9 的酸性缓冲液, 以 75 伏/厘米的电场强度, 沿滤纸的长边电泳 40 分钟。取出晾干后用正丁醇:甲酸:水 = 15:3:2 的溶剂系统进行上行纸层析, 展层一次。茚三酮显色。对照有关文献 [1, 2], 将初步确认之斑点标出。其他斑点可能是这种昆虫体液中的肽或氨基酸衍生物。

由图 3 可见, 本仪器的分辨能力比较令人满意。

参 考 文 献

- [1] 陈丽筠:《生化学报》, 1958 年, 第 1 卷, 第 19 期。
- [2] Smith, L.: Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. II, p. 45, 4th Ed., London, 1976.

[本文于 1978 年 12 月 12 日收到]

经层析柱分离提纯后的酶蛋白,加牛清蛋白至每毫升酶液含2毫克,冷冻干燥后放低温-20℃冰箱保存。

2. 结果和讨论

酶液经 DEAE-纤维素柱分离后结果见图1。与 G. Ciliv 的结果比较,非酶蛋白质含量较高,是第一步提取膜时,有部分血红蛋白未提净。酶液经磷酸钙纤维素柱后结果见图2,与 G. Ciliv 的结果比较,所收集的酶活性管范围较窄,最后所得酶活性为600单位(微克分子底物/毫克蛋白/小时)。

所得酶制剂用紫外吸收光谱可见266毫微米有高峰, A_{260} 毫微米/ A_{280} 毫微米=0.77<1,与 G. Ciliv 观察一致。

将酶制剂用 K. Takayama 等人聚丙烯酰胺电泳法鉴定,酶蛋白在电泳前溶于冰醋酸:酚:水(1:2:1 V/W/V),酶蛋白浓度调至10微克/微升,固体尿素加到最后浓度为2M,分离凝胶也加有冰醋酸、尿素,其上用75%醋酸覆盖。电泳结果用氨基黑染色,在凝胶柱内可见一条清晰的蓝色区带(图3)。结果与 G. Ciliv 相符合。

3. 总结

本文报告了参照 G. Ciliv 的方法,按本室的工作条件,建立了用 Triton X-100 提纯人红血球膜乙酰胆碱酯酶的方法。酶活性为600单位。紫外吸收光谱用 Takayama 等人聚丙烯酰胺电泳方法鉴定结果与 G. Ciliv 相符合。

经层析柱分离提纯后的 AChE 加少量牛清蛋白,冷冻干燥低温保存,活性可维持一年之久。

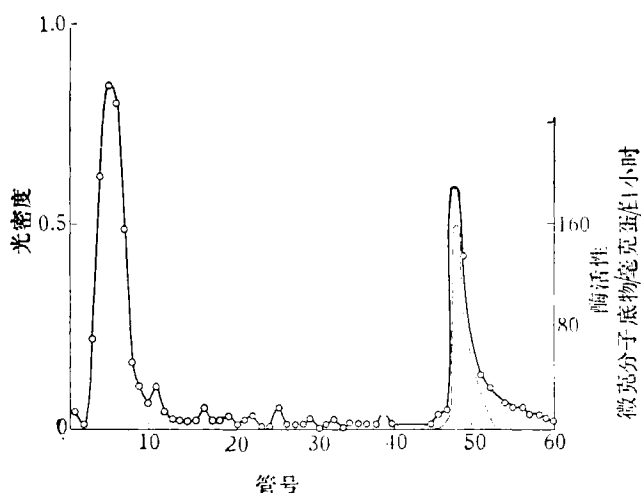


图1 DEAE-纤维素柱分离图谱

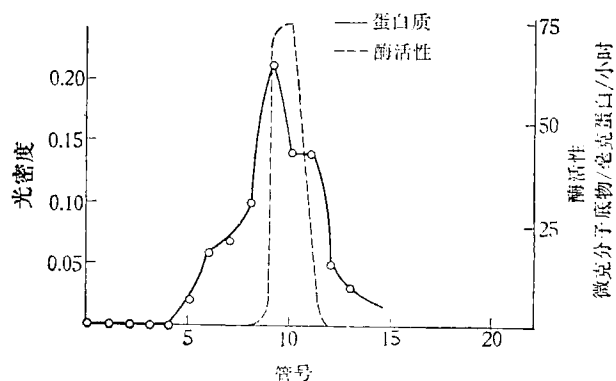


图2 磷酸钙纤维素分离图谱

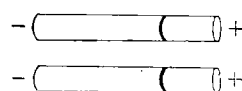


图3 乙酰胆碱酯酶聚丙烯酰胺电泳图谱

参考文献

- [1] Ciliv, G. and Özand, P. T.: *Biochem. Biophys. Acta*, **284**, 136, 1972.
- [2] Masahiko Roika and Minoru Hamada: *Methods in Enzymology*, **22**, 339, 1971.
- [3] Huerga, De. la. et al.: *Am. J. Clin. Path.*, **12**, 1126, 1952.

[本文于1979年2月16日收到]

(上接第58页)

参考文献

- [1] Deutscher, M. P.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 450, 1972.
- [2] Sternbach, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **22**, 166,

- 1971.
- [3] Miller, J. P., Philipps, G. R.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1274, 1971.
- [4] Williams, K. R.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 5589, 1977.

[本文于1979年5月29日收到]