

限制性内切酶 MspI 的分离纯化

霍奕

林培懋

(陕西省微生物研究所,西安)

(西北大学生物系,西安)

MspI 内切酶是 II 型限制内切酶。该酶首先是由 R. J. Roberts 从 *Moraxella species* 中提纯出来的^[1], 但有关该酶的纯化方法目前在国内外尚无报道。我们参照 Roberts 等人提取其它内切酶的方法, 经过适当改进, 从克隆 MspI 基因的大肠杆菌中分离、纯化了 MspI。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 基本上用 Weber 等方法^[2]。

聚丙烯酰胺凝胶电泳: 分离胶 10%, 间隔胶 2.5%。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸系统, pH8.3。在考马斯亮兰中染色, 在 570nm 处扫描。

二、结果与讨论

一、材料与方 法

(一) 材料

菌种: 克隆 MspI 基因的 *E. Coli*. RRI

试剂: 磷酸纤维素 P₁₁ (Whatman 进口分装); DE52 (Whatman 进口分装); λ DNA (华美生物工程中心); 硫酸链霉素(华北制药厂)。

(二) 方法

将 *E. coli*. RRI 接种于加有氨基苄青霉素(终浓度为 100μg/ml) 的 LB 培养基中 37℃ 培养达晚对数期, 离心收集菌体。10 克菌体悬浮于 20 毫升缓冲液 (0.01mol/L Tris · Cl pH 7.5, 0.01mol/L 巯基乙醇) 后, 超声破碎 (20 × 30s)。破碎液经 20000r/min 离心约 2 小时。上清液用硫酸链霉素除去核酸, 再于磷酸缓冲液 (0.01mol/L K-PO₄ pH7.4, 10⁻⁴mol/L EDTA pH 8.0, 10% 甘油, 0.01mol/L 巯基乙醇) 中透析 15 小时。透析液上磷酸纤维素柱(柱体积 φ1.6 × 30cm)。用 400 毫升 0—1.0mol/L KCl 的磷酸缓冲液进行梯度洗脱, 每管 5.3 毫升分部收集。每三个收集管测定酶活力。活性部分加固体硫酸铵至 60% 饱和度, 放置 20 分钟, 离心 (15000r/min, 15 分钟)。收集上清液并在磷酸缓冲液中透析。再于含 50% 甘油的磷酸缓冲液中透析浓缩, 浓缩的酶液于 -20℃ 冰箱中贮存。

酶活力测定: 测活反应液 50 微升 (6mmol/L Tris · Cl pH7.9, 6mmol/L MgCl₂, 6mmol/L 巯基乙醇) 含 2 微克 λDNA, 2—5 微升酶液。37℃ 保温 20 分钟至 1.5 小时, 加 10 微升终止反应液 (50% 甘油, 0.05% 溴酚兰, 0.1mol/L EDTA pH7.0)。用 15 微升的反应液进行琼脂糖凝胶电泳。

酶活力单位 (U): 37℃ 保温 1 小时, 在 20 微升反应液中, 完全消化 1 微克 λDNA 所需的内切酶量定为一个酶单位。

酶蛋白浓度测定: 主要参照 Lowry 等方法^[2]

经过 P₁₁ 柱层析后, 每 3 个收集管检测酶活力的分布, 结果如图 1 (图版 IV)。MspI 的活力峰约在 0.58mol/L KCl 处。

当用 60% (NH₄)₂SO₄ 处理酶液时, MspI 存在于上清液中。这一步可除去较多的杂蛋白和其它核酸酶。因为当用 10 倍量的酶与 λDNA 反应 18 小时, 酶切图谱清晰图 2 (图版 IV)。

为了将酶液进一步纯化, 我们曾用 DE52 柱分离 (柱体积 φ1 × 30cm)。将磷酸纤维素层析后收集的酶液经透析加到 DE52 柱上。用 200 毫升 0—0.5mol/L KCl 的磷酸缓冲液进行梯度洗脱。酶约在 0.1—0.13 mol/L KCl 较宽的范围内被洗脱下来。由于酶被稀释, 酶活也因此有所降低。

图 3 是主要纯化步骤的 SDS-聚丙烯酰胺电泳分析: 图 3a 是酶液经 P₁₁ 柱层析后的电泳图谱, 主要有五个蛋白峰。图 3b 是经 (NH₄)₂SO₄ 沉淀浓缩后的电

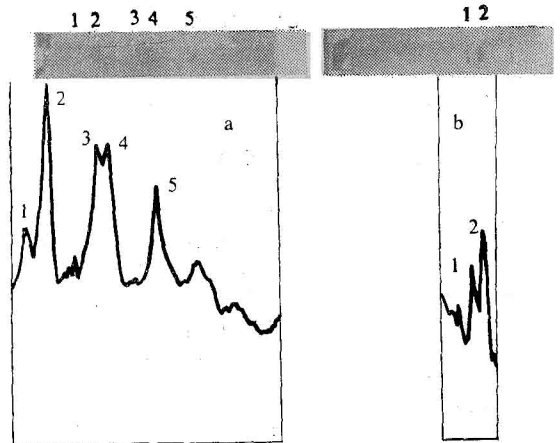


图 3 SDS-聚丙烯酰胺电泳图谱及扫描图 (a) P₁₁ 柱层析 (b) (NH₄)₂SO₄ 沉淀后

(下转第 235 页)

表1 老化红细胞的 SOD、LPO、荧光偏振度的变化

样品	例数	SOD ($\mu\text{g/g.Hb.}$)	LPO (nmol/g.Hb.)	P (偏振度)
年轻红细胞	10	481.43 \pm 10.13	2.31 \pm 0.14	0.237 \pm 0.031
老化红细胞	10	421.24 \pm 27.17	3.97 \pm 0.25	0.281 \pm 0.026
P 值 (T-test)		P<0.001	P<0.001	P<0.005

氧化物^[9],其中最重要的是丙二醛,它能交联蛋白质,脂类,核酸及糖类,使生物膜变性,致使组织破坏和老化。当机体处于正常生理状态时,自由基不断产生,也不断被清除。但老化细胞内的各种抗氧化剂减少,因而对自由基及过氧化物的清除能力也减弱,脂质过氧化物的含量因之增高。有学者报道^[10],氧化是导致衰老的主要原因。体内自由基及脂质过氧化物随年龄的增长而升高^[11]。本文结果说明在细胞水平也是如此,随着细胞的增龄,LPO也升高。

SOD的功能是催化超氧阴离子自由基(O₂⁻)的歧化反应,清除自由基,从而阻断自由基的链锁反应,对机体起保护作用^[12]。本文结果,SOD含量随红细胞的增龄而减少,这与有关的个体水平的报道一致^[13]。

已知不饱和脂肪酸的凝固点低于饱和脂肪酸,不饱和脂肪酸发生过氧化后,由于不饱和键减少,凝固点就会升高,膜的流动性就会变小,使膜丧失了正常的生理功能。本文结果,老化红细胞膜脂流动性下降,可能是由于SOD降低导致膜脂质过氧化程度加大所致^[14]。也有人说:可能是血红蛋白受超氧离子的侵袭氧化变成变性血红蛋白,再进一步分解成高铁卟啉,

后者可使膜脂质变性^[15]。我们觉得膜蛋白之间及其与脂质之间的氧化交联作用也是不容忽视的重要因素。

总之,据本文结果及有关资料,自由基在红细胞老化过程中起着重要作用,膜的过氧化损伤可能是红细胞老化的主要原因。

参 考 文 献

- [1] 吕维善等:《中华医学杂志》,1982,62,181。
- [2] 张南之等:《生理科学进展》,1984,15(3),222。
- [3] P. Hochstein and C. Rice-Evans: In *Lipid peroxidation in Biology and Medicine*, K. Yagi ed. Orlando Academic Press, 1982, 81~88。
- [4] Nakai, T. et al., *Acta Hematology Japan*, 1984, 47, 1230。
- [5] Uchlyma, M. et al., *Anal. Biochem.*, 1978, 86, 271。
- [6] Misra, H. P. et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, 181, 308。
- [7] 聂松青:《北京医学院学报》,1983,15(4),249。
- [8] 曹锡清等:《生物化学与生物物理进展》1986,(4),53。
- [9] Leibovitz, B E. et al., *J. Gerontology*, 1980,35(1), 24。
- [10] Roy, D. et al., *J. Neurochem*, 1984, 42, 628。
- [11] 佐佐木:《最新医学》,1978,33(5),863。
- [12] 李文杰:《生命的化学》,1982,2(5),49。
- [13] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》,1986,(6),35。
- [14] Dobretsov, G. E. et al: *FEBS Lett.*, 1977, 84, 125。
- [15] 忻文娟等:《中华医学杂志》,1987,67(12),641。

[本文于1988年4月11日收到]

(上接第236页)

泳图谱,有二个峰。进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定收集酶液的均质性,结果发现在自然状态下也有二个峰。说明收集的酶液中主要含有二种蛋白质。

表1 MspI 的纯化步骤及结果

纯化步骤	蛋白质		活力	
	体积 (ml)	总量 (mg)	总单位 (U)	比活 (U/mg)
磷酸纤维素层析	21	6.3	4200	666
(NH ₄) ₂ SO ₄ 处理 后浓缩液	14	3.6	3500	972

图版 IV 是 MspI 和 HpaII 降解 λ DNA 和

PBR 322 的酶切图谱。从图可见二种酶的酶谱完全相同。当用二种酶共同降解 λ DNA 和 pBR322 时,也无新片段产生。从而说明: MspI 与 HpaII 是同裂酶^[1]。

酶的稳定性: MspI 在上述未加牛血清白蛋白的条件下保存3个月,活性无明显损失。

参 考 文 献

- [1] Roberts, R. J.: *Nucleic Acids Res.*, 1985, 13, supplement, r165。
- [2] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265。
- [3] Weber, K. and Osborn, M.: *The Proteins*, Acad. Press, New York, 1975, Vol. 1 (3rd), 180-206。

[本文于1988年3月5日收到]

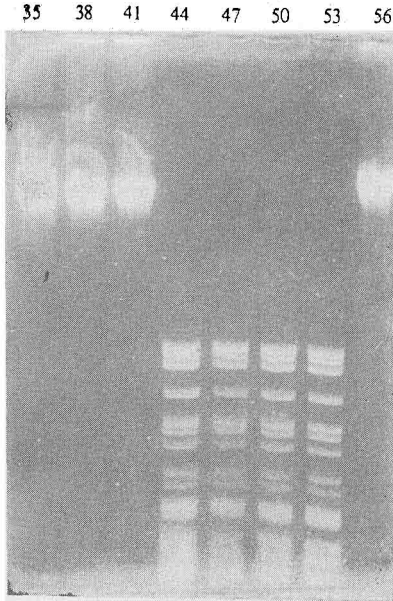


图 1 P_{11} 柱层析后酶活性分布



图 2 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀后酶液对 λ DNA 反应 18 小时的酶切图谱

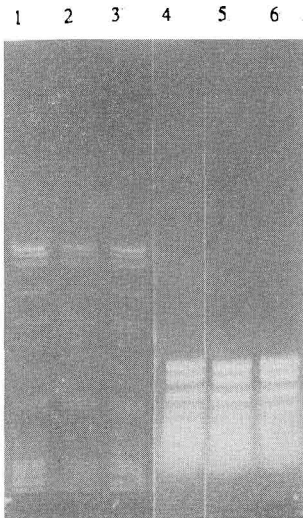


图 4 *MspI* 和 *HpaII* 对 λ DNA 和 pBR322 的酶切图谱

(1) *MspI* + λ DNA (2) *HpaII* + λ DNA (3) (*MspI* + *HpaII*) + λ DNA (4) *MspI* + pBR322 (5) *HpaII* + pBR322 (6) (*MspI* + *HpaII*) + pBR322

丁 曼等: “人 β 干扰素重组质粒导入 CHO-dhfr^r 细胞”一文的图 1

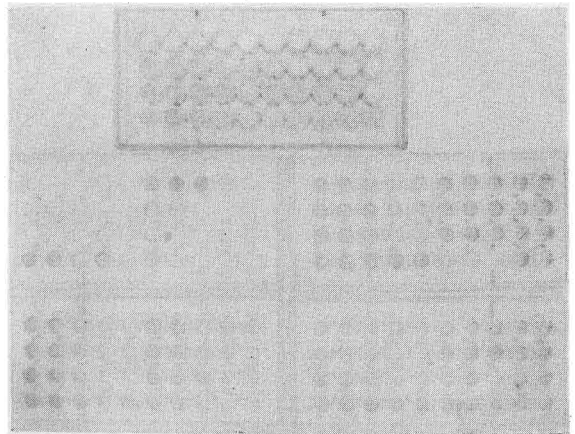


图 1 40 孔板测定 Hu-IFN- β_1 表达水平
图板第一排(横向)均为 Hu-IFN- β_1 国际标准品, 阳性对照。其余各排孔为筛选的细胞株培养上清液。最下面的一板最后一排为正常细胞培养基上清, 阴性对照