

# 限制性内切酶 Bgl I 和 Bgl II 的提纯比较

张静娟 马德钦 汪大受

(中国科学院微生物研究所, 北京)

II 类限制性内切酶 Bgl I 和 Bgl II 产自圆球芽孢杆菌 (*Bacillus globigii*)。对它们的提纯, 已有报道<sup>[1-4]</sup>。我们采用只产 Bgl I 及同时产 Bgl I 及 Bgl II 的菌株作为实验材料, 比较了磷酸纤维素 P11 柱和羟基磷灰石柱法及两种亲合色谱法(肝素-琼脂糖凝胶柱法和汽巴蓝-琼脂糖凝胶柱法)的提纯效果, 现将结果报告如下。

## 材料与方 法

### 一、菌株

圆球芽孢杆菌, *Migula* 菌株可产生 Bgl I 和 Bgl II 两种限制性内切酶, 由中国科学院上海生物化学研究所提供, 2204 菌株只产生 Bgl I, 由 Spizizen 教授赠予。

### 二、培养基

精解蛋白胨 11g, 甘油 4ml, 1M  $K_2HPO_4$  51ml 和 1M  $KH_2PO_4$  15.6ml, 用新鲜牛肉汁 1000ml 溶解, pH7.0。磷酸盐单独灭菌。

### 三、缓冲液

1. S 缓冲液: 25mM pH7.3 磷酸钾缓冲液, 2mM 巯基乙醇, 1mM  $Na_2$ -EDTA, 1mM  $NaN_3$ ;

2. HTP 缓冲液: 25mM pH7.0 磷酸钾缓冲液, 10mM 巯基乙醇, 1mM  $Na_2$ -EDTA, 1mM  $NaN_3$ ;

3. 肝素柱缓冲液: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM  $MgCl_2$ , 7mM 巯基乙醇和 0.2M  $NaCl$ ;

4. 汽巴蓝 (Cibacron blue) 柱缓冲液:

20mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM  $MgCl_2$ , 10mM 巯基乙醇;

5. 电泳缓冲液: 40mM Tris, 20mM NaAC, 2mM  $Na_2$ -EDTA, 用醋酸调节 pH 至 8.0。

### 四、提纯步骤

3 L 三角瓶装 500ml 培养基, 接种后 37°C 旋转摇床培养 15 小时。在 4°C 离心 (5000rpm) 15 分钟收集菌体。1L 培养液可得菌体约 11.5g。将菌体悬浮于 S 缓冲液中, 超声破碎 5—7 分钟, 每处理 1 分钟停 1 分钟。在 4°C 离心 ( $10^5g$ ) 90 分钟, 上清液即为粗酶液。

粗酶液用以下方法处理。

1. 磷酸纤维素 P11 柱和羟基磷灰石柱色谱分离<sup>[5]</sup>: 粗酶液通过边搅拌边逐滴加入 25% 硫酸链霉素溶液, 每 10ml 粗酶液加 1.8ml, 以除去核酸。在 4°C 以 10000 rpm 离心 15 分钟, 弃去沉淀。上清液中加入  $(NH_4)_2SO_4$  至 70% 饱和度, 4°C, 10000 rpm 离心 15 分钟, 弃去上清液。将沉淀溶于少量 S 缓冲液中, 用同样缓冲液透析除去  $(NH_4)_2SO_4$  后, 上柱。

2. 汽巴蓝-琼脂糖凝胶柱色谱分离: 按 George 等<sup>[6]</sup>的方法。汽巴蓝为 Pierce Chemical Company 出品, 溴化氰活化的 Sepharose 4B 为 Pharmacia 出品。

3. 肝素-琼脂糖凝胶柱色谱分离: 按 Bickle 等<sup>[7]</sup>的方法。肝素钠为郑州市畜产综合加工厂出品。

### 五、酶活测定

反应体系为 1  $\mu g$   $\lambda$  DNA\*, 50  $\mu l$  汽巴蓝柱

\* 按放世州等的方法制备。

缓冲液。37℃ 保温 1 小时。将 1 $\mu$ g  $\lambda$  DNA 完全水解定为 1 个活力单位 (u)。水解样品用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

六、蛋白质测定

采用 Layne 的方法<sup>[6]</sup>。

结 果

一、Bgl I 和 Bgl II 在肝素-琼脂糖凝胶柱上的色谱分布

见图 1。两种酶基本上可以被分离开。提

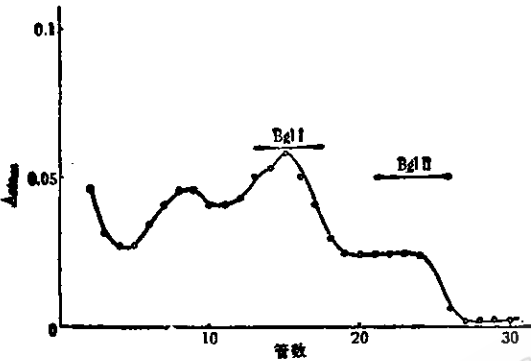


图 1 Bgl I 和 Bgl II 在肝素-琼脂糖凝胶柱上的色谱图。柱为 1.2 $\times$ 6.5 (cm)，先用肝素柱缓冲液平衡。样品上柱后用 0.2—0.7N NaCl 溶液作梯度洗脱。洗脱速度 12 ml/h。每管 6ml，操作温度：4℃。

纯效率见表 1。

表 1 Bgl I 和 Bgl II 通过肝素柱的提纯效率

样 品	总蛋白量 (mg)	总酶活 (u)	比活 u/mg 蛋白	回收率 (%)	提纯倍数
Bgl I (上柱前)	199.3	50000	250	100	1
Bgl I + Bgl II (上柱前)	199.3	250000	1254	100	1
Bgl I (下柱后)	1.227	9000	7335	18.0	29.2
Bgl II (下柱后)	0.625	36000	57600	14.4	45.9

二、三种方法提纯 Bgl II 的效率比较

23g 菌体用超声破碎后分成三分，用三种色谱柱提纯。结果见图 2—4，其效率见表 2 和图 5。

表 2 三种色谱方法提纯 Bgl II 效果的比较

样品	总蛋白质 (mg)	总酶活 (u)	比活 (u/mg 蛋白质)	回收率 (%)	提纯倍数
粗酶液	446.8	7000	15.7	100	1
磷酸纤维素 P11 柱 + 羟基磷灰石柱	4.34	5200	1198.7	74.3	76.4
汽巴蓝-琼脂糖凝胶柱	0.33	1400	4204.7	16.2	267.7
肝素-琼脂糖凝胶柱	1.52	3400	2236.8	48.5	142.5

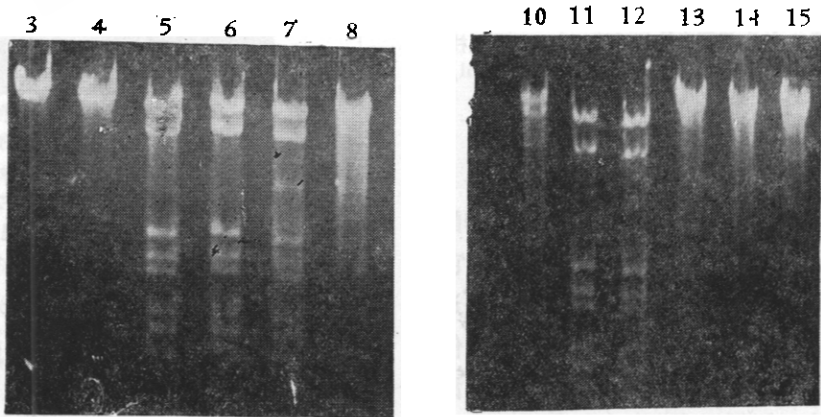


图 2 磷酸纤维素 P11 柱(左)和羟基磷灰石柱(右)色谱 左柱(1.6 $\times$ 12cm)先用 S 缓冲液平衡，样品上柱后用 0.1—0.8N NaCl 溶液梯度洗脱，流速 30ml/h，每管收集 10ml；右柱样品为经左柱分离出的 Bgl II 活力峰部分，柱先用 HTP 缓冲液平衡，样品上柱后用 10—500 mM 磷酸钾缓冲液进行梯度洗脱，流速 18ml/h，每管收集 4.5ml。操作温度均为 4℃。

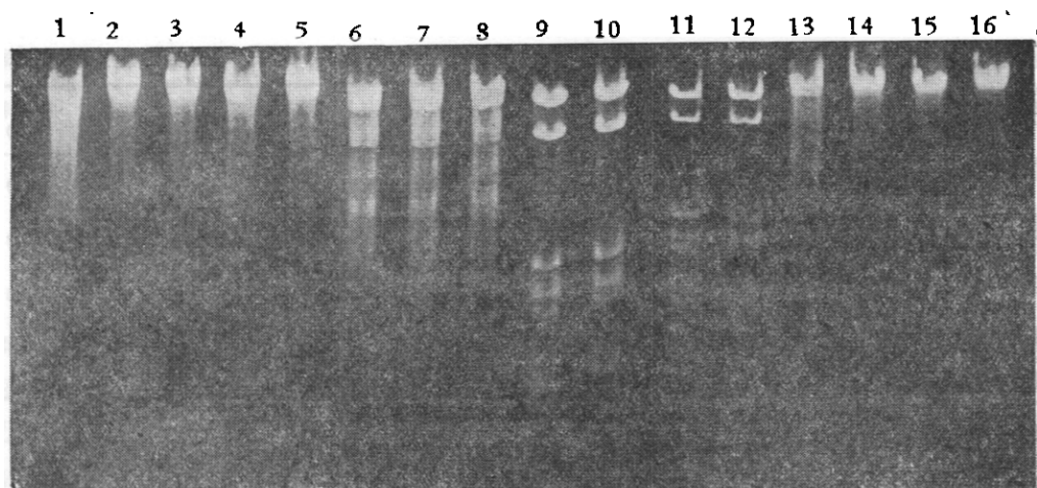


图3 汽巴蓝-琼脂糖凝胶柱色谱

柱 (1.2×3.2cm) 先用汽巴蓝柱缓冲液平衡, 样品上柱后用 0—0.8N NaCl 溶液进行梯度洗脱, 流速 20ml/h, 每管收集 7ml, 操作温度 4℃。



图4 肝素-琼脂糖凝胶柱色谱提纯 Bgl I

柱 (1.3×3.0 cm) 先用肝素柱缓冲液平衡, 样品上柱后用 0.2—0.7N NaCl 溶液进行梯度洗脱, 流速 20ml/h, 每管收集 9ml, 操作温度 4℃

## 讨 论

限制性内切酶最常用的提纯方法是磷酸纤维素柱和羟基磷灰石柱二步色谱法<sup>[1]</sup>, 其它二种方法也有人使用<sup>[2,3,4]</sup>。我们将这些方法进行比较, 发现回收率最高的是二步法, 但提纯倍数较低, 比活也最低。汽巴蓝-琼脂糖凝胶色谱提纯的酶纯度高, 但得率最低, 且酶液浓度很低, 不易保存。肝素-琼脂糖凝胶色谱的效果介于上述二者之间, 但酶最稳定, 可经受对  $\lambda$  DNA 水解 24 小时的检验。另外, 用肝素-琼脂糖凝

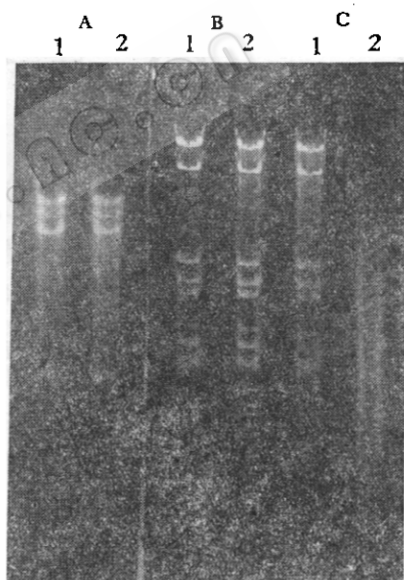


图5 三种色谱纯化的 Bgl I 和 Bgl II 对  $\lambda$  DNA 延长水解时间的检验

用酶量: 5u,  $\lambda$  DNA 1 $\mu$ g, 水解条件见酶活测定方法。

1 为水解 1 小时, 2 为水解 24 小时。

A, B 分别为用肝素琼脂糖凝胶色谱柱提纯的 Bgl II 和 Bgl I, C 为磷酸纤维素 P11 柱和羟基磷灰石色谱柱提纯之 Bgl I。

胶色谱可将 Bgl I 和 Bgl II 基本分开 (见图 1), Bgl II (21—26 管) 在延长 24 小时的水解过程中未见任何杂酶污染, 但 Bgl I (13—17 管) 经不起对  $\lambda$  DNA 延长水解时间的检验, 24 小时水解后可见微量 Bgl II 混入, 这个结果与 Bickle 等的报道一致<sup>[2]</sup>。

因此, 提纯 Bgl I, 以只产该种酶的菌株更合

适。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Greene, P. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 5(7): 2373—80, 1978.
- [ 2 ] Bickle, T. A. et al.: *ibid*, 4(8): 2561—72, 1977.
- [ 3 ] George, J. and J. G. Chirikjian; *ibid*, 5(7):

2223—32, 1978.

- [ 4 ] Baksi, K. et al.: *Biochemistry*, 17(20): 4136—39, 1978.
- [ 5 ] Duncan, C. H. et al.: *J. Bacteriol.*, 134(1): 338—344, 1978.
- [ 6 ] Layne, E.: *Methods in Enzymology* (ed. by Colowick, S. P. and N. O. Kaplan) Vol. 3, Academic Press, N. Y. and London, 1971, pp. 447—454.