

约 4—5 倍柱体积的抽提缓冲液洗柱,直至洗出液  $A_{280}$  接近零为止。接着以 NaCl-抽提缓冲液(总量 200 毫升)进行梯度洗脱。NaCl 梯度为 0.2—1.2M。然后将连接酶活力较高的部分合并,对含有 50% 甘油, 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1mM  $\text{NaN}_3$ , 7mM 巯基乙醇的溶液透析。透析后的酶液即为 T4 DNA 连接酶的酶制品。保存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

## 结果与讨论

### 1. DNA 连接酶的分离和得量

在磷酸纤维素柱层析分离过程中连接酶的活力测定方法如“材料与方法”中“电泳法”一节所述。一个代表性实验结果见图 1(见封三)。图中第 37—49 管是连接酶活力较高的部分,几乎把反应系统中的 BamHI-pBR 322 DNA 都由线状转变成了环状和其他形式。这些部分洗出液内的 NaCl 浓度在 0.5—0.8M, 连接酶的总量相当于 7500ATP-ppi 交换单位。从 3 克菌体得到的酶量相当于 Weiss 从 45 克菌体经五步分离所得酶量的 3 倍。整个过程(不包括菌体培养时间)只需两天。五次实验结果均一致。

### 2. DNA 连接酶的连接效率

本法所得连接酶制品连接粘性末端 DNA 的效率见图 2(见封三)。图中第 4 到第 7 行表明线状 DNA 已被完全转变成环状和其他形式。根据第 4 行所用酶量和底物量计算, 1 单位连接酶可在  $12^\circ\text{C}$ , 15 小时内完全连接 15 微克 Bam HI-pBR 322 DNA。

### 3. 连接酶制品中 DNase 的含量

在 pBR 322 DNA 与连接酶的保温实验中(图 3 见封三), 酶增加至完全连接同样多底物的酶量的 10 倍, 反应时间延长至 72 小时, 未见 pBR 322 由环状转变成线状或降解为其他形式。说明在酶制品中无内切核酸酶, 即使有也是极微的。

图 4(见封 3) 是 2.5 毫克分子  $^{32}\text{P}$ -d-(Gp ApCpGpApG) 与 1.75 单位连接酶在  $12^\circ\text{C}$  保温 16 小时后的同系层析谱。同系层析法能够检测出只有一个碱基之差的核苷酸片段。在图 4 上未见到新的斑点。此实验除了能检查出外切核酸酶外, 还能检查出内切核酸酶。这说明在本实验条件下, 这个方法制备的 T4 DNA 连接酶制品中既无内切核酸酶, 也无外切核酸酶。

## 参 考 文 献

- [1] Nathans, D. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 273, 1975.
- [2] Weiss, B.: *Methods in Enzymology*, Vol. 21, part D, 319, 1977.
- [3] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组等: 《微生物学报》, 1978 年, 18 期, 202 页。
- [4] Wilson, G. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, **132**, 471, 1979.
- [5] Greene, P. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2373, 1978.
- [6] Murray, N. E. et al.: *J. Mol. Biol.*, **132**, 493, 1979.
- [7] 刘金富等: 《细胞生物学杂志》, 1981 年, 第 3 卷, 第 2 期, 第 37 页。
- [8] Jay, E. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **1**, 331, 1974.
- [9] 中国科学院上海细胞生物学研究所三室核酸研究组: 《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 第 10 期, 第 217 页。
- [10] Richardson, C. C.: *Procedures in Nucleic acid Research* (Ed. by Cantoni, G. L. and Davies, D. R.), Vol. 2, 815, 1971.

[本文于 1981 年 12 月 4 日收到]

## 学术动态

### 今年将在匈牙利举办国际生物物理学讲座

受联合国教、科、文组织的委托, 匈牙利科学院和生物物理学学会所属的生物物理研究所将组织一次生物电力学电致效应讲座, 目的是使青年科学工作者熟悉线粒体、叶绿体和紫膜电致效应研究的技术和理论问题。

讲座包括 8—10 次综述报告, 10 次实验。实验的内容包括线粒体、亚线粒体颗粒、叶绿体、紫膜等的制备;

$\Delta\psi$  和  $\Delta\text{pH}$  测量; 快速电荷运动研究; 生色团的 EPR; 线粒体质子泵;  $\Delta\psi$  的调节作用等。

将邀请美、苏、匈、德、荷等各国的 20 多位科学家参加工作。学员 20 人。讲座定于 9 月 8—22 日, 在匈牙利的赛格德 (SZEGED) 举办。

[刁云程 供稿]