

与人 IgG 及正常人血清行双扩散试验时,可见 2—3 条沉淀线,而与标准的 IgG 亚类反应时只见一条沉淀线。又进行一次克隆后检查,仍然得到相同的结果。这是否与提取的 IgG 及人血清中,有聚合的 Ig 或不同 IgG 的碎片有关,其原因待进一步探讨。

我们的经验是:免疫小鼠用的抗原,应力求提纯,否则将给筛选鉴定带来麻烦。尽管免疫时可用不纯的抗原,甚至是未知的,但鉴定时必须用很纯的抗原,才能准确、及时地鉴定出 McAb 的性质,确定 McAb 与抗原反应的范围和应用价值。如 McAb 作为研究 Ig 决定簇的试剂时,特异性要高,反应范围要窄,而作为检定

Ig 类别时,则只要求反应范围宽。

本试验得到王世中教授多次指导,免疫抗原由聂良才提取特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Lowe, J. et al.: *Immunology*, **42**(2), 649, 1981.
- [2] 刘尔翔等译:《杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用》,人民卫生出版社,北京,1981。
- [3] Goding, J. W.; *J. of Immunological Methods*, **39**(4), 285, 1980.
- [4] 肖俊:《国外医学》, **6**: 290, 分册, **6**: 290, 1982。
- [5] 严自助等:《中华医学杂志》, **58**(8), 470, 1978。
- [6] Ling, N. R: *Brit. J. Haemat*, **7**, 299, 1961.
- [7] 王世中主编:《免疫学技术》,科学出版社,北京,1980。
- [8] Weber, K. et al: *J. B. C.*, **244**(4), 4406, 1969.

[本文于1983年7月7日收到]

分离纯化限制性核酸内切酶的基本方法和纯度鉴定

吴绳祖 吴 雪 陆惠芬 杨 颖

(中国科学院上海生物化学研究所)

为了适应研究工作需要,我们完成了 Bam-HI、EcoRI、PstI^[1]、AluI、BglII、SalI 等十几种限制性核酸内切酶的分离纯化工作,样品在质量上达到国外同类产品的水平。这些酶制剂用于遗传工程及核酸结构功能研究已能取代相应的进口酶,促进了科研工作的发展。

本文报道我们在制备限制性核酸内切酶中常用的几种方法,以及有实用意义的鉴定酶纯度的分析方法。

一、材料与试剂

1. 菌株: *Arthrobacter luteus* (ATCC21606), *Bacillus globigii*, *Streptomyces albus* G.

上述菌株由 CSHL 赠送

2. 试剂: 磷酸纤维素(P11)和 DEAE 纤维素(DE52)为 Whatman 产品; 聚乙烯亚胺, Serva 产品; λ DNA, 本所东风厂产品; 肝素琼脂糖、氨基戊烷琼脂糖, 5'-³²P λ DNA/HaeIII, 本室制备。

3. 磷酸钾缓冲液: 10mM K₂HPO₄-

KH₂PO₄(pH7.4) 1mM Na₂ EDTA, 7mM 巯基乙醇, 10% 甘油。

4. 酶反应液:

NaCl Tris-HCl MgCl₂ DTT
(pH7.4)

AluI 50mM 10mM 10mM 1mM

BglII 60mM 10mM 10mM 1mM

SalI 150mM 10mM 10mM 1mM

二、方 法

1. 菌体培养: *Arthrobacter luteus* 与 *Bacillus globigii* 菌株生长在 P. B 培养基(每升含牛肉膏 10 克, 蛋白胨 8 克、氯化钠 5 克), 30℃ 过夜培养, 低速离心得菌 5 克/升。 *Streptomyces albus* G 菌株生长的培养基(上述 P. B 培养基每升加入 10 克 MgCl₂, 340 克蔗糖), 37℃ 培养 24 至 32 小时, 低速离心得菌 15 克/升。

2. *AluI*, *BglII*、*SalI* 分离纯化(在 4℃ 条件下进行)。

(1) 粗酶制剂提取 菌体 25 克悬浮于 100

毫升含 0.2M NaCl 的磷酸钾缓冲液, 加入溶菌酶 10 毫克, 放置 15 分钟后超声波破碎。破碎液经 $35,000 \times g$ 45 分钟离心, 取上清液加入 10% 中性聚乙烯胺 10 毫升, 慢速搅拌 20 分钟。悬液经 $15,000 \times g$ 15 分钟离心, 取上清用 35—75% 饱和硫酸铵盐析蛋白。蛋白沉淀用 15 毫升含 0.2M NaCl 的磷酸钾缓冲液溶解后进行柱层析纯化。

(2) 葡聚糖凝胶 G25 柱层析 柱体积 $\phi 3.2 \times 25\text{cm}$ 。装柱后预先用含 0.2M NaCl 的磷酸钾缓冲液平衡。经溶解的粗酶样品上柱, 用柱平衡缓冲液洗脱, 每管 6 毫升分部收集。样品经 A_{280} 检测蛋白, Nessler 试剂检查 $[\text{NH}_4]^+$, 然后合并蛋白峰组分进行肝素琼脂糖柱层析。

(3) 肝素琼脂糖柱层析 柱体积 $\phi 1.8 \times 15\text{cm}$ 。装柱后预先用含 0.2M NaCl 的磷酸钾缓冲液平衡。经葡聚糖凝胶 G25 柱层析收集的样品上柱后, 用柱平衡缓冲液洗至 A_{280} 读数接近 0。再用 200 毫升含 0.2—1.0M NaCl 线性梯度的磷酸钾缓冲液洗脱。每管 5 毫升分部收集, 合并酶活力峰后对磷酸钾缓冲液透析过夜。

(4) 磷酸纤维素柱层析 柱体积 $\phi 1.8 \times 14\text{cm}$ 。装柱后预先用含 0.2M NaCl 的磷酸钾缓冲液平衡。经肝素琼脂糖层析后透析样品上柱后, 用柱平衡缓冲液洗至 A_{280} 读数接近 0, 再用 200 毫升含 0.2—1.0M NaCl 线性梯度的磷酸钾缓冲液洗脱。每管 5 毫升分部收集, 合并酶活力峰后对磷酸钾缓冲液透析过夜。

(5) 氨基戊烷琼脂糖柱层析 柱体积 $\phi 1.4 \times 12\text{cm}$ 。装柱后预先用磷酸钾缓冲液平衡, 将透析样品上柱, 用含 0.1M NaCl 磷酸钾缓冲液洗至 A_{280} 读数接近 0。再后用 150 毫升含 0.1—1.0M NaCl 线性梯度的磷酸钾缓冲液洗脱, 每管 4 毫升分部收集。合并活力峰, 对含 50% 甘油的磷酸钾缓冲液透析, 置 -20°C 保存。

(6) 酶活力测定 方法见文献 [1]。酶反应液按试剂 4 所示。

(7) 琼脂糖凝胶电泳 方法见文献 [1]。

3. 酶纯度分析

(1) 100 倍酶量检测 取 20u 经纯化的最

终样品在 50 μl 酶反应液中作用 1 μg λDNA , 37°C 保温 5 小时, 反应后 65°C 10 分钟酶灭活。电泳后照相分析结果。

(2) 5' 外切酶与磷酸单酯酶测定 30 μl 含 5'-[^{32}P]- λDNA /Hae III 片段 (放射性强度约 10^5cpm) 的酶反应液中加入 20—50u 酶样品, 37°C 保温 60 分钟。反应后加入等体积的 7% TCA, 离心后取上清测定放射强度。

(3) 连接与回切实验 方法同文献 [1]。

三、结果与讨论

限制性核酸内切酶 SalI 在肝素琼脂糖柱层析时酶活在 0.62—0.82M NaCl 处。如图 1 所示, 利用肝素琼脂糖作为第一根柱纯化 SalI, 活力峰与杂蛋白峰得到较好分离效果。SalI 在磷酸纤维素柱层析行为后测活电泳图谱 (图 2 见封 3)。酶活力在 0.58—0.80 M NaCl 处, 与 Arrand 等 [2] 报道的洗脱盐浓度相似。SalI 在氨基戊烷琼脂糖柱层析后测活电泳图谱 (图 3 见封 3)。酶活在 0.31—0.44 M NaCl 处, 与 Arrand 等 [2] 报道的洗脱盐浓度相似。

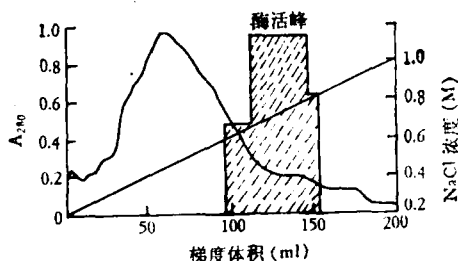


图 1 肝素琼脂糖柱分离 SalI 的层析行为

不同种类的限制性核酸内切酶在相同的柱层析中层析行为有所不同。如利用磷酸纤维素、DEAE 纤维素、肝素琼脂糖和氨基戊烷琼脂糖纯化 AluI 和 BglIII 时, 酶活洗脱盐浓度与 SalI 酶有差异 (见表 1)。又如图中肝素琼脂糖柱作为第一根柱纯化 BglIII 时, 酶活峰与蛋白峰重叠。酶活部分的 A_{280} 吸收值大于 1.5, 分离纯化效果与图 1 中肝素琼脂糖柱纯化 SalI 的效果截然不同。图 5 是改用磷酸纤维素柱纯化

表 1 AluI, BglII, SalI 酶活洗脱 NaCl 浓度比较

柱材料 酶类别	磷酸纤维素	DEAE-纤维素	肝素琼脂糖	氨基戊烷琼脂糖
Alu I	0.35—0.55M <A>	0.10—0.21M <C>	0.42—0.63M 	
Bgl II	0.35—0.58M <A>		0.40—0.65M 	0.28—0.52M <C>
Sal I	0.58—0.80M 		0.62—0.82M <A>	0.31—0.44M <C>

A、B、C 表示内切酶纯化时的柱层析前后顺序。

BglII 的结果。图中数据说明层析中 BglII 的酶活力部分偏离了杂蛋白峰，酶活力部分 A_{280} 最大吸收值小于 0.2。蛋白量减少，提高了酶的比活，得到了很好的纯化效果。从上述实验数据可知，利用限制性核酸内切酶层析行为的差异来设计各种限制性核酸内切酶的分离纯化方法是获得高纯度酶制剂的必要手段。据此我们按表 1 排列的柱层析顺序分离纯化 AluI、BglII、SalI，取得满意结果。

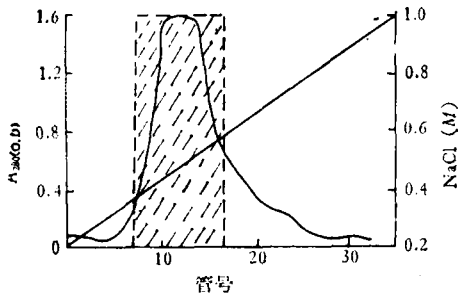


图 4 BglII 在肝素琼脂糖柱中层析行为

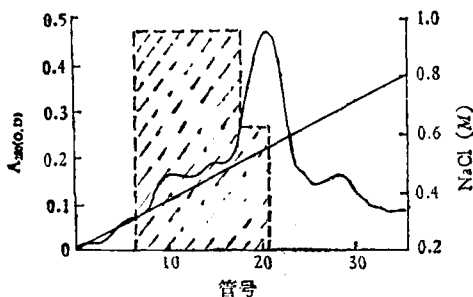


图 5 BglII 在磷酸纤维素柱中层析行为

J.R. Arrand^[2] 等报道在 *Streptomyces altus* G 菌株中存在两种不同识别位点的限制性核酸内切酶 SalI 与 SalII。但是我们在分离纯化过程中没有发现 SalII 的活力，最终样品经 100 倍酶量作于 λ DNA 和 pBR322 DNA，都没有发现 SalII 的活力。

AluI、BglII、SalI 的最终样品用方法 2 做了酶纯度分析。(1)经 100 倍酶量检测， λ DNA 片段呈该酶的特征性图谱(图 6 见封 3)。(2)通过 5' 外切酶与磷酸单酯酶测定，每单位酶量所释放的酸溶性放射强度小于总放射强度的 0.3%。(3)连接与再切实验具有较高的连接与回切效率(图 6 见封 3)。上述酶样品纯度分析参照 BRL 公司产品质量指标，并考虑到实验室实际应用情况而制定的。通过上述分析鉴定的酶制剂已用于重组 DNA 研究工作中，如 rRNA 基因、家蚕 NPV-DNA 和 HBV-DNA 的克隆和限制性核酸内切酶图谱分析，rRNA 基因和 HBV 序列分析测定，以及化学合成脑啡肽基因和 HBsAg 基因表达等方面，均取得了成功，从而证明酶制剂纯度良好，而且分离纯化和鉴定分析方法也是简单可行的。

本工作承李载平教授、冯宗铭同志提供宝贵意见，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 吴雪等:《生物化学与生物物理进展》, 6, 63, 1981。
- [2] Arrand, J. R. et al.: *J. Mol. Biol.*, 118, 127, 1979。

[本文于 1983 年 6 月 29 日收到]

《分离纯化限制性核酸内切酶的基本方法和纯度鉴定》一文的图 2、3、6

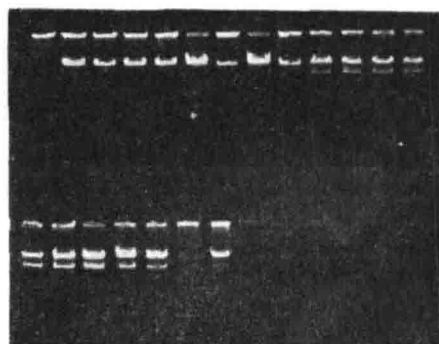
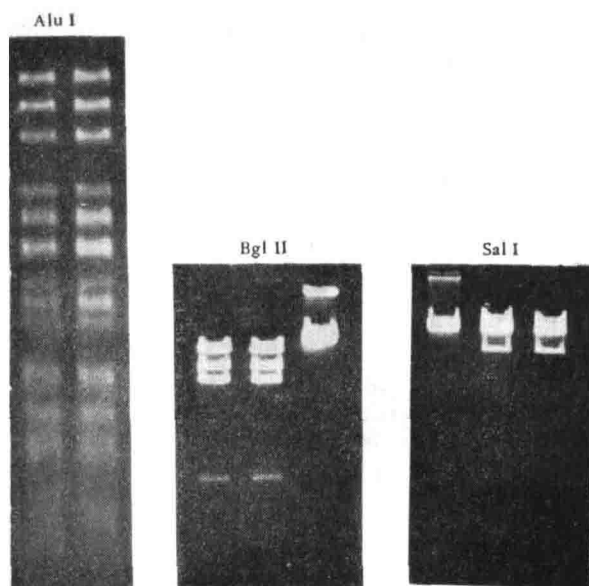


图 2 Sal I 经硝酸纤维素层析后测活电泳图谱

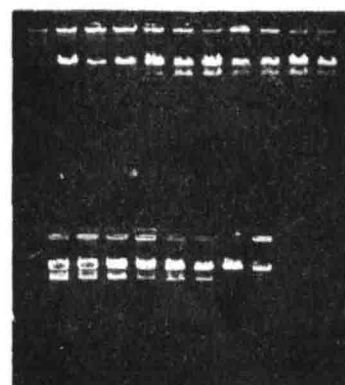
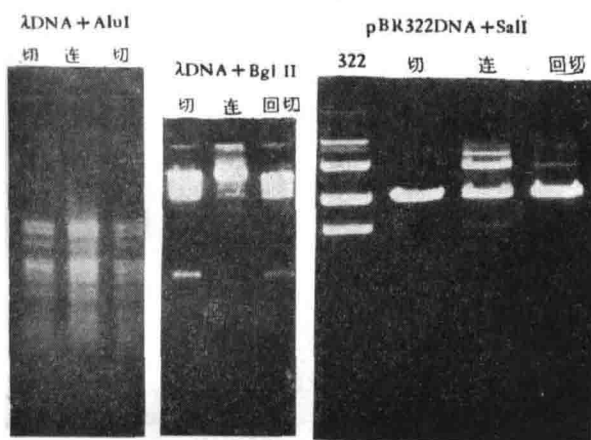


图 3 Sal I 经氨基戊烷琼脂糖层析后测活电泳图谱



连接,回切实验:

图 6