

E. coli tRNA^{Leu} 的提纯

黄守廷 张星岳 李 冰 林胜祥

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

提 要

本文报道一种 *E. coli* tRNA^{Leu} 简便而稳定的纯化方法。粗 tRNA 经过 BD-Cellulose 柱层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳两个步骤即可得到亮氨酸接受能力为 1400 pmol/A₂₆₀ 单位的 tRNA^{Leu}。

随着对核酸研究的不断深入, 从原核生物到真核生物的各种 tRNA 提纯方法越来越多。反相柱层析利用 tRNA 连接上或不连接上氨基酸的亲层析, 各种柱层析, HPLC 以及聚丙烯酰胺凝胶电泳等都已成为纯化 tRNA 的有效手段。这些方法的专一性不尽相同, 而有些方法, 如亲和层析, 往往不能对各种氨基酸专一的 tRNA 都有满意的结果。在 tRNA 的提纯中, 我们采用了简便而结果稳定的两步提纯法。

高产率, 用 Agarose-Haemoglobin (AGHEMTM, Pharmacia) 除去提取液中的蛋白酶。

上样前, 用牛血清蛋白溶液处理 CaM-Sepharose 4B 柱, 可封闭非特异性吸附。上样后, 用含 0.2mol/L NaCl 的缓冲液淋洗, 可加强 CaM 结合蛋白和 CaM 的结合, 并进一步洗去非特异性的结合。

去污剂 (如 1% Triton X-100) 对 CaM 和 CaM 结合蛋白的结合无影响, 可用 CaM-Sepharose 4B 柱提取 CaM 依赖的细胞膜蛋白。

由于细胞内含有多种 CaM 结合蛋白, 所以采用 CaM-Sepharose 4B 亲和层析提取得到的是多种 CaM 结合蛋白的混合物。如需进一步纯化其中某种 CaM 结合蛋白, 可与其它分离技术结合进行。

当提取液中存在 CaM 靶酶底物时, 在

一、BD-Cellulose 柱层析

粗 tRNA 用苯酚抽提方法^[1]制备。从 100 克大肠杆菌中提取了 170 毫克粗 tRNA。70 毫克粗 tRNA 溶解在 12ml 缓冲液 I (0.1 mol/L KAc-HAc, pH4.5, 0.35mol/L NaCl, 10mmol/L MgCl₂) 中, 上 BD-Cellulose 柱 (1.5 × 24 cm)。该柱预先用缓冲溶液 I 平衡, 然后用同样溶液洗柱至 A₂₆₀ 读数小于 0.1, 改用 NaCl 梯度

CaM-Sepharose 4B 上就可能形成 CaM-Ca⁺⁺-CaM 靶酶-底物复合物, 因此 EGTA 洗脱得到的 CaM 结合蛋白溶液中, 往往会存在 CaM 靶酶的底物, 该底物可能也是一种蛋白, 用 SDS-PAGE 鉴定 CaM 结合蛋白时需考虑到这一点。

参 考 文 献

- [1] Gopalakrishna, R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, 104, 830.
- [2] Ho, H. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 429, 461.
- [3] Wallace, R. W. et al.: *Methods in Enzymology*, 1983, 102, 39.
- [4] Birecka, H. et al.: *Plant Physiol.*, 1974, 53, 569.
- [5] Sharma, R. K. et al.: *Methods in Enzymology*, 1983, 102, 201.
- [6] Laemmli, U. K.: *Nature*, 1970, 227, 680.
- [7] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.

[本文于 1987 年 8 月 31 日收到]

(0.35mol/L→0.95 mol/L NaCl) 缓冲液洗脱。梯度缓冲液总体积为 200 ml, 流速12ml/小时, 每管 2ml 分管收集。在指定管中各取 80 μ l 流出液测定 tRNA 的接受氨基酸活力(见图 1)。可以看到 tRNA^{Leu} 在相应于¹⁴C-NaCl 浓度为 0.69mol/L 到 0.76mol/L 的位置被洗脱下来。

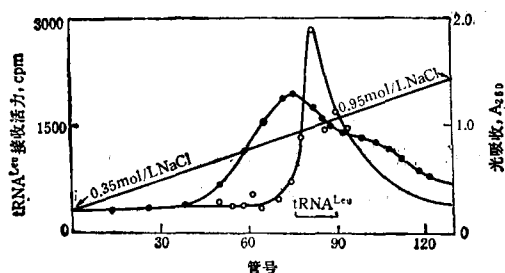


图 1 BD-Cellulose 分离 tRNA

●—●和○—○分别表示 tRNA 的光吸收和接受能力曲线

由于 BD-Cellulose 柱流出液中变化着的 NaCl 浓度较高且溶液酸度较大, 不便直接测活。因为高浓度的 Na⁺ 离子会影响合成酶与 tRNA 的结合, 我们采用了类似 Cherayil 等^[2] 的方法测定各级分对亮氨酸的接受活力: 各取 80 μ l 流出液于滤纸片上, 充分吹干后用 75% 乙醇-30mmol/L KCl 混合液洗涤数次(一般 2—3 次)。干燥后每片滤纸片上滴加 50 μ l 测活液(100mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 30 mmol/L KCl, 12mmol/L MgCl₂, 4 mmol/L ATP, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5mmol/L DTE, 0.5mmol/L [¹⁴C]-Leu 及过量亮氨酸 tRNA 合成酶)。在保持潮湿的条件下, 于 37℃ 保温 30min, 然后将纸片投入 5% 三氯醋酸溶液中停止反应, 洗净过量 [¹⁴C]-Leu, 液闪计数。这种 tRNA 测活方法的效率只有溶液中的 5% 左右, 可能由于洗涤过程中 tRNA 的损失或吸附在滤纸片上的 tRNA 与合成酶接触不充分导致反应不完全。但用已知接受活力的 tRNA 作对照, 求出修正系数, 可得到相当准确的数值。

二、电泳分离

合并对应于 tRNA^{Leu} 活力的 BD-Cellulose

柱的级分, 三倍乙醇沉淀。沉淀溶解于 100 μ l 蒸馏水中, 走 20 × 40cm 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 10% (交联度 5%) 厚度 2.1mm, 溶解在含 7mol/L 尿素的 pH 8.3 硼酸-Tris-EDTA 缓冲液中。电泳缓冲液也为硼酸-Tris-EDTA (pH 8.3)。950 伏电压下电泳 24 小时。置凝胶于增感屏(上海医械电化产品)上进行紫外检测。凝胶板上主要有四条带(见图 2)。用手术刀将各条带割下,

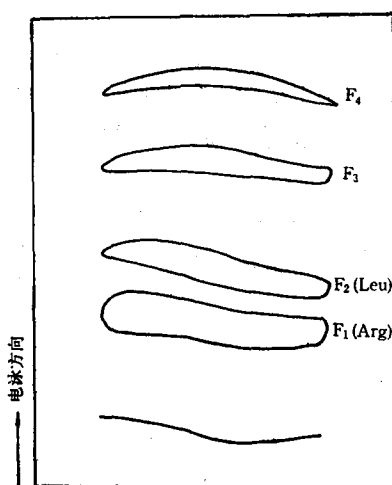


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离亮氨酸 tRNA

捣碎后用 50 mmol/L NH₄Ac (pH 5.4)-0.1% SDS 溶液室温浸泡过夜。重复浸泡一次以提高 tRNA 回收率。浸泡液中加入 3 倍体积乙醇, 置于 -20℃ 沉淀过夜。亮氨酸接受能力测定结果表明 F₂ 带对应于 tRNA^{Leu} (为 1400 pmol/A₂₆₀ 单位)。用该方法纯化 tRNA^{Leu}, 比活提高 23 倍, 总得率为 20% 左右。

各特异 tRNA 对氨基酸的接受活力理论值应该接近 1700pmol 氨基酸/A₂₆₀ 单位。实际测得纯化过的 tRNA^{Leu} 的接受活力只有 1400 pmol/A₂₆₀ 单位, 仅为理论值的 81% 左右, 末端测定结果表明 3'-末端以 A 和 C 结尾的 tRNA^{Leu} 分别为 84% 和 16% 所以溶液中 tRNA^{Leu} 3'-末端不配对核苷酸的自动脱落可能是实际测得的接受能力达不到理论值的主要原因。如果将 tRNA^{Leu} 制成干粉保存比溶液中稳定得多。

(下转第 399 页)

(上接第 398 页)

我们感谢王应陈教授对此工作的关心,感谢施建平同志的大力支持。

参 考 文 献

[1] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》,高等教育出版社,

(上接第 400 页)

漂移,形成较高的氨台阶, γ -氨基丁酸、赖氨酸-氨、组氨酸和精氨酸分离效果差;而后者基线较平稳,无氨台阶,既保证了碱性氨基酸的分辨率,又不影响其它氨基酸的分离,几种具有代表性的氨基酸,如苏氨酸-丝氨酸、酪氨酸-苯丙氨酸和赖氨酸-氨的分辨率分别为 81.5%、89.7% 和 97.5%。而且避免了双柱分析时 γ -氨基丁酸的遗失。

利用改变后的分析条件,对氨基酸混合液五次重复分析,各种氨基酸峰的保留时间的变异系数 $<0.5\%$,标准差 <1.2 ;各种氨基酸浓度的变异系数 $<2.5\%$,标准差 <2.5 。

综上所述,对 Beckman 121 MB 型氨基酸分析仪施加滤氨柱后,在更改过的缓冲液和分析条件下,氨基酸的分离效果尤其是碱性氨基酸明显好转,提高了分

1984 年,225—227 页。

[2] Ckérayil, J. D. et al.: *Methods in Enzymology*, 1968, Vol. XII (106a), Part B.

[本文于 1987 年 9 月 12 日收到]

辨率,基线稳定,精密度和重现性均在生化分析误差范围内,解决了缓冲液中的氨污染问题。一年多来,我们采用上述分析方法对蚜虫、牛肉、牧草、果品、谷物等样品进行测定,结果与文献[3][4]中的一致。

本文承汪沛洪教授审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Beckman Instruments Inc: Training Course for 121 MB Amino Acid Analyzer, 1979.
- [2] Analysis with Ammonia Filter Column by Model 835 Amino Acid Analyzer, 1983.
- [3] 陈志辉等:《昆虫学报》,1981, 3, 338—339.
- [4] 刘兴亚等:《营养学报》,1986, 4, 374—382.

[本文于 1987 年 8 月 24 日收到]