

Mn⁺⁺及二甲基亚砜(DMSO)对限制酶HindⅢ识别顺序的影响

罗进贤

(中山大学生物学系)

黄秉乾

(霍普金斯大学)

摘 要

本文以质粒pBR322及噬菌体 λ cl857S7 DNA为底物研究了Mn⁺⁺及DMSO对限制酶HindⅢ对底物DNA识别顺序的影响。在10mM Tris-HCl pH8.4, 10mM MgCl₂, 60mM NaCl及7mM 巯基乙醇的正常反应条件下, HindⅢ在pBR322 DNA上只有一个切点, 酶切后在凝胶电泳上可看到一条带。用10mM Mn⁺⁺代替Mg⁺⁺或在反应液中加入DMSO进行酶切, 在电泳上出现许多新的带。以 λ cl857S7 DNA为底物也得到类似的结果。新产生的片段可以用DNA连接酶重新连接成线状分子。Mn⁺⁺及DMSO还能使HindⅢ切割细菌本身的DNA。这些数据表明: Mn⁺⁺及DMSO确实能降低HindⅢ对底物的专一性, 放松对识别顺序的要求。讨论了专一性降低的机制及其在核酸研究及基因工程中的意义。

第二类的限制性内切核酸酶(简称限制酶)是一类以Mg⁺⁺为辅基的顺序专一的内切核酸酶^[1]。它能识别双链DNA上的特定顺序并在此顺序内切断DNA链, 产生特定的DNA片段。限制酶的这种特性使它成为基因工程及DNA结构功能研究中的重要工具酶, 也为从分子水平上研究蛋白质和DNA之间的相互作用提供了重要条件。但近年来的研究表明: 改变酶的反应条件, 某些金属离子、有机溶剂等都会改变酶的专一性, 使其对底物双链DNA的识别顺序产生“放松”的现象, 生成较多的片段。据报导, 改变pH和离子强度、以Mn⁺⁺代替Mg⁺⁺以及有机溶剂如甘油、二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺等都能降低EcoRI对底物DNA的专一性^[2-6]; Mn⁺⁺、甘油及DMSO等也能降低BamHI、XbaI、SalI、HhaI、PstI、SstI、BstI及BsuI对识别顺序的要求^[7-9]。限制酶识别顺序的“放松”现象对于研究蛋白质与DNA之间的相互关系以及DNA的结构都有重要意义。本文研究了Mn⁺⁺离子及二甲基亚砜对限制酶HindⅢ顺序专一性的影响。

材 料 与 方 法

1. λ cl857 DNA 主要根据Yamamoto的方法分离^[10]。接种溶源菌大肠杆菌RLM297(λ cl857S7)于1000mL-肉汤+0.1%葡萄糖中, 在30℃振荡培养至OD₅₉₀=0.5~0.6时

本文1984年10月收到

在42℃诱导15分钟。继续在37℃振荡2-2½小时。然后在室温下离心收集菌体,悬浮于10毫升10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂中,加1/2毫升氯仿,在37℃培养使细胞裂解。向裂解液加DNaseI至最后浓度为20微克/毫升,37℃培养至粘度降低。用SorvallSS34转子10000转/分离心15分钟。上清液加固体NaCl至最终浓度为0.5M,加聚乙二醇6000(PEG6000)至最后浓度为10%。搅匀后在冰浴中放置1小时,离心收集沉淀。沉淀悬浮于5-10毫升10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂的溶液中。用氯化铯预成梯度离心法纯化λ噬菌体,即将λ-悬浮液铺在 $\rho=1.7$, $\rho=1.55$ 及 $\rho=1.4$ 的预成梯度上面,在摇摆转子中25000转/分离心5小时后,取出λ-噬菌体带,再在氯化铯梯度中离心一次。获得的纯化λ-噬菌体用酚抽提法除去蛋白质,纯化λDNA。

2. pBR322的纯化 离心收集经氯仿处理的带质粒pBR322的大肠杆菌HB101细胞,用溶菌酶—SDS裂解,高速离心(SWL7转子17000转/分,一小时)除去细胞碎片后,用酚抽提除蛋白。用RNaseI除去RNA后,经酒精沉淀回收DNA,悬浮DNA于TE缓冲液中,用氯化铯—溴化乙锭密度梯度超离心(用Beckman Ti50转子45000转/分,40小时)取出质粒带后用正丁醇除溴化乙锭,透析除去氯化铯,然后酒精沉淀回收质粒DNA。

3. 流感嗜血杆菌DNA的分离纯化 主要根据Marmur的方法^[11],从*Haemophilus influenzae* Rd Kw37中提取。培养至静止期的细胞用SDS溶菌后用氯仿多次抽提除蛋白, RNase除RNA,然后用异丙醇沉淀回收DNA。

4. 限制酶Hind III的纯化 采用流感嗜血杆菌Rd株(*H. influenzae* Rd Kw37),纯化步骤前已报导^[12,13]。

5. 酶解条件 Hind III及Hae III的酶解反应标准液为20微升内含10mM Tris-HCl, pH8.4, 10mM MgCl₂, 60mM NaCl, 7mM 2-巯基乙醇, 0.5—1微克DNA, 1—5微升(5单位/微升)酶液。反应液在37℃保温一定时间。各试验组中另加10mM MnCl₂及不同浓度的DMSO。反应完毕加5微升25%甘油、0.1M EDTA、0.05%溴酚蓝以终止反应。样品用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

6. 电泳 琼脂糖水平板状凝胶电泳(14×13cm²)浓度为1%,电泳液为40mM Tris-HCl, pH8.0, 2mM EDTA, 30mM NaAc。点样后正80伏电泳3小时,取出在0.5微克/毫升的溴化乙锭溶液中染色20分钟,在蒸馏水中脱色20分钟,然后在紫外光下照相。聚丙烯酰胺垂直平板凝胶(15×20cm²)浓度是8%,电泳液为: 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 用硼酸钠pH至8.3。在250伏电压下,电泳2小时。电泳完毕按琼脂糖凝胶电泳方法染色照相。

7. 酶切片段的重新连接 经DMSO处理后产生的酶切片段用T4-DNA连接酶(BRL产品)处理。反应液含30mM Tris-HCl pH8.0, 4mM MgCl₂, 1.2mM EDTA, 0.2mM ATP, 10mM DTT, 50微克/毫升牛血清蛋白及1—2单位T4-DNA连接酶。18℃保温1—24小时。

结 果

1. Mn⁺⁺离子对Hind III识别顺序的影响。

在10mM Tris-HCl, pH8.4, 10mM MgCl₂, 60mM NaCl及7mM 2-巯基乙醇的正

常反应条件下, HindⅢ对底物DNA的识别顺序是A↓AGCTT,在质粒pBR322上有一个切点,酶切后只有一个片段,在凝胶电泳上可看到一条带[图1(A)(2)],若以Mn²⁺取代Mg²⁺,则出现多条带[图1(A)(3)–(10)]。pBR322经另一限制酶HaeⅢ切后再用HindⅢ酶切会产生新的带,若以Mn²⁺代替Mg²⁺则出现更多的带[图2(B)]。HindⅢ在λcI857S7DNA上有6个切点,酶解后有7个片段(图上只看到5条带,另二个片段因浓度稀看不清)。以Mn²⁺代替Mg²⁺则出现更多的片段[图1(C)]。以上实验结果表明:以Mn²⁺取代Mg²⁺时HindⅢ对底物DNA的专一性降低,对识别顺序的要求有所放松,因而酶解后产生的DNA片段增加。我们曾经研究过保温时间对HindⅢ活性改变的影响。如图1(A)所示,在10mM Mn²⁺存在时,保温五分钟即出现新的带,30分钟开始带型稳定,无新的带出现。我们曾用不同来源的酶做同样的实验都得到相同的结果,值得指出的是新产生的片段都具有一定的长度而且是可以重复的。把新产生的酶切片段用T4-DNA连接酶处理可以重新连接成线状DNA分子(图4),可见新形成的片段都具有粘性末端。以上结果证明:新片段的产生是由于酶识别顺序的改变而不是杂酶引起的。

2.DMSO对HindⅢ专一性的影响

疏水的有机溶剂如DMSO、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、甘油等能改变EcoRI、BamHI、XbaI等限制酶的专一性。我们在HindⅢ的正常反应液中加入5–20%的DMSO也得到相似的结果。图2表示不同浓度的DMSO对HindⅢ专一性的影响。在正常条件下,HindⅢ酶解pBR322后得到的是一条线状的DNA,在电泳上看到的是一条带,加入5% DMSO,开始出现新的带,随着DMSO浓度的增加,线状DNA片段的量逐渐减少,新生片段的数目逐渐增加,至15% DMSO时出现近20条带,这说明DMSO能改变HindⅢ对底物DNA的专一性,改变了对识别顺序的要求。我们曾用10–35%的甘油试图改变HindⅢ的专一性,但没有得到阳性结果,只发现20%以上的甘油对酶活性有抑制作用。

3.HindⅢ专一性变化对细菌(*H. influenzae*)DNA的影响。

我们分析了经Mn²⁺及DMSO处理后,HindⅢ专一性的改变对细菌本身DNA的影响。由于细菌存在限制-修饰系统,一种限制酶对细菌本身的DNA是不起作用的。HindⅢ是从*H. influenzae* Rd Kw37中纯化的,因此,在正常的反应条件下,它应该不切*H. influenzae*的DNA。在图3中,(1)是*H. influenzae* DNA,(2)是经过HindⅢ酶解的DNA,没有发现任何切割的现象。(3)及(4)是在酶解反应中分别加入Mn²⁺及DMSO,可以看到DNA被酶切的情况。由于细胞DNA分子量大,切点很大,切下的片段大小不一,不能在电泳形成可以彼此分开的带型,而是一条连续的带谱。这进一步表明:在Mn²⁺及DMSO存在的情况下,HindⅢ的识别顺序发生了变化,细菌的修饰作用已不再能保护本身的DNA了。

讨 论

第二类的限制酶是一类顺序专一的内切核酸酶,它们在特定的核苷酸顺序上切断

DNA链,产生可以重复的具有一定大小的DNA片段。但改变反应条件如以 Mn^{++} 代替 Mg^{++} 以及pH、离子强度的改变及有机溶剂可以改变某些限制酶的专一性,降低酶对识别顺序的要求。我们的研究集中在 Mn^{++} 及DMSO对Hind III活性的变化方面。实验结果证明: Mn^{++} 及DMSO确能改变Hind III对底物DNA的专一性,降低对识别顺序的要求。以pBR322为例,在正常条件下它只有一个Hind III切点,酶切后只有一个片段,但以 Mn^{++} 取代 Mg^{++} 或在反应液中加入DMSO,却出现许多新的片段。用DMSO处理后得到的pBR322酶切片段可以用T4-DNA连接酶重新连接成线状分子。在 Mn^{++} 及DMSO存在下,Hind III还能切断细菌(*H. influenzae*)本身的DNA。这些都证明 Mn^{++} 、DMSO能改变Hind III的酶活性,由于专一性的变化,使酶存底物DNA上的切点增加,产生更多的片段,使原来受修饰作用保护的寄主细菌DNA也被切断。

关于反应条件改变后,酶专一性降低的机制,Polisky等曾对EcoRI, BamHI等酶作过较详细的研究,大致有二种情况:一种是对识别顺序中核苷酸数目的要求减少,从6个核苷酸降为4个核苷酸。如EcoRI的识别顺序原来要求G↓AATTC 6个核苷酸,改变反应条件后,只要有AATT就行了^[2,15,16],这样在底物DNA上的切点势必增加。另一种情况是识别顺序内某个核苷酸的变化。如BamHI的识别顺序为G↓GATCC,在甘油、二甲基硫酸酯等存在时,其识别顺序可变为G↓GAACC, G↓GCTCC及G↓GGTCC^[14]。由于还没有做过酶切片段的顺序分析,目前还无法确定Hind III专一性改变的具体机制。这里只能提供一点线索。Hind III的识别顺序是A↓AGCTT,以pBR322为例,若识别顺序从AAGCTT变为AGCT,则在4362个核苷酸顺序中可找到15个这样的位点,而在 Mn^{++} 存在时,pBR322经Hind III切后可产生9个片段(电泳上可看到9条带)。考虑到pBR322上15个AGCT顺序中有7个AGCT之间的距离都很近,产生的片段只有几个至几十个碱基的长度。这样短的DNA片段在电泳上是难于看见的。这样电泳上看到的带的数目与理论推断的DNA片段的数目可能是相符的,就是Hind III专一性改变的机制可能与EcoRI相似。

在二价金属离子中,只有 Mn^{++} 能改变Hind III的专一性,其它离子如 Cu^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} 等都不能取代 Mg^{++} 或 Mn^{++} ,根据我们的实验结果(未示出)。这些离子在5mM以上的浓度时都能抑制Hind III的活性。值得指出的是 Mn^{++} 也会改变其它与核酸代谢有关的酶的专一性,如大肠杆菌DNA聚合酶I^[17]、大肠杆菌RNA聚合酶^[18]及DNaseI^[19]等。

限制酶在核酸研究和基因工程中起着关键的作用。酶专一性的改变可以使一酶多用,一些原来没有酶切点的DNA分子,可以通过改变反应条件而将之切开,产生粘性末端,进行重组,也可以使缺失片段引进此DNA分子中。因此限制酶专一性改变的研究不仅在蛋白质—DNA相互作用研究中有重要的理论意义,在DNA的结构功能研究及基因工程研究中也有实际意义。

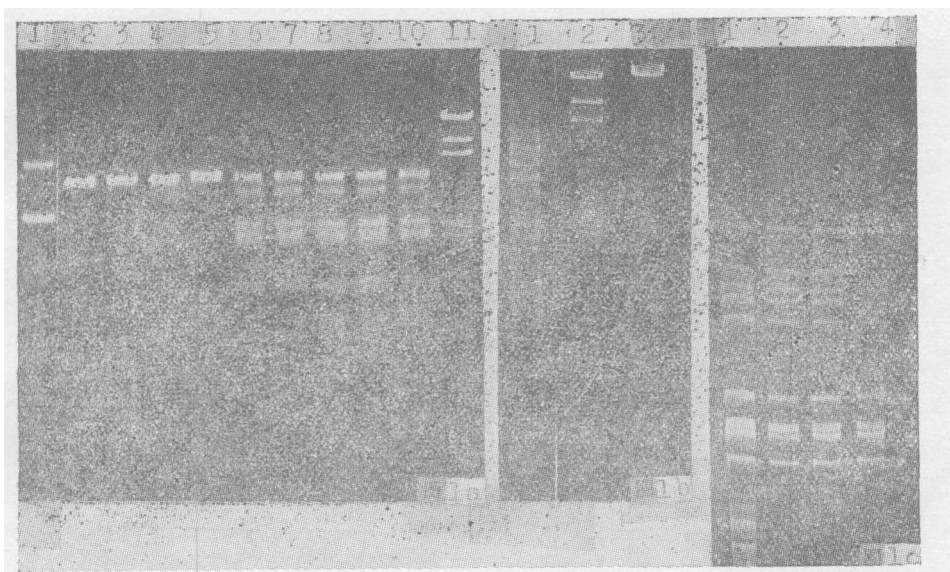


图1 Mn²⁺对HindⅢ专一性的影响

Fig1. Effect of Mn²⁺ on the Specificity of HindⅢ

(a) 1. pBR322DNA

2. pBR322DNA + 5u HindⅢ, 反应60', 37℃

3—10. pBR322DNA + 25u HindⅢ + 10mM Mn²⁺

反应时间分别为5'、10'、20'、30'、60'、120'、240'及360', 37℃

11. λcl857DNA + 5u HindⅢ, 反应60', 37℃

1%琼脂糖凝胶, 80伏, 电泳3小时

(b) 1. λcl857DNA + 25u HindⅢ + 10mM Mn²⁺, 反应60', 37℃

2. λcl857DNA + 5u HindⅢ 反应60', 37℃

3. λcl857DNA

1%琼脂糖凝胶, 80伏, 电泳3小时

(c) 1. pBR322DNA + 5u HaeⅢ + 25u HindⅢ + 10mM Mn²⁺, 37℃反应60'

2,3. pBR322DNA + 5u HaeⅢ + 5u HindⅢ, 37℃反应60'

4. pBR322DNA + 5u HaeⅢ 37℃反应60'

8%聚丙烯酰胺凝胶, 150伏, 电泳3小时

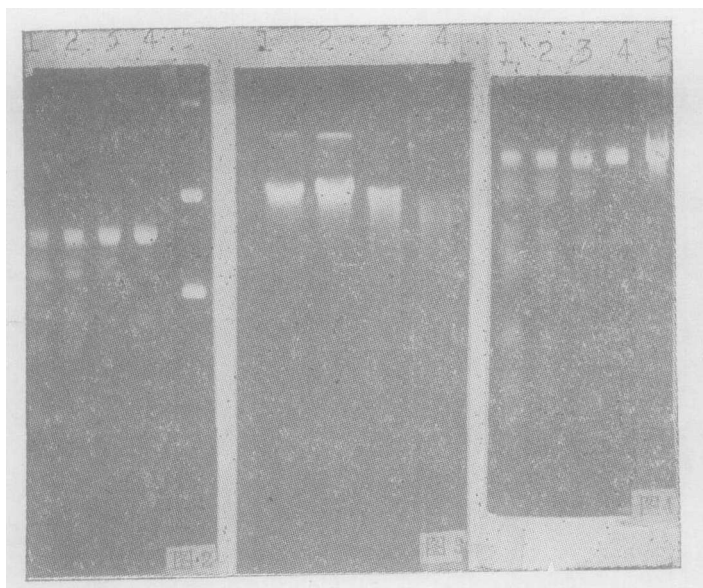


图2 二甲基亚砷对HindⅢ专一性的影响

Fig 2. Effect of DMSO on HindⅢ Specificity

酶解反应液含0.7微克 pBR322DNA, 25u HindⅢ, 10mM Tris—HCl pH8.4
10mM MgCl₂, 60mM NaCl及不同浓度 DMSO

1. 20% DMSO
2. 15% DMSO
3. 10% DMSO
4. 5% DMSO
5. 无 DMSO及HindⅢ

图3 HindⅢ专一性改变对细菌本身DNA的影响

Fig 3. Effect of Altered HindⅢ Specificity on *Haemophilus influenzae* DNA.

1. *H. influenzae* DNA
2. *H. influenzae* DNA + 25u HindⅢ.
3. *H. influenzae* DNA + 25u HindⅢ + 10mM Mn⁺⁺
4. *H. influenzae* DNA + 25u HindⅢ + 15%DMSO

反应条件为37℃, 60'

图4 酶切片段的重新连接

Fig4. Ligation of Fragments Generated by HindⅢ in the Presence of 15% DMSO

1. pBR322DNA + HindⅢ + 15%DMSO
2. pBR322DNA + HindⅢ + 15%DMSO + DNA连接酶, 16℃, 1小时
3. pBR322DNA + HindⅢ + 15%DMSO + DNA连接酶, 16℃, 4小时
4. pBR322DNA + HindⅢ + 15%DMSO + DNA连接酶, 16℃, 8小时
5. pBR322DNA + HindⅢ + 15%DMSO + DNA连接酶, 16℃, 24小时

参 考 文 献

- [1] Smith H. O., *Science*, 205(1979), 455-466.
[2] Polisky B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72(1975), 3310-3314.
[3] Hsu M. et al., *Biochemistry*, 17(1978), 4097-4101.
[4] Heininger K. et al., *Gene*, 1977, 1, 291-303.
[5] Tikchonenko T.I. et al., *Gene*, 1978, 4, 195-212.
[6] Woodbury C. P. et al., *Fed. Proc.*, 38(1979), 780.
[7] Malyguine E. et al., *Gene*, 1980, 8, 163-177.
[8] George J. et al., *J. Biol. Chem.*, 255(1980), 6521-6524.
[9] Clarke C. M. et al., *Biochem. J.*, 177(1979), 49-62.
[10] Yamamoto K. R. et al., *Virology*, 40(1970)734.
[11] Marmur J., *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, 208-218.
[12] H. O. Smith et al., *Method Enzymology*, 65(1980), 104-108.
[13] 罗进贤等, 中山大学学报 (自然科学版), 1981, 4, 1-9.
[14] J. George et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79(1982), 2432-2436.
[15] Woodhead et al., *Europ. J. Biochem.*, 115(1981), 293-296.
[16] J. M. Rosenberg et al., *DNA*, 1982, 1, 117-124.
[17] P. Berg et al., *Inf. Macromol Symp.*, 1963.
[18] G. V. Paddock et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(1974), 5017-5021.
[19] E. Melgar et al., *J. Biol. Chem.*, 243(1968), 4409-4416.

Effect of Mn²⁺ and DMSO on the Sequence Recognition of Hind Ⅲ

Lo Jinxian P. C. Huang

Abstract

The effect of Mn²⁺ and DMSO on the sequence recognition of the restriction endonuclease Hind Ⅲ was investigated. Under the normal reaction condition of 10mM Tris-HCl, pH8. 0, 10mM MgCl₂, 60mM NaCl and 7mM 2-ME, there is only one cutting site of Hind Ⅲ on pBR322 and only one band appears on gel electrophoresis. But multiple bands can be seen on electrophoresis gel when Mg²⁺ is replaced by Mn²⁺ or when DMSO is added. The DNA fragments generated in the Hind Ⅲ-DMSO reaction are converted to linear DNA molecules. In these conditions, the cellular DNA of the host (*Haemophilus influenzae*) is also digested by Hind Ⅲ. These data show that the specificity of cleavage of Hind Ⅲ is relaxed and cleavages occur at many other sites in the presence of Mn²⁺ and DMSO.