

λ [^3H]DNA 的制备和酶制剂中污染的核酸外切酶的检测

刘佑国 刘中昌 宋桂云

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

本文介绍一种简便制备 λ [^3H]DNA 的方法。用该方法制备 λ [^3H]DNA, 每升培养物可得 10mg 以上的产物。比放射性为 $6.75 \times 10^4 \text{cpm}/\mu\text{g}\lambda\text{DNA}$, 酸不溶的放射性产物达 99% 以上。用单链和天然的 λ [^3H]DNA 作底物, 能方便地检测出酶制剂中极微量的核酸外切酶 I 与 II 和 III 的污染活性。

基因工程中改造基因载体 DNA 常常借助限制性内切酶和核酸修饰酶等工具酶, 这些酶制剂中应尽可能没有非专一性核酸内切酶和核酸外切酶的污染。本文参照 Maniatis 和 Kathleen 等人的方法^[1,2]并作一些修改, 制备了 λ [^3H]DNA, 用它作底物测定酶制剂中微量的核酸外切酶污染活性。

λ [^3H]DNA 的制备

一、试剂

1. 重蒸苯酚, 用 0.1M Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% 2-巯基乙醇饱和, 4℃ 保存备用。2. 氯仿, 为重蒸氯仿与异戊醇混合物 (V:V 为 24:1)。3. 乙醚, 用重蒸水饱和。4. [甲基- ^3H]胸腺嘧啶核苷, 27Ci/mmol, 上海原子能所产品。5. 闪烁液: 二甲苯闪烁液(二甲苯 1000 毫升, 14 克 ppo, 50 毫克 popop), 二氧六环闪烁液(1000 毫升二氧六环, 80 克萘, 4 克 ppo, 20 毫克 popop)。6. 脱氧腺苷和其它试剂均为国产品。

二、菌体培养和 ^3H -DNA 合成

1. 菌体培养 将 $\lambda\text{CI857ts Sam7}$ 菌种接种 LB 培养板上, 30℃ 保温过夜。取同一单斑菌

落接种二块 LB 培养板, 分别放 30℃ 和 42℃ 保温过夜。挑选只在 30℃ 生长而在 42℃ 不生长的单斑菌落作菌种, 分别接种二只 5000 毫升的三角烧瓶, 每瓶事先各装 500 毫升 LB 培养液, 30℃ 激烈摇晃。当细胞生长到 $O.D_{600}$ 值为 0.5—0.6 时, 迅速把培养物升温到 45℃ 保温 30 分钟进行热诱导。20 分钟后检查诱导效果。取二只试管各装 1 毫升培养物, 1 管内加入 1—2 滴氯仿, 另一管不加, 作对照。37℃ 保温 5 至 10 分钟, 间断摇晃试管, 灯光下作对比观察。加入氯仿管的培养物出现自溶, 呈半透明状态。对照管呈现混浊, 说明培养是成功的, 可以继续进行。如两管差异不明显, 说明培养不成功, 须重新培养。

2. ^3H -DNA 的合成 热诱导结束后, 立即在一瓶中加入 5mCi 的 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷 (^3H -dT, 7Ci/mmol, 10 μCi /毫升) 和 3.6 毫升脱氧腺苷(dA, 0.1mg/毫升)。另一瓶不加上述两种成份, 供以后测定之用。37℃ 激烈摇晃 3—6 小时使噬菌体大量增殖, 而寄主细胞停止生长。这时新合成的 λDNA 就把 ^3H -dT 和 dA 合成到 DNA 中, 形成 λ [^3H]DNA。4℃, 4000rpm 离心收集菌体, 同时由对照瓶取 5 毫升培养物

加 0.5 毫升氯仿, 摇晃使细胞破壁。离心留上清, 用大肠杆菌 1.1128 菌株作检验菌测 λ 噬菌体效价。一般可达 2×10^{10} 噬菌体/毫升培养物。

三、 λ 噬菌体的提取和纯化

1. 粗提液的提取 将离心所得细胞悬浮于 30 毫升 TM 液 (50mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM $MgCl_2$) 中, 加入 10% 氯仿 (V/V), 激烈摇晃使细胞壁破碎, 然后加入 DNaseI 和 RNase 各 1 毫克, 37°C 保温 2 小时降解寄主细胞核酸。10000rpm, 4°C 离心 10 分钟去掉细胞碎片, 留取上清液, 加 NaCl 使最终浓度为 1M, 随后搅拌加聚乙二醇 6000 使最终浓度为 10% (W/V)。当聚乙二醇完全溶解后, 4°C 放置 2 小时以上使噬菌体充分沉淀。11000rpm, 4°C 离心 20 分钟。弃上清, 倒扣离心管弃去残存聚乙二醇。沉淀悬浮于 20 毫升 TM 液中, 得噬菌体粗提液。

2. 简单去蛋白 用 TM 液把噬菌体粗液稀释到 $O.D_{260}$ 值为 65 左右, 加等体积氯仿抽提 30 秒钟, 离心取水相, 作进一步纯化。

3. 甘油梯度离心 用日立牌超速离心机 10.5 毫升的离心管作梯度密度离心。先于管底铺上 4 毫升含 40% 甘油的 TM 液, 其上再铺 3 毫升含 5% 甘油的 TM 液, 最上层为 3 毫升噬菌体液。110000g, 4°C 离心 60—90 分钟。噬菌体沉淀到管底呈透明亮点。弃上清, 并把管内残存液除净以防寄主细胞核酸和降解物污染最终产物。每管内加 0.5—1 毫升 TM 液, 4°C 放置过夜, 用广口滴管使噬菌体充分分散。经过甘油梯度离心后, 得纯的 λ 噬菌体。

四、抽提 λ DNA

把纯的噬菌体用 TM 液稀释到 10 $O.D_{260}$ /毫升, 加等体积苯酚抽提 20 分钟, 4000rpm 离心 5 分钟, 留上层水相。再用等体积的酚: 氯仿 (1:1), 氯仿依次抽提水相。再用乙醚对水相抽提 2—3 次, 抽提后的水相即为 λ DNA 溶液。对 1000 倍体积的 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA 溶液透析, 更换透析外液, 每隔 4 小时从透析外液取样 30 微升加入二氧六

环闪烁液中测 cpm。当 cpm 低于 100 时, 终止透析。测 DNA 溶液 $O \cdot D_{260}$ 吸收值, 计算 DNA 的得率。把 DNA 溶液用含 50% 甘油的上述缓冲液透析浓缩后, 转到经过灭菌的容器内, 4°C 保存长达三年多, DNA 未出现降解现象。

结果与讨论

一、方法简单, DNA 产率高

按上述方法制备 λ DNA 简单易行, 避免了长时间的超速离心和耗费昂贵的氯化铯。据文献报道用其它方法制备, 1000 毫升培养物得率分别为 0.6—0.8 毫克^[3], 1—2 毫克^[4] 和 5 毫克^[2]。我们从 500 毫升培养物得约 6 毫克 λ [3H] DNA, 重复实验得率在 5 毫克以上, 比上述得率高。

二、 λ [3H] DNA 的放射性测定

1. 酸不溶产物测定 用水把 λ [3H] DNA 作适当稀释, 点样于 Whatman 3MM 滤纸上。用酸洗去酸可溶物质。把滤纸片浸泡于 10% 冷的 TCA 中, 10 分钟之后, 换用 5% TCA 漂洗 4 次, 每次漂洗 5 分钟, 接着用酒精、乙醚干燥, 热风吹干。置于二甲苯闪烁液中测 cpm。对照样品为不经酸洗的纸片经热风吹干测 cpm。以对照样品 cpm 为 100%, 酸处理样品的 cpm 比对照样品 cpm, 求出酸不溶物质的百分率。测定结果酸不溶物质含量达 99% 以上, 透析有效地去除了酸可溶物质。

2. 放射性比度的测定 采用二氧六环和均相法。 λ [3H] DNA 用水作适当稀释之后, 取 1 微克 DNA 溶液加入二氧六环闪烁液中, 测 cpm。其放射性比度为 6.75×10^4 cpm/微克 DNA。

三、核酸外切酶的检测

天然 λ DNA 为核酸外切酶 III 的作用底物, 而热变性的单链 DNA 又是核酸外切酶 I 与 II 的作用底物。核酸外切酶切割 DNA 时释放出单核苷酸, 通过测定酸可溶或酸不溶物质的方法均可确定核酸酶的活性。我们把 Berkner^[2] 测定核酸外切酶活性的方法改为纸片

法,检测一些酶制剂中是否有微量的核酸外切酶污染。

1. 核酸外切酶 I 与 II 的测定 间接测单链 DNA 释放出酸可溶产物。100 微升反应体积含 67mM 甘氨酸-KOH, pH9.5, 1.3mM MgCl₂, 3.3mM 2-巯基乙醇, 50μM 热变性 λ[³H]DNA 和酶, 37℃ 保温, 冰水冷却后取样 50 微升点于 Whatman 3MM 滤纸片上,按前述方法处理滤纸片,测纸片上酸沉淀物的 cpm。由不加酶的对照样品 cpm 减去加酶样品 cpm 即为核酸外切酶 I 与 II 外切 λ[³H]DNA 的酸可溶产物。以对照样品 cpm 为 100%, 酸可溶产物 cpm 比对照 cpm, 计算每单位酶制剂中污染的核酸外切酶对 λ[³H]DNA 的降解率。

2. 核酸外切酶 III 污染活性测定 测定天然 DNA 释放出酸可溶产物。100 微升反应体积含 67mM Tris-HCl, pH8.0, 7mM MgCl₂,

8.5mM 2-巯基乙醇, 50μM 天然 λ[³H]DNA 和酶, 37℃ 保温, 以后的步骤和计算同核酸外切酶 I 与 II。

上述为核酸外切酶作用最佳条件^[2]。检测极微量的核酸外切酶须延长保温时间。我们用不同酶量和不同保温时间检测过多种酶制剂,取得了满意的结果。37℃ 保温 5 小时,每单位酶对 λ[³H]DNA 的降解低于 0.1% 时,其酶制剂可以认为是优质品。现将三种酶制剂中核酸外切酶检测结果列于表 1。由结果看出:在 T₄RNA 连接酶粗制品中核酸外切酶污染严重;在 T₄DNA 连接酶制剂中未查出核酸外切酶 I 与 II 的污染活性,但经 5 小时保温后可查出极微量的核酸外切酶 III 的污染活性; T₄多核苷酸激酶未受到核酸外切酶 I 与 II 的污染,但经 5 小时保温可查出核酸外切酶 III 的污染活性。

表 1 不同酶制剂中污染的核酸外切酶降解 λ[³H]DNA 检测结果

名称	核酸外切酶	保温	对照保温三个样品平均 cpm	加入酶量 (u)	加酶保温三个样品平均 cpm	对照减实验样品 Δcpm	降解率 (%/u)
T ₄ RNA 连接酶(粗品)	I 与 II	37℃, 30 分	17292	4.5	6657	10640	13.7
		37℃, 6 小时	20863	4.5	1568	19295	20.6
	III	37℃, 5 小时	22253	4.5	15641	6612	6.6
T ₄ DNA 连接酶	I 与 II	37℃, 30 分	17277	48	17877	—	—
		37℃ 30 分加 18℃ 22 小时	17567	48	18085	—	—
	III	37℃, 30 分	22188	48	21420	768	0.0007
		37℃, 5 小时	22170	48	20543	1627	0.0015
T ₄ 多核苷酸激酶	I 与 II	37℃, 30 分	17292	6.6	19493	—	—
		37℃, 5 小时	29278	6.6	30998	—	—
	III	37℃, 30 分	22430	6.6	22274	156	0.001
		37℃, 5 小时	22170	6.6	20380	1790	1.2

参 考 文 献

[1] Maniatis, T., et al.: *Cell*, 15, 687, 1978.
[2] Kathleen, L., et al.: *J. Biol. Chem.*, 252, 3176, 1977.
[3] 鳌世洲: 《生物化学与生物物理学报》, 12 卷, 13 页,

1980.
[4] Harris, B.: in "Methods in Cancer Research," PP 91, 1976.

[本文于 1986 年 5 月 28 日收到]