

**表 3 胡萝卜根原生质体的活力(存活%)
和呼吸强度的关系**

处理	项目	活力 %		O ₂ 吸收 (μM/万原生质体/小时)	
		28℃	37℃	28℃	37℃
0		94.9	94.9	0.07	0.07
7 小时		87.6	84.3	0.09	0.07
24 小时		73.5	个别	0.16	0.05

一致的。37℃培养的呼吸强度虽不断下降，到24小时原生质体的活力几乎全部丧失，但观察到呼吸过程并未全部衰竭。这种活力与呼吸之间的不一致，可能由于原生质体脂酶活性和呼吸是彼此独立的体系；也可能是FDA染色法反映原生质体的活力比用呼吸强度来反映原生质体的活力更为灵敏。据报道FDA染色法已被广泛地用于观察花粉、悬浮培养的细胞和原生质体等的活力^[6]。Widholm将此法与胞质环流、质壁分离和生长等方法进行了核对，结

果表明凡是FDA染色为正反应的细胞都有胞质环流和质壁分离，并能在洋菜培养基上进一步生长。用物理或化学的方法杀死细胞，无论是FDA染色或上述其它反应都是负的^[7]。因此从上述的实验结果可以认为，用FDA染色来反映原生质体的活力是一个简单易行的方法。

参 考 文 献

- [1] Larkin, P. J., 1976. *Planta*, 213-216.
- [2] Orndorff, W.R. & Hemmer, A.J., 1927. *J. Am. Chem. Soc.*, 49:1272-1280.
- [3] 李德耀、叶济宇, 1980, 植物生理学通讯 1:35-40.
- [4] 王辅德、宛新杉、夏镇澳, 1981, 植物生理学通讯 1:59-60.
- [5] P. Morris, J. F. Thain, 1980. *J. Exp. Bot.* 31:83-95.
- [6] Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., 1970. *Stain Technol.*, 45:115-120.
- [7] Widholm, J. M., 1972. *Stain Technol.*, 47:189-194.

用羟基磷灰石柱分级洗脱法纯化小牛胸腺 末端脱氧核苷酸转移酶和DNA聚合酶*

朱心良 陈乐容 冯锦明

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

苏国富

(军事医学科学院)

DNA分子体外重组一般有两种方法。一种是限制性核酸内切酶—DNA连接酶方法^[1,2]，此法缺点是要求克隆的DNA和载体DNA都必须具有粘性末端，如无粘性末端，必须加大DNA连接酶的酶量才能重组；另一种方法为末端转移酶法，其优点是任意的两种DNA分子在末端转移酶存在下，分别加单链互补“尾巴”后，经过退火都可以送进受体细胞中连接起来。此法经过多次改进，提高了“加尾”

效率^[3,4]，解决了克隆DNA片段的回收^[5,6]，因而在DNA分子重组方面也是重要手段之一。末端转移酶法的关键是末端转移酶。Yoneda和Bollum^[7]从小牛胸腺中纯化小牛胸腺末端脱氧核苷酸转移酶(TDT)虽然已有近二

* 申晓珠同志、刘金富同志和复旦大学邵清同志曾参加部分工作；λDNA由居其达同志提供；钱若兰同志参加了pBR322制备；何俊坤同志也提供了部分pBR322，均在此致谢。

十年历史了,但改进很少。小牛胸腺既是 TDT 的丰富来源,也是 DNA 聚合酶的丰富来源,因此我们认为有必要改进抽提两种酶的方法,以满足 DNA 合成和重组等工作的需要。

材 料 和 方 法

1. 材 料

dATP、dCTP 和 dGTP 为 Boehringer Mannheim 产品。dTTP 为 Merck 产品。 $[^3\text{H}]$ dATP 和 $[^3\text{H}]$ dCTP 为 Amersham 产品。活化小牛胸腺 DNA 按 Setlow 法^[8]制备, oligo(dT)₇^[9] 和 λ DNA 均为本室制备。pBR322 采用 Birnboim 和 Colman 等人方法^[10,11] 制备。磷酸纤维素 (P11)、二乙氨基纤维素 (DE11) 和二乙氨基纤维素滤纸 (DE81) 均为 Whatman 产品。

2. 活力测定

50 微升 TDT 测活反应液中含 0.2M 二甲胍酸钠 pH7.2/1mM 巯基乙醇/4mM MgCl_2 /10 μM oligo(dT)₇/0.5 微居里 $[^3\text{H}]$ dATP, 在 37°C 温育 2 小时。50 微升 DNA 聚合酶测活反应液中含 50mM 三羟甲基氨基甲烷一盐酸 (Tris-HCl) pH8.3/80 mM MgCl_2 /10mM 二硫苏糖醇 (DTT)/dCTP、dGTP 和 dTTP 各 0.5mM/0.5 微居里 $[^3\text{H}]$ dATP/0.03% 活化小牛胸腺 DNA, 在 37°C 温育 1 小时。在确定酶活力单位时, 上述两种反应液中补加 0.2mM dATP。温育后取样 40 微升, 点于 DE81 滤纸片上。滤纸片用冷的 5% K_2HPO_4 洗三次, 每次 7 分钟, 然后经过 95% 乙醇和无水乙醚处理并烘干。纸片置于 0.4% 2,5-二苯基恶唑/0.02% 1,4-双[2'-(5' 苯基恶唑)]-苯的甲苯闪烁液中用 NSE813 闪烁计数仪测定计数。在上述测活条件下, 一小时中能将 1 纤克分子 (nanomole) dATP 合成为多聚物的酶量定为一个酶活力单位。每毫克蛋白所含的酶活力单位为该酶的比活。蛋白按 Layne 法^[12]测定。

3. 杂酶检查

10 单位 TDT 在 25 微升 0.2M 二甲胍酸钠 pH 7.2/1mM 巯基乙醇/4mM MgCl_2 反应液中分别与 pBR322 或 λ DNA 在 37°C 温育 2 小时。2 单位 DNA 聚合酶在 25 微升 50mM Tris-HCl pH8.3/8mM MgCl_2 /10mM DTT 反应液中分别与 pBR322 或 λ DNA 在 37°C 温育 1 小时。反应结束, 65°C 水浴处理 2 分钟, 加入 6 微升 50% 蔗糖、0.15% 溴酚蓝溶液。上样于

0.7% 琼脂糖凝胶电泳上电泳检定。电泳缓冲液: 0.04M Tris/0.02M 醋酸钠/1mM 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) pH8.0 (以醋酸调节 pH)。琼脂糖用电泳缓冲液配制, 并补加溴乙锭使达 0.4 微克/毫升。

4. 粗酶液制备

所有抽提纯化实验均在 4°C 冷室中进行。新鲜小牛胸腺 1.9 公斤, 剥去脂肪和结缔组织后, 切碎, 每 100 克胸腺加入 400 毫升 40mM 磷酸钾缓冲液 pH7.4/40mM NaCl/1mM 巯基乙醇/1mM EDTA 溶液, 用高速组织捣碎器匀浆破碎 2 分钟。匀浆液以二层纱布过滤, 倒入浅盘中, 置 -20°C 冰箱冻结过夜。第二天取出待其融化后, 经离心 2,800 转/分, 30 分钟。用 10% 醋酸将上清液调节到 pH6.5, 放置过夜。离心 5000 转/分, 30 分钟。弃沉淀得抽提液 7000 毫升 (F₁)。

5. 用 P11 吸附酶

P11 经过 0.05M 磷酸钾缓冲液 pH6.5/1mM EDTA/1mM 巯基乙醇溶液平衡后, 倒入 F₁ 中, 缓慢搅拌。放置 30 分钟待 P11 下沉, 以虹吸法弃上清液。用平衡液 18,000 毫升分三次漂洗吸附过酶的树脂。漂洗后的树脂装入下面有 10 厘米高经过平衡, 但没有吸附过酶的新鲜 P11 树脂上。柱为 5×110 厘米。用 6,000 毫升 0.1M 磷酸钾缓冲液 pH7.2/1mM EDTA/1mM 巯基乙醇淋洗树脂。最后以 0.2M 磷酸钾缓冲液 pH7.2/1mM EDTA/1mM 巯基乙醇洗脱。流速为 15 毫升/分。将粉红色溶液合并, 共 2870 毫升 (F₂)。

6. DE11 处理及硫酸铵分级

将 F₂ 全部通过事先用 0.2M 磷酸钾缓冲液 pH 7.2/1mM EDTA/1mM 巯基乙醇溶液平衡的 DE11 柱 (5×43.5 厘米)。流速为 15 毫升/3 分钟。根据 A₂₈₀ 毫微米光吸收得合并液 2870 毫升。加入 600 克固体硫酸铵使达到 35% 饱和度, 经离心 3400 转/分, 30 分钟。得上清液 3140 毫升。加入 634 克固体硫酸铵使达 55% 饱和度。再经离心 13,000 转/分, 20 分钟。取沉淀溶于 25mM 磷酸钾缓冲液 pH7.2/1mM EDTA/1mM 巯基乙醇/10% 甘油中, 体积为 10.5 毫升 (F₃)。

7. 葡聚糖凝胶过滤 (Sephadex G-100)

将 F₃ 上柱, 除测定凝胶过滤洗脱液 A₂₈₀ 毫微米光吸收外, 同时测定 DNA 聚合酶和 TDT 活力。并分别合并两种酶的活力峰 I 和 II, 各为 188 毫升 (F₄) 和 82.5 毫升 (F₅)。加入固体硫酸铵, 使各部分达 70% 饱和度。

8. 羟基磷灰石柱层析

层析过程中所有磷酸缓冲液均为 pH6.8, 并含

1mM EDTA/1mM 巯基乙醇/10% 甘油。柱先以 50mM 柠檬酸三钠处理,再以 0.1M 磷酸钾缓冲液平衡。DNA 聚合酶纯化: 40 毫升 F₂ 经离心 10,000 转/分, 15 分钟。沉淀溶解于 0.1M 磷酸钾缓冲液中, 透析过夜, 上柱 (1.7×2 厘米) 后, 经 0.125M 磷酸钾缓冲液淋洗后, 以 0.17M 磷酸钾缓冲液洗脱。活力部分用 0.01M 磷酸钾缓冲液 pH7.2/1mMEDTA/1mM 巯基乙醇/50% 甘油透析浓缩后, 贮于 -20℃。TDT 纯化: 5 毫升 F₂ 离心得到的沉淀溶解于 0.1M 磷酸钾缓冲液中, 透析过夜, 上柱 (0.5×3.2 厘米) 后, 经 1 个柱体积的 0.14M 磷酸钾缓冲液淋洗后, 以 0.2M 磷酸钾缓冲液洗脱。活力部分用 0.1M 磷酸钾缓冲液 pH 7.2/1mM EDTA/1mM 巯基乙醇/50% 甘油透析浓缩后, 贮于 -20℃。

9. 酶特性试验

测定 DNA 聚合酶和 TDT 最适温度、pH、二价阳离子浓度、时间曲线和酶量曲线时, 其试验条件与测活条件基本一致, 但相应地改变温度、缓冲液 pH、二价阳离子和离子浓度、³H]dCTP 和反应时间等。在所有试验中, 除酶量试验改变酶量外, 其他反应中分别含 DNA 聚合酶 4 单位和 TDT 6 单位。

结果和讨论

小牛胸腺是 TDT 和 DNA 聚合酶的丰富来源。但是, 首先由于胸腺细胞靠常规匀浆技术不能完全破碎; 第二, 在粗酶液中由于大量核酸及 DNA 聚合酶的存在, 抑制了 TDT 活力, 而 DNA 聚合酶活力又受 TDT 的影响, 因此既测不到 TDT 活力, DNA 聚合酶活力也测不准^[13,14]; 第三, 在最后纯化步骤中 TDT 活力极不稳定; 第四, 几种核酸内切酶在葡聚糖凝胶过滤 (Sephadex G-100)、寡聚脱氧胸腺核苷酸纤维素、肝素-葡聚糖和 Cibacron blue F 3GA 亲和层析中与 TDT 层析行为一致; 因此给分离和纯化带来了困难。

1. 粗酶液制备

我们采用 Okamura^[15]等制备抽提液的方法, 将胸腺匀浆液经过 -20℃ 冰冻后融化, 促使胸腺细胞进一步破碎。此时经过离心很方便地去除约占胸腺总重量一半的 DNA 纤维等杂质。继而以 10% 醋酸调节到 PH6.5, 又可除去

约 2/3 杂质—酸不溶性蛋白。Johnson 和 Morgan^[14]采用乙锭荧光 (Ethidium Fluorecence) 法检测粗酶液中和 TDT 一起纯化的 DNA 聚合酶以追踪 TDT。我们在 P11 吸附过程中, 合并粉红色溶液。而 DE11 处理后, 合并 A₂₈₀ 毫微米光吸收部分, 就不会丢失 DNA 聚合酶和 TDT。减少了纯化周期中耗费在测活上的时间。粗抽提液用 P11 吸附后, 树脂经过漂洗、淋洗, 除去了大量杂蛋白, 提高蛋白纯度 43 倍。随后抽提液用 DE11 处理和 35—55% 硫酸铵分级使蛋白纯度又提高了 3 倍, 而且 A₂₈₀ 毫微米光吸收/A₂₆₀ 毫微米光吸收达到 1.7 以上, 基本上除去了核酸类物质 (表 1)。

表 1 DNA 聚合酶和 TDT 的纯化

	Σ 蛋白 (mg)	Σ 活力 单位	比活 (单位/毫克)	活力回收 %
pH6.5 上清液	94021			
P11 吸附	2215			
DE11 处理	1761			
35—55% 硫酸铵沉淀	739			
葡聚糖 G-100 过滤				
DNA 聚合酶	474	40012	84.4	100
TDT	130	23348	179	100
羟基磷灰石 纯化				
DNA 聚合酶	50.4	41490	848	103.6
TDT	17.4	22774	1300	97.5

2. 葡聚糖凝胶 (Sephadex G-100) 柱分离

随着葡聚糖凝胶柱的加高, 完全能将 DNA 聚合酶和 TDT 分开, 给进一步纯化打下基础 (图 1)。

3. 酶的纯化

去除产品中污染的脱氧核苷酸酶是很重要的。我们早期曾以 Okamura^[15]等寡聚脱氧胸腺核苷酸—纤维素亲和层析法纯化 TDT, 此法对酶活力无明显影响, 但对去污染的内切酶活力却是有疑问的。鉴于肝素—琼脂糖 (Heparin-Sephrose) 和 Cibacron blue 已用于纯化多种原核生物来源的限制性核酸内切酶^[16,17]。E.

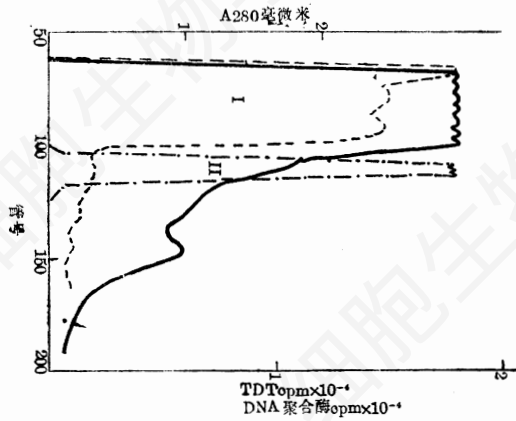


图1 葡聚糖凝胶过滤 (Sephadex G-100) 柱(3.3 × 145 厘米)

以 25mM 磷酸钾缓冲液 pH7.2/1mM EDTA/1mM 巯基乙醇/10%甘油平衡。F₃ 上柱后，以柱平衡液洗脱，流速：5 毫升/20 分。A₂₈₀ 毫微米光吸收——；I 为 DNA 聚合酶活力……；II 为 TDT 活力·-·-·-。

coli DNA 聚合酶和 T₄ DNA 聚合酶^[18]。因此我们分别以肝素—琼脂糖和 Cibacron blue 对 TDT 作亲和层析。虽然它们对 TDT 浓缩效应是非常高的，而且大多数活力都能回收，但对于 DNA 聚合酶、TDT 和核酸内切酶之间的分辨力却很差。Deible 和 Coleman^[19]曾以羧甲基—纤维素纯化了高分子量人的末端脱氧核苷酸转移酶。羧甲基—纤维素是一种阳离子交换树脂，对小牛胸腺 DNA 聚合酶、TDT 和几种未知蛋白的分辨力虽很好，可惜 TDT 和核酸内切酶之间仅达到部分分离。而且 TDT 经过羧甲基—纤维素层析后，活力回收仅达到 10%。若以二甲胍沉淀杂蛋白的方法纯化 TDT，虽能获得高比活的酶，但 DNA 聚合酶也随着杂蛋白一起被去除，因而不能同时拿到 DNA 聚合酶^[13]。用柠檬酸钠或 EDTA 处理羟基磷灰石以螯合有害重金属离子，再经梯度洗脱纯化 TDT，因纯化时间长，酶活力回收仅达 20%。最后我们采用羟基磷灰石分级洗脱法代替梯度洗脱，纯化后 TDT 比活低于文献，但 DNA 聚合酶活力高于文献^[7]。在这一步中几乎没有损失活力，TDT 和 DNA 聚合

酶活力回收分别达到 97.5% 和 103.6%。将这两种酶分别与 pBR322 和 λDNA 一起温育后，用 0.7% 琼脂糖凝胶作电泳检查，无论 pBR322 或 λDNA 的荧光带都依然存在，表明已检查不到污染的脱氧核苷酸酶。结果见表 1。

4. 酶特性试验

DNA 聚合酶和 TDT 活力随温度升高而逐渐增加，到 37℃ 时活力最高。继续增加温度，则活力很快降低(图 2)。DNA 聚合酶在 pH8—9.5 范围内活力都很好，而 TDT 最适 pH 为 7.2(图 3)。两种酶在反应时都需要二价阳离子。在反应体系中无论加入 Mg²⁺、Mn²⁺ 或 Co²⁺，DNA 聚合酶活力都比较高，而 Mg²⁺ 更优于 Mn²⁺ 及 Co²⁺，其最适浓度的范围广(8—16mM)。在 Mn²⁺ 存在的情况下酶活力虽高于 Co²⁺，但最适浓度范围(0.5—2mM)比 Co²⁺ (2—5mM)窄(图 4)。TDT 与二价阳离子的关系还和加上嘌呤还是嘧啶核苷酸“尾巴”有关。当 TDT 用于加上嘌呤核苷酸时，二价阳离子作用是 Mg²⁺ > Co²⁺ > Mn²⁺。Mg²⁺ 最适浓

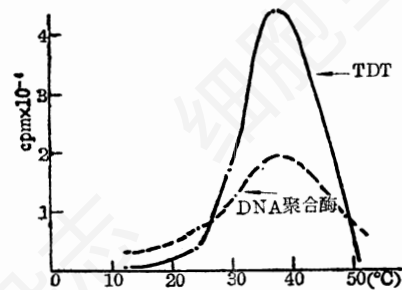


图2 DNA 聚合酶和 TDT 活力与温度关系

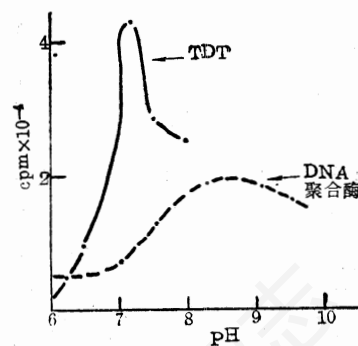


图3 DNA 聚合酶和 TDT 活力与 pH 关系

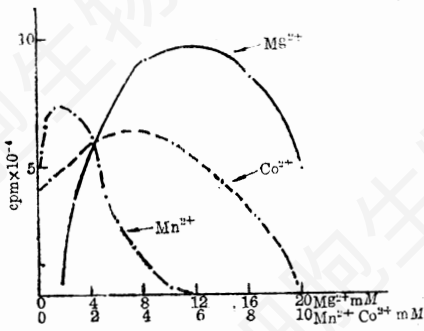


图4 DNA聚合酶活力与Mg²⁺、Mn²⁺和Co²⁺关系

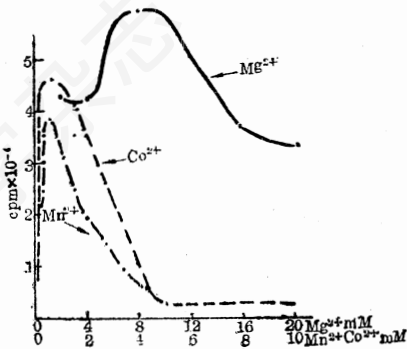


图5 末端加上嘌呤核苷酸时，TDT活力与Mg²⁺、Mn²⁺和Co²⁺关系

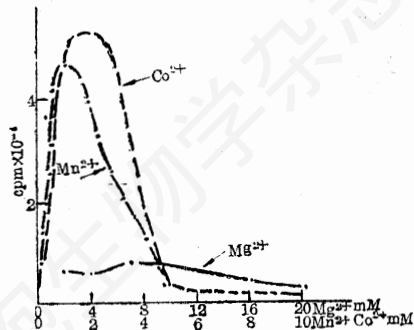


图6 末端加上嘧啶核苷酸时，TDT活力与Mg²⁺、Mn²⁺和Co²⁺关系

度范围为5—12mM，8mM时活力最高。Co²⁺和Mn²⁺最适浓度为0.5mM。因此在末端加上嘌呤核苷酸时使用8mM Mg²⁺是适宜的(图5)。在用于加上嘧啶核苷酸时，Co²⁺>Mn²⁺，Co²⁺最适浓度为2mM，Mn²⁺最适浓度为1mM，Mg²⁺几乎不起作用。因此末端加上嘧啶

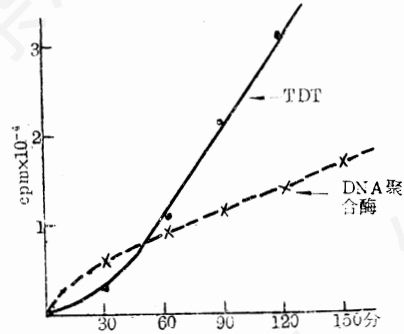


图7 DNA聚合酶和TDT活力与反应时间关系

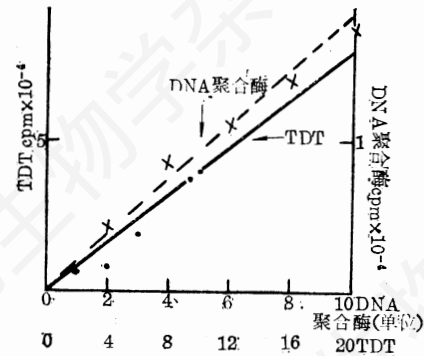


图8 DNA聚合酶和TDT活力与酶量关系

核苷酸时用2mM Co²⁺为宜(图6)。从DNA聚合酶与反应时间的关系中可以看出，在90分钟内活力与反应时间接近于直线关系，随后就逐渐缓慢。TDT在反应初期，反应速度略为迟缓一些，随后与时间完全呈直线关系(图7)。DNA聚合酶和TDT与酶量均呈直线关系(图8)。

综上所述，从我们所纯化的TDT及DNA聚合酶的活力、杂酶去除及反应最佳条件来看，这两种酶的酶反应正常，均可用于DNA体外合成。

参 考 文 献

[1] Sgaramella, V., 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:3389-3393.
 [2] 匡达人等, 1980, *中国科学*, 11:1105-1110.
 [3] Roychoudhury, R. and R. Wu., 1980, *Methods in Enzymology*, 65:43-62.

下转封三

perimental Tumor Processes, Pergamon Press.

- [16] C. T. Garratt, F. Gonzaler, M. Caine, D. Wiener., 1977, *Proc. Nat. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 18, 61.
- [17] T. Ono, M. Kawamura, M. Hyodo, K. Wakabayashi., 1971, *Gann*, 62, 31-40.
- [18] L. J. Grady, W.P. Campbell., 1975, *Nature* (London), *New Biology*, 254, 356.
- [19] 张玉砚, 徐永华, 徐亚男, 彭素芬, 1982, 实验生物学报, 15(2), 137.
- [20] 徐亚男, 张玉生, 张玉砚, 1980, 实验生物学报, 13(4), 371.
- [21] Y. G. Capetanaki, A. Alomso., 1980,

Nucleic Acids Res., 8(14), 3193.

- [22] R. K. Moyzis, D. L. Grady, D. W. L. Li, S. E. Mirris, P. O. P. Ts'o., 1980, *Biochemistry*, 19, 821.
- [23] 孙 谨、张玉砚, 最近工作, 待发表。
- [24] H. Jacobs, G. D. Birnie., 1980, *Nucleic Acids Res.*, 8(14), 3087.
- [25] J. I. Reiners, H. Busch, 1980, *Biochemistry*, 19, 833.
- [26] P. R. Wilkes, G. D. Birnie., 1981, *Nucleic Acids Res.*, 9(8), 2021.
- [27] A. Balmain, A. J. Minty, G. D. Birnie., 1980, *Nucleic Acids Res.*, 8(7), 1643.

上接第 22 页

- [4] Brutlag, D. et al., 1977, *Cell*, 10:509-519.
- [5] Hofstetter, H. et al., 1976, *Biochim. Biophys. Acta.*, 454:587-591.
- [6] Goff, S. P. and P. Berg, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1763-1767.
- [7] Yoneda, M. and F. J. Bollum, 1965, *J. Biol. Chem.*, 240:3385-3391.
- [8] Setlow, P., 1974, *Methods in Enzymology*, 29. Part E:4.
- [9] 细胞生物学研究所, 三室, 上海市生物化学学会, 1978 年年会论文摘要: 96.
- [10] Birnboim, H. C. and J. Doly., 1979, *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1523.
- [11] Colman, A. et al., 1978, *Eur. J. Biochem.*, 91:303-310.
- [12] Layne, E., 1957, *Methods in Enzymo-*

logy, 3:451-454.

- [13] Chang, L. M. S. and F. J. Bollum, 1971, *J. Biol. Chem.*, 246:909-916.
- [14] Johnson, D. and A. R. Morgan, 1976, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 72:840-849.
- [15] Okamura, S. et al, 1978, *J. Biol. Chem.*, 253:3765-3757.
- [16] Bickle, T. A. et al., 1977, *Nucleic Acids Res.*, 4:2561-2572.
- [17] Baksi, K. et al., 1978, *Biochemistry*, 17: 4136-4139.
- [18] Lindell, T. D. et al., 1979, *Biochim. Biophys. Acta*, 562:231-239.
- [19] Deibel, M. R. and M.S. Coleman., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254:8634-8640.