

似纯度的抗血清, 我们的抗血清可以满足等电聚焦电泳 Pi 表型分型研究要求。

上海第二医学院生化教研室和中科院上海生物化学所提供标准分子量蛋白质, 上海免疫学研究所提供兔抗人全血血清, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Harris, H. et al.: *Advances in Human Genetics*, 11, p. 1, Plenum Press, New York, 1981.
- [2] Cox, D. W. et al.: *Pediatr. Clin. North Am.*, 26, 267, 1979.
- [3] Eriksson, S.: *Acta Med. Scand.*, 177, Suppl, 432, 1, 1965.
- [4] 余演等: «临床免疫技术», p. 49, 57, 425, 上海科学技术出版社, 1982.

- [5] Jakoby, W. B.: *Methods in Enzymology*, vol. 34, p. 499, Academic Press New York, 1974.
- [6] Crawford, I. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, 215, 1973.
- [7] Morii, M. et al.: *J. Biochem.*, 83, 269, 1978.
- [8] Cameron, F. H. D. et al.: *Steroid Immunoassay*, p. 87, Alpha Omega Publishing Ltd, Cardiff, 1975.
- [9] Laurell, C. B.: *Anal. Biochem.*, 15, 45, 1966.
- [10] Musiani, P. et al.: *Biochemistry*, 15, 798, 1976.
- [11] Saklatvala, J. S. et al.: *Biochem. J.*, 157, 339, 1976.
- [12] Murthy, R. et al.: *FEBS Lett.*, 32, 243, 1973.
- [13] 莫汉庆, 孙册: «生物化学与生物物理进展», 5, 46, 1982.
- [14] 彭启明等: «生物化学与生物物理进展», 45, 59, 1982.
- [15] 关赛芳等: «中华医学检验杂志», 7, 88, 1984.

[本文于 1984 年 10 月 18 日收到]

限制性内切酶 Sau3AI 的提取与纯化

郑 文 尧

(中国科学院微生物研究所, 北京)

限制性内切酶 Sau3AI 是分子生物学与遗传工程研究的重要工具酶之一。它能确定 DNA 复制的起点或终点的位置, 确定 RNA 在 DNA 上的转录位置, 分析 DNA 中脱氧核苷酸序列的排列以及基因的分离等。

J. S. Sassenbach 等人^[1]首先从 *Staphylococcus aureus* 3A (1) 中提取限制性内切酶 Sau3AI, 其

↓
切割序列为: 5'-G-A-T-C-3'
3'-C-T-A-G-5' ↑
它除

了对腺嘌呤的甲基化作用不敏感之外, 是 MboI 的异源同功酶。

我们参考 J. S. Sassenbach 等人的方法, 并做了适当的改进, 因而获得了较高纯度的 Sau3AI 核酶内切酶。

一、材料与试剂

1. 菌种: *Staphylococcus aureus* (本所保藏,

编号 AS. 1.1529)。

2. 试剂: 磷酸纤维素 (P11) (Whatman 公司), 肝素琼脂糖 (上海生化所制备), Lysostaphin (Sigma 公司), λDNA (自制), T₄DNA 连接酶 (生物物理所生化试剂厂), [³²P]E. coli DNA (本所方荣祥同志惠赠)。

3. 培养基: Nutrient broth (每升含牛肉膏 3 克, 多聚蛋白胨 5 克, pH7.2)。

二、方 法

1. 细菌的培养: 将金黄色葡萄球菌在 BPY 斜面上转接三代 (每 10—16 小时一代), 最后转入 500 毫升三角瓶之营养肉汁培养基中 (每瓶装 100 毫升, 共四瓶), 在 37℃ 摇床上振荡培养过夜, 次日转接到 5000 毫升三角瓶中 (每瓶装 900 毫升营养肉汁培养液, 共 4 瓶), 继续振荡培养 4 小时。然后 5000rpm 离心 30 分钟, 收集菌体, 并用细胞洗涤缓冲液 (0.05M Tris-

HCl、0.015M 柠檬酸三钠,调 pH 至 7.4)洗涤三次,4000 毫升培养液共得菌体 2.8 克。

2. 限制性内切酶 *Sau3AI* 的提取: 2.8 克金黄色葡萄球菌菌体加 7.5 毫升细胞破碎缓冲液 [0.01M Tris-HCl (pH7.4), 0.01M β -巯基乙醇],用玻璃棒搅拌均匀,再加 188 微升 Lyso-staphin 溶液 [0.05M Tris-HCl, 0.145M NaCl (pH7.4) Lyso-staphin 200u/毫升,贮藏在 -20°C 冰箱中]。在 37°C 恒温水浴中振荡 15 分钟,然后在 9000—10000rpm 离心 15 分钟,弃上清液,收集菌体。使菌体重新悬浮在 7.5 毫升细胞破碎液中,在冰浴中用超声波处理 6 分钟(菌体悬液不得超过 8°C)。将超声波处理过的细胞破碎液在 4°C 100,000g 离心 90 分钟,收集上清液,用含 0.2MKCl 之 PC 缓冲液 [0.01M KPO_4 , 0.01M β -巯基乙醇, 0.0001M EDTA (pH7.4)] 稀释 2.5 倍,并装进用 0.2M KCl PC 缓冲液平衡过的磷酸纤维素 (P11) 柱 ($1.5 \times 15\text{cm}$) 中,用同一缓冲液洗柱,使流出液 A_{280} 约等于 0,再用含有 0.2—0.8M KCl 的 PC 缓冲液 200 毫升,进行线性梯度洗脱,每 4 毫升收集一管,共收集 50 管。以 λ DNA 为底物,加酶解反应液 [50mM NaCl, 6mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM MgCl_2 , 100 微克/毫升牛血清白蛋白] 30 微升,再加 10 微升磷酸纤维素柱的梯度收集液, 37°C 保温 1 小时,酶解产物加溴酚蓝终止液后以 1.8% 琼脂糖凝胶电泳 (30V 约 16 小时)。用溴化乙锭染色后在荧光灯下观察每一收集部分,确定酶活峰位置。

合并酶活部分,装透析袋并用 PC 缓冲液透析,然后装进用 PC 缓冲液平衡过的肝素琼脂糖柱 ($1.0 \times 10\text{cm}$) 中,用同一缓冲液洗柱,使流出液 A_{280} 约等于零,再用含 0—1M NaCl 的同一缓冲液 200 毫升进行线性梯度洗脱,每 2 毫升收集一管,共 100 管。用上述方法测定酶活,合并酶活峰,装透析袋并用 PC 缓冲液加 50% 甘油透析浓缩 16 小时。包装后置于 -20°C 冰箱中贮藏。

3. 酶活力单位测定: 每一反应体积加酶解反应液 30 微升, 1 微克 λ DNA, 37°C 保温 60

分钟,将能完全酶解 1 微克 λ DNA 的最低酶量定为一个酶活单位。

4. 连接实验: 反应体积加酶解反应液 72 微升,再加 λ DNA 3 微克,然后加 *Sau3AI* 6 个酶活单位,置 37°C 水浴中保温 60 分钟,再置 65°C 水浴中保温 10 分钟,使内切酶失活。取反应体积的 2/3 于另一新反应管中,加连接液 [50mM Tris-HCl (pH7.8), 10mM MgCl_2 , 20mM D. T. T, 1mM ATP, 50 微克/毫升牛血清白蛋白] 50 微升,再加 T_4 DNA 连接酶 1 微升, 15°C 保温 16 小时,然后 65°C 水浴中保温 10 分钟使连接酶失活,再从连接反应体积中取 1/2,加入另一新反应管中,加 *Sau3AI* 2 个单位,于 37°C 保温 60 分钟,分别加入溴酚蓝终止液,再进行琼脂糖凝胶电泳。

5. 过量酶解实验: 于每一反应体积中加酶解反应液 30 微升, λ DNA 1 微克, *Sau3AI* 1—10 单位, 37°C 水浴中保温 10 小时后,再加溴酚蓝终止液进行琼脂糖凝胶电泳。

6. 其他核酸酶含量的测定: 每一反应体积加酶解反应液 30 微升, [^{32}P]E.coli DNA 0.2 微克,再加 *Sau3AI* 20 单位, 37°C 水浴中保温 60 分钟,再加入 7% PCA, 然后离心 (16000rpm), 取上清液于闪烁液中,以不加酶的 [^{32}P] E.coli DNA 作为空白对照测定放射强度。

三、结果与讨论

1. 使用磷酸纤维素 (P11) 柱作初级分离,其酶活检测结果见图 1 (见封 2) 和 2。其酶活峰在 0.56—0.64M KCl 梯度处。上述装柱条件

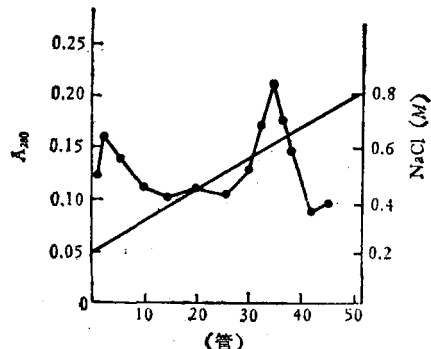


图 2 磷酸纤维素的 KCl 线性梯度洗脱曲线

是利用核酸不被磷酸纤维素 (P11) 柱吸附的特性^[3]。根据 Wilson, G. G. 等人^[4]报道, 在磷酸纤维素柱上 DNA 酶先于 T4 DNA 连接酶被洗脱下来, 长期实践证明, DNA 酶比大多数限制性内切酶先被洗下来。故可免去上柱前沉淀去除核酸, 硫酸分级沉淀等步骤。

2. 使用肝素琼脂糖分离纯化限制性内切酶具有许多优点^[2], 最突出一点是能得到纯度较高的限制性内切酶, 但因其对所有的核酸酶都有亲和力, 故样品在上柱前需先上一个能除去其他核酸酶的柱 (如 P11 柱)。在此柱上 Sau 3AI 酶活性检测结果见图 3 (见封 2) 和 4。其酶活峰在 0.2—0.32M NaCl 梯度处。

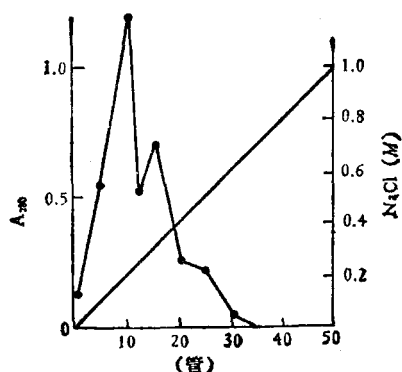


图 4 肝素琼脂糖的 NaCl 线性梯度洗脱曲线

3. 用上述方法制备的 Sau 3AI 限制性内切酶与国外同类产品相符 (图 5, 见封 2)。

为了进一步确定以上方法的可靠性, 做了以下三项检验:

1) 1 微克 λ DNA 加入 1—10 单位 Sau 3AI, 在 37℃ 保温 10 小时, 相当于 10—100 单位 Sau 3AI 在 37℃ 保温 1 小时, 从图 6 (见封 2) 可以看出琼脂糖凝胶电泳分析图谱清晰, 无杂酶出现。

2) λ DNA 被酶解后经 T4DNA 连接酶连接, 其效率在 95% 以上, 连接后的样品经 Sau 3AI 再酶解仍能表现其特性 (图 7, 见封 3)。

3) 100 倍 Sau 3AI 酶解 [³²P] E.coli DNA 的结果说明, 每单位酶酸溶性放射强度小于总放射强度的 0.01%。

以上结果说明用磷酸纤维素 (P11) 和肝素琼脂糖两步分离纯化方法制备 Sau 3AI 是切实可行的。

参 考 文 献

- [1] Sussenbach, J. S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, vol. 3, No. 11, 3193, 1976.
- [2] Thomas, A. B. et al.: *Nucleic Acids Res.*, vol. 4, No. 8, 2561, 1977.
- [3] Greene, P. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, vol. 5, No. 7, 2373, 1978.
- [4] Wilson, G. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, vol. 132, 471, 1979.

[本文于 1984 年 10 月 20 日收到]

介绍几种 DNA 的限制性内切酶图谱分析方法

余 曙 华

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

限制性内切酶图谱 (restriction map), 又称物理图谱 (physical map), 是将各种限制性内切酶的切点在 DNA 上定位, 绘制成的图谱 (以下简称酶谱)。1968 年 Meselson 等人首先发现了限制性内切酶^[1], 至今已从四百多种菌株中分离了限制酶。1973 年, Danna 等绘制了 SV40 的简单图谱^[2]。此后各种 DNA 的酶谱不

断被绘制。酶谱的出现, 对 DNA 分子的克隆, 基因定位, 核酸序列的测定以及进化比较等方面的研究都有重要意义。DNA 酶谱的分析方法很多, 本文只简单叙述几种。

一、双酶解分析方法

此法是将酶两两组合进行彻底酶解, 并与

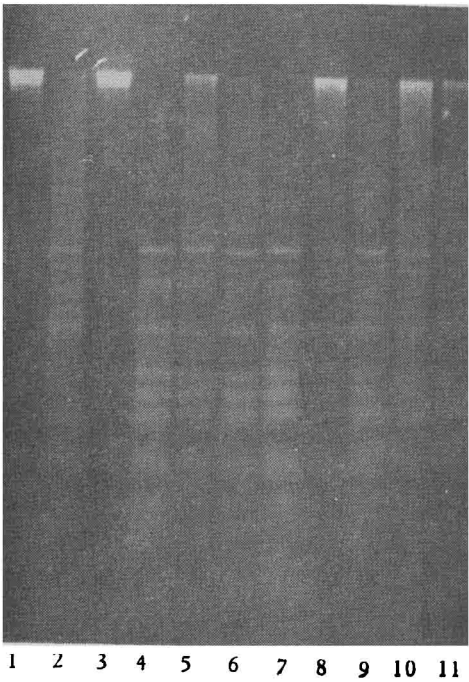


图 1 磷酸纤维素纯化样品的酶解 λ DNA 的
琼脂糖凝胶电泳图谱
1: λ DNA 2—11: λ DNA + 30—39
管样品

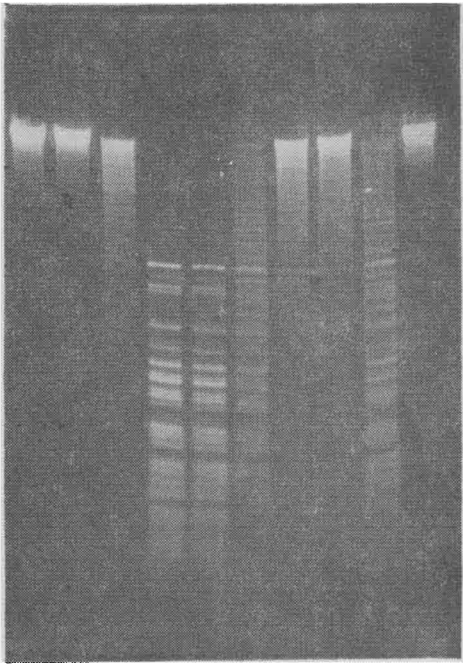


图 3 肝素琼脂糖纯化样品的酶解图谱
从左至右 1: λ DNA; 2—10: λ DNA
分别再加上 8 至 16 管的样品

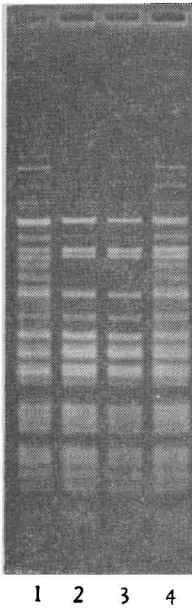


图 5 与 RBL 公司产品比较图谱
1.RBL 产品 1.09 单位
2.RBL 产品 3.29 单位
3.RBL 产品 4.35 单位
4.自制品 1 单位

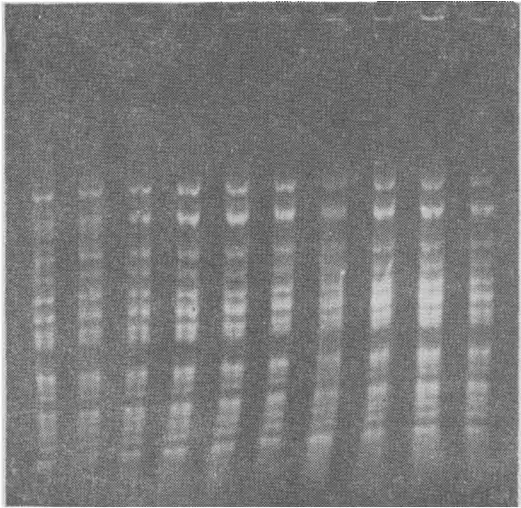


图 6 过量酶解图谱
从左至右 1—10: 分别为 1—10 单位 Sau3AI
酶解 1 微克 λ DNA



图 7 Sau 3A I 酶解与 T_4 DNA
连接图
1. λ DNA + Sau3AI
2. λ DNA + Sau3AI
 $\xrightarrow[10']{65^\circ\text{C}}$ + T_4 DNA 连接酶
3. λ DNA + Sau3AI + T_4 DNA
连接酶 $\xrightarrow[10']{65^\circ\text{C}}$ + Sau 3A I