

- [10] Schleif, R. F. et al.: in *Practical Methods in Molecular Biology*, 74, 1981.  
 [11] Lenard, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 56, 1828, 1966.  
 [12] Glaser, M. et al.: *Biochemistry*, 10, 1780, 1971.  
 [13] Holzwarth, G. et al.: *J. Supramol. Struct.*, 4, 161,

1976.

- [14] Ortner, M. J. et al.: *Photobiochem. Photobiophys.*, 4, 79, 1982.

[本文于 1984 年 4 月 18 日收到]

## DNA-蛋白质相互作用的研究——EcoRI 内切酶切割 P<sub>2</sub>-DNA

孙 连 魁\*

(西北大学生物系, 西安)

限制性核酸内切酶不仅是分析和操纵 DNA 序列的工具<sup>[1]</sup>,而且也为研究 DNA-蛋白质之间相互作用提供了一条可行的途径。核酸内切酶如何识别、结合、切割 DNA,不少文章已有报道<sup>[1,2,4-7,9]</sup>。至今没有解决的一个问题是:同一 DNA 分子上具有相同核苷酸顺序的不同限制位,为什么能以不同的速度为同一种内切酶切割。为了研究这个问题,我们选择 P<sub>2</sub>噬菌体 DNA 和 EcoRI 内切酶作为试验系统,用酶促反应的动力学和热力学方法研究其切割机制,所得资料表明,不同限制位点的切割速度不同,依赖于限制位两侧的碱基成分;限制位周围的核苷酸顺序有调节切割过程的活化阈值的功能。

### 一、材料和方法

#### 1. 材料

P<sub>2</sub>-DNA,腺病毒 5 型 DNA 分别为瑞典 G. Bertani 教授和 U. Pettersson 教授赠给; Poly[d(A-T)] 和 Poly[d(G-C)] 是西德产; EcoRI 内切酶自制<sup>[9]</sup>。

#### 2. 酶反应和 EcoRI 试验

EcoRI 的酶促反应是在不同温度下进行的,反应缓冲液含有 10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1MKCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 0.1mMDTT, 10% 甘油。不同稀释倍数的酶 5 $\mu$ l 和 20 $\mu$ l 或 5 $\mu$ l (含有 1 $\mu$ g 或 0.25 $\mu$ g) 的 P<sub>2</sub>-DNA

混合;以不同时间温育后,加含 10% 十二烷基磺酸钠的 0.16M EDTA 20 $\mu$ l,中止反应。

#### 3. 琼脂糖凝胶电泳

酶促反应后,将内切酶切割的 DNA 片段用琼脂糖凝胶电泳分离之。0.35g 琼脂糖,溶于含有 0.04 M Tris, 0.005 M Na-Ac, 0.02 M EDTA, pH 为 7.8 的 100ml 缓冲液中,以锡箔纸封瓶口;100 $^{\circ}$ C 加热并电磁搅拌 3—5 小时;冷却至 60 $^{\circ}$ C—75 $^{\circ}$ C,将热胶注入内径 5mm,长 190mm 的玻璃管中;点样 20 $\mu$ l 于凝胶管的顶端,室温下电泳 15 小时;每管电流 1.0—1.5mA。

#### 4. 凝胶染色及荧光测定

0.4  $\mu$ g/ml 的溴化乙锭染色电泳后的凝胶, DNA-溴化乙锭复合物在聚焦的 5145  $\text{\AA}$  的氩气激光束激发下发荧光,其荧光强度与 DNA 片段的相对长度成正比;用单光子计数器测定其荧光强度,并计算 DNA 片段的相对长度。

#### 5. 计算总的切割速度

不完全消化时, P<sub>2</sub>-DNA 可被 EcoRI 内切酶切割成 A、B、C、D 四个最终片段(其相对长度分别为 10%, 37%, 32%, 20%),以及 AB, CD, ABC, BCD, ABCD 六个未被完全切割和未被切割的 DNA 片段(图 1)。由文献<sup>[1]</sup>可知:

$$R_A^{(t)} = 1 - \exp(-K_1 t)$$

$$R_B^{(t)} = [1 - \exp(-K_1 t)][1 - \exp(-K_2 t)]$$

\* 本文系在瑞典卡罗林斯卡医学院医学生物物理系 Rudolf Rigler 教授指导下完成的。

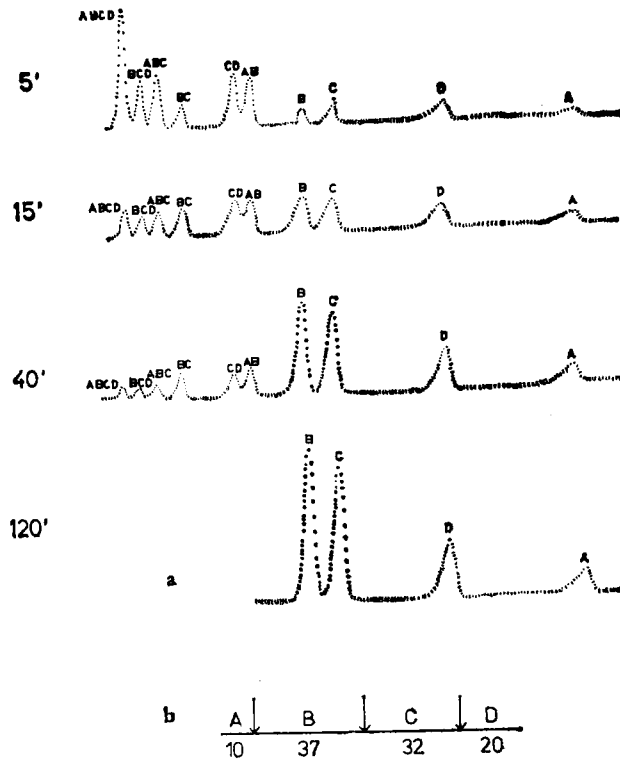


图 1 (a) 15°C 时, 不同的酶促反应时间情况下, P<sub>2</sub>DNA 的 EcoRI 切割片段在琼脂糖凝胶上的荧光外形 (b) P<sub>2</sub>DNA 上 EcoRI 切割位的相对位置及 DNA 片段的相对长度。

$$R_A^{(t)} = [1 - \exp(-K_1 t)] [1 - \exp(-K_3 t)]$$

$$R_D^{(t)} = 1 - \exp(-K_2 t)$$

这里,  $R_A^{(t)}$  代表切割时间为  $t$  时, 某 DNA 片段的切割比率, 如

$$R_A^{(t)} = \frac{\text{片段 A 的光量子数}}{\text{所有片段总的光量子数} \times 10\%}$$

$K_1, K_2, K_3$  分别是三个限制位的切割速度。

## 二、结 果

### 1. EcoRI 内切酶切割 P<sub>2</sub>DNA

(1) 切割片段的顺序和相对长度

P<sub>2</sub>DNA 完全被消化后, 可被切割成 A, B, C, D 四个片段, 由图 1 中四个峰的荧光强度可计算出诸片段的相对长度是: 10%, 37%, 32%, 20%, 这个结果与用电子显微镜测得的结果非常吻合<sup>[3]</sup>。

2. 总的切割速度常数  $K$  及催化速度常数  $K_c$ 。

P<sub>2</sub>DNA 上三个 EcoRI 限制位的切割速度常数  $K_1, K_2, K_3$  可根据诸 DNA 片段在切割过程中荧光强度的消涨情况(图 1)求出。最快的是  $K_2$ , 次之  $K_3$ , 最慢的是  $K_1$  (图 2)。

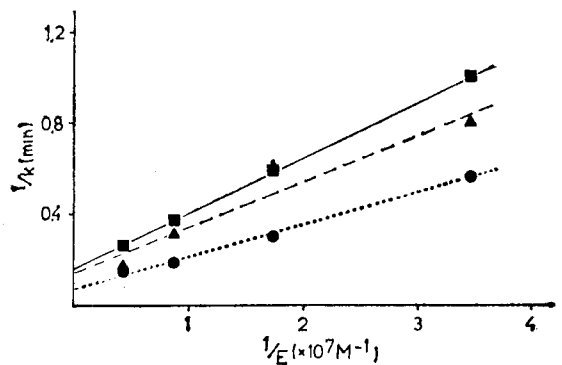
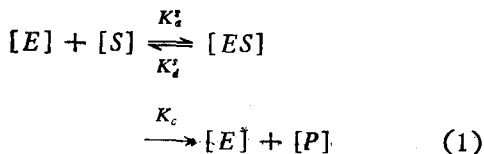


图 2 P<sub>2</sub>DNA 上 EcoRI 内切酶三个切割位点的切割速度及其与酶浓度的关系, (P<sub>2</sub>DNA 浓度是 1.84 nM)

■ 示位点 1 ● 示位点 2 ▲ 示位点 3

根据下列酶促反应的经典步骤分析:



那么,总的切割速度常数  $K$  可由文献<sup>[3]</sup>得知

$$K = \frac{[E] \cdot K_c}{[E] + K_M} \quad (2)$$

同时  $K_M = \frac{K_s' + K_c}{K_s}$ ,  $1/K$  对  $1/E$  作图产生

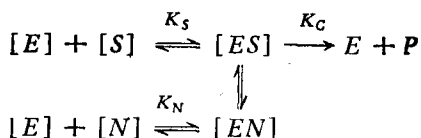
一直线,斜距为  $1/K_c$ ,斜率为  $K_M/K_c$  (图2)。显然由图2可求出催化速度常数  $K_c$ 。

不同温度下的  $K_c$  值列在表1。37°C时  $K_c$  大约是  $1S^{-1}$ ,而在低温时低于这个数值的10—100倍。

### 3. EcoRI 酶和 P<sub>2</sub>DNA 非专一性结合的动力学

#### (1) 非专一性结合常数的测定

酶既可同含有识别位的 DNA 结合,也可同不含识别位的 DNA 结合,而且同非专一性的 DNA 结合,将会竞争性地影响专一性的结合和切割。



因  $E_0 = [E] + [ES] + [EN]$

$$\text{所以 } [E] = \frac{E_0}{1 + K_s[S] + K_N[N]} \quad (3)$$

这里,  $E_0$  为原始酶浓度;  $[E]$  为自由酶浓度;  $[S]$  为切割位点浓度;  $[N]$  为非专一性位点浓度;  $K_s$  为专一性结合的平衡常数;  $K_N$  为非专一性结合的平衡常数。将(3)式代入(2)式得:

$$K = \frac{E_0 \cdot K_c}{E_0 + K_M(1 + K_s[S] + K_N[N])} \quad (4)$$

在酶浓度极大地大于底物浓度时,专一位点  $S$  被饱和,  $K_s[S]$  项可忽略不计,所以

$$K = \frac{E_0 \cdot K_c}{E_0 + K_M + K_M K_N [N]}$$

或

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{K_c} + \frac{K_M}{K_c E_0} + \frac{K_M}{K_c E_0} \cdot K_N [N] \quad (5)$$

$1/K$  对  $[N]$  作图产生一条直线,其截距为

$$\frac{1}{K_c} + \frac{K_M}{K_c E_0} \quad \text{斜率为} \quad \frac{K_M K_N}{K_c E_0}$$

因此

$$K_N = \frac{\text{斜率}}{\text{截距} - \frac{1}{K_c}} \quad (6)$$

我们以不含 EcoRI 识别位的 Poly[d(A-T)] 或 Poly[d(G-C)] 作抑制剂,研究酶与非专一性 DNA 的结合对酶的专一性结合与切割的影响,发现反应混合物中加入多聚脱氧核糖核酸后,导致  $K$  值降低。由图3的数据(示直线的斜率和截距)和公式(6)可求出不同反应条件下的  $K_N$  值(表1)。

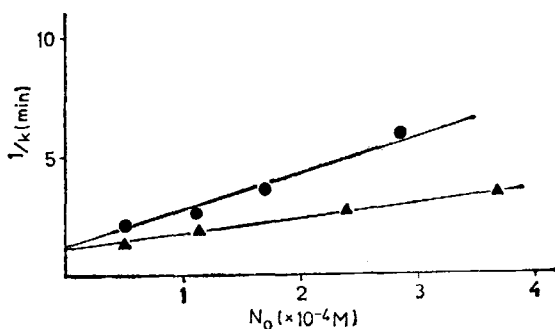


图3 P<sub>2</sub>DNA 切割位的切割速度常数与抑制剂的依赖关系(37°C时)  
▲: Poly[d(A-T)]; ●: Poly[d(G-C)];  
P<sub>2</sub>DNA 浓度是 7.67nM。

#### (2) 温度、盐浓度和不同抑制剂对 $K_N$ 值的影响

不同温度下测得的  $K_N$  值,列在表1中,15°C, 25°C, 37°C 时分别为:  $4.1 \times 10^5 M^{-1}$ ;  $1.5 \times 10^5 M^{-1}$ ;  $1.0 \times 10^5 M^{-1}$ 。由 Van-Hoff 绘图可得  $\Delta H = -11.4$  千卡/克分子,  $\Delta S = -14.4$  卡/克分子·度(表2)。

实验证明  $K_N$  也受反应缓冲液中 KCl 浓度的影响,用 Poly[d(A-T)] 和 Poly[d(G-C)] 作抑制剂得到了相似的结果,在 0.1M 到 0.02M 的盐浓度范围内,随 KCl 浓度的降低,  $K_N$  值可增高一倍(表3)。同时可以看出, Poly[d(G-

表1 专一性和非专一性 EcoRI-DNA 相互作用的动力学常数

温 度	位 点	$K_C$ [秒 <sup>-1</sup> ]	$K_N[10^{-5}M^{-1}]$		$K_S[10^6M^{-1}]$ $P_2$ DNA
			Polyd(G-C)	Polyd(A-T)	
15°C	1	0.076	4.1±0.2	(2.0±1.4)	1.03±0.12
	2	0.140			
	3	0.108			
25°C	1	0.389	1.5±0.1	(0.8±0.5)	0.18±0.01
	2	0.475			
	3	0.332			
37°C	1	1.700	1.0±0.3	(0.4±0.3)	0.04±0.01
	2	1.330			
	3	1.110			

表2 25°C 时 EcoRI-DNA 相互作用的热力学参数

DNA 位点	$P_2$			Ad5	
	1	2	3	1	2
$E_0$	25.5	17.1	18.7	23.0	15.5
$\Delta H(K_C)$	24.9	16.5	18.1	22.4	14.9
$\Delta S(K_C)$	±22.7	-4.8	-0.1	+11.0	-14.2
$\Delta H(K_N)$	-11.4				
$\Delta S(K_N)$	-11.4				
$\Delta H(K_S)$	-25.78				
$\Delta S(K_S)$	-53.32				

注:  $E_0$  及  $\Delta H$  的单位为[千卡/克分子];  $\Delta S$  的单位为[卡/克分子·度]

表3 37°C 时盐浓度对  $K_N$  的影响

抑 制 剂	KCl 浓度 [mM]	$K_N[10^5M^{-1}]$
Poly[d(A-T)]	100	0.7
	50	1.0
	20	1.4
Poly[d(G-C)]	100	2.9
	50	3.3
	20	4.2

C)] 较 Poly[d(A-T)] 的抑制能力强。KCl 浓度的影响表明, 酶同抑制剂 Poly[d(G-C)] 或 Poly[d(A-T)] 的结合是借助于静电引力, 即带负电的核苷酸链与酶的正电荷基团之间的相互吸引。

#### 4. EcoRI 酶和 $P_2$ -DNA 专一性结合的动力学

酶同限制位专一性结合的平衡常数  $K_S$  可由  $K_C$  和  $K_N$  求出

$$K_M = \frac{K'_d + K_C}{K'_d} \quad \text{如果 } K_C \ll K'_d$$

$$K_M = \frac{K'_d}{K'_d} = \frac{1}{K_S}$$

又由于斜率 =  $\frac{K_M K_N}{K_C E_0}$  (见式 5)

所以 
$$K_S = \frac{K_N}{K_C E_0 \times \text{斜率}}$$

我们实验测得 15°C, 25°C, 37°C 时的  $K_S$

表4 P<sub>2</sub>-DNA 和 Ad5-DNA 限制位两侧二十对碱基成分的统计

DNA	限制位	AT/GC		AT/GC
P2	I	0.54	5'-GCCTCGGCACGGAATA CCT G GAATTC T GCCGCACGGC AAAACACAA-3' 3'-CGGAGCCG TGCCTT AT GGAC CTTAAG ACG GCGTGCCG TTTT GTGTT-5'	0.82
P2	II	1.86	5'-AAAGTATCTTTTCCAGAGAG GAATTC AAAGAACTTTAAAAAATCT-3' 3'-TTTCATAGAAAAGGTCTCTC CTTAAG TTTCTTGAAATTTTTTTAGA-5'	5.67
P2	III	1.50	5'-ATGCCGGATTGACTGAAAAA GAATTC AACCCAGCCAT ACTGGCG AAT-3' 3'-TACGGCCTAACTGACTTTTT CTTAAG TTGGTCCGGTATG ACCGCTTA-5'	1.00
AD5	I	0.67	5'-TTATGCGCGGGTGGCT T TGG GAATTC AGGACC TGT CCGCCGATAA-3' 3'-AATACGCGCCACCG A A ACC CTTAAG T CCTGGAACAGCGCGCTATT-5'	0.82
AD5	II	1.50	5'-CTGATATCGACTCGAAG AAT GAATTC AAATTAATACFTTAAAATGAC-3' 3'-GACTATAGCTGAGCTT CTTA CTTAAG TTTAAATTATGAAATTT ACTG-5'	5.67

值分别为  $1.03 \times 10^8 M^{-1}$ ,  $0.18 \times 10^8 M^{-1}$ ,  $0.04 \times 10^8 M^{-1}$ , 而且同图4显示的那样, P<sub>2</sub>DNA 上三个位点的  $K_S$  值是极其相似的。由表1也可看出,在不同温度下  $K_S$  值强于  $K_N$  值大约2—3数量级。  $K_S$  对温度比  $K_N$  有较强的依赖性。由 Van Hoff 绘图(图4) 计算,  $\Delta H$  和  $\Delta S$  分别为 -25.78 千卡/克分子和 -53.32 卡/克分子·度(表2)。

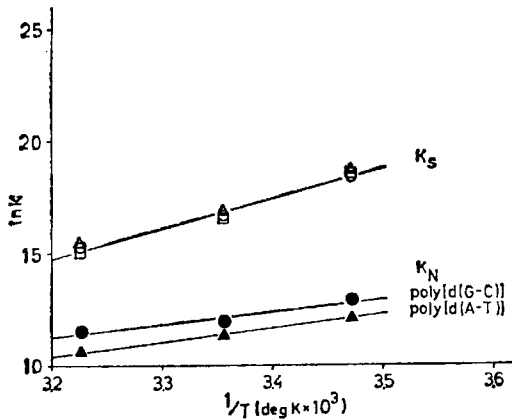


图4 温度对专一性和非专一性结合常数  $K_S$  和  $K_N$  的影响

### 三、讨 论

我们用多聚脱氧核糖核酸(不是 EcoRI 内切酶的底物)作抑制剂,研究酶同非专一性 DNA 的结合,获得的  $K_N$  值与前人的研究报道吻合<sup>[4,5,10]</sup>。 Poly[d(G-C)] 比 Poly[d(A-T)] 同酶的结合能力强,这是由于两种 DNA 在溶

液中结构不同。

比较 EcoRI 内切酶同 P<sub>2</sub>-DNA 上三个识别位点的结合常数  $K_S$ , 发现它们之间无显著差别。 Halford 等人(1980)也获得类似的结果,即酶与同一 DNA 分子上不同限制位的结合有相同的结合常数。因此,我们可以推断影响总的切割速度  $K$  的限速步骤不是专一性结合平衡常数  $K_S$ , 而是催化速度常数  $K_C$ , 即酶同限制位点专一性地结合成 ES 复合物的平衡常数是相同的,而 ES 复合物解离成自由酶 E 和产物 P 的催化速度是不同的。

$K_N$ ,  $K_S$  的  $\Delta H$  和  $\Delta S$  为负值时表明,专一性和非专一性结合不需要活化能,而且结合后增加了分子排列的有序性。

我们的实验资料表明, P<sub>2</sub>-DNA 上三个限制位的  $K_C$  值对温度的依赖性有明显不同,慢速位 I 比其他两个快速位需要较高的活化能。正如表4所示,限制位展现出相同的碱基顺序,而限制位外边的  $\frac{AT}{GC}$  成分却不同。显然,限制位两侧含有较多 G-C 碱基对(即  $\frac{AT}{GC}$  比率低)的位点,切割时需要较高的活化能,反之一样。我们用含有两个 EcoRI 内切酶限制位的腺病毒 5 型 DNA 作底物,进行切割试验也得到类似的结果,即不同限制位点的切割速度不同,依赖于限制位两侧的碱基成分;限制位周围的核苷酸顺序的重要性在于调节切割过程的活化阈值。

## 参 考 文 献

- [1] Forsblom, S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 3255, 1976.
- [2] Rigler, R. et al.: *In Gene Functions Proc. FEBS 12th Meeting Dresden* (ed. s. Rosenthal et al.), vol. **51**, 147, 1978.
- [3] Chatteraj, K. K. et al.: *Virology*, **81**, 460, 1977.
- [4] Langowski, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4727, 1980.
- [5] Goppelt, N. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **104**, 101, 1980.
- [6] Halford, E. et al.: *Biochemical J.*, **191**, Paper 227 (80/381), 1980.
- [7] Halford, E. et al.: *ibid.*, **191**, Paper 228 (80/381) 1980.
- [8] Modrich, P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 5866, 1976.
- [9] Langowski, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3483, 1981.
- [10] Jack, W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 4010, 1982.

[本文于1984年5月7日收到]

# 不同修饰剂对尿激酶化学修饰的对比研究

曹淑桂 程玉华

(吉林大学分子生物学系, 长春)

近年来为了解除某些酶制剂的抗原性<sup>[1,2]</sup>, 提高某些酶对环境的稳定性和延长其在体内的半衰期<sup>[3-6]</sup>, 以充分发挥其临床效果, 国内外曾用 PEG<sup>[1,2]</sup>, Dextran 及其硫酸酯<sup>[3-5]</sup>, 肝素钠<sup>[6]</sup>等水溶性大分子对某些酶制剂的自由氨基进行共价修饰, 取得了较好效果。但是由于各个实验室所修饰的酶不同, 所用修饰剂及其活化方法也不同, 所以对这些修饰剂或活化方法的修饰效果难以进行比较。因此我们用不同修饰剂采取不同活化方法对同一种酶——尿激酶进行修饰, 观察比较不同修饰剂和活化方法对修饰酶活性和稳定性的影响。

本文报道了肝素钠, Dextran 和 PEG 对尿激酶自由氨基共价修饰的对比研究。结果表明, 修饰物产率达 90% 以上时, PEG 对酶活力损失较大, 而 Dextran 及肝素对酶活力的影响较小, 其中肝素修饰酶在活力保持和某些其它性质方面均较其它二种修饰酶为优。在肝素作修饰剂的活化方法中溴化氰法优于高碘酸氧化法。这为进一步提高酶分子修饰技术提供了必要数据。

## 一、材料与方 法

### (一) 材料

尿激酶 吉林大学生生化实验厂提供, 比活 5 万 U/mg 蛋白。

肝素钠 上海生化制药厂产品, 生化试剂

溴化氰 Merck-Schuchardt 产品

右旋糖酐 (Dextran) 延吉市制药厂产品

单甲氧基聚乙二醇 (PEG) Union CARBIDE COR 产品, 分子量 5000。

胃蛋白酶 上海食品公司制药厂产品, (1:3000)

人血浆 长春生物制品研究所提供。

三硝基苯磺酸 (TNBS): 浙江黄岩城关助剂厂产品, 生化特定试剂。

尿激酶活力测定试剂 北京生物制品药检所提供。

其它试剂均为分析纯或化学纯。

### (二) 方法:

#### 1. 修饰酶的制备

按溴化氰法<sup>[7]</sup>制备活化肝素 (H<sub>CN</sub>) 及其