

# 几种限制性核酸内切酶的纯化\*

刘金富 朱丽华 叶增产 匡达人

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

通常所说的限制性内切酶或限制酶实际上是指 II 类脱氧核糖核酸内切酶。此类酶能够识别双链 DNA 分子上的特定核苷酸顺序,并在该特定的顺序处将 DNA 的双链切断。各种不同的限制酶都有它自己的识别顺序,所产生的片段的末端也不尽相同。自从 Smith 于 1970 年从 *Haemophilus influenzae* Rd 分离了顺序专一性限制酶 Hind II<sup>(1)</sup>以后至 1979 年底,已在 159 株微生物中找到了 110 种识别顺序不同的专一性限制酶<sup>[9]</sup>。它们在遗传工程和基因结构与功能研究方面的广泛应用,推动了生物学研究的迅速发展。与此同时,限制酶的提纯方法也在不断改进。虽然各种酶的纯化步骤有异,但一般都是在得到粗提物后首先将其中的核酸除去,然后再进行纯化。如 Smith 用 Bio-Gel A0.5 柱去核酸后进行磷酸纤维素柱层析<sup>(1)</sup>、Wilson 等用硫酸链霉素去核酸后进行磷酸纤维素和 DEAE-纤维素柱层析<sup>(2)</sup>、Bickle 等用聚乙烯亚胺沉淀去核酸后进行肝素-琼脂糖亲和层析<sup>(3)</sup>、George 等用硫酸链霉素或聚乙二醇沉淀核酸后进行 Cibacron Blue F<sub>3</sub>GA 亲和层析<sup>(4)</sup>等都得到了没有其他非专一性核酸酶和磷酸单脂酶的纯制品。后来 Greene 等调节粗提液中的 NaCl 浓度以使核酸不与磷酸纤维素结合,直接进行磷酸纤维素柱和羟基磷灰石柱层析<sup>(5)</sup>,以及 Baksi 等只进行 Cibacron Blue F<sub>3</sub>GA-琼脂糖亲和层析<sup>(6)</sup>,省去了除去核酸的步骤,也都得到了满意的结果。我们参照 Greene 等人的方法也从 *Escherichia coli* (pMB4)、*Haemophilus Parainfluenzae*、*Providencia Stuartii* 164 和 *Bacillus amyloliquefaciens*

*H* 四种菌株中分别纯化了 EcoR I、Hpa II、Pst I 和 Bam H I 四种限制性内切酶,其中 Hpa II 在国内尚未见到报道。这些酶制品的纯度至少可达到用以制作基因物理谱和 DNA 重组的要求。

## 材料与 方法

**菌种** *Escherichia coli* (pMB4)、*Providencia stuartii* 164 和 *Bacillus amyloliquefaciens* H 由生物物理研究所陈受宜同志赠送。*Haemophilus parainfluenzae* 由生物化学研究所周光宇同志赠送。

### 一、菌体培养和收集

***Haemophilus Parainfluenzae* 培养基** 每升培养基含 250 克牛心的浸出液、200 克牛脑的浸出液、蛋白胨 11 克、葡萄糖 2 克、NaCl 5 克和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 克,用 NaOH 调至 pH7.6,并补充辅酶 I 至 2 毫克/升和氯高铁血红素(Hemin)10 毫克/升(辅酶 I 用重蒸水配制,细菌漏斗过滤灭菌,储存于 -20℃ 备用;氯高铁血红素配于 95% 乙二醇中,于 65℃ 加热 15 分钟,储存于 4℃ 备用)。

***Providencia stuartii* 164 培养基** 每升含蛋白胨 11 克、牛肉膏 11 克、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 11.64 克、K-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.15 克和甘油 4 克,用 NaOH 调至 pH7.0—7.2。

***Bacillus amyloliquefaciens* H 和 *Escherichia coli* (pMB4) 培养基** 每升含蛋白胨 11 克、牛肉膏 22.5 克、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 11.64 克、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.15 克和葡萄糖 4 克,用 NaOH 调至 pH7.5。

上述各菌都在 37℃ 下培养至对数生长期晚期时以离心(2600×g)收集菌体,并用 0.033M Tris-HCl (pH7.8)缓冲液洗涤 2—3 次后置 -20℃ 待用。

\* 本工作中,北京大学毕业实习生李银太和上海东海制药厂进修生郭鹏达参加了酶的纯化;本室研究生居其达提供 λDNA,何俊坤同志提供 pBR322 质粒及重组实验图 4,作者一并表示感谢。

## 二、酶的抽提和纯化

1. **细胞的破碎** 每克菌体加 4 毫升抽提缓冲液 [0.01M  $K_2HPO_4-KH_2PO_4$  (pH7.0)、7mM 巯基乙醇、1mM  $NaNO_3$ 、1mM EDTA、0.2M NaCl 和 25 微克/毫升苯甲基磺酰氟(PMSF)], 使冻结的菌体熔化。此时 *E. coli* 菌可直接进行超声破碎。其余三种菌对超声不敏感, 需在超声破碎前把细菌悬液置于冰浴中加溶菌酶处理(100 微克/毫升), 然后在 MSE 超声仪上以电流 1.7 安培进行超声处理, 每次处理 30—60 秒钟。超声处理的总时间和溶菌酶处理的时间见表 1。在整个超声过程中需维持温度 10℃ 以下。

经超声处理后的悬液以 100000 × g 离心 30—60 分钟, 上清液即为粗酶液。然后进行柱层析纯化。

2. **磷酸纤维素柱层析** 磷酸纤维素 (whatman p11) 按常规处理装柱 (10—15 克菌体的酶抽提液用 1.2 × 45 厘米的柱), 经抽提缓冲液平衡后, 将前述上清液加到此柱上, 上柱流速为 20—25 毫升/小时。样

表 1 细胞破碎的条件

菌种	溶菌酶处理时间 (分钟)	超声时间 (分钟)
<i>Escherichia coli</i> (pMB4)	—	4
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	15	2
<i>Providencia stuartii</i> 164	30	12
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	15	4

品上完后, 用大约 4—5 倍柱体积的抽提缓冲液洗柱, 直至流出液  $A_{280} < 0.05$  为止。再以 NaCl-抽提缓冲液 (总量 300 毫升) 进行梯度洗脱。各种酶所用 NaCl 梯度见表 2。洗脱速度为 3—4 毫升/10 分钟。然后合并并将底物完全降解的含酶活力部分, 再进行羟基磷

表 2 酶在柱层析中被洗出时梯度洗脱液中的盐浓度

酶	磷酸纤维素柱层析		羟基磷灰石柱层析	
	NaCl 梯度 (M)	酶洗出时 NaCl 浓度 (M)	磷酸钾梯度 (M)	酶洗出时磷酸钾浓度 (M)
Hpa II	0.2—1.0	0.25	0.01—0.5	0.20
Pst I	0.2—0.6	0.30	0.01—0.4	0.25
BamH I	0.2—0.6	0.38	0.01—0.25	0.08
EcoR I	0.2—0.8	0.60	0.01—0.45	0.20

表 3 酶的测活系统和得率

酶	测 活			得率: 酶单位/每克细胞 (湿重)
	缓冲液*	磷酸纤维素柱和羟基磷灰石柱层析洗出液 (微升)	最终酶制品 (微升)	
Hpa II	666 + 0.05M NaCl	2	0.5—2	2130
Pst I	TM	2	0.5—2	1600—3450
BamH I	TM	2	0.5—2	1500—1900
EcoR I	TM + 0.1M NaCl	2	0.05—1	21600

\* 666 缓冲液: Tris-HCl, 6mM,  $MgCl_2$ , 6mM, 巯基乙醇, 6mM (PH7.5)  
TM 缓冲液: Tris-HCl, 0.1M,  $MgCl_2$ , 10mM (PH7.4—7.5)

灰石柱层析。

3. **羟基磷灰石柱层析** 羟基磷灰石按照 Liven 法<sup>(7)</sup>制备。上述合并后的酶液用不含 MaCl 的抽提缓冲液稀释至 NaCl 浓度为 0.2M, 加到经抽提缓冲液平衡过的羟基磷灰石柱上 (0.6 × 10 厘米), 流速为 15—20 毫升/小时。然后用 4—5 倍柱体积的抽提缓冲液洗涤, 再用磷酸钾—抽提缓冲液 (总量 160 毫升) 进行梯度洗脱。洗脱速度为 3 毫升/15 分钟。各种酶

所用的磷酸钾 ( $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ , pH7.0) 浓度见表 2。然后合并并将所有底物完全降解的含酶活力部分, 对含 50% 甘油、20mM  $K_2HPO_4-KH_2PO_4$  (pH7.6)、1mM EDTA、1mM  $NaNO_3$ 、7mM 巯基乙醇、0.2M NaCl 和 25 微克/毫升 PMSF 的缓冲液透析。此即为最终的酶制品, 保存于 -20℃。

## 三、酶的活力测定

酶的测活系统见表 3。反应总体积为 20 微升, 其

中含  $\lambda$ DNA 0.75 微克, 缓冲液和酶。在 37°C 下保温 60 分钟后, 加入 1/5 反应体积的溴酚蓝混合液 (EDTA 0.19%, 蔗糖 50% 和溴酚蓝 0.05%)。然后进行琼脂糖凝胶 (含溴化乙啶 40 微克/100 毫升) 垂直平板电泳。凝胶浓度为 0.7% 或 1%; 电泳缓冲液为 Tris-HAC 40mM、NaCl 5mM 和 EDTA 1mM, pH8.0; 电压 9 伏/厘米; 电泳时间 1.5—2 小时。电泳完毕后, 在紫外灯下观察荧光带或照相。酶活力单位定为: 在上述测活条件下, 完全降解 1 微克  $\lambda$ DNA 所需要的酶量即为 1 个酶单位。

## 结果与讨论

### 一、酶的纯化

四种酶在磷酸纤维素柱和羟基磷灰石柱上进行梯度洗脱时被洗出的盐浓度见表 2, 基本上与 Greene 的报道相符合。只是 Hpa II 和 Pst I 在磷酸纤维素柱上被洗下时的 NaCl 浓度偏低。另外, 在 *Haemophilus parainfluenzae* 中有 Hpa I 和 Hpa II。由于 Hpa I 的含量极低, 约为 Hpa II 含量的五十分之一, 而本实验纯化酶的规模又较小, 所以对 Hpa I 未作处理。

在羟基磷灰石柱层析过程中酶的失活比较严重, 作为成品的 Bam H I 活力的回收只有 10—20%, 甚至更低些。不过它去除杂蛋白的能力甚强。在磷酸纤维素柱上洗下来的含酶活力部分的蛋白峰很高, 峰顶的  $A_{280}$  可达 3, 杂蛋白量很大, 但经羟基磷灰石柱层析时, 绝大部分杂蛋白不被吸附, 酶活力部分的蛋白峰的  $A_{280}$  最高值小于 0.05, 酶纯度大大提高。其他酶都在不同程度上有上述类似情况。因此, 若将粗抽提物中核酸除去后, 直接就上羟基磷灰石柱层析以纯化某些限制酶也许是可行的。

### 二、酶的得率

酶的得率见表 3。从不同次培养的 *Providencia stuartii* 164 中制备的 Pst I 酶的收得率可差一倍以上。而从同一次培养的 *Bacillus amyloliquefaciens* H 中不同次制备的 Bam H I 的收得率差别不大, 表明酶的产量与菌体培养有关, 而与本实验中纯化酶的过程关系不大。

### 三、酶的鉴定

Sutcliffe 等已精确地制作了 pBR 322 质

粒的限制性内切酶物理图谱<sup>(8)</sup>, 这对本实验制备的四种酶的鉴定提供了方便。如果这些酶制品中有其他不许可量的内切酶或外切酶污染, 则 pBR 322 质粒或 pBR 322 质粒的特异片段被它们降解后会在凝胶电泳上显示出不应有的区带。

Bam H I 和 Eco R I 在 pBR 322 上都只各有一个切点。用 Bam H I 和 Eco R I 分别单独降解 pBR 322, 只能使 pBR 322 开环成直线; 而用这两种酶同时降解此质粒, 就能产生两个片段。结果见图 1。



图 1 Bam H I 和 Eco R I 降解 pBR 322 的琼脂糖 (1%) 平板电泳

1. Bam H I 降解
2. Bam H I + Eco R I 降解
3. Eco R I 降解
4. 未降解的 pBR 322 (三条带分别为二聚体、开环和超螺旋 DNA)

Pst I 在 pBR 322 上也只有一个切点。pBR 322 用 Eco R I 降解后, 将其末端用  $^{32}$ P 标记。然后用 Pst I 降解, 则可产生一端带  $^{32}$ P 标记的长度为 748 个碱基对的片段。这个一端标记的片段再用 Hpa II 部分降解, 可产生一端带标记的, 长度分别为 748、701 和 412 碱基对的三个片段。结果见凝胶电泳放射自显影图 2。

Hpa II 在 pBR 322 上的切点比较多。但是 Hinf I 内切酶降解 pBR 322 可得到碱基对为 220 和 221 的两个片段 (分别称为 7A 和 7B)。7A 上有两个 Hpa II 切点, 7B 上有一个 Hpa II



图2 由EcoR I和Pst I酶切pBR 322产生的一端带<sup>32</sup>P标记的小片段经Hpa II部分降解后的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳放射自显影

胶浓度4%；胶板28×15×0.3厘米  
电泳缓冲液：0.04M Tris-HAC；  
0.02M NaAc, 0.001M EDTA, 以HAC调至pH8.0；电压4伏/厘米；电泳时间16小时

切点。若这两个片段的两端都用<sup>32</sup>P标记，然后用Hpa II同时完全降解它们，则可产生一端带标记的有40、62、82和181碱基对的四个片段以及一个没有<sup>32</sup>P标记的76碱基对的片段。Hpa II切这两个特异片段的的结果见图3。



图3 Hpa II降解7A\*和7B\*的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳的放射自显影

胶浓度8%；胶板28×15×0.08厘米  
电泳缓冲液 Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05M；EDTA 0.001M pH8.3

电压10伏/厘米，电泳时间5小时

\* 由Heidelberg大学H. schaller教授赠送

从图1、2和3来看，均达到了对酶纯度鉴定的要求。

限制酶的纯度还可以用DNA的重组实验来验证。我们用pBR 322质粒与蟾蜍总DNA经Pst I酶切后进行重组制作过蟾蜍总DNA的

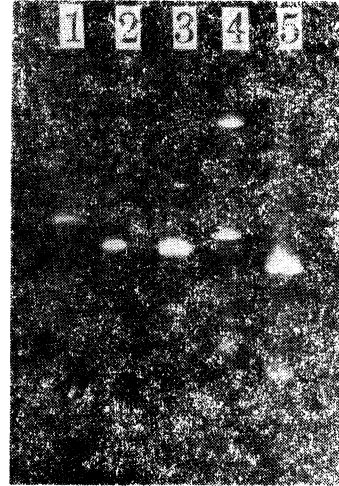


图4 重组DNA的琼脂糖(0.7%)凝胶柱电泳(柱:10×0.5厘米,其他条件同图3)

1. EcoR I酶切的重组质粒
2. Pst I酶切的pBR 322
3. Pst I酶切的重组质粒
4. 重组质粒
5. pBR 322

基因库。图4中第4条胶和第5条胶分别是重组质粒和pBR 322质粒的电泳位置。可见重组质粒的分子量大于pBR 322。重组质粒再经Pst I酶切后(见图4中第3条胶)则出现了与第2条胶Pst I处理过的pBR 322一样的带，说明分子量较大的重组质粒被切去了一段。此外在第3条胶上还应看到另一条插入片段的带，但可能因为插入片段较小而泳动出胶外了。不过从下面的事实可进一步说明：第1条胶是EcoR I处理过的重组质粒，它的分子量比Pst I处理过的pBR 322大，因为EcoR I切重组质粒不会把插入片段切掉。这结果与第4第5条胶的结果一致。重组质粒上存在一段外来DNA是确信无疑的。

#### 参 考 文 献

- [1] Kelly, T. J. and H. O. Smith, 1970, *J. Mol. Biol.*, 51: 379—409.
- [2] Wilson, G. A. and F. E. Young, 1975, *J. Mol. Biol.*, 97: 123—125.
- [3] Bickle, T. A. et al, 1977, *Nucleic Acids Res.*, 4: 2561—2572.
- [4] George, J. et al, 1978, *Nucleic Acids Res.*, 5: 2223—2232.
- [5] Greene, P. J. et al, 1978, *Nucleic Acids*