

子传递途径还缺少有事实根据的证明,只能推测应是多条的。正如文中所述,这个推测在国际上现已被一些工作所证实。这样,我们的“代谢多条路线”的论点,在呼吸作用的各部分中都是成立的。但这只是一个方面,另一方面,也是主要的方面,代谢对其它生理功能的调节作用,目前的认识还远远不足,今后应大力开展这方面的工作。

今后,我们将结合着目前国内外大量开展的花药培养、细胞溶合、体细胞杂交和受精作用,研究植物(细胞)分化过程中代谢过程的变化和调节,并试图测定这个过程熵值(向负值)变化。这些都是生物学中的重大基本理论问题。我们相信,在华主席、党中央的领导下,这方面的研究工作定会取得更大的成绩。

参 考 文 献

[1] 汤佩松:《生物科学动态》,1965年,第3期,第1—

13页。

- [2] 戴云玲等:《植物学报》,1963年,第11期,第359—369页。
- [3] Tang, P. S. et al.: *Scientia Sinica*, 14, 1617—1623, 1965.
- [4] Bendall, D. S. and Bonner, W. D.: *Plant Physiol.*, 47, 236—245, 1971.
- [5] Commaek, R. and Palmer, J. M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 222, 816—823, 1973. (Cited in (8)).
- [6] Palmer, J. M., and Coleman, C. D.: in *Horizons in Biochemistry and Biophysics*, 1, pp. 220—260, 1974. Quagliariello, ed., Addison-Wesley, Mass. U.S.A.
- [7] Brunton, C. and Palmer, J. M.: *Eur. J. Biochem.*, 39, 283—291, 1973.
- [8] Ellis, J. R. S. et al.: *Nature*, 241, 45—47, 1973.
- [9] McDaniel, R. C., *Seed Sci. and Technol.*, 1, 25—50, 1973.
- [10] 朱激、汤佩松:《植物学报》,1959年,第8期,第201—214页。
- [11] 沈久钢:《光合作用研究进展》,1976年,第105—126页,科学出版社。
- [12] 集体作者:《植物学报》1976年,第18期,第293—299页。

[本文于1977年8月20日收到]

限制内切酶及其应用

陈建文 静国忠

(中国科学院生物物理研究所)

当一种噬菌体从其特定的宿主进入新的宿主时,其生长被损害,如果在第二个宿主中幸存下来的噬菌体再用于感染此种细菌,它们将正常繁殖,这种现象叫做宿主控制的限制和修饰作用。后来人们发现细菌体内的限制修饰系统有二种酶,一种就称为限制内切酶,它能识别外源DNA并将其降解;另一种称为修饰酶,将其自身的DNA修饰以避免限制内切酶的降解。假如外来的DNA(如噬菌体DNA)偶然也被修饰,那么就不再为限制内切酶所识别而存活下来。因此,在一定意义上,细菌的这种限制修饰系统起着安内御外的作用。

自六十年代末期,人们提出第一个限制内切酶之后,越来越多的限制内切酶被发现和纯

化,特别是特异性非常强的II类酶的发现,大大地促进了对于DNA这一重要生物高分子的结构和功能的研究,用限制内切酶所进行的基因工程的精巧操作已为人们所熟知,限制内切酶作为一个核酸研究的工具酶正在发挥越来越大的作用。

本文将着重介绍限制内切酶(主要是II类酶)的分离纯化及应用。

一、限制内切酶的命名及分布

限制内切酶的命名一般是以微生物属名的第一个字母和种名的前两个字母组成,第四个字母表示菌株(品系)。例如从 *Bacillus amyloliquefaciens* H中提取的限制内切酶称为BamH,从

Bacillus subtilis N Rr13 中提取的限制内切酶称为 BsuN, 在同一品系细菌中的几种不同酶可以编成不同的号, 如: Hind II、Hind III、Hpa I、Hpa II、Mbo I、Mbo II 等等。

限制内切酶的分布极广, 几乎在所有细菌的属、种中都发现至少一种限制内切酶, 多者在一属中就有几十种, 例如在嗜血杆菌属中 (*Haemophilus*) 现已发现的就有 22 种。在同一个品系中, 也常常有识别不同碱基顺序的两种酶, 如在 Bam N^[1] 中就有两种不同活性的限制内切酶, 分别称为 Bam N I 和 Bam N X。Sharp^[2] 等人也从 *H. parainfluenzae* 中提取了两种不同特异性的限制内切酶 Hpa I 及 Hpa II。至今所发现的限制内切酶的数目已达九十种以上, 有的菌株含酶量极低, 很难分离定性; 然而在有的菌株中, 酶含量极高, 如 *E. Coli* 的 p MB4 (EcoR I 酶) 和 *H. aegyptius* (Hae III 酶) 就是高产酶菌株。据报道从 10 克的 *H. aegyptius* 的细胞中, 能分离提纯出可消化 10 克 λ 噬菌体 DNA 的酶量。

在高等有机体中是否存在限制内切酶, 也有一些报道, 但至今尚未证明它们是特异性很强的 II 类酶。可以这样说, 到目前为止细菌是限制内切酶, 尤其是 II 类限制内切酶的主要来源。

二、限制内切酶的分类和性质

根据酶的功能特性、大小及反应时所需的辅助因子, 限制内切酶可分为两大类, 即 I 类酶和 II 类酶。最早从大肠杆菌中发现的 EcoK、EcoB 就属于 I 类酶, 其分子量较大, 反应过程中除需 Mg^{2+} 离子外, 还需要 S-腺苷酰-L-甲硫氨酸、ATP。在 DNA 分子上没有特异性的切割位点, 因此不产生特异性的酶解片断, 这是 I、II 类酶之间最明显的差异, 也正因为如此, I 类酶作为 DNA 的分析工具价值不大。所以在下面的讨论中我们仅对 II 类酶进行较详细的论述。II 类酶, 如大家所熟悉的 EcoR I、BamH I、Hind II、III 等等, 其分子量小于 10^5 道尔顿, 反应只需 Mg^{2+} 离子。最重要的是在所识别的特定碱基

顺序上有特异性的切点, 因而 DNA 分子经过 II 类酶作用后可产生特异性的酶解片断, 这些片断可用凝胶电泳法进行分离、鉴别。相当一部分酶(如 EcoR I、BamH I、Hind 等)的切口作用点有 180 度旋转对称性, 因而可形成粘合末端 (Cohensive end), 但也有一些 II 类酶如 Alu I、BsuR I、BalI、Hae III、Hpa I、Sma I 等切割 DNA 分子并不产生粘合末端, 而只形成平端。

现已发现的九十多种限制内切酶中, 近 50 种酶的识别顺序已被测定^[3] (见表 1)。同时发现, 有很多来源不同的酶, 有相同的碱基识别顺序, 这种酶称为“异源同功酶”(isoschizomers)。现在已经发现的“异源同功酶”有以下几种(见表 2)应该注意的是, 这些异源同功酶, 虽然有相同的识别顺序, 但它们的切点并不完全一样。例如 Xma I 和 Sma I, 虽然都识别六核苷酸 CCCGGG,

但 Xma I 的切点在 CCCGGG, 而 Sma I 的切点在 CCCGGG 前者切割 DNA 分子, 形成带有 CCGG 粘合末端的 DNA 片段, 而后者并不形成粘合末端。当然, 也有识别顺序和切点都相同的酶, 如 Hap II、Hpa II、Mno I, 都在识别顺序 CCGG 内有一相同的切点, Hae III 和 BsuR I 同样在识别顺序 GGCC 内有一相同的切点。

现在发现, 有些限制内切酶对单链 DNA 分子也能够作用。然而, 切割单链的速度远比切割双链 DNA 的速度来得慢, 这有两种解释: 一种认为, 由于单链 DNA 盘绕的二级结构形成了有限制内切酶识别的双链区; 另一种认为, 限制内切酶可能直接识别单链位点。

因为人们对于限制内切酶的兴趣在于把它作为核酸分析的工具, 所以对其碱基识别顺序及特异性的切割位点很注意研究, 而对催化反应的动力学参数及机制, 以及作为一个蛋白质的分子量及亚基组成等等至今了解甚少, 有待进一步的工作。

限制内切酶酶解 DNA 分子时, 能形成三种形式的末端:

1. 形成平端 (Flush end)

如 Alu I、BsuR I、Sma I 等。

表1 已知识别顺序的限制内切酶¹⁾

微生物	酶	识别顺序 ¹⁾	切点数目		
			λ	Ad2	SV40
<i>Anabaena variabilis</i>	AvaI	CGA ↓ CCG ³⁾	8	?	?
<i>Arthrobacter luteus</i>	AluI	AG CT	>50	>50	32
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	BamI	G ↓ GATCC	5	3	1
<i>Bacillus globigii</i>	Bgl II	A ↓ GATCT	5	10	0
<i>Bacillus stearothermophilus</i> 1503-4R	Bst I	GGATCC	5	3	1
<i>Bacillus subtilis</i> strain N	BsuN I	GGATCC	5	3	1
<i>Bacillus subtilis</i> strain R	BsuR I	GG CC	>50	>50	18
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Bbr I	AAGCTT	6	11	6
<i>Brevibacterium albidum</i>	Bal I	TGG ↓ CCA	15	17	0
<i>Brevibacterium luteum</i>	Blu II	GGCC	50	50	18
<i>Corynebacterium humiferum</i>	Chu I	AAGCTT	6	11	6
	Chu II	GTPyPuAC	34	20	7
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	Dpn I	GATC	?	?	?
	Dpn II	GATC	>50	>50	6
<i>Escherichia coli</i> RY 13	Eco RI'	G ↓ AATTC	5	5	1
	Eco RI'	PuPuA ↓ TPyPy	>10	>10	?
<i>Escherichia coli</i> R245	Eco RII	CC(A)GG	>35	>35	16
<i>Escherichia coli</i> (PL) ²⁾	Eco PI	AGATCT	?	?	?
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae I	(A)GGCC(T) ↓ (A)	?	?	?
	Hae II	PuGCGC ↓ Py	>30	>30	1
	Hae III	GG CC	>50	>50	18
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	Hap II	C ↓ CGG	>50	>50	1
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	Hhg I	GGCC	>50	>50	18
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Hha I	GCG ↓ C	>50	>50	2
<i>Haemophilus influenzae</i> serotype b, 1076	Hinb III	AAGCTT	6	11	6
<i>Haemophilus influenzae</i> Rb	Hinb III	AAGCTT	6	11	6
<i>Haemophilus influenzae</i> serotype c, 1160	Hinc II	GTPyPuAC	34	20	7
<i>Haemophilus influenzae</i> serotype c, 1161	Hinc II	GTPyPuAC	34	20	7
<i>Haemophilus influenzae</i> Rc	Hinc II	GTPyPuAC	34	20	7
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd (exo-mutant)	Hind II	GTPyPuAC	34	20	7
	Hind III	A ↓ AGCTT	6	11	6
<i>Haemophilus influenzae</i> Rf	Hinf I	G ↓ ANTC	>50	>50	10
<i>Haemophilus influenzae</i> H-I	HinH I	PuGCGCPy	30	30	1
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	Hph I	GGTGA → 8 bp	>50	>50	4
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	GTT ↓ AAC	11	6	4

(续表 1)

微生物	酶	识别顺序 ¹⁾	切点数目		
			λ	Ad2	SV40
<i>Haemophilus suis</i>	Hpa II	$\downarrow$ C CGG	>50	>50	1
	Hsu I	AGCTT	6	11	6
<i>Moraxella bovis</i>	Mbo I	$\downarrow$ GATC	>50	>50	6
	Mbo II	GAAGA $\rightarrow$ 8bp	>50	>50	6
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	Mno I	$\downarrow$ C CGG	>50	>50	1
<i>Moraxella osloensis</i>	Mos I	GATC	>50	>50	6
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Ngo I	PuGCGCPy	>30	>30	1
<i>Providencia alcalifaciens</i>	Pal I	GGCC	>50	>50	18
<i>Providencia stuartii</i> 164	Pst I	CTGCA $\downarrow$ G ⁴⁾	18	25	2
<i>Serratia marcescens</i> Sb	Sma I	$\downarrow$ CCC GGG	3	12	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	Sfa I	GGCC	>50	>50	18
<i>Thermus aquaticus</i> YTI	Taq I	$\downarrow$ T CGA	>50	>50	1
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	Xma I	$\downarrow$ C CCGGG	3	12	0

1) 识别顺序以 5' $\rightarrow$ 3' 表示, 只写出一条链, 已知的切割位点用箭头表示, 例如 $G \downarrow GATCC$ 是 $\begin{matrix} \downarrow \\ 5'GGATCC3' \\ 3'CCTAGG5' \end{matrix}$ 的缩写, 而 GC

(A/T)GC 是 $\begin{matrix} \downarrow \\ 5'GCAGC3' \\ 3'CGTCG5' \end{matrix}$ 的缩写。在某些情况下, 识别顺序是通过比较消化图谱 (digestion pattern) 推导出来的, 例如 Bst I 和 BamH I 在所用以作底物的 DNA 上, 给出相同的图谱, 用此二酶进行双消化也没发现进一步的切割, 在这些情况下, 没有测定在识别顺序内的精确切割位点, 因此也没用箭头标出。对于 Hph I 和 Mbo II, 切割位点距识别顺序 3'-核苷酸 8—9 个碱基对。

2) EcoP I 酶, 按分类属 I 类酶, 但其反应必需 Mg^{2+} 、ATP, 而不必需 S-腺苷酰-L-甲硫氨酸(S-AM), 然而 S-AM 的存在确能加速其切割速率。同 EcoB、EcoK (I 类酶) 不同, EcoP I 不水解 ATP。

3) 为方便起见, 只给出识别顺序的一条链, 全双链结构应为 $\begin{matrix} \downarrow \\ 5'CGG TCG3' \\ 3'GCCA GC5' \end{matrix}$ 。

4) Pst I 在单一位点切割 $\phi \times 174$, CTGCA $\downarrow$ G; 然而它可能也识别其他的顺序。

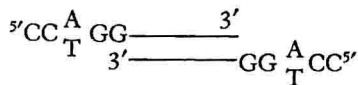
5) 此表节选自 CRC. Crit. Rev. Biochem., 4 (2), 123, 1976。

表 2 异源同功酶

识别顺序	异源同功酶
AAGCTT	Bbr I, Chu I, Hinc III, Hind III, Hsu I
GTPyPuAC	Chu II, Hinc II, Hind II
GGCC	Blu II, BsuR I, Hae III, Hhg I, Pal I, Sfa I
CCGG	Hap II, Hpa II, Mno I
GATC	Dpn I, Dpn II, Mbo I, Mos I
PuGCGCPy	Hae II, Hinc HI, Ngo I
GTTAAC	Apo I, Hpa I
GGATCC	Bam I, Bst I, BsuN I
CCCGGG	Sma I, Xma I

2. 形成 5'-粘合末端

如 EcoR II 形成 5'-五核苷酸粘合末端



EcoR I 形成 5'-四核苷酸粘合末端



Hpa II 形成 5'-二核苷酸粘合末端

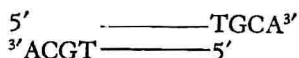


3. 形成 3'-粘合末端

如 Hha I 形成3'-二核苷酸粘合末端



Pst I 形成 3'-四核苷酸粘合末端



比较限制内切酶的识别顺序和切割位点,同样可以发现,虽然有些酶的识别顺序不一样,但 DNA 分子被它们切割后会产生相同粘合末端(见表 3)。

表 3 识别顺序不同而产生相同粘合末端

酶	识别顺序	粘合末端
BamH I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{GGATCC} \\ \text{CCTAGG} \\ \uparrow \end{array}$	GATC
Bgl II	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{AGATCT} \\ \text{TCTAGA} \\ \uparrow \end{array}$	GATC
Mbo I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{GATC} \\ \text{CTAG} \\ \uparrow \end{array}$	GATC
Taq I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{TCGA} \\ \text{AGCT} \\ \uparrow \end{array}$	CG
Hpa II	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{CCGG} \\ \text{GGCC} \\ \uparrow \end{array}$	CG

因此,这类酶(BamH I, Bgl II, Mbo I 或 Taq I Hpa II) 的 DNA 酶解片段都可以在体外互重组成异源二聚体(heterodimers),这在遗传工

程上非常有用。

三、限制内切酶的提纯

提取限制内切酶的主要目的是用于作为研究核酸的工具,而不在于对它本身的固有特性进行详细的研究,因此,除 *EcoR* I 以外,几乎没有制成纯品。提纯的关键是使酶制剂中不含其他非特异性核酸酶。

酶的纯化方法自1970年 Smith^[4]从 *H. influenzae* 提纯第一个 II 类酶以来,几乎没有多大的变化。下面就我们收集到的十余种常用酶的纯化方法,按照步骤作一概括:

1. 菌体培养

基本上按照各菌所要求的肉汤培养基进行培养,有些菌需要特殊的生长因子,如嗜血杆菌属,在培养基中需补加含 X、V 因子的成份(血红素、辅酶等)。一般都在 37℃ 培养至对数后期离心收集。

2. 菌体的破碎

百分之九十以上的细菌都是用超声破碎,破碎比较完全,释放酶量高。在冰盐浴中进行间歇超声处理,使菌液温度不超过 10—12℃。初次超声处理,要用显微镜检查效果。此外,也可用研磨破碎法,例如我们在制备 Bam H I 酶时曾用三倍于细菌湿重的玻璃粉(250 目)同菌体混合,用细菌磨破碎,也可达到良好效果。也有用细菌压法^[2]和渗透压法^[5]破碎菌体,但一般很少应用。

3. 除去核酸

菌体破碎后,经高速离心所得之上清液,首先要除去核酸,通常用三种方法:第一种方法是用 Bio-gel A 0.5M (200—400 目)柱去核酸, BamHI、Hind、Alu、Hha、Hap 都报道用此方法。一般是使酶液呈 1M NaCl 浓度过 Bio-gel A 柱去核酸,收集下柱液酶活性部分。此法的优点是效率较高,故去核酸比较干净;第二种方法是用硫酸链霉素沉淀核酸, EcoRI、Sau、BamN 等曾用此法,一般用量为每一个 1500A₂₆₀ 毫微米单位加 1 毫升 10% 的硫酸链霉素。我们在提取 EcoR I 和 Bam H 时都用此法,也得到较好的效

果；第三种方法是用聚乙烯亚胺 (PEI) 沉淀核酸^[6],其方法是 将 PEI 加入到酶液中,使其浓度为 1%。在低盐浓度下,酶蛋白与 PEI-DNA 的复合物一起沉淀下来,收集沉淀,然后用含有适当高盐浓度的缓冲液把酶蛋白抽提出来;如果在适当的高盐浓度缓冲液中,用 PEI 去沉淀核酸,酶蛋白并不同 PEI-DNA 复合物一起沉淀而保留在上清液中,这样酶蛋白可直接从上清液中回收。这两种不同的方法都有人使用过^{[6][7]}。

4. 用硫酸铵分部沉淀法收集粗酶

在除去核酸以后,一般用硫酸铵沉淀粗酶,在提取一新酶的时候,可用 70% 硫酸铵饱和度和把酶蛋白沉淀下来。但在有文献可查的情况下,可以参照文献提供的饱和度进行沉淀收集,然后用适量的缓冲液溶解。下面给出一些酶的硫酸铵饱和度(见表 4)。但也有的酶如 *San*、*Alu*、*Pst* 等,在除去核酸以后,就直接上磷酸纤维素 P_{11} 柱或 DEAE-纤维素柱,这种情况估计是杂蛋白含量较低。

表 4 某些酶的硫酸铵饱和度

限制内切酶	硫酸铵饱和度(%)
EcoR I	50
BamH I	50—80
Hind	50—70
Hae	70
BamN	40—60

5. 酶通过柱层析纯化

用硫酸铵沉淀所得到的粗酶溶液,一般是通过 P_{11} 柱或(和)DEAE-纤维素柱进一步纯化。装层析柱的树脂用酸碱处理好以后,一定要用缓冲液充分平衡。在上柱前,硫酸铵沉淀所得的粗酶溶液对上柱缓冲液透析。上柱后,吸附在柱上的蛋白质一般用 NaCl 或 KCl 的浓度梯度进行洗脱,收集酶活性部分。酶从柱上洗脱下来的盐浓度梯度如表 5。

最近 Bickle 等人应用肝素-琼脂糖 (heparin-agarose) 亲和层析的方法,从十一种不同的细菌品系中纯化出 16 种酶。heparin-agarose 柱层析

表 5 各种酶洗脱下来的盐浓度

限制内切酶	P_{11} 柱	DEAE 柱	缓冲液 pH
EcoR I	0.56—0.6MNa ⁺	0.1MNa ⁺	7.0
BamH I	0.31—0.36MNa ⁺	0.05—0.15MNa ⁺	7.4
HindII + III*	0.2—0.3MK ⁺	—	7.4
Sau 3A I	—	0.2—0.33MK ⁺	7.4
Alu I	0.6—0.75MK ⁺	0.21—0.26MK ⁺	7.4
Hae II	0.4—0.55MNa ⁺	0.13—0.18MNa ⁺	7.4
Hae III	0.65—0.95MNa ⁺	—	7.4
Hha I	0.8—1.0MK ⁺	0.45—0.50MK ⁺	7.4
HinH-I	0.3MK ⁺	0.12MK ⁺	7.5
Hpa I	0.3—0.35MK ⁺	—	7.4
Hpa II	0.45MK ⁺	—	7.4
Pst I	0.34—0.41MNa ⁺	0.14—0.28MNa ⁺	7.8
BamN I	—	0.05—0.1MNa ⁺	7.5
BamNX	—	0.12—0.25MNa ⁺	7.5

* 用 10mM Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液, Hind II, III 在 DEAE 纤维素柱上分离开来, Hind III 通过柱, 而 Hind II 吸附在柱上, 在 0.08—0.1M NaCl 浓度梯度洗脱下来

的优点是: heparin-Agarose 稳定性强、装柱容易、流速好、而且蛋白容量大,这样柱可装得很小(20—30 毫升床体积/100 克湿菌),使得回收的酶很集中,实际达到浓缩的目的。它的另一优点是非特异性的核酸酶并不吸附到柱上或在低盐浓度下就洗脱掉,这样获得的酶较纯,往往经此一步即可使用,从而简化了纯化过程。

6. 纯化酶的浓缩

这是酶纯化后的最后一步,一般有三种方法: 第一,用羟基磷灰石柱层析法,在低盐浓度下使酶蛋白完全吸附在柱上,然后用高盐浓度把它洗脱下来。在提取 EcoR I 时,我们用 10 毫升床体积的小柱浓缩,洗脱峰很窄,浓缩的效果较好;第二,用硫酸铵沉淀,这是古老的盐析法,广泛应用于提纯各种蛋白质的中间过程,但在酶通过柱层析以后,很少用此法浓缩,Smith^[4]曾用此法浓缩了 Hind 酶;第三,透析浓缩法,此方法目前应用较普遍。方法十分简单,将纯化后的酶溶液对含 50% 甘油的洗脱缓冲液透析,即可达浓缩之目的,一般可将酶浓缩 4 倍。另一个好处是,在 50% 甘油中的酶溶液可以在-20℃ 下长期保存而不失活。缺点是没有羟基磷灰石柱浓缩效率高,在透析过程中要注意防止酶失活。

四、酶活性的检测

顾名思义,限制内切酶与一般核酸酶不同,由于它在 DNA 分子上有特定的识别顺序会把 DNA 分子切割成大小不同的特定片断,因此在检测限制内切酶时,有其独特的方法。在此,我们对这些方法进行简单的介绍。

1. 粘度法

这是最早引入的一种方法,它先被 Smith^[4]应用在纯化第一个 II 类酶 Hind 的测活上。粘度的测定是在 30℃ 的水浴中,用 Ostwald 粘度计完成的。并将一分钟内使 DNA 溶液比粘度下降 25% 的酶量,定为一个活力单位。我们在提取 EcoR I 时,就借用此法跟踪酶的活性部分,并在纯化后用粘度单位表示酶的活力。但这方法因为不是测定限制内切酶的专一方法,其它酶对粘度的干扰很大,所以最好同其他方法配合,找出规律后即可直接使用。此法的另一个缺点是灵敏度取决于限制内切酶在底物上切点的多寡。如果所用的底物对一酶而言切点甚少,灵敏度就一定很低。

2. 凝胶电泳法

Agarose 或聚丙烯酰胺凝胶电泳法被广泛用于分离 DNA 的片断,作为酶纯化过程中的活性鉴定和跟踪,多数是用 Agarose 板或柱。凝胶电泳酶活性单位: 37℃, 1 小时水解 1 微克 λ DNA 的酶量定为一个活力单位。由于 DNA 分子量较大,依底物 DNA 分子的大小,Agarose 浓度一般用 0.7—1.5%。电泳后,凝胶在每毫升 0.5—1 微克的溴化乙锭 (EB) 溶液中染色,在紫外灯下显示 DNA 片断的荧光带。在 254 毫微米的波长下,其灵敏度可达 5 毫微克。DNA 的荧光带可以照像,便利保存实验结果。凝胶法的最大优点是可以定性地鉴定限制内切酶。如 1972 年 Gromkova 等人曾报道他们提取了 Hpa 限制内切酶,它切割 SV40 DNA 成四个片断,而 1973 年 Sharp 用 Agarose 凝胶电泳法检测 Hpa 酶,发现 Hpa 酶是由两个不同特异性的酶组成,命名为 Hpa I、Hpa II。Hpa I 对 SV 40 有三个切点,而 Hpa II 在 SV 40 上有一个切

点。此外, Hae II 和 Hae III 也是在同一电泳图上检测出。

3. 硝化纤维素滤纸法

1976 年 Reiser^[8]报道了一个检测限制内切酶的新方法,称为硝化纤维素滤纸法(Nitrocellulose filters)。其原理是,在一定条件下,环状的 λ 噬菌体 DNA 比线状 DNA 优先吸附在硝化纤维素滤纸上。首先把 ^{32}P 标记或 ^3H 标记的带有粘末端的 λ DNA 变成氢键环,称为 Hershey 环,把它作为限制内切酶的底物,终止反应后,对硝化纤维素滤纸过滤,完整的 Hershey 环保留在滤纸上,而被酶作用后成线状的 λ DNA 片段通过滤纸,测定滤液的放射性,即可得到酶活性的定量数据。此法的优点是快速,灵敏度高,同样可适用于对粗酶进行定量跟踪,但目前应用此法者尚少。

五、限制内切酶的应用

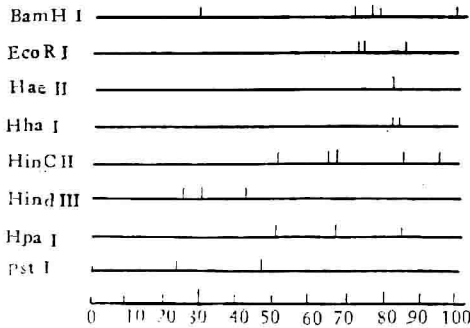
如上所述,限制内切酶最重要的特性就是能识别 DNA 分子上的特定碱基顺序,并在特定的位点进行切割。因此,限制内切酶的应用同这一特性密切相关。众所周知, DNA 作为生物信息大分子其分子量是非常之大,比如一个中等大小的 λ 噬菌体 DNA 的分子量为 $30.8 \pm 1.0 \times 10^6$ 道尔顿左右,一个细菌(如大肠杆菌)染色体 DNA 的分子量为 2×10^9 道尔顿,而人的 DNA 分子量可达 10^{12} 道尔顿之大。这样大的信息大分子,我们要想对其结构功能进行研究是很困难的,有时甚至是不可想像的。然而由于限制内切酶的发现和纯化,给我们分析 DNA 分子的结构与功能带来了革命性的变化,它带动了 DNA 大分子物理图谱的组建、基因的定位、DNA 分子或其特异片段的顺序分析以及基因的分离和体外重组等一系列工作的开展,现就其主要方面作一梗概介绍。

1. DNA 基因组物理图谱的组建

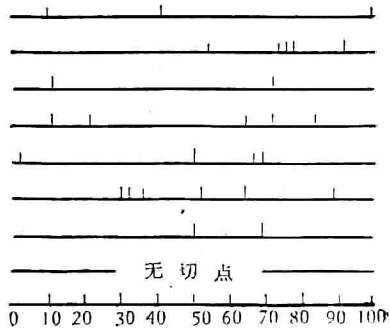
所谓基因组的物理图谱,就是利用一个或几个限制内切酶对特定 DNA 分子进行切割,对所产生的酶解片段按其物理位置在 DNA 分子上定位。DNA 分子的物理图谱是进行 DNA

分子基因组的遗传定位、顺序分析以及结构与功能研究的基础。要制作一个特定 DNA 分子的物理图谱,首先要确定其酶切片段的数目、大小,在 DNA 分子上找一个参考点,以其为起点计算出各酶切片段的百分比长度。对于一个线性 DNA 分子而言,其本身的端点即可作为参考点,而对于环状 DNA 而言(如 SV40),首先要找一个限制内切酶(如 EcoRI)在这 DNA 分子上只有一个切点,使成为线性。得到线性分子后,再通过末端标记法确定 DNA 分子的末

端片段。而对于分子内部各片段的顺序可利用部分消化法、双酶或多酶消化法推导出来。开始组建物理图谱,最好选择一特异性的限制内切酶,对给定的 DNA 基因组具有相对少的切点,这样更容易作出此酶的物理图谱,以此为基础就可以组建多酶的更详细的物理图谱。例如 Parker^[9]等分别用 BamH I、EcoR I、Hae II、Hha I、Hinc II、Hind III、Hpa I、Pst I 组建了小鼠和大鼠线粒体 DNA 的物理图谱。



小鼠线粒体 DNA 物理图谱



大鼠线粒体 DNA 物理图谱

目前收集到的物理图谱还有 ϕX 174, G4Rf, S13RF, f_1 , f_d , M_{13} , ZJ/2, T_5 , λ 噬菌体, λ_{dv} 质体, P_4 , ϕ_{15} , ϕ_{29} , ColE₂, ColE₃, 腺病毒-2, 腺病毒-5, Adeno-associated 病毒, 人乳头瘤病毒, SV 40, Bk 病毒、多瘤病毒、酵母线粒体 DNA, 人线粒体 DNA, 猕猴线粒体 DNA 等等, 这其中有单一限制内切酶图谱, 也有多酶图谱。

2. 基因的定位和基因分离

利用限制内切酶进行基因定位的工作,主要是将分离得到的特异性 RNA,同 DNA 分子的酶解片段进行杂交,在物理图谱的基础上就可以作出详细的基因图谱,完成 DNA 分子的基因定位。例如以 EcoRI 在环状 SV40 DNA 分子上的切点为参考点,分别组建了 Hin(其实是 Hind II + III)和 Hpa(其实是 Hpa I + II)的限制内切酶的物理图谱;然后利用 cRNA 同 DNA 分子的酶解片

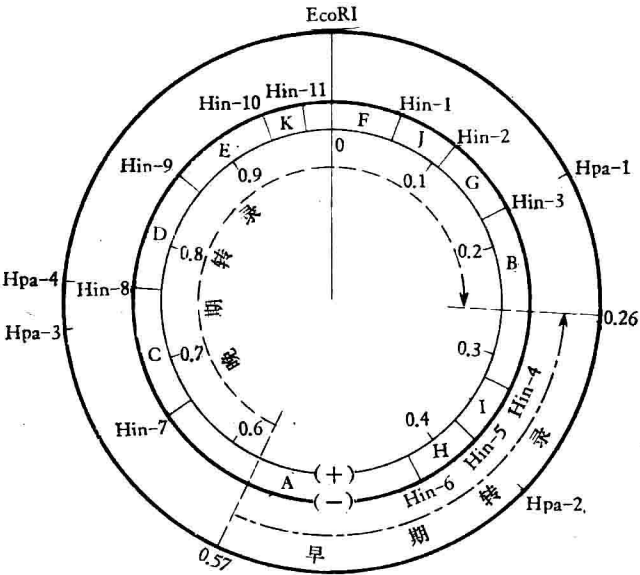


图 1 SV40 的物理图谱及基因定位(转录)图谱

其中 EcoRI 为其参考点, Hin 酶解片段按 F. J. G. 标出,早期转录从 (-) 链,按反时针方向进行;晚期转录从 (+) 链,按顺时针方向进行

段杂交,确定了早期转录和晚期转录区在 SV40 病毒 DNA 分子上的基因定位,并进一步证明,

在 DNA 合成之前的转录即早期转录是从 DNA (一)链以反时针方向进行;而晚期转录主要是在 DNA 分子的(+)链以顺时针方向进行(见图 1)。又例如,从海胆 DNA 的 EcoRI 的消化物中,首先分离出两个片段,这二个片段的总长度正好近似一个基因的重复单位(6.5—7.0kb)。然后再用 HindIII、Sal I、BamHI 和 Hha I 四种酶分别把这一基因重复单位切成若干片段,每个片段与组蛋白 mRNA 进行杂交,从而确定了五个组蛋白基因在这片段中的顺序,这是利用限制内切酶进行基因定位的又一个典型例子。

利用限制内切酶分离特定基因的例子很多,如用 EcoRI 切割酵母染色体 DNA,分离得到咪唑甘油磷酸脱水酶 (IGP) 基因,从果蝇染色体 DNA 通过 EcoRI 作用,分离得到 18S、28S rDNA,通过遗传工程的手段将其转入大肠杆菌并得以表现。至于应用限制内切酶从原核细胞中分离基因的例子就更多了,比较有用的如从大肠杆菌中分离出 DNA 连接酶基因, DNA 多聚酶 I 的基因。

3. DNA 分子碱基序列分析

近十几年来,核酸一级结构的测定工作主要集中在 RNA。原因有二:一是 RNA 分子量小,如 tRNA 都在 100 个核苷酸之内,已测定的 mRNA 分子也不过只有 500 个核苷酸左右;二是 RNA 有其自己的碱基特异性核酸酶,如 T_1 RNase 和牛胰 RNase,可把 RNA 分子水解到两个到几十个核苷酸大小的范围用于序列分析。然而 DNA 分子量极大,一个小的病毒 SV40 就有 5,000 个碱基对,而一个中等大小的噬菌体(如 λ) DNA 可达 50000 个碱基对,可是目前 DNA 分子碱基序列分析技术只能确定 50—100 或稍长一点的碱基顺序,由此可见,如果没有限制内切酶,对于 DNA 分子的碱基序列分析几乎不可能。通过选择不同的限制内切酶进行多酶水解,原则上,你所用的酶越多,得到的酶解片段就越小,所组建的物理图谱就越精细,最后可望得到几十到几百个核苷酸长度的酶解片段,通过对各片段进行序列分析,就可得到整个 DNA 分子的碱基排列顺序。现在人们已将 ϕX

174 的全部碱基顺序搞清,共计由 5,375 个核苷酸组成,为九种蛋白质编码。此外大量的工作正集中在乳糖操纵子,色氨酸操纵子以及很多特定的启动子和结构基因范围内的碱基序列分析,以便进一步有目的地进行 DNA 的结构与功能的研究。

4. 比较相关的 DNA 分子

利用限制内切酶识别位点的特异性,可以对相关 DNA 分子结构的变化和物种演化以及亲缘关系进行判断。例如,由于在一 λ 噬菌体 DNA 启动子 (Promoter) 处的一个 Hind II 切点的丢失,就发现这是由于其识别位点上一个碱基突变所引起的。限制内切酶识别位点的特异性使得它能检测出 DNA 分子上一个碱基的变化,这是电镜和分子杂交技术所不能比拟的。有趣的是通过比较酶切电泳图谱证明了线粒体是母系遗传^[10]:

马(♀) × 驴(♂) → 马骡

驴(♀) × 马(♂) → 驴骡

从亲本及杂种中提取线粒体 DNA,然后分别用 Hae 限制内切酶消化,用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,就可以从电泳图谱上发现马与马骡一致,驴与驴骡一致,一目了然地证明了线粒体是母系遗传。

5. 遗传工程

遗传工程也即基因工程,是在分子水平上,在体外用人工的方法进行遗传物质的重组,得到具生物活性的杂种 DNA 分子,然后通过转化或转染使其在有机体或细胞中得以表达。

限制内切酶是遗传工程学中一个强有力的工具,是 DNA 链条上的一把特异性解剖刀,相当多的酶产生具有粘合末端的 DNA 片段,在 DNA 连接酶的作用下很容易将带有粘合末端的二个异源 DNA 片段共价连接,为体外重组 DNA 杂种分子提供非常方便的手段。再一次值得指出的是,有些限制内切酶虽有不同的识别顺序,但在 DNA 分子上产生相同的粘合末端,如 BamHI、Bgl II、Mbo I,它们有相同的粘合末端—5'GATC3',假如一个 DNA 分子只能被 BamHI 切割,而另一个 DNA 分子只能被

Bgl II 切割,由于这两个 DNA 分子具有相同的粘合末端,用连接酶很容易在体外重组。

此外,利用限制内切酶在体外重组的 DNA 杂种分子(真核或原核),可以通过遗传工程的手段在体内进行基因扩增,为 DNA 分子的结构功能研究提供取之不尽的原材料。

总之,限制内切酶作为一个核酸研究的工具,以组建 DNA 分子物理图谱为基础,在基因定位、顺序分析以及遗传工程各方面越来越显示出它的巨大作用。我们相信,随着对限制内切酶研究的深入和不断发现更多的新酶,一定会对核酸结构与功能的研究产生深远的影响。

参 考 文 献

[1] Takehiko Shibata et al.: *Biochem. Biophys.*

Acta. 42, 184, 1976.

- [2] Sharp, P. A. et al.: *Biochemistry* 12, 3055, 1973.
- [3] Roberts, R. J. *CEC Crit. Rev. Biochem.* 4, 123, 1976.
- [4] Smith, H. O. et al.: *J. Mol. Biol.* 51, 379, 1970.
- [5] Smith, D. I. et al.: *Nucleic Acid Res.* 3, 343, 1976.
- [6] Biekle, T. A. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 4, 2561, 1977.
- [7] Alistair, H. A. Bingham. et al.: *FEBS Letter* 76, 250, 1977.
- [8] Reiser, J. et al.: *Anal. Biochem.* 75, 555, 1976.
- [9] Parker, R. C. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 4, 1291, 1977.
- [10] Hutchison, C. A. et al.: *Nature* 251, 536, 1974.

[本文于 1977 年 12 月 13 日收到]

λ 噬菌体及其在遗传工程中的应用(一)

劳 为 德

(中国科学院生物物理研究所三室)

一、概 论

病毒是一类最简单的生物,它由核酸及包在其周围的蛋白质外壳组成。能够感染细菌的病毒称为噬菌体。

噬菌体吸附到细菌细胞壁的受体位点上,并将其核酸注入细胞,这就开始了“感染”。然后病毒基因以一定的时间顺序进行表达,复制自己的 DNA,合成其本身的各种成份,装配成新的噬菌体,并将宿主细胞摧毁,释放出上百个

新的噬菌体颗粒。这一过程源于一个噬菌体基因组,而以菌体裂解和新噬菌体的释放而告终,构成了经典意义的噬菌体生活周期。这就是通常所说的裂解周期(图 1)。

除了裂解作用外,有些噬菌体还有另一种过程,称为溶原周期。这就是噬菌体 DNA 注入细胞之后,并不马上复

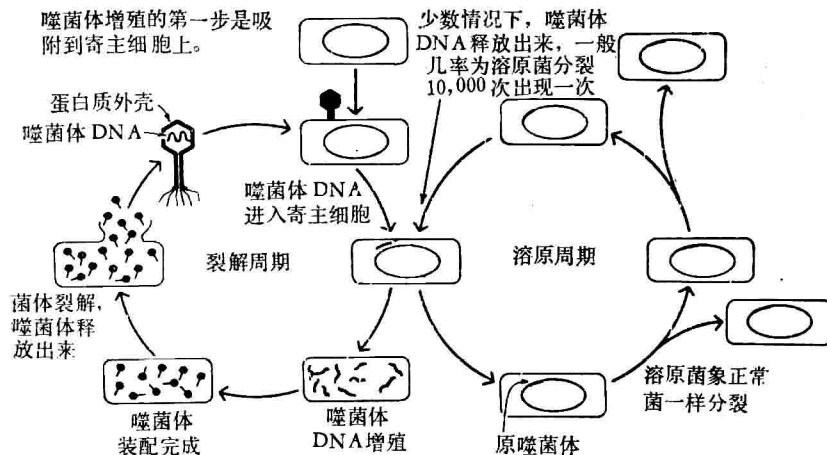


图 1 噬菌体的裂解周期和溶原周期示意图