

# BamHI DNA 甲基化酶的纯化及对 BamHI 限制性核酸内切酶限制作用的保护作用

何忠效 蒋 晔 薛继艳

郑文尧

(北京师范大学生化及分子生物学研究室) (中国科学院微生物研究所)

**摘要** 用硫酸铵盐析、磷酸纤维素柱层析和肝素-Sepharose 4B 亲和层析从解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 纯化了 BamHI DNA 甲基化酶。并以  $\lambda$ DNA 为底物,研究了  $\lambda$ DNA 被 BamHI DNA 甲基化酶作用后,对 BamHI 限制性核酸内切酶的切割产生了明显的阻抗作用。

**关键词** BamHI DNA 甲基化酶; BamHI 限制性核酸内切酶

大量研究表明, DNA 甲基化作用在基因表达调控中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。DNA 甲基化作用是在 DNA 甲基化酶的作用下得以实现的。DNA 甲基化酶是一类以 S-腺苷酰甲硫氨酸为甲基供体,以 DNA 中胞嘧啶为甲基受体(也有以腺嘌呤为甲基受体)的甲基转移酶类。这个过程对 DNA 的要求有种属专一性和序列专一性,并且甲基化的后果是可遗传的。

这种 DNA 的修饰作用与限制作用是密切相关的。特定序列处的修饰作用,带来了 DNA 大分子的构象变化,从而必将影响某些限制性核酸内切酶对相应部位的识别作用。也就是说,特定部位处的甲基化作用,将为 DNA 分子带来对某些识别该部位是限制性核酸内切酶的阻抗作用<sup>[4,5]</sup>。这种相互关系对保持生物品系遗传稳定性及体外基因操作的研究中都是至关重要的。

## 材料与方 法

### (一) 菌种

解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 是取自中国科学院微生物研究所菌种保藏室,编号: RUB500。

### (二) 主要试剂

1. 磷酸纤维素 P11: 购自英国 Whatman 公司。

2. 肝素-Sepharose 4B: 用瑞典 Pharmacia

公司产的溴化氰活化了的 Sepharose 4B, 参照 Thomas<sup>[6]</sup> 等的方法,并用上海生化制药厂出品的肝素制成。

3.  $\lambda$ DNA 和 PMSF (苯甲基磺酰氟,蛋白酶抑制剂)均购自美国 Sigma 公司。

4. S-腺苷酰-<sup>3</sup>H-甲基-甲硫氨酸(SAM)购自美国 Amersham 公司。

5. BamHI 限制性核酸内切酶 (14U/ $\mu$ l): 购自华美公司分装的 New England Bio-Labs 产品。

6. 其它试剂均为国产。

### (三) DNA 甲基化酶活力检验

参照文献[7]的方法进行。

### (四) 蛋白质含量的测定

按 Folin-酚法进行,以牛血清白蛋白作标准曲线。

### (五) 菌体的培养

用 I.B 培养基,1% 胰胨,0.5% 酵母粉,0.5% NaCl,调 pH 至 7.2。37 $^{\circ}$ C 摇床培养 18 小时左右(以 OD = 2.0 为宜)。离心取菌体并悬浮于 Buffer A (pH7.8, 0.01 mol Tris, 2 mmol EDTA, 10 mmol MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol 巯基乙醇, 1 mmol KCl),洗两次,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### (六) 提纯步骤

本研究是国家自然科学基金(高技术)资助项目。项目号 0388011。

1. 细胞破碎及去核酸: 将 10g 菌体加 20ml Buffer B (pH7.5, 0.02mol Tris、0.02mol  $MgCl_2$ 、0.1mmol EDTA、2mmol 巯基乙醇、0.6mmol PMSF) 于水浴中超声处理 (11kHz) 15 分钟, 注意间歇破碎, 控制破碎悬液的温度在 8℃ 以下。将破碎的细胞悬液 4℃ 离心, 10000g × 90 分钟, 上清液便为粗抽提液。再慢慢加入粗抽提液体积 1/10 的 10% 聚乙烯亚胺, 搅拌 30 分钟。4℃ 下, 3000g 离心 10 分钟, 去除核酸沉淀。

2. 硫酸铵盐析: 将已去除核酸的粗细胞抽提物, 用 30—70% 硫酸铵饱和度和进行分级。在 4℃ 下, 3000g 离心 10 分钟, 收集该饱和度范围内的沉淀。将沉淀以 0.2g/ml 的比例溶于 Buffer P (pH7.2, 0.02mol 磷酸钾缓冲液, 含 0.05mol NaCl、0.1mmol EDTA、0.2mmol 巯基乙醇、0.6mmol PMSF、20% 甘油), 再在 4℃ 下对 Buffer P 透析 20 小时后, 于 4℃ 下 3000g 离心 10 分钟, 取上清液供磷酸纤维素柱层析用。

3. 磷酸纤维素 P11 柱层析: 将磷酸纤维素 P11 依 0.5mol NaOH—0.5mol HCl 的顺序处理, 并用 Buffer P 平衡后, 装柱 (2 × 30cm), 再用 Buffer P 平衡之后, 将透析过的硫酸铵样品约 13ml (0.16mg/ml) 上柱, 并用含 0.05—1mol NaCl 的线性盐浓度梯度洗脱。合并活力峰, 并对 Buffer P 透析, 离心取上清液, 供肝素-Sephrose 4B 柱层析用。

4. 肝素-Sephrose 4B 柱层析: 将肝素-Sephrose 4B 柱 (1.4 × 25cm) 用 Buffer P 平衡后, 将透析后的 50ml 磷酸纤维素下柱样品再上此亲和柱, 并以 0.05—1mol NaCl 盐梯度洗脱。合并活力峰, 用聚乙二醇 P-1000 浓缩并对 Buffer P 透析, -20℃ 保存备用。

### (七) Agarose 电泳

1. 修饰反应: 在 50 $\mu$ l 反应混合物中含有: 20mmol Tris, pH7.6; 0.1mmol DTT; 5mmol EDTA; 9 $\mu$ mol SAM; 5 $\mu$ g  $\lambda$ DNA, 并加入 100 $\mu$ g DNA 甲基化酶制品。按标准反应程序, 37℃ 保温 10 分钟及 1 小时后, 置冰浴中止反

应。

2. 限制反应: 向上述修饰反应后的混合物中, 加 NaCl 至 0.15mol、加  $MgCl_2$  至 20mmol、再加 12 $\mu$ l BamHI 限制性核酸内切酶 (14U/ $\mu$ l), 37℃ 保温 30 分钟后, 则可用 1% Agarose 电泳检验此反应混合物; 另取 50 $\mu$ l 修饰反应后的混合物, 加 2 $\mu$ l 热失活的 BamHI 限制性核酸内切酶, 进行同样的限制性反应, 作为空白对照。

3. 1% Agarose 电泳: 将甲基化和未甲基化的  $\lambda$ DNA 直接用 BamHI 限制性核酸内切酶切割后, 各取约 1 $\mu$ g  $\lambda$ DNA, 并加适量溴酚兰。电泳约 5—7 小时后, 将凝胶用溴化乙锭染色后于紫外灯下观察并拍摄电泳图谱。

## 结果和讨论

### (一) 磷酸纤维素 P11 柱层析

将 30—70% 硫酸铵盐析并透析后的样品, 上到磷酸纤维素柱上进行层析, 其层析图谱如图 1 所示。结果表明, DNA 甲基化酶主要分布在第一个洗脱峰内。

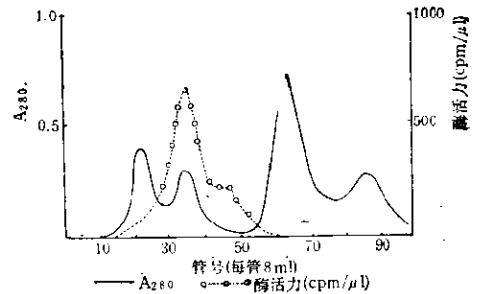


图 1 BamHI DNA 甲基化酶在磷酸纤维素柱上的层析图谱

### (二) 肝素-Agarose 亲和层析

将磷酸纤维素柱层析的 BamHI DNA 甲基化酶活力峰合并透析后, 再加入到肝素-Agarose 柱上进行亲和层析。结果如图 2 所示, 加梯度前出现的较高的蛋白峰为穿过峰。结果表明, DNA 甲基化酶主要分布在加梯度后, 第一洗脱峰的后半部。

### (三) 各提纯步骤的活力回收及提纯倍数

表 1 BamHI DNA 甲基化酶的提纯程序

步 骤	体 积 (ml)	蛋白质浓度 (mg/ml)	酶活力 (cpm/ml)	比活力 (cpm/mg)	总蛋白 (mg)	总活力 (cpm)	蛋白回收 (%)	提纯倍数
去核酸后的粗抽提液	38	47.8	51821	1084	1817.2	1969200	100	1
30-70%硫酸铵沉淀	12.8	124.7	128791	1032.9	1596.6	1648530	87.9	1
磷酸纤维素 P11, 柱层析	70	0.82	20187	24618.3	57.4	1413101	3.15	22.7
肝素-Sephrose4B 层析	50	0.1	23674	236740	4.9	1183700	0.27	218

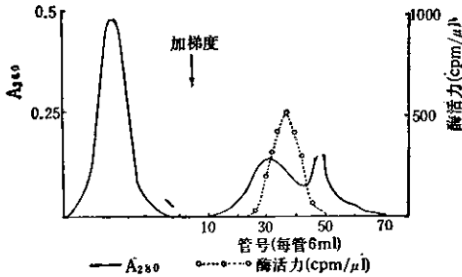


图 2 DNA 甲基化酶在肝素-Agarose 柱上的亲和层析

(表 1)。

表 1 列出了各步提纯程序的总蛋白、总活力及提纯倍数。结果表明,经这几步提纯可将该酶比活力提高 218 倍。

#### (四) DNA 甲基化作用对 BamHI 限制性核酸内切酶的阻抗作用(图 3)

图 3 是  $\lambda$ DNA 及用 BamHI DNA 甲基化酶作用不同时间后的  $\lambda$ DNA,经 BamHI 限制性核酸内切酶作用后,在 1% Agarose 电泳中表现出三条不同的区带。结果表明,未甲基化的  $\lambda$ DNA 可被 BamHI 限制性核酸内切酶所识别,出现三条新的、分子量较小的 DNA 碎片(图 3-1);而较彻底被 BamHI DNA 甲基化酶甲基化的  $\lambda$ DNA (反应 1 小时)则完全不再被 BamHI 限制性核酸内切酶所切割,只出现一条单一的  $\lambda$ DNA 区带(图 3-2)。甲基化反应 10 分钟的,对 BamHI 只有微弱的保护作用(图 3-3)。

从上述结果可见,经这些提纯步骤后,BamHI DNA 甲基化酶可被提纯 200 倍左右,但用聚丙烯酰胺凝胶电泳检查,产品尚未达到均一水平(图谱未示)。我们正继续纯化此酶,待得到均一产品后将对其性质进行深入研究。用所



图 3 未甲基化和甲基化的  $\lambda$ DNA, 在 1% Agarose 电泳中的 BamHI 限制性核酸内切酶切图谱  
1. 未甲基化的  $\lambda$ DNA 2. 甲基化反应 1 小时的  $\lambda$ DNA  
3. 甲基化反应 10 分钟的  $\lambda$ DNA

得到的部份纯化的 BamHI DNA 甲基化酶,对

CH<sub>3</sub>

|

$\lambda$ DNA 进行甲基化反应,使 5'.....GGATCC... 3' 部位甲基化,从而使 BamHI 限制性核酸内切酶不再能切割这个部位: 5'.....GGATCC... 3'。这说明随着甲基向  $\lambda$ DNA 中的引入,使 BamHI 限制性核酸内切酶的切割部位不再被该酶所识别,从而对这种切割作用产生了保护作用。这种作用不仅在生物体内(特别是原核生物)对保护一些基因部位的完整性有重要作用,而且可被用来定向地控制基因操作,取得合适的基因片段,进行理想的基因重组等工作。

### 参 考 文 献

- [1] Giulio L. Cantoni and Aharon Razin: "Biochemistry and Biology of DNA Methylation" Alan R. Liss, Inc. New York (1985).
- [2] Aharon Razin, Howard Cedar, Arthur D. Riggs: "DNA Methylation Biochemistry and Biological Significance" Springer-Verlag. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo (1984).
- [3] 何忠效: 微生物学通报, 12(2): 75, 1985.
- [4] Van der Ploeg, L.H.T. and R. A. Flavell: *Cell*, 19:947, 1980.
- [5] Waalwijk, C. and R.A. Flavell: *Nucleic Acids Res.* 5:3231, 1978.
- [6] Thomas, A. B. et al.: *Nucleic Acids Res.* 5(8): 2561, 1977.
- [7] 何忠效等: 科学通报, 30(21): 1660, 1985.