

噬菌体 T₄ 诱导的核糖核酸(RNA)连接酶的分离和纯化

中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组

(上海)

本文介绍了一种可以同时提取多核苷酸激酶(利用硫酸链霉素沉淀部分) DNA 连接酶(DE-52 柱层析峰 I)和 RNA 连接酶(DE-52 柱层析峰 III)的方法。RNA 连接酶的分离纯化步骤,除粗酶提取与 DEAE 纤维素柱层析两步与 DNA 连接酶的分离纯化方法一样外,以后只要再经过羟基磷灰石柱层析,葡聚糖凝胶(Sephadex-G 100)过滤,和单链 DNA 琼脂糖凝胶亲和层析三步就可以达到纯化的目的。最终酶浓度达到每毫升 24,800 交换单位,即 500 个标准连接单位。用 ³H 标记的聚腺苷酸作底物测不出 RNase 杂酶活力,而且成功地应用于核糖十二核苷酸和十六核苷酸的定向合成。此外还做了一些初步的连接试验,表明 RNA 连接酶对受体寡核苷酸中戊糖是核糖还是脱氧核糖有较明显的专一性,对受体寡核苷酸的组成和顺序有一定的选择性。5'-脱氧胸腺嘧啶寡核苷酸 d(pT)_n 也是个相当好的供体。

RNA 连接酶首先是由 Silber, Malathi 和 Hurwitz 等人^[1]在感染噬菌体 T₄ 的大肠杆菌中发现和初步提纯的。现在已知该酶是由分子量为 47,000 左右的单链多肽构成^[2,3]。它能催化单链寡聚核苷酸^[1],如 (pA)_n 分子内自身环化,当 $n = 10-30$ 之间时,对自身环化最有利,而 $n \leq 7$ 时则不能环化^[4]。此外还能催化以 5'-磷酸末端寡核苷酸(不能短于二核苷酸)作供体,和以 3'-羟基末端的另一个寡核苷酸(不得短于三核苷二磷酸)为受体的两个分子之间的连接^[5,5-8]。Snopek^[2,9] 等人在 Last 和 Anderson^[3] 的基础上再将 RNA 连接酶经过羟基磷灰石和单链 DNA 琼脂糖凝胶亲和层析进一步纯化,除去 3'-末端外切酶后还能催化 DNA 与 RNA 片段之间或两个 DNA 片段之间的定向连接。

至于该酶的作用机理,许多人的研究^[6,9,10]表明基本上与 DNA 连接酶的作用机制相似^[11]。

我们在分离纯化 T₄ 诱导的 DNA 连接酶的过程中,用 DEAE 纤维素(DE-52)进

行柱层析时,发现有三个焦磷酸-ATP 交换活力峰,当时只知道峰 I 是 DNA 连接酶。为进行比较研究和制取 RNA 连接酶,我们参照 Last, Anderson^[2,3,10] 等人纯化 RNA 连接酶的方法把上述第 3 个焦磷酸-ATP 交换活力峰再用羟基磷灰石柱层析,葡聚糖凝胶(G-100)过滤,以及单链 DNA 琼脂糖凝胶亲和层析三步纯化,结果获得成功。用 ³H 标记聚腺苷酸作底物检查,测不出 RNase 污染。酶制品的最终浓度达到每毫升 500 标准连接单位左右。该酶制品经过多次验证确认是 RNA 连接酶。本文介绍纯化 RNA 连接酶的方法和一些初步的连接结果。

材料和 方法

凡与纯化 DNA 连接酶所用的材料和方法共同的部分均见前文^[12]。

甲基三烷基氯化铵由中国科学院有机化学

本文于 1978 年 1 月 9 日收到。

1) 本文所用核酸、多聚核苷酸以及它们的组份的缩写符号系按照 IUPAC-IUB 系统^[13]。

研究所提供; UpCpCpA 由中国科学院生物化学研究所核酸研究室提供; dGpApCp GpApG 和 d(pT)₁₂, dT(pT)₁₂, 等由本室合成; 巯基乙醇是上海试剂四厂生产(批号: 730514); 聚三氟氯乙烯树脂是上海曙光化工厂生产; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 是上海化工专科学校工厂生产。Sephadex G-100 是 Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden 的产品; 琼脂糖(电泳用)系 BDH Chemicals Ltd, Poole England 出产。

(一) 羟基磷灰石的制备

系参照 Levin^[14]的方法。

(二) 单链 DNA 琼脂糖凝胶(4%)的制备

主要按照 Schaller 和 Nüsslein^[15]方法进行。测定包埋在琼脂糖凝胶中变性 DNA 的含量按 Bendich 和 Bolton 氯酸钠消化法进行^[16]。

(三) RNA 连接酶的 [³²P]-焦磷酸-ATP 交换测活法

与测 DNA 连接酶活力的方法相同^[14]。据 Cranston 等^[10]报道在纯化过程的最后一阶段该酶的标准连接单位与焦磷酸-ATP 交换活力单位之间保持恒定的比例关系(1:50)。

(四) 核糖核酸酶(RNase)的测定

除反应系统参照 Ohtsuka 等^[6]外其余均与前文^[13]相同。

(五) d(pT)₁₂ 的 5' 端标记法

参照 Chaconas 等利用 T₄ 诱导的多核苷酸激酶催化寡核苷酸的 5' 端磷酸基与 [³²P]-ATP 之间磷酸交换法进行标记^[17]。产物 [5'-³²P]-d(pT)₁₂ 用 Sephadex G-50 柱(0.8×100 厘米)过滤分离,以 0.05M 碳酸氢三乙胺缓冲液(pH7.5)洗脱,流速每分钟 1 毫升,分部收集,结果在第 34—39 管出现一个放射性峰,合并后减压浓缩至干,溶于 24 微升水中保存于低温冰箱备用,产品的比强为每 n mole 9 × 10⁶cpm。

(六) RPC-5 树脂的制备

筛取 180—200 目范围的聚三氟氯乙烯树脂,以甲基三烷基(C₈—C₁₀)氯化铵为涂膜剂,在氯仿溶剂中按 Kelmers 等人的方法^[18-20]制取。

(七) 分子间连接反应的条件

主要参考 Ohtsuka 等^[6]的反应系统进行,即在反应总体积 25 微升中除含有 1 n mole 的 [5'-³²P] 标记的供体寡核苷酸,10—100nmole 的受体

寡核苷酸(所有寡核苷酸的用量均指末端而言)以及 RNA 连接酶的最终纯化制品 2—10 微升外,其他成份则保持不变,反应在一端封闭的 2 毫米内径的塑料管中进行。当最后加入连接酶充分混匀后,即转移到 37℃ 水浴中保温 2 小时,反应完毕时将反应混合液移置 100℃ 水浴处理 2 分钟,立刻冷却,保存于冰箱中供分析用。

(八) 连接产物的鉴定

1. 对大肠杆菌碱性磷酸单酯酶的抗性分析:

在反应的不同时间间隔(如 0, 0.5, 1, 1.5, 2 小时)取出反应混合液 2 微升,分别注入含有 0.2 单位的碱性磷酸单酯酶的 100 微升 0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH9.0)中,置于 65℃ 水浴内作用 15 分钟,冰冷后加入 2 毫升 2% 的 Norit A 酸性悬浮液,以下操作按焦磷酸-ATP 交换活力测定法^[17]进行。用此方法来观察在两分子间形成新的 3'→5' 磷酸二酯键的百分效率,以抗单酯酶的放射性强度为纵坐标,以反应时间为横坐标作图。

2. 产物的链长分析:

(1)同系层析:于反应的不同时间间隔(与对单酯酶抗性试验一致)各取 1 微升反应混合液,分别点在 DEAE 微晶纤维素薄板上,再点上标准染料混合液后,在 27℃ 恒温室中,先用水走到其溶剂前沿越过原线变平整后,再改用同系混合液 III 上行展层至蓝色染料斑点走到薄板顶部为止(大约需要 6 小时)取出吹干作放射自显影,若有连接产物形成,则应在比原来供体的迁移率还小的地方出现链长增加的新黑斑。

(2)碱性磷酸单酯酶处理并结合 RPC-5 柱反相层析:取反应终了的反应混合液 3 微升,按上述同样方法用碱性磷酸单酯酶处理后,用水稀释至最终盐浓度在 0.01M 以下,上样至 RPC-5 柱(0.7×15 厘米)上进行反相层析^[21],用 200 毫升 0.02M NaHCO₃ 缓冲液(pH10)中含有 0—1.0M KCl 的线性梯度洗脱(洗脱液事先应用甲基三烷基氯化铵饱和)分部收集后用 Cerenkov 法计数,以每分钟脉冲数对管号作图,可以推想未曾作用过的 [5'-³²P]——供体经单酯酶作用之后均变为放射性 [³²Pi] 无机磷,而与受体连接或自身环化的和自身缩合的产物则具有抗磷酸单酯酶的特性,因此除了 ³²Pi 之外出现于其他部位的放射性,必定是连接的产物(特别是靠近高盐浓度一侧被洗

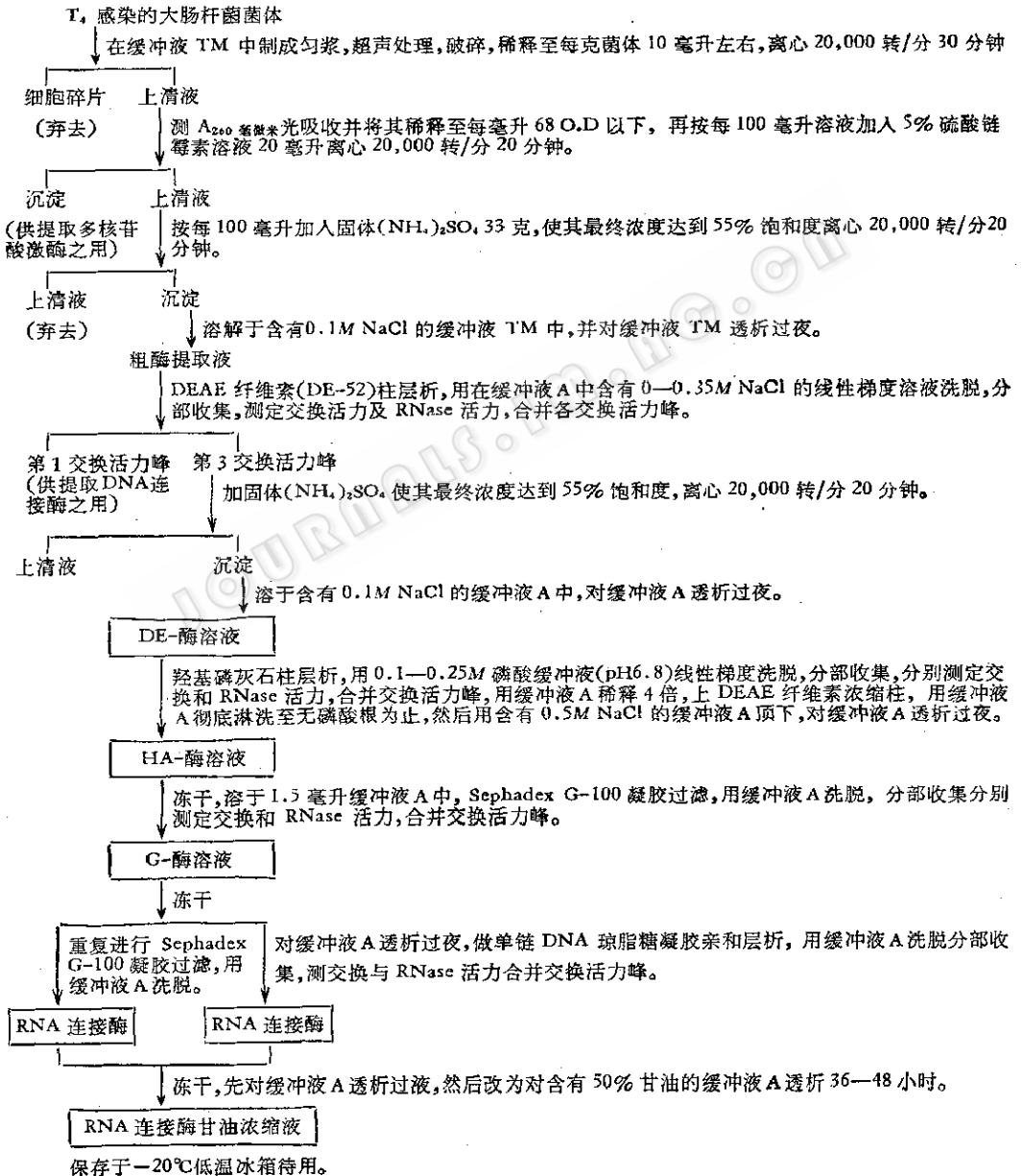
脱的部分), 至于自身环化的产物其洗脱位置应偏向低盐浓度一侧。

3. 连接点毗邻核苷酸分析: 取反应终了的混合液 3 微升装入一端已经封闭的细玻璃管中, 加入 17 微升 0.1N KOH 充分混匀后封管, 在 100°C 水浴中水解一小时, 冷却稀释中和, 加入四种核

苷酸载体, 然后上样到 RPC-5 柱(0.5×10厘米), 用 50 毫升事先以季胺盐饱和的 0.02M NaHCO₃ 缓冲液 (pH10) 中含有 0—0.25M KCl 的线性梯度溶液洗脱, 分部收集, 各管以水稀释至 5 毫升后, 以 Cerenkov 法计数, 并以每分钟脉冲数对管号作图。这是先将连接产物完全碱水解为 2'(3')

T. 诱导的 RNA 连接酶的分离纯化程序图解

(整个操作在 4—6°C 进行)



-单核苷酸后,再加入标准单核苷酸载体,然后用 RPC-5 柱反相层析来考察是否有从供体 5' 端的 ^{32}P 转移到受体 3' 端的核苷酸上去,使其变成 2', (3')- ^{32}P -单核苷酸,可以想象未曾连接的 [5'- ^{32}P] 标记的供体经碱水解后将变成 [5'- ^{32}P], -2' (3')-核苷二磷酸,它在层析图谱中的位置肯定要比前者早些才能被洗脱出来。同时从前后二者之间的放射性比例就可计算出其连接百分率。

结 果

(一) RNA 连接酶的分离和纯化

以下为从 29 克 T₂ 感染的菌体所获得的 DE-52 柱层析结果。从图 1 可看出共有三个焦磷酸-ATP 交换活力峰,经多次连接实验证明其中峰 I 是 DNA 连接酶,峰 III 是 RNA 连接酶,峰 II 因为量少且不稳定,故未继续研究下去。RNase 酶除在峰 I 内已很少外,分布甚广,特别是在峰 III 中污染仍很严重,看来似乎存在着数种能够作用于 RNA 底物的酶。此结果从 Weatherford 等人^[21]的研究结果得到支持。

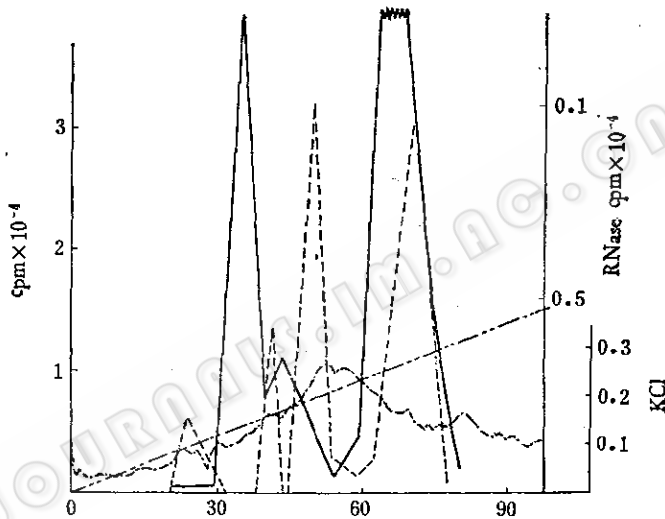


图1 DEAE 纤维素柱层析(DE-25)柱

柱 3.5×27.5 厘米,床积 300 毫升。样品: 31 毫升粗酶液。洗脱系统: 4000 毫升含有 0—0.35M NaCl 线性梯度的缓冲液 TM。流速: 每 15 分钟 1 管(40 毫升左右)。

--- 为 A_{280} 毫微米光吸收; ——— 为 ^{32}P 焦磷酸-ATP 交换活动;
——— 为 RNase 活力。

将峰 III (第 59—78 管)合并,作为进一步纯化 RNA 连接酶之用,由于体积很大(925 毫升),又含有相当多的盐,所以仍采用加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使其最终浓度达到 55% 的饱和度,重新沉淀 RNA 连接酶,再将沉淀溶解于 15 毫升含有 0.1M NaCl 的缓冲液 A 中[缓冲液 A 为 20mM Tris-HCl (pH7.5)-0.5mM β -巯基乙醇-0.1mM EDTA 二钠盐]对缓冲液 A 透析,每次 250 毫升,更换四次,除去 SO_4^{2-} 根后,作为上羟基磷

灰石柱的样品。

羟基磷灰石柱层析: 上样完毕后,先用平衡液淋洗 15 毫升,再改用 500 毫升含有 0.5mM β -巯基乙醇和 0.1mM EDTA 的 0.01—0.25M 磷酸钾缓冲液 pH6.8 线性梯度洗脱,分部收集并间隔测定各管的 A_{280} 毫微米光吸收、焦磷酸交换以及 RNase 酶的活力,对管号作图得图 2。

从图中可以看出大量的杂蛋白和 RNase 在焦磷酸交换活力峰之前被洗出,

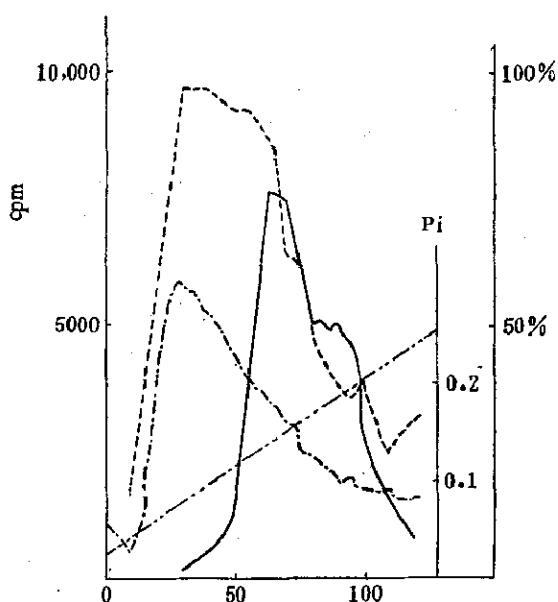


图2 羟基磷灰石柱层析: 事先以含有0.5mM β -巯基乙醇-0.1mMEDTA 二钠盐的10mM 磷酸钾缓冲液(pH6.8)平衡层析柱(1.5 \times 14.5厘米)。样品: 上一步所得的峰 III 回收的酶液21.5毫升。洗脱系统: 500毫升含有0.5mM β -巯基乙醇和0.1mM EDTA 二钠盐的0.01—0.25M 磷酸钾缓冲液(pH6.8)线性梯度洗脱。流速: 以蠕动泵控制, 每16分钟一管, 每管3.7毫升。
 - - - 为 A_{280} 毫微米 光吸收; ——— 为 $[^{32}\text{P}]$ 焦磷酸-ATP 交换活力; ····· 为 RNase 杂酶活力。

但在整个焦磷酸交换活力峰中仍有相当多的 RNase 污染, 并没有达到完全分离的效果。鉴于过去的经验 RNA 连接酶在磷酸缓冲液中容易失活, 因此合并交换活力峰(63—100管)得137毫升, 就用缓冲液 A 稀释四倍, 使其磷酸根的浓度降低到0.04M 左右, 此时的 pH 为7.0。通过 DE-52 小柱(1.3 \times 7.2厘米)回收活力, 待上样完毕就以缓冲液 A 彻底淋洗(共需500毫升)以便用 Cl^- 离子充分置换出磷酸根(用维生素 C 为还原剂酸性钼酸铵溶液与等体积的流出液混和, 在40 $^\circ\text{C}$ 保温的方法来检查流出液中磷酸根的含量), 直至检查不出磷酸根为止, 再用含有0.5M NaCl 的缓冲液 A 顶下酶来, 分部收集并测焦磷酸交换活力。合

并活力峰得20毫升, 对缓冲液 A 透析过夜以除去 NaCl, 然后冰冻干燥。作为下一步凝胶过滤样品。

葡聚糖凝胶过滤: 将上一步得到的冻干酶样品溶解于2.5毫升缓冲液中, 上样到 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱(1.6 \times 95厘米), 上样完毕后, 继续用缓冲液 A 洗脱, 但需将流出液的出口与储液瓶内液面间的距离保持在20—30厘米之间, 使凝胶不致受压而改变流速。分部收集后, 除排空体积不测外灵活间隔地测定焦磷酸交换活力(用量1微升)和 RNase 活力(用量10微升), 再对管号作图得图3。

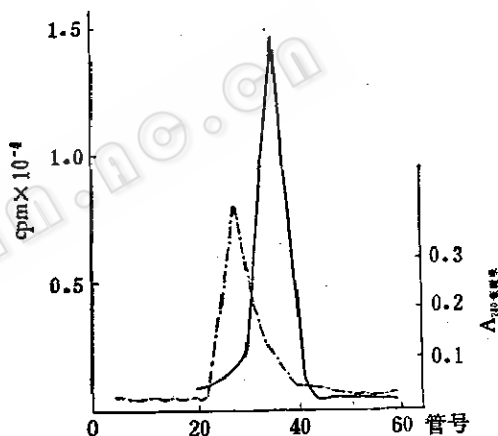


图3 葡聚糖凝胶过滤(Sephadex G-100, 1.6 \times 95厘米)事先用缓冲液 A (pH7.5) 平衡。样品: 羟基磷灰石柱层析所得的活力峰, 经过 DE-52 小柱回收, 并冻干的酶样品溶解于2.5毫升缓冲液 A 中。洗脱液: 缓冲液 A (pH7.5), 流速: 每18分钟一管, 每管2.7毫升。- - - 为 A_{280} 毫微米 光吸收; ——— 为 $[^{32}\text{P}]$ 焦磷酸-ATP 交换活力。

酶活力出现于凝胶柱排空体积 V_0 的1.35倍左右。从分离图谱中可以看出凝胶过滤能进一步去除相当多的杂蛋白, 用 ^3H -聚腺苷酸作底物检测各管 RNase 活力已不明显。将第30—40管合并, 冰冻干燥, 再溶解于2毫升缓冲液 A 中, 对同一溶液透析过夜。

单链 DNA 琼脂糖凝胶亲和层析: 按照 Cranston 等人^[10]的方法进行。将上一

步所得的酶制品上样到柱上后,继续用缓冲液 A 洗脱,分部收集,逐管测定焦磷酸交换活力 RNase 活力(用酶量同上)得图 4。

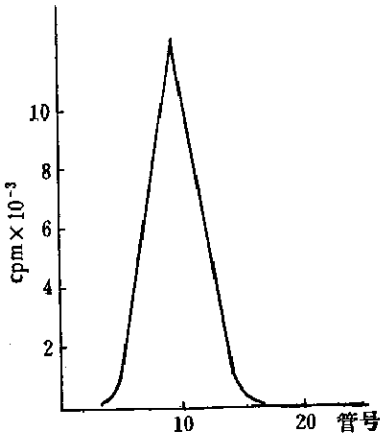


图 4 单链 DNA 琼脂糖凝胶亲和层析:柱(1×11 厘米)事先用缓冲液 A (pH7.5)平衡。样品:上一步凝胶过滤所得的酶样品 2 毫升。洗脱液:缓冲液 A (pH7.5)。流速:每 8 分钟一管,每管 0.8 毫升。——为焦磷酸-ATP 交换活力。

结果发现 RNA 连接酶能直接通过该柱,说明该酶对单链 DNA 并无亲和作用,同时再也检验不出各管中的 RNase 活力。

酶制品的浓缩与保存:合并第 4—12 管焦磷酸交换活力峰,冰冻干燥,溶解于少量缓冲液 A 中,先对同一缓冲液透析过夜,再对含有 50% (v/v) 甘油的缓冲液 A 透析 36 小时,在此期间更换透析液两次,每次 30—50 毫升,这样常可使酶液浓缩 4—5 倍。制得的最终 RNA 连接酶产品的酶浓度是每微升含有焦磷酸-ATP 交换活力 25 单位,相当于 0.5 标准连接单位。即使用 1 微升这样浓度的 RNA 连接酶液也仍旧检查不出能作用于 ³H 聚腺苷酸的杂酶存在。最后将酶保存于低温冰箱 (-20℃) 中。

(二) RNA 连接酶的鉴定和一些初步连接试验

RNA 连接酶的鉴定是以 A(pA)₄ 为受体, [5'-³²P]-(pA)₇₋₈ 为供体在标准的分

子间连接条件下进行,供体用量为 1n mole (其比强为 2 × 10⁶cpm/n mole) 受体与供体的比例是 10, 反应过程借抗碱性磷酸单酯酶(活性炭吸附法)特性和同系层析追踪,反应混合液经碱水解后用 RPC-5 柱反相层析观察到预期的 [³²P] 从 [5'-³²P]A 转移到 3'A [³²P]) 如图 5, 说明有无模板连接作用。

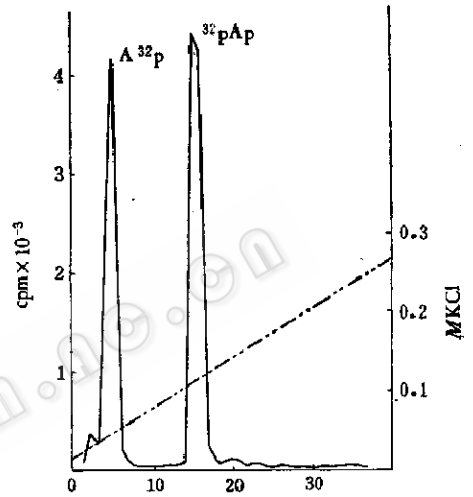


图 5 A(pA)₄ 和 [5'-³²P](pA)₇₋₈ 连接产物氢氧化钠水解液的 RPC-5 柱层析。柱 0.5×10 厘米。样品:连接产物经 0.1N NaOH 100℃ 处理 1 小时的水解液,洗脱系统:50 毫升 0.02M NaHCO₃ (pH10) 中含有 0.02—0.25M KCl 线性梯度溶液。

反应 2 小时的连接效率,不论从抗碱性磷酸单酯酶的程度(即占供体的百分数)计算,还是从 RPC-5 柱反相层析所获得的两个{即 2'(3')-A [³²P]和 [5'-³²P]pAp} 放射性强度之间的比例计算,结果一致,都接近 1:1。同时从 DEAE 薄板同系层析的结果,和连接反应的产物经碱性磷酸单酯酶处理后再进行 RPC-5 柱反相层析的结果(图 6) 都观察到链长增加的连接产物。说明有分子间的线性连接。

此外曾以 [5'-³²P]-(pT)₁₂ 作供体(其比强为 8.9 × 10⁴cpm/n mole),分别以 A(pA)₄, A(pA)₅, U(pC)₂A, dT(pT)₅ 和 dGpApCp-

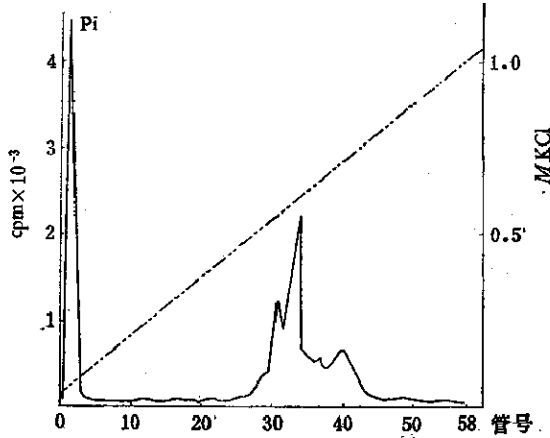


图 6 $A(pA)_4$ 与 $[5'-^{32}P]-(pA)_8$ 连接产物的 RPC 与反相柱层析
柱 0.5×10 厘米。样品: 连接产物经碱性磷酸单酯酶在 $0.05M$ tris-HCl ($pH9.0$)
缓冲液中作用 ($60^\circ C, 15$ 分钟) 后的反应混合液。洗脱系统: 200 毫升 $0.02M NaHCO_3$
($pH10$) 中含有 $0.02-1.0M$ KCl 线性梯度溶液。

表 1 利用 RNA 连接酶催化的连接反应

受体		供体		受供体之比	酶量标准 连接单位	反应 2 小时后抗单 酯酶的百分率 (%)
寡核苷酸种类	末端微克分子	寡核苷酸种类	末端微克分子			
$A(pA)_4$	10	$[5'-^{32}P]-(pA)_8$	1	10	7.5	49
$A(pA)_5$	71.8	$[5'-^{32}P]-(pT)_{12}$	0.45	160	2	52
$UpCpCpA$	360	$[5'-^{32}P]-(pT)_{12}$	1.8	200	4	27
$dT(pT)_5$	150	$[5'-^{32}P]-(pT)_{12}$	0.9	166	2	4
$dGpApCpGpApG$	133	$[5'-^{32}P]-(pT)_{12}$	0.9	148	2	0

$GpApG$ 为受体, 用 RNA 连接酶进行连接, 为了便于比较分析, 连同上述鉴定结果一并列于表 1:

若以抗磷酸单酯酶的百分率作为连接效率来看, 那么以相似的寡聚腺苷酸为受体, 不论以 $[5'-^{32}P]-(pA)_8$ 还是以 $[5'-^{32}P]-(pT)_{12}$ 为供体都可达到 50% 左右的连接效率, 似乎表明 RNA 连接酶对供体是核糖寡核苷酸还是脱氧核糖寡核苷酸并无严格的专一性。与此相反, RNA 连接酶对受体寡核苷酸中糖的种类和碱基组成却有严格的选择性, 即脱氧核糖寡核苷酸远不如核糖寡核苷酸, 此结果与 Sugino^[9] 所报道的情况完全一致。不仅如此, 而且在核糖寡核苷酸中, 连续的嘧啶寡核苷酸如 $UpCp-$

CpA 又远逊于嘌呤寡核苷酸 [如 $A(pA)_{4-5}$]。

至于 $A(pA)_4$ 与 $[5'-^{32}P]-(pA)_8$ 以及 $A(pA)_5$ 与 $[5'-^{32}P]-(pT)_{12}$ 连接反应的 DEAE 薄板同系层析的结果见图 7。连接反应的时间曲线见图 8。

在本实验中未曾观察到供体 $[5'-^{32}P]-d(pT)_{12}$ 的自身环化和自聚现象, 因此可以推断 $A(pA)_5$ 与其连接后所获得的抗碱性磷酸单酯酶的百分率, 主要来自分子间连接产物的贡献, 这一点在 DEAE 微晶纤维素薄板同系层析中看得更清楚。

讨 论

(一) 关于柱层析后酶活回收

1. DEAE 纤维素柱层析后的酶活回

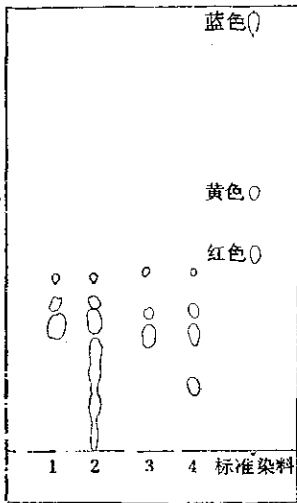


图7 DEAE 微晶纤维素薄板层析(以标准染料混合物作标记)

展层溶剂: 同系混合物 III

展层时间: 上行 6 小时

样品: 1. $[5^{32}\text{P}]-(\text{pA})_8$; 2. $\text{A}(\text{pA})_8 + [5^{32}\text{P}]-(\text{pA})_8$; 3. $[5^{32}\text{P}]-(\text{pT})_{12}$; 4. $\text{A}(\text{pA})_8 + [5^{32}\text{P}]-(\text{pT})_{12}$.

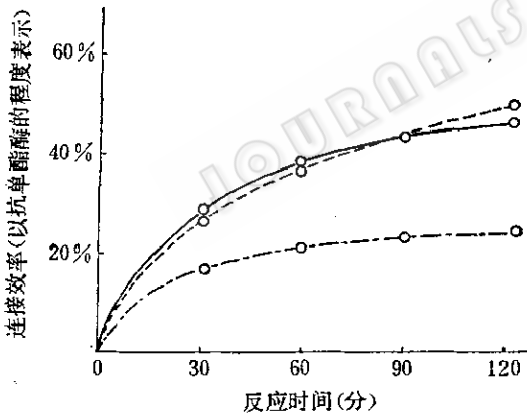


图8 RNA 连接酶反应的时间曲线

—○—○— $\text{A}(\text{pA})_8$, 10 n mole + $[5^{32}\text{P}](\text{pA})_8$ 1 n mole + RNA 连接酶 7.5 标准单位;

---○--- $\text{A}(\text{pA})_8$, 71.8 n mole + $[5^{32}\text{P}](\text{pT})_{12}$ 0.45 n mole + RNA 连接酶 2 标准单位;

○——○—— UpCpCpA 360 n mole + $[5^{32}\text{P}](\text{pT})_{12}$ 1.8 n mole + RNA 连接酶 4 标准单位。

收,我们采用添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使其达到55%饱和度来进行,经过仔细比较 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀前后的总活力,发现酶活损失竟达50%之多,因此今后最好提高 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的

饱和度或改用其他方法(如 DEAE 浓缩柱,超滤等方法)加以改进。

2. 羟基磷灰石柱层析后的酶活回收,从 Last 和 Anderson^[3]一文中可以看出这一步的酶活回收率最差,我们的结果也是如此。似乎该酶在磷酸缓冲液中容易失活,同时体积很大,无从直接进行葡聚糖凝胶过滤。我们曾采用冰冻干燥法来达到小体积上样的目的,但冻干后酶样品溶解度不好,且失活也较严重。后改用 DEAE 纤维素浓缩柱,并在此过程中用 Cl^- 置换掉大量的磷酸根,然后用浓盐洗脱再进行冰干就克服了上述的困难。

(二) RNase 的去除

1. 葡聚糖凝胶过滤的效果: 虽然羟基磷灰石柱层析已把大量的 RNase 在连接酶活力峰之前去除,所得到的连接酶中仍含有相当量的 RNase。但经过这一步纯化之后,连接酶活力峰中的 RNase 就不易测出,足见此法具有相当大的分离效果。我们曾利用 RNase 污染比较严重的连接酶样品进行凝胶过滤试验,发现 RNase 大都在连接酶活力的前半峰出现,再把前半峰冻干反复用凝胶过滤纯化,也同样可达到纯化的目的。

2. 单链 DNA 琼脂糖凝胶亲和层析的效果: 利用 RNA 连接酶与单链 DNA 没有亲和力这一特点,就易将它与其他和单链 DNA 有较强亲和力的 RNase、DNase 和 3' 末端外切酶等分开^[2,10,15,21],我们的结果也表明这点。凝胶过滤得到的连接酶经浓缩后 RNase 酶活仍有所表现,但再经亲和层析纯化浓缩后就再也测不到 RNase 酶活。值得指出的是层析时流速不宜过快,才能达到满意的分离效果。

(三) RNA 连接酶在各种层析中出现的位置

根据多次实践, RNA 连接酶在各种柱

层析过程中出现的位置已被确定: DEAE 纤维素柱层析是 0.25M NaCl; 羟基磷灰石柱层析是 0.155M 磷酸盐; 葡聚糖凝胶过滤则在 1.35 倍排空体积。

(四) RNA 连接酶最终纯化产品的浓缩和储藏

由于连接反应的总体积很小 (10—20 微升), 需要加入的其他成份又多, 因此要使酶的最终纯化产品适应连接反应的要求就必须事先经过浓缩处理。据 Last 等^[3]报道 RNA 连接酶不怕冻, 甚至可在液氮中保存, 于是我们就同时采用冻干和对 50% 甘油透析二种方法使该酶浓缩达到连接反应的要求。保存于低温 (-20℃) 冰箱, 取酶也很方便。

(五) RNA 连接酶纯化有待进一步简化和完善

1. 噬菌体突变株 T_{4am} 的应用: 我们用的是 T₄ 野生型, 虽然对各步酶活回收已给予重视, 但最终 RNA 连接酶的产率仍远不如 Last 等^[3]用 T_{4am} N82 突变株的高, 最近 Uhlenbeck 和 Cameron 采用 T_{4am} 4314 突变株也获得 RNA 连接酶的高产, 此外 T_{4am} 不致使大肠杆菌裂解, 操作起来要比野生型方便。

2. 选用缺失核糖核酸酶 RNase 的大肠杆菌变异株作为 T₄ 的寄主, 可能会对 RNA 连接酶纯化工作带来很大方便, 如大塚荣子^[22]选用大肠杆菌 A 19 RNase I⁻ 的菌株作寄主。此外大肠杆菌 PR7 菌株 (RNase I⁻ PNP)^[23]也可以考虑。

3. 超滤技术的应用: 超滤不但可以浓缩酶液, 而且可以同时除去大量的盐, 只要孔径适当不使连接酶通过就可以大大缩短纯化的周期。

4. RNA 连接酶标准测活方法的应用: 虽然 [³²P] 焦磷酸和 ATP 交换活力测定法既经济又方便, 但究竟不是特异的, 要进一

步提高 RNA 连接酶的纯化方法, 就有赖于在各种条件下 RNA 连接酶准确定位。也只有采用标准测活法才有可能计算出各个纯化步骤的酶活回收率和比活。

参 考 文 献

- [1] Silber, R., V. G. Malathi and J. Hurwitz: *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, 69: 3009—3013, 1972.
- [2] Snopek, J. J., A. Sugino, K. L. Agarwal, and N. R. Cozzarelli: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68: 417—424, 1976.
- [3] Last, J. A. and W. F. Anderson: *Arch. Biochem. Biophys.*, 174: 167—176, 1976.
- [4] Kaufmann, G., T. Klein, and U. Z. Littauer: *FEBS Letters*, 46: 271—257, 1974.
- [5] Walker, G. C., O. C. Uhlenbeck, E. Bedows, and R. I. Gumpert: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 122—126, 1975.
- [6] Ohtsuka, E., S. Nishikawa, M. Sugiura, and M. Ikehara: *Nucleic Acids Res.*, 3: 1613—1623, 1976.
- [7] Sninsky, J. J., J. A. Last, and P. T. Gilham: *Nucleic Acids Res.*, 3: 3157—3166, 1976.
- [8] Uhlenbeck, O. C., and V. Cameron: *Nucleic Acids Res.*, 4: 85—98, 1977.
- [9] Sugino, A., T. J. Snopek, and N. R. Cozzarelli: *J. Biol. Chem.*, 252: 1732—1738, 1977.
- [10] Cranston, J. W., R. Silber, V. G. Malathi, and J. Hurwitz: *J. Biol. Chem.*, 249: 7447—7456, 1974.
- [11] Weiss, B., A. J. Soblon, T. R. Live, G. C. Fareed, and C. G. Richardson: *J. Biol. Chem.*, 243: 4543—4555, 1968.
- [12] Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) 1971 Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituent recommendation (1970) *Virology*, 45: 326—337.
- [13] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组. 中国科学院生物物理研究所核酸研究组: *微生物学报*, 18 (3) 1978 年.
- [14] Levin, Östen: *Methods in Enzymology*, Vol. 5: 27—32, 1962.
- [15] Schaller, H., C. Nüsslein, and F. Bonhoeffer, et al: *Eur. J. Biochem.*, 26: 474—481, 1972.
- [16] Bendich, A. J. and E. T. Bolton: *Methods in Enzymology*, Vol. 7: Nucleic acids part B, 635—640, 1968.
- [17] Chacona, G., J. H. van de Sande, and

- R. B. Church: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**: 962—969, 1975.
- [18] Kelmers, A. D. and D. E. Heatherly: *Anal. Biochem.*, **44**: 486—495, 1971.
- [19] Pearson, R. L., J. F. Weiss, and A. D. Kelmers: *Biochim. Biophys. Acta.*, **228**: 770—774, 1971.
- [20] Singhal, R. P.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **319**: 17—24, 1973.
- [21] Weatherford, S. C., L. S. Weisberg, and D. T. Tehord, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**: 1307—1315, 1972.
- [22] 大塚荣子、西川馨、杉浦昌弘、池源森男: 生化学, **47**, 529, 1975.
- [23] Ramanarayanan, M., and P. R. S. Nivasan: *Fed. Proc.*, **34**: 699, 1975.

ISOLATION AND PURIFICATION OF BACTERIOPHAGE T₄-INDUCED RNA-LIGASE

Section for Nucleic Acid Research, Third Laboratory, Shanghai
Institute of Experimental Biology, Academia Sinica
(Shanghai)

A simple modified method suitable for purifying bacteriophage T₄-induced RNA-ligase, DNA-ligase and polynucleotide kinase with particular reference to RNA-ligase purification has been described. The procedure included six steps, namely: extraction of crude enzyme; DEAE-cellulose chromatography; hydroxylapatite column chromatography; sephadex G-100 gel filtration; single-stranded DNA-agarose affinity chromatography and enzyme concentration by lyophilization and by dialysis against 50% glycerol. The final enzyme preparation of RNA-ligase was RNase free (examined at a concentration as high as

500 standard units per milliliter) and was employed successfully in the intermolecular joining reaction for the synthesis of a linear dodecanucleotide with defined sequence. Some remarks for each step and several suggestions for further improving the overall enzyme yield have been discussed. The preliminary ligation experiments revealed that oligodeoxythymidylate, d(pT)₁₂, could be an excellent donor while hexadeoxyribo-nucleotide, dGpApCpGpApG, appeared to be a poor acceptor and that the efficiency of joining reaction depended on the composition and sequence of acceptor.