

DNA 引物酶的提取分离与引物合成活性的研究^①朱孝峰^② 刘宗潮 谢冰芬 潘启超 冯公侃 李奕菽

(中山医科大学肿瘤研究所治疗基础研究室; 广州, 510060)

摘要 以小鼠艾氏腹水癌细胞经超声破碎的提取液为材料, 依次用 DE-52 和 P-11 层析柱进行离子线性洗脱, 分别在 KCl 浓度为 0.17~0.2 mol/L 和 0.25~0.27 mol/L 处 DNA 引物酶被洗脱下来。用大肠杆菌大片 DNA 多聚酶 I 延长引物法检测 DNA 引物酶比活性为 8753 U/mg, 酶总获得为 22.1%。放射自显影法检测引物合成活性显示引物酶合成了不同长度的引物。

主题词 RNA 核苷酸转移酶类; 引物酶

中图分类号 R 345

DNA 引物酶与多聚酶 α 是以复合体形式存在于细胞核中, 无论是用离子交换、柱层析, 甚至用抗 DNA 多聚酶 α 的单克隆抗体免疫吸附层析, 得到的 DNA 引物酶仍然是与多聚酶 α 结合在一起的复合体^[1]。引物酶的功能是在 DNA 复制起始时合成引物, 供多聚酶 α 来延长 DNA 链。DNA 引物酶-多聚酶 α 复合体由 4 个亚基组成, 分别为 180 ku、78 ku、58 ku、49 ku 的多肽^[2]。Kagun^[3] 研究认为 49 ku 和 58 ku 亚基是引物酶活性所在, 180 ku 亚基负责多聚酶 α 的作用, 78 ku 亚基起着稳定复合体的作用。肿瘤细胞的 DNA 复制活跃, 引物酶的活性明显高于正常细胞^[4]。为了进一步研究 DNA 引物酶在肿瘤增殖与治疗中的作用, 我们进行了 DNA 引物酶的提取分离与引物合成活性的研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

昆明种小白鼠购自第一军医大学实验动物场, 动物合格证号: 95A05。小鼠艾氏腹水癌瘤株由本实验室提供。Poly[dT] 为 Sigma 公司产品。磷酸纤维素柱(P-11) 为 Whatman 公司产品。二乙基焦磷酸纤维素柱(DE-52) 为 SERVA 公司产品。³H-dATP 放射性比强度为 2.77×10^{15} Bq/kg, 放射性浓度为 3.7×10^{10} Bq/L。大片 DNA 多聚酶, GibcoBRL 产品。 α -³²P-ATP, 乙酸纤维素薄膜等均国内购买。

1.2 DNA 引物酶的提取分离

1.2.1 粗酶液的制备 取接种 7~9 d 艾氏腹水癌细胞的小鼠腹水, 加入 0.45% 的 NaCl 溶液破碎其中的红

细胞, 4 000 r/min 离心 5 min(转子半径 11 cm), 再用 PBS 洗涤后 4 000 r/min 离心 5 min(转子半径 11 cm) 得癌细胞团块。以下步骤在 4 °C 下进行, 取细胞 5 g 加 30 mL 缓冲液 A(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.001 mol/L 二硫苏糖醇(DTT), 0.0001 mol/L EDTA, 0.0001 mol/L PMSF), 混匀后超声破碎癌细胞(超声作用 30 s 停 1 min, 共 5 次, 功率为 145 W), 镜检罕见完整细胞为准。匀浆液 18 000 r/min 离心 30 min(转子半径 11 cm), 保留上清液, 即含有 DNA 引物酶的粗酶液。

1.2.2 依次通过 DE-52 和 P-11 柱 将含粗酶的上清液加入预先用缓冲液 B(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2, 0.02 mol/L KCl, 0.0001 mol/L EDTA, 20% 甘油)平衡过的 DE-52 柱(35 mL), 用 70 mL 缓冲液 B 洗之。再用 20 mL 缓冲液 B 和 20 mL 缓冲液 C(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2, 0.3 mol/L KCl, 0.0001 mol/L EDTA, 20% 甘油)作线性梯度洗脱。检测 DNA 引物酶的活性后取少量纯化的酶液真空浓缩, 检测蛋白含量, 收集酶活性部分。将上述酶液用缓冲液 B 稀释 2 倍后, 加入预先用缓冲液 D(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2, 0.15 mol/L KCl, 0.001 mol/L DTT, 30% 甘油)平衡过的 P-11 柱(25 mL)中, 用 50 mL 缓冲液 D 洗之, 再用 10 mL 缓冲液 D 和 10 mL 缓冲液 E(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2, 0.4 mol/L KCl, 0.001 mol/L DTT, 30% 甘油)作线性梯度洗脱, 检测酶活性和蛋白含量, 收集有酶活性的部分。置 DNA 引物酶于 -70 °C 中保存备用。

1.3 DNA 引物酶的活性测定

采用间接法测定酶的活性。0.03 mL 反应液(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2, 0.1% 聚乙二醇

① 国家自然科学基金资助课题。② 第一作者, 1970 年出生, 男, 在职博士生, 助教。

(PEG₆₀₀), 0.1 g/L BSA, 0.003 mol/L DTT, 0.006 mol/L MgCl₂, 10% 甘油, 33 mg/L poly[dT], 0.002 mol/L ATP, 0.3 μL ³H-dATP, 0.2 U 的大片段 DNA 多聚酶), 加 3 μL 酶液, 37 °C 保温 30 min 后, 加入 EDTA 至 0.01 mol/L 终止反应 移至乙酸纤维薄膜上, 晾干后, 除 1 管用测每管的总放射性活度外, 其它均用 5% 三氯醋酸漂洗 3 min × 2 次, 95% 乙醇漂洗 2 min × 2 次, 晾干后, 放入含有 4 mL 闪烁液的测定瓶中, 在液体闪烁计数器中测定放射性活度。以 30 min 聚合 1 μmol dATP 为 1 个酶活性单位(U)。

1.4 引物合成活性的检测

20 μL (0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.2, 0.1% PEG₆₀₀, 0.1 g/L BSA, 0.003 mol/L DTT, 0.006 mol/L MgCl₂, 10% 甘油, poly[dT], α-³²P-ATP) 反应液 加入 3 μL 引物酶, 37 °C 保温 30 min, 然后加入上样缓冲液 10 μL, 加热 90 °C, 5 min, 在 20% 聚丙烯酰胺(8 mol/L 尿素)变性凝胶中电泳, 凝胶作放射自显影以了解引物合成的情况。这个步骤所有的操作、反应液及器皿均注意对 RNase 的处理⁷。

2 结 果

2.1 DNA 引物酶的提取、分离与活性测定

通过 DE-52 柱时, DNA 引物酶在钾离子浓度为 0.17~0.2 mol/L 时被洗脱, 洗脱曲线中 DNA 引物酶的活性峰宽平, 与蛋白第 2 个曲线峰相重叠; 再过 P-11 柱时, 引物酶在钾离子浓度为 0.25~0.27 mol/L 时被洗脱, 洗脱曲线中引物酶的活性峰窄尖与蛋白峰完全重叠, 说明引物酶对 P-11 柱的结合力大于对 DE-52 柱的结合力(图 1, 图 2)。酶液中蛋白量从粗酶的 5 g/L 到提取后的 0.05g/L, 酶的比活性从粗酶液的 39.6 U/mg 蛋白到 8 753U/mg 蛋白, 引物酶的总获得率为 22.1%。

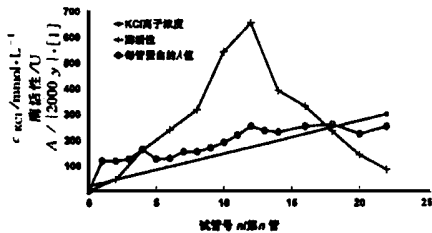


图 1 DE-52 柱层析后酶的洗脱曲线
A/(2000 y) [1] 中的 y 代表纵坐标上的数值

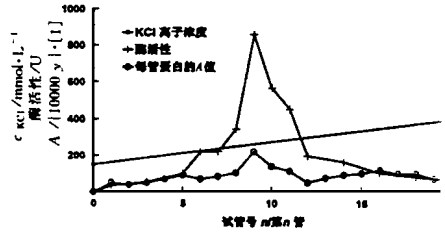


图 2 P-11 柱层析后酶的洗脱曲线

A/(1000 y) [1] 中的 y 代表纵坐标上的数值

2.2 DNA 引物酶的引物合成活性

引物合成后通过变性凝胶分离, 进行放射自显影, 无酶道未见有引物合成, 有酶道可见引物合成, 自显影呈阶梯状, 代表不同长度的引物(图 3)。



图 3 放射自显影检测 DNA 引物酶合成的引物
B: 未加入 DNA 引物酶 A: 加入 DNA 引物酶

3 讨 论

DNA 的复制是肿瘤细胞增殖的关键, DNA 复制首先是解旋, 随后由 DNA 引物酶结合于 DNA 单链上, 并在其上滑动, 寻找复制起始点, 合成 1 长度为 7~10 个核苷酸的 RNA 引物, 再由 DNA 多聚酶 α 来聚合 dNTP 完成引物延长。DNA 引物酶与多聚酶 α 是一个整体, 常规分离方法甚至用抗多聚酶 α 的单克隆抗体免疫吸附层析法亦未能把它们分开, 即使把它们分开, 两者活性均不稳定, 再混合到一起又形成复合体, 但二者在功能上是不同的, 且其功能由不同的亚基负责, 所以只是从功能上把其分为 DNA 引物酶和多聚酶 α^[3,5,6,8]

为了研究DNA引物酶在肿瘤发生和治疗中的作用,我们从艾氏腹水癌中提取DNA引物酶。在酶的提取过程中,应特别注意的就是实验条件。酶是一种蛋白质,与其它的蛋白质不同之处在于它有催化生物反应的活性。本实验选择接种7~9d的艾氏腹水癌细胞,一是肿瘤细胞中复制酶灶含量高,二是取材方便、成本低、易得大量细胞。依照酶分子的大小和电荷的正负量,溶解度与亲和性结合部位的有无,我们采用DE-52和P-11两条层析柱,提取分离DNA引物酶。艾氏腹水癌细胞提取液经过两条柱后酶的比活性大大提高,每毫克蛋白有8753U的酶。与国外所用的免疫亲和层析^[9]所得的结果相差不多,而此种方法步骤简单,所用试剂价格便宜,费用低,所得到的酶比活性大小足以使其应用于DNA引物酶在肿瘤发生和治疗学中的研究。

本实验采用放射自显影法研究了DNA引物酶的引物合成功能。变性聚丙烯酰胺电泳后,放射自显影显示由引物酶合成的引物,可见大小不等的显影带,成梯状,代表不同长度的引物。

参 考 文 献

1 Chang L M S, Rafter E, Augl C, *et al.* Purification of a

- DNA polymerase-DNA primase complex from calf thymus glands. *J Bio Chem*, 1984, 259(23):14679
- 2 Brooks M, Uumas L B. DNA primase isolated from the yeast DNA primase-DNA polymerase complex. *J Bio Chem*, 1989, 264(6):3602
- 3 Kaguni L S, Lehman T R. Eukaryotic DNA polymerase primase; Structure, mechanism and function. *Bioche Bioph Acta* 1988, 950(2):87
- 4 Haringto C, Perino F W. Initiation of RNA primed DNA synthesis in vitro by DNA polymerase α -primase. *Nucleic Acids Res*. 1995, 23(6):1003
- 5 Niranjankumari S, Gopinathan K P. DNA polymerase α -primase complex from the silk glands of the non-mulberry silkworm *philosamia ricini*. *Biochem J*, 1994, 298(3):529
- 6 Nasheuer H P, Frank G. DNA polymerase α -primase from calf thymus. *J Bio Chem*, 1988, 263(18):8981
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T M. *Molecular Cloning*. Second edition. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989, Book 1:6. 31~36
- 8 Sheaff R J, Kuchta R D. Mechanism of calf thymus DNA primase; slow initiation rapid polymerization and intelligent termination. *Biochemistry*, 1993, 32:3027

(1997-03-13 收稿 1997-07-28 修回)

EXTRACTION AND PRIMER SYNTHESIS ACTIVITY OF DNA PRIMASE

Zhu Xiaofeng Liu Zongchao Xie Bingfen
Pan Qichao Feng Gongcan Li Yisun

(Department of Therapeutic Basis, Cancer Institute, Sun Yat-sen
University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

DNA primase was extracted from mouse Ehrlich Ascites Carcinoma cells. The crude enzyme was loaded on DE-52 column and P-11 column sequentially. The primase active fraction was eluted at a KCl concentration of 0.17 mol/L to 0.2 mol/L on DE-52 column and 0.25 to 0.27 mol/L on P-11 column. DNA primase activity was assayed with *E. coli*. DNA polymerase I Klenow fragment extended primers. The specific activity of the enzyme was 8753 U/mg protein. Different length of primers were synthesized by primase and detected with autoradiograph.

Subject headings RNA-nucleotidyltransferases; DNA primase