

凝胶中进行电泳。电泳结束后,凝胶用500毫升10% TCA-10% 乙酸-30% 甲醇-2.5% 甘油溶液固定过夜。再用放射自显影增强剂(如EN³HANCE)在通风柜中处理1小时,水洗两次(2×15分钟),最后,真空干燥使凝胶平板成为透明薄膜。—70℃放射自显影数天。当在凝胶电泳中可以观察到杂交选择的 polyA⁺-mRNA 出现新的蛋白质带之后,才可以通过其它方法对它进一步作鉴定。

参 考 文 献

- [1] Weiss, E. H. et al.: *Nucleic Acids Res.* 10, 1981, 1982.
- [2] Aftara, N. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 9, 3061, 1981.
- [3] Kurtz, D. T. and Nicodemus G. F.: *Gene*, 13,

- 145, 1981.
- [4] Aftara, N. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11, 931, 1983.
- [5] Ricciardi, R. P. et al.: *PNAS.*, 76, 4927, 1979.
- [6] Cleveland, D. W. et al.: *Cell.*, 20, 95, 1980.
- [7] Parnes, J. R. et al.: *PNAS.*, 78, 2253, 1981.
- [8] Goldberg, M. L. et al.: "*Methods in Enzymology*" Vol. 68, 206, 1979.
- [9] Seed, B. *Nucleic Acids Res.*, 10, 1799, 1982.
- [10] Alwine, J. C. et al.: *PNAS.*, 74, 5350, 1977.
- [11] Alwine, J. C. et al.: "*Methods in Enzymology*" Vol. 68, 220, 1979.
- [12] Pelham, H. R. B. and Jackson, R. J. *Eur. J. Biochem.*, 67, 247, 1976.
- [13] Berns, A. J. M. and Bloementhal, H.: "*Methods in Enzymology*" Vol. 30F. 675, 1974.
- [14] Kurtz, D. T. et al.: *Biochemistry*, 15, 1031, 1976.
- [15] Robert, B. E. and Paterson, B. M.: *PNAS.*, 70, 2330, 1973.

(本文于1983年3月30日收到)

限制性内切酶 MboI 的提取与纯化

蔡良琬 熊伟军

(中国医学科学院基础医学研究所)

限制性内切酶 MboI 切开序列为 5'-G-T-A-C-3', 因为它只识别这四个碱基对, 所以它的切点比较多, 片段比较小, 在核酸结构分析中是一种比较常用的限制性内切酶。关于 MboI 的提取主要根据 Gelin R. E., Brown, N. L. Endow, S. A. 等人报道的方法^[1,2,3], 并进行了一定的改进。我们成功的配制了适用的脑心浸出液, 适用于国内生产的需要。所得到的 MboI 经过鉴定证明能用于核酸结构的分析。

一、材料和方法

1. 材料

菌种 *Moraxella, bovis* ATcc10900 (来源于英国)。

试剂 磷酸纤维素 p11 [Whatman p11] Bio-GelA-0.5M [BioRad], 其余均为国产分析纯试剂。

2. 脑心浸出液的配制

取200克去组织的小牛脑组织切成小块加水200毫升, 4℃浸泡过夜。8磅(116℃)20分钟, 冷却后用纱布过滤, 0.1N HCl调pH到4—5。使混合物沉淀为絮状后, 快火煮沸, 冷却过滤, 取滤液备用。另取250克心肌搅碎, 加入250毫升水, 4℃过夜, 用8磅(116℃)20分钟灭菌后, 快火煮沸, 冷却后过滤, 取滤液备用。将以上二种滤液混合后, 加入蛋白胨10克, 葡萄糖2克, NaCl 5克, Na₂HPO₄ 2.5克, 辅酶I每毫升2微克, 氯高铁血红素每毫升10微克, 用NaOH调节pH7.4, 定容为1000毫升, 然后8磅灭菌(116℃)30分钟。

3. 氯高铁血红素的制备

将脱纤羊血100毫升, 滴加在煮沸含有0.1克NaCl的400毫升冰醋酸溶液中, 温度保持在100—105℃, 然后继续加热10分钟, 放置过

夜,离心收集沉淀物,分别用 50% 乙醇,蒸馏水和 95% 乙醇各冲一次,最后用无水乙醚洗涤沉淀物,干燥后即可用。

4. 缓冲液的配制:

缓冲液 I: 含 0.01M Tris-HCl pH7.5, 0.01 M2-巯基乙醇。

缓冲液 II: 含有 1 MNaCl, 0.01M Tris-HCl, pH7.9, 0.01M2-巯基乙醇。

缓冲液 III: 含有 0.01 M 磷酸钾 pH7.4, 0.01M 2-巯基乙醇, 0.001M Na₂EDTA, 10% 甘油。

5. 细菌的培养:

此细菌必须保种在含血培养基中,每三天转种一次。用斜面菌种转入 5 毫升脑心培养液内,37℃ 活化 18 小时,转入 50 毫升培养液内,37℃ 培养 18 小时,最后转入 1000 毫升培养液中,37℃ 保育 22 小时(以上均有振荡培养)后,在 4℃ 下将菌溶液 3500 rpm 离心 20 分钟,弃上清,再用缓冲液 I 冲洗离心一次,从 3000 毫升培养液中可得湿重菌体 17 克,再将菌体悬浮于 50 毫升缓冲液 I 中。放置 -20℃ 冰箱过夜,以备超声波裂菌。

6. 限制性内切酶 MboI 的提取: 此过程均在 4℃ 下进行。

(1) 超声波处理 超声波破碎菌体 10 分钟,每分钟间歇 30 秒。

(2) 超速离心除去菌体碎片 破碎后的菌体以 30,000 rpm 离心 2 小时,取上清液。

(3) 硫酸链霉素处理 上清液加入 5% 的硫酸链霉素,在冰浴中轻摇 30 分钟,然后于 3,000 rpm 离心 30 分钟,取上清液。

(4) 固体硫酸铵沉淀蛋白 (50P) 将处理后的上清液,加到硫酸铵饱和度为 50%,放置冰箱过夜。

(5) 离心收集沉淀物 把硫酸铵沉淀蛋白的混合液于 3500rpm 离心 60 分钟,收集沉淀物,取 5 毫升缓冲液 II 溶解沉淀物,然后对缓冲液 II 透析 2 小时,即为 MboI 酶的粗提液。

(6) Biogel-A0.5M 层析柱的制备及酶粗提液的层析 把 Biogel-A0.5M 装柱,柱床

体积为 50 × 1.5 厘米。先用水冲洗一次,再用缓冲液 II 100 毫升平衡后,将样品上柱,流速为每 6 分钟 5 毫升,然后用 200 毫升缓冲液 II 洗脱,每管收集 5 毫升。

(7) 限制性内切酶 MboI 洗脱液活性鉴定以 λ-DNA 为底物,加入酶提取液,每微克 λ-DNA 加入洗脱液 5 微升,保温 1 小时 (37℃),65℃ 灭活 5 分钟,酶解产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。电泳缓冲液终浓度为 89mM Tris (pH 8.6), 89mM 硼酸, 2.5 mM Na₂EDTA, 端电压为 80 伏,电泳时间 5 小时。在紫外灯下直接观察 λ-DNA 酶解情况,确定有酶活性的部分,这部分的洗脱液为仍含有少量 MboII 的 MboI。

(8) 磷酸纤维素 p11 的层析柱配制及 MboI 的纯化 称取磷酸纤维素 p11 10 克,用无离子水漂洗后,用 0.5N HCl 浸泡 30 分钟,并用蒸馏水冲洗至中性,再用 0.5N NaOH 浸泡 30 分钟,蒸馏水冲洗至中性,然后装柱,柱床体积为 15 × 2 厘米,用缓冲液 III 100 毫升平衡。把透析好的酶洗脱液上柱,然后用含 0.3—1.0 M KCl 的缓冲液 III 200 毫升梯度洗脱。酶活性的鉴定步骤与(7)相同。

(9) MboI 的二次纯化 将具有酶活性的部分用不含 KCl 缓冲液 III 彻底透析,进行第二次的磷酸纤维素 p11 的纯化,以 0—0.3M KCl 梯度洗脱,分别以每管 5 毫升进行收集,测活步骤与(7)相同。

(10) 限制性内切酶 MboI 纯化后的活力单位测定 用 1 微克 pBR322 DNA 为底物,加入 1 单位酶,在 37℃ 中,1 小时完全水解所需要的 MboI 酶量为 1 个酶的活力单位。将酶解产物进行 5% 丙烯酰胺凝胶电泳,电泳缓冲液和方法与(7)所用的相同,端电压 250 伏,电泳时间 2 小时,然后用溴乙锭染色 20 分钟,蒸馏水漂洗后,在紫外灯下直接观察 pBR322 的酶解图谱。

(11) 酶液的浓缩及贮存 将含有 MboI 酶解活性,而不显外切酶及非特异性内切酶的各管酶液,装入透析袋,对 20 倍含 50% 甘油的缓冲液 III 透析过夜,次日分装,于 -20℃ 下保存

备用。

二、结果与讨论

1. MboI 酶粗提物的酶及两次纯化后酶制品活性在硫酸铵沉淀蛋白后,直接进行 Biogel-A0.5M 的层析洗脱,经过此步骤,在 3000 毫升的脑心浸出液培养的菌体中,可得大约 17,000 单位的 MboI 酶的粗提物,对含有 MboI 酶活性各管进行磷酸纤维素 p11 的纯化,其酶活性检测结果如图 1(见封 3)所示,纯化后的酶活性部分一般在 5—15 管之间,相当于 KCl 浓度 0.3—0.4M 之间。经进一步纯化后可得 MboI 6100 单位,纯化率为 35.9%。

2. MboI 纯化度的鉴定: 对纯化的 MboI 各管作外切酶和非特异内切酶鉴定,电泳是在 5% 丙烯酰胺胶中进行的, MboI 酶纯度的检测见图 2(放封 3)。用 pBR322,其中含有 22 个 MboI 酶切点片段如下: 1374, 655, 358, 341, 317, 272, 258, 207, 105, 91, 78, 75, 46, 36, 31, 27, 18, 17, 15, 12, 11, 8 碱基对。MboI 和 MboII 混合切时片段大小为: 692, 680, 355, 341, 317, 275, 236, 195, 183, 112, 105, 78, 70 碱基对。从图 3(见封 3)中可看出纯化后的 MboI 酶降解 pBR322 后的区带基本上与文献[4]中报道的结果符合。图 3 是以 Hinf I 已知片段大小作标准曲线,根据对数与反对数的算法得知酶解 pBR322 片段的大小如下:

已知 Hinf I: 1631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154 及 75 碱基对。

纯化的 MboI 经计算为: 1380, 660, 380, 316, 288, 251, 199, (133, 123) 109 及 89 碱基对。

以上是酶解后得出的片段,与文献报道基本符合。

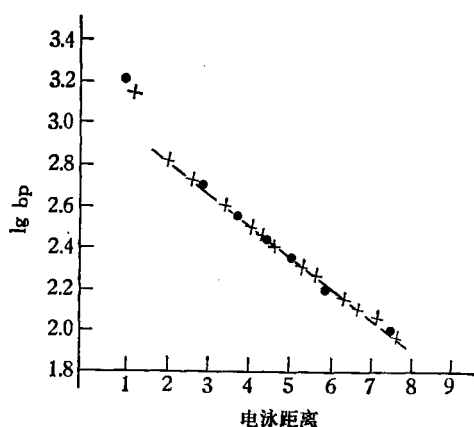


图 3 以已知 pBR322 的 Hinf I 片段为标准绘成的标准曲线

●—表示 Hinf I 酶切片段 ×—表示纯化 MboI 酶切片段

参 考 文 献

- [1] Gelinas, R. E. et al.: *J. Mol. Biol.*, 114, 169, 1977.
- [2] Brown, N. L. Hitchison et al.: *J. Mol. Biol.*, 140, 143, 1980.
- [3] Endow, S. A., *J. Mol. Biol.*, 114, 441, 1977.
- [4] *Genetic Engineering*, AMC Hakrabarty CRC Press, Inc. Editor. 1978.
- [5] Homandberg, G. et al.: *Biochemistry*, 17, 5220, 1978.
- [6] Sealock, R. W. et al.: *Biochemistry*, 8, 3703, 1969.
- [7] Widmer, F. et al.: *Carlsberg Res. Commun.*, 44, 37, 1979.
- [8] Oka, T. et al.: *Symp. on Peptide Chemistry in Japan*, Osaka, 79, 1977.
- [9] Obermeier, R. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357, 759, 1976.
- [10] Chu, S. H., et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, 647, 1981.
- [11] Kowalski, D. et al.: *Bayer-Symposium. V "Proteinase Inhibitors"*, Springer-Verlag, 311, 1974.
- [12] Homandberg, G. A. et al.: *Biochemistry*, 18, 586, 1979.
- [13] Bergmann, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 119, 707, 1937.
- [14] Bergmann, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 124, 321, 1938.
- [15] Inouye, K. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 101, 751, 1979.
- [16] Morihara, K. et al.: *Nature*, 280, 412, 1979.
- [17] Morihara, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 396, 1980.
- [18] Widmer, F. et al.: *Peptides*, 1980 Ed. Brunfeldt, Scriptor, Copenhagen, 46, 1981.
- [19] Gattner, H. -G., et al.: *Peptides*, 1980, Ed. Brunfeldt, Scriptor, Copenhagen, 372, 1981.
- [20] 张友尚,朱尚权等(上海生物化学研究所)个人通信。

(上接第 12 页)

参 考 文 献

(本文于1982年10月20日收到)

“限制性内切酶 MboI 的提取与纯化”一文的图 1 与 2



图 1 1% 的琼脂糖凝胶电泳图谱

(1) 以 1 微克 λ -DNA 为底物, 5 微升磷酸纤维素 P_{11} 柱酶的洗脱液

(2) 活性部分在 5—15 之间中间出现的 10—12 是梯度洗脱、仪器上的误差所引起的。

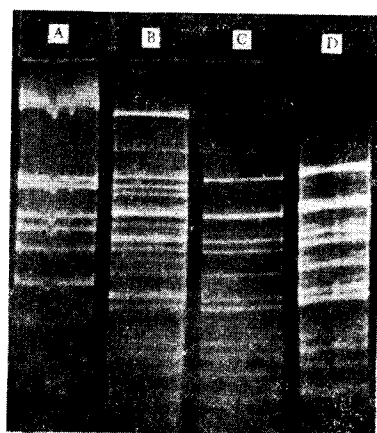


图 2 5% 的丙烯酰胺电泳图谱

A: HinfI 酶解 pBR 322, B, C: 用 HinfI 酶纯化的 MboI 酶解 pBR322, 但 B 降解不完全。D: 未纯化的 MboI 酶解的 pBR322。

“人胃粘膜细胞核的制备”一文的图 2—5

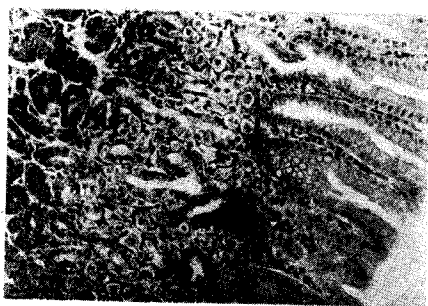


图 2 人胃粘膜组织常规石蜡切片
(光学显微镜 100 $\times$)

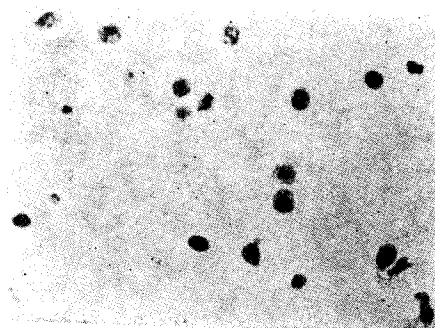


图 3 Chiu's 法制备的人胃粘膜细胞核
(光学显微镜下 400 $\times$)

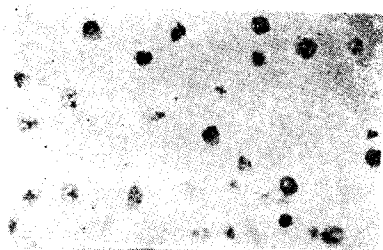


图 4 Chauveau's 法制备的人胃粘膜
细胞核(光学显微镜下 400 $\times$)

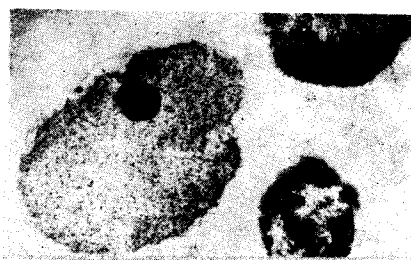


图 5 纯化后的人胃粘膜细胞核的电镜图 3,900 $\times$