

限制性内切核酸酶 Bam HI 的简化提纯方法

邹福强 梁意昭 王义良 曾淑云

(中山大学生物系)

限制性内切核酸酶是六十年代末期发现的一类核酸酶。近年在分子生物学研究中被广泛地应用,它能识别 DNA 分子中的特定碱基序列。其中的 II 型酶能在识别的碱基序列上切断特定的碱基间的磷酸二酯键,将 DNA 分子切成一定大小的片段,所生成的片段具有 3'-OH 和 5'-P,可被广泛地用于 DNA 的一级结构分析、基因定位和分离以及 DNA 分子的体外重组等研究。限制性内切核酸酶是分子生物学和基因工程研究的重要工具。

BamHI 是从 *Bacillus amyloliquefaciens* 提取的限制性内切核酸酶,是 DNA 的结构和功能以及基因工程研究中常用的工具酶之一。它属于 II 型酶,能识别

↓
5'-GGATCC-3' 这一特定碱基序列,并在 GG 之间切断
3'-CCTAGG-5'
↑

DNA 双链。

自 1968 年 M. Meselson 等 (*Nature*, **217**, 1110, 1968)首次从 *E. Coli* K 株分离出限制性内切核酸酶以来,至今已发现并不同程度地提纯了近 200 种。G. A. Wilson 等 (*J. Mol. Biol.*, **97**, 123, 1975)报道了 Bam HI 的提纯方法。提纯步骤与其它限制性内切核酸酶相似。流程较长,操作烦琐。BamHI 系疏基酶,在提纯过程中易失活。

我们经过反复实验,获得一个提纯 BamHI 的较简便和较安全的方法。现报道如下:

将 *B. amyloliquefaciens* H 在 Penassey 培养基中于 37℃ 振荡培养 8 小时 (至 $O.D_{490} = 5.5$)。离心收

集菌体,用 0.01M Tris-HCl (pH7.4)-0.03M NaCl 洗涤菌体 2 次。取 20 克菌体与 60 克石英砂混合研磨,然后悬浮于 20 毫升 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4)-0.01M 巯基乙醇中,离心,上清液用 0.2M NaCl 稀释至 100 毫升,然后上磷酸纤维柱 (1.2×10 厘米)。用 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 在 0.2—0.6M NaCl 范围进行线性浓度梯度洗脱。收集 0.28—0.35M NaCl 洗脱部分。合并后对 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 透析。透析液上 DEAE-纤维素柱 (1.2×5 厘米),然后用 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 在 0—0.3M NaCl 范围进行线性浓度梯度洗脱,用琼脂糖—溴乙锭凝胶电泳法检出有酶活力的洗脱峰,收集后对 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4)-0.01M 巯基乙醇-0.001M EDTA 透析。透析液经葡聚糖反透析浓缩后于 -20℃ 保存备用。

以 DNA 为底物,用琼脂糖—溴乙锭凝胶电泳法测定酶活力。电泳后,凝胶柱上出现清晰的 5 条荧光带,以西德 GmbH 出品的 BamHI 工作对照,二者完全一致 (应出现 6 条荧光带,琼脂糖凝胶电泳中有两条分不开)。

本法省去了常规方法中的核酸沉淀,硫酸沉淀,凝胶过滤等步骤,并改变柱层析的顺序,柱层析和透析等条件也作了若干改进,由于省去了硫酸沉淀,减少了 BamHI 被其中重金属离子抑制失活的危险性。因此,本法不仅简便,较安全,还可完全采用国产试剂进行。

生化专业 76 届学生宋桂云、李文禧、李月标参加过此工作。

[1980 年 12 月 22 日收到]

一种简易的复合 pH 微电极

雷克健

(中国科学院生物物理研究所)

现有国产仪器测定 pH 值必须样品体积在 2 毫升以上。我们制作了一种简易复合 pH 微电极,在不增添设备,不影响数据准确性的条件下,可以测量约 100 微

升的样品。现将制作方法使用情况介绍如下:

一、制作方法

1. 截取一段 6 厘米长,内径 3 毫米聚乙烯管和一根