

一步法分离 T4 DNA 连接酶

刘金富 戎红梅 王妙珠 张孝勇

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

T4 DNA 连接酶在 DNA 重组的研究中有重要作用^[1],需求量日益增加,因此有必要发展迅速简便的纯化 DNA 连接酶的方法。Weiss^[2]首先建立了此酶的纯化方法,以后曾有人相继做了不少改进^[3]。Murray^[6]等构建了载有 T4 DNA 连接酶基因的 λ 噬菌体,获得了 T4 DNA 连接酶的高产菌。本文根据 DNA 在 0.2M NaCl (pH7.0) 溶液中不与磷酸纤维素相结合^[5],在磷酸纤维素柱上, DNase 比 DNA 连接酶先洗脱下来^[4],以限制性内切酶水解过的 pBR 322 DNA 为底物可作为连接酶的简便测活方法^[8],建立了纯化 DNA 连接酶的简便方法。用 Murray 构建的 λ T4 lig 溶源菌,在细胞破碎和离心后,只经磷酸纤维素柱层析一步,即可取得连接酶分离的良好效果。仅在两天内,可从 3 克菌体得到 5500—7500ATP-ppi 交换单位的酶制品(不包括菌体培养时间)。此制品经 P^{32} -d-(GpApCpGpApG) 与 pBR 322 DNA 检查,未发现 DNase 污染,并已在基因库建立中应用。

材料和方法

菌株 载有噬菌体 NM 989 λ T4 lig wam 403 Eam 1100 att⁺ CI857 nin 5 Sam 100 的溶源菌 *E. Coli* 1100 EndoA⁻ Sup^o 来自 Murray, 菌体培养亦按 Murray 法^[6]进行。

1. DNA 连接酶的活力测定

(1) ATP-ppi 交换法 按 Weiss^[2]方法进行。

(2) 电泳法 20 微升连接酶反应缓冲液中含 66mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl₂, 10mM 二巯基赤藓醇 (DTT), 1mM ATP, 0.3

微克限制性内切酶 *Bam* HI 水解过的 pBR322 DNA (*Bam* HI-pBR 322) 和酶液, 在 12°C 反应 3 小时或过夜, 再经 65° 处理 10 分钟后进行琼脂糖凝胶电泳。限制性内切酶 *Bam* HI 的制备和电泳方法参考文献[7]。

2. DNase 的活力测定

(1) 质粒 DNA 测定法 反应体系内除了不加 ATP 并用 pBR 322 DNA 代替 *Bam* HI pBR 322 DNA 外, 其余条件和方法都与上述 1 的(2)节相同。

(2) 同系层析法 反应体系内除不加 ATP 并用 32 P-d (GpApCpGpApG) (比度为 2.56×10^6 cpm/n mole) 代替 *Bam* HI-pBR 322 DNA 外, 其余条件亦与 1 的(2)节相同, 反应后进行同系层析^[8]。d-(GpApCpGpApG) 由本室合成^[9], 32 P-d-(GpApCpGpApG) 的制备按 Richardson^[10]进行。

3. DNA 连接酶的抽提和分离

(1) 粗酶液的制备 3 克菌体悬浮于 20 毫升抽提缓冲液 [0.01M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH7.0) 1mM Na₂N₃, 1mM EDTA, 25 微克/毫升苯甲基磺酰氟 (PMSF), 7mM 巯基乙醇, 0.2M NaCl, 5% 甘油] 中, 置于冰浴内, 在 MSE 超声仪上以电流 1.7 毫安进行超声处理, 每次处理 30 秒钟, 共处理 7 次。超声处理时维持温度 10°C 以下。超声处理后的悬液以 $100000 \times g$ 离心 60 分钟, 上清液即为 DNA 连接酶的粗酶液。

(2) 磷酸纤维素层析 磷酸纤维素 (Whatman p11) 按常规处理装柱(1×18 厘米), 经抽提缓冲液平衡后, 将前述粗酶液加到此柱上。上柱流速为 3 毫升/20 分钟; 样品上完后, 用大

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 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°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 克菌体经逐步分离所得酶量的 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°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}P -d-(Gp ApCpGpApG) 与 1.75 单位连接酶在 12°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

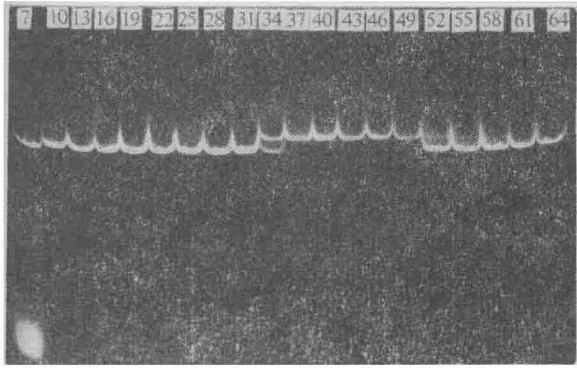
受联合国教、科、文组织的委托, 匈牙利科学院和生物物理学会所属的生物物理研究所将组织一次生物电力学电致效应讲座, 目的是使青年科学工作者熟悉线粒体、叶绿体和紫膜电致效应研究的技术和理论问题。

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 ΔpH 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]



一步法分离 T4DNA 连接酶

图1 T4DNA 连接酶在磷酸纤维素层析分离中的电泳测活

图上面的数字是收集管号，自第7管开始是样品上完后以平衡液淋洗。第25管开始进行梯度洗脱。第37到49管是连接酶活力较高的部分

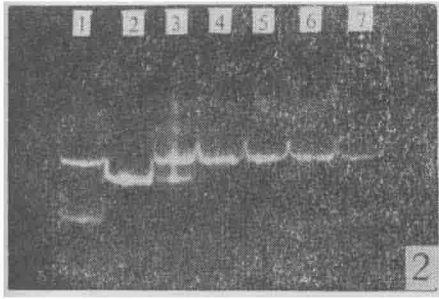


图2 T4DNA 连接酶的连接效率

1. PBR322DNA; 2. BamHI-PBR322DNA; 3, 4, 5, 6 和 7 是 BamHI-PBR322 DNA 分别加 0.1, 0.02, 0.04, 0.08 和 0.16 单位连接酶; 温度 12°C, 时间 15 小时

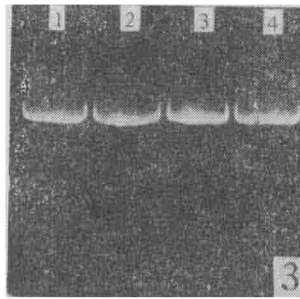


图3 PBR322 DNA 与 T4 DNA 连接酶保温不同时间后的琼脂粉凝胶电泳

1. 不加酶的 PBR322 在 12°C 保温 72 小时; 2, 3, 4 是 0.2 单位酶和 0.3 微克 PBR322 DNA 分别在 12°C 保温 24, 48, 72 小时



图4 $^{32}\text{p-d}-(\text{GpApCpGpApG})$ 与 T4DNA 连接酶保温后的同系层析谱

1. 未经任何处理的 $^{32}\text{p-d}-(\text{GpApCpGpApG})$;
2. $^{32}\text{p-d}-(\text{GpApCpGpApG})$ 在 12°C 保温 16 小时;
3. $^{32}\text{p-d}-(\text{GpApCpGpApG})$ 与 1.75 单位酶在 12°C 保温 16 小时。展层系统: HomomixIII

柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 蛹血淋巴脂蛋白的分离和鉴定

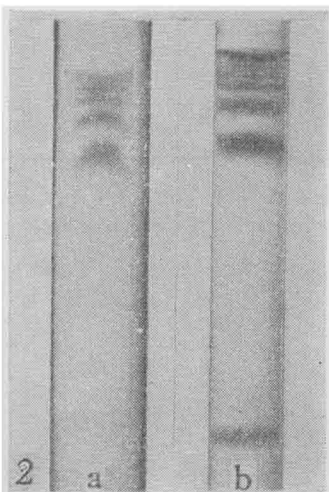


图2 高密度脂蛋白电泳图谱 a: ♀ b: ♂

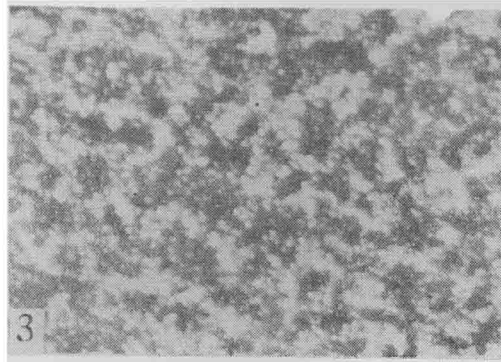


图 3