

E. coli 外切核酸酶 III 的提取和纯化*

陈乐容 冯锦明 王妙珠 朱心良

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

E. coli 外切核酸酶 III (EXO III) 有四种功能。第一, 从双链 DNA 3' 端向 5' 端逐个水解磷酸二酯键, 释放出 5'-单核苷酸, 因此是 3'→5' 的外切核酸酶。第二, 水解 DNA 的 3' 末端磷酸单酯键, 释放出无机磷酸。第三, 它可以在 DNA 无嘌呤区段上水解磷酸二酯键, 因而又是无嘌呤或无嘧啶内切核酸酶。最后, 对于 DNA-RNA 杂种分子则首先降解 RNA, 因而具有核酸酶 H 的作用^[1]。目前 EXO III 主要用于制备双链 DNA 探针和测定 DNA 序列^[2]。*E. coli* W 9138 菌株中的 pSGR 3 质粒带有 EXO III 结构基因, 在适宜条件下, 可成倍地增加 EXO III 的量。本文介绍以 pSGR 3-EXO III 重组质粒为材料抽提并纯化 EXO III 的过程, 并与 New England Biolabs (Biolabs) 和 Bethesda Research Laboratories(BRL) 同类产品进行比较。

材 料 和 方 法

一、材料

菌种 *E. coli* W 9138 由 Ray Wu 赠送。BRL 和 Biolabs 的 EXO III 由郭礼和提供。 λ DNA 由居其达提供。超声处理的小牛胸腺 DNA、酵母 tRNA^[3]、pBR 322 和 p₆Y^[4,5] 均为本实验室制备。聚乙撑亚胺 (Polyethyleneimine) 为 BDH 产品。磷酸纤维素 (P1) 和二乙氨乙基纤维素 (DE52) 为 Whatman 产品。

二、外切酶活力测定

主要按 Rogers^[1] 的方法进行。概括如下: 测活反应液 400 微升, [³H]-T7DNA 用 20 微克经 MSE-150 超声处理 90 秒的小牛胸腺 DNA 代替。在加入 EXO III 后于 37°C 温育 30 分钟, 加 200 微升 (2.5 毫克/毫升) 冰冷鱼精 DNA 作为载体, 加 600 微升 2.1 N 冰冷过氯酸, 在 0°C 放置 10 分钟, 离心 10 分钟 (12000 转/分), 上清液用水稀释 5—6 倍后, 测 A₂₆₀ 毫微米光吸收。以四种脱氧核苷酸在 pH 2 时的平均克分子消光系数 A₂₆₀ = 10, 4 × 10³ 来计算反应液中已释放的酸溶性核苷

酸克分子数。在上述测活条件下, 每 30 分钟释放一个核苷酸分子的酶量定为一个酶单位。每毫克蛋白中酶的活力单位称为比活。蛋白含量按 Layne^[6] 法测定。

三、EXO III 分子量测定

EXO III 与其他标准蛋白质一起按 Laemmli^[7] 法在 13% SDS-PAGE 上分析。所得数据用 Sharp PC-1500 微型电子计算机处理。从标准蛋白质的迁移距离和其分子量的对数值得到回归直线, 用测得的 EXO III 迁移距离与之比较, 求出 EXO III 分子量。

四、污染的内切核酸酶的检查

参照 Guo 等^[2] 方法将 6 微克 pBR 322 或 20 微克 p₆Y 用 EcoRI 切成线状, 与 1900 单位 EXO III 在 23°C 温育 (总体积 50 微升)。在一定的时间间隔取样 10 微升, 保存在 0°C, 然后作 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析。

五、菌体培养

按 Rogers^[1] 制备培养基: 每升培养基中含 20 毫升甘油/37.5 克胰酶水解冻/22 克酵母抽提物/3 克氯化钠/1 克氯化钾/3 克牛肉膏和 100 毫升分开消毒的 1 M 磷酸钾缓冲液, pH 7.6。种子培养液在 32°C 振荡培养过夜。第二天按 0.5% 接种量转移至上海医械四厂 6 立升玻璃自动发酵罐中, 通入纯氧, 当菌液的 A₅₂₅ 毫微米达到 3 时, 将培养液升温到 42°C, 20 分钟后, 再降到 37°C, 继续培养到菌液的 A₅₂₅ 毫微米为 31。放出罐中菌液, 置冰浴中冷却后离心 10 分钟 (8000 转/分)。收获的菌体保存于 -20°C。

六、纯化过程

纯化过程按 Rogers^[1] 方法进行。首先将菌体悬浮于 50 mM Tris-HCl pH 8.0/50 mM KCl/1 mM EDTA/0.002% PMSF (苯甲基磺酰氟化物) 中, 经超声破碎处理, 获得菌体抽提液。2. 加入 1/11.5 体积的 5% 聚乙撑亚胺 (HCl 调节到 pH 7.6), 获得聚乙撑亚胺分级溶液。3. 50%—70% 硫酸铵饱和度时的沉淀部分溶解于 10 mM 磷酸钾 pH 6.5/1 mM β-巯基乙醇/0.002% PMSF 中, 获硫酸铵分级部分。4. 酶液上样于经 20 mM 磷酸钾 pH 6.5/1 mM β-巯基乙醇平衡的磷酸

* 发酵罐由上海市农药研究所提供, 特此致谢。

纤维素(P1)柱(2.5×20厘米)后,先以柱平衡液淋洗,再以600毫升柱平衡液对600毫升300 mM磷酸钾pH 6.5/1 mMβ-巯基乙醇进行线性梯度洗脱。第二个A₂₈₀毫微米光吸收峰为EXOⅢ活力部分。5. 上述活力部分上样于DE 52柱(0.9×8厘米,并经20 mM Tris-HCl pH 8.0/1 mMβ-巯基乙醇平衡),先以50 mM Tris-HCl pH 8.0/0.1 mM二硫苏糖醇(DTT)淋洗,再用30毫升50 mM Tris-HCl pH 8.0/0.1 mM DTT对30毫升50 mM Tris-HCl pH 8.0/0.1 mM DTT/200 mM KCl作线性梯度洗脱。合并第二个A₂₈₀毫微米光吸收峰。各步用测定EXOⅢ活力跟踪。最后制品中加入等体积甘油,使其浓度达50%。保存于-20℃或+80℃冰箱中。

结果和讨论

在菌体培养液中用甘油代替常规使用的葡萄糖作为碳源,同时又含有100 mM磷酸缓冲液,因此在整个培养过程中能保持pH值恒定,有利于细菌的生长。后期通入纯氧,可促使细菌高密度生长。由于试验中纯氧用罄,中途停止培养,故细菌的最终密度只达到A₅₂₅毫微米=31。从3.5升培养液中收获菌体105克。我们认为培养时可先通入过滤消毒的空气至A₅₂₅=3—5,然后再接入纯氧,这样既可节约纯氧,又可获得更多的菌体。

用MSE-150超声破碎菌体,制备抽提液时,样品以维持在5℃以下为宜。抽提液中加入聚乙撑亚胺,可除去大部分DNA。磷酸纤维素柱层析几乎除去了所有其他非EXOⅢ蛋白质,提高EXOⅢ纯度达22倍,因此是关键性的一步。继之通过DE 52柱层析,进行浓缩的同时,也分离掉一个杂蛋白峰,EXOⅢ活力出现在第二个蛋白吸收峰。所以DE 52柱层析亦具有一定的纯化作用。从30克菌体可获得EXOⅢ 1.27×10^7 活力单位,比活为 3.06×10^5 单位/毫克蛋白。总活力的回收和最终产品的比活均优于文献报道^[1]。各步纯化效果列于表1。

国外一般采用^[3H]-T7 DNA作为EXOⅢ的测活底物。我们受实验室条件限制,不能对天然DNA进行同位素标记,因而采用超声处理的小牛胸腺DNA作为底物,测定在EXOⅢ

表1 EXOⅢ的纯化

纯化的各个阶段	Σ蛋白(毫克)	Σ活力单位×10 ⁻⁷	比活×10 ⁻³	活力回收%	纯化倍数
菌体抽提液	3654	2.1	5.8	100	
聚乙撑亚胺级分	1418	1.5	10.6	71	1.81
50-70%硫酸铵级分	574	1.3	22.5	61.9	3.88
磷酸纤维素层析峰	76	1.0*	131	47.6	22.58
二乙氨基纤维素层析峰	41.6	1.27	306	60.4	52.76

* 由于Σ活力是在实验最终一起测定,因此贮存时间较长。这部分酶液中又不含蛋白保护剂,所以测得的Σ活力偏低。

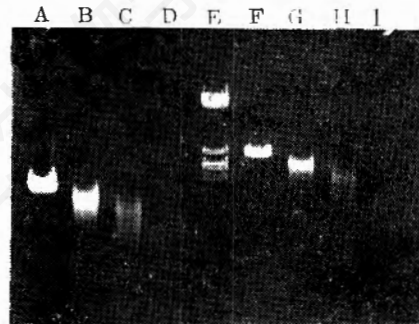


图1 线性pBR 322和p6Y DNA分子经EXOⅢ作用不同时间间隔的琼脂糖凝胶电泳图。

电泳缓冲液: 40 mM Tris/20 mM NaAC/1 mM EDTA pH 8.0。

电泳条件: 80V 2.5小时。A-D和F-I分别为pBR 322和p6Y与EXOⅢ温育0、30、60、90分钟后。E为EcoRI酶切的λ DNA。

作用后所释放的酸溶性核苷酸量,确定酶活力单位。我们也曾用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pWR 13}$ 作为底物进行酶活测定,所得结果与上述测活方法相仿。因此,用超声处理的DNA作为测活底物,虽然简化了底物制备的手续,但同样可以得到满意的结果。

EXOⅢ分别与EcoRI切割的线性pBR 322和p6Y DNA一起温育,然后在琼脂糖凝胶上作电泳检查,可以看到随着温育时间的延长,线性DNA链不断被缩短,而看不到有显著内切酶污染(见图1)。

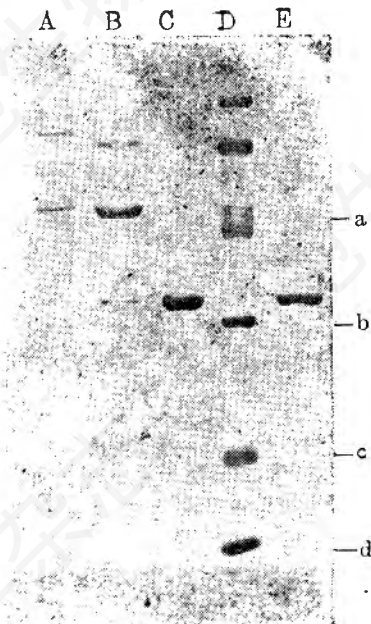


图2 13% SDS-PAGE 鉴定 EXO_{III} 纯度。

电泳条件：堆积胶 15mA。分离胶 18mA 5 小时。
A. 细胞抽提液。B. Biolabs 的 EXO_{III}。C. 纯化的 EXO_{III} 产品。D. 标准蛋白质。其中 a. 卵清蛋白；b. 碳酸酐酶；c. 大豆胰蛋白酶抑制剂；d. 乳清蛋白。E. BRL 的 EXO_{III}。

表2 13% SDS-PAGE 后蛋白迁移距离

	EXO _{III}	卵清蛋白	碳酸酐酶	大豆胰蛋白酶抑制剂	乳清蛋白
蛋白质分子量 × 10 ⁻⁴	3.26	4.3	3.0	2.01	1.44
蛋白质迁移距离(厘米)	4.95	3.5	5.2	7.8	9.6

从图2中可以看到纯化后的 EXO_{III} 仅一条带，已达到电泳纯，和 BRL 产品相当，并优于 Biolabs 产品。EXO_{III} 和标准蛋白质经 13% SDS-PAGE 后，它们的迁移距离分别列于表2。表2数据经微型电子计算机处理后，得到蛋白质迁移距离对相应分子量对数值间的回归直线(图3)，其相关性为 -0.998。因而计算出的 EXO_{III} 分子量 × 10⁻⁴ = 3.26，误差较小。此分子量的数值虽比 Weiss^[8]测得的 EXO_{III} 分子量(2.8 × 10⁻⁴)稍大，但电泳图显示我们的产品与 BRL 或 Biolabs 从携带 pSGR 3 的 *E. coli*

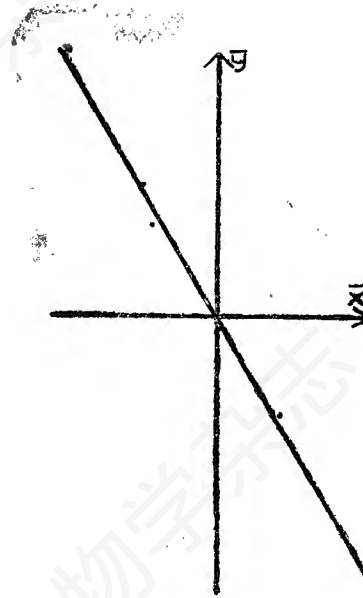


图3 标准蛋白质经 13% SDS-PAGE 后的迁移距离对相应分子量 × 10⁻⁴ 对数值间的回归直线

x 轴：蛋白质的迁移距离(厘米)，y 轴：分子量 × 10⁻⁴ 对数值。相关性 = -0.998。回归系数：斜率 A = -7.617 × 10⁻²，截距 B = 8.901 × 10⁻¹。估计值 x = 4.95 (EXO_{III} 迁移距离)，y = 0.513，EXO_{III} 分子量 × 10⁻⁴ = 3.26。本图由 CE-150 接口的打印机作出

中提取的产品的电泳位置相一致(图2)。推测可能是由于 EXO_{III} 结构基因被重组到 pSGR 3 后造成的。

参 考 文 献

- [1] Rogers, S. G. and B. Weiss, 1980, *Methods in enzymology*, 65: 201—211.
- [2] Guo, L. -H. and R. Wu, 1983, *Methods in Enzymology*, 100: 60—96.
- [3] Holley, R. W., 1963, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 10: 186—188.
- [4] Birnboim, H. C. and J. Doly., 1979, *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513—1523.
- [5] Summerton, J., et al., 1983, *Anal. Biochem.* 133: 79—84.
- [6] Layne, E., 1957, *Methods in Enzymology*, 3: 451—454.
- [7] Laemmli, U. K., 1970, *Nature (London)*, 227: 680—685.
- [8] Weiss, B., 1976, *J. Biol. Chem.*, 251: 1896—1901.