

發明專利說明書

※申請案號：

※申請日期：

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

台灣土壤分離之菌株及核酸限制酶/A newly identified restriction enzyme, SchI, from a local strain of Streptomyces sp. in Taiwan

二、申請人：共 人

指定為應受送達人

三、發明人：

◎專利代理人：

四、聲明事項

主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

主張專利法第二十六條微生物：

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存

五、中文發明摘要：

由台灣竹山土壤中篩選所得之竹山鏈黴菌 (*Streptomyces chusanensis*, ZS-2)，產生一新的第II型核酸限制酶，命名為SchI。純化後的SchI，經鑑定為一具有次單元分子量28kDa的同雙聚體，且無外切酶之活性。此一限制酶切磷二酯鍵，所切的位置在DNA順序5'-CCGCGG-3'的第四個位置上的C與第五位置上的G之間，為目前已被廣泛應用的SacII的同切酶。在不同的反應條件來比較SchI與SacII，發現SchI較SacII更適合用於各種基因基礎和應用的研究。

六、英文發明摘要：

Streptomyces chusanensis ZS-2, isolated from a soil sample in Chusan of Taiwan, was found to produce a new Type II restriction endonuclease. This restriction enzyme was designated as SchI. The purified enzyme was characterized to be a homodimer with a subunit molecular weight of 28 kDa. It was apparently free from exonuclease activities. It cleaves the phosphodiester bond between the 4th "C" and the 5th "G" on the 5'-CCGCGG-3' sequence of DNAs leaving a 2-nucleotide protruding end at its 3' site. This data suggests that SchI is an isoschizomer of SacII. In addition, based on the comparison between SchI and SacII regarding of reaction parameters, it seems that SchI is a better choice of restriction enzyme for genetic analysis and mapping.

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

[發明內容]

核酸限制酶(restriction endonucleases)的發現，使得科學家能夠進行基因的分離(isolation)、定序(sequencing)、重組(recombination)、表現(expression)及調節(regulation)等基礎和應用的研究。其應用之廣遍及醫、農、工、礦、化、能源、環境各方面。因此，這種酶的研究，世界各

地 都在進行，且陸續有新的限制^Ⅱ被發現。而目前我國研究 單位及工業界，所使用之限制^Ⅱ皆仰賴 國外進口，損失外 匯甚鉅。而限制^Ⅱ之生產及開發屬於高度技術密集之產 業，不需要很大的廠房及 許多的勞力，非常適合天然資源 有限的台灣來發展。

進行限制^Ⅱ之生產及開發，首先需要的是限制^Ⅱ生產 菌株。獲得限制^Ⅱ生產菌株，有兩個主要的途 徑，一是向 國外購買，一是自行篩選。向國外購買，通常需要付相當 高的權利金，生產成本會提 高，而降低市場的競爭力。因 此，自行篩選是有其必要的。

在選擇篩選的對象方面，由於目前重組DNA技術已 應用在放線菌屬(*actinomycetes*)，尤其是鏈黴菌 屬 (*Streptomyces*)，更是日益被重視，不僅是因為它產生抗 生素，在抗生素的市場佔重要的地 位，而且，同時具有下 列幾項特點：一、它對人及動物均沒有致病性；二、其遺 傳物質能在不同 菌株(strains)間彼此交換；三、所產生的蛋 白質有很多能分泌至細胞外；四、人類對它的醱酵經 驗已 經很豐富等特點；造成遺傳工程學者競相以鏈黴菌屬菌株 為研究材料。鏈黴菌中新的核酸限 制^Ⅱ生產菌株於是開始 陸續被開發出來。

本發明是由台灣竹山土壤中篩選出一新的第二型核酸 限制^Ⅱ生產菌，經菌種鑑定結果顯示是屬於新的 菌種，命 名為竹山鏈黴菌(*Streptomyces chusanensis*, ZS-2)。此菌株 所生產之核酸限制^Ⅱ，命 名為SchI。從菌體打破到以聚乙 烯亞胺沈澱，硫酸銨沈澱，及二乙氧乙基-篩分洋菜糖 (DEAF- Sepharose)管柱層析純化，SchI被純化了34倍，回 收率達15%，專一活性達76,000(U/毫克)且無外 切^Ⅱ (exonuclease)之活性。SchI為一分子量約為56千道爾頓 (kilodaltons；簡稱kDa)的同雙聚體 (homodimer)。此一限 制^Ⅱ切磷二酯鍵，所切的位置在DNA順序5' -CCGCGG-3' 的第四個位置上的C與 第五位置上的G之間，為目前已被 廣泛應用的SacII的同切^Ⅱ (isoschizomer)。在不同的反應 條件來 比較SchI與SacII，發現SchI較SacII有較佳的特 性，能在較多不同的反應條件下，有效率的來切 DNA，較 SacII更適合用於各種基因基礎和應用的研究。

綜合菌株ZS-2的化學成分分析、培養特性研究、生 理特性研究，以及掃描電子顯微鏡所觀察到的結 果，顯示 該菌株ZS-2是屬於鏈黴菌屬(*Streptomyces*)的菌株。如表 七所示SchI與SacII兩者於碳源 的利用情形上有明顯的不 同，SchI生產菌對阿拉伯糖(arabinose)利用度較差(doubtful utilization)，而對棉子糖(raffinose)及蔗糖(sucrose)的利用 良好(good utilization)。相對 地，SacII的生產菌亞瑟鏈黴 菌(*S. achromogenes*)則對前者阿拉伯糖(arabinose)的利用良 好，卻 無法利用(no utilization)後面的兩個糖。顯示SchI 生產菌與SacII生產菌，兩者是不一樣的菌 株，SchI生產 菌為一新的限制^Ⅱ生產菌。

研究SchI分子量，在SDS-PAGE中獲得單一個環帶 (single band)的純度。將SchI打破菌體以聚乙 烯亞胺沈澱， 進一步以三種不同性質的管柱層析利用快速蛋白分析儀 (FPLC)純化，包括Heparin Sepharose 6B(affinity column)、DEAF-Sepharose(ion exchange column)及Sephacryl S-300 HR(gel filtration column)，經過三種不同的管柱層析後所 得的含SchI的分劃(fractions)，濃縮 後，才以SDS-PAGE 觀察其分子量。

(一)由本省竹山篩選到一核酸限制^Ⅱ生產菌株ZS-2

由文獻報告中已知限制^Ⅱ的活性測定條件，得知主要 影響核酸限制^Ⅱ活性的因素，在於酸鹼值(pH)及 鹽的濃度。依照Biochemicals, P. P. -L. 於1983年活性條件可簡化歸類 為六種如表一所示。從台灣 各地區分離的三十六株放線菌 (actinomycetes)菌株中，發現由本省竹山收集編號ZS-2的 菌株，其 粗萃取液(crude extract)，在六種不同的反應條件 表一中的PL-4、PL-5及PL-6二種反應條件下， 顯示出具 有切 λ DNA的活性如圖一所示。

(二)菌株ZS-2經鑑定為一新發現的鏈黴菌屬 (*Streptomyces*)

菌株能生產核酸限制^Ⅱ的菌株ZS-2，為未知的菌種， 因此要做菌種的鑑定與分類的工作。

A. 培養特性

依照Shering, E. B. 等人於1966年Intern. J. Syst. Bacteriol. 第16卷第313頁國際鏈黴菌屬計劃 (International *Streptomyces* Project, ISP)，採用各種組成的培養基進行劃 線接種培養。接種 後之瓊脂平板，置28°C培養，每週觀察 一次，連續四週，記錄其生長情形，菌落形態和顏色以及 色素產生等。

例一、菌株ZS-2的生長特徵

菌株ZS-2在各種不同培養基上的生長特徵如表二及 圖二所示。該菌株的生長狀態除了在無機鹽-澱 粉瓊脂培 養基(Inorganic Salts-starch agar [ISP-4])上較差外，其它培 養基皆可供其良好的生 長。在燕麥片培養基(ISP-3, Oatmeal agar)中，菌落背面呈明顯之藍色，且有可溶性之藍色色素 分泌至菌落周圍之培養基內，氣生菌絲(aerial mycelium)的 顏色，則隨培養基之不同而異，且其 外型皆呈簡單長螺旋 狀(simple, long, spiral)，如圖三所示。

B. 掃描電子顯微鏡(Hitachi S-250)觀察

依照Shering, E. B. 等人於1966年Intern. J. Syst. Bacteriol. 第16卷第313頁國際鏈黴菌屬計劃 (ISP)之植物 蜜糖瓊脂培養基上，於28°C培養三週的菌體，粘至金屬鋁 架(Stub)之膠面上，以離子

塗層機將樣品鍍上金膜，用掃描電子顯微鏡加速電壓於25 kV下觀察及照相，以檢視其形態及孢子表面結構。

例二、菌株ZS-2之孢子表面結構

掃描電子顯微鏡觀察之結果如圖四，菌株ZS-2孢子表面結構呈平滑狀(smooth)，其大小約為0.65-0.68 μm × 0.65-0.9 μm ，其孢子鏈(spore chain)呈簡單螺旋狀，且長度超過40個孢子以上。

C. 細胞化學成分分析

依照Joseph, L. S. 等人於1964年Appl. Microbiol. 第12卷第226頁以及Becker, E. B. 等人於1964年Appl. Microbiol. 第16卷第313頁之方法進行細胞化學成分之分析。

1. 細胞壁化學成分二胺基庚二酸(diaminopimeic acid, DPA)之分析

將菌株ZS-2在YD培養基(broth)培養兩天後，過濾取得菌絲於室溫下風乾後，以6N鹽酸(HCl)在100°C砂浴中水解18小時後，過濾所得之水解液在蒸氣浴上蒸乾。乾燥物加水溶解，所得之溶液以薄層矽膠平板色層分析法分析其成分。

展開液為80:60:4:10(v/v/v/v)比例之甲醇/水/吡啶/鹽酸(methanol/H₂O/pyridine/6 N HCl)混合液，展開後的薄層矽膠平板，噴灑上寧海準(ninhydrin)成色劑後，在100°C烤箱烘乾後，有二胺基庚二酸(DPA)的位置呈現藍色。

2. 細胞水解液之醣類成分分析

取約25毫克乾重的菌絲，以1.5毫升1N硫酸在沸水浴中進行水解2小時，冷卻後，逐漸加入飽和的氫氧化鈣(barium hydroxide)溶液至酸鹼值(pH)為5.2-5.5。將此溶液在9,000×g, 4°C下離心15分鐘，除去沈澱物，上清液經風乾後，再以0.3毫升的蒸餾水溶解，所得溶液在薄層矽膠平板上以10:6:6:1(v/v/v/v)比例之正-丁醇(N-butanol)/水/吡啶(pyridine)/甲苯(toluene)為展開液，將展開後之矽膠平板噴灑呈色劑溶液。該溶液係以3.25克的鄰苯二甲酸(phthalic acid)之呈色劑溶於100毫升含有2毫升苯胺(aniline)的水溶液先經正-丁醇(N-butanol)飽和方式加以製備。在100°C的烤箱中烘乾後，如有單醣則呈現紫色。

例三、菌株ZS-2之類別

依照Buchanan B. 等人於1974年第8版Bergey's manual of determinative bacteriol.之資料，放線菌尤其細胞壁的主要成分不同可分為四類(type)如表三所示；又依其細胞內所含醣類之不同可分為四型(pattern)如表四所示。由上述兩表可將放線菌中的各屬(genus)分為如表五之五大類。菌株ZS-2的化學成分分析，結果如圖五所顯示，菌株ZS-2的細胞壁含有LL-DPA，而其菌體不含有半乳糖(galactose)、葡萄糖(glucose)、木糖(xylose)、鼠李糖(rhamnose)及阿拉伯糖(arabinose)、甘露醇(mannose)等七種單糖，所以，菌株ZS-2依其細胞壁的化學成分分析，推測菌株ZS-2屬於II類(type)，包括鏈黴屬(Streptomyces)、鏈黴輪生屬(Streptoverticillium)、微孢屬(Microellobosporia)或孢體屬(Sporichthya)等屬。

D. 菌株ZS-2生理特性研究

依Gorden, R. E. 等人於1953年J. Bacteriol. 第66卷第41頁所描述的方法，將菌株ZS-2接種於分別含有明膠(gelatin)、酪蛋白(casein)、酪氨酸(tyrosine)等瓊脂平板上，於28°C下培養五天後，觀察結果，其中牛奶的蛋白質消化(peptonization)及硝酸鹽的還原實驗於試管中進行。

例四、菌株ZS-2生理特性

由表六之結果，顯示菌株ZS-2在固體培養基上可生產黑色素，有液化明膠的能力，亦可消化牛奶中的蛋白質，及水解澱粉和酪蛋白(casein)，但不產生硫化氫，不能還原硝酸鹽，其最適合的生長溫度範圍在15-40°C之間。

綜合以上分析菌株ZS-2的化學成分、培養特性研究、生理特性研究、以及掃描電子顯微鏡所觀察到的結果，顯示出菌株ZS-2是屬於鏈黴菌屬(Streptomyces)的菌株。

E. 醣類的利用特性實驗

依照Shering, E. B. 等人於1966年Intern. J. Syst. Bacteriol. 第16卷第313頁國際鏈黴菌屬計劃(ISP)方法進行，除肌醇(inositol)及纖維素(cellulose)採用乙醚滅菌外，其餘的醣類如植物蜜糖(raffinose)、甘露醇(mannitol)、葡萄糖、半乳糖(galactose)、蔗糖、木糖(xylose)及阿拉伯糖(arabinose)皆以過濾法滅菌。並以硫酸銨作為氮源瓊脂平板上的各種醣類濃度為1%，於ISP-1培養液培養二天之菌株離心，所得菌絲以水洗三次後，接種在培養平板上，在28°C培養10-16天。

例五、比較菌株ZS-2

由上述實驗結果顯示，菌株ZS-2可利用大多數碳源，而對阿拉伯糖(L-arabinose)利用情形較差，對纖維素(cellulose)則完全無法利用，經與Buchanan B. 等人於1974年第8版Bergey's manual of determinative bacteriol. 資料內已知的鏈黴菌屬菌株比較，結果證實沒有完全與它相同的菌種，由於菌株ZS-2採集地點為竹山，暫時命名為竹山鏈黴菌(Streptomyces chusanensis)其所生產的限制酶，則命名為SchI而最接近其特性的菌株是亞瑟鏈黴菌(Streptomyces achromogenes)比較結果如表七。

(三)核酸限制^[15]SchI的產量在生長至對數後期或恆常前期時最高

A. 菌體的醱酵槽生長情形

將菌液以50%(v/v)接種量種入含9公升YD培養液，YD培養液係含有1%酵母抽出物(yeast extract)及1%葡萄糖的醱酵槽(Chemap AG, LF 7/14/20, Swiss)內進行7天的醱酵。其醱酵條件為：28°C下，每分鐘500轉速的攪拌速率，及每分鐘5公升的空氣供應量，醱酵期間並以矽油(silicone oil, KM-72)作為消泡劑。每日取樣150毫升，測量其酸鹼值(pH)，沈澱菌絲量，及限制^[15]活性。

例六、菌株ZS-2生長情況

在9公升YD培養液的醱酵槽內生長情況見圖六，由不同時間、單位體積內菌絲沈澱量的多寡，可知菌株ZS-2在第二天已生長至恆常期；而限制^[15]SchI的產量，在生長到40個小時後，也就是對數後期或恆常前期時最高，因此，定在此時來收集菌體分離純化SchI。

B. 菌體的大量培養

依照Pirrotta, B. 等人於1980年出版之General purification schemes for restriction endonuclease，由100毫升YD培養液內生長三天的菌液種入含有2公升YD培養液的5公升內凹錐瓶內，以每分鐘200轉速在28°C振盪培養，待生長培養至恆常期時收集菌體。

(四)竹山鏈黴菌(*Streptomyces chusanensis*)菌株ZS-2限制^[15]SchI的純化

A. 粗萃取液的製備：

將儲藏於-40°C的菌體取出解凍後，稱取50克(限制^[15]生產菌株篩選時秤取1克，以後其所添加之試劑均按比例降低)，加入300毫升的TEM緩衝液，置於冰水浴中，使用細胞震碎器(20 kHz, CELL DISRUPTOR Model W-2258, HEAT SYSTEMS-ULTRASONICS, Inc.)，以200watts功率，每操作30秒後，休息2-3分鐘，反覆操作，時間總計10分鐘，打破的細胞均質液，於4°C下，以14,700xg離心30分鐘，取出上清液，即為核酸限制^[15]之粗萃取液(crude extract)。

TEM緩衝液

20 mM Tris-HCl (pH7.5)

0.5mM EDTA

7 mM 硫化醇(pH7.5)

B. 聚乙烯亞胺(polyethyleneimine; PEI)沈澱分劃：

依照Pai, S. H. 等人於1984年之Proc. Natl. Sci. Council. 第8卷第41頁資料，將粗萃取液加入適量的氯化鈉，使其濃度達0.15M，並加入10%(v/v)聚乙烯亞胺水溶液(用鹽酸調酸鹼值(pH)至7.5)，使其濃度達0.2%(v/v)，於4°C攪拌30分鐘，以12,000xg離心15分鐘收集沈澱，加入32毫升含有0.15M氯化鈉的TEM緩衝液，並用頗桐(polytron)打散成懸浮液後，在4°C以12,000xg離心15分鐘收集沈澱，加入24毫升含有0.6M氯化鈉的TEM緩衝液，離心方法同前收集沈澱，再以16毫升含有0.6M氯化鈉的緩衝液，同法操作一次。將兩次含有0.6M氯化鈉的清洗液收集在一起。

C. 硫酸銨沈澱分劃：

將聚乙烯亞胺沈澱分劃所得之^[15]溶液，添加定量細粉末狀之硫酸銨，使達70%飽和，攪拌30分鐘後，以4°C、48,000xg離心30分鐘，收集沈澱，溶於少量含有10%甘油的TEM緩衝液中，並以相同的緩衝液1000毫升透析2次，在4°C測透析後的緩衝液導電度值，必須小於0.6 mMHO。

D. 快速管柱層析分離

將硫酸銨沈澱分劃所得的^[15]溶液，經孔徑0.45 μm 濾膜過濾後，以法瑪西(Pharmacia)公司的快速蛋白質分析儀(FPLC)之二乙氧乙基-篩分洋菜糖(DEAE-Sepharose)快速管柱層析管(20x2cm)分離。DEAF-Sepharose快速管柱層析管以含有0.1M氯化鈉的緩衝液流洗，平衡至280nm吸光度平穩無變化後，注入已過濾的^[15]溶液，以每分鐘2毫升相同流速用含有1.0M氯化鈉的相同緩衝液流洗，氯化鈉濃度自0.1~0.2M呈直線梯度改變，洗出限制^[15]，最後用0.4M氯化鈉將吸附較強的雜質洗去。收集具有限制^[15]活性的層析液部分，以超過濾裝置CX-10或pm-10超過濾膜(43 mm)濃縮，以上純化過程於室溫下操作，純化後^[15]溶液儲存於4°C。

例七、菌株ZS-2限制^[15]SchI的純化

菌株ZS-2限制^[15]SchI的純化結果整理於表八，粗萃取液以PEI沈澱除去核酸所得之上清液，再經70%飽和度的硫酸銨分化，收集沈澱部分，溶於少量含有10%甘油的TEM緩衝液中後，以DEAF-Sepharose快速管柱層析純化。當流洗條件是以0.1至1.0M氯化鈉呈直線梯度改變時，所得之分離效果如圖七所示。如設定較佳的流洗條件，重複實驗，則可得最佳層析效果如圖八所示，並且顯示第4管具有很強之外切^[15](exonuclease)活性，而核酸限制^[15]活性則集中在第22管至34管，亦即在0.1至0.16M氯化鈉直線梯度的範圍內，經此法純化已可除去大部分蛋白質，所以純化倍數可高達34倍，但回收率僅得15%，顯示DEAE-Sepharose快速管柱層析純化過程中損失大量限制^[15]，主要原因可能是因為上述操作快速蛋白質分析儀(FPLC)過程均在室溫下操作所致，所以操作快速蛋白質分析儀純化限制^[15]必須快速，而且儘可能的降低室溫。

E. 膠過濾快速管柱層析分離：

以法瑪亞(Pharmacia)公司之膠過濾(Gel filtration)管柱 Superose 6 prepacked HR 10/30(10mmx30cm)或 Sephacryl S-300HR用快速蛋白分析儀進一步純化上述以 DEAE-Sephacryl 分離所得含限制³²SchI之層析液。先以含有1.0M氯化鈉的TEM緩衝液平衡，注入³²溶液或標率蛋白質後，繼續以含有1.0M氯化鈉的TEM緩衝液流洗，收集有限制³²活性的部分。由其所流洗距離及標率蛋白質的流洗距離比較，測定其分子量大小。

例八、限制³²SchI之分離

將以DEAF-Sephacryl管柱層析分離所得含限制³²SchI之層析液注入Superose 6 prepacked HR 10/30，操作過程中平衡及流洗緩衝液均為含有1.0M氯化鈉的TEM緩衝液，其純化結果如圖九所示，可得到一個具有活性的尖峰，為估算其分子量，在相同條件觀察膠過濾蛋白質分子量標準品的移動度，結果如圖十及圖十一所示，由此可估算出SchI分子量約為56 kDa。

F. Heparin Sepharose 6B快速管柱層析分離：

秤取法瑪亞(Pharmacia)公司的Heparin Sepharose 6B 2克，加入25毫升TEM緩衝液，靜置15分鐘，使其膨脹後，以400毫升TEM在熔接玻璃(Sinter glass)上過濾清洗除氣後，填充在法瑪亞(Pharmacia)公司的管柱HR 10/10(8x1 cm)內，然後裝置在快速蛋白質分析儀上，先以TEM緩衝液流洗平衡後，注入已透析、濃縮的³²溶液800微升(μ l)，並繼續以每分鐘2毫升的流速流洗25毫升後，以80毫升體積，氯化鈉濃度自0~1.0M呈直線梯度改變。收集具有限制³²活性的層析液，以緩衝液TEM透析，並經CX-10濃縮。如以50%甘油及500微克/毫升牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin；簡稱BSA)為保護劑的方法儲存於-20°C，可保存相當久的時間。

例九、限制³²SchI分離：

將以Superose 6 prepacked HR 10/30管柱層析分離所得之³²溶液，注入Heparin Sepharose 6B親和力層析管柱，以氯化鈉濃度自0~1.0M呈直線梯度改變流洗，其結果如圖十二所示，可得到一個活性尖峰，在第23管至第26管，亦即濃度0.54~0.68M氯化鈉梯度的範圍內，由於只有一個尖峰，表示經過膠過濾層析所得的³²溶液，其純度已相當高了。

若未經DEAF Sepharose Fast Flow及膠過濾管柱純化的³²溶液直接以Heparin Sepharose 6B純化，其結果如圖十三，在同一個地方第24管到第27管，亦可得到與圖十二相類似的一個單一活性尖峰，而其它大多數雜質並不吸附，在前面幾管即被洗出，顯示Heparin Sepharose 6B的親和力純化效果極佳。綜合以上A~F的純化方法，二日內即可完成，得到純度高可供應用的核酸限制³²SchI。

G. 醃活性的測定：

限制³²活性單位(unit, U)係在最適當條件下，於25毫升的反應體積中反應1小時，能完全水解0.5微克 λ DNA的³²量，定為一活性單位。在³²純化過程中，依照Maniatis, T. 等人於1982年之A laboratory manual第150~185頁資料，³²活性係利用洋菜膠電泳法(agarose gel electrophoresis)來分析，將純化過程中經濃縮的³²液適當稀釋，分別取5微升加入盛於耶舵管(Eppendorf tube)的20微升反應液中，於37°C恆溫反應1小時後加入5微升反應停止液，反應停止後在65°C加熱5分鐘，以0.4%洋菜膠體在含有TA緩衝液的電泳槽內，以50V電泳5小時後，於DNA呈色液(0.5-1.0 μ g/ml溴化乙錠)中染15分鐘，最後在波長302 nm的紫外光透照偵測器下觀察及照相，以能完全水解DNA的最大稀釋倍數，即為此5微升³²的活性單位。

反應液

10 mM 三羥甲基氨基甲烷一氯化氫(Tris-HCl) (pH7.5)

10 mM 氯化鈉

7 mM 硫乙醇

100 μ g/ml牛血清白蛋白(BSA)

0.5 μ g脫氧核糖核酸(DNA)

停止液

25%甘油

0.1M乙底酸二鈉鹽(Na_2EDTA)

0.05% 溴酚藍(BPB)(pH8.0)

1% 硫酸十二酯鈉(SDS)

TA緩衝液

40 mM 三羥甲基氨基甲烷鹼(Tris Base)

200 mM 醋酸鈉

18 mM 乙底酸(EDTA)(pH7.8)

H. 蛋白質的測定：

蛋白質濃度以Bradford法測定，依照Bradford, M. A. 等人於1976年之Anal. Biochem. 第72卷第248頁資料，以BSA為標準品，測定³²蛋白質質量。

例十、菌林ZS-2之粗萃取液蛋白質測定

菌株ZS-2之粗萃取液經聚乙烯亞胺(PEI)和硫酸銨沈澱，以及DEAE-Sepharose快速管柱層析分離，已可除去大部分蛋白質，純化倍數達34倍，回收率達15%，而專一活性為76,000U/mg。如以長時間反應法來鑑定外核酸限制酶的活性，則在37°C以10個單位(U)的限制酶，反應16個小時，其在洋菜膠(agarose gel)泳動的圖形與反應一個小時完全一樣(如圖十四所示)，表示已無明顯的外核酸限制酶的存在。

(五)酶分子量的測定：

A. Superose 6™快速膠過濾(gel filtration)管柱層析

依前述第(四)之E節中所述之方法，以法瑪亞公司之膠過濾(Gel filtration)管柱Superose 6 prepacked HR 10/30 (10mmx30crn)，在快速蛋白分析儀上，分析經DEAE-Sepharose純化所得的酶溶液。

例十一、研判SchI活性

綜合圖九、十及十一，分析研判SchI活性相關位置，經對照而得其分子量約為56 kDa，是屬於一個中等分子量的酶。

B. SDS-聚丙醯胺膠體電泳：

酶的單聚體(subunit)分子量以SDS-聚丙醯胺膠體電泳鑑定。酶溶液先與2.5%SDS、5%硫乙醇之Tris-HCl緩衝液(0.07M, pH8.0)於100°C加熱5-10分鐘後，再加2.5微升0.1%溴酚藍(bromophenol blue)混合，然後以濃度10%的分離用膠體(separating gel)，濃度2.5%的濃縮用膠體(stacking gel)的電泳管(0.65x9.8cm)以泳動緩衝液(pH8.3)進行電泳。電流強度為2 mA/膠體，通過濃縮用膠體後，改成7 mA/膠體，並以法瑪亞(Pharmacia)公司的低分子量電泳標率蛋白質組(Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit)中所含六個蛋白質為分子量計算對照標準品。電泳後立即測量膠體長度及指示染料移動距離，以供染色後膠體變化時校正相對移動度(R_m)值。再以染色液染色30分鐘以上，再以退色液脫色8小時以上，膠體可保存於7%冰醋酸。

泳動緩衝液(pH 8.3) 每公升中

三羥甲基氨基甲烷鹼(Tris Base) 3.027 克

甘氨酸 14.41 克

硫酸十二酯鈉(SDS) 1 克

染色液

0.1% 苦麥西藍(Coomassie brilliant blue R-250)

50% 甲醇

10% 冰醋酸

退色液

7% 冰醋酸

50% 甲醇

例十二、SchI之蛋白質分子量

將SchI與標準蛋白質在相同狀況下，經SDS及加熱變性處理後，進行SDS-膠體電泳，所得結果如圖十五所示，可求出各種蛋白質在膠體中的相對移動度(R_m)，再以log 分子量對相對移動度做圖，則得圖十六，利用外插法可估算出SchI單聚體的分子量約為28 kDa。此結果與前述膠過濾管柱層析所得的未變性SchI的分子量56 kDa相對照，可推知SchI蛋白質分子為一同雙聚體(homo-dimer)，其分子量約為56 kDa。而SacII(新英格蘭公司，New England Biolabs)中蛋白質的分子量為67

kDa(圖+五的欄2)與BSA 一樣，因此，可能該67 kDa的蛋白質分子是外加之BSA，目的是增加SacII存放地安定度。

(六)SchI所鑑識核酸序列的決定-SchI和SacII為同切 酶(isoschizomers)

A. SchI與SacII鑑識的位點均為5'-CCGCGG-3'

由於SchI具有核酸限制酶的活性，且經相當之純化，進一步就是分析SchI所鑑識(recognize)切割的核酸序列。

例十三、SchI與SacII為同切酶

將中 ϕ X174 RFI DNA、Ad-2DNA與 λ DNA分別與 SchI於標準活性分析法中反應作用後，在同一片洋菜膠體上泳動，結果由圖十七得知SchI對上述不同的切割數目分別是1、>22及4。同時，SchI與SacII所得的切割圖譜完全一樣(如圖十七所示)，顯示兩者所鑑識的位置均為5'-CCGCGG-3'，SchI與SacII為同切酶(isoschizomers)。依照 Arrand, J. R. 等人於1985年Nucleic Acids Res. 第13卷第 r165-r200頁資料，該限制酶SacII係亞瑟鏈黴菌(*S. achromogenes*)所生產，為目前最廣泛被使用的核酸限制酶之一。

B. 限制酶SchI與SacII切割的位置均位在DNA序列 5'-CCGCGG-3'的第四個位置上的C與第五個位置上的G之間，以M13/dideoxy DNA定序系統進行實驗：

1. 建立引子延長(primer extension)所需之 M13mp18/SacII DNA

為了能重組一DNA使之含有一且SacII的切割位置(5'-CCGCGG-3')，依照Messing, J. 等人於1983年Enzymol. 第20-78頁，將Bacteriophage M13 mp 18 RF DNA先以SmaI來切，之後用由貝美(Boehringer Mannheim)製造之鹼性磷酸(alkaline phosphatase)加以磷酸化，最後與SacII連接子(linker)進行接合反應(ligation)。此一重組好之M13mp18 RF DNA以Hanahan, D. 等人於1983年J. Mol. Biol. 第166 卷第557-580頁方式進一步轉化(transformed)到E. coli JM107內。該M13mp18RF DNA含有一SacII切割位置(site)，被SacII切後，可產生一7258鹼基對(bp)的DNA 片段。

2. 引子延長(primer extension)：

引子延長用來定出SchI切割DNA的位置，2 μ g的 M13mp18/SacII DNA在被SchI切過後，以酒精沈澱純化之。而將其溶解在4 μ l含有3 ng M13共同引子(universal primer)之5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'的水溶液中。將此DNA-primer合物加熱到93°C。反應3分鐘後，然後，放到冰中冷卻5分鐘。之後，加入2 μ ldNTP水溶液(含 dCTP、dGTP及dTTP各0.3M)，1 μ l的 α -[³⁵S]dATP(600 Ci/mmol 8 mci/ml, Amersham)，和0.6U的貝美(Boehringer Mannheim)Klenow。所得M13mp18/SacII DNA單股(single-strand)模板(template)會和上述之M13共同引子(universal primer)進行復性(annealing)，經斯坦格雙去氧(Sanger dideoxy)定序反應後，產生一個個的環帶(bands)。

例十四、決定SchI的切割位置(position of cleavage)

以一於SmaI位置含有SacII連接子(linker; 5'-pGCCGCGGC-3')的M13的載體(vector)當作模板(template)，並利用共同引子來合成雙股DNA，此雙股DNA與SchI進行切割反應後，以引子延長定出SchI的切割位置。結果如圖十八所示，顯示SchI所切的位置在DNA順序5'-CCGCGG-3'的第四個位置上的與第五個位置上的之間，和SacII的切割位置相同。

(七)SchI具有極優的反應特性，可取代SacII用於各種分子生物學的研究

依照酸鹼度(pH)、溫度、及陽離子濃度等變數對SchI活性的影響；限制酶SchI的最佳反應條件，除了所改變的參數外：10mM三羥甲基氨基甲烷-氯(Tris-Cl)、pH7.5、50mM氯化鈉、10mM氯化鎂、7mM硫化醇、37°C。反應產物以洋菜膠體泳動分離，和溴化乙錠(ethidium bromide)染色，反應速率以光學密度分析(densitometric analysis)來定量。

例十五、SchI之最佳切割反應

SchI之最佳切割反應條件如圖十九所示，其最佳切割反應條件為：pH值7.5-9.5；溫度35-40°C；鹽度為0-200mM 氯化鈉。當鈉離子濃度高於200mM時活性會被抑制，而且，顯然的限制酶SchI切DNA並不需要氯化鈉；鎂離子的濃度為3-50mM，鎂離子為SchI切DNA所必需，但當其濃度大於50mM時，可抑制SchI的活性。顯示，相對於SacII(如表九所示)，SchI能在較大變化的反應條件變數下，有效率的來切DNA，可取代目前廣被使用的SacII，用於各種分子生物學的研究。

表一、篩選限制酶生產菌株的六種不同反應條件。

編號	反應組成成分				
	三羥甲基氨基 甲烷-氯化氫 (Tris-HCl, mM*)	酸鹼度 pH	氯化鈉 (NaCl, mM)	氯化鎂 (MgCl ₂ , mM)	巰乙醇 (2-mercapto- ethanol, mM)
PL-1	10	7.5	0	10	5
PL-2	10	8.5	0	10	5
PL-3	10	7.5	50	10	5
PL-4	10	8.5	50	10	5
PL-5	10	7.5	150	10	5
PL-6	10	8.5	150	10	5

*mM: 為毫莫耳濃度(millimolarity)。

表二、菌株ZS-2在各種不同培養基上的生長特徵。

培養基 Medium	氣生菌絲 Aerial mycelium	菌落背面 Reverse side of colony	可溶性色素 Soluble pigment
酵母抽出物-麥芽抽出物瓊脂培養基 Yeast extract-malt extract agar (ISP-2)	生長良好，基本上是灰白色 Good, basically white with gray	無 None	無 None
燕麥片瓊脂培養基 Oatmeal agar (ISP-3)	生長良好，黃色 Good, yellow	棕色 Brown	棕色 Brown
無機鹽-澱粉瓊脂培 養基 Inorganic salts- starch agar (ISP-4)	生長不好，灰色 Thin, gray	無 None	無 None
甘油-天冬醯胺瓊脂 培養基 Glycerol- asparagine agar (ISP- 5)	生長良好，基本上是灰白色 Good, basically white with gray	無 None	無 None

表三、放線菌細胞壁的主要成份。

細胞壁分類 Cell wall type	二胺基庚二酸 DAP		甘胺酸 Glycine	阿拉伯糖 Arabinose	半乳糖Galactose
	meso-	LL-			
I	-*	+	+	-	-
II	+	-	+	-	-
III	+	-	-	-	-
IV	+	-	-	+	+

*+: 表示含有該成分； -: 表示不含該成分。

表四、放線菌細胞內主要醣類成份的分類。

分類 Pattern	阿拉伯糖 Arabinose	半乳糖 Galactose	木蜜糖 Xylose	馬杜拉糖 Madurose
A	+*	+	-	-
B	-	-	-	+
C	-	-	-	-
D	+	-	+	-

*+: 表示含有該成份； -: 表示不含該成份。

表五、放線菌各屬(genus)之細胞壁化學成份和細胞糖類成份分類。

細胞壁分類 Cell wall type	糖類分類 Sugar pattern	屬 Genera
I	NC*	<u>Streptomyces</u> , <u>Streptoverticillium</u> , <u>Microellobosporia</u> , <u>Sporichthya</u>
II	D	<u>Micromonospora</u> , <u>Actinoplanes</u> , <u>Ampullariella</u> , <u>Amorphosporangium</u> ,
III	B	Microbispora, Streptosporangium, Spirillospora, Planomonospora, Dermatophilus, Nocardia-madurae type (Actinomadura)
III	C	<u>Actinobifida</u> , <u>Thermoactinomyces</u> , <u>Geodermatophilus</u>
IV	A	<u>Mycobacterium</u> , <u>Nocardia</u> , <u>Pseudo-nocardia</u> , <u>Thermomonospora</u> , <u>Micropolyspora</u>

*NC, 沒有特殊的糖類成份分類(no characteristic sugar pattern)。

表六、竹山鏈黴菌(*Streptomyces chusanensis*) ZS-2 之生理特性。

黑色素的生成 Melanin formation	+
酪氨酸酶的反應 Tyrosinase reaction	+
硫化氫的產生 H ₂ S production	-
硝酸鹽的還原 Nitrate reduction	-
明膠的液化 Liquefaction of gelatin	+
澱粉的水解 Hydrolysis of starch	+
酪蛋白的水解 Hydrolysis of casein	+
牛奶中蛋白質的消化 Peptonization of milk	+
生長的溫度 Growth temperature	15-40°C

*+: 代表有生長或有反應; -: 代表沒有生長或沒有反應。

表七、竹山鏈黴菌(*S. chusanensis*) ZS-2 和亞瑟鏈黴菌(*S. achromogenes*)
碳源利用情形的比較。

碳源 Carbon sources	竹山鏈黴菌 <i>S. chusanensis</i>	亞瑟鏈黴菌 <i>S. achromogenes</i>
葡萄糖 D-Glucose	+*	+
阿拉伯糖 L-Arabinose	±	+
纖維素 Cellulose	-	-
果糖 D-Fructose	+	+
肌醇 Inositol	+	+
植物蜜糖 Raffinose	+	-
甘露醇 D-Mannitol	+	+
鼠李糖 L-Rhamnose	+	+
木糖 D-Xylose	+	+
蔗糖 Sucrose	+	-

*+: 利用良好(good utilization); ±: 利用不好(doubtful utilization);
-: 無法利用(no utilization)。

表八、竹山鏈黴菌(*Streptomyces chusanensis*) 菌株 ZS-2 限制酶 *SchI* 的純化。

	體積 (毫升)	總活性量 (units; u)	總蛋白質量 (毫克)	專一活性 (u/毫克)	純化 倍數	回收率 %
粗萃取液	100	3,600,000	1,650	2,200	1	100
PEI 沈澱分化	40	2,300,000	128	18,000	8	63
硫酸銨沈澱分化	7.5	2,200,000	93.8	23,000	11	60
DEAE-Sepharose Fast flow	6.0	550,000	7.2	76,000	34	15

表九、*SchI* & *SacII* 兩者反應特性的比較。

	<i>SchI</i>	<i>SacII</i> *
溫度 Temperature	35-40°C	37°C
酸鹼度 pH (Tris-HCl)	7.5-9.5	7.5
鹽度 Salt Conc. (NaCl)	0-200 mM	0-60 mM
鎂離子濃度 Mg ²⁺ Conc.	3-50 mM	6-10 mM
緩衝液濃度 Buffer Conc. (Tris-HCl)	0-100 mM	6-10 mM
巯乙醇濃度 2-Mercaptoethanol	0-100 mM	2-10 mM
安定性 Stability	> 3.5 yr	not done

*資料取自文獻及商品目錄。

[圖式簡單說明]

第一圖限制酶生產菌株之篩選。

菌株ZS-2粗萃取液中含有限制酶活性可切入 DNA(欄8, 14, 及20), 而被切出的 λ DNA片斷如圖右方箭頭所示;

未加任何酶之控制組(欄2);

加入EcoRI之控制組(欄1);

其它的五株菌不含有可切λ DNA的限制 \square 活性(欄3-7; 9-13; 15-19)。

限制 \square 的反應條件: PL-4(欄15-20); PL-5(欄9-14); PL-6(欄3-8)。

第二圖菌株ZS-2在各種不同培養基上的生長特徵。

A. YD瓊脂培養基上28°C培養2週後所觀察到的結果。

B. 甘油-天冬醯胺(glycerol-asparagine)瓊脂培養基(ISP-5)上28°C培養3週後所觀察到的結果。

第三圖菌株ZS-2光學顯微鏡觀察(400倍)。

菌株ZS-2在植物蜜糖(raffinose)瓊脂培養基上28°C培養2週後所觀察到的結果。

A. 俯視觀察。

B. 縱切觀察。

第四圖菌株ZS-2掃描電子顯微鏡觀察。

菌株ZS-2在植物蜜糖瓊脂培養基上28°C培養2週後所觀察到的結果。

A. 10,000倍觀察。

B. 1,500倍觀察。

第五圖菌株ZS-2化學成份分析。

A. 細胞壁化學成份二胺基庚二酸(diaminopimelic acid; DPA)之分析。

1. ZS-2水解液。

2. 標準品LL-DPA。

B. 細胞水解液之醣類成份分析。

1. ZS-2水解液。

2. 標準品。

3. 標準品:

a. 半乳糖(galactose)

b. 阿拉伯糖(arabinose)

c. 核糖(ribose)

d. 葡萄糖(glucose)

e. 甘露糖(mannose)

f. 木糖(xylose)

g. 植物蜜糖(rhamnose)

第六圖菌株Streptomyces chusanensis ZS-2醱酵槽內生長情形。

第七圖以二乙氧乙基-篩分洋菜糖(DEAE-Sephrose)快速管柱層析進一步純化菌株ZS-2之硫酸銨沈澱分劃。

樣品(SAMPLE): 200 μ l, SchI(硫酸銨沈澱分劃)

管柱(COLUMN): 二乙氧乙基-篩分洋菜糖(DEAE-Sephrose)(10x1cm)

洗脫液(ELUENT):

緩衝液(Buffer A) TEM, pH 7.5

緩衝液(Buffer B) TEM, pH 7.5, 1.0 M NaCl

流洗速度(FLOW RATE): 2.0 ML/MIN

圖記錄速度(CHART SPEED): 0.7 CM/ML

偵檢器(DETECTOR): UV-1, 280nm, AUFS 0.5

分劃(FRACTION): 3ML/FRAC.

附註(COMMENTS): 內切 \square 活性(ENDONUCLEASE ACTIVITY): 16-18

第八圖以二乙氧乙基-篩分洋菜糖(DEAE-Sephrose)快速管柱層析進一步純化菌株ZS-2之硫酸銨沈澱分劃。

除了流洗條件及注入SchI \square 溶液為500 μ l外, 其它條件均與第七圖相同。內切 \square 活性集中在22-34。

第九圖以超糖(Superose)6膠過濾快速管柱層析進一步純化二乙氧乙基-篩分洋菜糖(DEAE-Sephrose)分離所得之SchI \square 溶液。

樣品(SAMPLE): 1000 μ l, SchI(二乙氧乙基-篩分洋菜糖DEAE-Sephrose管柱層析分離所得)

管柱(COLUMN): Superose 6 prepacked HR 10/30

洗脫液(ELUENT):

緩衝液(Buffer A)

緩衝液(Buffer B) TEM, pH 7.5, 1.0 M NaCl

流洗速度(FLOW RATE): 0.4 ML/MIN

圖記錄速度(CHART SPEED): 0.5 CM/ML

偵檢器(DETECTOR): UV-1, 280nm, AUFS 0.5

層析分劃(FRACTION): 1 ML/FRAC.

附註(COMMENTS)：內切 \square 活性：

19-24(=4.2-5.3 cm)；

21(4.6cm), highest.

第十圖膠過濾蛋白質分子量標準品之超糖(Superose)6快速管柱層析圖譜。

樣品(SAMPLE)：100 μ l，分子量凝膠過濾劑(Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kits)

管柱(COLUMN)：預填HR 10/30超糖(Superose 6 prepacked HR 10/30)

洗脫液(ELUENT)：

緩衝液(Buffer A)

緩衝液(Buffer B) TEM, pH 7.5, 1.0 M NaCl

流洗速度(FLOW RATE)：0.4 ML/MIN

圖記錄速度(CHART SPEED)：0.5 CM/ML

偵檢器(DETECTOR)：UV-1, 280nm, AUFS 0.5

層析分劃(FRACTION)：1 ML/FAC.

附註(COMMENTS)：

樣品容量(Sample Contents)：Conc. (mg/ml)

A. 甲狀腺球蛋白(Thyroglobulin) 5

B. 鐵蛋白(Ferritin) 0.4

C. 牛血清白蛋白(BSA) 8

D. 核糖核酸 \square A(Ribonuclease A) 5

E. 酪氨酸(Tyrosine) 1

第十一圖以膠過濾快速管柱層析(FPLC)來鑑定限制 \square SchI的分子量。

由第九圖及第十圖中所示結果，可得到各蛋白質在膠過濾管柱Superose 6中的移動度(R_m)，因流洗速度固定，所以移動度是以流洗距離(cm)來表示。本圖係以log分子量(M. W.)對移動度做圖，再以蛋白質分子量標準品各值(1：○)進行線性回歸(linear regression)所得到的直線(2：—)。此一直線可以下列方程式表示之：

$$\log M. W. = 11.3544 - 1.4356 \times R_m$$

$$r^2 = 0.9939 \quad n = 3$$

由第九圖所示SchI的移動距離為4.6cm，代入上述方程式中，或以內插法如本圖中3之●點所示，可估算出SchI的分子量為56 kDa。

第十二圖以肝素瓊脂糖(Heparin Sepharose 6B)快速管柱層析進一步純化超糖(Superose)6分離之SchI \square 溶液。

樣品(SAMPLE)：1000 μ l, SchI (Superose 6 prepacked HR 10/30管柱層析分離所得)

管柱(COLUMN)：肝素瓊脂糖(Heparin Sepharose-6B)(8x1cm)

洗脫液(ELUENT)：

緩衝液(Buffer A) TEM, pH 7.5

緩衝液(Buffer B) TEM, pH 7.5, 1.0 M NaCl

流洗速度(FLOW RATE)：2.0 ML/MIN

圖記錄速度(CHART SPEED)：0.7 CM/ML

偵檢器(DETECTOR)：UV-1, 280nm, AUFS 1.0

層析分劃(FRACTION)：3 ML/FAC.

附註(COMMENTS)：內切 \square 活性：23-26

第十三圖以肝素瓊脂糖(Heparin Sepharose 6B)快速管柱層析直接純化菌株ZS-2之硫酸銨沈澱分劃。

(第32管沒有band，係由於agarose gel的well有漏所致。)

樣品(SAMPLE)：1000 μ l, SchI(硫酸銨沈澱分劃)

管柱(COLUMN)：肝素瓊脂糖(Heparin Sepharose-6B)(8x1cm)

洗脫液(ELUENT)：

緩衝液(Buffer A) TEM, pH 7.5

緩衝液(Buffer B) TEM, pH 7.5, 1.0 M NaCl

流洗速度(FLOW RATE)：2.0 ML/MIN

圖記錄速度(CHART SPEED)：0.7 CM/ML

偵檢器(DETECTOR)：UV-1, 280nm, AUFS 1.0

層析分劃(FRACTION)：3 ML/FAC.

附註(COMMENTS)：內切 \square 活性：24-27

第十四圖以長時間反應法來鑑定純化所得之限制 EcoRI 中是否仍摻雜著外切 EcoRV (exonuclease)。將純化所得的SchI，取10U與1 μg λ DNA於37°C下16小時(欄4)，由其在洋菜膠(agarose gel)泳動的圖形與反應一個小時(欄3)完全一樣，表示純化所得的SchI已無明顯的外核酸限制 EcoRV 的存在。欄1及欄2為在相同反應條件下，未加SchI時，分別反應16小時及1小時所得到的結果。

第十五圖以SDS-聚丙醯胺膠體電泳來鑑定限制 EcoRI SchI的單聚體(subunit)分子量。相對之分子量大小是以7.5%聚丙醯胺膠體分析所得。膠體是以苦麥西藍(Coomassie blue)染色。

1. 蛋白質分子量標準品(Low molecular weight, Pharmacia)
2. 為SacII(New England BioLabs, Beverly, MA)
3. 粗萃取液(約100 μg)
- 4-5. PEI沈澱分割(25 μg)
6. 硫酸銨沈澱分割(25 μg)
7. DEAE-Sepharose快速管柱層析純化後所得到的產物(5 μg)，箭頭所示為28kDa之SchI。

第十六圖以SDS-聚丙醯胺膠體電泳來鑑定限制SchI的單聚體(subunit)分子量。

由第十五圖所示的結果，可得到各蛋白質在膠體中的相對移動度(R_m)。本圖係以log分子量(M. W.)對R_m做圖，再以蛋白質分子量標準品各值(1:○)進行線性回歸(linear regression)所得到的直線(2:—)。此一直線可以下列方程式表示之：

$$\log M. W. = 5.3203 - 0.9739 \times R_m$$

$$r^2 = 0.9741 \quad n = 4$$

由第十四圖的第8-9欄中，高度純化SchI的主要蛋白質分子的相對移動度(R_m)，0.9006，代入上述方程式或以外插法，如圖中3之●點所示，可估算出SchI的單聚體的分子量為28kDa。

第十七圖SchI和SacII對不同DNAs切割圖譜(Pattern)的比較。

1. 經EcoRI及HindIII切割的 λ DNA
2. 未切割的 $\phi \times 174$ RF DNA
3. 經SchI切割的 $\phi \times 174$ RF DNA
4. 經SacII切割的 $\phi \times 174$ RF DNA
5. 未切割的Ad-2 DNA
6. 經SchI切割的Ad-2 DNA
7. 經SacII切割的Ad-2 DNA
8. 未切割的 λ DNA
9. 經SchI切割的 λ DNA
10. 經SacII切割的 λ DNA
11. 經EcoRI及HindIII切割的 λ DNA

第十八圖以M13/dideoxy DNA定序系統來決定核酸限制 EcoRI SchI的切割位置(position of cleavage)。

第一欄：重組M13核酸經SacII剪切後，以M13共同引子進行引子延長反應，並有硫35[^{35}S]標記之延長產物；

第二欄：重組M13核酸經SchI剪切後，以M13共同引子進行引子延長反應，並有硫35[^{35}S]標記之延長產物；

第A、C、G、T欄：以斯坦格雙去氧核酸序列分析法分析重組M13核酸之序列梯級，作為引子延長產物之比較標準。

圖中第1及2欄顯示重組M13核酸經SacII及SchI剪切後之引子延長產物具有相同之大小及位置。

第十九圖SchI在不同反應條件下之相對反應速率。

- A. 酸鹼度(pH)
- B. 溫度
溫度(實線)
耐熱性(虛線)
- C. 氯化鈉濃度(NaCl, mM)
- D. 氯化鎂濃度(MgCl₂, mM)
- E. 三羥甲基氨基甲烷-氯化氫濃度(Tris-HCl, mM)
- F. 2-巰乙醇濃度(2-mercaptoethanol, mM)

十、申請專利範圍：

1. 一種第二型核酸限制 \square 生產菌種竹山鏈黴菌(*Streptomyces chusanensis* ZS-2)。
2. 一種竹山鏈黴菌(*Streptomyces chu-sanensis* ZS-2)篩選分離出之一新的第II型核酸限制 \square SchI；SchI是一分子量約為56 kDa的同雙聚體(homo-dimer)，切磷二酯鍵，所切的位置在DNA順序5'-CCGCGG-3'的第四個位置上的C與第五位置上的G之間，SchI最佳切割DNA的反應條件為：酸鹼度：8.5 溫度：30-40°C 鹽度：0-200毫莫耳濃度(mM) 氯化鈉 鎂離子濃度：3-50毫莫耳濃度。
3. 一種分離純化第II型核酸限制 \square SchI的方法，將竹山鏈黴菌(*Streptomyces chusanensis* ZS-2)菌體打破到以聚乙烯亞胺沈澱及硫酸銨沈澱後，可以二乙氨基乙基-篩分洋菜糖(DEAE-Sepharose)純化，詳細反應條件如下面A項所示，內切 \square 活性(endonuclease activity)集中在16-18管，亦即0.25至0.37M氯化鈉直線梯度的範圍內；或以肝素瓊脂糖(Heparin Sepharose 6B)管柱層析來進一步純化，詳細反應條件如下面B項所示，可得到一個活性尖峰在第24管至第27管，亦即濃度0.54~0.68M氯化鈉梯度的範圍內，如此可除去大部分蛋白質，且無外切 \square 之活性，立即可供切割DNA使用。

A. 樣品(SAMPLE)：200 μ l，SchI(硫酸銨沈澱分劃) 管柱(COLUMN)：二乙氨基乙基-篩分洋菜糖(DEAE-Sepharose)(10x1cm) 洗脫液(ELUENT)：緩衝液(Buffer A) TEM, pH 7.5 緩衝液(Buffer B) TEM, pH 7.5, 1.0 M NaCl 流洗速度(FLOW RATE)：2.0 ML/MIN 圖記錄速度(CHART SPEED)：0.7 CM/ML 偵檢器(DETECTOR)：UV-1, 280 nm, AUFS 0.5 分劃(FRACTION)：3ML/FRAC. 附註(COMMENTS)：16-18管有內切 \square 活性

B. 樣品(SAMPLE)：1000 μ l，SchI(硫酸銨沈澱分劃) 管柱(COLUMN)：肝素瓊脂糖(Heparin Sepharose-6B)(8x1cm) 洗脫液(ELUENT)：緩衝液(Buffer A) TEM, pH 7.5 緩衝液(Buffer B) TEM, pH 7.5, 1.0 M NaCl 流洗速度(FLOW RATE)：2.0 ML/MIN 圖記錄速度(CHART SPEED)：0.7 CM/ML 偵檢器(DETECTOR)：UV-1, 280 nm, AUFS 1.0 層析分劃(FRACTION)：3 ML/FRAC. 附註(COMMENTS)：24-27管有內切 \square 活性

十一、圖式：

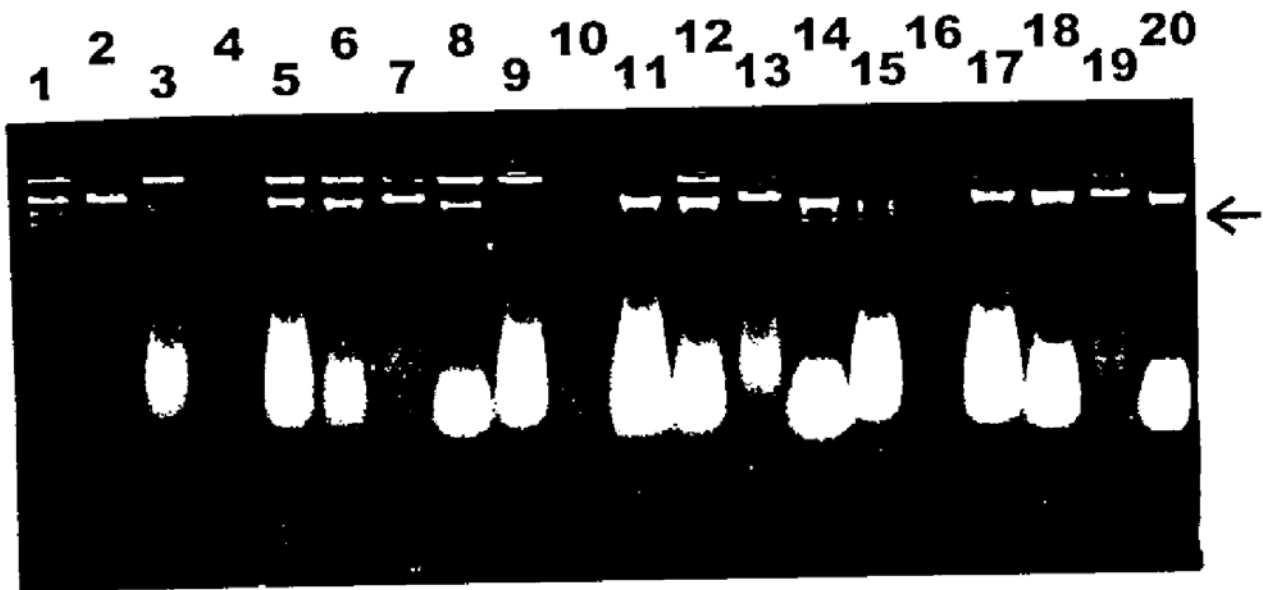


圖 一

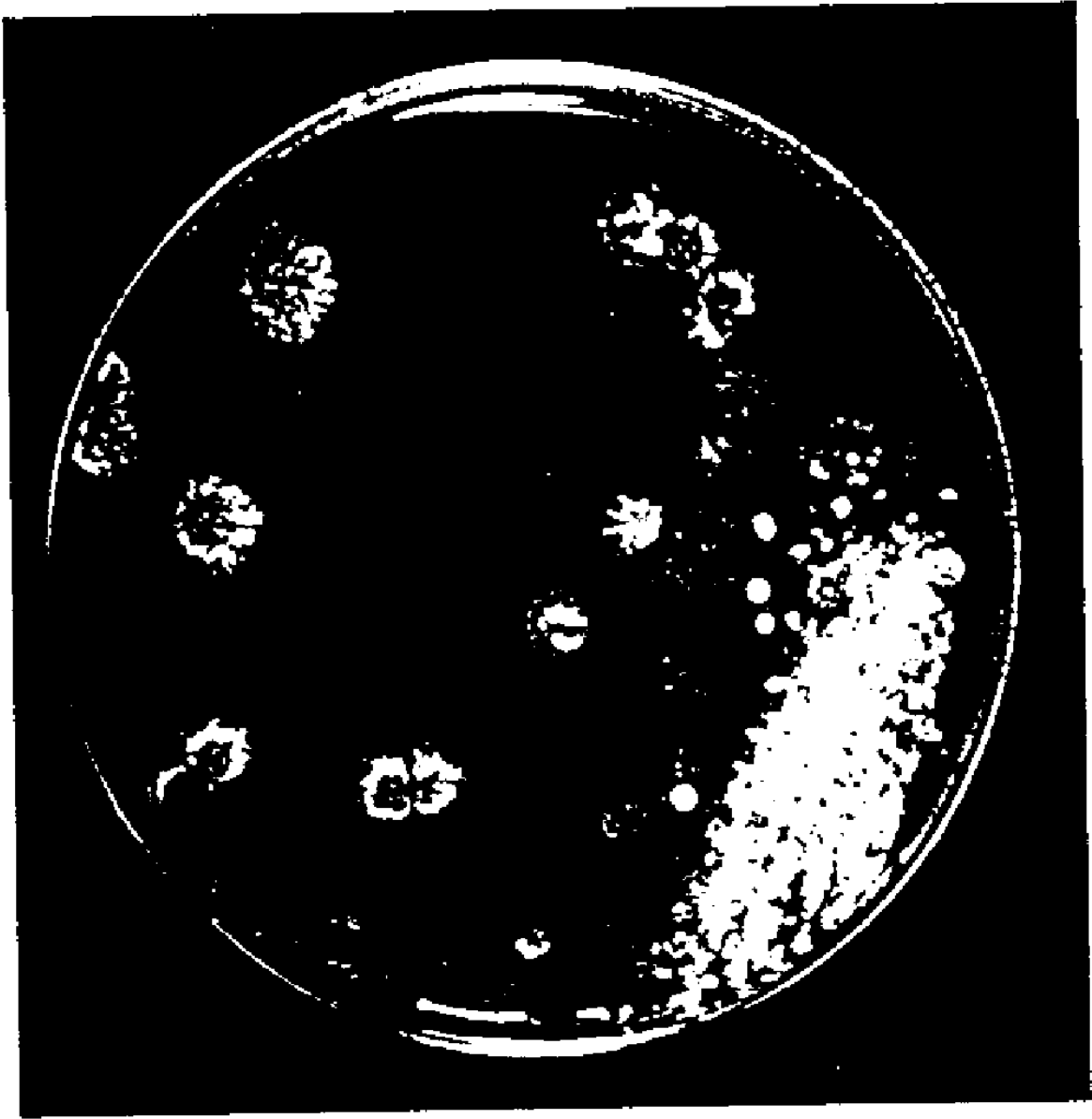


圖 二 A

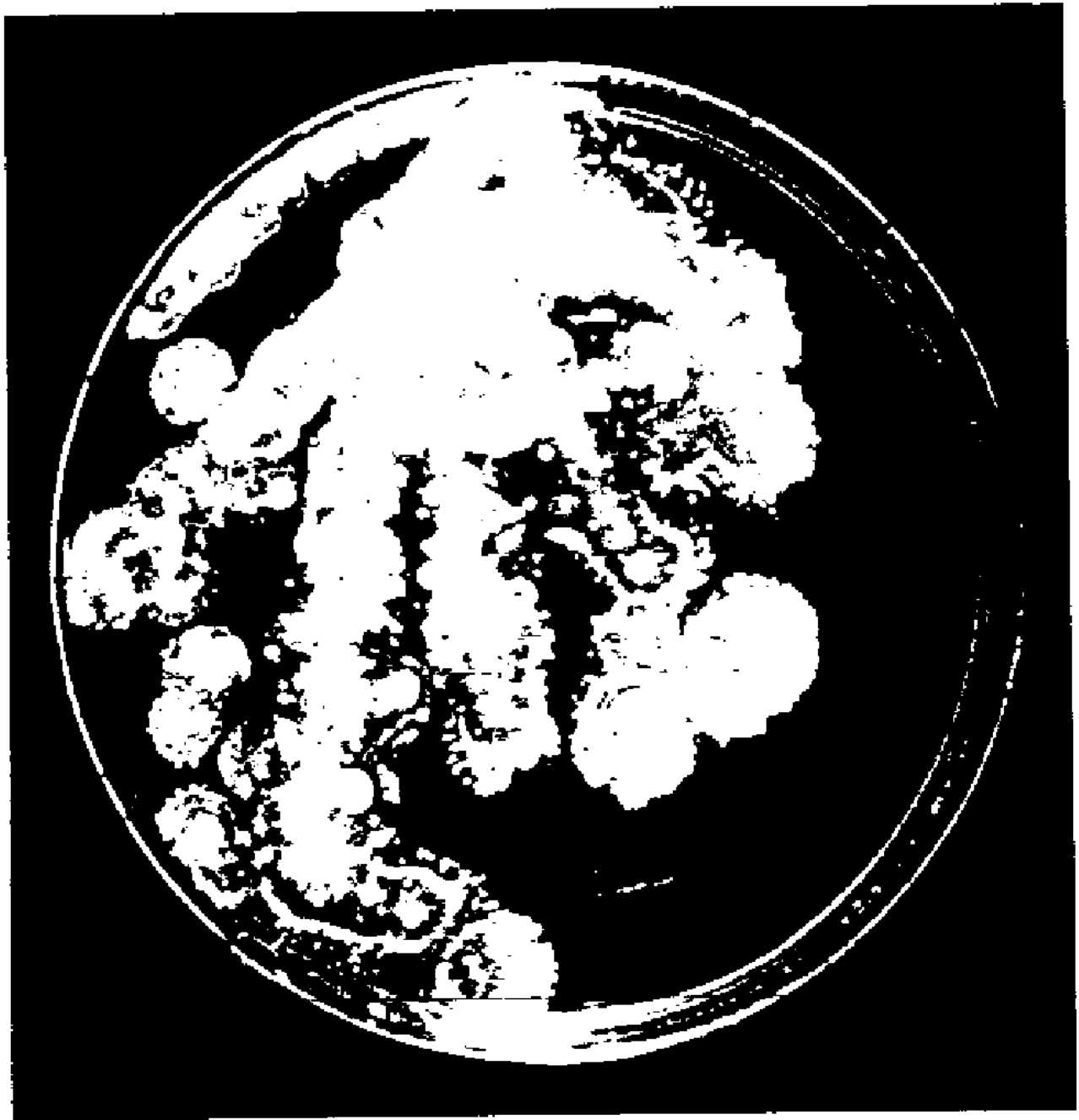


圖 二 B

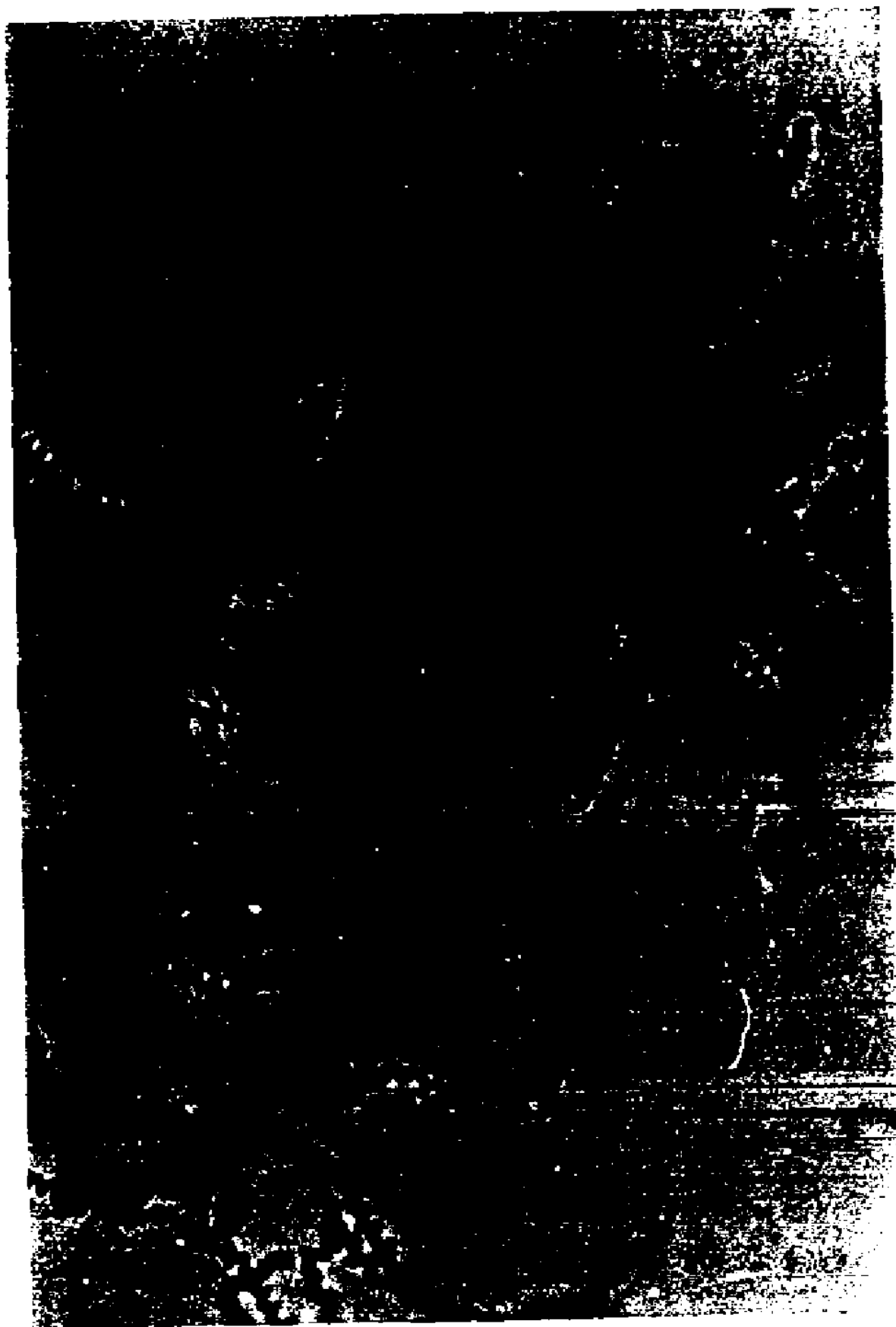


圖 三 A

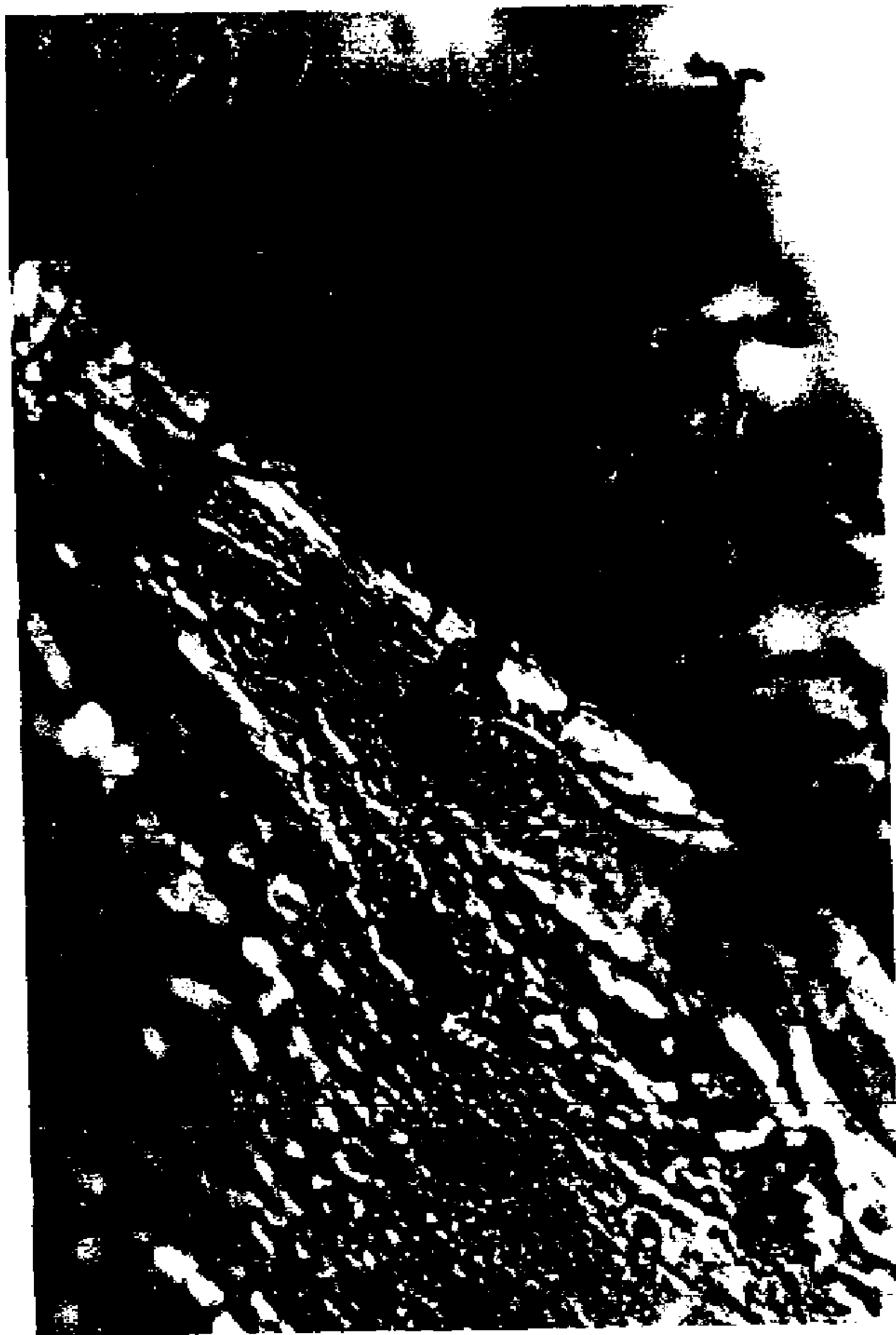




圖 四 A

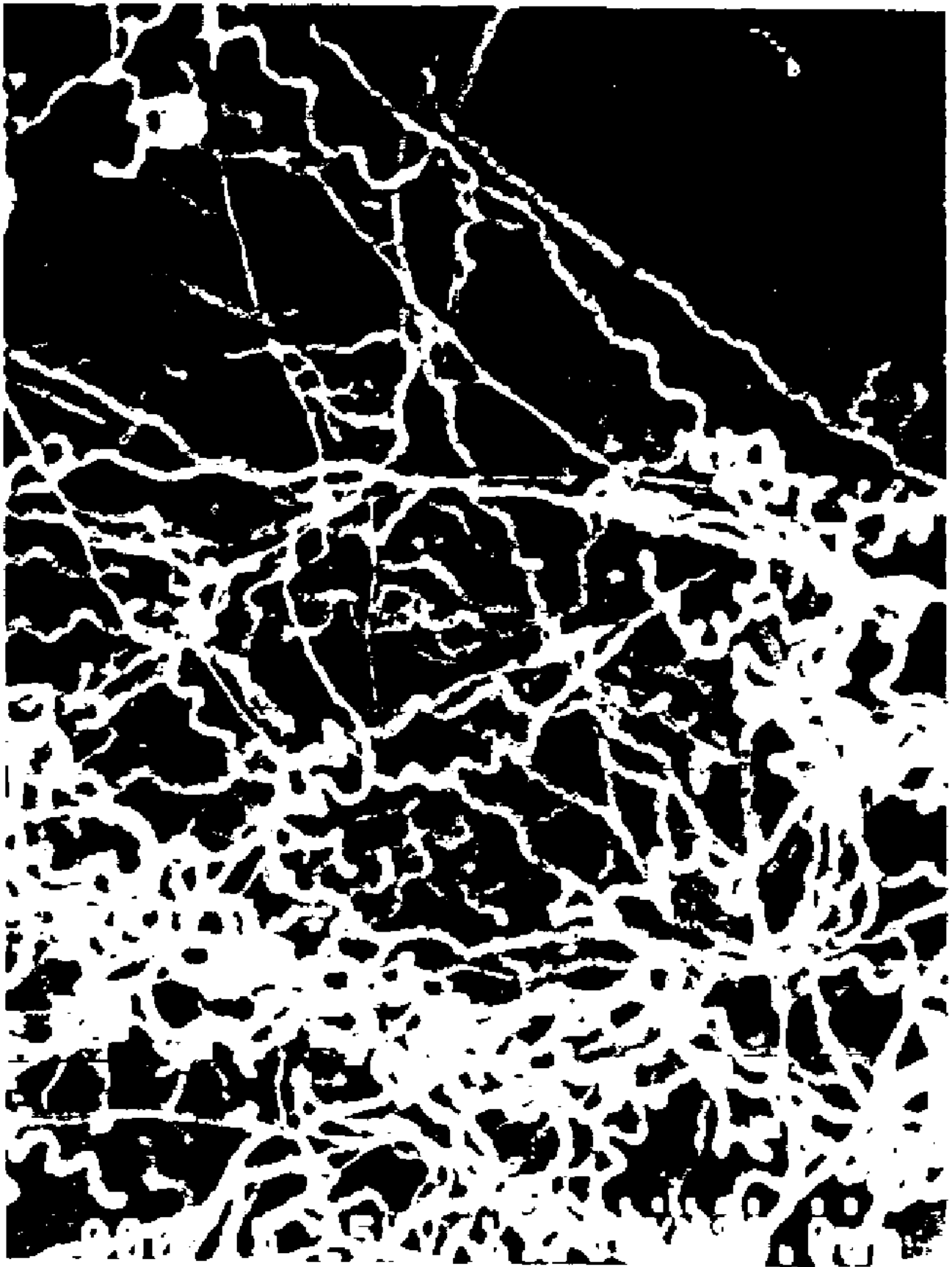
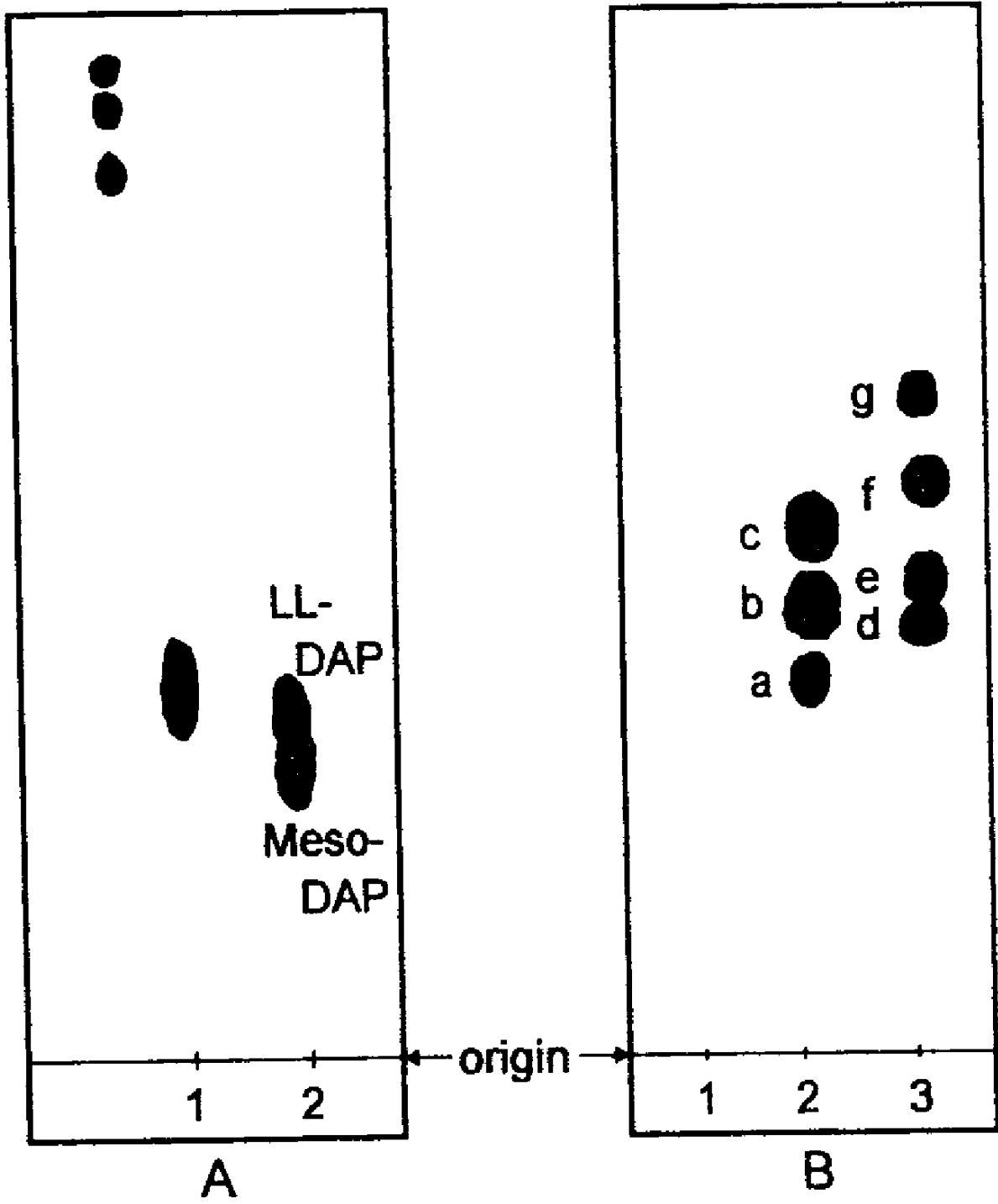
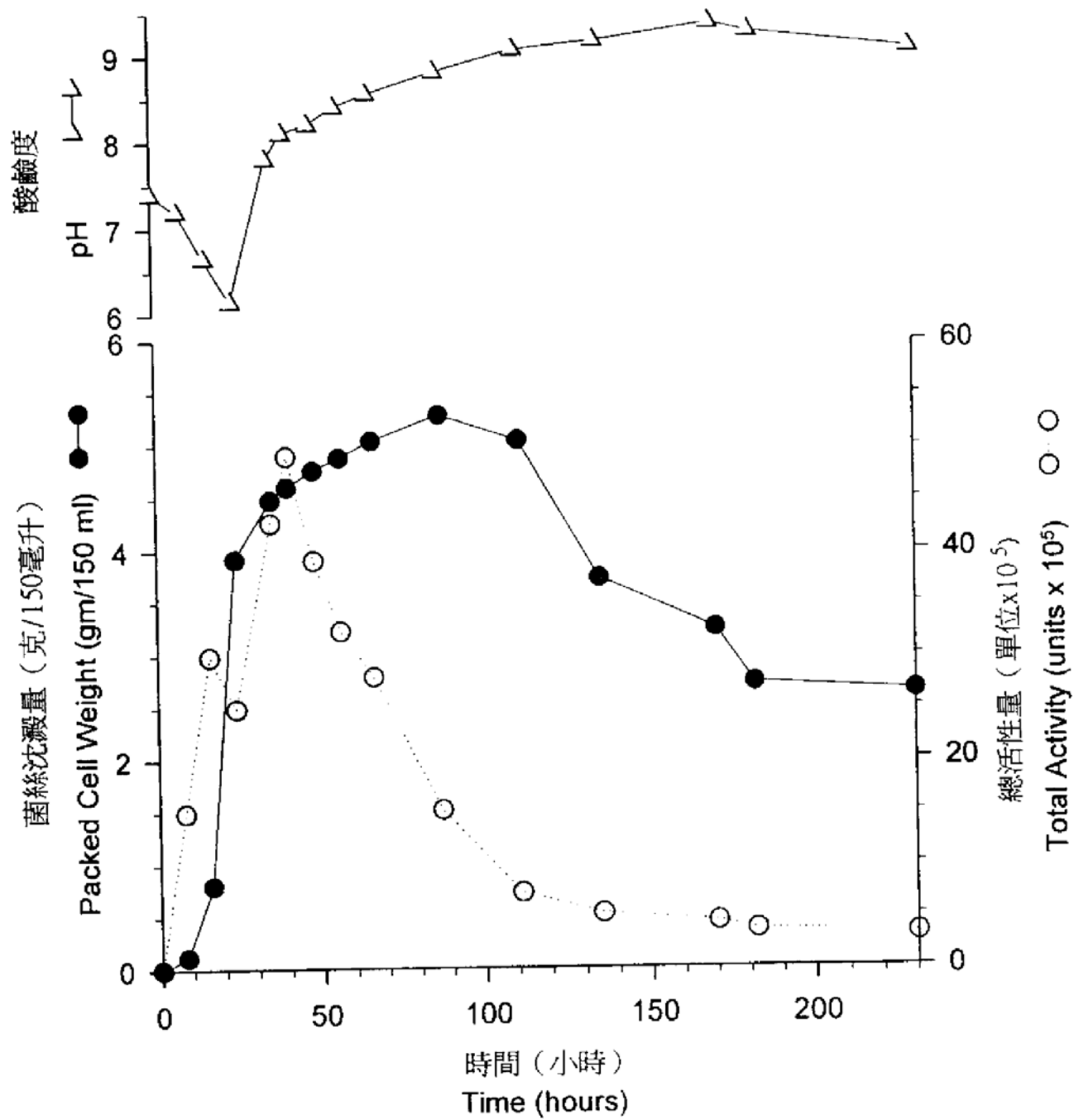


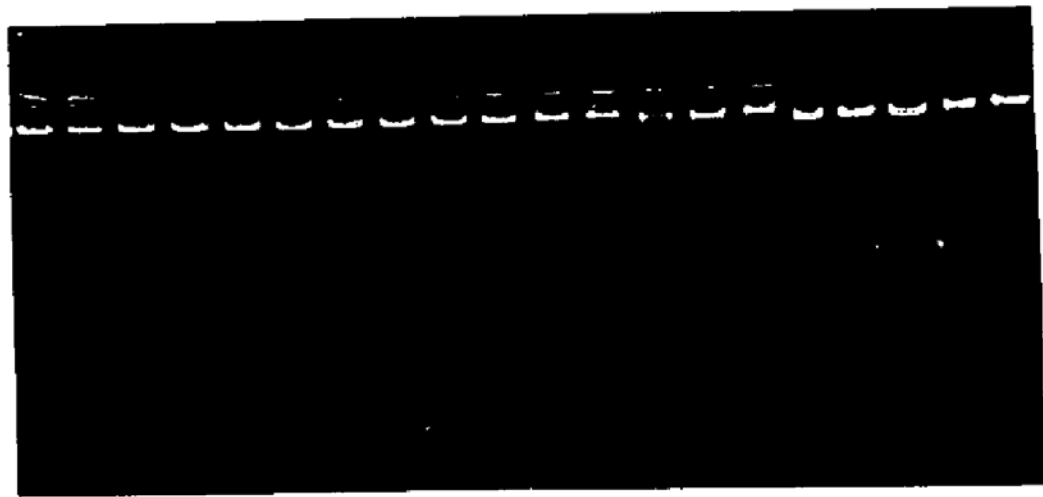
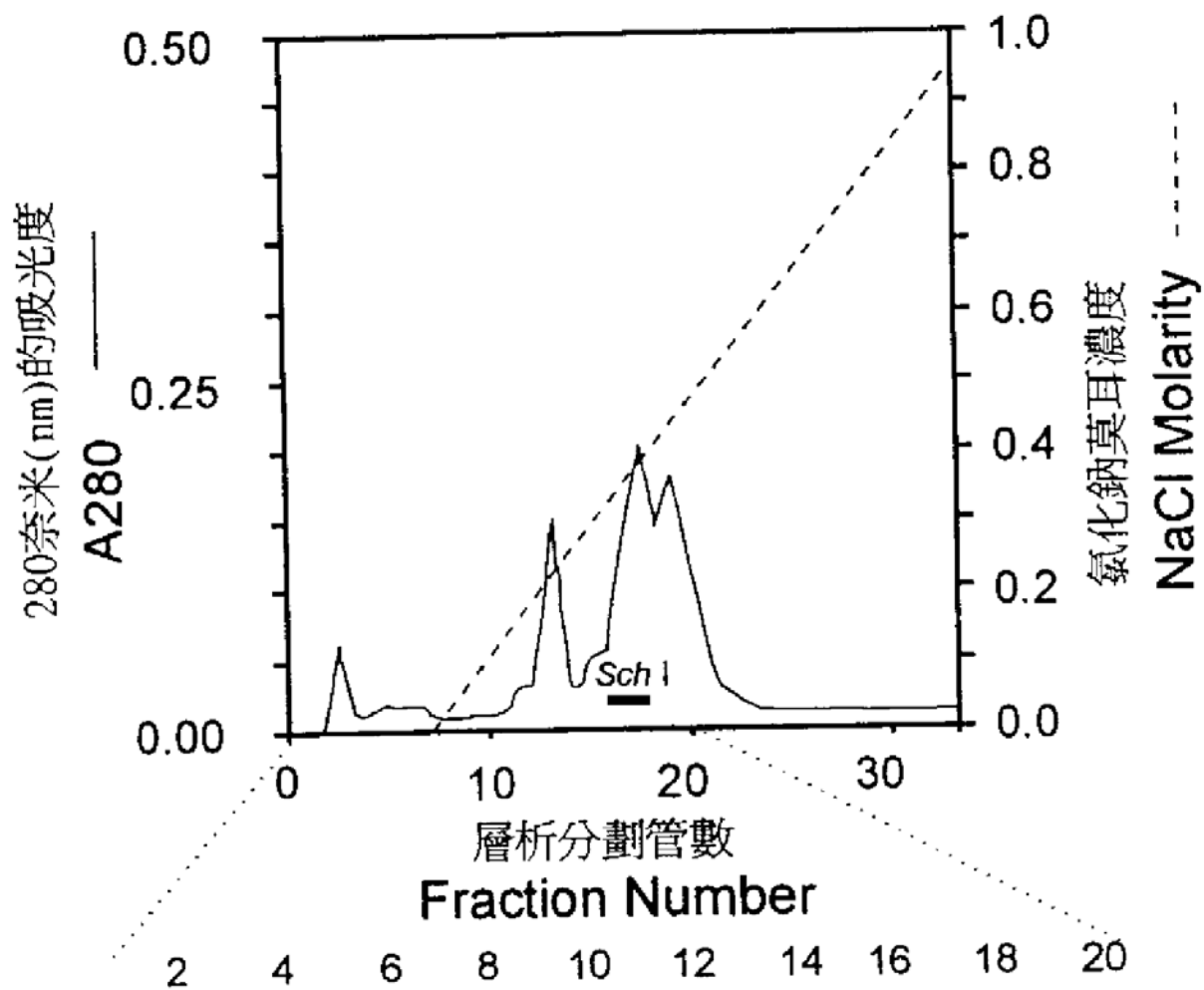
圖 四 B



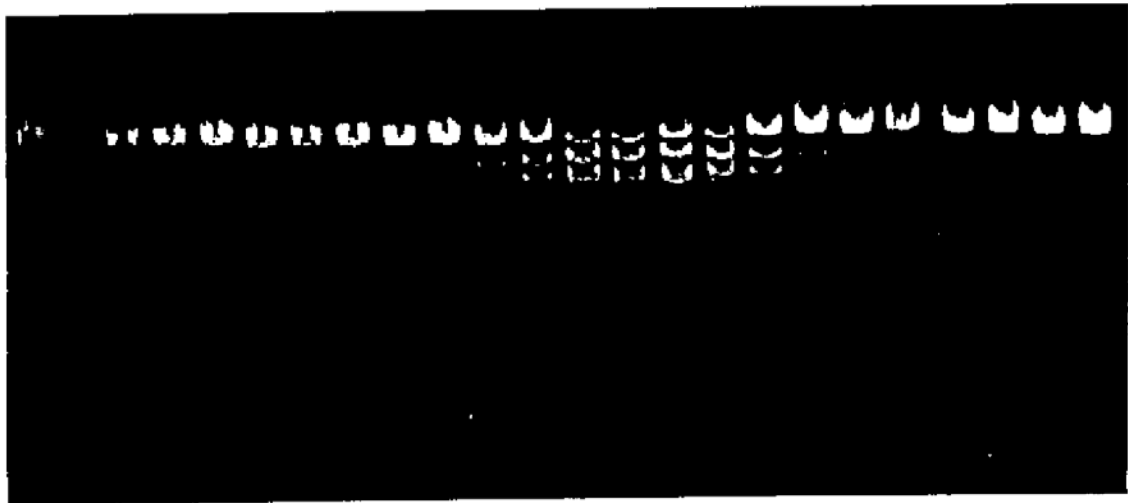
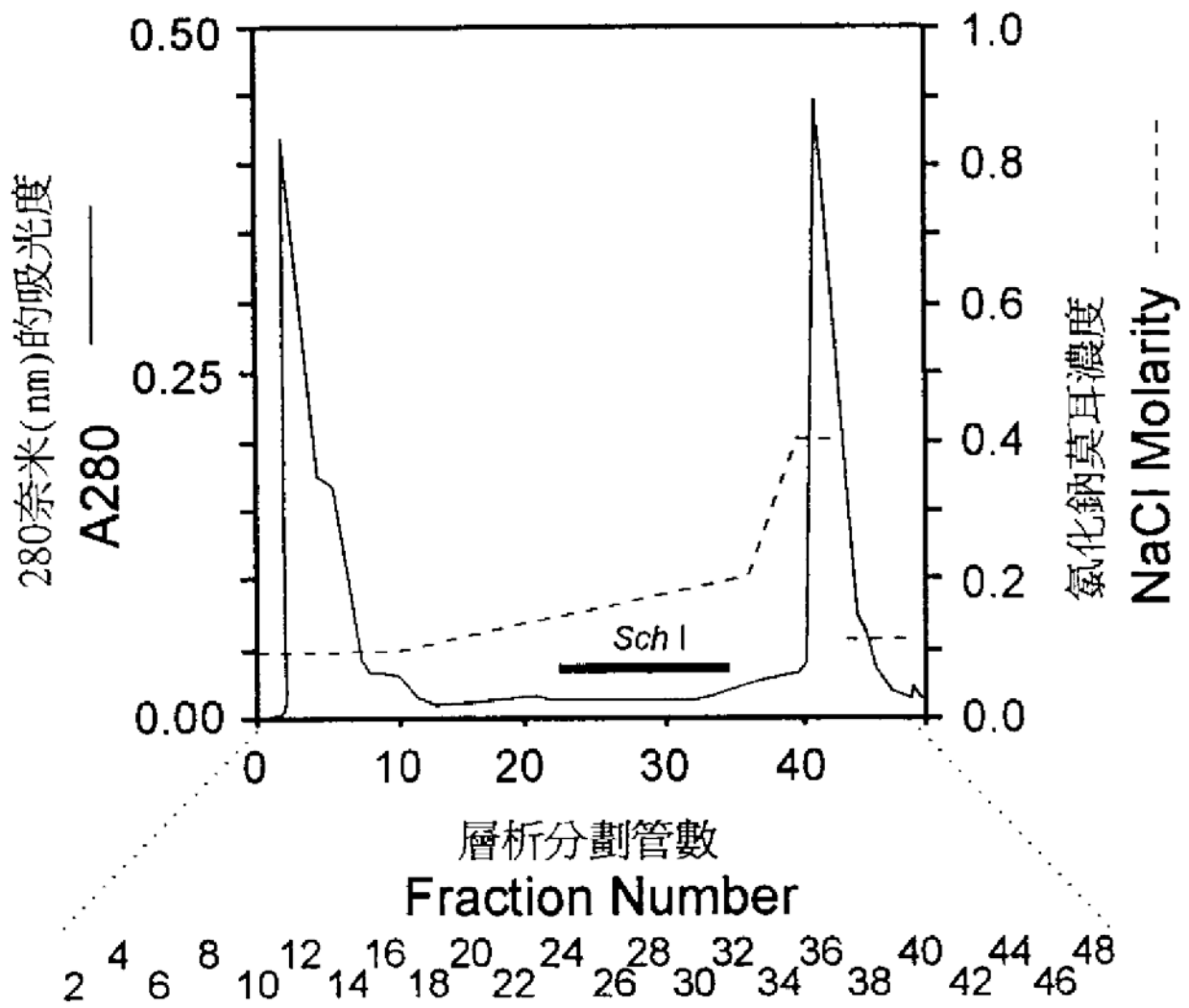
圖五



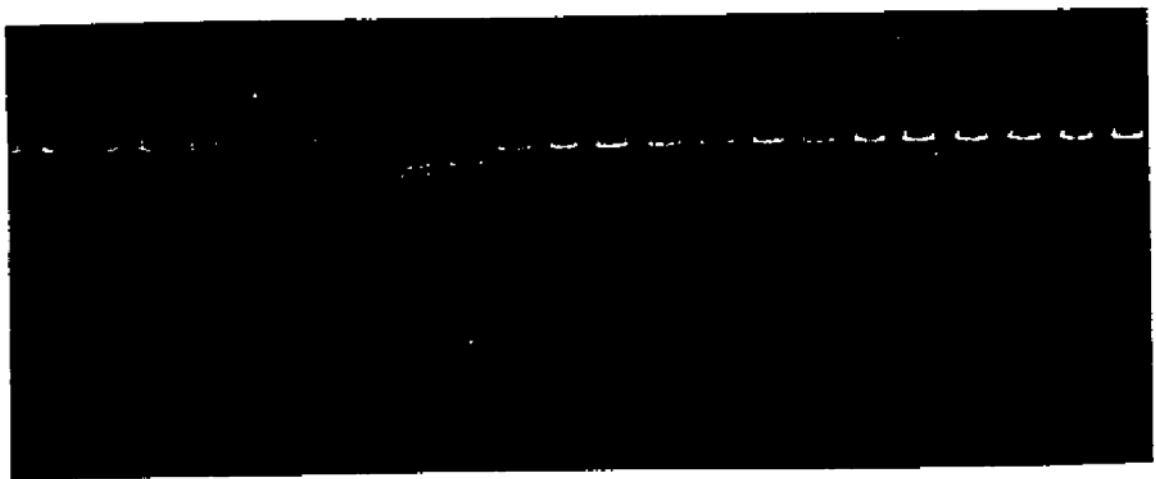
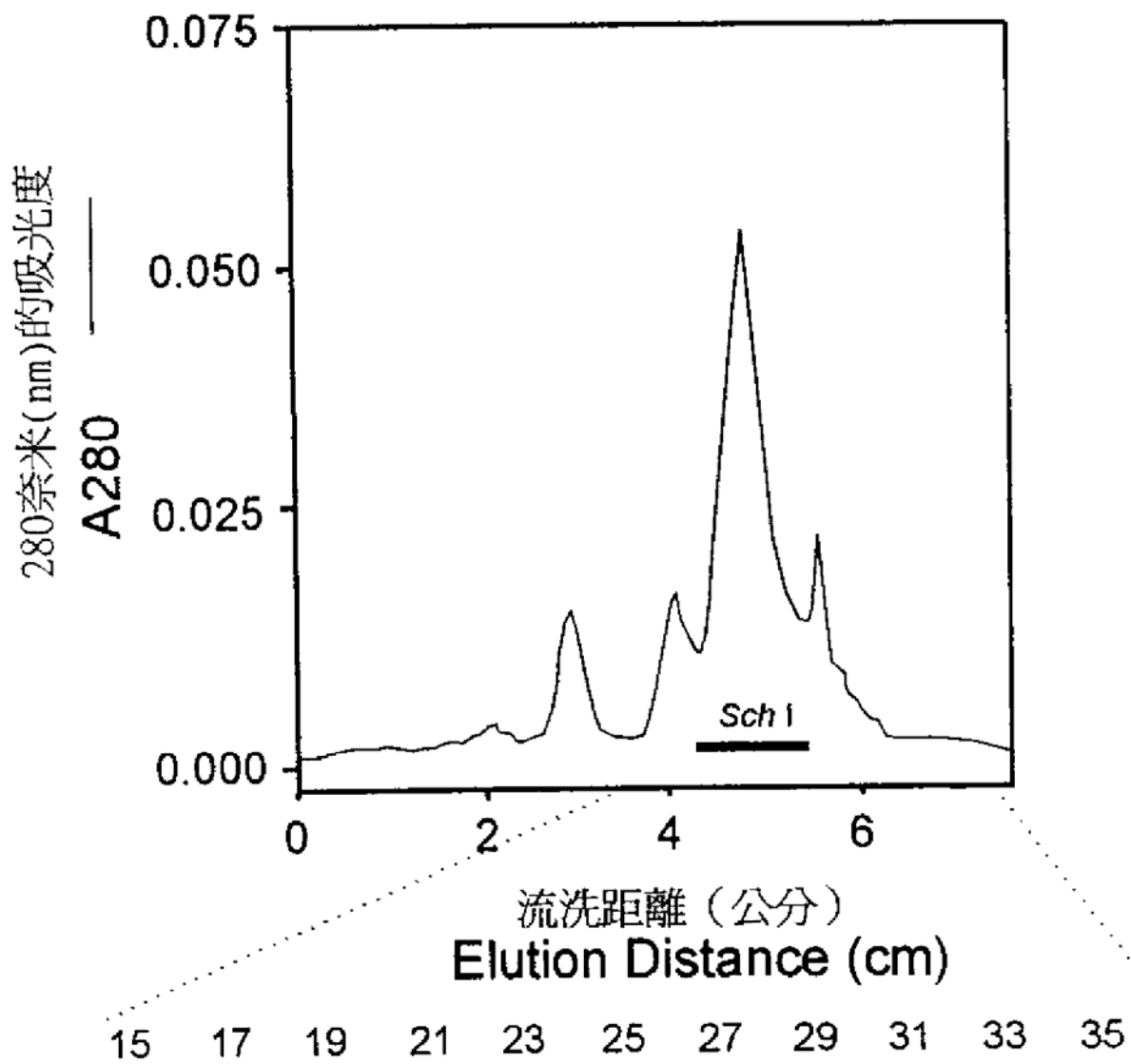
圖六



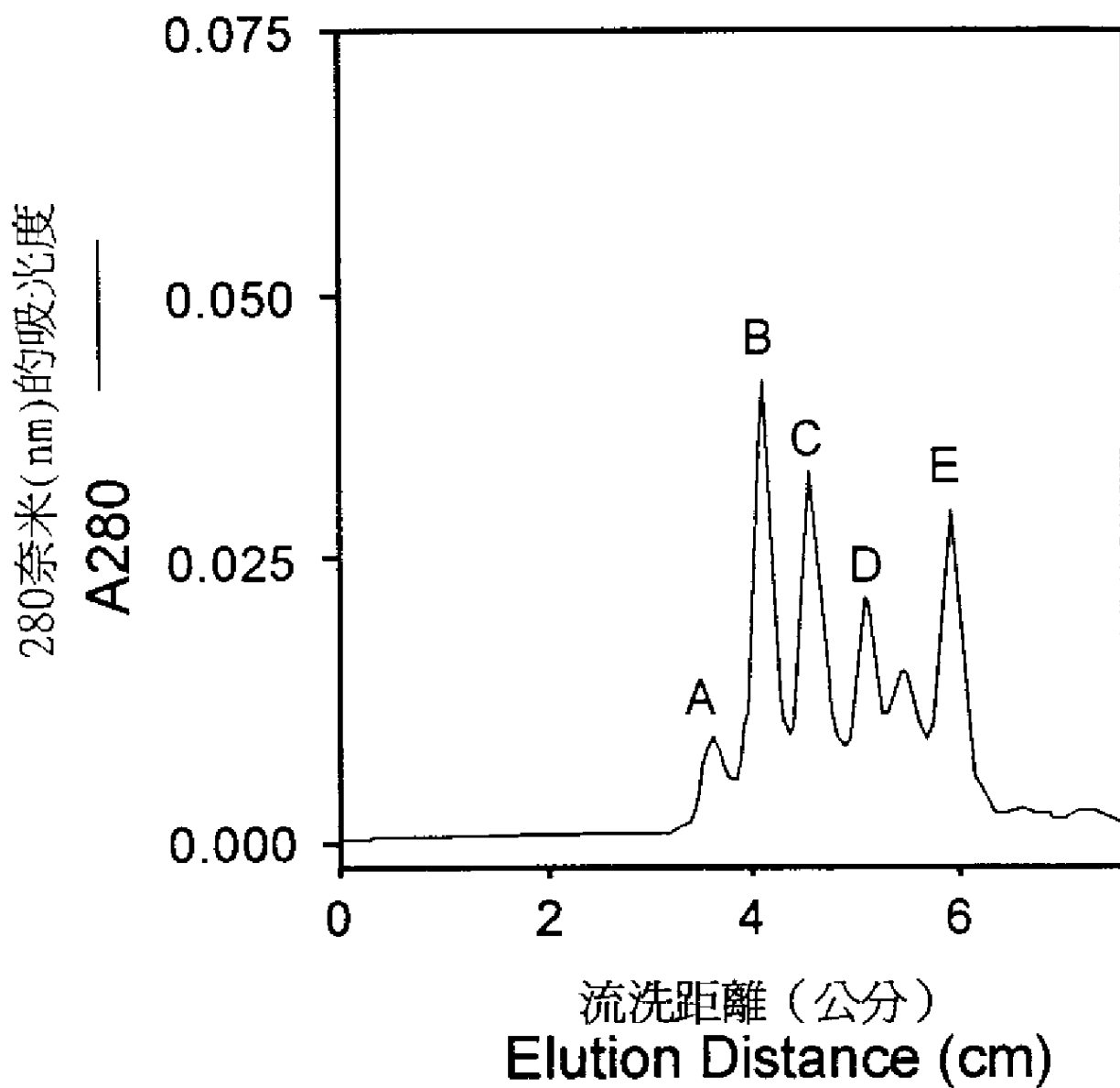
圖七



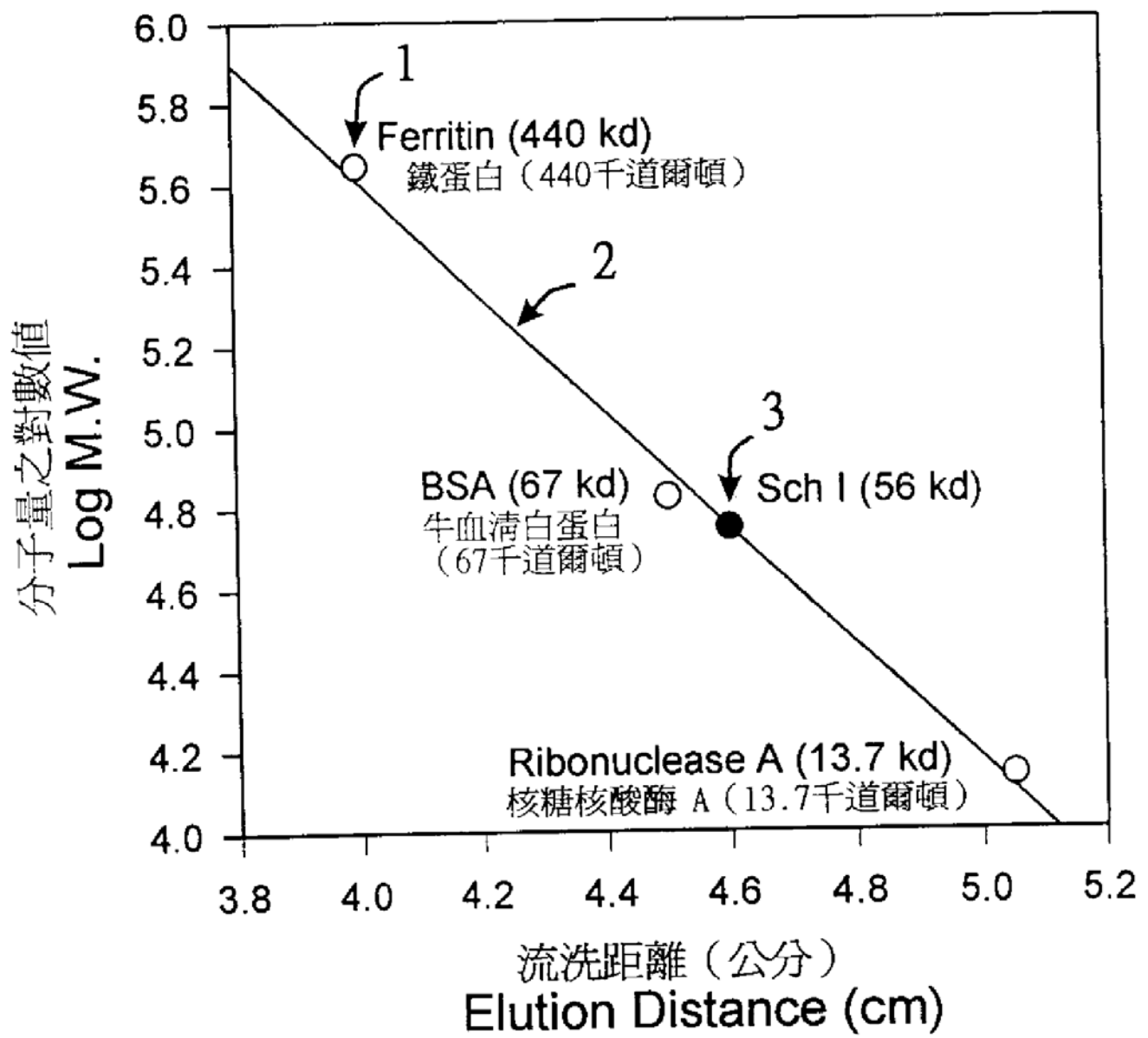
圖八



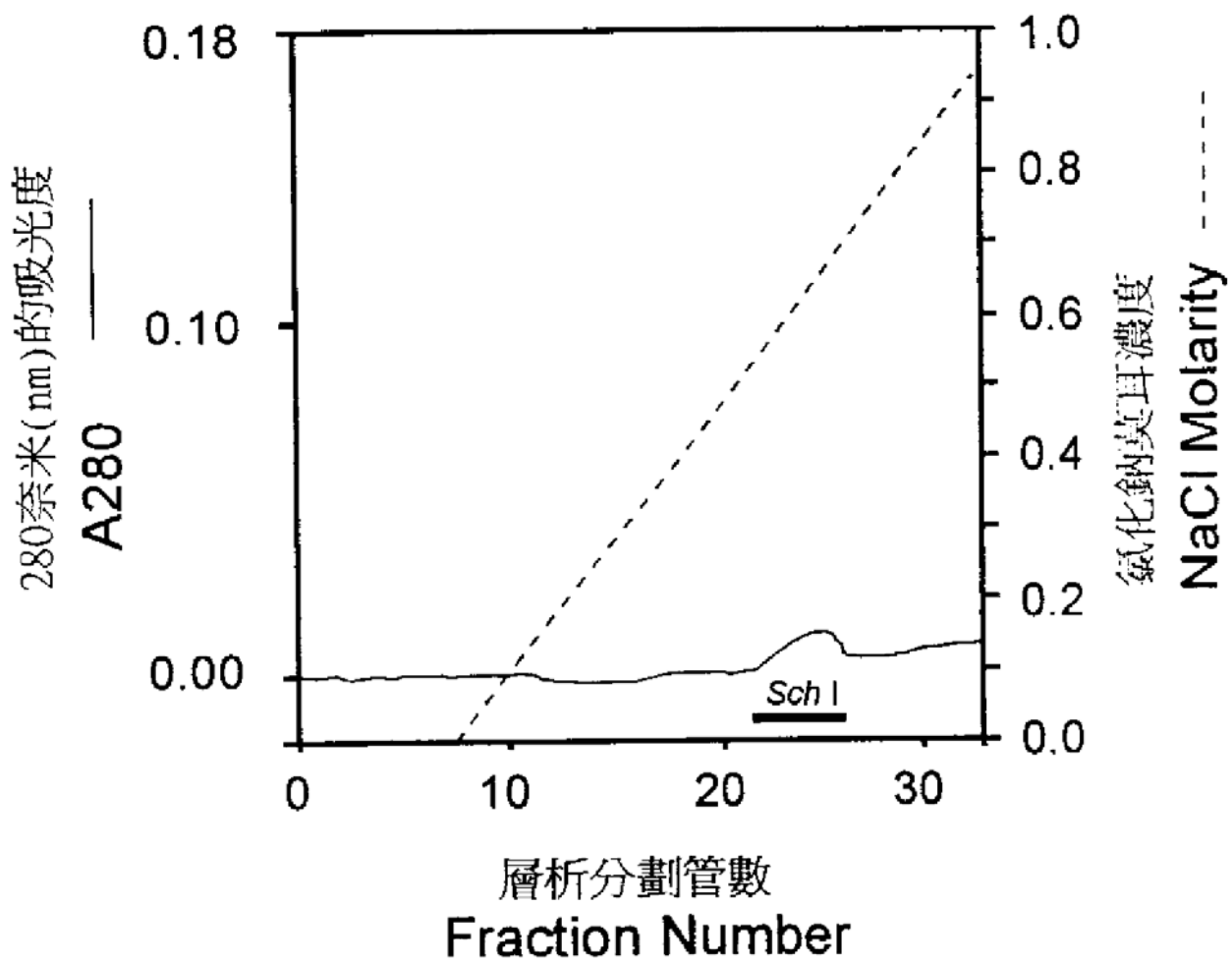
圖九



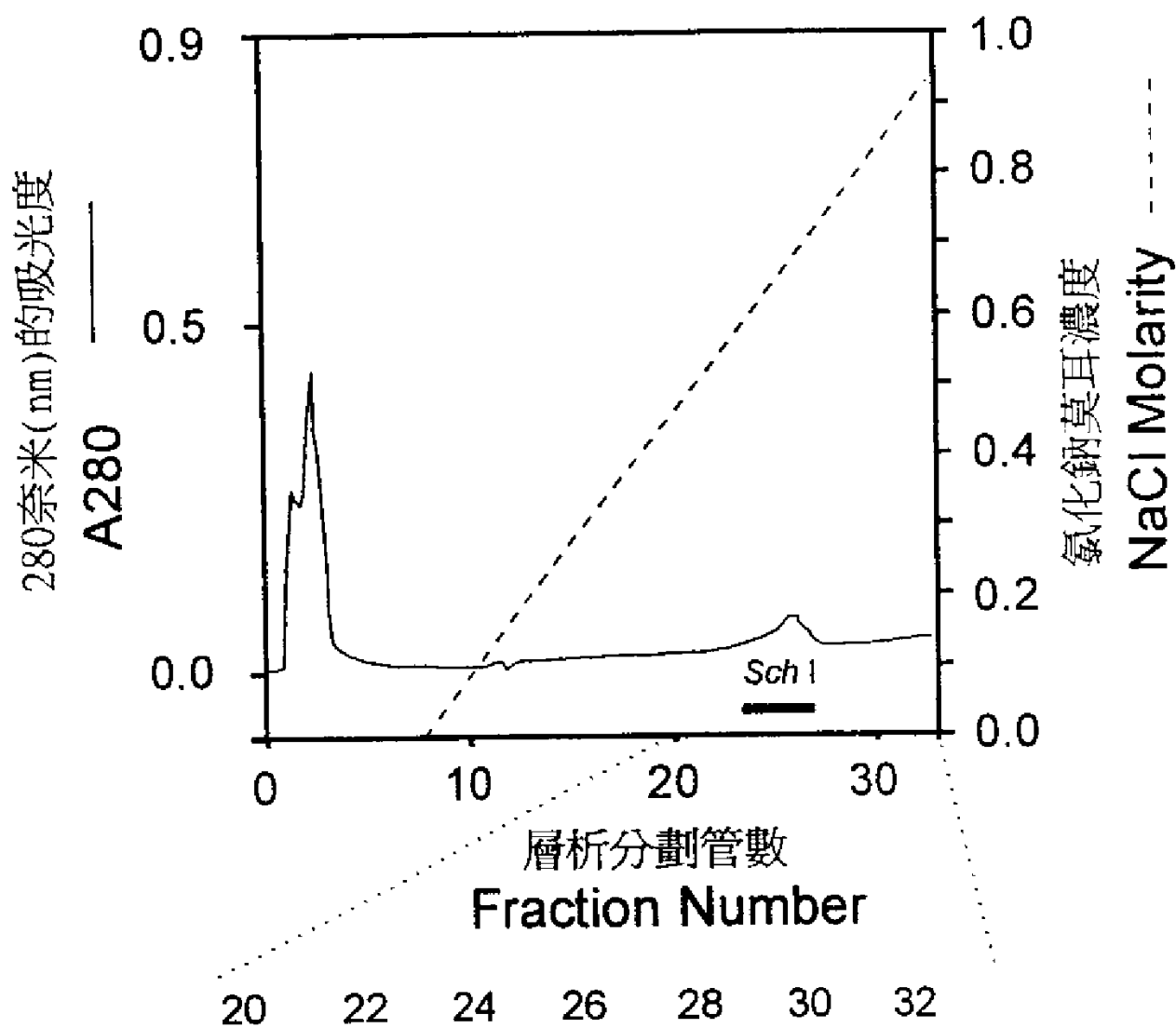
圖十



圖十一

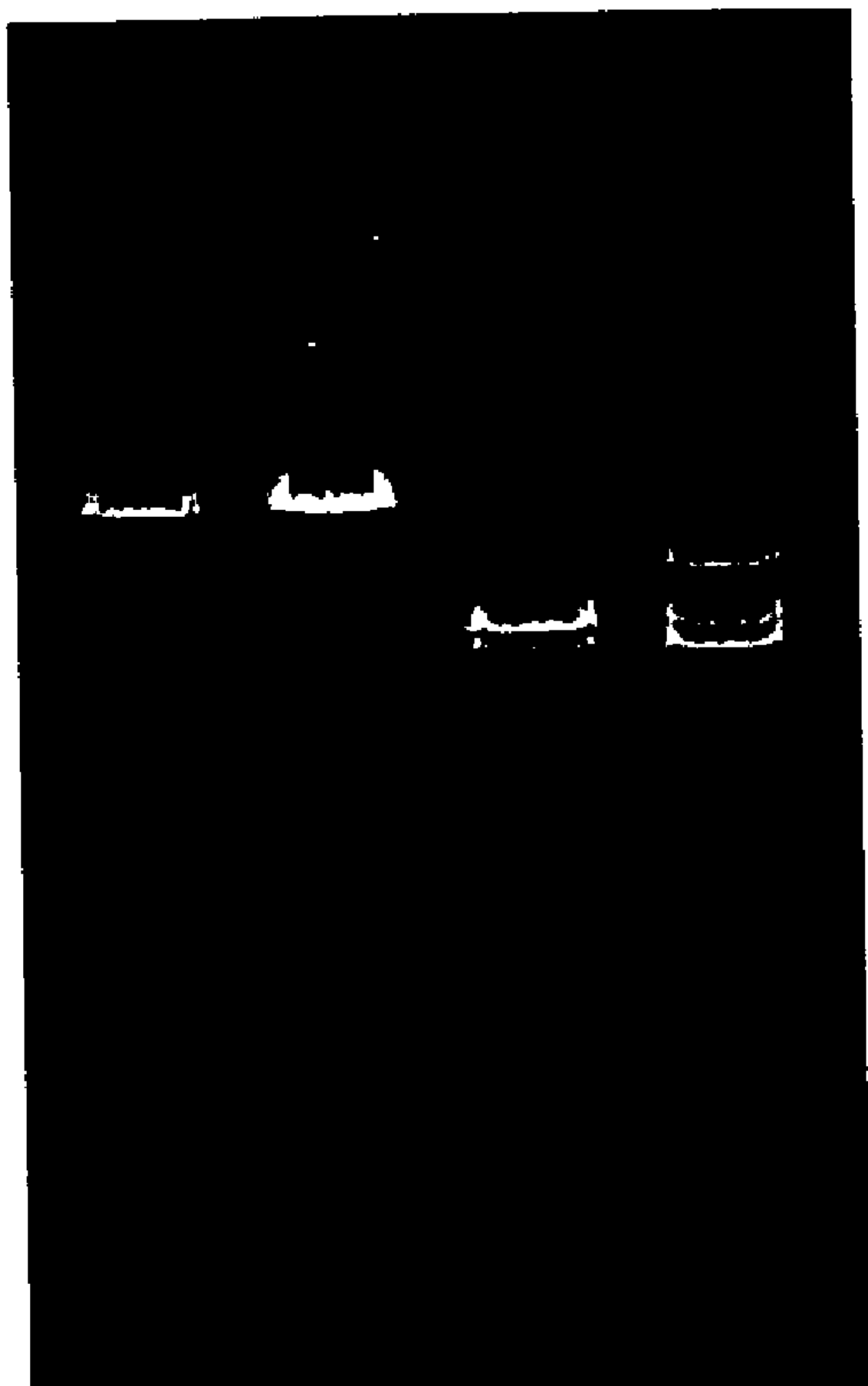


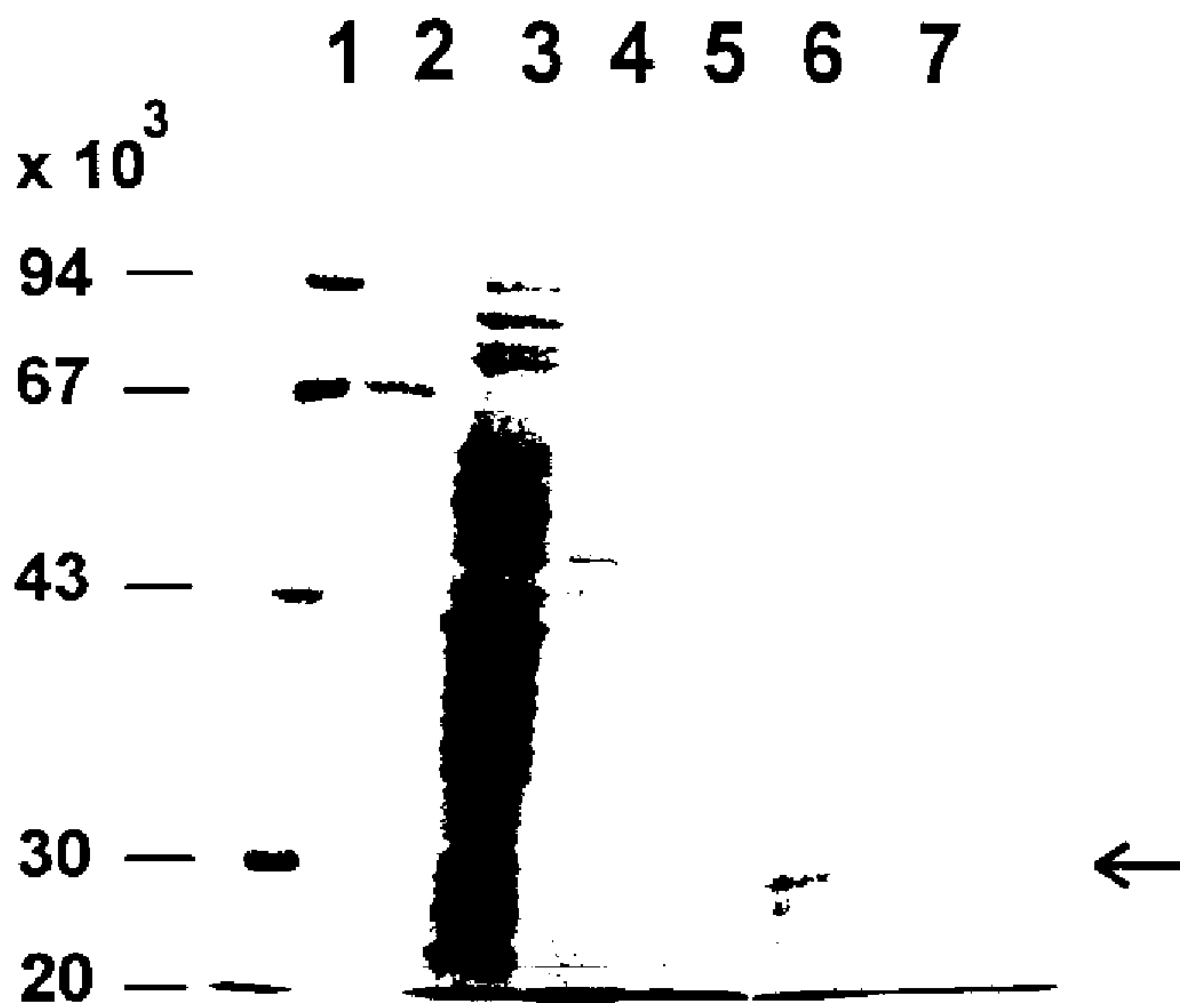
圖十二



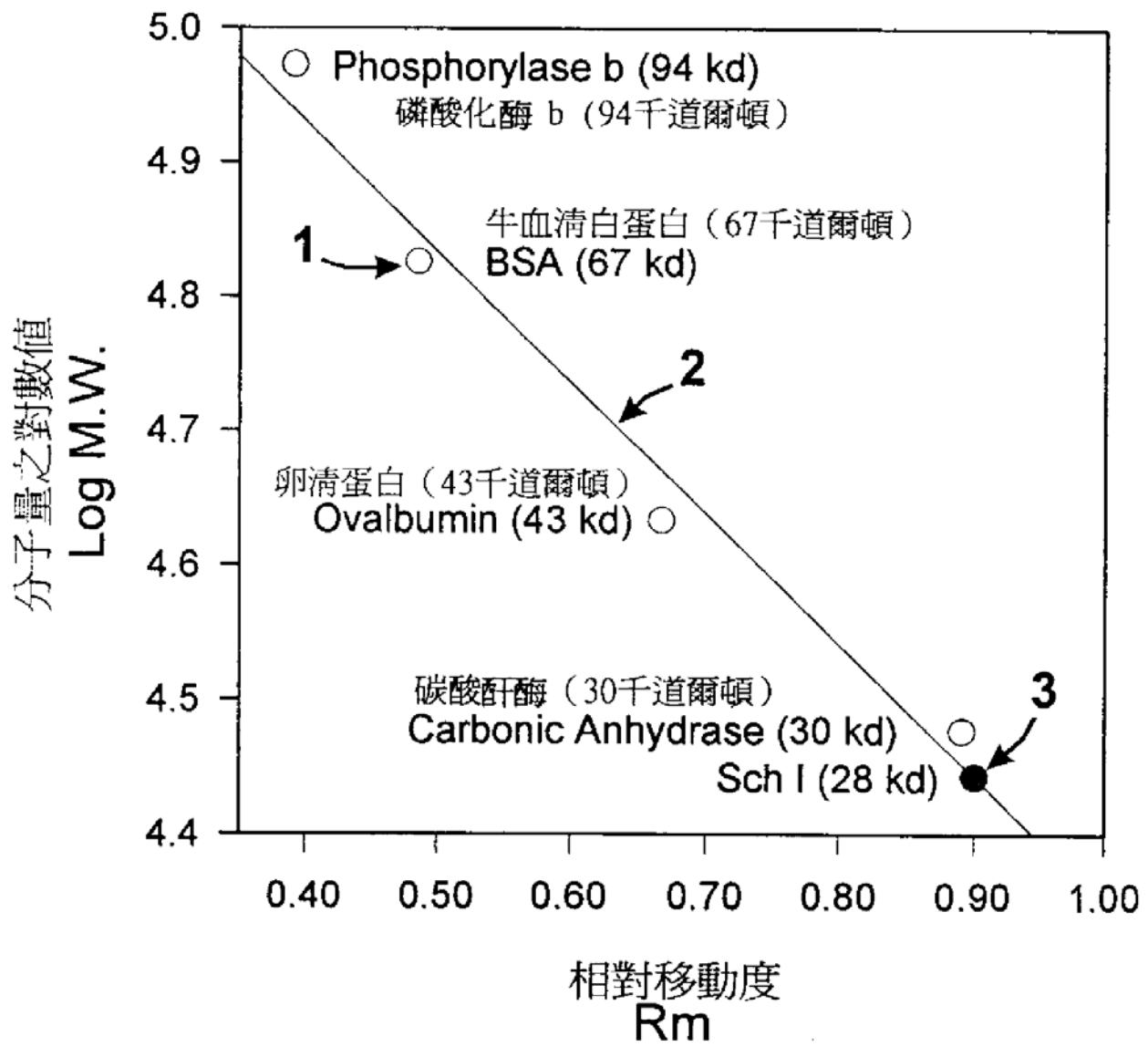
圖十三

1 2 3 4



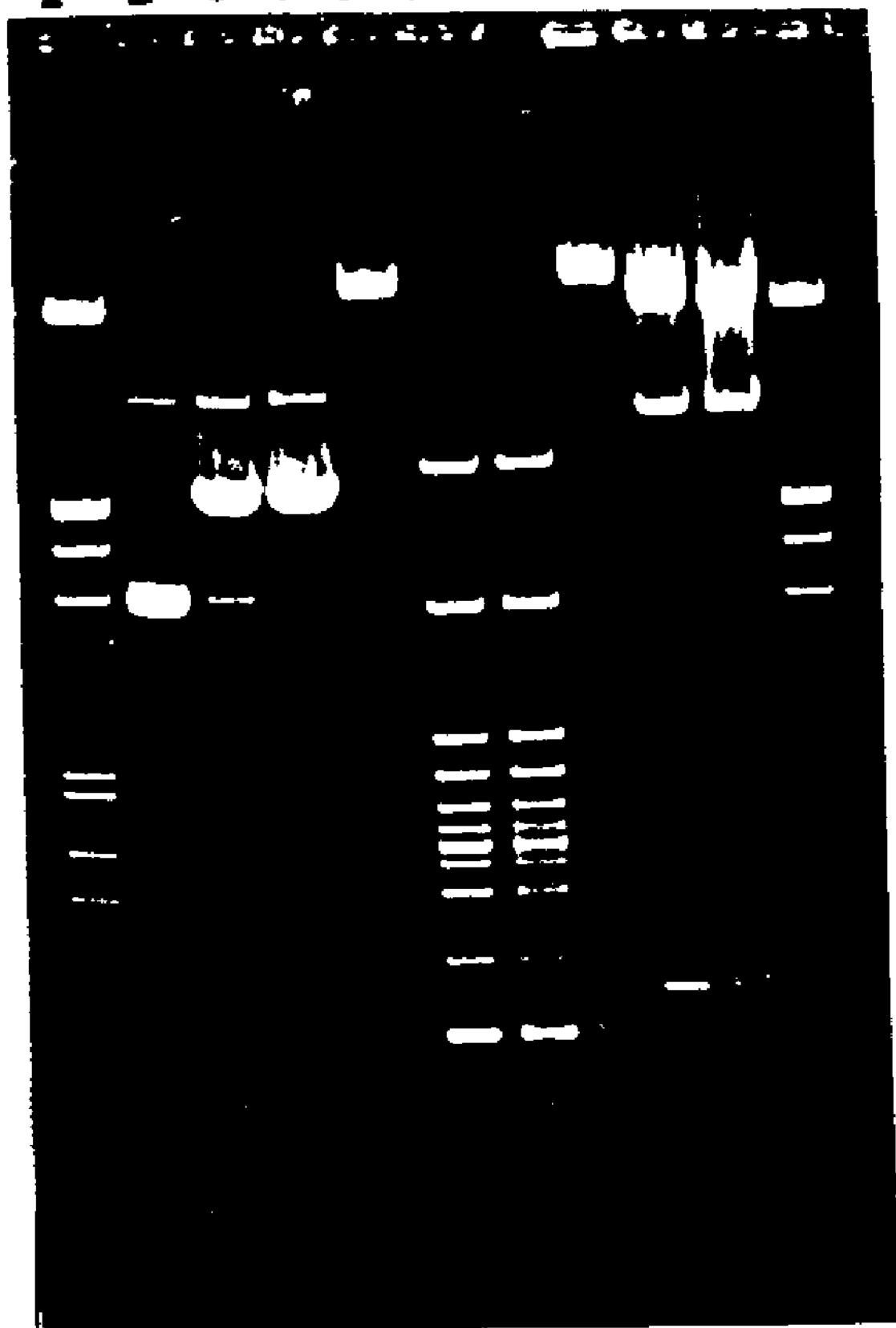


圖十五



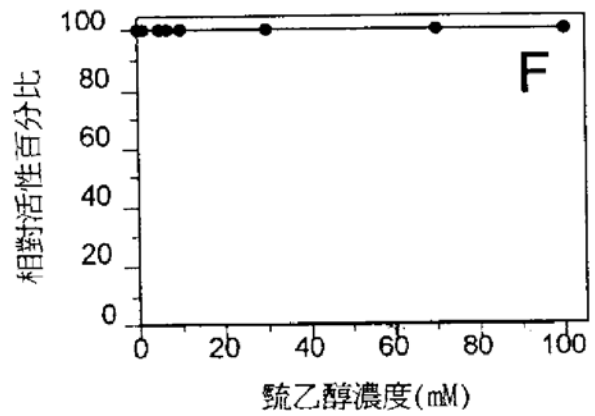
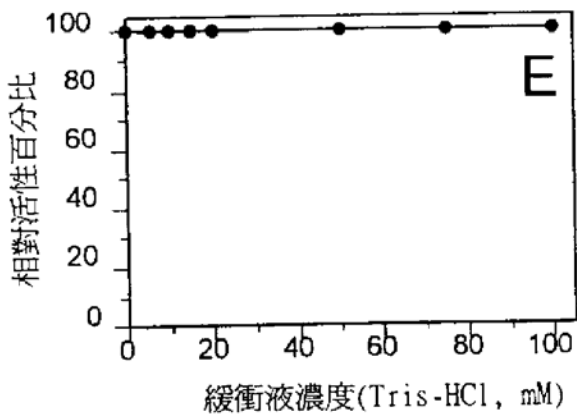
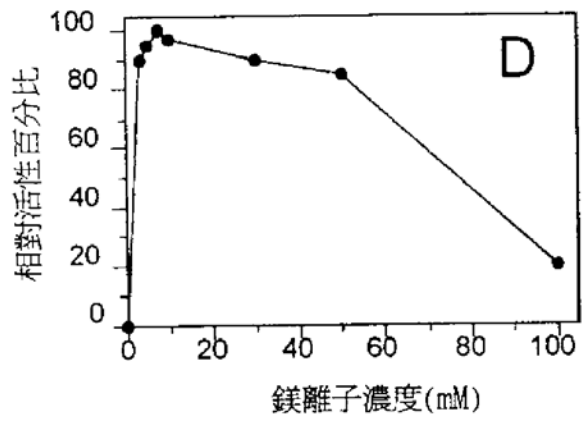
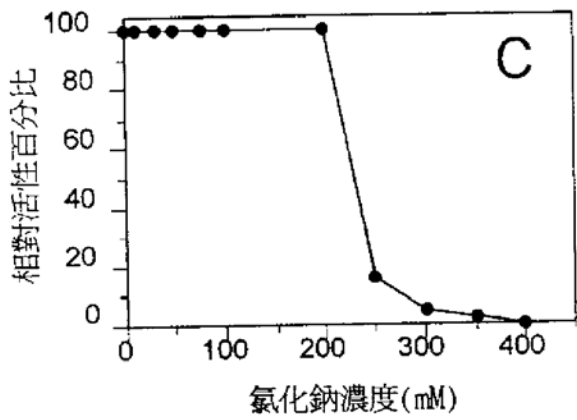
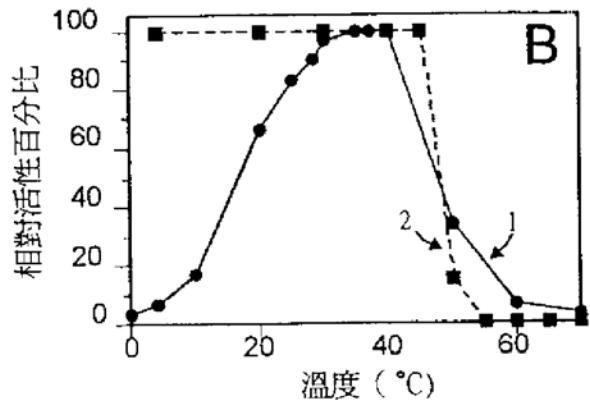
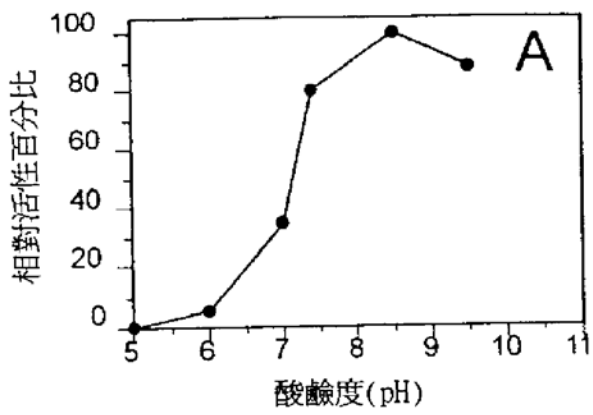
圖十六

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



1 2 A C G T





圖十九