

研究报告

限制性核酸内切酶 *Bsp* 63I 特性的研究¹⁾

曹新文 李冠一 黄宁悟

董群 邹国林 朱汝璠

(武汉大学生物系)

II 型限制性核酸内切酶的发现和应用, 革命性地推动了分子生物学和遗传工程的发展。不管从酶本身的理论研究或从工具酶的应用研究方面来说, 都必须首先确定酶促反应系统的最适条件以及各种因素对酶活性的影响, 但是目前关于这类酶促反应条件的确定, 多数是根据定性实验和经验, 很少是根据定量实验作动力学描述。

限制性核酸内切酶 *Bsp* 63I 是我国自己分离的菌种和发现的新酶^[1]。已测定其识别序列, 并确定它是 *Pst* I 酶的异源同功酶。根据我们对这两个异源同功酶的比较研究, 我们认为 *Bsp* 63I 比 *Pst* I 有较多的优点: 酶含量较高, 且比较稳定, 易于纯化。因此, 估计可用 *Bsp* 63I 取代 *Pst* I。但对 *Bsp* 63I 酶性质的研究, 国内外尚未见报道。因此我们采用本实验室自己纯化的 *Bsp* 63I 酶, 用定量测活的方法, 对其最适反应条件, 二价阳离子及一价阳离子对其活性的影响, 以及酶的 K_m 值等进行了初步的研究, 从而为今后对该酶的动力学研究结构分析及其作为工具酶的应用提供了必要的资料。

材料与方 法

1. 菌种 *Bacillus sphaericus* 63 I (上海生物化学研究所严佩芳等同志赠送)。

2. 细菌培养 另文报道。

3. 试剂 肝素琼脂糖和 Cibacron Blue F_3GA -琼脂糖(本实验室自制), 琼脂糖(上海东

海制药厂产品), pBR 322DNA (上海生物化学研究所产品), 其它试剂均为分析纯。

4. *Bsp* 63 I 酶的分离与纯化 另文报道。

5. 酶活性的定量测定 酶 $0.5 \mu\text{l}$, TM 缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl_2) $30 \mu\text{l}$, pBR322DNA $2 \mu\text{l}$ ($0.5 \mu\text{g}$), 总体积 $32.5 \mu\text{l}$ 。37°C 保温 20 分钟后, 加 $10 \mu\text{l}$ 终止反应液 (200mM EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 50% 甘油), 然后进行琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖凝胶浓度为 1.2%, 每毫升凝胶含溴化乙锭 $0.5 \mu\text{g}$, 电泳缓冲液为 89mM Tris, 89mM 硼酸, pH 8.5, 25mM EDTA。如为盘状电泳, 则电流每管为 2—3 mA, 如为卧式平板电泳, 则为 6 V/cm。电泳完毕后, 在 254 nm 紫外灯下观察。加红色滤光片照像, 通过测产物带的黑度定量测酶活。

6. 各种因素对酶活性影响的测定 除 pH 因素是用 50mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液代替 TM 缓冲液外, 其它因素对酶活性影响的测定所用缓冲液均为 TM 缓冲液。测定温度的影响时, 温度的范围是从 25°C 到 60°C。测定 Mg^{++} 浓度的影响时, 是在 TM 缓冲液中, 配制含各种不同浓度的 Mg^{++} (2、5、10、20、30、50、100mM)。测定无 Mg^{++} 存在下各种二价阳离子 (Mn^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , Co^{++} , Fe^{++} , Zn^{++}) 或一价阳离子的影响时, 是在缓冲液中配制各种分别

Cao Xinwen et al.: Characterization of Restriction Endonuclease *Bsp*63I

1) 中国科学院科学基金资助的课题。

含不同浓度的二价阳离子或一价阳离子，其浓度范围与 Mg^{++} 相同。测定有 Mg^{++} 存在下 NaCl 或 KCl 浓度的影响时，NaCl 或 KCl 浓度范围为 50mM—500mM。测定 TM 缓冲液中 Tris-HCl 的浓度的影响时，Tris-HCl 浓度从 10 mM—500 mM。

7. 酶的 K_m 值的测定 取缓冲液 30 μ l，分别加入不同浓度的 pBR322 DNA (体积均为 8 μ l)，再加入 *Bsp* 63 I 酶 0.5 μ l，总体积为 38.5 μ l。37 $^{\circ}$ C 保温后，定量测定酶活性，将 $1/\bar{v}$ 对 $1/[\bar{v}]$ 数据作改良双倒数图，求出其 K_m 值。

结果与讨论

1. 温度对酶活性的影响 图 1 是温度对酶活性影响的凝胶电泳图。图 2 是温度对酶活性影响的曲线图。从图 1 和图 2 可以看到

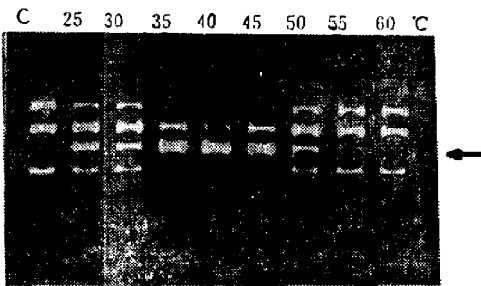


图 1 在不同温度下 *Bsp* 63 I 切割 pBR322 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱
箭头指示产物带，C 为对照。

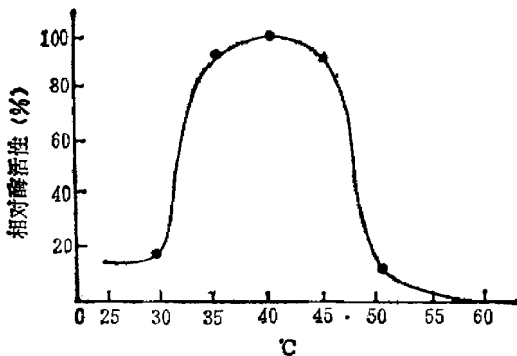


图 2 温度对 *Bsp* 63 I 酶活性的影响

Bsp 63 I 酶在 35 $^{\circ}$ C—45 $^{\circ}$ C 表现出活性最强。最适温度为 40 $^{\circ}$ C。温度达 55 $^{\circ}$ C 时，酶活性仅剩 1% 左右。大多数限制性核酸内切酶的最适温度均

为 37 $^{\circ}$ C 左右^[2]，但并不完全一样，有的甚至相差十分悬殊，例如 *Bcl* I 的最适温度为 50 $^{\circ}$ C，*Bst* E II 为 60 $^{\circ}$ C，*Taq* I 为 85 $^{\circ}$ C。我们将其异源同功酶 *Pst* I 进行对比研究，发现它们的最适温度相同。

2. pH 值对酶活性的影响 图 3 是 pH 对酶活性影响的曲线图。最适 pH 为 7.5，在 pH 7.3—7.8 酶表现出活性最强。限制性核酸内切酶的最适 pH 一般是偏碱性的，大多数在 pH 7.4 到 7.9 之间^[2]。

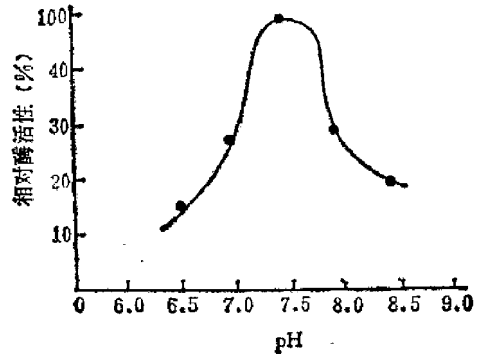


图 3 pH 对 *Bsp* 63 I 酶活性的影响

3. Mg^{++} 浓度对酶活性的影响 在无 Mg^{++} 螯合剂存在下，缓冲液中不含 Mg^{++} 时，*Bsp* 63 I 酶仍表现出很少一部分活性，而加入 Mg^{++} 螯合剂 EDTA 时，酶则完全不表现出活性。估计为酶蛋白在纯化过程中本身就络合着少量 Mg^{++} 所致。II 型限制性内切酶只需要唯一的激活因子 Mg^{++} ，这已是大家所公认的事实。从图 4 可以看出，当 Mg^{++} 浓度为 13.85

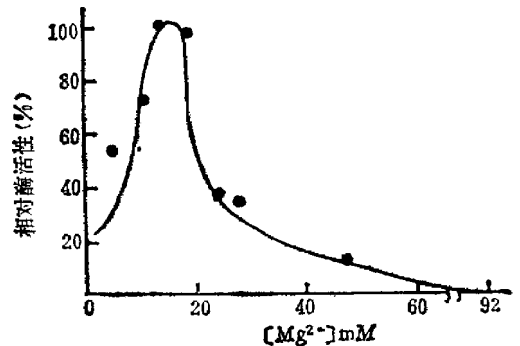


图 4 Mg^{++} 浓度对 *Bsp* 63 I 酶活性的影响

mM 时，酶活性达最大值。 Mg^{++} 为 2mM 左右时，酶只有 23% 的相对活性，然后随 Mg^{++} 浓度的

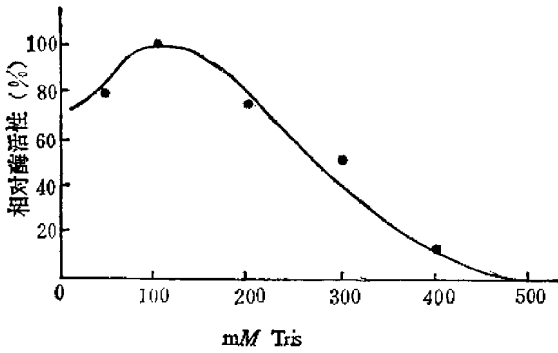


图5 Tris-HCl 浓度对 *Bsp* 63 I 酶活性的影响

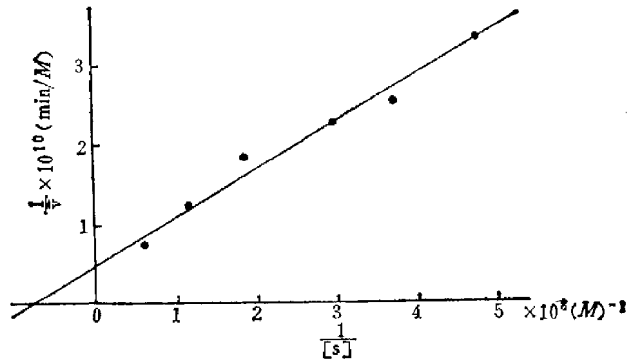


图6 底物浓度影响 *Bsp* 63 I 酶切割 pBR322DNA 速率的改良双倒数图

增加,酶活性急剧上升, Mg^{++} 浓度在 9—23 mM 范围内,酶活性较强,当其浓度再增加时,酶活性则又逐渐下降,浓度达到 46 mM 时,酶活性只剩下 10% 左右,而 Mg^{++} 浓度增至 92 mM 时,则完全失去酶活性。II 型限制性核酸内切酶的最适 Mg^{++} 浓度一般为 5—15 mM^[2]。例如 *Bam* HI 的最适 Mg^{++} 浓度为 13—17 mM。 Mg^{++} 浓度从 17 mM 逐渐上升,酶活性则逐渐下降,当 Mg^{++} 浓度高于 100 mM 时,酶活性则完全被抑制^[3]。 *Bsp* 63 I 的异源同功酶 *Pst* I 的最适 Mg^{++} 浓度在 16 mM 附近,当 Mg^{++} 浓度高于这个范围,酶活性就逐渐降低,当 Mg^{++} 浓度达 80 mM 后,酶活性则完全被抑制(未发表资料)。

4. 无 Mg^{++} 存在下各种二价阳离子 (Mn^{++} 、 Ca^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} 、 Fe^{++} 、 Zn^{++}) 对酶活性的影响 Mn^{++} 可以部分地取代 Mg^{++} , Mn^{++} 浓度低于 15 mM 时,酶有部分活性,但只有 10% 的相对活性。 Ca^{++} 浓度低于 5 mM 时酶有极弱的活性。 Mn^{++} 浓度高于 15 mM, Ca^{++} 浓度高于 5 mM, 酶则完全丧失活性。但 Cu^{++} 、 Co^{++} 、 Fe^{++} 与 Zn^{++} 均不能取代 Mg^{++} , 它们的浓度在 2—100 mM 范围内,酶均不表现出活性。这些结果与 *Eco* RI^[5]、*Bam* HI^[6] 及 *Bsp* RI^[4] 的结果基本相符合。

5. 无 Mg^{++} 存在下一价阳离子对酶活性的影响 Na^+ 或 K^+ 均不能取代 Mg^{++} , 不能使酶呈现活性。我们的结果与文献报道的其它内切酶结果完全相同。

6. 有 Mg^{++} 存在下 $NaCl$ 或 KCl 浓度对酶

活性的影响 Na^+ 浓度小于 150 mM 时,酶表现相当的活性,当 Na^+ 浓度大于 150 mM 时,酶几乎不表现活性。 K^+ 浓度小于 100 mM 时,酶亦有相当的活性, K^+ 浓度大于 100 mM 时,酶不表现活性。但 K^+ 存在时酶的活性低于相同浓度 Na^+ 存在时的酶活性。我们的结果与文献报道的其它内切酶结果相符。限制性核酸内切酶在反应系统中,一般含 $NaCl$ 或 KCl 50—100 mM^[2]。例如在 *Bam* HI 的反应系统中含 100 mM $NaCl$, 当 $NaCl$ 浓度为 250 mM 时,酶活性被完全抑制^[6]。 *Eco* RI 的最适 $NaCl$ 浓度为 50—120 mM, *Pst* I 的 $NaCl$ 或 KCl 的浓度高于 160 mM 时,酶活性完全被抑制(未发表资料)。

7. Tris-HCl 浓度对酶活性的影响 从图 5 可以看出,在 Mg^{++} 存在下,最适 Tris-HCl 浓度为 10—200 mM。100 mM 时酶活性最高,当大于 200 mM 时酶活性逐渐下降,达到 500 mM 时,酶不表现活性。这些亦与文献报道的其它内切酶的结果基本相符合,在反应系统中一般使用 10—100 mM 的 Tris-HCl,此称中等浓度,很少低于 10 mM,亦很少高于 100 mM。

8. *Bsp* 63 I 酶 K_m 值的测定结果 图 6 是以 pBR 322 DNA 为底物时 *Bsp* 63 I 酶的 $1/\bar{v}$ 对 $1/[S]$ 的改良双倒数图。从图求得其 K_m 值为 $1.33 \times 10^{-8} M$ 。关于限制性核酸内切酶的 K_m 值,除 *Eco* RI 有较多报道外,其它很少报道,这可能是由于没有简易而又准确的定量测活的方法的缘故。

(参考文献转第 38 页)

或是盐、碱,或是酸、盐,或是酸、碱等。为了充分利用这些显带条件,我们将这3种处理都放进流程,这样它的适用性要广泛些。事实上,我们的材料已包含了多种不同类型的植物。当今酸处理的作用越来越为许多作者所重视^[2,3,7],认为它对许多植物染色体显带有显著的促进作用。以往的做法多为将酸处理放在盐处理的前面,而我们的试验显示,将它放在最后对显带质量的提高有很大帮助,能使带纹清晰,反差增强,利于摄影和观察。

另外,组型分析和带型分析在同一分裂相上进行,对辨认同源染色体,确定随体、端粒、主、次缢痕是否显带,以及带的类型和位置等,提供了更为可靠的依据。

从处理(1)、(2)、(3)可见,不同染色体显带时,对酸处理要求较宽,最适处理时间可长达1小时,而且每种材料所需时间相差不大,但对碱、盐的处理强度则要求控制在一个较小的范围内。各种材料对碱处理强度的要求大致相同,我们认为在45℃条件下处理50秒—1分钟是最为合适的,故可将此因素固定下来。盐处理的时间,则因材料不同而差异较大,难以统一,如蚕豆为20分钟,而湿地松则要长达2小时。但近缘植物则大致相同,如玉米、蕹苡、川谷及玉米×蕹苡均为35分钟左右,因此我们将盐处理作为可变因素。

供试材料因种类不同,其染色体对显带条件的要求也不尽相同,完全统一是困难的,故在我们的BSHG流程中,将酸、碱两个因素固定下来,而只略微改变盐处理强度,以适应不同种类

植物的染色体的显带要求,这样做的好处是,在很大程度上将流程统一了起来,避免了由于技术条件不同而引起的带型上的差异。

关于显带和显带方法的关系,李懋学^[2]在研究蚕豆染色体异染色质与Giemsa显带技术的关系时证明,技术条件不同能引起带型的差异,而不是植物本身的带型差异。因此,将带型作为染色体一个固有的属性,在不同种或品种间对核型进行比较时,显带条件的一致性,应是这种比较的先决条件。将显带处理流程上差异较大的带型进行比较,意义不大。因此我们认为,有必要总结、推广几套从制片到显带的标准流程,这样利于不同植物带型比较分析,利于不同研究者之间的交流和成果的应用,使植物染色体显带技术更加实用化。

本文总结的方法,与传统方法相比,成功率、重复率、显带质量均有所提高。更重要的是由于流程相对统一,很大程度上消除了由于技术条件不同所带来的带型上的差异。从而使结果更为可靠。

参 考 文 献

- [1] 谷明光: 1981. 遗传学报, 8(2): 175—179.
- [2] 李懋学: 1982. 细胞生物学杂志, 4(1): 32—34.
- [3] 林兆平,王正询,潘坤清. 1984. 广州师范学院学报(自然科学版), (1): 71—72.
- [4] 张自立、董广元: 1984. 遗传, 6(1): 19—20.
- [5] 陈瑞阳、宋文芹、陈晓、李德成、徐悦凡、范海平、周显昌: 1979. 植物学报, 21(1): 11—18.
- [6] 朱凤绥、田自强、程尧楚: 1980. 湖南农学院学报, (4): 97—110.
- [7] Vosa, C. G. and P. Marchai: 1971. *Nature*, 237: 191—192.

—————
 (上接第 11 页)

参 考 文 献

- [1] 严佩芳等: 1982. 生物化学与生物物理学报, 14(2): 151.
- [2] Chirikjian, J. G.: 1981, *Gene Amplification and Analysis*, Vol. 1, Restriction Endonucleases, Elsevier/North-Holland, Inc., New York. pp. 1—

- 43, 73—100, 165—179, 209—215.
- [3] Hinsch, B. et al.: 1980, *Nucleic Acids Res.*, 8: 623.
- [4] Koncz, C. et al.: 1978. *Eur. J. Biochem.*, 89: 523.
- [5] Modrich, P. et al.: 1976. *J. Biol. Chem.*, 251: 5866.
- [6] Smith, L. A. et al.: 1979. *J. Biol. Chem.*, 254: 1003.