

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I 的分离纯化

吴 雪 孔玉英 朱绳祖 党进军*

(中国科学院上海生物化学研究所)

限制性内切酶是核酸研究工作的重要工具酶,它的纯度直接影响基因分离,基因克隆以及序列分析等实验结果。为了获得品种繁多、纯度达到要求的酶,人们在分离纯化技术上作了不少努力。目前在分离限制性内切酶方法上以采用亲和层析为主,其中有 Heparin-Sepharose、Pyran-Sepharose、Hydroxylapatite、Blue F₃GA-agarose、DNA-agarose 亲和层析等等^[1-5]。这些方法的特点是分离步骤简单,取得的酶制品纯度高,但是各种材料仍有其优缺点,需要根据具体情况使用。我们在分离纯化 *Bam*H I, *Eco*R I, *Pst* I 限制性内切酶时先后选用了磷酸纤维素,羟基磷灰石和肝素琼脂糖层析材料。所得的酶制品经正常使用的 50 倍酶量, [³²P] E. coli DNA 和再酶切实验三项纯度指标检查杂酶含量,获得较为满意的结果。我们还利用这个方法分离得到 Alu I, Bgl I, Bgl II, Sal I, Pvu II 等酶。

一、材料与试剂

1. 菌株 *B. amyloliquefaciens* HBu 500; *E. coli* 1100; *Providencia stuartii* 164.

2. 试剂 磷酸纤维素 P11 (Whatman); 羟基磷灰石(我室储美瑾同志制备); 肝素琼脂糖(我室制备); λDNA、[³²P] E. coli DNA(我室敖世洲同志制备); pBR₃₂₂ DNA (我室徐敏同志制备); 荧光试剂 (Fluram)。

3. 培养基: 改进的 SLBH 培养基 (每升含牛肉膏 20 g、蛋白胨 10g、酵母浸膏 15g、调 pH 至 7.4 左右)。

二、方 法

1. *Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I 分离纯化 (以 *Pst* I 为例) *Providencia stuartii* 164 菌株在上述培养基内于 37℃ 培养过夜, 离心收集菌体 (5—10g/l)。50 克菌体悬浮于 100 毫升含 0.4 M NaCl 的磷酸缓冲液 [10 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7.4) 1 mM Na₂EDTA 7mM 巯基乙醇] 后, 超声破碎。破碎液经 100,000 g, 离心 40 分钟, 上清液用等量磷酸缓冲液稀释后进行柱层析纯化 (以下各步层析在 0—4℃ 条件下进行)。

磷酸纤维素柱层析 柱体积 $\phi 2.5 \times 25$ cm, 装柱后用含 0.2 M NaCl 的磷酸缓冲液平衡。上述稀释样品上柱后, 用含 0.2 M NaCl 的磷酸缓冲液洗至 A₂₈₀ 读数接近零, 再用 600 毫升含 0.2—0.8 M NaCl 线性梯度的磷酸缓冲液洗脱, 以每管 6 毫升分部收集, 合并活力峰。留样定活力和蛋白含量。

羟基磷灰石柱层析 柱体积 $\phi 2.0 \times 7.0$ cm, 装柱后用磷酸缓冲液平衡。上述合并样品用磷酸缓冲液稀释一倍, 上柱后, 用磷酸缓冲液洗至 A₂₈₀ 读数接近零, 再用 200 毫升 0.01—0.6 M 磷酸钾 (pH 7.4) 线性梯度洗脱, 以每管 4 毫升分部收集。合并活力峰。留样定活力和蛋白含量。

肝素琼脂糖柱层析 柱体积 $\phi 1.0 \times 10$ cm, 装柱后用含 0.2 M NaCl 的磷酸缓冲液平衡。上

* 党进军同志原为北京大学生物系学生在我组搞毕业实践, 哈尔滨兽医研究所刘兴汉同志在本实验中参加部分工作。

述合并样品用含 0.2 M NaCl 的磷酸缓冲液稀释 2 倍上柱后,用含 0.2 M NaCl 的线性梯度的磷酸缓冲液洗脱,以每管 4 毫升分部收集。合并活力峰,并对含 50% 甘油的磷酸缓冲液透析过夜,得浓缩的酶液放置 -20°C 冰箱中贮存。

2. 酶活力测定 测活反应液 30 微升 [10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 10 mM MgCl₂, 7 mM 巯基乙醇, 50 mM NaCl] 含 0.5—1.0 微克 λ DNA, 和 2—5 微升酶液。37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 分钟后,加入 10 微升终止反应液(含 50% 甘油, 0.05% 溴酚兰, 0.2 EDTA),进行琼脂糖凝胶电泳。

酶活力单位(u) 是以上反应体系在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 分钟完全酶解 1 微克 λ DNA 所需的内切酶量定为一个酶单位。

3. 琼脂糖凝胶电泳 电泳缓冲液采用 Tris-硼酸缓冲液 [0.089 M Tris, 0.089 M 硼酸, 2.5 mM NaEDTA (pH 8.3)] 每毫升含 0.5 微克溴化乙啶。琼脂糖胶浓度为 0.7—1.4%, 胶板为 12 $\times$ 20 $\times$ 0.3 cm, 电压 100—150 V, 电泳 1—2 小时。电泳完毕取出, 在 2570 紫外灯下观察、照像。

4. 酶蛋白浓度测定 荧光法测定微量蛋白^[6]。取酶样若干微升,用重蒸水补足 100 微升后加入 300 微升 0.1 M NaHCO₃, 然后边摇边加入 200 微升荧光试剂 (150 微克/200 微升无水丙酮)。反应后在荧光计 (Hitachi—204 荧光分光光度计) 上用 390 nm 激发光,测定 475 nm 的荧光值,并按标准蛋白曲线定出浓度。

5. 其它核酸酶含量测定 [³²P] Ecoli DNA 加正常使用的 100 倍量的酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 分钟后加入 7% PCA, 然后离心,取上清液测定放射

性强度。

6. 连接实验 含有 3 微克 pBR 322 DNA 的酶反应液 50 微升加入 *Pst*I (*Bam*HI 或 *Eco*RI) 9 个单位, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 分钟后,置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 分钟使酶失活。再加 ATP 至 1 mM, 二巯基苏糖醇至 10 mM 后,取 1/3 量为酶切对照,剩下 2/3 加工单位 T₄-DNA 连接酶,置 15 $^{\circ}\text{C}$ 保温 3 小时。然后置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 分钟使连接酶失活,然后取出 1/2 量加入 3 单位 *Pst*I (*Bam*HI, *Eco*RI) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 分钟。再进行琼脂糖凝胶电泳。

三、 结果与讨论

本文结果与讨论以 *Pst*I 分离纯化为例。经磷酸纤维素柱层析行为见图 1。活力峰约在 0.45 M NaCl 处。利用磷酸纤维素柱在上述洗脱条件下不吸附核酸的特性,除去粗抽提液中的核酸碎片和杂蛋白,这样免去除核酸和多次硫酸铵分级沉淀步骤。通过这一步纯化约除去 80% 杂蛋白(见表 1)。

*Pst*I 在羟基磷灰石柱层析的行为见图 2。活力洗脱峰约在 0.25 M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 处。羟基磷灰石柱吸附能力大,不受样品中 NaCl 浓度影响,所以经磷酸纤维素纯化的样品不经透析直接上柱,这可缩短分离时间,减少酶蛋白失活的机会。利用羟基磷灰石柱可除去大量的杂蛋白,样品比活提高 10 倍(见表 1),但同时酶活损失较多。

Thomas 等^[4]已详细报道了肝素琼脂糖柱分离纯化限制性内切酶的优点。它对核酸酶具有专一的亲和力,表现于床体积小,吸附量大,洗



图 1 *Pst*I 经磷酸纤维素柱层析后的电泳活力行为

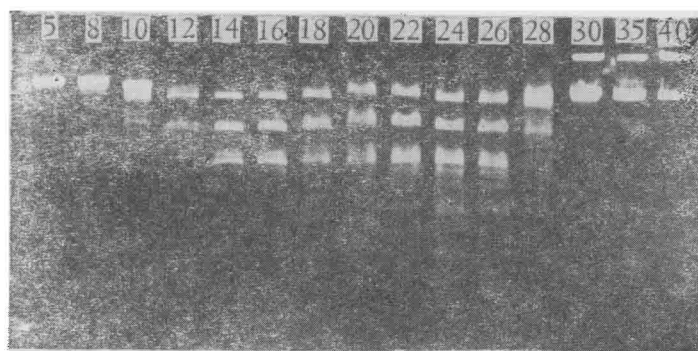


图2 *PstI* 经羟基磷灰石柱层析后的电泳活力行为

表1 限制性核酸内切酶 *PstI* 纯化

组 分	活力体积 (ml)	活力 (u/ml)	总活力 (u)	蛋白含量 (mg/ml)	总蛋白量 (mg)	比活
粗抽提液					2,250	
经磷酸纤维素柱层析后样品	84	1,000	84,000	1,100	92.4	909
经羟基磷灰石柱层析后样品	57	750	42,000	80	4.5	9,375
经肝素琼脂糖柱层析后浓缩样品	12	3,000	36,000	150	1.8	19,998

脱体积小,层析时间短,除去杂蛋白较明显。我们曾用以上两根柱来分离纯化限制内切酶,但发现像 *PstI* 这样酶含量少和得率低的酶不易获得纯度较高的酶制品,如果单收集柱层析中酶活力的峰尖部分,虽可以得到纯度较高的酶制品,但损失太大。我们利用肝素琼脂糖所具有的特点就可以避免上两根柱的不足,从而达到进一步的纯化。我们做了两根柱纯化的酶制品和增加肝素琼脂糖柱纯化的酶制品之间的比较,单从比活上看就可以提高 2.2 倍(见表 1)。另外我们认为增加肝素琼脂糖是比较有利的。*PstI* 在肝素琼脂糖柱层析行为见图 3。活力峰约在 0.45 M 处。

用以上方法制备的 *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* 限

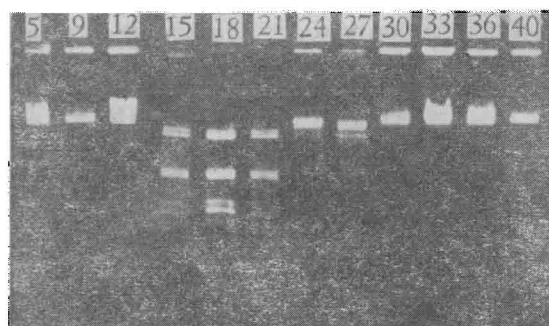


图3 *PstI* 经肝素琼脂糖柱层析后的电泳活力行为

制性内切酶比活数据与国外同类产品相符。为了进一步确定方法的可靠性,我们对 *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* 最终样品的三项指标作了检查: 1. 用方法 5 测得每单位酶酸溶性放射性强度小于总放射性强度的 0.01 %。2. 用方法 6 测得连接效率在 80 % 以上,连接样品经再酶切后仍成特性图谱(见图 4)。3. 以 50 倍正常使用酶量酶切 λ DNA, 37℃ 保温 60 分钟, DNA 专一性条带与背景清晰。以上结果可以说明利用上述三根柱分离纯化的限制内切酶样品纯度是较高

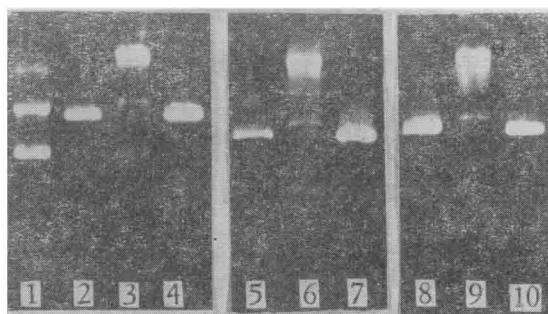


图4 *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* 酶切 pBR322DNA 后连接与连接后再切实验

1. pBR322 DNA
2. pBR322 DNA + *EcoRI*,
3. 样品 2 + T₄ DNA 连接酶, 4. 样品 3 + *EcoRI*,
5. pBR 322DNA + *BamHI*, 6. 样品 5 + T₄ · DNA 连接酶,
7. 样品 6 + *BamHI*, 8. pBR322DNA + *PstI*,
9. 样品 8 + T₄ · DNA 连接酶 10. 样品 9 + *PstI*

(下转第 76 页)

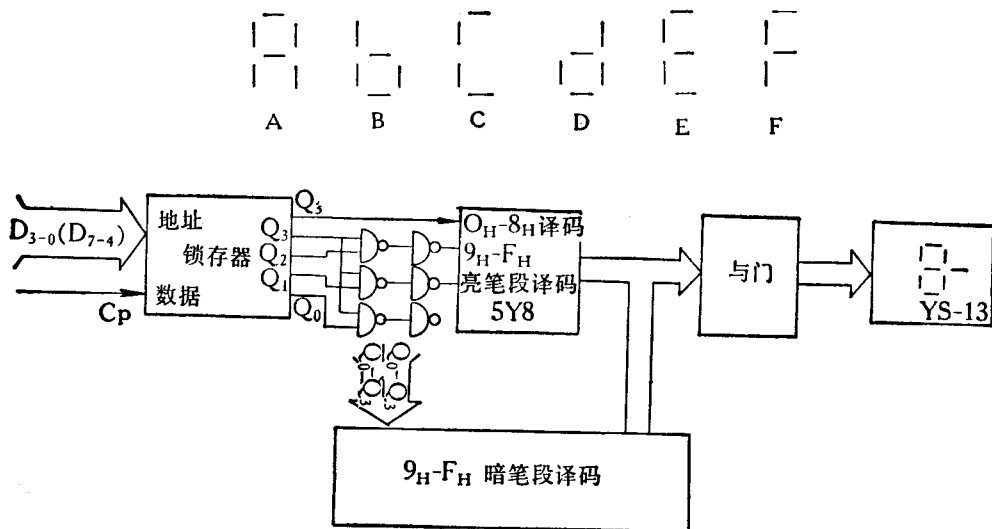


图 5

理图,图 5(1)为用荧光数码管 Y_{S-B} 显示字符 A、B、C、D、E 和 F 的字形。c_{pu} 数据总线的数据由口地址选通后锁于锁存器中,0—8 的显示由 5Y8 译码,9 和六个字符的显示,其译码分两路进行。一路由位于锁存器和 5Y8 中间的六个与非门把它们变成 8_H 码 (1000);另一路“9—F”译码电路完成暗笔段译码。然后,这两路译码再进行逻辑“与”便达到所要求的显示。

三、讨 论

1.本接口电路是为 μ CS-85 的最小系统设计,但按其设计方法,只要对线路略作改动,便能适合于其它类型的微型计算机系统。

2.键盘与主机采用 handshake 联系方式,地址内容和数据信息采用十六进制硬件编码,都

是为了减轻 c_{pu} 的负担,支援软件,节省内存。对于小系统,内存量有限,若键盘/显示采用扫描方式,很有可能使系统失去实用价值。

3.键盘通过 8155 向 8085 申请中断时,要求软件开放键盘中断口,屏蔽其它中断口,以确保键入数据不受干扰。

4.设置三种按键组是为了兼顾操作方便与应用上的灵活、通用。对于通用键的设置方法也是从操作方便和节省硬件资源上考虑的。

本工作得到陈俊强高级工程师的指导,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈俊强、王以忠、邓述珍、胡其蔚、谢晋光和张冠华:《微计算机自动化听觉实验系统》(待发表)。
- [2] Intel Component Data Catalog, 1978.

[本文于 1981 年 1 月 5 日收到]

(上接第 65 页)

的,能满足遗传工程研究上的实验要求。另外这个方法对于大部分限制内切酶的分离纯化具有普遍意义。

本工作承李载平教授、吴祥甫等同志的关心和指导,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Thomas A. Bickle, et al.: *Nucleic Acids Re-*

search, 4, 2561, 1977.

- [2] J. Greene Herbert, et al.: *Nucleic Acids Research*, 5, 2373, 1978.
- [3] Baksi K. et al.: G. W; *Biochemistry*, 17, 4136, 1978.
- [4] Jay George, et al.: *Nucleic Acids Research*, 5, 2223, 1978.
- [5] Heinz S'ohaller, et al.: *Eur. J. Biochem.*, 26,474, 1972.
- [6] D. L. Kacian *Methods in Enzymology*, XXIX part E 150, 1974.

[本文于 1981 年 3 月 22 日收到]