

限制性核酸内切酶 Bsu1076 的提取与纯化

郑文尧

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 用磷酸纤维素 (P11) 柱和肝素-Sephrose 4B 柱二步法, 分离纯化特异位点脱氧核糖核酸酶 Bsu1076, 可以达到较高的纯度, 经 50—150 酶活单位的过酶量实验, 酶解图谱清晰, 无杂酶现象。切割、连接、回切图谱也完全合格。Bsu1076 对 λ DNA、SPP1DNA、 ϕ X174DNA、SV40DNA 及 Ad-2DNA 的酶解图谱与 HaeIII 完全一致。它在磷酸纤维素 (P11) 柱上的 NaCl 洗脱梯度为 0.83—0.87M, 在肝素-Sephrose 4B 柱上的 NaCl 洗脱梯度为 0.80—0.87M。从 20g 菌体中可以获得 3000 酶活单位的精制产品。

关键词: 线性梯度洗脱; 酶解图谱; 蛋白峰, 酶活峰

特异位点的脱氧核糖核酸酶 Bsu1076 是由 Shibata 等^[1]最先从 *Bacillus subtilis* 中提取和纯化的。Bsu1076 的回文识别序列为

..GGCC..
..CCGG..

它是限制性核酸内切酶 HaeIII 的同功酶, 其酶

切 DNA 的功能表现较一致。

本文参照 Shibata 等^[1]的培养菌体之方法,改用磷酸纤维素 (P11) 和肝素-Sepharose 4B 两步纯化法,提取了较高纯度的 Bsu1076 酶,通过用 50—150 单位之过酶量切割 DNA 和切割、连接、回切等项实验证明,酶的纯度超过国内 1984 年规定标准的三倍以上。

材 料 和 方 法

(一) 材料和试剂

1. 菌种: *Bacillus subtilis* (IAM1076), 即 AS1.1507。

2. 试剂: 磷酸纤维素 (P11) Whatman 公司产品。肝素-Sepharose 4B, 用 Pharmacia 公司之 CNBr-activated Sepharose 4B, 参照 Thomas 等人^[2]方法加工处理后制成。肝素, 上海生化制药厂产品, SPPI DNA 和 λ DNA (自制), ϕ X174DNA, New England Biolabs 产品。SV40DNA, Ad-2DNA, BRL 公司产品。T₄DNA 连接酶, 生物物理所生化试剂厂产品, HaeIII Promega Biotec 产品。

3. 缓冲液

(1) 细胞洗涤缓冲液: 50mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 (pH7.0), 1mM EDTA- Na_2 , 7mM β -巯基乙醇, 1mM NaN_3 , 1M KCl。

(2) 细胞破壁缓冲液: 20mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA- Na_2 , 2mM β -巯基乙醇。

(3) PC 缓冲液: 0.01M K_2HPO_4 - KH_2PO_4 (pH7.4), 0.01M β -巯基乙醇, 0.0001M EDTA- Na_2 , 10% 甘油。

(4) 反应缓冲液

A. Bsu1076 反应液: 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 5mM β -巯基乙醇。

B. T₄DNA 连接酶反应液: 50mM Tris-HCl (pH7.8), 10mM $MgCl_2$, 20mM DTT, 1mM ATP。

(5) 电泳缓冲液: 0.089M Tris- H_3BO_3 (pH 8.0), 0.0025M EDTA- Na_2 。

4. Penassay broth 培养基: 肉膏 1.5g, 酵母膏 1.5g, 蛋白胨 5g, 葡萄糖 1g, $NaCl$ 3.5g, K_2HPO_4 3.65g, KH_2PO_4 1.32g, 蒸馏水 1000ml。调 pH 至 7.0

(二) 方法

1. 菌体培养: 参照文献[1]。

2. 限制性核酸内切酶 Bsu1076 的提取与纯化

(1) 细胞破壁处理: 将 20g 菌体悬浮在 40ml 细胞破壁缓冲液中, 加溶菌酶 160mg 同菌体一起混合均匀, 在冰浴中保持 30 分钟, 然后再补加苯甲基磺酰氟 (PMSF) 至 0.1mM, 用超声波处理 10 分钟(每超一分钟需间隔 2 分钟, 以免菌体悬浮液升温超过 8℃)。将超声波处理过的菌体悬浮液在 4℃ 100000g 离心 90 分钟, 收集上清液。

(2) 磷酸纤维素 (P11) 柱层析纯化: 将超离心收集之上清液加 2.5 倍体积含 0.2M NaCl 的 PC 缓冲液进行稀释, 并装进用含 0.2M NaCl 之 PC 缓冲液平衡好的磷酸纤维素 (P11) 柱 (1.5 × 30cm)。用同一缓冲液进行洗柱, 使流出液之 A_{280} 约等于零。再用 0.2—1.0 M NaCl 之 PC 缓冲液 500ml, 进行线性梯度洗脱, 每 15 分钟收集 6ml 为一管, 共收集 85 管。以 λ DNA 为底物, 加酶解反应液 30 μ l, 再加 5 μ l 磷酸纤维素 (P11) 柱之梯度洗脱液, 37℃保温 1 小时, 酶解终了加溴酚蓝终止液后, 以 1.4% 琼脂糖凝胶电泳 (80V, 4 小时)。用溴化乙锭染色后在荧光灯下观察每一收集部分, 确定酶活峰位置。合并有酶活部分, 装透析袋, 并用 PC 缓冲液透析 4 小时。

(3) 肝素-Sepharose 4B 亲和层析纯化: 将透析过的酶离心除掉蛋白沉淀, 再装进用 PC 缓冲液平衡好的肝素-Sepharose 4B 柱 (1 × 15 cm) 中, 并用同一缓冲液洗柱, 使流出液达到 A_{280} 约等于零。然后用 0—1.0M NaCl 的 PC 缓冲液 300ml 进行线性梯度洗脱, 每 5ml 收集一管, 共收集 55 管。用上述方法测定酶活, 合并酶活峰, 装透析袋, 并用 PC 缓冲液透析 2 小时后, 再用含 50% 甘油的 PC 缓冲液继续透析

浓缩 16 小时。分装后置于 -20°C 冰箱中贮藏。

3. 酶活力单位的标定: 每一反应体积加酶解反应液 $30\mu\text{l}$, $1\mu\text{g}$ λDNA , 不同量的酶液, 在 37°C 中保温 60 分钟, 将能完全酶解 $1\mu\text{g}$ λDNA 之最低酶量定为一个酶活单位。

4. 不同 DNA 的酶解实验: 分别取 λDNA 、 $\phi\text{X174DNA}$ 、 SV40DNA 、 Ad-2DNA 、 SPPI DNA 各 $1\mu\text{g}$, 加入每一反应体积中, 并各加酶解反应液 $30\mu\text{l}$, Bsu1076 1 个酶活单位, 于 37°C 保温 1 小时。酶解终了加溴酚蓝终止液后用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。

5. 同 HaeIII 酶解 λDNA 之比较: 于每一反应体积中各加酶解缓冲液 $30\mu\text{l}$, λDNA $1\mu\text{g}$, 分别加 Bsu1076 0.5、1、1.5、2.0、2.5 酶活单位, HaeIII 8、4、2.67、2、1.6、1 酶活单位, 于 37°C 保温 1 小时。酶解终了加溴酚蓝终止液后用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

6. 酶解、连接、回切实验: 在反应体积中加酶解反应液 $90\mu\text{l}$, 再加 λDNA $3\mu\text{g}$, 然后加 Bsu1076 5 个酶活单位, 置于 37°C 水浴中保温 60 分钟。再置于 65°C 水浴中保温 5 分钟, 使内切酶 Bsu1076 失活。取反应体积的三分之二于另一新反应管中, 补加 T_4DNA 连接反应液 $50\mu\text{l}$, T_4DNA 连接酶 1 个酶活单位, 于 4°C 冰箱中保持 16 小时, 然后再置于 65°C 水浴中处理 5 分钟, 使连接酶失活, 再从此反应体积中取二分之一体积, 置于另一新反应管中, 加 Bsu1076 1.5 个酶活单位, 于 37°C 保温 60 分钟, 分别加入溴酚蓝终止液后, 进行琼脂糖凝胶电泳。

7. 过酶量酶解实验: 于每一反应体积中加酶解反应液 $30\mu\text{l}$, λDNA $1\mu\text{g}$, Bsu1076 酶分别为 50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 单位, 于 37°C 水浴中保温 1 小时, 再加溴酚蓝终止液后进行琼脂糖凝胶电泳。

结果与讨论

1. Bsu1076 在磷酸纤维素 (P11) 柱进行层析分离: 其蛋白检测结果见图 1。酶活表现见图版 I-1, 其酶活峰在 68—72 收集管之间,

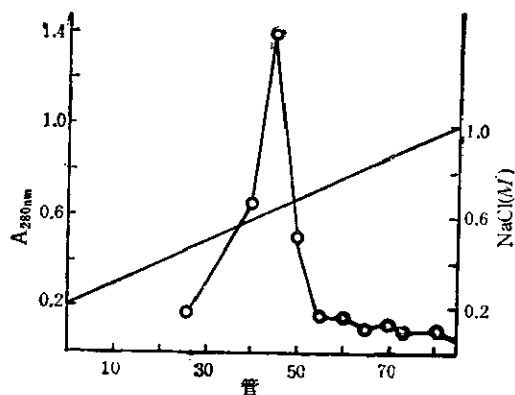


图 1 磷酸纤维素 (P11) 柱蛋白峰

相当于 $0.83\text{—}0.87\text{M}$ NaCl 梯度处。

根据以上实验结果证明 Bsu1076 之 NaCl 洗脱梯度较高, 为了缩短洗脱时间, 20g 菌体可改用 $1.5 \times 15\text{cm}$ 的磷酸纤维素柱床体积, 柱床体可直接用较浓的 (0.5M) NaCl PC 缓冲液进行平衡, 并用同一缓冲液稀释超离心后的上清液, 用 $0.5\text{—}1.0\text{M}$ NaCl PC 缓冲液进行线性梯度洗脱。

2. Bsu1076 在肝素-Sepharose 4B 柱上进行层析分离, 蛋白检测结果见图 2, 酶活表现见图版 I-2, 其酶活峰在 43—45 收集管之间, 相当于 $0.80\text{—}0.87\text{M}$ NaCl 梯度处。其 NaCl 洗脱梯度也是较高的。为简化手续, 免去费时的透析, Bsu1076 被磷酸纤维素 (P11) 柱纯化后, 可直接用等体积之 PC 缓冲液进行稀释后, 即可装进用含 0.5M NaCl 之 PC 缓冲液平衡过的肝素-Sepharose 4B 柱, 并用同一缓冲液洗

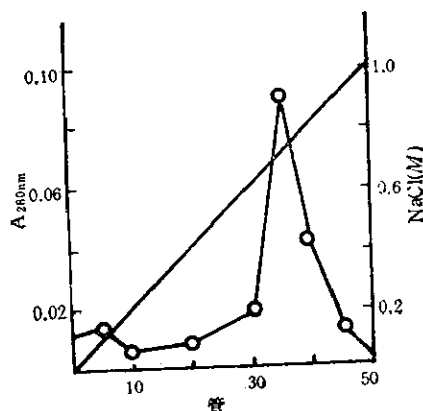


图 2 肝素-Sepharose 4B 柱之蛋白峰

柱,用含 0.5—1.0M NaCl 之 PC 缓冲液进行线性梯度洗脱。

3. 从图版 I-3 可以看出 Bsu1076 与 HaeIII 对 λ DNA 和 SPP1DNA 的酶解图谱是完全一致的。其对 ϕ X174DNA, SV40DNA, 及 Ad-2DNA 的酶解图谱与文献^[1]记载也完全相符。

4. 从图版 II-1 可以看出 Bsu1076 之酶解图谱与 HaeIII 之酶解图谱完全一致,图谱中 2 与 12 为 λ DNA 酶解不完全之表现。

5. 从图版 II-2 可以看出经 Bsu1076 酶解的 λ DNA, 经 T₄DNA 连接酶连接实验完全达到要求,同 New England Biolabs 产品 HaeIII 之酶解连图谱完全相似,回切实验也完全合格。

6. 通过 50—150 单位的过量酶酶解 λ DNA 的实验,从图版 II-3 可以看出 λ DNA 酶解之后的每一条带清晰可见,无杂酶现象存在,按国内规定(1984 年 3 月生化试剂会议)50 单位之过量酶实验标准计算,已超过规定之纯度标准的用酶量 300%。

7. 此菌产 Bsu1076 酶量较低,从 20g 菌体中仅获得 3000 酶活单位的产品。

参 考 文 献

- [1] Shibata, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 128(1): 473—476, 1976.
- [2] Thomas, A. B. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 4(8): 2561, 1977.
- [3] Christoph Kessler et al.: *Gene*, 33: 1—102, 1985.