

一步肝素琼脂糖亲和层析法分离 纯化限制性核酸内切酶 PstI

邹国林 曹新文 朱汝璠

(武汉大学生物系)

二、方 法

II 型限制性内切酶是重要的工具酶。它的提纯方法,以前一般是破碎细胞,超速离心取得酶的粗提液后,先除去核酸,后用硫酸铵部分沉淀除去部分杂蛋白,再用各种柱层析法进一步纯化。Greene 等人在 1978 年建立了直接用酶的粗提液,经过磷酸纤维素和羟基磷灰石两步柱层析提取酶的方法^[1],所得酶制剂中不夹杂其它脱氧核糖核酸酶。此法较简便快速,已为国内外所采用。

Baksi 等人报道用一步 Cibacron Blue F3GA-琼脂糖亲和层析提取 BamHI 等酶^[2]。George 等人报道 PstI 的粗提液只经过这一步柱层析还不能达到无其它脱氧核糖核酸酶夹杂的程度^[3]。

PstI 是最常用的工具酶之一,目前多采用 Greene 法制备。随着对该酶需求量日益地增加,为寻找快速简便且得率高的方法,我们作以下试验。

一、材料与试剂

1. 菌株 *Providencia stuartii* 164 (中国科学院微生物研究所提供)。

2. 培养基 每升培养基含蛋白胨 10 克,牛肉膏 10 克,酵母浸膏 20 克,调 pH 至 7.5。

3. 试剂 磷酸纤维素 P11 (Whatman 产品),羟基磷灰石和肝素琼脂糖(自制),肝素钠(上海生化制药厂产品),Sephrose 4B(Pharmacia 产品),λDNA 和 ATP 钠盐(上海生物化学研究所产品),pBR322 DNA 和 T₄DNA 连接酶(北京生物物理研究所产品),其它试剂均为分析纯。所有试剂用重蒸蒸馏水配制。

1. 细菌培养 37℃ 下,菌种活化后接种于 1 升培养基中,摇床振荡过夜,再转入 14 升培养基通氧培养,对数后期离心收集菌体。用缓冲液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 30mM NaCl)洗涤菌体两次,-4℃ 保存。每升培养基可得湿菌 6 克左右。

2. 羟基磷灰石的制备 按文献[4]进行。

3. 肝素琼脂糖的制备 参考文献[5]和[6],并有所改进。将 Sepharose 4B 用蒸馏水洗净,取 50 毫升沉降体积悬浮于等体积 0.5 M Na₂CO₃ 溶液中,在冰浴上加入 5 毫升含 5 克 CNBr 的二甲基甲酰胺溶液,不断搅拌,并滴加 3N NaOH 以维持反应液 pH 值在 11 左右。大约 15 分钟 pH 值恒定后,快速抽滤;用 500 毫升 4℃ 的 0.1 M NaHCO₃ 溶液洗涤,抽干,即得活化琼脂糖凝胶。以上操作在通风厨中进行。将活化琼脂糖凝胶悬浮于含 2 克肝素的 50 毫升 0.1 M NaHCO₃ 溶液中,4℃ 搅拌 16 小时;再加入 10 毫升三乙胺搅拌 4 小时,过滤;用大量 1 M KCl 和蒸馏水依次洗涤,即得肝素琼脂糖。肝素结合量为每毫升凝胶含肝素 15 毫克。

4. 酶的分离纯化 在 4℃ 下进行。取 50 克湿菌悬浮于 100 毫升 KPB(即磷酸钾缓冲液,10 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, pH7.4, 7mM 巯基乙醇, 1mM Na₂EDTA, 1mM NaN₃) (含 0.4M NaCl) 中,加 15 毫克溶菌酶冰浴上搅拌 15 分钟,用超声波破细胞 3 分钟(30" × 6),经 100,000 g 超速离心 1 小时后取上清液,此即酶的粗提液。用以下两种方法分离酶。

a. 一步肝素琼脂糖柱层析法 柱床体积为 1.5×25 厘米, 用 KPB (含 $0.2 M NaCl$) 充分平衡. 用 KPB 将酶粗提液调整到含 $0.2 M NaCl$ 后, 以每小时 20 毫升的流速上样. 用平衡缓冲液淋洗至 A_{280} 值低于 0.02 后, 采用 $0.2-0.8 M NaCl$ 的 KPB (150 毫升 $\times 2$) 进行线性梯度洗脱, 每管 4 毫升分部收集. 经酶活力测定, 合并酶活力峰. 留样测活力单位和蛋白质含量, 并进行酶纯度鉴定. 酶液经聚乙二醇 6000 浓缩后, 对含 50% 甘油的 KPB (含 $0.05 M NaCl$) 透析, 置 $-4^{\circ}C$ 保存.

b. Greene 法^[1] 磷酸纤维素柱柱床体积为 2.5×25 厘米, 用 KPB (含 $0.2 M NaCl$) 充分平衡. 用 KPB 将粗提液调整到含 $0.2 M NaCl$ 后, 以每小时 40 毫升流速上样. 用平衡缓冲液淋洗至 A_{280} 值低于 0.02, 采用 $0.2-0.8 M NaCl$ 的 KPB (300 毫升 $\times 2$) 进行线性梯度洗脱, 每管 6 毫升分部收集. 经酶活力测定, 合并酶活力峰. 留样测各种指标. 羟基磷灰石柱柱床体积为 1.5×12 厘米, 用 KPB (含 $0.2 M NaCl$) 充分平衡. 上述合并酶液用 KPB 1:1 稀释后, 以每小时 20 毫升流速上样. 用平衡缓冲液洗至 A_{280} 值低于 0.02, 采用 $0.01-0.6 M$ 磷酸钾缓冲液 (100 毫升 $\times 2$) 进行线性梯度洗脱, 每管 4 毫升分部收集. 经酶活力测定, 合并酶活力峰. 留样测各种指标. 酶液浓缩透析后置 $-4^{\circ}C$ 保存.

5. 酶活力测定 酶 3 微升, TM 缓冲液 ($50 mM Tris-HCl$, $pH 7.5$, $10 mM MgCl_2$) 30 微升, λDNA 1 微克, $37^{\circ}C$ 保温 20 分钟后, 加终止反应液 ($200 mM Na_2 EDTA$, 0.05% 溴酚兰, 50% 甘油) 10 微升, 进行管状琼脂糖凝胶电泳. 琼脂糖凝胶浓度为 1.2% , 每毫升胶含溴化乙锭 0.5 微克. 电泳缓冲液为 $89 mM Tris$, $89 mM$ 硼酸, $pH 8.5$, $2.5 mM Na_2 EDTA$. 每管 2 毫安电流进行电泳, 在 $254 nm$ 紫外灯下观测.

酶活力单位定义: 在上述反应系统中, $37^{\circ}C$ 保温 1 小时完全酶解 1 微克 λDNA 所需的酶量为 1 个酶单位.

6. 酶纯度鉴定

a. 蛋白质浓度的测定 按 Lowry 法^[7] 进行.

b. 酶制剂中其它脱氧核糖核酸酶活性的检验 酶 60 微升, TM 缓冲液 120 微升, λDNA 1 微克, $37^{\circ}C$ 下延长保温时间至 3 小时. 经琼脂糖凝胶电泳后在紫外灯下检查电泳区带, 并与常量酶切反应 (酶 3 微升, TM 缓冲液 30 微升, 其它条件相同) 电泳区带比较, 加红色滤光片照像.

c. 质粒 pBR 322 DNA 的酶切—连接—重切实验 取 pBR 322 DNA 3 微克, TM 缓冲液 47 微升, 加 6 个单位的 Pst I, 总体积为 54 微升. $37^{\circ}C$ 保温 1 小时后置 $65^{\circ}C$ 水浴保温 10 分钟使酶失活, 取 $1/3$ 体积为酶切对照. 其余反应液中加入 ATP 至 $1 mM$, 二硫苏糖醇至 $10 mM$, T₄ DNA 连接酶 5 单位, $4^{\circ}C$ 保温 16 小时, 再置于 $65^{\circ}C$ 水浴保温 10 分钟, 使连接酶失活. 取 $1/2$ 体积加 Pst I 2 单位 $37^{\circ}C$ 保温 1 小时. 最后进行琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下检查图谱, 并照像.

三、结 果

Pst I 在肝素琼脂糖、磷酸纤维素和羟基磷灰石柱的酶峰洗脱的盐浓度分别是 $0.45 M NaCl$, $0.45 M NaCl$ 和 $0.25 M$ 磷酸钾. 纯化结果见表 1 和表 2.

两种方法制备的酶经过量酶切反应检验, 专一性电泳区带清晰, 与常量酶切反应电泳图谱一致 (见图 1 封 3), 证明无其它可检测的脱氧核糖核酸酶存在.

pBR 322 DNA 有二聚体、开环和超螺旋等形式, 在电泳图谱中呈现为不同的区带; 经 Pst I 酶切后均开环为直线形, 在电泳图中呈现为一条带. 线形 pBR 322 DNA 粘性末端如果完整, 则易为连接酶所连接, 并且可恢复 Pst I 的识别序列; 再经酶切后重新开环成线形. 两种方法制备的酶经 pBR 322 DNA 酶切—连接—重切实验 (图 2 见封 3), 证明酶切片段的粘性末端是完整的, 从而进一步证明所制备的酶中无其它 DNase.

四、讨 论

Bickle 等人^[8] 首先把肝素琼脂糖用于限制

表1 一步肝素琼脂糖柱层析法结果 (50 克菌体)

步 骤	活力体积(毫升)	总活力(单位)	总蛋白量(毫克)	比 活 (单位/毫克蛋白)
粗提液			1900	
肝素琼脂糖柱层析	65	97500	12.1	8058

得率: 1950 单位/克 (湿菌)

表2 Greene 法的步骤和结果 (50 克菌体)

步 骤	活力体积(毫升)	总活力(单位)	总蛋白量(毫克)	比 活 (单位/毫克蛋白)
粗提液			2160	
磷酸纤维素柱层析	96	96000	73.9	1299
羟基磷灰石柱层析	48	48000	5.7	8421

得率: 960 单位/克 (湿菌)

性内切酶的提纯工作。他们在纯化 Bgl I 等酶时,先用聚乙烯亚胺除去核酸,然后用硫酸铵分部沉淀,再进行肝素琼脂糖柱层析。我们认为肝素是聚阴离子化合物,具有强负电性,能和许多含阳离子的生物物质结合。核酸的等电点比较低,在我们的实验条件下一般是不会与肝素相结合,故可省去除核酸这一步骤。肝素琼脂糖柱除杂蛋白的能力亦很强,许多杂蛋白或不结合于柱上,或可在低盐浓度下洗脱,而多数限制性内切酶要在相当高的盐浓度下才能被洗脱,所以硫酸铵分部沉淀也可省去。

本文所介绍的一步法与 Greene 法相比,所得酶的比活相似,酶的质量相似,但酶的得率要高 1 倍左右。同时此法还有以下优点:实验手续简化;亲和吸附剂吸附容量大,柱床体积和洗脱体积较小,所得酶的浓度亦较高;柱流动性

好;层析柱再生方便,稳定性好,可反复使用数十次;层析过程中配基与酶结合对酶的稳定性有一定的保护作用。我们认为此一步法也可适用于其它一些限制性内切酶的提纯。

参 考 文 献

- [1] Greene, P. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2373, 1978.
- [2] Baksy, K. et al.: *Biochemistry*, **17**, 4136, 1978.
- [3] George, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2223, 1978.
- [4] 中国科学院生物化学研究所代谢调节控制组:《生物化学与生物物理进展》,1976年1期,24页。
- [5] 戚德芳等:《生物化学与生物物理学报》,1981年,13卷,275页。
- [6] Sica, V.: *Biochemistry*, **18**, 2369, 1979.
- [7] Lowry, O. H., et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [8] Bickle, T. A., et al.: *Nucleic Acids Res.*, **4**, 2561, 1977.

[本文于1983年12月5日收到]

人红细胞膜唾液酸的测定

董 伟 沈定国 李新建

(中国人民解放军总医院酶学实验室,北京)

大多数哺乳动物的细胞膜(包括红细胞膜)含有糖蛋白。唾液酸是糖蛋白末端糖的残基,位于细胞的外表面,参加细胞的识别,粘着和接

触抑制^[1]。唾液酸也是循环系统中红细胞存活的主要决定因素,它在正常红细胞的衰老以及衰老细胞被清除中起着关键作用^[2]。红细胞唾

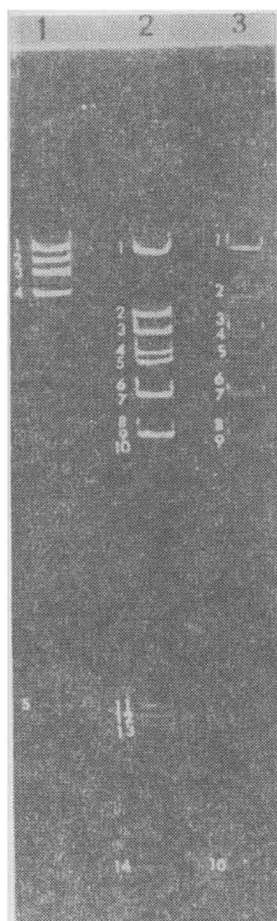


图 1 ArNPV-DNA 的限制性内切酶酶切后的电泳图(一)

1. ArNPV-DNA + BglII。2. ArNPV-DNA + (BglII + EcoRI)。3. ArNPV-DNA + EcoRI。

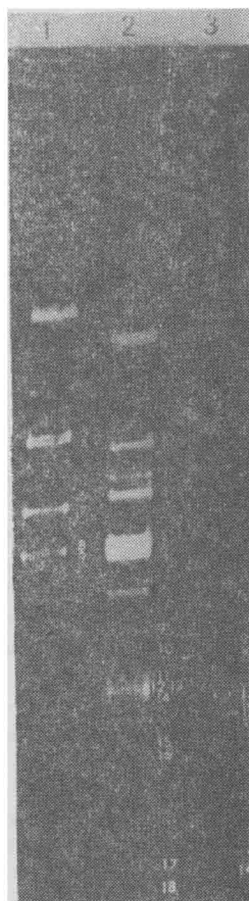


图 2 ArNPV-DNA 的限制性内切酶酶切后的电泳图(二)

1. ArNPV-DNA + EcoRI
2. ArNPV-DNA (EcoRI + KpnI)。
3. ArNPV-DNA + KpnI。

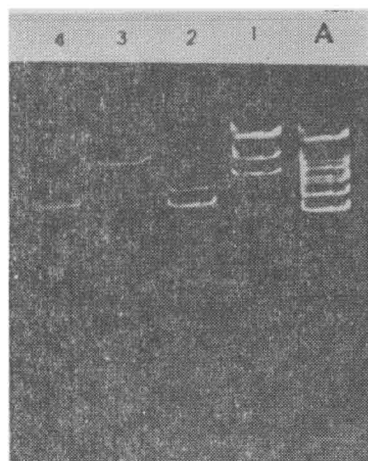


图 3 ArNPV-DNA 的 BglII 片段用 EcoRI 酶切后的电泳结果

A 为 ArNPV-DNA + (BglII + EcoRI); 1,2,3,4 分别为 B1、B2、B3、B4。

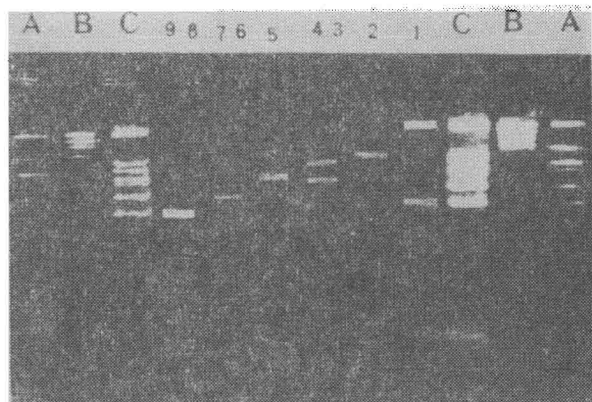


图 4 ArNPV-DNA 的 EcoRI 片段用 BglII 酶切后的电泳结果

A: ArNPV-DNA + EcoRI B: ArNPV-DNA + BglII C: ArNPV-DNA + (BglII + EcoRI) 1—9 代表 E1, E2, ..., E9; (3, 4)、(6, 7) 和 (8, 9) 同从凝胶上取出再酶切。

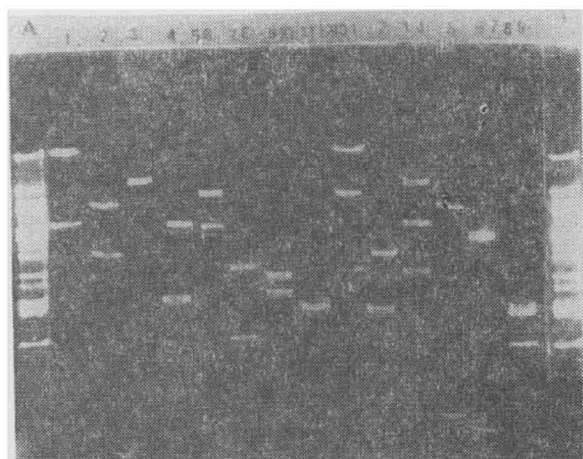


图 5 ArNPV-DNA 经 EcoRI 与 KpnI 交叉酶切后的电泳结果

1, A 为 ArNPV-DNA + (KpnI + EcoRI) 2. 1—13 表示 K1、K2、K3.....K13; (5, 6) 表示两个片段一起被 EcoRI 酶切, 下同。3. 1—9 表示 E1, E2, E3.....E9。

* 左右两组分别为用一步法和 Greene 法制备的 PstI。每组从左至右有四个样品, 它们依次为: 1. pBR322DNA, 2. pBR322DNA + PstI, 3. 样品 2 + T₄DNA 连接酶。4. 样品 3 + PstI。

“一步肝素琼脂糖亲和层析法分离纯化限制性核酸内切酶 PstI 一文的图 1、2”



图 1 过量酶切反应与常量酶切反应的电泳图谱比较

自上而下依次为一步法制备的酶样 3 微升和 60 微升的酶切图谱与 Greene 法制备的酶样 3 微升和 60 微升的酶切图谱



图 2 pBR322DNA 的酶切-连接-重切实验*