

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

直径3.5毫米的玻璃棒,用烧热的玻璃棒将聚乙烯管口扩展至3.5毫米,然后用酒精灯火焰使聚乙烯管距管口0.5厘米处软化,轻轻拉成毛细管(内径为1毫米),再沿中间剪断,制成如图1a的接头,然后将接头如图1b牢固接在甘汞电极下端。

2.将2克食用琼脂与100毫升饱和KCl溶液于100℃水浴加热,趁热滤去不溶物;滤液置100℃水浴中保温待用。

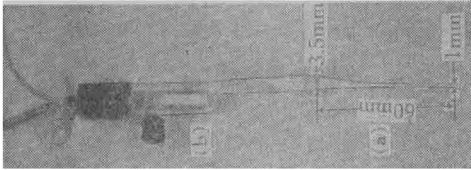


图1 改进甘汞电极的制作

- a) 塑料毛细管接头(盐桥)
- b) 接头(盐桥)与甘汞电极的组合

3.取一个5毫升注射器和一支7#封闭针头于烘箱中预热至40℃—50℃。立即抽取保温的2%琼脂-饱和KCl溶液,将针头顺毛细管插入至甘汞电极下端多孔磁蕊,小心注入琼脂-KCl溶液,并同时抽出针头。注入溶液时必须注意空气能顺毛细管排出,使琼脂-KCl溶液与甘汞电极下端多孔磁蕊接触良好,使整个溶液没有空气泡,以确保琼脂-KCl盐桥传导良好。待琼脂冷却后即可使用。

二、使用

将制作好的改进甘汞电极按图2用医用橡皮膏与玻璃电极复合在一起,即可如同一般pH计使用方法操作。复合电极的直径与一个单独的玻璃电极的直径相当,所以测定可以在一个直径1厘米、长4厘米的小管内进行,管内只需0.1毫升样品溶液便足以浸没玻

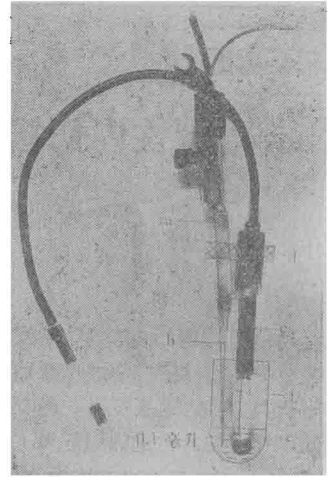


图2 改进后的甘汞电极与玻璃电极的复合

- a. 甘汞电极 b. 充满2%琼脂-饱和KCl的毛细管接头(盐桥) c. 玻璃电极 d. 橡皮膏 e. 待测液 f. 盛待测液的小试管(1×4厘米)

璃电极的小球,使测定顺利进行。

三、保存

选取一个直径1.5厘米,长10厘米的玻璃管,内盛饱和KCl溶液,选配一合适的橡皮塞,并在塞上打一可插入甘汞电极下端玻璃部分的小孔。实验后即可将改进的甘汞电极通过橡皮塞插入饱和KCl溶液中保存。注意应避免毛细管部分弯折造成琼脂-KCl盐桥的损坏。如保存得当,可使用一年以上。

以上复合pH微电极经两、三年使用观察,无论用标准pH溶液互校,或采用经常规方法测定pH值的缓冲液校验,数据精度和重复性与常规方法无明显差异。

[本文于1980年12月收到]

正常肝核糖核酸活性测定

鲁卓卿 孙凤至 刘丽文 刘淑霞

(长春生物制品研究所)

我们以正常肝核糖核酸(RNA)注入小白鼠子宫内,使原来不能制造血清白蛋白的子宫壁细胞合成只有肝脏才能合成的血清白蛋白;此时小鼠子宫接受胚胎率的可能性明显下降,可取得避孕的效果;同时可根据此种避孕效果,作为正常肝RNA活性测定的一种方法。现将实验结果介绍如下:

一、材料及方法

1. 被检的正常肝RNA样品。
2. 110—120日龄小白鼠(此日龄小鼠排卵期较为规律,繁殖力旺盛)。雌、雄分笼饲养8—10天,以便剔除已孕小鼠。
3. 注射RNA: (1) 体外注射法(套管法):