

# 从大肠杆菌 B/r 中同时制备 ATP:RNA 腺苷酰转移酶和多核苷酸磷酸化酶

秦士良\* 兰永强 蔡菊娥

商金宝 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

本文报道了从大肠杆菌 B/r 中同时制备 ATP:RNA 腺苷酰转移酶和 PNPase 的简便方法。菌体经压力破碎, 聚乙二醇-葡聚糖分相抽提及磷酸纤维素柱层析得到 ATP:RNA 腺苷酰转移酶。其滤液经 DEAE 纤维素柱层析和 Sephadex G-200 凝胶过滤得到 PNPase。用 Oligo dT 纤维素和聚丙烯酰胺凝胶电泳对酶反应产物作了初步鉴定。

大肠杆菌 ATP:RNA 腺苷酰转移酶 (EC2. 7. 7. 10) 是以 ATP 为底物, RNA 作引物, 在 RNA 的 3' OH 末端加上 PolyA 序列的一种酶<sup>[1,2]</sup>。PNPase (EC2. 7. 7. 8) 在证实 DNA 的双螺旋结构和阐明遗传密码及其阅读方向的研究中曾起过重要的作用<sup>[3]</sup>。从大肠杆菌中分别提取这两个酶的方法虽然早有报道<sup>[1,4]</sup>, 我们在以大肠杆菌 B/r 作原料制备 ATP:RNA 腺苷酰转移酶的过程中, 发现约 93% 的 PNPase 集中在经磷酸纤维素吸附后的滤液里。于是我们用简便的方法从滤液中制得 PNPase (回收率为 60%)。本文将扼要介绍从大肠杆菌 B/r 中同时制备 ATP:RNA 腺苷酰转移酶和 PNPase 的方法及其产物的鉴定。

## 材料和方法

### (一) 试剂

<sup>3</sup>H-ATP (29Ci/mM, 1mCi/ml), 上海原子核研究所出品; ADP, ATP, DTT, 腺苷-5'-对硝基磷酸钠, 酵母混合 tRNA 和 Oligo dT 纤维素为本所东风生化试剂厂出品; 聚乙二醇 6000, 上海合成洗涤剂二厂出品; 葡聚糖 T 500 和 Sephadex G-200 为瑞典 Pharmacia 出品; P11 纤维素及 DE-52 纤维素为英国 Whatman 出品; DNase I, 美国

Sigma 出品; DE-81 纤维素纸及大肠杆菌 B/r 菌种由本所戚德芳、潘铁城同志赠送。

缓冲液 A: 0.05 M Tris-HCl pH 7.9, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2M KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 5% 甘油。缓冲液 B: 0.025 M Tris-HCl pH 7.9, 1mM EDTA, 5% 甘油。缓冲液 C: 0.02M Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA。缓冲液 D: 0.02 M Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA。缓冲液 E: 0.1 M Tris-HCl pH8.0

### (二) 酶活力测定

1. ATP:RNA 腺苷酰转移酶: 基本参照 Sippe 的方法<sup>[1]</sup>并略加修改。

(1) 含 tRNA 的活性测定系统: 100 μl 反应液含有 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM MnCl<sub>2</sub>, 25 μg tRNA, 0.1 mM ATP, 5μl <sup>3</sup>H-ATP 和 10μl 酶液。于 37°C 保温 10 分钟后移至冰浴中终止酶反应。全部反应液转移至 DE-

本文于 1981 年 12 月 24 日收到。

\* 北京师范大学生物系。

本工作是在王德宝教授指导下进行的。

上海植物生理研究所包慧中同志多次帮助我们进行压力破碎, 特此表示衷心感谢。本所刘新垣、谢章群、郑宏大、戚德芳、潘铁城、叶盛钰、庄熙孟、顾华星等同志给予多方面的帮助, 谨此一并致谢。

本文采用以下缩写: PNPase: 多核苷酸磷酸化酶; PolyA: 聚腺苷酸; DNase I: 脱氧核糖核酸酶 I; Oligo dT: 寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸; UTT: 二巯基赤藓醇。

81 纤维素纸片上,用 5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  洗涤 5 次,再用蒸馏水洗涤 2 次,干燥后用国产液体闪烁计数器计数。以在 37°C 保温 10 分钟,催化 1 nmole AMP 参入 tRNA 的酶量定为一个酶活力单位。

(2) 不含 tRNA 的活性测定系统:除不加 tRNA 外其他均与含 tRNA 的系统相同。

2. PNPase:基本参照 Fuwa 和 Okuda 的方法<sup>[1]</sup>,并略加修改。3 ml 反应液中含有 0.02 M Tris-HCl pH9, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5M KCl, 3.3mM ADP 和适量的酶。于 37°C 保温 30 分钟后加 1ml 10% 过氯酸,放置 10 分钟。离心,沉淀先后用 5% 过氯酸和 95% 乙醇各 3 ml 洗涤。再加 3 ml 0.1M Tris-HCl pH8 缓冲液将沉淀溶解。离心后取 1ml 上清液,加 4 ml 水稀释,测定  $A_{237}$ 。在此条件下测得 1 ( $A_{237}$ ) 单位表示一个酶活力单位。

3. 磷酸二酯酶:参照本所二室建立的方法。0.5 ml 反应液含有 0.1 M Tris-HCl pH 9, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM 腺苷-5'-对硝基酚磷酸钠和适量的酶液。于 37°C 保温 16 小时后加 2 ml 0.1 M Tris-HCl pH9, 测定  $A_{420}$ 。一般每加 4 单位的 PNPase 制剂,其中磷酸二酯酶活力在  $A_{420}$  不超过 0.03 单位即可。

### (三) 蛋白质含量测定

用紫外吸收法计算<sup>[12]</sup>。

### (四) 菌体培养

大肠杆菌 B/c 在每升含 6 g 酵母浸出汁, 4.5 g 精解蛋白胨, 7.5 g 酪蛋白水解物和 5 g NaCl 的培养基中 30°C 培养。达对数期时将培养物冷却,离心,用 0.85% NaCl 洗涤菌体。10 l 培养基共得菌体 56.6g,置 -20°C 保存备用。

## 结果与讨论

以下操作均在 4°C 左右进行。

### (一) ATP:RNA 腺苷酰转移酶的制备

1. 低速上清液的制备:把 56.6 ml 含 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase I 的缓冲液 A 分部加入冷冻的 56.6 g 菌体中,搅拌均匀后用 X-PRESS 25 型压力机(瑞典)进行压力破菌。破菌液搅拌 30 分钟,离心(17000 转/分)30 分钟,得上清液 61 ml (低速上清液)。

2. 高速上清液的制备:在低速上清液中慢慢加入 2.73 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,使其最终浓度达 1 M,同时加 12.75 ml 含 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的缓冲液 A。搅拌 1 小时后离心(40000 转/分)6 小时。仔细倾出上清液共 67.5 ml (高速上清液)。

3. 分相抽提:在高速上清液中加入 25ml 30% (W/W) 聚乙二醇 6000, 10.8 ml 20% (W/W) 葡聚糖 T 500 和 26.3 g NaCl (NaCl 最终浓度达 4 M)。搅拌 1 小时后离心(11,000 转/分)45 分钟。分离上下两相,将 87 ml 上相清液(分相抽提上相)对缓冲液 B + 0.5 M NaCl 透析(2 l × 3)。离心(11000 转/分)30 分钟,得上清液 135ml。

4. 磷酸纤维素柱层析:取 5—6 g P 11 磷酸纤维素先用 0.5 N NaOH (干重的 25 倍体积)处理 5 分钟,用蒸馏水洗到 pH < 10,再加 25 倍体积 0.5 N HCl 处理 5 分钟,然后洗到 pH > 3,最后用 2—3 l 缓冲液 B + 0.5 M NaCl 平衡。在透析后的分相抽提上相清液中加入 50 ml 已平衡的湿磷酸纤维素和 100 ml 缓冲液 B + 0.5 M NaCl,缓慢搅拌 3 小时。磷酸纤维素用砂芯漏斗过滤(滤液用于制备 PNPase),并用 200 ml 缓冲液 B + 0.5 M NaCl 分几次洗涤,然后装柱(2.5 × 10cm),再用 100 ml 缓冲液 B + 0.5 M NaCl 洗涤。随后用缓冲液 B 配制的 0.5 M 和 1.1 M NaCl 各 100 ml 进行梯度洗脱。流速 0.25 ml/分。测定各收集管的酶活力。活力峰部分置 2°C 保存。洗脱曲线及各步提纯比较见图 1 和表 1。

我们在进行含 tRNA 引物的酶活力测定的同时也做了不含 tRNA 系统的测定。在不含 tRNA 系统中各管均无 AMP 参入,说明必须存在 RNA 引物的情况下此酶才能合成 PolyA 序列。

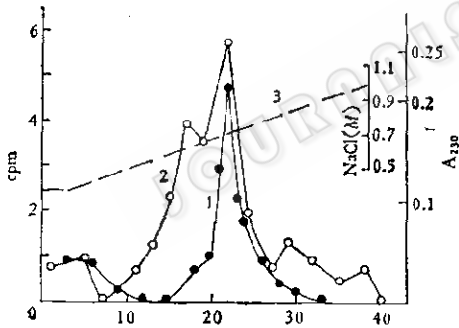
### 4. 酶反应产物的鉴定

(1) 通过 Oligo dT 纤维素柱: 6.25 ml

表 1 ATP: RNA 腺苷酰转移酶的提纯

Table 1 Summary of the purification of ATP:RNA adenylyl transferase

提纯步骤 Fraction	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg protein)	产率 Yield (%)
低速上清液 Low speed supernatant	3238	2656	0.8	100
高速上清液 High speed supernatant	2384	2323	0.9	87
分相抽提上相 Top layer of two phase system	1532	1991	1.3	72
磷酸纤维素活力峰总和 'Total phosphocellulose peak	28.6	1268	44	48
磷酸纤维素峰值管 Phosphocellulose peak fraction	3.2	347	117	13



管数 Fraction number

图 1 ATP: RNA 腺苷酰转移酶的磷酸纤维素柱层析图谱

Fig. 1 Phosphocellulose column chromatography of ATP:RNA adenylyl transferase

1. ATP:RNA 腺苷酰转移酶活力 [ $^3\text{H}$ -AMP 参入 (cpm)]ATP:RNA adenylyl transferase activity expressed in  $^3\text{H}$ -AMP incorporation (cpm)

2. A230 3. NaCl 浓度 Conc. of NaCl

反应液含有 0.05 M Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 0.2 mM ATP, 17.5 (A<sub>260</sub>) 单位 tRNA 和 2.5

ml 酶液。37°C 保温 40 分钟。经酚抽提和乙醇沉淀后按 Aviv 和 Leder 的方法<sup>[7]</sup> 通过 Oligo dT 纤维素柱。同时用未经酶反应的 tRNA 通过 Oligo dT 纤维素柱作为对照。结果见表 2。从反应后 A<sub>260</sub> 单位数的增加及通过 Oligo dT 纤维素柱后流出液中 A<sub>260</sub> 单位数的减少说明此酶确实在 tRNA 上加上了 Poly A 序列。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 取 2 (A<sub>260</sub>) 单位的 tRNA 按上述条件加酶反应和抽提, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定产物。电泳结果 (图 2) 表明经过酶反应的 tRNA 分子量增加而迁移率降低。这进一步证明在 tRNA 上加上了长度不等的 PolyA 序列。另外酶反应后 5 S RNA 带的消失说明 5 S RNA 可能比 tRNA 反应完全, 更适合于作此酶的引物。

## (二) PNPase 的制备

1. DEAE 纤维素柱层析: DE-52 纤维素柱 (2.5 × 57cm) 用缓冲液 C 平衡。在

表 2 ATP:RNA 腺苷酰转移酶反应产物通过 Oligo dT 纤维素柱吸附情况

Table 2 Oligo dT cellulose column adsorption of the products of ATP:RNA adenylyltransferase

样 品 Sample	A <sub>250</sub>			
	Poly A 化之前 Before addition of Poly A.	Poly A 化之后 After addition of Poly A	上柱液 Applied on column	流出液 Flow from column
Poly A 化 tRNA Polyadenylated tRNA	17.5	26	26	6.4
tRNA	—	—	44	44

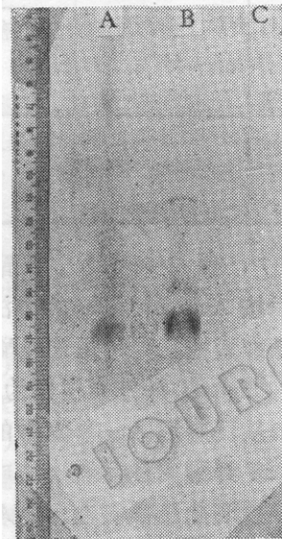


图 2 ATP:RNA 腺苷酰转移酶反应产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of the products of ATP:RNA adenylyltransferase  
电泳条件: 12% 凝胶, 0.05 M Tris-硼酸 pH 8.3 7M 脲, 甲萘蓝显色

A. 酶反应产物 B. tRNA C. 酶制剂(本身不含核酸)

Electrophoresis was performed on 12% polyacrylamide gel in 7M urea, 0.05M Tris-borate (pH 8.3), the gel was stained with methylene blue

A. Products of enzyme reaction B. tRNA C. Enzyme preparation lacking nucleic acid

经过 P 11 磷酸纤维素吸附后的 245 ml 滤液中加 88 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 使达 60% 饱和度。

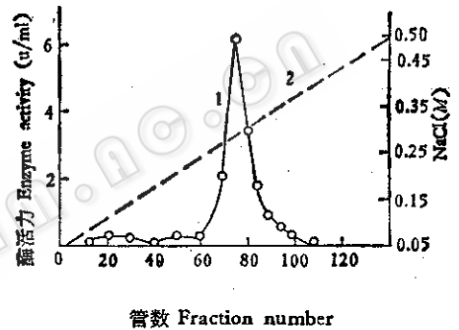


图 3 PNPase 的 DEAE 纤维素柱层析图谱  
Fig. 3 DEAE-cellulose column chromatography of PNPase

1. PNPase 活力 Activity 2. NaCl 浓度  
Concn. of NaCl

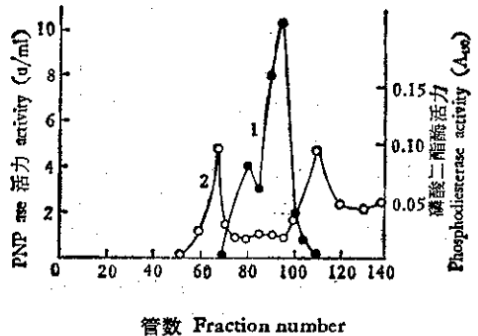


图 4 PNPase 的 Sephadex G-200 凝胶过滤  
Fig 4 Sephadex G-200 gel filtration of PNPase  
1. PNPase 活力 Activity 2. 磷酸二酯酶活力(用 A<sub>450</sub> 表示) Phosphodiesterase activity (A<sub>450</sub>)

表 3 PNPase 的提纯

Table 3 The purification of PNPase

提纯步骤 Fraction	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg protein)	产率 Yield (%)
磷酸纤维素吸附滤液 Filtered liquor of phosphocellulose	1521	955	0.6	100
DEAE 纤维素柱层析 DEAE-cellulose chromatography	286	854	3	89
Sephadex G-200 凝胶过滤 Sephadex G-200 gel filtration	48	577	12	60

离心(10,000 转/分) 30 分钟。用 50 ml 缓冲液 C 溶解沉淀,并对缓冲液 C 透析(11×3),内透液离心(10,000 转/分) 30 分钟,得上清液 120 ml,再加入 80 ml 缓冲液 C,然后通过 DE-52 纤维素柱,用 700 ml 缓冲液 C 淋洗柱。接着用缓冲液 C 配制的 0.05 M 和 0.5 M NaCl 各 1000 ml 进行梯度洗脱,流速 2 ml/分。测定各收集管的 PNPase 活力。洗脱曲线见图 3。

2. Sephadex G-200 凝胶过滤: Sephadex G-200 柱(2.5×160 cm)用缓冲液 E 平衡。合并 DE-52 纤维素柱洗脱峰的主要部分共 615 ml,加 222 g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>使达 60% 饱和度。离心(8000 转/分) 40 分钟。用 5ml 缓冲液 D 悬浮沉淀,先对缓冲液 D 透析(0.8 l×2),再对缓冲液 E 透析(0.8 l×3),得透析液 14 ml。然后上 Sephadex G-200 柱,用缓冲液 E 洗脱,流速 0.25 ml/分。测定各收集管的 PNPase 和磷酸二酯酶活力。洗脱曲线见图 4。以尽可能除去磷酸二酯酶为原则,合并 PNPase 活力峰的主要部分共 114 ml,对饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液进行反透析。内透液离心(10,000 转/分) 40 分钟,

所得沉淀加 0.5 ml 缓冲液 D 悬浮,再对缓冲液 D 充分透析。最终得到 3.3 ml PNPase 制剂,酶活力为 175 u/ml,共 577 单位。每 4 个单位酶液中含磷酸二酯酶活力 A<sub>450</sub> < 0.03,符合使用标准。各步提纯见表 3。

4. 为了提高 PNPase 制剂的浓度,我们取一定量的酶制剂对含 50% 甘油的缓冲液 D 透析,所得浓缩酶制剂的浓度为 636 u/ml,酶浓度提高 3.6 倍,并更有利于低温保存。

## 参 考 文 献

- [1] Sippel, A. E.: *Eur. J. Biochem.*, **37**: 31, 1973.
- [2] Devos, R. et al., *Eur. J. Biochem.*, **62**: 401, 1976.
- [3] 刘新垣等: 生物化学与生物物理进展, 1979 年第 6 期第 10 页。
- [4] 李禄先, 杨开宇: 生物化学与生物物理学报, **6**(2): 155, 1966.
- [5] Fuwa, I. & Okuda, J.: *J. Biochem.*, **59**: 95, 1966.
- [6] Layne, E.: *Methods in Enzymology*. Vol. III., Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. (ed) Academic press, New York, 1957, P447.
- [7] Aviv, H. & Leder, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA **69**: 1408, 1972.

**SIMULTANEOUS PURIFICATION OF ATP:RNA  
ADENYLTRANSFERASE AND POLYNUCLEOTID  
PHOSPHORYLASE FROM *ESCHERICHIA  
COLI B/r***

Qin Shiliang Lan Yuochang Cai Jue Shang Jinbao Liu Wangyi  
(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai*)

A simple procedure for simultaneous purification of ATP:RNA adenylyltransferase and PNPase from *E. coli B/r* has been developed. ATP:RNA adenylyltransferase was prepared by disruption of bacterial cells in an X-press, model 25, phase partition with polyethylene glycol-dextran-NaCl and phospho-

cellulose chromatography. PNPase was purified from the filtered liquor of phosphocellulose by using DEAE-cellulose column and Sephadex G-200 column chromatography. The products of these two enzymes have been characterized.