Sepharose CL-2B柱分离变形杆菌核糖体亚基-50S

张廷璐 杜凤范

（化学教研室）

提 要

我们应用Sepharose CL-2B柱分离变形杆菌核糖体亚基50S获得满意结果，为该亚基制备性分离提供了一简便而适用的新方法。

Sepharose CL-2B柱(内径20mm)床高46cm，核糖体亚基上柱量225mg（湿重），平衡液及洗脱液均为含Mg^{2+} 0.001M和KCl 0.1M的Tris-HCl 缓冲溶液（pH7.5），流速12ml/h，部分收集，测各流分的OD_{258}。洗脱曲线呈现两个峰，其结果与样品超速离心分析结果一致，按蛋白质含量粗略计算，核糖体亚基回收率为91%。

原核细胞核糖体亚基50S和30S的分离通常借助于蔗糖密度梯度离心。可是密度梯度离心法不仅需要超速离心设备，而且程序复杂，除区带转子(Zonal rotor) 外，一次离心所能处理的样品量也很小，不适用于制备性分离。核糖体亚基的分子量约为10^6，因而具有适当分离范围的琼脂糖凝胶应可作为分离核糖体亚基的分子筛，Lurquin等[1]曾用Sepharose 4B分离植物细胞DNA；Rinske Gonggrijp等[2]用Sepharose CL-2B纯化绿脓杆菌核糖体。但Sepharose应用于核糖体亚基的分离则尚未有报道。我们用sepharose CL-2B柱分离变形杆菌核糖体亚基50S获得满意结果。

一、材料与方法

1. 变形杆菌核糖体亚基提取液的制备

我们参考Baca等[3]对立克次体核糖体的研究结果，修改Tung-Tien Sun等[4]提取变形杆菌核糖体方法。降低Mg^{2+}浓度(0.001M)从菌体直接制备核糖体亚基提取液。

变形杆菌OX_{19}株，菌体由微生物学教研室提供。菌体堆集湿重15.6g，用缓冲溶液A〔0.001M Tris-HCl，pH7.5，0.001M Mg$(AOc)_2$，0.1M KCl〕洗涤两遍，然后悬浮于120ml 缓冲溶液 B〔0.001M Tris-HCl，pH 7.5，0.001M Mg$(OAc)_2$〕中，液氮反复冻融8次(-193—37℃)，17000rpm离心30分钟以除去细胞碎片(温度4℃)，共离心三遍。上清液于4℃、60000rpm离心2小时（日本Hitachi Preparative Ultracentrifuge Rp 80T-3 rotor），得沉淀，湿重0.6g，将沉淀悬浮于8 ml 缓冲溶液A中，用超声波振荡器作用30秒使匀化，标志为Rs样品。置冰箱中过夜，-20℃保存

2. 超速离心分析

超速离心分析系使用日本 Hitachi Preparative Ultracentrifuge，该机备有分析转头RA60-H及Schlieren光学系统。样品Rs经4000rpm离心30分钟，保持澄明，无可见沉淀。取Rs及其两倍、四倍稀释液作为分析样

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

品（用同样缓冲溶液稀释）。样品浓度(C%，湿重计)：(一)1×7.5%，(二)½×7.5%；(三)¼×7.5%，仪器温度20℃，棒角65°，转速34000rpm，每个样品共拍照片四张，按该仪器所附计算式进行计算，测得各样品的沉降系数S实验值，经浓度校正，得$S°_{20,W}$值。

3. Sepharose CL-2B柱分离亚基

Sepharose CL-2B (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden)经漂洗、除气后装柱（内径20mm），放置48小时，用双蒸馏水充分洗柱，然后用缓冲溶液A进行平衡，室温8℃，取样品Rs 3ml上柱，并开始收集，用同一缓冲溶液进行洗脱。床高46cm，流速12ml/h，部分收集，每管4ml。测各管收集液在258nm的光密度。

4. 紫外光谱分析系使用国产7520型分光光度计

5. 蛋白质检测采用 Lowry 试验

二、实验结果

1. 变形杆菌核糖体亚基提取液的紫外光谱分析及 Lowry 试验

样品Rs于4000rpm离心30分钟，溶液保持澄明，取0.6ml用同样缓冲溶液稀释至4ml。测得$OD_{258}=0.93$，$OD_{238}=0.63$，$OD_{258}:OD_{238}=1.48$。

样品Rs在258nm有最大吸收值，在238nm有最小吸收值，具有核酸紫外吸收谱特征。

样品Rs对Lowry试验显蓝色，呈阳性反应。

2. 超速离心分析

Rs样品的离心沉降界面图象显示两个峰—A和B。A峰经测定为50S峰。

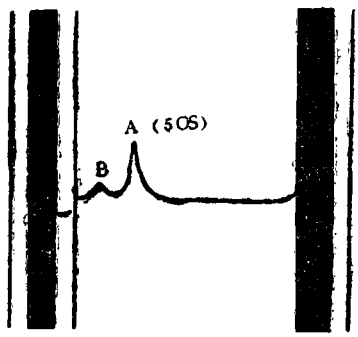


图1　核糖体亚基提取液离心沉降界面

A峰的S实验值见表1。

表 1

核糖体亚基液样品	(一)	(二)	(三)
C%　(湿重)	1×7.5%	1/2×7.5%	1/4×7.5%
A峰$S_{实验}\times10^{13}$	16.85	33.85	41.30

A峰的S值经浓度校正，得$S°_{20,W}=50$

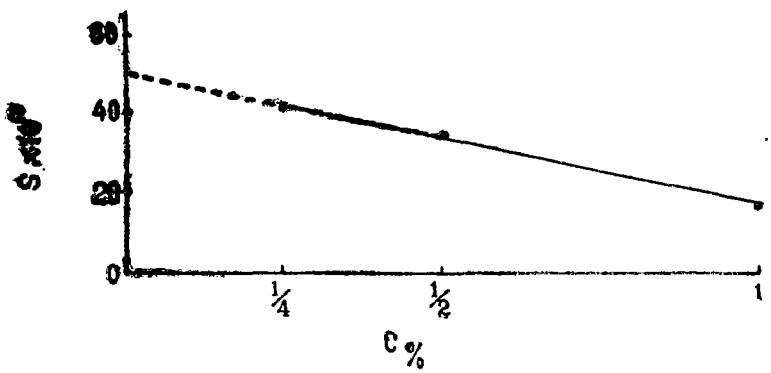


图2　A峰S值浓度校正

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由于Rs四倍稀释液所显示的B峰图象不清，故B峰的$S^{\circ}_{20,w}$值未能测定。

3. Sepharose CL-2B柱分离50S

样品Rs经Sepharose CL-2B柱的洗脱曲线见图3。

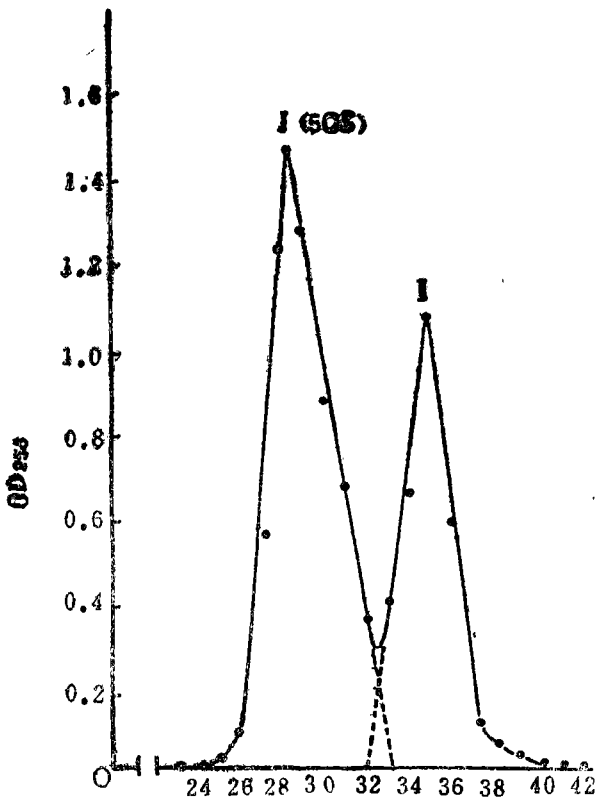


图3 Sepharose CL-2B柱的洗脱曲线

图3显示洗脱曲线有两个峰—Ⅰ和Ⅱ。与Rs超速离心分析结果一致。

合并26—32管，为Ⅰ峰区的合并液；合并33—38管，为Ⅱ峰区的合并液。分别进行紫外光谱分析和Lowry试验，结果见表2，均显示具有核蛋白体性质。可以看出Ⅰ峰和Ⅱ峰是两种大小不同的核蛋白体粒子所形成的峰。

同一样品—Rs在同一组成的缓冲溶液中经超速离心和经Sepharose CL-2B洗脱均获得两个峰，而且仅两个峰。根据这两种方法分离原理的不同及核糖体亚基物理性质的差异来进行分析（见讨论），可以论断A峰和Ⅰ峰是样品中同一核蛋白体粒子在不同条件下某种性质的反映。A峰经测定为50S峰，故Ⅰ峰可推断亦为50S峰。

三、讨　论

1. 样品Rs超速离心分析未发现核糖体单体或二聚体的图象，说明在Mg^{2+}浓度为0.001M条件下提取液中变形杆菌核糖体仅以亚基的形式而存在，同Baca等[3]对立克次体核糖体研究的结果一致。故采用降低Mg^{2+}浓度方法，可以从菌体直接制备核糖体亚基提取液，较之首先制备核糖体再经透析使分解成亚基的方法简化了程序。

表 2

收　集　液	OD_{258}	OD_{238}	OD_{280}	OD_{258}/OD_{238}	Lowry试验
26—32管(50S)	0.74	0.47	0.39	1.57	阳性
33—38管	0.45	0.32	0.25	1.41	阳性

2. Rs的OD_{258}和OD_{238}比值为1.48较Baca等[3]所测得的立克次体核糖体的比值1.67为低，可能是核糖体单体的比值同核糖体亚基的有所不同。

3. 超速离心的分离原理主要是根据粒子质量的差异，分子筛分离原理主要是根据粒子体积的不同。我们知道50S亚基的分子量和体积均较30S亚基的为大。因此对同一样品而言，在超速离心沉降界面图50S先出峰，则在Sepharose柱的洗脱曲线上先出峰者亦应为50S亚基。所以A峰和Ⅰ峰都是样

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

品Rs中50S亚基的峰。

至于B峰和Ⅱ峰，它们也应是Rs中同一核蛋白体粒子相应的峰，但因B峰的$S^{\circ}_{20,w}$值未能测定，故Ⅱ峰亦不能肯定，不过从它们紧接着50S亚基峰而出现这一特点来看，它们可能是30S亚基的峰。

4．我们在实验中同时使用两支SepharoseCL-2B柱，一支上柱量为Rs 3ml，另一支上柱量为Rs 2ml，在同样条件下进行洗脱，均获得具有两个峰的类似洗脱曲线，说明本方法有较好重现性。从洗脱曲线两峰的重叠程度来看，分离效果是比较好的。

5．Sepharose CL-2B 145ml(床体积)一次可处理核糖体亚基225mg（湿重）。粗略计算，核糖体亚基回收率为91%（按蛋白质含量计）。（表3）

近似计算式：$[P]=1.45OD_{280}-0.74OD_{260}$[5]

[P]：蛋白质浓度（mg/ml）

表 3

		毫升	OD_{280}	OD_{258}*	蛋白质(mg)
Rs 样品液		3	0.52**	0.93**	1.316
核糖体亚基洗脱液	26—32管	28	0.39	0.71	0.5012
	33—38管	24	0.25	0.45	0.697
回收率					91%

说明：* 样品的最大吸收值在258nm，故在计算中改用OD_{258}

** Rs样品0.6ml稀释至 4 ml 所测得光密度

6．本报告所提出的方法较之蔗糖密度梯度离心法具有如下优点：

（1）不需要特殊贵重设备；

（2）程序简单，操作方便；

（3）一次处理样品量较大。

由于它具有上述优点，同时又具有较好分离效果和重现性，故对核糖体亚基50S的制备性分离是一较为适用的新方法。

（微生物教研室朱红阳同志为本实验提供变形杆菌材料，并协助完成液氮反复冻触操作；仪器中心室李才安、孔容同志对超速离心给与大力支持，谨致忱谢。）

参 考 文 献

1. Lurquin PF, Tshitenge G, Delaunoit G, and Ledoux L: Isolation of DNA from Plant Cell by Gel Filtration on Agarose. Analytical Biochemistry 1975; 65:1

2. Rinske Gonggrijp, Wil JMA Mullers, Paul JMR Lemmens, and Van CPA: Ribonuclease Sensitive Ribosomal Vaccine of Pseudomonas Aeruginosa. Infection & Immunity 1980; 27: 204

3. Baca OG, Hersh RJ, and Paretsky D: Ribosomes amd Ribonucleic Acids of Coxiella Burneti. Journal of Bacteriology 1973; 116:441

4. Tung-Tien Sun, Thomas A Bickle, and Rolert R Traut: Similarity in the Size and Number of Ribosomal Proteins from Different Prokaryotes. Journal of Bacteriology 1972; 111:474

5.（日）管原浩、副島正美著，张旭译：蛋白质的定量法 第二版 1981; p.156

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Isolation of Ribosomal Subunit 50S from Proteus Vulgaris by Sepharose CL—2B Column

Chang Tinglu, Du Fonvan

(Department of Chemistry, The Third Military Medical College)

With a favorable result, we applied Sepharose CL-2B column to the isolation of ribosomal subunit, 50S, from P. Vulgaris cells. This report presents a simple and useful method for preparative separation of subunit species.

Ribosomal preparation 225mg (wet wt.) was loaded on Sepharose CL-2B column (inner diameter 20 mm, gel column height 46 cm) which had been previously equilibrated with pH 7.5 Tris-buffer containing Mg^{2+} 0.001M and KCl 0.1M. The column was developed with the same buffer. Elution was carried out with a flow rate of 12 ml/h. The adsorbance of the eluate was measured at 258nm. Two peaks were obtained in elution development. The result was checked up to be identical with that observed in ultracentrifuge analysis.

According to the proteins contained, the percent recovery of subunit species was 91% in approximate estimation.

(上接322页)

block; and in the fourth group, nothing was filled into the bony defects. Roentgenological and histological observations were made regularly.

It was found that after 8—10 weeks, 70—80% of the specimens filled with DBM showed firm union between the host bone and the graft material and no difference could be found between the two forms of DBM, incomplete union occurred in the third group and non-union in the fourth group. It is clear that the osteogenetic effect of DBM is better than undecalcified bone. It is suggested that decalcified bone powder be used as a graft material to fill bony defects or cavities because it is easily prepared and used, has good plastisity, and can be stored in room temperatmre.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net