

限制性内切酶 BamHI 的分离纯化

中国科学院生物物理研究所三室四组

同 EcoRI 酶^[1]一样,从 *Bacillus amyloliquefaciens* H 菌株分离出的限制性内切酶 BamHI, 是 DNA 分子体外重组中广泛使用的一种酶,其碱基识别顺序为: $5'-G^{\downarrow}GATCC-3'$ 。由于 BamHI 在 pBR317、pBR322 等质粒上只有一个切点,且正好在 T_C 基因部位,因此当用这些质粒作载体进行 DNA 体外重组时,可用 Ap^rT_C 进行筛选,给重组分子的筛选带来不少方便。我们参照 Wilson 和 Young^[2] 的方法,并作了必要的修改,从 *Bacillus amyloliquefaciens* H 菌株中分离纯化了 BamHI。

材料与方 法

1. 菌株 枯草杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* H (RUB500) 是 *Bacillus amyloliquefaciens* H 自发利福平突变株。

2. 试剂 磷酸纤维素 P₁₁ (Whatman), DEAE-纤维素 DE₅₂ (Whatman), 溶菌酶 (10,000 ± 2,000 单位/毫克蛋白上海市禽类蛋品公司禽蛋二厂),其他试剂均为 AR 级。

3. 测活底物的制备 将 *E. coli* 539 ($\lambda_{C185787}$) 溶原菌经 42℃ 诱导后,取一典型噬斑为种子,感染 *E. coli* C600,铺连斑平板 10 个,每平板用 2 毫升 λ 肉汤(每升含:胰蛋白胨 10 克,牛肉膏 5 克,酵母浸膏 5 克, V_{B1} 15 毫克)浸泡 1 小时,将溶液合并,加氯仿至 0.5% (V/V),充分摇动,离心 (8,000 rpm 10 分),上清液效价为 1×10^{11} /毫升。然后用 15 毫升上述裂解液再感染 50 毫升 OD₆₀₀ 毫微米为 0.7 的 *E. coli* C600,待全部裂解,与上述同理制备噬菌体贮液,效价为 $1-10 \times 10^{11}$ 。*E. coli* C600 于 600 毫升 λ 肉汤中,37℃ 摇床隔夜培养,2,500 rpm 离心后,菌体重新接入 600 毫升新鲜培养基中,37℃ 摇

床培养 1 小时后,接入上述噬菌体贮液,37℃ 放置 20 分钟后,继续培养至 *E. coli* C600 全部裂解,即 OD₆₀₀ 毫微米 ≈ 0 时,加入氯仿至 0.5% (V/V),NaCl 至 1M,继续振荡 30 分钟,冰箱中放置 2 小时,离心 (8,000rpm, 20 分)得裂解上清液,按 Thomas 和 Davis 方法^[3],通过氯化铯密度梯度离心,酚抽提法制备 λ DNA。600 毫升裂解液可制备 λ DNA 1—1.5 毫克,OD₂₆₀ 毫微米: OD₂₆₀ 毫微米为 0.4—0.45,在 10 mM Tris-HCl (pH 7.9) 1 mM EDTA 缓冲液中,于普通冰箱中保存一年仍未见降解。

4. 琼脂糖凝胶电泳测活 从各层析柱所得部分(除另指出外)取 20 微升测活,反应总体积为 40 微升,含 1 微克 λ DNA,反应缓冲液为 6 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-巯基乙醇,37℃ 保温 2 小时,加入 20 微升终止液 (200 mM EDTA:50% 甘油: 1% 溴酚蓝 10:10:1) 终止反应。在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,胶内含 0.5 微克/毫升 EBr,电泳缓冲液为 0.089 M Tris, 0.089 M 硼酸, 2.5 mM EDTA 二钠盐, pH8.5,电流每管 1mA,16℃ 电泳 4 小时,在 254 毫微米灯下,加红色滤片照像。

酶的制备过程

1. 菌体培养 培养基每升含:胰蛋白胨 10 克,酵母浸膏 5 克(北京产;如用上海产品,另加 3 克牛肉膏),NaCl 3 克,K₂HPO₄ 3.6 克,KH₂PO₄ 1.3 克,pH 7.2;将一支 *Bacillus amyloliquefaciens* H (RUB 500) 斜面接入 500 毫升上述肉汤中,37℃ 摇床隔夜培养,次日分别转接入 500 毫升 $\times 3$ 的新鲜培养基中,培养至对数生长后期,2,500rpm 离心 15 分钟收集菌体,用 TM 缓冲液 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM 2-巯基乙醇)洗

一次, 2 升培养基可得湿菌 15 克。

2. 菌体的破碎及抽提 将菌体悬浮于 80—100 毫升 TM 缓冲液中, 加入溶菌酶 (每毫升 100 微克) 置室温 30 分钟后用超声波破碎器超声, 共处理 12 分钟 (每次 1 分钟, 温度不超过 6℃), 然后 100,000×g 离心 1 小时, 取上清液。

3. 去核酸及硫酸铵分部分离 滴加 10% 硫酸链霉素于上述上清液中, 边滴边搅, 使最后浓度为 1.2%, 再充分搅拌 30 分钟沉淀核酸, 离心 (12,000 rpm, 15 分钟) 所得上清液用硫酸铵分部沉淀, 取 45—80% 硫酸铵饱和度的沉淀部分, 离心 (12,000 rpm, 15 分钟) 收集沉淀, 溶于 50 毫升 MEP 缓冲液 (10 mM Napi pH 7.4, 1 mM Na₂ EDTA, 7 mM 2-巯基乙醇) 中, 对同样缓冲液 (3,000 毫升×2) 搅拌透析 15 小时。

4. 酶的纯化 (1) 磷酸纤维素柱层析 磷酸纤维素 P₁₁ 依次用 0.5N NaOH, 0.5 NHCl 常规处理, 悬浮在 MEP 缓冲液中, 用 NaOH 滴定, 使其 pH 为 7.4 左右, 装柱 (2×15 厘米), 用同样缓冲液充分平衡。将透析后的酶液用 MEP 缓冲液稀释至 250 毫升, 上 P₁₁ 柱, 流速 0.5—0.7 毫升/分。用 10 倍于柱体积的同样缓冲液淋洗, 大部分蛋白并不吸附在柱上。然后用 400 毫升 0—0.6M NaCl 之 MEP 缓冲液, 进行线性梯度洗脱, 每管 6 毫升收集, 收集部分用 1% 琼脂糖凝胶电泳法测活 (图 1)。从图 1 可见, 酶活性出现在 45—57 管, 即 0.4—0.5M NaCl 梯度洗脱下来的部分。将活性部分合并, 约 80 毫升, 对 3,000 毫升×2MEP 缓冲液搅拌透析 15 小时。

(2) DEAE-纤维素柱层析 DEAE-纤维素 (DE₅₂), 装柱前步骤同前抽气后装柱 (1.4×15 厘米), 用 MEP 缓冲液充分平衡。将透析好的酶液直接上 DE₅₂ 柱, 流速 0.5—0.7 毫升/分。用 150 毫升 MEP 缓冲液淋洗, 然后用 250 毫升 0—0.6M NaCl 之 MEP 缓冲液进行线性梯度洗脱, 每管 4 毫升收集, 各部分用 1% 琼脂糖凝胶电泳测活 (图 2)。从图 2 可见, 酶活性在 10—18 管出现, 即 0.08—0.2M NaCl 梯度洗脱

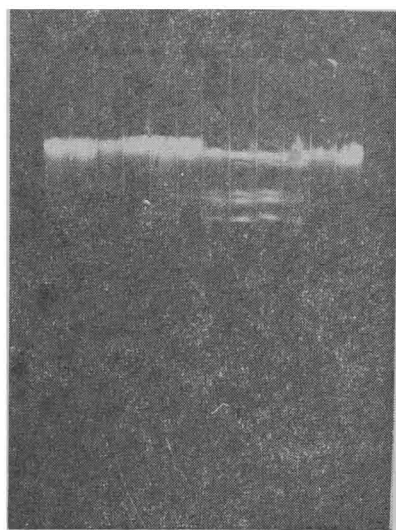


图 1 磷酸纤维素 P₁₁ 柱 (2×15 厘米) 层析

酶活性部分, 从左到右为 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65 管, 反应总体积: 40 微升, 含 1 微克 λ DNA, 10 微升酶液, 反应缓冲液为 6 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-巯基乙醇 37℃ 保温 2 小时, 加入 20 微升终止液终止反应 1% 琼脂糖凝胶电泳, 16℃, 4 小时, 1 mA/管。

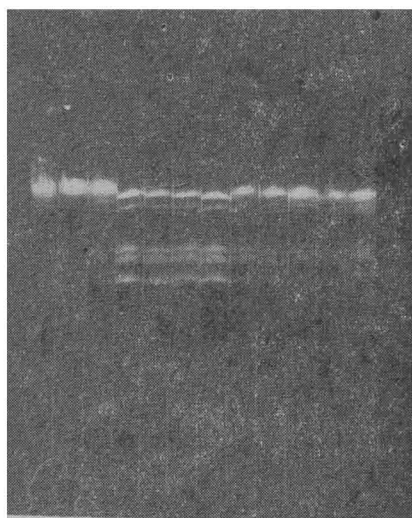


图 2 DE₅₂ 柱 (1.4×15 厘米) 层析酶

活性部分, 从左到右为 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 管。

下来的部分。

5. 酶的浓缩与保存 将上述活性部分合并, 对含有 50% (V/V) 甘油的 MEP 缓冲液隔夜透析, 所得酶液置 -20℃ 冰箱可长期保存。整个制备过程在 4℃ 进行。

结果与讨论

1. 用上述方法,从 *Bacillus amyloliquefaciens* H (RUB₅₀₀) 中纯化了 Bam HI 酶,过量酶液较长时间保温,酶切图谱完好。通过 DNA 分子体外重组实验,证明酶切后 DNA 粘末端完整(另文发表),说明不含或极少含外切酶。用此法纯化的 BamHI 可在 -20°C 保存。15 克湿菌能得 8,000 单位酶 (37°C , 1 小时水解 1 微克 λ DNA 的酶量定为一个活力单位)。

2. Wilson 和 Young 报道^[2],在磷酸纤维素 P_{11} 柱层析时,酶活性部分是在 $0.31-0.36\text{M}$ NaCl 梯度洗脱下来。在我们实验条件下,酶活性峰出现在 $0.4-0.5\text{M}$ NaCl 梯度范围。

3. 我们曾参照 Wilson 和 Young 的方法^[2]用细菌磨破碎菌体,经 TM 缓冲液抽提,去核酸后所得的 45—80% 硫酸铵饱和度沉淀组份,溶于 MEP 缓冲液直接上 Sephadex G25 脱盐,活性部分经二个 DE_{52} 柱(分别为 2×15 厘米, 1.2×10 厘米)纯化后,酶切图谱清晰,估计很少含外切酶(图 3),但因有相当量的杂蛋白酶存在,保存时间较短。

4. 当第一个柱用 DE_{52} 分离时,在较低盐梯度洗脱下来的酶,测活时可观察到五条 λ DNA 酶解片断(实际上是六条,因五、六条分子量相同,在凝胶上不能分开)之下,有数条低分子量的新带(图 4),这些新带的出现,有二种可能:(1)菌株中存在另一种含量相当少的,至今尚未被纯化的限制性内切酶。(2)同 EcoRI 一样,是一种松弛型特性 (relaxed specificity) 酶^[4]。L. A. Smith 等人^[5]也曾报道, BamHI 酶的粗提物中,似乎有少量的另一种酶活性,而产酶的水平同细胞的生长状态有关。此问题有待进一步研究。

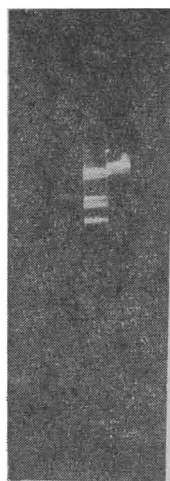


图 3 第二个 DE_{52} 柱 (1.2×10 厘米)层析后,酶活性部分合并, λ DNA 的酶切图



图 4 第一个 DE_{52} 柱 (2×15 厘米)层析酶活性部分,从左→右盐梯度上升,示较低盐梯度洗脱部分消化 λ DNA 时,出现的低分子量新带。

5. *B. amyloliquefaciens* H 对超声似有抗性,利用 Greene 法^[6],在超声前加入 100 微克/毫升的溶菌酶,室温下置 30 分钟后超声,破碎效果良好,超离心后,上清液的光密度数值同用细菌磨破碎的相当。

6. 参照 Smith 等人的方法^[7]用渗涨法 (osmotic shocking) 使酶从细胞中释放出来,将 8 克菌体用 10mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.4$) 30mM NaCl 洗二次,悬于 50 毫升 33mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.4$) 3mM Na_2EDTA , 20% 蔗糖溶液中, 30°C 置 10—15 分钟,离心后 ($2000 \times g \cdot 20$ 分) 沉淀悬于 50 毫升预冷至 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的 0.5mM 的 MgCl_2 中,置 0°C 15—12 分钟,并不时搅动,离心 ($2000 \times g \cdot 20$ 分) 上清液加入 25 微升 200mM EDTA 及巯基乙醇, 2.5 毫升 0.2M 磷酸钾缓冲液 ($\text{pH } 7.5$) 和 2.1 毫升 5M NaCl, 然后经磷酸纤维素 P_{11} 柱 (1.7×9.5 厘米), 羟基磷灰石 (1.0×8 厘米) 纯化, 活性峰分别在 0.35M NaCl 处和 0.08M 磷酸钾缓冲液处出现 (图 5), 经甘油浓缩后贮于 -20°C , 关于渗涨法, 据我

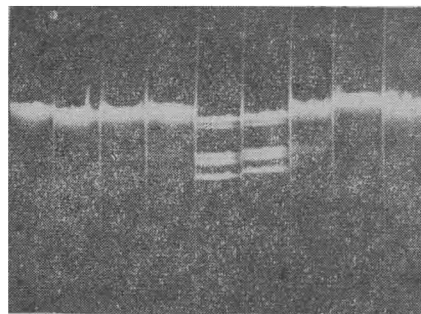


图 5 渗涨法经羟基磷灰石柱纯化后酶活性部分

们的经验,由于释放酶量不完全,产率比超声破碎及研磨为低,但具简便省时的优点,一般二天便可完成。离心只要一个低速冰冻离心机,因此设备较差的实验室更宜采用。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院生物物理研究所三室三组:《生物化学与生物物理学报》,1978年,第10卷,第1期,第71—76页。
[2] Wilson, G. A., Young, F. E.: *J. Mol. Biol.*, **97**,

123, 1975.

- [3] Thomas, M. & Davis, R. W.: *J. Mol. Biol.*, **91**, 315, 1975.
[4] Polisky, B. Greene, P. et al.: *Proc. natl. Acad. Sci.*, **72**, 3310, 1975.
[5] Smith, L. A. et al.: *Federation Proceedings*, **36** (3) 908, 1977.
[6] Greene, P. J.: *Nucleic Acid. Res.*, **5**, 2373, 1978.
[7] Smith, David I. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **3**, 343—353, 1976.

[本文于1979年3月9日收到]

兔肝 tRNA 核苷酸转移酶的提纯和部分性质

朱 榴 琴 韩 玉 珉

(中国科学院生物物理研究所)

在体外有 ATP、CTP 存在时, tRNA 核苷酸转移酶能有序地在缺少 CCA 末端的 tRNA 分子上加上 -C-C-A, 使 tRNA 分子具有接受氨基酸的功能。所以我们能够利用 tRNA 此种功能将标记的或者修饰的核苷酸引入完整的 tRNA 分子或 tRNA 的 3' 端的片段上, 以便于研究 tRNA 的结构和功能。此外通过它与 tRNA 形成的络合物, 还可以研究酶蛋白和核酸的相互作用。

国外已有人从多种材料中提纯到该酶的报道^[1-4], 但国内未见。Deutscher^[1] 从兔肝提取纯化此酶, 工作比较系统, 结果较好。

我们结合现有条件对 Deutscher 方法作了若干修改, 取得相近的结果。现介绍如下。

材 料 和 方 法

一、材料 DEAE 纤维素采用 Whatman DE-22, 磷酸纤维素, 采用 Whatman P-11。羟基磷灰石和 γ 型铝胶自制^[9]。

混合酵母 tRNA 上海东风生化试剂厂制品, 经部分纯化后使用。

其它试剂均为分析纯。

二、方法 1. tRNA 核苷酸转移酶活性测定 反应液总体积 100 微升, 其中各组份的

浓度为: 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.4), 50 mM; $MgCl_2$, 5 mM; tRNA-C-C, 75 微克/100 微升; $[H^3]$ ATP, 0.17 m M, 比强 $4 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ cpm/毫微克分子, 酶量在 0.5 单位以下。

反应混合物 37°C 保温 5 分钟后, 置冰水浴中冷却。取 50 微升点样后用纸片法洗, 干燥后用液闪计数器测放射性强度。对照样品不加酶。上述反应条件下, 每分钟掺入 1 毫微克分子 AMP 到 tRNA-C-C 分子上所需的酶量。定为一个活力单位。

2. RNase 测定 反应总体积 50 微升。其中甘氨酸缓冲液 (pH 9.4), 50 mM; $MgCl_2$, 5 mM; $[H^3]$ oligo A 5 微升; 酶适量。37°C 保温 30 分钟后, 冰水浴冷却, 取 40 微升点在 Whatman 3MM 滤纸上, 用 TCA 漂洗, 干燥并计数。以酸沉淀的 $[H^3]$ oligo A 的减少量表示 RNase 活力的相对大小。

3. 缓冲液 缓冲液 A: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM β 巯基乙醇; 5% 甘油。

缓冲液 B: 10 mM 磷酸钾, pH 7.5; 1 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM β 巯基乙醇; 5% 甘油。