

单链特异核酸酶 S_1 的提取

杨希才 康良仪

(中国科学院微生物研究所, 北京)

Vogt^[1] 从粗的 *Aspergillus oryzae* α -淀粉酶制剂提纯了单链特异的核酸酶 S_1 (简称 S_1 酶), 并详细描述了它的性质。目前已广泛利用这种酶于植物病毒和类病毒 (RNA) 的互补 DNA (cDNA) 的分子杂交中^[2-6]。

本文报道从商品高峰淀粉酶粉制剂提取核酸酶 S_1 及其在 cDNA 杂交中的应用。

材 料 和 方 法

一、化学试剂和缓冲液

1. 高峰淀粉酶: Sankyo Co., Ltd. 日本, 1964 年产品。
2. DE-32 纤维素: Whatman Biochemicals Ltd.
3. Sephadex G-50: Pharmacia Uppsala, Sweden。
4. Sulfo-Sephadex C-50: Pharmacia Uppsala, Sweden。
5. 缓冲液 A: 20mM 醋酸钠, 0.1mM $ZnSO_4$, 5% (V/V) 甘油, pH 4.6。
6. 缓冲液 B: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.05M NaCl, 0.1mM $ZnSO_4$, 5% (V/V) 甘油。
7. 缓冲液 C: 50mM 醋酸钠, pH 3.8, 0.01M NaCl, 0.1mM $ZnSO_4$, 5% (V/V) 甘油。
8. 酶活力测定用缓冲液: 30mM 醋酸钠, pH 4.6, 50mM NaCl, 1.0mM $ZnSO_4$, 5% (V/V) 甘油。

二、变性 DNA 制备

小牛胸腺 DNA, 按 2.0 mg/ml 的浓度溶于 10 mM Tris-HCl 中, pH 7.5, 超声波处理 20 秒钟, 100°C 加热 15 分钟, 即刻在冰水浴中冷却

后, 保存在冰箱备用。

三、酶活力测定

在 1.0 ml 酶活力测定用缓冲液中, 加入 200 μ l 变性 DNA (2.0mg/ml) 或酵母 RNA (2.0mg/ml), 再分别加入由各个分部管收集的洗脱液 20 μ l, 反应总体积 1.22 ml。在 45°C 水浴中保温 10 分钟, 取出放在冰水浴, 加 280 μ l 高氯酸 [0.075% (W/V) UAc, 25% (W/V) 高氯酸] 终止反应。1 小时后, 低速离心 5 分钟, 上清液稀释 5 倍后, 在紫外分光光度计 260nm 处测吸收值。按下式计算酶活力单位:

$$u/\mu l = A_{260nm} \times 1.5。$$

四、蛋白质含量测定

在 Folin-酚法^[7] 测定提取过程中每一步骤的样品中的蛋白质含量。

五、cDNA 制备及其杂交反应测定

按照以前的方法^[4] 从烟草花叶病毒番茄株的一个突变体 N_{14} ·RNA 制备 N_{14} ·cDNA 并进行杂交反应测定。

实 验 结 果

一、 S_1 酶的提取

基本上按 Vogt^[1] 的方法, 用以下步骤提取:

1. 加热处理: 16g 高峰淀粉酶粉末, 加 450 ml 缓冲液 A 及 0.05 M NaCl, 在 4°C 搅拌 1 小时后, 12,000 转/分, 0°C, 离心 10 分钟, 用醋酸将深褐色的上清液调至 pH 5.0, 然后在 75°C 水浴中, 慢慢地使上清液的温度升至 70°C, 立即

本工作得到澳大利亚阿德雷德大学 J. W. Randles 博士, P. Palukaitis 博士和本所田波同志的鼓励和热情支持。

放入冰水浴中冷却至 0°C, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 上清液加缓冲液 A 至 500ml。

2. 硫酸铵沉淀: 将 250g(NH₄)₂SO₄ 慢慢加入到上述清液中, 在 4°C 搅拌 1.5 小时, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 上清液再加 100g (NH₄)₂SO₄, 搅拌 2—3 小时, 除去不溶的 (NH₄)₂SO₄ 后, 12,000 rpm 离心 15—20 分钟, 沉淀溶于 50ml 缓冲液 B, 并在缓冲液 B 中, 4°C 透析, 更换 3—4 次, 每次 1—2L 缓冲液 B。

3. DE-32 纤维素和 Sephadex G-50 层析: 将处理好的 DE-32 纤维素和 Sephadex G-50 装柱。柱的底层装 Sephadex G-50 (1.8 × 11cm), 柱的上层装 DE-32 纤维素 (1.8 × 22cm), 用缓冲液 B 平衡。将上述透析过的样品溶液以 15ml/小时流速吸附到柱上, 先用 200ml 缓冲液 B 洗涤, 再用 800ml 缓冲液 B 作线型梯度洗脱到 0.35M NaCl, 以 6 ml/9 分钟的流速分部收集。按材料和方法所述测酶活力。洗脱图谱见图 1。合并酶活力高的部分 (45ml), 在 1l 缓冲液 C 中透析过夜。

4. Sulfo-Sephadex C-50 层析: 将处理好的 Sulfo-Sephadex C-50 装柱 (1.0 × 15cm), 再用缓冲液 C 平衡。将上述透析好的样品溶液以 4ml/小时的流速被吸附后, 先用缓冲液 c 洗涤,

再用缓冲液 C 作线型梯度洗脱到 0.15M NaCl, 以 4ml/小时的流速部分收集。按材料和方法所述测酶活力。洗脱结果见图 2。汇集酶活力高的部分。

S₁ 酶提取流程和各步骤所得结果列于表 1。由表 1 可见, 经过 DE-32 纤维素与 Sephadex G-50 混合柱层析 (步骤 4) 和 Sulfo-Sephadex C-50

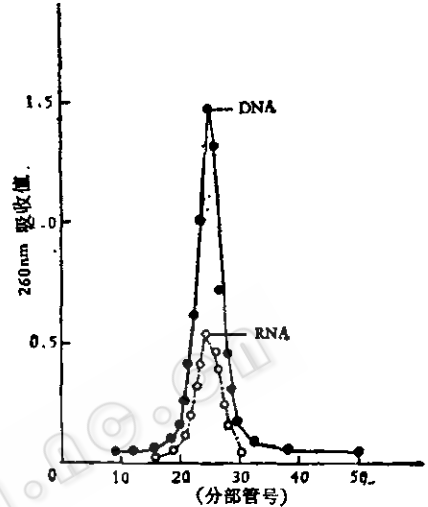


图 2. Sulfo-Sephadex C-50 层析

●—●: 小牛胸腺 DNA 为底物。
○—○: 酵母 RNA 为底物。

柱层析 (步骤 5) 后, S₁ 酶分别提纯 83 倍和 277.14 倍, 比活力分别为 5.81 和 19.40 (u./μg 蛋白), 从 16g 高峰淀粉酶中, 两次层析结果分别得到总酶活力单位为 102 和 16.1 (千单位)。

二、在 cDNA 杂交中的应用

取约 2000 cpm ³H-N₁₄·cDNA 作为底物, 在 S₁ 酶活力测定缓冲液中, 加入不同量的经步骤 4 或经步骤 5 后提取的酶液, 测定了 cDNA 的降解率。经提取步骤 4 的 S₁ 酶液加 5μl (12.5 单位), cDNA 降解率达 97%, 经步骤 5 提取的 S₁ 酶液加 10μl (12 单位), 其降解率也达 97%。

图 3 为经步骤 4 (图 3A) 和经步骤 5 (图 3B) 提取的 S₁ 酶在 ³H-N₁₄·cDNA 与 N₁₄-RNA 杂交反应中的应用。所得的 Rot 曲线和 Rot1/2 值与以前^[4]用别的来源的 S₁ 酶测定的结果很相近。

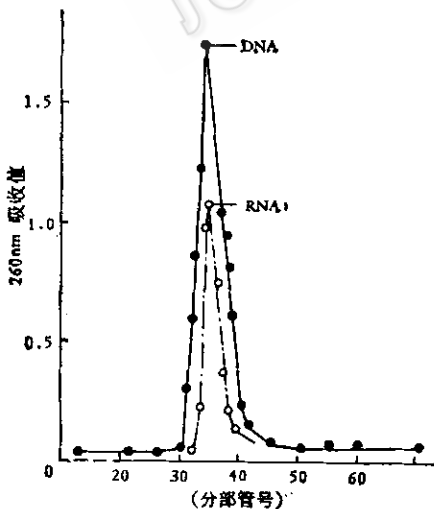


图 1. DE-32 纤维素和 Sephadex G-50 层析

●—●: 小牛胸腺 DNA 为底物。
○—○: 酵母 RNA 为底物。

表 1 S_1 酶提取流程各步骤的提纯倍数与回收率

步骤	体积 (ml)	总蛋白量 (mg)	总酶量 (千单位)	比活(单位/ μg 蛋白)	提纯倍数	回收率 (%)
1. 粗酶液	500	2300	161	0.07	1	100
2. 加热至70°C	500	1200	155	0.13	1.86	96.2
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀	73	77	115	1.50	21.43	71.4
4. DE-32 纤维素和 Sephadex G-50 层析	45	17.55	102	5.81	83.00	63.4
5. Sulfo-Sephadex C-50 层析	10	0.83	16.1	19.40	277.14	10.0

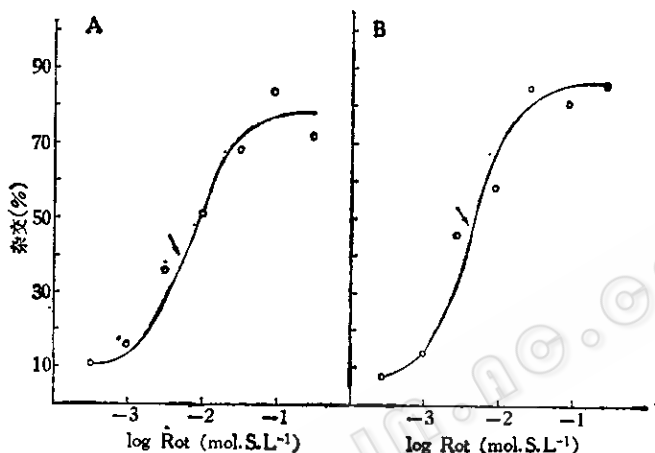


图 3. $^3\text{H-N}_{14}$ ·cDNA 与 N_{14} -RNA 杂交反应动力学

A: 加 5 μl (12.5 单位) 经 DE-32 纤维素和 Sephadex G-50 层析后的酶液;

B: 加 10 μl (12 单位) 经 Sulfo-Sephadex C-50 层析后的酶液。

讨 论

本文所报道的从高峰淀粉酶提取 S_1 酶方法比较简单。从对 $^3\text{H-N}_{14}$ ·cDNA 的降解和在杂交反应测定中应用的结果看, 所提取的 S_1 酶对单链核酸是特异的, 而不会降解 cDNA·RNA 杂交产物。从实用观点看, 经步骤 4 (DE-32 纤维素与 Sephadex G-50 层析) 提取的 S_1 酶即可用, 尽管酶提纯倍数不高 (83 倍) 和酶的比活力也低 (5.7 单位/ μg 蛋白), 但方法简单, 流程短, 得率高 (回收率 63.4%), 适于小批量生产。

参 考 文 献

- [1] Vogt, V. M.; *Eur. J. Biochem.*, **33**: 192—200 1973.
- [2] Gould, A. R. and R. H. Symons.: *Nucleic Acid Research*, **4** (11): 3787. 1977.
- [3] Gonda, T. J. and R. H. Symons: *Virology*, **88**: 361—370. 1978.
- [4] Palukaitis, P. et al.: *生物化学与生物物理学报*, **14**(3): 217, 1982。
- [5] Palukaitis, P. and R. H. Symons: *FEBS Letter*, **92** (2): 268. 1978.
- [6] Randles, J. W. and P. Palukaitis: *J. gen. Virol.* **43**: 649—662. 1979.
- [7] Palukaitis, P. and R. H. Symons: *J. gen. Virol.*, **46**: 477—489. 1980.
- [8] 陈炜等: *科学通报*, **27** (6): 660—664. 1982.
- [9] 潘家秀等: *蛋白质化学研究技术*: P. 28, 科学出版社, 北京, 1962.