

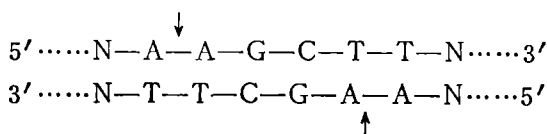
限制性内切核酸酶Hind III及Hind II的提纯及Hind III某些性质的探讨*

罗进贤 黄秉乾
(中山大学) (美国Johns Hopkins大学)

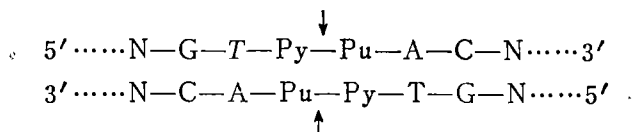
摘 要

从流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) Rd株中纯化了限制性内切核酸酶Hind III及部份纯化了Hind II; 探讨了纯化过程中的某些问题; 检查了酶对底物双链DNA的特性内切作用, 从琼脂糖平板凝胶电泳中观察到的经消化后产生的DNA断片表明: 酶对各种底物具有专一性作用; 通过DNA断片的重新连接证明, 经Hind III消化后生成的断片具有粘性末端, 也说明纯化的Hind III中不含明显的外切酶活力; 用聚丙烯酰胺-十二烷基硫酸钠平板凝胶电泳, 葡聚糖凝胶G150分子筛层析及蔗糖密度梯度离心法测定了Hind III的分子量并对其亚单位进行了讨论。

限制性内切核酸酶Hind III及Hind II是H.O.Smith等于1970年发现的^(1,2), 它们的底物都是双链DNA。Hind III的作用位点是:



Hind II的识别顺序为:



(Pu表示嘌呤, Py表示嘧啶, N表示任一碱基)。

DNA断裂以后生成5'-磷酸及3'-羟基末端^(3,4)由于Hind III在双链DNA上的切点是交错的, DNA断裂后生成粘性末端, 有利于DNA断片的重新粘合。而且对于基因工程中常用载体如λDNA、质粒pBR322等的切点数目都很少(λDNA上六个, pBR322上仅有一个), 使它和EcoRI一样成为DNA结构功能研究中最常用的工具酶之一。

迄今已提取的限制酶已达200多种⁽⁵⁾, 但除EcoRI外大多数酶均未提得很纯, 且纯化细节及物理性质如分子量等也未弄清。本文是在H.O.Smith等人⁽⁶⁾工作的基础上对Hind III的纯化过程、结果及其分子量、等电点等做了较详细的研究。

●承H.O.Smith教授及其助理G.M.Marley的指导, 謹此致谢

材料与方 法

菌种: 流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)Rd株

培养基: 脑心浸出膏 18.5克
 蛋白胨 5.0克
 酵母膏 2.5克
 氯化钠 2.5克
 蒸馏水 1000毫升

氯高铁血红素液原液: 氯高铁血红素 0.1克
 组氨酸 0.1克
 三乙醇胺 4毫升
 蒸馏水 96毫升

NAD原液: β -尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)10毫克/毫升, 过滤灭菌

缓冲液A: 30mM Tris-HCl pH 8.4
 14mM α -巯基乙醇
 5% 甘油

缓冲液B: 20mM Tris-HCl pH 8.4
 14mM α -巯基乙醇
 0.2M EDTA
 5%甘油

缓冲液C: 10mM 磷酸钾缓冲液 pH 7.4
 14mM α -巯基乙醇
 5%甘油

底物DNA: 质粒 pBR322从大肠杆菌HB101中分离,噬菌体 λ DNA从大肠杆菌R694(λ cl857S7)中分离。

细菌培养: 每升培养基加10毫升氯高铁血红素原液, 0.2毫升NAD原液, 接种对数生长期细菌培养液50毫升, 37℃震荡培养过夜, 一般在静止期后3小时($A_{600} \approx 1.5$)离心收集菌体。通常每升培养液可得3—4克湿菌体。

酶活力测定: Hind III反应混合液为1微克DNA, 10mM Tris HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 7mM 巯基乙醇, 1—10微升酶液, 加水至20微升。Hind III配方与Hind II比需另加60mM NaCl, Tris-HCl缓冲液, pH为8.4。以上反应液在37℃保温一小时, 反应完毕加5毫升染料混合液(25%甘油, 0.1M EDTA pH8.0, 0.05% 溴酚蓝)以中止反应。用1%琼脂糖平板凝胶电泳(13×14cm²)分析DNA断裂情况。电泳液为40mM Tris-HCl pH8.0; 2mM EDTA, 30mM醋酸钠, 在80伏电压下走3小时, 取出凝胶, 在0.2微克/毫升的吖啶溴红中染色20分钟, 用红色滤光片在紫外光下照相。

蛋白质含量测定: 按Lowry方法⁽⁷⁾。

蛋白质电泳: 主要根据Weber及Osborn的方法⁽⁸⁾。我们采用16% 丙烯酰胺,

0.2%十二烷基硫酸钠(SDS),在150伏、室温下走3小时,电泳完毕,取出凝胶在50%甲醇、10%冰醋酸及0.1%亮绿中染色2小时,在5%甲醇、10%冰醋酸中脱色,真空抽干。

蔗糖密度梯度离心:5毫升5%—20%蔗糖梯度内含10mM KPO_4 , pH7.4, 14mM 蔗糖基乙醇,5%甘油,配好梯度以后,将80微升(10单位/毫升)Hind III、20微升(50毫克/毫升)牛血清蛋白及100微升(10毫克/毫升)醛缩合酶混合,铺于蔗糖梯度表面,在SW50.1型转子中以40,000转/分速度,在4℃下离心20小时,离心后,用虹吸法自底部至顶底收集150微升的分部,测 A_{280} 及酶活力。

葡聚糖凝胶G150分子筛层析:柱大小:1.2×40cm,流速:0.2毫升/分,将600微升含50%甘油的Hind III(3,000单位)与已知分子量的醛缩合酶、牛血清蛋白、卵清蛋白及胰糜蛋白酶各一克一起上柱,收集1.5毫升的分部,测 A_{280} 及酶活力。

结果与讨论

1. 纯化过程

(1)抽提:20克菌体悬浮于120毫升缓冲液A中,在冰浴上用超声波处理20分钟,20,000×g离心10分钟,上清液调 $MgCl_2$ 至4mM, $NaCl$ 至0.3,100,000×g离心5小时,收集上清液,此为分部I。

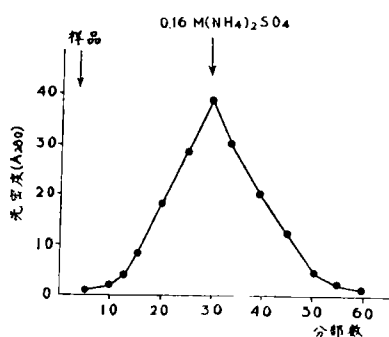
(2) $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀:分部I按0.472克/毫升量边搅拌边加入 $(NH_4)_2SO_4$,溶解后在冰浴上静置10分钟,10,000×g离心10分钟,收集沉淀,溶于约100毫升缓冲液B中,此为分部II。

(3)DEAE—纤维素柱(1):柱大小为2.5×30cm,用缓冲液B平衡,分部II以40毫升/小时的速度上柱,完后用150毫升含0.16M $(NH_4)_2SO_4$ 的缓冲液洗柱,分部(5毫升/分部)收集流出液及洗出液,测 A_{280} 得图(一),收集15—45分部含蛋白部份,此为分部III。

(4) $(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀:分部III用5M $NaCl$ 调至0.3M,并按0.313克/毫升量加入 $(NH_4)_2SO_4$ 至50%饱和度,10,000×g离心10分钟,收集上清液,按0.157克/毫升量再加 $(NH_4)_2SO_4$ 至70%饱和度,离心收集沉淀,溶于约20毫升缓冲液C中,此为分部IV。

(5)葡聚糖凝胶G25柱:凝胶床体积为300毫升,用缓冲液C平衡,分部IV以1—2毫升/分速度上柱,用缓冲液C洗,分部收集(5毫升/分部),测 A_{280} 得一很尖的蛋白质峰见图(二),收集25—34分部约40毫升,此为分部V。

(6)DEAE纤维素柱(2):柱大小:2×8cm,用缓冲液C平衡,分部V以20毫升/小时速度上柱,用120毫升缓冲液C洗,分部收集测 A_{280} 及酶活力,收集含Hind III活力部份,此为分部VI。Hind II留在柱上,再用含0—0.3M $NaCl$ 的缓冲液C进行线性梯度洗



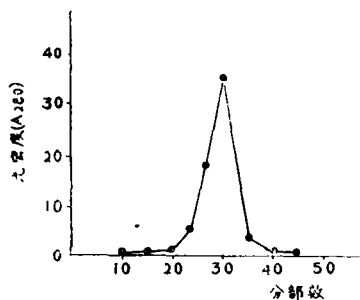
图(一) DEAE—纤维素柱(1)

的 A_{280} 流洗图

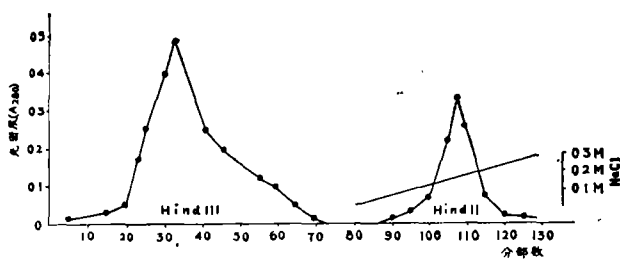
柱大小:2.5×30厘米

流速:40毫升/小时

每个分部:5毫升



图(二) 葡聚糖凝胶G25流洗图
床体积: 300毫升
流速: 1.5毫升/分
每个分部: 5毫升

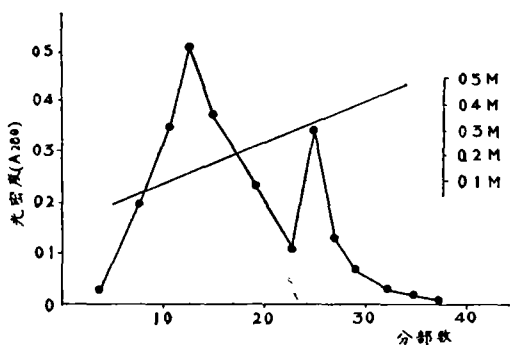


图(三) DEAE—纤维素柱(2)的 A_{280} 流速图
柱大小: 2×8 厘米
流速: 20毫升/小时
每个分部: 5毫升

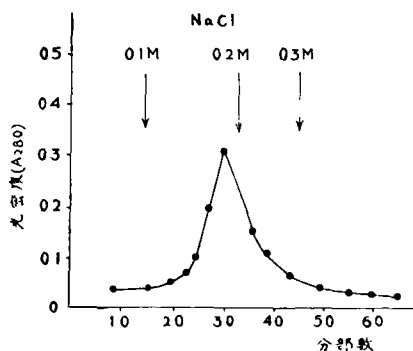
脱, 分部收集, 测 A_{280} 及酶活力, 取含Hind III活力部份, 此为分部VII。图(三)表示流洗情况。

(7)磷酸纤维素柱(1): 柱大小: 1×8 cm, 用缓冲液C平衡, 分部VI (Hind III)以7—8毫升/小时流速上柱, 经25毫升缓冲液洗柱后, 用50毫升含0—0.5M NaCl的缓冲液C进行线性梯度洗脱, 收集2毫升的分部, 测 A_{280} 及酶活力。图(四)表示洗脱情况: 有二个蛋白质峰, 酶活力在第二个峰; 取含酶活力部份, 此为分部VII。

(8)磷酸纤维素柱(2): 分部VII (Hind II)以10毫升/小时速度再上磷酸纤维素柱(2) (1×10 cm), 分别用含0.1M、0.2M及0.3M NaCl的缓冲液C进行分步洗脱, 收集2毫升的分部, 测 A_{280} 及酶活力, Hind II活力在0.2M NaCl处见图(五)。 A_{280} 的蛋白质峰与酶活力一致。收集含酶活力部份(分部IX), 可用聚乙二醇6,000进行透析浓缩。



图(四) 磷酸纤维素柱(1)的 A_{280} 梯度洗脱图
柱大小: 1×8 厘米
流速: 8毫升/小时
每个分部: 2毫升



图(五) 磷酸纤维素柱(2)的 A_{280} 分部洗脱图
柱大小: 1×10 厘米
流速: 10毫升/小时
每个分部: 2毫升

(9)羟基磷灰石柱层析: 为了进一步纯化Hind III, 我们把分部VII 3毫升(15,000单位)再上羟基磷灰石柱(1×5 cm), 流速2毫升/小时, 用5毫升缓冲液洗柱后, 用50毫升0—1M

KPO₄ pH7.4, 14mM巯基乙醇, 5%甘油, 进行梯度洗脱, 分部收集(2毫升/分部), 测酶活力并做聚丙烯酰胺凝胶电泳。酶活力出现在0.33—0.35M KPO₄处, 但电泳结果表明未见进一步纯化, 与分部Ⅶ一样是二条带。

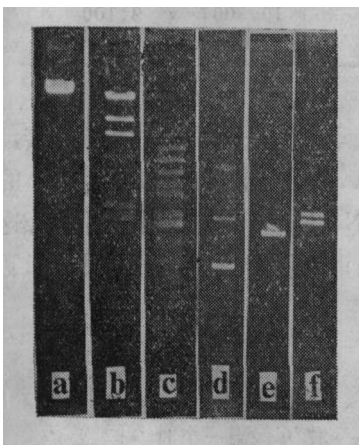
附表表示纯化过程及结果(不包括羟基磷灰石层析), 20克菌体(6升培养液)可得Hind III 110,000单位, 比活为13,750单位/毫克蛋白, Hind I 10,800单位, 比活为9,100单位/毫克蛋白。

2. Hind III及Hind I对各种底物DNA的作用

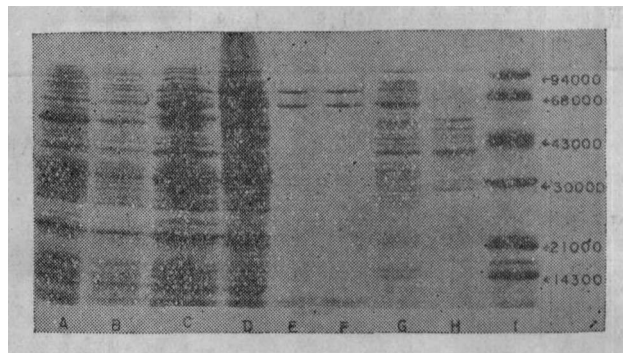
图(六)是λcl857S7 DNA及pBR322 DNA经Hind III及Hind I消化后的DNA断片的琼脂糖凝胶电泳图谱。λcl857S7 DNA有六个Hind III切点, 被切成七段, Hind I有34个切点, 图上有些断片看不清楚。pBR322 DNA是双链环状DNA, 有超盘绕, 开环及双体等构型在电泳上可看到三条带(图六d), Hind III在其上有一个切点, 经Hind III切后全部变成线状, 故只有一条带(图六e)。Hind I在其上有二个切点, 电泳上可看到二条带, 这些结果表明, 我们分离的酶对底物DNA的作用是专一的, 具有特异性。

3. 纯化过程各个步骤(分部)的聚丙烯酰胺—SDS凝胶电泳分析

图(七)是各分部的聚丙烯酰胺—SDS凝胶电泳图。从图中可见各分部的蛋白质的带愈来愈少, 分部Ⅷ(Hind III)只有二条主带, 经羟基磷灰石后仍然是二条带。分部Ⅸ(Hind I)除了一条主带(分子量约40,000)外还有些杂蛋白, Hind I的纯度不高, 一般不容易从Rd株细菌中提到很纯的Hind I, 通常是采用C株细菌来分离, 命名为Hinc I, 它是Hind I的同功异源酶。



图(六) Hind III, Hind I对λcl857S7 DNA及pBR232质粒的作用
 (a) λcl857S7
 (b) λcl857S7 + Hind III
 (c) λcl857S7 + Hind I
 (d) pBR322
 (e) pBR322 + Hind III
 (f) pBR322 + Hind I
 电泳条件见“材料与方法”

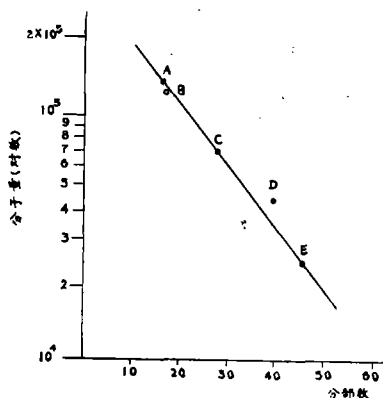


图(七) 纯化过程各个步骤(分部, 见附表)的聚丙烯酰胺—SDS平板凝胶电泳图。A. B. C. D. E. F. G. H分别代表分部Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, 4, 5, 6, 8, 7及9其中E及F(即分部Ⅵ及Ⅶ)为Hind III, G.及H(即分部Ⅷ及Ⅸ)为Hind I. I为标准蛋白质磷酸化酶B(94,000), 牛血清蛋白(68,000). 卵清蛋白(43,000)碳酸酐酶(30,000), 大豆胰蛋白酶抑制剂(21,000)及溶菌酶(14,300)电泳条件见“材料与方法”

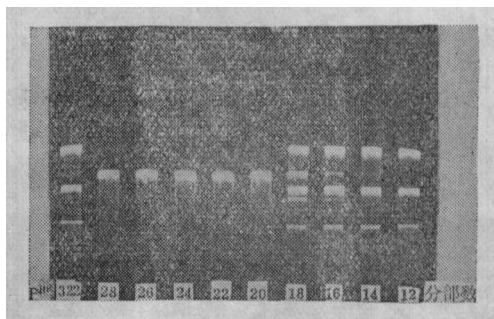
5. 关于Hind III的分子量及亚单位

(1) 葡聚糖凝胶G150分子筛层析

将已知分子量的标准蛋白质与Hind III一起上柱, 用A₂₈₀测定已知分子量的蛋白质含量, 用1%琼脂糖凝胶电泳测定酶活力, 从而求出各种蛋白质及Hind III的洗脱体积(以分部数表示), 然后以分子量的对数为纵坐标, 以分部数为横坐标作图, 从而估算出Hind III的分子量约为140,000, 见图(九).



①

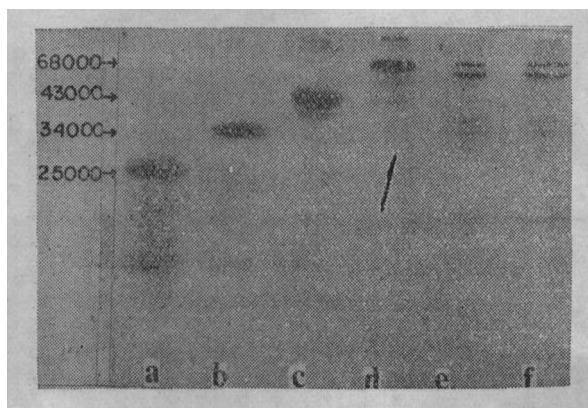


②

图(九) Hind III的葡聚糖凝胶G150分子筛层

① 分部数与分子量对数曲线, 图中A, B, C, D, E分别代表醛缩合酶(158,000), Hind III, 牛血清蛋白(68,000), 卵清蛋白(43,000)及胰糜蛋白酶原(25,000), 酶活力用1%琼脂糖凝胶电泳测定, 已知分子量的蛋白质用A₂₈₀测定

② 各分部的1%琼脂糖凝胶电泳图, 底物为pBR322DNA(0.7微克)10微升酶液, 37°C保温一小时, 图下数字为分部数, pBR322表示对照



③

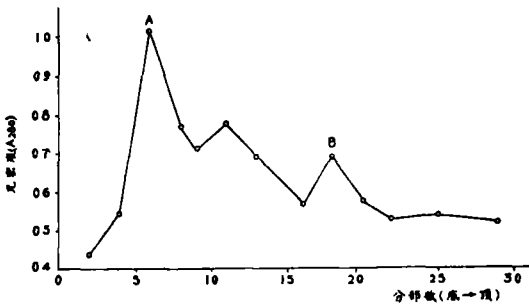
③ 分部14—22的聚丙烯酰胺凝胶—十二烷基硫酸钠电泳图. 图中(f)为经过分子筛后的Hind III. 分部14—22混合后用三氯乙酸沉淀, 乙醚洗涤, 沉淀溶于10微升电泳液中, 再走电泳, 条件见“材料与方法”. (e)为未上分子筛柱的Hind III, (a)、(b)、(c)、(d)分别代表牛血清蛋白, 卵清蛋白, 羧肽酶A及胰糜蛋白酶原

(2) 蔗糖密度梯度离心

我们把Hind III与已知分子量的醛缩合酶及牛血清蛋白共同沉降离心, 测定Hind III的沉降系数, 从而推

出其分子量. 图(十)①为各分部的光密度曲线, ②为各分部的酶活力. 酶活力峰在11—12分部与光密度的蛋白质峰是一致的. 根据公式:

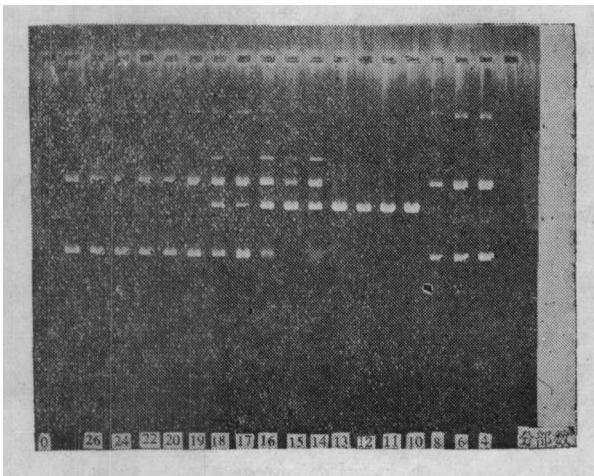
$$\left(\frac{M_1}{M_2}\right)^{\frac{2}{3}} = \frac{S_1}{S_2} = \frac{R_1}{R_2} \quad \text{〔其中M为分子量, S为沉降系数, R为离心管中从弯月面与} \text{]}$$



①

图(十) Hind III 的蔗糖密度梯度离心

- ① 各部分的 A₂₈₀ 光密度曲线, 第一个峰为醛缩合酶(158,000), 第二个峰为Hind III, 第三个峰为牛血清蛋白(68,000)



②

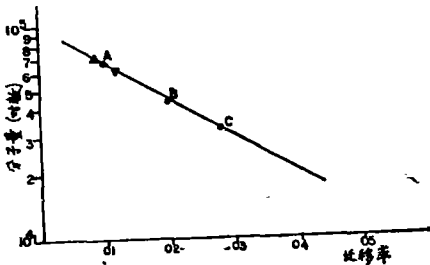
样品带的距离, 即沉降距离] 估计出 Hind III 的分子量为135,000, 这与凝胶过滤得出的结果[140,000]是相近的,

(3) 电泳分析

用16%的聚丙烯酰胺—SDS凝胶电泳, 把纯化的 Hind III (分部Ⅵ) 10微克, 在150伏特下走3小时, 得到为图(十一)②的电泳图谱。图中显示二条多肽的带, 与其它已知分子量的蛋白质: 牛血清蛋白、卵清蛋白及羧肽酶A等相比, 推出这二条带的分子量分别为70,000及62,000 [图(十一)②]。

图(十)

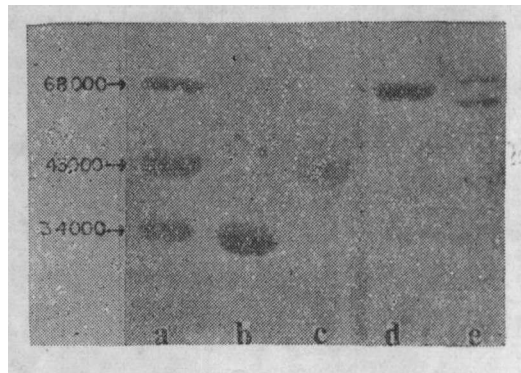
- ② Hind III 酶活力分布的 1% 琼脂糖凝胶电泳图, 底物为 0.7 微克 pBR322 DNA



①

图(十一) Hind III 的聚丙烯酰胺—SDS凝胶电泳分析

- ① 迁移率与分子量对数曲线, 图中 A, B, C 分别代表牛血清蛋白(68,000)、卵清蛋白(43,000)及羧肽酶 A(34,000), 小三角(Δ)代表Hind III 的二条带
- ② 凝胶电泳图 b, c, d, e 分别代表羧肽酶 A、卵清蛋白、牛血清蛋白及Hind III, a 为 b, c, d 的混合物



②

从电泳分析及凝胶过滤、蔗糖密度梯度离心得出的结果看, Hind III 的分子量在 135,000—140,000 之间, 而电泳中二条带的分子量只有 62,000 及 70,000, 因此 Hind III 至少应由二个亚基(单位)组成。我们曾用分部 VIII 做过等电点聚焦实验, 在等电点聚焦凝胶上看到的是二条 pI 不同的带, 而在磷酸纤维素柱的线性梯度洗脱的某些分部 (0.1—0.2 M NaCl 之间) 中亦曾出现过只有一条带的情况, 并具有内切酶活性, 但不是酶的活力峰。

EcoRI^(10,11), PstI⁽¹²⁾ 及 Hha I⁽¹³⁾ 等酶的基因已分离纯化, 并且发现这三种酶的限制酶和修饰酶的基因是连在一起的且大小相近。联系到电泳中这二条带很难分离(用羟基磷灰石仍然不能把这条带分开)的情况看, 电泳中的这二条带也可能一条是限制(内切)酶, 另一条是修饰(甲基化)酶。我们正在用聚焦层析等方法争取把它们分开并加以鉴别。

Hind III 是基因工程研究中广泛应用的一种工具酶, 但对其物理性质及作用机制知道很少, 而这些又是了解酶与其 DNA 底物的相互作用所必需的。我们提的酶其比活在 20,000 单位/毫克蛋白, 还拟在弄清这两条带的基础上再提纯一步, 这就可用于酶的识别作用及专一性的研究。

参 考 文 献

- [1] Smith, H.O. and Wilcox, K.W., *J. Mol. Biol.*, 5(1970), 379—391.
- [2] Smith, H.O., *Methods Mol. Biol.*, 9 (1975), 71.
- [3] Old, R., Murray, K., and Roizes, G., *J. Mol. Biol.*, 92 (1975), 331—339.
- [4] Kelly, T.J. and Smith H. O., *J. Mol. Biol.*, 51 (1970), 393—409.
- [5] Roberts, R.J., *Nucleic Acid Research*, 9 (1981), r75—r96.
- [6] Smith, H.O, and Marley G. M., *Methods in Enzymology*, 65 (1980), 104—108.
- [7] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), 265—275.
- [8] Weber, K. and Osborn, M.J., *J. Biol. Chem.*, 244(1969), 4406—4412.
- [9] Martin, R.G. and Ames, B.N., *J. Biol. Chem.*, 236 (1961), 1372—1379.
- [10] Newman, A. K., Rubin, R.A., Kim, S.H., and Modrich, P., *J. Biol. Chem.*, 256 (1981), 2131—2139.
- [11] Greene, P. J., Gupta, M. and Boyer, H.W., *J. Biol. Chem.*, 256 (1981), 2143—2153.
- [12] Walder, R. Y., Hartley, J. L., Donnelson, J. E., and Walder, J.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78 (1981), 1503—1507.
- [13] Mann, M. B., Rao, R. N. and Smith H. O., *Gene*, 3 (1978), 97—112.

Purification and Further Characterization of Restriction Endonuclease Hind III

Lo Jinxian *P. C. Huang*

Abstract

Hind III and Hind II have been purified from Haemophilus influenzae Rd strain. Some problems in the purification procedure were investigated. Endonucleolytic digestion of DNA from plasmid pBR322 and phage λ CI857S7 has been examined and the DNA fragments resolved by agarose electrophoresis. The digestion profiles produced are unique and characteristic for both DNA's and the endonucleases. The ligation of Hind III generated fragments indicates the existence of cohesive ends of the Hind III products. It also shows that the preparation of Hind III is free of significant exonuclease activity. The molecular weight of Hind III was estimated to be 135,000 as determined by polyacrylamide gel electrophoresis, Sephadex G150 gel filtration, and sucrose density gradient centrifugation. Electrophoresis in the presence of SDS revealed two polypeptides, MW 70,000 and 62,000, which is consistent with the presence of nuclease and methylase components in this enzyme.