

北京棒状杆菌 RNA 聚合酶的提纯及其性质的研究

那淑敏 徐 星 余茂劬

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道了北京棒状杆菌 RNA 聚合酶的分离和提纯方法。经 DEAE 纤维素层析提纯后的酶的比活比硫酸铵分段后提高 53 倍; 低浓度利福平和放线菌素 D 对酶显示强烈的抑制作用; 酶对外加 DNA 模板呈现明显的依赖性; 酶的反应最适温度为 37℃, 最适 pH 为 7.9, 反应 30 分钟时酶活力达到最高值, 当 0.15M 氯化钾存在时表现最高酶活性。此外, 本文还报道了模板、二价金属离子浓度和抑制剂浓度对酶活力的影响。

Weiss 和 Gladstone^[1,2] 首先在鼠肝核体系中发现以四种核苷三磷酸为底物合成 RNA。随后在许多细菌中陆续发现, 其中对大肠杆菌 RNA 聚合酶的研究最为广泛和深入^[3-5,10]。我们研究的目的在于探明北京棒状杆菌遭到噬菌体侵染后 RNA 聚合酶活性和组分的变化及其在转录水平上的调控作用^[4,9,11,12]。本文报道了在没有噬菌体侵染时从细菌中分离 RNA 聚合酶及其提纯和鉴定的结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299。

(二) 培养基组成(%)

牛肉膏 0.3, 葡萄糖 1, 蛋白胨 0.5 (武汉生化制药厂), 氯化钠 0.5, 蒸馏水配制, pH7.0。

(三) 菌体的制备

1. 摇瓶培养: 取 500ml 的三角瓶装 150ml 培养基, 接入 10% 生长过夜的种子, 在旋转式摇床 (200 次/分) 于 30℃ 振荡培养 7 小时, 经 5,000 转/分离心收集菌体。2. 小罐培养*: 利用 240l 发酵罐装入 120l 培养基, 接入 15l 生长 12 小时的种子, 在 30℃ 以空气流量为 1:0.5 和搅拌速度为 260 转/分培养 10 小时, 利用连续分离离心收集菌体。保藏在 -20℃ 备用, 在三个月期间酶活性保持稳定。

(四) 试剂

ATP、GTP、CTP 钠盐、鱼精 DNA 为上海东风试剂厂产品, ³H-UTP 由上海原子能所提供, 小牛胸腺 DNA 由中国科学院上海细胞生物学研究所惠赠, DEAE 纤维素 DE-52 为 Whatman 产品, 脱氧核糖核酸酶购自包头医学院生化制药厂。

(五) 分析方法和仪器

测定蛋白量按 Lowry 法^[13], 以牛血清蛋白作标准。利用 Hilger 紫外分光光度计测定洗脱液在 280nm 和 260nm 的吸光度。放射性强度测定系采用 NE 8312 型液体闪烁计数器。超声波发生器系 CFS-250 型。

(六) 溶液

1. 缓冲液 I: 0.05M Tris-HCl, pH7.9, 0.01M MgCl₂, 0.2M KCl, 0.1mM DTT, 5% 甘油。

2. 缓冲液 II: 0.01M Tris-HCl, pH7.9, 0.01M MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 5% 甘油。

3. 浓缩贮存液: 0.01M Tris-HCl, pH7.9, 0.1M MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.1M KCl, 50% 甘油。

4. 42% 硫酸铵缓冲液: 先将少量蒸馏水加入 51.2 克硫酸铵中使之溶解, 以浓 NH₄OH 将 pH 调至 7.0, 补足水到 180ml。使用时取此液 90ml 与 10ml 10× 的缓冲液 II。

5. 闪烁液: 将 0.4% PPO 和 0.01% POPOP

本文于 1980 年 8 月 9 日收到。

* 小罐培养和高速离心工作由本所技术室和工厂部分同志协助完成, 谨致谢意。

溶于甲苯,加入 10% 萘,避光保存。

(七) RNA 聚合酶活性的测定

测定掺入的 ^3H -UTP 变成酸不溶性产物作为衡量聚合酶活性的标准^[1]。

酶活性测定系统包含 0.04M Tris-HCl, pH7.9, 0.01M MgCl_2 , 0.1mM EDTA, 0.15M KCl, 0.8mM K_2HPO_4 , 0.15mM 的 ATP、GTP、CTP 钠盐, $10\mu\text{l}$ ^3H -UTP (比活 1mCi/ml), $50\mu\text{g}$ 的小牛胸腺 DNA 或鱼精 DNA 和一定量的被测酶液,反应总体积为 0.1ml。反应前保持在冰浴中,移往 37°C 水浴中保温 20 分钟,置于冰浴终止反应。取 $50\mu\text{l}$ 反应液进行活性测定,基本按 Bol-lum^[7] 圆片滤纸法进行。以单位时间内掺入的 ^3H -UTP 放射性计数相对地表示酶的活性强度。

(八) 酶的浓缩和贮存

收集酶活性高的洗脱液对浓缩贮存液反透析达到浓缩目的。保藏在安瓿中置于 -20°C 。

结 果

(一) 酶的提纯

酶的提纯操作,除另有注明外,均在 $0^\circ-4^\circ\text{C}$ 进行。取 60g 制备的冰冻细胞,悬浮在 80ml 缓冲液 I 中。分两次利用超声波破碎细胞,工作频率为 13—25 千周,输出功率 250W,工作电流 250mA;处理 1 分钟,间歇 1 分钟,实际处理 30 分钟,处理时菌体悬液保持在 10°C 以下,同时镜检细胞破碎的情况。加入新鲜配制的 DNA 酶液,在 4°C 作用 2—3 小时,然后在 30,000—33,000rpm 离心 60 分钟,去除菌体碎片和核糖体。保留上清液,用氢氧化钠调 pH 至 7.5。

在冰浴中将固体硫酸铵缓慢加到上清液中,使其浓度达到 33% 饱和度,滴加 NaOH 使 pH 不低于 7.0,继续搅拌 30 分钟,在 12,000rpm 离心 1 小时,收集上清液。再追加硫酸铵使之达到 50% 饱和度,继续搅拌 30 分钟,离心收集沉淀,悬浮于 50ml 的 42% 饱和度硫酸铵缓冲液中,搅拌沉淀 30—40 分钟,使之充分分散,离心

收集沉淀,并溶解在 200ml 的缓冲液 II 中,供上柱层析分离用。

取上述粗酶液加在已经缓冲液 II 平衡后的 DE-52 柱 ($2.3 \times 16\text{cm}$) 上,流速控制在每分钟 1ml 左右,待酶液进入树脂后,用少量缓冲液 II 洗涤,再以含 0.13M KCl 的缓冲液 II 按每分钟 1.2ml 的流速洗脱,直至洗脱液在 280nm 波长的吸光度小于 0.1 时,改用 0.23M KCl 的缓冲液 II 洗脱,收集 280nm 的吸收峰区段(图 1)。

经上述阶段洗脱后呈现两个吸收峰,但 0.13M KCl 的洗脱峰没有酶活性,而 0.23M KCl 的洗脱峰具有 RNA 聚合酶活性。图 1 展示所测出的蛋白峰和酶活性的峰相互重叠。曾经使用 0.1M 和 0.4M KCl 梯度洗脱时,也出现相似的现象。

粗酶液经三阶段硫酸铵分级后,继续通过 DE-52 纤维素柱层析,提纯的酶液比活可以提高 53 倍,酶在提纯过程中的活性比较结果列入表 1。

(二) 酶对模板的依赖性

在 DNA 模板和四种核苷三磷酸存在

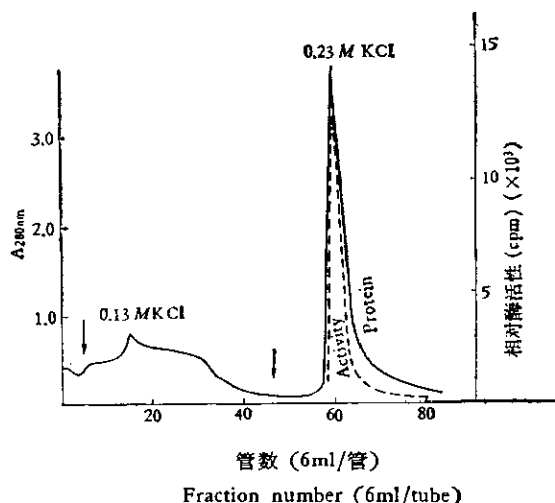


图 1 RNA 聚合酶分段洗脱液活性测定结果
Fig. 1 Chromatography of RNA polymerase on DE-52 column ($2.3 \times 16\text{cm}$)

表 1 酶在提纯过程中的活性测定结果
Table 1 Determination of RNA Polymerase Purification

提纯步骤 Fraction	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活性 Total activity (cpm)	比活性 Specific activity (cpm)	产 量 Yield (%)	
				Protein	RNA polymerase activity
硫酸铵分级 Ammonium sulfate fraction	125	2,600,000	2,680	100	100
DEAE-纤维素层析 Pooled DEAE-cellulose peak	15.1	2,170,000	143,600	12.8	84

表 2 RNA 聚合酶活性测定结果
Table 2 Determination of RNA Polymerase Activity

反 应 混 合 物 Reaction mixture	相对 RNA 聚合酶活性 Relative RNA polymerase activity		
	cpm (%)	cpm (%)	cpm (%)
	实 验 I Exp t. I	实 验 II Expt. II	实 验 III Expt. III
全部反应物 Complete reagents	9,401 100	7,983 100	5,408 100
全部反应物-DNA Complete reagents-DNA	597 6.3	34 0.42	53 1
全部反应物+放线菌素 D Complete reagents +actinomycin D	165 2	— —	51 0.9
全部反应物+利福平 Complete reagents +rifampicin	364 3.8	82 1.2	133 2.4
全部反应物-酶 Complete reagents -enzyme	0 0	0 0	0 0
全部反应物-ATP, GTP, CTP Complete reagents-ATP, GTP, CTP	300 3	19 0.23	42 0.08

的情况下,按上法提纯的 RNA 聚合酶可以催化 RNA 合成。定量的酶所合成的 RNA 量在一定范围内与反应系统中的 DNA 量呈线性关系。反应强烈地受到低浓度利福平($10^{-7}M$)和放线菌素 D($10^{-4}M$)的抑制^[1,9]。表明所分得的酶具有明显的模板依赖性(表 2 和图 2)。

(三) 利福平对酶的抑制作用

由于利福平对 RNA 聚合酶是特异性抑制剂,它与酶的一个亚基结合,从而阻抑转录。 $10^{-8}M$ 的利福平能抑制 RNA 聚合酶的活性^[5,13]。在我们实验的条件下,

$0.4\mu g/ml$ 利福平能抑制酶的活性达 40% 左右。见图 2 所示结果。

(四) 温度对酶活性的影响

比较不同温度下酶的活性,发现在 37℃ 酶活性最高(图 3)。

(五) 酶反应的最适时间:

试验结果表明,在所规定的条件下,反应 30 分钟相对酶活性呈现最高(图 4)。

(六) 不同镁离子浓度对酶活性的影响

图 5 显示,在反应混合物中加入不同浓度的氯化镁,可以呈现不同的酶活性。在

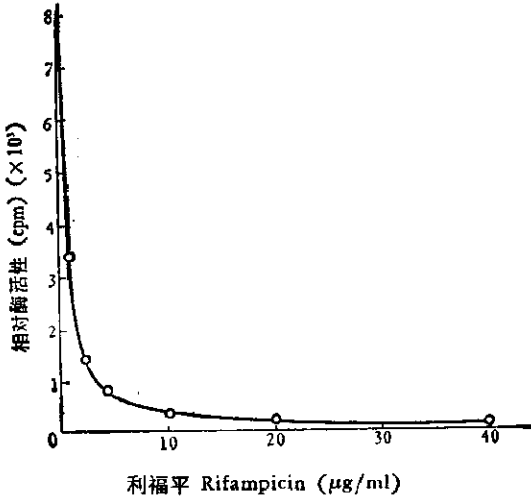


图2 利福平对 RNA 聚合酶的抑制作用
Fig. 2 Inhibition of rifampicin on RNA polymerase activity

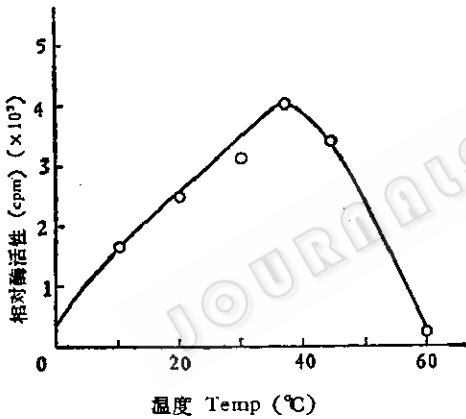


图3 不同温度对 RNA 聚合酶活性的影响
Fig. 3 The effect of temperature on RNA polymerase

0.01M 氯化镁时酶活性表现最高，超过此浓度时酶的活性受到抑制。

(七) 锰离子的取代作用

利用低浓度的锰离子 (0.0002M) 替代 0.01M 的镁离子可以获得更高的 ^3H -UTP 的掺入。

(八) 不同氯化钾浓度的影响

在图 6 中可以看到，0.15M 氯化钾存在时，RNA 聚合酶呈现最高活性，而超过这一浓度时，活性受到抑制。如以氯化钠

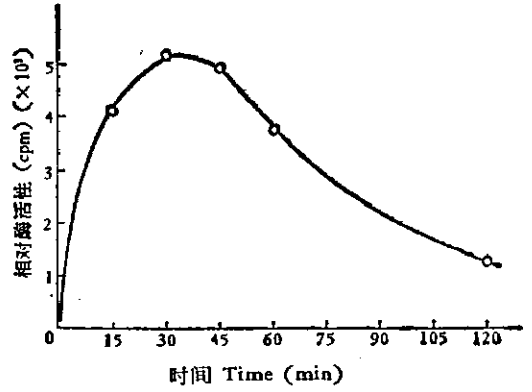


图4 RNA 聚合酶反应的最适时间
Fig. 4 The optimum reaction time for RNA polymerase

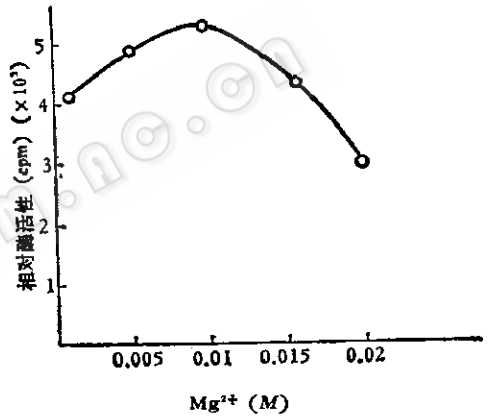


图5 Mg^{2+} 浓度对 RNA 聚合酶活性的影响
Fig. 5 The effect of Mg^{2+} concentration on RNA polymerase activity

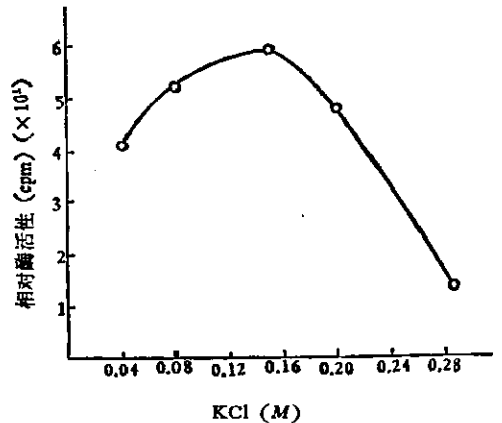


图6 不同浓度氯化钾对 RNA 聚合酶活性的影响
Fig. 6 The effect of KCl concentration on RNA polymerase activity

取代氯化钾进行反应时, 也取得相同的结果, 说明起作用的是盐类, 而不是一价阳离子。

(九) pH 值对酶活性的影响

反应中不同的 pH 对酶的活性有显著的影响。试验结果表明 pH7.9 为酶的最适反应条件, 若以 pH7.9 时反应中 ^3H -UTP 的掺入值为 100, 则在 pH7.3 和 pH8.3 时的掺入值分别为 pH7.9 时的 74% 和 83%。

(十) 四种模板的比较

究竟不同来源的 DNA 模板对北京棒状杆菌 RNA 聚合酶的反应系统起什么作用? 我们比较了四种不同 DNA 模板的作用。所采用的 DNA 是: 小牛胸腺 DNA、鱼精 DNA、 λ DNA (本所制备) 和噬菌体 A3 DNA^[10]。利用它们作为模板进行转录时, 发现前两种模板可获得相似的掺入量, 而后两种 DNA 只引起较低的掺入。

讨 论

将对数生长的北京棒状杆菌经超声波破碎, 通过硫酸铵分部, 再以 DEAE-纤维素层析, 可获得提纯的 RNA 聚合酶。与其它来源的酶一样^[1,5,13], 北京棒状杆菌 RNA 聚合酶也明显地受利福平特异性抑制, 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的药物浓度抑制酶的活性达到 40% 左右。在测定 RNA 聚合酶的转录活性中, 小牛胸腺 DNA 和鱼精 DNA 都能作为有效的模板, 但噬菌体 A3 和 λ DNA 则不然。这些结果表明北京棒状杆菌 RNA 聚合酶对 DNA 模板的转录活性有一定范围的特异性。根据最近的研究结果, 感染噬菌体 A3 后的北京棒状杆菌 RNA 聚合酶对 A3 DNA 模板的转录活性有较大幅度的提高。这反映酶的组分可能有所改变, 因而成为调控基因表达的一个重要因素。

此外, 在测定所提纯的酶的活性过程

中, 发现未加模板 DNA 时, 仍有微量的标记物掺入。这可能由于 DNA 未能完全除尽, 即使通过两次 DEAE 纤维素层析, 或曾经试用链霉素方法去除 DNA, 但其效果并未能明显提高。

细胞的破碎程度和酶的提取效率有直接的关系。对于北京棒状杆菌细胞的破碎, 我们曾试用各种方法, 其中包括三氧化二铝研磨、利用液氮反复多次冻融结合三氧化二铝研磨、细菌磨法和压力釜等法^[2,4], 看来压力釜法的破碎效果较好, 但操作步骤较繁琐, 尤其对大量细胞破碎不甚方便。现采取改进的超声波法处理可达到破碎目的, 但所需时间仍较处理大肠杆菌细胞为长, 看来改进破碎方法将会有效地提高分离的效果。

参 考 文 献

- [1] Chamberlin, M. J.: in "The Enzyme" Vol. 10, ed. by P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck, Academic Press, New York and London, 1974, pp. 333—334.
- [2] Weiss, S. B.: in "RNA Polymerase" ed. by R. Losick and M. J. Chamberlin, Cold Spring Harbor Laboratory, 1976, pp. 3—12.
- [3] Burgess, R. R.: *J. Biol. Chem.*, **244**: 6160—6167, 1969.
- [4] Chamberlin, M. J. et al.: *Nature*, **228**: 227—231, 1970.
- [5] 田中信男: 抗生物质的作用メカニズム, 《抗菌素的作用机制》翻译组译, 科学出版社, 1977.
- [6] Kay, D.: in "Methods in Microbiology" 7A, ed. by J. R. Norris and D. W. Ribbons, Academic Press, London and New York, 1972, pp. 240—246.
- [7] Bollum, F. J.: in "Procedures in Nucleic Acid Research" Vol. 1, ed. by G. L. Cantoni and D. R. Davies, Harper and Row, Publishers, New York, Evanston, San Francisco and London, 1967, pp. 296—300.
- [8] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [9] Niles, E. G. et al.: *Biochemistry*, **13**: 3904—3912, 1974.
- [10] 那淑敏等: 微生物学报, **19**: 41—44, 1979.
- [11] Furth, J. and L. I. Pizer: *J. Mol. Biol.*, **15**: 124—135, 1966.
- [12] Walter, G. et al.: *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., **30**: 240—247, 1968.

- [13] Hartmann, G. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **145**: 843—844, 1967.

- [14] 上海实验生物研究所三室细胞研究组: 生物化学与生物物理进展, 1977年, 第6期, pp. 6—9.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FROM *CORYNEBACTERIUM PEKINENSE*

Na Shumin Xu Xing Yu Maoxiao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

DNA-dependent RNA polymerase was isolated and preliminarily purified from L-glutamic acid producing *Corynebacterium pekinese* strain AS 1.299. After further purification by DEAE-cellulose chromatography, specific activity of RNA polymerase increased by 53 times as compared with the original preparation from ammonium sulfate fraction. Rifampicin and actinomycin D at low con-

centration exhibited strong inhibition to RNA polymerase activity. RNA polymerase was obviously dependent on extra-added DNA templates. Suitable templates, optima of temperature (37°C), pH (7.9), reaction time (30 min) as well as suitable concentrations of Mg^{2+} , Mn^{2+} , KCl (0.15 M) and inhibitors for the RNA polymerase activity were determined.